

느타리 단핵 임성체를 이용한 균주개발

유영복* · 김인엽 · 공원식 · 장갑열 · 오세종 · 전창성

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과

Strain improvement of *Pleurotus ostreatus* using self-fertility monospore isolate

Young-Bok Yoo*, In-Yeup Kim, Won-Sik Kong, Kab-Yeul Jang, Se-Jong Oh and Chang-Sung Jhune

Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA 441-707, Korea

ABSTRACT : Oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* is bifactorial heterothallism. Single basidiospore isolates from fruiting bodies are homokaryotic and self-sterile. However, we found that homokaryons derived from some strains of *P. ostreatus* could develop fruiting bodies with two different types. One hundred and two isolates out of 155 monospore isolates formed fruiting bodies (65.8%). First group did not have only mature or sporulating fruiting bodies but also clamp connections, which initial isolate also did not present clamp connections (Abortive homokaryotic fruiting, AHF). Second group had developed fruiting bodies with clamp connections even though initial homokaryotic colony did not form clamp connections (Pseudo-homokaryotic fruiting, PHF). The mycelial colonies derived from PHF by tissue culture formed clamp connections, while mycelial colonies of AHF lacked them. We obtained 535 PHF and 79 AHF inter-strain hybrids among 8 strains of *P. ostreatus* by hyphal anastomosis. The fruiting body yield of PHF group is higher than that of AHF group in bottle cultivation. A preselection of single spore isolates for fertility would save labour in strain improvement of *P. ostreatus*.

KEYWORDS : Abortive homokaryotic fruiting, Pseudo-homokaryotic fruiting, Self-fertile monokaryotic strain, Strain improvement, *Pleurotus ostreatus*.

느타리는 우리나라에서 가장 많이 재배되며, 세계에서도 양송이, 표고 다음으로 많이 재배되는 버섯이다. 우리나라에서 60-70년대에 양송이가 수출되어 호황을 누렸다. 그러나 80년대에 인건비 상승과 중국의 덩핑으로 점차 수출이 줄어들면서 수출위주의 버섯산업이 막을 내렸다. 이때부터 느타리가 본격적으로 국내 소비용으로 생산되기 시작하여 버섯산업이 점차 발전되었다. 2003년에 버섯 전체가 약 18만 톤 생산되어 생산가액 약 8,000억원에 달했다(유 등, 2005). 2006년에는 201천 톤 이상 생산되어 생산가액 1조원 이상 도달할 것으로 추정된다. 이 중에서 느타리버섯류(큰느타리; 새송이 포함)는 약 49% 정도를 차지한다. 느타리는 다양한 생리활성 물질을 가지고 있어 항종양, 항 에이즈바이러스, 항 세균과 기생물, 심관혈관 장애 방지, 신경섬유 활성화에 효력이 있는 것으로 알려졌다(Wasser and Weis, 1999). 또한 2005년 한영실교수의 KBS2 TV프로 '위대한 밥상'에서 비만예방에 효과적인 식품으로 추천되었다.

느타리는 전 세계 도처에 자생하는 버섯으로 알려져 있다. 우리나라에서도 산과 들의 미루나무 등 활엽수에서 발생하며 농가에서는 톱밥, 볏짚, 쉼부산물(폐면, 낙면)에서

많이 재배되고 있다. 최근에는 미국에서도 수요가 계속 증가하고 있다(Royse 등, 2005).

