

야생에서 채집된 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*)균에 관한 연구

이상선* · 김미혜 · 장후봉¹ · 신춘식¹ · 이민웅²

*한국교원대학교 대학원 생물교육학과

¹충북 농촌진흥원 균이계, ²동국대학교 응용미생물학과

Pholiota adiposa and its Related Species Collected from the Wild Forestry

Sang-Sun Lee, Mi-Hye Kim*, Hu-Bong Chang¹, Chun-Sik Shin¹ and Min-Woong Lee²

*Graduate school (Biological Science and education), Korea National University of Education,
Cheong-Won Kun, Chung Puk 363-791

¹Mushroom Institute, Chung Buk Provincial Rural Development Administration,
Cheong-Won Kun, Chung Puk 363-880

²Department of Applied Biology, College of Biological Resources Science,
Dongguk University, Pil-dong, 3-ga, Chung-gu, Seoul 100-715, Korea

ABSTRACT: Five basidiocarps of *Pholiota* species have been collected from the areas of BubJu Temple for last two years, and identified to those of *P. adiposa* or *Pholiota* species. The taxonomy of these basidiocarps with the morphological aspects was compared with the analysis obtained from the polymorphisms of PCR-RAPD bands made after reacted with the random primers. The polymorphic variations were observed within the species of the basidiocarps, but not between genomic DNA's of the mycelia obtained and the basidiocarps. Several different bands made from the primers (28 and 36) in PCR-RAPD reactions were identified within the genus of *Pholiota* and speculated to be specific for the individual basidiocarp of *P. adiposa* collected. The primers employed here were considered to be very useful for distinguishing the individual isolates or basidiocarps collected from the fields. Also, the basidiospores were obtained from the sporeprints of the above basidiocarps as a simple agar and confirmed with observations of clamp connection under microscopes. The matings of them indicated the 'tetrapolar' type, being different from the 'bipolar' type reported by Japanese basidiocarps of *P. adiposa* or *P. nameko*. Based on our work, the edible fungi collected were speculated to be a new breeding resource for those of *Pholiota* commercialized in Japan.

KEYWORDS: Breeding, Dikaryon, PCR-RAPD, *Pholiota adiposa*, Random primer, Tetrapolar

버섯은 저지방 고단백의 건강식품(Park 등, 1978)으로 식량이 부족한 저개발국가에서는 단백질 공급원으로 중요한 역할을 하고 있다(차 등, 1989). 또한 담자균에서 얻어지는 다수의 다당체와 당단 백 복합체가 항암효과가 있음이 알려지면서(Chung, 1982) 영지(*Ganoderma lucidum*), 복령(*Poria cocos*) 등이 한방에서 많이 이용되어지고 있다(차 등, 1989). 이처럼 버섯은 그 인지도가 높아지고 수요도 급격히 증가하는 추세(Peberdy 등, 1993)이

나, 지금까지는 표고(*Lentinus edodes*)와 느타리(*Pleurotus* species)를 농가에서 주작물로 재배하였고, 최근에 팽이(*Flammulina velutipes*)와 목이(*Auricularia auricula-judae*) 등이 고급식품으로 인정받아 그 재배면적이 증가되고 있다(차 등, 1989). 그러나 아직도 식용으로 이용될 수 있는 많은 버섯들이 자연 상태에 방치되어 있음에도 불구하고(성 등, 1998), 이에 대한 연구는 미약한 상태이다. 따라서 버섯에 대한 보다 나은 연구를 위해서는 야생 버섯 균주의 수집이 절실히 필요하고, 이를 기초로 하여 식품과 의약품에 대한 새로운 자원으로

*Corresponding author

로서 그 가능성이 연구되어야 한다. 이에 본 연구는 일본에서 이미 식용버섯으로 널리 이용되고 있는 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*; Arita, 1980)을 1996년부터 속리산 주변에서 채집, 분리, 동정하였고, 이로서 확보된 균을 이용하여 유용 균주 선발을 위한 기초 자료를 얻고자 실험을 실시하였다. 이를 위해 먼저 분리균의 교배형을 결정하였고, PCR-RAPD 기법을 이용하여 다른 버섯들과의 밴드적 차이와 유연 관계를 봄으로써, 이 균의 동정에 RAPD기법이 이용될 수 있음을 연구하였다.

