한 국 균 학 회 지 The Korean Journal of Mycology Research Article

해외도입 표고버섯의 진균바이러스 감염

이송희[1] · 곽서영[1] · 고한규[2] · 이현숙[1]*

[1]경상대학교 미생물학과, [2]산림조합중앙회 산림버섯연구소

Infection of Mycovirus in Imported *Lentinula edodes*

Song Hee Lee[1], Seo-Young Kwak[1], Han Kyu Ko[2] and Hyun-Sook Lee[1]*

[1]*Department of Microbiology and Research Institute for Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea*
[2]*Forest Mushroom Research Institute, Gyeonggi 469-803, Korea*

ABSTRACT : Up to date several mycoviruses including *Lentinula edodes* Spherical Virus (LeSV) have been reported. As fungal virus was spreaded by infested hypae and spores it could be important to use virus-free spawns to eradicate the mushroom virus disease in the culture farm. We tested the imported spawns of *Lentinula edodes* by PCR whether LeSV was infested them or not. The primer set targeting the *RdRp* gene of LeSV was prepared based on partial sequence of the LeSV genome. The RT-PCR analysis showed that 87 among 88 imported spawns of *L. edodes* were infested by LeSV.

KEYWORDS : Detection, *Lentinula edodes*, Mycovirus, RT-PCR

서 론

표고버섯은 국내 임산버섯 생산량 중 75%의 비중을 차지하고 있으나 재배 농가들의 56%만이 소득만족도를 보이고 있었다[1]. 이는 상당수의 버섯재배 농가들이 표고버섯 생산에 어려움을 느끼고 있는 것을 나타내며, 국내 버섯의 단위 면적당 생산성의 정체이유를 조사해본 결과 47.9%가 종균의 문제를 들었다[1]. 이러한 단위 면적당 생산성 정체와 관련된 종균의 문제는 종균퇴화가 주된 원인이며 이러한 종균퇴화의 주된 원인은 종균의 노화현상과 바이러스 이병으로 생긴 결과로 사료된다.

곰팡이 바이러스는 환경이 변하거나 기주의 특정 유전자에 돌연변이가 일어나면 병증이 발현되는 것으로 보고되어 있다[2]. 그 대표적인 예가 양송이에서 La France Isometric Virus (LIV)에 의해 발병한 La France Disease이다[3-6]. 이 병이 발현된 양송이는 자실체의 형태가 외소하며 형성이 늦어질 뿐 아니라 대의 길이가 짧고 갓의 모양이 기형이 되면서 얇아지는 현상이 보고되었으며, 버섯의 분화가 거의 이루어지지 않는 현상도 보고된 바 있다[7]. 이와 같은 바이러스에 의한 병으로 인해 유럽에서 양송이의 전체적인 생산량에 막대한 피해를 보았다[8,9]. 이로 인해 버섯 바이러스의 생활사에 대한 연구가 활발히 이루어졌으며[6,10,11], 그 결과 버섯 바이러스의 전이는 버섯의 균사접합 과정 중에 일어나는 것을 확인하였다[12]. 양송이뿐만 아니라 느타리버섯, 큰느타리버섯 및 표고버섯에서도 바이러스가 보고되었는데, 느타리버섯에서는 단일가닥의 RNA 바이러스인 Oyster Mushroom Sperical Virus (OMSV)[13]와 이중가닥의 RNA 바이러스인 Oyster Mushroom Isometric Virus (OMIV)[14]가 보고되었으며 이들 바이러스에 감염된 종균에서 바이러스를 퇴치하였을 때(virus-curing) 건전버섯을 생산할 수 있다고 보고되었다[15]. 큰느타리버섯에서도 단일가닥의 RNA 바이러스인 *Pleurotus eryngii* Sperical Virus (PeSV)[16]가 보고되었다. 표고버섯에서는 이중가닥의 RNA 바이러스인 *Lentinula edodes* Mycovirus HKB (LeV)[17,18]와 단일가닥의 RNA 바이러스인 *Lentinula edodes* Spherical Virus (LeSV)[19]가 보고되었다. 보고된 버섯바이러스에 감염된 버섯들은 모두 버섯대가 짧아지고 버섯갓이 찌그러지는 등 버섯 자실체에 기

Kor. J. Mycol. 2014 March, **42**(1): 64-68
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.1.64
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

***Corresponding author**
E-mail: hslee@gnu.ac.kr

Received March 6, 2014
Revised March 19, 2014
Accepted March 21, 2014

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.

