

야생버섯에서 분리한 미기록종 버섯기생균 *Sepedonium laevigatum* 보고

오승윤*

창원대학교 자연과학대학 생물학화학융합학부

Unrecorded mycoparasitic fungus *Sepedonium laevigatum* isolated from wild mushrooms in South Korea

Seung-Yoon Oh*

Department of Biology and Chemistry, College of Natural Science, Changwon National University, Changwon 51140, Republic of Korea.

ABSTRACT: Fungi that infect mushrooms and cause diseases are called mycoparasitic fungi. Understanding the diversity of mycoparasitic fungi in wild mushrooms is important for the mushroom industry, as they can parasitize cultivated mushrooms. However, few studies have been conducted on the diversity of mycoparasitic fungi in wild mushrooms in South Korea. Upon surveying mushroom flora, we found a mycoparasitic fungus and analyzed its strain using molecular phylogeny and morphological examination. The strain was identified as *Sepedonium laevigatum*, which is an unrecorded species in South Korea. In this study, we described the cultural and microscopic characteristics of this strain of fungus.

KEYWORDS: Diversity, Fungi, Mycoparasite, *Sepedonium*, Unrecorded species

버섯기생성균은 버섯을 기주로 서식하는 진균으로, 버섯병을 일으킬 수 있으므로 버섯 재배에 있어 중요한 요소이다(Sun *et al.*, 2019). 버섯병을 유발하는 대표적인 기생성균으로 마이코곤병을 일으키는 *Mycogone pernicioso*, 연부병을 일으키는 *Hypomyces rosellus*, 양송이 갈반병을 일으키는 *Verticillium fungicola*, 표고버섯 병 *Trichoderma*가 있다(Park *et al.*, 2006; Poldmaa, 2000; Sun *et al.*, 2019; Tamm and Poldmaa, 2013). 버섯병이 발생하면 기형적

형태, 색 변화, 괴사 등의 병징을 보이기 때문에 상품성을 떨어뜨리고 버섯 생장을 저해하여 생산성을 감소시킨다. 따라서 버섯기생성균의 다양성을 확인하고 관리하는 것은 중요하다. 야생버섯에서도 기생균이 발견되는 데 기생균들은 기주 특이성을 보이는 경우가 많다(Poldmaa, 2011). 예를 들어 *Syzygites megalocarpus*는 송이에서, *Cladobotryum semicirculare*는 구멍장이버섯목(Polyporales)과 주름버섯목(Agricales)에서 발견되었다(Ka *et al.*, 2000; Poldmaa, 2011). 야생버섯은 재배 버섯의 병을 일으킬 수 있는 기생균의 근원이 될 수 있으므로 야생버섯에 있는 기생성균의 다양성을 확인하는 것은 버섯병 관리 차원에서 중요하다고 할 수 있다.

무성세대 *Sepedonium* 속은 유성세대 균기생균속(*Hypomyces*)에 속하는 균기생성 진균이다(Sahr *et al.*, 1990). 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며, 그물버섯목(Boletales)과 주름버섯목(Agaricales)에 속하는 다양한 버섯에 주로 기생한다(Sahr *et al.*, 1990; Binimelis-Salazar *et al.*, 2021). 분류를 위해 배양적 특징과 주요 미세구조인 분생포자형성세포(conidiogenous cell), 경자(phiallide), 경자분생포자(phialloconidia), 측생후벽분생포자(aleurioconidia)의 모양과 크기를 기반으로 동정을 할 수 있지만, 특징이 명확히

J. Mushrooms 2022 December, 20(4):249-253
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2022.20.4.249>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Seung-Yoon Oh(Professor)
 *Corresponding author
 E-mail : syoh@changwon.ac.kr
 Tel : +82-55-213-3453

Received November 30, 2022
 Revised December 12, 2022
 Accepted December 19, 2022