재료 및 방법

균주 채집 및 분리

검은비늘버섯은 1996년부터 충북 속리산 법주사 주변에서 채집하였고, 버섯분류의 기준(Lee, 1988; Park, 1991; Singer, 1986)을 이용하여 동정하였다. 또한 비늘버섯속의 한 종으로 여겨진 버섯은 폴리에틸렌 백에 넣어서 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 그리고 두 종의 비늘버섯속균(*Pholiota* sp.)은 좀 더 정확한 동정을 위하여 한국 농촌진흥청 농업과학기술원의 김양섭 박사께 동정을 의뢰하였다. 실험에 사용된 모든 버섯들(Table 1)에서 균을 분리하기 위하여 자실체의 표면을 살균한 후 자실체 안쪽 부위에서 채취한 절편을 균 분리 배지인 GS agar(GS; Ginterova와 Janotkova, 1975)와 2% water agar(WA; Agar 20g, Distilled Water 1L)가 들어있는 petridish

Table 1. Sources of the fungal mycelia or the basidiocarps collected for this works

Isolates	Descriptions of the fungal mycelia or basidiocarps collected
P 1	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>Pholiota adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk in Sep. 1996 ^a .
P 2	Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (P1) cultivated on Oak sawdust in July, 1997 ^b .
P 3	Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (P1) cultivated on Poplar sawdust in Sep., 1997 ^b .
P 4	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk in Sep. 1996 ^a .
P 5	Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (P4) cultivated on PDA in Feb., 1998 ^b
P 6	Mycelia isolated from basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk in Sep. 1996 ^a .
P 7	Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (P6) cultivation on Oak sawdust in Aug., 1997 ^b .
P 8	Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (P6) cultivation on Poplar sawdust in Oct., 1997 ^b .
P 9	Mycelia of <i>P. adiposa</i> received from the laboratory of mushrooms in RDA of Chung-Puk in Sep. 1998 ^a .
P10	Basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk in Sep., 1997.
P11	Basidiocarps of <i>Pholiota</i> species collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk in Sep., 1997.
P12	Mycelia of <i>Pholiota nameko</i> (5006) received from the laboratory of mushrooms in RDA of Chung-Puk in Sep. 1998 ^a .
P13	Mycelia of <i>Naematoloma sublateritium</i> received from the laboratory of mushroom in RDA of Chung-Puk in Sep. 1998 ^a .
P14	Basidiocarps of <i>Tricholoma matsutake</i> collected from Yang-Yang, Gang Won Do in Nov., 1997 ^c .
P15	Basidiocarps of <i>Lentinus edodes</i> purchased from Dae-Jeon in Apr., 1998.
P16	Basidiocarps of <i>Flammulina velutipes</i> purchased from Dae-Jeon in Apr., 1998.
P17	Basidiocarps isolated from <i>Polyporus brumalis</i> cultivated on Oak sawdust in Sep., 1996 ^b .
P18	Basidiocarps of <i>Coprinus comatus</i> collected from Cheong-Won Kun, Chung Puk in Mar. 1998.
P19	Basidiocarps isolated from <i>Schizophyllum commune</i> cultivated on Oak sawdust in Sep., 1997. (collected from Mt. Cho-Ryeong, Chung-Puk in Sep., 1996 ^c)
P20	Mycelia isolated from basidiocarps of <i>Ramaria botrytis</i> obtained from Yang-Yang, Kang Won Do in Nov., 1997 ^b .
P21	Basidiocarps of <i>Agaricus bisporus</i> purchased from Dae-Jeon in Apr., 1998.

^aThe mycelia isolated from the basidiocarps stored in the laboratory of mushroom in RDA of Chung-Puk.

^bThe mycelia isolated from the basidiocarps obtained directly and stored in our laboratory.

^cSee the previous works of Lee & Sung (1997) in detail.

에 접종하여 균을 분리하였다. 여기서 자란 개개의 균사들은 PDA(Potato Dextrose Agar; DIFCO)에 이식하여 여러 번 계대배양한 후 본 실험의 균주로 사용하였고, 일부는 다음 실험을 위하여 사면 배지에 이식하여 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였다.

자실체 형성

실험에 사용된 톱밥배지는 충북 농촌진흥원 균이계에서 버섯 병재배용으로 만든 것으로 톱밥과 미강을 부피비(80:20 v/v, 수분 함량 65%)로 혼합한 후 고압멸균기에서 126°C, 30분 동안 멸균한 것을 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 톱밥종류는 참나무(Oak tree)와 미루나무(Poplar)이고 그 조성은 상기와 같다. PDA 배지에서 직경 6 cm 정도로 자란 균사체의 가장자리를 0.5 cm 잘라 무균실에서 멸균한 병배지에 접종하고 이를 25°C에서 90일 동안 배양하였다. 그 후 균사가 완전히 성장하여 병배지 전체가 백색을 나타내는 것을 골라 윗면의 노화된 균은 균긋기로 제거하고, 1시간 동안 물기를 적셔준 후 다시 엎어서 물기를 제거하였다. 이들은 다시 발이실험을 위해 12°C~15°C를 유지하도록 맞춘 chamber에 넣고 가습기를 최대한으로 높여 습도를 80% 이상으로 맞춘 후 자실체를 형성시켰다.

