THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 25, No 2, p111-120 June 1997
Printed in S. KOREA
Copyright © 1997 by The Korean Society of Mycology

팽나무버섯(*Flammulina velutipes*) 단포자 분리주의 유전적 변이성

공원식* · 김동현[1] · 김영호 · 김경수 · 유창현 · 변명옥 · 김광호[2]
*농업과학기술원, [1]고려대학교 자연자원대학원, [2]건국대 농학과

Genetic Variability of *Flammulina velutipes* Monosporous Isolates

Won-Sik Kong*, Dong-Hyun Kim[1], Young-Ho Kim*, Kyoung-Soo Kim*, Chang-Hyun You*, Myung-Ok Byun* and Kwang-Ho Kim[2]
*National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-707
[1]Natural Resouces Graduate School, Korea University, Seoul 136-701
[2]Department of Agronomy, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

ABSTRACT: The characteristics of monosporous isolates of winter mushroom [*Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.)] were investigated to obtain useful breeding materials. Within monokaryons from cultivars which have a white colored fruitbody showed narrow genetic variation, while domestic strains which have a brown colored fruitbody showed wide variation. The mating type of the white strains was A1A2B1B2 genotype, but that of the domestic brown strains were A3A4B3B4. In intra-crossing, the genetic stability of dikaryons mated by monokaryons from white strain was less than that of parents. While in brown strain, dikaryons with high yield and color variation were obtained.

KEYWORDS: *Flammulina velutipes*, Genetic variability, Intra-crossing, Monosporous isolate

팽나무 버섯[*Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.)]은 씹는 맛이 좋으며, 단백질 함량이 높고, 항암효과, 혈중 cholesterol 저하 효과 등이 인정되어 (Komatsu 등, 1963; Lin 등, 1974) 생산과 소비가 급격히 증가하고 있다. 이 버섯의 균사 생장 최적온도는 22~25°C, 자실체 형성 최적온도는 14~17°C이다. 야생종은 재배종과 다소 차이가 있는데 야생종은 자실체 색이 황갈색 내지 밤색이고 갓 직경과 대의 굵기가 크며, 대가 짧은 반면, 재배종은 자실체가 백색 내지 담황백색이고 갓크기는 10 mm 이하, 대길이는 100~140 mm, 대직경은 2~4 mm 정도이다.

대개 담자균의 동형핵균사(homokaryotic mycelium)는 세포당 하나의 유전자형으로 된 1개의 핵을 가지며 이 homokaryon은 영양생장을 주로 하는데, 때로는 단핵이지만 자실체를 형성하기도 한다(Brodie, 1936). 단핵에서 형성된 자실체는 한 개 유전자(mf+)에 의해 유도되며, 자실체 형성 유전자(fb+)나 modifier 유전자(mod+)에 의해 그 형태가 결정된다(Esser 등, 1975). 정상적인 이핵 자실체 형성 과정은 불화합성 유전자를 가진 1핵균사가 서로 화합성인 균사와 융합하고 꺽쇠연결체(clamp connection)를 형성하여 이형핵균사(heterokaryotic hypae)를 형성한다(Ingold, 1991).

한편 야생에서 얻은 팽나무버섯의 검정계통은 다른 불화합성 인자와 다양한 특성을 가지고 있기 때문에 이 계통에서 우량 단핵계통을 선발하고, 선발된 단핵주를 이용하여 군간교배 및 군내교배로 다양한 변이체를 얻고자 노력하고 있다(Lee와 Kinugawa, 1981; 1982). 발이능력은 genome에 분산된 다수의 유전자에 의해 나타나고 균사생장이 좋은 것이 발이능력도 좋으며, 영양생장이 나쁜 것은 생산능력도 낮다고 하였다(Lee와 Kinugawa, 1981). 버들송이(*Agrocybe aegelita*)에서는 이핵균사의 발이능력과 단핵균사의 발이간에는 유의상관이 있다는 보고도 있다(Esser 등, 1974). 양송이(*Agaricus bis-*

*Corresponding author

porus)에서는 단포자 기원의 균사체 선발에 의해 미국에서 재배되고 있는 품종보다 생산량이 높은 12계통을 얻었다(Kneebone 등, 1977). 치마버섯의 발이능력 유전에 대한 연구에서 발이능력은 genome에 분산된 다수의 유전자에 의해 지배되며, 단핵균사의 발이능력은 발이능력이 낮은 검정 계통과 교배하여 추정할 수 있다고 하였다(Raper 등, 1960). 팽나무버섯에서 교배 이핵균주의 자실체 형성 능력은 변이가 매우 크며, 양적 유전을 하고 heterosis현상을 보인다. 따라서 육종 초기에 검정 계통을 사용하는 것이 효율적이며 노력을 절감할 수 있다고 하였다(Lee와 Kinugawa, 1981; 1982).

