

# Mycovirus 동정 및 virus-free 느타리 버섯 육성

박원목 · 김규현 · 류기현  
(고려대학교 자연자원대학 농생물학과)

## Identification of Mycovirus and Development of Mycovirus-Free Oyster Mushroom

Won-Mok Park · Gyu-Hyun Kim · Ki-Hyun Ryu

Dept of Agricultural Biology, College of Natural Resources,  
Korea University, Seoul 136-701, Korea

### 적 요

1993년 11월 부터 1994년 4월에 걸쳐 경기도 수원, 광주, 화성, 고려대학교 버섯 재배사에서 자실체가 깔대기형(funnel shape) 및 왜소(dwarf)한 형태이고, 이후 괴저(necrosis)로 발전하는 병징을 보이는 자실체를 채집하여 바이러스를 순화하여 본 결과 직경이 50nm인 구형 바이러스가 검출되었으며, U. V scanning 결과 A260/A280비가 1.54였다. 순화 바이러스의 SDS PAGE결과 51,000 Dalton의 Mr을 보이는 외피 단백질 밴드가 확인되었으며, viral RNA의 정제후 PAGE 하여본 결과, 1.7Kbp 및 1.8Kbp의 viral RNA band를 확인 할 수 있었으며, 확인 되어진 viral RNA에의 nuclease처리를 통해 viral genome은 dsRNA임을 확인 할 수 있었다. 바이러스 이병 균사의 생리는 균사 생장의 경우 건전 균사에 비해 매우 부진한 양상을 보이며 균총의 형태는 appressed type을 보이며, 균사 생육 최적 산도는 건전 균사의 경우 pH 5-7의 범위에서 유의차 없이 균사 생육이 양호한 반면, 바이러스 이병 균사의 경우 특이적으로 pH 7에서 균사 생육이 최고조에 다다랐다. 균사 생육에의 온도의 영향을 조사하여 본 결과 25 C에서 건전 균사에 비해 이병 균사의 전형적인 균사 생장이 부진한 상태를 보이고 건전 균사는 정상적인 균사 생장을 하는 반면에, 35 C에 이르러서는 이병 균사의 더딘 균사 생장이 회복됨을 확인 할 수 있었다, 영양요구원 실험에서는 건전 균사 및 이병 균사 모두 동일한 영양 요구원 양상을 보였으며, 이는 탄소원, 유기 질소원, 무기 질소원 모두 동일하였다. 또한 항바이러스제인 ribavirin처리를 통한 바이러스 퇴치 가능성을 조사하여 본 결과 초기 처리 농도 25ppm에서 바이러스가 일부 퇴치됨을 확인할 수 있었고, 이는 이후 수대에 걸친 계대배양후에도 지속적이고 안정적이었다. 또한 일부 바이러스가 퇴치 되어진 균사에 재처리 농도 45ppm으로 재처리한 결과 균사 생장 부진이 완전 회복됨을 확인 할 수 있어 무병주 육성의 가능성을 간접적으로나마 확인 할 수 있었다.

### I. 서 론

1948년 미국의 펜실바니아의 한 양송이 재배 농가에서 재배되어지는 양송이에 심각한 병해가 발생하였는데, 병징으로는 자실체의 형태가 기형을 보이며, 이후 커다란 수확량의 손실을 보였다는 보고가 1950년에 있었다<sup>30)</sup>. 이후 이러한 병해는 영국, 프랑스, 네델란드, 이탈리아, 덴마크, 일본 및 오스트리아등의

세계 각지에서 보고되었고<sup>4, 14, 15, 22)</sup> X-disease<sup>14)</sup>, watery tipe, brown disease, die-back<sup>4)</sup>이라는 다양한 이름으로 보고되었으나, 최초 발생지의 이름을 따서 La France Disease라 명명되었고<sup>15)</sup>, Hollings<sup>15)</sup>는 영국에서 이러한 병징을 보이는 자실체로부터 25 nm, 29 nm, 19×50 nm의 fungal virus를 분리, 보고 하여, 적어도 세종류의 바이러스 입자들이 이병되어진 자실체에 존재한다고 하였다. 이것은 곰팡이에 존재하는 바이러스

에 대한 최초의 보고이었다. 또한 Dieleman-Van Zaayen 과 Temmink<sup>6)</sup> 등은 네델란드 양송이 재배 농가에서 34nm, 25nm, 19×50nm 크기의 입자를 발견 보고하였다. 이러한 5가지 크기의 입자들을 Hollings<sup>16)</sup> 등은 mushroom virus 1(25nm), mushroom virus 2(29nm), mushroom virus 3(19×50nm), mushroom virus 4(35nm), mushroom virus 5(50nm)등으로 구분하였고, Dieleman-Van Zaayen<sup>6)</sup>은 단지 25nm, 34nm, 19×50nm등의 세종류라고 분류, 보고하였다. 또한 Hager<sup>14)</sup>는 펜실바니아의 양송이 재배 농가에서 32nm 및 20nm의 바이러스 입자를 분류 보고하였고, Nair<sup>22)</sup>는 호주에서 19nm의 바이러스 입자를, Saksena<sup>28)</sup>는 펜실바니아에서 26.7nm의 바이러스 입자를 분리하였고, 분리되어진 바이러스 입자들은 대부분 isometric particle이며, rod shaped virus particle들 또한 양송이에서 분리되어졌는데, 350×17nm<sup>4)</sup>이 네델란드에서 분리되어졌다. 또한 Lesemn 과 Koenig<sup>18)</sup>는 독일에서 club-shape의 120-170×20-70nm의 바이러스 입자를 분리하였다. 이러한 특이적 경우를 제외하고는 일반적으로, 이병되어진 버섯 자실체 및 균사로부터 분리한 바이러스 입자는 19nm, 25nm, 29nm, 35nm, 19×50nm의 다섯 범주안에 포함된다<sup>16)</sup>. 일반적인 La France Disease의 병징은 균사 생장 부진, 원기 형성의 불량(suppression of development), 괴사(necrosis), 기형자실체(abnormal sporophore : dwarfing and early maturity of sporophore)등으로 요약되어질 수 있고<sup>29)</sup>, 이러한 mushroom virus의 분리는 양송이 뿐만 아니라 다양한 버섯속에서 분리되어졌는데, 표고 버섯(*Lentinus edodes*)에서는 25nm, 30nm, 39nm, 15×700~900nm 크기의 구형 및 간상형 바이러스 입자가 분리되어졌고<sup>32)</sup>, 초고버섯(*Volvariella volvacea*)에서 35nm, 45nm의 구형 바이러스 입자가 분리되었<sup>3)</sup>, 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)에서 23nm의 바이러스 입자가 분리되어졌다<sup>19)</sup>.

mushroom virus의 genome은 25nm, 34nm 크기의 양송이(*A. bisporus*)에서 분리되어진 바이러스가 이중쇄상RNA(dsRNA)genome를 가지고 있으며, 또한 분리되어진 bacilliform 버섯 바이러스는 단일쇄상 RNA(ssRNA) genome을 가졌다고 보고되어졌으며<sup>31)</sup>, 표고버섯(*L. edodes*)에서는 39nm 크기의 버섯 바이러스가 dsRNA genome을 가졌다는 보고가 있으며<sup>32)</sup>, 느타리 버섯(*P. ostreatus*)의 경우 23nm 크기의 버섯 바이러스가 dsRNA genome을 가졌다는 보고가 있었다<sup>9,19)</sup>. 국

내에서의 mushroom virus에 관한 연구는 고등<sup>9)</sup>이 균사 생장이 늦고 기형 생장을 하는 느타리 버섯으로부터 23nm 및 30nm 크기의 구형 mushroom virus를 분리, 보고한 바 있다.

바이러스 퇴치 방법에는 고온이나 항바이러스제로 처리하여 무균하에서 기내 배양을 하면 바이러스를 퇴치하는데 매우 효과적인 것으로 알려져있다<sup>34)</sup>. 그러나 열처리에 의한 방법은 바이러스의 완전한 제거가 어렵고 열에 민감한 식물조직에 해를 입힐 수 있으므로 실용적인 측면에서 문제시되고 있다. 항바이러스제 처리에 의한 화학적 치료법은 바이러스에 감염된 조직에서 바이러스의 복제를 억제함으로써 감염된 조직으로부터 바이러스의 근본적인 퇴치가 가능한 것으로 알려져있다<sup>26)</sup>. ribavirin을 포함한 대부분의 항바이러스제는 바이러스 제거에 효과가 있지만 식물체의 생육에도 나쁜 영향을 미칠 수 있으며 특히 바이러스에 효과적인 농도에서는 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 이러한 이유로 항바이러스제를 효과적으로 사용하기 위하여서는 항바이러스제의 적정 농도 규명이 필수적이다<sup>24)</sup>.

느타리버섯 (*Pleurotus sp.*)은 분류학적으로 담자균류(Basidiomycetes), 송이버섯과 (Trichomataceae), 느타리버섯속(Pleurotus)에 속하며 세계 각국에 널리 분포되어 있는 진균으로서, 자연에서 부생균으로 각종 활엽수의 고사목에서 총생 또는 군생하여 우리나라에서는 예전에는 미류나무 버섯 또는 버드나무 버섯이라고도 불리워졌다<sup>2)</sup>. 느타리 버섯은 맛과 풍미가 뛰어나서 오래전부터 즐겨 식용으로 애용되었었다. 특히 다른 버섯류에 비하여 높은 영양가를 가지고 있고 단위 기질당 수량이 높아서 Lilly<sup>17)</sup>는 구황작물로서도 유망하다고 하였다. 고혈압, 당뇨병<sup>2)</sup>에도 효능이 있으며, 특히 항암효과<sup>35)</sup>의 약리활성이 있다고 보고되어져있다. 느타리 버섯의 인공 재배 방식은 초기에 원목을 이용하여 재배하는 방법으로 시작되었으며<sup>2)</sup>, 이는 1958년 Block등에 의하여 톱밥에서의 재배가 시도되었다<sup>1)</sup> 이외의 다양한 ligno-cellulose 폐기물에서의 재배가 가능한데, 초기 활엽수 원목을 이용한 재배법이 개발된 후 뽕나무 가지와 과수 전정 가지를 이용한 가지 재배법이 개발되었다. 이들 방법은 자금회전이 더디고, 단위 면적당 수확량이 낮아 급증하는 수요를 충족시켜 주지 못하여 현재는 거의 이용되지 않는다. 이후 전국 어디서나 재배 기질 획득이 용이

하고 수확량이 높으며, 연중재배가 가능한 기질인 벚짚 재배가 개발되었다<sup>7)</sup>. 벚짚을 이용한 느타리 재배는 기계화가 가능하고 노동력이 절감되며, 안전 다수확재배를 할 수 있는 벚짚퇴비재배, 벚짚다발 야외발효 재배, 벚짚 통단 발효 재배, 퇴비 터널 재배, 폐면재배<sup>2)</sup> 등의 방법으로 발전하여 수확량 및 재배 면적이 급증하게 된다. 우리나라에서의 느타리버섯의 재배 면적 및 재배량의 증가 추세를 보면 80년도에 전체 버섯 생산량 33,743톤중 느타리 버섯은 6,739톤을 차지한 반면 1993년도에는 71,750톤중 56,878톤으로 약 79%를 차지할 정도로 전체 버섯 생산량중 느타리 버섯 생산량이 차지하는 양은 괄목할 만한 증가를 보였다. 1993년도의 전체 버섯 재배 면적은 2,943,000평이고 이중 느타리 버섯 재배 면적은 1,467,000평으로 전체 버섯 재배 면적에서 느타리 재배 면적이 차지하는 비율은 약 50%이었다.

