

*Cladobotryum varium*에 의한 팽이버섯 흰곰팡이병(가칭) 발생

김한경* · 석순자 · 김광포 · 문병주** · 寺下隆夫***

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과

**동아대학교 생명자원과학대학 농생물과

***近畿大學 農學部 食品微生物研究室

Occurrence of Disease Caused by *Cladobotryum varium* on *Flammulina velutipes* in Korea

Han-Kyoung Kim*, Soon-Ja Seok, Gwang-Po Kim,
Byung-Ju Moon** and Takao Terashita***

Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology,
R.D.A., Suweon 441-707, Korea

**Department of Agricultural Biology, College of Natural Resources and
Life Sciences, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

***Department of Food and Nutrition, College of Agriculture,
Kinki University, Higashiosaka 577, Japan

ABSTRACT: *Cladobotryum varium* infects the fruitbody of *Flammulina velutipes* during its cultivation. In the early stage of infection, white mycelia of *C. varium* partially attacked young fruitbody and eventually killed whole fruitbody during fruitbodies development. White fungi pathogen isolated from *F. velutipes* cultivation farm were investigated in pathogenicity and morphological features. The pathogen was identified as *Cladobotryum varium*. In asexual stage, 2~4 conidiophores formed, 8.5~10.0×16.1~17.0 μm long and conidiospores with single septum were shaped in chains, 32.8~50.4 μm in size. Size of chlamydospores were 12.7~18.0×17.7~48.1 μm with 1~4 septa.

KEYWORDS: *Flammulina velutipes*, Symptom, Morphological characteristics, *Cladobotryum varium*

팽이버섯은 1899년 일본에서 처음으로 인공재배법이 개발된 이후, 연간 약 10 만 톤이 생산되어 버섯산업의 선두 자리를 차지하고 있다(きのこ年監, 1998).

국내에서는 1989년 3,364평에서 120 M/T의 생산량으로 팽이버섯 재배농가가 극소수였으나(농림부, 1989) 현재는 114,437평에서 연간 생산량이 19,871 M/T으로 국내 버섯 총 생산량 중 느타리, 표고에 이어 3번째로 농가소득에 중요한 위치를 차지하고 있다(농림부, 1998).

그러나 재배면적이 늘어날수록 농가에서는 각종 해균의 피해가 심각하게 대두되고 있으며 그 피해액도 상당히 많을 것으로 추정된다. 이러한 문제점은 재배자들의 재배관리 기술에도 문제가 있지만 이들 해균들은 대부분 진균 기생균으로 어린 버섯이 발생되고 난 후 버섯 자실체에 감염되어 버섯의 발육을 정지시키거나 버섯이 발생된 부위 전체를 병원균의 균사와 무성포자로 만연되어 자실체의 생육을 억제시킨다. 또한 일부 병원균은 정상적으로 생육하는 버섯 줄기에 균사와 무성포자를 만연시킴으로서 버섯을 건조고사, 기형, 부패시켜 상품성을 저하시키는 병원균이 여러 종류 있다(Forer et al., 1974).

이들 병원균에 감염된 재배사는 정상적으로 버섯을 생산하는 것이 불가능하며 불완전세대에서 형성되는 무성포자들이 비산되어 계속하여 버섯을 감염시키므로 대만에서는 1968년 버섯 재배사를 폐쇄한 적도 있다(Hus and Han, 1981).

Tubaki(1975)는 이들 기생균들은 일반적으로 분생포자 상태에서 고등균류에 부착하여 서식한다고 하였으며, Hoch(1977)는 이 균들이 기주 세포에 침투하지는 않지만 자실체 표면을 덮어면서 생장한다고 하였다. Sohi and Upadhyay(1986)는 야생상태의 구멍장이 버섯에도 주로 어린 버섯에 발생하며 특히 인공재배하는 양송이버섯과 여름느타리버섯에도 어린 버섯에 많이 발생한다고 보고하고 있다.