새로운 품종을 육성하기 위해서는 야생종의 다양한 형질을 이용하기 위한 특성의 조사와 교배형의 확인이 필수적이다. 야생에서 수집한 균주는 다른 불화합인자와 다양한 특성을 가지고 있기 때문에 이를 이용하여 우량 단핵계통을 선발하고, 선발된 단핵주를 이용하여 군간교배 및 군내교배로 새로운 균주를 육성할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 백색 재배종과 갈색의 야생종으로부터 각각 단포자를 분리하여 이들의 특성과 그 변이성을 조사하고 이들의 계통내 교배에 의한 변이를 조사하여 품종 육성의 기초로 삼고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 단핵 균주 분리

공시균주는 국내 수집종으로 갈색의 자실체를 형성하는 ASI 4019와 일본에서 도입된 백색 재배종 ASI 4045를 사용하였다. 한 자실체로부터 담자포자를 받아 4°C에 보관하면서 필요에 따라 시험에 사용하였다. 단포자분리는 증류수에 연속적으로 희석하여 MCM배지가 든 평판배지에 약 1×10^4개를 도포하여 25°C에서 3~6일간 배양한 후 각각의 균총을 현미경으로 관찰하여 clamp가 없는 것을 새로운 PDA(Potato Dextrose Agar)배지로 옮겨 시험에 사용하였다.

교배형 결정

교배는 두개 단핵 균주를 같은 샤레에 10 mm 정도 띄워 접종한 다음, 25°C에서 7~12일간 배양하였다. 배양후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어내어 현미경으로 clamp의 존재를 확인하고, 7일 후 균총의 양끝에서 다시 확인하여 clamp가 있는 것을 2핵균사로 간주하여 교배가 된 것으로 보았다.

또한 단핵주간 교배를 직접 확인하는 방법으로 세포내 핵을 검경하기 위하여 NS buffer(20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sucrose, 0.05% 2-mercaptoethanol, 0.4 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 mM EDTA, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $ZnCl_2$)에 DAPI(4',6-diamidine-2-phenylindole)를 1 μg/μl로 녹여 형광현미경으로 검경하였다.

동일 균주내의 교배는 분리한 단핵균주를 모든 가능한 조합으로 실시하였으며, 일본 돗도리 대학에서 분양받은 7개의 tester균주(S2: A1B1, S8: A1B2, S1: A2B1, S5: A2B2, WB2: A5B5, WB6: A5B5, WD8: A7B7)를 사용하여 교배형을 결정하거나, Eger(1978)의 교배형 결정법을 사용하였다. 각 균주의 화합성 균주집단에서 대표적인 단핵균주를 선발하여 선발된 4개 단핵균주를 교호로 교배하여 교배형 인자를 확인하였다.

단핵균주 및 교배 이핵주의 특성 조사

공시균주는 백색계통 ASI 4045와 갈색계통 ASI 4019에서 각각 단핵균주를 분리한 후 PDA배지에서 14일간 배양하여 균사 생장 길이, 균사밀도, 균총색 등을 조사하였다. 그리고 이들 단핵주를 15°C와 20°C에서 1~3개월 동안 보관하며 단핵성 발이에 대하여 조사하였다. 또한 이들로부터 DNA를 분리하여 Operon primer(OPAX12: 5'-GGTCGGGTCA-3')를 사용하여 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) band를 비교하여 유전조성의 변이를 확인하였다. PCR 반응 조건은 Kong(1995)의 결과에 따라 반응액 총량을 20 μl 기준으로 하여 template DNA 100 ng과 primer 150 ng, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP 1.5 mM, Taq polymerase 1 unit로 조정한 후 나머지는 살균한 증류수를 첨가하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denature시킨 후 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 2분으로 40 cycle을 돌린 후 4°C에서 유지하였다. PCR 산물은 1.2% agarose

gel에서 100V로 전기영동한 후 EtBr에 15분 염색하여 UV lamp상에서 밴드를 관찰하였다.

동일 균주내 교배는 각 균주내에서 가능한 모든 조합으로 교배를 실시하였으며, 2핵균주로 확인된 교배균주를 850 m*l*병에서 재배하면서 각종 특성을 조사하였다.

결 과

단핵균주 분리 및 교배형

백색계통 ASI 4045에서 유래한 단핵 균주는 균사생장 정도에 따른 분포의 범위가 좁고 생장이 늦은 반면, 국내 수집균주인 4019단핵균주는 그 범위도 넓고 생장이 빠른 균주도 다수 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 자생종인 4019가 유전적으로 혼

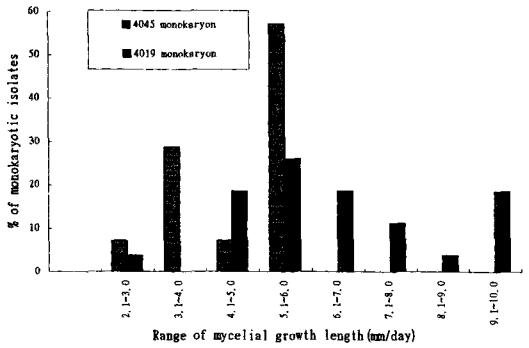

Fig. 1. Distribution of average length of daily mycelial growth with monokaryons isolated from ASI 4019 and 4045 dikaryon. Daily mycelial growth length of ASI 4045 and ASI 4019 dikaryon was 7.0 mm and 7.8 mm, respectively.