또한 상술한 바와 같은 다양한 장점으로 인해 증가 추세에 있는 느타리 재배는 최근 45년전 부터 커다란 난관에 봉착하게 되었는데, 이는 바로 병해충의 대발생인 것이다. 과거 신<sup>27)</sup>은 느타리 버섯 벚짚 배지에 발생하는 유해 균류에 대하여 조사하여 본 결과 그중 발생 및 피해가 큰균류로 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Rhizopus*라고 보고하였고, 그러나 이러한 병해들은 버섯의 균사나 자실체에 기생하는 병원균이 아닌 영양원을 이용하기 위하여 상호 경쟁하는 비기생성균이었고 피해도 현재에 비하면 경미하였다. 그러나 최근에 대발생하는 병해는 *Gliocladium* 및 *Pseudomonas* 등에 의한 푸른곰팡이병과, 세균성 갈변병이라는 균사에 기생하거나 용해시키며, 자실체에 직접 감염되어 갈변화 시키는 기생성 병원균이 대발생하고 있고, 특히 세균성 갈변병으로 일컬어 지는 병해의 경우는 현재 전국 농가에서 발생되고 있으며, 품질이 떨어지고, 수량의 많은 감소를 보이는 심각한 병해로 부각되고 있다. 또한 세균성 갈변병과 함께 최근 대규모로 발생하여 느타리 버섯 재배 농가에 커다란 피해를 유발하는 바이러스병의 전파확산은 버섯재배에 걸림돌이 되고 있으나 국내의 연구동향은 미흡한 실정므로, 본 연구의 목적은 감염 자실체에서 분리한 버섯 바이러스의 특성 및 감염 균사의 기초 생리 등의 실험등을 수행하여 궁극적인 최종 목적인 바이러스-free 버섯 육성의 기초 자료를 제공하며, 또한 항바이러스제 처리를 통한 무병주 육성의 가능성을 검토하여 보고자한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 이병 자실체의 채집

1993년 11월 부터 1994년 3월에 걸쳐 경기도 수원, 경기도 광주, 화성의 느타리 버섯 재배 농가 및 고려대학교 농생물 학과 버섯 재배사에서 깔대기형 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*) 자실체를 채집, 바이러스 분리를 위한 시료로 사용하였다.

### 2. virus 감염 균사의 획득

바이러스 감염 균사는 Dip 법에 의한 전자 현미경 검경 결과 바이러스 입자가 검출되어진 깔대기형 자실체의 조직 배양을 통해 획득되어졌다. 즉 자실체의 갓부분 혹은 대의 육질이 두꺼운 부분을 멸균된 면도날로 내부 조직을 사방 1×3mm크기로 절단한 다음 멸균된 접종침으로 미리 준비되어진 malt extract agar 사면 배지의 중심부에 가볍게 눌러 놓는다. 조직을 이식한 시험관은 25℃로 고정된 항온기에 넣어 균사가 2~3cm정도 성장하면 새로운 시험관에 이식하고 배지의 70~80%정도 균사가 자라면 4℃의 냉암소로 옮겨 보관하였다. 본균사로 부터의 바이러스 순화 및 이병 균사 생리 실험의 재료로 사용하였다.

### 3. 바이러스의 순화 및 특성

#### 가. 이병자실체로부터의 바이러스의 순화

바이러스의 순화는 Goodin<sup>10, 11)</sup>의 순화법을 기준으로 변형된 방법에 의해 실시하였으며, 모든 과정은 4℃에서 실시하였다. 수집된 바이러스 이병 느타리 자실체를 0.5% mercaptoethanol이 포함된 0.01M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 1:3(W/V)의 비율로 곱게 마쇄한 조즙액을 거르로 여과한 후, 6,000g로 20분간 원심분리를 한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 0.1 volume의 Chloroforme을 첨가하여 교반한 후 6,000g로 20분간 원심 분리를 실시하여 분리되어진 상등의 수용성 부위를 취하였다. 여기에 10% Polyethylene glycol. Mw8,000 및 0.6M NaCl을 서서히 첨가하여 2시간동안 교반 시킨 상등액을 6,000g로 20분간 원심분리하여 얻은 침전물에 최초양의 0.1volume(V/V)의 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)를 첨가하여 재현탁 시킨 후 이를 6,000g에서 30분간 원심 분리하

여 상등액을 취하였다. 회수된 상등액은 SW40Ti rotor(Beckman)를 사용하여 102,000g로 2시간 초고속 원심분리를 실시, 얻어진 소량의 침전물을 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 재현탁한 후 이를 10,000g에서 20분간 원심 분리를 실시하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 112,000g로 1시간동안 35% sucrose cushion 초원심분리를 실시하여 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 재현탁한 후 이를 다시 10,000g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 바이러스를 부분순화 하였다. 10~50%의  $^{13}\text{C}$ Cl density-gradient 용액을 제조하여 SW-40Ti(Beckman) 초고속 원심분리 튜브에 주사기를 이용하여 밀도구배층을 제조한 후 층의 안정화를 위해 4℃ 냉장고에서 16시간 방치 시킨 후 부분 순화액을 첨가하여 112,000g로 24시간 초고속 원심분리를 하였다. 원심 분리후 형성된 바이러스가 포함된 light scattering 층을 채취하여 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 희석시킨 후 이를 102,000g에서 2시간 원심분리하여 침전물을 얻었고, 이를 다시 0.1M Sodium phosphate buffer(pH 7.5)에 재현탁하여 10,000g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 순화 바이러스를 얻었다.

#### 나. 이병 균사로부터의 바이러스의 순화

갈대기형 병징의 자실체로부터 조직 배양을 하여 virus에 감염된 균사를 얻었다. 4℃ 냉장고에서 보관중인 virus 감염 느타리 균사 절편을 콜크보오러를 이용하여 절편(직경:8mm)을 만들어 준비되어진 Park 액체 배지(Table 1)에 접종한 후 25℃의 항온 진탕 배양기에서 8일간 진탕 배양하였다. 배양되어진 균사체는 Bouchner funnel을 사용하여 수확한 후 2-3회 증류수로 세척하였다. 본 균사체에서 자실체 순화와 동일한 방법으로 바이러스 순화를 하였다.

#### 다. 자외선 흡광도 조사

부분순화 및 전순화 과정을 실시하여 회수된 바이러스의 수량 및 순도의 측정 및 자외선 흡수 패턴을 알아보기 위해서 순화 바이러스 용액을 흡광계(Beckman DU-64)로 330-230nm범위의 U. V scanning을 실시하였다.

#### 라. 전자 현미경 검경

순화바이러스액 10ul위에 탄소막을 씌운 grid

(300mesh)를 15분간 방치한 다음 grid의 수분을 제거한 뒤 2% potassium phosphotungstate(pH 6. 8)용액에 10분간 염색(negative staining)시킨뒤, 실온에서 grid를 건조시켜 전자현미경(JEM 100 $\times$ X -II,80KV)으로 바이러스의 형태,크기 및 밀도를 관찰하였다.

## 4. 외피 단백질의 분자량

### 가. 단백질 시료 제조

순화되어진 바이러스 외피 단백질의 전기 영동 재료는 4% sodium dodecyl sulfate(SDS, Sigma)와 10% 2-mercapto-ethanol(MERCK) 및 20% glycerol(Showa)을 포함하는 0.125M Tris-Cl 완충액(pH 6.8)과 순화 바이러스액(1mg/ml)을 1:1(v/v)의 비율로 섞은 후, 100℃ 항온 수조에서 5분간 끓인 다음 소량의 bromophenolblue(0.2% stock)을 첨가하여 전기 영동의 재료로 사용하였다.

### 나. 전기 영동

전기영동용 젤은 0.1% SDS가 포함된 12.5% homogeneous polyacrylamide 젤을 사용하였다. 전기영동 시료는 상기 처리된 시료를 각 well당 30ul(0.5mg/ml)를 loading하였으며, 전기영동용 완충액은 0.1% SDS가 포함된 0.025M Tris-glycine(pH 8.3)을 사용하여 100V에서 30분간 전기영동을 실시한 후 전압을 200V로 올려 1시간동안 영동하였다. 분자량 측정용 표준 단백질은 SDS-7-kit(Sigma, MW. 142,000~66,000 Dalton)을 사용하였다. 전기영동이 끝난 젤은 단백질 염색 용액(Trichloroacetic acid 30g, methanol 100ml, acetic acid 35ml, H<sub>2</sub>O 400ml, 1% Coomassie brilliant blue R-250 5ml)에 넣어서 24 시간 염색한 후 탈색용액(Acetic acid:methanol:H<sub>2</sub>O = 1:6:14, v/v/v)으로 12시간 탈색시켜 단백질 밴드가 보이게 되면 5% 초산 용액에 넣어서 보관하였다. 형성된 단백질 밴드의 분자량을 측정하기 위하여 함께 전개 시킨 표준 단백질을 기준으로 하여 표준 곡선을 작성한 후 분자량을 측정하였다.

## 5. Viral 핵산 정제 및 특성

### 가. Viral 핵산 정제

순화바이러스액(1mg/ml)70ul에 50ul의 10% SDS와 5ul의 5M NaCl, 50ul의 0.1M EDTA, 50ul의 0.5M Tris 및

5ul의 Proteinase K (10mg/ml), 삼차증류수 270ul를 넣고 37°C 항온 수조에서 30분간 반응 시킨 후 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol을 넣어 섞고 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 수용액층을 취하였으며, 이것을 3차례 반복하여 얻어낸 수층에 chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v)을 첨가한후 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 phenol을 제거하였다. 최종적으로 수확한 수용액층에 2.5배의 absolute alcohol을 첨가하여 -70°C의 냉각고에서 20분간 침강시켰다. 이를 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 후 80% alcohol로 세척하여 얻어낸 침전물을 충분히 진공 건조 후 3차 멸균수에 용해 시켰다.

#### 나. U. V scanning

정제된 viral 핵산을 자외선 흡광계 (Beckman DU-64)로 330nm~230nm 범위의 U. V scanning을 실시하여 바이러스 핵산의 정량 및 순화도를 조사하였다.

#### 다. 핵산 전기영동

핵산시료는 TBE (Tris base 10.8g, boric acid 5.5g, EDTA 0.37g, H<sub>2</sub>O 1 liter) 영동완충액으로 7% polyacrylamide gel을 제조하여 분리되어진 핵산시료를 50V에서 4시간동안 전기영동하였다. molecular marker로는 1kbp DNA를 사용하였다. 영동이 끝난 젤은 ethidium bromide(EtBr, 0.1mg/ml)에 10분간 염색 후 U. V lamp에서 band를 확인하였다.