형이 발생하였으며 균사 생장이 불량하였다[14-16].

버섯바이러스는 그 특성상 한번 감염되면 퇴치하기 어려우며 감염 여부를 초기에 진단하기 어려우므로 버섯 농가에서 버섯 바이러스의 피해를 막으려면 바이러스에 감염되지 않은 건전 종균을 선정하는 것이 가장 중요하다. 표고버섯의 경우 2011년 기준으로 국내에서 육성한 품종의 점유율이 20% 수준에 불과하며, 대부분의 종균은 톱밥배지 형태로 중국에서 도입되고 있으며 이들 종균의 수입물량이 계속 증가하고 있는 추세이다[20]. 이러한 형태의 종균은 종균 수입이 아니라 배지 수입의 형식으로 이루어져 버섯 병원균이나 바이러스에 대한 검역이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구실에서는 표고버섯 바이러스인 LeSV와 이 바이러스를 검역하기 위한 RT-PCR primer를 보고한 바 있다[19]. 이 primer를 이용하여 표고버섯의 육종에 사용되는 균주와 재배에 사용되는 균주의 바이러스 감염도를 조사한 결과 각각 78.8%와 72.2%의 감염도를 나타내었다[19]. 이는 국내에서 육종 및 유통되고 있는 균주의 대부분이 바이러스에 감염되어 있음을 나타내는 것이다. 본 연구에서는 앞선 높은 바이러스의 감염도의 원인을 파악하기 위해 무분별하게 수입되고 있는 해외 종균들의 바이러스 감염도를 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 균주 배양

균주는 버섯균주 및 DNA 은행(Incheon University Mushroom; IUM)에서 해외도입 종균 및 배지형태로 수입된 종균에서 분리한 균사를 분양받아 사용하였고 균사의 배양은 PDA 배지를 이용해 25℃에서 20일간 이루어졌다.

균사에서의 Total RNA 추출

준비된 균사를 액체질소에 담그고 막자사발로 갈아 가루형태로 만들었다. 가루형태가 된 균사에서 RNeasy Kit (Qiagen)를 이용해 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA에 DNase 처리한 뒤 phenol을 처리하여 순수 RNA만 분리하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

같은 양의 RNA를 주형으로 2013년에 Won 등이 보고한 LeSV 검역용 primer와 조건을 이용해 RT-PCR을 수행하였다[19].