계이기 때문인 것으로 생각되었으며, 이들 중 균사생장이 빠른 균주는 육종 모본으로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

분리된 단핵균주는 7개의 tester균주를 사용하여 이들의 교배형을 결정한 결과(Table 1) ASI 4045에서 분리된 단핵균주들은 tester S1, S2, S5, S8과는 교배가 않되는 것이 있었고, WB2, WB6, WD8과는 모두 교배가 이루어졌다. 교배가 이루어지지 않은 것은 서로 불화합성 인자를 가지기 때문인데 A나 B인자가 같거나 또는 A와 B 두 인자가 모두 같은 경우이다. 본 시험에서 4045-1은 A1B1, A2B1, A2B2와는 교배가 되지 않았으므로 이들 균주들은 4045-1과 공통된 교배인자를 가지고 있다는 것을 알 수 있고, A1B2, A5B5, A7B7와 교배가 되었으므로 이들 균주들과는 다른 교배인자를 가졌다는 것을 알 수 있어 4045-1균주는 A2B1 유전자형을 가졌다고 결정할 수 있었다. 따라서 ASI 4045는 A1A2B1B2교배계를 가지는 것으로 나타났다. 한편 국내 수집종인 ASI 4019의 단핵균주는 모든 tester와 교배가 이루어져 clamp connection을 발견할 수 있었다. 즉, 자생종인 4019가 tester와는 다른 교배계를 가지는 것으로, 이들의 교배형을 새로이 결정할 필요가 있었다.

포자로부터 분리한 단핵균주와 화합성 균주간의 교배로 만들어진 이핵균주를 현미경으로 확인하기 위하여 DAPI(4',6-diamidine-2-phenylindole)를 이용하여 핵을 염색한 결과(Fig. 2) Fig. 2a의 단핵균주에서는 clamp가 없고 하나의 핵이 관찰되었으며, 이핵균주(Fig. 2b)에서는 clamp와 함께 2개의 핵을 뚜렷하게 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 In-

Table 1. Mating types of monokaryotic isolates examined by tester strains in *F. velutipes*

Monokaryon	Tester strain													Mating type
	S2	A1B1	S8	A1B2	S1	A2B1	S5	A2B2	WB2	A5B5	WB6	A5B5	WD8	A7B7	
4019 -2	+		+		+		+		+		+		+		AxBy
-3	+		+		+		+		+		+		+		AxBy
-5	+		+		+		+		+		+		+		AxBy
-6	+		+		+		+		+		+		+		AxBy
4045 -1	-		-		-		+		+		+		+		A1B1
-7	-		+		-		-		+		+		+		A2B1
-8	-		+		-		-		+		+		+		A2B1
-9	-		-		+		(+)		+		+		+		A1B2

*. - : No clamp, (+) : clamp on contact area, + : clamp

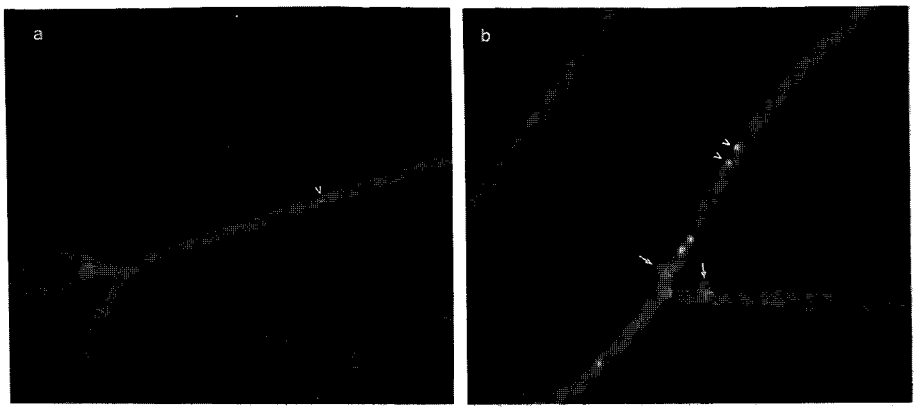

Fig. 2. Nuclei of monokaryon(a) and dikaryon (b) of *F. velutipes*.
* Arrow head : nucleus, Arrow : clamp connection
The figures were magnified by 375 (a) and 750 (b), respectively.

gold(1991)의 관찰에서도 보고된 바 있다.

백색 재배계통의 단핵분리주 특성 및 이핵주의 변이

백색계통인 ASI 4045는 앞에서 설명한 바와 같이 A5B5, A7B7의 tester와는 모두 교배가 되는 A1A 2B1B2의 교배계를 가지고 있으므로 각각의 14개 단핵균주에 대한 교배형을 결정하기 위하여 S2(A 1B1), S8(A1B2), S1(A2B1), S5(A2B2)의 tester 균주와 다시 교배한 결과(Table 2) A1B1교배형이 4균주, A1B2가 2균주, A2B1이 7균주, A2B2가 1균주로 확인되었다. 한편 4045-2×S1, 4045-22×S1, 4045-27×S5에서도 두 단핵주가 마주치는 지점에서는 clamp가 발견되었으나 서로 겹치지 않고 불연속띠를 형성하는 현상(barrage)을 보였으며, 두 균총의 양끝에서는 clamp를 발견할 수 없었다.

한편 단핵균주의 특성을 보면 균총의 색은 모두 백색이었으며, 균총의 직경은 19~47 mm의 분포를 보였고 균총밀도에서도 변이가 컸다. 주로 균사 생장이 늦은 균주의 균사밀도는 낮았으나 4045-25는

Table 2. Colony characteristics of monokaryons isolated from white strain, ASI 4045

Mating type	No. of isolates	Color of colony	Diameter of colony (mm/8 days)	Density of colony*	Fruiting**
A1B1	4045 -1	White	26	+	n
A1B1	2	White	19	+	f
A1B1	22	White	29	+	f
A1B1	24	White	31	+	f
A1B2	25	White	29	+++	n
A1B2	9	White	43	+	f
A2B1	15	White	42	+++	n
A2B1	17	White	47	+++	n
A2B1	18	White	45	++	n
A2B1	21	White	35	+++	n
A2B1	29	White	41	+++	n
A2B1	8	White	45	++	n
A2B1	7	White	41	+++	n
A2B2	27	White	47	+++	n

