

길항작용을 나타내는 *Trichoderma harzianum* SJG-99721의 분리 및 형태학적 특징

이 호 용* · 민 봉 희¹

상지대학교 생명과학과, ¹대구대학교 생명과학부

Isolation and Morphological Characterization of *Trichoderma harzianum* SJG-99721, a Powerful Biocontrol Agent

Ho Yong Lee* and Bong Hee Min¹

Department of Biological Science, Sang Ji University, Wonju 220-702, Korea

¹Division of Biological Science, Daegu University, Kyungsan 712-714, Korea

Abstract - Species of Genus *Trichoderma* are commercially applied as biological control agents against fungal pathogens. A powerful biocontrol agent, *Trichoderma* sp. SJG-99721 was isolated from 305 isolates by morphological characters, chitinase activities and antifungal activities against *Phytophthora capsici*. The isolate was identified as *Trichoderma harzianum* from various features such as growth rate at 27 °C, significant growth ratio of 27°C to 17°C, amount of aerial mycelium, types of branching system, and disposition patterns of phialide and phialospore. *Trichoderma harzianum* SJG-99721 have been shown to act as a powerful biological agent against fungal phytopathogens; *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycoshaerella melonis*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata*, *Phythium ultimum*, *Phytophthora drechsleri*, *Pyricularia grisea*.

Key words : Antifungal agent, Biocontrol agent, Chitinase activity, Phytopathogenic fungi, *Trichoderma harzianum*

서 론

*Trichoderma*속은 1794년 Persoon에 의해 처음 분류학적으로 언급되었으며 주위환경에 널리 분포하며 쉽게 분리되고 배양된다는 점이 이들의 특징이다. 그 동안 관심에서 사라졌던 이 균주가 학계의 주목을 받게 된 것

은 바로 버섯을 재배함에 있어 심각한 질병의 원인 균임이 밝혀졌기 때문이다(Beach 1937). 1953년 Sinden과 Hauser는 *Trichoderma*종이 양송이 버섯 생산에 있어 매우 치명적인 수확 감소를 일으키고 있음을 확인하였으며 이러한 원인은 바로 이들이 갖는 다른 곰팡이에 대한 포식능력 때문임을 알게 되었다. *Trichoderma*속의 이같은 강력한 제어능력은 곰팡이 세포벽의 구성성분인 chitin과 glucan을 분해하는 효소를 분비하기 때문이며 특히 *Botrytis cinerea* 등 식물 병원균 억제에 매우 효과

* Corresponding author: Ho Yong Lee, Tel. 033-730-0432.
Fax. 033-730-0403, E-mail. hylee@mail.sangji.ac.kr

적인 것으로 밝혀졌다 (Pandey *et al.* 1977; Ait-Lahsen *et al.* 2001; Donzelli and Harman 2001).

*Trichoderma*속의 대부분은 주변의 토양과 유기물에서 광범위한 분포를 나타내고 있어 손쉽게 분리할 수 있으며 많은 기질에서 아주 빠른 속도로 증식하는 특징이 있다. 특히 다양한 종류의 효소를 생산하여 여러 가지 병원성 균주에 대한 폭넓은 항균능력을 나타내고 있어 (Samuels 1996) 이러한 능력은 생물학적 제어제로서 *Trichoderma*의 사용 가능성을 제시하게 되었다.

일반적으로 *Trichoderma*속 균주들은 대부분의 합성 배지에서 매우 빠르게 성장하며 고도로 분화된 conidiophore의 끝에 포도상의 포자들을 대량으로 생산하는 특징이 있어 속 분류가 비교적 용이하다. 그러나 이들의 유사한 형태적 특징은 도리어 종 분류에 있어 혼돈을 가져오게 하여 그 분류를 어렵게 하기도 한다. Rifai (1969)는 *Trichoderma*속을 형태적 특징에 따라 9종으로 분류하였으며, Bisset은 1984년부터 일부 종에 대한 재분석을 실시하여 *T. polysporum*, *T. hamatum*, *T. pilukiferum*을 하나로 묶었고 *T. harzianum*과 *T. virens* 그리고 몇 가지 새로운 종들을 *Pachybasium* section으로 분류하였다 (Basset 1991a, b). 즉 Rifai (1969)와 Bisset (1984, 1991a, b)의 분류방법에는 기본적인 차이가 있으나 본 실험에서는 Rifai (1969)와 Seaby (1996)의 분류에 따라 분리 균주를 형태학적으로 동정하였다.

