

느타리버섯 포자와 균사체의 양성자 빔 조사에 대한 민감도

권혜진 · 공원식^{1*}

두레친환경농업연구소, ¹농업과학기술원 응용미생물과

Proton Beam Sensitivity of Basidiospore and Mycelium in *Pleurotus ostreatus*

Hye Jin Kwon and Won-Sik Kong^{1*}

Doorae Institute of Environment-Friendly Agriculture, Seoul 137-850, Korea

¹Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-707, Korea

(Received February 21, 2006)

ABSTRACT: To assess the effects of proton beam on radiation sensitivity of the basidiospore and mycelium of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), the D_{10} values and L_{50} (lethal 50%) values were analysed. By the proton beam radiation, the survival rate and germination rates increased at the dose of 10 Gy~100 Gy and then decreased significantly over 500 Gy. L_{50} values of basidiospore and mycelium of *Pleurotus ostreatus* were over 500 Gy and 400 Gy, respectively. D_{10} values were calculated from linear regression formulae ($D_{10} = -1/\text{slope}(b)$, $y = a + bx$) as 750 Gy and 1,250 Gy, respectively. Based on our experiment, the optimum dose of proton beam as a mutation source would be between from 500 Gy to 750 Gy for basidiospores and from 400 Gy to 1000 Gy for mycelium of oyster mushroom.

KEYWORDS: Germination rate, Mutation, Oyster mushroom, Proton beam, Sensitivity

느타리버섯은 식품 및 의학산업에 있어 그 가치를 인정 받고 있으며(Bano and Rajarathnam, 1988), 바이오폐기 물을 재이용하는 유용한 방법으로 인정되고 있다(Jwanny *et al.*, 1995; Peiji *et al.*, 1997). 또한 콜레스테롤 수치를 낮추고(Bobek *et al.*, 1998), 간암내성을 증진시키는 효과가 알려져 있다(Wang *et al.*, 2000). 버섯류의 유전육종에는 균사체간의 교배 또는 원형질체의 융합, 외부유전자 도입 등의 방법이 사용되고 있으며(Yoo, 1992; Yoo and Cha, 1992), 최근에는 담자포자(basidiospore)에 대한 DNA 다형성을 확인하고(Kong *et al.*, 1997), UV 조사로 영양요구주를 선발하는 등, 담자포자를 이용하여 다양한 표현형을 지닌 균주를 개발하기 위한 노력이 되어지고 있으나(Byun *et al.*, 1997), 양성자 빔을 이용한 유용균주의 유기에 관한 연구는 미진한 상태이다.

방사선과 유전자에 대한 연구는 1927년 초파리에서 방사선에 의한 돌연변이 유발, 1928년 옥수수 돌연변이 유발을 시작으로 연구가 진행되어 왔으며, 방사선으로 유발된 변이체를 직접 이용하거나 교잡육종의 소재로 중요하게 이용하고 있다. 최근, 새로운 방사선원으로 등장한 이온빔은 이온가속기로 얻을 수 있는 방사선의 일종으로 γ 선이나 X선에 비해 국부적으로 큰 에너지를 줄 수 있는 특징이 있어 DNA 이중결합절단, 결실, 전좌, 역위 등 큰

구조변화를 유발할 가능성이 높다고 판단되며, 다른 방사선이나, 화학변이원 처리로 얻을 수 없었던 새로운 돌연변이체 유발이 가능성이 밝혀졌다(Shugemitsu, 2003).