*Density of colony : + Low, ++ Normal, +++ High, ** Fruiting : f Monokaryotic fruiting, n Not fruiting

균사생장이 느려도 균사밀도가 높았던 반면 4045-9는 균사생장이 빠르면서 균사밀도는 낮았다. 한편 균사 생장과 교배형과의 관계를 보면 A1B1 교배형을 가진 균주는 균사 생장이 느리며 균사밀도도 낮은 것을 볼 수 있었다. 또 이들 단핵균사체가 자란 PDA배지를 15°C 항온기에서 약 3개월 보존할 때 4045-9, 4045-22 및 4045-24에서는 완전한 자실체가 형성되었다.

ASI 4045로부터 얻어진 단핵균주의 DNA를 분리한 후 OPAX-12 primer를 사용하여 RAPD를 분석한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 340~2500 bp에 걸쳐 10개의 밴드가 형성되었는데, 650 bp와 970 bp의 밴드는 모균주인 ASI 4045와 모든 단핵균주에서 공통으로 형성되어 이 밴드를 marker로 이용할 수 있을 것으로 판단되었다. 한편 단핵균주들의 밴드 양상은 대체로 유사하였으나 4045-2 균주는 특이한 형태를 나타내었다. 그러나 교배형간 차이를 보이는 밴드는 볼 수 없었다.

ASI 4045의 단핵균주들을 교배하여 얻은 이핵균주는 A1B1과 A2B2 교배형간 교배에서는 A2B2 교배형이 4045-27 하나밖에 없어 거의 성적을 구할 수 없었다. A1B2와 A2B1 교배형간 교배에서 얻은 이핵균주에서의 수량성을 비교해 보면(Table 3), 병당 79~108 g으로 모균주에 비해 전반적으로 수량이 낮을 뿐만 아니라 수량의 편차가 8.0~20.7로 커서 재배의 안정성이 낮았다.

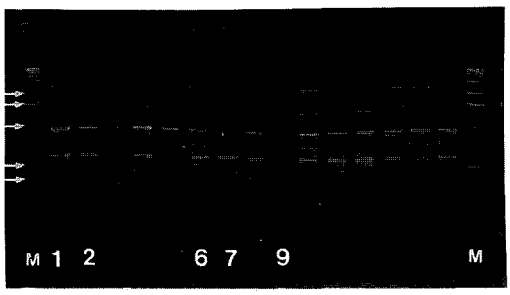

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RAPD products using OPAX-12 primer from DNA of monokaryon isolated from ASI 4045. M was 1 kb ladder marker. Arrows indicated 2036, 1636, 1018, 506 and 396 bp, respectively from upper to bottom.
ASI 4045: Lane 1, A1B1: lane 2, 3, 4, 5, A1B2: lane 7, 8, A2B2: lane 6, A2B1: lane 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.

갈색 야생종의 단핵균주 분리 및 교배 이핵주의 변이

국내 자생종인 ASI 4019는 갈색 자실체 계통으로 여기서 분리한 단핵균주는 7개의 tester로 교배형을 결정할 수 없었다. 따라서 이들 단핵균주간 가능한 모든 조합을 사용하여 교배형을 결정한 결과 (표 생략) clamp가 형성되는 2개의 group이 생기는데 이 들 중 4019-6, 7, 8, 11, 15, 17을 A3B3로, 이와 화합성을 보인 group을 A4B4로 결정하였다. 한편 불화합성을 보인 교배조합(4019-6×4019-23)의 양끝[6(23)와 23(6)] 부분의 균사체를 서로 반대쪽 균주와 화합성인 단핵주(4019-5와 4019-3)와 각각 교배한 후 clamp를 조사하여 A3B4, A4B3 교배형을 결정하였다. 이렇게 결정된 18개 단핵균주의 교배형은 A3B3가 6균주, A3B4가 2균주, A4B3가 6균주, 그리고 A4B4가 4균주였다. 교배형을 정하지 못한 나머지 균주는 일정한 경향을 보이지 않았는데 A 유전자나 B 유전자의 재조합으로 인한 것으로 생각되었다. 이와 같이 교배형이 결정된 단핵균주들은 다른 균주의 교배형을 결정하는 tester로 이용함으로써 노력과 시간을 절약할 수 있는 좋은 재료가 될 수 있을 것으로 판단되었다.

ASI 4019에서 분리한 29개 단핵균주의 균총 특성을 보면(Table 4), 균총 색이 다양하고 균사 생장과 균사밀도에서도 많은 변이를 관찰할 수 있었다.

