

*Metarhizium anisopliae*의 *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* 등에 대한 항진균활성

강선철* · 박영구 · 이동규 · 김용현¹
대구대학교 생물공학과
¹농업과학기술원 생물자원부

Antifungal Activities of *Metarhizium anisopliae* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria solani*

Sun Chul Kang*, Young Goo Bark, Dong Gyu Lee and Yong Heon Kim¹

Department of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan, Kyungbook 713-714, Korea

¹Division of Bio-resources, Agricultural Science and Technology Institute, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: This study was conducted to find out antifungal activities of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, against phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*. *M. anisopliae* was confirmed its antagonistic effect through mycelial inhibition zone of phytopathogenic fungi by culture filtrate of the antagonist. The filtrate (30%: v/v) inhibited the conidial germination of *B. cinerea* and *F. oxysporum* to 21.5% (control: 88.2%) and 53.0% (control: 78.6%), respectively and delayed the start of spore germination about 8 hours. Microscopic observations proved that the addition of 10% culture filtrate of *M. anisopliae* restricted the growth of phytopathogenic fungus, *F. oxysporum*, to the formation of chlamydospore. From these results, we concluded that an addition effect of the filtrate from *M. anisopliae* on culturing *F. oxysporum* was fungistatic.

KEYWORDS: Antifungal activities, Phytopathogenic fungi, Entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*

진균감염에 의해 발생하는 농작물의 피해는 약 15~20%를 차지하며, 병해의 70~80%를 차지한다(황, 1985). 이들 진균은 대부분 토양에 존재하며 식물과의 직접적인 접촉, 혹은 이미 감염된 식물의 종자를 통해 감염된다. 식물병원균의 방제법으로는 토양에 존재하는 진균을 혼종을 통하여 살균하는 방법, 종자감염을 방지하기 위한 종자소독법, 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제법, 식물에 직접 살균제를 살포하여 감염을 예방하거나 치료하는 방법 등이 있지만 살균제의 살포가 가장 보편화 되어 있다(Mandeel 등, 1993; Paulitz 등, 1987; Sutton 등, 1993). Benzimidazole계와 dicarboximide계 등의 대부분의 살균제는 유기합성

에 의해 제조되며, 비대상 생물에 대한 약해가 심하고, 또한 방제후에도 잘 분해되지 않고 토양에 오래 잔류하기 때문에 환경오염과 토양오염의 중요한 원인이 되고 있다(Burpee 등, 1984). 최근에는 오랜 사용으로 인한 내성균주들의 출현이 보고되고 있다(김 등, 1995). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 개발된 가장 효과적인 방제법은 길항미생물 혹은 이들이 생성하는 항생물질을 이용하는 생물학적 방제법이다(Mandeel 등, 1993; Omura 등, 1988; Sutton 등, 1993; Yoshie 등, 1993).

한편 *Metarhizium anisopliae*는 곤충병원성 곰팡이의 한 종류로 버섯구, 진딧물, 좀 등 다양한 종류의 해충에 감염하여 이들을 치사시킬 수 있는 능력이 있다(Leger 등, 1987; Moorhouse 등, 1993).

*Corresponding author

지금까지 알려진 곤충병원성 곰팡이는 *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thonysonii* 등을 포함하여 약 400여종이 된다(Mittler 등, 1987). 특히 *Metarhizium anisopliae*는 *Beauveria bassiana*와 함께 많은 종류의 해충에 대하여 강한 살충효과를 나타내기 때문에 살충제로 개발되어 사용되고 있다(Knudsen 등, 1991). 그러나 아직까지 *M. anisopliae*의 식물병원균 *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *A. solani* 등에 대한 항진균 효과에 대해서는 보고되지 않고 있다. 따라서 본 논문에서는 *M. anisopliae*의 식물병원균에 대한 항진균활성을 새로이 검정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시식물병원균

실험에 사용한 식물병원균 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *B. cinerea*, *A. solani* 등은 토마토로부터 분리한 균을 농업과학기술원 세포유전과에서 분양받아 사용하였으며, 백선균인 *Microsporium gypseum*은 영남대학교 의과대학 부속병원 피부과에서 내원환자로부터 분리한 균을 분양받아 사용하였다. 이들 진균의 배양은 Potato dextrose agar (PDA, potato 200 g, Bacto dextrose 20 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water; Difco Laboratories, USA) 배지를 이용하였다.

