

Di-Mon 교잡법에 의한 큰느타리버섯 교잡주의 특성

신평균^{1)*} · 유영복²⁾ · 공원식²⁾ · 유창현²⁾ · 오세종²⁾

^{1)*}농촌진흥청 농업과학기술원 식물영양과, ²⁾응용미생물과

Characterization of intraspecific hybrids by di-mon crossing in *Pleurotus eryngii*

Pyung-Gyun Shin^{1)*}, Young-Bok Yoo²⁾, Won-Sik Kong²⁾, Chang-Hyun You²⁾ and Se-Jong Oh²⁾

^{1)*}Plant Nutrition Division, ²⁾Applied Microbiology Division,

National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea.

ABSTRACT : *Pleurotus eryngii* is not edible and medicinal mushrooms indigenous to Korea. To improvement of strain suitable to the geographic setting of Korea, we are mated with 22 dikaryons and 47 monokaryons isolated from *Pleurotus eryngii* ASI 2547 by Di-Mon mating. 19 strains forming fruit body obtained from clamped 253 bred strains. 7 excellent strains are selected from 19 bred strains by various morphological features of fruit body. Among the selected 7 strains, H6 strain were identified into ASI 2547-like recombinant hybrids with URP uniprimer by RAPD analysis. This suggested that Di-Mon crossing is one of rapid and easy breeding method for strain improvement with molecular techniques.

KEYWORDS : Di-Mon crossing, *Pleurotus eryngii*, RAPD

큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii* Muller)은 사물기생균의 식용 및 약용버섯으로 75년 송이과로 분류되었다가 86년 느타리버섯과로 재분류돼 담자균아문(Basidiomycotina), 주름버섯목(Agaricales), 느타리버섯과(Pleurotaceae), 느타리버섯속(*Pleurotus*), 큰느타리버섯종(*Pleurotus eryngii*)으로 명명되었다. 그러나 시중에 유통되고 있는 "새송이"는 도입한 균주를 우리의 재배조건에 맞게 계통선발하여 붙여진 큰느타리버섯의 상업적 이름이다(이, 1997). 큰느타리버섯의 원산지는 주로 아열대 지방이나 수목이없는 초원지대, 남유럽일대, 중앙아시아, 북아프리카 등에 널리 분포하고 있다(Bars *et al.*, 1988; Breitenbach and Kranzlin, 1991). 이 버섯은 육질이 치밀하며 자연산 송이와 향과 맛이 유사할 뿐만아니라 면역증강효과도 뛰어나 소비자의 기호에 적합하여 널리 보급될 수 있는 버섯품종이나 인공재배가 까다로워 시중에서 고가로 판매되고 있는 실정이다(Kim *et al.*, 1997). 또한 중금속에 대한 결합 및 분해능력이 탁월하며, 리그닌 및 섬유소 분해 등의 연구도 진행되고 있고, 균체내 펠수아미노산이나 비타민 등이 많이 함유하고 있어 건강식품으로서 각광을 받고 있다(Camarero *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1996).