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다르지 않은 경우가 많아 핵 리보솜 ITS 영역과 같은 염기서열에 기반한 분석이 필요하다(Binimelis-Salazar *et al.*, 2021; Sahr *et al.*, 1999). 국내에서는 유성세대로 *Hypomyces chrysospermus* (= *Sepedonium chrysospermum*), *Hypomyces luteovirens*, *Hypomyces tubariicola* 3종이 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 1987). 이 중 *Sepedonium*이 무성세대인 종은 *Hypomyces chrysospermus* 1종인데, 이 종은 국내에서 토마토 재배 토양에서 분리된 균주이기 때문에 기주에 대한 생태적 정보가 알려지지 않았다(Lee *et al.*, 1987). 따라서, 국내에 분포하는 *Sepedonium* 속에 대한 다양성과 생태에 관한 연구가 필요한 상황이다.

창원시 정병산 인근에서 버섯 다양성을 조사하던 중 기생균에 감염된 자실체를 확인하였고, 균주를 분리 배양한 결과 국내에 아직 보고되지 않은 종임을 확인하였기에 형태적, 분자생물학적 분석을 수행하여 그 특징을 보고하고자 한다.

2020년 6~9월 경상남도 창원시 정병산 인근에서 야생 버섯 다양성을 조사하였고, 기생균에 감염된 자실체를 2점 채집하여 실험실에서 균 분리를 수행하였다. 기생균이 감염된 버섯의 동정은 형태적 특징을 이용하여 수행하였다. 채집한 버섯으로부터 기생균을 분리하기 위하여 기생균에 감염된 조직 조각을 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco, USA) 평판배지에 치상하여 25°C에서 3-5일간 배양한 후 PDA 배지에 순수분리하였다. 이후 실험에 이용하기 전까지 순수분리된 균주를 4°C에 보관하였다. 국내 자원은행에 보관 중인 유사 균주와 비교하기 위하여 KCTC 46122 균주를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 분석에 포함하였다. 기생균이 감염된 야생버섯 *Boletus* sp.와 젓비단그물버섯(*Suillus granulatus*)에서 기생균 균주 OhF20G07-i03과 OhF20I18-i01이 각각 순수분리 되었다.

분자생물학적 동정을 위하여 배양된 균주의 균사에서 DNA를 AccuPrep Genomics DNA Extraction Kit(Bioneer, South Korea)를 사용하여 추출하였다. 동정을 위한 염기서열 구간으로 핵 리보솜 ITS 영역을 선택하였고, AccuPower PCR PreMix(Bioneer, South Korea) 키트를 사용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 프라이머는 ITS1F와 ITS4(Gardes *et al.*, 1993; White *et al.*, 1990)를 이용하였고, 증폭 조건은 94°C 5분 이후, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 40초 조건을 35회 반복하고, 최종 합성을 72°C에서 10분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고 Expin PCR SV mini(GeneAll, South Korea) 키트로 정제하였다. 염기서열결정은 마크로젠(South Korea)에서 ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, USA) 장비를 이용하여 분석하였다. 확보된 염기서열은 MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011)에서 확인하여 편집하였다. 예비 동정을 위하여 NCBI 데이터베이스에서 BLAST를 수행하여 후보 분류

군을 예상하였다. GenBank 데이터베이스에 있는 후보 분류군의 염기서열 중 신뢰할만한 염기서열(모식균주 혹은 분류논문에서 사용된 것)을 확보하여 계통분석에 이용하였다. 계통분석은 Neighbor-Joining 방법과 Kimura-2-Parameter (K2P) 모델로 1000회 붓스트랩 반복하여 추정하였다.

