

느타리버섯 푸른곰팡이병 저항성 실내검정 방법의 개발

전창성*, 윤형식, 이찬중, 공원식, 정종천, 장갑열
농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과

Development of Effective Screening Method for Resistance of oyster mushroom to *Trichoderma* disease in vitro

Chang-Sung Jhune*, Hyung-Sik Yun, Chan-Jung Lee, Won-Sik Kong, Jong-Chun Cheong, Kab-Yel Jang

Mushroom research Division, Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707, Korea,

(Received August 10, 2011, Revised August 17, 2011, Accepted August 23, 2011)

ABSTRACT: *Trichoderma* disease of oyster mushroom has not been effectively detected in the field for testing its resistance against the disease with its varieties. In this study, we investigated the methods to detect its resistance in the laboratory by using media, which enables us to understand the relevant characteristics (e.g., lysis, toxin enzyme, mycelial growth rate). In coculturing with strains of *Trichoderma* and oyster mushroom, it is possible to observe the difference in the resistance of oyster mushroom against *Trichoderma* with the phenomena of barrage reaction, overgrowth and lysis. We also observed the inhibition of mycelial growth of oyster mushroom using the dilution method with 48-well plate, but could not observed the inhibition of mycelial growth using the filter paper method of cultural supernatant. In simultaneously culturing both *Trichoderma* and oyster mushroom, it was possible to detect the inhibition of the mycelial growth of oyster mushroom, but *Trichoderma* mycelium did not overgrow against oyster mushroom. We found that the pathogenicity was efficient in using solid medium with the phenomena of overgrowth and lysis by inoculating *Trichoderma* on top of mycelia of oyster mushroom. In conclusion, the methods (e.g., coculture method, dilution method with 48-well plate, post-inoculation method) are recommended to detect the resistance of oyster mushroom against *Trichoderma* disease.

KEYWORDS : Myelial growth, Oyster mushroom, *Trichoderma* sp.

서 론

느타리버섯의 푸른곰팡이병은 균사생장 및 버섯발생기를 막론하고 감염되어 균사생장 후 불완전세대대의 푸른색을 띠는 다양한 병원균에 의해 발생하는 병해로 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Penicillium*(Raper, 1948) 등에 의한 것으로 알려져 있다. 주로 *Trichoderma* 속에 속하는 곰팡이균에 의해 느타리버섯 균사재배 및 병재배에서 발생하여 버섯생산량 및 품질에 막대한 피해를 주는 병원균이다. 푸른곰팡이병, Green mold, *Trichoderma* disease 등으로 불리고 있다.

푸른곰팡이병의 병원균인 *Trichoderma*는 일반적인 작물에서는 발생하는 병원균에 기생하거나 독소, 용해, fungistasis 등의 방법(Dennis와 Webster 1971a, 1971b, 1971c)에 의해 병원균을 사멸시키는 특성을 갖고있어 생물적 방제의 도구로서 사용하는 이로운 균으로 알려져 있으며, 주로 버섯병해 방제에 관련한 연구보다는 항균성미생물

및 셀룰로오스 분해효소 생성균 등으로 활용에 관련된 수많은 연구논문들이 해마다 발표되고 있다. 그 외에 해로운 방향으로는 인체와 건물, 버섯재배에서는 피해를 주는 균으로 알려져 있다(Cotxarrera, 2002; Elad, 2000; Ejechi, 1997; Tsrer 2001; Viterbo, 2002; Wheatley, 1997).