#### 라. Viral 핵산 검정

분리되어진 핵산의 검정을 위하여 정제되어진 바이러스 순화액(1mg/ml)에 nuclease를 처리하였다. 사용되어진 nuclease로는 RNase, DNase, S1 nuclease을 사용하였고, 각각의 처리는 DNase처리의 경우, 정제되어진 핵산시료 2.5ul에 완충액 1ul, DNase 1ul, 멸균되어진 3차 증류수 5.5ul 넣어 섞어준 후 37°C 항온 수조에서 20분간 반응 시킨 후 전기영동 시료로 사용하였으며, RNase 처리의 경우는 첫번째 처리로서 핵산정제 시료 2.5ul에 RNase activity를 낮추기 위해 20X SSC 완충액 6.5ul를 넣어준 후, RNase 1ul를 넣어 섞어주었다. 다른 RNase 처리로는 RNA정제 시료 2.5ul에 RNase 1ul를 넣어준 후 완충액을 넣어주지않고 멸균되어진 삼차증류수 6.5ul를 넣어 섞어주었다. S1 nuclease처리의 경우, 핵산정제 시료 2.5ul에 완충액 1ul와 S1 nuclease 1ul 및 멸균되어진 삼차 증류수 5.

5ul를 넣어 섞어주었다. 각각 처리되어진 핵산시료들은 37°C 항온 수조에서 20분간 반응 시킨 후 전기영동 시료로 사용하였으며, 전기 영동이 끝난 후 band 상의 결과를 토대로 핵산의 종류를 확인하였다.

### 6. 바이러스 감염 균사의 생리

#### 가. 온도 및 산도에 따른 균사 생장 비교

상기 균사들을 바이러스 감염 균사와 건전한 자실체로부터 조직 배양을 통해 획득되어진 균사간의 균사 생장을 비교하기 위하여 malt extract agar 배지상에서 전배양되어져 보관 되어진 콜크보오리(직경 8mm)를 사용하여 평판 배지 상의 균사 절편을 떼낸 후 각각을 malt extract agar 배지 중앙에 다시 접종한 후 온도 및 pH를 달리한 조건하에서 균사 생장을 비교하였다. 온도별 균사 생장을 비교하기 위하여 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C로 고정되어진 항온기에서 10일간 배양하여 일별 균사 생장을 비교하였다. 산도별 균사 생장을 비교하기 위하여 1N NaOH 및 1N HCl 통해 배지 pH가 pH4, pH5, pH6, pH7, pH8, pH9로 고정되어진 배지 중앙에 접종한 후 25°C로 고정되어진 항온기에서 10일간 배양하여 일별 균사 생장을 비교하였다. 각각은 5반복 실시되었다.

#### 나. 영양원에 따른 균사 생장 비교

##### 1) 균사 배양

바이러스 이병 균사 영양원 실험용 기본 배지로는 Park 배지<sup>25)</sup>를 사용하였다. 각각 조건을 달리한 배양기에 virus에 감염된 균사와 건전 균사를 접종후 25°C의 항온기에서 배양하여 매일 균총의 크기를 측정하였다.

Table 1. Composition of Park medium

Chemicals	Amounts(g/l)
Starch	15.0
CaCO <sub>3</sub>	0.314
Arginine	3.484
Ammonium ttrate	3.06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.766
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.584
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.02
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.03
MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.02
Water	1 liter

## 2) 탄소원

탄소원에 따른 균사 생장을 관찰하였다. 탄소원이 제거되어진 기본 배지에 탄소원으로서 salicine, lactose, glycerol, ribose, mannose, arabinose, cellobiose, maltose, D-xylose, adonitol, fluctose, galactose, glucose, mannitol, sucrose, sorbitol, dextrin, starch 등 총 18종의 탄소원을 각각 100mM 첨가한 후 균사 생장을 측정하였다. 각각은 5반복 실시되었다.

## 3) 무기질소원

바이러스 이병 균사의 요구질소원의 변이를 조사하기 위하여 질소원이 제거되어진 기본 배지에 무기질소원 중 암모니아태로서 ammonium acetate, ammonium oxalate, ammonium phosphate, ammonium molybdate, ammonium bicarbonate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, ammonium tartrate를 초산태로서 sodium nitrate, potassium nitrate 등 총 10종의 무기질소원을 선별하여 각각 20mM 첨가한 후 균사 생장을 측정하였다.

## 4) 유기질소원

질소원이 제거되어진 기본 배지에 유기질소원으로서 DL-malic acid, phenylalanine, valine, glutamic acid, methionine, leucine, alanineglycine, asparagine, aspartic acid, serine, arginine 등 총 12종의 유기질소원을 선별하여 각각 20mM 첨가한 후 균사 생장을 비교하였다.

## 5) C/N 율

바이러스 이병 균사의 C/N 율 변이 여부를 조사하기 위하여 기본 배지의 탄소원을 고정된 후 질소원으로서 ammonium tartrate의 양을 변화시켜 C/N 율을 25, 50, 100, 300, 600 범위로 변화시킨 후 바이러스 이병 균사 절편 및 건전 균사 절편을 접종한 후 25℃로 고정된 항온기에서 배양한 후 균사 생장을 측정하였으며 대조구로는 정상 균사 생장을 하는 균사 절편을 접종하였으며 각각은 5반복 실시되었다.

## 7. Ribavirin 처리 효과 검증

### 가. Ribavirin 처리 농도 검증

ribavirin의 바이러스 억제 효과 여부 및 억제 최적 농도를 결정하기 위하여 고온고압하에서 멸균되어진

malt extract agar 배지에 membrane filter(Whatman, pore size:0.2 micron)로 여과되어진 ribavirin을 0, 15, 25, 35, 45, 55ppm씩 처리한 후 균사 생장이 매우 더딘 바이러스 이병 균사 절편을 접종하였다. 각각은 25℃로 고정된 항온기에서 배양한 후 균사 생장을 측정하여 최적 바이러스 퇴치 ribavirin의 농도를 결정하였으며, 건전 균사에 ribavirin의 영향을 알아보기 위하여 동일 처리를 한 배지에 건전 균사 절편을 접종, 그 영향을 조사하였다. 각각은 5반복 실시되었다.

### 나. Ribavirin 재처리를 통한 효과 검증

ribavirin 처리를 통한 균사 생장 부진이 회복된 균사 절편을 다시 25, 45ppm의 농도로 ribavirin 처리 malt extract agar 배지에 재접종하여 ribavirin 효과가 증대되어지는지 여부를 조사하였다. 각각은 5반복 실시되었다.

### 다. 계대 배양시 ribavirin 처리효과의 지속성 여부 검증

ribavirin 처리 후 효과의 지속성 여부를 검증하기 위하여 생장이 회복되어진 균사 절편을 다시 ribavirin 무처리 malt extract agar 배지에 재접종하여 계대 배양하여 동일한 효과를 보이는 지를 알아보았다. 각각은 5반복 실시되었다.

## Ⅲ. 결 과

### 1. Pleurotus ostreatus로 부터의 바이러스의 순화 및 특성

#### 가. 병징

건전 균사의 정상적인 생육을 하는 자실체에 비하여 이병 균사의 이병 자실체의 생육상은 균사 전체에 걸쳐 자실체의 발이가 불량하였으며(Fig1b), 발이되어진 자실체의 형태는 왜소하며 funnel shape이었으며(Fig1b, Fig 2a-b), 이러한 형태의 자실체들은 이후 대부분 necrosis로 발전하였다. 이러한 형태의 자실체들은 0.01M 인산 완충액(pH 7.5)으로 마쇄한 즙액을 dipping 법에 의해 전자현미경 검경 결과 구형의 직경이 약 50nm인 다수의 바이러스 입자들이 발견되었다. 이러한 형태의 자실체들을 일반 버섯 재배농가

에서는 깔대기 버섯이라고 한다. 또한 이러한 형태의 자실체로부터 조직 배양을 통해 획득되어진 균사의

균사 생장은 건전 균사에 비하여 매우 느렸으며(Fig 9), 균총의 형태는 appressed type을 보여주었다.

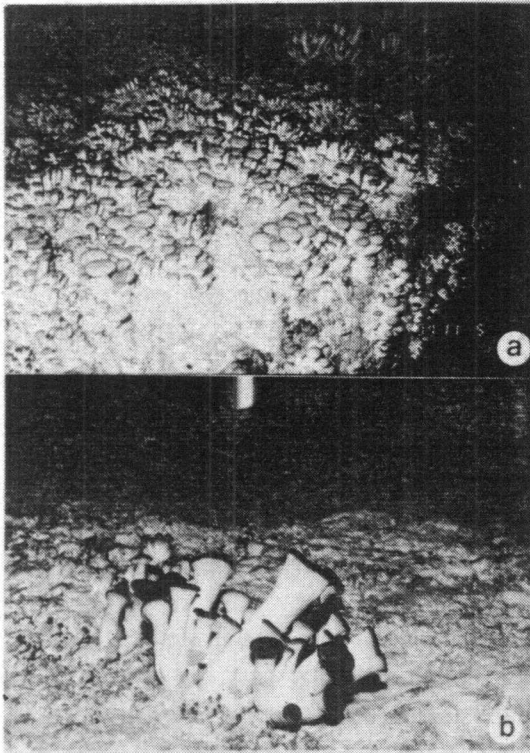


Fig. 1. a: Healthy bed and fruiting body  
b: Infected bed and abnormal fruiting body.

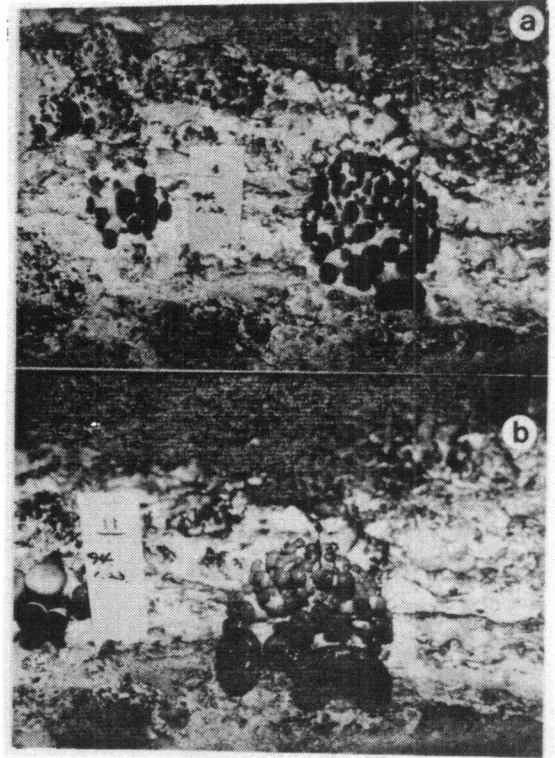


Fig. 2. a-b : Soft rot in later stage.