DNA 추출

Genomic DNA는 Weising 등(1995)의 방법을 기초로 하였고, 실험에 사용된 DNA는 직접 채집하였거나 본 실험을 통해 수확한 자실체 그리고 멸균된 셀로판지를 깬 PDA 배지위에서 자란 균사체를 사용하였다. 먼저 시료를 멸균된 유발에 넣어 액체 질소와 함께 갈아 분말로 만들고, 이를 0.3g 취하여 2 ml eppendorf tube에 옮긴 후 extracting buffer(2% CTAB: Cetyltrimethyl-ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM EDTA, 0.2% β -mercaptoethanol, pH 8.0) 1.6 ml를 넣어 잘 혼합하여 water bath(60°C, 80 min)시키고 이를 원심분리(12000 rpm, 4°C, 15 min) 하였다. 다시 상층액을 새 tube에 옮기고 동량의 PCI(Sigma)와 CI

(Sigma)를 첨가하여 단백질과 불순물을 제거하고, RNase A(Sigma: 50 μ g/ml, 30°C, 50분)와 Proteinase K(Sigma: 100 μ g/ml, 48°C, 60분)를 처리한 후 100% Isopropanol-용액($\times 0.6$ volume)에 의한 pallet 형성확인과 1.0 ml의 washing solution(10 mM Amonium acetate 또는 70% Ethanol)처리를 2회 반복하여 남은 CTAB을 완전히 제거하였다. 이로써 형성된 pallet은 멸균지 위에서 1시간 정도 건조시킨 후 TE beffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA) 200 μ l를 넣어 4°C에서 1시간(또는 overnight) 동안 반응시켜 DNA를 녹여주었다. 최종적으로 얻어진 DNA의 농도(20 μ l/ml)와 순도는 흡광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도를 맞춘 DNA는 PCR 반응의 주형 DNA(template DNA)로 이용하였고,

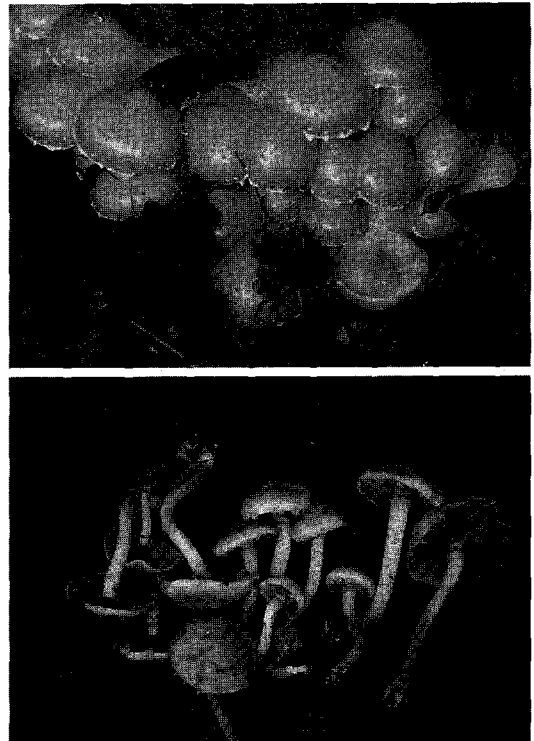


Fig. 1. The basidiocarps of two species of *Pholiota* collected from the areas of BubJu temple, Bo Eun Kun, Chung-Puk in September, 1997; a) *Pholiota adiposa* (marked as P10) and b) *Pholiota* sp. (marked as P11) identified.

남은 genomic DNA는 -20°C 냉동실에 보관하여 필요할 때마다 사용하였다(Lee와 Sung, 1997).

PCR 반응 및 분석

PCR 반응액은 공통 시료를 모두 혼합하여 0.5 ml의 eppendorf tube에 넣어 냉동건조한 premix-Top 제품((주)Bioneer)을 사용하였고(오, 1998), 실험에 사용한 primer는 3종류이다. OPD-18(5'GAGAGCCAAG3')은 Operon사에서, primer #28(5'CCCGCCGTTG3')과 primer #36(5'GGGCCCGAGG 3)는 Bioneer(주)에서 각각 구입하였다. PCR반응은 Williams 등(1990)을

