

RESEARCH ARTICLE

***Panellus edulis* 수집 균주의 균사배양 및 자실체 특성 분석**

우성이, 유림, 장영선, 박영애, 정연석, 가강현*

국립산림과학원 산림소득자원연구과

Mycelial Culture and Fruiting Analysis of *Panellus edulis* Strains Collected in Korea

Sung-I Woo, Rhim Ryoo, Yeongseon Jang, Youngae Park, Yeun Sug Jeong, Kang-Hyeon Ka*

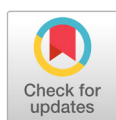
Special Forest Products Division, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

*Corresponding author: kasymbio@korea.kr

ABSTRACT

Molecular analysis using the internal transcribed spacer region sequences revealed that the strains used in this study, which were formerly identified as *Panellus serotinus*, are *Panellus edullis*. After Universal Fungal PCR Fingerprinting (UFPF) analysis, eight strains of *P. edulis* were divided into two groups. We conducted fundamental research on mycelial growth and sawdust cultivation to understand the cultural characteristics of eight wild *P. edulis* strains collected from Korean forests. All strains showed faster and denser mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) than on other media (malt extract agar, Sabouraud dextrose agar). Optimal conditions for mycelial growth were: 20°C on PDA, 25°C on potato dextrose broth (PDB), and pH 5~8 on PDB at 25°C. Two strains (NIFoS 2407, 3993) were selected as excellent strains based on mycelial growth and density on PDA. NIFoS 2792 showed high cellulase activities on carboxymethyl cellulose (CMC) agar, and NIFoS 2387 and 2804 exhibited high laccase activities on ABTS-containing agar media. The mycelial growth of *P. edulis* was the fastest on *Quercus acutissima* and *Q. mongolica* sawdust media, and mycelial density was the highest on *Quercus* spp. sawdust-containing media. Sawdust cultivation of *P. edulis* was successful. The conditions were 80~85 days of cultivation period after spawn inoculation, 10~11 days for primordial formation at 17~18°C, and 15~20 days for fruiting growth. NIFoS 2804 and 3993 were selected as good strains in terms of cultivation period and mushroom production. These results could be useful for the artificial cultivation of *P. edulis*.

Keywords: ABTS agar, CMC agar, Mushroom Production, Mycelial growth, *Panellus edulis*

**OPEN ACCESS**

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2018 September, 46(3): 281-294
<https://doi.org/10.4489/KJM.20180039>

Received: August 22, 2018

Revised: August 30, 2018

Accepted: August 30, 2018

© 2018 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

우리나라의 2016년 버섯 생산량은 186,306톤으로 표고, 느타리, 큰느타리, 팽이, 양송이 등이 1만톤

이상 생산하는 주요 품목이다[1, 2]. 우리의 주변국인 중국[3]과 일본[4]은 생산량뿐만 아니라 품목의 종류에서도 우리보다 훨씬 다양하다. 따라서 우리나라는 다양한 품목개발과 경쟁력 있는 품목의 대량생산 체계를 구축할 필요가 있다.

품목 다양성 측면에서 우리나라는 가을철 강원도를 중심으로 느타리와 매우 비슷한 ‘참부채버섯’이라는 버섯을 채취하여 식용하고 있다. 이 버섯은 식용 및 약용으로 쓰이며, 추출물에 의한 항암 활성[5]과 YAC-1 세포에서 세포독성 활성[6]도 나타내고 있다. 또한 참부채버섯은 면역력을 조절하고 혈중지질 농도를 낮추며 바이러스 작용을 억제하는 기능도 밝혀졌다[7].

참부채버섯은 동남아시아에서 흔히 볼 수 있는 식용버섯 중 하나지만 우리나라에서는 아직 인공재배가 되고 있지 않다. 우리나라와 인접한 중국과 일본도 이 버섯에 대해 관심은 있으나, 상업적인 재배가 아직 이루어지고 있지는 않다. 한편, 국립산림과학원은 2010년부터 국내 버섯자원을 체계적으로 수집하면서 야생버섯의 기초특성을 조사하고 있다[8, 9].

참부채버섯의 인공재배에 관한 연구는 미흡한 실정이고 국내 보급을 위해서는 균사배양 특성 및 적정 재배 환경을 구명하고 우량균주를 선발하는 연구가 시급한 실정이다. 본 연구에서는 국내에서 참부채버섯이라고 하여 수집한 버섯자원에 대해 Ribosomal DNA 중에서 5.8S를 포함하는 internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열을 이용하여 계통수 분석을 실시하였으며, 수집 균주 사이의 유연관계를 파악하였다. 버섯재배를 위한 기초특성을 파악하기 위해 균사배양 특성 및 재배시험을 실시하였다.

재료 및 방법

시험 균주

본 시험에 사용된 균주는 국립산림과학원(National Institute of Forest Science, NIFoS)에 보관 중인 것을 사용하였다. 사용 균주는 강원도 평창군 중왕산과 가리왕산에서 수집한 6개 균주, 경기도 구리시 동구릉에서 수집한 1개 균주와 가평군 화악산에서 수집한 1개 균주이다(Table 1, Fig. 1). 균주는 4°C 보관실에 보관 중이던 균을 감자한천 배지(potato dextrose agar, PDA)에 이식한 후 직경이 3 cm 이상 자랐을 때 균총의 가장 자리에서 직경 8 mm의 cork borer로 떼어 새로운 배지에 이식하였다. 균이 접종된 배지를 암 상태의 25°C 항온기에서 20일간 배양 후 본 시험에 사용하였다.

Genomic DNA 분리, ITS PCR 증폭 및 염기서열 분석

배양된 균사체를 동결건조 후 유발에 넣고 액체질소를 첨가하여 곱게 마쇄하였다. DNA는 DNeasy plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)를 이용하여 추출하였다. 흡광도 (optical density, O.D.)를 측정해서 template DNA 농도를 조정하였다. 본 연구에서 rDNA ITS 영역을 분리하기 위하여 28S rDNA의 5'말단과 18S rDNA의 3'말단을 포함하는 ITS 1, ITS 4 primer를 이용하였다[10]. PCR 증폭은 Accuprep PCR Premix kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였으며, Bio-Rad T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 실시하였다. PCR 반응조건은 template predenaturation는 94°C에서 5분간 반응 후 denaturation는 94°C에서 1분, annealing은 56°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분을 1 cycle로 하여, 총 35 cycle을 돌린 후 PCR 산물을 4°C에 보관하여 다음 시험에 사용하였다. PCR 산물을 1.5%의 agarose gel에서 전기영동 하였고 Dyne Loading STAR (DYNEBIO, Seongnam, Korea)로 염색하여 UV illuminator 위에서 band를 확인하였다. 증폭된

DNA는 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 실시하였다.

계통수 분석

결정된 염기서열은 미국생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 BLAST 프로그램을 사용하여 GenBank DNA 데이터베이스에 등록되어 있는 균류의 ITS 염기서열과 상동성을 비교하였다. NCBI의 GenBank에서 확인된 관련된 균류의 염기서열을 이용하여 MEGA X [11, 12]로 계통수 분석을 실시하였다. 이를 위해 neighbor-joining 방법[13]을 이용하였으며, 계통도 가지의 clade 신뢰도는 1,000번의 bootstrap resampling을 수행하여 평가하였다.