핵 리보솜 ITS 영역을 기준으로 BLAST 분석한 결과 99% 유사도로 *Sepedonium* 속에 속하는 종으로 추정되었다. 모식균주와 선행연구(Sahr *et al.*, 1999)의 염기서열과 함께 분석하여 계산된 NJ 계통수는 분리된 균주와 KCTC 46122가 *Sepedonium laevigatum*과 높은 신뢰도(99%)로 단계통군을 형성하는 것을 보였으며, *Sepedonium laevigatum* 모식균주의 서열과 높은 상동성(100% 유사도)을 보였다(Fig. 1). 생물자원센터 분양 균주인 KCTC 46122는 *Hypomyces chrysospermus*로 동정되어 있었으나, 염기서열 분석 결과 *Sepedonium laevigatum*와 높은 상동성(100% 유사도)을 보였으며, 계통분석에서도 *Sepedonium laevigatum*와 단계통군을 형성하므로, 이전 동정은 오동정이며 *Sepedonium laevigatum*이 맞는 것으로 추정된다. *Sepedonium laevigatum*은 미국, 독일, 뉴질랜드에 분포하며 *Boletus*, *Leccinum*, *Gyrodon*, *Suillus*, *Gomphidius*, *Tylopilus* 등 그물버섯목(Boletales)이나 주름버섯목(Agaricales)에 속하는 종을 기주로 삼는다고 알려져 있다(Binimelis-Salazar *et al.*, 2021; Sahr *et al.*, 1999). 본 연구에서 분리된 균주도 *Boletus*와 *Suillus* 종에서 발견되어 선행연구와 일치하는 특성을 보였다.

순수 분리된 균주를 PDA 배지와 Malt Peptone Agar(MPA; malt extract: 10 g/L, peptone: 2.5 g/L, agar: 15 g/L)(Sahr *et al.*, 1999) 배지에서 25°C에서 3-5일간 배양하여 배양적 특성을 관찰하였고, 광학현미경 Eclipse Ni(Nikon, Japan)으로 미세구조를 관찰하고 측정하였다(n = 40). 온도별 균사생장량은 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C에서 5일간 배양 후 측정하여 비교하였다.

순수분리한 균주를 PDA와 MPA 배지에서 25°C 조건으로 배양하여 특성을 관찰하니, 균주는 빠르게 성장하여 기중균사가 없거나 적었으며 배지의 바닥에 얇게 깔리는 양상을 보였다(Fig. 2). 배양이 진행되면서 무색의 투명한 균사만 보이던 배지가 약 3일경부터 옅은 황색이 나타나기 시작하고 시간이 지남에 따라 색이 짙어지면서 위치도 중심부에서 가장자리로 퍼졌다. 온도별 성장속도를 비교하면 PDA와 MPA 배지 모두 25°C 부근에서 최적 성장을 나타냈다(Table 1). 원기재문에 따르면, *Sepedonium laevigatum*은 얇고 평활한 균사층이 흰색으로 시작하여 점차 노란색으로 변하고, 최적 성장 온도는 MPA 배지에서 25-30°C로 기재되어있어 조사한 균주와 일치하는 특성을 보였다(Sahr *et al.*, 1999). 형태적으로 유사종인 *Sepedonium chrysospermum*의 경우 평활한 균사층이 점차 노란색으로 변한다는 특징이 유사하지만, MPA 배지