나. 바이러스의 순화 및 특성

바이러스의 순화는 Goodin 등의 방법<sup>22)</sup>을 변형하여 PEG 및 초고속 원심분리법으로 바이러스를 부분 순화 후 10~50 % CsCl 의 밀도구배 원심 분리법으로 바이러스를 순화(Table 3)한 결과 바이러스 층은 35%의 밀도구배층에서 light-scattering zone을 확인 할 수 있었다. 순화 바이러스의 자외선 흡광도를 조사한 결과 260nm에서 최대값이고 246nm에서 최소값을 나타내는 전형적인 핵산 단백질 패턴을 나타내었으며 A260/A280의 비율은 1.54를 나타내었다(Fig 3). 균사로부터의 바이러스의 순화는 상술한 바와 같은 동일한 방법으로 진행되었으며 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

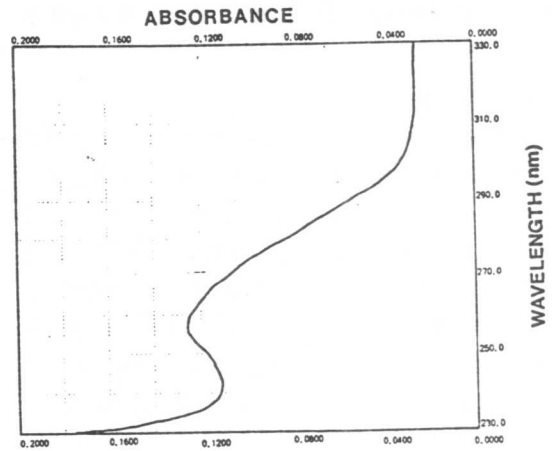


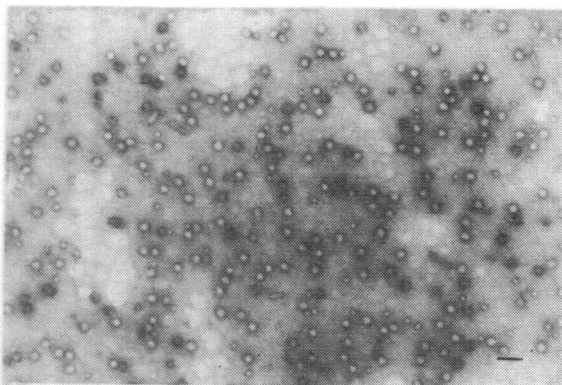
Fig. 3. Ultraviolet absorption spectrum of purified virus particles from *Pleurotus ostreatus*

다. 순화 바이러스의 전자 현미경 검경  
기형 성장하는 자실체로부터 순화한 바이러스액을 전자 현미경으로 검경한 결과 직경이 약 50nm인 구

형 바이러스 입자를 관찰할 수 있었다(Fig4). 정상적인 생육을 하는 자실체를 이병 자실체로부터 바이러스를 순화하는 방법과 동일한 방법으로 순화한 순화액에서는 어떠한 형태의 바이러스 입자도 관찰할 수 없었다.

**Table 2. Process of purification of virus from mushroom tissue**

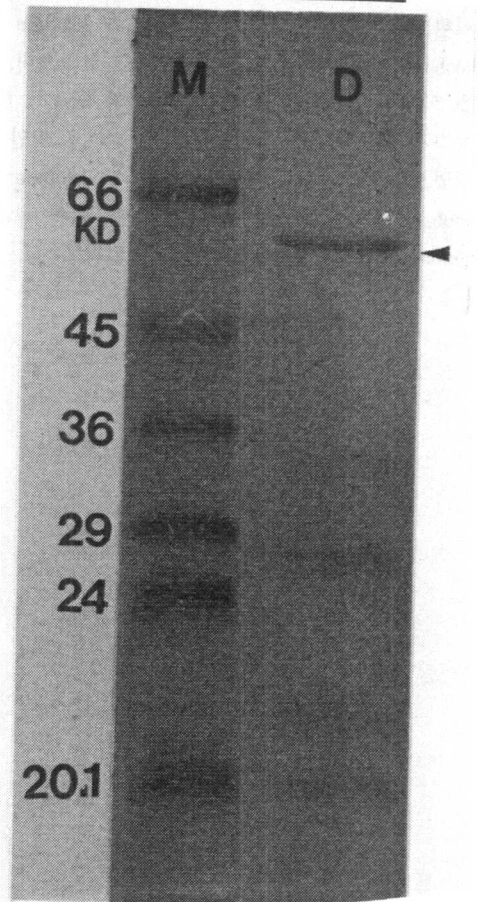
Grind Frozen Infected Sphorophore	
Crude Sap -	Cfg 6000g, 20min
	↓
Superntant -	Add 0.1V chloroforme/cfg 6000g, 20min
	↓
Aqueous phase -	Add 10% PEG and 0.6M NaCl/Stirring for 2hr/cfg 6000g, 20min
	↓
Pellet -	Resupend/cfg 6000g,30min
	↓
Supernatiant -	cfg 10200g 2hr
	↓
Pellet -	Resupend/cfg 10000g,20min
	↓
Supernatiant -	35% Sucrose cushion centrifugation at 112000g,1hr
	↓
Pellet -	Resupend/10-50% CsCl gradient centrifugation at 112000g,24hr
	↓
Supernatiant -	Fractionation/Mornitor at 260nm/Dialysis cfg 102000g, 2hr
	↓
Pellet -	Resupend



*OP.ostreatus*.(Bar equal 100nm)

**라. 외피단백질 특성**

순화 바이러스액을 SDS 및 2-mercaptoethanol로 SDS-7 kit marker(SIGMA)를 표준 단백질로 함께 SDS-PAGE를 실시한 결과 51,000 Dalton의 단백질 밴드를 관찰 할 수 있었으며(Fig5), 이보다 작은 크기의 단백질 밴드는 외피 단백질의 변성된 형태 혹은 purity에 기인한 형태로 추정된다.



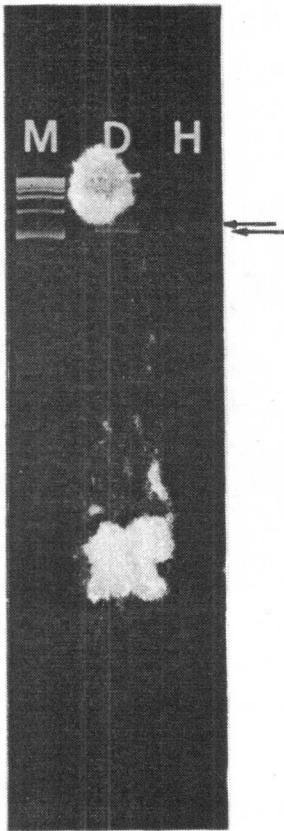
**Fig. 5. SDS PAGE pattern of coat protein of virus from *Pleurotus ostreatus*. Lane(M):molecular weight marker proteins, Lane(D):diseased sporophores.**

**마. Viral 핵산의 특성**

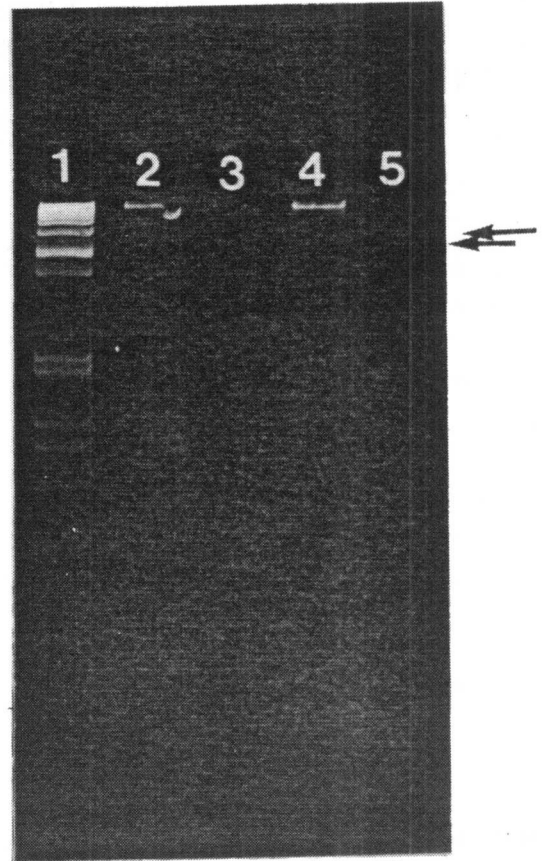
SDS-Phenol/chloroform 추출 및 proteinase K 처리와 에탄올 침전방법으로 순화 바이러스로부터 viral 핵산을 분리하였다. 분리되어진 viral 핵산을 polyacrylamide gel상에서 전기영동한 결과 크기는 약 1.7 kilobase 및 1.8 kilobase인 두개의 밴드를 확인할 수



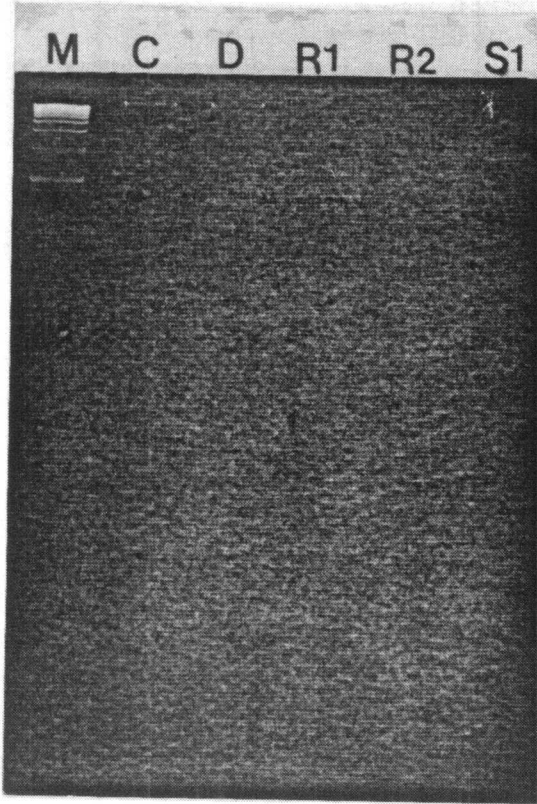
있었으며(Fig6), 건전 자실체로부터 동일한 방법으로 분리되어진 시료에서는 어떠한 밴드도 확인 할 수 없었으며, 또한 균사 시료로부터 동일한 방법으로 분리되어진 viral 핵산 시료 또한 자실체로부터 분리되어진 viral 핵산과 동일한 크기의 핵산 밴드를 확인 할 수 있었으며 건전균사로부터는 어떠한 밴드도 없었다(Fig 7). 따라서 이를 통한 진단이 가능하였다. 또한 nuclease처리를 통한 viral 핵산 검정은 DNase를 처리한 핵산 시료는 전기영동 결과 1.7 kilobase 및 1.8 kilobase인 두개의 밴드를 확인할 수 있었으며, RNase를 처리한 RNA시료는 전기영동 결과 band가 없었다. 따라서 분리되어진 viral genome은 RNA로 확인 할 수 있었으며, S1 nuclease처리시 역시 1.7 kilobase 및 1.8 kilobase인 두개의 밴드를 확인할 수 있어 viral RNA genome은 dsRNA임을 확인할 수 있었다.