Universal Fungal PCR Fingerprinting (UFPF)에 의한 균주 간 유연관계 분석

균주 간 유연관계를 분석하기 위하여 Universal Fungal PCR Fingerprinting kit (BioTech, Ltd) 를 이용하였다. 증폭 조건은, template predenaturation는 94°C에서 5분간, denaturation는 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분간 35 cycle 한 후 72°C에서 7분간 반응시켰다. UFPF primer kit의 sequence를 이용한 PCR 결과 12개의 다형성을 보이는 band가 있으면 1, 없으면 0으로 구분하여 SIMQULA의 계수를 계산 하였고, 이 계수를 이용하여 MEGA X 프로그램의 UPGMA (Unweighted par-Group method with Arithmetic means)로 군(cluter) 분석하였다[11, 12].

배지 종류별 균사생장

사용 배지는 potato dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA), malt extract agar (MEA; Difco),

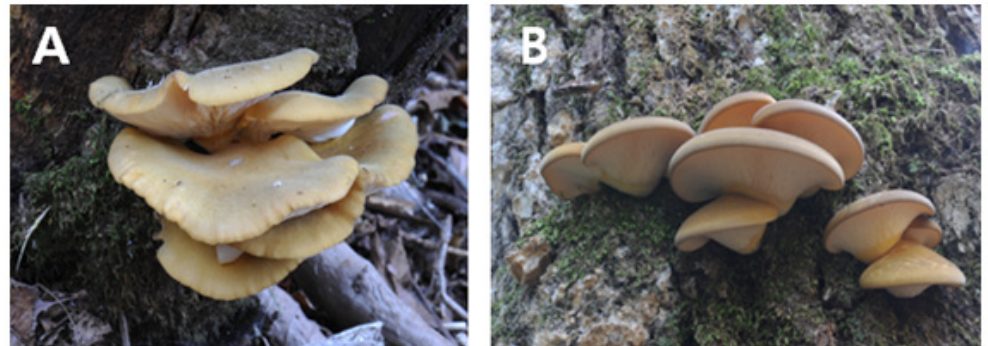


Fig. 1. Photographs of *Panellus edulis* on *Tilia* species(A) and oak tree(B).

Table 1. List of *Panellus edulis* used in this study

| NIFoS strain no. | Location of collection sites | Year | Accession no. |
|------------------|------------------------------|------|---------------|
| 2264 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2013 | MH747085 |
| 2387 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2013 | MH747086 |
| 2407 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2013 | MH747087 |
| 2792 | Guri, Gyeonggi-do | 2014 | MH747088 |
| 2803 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2014 | MH747089 |
| 2804 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2014 | MH747090 |
| 2805 | Pyeongchang, Gangwon-do | 2014 | MH747091 |
| 3993 | Gapyeong, Gyeonggi-do | 2017 | MH747092 |

NIFoS, National Institute of Forest Science.

Sabouraud dextrose agar (SDA; Difco)를 사용하였다. 배지는 고압살균(121°C, 1.2 kgf/cm², 20분) 후 무균상에서 petridish (bottom 85 mm × height 15 mm)에 20 mL를 분주하여 완전히 식힌 후 사용하였으며, 3반복으로 균을 접종하여 25°C에서 21일간 암배양 후 균사생장을 조사하였다[8].

온도별 균사생장

균주의 균사생장에 적합한 최적 온도를 구명하기 위하여 20분간 고압살균(121°C, 1.2 kgf/cm²)된 선발 배지를 petri-dish에 20 mL씩 분주하여 고체화시킨 평판배지에 접종원을 직경 8 mm인 cork borer로 절취하여 3반복 접종하고 배양온도가 각각 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C로 조절된 항온기에서 21일간 암배양 후 균층의 직경을 조사하였다[8].

pH별 균사생장

균주의 배양에 적합한 최적 pH를 알아보기 위하여 액체배지(potato dextrose broth, PDB; Difco)에 0.1 N HCl, NaOH를 이용하여 pH가 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 및 8.0가 되도록 조절하였으며, 100 mL 삼각플라스크에 20 mL씩 분주하여 20분간 고압살균(121°C, 1.2 kgf/cm²) 후 실온에서 냉각시킨 다음 접종원(ø 8 mm)을 접종하고, 25°C 항온기에서 21일간 암배양 후 균사체량을 측정하였다. 균체량은 배양액을 여과지(No.2; Whatman, Piscataway, NJ, USA)로 균사를 분리하여 건조(70°C, 2 days) 후 건조량(mg/flask)을 측정하였다[8].

버섯 균주의 CM-cellulase 활성 조사

섬유소 분해효소 cellulase의 활성을 조사하기 위해 Kasana 등[14]의 방법에 따라 carboxymethylcellulose (CMC) 1 L를 NaNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g, carboxymethylcellulose sodium salt 2 g, peptone 0.2 g, agar 15 g을 첨가하여 pH 6.0으로 조성한 후 10 mL씩 분주하여 사용하였다. CMC 배지에 공시균을 접종(ø 6 mm)한 후, 25°C에서 8일간 암배양 후 cellulase 활성을 측정하였다. cellulase 활성은 배지의 중앙에 염색시약인 Gram's iodine solution (KI 2 g, I₂ 1 g, 증류수 300 mL)을 1~2 mL씩 첨가한 후에 25°C에서 이루어졌으며, 배지 내 cellulase 비활성 영역과 활성 영역 중 투명대의 직경을 mm 단위로 측정하여 기록하였다[8].

버섯 균주의 laccase 활성 조사

리그닌 분해효소 중 하나인 laccase 활성을 조사하기 위해 Crowe와 Olsson [15]이 식물 병원성 토양진균의 laccase 활성을 검색하기 위해 사용했던 방법을 사용하였다. 무기물 혼합 농축액(K₂HPO₄ 2 g, KCl 2g, MgSO₄·7H₂O 2g, D.W. 1L, pH 5.0) 50 mL와 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 0.5487 g을 첨가하여 혼합액의 최종 부피가 1 L가 되도록 하였다. 혼합액에 한천(Bacto agar; Difco) 15 g을 첨가한 것을 20 mL씩 분주하여 고압살균(121°C, 1.2 kgf/cm², 20분) 후 사용하였다. laccase 활성은 완성된 배지에 공시균을 1개씩 접종(ø 8 mm)한 후, 25°C에서 5일간 암배양하여 관찰하였고, 접종원을 중심으로 청록색의 원형 발색대의 크기를 mm 단위로 측정하여 기록하였다[8].

톱밥배지 수종선발

배지별 균주를 선발하기 위하여 균주별로 톱밥배지에 균사생장속도를 조사하였다. 시험관 배지는 시험관 칼럼(200 × 30 mm)에 신갈나무(*Quercus mongolica*), 상수리나무(*Q. acutissima*), 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japonica*), 잣나무(*Pinus koraiensis*), 소나무(*P. densiflora*), 미루나무(*Populus*

deltoides) 등을 사용하였으며, 톱밥은 10~20 mesh 체로 친 후, 배지의 수분을 65%로 조절하였다. 수분이 조절된 배지는 용적밀도가 0.21 kg/cm²이 되도록 충전하여 90분간 고압살균(121°C)한 후 실온으로 냉각된 배지를 무균상 내에서 균을 접종하였다. 접종된 배지는 23°C로 조절된 배양실에서 50일간 배양하며 균사생장을 측정 하였으며 균사밀도를 육안으로 조사하였다.

톱밥 배지를 이용한 버섯 재배

버섯 톱밥재배에는 신갈나무 톱밥(*Q. mongolica*) 40%, 상수리나무 톱밥(*Q. acutissima*) 40%, 미강(rice bran) 20%를 재료로 하여 혼합하였고 수분함량은 65%로 맞춘 사각배지(2 kg)를 이용하였다. 제작한 배지는 121°C에서 90분간 고압살균 하여 이용하였다. 종균 접종 후 균 배양 관리는 배지온도 23°C에서 80~85일간 배양하고 이를 접종원으로 사각배지에서 균배양이 완료된 후 자실체 발생을 실시하였다.