버섯의 단포자분리주 단핵체의 자실체 형성에 대해서는 Poriales의 6속과 Agaricales의 12속 종들에 대해 오래전에 보고되었다(Esser, 1979). 느타리는 4극성 자웅이주성으로 담자포자는 핵을 1개 가지며, 단핵체는 자실체를 형성하지 못하는 것으로 알려져 있다(Terakawa, 1960; Eugenio and Anderson, 1968; Raper, 1978). 하지만 느타리속 중에서도 *P. flabellatus* (Samsudin and Graham, 1984), *P. eous* (Elliott, 1985), *P. sajor-caju* (Go and Shin, 1986)의 단핵 자실체 형성이 보고되었다. 이러한 단핵 임성체는 육종에 있어서 유리한 점이 있을 것으로 추측해 볼 수 있다. 그리고 단핵체의 유전적 다형성을 검정하였을 때 다소의 변이성을 보여 품종개발을 위해 다양한 단핵체의 이용성이 제시되었다(송 등, 1996). 따라서 이 단핵 임성체를 이용하여 균주개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

실험에 사용된 균주는 느타리 8균주로 표 1과 같다. 균주 배양, 담자포자 발아 등에 사용된 배지는 버섯완전배지

*Corresponding author: <ybyoo@rda.go.kr>

(Raper *et al.*, 1972)로 그 구성 성분은 Dextrose 20g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1.0g, Yeast extract 2g, Peptone 2g, Agar 20g, 증류수 1000ml이다.

Table 1. Strains of *Pleurotus ostreatus* used in this study

Strain	Source
ASI2018	Korea
ASI2183	Protoplast fusion products P5(2018+2016)+2001
ASI2194	Japan
ASI2344	Netherland
ASI2504	China
ASI2706	Korea
ASI2730	China
P1982	ASI2300 x P1542(P399 x 2181)

단포자 분리, 교배형 검정

자실체로부터 멸균 샐리에 담자포자를 채취하였다. 이 포자를 멸균수에 현탁하여 버섯완전배지에서 발아하였다. 발아된 단포자분리주를 1개씩 샐리에 옮겨 현미경으로 꺾쇠연결체(clamp connection) 유무를 확인하여 없는 것만 선발하여 사용하였다. 선발된 단핵체로 임의교배 하여 교배형 4종류를 정하였다.

단핵체 자실체 유도

활엽수배지, 숯부산물, 미강을 5: 3: 2로 혼합하여 850ml

플라스틱 병에 넣어 121℃에서 90분 살균 후 미리 배양된 균사체를 접종하여 25℃에서 30여일 배양하였다. 균사배양이 완료된 톱밥병을 생육실에 옮겨 10-15℃에서 빛을 조사하면서 자실체 발이를 유도하였다. 이때 병 마개를 벗기지 않고 유기하였으며, 원기가 형성되어 병 마개 옆이나 중앙으로 자라 나올 때에 마개를 벗기거나 그대로 두고 자실체를 생육시켰다.

계통간 교잡과 교잡체 (hybrid) 선발 및 자실체 특성 검정

버섯완전배지에 두 단핵체를 1-2cm 간격으로 접종 배양하여 2 균주가 접합된 부위를 현미경으로 꺾쇠연결체 형성 유무를 확인하여 꺾쇠연결체가 형성된 것을 교잡체로 선발하였다. 자실체 특성 검정은 단핵체 자실체 유도에서 사용한 것과 동일하게 배지제조 후 균사체 배양하여 완료 후 균균기를 실시하였다. 마개를 제거한 상태로 생육실에 이동하여 자실체를 유도하였다. 10-15℃에서 빛을 조사하면서 자실체를 생육하여 성숙되었을 때 자실체 특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

단핵체의 자실체 유도

단핵체 자실체는 모균주 이핵체보다 다소 원기형성과 자실체 발생이 늦었다. 또한 자실체도 모균주에 비해 발이 수가 적고 크기가 빈약한 편이었다 (그림 1). 그러나 일부 단핵체는 모균주와 유사하게 자실체의 수량이 많았다. 8개의 모균주로부터 분리한 155개의 단핵체 자실체를 유도한 결



Fig. 1. Fruiting body development of monokaryotic strains in *P. ostreatus*. Self-fertile monospore isolate : 2504-2, 2504-12, 2706-12, Dikaryotic strain : 2504

