

느타리버섯 유해균 *Hypocrea* sp.의 형태 및 URP-PCR 분석

서건식 · 김병련 · 박명수 · 김민경 · 유승현*

충남대학교 농업생명과학대학

Morphological Characteristics and URP-PCR Analysis of *Hypocrea* sp., a Weed Mould of Oyster Mushroom Cultivation

Geon Sik Seo, Byung Ryun Kim, Myeung Soo Park, Min Kyung Kim and Seung Hun Yu*

Chungnam National University, 220 Gung-Dong, Daejeon 305-764, Korea

(Received August 12, 2002)

ABSTRACT: Recently a serious outbreak of weed mould caused by a species of *Hypocrea* occurred in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrates in Korea. The disease was characterized by a rapid infestation of the oyster mushroom substrates by *Hypocrea* sp. and subsequent inhibition of fructification of the mushroom. In spite of its serious losses to the oyster mushroom industry in Korea, etiology and ecology of the disease have not been studied. Morphological characteristics of the fungus were examined and molecular characteristics of the fungus were compared with those of the green moulds (*Trichoderma* spp.) isolated from oyster mushroom bed. Stromata formed superficially on surface of the substrates were pulvinate to effuse or irregular, initially white but becoming yellowish brown, measuring 6.0~13.0 × 3.0~11.0 mm. Perithecia were globose to subglobose, immersed in stroma, 223~263 (Ave. 239.9) × 167.3~231 (Ave. 204.1) μm in size. Asci were unitunicate, cylindrical, nonamyloid, 82.7~124.8 (Ave. 103.3) × 4.1~5.1 (Ave. 4.9) μm in size, 16 part-spored. Ascospores were bullet-shaped or somewhat oblong, hyaline, bicellular, roughened or warty, 5.4~7.4 (Ave. 6.5) × 3.6~5.5 (Ave. 4.7) μm in size. This fungus readily form the stroma on PDA. Mycelia on PDA nearly invisible and without cottony aerial mycelium. Optimum temperature for mycelial growth of this fungus was 25°C on PDA and its growth rate was 15 mm per day. This species did not grow at below 10 and above 35°C. Phialides in culture enlarged in the middle and aggregated to penicillate type. They were very variable, shorted ampulliform and occasionally curved when matured, but cylindrical when young, measuring 11.9~24.3 (Ave. 14.7) × 2.9~3.9 (Ave. 3.4) μm when matured and 7.2~14.0 (Ave. 10.8) × 2.8~4.9 (Ave. 3.5) μm when young. Phialospores were ovoid to ellipsoid, smooth, measuring 3.5~7.2 (Ave. 4.5) × 2.6~3.3 (Ave. 2.9) μm. Nineteen isolates of *Hypocrea* sp. were analyzed on the basis of molecular characteristics and classified into phenotypic groups. On the basis of RAPD, URP-PCR, the fungus was confirm to monoclonal, and was classified as a different taxon from reported species of *Hypocrea* and *Trichoderma* and supposed to be a new species not previously reported in literature.

KEYWORDS: Anamorph, *Hypocrea* sp., Morphology, Oyster mushroom, Teleomorph, URP-PCR

느타리버섯은 재배방법이 비교적 잘 알려져 있고 재배를 위한 시설 투자도 다른 버섯류의 재배에 비해 저렴하기 때문에 농가에서 널리 재배되고 있고 재배농가와 수요가 매년 증가하고 있다. 초창기의 느타리버섯 재배는 버드나무, 포푸라나무, 뽕나무 등 재질이 연한 활엽수의 원목을 이용하여 재배하여 왔으나 벗짚을 이용한 재배 방법이 개발되어(박 등, 1975) 집약관리에 의한 대량 생산이 가능하게 되었고, 1990년대 초반부터 폐쇄 배지를 이용한 재배법이 보급되면서 우리나라 버섯 산업이 비약적으로 발전하였다. 그러나 재배관리의 미숙으로 인하여 재배 과정 중 각종 병해가 쉽게 발생하며 재배에 실패하는 농가가 적지 않게 발생하고 있다. 특히 *Trichoderma*속 균에

의해 발생하는 푸른곰팡이병은 재배사의 구조, 재배형태, 재배시기, 재배과정, 재배품종을 가리지 않고 발생하며, 1990년대 후반부터 일부 *Trichoderma*속과 *Gliocladium*속 균의 완전세대로 알려진 *Hypocrea*속 균의 발생이 급증하여 많은 농가에서 경제적 손실을 크게 입고 있으나 유 등(2001)에 의해 병원균의 발생생태학적 특징, 병원성, 방제법에 관하여 보고되었을 뿐 분류, 동정에 관한 연구는 보고된 바 없다.

*Hypocrea*속은 Fries(1849)에 의해 최초로 보고된 이래 Cooke(1884), Ellis와 Everhart(1892), Dingley(1952) 등에 의해 수많은 종이 보고되었다. Webster(1964)와 Rifai(1966, 1969)는 *Hypocrea*속의 불완전세대로 *Trichoderma* spp.를 보고하였고, Hashioka와 Komatsu(1964), Doi(1966)는 일본산 *Hypocrea*속과 그 불완전세대를 보고하였다. 또

*Corresponding author <E-mail: shunyu@cmu.ac.kr>

Doi(1969, 1972)는 *Hypocrea*속 균의 자좌 표층부 조직균사의 구조 및 그 불완전세대를 기초로 일본산 *Hypocrea*속과 근연종 60여종의 분류를 재검토한 바 있다. 한편 *Hypocrea*속 균은 매우 다양한 불완전 세대를 형성하는 것으로 알려져 있는데(Doi, 1972), Morquer와 Komatsu(1968)는 *H. lutea*의 불완전세대가 *Gliocladium deliquescens*임을 보고하였다. 또 Canham(1969)은 *H. citrina* 및 그 변종의 불완전세대로 *Cephalosporium* sp.를 보고한 바 있으며, Komatsu는 1969년 *Hypocrea*속 균의 자좌에서 *T. viride*, *T. polysporum*, *T. longibrachiatum*을 분리하였다.

