RESEARCH ARTICLE

이중 활성 곤충병원성 곰팡이 4균주에 대한 최적 배양 배지 선발 및 다양한 항균활성 평가

윤휘건, 곽원석, 우수동*
충북대학교 농업생명환경대학 농생물학과

Selection of Optimal Culture Medium for Four Entomopathogenic Fungal Isolates with Dual Activity and Evaluation of Their Antimicrobial Activity against Several Phytopathogens

Hwi-Geon Yun, Won-Seok Gwak , Soo-Dong Woo*
Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Life & Environment Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Corresponding author: sdwoo@cbnu.ac.kr

ABSTRACT

Selection of the optimal culture medium and evaluation of the antimicrobial activity against various phytopathogens were performed for four entomopathogenic fungal isolates with excellent insecticidal and antimicrobial activity against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*), green peach aphid (*Myzus persicae*), and gray mold (*Botrytis cinerea*). The optimal medium was selected by measuring the amount of blastospore production and the antifungal activity of the culture medium. On the basis of these experiments, GY medium was selected for *Beauveria bassiana* 2R-3-3-1 and *Metarhizium anisopliae* 4-2, SD3, and PDB medium for *B. bassiana* SD15. The antimicrobial activity test against other phytopathogens indicated that all four isolates showed high antifungal activities against *Colletotrichum acutatum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. However, for *Phytophthora capsici* and *C. fructicola*, only *M. anisopliae* SD3 showed a high antifungal activity against *P. capsici*, and the other three isolates had little activity. Antibacterial activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was high in two isolates of *M. anisopliae* but not in two isolates of *B. bassiana*. Thus, it was confirmed that entomopathogenic fungi effective for pest control could be effectively used as a control agent for various plant diseases.

Keywords: Antimicrobial activity, Culture medium, Entomopathogenic fungi, Phytopathogen

OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2018 September, 46(3): 333-344
https://doi.org/10.4489/KJM.20180025

Received: May 11, 2018
Revised: July 8, 2018
Accepted: July 20, 2018

서론

해충들과 식물병을 방제하기 위해서 일반적으로 이용되고 있는 화학 살충제 또는 살균제는 오랜 기간 과도하고 지속적인 사용으로 인하여 해충과 병의 저항성 발달과 더불어 심각한 환경오염 문제를 초래하고 있다. 따라서 이러한 문제들을 해결하기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 그 중 생물적 방제제가 그 대안으로 가장 주목 받고 있으며 그에 대한 연구 개발이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있다[1, 2]. 생물적 방제제 중 살충제 분야에서 가장 활발한 연구 개발 및 실용화는 곤충병원성 미생물을 중심으로 이루어지고 있으며, 곤충병원성 세균, 바이러스 그리고 곰팡이가 주로 이용되고 있다. 특히, 최근에는 곤충병원성 곰팡이의 살충제로서의 기능뿐만 아니라 다양한 역할의 보고에 따라 그에 대한 연구 개발이 더욱 활발히 이루어지고 있다[3].

곤충병원성 곰팡이는 자연 상태에서 해충의 밀도를 조절하며, 동시에 높은 기주 특이성으로 인해 목적 해충에게만 높은 병원성을 보이고 일반적으로 인축과 환경에 독성을 나타내지 않는다고 알려져 있다[4]. 따라서, 세계적으로 곤충병원성 곰팡이의 분리 및 연구 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 현재까지 약 700여 종 이상의 곤충병원성 곰팡이의 분리가 보고되고 있다[1, 3-5]. 특히, 최근에는 곤충병원성 곰팡이의 식물체에 대한 내생균, 길항 미생물, 근권 미생물 그리고 식물 생장 촉진 등 다양한 잠재적인 역할들이 밝혀지고 있을 뿐만 아니라[6, 7], 곤충병원성 곰팡이의 이차대사산물이 살충을 비롯하여 살균, 항암, 항산화 등 매우 다양한 활성이 있음이 보고되어 그에 대한 연구가 더욱 활발히 이루어지고 있다[3]. 국내에서도 최근, 난방제 해충인 점박이응애(two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*)와 복숭아혹진딧물(green peach aphid, *Myzus persicae*)에 대해 높은 살비 또는 살충 활성을 지니고 동시에 식물병원균인 잿빛곰팡이병균(gray mold disease pathogen, *Botrytis cinerea*)에 대해서도 높은 살균 활성을 보이는 곤충병원성 곰팡이들의 선발에 대한 보고가 있었다 [3, 8]. 점박이응애와 잿빛곰팡이병균에 대해 동시에 높은 이중 활성을 지닌 균주로는 *Beauveria bassiana* 2R-3-3-1와 *Metarhizium anisopliae* 4-2 균주[3], 복숭아혹진딧물과 잿빛곰팡이병균에 대해서는 *B. bassiana* SD15와 *M. anisopliae* SD3 균주[8]가 보고되었다. 이들 균주는 포자뿐만 아니라 배양액에서도 높은 살충 및 항균활성을 가지는 것으로 보고되어 향후 살충제 및 살균제의 새로운 소재로 이용이 기대되고 있다[9].

본 연구에서는 살충 및 살균 활성을 지닌 이들 4가지 곤충병원성 곰팡이 균주에 대해서 포자 및 배양액의 생산을 위한 최적 배양 배지에 대한 탐색과 더불어, 적용할 수 있는 식물병의 확장을 위하여 다양한 식물병원균에 대한 항균활성을 평가하였다.

