

## 느타리버섯 소포자 형성 균주 개발

신평균\* · 오세종<sup>1</sup> · 유영복<sup>1</sup>

농촌진흥청 농업과학기술원 식물영양과, <sup>1</sup>응용미생물과

### Improvement of sporeless strain in oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*

Pyung-Gyun Shin\*, Se-Jong Oh<sup>1</sup> and Young-Bok Yoo<sup>1</sup>

Plant Nutrition Division, <sup>1</sup>Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

**ABSTRACT :** The enormous production of spores by the fruitbodies in the cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) is develop an allergy with symptoms similar to an “extrinsic allergic alveolitis (EEA)”. the sporeless strain would noy only benefit health of mushroom workers but also reduce the risk of viral infections on the mushroom farms. For the development of a sporeless strain of *P. ostreatus* we used strain ASI 2069. This non-commercial strain is completely non-sporulating. We have recovered both nuclear types of strain ASI 2069 as monokaryons (hereafter referred to as neohaplonts) by protoplasting the mycelium. Crosses between neohaplonts and SSI's(single spore isolates) obtained from a sporulating commercial strain ASI 2180 yielded fruitbodies that isolated 128 strains. 13 excellent strains are selected from 30 bred strains by quality of fruitbodies and spore number. Among 13 excellent strains, G192 strain is chose finally to high yield and sporelessness.

**KEYWORDS :** *Pleurotus ostreatus*, neohaplont, breeding, sporeless

## 서 언

느타리버섯류는 세계적으로 양송이 다음으로 가장 많이 생산하는 되고 있으며 맛과 향이 뛰어나 한국인의 기호에 알맞아 국내에서는 버섯총생산량의 50%를 차지하고 있다. 느타리버섯류의 문제점은 버섯 수확시 확산되는 무수한 포자가 버섯재배농가의 호흡기계통질환인 알레르기를 유발한다(Hausen *et al.*, 1974; Cox *et al.*,1988). 느타리버섯의 무포자형성은 재배농가의 건강에 도움을 줄뿐 아니라 바이러스병 감염의 위험을 감소시킬 수 있다. 따라서 소포자 균주의 육성은 느타리 재배농가에게 가장 중요하리라 본다.

일반적으로 느타리버섯의 담자포자는 하루에 1그램당 2억내지 6억개가 생산된다. 초기에는 UV처리에 의해 *Coprinus macrohus*, *Pleurotus ostreatus*, 및 *P. pulmonarius* 등에서 무포자형성 돌연변이체를 선발하였으나 자실체의 형태적 변이와 수량성이 낮아 산업적으로 이용하지 못하고 있다(Takemaru, 1971; Imbernon and Labarere, 1989; Eger, 1974, 1978). 특히 Sonenberg 등(1996)은 포자의 양을 약 10배 정도를 적게 생산한다면 알레르기를 억제할 수 있다고 하였다. 이러한 결론은 무포

자 균주를 이용한 교배체는 포자량이 거의 없거나 형태적으로 보면 자실체가 비정상적으로 나와 포자형성과 형태형성이 서로 관련이 있을 것이라고 보고 있다(Imbernon and Houdeau, 1991; Murakami, 1993; Leal-Lara,1978). 유전분석에서는 열성 또는 우성을 띄는 대립 유전자 발현의 차이라고 주장하고 있으나 뚜렷한 분석이 나오지 않고 있어 이에 대한 연구가 미비한 실정이다. 유럽에서는 무포자느타리 육성이 Eger 등이 1976년에 무포자버섯의 특성구명에 대한 보고를 시작으로 30년에 걸쳐 육종되어, 최근에 Barrs 등(2000년)이 소포자느타리 버섯을 육성하였다. 이 자실체는 유럽형 기호에 맞도록 갓만 형성되고 대가 짧아 대의 짙은 맛을 좋아하는 한국인의 소비자 기호에 맞지 않다.