**Fig. 6. Electrophoretic pattern of viral genomic RNA**  
 Lane(M);size marker(1kb DNA ladder),  
 Lane(D):mushroom viral genomic RNA.  
 Lane(H):healthy control.



**Fig.7. Electrophortic pattern of viral genomic RNA**  
 Lane(1) ; size marker(1kb DNA ladder),  
 Lane(2) ; mushroom viral genomic RNA,  
 purified from sporophors.  
 Lane(3) ; healthy sporophores control.  
 Lane(4) ; mushroom viral genomic RNA,  
 purified from mycelium.  
 Lane(5) : healthy mycelium control.



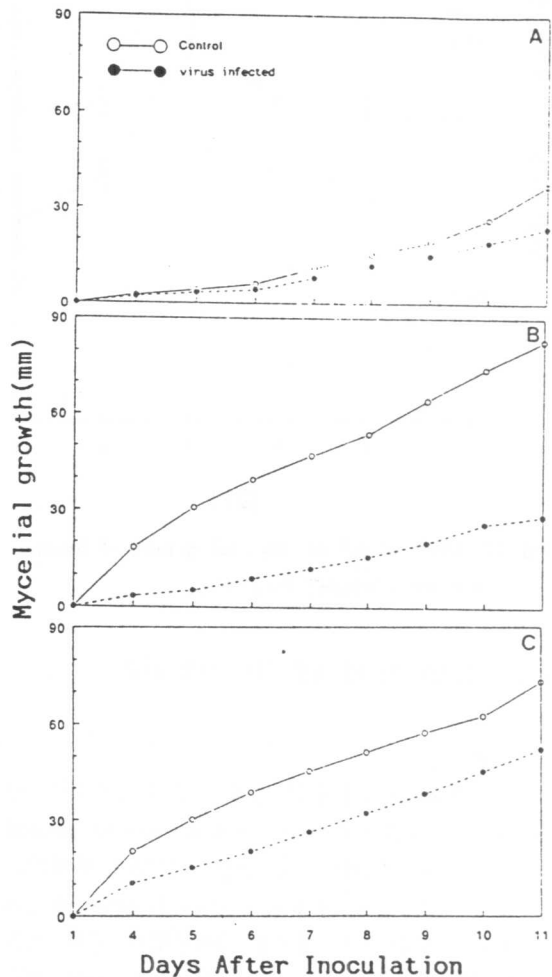
**Fig. 8. Effects of nuclease**  
 Lane(M) : size marker(1kb DnA ladder)  
 Lane(C) :untreated, Lane(D):DNase  
 Lane(R1) : RNase in distilled water.  
 Lane(R2) : RNase in 20×SSC.  
 Lane(S1) : S1 nuclease.

2. 바이러스 감염 균사의 생리.

가. 온도별 균사 성장 비교

바이러스 이병 균사 및 건전 균사의 온도별 균사 성장을 비교하여본 결과 15℃에서 이병 균사의 경우는 24.3mm, 건전균사 38.7mm이었다. 15℃에서는 건전 균사와 감염 균사 모두 균사 생장이 둔화하였다. 25℃의 경우에 이병 균사는 25.2mm, 건전 균사는 건전한 첨가시 균사 생장이 양호했던 Ammonium oxalate나 Ammonium acetate에서는 이병 균사는 생장이 불량하여 이병 균사의 질소원 요구 양상이 변화된 것을 확인 할 수 있었다. 또한 이병 균사나 건전 균사 모두 초산태 질소원 보다는 암모니아태 질소원

을 최적 생육 질소원으로 더 선호함을 알 수 있었다. 2mm이었다. 35℃의 경우 이병 균사는 41.4mm, 건전 균사는 75.6mm였다(Fig 9). 바이러스 이병 균사는 35℃에서 균사 생육이 최고에 다다름을 확인 할 수 있었고, 건전 균사의 경우는 25℃에서 균사 생장이 가장 잘자랐고, 따라서 정상적인 균사 생육에 필요한 온도인 25℃에서 보여준 정상적인 균사생장 및 이병 균사의 느린 균사 생장이 35℃에 이르러서는 약간의 변화가 있음을 확인 할 수 있었다. 균사 생육에 부적합한 온도인 35℃에서 건전 균사는 다소의 균사 생장의 장애를 받는 반면, 이병 균사의 생육은 다소 회복됨을 확인 할 수 있었다.



**Fig. 9. Effect of temperature on mycelia growth of healthy and virus infected *P.ostreatus*.**  
 A ; culture at 15℃, B ; at 25℃, C ; at 35℃

나. 산도별 균사 성장 비교

건전 균사는 pH 5, pH 6, pH 7에서 유의차 없이 넓은 생육 최적 산도를 요구한 반면, 바이러스 이병 균사는 pH 7에서 특이적으로 생육 최적 산도를 나타냈다.

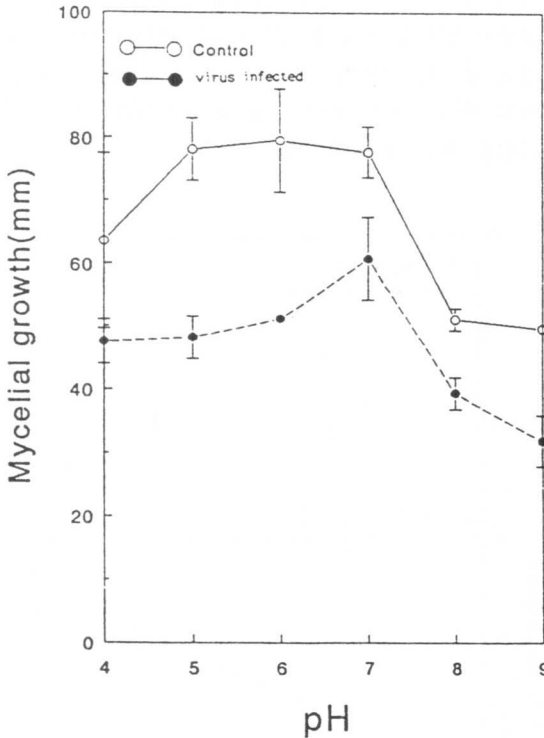


Fig. 10. Effect of pH on mycelial growth of healthy and virus infected *P.ostreatus*.

다. 영양원 변이에 따른 균사 성장 비교

1) 탄소원

총 18종의 탄소원 검정 결과 건전 균사의 경우 생육 최적 탄소원으로 starch, maltose, adonitol, glycerol 등의 순으로 우수한 균사 성장을 보였고, 바이러스 감염 균사는 starch, maltose, fructose, D-xylose, glucose 순으로 우수한 균사 성장을 보여주었다. 균사 생육 최적 탄소원으로 이병 균사 및 건전 균사 모두 starch에서 최고 균사 성장을 보임은 동일하였으며, 특이적으로, ribose의 경우 바이러스 이병균사는 건전 균사보다 생장이 더 우수함을 볼 수 있다.

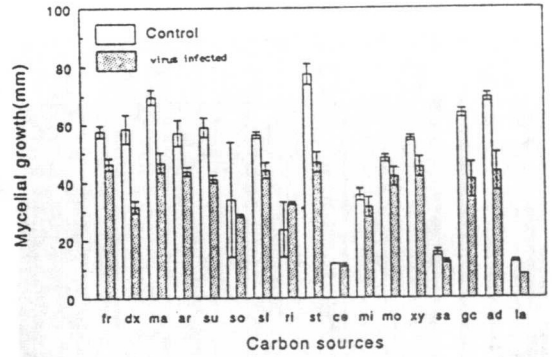


Fig. 11. Growth of healthy and virus infected mycelia with different sources of carbon.

fr:Fructose, dx:Dextrin, ma:Maltose, ar:Arabinose, Su:Sucrose, so:Sorbitol, sl:Glucose, ri:Ribose, st:Starch, ce:Cellobiose, mi:Mannitol, mo:Mannose, xy:D-xylose, sa:Salicine, gc:Glycerol, ad:Adonitol, la:Lactose.

2) 무기 질소원

총 10종의 무기 질소원 검정 결과 바이러스 이병 균사는 Ammonium tartrate, Ammonium sulfate, Ammonium nitrate가 첨가된 배지에서 우수한 생육 상태를 보여주었고, 건전한 균사는 Ammonium tartrate, Ammonium oxalate, Ammonium phosphate에서 우수한 균사 생육을 보여주었고, 또한 Ammonium sulfate첨가 되어진 배지에서도 균사 생육은 우수하였다. 그러나

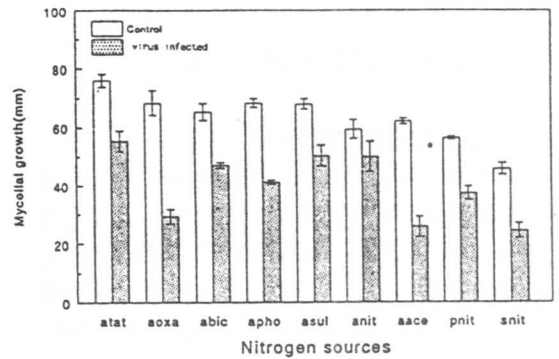


Fig. 12. Growth of healthy and virus infected mycelia with different sources of inorganic nitrogen.

atat:Ammonium tartrate, aoxa:Ammonium oxalate

**apho:Ammonium phosphate, asul:Ammonium sulfate**  
**anit:ammonium nitrate, aace:Ammonium acetate**  
**pnit:Potasium nitrate, snit:Sodium nitrate**  
**abic:Ammonium bicarbonate.**

3) 유기 질소원

총12종의 유기 질소원 검정 결과 건전균사 및 이병 균사 모두 균사 생육 최적 유기 질소원으로서 arginine과 alanine이었다.

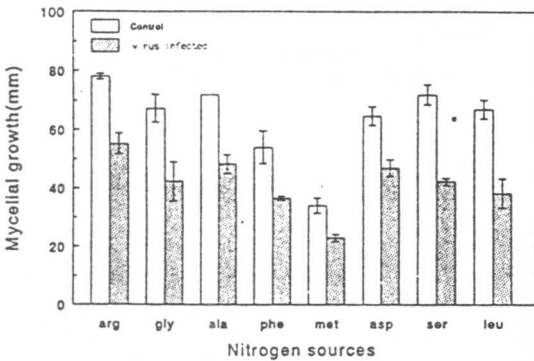


Fig. 13. Growth of healthy and virus infected mycelia with different sources of organic nitrogen.

