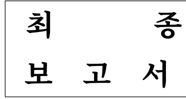


PCR을 이용한 느타리버섯 주요 병의 조기진단 및 병원균 검출기술 개발

Development of PCR methods for Diagnosis and Detection of the pathogens of major diseases on oyster mushroom

충북대학교(농업과학기술원)

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “PCR을 이용한 느타리버섯 주요 병의 조기진단 및 병원균 검출기술 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. 25.

주관연구기관명 : 충북대학교
총괄연구책임자 : 차 재 순
연 구 원 : 장 후 봉
연 구 원 : 이 성 희
연 구 원 : 이 혁 인
연 구 원 : 정 규 식
협동연구기관명 : 농업과학기술원
협동연구책임자 : 고 승 주
연 구 원 : 강 희 안
연 구 원 : 권 순 우

요 약 문

I. 제 목

PCR을 이용한 느타리버섯 주요 병의 조기진단 및 병원균 검출기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

느타리는 맛 과 향기가 좋아 많은 사람들이 식용으로 즐기는 버섯으로 인공 재배기술이 보급되면서 생산량이 급격히 증가하여 우리나라 전체 버섯 생산량의 약 74%를 차지하는 가장 대중적인 버섯이다. 또한 느타리는 전국적으로 약 7,000호 농가가 재배하고 있으며, 단위면적당 가장 높은 소득을 올릴 수 있는 작목으로 선정될 정도로 농가의 중요한 소득작목이 되었다. 느타리는 1997년의 경우 재배면적이 3,462,000평에 이르게 되었으며 생산량도 114,521M/T에 이르게 되었다. 이러한 느타리의 재배에 있어서 가장 큰 문제점 중의 하나는 여러 가지 병에 의한 피해이다. 특히 바이러스병, 푸른곰팡이병, 세균성갈색무늬병(세균성갈반병)은 그 피해가 극심하여 느타리의 안전재배를 위협하고 있다.

바이러스병의 경우 일부 재배단지에서 그 피해가 매우 심각하여 농가의 폐농사태로 나타나기도 하였으며, 그 피해에 의한 경제적인 손실뿐만 아니라 종균의 불신 등을 초래하여 느타리 재배농가의 가장 큰 민원의 대상이 되고 있다. 세균성갈반병의 경우 발생시기와 빈도의 차이는 있지만 전국적으로 거의 모든 재배사에서 이 병이 발생하여 큰 피해를 가져오고 있다.

느타리 재배에 있어서 이렇게 심각한 병의 피해는 여러 가지 복합적인 원인에 기인한 것으로 판단된다. 즉 재배자의 미생물에 대한 인식부족, 전 근대적 재배환경, 종균관리 및 유통의 불 합리, 병 저항성 품종육성의 부족 등 많은 요인이 있지만 근본적으로 버섯의 재배환경이 같은 미생물인 병원균의 생육에 매우 좋은 환경이지만 버섯의 재배적, 생물적 특성상 다른 농작물의 재배와는

달리 농약에 의한 병 방제의 효율이 매우 낮고, 많은 경우 방제가 거의 불가능하다는 점 때문으로 판단된다. 즉 버섯재배에 있어서 병 방제가 다른 농작물의 병 방제보다 훨씬 어렵다는 점이다. 따라서 버섯 병에 대한 근본적인 대책을 마련하기 위해서는 많은 방제를 위한 연구뿐만 아니라 풍부한 기초연구가 시급한 실정이다.

느타리 재배환경이 병 발생에 매우 좋다는 점과 병 방제의 수단이 많지 않다는 점은 느타리 병의 방제가 느타리 재배환경에 병원균의 도입을 철저히 차단하여 병 발생을 막아야 한다 점을 말해주고 있다. 즉 예방적 차원에서의 병 방제가 무엇보다 중요하다는 점이다. 이을 위해서는 병원균의 전염원을 파악하는 일이 가장 중요한 일이다.

따라서 본 연구에서는 느타리에 막대한 피해를 주고 있는 바이러스병과 세균성갈색무늬병의 조기진단 및 병원균의 특이적 검출을 위한 PCR(polymerase chain reaction; 중합효소연쇄반응)방법을 개발하고자 하였다. PCR 방법은 병 진단 및 병원균 검출을 위해 지금까지 개발된 여러 가지 방법중 신속성, 민감성, 정확성에 있어서 가장 우수한 방법으로 평가받고 있으며, 주변의 분자생물적 기술의 눈부신 발전에 따라 그 응용의 폭이 점차 확대되고 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 느타리에 막대한 피해를 주고있는 세균성갈색무늬병과 바이러스병의 조기진단 및 병원균의 특이적 검출을 위한 PCR 방법을 개발하고자 하였는데, 본 연구의 주요 연구개발의 내용을 요약하면 다음과 같다.

느타리 세균성갈반병 병원균 ***P. tolaasii*** 검출을 위한 **PCR** 방법 개발 분야

◎ 본 연구을 통하여 느타리 세균성갈색무늬병 병원균인 *P. tolaasii*를 특이적으로 동정, 검출할 수 있는 네가지 PCR 방법이 개발되었으며, 이들 방법은

순수분리된 세균 균총으로부터 한번의 PCR반응에 의해 단 몇 시간 안에 *P. tolaasii*를 정확하게 동정할 수 있을 뿐만 아니라 *P. tolaasii*가 포함된 어떠한 시료로부터도 *P. tolaasii*를 검출할 수 있는 매우 신속하고 민감하며 정확한 방법이다.

◎ *P. tolaasii*에 특이적 PCR primers를 얻기 위하여 *P. tolaasii*의 가장 중요한 병원성 결정인자인 tolaasin 유전자를 얻기 위하여 tolaasin을 형성하지 못하는 Tn*5* 돌연변이체를 만들었고, 이 돌연변이체의 genomic library 클론으로부터 Tn*5*를 함유한 클론을 선발하여 결국 약 2.4kb의 DNA를 클로닝하였다.

◎ Tolaasin을 생성하지 못하는 돌연변이체는 느타리 및 양송이에서 병원성을 상실하여 tolaasin이 이 병원세균의 병원성결정인자임을 확인할 수 있었다.

◎ 클론된 DNA의 총 2318쌍의 염기서열이 결정되었고, 이 염기서열로부터 다양한 primer를 제작하여 그들의 DNA 증폭능력, *P. tolaasii*에 대한 특이성 등을 바탕으로 2 set의 primer, Pt-1A/Pt-1D1 그리고 Pt-PM/Pt-QM를 최종 선발하였다.

◎ Primer Pt-1A/Pt-1D1는 총 33개의 버섯으로부터 분리한 세균 균주와 24개의 다른 Pseudomonads, 그리고 농업생태계에서 병원세균으로 잘 알려진 6개 균주의 세균 DNA를 이용한 PCR 수행결과 오직 *p. tolaasii*의 DNA로부터만 각각 449bp의 DNA을 증폭하였다.

◎ Primer Pt-PM/Pt-QM는 총 33개의 버섯으로부터 분리한 세균 균주와 24개의 다른 Pseudomonads, 그리고 농업생태계에서 병원세균으로 잘 알려진 6개 균주의 세균 DNA를 이용한 PCR 수행결과 오직 *p. tolaasii*의 DNA로부터만 249bp의 DNA을 증폭하였다.

◎ DNA 대신에 세균세포를 이용하여 primer pt-1A와 pt-1D1로 1차 증폭하고, 2 ㎕의 1차 증폭산물과 primer pt-PM와 pt-QM을 이용한 2차 증폭한

nested-PCR 방법은 *P. tolaasii*에 대한 특이성이 유지되면서 PCR 반응당 *P. tolaasii*가 3개의 세포(cfu)만 존재하여도 *P. tolaasii*를 검출할 수 있었다.

◎ 세균 현탁액으로부터 *P. tolaasii* 특이적 항체와 선발된 두 set의 primer를 이용한 IC-nested-PCR 방법은 시료에 *P. tolaasii*가 30개 세포(cfu) 이상 존재하는 경우 다른 세균이 10,000배 존재하여도 *P. tolaasii*를 검출할 수 있었다.

◎ 주로 충북지방의 느타리 재배사에서 수집된 57개 물 시료 중 73.7%인 42개 시료가 ㎖당 1,000cfu 이상의 일반 세균을 포함하고 있었으며, 19.3%인 11개의 시료가 10,000cfu 이상, 그리고 7%인 4개의 시료가 100,000cfu 이상의 세균을 포함하고 있었다. *P. tolaasii*의 경우 nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 5.3%인 3곳의 물이, 그리고 IC-nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 35.1%인 20개의 물 시료로부터 *P. tolaasii* 특이적 DNA가 증폭되었다.

느타리 바이러스병 진단용 **RT-PCR** 방법 개발 분야

◎ 본 연구를 통하여 느타리 바이러스병을 진단할 수 있는 RT-PCR 방법이 개발되었다.

◎ 느타리버섯의 자실체의 형태가 기형인 28개 균주를 지역 별로 수집하여 dsRNA를 분석한 결과 73%인 19개 균주에서 다양한 길이의 dsRNA가 검출되었다.

◎ 바이러스에 감염된 느타리버섯은 균사생장이 부진하고 자실체의 다발이 적고 조밀하였으며 대가 길고 분지가 많으며 갓의 수는 적었다.

◎ 바이러스병에 걸린 느타리버섯으로부터 25㎚의 구형바이러스를 순수 분리하였으며, 그 바이러스 입자로부터 2,000bp 크기의 dsRNA를 분리하였다.

◎ 순수 분리된 25㎚의 느타리버섯 바이러스 입자로부터 분리한 dsRNA를 주형

으로 cDNA를 합성하여 pUC119에 cDNA library를 제작하였다. cDNA 단편들의 크기는 500bp 정도였다.

◎ 25nm 바이러스로부터 분리한 dsRNA를 probe하여 cDNA library 클론들과 colony hybridization를 수행하였으며, probe와 강하게 hybridize하는 pPV2B1을 선발하였다. 선발된 pPV2B1는 바이러스에 감염된 여러 균주의 느타리로부터 분리한 dsRNA와 잘 hybridize하였다.

◎ pPV2B1 clone의 총 674bp 염기서열을 결정하였다.

◎ pPV2B1의 염기서열로부터 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 진단할 수 있는 프라이머 PVPF1과 PVPR1을 제작하였으며, 이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 감염된 느타리버섯에서 500bp의 DNA 밴드를 얻을 수 있었다.

◎ RT-PCR의 annealing 온도는 55℃가 적합하였으며, 검출한계 dsRNA 양은 0.2ng 이였다. RT-PCR은 건조된 시료 또는 생 시료로부터, 그리고 cellulose나 LiCl 처리에 의해 분리한 모든 dsRNA로부터 500bp의 DNA를 성공적으로 증폭하였다.

◎ PVPF1 및 PVPR1을 이용하여 시판 중인 느타리버섯 종균의 바이러스 감염여부를 검정한 결과 총 43개 종균의 27%인 12개 종균에서 PCR 밴드를 얻을 수 있었다.

◎ 국내에서 재배 중인 식용버섯 중 팽이, 표고, 양송이의 바이러스 감염여부를 dsRNA 분석으로 검정한 결과 표고로부터 dsRNA를 분리할 수 있었다. 표고로부터 분리된 dsRNA와 primer PVPF1 및 PVPR1를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과 어떠한 증폭 밴드도 얻을 수 없었다. 즉 표고의 dsRNA와 느타리 dsRNA는 서로 연관이 없는 것으로 판단되었다.

IV 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구결과 느타리에서 막대한 경제적인 손실을 가져오는 세균성 갈색무늬병의 병원균 *P. tolaasii* 검출 및 바이러스병의 진단을 위한 정확하고, 민감하며 신속한 PCR 방법이 개발되었다. 이 결과의 활용방안 및 활용에 대한 건의사항은 다음과 같다.

◎ 연구결과 및 연구개발내용 활용방안

1. 느타리 세균성갈색무늬병 병원균 *P. tolaasii* 검출법은 이미 본 연구의 일부로 수행된 재배사의 물 검사에서 보여 준 바와 같이 느타리 재배에 사용하는 물 검사에 사용되어 물의 오염여부를 판단하고, 물이 병원균으로 오염되었을 경우 적절한 조치를 취하여 느타리 균상으로 병원균의 전염을 막도록 하는데 활용될 수 있다.
2. 느타리 세균성갈색무늬병 병원균의 중요한 잠재적인 전염원인 종균의 오염여부를 검사하는데 사용될 수 있으며, 오염된 종균의 사용을 배제하여 병의 발생을 감소시킬 수 있다.
3. 버섯재배시설 즉 가습기, 재배사 내부, 여러 기구의 병원균 오염여부를 검사하는데 사용될 수 있으며, 이를 통해 병원균의 전염원을 제거 할 수 있을 것이다.
4. 앞으로 병원균의 정량적 검출법이 보완된다면 느타리 재배동안 병원균의 밀도를 추적하여 병원균이 병을 일으킬 수 있는 밀도에 도달하기 전에 병 발생방제조치를 취할 수 있도록 하는 병의 조기진단 및 발생예찰에 활용될 수 있을 것이다.
5. 느타리 재배재료 및 재배환경의 여러 시료로부터 병원균의 검출에 사용되어 병원균의 정확한 전염경로 그리고 발병생태를 파악하는데 유용하게 활용될 것이다.

6. 바이러스병 검출용 RT-PCR 방법은 본 연구의 일부로 수행한 결과로 보여준 바와 같이 종균의 바이러스감염여부를 검사하는데 사용될 수 있을 것이다. 바이러스병의 방제법은 바이러스에 오염되지 않는 종균을 사용하는 것이 가장 중요하면서 거의 유일한 방제법이다.
7. 바이러스 검출용 RT-PCR 방법도 *P. tolaasii* 검출방법과 같이 버섯재배에 사용되는 여러 재료로부터 바이러스를 검출하는데 활용될 것이다.

◎ 활용에 대한 건의

본 연구 결과 개발된 PCR 방법은 여러 가지 장비가 필요하며, PCR 방법의 특수성에 따라 느타리 재배농가에서 직접 실시할 수 있는 방법이 아니다. 최소한 일정한 실험기구가 갖추어진 실험실에서 숙련된 전문가가 수행하여야 정확한 결과를 얻을 수 있다. 따라서 공공연구기관에서 가칭 "버섯 병 진단센터"를 설립하여 농가의 의뢰시료 뿐만 아니라 종균의 검사까지도 수행할 수 있도록 하는 것이 본 연구결과를 잘 활용할 수 있는 방안이라고 생각한다. 본 연구책임자는 지난 10월초 호주에서 열린 국제버섯학회에 참석하여 본 연구결과를 발표하는 과정에서 뉴질랜드에서는 한 곳에서 한 개의 시료로부터 버섯의 중요한 병원균을 동시에 검출하여 처방토록 하는 "버섯 병 진단센터"를 설립하고자 하는 연구과제가 수행되고 있음을 알 수 있었다. 느타리 세균성갈색무늬병 병원균 *P. tolaasii* 검출용 PCR 방법은 10월 11일 국내에서 특허출원되었다.

SUMMARY

The purpose of this research is to develop PCR methods that can be used in early diagnosis and detection of the pathogens of viral disease and bacterial brown blotch disease of oyster mushroom. The diseases cause huge economic loss in oyster mushroom production in Korea. Control of the diseases is very difficult because the environment of oyster mushroom cultivation is a favorable for the growth of pathogens and chemical control has a restricted application. The prevention of pathogens introduction into cultivation bed is believed to be the most important and practical method of managing the diseases. A Sensitive and pathogen-specific detection method makes it possible to prevent from using contaminated water, spawn, and other materials for oyster mushroom cultivation.

The four different PCR methods were developed for detection and identification of *Pseudomonas tolaasii* causing bacterial brown blotch disease on oyster mushroom in this study. In order to obtain PCR primers specific for *P. tolaasii*, the gene involved in production of tolaasin, which is known for the primary disease determinant of *P. tolaasii*, was cloned and its nucleotide sequence was determined. Primers were designed from the nucleotide sequence and the two sets of primers, Pt-1A/Pt-1D1 and Pt-PM/Pt-QM were selected based on their ability of amplification and specificity for *P. tolaasii*.

PCR with primer Pt-1A and Pt-1D1 or Pt-PM and Pt-QM amplified 449bp and 249bp DNA only DNA from *P. tolaasii* when 17 species of *Pseudomonas* and other well known bacterial pathogens on crop plants were used. The tested bacteria include *P. agarici*, *P. gingeri*, and WLROs(white line reacting organisms) that are well known as bacterial pathogens on the cultivated mushrooms. Nested-PCR with Pt-PM and Pt-QM followed by the first round PCR with Pt-1A and Pt-1D1 and bacterial cells could detect 3

cfu of *P. tolaasii* per PCR reaction. Nested-PCR of bacterial cells captured with the primary anti-*P. tolaasii* antibody and magnetic bead cojugated with 2nd antibody can detect *P. tolaasii* successfully from the sample containing 10,000 times more other bacterial cells than *P. tolaasii*.

When 57 water sample collected from oyster mushroom cultivation houses in different area were tested with the immunocapture-nested PCR, the *p. tolaasii* specific DNA was detected from 20 water samples. This result indicates that 37% of water are being used in oyster mushroom house were contaminated with the bacterial brown blotch pathogen, *P. tolaasii*.

RT-PCR method was developed to detect myco-virus causing viral disease on oyster mushroom. The spherical viral particles, 25nm diameter in size, were purified from the fruiting body showing typical viral disease syptoms and ds-RNAs were purified from the viral particles. The size of the dsRNA was 2,000bp. The cDNA library of the dsRNA was constructed, and pPV2B1 was selected from clones hybridized strongly with the dsRNA probe in colony hybridization. The nucleotide sequence of pPV2B1 clone was determined and the primers PVPF1 and PVPR1 were designed from the sequence for RT-PCR.

RT-PCR with primer PVPF1 and PVPR1 can amplified 500bp DNA from dsRNAs from oyster mushroom fruiting body with abnormal shape. It can amplify the 500bp DNA successfully with dsRNAs isolated from dried or fresh fruiting body and dsRNAs purified with cellulose or LiCl methods. When 43 commercial spawns were tested with the RT-PCR, the 500bp DNA was detected in 17 spawn sample, which indicates that 27% of commercial spawn contains the myco-virus particles.

The sensitive, rapid, and specific PCR methods were developed in this study for detection and identification of the major pathogens of oyster mushroom. The methods will provide a valuable tools to manage of the economically important diseases and study the diseases as well.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

1.1. Purpose and scope of research................................

Chapter 2. Development of PCR method for detection of *Pseudomonas tolaasii* causing bacterial brown blotch disease on oyster mushroom

2.1. Introduction...

2.2. Materials and methods

2.2.1. Bacterial strains used in this study.......

2.2.2. White line test......................

2.2.3. Pathogenecity test...................

2.2.4. Hemolytic activity test.............

2.2.5. Tn*5* mutagenesis....................

2.2.6. Purification of tolaasin and HPLC analysis.....

2.2.7. Cloning of a gene involved in tolaasin production.....

2.2.8. DNA-DNA hybridization............................

2.2.9. Determination of nucleotide sequence...........

2.2.10. Selection of primers..............

2.2.11. Determination of *P. tolaasii* specific PCR condition.....

2.2.12. Nested-PCR..............................

2.2.13. Production of *P. tolaasii* specific antiserum ....

2.2.14. Immunocapture-nested-PCR.........

2.2.15. Preparation of bacterial suspension.....

2.2.16. Collection of water sample and detection of *P. tolaasii*.....

2.3. Results and discussion

2.3.1. Selection of WL- Tn*5* mutants...........

2.3.2. Pathogenicity of WL- Tn*5* mutants.......

2.3.3. Ability of tolaasin production of WL- Tn*5* mutants.....

2.3.4. Cloning of tolaasin gene.......

2.3.5. Specificity of the cloned gene......

2.3.6. Nucleotide sequence of the cloned gene and primer selection..
2.3.7. Specificity of PCR methods........
2.3.8. Nested-PCR with bacterial cells.....
2.3.9. Detection of *P. tolaasii* by Immunocapture-nested-PCR .....
2.3.10. Detection of *P. tolaasii* from water sample ....
2.4. Summary.....................................
2.5. Literature cited..........................
Chapter 3. Development of RT-PCR method for diagnosis of viral disease of oyster mushroom
3.1. Introduction.......................
3.2. Materials and Methods
3.2.1. Collection of the oyster mushrooms showing viral disease symptoms..
3.2.2. Purification of virus particles.......................
3.2.3. Isolation of dsRNA...................................
3.2.4. Contruction of cDNA library......................
3.2.5. Colony hybridization....................
3.2.6. Determination of nucleotide sequence and design of primers....
3.2.7. RT-PCR method..............
3.2.8. Characterization of PCR product...
3.2.9. Isolation of daRNAs from Shitake and button mushroom and cDNA cloning......
3.3. Results and Discussion
3.1. dsRNA analysis in the collected oyster mushrooms........
3.2. Purification of virus and dsRNA from them .....
3.3. cDNA cloning.................
3.4. Nucletide sequence of pPV2B1.................
3.5. Primer preparation and RT-PCR...........
3.6. Preparation of dsRNA for RT-PCR............
3.7. PCR condition..................

3.8. Detection of virus in commercial spawns by RT-PCR.......
3.9. Application of RT-PCR in other cultivated mushrooms.....
3.4. Summary.......................................
3.5. Literature cited....................................

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

<u>연구개발의 목적</u>

느타리에 막대한 피해를 주고 있는 바이러스병과 세균성갈색무늬병의 조기진단 및 병원균의 특이적 검출을 위한 PCR(polymerase chain reaction; 중합효소연쇄반응)방법의 개발

<u>연구개발의 범위</u>

PCR primer 개발

○ Tol- 돌연변이체 유도

○ Tolaasin 유전자 클로닝

○ 클론된 유전자의 P. tolaasii에 대한 특이성 확인

○ 클론된 유전자의 염기서열 결정

○ 바이러스 감염 느타리 수집

○ 바이러스 입자 분리 및 dsRNA 분리

○ cDNA library 만들기 및 cDNA cloning

○ cDNA 클론의 염기서열결정

<u>**PCR** 방법 확립</u>

○ PCR primer 선발

○ PCR를 위한 시료조제

○ PCR 조건 확립

○ PCR 방법의 특이성 확인

<u>**PCR** 방법의 실용화</u>

○ Nested-PCR 방법 개발

○ Immunocapture-nested-PCR 방법 개발

○ 선발된 시료로부터 병원균 검출

○ PCR 방법을 이용한 병진단 적용

○ 다른 재배 버섯의 유사병 진단에 적용

제 2 장 느타리버섯 갈색무늬병 병원균 *P. tolaasii* 검출을 위한 PCR 방법 개발

제 1 절 서 설

느타리(*Pleurotus osteatus*)는 우리 나라 전체 버섯 생산량의 약 74%를 차지하고 있으며, 단위면적당 소득이 가장 높은 농가의 중요한 소득 작목이다(차 등, 1997). 이러한 느타리 재배의 큰 문제점 중의 하나는 재배기간 동안 세균병의 발생에 의한 피해이다. 느타리에 발생하는 세균병 중 가장 심각한 피해를 가져오는 것은 *Pseudomonas tolaasii*에 의해 발생하는 느타리 세균성갈색무늬병(細菌性褐班病, bacterial brown blotch)이며, 이 병원세균은 우리 나라에서 뿐만 아니라 전 세계적으로 중요한 인공재배버섯, 즉 느타리(*Pleurotus osteatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 팽이(*Flammuliua velutipes*), 그리고 표고버섯(*Lentinus edodes*) 등에 병을 일으켜 많은 피해를 주고 있다(Rainey 등, 1991; Tsuneda 등, 1995; Wells 등, 1996; 이 등, 1999). 이 병은 병 발생의 예측이 매우 어렵고, 병 발생 후에는 방제가 거의 불가능하며, 한번 발생하면 재배사 전체로 급격하게 전염되어 심한 경우에는 버섯을 전혀 수확하지 못하게 하는 특성이 있다(차 등, 1997; 김 등, 1994; 신과 전, 1991; 진 등, 1994; 이와 차 1998).

