

발간등록번호

11-1543000-000644-01

버섯(느타리·표고) 바이러스 예방·진단기술 개발 및
viro-control 검정

(Development of a protective and diagnostic technology of
mushroom viruses in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*,
and study of platform technology of viro-control)

전북대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “버섯(느타리·표고) 바이러스 예방·진단기술 개발 및 viro-control 검
정에 관한 연구” 의 보고서로 제출합니다.

2014 년 9 월 18 일

주관연구기관명 : 전북대학교

주관연구책임자 : 김 대 혁

연 구 원 : 김 정 미

연 구 원 : 윤 숙 현

연 구 원 : 응웬응옥르엉

연 구 원 : 소 금 강

연 구 원 : 정 지 은

연 구 원 : 백 진 호

연 구 원 : 정 희 영

연 구 원 : 임 수 열

제1협동연구기관명 : 경상대학교

제1협동연구책임자 : 이 현 숙

제2협동연구기관명 : 산림버섯연구소

제2협동연구책임자 : 고 한 규

요 약 문

I. 제 목

버섯(느타리·표고) 바이러스 예방·진단기술 개발 및 친환경방제기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- ◆ 무분별한 바이러스감염 표고버섯의 유통 및 수입으로 인하여 버섯바이러스에 의한 버섯 농가피해 속출, 버섯바이러스에 대한 버섯 재배농가의 피해양상 파악이 시급
- ◆ 바이러스 감염여부는 육안으로 확인이 안 되므로 품질 안정성 확보를 위한 기술개발 및 우수 무바이러스 종균의 개발이 절실
- ◆ 버섯바이러스에 대한 연구 및 예방·진단 기술 연구가 전무하므로 연구의 독창성 및 우위를 차지할 수 있는 관련 기반연구도 필요
- ◆ 신품종 무바이러스(virus-free) 버섯개발과 산림버섯연구소 보유 균주의 검증을 통한 무바이러스 종균 확보 및 안정적인 종균의 농가 보급
- ◆ 버섯농가의 바이러스 감염 발병실태 및 버섯바이러스 조사를 통해 병원성 기작을 규명하고 버섯바이러스 예방·진단기술 개발
- ◆ 개발된 버섯바이러스의 진단 키트를 활용하여 국내 종균보급회사 및 수입검역소 등의 버섯의 바이러스 감염여부 조사, 바이러스 감염 종균의 보급 차단
- ◆ 무바이러스 종균만의 유통을 통해 국내 버섯 재배사의 버섯바이러스병 발생을 원천차단하고 무분별한 중국산 수입종균의 검역 강화에 활용

III. 연구개발 내용 및 범위

- ◆ 바이러스 규명 및 진단법 개발
 - 버섯바이러스 역학조사 및 바이러스 수집
 - 바이러스 유전체 분석
 - 유전체 기반 진단 kit 개발
 - 항체기반 진단 kit 개발

- 보급형 진단 kit 개발

◆ 무바이러스 표고품종 개발 및 실증시험

- 버섯재배농가에서 병징별 버섯수집 및 현황조사
- 표고 등록품종의 바이러스 감염도 조사
- 무바이러스 포자를 이용한 교배균주 육성
- 무바이러스 교배균주의 자실체 특성조사
- 선발된 무바이러스 교배균주의 자실체 실증시험
- 무바이러스 표고 품종 개발

◆ 버섯바이러스 기작규명을 통한 균주 안정성 마커개발
및 버섯피해균주의 viro-control 연구

- 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 기반연구
- 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사
- 바이러스 병원성 기작규명을 위한 isogenic 균주개발
- 바이러스 감염 균주의 병리학적 특성조사
- 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성 조사
- 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 수행
- 버섯바이러스 기작 규명을 위한 단백질체학 수행
- 버섯피해곰팡이의 생물적방제제 연구를 위한 균주개발

IV. 연구개발결과

- ◆ 신종버섯바이러스 3종 발굴성공
- ◆ DNA활용 진단키트 및 항체이용 ELISA 키트 기술 개발 성공
- ◆ 국내보유 표고버섯 종균 및 국외수입 종균의 표고버섯 바이러스 존재여부 조사, 고감염 상태확인
- ◆ 바이러스 병원성 기작연구를 위한 무바이러스 isogenic 버섯균주 분리기술 개발성공
- ◆ 무바이러스 표고버섯균주 4종 및 느타리버섯균주 12종 개발성공
- ◆ 무바이러스 표고 · 느타리버섯을 이용한 병원성기작연구결과 균사체 성장 및 자실체 형성량 저하에 영향을 미치는 것으로 확인, 무바이러스 버섯균주의 중요성 재확인
- ◆ 버섯바이러스의 병원성 기작 연구 및 상품화 종균개발을 위한 무바이러스 표고 · 느타리의 대규모 실증실험 성공적 수행, 상품화 준비를 위한 실증실험재배를 지속할 계획
- ◆ 버섯바이러스 병원성 기작연구를 위하여 유전체학 · 단백질체학 수행조건 확립에 성공,

관련 유전자들을 추가 확보할 계획

- ◆ 버섯피해곰팡이에 감염된 저병원성화 바이러스 분리 및 저병원성화 바이러스가 감염된 균주 개발성공을 통해 버섯감염 곰팡이의 친환경방제제 연구기반을 마련

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- ◆ 무바이러스 표고버섯 개발 기술의 특허출원(1 건), 개발균주의 특허기탁(2 종) 및 품종명칭 등록(2건) 및 보호출원(2 건)
- ◆ 무바이러스 느타리버섯 개발, 특허기탁 및 품종명칭등록 계획
- ◆ 무바이러스 표고버섯의 대규모 농가실증재배 진행 중, 무바이러스 표고버섯 상품화 계획
- ◆ 성공적인 표고버섯 상품화를 위하여 활발한 농가의 표고재배기술교육 및 홍보 계획
- ◆ 연구결과관련 SCI급 논문 12편 게재완료 및 2편 인쇄 중
- ◆ 발굴한 신종버섯바이러스 정보를 이용한 DNA활용 진단키트기술(특허등록 2건) 및 항체이용 ELISA 키트기술(특허계획) 개발 및 참여기업을 통한 상품화 계획
- ◆ 개발된 DNA 진단키트를 이용한 해외도입 표고버섯 종균의 바이러스 감염실태조사, 키트 및 결과를 활용한 무분별 종균수입의 차단을 위한 정책마련 계획

SUMMARY

I. Title

Development of a protective and diagnostic technology of mushroom viruses in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*, and study of platform technology of viro-control

II. Objectives and Requirements of Research and Development

- ◆ Damage of mushroom farm rapidly increased because virus-infected *L. edodes* was thoughtlessly distributed and imported. Viral diseases are urgently needed to investigate at mushroom farmers.
- ◆ Virus infection status can not detect by visual identification. Therefore, development of superior virus-free spawn is urgent for quality and safety control.
- ◆ Research foundation is necessary to go first because basis research and research related to protection·diagnosis technique nonexistent in the world.
- ◆ Superior virus-free spawns are merely secured and supplied to mushroom farm through development of new virus-free spawn and infection survey of spawn in mushroom institutes.
- ◆ A pathogenic mechanism is studied through investigation of virus and viral diseases at mushroom farmers. Therefore, techniques of protection and diagnosis are developed.
- ◆ Domestic spawn company and a quarantine station should detect a virus infection to block a supply of spawns using manufactured diagnosis kit to detect a mushroom virus.

III. Contents and Scope of Research and Development

- ◆ Investigation of virus and development of a diagnostic technique
 - Investigation of dynamics in mushroom virus and collection of a new virus

- Analysis of viral genome
 - Development of diagnosis kit using DNA
 - Development of diagnosis kit using antibody
 - Development of a popular diagnosis
- ◆ **Development of virus-free spawn of *L. edodes* and verification test**
- Mushroom collecting of the sort of disease from mushroom farmers and present-condition investigation
 - Survey of infectivity rate in registered *L. edodes*
 - Rearing of crossbred using virus-free spore of *L. edodes*
 - Fruiting body test in virus-free crossbred strains
 - Selection of virus-free strains and strains
 - Development of virus-free *L. edodes* strain and verification test of fruiting body

◆ **Development of a safety marker throughout investigations of pathogenic mechanism and insight of viro-control**

- Fundamental study about pathogenic mechanisms related to mushroom virus
- Various survey of virus-infected strains
- Development of isogenic strain to investigate pathogenic mechanisms
- Pathological characteristics of virus-infected strains
- Investigation of relationships between dysmorphia and viral symptoms
- Performance of genomics to investigate a pathogenic mechanism
- Performance of proteomics to investigate a pathogenic mechanism
- Development of hypovirulent strains to investigate a viro-control

IV. Results of Research and Development

- ◆ Three kinds of new viruses were successfully found.
- ◆ DNA kit and ELISA kit were developed using a viral genome and a specific antibody, respectively.
- ◆ The existence of virus was investigated in domestic and imported *L. edodes* strains. The most imported *L. edodes* strains were infected by virus.

- ◆ Manufacturing technique of virus-free strains was developed to investigate a pathogenic mechanism of mushroom virus.
- ◆ Virus-free *L. edodes* strains (4 strains) and *P. ostreatus* strains (12 strains) were developed.
- ◆ According to survey about pathogenic mechanisms using virus-free *L. edodes* strains and *P. ostreatus* strains, the viruses had evil influences such as a decrease in growth rate and formation rate of fruiting body.
- ◆ Virus-free *L. edodes* strains and *P. ostreatus* strains were carried out verification tests to investigate a pathogenic mechanism and develop spawns for a merchandising.
- ◆ Genomics and proteomics of mushroom were successfully established experimental conditions to investigate a pathogenic mechanism. Genes related to a viral pathogenicity are consistently found on further work.
- ◆ Hypoviruses were isolated from fungus-infected mushroom and Hypovirulent strains were developed to investigate the viro-control. The foundation for viro-control was established.

V. Products of Research and Its Application Plan

- ◆ One patent application about development technology of virus-free spawn, donation of 2 strains for patent, 2 variety registrations, and 2 applications of protection
- ◆ Establishment of plans about donation of virus-free *P. ostreatus* strains for patent and variety registrations
- ◆ Ongoing a verification test in virus-free *L. edodes* mushroom. Requiring a lot of farm educations about mushroom cultivation technique and publicity for merchandising
- ◆ Published 12 SCI-level articles and 2 article in press
- ◆ Development of ELISA kit (in preparation of patent) and DNA kit (2 patents) based on each genomic information of new viruses. Merchandising of these kits with the participating company
- ◆ The most *L. edodes* strains, which are imported an indiscreet, are infected by virus. Manufactured DNA-diagnosis kit is useful to detect a virus in the strains for quarantine.

CONTENTS

Part 1. The Outline for Research & Development	15
Section 1. The Goal of Research & Development	15
Section 2. The Backgroud and Requirement of Research & Development	15
1. The Backgroud of Research & Development	15
2. The Requirement of Research & Development	16
Part 2. The Present States of Technology and Development on the Home and Abroad	19
Section 1. The Present of Technology and Development at Home	19
Section 2. The Present of Technology and Development at Abroad	20
1. China	20
2. Japan	21
3. Other country	21
Part 3. The Result of Resarch & Development	23
Section 1. Theoretical and Experimental Methods	23
1. Clarification of Mycovirus	23
A. Investigation of viral diseases at Mushroom Farmers	23
B. Pure Purification of Mycovirus	23
C. Purification and Identification of Viral Genome	23
D. Electron Microscopic Examination	23
2. Develoment of Virus Diagnostic Techniques	23
A. Synthesis of Virus Antibody	23
B. Development of Biosensor of a Diagnostic Workup	24
C. Development of a Popular Handy Strip for Diagnosis	24
3. Development of Virus-Free Spawn	24
A. Selection of Virus-Free Spawn by Crossbreeding	24
B. Analysis of Culture Characteristics	24
C. Characteristics of Fruiting Body	24
4. Sawdust Culture of Mushroom	25
A. Manufacture of Sawdust Media	25
B. Spawn Inoculation and Culture	25

5. Genomics and Proteomics to Find Pathogenicity-related genes	25
A. Genomics	25
B. Proteomics	25
6. Selection of Candidate Genes Related to Viral Disease Symptom in <i>L. edodes</i>	25
A. Functional grouping	25
B. Gene Identification	26
7. Investigation of Mushroom Viral Mechanisms and Development of Safety Marker	26
A. Pathological Characteristics about Mushroom Virus	26
B. Development of Safety Marker to Detect Mushroom Virus	26
8. Investigation of Viro-Control as to Fungal Infection to Mushroom	26
 Section 2. Content and Results of Research	 27
1. Investigation of Mushroom Virus and Development of Diagnostic technique	27
A. Development of Virus-Cured Strain	27
B. Purification and Identification of Virus	29
C. Synthesis of Virus Antidody	38
D. Development of ELISA Kit Using Antibody	39
E. Development of Diagnosis Kit Using DNA	42
F. Detection of Mycovirus from <i>L. edodes</i> Using RT-PCR Method	44
2. Development of Virus-Free Spawn of <i>L. edodes</i> and Verification Test	51
A. Collection of Strains and Basic Characteristics	51
B. Selection of Parental Strain and Physiological Characteristics	60
C. Fruiting Body Test of in Collected strains	71
D. Fruiting Body Test in Crossbred strains	82
E. Fruiting Body Test of Superior Virus-Free Spawn in Sawdust Culture	87
F. Application for the variety protection of Superior Virus-Free Spawn.....	96
3. Development of Safety Marker throughout Investigations of Pathogenic Mechanism and Insight of Viro-Control	99
A. Fundamental Study about Pathogenic Mechanisms Related to Mushroom Virus	99
B. Various Survey of Virus-Infected strains	103
C. Artificial Manufacturing of Virus-Infected strain to Investigate a Pathogenic Mechanism	109
D. Pathological Characteristics of Virus-free and Virus-infected Strains	119
E. Collection of Sample To Investigate Relationships Between Dysmorphia and Viral	

Symtoms	134
F. Performance of Genomics and Proteomics to Investigate a Pathogenic Mechanism	136
G. Development of Hypovirulent strains to Investigate a Viro-Control	146
Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field	155
Section 1. Achievements of Purpose	155
1. Final Purpose	155
2. Annual Performance for Research & Development and Achievements	156
Section 2. Contributiveness	161
1. Research results	161
A. Development of New Strains of Virus-free Mushroom	161
B. Discovery of New Mushroom Viruses and Development of Diagnosis-Kit	161
C. Foundation for Research about a Pathogenic Mechanisms of Domestic Mycovirus and Viro-Control	162
Part 5. Products of Research & Development and Application Plan	163
Section 1. Annual Products of Research & Development	163
1. Annual Products of Research	163
A. Research Results	163
B. Results in Research Article	164
C. Patent Results	166
D. Results of Support to Workforce	166
E. Educational Results	166
F. Publicity Results	167
2. Application Plan of Research achievements	168
A. Practical Plans · Industrial Plan	168
B. Technical diffusion Plan as Education · Teaching · Publicity	168
C. Plan for intellectual property right security as Patent · Strain · Article	169
D. Plan for Further Study and Application for Other Study	169
Part 6. Collection of Technology information	171
Part 7. The Present States of Research Equipments	172
Part 8. Reference	173

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 1 절	연구개발의 목표	15
제 2 절	연구개발의 배경 및 필요성.....	15
1.	연구개발의 배경	15
2.	연구개발의 필요성	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절	국내기술개발 현황	19
제 2 절	국외기술개발 현황	20
1.	중국	20
2.	일본	21
3.	그 외 기타국가	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절	이론적·실험적 방법	23
1.	바이러스 규명	23
가.	버섯 농가 바이러스병 발생 실태조사	23
나.	바이러스 순수분리	23
다.	바이러스 유전체 분리 및 유전체 종류 확인	23
라.	전자현미경 검정	23
2.	바이러스 진단법 개발	23
가.	바이러스 항체 합성	23
나.	정밀진단용 바이오센서제작	24
다.	보급형 간이 진단 스트립의 제작	24
3.	무바이러스 품종개발	24
가.	무바이러스 교배균주 선발	24
나.	배양특성검정	24
다.	자실체 특성검정	24

4. 버섯 톱밥재배	25
가. 톱밥배지제조	25
나. 종균접종 및 배지배양	25
5. 병원성 조절 기작 관련 유전자를 확보하기 위한 genomics와 proteomics	25
가. Genomics	25
나. Proteomics	25
6. 표고 버섯바이러스의 병증에 관련하는 후보군 선발	25
가. Functional grouping	25
나. 유전자 특성화	26
7. 버섯바이러스 기작 규명 및 균주 안정성 마커 개발	26
가. 버섯바이러스 병리학적 특성 조사	26
나. 무바이러스 안정성 마커 개발	26
8. 버섯 푸른곰팡이병의 피해균주의 viro-control에 관한 연구	26
제 2 절 연구내용 및 결과	27
1. 버섯바이러스 규명 및 진단법 개발	27
가. 바이러스 curing을 통한 건전주 개발	27
나. 바이러스 분리 및 동정	29
다. 바이러스의 항체 합성	38
라. 항체이용 ELISA kit 개발	39
마. DNA활용 진단 키트 개발	42
바. RT-PCR법을 이용한 표고버섯의 바이러스 검출	44
2. 무바이러스 표고품종 개발 및 실증시험	51
가. 균주수집 및 기초특성조사	51
나. 모균주 선발 및 생리특성조사	60
다. 수집균주 자실체 발현시험(실증시험)	71
라. 교배균주 자실체 특성검정시험	82
마. 무바이러스 우수 선발 균주 톱밥재배 자실체 특성 검정	87
바. 무바이러스 표고 톱밥재배용 우수균주 품종보호출원	96
3. 버섯바이러스(느타리·표고) 기작규명을 통한 균주 안정성 마커개발 및 버섯피해균주의 viro-control 연구	99

가. 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 기반연구	99
나. 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사	103
다. 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 인위적 버섯바이러스 감염	109
라. Virus-free 버섯균주와 virus-infected 버섯균주의 병리학적 특성조사	119
마. 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성 조사를 위한 수집	134
바. 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행	136
사. 버섯피해곰팡이의 viro-control 연구를 위한 균주 개발	146
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	155
제 1 절 목표달성도	155
1. 최종목표	155
2. 연차별 연구개발 수행내용 및 달성도	156
제 2 절 기여도	161
1. 연구성과	161
가. 신품종 무바이러스 버섯개발 연구	161
나. 신종버섯바이러스 발굴 및 진단키트 기술 개발	161
다. 국내버섯바이러스 병원성 기작 및 생물방제제 연구기반	162
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	163
제 1 절 연구개발 성과	163
1. 연차별 연구 성과	163
가. 연구 성과	163
나. 논문게재 성과	164
다. 특허성과	166
라. 인력지원 성과	166
마. 교육 성과	166
바. 홍보성과	167
2. 연구성과활용 계획	168
가. 실용화·산업화 계획	168
나. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등	168
다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등	169

라. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등	169
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	171
제 7 장 연구시설·장비 현황	172
제 8 장 참고문헌	175

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목표

버섯농가별 곰팡이바이러스 감염에 의한 버섯의 발병실태를 파악하고, 병징별 버섯시료를 수집하여 신종 버섯바이러스를 분리 및 분석하며, 무바이러스 표고 및 느타리 버섯균주의 개발과 분석을 통해 병원성 기작을 규명하고 이와 관련된 유전자 마커들을 개발한다. 또한 버섯바이러스의 핵산 또는 항체를 활용한 정밀용 및 보급용 진단용 키트를 개발하여 국내 농가 보급 종균의 바이러스 감염여부 조사와 외국품종 도입 시 바이러스 감염여부를 조사하는데 활용하고 신품종 표고버섯을 포함한 1,000여 종 이상의 기존 균주들의 검증을 통해 무바이러스(virus-free) 종균을 최종 확보하여 균을 농가에 보급하여 농가수익을 증대시키고, 수입종균을 검역하는데 활용하고자 한다. 나아가 버섯피해진균의 viro-control 기반구축연구를 통해 장래 버섯 친환경 생물방제법 기술개발에 밑바탕이 되고자한다.

제 2 절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 연구개발의 배경

- ◆ 국내버섯산업은 느타리버섯, 새송이버섯, 팽이버섯, 양송이버섯, 표고버섯 등 5대 식용버섯을 중심으로 약 1조원 규모의 시장을 형성하고 있으며, 농산버섯으로 분류되는 느타리버섯, 새송이버섯, 팽이버섯, 양송이버섯은 연 15만톤 이상이 생산되어 전체 농업생산의 2% 정도를 차지하고 있는 농가의 고소득 작물이다. 하지만 국내 종균시장의 60%이상을 일본산 종균이 차지하고 있어 로얄티 지불에 의한 경제적 손실이 크므로 대체우량종균의 개발이 시급하며 현재 국내의 우수연구진들이 신품종 개발이 중요하게 대두되고 있다.
- ◆ 특히 표고버섯은 생표고, 건표고로서 소비되는 맛과 풍미가 뛰어난 고가의 식용버섯으로서 식품산업에서도 조미료로서 중요한 위치를 차지하고 있다. 표고버섯의 생리활성은 오래 전부터 관심의 대상이 되어 왔으며, 버섯에 함유된 물질의 항암효과에 대해서도 많은 연구가 수행되었는데, 특히 렌티난의 항암효과가 밝혀진 바 있다. 이처럼 버섯의 가치에 대한 일반인들의 관심이 증대됨으로써 이제 버섯은 단순한 식품이 아닌 기능성 건강식품 또는 약용작물로 인식되고 있으며, 농가의 고부가가치 작물로서 농가의 주요 소득원 역할을 담당하고 있다. 선진 일본의 경우 표고 골목재배가 계속해서 줄어드는 추세여서 양질의 표고를 한국에서 수입하려는 경향이 늘고 있다. 이러한 실정에서 국내의 표고가 안정되게

생산되는 것이 국외 수출 및 우리나라 국민의 안전한 소비와 재배농민의 소득증대에 기여할 수 있으므로 품종개발이 절실히 요구되는 실정이다.

- ◆ 표고버섯의 경우 톱밥배지에 의한 생산량이 급증하면서 값싼 중국산 톱밥배지가 균주 및 배지에 대한 안정성 검증 절차 없이 무분별 수입되고 있으며 여러 문제들을 야기하고 있다. 특히 버섯생산에 큰 피해를 주는 버섯바이러스 감염은 톱밥배지상태에서 육안으로 확인하는 것이 불가능하므로 바이러스를 진단할 방법 및 기술개발이 요구된다. 하지만 버섯바이러스가 감염되지 않은 무바이러스에 대한 연구 기술과 정보의 부족으로 무바이러스 품종개발에 대한 연구가 미비한 실정이다.
- ◆ 생물적 방제란 미생물, 곤충, 식물 그 밖의 생물 사이의 길항작용이나 기생관계를 이용하여 인위적으로 천적의 기능을 극대화 시켜 해충밀도를 억제하는 방법으로써 친환경적인 방제 방법이다. 화학농약의 사용 없이 농작물 해충을 방제함으로써 인체에 무해한 농작물 생산이 가능하고 화학농약에 대한 각종 병해충의 내성문제가 해결되며 각종 농자재 및 인건비 등의 비용이 절감된다(그림 1). 생물학적 방제의 종류에는 첫째, 곤충천적, 거미, 포식성 응애 등의 포식자를 이용하는 병해충 방제, 둘째, 기생벌, 기생파리 등 기생자와 선충을 이용하여 천적의 알을 해충의 몸에 산란하는 해충방제, 셋째, 세균, 사상균, 바이러스 등 병원균을 병해충에 침투시켜 병해충을 방제하는 경우가 있다. 본 연구팀이 연구 계획하는 저병원화 바이러스에 의한 버섯 피해진균의 병원성저하(virocontrol)를 활용한 생물적 방제 연구는 아직 미미한 수준이다.



[그림 1. 농업에 이용되는 생물적 방제재의 종류]

2. 연구개발의 필요성

- ◆ 동물이나 식물 바이러스는 바이러스 입자가 기주 세포외에서도 존재 가능하여 공기, 접촉, 상처 등으로 전파되므로 바이러스에 감염되지 않은 개체가 개체 밖의 바이러스에 노출되면 쉽게 감염된다. 하지만 곰팡이 바이러스는 공기, 접촉, 상처 등을 통하여 감염률이

현저히 낮고 바이러스에 감염된 세포가 건전한 세포와 세포융합을 하여 건전세포에 바이러스가 전이되는 방법으로만 바이러스 전파가 가능하므로 바이러스에 감염되지 않은 건전한 종균만 재배에 이용된다면 공기, 혹은 외부 환경에 의한 감염도가 미비하므로 근본적으로 버섯의 바이러스 퇴치가 가능하므로 무바이러스 품종개발과 보급이 아주 중요하다.

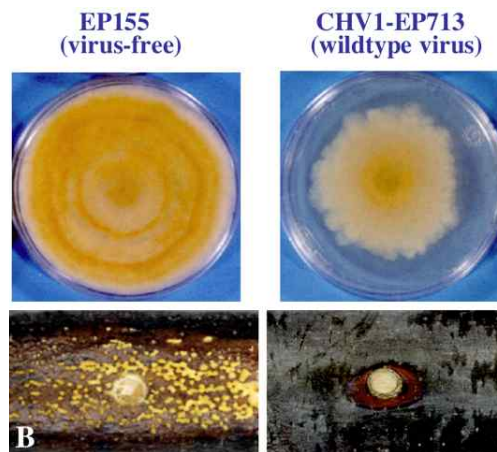
- ◆ 표고버섯은 현재 전국 표고재배 농가의 버섯 바이러스 감염실태 및 피해상황의 보고가 전무한 실정이다. 버섯바이러스에 대한 문제는 시중에 유통되는 종균의 안전성을 재배농민이 직접 확인 할 수 없으며 이를 개선하기 위해서는 종균 공급업체가 무바이러스 품종개발하고 종균제조과정의 엄격한 품질기준과 검사를 통해 안전한 무바이러스 표고 종균 공급이 시급하다(그림 2). 따라서 본 연구팀인 산림조합중앙회의 산림버섯연구소는 전국 143개소의 단위산림조합을 통한 자료수집 및 실태파악을 할 수 있는 조직력을 가지고 있어 본 연구과제 수행을 위한 버섯농가의 버섯 바이러스 감염 실태조사와 바이러스 감염 버섯 샘플의 수집 등에 큰 장점을 가지고 있다.



[그림 2. 바이러스 감염 표고버섯의 자실체와 정상표고버섯]

- ◆ 바이러스는 그 특성상 기주특이성이 강하여 버섯의 속, 종이 다르면 감염되는 바이러스도 다르므로 새로운 바이러스(병)가 발견되면 첫째, 그 바이러스의 병원성을 검정하고, 둘째, 진단방법의 개발이 필요하며, 셋째, 그 바이러스의 퇴치방법 개발이 절실하므로 본 연구개발결과물인 간이진단키트는 농가에 무바이러스 종균을 보급하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.
- ◆ 현재 지구온난화에 의한 기후이상 현상으로 재배환경의 변화하여 새로운 병해충 발생이 심각해지고 있으며 재배 농민의 피해 사례가 속출하고 있다. 친환경 버섯재배를 통한 농가의 소득증대를 창출을 위하여 biological control을 통한 친환경 생물방제기술의 개발이 요구된다.

- ◆ 본 연구과제 추진으로 버섯바이러스에 대한 표고버섯 재배농가의 피해 양상을 조사하고, 무바이러스 품종개발 및 품종보호출원을 할 수 있으며 이를 활용하여 직접 종균을 생산 공급하여 궁극적으로 재배농가의 안정적인 버섯 생산을 통해 소득증대 및 수출의 활로를 개척할 수 있을 것이라 사료된다.
- ◆ 한편, 중국에서 수입한 톱밥배지에 대해 재배임가 및 작목반 대부분은 표고배지의 특성을 제대로 파악하지 못하여 버섯생산성이 떨어지고 고품질의 버섯을 수확하지 못하는 등 심각한 농가의 피해가 늘어가고 있기 때문에 수입배지의 품질 안전성 확보를 위한 기술개발을 통해 농가의 피해가 확산되는 것을 막아야 한다. 따라서 안정된 표고 생산을 위해서는 한국의 사계절에 알맞은 무바이러스의 우량한 품종개발 연구가 필요하다.
- ◆ 본 연구팀은 *C. parasitica*의 병원성 관련 유전자의 연구와 이러한 유전자들의 발현에 영향을 주는 hypovirus의 유전자 발현 조절 기작을 연구함으로써 plant-fungus-virus 상호간의 interaction에 대한 연구를 오랜 동안 진행 중이므로 버섯바이러스 병원성 기작을 규명하고 이를 활용하여 버섯에 피해를 일으키는 진균류에 대한 친환경 생물학적 방제기술 (viro-control)을 개발하는데 크게 용이하다(그림 3).



[그림 3. 밤나무동고병균의 저병원화바이러스에 의한 viro-control]

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술개발 현황

- ◆ 국내는 90년대 후반에서 2000년대 중반까지 중국에서 배양이 완료된 표고버섯배지를 수입하여 재배하는 균상재배가 주를 이루었으나 최근 원목재배방식의 단점이 보완된 톱밥배지에 대한 사용량이 급증하면서 저렴한 중국산 배지가 무분별 대량 수입되고 있으며 저가수입배지와 경쟁하기 위해 국내 연구소들은 우수품종개발 및 재배기술관련 연구를 진행 중이다.
- ◆ 국내의 표고품종 육성을 위해 산림조합중앙회 산림버섯연구소와 산림청 산하 국립산림과학원, 충북산림환경연구소, 전남산림자원연구소, 국립산림과학원, 농촌진흥청의 연구진들이 표고 다양한 우수종균을 개발하고 있으며 종균의 원균분양을 원하는 종균배양소를 통해 전국의 표고 재배농가에게 보급되고 있다.
- ◆ 현재 국내의 표고품종출원 현황은 2014년 6월 현재 산림버섯연구소는 17개 품종, 국립산림과학원 11개 품종, 민간육종가에 의한 8 품종 총 36종을 개발 및 출원하여 국립산림품종관리센터에 심사 중에 있다. 그러나 재배의 대부분을 이루는 톱밥재배용 품종은 총 17개 품종으로 산림버섯연구소 10개 품종, 산림과학원 1개 품종, 민간육종 6개 품종밖에 개발되지 않았다. 표고품종육성은 개발 기간이 오래 걸리고 재배가능시간의 제한으로 연구에 제약이 많다.
- ◆ 국내의 버섯바이러스 연구는 대부분 경상대학교 이현숙 교수 연구진에 의해 이루어졌으며 병든 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)의 OMSV, OMIV-1, -II, III, 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)의 PeSV, 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)의 FeSV, 양송이(*Agaricus bisporus*)는 다수, 신령버섯(*Agaricus blazei*) 등 에서 다수의 버섯바이러스들을 분리 및 분석하였으며 병증을 유발하여 버섯생산량에 큰 영향을 주는 것으로 보고하였다.
- ◆ 경상대학교 이현숙 교수 연구진은 국내외 유일하게 느타리버섯바이러스 중 심한 병증을 유발하는 버섯바이러스에 대한 진단법을 개발하여 보고한 바 있다. 추가적으로 완벽한 방법은 아니지만 cAMP plate를 이용한 바이러스퇴치실험방법을 개발하여 보고한 바 있다.
- ◆ 버섯재배에 큰 피해를 주는 버섯바이러스가 감염되지 않은 무바이러스 연구에 대한 기술과 정보 부족으로 무바이러스 품종개발에 대한 연구 및 무바이러스 종균 검출 기술개발에

관한 연구들이 미비한 실정이다.

- ◆ 식물병원성곰팡이에 감염된 저병원성화바이러스를 활용한 biological control 연구는 국내 서울대학교 김국형 교수연구진과 전북대학교 김대혁 교수연구진에서 수행 중이다.

제 2 절 국외기술개발 현황

표고버섯의 수요는 세계적으로 증가하고 있는 추세이며 원목재배의 한계점에 의한 생산량 공급한계를 극복하기 위해 효율적인 톱밥재배연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 톱밥재배 품종에 대한 요구도 증가에 따라 중국과 일본의 품종개발 연구도 활발히 이루어지고 있으며 다양한 품종보호출원 버섯의 수도 증가하고 있다. 그러나 버섯재배 피해 미생물 오염균 관련 연구 이외에 버섯바이러스에 관한 연구는 유럽의 버섯바이러스 분리에 대한 연구 이외에 중국, 일본에서는 보고된 바가 거의 없다.

1. 중국

- ◆ 표고버섯 인공재배가 1930년대 이후부터 체계화되었으며 중국의 대표 버섯연구기관인 상해식용균연구소가 안정적 생산을 위한 연구를 수행하여 1964년 톱밥재배법을 최초로 개발하여 1978년부터 실용적 재배가 시작되었다. 상해식용연구소는 꾸준히 각종 버섯재배법 개발 및 표고 톱밥 재배용 품종육성연구를 통해 재배기술 보급 실용화에 집중하고 있다.
- ◆ 중국은 WTO 가입 이후 동부 연안지역 수출농업을 집중 육성하면서 중국의 품종개발, 재배기술, 생산성 증대에 대한 연구개발을 지속하고 있으며 자세한 특성 정보는 알려진 바가 없으나 수백 개의 표고버섯 품종을 개발한 것으로 보고되었다. 현재 세계 최대 표고버섯 생산국으로 전세계 생산량의 약 93% 가량을 차지하고 있으며 일본과 우리나라가 각각 2위, 3위를 차지하고 있으나 그 생산비중은 낮다.
- ◆ 최근 중국도 일본에 이어 표고버섯 기초연구를 활발히 진행하고 있다. 표고버섯 자실체 형성에 따른 유전자 발현차이 분석 (Chum et al., 2008)보고를 시작으로 Solexa sequencing에 의한 표고버섯의 transcriptome을 수행한 결과를 보고하였고(Zhong et. al., 2013), 표고버섯의 mating type 관련 연구(Wu et al., 2013) 결과를 꾸준히 연구 보고 중이다. 하지만 이러한 다양한 관련 연구에도 불구하고 버섯재배에 큰 영향을 미치는 버섯바이러스에 대한 연구는 전무하다.

2. 일본

- ◆ 일본은 표고 톱밥재배가 일본 내 버섯생산량의 75%를 차지하고 있으며 환경조절이 가능한 공조재배, 연중재배로 기계화, 자동화 비율이 높고, 190여종의 다양한 표고 품종을 개발하여 버섯 생산성을 향상시키고 있다.
- ◆ 일본의 산림종합연구소는 버섯의 생리, 생태, 유전연구를 하여 버섯연구의 기초자료를 제공하고 있으며 도토리균심연구소는 표고 품종육종, 재배기술 개발보급 및 실용화를 위해 꾸준히 노력하고 있다. 그 결과 현재까지 일본은 1998년부터 버섯의 품종보호출원을 실시하였으며, 표고버섯은 153개(2005년)를 품종보호출원하였다.
- ◆ 일본은 균주개발을 위하여 전통적 육종방법인 교잡육종법을 이용하여 왔다. 2004년 표고버섯의 교배인자(mating factor)를 연구하여 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 실험방법을 이용한 교배인자의 분자적 마커를 개발하여 보고하였다(Tanaka et al., 2004). 이는 버섯의 교배형을 단기간에 분석 조사하여 품종육종시간을 단축하고 양적, 질적 우수한 품종을 개발할 수 있는 기반을 마련한 계기가 되었다.
- ◆ 일본은 표고버섯에 대한 기초연구 보고를 꾸준히 하고 있으며 공식 보고된 바는 없으나 표고버섯 균사체와 자실체 간 성장 단계별 단백질체학 연구를 수행한 것으로 알려져 있다. 그러나 활발한 기초연구에도 불구하고 표고버섯바이러스에 대한 보고는 Magae에 의한 HKB 바이러스 분리 및 유전자 분석연구보고에 그치고 있다 (Magae, 2012).

3. 그 외 기타국가

- ◆ 표고버섯 및 느타리버섯이 경우 미국 및 유럽 등지에서 재배되고 있으나 대부분 수입에 의존하고 있어 다른 버섯에 비해 품종개발 및 기초 연구가 활발하지 못하고 버섯연구의 대부분이 기능성 물질에 관련된 연구에 집중되어있다.
- ◆ 버섯바이러스의 경우 1950년대 버섯 바이러스가 유럽과 미국의 양송이에 La France disease(Harmsen et al., 1991)를 발생하게 하여 버섯바이러스의 심각성을 절실히 인지하고 있으며 관련 연구가 오히려 3대 생산 국가인 중국, 일본, 국내보다 앞서있다.
- ◆ 최근에는 영국의 Scotland에서 발생한 VirusX에 의한 병이 확산되고 있다. 세계적 규모의

종균회사(Le Lyon, Italspawn, Sylvan)는 농가에 종균을 보급할 때 반드시 바이러스 검정을 한 뒤 판매하고 있으나 특별한 진단키트들이 개발된 바는 없다.

- ◆ 밤나무 줄기마름병균 *Cryphonectria parasitica*는 전 세계적으로 분포하며, 특히 북미대륙의 밤나무 산림을 황폐화 시킨 매우 치명적인 식물병원성 진균으로, ssRNA로 구성된 mycovirus가 감염을 일으키면 기주인 밤나무에 대한 병원성이 현저히 약해지며 저병원성화(hypovirulence)현상이 밝혀진 모델 system로써 대표적인 사상성진균의 mycovirus를 이용한 biological control의 대표 경우로 연구되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 · 실험적 방법

1. 바이러스 규명

가. 버섯 농가 바이러스병 발생 실태조사

협동기관인 산림 버섯 연구소에서 전국 농가와 연계하여 병징별, 특히 바이러스에 감염된 버섯들을 수집하고 발생 실태를 조사한다.

나. 바이러스 순수분리

버섯균사를 세포 파쇄기로 균일하게 파쇄시킨 뒤 원심 분리하여 세포 찌꺼기를 제거한다. 상등액내 바이러스를 10% PEG 6000로 침전시킨다. 침전물을 증류수로 현탁하여 원심분리하고 상등액을 초원심분리하여 바이러스 입자의 침전물을 얻는다. 이 침전물을 증류수에서 현탁하고, 바이러스 입자들을 50% CsCl(1.583g/cm)에서 16시간동안 초원심분리하여 분획한다.

다. 바이러스 유전체 분리 및 유전체 종류 확인

바이러스입자 현탁액에 같은 부피의 페놀을 처리하여 외피단백질을 제거한 후 핵산을 정제한다. 핵산의 종류를 분석하기 위하여 DNase I, RNase A 를 처리하고 전기영동을 수행하여, 바이러스의 유전체가 DNA인지, dsRNA인지, ssRNA인지를 밝힌다.

라. 전자현미경 검정

순수 분리한 바이러스 용액을 포름바로 코팅한 400메쉬 구리망(formbar-coated 400 mesh copper gride)에 1분 동안 고정시킨 후 2%(W/V) 유라닐 아세테이트(uranyl acetate) pH 4.5로 5분 동안 실온에서 염색한다. 이 grid를 공기 중에 말린 후 투과전자현미경(Transmission electron-microscope ;TEM; JEOL model 200)로 관찰한다.

2. 바이러스 진단법 개발

가. 바이러스 항체 합성

단클론항체는 정제된 바이러스 혹은 바이러스 단백질을 생후 6주된 암컷 BALB/c 마우스에 주사하여 항체를 형성시킨다. 항체생산 마우스의 비장세포를 myeloma cell 과 세포 융합시켜 hybridoma cell line 을 제작한다. 최적 hybridoma cell line 을 선택하여 BALB/c 암컷의 복강에 주사하고 약 일주일 후 쥐의 복강으로부터 복수를 얻어냄으로써

다량의 단클론항체를 생산한다. 분리된 항체를 ammonium sulfate(40~50% saturation) 침전법으로 농축한 후 단백질 A 컬럼(protein A column)을 통과시켜 정제한다. 역가의 검정은 ELISA 방법을 사용한다. 폴리클론항체 제작을 위해서는 정제된 바이러스 혹은 바이러스 단백질을 토끼에 주사한다. 3차 접종 4~5일 후 토끼의 귀 정맥에서 혈청을 얻어 역가 검정을 한다.

나. 정밀진단용 바이오센서제작

단일 바이러스의 검출을 위해서는 형광 및 SPR(surface plasmon resonance) 기반의 label-free detection 방법을 이용하는 바이오센서를 개발한다. 형광법의 경우 형광 scanner가 구비되어 있는 기관에서만 사용할 수 있으나, 감도가 뛰어나다는 장점이 있다. 반면 SPR 장비는 휴대가 가능한 소형장비로서 가격이 싸므로 연구실 단위에서 운용할 수 있는 장점이 있다. SPR 기반 바이오센서의 제작은 가로x세로 1.8 cm x 1.8 cm의 gold-thin film에 바이러스 항체를 고정하여 제작한다. 이러한 SPR 바이오센서 위에 버섯추출액을 흘려보내서 바이러스가 바이오센서 표면의 항체와 결합하면 발생하는 SPR 신호를 검출하여 바이러스의 존재유무를 검출하는 방법이다.

다. 보급형 간이 진단 스트립의 제작

농가 혹은 영세 중간보급소에서 직접 사용할 수 있는 임신진단 kit 형태의 바이러스 진단 스트립을 개발한다. 이를 위해서는 capture antibody와 detection antibody의 pair가 필요하므로 항체 제작에 있어서 항원이 두 종류가 필요하다.

3. 무바이러스 품종개발

가. 무바이러스 교배균주 선발

모균주를 선발하여 포자를 채취하고 단핵균주를 분리한다. 무바이러스 단핵균주를 분리하여 균사의 생장을 조사하고 무바이러스 단핵균주를 선발한 후 mono-mono, di-mono 교배균주를 육성한다. 톱밥재배를 실시하여 버섯 형태, 색깔, 수량, 품질, 무바이러스 등을 조사하여 배양 특성과 자실체 특성을 검정하고 농가실증시험을 실시한다.

나. 배양특성검정

배양 특성조사로는 표고 균을 5개의 배양온도(10, 15, 20, 25, 30℃)에서 균사를 배양하여 이들의 균사생장 정도와 밀도를 조사한다. 표고 균의 최적 배양온도는 25℃이며, 이보다 낮은 온도인 저온에서 또는 높은 온도인 고온에서 균의 배양에 대한 특성을 조사하고자 하는 것이다.

다. 자실체 특성검정

자실체 특성조사로써 갖의 크기, 대 길이, 개체 무게 등을 조사하며, 톱밥배지의 배양기간, 갈변 특성을 조사하게 된다. 균주로서 보존할 뿐만 아니라 보존균주의 자실체를 확인하고 농가실증시험을 실시한다.

4. 버섯 톱밥재배

가. 톱밥배지제조

혼합기에 톱밥(85%)과 영양원인 미강(15%) 등을 넣고 고르게 혼합한 후 물을 첨가하여 수분 함량을 55-60%로 조절한다. 수분조절된 배지는 입봉기를 통해 입봉을 한 후 플라스틱링을 끼워 솜마개로 덮어 넣은 후 살균을 한다.

나. 종균접종 및 배지배양

톱밥배지의 상단면에 있는 뚜껑을 또는 솜을 열고 미리 분쇄해놓은 접종원을 소독한 스푼이나 접종봉으로 배지 중앙부분에 고르게 옮겨 넣는다. 배양실에서 배양이 끝난 균사는 온도 20-25℃, 조도 200 lux, 탄산가스 농도 0.1%이하의 조건에서 갈변이 잘되며, 버섯의 수량과 품질에 영향을 미치므로 배양특성을 잘 숙지한다. 갈변이 70%이상 진행되면 재배사로 이동 후 개봉을 하여 버섯을 발생시킨다.

5. 병원성 조절 기작 관련 유전자를 확보하기 위한 genomics와 proteomics

가. Genomics

무바이러스 표고버섯과 바이러스감염 표고버섯에서 RNA를 분리한다. 바이러스에 대한 균주의 유전자 발현을 "gene fishing" 방법을 이용하여 구분하고, 느타리와 표고버섯바이러스 감염여부에서 차이를 보이는 유전자 후보를 결정짓고, 이 후보 유전자를 cloning 하여 분석하는 genomics 부분에 대한 연구를 실시한다.

나. Proteomics

무바이러스 표고버섯과 바이러스감염 표고버섯에서 단백질을 분리한다. 분리한 단백질을 2-D PAGE 및 MALDI-TOF를 수행하여 표고버섯바이러스의 감염여부에서 차이를 보이는 단백질을 genome sequence database를 활용하여 proteomics에 대한 연구를 실시한다. 느타리버섯도 동일한 실험 과정을 수행한다.

6. 표고 버섯바이러스의 병증에 관련하는 후보군 선발

가. Functional grouping

genomics와 proteomics 분석에 따른 각각의 후보 유전자 및 단백질 군들에 대한

bio-informatics에 근거한 기능분석을 1차 실시한다. 특히 2개의 “-omics” 조건에서 모두 나타나는 후보들을 1차 선발하며, 본 연구와 밀접한 stress responsive pathway, signal transduction pathway, transcriptional regulator, pathogenesis, host factors for viral replication, gene silencing에 관여하는 후보들을 선발한다.

나. 유전자 특성화

바이오마커 개발에 활용하기 위해 degenerated primer를 이용한 PCR, genomic λ library screening, sub-cloning, sequencing, primer extension, 5' & 3' RACE등 기본적인 분자생물학적인 방법을 이용하여 full-length 및 유전자 구조의 특성을 규명한다.

7. 버섯바이러스 기작 규명 및 균주 안정성 마커 개발

가. 버섯바이러스 병리학적 특성 조사

협동기관으로부터 무병증 버섯을 분양받아 분리한 버섯바이러스 입자를 직접적으로 감염시키거나 제작한 바이러스 유전체의 발현벡터를 형질전환시켜 바이러스를 감염시킨다. 성공적인 바이러스의 감염을 위하여 버섯의 저조한 형질전환률을 높인다. 복합효소 glucanex 100 G를 이용하여 protoplast 생성률을 높인 후 다양한 형질전환 방법을 시도한다. 바이러스 감염체를 선별하여 바이러스의 형태, 크기, 색깔, 품질 등을 관찰하여 병리학적 특성을 조사하여 바이러스 기작을 추정한다.

나. 무바이러스 안정성 마커 개발

저병원성 바이러스에 의한 viro-control 마커를 개발하기 위하여 보고된 생화학적 마커인 laccase과 oxalate, 유전자 관련 마커인 *lac*, *crp*, *Mf2/1*, *Mf2/2*, signal pathway 관련 유전자들을 데이터화하여 이들의 발현여부를 조사하여 변화를 보이는 바이러스 기작 관련 마커를 선발하고 균주에 맞는 생화학, 유전학, 분자생물학적 마커를 활용한 버섯종균의 안정성을 검증의 가능성을 제시한다.

8. 버섯 푸른곰팡이병의 피해균주의 viro-control에 관한 연구

다양한 식물병원성균 *Helminthosporium victoriae*, *Penicillium chrysogenum*, *Cryphonectria nitsckei*, *C. parasitica*과 *Aspergillus foetidus*에 바이러스가 감염된 균주를 확보하고 각 균주로부터 바이러스를 분리한다. 바이러스의 유전자를 분리하여 염기서열을 분석하고 특성을 조사한다. 버섯에 피해를 일으키는 푸른곰팡이의 virus-free 균주를 확보한 후, 저병원화 바이러스를 감염시켜 virus-infected isogenic 균주를 확보하고 병원성을 조사하여 viro-control 연구의 기반을 구축한다.

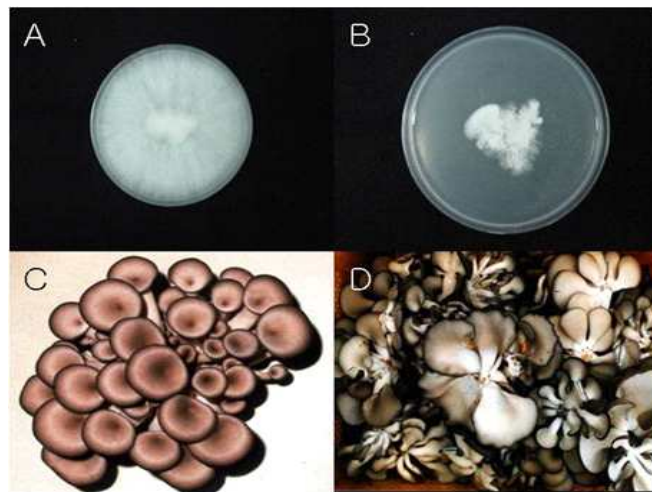
제 2 절 연구내용 및 결과

1. 버섯바이러스 규명 및 진단법 개발

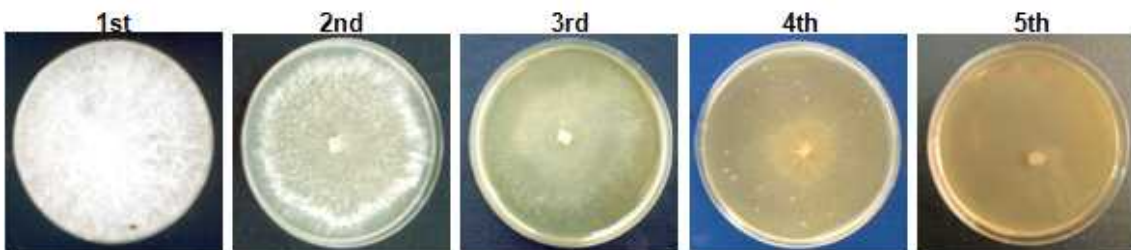
가. 바이러스 curing을 통한 건전주 개발

1) cAMP 배지에서의 계대 배양

Curing을 실시하기 위해서, OMSV와 OMIV-II가 감염되어 있는 *P. ostreatus* c.v 춘추2와 *P. ostreatus* c.v 2206 균사 (그림 4)를 cAMP와 rifamycin 배지에 계대배양하였다. 여러 농도 (0.1, 0.5, 2 mM)의 cAMP가 첨가된 배지에서는 바이러스의 퇴치가 되지 않았다. 우선, 낮은 농도(0.1 그리고 0.5 mM)의 cAMP에서는 바이러스의 curing이 일어나지 않았으며, 높은 농도(2mM)의 cAMP에서는 버섯 균사 자체의 성장이 일어나지 않았다(결과 미제시). 하지만, 1 mM의 cAMP 농도에서는 계대의 횟수가 증가함에 따라 바이러스 감염 버섯 균사의 생장이 점점 저해되는 것을 볼 수 있었다(그림 5).



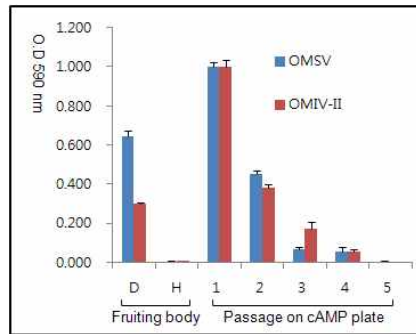
[그림 4. 느타리버섯에서의 바이러스 병징과 PDA배지에서 바이러스 감염 균사 성장. A : 건전 균사 성장, B : 바이러스 감염 균사 성장, C : 건전버섯, D : 바이러스 감염 버섯]



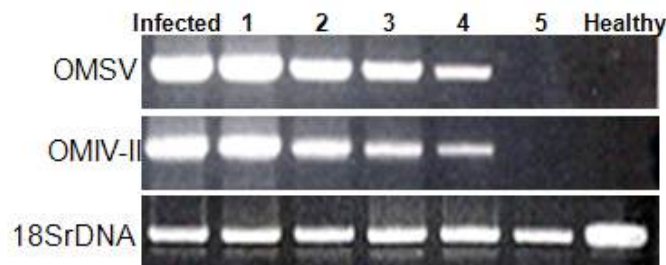
[그림 5. 바이러스 감염 균사의 cAMP 배지에서의 계대 배양]

2) 바이러스 curing을 알아보기 위한 TAS-ELISA와 RT-PCR 수행

5회 계대한 cAMP 배지에서 자란 균사를 대상으로 바이러스의 curing을 조사하기 위하여 TAS-ELISA와 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 TAS-ELISA에서는 계대의 횟수가 증가함에 따라 바이러스의 입자가 점점 줄어드는 것을 알 수 있었다 (그림 6). 이 결과를 확인하기 위해서 실시한 RT-PCR 결과에서도 계대의 횟수가 점점 증가함에 따라 바이러스 유전체가 점점 줄어드는 것을 알 수 있었다 (그림 7).



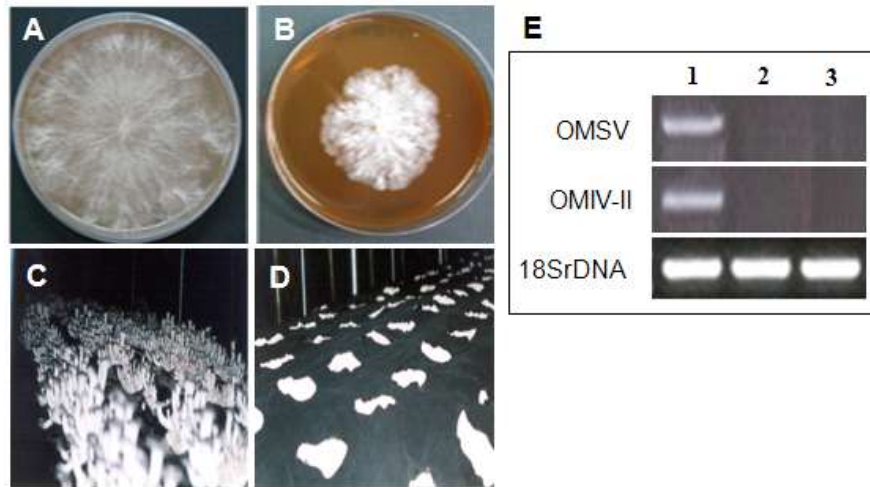
[그림 6. cAMP 배지에서의 계대 배양된 바이러스 감염균사의 OMSV 및 OMIV-II 검출 TAS-ELISA 결과]



[그림 7. cAMP 배지에서의 계대 배양된 바이러스 감염균사의 OMSV 및 OMIV-II RT-PCR 결과]

3) Curing 된 균사의 재배 시험

5회째 계대 된 cAMP 배지에서 자란 균사를 증균시켜, 느타리버섯 농가에 직접 의뢰하여, 재배실험을 실시하였다. 그 결과, 바이러스가 curing 된 *P. ostreatus* c.v 춘추2와 *P. ostreatus* c.v 2206 균사에서는 건전주와 똑같은 버섯을 수확할 수 있는 것을 확인하였다 (그림 8) 연구는 버섯에 감염되어 있는 버섯 바이러스의 curing에 대한 실험으로, cAMP와 Rifamycin의 적정한 농도에서 버섯 바이러스가 curing 되는 것을 보여주는 결과로서 우리가 아는 한 세계 최초의 curing 실험일 것으로 사료된다.



[그림 8. 바이러스 curing 후 재배실험 A : curing 후 균사배양, B: virus 감염 균사, C : curing 후 재배, D : virus 감염균사 재배, E : curing 후 배양된 균사로부터 RT-PCR결과]

나. 바이러스 분리 및 동정

1) 표고버섯 바이러스 분리 및 동정

① Cesium chloride를 이용한 병증의 표고버섯으로부터 바이러스 분리

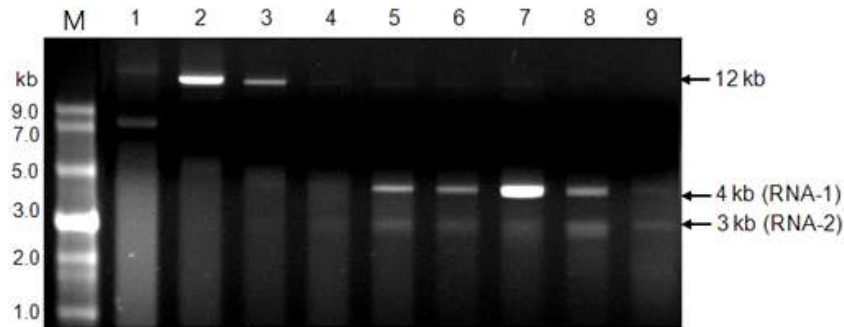
버섯 바이러스는 수직 및 수평 감염을 동시에 하는 균주로 익히 잘 알려져 있으며, 오직 건전 세포 안에서만 자라는 완전 기생체로 알려져 있다. 따라서, 표고버섯 바이러스가 감염되면, 표고버섯의 생장이 억제될 뿐만 아니라, 비정상적인 갓의 형태 등의 정상 버섯과는 다르게 성장한다 (그림 9).



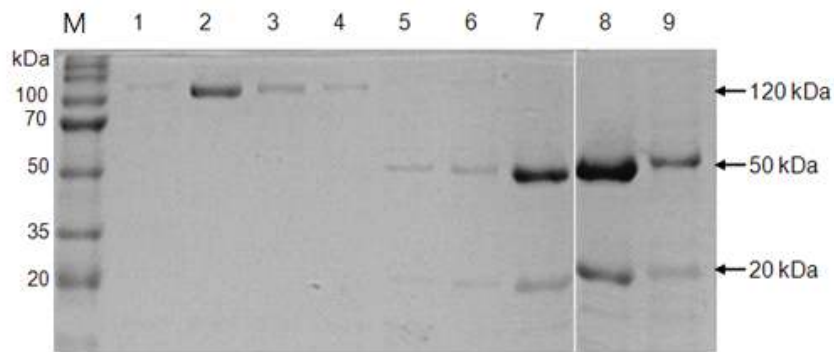
[그림 9. 표고버섯의 병증. A : 정상 표고 버섯, B : 바이러스 감염 표고버섯]

본 연구에서는 polyethylene glycol(PEG) 6000과 NaCl, 그리고 Cesium chloride를 이용하여 equilibrium density gradient ultracentrifugation로 표고버섯에 감염되어 있는 바이러스를 분리하였다. 바이러스를 분리한 후, 1% 아가로스젤 전기영동을 실시하여 바이러스 유전체의

크기를 분석하였다. 그림. 2에서 보듯이 Cesium chloride 분획의 2, 3번(대략 12 kb 크기)과 7, 8번(대략 4kb, 3kb)에서 바이러스로 의심되는 유전체가 나타났다 (그림 10). 또한 Cesium chloride로 분획한 각각의 바이러스 입자의 크기를 조사하기 위해서 단백질 전기영동을 실시한 결과 아가로스젤 전기영동 결과와 동일하게 Cesium chloride 분획의 2, 3번에서는 대략 120kDa 크기의 단백질이 존재하며, 7, 8번 에서는 50kDa, 20kDa 크기의 단백질이 존재하는 것을 알 수 있었다(그림 11).