자실체 발생 조건은 습도 85%, 실내온도 17~18°C, 광 80~120 lux 정도로 유지하여 관리하였다. 자실체의 크기와 모양이 좋고, 단단하며 상품성을 가질 수 있는 수확 적기를 조사하기 위하여 인공재배된 균주의 자실체를 생육 단계별 크기와 갓과 대를 측정하였다.

결과 및 고찰

ITS 염기서열에 의한 종속간 유연관계 분석

ITS 영역의 염기서열을 이용하여 BLAST search를 통하여 기존에 알려진 균류의 염기서열들과 비교 분석하였다. 그 결과 *Panellus edulis* AB819092 염기서열과 99%의 상동성을 나타내었다. 분석한 ITS 영역 염기서열은 NCBI의 GenBank DNA database에 등록하였고 accession 번호는 MH747085~MH747092이며 Table 1에 제시하였다.

계통수 분석은 MEGA version X [11, 12]를 이용하여 neighbor-joining 방법으로 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 본 실험에 이용한 균주들은 기존에 *Panellus edulis*로 명명된 염기서열과 단계통을 이루는 것을 확인하였다. 이 종은 2003년 중국에서 어떤 종의 갓이 황색 유형과 녹색 유형으로 나누면서 새롭게 명명된 것이다[16, 17]. 국내에서 참부채버섯이라고 알려진 종은 *Panellus serotinus*이나 본 연구에서는 확인하지 못하였으며, 이를 확인하기 위해 추후 더 광범위한 지역에서 수집한 시료를 이용한 연구가 필요하다.

UFPF 다형성 속간 유연관계 분석

UFPF PCR 분석을 위해 국내 수집 균주 8개를 비교하여 유연관계를 관찰하였다. UPGMA 방법으로, 유연관계 분석은 radiation에 정확성을 알기 위해 3번 반복하였다(Fig. 3). NIFoS 2264, 2387, 2804, 2805, 3993가 한 그룹(Group I)으로 묶였으며, NIFoS 2407, 2792, 2803가 다른 한 그룹(Group II)으로 묶였다. 평창에서 수집한 균주들은 Group I과 Group II에 고르게 분포하는 것을 확인하였으며, 가평에서 수집한 균주(NIFoS 3993)는 Group I에 묶였지만 평창에서 수집한 균주들과 따로 떨어져 있는 모습을 나타내었으며, 구리에서 수집한 균주(NIFoS 2792)는 평창에서 수집한 균주와 그룹을 형성하였다. 품종 개발은 다양한 변이를 지닌 균주를 요구하기 때문에 보유하고 있는 유전자원에서 상업적으로 사용되는 품종의 분류가 더욱 중요하다[18]. 위 실험 내용을 근거로 국내 *P. edulis*의 야생 수집 균주를 인공재배하여 이를 토대로 추후에 우수한 품종으로 활용될 것이라 기대된다.

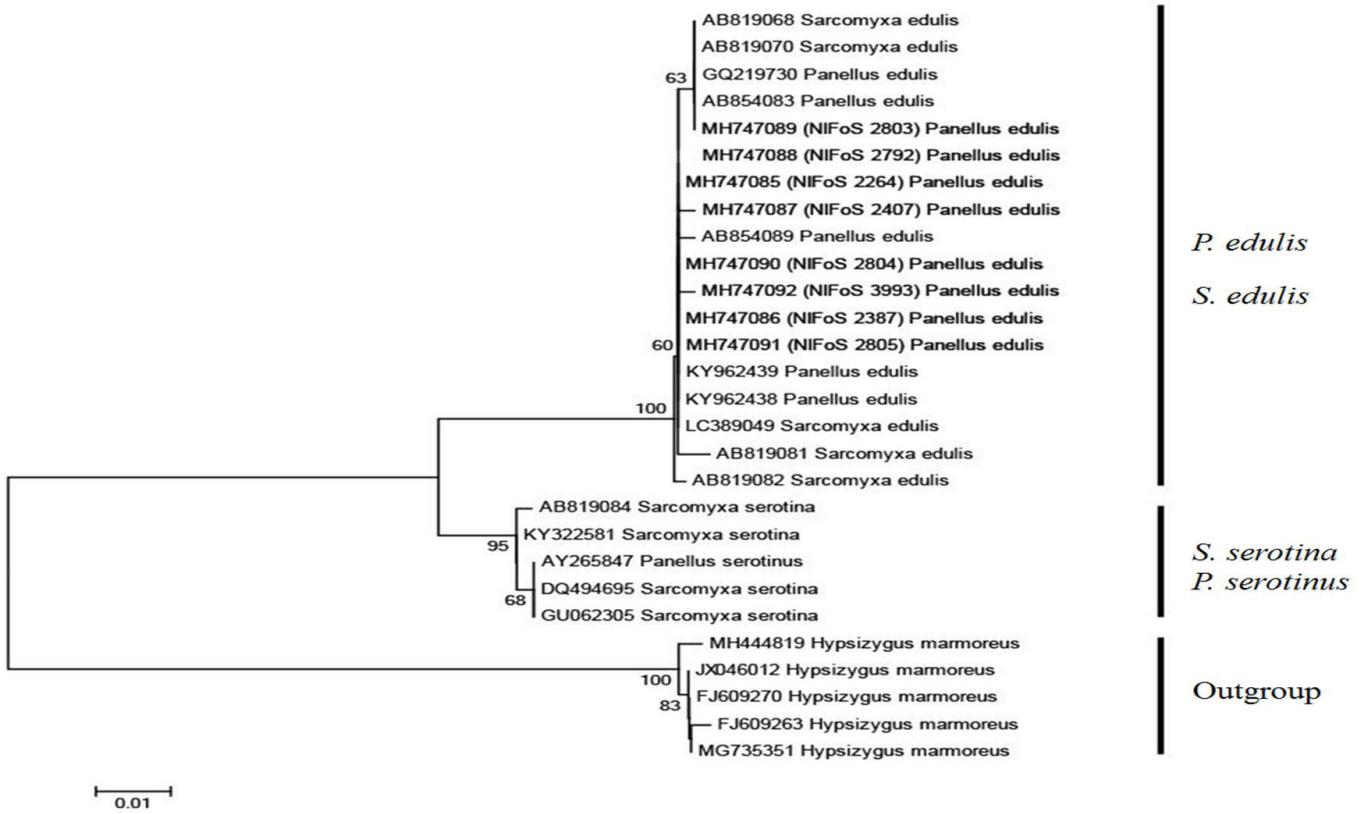


Fig. 2. Neighbor-joining tree inferred from the internal transcribed spacer (ITS) sequences of eight Korean *Panellus edulis* strains. Bootstrap value is presented on the line. The accession numbers of the representative specimens are marked. Fungal strains used in this study are bold.