3. Ribavirin처리 효과 검정

가. ribavirin 처리 최적 농도 검정

항바이러스제인 ribavirin의 버섯 바이러스에 대한 효과를 검정 하기 위하여 0, 15, 25, 35, 45ppm의 농도로 배지에 첨가, 효과를 검정하여본 결과,접종10일후 대조구인 ribavirin 무처리 건전 균사의 균사 생장은 85.6mm였고,ribavirin 무처리 이병 균사의 균사 생장은 27mm였으나, 이병 균사의 ribavirin 25ppm 처리시는 70mm, 35ppm 처리시는 68mm, 45ppm 처리시는 66mm로 균사 생장 부진이 회복 됨을 확인 할 수 있었으며, 최적 처리 농도는 25ppm있었고, 이는 35ppm 및 45ppm의 균사 생장치와 유의차가 있었다. 또한 ribavirin처리시 건전 균사 생장에의 영향을 확인하여 본 결과 ribavirin 25ppm 처리시는 85mm, 35ppm 처리시는 85mm, 45ppm 처리시는 77mm로 균사 생장이 35ppm처리시까지는 영향을 받지 않으나 45ppm 처리시는 어느정도 영향을 받음을 확인할 수 있었다.

4) C/N 율

바이러스 이병 균사의 C/N율 변이 여부를 조사한 결과, 이병 균사 및 건전 균사 모두 C/N율 200에서 균사 생장이 최고치에 다다름을 알수있어, 이병 균사의 C/N율에는 변이가 없었다.

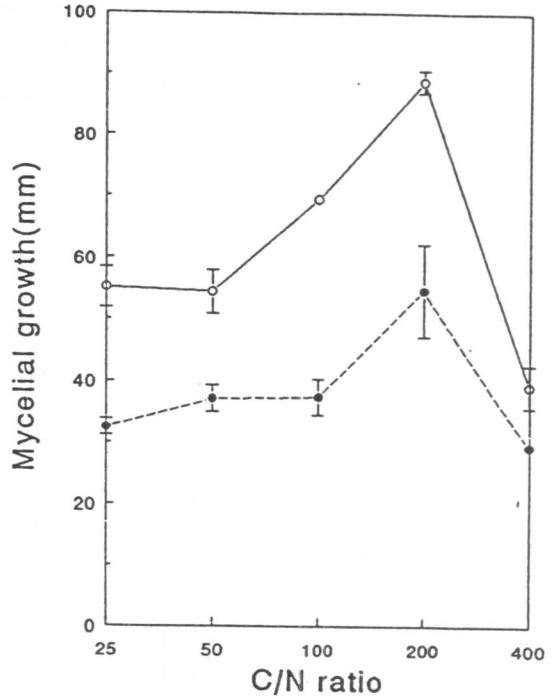


Fig. 14. Effect of C/N ratio on mycelium growth of healthy and virus infected *P.ostreatus*

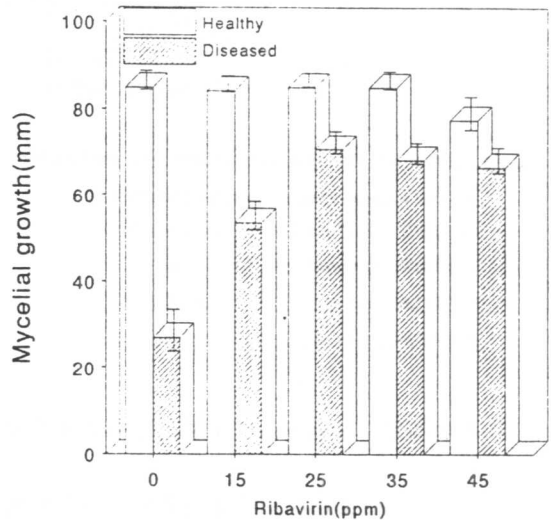


Fig. 15. Effect of ribavirin treatment and its level on therapy of oyster mushroom infected by mushroom virus.

나. ribavirin재처리를 통한 효과 검증

생장이 회복되어진 균사 절편을 다시 ribavirin 처리 malt extract agar 배지에 재접종하여 ribavirin 효과가 증대되어지는지 여부를 조사하여본 결과, 25ppm처리 배지에 재접종하여본 결과, 접종전 70.6mm인 균사 생장이 75mm로 증대되어짐을 관찰 할 수 있었으며, 특이적으로 45ppm처리 배지에 재접종한 결과 90mm로 균사 성장 부진 균사의 완전 회복 효과를 관찰 할 수 있었다.

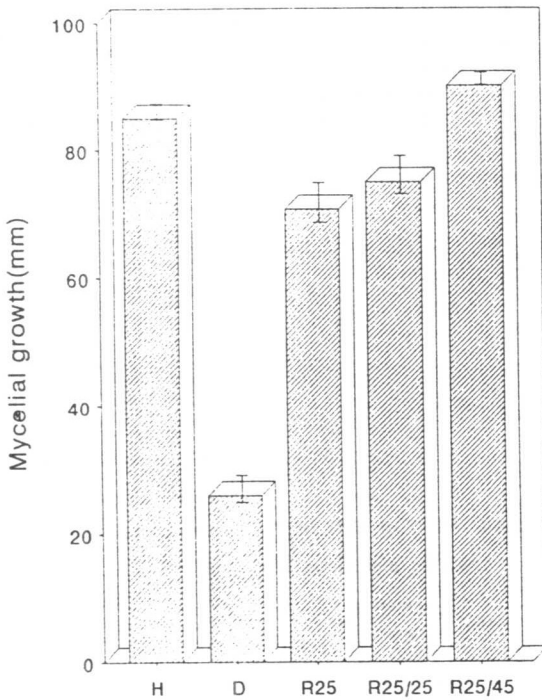


Fig. 16. Effect of ribavirin retreatment for eradication of mushroom virus in oyster mushroom. H:healthy mycelium, D:diseased mycelium, R25:ribavirin treatment at 25ppm, R25/25:ribavirin retreatment at 25ppm, R25/45:ribavirin retreatment at 45ppm.

다. 계대 배양시 ribavirin 처리 효과의 지속성 여부 검증.

ribavirin 처리후 효과의 지속성 여부를 검증하기 위하여 생장이 회복되어진 균사 절편을 다시 ribavirin 무처리 malt extract agar 배지에 재접종하여 계대 배양하여 동일한 효과를 보이는 지를 알아본 결과 대

조구로 사용되어진 바이러스 이병 균사 생육이 24mm것에 비하여,ribavirin 25ppm처리 배지에서 배양되어 균사 생육이 회복되어진 균사의 일대 계대 배양후 균사 생육은 79.25mm로 계대 배양전의 생육이 70mm에 비하면 다소 향상된 효과를 나타냄을 볼수 있었고,이는 35.45ppm의 농도로 처리되어져 계대배양되어진 균사에서도 동일한 효과를 보임을 알 수 있었고,또한 ribavirin의 효과는 계대 배양후에도 지속적이고 고정된듯하였고, 다소 균사 부진 개선 효과가 개선되었음을 확인할 수 있었다. 이후의 지속적인 계대 배양후에도 효과는 안정적으로 유지되었다.

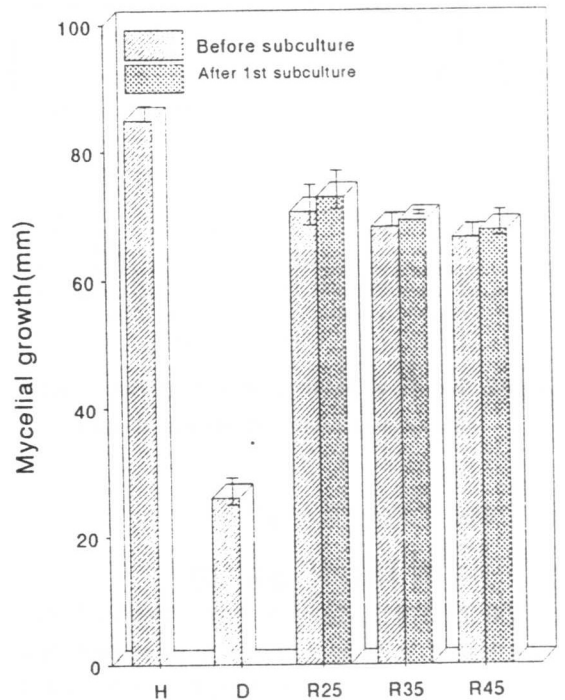


Fig. 17. Stationary effect of ribavirin during continuous subculture.

IV. 고 찰

느타리 버섯은 재배 기질의 다양성과 재배의 용이 함 및 효능의 다양함이 점차 입증됨에 따라 우리나라 농가에 소득 작물로 각광을 받아왔으며, 이에따라 재배 면적과 수확량은 해마다 증가 추세에 있어왔다. 그러나 최근 몇년 전부터 병해충의 대발생으로 인하여 느타리 재배는 큰 난관에 부딪히게 되었다. 1993

년 11월 부터 1994년 4월에 걸쳐 병해가 대발생한 경기도 광주, 화성, 수원 및 고려 대학교 버섯 재배사에서 기형 겨울 느타리 버섯을 채집하였다. 고등<sup>9)</sup>의 보고에 의하면 사철 느타리 버섯(*Pleurotus florida*) 및 겨울 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 자실체로 부터 각각 23nm 및 30nm의 구형 바이러스 입자를 발견하였다고 한다. 또한 고등<sup>9)</sup>은 바이러스 입자가 분리되어진 사철 느타리 버섯(*P. florida*)에서의 병징에 관한 보고에서 발이시 pinhead 형성이 너무 과밀하거나, 영성하며, 균상에서의 생장이 느리고, 또한 버섯 대의 모양이 굵고 길며 갓이 작으며, 초발이 소요 기간이 건전한 버섯의 초발이 소요 기간에 비하여 느린 병징을 보인다고 하였다. 본 실험에서 채집되어진 자실체의 형태는 왜소하며(dwarf) 깔대기형(funnel shape)이고 이후 대부분 괴저(necrosis)로 발전하였다. 이러한 자실체의 병징은 고등<sup>9)</sup>의 보고와는 다소 차이가 있었으나, 자실체로 부터 조직 배양을 통해 획득되어진 균사의 생장이 건전 균사에 비하여 부진하다는 점에서는 일치하였다. 이는 이미 보고되어진<sup>29)</sup> 바이러스 입자가 분리되어진 양송이 자실체의 병징과 유사하였다. 고등은 바이러스에 감염된 균상에서의 느타리버섯 수확량이 건전 균상에서의 수확량에 비하여 약 30% 감소된다고 보고하였다. 채집되어진 느타리 버섯 자실체로부터의 바이러스의 순화는 Goodin<sup>10)</sup>등의 방법을 변형하여 사용하였다. 바이러스 전순화 과정중에서 가장 치명적인 부분은 PEG침전 후 바이러스의 용해도가 문제가 되는데 때때로 PEG 처리후 불용성으로 바이러스가 남아있는 상태에서 실시하는 저속원심분리에서 바이러스가 침전물로 되어, 수율을 높히는데 장애가 되었다. 이러한 장애를 극복하기 위하여 바이러스 추출하는 최초의 완충액에 EDTA나 thyo glycol acid를 첨가하는데 이는 이러한 chelating agent 나 산화 방지제가 기주의 라이보솜을 분산시키고 바이러스를 안정화 시키며 바이러스의 응집을 분산하여 바이러스의 침전을 막아준다. 바이러스간의 응집 현상은 순화시 문제가 되지만 그 심각도는 순화 단계마다 차이가 있다. 바이러스 순화 과정 중 문제가 되는 또다른 단계는 sucrose cushion을 통한 초원심분리과정 중의 sucrose의 밀도다. Goodin<sup>11)</sup>은 양송이(*Agaricus bisporus*)로 부터 직경이 36nm의 isometric particle을 순화하는 과정중에서 35%의 밀도를 갖는 sucrose cushion을 사용하였고, 본 실험

