

## 감마방사선 조사에 의한 느티만가닥버섯의 변이

김종균<sup>1,4</sup> · 문덕훈<sup>1</sup> · 서건식<sup>2</sup> · 강희완<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>한경대학교 바이오·정보기술 전문대학원

<sup>2</sup>한국농수산대학 특용작물학과

<sup>3</sup>한경대학교 유전공학연구소

<sup>4</sup>JK 바이오테크 (주)

## Mutagenesis of of *Hypsizygus marmoreus* by Gamma Ray Irradiation

Jong-Kun Kim<sup>1,4</sup>, Deok-Hun Moon<sup>1</sup>, Geon-Sik Seo<sup>2</sup> and Hee-Wan Kang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Bio.&Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

<sup>2</sup>Korea National college of Agricultural and Fisheries, Bongdam, Hwaseong, Gyonggi, 445-760, Korea

<sup>3</sup>Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

<sup>4</sup>JK BioTech Co. Ltd. Gyonggi, Ansung 456-749, Korea

(Received 16, Novembr 2011., Accepted 21, November 2011)

**ABSTRACT :** This study was performed to develop new *Hypsizygus marmoreus* cultivars that have enhanced functional materials and improved physiological characteristics with mutagenesis by gamma ray irradiation. Protoplasts of *H. marmoreus* brown strain HYM-056 were irradiated by gamma ray for mutagenesis, and then 2,000 clones of mutants were randomly selected and the fruiting bodies were induced by bottle culture. Among them, 157 isolates with fast-growing, heavy and many fruiting body-producing were selected. The isolates were cultured in plastic bottle containing rice bran, barley hulls and fir sawdust to form the fruiting bodies. About 100 days after inoculation, characteristic of fruiting bodies were investigated. The isolates were divided into 6 groups based on color, shape and size of pileus, and length, diameter, number and weight of stipe. In addition, the genetic variation of the isolates was analyzed by URP-PCR fingerprinting.

**KEYWORDS :** Gamma-ray irradiation, *Hypsizygus marmoreus*, Mutagenesis

느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*)은 담자균류의 주름버섯목, 송이과에 속하는 식용버섯으로 가을철 너도밤나무 등 활엽수의 고사목과 생목에 발생하며, 주로 북반구 온대 지역에 분포한다(임 등, 2010). 현재 국내에서는 소량으로 재배되고 있으며, 일본에서는 큰느티리버섯에 이어 가장 많이 소비되고 있는 버섯이며, 중국, 대만 등에서도 대량으로 소비되고 있다. 이러한 느티만가닥버섯은 항암효과와 항동맥경화 효과가 있는 것으로 보고된 바 있고(Matsuzawa *et al.*, 1998; Mori *et al.*, 2008), 특히 여기에서 분리한 다당류는 매우 높은 항종양활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Akavia *et al.*, 2009). 또한 최근에는 혈전증, 뇌졸중, 동맥경화와 같은 심혈관계 질환에도 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되었다(Park *et al.*, 2011). 한편, 느티만가닥버섯은 조직이 치밀하여 식감이 좋고, 저장성이 좋기 때문에 수출용 버섯으로서의 가능성이 매우 크다. 그러나 이러한 장점에도 불구하고 느티만가닥버섯은 균의 성장 속도가 매우 느리기 때문에 재배기간이 100일 이상 소요되는 단점이 있어 우리