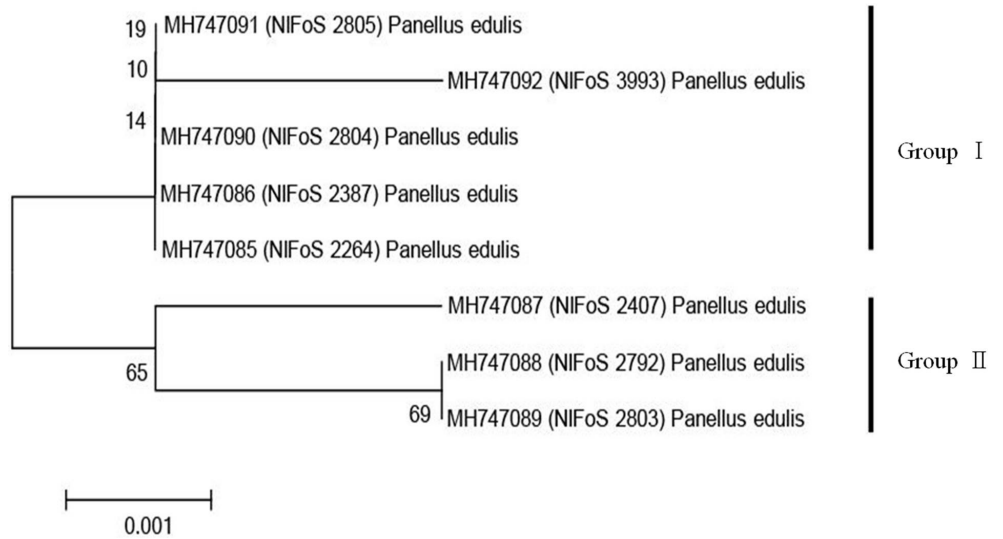


Fig. 3. Dendrogram of *Panellus edulis* strains used in this study based on Universal Fungal PCR Fingerprinting analysis with random primers.

배지 종류별 균사생장

8개의 *P. edulis* 균주는 모두 PDA 배지에서 균사생장이 가장 좋았으며 다음으로 SDA 배지였고, MEA 배지에서 생장이 가장 저조하였다(Table 2, Fig. 4), PDA 배지에서는 NIFoS 2407, 3993 균주의 균사생장속도가 가장 빠른 것으로 나타났고 SDA 배지에서도 같은 결과로 나타났다.

온도별 균사생장

대부분 균주에서는 10°C 저온성과 30°C 고온성에서 균사 생장력이 낮은 것으로 조사되었다(Table 3, Fig. 5). 버섯 균들은 저온, 고온 환경에 대한 적응력이 많이 떨어지는 것을 알 수 있었다. NIFoS 2264 균주는 온도에 상관 없이 모두 균사생장이 저조하였다. 또한 NIFoS 2407, 2805의 경우에는 균층의 가장자리가 불규칙한 형태를 이루며 균사가 성장하는 특성이 관찰되었다. NIFoS 2387에서 최적 온도 범위는 15~20°C였고, NIFoS 3993의 최적 온도 범위는 20~25°C 이었다. *P. edulis*의 온도별 균사생

Table 2. Mycelial growth of *Panellus edulis* strains on three different solid media

| NIFoS strain no. | PDA | MEA | SDA | Optimum medium |
|------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| 2264 | 26.6±1.6 ^a | 3.6±3.2 ^c | 20.7±0.8 ^b | PDA |
| 2387 | 63.7±7.3 ^a | 0 ^b | 0 ^b | PDA |
| 2407 | 79.0±0 ^a | 4.3±1.5 ^c | 41.4±0.1 ^b | PDA |
| 2792 | 12.2±0.4 ^a | 0 ^b | 7.2±0.4 ^c | PDA |
| 2803 | 36.8±1.9 ^a | 3.7±0.3 ^b | 26.4±2.5 ^a | PDA, SDA |
| 2804 | 72.0±1.9 ^a | 5.5±0.2 ^c | 40.1±2.1 ^b | PDA |
| 2805 | 24.5±1.3 ^a | 7.6±0.2 ^c | 12.0±0.6 ^b | PDA |
| 3993 | 79.0±0 ^a | 6.7±0.3 ^b | 46.4±2.5 ^c | PDA |

NIFoS, National Institute of Forest Science; PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar; SDA, Sabouraud dextrose agar.

All strains were incubated on plates at 25°C for 21 days.

Different letters in the same column indicate significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test ($n = 3$).

The values are mean ± SD of three replicates.

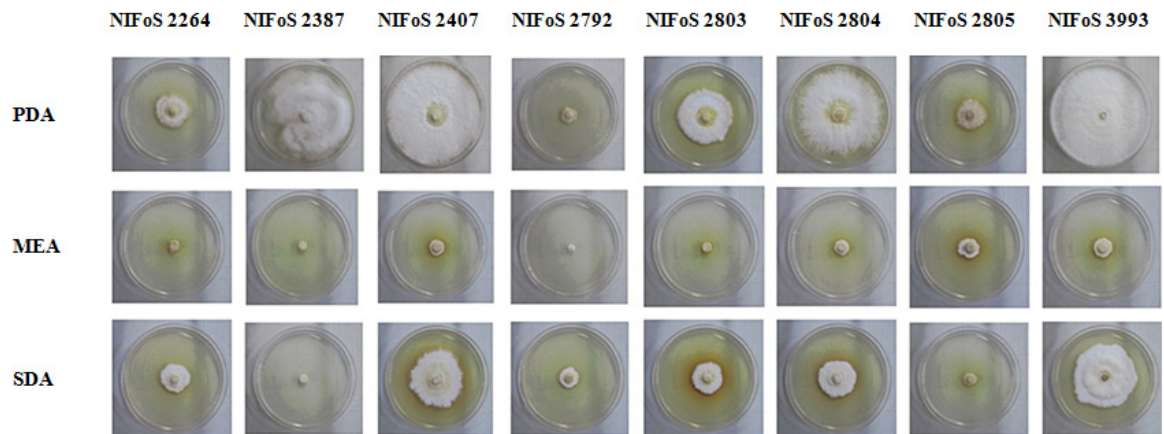


Fig. 4. Morphological characteristics of *Panellus edulis* grown on different solid media (bottom size: 85 mm in diameter). NIFoS, National Institute of Forest Science; PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar; SDA, Sabouraud dextrose agar.

장은 15~25°C에서 양호하였으며, 그 중 25°C에서 균총의 크기가 가장 크게 나타나 균이 성장하기에 최적 온도임을 알 수 있었다. 이 버섯은 늦은 가을에 발생하는 버섯으로 생태적인 영향을 반영한 결과로 생각된다[8].

pH별 군사생장

배양 21일 후 PDB 액체배지의 pH에 따른 군사량을 조사한 결과(Table 4) 성장 및 밀도를 고려하면 pH 6.0이 배지의 최적 산도로 조사 되었다. 이러한 군사 특징은 조사한 8균주중 5균주에서 두드러지며, 시험균의 pH 6.0인 배지에서 가장 많은 군사체량을 생산한 균주는 NIFoS 2805로, 151.7 mg/flask로 나타났다. 그중 가장 뚜렷한 것은 NIFoS 2804는 pH 5.0에서, NIFoS 2803, 2805는 pH 6.0로 나타났다. 예외적으로 NIFoS 2407은 pH 8.0에서, NIFoS 2264, 2387, 3993는 pH에 균체량에 영향을 받