최근에는 WTO에 의한 문호개방에 따라 도입품종이 증

가하고 있어 이에 대한 수입대체 품종개발이 요구되고 있다. 그러나 기존의 원연 및 근연 교배법으로는 많은 시간과 인력이 요구되고 있어 재배농가 및 종균배양소에서 수행하기가 어렵다(Eger, 1974, 1978; Eger *et al.*, 1976). 따라서 버섯교배에 있어서 고등식물과 다른 불리현상이라는 교배방법(Di-Mon mating)이 존재하는데 이 Di-Mon 교배의 장점은 교배조합의 한쪽 어버이의 1핵균사체가 얻어지고 있지 않을 때에도 잡종을 만들 수가 있고, 단포자분리의 수고가 줄어들어서 편리하다. 또한 한쪽 어버이가 포자를 만들지 않을 경우나 자실체를 형성하지 않은 계통을 교배할 때에도 이용할 수 있다(Kimura, 1966). 이것은 1핵균사체가 2핵균사체와 접합할 때 1핵균사체의 2핵화가 일어나는 3가지 현상으로서 첫째, 화합조합으로서 1핵균사체의 교배형인자가 2핵균사체의 2개의 핵의 교배형인자와 다른 교배화합성일 경우이고 둘째, 반화합성조합으로서 1핵균사체의 교배형 인자가 2핵균사체의 2핵중 어느 한쪽과 화합성일 경우 셋째, 불화합성 조합으로서 1핵균사체의 교배형인자가 2핵균사체의 양쪽 핵과도 불화합성일 경우이다(Buller, 1930; Chang and Miles, 2000; Papazian, 1951). Buller 현상에서 화합 및 반화합성은 양친형질을 그대로 유지하기 때문에 계통 구별에 널리 이용하고 있지만 새로운 교배체를 만들기에는 부적합하며, 재조환을 일으키는 불화합성 조합에서 선발하여야 하는데 기존의 선발방법으로는 어렵고, 새로운 유전적 선발방법인 RAPD, RFLP 및 AFLP 등의 방법을 이용하여 선발되

*Corresponding author: <E-mail : pgshin@rda.go.kr>

어야 한다(Blastid and Horgen, 2003; Fisher and Wolfrath, 1997; Ramirez *et al.*, 2000; Zarvakis *et al.*, 2001).

본 실험은 빠른시간내에 새로운 품종의 육성법으로 시중에 나돌고 있는 부가가치가 높은 균주인 ASI 2547을 가지고 단포자를 분리하고 다른 수집된 이핵균사와 교배하는 이른바 Di-Mon 교배법(Buller 현상)을 이용하여 육성된 새로운 균주를 RAPD를 이용한 분자생물학적으로 동정함으로써 이 방법이 빠른 교배 및 선발방법으로서의 이용가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

단핵균주분리 및 Di-Mon 교배

단포자 분리를 위해 ASI2547의 자실체를 원심분리를 통해 갖 주름살에서 포자를 수확한 다음 MCM배지가 든 평판배지에 도말하여 25℃에서 3~7일간 배양하였다. 배양된 균종을 현미경으로 clamp가 없는 균사를 새로운 PDA 배지로 옮겨 재차 clamp가 없는 것을 확인한 후 Di-Mon 교배를 위한 단핵균주로 사용하였다. Di-Mon교배는 분리된 47개의 단핵균사와 농업과학기술원에서 수집보존중인 이핵균주인 22균주와 대치배양하여 단핵균주의 균사생장에서 2차성장을 보여주는 부분을 현미경으로 관찰하여 clamp가 형성되는 균사를 새로운 PDA배지에서 생장시켰다. 이 균사체를 가지고 재차 clamp형성을 확인한 후 교배된 것으로 보고 850ml 병에서 재배하여 자실체를 형태학적으로 조사하였다.

교배체의 genomic DNA 분리 및 유전분석

Genomic DNA 분리를 위해 농업과학기술원에서 수집보존중인 이핵균주인 22균주와 Di-Mon 교배에 의해 육성된 7개 품종을 가지고 Baldrian 등(1999)의 방법으로 분리하였다. PCR primers는 universal repetitive sequences를 이용한 URP uniprimer kit (Seolin Scientific Co.)를 사용하였으며, PCR 증폭은 PCR primix kit (Bioneer Co.)를 이용하여 94℃에서 5분간 DNA 변성시킨 후 94℃에서 1분, annealing은 55℃에서 1분, DNA 합성은 72℃에서 2분으로 하여 총 35 cycles를 실시하였으며 최종 DNA 합성은 10분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 agarose 및 acylamide gel상에서 DNA 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

큰느타리버섯 ASI 2547 균주의 자실체로부터 3~7일간 27℃에서 갖을 형성시켜 표1과 같이 47개의 단포자를 분리하였다. 분리된 단포자와 수집보존 중인 2핵균주 22개를 PDA 배지에서 3~7일간 대치배양하였다. 1034개의 대치배양 중에서 253개에서 clamp가 형성되어 교배율이

25%이며 그 중 9 균주는 교배가 이루어지지 않았다.