이온빔은 조사 target에 막대한 에너지를 주는 대신 스스로 급속히 속도를 잃게 된다. γ 선이나 전자선 등에서 비중에 따라 물질에 주는 에너지, 소위 선에너지 부여(Linear Energy Transfer; LET)가 0.2 keV/ μ m로 낮은 것에 비해 220 MeV의 탄소 ion에서는 100~200 keV/ μ m로 500배 이상 높기 때문에 수중에서 1.2 mm 정도밖에 진행하지 않는다. 탄소이온빔(150 Gy)에 의한 특정 유전자좌의 돌연변이율은 1.9×10^{-6} 으로, 전자선(750 Gy)이 0.11×10^{-6} 인 것에 비해 17배 높게 나타나며, 점돌연변이보다 역위나 결실 등 큰 DNA 구조변화에 의한 돌연변이율이 높게 나타나 낮은 선량에 의해서 많은 수의 돌연변이체를 얻을 수 있다. 벼의 경우 도열병, 엽고병 등 내병성 변이체를 얻는 빈도가 높으며, 화훼류의 경우 재분화계를 이용하는 것이 변이체 유발이 잘 일어나서 카네이션의 꽃색, 꽃 모양의 변이 스펙트럼에서도 이온빔에 의한 돌연변이 양상이 기존의 방사선 처리에 비해 변이 스펙트럼이 넓게 나타나며, 유발된 변이의 경우 회복하기 어려운 변이가 유지되고 있음이 발견되고 있다 (Atsushi, 2003).

따라서 우리나라에서 버섯류 중 가장 많이 재배되고 있으며 그 효용 가치가 높은 느타리버섯을 대상으로 새로운 유전자원 확보 및 변이체 유도에 이온빔이 효과적으로 이

*Corresponding author <E-mail: wskong@rda.go.kr>

용될 수 있을 것으로 기대되며, 이중 양성자를 이용한 빔 조사가 가능성이 있을 것으로 판단되어 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

균주

2004년 10월에 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양 받은 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) “수한”(ASI2504) 품종을 사용하였다. 자실체로부터 담자포자를 받아 petri dish에 도말하여 실험을 수행하였다. 균사체의 경우 분양 받은 균주를 계대배양하여 액체 및 고체배지에서 배양한 후 양성자 빔 조사에 이용하였다.

양성자 빔 조사 조건

원자력의학원의 MC-50 cyclotron을 이용하여 2004년 11월 11일부터 3회에 걸쳐 Table 1의 조건으로 양성자 빔을 조사하였다.

담자포자와 균사체 처리 조건

자실체에서 담자포자를 받아 petri dish에 도말하여 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 Gy의 선량을 조사하였다. PDB(Potato Dextrose Broth) 배지에서 액체배양한 균사체를 homogenizer로 분쇄하여 eppendorf tube(200 μ l)에 담아 현탁액상태로 10, 20, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000 Gy의 선량을 조사하였다.

또한, 균사체 성장저해 정도를 조사하기 위하여 직경 35 mm petri dish에 접종하여 25°C에서 1주일 생장을 시킨 후, petri dish에서 자란 상태에서 10, 20, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000 Gy의 선량을 조사하였다.

담자포자 발아율 및 균사체 생존율

양성자 빔이 조사된 포자와 균사체는 조사된 당일에 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 도말한 후, 25°C 항온기에서 일주일간 배양 후 발아율과 생존율을 조사하였다. 포자의 발아율($100 \times \text{number of the germinated basidiospore} / \text{number of the spread basidiospore}$)과 균사체의 생존율($100 \times \text{number of the survival mycelium} / \text{number of the spread mycelium}$)을 조사하였으며, 선량에 따른 반응곡선을 그리고, D_{10} value($D_{10} = -1/\text{slope}(a)$, linear regression curve; $y = ax + b$)를 계산하였다(Lee and Chang, 1999). 또한, 생존율 결과를 토대로 치사율 50%(L_{50}) 이상인 선량조건을 조사하였다.

Table 1. MC-50 cyclotron irradiation condition at room temperature applied

Details	Value
Beam species	Proton
Beam energy and current from MC-50 cyclotron	45 MeV/5 nA
Beam energy at the target	35.7 MeV
dE/dx in water	1.65 keV/ μ m
Vacuum pressure	1.19×10^{-6} torr
Dose rate	0.786 Gy/s
Uniformity (35 mm Dia.)	92.98%
Dose	10 Gy~2 kGy

균사생장 저해 조사

PDA 고체배지에서 1주일간 배양된 균사체에 양성자 빔을 조사한 후 균사체의 일부를 6 mm cork borer로 채취하여 PDA 고체배지에 접종하여 25°C에서 1주일간 배양 후 성장된 균사체의 직경을 측정하였다.

