

끈적긴뿌리버섯(*Oudemansiella mucida*)의 최적배양조건 및 배양 추출액의 항균작용에 관한 연구

최미례 · 조해진 · 이재성 · 김혜영 · 이태수*

인천대학교 생명과학부

The Optimal Culture Conditions and Antifungal Activity of Culture Extract from *Oudemansiella mucida*

Mi Ryue Choi, Hae Jin Cho, Jae Seong Lee, Hye Young Kim and Tae Soo Lee*

Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

(Received 27, July 2011., Accepted 27, July 2011)

ABSTRACT : *Oudemansiella mucida*, an edible and medicinal mushrooms belonging to Tricholomataceae of Basidiomycota, has been known to produce antifungal substances to inhibit the mycelial growth and spore germination of the plant pathogenic fungi. To produce good amount of antifungal substances from culture media, the optimal culture conditions of *O. mucida* were investigated. The most favorable conditions for the mycelial growth were 25°C and pH 5 in potato dextrose agar. The most favorable carbon and nitrogen sources promoting mycelial growth were maltose and calcium nitrate, respectively. The optimum C/N ratio was about 20:1 in case that 3% glucose was supplemented to the basal medium as a carbon source. The optimal mycelial growth of *O. mucida* was found in the Hennerberg medium. The crude extract from submerged culture of potato dextrose broth exhibited inhibition of mycelial growth of *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea* and *Pyricularia oryzae* but, fungicidal activity is not good enough to compared with commercially available fungicides tested. Therefore, the antifungal substances extracted from submerged culture of *O. mucida* might have a potential to be used for biocontrol agent of fungal diseases of plants.

KEYWORDS : Antifungal substance, Culture condition, Fungal diseases, *Oudemansiella mucida*

서 론

균류는 지구 생태계에서는 낙엽, 낙지 및 고목 등의 유기물을 분해시켜 토양을 비옥하게 만들고, 오염된 토양과 물을 정화하는 등 분해자로서 지구의 원소의 순환에 직접적으로 관여하는 역할을 하는 미생물이다. 이외에도 균류는 식물, 동물 및 인체에 기생하여 병을 일으키고, 또한 의류, 목재를 분해하여 인간에게 피해를 주기도 하지만 동시에 식품의 발효와 각종 유기산이나 항생물질을 생산하여 바이오산업의 기반이 되는 유용미생물이기도 하다(Deacon, 2005).

항균물질은 미생물이 서식과정에서 다른 미생물의 생장을 저해하거나 사멸시키기 위해서 생산하는 2차 대사산물이다. 이제까지 보고된 미생물이 생산하는 항생물질은 약 10,000여 종으로 이 중 64%가 방선균으로부터 분리되었으며, 약 13%가 세균 약 23%가 곰팡이에서 생산되고 있다(Berdy, 1989).

미생물이 식물병원성 곰팡이에 대해 나타내는 항균작용에는 곰팡이의 세포벽 성분을 가수분해하는 chitinase와 β -glucanase 효소를 생산하여 세포벽을 분해시키는 용균

작용과 siderophore를 생산하여 다른 식물병원균의 생장을 경쟁적으로 저해하는 길항작용도 있다(Kloepfer *et al.*, 1980). 또한 여러 종류의 길항미생물을 토양에 투입하여 병을 억제하는 환경을 조성하거나 식물에 비병원성인 미생물을 병원성 미생물에 기생시켜 병원성 곰팡이의 생장을 무력화하거나 사멸시키는 등의 기작이 있다(Mandeel and Baker, 1993).

따라서 식물병원균에 길항적인 미생물을 이용하여 식물의 병을 방제하기 위한 방법에 대한 연구가 널리 진행되고 있고 또한 많은 종류의 미생물체제가 전 세계적으로 등록되어 있으나, 시장 점유율이 2%도 되지 않을 정도로 낮다. 우리나라에서도 미생물 농약을 사용할 경우 농산물에 대한 잔류독성이 낮고, 농업생태계를 크게 교란하지 않는 장점이 있어 길항미생물을 이용한 생물적 방제에 대한 관심이 높아지고 있다(Shen *et al.*, 2002).

식물병의 방제법에 이용되고 있는 진균으로는 *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Talaromyces flavus*, *Sporidesmium sclerotivorum* 등이 알려져 있다(Adams, 1990).

끈적긴뿌리버섯(*Oudemansiella mucida* (Schrad. :Fr.) Hühn.)은 분류학적으로 송이과(Tricholomataceae), 민긴뿌리버섯속

*Corresponding author <E-mail : tslee@incheon.ac.kr>

(*Oudemansiella*)에 속하는 버섯으로 여름부터 가을까지 활엽수의 고목, 생목, 죽은 가지 등에 발생하는 목재부후성 버섯이다. 이 버섯에는 여러 종류의 곰팡이 생장을 저해하는 항진균물질을 함유하고 있다고 보고되었으며 이들 물질 외에도 oudemansin이라고 불리는 생쥐의 Sarcoma 180과 Ehrlich 복수암의 생장을 억제하는 성분도 함유되어 있다고 보고되었다(Ying *et al.*, 1987).