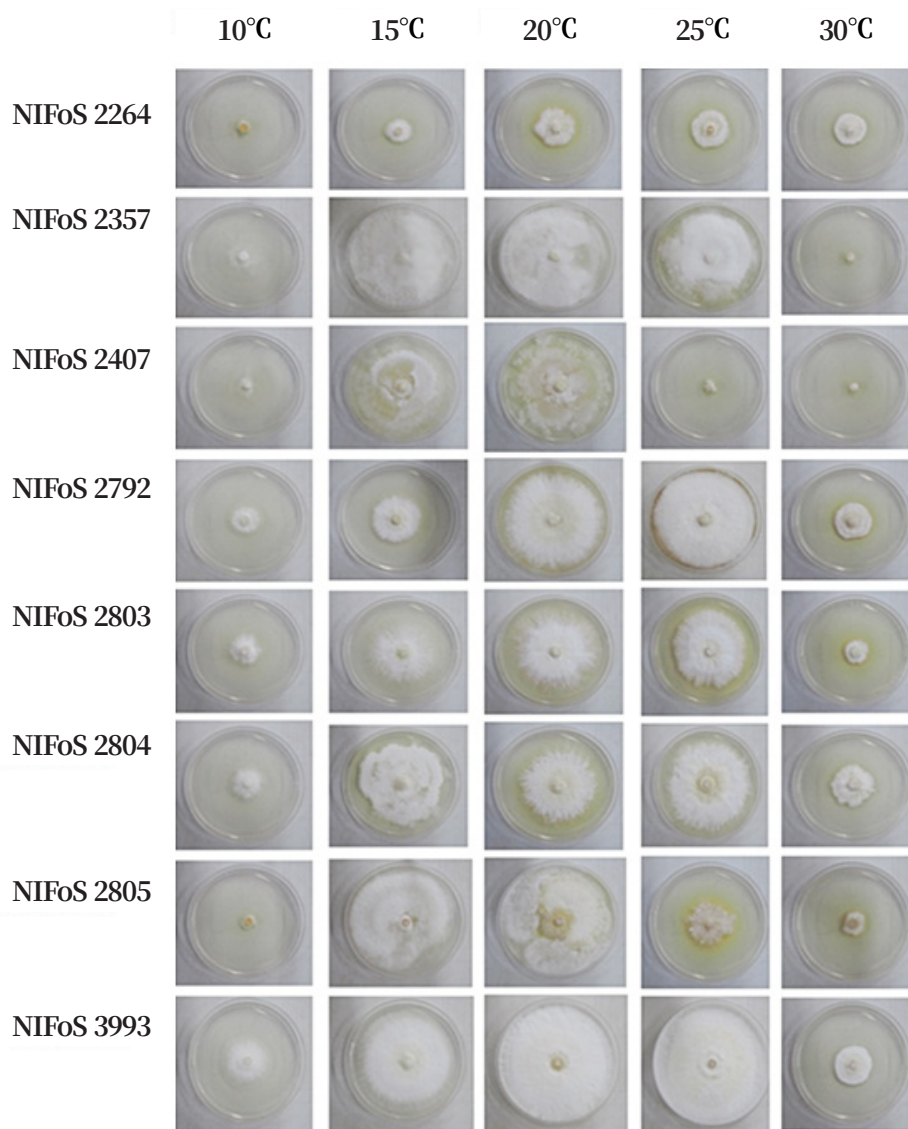


Fig. 5. Morphological characteristics of *Panellus edulis* on potato dextrose agar at different temperatures. NIFoS, National Institute of Forest Science.

지 않았다.

pH 6.0값의 배지에서 상당히 잘 자라는 균들이 같은 농도에서 세포외 다당체 및 균체의 생산도 높다는 것이 보고되었다[19].

버섯 균주의 cellulase 활성

버섯의 셀룰라아제(cellulase)는 섬유소를 당(sugar)으로 가수분해하는 반응을 촉매하는 효소로[14], Carboxymethylcellulose (CMC)는 미생물에 의해 빨리 가수분해 된다. Cellulase 생산 균주를 검색하는데 유용하게 사용되기 때문에[20] 상업적인 측면에서 높은 활용 가치를 갖고 있다. 이와 같은 CMC agar plate에서 균을 접종하고 25°C에서 8일간 배양하여 조사하였다(Table 5, Fig. 6).

CM-cellulase 활성은 균주 중 NIFoS 2264, 2407, 2792에서 발색대의 크기가 30 mm 이상, 발색 강도가 strong (+++)으로 다른 균주들에 비해 높게 나타났다. 반면 NIFoS 2387, 2804에서는 13 mm 이하, 발색 강도가 weak (+)로 비교적 낮은 효소 활성이 나타났다. 이는 CMC agar plate 상에서는 CM-cellulase 활성과 균사생장과 같은 비례적인 관계에 있지 않을 수도 있다는 것을 제시하였다[8]. 또한 여기에서 사용한 cellulase 활성 검색법은 균주 간 cellulase 활성을 수치적으로 비교할 수 있었고, 무

Table 3. Mycelial growth of *Panellus edulis* on PDA at different temperatures

| NIFoS strain no. | 10°C | 15°C | 20°C | 25°C | 30°C | Optimum temperature (°C) |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 2264 | 3.6 ± 1.1 ^e | 15.2 ± 1.0 ^d | 30.5 ± 1.7 ^a | 26.2 ± 0.8 ^b | 25.6 ± 0.9 ^c | 20 |
| 2387 | 42.0 ± 5.0 ^c | 79.0 ± 0 ^a | 79.0 ± 0 ^a | 71.6 ± 2.5 ^b | 0 ^d | 15~20 |
| 2407 | 44.3 ± 1.8 ^b | 78.3 ± 0.7 ^a | 77.4 ± 1.2 ^a | 5.8 ± 0.4 ^c | 0 ^d | 15~20 |
| 2792 | 19.2 ± 0.5 ^e | 51.4 ± 2.4 ^c | 72.0 ± 0.1 ^b | 79.0 ± 0 ^a | 24.6 ± 0.3 ^d | 25 |
| 2803 | 25.8 ± 0.4 ^d | 37.7 ± 1.1 ^c | 65.1 ± 2.6 ^a | 56.7 ± 1.0 ^b | 12.1 ± 0.1 ^e | 20 |
| 2804 | 24.6 ± 6.3 ^c | 68.1 ± 1.6 ^a | 47.2 ± 3.3 ^b | 67.2 ± 3.8 ^a | 25.8 ± 3.2 ^d | 15, 25 |
| 2805 | 3.7 ± 0.7 ^e | 75.5 ± 3.0 ^b | 79.0 ± 0 ^a | 34.6 ± 0.4 ^c | 14.4 ± 1.7 ^d | 20 |
| 3993 | 32.5 ± 0.7 ^c | 72.4 ± 0.6 ^b | 79.0 ± 0 ^a | 79.0 ± 0 ^a | 22.9 ± 0.7 ^d | 20~25 |

NIFoS, National Institute of Forest Science; PDA, potato dextrose agar.

All strains were incubated on PDA plates (pH 5.0, 85 mm in diameter) at different temperatures for 21 days.

Different letters in the same column indicate significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test ($n = 3$).

The values (except for the inoculum size, 6 mm in diameter) are mean ± SD of three replicates.