나라에서는 본격적인 재배가 되고 있지 않다. 따라서 국내에서도 새로운 품종의 개발이나 재배기술, 유용한 성분 분석 등 느티만가닥버섯에 대한 연구가 필요한 실정이다. 특히 교배 및 선발 육종을 이용한 품종 개발에는 한계가 있기 때문에 돌연변이 유발 육종, 형질전환 등이 대안으로 제시되고 있다. 그러나 형질전환과 같은 유전자 조작에 의한 품종 개발은 GMO 논란이 계속되고 있어 새로운 품종 개발을 위한 육종법으로 사용하기에는 한계가 있다. 반면 방사선 조사와 같이 무작위로 유발되는 돌연변이를 이용한 방법은 적용 방법이 비교적 단순하고 표준화된 프로세스에 의해 대량의 시료에 적용이 가능하며, 특히 유전체 상에 항생제 내성 유전자와 같은 마커를 남기지 않고, 자연계에서 일어나는 진화 과정과 유사하게 변이되며, 화학적 또는 자외선 조사 등에 의한 방법에 비해 유전적 변이가 뚜렷하게 나타나는 등 여러 가지 장점이 있다(정과 김, 2010). 따라서 본 연구에서는 감마방사선 조사를 통하여 느티만가닥버섯의 돌연변이를 유발하고, 이들 돌연변이체의 특성을 분석하여 느티만가닥버섯의 신품종을 개발하고자 하였다.

시험균주인 *H. marmoreus* HYM-056 균주는 한국농수산

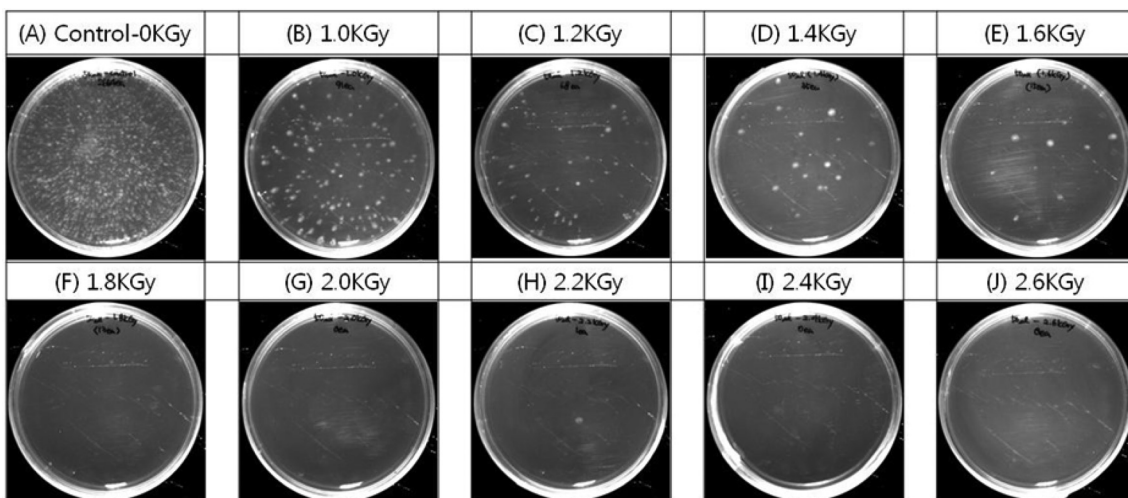
\*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