기준으로 약간의 변형을 가하였다; premix-Top에 10 pM의 primer 1.3 μL와 20 ng의 template DNA 1.5 μL에 17.2 μL의 증류수를 넣어 전체 부피가 20 μL이 되도록 맞춘 후 동량의 mineral oil 을 첨가하여 PCR시켰다. 반응조건은 94°C에서 7분간 predenaturing, 94°C에서 1분간 denaturing, 37°C에서 1분 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation의 3단계를 1 cycle로 하여 총 35회를 진행시켰으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 안정화시킨 후 전기영동하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 증폭된 PCR product는 1× TAE buffer(40 mM Tris-ace tate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하였고, 0.5 μg/ml ethidium bromide로 15분간 염색하고 흐르는 수돗물에서 15분간 염색액을 제거한 후, uv transilluminator 상에서 polaroid film 667을 이용하여 각각의 밴드들을 촬영하였다(Fig. 2; Sambrook 등, 1989). 증폭된 DNA 단편은 전기영동상에서 2가지의 charater states로서 나타나는데 band가 있으면 1로, 없으면 0으로 code화 하였다. 사용된 primer에 관계없이 같은 종별로 한꺼번에 처리하였고, 이를 집괴분석하고(Yu 등, 1996), UPGMA 분석법을 이용하여 유지도를 작성하였다(Fig. 3: Rohlf 등, 1979).

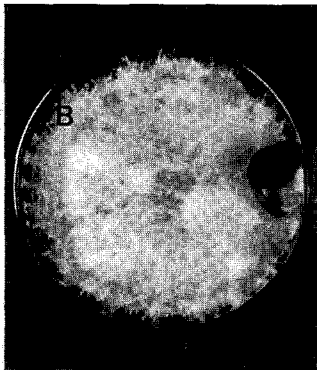


Fig. 2. The basidiocarps of the isolates of *Pholiota adiposa* cultivated on the solid sawdust bottles under the artificial conditions: basidiocarps of the isolates P3 (in the left, the top), and those of the isolate P8 (in the right, the top) on the poplar solid sawdust, respectively. A small basidiocarp of the isolates P5 developed on PDA plate (shown on the bottom).

단포자 분리 및 교배형 결정

본 실험을 통하여 재배된 검은비늘버섯(P2)의 한 자실체로부터 포자를 받아 이를 멸균수에 연속적으로 희석하여 10⁻⁴~10⁻⁶으로 만든 후 PDA 배지가 든 평판배지에 도포하여 25°C에서 7~10일간 배양하였다. 발아되어 나온 균사는 현미경으로 관찰하여 clamp가 없는 것을 단포자 분리균으로 간주하고 (Triratana와 Chaiprasert, 1991) 이를 새로운 PDA 배지에 옮겨 각각에 대한 생장력(cm/5 days)을 측정하였다. 교배는 세 개의 단포자 분리균을 같은 샐레에 20 mm 정도 띄워 접종한 다음, 25°C에서 7~10일간 배양하였다. 배양 후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어 현미경으로 clamp connection의 존재를 확인하여 이를 교배된 2핵 균사로 간주하였다(Kong 등, 1997).

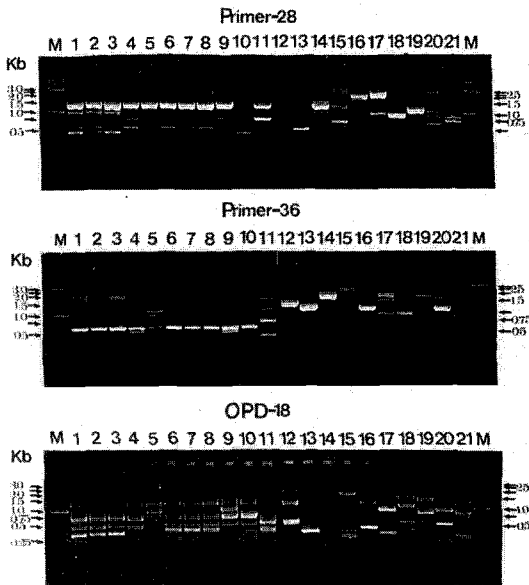


Fig. 3. The polymorphism of PCR-RAPD bands made from the mushroom genomic DNA after reacted with the different primers, 28(the top), 36 (the middle), and OPD-18 (the bottom); M (the 1 Kb DNA ladders), Lane 1 to 10 (*P. adiposa*, the numbers of P series corresponding to those described in Table-1), Lane 11 (*Pholiota* sp., P10), Lane 12 (*P. nameko*, P12), Lane 13 (*Naematoloma sublateritium*, P13), Lane 14 (*Tricholoma matsutake*, P14), Lane 15 (*Lentinus edodes*, P15), Lane 16 (*Flammulina velutipes*, P16), Lane 17 (*Polyporus brumalis*, P17), Lane 18 (*Coprinus comatus*, P18), Lane 19 (*Schizophyllum commune*, P19), Lane 20 (*Ramaria botrytis*, P20), and Lane 21 (*Agaricus bisporus*, P21).

