

신령버섯의 기형으로부터 배양불능세균의 PCR 검정

신평균¹, 박윤정¹, 유영복¹, 공원식¹, 장갑열¹, 오세종², 이금희^{3*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²국립농업과학원 유전자원센터, ³농수산식품부 국립식물검역원

PCR-based identification of uncultured bacterium from malformed *Agaricus blazei*

Pyung-Gyun Shin¹, Yun-Jung Park¹, Young-Bok Yoo¹, Won-Sik Kong¹, Kab-Yeul Jang¹
and Se-Jong Oh², Keum-Hee Lee^{3*}

¹Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science,

²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

³National Plant Quarantine Service, MIFAFF, Anyang 430-016, Korea

(Received November 29, 2010, Revised December 24, 2010, Accepted December 27, 2010)

ABSTRACT : *Agaricus blazei* Murill is a important medicinal mushroom for a powerful immune system builder and tonic. Currently, it is known about a new disease phenomenon that appears to be occurring on a number of mushroom farms. We described a straightforward approach in which molecular methods was used to survey the presence of potentially endo- and epiphytic bacteria infected with the *Agaricus blazei*. The 16S rDNA was amplified with universal eubacterial primers directly from pure cultures of *Agaricus blazei* mycelium and fruit body. The 16S rDNA sequences were almost identical (96 to 97% similarity), and phylogenetic analysis placed them in a single unique rRNA branch belong to the uncultured bacterium phylogroup. PCR detection of uncultured bacterium in the malformed tissues of *Agaricus blazei* were carried out by using 16S rRNA sequenced specific probe. It was strongly amplified at the malformed pileus region of fruit body and also spore print was impossible.

KEYWORDS : *Agaricus blazei*, PCR-based identification, Uncultured bacterium

서론

자연계에는 수많은 미생물이 존재하고 있으나 기존의 희석평판법으로는 1%내외의 미생물만 동정되는 것으로 알려져 있다. 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 특정미생물, 생존하지만 배양되지 않은 미생물(Uncultured microorganisms or ultra-microorganisms)을 rRNA sequence 유연관계를 이용하거나 RDA(Representation difference analysis) 방법을 통하여 새로운 미생물이 동정되고 있다(Amann 등, 1995; Fredricks & Relman, 1996; Small 등, 2001; Sontakke 등, 2009). 이러한 방법은 전체미생물 군집의 특징을 알 수 있을 뿐만 아니라 토양 내 병원균의 밀도 등을 조기에 신속하게 검출함으로써 조기 병발생 예방도 가능하리라 사료되며(Borneman & Triplett, 1997), 특히 바닷물, 폐수 슬러지, 오염수, 원인모를 병원성에 관여하는 미생물을 동정하고 있는 실정이다(Cary 등, 1997; Hugenholz 등, 1998; McBride & Baker, 1996; Relman 1999; Simek 등, 2001; Mogge 등, 2000). 또한 활발공생균으로 알려져 있는 식용버섯인 Truffle(*Tuber borchii*) 내에서 ultra-microorganism인

CFB 세균(*Cytophaga-Flaxibacter-Bacteroides*)이 동정되었다(Bianciotto 등, 1996; Barbieri 등, 2000).

본 실험에서는 개발된 rRNA 염기서열 프라이머를 이용하여 신령버섯에 기형을 유발하는 배양불능세균을 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 PCR 프라이머 제작

본 실험에 사용한 균주는 전국 농가에서 재배하여 기형이 발생된 버섯과 농과원 응용미생물과에서 재배한 버섯을 공시균주로 이용하였다. 병원균을 동정하기 위해 eubacterial 16S rDNA sequence 영역을 이용하여 mp165(5'-gtt tga tcc tgg ctc agg att-3') 및 mp163(5'-aac ccc gag aac gta ttc acc-3')의 프라이머를 제작하였다.