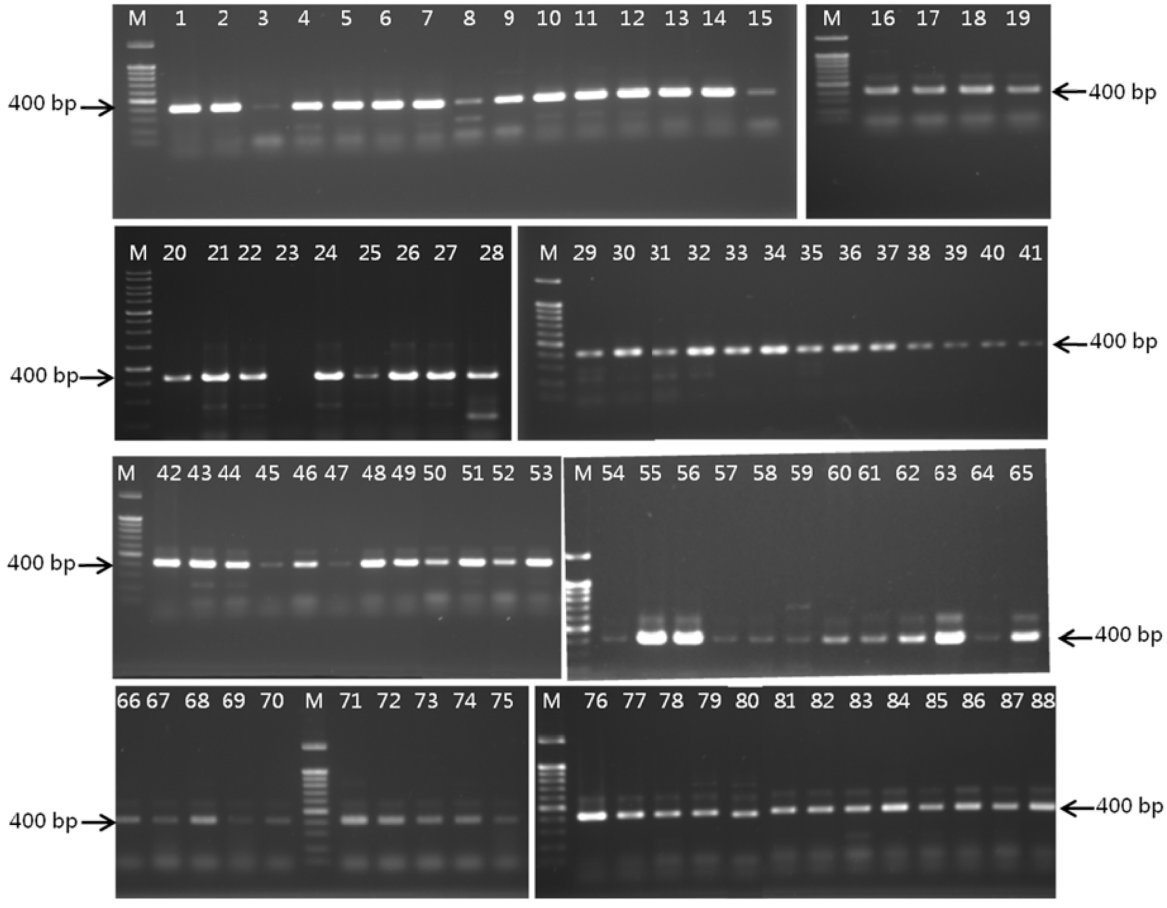

Fig. 1. RT-PCR analysis of LeSV infection in imported spawns of *Lentinular edodes*. The size specific for LeSV was 400 bp. M: 1 kb marker, 1-88 imported spawns.

증폭된 바이러스 DNA 염기서열 분석

RT-PCR을 통해 증폭된 DNA를 T-easy vector (Promega)에 삽입한 뒤 competent cell에 형질전환시켰다. Competent cell을 배양한 뒤 ampicillin을 이용해 형질전환이 이루어진 competent cell을 선택하였고, 선택된 competent cell에서 vector를 분리한 뒤 *Eco*R I을 이용해 바이러스의 RNA가 증폭된 DNA가 vector에 삽입되었는지 확인하였다. 삽입된 DNA의 염기서열을 분석한 뒤 LeSV의 염기서열과 비교하였다.

결과 및 고찰

해외도입 표고버섯 종균의 LeSV 검출

2013에 Won 등이 보고한 LeSV의 RdRp 유전자의 특이적인 primer 및 RT-PCR 조건[19]을 이용하여 해외 도입 표고균주를 대상으로 바이러스 검출을 수행하였다. 총 89종의 해외도입 표고버섯 균주를 대상으로 실험을 진행하였으며 도입국가는 중국, 대만, 일본, 핀란드, 슬로베니아 및 네덜란드 등이다. 바이러스 유전자의 염기서열에 의하면 LeSV 검출용 primer를 이용해 RT-PCR을 수행하였을 때 LeSV가 존재할 경우 약 400 bp의 DNA가 증폭되어야 하는데[19], 해외 도입 표고균주를 대상으로 바이러스 검출을 수행한 결과 LeSV는 해외도입 표고버섯 균주 88균주 중 87균주에서 약 400 bp의 DNA가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 1, 표 1). 증폭된 DNA의 염기서열을 LeSV의 RdRp 유전자와 비교분석한 결과 LeSV의 RdRp 유전자 일부와 증폭된 DNA 염기서열이 일치함을 확인할 수 있었다. 이는 본 연구에서 조사한 해외도입 표고버섯 균주는 거의 모두 LeSV에 감염되어 있음을 나타내는 결과이다.