느타리 세균성갈색무늬병 병원균 *P. tolaasii*는 tolaasin이라는 독소를 생산하여 세포 밖으로 분비하는데, 이 독소는 아미노산으로 구성된 펩티드와 유기산으로 된 lipodepsipeptide로서 세균, 곰팡이, 식물, 동물의 다양한 생체 세포막에 구멍(pore)을 형성하여 세포를 파괴할 수 있으며, *P. tolaasii*가 병을 일으키는데 필요한 가장 중요한 병원성 결정인자로 보고되었다(Brodey 등, 1991; Nair 와 Fahy, 1973; Rainey 등, 1991). 이러한 tolaasin은 처음에는 두 개의 tolaasin, 즉 tolaasinⅠ, Ⅱ가 존재한다고 보

고되었으나(Mortishire-Smith 등, 1991; Nutkins 등, 1991), 최근에는 이들과 유사한 6개의 다른 tolaasin이 보고되었다(Shirata 등, 1995). 한편 tolaasin과는 다른 휘발성 물질인 tovsin이라는 물질이 보고되기도 하였다(Shirata, 1996). Tolaasin은 일부 식물병원세균이 생성하는 독소인 syringomycin과 syringotoxin처럼 non-ribosomal enzyme complex에 의해 합성될 것이라고 알려졌다(Rainey 등, 1992; Rainey 등, 1993). 또한 이 독소는 biosurfactant 특성을 가졌고, *P. tolaasii*가 WLROs(white line reacting organisms) 또는 *Pseudomonas* '*reactans*'라는 일군의 세균과 *Pseudomonas* Agar F(PAF) 평판배지에서 대치 배양하였을 때 흰침강선(white line) 형성에 관여하고, 이 흰침강선형성검정(white line test)은 *P. tolaasii*의 병원성 검정방법인 rapid pitting test와 함께 *P. tolaasii*의 간편한 동정법으로 보고되기도 하였다(Wong과 Preece, 1979; Rainey 등 1992). 그러나 *P. tolaasii*에는 병원성을 가지면서도 흰침강선을 형성하지 못하는 균주가 존재한다고 보고되었으며(김 등, 1994), 또한 환경의 자극에 따라 tolaasin생성을 포함한 여러 가지 형질이 동시에 바뀌는 표현형변이현상(phenotypic variation)이 존재하며, 이 현상은 유전자의 재조합에 의해 조절되는 것으로 보고되었다(Goor 등, 1986; Grewal 등 1995; Han 등, 1997).

느타리 세균성갈색무늬병의 병징은 초기에 버섯 갓조직 표면에 갈색의 작은 점무늬가 생겨 병이 진전됨에 따라 암갈색의 병반으로 크게 확대된다. 또한 버섯 갓이 움푹하게 되며 점액질물질로 덮히고 독특한 생선 썩는 냄새가 난다. 일부는 어린 버섯이 투명한 물질로 덮혀 생장이 중지되기도 하고, 버섯의 갓이 반점의 형성이 없이 갈색 또는 짙은 갈색으로 변색되기도 한다. 이러한 느타리 세균성갈색무늬병은 버섯을 재배하는 환경이 세균의 생장에 적합한 조건을 갖추고 있으므로 전염성이 강하고 방제가 매우 어려워 그 피해는 해마다 증가하고 있으며 그 정도가 매우 심각하여 버섯재배 자체를 위협하고 있다.

이러한 느타리 세균성갈색무늬병은 그 피해에도 큼에도 불구하고 병원세

균에 대한 전염경로 및 생태파악이 제대로 이루어져 있지 않으며, 효과적인 방제법도 아직 개발되어 있지 않다. 일부 항생제를 이용한 화학적 방제와 길항미생물을 이용한 생물적 방제법이 계속하여 시도되고 있지만 아직 만족할 만한 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다(차 등, 1997).

느타리 세균성갈색무늬병의 발생 억제를 위해서는 느타리 균상으로 병원세균의 전염경로를 파악하여 병원균의 전염을 막고, 발병생태를 파악하여 병 발생환경을 바꾸며, 재배동안 병원균의 밀도를 추적하여 병 발생 전에 미리 예방적 조치를 취하는 것이 무엇보다 중요하다고 할 수 있다. 그러나 지금까지 느타리 재배환경에서 병원균의 전염원 파악, 전염경로 추적, 발병환경 조건에 대한 자료나 연구보고가 전혀 없는 실정이다. 그런데 이러한 느타리 세균성갈색무늬병의 병원세균의 정확한 생태파악, 병 발생 예측에 의한 병 발생 예방, 그리고 효과적인 병 방제법의 확립 등을 위한 연구를 위해서는 무엇보다 병원균인 *P. tolaasii*의 정확하고 민감하며 신속한 검출 및 동정 방법이 있어야 한다. 따라서 본 연구에서는 느타리 세균성갈색무늬병의 조기진단 및 병원세균인 *P. tolaasii*의 특이적 검출 및 동정에 사용할 수 있는 PCR (Polymerase Chain Reaction, 중합효소연쇄반응) 방법을 개발하고자 하였다.

병원균의 검출 및 병의 조기진단에는 병원균 배양을 통한 방법과 항혈청을 이용한 다양한 방법들이 있으나 최근 분자생물적인 기술이 발전하면서 PCR 방법이 광범위하게 사용되고 있다. PCR 방법은 현재 개발되어 있는 병 진단 및 병원균 검출 방법들 중에서 특이성, 민감성, 신속성 등에 있어서 가장 우수한 방법으로서 알려져 있으며, 동、식물의 중요한 병 진단법으로 이용되고 있다. 식물 병 분야에서는 바이러스병에 대한 진단법이 가장 많이 개발되어 있으며, 식물에 많은 피해를 주고있는 곰팡이병이나 세균병의 진단법도 많이 개발되어 있다(Henson과 French, 1993).

식물의 세균병 진단에 있어서 PCR 방법은 DNA의 경우 1pg, 병원세균의 경

우 100개 세포 이하의 농도에서도 검출이 가능하고, 병원균과 유사한 다른 세균들이 105 cells/ml의 농도로 함께 섞여 있어도 검출이 가능할 정도로 매우 특이적이고 민감한 진단법으로 보고되었다(Hu 등, 1995; Rudi 등, 1998). 또한 복잡한 염기서열로 부터 특이적인 PCR primer를 선발할 수 있는 여러가지 컴퓨터 프로그램이 개발되어 있고, magnetic bead를 이용하여 여러 시료로부터 DNA 및 세균을 검출할 수 있는 방법과(Brunk 등, 1996; Pooler 등, 1997; Rudi 등, 1998), 토양이나 물과 같은 특수한 환경의 시료로부터 PCR을 위한 세균 및 DNA의 효율적인 분리 방법들이 계속적으로 개발되어 PCR 방법의 효율성을 높이고 있다(Jung과 Lee, 1997; Matheson 등, 1997; Volossiouk 등 1995). 또한 PCR 방법은 면역검출(immunodetection) 방법과 조합한 immunocapture-PCR방법(Hartung 등, 1996), DNA 잡종화(hybridization) 방법과 조합하여 PCR의 특이성과 민감성을 높이는 방법(Rudi 등, 1998), 그리고 병원균의 정량적인 검출이 가능한 경쟁 PCR (competitive-PCR) 방법(Hu 등, 1995; Rudi 등, 1998) 등 그 사용목적에 맞도록 다변화되고 있다.

*P. tolaasii*의 특이적 검출을 위한 PCR 방법 개발에는 무엇보다 *P. tolaasii*의 DNA에 특이적인 결합하는 PCR primer를 확보하는 것이 가장 중요한 일이다. 이를 위해서 본 연구에서는 *P. tolaasii*의 tolaasin 생성 유전자를 사용하고자 하였다. 세균이 생산하는 독소는 일반적으로 세균의 종(種)에 특이성이 있으며, 특히 tolaasin은 *P. tolaasii*의 병원성 결정인자로 알려져 있으므로 *P. tolaasii*에 특이적인 primer를 얻는 가장 좋은 DNA source라 판단하였다. 따라서 먼저 tolassin 생성에 관여하는 유전자를 클로닝하고, 클론된 DNA 절편을 탐침(probe)으로 이용하여 이 DNA 절편의 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 DNA-DNA hybridization을 통해 확인하고, 특이성이 확인된 DNA 절편의 염기서열을 바탕으로 *P. tolaasii*에 특이적인 primer를 제작하고, 그 primer를 이용하여 *P. tolaasii*을 특이적으로 검출할 수 있는 nested-PCR 및 immunocapture-nested-PCR방법을 개발하였으며 이들 방법

을 이용하여 병원균의 전염원을 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 세균균주

본 연구에 사용된 세균 균주들은 미국 Wells(1996)그룹, 한국의 김 등(1994), 생명공학연구소 부설 Korean Collection for Type Cultures(KCTC), 농업과학기술원의 Korean Agricultural Culture Collection(KACC)로부터 분양 받았거나, 본 연구책임자의 실험실(Chungbuk National University Plant Bacteriology Laboratory; CNUPBL) 수집균주들이다. 일부 느타리 병원균이나 느타리 분리균주는 본 연구기간 동안 느타리로부터 분리되어 사용되었다(Table 1). 세균 균주들은 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

2. 흰침강선형성검정(**White line test**)

P. tolaasii 또는 검정하고자 하는 세균과 WLRO를 *Pseudomonas* Agar F (PAF; Bacto-tryptone 10g, Bacto-proteose peptone No. 3 10g, dipotassium phosphate 1.5g, magnesium sulphate 1.5g, glycerol 10㎖, agar 15g per liter) 평판배지 위에서 약 1.0 ㎝의 간격을 두고 streak한 후 25°C의 항온기에 배양시키면서 24시간 간격으로 1주일간 두 균주사이에 흰침강선(white line)의 형성 유무를 조사하였다.

3. 병원성 검정

세균의 병원성 검정은 양송이와 느타리의 자실체를 이용하였다. 양송이를 이용한 검정은 양송이의 갓조직을 멸균된 칼로 두 쪽 혹은 네 쪽으로 반듯하게 잘라내어 petri dish 안의 멸균수로 적신 여과지에 올려놓고, 배양한 분리세균의 현탁액(108 109 cells/㎖) 10㎕를 버섯 절단면에 접종하고 20 25°C의

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Strain	Source
A. tumefaciens	NT1RE	CNUPBL collection
E. caratovora subsp. *caratovora*	6125	CNUPBL collection
E. chrysanthemi	6382	CNUPBL collection
P. acidovorans	ATCC 11299	KCTC 1638
P. aeruginosa		KCTC 1636
P. aeruginosa		KCTC 1637
P. agarici		KACC 10145
P. agarici	ATCC 25941	KACC 10146
P. agarici		KACC 10144
P. arvilla	ATCC 23973	KCTC 1643
P. cepacia		KCTC 2475
P. diminuta	ATCC 19146	KCTC 2473
P. fluorescens	ATCC 11250	KCTC 1645
P. fluorescens	ATCC 12633	KCTC 1751
P. fragi	ATCC 27362	KCTC 2345
P. gingeri	pf9	Wells *et al* (1996)
P. gingeri	pf31	Wells *et al* (1996)
P. maltophilia	7191	KCTC 2437
P. ovalis	ATCC 8207	KCTC 2349
P. pseudoalcaligenes	ATCC 12815	KCTC 2347
P. paucimobilis		KCTC 2346
P. putida	ATCC 17416	KCTC 1639
P. saceharophila		KCTC 2350
P. stuzeri	ATCC 17588	KCTC 1066
P. syringae		KCTC 2440
P. syringae pv. *actinidae*	KI 97148	CNUPBL collection
P. syringae pv. *actinidae*	KI 98051	CNUPBL collection
P. syringae pv. *hibisci*	KI 97295	CNUPBL collection
P. syringae pv. *morsprunum*	KI 97303	CNUPBL collection
P. syringae pv. *syringae*	PSS 61	CNUPBL collection
P. syringae pv. *syringae*	KI 97267	CNUPBL collection
P. syringae pv. *tomato*	PT 23	CNUPBL collection
P. taetrolens		KCTC 1064
P. testosteroni	ATCC 11996	KCTC 1772
P. tolaasii	6007	This study
P. tolaasii	6008	This study
P. tolaasii	6009	This study
P. tolaasii	6010	This study
P. tolaasii	6041	This study
P. tolaasii	6096	This study
P. tolaasii	6130	This study

Table 1 continued

Species	Strain	Source
P. tolaasii	A	Kim et al (1994)
P. tolaasii	6131	This study
P. tolaasii	6132	This study
P. tolaasii	6134	This study
P. tolaasii	ATCC 33618	CNUPBL collection
P. tolaasii	P3a	Wells *et al* (1996)
P. tolaasii	Pf29	Wells *et al* (1996)
P. tolaasii	AR	This study
P. tolaasii	6041R	This study
P. tolaasii	ATCC 51309	CNUPBL collection
P. tolaasii	7058	This study
P. tolaasii	7060	This study
P. tolaasii	7063	This study
P. tolaasii	7078	This study
P. tolaasii	7081	This study
P. tolaasii	7098	This study
P. tolaasii	7100	This study
P. tolaasii	7115	This study
P. tolaasii	7126	This study
P. tolaasii	7135	This study
R. solnanacearum	6202	CNUPBL collection
X. campestris pv. *campestris*	UCRDAC 1188-2	CNUPBL collection
X. campestris pv. *pruni*	6284	CNUPBL collection
WLRO	502-3	Kim *et al* (1994)
WLRO	ATCC 14340	Wells *et al* (1996)
WLRO	D2	Wells *et al* (1996)
WLRO	H3	Wells *et al* (1996)
WLRO	ATCC 51314	CNUPBL collection
WLRO	I5	Wells *et al* (1996)
WLRO	6043	This study
WLRO	6065	This study
WLRO	6074	This study
WLRO	6153	This study
WLRO	6178	This study
WLRO	6314	This study
WLRO	6601	This study
WLRO	7017	This study

ATCC: American Type Culture Collection
KCTC: Korean Collection for Type Cultures
KACC: Korean Agricultural Culture Collection
CNUPBL: Chungbuk National University Plant Bacteriology Laboratory

항온기에 두면서 24시간 간격으로 변색과 버섯조직 함몰 여부를 조사하였다.

느타리를 이용한 검정은 평판배지에서 배양한 세균을 느타리 자실체의 표면에 묻힌 후 양송이와 동일한 조건에서 같은 방법으로 조사하였다.

4. 적혈구용혈검정(Hemolytic activity test)

검정하고자하는 세균 배양여과액의 적혈구 용혈활성은 쥐의 적혈구를 이용하여 측정하였다. 세균 배양여과액은 세균을 PAF broth에서 48시간동안 진탕배양(200rpm, 25℃)후 세균세포를 원심분리와 막여과(0.45μm)로 제거하여 준비하였다. 25mM CaCl2를 함유한 Hepes buffered saline (150mM NaCl, 5mM KCl, 5mM Hepes, 1mM MgSO4, pH 7.4) 800μℓ에 적혈구용액과 배양여과액을 각각 100μℓ를 첨가하고 37℃ 항온수조에서 30분간 둔 후 600nm에서 흡광도 감소량을 측정하여 용혈활성을 조사하였다.

5. *Tn5* 돌연변이체 유도

*P. tolaasii*의 선발 marker로 사용하기 위해서 rifampicin 저항성(Rifr) 자연 돌연변이체를 100μg/mℓ의 rifampicin이 함유된 KB (King's medium B; Bacto proteose peptone No. 3 20g, dipotassium phosphate 1.5g, magnesium sulphate 1.5g, glycerol 10mℓ, agar 15g per liter) 평판배지에서 선발하였고, 선발된 *P. tolaasii* 두 균주 AR과 6041R을 Tn*5* 돌연변이체 유도에 사용하였다. 50μg/mℓ의 kanamycin이 함유된 Luria-Bertani (LB; Bacto-tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g, agar 15g per liter)평판배지에서 하룻밤 배양시킨 대장균 HB101(pSUP2021::Tn*5*)과 KB 평판배지에서 하룻밤 배양시킨 *P. tolaasii* AR 혹은 6041R 균주를 각각 108 109 cells/mℓ의 농도로 현탁시키고, 이 현탁액을 NA (nutrient agar; Beef extract 3g, Peptone 5g, Yeast extract 2g, Agar 15g per liter) 평판배지위에 놓인 멸균된 membrane

filter위에 각각 10㎕씩 놓아 혼합시켜 28℃ 에서 하룻밤 배양 후, 각각 100 ㎍/㎖와 50㎍/㎖의 rifampicin과 kanamycin을 함유한 배지 위에 도말하여 *Tn5*가 삽입된 균주를 선발하였다. 선발된 *Tn5* 돌연변이체들은 PAF 배지에서 WLRO 균주와 흰침강선형성검정을 통하여 흰침강선을 형성하지 못하는 균주 (WL-)들을 선발하였다.

6. Tolaasin 분리 및 HPLC 분석

*P. tolaasii*와 선발된 WL- 돌연변이체 균주의 배양여과액으로부터 tolaasin을 추출하고 HPLC로 분석하여 그 균주의 tolaasin 생성유무를 확인하였다. Tolaasin의 분리 및 정제는 Shirata 등(1995)의 방법을 따랐다. 정제된 독소는 Waters사의 HPLC system (600 controller, 626 pump, 486 tunable absorbance detector)을 이용하여 분석하였다. Protein-pak 60 column (7.8 x 300mm)과 C8 Rp column을 직렬로 연결하여 사용하였고, 용매는 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 acetonitrile (40% 60%)를 사용하였으며, tolaasin은 220nm에서 검출하였다.

7. Tolaasin 생성 유전자 클로닝

Tolaasin을 생성하지 못하는 *Tn5* 돌연변이 균주(Tol-)의 전체 DNA를 분리하여, Sambrook 등(1989)의 방법으로 pLAFR3에 그 균주의 genomic libray를 만들었다. Genomic libray 클론을 가진 대장균 균주들을 50㎍/㎖ kanamycin이 함유된 LB 평판배지에 도말하여 *Tn5*를 가진 균주를 선발하였다. 선발된 kanamycin 저항성 대장균 균주로부터 플라스미드를 분리하여 *Tn5* 존재를 확인하고, pToltn5라 명명하였으며, pToltn5의 physical map을 작성하였다(Fig 2). 작성된 physical map을 바탕으로 *Tn5*가 삽입된 주변에 있는 *Bam*HI 절편을 pBluescript SKII(+)에 subcloning하였고, pTol1이라 명명하였다.

8. DNA-DNA hybridization

플라스미드 분리 Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 대장균으로부터 pSUP2021::Tn*5*와 pTol1을 분리하였다. pSUP2021::Tn*5*를 *Hpa*I 제한효소로 절단하여 agarose 젤에서 전기영동 후 3.7kb DNA를 Gene Clean II Kit (Bio 101, Vista, CA, USA)로 분리하여 이 DNA 절편을 Tn*5*에 대한 probe로 사용하였다. 또한 pTol1을 *Bam*HI으로 절단하여 삽입 DNA를 위와 같은 방법으로 회수한 후 *P. tolaasii*에 대한 특이성 확인을 위한 probe로 사용하였다.

세균으로부터 분리된 전체 DNA의 약 4 6μg을 제한효소로 완전히 절단하고 agarose 젤에서 전기영동 후 nylon membrane에 blot시켰으며, probe DNA의 labelling, hybridization, 그리고 검출에는 DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Manheim, Indianapolis, USA)을 이용하였다.

9. DNA 염기서열 결정

DNA-DNA hybridization에 의해 *P. tolaasii*에 대한 특이성이 확인된 약 2.3kb DNA는 내부의 *Sal* I 제한부위가 있어서 *Sal* I을 이용하여 두 개의 pBluescript SKII에 subcloning 되었으며, 각각 pTol2, pTol3로 명명하였다. 이들 두 개의 플라스미드는 대장균에서 증폭된 후 플라스미드 분리 Kit를 이용하여 충분한 양을 분리하여 염기서열 결정에 사용하였다. 첫 번째 염기서열 결정은 클로닝 운반체인 pBluescript SKII의 multiple cloning site가 가지고 있는 universal primer인 M13F와 T3 primer를 사용하였으며, 첫 번째 염기서열을 결정한 후 결정된 염기서열에서 다시 다음 부분의 염기서열 결정을 위한 primer를 제작하여 다음 부분의 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정은 대전에 있는 기초과학지원 연구소의 생체고분자 그룹에 의뢰하여 수행하였고, Perkin Elmer사의 ABI Prism 377 DNA sequencer를 이용하였으며, 염기서열 결정

을 위한 처리는 Perkin Elmer사의 BigDye Terminator Cycle sequencing Kit를 사용하였고, gel은 Amresco사의 PAGE-plus gel을 사용하였다.

10. Primer 선발

먼저 DNA 염기서열을 결정하기 위해 만들어진 Internal primer와 결정된 염기서열을 기초로 하여 PCR을 위한 primer를 제작하였다. Primer는 GC함량, melting temperature 등을 고려하여 염기서열을 선발하였으며, 주로 20mer의 크기로 Bioneer사에 주문 제작하여 사용하였다. 이렇게 제작된 여러 개의 primer를 다양한 조합으로 사용하여 *P. tolaasii* 전체 DNA를 이용하여 문헌에 나타난 가장 일반적인 조건 (DNA 20ng, primer 10pM, MgCl2 1.5mM, dNTP 0.2mM, polymerase 2.5U, annealing 온도 55°C, 30 cycle)으로 PCR을 수행하여 DNA 증폭 여부 및 증폭 DNA 크기, 양을 확인하였다. 이러한 과정을 통해 DNA가 증폭되는 primer 조합을 1차 선발하였다.

11. PCR 조건 확립 및 *P. tolaasii*에 대한 특이성 확인

1차 선발된 primer 조합을 사용하여 *P. tolaasii*와 매우 유사한 White line reacting organisms (WLROs) 균주 중 병원성(path+)이 있는 균주와 비병원성(path-) 균주의 전체 DNA를 control로 사용하면서 PCR에 영향을 미치는 MgCl2 농도별 (0 3mM 범위에 0.5mM씩 다른 조건), annealing 온도별 (55°C에서 2°C씩 다르게 65°C 까지), target DNA 농도별 (10ng 100ng 범위에서 10ng씩 다른 조건), primer 농도별 (10pM, 20pM), 그리고 Taq DNA 중합효소 농도별 (반응당 0.5U 2.5U) 다른 조건에서 *P. tolaasii*에 특이성을 가지는 primer를 선발하였고, 동시에 primer에 적합한 PCR 조건을 찾았다. 일단 선발된 primer와 PCR 조건을 이용하여 보다 많은 *P. tolaasii* 균주와 *P. tolaasii*와 유사한 많은 다른 균주의 DNA를 이용하여 그 primer와 PCR 방법의 특이성, 재현성을 확인하였다.

12. 세균 세포를 직접 이용한 nested-PCR

PCR 방법을 좀 더 단순화하고 검출민감성을 높이기 위하여 세균 세포와 두 set의 primer를 이용한 nested-PCR를 실시하였다. PCR 반응액에 DNA 대신 세균 현탁액을 첨가하고 먼저 primer Pt-1A와 Pt-1D1로 1차 증폭하였고, 1차 증폭된 증폭산물 2μℓ와 internal primer인 Pt-PM과 Pt-QM을 이용하여 2차 증폭하였다.

13. *P. tolaasii* 항체 생산

P. tolaasii ATCC 51309 균주를 PAF 평판배지에 하룻밤 배양 후 얻어진 세균세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 두 번 wash 한 후 최종적으로 PBS에 109 cells/ml가 되도록 조정하여 60℃에서 30분간 열탕처리하였다. 이 현탁액을 -20℃에 보관하여 *P. tolaasii*의 항원으로 사용하였다.

조제된 세균현탁액 0.5 mℓ를 같은 양의 Freund's complete adjuvant(Difco, USA)와 완전히 혼합 후 충북대학교 수의과대학 실험동물실에서 구입한 white female 토끼에 피하주사하였다. 1주일 후 같은 양의 항원을 같은 방법으로 주사하였으며, 이후에는 세균현탁액을 동량의 Freund's incomplete adjuvant(Difco, USA)와 혼합하여 1주일 간격으로 4회 더 주사하였다. 첫 번째 주사 4주 후에 test bleeding하여 항체의 역가(titer)를 판정하였으며, 마지막 주사 2주 후에 total bleeding하였다. 항체의 역가는 microprecipitation법을 사용하였다.

얻어진 혈액은 상온에서 2시간 그리고 4℃에 하룻밤 두어 응고시킨 후 혈청을 얻었으며, 이 혈청은 2,000rpm으로 10분간 원심분리 후 0.45μm와 0.2μm의 막을 차례로 통과시키고 0.025%의 sodium azide를 첨가하여 0.5 mℓ씩 나누어 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

14. Immunocapture-nested-PCR

세균현탁액 500μℓ에 PBS에 250배 희석한 *P. tolaasii* 항혈청용액 200μℓ을 넣고 상온에서 orbital shaker 위에서 천천히 흔들어 주면서 30분간 반응시켰다. 이 용액을 원심분리하여 세균을 얻고 0.1% BSA(bovine serum albumin)을 함유한 PBS 용액으로 두 번 씻은 후 최종적으로 300μℓ의 PBS에 현탁시켰다. 이 세균현탁액에 5μℓ의 양(heep)에서 만든 anti-rabbit IgG가 부착된 Dynabead™ M-280(Dynal, Oslo, Norway)를 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후 자석(MPC-M, Dynal, Oslo, Norway)을 이용하여 Dynabeads를 회수하였다. 회수된 Dynabeads를 5μℓ의 멸균수에 현탁시키고, 이 현탁액을 nested-PCR에 직접 사용하였다.