Table 2. Distribution of the mating types of self-fertile (PHF) progenies derived from *P. ostreatus*

Strain	No. test	No. fertile segrents in each incompatibility group					No. sterile
		I	II	III	IV	Total	
ASI2018	20	5	3	3	4	15	5
ASI2183	20	8	3	1	2	14	6
ASI2344	18	3	3	2	1	9	9
ASI2504	20	8	2	4	2	16	4
ASI2706	19	5	3	2	1	11	8
ASI2194	18	3	3	4	5	15	3
ASI2730	20	6	6	2	5	19	1
P1982	20	-	2	1	-	3	17
Total	155	38	25	19	20	102(65.8%)	53(34.2%)

과 102개의 단핵체가 완숙한 자실체를 형성하여 65.8% 임성율을 나타내었다 (표 2). 8개 모균주의 단핵 임성체율은 15-95%로 균주별로 차이가 있었고 P1982가 가장 낮았으나 ASI2730은 무려 95%로 나타났다. 이러한 단핵 임성체 비율은 상당히 높은 것으로 나타났는데 그 이유는 단포자분리시 균사생장이 빠른 것을 많이 선발한 결과이거나 실험에 사용된 균주가 대부분 생산력이 높은 농가에서 재배되는 품종으로서 교잡종이므로 여기에 기인하는 것으로 사료된다.

임성체간 및 비임성체간 교잡체의 자실체 특성 비교

느타리 8개 계통으로 계통간 11조합을 교잡하여 임성체간 535개, 비임성체간 79개 교잡체를 얻었다 (표 3). 이 교잡체에 대해 자실체 특성을 조사하여 서로 비교분석하였으며, 모균주와도 비교하였다. 자실체 생육일수는 임성

간 교잡 집단이 비임성간 보다는 빨랐다. 병당 유효경수는 임성체간 교잡주가 모균주나 비임성 교잡체보다 많았으며, 대길이도 두 집단에 비해 길었다. 그러나 대굵기와 개체중은 3개 집단간 거의 차이가 없었다. 단핵 임성체간 교잡주 집단의 병당 자실체 수량이 비임성간과 모균주 집단보다 높은 경향이였다. 모균주 집단의 자실체 수량지수를 100으로 하였을 때 임성체간 교잡체 집단은 105, 비임성간 교잡체 집단은 86으로 나타났다. 특히 ASI2194 x 2344 조합은 59.95%, ASI2194 x 2730 조합은 27.39%, P1982 x ASI2504 조합은 22.43% 양친균주보다 자실체 수량이 증수되는 것으로 나타났다. 교잡체가 수량이 증가되는 현상은 잡종강세 현상으로 교잡조합에 따라 상당히 다르게 나타났다 (표 4). 따라서 단핵체로서 자실체를 형성하는 임성체는 느타리 품종을 개발하는데 훌륭한 새로운 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Inter-strain hybridization of *P. ostreatus* by hyphal anastomosis

Cross combination	No. hybrids among self-fertile strains	No. hybrids among self-sterile strains
ASI2018(7) × ASI2504(9)	63	4
ASI2183(8) × ASI2344(9)	72	4
ASI2183(8) × ASI2504(9)	72	4
ASI2183(8) × ASI2706(6)	48	4
ASI2183(8) × ASI2730(8)	64	9
ASI2194(8) × ASI2344(5)	40	9
ASI2194(8) × ASI2730(8)	64	9
ASI2344(5) × ASI2730(8)	40	9
P1982(3) × ASI2183(8)	24	9
P1982(3) × ASI2504(8)	24	9
P1982(3) × ASI2730(8)	24	9
Total	535	79

Table 4. Comparison of the cross combination on the yield of fruiting body in *P.ostreatus*

