

원형느타리백색변이체에 존재하는 바이러스의 특성

이강호* · 김규현¹ · 이진경² · 석순자 · 원향연 · 김양섭 · 김완규 · 성재모³

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과, ¹천안연암대학 원예과, ²국립농산물품질관리원, ³강원대학교 농업생명과학대 생물환경학부

Characteristics of virus-like particles in color mutants of oyster mushrooms

Kang-Hyo Lee*, Gyu-hyun Kim¹, Jin-Kyung Lee², Soon-Ja Seok, Hang-Yeon Weon,
Yang-Sup Kim, Wan-Gyu Kim and Jae-Mo Sung³

Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon.

¹Department of Horticultural Bio-Industry, Cheonan Yonam College, Chungnam, 330-709.

²Ganghwa Branch Office, Gyeonggi Provincia Office, National Agricultural Products Quality Management Service

³Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chuncheon.

ABSTRACT : This study was carried out to characterize virus-like particles (VLPs) in *Pleurotus ostreatus*. The white and the dark gray mutants frequently observed in mushroom farms of *Pleurotus ostreatus* (Wonhyeong-neutari). A 5.8kb segments of dsRNA was detected only in the white mutants but not in the dark gray mutants. The VLPs were purified from the fruit bodies by Polyethylene Glycol (PEG) and ultracentrifugation. Electron microscopy analysis showed that VLPs were isometric about 14, 20~45nm in diameter. Further study is needed to reveal the morphological and yield variations of mushroom strains including VLPs observed in the mushroom farms. Also it is needed to maintain fundamental research for taxonomy, diagnosis, and physiology of VLPs in the mushroom strains.

KEYWORDS :

원형느타리 재배농가에서 자실체 갖색이 백색인 돌연변이체가 발생하는 경우가 있으며, 이 색소변이체는 원형느타리에서 유래된 것으로 확인되었으며, 또한 바이러스 게놈인 dsRNA가 검출되어 바이러스에 감염된 것으로 확인되었다. 자실체가 기형인 버섯이 발생하여 농가의 소득을 감소시키고 있을뿐만 아니라 농가와 종균을 공급한 배양소간의 문제가 되고 있다. 또한 색소돌연변이체와 기형자실체가 발생하는 농가에서 바이러스 감염증상이 많이 나타나고 있다.

진균은 생태계내에서 난분해성 물질분해, 중금속 흡착 등의 역할을 하는데 바이러스에 감염되면 곰팡이의 물질분해능력, 대사능력, 병원성을 약화시킨다 (Robert V. Forgarty and John M. Tobin. 1996.). 진균 바이러스는 23종의 곰팡이에서 총 43종류의 바이러스가 보고되었다 (ICTV, 2000). 버섯에서는 양송이 등 4종류에서 23종의 바이러스가 보고되어 있으며 (Harmsen et al., 1989 ; Rokuo, 1983 ; Morris and Dodds, 1979), 특히 느타리 바이러스는 한국과 일본에서 발견되었다 (Go et al., 1992 ; Liang et al., 1990 ; Park et al., 1994). 양송이에서 발견된 LIVP 바이러스에 대해서는 RT-PCR 용 특이프라머가 개발되었으며 (Romaine et al., 1995), 국내에서도 특이프라

머를 이용한 RT-PCR법과 특이항체를 이용한 TAS-ELISA법이 개발되었다 (고승주 · 차재순, 1999 ; 이현숙, 2000). 현재 개발되어 있는 진단용 프라이머와 항체를 이용하여 느타리버섯에 존재하는 바이러스의 종류와 특성에 대한 종합적인 정밀조사를 하기는 어려우며, 바이러스로 인한 피해예방 대책 수립, 느타리와 바이러스간의 상호작용 등에 대한 연구가 어려운 실정이다. 따라서 색소변이체에 존재하는 바이러스의 특성을 분석하여 느타리버섯 바이러스의 분류체계와 진단체계 확립을 위한 자료를 제공하고, 색소변이의 원인을 규명하기 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

원형느타리 재배농가에서 발생한 백색변이체 MGL2205, MGL2206 등을 공시균주로 하여 다음과 같은 분석을 하였다.