현미경 관찰

Petri dish에 받은 포자는 양성자 빔을 조사한 후 PDB 액체배지에 희석하여 25°C에서 3일간 배양 후 광학현미경(Axioplan 2 imaging, Zeiss)을 이용하여 포자에서 균사체가 발아되는 모습을 관찰하였다.

결과 및 고찰

담자포자 발아율 및 균사체 생존율

양성자 빔 조사 후 PDA 고체배지에서 담자포자와 균사체를 1주일간 배양한 결과는 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 담자포자는 petri dish에 받아 직접 양성자 빔을 조사한 후 멸균수에 희석하여 PDA 배지에 도말하여 균사가 발생한 것을 측정하였다(Table 2).

포자발아율은 양성자빔 조사선량 200 Gy 이하에서 대조구에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않은 반면, 500 Gy 이상의 선량에서는 발아율이 현저하게 감소하였다. 또한 100 Gy 조사시 대조구에 비해서 발아율이 유의성있게 증가한 결과를 보여, 양성자 빔을 조사할 경우 낮은 선량에서는 발아율이 다소 증가하는 경향이었다. 100 Gy 이상에서는 조사선량이 높아질수록 발아율은 급격하게 감소하였다. 500 Gy 이상의 선량을 조사한 경우 치사율 50%로 나타났으며, 이 결과를 토대로 양성자 빔 조사 후 번이체 유도에 효과적인 발아조건을 찾을 수 있을 것으로 판단된다.

균사체의 경우 조사선량을 400 Gy와 750 Gy 조사를 추

Table 2. Germination rate of the basidiospore in *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation

Treatment	control	10 Gy	20 Gy	50 Gy	100 Gy	200 Gy	500 Gy	1 kGy	2 kGy
Germination rate (%)	1.49 bc ^z	2.37 b	1.36 bc	2.19 b	3.67 a	2.16 b	0.74 cd	0.01 d	0.05 d

^zValues in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

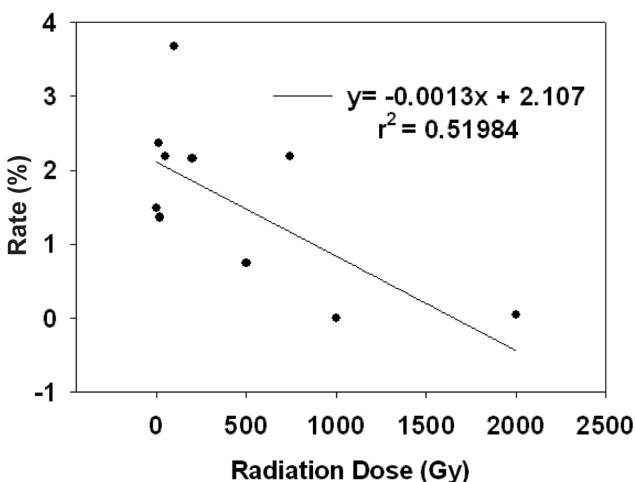
Table 3. Survival rate of the mycelium in *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation

Treatment	control	10 Gy	20 Gy	50 Gy	100 Gy	200 Gy
Survival rate (%)	2.95 b ^z	2.95 b	4.96 a	2.55 bc	2.75 b	1.62 cd
Treatment	400 Gy	500 Gy	750 Gy	1 kGy	2 kGy	
Survival rate (%)	0.79 de	0.29 e	0.24 e	0.01 e	0.00 e	

