

표고 배양시 균주 혼입에 따른 생리 및 유전적 변화

이봉훈* · 박원철 · 김명길 · 유선화 · 유성열

국립산림과학원 화학미생물과

Physiological and Genetic Changes by Mixing Culture of Shiitake

Bong-Hun Lee*, Won-Chull Bak, Myungkil Kim, Sunhwa Ryu and Sung-Ryul Ryu

Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

(Received September 29, 2006)

ABSTRACT: Attempts were made to investigate the physiological and genetic changes when two different shiitake (*Lentinula edodes*) strains are mixed. Mycelial growth of KFRI 180 strain and KFRI 1 strain were investigated 82 mm and 80 mm, respectively. Concerning the weight loss percentage of medium, KFRI 1 strain decreased 2.4% and KFRI 180 strain 1.6%. Plug-shaped spawn had no problem to incubate and there were no differences among the ratios of mixture. Also, conditions of plug-shaped spawns were similar. When the isolated mycelia from plug-shaped spawns was incubated again, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% showed decreased growth of mycelia compared with other treatments. The same results were obtained from test tubes filled with sawdust. When surface of spawn bottles were observed, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% showed spots, but other treatments were not different from KFRI 1 and KFRI 180. Test was made to confirm the strains by confrontation culture. The mixture of two strains was proved to be KFRI 1 regardless the ratios of mixture. However, by the RAPD primer analysis, when KFRI 1 was mixed with KFRI 180, KFRI 180 was stronger. Thus, the confrontation line on PDA was different from the bands analysis by primers. Attempts were made whether the fruit-bodies were made at the generating condition of spawn bottles. The results were that KFRI 1 100%, KFRI 1 90%-KFRI 180 10%, KFRI 1 80%-KFRI 180 20%, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% treatment showed fruit-body formation. The shape of fruit-body was deformed, but the gill was made normally.

KEYWORDS: Genetical, Mixing, Physiological, RAPD primer analysis, Shiitake strains

1980년대에는 상대적으로 낙후된 재배기술 및 재배관리 등에 대한 정확한 분석을 통한 표고재배의 투자효과 분석을 시도한 보고가 있었고, 표고균이 초기에는 목질부의 xylan을 분해하여 이용하고 그 다음 pectin 질을 분해한다는 보고도 있었다(박, 1984; 홍 등, 1986).

또한 종균을 사용한 인공재배가 시작되면서 개발된 많은 품종의 계통분석자료가 축적되었고, 종균의 생산능력을 검정하는 시도도 있었으며, 더불어 새로운 품종 개발도 병행되었다(박, 1996; 이 등, 1987, 1988, 1993, 1997).

그 후에는 매년 수백만본 정도로 추산되는 폐골목을 목질보드로 사용하기 위한 시도나, 야생표고들 간의 유전적 변이에까지 관심이 확대되고 있으며, 기능성물질 탐색에 많은 관심이 집중되는 상황에 발맞춰 표고 자실체로부터 추출한 성분을 분석하는 연구도 진행하였다(김·박, 2001; 이 등, 2003; 최 등, 1998).

외국에서는 표고균 자체에 관한 연구에 치중하고 있으며, 그 중 상당수가 효소, 항돌연변이 효과, 항세균 효과,

표고에서 추출한 다당체의 기능, 유전자 관련 부분 등에 집중되고 있다(Hatvani, 2001; Kim, 2005; Lee *et al.*, 2001; Miyazaki *et al.*, 2005; Sugui, 2003; Zheng, 2005).

하지만 이런 다양한 노력에도 불구하고 끊임없이 새로운 의문들이 제기되었고 그 중 하나가 최근 들어 표고골목에 성형종균을 접종해서 재배하는 경우가 급격히 늘어나면서 비롯된, ‘종균을 접종해도 버섯이 나오지 않는 것은 종균들이 썩었기 때문일지도 모른다’라는 의심이다.

따라서 본 연구에서는 표고 배양시 균주의 혼입에 따른 균사의 생리적 및 유전적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

균주

국립산림과학원 버섯연구실에서 보관 중인 KFRI 1과 KFRI 180이 실험에 사용되었다.