곤충병원성진균의 배양 및 식물병원균에 대한 항균력 조사

곤충병원성진균인 *M. anisopliae*(ATCC 20500)의 배양은 YPD agar 배지(yeast extract 10 g, peptone 10 g, dextrose 2.5 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water)를 사용하여 3~5일간 배양하였다. 식물병원균에 대한 *M. anisopliae*의 항진균활성을 검정하기 위하여 PDA 배지가 들어있는 petri dish에 *M. anisopliae* 균총(직경 5 mm)을 접종하고 이로부터 2 cm 떨어진 곳에 시험균주의 균총(직경 5 mm)을 접종하여 25°C의 항온배양기에서 4일동안 배양하였다. 이때 *M. anisopliae*에 의해 식물병원균의 균사생장저해가 일어나는 정도

로써 항진균활성을 검정하였다. 또한 *M. anisopliae*의 배양액을 이용한 inhibition rate 실험에서는 *M. anisopliae*를 최적생장조건(25°C, pH 6.5)에서 6일간 진탕배양한 후 원심분리하여 상등액을 얻고 이를 filtration(pore size: 0.45 μ m)하여 균체를 완전히 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 filtrate 10 ml을 멸균된 PDA 배지 90 ml에 섞은 후 적당량 petri dish에 분주하여 굳혔다. 여기에 PDA 배지에서 3일간 전배양한 식물병원균의 균총을 접종하여 25°C 항온배양기에서 4~6일간 배양한 후 균총의 직경을 측정하였으며 한편으로는 *M. anisopliae*의 배양여액을 첨가하지 않고 배양한 식물병원균의 균총직경을 따로 측정하여 이 둘을 비교하여 항진균활성을 결정하였다. 이상의 실험은 3회 반복 수행하였으며, 이때의 항진균효과(%)는 $\{1 - [\text{균총직경(PDA+배양액)}/\text{균총직경(PDA)}]\} \times 100$ 로 표시하였다.

초기 pH 변화와 항진균활성 조사

*M. anisopliae*의 초기 pH 변화에 따른 균체생장과 항진균활성의 변화를 알아보기 위하여 1M의 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 3.0~10.0으로 조절한 30 ml YPD 배지가 든 100 ml의 삼각플라스크를 준비하여, 여기에 YPD배지에서 전배양한 *M. anisopliae* 1 ml을 접종한 다음 25°C, 120 rpm의 동일한 조건으로 6일간 배양하여 원심분리한 후 균체와 상등액을 분리하였다. 이때 얻어진 원심상등액은 filtration 하여 pH를 측정하고 다음, ethyl acetate로 추출하여 유기용매층을 분리 건조하였다. 이것을 1 ml의 ethyl acetate에 다시 녹여 직경이 0.5 cm인 filter paper에 각각 30 μ l씩 흡착하여 유기용매를 완전히 증발시켰다. 이렇게 준비된 filter paper를 시험공시균이 도포된 PDA배지 위에 올려놓고 25°C의 항온배양기에서 3~4일간 배양하여 filter paper 주위에 생긴 투명대를 확인하여 항진균활성을 결정하였다. 또한 원심분리 후 얻어진 균체는 냉동건조기로 수분을 완전히 제거한 후 무게를 측정하였다.