1985년 북 아일랜드의 엄청난 버섯재배 피해로 인해 *Trichoderma harzianum*이 가장 위험한 종류로 밝혀지게 된 이후 (Doyle *et al.* 1991) 특히 *T. harzianum*에 대한 연구가 집중되게 되었으며 분류학적 연구로 인해 *T. harzianum*이 여러 taxa로 이루어져 있으며 그 중 단 한가지만이 푸른곰팡이 병의 주된 원인 균으로 작용함을 알게 되었다 (Seaby 1987, 1996; Ospina-Giraldo *et al.* 1999). 미국의 Samuels (1996) 역시 *Trichoderma*속에 대한 전반적인 검토를 통해 이들이 버섯의 푸른곰팡이 병을 유도할 뿐만 아니라 식물 병원균을 제어하는 생물학적 제어능력을 갖고 있음을 알게 되었다.

*T. harzianum*의 곰팡이 병원균에 대한 생물학적 제어 효과는 이제 상업적으로 매우 중요하게 인식되고 있다. 특히 화학합성 농약의 여러 가지 문제점으로 인해 앞으로 그 효율성이 더욱 증대될 것으로 판단된다.

본 연구에서는 국내 환경에 가장 적합한 생물학적 제어제 개발을 위하여 국내 토양으로부터 *T. harzianum*의 분리를 시도하였으며 분리 균주의 식물 병원성 균주에 대한 길항성을 측정하여 길항 능력이 가장 뛰어난 1종을 선발하여 그 생리 형태학적 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

1. *Trichoderma* 균주의 분리

강원도, 충청북도, 전라도 지역에 위치하고 있는 푸른곰팡이 병에 오염된 버섯 농장에서 1997년부터 3년간 305 균주를 분리하였다. 오염된 버섯배지 60g을 채취하여 200 ml의 0.015 M phosphate saline buffer (pH 7.2)에 넣어 1분 간격으로 3분간 3회 stirrer로 천천히 교반하였다. 잘 섞여진 용액을 필터로 걸러 배지를 제거한 후 여과액 100 μ l를 potato dextrose agar (PDA) 배지에 접종하였다. 배지에서 성장한 균사의 형태, 포자의 색, 균사의 성장속도 등을 기준으로 *Trichoderma*속 균주를 우선 분리하였다. *Trichoderma*속의 종 분류는 Morris와 Doyle (1995a, b), Rifai (1969), Seaby (1996) 및 Gams와 Bissett (1998)의 분류방법에 준하였다.

2. 길항균주의 분리

분리된 모든 균주의 배양은 30°C에서 60시간 실시하였으며 3차 계대배양을 통하여 활성도가 높은 균주를 식물 병원균과 동시 배양하여 길항균주를 선발하였다. 식물 병원균으로는 고추 역병균인 *Phytophthora capsici*를 선택하였으며 25°C에서 2일간 동시에 배양하였다. 이 과정을 통하여 *Phytophthora capsici*에 대한 길항작용을 나타내는 83개 균주를 분리하였으며 현미경을 이용한 포자 분리방법, 제어능력 및 성장속도 등으로 11개 균주를 선택하였다. 또한 배양온도를 달리하여 역병균과 길항균의 성장속도를 측정하여 배양온도에 따른 길항효과를 비교하였다. 선택된 균주는 -20°C PDA 사면배지에서 보관하였다 (Royse and Ries 1978).

3. Chitinase 생산성 확인 및 활성도 조사

분리된 길항균의 chitinase 생성 여부를 조사하기 위하여 chitinase 생산배지 (Colloidal chitin 4 g, K₂HPO₄ 0.7 g, MgSO₄ · 5H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, MnCl₂ 1.0 mg, ZnSO₄ 1.0 mg, agar 20 g, D.W 1 L, pH 7.0)에 배양하면서 colloidal chitin의 분해로 생성되는 clear zone의 크기로 chitinase의 활성도를 판단하였다. 이 과정을 통하여 chitinase 활성도가 가장 높은 1개 균주를 최종 선발하여 실험에 사용하였다.