대학에서 분양받아 실험에 사용하였다. 돌연변이 유발을 위하여 시험균주의 원형질체를 나출시키고, 이를 이용하여 감마방사선을 조사하였다. 원형질체의 대량 나출을 위하여 균사생장을 빠르게 유도한 후, PDB 배지에 진탕배양한 균사체를 호모게나이저를 이용하여 마쇄하고, 이를 회수하여 24 시간 동안 배양한 다음 Glucanex<sup>R</sup> 200G (Novo Industry, Denmark)와 Cellulase R-10(Yakult Honsha, Japan)을 이용하여 원형질체를 나출시켰다(김 등, 2010). 전북 정읍에 있는 한국원자력연구원 고준위 감마선 조사장치를 이용하여 느티만가닥 버섯의 돌연변이를 유기하였다. 나출된 원형질체  $1.5 \times 10^7$  cell/ml를 1.5 ml tube에 넣고 각각 1.0 KGy에서 2.0 KGy까지 0.2 KGy 간격으로 각기 다른 감마방사선량을 처리하였고, 대조구는 0.0 KGy로 처리하였다. 각각 설정된 감마방사선량을 1시간동안 조사한 후, 0.6M의 Sorbitol이 첨가된 YPMGA 배지에 overlay하여 25°C에서 1주일간 배양하여 재생된 균사체 colony 수를 조사하였다. 느티만가닥버섯 원형질체에 감마방사선을 처리하고 균사체 재생을 조사한 결과, 1.0 KGy에서 80%의 치사율을 나타내었으며, 1.4 KGy에서는 95% 이상의 치사율을 보였고, 1.8 KGy 이상의 방사선량 처리구에서는 균사체 colony가 나타나지 않았다(Fig. 1). 이상의 결과로 볼 때 느티만가닥버섯의 원형질체 방사선 유기는 1.0~1.2 KGy 선량에서 유효한 변이체를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 버섯에 있어 감마선 또는 UV 조사에 의한 돌연변이 유기는 일반적으로 균사체를 대상으로 하였다(Lee *et al.*, 2000) 또한 변이체로부터 자실체 형성을 위해서는 교배 등의 번거로운 과정이 필요하며, 돌연변이를 유기할 때 균사체 자체를 이용할 경우 세포개체의 변이를 단정할 수 없어 원형질체를 이용하는 것이 유전적으로 단일개체를 선발하는데 유리할 것으로 사료된다.

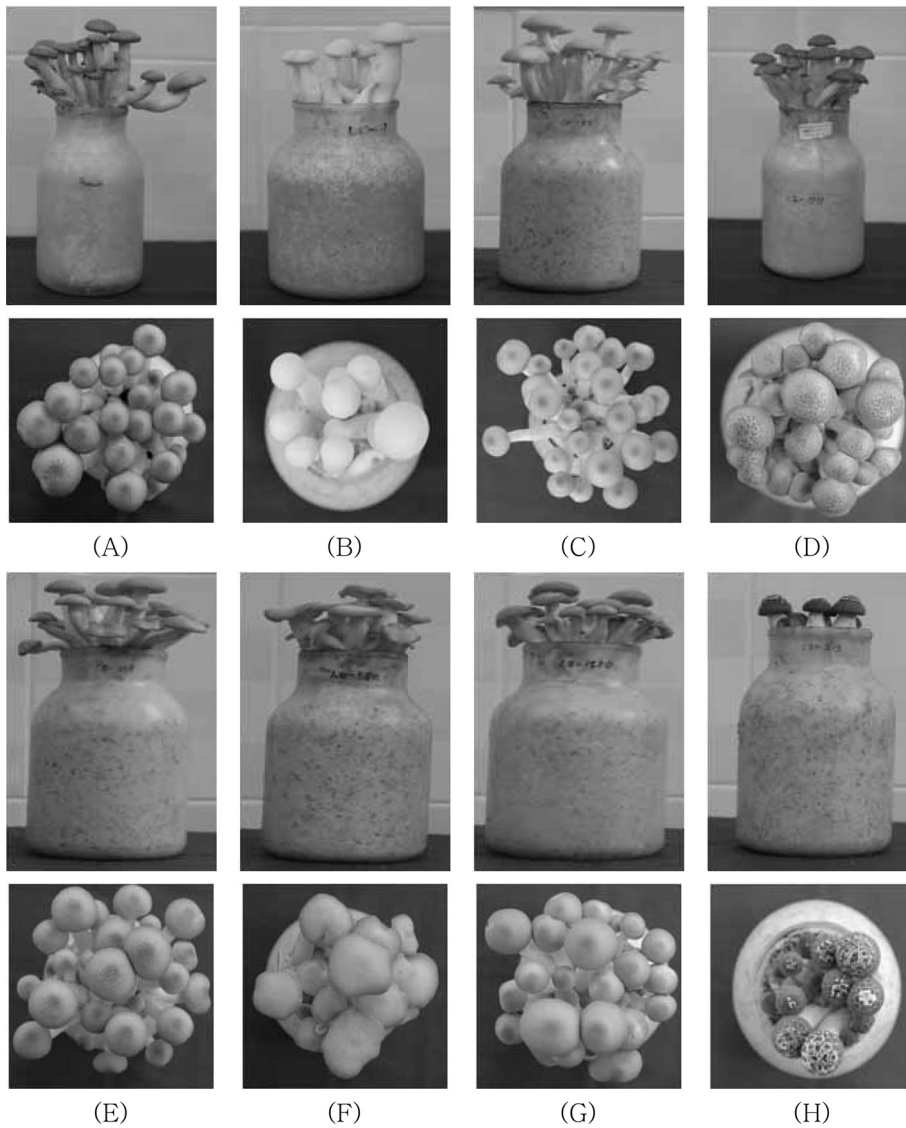
감마방사선이 조사된 원형질체로부터 재생된 균사체 colony를 2,000개 분리하여 PDA배지에 배양하고 형태적