따라서 본 실험은 기존의 느타리버섯에서 무포자 균주를 선발하여 그 특성을 구명하고, 교배를 통하여 소포자균주를 스크리닝한 후 우량품종을 육성하여 보급하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양배지

본 실험에 사용된 균주는 *Pleurotus ostreatus* ASI 2069, ASI 2180(원형1호), ASI 2069에서 유래된 단핵화

\*Corresponding author: <pgshin@rda.go.kr>

균주(Nh9, Nh15, Nh26, Nh34, Nh36) 등은 MCM배지에서 각각 접종하여 27℃에서 4일간 계대배양한 후 4에 보관하면서 사용하였다.

**무포자형성 자연돌연변이 균주의 선발**

무포자균주 선발은 농업과학기술원 응용미생물과에서 수집하여 보존중인 느타리버섯 중에서 상자재배를 통해 자실체를 획득하여 포자비산량을 petri dish 상에서 수집하여 그 중에서 포자비산량이 적은 균주를 선발하였다.

**원형질체 재생에 의한 단핵화 균주 분리**

포자비산량이 적은 자연돌연변이 무포자균주의 단핵화 선발은 무포자균주 ASI 2069로 Novozyme 234 효소를 이용하여 원형질체를 분리, 재생한 후 clamp connection이 없는 균주를 단핵화 균주로 선발하였으며, 또한 상업적 가치가 높아 가장 많이 재배되고 있는 원형1호 균주를 이용하여 포자를 수확한 다음 평판배지에 도말하여 배양된 균총을 현미경으로 clamp가 없는 균사를 재차 선별하여 교배를 위한 단핵균주로 사용하였다.

**균주간 교잡**

자연돌연변이 무포자 균주인 ASI 2069로부터 선발된 단핵화 균주 중 균총형태가 다른 Nh26 및 Nh36를 이용하여 ASI2180(원형1호) 단핵균주와 대치배양하여 접합부위의 2핵균사의 형성을 보여주는 clamp 꺾쇠를 확인한 후 재차 계대배양하여 교잡체를 선발하였다.

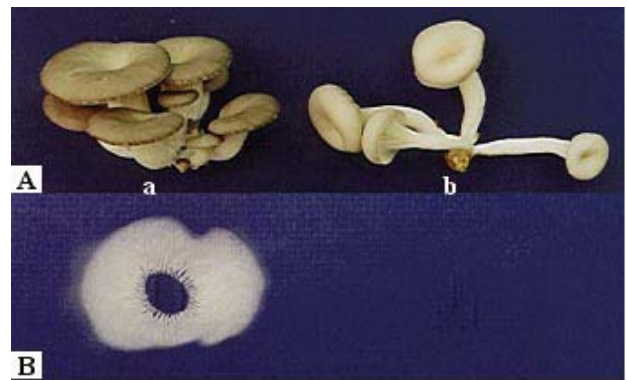
**교잡체의 자실체 및 포자형성능 검정**

선발된 교잡체를 먼저 병재배방법으로 자실체를 선발하여 그 특성을 조사하고, 그리고 수량성 조사를 위해 균상재배하였다.

**결과 및 고찰**

**무포자형성 균주의 선발 및 특성 검정**

느타리버섯 소포자형성 우량품종을 육성하기 위해서 국내외에서 수집한 균주중에서 무포자를 형성하는 ASI 2069의 자실체 형태 및 포자량을 그림1과 같이 조사한 결과 자실체가 형태적으로는 갓이 작고 대가 약해 직립하지 못하고 바닥에 드러눕는 모양을 띄고 있으며, 포자량에서는

