

## 복숭아혹진딧물 방제를 위한 *Lecanicillium* 균주 선발

정혜숙 · 이항범<sup>1</sup> · 김근\* · 이은영<sup>2</sup>

수원대학교 생명공학과, <sup>1</sup>전남대학교 응용생물공학부, <sup>2</sup>수원대학교 환경공학과

### Selection of *Lecanicillium* Strains for Aphid (*Myzus persicae*) Control

Hye Sook Jung, Hyang Burm Lee<sup>1</sup>, Keun Kim\* and Eun Young Lee<sup>2</sup>

Department of Bioscience & Biotechnology, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea

<sup>1</sup>Division of Applied Bioscience and Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea

(Received September 29, 2006)

**ABSTRACT:** To select efficient entomopathogenic fungal strains of *Lecanicillium* for the biocontrol of aphid, *Myzus persicae*, conidial suspension ( $1 \times 10^7$  conidia/ml) was sprayed onto a detached Chinese cabbage leaf in a petri dish with a dampened filter paper that had 20 nymphs of aphid. *Lecanicillium* strain 4078 and 6543 were the best strains for the biocontrol of aphid at high temperature of 30°C and low relative humidity (RH) of 85%, respectively. The cumulative mortality of strain 4078 at 30°C after 3 days was 100% and that of strain 6543 was 90% at 85% RH after 5 days. Strain 4078 also exhibited almost 100% germination ratio of conidia and high rate of mycelial growth at the broad temperature-range of 15~25°C. The strain 4078 and 6543 were all identified as *Lecanicillium* species based on the DNA sequences (accession no.: EF026004 and EF026005, respectively) of the ITS regions of the fungi. Excellent production of aerial conidia of strain 6543 was accomplished by using steamed polished rice as the solid culture medium.

**KEYWORDS:** Aphids, Biocontrol, Germination, *Lecanicillium*, Production of conidia

최근 채소류의 재배기술 개발과 농가보급으로 년 중 시설 재배생산에 따른 해충발생이 우려되고 있다. 그 중 진딧물은 밀도증가가 매우 빠르고, 식물바이러스를 매개하며, 저항성 발현이 빠른 특징을 가지고 있다. 지금까지 이 해충의 방제는 주로 화학농약에 의존하고 있어서 환경오염, 해충의 약제 저항성 유발, 농약잔류, 토양, 수질오염, 인축에 대한 독성 및 환경호르몬, 저항성 해충출현, 유용천적 감소 문제 등이 발생하게 되었다(Song *et al.*, 1993). 따라서 화학농약 사용을 대체할 수 있는 친환경 방제 기술 개발이 매우 시급하며, 이러한 약제저항성 해충은 곤충병원성 미생물을 이용한 대체방제가 매우 효율적이다.

곤충 병원성 균은 해충방제에 이용할 경우 포유류에 감염을 일으키지 않고, 알레르기 반응 또한 일으키지 않으므로(Hall, 1981) 고등생물, 어류, 곡물 등에 위험물질 축적과 같은 유해 요소가 없어 안정성이 높고, 목적하는 해충만 선별적으로 제거할 수 있는 선택성과 살충효과의 지속성이 유지되어 반복적인 미생물제제의 살포를 최소화할 수 있다는 이점이 있다(Samuel *et al.*, 1989; Milner *et al.*, 1991; Zoberi, 1995).

시설재배에서의 진딧물과 온실가루이 등과 같은 해충 방제와 관련하여 *Verticillium lecanii*는 곤충 병원성 곰팡이로 널리 알려져 있으며, 이 균의 응용에 대한 많은 연구가 있어 왔다(Askary *et al.*, 1998; Hall and Burges, 1979; Lee *et al.*, 2002; Milner, 1997; Shah and Pell, 2003). 한편 네덜란드의 Kopper사에서 *V. lecanii* 두 균주를 이용하여 온실가루이 방제용 'Mycotal', 진딧물 방제용 'Vertalec' 두 제품을 생산·판매하였다(Hall, 1984; Milner, 1997).

최근에 *V. lecanii*가 재분류 되는 작업이 있어 왔는데, *V. lecanii*(Zimm.)Viégas는 새로운 genus인 *Lecanicillium*의 type species로 분류되었다. 또한 *V. lecanii*는 species complex 문제 때문에 다시 *Lecanicillium lecanii*(Zimm.) Zare & W. Gams, *L. longisporum*(Petch) Zare & W. Gams, *L. muscarium*(Petch) Zare & W. Gams의 3 species로 나뉘게 되었다.