Cross combination	Test no. hybrid	Days to primordia	Days to harvest	No. carpophore/ bottle	Fruiting yield (g/bottle)	Stipe (mm)		Weight of carpophore (g)
						Diameter	Length	
(Self-fertile)								
2018 x 2504	63	4 ± 1	12 ± 2	14 ± 6	75 ± 15.2	12.8 ± 3.0	38.9 ± 10.6	8.2 ± 1.8
2183 x 2344	72	4 ± 2	13 ± 2	21 ± 7	95 ± 14.8	10.6 ± 1.6	46.8 ± 8.5	7.3 ± 1.4
2183 x 2504	72	5 ± 2	13 ± 2	18 ± 8	86 ± 21.3	11.5 ± 2.0	47.1 ± 10.2	7.8 ± 1.5
2183 x 2706	48	6 ± 2	14 ± 3	21 ± 12	87 ± 18.8	10.4 ± 1.9	40.1 ± 7.9	6.5 ± 1.7
P1982 x 2183	24	9 ± 3	19 ± 6	18 ± 10	90 ± 15.6	12.0 ± 2.6	53.4 ± 9.0	7.6 ± 3.5
P1982 x 2504	24	5 ± 2	13 ± 6	34 ± 18	119 ± 26.5	11.8 ± 4.4	60.5 ± 15.2	7.7 ± 2.0
P1982 x 2730	24	10 ± 3	21 ± 7	15 ± 4	80 ± 16.1	11.3 ± 2.2	48.0 ± 9.5	6.8 ± 0.8
2183 x 2730	64	6 ± 2	13 ± 4	22 ± 10	91 ± 18.4	11.8 ± 2.0	51.4 ± 13.2	7.1 ± 1.8
2194 x 2344	40	3 ± 1	9 ± 1	47 ± 12	134 ± 9.9	10.2 ± 2.2	58.3 ± 16.0	6.3 ± 1.3
2194 x 2730	64	5 ± 2	12 ± 2	37 ± 18	100 ± 21.7	10.7 ± 2.0	50.6 ± 9.4	6.1 ± 1.5
2344 x 2730	40	6 ± 2	12 ± 2	20 ± 9	93 ± 20.6	11.5 ± 2.4	53.6 ± 13.7	8.0 ± 2.2
(Self-sterile)								
2018 x 2504	4	4 ± 3	14 ± 6	13 ± 8	72.0 ± 5.4	14.7 ± 2.1	32.7 ± 3.2	8.8 ± 0.6
2183 x 2344	4	6 ± 2	13 ± 2	20 ± 8	92.0 ± 13.1	10.3 ± 1.4	45.8 ± 6.9	7.4 ± 0.9
2183 x 2504	4	5 ± 2	14 ± 3	21 ± 8	95.0 ± 10.5	10.1 ± 0.8	48.9 ± 7.3	7.0 ± 1.4
2183 x 2706	4	7 ± 1	15 ± 1	14 ± 7	63.5 ± 29.6	10.0 ± 0.3	37.0 ± 4.4	6.0 ± 1.2