결과 및 고찰

인공자실체 형성

1996년부터 충북 속리산 주변의 서로 다른 지역에서 3종의 검은비늘버섯(P1, P4, P6)을 각각 채집하여 이들을 동정, 분리하였다. 그리고 각각의 분리균은 자실체 형성여부를 실험하기 위하여 참나무와 미루나무뚝뚝밥 병배지에 접종한 후 25°C에서 90일 동안 균사 배양을 시켜서 백색의 균사체가 완전히 병배지의 표면과 안쪽에 퍼져 있는 것만을 골라 발이실로 옮긴 후 자실체를 형성시켰다. 그 결과 P1과 P6은 두 종류의 병배지에서 Fig. 2A와 같이 자실체

를 형성시켰다. 그러나 P4는 병배지에서 자실체를 얻지 못하였고, 단지 계대배양하기 위하여 접종시킨 PDA 배지내에서 자연적으로 자실체(P5)가 발생되었다(Fig. 2B). 배지 종류에 따른 자실체 형성을 비교한 결과, 검은비늘버섯에 대하여는 두 종류의 배지가 차이가 났다. P1과 P6은 참나무배지에 접종하였을 경우가 미루나무배지에서 보다 수확시기와 수확량이 훨씬 많고 빨랐다. 그러나 자실체 형성시기가 비록 참나무배지보다는 늦지만, 미루나무배지에서도 일단 원기(primodium)가 형성된 후에는 많은량의 자실체를 수확할 수 있었다. 성 등(1998)이 액체증균을 이용한 포플러배지에서의 자실체 형성에 대한 보고와 본 실험 결과는 검은비늘버섯의 인공 자실체형성을 위한 적정배지선택에 기초 자료로 제공될 수 있을 것으로 사려된다.

PCR-RAPD

검은비늘버섯을 포함한 총 21균주(Table 1)에 대해 PCR-RAPD를 실시한 결과 대부분이 polymorphic band를 형성하였으나, 일부 균은 증폭 상태가 다소 불안정하여 제대로 증폭되지 않았다. 따라서 다형적 밴드가 나타나지 않은 균주는 사전의 실험 결과와 자료와 비교하여 분석하였다. 3종류의 primer를 사용한 RAPD 결과 primer #28에서 19개, primer #36에서 15개 그리고 OPD-18에서 18개 등 총 52개의 polymorphic DNA band를 얻었다. 증폭된 DNA 밴드의 크기는 대부분 0.25~3 Kb 사이였으며, OPD-18에서는 비늘버섯속들이 0.25 Kb보다 더 작은 크기를 나타내기도 하였다. primer #28을 이용한 결과 1.5 kb와 1.0 kb에서 *P. adiposa*와 *Pholiota* sp.의 공통밴드가 형성되었고, primer #36의 경우에는 750과 500 bp에서, OPD-18에서는 750 bp에서 검은비늘버섯만의 특이적 밴드가 형성되었다. 또한 Fig. 3에서 나타난 다형적 밴드를 코드화하여 SPSSWIN 프로그램을 이용하여 유사도를 작성하였다(Fig. 4). 그 결과 비늘버섯속이 RAPD에 나타난 결과와 같이 한 그룹으로 형성되었다. 비록 이 유사도가 현재의 분류 체계와는 일치하지 않지만 실험에 사용된 균주들의 묶음간의 분리가 뚜렷하게 구별되는 것을 볼 수 있었다. 이로써 실험에 사용된 3종류의 primer를 이용한 PCR-