분생포자 발아율 조사

위에서 준비한 배양여액을 5 ml의 PDB배지가

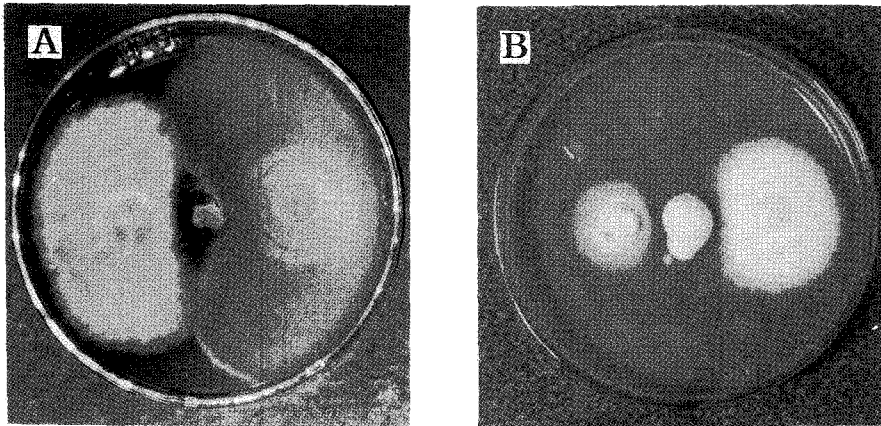


Fig. 1. *In vitro* antagonism assay. A mycelial plug of *Metarhizium anisopliae* was placed on the center of potato dextrose agar (PDA) plate and surrounded by mycelial plugs of *A. solani*, *B. cinerea*, *M. gypseum*, and *F. oxysporum* at given distance (2 cm) from the center.

A. *Alternaria solani* (left), *Metarhizium anisopliae* (center), and *Botrytis cinerea* (right)

B. *Microsporium gypseum* (left), *Metarhizium anisopliae* (center), and *Fusarium oxysporum* (right)

Table 1. Inhibition rate of mycelial growth of phytopathogenic fungi with the culture filtrate of *M. anisopliae*

Phytopathogenic fungi \ Media	Inhibition rate			
	PDA	SDA	TSA	LB
<i>Botrytis cinerea</i>	10.0	5.4	3.7	18.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	16.5	5.4	5.6	5.3

*Culture media: PDA (potato 200 g, Bacto dextrose 20 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); SDA (neopepton 10 g, dextrose 40 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); TSA (tryptic soy broth 20 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water); LB (trytone 10 g, yeast extract 5 g, sodium chloride 10 g, agar 15 g, and 1 liter of distilled water)

들어있는 시험관에 각각 15%(최종농도: 12 $\mu\text{g/ml}$), 30%(최종농도: 24 $\mu\text{g/ml}$)씩 첨가하고, 여기에 공시 균인 *B. cinerea*(3×10^4 spores/ml)와 *F. oxysporum*(7×10^5 spores/ml)의 포자를 접종하여 25°C, 120 rpm의 조건으로 배양하면서 4시간 간격으로 배양액을 채취하여 포자의 발아율을 조사하였다. 이때 실험적 오차를 최소화하기 위하여 이상의 실험을 동일한 조건에서 3회 반복 실시하여 평균값을 구하였다.

항진균활성에 대한 미세관찰

*M. anisopliae*가 생성, 분비하는 항진균물질이 식물병원성 진균의 포자와 균사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *M. anisopliae*를 6일동안 진탕배양한 후 얻은 배양액 0.5 ml을 식물병원균이 접종된 5 ml의 PDB(Potato Dextrose Broth)배지에 첨가하여 25°C, 120 rpm으로 4일간 동시 배양한 후 균체의 일부를 얻어 lactophenol aniline blue로 염색하여 위상차현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

식물병원성진균에 대한 항진균활성 검증

근충병원성진균 *M. anisopliae*의 식물병원균에 대한 항진균활성을 plate상에서 조사한 결과(Fig. 1A), 잣빛곰팡이병을 일으키는 *B. cinerea*와 검둥근무늬병을 일으키는 *A. solani* 등에 대해서 비교적 강한 항진균활성을 나타내었다. 또한 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum*과 백선균으로 알려진 *Microsporium gypseum*에 대한 길항력도 이들과 비슷한 수준이었다(Fig. 1B). 이것은 *M. anisopliae*가 식물병원성진균 뿐 아니라 인체에 기생하는 피부 사상균에까지 광범위한 항균 spectrum을 갖고 있음을 나타낸다.