특성을 관찰하였다. 이 중 균사 생육속도가 빠르고, 형태적 변이가 없는 균주 500개를 선발하여 자실체를 형성시켰다. 선발된 균주의 자실체를 확인하기 위하여 각각의 균주를 PDA 평판배지에 배양하였다. 10일 정도 배양한 후 agar block을 떼어내어 톱밥배지에 치상한 다음 23°C에서 배양하였다. 70일 후, 자실체 형성을 위하여 균굽기를 실시하고, 15°C에서 재배하였고, 약 100일 후 초발이를 관찰하고 수확하였다. 수확한 버섯은 갖의 색깔, 형태, 크기와 대의 길이, 직경, 대의숫자, 무게 등에 따라 6개의 그룹으로 구분하였다(Fig. 2). 1그룹은 갖과 대의 색이 밝고 갖무늬가 작으며, 2그룹은 갖과 대의 색이 어둡고 갖무늬가 크고 뚜렷한 특징이 있었고, 3그룹은 1그룹과 2그룹의 중간색을 나타내었다. 4그룹은 갖의 모양이 평평하였으며, 5그룹은 갖의 무늬가 거의 없었고, 6그룹은 자실체의 모양이 비정상적으로 퇴화된 특징이 있었다. 자실체 특성의 고정 여부 확인을 위하여 각 그룹에서 150개 균주를 재선발하여 M2 세대의 자실체를 형성시켰다. 위와 같은 방법으로 수확한 버섯을 다시 6개 그룹으로 구분한 결과, 1그룹부터 6그룹의 분포는 각각 13%, 24%, 41%, 10%, 8%, 4%로 나타났다. 여기서 42개의 균주를 다시 선발하여 M3 세대의 자실체를 형성시켜 6개의 그룹으로 구분하였고, 유전적 차이를 조사하기 위하여 PCR 핵산지문 분석을 수행하였다. M3 세대의 그룹별 분포는 1그룹부터 6그룹이 각각 16%, 5%, 58%, 11%, 5%, 5%로 나타나 M2세대와 동일하게 그룹3의 비율이 가장 높았다. 최종적으로 42개의 자실체를 비교하여 우량품종으로서의 가능성이 있는 10개의 균주를 선발하였다(Fig. 3).