[그림 10. 전기영동에 의한 바이러스 핵산 분석. 바이러스 핵산은 CsCl gradient 초고속 원심분리에 의한 분획에 의해 획득. 1 - 9: 분획 번호, M: ssRNA marker]

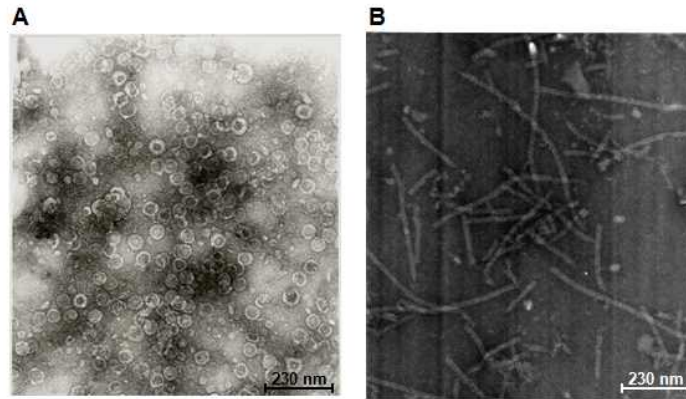


[그림 11. 단백질 전기영동에 의한 바이러스 외피 단백질 분석. 바이러스 단백질은 CsCl gradient 초고속 원심 분리에 의한 분획에 의해 획득. 1 - 9: 분획 번호, M: protein size marker.]

② 바이러스 입자 전자현미경 분석

바이러스가 존재하는 분획에서 바이러스 입자의 존재 유무 및 입자의 형태를 조사하기 위해서 전자현미경 분석을 실시하였다. 그 결과, Cesium chloride 분획의 2, 3번에서는 직경이

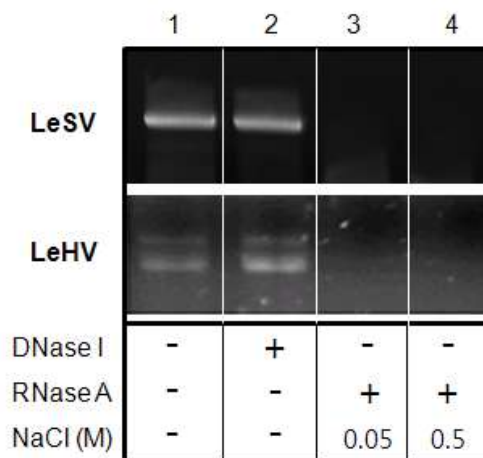
50 nm 크기의 구형의 바이러스 입자를 찾았으며, 7, 8번에서는 12 x 500nm 크기의 선형 바이러스 입자를 찾았다.(그림 12).



[그림 12. 바이러스 전자 현미경 입자. A: 직경이 대략 50 nm의 구형 바이러스. B: 크기가 대략 12 x 500nm의 선형 바이러스]

③ 바이러스 유전체 분석

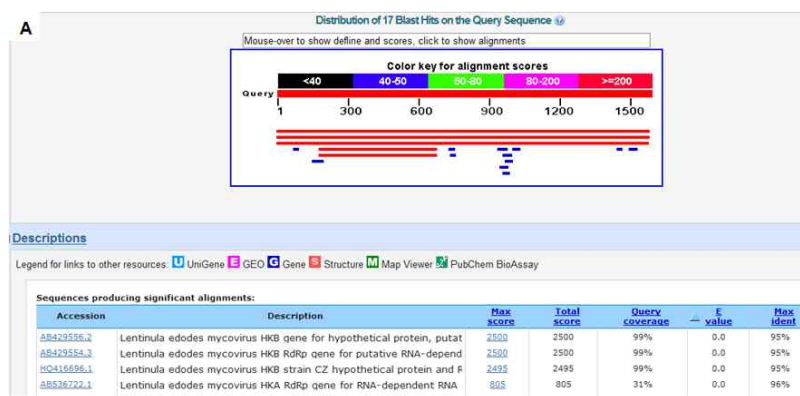
병증을 나타내는 표고버섯으로부터 분리한 바이러스의 유전체를 조사하기 위해서, DNase 및 RNase 처리를 하였다. 그 결과, 그림. 5에서 보듯이 분리된 구형 및 선형 바이러스 유전체 모두 DNase에는 분해되지 않았다. 또한, 고염의 조건에서의 RNase에도 두 바이러스 유전체 모두 분해되지 않았으며 저염 조건의 RNase 반응에서 두 바이러스 유전체가 분해되는 것을 알 수 있었다(그림 13).



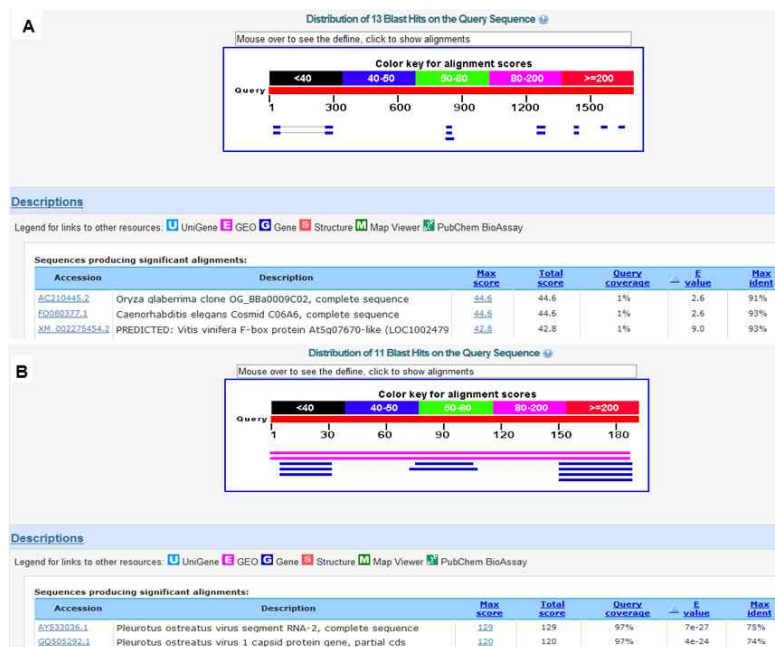
[그림 13. DNase 및 RNase를 이용한 바이러스 유전체 분석 1; 바이러스 핵산, 2; DNase I (10 unit/ml)으로 처리한 바이러스 핵산, 3 : 0.05M NaCl이 첨가 후 RNase A (10 g/ml) 처리한 핵산, 4 : 0.5M NaCl이 첨가 후 RNase A (10 g/ml) 처리한 핵산]

④ 바이러스 유전자 염기서열 분석

병증을 나타내는 표고버섯으로부터 분리한 구형 바이러스 및 선형 바이러스를 대상으로, cDNA를 합성하여 염기서열을 결정하였다. 구형 바이러스 염기서열을 blast search한 결과 1579 base pair의 fragment는 *Lentinula edodes* mycovirus HKB이 가지는 putative RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)와 99%의 유사성을 나타내었으며, 708base pair의 fragment는 *Lentinula edodes* mycovirus HKB이 가지는 putative RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)와 95%의 유사성을 나타내었다 (그림 14). 또한 선형 바이러스 염기서열을 blast search한 결과 190 base pair의 fragment가 *Pleurotus ostreatus* virus 1 capsid protein 과 95%의 유사성을 나타내었다 (그림 15).



[그림 14. LeSV partial sequence 를 이용한 blast search 결과]



[그림 15. LeHV partial sequence 를 이용한 blast search 결과]

>LeHV₁

TAAGGTGATAGCAGAGGATTGGGAGTAAATGAGACTGAGTTTCTAAGAGCTGAGGCTGTGAAAGACCGGCCAATTA
TTCGTAAACCATGCTCAGATCGTTTCTCTATAGTCGGGGATCCAAGGTAGGCACGCTCAGGGCCCTGCGTACCGTGG
TGCCCCTTGAGAGGGCCGTAAAGACAGCGTACCTCAGGTGGCTTACACTAGCCCCCACCAGGAGCGGAAATCA
CAGGGCTGTAAGGTGATAGCAGAGGATTGGGAGTAAATGAGACTGAGTTTCTAAGAGCTGAGGCTGTGAAAGACC
GGCCAATTATCTGTAACCATGCTCAGATCGTTTCTCTATAGTCGGGGATCCAAGGTAGGCACGCTCAGGGCCCTGCGT
GTACCGTGTGGGCCTTGAGAGGGCCGTAAAGACAGCGTACCTCAGGTGGCTTACACTAGCCCCCACCAGGAGCG
GGAAATCACAGGGCTGATATGACGATACCTCTTACATGAACCCACAGGCGTCCATCTCTGGCGTGTGAGTTAAC
CAAGGCAAAGATAGTGTCTAATCTGCCGGGCCCTTCGGTTTAATAAGAGCGCACCGATAGGCACACGCTAGATATTGCTC
CCCACCAGCTTGCTAC TAGCGTATACCGAGGTTACAGCTCCGACTGTCTCCCAACCATCTGGAGAGTCTGGTTGA
GTGAACATACGCCGAATGACATCCACAGTCCCTAGGATACTACAGTCAACAATGTCCCTGACGATGACCGGGTTGAAT
GGTGTATTCTCCCTCACCGCCCTCTAGAAGCTGCTCCCGTACTGATCATCTGTGTAAGACAGGAGCTCAGATATATCTCT
ATCTTTGATGTAAGCTTTGAGAATCAACACCTTATTGCCACTCTGTAGAGCGGGACACAGGCTTCGAGAGTGGG
GATGTAGTAAGGATCTGAAGGAGAGCTTCCAAGATGGGTGAGCATTATAGAACCCTGTCATCTCTACAGCTGCGAG
GATGCTCTGACAGTACTGATGATGTGACAATATCGACAGCCCTGCTAAGGTTTATAGAGAGGATCTGATCCCTCT
CGGTACAAGAAGTCTGTGACCGGATACAGGAAGCCCTCTAGGTGCGCTGGAAGAAGGAGCATTTCTGAAGAAC
GTCCGTGGTAATCTGGCGGGATCTGCTCCCAACACAGAAATAGGGGCCCGCTATGCTTGTAAACCGGGAGAGGA
ACATAGCTCCATGTATGAGGGCAAGGTGATAGCAGAGGATTGGTCTTAGCTTCTCGGCGGCGGCCACACACGAG
GAAAAGATGGATCCGAGCCTAGACCTTATCGAGGTAAATCAACAGCGTCAATGTGGAAATACCTTCTAGAGCTTG
ATCGAGCTCGGATAATCAACACCATCTATATAACAATCTTAGAATATGTAATACAGACGTTGATACTACACACTCTCT
GGCTTACAGGTATGTTTAGCTTTTCAAGTATGATAGAGGATCTTAAAGGTAACATCTCGCAATCTTTGACTGTTC
CTGAACCGTGAAGTTCGGATCTTCTCTCCAGAATTGAGAGGATAACGTTATCACCCTGTCAGTGAAGCTTGAAGGC
GATGTTCTCTATGAAGAGCGAGATCAATCTCTGCTATCACCCT

[그림 16. LeHV partial sequence]

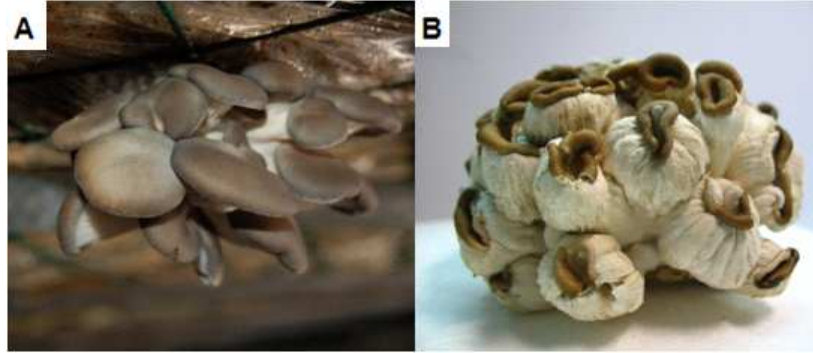
>LeSV

TGCTTAGCTGTGTATGCTGATAGTGACCTAAAATATGCAATTATGACCGCTTAGATTACGATATAGCAGCCATGGGCTT
GCACGTTGGAAACAAATCTGGAAGCAGCGCATGAAGTGACAAGAAGAGTGATAAATCCATGGTTTTAAGAGA
CTTGATGTTCTGAATATCTTAGGCATGGCGGATTGGTGAATAGTACTATATGACGGACCATAATAAATATTATA
CATACTACTTCTGGAGTGCCTGATCTGTTGTTAGCGGATGACGATTATGCCGTAACGCTCTAAAGTCTGCTG
AACAGCATAGGCTTGCTGAGATATACCTGATTTAGATAGGGAATCCCTAAATGGGACCATACGTCGATGACGAT
GGCGAAATATAAGCTGCTCTGGATGCACTTCAAGTCCGGATAAGGACATCACACCTCAAGAGGTACATGCCGATTT
CATTTCACTTGACCCACTGGTGCATTAAGTGAAGGAAAGCGGATCTAGTGAACGTAATAGCTGACACACACCCTGTC
GAATAAACGAACCTGGTTAGATAACATAACGCCGGAACAAATGGTGGACCTGTTAATCAGAACCCTGTTAAAAGC
GGAAGCGCGATAAAGGTCGAGACGGGGCTCCGTAGTGTGAGATTGTCCCTGGACCTACCAACACTGGATGAATG
AAACGATAGTAATGCGAATCTAGAAAAGCTATTACAGATCTAACCCGGAATCACTTTAGAACTAGTGAATGGGA
TATTCTCGTGCACATCTGAAAGGATGATCCGGACTTCAAGATGACGCGGTGTC TACTTTAGCATCGGACTATGCTG
ACTTCAACTCTGCTACTATCTCAGATATGCAAGATTTGGCGTATGATCGTGCAGCGCTGAACAGTTCAGTGG
TCCCGGAGAGTGGGCTGACTAATATGCTGCTCACGTTGTGAAATGTGTGTCGTGGTGGAAAGACCTTATCTCT
ATGTACGTAGGAAACTTCAACAACTGGTACATTCATACACTTGTACGAGGCTATGGTCTGGATGGCTACAACCT
CAGTTATCAATAACGTGTTCAATGAGGTATACGTTAAAGTATATCTCGAGTATGTAAGACATACTTGGTTATGACCCAA
TTGAATAGCACGGCGTAACGAGATGATGAAGATGCTCGGCTAAATCGGTAGTAGCTCACTGCTATCTTGGCGA
TGATGACATACAGTAGATTGGACGCCAACCCGGCTAAACAGAAAATTTGGCTTCAAGGAGAGTGAATCACCCGGGTA
ACCTATGCAAAAGGAGTGGCATATAACCAATGACGCTGGGAATCGCATCTTACATCTAGTATCTGCAAGCTCTG
TAATAGACGTATCCCTGAATACGTTTCGAGGAACTAATGAGGCTCTGCACGCATTAATCGCGAGGGGAGCCGACGAAG
AGCGTATAGAAATGCTCCGTACTGAGTTACTGATGACTTTTAGTCAACAGTCAATATGGAAGCGGGTATTAACATGTA
GTCACACTACGCAATTTGGCGCATGTTATACGTACCCGTCAACAAGGAGGCTTTGGAGTGAACGCTACGGAAGTTC
GGAACCTTACAACCTAAAACGCTATACCTTGGGATACAGTAAAGCTTATGGGAATACCAGGATCTATGCACCAT
GGGATAGCATCTTTGAAAACCATTTAAAAGACAAATCACCAAGGCACGTATACTCACGAACATGTTGAAACTGTT
GTCGTTGATGCAACGTCGATAGCATCAAAAATGTAGACACAGGACATAACGAACAATGGGTGAATATGCTCGCAAA
CAGAGGGCTGACCATTTAGTAAAACCTCAATGCAGCGCAATGTTATCCGAGTGCAGTTCGACTAGTTCCGACTACTCCACCAT
TCCCAGGGTTAAACGCTCTGATATACAAAGTGTATCGACGAAATTTGCTGTACACCCGGACAAAGTCCGGTCTTATAA
AGCACCTAATTTGGAGAACTCTGACAGTTACGTTGGGCAAAAGCTTAGGCTTAGCCCTCGGTAACGAGAGATATTT
ATATGACCTACGGGAGTATCCAAAATCAAAATAAAGCCATGGGATGCTTGTGCTGATTAACGGGCTAGCGTA
GCATCCCAACAAGTC

[그림 17. LeSV partial sequence]

2) 느타리버섯 바이러스 분리 및 동정

버섯 바이러스는 수직 및 수평 감염을 동시에 하는 균주로 익히 잘 알려져 있으며, 오직 건전 세포 안에서만 자라는 완전 기생체로 알려져 있다. 따라서, 느타리버섯 바이러스가 감염되면, 느타리버섯의 생장이 억제될 뿐만 아니라, 비정상적인 갓의 형태 등의 정상 버섯과는 다르게 성장한다 (그림 18).



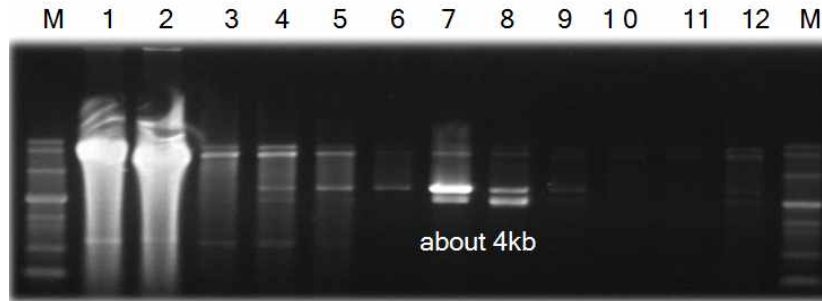
[그림 18. 느타리버섯의 병증. A : 정상 느타리버섯, B : 바이러스 감염 느타리버섯]

이에 본 연구진은 경북 포항에서 병증을 나타내는 느타리버섯으로부터 바이러스를 분리하였고, 분리된 바이러스로부터 바이러스의 특성을 조사 하였다. 본 실험 결과, 느타리버섯에 감염되어 있는 바이러스는 유전체의 크기가 대략 4kb 정도로 나타났으며, 70 kDa의 바이러스 외피 단백질에 encapsidation 되어 있었다. 분리된 바이러스 분획을 대상으로 전자 현미경 검정에서는 대략 직경이 28~30 nm의 구형 바이러스로 나타났다. 이 특징을 바탕으로 느타리버섯 구형 바이러스(*Pleurotus ostreatus* Spherical Virus: PoSV)라 명명 하였다. PoSV의 유전체 분석을 조사하기 위한 DNase 및 RNase 검사에서는, PoSV의 유전체가 DNase 및 고염의 RNase에는 분해되지 않고, 저염의 RNase에서만 분해되는 것으로 보아 단일가닥 RNA 바이러스로 확인 되었다. PoSV 유전체 염기서열 분석을 위한 cDNA 합성 및 PCR을 통한 염기서열 분석 결과, 기존에 밝혀진 느타리버섯 바이러스와 유사성을 나타냈으나 핵산의 크기 및 단백질의 크기를 비추어 봤을 때 기존의 느타리 버섯 바이러스와 그 크기가 다르기에 새로운 바이러스를 발견한 것이라 사료된다. PoSV를 이용한 항체 합성은 현재 진행 중에 있다.

① Cesium chloride를 이용한 병증의 표고버섯으로부터 바이러스 입자 분리

Polyethylene glycol(PEG) 6000과 NaCl, 그리고 Cesium chloride를 이용하여 equilibrium density gradient ultracentrifugation로 표고버섯에 감염되어 있는 바이러스를 분리하였다. 바이러스를 분리한 후, 1% 아가로스젤 전기영동을 실시하여 바이러스 유전체의 크기를 분석하였다. Cesium chloride 분획의 7, 8번(대략 4kb)에서 바이러스로 의심되는 유전체를 발

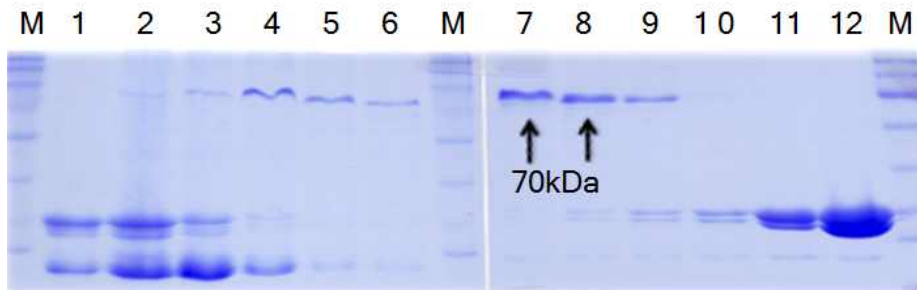
견했다 (그림 19).



[그림 19. 아가로스젤 전기영동에 의한 바이러스 핵산 분석. 바이러스 핵산은 CsCl gradient 초고속 원심 분리에 의한 분획에 의해 획득. 1 - 12 : 분획 번호, M: ssRNA marker]

② 단백질 전기영동에 의한 바이러스 입자 분석

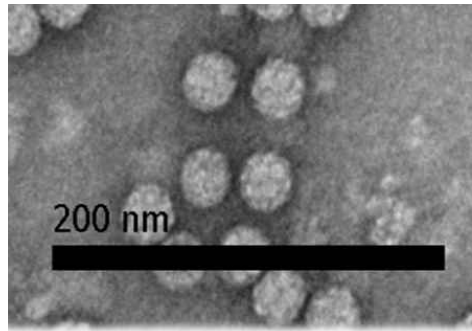
Cesium chloride로 분획한 각각의 바이러스 입자의 크기를 조사하기 위해서 단백질 전기영동을 실시하였다. 그 결과 아가로스젤 전기영동 결과와 동일하게 Cesium chloride 분획의 7, 8번 에서 70kDa 크기의 단백질이 존재하는 것을 확인했다(그림 20).



[그림 20. 단백질 전기영동에 의한 바이러스 외피 단백질 분석. 바이러스 단백질은 CsCl gradient 초고속 원심 분리에 의한 분획에 의해 획득. 1 - 12 : 분획 번호, M : protein size marker.]

③ 바이러스 입자 전자현미경 분석

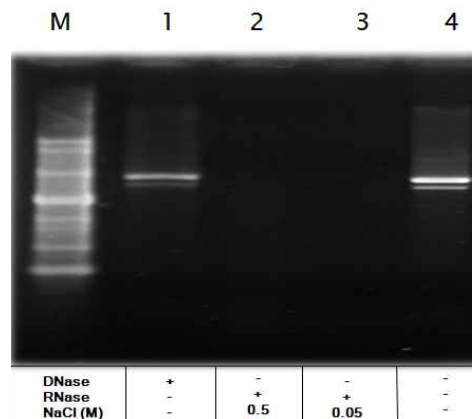
바이러스가 존재하는 분획에서 바이러스 입자의 존재 유무 및 입자의 형태를 조사하기 위해서 전자현미경 분석을 실시하였다. 그 결과, Cesium chloride 분획의 7, 8번에서 직경이 28~30nm의 구형 바이러스 입자를 찾았다(그림 21).



[그림 21. 바이러스 전자 현미경 입자. 대략 28~30 nm의 구형 바이러스]

④ 느타리버섯 바이러스 유전체 분석

병증을 나타내는 표고버섯으로부터 분리한 바이러스의 유전체를 조사하기 위해서, DNase 및 RNase 처리를 하였다. 그 결과, 그림. 5에서 보듯이 분리된 구형 바이러스 유전체는 DNase에는 분해되지 않았다. 또한, 고염의 조건에서의 RNase에도 바이러스 유전체는 분해되지 않았으며 저염 조건의 RNase 반응에서 바이러스 유전체가 분해되는 것을 알 수 있었다(그림 22).



[그림 22. DNase 및 RNase를 이용한 바이러스 유전체 분석 M : ssRNA marker, 1 : 바이러스 핵산, 2 : DNase I (10 unit/ml)으로 처리한 바이러스 핵산, 3 : 0.05M NaCl이 첨가 후 RNase A (10 g/ml) 처리한 핵산, 4 : 0.5M NaCl이 첨가 후 RNase A (10 g/ml) 처리한 핵산]

⑤ 바이러스 유전자 염기서열 분석

병증을 나타내는 느타리버섯으로부터 분리한 구형 바이러스를 대상으로, cDNA를 합성하여 염기서열을 결정하였다. 구형 바이러스 염기서열을 blast search한 결과 2232 base pair의 fragment는 *Pleurotus ostreatus* virus-1이 가지는 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)

유전자와 70%의 유사성을 나타내었으며 (그림 24), 2005 base pair의 fragment는 *Pleurotus ostreatus* virus-1이 가지는 capsid protein 유전자와 31%의 유사성을 나타내었다(그림 25).

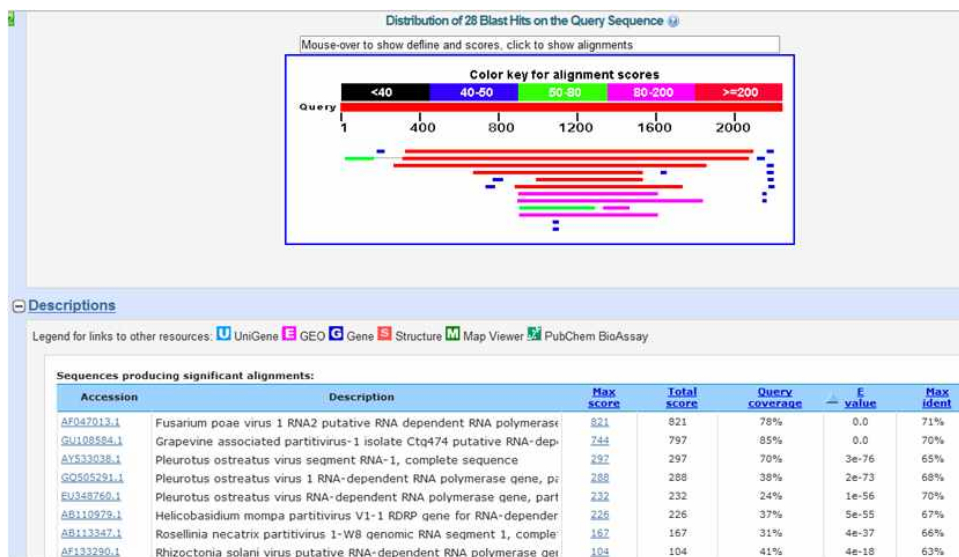
> PoSV coat protein gene (2005bp)

```

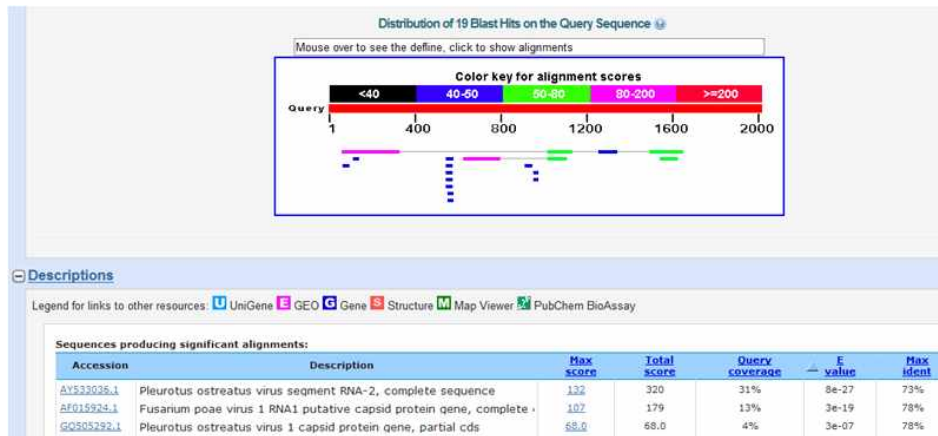
GAACCCGACC CTCATCATCC CTTGACAAA CCCAGGCCTA TTCCCATGGA TGTTCGCTTC
GTGAGAAAGA AAACAAAAAA CGATGAAGAT GCAGAGAGCC ATCTGGTTAG GATGTTTCATG
ACTTACACTT CGAGAAATTT TCTGAAAGAG AAAACTTTAG CATAACAGAC ACAAACGAGG
GTGGTTTAGT GAGGGATGAT GAGGGTCGGG TTCTTCGAAC GGGAGAGTGT TACGTTAGTA
CCGTACACGG GGGCGAAGGT GCGGATCATC GAGATATCCT TGAGCTCGGG CTTGTTAGCC
TTGTGGATGA CGCGGTATGA GGACCAAAGA TAGGTCTTCA TCTTGTCACC GATGTTGAGC
TTGCCATTAG AACCGGCGGT ATAGGTGAAT GCGGTTCCGT GGTGCGTCTG GTTGTCTTCT
TTTACGAAGC CAGAATTGTA CTGGTTTTCG ATGGCGGTGT CGTTGACGTT TTCGTTGTCG
AAACGTGGCA TGACATTGCG AGACATGTCG CGGAAAGCGA AGCCGATGGC TTGGTTTTCG
CGGTCGAGTT GACGGCGGGC GAGGATGCGG ACGCGGCTGG TTGTGGGGTC AGCTGAGTCG
AGGATTGTAT CAATGTTGGT GAGACGGATG GCAGATTGGA GGTACTGAGA ATTGTTGTCG
TCGAGTCGAG ACTCGGGATG TTCAGTAGGG ACGGTGAAGC CGTCGAATTC TGCGGTCCTCG
ATCTTGATTC CTGTGATGAT GGTGTAAGGC GAGGGAGGAG GCGTTAACAT CATAAGGTTG
GAAGTAAAGA ACGTAGGGTG AAACGTGGGA GGAGGGGTCG AATAGAACGC GTTTGTTGGG
GGCTTCTTGG GATCAAATT TTCCTTTGAC GAGGGGATAT AGCTGCTGGT AGAGTTCAGT
TAGATCGGAG ATCCAAGTGA GGGAAACCAG GTAGGCTTTG GGTCAACGA GGAAGTTGTG
GGATTTTGGC AACTCTTTGT GAGTGAGGTC GGAATCAGAT CCGGTAGTAG AGCCAGTCCA
GGTAGGGAGC GTGGGAGGTT CTATCGAGTG CGAGAGGAGG AGAGATCCTG ATAGGGACCG
GAGGATGGAT CCAAGCTTTG GGAGCTTAGG ATTCTGGGCC TTGAAGAAGG CAGAGAGAGA
TCCAATAACA TTGACCGTGC GGTGATGTTT GTCGTCATCA GCGATCAAAA GATATTGCGTA
CATGTCCATG CTTTGGTGGG AGGCGTAAGA CTAGGGTGGC AGACTGAATT TCGCGAAGGT
CGGTTTTTGA ACGAGAGATC GTCCAACAAC AGGGTTGAAG AAGCCTTCGA AGTCAGTGTT
GAGCCAGTTG TCGTGGGTG CACCGAAGTG AGTTCCAAAG TAGTGGCATA TCTTGAATTC
TTGTGTTTGG AATGTGGTGA TACAAATGTC GTAATTTTCA TCAATTTGAG TGTCCGGAGC
AGTTGCTTGA TTAGCGGTGG CGAGGTGGTG GTGGCATTCA AAGAATACCT GAGGAGGGAT
GGTGGCGCCA AAATCGTGGC GATGGGAGTA TGCTGCGAGG GTGGGGACAA ATAGGTGGTT
GGTGGCGCGG GGTGCGTACA CAGGGGCGAG TTCCATGAGG ATGTCGGCGA GAAAGTCGGG
GACGTGACAG TTGAGGAGGA CGTCGAAATA ATCAGACTTT TGTGCGTCGG AGAAAACTT
GCGGCAGTAG GTAGACTTGG TGGGCGGTA GAAGGAGTCG CAGCCAAGGA GATGAGCATT
TAGGAGAATG AGGCAATAAC CGGCGAGGGA GAGGGAAGAA TGAAGGGCTG CATGGCTAGT
GGTGGGGGTA CTCTGAGCG ATGTGATACA TGATGTATTG AACGAGGAAG CGATTGTCGA
GTTGATATC GTAGAGGGCG AATGAGCCGG AATCGTGTTC AACATTGTGG TTGATGTTCA
TGCGAGCGAG GTAGTCCGAA ACTTTGGCGG GAGTGGGAGT TCCGTCAGTT TGAGTTACAA
CAGGACGAAA GGGCTGCATG GCTAT

```

[그림 23. PoSV partial sequence]



[그림 24. PoSV RdRp 유전자 염기서열의 Blast search 결과]

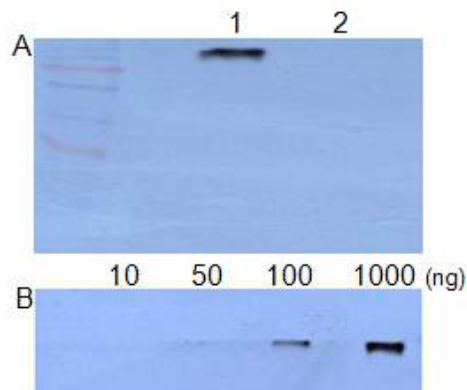


[그림 25. PoSV Coat protein 유전자 염기서열의 Blast search 결과]

다. 바이러스의 항체 합성

1) LeSV의 단클론 및 복클론 항체 합성

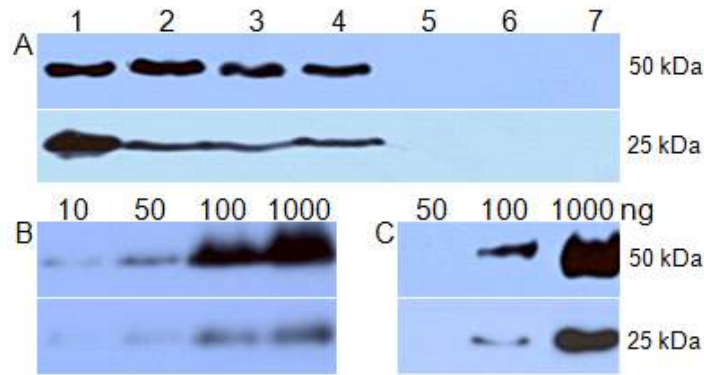
LeSV로부터 정제된 바이러스 단백질을 이용해 LeSV의 단클론 및 복클론 항체를 합성하였으며 western blot을 이용해 각 항체의 특이성 확인 및 역가측정을 수행하였다(그림 26).



[그림 26. LeSV 단클론 항체의 특이성 확인 및 역가측정. A : LeSV 단클론 항체의 특이성 확인, 1 : 정제된 LeSV 단백질, 2 : 정제된 LeHV 단백질 B : 단클론 항체의 역가측정]

2) LeHV의 단클론 항체 합성

LeHV로부터 정제된 바이러스 단백질을 이용해 LeHV의 단클론항체를 합성하였으며 western blot을 이용해 항체의 특이성 확인 및 역가측정을 수행하였다(그림 27).



[그림 27. LeHV 단클론 및 복클론 항체의 특이성 확인 및 역가측정. A : LeHV 단클론 항체의 특이성 확인. 1 : LeHV에 감염된 표고버섯, 2 ~ 4 : 시중에 판매중인 표고버섯, 5: 새송이버섯, 6 : 양송이버섯, 7 : 팽이버섯 B : 단클론 항체의 역가 측정 C : 복클론 항체의 역가 측정]

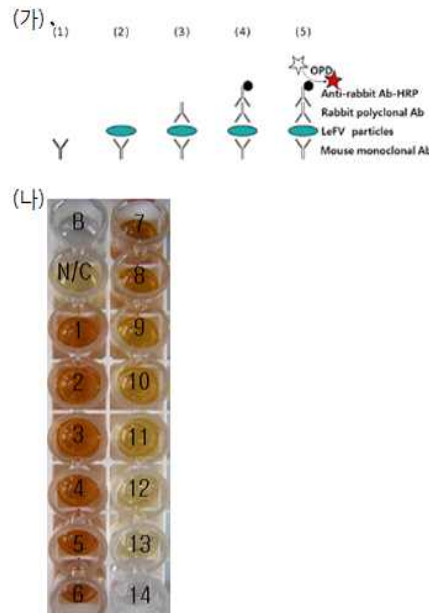
합성된 LeSV의 단클론 항체와 LeHV의 단클론 항체 및 복클론 항체의 특이성 및 역가측정을 수행한 결과 세 클론 모두 LeSV 및 LeHV에 특이적으로 반응함을 확인하였으며, LeSV의 단클론은 western blot으로 최소 100ng의 LeSV 단백질을 검출할 수 있음을 확인하였고, LeHV의 단클론은 western blot을 통해 최소 50ng의 LeHV 단백질을, 복클론은 100ng의 LeHV 단백질을 검출함을 알 수 있었다. 본 실험 결과를 통해 LeSV의 단클론 항체와 LeHV의 단클론 및 복클론 항체가 합성 되었음을 확인할 수 있었다.

라. 항체이용 ELISA kit 개발

1) LeSV ELISA kit 개발

LeSV에 감염된 버섯을 신속하게 진단하기 위해 mouse monoclonal antibody와 rabbit polyclonal antibody로 TAS-ELISA를 수행하였다. Mouse monoclonal antibody를 coating buffer에 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하고 E.I.A./R.I.A. 8 well strip에 well당 100 μl 씩 분주하여 37°C에서 2시간 동안 부착시켰다. PBST로 3회 세척하고 3% BSA(in PBST)를 well당 150 μl /well씩 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시켜 항원이 부착되지 않는 부위를 차단하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고 일정량의 LeSV 입자 또는 자실체의 파쇄액(3 ml/g) 200 μl /well을 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBST로 3회 세척하고 7,000배 희석된 rabbit polyclonal antibody 100 μl /well를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척하고 7,000배 희석된 HRP conjugated Goat anti- Rabbit IgG Polyclonal Antibody를 100 μl /well씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. PBST로 5회 세척하고 PCB 5 ml에 OPD 4 mg과 30% H₂O₂ 10 μl 가 들어간 용액을 100 μl /well씩

분주하였다. 실온에서 15~20분간 효소반응을 시키고 4.5 N H₂SO₄를 50 μ l씩 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. 발색반응의 정도를 Microplate Reader로 490 nm에서 측정하였다(그림 28).

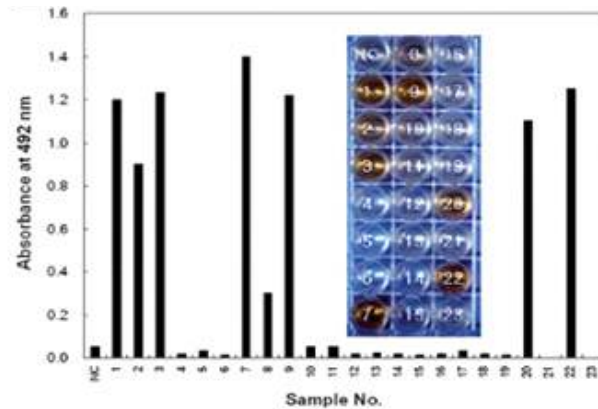


[그림 28. LeSV 진단용 TAS- ELISA 키트: (가) TAS-ELISA 키트 합성 방법 모식도 (나) TAS-ELISA 키트를 이용한 이병표고버섯 담자포자의 LeSV 검정 14개의 포자 중 시료번호 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11의 8개의 포자에서 바이러스 검출확인]

2) LeHV ELISA kit 개발

LeHV에 감염된 버섯을 신속하게 진단하기 위해 mouse monoclonal antibody와 rabbit polyclonal antibody로 TAS-ELISA를 수행하였다. Mouse monoclonal antibody를 coating buffer에 4 μ g/ml의 농도로 희석하고 E.I.A./R.I.A. 8 well strip에 well당 100 μ l씩 분주하여 37°C에서 2시간 동안 부착시켰다. PBST로 3회 세척하고 3% BSA(in PBST)를 well당 150 μ l/well씩 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 반응시켜 항원이 부착되지 않는 부위를 차단하였다. 다시 PBST로 3회 세척하고 일정량의 LeHV 입자 또는 자실체의 파쇄액(3 ml/g) 200 μ l/well을 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 항원-항체 반응을 진행시켰다. PBST로 3회 세척하고 7,000배 희석된 rabbit polyclonal antibody 100 μ l/well를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST 으로 3회 세척하고 7,000배 희석된 HRP conjugated Goat anti-Rabbit IgG Polyclonal Antibody를 100 μ l/well씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. PBST로 5회 세척하고 PCB 5 ml에 OPD 4 mg과 30% H₂O₂ 10 μ l가 들어간 용액을 100 μ l/well씩 분주하였다. 실온에서 15~20분간 효소반응을 시키고 4.5 N H₂SO₄를 50 μ l씩 첨가하여 효소반응을 중단시켰다. 발색반응의 정도를 Microplate Reader로 490 nm에서 측

정하였다(그림 29).



[그림 29. LeHV 진단용 TAS- ELISA 키트: TAS-ELISA 키트를 이용한 이병표고버섯 담자 포자의 LeHV 검정 23개의 포자 중 시료번호, 1, 2, 3, 7, 8, 9, 20, 22, 8개의 포자에서 바이러스 검출]

3) 항원의 purity 증가를 위한 실험방법 모색

기존의 실험방법에서 바이러스를 버섯의 세포에서 분리할 때 버섯세포의 잔여물들 (polysaccharide 및 단백질)이 다량 포함되어있음을 SDS-PAGE gel에서 확인 할 수 있었으며 이를 제거하기 위해 Liyou QIU이 2010년도에 British Mycological Society에 게재한 논문을 참고하였다. 기존의 방법과 달라진 점은 버섯세포와 바이러스를 분리하는 원심분리과정에서 원심분리 시 g값을 높임으로써 버섯세포의 polysaccharide 및 단백질과 바이러스의 단백질을 완벽하게 분리가 가능해진 점이다(표 1). 변화된 실험결과를 기존의 실험결과와 비교해 보았을 때 purity가 높은 바이러스 단백질이 분획됨을 확인하였다(표 1).

표 1. 바이러스 순수분리 방법

	기존 바이러스 순수분리 방법	새로운 바이러스 순수분리 방법
버섯으로부터 바이러스 분리	<ol style="list-style-type: none"> 1. 버섯(균사) 600g을 멸균수로 세척하고 1X phosphate buffered saline(PBS, 137mM NaCl, 27mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH7.4) 1.2L를 가하여 30초씩 10회 Waring blender로 homogenization 시킨다. 2. 8,500xg, 4℃에서 30분 동안 원심 분리한다. 3. 상등액을 취하여 polyethylene glycol 6000(PEG 6000)과 NaCl을 각각 10%와 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 버섯(균사) 습중량 100g을 멸균수로 세척하고 액체질소를 이용해 세포를 파쇄 한다. 2. 1X STE(0.2M NaCl, 0.1M Tris, 0.002M EDTA, pH7.4) buffer를 2배의 양으로 넣어준 후 잘 섞는다. 3. 80,000xg, 4℃에서 30분간 초원심 분리한다.

	기존 바이러스 순수분리 방법	새로운 바이러스 순수분리 방법
	<p>0.6M이 되도록 첨가하여 4℃에서 1시간 30분 동안 교반시킨다.</p> <p>4. 교반이 완료되면 8,500xg, 4℃에서 30분간 원심 분리한다.</p> <p>5. 침전물을 1X PBS로 현탁하여 10,000xg, 4℃에서 30분 동안 원심 분리한다.</p> <p>6. 상등액을 취하여 105,000xg, 4℃에서 1시간 30분 동안 초원심 분리하여 바이러스 입자의 침전물을 얻는다.</p>	<p>4. 상등액을 취하여 polyethylene glycol 6000(PEG 6000)을 4%가 되도록 첨가하여 4℃에서 40분 교반 후 2시간 정체</p> <p>5. 100,000xg 4℃에서 30분간 초원심 분리한다.</p>
바이러스 분획	<p>7. 이 침전물을 1X PBS로 현탁한 뒤 50% CsCl(1.583g/cm³)에서 130,000xg, 4℃의 조건으로 16시간 동안 equilibrium density gradient ultracentrifugation 하여 1ml씩 분획한다.</p> <p>8. 바이러스 입자가 포함된 fraction을 1X PBS로 dilution한 뒤 105,000xg, 4℃에서 1시간 30분 동안 초원심 분리하여 얻어진 침전물을 1X PBS로 현탁하여 바이러스 입자를 순수분리함.</p>	<p>6. 침전물을 1X STE buffer로 현탁한 뒤 50% CsCl(1.583g/cm³)에서 130,000xg, 4℃의 조건으로 16시간 동안 equilibrium density gradient ultracentrifugation 하여 1ml씩 분획한다.</p> <p>7. 바이러스 입자가 포함된 fraction을 1X STE로 dilution한 뒤 105,000xg, 4℃에서 1시간 30분 동안 초원심 분리하여 얻어진 침전물을 1X PBS로 현탁하여 바이러스 입자를 순수분리함.</p>
단백질 결과		

마. DNA활용 진단 키트 개발

본 연구에서 분석한 바이러스 유전체 정보를 바탕으로 LeSV 및 LeHV 염기서열에 특이적인 primer를 제작하였다. primer 서열은 DNASTAR program을 이용하였으며, G+C 함량이 50-60% 정도가 되게끔 제작하였다. 각 primer 사이에 primer dimer가 일어나지 않게 제작하였다. LeSV는 RT-PCR에서 PCR 산물이 대략 400 bp로, LeHV 에서는 대략 830 bp가 되게끔 제작하였다(표 2). RT-PCR 조건은 표 2의 조건으로 수행하였다. RT-PCR 수행 결과 LeSV와 LeHV primer 모두 바이러스가 존재하는 버섯에서는 LeSV 및 LeHV의 유전자가

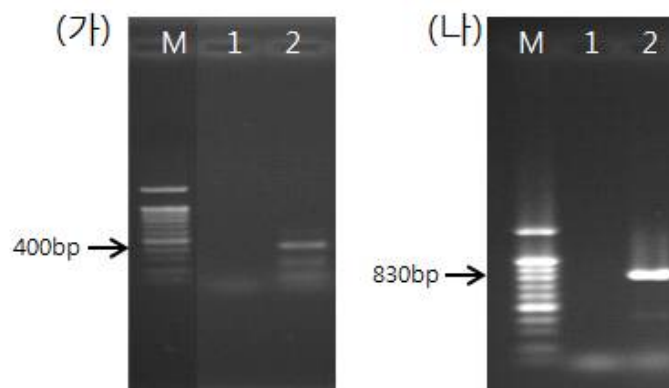
증폭되고 바이러스가 존재하지 않는 버섯에서는 LeSV 및 LeHV의 유전자가 존재하지 않기에 유전자 증폭이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다(그림 30). 또한 증폭된 유전자를 분석한 결과 LeSV 및 LeHV 유전자가 정확히 증폭되었음을 확인할 수 있었다(그림 31). 또한 PoSV에 특이적인 primer 역시 개발 중에 있다.

표 2. LeSV와 LeHV에 특이적인 primer 서열

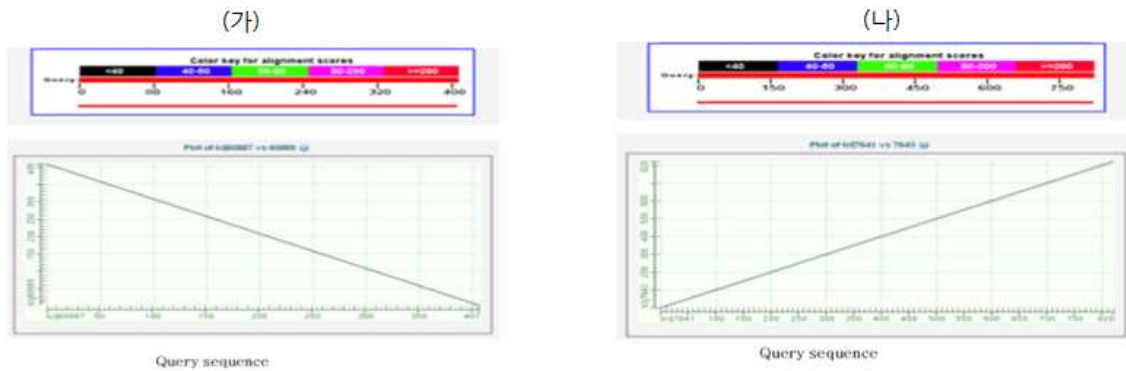
	Primer	Sequence	product(bp)
LeHV	foward	5'-CGATGACCGGGTTGAATGG-3'	400
	reverse	5'-TCTCGTGTGTAGGGCAGGAT-3'	
LeSV	foward	5'-ACTAGCTGCCTATATGACGG-3'	830
	reverse	5'-AAGGCTTCTCCAACCAGAC-5'	

표 3. RT-PCR 조건

	RT-PCR cycle	Temp.	Time
1 cycle	Reverse transcription reaction	45℃	30 min
	Inactivation of RTase	94℃	5 min
35 cycles	Denaturation	94℃	30 sec
	Annealing	60℃	30 sec
	Extension	72℃	1 min
1 cycle	Final extension	72℃	5 min



[그림 30. LeSV 및 LeHV에 특이적인 primer를 이용한 RT-PCR: (가) LeHV에 특이적인 Primer를 이용한 RT-PCR (나) LeSV에 특이적인 Primer를 이용한 RT-PCR M: Marker, 1: 무바이러스 균주, 2: 바이러스 균주]



[그림 31. 표고버섯에서의 RT-PCR 산물의 염기서열 분석: (가) RT-PCR 산물과 LeHV 유전자 비교 (나) RT-PCR 산물과 LeSV 유전자 비교]

LeSV RT-PCR product

ACTAGCTGCC TATATGACGG ACCATAATAAATTATTATACATACACTTACTTTCTGGACGTGCGTCTGATCTGTTGTTAGC
 GGATGACGATTATGCCGTAACGCTCTAAA GTTCCTGAACAGCATAGGCTTCTGAGATATACCCTGATTTAGATAGG
 GAATCCCTAAAATGGGACCATTACGTCTGATGACGAGATGGCGAAATATAAGCCTGCTCTGGATGCACTTCAGTCGG
 GATAAGGACATCACACCTCAAGAGGTACATGCCGATTCATTTCACTTGCACCCACTGGTGCATTAGGTGAAGGGAAA
 GCGGATCTAGTGAACGTAATAGCTGACACACACCGTGC GAATAAACGAACTTGGTTAGATAACATAACGCCGGAACA
 AATGGTGGACCTTGTAAATCAGAACCGCTGTTAAAAGCGGAAGCGCGGATAAAGGTCGAGACGGGGCTCCGTAGTC
 GTCAGATTGTCCCTGGACCTACCAAACACTGGATGAATGAAACGATAGTAATGCGCAATCTAGAAAAAGCTATTACA
 GATCTAACCCGGAATTCATTTAGAACTAGTGAATGGGATATTCTGTCGACCATCTTGAAAGGATGTACCGGACTTC
 AGATATGCACGGTGGTGTACTTTAGCATCGGACTATGCTGACTTCAACTTCTGCATACTATTCCAGATATGCAGAAGT
 TTTGGCGTATGATCCGTGCAAGCGCTGAACAGTTCACTGGTCCCGGAGAGTGGGCTGGTACTAATTATGCTGGTCACG
 TTGTGAAATTGTGT **GTCTGGTTGGAAGAAGCCTT**

LeHV RT-PCR product

CGATGACCGGGTTGAATGGTGTATTCCCTTCACCGCCTCTAGAAGCTGCTCCCGGTA CTGATCATCGTTGTAAGACAG
 GAGCTCAGATATATCTCTATTCTTGCATGTAAGCTTGAGAACATCAACACCTTATTGCCACTCTGTGACAGCGGGAC
 ACAGGCTTCGAGATGGGATTGAGTAAGGATCTGAAGGAGAGCTTCCAAGATGGGTGAGCATTATAGAACCTGTC
 ATCTCTACAGCTGCGAGGATGTCTCGACAGTACTGATGTATGGTGACAATATCGACAGCCCTGCTAAGGTTTATAGAG
 AGAGGATCTGATCCTCCTCGGTACAAGAAGTGTGTACCCGAGTACAGGAAGGCCTCTAGGTCGGCTGGAAGAAG
 GAGCATTCTTGAAGAACGTCCGTGGTAATCTGGCGGG**ATCCTGCCCTAACACAGAGA**

[그림 32. 표고버섯에서의 RT-PCR 산물의 염기서열]

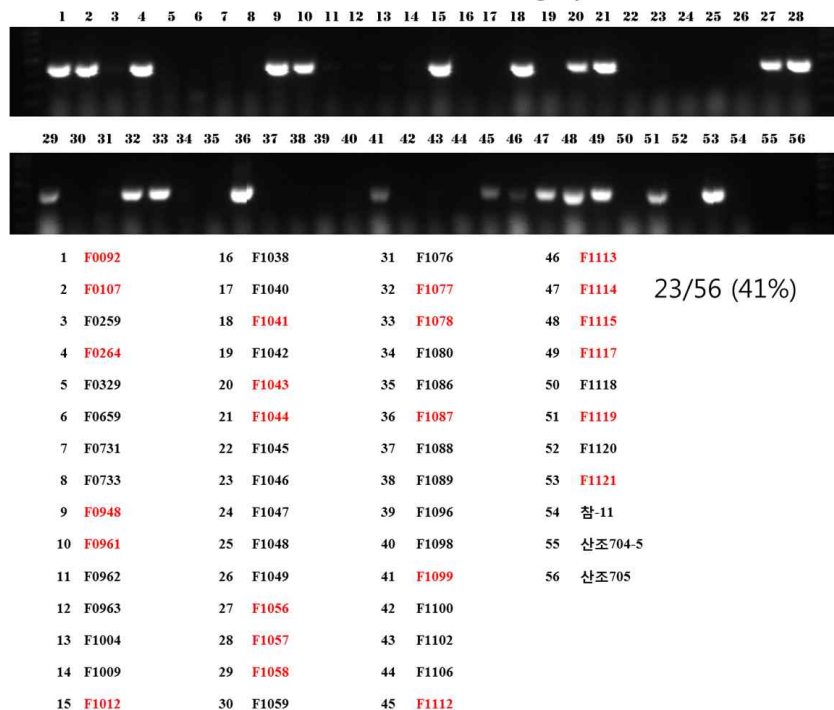
바. RT-PCR법을 이용한 표고버섯의 바이러스 검출

1) 산림버섯 연구소 교배균주 육성용 균주 및 수집 균주에서의 LeSV 및 LeHV 검출

본 연구에서 분리 및 동정한 표고버섯 바이러스인 LeSV 및 LeHV의 유전체 정보를 이용해 각각의 바이러스를 검출할 수 있는 primer를 제작하여 산림버섯 연구소에서 교배균주 육성용으로 사용 중인 일핵균주 및 수집균주에서 LeSV 및 LeHV 바이러스를 검출 하는데 사용하였다(그림 33, 표 2, 3). 육성용 일핵균주 에서는 총 79개의 균주 중 77개의 균주에서 total

RNA를 추출할 수 있었으며, total RNA를 추출한 77개의 균주에서 LeSV는 36개(46.8%)의 균주에서 존재하는 것으로 의심되고 19개(24.7%)의 균주에서 검출되었다. LeHV의 경우에는 13개(16.9%)의 균주에서 존재하는 것으로 의심되며 1개(1.3%)의 균주에서 검출되었다(표 4). 수집균주에서는 195개의 균주 중 192개의 균주에서 total RNA를 추출할 수 있었으며, total RNA를 추출한 192개의 균주에서 LeSV는 135개(70.3%)의 균주에서 존재하는 것으로 의심되고 121개(63.0%)의 균주에서 검출되었다. LeHV의 경우에는 59개(30.7%)의 균주에서 존재하는 것으로 의심되며 54개(28.1%)의 균주에서 검출되었다 (표 5). 본 결과를 보았을 때 육성용 단핵균주 및 수집균주에서 LeSV 및 LeHV의 감염이 상당 수 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 이런 버섯 바이러스가 감염되면 버섯의 생장이 억제된다. 또한 버섯 바이러스는 수직 및 수평 감염을 동시에 하기 때문에 한번 감염되면 약제를 통해 박멸하기가 거의 불가능하다. 즉 한번 바이러스에 감염된 균주를 사용할 경우 바이러스 퇴치 활동을 하더라도 바이러스가 퇴치되기 어려우며 버섯의 성장 감소를 막을 수 없다. 이러한 바이러스를 통한 버섯의 성장 감소를 막기 위해서는 건전 버섯 균사를 이용하는 방법밖에는 없는 것으로 생각되며 본 연구에서 개발한 primer를 이용하여 바이러스 감염 균사를 선별하여 재배 및 육종에서 제외시킨다면 바이러스로 인한 버섯성장 감소 및 농가의 생산량 감소를 막을 수 있을 것이라 사료된다.