P1982 x 2183	9	9 ± 2	23 ± 8	12 ± 6	66.5 ± 19.8	10.5 ± 1.2	46.4 ± 3.6	6.5 ± 3.0
P1982 x 2504	9	4 ± 1	10 ± 2	26 ± 9	89.0 ± 17.4	11.0 ± 1.7	40.7 ± 8.6	5.2 ± 3.6
P1982 x 2730	9	7 ± 1	19 ± 7	12 ± 5	58.9 ± 14.0	10.6 ± 0.9	51.3 ± 11.1	4.8 ± 3.4
2183 x 2730	9	8 ± 2	17 ± 5	15 ± 6	74.1 ± 13.7	10.4 ± 0.8	43.7 ± 6.5	6.2 ± 2.5
2194 x 2344	9	5 ± 1	13 ± 3	25 ± 11	83.6 ± 14.4	10.0 ± 0.4	47.0 ± 11.8	5.0 ± 4.4
2194 x 2730	9	7 ± 1	14 ± 1	25 ± 8	85.6 ± 8.7	10.0 ± 1.7	47.6 ± 8.4	5.5 ± 2.3
2344 x 2730	9	7 ± 2	14 ± 1	15 ± 3	76.7 ± 20.0	10.7 ± 0.8	41.4 ± 6.5	6.3 ± 2.7
(Parents)								
2018	1	2	11	16 ± 6	75 ± 13.3	10.0 ± 1.0	30.8 ± 4.1	6.2 ± 0.8
2183	1	5	13	19 ± 5	102 ± 12.0	11.0 ± 1.3	35.2 ± 6.1	8.0 ± 2.7
2344	1	2	10	26 ± 5	88 ± 11.5	10.2 ± 1.9	33.4 ± 5.8	7.1 ± 1.7
2504	1	3	10	15 ± 3	99 ± 11.2	16.9 ± 3.6	32.6 ± 10.0	8.3 ± 0.3
2706	1	3	11	37 ± 11	99 ± 11.6	10.4 ± 1.7	33.2 ± 6.6	4.7 ± 1.7
2194	1	3	10	16 ± 4	80 ± 10.3	10.4 ± 0.9	47.1 ± 4.3	7.9 ± 1.9
2730	1	5	12	16 ± 5	78 ± 11.7	14.2 ± 1.9	35.7 ± 4.8	6.3 ± 0.9
p1982	1	5	12	20 ± 9	95 ± 18.5	10.9 ± 0.8	60.9 ± 8.3	7.8 ± 1.1
Average of self-fertile	535	5 ± 2	13 ± 4	24 ± 14	93.6 ± 23.2	11.3 ± 2.4	48.4 ± 12.4	7.2 ± 1.9
Average of self-sterile	79	7 ± 2	15 ± 5	18 ± 8	77.2 ± 18.5	10.7 ± 1.6	44.1 ± 8.2	7.1 ± 1.1
Average of parents	8	4 ± 1	11 ± 1	23 ± 9	89.4 ± 10.9	11.8 ± 2.5	38.6 ± 10.3	7.0 ± 1.2