Fletcher(1981)는 1964~1970년 사이에 양송이버섯에서 기생균의 발생이 증가하여 1969년 많은 농가에서 관심을 갖게 되었다고 보고하고 있지만, 이들 대다수가 양송이버섯에서 보고되어 있을 뿐이며, 최근 국내에서도 이와 유사한 해균들의 발생이 자주 눈에 띄고 있어 이들 균이 확산될 경우 국내 버섯재배 농가에서도 상당한 피해가 우려된다.

본 연구는 아직 국내에서 보고되지 않은 *Cladobotryum varium*에 의한 팽이버섯의 병징과 감염된 조직으로부터 분리하여 관찰한 *C. varium*의 균학적 특징을 보고하고자 한다.

*Corresponding author

재료 및 방법

병발생 조사

팽이버섯의 재배단계는 배지제조 및 배지살균(1일), 팽이버섯 종균접종(1일), 균배양 기간(18~21일), 균꺾기 (1일), 어린 버섯 발생 유도기간(10~12일), 어린 버섯 발생 후 억제기간(5~7일), 자실체 생육기간(5~7일) 등으로 총 재배 일수는 약 50일이 소요된다. 이들 단계별로 병발생을 조사하기 위하여 재배단계인 균꺾기 후부터 수확시기까지 각 단계별로 850 ml PP병에 팽이버섯 균배양이 완성된 배양병을 300병씩 임의 선별하여 재배조건이 조절된 재배사에서 병징이 발생하는 과정을 관찰하고 발병율을 조사하였다.

병원균 분리

팽이버섯 재배농가에서 수집한 이병조직을 길이 2 cm의 조각으로 잘라 25°C에서 3일간 습상 처리한 후, 이병시료에 형성된 균사를 취하여 PDA 배지에 이식한 후 25°C에서 8일간 배양하여 병원균의 배양적 특징을 관찰하고 팽이버섯 균과 병원균의 대치배양은 병원균 이식 4일전에 미리 PDA 배지에 팽이버섯 균을 배양한 후 병원균을 이식하여 상호생육 상태를 관찰하였다.

단포자 분리

병원균의 단포자 분리는 PDA 배지에 병원균을 이식하여 25°C에서 8일간 배양한 후 배지의 표면에 형성된 병원균의 균사 층에 멸균수 주입하여 스페츨라로 배지의 표면을 끌어 2중 가제로 걸러낸 여액에 Tween 80을 0.05% 첨가하여 현미경하에서 포자가 10개/1 ml 정도 되게 현탁한 후 단포자를 분리하였으며 분리된 단포자는 농업과학기술원 응용미생물과 균주보존실(4°C)에 보관중인 균주를 공시하였다.

병원균의 현미경적 관찰

PDA 배지 표면에 살균된 cover glass(25×50 mm)를 petri dish 양쪽 끝 부분에 올려놓고 배지의 중앙에 공시 균주를 이식하여 25°C에서 4일간 배양 후 cover glass의 표면에 형성된 균사의 특징을 광학 현미경상에서 150~600배로 관찰하고 포자와 후막포자의 형태는 Lactophenol cotton blue, 분생자경은 1% Phloxine로 염색 후 3% KOH로 세척하여 형태를 관찰하였다. 포자의 전자현미경적 관찰은 병원균이 생육한 PDA 배지를 5×5 mm로 절편하여 2.5% glutaraldehyde 용액(pH 7.0, phosphate buffer)으로 상온에서 2시간 고정 후 buffer 용액으로 3회 세척하고 2% Osmic acid로 90분간 고정, 증류수로 2~3회 세척하고 고정시킨 후 30%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% ethanol로 각각 60분씩 탈수하였으며 amyl acetate로 실온에서 40분간 치환하여 Hitachi HCP-2 critical point dryer로 건조시켜 Eiko IB-3 ion coater로 gold coating 후 Hitachi S-570 SEM(scanning electron microscope)으로 관찰하였다.

병원균의 동정

팽이버섯에 발생하는 흰곰팡이 병원균의 동정은 병징, 균총의 형태, 분생자경의 크기 및 형태, 분생포자의 크기 및 형태, 후벽포자의 크기 및 형태적 특징을 Hoog(1978) 및 Rogerson and Samuels(1989) 등의 분류방법에 따라 불완전세대를 동정하였다.