Table 3. Fruitbody yield of dikaryons developed by crosses between monokaryons isolated from white strain, ASI 4045

Mating type	Combination	Yield (g/850 ml)
A1B2×A2B1	4045- 9×4045- 4	79±19.8
	4045- 9×4045-10	85± 8.0
	4045- 9×4045-15	80±15.4
	4045- 9×4045-17	96±17.9
	4045- 9×4045-21	108±16.1
	4045- 9×4045-23	87± 9.6
	4045- 9×4045-29	84±16.4
	4045-25×4045-23	102± 8.8
	4045-25×4045-29	96±20.7
ASI 4045		130± 8.4

Table 4. The colony characteristics of monokaryons isolated from brown strain, ASI 4019

No. of isolates	Mating type	Color of colony	Diameter of colony (mm/8 days)	Density of colony*	Fruiting**
4019- 1	?	White	85	+++	f
2	?	Light brown	85	+++	n
3	A4B4	Brown	68	+	n
4	?	Brown	84	+++	f+
5	A4B3	Light brown	55	+	f
6	A3B3	Brown	49	+	f+
7	A3B3	Brown	47	+++	f
8	A3B3	Light brown	59	++	n
9	A4B3	Light brown	53	+++	n
10	A4B3	White	40	+++	n
11	A3B3	Brown	55	++	f
13	?	Brown	84	++	f
14	A4B3	Brown	67	+++	n
15	A3B3	Light brown	67	++	n
16	?	Brown	56	++	n
17	A4B4	White	52	+++	f
18	A4B4	White	57	++	n
19	?	White	54	+	n
20	A4B3	White	-	++	f
21	A4B3	Brown	84	++	n
22	A4B4	Brown	73	++	n
23	A3B4	Brown	40	+	n
24	A3B4	White	40	+++	f
25	?	Brown	58	+++	f+
26	?	Brown	63	++	n
27	A3B3	Brown	46	+++	f
28	?	White	55	++	n
29	A4B4	White	30	+++	n

*: + Low, ++ Normal, +++ High, **: f Monokaryotic fruiting, f+ Fruiting in high temperature, n Not fruiting

균총의 색에 있어서는 백색인 균주가 9개, 연갈색이 4개, 갈색이 16개로 나타나 ASI 4045에서 백색 단핵주만 나타났던 것과는 다른 양상이었다. 균사생장에 있어서도 ASI 4045 보다 대체로 빨랐는데, 8일만에 85 mm 이상 자란 균주들도 있었던 반면 같은 기간에 30 mm밖에 자라지 못한 균주도 있었다. 또한 이들 단핵균주를 15℃와 20℃에서 3개월 동안 배양했을 때 12개 단핵균주에서 단핵 자실체가 형성되었으며, 이들중 4019-4, 6 및 25는 20℃의 고온에서도 발이가 되어 이들은 고온발이성 균주임을 확인하였다.

ASI 4019의 단핵균주중 갈색계통과 백색계통의 DNA를 분리하고 RAPD 밴드를 조사한 결과(Fig. 4), 500~2000 bp에서 9개의 밴드가 형성되었으며 ASI 4045의 단핵균주와는 달리 다양한 밴드 형태를 나타내었다. 이렇게 다양한 밴드 형태를 보이는 것은 모균주의 유전적 조성이 혼계이기 때문으로 생각되었다. 또한 색에 따른 비교에 있어서도 특이한 밴드를 찾을 수 없어 다양한 유전적 소질을 고정할 필요가 있었다.

ASI 4019로부터 분리된 단핵균주들간 교배에 의해 형성된 이핵균주의 자실체 색은 갈색과 백색으로 나누어졌다(Table 5). 이들을 균총의 색과 관련시켜 보면 백색 균총의 단핵주들간 교배에서 얻은 이핵균주는 백색 자실체를 형성하였고, 갈색균총의 단핵주들간 교배에 의하여 얻은 이핵균주는 모두

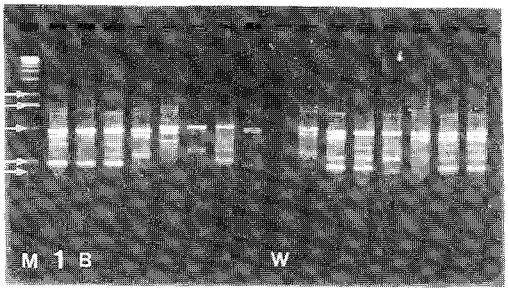

Fig. 4. Comparison of RAPD banding patterns using OPAX-12 primer between brown and white colonies of monokaryons isolated from ASI 4019. M was 1 kb ladder marker. Arrows indicated 2036, 1636, 1018, 506 and 396 bp, respectively from upper to bottom.
Lane 1: ASI 4019, B: Brown monokaryons, W: White monokaryons

갈색 자실체를 나타내었다. 한편 백색과 갈색 단핵주간의 교배와, 연갈색과 갈색 단핵주간 교배에서는 모두 갈색 자실체를 형성하였다. 그러나 백색과 연갈색 단핵주간 교배에서는 균주에 따라 백색과 갈색이 나오는 경우가 모두 나타났다. 이와 같은 결과는 연갈색 균총중 4019-5와 15는 백색으로 보고 4019-8은 갈색으로 볼 때 갈색이 백색에 우성으로 작용한다는 것을 알 수 있었는데 이는 기존의 보고(Brodie, 1936; Byun 등, 1996; Zattler, 1924)와도 일치하였다.

