

과제구분	기본연구	Code : LS 0116	수행구분	전반기	연구기간	'03(완결)
연구과제명	버섯 신품종 육성 연구				연구책임자	홍대기
세부과제명	느타리버섯 신품종 육성 및 균주보존방법 구명시험					
연구원별임무						
구분	소 속		성 명		담 당 임 무	
세부과제책임자	강원도농업기술원농산물이용시험장		홍대기		과제총괄 및 배지제조	
공동연구자	"		박영학		원형질분리 및 검경	
	"		김경희		연구방향 설정	
	강원대학교 미생물학과		이세원		연구자문	
색인용어	느타리버섯, 원형질분리, 1핵 균사					

ABSTRACT

This study was carried out to develop neohaplonts for strains conservation and making spawns of *Pleurotus ostreatus*, oyster mushroom. Protoplasts were isolated from dikaryotic mycelium and regenerated selection rate of neohaplonts was 15.0%.

1. 연구배경

2002년 국내 전체 버섯생산량중 느타리버섯이 51.1%, 팽이버섯이 26.9%, 양송이가 15.0%

로 대부분을 차지하고 있다. 특히 느타리버섯은 국내에서 가장 많이 재배되며 농가소득에 매우 주요한 역할을 하는 경제작물이다. 경제적인 가치가 있는 버섯의 유전자원을 보존시 자체의 유전적 변이의 방지와 환경적 영향으로부터의 보호가 중요하다(Lee et al., 1998).

버섯류의 보존은 보통 균사체 계대배양에 의하며, 이러한 균사체를 계대배양하는 보존법이 안정성이 높다(Lambert, 1959). 그러나 균사체가 성장하는 중에도 균총과 균사내에 심한 유전적 또는 물리적 변화가 생길 수 있으며(Peng and Wu, 1972), 계대배양의 횟수가 많아질수록 균주가 퇴화하고 균주의 유전적 변화가 심하며 생존율이 저조해진다(Lee et al., 1999). 특히 느타리버섯은 보존 및 계대배양을 계속할 경우 핵간의 재조합, 치환 등 변이유발 가능성이 높아 품종 고유의 특성을 장기간 보존하기 위해서는 2핵보다는 1핵 형태로 분리 보존하는 것이 효과적으로 알려져 있다.(강 등, 2002).

현재 재배되고 있는 느타리버섯은 이핵체 균사형태로서 계대배양하여 재배되고 있으나 이러한 계대배양하여 재배된 품종은 활력이 저하되어 자실체의 상품가치가 저하되는 심각한 문제점이 발생되며, 이와 같은 이핵체 품종은 반복적인 계대배양을 통해 이핵체 종균균사의 동일 세포내의 이웃하는 2개 핵간의 유전적 상호작용에 의한 간접적인 대립유전자 재조합이 우수한 유전형질의 보존을 불가능하게 하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 느타리버섯의 일핵체성 순수 유전형(교배형)을 확보할 경우, 필요시 교배하여 품종의 순수성 및 자실체 생산능력을 보존할 수 있으므로, 본 실험은 느타리버섯의 원형질분리를 통하여 균사체를 핵형별로 분리함으로써 우량한 균주보존 및 필요한 경우에 1핵 균사의 교배를 통한 우수활력 품종을 보존, 제공할 수 있도록 시험한 결과이다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주

2002년 농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양받은 원형3호느타리버섯균 (*Pleurotus ostreatus* : 2핵균주)을 PDA배지에 접종하여 계대배양하여 증식하였다.