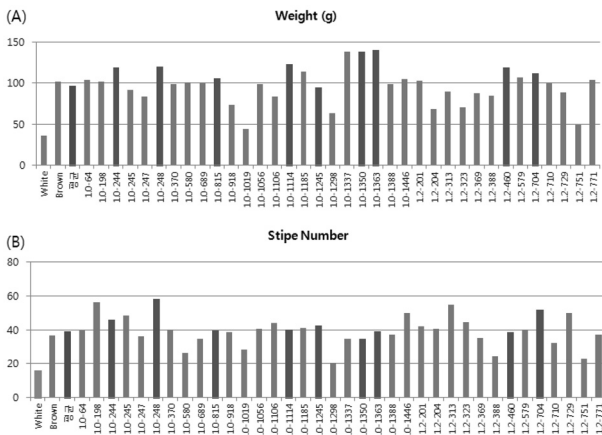
PCR 핵산지문 분석은 URP-PCR 핵산지문 Kit(JK BioTech.)에서 구입하여 제공된 프로토콜에 준하여 수행하였다. RAPD primer를 이용한 기본적인 PCR반응 조건은 100 ng정도의 DNA 5  $\mu$ l에 10 $\times$ PCR buffer(10 mM tris-HCl(pH.8.0), 50 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin) 5  $\mu$ l와 RAPD primer



**Fig. 1.** Regeneration on YPMGA medium of gamma-ray irradiated protoplasts with different intensity. (A) control, (B) 1.0 KGy, (C) 1.2 KGy, (D) 1.4 KGy, (E) 1.6 KGy, (F) 1.8 KGy, (G) 2.0 KGy, (H) 2.2 KGy, (I) 2.4 KGy, (J) 2.6 KGy.

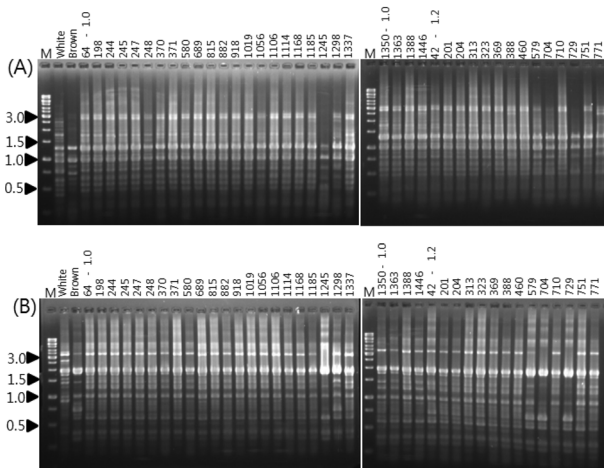


**Fig. 2.** Morphological characteristics of fruiting bodies of gamma-ray irradiated *H. marmoreus* on sawdust cultivation. (A) *H. marmoreus* HYM-056 Brown strain, (B) *H. marmoreus* HYM White strain, (C) Group 1, (D) Group 2, (E) Group 3, (F) Group 4, (G) Group 5, (H) Group 6.



**Fig. 3.** Morphological characteristics of M3 generation fruiting body of gamma irradiated *H. marmoreus* on sawdust cultivation. (A) weight, (B) stipe number.

(20pmol) 1  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 4  $\mu$ l, HQ Taq polymerase (JK BioTech.) 0.25  $\mu$ l에 멸균수로 최종 volume을 50  $\mu$ l로 하여 PCR 반응액을 만들었다. RAPD primer는 JK BioTech. 에서 구입한 2종류의 primer를 사용하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA는 1.5%의 agarose gel 상에서 50 V 전압으로 1시간 30분 동안 전기영동 한 뒤 Ethidium bromide에 염색하여 UV lamp하에서 PCR 다형성을 관찰하고 사진촬영하였다. URP-2F와 URP-6R primer를 사용하여 핵산지문 분석을 한 결과, 균주간 특이적인 차이는 없었으며, 특히 최종 선발된 10개의 균주에서도 뚜렷한 차이는 보이지 않았다 (Fig. 4). 감마방사선을 조사한 느티만가닥버섯 균사체에서 lignocellulolytic 돌연변이체를 유기하여 자실체 형성, 생장율, extracellular 효소 활성 등의 특성을 조사한 결과, 자실체 형성과 생장율은 대조구와 차이가 없었으나 extracellular 효소



**Fig. 4.** URP-PCR profile of gamma-ray irradiated *H. marmoreus*. (A) URP-2F primer, (B) URP-6R primer. M: 1 kb marker, lane 2 and 3: *H. marmoreus* white and brown, respectively, lane 4-42: mutants.