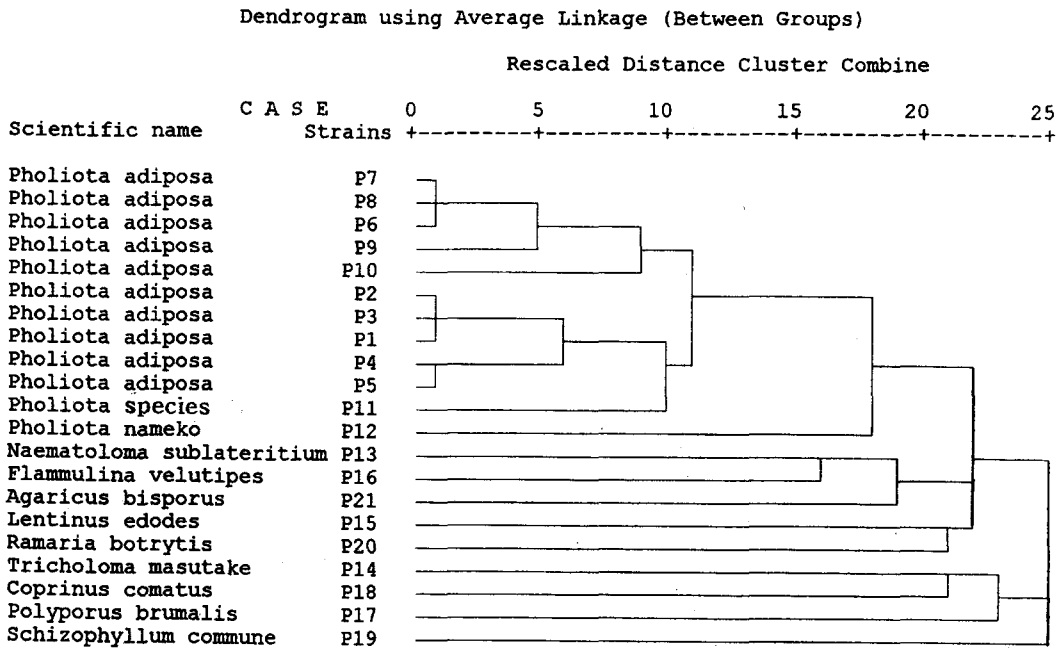


Fig. 4. The dendrogram calculated by the unweighted pair grouping method (the scale shown here indicated the Cosine similarity coefficient) as based on the PCR-RAPD bands made from the various mushroom genomic DNAs.

RAPD 기법으로 비늘버섯속과 일반적인 다른 버섯들을 구별할 수 있고, 특히 검은비늘버섯의 동정에 유용함을 알 수 있었다. 또한 유사도에서 10 균주의 검은비늘버섯은(P6 P7, P8), P9, P10, (P1 P2 P3), (P4, P5)와 같이 5그룹으로 묶여졌다. 이것은 모 균주의 자실체로부터 분리한 균사체와 이를 접종원으로 하여 배양한 자실체에서 직접 추출된 DNA가 동일한 것임을 의미할 뿐만 아니라(Lee 등, 1997), 5종의 검은비늘버섯이 서로 다른 유전적 특징을 가진 것임을 가리키고 있다. 따라서 이 실험결과는 경제식물처럼 버섯의 육종 계획에 기초를 제공할 것이고, 또한 검은비늘버섯 각 개체의 이러한 수집들은 더 나은 육종을 위한 좋은 유전적 재료가 될 것이다(Peberdy 등, 1993; Triratma와 Charpraert, 1991).

교배형 결정 및 균사생장력조사

담자포자들은 P1을 접종원으로 참나무톱밥배지에서 수확한 자실체 (P2)중 가장 견고하고 싱싱한 것을 채취하여 포자프린트를 하고, 이를 멸균수에

회석한 후 PDA 배지에 도말하여 분리하였다. 교배형 결정을 위해 3개의 단포자 분리균을 같은 PDA 배지에 접종한 결과 균들이 서로 접한 지점에서 크게 3가지의 특징이 나타났다(Fig. 5. A, B); 첫째는

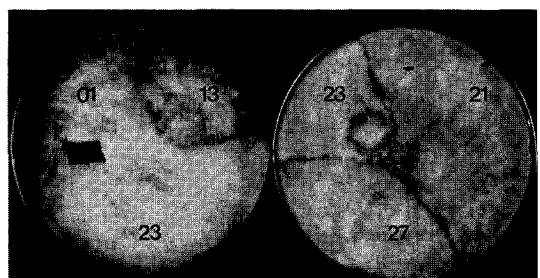


Fig. 5. The mating systems of the basidiospore mycelium (the numbers shown in fig. indicated the mycelia originated from the basidiospores of the isolate P2); A comparable mating between the two basidiospore mycelia (01×23) on A and Incompatible matings between two basidiospore mycelia of 21, 23, and 27 showed the demarcation (21×23, 21×27, and 23×27).

Table 2. Matings of the basidiospores (mycelia) isolated from the spore print of *P. adiposa* (P2) cultivated on the sawdust bottles under the artificial cultivations^a

The isolates of Basidiospore ^b	Matings between the two isolates of the marked (P2 basidiospores) ^c																						
	A ₁ B ₁				A ₁ B ₂				A ₂ B ₁		A ₂ B ₂												
	01	09	26	28	32	37	39	03	07	15	19	20	30	31	38	13	27	02	05	21	23	25	29
A ₁ B ₁ P2 - 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
37	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
39	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
A ₁ B ₂ 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
31	-	-	-p	-	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
A ₂ B ₁ 13	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-p	-p	-	-	-p	-	
27	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
A ₂ B ₂ 02	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	-	-	-	
05	+	+	+	+	+	+	+	-	-p	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	-p	-	-	
21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	
23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-	
25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-p	-	-	-	-p	-	-	-	
29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^aThe sawdust of the oak or the poplar mixed with the rice bran at the rate of 80 : 20 (v/v) and sterilized at 126°C for 30 min.