*Hypocrea*속 균의 불완전세대인 일부 *Trichoderma*속 균은 미생물에 기생력이 있고 다양한 항생물질을 생산하기 때문에 식물병의 생물학적 방제제로 많이 이용되고 있지만, 이러한 특성은 버섯의 병원균으로 작용하는 원인이 되고 있다. Komatsu(1976)와 Tokimoto(1982)는 표고(*Lentinula edodes*)에 피해를 주는 *Trichoderma*속 균과 *Hypocrea*속 균에 의한 표고곰팡이의 피해와 분류학적 연구를 체계적으로 수행한 바 있다. 또 양송이(*Agaricus bisporus*)도 *Trichoderma*속 균에 의한 피해가 보고되어 있는데, 1986년 영국의 아일랜드 지방에서 Th2 biotype(Seaby, 1987 and 1989)과 1990년대 초반에 북미에서 Th4 biotype의 *T. harzianum*이 대 발생하여 막대한 손실을 초래한 것으로 보고되어 있다(Morris *et al.*, 2000). 푸른곰팡이에 의한 느타리(*Pleurotus ostreatus*)의 피해에 관한 보고는 표고와 양송이에 비해서 적은 편이나 벨기에에서 느타리 재배시에 발생하는 *Trichoderma*속 균에 의한 푸른곰팡이 병이 보고된 바 있고(Lelley, 1987; Poppe *et al.*, 1985), 국내에서도 정(1986)과 신(1987)에 의해 느타리버섯 벗짚 배지에 발생하여 피해를 주는 *Trichoderma*속 균이 보고된 바 있다.

최근 분자생물학적 기법의 발달에 의해 *Hypocrea*속 균의 완전세대와 불완전세대간의 연관성과 분류에 관한 연구가 활발히 진행되고 있어 많은 종들의 분류학적 위치가 새롭게 밝혀지고 있다(Cheverri *et al.*, 2001; Lieckfeldt *et al.*, 1999).

본 연구는 느타리 재배사에 발생하여 피해를 주고 있는 *Hypocrea*속 균의 분류학적 위치 구명을 위하여 형태적 및 배양적 특징을 조사하였고 분자생물학적 분류의 기초자료를 얻고자 RAPD, URP-PCR 및 ITS-RFLP 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주

2000년 5월부터 2001년 2월까지 충남·전남 등 8개 지역의 느타리버섯 재배사에서 수집한 *Hypocrea*의 자좌(stroma)에서 조직분리 또는 단포자 발아법으로 분리한 19균주를 배양적 및 형태학적 특징 조사를 위한 공시 균

주로 사용하였다. RAPD, URP-PCR 및 ITS-RFLP 분석을 위한 대조 균주로 느타리버섯 재배 농가에서 분리한 *Trichoderma*속 균 21균주와 International Mycological Institute(IMI) 및 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures: KCTC)에서 분양 받은 *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*를 공시하였다(Table 1).

형태학적 특징 조사

느타리 버섯 재배사에서 분리한 *Hypocrea*속 균의 형태학적 특징을 조사하기 위하여 신선한 자좌를 stainless blade를 이용하여 증으로 절단하여 자낭각, 자낭, 자낭포자를 광학현미경으로 관찰하였다. 현미경 관찰을 위한 프레파라트는 lactophenol 용액(crystal phenol 60 g, lactic acid 20 g, glycerol 40 g, D.W. 20 ml)을 이용하여 제작하였다. 한편 불완전세대의 형태학적 특징은 공시균주를 감자한천배지(PDA, potato dextrose agar)에 접종하여 10일간 암(12시간) 혹은 광(12시간)을 교대 하면서 배양하여 분생자경, 분생포자 등의 형태를 조사하였다.

배양적 특징 조사

*Hypocrea*속 균의 균총의 형태와 균주의 균사 성장량을 조사하기 위하여 공시 균주를 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 5일간 배양한 후 조사하였다. *Hypocrea*속 균의 최적 균사성장 온도와 균사성장 및 자좌 형성 온도 범위를 조사하기 위하여 배양 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 30 그리고 35°C로 조절한 배양기에서 암, 광을 교대하면서 5~30일간 배양하였다.

한편, *Hypocrea*속 균의 유성세대를 유도하기 위하여 공시균과 느타리 버섯균(원형)을 PDA 및 폐쇄배지에 혼합 접종하여 25°C에서 광을 조사하면서 20일간 배양하여 자좌를 유도하였다. 폐쇄배지는 수분함량을 70%로 조절하였고 121°C에서 30분간 고압증기멸균하였다.

RAPD, URP-PCR 및 RFLP 분석

공시 균주를 PD broth에 진탕 배양하여 얻은 균사체를 동결 건조 후 액체진소로 급냉, 마쇄한 뒤 extraction buffer(200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS)에 현탁하고, proteinase K 50 µg을 첨가, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 400 µl의 2×CTAB solution[2% CTAB(w/v), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) Mr 40,000]을 첨가하여 섞은 뒤, chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 용액으로 추출하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA를 10-mer의 random primer[GT-02 (Nippon Gene Co., LTD), OPA-13, OPA-18(Operon Technologies, Inc., Alameda, CA)]와 20-mer의 URP primer [서린생명과학연구소(SRILS), SRILS UniPrimer™ kit]를