^zValues in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

가하여 실시하였고, 조사된 균사체의 생존율을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. 20 Gy에서 생존율이 가장 높았으며, 이를 통해 100 Gy 수준까지는 대조구와 차이가 없었다. 균사체에 있어서 담자포자와 마찬가지로 200 Gy 이상 조사할 경우 유의성있게 생존율이 감소하기 시작하였다. 50% 치사율은 400 Gy 이상 조사선량에서 나타났으며, 양성자 빔 조사후 돌연변이체 유도시 생존율을 고려하여 총 개체수를 결정할 수 있을 것으로 사료된다. 발아율과 생존율을 그래프로 그려보면 시그모이드 형태의 그래프를 나타냈다. 이러한 결과는 감마선이나 UV를 조사한 경우와도 비슷한 양상(Lee and Chang, 1999; Joh *et al.*, 2004)을 나타냈으며, 본 실험에서 사용한 양성자 빔의 에너지 수준이 45 MeV로 낮은 에너지수준에 속하기 때문에 감마선 처리와 조사선량에 따른 결과가 비슷하게 나온 것으로 생각되었다.

Table 2와 Table 3의 결과를 토대로 선량에 따른 반응곡선을 그리고, D_{10} value($D_{10} = -1/\text{slope}(a)$, linear regression curve; $y = ax + b$)를 계산한 것이 Fig. 1과 Fig. 2이다. 회귀곡선에 의하면 담자포자와 균사체의 D_{10} value가 각각 750 Gy 와 1,250 Gy로 계산되었다. 감마선에 대한 각각의 D_{10} value가 2,500 Gy, 500 Gy 이었던 것(Lee and Chang, 1999)과는 달리 균사체의 빔에 대한 저항성은 감마선보다 양성자빔에서 높았던 반면, 담자포자의 경우 양성자 빔에 대한 민감도가 높다고 할 수 있었다.

**Fig. 1.** Linear regression curve of the basidiospore germination rate in *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation.

균사 성장저해

양성자 빔 조사 후 PDA 고체배지에서 균사체를 1주일 간 배양한 후, 생장한 균사체의 직경을 측정된 결과 Table 4에서와 같이 10 Gy~50 Gy 처리시 대조구와 유의성 있는 차이를 보이지 않았으며, 10 Gy 처리시 균사 생장율이 대조구보다 증가하는 결과를 보였으며, 400 Gy 이상 처리구에서 균사생장이 유의성있게 지연되는 경향이였다. 특히, 2 kGy 처리구에서는 균사가 전혀 성장하지 못하였다. 이는 균사체의 생존율과도 유사한 결과로서 1 kGy 이상 처리는 균사체생존율이 매우 낮아지므로 돌연변이 유도 선량으로 적합하지 않음을 알 수 있었다.

현미경 관찰

양성자 빔을 조사한 후 담자포자를 PDB 액체배지에 희석하여 25°C에서 3일간 배양 후 현미경(Axioplan 2 imaging, Zeiss)을 이용하여 포자에서 균사체로 발아되는 모습을 관찰한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 양성자 빔 조사에 의해 포자에서 균사가 형성되는 과정은 무처리구에 비교하여 특이한 차이가 나타나지는 않았다. 다만, 앞서 발아율, 생존율과 관련하여 조사선량이 높아질수록 발아되지 않고 담자포자 상태로 존재하는 비율이 높았으며, 발아된 균사가 생장 도중에 정지하는 모습을 관찰할 수 있었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조구의 경우 균사가 생장하여, 분지를 형성한 반면, 발아율이 감소하는 200

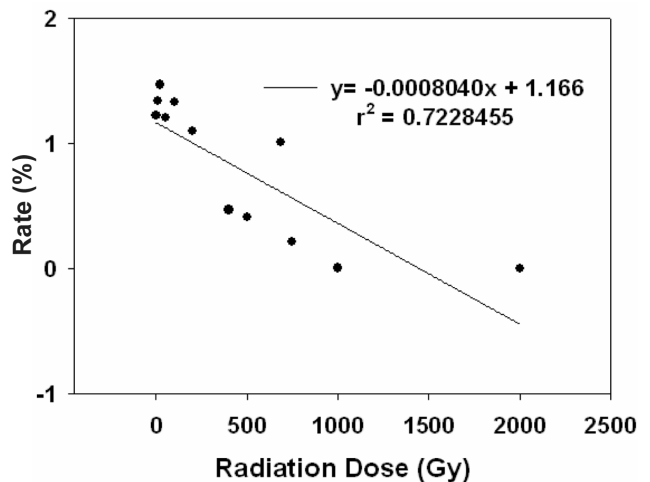
**Fig. 2.** Linear regression curve of the mycelium survival rate in *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation.