지금까지 알려진 식물병원균에 대한 항균기작은 parasitism, antibiosis, competition, induced resistance, lysis 등의 다섯가지가 있다(Howell 등, 1995; Mandeel 등, 1993). *M. anisopliae*의 항균기작을 알아보기 위하여 이 균이 생성하는 배양상등액을 이용하여 다양한 배지조건에서 inhibition rate를 측정 한 결과 Table 1에서 보여주는 바와 같이 *B. cinerea*와 *F. oxysporum*에 모두 저해효과를 보였다. *B. cinerea*는 LB배지에서 18.0%의 저해를 받았지만 TSA배지에서는 3.7%로

아주 약한 저해를 받았다. 반면 *F. oxysporum*은 PDA배지에서 16.5%의 저해를 받았지만 SDA, TSA, LB배지에서는 5.0% 내외의 약한 저해를 받았다. 또한 배양상등액을 100°C로 1시간 이상 가열 하여도 여전히 저해효과(80% 이상)를 보였기 때문에 이 균은 antibiosis에 의해서 항진균작용을 일으 킴을 알 수 있었다. 한편 *M. anisopliae*는 살충기 작과 관련하여 곤충의 외피를 분해하기 위해서 chitinase, chitobiase 등의 효소를 분비하는 것으로 Leger 등이 보고하고 있다(Leger 등, 1991). 그런데 곤충과 마찬가지로 식물병원균도 세포벽(cell wall)의 주성분이 chitin으로 되어 있기 때문에 이 균이 분비하는 곤충외피분해효소들에 의하여 식물 병원균이 용해(lysis)되어 항진균효과를 나타낼 수 도 있다. 만약에 이와같은 lysis 기작에 의해서 항진 균효과를 나타낸다면 이것은 antibiosis와 lysis 기 작이 동시에 작용하는 것으로 생각할 수 있다. 실제로 Di Pietro 등(Di 등, 1993)의 보고에 의하면 *Gliocladium virens*는 병원균의 lysis에 관여하는 endochitinase와 antibiosis에 관여하는 gliotoxin을 동시에 분비하여 이것이 서로 synergistic effect를 나타내어 *Rhizoctonia solani*와 *Pythium ultimum*에 대하여 항진균작용을 나타낸다고 하였 다.

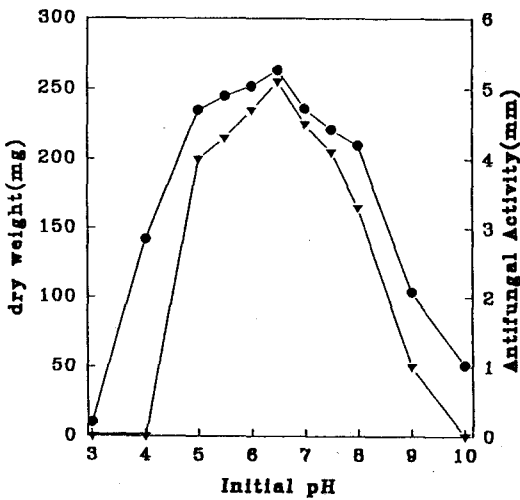


Fig. 2. Effect of initial pHs on antibiotic production of *M. anisopliae* culturing in YPD media for 6 days. Symbols: (●) Dry weight of cell mass (*M. anisopliae*, mg); (▼) Antifungal activity (diameter of inhibition zone, mm)

초기 pH의 변화에 대한 항진균활성 조사

*M. anisopliae*를 pH가 다른 YPD 배지에서 6일 간 배양한 후 균체생장과 항진균활성의 변화를 살펴보면 Fig. 2와 같다. 이 결과에 따르면 *M. anisopliae*는 초기 pH가 6.5일 때 최대균체량과 최대

Table 2. Effect of culture filtrate of *M. anisopliae* on the spore germination of *B. cinerea*

Treatment \ Time (hrs)	% of germination							
	12	16	20	24	28	32	36	40
Control	—	—	7	10.0	22.0	40.3	75.5	88.2
15%	—	—	2	7.5	17.0	20.7	35.5	40.1
30%	—	—	—	—	5.4	9.7	15.5	21.5

control: PDB medium

15%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at the final concentration of 12 µg/ml.

30%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at the final concentration of 24 µg/ml.

Table 3. Effect of the culture filtrate of *M. anisopliae* on the spore germination of *F. oxysporum*

Treatment \ Time (hrs)	% of germination									
	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Control	—	—	8.6	13.0	18.7	25.0	30.4	40.0	56.7	78.6
15%	—	—	—	6.5	22.0	27.0	30.4	41.3	47.8	53.3
30%	—	—	—	—	17.5	20.2	29.5	35.4	40.7	53.0

control: PDB medium

15%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at the final concentration of 12 $\mu\text{g/ml}$.

