

原形質體 融合에 의한 느타리버섯屬의 品種開發

劉英福* · 柳昌鉉** · 車東烈**

*농촌진흥청 농업유전공학연구소 세포유전과

**농촌진흥청 농업기술연구소 균이과

Strain Improvement of the Genus *Pleurotus* by Protoplast Fusion

Young-Bok Yoo*, Chang-Hyun You** and Dong-Yeul Cha**

*Genetics Division, Agricultural Biotechnology Institute, RDA, 441-707, Korea

**Applied Mycology & Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute, RDA, 441-707, Korea

ABSTRACT: Somatic hybrids of *Pleurotus florida* ASI 2016 and *Pleurotus ostreatus* ASI 2018 were obtained by protoplast fusion. The 40 fusants(P1~P40) was examined for the yield on fermented and pasteurized rice straw in a tray. The carpophore yield of them were showed as the range of 27.0~155.2, based on parental values of 100(ASI 2018). The pilei of fusants between orange white colored *P. florida* and dark grey colored *P. ostreatus* had mixed colors in the young stage. Other breeding programmes were performed to improve new varieties with high yield and good quality. A new oyster mushroom variety, Wonhyeongneutaribeosus(P72), was developed at the Agricultural Sciences Institute, Rural Development Administration in 1990. This *P.florida-ostreatus-ostreatus* hybrid P72 was selected from 38 protoplast fusion products(P41~P78) between *P. florida-ostreatus* recombinant P5-M 43-arg rib and *P. ostreatus* ASI 2-13-0 2001-19-pro orn. The yield indexes of 38 hybrids ranged 40.5~152.7 compared with the parental values of 100(ASI 2001). Hybrid P72 was characterized by the large fruiting bundle of semispherical shape with long stipe and by the small and circular pileus, resulting in lower harvesting cost. A significant increase in carpophore production was observed in somatic hybrids of protoplasts due to heterosis. A comparison of hybrid with parents P72 was made using isozyme analysis. The esterase banding patterns could be characterized by new bands in the hybrids. Seven fusion products of four crosses between *P.florida* ASI 2016 and *P. ostreatus* ASI 2018 were analysed with respect to the distribution of progenies and segregation of gene markers by random basidiospore analysis. Segregation of alleles should yield progeny of four genotypes in a Mendelian ratio of 1 : 1 : 1 : 1 for prototrophs, auxotrophs of one parental type, auxotrophs of the other parental type, and auxotrophic recombinants, respectively. However, five fusants of them did not detect one parental, *P.ostreatus*, type. Basidiospores could yield progeny of 16 genotypes in the cross of one of the recombinant P5-M43-arg rib × *P. ostreatus* ASI 2-13-pro orn but the segregants of three fusants were not detected clearly. The allele ratio of loci could be expected 1 : 1 : 1 : 1 for arg, rib, pro and orn. The ratio, however, would be changed to 4 : 1 : 1 : 1 with increasing proportion of arg. In almost all the fusants, prototrophic recombinants were recovered in large numbers against auxotrophic markers. Parental genotypes were recovered with the recombinant progeny amounting to 38.68~99.56%. The analysis provides proof of heterokaryosis and strong evidence for haploidy of vegetative nuclei, a sexual cycle consisting of nuclear fusion and meiosis.

KEYWORDS: Protoplast Fusion, Wonhyeongneutaribeosus, Heterosis, Esterase, Genetic analysis, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, Basidiomycotina.

*Corresponding author

서 언

느타리버섯은 옛부터 식용으로 이용되어 왔는데 약용으로는 혈액순환을 촉진하며, 요통과 관절염의 치료, 수족마비, 혈관의 불안정성치료, 항암작용이 알려져 있다(Ying *et al.*, 1987; Ahn, 1992). 우리나라에서는 1992년 현재 약 155만평에서 6만여톤이 생산되며 전체 버섯의 60% 정도를 차지하는 고소득 작물의 하나로 점차 매년 증가하고 있는 경향이다. 식용버섯은 균총형태와 유전양식이 복잡하며 종의 수가 많고 자실체 형성이 실험실내에서 어려워 유전연구가 하등미생물이나 고등식물에 비해 뒤떨어져 있다. 버섯의 육종은 균사접합에 의해 계속되어져 왔는데 불화합성에 의해 종속간 교잡이 어려우며 느타리의 경우는 동일한 계통내에서도 4개의 교배형을 가져 교배가 어려운 경우가 많다(Eger, 1978). 이러한 불화합성 요인과 근연종간의 교잡에 의한 품종의 위약성을 극복하기 위하여 최근에 여러가지의 유전자 전이 방법들이 알려져 있다(Ferenzy, 1984; Mishira, 1985; Fincham, 1989; Peberdy, 1989; Yoo and Cha, 1993). 이들 중의 하나인 원형질체 융합은 원연종의 다수유전자 polygene을 전이할 수 있는 것으로(Ball, 1985) 많은 생식질을 이

용하여 새로운 우수한 균주를 개발할 수 있는 가능성을 가진다. 다른 주요 진균인 효모, *Aspergillus*, *Penicillium*에 비하여 버섯의 원형질체 융합은 뒤떨어져 있는데 느타리 속에 있어서 다수 보고되었다(Toyomasu *et al.*, 1986; Toyomasu and Mori, 1987a, 1987b, 1989; Go *et al.*, 1989). 저자들은 본 연구와 관련하여 중온성 느타리버섯과 중고온성 사철느타리버섯의 체세포 잡종의 버섯자실체 특성과 생활주기에 관한 유전분석을 이미 보고하였다(Yoo *et al.*, 1984; Yoo *et al.*, 1986). 사철느타리와 느타리의 원형질체 융합주로부터 얻은 유전자 재조합주와 다시 저온성 느타리를 융합하여 생산력이 높고 품질이 우수한 품종을 개발하여 1990년에 농가에 보급하였으며, 이들 체세포잡종의 자실체 특성과 동위효소 분석, 유전분석에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지: 사철느타리버섯 *Pleurotus florida* 와 느타리버섯 *P. ostreatus*의 야생형과 영양요구주를 사용하였는데 자외선 조사에 의해 유기된 영양요구주는 유등(Yoo *et al.*, 1988)에 의해 보고되었으며 사용한 균주는 Table 1과 같다. 균주의 배양은 버