버섯 병에 관한 연구는 주로 품종 저항성에 대한 것으로는 우리나라의 703, 705호 품종이 양송이의 마이코곤병(유등, 1979, 1981) 등 몇몇의 병원균에 대한 연구가 되어 왔으며, 외국에서는 90년 중반 이후부터 양송이 부패병(*Verticillium fungicola*) 병원포자의 자실체 갓표면 접종에 의한 품종간 병저항 구분방법(Mamoun, 1995), 표토버섯재배에서의 푸른곰팡이병에 대한 품종적 차이와 시험방법(Ohmasa, 1995), 양송이의 푸른곰팡이병원균 *Trichoderma hazianum* biotype4에 대한 품종별 저항성 검토 결과 Hybrid 백색계통은 수량감소가 96%, Hybrid-off 백색계통은 56~73%, 갈색품종은 8~14% 수확량의 감소(Anderson, 2000)를 보였다는 보고들이 있다. 그러나 느타리버섯의 재배역사가 매우 짧고 초창기의 재배과정에서 푸른곰팡이병을 발생시켰던 병원균들은 병원성이 매우 약해 방제약제보다는 소석회

* Corresponding author <csjhune@korea.kr>

활용으로 방제가 가능했지만 80년대 말부터 *Trichoderma virens*와 *Hypocrea* sp. 등과 같이 강한 병원성을 갖는 새로운 균의 발생으로 그 피해가는 커가고 있으나, 느타리버섯 균과는 관련이 없이 단지 *Trichoderma* 균에 대한 기능에 관련한 연구결과만 보고되어있다. 이들 병원균에 대한 육종적인 측면에서 품종 저항성에 대한 연구는 전무한 실정이다. 특히 버섯재배 포장에서의 품종저항성에 대한 시험은 균사생장과 자실체의 생장에 미치는 환경요인이 다양하고 복잡하여 버섯균의 저항성 유무를 확인하기가 어려운 상태이다. 따라서 실내 한천배지 상에서 푸른곰팡이균의 저해 유무를 확인할 수 있는 실내에서 검정할 수 있는 시험방법을 검토하여 농가 보급 품종에 대한 저항성의 판단유무가 가능 및 적용여부를 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시험방법 및 공시균주

병원균의 특성별 느타리버섯균 균주의 저항성 유무를 효과적으로 잘 판단 할 수있는 시험방법으로 느타리버섯균과 푸른곰팡이균의 대치배양, 배양여액을 이용한 저지원판법, 분리형 petri dish을 이용한 방법, 느타리버섯 균사배양 후 병원균 접종 방법을 사용하고, 느타리버섯은 육성 대표품종에 대하여 시험을 수행하였다.

대치배양

대치배양법은 PDA배지를 사용하여 petri dish의 가장자리에 느타리버섯균을 접종하여 4일간 배양하고 반대의 끝부분에 푸른곰팡이균을 접종한 후에 1-2일 간격으로 느타리버섯균과 푸른곰팡이균의 균사생장정도와 대치선 발생 유무, 푸른곰팡이균의 버섯균에 대한 over growth(OG), 대치과정에서 발생하는 특이적인 현상 등을 조사하였다.

배양여액

배양여액을 이용한 시험에서는 PD배지에 푸른곰팡이균주를 4일간 배양하여 0.27 μ m 여지에 여과하여 멸균하였고, 저지원판법에 활용할 배양여액 희석농도를 정하기 위하여 0, 5, 10, 50 배액으로 검정용 희석 배양여액을 준비하였으며, petri dish당 6개의 멸균된 항생물질 검정용 Filter paper disk(8mm)를 가장자리에 놓고, 그 위에 0.2ml 씩 배양여액을 처리하였으며, 여지 가운데에 느타리버섯균을 접종하여 저지원의 형성정도를 조사하였다. 그러나 이 방법은 효율적 방법이 되지 못하여 48 wellplate를 이용하여 배양여액을 0, 0.1, 0.3 0.5, 0.7, 0.9 1.0ml를 각각의 cell에 넣고 그 곳에 총 1ml가 되도록 0.27 μ m 필터에 여과한 PD배지를 첨

가하고, 그곳에 PD배지에 배양하여 분쇄한 느타리버섯 균주를 0.05ml 씩 접종하여 균사생장정도의 확인 느타리버섯의 균주별 저항성 검정 가능성을 조사하였다.