15. 세균현탁액 조제

Nested-PCR 또는 immunocapture-nested-PCR에 사용된 세균 현탁액은 Nutrient broth에서 12시간 배양한 mid-log phase의 세균세포를 멸균수로 wash하고 실험에 필요한 농도로 희석 후 사용하였다. 세균현탁액의 세균수는 세균현탁액 100μℓ를 PAF 평판배지에 도말하여 나타난 균총수(CFU)로 계산하였다.

16. 느타리 재배사로부터 물 수집 및 *P. tolaasii* 검출

주로 충북지방의 느타리 재배사로부터 느타리 재배에 사용하는 물을 멸균한 종균배양용 플라스틱 통을 이용하여 수집하였다. 실험실로 가져온 물은 100μℓ를 NA 평판배지에 도말하여 형성된 균총수를 세어 물속의 전체 세균수를 결정하였다. 그 물의 250mℓ를 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여 가라앉은 세균세포를 1mℓ 멸균수에 현탁하였으며, 이 현탁액 10μℓ는 직접 nested-PCR에 사용하였고 500μℓ는 immunocapture-nested-PCR에 사용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Tn5 돌연변이체 선발

P. tolaasii AR 및 6041R 균주와 pSUP2021::Tn*5*를 가진 대장균과의 접합에 의해 Tn*5* 돌연변이체가 만들어 졌으며, 각각의 돌연변이체는 WLRO 균주와 대치배양을 통해 흰침강선 형성능력을 확인하였다. AR균주에서 형성된 2000개의 Tn*5* 돌연변이체중 6개 균주가 흰침강선을 형성하지 못했으며(WL-), 6041R에서 만들어진 1500개의 Tn*5* 돌연변이체중에서 3개의 균주가 WL-으로 선발되어, 흰침강선 형성능력에 대한 돌연변이율은 0.2 0.3%로 계산되었다.

WL- 돌연변이체에 Tn*5*가 삽입되었나를 확인하기 위해 AR균주로부터 유도된 6개의 Tn*5* 돌연변이체로부터 전체 DNA를 분리하여 Tn*5*내에 절단부위(restriction site)가 없는 *Eco*RⅠ과 Tn*5*내에 한 개의 절단부위를 가진 *Bam*HⅠ으로 각각 절단 후 Tn5의 *Hpa*Ⅰ DNA절편을 probe로하여 DNA-DNA hybridization을 실시하였다. *Eco*RⅠ으로 절단된 모든 Tn*5* 돌연변이체는 한 개의 hybridization 밴드를 가졌고, *Bam*HⅠ으로 절단한 경우에는 두개의 밴드를 가지고 있어서 Tn*5*의 삽입이 확인되었으며, *Bam*HⅠ으로 절단한 blot에 나타난 hybridization 밴드들의 다형성(polymorphism)에 의해 4개의 다른 위치에 삽입된 돌연변이체를 얻었음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. WL- 돌연변이체의 병원성

양송이 버섯의 갓조직을 이용한 병원성검정 결과 야생형 균주(AR)는 버섯 갓조직을 짙은 갈색으로 변색시키고 조직을 깊게 함몰시키는 강력한 병원성을 보여주었으나, WL- 돌연변이체들은 아무런 병징을 유도하지 못하였다(Table 2). 또한 느타리 갓에 세균을 묻혀 실시한 병원성검정에서도 같은 결과를 얻었다(Fig. 2). 이 결과는 WL- Tn*5* 돌연변이체들이 병원성을 상실했거나 크게 감소했음을 나타내는 것으로 Tolaasin이 흰침강선(white line)을 형

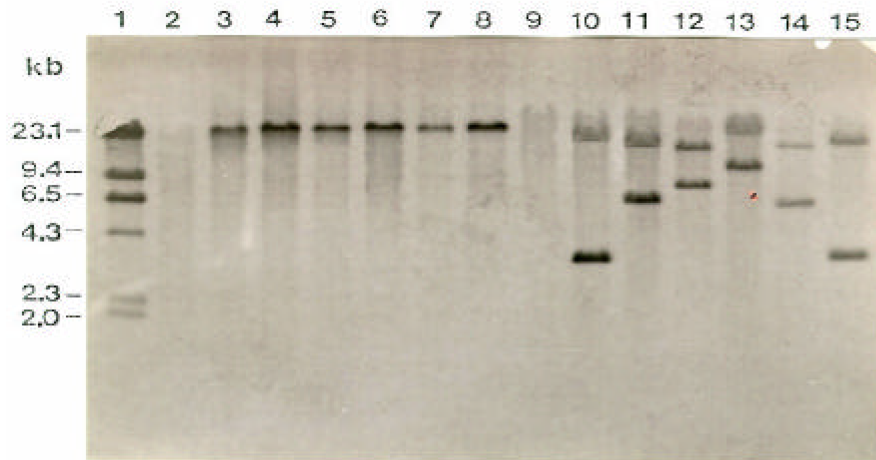


Fig. 1. DNA-DNA hybridization to confirm Tn*5* insertion in Tn*5* mutants. Total DNA from wild type strain (lane 2, 9) and Tn*5* mutants (lanes 3 8, 10 15) of *P. tolaasii* was digested with *Eco*RI (lanes 2 8) and *Bam*HI (lanes 9 15), and the DNA was hybridized with *Hpa*I fragment of Tn*5* as a probe.

성하는 인자로 알려져 있으므로 tolaasin이 *P. tolaasii*의 강력한 병원성 결정인자임을 다시 보여주는 결과이다.

3. WL- 돌연변이체의 tolaasin 생성능력.

(1) 적혈구용혈검정(Hemolytic activity test)

WL- 돌연변이체의 tolaasin 생성 유무를 확인하기 위하여 돌연변이체 균주들의 배양여과액의 적혈구 용혈활성을 측정해 본 결과 야생형 *P. tolaasii* 균주와 WL+ 돌연변이체의 배양여과액은 37℃에서 30분 경과 후 흡광도를 크게 감소시켰으나, WL- 돌연변이체의 배양여과액처리에 의해서는 배지을 이용한 대조구에 비해서 흡광도의 감소정도가 크지 않았다(Table 2). 이러한 WL- 돌연변이체의 적혈구 용혈능력의 상실은 이들 돌연변이체들이 tolaasin독소를 생성하지 못함(Tol-)을 말해주고 있다.

(2) HPLC 분석

P. tolaasii 6041R의 배양여과액으로부터 tolaasin을 추출, 정제하여 HPLC로 분석해 본 결과 Shirata 등(1995)의 보고와 같이 전형적인 8개의 tolaasin peak들이 나타났으며, Dr. Shirata로부터 분양 받은 tolaasinⅠ을 동일한 조건에서 분석하여 그 retention time을 비교해 본 결과 6041R균주의 4번째 peak가 tolaasinⅠ인 것으로 나타났다(Fig. 3A, 3B). 그러나 WL- 돌연변이체 6130균주로부터 분리한 분획의 HPLC 분석에서는 야생형 균주에서 나타난 8개의 tolaasin peak들 대신 2개의 peak가 나타났다. 돌연변이체 분획에서 나타난 이들 2개의 peak는 야생형 균주의 분획에서 나타난 8개의 peak 어느 것과도 retention time이 일치하지 않았다(Fig. 3C). 따라서 WL- 돌연변이체가 tolaasin독소를 생성하지 못한다는 것이 직접적으로 확인되었다.

Table 2. Characteristics of Tn*5* Mutants of *Pseudomonas tolaasii*

Mutant	White line test	Rapid pitting test	Hemolysis test (OD_{600})	Fluorescence on KB
6007	-	-	1.14 ± 0.04	+
6008	-	-	1.02 ± 0.09	+
6009	-	-	1.05 ± 0.03	+
6010	-	-	1.03 ± 0.03	+
6130	-	-	1.04 ± 0.02	+
6131	-	-	1.19 ± 0.05	+
6132	-	-	1.19 ± 0.07	+
6134	-	-	1.22 ± 0.03	+
AR*	+	+	0.25 ± 0.04	+
6041R*	+	+	0.25 ± 0.01	+
control(PAF)	NA	NA	1.41 ± 0.01	NA

+ : positive, - : negative, * : Wild type, NA : Not applicable

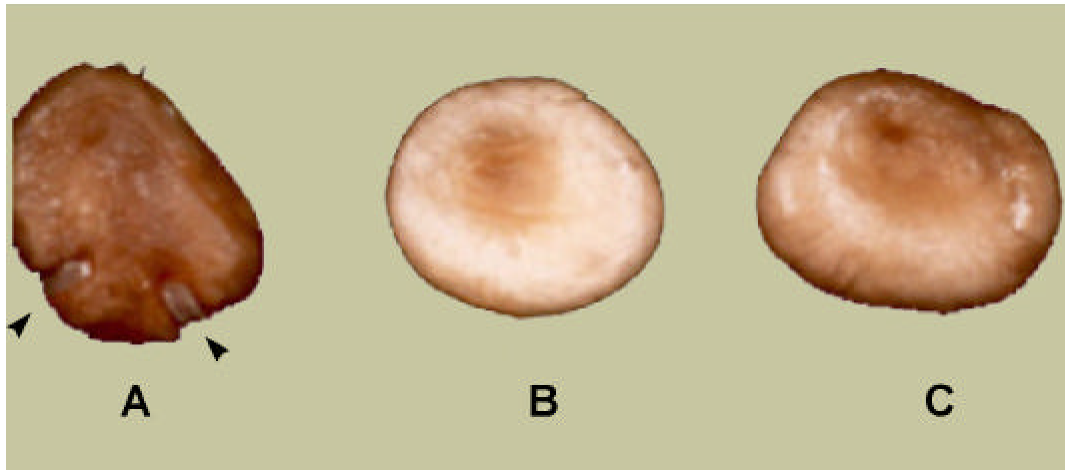


Fig. 2. Pathogenicity of *P. tolaasii* and WL-Tn*5* mutant. Wild type strain (A) made deep pit and discolored cap (arrows) of oyster mushroom while WL-Tn*5* mutant (C) and water control (B) did not make any symptom.

4. Tolaasin 생성 유전자 클로닝

Tolaasin을 생성하지 못하는 돌연변이체(Tol-)로부터 tolaasin생성에 관여 할 것으로 생각되는 *Tn5* 삽입 주변 DNA를 클로닝하기 위하여 Tol- 균주의 전체 DNA를 분리하고 pLAFR3에 genomic library를 만들었다. 이 genomic library 각 클론을 가진 대장균 중 kanamycin 저항성 균주를 선발하였으며, 그 균주로부터 분리된 플라스미드가 *Tn5*를 가지고 있는 것을 확인한 후 그 플라스미드를 pToltn5라 명명하였다. 몇 가지 제한효소로 pToltn5의 physical map을 작성한 결과 pToltn5는 *Tn5*를 포함하여 약 16.9kb의 insert DNA를 가지고 있었다(Fig. 4). 이 플라스미드로부터 *Tn5*의 오른쪽에 있는 약 2.3kb의 *Bam*HI DNA 절편을 pBluescript SKII(+)에 클로닝하였고(pTol1), 이 DNA 절편을 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 확인하기 위한 DNA-DNA hybridization에서 탐침(probe)으로 사용하였다.

5. 클론된 DNA의 *P. tolaasii*에 대한 특이성

pTol1에 클론된 DNA의 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 확인하기 위하여 그 DNA을 probe로 하여 이미 동정된 *P. tolaasii*를 비롯하여 *P. agarici*, *P. gingeri*, WLROs, 그리고 느타리에서 분리된 형광성 *Pseudomonas*의 DNA와 DNA-DNA hybridization 실시하였다. 우리 나라에서 분리 동정된 세 균주(A, 6041, 6096)와 미국에서 분리된 두 균주(P3a, Pf29)등 사용된 5개 균주의 *P. tolaasii*는 모두 같은 크기의 hybridization 밴드를 가졌으나, 사용된 4개의 WLRO균주 중 한 균주와 2개의 형광성 *Pseudomonas* 균주 중 한 균주, 그리고 *P. agarici*에서는 어떠한 bannd도 나타나지 않았으며, 사용된 나머지 균주들도 *P. tolaasii*에 나타난 밴드와 크기 그리고 강도가 다른 밴드를 가졌다 (Fig. 5). 그리고 한국생명공학연구소에 부설된 KCTC로부터 분양 받은 13개의 *Pseudomonas*속 세균들의 DNA와 hybridization에서도 어떤 hybridization

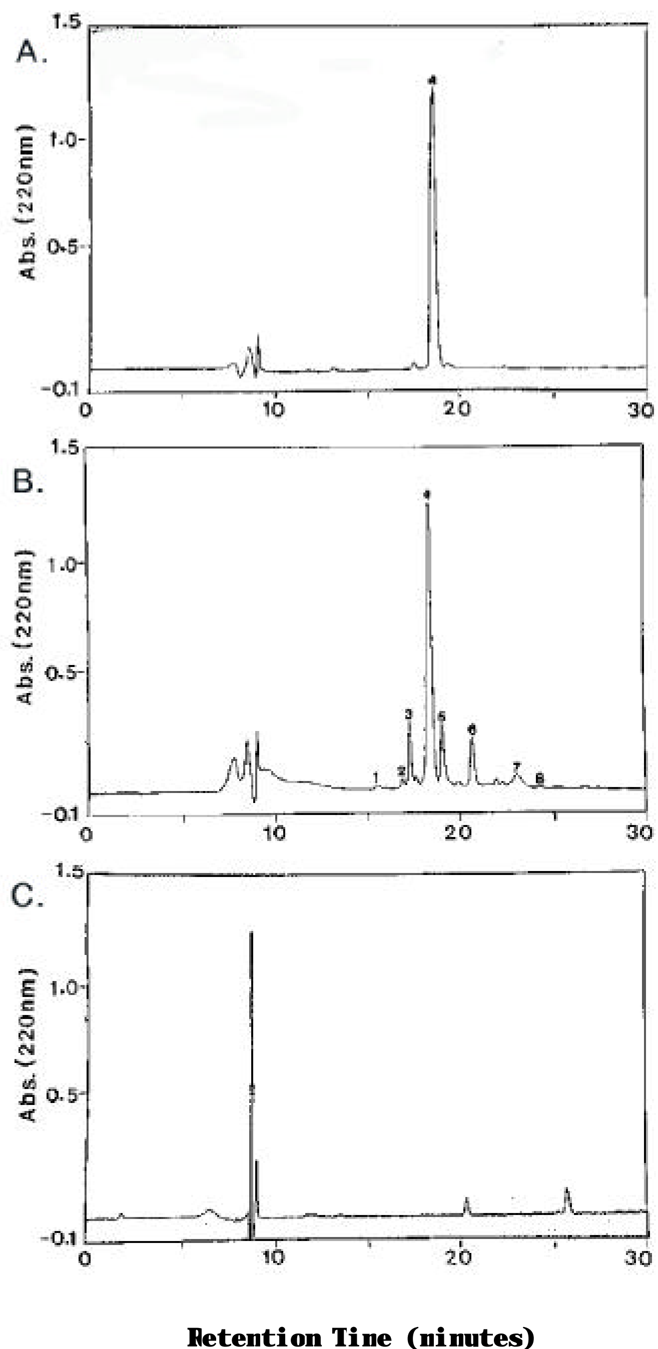


Fig 3. HPLC chromatograms of tolaasins from *F. tolaasii* and WL-mutant. Peak 1 8 represent tolaasin 1 8, based on Dr. Shirata's identification. HPLC chromatograms of tolaasin I (A) from Dr. Shirata, tolaasins from *F. tolaasii* 6041R (B), and Tol- mutant (C).

밴드도 나타나지 않았다(Fig. 6).

이러한 결과는 클론된 DNA와 hybridization되는 유사한 DNA가 일부 다른 세균에 존재함에도 불구하고 DNA hybridization 결과로 나타난 RFLP pattern과 hybridization 밴드의 색의 강도는 최소한 이 DNA절편의 염기서열이 *P. tolaasii*에 특이적인 PCR primer을 만드는데 충분하게 다른 세균의 DNA와 다름을 나타내 주고있다.

6. Tolaasin 생성에 관여하는 DNA 절편의 염기서열 결정 및 primer 선발

이렇게 특이성이 확인된 클론된 DNA(pTol1)의 염기서열이 결정되고, 총 2318쌍의 염기서열을 얻었다(Fig. 7).

Tolaasin 생성 유전자의 염기서열을 결정하기 위해 제작된 primer들과 결정된 염기서열 중 이상적인 PCR primer 부위의 염기서열을 기초로 하여 제작된 primer들(Table 3)를 가지고 여러 조합으로 *P. tolaasii*의 DNA로부터 PCR을 수행하여 *P. tolaasii*의 DNA로부터 DNA를 증폭하는 primer 조합을 1차 선발하였다(Fig. 8).

다음 단계로 1차 선발된 primer 조합을 가지고 *P. tolaasii*와 유사한 일부 세균의 DNA를 이용하여 같은 조건으로 PCR을 수행하여 1차 선발된 primer 조합의 *P. tolaasii*에 대한 특이성을 조사하였다. 또한 이 과정에서 PCR에 크게 영향을 미치는 MgCl2 농도, target DNA의 농도, annealing 온도, primer의 농도, Taq 중합효소 농도의 조건에 따라 *P. tolaasii*에 대한 특이성과 증폭되는 DNA의 재현성을 종합적으로 검토하였다. 이러한 실험결과를 종합하여 Pt-1A와 Pt-1D1 그리고 Pt-1PM와 Pt-1QM의 두 개 primer 조합을 최종 선발하였다. Pt-1PM와Pt-1QM은 nested-PCR을 위하여 primer Pt-1A와 Pt-1D1가 증폭하는 DNA 절편의 내부의 염기서열로부터 만들어졌다.

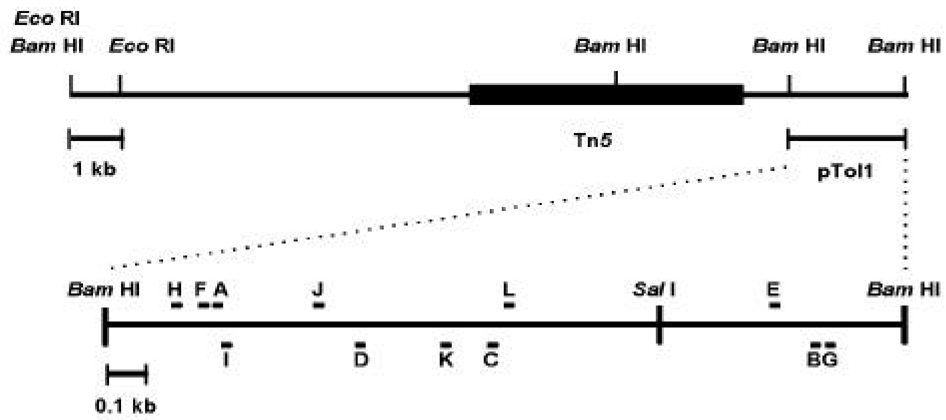


Fig. 4. Physical map of insert DNA of pToltn5 and pTol1. The capital letters (A L) indicate the position of primers.

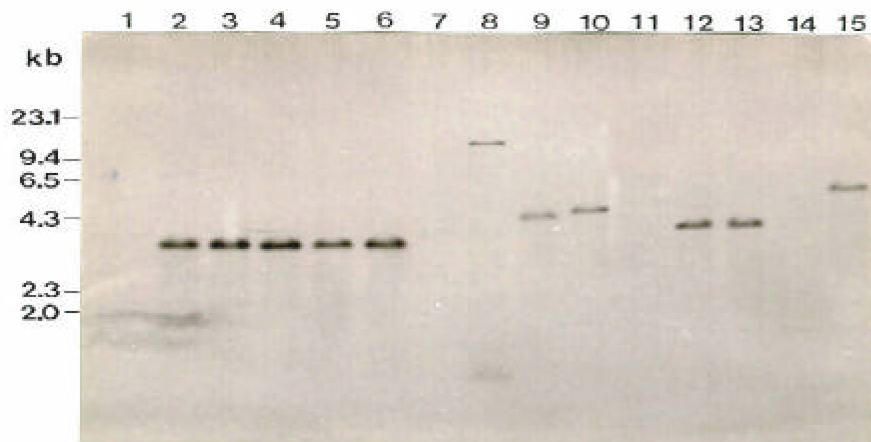


Fig 5. DNA-DNA hybridization of *Pseudomonas* strains isolated form mushroom to determine the specificity of pTol1. Total DNA from *P. tolaasii* (lanes 2-6; A, 6041, p3a, pf29, 6096), WLROs (lanes 7 10; 502-3, ATCC 14340, D2, H3), *P. agarici* (lane 11; ATCC 25941), *P. gingeri* (lanes12 13; pf9, pf31), and fluorescent Pseudomonads (lanes 14 15; 7023, 7053) was digested with *Eco*R I and *Bam*H I, and hybridized with insert DNA of pTol1 as a probe.

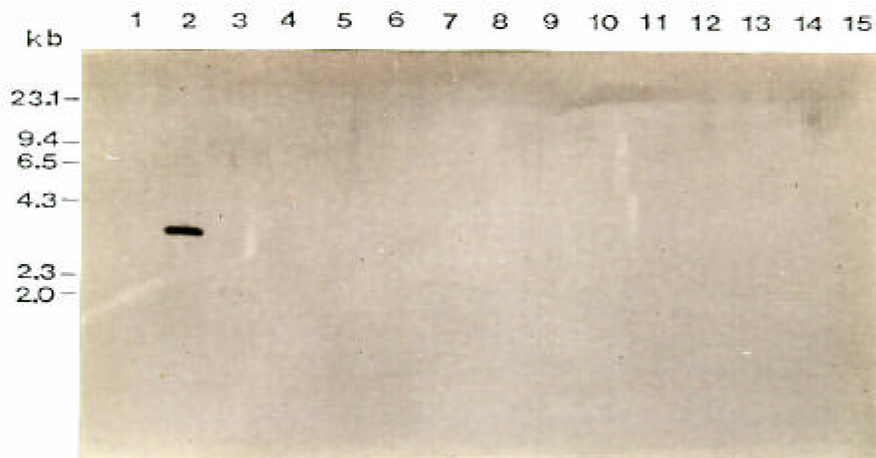


Fig 6. DNA-DNA hybridization of *F. tolaasii* and other Pseudononads to deternine the specificity of pTol1. Total DNA from *F. tolaasii* (lane 2; 6096) and other Pseudononads (lanes 3 15; *F. acidovorans*, *F. arvilla*, *F. dininuta*, *F. fluorescens* KCTC 1645, KCTC 1751, *F. fragi*, *F. naltophilia*, *F. pseudoalcaligenes*, *F. putida*, *F. stutzeri*, *F. taetorolens*, *F. testosteroni*) was digested with *Eco*RⅠ and *Ban*HⅠ, and hybridized with insert DNA of pTol1 as a probe.