본 연구에서는 채소류 생산 농가에서 큰 피해를 주고 있는 해충인 진딧물에 대한 방제효과가 우수한 살충성 미생물 개발을 위하여 외국에서 분양받은 *Lecanicillium*속의 5 균주를 사용하여 진딧물에 대한 살충효과를 조사하였고, 포자생산을 위한 배지의 선정 및 분자 생물학적 동

\*Corresponding author <E-mail: kkim@suwon.ac.kr>

**Table 1.** Origins of various entomopathogenic fungal strains used in this study

<i>Lecanicillium</i> strain	Original species name <sup>a</sup>	Original host	Geographical origin
3387	<i>Verticillium lecanii</i> 3387	<i>Myzus persicae</i>	USA
4075	<i>V. lecanii</i> 4075	<i>Myzus persicae</i>	Denmark
4078	<i>V. fusisporum</i> 4078	<i>Myzus persicae</i>	Denmark
6541	<i>V. lecanii</i> 6541	<i>Aphis gossypii</i>	UK
6543	<i>V. lecanii</i> 6543	<i>Myzus persicae</i>	UK

<sup>a</sup>The fungal strains are provided by ARSEF (USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures) with these species names and strain numbers.

정법을 확립하여 새로운 균주 탐색을 위한 기초실험을 수행하였다.

균주들의 살충력을 측정하기 위한 bioassay 실험에 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용한 *Lecanicillium* 균주는 Dr. Humber (USDA-ARS collection of Entomopathogenic Fungal Culture[ARSEF], USDA-ARS Plant Protection Research Unit, US Plant, Soil & Nutrition Laboratory, Ithaca, New York, USA)로부터 분양 받았다(Table 1). *V. lecanii* KCCM 11850(ATCC 26854)는 한국종균협회에서 구입하였다.

### 배지 및 배양

*Lecanicillium* 균주의 배양을 위한 고체배지는 potato dextrose broth(PDB, Difco Co.)에 2.0%(w/v) 한천을 첨가한 PDA를 사용하였으며, PDA 배지에 균을 백금니로 접종하여 25±1°C의 배양기에서 7~10일간 배양하였다. 액상배지는 PDB에 0.05% Tween 80를 첨가한 것을 사용하였으며, PDA에서 성장한 곰팡이 균을 백금니로 접종하여 교반배양기에 넣고 25±1°C에서 150 rpm의 속도로 3~4일간 배양하였다.

### 포자 발아율과 균사 성장에 미치는 온도의 영향

멸균된 slide glass상의 중앙 부위에 PDA 배지를 떨어뜨리고 균화 후 포자 현탁액을 20 µl씩 도말하여 15~35°C의 배양기에서 12시간 동안 배양하며 포자의 발아율을 광학 현미경(×400)으로 관찰하였으며, 이 시험은 각 균주 당 3구씩 반복 수행하였다. 고체배지 상에서 발아된 균사의 길이와 포자의 길이가 같은 포자를 발아한 것으로 간주하여 계수하였다. 여러 온도에서의 균사 성장을 보기 위해서는 *Lecanicillium* 균주 colony들을 1 cm×1 cm 크기로 잘라서 PDA 배지에 얹은 후 15~35°C의 배양기에서 7일간 배양하면서 온도에 따른 균사 성장속도를 측정하였다.

### 진딧물

복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)을 경기도 수원시에 소재한 농촌 진흥청 농업 해충과에서 분양 받아 화분에서 재배하는 배추 잎에 옮겨 20°C에서 사육하면서 *Lecanicillium*

### 살충력 실험

PDA 고체 배지에서 배양한 각각의 *Lecanicillium* 균주를 0.05%의 Tween 80를 넣은 멸균수로 균사체를 모아서 여과지(pore size : 8 µm)로 균사를 제거하였다. 포자 현탁액 내의 포자수를 haemocytometer로 측정하여 1×10<sup>7</sup> conidia/ml 농도의 포자 현탁액을 준비하였다. Petri dish (90×15 mm)에 젖은 흡습지를 깔고 5×5 cm의 배춧잎을 그 위에 얹은 후 복숭아혹진딧물 약충 20마리씩을 옮겨 놓은 후 준비된 포자현탁액을 30 cm의 거리에서 spray로 분사하여 포화습도를 유지시킨 상태에서 5일간 매일 1회씩 사멸된 진딧물 수를 측정하여 살충율(mortality)과 LT<sub>50</sub>(50% 치사에 필요한 lethal time)을 계산하였다. *Lecanicillium* 균주들에 의해 치사한 진딧물들은 육안과 현미경으로 진딧물 표면에 감염하여 성장하는 균사들을 관찰한 경우를 *Lecanicillium* 균주에 의해 사멸된 것으로 간주하였다.