그러나 이제까지 국내외에서 버섯을 이용하여 식물병원성 곰팡이병을 방제하기 위한 연구는 거의 없었기에 본 연구에서는 끈적끈뿌리버섯으로부터 항진균 물질을 생산하기 위한 균사체의 최적배양조건을 규명하고 균사체의 액체 배양을 통해 생산된 물질이 식물병원성 곰팡이의 균사체 생장과 포자의 발아억제에 미치는 효과를 검증하여 이 물질이 농업용 항진균제로서의 이용 가능성을 규명하기 위한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시버섯균주

본 실험에 사용된 끈적끈뿌리버섯(*Oudemansiella mucida*) 균주는 IUM 2548로 인천대학교 생명과학부 “버섯균주

및 DNA 은행”에서 분양받아 PDA(potato dextroae agar)에서 25°C로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

식물병원성 곰팡이 균주

본 실험에는 총 3종의 식물병원성 곰팡이를 사용하였다. 벼 도열병균인 *Pyricularia oryzae*와 고추 탄저병균인 *Colletotrichum acutatum* 등 2종의 균주는 서울대학교 곰팡이유전자은행(CFGR; Center for Fungal Genetic Resources)에서 분양받은 후 계대 배양하여 사용하였으며, 나머지 한 균주는 딸기잣빛곰팡이 병을 일으키는 *Botrytis cinerea*로 인천대학교 생명과학부 응용미생물학 연구실에서 분리하여 보관 중인 균주를 실험에 사용하였다.

균사체의 최적 배양조건 규명

끈적끈뿌리버섯의 균사생장을 위한 최적 배양조건을 규명하기 위해 pH, 온도, 영양원, 배지 및 C/N ratio 등을 달리한 배지를 제조하여 균사체의 생장을 조사하였다. 각각의 실험은 4반복하여 수행하였다.

온도조건

균사생장을 위한 최적 온도를 조사하기 위하여 PDA

Table 1. Media composition used for mycelial growth of *Oudemansiella mucida*

	Media and composition (g/L)									
	Czapek	Dox	Hamada	Henner-berg	Glucose peptone	Glucose tryptone	Lilly	Mushroom complete	PDA	YM
Asparagine							2			
Dextrose			10						20	10
Ebiose			5							
Hyponex			3							
Glucose				50	10	5				
Malt extract					15			20		3
Maltose							10			
Peptone					10			2		5
Potatoes									200	
Sucrose	30									
Tryptone						10				
Yeast extract			3		10	3		2		3
NaNO ₃	3			2						
K ₂ HPO ₄	1							1		
MgSO ₄	0.5			0.5			0.5	0.5		
KCl	0.5									
FeSO ₄	0.01									
CaCl ₂				0.1						
KH ₂ PO ₄				1			1	0.5		
KNO ₃				2						

PDA, potato dextrose agar; YM, yeast and malt extract agar.

plate에서 7일 동안 배양한 끈적끈뿌리버섯의 균사체를 cork borer를 이용하여 6 크기로 mycelial disc로 떼어낸 뒤 이를 PDA plate 배지의 중앙에 접종하여 15, 20, 25, 30, 35°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사의 직경을 mm 단위로 측정하였다.

pH

PDA 배지의 pH를 멸균 전 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절한 후 끈적끈뿌리버섯의 6 mycelial disc를 접종하여 25°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사의 직경을 mm 단위로 측정하였다.

탄소영양원

균사 생장에 최적인 탄소영양원(carbon source) 선발을 위한 기본 배지는 peptone 5.0 g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120 µg, agar 20 g/D.W. 1000로 조성한 후, 10종류(dextrin, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, ribose, sucrose, xylose)의 carbon source를 0.1°CM/1000 ml씩 첨가하여 배지를 제조하였다. 각각의 배지에는 PDA plate에서 7일 배양한 6 mm 균주의 mycelial disc를 접종하여, 25°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사의 직경을 mm 단위로 측정하였다.

질소영양원

탄소영양원 선발 실험에서 사용한 기본 배지에 2%의 glucose을 넣은 후 10종류의 0.02 M nitrogen sources(alanine, ammonium acetate, ammonium phosphate, arginine, calcium nitrate, glycine, histidine, methionine, potassium nitrate, urea)를 첨가하여 배지를 제조하고 이들 배지에 끈적끈뿌리버섯의 6 mm mycelial disc를 접종하여 25°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사의 직경을 mm로 측정하였다.

질소원과 탄소원의 비율

기본 배지에 carbon source로서 glucose를 1, 2, 3, 4% (w/v)의 비율로 첨가하고, glucose에 대한 nitrogen source인 NaNO₃의 비율을 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1로 조절하여 PDA plate 중앙에 끈적끈뿌리버섯의 6 mm mycelial disc를 접종하여 25°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사를 직경을 mm 단위로 측정하였다.

고체배지의 선발

균사 생장에 최적인 고체배지를 선발하기 위해 버섯의 균사체 배양에 널리 이용되는 총 9종류 배지(Table 2)를 선발하고 배지의 pH를 5.0으로 조정하고 살균하여 식힌 후 위의 배양 방법과 동일하게 실험을 수행하였다.