한편 자실체 수량지수를 보면 갈색과 백색 자실체 균주 모두 모본보다 수량이 높은 것과 아주 낮은 것이 있었다. 특히 4019-15와 29의 교배에서는 자실체의 색이 백색이면서 모균주보다 수량이 40%나 높았다. 따라서 ASI 4019의 단핵주간 교배에서는

Table 5. Fruitbody color and yield index of dikaryon developed by crosses between ASI 4019 monokaryons with different colony color. The fruitbody yield of ASI 4019, 108 g/bottle, was used to calculate the yield index of mated dikaryon

Monokaryon Colony color	Combination	Yield index of dikaryon	Fruitbody color of dikaryon
White × White	4019- 1×4019-29	84	White
	4019-10×4019-24	82	White
	4019-20×4019-24	84	White
White × Light brown	4019-17×4019-15	83	White
	4019-18×4019-15	100	White
	4019-15×4019-29	140	White
	4019- 5×4019-24	90	White
White × Brown	4019- 8×4019-17	38	Brown
	4019- 8×4019-18	72	Brown
	4019- 1×4019- 3	81	Brown
	4019-10×4019-23	120	Brown
	4019-17×4019- 6	100	Brown
	4019-18×4019- 6	108	Brown
	4019-18×4019- 7	66	Brown
	4019-18×4019-11	79	Brown
	4019-24×4019-14	58	Brown
	4019-29×4019-11	60	Brown
	4019-29×4019-27	111	Brown
Light brown × Brown	4019- 5×4019-23	65	Brown
	4019- 8×4019-22	69	Brown
	4019-15×4019-22	125	Brown
Brown × Brown	4019- 3×4019-27	93	Brown
	4019- 6×4019-22	115	Brown
	4019- 7×4019-22	73	Brown
	4019-11×4019-22	48	Brown

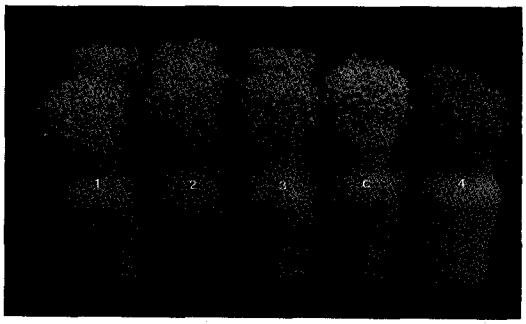

Fig. 5. Color variation of fruitbody in the intracrossing stocks between monokaryons isolated from the brown dikaryotic strain, ASI 4019. 1 and 2 are dikaryon fruitbody mated between White and white monokaryon, 3 is between white and light brown monokaryon, 4 is between white and brown monokaryon, and c is white cultivar.

백색의 자실체를 가지면서 수량도 높은 계통을 육성 할 수 있었다. 그러나 모균주가 갈색균주인 단핵균주간 교배로 얻어진 백색 자실체는 현 재배품종의 백색과는 차이가 있었다(Fig. 5). 즉, 재배품종이 순백계라고 할 때 이 교배계통의 백색은 다소 투명하고 창백한 감이 있으며 광조건 아래서 다소 푸른 빛을 보여 이를 개선할 필요가 있었다.

고 찰

백색 재배종과 갈색 야생종으로부터 단포자를 분리하고 이핵균주를 육성하여 모균주와 균사생장을 비교한 바 대개의 단핵균주보다 이핵균주의 균사생장이 빨랐는데 이는 기존의 보고와 일치하였다(Lee와 Kinugawa, 1981; Takemaru, 1957). 단핵균주의 균사생장은 유전적인 특성으로 균사생장이 좋은 균주가 발이 능력도 좋다는 보고(Lee와 Kinugawa, 1981)를 볼 때 ASI 4019에서의 균사 생장이 빠른 단핵균주들은 유용한 육종 모본이 될 수 있을 것으로 판단 되었다.한편 분리된 단핵균주들의 교배형을 결정하고자 tester 균주와 교배를 하였으나 국내 자생종인 ASI 4019는 교배형을 결정할 수 없어 자식교배를 통한 교배형 결정으로 A3A4B3B4의 새로운 교배인자 번호를 지정하였다. 팽나무버섯에서 이와 같은 교배형에 의한 불화합성이 존재한다는 것은 식물의 불화합성 체계가 근계교배를 완전히 차단하는 것과는 그 의미가 다르다고 보고된 바 있다(Noel 등, 1991; Ullrich, 1977). 즉 불화합성에 관여하는 복대립인자가 존재함으로써 outbreeding을 조장하는 반면 4극성을 지배하는 2개 인자가 있어서 75%만 불화합이 되고 25%는 근계교배되므로써 유전자형이 조화를 유지할 수 있다고 보았다. 따라서 이와 같은 4극성은 outbreeding과 inbreeding의 균형으로 집단내 유전적 충격을 완화시키고 다양한 환경조건에 적응하게 하며, 이형핵성이 갖는 이질세포내에서의 부조화를 극복하도록 하는 버섯 특유의 메카니즘인 것으로 생각되었다.

단핵균주간 교배에 있어 두 균의 접촉부위에서만 clamp가 나타나는 현상은 다른 4극성 담자균에서도 차이는 있으나 일반적으로 나타난다고 하였다(Takemaru, 1961). Takemaru는 이러한 현상이 교배형 유전자 B가 공통인(common-B) 균주간에 교배될 때 두 균총이 서로 겹치지 않아서 균총 사이에 띠를 형성하는데 이것을 협촉현상(barrage)이라고 하였다. 또한 이때는 pseudoclamp라고 하는 것이 형성되는데 현미경하에서도 실제 clamp 연결체와 형태만으로 구별하기는 매우 어렵다고 하였다. 또한 담자균의 교배에서 교배형 인자 A가 같을 때는 flat이라는 현상이 나타나는데 팽나무버섯에서의 flat현상은 관찰되지 않았다고 하였다. 본 시험에서도 균총간에 협촉현상을 발견할 수는 있었으나 flat현상은 발견할 수 없었다.