Genomic DNA 분리

Genomic DNA를 분리하기 위하여 균사체는 15일간 PDA(potato dextrose agar)에서 고체배양한 다음 균사체를 수확하고, 버섯은 자실체 중에서 갖은 주름살부위를, 대부분위는 횡으로 반을 쪼개 후 속부위만 추출한 다음 동결건조

* Corresponding author (pgshin@korea.kr)

하여 사용하였다. 동결건조된 시료는 액체질소를 이용 마쇄하고 CTAB 및 phenol 추출방법으로 DNA를 정제하였다.

PCR

PCR 증폭은 각 시료에서 분리한 DNA를 공시 프라이머 및 premix 용액(Bioneer Co.)을 이용하여 반응하였다. 반응조건은 95℃, 1분(denaturation) - 52℃, 1분(annealing) - 72℃, 1분(elongation)을 35cycle로 실시한 후 72℃, 10분으로 종료하였다. 증폭된 DNA 단편은 2% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하였다.

Partial cloning 및 sequencing

증폭된 DNA 단편은 agarose gel에 추출하여 제한효소 Sau3AI로 절단하고 pBluescript KS vector를 BamHI로 절단한 후 ligation하여 *E. coli* XL-Blue에 형질전환하였다. 형질전환체는 plasmid miniprep에 의해 DNA를 분리한 후 BigDye sequencing kit로 PCR를 수행하여 DNA 염기서열을 분석한 후 NCBI Blast search program에 의해 유사성을 분석하였다.

조직부위별 PCR

Sequencing에 의해 유사성을 비교분석한 후 Nested-PCR를 위해 sequencing된 영역을 이용하여 새로운 프라이머를 제작한 후 균사체와 조직부위별 분리된 DNA를 이용하여 상기의 PCR 증폭방법으로 DNA를 확인하였다.

결 과

16S rDNA 영역을 이용한 기형버섯의 PCR 검정

전국적으로 수집된 기형버섯 중에서 종균배양소별로 정상과 기형버섯을 Fig. 1과 같이 형태학적으로 구분하였고, 살아있는 곰팡이나 식물체에 기생하면서 배양되지 않는 세균의 16S rDNA 영역을 프라이머로 제작하여 PCR을 실시한 결과 Fig. 2와 같이 기형을 일으킨 버섯에만 약 1.3 Kb 크기의 단편이 증폭되었다. 특히 Fig. 2에서 보듯이 b(Ab28)가 가장 많이 증폭되었다. 증폭된 DNA 단편을 제한효소 Sau3AI로 자르고 ligation한 후 형질전환하여 insert가 약 560bp의 단편(ASI 1174 shin)을 얻어 염기서열을 분석한 결과 Fig. 3와 같이 eubacterial conserved한 영역의 염기서열이 분석되었으며 Fig. 3과 같이 분석된 염기서열의 유사성 비교에서는 uncultural bacterium group에 유사성이 99%로 가장 높게 나타내어 CFB(*Cytophaga-Flaxibacter-Bacteroides*) group에 해당하는 ultra-microorganism으로 추정할 수 있다.

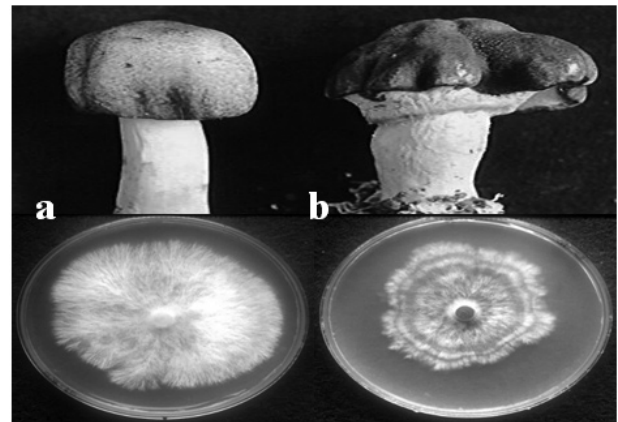


Fig. 1. Morphological and mycelial features of *Agaricus blazei*. a : *Agaricus blazei* ASI 1174(Shinyung 1ho), b : *Agaricus blazei* Ab6 isolated from malformed fruit body.