ASI 2547 균주의 각 단포자에 대한 clamp 형성이 가장 높은 균주는 ASI 2513이며, 수집균주에 대한 clamp 형성이 가장 높은 단포자는 15개로 ASI 2547-16이었다. 이러한 내용은 수집균주 및 단포자에 따라 화합성이나 불화합성이 각각 다르게 나타나고 있음을 보여주고 있다. 이러한 교배체 중에서 6균주를 RAPD로 분석한 결과 그림1-b, h, i는 단핵균주가 2핵화 되어 단핵균주의 어버이와 유사하고, H2는 2핵균주가 이동하여 단핵균주를 2핵화함으로써 2핵균주의 어버이와 유사한 유전적 형질을 가져, buller 현상의 화합성 및 반화합성에 의해 형성된 교배체라 할 수 있다(그림2-C). 그렇지만 이러한 교배체는 교배체인지 아니면 단핵균사의 자가 clamp 형성에 의해 자실체를 형성한 것인지 구분하기 힘들고 선발의 의미도 없다. 그러므로 실제에 있어서 새로운 품종을 만들기 위해서는 그림2-D와 같이 새롭게 구성된 유전적 형질을 가진 즉 2핵균사체의 증식 중에 2핵의 사이에서 체세포 조환이 일어나 1핵균사체가 2핵화 되는 불화합성의 교배체가 만들어져 기존의 형질에 새로운 유전인자가 더해지거나 제거된 교배체가 요구된다.

그림1-j는 1핵균사체와 2핵균사체의 유전적 조성이 재조합된 불화합성 교배체임을 확인되어, buller 현상에서 불화합성 교배형으로 재조합에 의한 핵간의 교배형 교환으로 인한 양친의 유전적 형질을 다 가진 잡종화 된 새로운 품종으로 볼 수 있으나 양친을 합한 band로 구성하고 있어 두 양친의 혼합체라고 판단할 수 있어 그림3-b과 같이 polyacrylamide gel 상에서 분석한 결과 ASI 2547의 양친과 형질이 닮은 새로운 밴드를 형성하고 있어 새로운 균주로 육성되었음을 알 수 있다. Blastide and Horgen(2003)은 양송이에서 미토콘드리아 유래의 새로운 밴드의 형성을 제시하고 있으나 그림3-b는 repetitive primer를 이용하였기 때문에 genome 유래라고 추정된다.

자실체 형태는 그림4에서와 같이 양친형질을 그대로 가지고 있어 Di-Mon 교배법은 양적형질은 영향을 받지않고 질적형질인 유전적 형질만 다양하게 나타내는 교배체의 선발에 이용가능하리라 사료된다. 교배체 선발에 유전형질의 감정법이 도입됨으로서 어버이 품종의 유전적 변이 추정, 우량 유전자의 집적이나 열악한 유전자의 제거에 의한교배체 육성 및 잡종강세를 나타내는 교배체에 이용함으로써 새로운 균주육성에 필요하리라 사료된다.

적 요

큰느타리버섯은 식용 및 약용으로 쓰이는 부가가치가 높은 버섯으로서 한국 고유의 육성품종 개발이 절실하다. 이에 새로운 큰느타리버섯 품종을 육성하고자 시중에 고가로 판매되고 있는 ASI 2547균주의 단포자를 분리하고 22개의 수집균주와 Di-Mon 교배를 실시하여 격쇠연결체를

Table 1. Di-Mon crossing of *Pleurotus eryngii* dikaryons and monokaryons isolated from *Pleurotus eryngii* ASI 2547