Table 4. Mycelium diameter of the *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation

Treatment	control	10 Gy	20 Gy	50 Gy	100 Gy	200 Gy
Diameter (mm)	56.8±15.9 ab ^z	64.2±12.2 a	55.4±7.4 ab	49.8±6.5 abc	38.5±11.9 cde	44.5±10.2 bcd
Treatment	400 Gy	500 Gy	750 Gy	1 kGy	2 kGy	
Diameter (mm)	24.8±17.5 ef	32.0±17.9 de	13.0±7.3 fg	11.5±9.2 fg	6.0±0.0 g	

^zValues in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

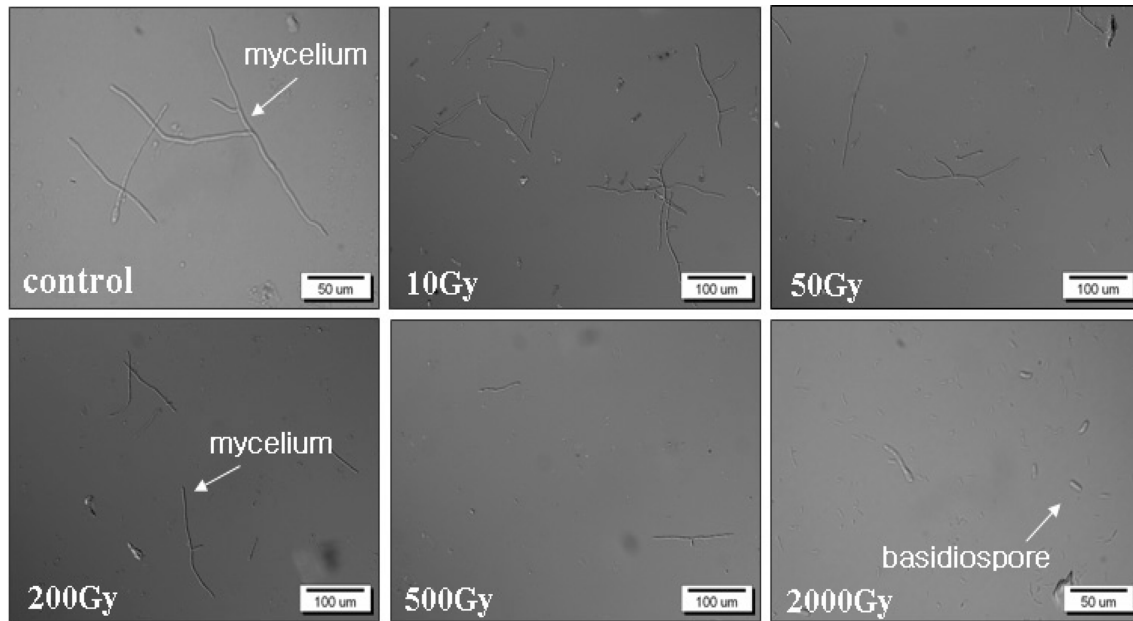


Fig. 3. Microscopic view of the basidiospore and mycelium in *Pleurotus ostreatus* after proton beam radiation at dose 10, 50, 200, 500 Gy and 2000 Gy. Increasing dose, decreasing germination rate of basidiospore.

Gy 이상 조사구에서는 발아하지 않는 담자포자를 많이 발견할 수 있었다.