바이러스에 의한 기형버섯의 발생은 환경에 따라 발생정도 및 빈도가 다르게 나타난다. 2013년에 Kim 등이 발표한 결과를 보면 *L. edodes* virus가 감염된 표고균사는 그 생장속도가 느리고 균사 mass가 줄어드는 등 건전 표고균사보다 생장이 불량함을 알 수 있었다[21]. 또한 버섯 바이러스의 전파는 공기나 접촉에 의한 감염이 아니고 병이든 세포와 그렇지 않은 세포간의 접합(fusion)에 의한 것이기 때문에 감염원이 종균일 수밖에 없으며[12], 한번 감염이 되면 퇴치하기가 어렵다. 이러한 이유로 인해 버섯 바이러스 병은 감염 후 퇴치가 아닌 감염을 예방하는 것이 가장 중요하다. 그러나 현재 국내에 유통되는 중국종균은 수입 시 톱밥배지로 수입이 되기에[20] 종균에 대한 바이러스 검역이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 하지만 본 연구결과를 보았을 때 해외에서 도입된 균주 중에서도 가장 높은 비율을 차지하고 있는 중국균주가 모두 LeSV에 감염되어 있음을 확인하였다. 이는 국내 버섯의 단위 면적당 생산성의 정체이유 중 하나일 것이며, 바이러스 감염 병증이 나타나지 않고 있는 중국종균 역시 병증발현의 위험성을 내포하고 있는 것을 나타낸다.

Table 1. Detection of LeSV in the imported spawns of *Lentinula edodes*

No.	Origin	IUM No.	LeSV
1	China Beijing	1402	+
2	China Beijing	1404	+
3	China Beijing	1405	+
4	China Beijing	1407	+
5	China Beijing	1409	+
6	China Beijing	1413	+
7	China Beijing	1418	+
8	China Beijing	1422	+
9	China Beijing	1423	+
10	China Beijing	1425	+
11	China Beijing	1426	+
12	China Beijing	1429	+
13	China Beijing	1535	+
14	China Shanghai	1567	+
15	China Shanghai	1568	+
16	China Shanghai	1574	+
17	China Beijing	1748	+
18	China Shanghai	2062	+
19	China Shanghai	2063	+
20	China Shanghai	2065	+
21	China Shenyang	2220	+
22	China Shenyang	2221	+
23	China Shenyang	2223	-
24	China Shenyang	2234	+
25	China Shenyang	2239	+
26	China Shenyang	2298	+
27	China Shenyang	2314	+
28	China Qingdao	2355	+
29	China Qingdao	2360	+
30	China Beijing	2408	+
31	China Beijing	2648	+
32	China Qingdao	2663	+
33	China Qingdao	2671	+
34	China Qingdao	2716	+
35	China Beijing	2745	+
36	China Qingdao	2751	+
37	China Dalian	3359	+
38	China Dalian	3370	+
39	China Dalian	3372	+
40	China Dalian	3378	+
41	China Shenyang	3397	+
42	China Shenyang	3412	+

Table 1. Continued

43	China Yantai	3438	+
45	China Yantai	3441	+
45	China Yantai	3441	+
46	China Yantai	3442	+
47	China Yantai	3452	+
48	China Weihai	3457	+
49	China Weihai	3461	+
50	China Weihai	3464	+
51	China Weihai	3477	+
52	China Weihai	3479	+
53	China Shenyang	3488	+
54	China Shenyang	3492	+
55	China Shenyang	3493	+
56	China Shenyang	3502	+
57	China Shenyang	3505	+
58	China Shenyang	3507	+
59	China Dalian	3509	+
60	China Shenyang	3528	+
61	China Shenyang	3529	+
62	China Dalian	3543	+
63	China Dalian	3544	+
64	China Dalian	3550	+
65	China Dalian	3551	+
66	China Dalian	3552	+
67	China Dalian	3553	+
68	China Dalian	3557	+
69	China Dalian	3558	+
70	China Dalian	3559	+
71	China Changchun	3679	+
72	China Dalian	3952	+
73	Taiwan Taipei	1390	+
74	Taiwan Taipei	1398	+
75	Taiwan Taipei	1465	+
76	Taiwan Taipei	2132	+
77	Taiwan Taipei	2141	+
78	Taiwan Taipei	2144	+
79	Taiwan Taipei	2146	+
80	Taiwan Taipei	2149	+
81	Taiwan Taipei	2150	+
82	Taiwan Taipei	2159	+
83	Japan Chiba	2251	+
84	Japan Chiba	2252	+
85	Japan Chiba	2271	+

Table 1. Continued

86	Finland Helsinki	1953	+
87	Slovenia Ljubljana	3269	+
88	Netherlands Amsterdam	4007	+

+: LeSV infested spawn. -: LeSV-free spawn.
IUM No: Incheon University Mushroom Number.