4. 형태학적 관찰

집락의 크기는 25°C malt extract agar (MEA)에서 14

Table 1. Strains of phytopathogenic fungi used in this experiment

Symbol	Scientific name of phytopathogen
B-1	<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40574
B-2	<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40111
B-3	<i>Phytophthora cryptogea</i> KACC 40189
B-4	<i>Phytophthora capsici</i> KACC 40158
B-5	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 40457
B-6	<i>Mycosphaerella melonis</i> (Isolated strain)
B-7	<i>Alternaria solani</i> KACC 40570
B-8	<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 40236
B-9	<i>Collectotrichum gloesporioides</i> KACC 40005
B-10	<i>Alternaria alternata</i> KACC 40020
B-11	<i>Phythium ultimum</i> KACC 40705
B-12	<i>Phytophthora drechsleri</i> KACC 40705
B-13	<i>Pyricularia grisea</i> KACC 40415

All strains were obtained from the National Institute of Agricultural Science and Technology.

일간 배양하여 관찰하였다.

Chlamyospore 형성과 conidiogenous cell과 conidia의 크기 역시 같은 조건에서 조사하였으며 형태학적 관찰에 따른 평균값은 각 조건에서 8회 실험을 통하여 구하였다.

5. 길항균주의 병원성 곰팡이에 대한 제어효과

최종 선택된 분리 길항균주의 병원성 곰팡이에 대한 성장 저해효과를 확인하였다. 모두 13종의 병원성 곰팡이를 농업과학기술원으로부터 분주받아 본 실험에 사용하였다(Table 1).

결 과

1. 형태학적 관찰

분리한 *Trichoderma* sp. SJG-99721의 집락은 매우 빠르게 성장하여 72시간이 되면 PDA 배지에서 45 mm 정도 성장하였으며 부드러운 표면을 형성하였다. 배양 초기에는 하얀색의 균사를 형성하다가 균사체가 표면에 발달되면서 중앙 부위부터 포자형성이 나타나 연녹색을 띄다가 결국에는 짙은 녹색을 나타내었다(Fig. 1). 그러나 배지 뒷면에서 집락을 관찰하면 다른 색을 나타내지는 않았다. 균사체는 격막을 가지고 있으며, 가지가 나뉘어 있고, 색은 없으며, 1.5~12 μ m의 직경을 가지고 있었다. 포자는 대부분 균사체의 끝에서 형성되었으며 모든 phialospore들은 구형에 가까운 구조를 나타내고 있었다(Fig. 2 및 Table 2).

균사 성장의 최적온도는 25°C였으며 31°C 이상에서는 균사 성장이 극히 제한되었다. 또한 15°C 이하에서는 균사의 성장속도가 50% 감소되었으며 8°C 이하에서는 균사가 성장하지 않았다. 최적 온도에서 균사의 시간당 성장률은 1.1 mm 이상으로 다른 균주에 비하여 현저히 빠른 것으로 나타났으며 성숙한 포자의 모양은 부드럽고 구형에 가까운 모양이었다. 균사의 형태, 균사의 성장률, 성숙 포자의 크기 및 형태, 배양상의 특징 등을 고려하여 분리 균주는 *Trichoderma harzianum*으로 동정할 수 있었다.