재료 및 방법

곤충병원성 곰팡이

곤충병원성 곰팡이 균주는 국내 토양에서 분리한 342개 균주들 가운데에서 점박이응애와 잿빛곰팡이병균에 대해 동시에 높은 활성을 보인 *B. bassiana* 2R-3-3-1 (NCBI GenBank accession no. KX756085), *M. anisopliae* 4-2 (NCBI GenBank accession no. KX756078) 균주들[3]과 복숭아혹진딧물과 잿빛곰팡이병균에 대해 동시에 높은 활성을 보인 *B. bassiana* SD15 (NCBI GenBank accession no. KC551951), *M. anispoliae* SD3 (NCBI GenBank accession no. KC551963) 균주들을[8] 각각 실험에 이용하였다.

곤충병원성 곰팡이 배양

곤충병원성 곰팡이 균주는 고체배양 배지인 potato dextrose agar (PDA, pH 5.6) 배지에 접종하고, 25℃에서 2주간 배양하였다. 포자를 수거하기 위해, 배양된 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 0.02% tween 80을 이용하여 포자현탁액을 만들고, 멸균된 탈지면으로 균사를 제거한 후 hemocytometer로 계수하여 실험에 이용하였다. 포자현탁액은 실험에 사용 시까지 4℃에 보관하였고, 보관기간은 3일을 넘기지 않았다. 고체 배양을 통해 얻어진 포자현탁액은 액체배지에 접종하기 전 Sabouraud dextrose agar (SDAY, supplemented with 1% Yeast extract, pH 5.6) 배지에 0.05% benomyl (95% active ingredient; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 SDAY+B 배지에서 포자의 발아 여부를 확인하여, 90% 이상 viability를 보이는 경우만 사용하였다. 포자현탁액 50 μL (9×10^5 conidia/mL)를 30 mL의 potato dextrose broth (PDB, pH 5.6) 배지가 들어있는 100 mL 플라스크에 접종하고 25℃, 150 rpm, 암조건에서 14일간 배양하였다. 14일간 배양된 배양산물을 10,000 × g, 4℃, 20분 동안 원심분리하여 균체와 배양액을 분리하였고, 얻어진 배양액은 filter paper (No. 2; Advantec MFS, Dublin, CA, USA)로 1차 여과한 후, 0.45 μm filter (28 mm Corning syringe filter; Sigma-Aldrich)를 이용한 2차 여과로 얻어진 순수한 배양액을 실험에 사용하였다.

효율적 배양조건 탐색

선발된 균주들의 배지에 따른 출아포자(blastospore)의 생산 효율과 항균활성을 비교하고자, 각각 PDB, Sabouraud dextrose broth (SDB; 0.5% peptic digest of animal tissue, 0.5% pancreatic digest of casein, 2% dextrose, pH 5.5), GY (2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.02% $MgSO_4{\bullet}7H_2O$, 0.1% K_2HPO_4, pH 5.5), Adameks's 배지(4% glucose, 4% yeast extract, 3% corn steep liquor, pH 5.5) 100 mL을 250 mL 플라스크에 분주하고, 각각의 균주를 100 μL (1×10^8 conidia/mL)씩 접종하여 25℃, 150 rpm, 암조건에서 7일간 배양하여 출아포자 생산량과 항균활성을 확인하였다. 출아포자 생산량 측정은 7일간 배양한 산물을 원심 분리하여 분리된 균체에 멸균수를 2회 처리하여 배양액을 제거하고, 멸균수를 다시 1 X의 농도로 첨가하고 vortexing하여 현탁액을 제조하였다. 이후 멸균된 거즈를 이용하여 균체를 제거하고, 출아포자를 수거하여 hemocytometer로 계수하였다. 항진균 활성 측정은 배양산물을 원심 분리 후 얻어진 배양액을 filter paper로 1차 여과한 후, 다시 0.45 μm filter를 이용한 2차 여과로 얻은 순수한 배양액을 각각 농도별(1, 10, 20, 40, 60, 80, 100% with sterile distilled water)로 희석한 후 항진균 활성에 이용하였다.

식물병원균과 배양

항진균 활성 검정을 위한 토마토 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea* T3-4), 고추 탄저병균(*Colletotrichum acutatum* 15AS32), 고추 역병균(*Phytophthora capsici* P13-1), 딸기 탄저병균(*Colletotrichum fructicola* CGF160401), 토마토 균핵병균(*Sclerotinia sclerotiorum* 11-49)은 충북대학교 식물진균병학 연구실에서 분양 받았으며, 이들 균주들은 PDA 배지에 접종하고 *P. capsici* P13-1는 22℃, 나머지 균주는 25℃ 조건으로 배양하여 실험에 사용하였다. 항세균 활성 검정에 이용된 토마토 궤양병균(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* LMG 7333)은 충북대학교 식물세균병학 연구실에서 분양받아 King's B 배지(2% proteose peptone no.3, 1% glycerol, 0.15% K_2HPO_4, 0.15% $MgSO_4{\bullet}7H_2O$, pH 7.4)에서 27℃ 조건으로 배양하면서 실험에 사용하였다.