시험균주들의 균사생장 및 중량감소를 조사

균사생장 조사를 위해 저온보관 중이던 해당 균들을

*Corresponding author <E-mail: bonghun90@naver.com>

PDA(Potato Dextrose Agar)에 옮겨 23°C에서 배양하다가 5 mm cork borer로 떼어내어 새로운 PDA에 치상하였다. 균은 23°C에서 10일간 배양 후 균사생장길이를 조사하였다. 중량감소를 조사를 위해 신갈나무톱밥 79%, 미강 19%, 설탕 1%, CaCO₃ 0.6%, KNO₃ 0.4% 비율로 섞은 톱밥배지를 함수율 60%로 조정해서 150×22 mm 시험관에 단단하게 넣은 다음 충전된 배지 길이를 100 mm, 배지무게 38 g으로 균일화 시켰다. 그리고 121°C에서 90분 살균하여 실험에 사용하였다. 살균 후, 무균실에서 균을 5 mm cork borer로 떼어내어 배지의 윗면에 치상한 다음 시험관 입구를 실리콘마개로 막았으며, 균을 접종하지 않은 것을 무처리로 하였다. 23°C에서 60일 배양 후 중량감소율을 조사하였다.

성형종균 관찰

신갈나무톱밥 80%, 미강 19%, 설탕 1% 비율로 섞고 함수율을 65%로 조절한 후 일반적으로 사용되고 있는 1 l 용량의 종균병에 800 ml씩 넣어서 고압살균(121°C, 90분)했다. 살균이 끝난 배지에 각각의 균을 접종하고 23°C에서 30일 간 배양했다. 배양이 완료된 KFRI 1과 KFRI 180 종균을 새로운 종균병의 톱밥배지 윗면에 KFRI 1 100%, KFRI 180 100%, KFRI 1 90%-KFRI 180 10%, KFRI 1 80%-KFRI 180 20%, KFRI 1 70%-KFRI 180 30%, KFRI 1 60%-KFRI 180 40%, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 등 7가지 혼합비율(처리구)로 구획을 나누어 접종했다. 이렇게 접종된 종균병들을 30일간 배양한 다음 종균을 종균병에서 꺼내어 체에 갈아 잘 섞은 후 성형틀을 이용해서 성형종균을 만들었다. 제작된 성형종균을 6일간 배양한 후 처리구들 간의 상태를 비교했다.

성형종균의 생장력 조사

성형종균에서 재분리한 균의 생장력을 PDA와 톱밥배지에서 확인했다. PDA에서의 확인은 7 처리구 모두를 대상으로 23°C에서 7일간 배양 후 실시하였다. 톱밥배지에서의 확인은 ‘중량감소율 조사’와 같은 방법으로 제작된 시험관에 KFRI 1 100%, KFRI 180 100%, KFRI 1 80%-KFRI 180 20%, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 이상 4개 처리구의 성형종균에서 균을 재분리, 배양한 균을 PDA에 재접종한 다음 23°C에서 25일간 배양 후 확인했다.

성형종균을 접종한 종균병 관찰

‘성형종균 관찰’에서와 같은 방법으로 배합해서 톱밥배지를 넣은 종균병에 각 처리구 별로 2개씩 성형종균을 접종했다. 그리고 배양 과정 중 종균의 외형에 어떤 변화가 생기는지 관찰했다.

대치배양

성형종균에서 재분리한 7 처리구 균들이 혼입에 사용된

모균주들인 KFRI 1과 KFRI 180 중 어느 균주와 유사한지를 확인하기 위해 PDA 배지 상에서 일정한 거리를 유지한 채 서로 대치시켰다. 23°C에서 30일간 배양 후 확인하였다.

RAPD(Random Amplified polymorphic DNA)에 의한 확인

성형종균에서 PDA 배지로 재분리된 균을 사용하였다.

각 균사체로부터 genomic DNA를 추출하기 위하여 lysis buffer를 넣고 잘 섞은 후 65°C에 1시간 반응시켜 동량의 phenol : chloroform을 넣고 원심분리하여 DNA를 포함한 상층부를 새 튜브로 옮겼다. 그런 다음 3 M NaOAc로 침전시키고 isopropanol로 세척하여 genomic DNA를 회수하였다(Lee and Taylor, 1990).

얻어진 genomic DNA와 Operon Technologies primers를 이용한 RAPD 분류를 위해 OPA1 primer: CAGGCCCTTC, OPA2 primer: TGCCGAGCTG, OPA4 primer: AATCG-GGCTG, OPA7 primer: GAAACGGGTG, OPA8 primer: GTGACGTAGG, OPA10 primer: GTGATCGCAG, OPA13 primer: CAGCACCCAC로 하여 92°C에서 1분간 1 cycle, 35°C에서 1분간, 72°C에서 2분간 set을 45 cycles로 PCR을 수행하였고(Maki *et al.*, 2001; Zhang and Francis, 1995), 밴드의 상동성 검색은 Fingerprinting II Informatix Software(Bio-Rad) program에 의해 수행하였다.