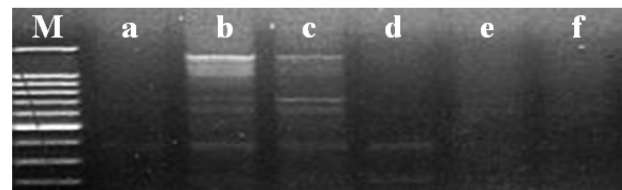


Fig. 2. PCR products of eubacteria 16S rDNA sequence with primers mp165 and mp163 from *Agaricus blazei*. a : Ab5, b : Ab28, c : Ab6, d : Ab8, e : Ab29, f : Ab30,

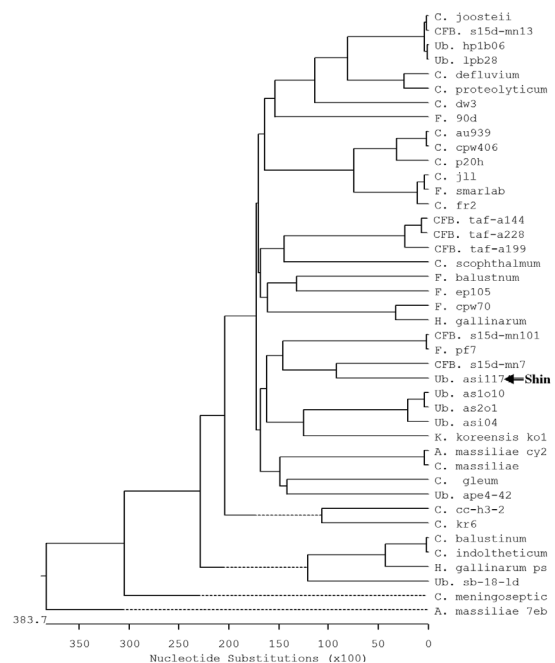


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using the neighbour-joining method with 16S rRNA gene sequences from 42 uncultural bacteria. Phylogenetic subclade shin(identified in this study) is indicated uncultural bacterium ASI 1174(GenBank Accession no. AY289198). C : *Chryseobacterium*, CFB : *Cytophaga-flaxibacter-Bacteroid*, Ub : Uncultural bacterium, F : *Flavobacterium*, H : *Haloanella*, K : *kaistella*, A : *Amoebinus*

기형버섯의 부위별 PCR 검정

유사성 영역과 기존의 16S rDNA 영역을 이용하여 프라이머를 디자인한 후 nested PCR한 결과 약 1.3 Kb 와 0.8 Kb의 DNA 단편을 확인하였고, 이 프라이머를 이용하여 균사체, 자실체의 갓 및 대부위를 PCR한 결과 Fig. 4와 같이 정상버섯(ASI 1180)의 주름살에서는 증폭되지 않았고 기형버섯(Ab83)의 주름살에서 가장 많이 증폭되는 것으로 보아 신령버섯의 갓이 기형으로 형태 변형되는 데에 관련이 있을 것이라고 사료된다. 또한 갓이 기형으로 형태가 변함으로서 포자형성에 문제가 있을 것이라고 판단 하에 기형버섯의 갓을 떼어내어 포자를 받았으나 Fig. 5와 같이 포자를 얻지 못했다.

양송이버섯에서 배양불능세균의 동정

신령버섯에서 갓의 기형이 유발되는 원인으로 배양불능세균이라면 이와 유사한 환경으로 재배되고 있는 양송이에서 발생하는가를 살펴보아야 한다고 판단하고 양송이 농가에서 비슷한 증상을 나타내는 균주를 수집(기형버섯 a, b, c)하여 PCR 검정을 실시한 결과 Fig. 6과 같이 기형버섯 c에서 PCR 증폭 단편이 확인됨으로서 신령버섯의 기형증상에 배양불능세균이 관여함을 시사하고 있다.