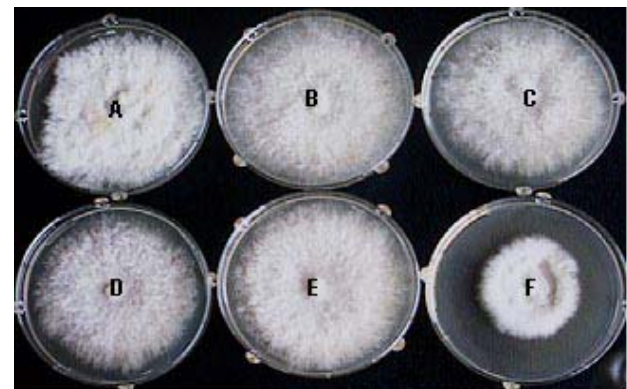


**Fig.1.** Morphological feature(A) and spore print(B) of non-sporulating *P. ostretus*. a: ASI 2001, b: ASI 2069.

포자를 형성하지 않았다. 이러한 무포자균주의 재배적 특성에서는 표1에서와 같이 수량성은 차이가 나지 않았다.

**소포자형성 교잡균주 육성**

무포자균주의 원형질체 재생에 의한 단핵화 선발은 무포자균주 ASI 2069로 Novozyme234 효소를 이용하여 원형질체를 분리, 재생한 후 clamp connection이 없는 단핵화 균주를 그림2와 같이 선발한 결과 균사생장에 있어서 크게 2가지 타입이 선발되었는데 하나는 성글면서 빠르게 성장하였고 다른 하나는 균총의 균사가 밀집되고 공중균



**Fig. 2.** Morphological features of neohaplonts isolated by protoplast reversion from non-sporulating *P. ostretus*. A: ASI 2069, B~F: Neohaplonts (Nh9, Nh15, Nh34, Nh36 and Nh26).

**Table 1.** Characterization of non-sporulating *P. ostretus* ASI 2069

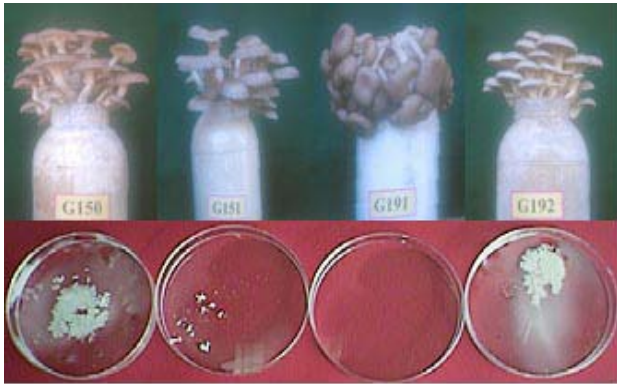
Strain (ASI)	Fruitification (Day)	Yield (g/0.185m <sup>2</sup> )	Individual weight(g)	Morphological characteristics(mm)				Cap color
				Stipe length	Stipe thickness	Cap size	Cap thickness	
2001	47	1053	5.7	16.5	11.4	43.5	7.2	Dark grey
2069	45	974	4.7	58.8	10.4	39.5	6.2	Light grey

사가 다소 있으며 느리게 성장하였다. 분리된 단핵체 2종류는 뚜렷이 균총형태가 달랐다. 이것은 표고버섯의 단핵화 균주의 균총형태와 유사하였다(Fukumasa-Nakai et al., 1994; Matsumoto et al., 1995). 분리된 단핵균주간 교배에 의하여 육성한 95개의 2핵균주에 대한 1차 병재배 시험을 통하여 표2와 같이 G135 등 30개의 우수한 균주를 선발하였다. 이들 균주의 특성에서 단핵화 균주인 Nh26과 교배했을 때 포자량이 대체적으로 많았고 Nh36과 교배한 교배체에서는 무포자 균주가 선발되는 것으로