재배시설 내에서는 건조한 경우가 많으므로 낮은 상대 습도에서 살충력이 우수한 균주를 선발하기 위해 상대 습도 85%에서의 살충력 비교하였다. 어린 배추묘에 직접 복숭아혹진딧물 약충 20마리씩을 놓은 후 포자 현탁액(1.0×10<sup>7</sup> conidia/ml)을 약 30 cm거리에서 분사한 후, 25±1°C, 16시간 광조건의 습도 케이지 안에 넣고 5일 동안 약충의 치사율을 조사하였다. 습도 케이지 안의 상대 습도는 염화칼륨(potassium chloride) 포화용액을 이용하여 상대습도 85%를 유지시켰다.

### 포자 생산을 위한 고체 배양

*Lecanicillium* 균의 포자 생산을 위한 고체 배양에 필요한 산업용배지로는 쌀, 볏씨, 말분 그리고 피트머스를 사용하였다. 초기 수분함량을 50%로 한 각각의 배지를 100 g씩 달아 적당한 용기에 담은 후 121°C에서 볏씨와 말분은 30분, 쌀은 20분, 피트머스배지는 1시간 동안 멸균하였다. PDB에서 배양한 균사 배양액을 멸균한 각 고체배지에 10%로 접종하여 9일간 배양하면서 고체배지별 균사와 포자생산 정도를 관찰하였다. 각 배지마다 3구씩 반복실험 하였다.

### 염기서열분석을 통한 *Lecanicillium* sp.의 동정

PDB에서 3일간 배양한 균체를 원심분리 후 수거하여 동결건조(EYELA TOKYO RIKAKIKAI Co., LTD. Japan)하였다. 동결건조된 균사를 액체질소를 이용하여 마쇄하고 25 mg을 취하여 500  $\mu$ l의 lysis buffer[400 mM Tris-HCl(pH 8.0), 60 mM EDTA(pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate]에 실온에서 10분간 처리한 후 150  $\mu$ l의 potassium acetate 용액[5 M potassium acetate (pH 4.8) 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, 증류수 28.5 ml]를 첨가하여 vortex한 후 10,000 $\times$ g에서 2분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액으로부터 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega Corp., USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 다음 denaturation 95 $^{\circ}$ C/1분, annealing 52 $^{\circ}$ C/1분, extension 72 $^{\circ}$ C/1분, terminal extension 72 $^{\circ}$ C/10분의 조건으로 primer ITS1(TCCGTA-GGTGAACCTGCGG)과 LR5(TCCTGAGGGAAACTTCG) (1.5 kb)(White *et al.*, 1990)을 사용하여 30 cycle의 PCR을 수행하였다. 0.8% agarose gel를 통하여 1.5 kb band가 있음을 확인한 후 AccuPrep PCR purification kit(Bioneer Corp., Daejeon, Korea)로 정제하였다.

정제된 PCR product는 primer ITS4(TCCTCCGCTTA-TTGATATGC)와 LR3(CCGTGTTC AAGACGGG)(White *et al.*, 1990)를 사용하여 Automated DNA Sequencer (ABI3700, Applied Biosystems Inc., Foster, CA, USA)로 염기서열을 분석하였다. 이 후 CLUSTAL X ver.1.83 (Thompson *et al.*, 1997)를 사용하여 염기서열을 조합하여 NCBI(The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 제공하는 Advanced Blast search(Altschul *et al.*, 1997)을 통하여 GenBank의 염기서열과 DNA homology(%)를 비교하여 일차 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### *Lecanicillium*균의 포자 발아율과 균사 성장에 미치는 온도 영향

여러 온도에서의 *Lecanicillium*의 포자 발아율과 균사생장을 조사한 결과(Fig. 1과 Table 2) 15~30 $^{\circ}$ C의 넓은 범위의 온도에서 포자 발아율이 우수한 균주는 4078이었고,

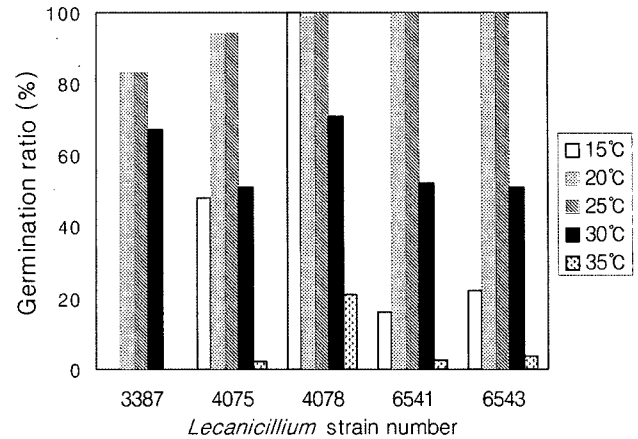


Fig. 1. Effect of temperature on the conidial germination ratio of various strains of *Lecanicillium*.