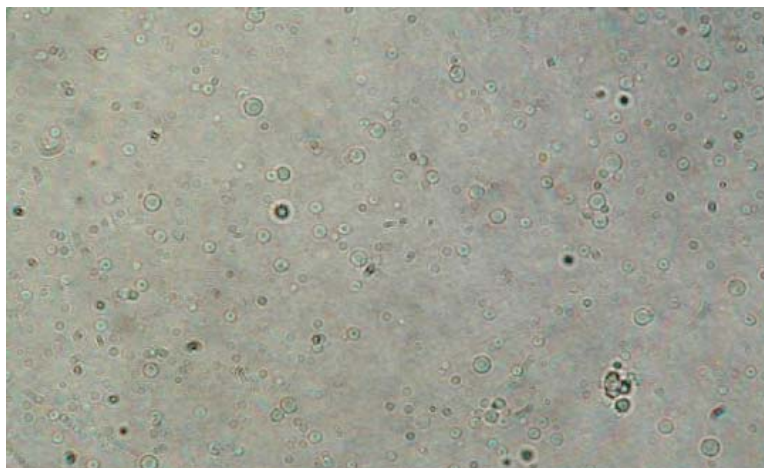
나. 원형질 분리

증류수 200ml에 sucrose 6g, yeast extract 2g을 녹여 액체배양액을 만들고 삼각플라스크 2개에 나눠 담아 살균한 다음 미리 배양해 둔 가.의 원균조각을 배양액에 넣어 25℃, 3일간 진탕배양한 후 펠렛을 얻어서 웨어링블랜더에 3~4회 갈아 25℃에서 1일간 배양하였다..

배양액을 실온에서 8분간 2,700rpm으로 원심분리하여 상등액을 버리고 0.6M sucrose 용액을 넣고 다시 원심분리를 2회 4℃에서 10분간 6000~7000rpm으로 실시하였으며 0.6M sucrose 용액에 lysing enzyme으로 Novozyme234를 1mg/ml 농도로 희석하여 효소액을 조제하여 100ml 삼각플라스크에 효소액을 10ml 넣고 원심분리된 균사체를 소량 떼어 넣고 진탕배양기로 25℃에서 2시간 동안 80~100rpm으로 배양하여 원형질체를 추출한 후 현미경으로 조사하였다. 0.6M의 sucrose 용액에 1.5%로 PDA를 넣어 패트리디쉬에 배지를 미리 제조하였으며 거즈를 채우고 솜으로 입구를 막은 후 살균한 초자Filtration 용기에 원형질체추출 효소액을 여과한 후 0.8% agar와 0.16M sucrose를 살균한 것이 45℃정도(균기전)도될때 여과된 효소액을 혼합한 후, 미리 제조한 PDA배지에 떨어뜨리고 도말하고 5일 후 분리배양된 균사를 채취하여 새로운 PDA 배지에 접종하고 7일 후 균사를 현미경으로 관찰하여 꺾쇠(Clamp connection)이 없는 1핵 균사를 계수하였다.

3. 결과 및 고찰

느타리버섯의 우량균주 보존을 위하여 균사체를 1핵 및 2핵균주로 분리하기위해 2핵 균사체를 세포벽 분해효소인 Lysing enzyme(Novozyme 234)를 처리하여, 결과는 <그림 1>과 같다.



<그림 1> 원형3호느타리버섯의 원형질체

0.6M의 sucrose 용액에 PDA를 1.5%로 넣어 제조한 페트리디쉬 배지에 재생시킨 균총에서 1핵 균사를 선발한 결과<표 1>, 1핵 균사 선발 비율은 15%였다.

<표 1> 원형질체 분리에 의한 1핵 균사 선발비율

품 종	검경균총수	1핵 균사 균총수	1핵 균사 선발비율(%)
원형3호느타리버섯	27	4	15.0

Matsumoto 등(1995) 느타리버섯 등 13개 균주에 대하여 원형질체를 재생하여 단핵균주를 확인한 결과, 단핵균주의 비율이 44~97%라고 한 바 있고, Yoo 등(1987)은 *Pleurotus spodoleucus*에서 48.76%의 많은 단핵 균주를 분리한 바 있으나, *Lyophyllum ulmarium* 에서는 4.475로 단핵균주의 비율이 낮다고 하였다. 그리고 Zhao 등(1993)은 *Coprinus cinereus* 등 6종 8균주에서 46.0~70.1%의 단핵균주를 선발하였으며 Fox 등(1994)은 *L. edodes*에서 단핵균주의 재생율이 매우 낮다고 하였으며 김 등(2004)은 영지버섯의 2핵 균주에서 원형질체를 분리, 재생하여 선발된 단핵균주(neohaplont)의 균주간 평균 선발율이 5.24%였다고 하였다. 본 시험 결과는 특히 Yoo 등(1987)이 *Pleurotus spodoleucus*에서 48.76%의 많은 단핵 균주를 분리한 결과와 비교하면 버섯종별로 neohaplonts의 선발율은 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다.