바이러스 감염 검정

원형느타리와 색소변이체의 total RNA를 추출한 후 일정량의 total RNA에 DNase와 S1 nuclease를 처리하여 바이러스의 유전체인 dsRNA를 확인하였다. RT-PCR용 핵산은 버섯시료 200mg에서 Trizol법으로 RNA를 추출하여

*Corresponding author: <khlee66@rda.go.kr>

사용하였다. RT-PCR 반응조건은 94°C 10 min → (94°C 1min → 55°C 60Sec → 72°C 1min) 35cycle을 이었으며, RT-PCR 검정에 사용한 느타리바이러스 진단용 프라이머인 PVP (고승주, 차재순, 1999)와 양송이버섯 바이러스 진단용 프라이머인 LIVP 등 (Romaine and Schlagnhauser, 1995)을 사용하였다.

바이러스유사입자의 순화 및 입자관찰

부분순화된 바이러스유사입자는 10~70% sucrose density gradients를 이용하여 완전순화하였다. 부분 순화 및 전순화 과정을 실시하여 회수된 바이러스유사입자의 수량 및 순도의 측정 및 자외선 흡수상을 알아보기 위해서 순화 바이러스용액을 흡광계 (Beckman DU-64, U.S.A.)로 220~330nm 파장범위의 U.V. scanning을 실시하였다. 순화바이러스액 10µl 위에 탄소막을 씌운 grid (300mesh)를 5분간 방치한 다음 grid의 수분을 제거한 뒤 0.5% Uracil acetate (pH 6.8)용액에 5분간 염색 (negative staining)시킨 후, 실온에서 grid를 건조시켜 전자현미경 (H-800, 150 KV, Hitach, Japan)으로 바이러스입자를 관찰하였다.

바이러스유사입자의 증식조건 분석

백색변이체 (MGL2205)균주를 PDB 배지에 접종 후 5, 10, 15, 20, 25, 30°C에서 7, 14, 21 일간 진탕배양한 후, Harmsen 등(1989)의 방법을 변형하여 바이러스 게놈 dsRNA를 정량하여 바이러스의 증식량을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 색소변이체의 바이러스 감염검정

색소변이체가 바이러스에 감염되어 있는지 확인하기 위해 바이러스의 유전체로 알려져 있는 dsRNA를 분리한 결과, 백색변이체인 MGL2205, MGL2206에서 서로 다른 종류의 dsRNA가 확인되었으며, dsRNA의 크기는 각각 5.8kb, 1.8kb 이었다. 반면 흑회색변이체에서는 버섯바이러스 유전체로 추정되는 dsRNA가 검출되지 않았다 (Fig 1). 농과원에서 개발된 느타리바이러스 진단용 특이프라이머 PVP 등을 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 백색변이체인 MGL2205에서만 특이밴드를 관찰할 수 있었다 (Fig 2). 바이러스 dsRNA가 검출된 MGL2206에서는 특이밴드를 관찰할 수 없었으므로 또 다른 종류의 바이러스로 판단된다.

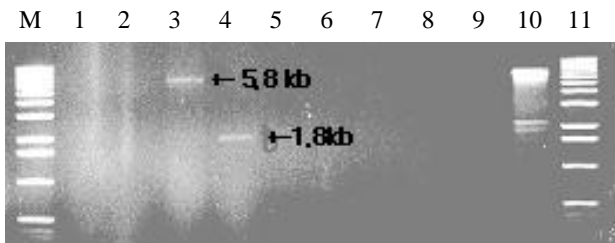


Fig. 1. Detection of viral dsRNA in color mutants. Electrophoresis was carried out in 1.5% agarose gel. M : 1kb ladder ; 1 : Wonhyeong-nutari 1 ; 2 : Wonhyeong nutari 2 ; 3~5 : white mutants ; 6, 7 : dark gray mutants ; 8 : normal spore ; 9 : Sporeless ; 10 : Viral dsRNA M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

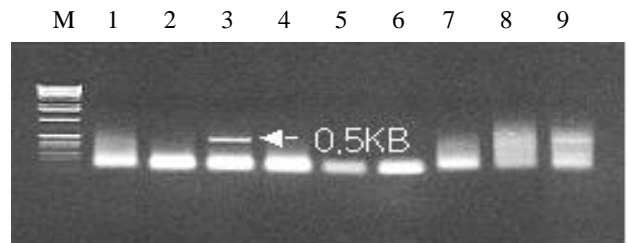


Fig. 2. Analysis by electrophoresis through 1% agarose gels for RT-PCR products by PVP primer. M:1kp, 1: Wonhyeong nutari 1, 2: Wonhyeong nutari 2, 3~4 : white-color mutants (MGL 2205, MGL 2206), 5~6: dark gray-color mutants (MGL 2302, MGL 2308), 7: ASI 2029, 8: MV16, 9:

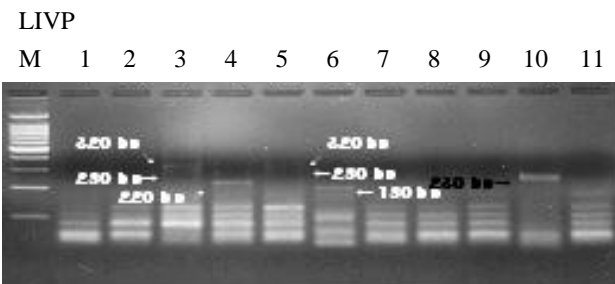
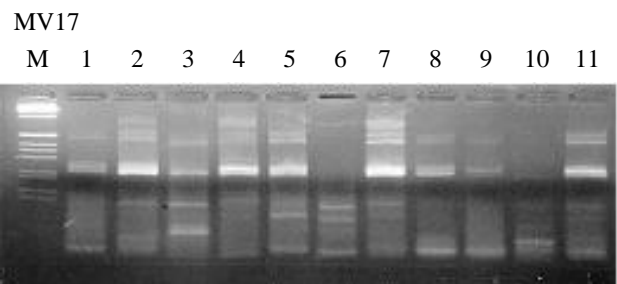


Fig. 3. Analysis by electrophoresis through 1% agarose gels for RT-PCR products by LIVP primer. M:100bp, 1:ASI 2018, 2:ASI 2029, 3~5: white-color mutants (MGL 2205, MGL 2206, MV12W), 6: H-1, 7: ASI2180, 8~11: Strains collected. * LIVP : La France Isometric Virus-like Particle* MBVP : mushroom bacilliform virus



양송이 바이러스진단용 프라이머 L1VP와 MBVP를 이용하여 색소변이체의 바이러스 감염을 검정한 결과, 백색변이체인 MGL2205와 MGL2206에서 크기와 밴드수가 서로 다른 양상을 보였다. 이는 dsRNA 밴드패턴에 의한 결과와 부합되는 것이다 (Fig 3). 양송이 바이러스 La France isometric 바이러스는 L1VP 프라이머의 RT-PCR 검정결과 분자량 128bp의 특이밴드를 보이는 것으로 보고되어 있으나 (Romaine and Schlagnhauser, 1995) 백색변이체 MGL2205에서는 분자량이 320bp, 280bp인 2개의 특이밴드가, 백색변이체 MGL2206에서는 분자량이 220bp 인 한 개의 특이밴드와 나타나는 것으로 보아 원형느타리에서 발생한 백색변이체에 감염된 바이러스는 양송이 바이러스와는 다른 종류의 바이러스인 것으로 추정되며, 이들 바이러스의 특성에 대해서는 보다 정확한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 느타리바이러스 유사입자의 특성

원형느타리의 백색변이체 (MGL2205)에 존재하는 바이러스유사입자를 투과전자현미경 (TEM)으로 관찰한 결과,

바이러스유사입자는 구형이었으며, 크기는 14, 20~45nm으로 관찰되었다 (Fig. 4). 또한 균사체의 세포조직 내에서 바이러스 순화액에서 확인된 바이러스유사입자와 비슷한 구형의 입자들이 관찰되었으며 (Fig. 5), 순화된 바이러스유사입자와 동일한 입자인지는 다른 방법을 통해 추가로 확인되어야 할 것으로 사료된다.

3. 바이러스의 증식 특성

바이러스의 증식조건을 구명하기 위해 액체배양한 감염 균주의 균사체에서 바이러스 게놈인 dsRNA를 정량하였다. 배양한 조건은 온도 5, 10, 15, 20, 25, 30℃, pH 4, 5, 6, 7, 8로 처리한 결과, 15℃에서 3주간 배양한 균사체에서의 dsRNA 함량이 가장 높았으며, pH 6에서 dsRNA의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 6). 따라서 원형느타리 백색변이체 (MGL2205)에 존재하는 바이러스의 최적 증식 조건은 15℃, pH 6, 배양기간 3주인 것으로 추정되며, 이러한 바이러스 증식경향은 재배적 조건에서 재 확인되어야 할 것으로 사료된다.