그 다음은 6543 균주가 우수하였으며, 3387은 15 $^{\circ}$ C와 35 $^{\circ}$ C에서 포자 발아가 전혀 되지 않았다. 4078 균주는 15, 20, 25 $^{\circ}$ C에서 거의 100%의 발아율을 보였고 35 $^{\circ}$ C에서도 발아율이 상대적으로 가장 우수하였다.

*Lecanicillium*의 균사 생장은 4078 균주가 발아율에서와 마찬가지로 넓은 범위의 온도에서 다른 균주들에 비하여 가장 높은 균사 생장률을 보였고, 그 다음은 6543 균주이었다(Table 2). 여러 온도에서 상대적으로 균사 성장이 저조한 균주는 4075 균주이었는데, 이 균주는 포자 발아율에서도 역시 저조한 수치를 나타내었다(Fig. 1).

채소의 시설재배 시 시설 내의 온도가 15~35 $^{\circ}$ C 사이에서 변화할 때에는 가장 넓은 범위의 온도에서 발아율과 균사 생장률이 높은 균주를 사용하는 것이 바람직하므로, 4078 균주가 시설재배 시의 진딧물 방제에 가장 적합한 것으로 판단된다.

실험 결과 전반적으로 포자 발아와 균사생장을 위한 최적온도는 다른 보고들(Kim, 2004; Hall, 1981)에서와 마찬가지로 대체로 20 $^{\circ}$ C와 25 $^{\circ}$ C 사이이었다. 그러나 4078 균주는 최적 발아온도가 15~25 $^{\circ}$ C로서 15 $^{\circ}$ C의 낮은 온도에서도 100%의 높은 발아율을 보인 점들이 특이하였다. 한편 35 $^{\circ}$ C에서는 대부분의 균주들이 낮은 발아율이지만 발아를 하였으나, 균사 성장은 7일 후에도 전혀 이루어지지 않았다. Preening이나 탈피같은 진딧물의 행동이 이

Table 2. Effect of temperature on the mycelial growth of various strains of *Lecanicillium*

<i>Lecanicillium</i> strain	Annular radius <sup>a</sup> of mycelial growth $\pm$ S.E. (mm) at different temperatures ( $^{\circ}$ C)				
	15	20	25	30	35
3387	8.00 $\pm$ 1.73	14.00 $\pm$ 1.0	15.00 $\pm$ 1.73	3.67 $\pm$ 1.53	0.00
4075	7.33 $\pm$ 0.57	11.30 $\pm$ 2.40	9.33 $\pm$ 0.88	4.33 $\pm$ 2.02	0.00
4078	15.30 $\pm$ 1.85	24.00 $\pm$ 2.08	30.30 $\pm$ 3.17	4.00 $\pm$ 1.52	0.00
6541	9.00 $\pm$ 1.73	17.30 $\pm$ 0.88	14.00 $\pm$ 0.57	0.00	0.00
6543	12.30 $\pm$ 0.88	17.60 $\pm$ 1.20	15.60 $\pm$ 0.66	2.00 $\pm$ 0.57	0.00

<sup>a</sup>Mycelial plugs with the size of 1 cm  $\times$  1 cm were placed on the PDA plates, incubated at different temperatures for 7 days, and the annular radiuses of the mycelial growth were measured.

곤충의 cuticle로부터 포자를 떨어뜨릴 수 있고 따라서 곰팡이의 살충력을 감소시킬 수 있다는 보고(Jackson *et al.* 1985)를 볼 때 포자 발아와 침투의 속도는 높은 병원성을 위한 중요한 요인들이 될 수 있다(Altre *et al.* 1999; Altre and Vandenberg, 2001).

**Lecanicillium 균주의 살충력 비교**

분양받은 5개 *Lecanicillium* 균주들의 복숭아혹진딧물에 대한 살충력을 시험하여 그 결과를 Fig. 2와 Table 3에 나타내었다. 실온에서 가장 살충력이 우수한 균주는 4078 이었고, 가장 저조한 균주는 4075이었다. 4078과 6541, 6543 균주들은 시험 3일째부터는 유사하게 높은 살충력을 나타내었고, 4일째부터 100% 살충력을 보였다. 한편 *V. lecanii* KCCM 11850 균주는 살충력이 없는 것으로 나타났다(data not shown). *Lecanicillium* 4078 균주(LT<sub>50</sub>=1.92 days)는 Russian wheat aphid(LT<sub>50</sub>=2.4 days)(Feng, 1990), 목화진딧물(LT<sub>50</sub>=2.7 days)(Kim, 2004)보다 LT면