결과 및 고찰

병징 및 병발생

팽이버섯 균배양이 완료된 배지상태에서 자실체의 발생을

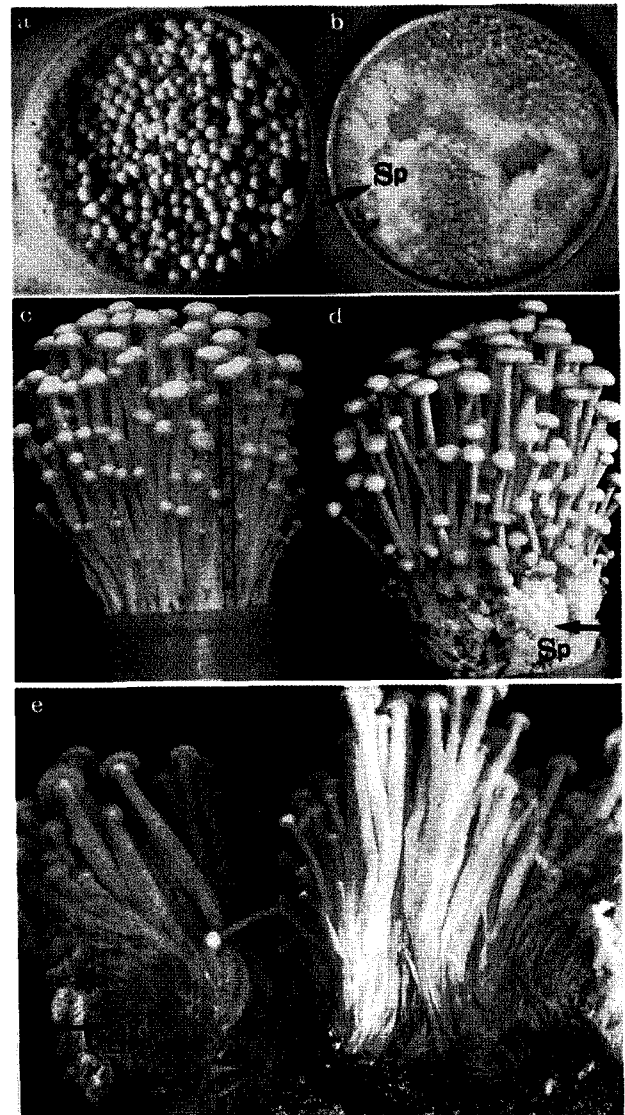


Fig. 1. Symptoms on *F. velutipes* at infected with *Cladobotryum varium* by different growth stages.

a. Normal pinheading. b. Symptom on pinheading stage. c. Normal fruiting body. d. Symptom on fruiting body growth stage. e. Symptom on the lower stems of *F. velutipes* infected with *C. varium*. Note the lower part was rotten. *Sp, symptom.

Table 1. Infection rate of *F. velutipes* with *Cladobotryum varium* by growth stages

Growth stage	Infection rate (%)
Pinheading*	37
Controlling**	63
Development of fruiting body	0

*after scratching 12~13 days.

**after scratching 15~17 days.

유도하기 위하여 배지의 표면에 균균기 처리를 하고 환경이 조절된 재배사로 옮겨 자실체 발생을 유도하였다. 이때 배양이 완성된 배지의 표면에 기계로 균균기 처리 후 약 3~4일 되면 새로운 팽이버섯 균사가 톱밥배지의 표면에 재 부상하고 약 5~7일 후면 어린 버섯의 발생이 시작되어 갓의 형태가 갖추어진다(Fig. 1-a). 이때부터 어린 버섯의 갓 부분에 병원균이 존재하기 시작하여 부정형의 흰 균사가 형성되면서 균균기 후 약 12~13일 에는 자실체의 표면에 병원균이 부착하여 부분적으로 하얀 균사가 형성되기 시작한다(Fig. 1-b). 그 후 자실체의 억제단계에서 시간이 경과할수록 병원균의 균사가 어린 버섯의 자실체를 완전히 덮어 생장을 정지시켰으며 마치 거품(dry bubble)이 생긴 모양을 하면서 약 4~5일이 경과하면 균사에 무성포자가 많이 형성되었다.