Table 1. List of strains used

Strain	Code No.	Genetic markers*	Origin	Source
<i>Pleurotus florida</i>	ASI 2016	Wild type		Germany
	ASI 2-3	rib-1	ASI 2016	
	ASI 2-4	rib-2	ASI 2016	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	ASI 2018	Wild type		Korea
	ASI 2-1	arg	ASI 2018	
	ASI 2-2	gly ser	ASI 2018	
	ASI 2001	Wild type		Korea
<i>P. florida</i> × <i>P. ostreatus</i>	P5-M43	arg rib	P5	
	P1-P10		ASI 2-1 × ASI 2-3	
	P11-P20		ASI 2-2 × ASI 2-4	
	P21-P30		ASI 2-1 × ASI 2-4	
	P31-P40		ASI 2-2 × ASI 2-3	
P5(<i>P. florida</i> × <i>P. ostreatus</i>) × <i>P. ostreatus</i>	P41-P78		P5-M43 × ASI 2-13	

*arg(arginine), gly(glycine), orn(ornithine), pro(proline), rib(riboflavine), ser(serine)

섯완전배지(complete medium : CM)에서 하였는데 그 조성은 증류수 1l당 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g, KH_2PO_4 , 0.46 g, K_2HPO_4 , 1.0 g, Peptone 2.0 g, Yeast extract 2.0 g, Glucose 20.0 g, agar 20.0 g을 사용하였다. 원형질체 융합주는 삼투압 조정제가 첨가된 버섯최소배지(minimal medium : MM)에서 배양하여 선발하였으며 그 조성은 1l당 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g, KH_2PO_4 , 0.46 g, K_2HPO_4 , 1.0 g, DL-asparagine 2.0 g, Thiamine-HCl 120 μ g, Glucose 20.0 g, Bacto-agar 20.0 g이고 삼투압조정제 0.6 M sucrose와 혼합하여 사용하였다.

원형질체 융합 : 원형질체 분리는 Yoo 등(1985)의 방법에 따라 셀로판지 위에 균사를 접종하여 3~4일 배양한 후 셀로판지를 그대로 옮겨 분해효소를 처리하였다. 분해효소에 있어서 느타리는 Novozym 234(Novo Biolabs) + β -Glucanase(BDH) + β -Glucuronidase(Sigma)를 혼합하였으며 사철느타리는 Novozym 234 + Cellulase CP(Sturge) 또는 Novozym 234 + Cellulase onozuka R-10(Yakult)을 각각 5 mg/ml 농도로 0.6 M sucrose 삼투압조정제에 pH 조정없이 녹여 사용하였다. 분리된 원형질체는 sintered glass filter(Porosity 1)에 여과하여 Anne & Peberdy(1976)의 방법에 따라 원형질체 융합하였다. 융합은 $10^7 \sim 10^8$ 의 원형질체를 융합시험관에 넣어 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 와 50 mM glycine을 10 mM NaOH로 pH 8.0으로 조정한 30% polyethylene glycol(PEG) 4000과 혼합하여 37°C에서 10분 처리하여 0.6 M sucrose로 제거한 후 현탁하여 완전배지와 최소배지에 배양하여 10~20일 후에 융합주를 선발하였다.

자실체 생산력 검정 및 유전분석 : 종균은 포푸라톱밥 80%, 쌀겨 19%, 석고 1%를 고루 섞으면서 수분이 65%되게 조정한 다음, 병에 750 g의 톱밥배지를 넣어 121°C에서 90분 멸균한 후 균주를 접종하여 25°C에서 25~40일 배양하였다. 버섯 자실체 생산을 위하여 난괴법 3회 반복으로 배치하였다. 나무로 된 상자(41.4×56.3×20.3 cm)에 야외에서 발효한 볏짚을 단으로 묶어 알맞게 잘라 넣은 후 비닐을 덮어 스팀으로 60~65°C에서 10~12시간 살균한 후 50~55°C에 3일간 후발효하였다. 배지가 25°C 되었을 때 배양해 둔 종균을 접종하여 25~30°C에서 40일간 배양한 후 수분, 광, 온도가 알맞은

재배사에서 자실체를 형성하였다. 유전분석을 위하여 멸균사레에 멸균된 철사를 걸치고 그 위에 자실체를 얹어 10~20시간 포자를 채취하여 4°C 냉장고에 보관하면서 발아시켰다. 25°C의 CM에서 5~10일간 배양한 후 발아 균주들을 요지로 1사레에 12균주씩 옮겨 독립영양형 prototroph과 영양요구형 auxotroph를 확인하였으며 영양요구주는 다시 일정한 영양원이 첨가된 배지에 옮겨 유전표지를 확인하였다.

전기영동 : 시료조제는 균사체를 CM 용액에서 10~15일간 배양하여 여과한 후 증류수로 세척하였다. 균사체 10 g에 0.1 M Tris-HCl buffer(PH 7.5)를 10 ml 첨가하여 4°C의 유발에서 액체질소(-196°C)를 넣어 마쇄한 후 1300 g에서 30분 원심분리하여 상등액을 취하였다. 전기영동은 Homogeneous gel로 하였는데 10% polyacrylamide slab gel을 이용하였으며 5°C에서 일정한 전류로(30 mA/cm, gel)하였다. esterase 발색은 α -naphthylacetate 20 mg, ethylene glycol monomethyl ether 2 ml, fast blue RR salt 20 mg을 0.2 M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 100 ml와 혼합한 후 gel을 침적하여 암상태로 37°C에서 30분간 발색하였다.

결 과

체세포잡종 육성 : 중고온성 사철느타리 ASI 2016과 중온성 느타리 ASI 2018의 자실체에서 분리한 단핵주로부터 분리한 원형질체에 자외선을 조사하여 얻은 영양요구주로 원형질체 융합하여 40개의 융합주를 얻었으며 이를 P1~P40으로 표기하였다. 이 중에서 P5의 버섯 자실체로부터 두 종의 유전자 재조합주를 얻었는데 저온성 느타리 ASI 2001의 담자포자에서 얻은 영양요구주와 다시 원형질체 융합하여 P41~P78의 체세포잡종을 얻었으며 자실체 생산력과 주요 특성 검정을 거친 후 우수한 균주 P72를 "원형느타리버섯"으로 명명하여 농가에 보급하였는데 Fig. 1과 같다.