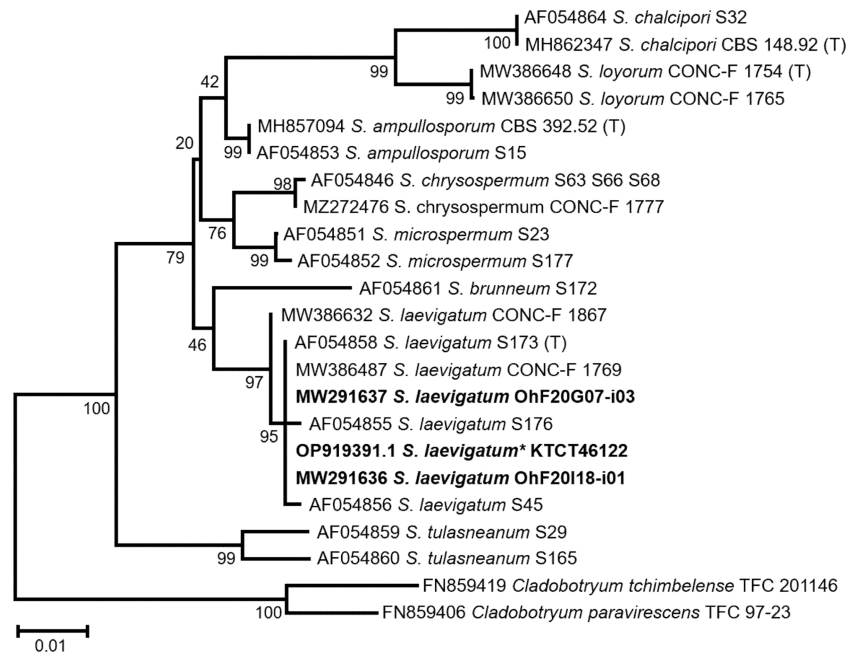


Fig. 1. Phylogenetic tree based on neighbor-joining analysis with ITS region. Bootstrap values (1000 replicates) are on the branch. Sequences generated from this study are in bold. The scale bar indicates the ratio of nucleotide substitution. (T) after the strain name indicates the sequence from ex-type strain. Asterisk on KTCT strain means that the newly identified name in this study is used.

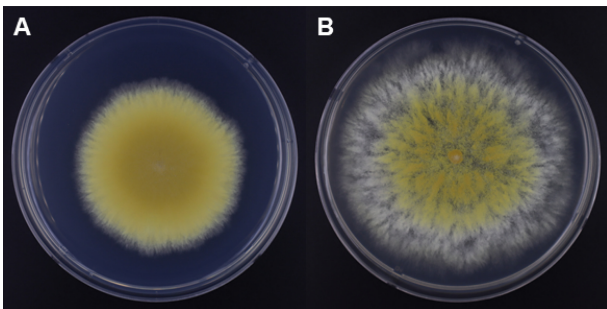


Fig. 2. Cultural characteristics of *Sepedonium laevigatum* strain OhF20I18-i01 grown for 7 days at 25°C on PDA (A) and MPA (B) media.

Table 1. Growth diameters (mm) of OhF20I18-i01 strain after 5 days in various temperature and media

Medium	Temperature				
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
PDA	24-27	37-41	60-66	36-40	0
MPA	23-28	45-47	70-75	35-40	0

25°C에서 4.6 mm/일의 성장속도를 보이고 최적성장온도가 20°C라는 점에서 차이를 보인다(Binimelis-Salazar *et al.*, 2021; Sahr *et al.*, 1999).

미세구조를 광학현미경으로 관찰한 결과 형태적 특성이 *Sepedonium laevigatum*에서 보고된 특성과 유사하였다

(Fig. 3). *Sepedonium laevigatum*의 원기재문과 비교해보면, OhF20I18-i01 균주는 분생포자형성세포(conidiogenous cell)의 형태는 유사하지만 길이가 다소 짧으며, 경자분생포자와 측생후벽분생포자는 색과 형태가 유사하고 길이 범위는 포함되었으므로 전반적으로 *Sepedonium laevigatum*의 미세구조의 특성이 일치하였다(Table 2). 유사한 종인 *Sepedonium chrysospermum*의 경우 경자와 경자분생포자의 형태와 길이가 유사하지만, 측생후벽분생포자가 길다는 차이가 있다. *Sepedonium microspermum*의 경우 경자분생포자와 측생후벽분생포자의 길이와 형태가 유사하지만, 경자의 길이가 상대적으로 짧다는 차이가 있다.

결론적으로 분리된 균주 2점과 KCTC 46122 균주는 분자생물학적 분석과 형태적 분석 결과 모두 *Sepedonium laevigatum*으로 최종 확인되었고, 이 종은 국내에서 보고되지 않은 미기록종이다. 과거에는 형태적 유사성 때문에 *Sepedonium laevigatum*이 *Sepedonium chrysospermum*으로 오동정되었으나 염기서열에 기반한 계통분석의 도움으로 처음 독립된 분류군으로 인식되었고, 추가적인 형태적 관찰을 통하여 신종으로 보고되었다(Sahr *et al.*, 1999). 이 종은 뉴질랜드, 독일, 미국, 일본, 칠레, 폴란드에서 서식하며 아프리카를 제외한 모든 대륙에 분포한다(Binimelis-Salazar *et al.*, 2021; Mleczko *et al.*, 2010; Sahr *et al.*, 1999; Tokiwa *et al.*, 2021). 기주는 그물버섯목에 국한되어 있으나, 다양한 속(*Boletus*, *Gyrodon*, *Leccinum*, *Octaviania*, *Rhizopogon*, *Suillus*, *Tylopilus*)에