TCTGCGACAC CGCCGCTCGT CTGCACGCGC CGCGGTCCGG ACCGCCGCCC GATCTCCATC CGCTACAGGA ATGGTTCCAG CCGCTTTTCC GGTTGGCCGC
AGACGCTGTG GCGGCGAGCA GACGTGCGCG GCGCCAGGCC TGGCGGCGGG CTAGAGGTAG GCGATGTCCT TACCAAGGTC GGCGAAAAGG CCAACCGGCG

TGAGCACGCG GCACTTGCGC CCGCCGCCAG CGTAGCGCGC CAACTTCTGG CGGCGCCGCG CGAGGTGTGC CCGCTCCACG GCGACCTGCA CCACGAGAAC
ACTCGTGCGC CGTGAACGCG GGCGGCGGTC GCATCGCGCG GTTGAAGACC GCCGCGGCGC GCTCCACACG GGCGAGGTGC CGCTGGACGT GGTGCTCTTG

GTGCTCGACT TCGGCGACCG CGGCTGGCTG GCCATCGACC CGCACGGACT GCTCGGCGAG CGCACCTTCG ACTATGCCAA CATCTTCACG AATCCCGATC
CACGAGCTGA AGCCGCTGGC GCCGACCGAC CGGTAGCTGG GCGTGCCTGA CGAGCCGCTC GCGTGGAAGC TGATACGGTT GTAGAAGTGC TTAGGGCTAG

CCTTCGGCGT TTACCTGGGT GTTTACCGGC CTGCGTTTGT CGGTGCCTTA CGCGCTGATT GGCGCGCTGG TGGGCGAGAT CATCGCGGCC AACCGTGGGC
GGAAGCCGCA AATGGACCCA CAAATGGCCG GACGCAAACA GCCACGGAAT GCGCGACTAA CCGCGCGACC ACCCGCTCTA GTAGCGCCGG TTGGCACCCG

TGGGCTATTT GCTCTCGGAC GCGGCCTCGC AGTTCGACAC TGCCGGCGTG TTCGCCTCGC TGGTGGGCAT CATTGCCCTG GCGCTGATCC TCAACACCGC
ACCCGATAAA CGAGAGCCTG CGCCGGAGCG TCAAGCTGTG ACGGCCGCAC AAGCGGAGCG ACCACCCGTA GTAACGGGAC CGCGACTAGG AGTTGTGGCG

CGTGAAGCTC GCCGAACGCA AGCTGATGCC GTGGAAAGCC AACGAAGCCG AACGTGAAGT CGCGGTTTAA CCCCCTCTAT TGCTGGAGTT TGATCATGCT
GCACTTCGAG CGGCTTGCGT TCGACTACGG CACCTTTCGG TTGCTTCGGC TTGCACTTCA GCGCCAAATT GGGGGAGATA ACGACCTCAA ACTAGTACGA

TAAGCGTCTC GTGATTGCCG GTCTGTTGTG CGCCTCGTTT TTACCCGCCG CACAGGCTCA GGATCTGACC AAAGTGACCC TCGCATTCCC CAGCGAAGGT
ATTCGCAGAG CACTAACGGC CAGACAACAC GCGGAGCAAA AATGGGCGGC GTGTCCGAGT CCTAGACTGG TTTCACTGGG AGCGTAAGGG GTCGCTTCCA

TTCCTGTATG TGCCGATTTA TGTGGCGCAG AAGCAGGGTT ACTTTGCCGC CGAAGGCCTG GATGTGGAGG TCATCGTGTT TCAAAAAGGC GGGTCGGCGG
AAGGACATAC ACGGCTAAAT ACACCGCGTC TTCGTCCCAA TGAAACGGCG GCTTCCGGAC CTACACCTCC AGTAGCACAA AGTTTTTCCG CCCAGCCGCC

CGCTGACCGC CGTACTGGGC CGTGACGCCG ATGCCTACGT CGGTCTGCCC GCCGTGGCGG TGCGTGCGCG CACCAAAGGC CAGAATGTAC AGGCCTTCGC
GCGACTGGCG GCATGACCCG GCACTGCGGC TACGGATGCA GCCAGACGGG CGGCACCGCC ACGCACGCGC GTGGTTTCCG GTCTTACATG TCCGGAAGCG

CGCTGTGCAA ACCCAGTTCG GCAGCACCGT GGTGATCGAC GGCGAGTCGG CGCACAAAGC CGGTGTGACA GCCACCTCGC CGGTCGCCGC CCGTGCCCAG
GCGACACGTT TGGGTCAAGC CGTCGTGGCA CCACTAGCTG CCGCTCAGCC GCGTGTTTCG GCCACACTGT CGGTGGAGCG GCCAGCGGCG GGCACGGGTC

GCCCTCAAAG GCTTGAAAAT CGGCGTGACC GGCCCCGGCA GCACCACCGA CATGCTGGTG CGTTATCTGG CCAGGGATGC CGGTTTTGAA CCCCGACAAG
CGGGAGTTTC CGAACTTTTA GCCGCACTGG CCGGGGCCGT CGTGGTGGCT GTACGACCAC GCAATAGACC GGTCCCTACG GCCAAAACTT GGGGCTGTTC

GATTTACCAT CATGCCGGTC GGCGGCGCGC CGAACATGCT CGCGGCGTTT TCCCAGGGCA GCATCAATGG CTTCTCGCTG TCGCCACCGA CCATCACCAC
CTAAATGGTA GTACGGCCAG CCGCCGCGCG GCTTGTACGA GCGCCCAAAA AGGGTCCCGT CGTAGTTACC GAAGAGCGAC AGCGGTGGCT GGTAGTGGTG

CGCCGCGCAG CAGGGCGGGT TTGTGCTGAT GGACCTGGCC AAGGGGGAAT ACAAACCGCT GGATGGTTTC CTGTTCACGG CCATGATCGC CCGTGAGGAC
GCGGCGCGTC GTCCCGCCCA AACACGACTA CCTGGACCGG TTCCCCCTTA TGTTTGGCGA CCTACCAAAG GACAAGTGCC GGTACTAGCG GGCACTCCTG

TGGCTGAGCG CAAACAAGGC CACCGCCGAG AAACTGGTGC GCGCGCTGTG GAAAGCCCGA ACACCTGATC GCCACCGAGC CGCAAAAGGC CCGTGAATCG
ACCGACTCGC GTTTGTTCCG GTGGCGGCTC TTTGACCACG CGCGCGACAC CTTTCGGGCT TGTGGACTAG CGGTGGCTCG GCGTTTTCCG GGCACTTAGC

GTGCGCCCAT ACTTTGCGCA CACCGACAAC GCGATTTTTG ATGCCGCCTG GACCGCCTCG CTGCCGTCCT ATCCGGCTAC GCCGCGTGTG GAGAGGGACG
CACGCGGGTA TGAAACGCGT GTGGCTGTTG CGCTAAAAAC TACGGCGGAC CTGGCGGAGC GACGGCAGGA TAGGCCGATG CGGCGCACAC CTCTCCCTGC

GCGTGGAGAA GAACATCAGT TTCATGAACG CCGTGGAGAA CGACCCCGTG TCGATCGACC CGCAGCAGGT CTACACCAAT GCCATCGTCG ACGCCGTGGC
CGCACCTCTT CTTGTAGTCA AAGTACTTGC GGCACCTCTT GCTGGGGCAC AGCTAGCTGG GCGTCGTCCA GATGTGGTTA CGGTAGCAGC TGCGGCACCG

GCCGACTGTT TCCACCCTCA AGGGAGAGGC GAAATGACGC CCGAGGTTCA CCTGGTCAAT GTATTTCCCG CCACTCCCCG TGGCGGCAAC CCGGCGCCCA
CGGCTGACAA AGGTGGGAGT TCCCTCTCCG CTTTACTGCG GGCTCCAAGT GGACCAGTTA CATAAAGGGC GGTGAGGGGC ACCGCCGTTG GGCCGCGGGT

CCGTGGCCGT GGCGGACGGC ATGAGCGACG CCGACATGCA GCAAGTCGCA CGGGATTACG GGCATGAATG CGGCTTTGTC TTTGCCGCAC CCGCCGGCAG
GGCACCGGCA CCGCCTGCCG TACTCGCTGC GGCTGTACGT CGTTCAGCGT GCCCTAATGC CCGTACTTAC GCCGAAACAG AAACGGCGTG GGCGGCCGTC

CGACTTTGAT TTTGCCCTGC GTTTCTGGGT GCCCAACCAT GAGATGGAAA TGTGCGGCCA CGCCACCGTC GGTGCGGTGT GGTTGCTCGA CCAACTGGGC
GCTGAAACTA AAACGGGACG CAAAGACCCA CGGGTTGGTA CTCTACCTTT ACACGCCGGT GCGGTGGCAG CCACGCCACA CCAACGAGCT GGTTGACCCG

ATGTTGCACA AGGATCGCCT GGCGCTGTGG ACCCAAAGCG GGCGCGTCGA TGCACGAGTG ACCGGCGCCG GTACGCCGCA GATTCAAGTG GAAATCAGCC
TACAACGTGT TCCTAGCGGA CCGCGACACC TGGGTTTCGC CCGCGCAGCT ACGTGCTCAC TGGCCGCGGC CATGCGGCGT CTAAGTTCAC CTTTAGTCGG

AGCCCAAAGG GCAGGTCCAC ACCTTGAGCG ACCCGGAGGT GGAGGCCGAA ATTCTGTCGG TGCTGGGCAT CACCTCCAAC GAACTGGCAC CGCTGCCGAT
TCGGGTTTCC CGTCCAGGTG TGGAACTCGC TGGGCCTCCA CCTCCGGCTT TAAGACAGCC ACGACCCGTA GTGGAGGTTG CTTGACCGTG GCGACGGCTA

CCAGAACGCG TGCACCAGCC GCGTCAAAAC CCTGATCGCG CTGAAAAGCG TGGCGGTGCT CGACAGCCTC AAGCCGGACT ACCGGCGCAT GGAGCAACTG
GGTCTTGCGC ACGTGGTCGG CGCAGTTTTG GGACTAGCGC GACTTTTCGC ACCGCCACGA GCTGTCGGAG TTCGGCCTGA TGGCCGCGTA CCTCGTTGAC

TGCGAGCGCA TCGGCTCCAC CGGTCTGTAC CCCTACGCGC CGTCAGACCT TGAAGGTCGC CAGTTTGACG CGCGGCAGTT TCCCAAATCC TCGGGCTACC
ACGCTCGCGT AGCCGAGGTG GCCAGACATG GGGATGCGCG GCAGTCTGGA ACTTCCAGCG GTCAAACTGC GCGCCGTCAA AGGGTTTAGG AGCCCGATGG

CCGAAGACGC GGCCACGG
GGCTTCTGCG CCGGTGCC

Fig. 7. Nucleotide sequence of insert DNA of pTol1.

Table 3. Oligonucleotide primers used in this study

Primer Name	Sequence of Primer
Pt-1A	5' - ATCCCTTCGGCGTTTACCTG - 3'
Pt-1B	5' - GATGCCCACACCGACAGAAT - 3'
Pt-1C	5' - CGCCGAACGGCATGATGGTG - 3'
Pt-1D	5' - CTTCTGCGCCACATAAATCG - 3'
Pt-1E	5' - ACTGGGCATGTTGCACAAGG - 3'
Pt-1F	5' - GCCAACATCTTCACGAATCC - 3'
Pt-1G	5' - CCAGCACCGACAGAATTTCG - 3'
Pt-1H	5' - ACGAGAACGTGCTCGACTTC - 3'
Pt-1I	5' - TAAGGCACCGACAAACGCAG - 3'
Pt-1J	5' - GATCATGCTTAAGCGTCTCG - 3'
Pt-1K	5' - TGTCACACCGGCTTTGTGCG - 3'
Pt-1L	5' - GGATGGTTTCCTGTTCACGG - 3'
Pt-1M	5' - TCCCAGGGCAGCATCAATGG - 3'
Pt-1P	5' - TTACGCGCTGATTGGC - 3'
Pt-1Q	5' - ATCAAACTCCAGCAATAG - 3'
Pt-1A1	5' - CAACATCTTCACGAATCCCG - 3'
Pt-1D1	5' - CAAAGTAACCCTGCTTCTGC - 3'
Pt-2A	5' - CAACATCTTCACGAATCCCG - 3'
Pt-2B	5' - TGACACGGCTGGTGCACGCG - 3'
Pt-k2	5' - GCGTGTTTCGGCCACACTGT - 3'
Pt-PM	5' - TGCCTTACGCGCTGATTGGC - 3'
Pt-QM	5' - TGATCAAACTCCAGCAATAG - 3'

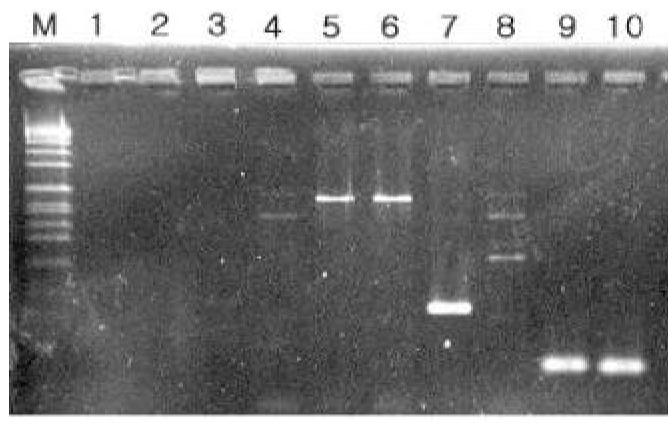


Fig. 8. Patterns of PCR products amplified with various primer pairs from genomic DNA of *P. tolaasii*. M: Mol. wt. marker (SPP1-DNA/*Eco*RI); lane 1: pt-1F and 1B; lane2: pt-1F and 1G; lane 3: pt-1F and 1D; lane 4: pt-1F and 1C; lane 5: pt-1A and 1G; lane 6: pt-1A and 1B; lane 7: pt-1A and 1D; lane 8: pt-1A and 1C; lane 9: pt-1E and 1B; lane 10: pt-1E and 1G.

8. PCR 방법의 특이성 확인

Primer Pt-1A와 Pt-1D1, 그리고 Pt-PM과 Pt-QM을 이용한 PCR 방법의 조건은 Fig. 9와 같다. 먼저 미국 및 한국에서 분리된 *P. tolaasii* 14 균주, 버섯 재배동안 흔히 분리되며 *P. tolaasii*와 대치배양하였을 때 흰침강선을 형성하는 WLRO 14 균주, 양송이와 느타리에서 세균병을 일으키는 *P. agarici* 3 균주, 그리고 양송이에 ginger blotch병을 일으키는 *P. gingeri* 두 균주로부터 분리한 DNA를 이용한 PCR에서 primer Pt-1A와 Pt-1D1는 449bp DNA를 *P. tolaasii*균주의 DNA로부터만 증폭하였다(Fig. 10).

또한 다른 Pseudomonads 24 균주와 농업생태계 내에서 흔히 분리되는 *Erwinia, Agrobacterium, Xanthomonas,* 그리고 *Ralstonia* 속 6균주의 DNA를 이용한 PCR에서도 Pt-1A와 Pt-1D1은 오직 *P. tolaasii* DNA로부터 249bp DNA를 증폭시켰다(Fig. 11). 이 결과는 수행한 PCR 조건에서 primer Pt-1A와 Pt-1D1가 *P. tolaasii*에 확실한 특이성을 가지고 있음을 나타내는 것으로 본 연구의 목적인 *P. tolaasii*의 특이적 검출에 충분히 이용될 수 있음을 의미한다.

PCR 방법의 민감도를 높이기 위한 nested-PCR 방법에 이용하기 위하여 primer Pt-1A와 Pt-1D1가 증폭한 DNA 절편의 내부에서 선발된 Primer Pt-1PM과 Pt-1QM의 *P. tolaasii*에 대한 특이성도 동일한 방법으로 확인되었다.

Primer Pt-PM과 Pt-QM은 *P. tolaasii* 14 균주, WLRO 13 균주, *P. agarici* 3 균주, 그리고 *P. gingeri* 두 균주로부터 분리한 DNA를 이용한 PCR에서 *P. tolaasii* 균주의 DNA로부터만 249bp의 DNA를 증폭하였다(Fig. 12). Primer Pt-1A와 Pt-1D1와 같이 다른 Pseudomonads 24 균주와 농업생태계 내에서 흔히 분리되는 *Erwinia, Agrobacterium, Xanthomonas,* 그리고 *Ralstonia* 속 6균주의 DNA를 이용한 PCR에서도 오직 *P. tolaasii* DNA로부터 249bp DNA를 증폭시켰다(Fig. 13). 이 결과 또한 primer Pt-1A와 Pt-1D1와 같이 Primer Pt-1PM과 Pt-1QM이 *P. tolaasii*에 특이적임을 보여주는 결과이다.

Reaction mixture composition

Volume: 50 μℓ

Primers: 10 pM each

Pt-1A: 5' ATCCCTTCGGCGTTTACCTG 3'

Pt-1D1: 5' CAAAGTAACCCTGCTTCTGC 3'

Pt-PM: 5' TGCCTTACGCGCTGATTGGC 3'

Pt-QM: 5' TGATCAAACTCCAGCAATAG 3'

dNTP: 200μM

Target: 20ng DNA

Polymerase: 1 U Taq polymerase(AmpliTaq Gold™, PE applied biosystems)

Buffer: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$

Amplication condition

95℃, 10 min: Initial denaturation and activation of Taq Gold™

30 cycles: 94℃, 1 min; 65℃, 1 min; 72℃, 2 min

72℃, 10 min: Final extention

Thermal cycler: Geneamp 2400(Perkin-Elmer)

Fig 9. PCR condition for *P. tolaasii*-specific detection with bacterial DNA.

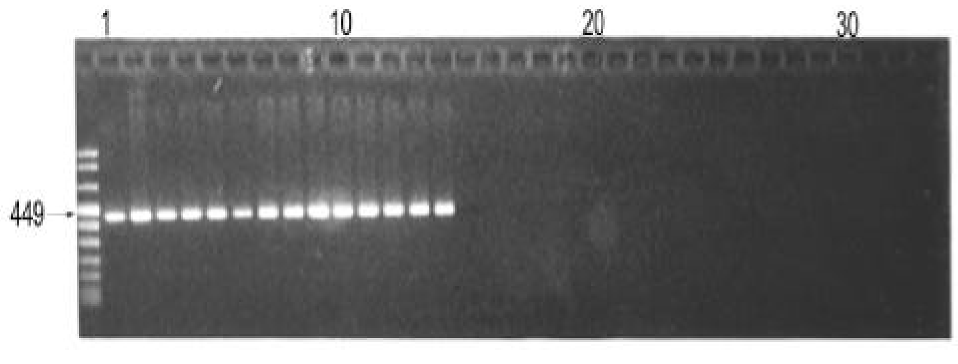


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of PCR products, which were carried out with DNA from *P. tolaasii* and other bacteria isolated from mushrooms and primer Pt-1A and Pt-1D1. Lane 1 to 14, *P. tolaasii* A, ATCC 33618, ATCC 51309, pf29, 7058, 7060, 7063, 7078, 7081, 7098, 7100, 7115, 7126, 7135; lane 15 to 28, white line reacting organism (WLRO) 6043, 6065, 6074, 6153, 6178, 502-3, 6314, 6601, ATCC14340, ATCC51314, ATCC51313, H3, I5, 7017; lane 29 to 31; *P. agarici* KACC10146, KACC10144, KACC10145; lane 32 to 33, *P. gingeri* pf9, pf31. The 449-bp band resulted from only *P. tolaasii* DNA.

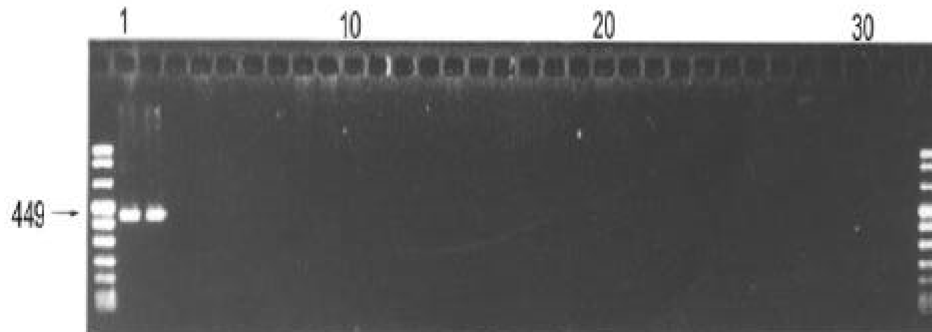


Fig. 11. Agarose gel electrophoresis of PCR products, which were carried out with DNA from Pseudomonads and other bacteria isolated from plants and primer Pt-1A and Pt-1D1. Lane 1-2, *P. tolaasii* A, 7058; lane 3-4, *P. syringae* pv. *syringae* pss61, Ki97267; lane 5, *P. syringae* pv. *tomato* PT23; lane 6-7, *P. fluorescens* KCTC1751, KCTC1645; lane 8-9, *P. aeruginosa* KCTC1637, KCTC1636; lane 10, *P. acidovorans* KCTC1638; lane 11, *P. testosteroni* KCTC1772; lane 12, *P. taetrolens* KCTC1064; lane 13, *P. putida* KCTC1639; lane 14, *P. arvilla* KCTC1643, lane 15, *P. cepacia* KCTC 2475; lane 16, *P. maltophilia* KCTC2437; lane 17, *P. stutzeri* KCTC1066; lane 18, *P. ovalis* KCTC2349, lane 19, *P. syringae* KCTC2440; lane 20, *P. fragi* KCTC2345; lane 21, *P. paucimobilis* KCTC2346; lane 22, *P. saccharophila* KCTC2350; lane 23, *P. syringae* pv. *morsprunorum* Ki97303; lane 24, *P. syringae* pv. *hibisci* Ki97295; lane 25-26, *P. syringae* pv. *actinidiae* Ki97148, Ki98051; lane 27, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 6125; lane 28, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* UCRDAC1188-2; lane 29, *X. campestris* pv. *pruni* 6284; lane 30, *E. chrysanthemi* 6382; lane 31, *Agrobacterium tumefaciens* NT1RE; lane 32, *Ralstonia solanacearum* 6202. The 499-nucleotide band resulted from only *P. tolaasii* DNA.

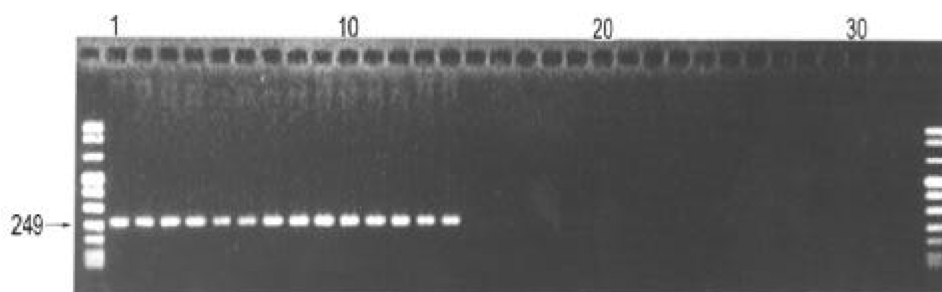


Fig. 12. Agarose gel electrophoresis of PCR products, which were carried out with DNA from *P. tolaasii* and other bacteria isolated from mushrooms and primer Pt-PM and Pt-QN. Lane 1 to 14, *P. tolaasii* A, ATCC33618, ATCC51309, pf29, 7058, 7060, 7063, 7078, 7081, 7098, 7100, 7115, 7126, 7135; lane 15 to 27, WLRO 6043, 6065, 6074, 6153, 6178, 502-3, 6314, 6601, ATCC14340, ATCC51314, ATCC51313, H3, I5; lane 28 to 30, *P. agarici* KACC10146, KACC10144, KACC10145; lane 31 to 32, *P. gingeri* pf9, pf31, ATCC51312. The 249-bp band resulted from only *P. tolaasii* DNA.

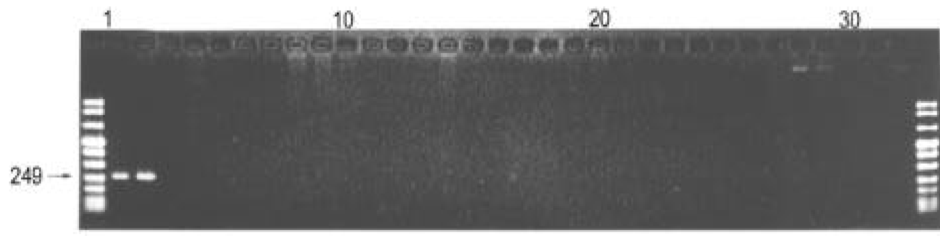


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of PCR products, which were carried out with DNA from Pseudononads and other bacteria isolated from plants and priner Pt-PM and Pt-QN. Lane 1-2, *F. tclaasii* A, 7058; lane 3-4, *F. syringae* pv. *syringae* pss61, Ki 97267; lane 5, *F. syringae* pv. *tcnato* PT23; lane 6-7, *F. fluorescens* KCTC1751, KCTC1645; lane 8-9, *F. aeruginosa* KCTC1637, KCTC1636; lane 10, *F. acidcvorans* KCTC1638; lane 11, *F. testcteroni* KCTC1772; lane 12, *F. taetrolens* KCTC1064; lane 13, *F. putida* KCTC1639; lane 14, *F. arvilla* KCTC1643, lane 15, *F. cepacia* KCTC 2475; lane 16, *F. naltophilia* KCTC2437; lane 17, *F. stutzeri* KCTC1066; lane 18, *F. cvalis* KCTC2349, lane 19, *F. syringae* KCTC2440; lane 20, *F. fragi* KCTC2345; lane 21, *F. paucincbilis* KCTC2346; lane 22, *F. saccharophila* KCTC2350; lane 23, *F. syringae* pv. *norsprunum* Ki97303; lane 24, *F. syringae* pv. *hibisci* Ki97295; lane 25-26, *F. syringae* pv. *actinidae* Ki97148, Ki98051; lane 27, *Erwinia caratovora* subsp. *caratovora* 6125; lane 28, *Xanthcnonas canpestris* pv. *canpestris* UCRDAC1188-2; lane 29, *X. canpestris* pv. *pruni* 6284; lane 30, *E. chrysantheni* 6382; lane 31, *Agrobacterium tunefaciens* NT1RE; lane 32, *Ralstonia sclanacearum* 6202. The 249-bp band resulted from only *F. tclaasii* DNA.

9. 세균 세포를 직접 이용한 nested-PCR

여러 시료로부터 병원세균을 검출하는데 있어서 세균으로부터 DNA를 분리하여 사용하는 것보다 세균 세포를 직접 사용하는 것이 검출의 민감도를 높이고 PCR 전처리과정을 줄임으로써 빠르고 간편하게 세균을 검출하는 방법이다. 따라서 세균 세포를 직접 이용하고, *P. tolaasii*에 특이성이 인정된 두 set의 primer를 사용하여 검출민감도가 가장 뛰어난 PCR 방법인 nested-PCR를 실시하여 *P. tolaasii*에 대한 특이성과 세균 세포의 검출한계를 측정하였다.