2. 배양온도에 따른 고추 역병균에 대한 길항성 실험

Trichoderma harzianum SJG-99721과 *Phytophthora*

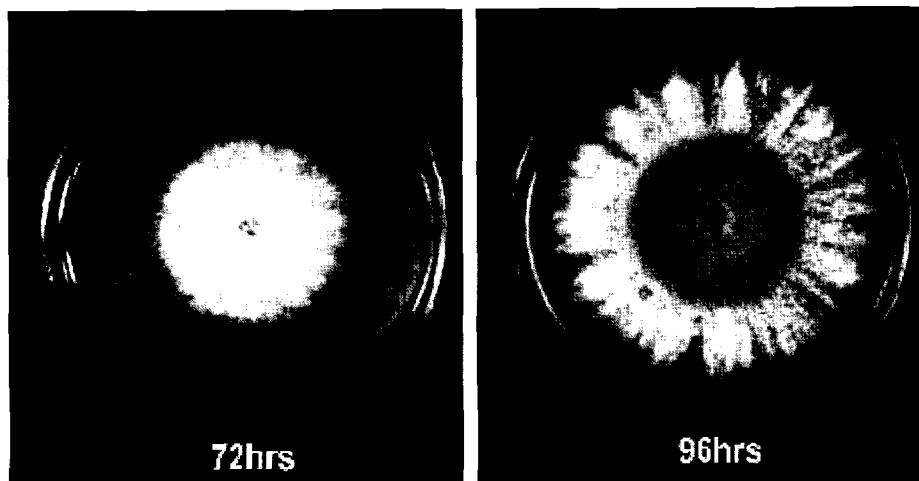


Fig. 1. Mycelial growth and spore formation of *Trichoderma* sp. SJG-99721 on PDA plate.

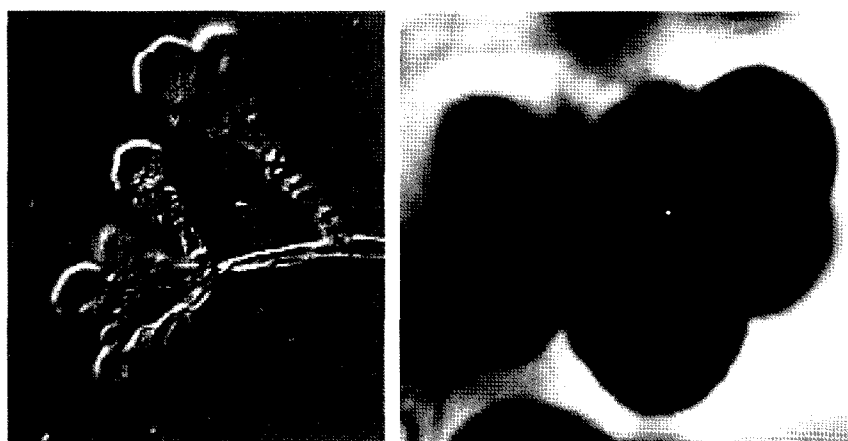


Fig. 2. Microscopic photograph of branching system and disposition patterns of phialide and phialospore indicating the typical characteristics of *Trichoderma harzianum*.

Table 2. Main characteristics of *Trichoderma* sp. SJG-99721

Phialides	Conidial wall size (μm)	Culture edge Sporulation colour	Growth rate (mm/h at 25°C)	Ratio of growth rate (25°C/15°C)
Short and close	Smooth short ovoid 3.5 × 3.5	Smooth White, dull green	1.14	2.21

Table 3. The virulence of *Trichoderma harzianum* SJG-99721 against *Phytophthora capsici* at various temperatures

Temp. (°C)	<i>Trichoderma harzianum</i> SJG-99721 ^{a)}	<i>Phytophthora capsici</i> ^{b)}	
		With <i>Trichoderma harzianum</i> SJG-99721	Without <i>Trichoderma harzianum</i> SJG-99721
22	3.8	2.0	3.1
25	4.5	1.3	3.6
27	4.5	1.2	4.1
30	1.9	3.2	3.8

^{a)} The numbers indicate the colony diameter (cm) of *Trichoderma harzianum* SJG-99721.

^{b)} The numbers indicate the colony diameter (cm) of *Phytophthora capsici* cultured with and without *Trichoderma harzianum* SJG-99721.

Each data represent the mean of six scores. The effect of temperature is significant ($p < 0.001$).

capsici 간의 동시 배양에서 성장속도에 미치는 온도의 영향을 알아본 결과는 Table 3과 같다. 배양시간은 120 시간이었으며 90 mm 펠트리 접시에서 배양하여 생성되는 집락의 직경을 측정하였다. 모든 배양온도에서 길항균은 고추 역병균에 대한 성장 저해를 나타내었으며 특히 27°C에서 가장 저해가 큰 것으로 나타났다.