배지여액에서 항균물질의 추출

항진균물질의 추출을 위하여 끈적끈뿌리버섯을 PDA

Table 2. Effect of different carbon sources on mycelial growth of *Oudemansiella mucida* in basal medium^a

Carbon source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Dextrin	77.42 ± 1.4 ^e	SC
Fructose	61.64 ± 1.2	ST
Galactose	68.36 ± 0.5	T
Glucose	80.12 ± 2.4	ST
Lactose	38.26 ± 1.6	T
Maltose	83.24 ± 3.2	SC
Mannose	79.46 ± 2.4	T
Sorbitol	67.38 ± 2.1	SC
Sucrose	71.08 ± 1.5	T
Xylose	46.52 ± 2.1	SC

^aThe basal medium is composed of peptone 5 g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120, agar 20 g and D.W. 1000 ml.
^bEach carbon source was added to the basal media at the concentration of 0.1 M.
^cThe colony diameter was measured at 10 days of incubation
^dMycelial density : C, compact; SC, somewhat compact; ST, somewhat thin; T, thin
^eValues are the mean of four replicates and SE

plate에 7일간 배양한 후 6 mm의 cork borer를 이용하여 10개의 mycelial disc를 떼어내 100 ml의 PDB(Potato dextrose broth)가 들어있는 250 ml의 삼각플라스크에 각각 접종하여 25°C에서 12일 동안 150 rpm/min의 암조건 상태에서 배양하였다. 배양 후 각각의 버섯균사가 배양된 액체배지는 진공펌프와 여과지(Advantec, Toyo Roshi Kaisha)를 사용하여 균사체와 배양액을 분리하였다. 분리된 배양액은 동결 건조하여 가루형태로 만든 뒤 -70°C의 냉동고에 보관하면서 항진균 활성실험에서는 추출된 이 물질을 멸균된 3 차 증류수에 녹여 사용하였다.

식물병원성곰팡이의 균사생장 저해효과

끈적끈뿌리버섯의 배양액에서 추출한 물질과 시판되고 있는 항진균 농약이 공시된 3종류의 식물병원성 곰팡이의 균사생장 억제효과를 비교하기 위하여 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin 등 4종류의 항진균성 농약과 끈적끈뿌리버섯의 액체배양액에서 추출한 물질을 각각 100 µg/ml로 준비하였다. PDA를 멸균기에 살균한 후 46°C로 식힌 후 이들 물질을 각각 잘 넣어 섞은 후 petri plate에 부어 굳혔다. 그리고 PDA plate에서 25°C로 7일 동안 암배양한 식물병원진균의 균사체를 직경 6 mm의 cork borer를 이용하여 떼어낸 후 농약과 버섯균사체의 배양추출물이 함유된 각각의 PDA 배지 중앙에 접종하여 25°C에서 5일간 암배양 후 균사체의 생장을 단위로 측정하여 이들 물질이 식물병원진균의 균사생장에 미치는 저해효과를 측정하였다.

식물병원성곰팡이의 포자발아 저해효과

근적긴뿌리버섯의 균사체 배양액에서 추출한 물질과 시판되는 4종의 항균 농약이 3종류의 식물병원성 진균 포자의 발아를 저해하는 효과를 규명하기 위하여 PDA plate에서 14일 배양하여 생성된 식물병원진균의 포자를 채취하였다. 채취한 포자는 멸균수를 이용하여 포자의 농도가 1×10^6 conidia/ml로 되도록 포자현탁액을 만들고 멸균 피펫을 이용하여 포자현탁액 1 ml를 PDA 배지가 들어있는 plate에 분주하고 유리봉으로 고르게 편 후 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin과 근적긴뿌리버섯의 균사체 배양액 추출물질을 각각 50 µg/ml의 농도로 조절하여 paper disc(Avantec, 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)에 흡수시킨 후 PDA petri plate의 중앙에 올려놓고 25°C에서 3일 동안 암배양 후 paper disc의 둘레에 포자의 발아가 저해되어 나타난 생장 저지대의 직경을 mm 단위로 측정하였다(Victor and Editor, 1991).

결과 및 고찰

1. 근적긴뿌리버섯의 균사생장 최적조건

온도

균사생장을 위한 최적 온도를 조사하기 위하여 민근적뿌리버섯 균주를 PDA에 접종하여 15, 20, 25, 30, 35°C에서 10일 동안 암배양한 결과, 25°C에서 배양된 petri plate의 균사체의 직경이 85 mm로 생장이 가장 활발한 것으로 나타났고 그 다음은 20°C, 15°C순으로 균사생장이 활발하였고, 30°C 이상의 온도에서는 균사생장이 매우 저조한 것으로 나타났다(Fig. 1).