Mon \ Di	2125	2155	2302	2317	2320	2326	2340	2341	2346	2363	2373	2381	2391	2507	2513	2514	2515	2516	2518	2539	2540	2542
1						+												+				
3				+					+		+	+							+			+
6	+	+	+	+			+	+				+			+	+	+	+	+	+	+	
7							+													+		
8				+	+		+	+	+	+	+	+			+				+			
9							+	+	+		+				+							
10	+					+						+	+		+		+					
13		+		+	+		+	+		+	+		+		+							
14		+					+		+	+				+					+			
15		+	+	+													+					
16	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+			+	+	+			+			+
17		+	+	+	+	+	+		+		+		+	+	+		+					+
18		+																				
19	+					+		+		+		+	+				+					+
20		+		+					+													
22		+	+				+		+		+	+	+		+							+
23		+						+		+	+		+		+				+			
26	+	+			+			+	+	+	+	+	+		+							+
28		+	+	+		+		+	+	+		+	+		+							+
29		+								+	+	+			+				+			+
30									+			+			+				+			
31				+	+	+	+	+					+		+							
32	+		+						+		+	+	+		+	+	+					
33	+							+				+	+		+	+						
34				+					+			+			+		+					
35								+							+			+	+			+
36	+	+					+					+			+							
37		+							+			+	+									+
38								+							+							+
39										+			+			+	+		+			+
40	+							+		+		+			+							
41	+																					+
42	+					+	+	+	+		+	+	+						+			
43		+		+																		
44	+	+	+	+								+		+	+				+			+
45		+	+	+		+	+					+	+									
46		+	+			+	+	+	+		+	+										
47			+				+	+		+	+		+		+				+			

* Di : Dikaryon, Mon : Monokaryon, ** + : Clamp formation.

P. eryngii strains were collected from America ; ASI 2125, Dutch ; ASI 2155, Japan ; ASI 2302, 2317, 2320, 2326, 2341, 2381, 2391 and 2547, China ; ASI 2507, Netherland ; ASI 2513, 2514, 2515, 2516, 2518 and 2539, Nepal ; ASI 2540 and 2542, and Korea (Spawn Cultivation Co.) ; ASI 2340, 2346, 2363 and 2373.

가진 253균주중에서 자실체를 형성하는 19균주를 선발하여 그 중에서 형태적으로 다양한 7균주를 선택하여 RAPD

로 분석한 결과 Hybrid H6 균주가 형태학적으로는 양친과 유사하나 유전자 증폭산물은 재조합된 교배체임이 확인되

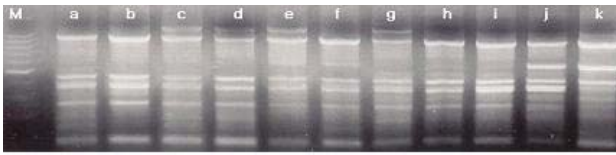


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with URP uniprimer 3 from hybrids by Di-Mon mating. M : 1 kb molecular marker, a : *Pleurotus eryngii* ASI 2547, b : H1, c : ASI 2340, d : H2, e : ASI 2373, f : H3, g : ASI 2391, h : H4, i : H5, j : H6, k : ASI 2518.

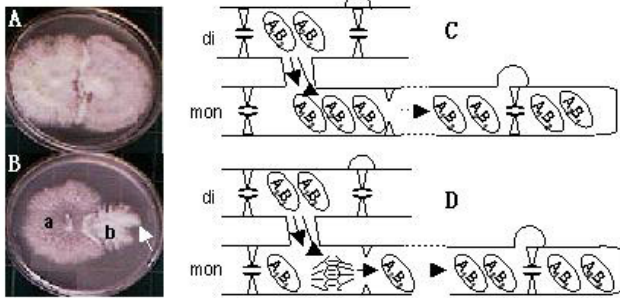


Fig. 2. Di-mon crossing and Buller phenomenon. a : dikaryon, b : monokaryon, Arrow head indicate formation from monokaryon to dikaryon.



Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products amplified with URP uniprimer 3 from hybrids by Di-Mon mating. M : 1 kb molecular marker, a : *Pleurotus eryngii* ASI 2547, b : H6, c : H5, d : *Pleurotus eryngii* ASI 2518.



Fig. 4. Fruitbody features of hybrid H6 between monokaryons isolated from dikaryotic strains, ASI 2547 and 22 dikaryon strains. a: ASI 2547, h: Hybrid H6, b: ASI 2518.

었다. 따라서 Di-Mon 교배법이 분자생물학적 동정과 결합됨으로서 손쉽고 빠른 교배법으로 새로운 균주육성에 사용할 수 있으리라 사료된다.

참고문헌

이현옥. 1996~1999. 큰느타리(새송이)버섯 병재배기술확립 시험. 경남도원 농사시험연구보고서. <http://WWW.Mushtopia.com/>.

Bas, C., Kuyper, T.W., Noordeoos, N.S. and Vellinga, E.C. 1998. Flora Agaricina Neerlandica; Critical monographs on families of agarics and boleti occuuing in the Netherlands. p. 22.

Baldrian, P, Gabriel, J. and Pospisek, M. 1999. Improved isolated of nucleic acids from basidiomycete fungi. Biotechniques 27 : 458-460.

Breitenbach, J. and Kranzlin, F. 1991. Fungi of Switzerland, vol. 3. Boletes and Agarics, p312.

Buller, A.H.R. 1930. The biological significance of conjugated nuclei in *Coprinus lagopus* and other Hymenomycetes. Nature 126 : 686-689.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J. and Martinez, A.T. 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that have both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. J. Biol. Chem. 274 : 10324-10330.

Chang, S-T. and Miles, P. G. 2000. Edible mushrooms and their cultivation, Capter 5. Sexuality and the genetics of basidiomycetes. 93-113. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

de la Bastide, P.Y. and Horgen, P. A. 2003. Mitochondrial inheritance and the detection of non-parental mitochondrial DNA haplotypes in crosses of *Agaricus bisporus* homokaryons. Fungal Genetics and Biology 38 : 333-342.

Eger, G., Eden, G. and Wissig, E. 1976. *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. Theoret. Appl. Genetics 47 : 155-163.

Eger G. 1974. Rapid method for breeding *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Sci. 9 : 567-573.

Eger G. 1978. New ways of breeding and strain protection for practical mushroom cultivation, Mushroom Sci, 10 : 415-420.

Fisher, M. and Wolfrath, H. 1997. Mitochondrial DNA in Mon-Mon and Di-Mon pairing of *Pleurotus ostreatus*. Botanica Acta 110 : 172-176.

Kim, H-K., Cheong, J-C., Chang, H-Y., Kim, G-P., Cha, D-Y. and Moon, B-J. 1997. The artificial cultivation of *Pleurotus eryngii*(I) - Investigation of mycelial growth conditions-. Korean J. Mycol. 25 : 305-310.

Kimura, K. 1966. Studies on the Buller phenomenon by making use of a gene marker. I. Incompatible di-mon mating. Rep. Tottori. Myc. Inst. (Japan). 5 : 1-5.

Martinez, M.J., Ruiz-Duenas, F.J., Guillen, F. and Martinez,

- A.T. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 237 : 424-432.
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A.T. and Martinez, M.J. 1997. Laccase isoenzyme of *Pleurotus eryngii*; characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 2166-2174.
- Papazian, H.P. 1951. The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. Genetics 36 : 441-459.
- Ramirez, L, Larraya, L.M., Penas, M.M., Perez, G., Eizmendi, A., Agos, I., Arana, D., Aranguren, J., Iribarren, I., Olaberria, N., Palacios, E., Ugarte, B.E. and Pisabarro, A.G. 2000. Molecular techniques for the breeding of *Pleurotus ostreatus*. Mushroom Sci. 15 : 157-163.
- Zervakis, G. I., Venturella, G. and Papadopoulou, K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology 147 : 3183-3194.