Lentinula edodes Helical Virus (LeHV) Screening by RT-PCR(4월25일)



[그림 33. 산림버섯 연구소 교배균주 육성용 일핵균주에서의 LeHV LeSV를 검출하기 위한 RT-PCR]

표. 4. 산림버섯 연구소 교배균주 육성용 일핵균주에서의 LeSV 및 LeHV를 검출하기 위한 RT-PCR 결과. O : 바이러스 검출, △ : 바이러스 검출 의심, Blank : 바이러스 무검출

	균주명	total RNA	LeSV 반응	LeHV 반응
1	산조 701 - 1	O		
2	산조 701 - 2	O		
3	산조 701 - 3	O		△
4	산조 701 - 4	O		
5	산조 701 - 5	O		
6	산조 701 - 6	O	△	
7	산조 701 - 7	O		
8	산조 701 - 8	X		
9	산조 701 - 9	O	O	
10	산조 701 - 10	O	△	
11	산조 701 - 11	O	O	
12	산조 701 - 12	O	△	
13	산조 701 - 13	X		
14	산조 701 - 14	O	O	△
15	산조 701 - 15	O	O	
16	산조 701 - 16	O		
17	산조 701 - 17	O	△	△
18	산조 701 - 18	O	△	△
19	산조 701 - 19	O	O	△
20	산조 701 - 20	O	△	O
21	산조 701 - 21	O		
22	산조 701 - 22	O		
23	산조 704 - 1	O	O	
24	산조 704 - 2	O	O	
25	산조 704 - 3	O	O	△
26	산조 704 - 4	O	O	
27	산조 704 - 5	O	△	△
28	산조 704 - 6	O	O	
29	산조 704 - 7	O	O	△
30	산조 704 - 8	O		
31	산조 704 - 9	O	△	△
32	산조 704 - 10	O	O	
33	산조 704 - 11	O	O	△
34	산조 704 - 12	O	O	
35	산조 704 - 13	O	O	
36	산조 704 - 14	O	O	
37	산조 704 - 15	O	O	
38	산조 704 - 16	O		
39	산조 704 - 17	O	O	△
40	산조 704 - 18	O	O	△

	균주명	total RNA	LeSV 반응	LeHV 반응
41	찰아람 - 1	O	△	
42	찰아람 - 2	O		
43	찰아람 - 3	O		
44	찰아람 - 4	O		
45	찰아람 - 5	O		
46	찰아람 - 6	O		
47	찰아람 - 7	O		
48	찰아람 - 8	O		
49	찰아람 - 9	O		
50	찰아람 - 10	O		
51	찰아람 - 11	O		
52	찰아람 - 12	O	△	
53	찰아람 - 13	O	△	
54	찰아람 - 14	O	△	
55	찰아람 - 15	O		
56	찰아람 - 16	O	△	
57	찰아람 - 17	O	△	
58	찰아람 - 18	O		
59	찰아람 - 19	O	△	
60	찰아람 - 20	O	△	
61	찰아람 - 21	O		
62	찰아람 - 22	O		
63	찰아람 - 23	O	△	
64	찰아람 - 24	O		
65	찰아람 - 25	O		
66	찰아람 - 26	O		
67	찰아람 - 27	O		
68	찰아람 - 28	O		
69	찰아람 - 29	O		
70	찰아람 - 30	O		
71	찰아람 - 31	O		
72	찰아람 - 32	O		
73	찰아람 - 33	O		
74	찰아람 - 34	O		
75	찰아람 - 35	O		
76	찰아람 - 36	O		
77	찰아람 - 37	O		
78	찰아람 - 38	O		
79	찰아람 - 39	O		

표. 5. 산림버섯 연구소 수집균주에서의 LeSV 및 LeHV를 검출하기 위한 RT-PCR 결과.

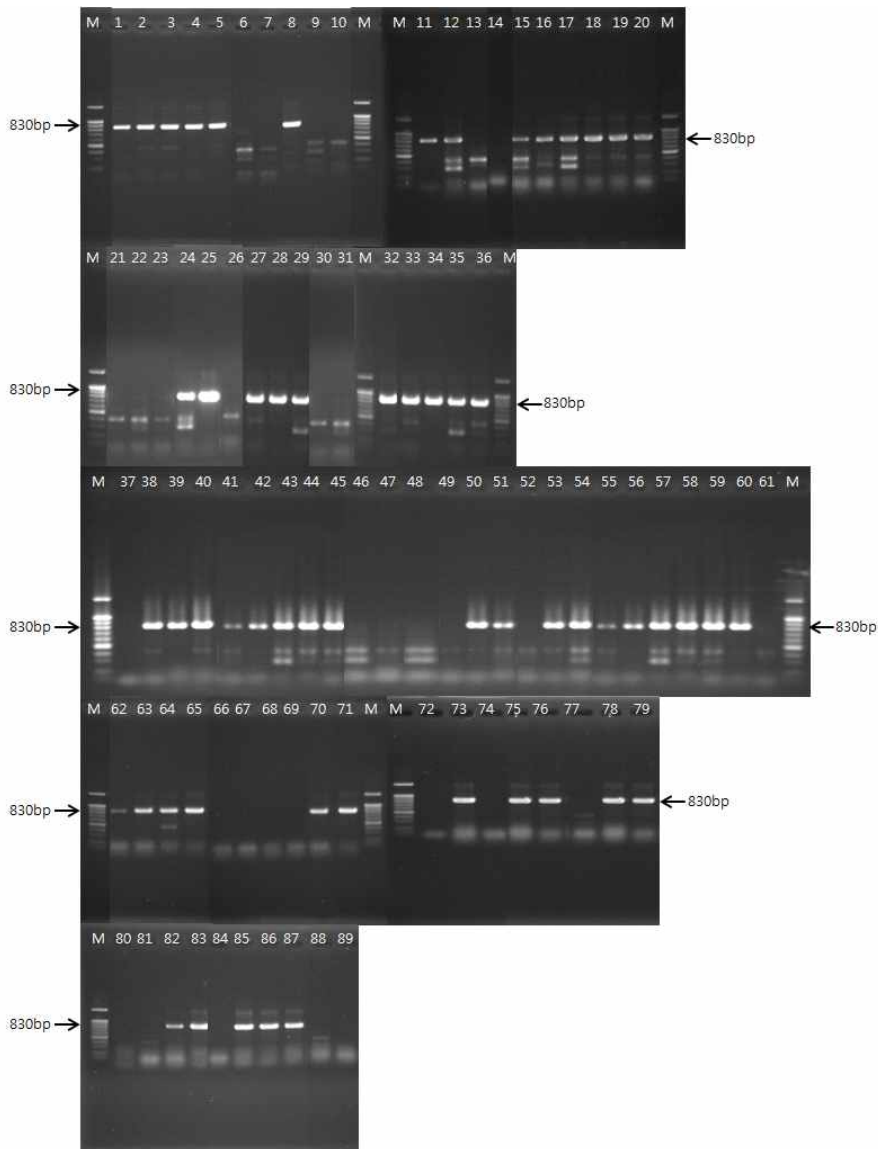
○ : 바이러스 검출, △ : 바이러스 검출 의심, Blank : 바이러스 무검출

균주명	total RNA	LeSV 반응	LeHV 반응	비고
1 FMRI 0037	○	○		아생채집
2 FMRI 0040	○			아생채집
3 FMRI 0053	○	○		아생채집
4 FMRI 0060	○			아생채집
5 FMRI 0064	○	△		아생채집
6 FMRI 0066	○	△		아생채집
7 FMRI 0070	○			아생채집
8 FMRI 0073	○			아생채집
9 FMRI 0076	○	○	△	아생채집
10 FMRI 0080	○	○		아생채집
11 FMRI 0088	○			아생채집
12 FMRI 0092	○	○	○	아생채집
13 FMRI 0094	○	○		아생채집
14 FMRI 0098	○	○		아생채집
15 FMRI 0101	○			아생채집
16 FMRI 0107	○	○	○	아생채집
17 FMRI 0259	○			모균주
18 FMRI 0264	○	○	○	모균주
19 FMRI 0299	○	○		모균주
20 FMRI 0313	○	○		모균주
21 FMRI 0315	○	○		모균주
22 FMRI 0329	○	○		모균주
23 FMRI 0339	○	○	○	모균주
24 FMRI 0356	○			모균주
25 FMRI 0363	X			모균주
26 FMRI 0364	○	○		모균주
27 FMRI 0367	○			모균주
28 FMRI 0368	○	○		모균주
29 FMRI 0386	○			모균주
30 FMRI 0540	○	○		모균주
31 FMRI 0589	○	△		아생채집
32 FMRI 0590	○	○	○	아생채집
33 FMRI 0591	○	△	○	아생채집
34 FMRI 0592	○	○	○	아생채집
35 FMRI 0659	○			모균주
36 FMRI 0723	○	○		아생채집
37 FMRI 0724	○			아생채집
38 FMRI 0725	○		○	아생채집
39 FMRI 0726	○			아생채집
40 FMRI 0727	○			아생채집
41 FMRI 0728	○	○		아생채집
42 FMRI 0729	○	○		아생채집
43 FMRI 0730	○			아생채집
44 FMRI 0731	○	○		아생채집
45 FMRI 0732	○	○		아생채집
46 FMRI 0733	○	○		아생채집
48 FMRI 0735	○	○		아생채집
49 FMRI 0736	○	○		아생채집
50 FMRI 0795	○		○	아생채집

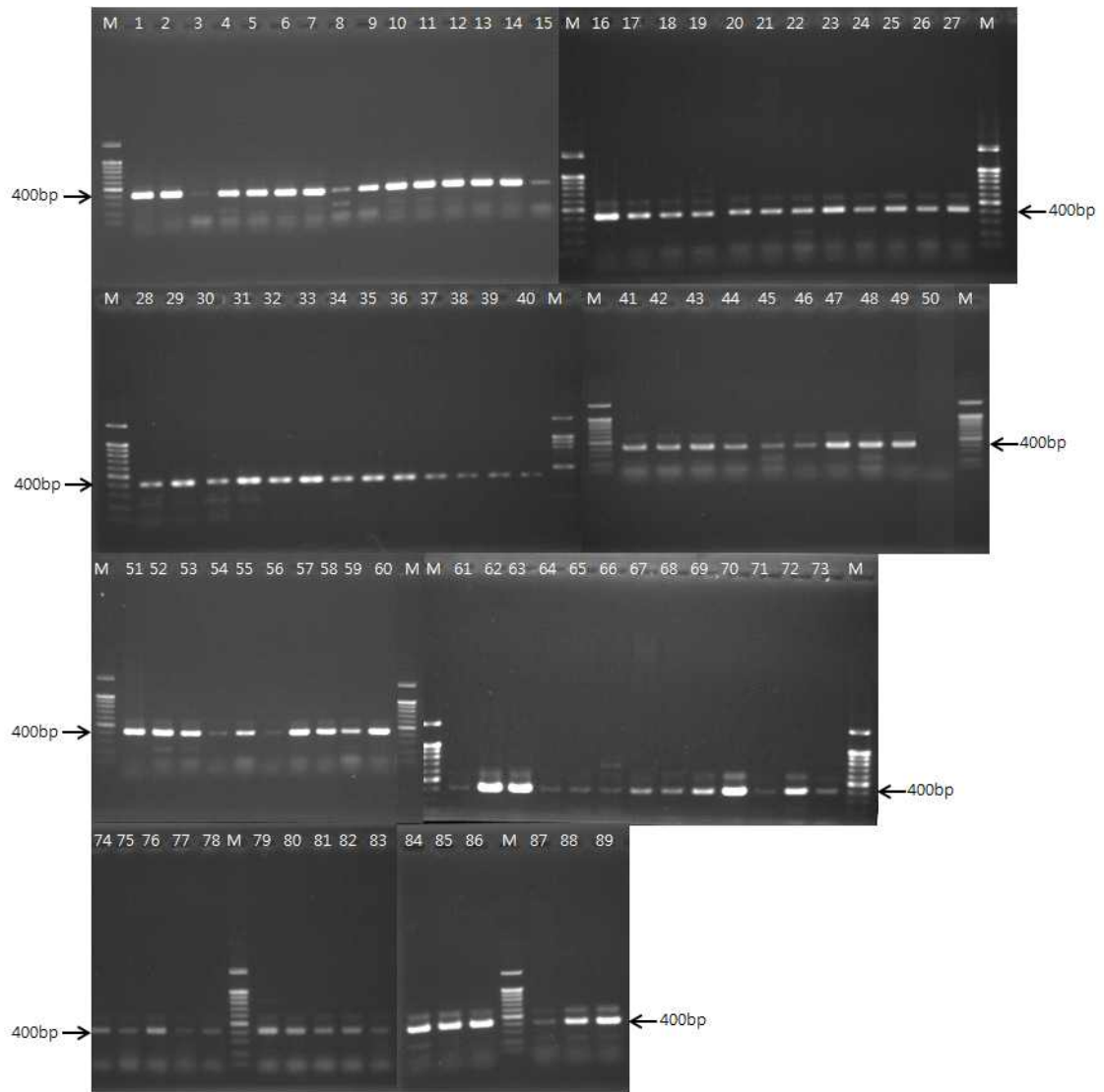
균주명	total RNA	LeSV 반응	LeHV 반응	비고
51 FMRI 0796	○	○		아생채집
52 FMRI 0797	○		○	아생채집
53 FMRI 0799	○	○		아생채집
54 FMRI 0801	○	○	○	아생채집
55 FMRI 0802	○			아생채집
56 FMRI 0804	○			아생채집
57 FMRI 0805	○			아생채집
58 FMRI 0808	○		○	아생채집
59 FMRI 0809	○	○	○	아생채집
60 FMRI 0810	○			아생채집
61 FMRI 0811	○	○		모균주
62 FMRI 0841	○	○		모균주
63 FMRI 0845	○	○	○	모균주
64 FMRI 0857	○			모균주
65 FMRI 0933	○	○	○	아생채집
66 FMRI 0934	○	○	○	아생채집
67 FMRI 0936	○	○		아생채집
68 FMRI 0939	○	△		아생채집
69 FMRI 0941	○	○	○	아생채집
70 FMRI 0942	○	○	○	아생채집
71 FMRI 0944	○	○	○	아생채집
72 FMRI 0946	○			아생채집
73 FMRI 0948	○	○	○	아생채집
74 FMRI 0954	○			모균주
75 FMRI 0961	○	○	○	모균주
76 FMRI 0962	○	○		모균주
77 FMRI 0963	○	△		모균주
78 FMRI 0964	○			아생채집
79 FMRI 0965	○	○	○	모균주
80 FMRI 0966	○			모균주
81 FMRI 0975	○			아생채집
82 FMRI 0976	○			아생채집
83 FMRI 0977	○			아생채집
84 FMRI 0979	○	○		아생채집
85 FMRI 0980	○			아생채집
86 FMRI 0981	○	○		아생채집
87 FMRI 0996	○			모균주
88 FMRI 0997	○	○	○	모균주
89 FMRI 1002	○			아생채집
90 FMRI 1003	○		△	아생채집
91 FMRI 1004	○			아생채집
92 FMRI 1006	○	○		아생채집
93 FMRI 1007	○			아생채집
94 FMRI 1009	○	△		아생채집
95 FMRI 1012	○	○	○	모균주
96 FMRI 1014	○	○		모균주
97 FMRI 1023	○			아생채집
98 FMRI 1025	○	○		아생채집
99 FMRI 1026	○	○		아생채집

2) 해외도입 표고균주의 바이러스 감염도 조사

본 연구에서 개발한 표고버섯 바이러스 LeSV의 RdRp, LeHV의 Coat protein 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 해외 도입 표고균주를 대상으로 바이러스 검출을 수행하였다. 총 89종의 해외도입 표고버섯 균주를 대상으로 실험을 진행하였으며 도입국가는 중국, 대만, 일본, 필란드, 슬로베니아 및 네덜란드이다. 실험결과 LeSV는 중국에서 도입된 50번의 균주를 제외한 모든 균주에서 검출됨을 확인할 수 있으며, LeHV는 89종 중 31종을 제외한 균주에서 검출됨을 확인할 수 있었다(그림 34, 35, 표 6). 본 결과를 보았을 때 LeSV의 경우는 본 연구진이 검사한 해외도입 균주 중 약 99%의 감염률을 나타내었으며, LeHV의 경우는 약 65%의 감염률을 나타내었다. 이는 해외도입균주가 바이러스에 상당량이 감염되어있음을 나타내며, 차후 해외 균주의 수입(특히 배지분양) 시 적절한 검역절차를 거치지 않을 경우 국내 농가 및 종균회사에 큰 피해를 초래할 것으로 생각된다.



[그림 34. LeSV 특이 primer를 이용한 해외도입 표고균주에서의 RT-PCR]



[그림 35. LeHV 특이 primer를 이용한 해외도입 표고균주에서의 RT-PCR]

표 6. 해외도입 표고버섯 종균의 LeSV 및 LeHV 검출

도입국가	LeSV	LeHV	도입국가	LeSV	LeHV	
1	+	+	46	+	-	
2	+	+	47	+	-	
3	+	+	48	+	-	
4	+	+	49	+	-	
5	+	+	50	-	+	
6	+	-	51	+	+	
7	+	-	52	+	-	
8	+	+	53	+	+	
9	+	-	54	+	+	
10	+	-	55	+	+	
11	+	+	56	+	+	
12	+	+	57	+	+	
13	+	-	58	+	+	
14	+	-	59	+	+	
15	+	+	60	+	+	
16	+	+	61	+	-	
17	+	+	62	+	+	
18	+	+	63	+	+	
19	+	+	64	+	+	
20	+	+	65	+	+	
21	+	-	66	+	-	
22	+	-	67	+	-	
23	중 국	+	68	+	-	
24	+	+	69	+	-	
25	+	+	70	+	+	
26	+	-	71	+	+	
27	+	+	72	+	-	
28	+	+	73	+	+	
29	+	+	74	+	-	
30	+	-	75	+	+	
31	+	-	76	+	+	
32	+	+	77	+	-	
33	+	+	78	대 만	+	+
34	+	+	79	+	+	
35	+	+	80	+	-	
36	+	+	81	+	-	
37	+	-	82	+	+	
38	+	+	83	+	+	
39	+	+	84	+	-	
40	+	+	85	일 본	+	+
41	+	+	86	+	+	
42	+	+	87	핀 란 드	+	+
43	+	+	88	슬로베니아	+	-
44	+	+	89	네덜란드	+	-
45	+	+				

2. 무바이러스 표고품종 개발 및 실증시험

가. 균주수집 및 기초특성조사

1) 표고 균주 수집

무바이러스 품종을 개발하기 위해 다양한 유전자원을 확보하고자 국내외로부터 196개 표고 버섯균주를 수집되었고, 수집된 균주는 PDA 평판배지, 25℃에서 배양한 후 오염여부 등을 확인하여 버섯균만 순수 분리하였다. (분양균주 : 수집균주 196개, 교배용 일핵균주 79개, 등록품종 13 품종)

2) 수집균주 배양특성조사

입수된 196개 균주중 1차년도에 생리특성조사를 표고 84개 균주에 대하여 배양온도별(10~30℃, 5℃간격)로 균사생장 및 밀도를 조사하였다. 이들 시험균주 중에서 국내야생 표고 6개 균주에 대하여 균주상호간과 유통품종(산림조합 8개 품종)과의 대치배양을 통하여 독립성을 조사하였다. 표고 84개 균주에 대하여 배양온도별(10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃)로 균사생장과 밀도를 조사한 결과, 모든 균주가 25℃에서 가장 우수하였으며 균사의 밀도에서는 몇몇 균주를 제외한 모든 균주에서 균사의 밀도가 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 야생채집 표고 6개 균주에 대하여 균주간과 유통품종간의 독립성을 조사하고자 대치배양을 실시하였다. 표고 6균주에 대하여 채집균주들간의 대치배양을 실시한 결과, 균주간에 모두 대치선이 관찰됨으로 독립성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 표고 6균주와 산림버섯연구소 개발보급 8개 품종과의 대치배양을 실시한 결과, 8개 품종 모두와 대치선이 관찰됨으로 이들 품종들과도 독립성을 나타내었다.

표 7-1. 1차년도 생리특성조사 균주 목록

균주번호	세부지역	수집처	원산지
FMRI 1025	강원 박지산	강원 평창 진부	한국
FMRI 1026	"	"	
FMRI 1027	"	"	
FMRI 1029	"	"	
FMRI 1031	"	"	
FMRI 1032	강원 계방산	강원 평창 진부	한국
FMRI 1040	경북 문경	재배임가	-
FMRI 1041	충북 괴산	"	-
FMRI 1042	경기 여주	여주 재래시장	중국
FMRI 1043	재배장	산림버섯연구소	-
FMRI 1044	경북 문경	재배임가	-
FMRI 1045	충남 천안	"	-
FMRI 1046	경기 여주	"	-
FMRI 1047	충북 괴산	"	-
FMRI 1048	경기 화성	"	-
FMRI 1049	경기 화성	"	-
FMRI 1050	충남 청양	"	-
FMRI 1051	강원 평창	재배임가	중국
FMRI 1052	강원 평창	백석산 야생	한국
FMRI 1053	강원 평창	백석산 야생	한국
FMRI 1055	강원 인제	곰배령 야생	한국
FMRI 1056	강원 평창	오대산 두로봉 인근	한국
FMRI 1057	강원 평창	오대산 두로봉 인근	한국
FMRI 1058	충남 천안	-	중국
FMRI 1059	강원	점봉산 야생	한국
FMRI 1060	"	"	"
FMRI 1061	"	"	"
FMRI 1062	"	"	"
FMRI 1063	"	"	"
FMRI 1064	"	"	"
FMRI 1065	"	"	"
FMRI 1066	강원 고성	재배임가	중국
FMRI 1067	해발 900-1000m	강원 진부 신기리	한국
FMRI 1068	해발 900-1000m	강원 진부 신기리	한국
FMRI 1069	해발 950-1000m	강원 진부 탑동	한국
FMRI 1070	해발 950-1000m	강원 진부 탑동	한국
FMRI 1071	경기 파주	재배임가	중국
FMRI 1072	북경	버섯균주 및 DNA은행	중국
FMRI 1073	문경 집촌농협	"	한국
FMRI 1074	북경	"	중국
FMRI 1075	전북 무주군	"	한국
FMRI 1076	운남성 곤명시	"	중국
FMRI 1077		"	핀란드
FMRI 1078	태안	"	한국
FMRI 1079	상해	"	중국
FMRI 1080		"	대만

표 7-2. 1차년도 생리특성조사 균주 목록

균주번호	세부지역	수집처	원산지
FMRI 1081		버섯균주 및 DNA은행	대만
FMRI 1082	심양	"	중국
FMRI 1083	지바현	"	일본
FMRI 1084	심양	"	중국
FMRI 1085	북경	"	중국
FMRI 1086	심양	"	중국
FMRI 1087	경기 인천	"	한국
FMRI 1088	전북 무주	"	한국
FMRI 1089	청도	"	중국
FMRI 1090	전북 무주	"	한국
FMRI 1091	청도	"	중국
FMRI 1092	청도	"	중국
FMRI 1093	설악산	"	한국
FMRI 1094	설악산	"	한국
FMRI 1095	설악산	"	한국
FMRI 1096	설악산	"	한국
FMRI 1097	-	"	슬로베니아
FMRI 1098	-	"	슬로베니아
FMRI 1099	대련	"	중국
FMRI 1100	대련	"	중국
FMRI 1101	심양	"	중국
FMRI 1102	심양	"	중국
FMRI 1103	대련	"	중국
FMRI 1104	대련	"	중국
FMRI 1105	심양	"	중국
FMRI 1106	대련	"	중국
FMRI 1107	심양	"	중국
FMRI 1108	심양	"	중국
FMRI 1109	대련	"	중국
FMRI 1110	연태	"	중국
FMRI 1111	연태	"	중국
FMRI 1112	연태	"	중국
FMRI 1113	연태	"	중국
FMRI 1114	위해	"	중국
FMRI 1115	위해	"	중국
FMRI 1116	위해	"	중국
FMRI 1117	심양	"	중국
FMRI 1118	심양	"	중국

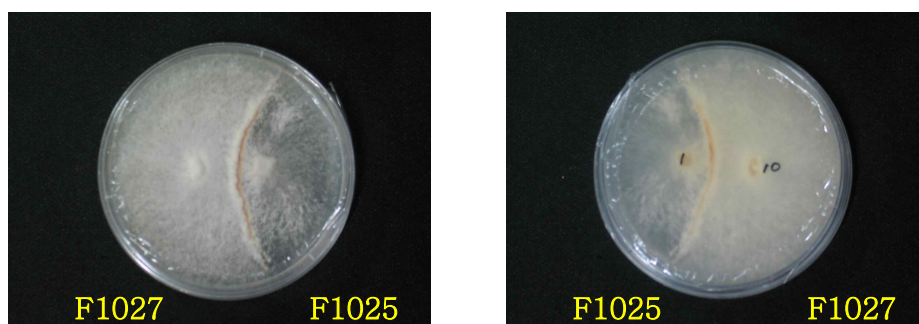
표 8. 등록품종 목록 및 특성

품종명	발생시기	육성	발생온도	온도형	재배형	특성
산조101호	5월초순-7월초순	교잡	12-25℃	고온성	원목용	· 첫 버섯 발생이 빠르다.
	8월하순-9월하순					· 발생온도 범위가 넓어 수확기간이 길다
산조102호	5월하순-7월중순	선발	13-26℃	고온성	"	· 고온 다습기에 다량발생 된다.
	8월하순-9월하순					· 다량 강우시 도굴 자극에 집중 다량 발생한다.
산조301호	4월초순-6월하순	교잡	10-23℃	중온성	"	· 균사활력과 부후력이 강하다.
	9월초순-10월하순					· 양질의 버섯을 수확한다.
산조501호	3월초순-5월하순	교잡	7-18℃	저온성	"	· 수확기간이 짧다.
						· 양질의 버섯을 다량 수확(동고품질형)한다.
산조502호	3월하순-6월초순	선발	7-20℃	저온성	"	· 골목은 자극에 예민, 자연발생 순조롭다.
	9월하순-11월하순					· 건포고 생산에 적합하다.
산조302호	4월초순-6월하순	교잡	10-23℃	중온성	"	· 육질이 매우 충실하다.
	9월초순-10월하순					· 생포고, 건포고 용도에 양질의 버섯을 수확한다
산조103호	6월초순-7월중순	교잡	14-26℃	중고온성	"	· 발생온도 범위가 넓어 수확기간이 길다.
	8월하순-10월하순					· 대엽, 후육이고, 개체중량이 무겁다.
산조108호	4월중순-7월중순	선발	12-24℃	중고온성	"	· 발생온도 범위가 재배기간이 길다.
	8월하순-10월하순					· 갓표면에 비닐껍질 형성이 많아 습기에 강하다
산조109호	6월초순-7월하순	교잡	12-26℃	중고온성	"	· 발생온도 범위가 재배기간이 길다.
	8월하순-10월초순					· 고품질의 버섯 수확이 가능하다.
산조701호	4월초순-7월하순	선발	12-24℃	중고온성	툽밥용	· 지면 방지재배용 품종으로 버섯의 색택이 밝다.
	8월하순-10월초순					· 숙성기간이 길수록 생산량과 품질이 향상된다.
산조702호	4월초순-7월하순	교잡	10-23℃	중온성	"	· 산조701호보다 버섯발생이 1개월 빠르다.
	8월중순-10월초순					· 병해에 강하며, 고온기 버섯발생이 유리하다.
산조110호	4월중순-8월초순	교잡	12-28℃	중고온성	원목용	· 생산성이 우수. 버섯육질이 단단하다.
	8월하순-10월하순					· 병해충에 강하고, 고온기 버섯발생이 유리하다.
참아람	3월하순-6월중순	교잡	8-21℃	중온성	툽밥용	· 중엽, 후육으로 산조701호보다 품질이 우수하다.
	9월중순-11월하순					· 가을-초겨울 가온시설 구비시 재배 가능하다.

표 9. 수집균주중 야생표고 균주간 독립성 조사

균주번호	F1026	F1027	F1029	F1030	F1031	F1032
F1025	+	+	+	+	+	+
F1026		+	+	+	+	+
F1027			+	+	+	+
F1029				+	+	+
F1030					+	+
F1031						+

+: 대치선 생김, -: 대치선 생기지 않음



+ 대치선 생김

+ 대치선 생김

[그림 36. 수집균주중 야생표고 균주간 대치배양(25℃, 28일 배양)]

표 10. 수집균주중 야생표고와 등록품종과의 독립성 조사

균주번호	산조 101호	산조 103호	산조 108호	산조 109호	산조 302호	산조 502호	산조 701호	산조 702호
F1025	+	+	+	+	+	+	+	+
F1026	+	+	+	+	+	+	+	+
F1027	+	+	+	+	+	+	+	+
F1029	+	+	+	+	+	+	+	+
F1031	+	+	+	+	+	+	+	+
F1032	+	+	+	+	+	+	+	+

+: 대치선 생김, -: 대치선 생기지 않음

표 11-1. 표고 수집균주 배양온도별 균사생장조사 (PDA, 7일 배양)

균주번호	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	Density(밀도)
F1040	12.4 ^a	27.6	46.8	70.4	0	+++ ^b
F1041	13.2	32.8	48.0	63.4	0	+++
F1042	11.0	27.4	51.8	66.2	0	++
F1043	12.8	32.4	54.8	70.0	0	++
F1044	11.8	24.0	41.2	56.4	0	++
F1045	11.6	31.4	50.8	62.0	0	++
F1046	11.2	27.2	42.6	56.2	0	+++
F1047	11.8	29.2	51.0	72.4	0	+++
F1048	10.6	26.0	43.8	57.2	12.2	+++
F1049	9.4	23.8	38.8	56.6	10.6	+++
F1050	11.2	32.6	51.6	68.2	24.2	+++
F1051	11.4	33.2	48.6	70.6	20.8	+++
F1052	11.8	33.6	50.0	68.2	33.0	+++
F1053	11.4	34.4	51.8	61.6	28.6	++
F1054	11.8	27.2	31.6	44.2	15.4	++
F1055	13.0	37.0	57.8	72.4	32.8	+++
F1056	14.6	24.0	30.4	35.8	12.4	+
F1057	13.2	26.0	36.8	45.6	17.8	++
F1058	20.8	33.8	53.4	64.4	19.0	+++
F1059	25.6	31.4	58.2	65.6	20.6	+++

^a Diameter (mm/7days), ^b + : thin, ++ : moderate, +++ : compact

표 11-2. 표고 수집균주 배양온도별 균사생장조사 (PDA, 7일 배양)

균주번호	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	Density(밀도)
F1060	15.0 ^a	19.6	38.2	49.2	10.8	++ ^b
F1061	17.8	35.4	51.8	57.6	31.0	+++
F1062	14.4	20.2	26.8	33.0	12.6	++
F1063	11.4	20.0	37.0	38.0	7.0	++
F1064	17.6	31.6	47.2	55.0	20.0	+++
F1065	17.6	23.4	32.2	49.4	13.6	+++
F1066	23.2	38.2	51.8	65.8	21.8	++
F1067	18.4	31.2	44.8	53.8	27.0	+++
F1068	17.0	28.2	37.8	48.4	26.6	+++
F1069	12.8	24.2	30.2	50.0	13.0	+++
F1070	14.2	31.2	48.2	61.4	28.8	+++
F1071	16.6	30.0	42.8	55.1	11.4	+
F1072	13.0	25.0	40.4	52.4	9.4	+++
F1073	11.8	26.4	46.2	61.6	16.0	++
F1074	16.6	27.0	43.8	59.6	12.8	+++
F1075	12.8	28.6	50.8	65.8	30.0	+++
F1076	12.0	28.6	45.2	55.6	27.6	++
F1077	16.2	30.8	43.0	52.4	19.8	+++
F1078	9.0	23.4	33.4	49.8	25.0	+++
F1079	14.4	36.8	62.6	77.4	18.0	++

^a Diameter (mm/7days), ^b + : thin, ++ : moderate, +++ : compact

표 11-3. 표고 수집균주 배양온도별 균사생장조사 (PDA, 7일 배양)

	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	Density(밀도)
F1080	9.7	25.3	52.7	62.3	9.0	+++
F1081	10.7	24.7	47.3	54.0	13.7	+++
F1082	10.3	25.0	46.0	55.3	13.0	+++
F1083	10.0	23.0	45.3	46.7	27.7	+++
F1084	9.3	21.3	41.3	46.0	12.7	+++
F1085	9.0	19.3	30.3	38.7	7.0	++
F1086	9.0	20.3	40.7	48.3	15.3	+++
F1087	9.3	24.0	50.0	59.7	29.7	+++
F1088	9.7	19.7	38.3	47.0	8.0	+++
F1089	11.7	24.3	44.3	53.7	14.3	+++
F1090	9.7	22.0	46.7	60.7	18.0	+++
F1091	9.7	21.3	38.3	48.3	10.3	++
F1092	11.3	23.3	38.3	53.0	8.0	+++
F1093	7.0	19.0	45.3	51.7	8.0	+++
F1094	9.7	22.3	45.0	61.7	12.3	+++
F1096	8.0	19.0	35.0	41.0	10.7	++
F1097	10.7	23.7	46.3	59.0	12.3	+++
F1098	11.7	20.0	35.7	45.0	10.0	+++
F1099	9.7	20.0	39.3	51.3	12.0	+++
F1100	11.7	18.0	35.3	51.7	9.3	++

^a Diameter (mm/7days), ^b + : thin, ++ : moderate, +++ : compact

표 11-4. 표고 수집균주 배양온도별 균사생장조사 (PDA, 7일 배양)



균주번호	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	Density(밀도)
F1101	10.7 ^a	24.3	45.0	53.3	14.3	+++ ^b
F1102	11.7	20.7	41.3	53.3	16.7	++
F1103	7.3	26.7	52.7	57.7	18.7	+++
F1104	10.3	23.3	44.0	52.7	17.3	++
F1105	10.7	21.7	41.3	54.0	14.7	+++
F1106	11.7	24.7	41.7	52.7	16.3	+++
F1107	10.0	19.3	35.3	51.3	15.0	+++
F1108	10.3	19.7	40.3	51.7	11.0	+++
F1109	11.3	25.7	50.3	57.3	15.7	+++
F1110	16.7	23.0	44.3	49.3	11.3	+++
F1111	17.3	20.7	39.7	45.7	9.7	+++
F1112	18.3	29.7	54.0	53.3	13.7	+++
F1113	14.3	23.3	33.0	39.7	11.0	+++
F1114	13.0	19.3	37.0	43.0	11.7	++
F1115	13.3	21.3	38.3	51.7	25.0	++
F1116	18.0	27.7	46.0	60.7	34.0	+++
F1117	12.7	23.3	43.7	44.7	22.3	++
F1118	14.0	21.0	33.3	38.7	31.0	++

^a Diameter (mm/7days), ^b + : thin, ++ : moderate, +++ : compact

나. 모균주 선발 및 생리특성조사

1) 모균주 선발

연구진행 과정상 단기간의 품종육성이 이루어져야 하기 때문에 교배전 모균주의 바이러스 감염도 조사 하였다, 아래 표는 모균주의 주요 특성이다.

균주명	주요 특성	자실체 사진
산조704호	중고온성(15~25℃) 중엽형으로 갓색이 밝고 육질이 단단함 생산성이(회수율 약35%) 높고 병해에 강함	
참아람	중온성(8~21℃) 중대엽형으로 대가 짧고 굽어 형태 우수 비교적 넓은 온도 범위에서 버섯발생이 잘되고 재배관리가 쉬움	

2) 일핵균주 선발 및 군사생장조사

선발된 모균주로부터 담자포자를 분리하였다. 살균된 샤알레 위에 갓이 벌어진 버섯을 올려 놓고 바람이 불지 않는 곳에 24시간 정치하여 자연 낙하된 담자포자를 분리하였다. 분리된 담자포자를 살균수에 연속 희석하여 PDA배지에 도말하고 25℃ 항온기에서 배양한 후 발아된 균총을 점종침으로 새로운 배지로 옮겨 배양하였다. 담자포자에서 발아된 군사를 PDA배지에 재이식 후, 25℃ 항온기 에서 10일간 배양하였고, 현미경 관찰을 통해 꺾쇠연결체 (clamp connection)가 없는 일핵군사를 선발, 배양하였다. 일핵균주별로 실내에서 생장 특성 (군사생장, 갈변정도, 군사밀도 등)을 조사하였다.

표 12. 산조704호 선발일핵균주 성장특성

균 주 번 호	균사생장(mm/7일)	갈 변 정 도 ^a	균 사 밀 도 ^b
산조704호-01	57.3	-	++
산조704호-02	49.0	-	++
산조704호-03	64.3	-	++
산조704호-04	43.4	+	++
산조704호-05	49.0	-	++
산조704호-06	56.3	-	++
산조704호-07	53.5	-	+
산조704호-08	60.3	-	++
산조704호-09	47.0	-	++
산조704호-10	50.0	-	++
산조704호-11	52.0	-	+
산조704호-12	55.0	-	++
산조704호-13	47.0	-	++
산조704호-14	55.0	-	++
산조704호-15	44.7	-	++
산조704호-16	47.3	-	++

a: 균사 갈변정도 -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

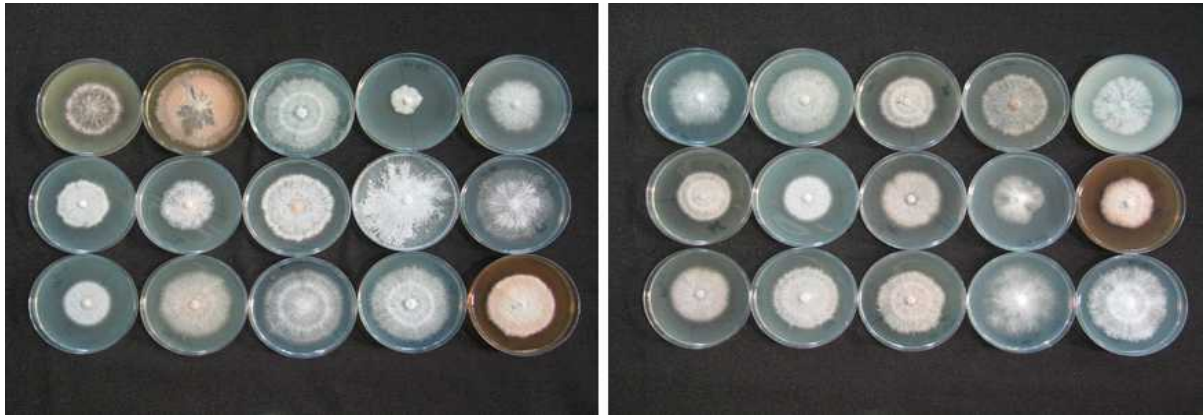
b: 균사밀도 +; 약, ++; 중, +++; 강

표 13. 참아람 선발일핵균주 성장특성

균 주 번 호	균사생장(mm/7일)	갈 변 정 도 ^a	균 사 밀 도 ^b
참아람-01	52.0	-	++
참아람-02	50.3	-	++
참아람-03	56.0	-	++
참아람-04	55.3	-	++
참아람-05	58.0	-	+++
참아람-06	38.3	-	++
참아람-07	59.0	-	+
참아람-08	55.0	-	++
참아람-09	40.3	-	++
참아람-10	47.3	-	++
참아람-11	34.7	-	+++
참아람-12	37.3	-	++
참아람-13	42.0	-	++
참아람-14	56.3	-	++
참아람-15	48.0	-	++
참아람-16	62.7	-	++
참아람-17	45.3	-	+
참아람-18	48.3	-	++
참아람-19	55.0	-	++
참아람-20	51.3	-	++
참아람-21	53.0	-	++
참아람-22	53.0	-	++
참아람-23	37.3	-	++
참아람-24	35.3	+	+
참아람-25	44.7	-	++
참아람-26	35.7	-	++
참아람-27	43.0	-	++
참아람-28	54.0	-	++
참아람-29	45.0	-	++
참아람-30	42.7	-	+++
참아람-31	50.7	-	++
참아람-32	59.3	-	+++

a: 균사 갈변정도 -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 균사밀도 +; 약, ++; 중, +++; 강



[그림 37. 다양한 일핵균주의 군사생장 및 균총 사진]

3) 무바이러스 mono-mono mating 교배균주 육성

교배균주를 육성하기 위하여 선발된 일핵군사를 균주간 교배(Mono-mono mating)를 실시하였다. PDA 평판배지상에 2개의 일핵균주를 20mm 간격을 두고 균총의 가장자리 군사가 맞닿아 접합이 이루어진 부분을 새로운 PDA 배지에 이식하였다. 이후 군사생장을 조사하면서 현미경 검경으로 꺾쇠연결체의 형성이 이루어진 이핵균주(교배균주)를 선발하였다. 선발된 교배균주는 이들의 모균주와 PDA배지에서 삼각형으로 대치 접종하여, 25℃ 항온기에서 20일간 암배양 후 상온에 꺼내어 20일간 명배양을 한 후에 균주간 대선의 형성유무로 독립성을 조사하였다.

그 결과, 모균주로부터 20개씩 일핵균주가 선발되었고, 교배조합을 1,000조합 실시하여 현미경 검경을 통해 403균주가 clamp connection 구조가 관찰되어 1차 선발하였으며, 모균주에 대치배양으로 대선 유무를 확인한 후 최종적으로 275균주의 교배균주가 선발되었다. 따라서 3차년도에 재배시험을 통해 자실체 특성조사를 실시하였다.

표 14. 교배균주 육성 현황

교 배 조 합	조합수	교배확인	최종선발(독립성조사)
산조704호 × 참아람	512	206	78
참아람 × 참아람	496	197	197
계	1,008		275

표 15-1. 교배균주 선발 현황(참아람×산조704호)

No	균주번호	균주명	균사생장 (mm/7일)	피막형성 ^a	갈변정도 ^b
1	2G01	참아람-1×산704-3	55.3	+++	+++
2	2G02	참아람-1×산704-8	56.7	++	+
3	2G03	참아람-1×산704-9	53.3	++	+
4	2G04	참아람-1×산704-10	50.7	++	++
5	2G05	참아람-1×산704-12	52.7	++	++
6	2G06	참아람-1×산704-13	52.7	++	+++
7	2G07	참아람-1×산704-14	46.3	+++	++
8	2G08	참아람-2×산704-8	57.7	+++	++
9	2G09	참아람-2×산704-9	53.7	+++	++
10	2G10	참아람-2×산704-10	54.0	+++	+
11	2G11	참아람-2×산704-11	55.0	+++	++
12	2G12	참아람-2×산704-12	58.7	+++	+++
13	2G13	참아람-2×산704-14	51.7	+++	++
14	2G14	참아람-3×산704-4	55.3	++	++
15	2G15	참아람-3×산704-9	48.7	+	-
16	2G16	참아람-3×산704-13	49.3	+	+
17	2G17	참아람-3×산704-14	47.3	++	+
18	2G18	참아람-4×산704-9	44.3	+++	++
19	2G19	참아람-4×산704-11	53.3	+++	+
20	2G20	참아람-4×산704-14	40.7	+++	++
21	2G21	참아람-5×산704-3	48.7	+++	+++
22	2G22	참아람-5×산704-4	51.0	++	++
23	2G23	참아람-5×산704-9	43.7	++	++
24	2G24	참아람-5×산704-12	52.3	++	++
25	2G25	참아람-6×산704-4	48.0	++	+++
26	2G26	참아람-7×산704-4	52.3	++	++
27	2G27	참아람-7×산704-8	57.3	++	-
28	2G28	참아람-8×산704-7	57.3	+++	++
29	2G29	참아람-8×산704-16	55.3	++	-
30	2G30	참아람-9×산704-1	58.0	+	-
31	2G31	참아람-9×산704-5	52.7	++	-
32	2G32	참아람-9×산704-7	54.7	++	-
33	2G33	참아람-9×산704-15	59.3	-	-
34	2G34	참아람-9×산704-16	46.3	-	-
35	2G35	참아람-10×산704-9	44.0	++	-
36	2G36	참아람-10×산704-10	43.3	+++	++
37	2G37	참아람-10×산704-11	47.0	+++	+++
38	2G38	참아람-10×산704-13	42.3	+++	+++
39	2G39	참아람-11×산704-8	53.7	+	++
40	2G40	참아람-11×산704-9	49.0	++	+++

a: 피막형성정도(배양21일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 15-2. 교배균주 선발 현황(참아람×산조704호)

No	균주번호	균주명	균사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
41	2G41	참아람-11×산704-12	56.7	+++	++
42	2G42	참아람-11×산704-14	48.7	++	++
43	2G43	참아람-12×산704-2	50.0	++	++
44	2G44	참아람-12×산704-5	55.7	++	++
45	2G45	참아람-12×산704-7	52.0	++	+
46	2G46	참아람-12×산704-15	56.3	+++	+
47	2G47	참아람-12×산704-16	49.7	++	++
48	2G48	참아람-13×산704-2	54.0	++	++
49	2G49	참아람-13×산704-5	52.7	+	-
50	2G50	참아람-13×산704-7	53.0	+	-
51	2G51	참아람-13×산704-16	55.7	+	+
52	2G52	참아람-14×산704-4	45.7	+	+
53	2G53	참아람-14×산704-8	58.7	+	+
54	2G54	참아람-14×산704-11	49.7	+	+
55	2G55	참아람-14×산704-12	56.7	+	+++
56	2G56	참아람-14×산704-14	51.7	+	+
57	2G57	참아람-16×산704-8	58.3	++	+
58	2G58	참아람-16×산704-9	53.3	+++	+
59	2G59	참아람-16×산704-10	52.0	++	+
60	2G60	참아람-16×산704-11	55.7	+++	++
61	2G61	참아람-16×산704-14	50.0	+++	++
62	2G62	참아람-17×산704-2	50.3	+	-
63	2G63	참아람-17×산704-7	55.0	-	-
64	2G64	참아람-17×산704-15	50.7	+	-
65	2G65	참아람-17×산704-16	47.3	-	-
66	2G66	참아람-18×산704-1	55.0	++	+++
67	2G67	참아람-18×산704-15	54.7	+	-
68	2G68	참아람-18×산704-16	50.3	+	+
69	2G69	참아람-19×산704-10	50.7	++	++
70	2G70	참아람-19×산704-11	50.3	++	++
71	2G71	참아람-19×산704-13	45.3	++	++
72	2G72	참아람-19×산704-14	43.7	++	+
73	2G73	참아람-20×산704-4	48.3	+++	++
74	2G74	참아람-20×산704-8	54.7	+++	+
75	2G75	참아람-20×산704-10	48.0	++	++
76	2G76	참아람-20×산704-11	51.7	+++	+++
77	2G77	참아람-20×산704-12	55.0	+++	+++
78	2G78	참아람-20×산704-14	47.3	+++	+

a: 피막형성정도(배양21일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 16-1. 교배균주 선발 현황(참아람×참아람)

No	균주번호	균주명	균사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
1	2X01	참아람-1×참아람-12	57.0	+++	++
2	2X02	참아람-1×참아람-15	55.0	+++	+
3	2X03	참아람-1×참아람-17	59.0	+++	++
4	2X04	참아람-1×참아람-24	59.0	++	+
5	2X05	참아람-1×참아람-28	58.7	+++	+
6	2X06	참아람-2×참아람-8	54.7	+++	+++
7	2X07	참아람-2×참아람-9	45.7	++	++
8	2X08	참아람-2×참아람-13	54.7	+++	+
9	2X09	참아람-3×참아람-12	46.7	+	-
10	2X10	참아람-3×참아람-15	57.7	+	+
11	2X11	참아람-3×참아람-16	60.7	+++	+++
12	2X12	참아람-3×참아람-17	48.3	-	-
13	2X13	참아람-3×참아람-24	45.3	-	-
14	2X14	참아람-3×참아람-27	45.7	-	-
15	2X15	참아람-3×참아람-28	55.3	-	-
16	2X16	참아람-4×참아람-12	58.7	++	+
17	2X17	참아람-4×참아람-15	64.3	+++	+
18	2X18	참아람-4×참아람-16	61.7	+++	++
19	2X19	참아람-4×참아람-17	52.3	++	-
20	2X20	참아람-4×참아람-27	59.0	-	-
21	2X21	참아람-4×참아람-28	57.3	+++	+
22	2X22	참아람-5×참아람-12	54.3	++	++
23	2X23	참아람-5×참아람-15	56.3	+++	+++
24	2X24	참아람-5×참아람-16	58.3	+++	+++
25	2X25	참아람-5×참아람-17	51.3	-	-
26	2X26	참아람-5×참아람-24	52.7	+	+
27	2X27	참아람-5×참아람-27	55.7	+	-
28	2X28	참아람-5×참아람-28	61.0	+++	++
29	2X29	참아람-6×참아람-8	53.3	+++	+
30	2X30	참아람-6×참아람-13	57.7	++	++
31	2X31	참아람-7×참아람-12	54.7	++	+
32	2X32	참아람-7×참아람-15	62.3	+++	+
33	2X33	참아람-7×참아람-16	56.7	++	++
34	2X34	참아람-7×참아람-24	54.7	++	+++
35	2X35	참아람-7×참아람-27	54.7	++	+
36	2X36	참아람-7×참아람-28	57.7	+++	++
37	2X37	참아람-8×참아람-6	57.0	+++	+
38	2X38	참아람-8×참아람-14	59.7	+++	++
39	2X39	참아람-8×참아람-19	58.3	++	+
40	2X40	참아람-8×참아람-20	58.7	+++	+

a: 피막형성정도(배양21일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 16-2. 교배균주 선발 현황(참아람×참아람)

No	균주번호	균주명	균사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
41	2X41	참아람-8×참아람-22	57.0	+++	+
42	2X42	참아람-8×참아람-23	58.3	+	+
43	2X43	참아람-8×참아람-29	51.3	+++	++
44	2X44	참아람-9×참아람-14	35.0	+	-
45	2X45	참아람-9×참아람-20	52.0	++	++
46	2X46	참아람-9×참아람-22	56.7	+	+
47	2X47	참아람-9×참아람-23	31.7	+	-
48	2X48	참아람-9×참아람-29	46.7	+	+
49	2X49	참아람-10×참아람-12	45.7	+++	+++
50	2X50	참아람-10×참아람-15	55.3	+	-
51	2X51	참아람-10×참아람-16	60.0	+++	+++
52	2X52	참아람-10×참아람-17	34.3	-	-
53	2X53	참아람-10×참아람-24	38.0	-	-
54	2X54	참아람-10×참아람-27	36.0	-	-
55	2X55	참아람-10×참아람-28	50.7	+	-
56	2X56	참아람-11×참아람-12	42.0	+	++
57	2X57	참아람-11×참아람-15	53.0	++	++
58	2X58	참아람-11×참아람-16	45.7	+	-
59	2X59	참아람-11×참아람-24	44.3	++	+
60	2X60	참아람-12×참아람-1	55.0	+++	+
61	2X61	참아람-12×참아람-4	57.3	++	+++
62	2X62	참아람-12×참아람-5	45.7	+++	++
63	2X63	참아람-12×참아람-7	39.7	++	++
64	2X64	참아람-12×참아람-10	44.0	++	++
65	2X65	참아람-12×참아람-11	46.0	+++	+++
66	2X66	참아람-12×참아람-21	43.3	+	+
67	2X67	참아람-12×참아람-25	55.0	++	+++
68	2X68	참아람-12×참아람-26	49.0	++	++
69	2X69	참아람-12×참아람-31	43.7	++	+++
70	2X70	참아람-12×참아람-32	50.0	+++	+++
71	2X71	참아람-13×참아람-2	52.0	++	++
72	2X72	참아람-13×참아람-6	49.0	++	++
73	2X73	참아람-13×참아람-14	40.0	+	-
74	2X74	참아람-13×참아람-20	61.0	++	+
75	2X75	참아람-13×참아람-22	56.3	+	++
76	2X76	참아람-13×참아람-23	43.0	-	-
77	2X77	참아람-13×참아람-29	52.7	+++	-
78	2X78	참아람-14×참아람-8	61.0	+++	+
79	2X79	참아람-14×참아람-9	40.3	-	-
80	2X80	참아람-14×참아람-13	38.7	-	-

a: 피막형성정도(배양21일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 16-3. 교배군주 선발 현황(참아람×참아람)

No	군주번호	군주명	군사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
81	2X81	참아람-14×참아람-18	35.7	+	+++
82	2X82	참아람-15×참아람-1	57.7	++	+
83	2X83	참아람-15×참아람-3	60.3	++	+
84	2X84	참아람-15×참아람-4	57.7	+++	+
85	2X85	참아람-15×참아람-5	58.0	+++	+++
86	2X86	참아람-15×참아람-7	62.0	+++	++
87	2X87	참아람-15×참아람-10	49.7	++	+
88	2X88	참아람-15×참아람-11	49.0	++	+
89	2X89	참아람-15×참아람-21	52.0	+++	-
90	2X90	참아람-15×참아람-25	59.3	++	+
91	2X91	참아람-15×참아람-26	55.0	+	+
92	2X92	참아람-15×참아람-30	58.3	+++	-
93	2X93	참아람-15×참아람-31	56.7	+	-
94	2X94	참아람-15×참아람-32	53.3	+++	+
95	2X95	참아람-16×참아람-1	58.0	+++	+
96	2X96	참아람-16×참아람-3	61.0	+	-
97	2X97	참아람-16×참아람-4	59.0	+++	+
98	2X98	참아람-16×참아람-5	56.7	+++	+++
99	2X99	참아람-16×참아람-7	59.7	+++	++
100	2X100	참아람-16×참아람-10	54.0	+	++
101	2X101	참아람-16×참아람-11	48.0	+	+
102	2X102	참아람-16×참아람-21	54.7	++	+
103	2X103	참아람-16×참아람-25	57.3	+++	+++
104	2X104	참아람-16×참아람-31	55.7	+	+
105	2X105	참아람-16×참아람-32	52.3	+++	+++
106	2X106	참아람-17×참아람-1	56.7	+++	++
107	2X107	참아람-17×참아람-3	56.0	-	-
108	2X108	참아람-17×참아람-4	58.3	+	-
109	2X109	참아람-17×참아람-5	57.7	-	-
110	2X110	참아람-17×참아람-7	56.0	++	+
111	2X111	참아람-17×참아람-10	32.0	-	+
112	2X112	참아람-17×참아람-21	62.0	++	-
113	2X113	참아람-17×참아람-25	40.3	+	+
114	2X114	참아람-17×참아람-26	42.7	-	-
115	2X115	참아람-17×참아람-30	47.0	+	+
116	2X116	참아람-17×참아람-31	42.3	-	-
117	2X117	참아람-17×참아람-32	54.7	++	++
118	2X118	참아람-18×참아람-20	48.7	+	+
119	2X119	참아람-18×참아람-22	54.0	+	++
120	2X120	참아람-18×참아람-29	41.3	++	++

a: 피막형성정도(배양21일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 16-4. 교배군주 선발 현황(참아람×참아람)

No	군주번호	군주명	군사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
121	2X121	참아람-19×참아람-8	54.7	+++	+
122	2X122	참아람-19×참아람-13	65.3	++	+
123	2X123	참아람-20×참아람-8	65.0	+++	+
124	2X124	참아람-20×참아람-9	50.3	++	++
125	2X125	참아람-20×참아람-13	60.3	+	+
126	2X126	참아람-20×참아람-18	47.3	++	+
127	2X127	참아람-21×참아람-12	46.0	+++	+++
128	2X128	참아람-21×참아람-15	48.3	++	+
129	2X129	참아람-21×참아람-16	54.7	+++	++
130	2X130	참아람-21×참아람-17	55.3	-	-
131	2X131	참아람-21×참아람-24	55.3	+++	+++
132	2X132	참아람-21×참아람-27	57.7	-	-
133	2X133	참아람-21×참아람-28	57.3	++	++
134	2X134	참아람-22×참아람-8	51.0	+++	+
135	2X135	참아람-22×참아람-9	50.7	++	+
136	2X136	참아람-22×참아람-13	58.7	+	+
137	2X137	참아람-22×참아람-18	47.7	++	+
138	2X138	참아람-23×참아람-8	58.0	+	+
139	2X139	참아람-23×참아람-13	30.7	-	-
140	2X140	참아람-24×참아람-1	58.3	++	+++
141	2X141	참아람-24×참아람-3	45.0	-	-
142	2X142	참아람-24×참아람-4	47.0	+	-
143	2X143	참아람-24×참아람-7	55.7	+	+
144	2X144	참아람-24×참아람-10	44.0	-	-
145	2X145	참아람-24×참아람-11	49.0	+	+
146	2X146	참아람-24×참아람-21	58.0	+++	++
147	2X147	참아람-24×참아람-25	52.7	++	++
148	2X148	참아람-24×참아람-30	39.0	-	-
149	2X149	참아람-24×참아람-32	57.3	++	+
150	2X150	참아람-25×참아람-12	54.0	++	++
151	2X151	참아람-25×참아람-16	57.0	++	+
152	2X152	참아람-25×참아람-17	40.0	+	+
153	2X153	참아람-25×참아람-24	50.3	++	++
154	2X154	참아람-25×참아람-27	44.7	+	-
155	2X155	참아람-25×참아람-28	52.0	+	+
156	2X156	참아람-26×참아람-12	41.7	+	++
157	2X157	참아람-26×참아람-15	56.0	++	+
158	2X158	참아람-26×참아람-17	35.3	-	-
159	2X159	참아람-26×참아람-28	55.0	+	-
160	2X160	참아람-27×참아람-3	50.0	-	-

a: 피막형성정도(배양21일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -: 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

표 16-5. 교배군주 선발 현황(참아람×참아람)

No	군주번호	군주명	군사생장 (mm/7일)	피막형성	갈변정도
161	2X161	참아람-27×참아람-4	56.7	++	++
162	2X162	참아람-27×참아람-10	35.7	-	-
163	2X163	참아람-27×참아람-21	52.3	+	+
164	2X164	참아람-27×참아람-25	46.7	+	-
165	2X165	참아람-27×참아람-31	58.7	+	-
166	2X166	참아람-27×참아람-32	54.3	++	+
167	2X167	참아람-28×참아람-1	59.7	++	+
168	2X168	참아람-28×참아람-3	57.0	-	-
169	2X169	참아람-28×참아람-4	59.3	+++	+
170	2X170	참아람-28×참아람-7	54.3	++	++
171	2X171	참아람-28×참아람-10	44.0	+	+
172	2X172	참아람-28×참아람-21	62.7	+++	+
173	2X173	참아람-28×참아람-25	60.3	+++	+
174	2X174	참아람-28×참아람-26	55.3	+	+
175	2X175	참아람-28×참아람-31	60.3	+++	++
176	2X176	참아람-28×참아람-32	45.7	+++	+++
177	2X177	참아람-29×참아람-8	62.7	+++	+
178	2X178	참아람-29×참아람-9	50.3	+	+
179	2X179	참아람-29×참아람-13	45.3	+	-
180	2X180	참아람-29×참아람-18	47.0	+	+
181	2X181	참아람-30×참아람-12	40.0	++	+++
182	2X182	참아람-30×참아람-15	57.0	+	++
183	2X183	참아람-30×참아람-16	54.7	++	+
184	2X184	참아람-30×참아람-17	40.3	+	+
185	2X185	참아람-30×참아람-24	45.3	+	-
186	2X186	참아람-30×참아람-27	40.3	+	-
187	2X187	참아람-31×참아람-12	47.3	++	+
188	2X188	참아람-31×참아람-15	54.0	+++	+
189	2X189	참아람-31×참아람-24	50.0	-	-
190	2X190	참아람-31×참아람-27	54.0	-	-
191	2X191	참아람-31×참아람-28	52.0	+++	++
192	2X192	참아람-32×참아람-15	54.3	+++	++
193	2X193	참아람-32×참아람-16	53.0	+++	+++
194	2X194	참아람-32×참아람-17	52.0	++	+
195	2X195	참아람-32×참아람-24	53.3	+	+
196	2X196	참아람-32×참아람-27	59.7	+	++
197	2X197	참아람-32×참아람-28	56.0	+++	+

a: 피막형성정도(배양21일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

b: 갈변정도(배양30일차) -; 없음, +; 약, ++; 중, +++; 강

다. 수집균주 자실체 발현시험(실증시험)

1) 수집균주별 종균 조제

참나무 톱밥을 이용한 종균용 배지를 조제한 후 각 균주별(196균주)로 2병씩 접종하여 총 392병의 종균을 조제하였음.