적 요

최근 몇몇 버섯의 바이러스가 보고되었으며, *Lentinula edodes* Spherical Virus (LeSV) 역시 보고되었다. 곰팡이 바이러스는 종균에 의해 전파되기 때문에 농장에서 버섯 바이러스병을 근절하기 위해서는 건전 종균을 사용하는 것이 중요하다. 이에 표고버섯 바이러스인 LeSV의 RdRp 유전자에 특이적인 primer 및 RT-PCR 조건을 이용하여 해외에서 도입한 표고종균을 대상으로 LeSV 감염도를 조사하였다. 분석결과 해외도입 종균의 99%가 LeSV에 감염된 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기획평가원 생명산업기술개발사업(No.311021-3)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. MAFRA. Present situation and issues of mushroom industry; 2005.
2. Ridley SP, Sommer SS, Wickner RB. Superkiller mutations in Saccharomyces cerevisiae suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. Mol Cell Biol 1984;4:761-770.
3. Hollings M. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushroom. Nature 1962;196:962-965.
4. Goodin MM, Schlagnhaufer B, Romaine CP. Encapsida- tion of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36 nm isometirc virus-like particles. Phytopathol 1992;82:285-290.
5. Bruenn FA. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-strand RNA viruses. Nucleic Acids Res 1993;21:5667-5669.
6. van der Lende TR, Harmsen MC, Wessels JGH. Double-stranded RNA and proteins associated with 34 nm virus particles of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. J Gen Virol 1994;75:2533-2536.
7. Schisler LC, Sinden JW, Sigel EM. Ethiology, symptomatology, and epidemiology of a virus disease of cultivated mushrooms. Phytopathology 1967;57:519-526.
8. Marino R, Saksena KN, Schuler M, Mayfield JE, Lemke PA. Double-stranded ribonucleic acid in *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 1976;31:433-438.

9. Morris TJ, Dodds JA. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 1979;69:854-858.
10. Harmsen MC, Tolner B, Karm A, Go SJ, de Haan A, Wessels JGH. Sequence of three dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). Cuur Genet 1991;20:137-144.
11. van der Vlugt RAA, Schapp PJ, Muller Y, Thurstio CF, Sonnenberg ASM, Visser J, van Griensven LJLD. A codon usage table for Agaricus bisporus. CMR Newsletter 1993;1:50-52.
12. Harmsen MC, van Griensven LJLD, Wessels JGH. Molecular analysis of *Agaricus bisporus* double stranded RNA. J Gen Virol 1989;79:1613-1616.
13. Yu HJ, Lim DB, Lee HS. Characterization of a novel single stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. Virology 2003;15:9-15.
14. Ro HS, Lee NJ, Lee CW, Lee HS. Isolation of novel mycovirus OMIV in *Pleurotus ostreatus* and its cetection using a triple antibody sandwich-ELISA. J Virol Methods 2006;138: 24-29.
15. Kwon YC, Jeong DW, Gim SI, Ro HS, Lee HS. Curing viruses in *Pleurotus ostreatus* by growth on a limited nutrient medium containing cAMP and rifamycin. J Virol Methods 2012;185: 156-159.
16. Ro HS, Kang EJ, Yu JS, Lee TS, Lee CW, Lee HS. Isolation and characterization of novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. Biotechnol Lett 2007;29:129-135.
17. Ohata C, Taguchi T, Takahashi S, Ohtsuka K, Ayusawa S, Magae Y. Detection of double stranded RNA elements in cultivated *Lentinula edodes*. Mushroom Sci Biotechnol 2008;16: 155-158.
18. Magae Y. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom *Lentinula edodes*. Virol J 2012;9:60-65.
19. Won HS, Park SJ, Kim DK, Shin MJ, Kim N, Lee SH, Kwon YC, Ko HK, Ro HS, Lee HS. Isolation and characterization of a mycovirus in *Lentinula edodes*. J Microbiol 2013;51:118-122.
20. Korea Forest Service. Statistical yearbook of forestry; 2011.
21. Kim JM, Yun SH, Song HY, Choi HJ, Ko YH, Oh JM, Kim DH. Biological function of a mycovirus LeV-FMR10339 in the edible mushroom *Lentinula edodes* FMR10339 strain. 2013 International Meeting of the federation of Korean Microbiologica Societies; October 17-18, Seoul, Korea, 2013. p. 135.