3. 식물 병원균에 대한 저해효과

Fig. 3에서 보는 바와 같이 *Trichoderma harzianum* SJG-99721은 대부분의 병원균을 완전히 제압하여 성장을 불가능하게 하였으며 일부의 병원균도 성장은 하지만 매우 제한적이어서 작물에 병을 일으키지 못할 것으로 판단되었다.

또한 토양 내에서 잿빛 곰팡이병의 원인균인 *Botrytis cinerea* KACC 40574와 *Trichoderma* 균 배양액을 같이 처리하여 실험한 결과에서도 15일 후에는 잿빛 곰팡이병의 원인균이 토양에서 거의 발견되지 않아 다른 곰팡이 질병에도 효과적임을 확인하였다.

적 요

PDA 배지에서 25°C로 배양할 때 초기 균사의 색은 흰색을 띠고 있었으며 배양 후기에 생성되는 포자의 색은 짙은 푸른색을 나타내고 있었다. 시간당 성장률은 1.1 mm보다 빠른 것으로 나타났으며 성숙한 포자의 모양은 부드럽고 구형에 가까운 모양이었다. 이러한 형태학적 결과는 시간당 성장률이 0.5~0.7 mm 이하인 *Trichoderma viride* 및 *T. hamatum*의 특징과 성숙 포자의 모양이 실린더 모양인 *T. koningii*, *T. longibrachiatum*과

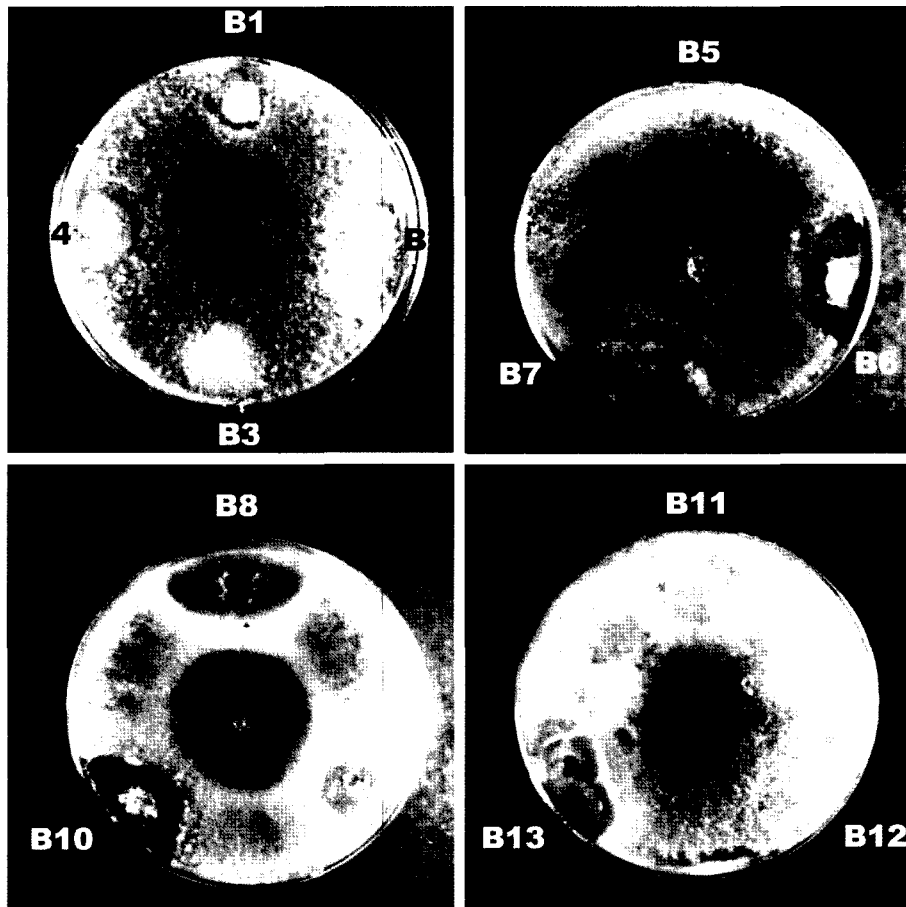


Fig. 3. Biocontrol effect of *Trichoderma harzianum* SJG-99721 on phytopathogenic fungi. The growths of pathogenic fungi (B-1~B-13 in Table 1) were inhibited by *Trichoderma harzianum* SJG-99721 (center).

