

무포자느타리 선발을 위한 단핵화 균주의 분리 및 Spo11 마커의 이용

신평균¹, 유영복¹, 오세종², 박윤정¹, 공원식¹, 장갑열¹, 이금희^{3*}

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²국립농업과학원 유전자원센터, ³농수산식품부 국립식물검역원

Isolation of neohaplonts and application of spo11 marker to identify sporeless *Pleurotus ostreatus*

Pyung-Gyun Shin¹, Yun-Jung Park¹, Young-Bok Yoo¹, Won-Sik Kong¹,
Kab-Yeul Jang¹, and Se-Jong Oh², Keum-Hee Lee^{3*}

¹Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science,

²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science,
RDA, Suwon 441-707, Korea

³National Plant Quarantine Service, MIFAFF, Anyang 430-016, Korea

(Received December 13, 2010, Revised December 22, 2010, Accepted December 24, 2010)

ABSTRACT : For the development of a sporeless strain of *P. ostreatus* we used sporeless strain ASI 2069. We have recovered both nuclear types of strain ASI 2069 as monokaryons of nh9, nh15, nh26 and nh36 (here after 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. Five excellent strains are selected from 30 bred strains by quality of fruitbodies and spore number. To development of molecular markers linked to sporeless strain of *P. ostreatus*, we are screened helicase, recombinase(DMC1) and topoisomerase(Spo11) genes related meiosis by PCR and sequencing. Among three genes, Spo11 gene was identified into molecular marker of sporeless from neohaplonts and bred strains of *P. ostreatus*.

KEYWORDS : Neohaplont, PCR, *Pleurotus ostreatus*, Sporeless, Topoisomerase(Spo11),

서론

느타리버섯류는 맛과 향이 뛰어나 한국인의 기호에 알맞아 국내에서는 버섯총생산량의 50%를 차지하고 있다. 느타리버섯의 문제점은 생산과정의 수확기에 무수한 포자가 비산됨으로서 버섯재배농민의 호흡기계통질환인 알레르기성 질환, 안질, 기관지 천식, 기침, 가래, 오환, 몸살, 권태와 심할 경우 폐결핵, 폐염, 폐혈증 등의 증상을 유발할 수 있다 (Hausen *et al.*, 1974; Cox *et al.*, 1988). 그러나 버섯 자체는 식용시에 아무런 독성이 없고 어떠한 식품에서도 찾아볼 수 없는 고단위 영양가와 약리작용까지 고루 갖춘 식품이므로 생산자가 버섯 포자에 의한 고통을 받지 않게 하기 위해서는 재배시에 포자가 흐르지 않는 무포자 균주의 육성은 느타리 재배농민에게 가장 중요하리라 본다. 느타리버섯의 무포자형성은 재배농민의 건강에 도움을 줄뿐 아니라 바이러스병 감염의 위험도 감소된다고 알려져 있다.

일반적으로 느타리버섯의 포자는 하루에 1그램당 2억 내지 6억개가 생성되는데 이러한 포자의 형성을 억제하기

위해 초기에는 UV처리로 *Coprinus macrohus*, *Pleurotus ostreatus*, 및 *P. pulmonarius* 등에서 무포자형성 돌연변이체를 선발하였으나 자실체의 형태적 변이와 수량성이 낮아 산업적으로 이용하지 못하였다(Takemaru and Kamada, 1971; Imbernon and Labarere, 1989, 1991; Eger *et al.*, 1976). Eger and Leal Lara(1981)가 교배를 통하여 종을 거꾸로 얹어놓은 형태의 무포자느타리를 최초로 개발하여 특허로 등록하였지만 환경에 따라 기형버섯이 나오고 모양이 좋지 않아 재배되지 않고 있다. 국내에서도 김 등(1981)이 성장온도를 조절하여 무포자느타리를 육성하였지만 Eger and Leal Lara(1981)와 마찬가지로 형태적으로 정상적이지 못해 상품성이 결여되어 이 또한 재배되지 않고 있다. 최근에는 Sonenberg *et al.*(1996)은 포자의 양을 약 10배 정도를 적게 생산한다면 알레르기를 억제할 수 있다고 하여 포자량이 거의 없으나 형태적으로 보면 자실체가 비정상적으로 나오는 무포자형태보다는 자실체를 정상적으로 형성하면서 포자량이 적은 소포자형태를 선발하는 것이 유리할 것이라고 언급하였다. 이러한 방법으로 Baars *et al.*(2000)이 소포자느타리를 육종하였으나 버섯 자실체가 유럽형 기호에 맞도록 갓만 형성되고 대가 짧아 대의 쫄깃한 맛을 좋아

* Corresponding author (pgshin@korea.kr)

하는 한국인의 소비자 기호에 맞지 않다.