Table 4. Mycelial growth of *Panellus edulis* in liquid media with different initial pH values

| NIFoS strain no. | pH 4 | pH 5 | pH 6 | pH 7 | pH 8 | Optimum pH |
|------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|------------|
| 2264 | 58.0 ± 6.0 ^c | 64.0 ± 0 ^c | 84.7 ± 4.7 ^a | 66.7 ± 5.5 ^b | 81.7 ± 2.1 ^a | 6, 8 |
| 2387 | 45.0 ± 4.4 ^{ab} | 53.7 ± 2.3 ^a | 36.0 ± 16.6 ^b | 47.0 ± 7.9 ^{ab} | 47.0 ± 5.3 ^{ab} | 4, 5, 7, 8 |
| 2407 | 69.7 ± 0.6 ^b | 69.7 ± 0.6 ^b | 68.7 ± 7.6 ^b | 60.3 ± 7.5 ^b | 80.3 ± 4.0 ^a | 8 |
| 2792 | 80.3 ± 7.0 ^c | 80.3 ± 7.0 ^b | 94.3 ± 9.1 ^a | 93.3 ± 2.5 ^a | 91.0 ± 5.3 ^{ab} | 6-8 |
| 2803 | 64.3 ± 8.7 ^d | 67.7 ± 12.9 ^{cd} | 100.3 ± 7.0 ^a | 85.3 ± 3.5 ^b | 81.3 ± 3.2 ^{bc} | 6 |
| 2804 | 72.0 ± 5.6 ^b | 86.7 ± 15.1 ^a | 56.7 ± 28.0 ^{bc} | 62.3 ± 8.1 ^{bc} | 54.3 ± 1.5 ^c | 5 |
| 2805 | 123.0 ± 10.1 ^{bc} | 131.7 ± 10.1 ^b | 151.7 ± 9.2 ^a | 104.0 ± 4.4 ^c | 113.7 ± 4.7 ^{bc} | 6 |
| 3993 | 80.3 ± 0.6 ^{bc} | 80.3 ± 0.6 ^{bc} | 84.0 ± 5.0 ^{ab} | 85.0 ± 8.7 ^a | 75.3 ± 3.1 ^c | 6-7 |

NIFoS, National Institute of Forest Science.

Strains were grown in potato dextrose broth 20 mL adjusted to various pH values for 60 days at 25°C.

The values (including the weight of inoculum) are mean ± SD of three replicates.

Different letters in the same column indicate significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test ($n = 5$).

엇보다 여러 종류의 버섯 균주를 대상으로 cellulase 생산 유무를 판별해야 하는 경우에는 간편하고 유용한 방법이 될 수 있다.

버섯 균주의 laccase 활성

*P. edulis*의 리그닌 분해력을 조사하기 위해 ABTS agar plate 상에 laccase 활성을 조사하고, 균을 접종하여 25°C에서 5일간 배양하였다(Table 6, Fig. 6). 이 실험에서 NIFoS 2387, 2804는 laccase 활성의 발색대의 크기가 40 mm 이상, 발색 강도가 strong (+++)로 높은 활성을 나타냈다. NIFoS 3993은 발색대의 크기가 18 mm 이상, 발색 강도가 weak (+)로 나타나 비교적 낮은 활성을 보였고, 나머지 균주들은 laccase 활성의 발색 강도는 moderate (++)로 활성을 보였다.

Cellulase 활성이 높은 균주는 NIFoS 2264, 2407, 2792와 활성이 낮은 균주는 NIFoS 2387, 2804로 확인되었는데, 이 결과는 laccase 활성이 높은 균주와는 반대의 결과를 얻었다. Cellulase의 활성이 높은 균주가 laccase 활성이 높은 것으로 보고되기도 하였으나[8], *P. edulis*는 그렇지 않아 균주의 분해효소들의 작용 기작에 대해 더 연구할 필요가 있었다.

톱밥배지 수종 선별

톱밥배지 시험관에서 수종별로 50일간 균사생장 속도를 조사한 결과, NIFoS 2804균주는 신갈나무

Table 5. Cellulase activity and mycelial growth of *Panellus edulis* on CMC agar

| NIFoS strain no. | Mycelial growth (mm) | CM-cellulase activity (mm) | Indexer activity | Chromogenic intensity |
|------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 2264 | 7.7 ± 0.2 ^b | 30.7 ± 0.4 ^b | 4.0 ± 0.1 ^{cd} | +++ |
| 2387 | 6.0 ± 0 ^c | 12.4 ± 0.7 ^f | 2.0 ± 0.7 ^f | + |
| 2407 | 10.6 ± 0.7 ^a | 30.8 ± 1.4 ^b | 2.9 ± 0.1 ^c | +++ |
| 2792 | 7.3 ± 0.5 ^b | 35.6 ± 1.7 ^a | 4.9 ± 0.3 ^a | +++ |
| 2803 | 6.2 ± 0.2 ^c | 26.6 ± 1.1 ^c | 4.3 ± 0.3 ^b | ++ |
| 2804 | 0 ^d | 10.0 ± 0 ^g | 0 ^g | + |
| 2805 | 6.0 ± 0 ^c | 25.2 ± 0.7 ^d | 4.2 ± 0.1 ^{bc} | ++ |
| 3993 | 6.0 ± 0 ^c | 22.6 ± 1.2 ^e | 3.8 ± 0.2 ^{cd} | ++ |

NIFoS, National Institute of Forest Science; CMC, carboxymethylcellulose; +, weak; ++, moderate; +++, strong. Strains were incubated on solid agar media containing 0.2% (w/v) CMC with pH 6.0 at 25°C for 8day. The CM-cellulase activity agar plate (55 mm in diameter) of cellulolytic zone only. The values (cellulolytic zone only) are mean ± SD (n = 3) of three replicates.

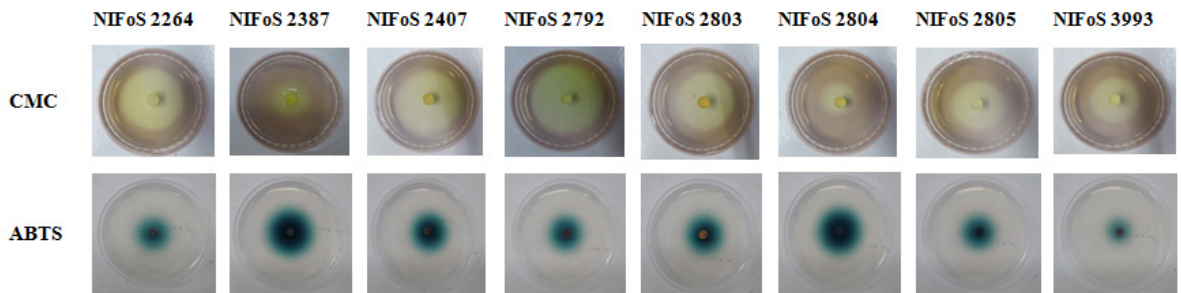


Fig. 6. *Panellus edulis* strains showing CM-cellulase activities on carboxymethylcellulose (CMC) agar and laccase activities on 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) agar.

톱밥에서 148.1 ± 2.6 mm/50 day이며 가장 균사 속도가 양호하였고 다른 톱밥 종류에서도 124.5 mm/50 day 이상으로 균사의 성장형태가 균일하였다. NIFoS 3993균주는 소나무 톱밥배지의 평균 균사생장은 143.7 ± 1.1 mm/50 day로 균사생장이 가장 높았다. 그 반면 균사배양 시 NIFoS 2387의 형태상으로는 균사의 성장 형태가 불규칙하고 톱밥 배지에서도 생장이 늦은 것이 많았다. 시험관 내 미루나무 톱밥은 빠르게 성장하였지만 균사밀도가 낮은 것을 알 수 있었다. *P. edulis* 버섯 인공재배를 위한 적정 배지 재료로 대체적으로 모든 균주에서 높은 성장량을 보인 상수리나무와 신갈나무 톱밥을 선발하였다(Table 7).