심 등(2003)는 매미눈꽃동충하초의 균사체 배양 실험에서 균사체 배양의 최적온도는 25°C라고 보고하였으며 Shim 등(1997)은 저령의 균사체 배양 최적온도는 20°C로 보고하였다. 따라서 이들의 실험결과와 본 실험의 결과를 비교

분석하면 버섯 균사체 최적온도는 20°C에서 25°C인 것으로 사료된다.

pH

pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절한 PDA에 6 mm의 근적긴뿌리버섯 mycelial disc를 접종하여 25°C에서 10일 동안 암배양한 후 균사생장에 가장 최적인 pH를 조사한 pH 5에서 균사생장이 가장 활발하였으며, pH 4, 6, 7, 8의 순으로 균사 생장이 서서히 감소하여 이 버섯의 균사체 생장은 중성이나 산성배지에서의 균사생장이 알칼리성 배지에 비해 양호한 것으로 나타났다(Fig. 2). Shim 등(1997)은 저령의 균사체 배양 최적 pH는 4이고 다음으로 왕성한 균사의 생장은 pH 5에서 나타났다고 보고하였다. 따라서 본 실험의 결과와 위의 실험 결과를 비교하면 버섯의 균사체 배양 최적의 배지 pH는 산성인 것으로 판단된다.

탄소영양원

질소영양원으로 0.5%의 peptone이 첨가된 기본배지에 총 10 종류의 탄소영양원을 이용하여 근적긴뿌리버섯의 균사생장에 최적인 탄소영양원을 조사한 결과 maltose가 첨가된 배지에서 균사의 생장이 83.24 mm로 가장 높은 생장률을 보였고 그 다음은 glucose와 mannose와 순으로 높은 균사생장을 나타냈으나 균사의 밀도는 균사의 최적 생장과는 상관관계 높지 않았다(Table 2). Hong 등(1986)은 영지의 균사체 생장에 최적인 탄소원은 cellobiose라고 보고하였고, Shim 등(1997)은 저령의 최적인 탄소원은 포도당으로 보고하였다. 따라서 버섯의 균사체 생장에 필요한 탄소영양원은 일반적으로 버섯의 종류와 이들 버섯이 서식하는 환경에 따라 변화가 있는 것으로 보고되었다.

질소영양원

탄소영양원의 선발 실험과 같은 기본 배지에 peptone을 제외하고 2% glucose와 총 10 종류의 질소영양원을 이용

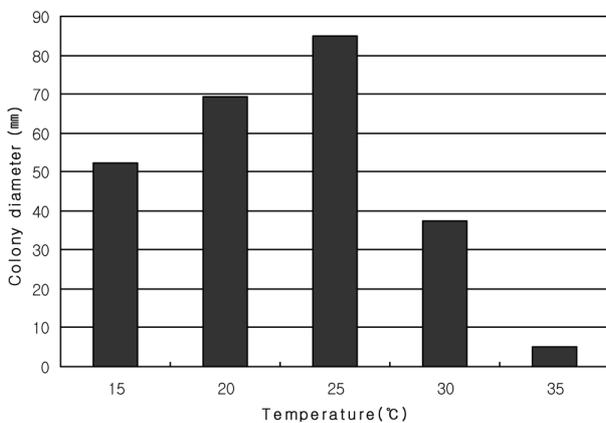


Fig. 1. Mycelial growth of *Oudemansiella mucida* on PDA for 10 days at different temperatures.

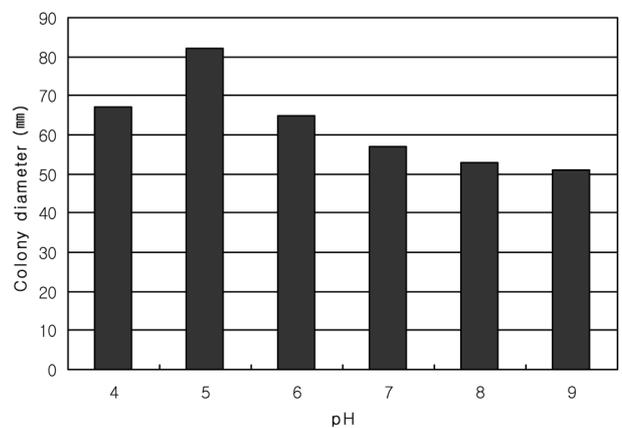


Fig. 2. Mycelial growth of *Oudemansiella mucida* on PDA at different pHs for 10 days at 25°C.

하여 민근뿌리버섯의 균사생장에 최적인 질소영양원을 조사한 결과 calcium nitrate의 균사 생장이 68.36mm으로 가장 빠른 균사생장을 보였다. 그리고 ammonium acetate가 2번째로 높은 균사생장을 보였으며 histidine이 10.24 mm로 가장 저조한 균사생장을 나타내었다(Table 3). 일반적으로 버섯 균사의 최적 질소영양원은 무기염류보다는 균류가 흡수 후 곧바로 이용할 수 있는 아미노산이나 단백질과 같이 유기물인 경우가 많다 따라서 본 실험에서 균사체 생장의 최적 질소 영양원이 무기염류인 calcium nitrate로 나타난 것은 어느 정도 예외적인 것으로 사료된다.