2) 톱밥재배

표고 수집 196개 균주에 대한 톱밥재배에서 자실체 특성을 조사하기 위해. 시험균주를 톱밥 배지(원통형 1.3kg, 톱밥 80%+미강 15%+면실피 5%+탄산칼슘 0.5%) 2352봉에 접종하여 실내 배양실에서 약 120일간 배양 및 갈변을 진행하고, 6월초 지면재배 비닐하우스로 이동, 상면의 비닐을 개봉하여 지속적인 배양과 갈변을 진행 한 후 자실체특성을 조사하였다.

- 톱밥배지 조성 및 살균방법

- 재배방법 및 배지규격 : 표고지면봉지재배 1.3±0.1kg(∅110mm + 210mm(H))
- 배지조성 : 참나무톱밥 84 + 미강 15 + 면실피 1(v/v) 함수율 52±1%
- 살균방법 : 300분간 100℃ 상압살균

3) 결과

표고 수집 196개 균주에 대하여 톱밥재배에서의 자실체 특성을 조사하였다. 톱밥배지(원통형 1.3kg, 톱밥 83%+미강 15%+면실피 2%)에 탄산칼슘 0.5%를 첨가한 후 배지를 조제하여 시험균주를 접종하였다. 접종 후 실내 배양실에서 약 120일간 배양 및 갈변을 진행하고, 6월 10일에 지면재배 비닐하우스로 이동, 상면의 비닐을 개봉하여 지속적인 배양과 갈변을 진행 한 후 5주기 자실체를 발생시켰다. 톱밥지면봉지 재배시험에서 196개 균주 중 175개 균주에서 자실체가 발생하였다. F0734, F804, F808, F997, F1031 등은 배지오염 또는 버섯파리 발생 등에 의해 배지의 상태가 불량하여 버섯이 발생되지 않았다. 톱밥재배 시험균주 중에서 중국에서 수집된 F264, 강원 인제 곰배령에서 수집된 F1055에서 자실체의 모양은 양호하지 못했지만 개체수가 많이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 중국에서 수집된 F367, F368균주에서 수량 및 개체수가 양호하게 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 강원도 인제 십이선녀탕 입구에서 수집된 F1002 균주에서 개체수가 109개/12봉, 개체중은 21g으로 버섯이 양호하게 발생되었으며 슬로베니아에서 수집된 F1097 균주에서 총중량 4,030g/12봉, 개체수 275개/12봉, 개체중은 15g으로 버섯수량 및 모양이 양호하게 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 무바이러스 톱밥품종을 육성하기 위한 모균주로서의 활용가능성이 높다고 판단되었다.(표 17, 그림 38-40).



[그림 38. 톱밥배지 배양(좌, 3/28) 및 배양완료 후 개봉(우, 6/12)]

표 17-1. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F0037	1,570	147	11	
F0040	2,840	230	12	
F0053	170	10	17	
F0060	2,450	132	19	
F0064	720	43	17	
F0066	3,690	275	13	
F0070	860	83	10	
F0073	180	9	20	
F0076	1,340	147	9	
F0080	3,600	277	13	
F0088	1,200	190	6	
F0092	540	41	13	
F0094	2,250	256	9	
F0098	870	57	15	
F0101	20	6	3	
F0107	140	10	14	
F0259	2,830	207	14	
F0264	3,660	487	8	개체수 많음
F0299	340	18	19	
F0313	3,850	417	9	

표 17-2. 표고 수집군주 자실체 특성 조사

군주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F0315	3,340	340	10	
F0329	30	1	30	
F0339	1,330	73	18	
F0356	2,180	114	19	
F0363	860	54	16	
F0364	2,730	276	10	
F0367	5,070	415	12	수량 많음
F0368	4,170	318	13	수량 많음
F0386	2,250	195	12	
F0540	20	1	20	
F0589	0	0	0	미발생
F0590	2,530	167	15	
F0591	2,250	146	15	
F0592	1,180	114	10	
F0659	330	14	24	
F0723	2,320	310	7	
F0724	270	22	12	
F0725	1,920	167	11	
F0726	190	13	15	
F0727	1,590	190	8	

표 17-3. 표고 수집군주 자실체 특성 조사

군주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F0728	2,380	128	19	품질 우수
F0729	180	10	18	
F0730	150	7	21	
F0731	3,060	255	12	
F0732	1,770	229	8	
F0733	1,400	143	10	
F0735	1,580	100	16	
F0736	2,420	162	15	
F0795	940	59	16	
F0796	1,280	77	17	
F0797	460	36	13	
F0799	2,250	141	16	
F0801	1,680	149	11	
F0802	570	55	10	
F0804	0	0	0	미발생
F0805	580	66	9	
F0808	0	0	0	미발생
F0809	580	43	13	
F0810	3,480	265	13	
F0811	320	15	21	

표 17-4. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F0841	90	4	23	
F0845	290	14	21	
F0857	660	30	22	
F0933	640	114	6	
F0934	2,340	202	12	
F0936	1,200	81	15	
F0939	590	81	7	
F0941	440	28	16	
F0942	1,370	193	7	
F0944	1,280	89	14	
F0946	780	50	16	
F0948	810	85	10	
F0954	1,700	207	8	
F0961	2,810	266	11	
F0962	380	22	17	
F0963	1,370	81	17	
F0964	350	24	15	
F0965	3,480	268	13	
F0966	810	63	13	
F0975	690	34	20	

표 17-5. 표고 수집군주 자실체 특성 조사

군주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F0976	1,370	71	19	
F0977	60	3	20	
F0979	2,100	257	8	
F0980	3,440	335	10	
F0981	2,070	197	11	
F0996	190	8	24	
F0997	0	0	0	미발생
F1002	2,310	109	21	버섯양호
F1003	840	109	8	
F1004	210	18	12	
F1006	3,000	273	11	
F1007	1,230	80	15	
F1009	970	43	23	
F1012	1,550	99	16	
F1014	380	15	25	
F1023	3,140	404	8	
F1025	1,110	74	15	
F1026	410	26	16	
F1027	240	19	13	
F1029	2,530	233	11	

표 17-6. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F1031	0	0	0	미발생
F1032	30	1	30	
F1038	760	35	22	
F1040	430	20	22	
F1041	2,110	161	13	
F1042	0	0	0	미발생
F1043	0	0	0	미발생
F1044	0	0	0	미발생
F1045	1,460	79	18	
F1046	1,980	164	12	
F1047	460	16	29	
F1048	30	1	30	
F1049	0	0	0	미발생
F1050	120	5	24	
F1051	810	60	14	
F1052	540	31	17	
F1053	80	4	20	
F1054	2,850	208	14	
F1055	4,110	432	10	개체수 많음
F1056	2,250	237	9	

표 17-7. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F1057	2,200	179	12	
F1058	260	9	29	
F1059	1,930	166	12	
F1060	2,350	194	12	
F1061	1,740	111	16	
F1062	590	84	7	
F1063	0	0	0	미발생
F1064	800	56	14	
F1065	0	0	0	미발생
F1066	460	17	27	
F1067	140	4	35	
F1068	280	19	15	
F1069	610	55	11	
F1070	2,170	151	14	
F1071	3,450	292	12	
F1072	20	1	20	
F1073	680	47	14	
F1074	3,200	256	13	
F1075	290	13	22	
F1076	120	3	40	

표 17-8. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F1077	3,170	287	11	
F1078	1,650	151	11	
F1079	550	26	21	
F1080	1,900	144	13	
F1081	50	2	25	
F1082	1,420	91	16	
F1083	1,700	106	16	
F1084	3,770	236	16	
F1085	0	0	0	미발생
F1086	340	22	15	
F1087	3,020	282	11	
F1088	3,100	237	13	
F1089	3,460	255	14	
F1090	330	11	30	
F1091	4,220	320	13	
F1092	4,300	324	13	
F1093	650	50	13	
F1094	1,010	52	19	
F1095	540	47	11	
F1096	920	70	13	

표 17-9. 표고 수집군주 자실체 특성 조사

군주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F1097	4,030	275	15	버섯 양호
F1098	3,580	406	9	개체수 많음
F1099	0	0	0	미발생
F1100	200	13	15	
F1101	3,860	235	16	품질 우수
F1102	370	38	10	
F1103	4,580	381	12	수량 많음
F1104	3,990	292	14	
F1105	240	15	16	
F1106	2,350	187	13	
F1107	0	0	0	미발생
F1108	0	0	0	미발생
F1109	710	36	20	
F1110	300	21	14	
F1111	3,960	248	16	품질 우수
F1112	5,010	333	15	수량 많음
F1113	0	0	0	미발생
F1114	0	0	0	미발생
F1115	0	0	0	미발생
F1116	30	1	30	

표 17-10. 표고 수집균주 자실체 특성 조사

균주번호	중량(g)	개체수(개)	개체중량(g)	비고
F1117	4,190	318	13	
F1118	0	0	0	미발생
F1119	4,190	303	14	
F1120	620	56	11	
F1121	3,460	219	16	
F1122	3,930	224	18	
F1123	110	3	37	
F1124	3,030	204	15	
F1125	1,720	102	17	
F1126	0	0	0	미발생
F1127	240	11	22	
산조111호	1,390	113	12	
산조704호	3,300	249	13	
산조705호	4,200	298	14	
산조706호	1,420	65	22	



[그림 39. 수집균주 자실체 발생(F1002)]



[그림 40. 수집균주 자실체 발생(F1097)]

라. 교배균주 자실체 특성검정시험

1) 교배균주 종균 조제

참나무 톱밥을 이용한 종균용 배지를 조제한 후 각 균주별(180균주)로 2병씩 접종하여 총 360병의 종균을 조제하였음.

2) 톱밥재배

실내에서 육성된 180개 교배균주에 대한 톱밥재배에서 자실체 특성을 조사하기 위해. 시험 균주를 톱밥배지(원통형 1.3kg, 톱밥 80%+미강 15%+면실피 5%+탄산칼슘 0.5%) 4320봉에 접종하여 실내 배양실에서 약 120일간 배양 및 갈변을 진행하고, 6월초 지면재배 비닐하우스

스로 이동, 상면의 비닐을 개봉하여 지속적인 배양과 갈변을 진행 한 후 자실체특성을 조사하였다.

- 톱밥배지 조성 및 살균방법

- 재배방법 및 배지규격 : 표고지면봉지재배 1.3±0.1kg(∅110mm + 210mm(H))
- 배지조성 : 참나무톱밥 84 + 미강 15 + 면실피 1(v/v) 함수율 52±1%
- 살균방법 : 300분간 100℃ 상압살균

3) 교배균주 자실체 특성 검정

배양이 완료된 배지는 재배사로 이동하여 자연기후 환경에서 7회의 발생작업을 실시하였고 교배균주별로 자실체의 생산성을 조사하고 그중 형질이 우수한 교배균주를 선발하여 제원 특성을 조사하였다.

표 18-1. 교배균주의 자실체 생산성 현황

	균 주 명	수확량	개체수	개체중	회수율(%) ^a	비고
1	07-02	230	21	11.0	0.8	기형 ^b
2	07-04	70	3	23.3	0.2	
3	07-05	1,330	62	21.5	4.6	
4	07-06	6,050	345	17.5	21.0	기형
5	07-07	1,330	80	16.6	4.6	
6	07-08	1,220	51	23.9	4.2	
7	07-09	4,890	261	18.7	17.0	
8	07-11	5,730	440	13.0	19.9	
9	07-12	980	46	21.3	3.4	
10	07-13	7,160	422	17.0	24.9	
11	07-14	5,230	394	13.3	18.2	
12	07-15	40	2	20.0	0.1	기형
13	07-16	9,520	544	17.5	33.1	
14	07-17	1,750	99	17.7	6.1	
15	07-18	3,550	225	15.8	12.3	
16	07-19	1,730	120	14.4	6.0	기형
17	07-20	360	11	32.7	1.3	기형
18	07-21	30	1	30.0	0.1	
19	07-22	1,460	207	7.1	5.1	기형
20	07-23	9,320	429	21.7	32.4	

a: 회수율; 생버섯 수확량/배지의 무게*100

b: 기형자실체; 자실체는 발생되나 갓주름이 형성되지 않는 균주

표 18-2. 교배균주의 자실체 생산성 현황

	균 주 명	수확량	개체수	개체중	회수율(%) ^a	비고
21	07-24	1,130	55	20.5	3.9	
22	07-25	2,610	115	22.7	9.1	
23	07-26	780	63	12.4	2.7	기형 ^b
24	07-27	2,220	137	16.2	7.7	
25	07-28	2,170	200	10.9	7.5	기형
26	07-29	120	3	40.0	0.4	기형
27	07-30	920	61	15.1	3.2	기형
28	07-31	610	65	9.4	2.1	기형
29	07-32	3,170	180	17.6	11.0	
30	07-33	30	1	30.0	0.1	
31	07-34	2,400	128	18.8	8.3	
32	07-35	2,480	142	17.5	8.6	
33	07-36	620	55	11.3	2.2	기형
34	07-37	340	31	11.0	1.2	기형
35	07-38	60	4	15.0	0.2	기형
36	07-39	1,320	63	21.0	4.6	
37	07-40	4,530	379	12.0	15.7	
38	07-41	8,300	555	15.0	28.8	
39	07-43	2,240	96	23.3	7.8	
40	07-44	4,140	221	18.7	14.4	
41	07-45	3,260	227	14.4	11.3	
42	07-46	3,750	143	26.2	13.0	
43	07-47	290	10	29.0	1.0	
44	07-48	660	34	19.4	2.3	
45	07-49	300	28	10.7	1.0	
46	07-50	2,780	228	12.2	9.7	
47	07-51	1,180	52	22.7	4.1	
48	07-52	2,860	127	22.5	9.9	
49	07-53	7,280	572	12.7	25.3	
50	07-54	590	31	19.0	2.0	
51	07-55	470	17	27.6	1.6	
52	07-56	240	8	30.0	0.8	
53	07-57	1,320	79	16.7	4.6	
54	07-58	430	16	26.9	1.5	
55	07-59	2,330	189	12.3	8.1	
56	07-61	5,590	641	8.7	19.4	
57	07-62	7,670	372	20.6	26.6	
58	07-63	1,360	75	18.1	4.7	
59	07-65	1,130	61	18.5	3.9	
60	07-66	2,500	147	17.0	8.7	

a: 회수율; 생버섯 수확량/배지의 무게*100

b: 기형자실체; 자실체는 발생되나 갓주름이 형성되지 않는 균주

표 18-3. 교배균주의 자실체 생산성 현황

	균 주 명	수확량	개체수	개체중	회수율(%) ^a	비고
61	07-69	2,820	265	10.6	9.8	
62	07-70	1,280	66	19.4	4.4	
63	07-71	4,620	293	15.8	16.0	
64	07-72	3,620	173	20.9	12.6	기형 ^b
65	07-73	7,350	589	12.5	25.5	
66	07-74	160	8	20.0	0.6	
67	07-75	260	5	52.0	0.9	
68	07-77	3,780	218	17.3	13.1	
69	07-78	6,210	414	15.0	21.6	
70	07-79	5,420	454	11.9	18.8	
71	07-80	420	18	23.3	1.5	
72	07-81	3,020	225	13.4	10.5	기형
73	07-82	4,210	221	19.0	14.6	
74	07-83	2,780	134	20.7	9.7	
75	07-84	1,860	66	28.2	6.5	
76	07-86	250	13	19.2	0.9	기형
77	07-87	9,540	445	21.4	33.1	
78	07-88	460	22	20.9	1.6	기형
79	07-89	2,200	96	22.9	7.6	
80	07-90	3,100	187	16.6	10.8	
81	07-91	9,330	474	19.7	32.4	
82	07-93	2,990	172	17.4	10.4	
83	07-94	3,660	176	20.8	12.7	
84	07-95	1,190	87	13.7	4.1	기형
85	07-96	2,720	136	20.0	9.4	
86	07-97	290	10	29.0	1.0	기형
87	07-98	1,200	60	20.0	4.2	
88	07-99	3,340	198	16.9	11.6	
89	07-100	1,950	98	19.9	6.8	
90	07-101	4,760	267	17.8	16.5	
91	07-102	11,330	559	20.3	39.3	기형
92	07-103	6,730	385	17.5	23.4	기형
93	07-104	990	40	24.8	3.4	
94	07-105	2,710	151	17.9	9.4	
95	07-106	1,160	46	25.2	4.0	기형
96	07-107	20	2	10.0	0.1	기형
97	07-108	2,330	91	25.6	8.1	
98	07-109	1,900	170	11.2	6.6	기형
99	07-110	240	11	21.8	0.8	기형
100	07-111	790	56	14.1	2.7	기형

a: 회수율; 생버섯 수확량/배지의 무게*100

b: 기형자실체; 자실체는 발생되나 갓주름이 형성되지 않는 균주

표 18-4. 교배균주의 자실체 생산성 현황

	균 주 명	수확량	개체수	개체중	회수율(%) ^a	비고
101	07-113	990	33	30.0	3.4	
102	07-114	620	30	20.7	2.2	기형 ^b
103	07-116	2,730	189	14.4	9.5	
104	07-117	7,990	447	17.9	27.7	
105	07-119	20	1	20.0	0.1	
106	07-122	180	3	60.0	0.6	기형
107	07-124	620	30	20.7	2.2	
108	07-129	790	32	24.7	2.7	
109	07-131	500	18	27.8	1.7	
110	07-133	140	10	14.0	0.5	기형
111	07-134	70	3	23.3	0.2	
112	07-137	4,350	262	16.6	15.1	
113	07-138	40	1	40.0	0.1	
114	07-141	60	5	12.0	0.2	기형
115	07-144	250	20	12.5	0.9	기형
116	07-145	150	15	10.0	0.5	기형
117	07-147	350	17	20.6	1.2	기형
118	07-148	60	6	10.0	0.2	
119	07-149	690	43	16.0	2.4	기형
120	07-152	2,960	150	19.7	10.3	
121	07-155	196	9	21.8	0.7	
122	07-156	590	28	21.1	2.0	
123	07-157	280	16	17.5	1.0	
124	07-159	2,280	72	31.7	7.9	
125	07-160	750	33	22.7	2.6	기형
126	07-161	5,150	290	17.8	17.9	
127	07-162	520	23	22.6	1.8	기형
128	07-163	320	12	26.7	1.1	
129	07-164	4,850	229	21.2	16.8	
130	07-166	700	33	21.2	2.4	기형
131	07-167	1,260	41	30.7	4.4	기형
132	07-168	910	49	18.6	3.2	기형
133	07-169	510	26	19.6	1.8	기형
134	07-170	80	3	26.7	0.3	
135	07-171	550	23	23.9	1.9	
136	07-172	1,140	60	19.0	4.0	
137	07-173	8,940	446	20.0	31.0	
138	07-174	2,690	123	21.9	9.3	
139	07-175	3,050	163	18.7	10.6	
140	07-176	360	42	8.6	1.3	
141	07-177	4,460	237	18.8	15.5	
142	07-178	600	18	33.3	2.1	
143	07-180	2,620	122	21.5	9.1	

a: 회수율; 생머섯 수확량/배지의 무게*100

b: 기형자실체; 자실체는 발생되나 갖추름이 형성되지 않는 균주

4) 우수교배균주 선발 및 확대재배시험

교배균주의 재배시험을 통해 우수한 성적을 보인 균주들을 선발하고 자실체 제원을 조사하였다. 또한 선발된 균주들은 현재 확대재배시험을 실시하였다.

표 19. 우수교배균주 자실체 제원

	구 분	온도형	갓모양	갓두께	갓직경	대길이	대굵기	대길이 ^a 비율	개체중
1	07-16	중온	반구	13.9±2	59.6±6	53.6±7	20.5±2	1.1±0.1	30.9±7
2	07-41	중온	반구	13.1±2	60.2±9	58.4±15	14.8±3	1.1±0.2	25.4±8
3	07-62	중고온	반구	17.2±4	62.8±8	52.6±9	13.6±3	1.2±0.2	26.9±9
4	07-73	중온	반구	15.9±4	63.3±10	58.7±10	16.3±5	1.1±0.2	32.0±12
5	07-79	중온	반구	15.1±3	66.3±5	67.3±13	17.4±4	1.0±0.7	31.5±9
6	07-87	중고온	편평형	12.7±5	55.5±4	55.6±8	9.2±1	1.0±0.1	18.4±5
7	07-117	중온	반구	21.4±4	68.7±9	50.6±7	14.3±3	1.4±0.3	34.8±10
대조	산조701호	중고온	평반구	16.2±2	69.2±7	44.5±8	12.0±2	1.7±1	28.2±7
대조	참아람	중온	평반구	17.9±2	79.7±8	46.8±8	20.3±4	1.7±0.3	49.8±10

a; 대길이 비율; 갓직경/대길이

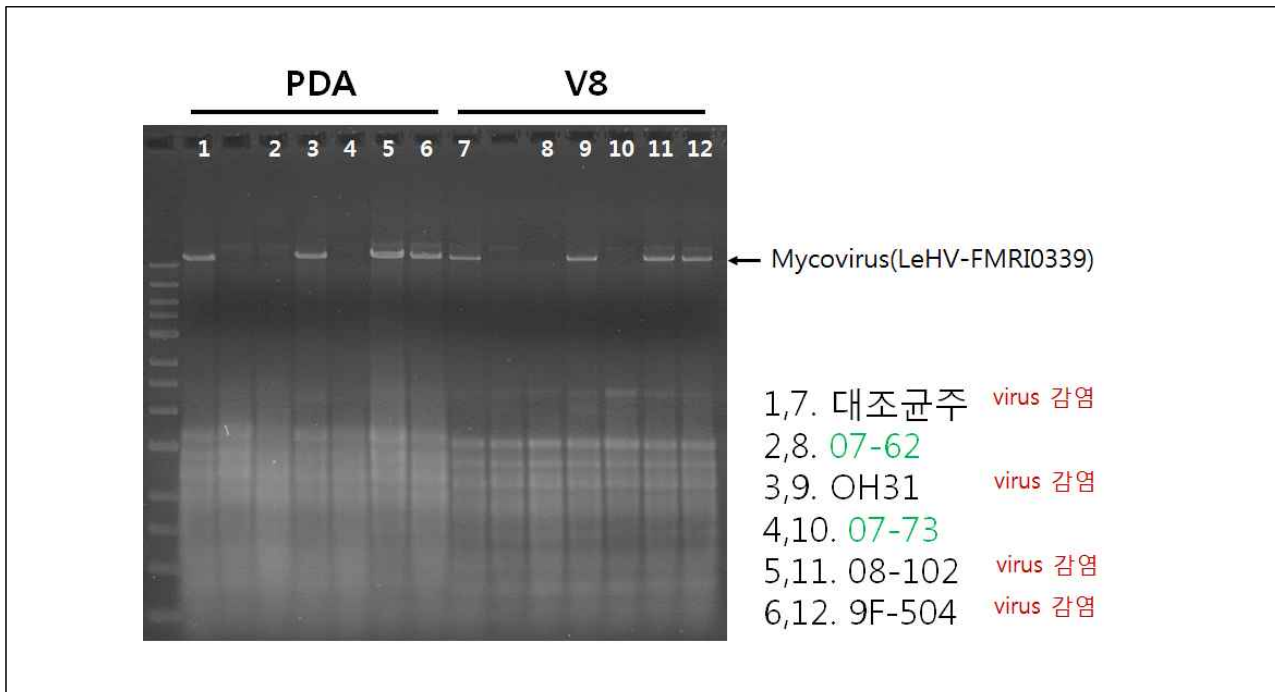
마. 무바이러스 우수 선발 균주 톱밥재배 자실체 특성 검정

1) 무바이러스 표고 선발 균주 임가실증시험

선발된 우수 교배균주들 중 바이러스가 검출 여부를 확인하여 무바이러스가 확인된 균주중 품종보호출원 가능성이 높은 2개균주(07-62, 07-73)에 대하여 임가실증시험을 진행하였다. 톱밥배지는 20-25℃온도에서 배양하여 6월말경 재배사로 이동하여 상면을 개봉하고 재배하였다. 재배방법은 각 임가의 관행적인 재배방법에 준하여 재배하며 현재 재배하고 있는 산조 701호품종을 대조로 하여 비교재배하면서 각 균주의 균일성, 안정성 및 생산성 등을 조사하였다.

- 톱밥배지 조성 및 살균방법

- 재배방법 및 배지규격 : 표고지면봉지재배 1.3±0.1kg(∅110mm + 210mm(H))
- 배지조성 : 참나무톱밥 85 + 미강 15 (v/v) 함유율 52±1%
- 살균방법 : 300분간 100℃ 상압살균



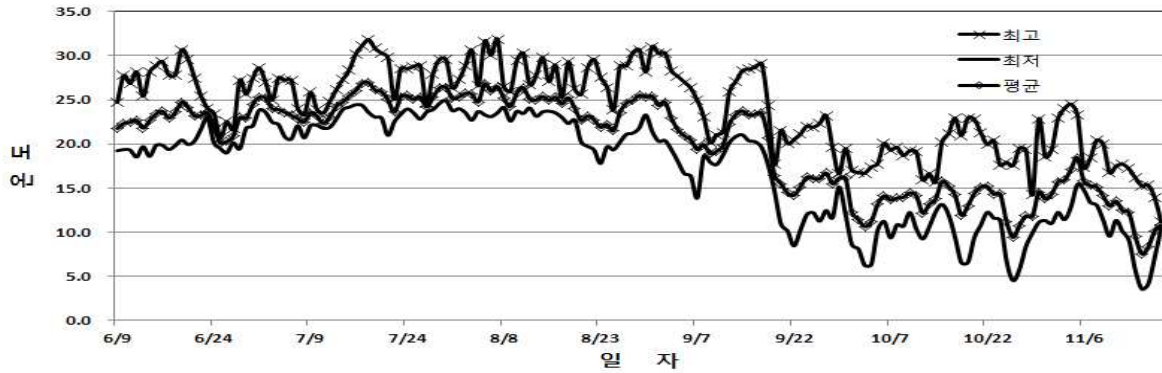
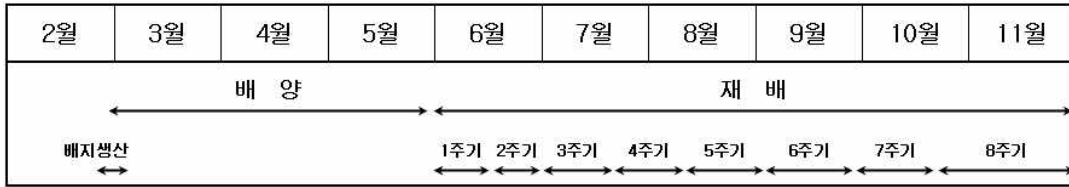
[그림 41. 우수 교배균주의 바이러스 감염여부 확인]

2) 자실체 발생과정

시험균주들의 첫 버섯발생은 배양이 완료된 배지를 6월 중순경 차광 및 살수 시설이 구비된 비닐재배사로 이동한 후 3일 이내에 상면을 개봉하고 수분관리하여 이동과정에서 받은 물리적 충격과 온도편차에 의해 자실체가 발생할 수 있도록 하였다. 배지의 개봉은 상면으로부터 약 1cm 내외를 절단하여 상면 비닐을 제거하였으며, 개봉 후 수분관리는 배지의 표면이 건조되지 않도록 1일 3~5회씩 동력 분무기 또는 스프링클러로 배지 표면에 살수를 실시하였다. 낮시간에는 차광망을 이용하여 재배사내부로 직사광선이 들어오는 것을 막아 재배사 내부의 온도가 과도하게 높아지지 않도록 조절하였다. 표 20 및 그림 42은 재배기간 동안의 처리일정 및 온습도 변화추이를 나타낸 것이다.

버섯발생 2주기 이후부터는 발생작업 약 3일 전부터 점차 살수량을 늘려준 후 스프링클러를 이용하여 4시간 살수 후 배지의 상면이 재배사 바닥에 닿도록 뒤집은 후 다시 4시간 살수를 실시한 후 반일간 두었다가 원위치 하는 방법으로 발생작업을 하였으며, 휴면기간 없이 계속 버섯을 발생시켜 수확하였다.

표 20. 톱밥배지의 시기별 처리일정



[그림 42. 재배사 온습도 변화 추이]

표 21. 실증임가 현황

임 가 구 분	재배방법	연간 재배규모	주요재배품종	시험군주	시험규모	배지중량
충북 청원	지면봉지재배	10만봉	산조701호	07-62	5,000봉	1.3kg
전북 군산	지면봉지재배	5만봉	산조701호	07-73	5,000봉	1.3kg

표 22. 선발군주 생산성

(단위 : g/배지1kg)

구 분	충북 청원		전북 군산	
	07-62(산조708호)	산조701호	07-73(산조709호)	산조701호
6월	8	27	25	18
7월	-	13	46	7
8월	-	46	59	38
9월	35	76	66	78
10월	75	78	62	82
11월	65	25	32	35
12월	42	-	-	-
1월	21	-	-	-
계	246	265	290	258



2013.11.01.



2013.12.17.

[그림 43. 07-62균주(산조708호) 실증재배]

표 23. 시험균주와 대조품종의 특성비교

구 분	07-62(산조708호)	산조701호(기존품종)
발 생 형	중온성(9~19℃)	중고온성(12~24℃)
육성방법	교배육성	선발육성
버섯생산 효율(%)	25%	26%
특 성	<ul style="list-style-type: none"> - 저온(평균10-15℃) 버섯발생 유리 - 갓형태가 반구형으로 쉽게 퍼지 않음 - 상대적으로 대가 굵고 균일성이 높음 - 저온에서도 갓색 밝고 습에 강함 - 중엽형, 개체중 우수(평균33g) 	<ul style="list-style-type: none"> - 여름~가을재배의 대표적 품종 - 고온에서 버섯품질 매우 우수 - 버섯발생 늦고 재배 어려움 - 10월 이후 재배 안됨



2013.07.16.



2013.10.15.

[그림 44. 07-73균주(산조709호) 실증재배]

표 24. 시험균주와 대조품종의 특성비교

구 분	07-73(산조709호)	산조701호(기존품종)
발 생 형	중고온성(12~25℃)	중고온성(12~24℃)
육성방법	교배육성	선발육성
버섯생산 효율(%)	29%	26%
특 성	<ul style="list-style-type: none"> - 고온 버섯발생 유리 - 생산성이 높고 병해에 강함 - 버섯 품질 우수하고 습에 강함 - 산조701호에 비해 버섯발생 15일 가량 빠름 	<ul style="list-style-type: none"> - 여름~가을재배의 대표적 품종 - 고온에서 버섯품질 매우 우수 - 버섯발생 늦고 재배 어려움 - 10월 이후 재배 안됨



산조708호



산조709호



산조701호

[그림 45. 산조708호 및 산조709호의 자실체]

3) 무바이러스 느타리버섯 선발 균주 자실체 특성 검정

- ① 공시균주 : 전북대학교에서 분양받은 Virus infection 1균주와 Virus free 3균주를 공시균주로 사용하였다(POV, VF8, VF13, VF18).
- ② 톱밥배지 생산 : 미루나무 톱밥, 미강, 비트펄프, 면실박을 혼합하여 수분을 65%를 만들었다. 혼합한 배지는 입병기를 이용하여 1100cc 배양병에 입병 후 121℃, 1.2기압에서 90분간 살균 후 공시균주를 접종하였다.
- ③ 톱밥배지 배양 : 접종 작업이 끝난 후 배양실로 옮겨 22℃에서 30일간 배양 후 생육실로 이동하여 버섯 품질 및 버섯발생량을 조사하였다.
- ④ 생산성 검증 : 병당 버섯생산량(g/병), 개체중량(g/개) 등을 조사하여 버섯의 품질 및 생산성을 조사하였다.
- ⑤ 결과: 무바이러스 느타리버섯 선발균주의 자실체 특성 조사 결과, 무바이러스 균주에서 개체중량 및 개체수에서 바이러스 감염균주보다 더 좋은 생산성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 버섯의 품질을 측정하는 갓길이 및 대길이에 있어서 무바이러스 균주가 갓길이 작으며 대길이가 길게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 버섯의 생산성 및 품질 검증에서는 무바이러스 균주가 더 좋은 결과를 보이는 것을 확인할 수 있었음(그림 46-51).

표 25. 무바이러스 느타리버섯 선발 균주의 자실체 특성 조사

균주	개체중량	개체수	갓길이	대길이
POV	92.3	15.8	44.6	63.8
VF8	124.3	15.3	47.2	59.0
VF13	93.6	14.6	39.5	62.5
VF18	97.6	18.6	38.9	63.0



[그림 46. 생육전경]



[그림 47. Positive virus 생육 전경]



[그림 48. Virus free-8 생육 전경]



[그림 49. Virus free-13 생육 전경]



[그림 50. Virus free-18 생육 전경]



POV



VF8



VF13



VF18

[그림 51. 무바이러스 느타리 버섯 자실체]

바. 무바이러스 표고 톱밥재배용 우수균주 품종보호출원

바이러스 감염 여부가 확인된 우수균주의 임가실증시험을 통해 각 균주의 생산성 및 안정성, 균일성이 입증되었고, 실증임가들의 해당 균주에 대한 버섯 품질평가가 우수하여 품종보호출원을 하였다. 07-62균주(산조708호)는 균일성이 높고 기존 산조701호에 비해 버섯발생 및 생육온도가 낮아(표 23) 동절기 재배에 적합하며 07-73균주(산조709호)는 산조701호에 비해 버섯발생 최성기까지의 기간이 15일 가량 짧고 생산성이 우수한 특성(표 24)을 가지고 있다.

1) 산조708호, 산조709호의 품종보호출원



품격있고 가치있는 녹색자원 육성

국립산림품종관리센터



목재, 생활속의 자연
fine wood, fine living

수신자 산림조합중앙회장 장일환 귀하 (우 138-880 서울 송파구 삼전동 산림조합중앙회)
(경유)
제목 품종보호 출원번호 통지서

1. 귀하의 무균한 발전을 기원하며, 품종보호제도의 정착과 신품종 육성에 적극 협조하여 주셔서 감사드립니다.

2. 귀하께서 우리센터에 품종보호 출원한 품종에 대하여 식물신품종 보호법 제32조 1항과 동법 시행규칙 제42조의 규정에 의거, 품종보호출원등록부에 등록된 출원번호 및 출원일자를 아래와 같이 확정하여 알려드립니다.


- 품종보호 출원번호 및 출원일자 내역 -

출원번호	출원일자	품종명칭	학명 및 일반명	출원인	육성자
2013-35	2013.12.27	산조 304호 (SANJO 304HO)	표고버섯 <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	산림조합 중앙회	김선철, 고한규, 노종현, 이원호, 최선규, 김인엽, 이중현, 박홍수.
2013-36	2013.12.27	산조 708호 (SANJO 708HO)	표고버섯 <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	산림조합 중앙회	노종현, 김선철, 고한규, 이원호, 김인엽, 최선규, 이중현, 박홍수.
2013-37	2013.12.27	산조 709호 (SANJO 709HO)	표고버섯 <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	산림조합 중앙회	노종현, 김선철, 고한규, 이원호, 김인엽, 최선규, 이중현, 박홍수.
2013-38	2013.12.27	산조 710호 (SANJO 710HO)	표고버섯 <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	산림조합 중앙회	노종현, 김선철, 고한규, 이원호, 김인엽, 최선규, 이중현, 박홍수.

끝.

2) 산조708호 명칭등록

품격있고 가치있는 녹색자원 육성



국립산림품종관리센터



수신자 산림조합중앙회(산림버섯연구센터)
(경유)
제목 품종명칭등록 알림(산조708호)


1. 귀하의 무궁한 발전을 기원하며, 산림분야 품종보호제도의 정착과 신품종 육성에 적극 협조하여 주셔서 감사드립니다.

2. 귀하께서 출원한 품종명칭이 식물신품종보호법 제109조 제8항의 규정에 의하여 아래와 같이 품종명칭으로 등록되었음을 알려 드립니다.

- 품종명칭등록 내역 -

작 물 명 : 표고버섯
 품종명칭 : 산조708호 (영문명) Sanjo 708호
 출원번호 : 명칭 2013-36
 등록번호 : 제09-06-38호
 등 록 일 : 2014년 3월 17일. 끝.

국립산림품종관리센터



주무관	방승하	행정사무관	최근화	임업연구관	이정호	품종심사과장	03/24
							권오웅

협조자




시행 품종심사과-1456 (2014. 03. 24.) 접수

우 380-941 충북 충주시 수안보면 수회리로 72 국립산림품종관리센터 / <http://www.forest.go.kr>

전화 043-850-3351 전송 043-848-3055 / ksbang@forest.go.kr / 대국민 공개

정확한 판단, 신속한 대응, 안전한 진화

3) 산조709호 명칭등록

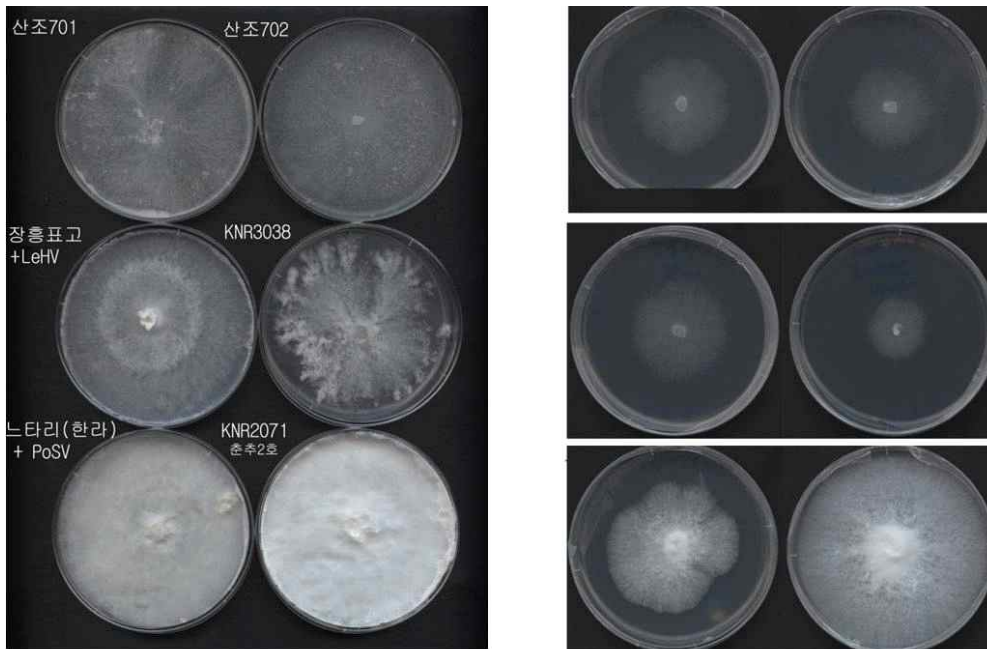
 <p>국립산림품종관리센터</p>		 <p>3월 3일 세계 산림의 날</p>					
품격있고 가치있는 녹색자원 육성							
수신자	산림조합중앙회(산림버섯연구센터)						
(경유)							
제목	품종명칭등록 알림(산조709호)						
<p>1. 귀하의 무궁한 발전을 기원하며, 산림분야 품종보호제도의 정착과 신제품 육성에 적극 협조하여 주셔서 감사드립니다.</p> <p>2. 귀하께서 출원한 품종명칭이 식물신제품보호법 제109조 제8항의 규정에 의하여 아래와 같이 품종명칭으로 등록되었음을 알려 드립니다.</p>							
- 품종명칭등록 내역 -							
작 물 명	표고버섯						
품종명칭	산조709호 (영문명) Sanjo 709ho						
출원번호	명칭 2013-37						
등록번호	제09-06-39호						
등록일	2014년 3월 17일. 끝.						
							
국립산림품종관리센터							
주무관	방승하	행정사무관	최근화	임업연구관	이정호	품종심사과장	03/24
협조자							권오웅
시행	품종심사과-1455	(2014. 03. 24.)	접수				
우	380-941	충북 충주시 수안보면 수회리로 72	국립산림품종관리센터	/ http://www.forest.go.kr			
전화	043-850-3351	전송	043-848-3055	/ ksbang@forest.go.kr	/ 대국민 공개		
정확한 판단, 신속한 대응, 안전한 진화							

3. 버섯바이러스(느타리·표고) 기작규명을 통한 균주 안정성 마커개발 및 버섯피해균주의 viro-control 연구

가. 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 기반연구

1) Virus-free과 virus-infected 버섯 분양

버섯바이러스의 병원성 기작규명을 위해 바이러스가 감염되었으나 유전적 배경은 일치하는 isogenic 균주의 준비는 필수요건이다. 분자유전학적 기술을 활용한 isogenic strain을 개발 하기에 앞서 표고버섯과 느타리버섯의 바이러스 병원성 기작에 관한 기초 연구결과를 미리 확보하고자 virus-free과 virus-infected 균주를 협동기관들과 참여기업체로부터 분양받았다. Virus-free 표고버섯인 “산조 702”와 virus-infected 표고버섯인 “산조 701”은 산림버섯연구소(제2협동)로부터, virus-free 표고버섯인 “KNR3038”과 virus-infected 표고버섯인 “장흥표고”를 경상대학교(제1협동)로부터 분양받았다. 또한 virus-free 느타리버섯인 “춘추2호”와 virus-infected 느타리버섯 “한라”도 경상대학교로부터 분양받았다. 분양받은 균주들의 형태 학적인 관찰을 위하여 우선 표고버섯 재배를 위한 일반배지 PDA에 배양하였다(그림 52).



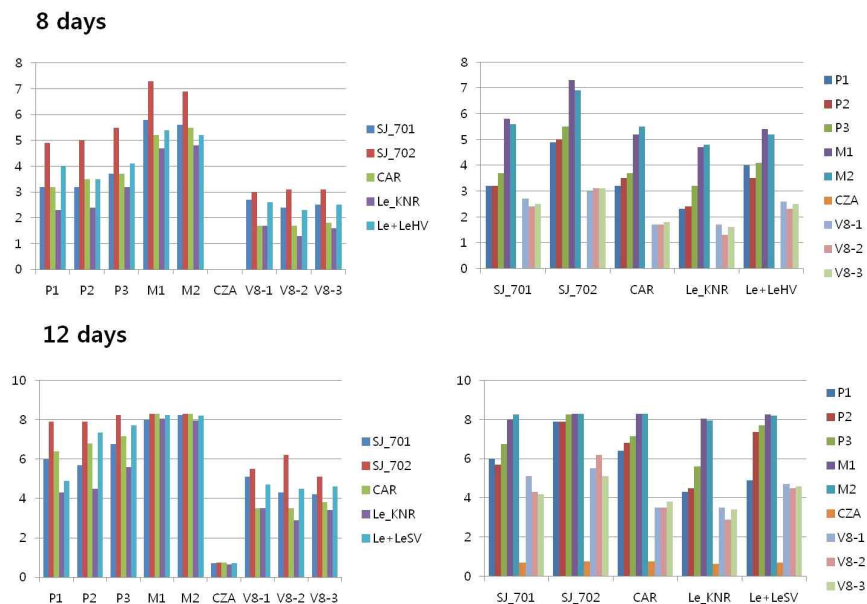
[그림 52. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯과 느타리버섯 균사체의 관찰]

2) 분양균주 특성조사

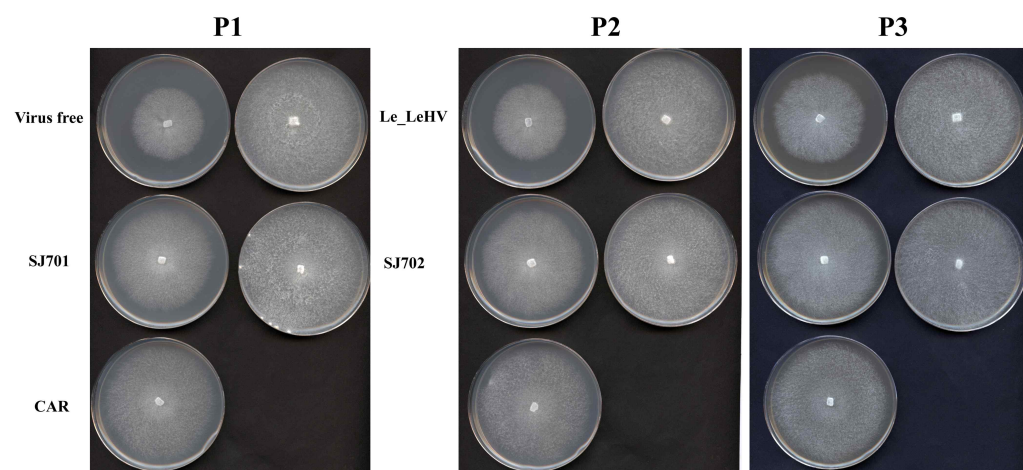
① 균주 균사성장조건 확립

다양한 연구를 위하여 표고버섯균사체의 대량 확보가 중요하지만 지금까지 보고되어진 PDA 배양조건에서는 실험에 요구되는 양만큼의 균사체 확보가 불가능하였다. 이런 문제점

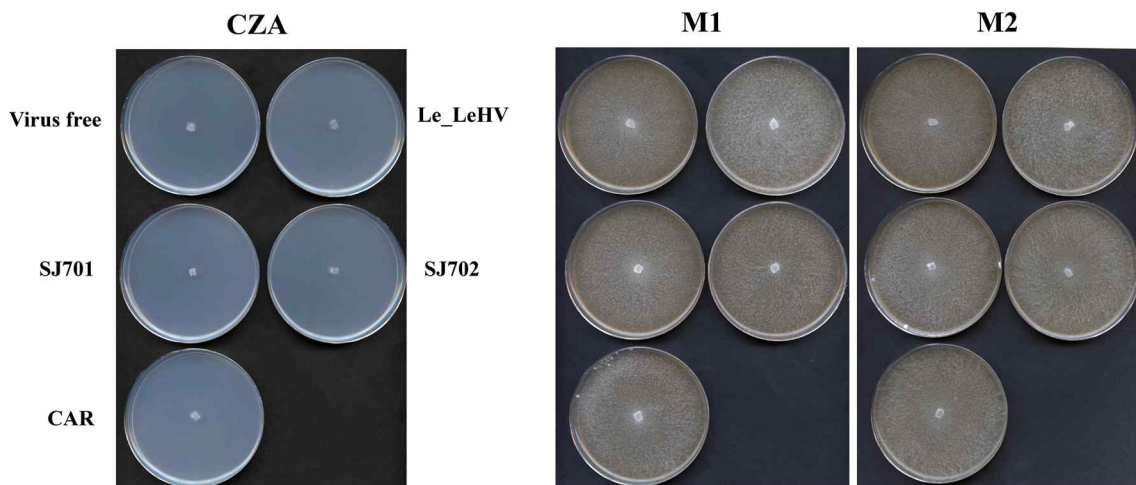
해결을 위하여 표고버섯의 균사체량 증가를 위한 최적의 배양조건을 조사하였다. PDA, PDA+ 2% glucose, PDA + 2% glucose + 2% malt extract, CZA, malt extract, malt extract 5% + 2% glucose, V8, V8 + 2% glucose, V8 + 2% glucose + 2% malt extract와 같이 carbon source와/또는 nitrogen source가 첨가된 9가지 종류의 배지에서 균사체량을 조사하였다. 그 결과 V8를 기초로 하는 배지에서 균사체 성장속도는 약 70% 정도로 감소하는 반면 (그림 53) 균사체량은 2배 이상 증가하는 것으로 나타났고(결과미제시) V8 기초배지에 표고버섯을 배양했을 경우 실험에 요구되는 균사체량을 빠른 시간 내에 확보 가능함을 알 수 있었다(그림 54-57). 본 연구팀의 연구의 진행에 큰 도움이 될 연구정보가 될 것으로 사료된다.



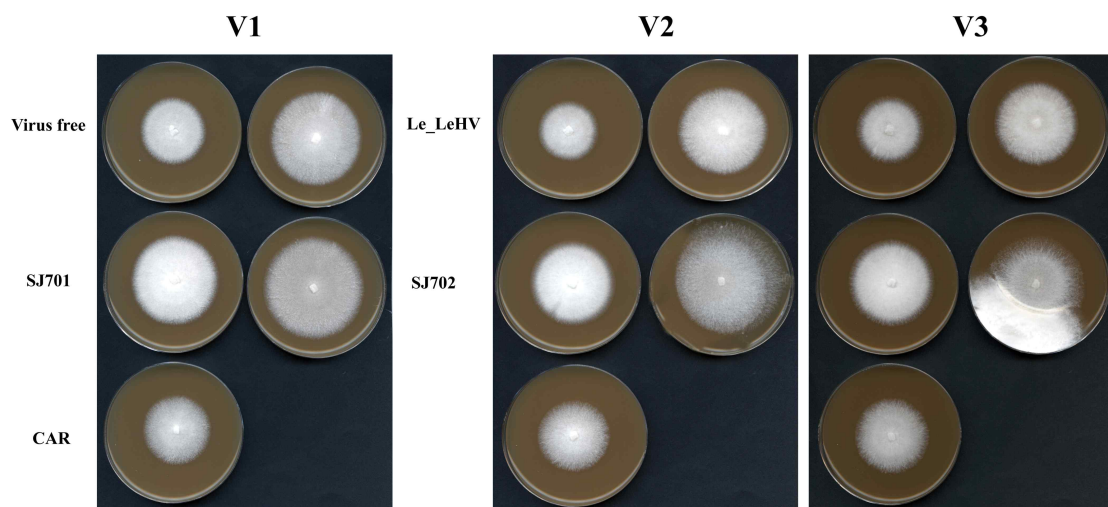
[그림 53. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯의 9가지 다양한 배지에서의 균사 성장속도 비교 관찰. 4일 간격으로 plate이 colony 크기를 조사]



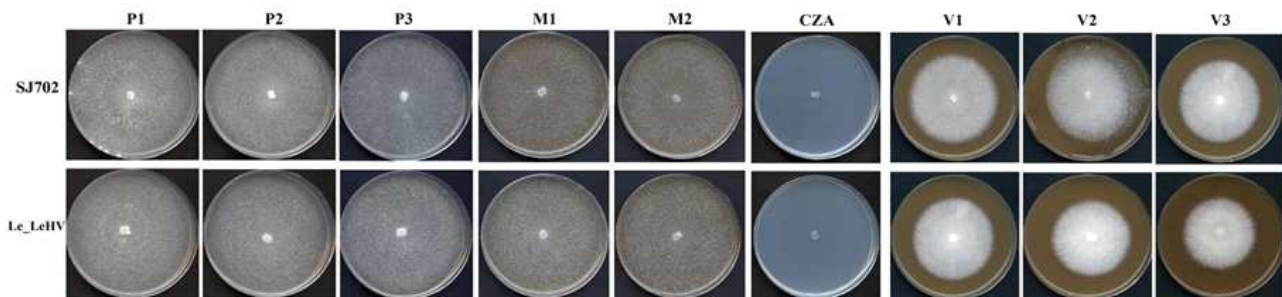
[그림 54. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯의 PDA 종류 배지에서의 균사체 관찰. P1, PDA; P2, PDA+2% glucose; P3, PDA+2% glucose+2% malt extract]



[그림 55. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯의 CZA와 malt extract 배지에서
의 균사체 관찰. M1, malt extract; M2, malt extract 5%+2% glucose]



[그림 56. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯의 V8 배지에서
의 균사체 관찰. V1, V8; V2, V8+2% glucose; V3, V8+2% glucose+2% malt extract]

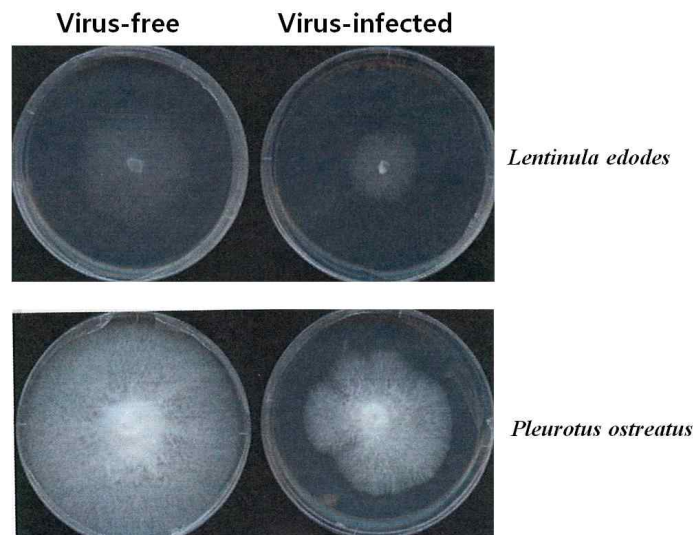


[그림 57. 분양받은 virus-free과 virus-infected 표고버섯의 9가지 다양한 배지에서
의 균사체 관찰]

② 균주 계통도조사 및 1차 균주 선정

분양받아 다양한 형태적 조사를 수행하는 과정에서 버섯균사의 계통분류정보와 버섯바이러스 존재여부를 확인하였다. 균사체 성장조사를 한 후 각각으로부터 gDNA를 회수하여 PCR의 주형으로 이용하고 Internal transcribed spacer (ITS) 부위를 확보할 수 있는 ITS-1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' primer와 ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' primer pair를 이용하여 PCR을 수행한 후 pGEM T easy vector에 삽입하여 클로닝하였다. 각 클론에 삽입된 DNA의 염기서열을 분석한 후 genbank database를 활용하여 계통정보를 분석한 결과 동일 버섯 간에 97-99%의 상동성을 보였으며 오염된 균이 아닌 표고버섯, 느타리버섯균사체임을 확인하였다. 또한 각 균사체로부터 total RNA를 확보하여 RT-PCR을 수행하여 cDNA library를 확보한 후 바이러스 cDNA를 얻어 클로닝한 후 동일한 방법으로 염기서열을 조사한 결과 표고버섯바이러스는 LeHV, 느타리 버섯바이러스는 PoSV임이 최종적으로 확인되었다. 이로써 분양받은 버섯균사체들을 명확히 확인하였고 본 연구팀의 버섯을 연구하기위한 gDNA 분리, total RNA 분리, 바이러스 RNA분리, 바이러스의 cDNA 확보 등의 다양한 버섯바이러스 관련 분자유전학 기술을 확립하여 기반을 성공적으로 마련하였다.

다양한 배양배지조건에서 각 버섯들의 형태학적인 관찰을 수행하고 DNA 분석을 통한 분자유전학적 동정을 통하여 최종적으로 표고버섯 2 균주(산조702, 701)와 느타리버섯 2균주(춘추2호, 한라)를 각각 virus-free와 virus-infected isogenic strain 확보 전까지 바이러스 감염 표고버섯과 느타리버섯의 특징을 분석하는데 활용하였다 (그림 58).