30%: PDB media supplemented with the culture filtrate of *M. anisopliae* at the final concentration of 24 $\mu\text{g/ml}$.

항진균활성을 보였으며, pH 5.0~7.5 사이에서는 pH 6.5에 비해 80% 이상의 균체량과 항진균활성을 보였다. 반면 pH 3과 9, 10에서는 거의 성장하지 못하였고 항진균활성도 없었다. 이상의 결과를 보아 항진균물질의 생성은 배양액의 초기 pH에 영향을 받고, 또한 균체의 성장과 함께 항진균활성도 증가하는 것으로 판단된다.

분생포자의 발아율

*M. anisopliae*의 항진균효과에 대해서 알아보기 위하여 *M. anisopliae*의 배양여액을 첨가 혹은 첨가하지 않았을 때의 식물병원균의 포자발아율을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보여주는 바와 같이 *B. cinerea*에서는 40시간 경과 후 발아율이 88.2% 였지만 15%, 30%의 *M. anisopliae* 배양여액을 첨가한 경우 각각 40.1%, 21.5%로 발아율이 감소하였다. 뿐만 아니라 초기 발아시간도 15, 30%의 배양여액이 첨가되면 각각 4, 8시간 정도 늦어졌다. *F. oxysporum*의 경우(Table 3)에도 15%~30%의 *M. anisopliae* 배양여액을 첨가하면 40시간 이후에 포자발아율이 50.0% 내외였지만 대조구는 계속해서 포자발아율이 증가하여 48시간에는 최대 78.6%의 발아율을 보였다. 또한 초기 발아시간도 15%, 30% 첨가시 각각 4시간, 8시간씩 늦어지는 것을 볼 수 있었다. 이상의 결과는 *M. anisopliae*의 배양여액이 식물병원균의 분생포자에 대한 발아율저하와 발아개시시간 지연의 효과가 있음을 나타낸다. 이것은 *Penicillium frequentans*가 생성하는 항생물질이 *Monilinia laxa*의 포자발아율을 저해한다는 보고(De 등, 1994)와 *Bacillus subtilis*

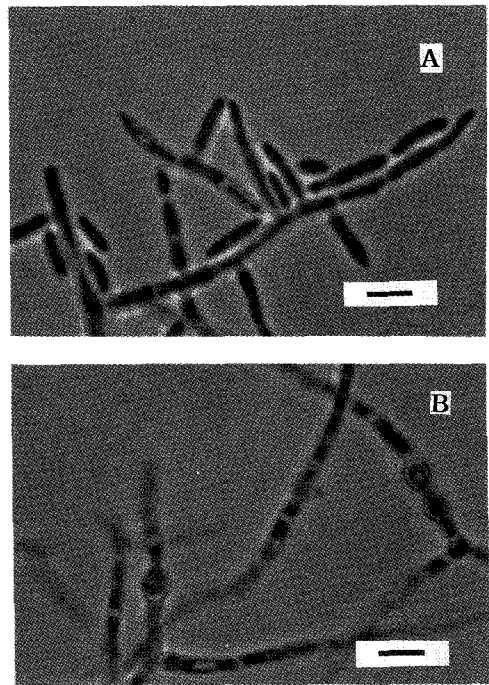


Fig. 3. Chlamydospore formation of *F. oxysporum* induced by culture filtrate of *Metarhizium anisopliae*. (bar=30 μm)

A: PDB medium

B: PDB medium with 10% of culture filtrate of *M. anisopliae*.

YB-70이 생성하는 항생물질이 *Fusarium solani*의 포자발아율을 저해한다는 보고(Kim 등, 1994) 등과 유사한 결과이다.