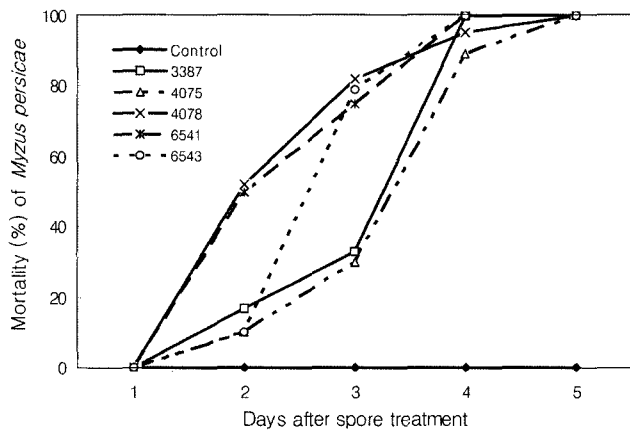
에서 더 우수한 살충력을 보였다. 본 실험과 다른 연구보고의 결과(Kim, 2004; Yokomi and Gottwald, 1988)를 종합하여 보면 *Lecanicillium*의 균주들 간에도 같은 host insect에 대한 살충력이 다양하며, 같은 *Lecanicillium* 균주라도 다른 host insect에 대하여 다른 살충력을 보이는 것을 알 수 있었다.

**상대 습도 85%에서의 Lecanicillium 균주의 살충력 비교**

상대 습도 85%에서 여러 균주의 복숭아혹진딧물에 대한 살충력을 조사한 결과(Fig. 3 and Table 3), 가장 높은 살충력을 보인 균주는 6543이었고 그 다음은 4075이며 가장 저조한 균주는 3387이었다. 재배 시설 내 채소에 뿌린 물은 급속히 건조되므로 낮은 RH에서 살충력이 높은 균주가 유리하다. 따라서, 낮은 RH에서는 6543을 사용하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

*V. lecanii*의 살충력은 상대습도에 크게 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 즉, Kim(2004)은 목화진딧물의 경우 97% RH에서 5일 후 거의 100% 사멸율을 보였으나, 85% RH에서는 5일 후 약 46%로 크게 사멸율이 감소하였다고 보고하였다. 특히 RH 75%와 RH 45%의 상태가 24시간 이상 지속될 때는 목화진딧물이 아예 생존하지를 못하였고 85% RH에서는 포자의 발아율이 낮은 이유가 낮은 살충력을 보인 이유 중의 하나일 것이라고 추정하였다(Kim, 2004). 따라서 *Lecanicillium*을 사용한 효과적인 진딧물 방제를 위해서는 높은 RH를 유지하고 되도록이면 낮은 RH에서도 살충성이 높은 균주를 사용하는 것이 필요하다고 하겠다.

진딧물은 온도가 낮을 때보다 여름의 높은 온도에서 왕성하게 나타나기 때문에 높은 온도에서 살충력이 좋은 곰팡이 균주가 진딧물 방제에 유리하다. 진딧물은 35°C가 계속적으로 유지되는 곳에서는 생존하지 못하기 때문에(Kersting *et*



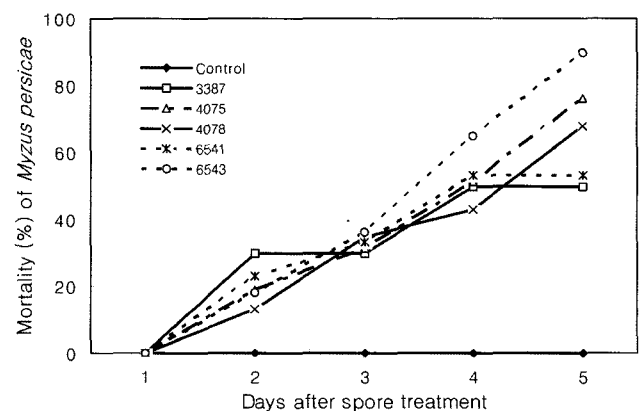
**Fig. 2.** Mortality of *Myzus persicae* by various strains of *Lecanicillium* at room temperature. The mortality was determined by bioassay using a detached leaf of Chinese cabbage.

**Table 3.** Cumulative mortality and LT<sub>50</sub> of *Myzus persicae* 5 days after treatment with conidia of various strains of *Lecanicillium*

<i>Lecanicillium</i> strain	Cumulative mortality (%)		LT <sub>50</sub> (days)	
	RH 100% <sup>a</sup>	RH 85% <sup>b</sup>	RH 100% <sup>a</sup>	RH 85% <sup>b</sup>
Control	0	0	—	—
3387	100	50	3.2	4.0
4075	100	76	3.3	3.9
4078	100	68	1.9	4.3
6541	100	53	2.0	3.8
6543	100	90	2.5	3.4

<sup>a</sup>The mortality was determined by bioassay using a detached leaf of Chinese cabbage at 25°C and 100% RH.

<sup>b</sup>The mortality was determined by bioassay using a whole plant of Chinese cabbage at 25°C and 85% RH.