그리고 드물지만 다소 늦게 자실체가 성숙할 시기에도 발병하는데 자실체의 줄기 부분이 감염되어 세포조직이 물러지게 되고(Fig. 1-d), 상품가치가 떨어진다(Fig. 1-e). 이 증상은 어린 버섯 발생시나 억제시에 이미 병원균이 감염되어 쪼거나 병징이 늦게 진전된 것으로 생각된다. 그러나 자실체 발생시나 억제단계에서 병원균이 감염되지 않는 한 성숙한 자실체는 큰 문제가 되지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1-c). 그 결과는 Table 1과 같이 어린 버섯 발생시에 63%로 발병율이 가장 높고, 억제시에는 37%, 자실체 생육시에는 발병이 되지 않았다. 이 병의 전반은 병반 위에 형성된 분생포자들이 재배사내 냉방용으로 설치된 팬의 바람에 의해서 분생포자가 비산 되거나 수확하기 위하여 팽이버섯 재배용기를 돌려 싸고있는 종이봉지를 제거할 때 분생포자가 공기중에 비산 되어 재배사 전체에 감염되는 것으로 생

Table 3. Characteristics in mycelial growth of *Cladobotryum varium* on PDA

Characteristics	<i>C. varium</i>
mycelial of colony (mm/6 days)	61
mycelial density	++++
mycelial colour	white
medium colour	pale yellow to golden yellow
conidiophore formation	form
conidiophore colour	white

*incubation temperature (°C): 25, pH: 6.0.

각된다.

Tubaki(1975)는 이들 기생균들은 일반적으로 분생포자 상태에서 고등균류에 부착해서 서식한다고 하였으며, Sohi and Upadhyay(1986)는 야생상태의 구멍장이 버섯에서 주로 어린 버섯에 발생하며 특히 인공재배하는 양송이버섯과 여름느타리버섯에도 어린 버섯에 발생한다고 보고한 바 있어 본 결과에서도 병원균의 기주는 다르지만 팽이버섯의 어린 자실체를 감싸는 것과 자실체의 밑 부분이 물러지는 현상으로 보아 이들 균과의 특성이 비슷한 것으로 생각된다.

배양적 특성

팽이버섯 자실체에 발생하는 병원균을 분리한후 PDA 배지에 배양하여 배양적 특성을 조사한 결과, Table 3과 같이 균사생육은 25°C에서 6일만에 61 mm로 자라 생육속도가 빨랐으며, 균총은 흰색이고, 균사의 초기 생육 형태는 솜털 모양으로 공중 균사가 형성되나 배양기간이 지나면서 분생포자가 형성되어 균총 층이 배지에 밀착형으로 변하고 배지는 균사가 생육함에 따라 연노랑에서 진노랑으로 변하였다.

분생포자의 형성은 배지의 가장자리 부분으로 형성하며 분생포자의 형성량은 많았다(Fig. 2-a). 분생포자의 발아는 PDA 배지상에서 12시간만에 단포자에서 한쪽 또는 양쪽으로 발아하기 시작하며(Fig. 4-a), 24시간 후에는 균사가 많이 분지 되었다(Fig. 4-b).

그리고 팽이버섯 균사와 병원균을 대치 배양한 결과, 병

Table 2. Comparison of morphological characteristics between two *Cladobotryum varium*

Characteristics	Authore	Rogerson and Samuels (1993)
Colony diameter (mm/days)	17.8	-
Colony colour	white	white
Hyphal width (μ m)	3.0~4.0	-
Odour	not pronounced	-
Conidiophore size (μ m)	32.8~50.4	35.0×65.0
Conidiophore branching	diffusely verticillate	-
Conidial size (μ m)	8.5~10.0×16.1~17.0	5.0~7.5(-10)×(8.5-)10.0~16.0(-21.0)
Conidia shape	1 septate (ellipsoidal or obovoidal)	1 septate (ellipsoidal or obovoidal)
Chlamyospore size (μ m)	12.7~18.0×17.7~48.1	12.0~18.0×18.0~48.0
No. of septum	1~4 cells	1~4 cells