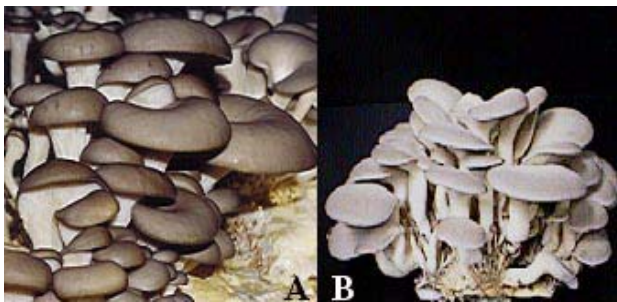
보아 Nh36 균주가 무포자형성 관련인자를 가지고 있을 것이라고 판단된다. 교배균주의 1차선발시험에서 선발된 8 균주를 대상으로 규모를 확대하여 균상재배 시험한 결과 그림3과 같이 3가지 타입으로 구분되었다. 첫째 모균주와 형태적으로 유사하면서 포자량이 많은 균주, 둘째 소포자이면서 수량이 적으나 정상인 균주, 셋째 무포자이면서 수량성이 많으나 자실체 대의 힘이 약해 드러눕는 타입으로 나눌 수 있다. Baars 등(2000)도 소포자 형성 느타리버섯을 육성하기 위해 무포자를 형성하면서 갓이 벌어진

**Table 2.** Characterization of inter-strain hybrids between monokaryon of strain ASI 2180 and neohaplonts of non-sporulating ASI 2069 in *P. ostreatus*

No. of hybrids (neohaplont x monokaryon)	Fruiting yields (g/bottle)	No. Individual	Stipe thickness	Stipe length	Cap size	Basidiospore formation
G135 (Nh26 x 2)	112	10.5	1.3	5.3	7.5	++++
G136 (Nh26 x 5)	98	7.5	1.6	4.8	8.0	++++
G137 (Nh26 x 6)	123	15.0	1.0	6.0	6.0	+
G138 (Nh26 x 7)	96	12.0	1.1	5.3	5.3	+
G139 (Nh26 x 8)	106	18.5	1.0	5.3	6.3	+++
G141 (Nh26 x 10)	190	13.0	2.2	6.0	10.5	++++
G142 (Nh26 x 14)	83	19.5	0.9	5.8	5.5	+++
G144 (Nh26 x 18)	104	26.5	1.2	5.5	6.0	++++
G145 (Nh26 x 19)	158	12.5	1.9	4.8	7.5	++++
G146 (Nh26 x 20)	112	16.5	1.3	4.0	7.0	+++
G148 (Nh26 x 26)	112	14.0	1.3	5.5	7.0	++++
G149 (Nh26 x 28)	209	14.0	1.2	3.5	7.9	++++
G150 (Nh26 x 29)	136	57.5	0.7	5.8	5.0	++
G151 (Nh26 x 31)	124	26.0	1.2	3.3	5.8	+
G152 (Nh26 x 32)	63	32.0	1.0	3.7	7.5	+++
G153 (Nh26 x 35)	137	24.5	1.0	5.0	7.5	++++
G154 (Nh26 x 36)	152	49.0	0.7	3.8	4.8	++++
G155 (Nh26 x 38)	89	6.5	1.7	5.5	7.5	+++
G157 (Nh26 x 42)	143	16.0	1.4	5.0	5.4	+
G158 (Nh26 x 43)	146	25.0	0.9	4.5	4.8	+
G159 (Nh26 x 44)	149	23.0	1.2	4.5	6.3	++++
G179 (Nh36 x 16)	75	7.0	1.4	9.0	3.8	-
G180 (Nh36 x 17)	68	28.0	1.1	6.0	2.5	+
G183 (Nh36 x 27)	77	32.0	0.8	5.2	2.8	+
G187 (Nh36 x 45)	60	22.0	1.0	4.8	3.5	++
G182 (Nh36 x 20)	74	11.0	1.2	5.3	4.8	-
G191 (Nh36 x 29)	120	63.0	1.8	5.5	4.5	-
G192 (Nh36 x 31)	143	27.0	1.2	3.8	5.9	+
G194 (Nh36 x 36)	165	51.0	0.9	4.0	4.5	-
G185 (Nh36 x 43)	80	43.5	0.9	4.8	6.5	+



**Fig. 3.** Morphology of fruitbody and spore prints from inter-strain hybrids between strain ASI 2180 and ASI 2069 in *P. ostreatus*.