Table 1. Isolates of *Hypocrea* and *Trichoderma* used in this study

Isolate number	Fungus	Geographic origin (Year of isolation)	Substratum	Isolate number	Fungus	Geographic origin (Year of isolation)	Substratum
CNU ¹⁾ H670	<i>Hypocrea</i> sp.	Taeon, Chungnam (2000)	Waste cotton	CNU T518	<i>T. koningii</i>	Taeon, Chungnam (1998)	Rice straw
CNU H671	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2000)	Waste cotton	CNU T553	<i>Trichoderma</i> sp.	Namwon, Chonbuk (1998)	Rice straw
CNU H723	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2000)	Waste cotton	CNU T554	<i>T. harzianum</i>	Namwon, Chonbuk (1998)	Rice straw
CNU H724	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2000)	Waste cotton	CNU T575	<i>Trichoderma</i> sp.	Yeongi, Chungnam (1999)	Waste cotton
CNU H725	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2000)	Waste cotton	CNU T580	<i>T. viride</i>	Seosan, Chungnam (1999)	Sawdust
CNU H800	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2001)	Rice straw	CNU T596	<i>Trichoderma</i> sp.	Yangju, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H801	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2001)	Rice straw	CNU T603	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H802	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeongi, Chungnam (2001)	Rice straw	CNU T604	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H803	<i>Hypocrea</i> sp.	Seosan, Chungnam (2001)	Rice straw	CNU T605	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Material wood
CNU H804	<i>Hypocrea</i> sp.	Seochon, Chungnam (2001)	Waste cotton	CNU T607	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H805	<i>Hypocrea</i> sp.	Seochon, Chungnam (2001)	Waste cotton	CNU T609	<i>Trichoderma</i> sp.	Yeosu, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H806	<i>Hypocrea</i> sp.	Boryeong, Chungnam (2001)	Rice straw	CNU T612	<i>Trichoderma</i> sp.	Yeosu, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H807	<i>Hypocrea</i> sp.	Nonsan, Chungnam (2001)	Waste cotton	CNU T614	<i>Trichoderma</i> sp.	Yeosu, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H808	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeosu, Cheonnang (2001)	Waste cotton	CNU T617	<i>T. harzianum</i>	Yeosu, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H809	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeosu, Cheonnang (2001)	Waste cotton	CNU T618	<i>T. harzianum</i>	Paju, Kyonggi (1999)	Sawdust
CNU H810	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeosu, Cheonnang (2001)	Waste cotton	CNU T619	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Waste cotton
CNU H811	<i>Hypocrea</i> sp.	Yeosu, Cheonnang (2001)	Waste cotton	CNU T620	<i>Trichoderma</i> sp.	Paju, Kyonggi (1999)	Material wood
CNU H812	<i>Hypocrea</i> sp.	Hampyeong, Cheonnang (2001)	Rice straw	CNU Thr006	<i>T. harzianum</i>	KCTC ²⁾ 6043, ATCC ³⁾ 24274	Mushroom compost
CNU H813	<i>Hypocrea</i> sp.	Hampyeong, Cheonnang (2001)	Rice straw	CNU Thr008	<i>T. harzianum</i>	CBS ⁴⁾ 101525, TH2	Mushroom compost
CNU T506	<i>Trichoderma</i> sp.	Inje, Kangwon (1998)	Waste cotton	CNU Thr009	<i>T. harzianum</i>	IMI ⁵⁾ -TH2	Mushroom compost
CNU T507	<i>T. viride</i>	Yeosu, Cheonnang (1998)	Rice straw	CNU Tko001	<i>T. koningii</i>	KCTC 6042, ATCC 26113	Mushroom compost
CNU T508	<i>Trichoderma</i> sp.	Yeosu, Cheonnang (1998)	Rice straw	CNU Tre001	<i>T. reesei = T. viride</i>	KCTC 6045, ATCC 26920	Mushroom compost
CNU T512	<i>T. viride</i>	Yeosu, Cheonnang (1998)	Rice straw	CNU Tvi001	<i>T. viride</i>	KCTC 6951	Mushroom compost

¹⁾CNU : Chungnam National University.²⁾KCTC : Korean Collection for Type Cultures.³⁾ATCC : American Type Culture Collection.⁴⁾CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures.⁵⁾IMI : International Mycological Institute.

사용하여 PCR로 증폭하고, 이를 전기영동으로 분석하여 증폭산물의 다형성을 비교 분석하는 방법으로 종간 혹은 균주간의 유연관계를 분석하였고, rDNA의 ITS 영역을 PCR로 증폭하여 5종(*AluI*, *HaeIII*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*)의 제한 효소를 사용하여 RFLP 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Hypocrea sp.의 형태적 특징

유성세대(teleomorph): 느타리 버섯 균상에 발생한 *Hypocrea*의 자좌는 발생 초기에는 단생(solitary)하는 경우도 있으나 군생(gregarious)하고 서로 인접하고 있는 자좌가 한 덩어리로 융합한다(Figs. 1과 2). 자좌는 육질(fleshy, pulvinate)이고 균상에서 쉽게 분리된다. 발생 초기 미성숙한 자좌는 순백색이나 성숙되면서 노란빛에서 붉은빛을 띤 갈색으로 변한다. 성숙하면 자좌 표면의 자낭공(ostiole)에서 백색의 자낭포자가 사출된다. 성숙한 자좌의 폭과 높이는 각각 6.0~13.0 mm와 3.0~11.0 mm이다(Figs. 3, 4, 5).

자좌 표면은 털모양의 균사(velutinous)로 덮여 있고, 자낭공 부위의 세포는 뚜렷하지 않고 위유조직(pseudoparenchyma)으로 구성되어 있다. 자좌 표면 부근의 위유조직은 자낭각 주변과 아래의 위유조직보다 작고 뾰뚱하다(Figs. 6, 7).