느타리버섯의 균사체 계대배양에 따른 유전적 변이양상을 조사한 결과, 2핵 균사가 1핵 균사보다 균사생장속도가 빨랐으며, 균사생장 속도가 빠른 균주가 느린 균주보다 유전적인 변이가 많이 나타나며, 유사성 조사에서도 이핵균사는 57.5%, 1핵 균사는 85.7%를 보여 유전적으로 변이가 적었으며 원형질체 분리 및 재생에 의한 1핵균주의 선발은 자실체를 발생키지 않고 균사체로부터 직접 1핵 균주를 선발할 수 있기 때문에 유전적으로 안정적이고 신품종 육성에도 시간을 절약할 수 있는 새로운 방법이라는 결과(강 등, 2002)를 고려할 때 동일한 배양조건에서 2핵 균사로 배양·보존하는 것보다 1핵 균사로 배양·보존하는 것이 종균 제조와 육종에 유리한 것으로 사료되었다. 본 시험 결과, 1핵 균사를 선발하였기에 1핵 균사간 교배를 하여 균사접합 3일 후 현미경으로 관찰하여 1핵 균사들의 교배형을 결정하여 상호 접합성의 두 2핵 균사를 얻어 균사의 배양횟수 및 보존온도별 균사활력 및 수량성을 검토할 경우 우량균주 보존방법 및 품종육성의 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

4. 적 요

느타리버섯 우량균주 보존방법 구명을 위해 시험한 결과는 다음과 같다.

- 가. 원형3호느타리버섯 2핵균사체를 원형질체 분리 및 재생방법으로 1핵 균사를 선발한 결과, 선발율은 15%이었다.
- 나. 우량균주 보존을 위한 계대배양 횟수 및 보존온도별 균사활력 및 수량성을 검토할 수 있는 1핵 균사를 획득하였다.

5. 인용문헌

강경홍, 송주희, 김홍남. 2002. 느타리버섯속(*Pleurotus* spp)의 계대배양에 따른 유전적 변이. 한국균학회지 30(1) : 23~30

김경수, 공원식, 최선규, 유창현, 고미석, 서건식. 2004. 원형질체 분리에 의한 영지버섯 균주의 육종소재 개발. 한국버섯학회지. 2(1) : 33-37

- Fox, H. M., Burden, J., Chang, S. T. and Peberdy, J. F. 1994.** Mating-type incompatibility between commercial strains of *Lentinus edodes*. *Experiment Mycology* 18 : 18 : 95-102
- Lambert, E. B. 1959.** Improving spawn cultures of cultivated mushroom. *Mushroom Science* 4: 33-51
- Lee, D. H., Km, C. J. and Shin, K. S. 1998.** Preservation of mushroom cultures in sterile distilled water. *Korean J. Mycology* 26 : 91-96
- Lee, Y. H., Chi, J. H. Kim, Y. H. and Yu, S. H. 1999.** Comparison in productivity of *Pleurotus ostreatus* sawdust spawn under different storage conditions. *Korean J. Mycology* 27 : 39-321
- Matsumoto, T., Fukumasa-Nakai, Y. and Komatu, M. 1995.** Efficient dikaryotization of basidiomycetes by the protoplast regeneration method. *Rep. Totorri Mycol. Inst.* 3 : 29-33
- Peng, J. T. and Wu, L. C. 1972.** Variations in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 8 : 103-113
- Yoo Y. B., Lee. Y. H., Yeo, U. H., Um, S. D., Cha, D. Y. and Park, Y. H. 1987.** Selection of neohaplont in some edible fungi by protoplast reversion. *Korean. J. Mycology.* 15(1) : 38-41
- Zhao, J. and Chang, S. T. 1993.** Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9 : 538-543

6. 연구결과 활용제목

- 군사핵형별 계대배양 횟수 및 보존온도별 효과적인 균주보존--(기초자료활용, '04)