에서 sucrose cushion 초원심 분리에 적합한 최적 sucrose 밀도를 확인하기 위하여 10~50%의 lineare sucrose density gradient 초원심분리를 실시하여본 결과 37.5% 및 16%의 sucrose 밀도에서 두개의 light scattering band를 확인할 수 있었고, 각각의 U. V scanning 및 전자 현미경 검경 결과 37.5%의 sucrose 밀도에서 취하여진 시료에서만 전형적인 바이러스 U. V pattern 및 바이러스 입자를 확인할 수 있었고, 16%의 sucrose에서 취하여진 시료는 전자 현미경 검경 결과 자실체 잔존물에서 기인한 듯한 ribosome으로 추측되어지는 다수의 물질들 만 확인할 수 있었을 뿐이다. 따라서 sucrose cushion 초원심 분리에 사용 가능한 sucrose의 농도를 35%로 채택, 사용하였다. 본 실험에서는 느타리 자실체의 cell organel로 부터 PEG에 의한 침전 및 차등원심분리에 의해 분리되어진 바이러스 입자들을 최종적으로 침전물화 시키기 위한 초원심분리의 gravity value(g value)에 문제가 있었는데 본 실험에서 사용한 자실체로 부터 직경 50nm의 바이러스 입자를 침전물화 시키기 위하여 사용한 초원심분리시의 g값은 112,000g로 고등<sup>9)</sup>이 사용한 수치와는 차이가 있었으며, Goodin<sup>11)</sup>이 사용한 수치와는 유사하였다. 본 실험 결과 200g의 감염 느타리 버섯 자실체로부터 0.6mg의 바이러스를 최종적으로 순화할 수 있었으며, A260/A280의 비는 1.54였고 자외선 흡광도 측정시 260nm에서 최대치를, 246nm에서 최소치를 나타내 전형적인 핵산 단백질의 패턴을 보였다. 또한 분리되어진 바이러스 입자들의 전자 현미경 검경 결과 직경이 50nm인 구형 입자들을 관찰할 수 있었으며, 이는 고등<sup>9)</sup>이 사철 느타리 버섯(*Pleurotus florida*) 및 겨울 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 자실체로 부터 각각 23nm 및 30nm의 구형 바이러스 입자를 발견하였다는 보고와는 상이하였으며, Liang<sup>19)</sup>이 *P. ostreatus*로 부터 23nm의 구형 바이러스 입자를 발견하였다는 보고와도 상이하였다. 또한 바이러스 순화액의 U. V scanning 결과 A260/A280의 비는 1.54로 고등<sup>9)</sup>이 보고한 수치와도 다소 차이가 있었다. 그러나 만약 동일한 전자 현미경으로 정확한 internal calibration standard로 바이러스의 입자를 비교하지 않는 한 바이러스 입자의 크기에 의한 분류에 적합하지 않다. 왜냐하면 전자 현미경의 배율에 따라 많은 변이가 존재하며, 이러한 변이는 보통 정확하게 조정되지 않기 때문이다. 더우기 바이러스

입자는 어느정도 유연하고 변형적이고, 바이러스 입자의 크기나 모양은 완충액의 pH나 화학적인 조성에 따라 달라질 수 있기 때문이다<sup>30)</sup>. 또한 공시 바이러스 순화액에 SDS 및 2 mercaptoethanol 처리 후 SDS-PAGE를 실시한 결과 약 51,000 Dalton 및 34,000 Dalton, 27,000 Dalton, 21,500 Dalton의 네종류의 단백질 밴드를 관찰하였는데, 33,000 Dalton이 본 바이러스의 외피단백질의 소단위였으며, 작은 단백질들은 기주에서 유래된 proteinase에 의한 degradation form으로 여겨지며, 혹은 순화 purity에 기인한 기주유래 단백질로 추정되어지는 형태였다. 순화 바이러스액에 SDS/proteinase K와 phenol추출로 바이러스 RNA를 정제한 후 polyacrylamide gel상에서 전기 영동한 결과 약 1.7kb 및 1.8kb 크기의 바이러스 RNA를 확인할 수 있었고, 또한 건전한 형태의 자실체로부터 바이러스 RNA정제 과정과 동일한 과정을 거쳐 얻어진 시료로부터는 전기 영동후 어떠한 크기의 바이러스 RNA도 없었다. 정제되어진 바이러스 RNA 또한 여러종류의 nuclease 처리를 통해 확인할 수 있었는데, DNase, RNase 및 S1 nuclease 처리를 통해 확인 하여본 결과 이중쇄상 RNA(dsRNA)임을 확인할 수 있었고, 분리되어진 바이러스의 genome이 dsRNA genome인 RNA 바이러스임을 확인할 수 있었다. mushroom virus의 genome에 대한 연구는 양송이(*A. bisporus*)에서 분리되어진 25nm, 34nm 크기의 isometric virus가 이중쇄상 RNA(dsRNA) genome를 가지고 있으며 또한 bacilliform 바이러스는 단일쇄상 RNA (ssRNA) genome을 가졌다고 보고되어졌으며<sup>32)</sup>, 표고버섯(*L. edodes*)에서는 39 nm 크기의 버섯 바이러스가 dsRNA genome을 가졌다는 보고가 있으며<sup>32)</sup>, 느타리 버섯(*P. ostreatus*)의 경우 23 nm 크기의 버섯 바이러스가 dsRNA genome을 가졌다는 보고가 있었다<sup>19)</sup>.

또한 국내에서 고등<sup>9)</sup>이 보고한 바에 따르면, 사철 느타리 버섯(*P. florida*) 및 겨울 느타리버섯(*P. ostreatus*)의 자실체로부터 분리한 구형 바이러스에서 이중쇄상 RNA(dsRNA)를 확인하였고, 바이러스 무병주로 부터는 없었다고 보고하였다. 또한 분리되어진 바이러스의 genome은 8.1kb 및 2.17kb, 2.12kb, 1.98kb 크기의 네개의 segment들로 구성되어있다고 보고하였다. 이는 본실험의 결과와는 상이하였다.

또한 본실험에서는 이병되어진 자실체로부터 조직 배양을 통해 분리한 균사의 기초 생리를 조사하

기 위하여 여러가지 실험이 수행되어졌다. 바이러스 이병 균사의 영양원 변이 여부를 조사하기 위한 실험중 탄소원 변이 여부 조사에서 총 18종의 탄소원을 검정한 결과 건전 균사의 경우 생육 최적 탄소원으로 starch, maltose, adonitol, glycerol 등의 순으로 우수한 균사 생장을 보였고, 바이러스 이병 균사는 starch, maltose, fructose, D-xylose, glucose 순으로 우수한 균사 생장을 보여주었다. 균사 생육 최적 탄소원으로 이병 균사 및 건전 균사 모두 starch를 요구함은 동일하였으며, 특이적으로, ribose의 경우 바이러스 이병균사는 건전 균사보다 생장이 더 우수함을 볼 수 있었다. 결과적으로, 건전 *P. ostreatus* 균사 생육에 mannitol이 가장 우수한 균사 생장을 보이는 최적 탄소원이라는 홍<sup>13)</sup>의 보고와는 다른점이었으나, starch에서는 일치되었고, 탄소원을 단당류로 분해하여 영양원으로 이용하는 것에 대한 바이러스 이병균사 및 건전 균사 모두에서의 탄소원 차이를 관찰 할 수 없었다.

또한 바이러스 이병 균사의 생육 요구 질소원의 변이 여부를 조사하기 위하여 먼저 총 10종의 무기 질소원을 검정하여본 결과 바이러스 이병 균사는 Ammonium tartrate, Ammonium sulfate, Ammonium nitrate가 첨가된 배지에서 우수한 생육 상태를 보여주고, 건전한 균사는 Ammonium tartrate, Ammonium oxalate, Ammonium phosphate에서 우수한 균사 생육을 보여주었고 이는 홍<sup>13)</sup> 및 고등<sup>8)</sup>의 견해와도 일치하였다, 또한 Ammonium sulfate가 첨가되어진 배지에서도 균사 생육은 우수하였다. 그러나 건전한 균사의 경우 첨가시 균사 생장이 양호했던 Ammonium oxalate나 Ammonium acetate에 대해서는 이병 균사는 생장이 불량하여 이병 균사의 질소원 요구 양상이 변화된 것을 확인할 수 있었다. 또한 이병 균사나 건전 균사 모두 초산태 질소원 보다는 암모니아태 질소원을 최적 생육 질소원으로 더 선호함을 알 수 있었다. 또한 유기 질소원 요구 변이 여부를 조사하기 위하여 총 12종의 유기 질소원 검정한 결과 건전균사 및 이병 균사 모두 균사 생육 최적 유기 질소원으로서 arginine과 alanine을 선호함을 알 수 있었다. 결과적으로 이병 및 건전 균사 모두에서 질소원 요구 양상은 유사하였다. 또한 바이러스 이병 균사의 C/N을 변이 여부를 조사한 결과, 이병 균사 및 건전 균사 모두 C/N을 200에서 균사 생장이 최고치에 다다름을 알수

있어, 이병 균사의 C/N율에는 변이가 없음을 확인 할 수 있었다. 그러나 건전 균사의 경우 생육 최적 C/N율이 40이라는 고등<sup>6)</sup>의 견해와는 상이한 결과를 보였다.

이병 균사 및 건전 균사간의 균사 생장을 비교하여본 결과 바이러스 이병 균사는 건전 균사에 비하여 일별 균사 생육 및 최종 균사 생장이 매우 느렸으며, 최종 균사 생장의 경우 건전 균사가 접종 10일 후 81.7mm의 균사 생장을 보이는 반면, 바이러스 이병 균사의 경우 동일 배양일의 경과후에 18.6mm의 균사 생장을 보일 정도로 매우 느렸으며, 이러한 균사 생장 부진은 이후 계대 배양을 통하여서도 유지되어, 고정된 듯했다. 이러한 바이러스 이병 균사의 균사 생장 부진은 고등<sup>9)</sup> 및 Schisler등<sup>29)</sup>의 보고와 일치하였다. 이러한 균사 생장 부진의 원인에 대한 언급은 보고되어진 바가 없고, 균사 생장에 요구되어지는 영양원의 변이가 관찰되지 않은 상태에서 이러한 균사 생장의 부진은 아마도 바이러스 감염에 의해 느타리버섯 형질이 전환되었으리라고 추정되어질 수 밖에 없고, 정확한 기작에 대한 연구가 필요하리라 생각되어진다.