버섯발생 확인

균주가 혼입되었어도 자실체는 발생되는지를 확인하기 위해 ‘성형종균을 접종한 종균병 관찰’ 실험에 사용되었던 종균병들을 자실체 발생조건에 노출시켰다. 자실체 발생조건은 온도 15~16°C, 습도 90% 이상 조건이었으며, 발생작업에 들어갈 때는 4개월 배양 시점이었다.

결과 및 고찰

시험균주들의 균사생장 및 중량감소율 조사

균사생장은 KFRI 180이 82 mm, KFRI 1 80 mm로 조사되었다(data not shown). 중량감소율 조사에서는 KFRI 1이 2.4% 중량감소가 이루어졌으며, KFRI 180은 1.6% 감소된 것으로 나타났다(Fig. 1). 이는 ‘균사생장 조사’에서, 비록 미미한 차이이기는 하지만 KFRI 180이 약간 더 빠른 균사생장을 보였던 것과는 반대의 결과로서, 배지의 부후능력과 균사생장에는 관련성이 크지 않음을 의미한다.

성형종균 관찰

성형종균은 배양 과정 중이나 배양 후에 균사가 묻쳐져서 성형이 유지되는 것에는 전혀 문제가 없었고 이런 현상은 혼입비율 간에도 차이가 없었다. 또한 성형종균의

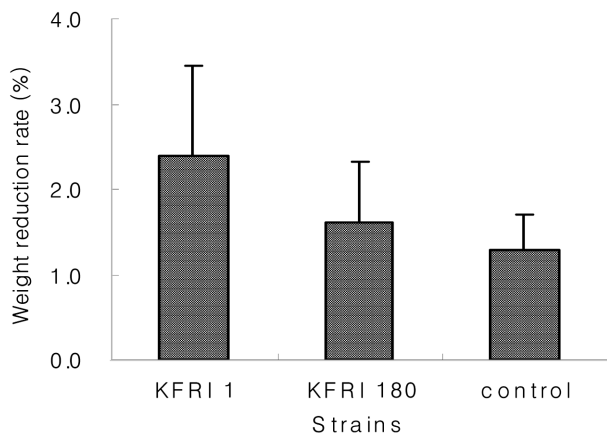


Fig. 1. Weight reduction rate of shiitake strains on sawdust medium after 60 days incubation.



Fig. 2. Comparison of plug-shaped spawns made by mixed shiitake strains after 6 days incubation (from left, KFRI 1 100%, KFRI 180 100%, KFRI 1 90%-KFRI 180 10%, KFRI 1 80%-KFRI 180 20%, KFRI 1 70%-KFRI 180 30%, KFRI 1 60%-KFRI 180 40%, KFRI 1 50%-KFRI 180 50%).

상태도 서로 간에 구별할 수 없을 정도로 비슷했다(Fig. 2). 다만 KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 처리구 성형종균이 균사간의 연결에 있어서 약간 성긴 듯 했지만 따로따로 놓은 상태에서는 육안으로 구별하기 어려울 정도의 차이였다. 이는 균주가 섞였을 때, 성형종균 상태로 확인하는 것이 불가능함을 의미한다.

성형종균의 생장력 조사

각 처리구별로 성형종균에서 분리한 균을 PDA에서 재배양했을 때, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 처리구 성형종균이 모균주들과 유의성 있는 차이를 나타냈으며, 다른

Table 1. Mycelial growth of *Lentinula edodes* isolated from plug-shaped spawns of mixed shiitake strains on PDA

	Mycelial growth (mm/7 days)
KFRI 1 100%	40.8 ± 2.1bc ^a
KFRI 180 100%	43.4 ± 2.2a
KFRI 1 90%-KFRI 180 10%	42.9 ± 1.3ab
KFRI 1 80%-KFRI 180 20%	39.6 ± 1.3dc
KFRI 1 70%-KFRI 180 30%	41.6 ± 1.3abc
KFRI 1 60%-KFRI 180 40%	42.1 ± 1.7ab
KFRI 1 50%-KFRI 180 50%	37.6 ± 2.8d

^a: Followed by LSD multiple range test ($p < 0.05$).