자실체 특성 및 우수 균주 선발

P. edulis 우수 균주를 선발하기 위하여 신갈나무 톱밥(*Q. mongolica*) 40%, 상수리나무 톱밥(*Q. acutissima*) 40%, 미강(Rice bran) 20%를 재료로 하여 2 kg 사각형 배지를 제작하고 균주를 접종하였다. 균사배양적온은 23°C 이며 배양기간은 접종 후 80~85일이 소요되었다. 원기형성은 10~11일이 소요되었고 수확까지의 자실체 생육기간은 $17\sim 18^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 15~20일 소요되었다. 사각배지에서 8개 균주를 재배하여 수량을 조사한 결과(Table 8) 버섯의 색깔 및 버섯 형태에 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). *P. edulis*는 갓색이 노랑색과 녹색으로 구분되어 있고[17], 자실체 주요 특성에서 갓색

Table 6. Laccase activity and mycelial growth of *Panellus edulis* on ABTS agar

| NIFoS strain no. | Mycelial growth (mm) | Laccase activity (mm) | Indexer activity | Chromogenic intensity |
|------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| 2264 | 6.0 ± 0^a | 21.7 ± 5.6^c | 3.6 ± 0.9^c | ++ |
| 2387 | 6.0 ± 0^a | 42.5 ± 1.7^a | 7.1 ± 0.3^a | +++ |
| 2407 | 6.0 ± 0^a | 22.6 ± 4.5^c | 3.8 ± 0.8^c | ++ |
| 2792 | 6.0 ± 0^a | 14.9 ± 6.8^d | 2.5 ± 1.1^d | ++ |
| 2803 | 6.0 ± 0^a | 32.0 ± 2.0^b | 6.9 ± 0.3^a | ++ |
| 2804 | 6.0 ± 0^a | 41.7 ± 5.8^a | 5.3 ± 1.0^b | +++ |
| 2805 | 6.0 ± 0^a | 19.8 ± 9.4^c | 3.3 ± 1.6^c | ++ |
| 3993 | 6.0 ± 0^a | 17.5 ± 0.3^d | 2.9 ± 0.5^d | + |

NIFoS, National Institute of Forest Science; ABTS, 2, 2'-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid; +, weak; ++, moderate; +++, strong. Strains were incubated on are medium containing ABTS agar plate (85 mm in diameter) for 5 days at 25°C .

Laccase activity was determined by the sizes of both chromogenic (blue-green) zone including the 6 mm in diameter of inoculant.

The values are mean \pm SD (n = 3) of three replicates.

Table 7. Mycelial growth of *Panellus edulis* on different sawdust media

| NIFoS strain no. | <i>Quercus mongolica</i> | <i>Quercus acutissima</i> | <i>Betula platyphylla</i> var. <i>japonica</i> | <i>Pinus koraiensis</i> | <i>Pinus densiflora</i> | <i>Populus deltoides</i> |
|------------------|--------------------------|---------------------------|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| NIFoS 2264 | 129.3 ± 2.0^b | 139.6 ± 3.3^a | 100.6 ± 2.6^c | 85.3 ± 9.2^d | 108.5 ± 3.1^c | 126.0 ± 1.3^b |
| NIFoS 2387 | 136.9 ± 1.2^a | 137.5 ± 4.1^a | 99.9 ± 1.5^c | 93.8 ± 0.6^d | 133.0 ± 1.2^a | 129.4 ± 0.6^b |
| NIFoS 2407 | 145.0 ± 0.8^a | 144.1 ± 0.9^a | 112.0 ± 3.4^c | 113.1 ± 3.3^c | 130.7 ± 6.0^b | 130.5 ± 3.1^b |
| NIFoS 2792 | 124.9 ± 1.9^b | 141.8 ± 1.4^a | 112.0 ± 3.4^c | 118.8 ± 2.0^{bc} | 140.8 ± 0.7^a | 125.4 ± 8.2^b |
| NIFoS 2803 | 142.9 ± 2.2^a | 138.9 ± 2.0^a | 114.7 ± 3.1^c | 115.6 ± 1.7^c | 143.1 ± 0.7^a | 127.7 ± 0.7^b |
| NIFoS 2804 | 148.1 ± 2.6^a | 140.6 ± 0.4^a | 122.8 ± 5.5^b | 101.9 ± 4.5^c | 120.2 ± 3.7^b | 126.6 ± 3.5^b |
| NIFoS 2805 | 143.6 ± 1.2^a | 141.7 ± 2.4^a | 124.5 ± 2.1^b | 124.5 ± 2.0^b | 124.5 ± 1.9^a | 124.5 ± 1.8^b |
| NIFoS 3993 | 141.3 ± 1.3^a | 142.9 ± 0.5^a | 112.0 ± 1.7^d | 117.9 ± 0.4^c | 143.7 ± 1.1^a | 130.4 ± 0.9^b |

NIFoS, National Institute of Forest Science.

Colony diameter (mm) after 50 days of incubation at 25°C .

The values (including the weight of inoculum) are mean \pm SD of three replicates.

Different letters in the same column indicate significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test (n = 3).

이 녹색인 NIFoS 2804는 갓직경 44.5 ± 1.8 mm, 갓두께 8.8 ± 0.9 mm, 대길이 48.2 ± 3.8 mm, 대두께 15.6 ± 0.3 mm, 무게 332.2 ± 35.8 g 이었고, 그 다음에는 갓색이 녹색인 NIFoS 3993에서 무게 289.2 ± 14.8 g로 두 번째로 수량이 높았다. 노랑색인 NIFoS 2792는 갓직경 50.1 ± 9.4 mm, 갓두께 4.3 ± 0.1 mm, 대길이 29.5 ± 2.2 mm, 대두께 19.2 ± 1.5 mm, 무게 270.1 ± 2.0 g이었다. 이와 같이 재배적 특성 및 품질을 고려하였을 때 갓색이 녹색인 NIFoS 2804, 3993균주와 노랑색인 NIFoS 2792는 우수한 특성을 나타내었다(Table 2, Table 8).

적요

국내에서 참부채버섯(*Panellus serotinus*)으로 수집한 8균주의 internal transcribed spacer 영역 염기서열을 이용하여 계통분석을 실시한 결과 참부채버섯이 아닌 *Panellus edulis*로 나타났다. Universal Fungal PCR Fingerprinting (UFPF) 분석결과 *P. edulis* 8균주는 크게 두 그룹으로 나뉘었다. 우리나라 산림에 서식하는 8개 균주의 배양특성을 이해하기 위해 균사의 성장과 효소 활성에 대한 기초특성 연구를 수행했다. 모든 균주는 21일 동안 3종류 배지를 사용하여 배양하였고 생장이 적합한 배지는 malt extract agar (MEA), Sabouraud dextrose agar (SDA) 배지보다 potato dextrose agar (PDA)로, 빠른 균사 생장 및 균사 밀도를 보였다. *P. edulis* 균주의 균사 생육 조건은 PDA에서는 20°C, potato dextrose broth (PDB)에서는 25°C가 선발되었으며, 균사생장에 적합한 수소이온 농도가 PDB는 pH 5~8로 이때 균사생장이 영향을 받지 않았다. 두 균주(NIFoS 2792, 2804)는 PDA의 균사 생장 및 밀도를 기준으로 우수한 균주로 선정되었다. 모든 균주는 셀룰라아제와 라카아제 활성을 나타내었고 NIFoS 2407과 2805는 다른 균주보다 높은 효소 활성을 보였다. 그 중에서도 라카아제 활성은 NIFoS

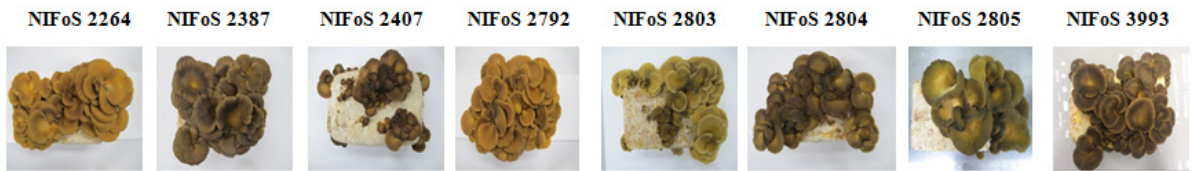


Fig. 7. Fruiting bodies of *Panellus edulis* on sawdust cultivation.