질소영양원과 탄소영양원의 비율

기본 배지에 탄소원인 glucose를 1, 2, 3, 4% (w/v)의

Table 3. Effect of nitrogen sources on mycelial growth of *Oudemansiella mucida* in basal medium^a

Nitrogen source ^b	Colony diameter(mm) ^c	Mycelial density ^d
Alanine	57.26 ± 1.5 ^e	C
Ammonium acetate	65.34 ± 2.2	C
Ammonium phosphate	49.62 ± 2.1	SC
Arginine	43.14 ± 0.5	SC
Calcium nitrate	68.36 ± 2.6	SC
Glycine	47.48 ± 2.1	SC
Histidine	10.24 ± 1.4	T
Methionine	15.32 ± 1.2	ST
Potassium nitrate	61.62 ± 3.1	T
Urea	53.26 ± 1.8	ST

^aThe basal medium is composed of glucose 20 g, MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bEach nitrogen source was added to the basal media at the concentration of 0.1 M.

^cThe colony diameter was measured at 10 days of incubation.

^dMycelial density : C, compact; SC, somewhat compact; ST, somewhat thin; T, thin.

^eValues are the mean of four replicates and SE.

Table 4. The effects of different C/N ratio on mycelial growth of *Oudemansiella mucida* in the basal medium^a

C/N ^b ratio	Colony diameter ^c (mm) on 4 different D-glucose concentrations (%)			
	1	2	3	4
10:1	50.64 ^d	53.56	44.57	46.30
20:1	51.16	54.02	57.74	52.40
30:1	48.86	52.36	54.46	48.54
40:1	47.24	49.44	47.56	46.62

^aThe basal medium is composed of MgSO₄ 0.05 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, Thiamine-HCl 120 mg, agar 20 g and D.W. 1000 ml.

^bThe colony diameter was measured at 7 days of incubation.

^cThe ratio of NaNO₃ vs D-glucose were adjusted to 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1, respectively.

^dValues are the mean of four replicates and SE.

비율로 첨가하고, nitrogen source인 NaNO₃의 비율을 10 : 1, 20 : 1, 30 : 1, 40 : 1로 조절하여 끈적끈적버섯의 균사를 접종한 후, 25°C에서 10일 동안 암배양하여 균사의 생장을 측정 한 결과 3% glucose가 첨가되고 C/N의 비율이 20 : 1인 경우에 균사의 생장이 가장 활발하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Table 4). 이 결과와는 다르게 심 등(2003)은 매미늪꽃동충하초의 균사체 배양의 최적 C/N의 비율은 20 : 1로 이 경우 1%의 포도당을 탄소영양원으로 첨가하여야 한다고 보고하였다. Lai 등(2011)에 의하면 *Lignosus rhinocerus* 배양의 경우 배지의 포도당의 함량이 2-3%이고 질소영양원과 탄소원의 비율이 10 : 1일 때 배양이 양호하다고 보고하여 본 실험의 유사하였다.

최적의 고체배지 선발

버섯의 균사체 배양에 널리 이용되는 총 9종류의 배지를 pH 5.0으로 조절하고 끈적끈적버섯의 균사를 접종하여 균사생장에 적합한 고체배지를 선별한 결과(Table 5), Hennerberg 배지에서 균사의 생장이 가장 양호한 78.38mm로 나타났으며 다음으로는 glucose tryptone 배지에서 균사생장이 양호하였다. 균사생장이 가장 저조한 고체배지는 Czapek dox 배지로 균사생장이 58.42 mm로 나타났다. 균사의 생장이 저조한 Czapek dox 배지는 유기물질인 탄소영양원을 제외하고 대부분의 영양원이 무기염류로 구성되어 있어서 균사체의 생장이 더딘 것으로 알려져 있다.

식물병원성곰팡이의 균사생장 저해효과

끈적끈적버섯의 균사체가 생산한 물질이 3 종류의 식물병원진균에 대한 항균 효과를 규명하기 위하여 고추탄저병균인 *C. acutatum*, 잣빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis*

Table 5. The effects of various culture media on mycelial growth of *Oudemansiella mucida*

Culture medium	Colony diameter(mm) ^a	Mycelial density ^b
Czapek dox	58.42 ± 2.4 ^c	T
Hamada	72.14 ± 3.2	C
Hennerberg	78.38 ± 2.5	SC
Glucose peptone	68.52 ± 1.4	C
Glucose tryptone	76.26 ± 2.6	ST
Lilly	70.62 ± 3.4	ST
Mushroom complete	70.28 ± 2.2	SC
PDA	68.36 ± 1.2	SC
YM	64.24 ± 2.8	SC

PDA, potato dextrose agar; YM, yeast and malt extract agar.