최근에는 감수분열에 관련된 유전자 DMC1이 포자형성에 관여한다는 것이 먹물버섯 및 느타리에서 밝혀짐에 따라 감수분열유전자 제어에 의한 무포자균주 육성에 집중하고 있다(Mikosch *et al.*, 2001; Celerin *et al.*, 2000). 이러한 무포자균주를 교배육종할 때 포자를 생성하지 않기 때문에 원형질체 분리 및 재생 방법으로 단포자를 분리하는 데 이것을 단핵화(Dedikaryotization)라고 하고, 단포자를 단핵균주(neohaplont)라 한다. 이 방법을 이용하여 느타리나 표고 등에서 품종을 육성하였다(Fukumasa-Nakai *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995; Murakami, 1993).

따라서 본 실험은 기존의 느타리버섯에서 무포자 단핵균주를 선발하여 그 특성을 구명하고, 교배를 통하여 감수분열 유전자 spo11를 이용하여 무포자균주를 스크리닝하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에 사용한 느타리버섯 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에서 수집하여 보존중인 균주중에서 재배를 통하여 자실체를 획득하여 포자비산량을 petri dish 상에서 수집하여 그 중에서 포자비산량이 적은 균주 *Pleurotus ostreatus* ASI 2069를 선발하였다. 선발된 균주를 MCM배지에서 각각 접종하여 27℃에서 4일간 계대배양한 후 4℃에 보관하면서 사용하였다.

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 및 포자형성능 검증

무포자 균주인 ASI 2069로부터 선발된 단핵화 균주 중 균총형태가 다른 Nh26 및 Nh36를 이용하여 ASI 2180(원형1호) 단핵균주와 대치배양하여 접합부위의 2핵균사의 형성을 보여주는 clamp 꺾쇠를 확인한 후 재차 계대배양하여 교잡체를 선발하였다. 선발된 교잡체를 먼저 병재배방법으로 자실체를 선발하여 그 특성을 조사하고, 그리고 포자비산량을 조사하였다.

Genome 분리 및 PCR

포자형성관련유전자의PCR를위해Baldrian*et al.*(1999)의 방법에 의해 genomic DNA를 분리하였고, 포자형성관련 유전자 Spo11의 동정을 위한 PCR primer는 NCBI BLAST 및 primer3 program를 이용하여 디자인하였고, PCR반응은 preMix reaction(Bioneer Co.)를 이용하여 PCR 증폭산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

무포자느타리 단핵화균주 및 교잡주 선발

무포자 균주를 육성하기 위해서는 우선 무포자 균주를 분리하여야 하고 그다음 단포자를 분리하여야 하는데 무포자 균주는 포자가 형성되지 않기 때문에 균주육성이 힘들다. 따라서 농업과학기술원 응용미생물과에서 수집하여 보존중인 느타리버섯 균주 중에서 재배를 통하여 자실체를 획득하여 포자문이 형성되지않은 *Pleurotus ostreatus* ASI 2069를 선발하였다(Fig. 1). 선발된 무포자 균주는 포자가 형성되지 않기 때문에 원형질체 분리 및 재생방법(단핵화)으로 단핵화 균주를 선발하였는데, 신 등(2006)의 방법에서 Novozyme 234 효소 하나만 사용하고 다른 효소를 사용하지 않은 대신에 원형질체 분리시간을 3시간에서 4시간으로 늘림으로서 원형질체 수가 약 100배정도 줄어으나 찌꺼기가 없는 깨끗한 원형질체를 분리하여 재생하였다(Fig. 2). 재생율(단핵화율)은 10.4%로 재생율은 낮으나 이러한 방법으로만이 단핵균주를 분리할 수 밖에 없는 실정이다. 분리된 단핵균주를 가지고 대치배양을 사용하여 Table 1과 같이 교배형을 결정하였다. 4개의 교배형을 모두 나타내어 그 중에서 대표적인 2균주 Nh26 및 Nh36를 이용하여 교배를 실시하여 128 교배체를 얻어 그 중 30 교잡주를 획득하였다. 이것을 이용하여 자실체 형성 및 포자 비산량 조사에 의해 표 2와 같이 13개의 유망균주를 선발하였으며 교배형 중에서 Nh36 단핵균주와 교배하였을 때 포자량이 없거나 소량 발생하는 것으로 보아 Nh36 단핵균주가 무포자 단핵균주임을 시사하고 있다.