분할 petri dish

분할 petri dish를 이용한 방법은 한쪽에는 느타리버섯균을 접종하여 3일간 배양하고 다른 한쪽에는 푸른곰팡이균 17균주를 접종한 다음 비닐테이프로 밀봉하여 배양하여 느타리버섯균주의 생장정도를 조사하여 푸른곰팡이균에 의한 fungistasis의 효과의 의한 느타리버섯의 균주별 저항성 검정가능성을 확인하였다.

배양후 접종

배양후 병원균 접종법은 느타리버섯 공시균주를 15일간 배양하여 완전히 자란 느타리균사 위에 배양된 병원균 균주의 4mm 직경의 균총을 접종하여 균사의 용해정도와 over growth의 정도를 조사하였다. 각각의 시험에서는 푸른곰팡이 균주의 침투정도와 Lysis의 가능성을 조사하였다.

결과 및 고찰

대치배양

느타리버섯균에 대한 발생 빈도가 높은 푸른곰팡이병원균 별로 대치배양에 따른 형태적 특징을 구분해보면 다양한 다른 형태를 나타낸다 (Fig. 1, 2). *T. longibrachitum*은 대치현상이 뚜렷하며, 접종 20일후에는 느타리버섯균의 활력 좋은 느타리균이 아주 서서히 over growth 되는 증상이 발생할 수 있으며, *T. hazianum*은 초기에는 *T. longibrachitum*과 유사하나 *Trichoderma virens*는 대치선이 형성되지 않으며, 후기에 느타리균의 over growth 현상보다는 푸른곰팡이균이 over growth되었다. 이런 결과들은 느타리버섯 균주에 의한 저항성유무에 따른 것이기보다는 병원균의 종류에 따라 다