자낭각(perithecium)은 구형이며 약간 신장(elongate)되어 있는 것도 있다. 자낭(ascus)은 긴 원통형이며 무색 투명하고 그 안에 16개의 자낭포자를 형성한다. 자낭포자는 표면이 거칠고(roughened or warty) 총알모양(bullet-shaped)이거나 각이 진 타원형(oblong)이다(Figs. 8, 9).

자낭각, 자낭, 자낭포자의 크기는 각각 223.0~263.3×167.3~230.8 μm(평균 239.9×204.1 μm), 82.7~124.8×4.1~5.1 μm(평균 103.3×4.9 μm), 5.4~7.4 × 3.6~5.5 μm(평균 6.5×4.7 μm)이다(Table 2).

무성세대(anamorph): PDA 배지에 주기적인 광을 조사하면서 배양할 경우 분생자경(conidiophore)은 원(concentric ring)을 이루며 형성되며 매우 성글게 집합체(aggregate)를 이룬다. 암상대에서 배양하면 기중균사(aerial mycelia)를 거의 형성하지 않고 투명하게 성장하며 1개월 이상 배양하면 옅은 녹색의 분생포자를 형성한다.

PDA 배지에 형성된 phialide는 보통 *Trichoderma virens* (*Gliocladium*)와 유사하게 모여서 형성되나 때때로 penicillate의 형태도 관찰된다. Phialide의 형태는 둥글고 목이 잘록한 병모양(ampulliform)인 것과 원통형에서 긴 플라스크형(lageniform)인 것이 있다. 병모양인 것은 종종 굽은 형태가 관찰되며 그 크기는 7.2~14.0×2.8~4.9 μm(평균 10.8×3.5 μm)이고 원통모양인 것은 단독으로 형성되거나 선단에 윤생체(whorl)로 형성되기도 하며 크기는 11.9~24.3×2.9~3.9 μm(평균 14.7×3.4 μm)이다(Figs. 10,

11, Table 2).

분생포자는 계란형에서 타원형으로 매우 다양하나 포자의 표면은 모두 매끈하다. 후막포자는 관찰되지 않았다. 분생포자의 크기는 3.5~7.2×2.6~3.3 μm(평균 4.5×2.9 μm)이다(Fig. 12, Table 2).

*Hypocrea*속 균의 불완전세대는 배양조건, 배양기간 등에 따라 다른 형태를 보이는 것으로 알려져 왔다(Doi, 1972). *H. pulvinata*의 경우 *Cephalosporium*, *Verticillium*, *Gliocladium*, *Trichoderma* 그리고 *Pachybasium* 등과 같이 많은 종류의 불완전세대를 형성하기 때문에 불완전세대의 형태를 기준으로 종을 동정하는 것은 불가능할 것으로 사료된다.

배양적특징: 느타리버섯 재배사에서 분리한 *Hypocrea*속 균의 배양적 특징을 조사하기 위하여 단포자분리법과 조직분리법을 이용하여 총 19균주를 분리하였으며 이를 공시하여 균사생장 속도, 최적 배양온도 그리고 *in vitro*에서의 자좌 형성을 조사한 결과는 Table 3 그리고 4와 같다.

분리된 균주의 PDA 배지에서의 균총의 형태는 균주간에 큰 차이가 없었으며 전체적으로 기중균사의 발달이 아주 미약하고 균총 전체에 노란빛을 띤 녹색의 분생포자를 다량 형성한다(Figs. 13, 14).

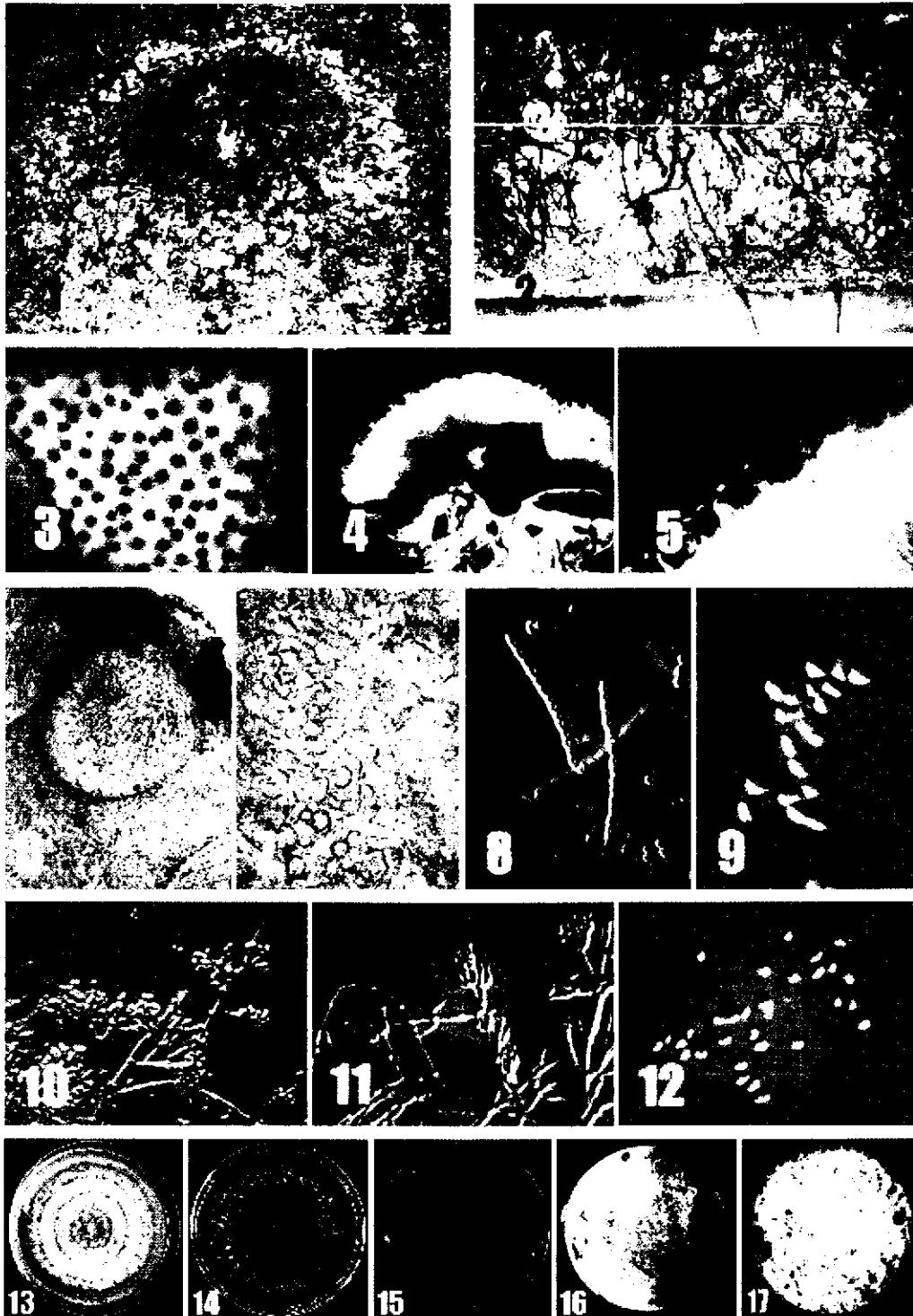
균사 생장은 15에서 30°C 범위에서 가능하였고, 최적 온도는 25°C이었으며 10°C와 35°C에서는 전혀 성장하지 않았다. 균주간의 균사생장은 큰 차이를 보이지 않았다. 배양중 혹은 배양 완료 후 특이한 냄새는 없었으며 배지 중에 색소를 분비하지 않았다.