**Fig. 3.** Mortality of *Myzus persicae* by various strains of *Lecanicillium* at 25°C and 85% RH. The mortality was determined by bioassay using a whole plant of Chinese cabbage.

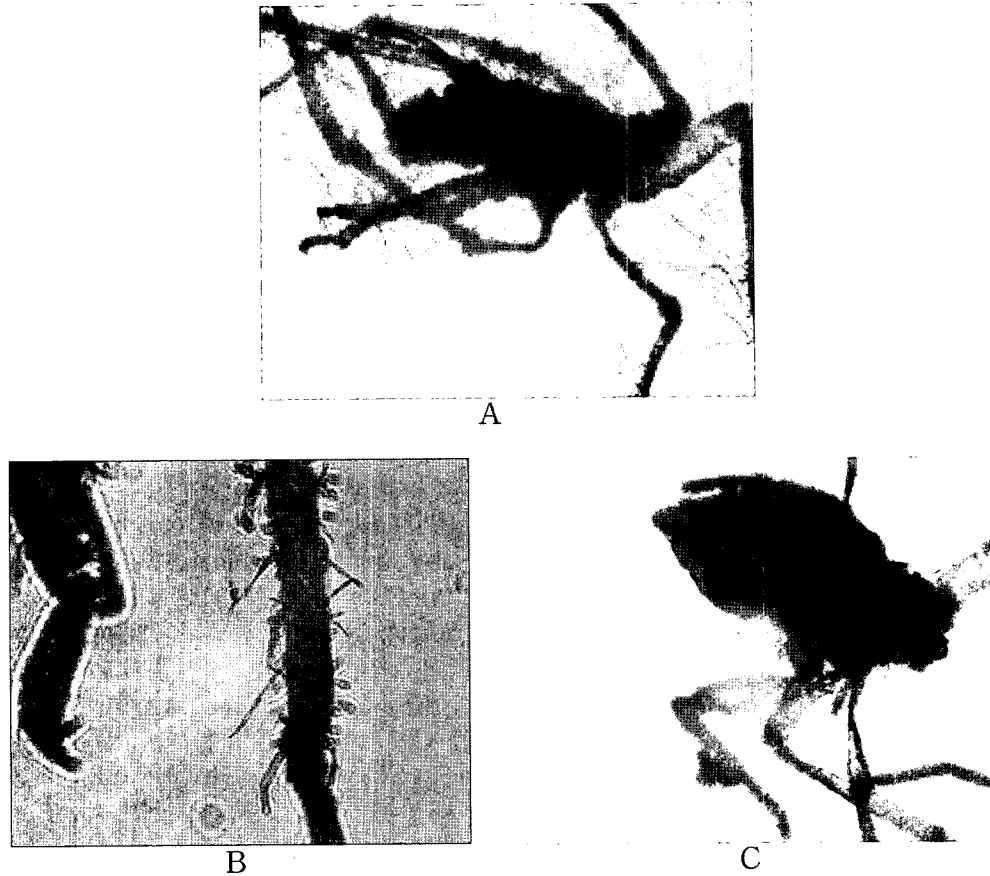


Fig. 4. Microscopic morphology ( $\times 400$ ) of *Myzus persicae* killed by different strains of *Lecanicillium*. A: 3387, B: 4078, C: 6543.

al., 1999; Kim, 2004), 30°C에서의 *Lecanicillium* 균주들의 살충력을 비교하였다. 실험결과 4078 균주가 3일 만에 100%의 사멸율을 보이면서 뚜렷하게 30°C에서 가장 우수한 살충력을 나타내었다(data not shown). 그 다음은 4일 후 살충력 100%를 보인 6543균주가 살충력이 좋았고, 3387은 가장 저조한 살충력을 보였다. 한편 이들 곰팡이 균주들에 의해 치사한 진딧물들의 감염 모습을 현미경으로 관찰한 결과 진딧물 표면에 감염하여 성장하는 곰팡이 균사들을 뚜렷이 관찰할 수 있었으며(Fig. 4), 죽은 진딧물이 실제로 *Lecanicillium* 균주들에 의해 사멸된 것을 확인할 수 있었다.

특히, 4078 균주는 30°C에서 뿐만 아니라 25°C에서도 여러 균주들 중에서 가장 높은 살충율을 나타냈으며(Fig. 2), 15~30°C의 넓은 온도 범위에서 포자 발아율이 우수하였고(Fig. 1) 균사 성장도 뚜렷하게 가장 높은 성장률을 나타내었기 때문에(Table 2) 가장 살충효과가 좋은 균주로 판단된다.