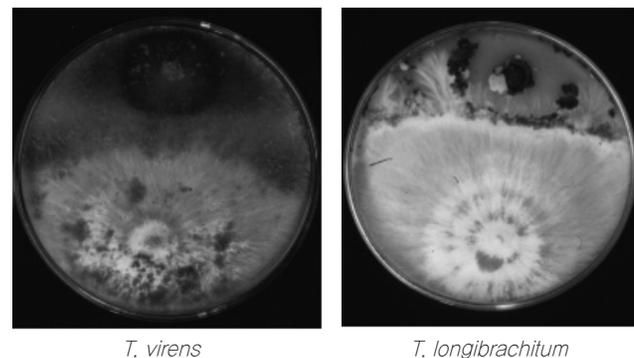


Fig. 1. characteristic of pathogens by co-cultures

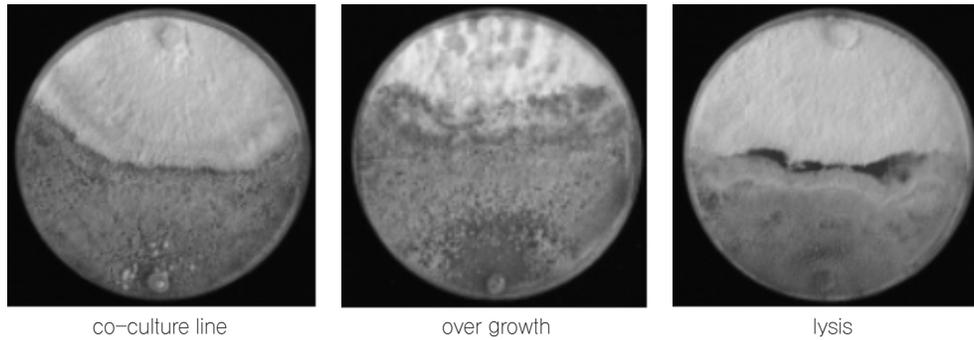


Fig. 2. The appearance of co-culture with mushroom and pathogens

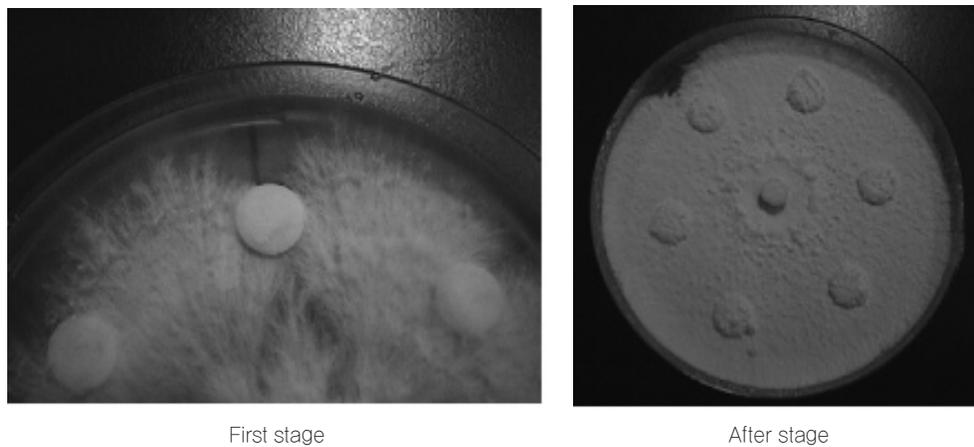


Fig. 3. Inhibition zone test of oyster mushroom with culture filtrate

양한 증상들이 나타나고 있으며, 다양한 증상에 따른 각기 다른 병원성 검정방법이 필요할 것으로 판단되었다.

이런 품종에 따른 경향들과 대치현상을 잘 표현할 수 있다면 느타리버섯 병저항성의 정도를 판단할 수 있는 가능성이 있을 것이라고 판단되며, 더욱 많은 느타리와 푸른곰팡이병원균의 균주에 대한 대치배양 시험이 수행된다면 저항성 유무를 실내검정 통해서도 간단히 판단할 수 있는 방법이 개발될 것으로 판단된다.

배양여액

푸른곰팡이병원균을 액체배양하여 0.27 μ m 여과지에 여과하고 농도별로 희석하여 Fig. 3와 같이 petri dish의 가운데에 검정용 느타리버섯균을 접종하고 가장자리에 일정간격으로 petri dish당 6개씩 항생물질 검정용 Filter paper(8mm)를 놓고 그 위에 배양여액을 0.2ml씩 떨어뜨리고 저지원의 형성 정도를 조사 결과.

Fig. 3에서와 같이 초기에는 약간의 느타리버섯균의 억제효과가 있는 듯하였으나 후기에는 over growth되었다. 이러한 결과는 푸른곰팡이병원균이 분비하는 Toxin에 의한

억제효과가 없거나, 여지에 접종한 Toxin성분이 배지에 확산되어 효과가 없는 것으로 판단되어, 배양여액을 이용한 저지원판법은 효과적인 저항성 판정방법으로 사용할 수 없었다. 그러나 이 방법을 well plate에 배양여액을 PD배지로 희석하고 그곳에 분쇄 느타리버섯 균사체를 0.05ml씩 접종하여 시험한 결과에서는, Fig. 4와 같이 억제되는 정도가 버섯균과 푸른곰팡이균의 종류와 희석 농도에 따라 다르게 나타나 well plate를 이용한 방법은 매우 효과적인 것으로 판단되었다.

Fig. 4.에서는 배양기간 초기에는 균사생장의 억제정도가 다양하게 구분이 되나 억제정도를 명확히 구별할 수 없으며, 후기에는 억제정도의 구분이 차이가 확실하게 구분이 가능하나 처리간의 정도의 차이를 구분하는 데에는 비효율적이다. 그러므로 조사시기는 2회에 걸쳐 조사하므로써 정확한 저항성에 필요한 자료가 가능할 것으로 판단된다.