항진균 활성 검정

PDA 배지에서 5일간 배양한 식물병원균 균총의 가장자리를 cork borer를 이용하여 6 mm로 자른 후, 새로운 PDA 배지(pH 5.6) 중앙을 기준으로 15 mm 좌측에 접종하고, 우측 15 mm에 PDA 배지에서 7일간 배양한 곤충병원성 곰팡이 균주의 가장자리 6 mm 균총을 접종하였다. 접종 후, 25℃, 암 조건에서 4일간 배양하여 형성되는 inhibition zone의 크기를 측정하였다. 곤충병원성 곰팡이 균주 배양액의 항진균 활성 검정은 PDA 배지에서 식물병원성 진균을 배양하고 포자형성을 유도한 후, 곰팡이 표면을 긁어 수확된 포자를 10% PDB 배지를 이용하여 포자현탁액을 만들었다. 수거한 포자현탁액을 멸균된 거즈를 이용하여 균사를 제거하였으며, 포자를 hemocytometer로 계수하고 2 X PDB 배지(pH 5.6)를 이용하여 약 2×10^4 conidia/mL이 되도록 조절한 후, 96 well plate에 100 uL 접종하였다. 접종 후, 100% 곰팡이 배양액과 멸균수로 희석한 1%, 10% 배양액을 100 μL씩 접종하고, 22℃, 암조건에서 48시간 배양 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 식물병원균의 생장을 관찰하였다. 대조구는 배양액 대신 100 μL의 멸균수를 사용하였다.

항세균 활성 검정

대치배양 검정은 PDA 배지에서 7일간 배양한 곤충병원성 곰팡이 균주 균총의 가장자리를 cork borer를 이용하여 6 mm로 자르고 새로운 PDA 배지 양쪽 가장자리에 접종하여 2일간 25℃, 암조건에서 배양하였다. 2일 후, King's B 배지에서 배양한 *C. michiganensis* subsp. *michiganenesis* 현탁액(1×10^8 CFU/mL)을 도말 막대를 사용하여 곰팡이를 접종한 배지 중앙에 도말하고, 25℃, 암 조건에서 3일간 배양하여 형성되는 inhibition zone의 크기를 측정하였다. 곤충병원성 곰팡이 균주 배양액의 항세균 활성 검정은 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*를 배양하면서 KB 배지(pH 7.4)에서 650 nm로 흡광도(O.D)를 측정하여 균수를 약 1×10^8 CFU/mL이 되도록 배양한 후, 2 X KB 배지(pH 7.4)를 이용하여 약 5×10^5 CFU/mL로 조절한 뒤 96 well plate에 100 μL를 접종하였다. 접종 후, pH 7.4로 조절한 100% 곰팡이 배양액과 멸균수로 희석한 1%, 10% 배양액을 100 uL씩 각각 접종하고 27℃에서 36시간 배양 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 배양액 대신 100 μL의 멸균수를 사용하였다.

데이터 분석

항균활성은 SPSS ver. 24 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 분석하였다. 데이터는 일원분산분석(ANOVA)으로 수집하였고, 그룹 간의 비교는 Tukey's studentized range (honestly significant difference)로 수행하였다. 자료는 평균 ± 표준오차(SE)로 표시하였고, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 설정하였다.

결과

효율적 배양 배지 선발

높은 살충력 및 항진균 활성을 가진 4가지 곤충병원성 곰팡이 균주들의 효율적인 배양 배지를 선발하기 위해서, 일반적으로 많이 이용되는 PDB, SDB, GY, Adamek's 배지에 각각의 병원성 곰팡이를 배양하여 배지별 출아포자의 생산량과 항진균 활성을 비교 평가하였다. 그 결과, 배지에 따라 출아포자 생산량과 항진균 활성의 차이를 확인할 수 있었으며(Figs. 1, 2), 점박이응애 병원성 곰팡

이의 경우에 있어 출아포자 생산량은 *M. anisopoliae* 4-2의 경우 GY 배지와 Adamek's 배지에서 모두 큰 증대와 더불어 비슷한 포자 생산량을 보였으나, *B. bassiana* 2R-3-3-1의 경우는 GY 배지보다 Adamek's 배지에서 더 높은 포자 생산량을 보였다(Fig. 1A). 그러나 배양액의 항진균 활성 결과에서는 이와는 다르게 PDB 배지와 SDB 배지에서 보다 높은 활성을 보였으며, Adamek's 배지의 경우는 항진균 활성이 크게 낮아졌다(Fig. 2A). 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이는 *M. anisopliae* SD3와 *B. bassiana* SD15 두 균주 모두 SDB, PDB, GY, Adamek's 배지 순으로 포자 생산량이 증가하였으며(Fig. 1B), 항진균 활성은 *M. anisopliae* SD3의 경우 모든 배양액에서 매우 높은 항진균 활성을 보였으나, *B. bassiana* SD15의 경우에는 GY 배지에서 농도에 비례하여 항진균 활성 또한 낮아지는 경향을 보였고, Adamek's 배지 배양액의 경우는 활성이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 2B). 4개 균주의 포자 생산량과 항진균 활성을 종합한 결과, *B. bassiana* SD15를 제외한 다른 균주들은 포자 생산량의 향상을 보이면서 높은 항진균 활성을 보인 GY 배지를, 그리고 *B. bassiana* SD15의 경우 포자생산량은 높지 않지만 높은 항진균 활성을 보인 PDB 배지를 최적 배지로 선택할 수 있었다.