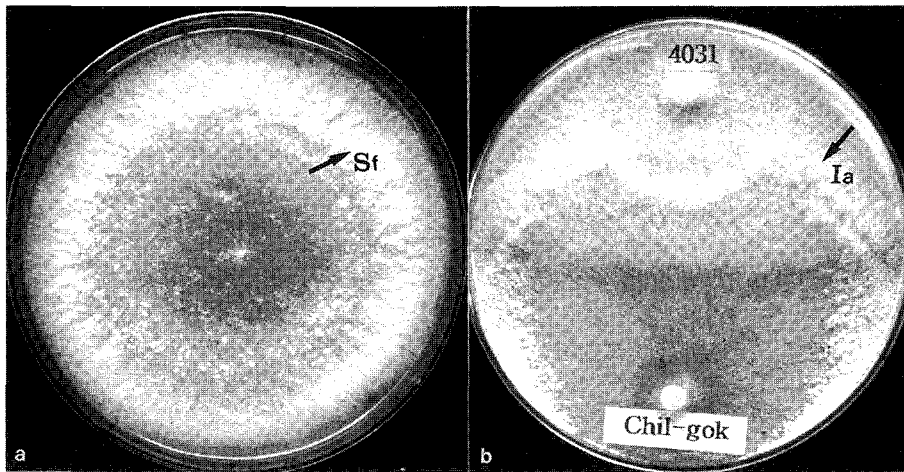


Fig. 2. Formation of stromata by *Cladobotryum varium* and dual culture between *F. velutipes* and *C. varium* on PDA.
 a. Hyphal color and shape (6 days/25°C), Sf, Spore formation site. b. Dual Culture for *F. velutipes* (ASI 4031) and *C. varium* from Chil-gok (10 days/25°C), Ia, Infected area.

원균이 팽이버섯 균사를 완전히 피복하면서 팽이버섯 균사는 생육이 정지되었다(Fig. 2-b). 균사의 형태는 격벽이 있으며 격벽이 있는 가까운 쪽에서 균사가 분지되며 균사의 폭은 3.0~4.0 μm 로 넓었다(Table 2).

병원균의 형태적 특징 및 동정

병원균의 형태적 특징을 조사하기 위하여 Hoog(1978)과

Rogerson and Samuels(1989)의 분류방법에 따라 동정한 결과는 Table 2와 같다. 분생자경은 직립형이며, 2~4개로 분지되었다. 분생자경의 윗 부분은 가늘고 단생형으로 크기는 32.8~50.4 μm 이고, 분생자경 위에 형성되는 분생포자 형성세포의 형태는 전출아형(holoblastic)이며, 포자가 탈락한 정단부는 단추모양의 홈이 남고 타원형이었다(Fig. 3-b). 분생포자는 분생자경 위에 연쇄상으로 연결되어 있으며