버섯 자실체의 특성 : 원형질체 융합주 P5, P49, P72와 양친주의 자실체 형태는 Fig. 2와 같은데 융합주는 갓이 원형에 가까워지는 경향을 보였다. 느타리 ASI 2018과 사철느타리 ASI 2016 체세포잡종 40균주(P1~P40)의 자실체 생산량은 Table 2와 같

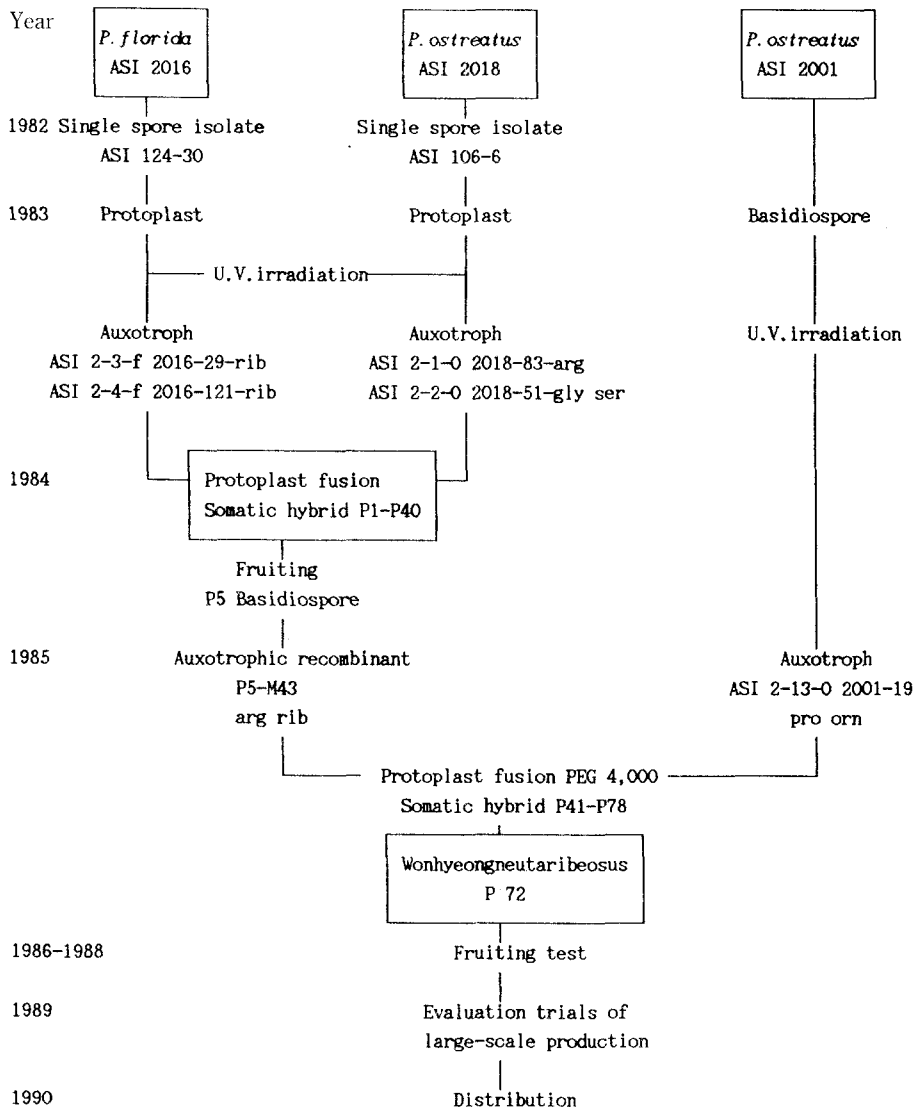


Fig. 1. Breeding process of somatic hybrids of protoplasts in *Pleurotus*.

다. 50%의 융합주가 양친의 생산량과 유사하며 10%만이 친주 사철느타리보다 높은 생산량을 나타내었고 40%는 적은 생산량을 나타내는 친주 느타리보다도 낮았다. 편친 느타리 수량을 100으로 할 때 가장 높은 P8은 155.2였으며 가장 낮은 P16은 27.0이었다. P41~P78의 자실체 생산량에 있어서 52.7%의 융합주가 양친과 수량이 유사하였다(Table 3). 높은 수량을 나타내는 친주 P5보다 더 높은 균주수는 21.0%였으며 낮은 수량을 보인 편친 ASI 2001보다 더 낮은 균주수는 26.3%였다. ASI 2001의 수

량을 100으로 할 때 가장 수량이 높은 P72는 141.3이었으며 가장 낮은 P46은 40.5였다. 품질이 우수하고 수량성이 높은 P49, P72와 이들 모균주와의 버섯 자실체의 갯 선택에 관한 것은 Table 4와 같다. 융합주는 양친의 중간색을 나타내는 경향이었으며, P49, P72는 모균주중 느타리 ASI 2018과 가장 유사한 갯 선택을 지녔다. 원형질체 융합주의 수량에 주요하게 관여하는 형질을 보면 갯의 크기는 작아지고 자실체 대는 길어지는 경향이였다(Table 5). P5는 양친주보다 자실체 대의 길이는 길어지고 다발