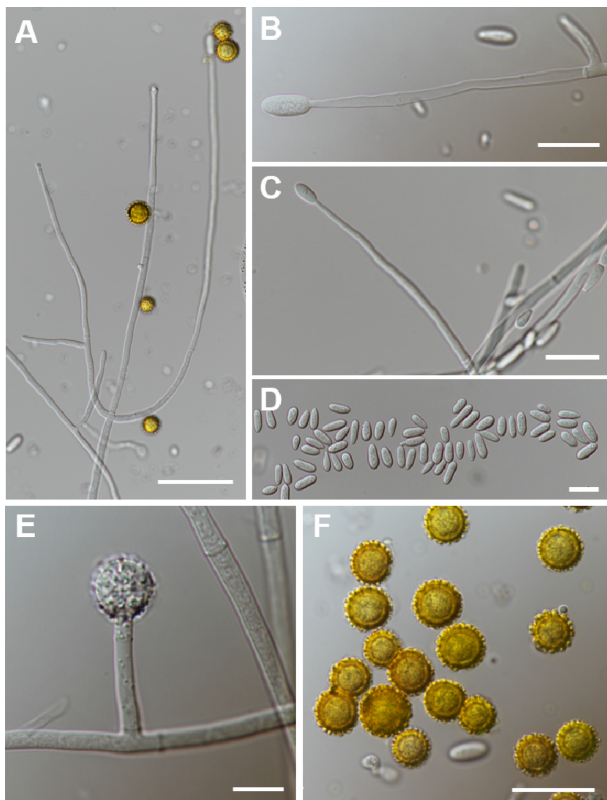


Fig. 3. Microscopic characteristics of *Sepedonium laevigatum* strain OhF20I18-i01. (A) Conidiophores. (B-C) Phialides. (D) Phialoconidia. (E-F) Aleurioconidia. Scale bars: (A) 50 μ m, (B-D) 20 μ m, (E-F) 10 μ m.

서식한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 그물버섯속과 비단그물버섯속에서 발견되었는데, 우리나라에도 다양한 그물버섯목의 버섯이 서식하고 있으므로, 광범위한 조사가 진행된다면 국내 *Sepedonium laevigatum*의 기주 다양성을 추가적으로 확인할 수 있을 것이라 기대된다.

Table 2. Morphological characteristics of strain OhF20I18-i01 and authentic strains of *Sepedonium chrysospermum*, *S. microspermum*, and *S. laevigatum* (Sahr et al., 1999)

Species name	Conidiogenous cell	Phialoconidia	Aleurioconidia
<i>Sepedonium chrysospermum</i>	Hyaline, septate, with verticills of 1-3 phialides, these 50-120 \times 5-6 μ m	Ellipsoidal to cylindrical, 5-27 \times 3-11 μ m	Bright yellow, globose, 14-21 μ m, tuberculate; tubercles cylindrical to conical, up to 1.5 μ m long
<i>Sepedonium microspermum</i>	Hyaline, septate, with verticills of 1-3 phialides, these slender, 40-70 \times 3-4 μ m	Ovoid, fusiform, often cuneiform, 9-17 \times 4-6.5(-8) μ m	Yellow, globose, 9-15 μ m, with angular tubercles; tubercles slightly reticulated
<i>Sepedonium laevigatum</i>	Hyaline, septate, with verticills of 1-2 phialides, 120-250 \times 3-4 μ m	Colorless, thin-walled, cylindrical, spindle-shaped or cuneiform, very variable in size, 8-24 \times 3.5-9.5 μ m	Colorless in the beginning, then becoming yellow, globose, thick-walled, globose, (13-)14-19(-22) μ m
OhF20I18-i01	Hyaline, septate, with verticills of 1-3 phialides, 31-134(-197) \times (2-)3-5 μ m	Hyaline, thin-walled, ellipsoid to cylindrical, obovoid-shape, pyriform, or clavate, (8-)10-17(-21) \times (3-)4-6(-9) μ m (L/W = 2-3)	Hyaline in the beginning, then becoming golden yellow, thick-walled, globose to subglobose, 11-15(-17) \times (10-)11-15(-16) μ m (L/W = 1-1.1), warted; tubercles cylindrical, 1-2 μ m long