먼저 세균의 대사활성이 왕성한 대수생장기의 *P. tolaasii* ATCC51309를 10배 희석법으로 희석후 각 희석액의 10μℓ를 PCR 반응에 사용하였으며, nested-PCR 조건은 Fig.14 와 같다. 평판배양에 의한 세균의 CFU 측정 결과 PCR 반응액 당 각각 300,000, 30,000, 3,000, 300, 30, 3, 0.3, 0.03, 0.003, 0.0003의 세균이 사용되었다. Fig. 14에서 보는 바와 같이 프라이머 Pt-1A와 Pt-1D1을 이용한 1차 증폭의 경우 PCR반응 당 3,000CFU까지 DNA 밴드가 나타났으나 2차 증폭 후에는 PCR 반응 당 3CFU까지 DNA 밴드가 나타났음을 알 수 있다. 즉 1차 증폭의 세균검출한계는 PCR반응 당 3,000CFU이지만 2차 증폭의 세균검출한계는 PCR 반응 당 3CFU로서 세균세포를 직접 이용한 nested-PCR에 의해 검출민감도가 1,000배 증가하였음을 나타낸다. 또한 이 결과뿐만 아니라 여기에 첨부되지는 않았으나 독립적으로 수행한 수 차례 실험결과는 Primer Pt-1A와 Pt-1D1, 그리고 Pt-PM과 Pt-QM과 세균 세포를 직접 이용한 nested-PCR에 의한 세균의 검출한계가 PCR 반응당 세균이 1CFU 또는 그 이하까지 계산되었다.

프라이머 Pt-1A와 Pt-1D1 그리고 Pt-PM과 Pt-QM의 *P. tolaasii*에 대한 특이성이 세균의 DNA을 이용하여 확인되었으므로 세균세포를 직접 이용한 nested-PCR의 경우 *P. tolaasii*가 아닌 다른 세균으로부터 DNA를 증폭할 수 있는 가능성을 배제할 수 없으므로 *P. tolaasii*와 매우 유사한 WLRO 502-3를 이

1st_round_Amplification

Reaction mixture composition

Volume: 50 μℓ

Primers: Pt-1A/Pt-1D1, 10 pM each

dNTP: 200 μM

Target: bacterial cells

Polymerase: 1 U Taq polymerase(AmpliTaq Gold™,
PE applied biosystems)

Buffer: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$

Amplication condition

95°C, 10 min: Initial denaturation and activation of Taq Gold™

30 cycles: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min

72°C, 10 min: Final extention

Thermal cycler: GeneAmp 2400

2nd_round_amplification

Everything is the same as the 1st round amplification except that 2 μℓ of 1st round amplification product was for target and Pt-PM, Pt-QM werefor primers.

Fig. 14. Nested-PCR condition with bacterial cells.

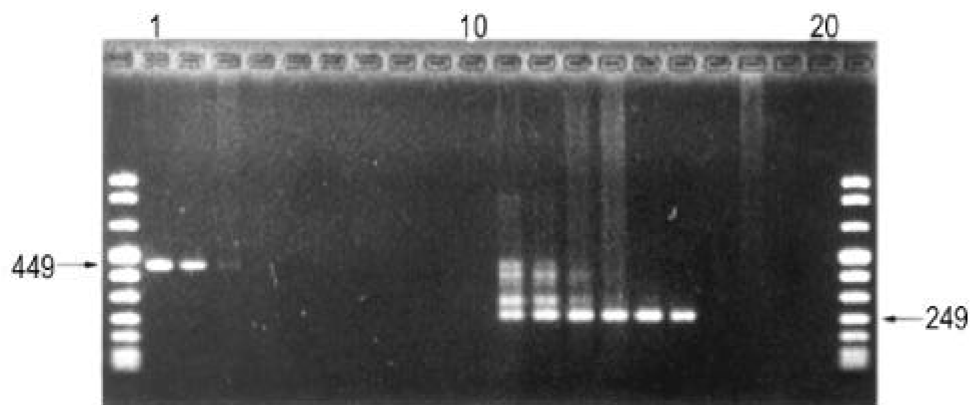


Fig. 15. Sensitivity of nested-PCR. The first round PCR was carried out with external primers, Pt-1A and Pt-1D1 (lane 1-10) and nested PCR with internal primers, Pt-PM and Pt-QM and 2μℓ of the first round PCR products (lane 11-20). The number of bacteria in the PCR mixture, estimated by dilution plate, were 300,000, 30,000, 3,000, 300, 30, 3, 0.3, 0.03, 0.003, 0.0003 for lane 1-10 respectively. The detection limit of the first round PCR and nested PCR were 3,000 and 3 CFU per PCR reaction respectively.

용하여 동일한 방법으로 PCR를 수행하였다. 그 결과 어떤 세균의 농도에서도 그리고 1차 그리고 2차 증폭 모두에서 어떠한 DNA도 증폭되지 않았다. 즉 세균 세포를 직접 이용한 nested-PCR의 경우도 프라이머 Pt-1A, Pt-1D1와 Pt-PN, Pt-QN의 *P. tolaasii*에 대한 특이성이 유지되었다.

10. IC(Immunocapture)-nested-PCR에 의한 *P. tolaasii* 검출

세균 세포를 직접 이용한 nested-PCR의 경우 *P. tolaasii* 검출민감도는 매우 높아졌지만 여러 가지 시료로부터 *P. tolaasii*의 직접적인 검출에 적용하는데 한계가 있다. 즉 버섯배지, 오염된 물, 병든 버섯 등 여러 시료에는 흔히 PCR 억제인자가 존재하며, *P. tolaasii* 외에 다른 세균이 수천, 수만 배 더 많이 존재할 수 있다. 따라서 시료로부터 *P. tolaasii*를 특이적으로 얻은 후 다른 불순물을 제거하고 PCR를 수행하여 *P. tolaasii*를 검출하는 immunocapture-PCR법을 개발하였다.

먼저 활발하게 생장하는 *P. tolaasii* ATCC51309와 WLRO 502-3의 현탁액을 10배 희석법으로 희석한 후 각각 다른 비율로 혼합하였다. 이렇게 만든 세균 현탁액에서 Fig.16에서 표시한 방법으로 *P. tolaasii*를 Dynabeads에 흡착시켜 얻은 Dynabeads를 nested-PCR에 사용하였다.

IC-nested-PCR 결과 1차 증폭에 의해서는 어떠한 DNA 밴드도 나타나지 않았으며 2차 증폭에 의해서 *P. tolaasii*와 WLRO가 30:300,00로 혼합된 시료까지 DNA 밴드가 나타났다(Fig. 17). 이 결과는 사용된 세균현탁액에 *P. tolaasii*가 30개 이상 존재하면 다른 세균이 10,000배 존재하여도 검출될 수 있음을 보여주는 결과이다. 또한 WLRO는 높은 수준으로 존재하여도 증폭되지 않음을 보여주고 있다. 따라서 *P. tolaasii*의 항체를 이용한 IC-nested-PCR 방법은 P. tolaasii가 약 30 CFU 존재하는 어떤 시료로부터도 *P. tolaasii*가 검출될 수 있음을 의미한다.

Immunocapture *P. tolaasii* cells

1. Mix 500μℓ bacterial suspension with 200μℓ of anti-Pt antiserum (1:250 dilution in PBS)
2. Gently shake the mixture for 30 min
3. Remove unbound anti-Pt antibody by centrifugation and wash twice with PBS containing 0.1% BSA
4. Resuspend the bacterial pellet in 300μℓ PBS-BSA
5. Add 5μℓ Dynabead M-280 sheep anti-rabbit IgG
6. Incubate 30 min with gentle shaking
7. Recover Dynabead M-280 by magnetic stand
8. Resuspend the Dynabead M-280 in 5μℓ sterile water

Nested-PCR

Everything is the same as the nested-PCR in Fig. except 5μℓ of Dynabead suspension is used for target rather than bacterial suspension in the 1st round amplification.

Fig. 16. Immunocapture-nested-PCR condition.

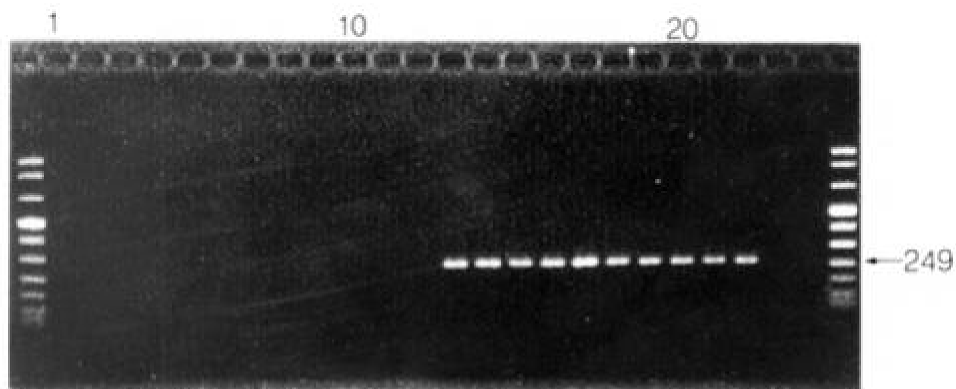


Fig. 17. Selectivity and sensitivity of the combined immuno-capture and nested-PCR. Agarose gel electrophoresis of PCR product following immuno-capture and the first round PCR with external primer, Pt-1A and Pt-1D1 (lane 1-12) and nested PCR with internal primer, Pt-PM and Pt-QM and 2μℓ of the first round PCR products (lane 13-24). The original sample (300μℓ) contained bacterial cells of *P. tolaasii* ATCC 51309 and WLRO 502-3 with different ratio; 300:300, 300:3,000, 300:30,000, 300:300,000, 300:3,000,000 for lane 1-5, 30:30, 30:300, 30:3,000, 30:30,000, 30:300,000 for lane 6-10, 3:3, 3:30 for lane 11-12.

11. 느타리 재배사의 물로부터 *P. tolaasii*의 검출

느타리 재배동안 병원균이 전염될 수 있는 전염원은 크게 세가지, 즉 버섯재배에 사용하는 물, 종균, 배지재료로 생각할 수 있다. 그런데 배지재료에 오염된 병원균은 *P. tolaasii*가 저온성 세균으로 열에 민감한 것으로 알려져 있기 때문에 멸균 혹은 살균과정에서 제거될 수 있다고 판단된다. 그러나 재배에 사용되는 물이나 종균이 오염되어 있다면 버섯 재배과정에서 병원균의 전염을 막을 수 없다. 따라서 먼저 주로 충북지방의 버섯 재배사에서 사용하는 물을 채집하여 병원균 오염정도를 조사하였다. 수집된 물로부터 평판배양을 통하여 물에 포함된 전체 세균수를 조사하였으며, 개발된 두 가지 PCR방법으로 *P. tolaasii*를 검출하였다.

수집된 전체 57개 시료 중 73.7%인 42개 시료가 ㎖당 1,000cfu 이상의 일반 세균을 포함하고 있었으며, 19.3%인 11개의 시료가 10,000 cfu 이상, 그리고 7%인 4개의 시료가 100,000cfu 이상의 세균을 포함하고 있었다. 한편 *P. tolaasii*의 경우 nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 5.3%인 3곳의 물이, 그리고 IC-nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 35.1%인 20개의 시료로부터 검출되었다. Nested-PCR과 IC-nested-PCR의 결과가 큰 차이가 있는 이유는 nested-PCR의 경우 *P. tolaasii* 이외의 미생물이 많이 존재 할 경우 target DNA의 경쟁에 의해 DNA 밴드가 증폭되지 않을 수 있으며, 시료에 PCR 저해제가 포함되어 있을 가능성이 있어서 상대적으로 적은 수의 물에서 *P. tolaasii*가 검출된 것으로 판단된다.

이상의 결과는 전체적으로 버섯재배사의 많은 물이 일반세균 뿐만 아니라 병원균인 *P. tolaasii*에 오염되어 있다는 사실을 말해주고 있다. 느타리 세균성갈색무늬병의 발생을 위해서는 꽤 높은 농도의 병원세균이 존재해야 한다고 알려져 있으므로 병원균이 검출된 물의 사용이 바로 이 병에 걸린다는 것을 의미하지는 않지만 재배에 사용하는 물이 병원균의 중요한 전염원의 하

Table 4. Datection of *P. tolaasii* in water which were collected from oyster mushroom cultivation houses by nested-PCR and Immunocapture-nested-PCR.

Site	Location	Number of bacteria(CFU/mℓ)	Nested PCR	IC-PCR
1	Jaecheonshi Bongyangyeup	4,500	−	−
2	〃	180	−	−
3	〃	470	−	−
4	〃	10,000	−	−
5	〃	34,000	−	−
6	〃	14,000	−	−
7	〃	6,360	−	−
8	Jaecheonshi Sangokdong	6,400	−	+
9	Jaecheonshi Heukseokdong	191,000	−	−
10	Jaecheonshi Daeryangdong	122,000	+	+
11	Jaecheonshi Duhakdong	200	−	+
12	Jaecheonshi Keumsungmyon	1,270	−	−
13	〃	6,940	−	−
14	Jaecheonshi Keumsungmyon 1	3,360	−	−
15	Jaecheonshi Keumsungmyon 2	2,040	−	+
16	Jaecheonshi Keumsungmyon	960	−	+
17	〃	0	−	−
18	Koesangun chilseongmyon	4,500	−	−
19	Koesangun Saleemyon	40	−	−
20	Koesangun Yonpungmyon	1,180	−	−
21	〃	19,000	−	−
22	〃	6,980	−	+
23	〃	8,000	−	+
24	〃	269,000	−	−
25	Koesangun Doanmyon	1,210	−	−
26	Chungnam Yongigun	160	−	+
27	〃	140	−	−
28	〃	400	−	+
29	Danyanggun Jeoksungmyon	350	−	+
30	Eumseonggun Eumseongyeup	1,440	−	−
31	〃	2,840	+	+
32	Eumseonggun Wonnammyon	35,000	−	+
33	Cheongwongun Ochangmyon 1	2,560	−	−
34	Cheongwongun Ochangmyon 2	Humidifier:58,000	−	+
35	Cheongwongun Oksanmyon	510	−	−
36	Cheongjushi Jijungdong 1	2,400	−	+
37	Cheongjushi Jijungdong 2	4,900	−	+
38	Cheongjushi Sincheondong	2,800	−	−
39	Cheongjushi Sindaedong	3,880	−	−
40	Cheongjushi Jangseongdong	280	−	−

Table 4 Continued

Site	Location	Number of bacteria(CFU/mℓ)	Nested PCR	IC-PCR
41	Jungwongun Judeokmyon	1,600	−	+
42	Jungwongun Yeomjeongmyon	0	−	−
43	〃	416,000	−	+
44	〃	3,400	−	+
45	Koesangun Cheongcheonmyom	4,280	−	−
46	〃	6,600	−	−
47	〃	870	−	−
48	〃	14,560	+	+
49	〃	3,140	−	−
50	Jincheongun Chopyungmyon	1,700	−	−
51	〃	20	−	−
52	Jincheongun Leewolmyon	2,000	−	+
53	〃	3,660	−	−
54	〃	260	−	−
55	Okcheongun Annammyon	3,880	−	−
56	〃	1,860	−	−
57	〃	4,200	−	−

나라고 판명되었다고 판단된다.

본 연구에서 종균의 오염정도를 측정한 결과는 없지만 느타리 세균성갈색무늬병의 경우 전국적으로 거의 모든 느타리 재배사에서 병이 발생이 한다는 점을 생각할 때 병원균의 전염원이 버섯재배와 매우 밀접하게 연관되어 있음 짐작할 수 있다.

제 4 절 요약

본 연구에서는 느타리 재배에 큰 피해를 주고있는 세균성갈색무늬병의 조기 진단 및 병원균인 *P. tolaasii*의 신속한 검출 및 동정을 위한 PCR 방법을 개발하였으며, 개발된 PCR 방법으로 병원균의 중요한 전염원으로 생각되는 느타리 재배에 사용되는 물검사 결과 많은 물이 병원균에 오염되어 있는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. *P. tolaasii*의 tolaasin 유전자를 클로닝하기 위하여 *P. tolaasii* 균주와 pSUP2021::Tn*5*를 가진 대장균과의 접합을 통해 *P. tolaasii*의 Tn*5* 돌연변이체를 만들었으며, Tn*5* 돌연변이체중에서 흰침강선(white line)을 형성하지 못하는 9개의 돌연변이체(WL-)가 흰침강선형성검정을 통해 선발되었다.
2. 선발된 WL- 돌연변이체들은 모두 양송이와 느타리에서 병원성을 나타내지 못했으며, 적혈구 용혈능력도 상실한 것으로 나타났다. 이 돌연변이체의 배양여액으로부터 tolaasin을 추출하여 HPLC로 분석한 결과 돌연변이체는 tolaasin 독소를 생성하지 못하였다(Tol-).
3. Tol- 돌연변이체의 genomic library를 만들고, Tn5를 가진 클론을 선발하여 그 클론으로부터 Tn5의 약 2.4kb DNA를 클로닝하였다.
4. 클로닝된 DNA절편을 probe로 하여 *P. tolaasii*와 다른 *Pseudomonas*속 균주의 genomic DNA와 DNA-DNA hybridization 결과 클로닝된 DNA는 *P. tolaasii*에 대해 특이성을 나타내었다.

4. 총 2318쌍의 클론된 DNA 절편의 전체 염기서열을 결정하였다.

5. 염기서열을 기초로 하여 PCR를 위한 primer를 제작하였고, 이들 primer중 *p. tolaasii*의 DNA를 특이적으로 증폭시키는 pt-1A와 pt-1D1 조합과 pt-PM와 pt-QM primer 조합을 최종 선발하였다.

6. 총 33개의 버섯으로부터 분리한 세균 균주와 24개의 다른 Pseudomonads, 그리고 농업생태계에서 병원세균으로 잘 알려진 6개 균주의 세균 DNA를 이용한 PCR 수행결과 선발된 2쌍의 Primer는 오직 *p. tolaasii*의 DNA로부터만 각각 449 bp와 249bp의 DNA절편을 증폭하였다.

7. DNA 대신에 세균세포를 이용하여 primer pt-1A와 pt-1D1로 1차 증폭하고, 2 ㎕의 1차 증폭산물과 primer pt-PM와 pt-QM을 이용한 2차 증폭한 nested-PCR 방법은 *P. tolaasii*에 대한 특이성이 유지되면서 PCR 반응당 *P. tolaasii*가 3CFU만 존재하여도 *P. tolaasii*를 검출할 수 있었다.

8. 세균 현탁액으로부터 *P. tolaasii* 특이적 항체와 선발된 두 set의 primer를 이용한 IC-nested-PCR 방법은 시료에 *P. tolaasii*가 30 cfu 이상 존재하는 경우 다른 세균이 10,000배 존재하여도 *P. tolaasii*를 검출할 수 있었다.

9. 주로 충북지방의 느타리 재배사에서 수집된 57개 물 시료 중 73.7%인 42개 시료가 ㎖당 1,000cfu 이상의 일반 세균을 포함하고 있었으며, 19.3%인 11개의 시료가 10,000 cfu 이상, 그리고 7%인 4개의 시료가 100,000cfu 이상의 세균을 포함하고 있었다.

10. *P. tolaasii*의 경우 nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 5.3%인 3곳의 물이, 그리고 IC-nested-PCR로 검출하였을 경우 전체의 35.1%인 20개의 물 시료로부터 *P. tolaasii* 특이적 DNA가 증폭되었다.

제 5 절 인용문헌

Brodey, C. L., Rainey, P. B., Tester, M., and Johnstone, K. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 407-411.

Brunk, C. F., Avaniss-Aghajani. E., and Brunk, C. A. 1996. A computer analysis of primer and probe hybridization potential with bacterial small-subunit rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 872-879.

차동열, 박정식, 유창현, 김광포, 전창성, 이두원. 1997. *느타리 재배기술과 재배경영.* 농민신문사. 374pp.

Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gilllis, M., Kersters, K., and Deley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2249-2264.

Grewal, S. I. S., Han, B., and Johnstone, K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii,* the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus. J. Appl. Bacteriol.* 177: 4658-4668.

Han, B., Pain, A., and Jonstone, K. 1997. Spontaneous duplication of a 661bp element within a two-component sensor regulator gene causes phenotypic switching in colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Mol. Microbiol.* 25 : 211-218.

Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Villemot, I., and Alvarez, A. Rapid and sensitive colorimeric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay.

Phytopathology 86: 95-101.

Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 81-109.

Hu, X., Lai, F-M., Reddy, A. S. N., and Ishimaru, C. A. 1995. Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85: 1468-1473.

진경식, 김정준, 전항성, 이은종. 1994. 버섯 갈변병균 *Pseudomonas tolaasii*와 *Pseudomonas agarici*의 분리동정에 있어서 특성차이. 농업논문집 36: 343-348.

Jung, S. J., and Lee, Y. J., 1997. Methods for extraction of DNA from water samples for polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 35: 354-395.

김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원 세균에 관한 연구; 1. 인공 재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여. 한국식물병리학회지. 10: 197-210.

김종완, 권순익, 강희진. 1995. 인공 재배버섯에 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구; 2. 버섯 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii*와 White Line 형성균의 세균학적 특성. 한국식물병리학회지. 11: 353-360.

이혁인, 차재순. 1998. 느타리 세균성갈색무늬병 병원균 *Pseudomonas tolaasii*의 특이적 DNA 클로닝. 한국식물병리학회지. 14: 177-183.

이현욱, 김태성, 박현철, 송근우, 신원교, 문병주. 1999. 팽이버섯 세균성 갈색무늬병(Pseudomonas tolaasii) 방제약제 선발. 한국균학회지 27:164-169

Matheson, V. G., Munakata-Marr, J., Hopkins, G. D., Mccarty, P. L.,

Tiedje, J. M., and Forney, L. J. 1997. A novel means to develop strain-specific DNA probes for detecting bacteria in the enviroment. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2863-2869.

Mortishire-Smith, R. J., Drake, A. F., Nutkins, J. C., and Williams, D. H. 1991. Left handed α-helix formation by bacterial peptide. *FEBS.* 278: 244-246.

Nair, N. G., and Fahy, P. C. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Aust. J. biol. Sci.* 26: 509-512.

Nutkins, J. C., Mortishire-Smith, R. J., Packman, L. C., Brodey, C. L., Rainey, P. B., Jonstone, K., and Williams, D. H. 1991. Structure determination of tolaasin, an extracellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2621-2627.

Pooler M. R., Myung, I. S., Bentz, J., Sherald, J., and Hartung, J. S. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 123-126.

Rainey, P. B., Brodey, C. L., and Johnstone, K. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii.* *Physiol. mol. plant pathol.* 39: 57-70.

Rainey, P. B., Brodey, C. L., and Johnstone, K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Adv. Plant Pathol.* 8; 95-117.

Rainey, P. B., Brodey, C. L., and Johnstone, K. 1993. Identification

of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Mol. Microbiol.* 8: 643-652.

Rudi, K. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. 1998a. Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 34-37.

Rudi, K. Larsen, F. and Jakobsen, K. S. 1998b. Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2693-2643.

Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.

신관철, 전낙범. 1991. 느타리 세균성갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. 1991. 농시논문집 34: 1-10.

Shirata, A. 1996. Production of volatile components by *Pseudomonas tolaasii* and their toxic activity. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 185-193.

Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M., and Monde, K. 1995. Isolation and biological activity of toxins produced by a japanese strain of *Pseudomonas tolaasii* the pathogen of bcterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 493-502.

Tsuneda, A., Suyama, K., Murakami, S., and Ohira, A. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed *Quercus* logs. *Mycoscience* 36: 283-288.

Volossiouk, T., Robb, E. J., and Nazar, R. N. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3972-3976.

Wells, J. M., Sapers, G. M., Fett, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H., and Miller, F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology* 86: 1098-1104.

Wong, W. C., and Preece, T. F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 401-407

제3장 느타리버섯 바이러스 병 진단용 RT-PCR 방법개발

제1절 서 설

느타리버섯는 우리 구미에 잘 맞을 뿐만 아니라 재배가 용이하고 소득이 높아 재배면적이 매년 증가하고 있다. 1997년의 경우에는 재배면적이 3,462,000평에 이르게 되었으며 생산량도 114,521M/T로 식용버섯 중 가장 많았다(RDA,1998). 그러나 재배면적이 넓어지고 재배 연수도 증가함에 따라 병해충의 발생이 심해져 안전재배를 위협하고 있으며 심한 경우 재배자체를 포기하는 경우도 있어 문제가 되고 있다. 느타리버섯의 안전재배를 위협하고 있는 중요한 병으로는 세균성갈색무늬병, 푸른곰팡이병, 바이러스병 등이 있다.