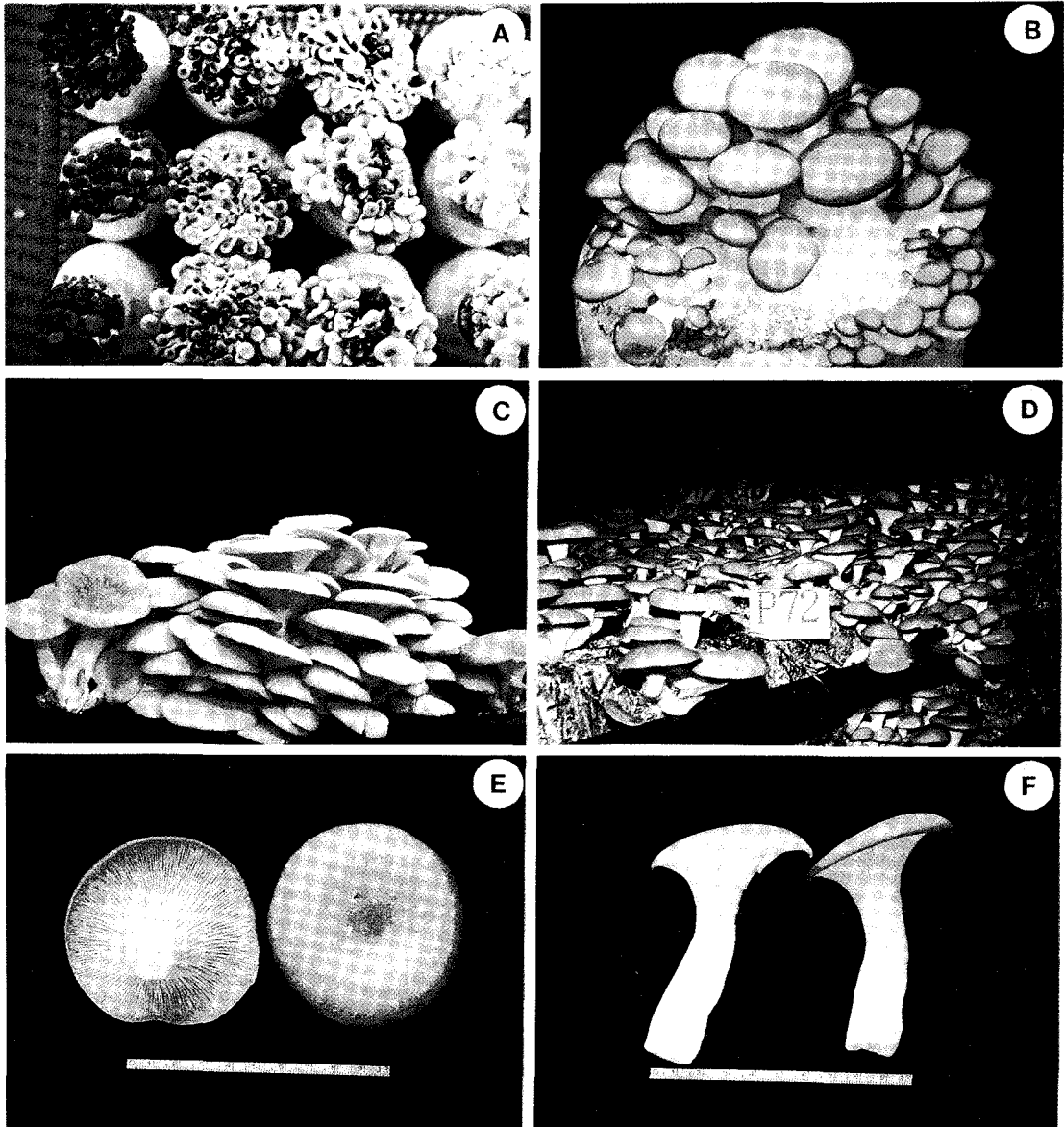


Fig. 2. Basidiocarps of the somatic hybrids of protoplasts and parents in *Pleurotus*.

(A) From left lane dark grey colored *P. ostreatus* ASI 2018, somatic hybrids of strain 2018 and strain 2016, and orange white colored *P. florida* ASI 2016 (B) Young carpophores of "Wonhyeongneutaribeosus, P72" of P5 and strain 2001 (C) From left fusant P5 of strain 2018 and strain 2016, P72 of P5 and strain 2001, and *P. ostreatus* ASI 2001 (D) P72 grown on rice straw substrates (E) Typical shape of caps of P72 (F) Longitudinal sections of P72

무게가 증가하나 갓의 크기, 대직경, 개체중은 감소하였다. P49는 갓의 크기는 양친주의 중간이나 나머지 6개 형질은 모두 양친보다 증가하였으며, P72는 다발의 유효경수와 갓의 크기는 양친과 유사하나

나머지 5개 형질은 모두 증가하였다. 이들 형질중에서도 다발의 무게가 증가하는 것이 특이하였는데 유효경수가 갓색택이 유사한 편친 ASI 2018에 비해 P49는 223.7%, P72는 52.5% 증가되었고, 다발무게가

Table 2. Comparison for carpophore production of somatic hybrids between *Pleurotus florida* ASI 2016 and *Pleurotus ostreatus* ASI 2018 following protoplast fusion

Fusant	Yield per tray* (g/7.5 kg)	Fusant	Yield per tray* (g/7.5 kg)
P1	3935± 540	P22	3395± 307
P2	4427± 781	P23	2333± 543
P3	3660± 240	P24	2072± 147
P4	3270± 20	P25	2262± 786
P5	3224± 362	P26	4050± 854
P6	4740± 254	P27	3273± 664
P7	3710± 629	P28	3005± 257
P8	4775± 1197	P29	2823± 803
P9	4630± 1362	P30	3170± 331
P10	3433± 337	P31	3380± 910
P11	2990± 555	P32	3192± 657
P12	2858± 257	P33	3060± 700
P13	3348± 88	P34	3480± 660
P14	1987± 891	P35	1740± 411
P15	3163± 354	P36	3040± 430
P16	831± 64	P37	3670± 835
P17	2870± 220	P38	3460± 880
P18	1833± 44	P39	3463± 718
P19	1484± 749	P40	3832± 1085
P20	3020± 595	ASI 2016	4377± 902
P21	3515± 985	ASI 2018	3076± 463

*Tray : 41.4×56.3×20.3 cm

P49는 141.5%, P72는 91.8%나 증가하였으며 큰 것은 간혹 2~3 kg이나 되는 것도 있었는데 수확인력의 질감에 기여하는 요인이 되었다.

동위호소 esterase 분석 : 융합주 P5는 양친 느타리 arg와 사철느타리 rib의 밴드를 동시에 가지면서 소실한 야생형 ASI 2018의 밴드를 가지는 양상이었다(Fig. 3). P48, P49, P72는 서로 밴드양상은 차이가 나지 않았으며 양친 P5와 야생형 ASI 2001과는 밴드양상이 차이가 있었는데 두균주에 없는 새로운 밴드를 나타내었다.