PDA 배지에 균을 접종하고 광을 조사하면서 균사생장 가능 온도인 15에서 30°C에 배양하면 완전세대인 자좌를 형성한다. 한편 PDA 배지와 폐쇄 배지에 *Hypocrea*와 느타리 버섯 균을 동시에 접종하여 배양할 경우 느타리 균총 위에 *Hypocrea* 자좌를 형성하였다(Figs. 15, 16, 17).

한편 *Hypocrea*속 균은 인공배지에 배양하면 불완전세대인 *Trichoderma* 혹은 *Gliocladium*으로 쉽게 전환되며 *in vitro* 조건에서 완전세대인 자낭각을 잘 형성하지 않으나 *H. jecorina*(불완전세대: *T. reesei* 또는 *T. viride*)(Samuels *et al.*, 1998)와 *H. poronioidea*(Samuels, 2000)는 *in vitro*에서도 자좌를 형성하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 연구의 공시균은 PDA에서 배양할 경우 자좌를 쉽게 형성하였지만 *H. jecorina*와 *H. poronioidea*와는 자좌와 자낭포자 등의 형태에 차이가 있는 다른 종이였다.

Hypocrea sp.의 분자생물학적 특징

*Hypocrea*속 균의 불완전 세대인 *Trichoderma*속 균은 형태학적으로 매우 유사하고, 형태 분류의 기준이 되는 분생 포자의 모양이나 크기가 매우 작고 유사하며, 배양 조건에 따른 변이도 심하기 때문에 형태학적 특징만으로 분류하기에는 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 DNA marker를 이용한 분자



Figs. 1-17. *Hypocrea* sp. 1, 2. Stromata of *Hypocrea* sp. formed on waste cotton (1) and rice straw (2) substrates of oyster mushroom. 3. Ostioles on the surface of stroma. 4, 5. Section through part of a stroma showing embedded perithecia. 6. Median longitudinal section through a perithecium and stroma. 7. Pseudoparenchymal internal tissue of stroma below perithecia. 8, 9. Asci and ascospores. 10. Conidiophores and ampulliform phialides. 11. Conidiophores and slender lageniform phialides. 12. Conidia. 13, 14. Colonies of *Hypocrea* sp. grown on PDA at 25°C. 15, 16. *In vitro* formation of stromata of *Hypocrea* on PDA by solitary culture (15) and dual culture (16) with *Pleurotus ostreatus*. 17. Formation of stromata of *Hypocrea* on waste cotton substrate by mixed culture with *P. ostreatus*. Scale bars : 1 = 100 mm; 2 = 50 mm; 3 = 0.5 mm; 4 = 3 mm; 5 = 1 mm; 6 = 100 μ m; 7 = 10 μ m; 8 = 20 μ m; 9 = 10 μ m; 10, 11 = 20 μ m; 12 = 10 μ m.

Table 2. Morphological characteristics of *Hypocrea* sp.

Characteristics		Shape and color	Size (l × w, μm) ¹⁾
Teleomorph	Stroma	white to pale brown	6,000~13,000 × 3,000~11,000 (ave. 7,700 × 5,900)
	Perithecium	Globose to subglobose, slightly elongated	223.0~263.3 × 167.3~230.8 (ave. 239.9 × 204.1)
	Ascus	Cylindrical, 16 part spores in a ascus	82.7~124.8 × 4.1~5.1 (ave. 103.3 × 4.9)
	Ascospore	Bullet-shaped, ovovate with truncate base, warted, hyaline	5.4~7.4 × 3.6~5.5 (ave. 6.5 × 4.7)
	Anamorph	Colony	Growing moderately rapidly (6~6.5 cm) ²⁾ white to yellowish green on PDA, aerial mycelia not obvious
	Phialide	Narrowly lageniform to ampulliform, slender, penicillate	lageniform 11.9~24.3 × 2.9~3.9 (ave. 14.7 × 3.4) ampulliform 7.2~14.0 × 2.8~4.9 (ave. 10.8 × 3.5)
	Conidia	Ovoid to ellipsoidal, smooth-walled	3.5~7.2 × 2.6~3.3 (ave. 4.5 × 2.9)

¹⁾Total number of stromata, perithecia, asci, ascospores, phialides and conidia measured were 30, 30, 50, 100, 50, and 100, respectively.