항진균 활성 검정

잿빛곰팡이병균에 대한 항진균 활성이 검증된 4가지 곤충병원성 곰팡이의 식물병에 대한 적용 범위를 확대하고자, 여러 가지 다른 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성을 검정하였다. 그 결과, 점박이응애 병원성 곰팡이 중 *M. anisopliae* 4-2는 *P. capsici*와 *Colletotrichum fructicola*에 대해서는 항진균 활성을 나타내지 못 하였고, *C. acutatum*과 *S. sclerotiorum*에 대해서는 0.5~1.4 mm 내외의 낮은 항진균 활성을 보였다(Fig. 3). *Beauveria bassiana* 2R-3-3-1은 *S. sclerotiorum*과 *C. acutatum*에 대해 높은 항진균 활성을 나타냈으나, *C. fructicola*와 *P. capsici*에는 높은 활성을 보이지 않았다(Fig. 3). 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 중 *M. anisopliae* SD3가 모든 식물병원균에 항진균 활성을 나타내었으며, 특히 *P. capsici*과 *C. acutatum*에 대해 매우 높은 항진균 활성을 보였다(Fig. 4). *Beauveria bassiana* SD15

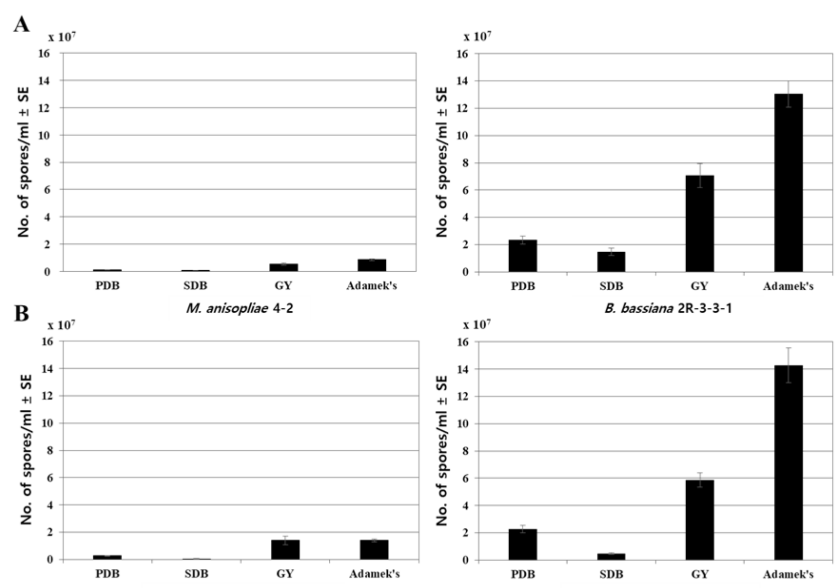

Fig. 1. Comparison of blastospore yields for 4 entomopathogenic fungi by each medium. A, mite-pathogenic fungi; B, aphid-pathogenic fungi. Vertical bars correspond to standard error (SE).

의 경우에는 *M. anisopliae* 1-5와 비교하였을 때, *C. acutatum*, *P. capsici* 및 *C. fructicola*에는 낮은 항진균 활성을 보였고, *S. sclerotiorum*에 대해서는 비교적 높은 항진균 활성을 나타내었다(Fig. 4). 4개 균주 모두 *C. acutatum*과 *S. sclerotiorum*에 대해서는 항진균 활성을 나타냈으나, *P. capsici*와 *C. fructicola*에 대해서는 *M. anisopliae* SD3가 *P. capsici*에 대한 7.7 mm의 높은 항진균 활성을 나타낸 것을 제외하고는 낮은 활성을 보이거나 활성이 없었다.

대치 배양에 의한 결과를 기초로 배양액에 의한 항진균 활성을 *C. fructicola*와 *C. acutatum*에 대하여 추가 검정한 결과, 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이인 *B. bassiana* SD15를 제외한 모든 배양액의 항진균 활성은 농도가 높을수록 활성이 증가되었으며, 1% 농도에서는 거의 활성을 보이지 않았다

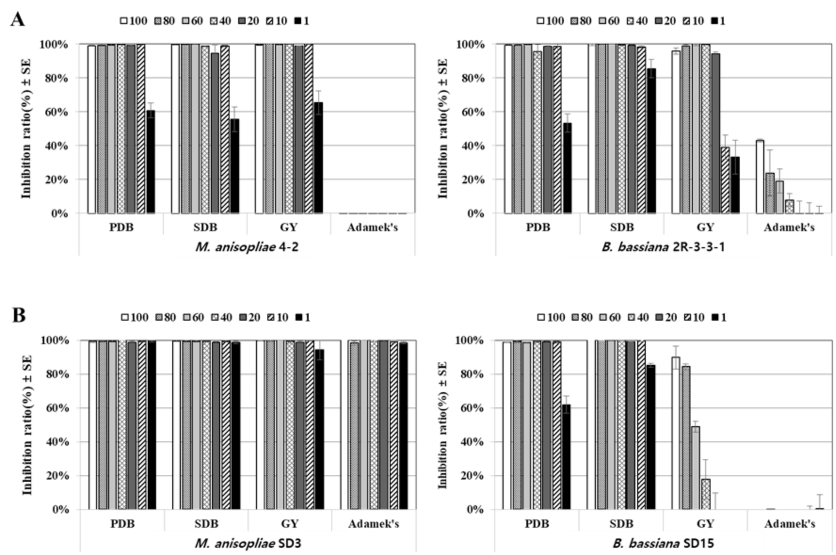

Fig. 2. Antifungal activities of fungal culture filtrates from 4 entomopathogenic fungi by each medium. A, mite-pathogenic fungi; B, aphid-pathogenic fungi. Vertical bars correspond to standard error (SE).