[그림 58. 버섯바이러스 분석 연구에 이용한 표고버섯(*L. edodes*) 무바이러스(virus-free) 균주, 산조702와 바이러스감염(virus-infected)균주, 산조701; 느타리버섯(*P. ostreatus*) 무바이러스 (virus-free)균주, 춘추2호와 바이러스감염 (virus-infected)균주, 한라]

나. 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사

1) 버섯바이러스감염 표고버섯 산조701의 바이러스 정보 확보

느타리버섯 한라는 제 1협동팀에서 새롭게 분리한 PoSV 버섯바이러스가 감염되었음을 정확히 재확인하였으며, 표고버섯의 경우 LeHV 바이러스가 아닌 제 1협동팀에서 새롭게 분리한 LeSV와 99%의 상동성을 보이는 버섯바이러스로 감염됨을 확인하였다. 본 연구진은 산조 701에서 분리된 이 바이러스를 LeV-FMRI0339라 명명하고 다른 곰팡이바이러스, *Lentinula edodes* HKA mycovirus (LeV-HKA) (GenBank Accession No. AB646992), *L. edodes* HKB mycovirus (LeV-HKB) (GenBank Accession No. AB429556), *Phlebiopsis gigantea* mycovirus (PgV) (GenBank Accession No. AM111096), *Rosellinia necatrix* megabirnavirus (RnMV) (GenBank Accession No. AB512282), *Cryphonectria nitschkei* BS122 chrysovirus (CnV1) (GenBank Accession No. ACT79255), *Penicillium chrysogenum* virus (PcV) (GenBank Accession No. YP_392482), *Helminthosporium victoriae* 145S virus (Hv145S) (GenBank Accession No. YP_052858), Amasya cherry disease-associated chrysovirus (ACDAV) (GenBank Accession No. AJ781166), and Cherry chlorotic rusty spot associated chrysovirus (CCSAV) (GenBank Accession No. AJ781397)들의 RDRP(RNA-dependent RNA polymerase) 아미노산서열들과 alignment 분석을 실시하여 기존에 보고된 곰팡이 바이러스들과 유사성이 높음을 확인하였으며(그림 59) 특히 표고버섯바이러스들과의 DNA 염기서열 유사성을 조사한 결과 일본연구진이 보고한 LeV-HKA, LeV-HKB, 제 1협동팀에서 보고한 LeSV와 99%의 상동성을 보였다(그림 60). 이와같이 본 연구진이 연구에 활용하는 표고버섯바이러스 감염균주 산조701의 바이러스 정보를 정확히 분석하여 확보하였다.

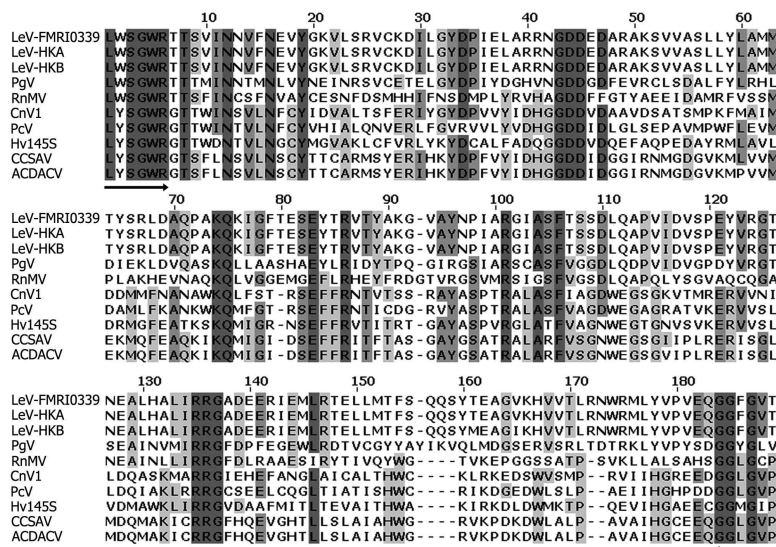


그림 59. 산조701의 버섯바이러스 LeV-FMRI0339의 부분 RNA-dependant RNA polymerase (RDRP) proteins과 다양한 곰팡이 바이러스들과의 alignment 분석

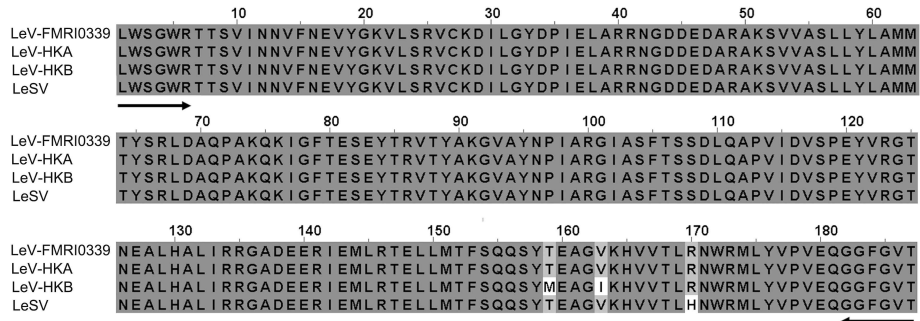


그림 60. 기존 보고된 표고버섯바이러스들의 RNA-dependant RNA polymerase (RDRP) proteins 조각과 산조701에 감염된 표고버섯바이러스 LeV-FMRI0339의 alignment 분석

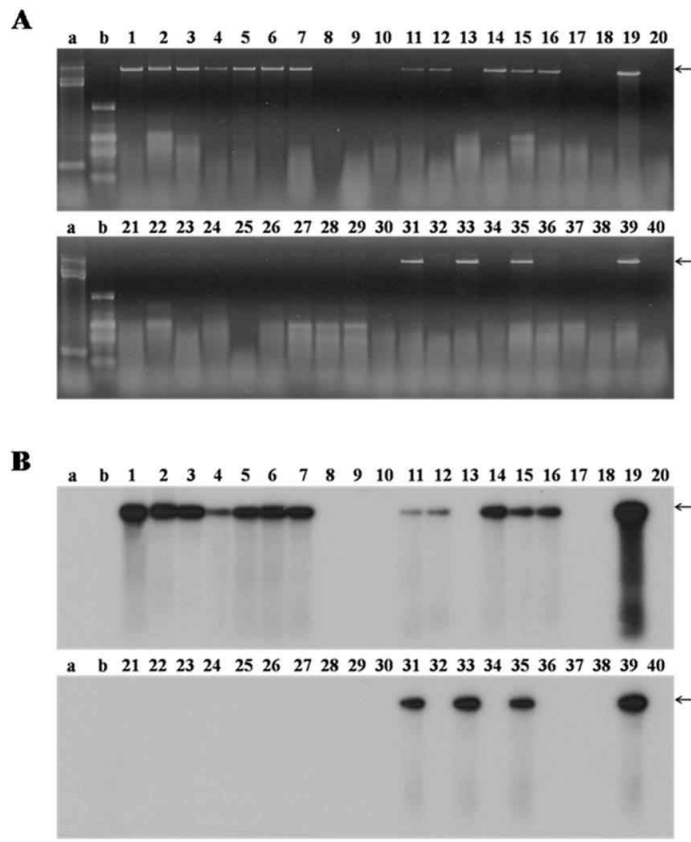
2) 버섯바이러스 다음세대 감염률 조사

버섯바이러스의 vertical transmission(다음세대 감염) 여부와 meiotic stability를 조사하여 버섯바이러스의 감염 위험률을 조사하여 연구정보로 활용하고 바이러스가 전달된 단핵균주와 전달되지 않은 단핵균주의 생리특성을 조사하였다. 본 연구진은 제 2협동팀으로부터 제공된 산조 701-버섯바이러스 감염 표고버섯의 자실체로부터 담자포자 100개를 계대배양한 agar block을 셀로판지위에서 올려 배양한 후 균사체를 각각 확보하여 dsRNA 분리하고 전기영동법으로 확인한 결과 버섯바이러스에 감염된 산조701의 100개 단핵균주 중 39개에서 바이러스가 관찰되었다. 이 결과로부터 LeV-FMRI0339 표고버섯바이러스가 약 40%의 높은 수직감염률을 보여 다음세대로 잘 전달되는 것으로 조사되었다. 정확한 확인을 위하여 40개의 단핵균주를 무작위 선별하여 각각의 dsRNA를 전기영동법으로 분리하고, LeV-FMRI0339의 RDRP 유전자절편을 probe로 이용하여 Northern blot analysis를 수행한 결과 40개의 단핵균주 중 1-7번, 11-12번, 14-16번, 19번, 31번, 33번, 35번, 39 번까지 총 17개의 dsRNA band 모두 LeV-FMRI0339 바이러스가 자손세대에 전달되었음을 관찰하였고 1차 확인하였던 40%의 수직감염률이 재확인되었다(그림 61). 본 결과를 통하여 바이러스 감염 균사체를 재배하여 자실체 형성을 시키고 이로부터 확보된 단핵균주들의 바이러스 전달여부를 통하여 버섯바이러스에 감염된 개체의 meiotic stability 특성을 새롭게 조사하였으며, 내용의 독특성을 인정받아 SCI급 논문 "The Plant Pathology Journal"에 2013년 보고되었다. 느타리버섯의 경우 본 실험이 과제수행 내용은 아니지만 느타리버섯에서의 다음세대 감염률 또한 조사하고자하였으나 단핵균주가 확보되지 않았다.

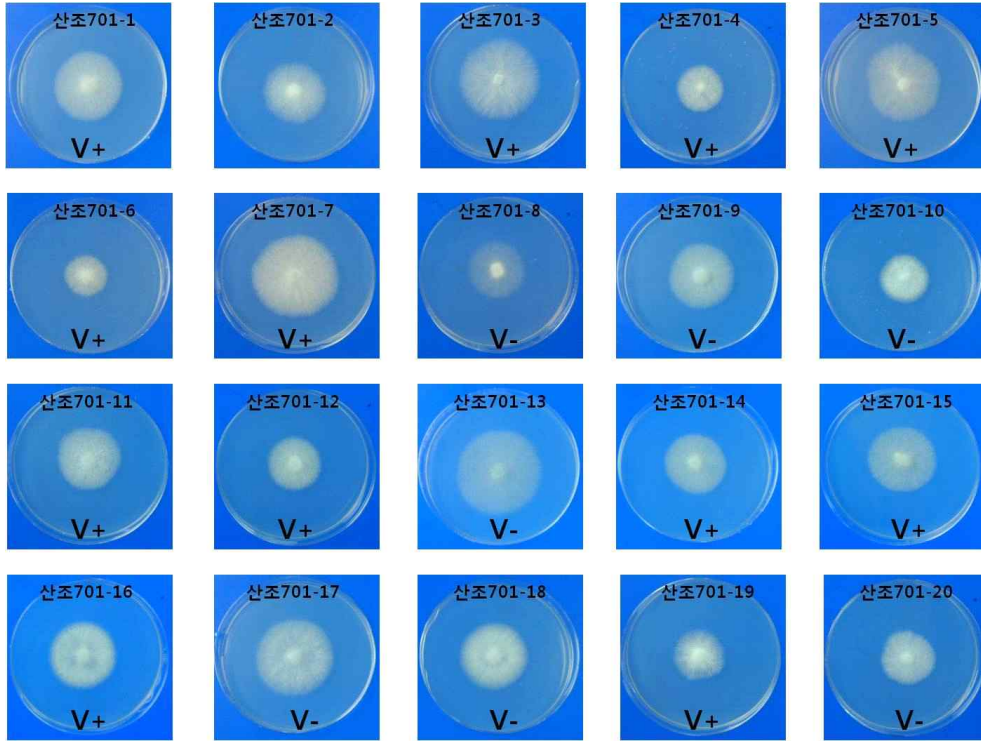
3) 버섯바이러스 단핵버섯균주 특성조사

바이러스 vertical transmission를 조사를 위해 Northern blot analysis에 사용하였던 산조 701 단핵균주 40개를 PDA와 V8 배지에 배양하는 등 형태학적 분석을 시도하였다 (그림 62-64). 전반적으로 V8에서 균사체 밀도가 현저히 높아짐을 관찰하였다. 각 단핵균주의 형태를 관찰하고 다음 단계로 성장속도와 균사체 mass를 확인하여 LeV-FMRI0339 바이러스

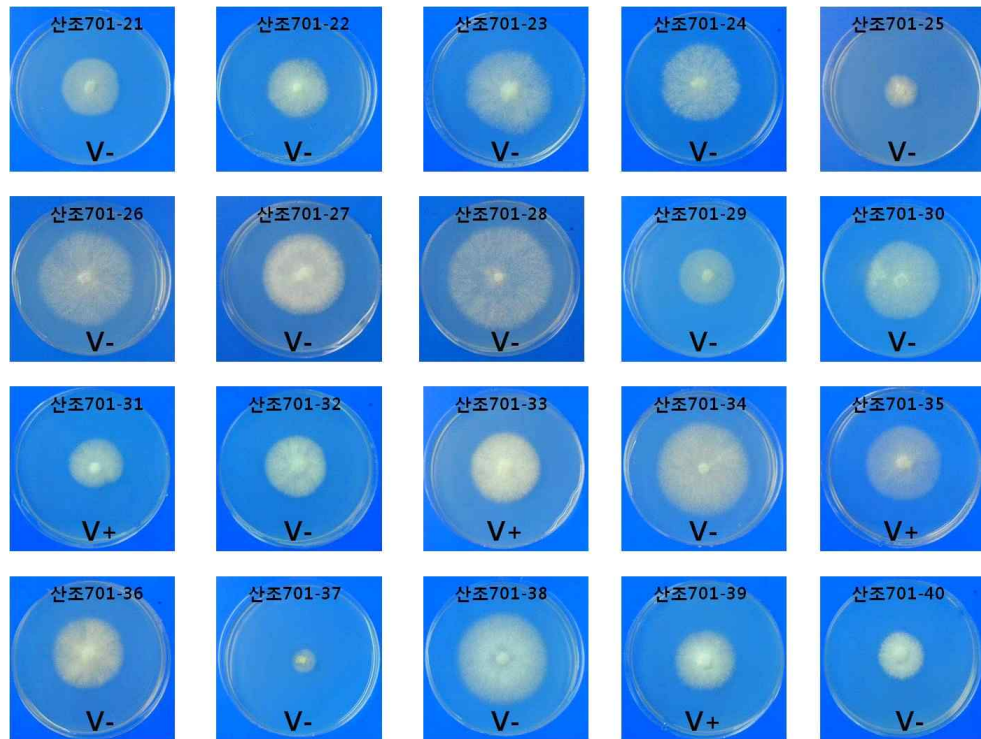
감염에 의한 단핵균주의 특성을 조사하였다. 바이러스 감염여부에 상관없이 단핵균주의 성장속도와 mass는 다양하며 계대배양에 따라 균주의 성장상태가 다양하게 변화 하는 것 또한 확인하였다(그림 65-66). 그러나 이러한 단핵균주의 성장 변화성에도 불구하고 바이러스가 감염된 단핵균주들은 성장속도 상위 10%안에 포함되는 균주가 2개 뿐이었으며 바이러스 감염균과 비감염균을 그룹으로 다시 그래프를 작성한 결과 바이러스 감염균들에서 성장속도가 높은 균주는 관찰되지 않았다. 이 결과로써 바이러스 감염이 버섯 균사체 성장속도에 영향을 미치는 것으로 판단된다(그림 67). 추가적으로 바이러스감염이 유전적교배를 통한 이핵균주형성에 영향을 미치는지 확인한 결과 모든 조건에서 이핵균주가 모두 형성되었고, 이 결과 바이러스가 유전적 교배에는 아무런 영향을 주지않음을 확인하였다 (그림 68).



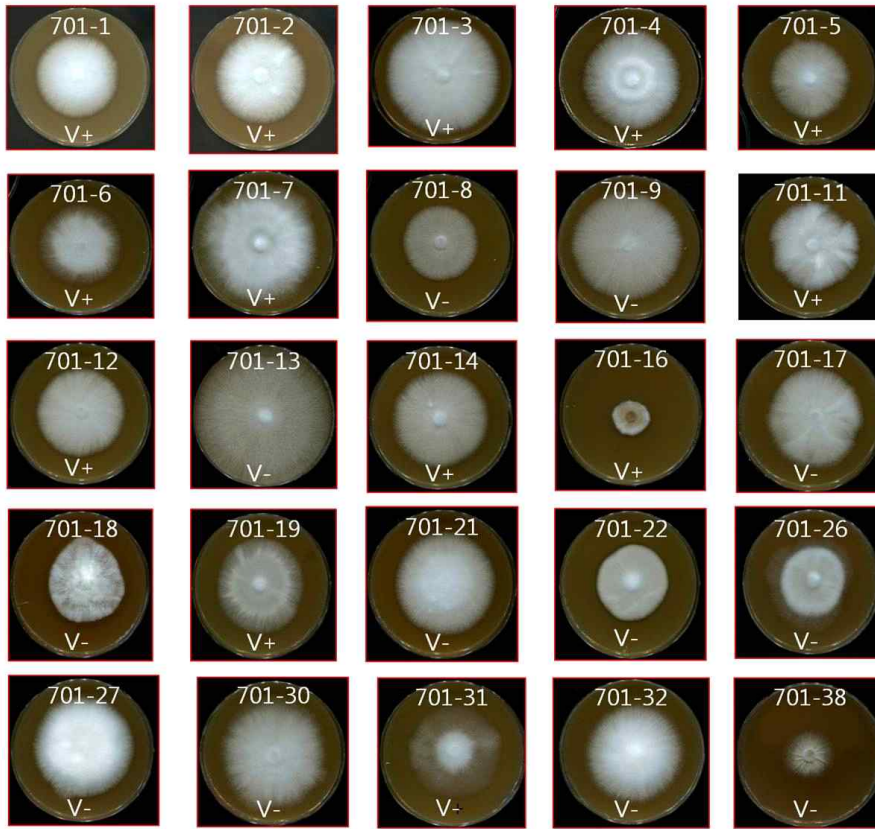
[그림 61. 산조701-표고버섯바이러스 감염균주로부터 분리된 단핵균주들의 dsRNA 바이러스 존재여부 확인을 위한 Northern blot analysis]



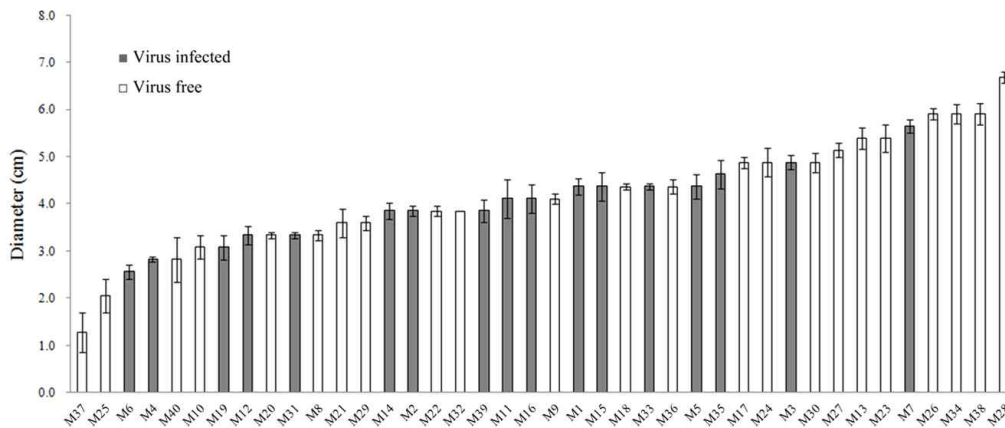
[그림 62. 산조701-버섯바이러스감염균주의 단핵균주 표현형관찰. 단핵균주 1번-20번 까지 PDA배지에서 관찰]



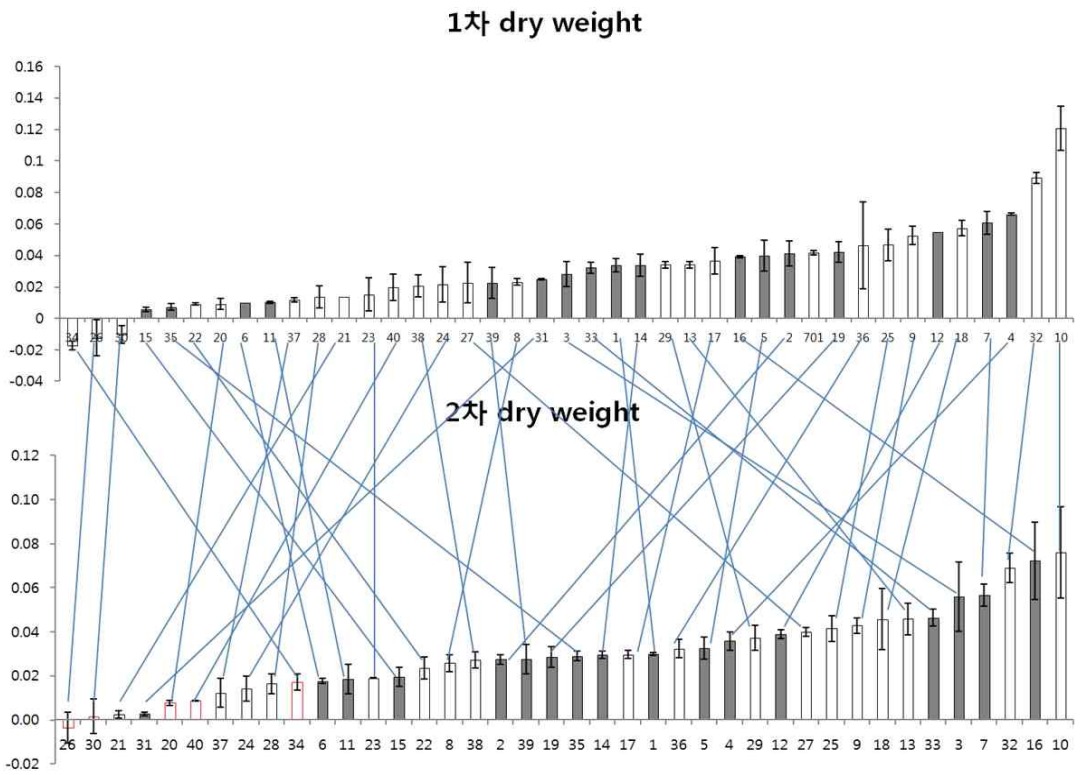
[그림 63. 산조701-버섯바이러스감염균주의 단핵균주 표현형관찰. 단핵균주 19번-40번 까지 PDA배지에서 관찰]



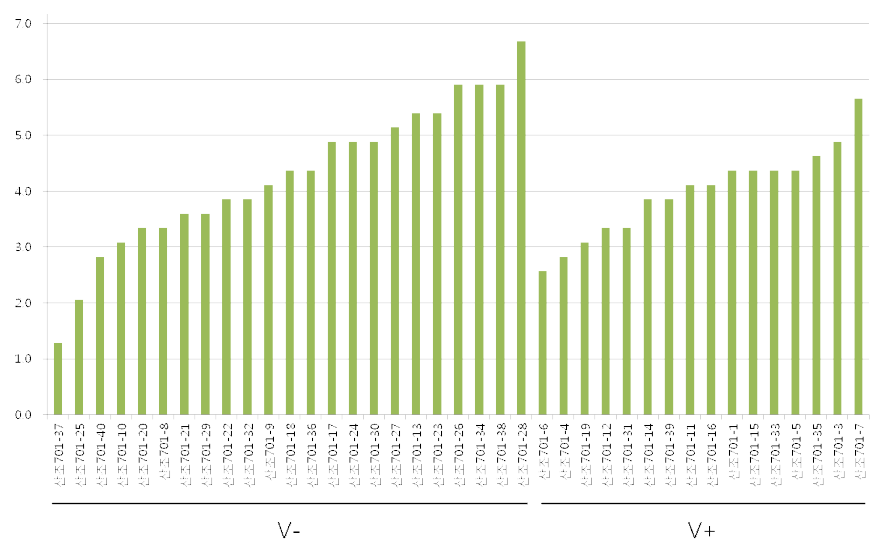
[그림 64. 산조701-버섯바이러스감염균주의 단핵균주 표현형관찰. 단핵균주 V8 배치에서 관찰]



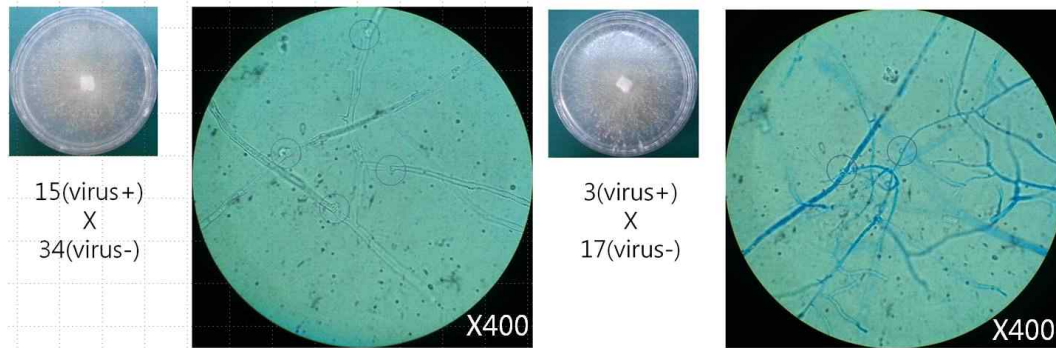
[그림 65. 단핵균주 40개의 성장비교 그래프. 표고버섯바이러스 LeV-FMRI0339가 감염된 17개의 단핵균주를 포함하여 총 40개의 단핵균주를 10일 배양 후 colony 크기 측정]



[그림 66. 단핵균주 40개의 군사체량 비교그래프. 표고버섯바이러스 LeV- MRI0339가 감염된 17개의 단핵균주를 포함하여 총 40개의 단핵균주를 셀로판지위에 10일 배양 후 군사체를 회수하여 건조중량 측정]



[그림 67. 단핵균주 40개의 성장비교 그래프. 표고버섯바이러스 LeV- FMRI0339가 감염된 17개의 단핵균주를 포함하여 총 40개의 단핵균주를 10일 배양 후 colony 크기 측정]



[그림 68. 단핵균주간의 유전적 교배를 통한 이핵균주 제작 후 clamp connection 확인작업]

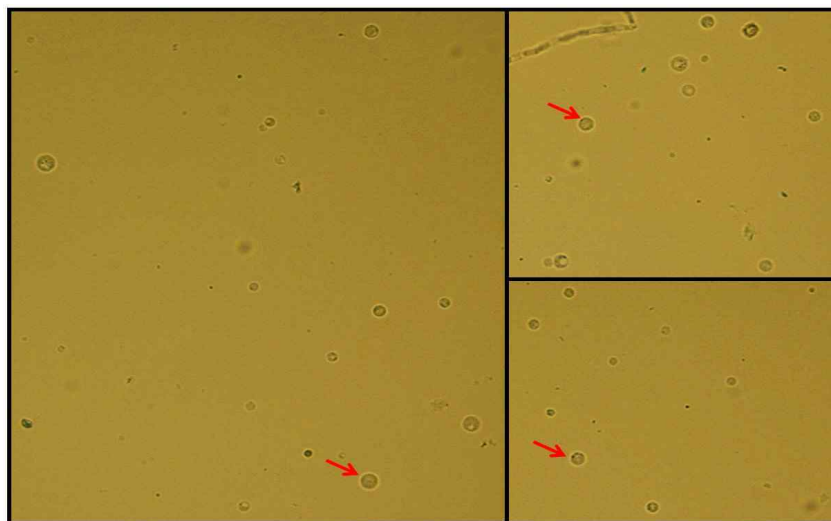
다. 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 인위적 버섯바이러스 감염

1) 버섯의 형질전환방법 개선

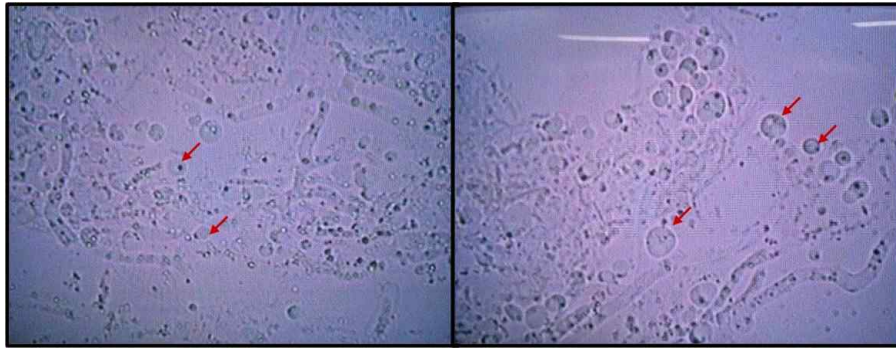
① protoplast 생성률 개선

표고버섯의 형질전환은 지금까지 여러 연구진들에 의해 수행되어져왔으나 protoplast 생성률이 저조하여 작업에 한계가 있는 것으로 보고되어져왔다. 본 연구진은 버섯바이러스의 기작규명을 위하여 효율이 높은 형질전환방법을 개선하고자하였다. 또한 버섯의 병원성 기작 관련 유전자 연구, 원형질체 융합을 통한 신품종 개발 및 표고버섯 기초연구 등의 후속연구를 위하여 본 연구이 보유한 곰팡이로부터 protoplast를 고효율로 생산기술을 활용하여 표고버섯균사체로부터 protoplast를 만들고자 시도하였다. 기존의 방법은 다음과 같다. 500 ml의 PDB 배지에 버섯균주를 접종 후 cell mass가 1 g 이상 되도록(균주 10조각을 접종해서 배양했을 때 3주 이상 배양) 배양하고 배양된 균주를 miracloth를 이용하여 harvest하여 washing buffer(0.6M MgSO₄)로 여러 차례 washing해준다. OM buffer(1.2M MgSO₄, 10mM NaH₂PO₄, 최종pH5.8)로 한차례 washing한 후 125 ml flask에 1 g의 균주와 10 ml의 OM buffer와 3가지의 효소(BSA, β-glucuronidase, novozym234)를 넣고 30°C에서 3-4 h 반응시켜준 후 현미경을 통해 protoplast가 만들어 졌는지 확인하였다. 하지만 만들어진 protoplast가 거의 없었고 위와 같은 방법으로 3차례 시도하였지만 protoplast가 만들어지지 않아 기존의 방법으로는 버섯 균주에서 protoplast를 얻는 것이 가능하지 않을 것 같다고 판단하였다. 본 연구진은 다양한 정보검색을 통하여 업그레이드 조건을 개발하여 표고버섯균사체로부터 protoplast를 다량 얻고자 실험을 수행하였다. 배양방법은 기존에 했던 것과 같고 균주를 washing할 때 썼던 0.6M MgSO₄ 대신 SM buffer(50mM succinate (pH5.6), 0.6M mannitol)를 사용하여 여러 차례 washing을 해주었고 효소와 함께 처리하였던 OM buffer

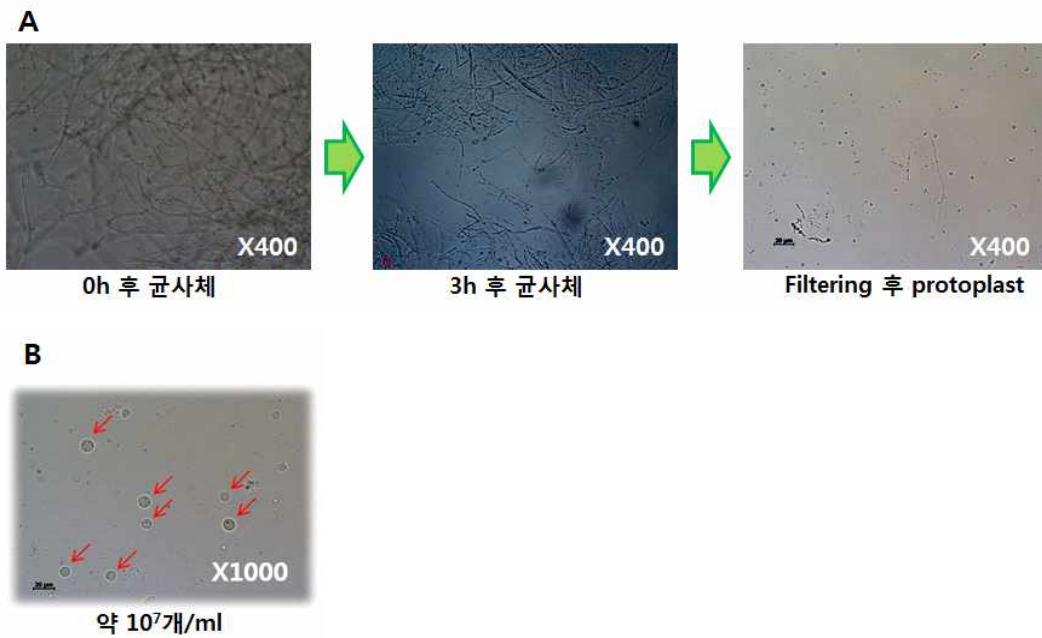
대신 SM buffer를 사용하고 기존에 사용하였던 3가지 효소에 2.5% cellulase onozuka RS(Yakult), 0.01% chitinase (Sigma)를 더 첨가하여 28℃에서 3-4h 반응시켜주었다. 반응 후 현미경을 통해 protoplast가 만들어 졌는지 확인하였고 기존의 방법을 통해 얻을 수 없었던 protoplast가 새로운 방법으로는 만들어지는 것을 확인할 수 있었다. 효소처리 후 만들어진 protoplast를 40 μ m nylon mesh를 이용하여 filtering한 후, STC buffer(10mM Tris-Cl(pH 7.5), 10mM CaCl₂, 1.2M sorbitol)에 suspension하여 개수를 측정한 결과 1.7 \times 10⁶/ml 개의 protoplast가 생성된 것을 확인하였다(그림 69, 70). 본 연구진은 연구과제기간 동안 지속적으로 생산률을 높이기 위해 꾸준한 시도를 하였고 평균 10⁷/ml 개 이상의 protoplast 생성 매뉴얼을 최종 다음과 같은 실험방법을 구축하여 형질전환에 본격적으로 활용하였다(그림 71). 많은 수의 표고버섯 균사체를 얻기 위해 25℃에서 2주간 셀로판지를 올린 PDA 고체배지 위에 배양 후, 균사체를 회수하여 25℃에서 1주 간 액체배양하고 블라인더로 파쇄된 균사체를 100 μ m filter에 여과하여 작은 균사체 조각을 얻은 후, 25℃에서 정치배양을 1주 실시하여 많은 수의 어린 표고버섯 균사체를 얻었다. 많은 량의 표고버섯 균사체에 cellulase onozuka, chitinase, glucanex와 같은 다양한 효소를 처리한 후, 30℃에서 3-4 h 반응시킨 후, 현미경을 통해 protoplast 생성여부를 확인하였으며, 3시간 후 40 μ m filter에 여과하여 약 10⁷개/ml 이상의 protoplast를 얻을 수 있었다(그림 71). 또한 표고버섯의 형질전환 성공가능성 및 protoplast의 진위여부를 조사하기위하여 protoplast regeneration test 수행하였고 일반 PDA배지(A)와 0.6M sucrose가 첨가된 PDA배지(B)에서 표고버섯 protoplast의 재생 비율을 확인하였고, 그 결과 약 15%의 protoplast가 재생되는 것을 확인하여 형질전환의 성공가능성을 확인할 수 있었다 (그림 72). 본 연구진의 Protoplast 생성방법개발로 인하여 형질전환방법을 한 층 개선시킨 것으로 사료된다.



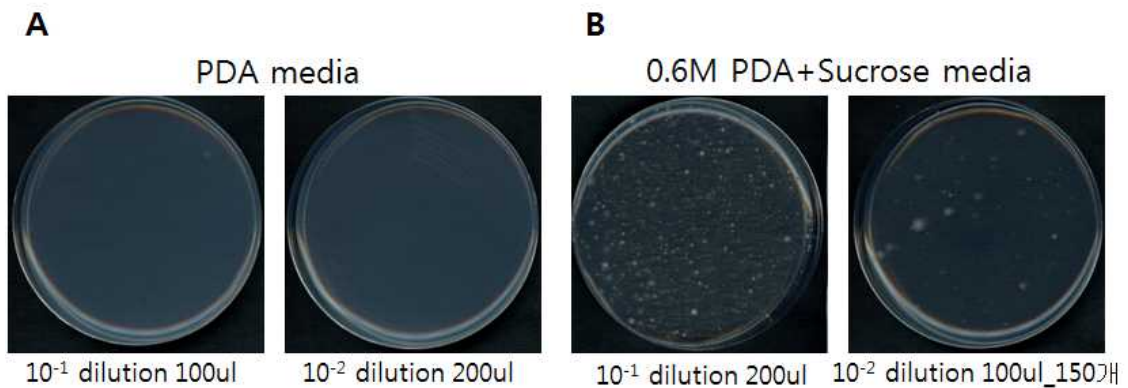
[그림 69. 표고버섯 균사체로부터 확보한 protoplast]



[그림 70. 표고버섯 균사체로부터 확보한 protoplast]



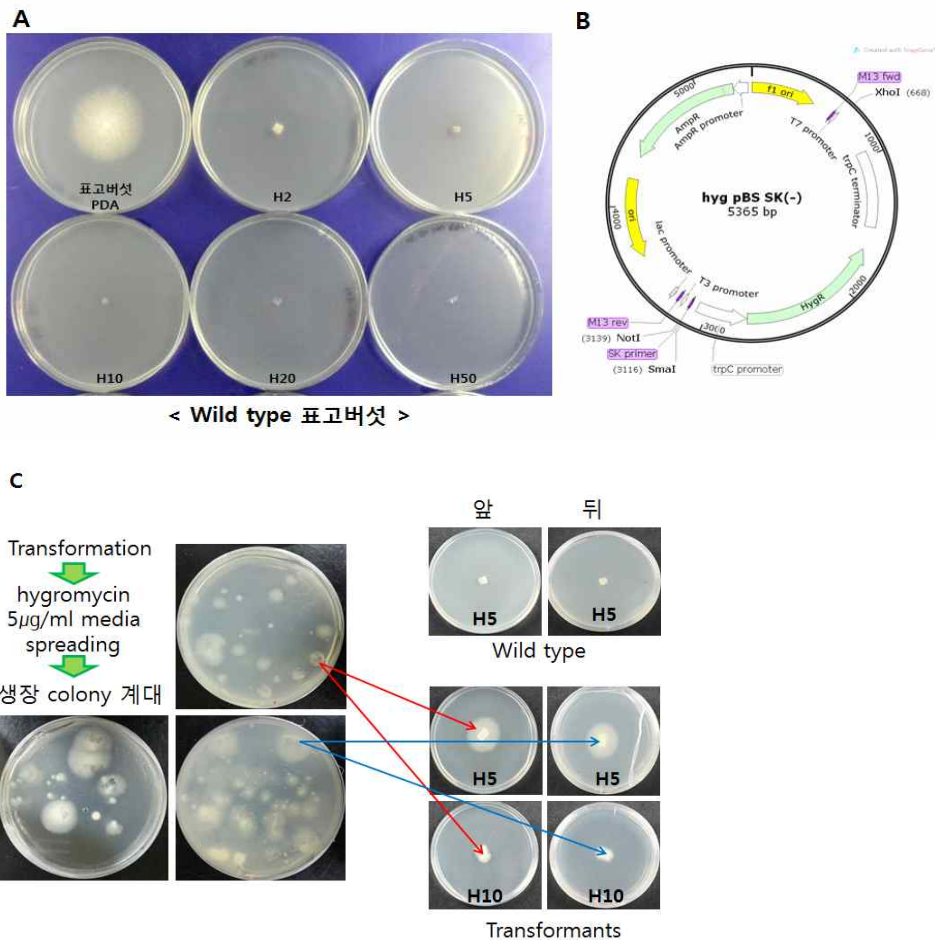
[그림 71. (A) 표고버섯 protoplast 생성과정, (B) 많은 수의 표고버섯 protoplast]



[그림 72. (A) PDA 배지에 접종한 protoplast, (B) 0.6M sucrose를 첨가한 PDA 배지에 접종한 protoplast]

② 형질전환방법 구축

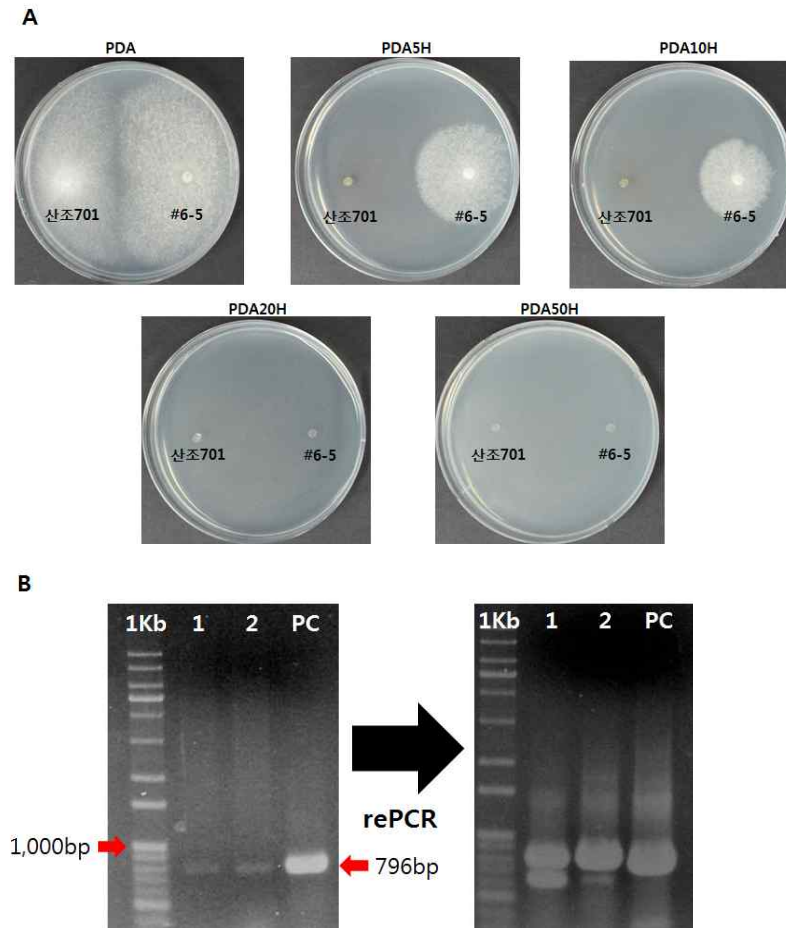
버섯바이러스의 인위적 감염시도 전에 각 버섯의 형질전환방법을 구축하여야하였다. 느타리버섯의 경우 protoplast 생성 뿐 아니라 형질전환도 1차 실험수행에서 성공적인 결과를 확보하여 연구진행에 무리가 없었으나 표고버섯의 경우 protoplast를 이용한 형질전환 방법 구축 또한 해결해야하는 문제였다. 본 연구진은 새로운 protoplast 생성방법으로 확보된 protoplast를 이용하여 형질전환방법 또한 구축하였다. 1차적으로 선택마커로 사용가능한 항생제를 조사하기 위하여 virus-free type 표고버섯 균사체를 여러 농도의 hygromycin PDA 배지에 접종하여 배양하였고, 그 결과 5 μ g/ml의 hygromycin PDA 배지에서 표고버섯이 자라지 못하는 것을 확인하였다(그림 73). 또한 표고버섯의 형질전환(transformation) 가능성을 확인하기 위하여 대표 selective marker gene인 hygromycin B 저항유전자를 삽입한 벡터를 제작하여 본 연구팀이 가진 고유의 방법으로 표고버섯균주의 형질전환을 수행하였고 성공적으로 항생제 저항성을 가지는 표고버섯 형질전환체를 다수 확보하였다(그림 73). 이 결과는 바이러스 병원성 기작연구 뿐만 아니라 표고버섯의 다양한 분자유전학적 연구 및 분자유종이 국내에서도 가능해짐을 시사하는 중요한 결과라 사료된다.



[그림73. (A) Wild type 표고버섯의 hygromycin 항생제 저항성테스트, (B) 표고버섯 형질 전환에 이용한 HygromycinB vector, (C) 형질전환 후 항생제저항성을 가진 표고버섯배양]

③ 형질전환체의 형질전환 여부 확인

Hygromycin 배지에서 자라는 표고버섯을 wild type과 함께 10 μ g/ml 농도의 hygromycin 첨가배지에 접종하여 분리 계대 배양하여 관찰하였고, 항생제 저항성이 확인된 표고버섯 형질전환체의 균차체로부터 genomic DNA를 추출하여 hygromycin gene의 삽입여부를 PCR을 통해 확인하였다(그림 74).



[그림 74. (A) 여러 농도의 hygromycin PDA 배지에 버섯형질전환체의 항생제 저항성 조사 (B) 형질전환체의 형질전환여부 조사를 위한 PCR수행]

2) 형질전환을 통한 버섯바이러스 인위적 감염시도

버섯바이러스 병징과 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학과 단백질체학 수행을 위해서 1차년도와 2차년도 연구초반까지 버섯바이러스 병원성 기작 기반연구에 사용하였던 virus-free와 virus-infected isogenic strain인 표고버섯 2균주(산조702, 701)와 느타리버섯 2균주들(춘추2호, 한라)은 그룹간에 유전형이 100% 일치하는 isogenic strain이 아니므로 최적의 비교군은 될 수 없었다. 정확한 버섯바이러스의 병원성 기작을 연구하기 위하여 유전형이 서로 완벽히 일치하는 무바이러스 표고버섯 및 느타리버섯의 바이러스 감염 isogenic strain의 확보가 절실히 요구되었다. 1차년도 형질전환을 통해 무바이러스 균주를 숙주로 이

용하기 위하여 protoplast 생성효율을 증가시키는 실험조건을 1차 성립하였고 지속적인 업그레이드를 통하여 높은 protoplast 생산률조건을 최종수립하여 형질전환에 사용하였다. 확보된 표고버섯과 느타리버섯의 protoplast에 1차년도 제작된 표고버섯바이러스, 느타리버섯 바이러스 유전체삽입 발현벡터와 LeHV, LeSV, LeV-FMRI0339 버섯바이러스입자와 느타리의 PoSV, OMSV 바이러스 입자를 각각 반복수행적으로 형질전환하였다.

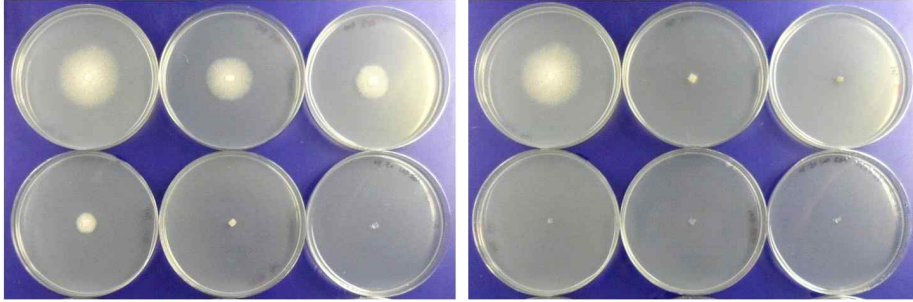
① 바이러스 입자를 이용한 형질전환시도

1차적으로 바이러스입자를 형질전환하는 방법을 시도하기 위하여 다음과 같은 방법으로 바이러스입자를 분리하였다. 버섯균사를 세포 파쇄기를 균일하게 파쇄시킨 뒤 원심 분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 후, 10% PEG 6000을 이용해 상등액 내 바이러스를 침전시키고 침전물을 증류수로 현탁하여 원심분리하고 상등액을 초원심분리하여 바이러스 입자의 침전물을 얻었다. 이 침전물을 증류수에서 현탁하고, 바이러스 입자들을 50% CsCl(1.583g/cm)에서 16시간동안 초원심분리하여 분획하여 분리하였다. 각 표고버섯과 느타리버섯의 개선된 protoplast 생성방법을 이용하여 protoplast를 확보한 후 바이러스 입자를 혼합하여 형질전환을 시도하였다. 약 100여 개의 형질전환체를 확보하였으며 total RNA 분리한 후 전기영동 방법으로 바이러스 감염여부를 조사하였다. 이 방법은 항생제 선택마커 등을 사용할 수 없으므로 작업의 반복성과 대량 확인 요구로 다수의 형질전환체를 확보하여 연구하였으나 바이러스 감염 균사체를 확보하기 이전에 virus-free 균주를 다른 실험방법으로 확보하는데 성공하여 더 이상 진행할 필요가 없었다.

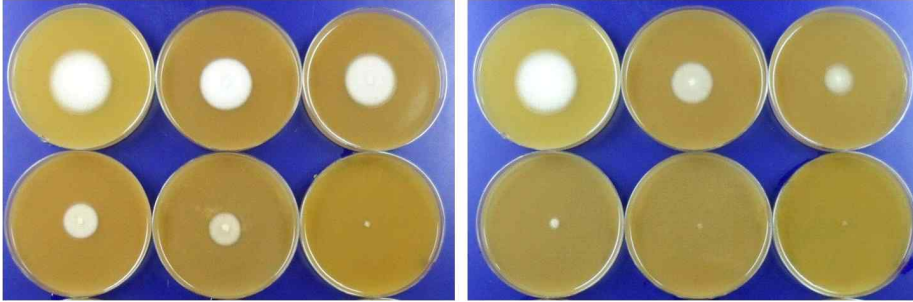
② 바이러스 유전체 발현벡터를 이용한 버섯 형질전환

2차적인 방법으로는 형질전환에 사용될 바이러스 유전체 발현벡터를 제작하였다. 표고버섯과 느타리버섯 각각의 발현을 위하여 hygromycin과 geneticin 저항성 유전자를 선택마커로 도입하였으며, 각각의 바이러스로부터 확보된 cDNA의 5'과 3'에 *Aspergillus* spp.의 tryptophan promoter region과 terminator region을 연결하여 최종 벡터를 제작하였다. 또한 형질전환 작업에 앞서 버섯균사체의 항생제 마커 test를 수행하였다. PDA와 V8배지에서 다양한 버섯균사체의 MIMIC test를 추가적으로 진행한 결과 모두 geneticin 50 ug/ml, hygromycin 10 ug/ml이 최소농도인 것으로 조사되었다 (그림 75). 그 결과를 바탕으로 형질전환체를 얻기 위한 작업을 진행하였고 유전자 삽입여부가 확인된 형질전환체의 바이러스 생성여부를 확인하였다. CC41을 활용한 dsRNA, trizol 용액을 이용한 total RNA 분리방법을 이용하여 20 여개 이상 분석 진행하였으나 확보하지 못하였다. Isogenic strain 확보를 위한 새로운 실험방법을 꾸준히 연구하여 본 연구진은 새로운 virus-free 균주 제작방법을 개발하였으며 더 이상 형질전환을 통한 isogenic 균주 개발은 진행할 필요가 없었다. 본 연구결과는 표고버섯의 형질전환 방법을 효율적으로 구축하였다는 것만으로도 국내외적으로 큰 의미가 있는 것이라 사료된다.

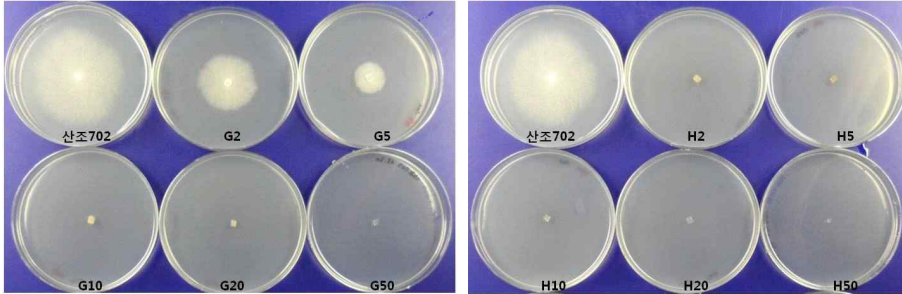
PDA 배지 산조701



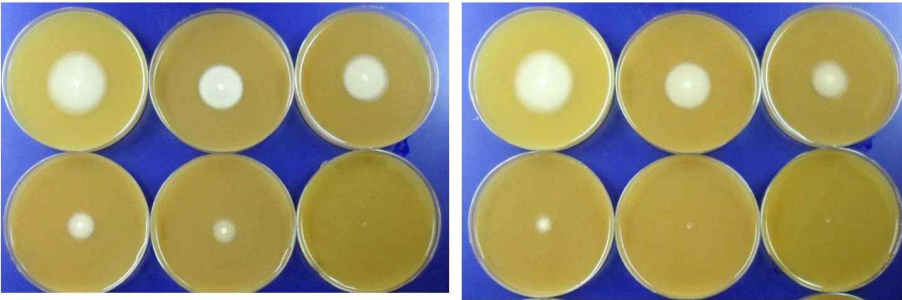
V8 배지 산조701

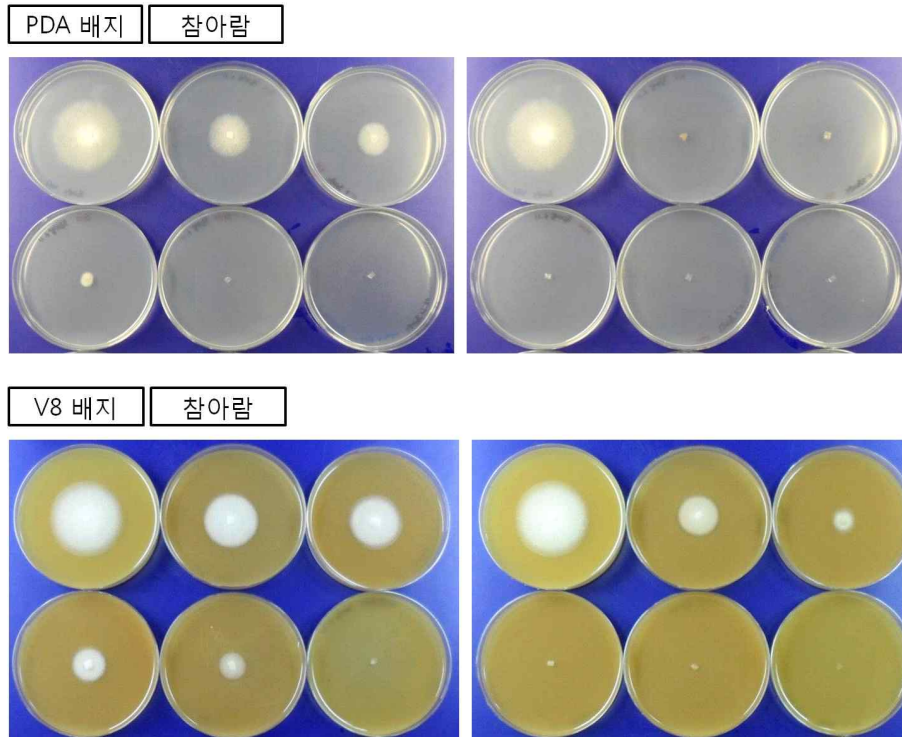


PDA 배지 산조702



V8 배지 산조702





[그림 75. 표고버섯균사체의 hygromycin, geneticin 항생제 마커 test]]

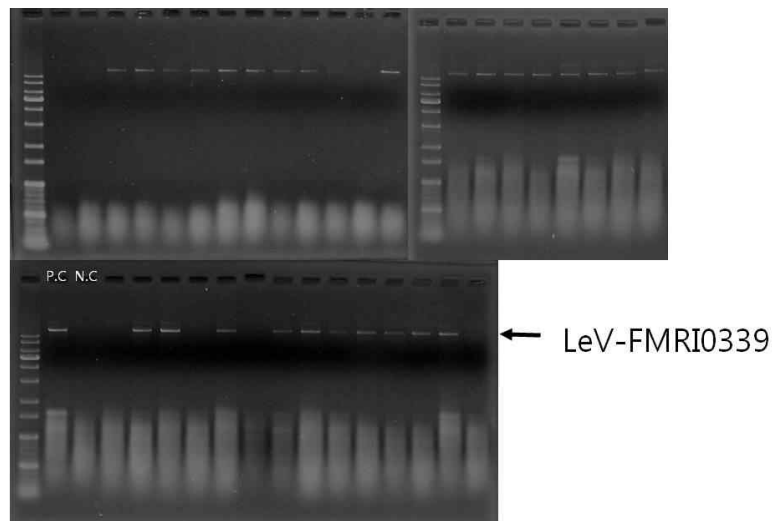
3) 균사체 절편을 이용한 곰팡이바이러스 제거방법 개발 및 무바이러스균주 확보

Isogenic strain 확보를 위한 새로운 실험방법의 개발이 절실히 요구되는 바 본 연구진은 화학약품을 이용한 곰팡이바이러스 제거방법은 균사체의 변이를 유발할 수 있으므로 곰팡이의 성장에 변화를 주지 않는 자연적인 제거방법을 도안하였다. 곰팡이의 모든 균사체에 바이러스가 다 전달되지 않는다는 연구논문을 아이디어로 하여 버섯바이러스가 감염된 표고버섯균주 산조701(LeV-FMRI0339)은 4주 이상, 느타리버섯균주는 2주 이상 빛차단 조건에서 장시간 배양한 후 균사를 멸균수로 현탁하여 수집한 후, 수집한 균사액을 분자체(molecular sieve)로 여과하고 회석하여 작은 조각의 균사체를 확보하고 진균 배양 배지에 도말 배양하였다(그림 76). 새롭게 형성된 콜로니 중 바이러스에 감염되지 않은 진균을 dsRNA 확인방법으로 1차 선별하였다(그림 77). 그 결과 35개의 colony 중 8개의 virus-free 균주를 확인하였으며(그림 78) 단순히 dsRNA 분리가 성공하지 못해서인지 실제 virus-free type 균주 확보가 성공적으로 이루어졌는지 확인하기 위하여 균주들을 재배양한 후 균사체를 확보한 후 dsRNA를 분리하고 전기영동 및 Northern blot analysis를 통하여 최종 확인한 후 3개의 비교균을 무작위 선별하였다(그림 77-78). 3개의 virus-free 균주는 RT-PCR 및 Northern blot analysis로 최종 확인된 산조701의 virus-free isogenic 균주 3개를 선별하여(그림 79) 바이러스 감염된 균주의 병리학적 특성조사 및 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행을 위한 실험균으로 사용하였다. PoSV 버섯바이러스가 감염된 느타리버섯, 한라 또한 동일한 방법으로 50개의 colony를 확보하여 전기영동으로 바이러스 존재여부를 1차 확인한 후 12개를 분리 선별하여 전기영동 및 Northern blot analysis를 통

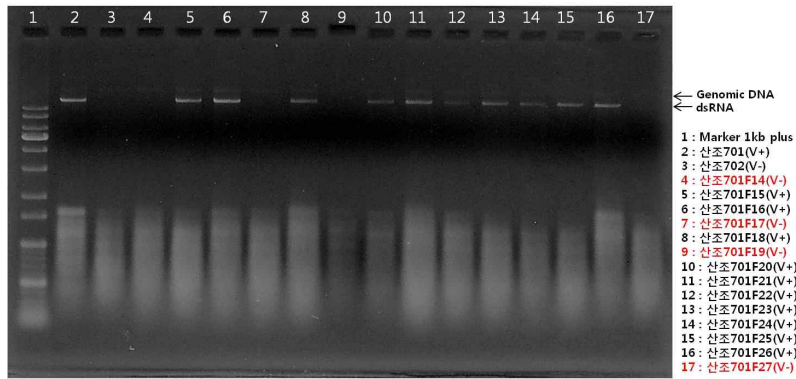
하여 한라 virus-free isogenic 균주를 12개 확보하였다(그림 80). 이러한 새로운 방법은 특허 출원을 통하여 연구의 독창성을 보장받고자 하였고, 수익성이 좋은 표고버섯의 경우 3개 중 2개를 선별하여 *Lentinula edodes* FMRI 0339/Sanjo701-vf1과 *Lentinula edodes* FMRI0339/Sanjo701-vf2란 명명으로 국제특허기탁(그림 81)을 하였으며 향후 상품으로 활용하고자한다. Virus-free type의 곰팡이 균주를 확보하는 실험은 각 실험실마다 병원성기작 연구를 위하여 반드시 확보하고자하는 필수 실험균주이나 확보가 어려우며 그 방법 자체가 특허가 되는 활용가치가 높은 방법이다. 본 연구진은 버섯바이러스의 병원성 기작을 정확히 관찰할 수 있는 균주가 확보된 것이며 이는 연구목표를 성공적으로 달성한 결과라 사료된다.