²⁾The diameter of colonies was measured after 5 days at 25°C on PDA.

Table 3. Mycelial growth rate of *Hypocrea* sp. on PDA at 25°C

Isolate	Growth rate ¹⁾ (mm/day)	Isolate	Growth rate (mm/day) ¹⁾
CNU H670	14.1±2.8	CNU H805	16.0±2.8
CNU H671	14.1±1.7	CNU H806	14.6±2.4
CNU H723	14.8±2.9	CNU H807	16.2±2.7
CNU H724	14.8±2.6	CNU H808	15.7±2.1
CNU H725	10.7±2.1	CNU H809	16.4±1.6
CNU H800	13.6±1.4	CNU H810	17.3±1.7
CNU H801	14.4±2.3	CNU H811	15.9±4.5
CNU H802	13.6±2.8	CNU H812	15.9±1.9
CNU H803	15.0±1.3	CNU H813	16.6±1.9
CNU H804	15.1±3.2		
Average		15.0±2.4	

¹⁾The diameter of colonies was measured after 5 days at 25°C on PDA in darkness. Mean±standard deviation.

분류를 시도하였다. PCR 반응을 위한 primer는 GT-02, OPA-13, OPA-18 등을 사용하였으며, PCR 반응 생성물을 agarose gel에 전기 영동 한 결과는 Fig. 18과 같다.

각 균주의 genomic DNA를 추출하여 10-mer primer GT-02, OPA-13 그리고 OPA-18로 증폭하여 얻은 RAPD pattern은 느타리버섯 재배사에서 분리한 *Trichoderma* 균주(Fig. 18A와 B, lanes 2~19) 및 균주 보존 기관에서 분양 받은 *Trichoderma* 균주(Fig. 18C, lanes 2~5 및 10~11)와 *Hypocrea* sp. 균주(lanes 20~22)간에 뚜렷한 차이를 보여 느타리버섯 재배사에 발생하는 *Hypocrea*와 *Trichoderma*는 서로 다른 유전형질을 갖는 것으로 사료되었다.

한편 수집한 *Hypocrea*속 균의 유전적 기원을 조사하고 분류, 동정의 기초자료로 활용하기 위하여 전국 19개소에 서 수집한 *Hypocrea* sp. 균주(Table 1)를 공시하여 URP-PCR 분석과 ITS-1 region의 RFLP 분석을 실시한 결과는 Fig. 19와 같다. URP primer로 10-mer 보다 균주간의 변이를 좀더 정확하게 검출해 낼 수 있는 20-mer primer인 URP-01, -03, -04, -05, -08, -10 primer를 사용하였으며, RFLP 분석을 위한 제한효소는 *Ava*I, *Hae*III, *Mbo*I, *Msp*I, *Rsa*I를 사용하였다.

URP-PCR을 수행한 결과 Fig. 19에서와 같이 *Hypocrea*

Table 4. Effect of temperature on mycelial growth and formation of stroma of *Hypocrea* isolate CNU H803

Characters	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Mycelial growth ¹⁾	0	0	6.0±2.8	51.3±4.6	63.7±5.7	18.7±1.2	0
Formation of stroma ²⁾	-	-	+	+	+	-	-

¹⁾The diameter of colonies was measured after 5 days at 25°C on PDA in darkness.

²⁾Formation of stroma on PDA was observed after 30 days at 25°C under light (- : not formation of stroma, + : formation of stroma).