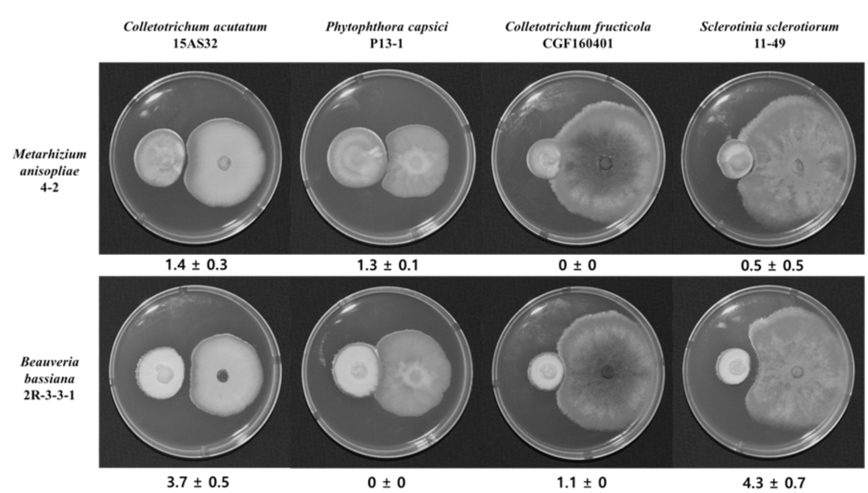

Fig. 3. Representative antifungal activities of mite-pathogenic fungi against phytopathogenic fungi on potato dextrose agar plates. Entomopathogenic fungi were placed at right side on each plate. The values of clear zone are described below each plate (mm ± SE).

(Fig. 5). 대치배양과 배양액의 항진균 활성을 비교하였을 때, 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이인 *B. bassiana* SD15는 균주의 대치배양 결과(Fig. 4)와 같이 항진균 활성을 나타내지 않았으나, 그와 반대로 점박이응애 병원성 곰팡이인 *M. anisopliae* 4-2는 균주의 대치배양 결과(Fig. 3)와 다르게 항진균 활성을 나타내었다. 균주의 항진균 활성 결과로는 *M. anisopliae* SD3와 *B. bassiana* 2R-3-3-1가 비슷한 항진균 활성을 보였지만(Figs. 3, 4), 배양액의 항진균 활성에서는 상당한 차이를 보였다(Fig. 5).

항세균 활성 검정

식물병원성 진균 외에 세균에 대한 항균활성을 검정하기 위하여 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 에 대한 활성을 검정한 결과, *M. anisopliae*와 *B. bassiana* 간에 항세균 활성의 차이가 명확히 나타났

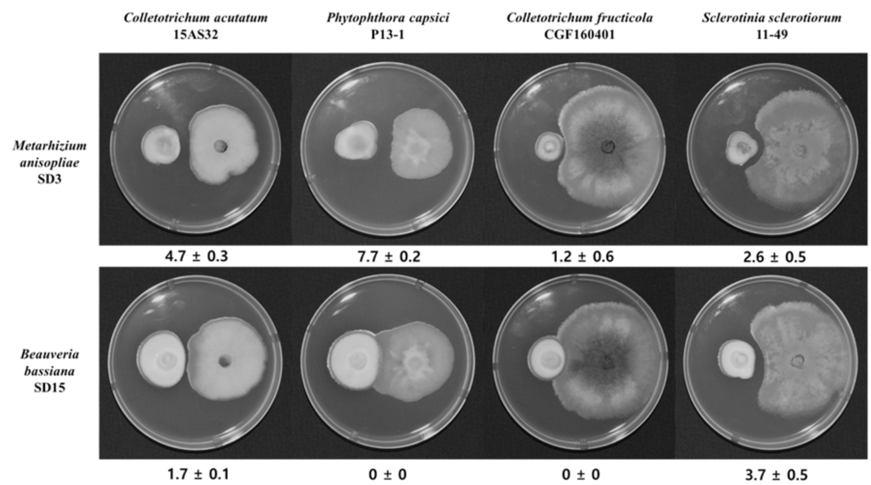

Fig. 4. Representative antibacterial activities of aphid-pathogenic fungi against phytopathogenic fungi on potato dextrose agar plates. Entomopathogenic fungi were placed at right side on each plate. The values of clear zone are described below each plate (mm ± SE).