ASI 4045와 4019로부터 분리한 단핵균주의 교배형을 결정한 결과 각 교배형이 동일 비율로 출현하지 않았다. 이는 분리된 단핵균주 수가 적기도 하지만, 단포자 분리 시 발아가 빠른 것이 우선적으로 선발되는데 따라 발아와 연관된 교배형이 선발에 누락될 가능성이 있기 때문으로 생각되었다. 따라서 이러한 가능성을 배제하기 위해서는 Fries와 Ascan(1952)이 보고한 바와 같이 미세조작기를 사용하여 4포자를 분리하는 기술이 필요하다. 한편 Fox 등(1994)과 Hasebe 등(1992)의 시험 결과에 의하면 표고버섯에서는 A인자와 연관된 열성 치사인자에 의하여 교배형의 불균형 분포를 보인다고 하였으며, Kitamoto 등(1993)은 B인자가 담자포자의 발아율과 균총 형태에 관련이 있다고 하였다.

또한 ASI 4045의 단핵균주 중 A1B1 교배형을 가진 균주들은 균사생장이 느리고 균총밀도도 낮은 것을 볼 수 있었는데, 교배형인자 A가 균사생장을 억제하는 유전자(a^{rep})와 강하게 연관되었다는 보고(Kinugawa와 Nakagi, 1984)도 있어 추후 이들의 연관을 검토할 필요가 있다.

본 시험에서 분리 단핵균주가 자실체를 형성하는 것을 볼 수 있었는데, 단핵 자실체는 단일 유전자에 의해 유도된다는 보고(Esser 등, 1975; Takemura, 1961)와 2개 이상의 열성 유전자에 의해 조절된다는 보고(Lee와 Kimugawa, 1981, 1982)가 있다. 한편 Eger(1978)는 느타리버섯에서 발이 능력이 있는 단핵주 계통을 선발하면 육종노력과 시간을 절약할 수 있다고 하였다. 또한 Esser 등(1974)은 버들송이에서 이핵균사가 자실체 발생에 걸리는 시간이 모균주 단핵균사의 발이능력 차이를 결정한다고 하며, 단핵성 발이와 이핵균사의 발이능력간에 유의상관이 있다고 보고하였다. 따라서 본 시험에서 발견한 단핵자실체 형성 능력이 있는 단핵균주를 이용하기 위해서는 이들을 육종 모본으로 사용하여 이핵 교배주에서의 수량성 등을 검토하여야 할 것으로 생각된다. 또한 팽나무버섯은 인위적인 환경조절이 가능한 6~8°C 재배사에서 병으로 재배하고 있는데, 고온성 품종을 육성하면 경제적으로 비용을 절감할 수 있어 육종적 측면에서 관심이 되고 있다. Masuda 등(1995)은 고온성이나 조생성 품종을 육성하기 위하여 단핵주의 고온 생장성을 검정하고 이들을 선발하여 모본으로 이용한다고 하는데, 본 시험의 ASI 4019 단핵균주에서 나타났던 고온 발이성을 이용하는 것도 육종적인 면에서 검토될 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 단핵균주의 RAPD 분석 결과, 백색의 단핵균주는 모본과 거의 동일하게 나타났는데, 이런 결과는 양송이의 담자포자 유래 균주에 대한 Khush 등(1992)의 보고와 일치하였다. 그러나 esterase 동위효소 밴드패턴에서는 단핵균주의 교배형간 또 교배형내에서 변이를 보였다는 보고(Kneebone 등, 1977)에 비해 RAPD밴드가 단핵균주간의 변이를 나타내지 못했던 것은 사용된 primer가 단핵주간 차이나 교배형의 구별에는 적합하지 못한 것으로 사료된다. 따라서 이런 균주간 차이를 보일 수 있는 적절한 primer를 선발함으로써 교배형과 연관된 marker로 이용할 수 있을 것으로 생각되었다. 다만 여기서 알 수 있었던 것은 백색종인 ASI 4045가 재배품종이기 때문에 야생에서 수집된 4019에 비해 그 유전적인 구성이 매우 안정적이며 순계화된 것으로 볼 수 있었다.

백색균주인 ASI 4045의 단핵균주간 교배에 의해 얻은 이핵균주는 수량이 낮고 안정성도 떨어졌다. 이러한 이유는 이 균주가 순계에 가까운 품종이기 때문에 여기서 분리된 단핵균주간 교배는 유전적으로 자식교배에 해당되어 작물에서 보이는 자식열세를 나타낸 것으로 생각되었다. 그러나 자생균주인 ASI 4019는 유전적으로 혼계이기 때문에 이 균주의 단핵주간 교배에서는 모본보다 수량이 높은 균주가 육성되었다. Lee와 Kinugawa(1982)도 수량이 높은 이핵균주에서 분리한 단핵균주간 교배에서 새로이 더 우수한 특성을 가진 이핵주를 분리할 수 있었다고 보고한 바가 있다.

적 요

팽나무버섯[*Flammulina velutipes*(Curt. ex Fr.) Singer]의 새로운 우량균주를 육성하고자 단핵균주를 분리하여 이들의 특성을 조사하고 계통내 교배 시험한 결과 백색 재배종에서 분리된 단핵균주는 모균주에 비해 균사생장의 변이가 적고, 균총의 색이 모두 백색이며 RAPD 밴드로 본 변이가 적었던 반면, 갈색 자생종에서 분리된 단핵균주는 균총의 색이 백색, 갈색, 연갈색으로 분리되고 RAPD 밴드에 다양한 변이를 보였다. 또한 백색 재배종의 교배형은 A1A2B1B2 교배형이었으나, 갈색 야생종의 교배형은 백색종과 교배형이 다르게 나타나 A3A4B3B4 교배형으로 결정하였다.