균사생장저해 정도를 현미경으로 관찰한 결과 양성자 빔을 조사하지 않은 대조구에서는 균사체가 분지하면서 성장하였으나, 100 Gy 이상에서는 균사에서 분지가 제대로 이루어지지 않았으며, 1,000 Gy 이상에서는 거의 사멸하였다.

양성자 빔 처리에 의한 담자포자 발아율, 균사체 생존율, 균사생장저해 결과를 종합해 볼때 돌연변이원으로 양성자빔 이용시 적정조사 선량은 담자포자의 경우 L_{50} 값인 500 Gy와 D_{10} 값의 750 Gy, 균사체의 경우 L_{50} 값인 400 Gy에서 균사생장을 저해하는 1,000 Gy 사이가 적절할 것으로 판단되었으며, 본 실험에서 얻어진 균주들은 이후의 특성조사를 거쳐 육종모본으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

양성자 빔 조사 후 조사선량에 따른 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 담자포자 발아율 및 균사체 생존율이 10~100 Gy 조사선량에서 시그모이드 곡선을 그리며 증가하였으

며, 이후 500 Gy 이상 조사시 유의성있게 감소하였다. 50% 치사율(L_{50})을 나타내는 조사선량은 담자포자가 500 Gy, 균사체가 400 Gy로 나타났으며, D_{10} 값($D_{10} = -1/\text{slope}(b)$, $y = a + bx$)은 각각 750 Gy와 1,250 Gy로 나타났다. 느타리버섯 돌연변이원으로서 양성자 빔 이용시 적정 조사선량은 담자포자의 경우 500~750 Gy, 균사체의 경우 400~1,000 Gy가 바람직하다고 판단되었다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 원자력연구개발사업 및 21세기 프론티어연구개발사업으로 시행한 양성자기반공학기술사업의 양성자가속기 이용자프로그램(No. M202AK010021-04A1101- 02110)의 연구결과입니다.

인용문헌

- Atsushi, T. 2003. Ion beam 육종연구의 개발과 특징. 방사선과 산업 99: 6-16.
 Bano, K. and Rajarathnam, S. 1988. *Pleurotus* Mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, Post-harvest Physiology, preservation and role as human food. *CRC Crit. Rev.*

- Food Sci. Nutr.* **27**: 87.
- Bobek, P., Galbavy, S. and Ozdin, L. 1998. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in diemthylhydrazine-induced rat colon cancer. *Oncol. Rep.* **5**: 727-730.
- Byun, M. O., Chung, J. C., You, C. H., Cha, D. Y. and Lee, D. H. 1997. Transformation of *Pleurotus sajor-caju* by complementation of PABA requiring mutant. *Kor. J. Mycol.* **25**: 233-237.
- Joh, J. H., Kim, B. G., Kong, W. S., Yoo, Y. B., Chu, K. S., Kim, N. K., Park, H. R., Cho, B. G. and Lee, C. S. 2004. Isolation and characterization of dikaryotic mutants from *Pleurotus ostreatus* by UV irradiation. *Mycobiology* **32**: 88-94.
- Jwanny, E. W., Rashad, M. M. and Abodu, H. M. 1995. Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus cultivation*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50**: 71-78.
- 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**: 121-129.
- Lee, Y. and Chang, H. 1999. Radiation sensitivity of basidiospore and mycelium in *Pleurotus ostreatus*. *J. Kor. Nuclear Soc.* **31**: 287-293.
- Peiji, G., Yinbo, Q., Xin, Z., Mingtian, Z. and Yonhheng, D. 1997. Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 581-584.
- Shugemitsu, T. 2003. 방사선으로 만드는 보다 나은 생활을 목표로 해서. 방사선과 산업 **99**: 1-5.
- Wang, H., Gao, J. and Ng, T. B. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**: 810-816.
- Yoo, Y. B. 1992. Interspecific hybridization between *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus florida* following protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* **20**: 118-126.
- _____ and Cha, D. Y. 1992. Gene transfer in edible fungi using protoplasts. Pp 157-192. In: Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G. Eds. Genetics and breeding of edible mushrooms. Gordon and Breach Science Publisher, New York.