^bThe basidiospore isolated from the PD agars containing penicillin-G (10 IU/ml) after serial dilutions and plate counting methods and stored at 4°C. The mating type (A₁B₁) was determined without any reference, here.

^cThe status of matings between two basidiospores: The sign of plus(+) indicated the formation of clamp connection (compatibility); minus (-) no clamp (incompatibility); The letter 'p' showing the single pigment line (brown) on a plate when two isolates inoculated and grown on the PD agar.

경계선이 없고 균사간 결합이 일어난 상태(compatibility), 둘째는 균사간 인접부분에서 각 균사의 가장자리에 갈색선이 형성된 상태(incompatibility), 셋째는 균사들이 서로 접하지 않고 뚜렷한 경계를 형성한 상태(incompatibility)(Fischer, 1994). 교배형은 이를 기초로 하여 결정되었다. 예를 들면 P2-01은 A₁B₁으로 교배형을 정하고 이와

결합하는 균사들은 A₂B₂형으로 하였다. 그리고 화합된 균사들은 그 접촉 부위를 현미경으로 관찰하여 clamp connection을 확인하였다(Song, 등, 1996). 나머지 균주들에 대한 교배형은 Table 2와 같다. 실험 결과 검은비늘버섯은 tetrapolar로 나타났다는데, 이것은 이미 Arita와 Mimura(1969)가 *P. nameko*와 함께 bipolar라고 한 것과 차이가 있

었다. 또한 각 단포자들의 균사 성장력을 보면 전체적으로 모균주인 P1 보다 성장력이 낮았다(Table 3). 특히 균 접종후 5일 동안은 비슷한 성장력을 보였으나 10일 후부터는 평균 1.5 cm 정도 차이가 나타났다. 이는 *Flammulina velutipes*(Lee와 Kinugawa, 1981)에 대한 육종 실험에서 균사생장의 차이점에 관한 보고와, Yusof와 Graham(1977)이 단핵주가 모균주인 이핵주보다 성장속도가 느리다는 보고와 일치하였다. 각 교배형내에서는 A₁B₁(7/23)의 경우 P2-32와 P2-37이 가장 빨리 성장하였고, A₁B₂(8/23)에서는 P2-30과 P2-07이, A₂B₂(6/23)에서는 P2-05와 P2-29가 15일 동안 거의 7.2 cm 정도 성장하였다. 반면에 A₂B₁(2/23)인 P2-13과 P2-27는 다른 단핵균과 마찬가지로 15일 동안 6.0 cm 정도의 성장력을 나타내었다. 그리고 가장 느린 성장력을 나타낸 것은 A₁B₂의 P2-15였다. Ellingboe(1993)가 표고(*Lentinula edodes*)의 육종 실험에서 모균주보다 교배시킨 이핵균주에서 더 큰 자실체를 생산하였다는 것과 Kneebone 등(1977)이 양송이(*A. bisporus*)에서 단포자 기원의 균사체 선발에 의해 생산량이 높은 12계통의 균주를 얻었다는 결과에 근거하여, 다음 실험 단계로 각 교배형내에서 가장 빠른 성장력을 나타낸 단핵균주와 가장 느린 성장력을 한 단핵주들을 교배시켜 자실체 형성능력과 균사성장력 등을 서로 비교하여 우수한 품종을 육성할 예정이다.

적 요

1996년부터 속리산 법주사 주변과 그 외의 지역에서 *Pholiota species* 5종을 채집하여 *Pholiota adiposa*와 *Pholiota species*로 동정하였다. 이 버섯들을 다른 버섯들과 random primer에 의한 RAPD를 실시하여 형태적 분류와 연관시켜 본 결과, primer #28(1.5 kb와 1.0 kb 사이)에서 *Pholiota adiposa*와 *Pholiota sp.*의 공통밴드가 형성되었고, primer #36(750과 500 bp 사이)와 OPD-18(750 bp)에서는 검은비늘버섯만의 특이적 밴드가 나타났다. 모균주와 이를 접종원으로 하여 수확한 자실체의 DNA에서는 동일한 모양의 다형적 밴드가 형성되었다. 또한 채집된 5종의 검은비늘

버섯은 약간씩 다른 밴드적 차이를 나타내었다. 검은비늘버섯의 포자지문법을 통한 단포자분리에 의한 mating 결과 tetrapolar형을 관찰하였는데, 이는 Arita와 Mimura(1969)가 이미 *P. adiposa*와 *P. nameko*가 bipolar 형이라고 한 것과 다른 결과이다. 본 실험은 PCR-RAPD를 이용하여 하나의 버섯에서 얻은 담자포자의 단핵(monokaryon)과 이핵(dikaryon) 균사간의 차이를 보기 위한 기초실험이며, 또한 육종 계획에 대한 응용을 위한 실험이다.