활성은 10배 높았으며 유전분석에서는 64.4%~93.3%의 상동성을 나타냈다(Lee *et al.*, 200). 따라서 감마방사선 조사에 의해 유전적으로 큰 차이는 없으나 표현형적으로 차이가 나타날 수 있음을 알 수 있다. 또한 감마선을 조사한 느타리버섯 돌연변이체에서 항산화활성이 높은 균주를 선발하여 자연 항산화제로서 의학, 식품 산업에서의 이용 가능성을 언급하였다(Djajanegara and Harsoyo, 2008). 따라서 최종 선발된 10개의 느타리버섯 균주는 유전적으로는 대조구와 차이가 없었으나 자실체의 크기와 색깔 등이 우수하여 새로운 품종으로 이용 가능성을 제시하였으며, 앞으로 유용성분 분석 등의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 적요

본 연구는 감마방사선 조사에 의해 기능성 물질이 증가하고, 생리적 특성이 증진된 느타리버섯의 새로운 품종을 개발하기 위하여 수행되었다. 돌연변이 유기를 위하여 느타리버섯의 갈색 계통 균주 HYM-056의 원형질에 감마방사선을 조사하여 2,000개의 돌연변이체를 무작위로 선발하고 병 재배하여 자실체를 형성시켰다. 이 증장속도가 빠르고, 중량이 무거우며, 자실체를 다량으로 생산하는 500개 균을 선발하였다. 선발된 균주의 자실체

형성을 위하여 미강, 보리껍질, 미송이 함유된 플라스틱 병에 재배하였다. 접종 100일 후, 자실체의 특성을 조사하였다. 그 결과 맛의 색깔, 형태, 크기와 대의 길이, 직경, 숫자, 무게 등에 따라 6개의 그룹으로 나뉘었다. 또한 URP-PCR 핵산 지문 분석으로 유전적 변이를 조사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발 사업(108100033HD110)에 의하여 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 김종근, 김진희, 공원식, 강희완. 2010. 버섯류의 원형질체 나출을 위한 고효율 효소 선발. *한국균학회지* 38(1):21-24.
- 임윤정, 이창운, 박정은, 김상우, 이현숙, 노현수. 2010. 느타리버섯의 분자유전학적 분류 및 품종특이적 DNA 마커 탐색. *한국균학회지* 38(1):34-39.
- 정해영, 김계령. 2010. 이온빔을 이용한 미생물 균주 개량. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38(3):235-243.
- Akavia, E., Beharav, A., Wasser, S. P. and Nevo, E. 2009. Disposal of agroindustrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Waste Manage.* 29(5):1622-1627.
- Djajanegara, I. and Harsoyo. 2008. White oyster mushroom (*Pleurotus florida*) mutant with altered antioxidant contents. *Biotropia* 15(1):65-73.
- Lee, Y.-K., Chang, H.-H., Kim, J.-S., Kim, J. K., and Lee, K.-S. 2000. Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. *Radiation Physics and Chemistry* 57(2):145-150.
- Matsuzawa, T., Saitoh, H., Sano, M., Tomita, I., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. 1998. Studies on antioxidant effects of *Hypsizygus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of tumorbearing mice. *Yakugaku Zasshi*, 118(10):476-481.
- Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S. and Ikeda, M. 2008. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr. Res.* 28(5):335-342.
- Park, J. Y., Oh, W.-J., Kwak, D.-M., Kim, M.-G., Seo, G.-S., Hong, S.-B. and Rhee, M. H. 2011. The anti-platelet activity of *Hypsizygus marmoreus* extract is involved in the suppression of intracellular calcium mobilization and integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11): 2369-2377.