Fig. 5에서와 같이 균사생장이 억제된 것과 정상인 균사체의 형태적 특징은 현미경상에서의 형태적 특징은 차이가 없는 것으로 확인되었다. well plate를 이용한 배양여액을 방법으로 버섯 균사체의 균사생장정도를 수치화

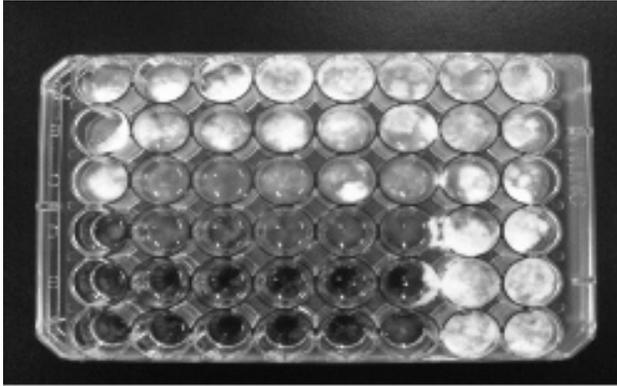


Fig. 4. Inhibition test of well plate of oyster mushroom with culture filtrates

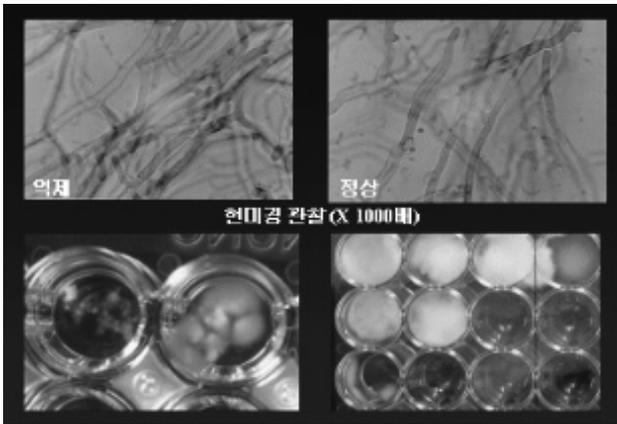


Fig. 5. Mycelial morphology of oyster mushroom with the culture filtrates of *Trichoderma*

하는 것은 가능하였으나, 육안적 관찰에 의한 방법은 개인차에 의한 편차가 심할 것으로 판단되어 균사활력을 검정하는 방법으로 종양, 독성물질, 활성정도를 조사하는 데에 사용하는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)를 활용하여(최, 1999; 이, 1997; 한, 1999; 지, 2000) mitochondria dehydrogenase 활성효소를 yellow tetrazolin 반응하여 purple formazon 변하는 기작을 이용하여 정량화하려고 하였으나 시험결과는 Figure 6에서와 같이 색깔도 purple보다는 훨씬 진한 흑청색으로 변하며, 변색시간은 일반적으로 4시간이 소요된다고 하였으나 12시간이 소요되었으며, 적갈색으로 변화되었던 purple formazon이 Fig. 6과 같이 균사체에 달라붙어 효소 활성도를 측정하는 데에는 실패하였다.

분할 petri dish

분리형 petri dish를 이용하여 푸른곰팡이병원균이 발생하는 가스에 의하여 생장이 억제되는 효과를 보기 위하여

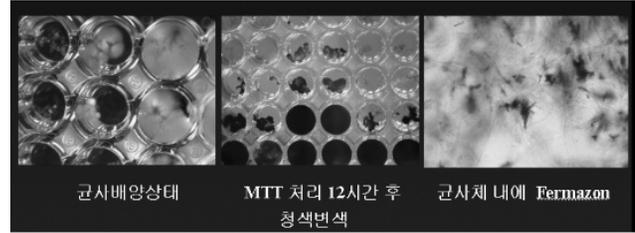


Fig. 6. Quantitative of inhibition effect of the culture filtrates of *Trichoderma* by MTT.