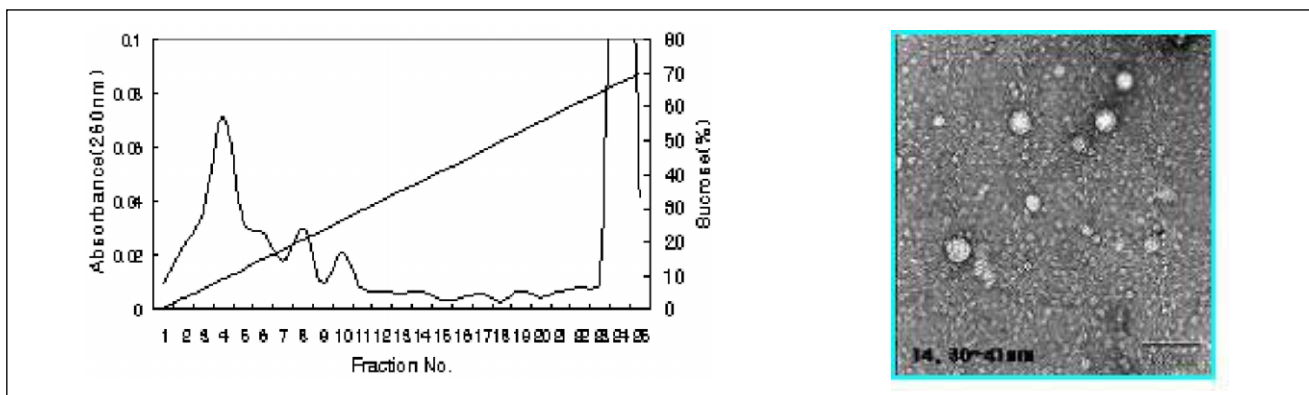


Fig. 4. Characteristics and morphology of VLPs purified from *P. ostreatus* (MGL2205).

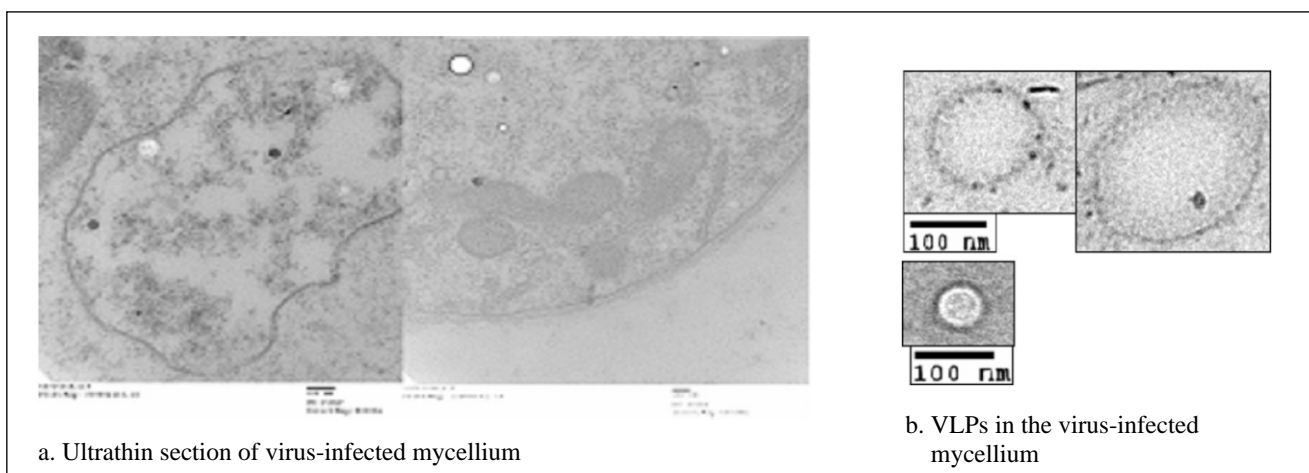


Fig. 5. VLPs in the cell of the white-color mutant (MGL2205)