바이러스 이병 균사 및 건전 균사의 온도별 균사 생장을 비교하여본 결과 15℃에서 이병 균사의 경우는 24.3mm, 건전균사 38.7mm이었고, 25℃의 경우에 이병 균사는 25.2mm, 건전 균사는 83.2mm이었고, 35℃의 경우 이병 균사는 41.4mm, 건전 균사는 75.6mm였다. 바이러스 이병 균사는 35℃의 경우 균사 생육이 최고에 다다름을 확인 할 수 있었고, 건전 균사의 경우는 25℃에서 균사 생장이 최고에 이르렀다. 건전 균사의 생육 최적 온도가 25℃라는 고등<sup>8)</sup>의 견해와 유사하였다. 따라서 정상적인 균사 생육에 필요한 온도인 25℃에서 보여준 정상적인 균사생장 및 이병 균사의 느린 균사 생장이 35℃에 이르러서는 약간의 변화가 있음을 확인 할 수 있었다. 균사 생육에 부적합한 온도인 35℃에서 건전 균사는 다소의 균사 생장의 장애를 받는 반면, 이병 균사의 생육은 다소 회복됨을 확인 할 수 있었다. 이는 바이러스 이병 균사내에 존재하는 버섯 바이러스의 replicase에 온도가 cofactor의 역할을 하여 masking되는것으로 추정된다. 바이러스 이병 균사 및 건전 균사의 산도별 균사 생장을 비교하여본 결과 건전 균사는 pH 5, pH 6, pH 7에서 유의차 없이 넓은 생육 최적 pH를

요구하였고, 이는 건전 균사의 생육 최적 pH가 5라는 보고<sup>36)</sup>와 다소 차이가 있었으며, 반면, 바이러스 이병 균사는 pH 7에서 특이적으로 생육 최적 pH를 요구하였다. 이러한 이병 균사의 생육 최적 산도의 변이는 깔대기형(funnel shape)자실체 발이후 괴저(necrosis)로 발전하는 병진전을 유도하는 직,간접적인 factor라고 추정되어진다. 현재 느타리 버섯 재배 농가에서 대규모로 발생하여 막대한 수확량의 손실을 유발케하는 병해인 세균성 갈변병은 pathogen이 *Pseudomonas tolaasii* 로서 다른 세균들인 *P. agarici*, *P. gingeri* 등과 함께 버섯 조직으로 부터 영양분을 흡수하여 공존하며, 특히 버섯의 생장 온도 18℃ 및 습도 75~80% RH에서 이러한 세균은 급격히 증식되어서 amine과 같은 세포의 독소를 생성하여 버섯 갓부위에 갈변병을 유발시킨다<sup>23)</sup>. 갈변병은 주로 버섯 수확전에 발생하고 수확후 낮은 온도에서 저장하는 기간중에도 발생한다. 이러한 느타리에 침입하여 기생하기 위한 감염 환경을 *P. tolaasii*에 유리하게 조성하는 것이 바이러스에 의해 감염되어져 생육 최적 pH가 변이되어진 느타리 버섯 자실체이다. 기생성 병원균인 *P. tolaasii*는 1차적으로 바이러스 감염에 의하여 생육 환경이 변화되어진 느타리 자실체에 2차적으로 감염, 갈변을 유발케하는 것으로 추정된다.

또한 바이러스 감염 균사의 균사 생장의 부진에 기인하여 버섯의 균사나 자실체에 영양원을 이용하기 위하여 상호 경쟁하는 비기생성균인 푸른 곰팡이 등의 감염 시기를 폭넓게해주는 것 같다. 즉 발효후 곰팡이가 이용가능케 분해되어진 기질 산물을 느타리 균사 생장 부진으로 인해 느타리 버섯균이 적시에 점유, 이용하지 못하고 토양 및 공기중에 대규모로 존재하는 부생균인 푸른 곰팡이등이 전 점유, 이용하여 대규모 균상 감염을 유발케 하는것으로 추정되어진다.

항바이러스제인 ribavirin에 의한 바이러스의 제거 가능성을 전형적인 바이러스 감염에 의한 병징의 하나인 균사 생장 부진의 회복 여부를 통하여 간접적으로 조사하여본 결과 처리농도 25ppm에서 부분적인 바이러스 제거 효과를 확인 할 수 있었고, 이러한 효과는 수대에 걸친 계대 배양후에도 지속적이었으며, 안정적이었다. 또한 초기 처리에 의하여 균사 생장이 회복되어진 균사에 ribavirin을 재처리하여 본 결과 재처리 농도 45ppm에서 균사 생장 부진이 완



전 회복됨을 확인 할 수 있었고 이를 통한 무병주육성은 가능성을 확인할 수 있었다. 이는 항바이러스제 처리에 의해 바이러스에 감염된 균사내에서의 바이러스의 복제를 억제함으로써 감염된 균사내 바이러스의 퇴치가 가능한 것으로 추정되어진다.

1986년 처음 국내 느타리 재배 농가에서 바이러스에 이병 되어진 느타리 자실체의 발생 이후 푸른 곰팡이 및 세균성 갈변병의 대발생 시기가 어느 정도 일치되어지는것은 어느정도 상관관계가 있는 것으로 추정되어진다. 따라서 푸른 곰팡이 및 세균성 갈변병원균, 버섯 바이러스 간의 상호 관계에 대한 심도 깊은 연구가 필요하리라고 본다.

## 참고문헌

- Block, S. S., G. Tsao, and L. Han. 1958. Production of mushroom from sawdust. *J. Agric. Food Chem.* **6**:923-927
- 차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신편버섯 재배 기술. 상록사, 수원. pp107-187.
- hen, K. P. L., M. Yu, and S. T. Chang. 1988. A new double-stranded virus from *Volvariella volvacea*. *Mycologia.* **80**(6):849-853.
- Dieleman-van Zaayen, A., 1967. Virus-like particles in a weed mould growing on mushroom trays. *Nature, London.* 216,595-596.
- Dieleman-van Zaayen, A., 1969. A virus disease in the Netherlands: symptoms, etiology, electron microscopy, spread, and control. *Agric. Res. Rep.* 782, *Inst. Phytopath. Res., Wageningen.*
- Dieleman-van Zaayen, A., and Temmink, J. H. M. 1968. *Neth. J. Plant Pathol.* **74**,48-51
- 고승주, 박용환, 차동열. 1981. 벗짚을 이용한 사철느타리버섯의 배지조제 및 종균 재식에 관한 연구. *한국균학회지.* **9**(2):67-72.
- 고승주, 유창현, 박용환. 1984. 여름느타리버섯과 느타리버섯의 균사 생장에 영향을 미치는 몇가지 요인에 관한 시험. *한국균학회지* **12**(1):15-19.
- 고승주, 차동열, 신관철. 1992. 균사생장이 부진한 사철느타리 및 느타리 버섯으로 부터의 Virus 입자의 분리. *한국균학회지.* **20**(2):149-153.
- Goodin. M. M., and Romaine. C. P. 1991. The La France disease-specific double-stranded RNAs are encapsidated in isometric virus-like particles(Abstr. ) *Phytopathology.* **81**:702.
- Goodin. M. M., and Romaine. C. P. 1992. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36-nm isometric particles. *Phytopathology.* **82**:285-290.
- 홍범식, 김세진, 송치현, 황세현, 양한철. 1992. 느타리 버섯(*Pleurotus sajor-caju*)재배를 위한 기질 및 재배 방법의 개발. *한국균학회지.* **20**(4):354-359.
- 홍재식. 1978. 느타리 버섯의 생리화학적 성질 및 재배에 관한 연구, *한국농화학회지,* **21**(3), 150-184
- Hager, R. A., 1969: An investigation of X-disease. *Mushr. Sci.* VII, 205-211
- Hollings, M. 1962. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushroom. *Nature, London.* **196**:962-965.
- Hollings, M. 1978. Mycoviruses: viruses infect fungi. *Adv. Virus Res.* **22**,1-53.
- Lelly, J. 1987. Edible mushrooms as a weapon against stravation. *Mushroom J.* 173:170
- Leseman, D. E., and R. Koenig, 1977. Association of club shaped virue-like particles with a severe disease of *Agaricus bisporus*. *Phytopatho. Z.* **89**,161-169.
- Liang P., K. Chen, and H. Liu. 1987. Virus particles in sporophore of oyster mushroom. *Chinese J. Virol.* **3**(4):369-375.
- Macaya-Lizano, A. V. 1974. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr. ) Quelet, former et especes affinies comportement cultural et systematique, *Revue De Mycologie,* **39**, 3-42.
- Mattew, R. E. F. 1991. *Plant virology* 3rd Ed. 83pp. Academic press.
- Nair, N. G., 1972. Observations on virus disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, in Australia. *Mushroom. Sci.* VIII, 155-170.
- Nair, N. G. and Fahy, D. C. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bact.* **35**,439-442.
- 박세원, 전재홍, 김현순, 정혁. 1994. 감자조식배양

- 시 항바이러스제 처리에 의한 감자 바이러스 S (PVs) 퇴치 효과. 한국 원예학회지, **35**(1):32-35
25. Park, W. M., Kim, G. H, and Hyun, J. W., 1994. The new synthetic medium for growth of *Pleurotus* spp. Korean J. Mycol. Newsletter **6**(1):23 (Abstr).
  26. Pennazio, R. 1973. Effects of four antimetabolites on PVX inhibition in infected potato tips cultured on artificial substrate. Rib. Patol. Veg. **9**:3-10.
  27. 신관철. 1987. 느타리 버섯 벚짚배지에 발생하는 유해 균류, 한국균학회지, **15**(2),92-98
  28. Saksena, K. N., 1975. Isolation and large-scale purification of mushroom viruses. Devel. Industr. Microbio. **16**,133-144.
  29. Schisler, L. C., Sinden, J. W., and Sigel, E. M. 1967. Etiology, symptomatology, and epidemiology of a virus disease of cultivated mushroom. Phytopathology **57**:519-526.
  30. Sinden, J. W., and E. Hauser. 1950. Report on two new mushroom diseases. Mushroom Sci. **1**:96-100.
  31. Stanek, M. and Rysava, J. 1971. Application of thermophilic microorganisms in the fermentation of the nutrient substrate for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Kummer. Mykol. Sb. **8**:59-60.
  32. Ushiyama, R, and Y. Nakai. 1982. Ultrastructural features of fungal virus-like particles from *Lentinus edodes*. Virology **123**:53-60.
  33. Van Zaayen, A. 1979. Mushroom viruses. Pages 239-324 in: Viruses and Plasmids in Fungi. P. A. Lemke, ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
  34. Wang, P. J. and C. Y. Hu. 1980. Regeneration of virus-free plants through in vitro culture. Adv. Biochem. Eng. **18**:61-99.
  35. Yoshioka, Y., R. Tabeta, H. Saito, N. Uehara and F. Fukuoka. 1985. Antitumor polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*(Fr.) QUEL. Isolation and structure of a -glucan, Carbohydr. Res., **140**,93-100
  36. Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. in the biology and Cultivation of Edible Mushroom. Chang, S. T. and Hays, W. A. eds. Academic Press, p521.