^aThe colony diameter was measured at 10 days of incubation

^bMycelial density : C, compact; SC, somewhat compact; ST, somewhat thin; T, thin

^cValues are the mean of four replicates and SE

cinerea 그리고 벼의 도열병균인 *Pyricularia oryzae*에 대한 항균 효과를 조사하였다. 또한 이 벼의 균사여액에서 추출한 물질과 기존에 시판되는 항진균 농약과의 균사생장억제 효과를 비교하기 위해 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin 등 4종의 농약을 공시하여 실험에 사용하였다. 먼저 끈적끈뿌리벼의 배양액에서 추출한 물질을 준비하여 PDA에 넣어 잘 섞은 뒤 petri dish에 부어 굳혔다. 이들 각각의 PDA plate에 25°C에서 7일 동안 배양한 *C. acutatum*의 균사를 직경 6의 cork borer로 절단하여 접종한 후, 25°C에서 5일 동안 배양한 후 벼의 추출물 처리, 농약을 처리 및 대조군의 plate에서 생장한 균사의 직경을 측정하였다. 각각의 농약을 100 µg/ml로 처리한 배지에 각각 *C. acutatum*을 접종한 경우 대조군에 비하여 carbendazim은 *C. acutatum*의 균사생장을 38.6%, prochloraz는 48.8%, folpet은 34.2%, trifloxystrobin은 42.07% 억제하였다. 따라서 *C. acutatum* 균주는 공시된 농약 중 folpet에 대해서 비교적 균사생장의 저해도가 낮았다. 또한 끈적끈뿌리벼의 배양액에서 추출한 물질을 동일한 방법으로 실험을 수행한 경우에도 19.4%의 균사생장 저해작용이 나타나서 기존에 시판되는 농약에 비해 균사생장을 억제하는 효과가 낮았다. 따라서 끈적끈뿌리벼가 생산하는 물질은 기존의 농약을 대체할 수는 없을 것으로 사료되었으며 *C. acutatum*에 대해 약간의 길항효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다(Table 6). Kim 등 (1999)에 의하면, 고추탄저병균 (*Colletotrichum* spp.)를 대상으로 benzimidazole계 살균제인 benomyl, sulfamide계 살균제인 folpet 등의 약제를 각각 100 µg/ml 첨가한 PDA에서의 약제 저항성을 조사한 결과 benzimidazole계는 4%의 균주가 저항성을 나타냈고, folpet에서는 35.3%의 높은 저항성 출현율을 나타냈다. 나(2002)는 우리나라의 고추산지에서 분리한 고추탄저병균을 이용하여 folpet에 대한

Table 6. Mycelial growth of 3 plant pathogenic fungi on the PDA supplemented with culture extract of *O. mucida* and 4 commercial fungicides

Treatment ^a	<i>Colletotrichum acutatum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>
	Mycelial diameter(mm) ^b		
Carbendazim	25.3 ± 0.6 ^c	26.5 ± 0.5	23.3 ± 0.5
Prochloraz	21.4 ± 0.5	25.3 ± 0.4	24.5 ± 0.4
Folpet	27.1 ± 0.5	29.1 ± 0.5	29.3 ± 0.6
Trifloxystrobin	23.5 ± 0.4	27.2 ± 0.4	21.1 ± 0.4
Culture extract of <i>O. mucida</i>	33.2 ± 0.5 ^b	32.4 ± 0.4	29.5 ± 0.4
Control	41.2 ± 0.4	45.5 ± 0.6	37.2 ± 0.2

^aThe inhibition of mycelial growth was tested on PDA supplemented with 100 µg/ml of culture extract of *O. mucida* and 4 fungicides

^bColony diameter(mm) was measured for 5 days of incubation at 25°C

^cValues are the mean of four replicates and SE

약제 내성을 조사한 결과 분리균주의 30% 이상이 저항성을 보였으나 다른 공시 농약인 prochloraz에 대해서는 내성을 나타내지 않았다. 본 실험에서도 끈적끈뿌리벼에서 추출한 항균물질과 공시한 4종 농약의 *C. acutatum*에 대한 항균효과가 앞서 이들의 연구결과와 유사하게 나타나서 본 실험에서 사용한 *C. acutatum* 균주 또한 기존에 판매되는 농약에 대해 어느 정도 내성을 갖고 있는 것으로 판단된다.

잿빛곰팡이 병원균인 *B. cinerea*의 대한 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin과 끈적끈뿌리벼의 배양액에서 추출한 물질을 위와 동일한 방법으로 균사의 생장 억제효과를 조사한 결과 대조군에 비해 carbendazim은 39.1%, prochloraz는 44.4%, trifloxystrobin은 41.2%의 균사생장을 억제하였으며, folpet은 균사의 생장을 36.1%가 억제하였다. 끈적끈뿌리벼의 배양액은 *B. cinerea*의 균사생장을 28.8% 억제시켜 공시된 농약에 비해 저해효과가 낮게 나타났다(Table 6). 김(1990)은 병든 딸기, 토마토, 오이로부터 분리한 2397개의 잿빛곰팡이병원 균주를 이용하여 시판되고 있는 여러 농약에 대한 이들 균주의 저항성 출현율을 조사한 결과 benzimidazole계 농약인 benomyl에 대해서는 69.9%, prochloraz에 대해서는 12.6%가 나타나서 본 실험에서 사용된 benzimidazole계 농약인 carbendazim의 균사생장 억제율과 유사한 결과를 보여주었다.