체세포잡종의 유전분석 : 느타리와 사철느타리의 4개 조합 7 원형질체 융합주의 후대의 표지 유전자의 분리와 유전자 재조합을 나타낸 것은 Table 6과 같

Table 3. Comparison for carpophore production of somatic hybrids between *Pleurotus florida-ostreatus* P5 and *P. ostreatus* ASI 2001

Fusant	Yield per tray* (g/7.5 kg)	Fusant	Yield per tray* (g/7.5 kg)
P41	2483± 445	P62	3685± 1760
P42	4163± 526	P63	5266± 1316
P43	4513± 355	P64	4880± 675
P44	4973± 695	P65	3540± 924
P45	3606± 446	P66	4760± 1690
P46	1583± 704	P67	2870± 150
P47	4135± 883	P68	4743± 2400
P48	4583± 292	P69	5465± 233
P49	4983± 885	P70	4443± 686
P50	3425± 253	P71	4880± 1219
P51	4841± 946	P72	5523± 586
P52	4273± 490	P73	5160± 381
P53	5366± 277	P74	4506± 122
P54	4090± 876	P75	4600± 2462
P55	4235± 445	P76	3790± 766
P56	5063± 1727	P77	4483± 696
P57	4860± 342	P78	4225± 417
P58	3195± 883	2016	4688± 1138
P59	3000± 862	2018	3269± 300
P60	4520± 1046	P5	4965± 230
P61	4880± 648	2001	3908± 608

*Tray : 41.4×56.3×20.3 cm

Table 4. Carpophore characters in four parents and two somatic hybrids of protoplasts between *P. florida-ostreatus* P5 and *P. ostreatus* ASI 2001

Strain	Color of pileus	
	Young	Mature
P49	dark grey	bluish grey
P72	dark grey	bluish grey
ASI 2016	orange white	yellowish white
ASI 2018	dark grey	bluish grey
P5	orange grey	brownish grey
ASI 2001	dark grey	violet grey

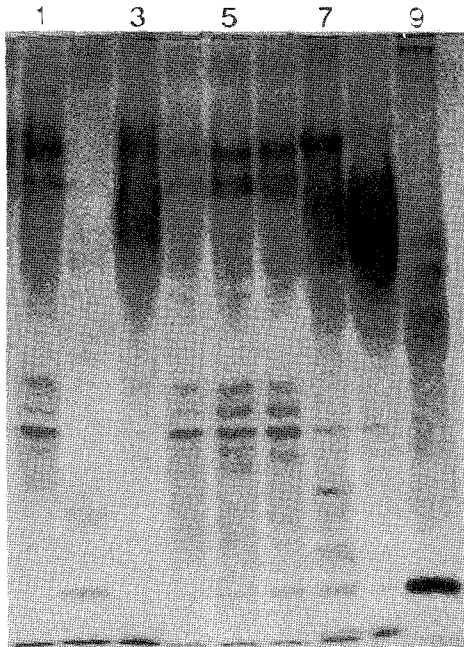
다. 유전형질의 분리에서 2개 융합주만 양친의 형질이 나타나고 나머지는 모두 사철느타리의 형질은

Table 5. Means of eight characters in four parents and two somatic hybrids of protoplasts between *P. florida-ostreatus* P5 and *P. ostreatus* ASI 2001

Strain	Fruiting bundle ¹⁾		Individual basidiocarp ²⁾				
	No. of carpophore	Weight(g)	Pileus size(cm)	Thickness of pileus(cm)	Length of stipe(cm)	Diameter of stipe(cm)	Weight of carpophore(g)
P49	19.1± 8.7	413.0± 249.0	6.0± 1.3	1.4± 0.2	10.1± 1.2	1.5± 0.3	33.5± 14.2
P72	9.0± 2.8	328.0± 188.0	6.9± 1.1	1.4± 0.2	7.5± 0.8	1.6± 0.2	33.5± 8.1
ASI 2016	5.3± 1.3	85.5± 33.2	7.4± 1.3	0.7± 0.1	5.9± 1.4	1.5± 0.3	27.5± 9.2
ASI 2018	5.9± 3.3	171.0± 59.1	7.6± 1.8	0.9± 0.2	6.0± 1.7	1.6± 0.8	34.5± 17.5
P5	7.4± 1.9	107.5± 47.4	5.5± 1.1	0.8± 0.3	6.2± 1.2	0.9± 0.2	19.0± 6.6
ASI 2001	9.9± 7.1	143.0± 71.3	7.5± 1.3	1.0± 0.2	5.2± 0.9	1.3± 0.3	28.8± 9.0

1) The estimation are based on counts of 10.

2) The estimation are based on counts of 30.

**Fig. 3.** Esterase zymogram for the somatic hybrids of protoplasts and parents in *Pleurotus*.

(1) *Pleurotus ostreatus* ASI 2001 (2) *P. florida* ASI 2016 (3) *P. ostreatus* ASI 2018 (4) P72, (5) P49, (6) P48 : P5-M43-arg rib+ASI 2-13-2001-pro orn (7) P5 : ASI 2-1-arg+ASI 2-3-rib (8) *P. ostreatus* ASI 2-1-arg from ASI 2018 (9) *P. florida* ASI 2-3-rib from ASI 2016

나타났으나 느타리의 형질은 전혀 나타나지 않았으며 이들중 영양요구성 유전자 재조합주가 전혀 나타나지 않는 것도 2군주나 있었다. 양친 사철느타리

형질과 독립영양형 유전자 재조합주가 거의 유사한 수로 많이 분리되었으며 느타리형질과 영양요구성 유전자 재조합형은 적게 나타났으나 양친형과 유전자 재조합주가 거의 1 : 1로 분리되었다. P5의 유전자 재조합주 arg rib와 느타리 ASI 2001의 pro orn 융합주 P48, P49, P72의 유전형질 분리, 대립형질비, 유전자 재조합형율은 Table 7, 8, 9와 같다. 16종류의 유전자형중에서 각각 6, 9, 10개의 유전자형만 분리되었으며 독립영양형과 arg형질이 가장 많았다. 대립형질의 비에 있어서는 arg이 3군주 모두 가장 많이 분리되었는데 P49와 P72는 arg, rib, pro, orn이 거의 4 : 1 : 1 : 1이었으며, P48은 pro과 orn형질이 훨씬 적게 나타났다. 양친 형질은 극히 적었으며 독립영양형과 영양요구성 유전자 재조합형이 많아 유전자 재조합형율이 아주 높은 91% 이상이었다.