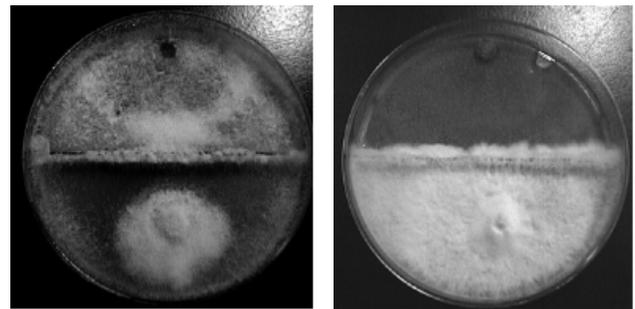


Fig. 7. Effect examination of fungistasis by 2 section petri-dish (green mold OG, mushroom OG)

시험을 한 결과, Fig. 7에서와 같이 대개는 푸른곰팡이균이 petri dish의 분리벽을 넘어 버섯균을 over growth하였으며, 극히 일부의 균주에서는 느타리버섯균이 성장하여 petri dish 분리벽을 넘는 경우도 있어 효과적이지 못하였다. 따라서 fungistasis 효과는 확실하게 나면서 푸른곰팡이균 생장의 억제정도를 효율적으로 판단할 수 있는 개선된 방법이 필요하였다.

배양후 접종

느타리버섯 배양후에 푸른곰팡이균을 접종하여 성장여부를 검정하는 방법은 Fig. 8에서 보는 바와 같이 Lysis, over growth, Lysis+over growth의 3가지의 형태로 나타나며, 이 시험방법은 포장에서 종균접종후 느타리버섯균이 표면에 어느 정도 생장이 되고 난 다음에 후기감염에 의한 저항성 정도를 구분하는 데에 매우 효과적인 방법으로 생각되었다.

푸른곰팡이병원균에 대한 저항성 판단방법으로 시험한 4가지 시험법인 대치배양법, wall plate 활용 배양여액법, 배양후 접종방법 등은 느타리버섯의 저항성을 판단하는 기준으로 사용가능 할 것으로 판단되지만 시험하는 과정에서 느타리버섯과 푸른곰팡이균의 활력관계에서 상당한 차이를 나타내었고, 반복 간에 차이가 클 뿐만 아니라 시험에 사용하는 시기에 따라 사용하는 균의 활력이 다르다면 일정한 결과를 얻을 수가 없으며, 또한 느타리버섯을 배양하는 과정에서 접종된 상태에 따라 엄청난 차이가 있다는 것을 확인하였다. 특히 느타리버섯 ASI 2172 경우에는 균층의 직