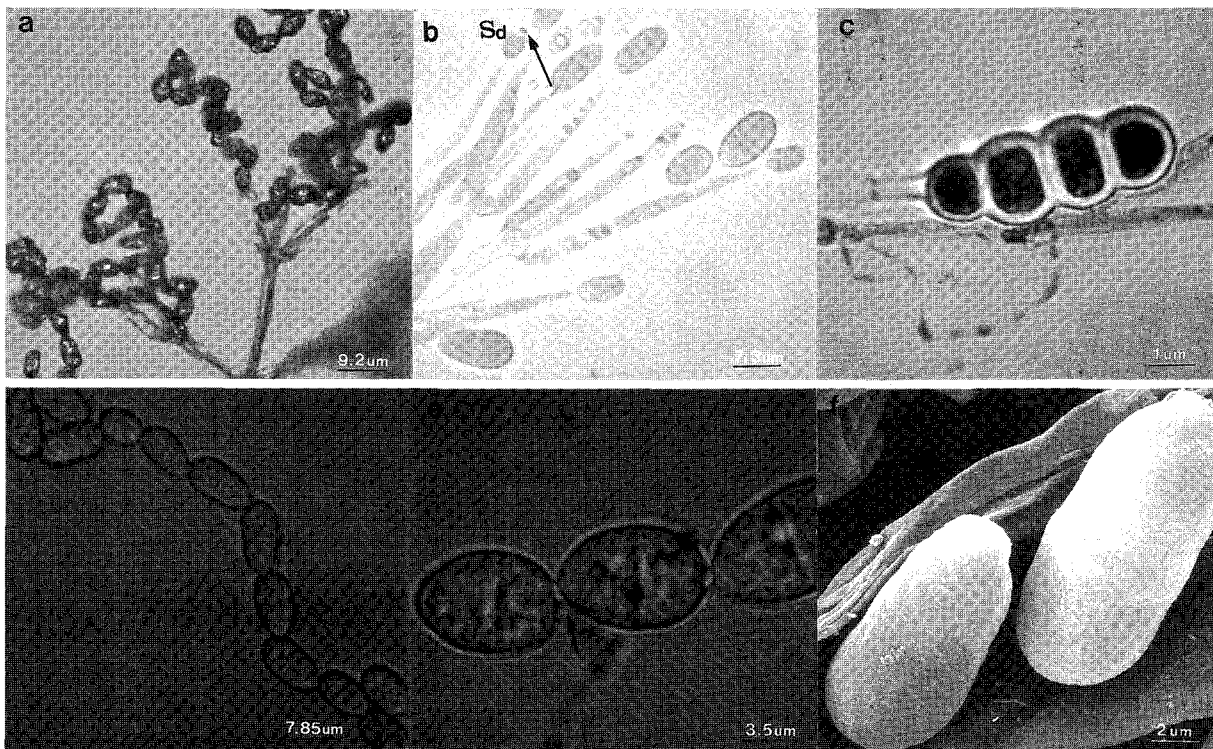


Fig. 3. Morphology of *Cladobotryum varium*.
 a. Conidia formation on PDA plate($\times 300$). b. Conidiogenous cells shaving in conidial development ($\times 600$), Sd, Small disc at the apex. c. Chlamydospore (1 and 4 cells, $\times 500$). d. Conidia which was linearly linked for easy dispersion ($\times 600$). e. Conidia which is linked like bead ($\times 1,500$), Sc, Shape in chains. f. Conidia observed under SEM ($\times 5,000$).

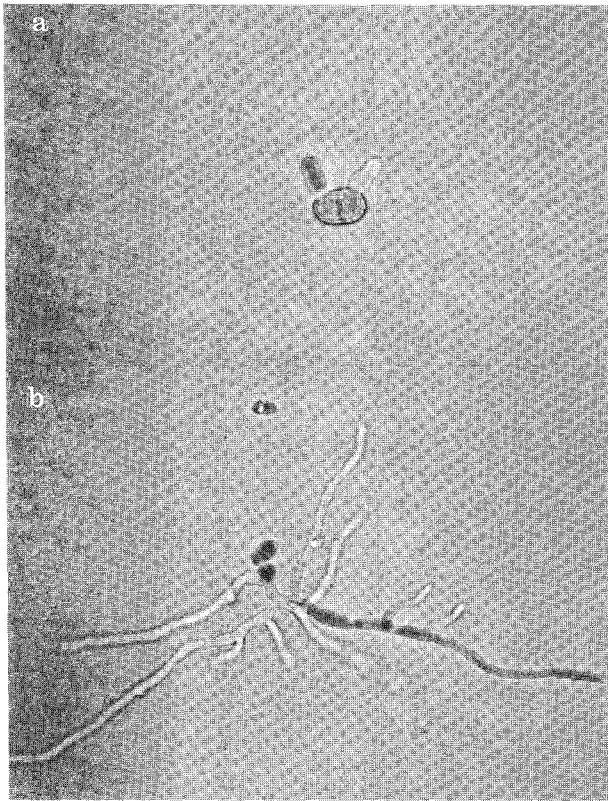


Fig. 4. Conidial germination of *Cladobotryum varium* on PDA.
a. 12 hours after placing on PDA ($\times 300$). b. 24 hours after placing on PDA ($\times 300$).

(Fig. 3-a), 포자와 포자 사이의 연결 형태는 정단 부분이 서로 연결된 모양이었다(Fig. 3-d). 연결된 모양을 더 확대해서 보면 구슬을 실로 꿰 모양으로 되어 있었다(Fig. 3-e). 분생포자의 형태는 표면이 부드럽고 타원형 또는 난형이며 2개의 세포로 되어 있었다(Fig. 3-d).