고 찰

5조합의 10개 융합주의 담자포자를 받아하여 후대 유전형질을 분석한 결과 모든 융합주에서 유전자 재조합주가 분리되었고 2개 조합 2군주를 제외하고는 모두 영양요구성 유전자 재조합주가 나타났는데 이들은 융합주의 이질핵화, 담자기 내에서의 핵융합과 곧이어 감수분열을 가지는 유성생식의 생활주기를 가지는 것을 의미하며 원형질체 융합으로 유전자 재조합이 가능한 것을 보여준다. 분리되는 유전자형은 원영양형, 양친의 한쪽 편친형, 양친의 다른 편친형, 영양요구성 유전자 재조합형으로 그 기

Table 6. Segregation and recombination of genetic markers in progenies of interspecific hybrids of *Pleurotus florida* and *P. ostreatus* following protoplast fusion

Strain combination			Fusant	No. of colonies examined	Parentals		Recombinant ¹⁾		%
<i>P. florida</i> (A)		<i>P. ostreatus</i> (B)			A	B	Pro.	Auxo	
ASI 2-3-rib	+	ASI 2-1-arg	P3	320	129	0	191	0	59.68
			P5	462	178	39	212	33	53.03
ASI 2-3-rib	+	ASI 2-2-gly ser	P34	274	168	0	105	1	38.68
ASI 2-4-rib	+	ASI 2-1-arg	P22	244	98	9	94	43	56.14
			P25	142	46	0	62	34	67.60
ASI 2-4-rib	+	ASI 2-2-gly ser	P12	156	72	0	84	0	53.84
			P15	478	227	0	240	11	52.51

*germination : 0.1~15.0%

1) Pro(prototroph), Auxo(auxotroph)

대치는 1:1:1:1이나 원형양형이 많이 나타났으며 유전인자가 증가할수록 대립형질에 관한 분리비는 기대치와는 다른 경향을 보였다. 이러한 현상은 원형질체 융합이나 핵전이와 같은 체세포 잡종화의 방법에 따라라도 다소의 차이가 있었다(Yoo and Cha, 1993). 그러나 전통적 방법인 균사접합에 의한 *P. florida* ASI 2-3-rib와 *P. ostreatus* ASI 2-1-arg의 균사접합주의 분석에 있어서도 *P. ostreatus*의 arg 형질은 전혀 나타나지 않았으며 특히 영양요구성 유전자 재조합형이 나타나지 않았고 유전자 재조합형의 비율은 62.50%(Yoo, 1993. 미발표 결과)로 나타나 기대치와는 상당히 다르게 나타난 것을 감안한다면 원형질체 융합주들의 비정상적인 분리는 원형질체 융합이라는 방법상에서만 기인되는 것은 아닌 것으로 생각된다. 동일한 조합의 융합주들의 유전형질이 다르게 분리되었는데, 특히 양친중 한 형질이 전혀 나타나지 않는 것과 나타나는 것으로 구분되어지는 조합도 있었는데 이러한 결과의 차이는 각각의 원형질체들이 핵의 수가 서로 다르고, 원형질체내의 소기관의 부재, 원형질체가 분리되는 과정에서의 기계적인 손상 및 파열로 많은 변이가 있는 상태의 원형질체에 PEG를 처리하였기 때문에 다양한 양친의 원형질체들이 서로 모여 응축하게 되고 이 때 융합되는 원형질체 수도 다를 수 있으며 파열된 원형질체로부터의 핵, 염색체, 미토콘드리아 등이 임의로 원형질체 내에 삽입되었을 것으로 추

측된다. 따라서 융합주는 각각 다른 세포내 소기관들과 유전물질로 구성되어지며 세포내의 핵의 증가, 염색체 이상, 세포질의 이상 등으로 세포내 물질들의 재배열이 이루어지면서 여러가지 형태의 특성으로 나타났다고 볼 수 있다. 융합주 모두 독립영양형 유전자 재조합주가 32.89~69.38%로 많이 분리되었는데 *Phanerochaete chrysosporium*(Alic and Gold, 1985)에서 20.83~43.75%, *Volvariella volvacea*(Santiago, 1982)에서 12~50%, *Coprinus cinereus*(Yanagi, 1988)에서 1~72%, *Agaricus bisporus*(Raper, 1972)에서 52.5~99.8%, *P. ostreatus*+*P. columbinus*의 융합주에서 45.63%(Toyomasu, 1989), *Pleurotus cornucopiae*+*P. florida*의 융합주에서 50.0~100%(Yoo, 1992)와는 유사한 경향이였다. 40개 융합주에서 10%, 다시 한번 더 융합한 38개 융합주에서 18.42%의 융합주의 자실체 생산량이 양친주보다 증가하였으며 P72는 갓 색택을 포함한 품질에 관여하는 몇개의 형질들이 양친보다 우수하였는데 갓색택과 재배온도 범위가 유사한 스타리 ASI 2018에 비하여 68.9%, ASI 2001에 비하여 41.3% 증가하였다. 이러한 결과는 잡종강세 현상(Gowen, 1952; Frankel, 1983)으로서 핵내 유전자의 상호작용 또는 세포질과 핵내 유전자와의 양쪽 물질의 작용에 의하는 것으로 사료된다. 이와 유사한 경향으로 Hamlyn and Ball(1979)이 *Cephalosporium acremonium*의 동종간 융합으로 Cephalosporin C titer를

Table 7. Frequency distribution of progenies in *Pleurotus florida-ostreatus* hybrid P5-M43-arg rib×*P. ostreatus* ASI 2-13-pro orn crosses(P48)

Genotype				No. of individual
+	+	+	+	136
arg	rib	+	+	17
+	+	pro	orn	0
arg	+	+	+	39
+	rib	+	+	0
+	+	pro	+	1
+	+	+	orn	1
arg	+	pro	+	2
arg	+	+	orn	0
+	rib	pro	+	0
+	rib	+	orn	0
arg	rib	pro	+	0
arg	rib	+	orn	0
arg	+	pro	orn	0
+	rib	pro	orn	0
arg	rib	pro	orn	0
Allele ratio				
Locus	Mutant	Wild	X ²	P
arg	58	138	32.65	<0.005
rib	17	179	133.89	<0.005
pro	3	193	184.18	<0.005
orn	1	195	192.02	<0.005
Genetic analysis of paired markers				
Parental	Recomb.	X ²	P	
17	179	133.89	<0.005	

*germination : 2.6%

40% 증가하였으며, 성장속도와 포자형성도 증가한다고 하였다. 그러나 Anne and Peberdy(1985)는 *Penicillium*의 종간 원형질체 융합으로 Penicillin 생산이 오히려 양친보다 융합주가 감소하는 것으로 나타났는데 이러한 결과는 제한된 수의 융합주 선발, 낮은 생산력 또는 융합주의 불안정성 등 여러 가지 요인에 기인한다고 하였다. 원형느타리버섯의 개발 보급은 원형질체 융합이 훌륭한 육종방법이 될 수 있음을 제시한다. 진균에 있어서 화합성 균주간의