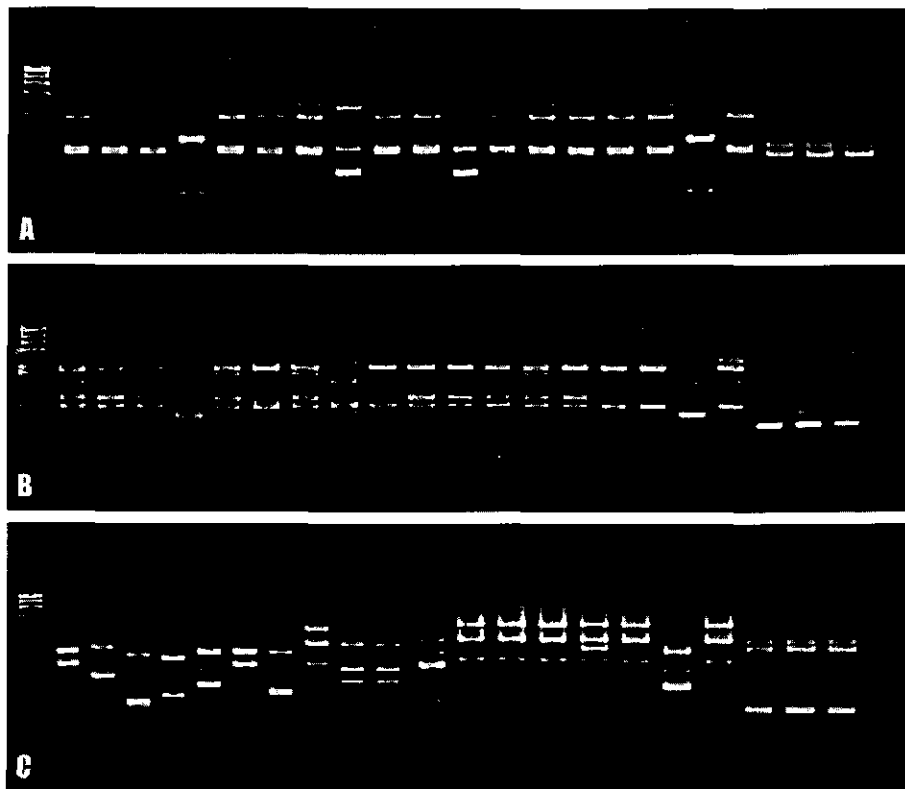


Fig. 18. Random amplified polymorphic DNA patterns of *Trichoderma* spp. and *Hypocrea* sp. by primer GT-02 (A), OPA-18 (B), and OPA-13 (C). Lane 1, molecular marker, (A) AND (B) : lanes 2~19; T614, T553, T508, T580, T612, T603, T620, T617, T607, T609, T618, T604, T620, T575, T619, T605, T512, T596, lane 20~22; h670, H617, H804. (C) : lanes 2~19; Tko001, Tre001, Tvi001, Thr006, T507, T518, T554, T506, Thr009, Thr008, T618, T604, T620, T575, T619, T605, T512, T596, lane 20~22; h670, H617, H804.

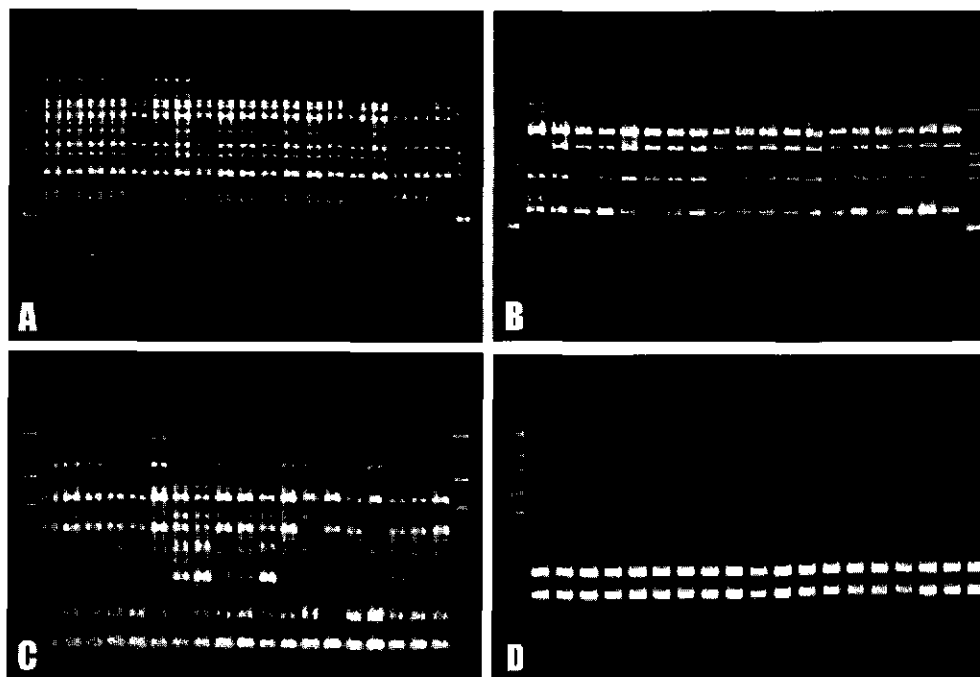


Fig. 19. PCR fingerprinting patterns of *Hypocrea* species amplified by primers URP-03 (A), URP-04 (B), URP-05 (C) and ITS-RFLP (D) pattern using restriction enzyme *Mbo*I. Molecular weight marker are 1 kb DNA ladder. Lanes 2~20; H670, H671, H723, H724, H725, H800, H801, H802, H803, H804, H805, H806, H807, H808, H809, H810, H811, H812, H813.

sp. 균주는 채집 지역과 채집 시기에 관계없이 모두 사용한 6개 20-mer primer 모두에서 동일한 밴드패턴을 보였다. 이것은 느타리버섯 재배사에 발생하여 *Hypocrea* 병을 유발하는 대부분의 *Hypocrea*가 유전적으로 차이가 없음을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 분리된 *Hypocrea* 균주들의 ITS 영역은 5종의 제한효소에 의해서도 모두 같은 RFLP를 보여(Fig. 19D), 이들이 유전적으로 동일한 기원을 갖는 균임을 알 수 있었다. 이들 *Hypocrea*를 형성하는 균주의 DNA 분석 결과는 본 연구실에서 느타리 버섯 재배사에서 분리하여 보관하고 있는 *Trichoderma*속 균 및 균주 보존 기관인 ATCC, CBS, IMI 등에서 도입한 대조 균주(*T. koningii*, *T. hazianum*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. aureoviride*)와 일치하는 것이 없었다(Fig. 18C). 따라서 본 연구에서 공시한 *Hypocrea* sp.는 문헌상에 보고된 바 없는 신종일 것으로 추정되며 현재 정확한 종의 동정을 수행 중에 있다.

적 요

느타리 버섯 균상에 발생하는 *Hypocrea*속 균의 분류학적 위치를 확립하기 위하여 유성세대 및 무성세대의 형태적 특징을 조사하였고, 국내 분리 균주의 RAPD, RFLP, URP-PCR 분석 등 분자생물학적 특징을 조사하였다.

1. 충남과 전남 일대의 8개 시, 군의 느타리 재배사에서 19 균주를 분리하였으며 이들 균주간의 형태적, 발생생태학적 변이는 없었고, 기존 보고된 *Hypocrea* 종들과는 다른 형태적 특징을 나타내었다.

2. *Hypocrea* 자좌의 크기는 6.0~13.0×3.0~11.0 mm이었고, 위유조적으로 구성되어 있으며 대부분 균생하고 처음엔 백색이지만 싱숙되면 노란빛을 띤 갈색을 나타내었다. 자낭각은 구형으로 크기가 평균 239.9×204.1 μm이었고, 자낭에는 16개의 자낭포자(part ascospores)를 형성하였고, 자낭과 자낭포자의 크기는 각각 103.3×4.9 μm와 6.5×4.7 μm이었다.