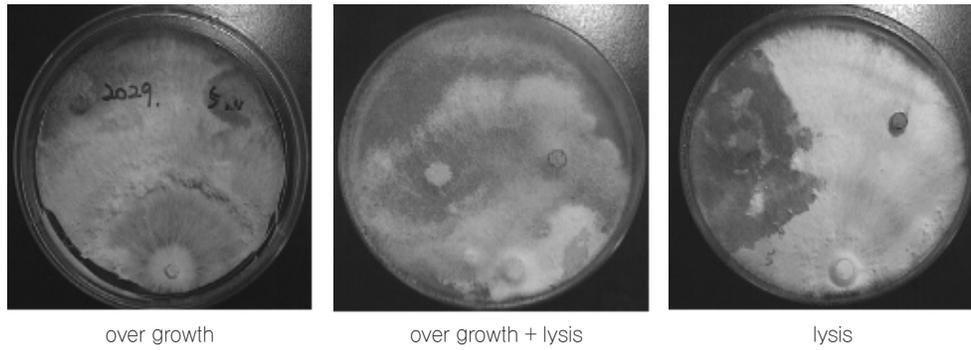


Fig. 8. Effect of green mold on mycelium growth of oyster mushroom

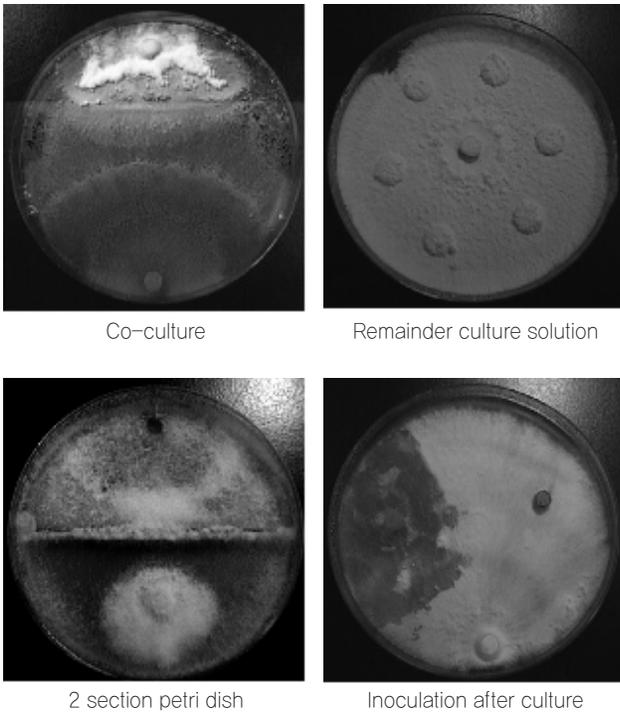


Fig. 9. Method of resistance test of green mold

경이 6-7Cm 정도의 활력이 좋은 접종원을 사용한 것과 균사생장이 완료되고 오랫동안 보관 배양한 균사체를 접종한 것은 4-5cm이상의 균사체 생장의 차이를 보임으로서, 실내에서의 저항성균주의 판정은 접종원의 정확한 관리 즉 접종원의 활력을 얼마만큼 균일하게 유지하는냐에 따라 결정될 수 있음을 알 수 있었다.

푸른곰팡이병원균의 Toxin, Lysis, Fungistasis, Hyperparasite 등의 발병 기작에 따른 저항성 검정방법을 시험해 본 결과(Fig. 9), 각 시험방법들의 개선해야할 문제점들은 배양여액을 이용한 방법에서는 저항성정도를 계량화 할 수 있는 방법을 개발해야만 육안 검사에 의한 문제점을 개선될 수 있을 것이라고 생각되며, 또한 대치배양법에서 간혹 반

복간의 차이가 나타나는 것은 느타리버섯균과 병원균의 접종원의 미세한 활력차이에 의해 나타나는 것으로 추측되어 접종원 활력의 균일화에 신경을 써야할 것으로 판단되며, 대치거리를 조사하는 하는 과정에서 Fig. 9에서와 같이 표면에서의 대치거리도 중요하지만 이면에서 볼 수 있는 침입양상도 정확히 판단하여야 함은 물론, 느타리버섯균이 over growth 된다고 하여 무조건 병원성이 없는 것으로 판단하여서는 안된다. 배양 후 접종에 따른 증상 중에서 균주에 따라 lysis와 over growth의 특성을 나타내는 경우에는 각각에 나타난 증상에 대한 평가를 어떻게 할 것인가의 평가기준을 설정해야 하고, 느타리버섯을 over growth 하는 푸른곰팡이 균주는 육안적으로 감염된 부위를 정확히 판단하기가 곤란하므로 선명한 over growth를 나타낼 수 있는 방법을 고안해야 할 것이다.

저항성을 구분하는 방법에서는 over growth 되는 것은 병원균의 병원성이 강하거나 느타리버섯균이 감수성일 때에 나타나는 증상으로 보이며, 특성의 균주가 대치되었을 때에는 그 느타리버섯균은 저항성이 강하거나 병원균이 병원성이 약한 것으로 판단하면 가능할 것이며, 대치배양에서 대치선 형성부위에 lysis 현상이 나타나는 것은 느타리버섯균이 저항력은 있으나 병원균이 별도의 병원학적 특성인 lysis의 능력이 있는 것으로 판단된다.

적 요

느타리버섯 푸른곰팡이병에 대한 품종 저항성은 포장에서 효과적인 검토가 불가능하여 한천 배지상에서 푸른곰팡이균이 균을 저해하는 특징 fungistatic, lysis, toxin enzyme 등에 대한 각각의 특성을 실내에 검정할 수 있는 방법을 검토하기 위하여 균사생장과 특이 현상을 조사하였다.