포자형성관련유전자 분리 및 무포자균주 스크리닝

버섯 자실체가 형성될 때 갖의 주름살 밑에 포자가 만들어진다. 포자를 만들려면 반드시 감수분열 과정을 거쳐야 한다(Fig. 3). 이러한 감수분열 과정에 관여하는 많은 유전자가 있지만 대표적으로 DNA 이중가닥을 풀어주는 topoisomerase(Spo11)와 helicase(Hel), 재조합에 관여하는 recombinase(DMC1) 유전자가 깊은 관련이 있다고 알려져 있어 이에 대한 유전자를 탐색하였다. 최근 Baars *et al.*(2000)은 느타리에서 무포자 균주를 육성하여 육종기술의

Table 1. mating reaction between neohaplonts isolated from sporeless *P. ostreatus* ASI 2069

	Nh15	Nh36	Nh26	Nh34
Nh15	-	-	+	+
Nh36	-	-	+	+
Nh26	+	+	-	-(+)
Nh34	+	+	-(+)	-

Table 2. Characteristics and spore formation of hybrids between neohaplonts isolated from sporeless *P. ostreatus* ASI 2069

No. of hybrids (neohaplontxmonokaryon)	Yields (g/bottle)	Individual number	Stipe thickness	Stipe length	Cap size	Spore formation
G145 (nh26 x 19)	158	12.5	1.9	4.8	7.5	++++
G149 (nh26 x 28)	209	14.0	1.2	3.5	7.9	++++
G179 (nh36 x 16)	75	7.0	1.4	9.0	3.8	-
G182 (nh36 x 20)	74	11.0	1.2	5.3	4.8	+
G187 (nh36 x 45)	65	17.0	1.0	4.5	3.5	-
G191 (nh36 x 29)	120	63.0	1.8	5.5	4.5	+
G194 (nh36 x 36)	165	51.0	0.9	4.0	4.5	+

이용을 위해 DMC1 유전자 발현특성을 조사한 결과 무포자형성에 DMC1 유전자가 억제되었다고 하였다. 따라서 DMC1, Hel 및 Spo11 유전자를 이용하여 PCR를 시도하기 위해 프라이머를 디자인하여 PCR한 결과 DMC1 및 Hel은 모두 똑같이 증폭되어 마커로서의 사용이 어렵지만 Spo11에서는

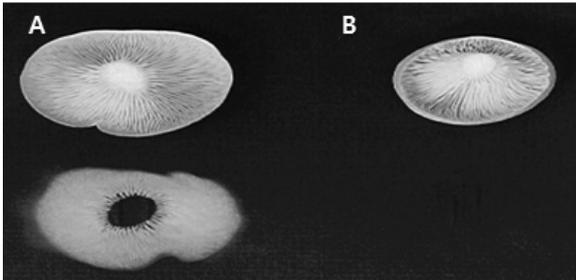


Fig. 1. Spore print color of *P. ostreatus* ASI 2001(A) and sporeless *P. ostreatus* ASI 2069(B).

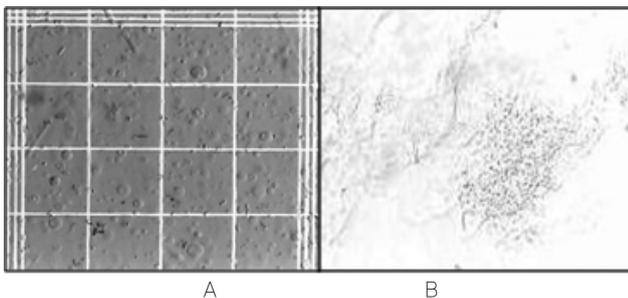


Fig. 2. Isolation of neohaplonts using protoplast isolation and regeneration method. A : Protoplasts, B : Regeneration

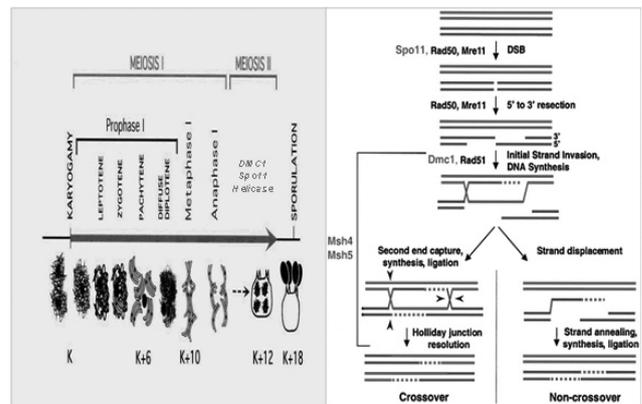


Fig. 1. Schematic of chromosome arrangements during the synchronous meiotic progression of *Coprinus cinereus* (Celerin et al, 2000).