그 중에서 느타리버섯의 바이러스병은 재배의 실패 및 품질저하의 중요한 원인으로 생각되고 있다. 바이러스병의 중요한 증상으로는 수량이 감소하고 기형의 자실체가 형성되는데, 바이러스에 감염된 느타리버섯은 갓이 대체로 작으며 대가 길거나 굽은 형태로 분지를 형성하는 것이 특징이다. 균사생장은 건전 느타리버섯에 비하여 전체적으로 생장이 지연된다. 건전 균주의 균사를 이병균주의 균사와 균사융합을 시키면 바이러스가 세포액을 따라 건전 균사체로 전이되는데 이 때 건전균사의 균사의 생장은 잠시 멈춘듯 생장이 지연된다(Go, 1990). 균사의 세포는 건전 느타리버섯의 세포에 비하여 폭은 굵으나 길이가 짧은 것이 특징이다. 또한 바이러스에 감염된 느타리버섯은 세포벽이 얇아 Novozyme 234로 처리하였을때 건전균주는 180분 경과후 원형질체가 가장 많이 나출되나 이병균주는 90분 경과후에 가장 많았다(Go, 1990). 이러한 증상들은 재배환경조건이나 품종에 따라 차이가 심하여 재배자가 육안으로 진단하는데 어려움이 있다. 특히 재배환경이 불량한 경우는 뚜렷한 증상을 나타내지만 재배환경이 양호한 경우에는 특별한 증상이 없어 바이러스 감염 여부의 판단이 불가능하다.

느타리 버섯과 같은 균류에 감염되어 번식하고 있는 바이러스를 균주 바이러스라고 하는데 균주 바이러스 중 버섯과 같은 양송이에 감염되어 병징을 일으키는 것(Hollings, 1978)과 표고버섯과 같이 병징을 일으키지 않는 경우도 있다. 바이러스가 양송이에 감염되면 자실체가 기형으로 발생하며수량이 감소되는데 이를 La France 병이라 한다. 그러나 이들 균류 바이러스 상오간 동질여부는 규명된 바 없으나 양송이 내에서 발견되 바이러스 상호간에도 homology가 없었다(Harmsen, 1991)

느타리에 바이러스병을 일으키는 바이러스는 크기가 다른 구형 바이러스와 간형 바이러스가 보고되었다. 구형바이러스의 크기는 연구자에 따라 차이가 있으며 23nm, 32nm (Go, *et al.*, 1992) 혹은 50nm(김, 1995)이다. 간형 바이러스는 16 x 47nm와 4 x 23nm(Park, *et al.* 1996)가 보고되었다. 느타리 바이러스는 종류에 따라 구형 바이러스의 경우 크기가 다른 5개의 이중가닥 RNA(double stranded RNA; dsRNA, Go, *et al.*1992) 절편을 함유하고 있으며, 간형 바이러스의 경우는 0.7kb의 단일가닥 RNA(single stranded; ssRNA) 절편(Park, *et al.*)을 함유하고 있다. 한편 건전 느타리버섯은 dsRNA나 ssRNA를 함유하고 있지 않은 것으로 알려져 있다.

느타리 바이러스병은 현재까지 특별한 치료나 방제 방법이 없다. 따라서 안전재배를 위해서는 바이러스병의 조기진단을 통해 병든 느타리버섯을 제거하거나, 바이러스를 함유한 느타리버섯를 재배하지 않는 방법이 바이러스병을 퇴치하는 가장 중요한 방제법이다.

바이러스병의 진단을 위한 바이러스 검출방법으로는 바이러스 외피단백질의 특이항체를 이용한 다양한 혈청적 방법과 현미경을 이용한 직접 관찰하는 방법등이 있으나 국내에서 느타리버섯의 바이러스병에 대한 진단 방법은 전혀 연구된 바가 없다. 최근에는 여러 가지 병원체의 검출에 병원체의 핵산을 진단에 이용하는 분자생물학적 방법의 사용이 크게 증가하고 있다. 그 중에서도 핵산

중합효소연쇄반응방법(polymerase chain reaction, PCR)은 핵산절편을 이용한 hybridization 방법보다 신속하고 정확하며, 다른 어떤 병원체 검출법보다 민감한 방법으로 알려져 있다. PCR은 DNA 또는 RNA에 상보적인 2개의 oligonucleotide primer와 DNA polymerase를 이용하여 PCR 기내에서 목표로 하는 핵산만을 중합하므로 바이러스에 존재하는 dsRNA의 핵산절편이나 그 염기를 이용하여 느타리버섯의 바이러스 이병 여부의 진단에 이용이 가능하다. PCR을 이용한 핵산중합은 사용된 핵산양의 10배 이상 중합되므로 hybridization 방법보다 10-1000배정도 탐색 감도가 높다(Kanekoet al., 1989).

본 과제는 느타리버섯 재배에 있어서 재배실패 원인 중의 하나인 느타리바이러스를 조기에 진단할 수 있는 RT-PCR 방법을 개발하고자 실시하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 바이러스에 감염된 느타리버섯의 수집

느타리버섯에 감염되어 있는 바이러스 입자를 분리하기 위하여 전국 느타리버섯 재배단지를 중심으로 바이러스에 감염된 느타리버섯으로 생각되는 기형버섯을 수집하였다. 수집된 느타리버섯의 자실체로부터 무균적으로 조직을 분리하여 감자한천배지(PDA)에 접종하여 균사를 얻었다. 느타리버섯의 균사는 25℃에서 배양하였으며, 배양이 완료된 느타리버섯은 4℃로 보관하며 실험에 이용하였다.

2. 바이러스의 순수분리

느타리버섯으로부터 바이러스의 순수 분리는 Lende등(1995)의 방법을 일부를 변형하여 수행하였다. 액체배양하여 얻은 균사체를 0.01M 인산완충액 (pH 7.5)으로 1회 세척한 후 0.5%의 mercaptoethanol를 함유한 균사체 양의 2배의 인산완충용액과 함께 혼합기로 10분간 마쇄하고, 7500rpm에서 30분간 원심분리

한 후 상등액을 얻었다. 상등액에 polyethylen glycol(PEG)을 10%되게, NaCl을 0.6M되게 각각 첨가하여 4℃에서 12시간 stirring 조건하에서 바이러스 입자를 응결하여 침강시켰다. 침강된 바이러스는 원심분리로 회수하여 0.1M 인산완충액에 희석하고 설탕구배(10-40%) 원심분리를 실시하여 바이러스입자만을 순수분리하였다. 설탕구배 원심분리는 Beckman SW41Ti로터로 25000rpm에서 2시간 실시하였으며, 여기서 얻은 바이러스 밴드을 완충액에 현탁시켜 Beckman 55.2 로터를 이용하여 30000rpm으로 원심분리하여 바이러스 입자만을 회수하였다.

바이러스의 전자현미경 관찰은 150-200메쉬의 grid에 순수 분리된 바이러스 현탁액을 놓고 uranyl acetate로 염색하여 Hitachi H-800 전자현미경으로 관찰하였다.

3. dsRNA분리

균사체에서 double stranded ribonucleic acid(dsRNA) 분리는 Lend등(1995)이 기술한 방법에 따라 실시하였다. 냉동건조 된 시료를 mortar에서 완전 분쇄한 후 RNA 추출 완충액과 phenol/chloroform으로 핵산을 분리하고 bio-cellex를 이용하여 dsRNA를 분리하였다. 분리된 dsRNA는 isopropanol을 첨가하여 침강시키고 원심분리하여 회수하였다.

바이러스로부터 dsRNA의 분리는 바이러스 현탁액과 동량의 phenol/chloroform액을 혼합하여 추출하였다. 추출된 용액은 isopropanol로 침강시켜 dsRNA을 회수하였다. PCR 방법에 의한 바이러스 진단을 위하여 dsRNA 분리시 bio-cellex 이용 외에 2M LiCl를 이용하여 PCR 가능 여부도 검토하였다.

4. cDNA library 제작

바이러스 입자 및 느타리버섯의 균사체로부터 분리한 dsRNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성은 TAKARA cDNA 합성kit를 이용하여 제조하였

다. dsRNA를 100°C에서 10분간 변성시킨 후 RAV역전사 효소(reverse transcriptase)를 처리한 다음 42°C에서 1시간 배양하여 1차 cDNA를 합성하였다. 1차 cDNA를 합성한 후 *E. coli*의 DNA polymerase를 처리하여 2차 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 *Eco*R1 adaptor를 붙여 pUC 119 plasmid에 cloning 하였다.

5. dsRNA hybridization

합성된 cDNA 클론을 선발하고 느타리버섯의 바이러스 감염 여부를 검정하고자 dsRNA 혹은 cDNA를 probe로 이용하여 Northern hybridization을 실시하였다. 분리된 dsRNA는 1M glyoxal, 50% DMSO, 10mM Sodium phosphate buffer(pH6.5)에서 55°C로 30분간 변성 시켰으며 변성된 dsRNA는 1% agarose gel에 전기영동 하였다. gel내의 dsRNA는 10% SSC 용액과 함께 nylon membrane에 옮겨졌으며 ^{32}P dCTP를 사용한 nick- translation에 의해 label된 cDNA를 probe로 하여 hybridization을 실시하였다.

6. 염기서열 분석 및 primer 제작

선발된 cDNA의 염기서열은 자동염기서열분석기(Applied Biosytems 377)를 이용하여 제조회사(Perkin elmer)의 방법에 따라 실시하였다. 결정된 염기서열을 가지고 RT-PCR을 위한 primer부위를 선발하였다. 선발된 primer는 한국생공(주)에 의뢰하여 합성하여 사용하였다. 얻어진 염기서열은 Blast search program으로 상동성이 있는 유전자를 검색하였다.

7. RT-PCR 방법

RT-PCR은 Gene Amp RNA PCR kit(Perkin Elmer)와 TAKARA RNA PCR kit(AMV)을 사용하였으며 먼저 16μℓ의 RT-master mix에 3μℓ dsRNA solution, 1μℓ down

stream primer를 넣고 42°C에서 15분간 cDNA를 제조하고 99°C에서 reverse transcriptase를 변성시키고 5°C로 5분간 처리하여 cDNA 합성을 완료하였다. 합성된 반응액 10μℓ을 40μℓ의 PCR mixture에 섞어서 94°C에서 2분, 60°C에서 45초, 72°C에서 2분의 조건으로 1회 실시하고 94°C로 45초, 60°C로 45초, 72°C로 45초로 하여 전체 33cycle 증폭하였으며 마지막은 94°C로 45초, 65°C로 45초, 72°C로 2분간 처리하였다. RT-PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 검출하였다. 이때 RT-PCR의 annealing 온도는 45°C, 50°C, 55°C로 다르게 하여 그 결과를 비교하였다.

8. RT-PCR 산물과 느타리바이러스 dsRNA과의 관계구명

RT-PCR에 의하여 생성된 DNA band가 느타리버섯 바이러스로부터 증폭된 것인지를 확인하기 위하여 증폭된 DNA를 probe로 사용하여 바이러스의 dsRNA와 hybridization을 실시하였다.

9. 표고, 양송이 및 기타 식용버섯의 바이러스 검출을 위한 dsRNA 분리 및 cDNA cloning

느타리버섯 외에 표고, 양송이, 팽이 등의 식용버섯의 바이러스 감염여부를 검정하고 자 이들 버섯의 자실체를 수집하여 dsRNA를 분석하였다. 분석방법은 앞의 “dsRNA 분리“ 방법에 따라 실시하였다. 표고의 경우 dsRNA가 검출되어 본 연구에서 개발된 RT-PCR를 이용하여 그 적용을 검토하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 바이러스 감염 느타리버섯으로부터 dsRNA 분석

느타리버섯 자실체의 형태가 비정상적으로 발생하여 대가 길거나 굽어졌고 분지가 많으며, 갓이 작은 것, 버섯 다발이 지나치게 비대하고 원기가 너무 조밀하게 형성되어 생장하지 못하고 사멸하는 버섯이 많은 균상에서 얻어진 자실체나 세균성갈반병이 감염된 자실체를 바이러스 감염 느타리버섯으로 간주하고 지역별로 수집하였다. 수집된 느타리버섯은 무균적으로 자실체 내의 조직을 분리하여 배양하여 28개 느타리버섯 균주를 얻었다(Table 1). 자실체가 비정상적인 형태를 가진 느타리버섯은 수원, 보령 등의 중부지역과 산청 등지의 남부지역에서 모두 수집되었으며 재배되고 있는 품종 중에는 재배기간이 오래된 사철느타리버섯 뿐만 아니라 원형느타리, 최근에 도입되어 재배되고 있는 춘추1호, 흑평 등도 포함되어 있었다.

이들 느타리버섯의 균사생장은 대조로 사용된 정상의 원형느타리보다 대체로 부진하였다(Table 1, Fig. 3). 균사생장이 가장 부진한 느타리버섯은 20, 21, 15, 16, 22 및 7번 수집균주였으며, 품종은 사철느타리버섯과 원형느타리버섯이었다(Table 1). 수집된 느타리버섯 자실체의 형태적 특성은 대가 가늘고 가지가 많으며 갓은 작았다. 이들 느타리버섯 재배농가의 설문에 의하면 버섯 수확량이 건전 느타리버섯 보다 30% 적었다고 하였다.

수집된 느타리버섯을 대상으로 바이러스 감염여부를 조사하고자 먼저 dsRNA를 분석하였다. dsRNA 분석은 버섯균사를 감자한천 액체 배지(potato dextrose broth)에 배양하여 균사체만을 수확한 후 냉동건조 시켜 분쇄한 것을 사용하였다. dsRNA는 분석에 사용한 26개 느타리버섯 중 수집번호 3, 5, 6, 8, 11, 14, 24번에 해당하는 7개 느타리버섯을 제외하고 모두 검출되었다(Fig. 1). 한편 대조로 사용된 느타리버섯은 dsRNA band가 발견되지 않았다. 따라서 dsRNA가 기형 느타리버섯의 형성과 관련이 있음을 알 수 있었으며, 전체 수집균주의

Table 1. Characteristics of *P. ostreatus* isolates collected from mushroom farms on which the symptoms of virus infection were shown.

Isolates	Collection area	Name of strain	Mycerial growth(mm/7days)	Shape of sporophores
1	Anyang4	Wonhyeng	17	thick stem, small cap
2	Anyang5	Wonhyeng	24	thin stem, small cap
3	Kunpo	Sachull	17	thin stem with branch
4	Anyang	Sachull	11	thin stem with branch
5	Kunpo	Wonhyeng	11	branch
6	Kunpo	Sachull	28	normal shape
7	Suwon3	Sachull	9	long stem with branch
8	Anyang3	Wonhyeng	18	thin stem
9	Suwon	Sachull	34	thin stem with branch
10	Suwon	Wonhyeng	27	bacterial diseased
11	Suwon	Sachull	34	long stem
12	Hwasung1	Wonhyeng	25	bacterial diseased
13	Suwon	Sachull	37	thin stem easily broken
14	Suwon	Wonhyeng	30	thin stem, small cap
15	Hwasung	Wonhyeng	3	fruiting densely
16	Chulwon1	Wonhyeng	4	bacterial diseased
17	Chulwon2	Wonhyeng	18	bacterial diseased
18	Chulwon3	Wonhyeng	26	long stem, small cap
19	Chulwon4	Wonhyeng	29	long stem, small cap
20	Boryeng1	Wonhyeng	2	funnel shape cap
21	Boryeng2	Wonhyeng	3	bacterial diseased
22	Boryeng3	Wonhyeng	6	funnel shape cap
23	Sanchung1	Heukpyeng	21	long stem, small cap
24	Euruenq1	Aenutari	14	bacterial diseased
25	Sanchung2	Choonchoo	24	long stem with branch
26	Sanchung3	Choonchoo	22	fruiting densely

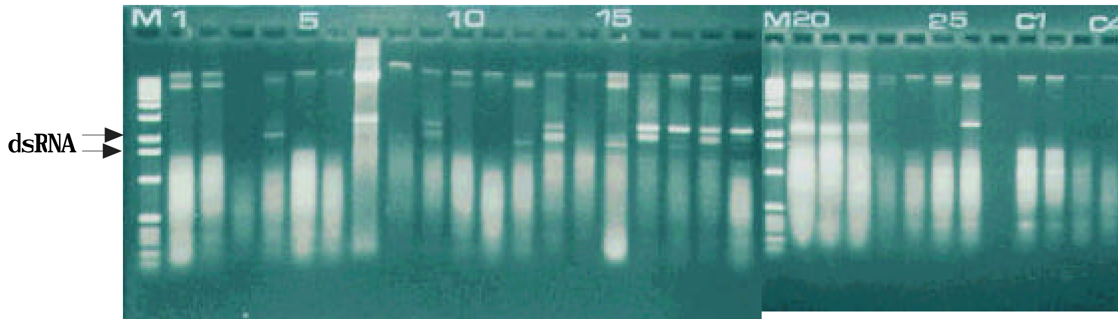


Fig. 1. Double-stranded RNAs of *P. ostreatus* isolates collected from mushroom farms. Lane M: Molecular weight marker; Lane 1-26: isolate no. of Table 1;Lane C1-C4: control strains(normal culture shape)

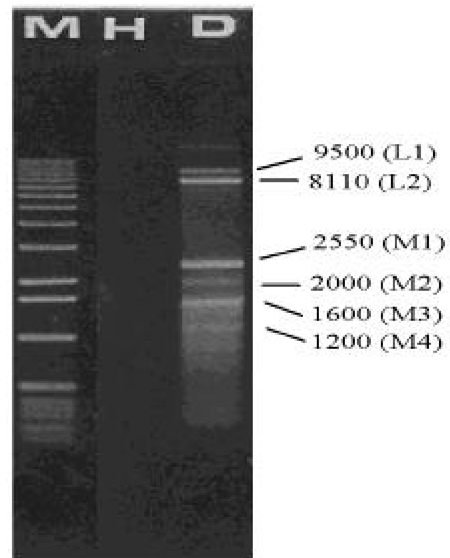


Fig. 2 Double stranded-RNAs of C1(H) and isolate 7(D) of *P. ostreatus*.

73%가 dsRNA를 함유하고 있었다.

기형버섯은 한 개의 dsRNA를 가지고 있는게 아니라 여러개의 dsRNA가 분리되었는데 그 크기가 9500bp, 8100bp, 2500bp, 2000bp, 1600bp, 1200bp이었으며 단편의 크기에 따라 L1, L2, M1, M2, M3, 및 M4로 각각 구분하였다(Fig. 2).

균류의 바이러스는 대부분이 dsRNA 핵산을 가지며 dsRNA는 절편으로 구성되어 있다. 양송이 바이러스 경우 dsRNA는 10개의 절편으로 이루어졌으며 모든 절편이 병원성과 관계가 있으나 그 중 1개의 절편(L6, 2.35kb)만은 건전한 양송이에서도 분리되므로 병원성과는 관계가 없는 것으로 알려져 왔다. dsRNA가 함유되어 있는 느타리버섯의 균사생장을 건전균주와 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 dsRNA가 함유된 느타리버섯은 건전균주에 비하여 균사생장이 매우 부진한 특성을 보였다. 이와 같은 현상은 식물 바이러스 감염 증상으로 보이는 위축이나 왜소로 나타나는 현상과 비슷한 것으로 보여진다. 그러나 자실체의 발생이나 생장에서는 왜소 현상은 전혀 발견할 수가 없었다. dsRNA를 함유한 느타리버섯은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 균상에 부분적으로 거대한 다발을 형성하고 개체수도 조밀하게 많아 생장이 불량하고 대가 길게 자라며 갓이 작은 기형으로 생장하게 된다. 특히 자실체가 생장하면서 대에 분지가 많이 발생하여 대가 굽고 갓이 작은 특성을 보이게 된다(Fig. 4 B). 갓의 크기도 균일하지 못하여 상품적 가치가 떨어지는 원인이 되기도 한다.

한편 건전 느타리버섯은 Fig.4의 C에서 보는 바와 같이 자실체의 발생이 균상 전체에 균일하게 이루어지며 다발은 형성하나 너무 크지 않고 발생상태도 너무 조밀하지 않기 때문에 대는 곧게 생장하고 갓은 우산형으로 크게 생장하게 된다. 갓과 대의 비율이 1 : 1 혹은 1 : 2정도 된다. 그러나 dsRNA를 함유한 균주나 건전 균주 모두 재배환경에 많은 영향을 받으며 재배환경에 따라 자실체의 형태가 변화하게 된다.

2. 바이러스의 및 dsRNA 순수분리

dsRNA가 함유되어 있는 느타리버섯으로부터 바이러스 입자만을 순수 분리하여 특성을 조사하였다. 정제된 바이러스 입자는 Uranyl acetate로 negative 염색하여 Hitachi H-800 전자현미경으로 관찰한 결과 바이러스입자는 크기가 25nm의 구형입자였다(Fig.5). 이러한 결과는 사철느타리버섯에서 분리한 입자(23nm)와 유사하나 회색계통의 느타리버섯에서 분리한 바이러스 입자(32nm)보다는 작았다. 균류 바이러스의 대부분은 구형 입자로 단일 크기나 여러 크기의 입자가 혼재하여 있는 경우가 있다. 양송이는 23, 29, 34, 45nm의 구형 바이러스와 19x50nm의 간형 바이러스가 혼재되어 있으며(Hollings, 1978), 표고의 경우도 25, 30, 39nm의 구형바이러스와 15x700-900nm의 선모양의 바이러스(Ushiyama, 1983)가, 느타리버섯의 경우 23nm의 구형 바이러스의 존재가 보고(Liu, 1986; Lianget al., 1987; Go et al.,1992) 되었으며, 깔대기형 병징의 느타리버섯 자실체에서 분리한 바이러스 입자의 크기는 50nm로 보고된 바 있다(김,1994).

순수하게 분리한 바이러스입자로부터 SDS 및 phenol 추출법으로 dsRNA를 분리하였다. 바이러스입자로부터 분리된 dsRNA의 밴드는 Fig. 6에서 보는바와 같이 2000bp의 뚜렷한 밴드를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 느타리버섯의 균사체에서 불리한 6개의 dsRNA 밴드와는 수적으로 차이가 있었지만 이 바이러스의 dsRNA를 이용하여 바이러스병 진단용 RT-PCR 방법을 개발하기로 하였다.

3. cDNA cloning

바이러스입자로부터 분리한 dsRNA를 주형으로 하여 cDNA를 합성하고 library를 제작하였다. cDNA는 TAKARA cDNA 합성 kit를 이용하여 제조하였다. cDNA합성은 먼저 dsRNA와

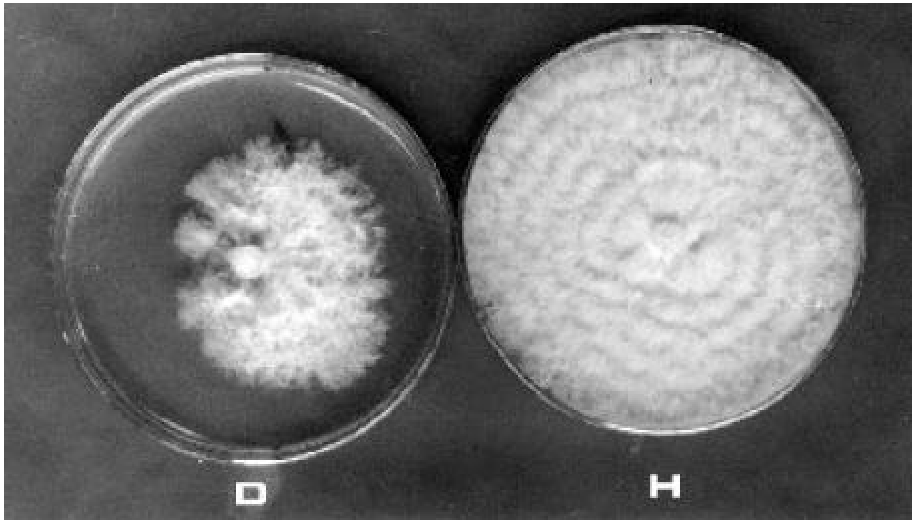


Fig. 3. Comparisons of mycelial growth between dsRNA free isolate(H) and dsRNA contained isolate(D) of *P. ostreatus*.

Fig. 4. Abnormal fruiting body formation and branched stem of dsRNA contained isolates(A, B) and normal shape of dsRNA free isolate(C) of *P. ostreatus*.