대치배양에서는 느타리버섯 균주에 따라 대치선 형성 위치, 푸른곰팡이균의 느타리균사 성장부분 위로 성장

(overgrowth), 대치선 이후의 버섯균의 용균(lysis)현상이 발생하여 효과적인 저항성 검정이 가능하였다. 배양여액을 여지에 적용하는 방법은 버섯균과 병원균의 종류에 따른 균사생장 및 특이적 현상이 나타나지 않았으나, well plate를 이용한 배양여액 희석방법으로 균사생장의 억제정도의 확인이 가능하였다. 분할 petri dish를 활용하여 동시배양의 경우 약간의 버섯균이 억제되는 현상은 보였으나, 푸른곰팡이균이 버섯균 생장 부분 위로 덮어 효과검정이 불가능하였다. 버섯균을 petri dish 전체에 배양한 후 그 위에 병원균의 균층을 접종하는 방법은 overgrowth, lysis등의 현상이 발생하여 병원성의 검정이 용이하였다. 실내에서의 느타리버섯균의 푸른곰팡이병에 대한 저항성 검정은 대치배양, 배양여액법, 성장후 접종법에 의한 방법으로 가능한 것으로 판단되었다.

참고문헌

- 유창현, 변명옥, 박용환, 신관철. 1981. 신계통 705호 육성에 관한연구. Kor. J. Mycol. 9 : 133-139
- 유창현, 신관철, 박용환. 1979. 양송이 신품종 703호의 선발 및 재배법개선에 관한연구. 농사시험연구보고 20 : 119-128
- 이동진, 이성구, 김길룡, 함경수. 1997. MTT방법에 의한 항진균성 활성효과의 측정. 산업미생물학회지 25 : 335-337
- 지정환, 김미남, 최근표, 정차권, 함승시. 2000. 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill) 추출물의 항돌연변이원성 및 세포독성 효과. 한국식품과학회지 32 : 1371-1378
- 최원경, 박정현, 김성환, 이도영, 이용창. 1999. 암세포의 종류에 따른 녹차 Catechin의 항암효과. 한국영양학회지 32 : 838-843
- 한정, 김현정, 이상선, 이인선. 1999. 전통 메주에서 분리된 단독균으로 제조한 메주추출물의 혈액암세포에 대한 저해효과 한국균학회지 27 : 312-317
- Anderson M. G., D.M. Beyer and P.J. Wuest. 2000. Using spawn strains resistance to damage *Trichoderma* green mold. Mushroom science XV 641-644
- Cotxarrera L., M. I. Trillas-Gay, C. Steinberg and C. Alabouvette 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato, Soil Biology and Biochemistry 34 : 467-476
- Ejechi B. O. 1997. Biological Control of Wood Decay in an Open Tropical Environment with *Penicillium* sp. and *Trichoderma viride*, International Biodeterioration & Biodegradation, 39 : 295-299
- Elad Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action, Crop Protection 19 : 709-714
- Mamoun M. and J.M. Olivier. 1995. Discussions of artificial infection with *Verticillium fungicola* for breeding programmes. Mushroom science XIV 669-677
- Ohmasa M., M. Tsunoda & M. Hiraide. 1995. A method to assay varietal difference of disease resistance of *Lentinus edodes* against *Trichoderma* spp. 5 : 15-26.
- Raper, K. B. and C. Thom. 1948. A manual of the penicillia. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Tsror L. (Lahkim), R. Barak and B. Sneh. 2001. Biological control of black scurf on potato under organic management, Crop Protection 20 : 145-150
- Viterbo Ada, Shoshan Haran, Dana Friesem, Ofir Ramot and Ilan Chet. 2002. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM, FEMS Microbiology Letters 200 : 169-174
- Wheatley Ron, Christine Hackett, Alan Bruce and Andrzej Kundzewicz. 1997. Effect of Substrate Composition on Production of Volatile Organic Compounds from *Trichoderma* spp. Inhibitory to Wood Decay Fungi, International Biodeterioration & Biodegradation 39 : 199-205