구별되는 결과였다 (Raifai 1969; Seaby 1996; Gams and Bissett 1998). 또한 *Trichoderma harzianum*의 분류에 있어 가장 중요한 구조는 phialospore의 형태가 구형이어야 하며, 포자의 길은 부드럽고 크기는 $2.5 \sim 3.0 \times 3.4 \sim 4.0 \mu\text{m}$ 정도인 것이 특징이다 (Morris and Doyle 1995a, b). 이러한 결과를 종합하여 분리 균주를 동정한 결과 *Trichoderma harzianum*으로 확인할 수 있었다.

*Phytophthora capsici*에 대한 분리 균주의 성장저해 정도를 측정한 결과 27°C 의 조건에서 가장 높은 길항력을 나타내었으며 다른 곰팡이에 대한 성장억제도 이 온도에서 가장 높을 것으로 판단되었다. 또한 31°C 이상에서는 *T. harzianum* SJG-99721의 성장 속도가 급속히 떨어짐을 확인한 바 이러한 성질을 이용하여 느타리버섯의 균사 배양시 고온 배양을 실시할 경우 푸른곰팡이 병 오염을 극히 제한할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 이러한 고온에서의 성장 속도 제한은 식물 병원성 미생물과의 길항 작용에서도 영향을 미치는 만큼 생물

농약으로서의 사용은 토양 온도가 30°C 가 넘지 않는 기간에 최대한 토양 내에서 증식이 이루어지도록 조치해야 한다.

진균성 식물 병원균의 세포벽 분해효소인 extracellular chitinase의 높은 활성도를 확인함으로써 *Trichoderma harzianum* SJG-99721의 강력한 식물 병원균 제어능력은 이들의 높은 chitinase의 활성도에 의한 것으로 유추할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 2001년도 대구대학교 학술연구비의 부분적 지원에 의해 수행되었기 이에 감사드립니다.

참고 문헌

Ait-Lahsen H, Soler A, Rey M, de La Cruz J, Monte E and

- A Llobell. 2001. An antifungal exo- α -1, 3-gluco-
nase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 67:5833-5839.
- Beach WS. 1937. Control of mushroom disease and seed fungi. Penn. State Coll. Agric. Bull. 351:1-32.
- Bisset J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- Bisset J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69:2357-2372.
- Bisset J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot. 69:2373-2417.
- Donzelli BG and Harman GE. 2001. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. Appl. Environ. Microbiol. 67:5643-5647.
- Doyle O, E Morris and K Clancy. 1991. *Trichoderma* green mould- Update. Irish Mush. Rev. 3:13-17.
- Gams W and J Bissett. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34. In *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. I. Basic biology, taxonomy and genetics. Kubicek CP and GE Harman, eds. Taylor and Francis, London.
- Morris E and O Doyle. 1995a. A profile of *Trichoderma* species I-Mushroom compost production. Sci. Cult. Edible Fungi. 611-618.
- Morris E and O Doyle. 1995b. A profile of *Trichoderma* species II-Mushroom growing units. Sci. Cult. Edible Fungi. 619-625.
- Ospina-Giraldo MD, DJ Royse, X Chen and CP Romaine. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mould. Phytopathology 89:308-313.
- Pandey RC, JC Cook Jr and KL Rinehart Jr. 1977. Structures of the peptide antibiotics. Emerimicins III and IV 1, 2. J. Am. Chem. Soc. 99:5205-5206.
- Raifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Papers 116:1-56.
- Royse DJ and SM Ries. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. Phytopathology 68:603-607.
- Samuels GJ. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100:923-935.
- Seaby DA. 1987. Further observations on *Trichoderma*. Mushroom J. 197:147-151.
- Seaby DA. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. Plant Pathol. 45:905-912.
- Sinden J and E Hauser. 1953. Nature and control of three mildew diseases of mushrooms in America. Mushroom Sci. 2:177-180.

(Received 2 March 2002, accepted 12 May 2002)