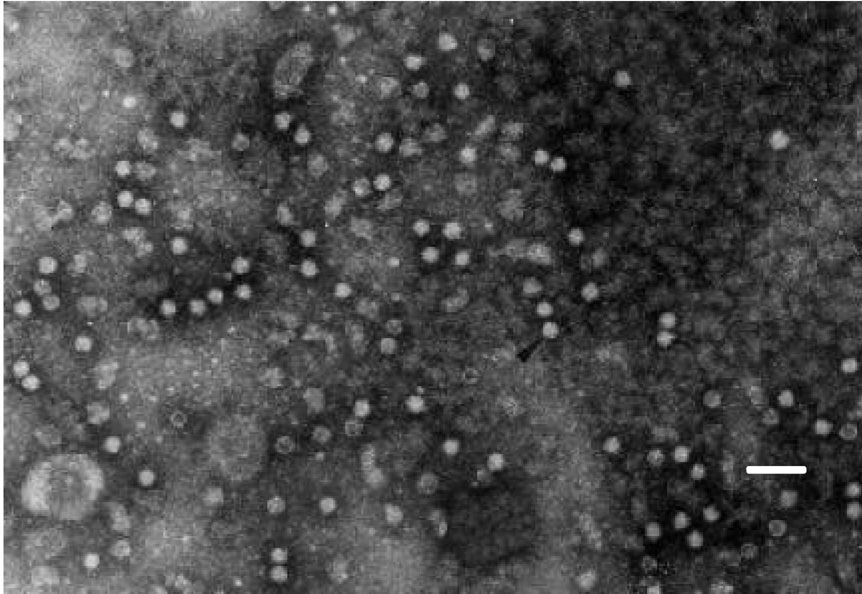


Fig. 5. Electron micrograph of virus particles isolated from dsRNA contained *P. ostreatus*. Purified virus particles were negatively stained with uranyl acetate(bar= 100nm).

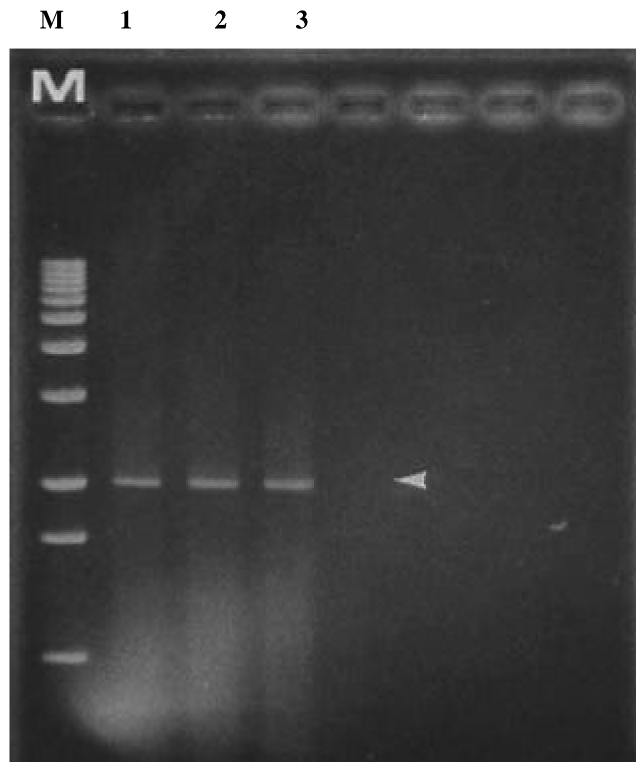


Fig. 6. Double stranded-RNA isolated from 25nm virus particles of abnormal *P. ostreatus* isolate. M: Molecular weight marker. Arrow: dsRNA band(2000bp)

random priner를 100℃에서 10분간 변성시킨 다음 RAV 역전사효소를 첨가하고, 42℃에서 1시간동안 배양하여 1차 cDNA를 합성하였다.

1차 cDNA를 합성한 후 *E. ccli*의 DNA polymerase를 이용하여 2차 cDNA를 합성하였다. 완전히 합성된 cDNA는 *EcoR1* adaptor를 붙여 pUC119 plasmid에 cloning 하였다. 제조된 cDNA library로부터 느타리바이러스의 dsRNA에서 유래된 clone을 선발하고자 느타리버섯의 dsRNA를 probe로 하여 cDNA colony hybridization을 실시하였다. Fig.7-1에서 보는 바와 같이 cDNA colony 100개 중 뚜렷한 positive signal을 보인 4-5개의 클론을 선발하였다. 이상과 같이 선발된 200여 클론들의 plasmid를 분리하여 *EcoR1*으로 절단하여 삽입 DNA의 길이를 조사한 결과 대체로 500bp 크기였다(Fig. 7-2). cDNA 클론 중 삽입 DNA의 길이가 길고 반응이 뚜렸한 클론을 선발하여 pPV2B1라고 명명하였고, 이 클론을 probe로 이용하여 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 검정하였다. 바이러스에 감염된 것으로 생각되는 느타리버섯의 dsRNA를 분리하여 nembrane에 옮기고 pPV2B1을 probe로 하여 Northern hybridization을 실시한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 14개의 느타리버섯 수집균주중 5, 6, 8번 느타리버섯을 제외하고 모든 시료에서 hybridization band가 나타났다.

Northern blot 결과 사용한 느타리버섯의 시료에 따라 크기가 다른 2개의 밴드(9.5kb, 8.5kb)가 나타났다. 분석에 사용한 느타리버섯 중 2, 4, 7, 10, 12, 13번 균주는 큰 밴드만, 1, 3, 9, 14번 느타리버섯은 작은 밴드만 검출되었으며 11번 느타리버섯은 두 밴드 모두 가진 것으로 나타났다. 이와 같이 느타리버섯의 균주에 따라 hybridization 결과에 차이가 있는 것은 느타리버섯내에 다른 종류의 바이러스가 존재하거나 한 종류의 바이러스 내에 sub-genone구성에 차이가 있는 것으로 생각되지만 그 이유는 아직 확실하지 않다. pPV2B1를 probe로 이용하여 동일한 실험을 수원, 화성, 및 남부지역의 재배 농가로부터 수집된 시료를 분석하였다. 수집된 모든 시료에서

hybridization 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 9). 분석된 시료 중 곡성, 경주, 진양에서 수집된 균주는 농가가 직접 농업과학기술원내 응용미생물과로 이상원인을 문의한 시료로 느타리버섯의 자실체가 너무 조밀하게 발생하고 대는 짧으며 비대하여 바이러스 감염 증상과 비슷하여 hybridization을 실시한 결과 모두 느타리바이러스에 감염된 것을 확인할 수 있었다. hybridization 밴드는 대부분 큰 밴드와 작은 밴드 모두 가지고 있었다. 특히 시료 중 13, 14번은 느타리버섯이 배양된 폐면으로 hybridization 결과 밴드를 얻을 수 있었다. 이상의 결과로 보아 pPV2B1의 probe를 이용할 경우 균사나 자실체는 물론이고 폐면과 같은 배지에서도 바이러스 감염여부를 검정할 수 있었다. 또한 전북 순창에서 의뢰한 버섯의 dsRNA를 분리하여 pPV2B1과 hybridization을 실시한 결과 4개의 자실체 시료(Fig. 9의 1-4번) 중 3개의시료에서 뚜렸한 밴드를 보였다. 2개의 종균 시료(Fig. 9의 5-6번) 중에는 1개의 시료에서 밴드를 보였다. 2개의 종균 시료 중 5번 시료는 경기도 소재 종균배양소에서 구입한 대조종균으로 바이러스가 감염되지 않았음을 확인 할 수 있었으나 6번 시료는 농가 스스로 재배중인 버섯의 조직을 분리하여 종균으로 만든 종균시료로 바이러스가 감염되어 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 3가지 독립된 실험의 결과는 pPV2B1가 느타리버섯 바이러스 검정용 probe로 사용할 수 있음을 보여주었다.

4. **pPV2B1**의 염기서열

E. coli DH5aF'에 cloning 된 pPV2B1의 염기서열을 분석하고자 QIAquick plasmid minikit(Qiagene GmbH)로 plasmid만을 순수 분리한 후 자동염기서열 분석기 (Applied Biosytems 377 sequencer)를 사용하여 분석하였다. pPV2B1의 결정된 염기서열은 총 674bp 였다(Fig. 10). pPV2B1의 cDNA clone은 GC 함량이 55.6% 정도였으며 생성될 단백질 산물

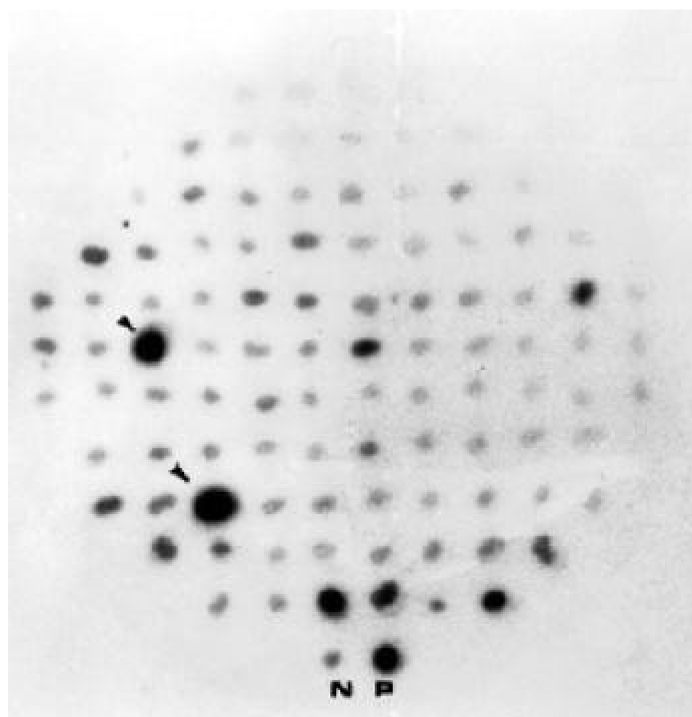


Fig. 7-1. Colony hybridization results of cDNA clones with dsRNA isolated from 25nm virus particles as a probe. P: positive clone, N: negative clone.

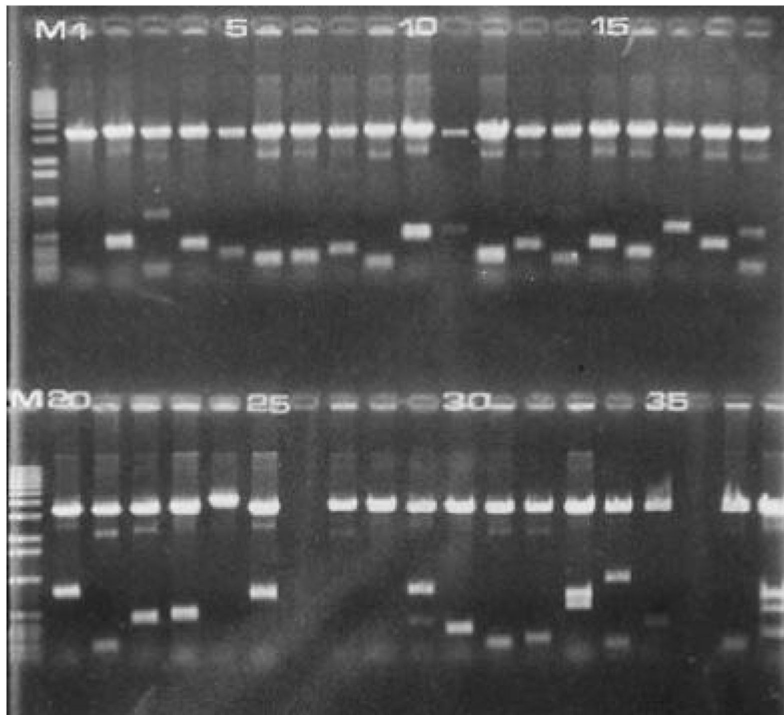


Fig. 7-2. DNA inserts of cDNA library clones of the dsRNA purified fron 25nm virus particles. M: Molecular weight marker, 1-38: cDNA clones.

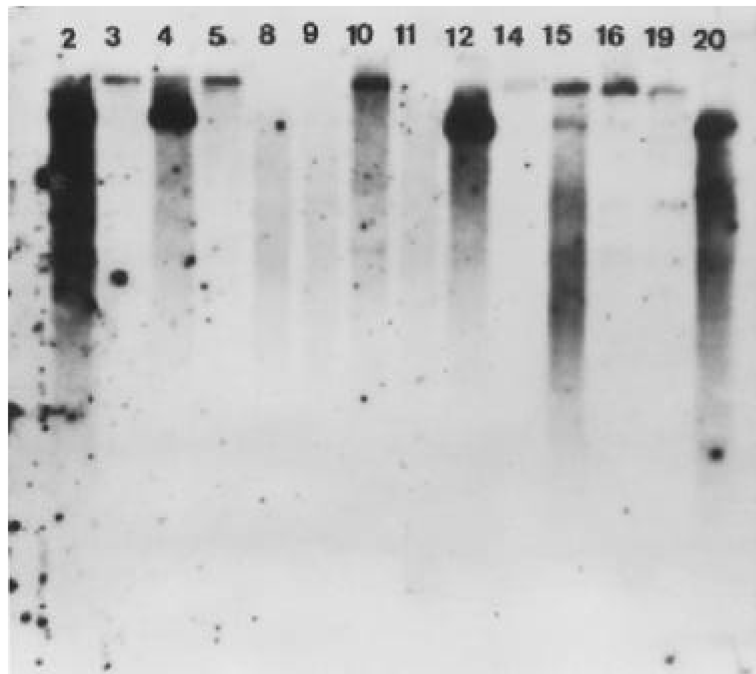


Fig. 8. Northern hybridization of dsRNA from different isolates of *P. ostreatus* with pPV2B1 as a probe. 1; Andong isolate, 2; Kunpo isolate, 3; Andong isolate. 4; Kunpo isolate, 5; Andong isolate. 6; Suwon isolate. 7; Suwon isolate, 8; Suwon isolate, 9;Hwasung isolate, 10; Suwon isolate, 11; Hwasung isolate, 12; Chulwon isolate, 13; Chulwon isolate, 14; Boryeng isolate.

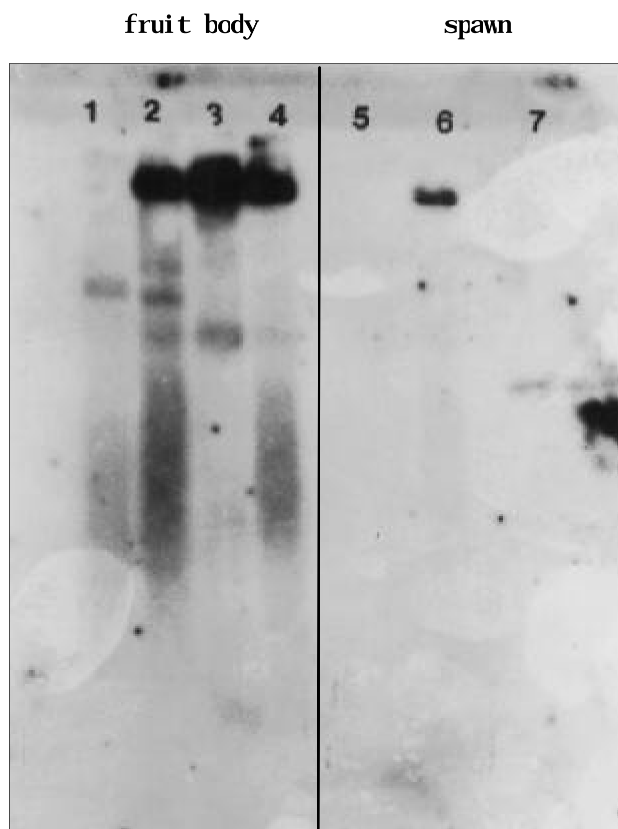


Fig. 9. Hybridization result of dsRNAs from abnormal fruit body(lane 1-4) and spawns(lane 5: mushroom spawn by Pochun spawn maker; lane 6: Home made spawn by the farmer; lane 7: mushroom spawn made by Applied microbiology in the NIAST) with pPV2B1 probe.

```
1    GTCTTGNAGA TTCCNTCCGT TGGGTTNGTA CTTGGGANCG GTTGNAGGGC
51   G[CTGCGTACAATGGTAGAGCT]TGGNTCTG GATTTGTNGC TCGCCGAGNC
101  CTTTCCTNGC AGCAGGNTTA CGTCNAGAGC TTCCAGCCTT CACNATAGCC
151  CCGGAGTGNT GCTTTTNGAC CCCNTCGCTG ATNCCGCCAC CNGTGTATAT
201  GNTGAGAATT TCTNAAGGCT AGGGATGAA AACTNCGCCC GTTTGGNTCG
251  CGTCATCGAT GCGAACCGCA GTATTCCCGC CCCAACCCAT TGAGTTGATT
301  TTACTCAATG GTACTGCAGG GGTGGCAAAT CTTACTACCT CCGTTNTCAA
351  GTGCCCCAAT GGCTTAACGA AGGTGAGGTT CGCTTCACAC GTGGAATAAT
401  GTGTTCGGTC CCGAGATTGT GTCGGTCTTC CGTCCCTTTT CGGCTCTCGG
451  TGGCGCAGTT CGTCTCGTTG TACTTCCACC GTCCCNCTCT TCCAACCTTC
501  CANTGGCACT CTCATNCTTG ATGATGNTGG TTTNTGTGGC CCGGCATGAT
551  TCCANTTATC ATGTTTTG[TTCTACGGGTCTTAAGAGCCG]GTCTGCANTT
601  TCGANGGTGC TNAGGGGAAG GCTCCNTTCC NTGAAGAGGA CTNTATGTGC
651  CGGTCNTGATC CGAAGANCGT GGAGT
```

Fig. 10. Nucleotide sequences of insert DNA of pPV2B1 from (□: Primers, PVPF1, PVPR1).

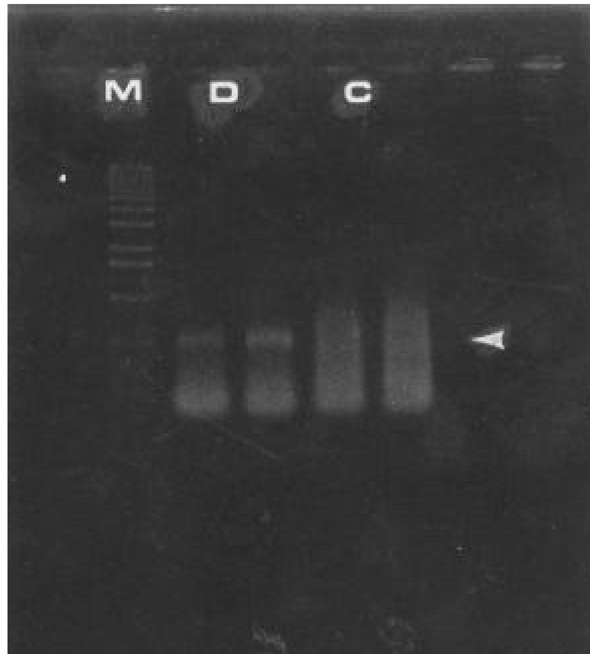


Fig. 11. RT-PCR result which were carried with total nucleic acid from virus infected isolates(D) and virus free isolates(C) of *P. ostreatus* using PVPF1 and PVPR1 as a primer.

에 대한 분석은 이루어지지 않았다. 얻어진 염기서열은 BLASTE-mail server(SMTP:blast@ ncbi. nih.gov)에 의뢰하여 상동성 여부를 검색하였다.

pPV2B1의 염기서열은 Hepatitis C virus, *Caenorhabdetis elegans* cosmid F54D8, 사람의 Chromosome 11, *Rhizobium* sp. NGT234a section38와 homology가 있는 것으로 나타났으나 타 종의 균류 바이러스와는 homology를 찾을 수가 없었다. homology가 있었던 *Caenorhabdetis elegans* 등의 DNA 경우도 homology 부위가 19/19나 23/23으로 너무 적은 부위였으나 Hepatitis C virus의 경우 131bp로 비교적 염기가 길었기 때문에 이 유전자와 좀더 자세한 비교가 필요할 것으로 본다.

5. Primer 선발 및 RT-PCR

RT-PCR을 위한 두 개의 primer를 pPV2B1의 염기서열을 기초로하여 만들었으며, 이들 primer를 PVPF1 및 PVPR1으로 명명하였다. PVPF1과 PVPR1을 이용하여 느타리버섯에 대한 바이러스의 감염여부를 검정하였다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 바이러스에 감염되어 dsRNA을 함유한 느타리버섯(D)의 경우 500bp 크기의 DNA 밴드가 형성되었다. 한편 대조로 사용된 건전한 느타리버섯(C)의 경우는 명확한 밴드가 형성되지 않았다. Agarose gel에 DNA 밴드외에 뿌연 핵산물질이 보이는 것은 primer의 과다사용(D)과 Taq. polymerase의 과다사용(C)에 기인한 것으로 보인다.

PCR 결과 얻어진 밴드를 agarose gel로부터 분리하여 바이러스에 감염된 느타리버섯으로부터 분리한 dsRNA 와 Northern hybridization을 실시한 결과 1, 21번 균주의 dsRNA 밴드와 hybridization 되었다(Fig. 12). 그러나 건전 균주인 6, 8번 느타리버섯에서는 어떤 hybridization 밴드도 얻을 수 없었다.

한편 얻어진 PCR 산물이 순수한 dsRNA에서만 온 것인지 느타리버섯의 DNA에서도 올 수 있는 것인지 여부를 검토코자 우선 느타리버섯으로부터 DNA를 분리

하고 바이러스에 감염된 느타리버섯으로부터 dsRNA 절편만을 agarose gel에서 elution하여 PCR를 실시하였다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 느타리버섯의 DNA 만을 첨가하여 PCR를 한 경우는 전혀 밴드를 얻을 수 없었으나 dsRNA만을 첨가하여 PCR를 실시한 경우는 뚜렸한 밴드를 얻었다. 이상의 결과로 보아 pPV2B1 cDNA clone에서 유래된 PVPF1 및 PVPR1 primer를 이용한 PCR산물은 정확히 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 진단하는 것에 이용할 수 있을 것으로 본다.

6. PCR 시료준비

PCR를 이용한 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 검정하기 위해서 dsRNA만을 순수분리 하여 사용하여야 한다. dsRNA의 분리과정을 단순화하기 위한 몇 가지 실험을 실시하였는데, 냉동건조 된 시료와 건조하지 않은 시료로부터 분리한 dsRNA를 이용하여 PCR를 실시한 결과 건조되지 않은 시료에서도 PCR 산물을 얻을 수 있었다(Fig. 14). 건조하지 않은 느타리버섯 시료로부터 분리한 dsRNA로부터도 PCR 밴드를 얻을 수 있었던 것은 PCR기기가 저 농도로 함유되어 있는 dsRNA를 증폭하여 가시적 밴드를 형성하였기 때문으로 생각된다. 한편 dsRNA를 ssRNA로부터 분리하여 PCR에 사용하고자 RNA 추출액을 cellulose처리와 LiCl처리후 얻은 시료로 실시한 PCR에서 모두 뚜렷한 단일 밴드를 얻었다 (Fig. 15).

지금까지는 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 검정하기 위하여 RT-PCR를 할 경우 순수한 dsRNA를 분리하기 위하여 시료의 냉동건조가 필수적 이였으나 본 연구의 결과로 보아 건조되지 않은 균사체나 자실체를 시료로 사용할 수 있음이 확인되었는데 이는 시료준비동안 건조하는 시간과 노력을 절약할 수 있음을 의미한다. 또한 LiCl를 사용하여 dsRNA를 분리할 수 있으므로 cellulose를 사용할 경우보다 다량의 시료 분석이 가능하게 되었다.

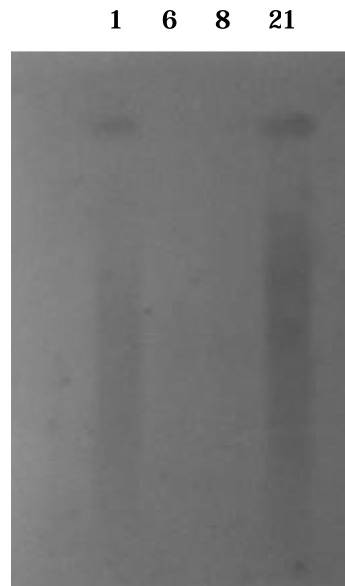


Fig. 12. Results of hybridization of PCR products with dsRNA from virus infected isolates(1, 21) and dsRNA free isolates(6, 8). Number of Isolates were indicated in Table 1.

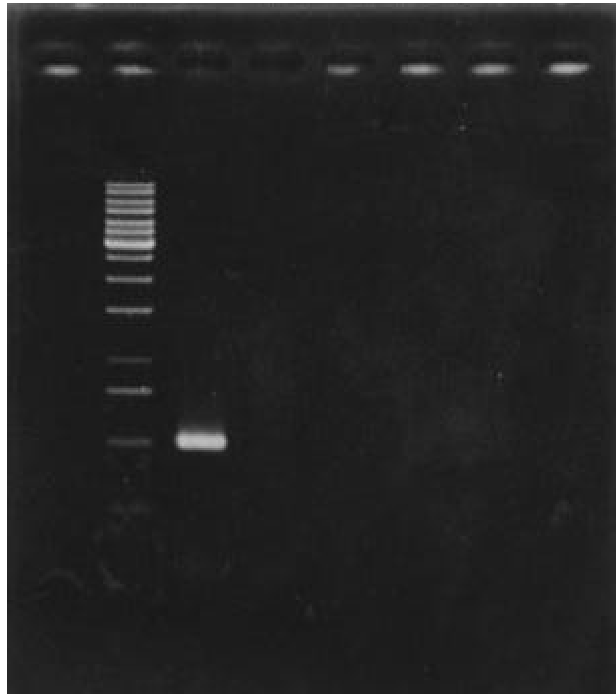


Fig. 13. PCR products, which were carried out with dsRNA(1) or total DNA(2) of *P. ostreatus* and primers, PVPF1 and PVPR1. M: Molecular weight marker.