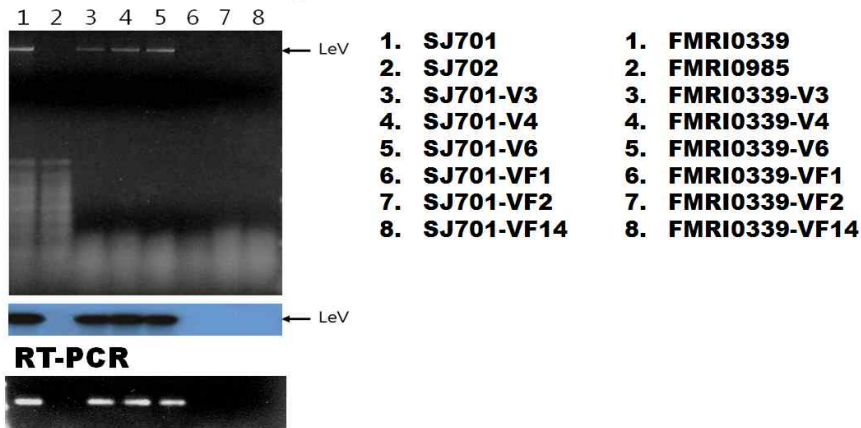
[그림 76. 분사체로 여과된 작은 절편의 표고버섯 균사체]



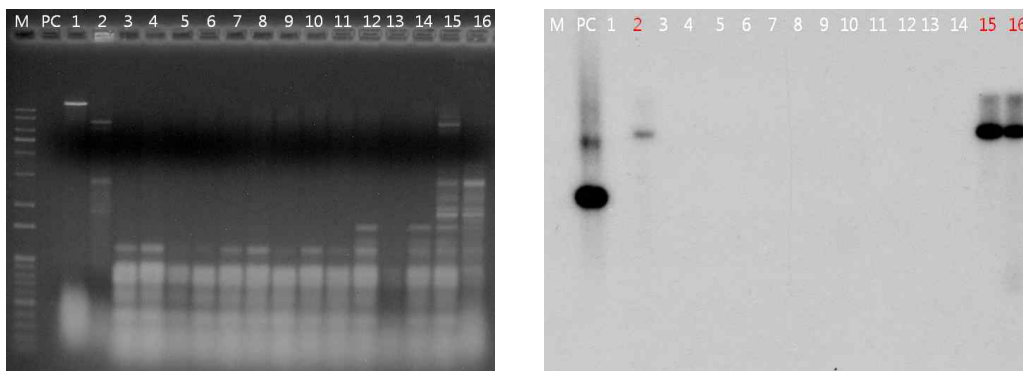
[그림 77. 산조701의 균사체 절편을 이용한 무바이러스 균주 확인작업]



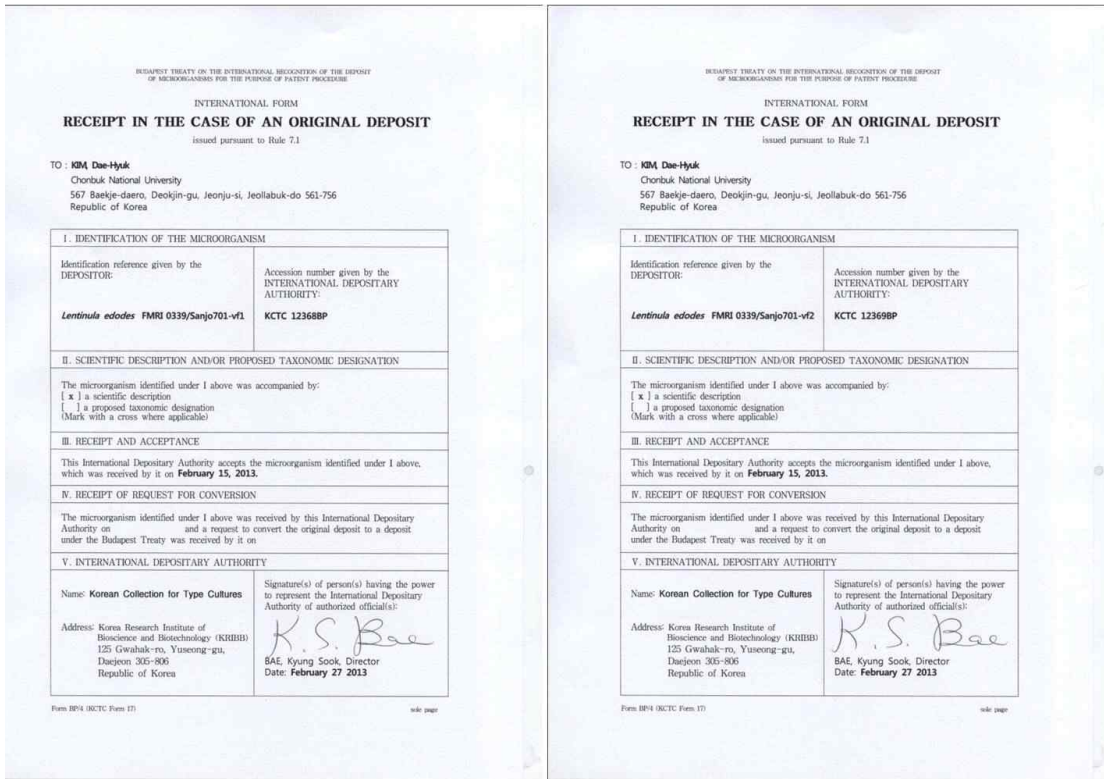
[그림 78. 산조701의 무바이러스 isogenic 균주 확인을 위한 dsRNA 확인실험]



[그림 79. 최종 확보된 표고바이러스 free 균주의 바이러스 존재여부확인을 위한 RT-PCR 및 Northern blot analysis]



[그림 80. 느타리버섯 virus 존재여부 확인을 위한 전기영동 및 RDRP 유전자 절편을 이용한 Northern blot analysis, Lane 1: 산조701, Lane 2: 느타리버섯-한라, virus-infected 균주 Lane 3-14: virus-free isogenic strain. Lane 15: 한라, virus-infected strain. Lane 16: virus-infected strain(V8 배지에서 배양)]



[그림 81. virus free균주 특허 기탁증서 (vf1=산조701F2, vf2=산조701F14)]

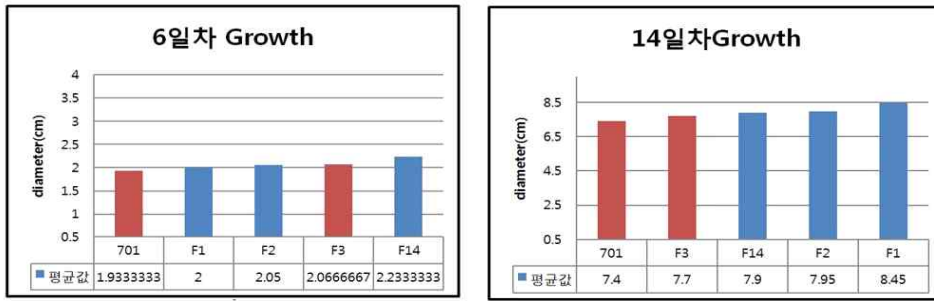
라. Virus-free 버섯균주와 virus-infected 버섯균주의 병리학적 특성조사

1) 표고버섯 isogenic 균주들의 형태학적 비교 관찰

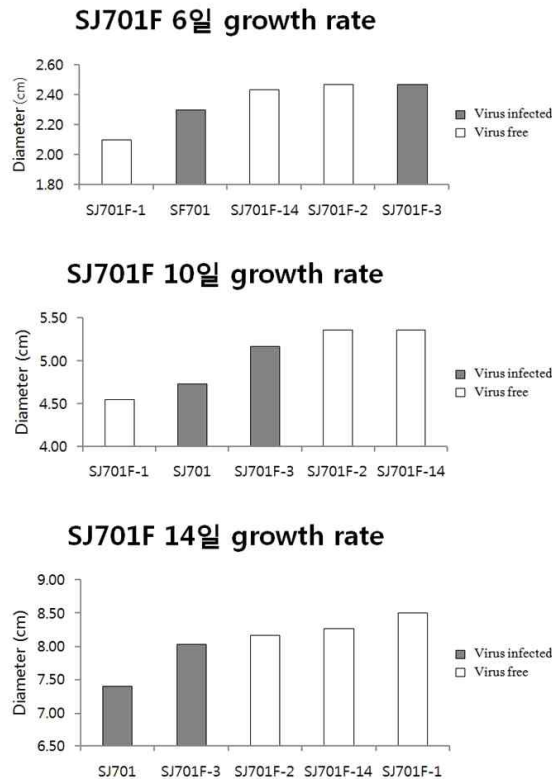
① 표고버섯 isogenic 균주들의 1차 growth rate 비교분석

산조701은 국내 농가에서 재배률이 아주 높은 버섯이지만 최근 환경의 변화에 적응성이 약하고 수확률이 저하되는 문제점이 발생하여 후속 표고버섯균주 품종의 개발이 절실히 요구되는 바 제 2협동 과제팀인 산림버섯연구소에서 본 연구과제 진행 이외에 많은 연구인력을 투입하여 교배균주를 다양하게 개발하고 있는 실정이다. 본 연구과제의 연구결과를 통하여 산조701의 이러한 재배문제점의 발생이 LeV-FMRI0339라 명명한 버섯바이러스의 감염이 원인일 것으로 추정하였으며, 성공적으로 확보된 virus-free type 균주들과 virus-infected 산조701 균주들의 다양한 형태를 비교분석하여 상세한 바이러스의 기작을 연구하고자하였다.

일차적으로 대표배양배지 PDA에 산조701 virus-infected 균주(701, F3)와 virus-free 균주(F1, F2, F14)를 6일, 10일, 14일 간격으로 배양한 후 colony의 직경을 측정하여 각 균주들의 성장속도를 비교분석하였다(그림 82, 83). 그 결과 배양시간이 길어질수록 virus-free 균주에 비해 virus-infected 균주의 성장률이 낮음을 2 반복 실험 모두에서 확인하였다. 특히 virus-free 균주 중 F1의 성장률이 최대였다. F1은 표고버섯 상품균주의 후보균이 될 수 있는 가능성을 보이는 결과였다고 사료된다.



[그림 82. 산조701 virus-infected 균주(701, F3)와 virus-free 균주(F1, F2, F14)의 성장 속도 1차 비교 분석실험]



[그림 83. 산조701 virus-infected 균주(701, F3)와 virus-free 균주(F1, F2, F14)의 성장속도 2차 비교 분석실험]

② 표고버섯 isogenic 균주들의 2차 growth rate 비교분석

바이러스에 감염된 표고버섯균주들의 growth rate를 상세히 비교하기 위해 11가지의 배지를 사용하였다(표 26). 산조701 virus-infected 균주(산조701)와 virus-free 균주(F1, F14)를 11가지의 배지에 각각 접종하여 배양한 후 colony의 직경을 측정하여 각 균주들의 성장속도를 비교 분석하여 통계적 처리를 수행하였다(표 27). 그 결과 두 가지 배지를 제외한 모든 배지에서 virus-free 균주가 virus-infected 균주보다 colony diameter값이 크게 나타났다. 여섯 가지의 배

지(MCM, ME, MYPA, PDA, YM, YMPG)에서는 두 virus-free 균주 모두가 virus-infected 균주와 비교하여 colony diameter 값이 높게 관찰되었다. 세 가지 배지(Czapek-dox, sawdust, YMG)에서는 모든 virus-free 균주에서 colony diameter가 virus-infected 균주보다 높았지만, 통계학적으로 증명하기에는 어려움이 있으며 Hamada 배지에서도 마찬가지로 virus-infected 균주의 colony diameter는 virus-free 균주보다 높았지만 통계학적으로 증명할 수는 없었다. V8 juice 배지에서 virus-infected 균주는 virus-free 균주인 F14에 비해 colony diameter가 상당히 높게 나타났지만 배양 10일 이후의 측정에서는 stationary growth rate를 나타낸 다른 strain과는 다르게 F14 균주가 plate의 끝에 닿을 때 까지 linear growth rate를 보였다. 따라서 10일 이후의 diameter가 거의 유사하기 때문에 growth rate에 큰 차이가 없다고 말할 수 있다. 이러한 결과는 virus-free 균주의 growth rate가 전반적으로 virus-infected 균주보다 높다는 결과가 통계적으로 유의하다는 것을 나타낸다(그림 84).

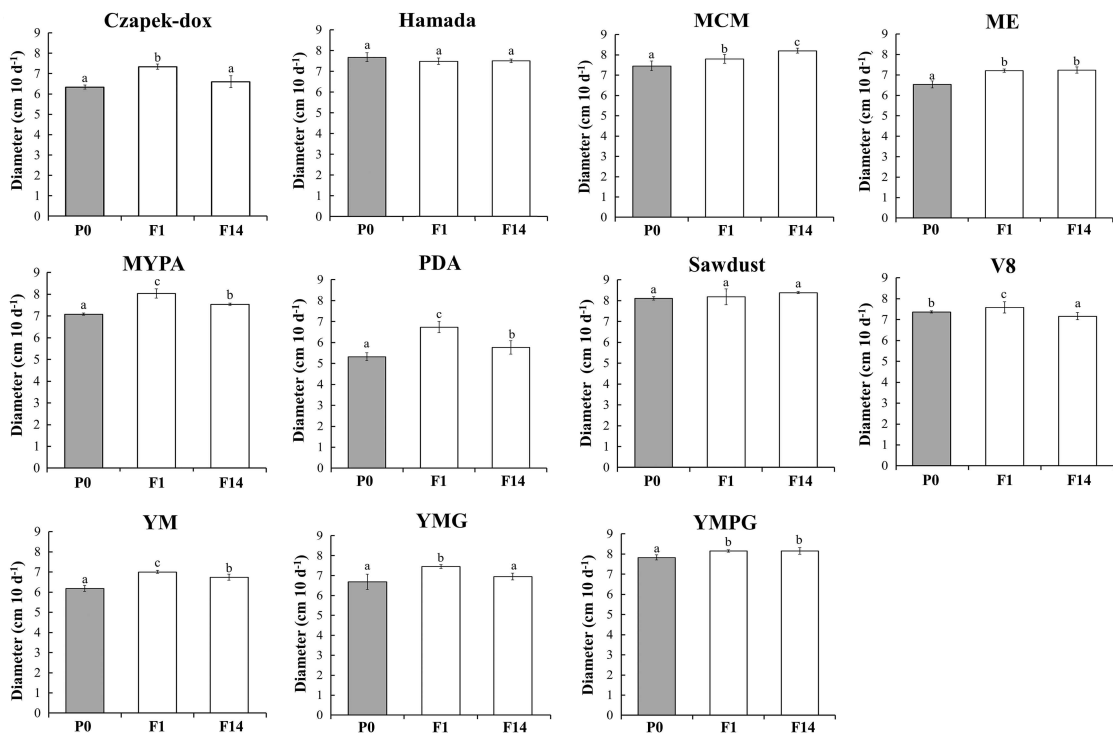
표 26. Virus-free 표고버섯균주의 형태학적 비교분석을 위한 11가지 배지 조성

Composition (g l ⁻¹)	Media										
	Czapek -dox	Hamada	MCM	ME	MYPA	PDA	Sawdust	V8	YM	YMG	YMPG
Agar	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
CaCO ₃								3.0			
Asparagine											1.0
FeSO ₄	0.01										
Glucose		20.0	20.0						10.0	4.0	10.0
Hyponex		2.0									
KCl	0.5										
KH ₂ PO ₄			0.46								2.0
K ₂ HPO ₄	1.0		1.0								
Malt extract				20.0	30.0		3.0		3.0	10.0	10.0
Maltose											
MgSO ₄	0.5		0.5								1.0
NaNO ₃	2.0										
Oak sawdust							150.0				
Peptone			2.0	5.0	1.0				5.0		2.0
Potato dextrose						24.0					
Sucrose	30.0						20.0				
Thiamine HCl											1.0
V8 juice								200.0			
Yeast extract		2.0	2.0		2.0				3.0	4.0	2.0

MCM: mushroom complete media, ME: malt extract agar, MYPA: malt-yeast-peptone agar, PDA: potato dextrose agar, YM: yeast-malt agar, YMG: yeast-malt-glucose agar, YMPG: yeast-malt-peptone-glucose agar

표 27. virus-infected 균주와 virus-cured 균주의 growth rate와 mycelial dry weight 통계분석

	Growth rate (cm)	Mycelial mass (mg of dried weight)
Virus-infected L. edodes FMRI0339	6.95 ± 0.83 ^{a*} (5.10 - 8.20)	11.73 ± 8.5 ^a (2.2 - 44.6)
Virus-cured L. edodes FMRI0339-vf-1	7.42 ± 0.83 ^b (6.40 - 8.40)	14.73 ± 11.4 ^{ab} (0.6 - 47.8)
Virus-cured L. edodes FMRI0339-vf-14	7.29 ± 0.75 ^b (5.70 - 8.40)	17.67 ± 8.1 ^b (1.9 - 36.3)



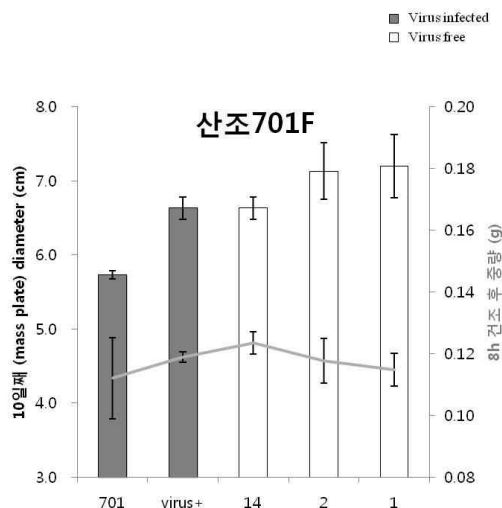
[그림 84. 11가지 배지로부터 virus-free strain과 virus infected strain의 growth rate 분석]

③ 표고버섯 isogenic 균주들의 균사체량 비교분석

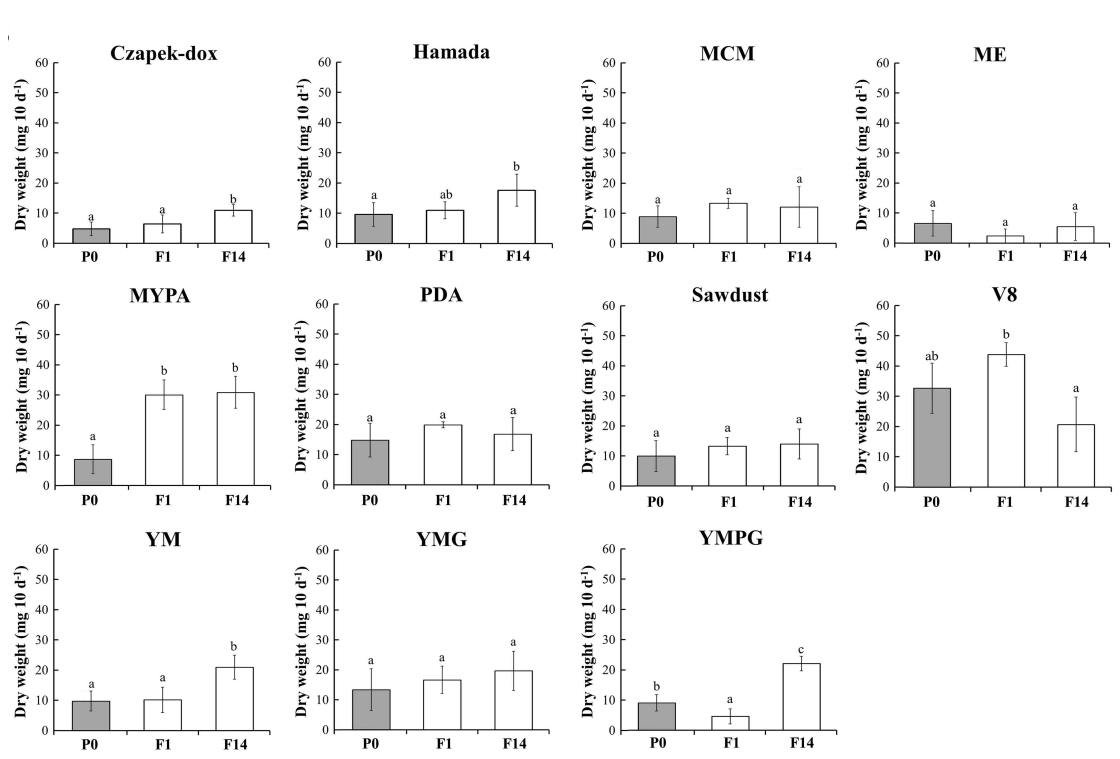
추가적으로 동일한 실험균들의 균사체중량을 대표배지 PDA에서 반복 측정하였고 그 결과는 virus-free 균주들 F1 또는 F14가 가장 큰 값을 보였으나 그 값 차이가 virus-infected 균주와 큰 차를 보이지는 않았으므로 균사체 중량은 바이러스감염과 연관되어 있지 않은 것으로 사료된다(그림 85).

Mycelial dry weight는 여덟가지 배지(Czapek-dox, Hamada, MCM, MYPA, PDA, Sawdust, YM, YMG)에서 virus-infected 균주가 virus-free 균주들 보다 낮은 것으로 나타났다. 일부 virus-free 균주에서 mycelial dry weight가 높은 값을 보였으나, 통계적으로 증명하기 힘들다. ME와 V8 juice 배지에서는 virus-infected 균주가 하나 또는 두 개의 virus-free 균주보다 mycelial dry weight값이 높게 나타났고 YMPG 배지에서는 virus-infected 균주가 virus-free 균주인 F1보다 높지만 F14 균주 보다는 상당히 낮은 값으로 나타났다. 배양 배지에 따라서 균주들 간에 다양한 mycelial dry weight 값을 나타내어 정확한 결과 유추를 위하여 통계적 분석이 요구되었다(그림 86).

최종적으로 Growth rate와 mycelial dry weight에서 virus가 미치는 영향을 알아보기 위해 SPSS version 15를 사용한 ANOVA로 통계분석을 실시하였다(표 27). Virus-free 균주(F1, F14)의 growth rate는 virus-infected 균주(산조701)보다 상당히 높게 나타났으며 F1, F14 두 균주 간에는 값의 차이가 없었다. 이것은 LeV의 존재가 fungi의 growth rate에 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 하지만 mycelial dry weight에서는 virus-infected 균주와 virus free 균주들이 11가지 배지에서 통계적으로 모든 것이 뒷받침되지는 않았다. virus-free 균주 F14의 dry weight 평균값은 virus-infected 균주보다 높게 나타났지만, F14와 virus-infected 균주간의 차이가 크지 않았고 또한 virus-free 균주 F1의 dry weight 평균값은 virus-infected 균주보다 높은 것으로 나타났다(표 27).



[그림 85. 산조701 virus-free 균주(701, F3)와 virus-infected 균주(F1, F2, F14)의 성장속도]



[그림 86. 산조701 virus-free 균주(701, F3)와 virus-infected 균주(F1, F2, F14)의 건조중량분석결과]

2) 느타리버섯 isogenic 균주의 형태학적 비교 관찰

수 년 전 느타리버섯의 경우 버섯바이러스에 감염된 느타리종균이 보급되어 재배농가에 아주 큰 피해를 주어 사회적 물의를 일으킨 적이 있다. 그러나 최근 무바이러스 느타리버섯이 분양된 이후로 농가피해가 전반적으로 해결이 된 상태이다. 느타리버섯바이러스와 버섯바이러스를 검출하는 시스템은 제 1협동팀에 의해서 진행되었으나 느타리버섯바이러스의 병원성기작에 대해서는 밝혀진 바가 거의 없었다. 이러한 이유로 본 연구진은 표고버섯의 병원성기작 뿐만 아니라 느타리 버섯바이러스 기작연구도 진행하고자하였으며 앞 연구결과에서 언급한 바와 같이 PoSV 버섯바이러스가 감염된 느타리버섯-한라의 균사체 절편으로부터 최종 확보된 균주들 중 무작위 선별된 2개의 virus-free isogenic 균주와 PoSV 감염 느타리 버섯의 형태를 대표배지 PDA에서 1차 비교분석하였다. 그 결과 virus-free isogenic 균주에 비해 PoSV 바이러스 감염시 MM 배지와 같은 열악한 환경에서 성장률이 더 떨어지는 것을 확인하였다. 느타리버섯바이러스 PoSV 또한 느타리에 감염되어 균사 성장을 저해하는 것으로 사료된다 (그림 87, 88).

추가적으로 virus-infected 균주와 virus-free균주의 상세한 비교 관찰을 위해 11가지 종류의 배지에서 growth rate를 조사하였다(표 28). 25°C incubator에서 성장하였으며 2일 간격으로 8일 까지 growth rate를 측정하였다. Virus-infected 균주의 성장이 가장 느리게 관찰된 배지는 Czapek, ME, Sawdust, YMG 배지였으며 virus-free 균주가 sawdust 및 V8배

지에서 높은 growth rate를 나타내었다. Sawdust에서는 virus유무와 상관없이 균사체가 다른 배지에 비해 좀 더 compact하게 자라는 것을 볼 수 있었다. Virus-free균주가 11가지 배지에서 virus-infected 균주보다 평균적으로 growth rate가 조금 더 높다는 것을 알 수 있었으며 균사체의 density역시 virus-free균주가 조금 더 높은 것으로 관찰되었다(그림 89). 이 결과는 느타리버섯바이러스 PoSV가 느타리버섯의 균사성장을 저해한다는 본 연구진의 가설을 뒷받침하였다.

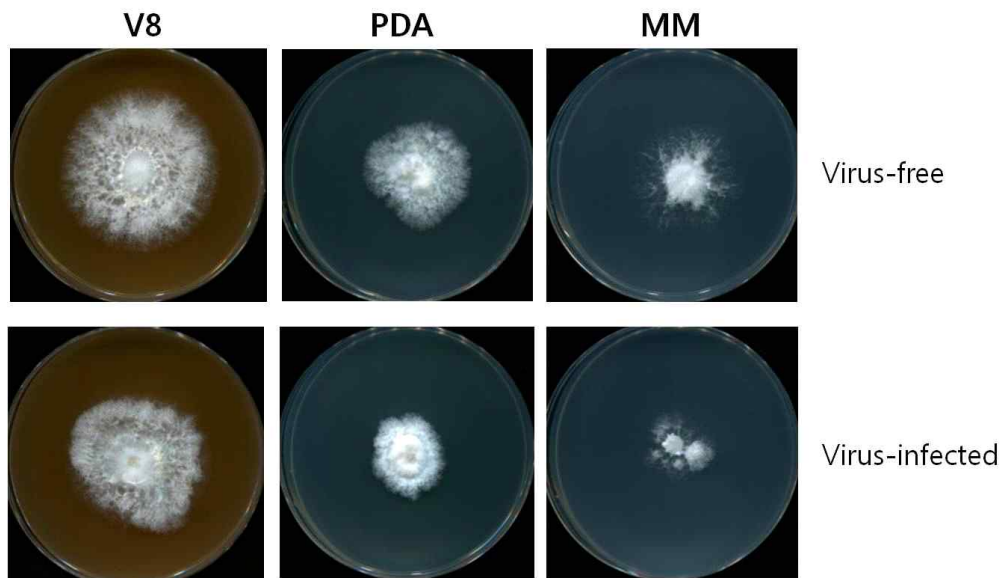


그림 87. 느타리버섯 한라의 virus-free 균주와 virus-infected 균주의 표현형관찰

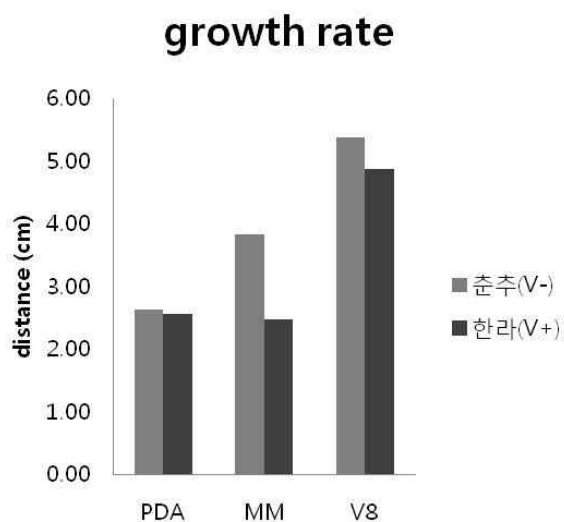
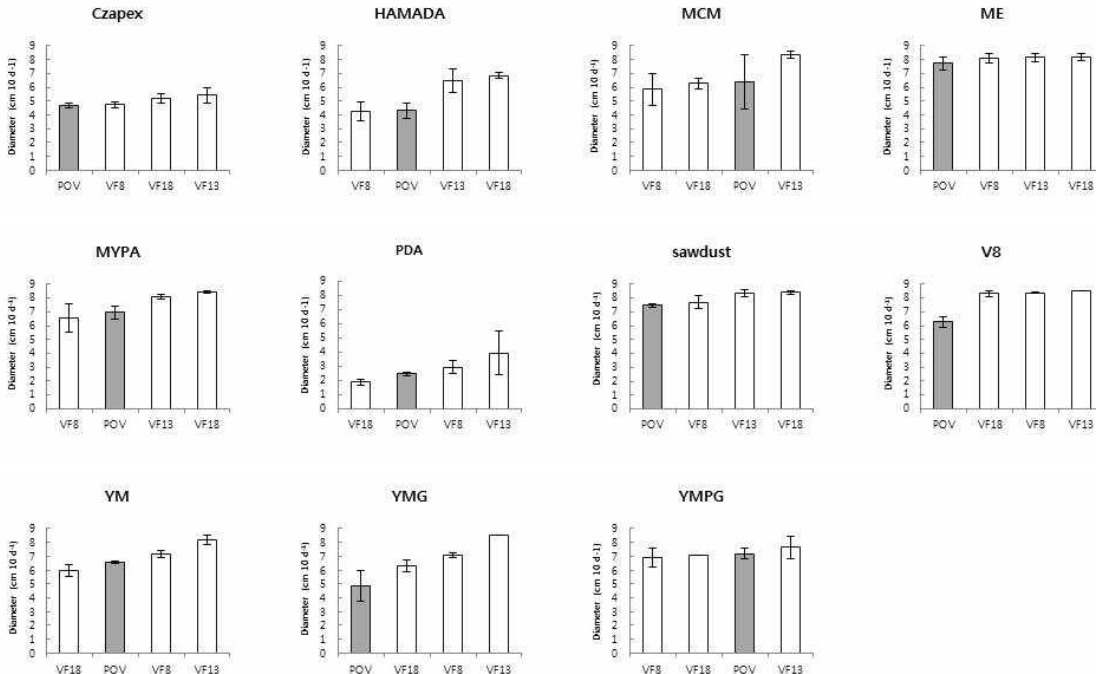


그림 88. 느타리버섯 한라의 virus-free 균주와 virus-infected 균주의 성장률조사

표 28. Virus-free 느타리버섯균주의 형태학적 비교분석을 위한 11가지 배지 조성

	Medium and Composition (g/L)										
	PDA	V8	MCM	MYPA	ME	YM	YMPG	YMG	Czapek-dox	Hamada	Sawdust
Potato dextrose	24.0										
Glucose			20.0			10.0	10.0	4.0		20.0	
Maltose											
Sucrose									30.0		20.0
Peptone			2.0	1.0	5.0	5.0	2.0				
Malt ex.				30.0	20.0	3.0	10.0	10.0			3.0
Yeast ex.			2.0	2.0		3.0	2.0	4.0		2.0	
Thiamine HCl							1.0				
DL-Asparagine							1.0				
K ₂ HPO ₄			1.0						1.0		
KH ₂ PO ₄			0.46				2.0				
MgSO ₄			0.5				1.0				
CaCO ₃		3.0									
NaNO ₃									2.0		
KCl									0.5		
FeSO ₄									0.01		
V8 juice		200.0									
Hyponex										2.0	
Oak sawdust											150.0
Agar	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0

PDA : potato dextrose agar, MCM : mushroom complete media, MYPA : malt-yeast-peptone agar, ME : malt extract agar, YM : yeast-malt agar, YMPG : yeast-malt-peptone-glucose agar, YMG : yeast-malt-glucose agar



[그림 89. 11가지 배지로부터 virus-free strain과 virus infected strain의 growth rate 분석]

3) 버섯자실체의 비교분석을 통한 바이러스 병리학적 특성조사

① 표고버섯 자실체 비교분석을 통한 배양조건

위의 형태학적 분석 결과를 확보한 후 virus감염이 버섯 자실체에 미치는 영향을 조사하여 바이러스 감염의 병리학적 특성을 조사하고자 하였다. 본 연구진은 자실체 비교를 통한 바이러스의 병리학적 특성을 분석하기 위하여 표고버섯바이러스감염 균주와 무바이러스표고버섯 균사체를 제 2 협동팀의 대형 실증재배를 위해 버섯은 virus-free 균주(F1, F2, F14)와 virus-infected 균주(산조701, F3, F4)를 산림버섯연구소에 분양하였다. 또한 본 연구진은 협동팀의 버섯재배지가 지리학적으로 주관기관과 원거리임을 감안하여 미니버섯온실(그림 90)을 본 기관의 시설팀 지원으로 제작하여 추가 연구진에 의해 반복 관찰이 가능하게 노력하였으며, 다양한 자실체 샘플링이 용이하였다. 주관기관은 협동기관 산림버섯연구소와 별도로 추가적인 병리학적 특성조사를 위한 소규모 실험을 위하여 표고버섯 균사체 배양이 완료된 후 각 균주당 톱밥배지 100 봉투에 접종하여 주관기관의 버섯재배온실에서 배양하면서 약 8주 동안 관찰하였다.



[그림 90. 주관기관-전북대학교의 미니버섯재배온실]

② RT-PCR법을 이용한 표고버섯 자실체 샘플내의 바이러스 존재여부확인

자실체 실증실험을 진행 중인 톱밥배지에 접종된 *L. edodes* virus-infected 균주(산조701, VF3)와 virus-free 균주(F2, F14)의 균사체로부터 LeV 바이러스 존재유무를 확인하였고(그림 92), 실험 과정 중 바이러스 감염균주에서 형성된 자실체의 바이러스 존재유무를 확인하여 균사체에서 자실체로 버섯바이러스가 전달되는지 다음과 같은 방법으로 조사하였다. 각 버섯 자실체로부터 dsRNA를 추출하여 random primer로 1차 RT-PCR로 DNA template를 만들고 LeHV primer를 이용해 2차 specific PCR을 수행하였다. 그 결과 virus-free 균주 F2, F14들은 예상한 대로

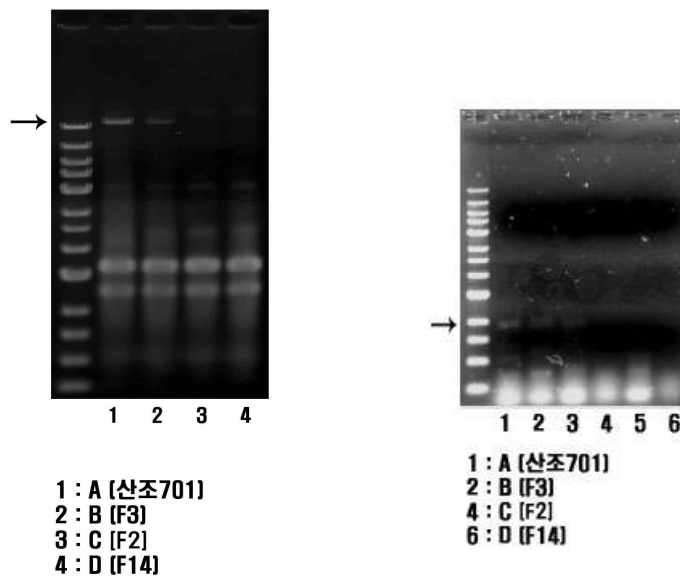
LeHV 바이러스가 존재하지 않았고 virus-infected 균주인 산조701, VF3에는 바이러스가 전달되어 존재하는 것을 확인하였으며 이는 균사체에 존재하는 바이러스가 자실체에도 여전히 전파되는 특성을 가지고 있기 때문이다(그림 91-92).

RT-PCR 조건

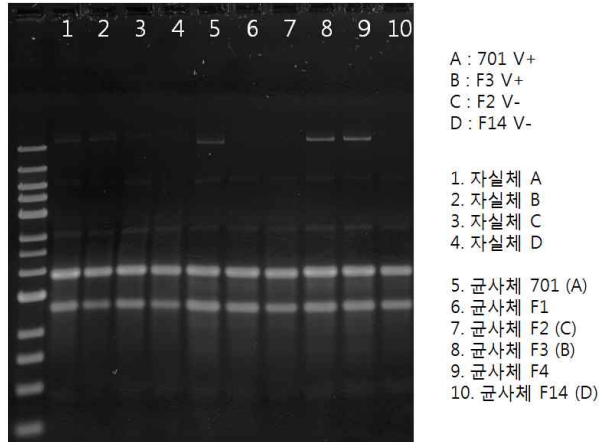
RT-PCR cycle		Temp.	Time
1 cycle	cDNA synthesis	25℃	5 min
	PCR amplification	40℃	60 min
	enzyme inactivation	70℃	15 min
		72℃	30 sec

2nd-PCR 조건

2nd-PCR cycle		Temp.	Time
1 cycle	Initial denaturation	95℃	5 min
15 cycle	Denaturation	94℃	1 min
	Annealing	50℃	1 min
	Extension	72℃	1 min 40 sec
20 cycle	Denaturation	94℃	1 min
	Annealing	55℃	1 min
	Extension	72℃	1 min 30 sec
1 cycle	Final extention	72℃	1 min



[그림 92. 자실체 발현 실증시험에 접종된 균주의 dsRNA 바이러스 존재여부 확인]



[그림 92. 자실체 균사체로부터 dsRNA 바이러스 존재여부확인]

③ 표고버섯 톱밥배지에서의 균사성장률 조사 및 자실체 발생

Virus 감염이 버섯 자실체에 미치는 영향을 조사하기 위해 virus-infected 균주(산조701, VF3)와 virus-free 균주(F2, F14)를 분양하여 배양하였다. 균사의 성장 및 배지의 갈변화 속도가 가장 빠르게 나타났던 균주는 VF3 strain(virus-infected)과 F14 strain(virus-free)으로 관찰되었으나 자실체의 발생량이 VF3 strain이 가장 낮고 F14 strain에서 가장 많이 발생된 것으로 보았을 때 표고버섯 봉지재배에서 균사의 성장속도와 자실체 발생은 크게 연관되어 있지 않다고 볼 수 있다(그림 92). 암배양 조건에서 표고버섯 톱밥배지의 균사가 배지 전체로 성장된 후 명배양으로 전환하여 톱밥배지의 바닥까지 갈변화가 진행되었을 때 봉투를 개봉하고 버섯의 발생을 유도하였다(그림 93-95). 1차 자실체 수확이 완료되었을 때 휴면기를 가진 후 2차 자실체 발생을 진행하였다. 본 연구진의 1차 자실체 관찰에 어려움이 있어 데이터를 활용하지 못하였으며 2차 자실체 관찰의 경우 virus-free 균주인 F2와 F14가 virus-infected 균주인 산조701, VF3보다 현저히 높은 자실체 형성률을 나타내었다. 특히 대표 농가보급용 표고균주인 산조 701의 자실체 형성보다 virus-free 균주들은 최소 1.9 배에서 최대 2.7 배까지 자실체 형성 증가율을 보였다(그림 96). 현재도 주관기관인 전북대학교는 추가적인 병원성 기작 연구를 위한 샘플링을 위하여 8월 표고버섯바이러스 감염균주와 무바이러스 균주가 접종된 톱밥배지를 산림버섯연구소로부터 재차 분양받아 배양 중이다.

(mm) \	산조701	F3	F2	F3
0	7	39	8	21
10~19	13	11	20	11
20~29	12	13	33	18
30~39	20	10	10	7
40~57	28	3	3	10
톱밥배지 수	79	78	74	67



[그림 92. 톱밥배지에서의 균사 성장을 조사]



[그림 93. 표고버섯 봉지재배 균사성장 후 갈변화의 과정]



1 day

2 days

3 days

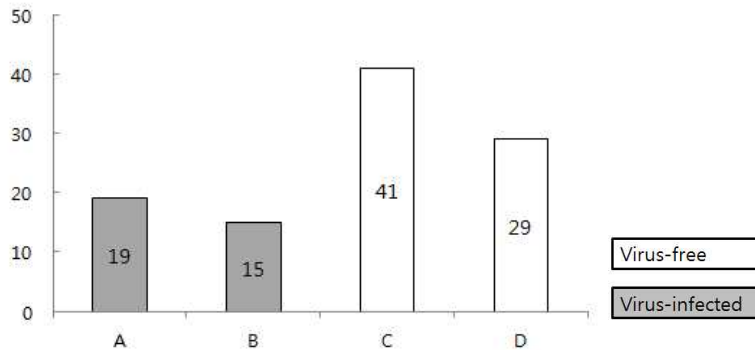
4 days

[그림 94. 표고버섯 톱밥 재배에서 primodia 발생 및 자실체 형성과정]



[그림 95. 전북대학교의 미니버섯재배온실 자실체 발생작업]

2차 *L. edodes* 자실체 수확량



[그림 96. 표고버섯 톱밥배지 에서 *L. edodes* 자실체 수확량 조사]

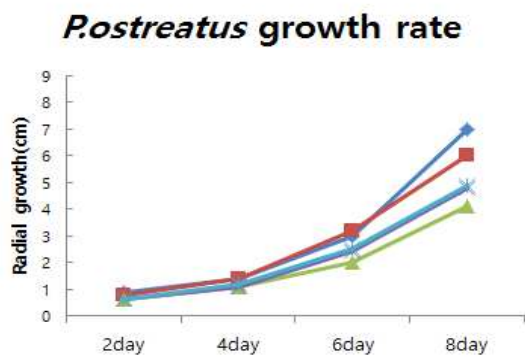
④ 느타리버섯 톱밥배지에서의 균사성장 및 자실체 발생률 조사

느타리바이러스 POSV가 감염된 virus-infected균주의 병증관찰을 위하여 virus-infected균주와 virus-free균주의 균사체 성장률을 비교하였으며, 톱밥 병배지를 사용하여 자실체 수확량도 비교 관찰하였다. Virus-infected 균주가 virus-free 균주보다 전반적으로 자실체 형성전의 균사생장이 균일하지 못했으며 성장속도가 느린 것을 확인 할 수 있었다(그림 97). 반면 virus-free 균주는 균일하게 자라며 자실체의 양도 2배정도 더 수확되는 것으로 관찰되었다(그림 98). 실증실험에서와 마찬가지로 virus-infected균주는 plate에서도 균사체가 고르지 못하며 growth rate가 현저히 낮음을 확인할 수 있었다. 실증실험에서와 마찬가지로 virus-infected 균주는 plate에서도 colony edge가 고르지 못하며 growth rate가 현저히 낮음을 확

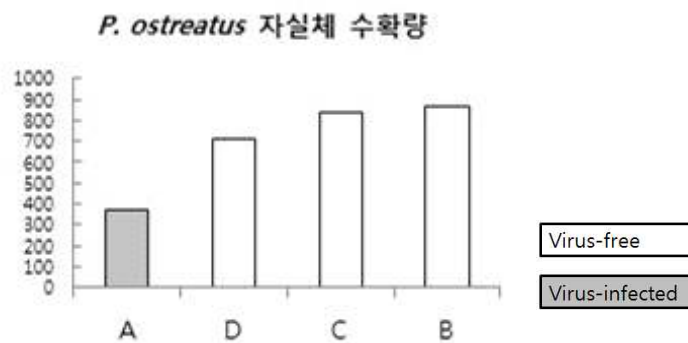
인할 수 있었다(그림 97-99).



[그림 97. 느타리버섯 자실체와 균사체의 형태적 관찰]



[그림 98. 느타리버섯 자실체와 균사체의 성장속도 비교]

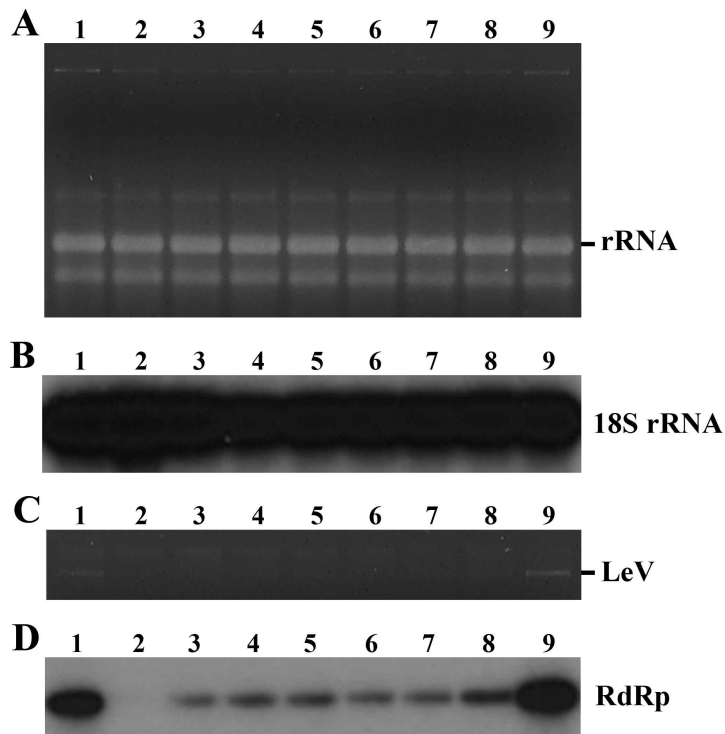


[그림 99. 표고버섯 톱밥배지에서 느타리버섯 자실체 수확량 조사]

4) 버섯 바이러스 LeHV의 배양 조건에 따른 titration 특성조사

① 배양방법에 따른 바이러스 titration 차이 검증실험

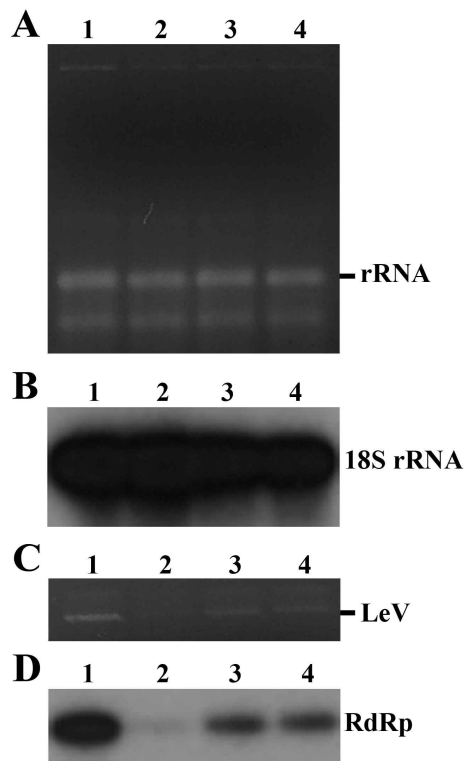
셀로판을 올린 PDA media에 산조701 균주를 접종하여 12day 배양(1 lane), PDB media에 12day배양(2 lane), PDB media에서 배양한 mycelia를 PDA media에 올려 4, 8, 12day 배양 (3~5 lane), PDB media에 정치배양 4, 8, 12day(6~8 lane), V8 agar media에 12day 배양(9 lane)하여 mycelia를 준비하였다. 각 mycelia들을 total nucleic acid prep과 CC41 column을 이용한 dsRNA prep방법을 통하여 시료를 획득하였으며, dsRNA Northern blotting을 수행하였다(그림 100). 본 실험을 통해 plate에서 배양하는 것에 비해 liquid배양 했을 때 virus titration이 현저하게 감소됨을 알 수 있었으며, 이를 plate배양 조건으로 이동시킴으로써 virus titration이 다시 증가함을 확인 할 수 있었다. 또한 정치배양 시 virus titration이 plate배양이나 liquid배양, 둘 중 어느 것보다도 일치하지 않음을 관찰할 수 있었고, 1 lane과 9 lane을 비교 했을 때 배지의 성분 보다는 배양 조건에 의해 virus titration의 차이가 생길 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다. virus titration이 배양방법에 따라 차이를 보임을 확인하고 titration에 변화를 줄 수 있는 다른 요소에 대해서 연구를 하고자 하여 산소의 유무에 따라서 어떤 차이를 보이는지 관찰 하였다.



[그림 100. 고체배양과 액체배양에 따른 바이러스 존재율의 변화조사]

② 산소농도에 따른 바이러스 titration 차이 검증실험

셀로판을 올린 PDA media에 산조701 균주를 접종하여 20day 배양(1 lane), PDB media에 13day배양(2 lane), PDA media에 접종한 균주를 Anaeropack-Anaero 조건에서 13day배양(3 lane), PDA media에 접종한 균주를 일반배양기에서 3day배양 후 Anaeropack-Anaero 조건에서 10day배양(4 lane)하여 mycelia를 준비하였다. 각 mycelia들을 total nucleic acid prep과 CC41 column을 이용한 dsRNA prep방법을 통하여 시료를 획득하였으며, dsRNA Northern blotting을 수행하였다(그림 101). 위의 실험을 통해 hypoxia 상태일 때 virus titration이 감소됨을 관찰하였고, plate배양과 liquid배양 시 virus titration이 차이가 생김을 다시 한 번 확인 할 수 있었다(그림 101). dsRNA Northern에 사용한 probe는 total nucleic acid의 경우 *Cryphonectria parasitica*의 18s rRNA(993bp)를 사용하였고, dsRNA의 경우 표고의 RNA dependent RNA polymerase(561bp)를 사용하였다.



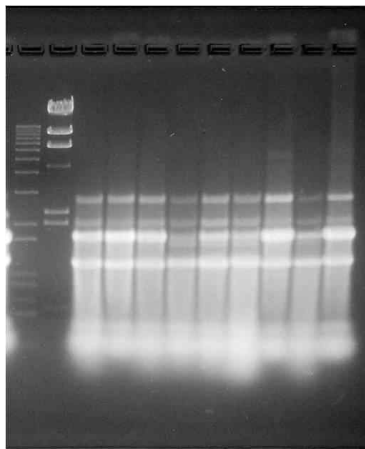
[그림 101. 산소고갈 상태에서 바이러스의 존재를 분석. 2: hypoxia 상태 배양조건]

마. 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성 조사를 위한 수집

1) 표고버섯균사체의 이상성장과 바이러스 감염여부와와의 관련성 조사

표고툽밥재배는 표고원목재배의 단점을 보완할 수 있는 재배방법으로써 세계적으로 표고의 주요 생산국인 중국, 대만, 일본 등도 많은 양의 표고를 툽밥재배방법으로 생산하고 있다. 툽밥재배의 과정은 툽밥배지가 담겨있는 봉투 중심부에 균사체를 접종하여 장시간 배양하

면 균사체가 성장하면서 배양후기에는 배지 갈변기가 되어 균사의 배양이 붓지 하단까지 완료된 배지의 갈변이 일어난다. 배지 전체에 고루 퍼질수록 버섯의 품질이 좋아지고 배지의 수명도 늘어난다. 그러나 최근 본 과제의 제 2협동팀인 산림버섯연구소에서 표고버섯재배를 위한 붓지종균과 생산하는 표고버섯자실체에서 이상형태 균사체와 자실체가 발견되어 이러한 형태가 바이러스에 의한 병징인지 그 관련성을 조사하기 위하여 이상형태 균사체를 다양하게 수집하였다. total RNA를 회수하여야만 dsRNA, ssRNA 모두 존재여부를 확인할 수 있으므로 total RNA를 회수하여 전기영동을 하는 방법으로 바이러스 존재여부를 확인하였다. 표고버섯 붓투배지를 톱밥배지 높이에 따라 “상, 중, 하”로, 단면에 따라 “외, 중, 내”로 비정상성장 균사체를 분리하여 계대배양을 2차례 반복하였다. 세포판지가 깔려있는 배지에 접종하여 2주간 배양한 후 균사체를 회수하여 total RNA를 분리하고 전기영동하는 방법으로 바이러스 존재여부를 확인하였다 (그림 102). 그림 102는 톱밥배지 1봉투 기준으로 작업한 것을 확인한 것이며 이상형태를 보이는 10개의 봉투를 동일한 방법으로 다 조사하였으나 바이러스는 존재하지 않는 것으로 확인하였다. 지속적으로 샘플을 확보하여 확인하였으나 이상형태 균사체로부터 본 연구기간 동안 추가 바이러스가 발견되지 않았다.



1. Top/white/outside
2. Top/brown/outside
3. Top/brown/line
4. Middle/white/outside
5. Middle/brown/outside
6. Middle/brown/line
7. Bottom/white/outside
8. Bottom/brown/outside
9. Bottom/brown/line

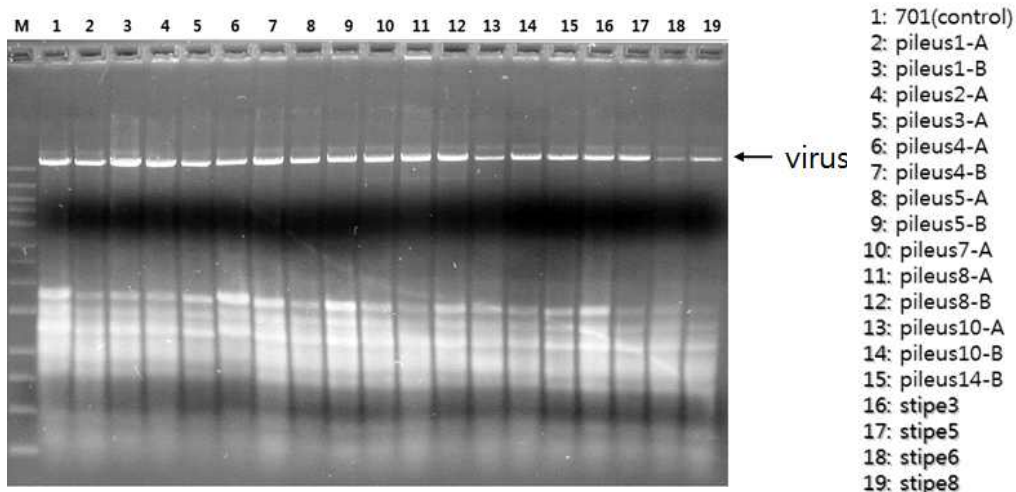
[그림 102. 톱밥재배봉지 내 균사체의 비정상 갈변부위의 바이러스 존재여부확인. Total RNA 분리 후 전기영동 확인. 위치용어는 톱밥배지봉지에서 위치를 나타냄]

2) 자실체 이상형태성장과 virus 감염여부 관련성 조사

표고버섯 톱밥배지상 비정상 자실체를 수집하여 비정상 버섯의 pileus와 stipe로부터 부위별 다양한 균체를 분리하였고 계대배양한 후 50개 이상의 균사체를 배양하였고(그림 103) 균사체로부터 각각 dsRNA를 분리하여 전기영동으로 존재여부를 확인한 결과 대부분의 이상형태 자실체로부터 virus가 존재함을 확인하였고(그림 104) 유전자 서열 분석결과 본 연구진의 다양하게 특성조사를 실행하였던 LeHV가 감염됨을 확인하였다.