백색 재배종에서 분리한 단핵균주간 자식교배에 의하여 육성한 이핵균주는 모본보다 자실체 수량이 적고 수량의 변이 폭이 컸다. 갈색 자생종에서 분리한 단핵균주를 서로 교배한 결과 자실체의 색깔에 변이를 나타내었는데 백색 자실체를 형성하는 교배균주 중에는 모본보다 수량이 많은 이핵균주도 있었다. 따라서 갈색 자생종의 자식교배로 현재 재배되는 순백계와는 다른 새로운 백색계통을 육성할 수 있었다.

참고문헌

Brodie, H.J. 1936. The occurrence and function of oidia in the Hymenomycetes. *Ame. J. Botany* **23**: 309-327.

Byun, M.O., Kong, W.S., Kim, Y.H., You, C.H., Cha, D.Y. and Lee, D.H. 1996. Studies on the inheritance of fruitbody color in Flammulina velutipes. *Kor. J. Mycol.* **24**(4): 237-245.

Eger, G. 1978. New ways of breeding and strain protection for practical mushroom cultivation. *Mush. Sci.* **10**(2): 415-420.

Esser, K., Semerdzieva, M. und Starl, U. 1974. Genetishe Untersuchungen an dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita. Theor. Appl. Genet.* **45**: 77-85.

Esser, K. and Starl, U. 1975. A genetic correlation between dikaryotic and monokaryotic fruiting in Basidiomycetes. Proc. 1st Intersect. Congr. Intern. Assoc. *Microbiol Soc.* **1**: 294-300.

Fox, H.M., Burden, J., Chang, S.T. and Peberdy, J.F. 1994. Mating-type incompatibility between commercial strains of *Lentinula edodes. Exp. Mycol.* **18**: 95-102.

Fries, N. and Aschan, K. 1952. The physiological heterogeneity of the dikaryotic mycelium of *Polyporus abientinus* investigated with the aid of microurgical technique. *Svensk Botanisk Tidskrift.* **46**: 429-445.

Hasebe, K., Murakami, S. and Tsuneda, A. 1992. Cytology and genetics of a dikaryotic strain of *Lentinus edodes* carring two haplolethal factors. *Can. J. Bot.* **70**: 601-606.

Ingold, C.T. 1991. Dikaryon development in *Flammulina velutipes. Mycol. Res.* **95**(5): 636-639.

Khush, R.S., Becker, E. and Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus. Appl. Environ. Mycrobiol.* **58**: 2971-2977.

Kinugawa, K. and Nakagi, N. 1984. A breeding method of *Flammulina velutipes*(3) Genes regulating mycelial production. *Mem. Fac. Agr. Kinki Univ.* **17**: 131-140.

Kitamoto, Y., Nakamata, M. and Masuda, P. 1993. Production of a novel white *Flammulina velutipes* by breeding. In Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers. pp.65-86.

Kneebone, L.R., Patton, T.G. and Shultz, P.G. 1977. Improvement of the brown variety of *Agaricus bisporus* by single spore selection. *Mush. Sci.* **9**: 237-243.

Komatsu, J., Terekawa, H., Nakanishi, K. and Watanabe, Y. 1963. *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J. Antibiot., Ser. A.* **16**:139-143.

Kong, W.S. 1995. Isolates grouping of *Elfingia applanata* by random amplified polymorphic DNA. *J. Graduate Academic Research of Kon-Kuk Univ.* **42**: 351-361.

Lee, P.J. and Kinugawa, K. 1981. A breeding method for *Flammulina velutipes*. 1. Selection of monokaryotic strains by the use of testers. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **22**: 89-102.

_____and _____ 1982. A breeding method for *Flammulina velutipes*. 2. Selections from the intercrossing and the following intracrossing. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **23**: 177-186.

Lin, J.Y., Lin, Y.J., Chen, C.C., Wu, H.L., Shi, G. Y. and Jeng, T.W. 1974. Cardiotoxic protein from edible mushrooms. *Nature* (London). **252**: 235-237.

Masuda, P., Nogami, T., Mori, N. and Kitamoto, Y. 1995. An empirical rule for breeding high-optimum-temperature strains of *Flammulina velutipes. Trans. Mycol. Soc. Japan* **36**: 158-163.

Noel, T., Ho Huynh, T.D. and Labare're, J. 1991. Genetic variability of the wild incompatibility alleles of the tetrapolar Basidiomycete *Agrocybe aegerita. Theor. Appl. Genet.* **81**: 745-751.

Raper, J.R., Baxter, M.G. and Ellingboe, A.H. 1960. The genetic structure of the incompatibility factors of *Schizophyllum commune*: the A-factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **46**: 833-842.

Takemaru, T. 1957. Genetics of *Collybia velutipes*, III. Growth rates of certains. *Biol. J. Okayama Univ.* **3**: 182-186.

_____1961. Genetical studies on fungi, X. The mating system in Hymenomycetes and its genetical mechanism. *Biol. J. Okayama Univ.* **7**: 133-211.

Ullrich, R.C. 1977. Natural distribution of incompatibility factors in Basidiomycetous fungi. *Mycologia* **69**: 714-719.

Zattler, F. 1924. Vererbungsstudien an Hutpilzen (Basidiomyceten). *Zeitschr. Bot.* **16**: 433-499.