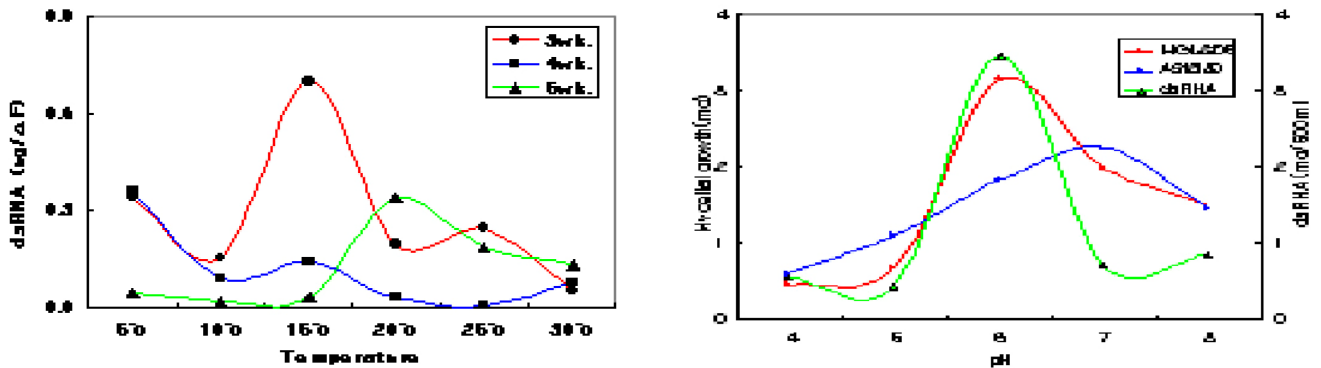


Fig. 6. Influence of temperature and pH on virus proliferation.

적 요

색소변이체에서 버섯 바이러스의 게놈인 dsRNA가 확인되었으며, 크기는 각각 5.8kb, 1.8kb 이었다. 느타리바이러스 진단용 프라이머인 PVP로 RT-PCR을 수행한 결과 500bp 크기의 특이밴드가 관찰되었다. 또한 양송이 바이러스 진단용 프라이머 LIVP와 MBVP에서도 특이밴드가 관찰되었으나 양송이 바이러스와는 다른 양상이었다. 원형느타리의 백색변이체 (MGL2205)에 존재하는 바이러스 유사입자는 구형이었으며, 크기는 14, 20~45nm이었다. 균사체의 세포단면을 관찰한 결과 바이러스 순화액에서 확인된 바이러스 유사입자와 비슷한 구형의 입자들이 관찰되었으며, 순화된 바이러스와 동일한 입자인지는 추후 확인되어야 할 것으로 사료된다. 원형느타리 백색변이체(MGL2205)에 존재하는 바이러스의 최적 증식 조건은 15°C, pH 6, 배양기간 3주인 것으로 판단되며, 이 결과는 이와 유사한 재배적 조건에서 재확인되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

고승주, 차재순. 1999. PCR을 이용한 느타리버섯 주요 병의 조기진단 및 병원균 검출기술 개발. 농특과제보고서 1-107.
Go, S. J., Cha, D. Y. and Shin, G. C. 1992. Virus-like Particles from Abnormal Growing Oyster Mushroom, *Pleurotus florida* and *P. ostreatus*. Korean J. Mycology 20(2):149-153.

Harmsen, M. C., van L. J. L. D. Griensven, J. G. H. Wessels. 1989. Molecular analysis of *Agaricus bisporus* double-stranded RNA. J. Gen. Virol. 70:1613-1616.
van Regenmortel. 2000. The Virus. In Virus Taxonomy. ed. M.H.V. Regenmortel, C. M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E. B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, and R.B. Wickner. pp 27-62. London. Academic press
Lee Hyun-sook. 2000. Detection of Three Isometric Viruses in Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus*. KSM news letter 12(2)5-6.
Liang P., Hongdi L. and Kaiying C. 1990. Intracellular appearance, morphological features and properties of oyster mushroom virus. Mycol. Res. 94(4):529-537.
Morris, T. J., and J. A. Dodds. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69:854-858.
Park, W. M., G. H. Kim, and K. H. Ryu. 1994. Isolation and isometric virus particle from abnormal growing *Pleurotus ostreatus* and physiology of the infected mycelium of *P. ostreatus*. Kor. J. Plant Pathol. 10: 362.
Rokuo U., 1983. Studies on a virus associated with shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. Rept. Tottri Mycol. Inst. 21:1-60.
Robert V. Forgarty and John M. Tobin. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals Enzyme and Microbial Technology 19:311-317.
Romaine C. P., and B. Schlagnhauer. 1995. PCR Analysis of the viral complex associated with La France Disease of *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 61(6):2322-2325.