[그림 103. 비정상 버섯의 pileus/stipe 샘플로부터 균사체 배양]



[그림 104. 비정상 버섯으로부터 배양한 균사체들의 virus 감염 여부 조사]

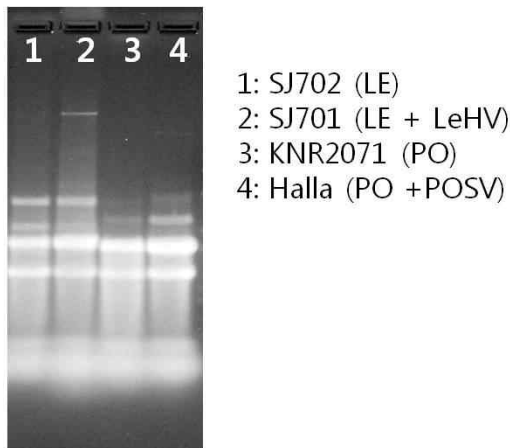
바. 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행

1) 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 수행

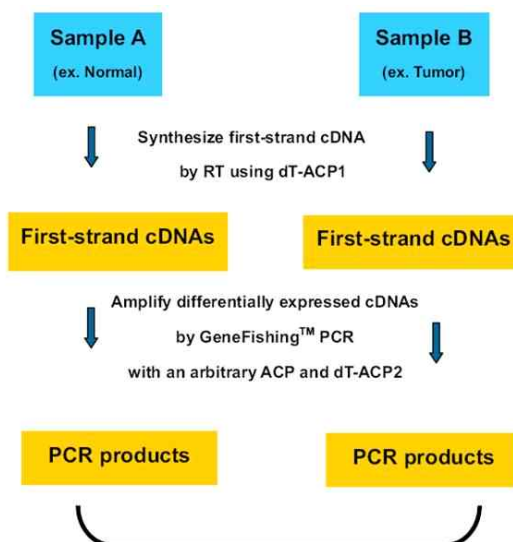
① 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 조건확립

유전체학(genomics)을 통해 고부가가치의 표고와 느타리버섯에 질병을 유발하는 버섯바이러스의 병원성 조절기작에 관련한 유전체를 분리 및 동정하여 버섯과 바이러스와의 관계를 조사하여 병원성 관련 후보 유전자들을 데이터화하고자 1차년도에는 유전체학 수행을 위한 조건을 확립하였다. 1차적으로 virus-free 느타리, 바이러스 감염 느타리 버섯의 균사체로부터 RNA를 분리하였다. 추가적으로 virus-free 표고와 바이러스 감염 표고버섯의 균사체 각

각으로 부터 RNA를 분리하였다. 단 서로 유전자형이 동일한 isogenic strain은 아니었다 (그림 105). 각각의 균사체들은 협동과제 2팀으로부터 확보하였다. 자실체의 분석은 complete isogenic strain이 확보되어 참여기업과 버섯연구소에서 자실체를 형성해야만 수행이 가능했으므로 1차-2차년도에 자실체를 샘플로 활용하지는 못했다. 버섯의 isogenic strain의 확보는 장기연구에 해당되므로 자실체 분석은 불가피하게 지연되었다. 하지만 유전체 수행 조건을 미리 확립하기 위하여 gene fishing을 위한 버섯으로부터의 RNA 시료 확보를 위한 실험방법을 구축하였으며(그림 105) ACP primer를 이용한 gene fishing을 수행이 가능하게 되었다(그림 106).



[그림 105. 표고버섯, 느타리버섯의 바이러스 기작규명을 위한 유전체학 수행용 total RNA 분리 및 확인. SJ702, virus-free 표고버섯균사체; SJ701, virus-infected 표고버섯균사체; KNR2071, virus-free 느타리버섯균사체; Halla, virus-infected 느타리버섯균사체]

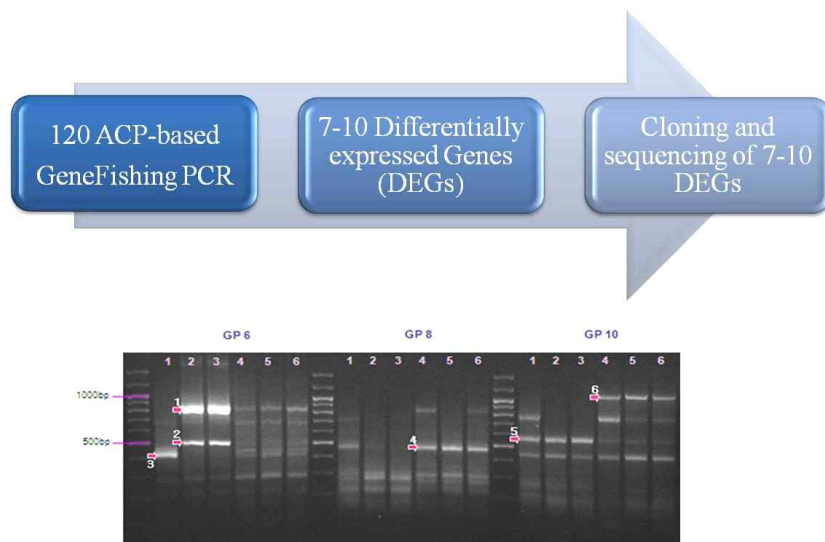


[그림 106. 바이러스 감염체와 비감염체 사이의 발현차이를 조사하여 바이러스 병원성 기작에 대한 연구를 수행할 DEG(Differentially Expressed Gene) 기술]

② 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 수행

유전체학(genomics)을 통해 고부가가치의 표고와 느타리버섯에 질병을 유발하는 버섯바이러스의 병원성 조절기작에 관련한 유전자를 분리 및 동정하여 버섯과 바이러스와의 관계를 조사하여 병원성 관련 후보 유전자들을 데이터화하고자 유전체학을 수행하였다. 본 연구진에 의해 확립된 유전체학 실험조건을 기반으로 원활히 ACP primer를 이용한 genefishing을 진행하였다. 하지만 기대와 달리 발현에 차이를 보이는 후보군이 너무 많은 관계로 바이러스와 관련하는 유전자를 선별하기가 어려웠다.

본 연구진의 이러한 결과는 실험에 이용한 두 균주가 서로 isogenic 균주가 아닌 유전체 유사 버섯균주였기 때문에 발현에 차이를 보이는 후보유전자가 많이 나타났을 것으로 추정하고 2차년도 중반에 성공적으로 확보된 표고버섯과 느타리버섯의 무바이러스 균주와 각각의 균주에 LeV-FMRI0339 바이러스와 PoSV가 감염된 isogenic 균주들을 실험군으로 재지정하였다. 각 균주들의 전체 RNA를 분리한 후 ACP primer를 이용하여 Genefishing 결과 표고버섯은 9개, 느타리버섯은 6개의 발현차이가 확인되는 유전자 후보군을 확보하였다(그림 107-108). 발현차이가 확인된 PCR amplicon은 gel elution방법을 통하여 분리한 후 pGEM T easy vector에 클로닝하였고 한 샘플당 3개의 클론을 무작위로 선별한 후 plasmid DNA를 회수하고 M13 forward, M13 reverse primer pair를 이용하여 총 느타리버섯 6개 유전자, 표고버섯 9개의 유전자의 염기서열을 3반복 분석하였다. 확보된 염기서열을 분석한 결과 표고버섯의 경우 9개 유전자 중 3개의 서열이 중복되었고 1개는 서열분석이 되지않았다(그림 107-108).



[그림 107. 표고버섯과 느타리버섯의 genefishing 방법을 이용한 유전체학 수행]

GeneFishing DEG Analysis of *L. edodes* and *P. ostreatus*

DEG	AC Primer (ACP)	L. edodes V+	L. edodes V-	DEG	AC Primer (ACP)	P. ostreatus V+	P. ostreatus V-
1	6	-	+	1	2	-	-
2	6	-	+	2	2	-	-
3	6	-	+	3	2	-	-
4	8	+	-	4	4	+	+
5	10	+	-	5	32	+/-	-
6	10	+	+	6	35	+	+
7	11	-	-	7	48	+	-
8	14	-	-	8	50	-	-
9	16	-	-	9	55	-	-
10	34	-	+/-	10	56	+	+/-
11	47	-	+	11	68	-	+
12	48	+/-	-	12	68	+	+/-
13	53	+/-	+	13	68	+	+
14	73	-	-	14	72	+	-
15	75	-	-	15	72	-	-

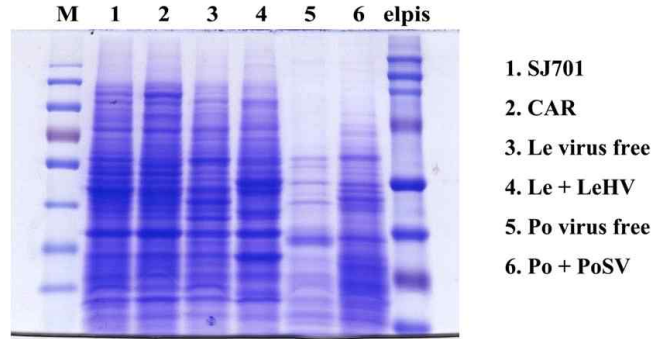
[그림 108. 표고버섯과 느타리버섯의 genefishing 수행을 통해 분석된 DEG 분석표]

그 결과 6개의 유전자를 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blast search site를 이용하여 어떤 종류의 유전자인지 확인한 결과 모두 unknown gene 정보로 확인되었다. 느타리버섯의 경우 6개 유전자 중 4개가 중복되었고 총 3개를 동일한 방법으로 분석한 결과 결과를 얻지못하였다. 일반적으로 다른 발현 양상을 보이는 DEG 유전자의 경우 중복되는 경우는 드물지만 본 연구의 경우는 같은 유전자서열을 가지는 동일 유전자인데도 다른 발현양상을 보인다. 그 결과 본 연구진의 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 수행을 통해 병원성 기작에 관련된 유전자를 확보하지 못하였다. 본 연구진은 현재 느타리 버섯의 자실체 샘플을 virus-free 균주와 virus-infected 균주로부터 확보하고 있으며 자실체 수확이 완료되면 과제종료여부와 상관없이 유전체학 실험을 재수행할 계획이다.

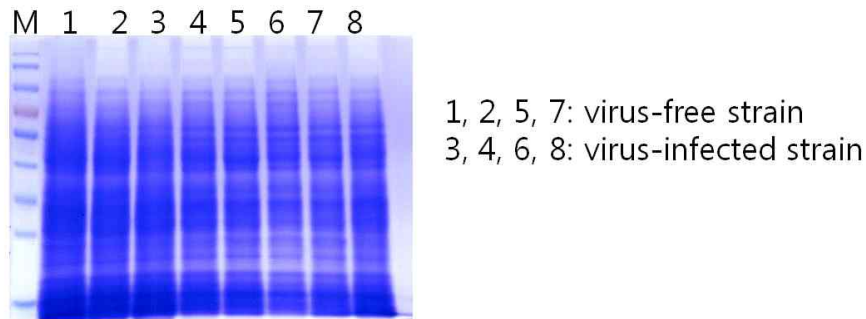
2) 버섯바이러스 기작 규명을 위한 단백질체 수행

① 단백질체학을 위한 단백질 분리

유전체학과 동일한 실험목적으로 본 연구진은 단백질체학을 수행하였다. 1차적으로 “무바이러스 표고버섯과 바이러스감염 표고버섯” 그리고 “무바이러스 느타리버섯과 바이러스 감염 느타리 버섯”에서 단백질체를 분리한 후 SDS-PAGE에서 분리한 단백질의 quality를 확인한 결과 표고버섯의 실험군은 그 양이 실험수행에 충분하였으나 느타리버섯 실험군의 경우 다른 곰팡이와 달리 단백질 회수율이 현저히 낮았다. 표고버섯의 실험군은 1차년도와 동일한 방법으로 단백질 샘플을 분리하여 실험에 사용하였으며 느타리의 경우 사용하는 균사체의 량, 균사체 파쇄방법 및 사용 완충용액 등을 보완하여 단백질 회수율을 높여 단백질체학 실험 수행에 충분한 양을 확보했음을 SDS-PAGE로 확인하였다 (그림 109-110).



[그림 109. 단백질체학 수행할 각 버섯 균사체의 단백질의 quality 조사를 위한 SDS-PAGE 수행결과. 1,4, virus free 표고버섯 균사체의 단백질; 2,3, virus-infected 표고버섯 균사체의 단백질; 5, virus free 느타리 버섯균사체의 단백질; virus-infected 느타리버섯 균사체의 단백질]



[그림 110. 느타리버섯의 단백질체학 수행을 위한 버섯 균사체의 단백질 확보 및 SDS-PAGE 확인결과. 1,2,5,7: virus free 느타리 버섯균사체의 단백질; 3,4,5,8: virus-infected 느타리 버섯 균사체의 단백질]

② 버섯바이러스 기작 규명을 위한 단백질체학 수행

2D-PAGE 작업에 적합한 것으로 판단되어 다양한 조건으로 gel layout 실험을 수행하였다. 여러차례의 trouble shooting 과정을 통해 좋은 layout 조건을 확립하는데 성공하였다. 다양한 pI 대의 단백질들을 모두 screening하기 위하여 13 cm 길이의 3-10NL strip을 이용하였으며 2D-PAGE는 20x20 cm² gel에서 수행하였다. (그림 111).

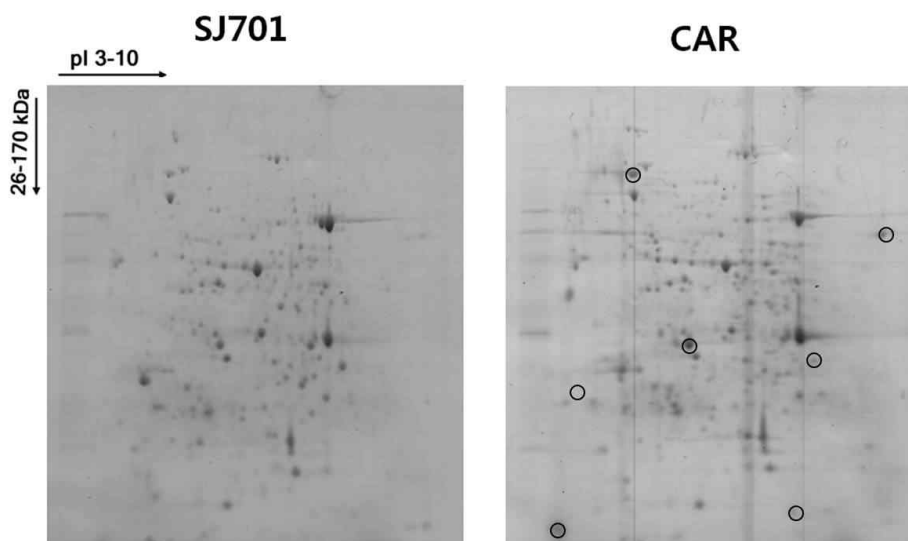
표고버섯은 산조701로부터 제작된 "virus-free 산조701 균주 vs LeV-FMRI0339 virus-infected 산조701 균주"를 실험군으로 하여 오직 LeV-FMRI0339 바이러스에 의해 발현에 영향을 받는 단백질을 조사하였다(그림 112). 느타리버섯은 한라로부터 제작된 "virus-free 한라 균주 vs virus-infected 한라"를 실험군으로 하여 오직 PoSV 바이러스에 의해 발현에 영향을 받는 단백질을 조사하였다(그림 115).

그 결과 표고버섯바이러스 감염체와 비감염체의 2D gel을 Bio-Rad GS-700 calibrated imaging densitometer를 이용하여 양의 비율을 조정한 후 2 gel 이미지상의 단백질들 비교

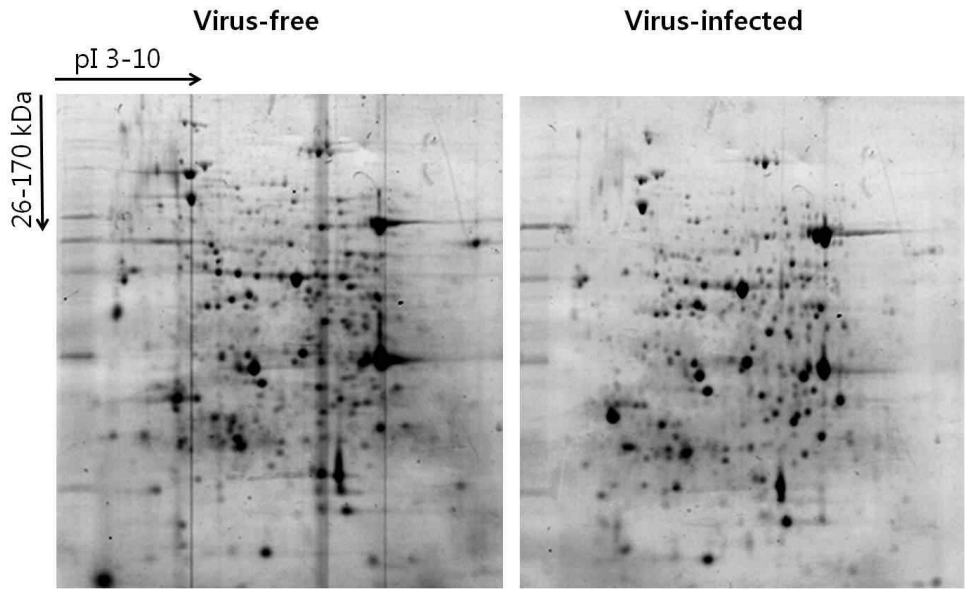
분석결과 progenesis sameSpot 프로그램상 matching되는 단백질은 약 320개 였으며 그 중 발현의 차이가 5배 이상 나는 단백질 spot은 36개 이상이었다(그림 113, 114). 본 연구진은 그 중 단백질 분리가 용이한 spot을 5개를 분리하여 Q-TOF를 수행하였다. 느타리버섯바이러스 감염체와 비감염체의 단백질들 비교분석결과 프로그램상 matching되는 단백질은 50여 개 정도이며 그 중 발현의 차이가 5배 이상 나는 단백질 spot은 약 15개 이었다(그림 116, 117). 본 연구진은 그 중 단백질 분리가 용이한 spot 5개를 분리하여 Q-TOF를 수행하였다.

수행 후 MASCOT search 프로그램을 이용하여 MS/MS data를 대표 Genbank인 NCBI data와 비교 분석하였으나 표고버섯/느타리의 유전정보 전체가 release되어있지 않은 관계로 어떤 단백질의 서열들인지 matching이 불가능하였다. 문제점을 해결하기 위하여 본 연구진은 캐나다 fungal genome project서 공개한 표고버섯의 cDNA database 정보를 다운로드하여 동일한 방법으로 시도하였으나 공개된 cDNA 정보량이 미비하여 matching해도 결과를 확인할 수 없었다. 현재 본 연구진은 본 연구의 중요성을 인식하고 있고 또한 현재 확보한 MS/MS data를 적극 활용하여야하기 때문에 일본의 Forest GEN, Forestry and forest products research institute에 database를 활용할 수 있는지 직접 contact할 계획이며 국내의 타 연구진에서 보유하고 있는 표고버섯, 느타리버섯의 cDNA database를 조사하여 활용도를 확인 중에 있다.

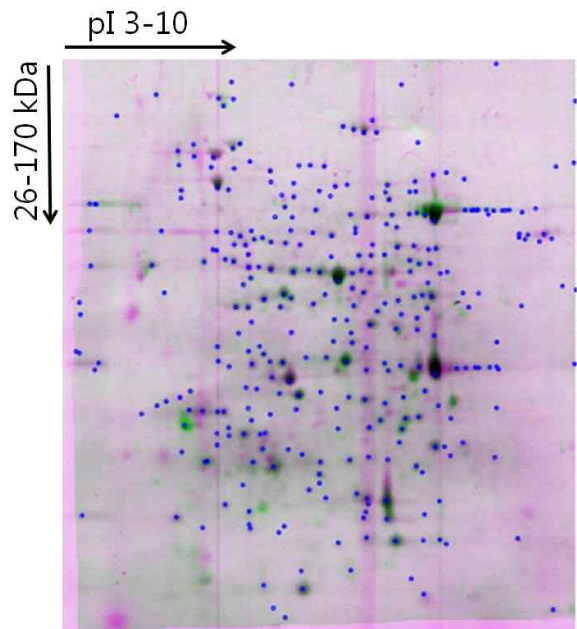
또한 표고버섯의 자실체 샘플이 과제가 종료된 9월 초순에 최종 확보되었으며 자실체의 단백질체학 수행을 위하여 현재 단백질체학 용도의 단백질을 자실체로부터 회수하는 방법을 확립하였다. 균사체보다 단백질 분리 후 1D-PAGE 전기영동을 수행하였을 때 단백질의 끌림현상이 심하였다(그림 118). 그 현상을 제거하기 위하여 Sephadex G column을 다양한 버전으로 사용하여 끌림 현상이 개선된 상태이며(그림 119) 이 샘플을 활용하여 단백질체학을 수행 중에 있다.



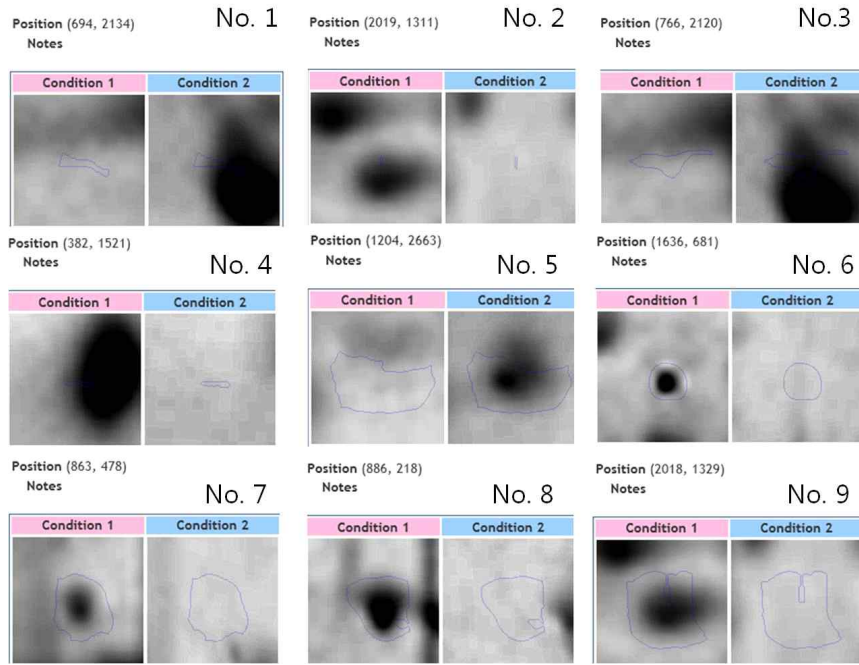
[그림 111. 표고버섯바이러스 감염체와 비감염체의 2D-PAGE 수행]



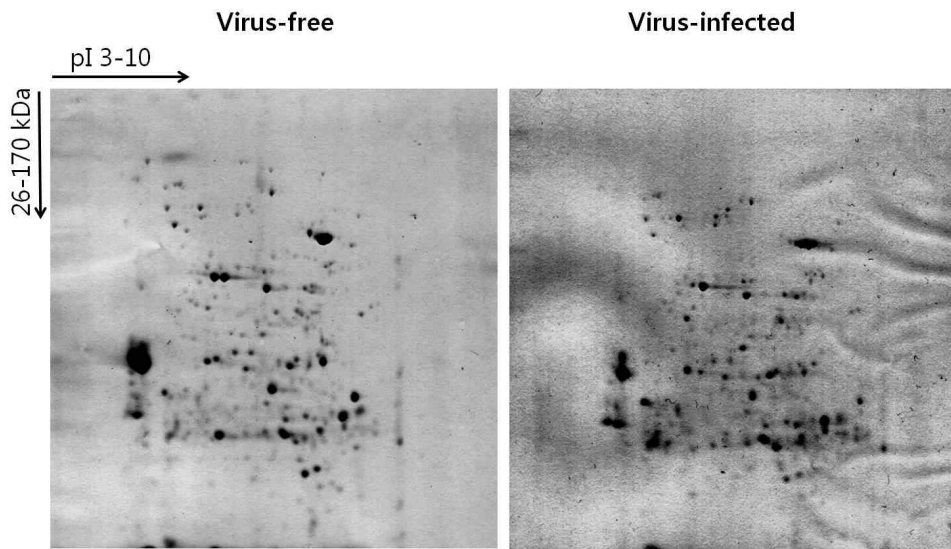
[그림 112. 표고버섯바이러스 감염체와 비감염체의 2D-PAGE 수행결과]



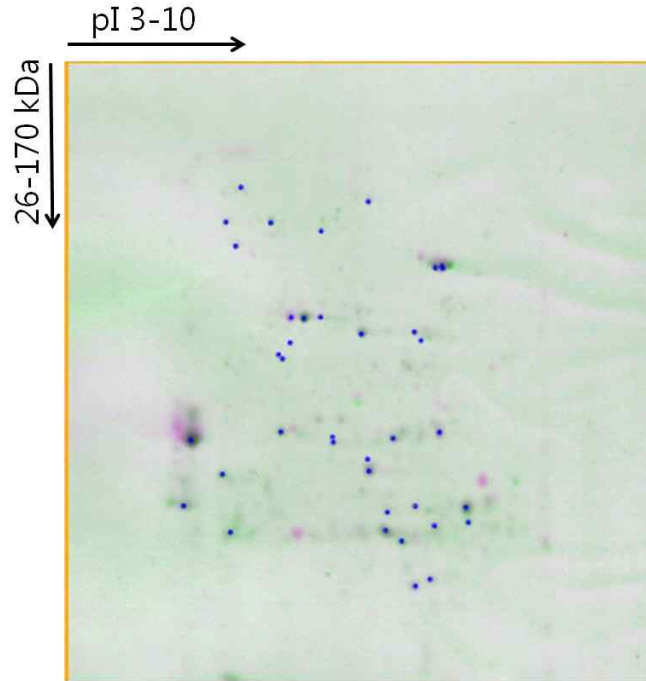
[그림 113. 표고버섯바이러스 감염체와 비감염체의 2D-PAGE 수행 후 2 결과의 비교분석]



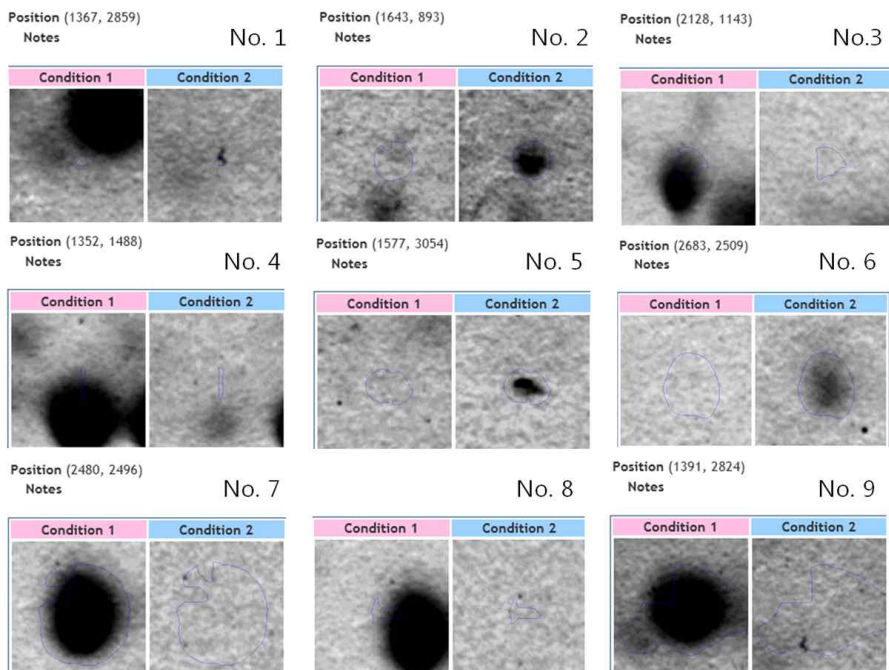
[그림 114. 표고버섯바이러스 LeV-FMRI0339의 감염에 의해 단백질 발현에 영향을 받는 유전자 후보군 분석]



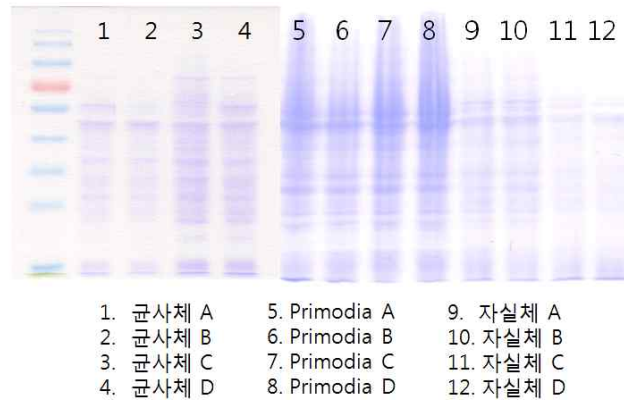
[그림 115. 느타리버섯바이러스 감염체와 비감염체의 단백질체학 수행]



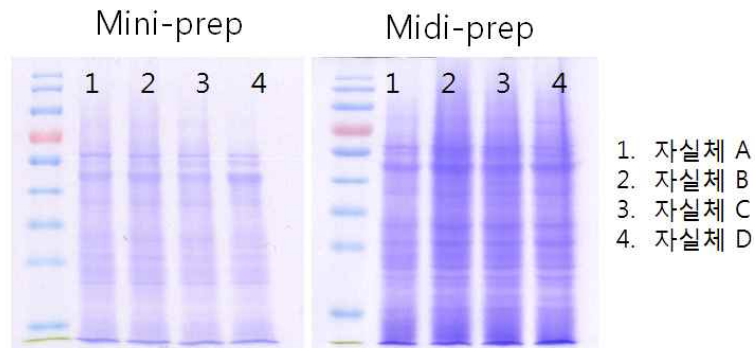
[그림 116. 느타리버섯바이러스 감염체와 비감염체의 2D-PAGE 수행 후 2 결과의 비교분석]



[그림 117. 느타리버섯바이러스 PoSV 감염에 의해 단백질 발현에 영향을 받는 유전자 후보군 분석]



[그림 118. 표고버섯 균사체, primodia 와 자실체로부터 단백질을 수행을 위한 단백질 분리]



[그림 119. 표고버섯 자실체로부터 단백질을 수행을 위한 단백질 분리]

3) 버섯 바이러스 병원성 기작 관련 바이오마커 개발

본 연구진은 virus-free 버섯균주와 virus-infected 버섯균주의 분자유전학적 실험을 진행하기 위하여 다양한 배양조건으로 균사체회수를 진행하였으며 그 과정에서 셀로판지의 분해도가 여타 타 곰팡이에 비해 월등함을 확인하였다. 또한 그 과정에서 virus-infected 버섯균주의 경우 그 분해도가 감소함을 관찰하였다(결과미제시, 셀로판지의 분해도를 입증하기가 어렵기 때문). 버섯균주의 바이러스감염도가 균주의 외부분비효소의 생성량에도 영향을 미치기 때문이라 인 것이라 수 있을 것이라 추정하였다. 연구과정 동안 해당 효소들에 대한 정보를 수집하였으며 현재 고체배지 또는 액체배양액을 활용한 효소활성도 측정을 진행 중에 있다. Virus-free 버섯균주와 virus-infected 버섯균주 간의 대표 cellulolytic system 효소 (hemicelluase), ligninolytic system 효소(amylase, acid protease), cell wall lytic 효소 (laminarinase), laccase 등의 활성도 차이를 조사 중이다. 효소조사용 고체배지 또는 액체배

지의 배양액을 활용하여 사용하고 있으며 이 조사를 통하여 버섯바이러스의 효소감소량을 입증한다면 간단하면서도 명확한 바이오마커로 활용 가능할 것이라 판단된다.

사. 버섯피해곰팡이의 viro-control 연구를 위한 균주 개발

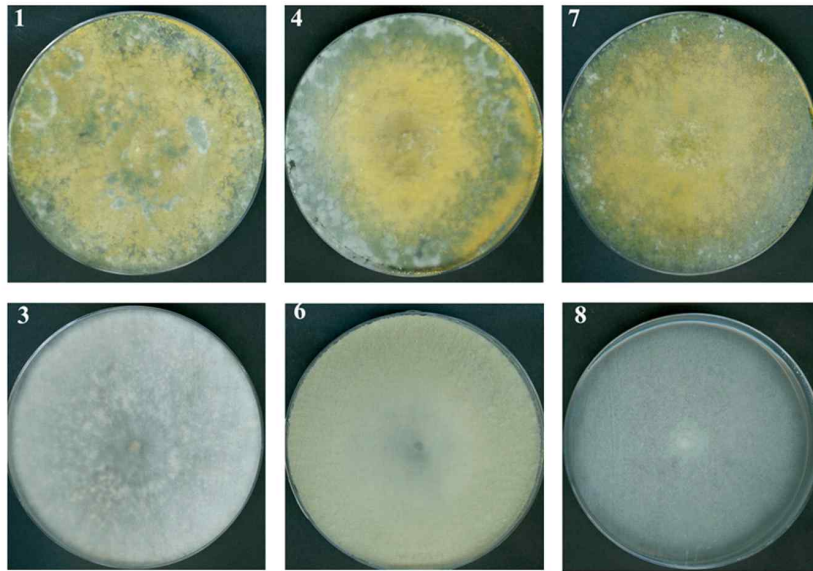
1) 버섯피해곰팡이균주의 조사

① 버섯농가로부터 다양한 피해곰팡이 분리 및 분석

버섯바이러스 예방과 진단 기술개발 연구를 진행하는 본 연구진은 화학제재 내성 곰팡이가 출현하고 다양하게 버섯재배에 큰 피해를 주는 곰팡이에 관한 연구를 간과할 수 없었다. 대표버섯피해곰팡이인 푸른곰팡이균등의 병원성을 저하시키는 저병원화 바이러스를 이용하여 병원성을 저하시키는 “친환경 생물학적 방제제” 연구에 대한 기반을 구축하고자 하였다. 1차적으로 본 연구진은 제 2협동 과제팀인 “산림버섯연구소”를 비롯한 “(주) 리을농산과 (주) 머쉬아트” 참여기업체로 부터 분양받은 여러개의 표고버섯, 느타리버섯재배 시료로부터 푸른곰팡이균을 비롯한 다양한 곰팡이들을 분리하였다. 형태학적 특징이 다른 여러 가지의 곰팡이를 단포자 분리하여 액체배양한 후 각각의 곰팡이로부터 gDNA를 회수하여 PCR의 주형으로 이용하고 Internal transcribed spacer (ITS) 부위를 확보하기 위하여 ITS-1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' primer와 ITS-4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' primer pair를 이용하였다. PCR amplicon을 확보한 후 pGEM T easy vector에 삽입하여 클로닝을 수행한 후 각 클론에 삽입된 DNA의 염기서열을 분석야한 후 genbank database를 활용하여 계통정보를 분석하였다. 그 결과 표고버섯으로부터 *T. longibrachiatum*, *T. harziatum*, *T. virens*, 과 *Mucor plumbeus*이 분리되었고 느타리버섯으로부터 *T. kongi*, *T. atroviride*, *T. citrinoviride*이 분리된 것을 확인하였다 (그림 120-121).

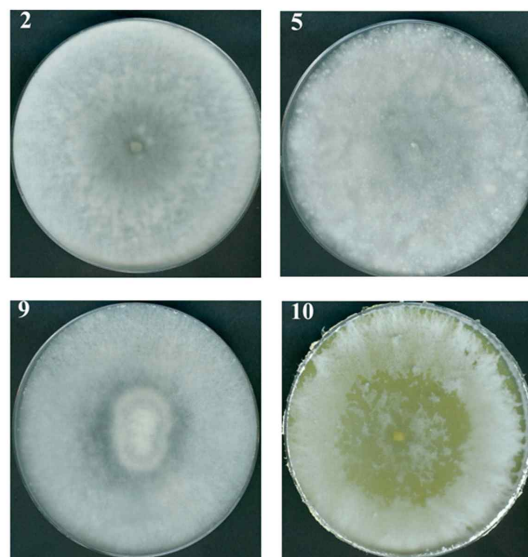
위와같이 1차적으로 균주개발을 위하여 버섯농가로부터 *Tricoderma longibrachiatum*, *T. kongi*, *T. harziatum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *Mucor plumbeus*, *T. citrinoviride*등을 포함하여 10종 이상의 버섯피해곰팡이를 분리하였고 분리된 곰팡이들의 형태학적 관찰 결과를 확보하였다. 그 결과 형질전환 숙주곰팡이는 다양하게 확보되었으나, viro-control 균주개발에 저병원성화바이러스(hypovirus)를 제공할 곰팡이가 농가로부터 확보되지 않아 추가적인 버섯피해곰팡이를 확보하였다.

제 2협동 과제팀인 “산림버섯연구소”를 비롯한 “(주)리을농산과 (주)머쉬아트” 참여기업체로부터 버섯피해곰팡이들이 오염된 버섯을 공급받아 추가실험을 진행한 결과 총 21개체의 곰팡이를 분리하였고 ITS로 분자유적학적인 동정을 실시한 결과 대부분 1차년도에 분리된 버섯피해균주들과 동일하였고 *Penicillium* 종과 *Aspergillus* 종 2종이 추가적으로 분리되었다 (그림 122). 각 분리균주의 전체 RNA를 분리하여 전기영동법으로 바이러스 감염여부를 확인한 결과 모두 저병원성화 바이러스를 포함하고 있지는 않았으며 버섯농가로부터 저병원성화바이러스에 감염된 곰팡이의 분리가 어려운 것으로 확인되었다.



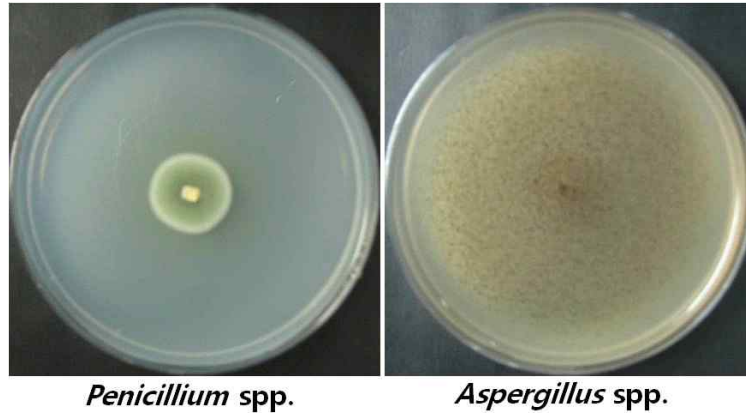
1,4,7: *T. longibrachiatum*
 3: *T. harzianum*
 6: *T. virens*
 8: *Mucor plumbeus*

[그림 120. 표고버섯(*Lentinula edodes*)으로 부터 분리한 표고버섯 오염 균주의 형태적 관찰. PDA 고체배지에 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰. 1,4,7, *Trichoderma longibrachiatum*; 3, *T. harzianum*; 6, *T. virens*; 8, *Mucor plumbeus*.]



2: *T. kongii*
 5,9: *T. atroviride*
 10: *T. citrinoviride*

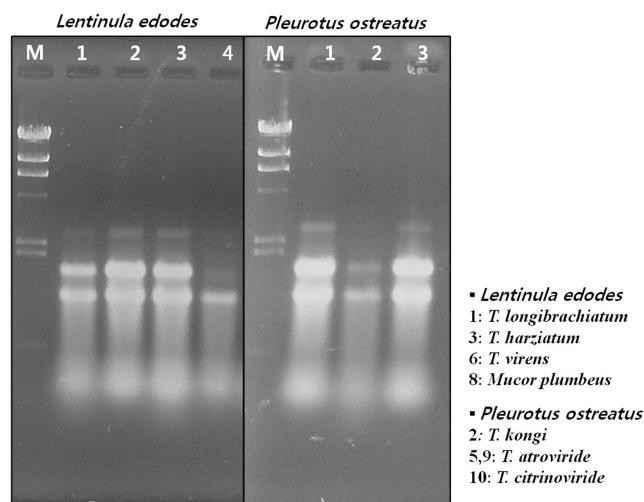
[그림 121. 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)으로 부터 분리한 느타리버섯 오염균주의 형태적 관찰. PDA 고체배지에 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰. 2, *T. kongii*; 5,9, *T. atroviride*; 10, *T. citrinoviride*.]



[그림 122. 버섯재배농가로부터 분리한 추가 2종 버섯오염균주의 고체배지에서의 형태적 관찰

② 버섯재배 피해균주들의 바이러스 존재여부 조사

분리된 7종의 균주로부터 viro-control 연구에 앞서 각 균주들의 바이러스 오염여부를 확인하였다. 각 균사체들을 PDA 고체배지에서 1차 배양한 후 셀로판지가 깔려있는 PDA 고체배지에 접종하여 5일 배양한 후 균사체를 확보한다. 균사체는 건조시킨 후 파쇄하여 total RNA를 분리하고 전기영동하여 바이러스 존재여부를 확인하였다. 그 결과 7개의 버섯오염 균주에는 바이러스가 존재하지 않음을 확인하였고 1차년도 연구목표인 virus-free type의 버섯피해균주 확보에 성공하였다 (그림 123).



[그림 123. 표고버섯과 느타리버섯의 오염균주로부터 바이러스 RNA 존재여부 확인. 표고버섯 오염균주(left)와 느타리버섯 오염균주(right)의 total RNA 회수 후 전기영동.]

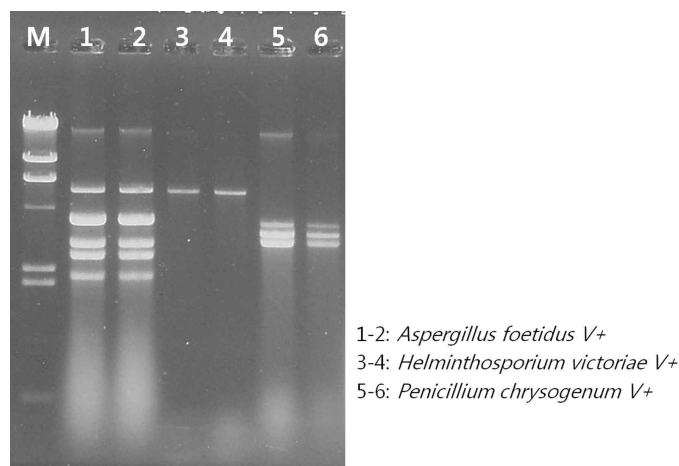
③ 저병원성화바이러스의 분리

버섯농가로부터 분리한 곰팡이로부터 viro-control 균주개발에 이용할 저병원성화바이러스를 공급받지 못하는 관계로, 본 연구진은 원활한 연구진행을 위하여 1차년도에 본 연구진 및 ATCC로부터 확보된 식물병원성곰팡이 *Aspergillus foetidus*, *Helminthosporium victoriae*, *Penicillium chrysogenum* 및 *Cryphonectria parasitica* 등에 감염된 저병원성화 바이러스를 viro-control 균주개발을 위한 곰팡이 형질전환에 사용하였다. 4 종의 곰팡이를 액체배양하여 균사체를 확보하고 액체질소로 급게 파쇄한 후 polyethylene glycol (PEG) 6000과 NaCl, 그리고 Cesium chloride가 포함된 완충용액을 이용하여 equilibrium density gradient ultracentrifugation로 각각의 곰팡이에 감염된 바이러스를 분리하였다.

2) 저병원성화 바이러스 감염을 위한 형질전환조건 확립

① 바이러스에 감염된 식물병원성균 확보 및 분석

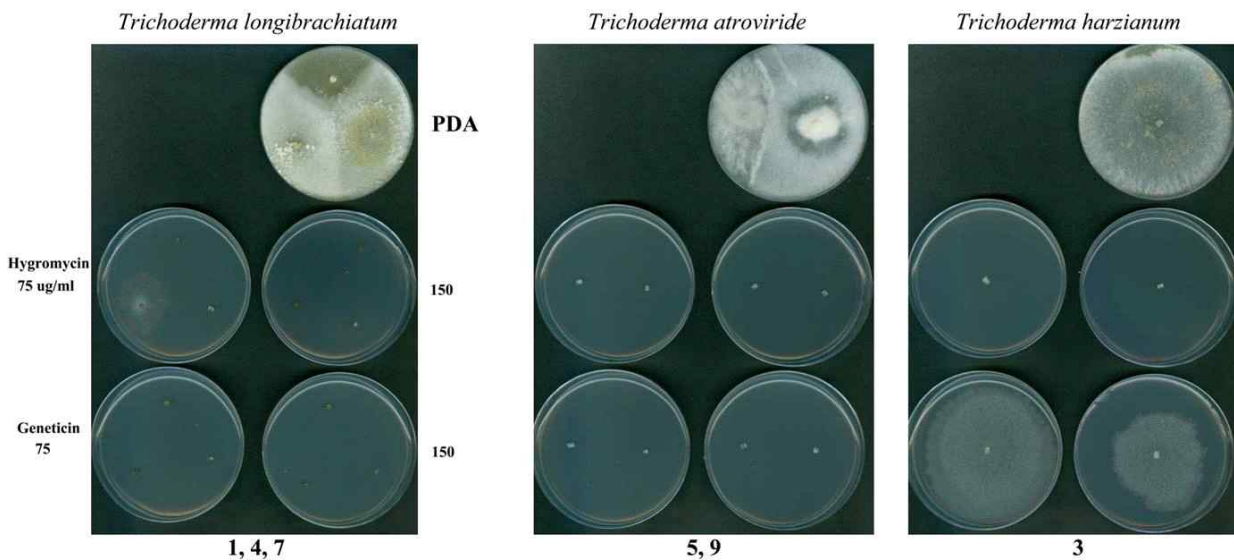
Viro-control 연구의 기반을 구축하기 위하여 1차적으로 다양한 식물병원성균 *Helminthosporium victoriae*, *Penicillium chrysogenum*, *C. parasitica*과 *Aspergillus foetidus* 등에 바이러스가 감염된 균주를 확보하고 각 균주로부터 바이러스를 분리하고자하였다. 곰팡이에 의해 피해를 입은 버섯재배 농가로부터 분리된 곰팡이들은 모두 virus-free type이었으므로 연구의 원활한 진행을 위하여 각각의 식물병원성균에 관련된 논문을 분석한 후 대표적인 균주를 선발하여 ATCC, KACC 등으로부터 *Helminthosporium victoriae*, *Penicillium chrysogenum*과 *Aspergillus foetidus* 균주의 virus-free type과 virus-infected type 균주를 각각 분양받았다. 각 virus-infected type 균주의 바이러스 감염여부를 확인하기 위하여 CC41을 활용한 prep방법으로 dsRNA를 회수한 후 전기영동하여 바이러스 존재여부를 확인하였다 (그림 124).



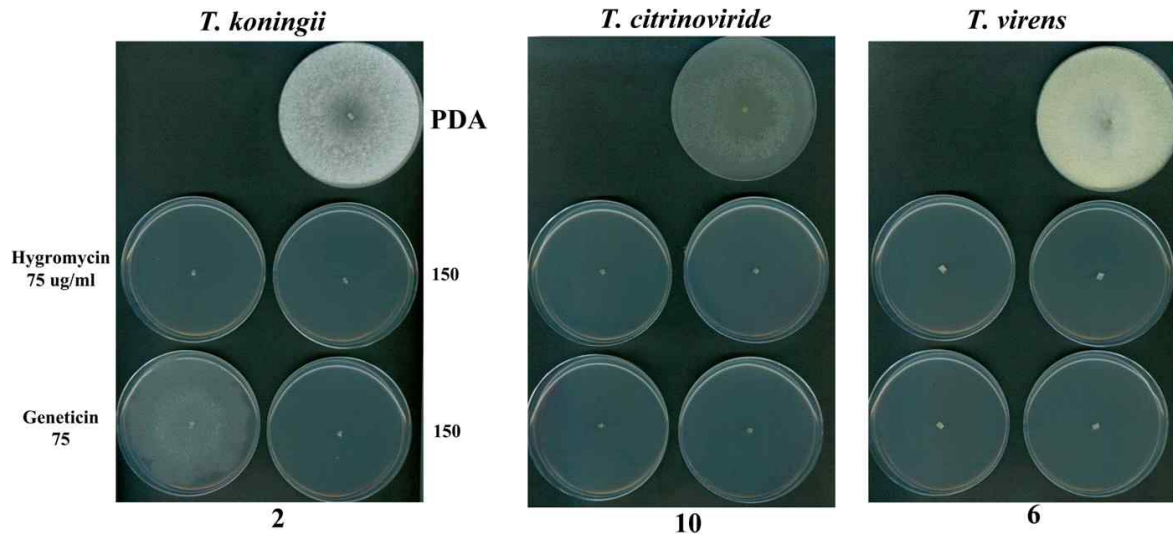
[그림 124. 식물병원성균의 바이러스 존재여부확인을 위한 dsRNA의 전기영동. *Aspergillus foetidus*, *Helminthosporium victoriae*, *Penicillium chrysogenum*에 dsRNA가 감염된 균주의 dsRNA 확인]

② 확보된 바이러스의 형질전환을 위한 조건 확립

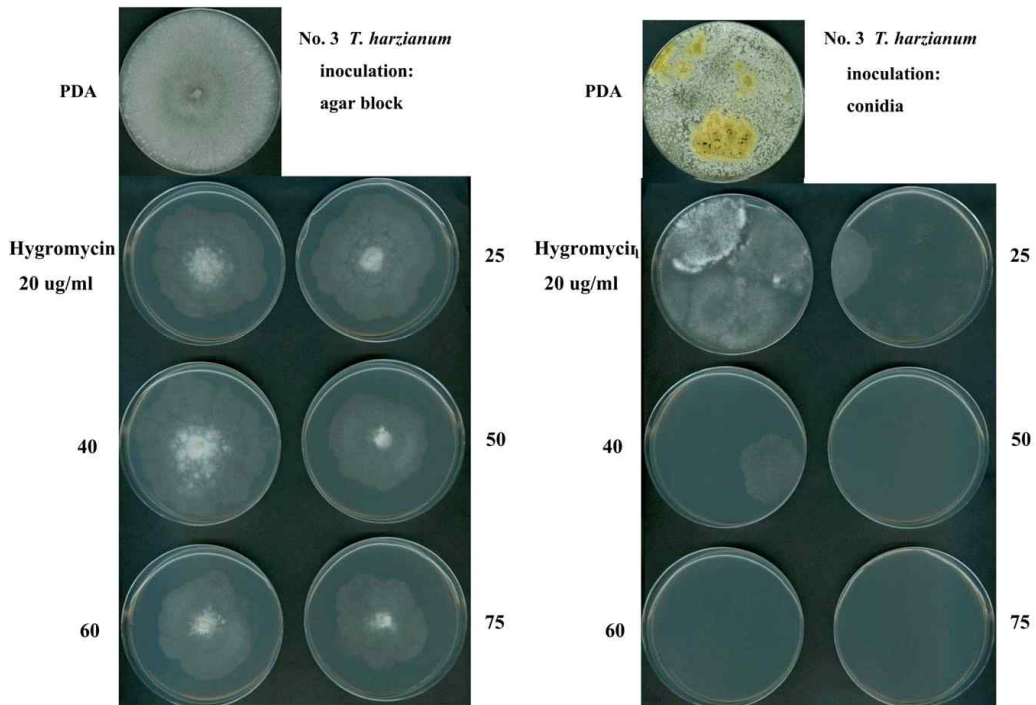
저병원성화 바이러스가 감염된 isogenic strain의 확보에 앞서 각 곰팡이들의 항생제 선택 마커 조사를 실시하였다. 바이러스 감염을 위한 형질전환은 곰팡이 형질전환에 대표적으로 사용되는 hygromycin과 geneticin 저항성 유전자를 선택마커로 사용할 계획이며, 수행에 앞서 선택마커 항생제 test를 수행하였다. 1차적으로 버섯피해균주 *T. longibrachiatum*, *T. kongi*, *T. harziatum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *Mucor plumbeus*, *T. citrinoviride* 모두를 hygromycin 75, 100, 150, 200 ug/ml 과 geneticin 75, 100, 150, 200 ug/ml 이 첨가된 PDA 고체배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰하였다. 그 결과 *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. virens*균주는 미세량 test가 요구되기는 하나 hygromycin, geneticin 모두 이용이 가능한 것으로 조사되었으며 *T. longibrachiatum*, *T. harziatum*, *T. kongi*은 두 항생제 중 한가지에서는 높은 농도에서도 성장하였으므로 선택마커로 사용이 어려울 것으로 판단되며, 가능한 마커만 미세량 test를 시도하기로 하였다 (그림 125-126). 7개의 균주 중 대표적으로 3개의 균주 *T. harziatum*, *T. atroviride* *T. longibrachiatum*를 선발하여 hygromycin 20, 25, 40, 45, 60, 75ug/ml을 각각 첨가한PDA 고체배지에 균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 다시 test 하였다 (그림 127-129. geneticin은 결과 미제시). 그 결과 세 균주의 conidia 모두 50 ug/ml의 농도에서 성장을 하지 못하므로 MIMIC 농도는 50 ug/ml 이다. 다음 단계에서 수행할 형질전환에 각 항생제의 농도는 50 ug/ml로 진행할 계획이다.



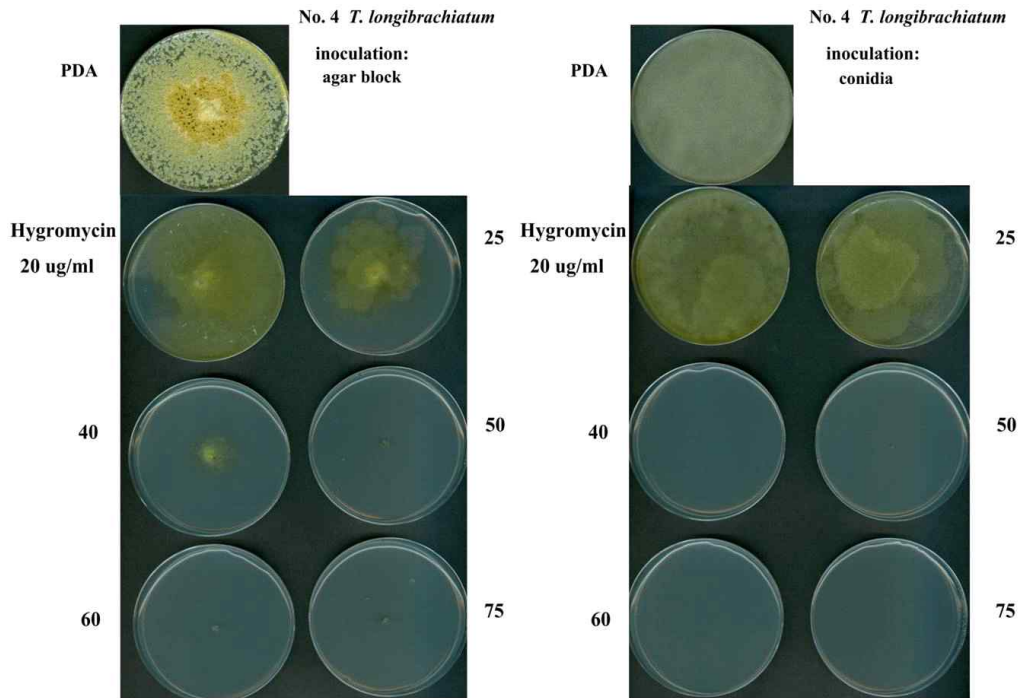
[그림 125. 버섯피해균주 형질전환을 위한 antibiotic selective marker test. Hygromycin/ geneticin selective marker test. Hygromycin 75ug/ml, geneticin 75ug/ml을 각각 첨가한 PDA 고체배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰]



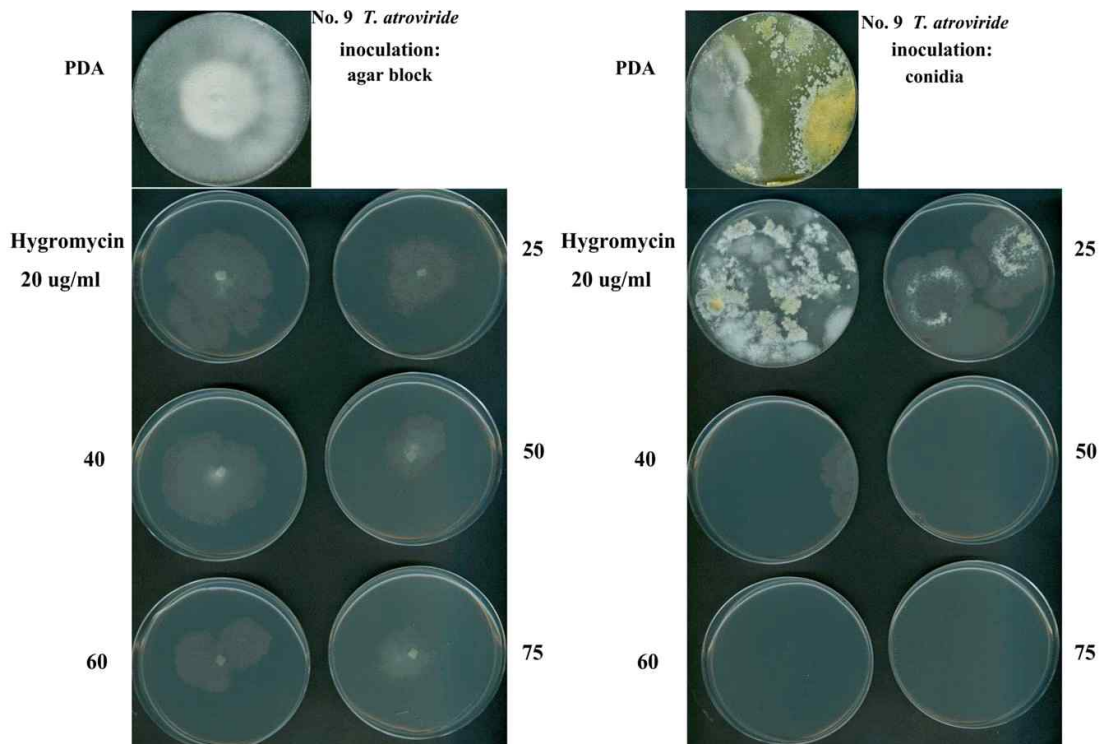
[그림 126. 버섯피해균주 형질전환을 위한 antibiotic selective marker test. Hygromycin/geneticin selective marker test. Hygromycin 75ug/ml, geneticin 75ug/ml을 각각 첨가한PDA 고체배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰]



[그림 127. 버섯피해균주, *T. harzianum*의 antibiotic selective marker test. Hygromycin 20, 40, 60ug/ml을 각각 첨가한PDA 고체배지에 배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰]



[그림 128. 버섯피해균주, *T. longibrachiatum*의 antibiotic selective marker test. Hygromycin 20, 40, 60ug/ml을 각각 첨가한 PDA 고체배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰]



[그림 129. 버섯피해균주, *T. atroviride*의 antibiotic selective marker test. Hygromycin 20, 40, 60ug/ml을 각각 첨가한 PDA 고체배지에 오염균주 각각을 접종하여 30℃에서 1주일간 배양 후 관찰]

3) Viro-control 균주개발을 위한 형질전환체 확보 및 분석

① 저병원성화바이러스 감염 형질전환체 확보

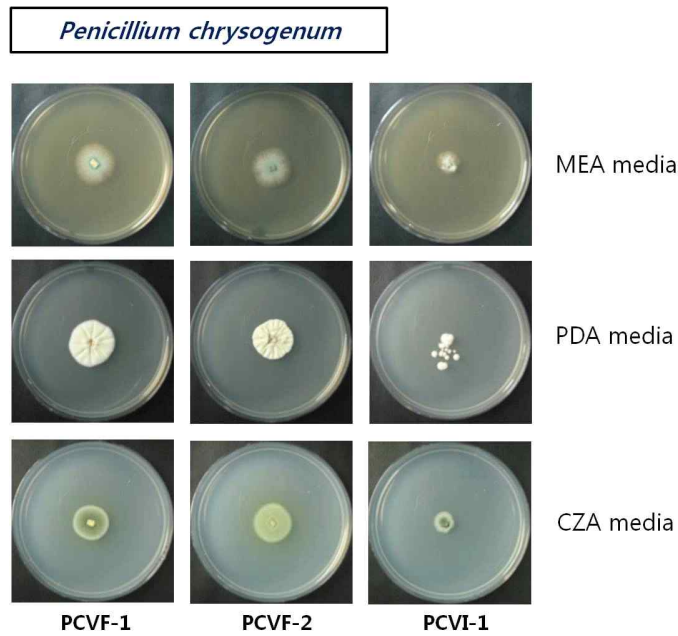
바이러스감염방법에는 유전학적인 hyphal fusion 방법, protoplast를 활용하여 바이러스 입자 감염 및 바이러스 유전체벡터를 제작하여 형질전환시키는 방법 등이 있다. 본 연구진은 다양한 조합으로 저병원성화 바이러스가 포함된 균주들과 농가에서 분리된 피해곰팡이 균주의 hyphal fusion을 시도하였으나 VCG(vegetative compatibility group)이 다른관계로 예상했던 바대로 원하는 저병원성화바이러스가 전달된 viro-control 곰팡이를 확보하지 못하였다.