3. 무성세대의 phialide는 보통 *Trichoderma virens*와 유사한 형태로 모여서 형성되나 때때로 penicillate의 형태도 관찰되었다. *T. virens*형 phialide의 크기는 10.8×3.5 μm이었고 penicillate형은 14.7×3.4 μm이었다. 분생포자는 계란형에서 타원형으로 표면은 매끈하고 크기는 4.5×2.9 μm이었다.

4. *Hypocrea* 균주들의 배양적 특징 조사한 결과, PDA 배지에서 균사생장 최적 온도는 25°C이었고 자좌는 15~25°C 범위에서 발생하였으며 자좌 발생 최적 온도는 20°C였다.

5. RAPD 및 RFLP 분석을 실시한 결과 *Hypocrea*속 균은 공시균주는 모두 단일 유전 개체군으로 느타리 재배사에서 발생하는 *Trichoderma*속 균 및 기존에 보고된 *Hypocrea* spp.와는 다른 분류군으로 나타났다.

감사의 글

“이 논문은 2000년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-037-GA0002)”.

참고문헌

- 박용환, 고승주, 김동수. 1975. 벗짚을 이용한 느타리버섯 재배에 관한연구. 제1보. 매시재료에 관한 시험. 농시보고 17: 103-107.
- 신관철. 1987. 느타리버섯 벗짚 재배에 발생하는 유해균류. 한국균학회지. 15(2): 92-98.
- 유승헌, 서건식, 김홍규. 2000. 느타리버섯 유해균 *Hypocrea*속 균의 발생생태 및 방제법 개발. 대산논총 9: 19-36.
- 정환옥. 1986. 느타리버섯 벗짚 재배에서 발생하는 유해균류에 관한 연구. 충남대학교 교육대학원 석사학위논문. 33pp.
- Canham, S. C. 1969. Taxonomy and morphology of *Hypocrea citrina*. *Mycology* 61: 315-331.
- Cheverri, P. Samuels, G. J. and Stewart, E. L. 2001. *Hypocrea virens* sp. nov., the telemorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia*, 93(6): 1113-1124.
- Cooke, M. C. 1884. Notes on Hypocreaceae. *Grevillea* 12: 77-100.
- Dingley, J. M. 1952. The Hypocreales of New Zealand. III. The genus *Hypocrea*. *Trans. Roy. Soc. N. Z.* 79: 323-337.
- Doi, Y. 1969. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (1) Enumeration of the Species. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo*. 13: 693-724.
- . 1972. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (2) Enumeration of the Species. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo*. 15(4): 649-750.
- Ellis, J. B. and Everhart, B. M. 1892. *The North American Pyrenomycetes*. 77-90.
- Fries, E. M. 1849. “Summa Vegetabilium Scandinaviae” Sectio posterior. A. Bonnier, Holmiae et Lipsiae.
- Hashioka, Y. and Komatsu, M. 1964. *Trichoderma viride*, as an antagonist of the wood-inhabiting Hymenomyces. III. Species of *Hypocrea* occurring on low-wood of *Lentinus edodes*. *Rept. Totri Mycol. Inst.* 4: 1-5.
- Komatsu, M. 1976. Studies on *Hypocrea*, *Trichoderma* and allied fungi antagonistic to shiitake, *Lentinus edodes*. *Rep. Torori. Mycol. Inst.* 13: 1-113.
- Lelley, J. 1987. Disinfection in mushroom farming-possibilities and limits. *Mushroom J.* 174: 181-187.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I. and Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: Is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2418-2428.
- Morquer, R. and Komatsu, M. 1968. *Trichoderma* and *Gliocladium* found on bed-logs of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 8: 136-140.
- Morris, E., Harrington, O. and Doyle, O. P. E. 2000. Green mould disease- The study of survival and dispersal characteristics of the weed mould *Trichoderma*, in the Irish mushroom industry. In: “Science and Cltiavtion of Eible Fungi” (ed. Van Griensven). *Balkema, Rotterdam*. 645-651.
- Persoon, C. H. 1794. Disposito methodica fungorum. *Romer's*

- neus Magazm Botanische* **1**: 81-128.
- Poppe, J., Welvaert, W. and De Both, G. 1985. Disease and their control-possibilities after ten years of *Pleurotus* culture in Belgium. *Medelinger van de Faculteit Landbouwweter schappen Rijksuniversiteit Gent*. **50**: 1097-1108.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**: 1-56.
- _____ and Webster, J. 1966. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. III. *H. lactea*(= *H. citrina*) and *H. pulvinate*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **49**: 297-310.
- Samuels, G. J., 2000., *Hypocrea* and its anamorphs, *Gliocladium* and *Trichoderma* In : "Systematics of fungi important in biological control". CRIS project : 1275-22000-105-00D (1.0 FTE). <http://nt.ars-grin.gov/SBMLweb/ResearchActivities/Pect/PEETPage.htm>.
- _____, Petrini, O., Kuhls, K. Lieckfeldt, E. and Kubicek, C. P. 1998. The *Hypocrea schweinizii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology* **41**: 1-55.
- Seaby, D. A. 1987. Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species. *Mushroom J.* **97**: 355-361.
- _____. 1989. Further observations on *Trichoderma*. *Mushroom J.* **197**: 147-151.
- Tokimoto, K. 1982. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in antagonistic state. *Trans. Mycol. Japan.* **23**: 13-20.
- Webster, J. 1964. Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma*. I. Comparison of perfect and imperfect stages of *H. gelainosa*, *H. rufa* and *Hypocrea* sp. 1. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **47**: 75-96.