한편 Kim(2004)은 15~30°C에서의 *V. lecanii*에 의한 목화진딧물의 살충력을 비교한 실험에서 온도가 올라갈수록 살충효과가 높아짐을 관찰하였는데, 본 연구에서도 4075 균주가 25°C에서 보다 30°C에서 뚜렷하게 살충력이 증진된 것을 관찰할 수 있었다.

#### 산업용 고체 배지에서의 *Lecanicillium* 균주의 생장 및 포자 생산

미생물농약으로 사용하기 위해서는 살충력이 좋고, 장기 유통보관에 용이한 포자를 사용하여야한다. 포자 생산에 있어서는 전반적으로 6543이 4078보다 월등히 우수하였다(Table 4). 각 균주의 최적 포자 생산배지는 6543은 정백미(polished rice), 4078은 말분(wheat bran powder)이었다. 4078은 포자 생산이 대체적으로 저조하였고, 말분에서 8일째부터는 포자 생산이 어느 정도 잘 되었으나, 포자가 많은 점액질과 같이 생산되어, 포자회수가 용이하지 않았다.

#### 미생물농약 개발을 위한 *Lecanicillium* 균주 선정

본 실험에 사용된 *Lecanicillium*속 5균주를 가지고 복숭아혹진딧물에 대한 살충력 시험결과와 균주들의 여러 특성들을 조사한 결과들을 종합하여 볼 때, 4078 균주는 실온과 30°C에서 5균주 가운데 가장 우수한 살충력을 가졌음이 확인되었고(Fig. 2), 30°C에서 포자 발아율(Fig. 1)과 균사 성장률(Table 2)도 가장 우수하였다. 따라서 진딧물이 기온이 높은 하절기에 가장 활발하게 번식하는 것을 고려하면 높은 온도에서 살충력이 우수한 4078 균주가 진

**Table 4.** Production of aerial conidia of various strains of *Lecanicillium* in different types of solid substrate

Substrate	<i>Lecanicillium</i> strain	Conidiogenesis after				
		5 days	6	7	8	9
Polished rice	4078	± <sup>a</sup>	±	±	±	+
	6543	++	++	+++	+++	+++
Rice grain with bran	4078	±	+	+	+	+
	6543	++	++	+++	+++	+++
Wheat bran powder	4078	±	±	±	++	+++
	6543	++	++	++	++	++

<sup>a</sup>Where +++ represents excellent, ++ good, + fair, and ± poor conidiogenesis.

덧물 방제에 적합할 것으로 생각된다. 한편 낮은 상대 습도에서 가장 우수한 균주는 RH 85%에서 5일 동안 90%의 살충성을 보인 6543 균주이었는데(Table 3, Fig. 3), 이 균주는 건조로 인해 낮은 습도가 지속되는 채소류 재배 시설 내 또는 노지에서 진딧물 방제에 효과가 상대적으로 높을 것으로 판단된다.

한편, 미생물농약 생산에 중요한 포자생산능을 비교할 경우 6543 균주가 4078 균주보다 월등히 우수하였다(Table 4). 또한 4078 균주는 포자 생산시 점액질이 많이 분비되어서 미생물제제 생산을 위한 포자회수 시 어려움이 따를 것이 예상되었다. 따라서 6543 균주의 살충력이 4078 균주보다는 다소 낮지만, 살충력이 여전히 우수하며 포자생산량이 많고, 회수에도 용이하기 때문에, 미생물농약의 생산을 위해서는 6543 균주가 가장 적합하다고 판단되었다.

#### 염기서열분석을 통한 *Lecanicillium* sp.의 동정

여러 살충곰팡이 균주들의 ITS 염기 서열을 결정하였고 이들 sequence의 Blast search 결과에 근거하여 4075 (accession no. EF026003), 4078(accession no. EF026004), 6543(accession no. EF026005) 균주들은 모두 *Lecanicillium*에 속하는 균주들로 확인되었다. 또한 KCCM 11850 (accession no. EF026006) 균주는 동충하초인 *Cordyceps bassiana*로 동정되었는데, 이 균주는 *V. lecanii*의 유성생식세대로 잘 알려져 있다.

여러 살충곰팡이 균주들의 ITS rDNA sequence의 phylogenetic 분석결과, 4075 및 4078 균주는 모두 *Lecanicillium* 속에 속하는 균주들로 동정되었으며, 특히 4078 균주는 *Lecanicillium* sp. CBS 100890 균주와 매우 높은 유사도(529/532, 99.4%)를 나타내 본 균주가 *Lecanicillium* 속에 속하는 것을 확인하였다(data not shown). 그러나 종 수준에서의 동정은 더 많은 관련 균주를 대상으로 그리고 ITS 유전자 이외에 더 많은 표식인자(marker)를 이용한 체계적인 계통분석이 필요한 것으로 판단되었다. 한편, 6543 균주는 ITS rDNA 유전자 분석결과 *L. muscarium* 균주(IMI 179173, IMI 068689, IFO 8579)와 거의 100%의 유사도를 나타내 동일한 균주로 판