적 요

버섯기생균은 버섯을 기주로 살아가면서 병을 일으킬 수 있는 진균이다. 야생버섯의 버섯기생균이 재배종에 병을 일으키는 병원균이 될 수 있다는 점에서 야생버섯의 버섯기생균 다양성을 연구하는 것은 버섯 산업에 중요하다. 그러나 국내에서는 야생버섯의 기생균 다양성에 관한 연구가 많지 않다. 본 연구에서는 버섯 다양성 조사 과정에서 발견한 버섯기생균을 분리하여 분자계통분석과 형태적 특성 조사를 통해 분석하였다. 그 결과 분리된 균주가 미기록종인 *Sepedonium laevigatum* 종으로 동정되었으므로, 이 균주의 배양적 특성과 미세구조의 특성을 조사하여 기재하였다.

감사의 글

이 논문은 2021~2022년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원으로 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Binimelis-Salazar J, Casanova-Katny A, Arnold N, Lima CA, Norambuena HV, Gonzalez-Rocha G, Palfner G. 2021. Diversity and host relationships of the mycoparasite *Sepedonium* (Hypocreales, Ascomycota) in temperate central Chile. *Microorganisms* 9: 2261.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.
- Ka KH, Park H, Yoon KH, Bak WC. 2000. Occurrence of *Syzygites Megalocarpus* on wild mushrooms and its cultural characteristics. *J Korean Soc For Sci* 89: 691-696.
- Kim M, Ahn C, Kim C. 2017. The fungicolous ascomycetes genus *Hypomyces* in Korea. *Mycobiology* 45: 209-212.
- Lee SK, Suh JS, Kim YS, Park JK. 1987. Studies on phytotoxin in

- intensively cultivated upland crops-II. Population and identification of soil microorganisms in rhizosphere of upland crops. *Korean J Soil Sci Fert* 20: 179-183.
- Mleczko P, Kozak M, Lawrynowicz M, Dubiel G. 2010. *Octaviania asterosperma* (hypogeous Basidiomycota). Recent data to ecology and distribution. *Acta Mycol* 45: 133-144.
- Park MS, Bae KS, Yu SH. 2006. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology* 34: 111-113.
- Poldmaa K. 2000. Generic delimitation of the fungicolous Hypocreaceae. *Stud Mycol* 45: 83-94.
- Poldmaa K. 2011. Tropical species of *Cladobotryum* and *Hypomyces* producing red pigments. *Stud Mycol* 68: 1-34.
- Sahr T, Ammer H, Besl H, Fischer M. 1999. Infrageneric classification of the boleticolous genus *Sepedonium*: species delimitation and phylogenetic relationships. *Mycologia* 91: 935-943.
- Sun JZ, Liu XZ, McKenzie EHC, Jeewon R, Liu JK, Zhang XL, Zhao Q, Hyde KD. 2019. Fungicolous fungi: terminology, diversity, distribution, evolution, and species checklist. *Fungal Diversity* 95: 337-430.
- Tamm H, Poldmaa K. 2013. Diversity, host associations, and phylogeography of temperate aurofusarin-producing *Hypomyces/Cladobotryum* including causal agents of cobweb disease of cultivated mushrooms. *Fungal Biol* 117: 348-367.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
- Tokiwa T, Hirose D, Nonaka K. 2021. Two boleticolous *Sepedonium* species new to Japan. *Jpn J Mycol* 62: 111-117.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand PH, Sninsky JJ, White TJ. (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA. pp. 315-22.