감사의 글

본 연구 내용의 일부는 1997~8년도 농림수산 기술개발사업 연구지원에 의하여 이루어진 것임(동국대학교, 유용버섯 자원 발굴과 재배).

참고문헌

- 성재모, 이재근, 박동수. 1998. 비늘버섯속균(*Pholiota sp.*)의 특징과 자실체 형성. 한국균학회지. 26(2): 194-199.
- 오창호. 1998. 한국 춘란에서 분리한 난 균근균의 난 성장 효과에 대한 연구. 한국고원대학교 생물교육과 박사학위 논문.
- 차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯 재배 기술. 사단법인 농진회.
- Arita, I. and Mimura, K. 1969: The mating system in some Hymenomycetes II. The mating system in *Favolus arcularius* (BATSCH ex FR.) AMES, *F. mikawai* (Lloyd) IMAZ., *Pholiota adiposa* (FR.) QUEL. and *Pleurotus cornucopiae* (PAUL. EX PERS.) ROLL. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 7: 51-58.
- Arita, I., Teratani, A. and Shione, Y. 1980. The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 18: 107-113.
- Chiu, S. W., Kwan, H. S. and Cheng, S. C. 1993. Application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species with emphasis on *Lentinus edodes*. In *Genetics and Breeding of Edible Mushroom*. Edited by Shu-Ting Chang, John A. Buswell, and Philip G. Miles. Gordon and Breach Science. Publishers. U.S.A.

- Chung, K. S. 1982. Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea(II). *Kor. J. Mycol.* 10(1): 33-39.
- Ellingboe, A. H. 1993. Breeding for mushroom production in *Lentinula edodes*. In Genetics and Breeding of Edible Mushroom. Edited by Shu-Ting Chang, John A. Buswell, and Philip G. Miles. Gordon and Breach Science. Publishers. U.S.A
- Erlich, H. A., Gelfand, D. H. and Sninsky, J. J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 252: 1643-1651.
- Fischer, M. 1994. Pairing tests in the *Phellinus pini* group. *Mycologia* 86: 524-539.
- 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.
- Kong, W. S., Kim, D. H., Kim, Y. H., Kim, K. S., You, C. H., Byun, M. O. and Kim, K. H. 1997. Genetic variability of *Flammulina velutipes* monosporous isolates. *Kor. J. Mycol.* 25: 111-120.
- Lee, G. Y. 1988. Colored Korean Mushrooms. Academy Publishing Co., LTD. Seoul, Korea.
- 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.
- Lee, S. S. and Sung, C. K. 1997. The Mycelia isolated from the Basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 121-129.
- Lee, T. S., Bak, W. C., Kang, H. D., Kim, S. K., Byun, B. H., Yi, C. K., Lee, W. K. and Min, D. S. 1997. Classification of Korea *Lentinula edodes* strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 219-225.
- Park, Y. H. 1991. Colored Fungi of Korea. Kyohak Publishing Co., LTD. Seoul, Korea.
- Park, Y. H., Kim, Y. S. and Cha, D. Y. 1978. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.
- Peberdy, J. F., Hanifah, A. M. and Jia, J. H. 1993. New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In Mushroom Biology and Mushroom Products. pp 55-62. Edited by S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. The Chinese University Press.
- Rohlf, F., Kishpaugh, J. and Kirk, D. 1979. NTSYS numerical taxonomy system of multivariate statistical program. State University of New York. Stony Brook.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatic, T. 1989. Molecular cloning-A Laboratory manual. 2nd eds. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 6.1-6.19.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. Sven Koeltz Scientific Books. D-6240 Koenigstein/Federal Republic of Germany. pp 573-584.
- Song, Y. J., Jeong, M. J., Kim, B. G. and Rho, Y. D. 1996. Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Kor. J. Mycology* 24: 186-205.
- Tirratana, S. and Chairprasert, A. 1991. Science and Cultivation of Edible Fungi, Maher(ed.) Balkema, Rotterdam. ISBN 90 5410 0214. see pp 57-63.
- Weising, K., Nybom, H., Woff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in Plants and Fungi, CRC Press. see pp 24-135.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Pafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid. Res.* 18: 6531-6535.
- Yu, K. W., Seong, C. K., Lee, S. S. and Yoo, J. Y. 1996. Studies on the fungal isolates of *Mucorales* collected from Korean home made mejus and nuluks. *Kor. J. Mycology* 24: 280-292.
- Yusof, N. and Graham, K. M. 1977. A preliminary genetic study of local edible mushroom *Pleurotus flabellatus*. *Mal. Appl. Biol.* 6(1): 59-66.