버섯의 품종을 개발하는 데에는 여러 가지 방법이 있다. 이 중에서 교잡법이 돌연변이 등 다른 어떠한 방법보다 개량하고자 하는 균주의 유전자 (DNA)를 직접 또는 간접적으로 크게 변화시키는 방법이다. 그 동안 품종개량에 많이 이용은 되어 우수한 품종육성을 이루어 왔지만 실제 생산량 증가에 대한 연구 보고는 많지 않다. 이러한 이유는 자실체 생산량 증가에 관련되는 요인이 많고, 많은 실험균주의 분석 등에 대한 어려움이 주요한 요인 중 하나일 것이다.

우리는 오래전에 원형질체 융합으로 얻은 체세포잡종에 대한 자실체 생산량을 검정하여 양친균주를 100으로 볼 때 체세포 잡종이 40.5-152.7로 나타나 수량성이 아주 높은 품종을 개발하여 보고하였다(유 등, 1993). 이에 비해 근사접합에 의한 교잡체는 자실체 수량이 양친에 비해 변화의 정도는 작지만 수량성이 높은 우수한 교잡주 선발이 기대된다.

적 요

느타리는 4극성 자웅이주성으로 단포자분리주는 단핵으로 자실체를 형성하지 못하는 것으로 알려져 있다. 그러나 단포자분리주는 2종류로 구분되었는데 하나는 자실체를 완전히 형성하지 못하는 AHF형 (abortive homokaryotic fruiting, AHF) 이며, 나머지 하나는 원기형성 후 완전한 자실체로 발달하는 PHF형 (Pseudo-homokaryotic fruiting, PHF)이었다. 느타리 8개 계통으로부터 단포자분리주 155개를 얻어 단핵체 자실체를 유도하여 이 중에서 102개임성체를 얻었으며, 이는 65.8%에 해당되었다. 단핵 자실체는 이핵체 모균주에 비해 대부분 자실체가 빈약하였으나 일부 모균주와 유사한 크기의 자실체도 발생하였다. 이들 단핵 임성균주를 이용하여 계통간 교잡조합 11개에서 535 교잡체와 비임성균주간 교잡체 79개를 얻어 톱밥병재배를 하여 자실체 생산력을 모균주와 조사 비교하였다. 자실체 생육일수는 임성주가 비임성주간 교잡 집단에 비해 빨랐다. 병당 유효경수는 임성체간 교잡주가 모균주나 비임성교잡체보다 많았으며, 대길이도 두 집단에 비해 길었다. 그러나 대굵기와 자실체 개체중은 3개 집단간 거의 차이가 없었다. 단핵 임성체간 교잡주 집단의 병당 자실체 수량이 비임성간과 모균주 집단보다 높은 경향이 있었다. 모균주 집단의 자실체 수량지수를 100으로 하였을 때 임성체간 교잡체 집단은 105, 비임성간 교잡체 집단은 86으로 나타났다. 특히 2194 × 2344 조합은 59.95%,

2194 × 2730 조합은 27.39%, 1982 × 2504 조합은 22.43% 양친균주보다 자실체 수량이 증수되는 것으로 나타났다. 따라서 단핵 임성체를 이용한 우수 균주개발 가능성은 높다고 할 것이다.

인용문헌

- Elliott T.J. 1985. Developmental genetics from spore to sporophore. In : Moore D, Casselton LA, Wood DA, Frankland JC (eds) Developmental Biology of Higher Fungi. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 451-465.
- Esser K. 1979. Genetic control of fruit body formation in higher basidiomycetes. *Mush Science*, 10, 1-12.
- Eugenio C.P. and Anderson N.A. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* 60, 627-634.
- Go S.J. and Shin G.C. 1986. Incompatibility factors and genetic analysis of *Pleurotus sajor-caju*. *Korean J. Mycol*, 14, 17-23.
- Raper, C. A. 1978. Sexuality and breeding. In the biology and cultivation of edible mushrooms, pp. 83-117. ed. S. T. Chang & W. A. Hayes. New York : Academic Press.
- Raper CA, Raper JR, and Miller RE (1972) Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64 : 1088-1117.
- Royse, D. J., Shen, Q. and Mcgarvey, C. 2005. Consumption and production of recently domesticated edible fungi in the United States with a projection of their potential. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*, pp. 338-342, ed. Q. Tan, J. Zhang, M. Chen, H. Cao and J. A. Buswell. *Acta Edulis Fungi*.
- Samsudin S. and Graham K.M. 1984. Monokaryotic fruiting in *Pleurotus flabellatus*. *Malaysian Appl Biol*, 13, 61-65.
- Terakawa H. 1960. The incompatibility factors in *Pleurotus ostreatus*. *Scientific Papers of the College of General Education, University of Tokyo* 10, 65-71.
- Wasser, S. P. and Weis, A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: current perspectives (Review). *International J. of Medicinal Mushrooms* 1: 31-62.
- 송영재, 정미정, 김범기, 노영덕, 류진창, 유영복. 1996. DNA 다형성 분석에 의한 느타리버섯 단포자 분리주의 유전적 변이성. *한국균학회지* 24(3): 186-205.
- 유영복, 공원식, 오세종, 정종천, 장갑열, 전창성. 2005. 버섯 과학과 버섯산업의 동향. 2005. *한국버섯학회지* 3: 1-23.
- 유영복, 유창현, 차동열. 1993. 원형질체 융합에 의한 느타리버섯속의 품종개발. *한국균학회지*. 21(3): 200-211.
- 한영실. 2005. 위대한 밥상 p. 12-17. 현암사.