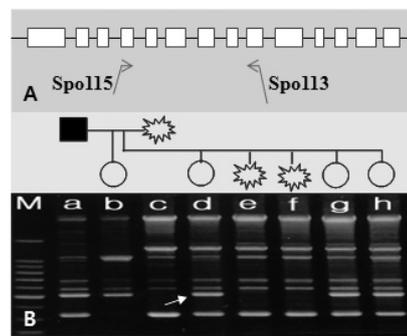


Fig. 2. Identification of Spo11 (Topoisomerase II) from hybrids of *P. ostreatus* ASI 2180 monokaryon and of sporeless *P. ostreatus* ASI 2069 protoclone. A: Spo11 primer design, B: PCR products, M: 100bp marker, a: ASI2180, b: ASI2069-Nh26, c: ASI2069-Nh36, d: G182, e: G179, f: G187, g: G191, h: G194.

차이를 보여 무포자 균주의 단핵화균주 및 교배균주를 사용하여 PCR를 시도한 결과 Fig. 4와 같이 Nh36과 교배균주 2균주에서 Spo11유전자가 증폭되지않아 Spo11유전자가 무포자 균주를 스크리닝하는데 가능하리라 시사하고 있다. 따라서 무포자 균주가 상품화되기 위해서는 꾸준한 교배와 Spo11유전자를 이용한 스크리닝방법을 동시에 수행함으로써 가능하리라 판단된다.

적 요

무포자형성 자연돌연변이 균주의 선발 및 특성검정 결과 ASI 2069 균주가 무포자이면서 수량성이 높으나 상품적 가치가 없어 원형질체 재생에 의한 단핵화로 Nh36(neohaplont 36) 등 4균주를 분리하였다. 원형1호(ASI 2180) 및 무포자느타리간의 단핵교배(Mon-Mon)를 시도한 결과 128교배조합수를 얻어 이 중 30균주를 특성 검정한 다음 자실체형성 및 포자비산량 조사에 의해 소포자형성 유망 13균주를 선발하였다. 무포자균주의 스크리닝법을 개발하기위해 포자형성 및 감수분열에 관여하는 helicase, DMC1(recombinase) 및 Spo11(topoisomerase II)유전자를 이용하여 PCR 증폭한 결과 단핵화균주 Nh36 및 교배체 2균주 중에서 Spo11유전자가 증폭되지않아 무포자 균주 스크리닝 방법으로 가능하리라 사료된다.

참고문헌

김석원, 이구철, 한봉수, 신도동. 1982. 무독성, 무포자의 느타리버섯 종균 배양 방법. 특허출원번호 특1982-0004288. 신평균, 오세중, 유영복. 2006. 느타리버섯 소포자 형성 균주 개발. 한국버섯학회지 4(2):53-56.

Baars, J.J.P., Sonnenberg, A.S.M., Mikosch T.S.P. and Van Griensven, L.J.L.D. 2000. Development of a sporeless strain of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Sci.* 15 : 317-323.

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

Celerin, M., Merino, S.T., Stone, J.E., Menzie, A.M. and Zolan, M.E. 2000. Multiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behavior. *EMBO J.* 19 : 2739-2750.

Cox, A., Folgering, H.T.M. and Van Griensven, L.J.L.D. 1988. Extrinsic allergic alveolitis caused by spores of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Eur. Respir. J.* 1 : 466-468.

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. and Leal Lara, H. 1981. Processing for preparing monokaryons by dedikaryotizing dikaryotic strains of basidiomycetes. US Patent 4242832.

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, B.M., Schulz, K.H. and Noster, U. 1974. Allergic disease caused by the spores of an edible fungus *Pleurotus florida*. *Mushroom Sci.* 9 : 219-225.

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.

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.

Mikosch, T.S., Sonnenberg, A.S. and Van Griensven, L.J.L.D. 2001. Isolation, characterization, and expression patterns of a DMC1 homolog from the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Fungal Genet Biol.* 33 : 59-66.

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., Van Loon, P.C.C. and Van Griensven, L.J.L.D. 1996. The number of spores spread by *Pleurotus* spp. in the air. *De Champignoncultuur* 40 : 269-272.

Takemaru, T. and Kamada, T. 1971. Gene control of basidiocarp development in *Coprinus macrorrhizus*. *Rep. Tottori Myc. Inst.* 9 : 21-35.