벼도열병 병원균인 *P. oryzae*에 대한 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin과 끈적끈뿌리벼의 배양액에서 추출한 물질을 이용한 균사의 생장억제효과 실험에서는 대조군에 비해 carbendazim은 37.4%, prochloraz는 44.1%, trifloxystrobin은 43.3%의 균사생장을 억제하였으며, folpet에서는 21.2%가 억제되었다. 끈적끈뿌리벼의 배양액은 *P. oryzae*의 균사생장을 20.78% 억제시켜 공시된 4종류의 농약에 비해 억제효과가 낮게 나타났다(Table 6). 따라서 현재 판매되고 있는 항진균성 농약이 고추탄저병균, 잿빛곰팡이병원균 및 도열병균의 균사 생장을 저해하는 효과가 비교적 낮게 나타난 것은 공시한 농약이 우리나라에서 이들 병의 방제를위해 오랜 기간 사용되었기 때문에 이미 많은 종류의 식물병원균이 이들 농약에 대해 저항성을 획득할 충분한 시간을 가질 수 있어서 비교적 높은 저항성을 유지하고 있는 것으로 사료된다.

식물병원성곰팡이 포자 발아 억제효과

끈적끈뿌리벼에서 생산하는 항진균물질이 고추탄저병에 대하여 생물학적 방제제로서 사용 가능한지를 규명하기 위해 *C. acutatum*를 PDA에서 14일 동안 배양하여 포자를 생성시킨 후 포자 현탁액을 1×10^6 conidia/로 준비하여 PDA배지에 분주하여 멸균한 유리병으로 고르게 접종한 후, 시판되는 농약 carbendazim, prochloraz, folpet, trifloxystrobin과 벼의 배양액에서 분리한 물질을 각각 50 µg/ml씩 8mm의 paper disc(Advantec, Toyo Roshi Kaisha)에 흡수시켜 PDA배지의 중앙에 올려놓은 후 25°C에서 72시간 배양한

Table 7. The inhibition of spore germination in 3 plant pathogenic fungi on the PDA treated with culture extract of *Oudemansiella mucida* and 4 commercial fungicides

Treatment ^a	<i>Colletotrichum</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Pyricularia</i>
	<i>acutatum</i>	<i>cinerea</i>	<i>oryzae</i>
	Diameter of inhibition zone ^b (mm)		
Carbendazim	14.6±0.5 ^c	15.2±0.6	13.0±0.4
Prochloraz	12.4±0.7	10.3±0.6	11.0±0.5
Folpet	1.1±0.1	1.2±0.3	1.4±0.2
Trifloxystrobin	13.2±0.5	11.6±0.4	12.4±0.6
Culture extract of <i>O. mucida</i>	6.3±0.3	7.4±0.4	8.1±0.4
Control	0	0	0

^aThe paper disc (8 mm in diameter) were treated with 50 µg/ml of culture extract of *O. mucida* and 4 commercial fungicides

^bInhibition zone was measured after 72 hr of incubation at 25°C

^cValues are the mean of four replicates and SE

다음 생장 저지된 직경을 mm로 단위로 측정하였다. 포자의 발아가 억제된 저지환의 직경을 측정한 결과 carbendazim, prochloraz, trifloxystrobin을 함유한 paper disc를 처리한 배지에서 고추탄저병균의 포자 발아가 억제된 저지환이 각각 14.6 mm, 12.4 mm, 13.2 mm로 나타났고, folpet가 함유된 disc를 처리한 배지에서 저지환의 크기는 1.1 mm로 나타나 folpet은 고추 탄저병균의 포자 발아를 거의 억제하지 못하였다. 그러나 끈적끈뿌리버섯 배양액에서 추출한 물질을 처리한 paper disc의 포자 발아 억제 저지환은 시판 농약에 비해서는 적었으나 folpet에 비해서는 큰 6.3 mm를 나타내서 포자의 발아를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다 (Table 7).

갯빛곰팡이병원균에 대한 포자의 발아억제 효과를 위와 동일한 방법으로 수행하여 포자의 발아가 억제되어 나타난 저지환의 크기를 측정한 결과 carbendazim, prochloraz, trifloxystrobin을 50 µg/ml 함유한 paper disc를 올려놓은 배지에서의 저지환의 크기는 15.2 mm, 10.3 mm, 11.6 mm였으나 folpet은 1.2 mm로 포자의 발아 억제효과를 나타내지 못했다. 끈적끈뿌리버섯 추출물질을 처리한 paper disc의 포자발아 억제 저지환의 크기는 6.3 mm로 공시 농약에 비해서는 작았으나 folpet에 비해서는 높게 나타나서 식물 병원성 곰팡이의 포자 발아를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다 (Table 7). carbendazim, prochloraz, trifloxystrobin 이 벼도열병균의 포자의 발아를 억제하는 효과를 측정할 결과 항진균 농약에 의한 저지환의 크기가 각각 15.2 mm, 10.3 mm, 11.6 mm로 나타났고 folpet은 1.2 mm로 나타나 포자의 발아를 억제하는 효과가 나타나지 않았다. 그러나 끈적끈뿌리버섯에서 분리한 항진균물질이 포자 발아 억제효과는 시판 농약에 비해서는 낮았으나 folpet에 비해서는 높은 결과를 나타냈다 (Table 7).