고찰

신령버섯의 기형 원인을 포괄적으로 바이러스, 세균 및 생리적 현상을 집중적으로 연구한 결과 바이러스(dsRNA)는 정상이나 기형에서 모두 검출되었고, 기형버섯의 발생이 집단적으로 병징을 나타내는 것으로 보아 세균병일 확률이 높았는데도 세균병이 검출되지 않았다(유 등, 2001; 정 등, 2002). 하지만 버섯 발생이 안되는 점이나 버섯이 발생되더라도 형태가 기형으로 나타나므로 자실체 기형의 관점에서 보면 특히 나타나는 병징으로 볼 때 세균병임을 유추할 수 있다. 지금까지 보고된 버섯 세균병 중에서 양송이 미이라(mummy)병(Zaayen and Waterreus, 1974)과 가장 유사하여 그 병징의 특징을 비교하여 보면 미이라병은 주름이 없으며, 갓의 주름부위가 부풀지 않으면서 기울지 않고 내부가 변색이 되지 않은 반면 기형의 신령버섯은 주름이 생기며, 갓은 부풀어 쳐져 있으면서 한쪽으로 기울고 내부는 변색이 일어나지 않았다. 따라서 병징 전체적으로 미이라병과는 다른 병징을 가졌다고 볼 수 있으며 세균의 침입에서 유래할 수 있다고 가정하고 배양불능세균병으로 초점을 맞춰 16S rDNA 영역을 이용하여 염기서열을 분석한 결과 CFB세균이 동정되는 것으로 보아 이와 연관성을 배제하지 못하고 할 수 있다. 또한 신령버섯에서 기형이 유발되는 원인으로

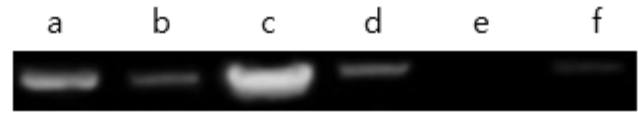


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with primers mp165 and FBU3 from *Agaricus blazei*. a : *A. blazei* ASI 1174(Ab85 : mycelium), b : Ab17(mycelium), c : Ab83(gill), d : Ab83(stipe), e : ASI 1180(gill), f : ASI 1180(stipe).

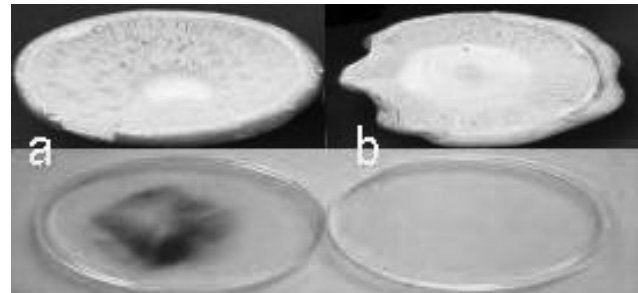


Fig. 5. Spore print of abnormal fruit body pileus from *Agaricus blazei*. a : *A. blazei* ASI 1180, b : *A. blazei* Ab28(malformed pileus).

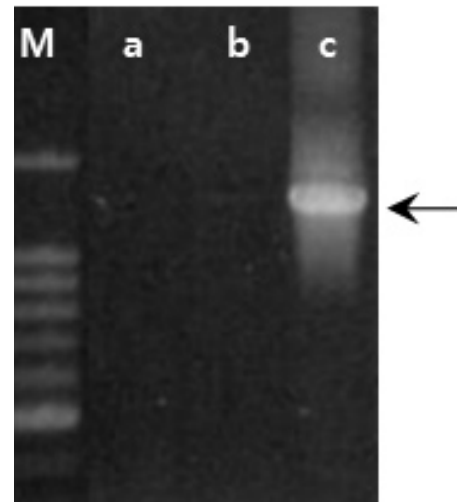


Fig. 6. PCR products of eubacterial 16S rDNA sequence with primers mp165 and mp163 from *Agaricus bisporus*. M: 100bp marker, a : *Agaricus bisporus* Takahashi 505, b : *Agaricus bisporus* Sylvan, c : *Agaricus bisporus* Somycel 703.