단되었다(data not shown). 지금까지 연구된 ITS, beta tubulin, elongation factor 유전자를 포함하는 분자 표식인자의 분석결과(data not shown), 본 균주가 속하는 clade 내에는 *Torrubiella confragosa* 등 *Lecanicillium* 속 이외의 다른 속이 포함되어 있어 관련 속(genus) 균에 대한 분류체계를 다시 정립할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 채소류 생산 농가에서 막대한 피해를 주고 있는 해충인 진딧물에 대한 방제효과가 우수한 환경친화적 살충성 미생물 개발을 위한 기초연구로서 살충효과를 갖는 *Lecanicillium*(*Verticillium*)속의 우수 균주를 선발하고, 포자생산을 위한 배지를 선정하며, 분자 동정법을 확립하여 새로운 균주 탐색을 위한 기틀을 마련하고자 실시하였다. 새로 동정된 *Lecanicillium*속 5균주를 이용하여 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)에 살충력 시험과 균주들의 여러 특성들을 조사한 결과, 4078 균주는 실온과 30°C에서 우수한 살충력을 나타냈으며, 30°C에서 2일 만에 100%의 살충성을 보였다. 한편, 낮은 상대 습도에서 가장 우수한 균주는 RH 85%에서 5일 동안 90%의 살충성을 보인 6543 균주이었다. 이들 4078과 6543균주들의 ITS의 DNA 염기서열(accession no.: 순서대로 EF026004와 EF026005)에 의해 *Lecanicillium* 종으로 확인되었다. 한편, 미생물 농약 생산에 중요한 포자 생산에 있어서 6543 균주가 4078 균주보다 월등히 우수하였는데, 6543 균주의 살충력이 4078 균주보다는 다소 낮지만, 살충력이 여전히 우수하며 포자생산량이 많고, 회수에도 용이하기 때문에, 미생물농약으로서는 6543 균주가 가장 적합하다고 판단된다.

## 참고문헌

- Askary, H., Carriere, Y., Belanger, R. R. and Brodeur, J. 1998. Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocont. Sci. Technol.* **8**: 23-32.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and

- PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Feng, M. G., Johnson, J. B. and Kish, L. F. 1990. Virulence of *V. lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species of cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* **19**: 815-820.
- Gardner, W. A. and McCoy, C. W. 1992. Insecticides and herbicides. In: David B. Finkelstein and Christopher Ball. *Biotechnology of Filamentous Fungi*. USA: Butterworth-Heinemann. Pp 335-343.
- Gelenter, W. D. and Evans, H. F. 1999. Overview: Factors in the success and failure of microbial insecticides. *Integrated Pest Management Reviews* **4**: 279.
- Hall, R. A. 1981. The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. Pp 438-498. In: Burges, H. D. Ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic press, London.
- Hall, R. A. 1984. Epizootic potential for aphids of different isolates of the fungus *Verticillium lecanii*. *Entomophaga* **29**: 311-321.
- Hall, R. A. and Burges, H. D. 1979. Control of aphids in the greenhouse with the fungus *Verticillium lecanii*. *Annal. Appl. Biol.* **93**: 235-246.
- Jackson, C. W., Heale, J. B. and Hall, R. A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolates of *Verticillium lecanii*. *Annal. Appl. Biol.* **106**: 39-48.
- Kim, J. J. 2004. Pathological studies of *Verticillium lecanii* on the cotton aphid control. Ph. D. dissertation. Chonnam National University, Korea.
- Lee, M. H., Yoon, C. S., Yun, T. Y., Kim, H. S. and Yoo, J. K. 2002. Selection of a highly virulent *Verticillium lecanii* strain against *Trialeurodes vaporariorum* at various temperatures. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 145-148.
- Milner, R. J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* **42**: 227-239.
- Samuels, K. D. Z., Heale, J. B. and Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Invert. Pathol.* **53**: 25-31.
- Song, S. S., Oh, H. K. and Motoyama, N. 1993. Insecticide susceptibility of field-collected populations of the spiraea aphids, *Aphis citricola* (van der Goot) (Homoptera : Aphididae) in apple orchards. *Kor. J. Appl. Entomol.* **32**: 259-264.
- Shah, P. A. and Pell, J. K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 413-423.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- White, T., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp 315-322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. Eds. *PCR Protocols*. Academic press, Sandiego.
- Yokomi, R. K. and Gottwald, T. R. 1988. Virulence of *Verticillium lecanii* isolates in aphids determined by detached-leaf bioassay. *J. Invert Pathol.* **51**: 250-258.
- Zoberi, M. H. 1995. *Metarhizium anisopliae*, fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes*. *Mycologia* **87**: 354-359.