그러나 전자 현미경상에서는 중앙부위의 세포벽이 부풀어 있으며(Fig. 3-f) 격벽은 보이지 않았다. 분생포자의 크기는 $8.5\sim 10.0 \times 16.1\sim 17.0 \mu\text{m}$ 이었다. 후벽포자는 1~4개의 격벽이 있으며(Fig. 3-c), 크기는 $12.7\sim 18.0 \times 17.7\sim 48.1 \mu\text{m}$ 이었다. 이러한 결과는 Hoog(1978)과 Rogerson and Samuels(1989)의 보고와 유사하여 불완전세대를 *Cladobotryum varium*으로 동정 하였다.

적 요

팽이버섯 톱밥 병재배시 자실체에 발생하는 *Cladobotryum varium* 병원균을 재배농가에서 수집하여 관찰하였다.

Cladobotryum varium 병원균은 주로 팽이버섯 재배사내에서 어린 버섯 발생 후에 버섯을 기주로 감염되는 병원균으로 초기에는 흰 균사가 부분적으로 발생되면서 자실체 전체를 피복시키고 또한 분생포자에 의해 계속 감염되는 현상으로 어린 버섯 발생시에 63%의 높은 발병율을 보였다. 이들 병징으로부터 균을 분리하여 배양적 특성을 조사한 결과 균사생육은 25°C 에서 17.8 mm/일 로 빨랐으며, 균사의 색택은 흰색이었다. 그리고 대치 배양시 팽이버섯 균은 생육이 정지되면서 병원균이 전체적으로 피복되었다.

병원균에 대한 형태적 특징은 균사의 폭이 $3.0\sim 4.0 \mu\text{m}$ 로 2~4개의 분생자경을 형성하며 크기는 $8.5\sim 10.0 \times 16.1\sim 17.0 \mu\text{m}$ 로 직립형이다. 분생포자는 사슬처럼 연쇄상으로 형성되고 1개의 격벽이 있으며 크기는 $32.8\sim 50.4 \mu\text{m}$ 로 타원형 또는 난형이었다. 후벽포자는 1~4개의 격벽이 있으며 크기는 $12.7\sim 18.0 \times 17.7\sim 48.1 \mu\text{m}$ 로 팽이버섯에 발생하는 흰곰팡이 병의 불완전세대를 *Cladobotryum varium*으로 동정하였다.

참고문헌

- きのこ年監. 1998. 農村文化社. 23 p.
 농림부. 1989. 농림수산통계연보. 200-207.
 농림부. 1999. '98 특용작물생산실적. 8 p.
 Fletcher, J. T. 1981. The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Lmbach. *Mushr. Sci.* **XI**: 597-604.
 Forer, L. B., Wuest, P. J. and Wagner, V. R. 1974. Occurrence and economic impact of fungal disease of mushrooms in Pennsylvania. *Plant Dis. Repr.* **58**: 987-991.
 Hoch, H. C. 1977. Mycoparasitic relationships. III. Parasitism of *Physalospora obtusa* by *Calarisporium parasiticum*. *Can. J. Bot.* **55**: 223-240.
 Hoog de, G. S. 1978. Notes on some fungicolous Hypomyces and their relatives. *Persoonia* **10**: 33-81.
 Hus, Hoang-Kao and You-Hsin, Han. 1981. Physiological and ecological properties and chemical control of *Mycogone perniciosa* Magn. causing wet bubble in cultivated mushroom. *Mushroom Science* **XI**: 403-425.
 Rogerson, C. T. and Samuels, G. J. 1993. Polyporiculous species of *Hypomyces*. *Mycologia* **85**: 231-272.
 Sohi, H. S. and Upadhyay, R. C. 1986. Occurrence of *Cladobotryum variospermum* (Ling) Hughes on *Polyporus* fungi under natural conditions. *Curr. Sci.* **55**: 1037-1038.
 Tubaki, K. 1975. *Hypomyces* and the conidial states in Japan. *Rept Tottori Mycol. Inst.* **12**: 161-169.