항진균활성에 대한 미세관찰

시들음병을 일으키는 *F. oxysporum* 균을 10%

의 *M. anisopliae* 배양여액을 첨가하여 4일간 진탕 배양한 후 위상차현미경을 통하여 관찰하면 Fig. 3과 같다. 그 결과에 따르면 정상배양된 균사의 굵기가 10 μm 인데 비해 배양여액 첨가시 부분적으로 20~25 μm 정도로 부풀어 올랐다. 이와같은 균사의 형태변화는 *M. anisopliae* 배양여액에 의한 후막포자(chlamydospore)의 생성에 기인하는 것으로 생각된다. 이상의 결과로부터 *M. anisopliae*가 생성하는 항진균물질은 식물병원균에 대하여 균사의 파괴없이 생장저해만 일으켰기 때문에 fungistatic effect가 있는 것으로 추정된다.

적 요

살충성진균 *Metarhizium anisopliae*가 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*, 잿빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea*, 겹등근무늬병을 일으키는 *Alternaria solani* 등에 대하여 항진균활성을 갖는지 알아보았다. 그 결과 plate상에서 균사 생장저해 실험과 inhibition rate 실험을 했을 때 항진균활성이 검정되었으며 또한 YPD배지에서 배양된 *M. anisopliae*로부터 얻은 배양여액을 식물병원균에 30% 농도로 첨가했을 때 이들의 포자발아율은 *B. cinerea*, *F. oxysporum*에서 각각 21.5%(control: 88.2%), 53.0%(control: 78.6%)로 감소하였으며 발아개시 시간도 8시간 정도 지연되었다. 또한 현미경을 통한 미세구조관찰에서는 10% 배양여액을 첨가했을 때 *F. oxysporum*의 균사로부터 후막포자가 생성되고 생장저해가 일어나는 것이 확인되었다. 이상의 결과로부터 *M. anisopliae*의 항진균활성은 fungistatic effect를 나타냄을 알 수 있었다.

참고문헌

Burpee, L.L. and Goulty, L.G. 1984. Evaluations of fungicides for control of pink and gray snow mold on creeping bentgrass. pp. 6-7, In; Turfgrass Research Annual Report, R.W. Sheard(ed). Univ. of Guelph, Ontario. pp. 38.

- De Cal, A. and Melgarejo, P. 1994. Effect of *Penicillium frequentans* and its antibiotics on unmelanized hyphae of *Monilinia laxa*. *Phytopathology* 84: 1010-1040.
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C.K., Broadway, R.M. and Harman, G.E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83: 308-313.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Kim, Y.S. and Kim, S.D. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biological control agent. *Microbiol. Biotechnol.* 4: 296-304.
- Knudsen, G.R.M., Eschen, D.J., Dandurand L. M. and Wang, Z.G. 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biological fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2864-2867.
- Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1987. Production of cuticle-degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1371-1382.
- Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnlry, A.K. 1991. Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Gen. Microbiol.* 58: 412-426.
- Mandeel, Q. and Baker R. 1993. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 462-469.
- Mittler, T.E., Radovsky, F.J. and Resh, V.H. 1987. Annual review of entomology. Vol. 32. pp. 228-229. Annual Reviews INC

- press.
- Moorhouse, E.R., Easterbrook, M.A., Gillespie, A.T. and Charnley, A.K. 1993. Control of *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) larvae on a range of hardy ornamental nursery stock species using the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. Technol.* **3**: 63-72.
- Omura, S., Tomoda, H., Kimura K., Zhen, D.-Z, Kumagai H., Igarashi K., Imamura, N., Takahashi, Y., Tanaka, Y. and Iwai, Y. 1988. Atpenins, new antifungal antibiotics produced by *Penicillium* sp. (production, isolation, physico-chemical and biological properties). *J. Antibiot.* **41**: 1769-1773.
- Paulitz, T.C., Park, S. and Baker, R. 1987. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* **33**: 349-353.
- Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology* **83**: 615-621.
- Yoshie, Y., Katsushige, I., Yoshihisa, U., Atsuko, O., Kazutoh, T., Ikunoshin, K. and Hiroshin, N. 1993. Isolation, structures, and antifungal activities of new Aureobasidins. *J. Antibiot.* **46**: 1347-1354.
- 황병국. 1985. 식물의학. pp. 295. 탐구당.
- 김병섭, 임태헌, 박은우, 조광연. 1995. Benzimidazole계 및 N-phenylcarbamate계 살균제에 다중 저항성인 잭빛곰팡이균의 발생. *한국 식물병리학회지* **11**(12): 146-150.