Table 8. Morphological characters of *Panellus edulis* fruiting bodies on sawdust cultivation

| NIFoS strain no. | Pileus | | Gill | | Stipe | | Fresh weight (ea) | Weight (2kg) | Pileus color |
|------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------|
| | Diameter (mm) | Thickness (mm) | Width (mm) | Number (ea) | Length (mm) | Diameter (mm) | | | |
| 2264 | 47.9±3.4 ^{cd} | 4.9±0.4 ^d | 3.8±0.7 ^d | 15.8±0.5 ^d | 27.1±4.9 ^c | 14.4±0.2 ^{bc} | 4.1±1.1 ^f | 188.1±1.8 ^{ef} | Dark Yellow |
| 2387 | 59.8±4.4 ^a | 4.8±0.4 ^d | 4.9±0.2 ^{bc} | 17.4±1.0 ^d | 19.7±1.7 ^c | 11.7±0.4 ^{cd} | 4.9±0.8 ^{ef} | 200.1±9.5 ^{ef} | Dark Green |
| 2407 | 53.7±10.1 ^{ab} | 4.8±1.1 ^c | 5.1±0.5 ^b | 21.6±4.1 ^b | 17.1±4.7 ^e | 11.1±4.7 ^{cd} | 5.1±1.9 ^{de} | 179.9±16.7 ^f | Green |
| 2792 | 50.1±9.4 ^{bc} | 4.3±0.1 ^d | 4.3±0.1 ^{cd} | 20.0±1.6 ^c | 29.5±2.2 ^c | 19.2±1.5 ^a | 3.8±0.7 ^f | 270.1±2.0 ^{bc} | Dark Yellow |
| 2803 | 44.4±8.9 ^{cd} | 5.7±1.1 ^{bc} | 4.1±1.2 ^{cd} | 19.6±2.4 ^c | 22.6±5.1 ^d | 11.1±0.8 ^c | 6.2±1.9 ^d | 222.9±9.9 ^{de} | Yellow |
| 2804 | 44.5±1.8 ^d | 8.8±0.9 ^a | 4.5±0.6 ^{bc} | 20.6±0.9 ^c | 48.2±3.8 ^a | 15.6±0.3 ^b | 12.4±1.0 ^c | 332.2±35.8 ^a | Green |
| 2805 | 59.4±3.7 ^a | 5.6±1.7 ^b | 3.2±0.6 ^e | 26.0±0.8 ^a | 32.3±1.8 ^{bc} | 13.1±0.8 ^{bc} | 13.8±0.4 ^b | 215.1±95.8 ^{cd} | Green |
| 3993 | 57.3±4.0 ^{ab} | 8.5±0.8 ^a | 6.6±0.1 ^a | 19.0±2.1 ^c | 34.3±2.8 ^b | 15.3±0.1 ^b | 15.8±0.5 ^a | 289.2±14.8 ^b | Green |

NIFoS, National Institute of Forest Science.

The values (including the weight of inoculum) are mean ± SD of three replicates.

Different letters in the same column indicate significant difference at $p < 0.05$ according to Duncan's multiple range test (n = 3).

2387이었고 모든 균주는 셀룰라아제를 생산하였다. 톱밥 종류별 시험에서 상수리나무와 신갈나무에서 균사생장속도가 다른 톱밥에서보다 좋았고 균사 밀도도 가장 양호하였다. 버섯의 톱밥재배는 23°C에서 균 접종 후 80~85일간 배양하였고, 원기형성 온도는 17~18°C에서 10~11일간, 자실체 생육은 15~20일간 수행하였다. 버섯 재배 결과, 배양기간과 수량 면에서 NIFoS 2804, NIFoS 3993 균주가 가장 양호한 균주로 선발되었다. 이러한 결과는 추후 *P. edulis*의 인공재배를 하는데 유용한 정보로 활용 될 수 있을 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant (FP 0801-2010-01-2018) from the National Institute of Forest Science, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Korea Forest Service. 2017 Statistical Yearbook of Forestry. Daejeon: Korea Forest Service; 2017.
2. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2016 Production of Special Crops. Sejong: Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs; 2018.
3. Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. 2017 Status of Mushroom Market in China [Internet]. Naju: Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation; 2017 [cited 2018 August 4]. Available from: https://www.kati.net/board/exportNewsView.do?board_seq=85177&menu_dept2=35&menu_dept3=71.
4. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Mushroom production [Internet]. Tokyo: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries; 2018 [cited 2018 August 4]. Available from: <http://www.maff.go.jp/j/tokei/sihyo/data/25.html>.
5. Kim JH, Lee JS, Lee KR, Shim MJ, Lee MW, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, Lee TS. Immunomodulating and antitumor activities of *Panellus serotinus* polysaccharides. *Mycobiology* 2012;40:181-8.
6. Lee JS, Oka K, Watanabe O, Hara H, Ishizuka S. Immunomodulatory effect of mushrooms on cytotoxic activity and cytokine production of intestinal propria leukocytes does not necessarily depend on β -glucan contents. *Food Chem* 2011;126:1521-6.
7. Nagao K, Inoue N, Inafuku M, Shirouchi B, Morooka T, Nomura S, Nagamori N, Yanagita T. Mukitake mushroom (*Panellus serotinus*) alleviates nonalcoholic fatty liver disease through the suppression of monocyte chemoattractant protein 1 production in db/db mice. *J Nutr Biochem* 2010;21:418-23.
8. Jeon SM, Ka KH. Mycelial growth and extracellular enzyme activities of wood-decaying mushroom strains on solid media. *Kor J Mycol* 2014;42:40-9.
9. Jeon SM, Kim MS, Ka KH. Effects of medium, temperature and pH on mycelial growth and cellulase activity of ectomycorrhizal fungi from Korean forests. *Kor J Mycol* 2012;40:191-203.
10. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press; 1990. p. 315-22.

11. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013;30:2725-9.
12. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547-9.
13. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
14. Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbiol* 2008;57:503-7.
15. Crowe JD, Olsson S. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2088-94.
16. Dai YC, Niemelä T, Qin GF. Changbai wood-rooting fungi 14. A new pleurotoid species *Panellus edulis*. *Ann Bot Fenn* 2003;40:107-12.
17. Saito T, Tonouchi A, Harada Y. Biological characteristics and molecular phylogeny of *Sarcomyxa edulis* comb. Nov. and *S. serotina*. *Trans Mycol Soc Jpn* 2014;55:19-28.
18. Nam Y, Kong WS, Jang KY, Shin PG, Oh MJ, Im IH, Koo CD, Oh YL. Analysis of Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in cultivars and collected strains of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *J Mushrooms* 2017;15:139-44.
19. Lee BC, Bae JT, Pyo HB, Choe TB, Kim SW, Hwang HJ, Yun JW. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme Microb Technol* 2004;35:369-76.
20. Hankin L, Anagnostakis SL. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulose activity of micro-organisms. *J Gen Microbiol* 1977;98:109-15.