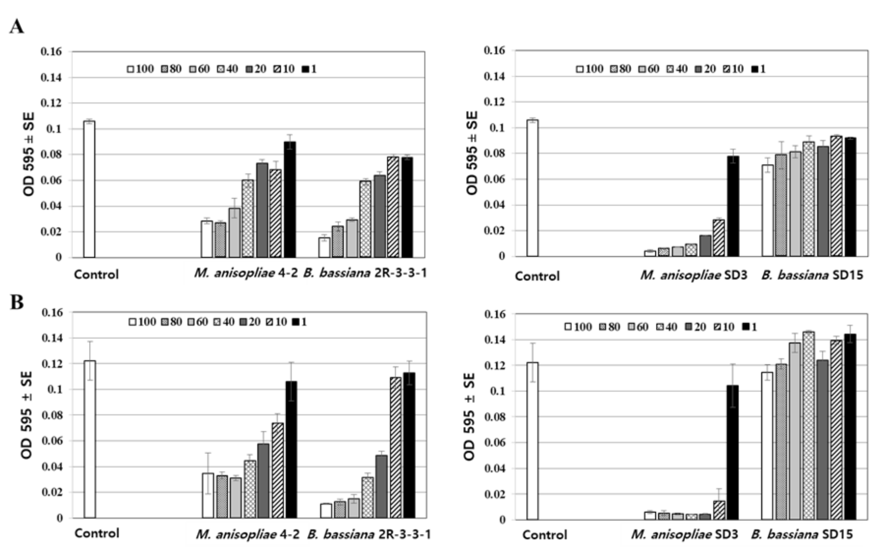

Fig. 5. Antifungal activities of fungal culture filtrates of entomopathogenic fungi against *Colletotrichum fructicola* (A) and *Colletotrichum acutatum* (B) for 24 hr. Vertical bars correspond to standard error (SE).

다(Fig. 6A). *Metarhizium anisopliae* 4-2와 *M. anisopliae* SD3의 경우 각각 11.5 mm와 14.5 mm의 높은 항세균 활성을 보였으나, *B. bassiana*의 경우 SD15, 2R-3-3-1 균주 모두 활성이 나타나지 않았다(Fig. 6A). 항세균 활성을 *B. cinerea*의 항진균 활성과 비교하였을 때, 항진균과 항세균 활성의 연관성은 확인되지 않았다. 배양액의 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*에 대한 항세균 활성을 검정한 결과, 점박이응애 병원성 곰팡이 배양액의 경우, *M. anisopliae* 4-2가 100% 배양액에서 낮은 항세균 활성을 보였으며, 낮은 농도에서는 활성을 나타내지 않았다(Fig. 6B). 복숭아혹진딧물 병원성 곰팡이 배양액의 경우 *M. anisopliae* SD3는 100%와 10% 배양액에서 항세균 활성을 나타내었으며(Fig. 6B), *B. bassiana* SD15의 경우 100%에서는 중간의 항세균 활성을 보였고, 낮은 농도의 배양액은 항세균 활성을 나타내지 않았다. 균주와 배양액의 항세균 활성을 비교하였을 때, 균주에서 높은 항세균 활성을 보였던 *M. anisopliae*도 배양액에서는 높은 항세균 활성을 나타내지 않았다.

고찰

친환경적 방제를 위한 생물적 수단 중의 하나인 곤충병원성 곰팡이는 다른 방제제에 비해서 특히, 난방제 흡즙성 해충에 대해 효과적으로 이용되어 많은 연구 개발과 더불어 다양한 상품의 개발이 이루어지고 있다[5, 10]. 곤충병원성 곰팡이의 대상이 되는 대표적인 난방제 흡즙성 해충으로는 점박이응애, 복숭아혹진딧물, 목화진딧물, 온실가루이 등이 있다. 본 연구에서 대상으로 한 4가지 곤충병원성 곰팡이는 이러한 난방제 해충인 점박이응애와 복숭아혹진딧물에 대해 높은 병원성 및 환경 안정성 그리고 나아가 식물병원성 진균인 잿빛곰팡이병균에 대해 효과적인 균주들로서 그 유용성은 이미 앞서의 연구를 통해 보고하였다[3, 8]. 최근 세계적으로 곤충병원성 곰팡이가 해충뿐만 아니라 식물병원균에 대해서도 방제효과를 가진다는 연구가 진행되면서, 많은 연구들을 통하