로 배양불능세균이라면 이와 유사한 환경으로 재배되고 있는 양송이에서 발생할 수 있다고 유추하고 양송이 농가에서 비슷한 증상을 나타내는 균주를 수집 분석하였다. 그 중 한 균주에서 배양불능세균이 동정됨으로써 신령버섯의 기형증상에 배양불능세균이 관여함을 시사하고 있다.

적요

신령버섯은 항암작용과 더불어 면역강화작용 등 약용으

로서 이용되고 있습니다. 최근에는 신령버섯 재배농가에서 새로운 병징 현상이 보고되어 내생세균에 대한 분자생물학적 방법으로 조사하였다. 병징을 나타내는 수집된 기형버섯을 eubacterial 16S rDNA 영역을 이용하여 PCR한 결과 기형버섯만 증폭되었다. 이 영역을 부분적으로 염기서열을 결정하고 CFB bacterium과 유사성이 가장 높았고, 이 염기서열을 이용하여 프라이머를 디자인한 후 nested PCR를 부위별로 확인한 결과 기형을 일으킨 것의 주름살 부위에서 가장 강하게 증폭되었고 포자수확도 되지 않았으며 배양불능세균 group인 CFB bacterium임을 확인하였다.

참고문헌

- 유영복, 김규현, 천정욱, 최홍수. 2001. 버섯 육성 품종의 원원균에 대한 바이러스 검정, pp. 499~511. 농촌진흥청 농업과학기술원. 농업생명공학연구. 문영당.
- 정재은, 김우재, 차재순. 2002. 양송이와 신령버섯 미이라병 (Mummy disease). 식물병연구 89(3) : 189-192.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 : 143-169.
- Barbieri, E., Potenza, L., Ross, I., Sisti, D., Giomaro, G., Rossetti, S., Beimfohr, C. and Stocchi, V. 2000. Phylogenetic characterization and *in situ* detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 5035-5042.
- Bianciotto, V., Bandi, C., Minerdi, D., Sironi, M., Tichy, H.V. and Bonfante, P. 1996. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 3005-3010.
- Borneman, J. and Triplett, E. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2647-2653.
- Cary, S.C., Cottrell, M.T., Stein, J.L., Camacho, F. and Desbruyeres, D. 1997. Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 1124-1130.
- Fredricks, D.N. and Relman, D.A. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiol. Rev.* 9 : 18-33.
- Hugenholtz, P.H., Goebel, B.M. and Pace, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. bacteriol.* 180 : 4765-4774.
- Mcbride, M.J. and Baker, S.A. 1996. Development of techniques to genetically manipulate members of the genera *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, and *Sporocytophaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 3017-3022.
- Mogge, B., Loferer, C., Agerer, R., Hutzler P. and Hartmann, A. 2000. Bacterial community structure and colonization patterns of *Fagus sylvatica* L. ectomycorrhizospheres as determined by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Mycorrhiza* 9 : 271-278.
- Relman, D.A. 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science* 284 : 1308-1310.
- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Hornak, K., Dolan, J.R., Nedoma, J., Masin, M. and Amann, R. 2001. Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 2723-2733.
- Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M. and Chandler, D.P. 2001. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 4708-4716.
- Sontakke, S., Cadenas, M.B., Maggi, R.G., Diniz, P.P.V.P. and Breitschwerdt, E.B. 2009. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J. Microbiological Methods* 76 : 217-225.
- Zaayen, A.V. and Waterreus, H.A.J.I. 1974. Intercellular occurrence of bacteria in Mummy-diseased mushrooms. *Phytopathology* 64 : 1474-1475.