2차 시도는 *A. foetidus*, *H. victoriae*, *P. chrysogenum* 및 *C. parasitica*로부터 분리된 바이러스 입자를 활용하여 *Penicillium* 종, *Aspergillus* 종과 *T. harziatum* 균주의 protoplast에 형질전환하였다. Protoplast의 제작을 위하여 각 균주들로부터 무성포자를 회수하여 16-20시간 진탕배양을 한 후 miracloth로 harvest하여 멸균한 증류수 및 osmotic buffer로 세척하고 여기에 Novozyme 234 복합효소, BSA를 가하고 2-4시간 동안 반응시킨 후 protoplast를 miracloth에 통과시켜 최종확보하였다. STC buffer를 가하여 protoplast pellet을 조심스럽게 각각의 microcentrifuge tube에 분리된 바이러스 입자와 함께 PEG 형질전환방법으로 형질전환을 수행하였다. 선택마커가 없는 관계로 전체 RNA 분리 후 전기영동 방법으로 바이러스 존재 여부를 확인하여 형질전환 성공여부를 확인하였다. 그 결과 저병원성화바이러스 PcV가 감염된 *Penicillium* 종 1개체(PCVI), AfV가 감염된 *Aspergillus* 종 1개체(AFVI)를 분리하였다. 현재 본 연구진은 대표적인 버섯피해균주 푸른곰팡이 *Trichoderma*를 대상으로한 저병원성화 균주개발도 지속적으로 시도하고 있다.

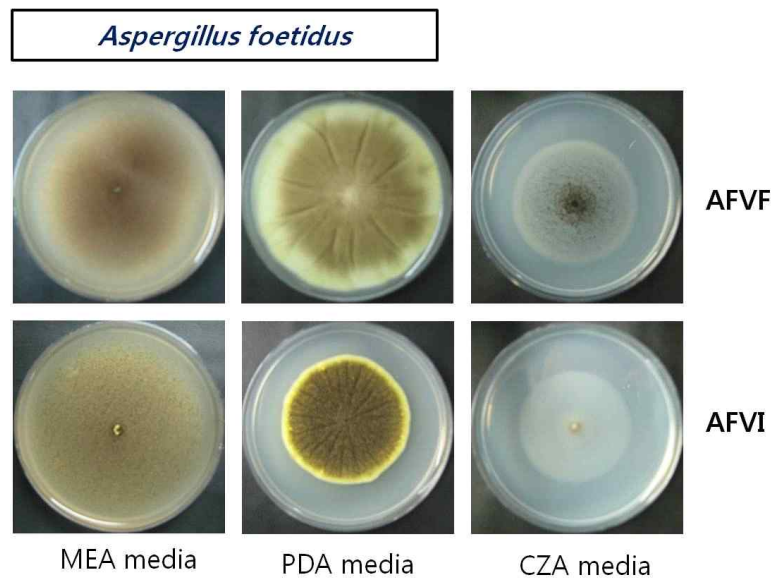
② 저병원성화바이러스 감염균주의 형태적 관찰

저병원성화바이러스가 성공적으로 전달된 각 균주들 *Penicillium* 종 1개체(PCVI), *Aspergillus* 종 1개체(AFVI)를 바이러스가 감염되지 않은 대조 균주들과 MEA(malt extract agar) 배지, PDA(potato dextrose agar)배지 및 CZA(czapek agar) 배지에서 각각 배양하여 그 형태를 비교 관찰하였다. PcV가 감염된 *Penicillium* 종(PCVI)의 경우 비감염 *Penicillium* 종(PCVF)에 비해 성장속도가 MEA에서 55%, PDA에서 23%, CZA에서 50%로 감소하였으며, MEA에서는 무성포자생성 또한 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 130). AfV가 감염된 *Aspergillus* 종(AFVI)은 비감염균주(AFVF)에 비해 성장속도가 PDA에서 65% 감소하였으며, MEA나 CZA에서 무성포자생성률이 현저히 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 131). 위의 실험결과들은 저병원성화바이러스가 전달된 곰팡이들에서 관찰되는 성장속도 감소와 무성포자가 생성률 감소결과와 일치하므로 형질전환법에 의해 개발된 성공적으로 viro-control 균주가 개발된 것으로 판단된다. 본 연구에서 개발된 친환경방제제를 활용하여 버섯피해곰팡이의 피해감소 정도를 조사할 예정이나 현재 표고버섯 자실체 생성률 조사가 진행 중이므로 자실체조사 실험이 완료된 후 해당 온실에 *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus foetidus* 곰

팡이를 인위적으로 감염시킨 후 개발된 PCVI-1, AFVI를 각각 사용하여 피해곰팡이에 대한 저해도를 조사할 계획이다.



[그림 130. *Penicillium* spp. viro-control 균주의 다양한 배양배지에서의 형태적 관찰. PCVF-1, PCVF-2; virus free strain, PCVI; virus-infected isogenic strain]



[그림 131. *Aspergillus* spp. viro-control 균주의 다양한 배양배지에서의 형태적 관찰. AFVF; virus free strain, AFVI; virus-infected isogenic strain]

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 최종목표

최 종 목 표	내 용
<p>버섯농가별 곰팡이바이러스 감염에 의한 버섯의 발병실태를 파악하고, 병징별 버섯시료를 수집하여 신종 버섯바이러스를 분리 및 분석하며, 무바이러스 표고 및 느타리 버섯균주의 개발과 분석을 통해 병원성 기작을 규명하고 이와 관련된 유전자 마커들을 개발한다. 또한 버섯바이러스의 핵산 또는 항체를 활용한 정밀용 및 보급용 진단용 키트를 개발하여 국내 농가 보급 종균의 바이러스 감염여부 조사와 외국품종 도입 시 바이러스 감염여부를 조사하는데 활용하고 신 품종 표고버섯을 포함한 1,000여 종 이상의 기존 균주들의 검증을 통해 무바이러스(virus-free) 종균을 최종 확보하여 균을 농가에 보급하여 농가 수익을 증대시키고, 수입종균을 검역 하는데 활용하고자 한다. 나아가 버섯피해진균의 viro-control 기반구축 연구를 통해 장래 버섯 친환경 생물 방제법 기술개발에 밑바탕이 되고자 한다.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스 규명 및 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 버섯바이러스 역학조사 및 바이러스 수집 - 바이러스 유전체 분석 - 유전체 기반 진단 kit 개발 - 항체기반 진단 kit 개발 - 보급형 진단 kit 개발 ◆ 무바이러스 표고품종 개발 및 실증시험 <ul style="list-style-type: none"> - 버섯재배농가에서 병징별 버섯수집 및 현황조사 - 표고 등록품종의 바이러스 감염도 조사 - 무바이러스 포자를 이용한 교배균주 육성 - 무바이러스 교배균주의 자실체 특성조사 - 선발된 무바이러스 교배균주의 자실체 실증시험 - 무바이러스 표고 품종 개발 ◆ 버섯바이러스 기작규명을 통한 균주 안정성 마커개발 및 버섯피해균주의 viro-control 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 버섯바이러스 병원성기작 규명을 위한 기반연구 - 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사 - 바이러스 병원성 기작규명을 위한 isogenic 균주개발 - 바이러스 감염 균주의 병리학적 특성조사 - 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성 조사 - 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 수행 - 버섯바이러스 기작 규명을 위한 단백질체학 수행 - 버섯피해곰팡이의 생물적방제제 연구를 위한 균주개발

2. 연차별 연구개발 수행내용 및 달성도

구분	연도	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
1차 년도	2011	○ 바이러스병 발병 버섯 수집 및 바이러스 분리 및 동정	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스병 발병 버섯수집 <ul style="list-style-type: none"> - 버섯농가 바이러스병 발생 버섯 병징 별 버섯수집 (느타리버섯, 표고버섯) - 버섯농가의 바이러스병 실태조사
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 등록품종의 바이러스 감염도 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 유통 및 등록품종의 바이러스 감염도 조사 (표고버섯) - 톱밥배지의 바이러스 감염도 조사
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 버섯감염 바이러스분리 <ul style="list-style-type: none"> - 초원심분리기를 이용한 버섯바이러스 분획분리 - 신 바이러스 감염 버섯분리
			100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스 분리동정 (3종) <ul style="list-style-type: none"> - 핵산분석과 전자현미경 통한 바이러스 동정
		○ 항체 제작을 위한 바이러스 유전자 cloning 및 단백질 생산	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스 항체 개발을 위한 단백질 생산 (3종) <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 단백질 생산을 위한 바이러스 유전자 cloning - 마우스 이용 바이러스 항체 제작 (복클론항체 3종)
		○ 표고버섯 수집 및 실태조사	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 재배지 바이러스 병징 실태조사 및 버섯 수집(196종) ◆ 순수 분리 및 보존 완료, 군사생장 특성조사, 대치배양실시
		○ 등록품종의 바이러스 감염도 조사	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 전북대, 경상대, 수집 및 등록품종 분양 무바이러스 감염도 조사
		○ 표고 무바이러스 단핵균주 선발 및 교배균주 육성	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 모균주 6개품종 특성조사 및 선발 ◆ 모균주당 20개씩 단핵균주 분리, 교배 조합실시, 군사생장조사 ◆ mono-mono mating 1,000조합실시, 275개 교배균주선발 및 군사생장 조사
		○ 수집균주별 자실체 발현시험 (실증시험)	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 수집균주 접종원 종균 392병 완성 및 톱밥배지 접종(1.3kg 2352봉) ◆ 배양 완료 후 재배사 이동 버섯발생 자실체 특성조사
		○ 버섯바이러스 기작 규명을 위한 인위적 버섯바이러스 감염	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ virus-free과 -infected 버섯 분양 및 바이러스 유전체 벡터 제작 - 형질전환법 감염을 위한 바이러스 유전체 발현 벡터 제작 (표고용벡터 2종, 느타리용벡터 2종) ◆ 버섯의 형질전환방법 개선(protoplast 생

구분	연도	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
				성률 증가 10 ⁶ 개/ml 이상) ◆ 다양한 virus-free 버섯에 버섯바이러스 감염
		○ 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성조사	100 %	◆ 이상형태(sector) 균사체 수집, 확인 - 바이러스와 이상형태와의 관계를 조사를 위한 표본 수집 및 바이러스 확인 (9개 조사)
		○ 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행	100 %	◆ 각 그룹별 자실체와 균사체의 유전자와 단백질 분리 ◆ gene fishing을 이용한 유전체학 조건성립 및 수행 ◆ 단백질체학 분석을 위한 버섯별 단백질의 2D gel에서의 layout 조건 성립
		○ 버섯피해곰팡이의 viro-control에 관한 연구 기반구축	100 %	◆ 버섯피해균주 푸른곰팡이균의 다양성 조사 - 다양한 푸른곰팡이균주의 분석(표고 버섯감염균 4종, 느타리 버섯감염균 3종) - 각 균주들의 바이러스 존재여부 확인
2차 년도	2012	○ 바이러스 유전체 분리 및 분석	100 %	◆ 바이러스유전체확보 및 분석 (3종) - 버섯바이러스 추출 - RT-PCR을 통한 유전체 추출 - 염기서열 결정
		○ DNA활용 진단 키트 개발 및 항체활용 진단 시스템 구축	100 %	◆ DNA활용 진단 키트 개발 - 유전체 정보를 바탕으로 한 바이러스 특이적 primer 합성
			80 %	◆ 항체개발(단클론 3종) 및 항체이용 ELISA kit 개발
		○ 바이러스 감염도 조사	100 %	◆ RT-PCR을 이용한 해외도입 종균(배지 분양 등)의 바이러스 감염도 조사
		○ 표고버섯 수집 및 실태조사	100 %	◆ 표고 재배농가 바이러스 병징 버섯수집 및 실태조사 ◆ 이병버섯 및 정상버섯 특성조사
		○ 표고 무바이러스 단핵균주 보존 및 교배균주 생리특성 조사	100 %	◆ 무바이러스 단핵균주 생리적 특성조사 ◆ 무바이러스 교배균주 균사생장 및 생리학적 특성조사
		○ 무바이러스 교배균주 톱밥재배 자실체 특성 검정 (실증시험)	100 %	◆ 무바이러스 표고 선발균주 톱밥재배 - 배지조제, 접종, 배양, 갈변화(1.3kg 내외 톱밥배지 3500봉) ◆ 버섯의 생산성 및 품질 비교, 분석
		○ 바이러스에 감염된 버섯특성 조사 및 병징조사	100 %	◆ 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사 - 감염 버섯의 병리학적 특성 조사 (표고버섯감염바이러스로 분리된 100개의 단핵균주의 분자유전학적 분석을 통한 특성조사. SCI급 논문발표)

구분	연도	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
				<ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 감염 균사체를 재배하여 자실체 형성시도(400봉) ◆ 버섯바이러스 인위적 감염 및 감염 버섯선별 - 인위적 배양방법으로 무바이러스 버섯 제작 후 형태학적 특징 분석 (무바이러스 균주 제작방법 개발) <ul style="list-style-type: none"> • 논문발표 및 특허 출원: • 무바이러스 표고균주 3종 분리 후 2종 특허기탁 • 무바이러스 느타리버섯 12종 분리) ◆ 이상형태(sector) 균사체수집, 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 수집, 바이러스에 의해 이상 형태를 보인 버섯 선별(50개 분석)
		○ 버섯바이러스 기작 규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 유전체학 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 병원성 관련 유전자 후보 선별 및 유전자 확보 ◆ 단백질체학 분석을 위한 기초작업 <ul style="list-style-type: none"> - 그룹별로 2D PAGE를 수행 및 병원성과 관련 있는 후보 단백질 추출 - MS에 의한 분석 (표고버섯바이러스 기작 관련 단백질 5종, 느타리 5종)
		○ 버섯피해곰팡이의 virocontrol 연구를 위한 균주개발	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Virus-free가 확인된 푸른곰팡이균의 저병원화 dsRNA 등을 감염 <ul style="list-style-type: none"> - 확인된 virus-free 균주에 대표적으로 보고된 저병원화 바이러스 감염 ◆ Hypovirus가 감염된 푸른곰팡이균들을 선별, 최종 isogenic 균주 확보 (감염균주 2종) ◆ Isogenic 균주의 형태학적 비교 관찰
3차 년도	2013	○ 바이러스 정밀 진단 및 보급형 간이 진단 시스템 개발	80 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스 정밀 진단 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 핵산 검출 진단법: RT-PCR 법 개발 - 바이러스 항체 정밀 진단법: 형광 및 SPR 검출 바이오센서 개발
			80 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 바이러스 보급형 간이 진단법 개발 (3종 이상) <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 단백질 항체를 이용한 보급형 진단 스트립 개발
		○ 무바이러스 우수 선발균주 톱밥재배 자실체 특성 검정	100 %	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 1차 무바이러스 표고 선발균주 2차 특성검정 <ul style="list-style-type: none"> - 무바이러스 느타리버섯 선발균주 자실체

구분	연도	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
				특성검정 - 버섯 제원 및 무바이러스 자실체 특성 조사
		○ 무바이러스 우수 선발균주 농가실증시험	100 %	◆ 2차 무바이러스 표고 선발균주 농가실증(10000봉 규모, 2개소) - 톱밥배지상 균배양특성 조사 - 톱밥재배 생산성 및 품질 비교검정
		○ 품종보호출원용 품종 선발및 TG 재배시험	100 %	◆ 품종보호출원 TG(Test Guideline) 항목 조사 ◆ 명칭등록, 출원서제출(2품종)
		○ 바이러스에 감염된 버섯의 특성조사	100 %	◆ 바이러스 감염 버섯의 다양한 조사 - 감염 버섯의 병리학적 특성 조사 - 분자생물학적 기술을 활용한 바이러스의 기작 규명
		○ 버섯의 이상형태와 바이러스 관계 규명	100 %	◆ 이상형태(sector)와 바이러스와의 연관성 조사
		○ 병원성 조절기작에 관여하는 유전체 및 단백질체 정보 데이터화	80 %	◆ 느타리와 표고 버섯바이러스 병징에 관련된 단백질확보 및 분석중 (표고버섯바이러스 기작관련 유전자 추가 6종, 느타리 3종)
		○ 버섯 바이러스 병원성 기작 관련 바이오 마커개발	80 %	◆ 수행결과를 바탕으로 한 바이오마커 선별 - 바이오마커로 활용가능한 유전자 또는 단백질 및 화합물질들을 선별(마커개발 2종) - 균주에 맞는 생화학, 분자생물학적 마커를 활용한 버섯종균의 바이러스 안정성 검증실험
○ 버섯피해곰팡이의 viro-control 연구	90 %	◆ 느타리와 표고버섯피해균주 각각 저병원화 바이러스에 의해 감염된 isogenic 균주 선발 - 푸른곰팡이균을 viro-control시키는 바이러스 최종선발 - 저병원화 푸른곰팡이를 버섯재배시 감염시켜 피해발생 저감도 측정 및 분석		
최종 평가	2013	▷ 바이러스병 발병 버섯 수집 및 바이러스 분리 및 동정	100 %	◆ 바이러스병 발병 버섯수집
			100 %	◆ 버섯감염 바이러스분리 및 동정
		▷ DNA활용 진단 키트 개발 및 항체활용 진단 시스템 구축	100 %	◆ DNA활용 진단 키트 개발
			80 %	◆ 항체개발(단클론 3종) 및 항체이용 ELISA kit 개발
		▷ 바이러스 정밀 진단 및 보급형 간이 진단 시스템 개발	80 %	◆ 바이러스 정밀 진단 시스템 개발
80 %	◆ 바이러스 보급형 간이 진단법 개발			

구분	연도	세부연구목표	달성도	연구개발수행내용
		▷ 바이러스 감염도 조사	100 %	◆ 등록품종의 바이러스 감염도 조사
			100 %	◆ 해외도입 종균(배지분양 등)의 바이러스 감염도 조사
		▷ 표고버섯 수집 및 실태조사	100 %	◆ 재배지 바이러스 병징 실태조사 및 버섯 수집(196종)
		▷ 표고 무바이러스 교배균주 육성 및 실증시험	100 %	◆ 교배균주 최종선발(275개)임가실증시험(표고;10000봉, 느타리3000봉)
		▷ 품종보호출원	100 %	◆ 품종명칭등록(2품종) 품종보호출원(2품종)
		▷ 버섯바이러스 병원성기작 규명연구	100 %	◆ 단핵균주(100개)를 이용한 바이러스특성 조사(SCI급 논문보고) ◆ 표고버섯 무바이러스 균주개발 3종(특허기탁 2종, 무바이러스균주개발법 특허) ◆ 느타리버섯 무바이러스 균주개발 12종 ◆ 병원성 기작연구를 위한 균사체성장(11배지 조사) ◆ 자실체 형성률 조사(400봉 x 2회)
		▷ 버섯형질전환법 개선	100 %	◆ 형질전환법 구축 (protoplast 10^7 개/ml 생성률 성공)
		▷ 이상형태와 바이러스 병징과의 관련성 조사	100 %	◆ 이상 균사체(9종) 및 자실체(50) 바이러스 존재여부 조사. 이상형태 자실체와 바이러스의 관련성 확인
		▷ 버섯바이러스 기작규명을 위한 유전체학 및 단백질체학 수행	90 %	◆ 유전체학, 단백질체학 실험방법 구축 ◆ 표고버섯 유전자 6개, 느타리버섯 3개 확보 및 분석 ◆ 표고버섯 단백질 5개, 느타리버섯 5개 확보 및 분석 중
		▷ 버섯바이러스 병원성 기작 관련 바이오마커 개발	90 %	◆ 생화학마커개발(2종)
▷ 친환경방제제 연구기반마련		◆ 저병원성화 바이러스에 의해 성장이 저해된 버섯감염곰팡이 개발(2종)		

제 2 절 기여도

1. 연구성과

가. 신제품 무바이러스 버섯개발 연구

- 총 무바이러스 느타리버섯 12 종, 표고버섯 6 종 개발
- 이 중 표고버섯 2종은 국제특허기탁 완료 후 무바이러스 진균개발기술과 함께 특허 출원 진행(10-2013- 0018689), 관련내용을 SCI논문 2편(2013)에 게재
- 다른 2종의 표고버섯은 신제품 명칭등록, 품종출원 및 상품화를 진행예정
- 추가적으로 무바이러스 느타리버섯 2종 관련내용 SCI 논문 1편(2012) 게재
- **과제종료 후 예상기여도:**
 - 무바이러스 표고버섯균주의 명칭등록(2종), 품종출원(2종), 상품화(1종)가 진행예정이므로 국내 표고버섯 생산량(4만톤/년, 2,250억) 중 국내중균자급률(40%) 상승효과 및 로열티 (67-113억원/년) 절감효과가 기대됨.
 - 무바이러스 균주 선발방법의 규명으로 이를 무바이러스 균주에 적용
 - 바이러스에 이병된 버섯에서 바이러스를 퇴치가가능하게 하여 우량 무바이러스 중균생산 방법을 확립
 - 버섯의 이병화에 대하여 재배농가의 재배현황개선으로 생산성 및 품질 향상을 통한 재배 농가의 버섯 수량증대 및 품질향상으로 소득증대를 창출

나. 신종버섯바이러스 발굴 및 진단키트 기술 개발

- 신종버섯바이러스 3종을 발굴하여 유전체확보 후 DNA활용 진단키트 및 항체이용 ELISA 키트 기술 개발, 실용성 조사 진행
- 관련내용 SCI 논문 1편(2013) 게재
- **과제종료 후 예상기여도:**

신종버섯바이러스 진단키트의 기술이전, 상품화 및 판매를 최대화하기 위하여 제 1협동과 제팀의 참여기업을 (주)머쉬아트에서 벤처회사 Amicogen으로 변경하고 기술이전 후 상품 판매예정. 정밀형 진단키트(100 만원)의 경우 식물검역소, 농진청 및 중균회사에 판매하여 수익창출이 가능함(약 2억/년).

 - 중국 및 외국 수입접종배지중 표고접종 배지(8,300톤/년)에서 90% 이상의 바이러스 감염률을 보이거나 검역이 이루어지지 않음. 따라서 본 연구진의 연구결과를 바탕으로 표고접종 배지의 검역을 농림부 식물검역소에 시책건의 할 예정임. 수입중균의 검역이 의무화될 경우 진단키트의 수요 급증(예상매출액 30배 이상)과 본 연구진의 무바이러스 버섯품종의 가치가 상승할 것으로 기대됨. 농가의 버섯품질과 생산량 증대효과 기대됨.

- 종균보급회사에 진단키트를 제공하여 무바이러스 종균만 유통가능 하게 할 수 있다.
이를 통하여 버섯 재배사에서 바이러스병 발생을 원천적으로 방지

다. 국내버섯바이러스 병원성 기작 및 생물방제제 연구기반

- 병원성 기작연구과정 중 유전자원 후보군 21개를 확보한 후 분석 완료 된 6개 등록 중.
관련 정보 진단키트 개발에 활용, 버섯재배 피해곰팡이의 생물방제제 균주 2종 개발
- 관련내용 SCI 논문 6편 게재

• 과제종료 후 예상기여도:

- 분석 중인 유전자 후보군 모두 유전자원 추가등록 예정. 바이오마커 2종을 활용하여 안정성 검증방법 개발, 진단키트의 결과를 재검증 또는 미검출 바이러스 확인 등에 활용함.
- Viro-control 연구기반구축을 통한 미래의 친환경 생물방제기술 개발을 뒷받침

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연차별 연구 성과

가. 연구 성과

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시)유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도 (2011)	목표								3	1	
	달성								<ul style="list-style-type: none"> 진균이상형태 연구 표고버섯바이러스발굴 바이러스검출법 	<ul style="list-style-type: none"> 재배종버섯 바이러스 	
2차 년도 (2012)	목표	1 • 신규표 버섯바 이러스						5	3	2	
	달성	1[2] • 무바이 러스버섯 제작방법 [• 신규 무바이러 스표고버 섯 특 허기탁- 2종]						4	7		
								<ul style="list-style-type: none"> 표고버섯바이러스 병원성관련 유전자 느타리버섯 바이러스병 원성관련유 전자 	<ul style="list-style-type: none"> 표고버섯 바이러스기 작 관련연구 버섯이상형태 관련연구 버섯바이러스 동정 및 검출 	<ul style="list-style-type: none"> 느타리버섯 바이러스기 작 관련연구 	
								<ul style="list-style-type: none"> 병원성 대사물질 관련유전자 	<ul style="list-style-type: none"> 표고버섯바이 러스의 기작 관련연구 진균바이러스 의 기능 분석 표고버섯바이 러스 검출 및 분석 목재분해진균 의 효소 유전자분리 및 분석1 목재분해진균 의 효소 유전자분리 및 분석2 바이러스 백신개발 대사산물 생성 유전자 분리 및 분석 		

3차 년도 (2013)	목표	1 • 신규 느타리 버섯 바이러스		2 • 표고신품종 명칭 등록 2종		2 • 표고신 품종 출원 2종		10 • 표고버섯 바이러스 병원성관 련유전자 • 느타리버섯 바이러스 병원성 관련유전자 • 버섯이상 형태관련 유전자	4 • 표고버섯바이 러스기작관련 유전자연구 • 느타리버섯 바이러스기작 관련유전자 연구 • 버섯피해 균주 viro- control 연구	2 • 무바이러스 표고종균 개발	
	달성		1 • 느타리 버섯 바이러스 진단키트	2 • 표고신품종 명칭 등록 2종		2 • 표고신 품종 출원 2종		2 • 진균병원성 관련유전자 [유전자등록 진행할 확보 유전자 보유중]	3 • 진균의병원성 기작연구 • 대사물질의 대량생산유도 연구 • 진균의미생물 분포도연구		
계	목표	2		2		2		15	10	5	
	달성	1 [2] [특허기탁]	1	2		2		6	14	0	

나. 논문게제 성과

게제연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Curing viruses in <i>Pleurotus ostreatus</i> by growth on a limited nutrient medium containing cAMP and rifamycin	권영철	이현숙	정동원 김신일 노현수	Journal of Virological Methods	185(1)	국외	SCI급
2012	Comparative proteomic analysis of chestnut blight fungus, <i>Cryphonectria parasitica</i> , under tannic-acid inducing and hypovirus-regulating conditions	김정미	김대혁	박진아	Canadian Journal of Microbiology	58(7)	국외	SCI급
2012	Biological function of a novel chrysovirus, CnV1-BS122, in the Korean <i>Cryphonectrianitschkei</i> BS122strain	김정미	김대혁	정지은 박진아 박승문 차병진	Journal of Bioscience and Bioengineering	115(1)	국외	SCI급
2012	Rapid screening of an ordered fosmid library to clone multiple polyketide synthase genes of the phytopathogenic fungus	소금강 김정미	김대혁	응웬응옥르영 박진아 김범태 박승문 황기준	Journal of Microbiological Methods	91(3)	국외	SCI급

	Cladosporium phlei							
2013	Isolation and characterization of a mycovirus in <i>Lentinula edodes</i> and determination of its vertical transmission	김동규	이현숙	권영철 원효경 김나리 신명주 박소정 김신일	Virus Genes	51(1)	국외	SCI급
2013	Isolation and characterization of a mycovirus in <i>Lentinula edodes</i>	원효경	이현숙	박소정, 김동규 신명주, 김나리 이송희, 권영철 고한규, 노현수	Journal of Microbiology	51(1)	국내	SCI급
2013	Occurrence of dsRNA mycovirus (LeV-FMRI0339) in the edible mushroom <i>Lentinula edodes</i> and meiotic stability of LeV-FMRI0339 among monokaryotic progeny	김정미	김대혁	윤숙현 고한규 박승문	The Plant Pathology Journal	29(4)	국내	SCI급
2013	Biological function of a novel chrysovirus, 91V1-BS122, in the Korean <i>Cryphonectria nitschkei</i> BS122 strain	김정미	김대혁	정지은 박진아 박승문 차병진	Journal of Bioscience and Bioengineering	115(1)	국외	SCI급
2013	Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> and its synergistic action with endo-xylanase	응웬덕후이	박승문	Thiyagarajan S 김대혁 최윤이	Bioprocess and Biosystems Engineering	36(6)	국외	SCI급
2013	Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase with carbohydrate binding module from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	응웬덕후이	박승문	Thiyagarajan S 김대혁	Journal of Bioscience and Bioengineering	115(5)	국외	SCI급
2014	Functional analysis of a tannic acid-inducible and hypoviral-regulated small heat shock protein Hsp24 from the chestnut blight fungus <i>Cryphonectria parasitica</i> .	백진호	김대혁	박진아, 김정미, 오정미, 박승문	Molecular Plant-Microbe Interaction	27(1)	국외	SCI급
2014	Expression and characterization of an M cell-specific ligand-fused dengue virus tetravalent epitope using	응웬응 옥르영	김대혁	소금강, 김정미, 양문식, 장용석,	Journal of Bioscience and Bioengineering	S1389-1723 (14)00221-7.	국외	SCI급

	Saccharomyces cerevisiae.							
2014	Mycoflora and Enzymatic Characterization of Fungal Isolates in Commercial Meju, Starter for a Korean Traditional Fermented Soybean Product	백진호	김대혁	소금강, 고요한, 김정미	Mycobiology	9월 출간	국내	SCI급
2014	Mass production of phleichrome from the phytopathogenic fungus <i>Cladosporium phlei</i> using synthetic inducers and photodynamic ROS production by phleichrome	소금강	김대혁	조익수, 채민선, 김정미, 김범태, 김진국, 최종경	Journal of Bioscience and Bioengineering	accepted	국외	SCI급

다. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	마이코 바이러스에 감염된 진균류의 마이코 바이러스 제거방법	김대혁 양문식 김정미	대한 민국	10-2013-0018689	2014	느타리 버섯 바이러스 PoSV 진단용 특이 프라이머, 및 이를 이용한 진단 방법	이현숙, 정동원, 권영철	대한민국	10-1356375

라. 인력지원 성과

구분	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차년도	-	3	-	-	1	2	-	-	3
2차년도	-	1	1	-	2	-	-	-	2
3차년도	2	1	1	-	3	1	1	1	2
합계	2	5	2	-	6	3	1	1	7

마. 교육 성과

교육명	교육일	교육시간	교육인원	교육지역	교육내용
표고재배기술 상설 교육	2011년 08월 31일	2	31	여주	표고재배기술 교육 종균 및 배지생산시설 견학

표고재배기술 상설 교육	2011년 10월 31일	2	34	여주	표고재배기술 교육 중군 및 배지생산시설 견학
표고재배기술교육 (초급반)	2012년 01월 16일	8	111	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2012년 02월 16일	8	116	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2012년 04월 25일	8	113	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2012년 05월 09일	8	56	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2012년 08월 29일	8	101	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술 순회교육	2012년 09월 06일	4	30	예산	표고원목및튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술 순회교육	2012년 09월 20일	2	45	용인	표고튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술 상설 교육	2012년 10월 09일	3	29	여주	표고재배기술 교육 중군 및 배지생산시설 견학
표고재배기술 순회교육	2012년 10월 26일	3	40	포천	표고원목및튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술 상설 교육	2012년 12월 28일	2	24	여주	표고재배기술 교육 중군 및 배지생산시설 견학
표고재배기술교육 (초급반)	2013년 01월 23일	8	111	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2013년 02월 19일	8	100	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술 상설 교육	2013년 02월 27일	2	29	여주	표고재배기술 교육 중군 및 배지생산시설 견학
표고재배기술 순회교육	2013년 09월 13일	2	52	여주	표고원목및튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술 순회교육	2013년 10월 10일	2	30	칠곡	표고튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술 순회교육	2013년 10월 22일	2	48	진안	표고원목및튱밥재배전문기술 현장애로사항토의및개선택지도
표고재배기술교육 (초급반)	2014년 01월 22일	8	90	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학
표고재배기술교육 (초급반)	2014년 02월 19일	8	80	여주	표고버섯원목및튱밥재배기술 재배관련기자재전시및재배현장견학

바. 홍보성과

유형	홍보일	제목	매체명	보도일	작성자
잡지	2012.03	표고재배기술교육(초급반)1/16	산림지(산림소식News)	2012.03	최선규
잡지	2012.03	표고 튱밥재배 배지배양관리	월간버섯	2012.03	김인엽
학술지	2012.06	한국버섯학회하계학술대회'버섯'	한국버섯학회'버섯'	2012.06.	최선규

		(이미지광고)			
신문	2012.06	2012년제3회임산미생물분야산학 연간담회및산림버섯채집회	버섯정보신문	2012.06.	이원호

2. 연구성과활용 계획

가. 실용화 · 산업화 계획

1) DNA 활용 바이러스 진단키트

개발한 DNA 활용 진단키트를 이용해 국내 농가 보급 종균의 바이러스 감염여부 조사와 외국품종 도입 시 바이러스 감염여부 조사에 활용계획

2) 항체 활용 바이러스 진단키트

개발한 항체 활용 바이러스 진단키트를 이용해 국내 농가 보급 종균의 바이러스 감염여부 조사와 외국품종 도입 시 바이러스 감염여부 조사에 활용. 개발된 항체를 이용해 바이러스 정밀진단 시스템 및 보급형 간이진단 시스템 확립

: 본 연구진에 의해 개발된 DNA활용 진단 키트와 구축된 항체활용 진단 시스템을 (주) 아미코젠에 기술이전 하여 상품화할 계획. 본 기술이 상품화될 경우 버섯종균의 안정성 조사에 활용하여 무바이러스 종균을 농가에 보급하도록 하며 외국품종 도입 시 바이러스에 감염된 종균을 선별하는데 이용하여 국내 농가의 피해 축소

3) 무바이러스 표고버섯 상품화

현재 표고버섯의 바이러스 감염에 의한 농가 표고버섯 이상형태 및 곰팡이 감염률 증가 문제를 해결하기 위한 새로운 무바이러스 품종의 상품화가 절실한 실정. 본 연구를 통해 개발된 무바이러스 표고버섯의 실증실험 및 품종테스트를 약 5년간 진행 후 상품등록계획. 농가의 소득증대에 크게 기여할 것이라 사료됨.

4) 무바이러스 종균개발기술의 실용

본 연구진은 간단한 방법으로 이병버섯균주로부터 무바이러스 버섯균주를 개발하는 실험기술을 개발하였고 본 과제의 실적으로 특허등록 및 논문실적을 확보. 바이러스의 출현을 쉽게 검출할 수 있는 핵산 검출법을 구축하였고 이병버섯균주로부터 무바이러스 버섯균주를 간단히 생산할 수 있는 기술은 버섯바이러스가 출현에 대응가능.

나. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

1) 교육 및 지도

제 2 협동기관인 산림버섯연구소는 무바이러스 표고버섯의 상품화를 위해 약 5년간 농가실 증재배를 지속해야하며 정확한 결과확보를 위하여 농가를 순위교육을 통해 톱밥재배기술을 교육하고 지도할 계획임.

2) 홍보

◆ 버섯바이러스 진단키트 상품화 및 무바이러스 표고버섯 상품화의 성공을 위하여 다양한 홍보를 통하여 버섯바이러스의 문제점을 알리고 본 연구결과의 중요도를 강조하는 홍보를 (주) 아미코젠, 산림버섯연구소, IPET에서 진행할 계획임.

다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

1) 특허

- ◆ 현재 마이코바이러스 제거방법에 관한 특허등록을 진행 중이며 2014년 내에 특허등록을 완료할 계획임.
- ◆ 본 연구에서 개발한 느타리 무바이러스 균주에 대한 특허기탁은 이루어지지 않은 관계로 자실체 실증실험이 완료되면 균주의 특허기탁을 진행할 예정임.

2) 품종

- ◆ 본 과제에서 품종보호출원한 무바이러스 표고균주에 대해 품종보호등록을 진행할 예정
- ◆ 무바이러스 느타리버섯의 품종명칭등록을 위하여 정보를 수집 중.

3) 논문

- ◆ 표고버섯바이러스의 특성을 조사한 관련 논문을 현재 심사 중이며 수개월 안에 논문 인쇄가 완료되도록 진행 중
- ◆ 느타리버섯바이러스이 특성을 조사한 연구결과를 활용하여 논문을 투고할 계획임.

라. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1) 새로운 버섯바이러스 검출용 진단키트의 개발연구

버섯바이러스에 대한 지속적인 진단키트가 요구되며 본 연구진은 새로운 버섯바이러스를 추가 탐색하고 해당 바이러스 유전자를 활용한 항체를 제작하여 추가 진단키트를 개발하는데 본 연구의 연구결과 및 기술을 적극 활용할 계획임.

2) 무바이러스 신품종 보급을 위한 연구

육성된 교배균주에 대하여 자실체검정시험의 확대재배와 농가실증시험을 지속적으로 진행하여 무바이러스 신품종을 개발하여 보급할 계획

3) 친환경생물방제제 개발연구

버섯감염곰팡이의 친환경생물적방제제 개발을 위한 후속과제가 선정되었으며 본 연구에서 개발한 균주를 활용하여 활용가능성을 조사하고 대표 버섯감염푸른곰팡이의 생물방제제개발에 본 연구결과와 기술을 연구의 기반으로 적극 활용

4) 표고버섯바이러스의 병원성 기작연구

유전체학과 단백질체학을 추가 진행할 예정이며 최종 확보하게 될 유전자들의 분자유전학적 접근을 통해 병원성기작과의 연관성을 연구할 예정

제 6 장 연구개발과정에서 수입한 해외과학기술정보

연구개발과정에서 비용을 지불하고 수입한 해외과학기술정보는 없다. 그러나 본 연구진은 과제진행에 중요한 기술을 개발하기 위하여 외국연구진의 관련 연구논문을 인용하였으며 그 상세한 정보는 아래와 같다.

1. Qiu L, Li Y, Liu Y, Gao Y, Qi Y, Shen J. 2010. Particle and naked RNA mycoviruses in industrially cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* in China. *Fungal Biol.* 114(5-6): 507-513.

: 본 연구에서 항체를 제작하는데 항원의 purity를 높이기 위해 바이러스 단백질 분리 방법을 변경하였는데 앞선 논문의 내용을 참고 하였다. 그 결과 항원의 purity를 상당히 높일 수 있었으며 이는 앞으로 버섯 바이러스 항원의 purity를 높이는데 큰 도움이 될 것이다.

제 7 장 연구시설, 장비 현황

연구기자재 및 연구시설	규격	수량	활용용도	보유기관	확보방안	비고
Ultracentrifuge	Vision	1	바이러스 분리	경상대학교	기확보	제1협동
PCR	Labnet	1	유전자증폭	경상대학교	기확보	제1협동
Deep freezer	Sanyo	1	시료보관	경상대학교	기확보	제1협동
Clean Bench	Hanil	1	무균조작	경상대학교	기확보	제1협동
Water bath	Vision	1	시료항온유지	경상대학교	기확보	제1협동
Autoclave	Vision	1	기기멸균	경상대학교	기확보	제1협동
Dry oven	Daehan	1	초자기구건조	경상대학교	기확보	제1협동
Centrifuge	Eppendorf	1	시료침전	경상대학교	기확보	제1협동
Magnetic stirrer	Mylab	1	시약용해	경상대학교	기확보	제1협동
Balance	Beckman	1	시약정량	경상대학교	기확보	제1협동
Incubator	Vision	1	시료배양	경상대학교	기확보	제1협동
Electrophoresis cell	Bio-Rad	1	유전자확인	경상대학교	기확보	제1협동
균 배양기	2,4 Chamber	7	균배양	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
진탕배양기	1,2 Chamber	2	균배양	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
무균실	3×4 m	1	균접종실	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
클린벤취	1500 mm	3	무균조작	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
현미경	광학, 도립	4	균사검정	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
저온보존고	4℃	4	균주 및 시약보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
냉장냉동고	4℃, -20℃	2	균주 및 시약보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
냉동고	-20℃	2	균주 및 시약보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
Spectrophotometer	Beckman	1	특성검정 DNA정량	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
PCR system	96 well	2	DNA 증폭	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
Gel Doc System	CCD gel	1	핵산 영상분석기	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
Fingerprinting Software	Cluster Anal.	1	핵산지문분석	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
전기영동기	30, 20, 14well	4	핵산분석	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
액체질소보존고	액체질소탱크	1	균주보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
초저온냉동고	-70℃	2	균주보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
저온냉각기	-40℃	1	균주보존	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
동결건조기	EYLA	1	시료건조	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
살균기	50 L	2	배지 및 초자 살균	산림버섯연구센터	기확보	제2협동

건조기	120 L	1	초자건조	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
원심분리기	1.5 ml, 2 ml	2	원심분리	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
아이스 메이커	150 kg	1	시료준비	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
Hybridizer	5 L	1	DNA 분석	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
Heating block	24 hole	1	DNA 분석	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
항온진탕배양기	96 well	1	균배양	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
항온수조	3 L	1	시료처리	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
저온항온수조	2 L	1	시료처리	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
항온 배양실	25 m ²	1	균배양	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
종균배양시설	100만병/년	1	종균배양	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
원목재배시험 재배사	300 m ²	23	원목재배시험	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
툽밥재배시험 재배사	180 m ²	23	툽밥재배시험	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
환경조절재배사	330 m ²	1	자실체 특성검정	산림버섯연구센터	기확보	제2협동
툽밥재배시험 재배사	30 m ²	1	툽밥재배시험	전북대학교	기확보	주관
Clean bench	Vision	3	무균실험	전북대학교	기확보	주관
PCR	Labnet	2	유전자증폭기	전북대학교	기확보	주관
Autoclave	Vision	2	미생물 및 배지살균	전북대학교	기확보	주관
동결건조기	Operon	1	시료건조	전북대학교	기확보	주관
Microscope	Olympus	1	미생물관찰	전북대학교	기확보	주관
PH측정기	Beckman	1	시료 PH 측정	전북대학교	기확보	주관
Deep freezer	Sanyo	2	미생물 보존	전북대학교	기확보	주관
전기영동장치	Bio-Rad	3	시료 전기영동	전북대학교	기확보	주관
초음파분쇄기	BioSpec	1	조직세포분쇄기	전북대학교	기확보	주관
저온BOD배양기	Vision	1	시료배양	전북대학교	기확보	주관
미량원심분리기	Hanil	3	시료 분리·정제	전북대학교	기확보	주관
Standing incubator	Vision	2	미생물 배양	전북대학교	기확보	주관
Shaking incubator	Vision	4	미생물 배양	전북대학교	기확보	주관
항온수조	Vision	1	시료 온도제어	전북대학교	기확보	주관
진공 농축기	Savant	1	시료 농축	전북대학교	기확보	주관
냉장플로어원심분리기	Eppendorf	1	시료 분리·정제	전북대학교	기확보	주관
Realtime PCR	AB	1	유전자증폭기	전북대학교	기확보	주관
자외선 작업함	Vilber	1	UV cross linker	전북대학교	기확보	주관
진탕기	Vision	2	Rocker	전북대학교	기확보	주관
교반기	MTops	5	시약 제조	전북대학교	기확보	주관

실험실용 히터	TS	2	시료 온도제어	전북대학교	기확보	주관
증류제조기	Younglin	1	2차 증류수 제조	전북대학교	기확보	주관
증류수장치	Millipore	1	3차 증류수 제조	전북대학교	기확보	주관
멀티미디어영상현미경	Leica	1	미생물 관찰	전북대학교	기확보	주관
미니원심분리기	Mylab	1	시료 분리·정제	원광대학교	기확보	공동연구원
고속원심분리기	Hanil	1	시료 분리·정제	원광대학교	기확보	공동연구원
pH 적정기	Thermo	1	시료적정	원광대학교	기확보	공동연구원
핫플레이트	Mylab	3	시약 균일혼합	원광대학교	기확보	공동연구원
튜브혼합기	Genie 2	3	Cell·시약 혼합	원광대학교	기확보	공동연구원
진탕배양기	한백과학	1	미생물 배양	원광대학교	기확보	공동연구원
Deep freezer	Operon	1	미생물 배양	원광대학교	기확보	공동연구원
Clean bench	한백과학	2	미생물 접종	원광대학교	기확보	공동연구원
건조기	Wiseven	2	시료·기구 건조	원광대학교	기확보	공동연구원
배양기	Vision	3	미생물 배양	원광대학교	기확보	공동연구원
Heating dry bath	Echotherm	1	시료 전처리	원광대학교	기확보	공동연구원
동결건조기	Christ	1	Cell 건조	원광대학교	기확보	공동연구원
혼합기	Vision	1	시료 전처리	원광대학교	기확보	공동연구원
디지털 저울	Satorus	3	칭량	원광대학교	기확보	공동연구원
PCR 기기	Applied	1	DNA 증폭	원광대학교	기확보	공동연구원
현미경	Kyowa	2	미생물 관찰	원광대학교	기확보	공동연구원
아이스 제조기	Vision	1	온도 유지	원광대학교	기확보	공동연구원
고압멸균기	삼흥	1	미생물 멸균	원광대학교	기확보	공동연구원
증류수기	셀바이오	1	초순수 제조	원광대학교	기확보	공동연구원
Water Bath	JSR	1	시료 전처리	원광대학교	기확보	공동연구원
핵산 전기영동장치	Bio-Rad	3	핵산분석	원광대학교	기확보	공동연구원
단백질 미니전기영동기	Bio-Rad	1	단백질분석	원광대학교	기확보	공동연구원
단백질 전기영동기	Bio-Rad	1	단백질분석	원광대학교	기확보	공동연구원
등전집속기	GE	1	단백질분석	원광대학교	기확보	공동연구원
Hood	한백과학	1	시약조제	원광대학교	기확보	공동연구원
광도계	GE	1	시료분석	원광대학교	기확보	공동연구원

제 8 장 참고문헌

1. Akamatsu S., Watanabe A., Tamesada M., Nakamura R., Hayashi S., Kodama D., Kawase M. and Yagi K. 2004. Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on Dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 27:1957-1960.
2. Buller A. H. R. 1931. Research on Fungi Vol. 4, Longmans, Green, and Co., London, p6-26.
3. Campbell A. C. and Racjan M. 1999. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinula edodes* (shiitake). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 43:101-107.
4. Chang S. T. and Miles, P. G. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact 2nd edition. CRC press. p451.
5. Chiu S. W., Wang Z. M., Chiu W. T., Lin F. C. and Moore D. 1999. An integrated study of individualism in *Lentinula edodes* in nature and its implication for cultivation strategy. *Mycol. Res*. 103:651-660.
6. Chiu S. W., MA A. M. Lin F. C., Moore D. 1996. Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake(*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. *Mycol. Res*. 100:1393-1399.
7. Chum W. W., Kwan H. S., Au C. H., Kwok, I. S., Fung, Y. W., 2011. Cataloging and profiling genes expressed in *Lentinula edodes* fruiting body by massive cDNA pyrosequencing and LongSAGE. *Fungal. Genet. Biol*. 48:359-369.
8. Chum W. W., Ng K. T., Shih R. S., Au C. H., Kwan, H. S., 2008. Gene expression studies of the dikaryotic mycelium and primordium of *Lentinula edodes* by serial analysis of gene expression. *Mycol. Res*. 112:950-964.
9. Diehle D. A. and Royse D. J. 1986. Shiitake cultivation on sawdust: Evaluation of selected genotypes for biological efficiency and mushroom size. *Mycologia*. 78:929-933.
10. Enman J., Rova U., Berglund K. A. 2007. Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:1177-1180

11. Fang N., Li Q., Yu S., Zhang J., He L., Martin J. J. Ronis and Thomas M. Badger. 2006. Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Human Cancer Cell Lines by an Ethyl Acetate Fraction from Shiitake Mushrooms. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 12:125-132.
12. Goodin, M. M., Schlagnhauer, B. and Romaine, C. P. 1992. Encapsidation of the La France disease-specific double-stranded RNAs in 36nm isometric virus-like particles. *Phytopathology*. 82: 285-290.
13. Hallings, M. 1962. Viruses associated with dieback disease of cultivated mushrooms. *Nature* 196: 962-965.
14. Harmsen M. C., Tolner B., Kram A., Go S. J., de Haan A., Wessels J. G. 1991. Sequences of three dsRNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). *Curr. Genet.* 20:137-144.
15. Kathryn M. Jacobson, Orson K. Miller, JR., and Bruce J. Turner. 1993. Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Population Biology*. 90:9159-9163.
16. Kim K.H., Kim Y. Y., Ka K. H., Lee H. S., Bak W. C., Jeong S. J., Seong J. Y. and Suh D. D.. 2009. Microsatellite Markers for Population-Genetic Studies of Shiitake (*Lentinula Edodes*) Strains. *Genes & Genomics*. 31:421-429.
17. Kulkarni R. K.. 1991. DNA polymorphism in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1735-1739.
18. Magae Y. 2012. Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*. *Virology*. 9:60.
19. Miyazaki K., Neda H., and Shirashi S. 2005. Tetrad analyses of mating types in shiitake (*Lentinula edodes*). 森林総合研究所研究報告. 4:217-223.
20. Moore, R.T. 1980. "Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts". *Botanica Marina*. 23:371
21. Ngai Patrick H.K., Ng T.B. 2003. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse

transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Science* 73:3363-3374.

22. Park W. M., Ko H. G., Park R. J. Hong K. S., Kim G. H. 1997. Differentiation of *Lentinula edodes* isolates in Korea by isoenzyme polymorphism and random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Kor. J. Mycol.* 25:176-190.
23. Revill, P. A., Davidson, A. D. and Wright, P. J. 1999. Identification of a subgenomic mRNA encoding the capsid protein of mushroom bacilliform virus, a single-stranded RNA mycovirus. *Virology*. 260:273-276.
24. Royse Daniel J., Sanchez Jose E. 2007. Ground wheat straw as a substitute for portions of oak wood chips used in shiitake (*Lentinula edodes*) substrate formulae. *Bioresource Technology*. 98:2137-2141.
25. Sinden, J. W. and Hauser, E. 1950. Report of two new mushroom diseases. *Mushroom Sci.* 1: 96-100.
26. Suzuki M., Iwashiro M., Takatsuki M., Kuribayashi K. and Hamuro J. 1994. Reconstruction of anti tumor effects of lentinan in nude Mice: roles of delayed-type hypersensitivity reaction triggered by CD4-positive T cell clone in the infiltration of effector cells into tumor. *Cancer Science* 85:409-417.
27. Tavantzis, S. M., Romaine, C. P. and Smith, S.H. 1980. Purification and partial characterization of a bacilliform virus from *Agaricus bisporus*: a single strand RNA mycovirus. *Virology*. 105, 94-102.
28. Takehara M., Kuida K. Mori K. 1979. Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Archives of Virology*. 59:269-274.
29. Tanaka A., Miyazaki K., Murakami H., Shiraishi S. 2004. Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*. *Genome*. 47:156-162.
30. Terasima K., Matsumoto T., Hasebe K., Fukumasa-Nakai Y. 2002a. Genetic diversity and strain-typing in cultivated strains of *Lentinula edodes*(the shiitake mushroom) in japan by AFLP analysis. *Mycol. Res.* 106:34-39.
31. Van der Lende, T. R., Harmsen, M. C., Go, S. J. and Wessel, J. G. H. 1995. Double-stranded RNA Mycoviruses in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 51-56.
32. Vos P., Hogers R. Bleeker M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid*

Res. 23:4407-4414.

33. Wang Ming Li, Barkley Noelle A., Jenkins Tracie M.. 2009. Microsatellite Markers in plant and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. Global Science Books. p5-7.
34. Wu L, van Peer A, Song W, Wang H, Chen M, Tan Q, Song C, Zhang M, Bao D. 2013. Cloning of the *Lentinula edodes* B mating-type locus and identification of the genetic structure controlling B mating. *Gene*. 531:270-278.
35. Yap Ann-Teck, Ng Mah-Lee. 2006. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 3:9-20.
36. Yue G. H., Orban L. 2000. Rapid isolation and characterization of microsatellites from the genome of Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae, Pisces). *Molecular Ecology*. 9:1007-1009.
37. Zietkiewics E., Rafalski A., Labuda D. 1994. Genom fingerprinting by simple sequence repeats(SSR) anchored PCR amplification. *Genomics*. 20:176-183.
38. Zhong M, Liu B, Wang X, Liu L, Lun Y, Li X, Ning A, Cao J, Huang M., De novo characterization of *Lentinula edodes* C(91-3) transcriptome by deep Solexa sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 431:11-115.
39. 長谷部公三部, 大平郁男, 有田郁夫本. 1998. ツイタケの木栽培における字實體發生溫度型: 高温型, 中温型および低温型遺傳的 關係. 菌蕈研究所研究報告. 36:21-28
40. 고향규, 김선철, 최선규, 노종현, 이병석. 2009. 표고생산기반조성사업 연구보고서. 산림조합중앙회 산림버섯연구소. p186-192.
41. 구창덕, 유창현, 문중현, 변형석, 이명수, 이향주, 정의용, 황성태. 2006. 표고재배사내 적정 수분-온도 관리모델 개발. 농림부(충북대학교). p120-122.
42. 박원철, 윤갑희, 가강현, 박현, 이봉훈. 2006. 표고재배 및 병해충 방제기술, 국립산림과학원 연구자료 제258호 196p.
43. 박재인, 민두식, 이상선, 박한오. 2001. 유전자 분석과 mating에 의한 버섯의 개량 및 버섯생산 기질의 다양화. 농림부(충북대학교). p35-93.
44. 유성렬. 2008. 표고 톱밥재배용 균주의 육종과 유전학적 특성 및 등록균주의 초저온 보존에 관한 연

구. 충북대학교. p1-3. p13-19.

45. 유창현, 고한규, 가강현. 2011. 표고신품종 육성 및 국내유통 표고품종의 식별체계 구축. 농림부(산림조합중앙회 산림버섯연구소). p61-84.
46. 윤갑희, 김용율. 2008. 신품종 심사를 위한 작물별 특성조사요령(표고버섯). 산림청. p2-6.
47. 이창근, 이원규, 윤갑희, 박원철, 정덕균, 이태수. 1994. 표고재배기술. 임업연구원연구자료 제 87호.
48. 임착한, 김민근, 제희정, 김경희, 류재산. 2012. 큰느타리(새송이) 버섯에서 역교배를 통한 속성형질의 도입. 한국버섯학회지. p49-56.
49. 장철수, 민경택, 김명은. 2012. 표고버섯관측월보 12월호. 한국농촌경제연구원 pp1-4.
50. 홍기성, 안광문, 장환용, 김찬래, 김성희, 고한규, 박원목, 편철우, 김규현. 1998. 표고 품종개량에 관한 연구. 농림부(임협중앙회) 임산미생물사업소. pp48-72.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.