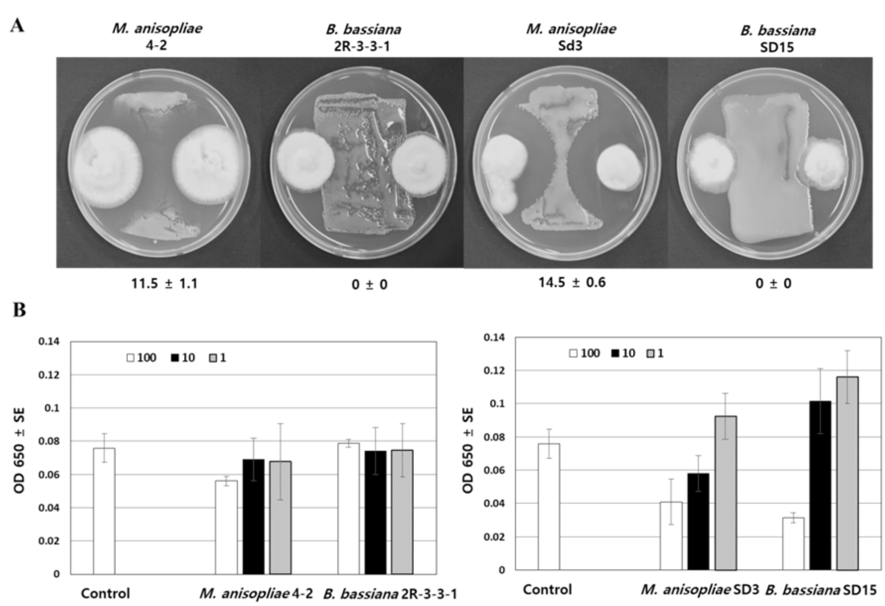

Fig. 6. Representative antibacterial activities of entomopathogenic fungi against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Antibacterial activities were measured on potato dextrose agar plates (A) and using fungal culture filtrates (B). Entomopathogenic fungi were placed at both sides on each plate. The values of clear zone are described below each plate (mm ± SE). Vertical bars correspond to standard error (SE).

여 곤충병원성 곰팡이가 해충과 식물병에 대해 동시 방제 능력을 가지는 것으로 보고되고 있다[3, 6, 7, 11, 12]. 일반적으로 곤충병원성 곰팡이의 포자 생산은 두 가지 방법이 이용되는데, 고체 배양을 통한 aerial conidia 그리고 액체 배양을 통한 출아포자의 생산 방법이 있다. Aerial conidia의 경우 부적절한 환경 조건에서 출아포자에 비해 더욱 안정적으로 존재할 수 있기 때문에 일반적으로 이용되는 살충제의 소재로 이용되고 있으며, 그 생산을 위해서는 액체 배양을 통한 1차 배양 후에 최소 10일 이상의 고체 배양을 통해 얻을 수 있다. 그에 비해 출아포자의 경우에는 3~4일의 짧은 배양 기간만으로도 생산이 가능한 반면 안정성이 낮다는 이유로 살충제의 소재로써 부적절한 것으로 평가되고 있었으나 최근 제제화 공정을 통해 안정성을 높일 수 있게 되면서 살충제 개발의 새로운 소재로 부각되고 있다[10, 13]. 또한 액체 배양을 통한 출아포자의 생산 과정 중에는 살충 활성 및 살균 활성 등 다양한 활성을 지닌 여러 가지 대사산물의 생산이 동시에 이루어짐으로써 출아포자와 함께 다양한 이용에 대한 관심이 높아지고 있다[10, 13-15].

본 연구에서는 국내에서 보고된 이들 4가지 곤충병원성 균주들의 효율적인 배양 배지 선발과 동시에 식물병원균에 대한 확대 적용 가능성을 검정하여 이들 균주들의 유용성을 더욱 높이고자 하였다. 효율적인 배양 배지 선발을 위하여 일반적으로 많이 이용되는 4가지 배지를 대상으로 살충성의 원인이 되는 포자 생산능력과 더불어 배양액에 의한 항진균 능력을 동시에 비교 평가하였다. 그 결과 배지에 따라 포자생산능력과 배양액에 의한 항진균 활성은 다양하게 나타났으며(Figs. 1, 2) 최종적으로 GY 배지와 PDB 배지를 선발할 수 있었다. 출아포자 생산량의 경우 탄소원과 질소원의 함량 차이에 따라 다를 수 있으며[16], 여러 대사산물의 생산 또한 균주마다 배지에 따른 차이를 보이므로[10] 균주별 최적 조건 탐색이 필요하다는 기존의 연구와 일치하는 결과였다[17].

난방제 흡즙성 해충의 방제에 효과적으로 이용되고 있지만 곤충병원성 곰팡이는 실제 환경에서 적용할 때 발아를 위해서 높은 습도조건이 필요하다는 치명적인 단점이 존재한다[18]. 이러한 높은 습도의 요구는 곤충병원성 곰팡이뿐만 아니라 흰가루병이나 잿빛곰팡이병과 같은 식물병원성 곰팡이에 대해서도 발병력을 높일 수 있기 때문에, 식물병의 발생이라는 부작용이 있을 수 있다[19]. 따라서, 곤충병원성 곰팡이가 해충과 식물병에 대해서 동시에 높은 방제 능력을 지닌다면 높은 습도로 인한 식물병의 발생 문제도 극복할 수 있을 것이며, 작물보호제로서 좋은 대안이 될 수 있을 것이다. 그에 따라 잿빛곰팡이병균에 대해 활성이 검정된 4가지 균주에 대해 그 적용범위의 확대를 위하여 4가지의 주요 식물병원성 진균과 더불어 식물병원성 세균에 대해서 항균능력을 검정하였다. 그 결과 4가지 곤충병원성 곰팡이 균주에 따라 식물병원성 진균과 세균에 대해 서로 다른 확대된 항균 능력을 보여주었다(Figs. 3-6). 이러한 결과는 이들 4가지 균주가 잿빛곰팡이병균을 대상으로 선발되었으나 그들의 항균활성물질이 서로 다르며 그에 따라 서로 다른 항균활성을 보인 것으로 여겨진다. 곤충병원성 곰팡이의 항진균 활성에 대한 이전 연구들에 따르면, *Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp., *Metarhizium* spp.가 해충에 대한 살충성과 더불어 *B. cinerea*, *Fusarium* spp., *Phytophthora megasperma*, *Podoshaea fuliginea*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Verticillium dahliae* 등 식물병원균에 대해서도 항균활성을 지닌다고 보고되었다[3, 6, 7, 11, 12, 20, 21].