적요

본 연구는 식·의약품버섯으로 알려진 끈적끈뿌리버섯 (*Oudemansiella mucida*) 배양액에서 추출한 물질이 항진균 효과를 갖고 있는지 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 균사체의 배양액에서 항진균 물질을 생산하기 위한 전단계로 끈적끈뿌리버섯의 균사생장에 적합한 온도, pH, 탄소영양원, 질소영양원, 탄소/질소 비율 및 최적의 고체배지 등을 선별하기 위한 실험을 수행하였다. 균사생장에 최적인 온도와 pH는 각각 25°C와 pH 5이었으며, 최적 탄소영양원과 질소영양원은 각각 maltose와 calcium nitrate였다. 균사생장을 위한 탄소/질소 영양원의 비율이 20 : 1이고 배지의 glucose 농도가 3%일 때, 균사생장이 가장 활발하였으며, 최적의 고체배지에는 Hennerberg 배지가 선정되었다. 균사생장의 실험 결과를 토대로 끈적끈뿌리버섯의 균사체를 배양한 후 그 배양여액을 이용하여 식물병원 곰팡이에 대한 항진균 효과를 규명하였다. 끈적끈뿌리버섯의 균사체 배양액에서 추출한 물질과 시판되고 있는 항진균 농약을 이용하여 *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea* 및 *Pyricularia oryzae* 등 식물병원성 곰팡이를 대상으로 균사생장과 포자발아를 저해하는 효과를 조사한 결과 끈적끈뿌리버섯의 균사체에서 생산된 물질은 식물병원균의 균사생장을 저해하는 효과를 나타내었으나 공시된 항진균 농약에 비해 저해효과는 낮게 나타났다. 공시된 식물병원균 포자의 발아를 억제하는 효과는 folpet을 제외한 모든 공시 농약에 비해 낮게 나타났다. 따라서 끈적끈뿌리버섯의 균사체 배양액에서 추출한 물질에는 항균성을 나타내는 물질을 함유되어 있어서 새로운 항진균 제제로 개발할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부, 한국연구재단, 연구소제지원사업의 “버섯균주 및 DNA은행”에 지원한 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김병섭. 1997. 갯빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)의 살균제 저항성 및 생리생태적 다양성. 서울대학교 박사학위논문. 149pp.
- 김병섭, 최경자, 조광연. 1993. Benzimidazole계 및 dicarboximide계 살균제에 저항성인 갯빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)의 몇가지 약제에 대한 반응. 한식병지. 9(3):98-103.
- 나정은. 2002. 고추탄저병균의 약제내성과 변이에 관한 연구. 인천대학교 석사학위논문. 66pp.
- 심성미, 이경림, 임경환, 이우윤, 이민용, 이태수. 2003. 매미눈꽃 동충하초(*Paecilomyces sinclairii*)의 균사 생장과 자실체 형성 조건의 특성. 한국균학회지 31(1):8-13.
- 홍재식, 최윤희, 윤세익. 1986. 합성배지에서 불로초가 생산하는 섬유소분해효소에 관한 연구. 한국균학회지 14(2):121-130

- Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:59-72.
- Bae, M. 1978. Present status and future of antibiotics for agriculture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 6(3):141-148.
- Berdy, J. 1989. The discovery of new bioactive microbial metabolites; Screening and identification. In Bushell, M. E. and U. Grafe(ed), *Bioactive metabolites from microorganisms. Elsevier, Amsterdam.* 3-25.
- Deacon. 2005. *Fungal biology. Blackwell Publishing Company.* 435pp.
- Dekker, J. 1976. Acquired resistance to fungicides. *Ann. Rev. Plant Pathol.* 14:405-428.
- Kim, B. S., Park, E. W., Roh, S. H. and Cho, K. Y. 1997. Physiological diversity between morphological phenotypes of *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Mycol.* 25(4):320-329.
- Kim, H. Y. and Lee, T. S. 2009. Isolation of antifungal substances by *Bacillus amyloliquefaciens* IUM158-03 and antagonistic activity against pathogenic fungi. *Kor. J. Mycol.* 37(1):96-103.
- Lai, W.H., Murini, M. J. S., Fauzi, D., Mazni, O. A. and Saldh, N. M. 2011. Optimal culture conditions for mycelial growth of *Lignosus rhinocerus*. *Mycobiol.* 39(2):92-95.
- Mandeel, Q. and Baker, R. 1993. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *J. Phytopathology.* 81: 462-469.
- Shen, S. S., Choi, O. H., Lee, S. M. Park, C. S. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Serratia plymutica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol. J.* 18(4):221-224.
- Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, Y. S., Lee, J. y., Lee, T. S., Lee, S. S. and Lee, M. W. 1997. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. *The Kor. J. Mycol.* 25(3):209-218.
- Victor, L. M. and Editor, D. 1991. Antibiotics in laboratory medicine (3rd) Williams and Wilkins. 17-52.
- Ying, J. Z., Mao, X. L., Ma, Q. M., Zong, Y. C. and Wen, H. A. 1987. Icons of medicinal fungi from China. *Science Press, Beijing, China.* 575pp.