Table 8. Frequency distribution of progenies in *Pleurotus florida-ostreatus* hybrid P5-M43-arg rib×*P. ostreatus* ASI 2-13-pro orn crosses(P49)

Genotype				No. of individual
+	+	+	+	96
arg	ribo	+	+	2
+	+	pro	orn	0
arg	+	+	+	92
+	rib	+	+	0
+	+	pro	+	0
+	+	+	orn	0
arg	+	pro	+	2
arg	+	+	orn	2
+	rib	pro	+	0
+	rib	+	orn	0
arg	rib	pro	+	0
arg	rib	+	orn	2
arg	+	pro	orn	6
+	rib	pro	orn	2
arg	rib	pro	orn	24
Allele ratio				
Locus	Mutant	Wild	X ²	P
arg	130	98	4.49	<0.025
rib	30	198	123.78	<0.005
pro	34	194	112.28	<0.005
orn	36	192	106.73	<0.005
Genetic analysis of paired markers				
Parental	Recomb.	X ²	P	
2	226	220.07	<0.005	

*germination : 5.8%

원형질체 융합주는 다른 미생물이나 고등식물과는 달리 한 세포내에 양친의 이질적인 핵을 공유하며 (Anne and Peberdy, 1985) 특히 버섯은 각최연결체를 형성하여 보다 균일하게 이질핵을 가지게 된다 (Yoo *et al.*, 1984). 또한 공여 미토콘드리아와 숙주의 것이 융합되어 새로운 유전자를 형성하게 되는데 (Mellon, 1983), 이러한 세포스스로의 계놈 재배열은 양친의 유전자가 소실되지 않고 발현되는데 유리한 점을 가진다. 불화합성 균주간에는 융합주의 사실체

Table 9. Frequency distribution of progenies in *Pleurotus florida-ostreatus* hybrid P5-M43-arg ribo×*P. ostreatus* ASI 2-13-pro orn crosses(P72)

Genotype				No. of individual
+	+	+	+	75
arg	rib	+	+	1
+	+	pro	orn	0
arg	+	+	+	100
+	rib	+	+	0
+	+	pro	+	1
+	+	+	orn	0
arg	+	pro	+	4
arg	+	+	orn	8
+	rib	pro	+	0
+	rib	+	orn	0
arg	rib	pro	+	1
arg	rib	+	orn	1
arg	+	pro	orn	8
+	rib	pro	orn	0
arg	rib	pro	orn	29
Allele ratio				
Locus	Mutant	Wild	X ²	P
arg	152	76	25.33	<0.005
rib	32	196	117.96	<0.005
pro	43	185	88.43	<0.005
orn	46	182	81.12	<0.005
Genetic analysis of paired markers				
Parental	Recomb.	X ²	P	
1	227	224.01	<0.005	

*germination : 7.2%

형성이 어렵고, 또 다른 새로운 불화합성이 생기지만 (Yoo *et al.*, 1987) 자실체가 형성되어 성숙되면서 화합성에서와 같이 격쇠 연결체가 생기고, 담자포자로부터 양친의 유전자재조합주를 선발할 수 있어 육종에로의 응용이 크게 기대된다(Yoo, 1992; Yoo and Cha, 1993). 이상의 결과로 보아 수량성이나 품질과 같은 양적형질에 관여하는 유전자수는 많으므로 다수유전자 polygene을 전이할 수 있는 원형질체 융합이 유리할 것이며, 단순유전자 single gene가 지배하는 유용한 성분이나 내병충성 유전자

개발에 형질전환이 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

사철느타리버섯 *Pleurotus florida* 1균주와 느타리버섯 *P. ostreatus* 2균주의 영양요구주로 원형질체 융합하여 체세포 잡종을 얻어 자실체의 특성과 후대의 유전자 재조합을 조사하였다. 사철느타리 ASI 2016의 ASI 2-3-rib와 느타리 ASI 2018의 ASI 2-1-arg의 원형질체 융합으로 40개의 체세포잡종(P1~P40)을 얻어 그중 P5에서 얻은 유전자 재조합주 P5-M43-arg rib를 다시 느타리 ASI 2001의 ASI 2-13-pro orn과 융합하여 38개 체세포잡종(P41~P78)을 얻었는데 생산력이 높고 품질이 우수한 P72를 “원형느타리버섯 *Wonhyeongneutaribeosus*”으로 명명하여 1990년에 보급하였다.

자실체의 갓 색택이 yellowish white인 사철느타리 ASI 2016과 bluish grey인 느타리 ASI 2018의 원형질체 융합주는 중간색인 brownish grey를 나타내었고, P5에 다시 violet grey인 느타리 ASI 2001을 융합한 것은 bluish grey를 나타내었다. 40균주(P1~P40)의 자실체 생산량에 있어서 10%만이 양친보다 높았고 40%는 낮았으며 나머지는 양친과 유사하였는데 친주 ASI 2018의 수량지수를 100으로 할 때 융합주는 27.0~155.2로 나타났으며, 체세포잡종 38균주(P41~P78)에 있어서 21.0%는 양친보다 높았고 26.3%는 낮았으며 나머지는 양친과 유사하였는데 ASI 2001을 100으로 할 때 체세포잡종은 40.5~141.3으로 잡종강세 현상이 나타났다. 수량에 영향을 주는 7개 형질에 관한 특성에 있어서 P5는 양친주보다 유효경수와 대의 길이는 증가하나 갓의 크기, 대직경, 개체중은 감소하였고, 다발무게와 갓 두께는 유사하였으며, P49는 갓의 크기는 양친과 유사하나 나머지 6개 형질이 모두 증가하였으며 P72는 다발 유효경수와 갓의 크기는 양친과 유사하나 나머지 5개 형질은 모두 증가하였다. esterase 동위효소 분석결과 P5는 양친의 밴드를 대부분 가지면서 새로운 밴드양상이 형성되었으며 융합주 P48, P49, P72의 상호간에는 밴드의 차이가 없었으나 양친인 ASI 2001과 P5의 밴드를 대부분 가지는 양상을 나타내었다.