**Fig. 4.** Morphology of fruitbody from inter-strain hybrids between monokaryon of strain ASI 2180 and ASI 2069 in *Pleurotus ostreatus*. A: ASI 2069, B: Hybrid G192.

ATCC 58937로부터 대가 없고 갓이 큰 유럽형 소포자 느타리를 육성하였는데 소포자형성 유형이 유사하였다. 따라서 무포자이면서 정상적인 자실체를 형성하고 수량성이 높은 품종은 육성하지 못했지만 그림4와 같이 G192균주가 소포자이면서 수량성이 좋은 균주로 선발되었다. 이 균주는 재배적 방법이 확립하여야 우량품종 육성에 유용한 육종소재로서의 가치가 있으리라 사료된다.

## 적 요

느타리버섯의 포자는 버섯재배 농업인의 호흡기계통질환인 알레르기를 유발한다. 느타리버섯의 무포자형성 균주는 재배농업인의 건강에 도움을 줄뿐 아니라 다른 재배사에 바이러스병 감염의 위험을 감소시킬 수 있다. 소포자형성 느타리버섯을 육성하기 위해 무포자형성 균주의 선발 및 특성검정 결과 ASI 2069 균주가 무포자이면서 수량성이 높으나 형태적으로 상품적 가치가 없어 원형질체 재생에 의한 단핵화를 시도하여 neohaplont를 분리하였다. 원형 1호(ASI 2180) 및 무포자 느타리간의 단핵교배 (Mon-

Mon)를 시도한 결과 128교잡체를 얻어 이 중 30균주를 특성검정한 다음 자실체형성 및 담자 포자비산량 조사에 의해 소포자형성 유망 13균주를 선발하였다. 그 중에서 G192 교잡체가 소포자이면서 수량성이 좋은 가장 우량 균주로 선발되었다.

## 인용문헌

- Baars, J.J.P., A.S.M. Sonnenberg, T.S.P. Mikosch and L.J.L.D. Van Griensven, 2000. Development of a sporeless strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, *Mushroom Sci.* 15:317-323.
- Cox, A., H.T.M. Folgering, and L.J.L.D. Van Griensven, 1988. Extrinsic allergic alveolitis caused by spores of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, *Eur. Respir. J.* 1:466-468.
- Eger, G., G. Eden and E. Wissig, 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.
- Fukumasa-Nakai Y, Matsumoto T and Komatsu M, 1994. Dedikaryotization of the shiitake mushroom, *Lentinula edodes* by the protoplast regeneration method, *J Gen Appl Microbiol.* 40: 551-562.
- Hausen BM, Schulz KH and Noster U, 1974. Allergic disease caused by the spores of an edible fungus *Pleurotus florida*, *Mushroom Sci.* 9:219-225.
- Imbernon M and Houdeau G, 1991. *Pleurotus pulmonarius* 3300 INRA-Somycel: A new poorly sporulating strain, *Mushroom Sci.* 13:555-559.
- Imbernon M and Labarere J, 1989. Selection of sporeless or poorly-spored induced mutants from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and selective breeding, *Mushroom Sci.* 12:109-123.
- Leal-Lara H, 1978. Is sporelessness in *Pleurotus ostreatus* an infectious agent? *Mushroom Sci.* 10:145-154.
- Matsumoto T, Fukumasa Y and Komatsu M, 1995. Efficient dedikaryotization of higher basidiomycetes by the protoplast regeneration method, *Rep Tottori Mycol Inst.* 33:29-33.
- Murakami S, 1993. Genetics and breeding of spore-deficient strains in *Agrocybe cylindracea* and *Lentinus edodes*, *Mushroom biology and mushroom products* (Hong Kong). 63-69.
- Sonnenberg, A.S.M., P.C.C. van Loon, and L.J.L.D. van Griensven, 1996. The number of spores spread by *Pleurotus* spp. in the air, *De Champignoncultuur* 40:269-272.
- Takemaru, T., and T. Kamada, 1971. gene control of basidiocarp development in *Coprinus macrorhizus*, *Rep. Tottori Myc. Inst.* 9:21-35.