이상의 연구 결과를 통해 점박이응애와 복숭아혹진딧물 그리고 잿빛곰팡이병균에 효과적인 4가지 곤충병원성 곰팡이 균주들의 출아포자 및 배양액의 효율적인 배양 배지를 선발할 수 있었으며, 또한 이들 곰팡이 균주들의 다른 식물병원성 진균 및 세균에 대해서도 항균활성을 가짐이 확인

됨으로써 이들 균주들을 이용한 효율적인 친환경 작물보호제의 개발이 기대된다.

적요

점박이응애와 복숭아혹진딧물 그리고 잿빛곰팡이병균에 대해 우수한 살충 및 항균활성을 지닌 4가지 곤충병원성 곰팡이에 대해 효율적인 배양 배지 선발 및 다른 식물병원균에 대한 항균활성을 검정하였다. 효율적인 배지 선발은 출아포자 생산량과 배양액의 항진균활성 검정을 통해 선발하였으며, 그 결과 *Beauveria bassiana* 2R-3-3-1, *Metarhizium anisopliae* 4-2, SD3의 경우 GY배지가, *B. bassiana* SD15의 경우에는 PDB 배지가 적절한 배지로 선발되었다. 다른 식물병원균에 대한 항균활성 검정 결과, 4개 균주 모두 *Colletotrichum acutatum*과 *Sclerotinia sclerotiorum*에 대해서는 항진균 활성을 보였으나, *Phytophthora capsici*와 *Colletotrichum fructicola*에 대해서는 *M. anisopliae* SD3만 *P. capsici*에 대해 높은 항진균 활성을 나타내었고 다른 균주들의 활성은 미미하였다. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*에 대한 항세균 활성은 *Metarhizium*속의 2균주는 높은 활성을 보였으나 *Beauveria*속의 2 균주들은 활성을 보이지 않았다. 이상의 결과로 해충방제에 효과적인 곤충병원성 곰팡이가 다양한 식물병원균에 대해서도 효과적인 방제제로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (115086-2).

REFERENCES

1. Hajek AE, St Leger RJ. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annu Rev Entomol 1994;39:293-322.
2. Milner RJ. Prospects for biopesticides for aphid control. Entomophaga 1997;42:227-39.
3. Shin TY, Bae SM, Kim DJ, Yun HG, Woo SD. Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopathogenic fungi against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Mycoscience 2017;58:204-12.
4. Lacey LA, Frutos R, Kaya HK, Vail P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? Biol Control 2001;21:230-48.
5. de Faria MR, Wraight SP. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol Control 2007;43:237-56.
6. Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecol 2009;2:149-59.
7. Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. In: Roy HE, Vega FE, Chandler D, Goettel MS, Pell J, Wajnberg E, editors. The ecology of fungal entomopathogens. Dordrecht: Springer; 2009.

p. 113-28.
8. Yun HG, Kim DJ, Gwak WS, Shin TY, Woo SD. Entomopathogenic fungi as dual control agents against both the pest *Myzus persicae* and phytopathogen *Botrytis cinerea*. Mycobiology 2017;45:192-8.
9. Yun HG, Kim DJ, Lee JH, Ma JI, Gwak WS, Woo SD. Comparative evaluation of conidia, blastospores and culture filtrates from entomopathogenic fungi against *Tetranychus urticae*. Int J Indust Entomol 2017;35:58-62.
10. Yoon HG, Shin TY, Yu MR, Lee WW, Ko SH, Bae SM, Choi JB, Woo SD. Characterization of entomopathogenic fungus from *Trialeurodes vaporariorum* and evaluation as insecticide. Korean J Microbiol 2013;49:64-70.
11. Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. J Invertebr Pathol 2008;98:256-61.
12. Shin TY, Bae SM, Woo SD. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. J Asia Pac Entomol 2016;19:1053-9.
13. Jackson MA, Payne AR, Odelson DA. Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. J Ind Microbiol Biotechnol 2004;31:149-54.
14. Jackson MA, Mcguire MR, Lacey LA, Wraight SP. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycol Res 1997;101:35-41.
15. Vega FE, Jackson MA, McGuire MR. Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Mycopathologia 1999;147:33–5.
16. Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. World J Microbiol Biotechnol 2003;19:363-8.
17. Campos RA, Arruda W, Boldo JT, da Silva MV, de Barros NM, de Azevedo JL, Schrank A, Vainstein MH. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. Curr Microbiol 2005;50:257-61.
18. Drummond J, Heale JB, Gillespie AT. Germination and effect of reduced humidity on expression of pathogenicity in *Verticillium lecanii* against the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. Ann Appl Biol 1987;111:193-201.
19. Jandricic SE, Filotas M, Sanderson JP, Wraight SP. Pathogenicity of conidia-based preparations of entomopathogenic fungi against the greenhouse pest aphids *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, and *Aulacorthum solani* (Hemiptera: Aphididae). J Invertebr Pathol 2014;118:34-46.
20. Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. Biol Control 2007;40:327-32.
21. Lozano-Tovar MD, Ortiz-Urquiza A, Garrido-Jurado I, Trapero-Casas A, Quesada-Moraga E. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil-dwelling pest and soil-borne pathogens of olive. Biol Control 2013;67:409-20.