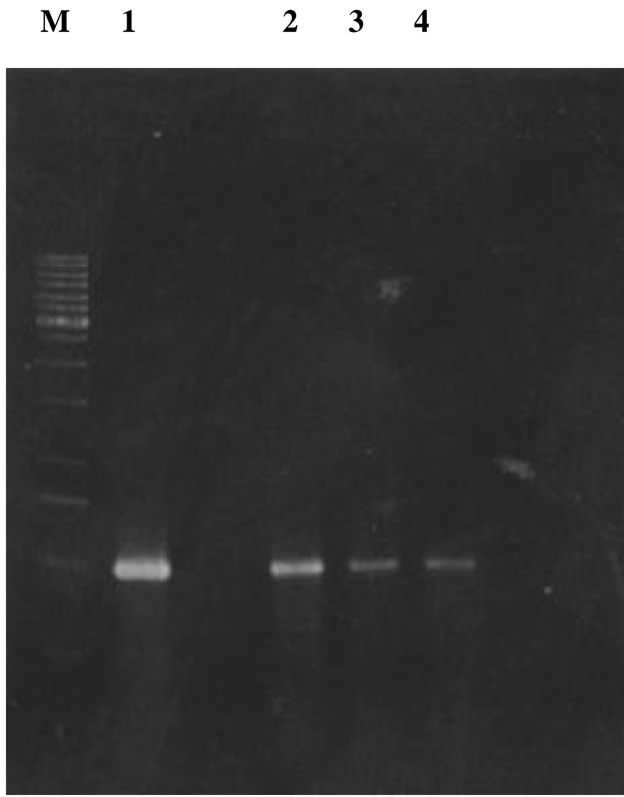


Fig. 14. PCR products, which were carried out with dsRNA from freeze dried sample(1) or fresh sporophores(2-4) *P.ostreatus*. M: Molecular weight marker

7. PCR 조건

PCR 조건을 확립하기 위하여 annealing 온도를 달리하여 PCR를 실시하였다. Fig. 16에서 보는바와 같이 온도를 55℃로 하였을 때 가장 선명한 밴드를 얻을 수 있었다. annealing 온도를 45℃로 낮을 경우는 생성된 밴드도 희미할 뿐만 아니라 비 특이적인 밴드가 많이 나타났다. 그러나 50℃나 55℃의 경우도 비 특이적인 밴드가 많이 보이는데 이는 온도의 영향보다는 Harnsen(1990)이 언급한 바와 같이 DNA Taq. polymerase의 사용량이 많은 때문으로 판단된다.

dsRNA 함량 별로 PCR를 실시한 결과는 Fig. 17과 같다. dsRNA를 주형으로 한 RT-PCR은 2ng까지 분명한 밴드를 형성하였으며 0.2ng도 육안으로 식별이 가능하였으나 밴드가 다소 희미하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발한 RT-PCR방법이 dsRNA분석 보다 1000배, hybridization보다 50-100배정도 높은 감도로 바이러스를 검출할 수 있다는 것을 의미한다.

8 RT-PCR에 의한 종균의 바이러스 감염 여부 조사

느타리버섯의 바이러스는 전염 경로가 균사의 접촉이나 이병 포자의 오염에 의한 균사융착이다(Go *et al.* 1992). 지금까지 보고에 의하면 느타리버섯의 바이러스는 중간 매체가 아직 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 바이러스에 감염된 균사체의 제거가 가장 중요한 방제 방법이라 할 수 있다. 느타리버섯은 종균을 배지에 접종하므로 바이러스에 감염되지 않은 우량 종균의 보급은 바이러스 예방을 위하여 가장 중요하다고 판단된다. 현재 시판되고 있는 종균을 종균 배양소로부터 수집하여 바이러스 감염여부를 조사하였다. Fig. 18에서 보는 바와 같이 총 43개의 종균 중 27%인 12개 종균에서 RT-PCR 밴드가 형성되는 것을 확인하였다.

시판종균에 바이러스가 어떻게 감염된 것인지 원인은 알 수 없으나 느타리버섯의 종균 관리에 대한 특별한 대책이 수립되어야 할 것으로 본다. 본 실험

에 사용된 느타리버섯 품종이나 dsRNA가 확인 된 시중 느타리버섯 종균배양소의 이름은 밝히지 않는다.

9. 타 식용 버섯의 dsRNA 진단 적용검토

우리 나라에서 재배되고 있는 대표적인 식용버섯은 느타리버섯, 표고, 팽이 및 양송이라고 할 수 있다. 느타리버섯 외에 팽이, 표고, 양송이의 바이러스에 대한 국내 연구는 이루어 진 바 없다. 팽이, 표고, 양송이의 바이러스 감염여부를 조사하고자 dsRNA를 검정하고 느타리바이러스 검정용 프라이머 PVPF1, PVPR1의 사용 가능성을 검토하였다. 국내 팽이, 표고, 양송이의 dsRNA를 분석한 결과 팽이에서는 dsRNA 밴드를 확인할 수 없었으나 표고, 양송이에서는 dsRNA가 확인되었다(Fig. 19). 그러나 양송이의 경우 건전한 양송이에서도 나타나는 L6 밴드로서 큰 문제가 안되는 것으로 판단된다. 표고의 경우는 4개의 균주 중 1개 균주에서 dsRNA 밴드가 검출되어 바이러스에 감염되었다고 생각되었다.

느타리버섯의 바이러스 검정용 프라이머 PVPF1, PVPR1을 이용한 표고 바이러스 검정 가능성을 검토한 결과 Fig. 19와 같이 느타리버섯(1) 경우에는 분명한 밴드를 얻을 수 있었으나 표고(2, 3, 4, 5)의 경우에는 전혀 밴드를 얻을 수 없었다. 이러한 결과는 느타리버섯의 바이러스와 표고 바이러스간에 상호간 homology가 없기 때문으로 생각된다. 실제로 표고 바이러스에 대한 pPV2B1 느타리버섯 바이러스 cDNA clone을 probe로 하여 hybridization을 실시한 결과 표고 바이러스에서는 전혀 밴드를 얻을 수 없었다(data not shown).

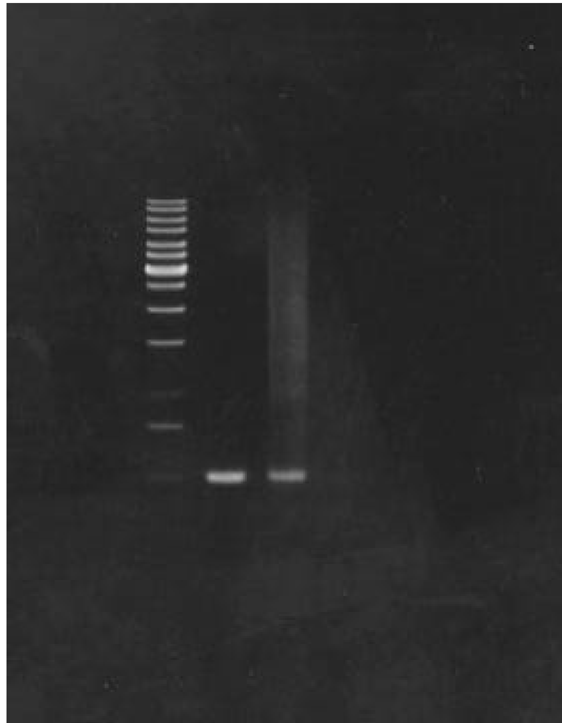
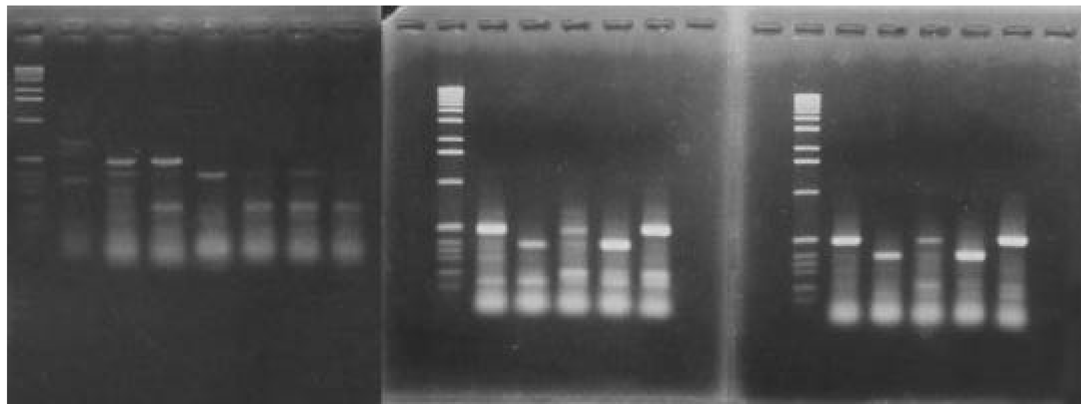


Fig. 15. RT-PCR result, which were carried out with dsRNA purified by cellulose(C) and LiCl(L). M, Molecular weight market.



. 45℃ 50℃ 55℃

Fig. 16. RT-PCR results, which were carried out at different annealing temperature.

M 1 2 3

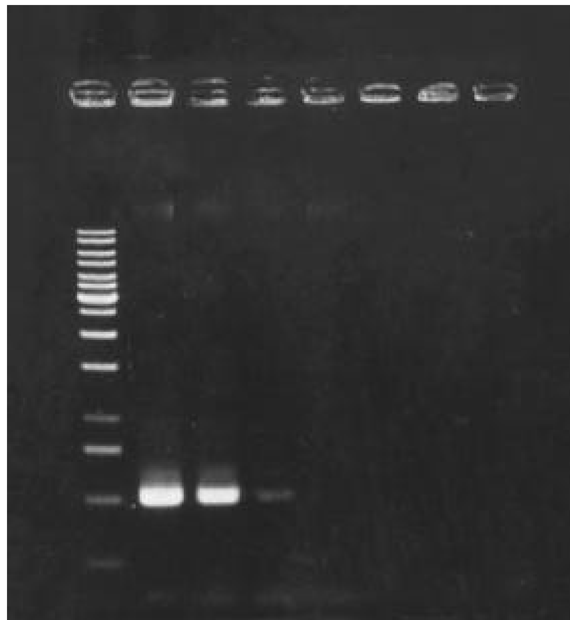


Fig. 17. RT-PCR results, which were carried out with different concentrations of dsRNA (lane 1; 20ng, lane 2; 2ng, lane 3; 0.2ng).

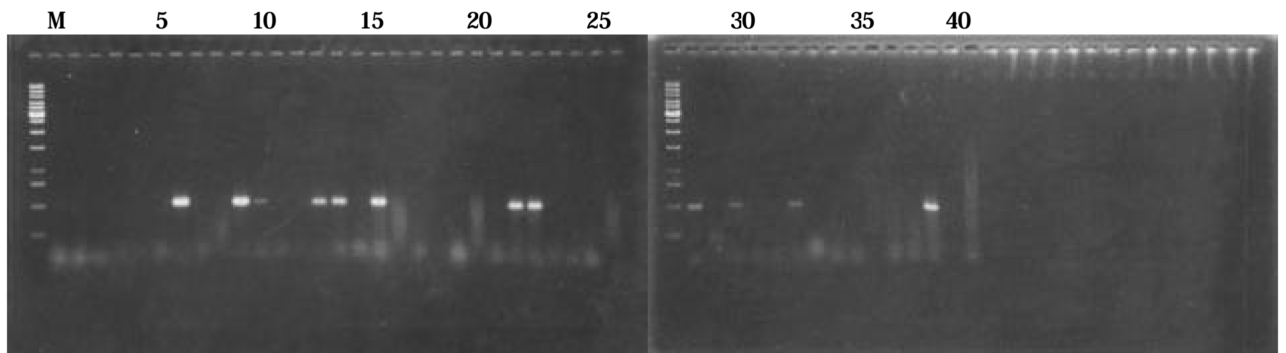


Fig. 18. Detection of virus in the spawns of *P. ostreatus*, which were collected from the commercial spawn production houses by RT-PCR with primers, PVPF1 and PVPR1.

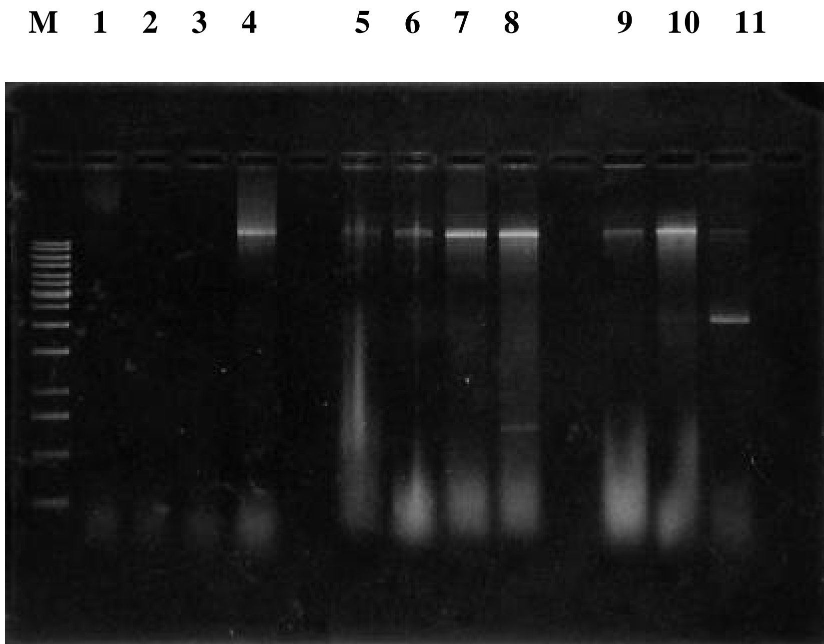


Fig. 19. DsRNA analysis of *Flammulina velutipes* (lane 1, 2, 3, 4), *Lentinus edodes* (lane 5, 6, 7, 8) and *Agaricus bisporus* (lane 9, 10, 11).

M 1 2 3

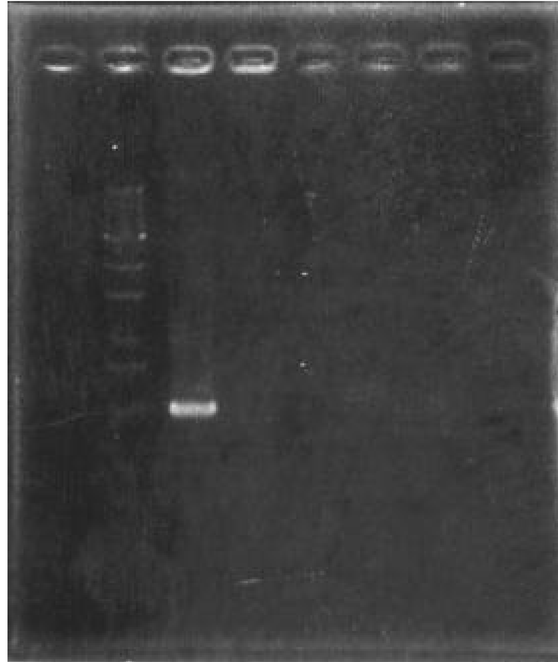


Fig. 20. RT-PCR results which were carried out with dsRNA from *P. ostreatus* (lane1) and *L. edodes* (lane2, 3) and primers, PVPF1 and PVPR1.

표고의 바이러스 감염여부를 검정하기 위한 PCR primer를 제작하고자 바이러스에 감염된 표고로부터 dsRNA 밴드만을 분리하여 임의 primer로 PCR기 내에서 cDNA를 제조하였다. 제조된 cDNA는 agarose gel 상에서 smear하게 끌리는 상태로 크기를 측정할 수가 없었다. 제조된 cDNA를 이용하여 2차 PCR를 실시한 결과 2,000bp, 1,500bp, 1,000bp, 750bp, 및 600bp의5개 밴드가 나타났다(Fig. 21). 이 밴드를 분리하여 PGEM easy T vector에 cloning하여 *E. coli* DH5a에 형질전환 하였다. 이 중 600bp 밴드의 염기를 분석하였다. 총 염기수는 505bp 이였으며 타종의 DNA와는 상동성이 매우 낮았다(data not shown). 염기서열을 기초로 하여 PCR primer를 제작하였다. 제작된 primer를 이용하여 표고 바이러스의 dsRNA를 PCR로 증폭한 결과 대조인 dsRNA가없는 시료에서는 증폭된 밴드를 얻을 수 없었으나 dsRNA를 함유한 시료에서는 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 22).

표고 dsRNA로부터 얻은 4개의 뚜렷한 밴드는 크기가 600bp, 1100bp, 1200bp, 1500bp 이였다. 느타리버섯의 경우 단일 primer 쌍에서 단일 밴드가 형성되었으나 표고의 경우는 차이가 있었다. 이와 같은 원인은 homology가 높은 염기가 타 dsRNA 절편에도 있는 것으로 사료되나 지금으로서는 알 수가 없다. RT-PCR에 의하여 얻어진 밴드가 표고의 DNA로부터 올 수 있는지를 검토한 결과 표고 DNA에서는 밴드를 얻을 수 없었다(data not shown). 따라서 표고에서 얻어진 RT-PCR 밴드는 dsRNA로부터 유래된 것임을 알 수가 있다.

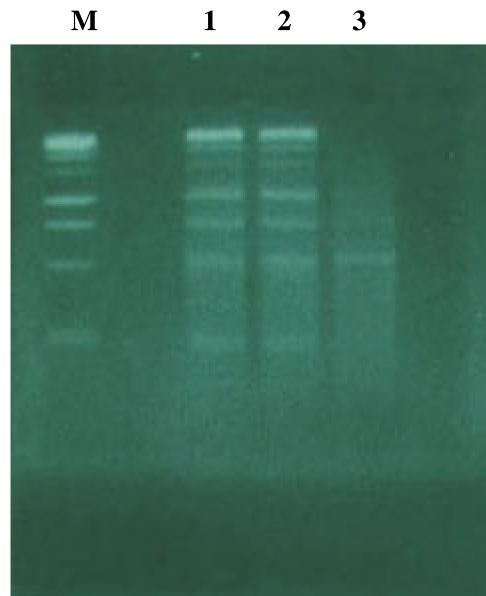


Fig. 21. PCR amplification of cDNA synthesized by random primer and dsRNA from *Lentinus edodes*(lane 1-3: synthesis cDNA).

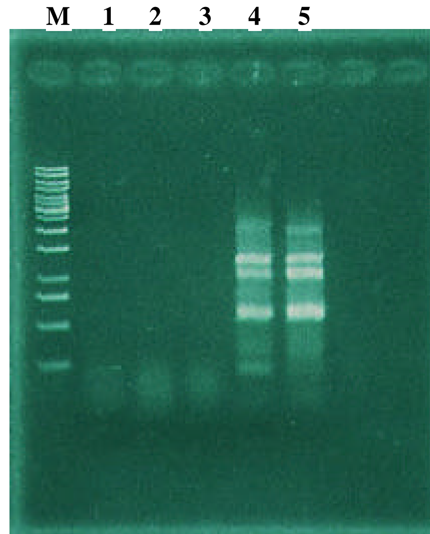


Fig. 22. RT-PCR results of dsRNA from *L. edodes*(lane1-3: dsRNA free isolates, lane4,5: dsRNA contained isolates).

제4절 결과요약

1. 느타리버섯의 자실체의 형태가 기형인 28개 균주를 지역 별로 수집하여 dsRNA를 분석한 결과 73%인 19개 균주에서 다양한 길이의 dsRNA가 검출되었다.
2. 바이러스에 감염된 느타리버섯은 균사생장이 부진하고 자실체의 다발이 크고 조밀하였으며 대가 길고 분지가 많으며 갓의 수는 적었다.
3. 바이러스병에 걸린 것으로 추정되는 느타리버섯의 자실체로부터 분리한 dsRNA는 9500bp(L1), 8114bp(L2), 2550bp(M1), 2000bp(M2), 1600(M3) 및 1200bp(M4)의 6개 단편으로 이루어져 있었다.
4. 바이러스병에 걸린 느타리버섯으로부터 25nm의 구형바이러스를 순수 분리하였으며, 그 바이러스 입자로부터 2,000bp 크기의 dsRNA를 분리하였다.
5. 순수 분리된 25nm의 느타리버섯 바이러스 입자로부터 분리한 dsRNA를 주형으로 cDNA를 합성하여 pUC119에 cDNA library를 제작하였다. cDNA 단편들의 크기는 500bp 정도였다.
6. 25nm 바이러스로부터 분리한 dsRNA를 probe하여 cDNA library 클론들과 colony hybridization를 수행하였으며, probe와 강하게 hybridize하는 pPV2B1을 선발하였다. 선발된 pPV2B1는 바이러스에 감염된 여러 균주의 느타리로부터 분리한 dsRNA와 잘 hybridize 하였다.
7. pPV2B1 clone의 총 674bp 염기서열을 결정하였다.
8. pPV2B1의 염기서열로부터 느타리버섯의 바이러스 감염여부를 진단할 수 있는 프라이머 PVPF1과 PVPR1을 제작하였으며, 이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과 감염된 느타리버섯에서 500bp의 DNA 밴드를 얻을 수 있었다.
9. RT-PCR의 annealing 온도는 55°C가 적합하였으며, 검출한계 dsRNA 양은 0.2ng 이였다. RT-PCR은 건조된 시료 또는 생 시료로부터, 그리고

cellulose나 LiCl 처리에 의해 분리한 모든 dsRNA로부터 500bp의 DNA를 성공적으로 증폭하였다.

9. PVPF1 및 PVPR1을 이용하여 시판 중인 느타리버섯 종균의 바이러스 감염 여부를 검정한 결과 총 43개 종균의 27%인 12개 종균에서 PCR 밴드를 얻을 수 있었다.

10. 국내에서 재배 중인 식용버섯 중 팽이, 표고, 양송이의 바이러스 감염여부를 dsRNA 분석으로 검정한 결과 표고로부터 dsRNA를 분리할 수 있었다. 표고로부터 분리된 dsRNA와 primer PVPF1 및 PVPR1를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과 어떠한 증폭 밴드도 얻을 수 없었다. 즉 표고의 dsRNA와 느타리 dsRNA는 서로 연관이 없는 것으로 판단되었다.

제 5 절 인 용 문 헌

1. Go, S. J., D. Y. Cha, G. C. Shin 1992. Virus-like particles from abnormal growing oyster mushrooms, *Pleurotus florida* and *P. ostreatus*. *KOR. J. Myco.* Vol.20: 149-153.
2. Go, S. J., Y. H. Park, G. C. Shin, J.G.H. Wessels 1992. Molecular analysis of double-stranded RNA in abnormal growing oyster-mushrooms, *Pleurotus florida* and *P. ostreatus*. due to virus infection *Kor. J. Mycol.* Vol.20:234-239.
3. Go, S. J. 1990. A virus disease of oyster mushroom, *Pleurotus florida*, its characterization, transmission and effects on host. Ph. D. Thesis, Chung Nam National University
4. Harmsen, M. C. B. Tolner, A. Kram, S. J. Go A. deHaan, J.G.H. Wessels 1991 Sequences of three ds RNAs associated with La France disease of the cultivated mushroom (Agaricus bisporus).
5. Hollings, M. 1978. Mycoviruses: viruses that infect fungi Pp.1-53. In:Advances in virus research. Vol. 22.Eds.K.M. Smith and M. A.

Lauffer. Academic Press, New York.

6. Kaneko, S., R. H. Miller, S.M. Feinstone, M. Unoura, K. Kobayashi, N.Hattori, R. H. Purcell, 1989. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA86, 313-316.
7. 김규현 1994. 깔대기형 병징의 느타리 자실체에서 분리한 버섯 바이러스의 특성 및 감염균사 생리. 고려대학교 석사학위 논문
8. van der Lende, T. R. M. C. Harmsen, S. J. Go, J. G. H. Wessel 1995. Double- stranded RNA mycoviruses in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 125: 51-56.
9. Liang, P., K. Chen, H Liu 1987. Virus particles in sporophore of oyster mushroom. *Chinese J. Virol.* 3(4): 396-375.
10. Liu, H., P. Liang 1986. Ultrasection studies of virus infected *Pleurotus* spp. *Acta Microbiologica Sinica* (China)26(3) 221-225.
11. Park, J. S., Y H. Kim 1996. Infectious RNA viruses in the edible mushroom *Pleurotus* spp. *Kor. J. Microb.* Vol.34: 61-67.
12. RDA 1998. Major Statistics of Korean Agriculture. Rural Development Administration, Farm Management bureau.
13. Ushiyama, R. 1983. Studies on a virus associated with shiitake mushrooms, Lentinus edodes(berk) Sing.Rep. Tottori Mycol Inst. (Japan)21-60.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.