사철느타리 ASI 2016과 느타리 ASI 2018의 4개

융합조합 7개 융합주의 유전형질 분리에 있어서 분리되는 유전자형은 원영양형 prototroph, 양친의 한쪽 편친형, 양친의 다른 편친형, 영양요구성 유전자 재조합형으로 나타나며 그 기대치는 1 : 1 : 1 : 1 이나 원영양형이 가장 많았으며 2개 융합주를 제외하고는 양친 중 사철느타리 형질만 분리되었으며 양친형과 유전자 재조합형이 거의 1 : 1로 분리되었다. P5 유전자 재조합주 arg rib와 ASI 2001의 pro orn의 체세포 잡종 P48, P49, P72의 분리에 있어서 pro orn 친은 분리되지 않았으며 각 유전형질 arg, rib, pro, orn의 비가 P49, P72는 거의 4 : 1 : 1 : 1로 나타났으나 P48은 pro, orn형질이 훨씬 적게 나타났으며 유전자 재조합형의 비율이 아주 높은 91%이상이었다.

참고문헌

- Ahn, D. K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Korean J. Mycology* **20**(2): 154-166.
- Alic, M. and Gold, M. H. 1985. Genetic recombination in the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. microbiol.* **50**(1): 27-30.
- Anne, J. and Peberdy, J. F. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413-417.
- Anne, J. and Peberdy, J. F. 1985. Protoplast fusion and interspecific hybridization in *Penicillium*. In *Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics*. ed. J. F. Peberdy, & L. Ferenczy. pp. 259-277. New York. Basel: Marcell Dekker.
- Ball, C. 1985. Perspectives for protoplasts in the genetics of industrially important fungi. In *Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics*. ed. J. F. Peberdy & L. Ferenczy. pp. 337-343. New York. Basel: Marcell Dekker.
- Eger, G. 1978. Biology and breeding of *Pleurotus*. In *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. ed. S. T. Chang & W. A. Hayes. pp. 497-519. New York. Academic press.
- Ferenczy, L. 1984. Fungal protoplast fusion : basic and applied aspects. In *Cell Fusion : Gene Transfer and Transformation*, pp. 145-169. ed. R. F. Beers Jr & E. G. Bassett. New York: Raven Press.
- Fincham, J. R. 1989. Transformation in fungi. *Microbiol Reviews*. **53**(1): 148-170.
- Frankel, R. 1983. Heterosis. Reappraisal of theory and practice. Berlin Springer Verlag.
- Go. S. J., You, C. H. and Shin, G. C. 1989. Effects of incompatibility on protoplast fusion between intra-and interspecies in basidiomycete, *Pleurotus* spp. *Korean J. Mycology* **17**: 137-144.
- Gowen, J. W. 1952. *Heterosis. A record of researches directed toward explaining and utilizing the vigor of hybrids*. Ames. Iowa. Iowa state college Press.
- Hamlyn, P. F. and Ball, C. 1979. Recombination studies with *Cephalosporium acremonium*. In *Genetics of Industrial Microorganisms*. ed. O. K. Sebek & A. I. Laskin pp. 1185-1191. American Soc, Microbiol Washington. D. C.
- Mellon, F. M., Peberdy, J. F. and MacDonald, K. D. 1983. Hybridization of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium baarnense* by protoplast fusion; genetics and biochemical analysis. In *Protoplasts 1983. Poster Proceedings*, pp. 310-311. ed. I. Potrykus, C. T. Harms, A. Hinnen, R. Hutter, P. J. King & R. D. Shillito. Basel: Birkhauser Verlag.
- Mishira, N. C. 1985. Gene transfer in fungi. In *Advances in Genetics*. **23**: 73-178. Academic Press.
- Peberdy, J. F. 1989. Fungi without coats-Protoplasts as tools for mycological research. *Mycological Research* **93**: 1-20.
- Raper, C. A. Raper, J. R. and Miller, R. E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* **64**: 1088-1117.
- Santiago, C. M. Jr. 1982. Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea*(Bull.ex Fr.) Singer. Ph. D. Thesis. Univ. Nottingham. U. K.
- Toyomasu, T. Matsumoto, T. and Mori, K. 1986. Interspecific protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus salmoneostramineus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 223-225.
- Toyomasu, T. and Mori, K. 1987a. Fruit body formation of the fusion products obtained by interspecific protoplast fusion between *Pleurotus* species. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2037-2040.
- Toyomasu, T. and Mori, K. 1987b. Intra-and interspecific protoplast fusion between some *Pleurotus* species. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 35-37.
- Toyomasu, T. and Mori, K. 1989. Characteristics of the fusion products obtained by intra-and interspecific protoplast fusion between *Pleurotus* species. *Mushroom Sci.* (1): 151-159.
- Yanagi, S. O. Kawasumi, T. Takebe, I. and Takemaru, T. 1988. Genetic analyses of *Coprinus cinereus* strains derived through intraspecific protoplast fu-

- sion. *Agric. Biol. Chem.* **52**(1): 281-284.
- Ying, L., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. 1987. *Icones of Medicinal Fungi from China*. Beijing, China. Science Press.
- Yoo, Y. B. 1992. Interspecific hybridization between *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. *Korean J. Mycology* **20**(2): 118-126.
- Yoo, Y. B., Byun, M. O., Go, S. J., You, C. H., Park, Y. H. and Peberdy, J. F. 1984. Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. *Korean J. Mycology* **12**(4): 164-169.
- Yoo, Y. B. and Cha, D. Y. 1993. Gene transfer in edible fungi using protoplasts. In *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*. ed. S. T. Chang, J. A. Buswell & P. G. Miles. pp. 157-192. USA: Gordon and Breach Science Publishers.
- Yoo, Y. B., Park, Y. H. and Chang, K. Y. 1988. Induction of auxotrophic mutants and back mutation in *Pleurotus*. *Res. Rept. RDA (E, Fm, S. F. P. U. & M)* **30**(3): 133-140.
- Yoo, Y. B., Peberdy, J. F. and You, C. H. 1985. Studies on Protoplast isolation from edible fungi. *Korean J. Mycology* **13**(1): 1-10.
- Yoo, Y. B., You, C. H., Park, Y. H., Lee, Y. H., Chang, K. Y. and Peberdy, J. F. 1987. Interspecific protoplast fusion and sexuality in *Pleurotus*. *Korean J. Mycology* **15**: 135-141.
- Yoo, Y. B., You, C. H., Park, Y. H. and Peberdy, J. F. 1986. Genetic analysis of the life cycle in interspecific hybrids of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. *Korean J. Mycology* **14**(1): 9-15.