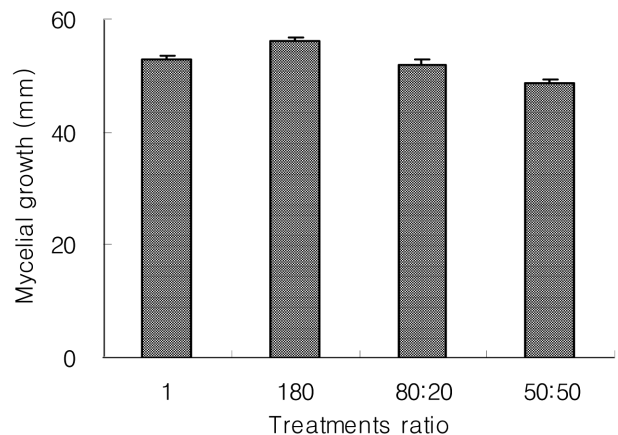


Fig. 3. Mycelial growth length of *Lentinula edodes* isolates regrown from plug-shaped spawns made by mixed shiitake strains (test tube filled sawdust, 25 days incubation). 1, KFRI 1 100%; 180, KFRI 180 100%; 80 : 20, KFRI 1 80%-KFRI 180 20%; 50 : 50, KFRI 1 50%-KFRI 180 50%.

처리구들의 생장력은 모균주들과 큰 차이를 보이지 않았다(Table 1). KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 처리구 성형종균의 균사생장속도는 KFRI 1에 대해 7.8%, KFRI 180에 비해서는 13.4% 감소한 것으로 나타났다. 톱밥배지 시험관에서의 생장력을 조사한 결과, PDA에서의 균사생장력과 마찬가지로 KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 처리구가 모균주들인 KFRI 1, 180 보다 낮은 생장력을 보였다(Fig. 3).

성형종균을 접종한 종균병 관찰

배양 중인 종균병의 외형을 관찰한 결과, KFRI 1 50%-KFRI 180 50% 처리구 종균에 얼룩덜룩한 무늬가 형성된 반면에 다른 처리구들은 KFRI 1, 180과 구별될 수 있을 정도의 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

대치배양

대치배양 결과, 두 균주가 섞인 것들은 혼합 비율과 관계없이 모두 KFRI 1 균주와 대치선을 형성하지 않았다(Table 2). 이는 만약 균주가 서로 섞일 경우, 톱밥종균이



Fig. 4. Surface observation of sawdust spawns made by mixed shiitake strains. A, KFR1 100%; B, KFR1 50%-KFR180 50%; C, KFR180 100.

나 성형종균에서 분리된 균은 섞인 두 균주 중 활력이 더 강한 균으로 동정될 가능성이 높다는 의미가 된다.

RAPD에 의한 확인

Band 상에서 서로간의 차이를 일부 확인할 수 있는 OPA 04, 07, 08 primer의 결과를 토대로 분석을 행하였다(Fig. 5).

Table 2. Formation of confrontation line between original strains and reestablished isolates on PDA

	Treatments ^a						
	1	2	3	4	5	6	7
KFR1 1	× ^b	○	×	×	×	×	×
KFR1 180	○	×	○	○	○	○	○

^a: 1, KFR1 1 100%; 2, KFR1 180 100%; 3, KFR1 1 90%-KFR1 180 10%; 4, KFR1 1 80%-KFR1 180 20%; 5, KFR1 1 70%-KFR1 180 30%; 6, KFR1 1 60%-KFR1 180 40%; 7, KFR1 1 50%-KFR1 180 50%.

^b: ○, formation of confrontation line; ×, non formation of confrontation line.

혼합 비율별로 섞은 균주 중에서 KFR1 1 100%와 KFR1 1 90%-KFR1 180 10%, KFR1 1 80%-KFR1 180 20%, KFR1 1 70%-KFR1 180 30%, KFR1 1 60%-KFR1 180 40% 처리구가 서로 유사한 것으로 나타났고 KFR1 180 100%와 KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 처리구가 서로 유사한 것으로 나타났다.

분석결과, PDA 대치배양실험에서는 섞인 모든 처리구가 KFR1 1로 나타났지만 primer를 이용한 분석에서는 KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 처리구가 KFR1 180과 비슷한 것으로 나타났는데, 이는 KFR1 1과 KFR1 180이 섞였을 경우, KFR1 180의 특성이 더 강하게 나타난다는 의미다. 따라서 본 실험은 전통적인 방법으로 진행되어온 PDA 대치배양을 통한 품종구분에 더 많은 주의를 기울여야 하며, 정밀한 유전분석기법을 개발해야 할 필요성을 인식하게 했다.

버섯발생 확인

균주가 혼입되었어도 자실체는 발생되는지를 확인하기 위해 종균병들을 자실체 발생조건에 노출시킨 결과, KFR1 1 100%, KFR1 1 90%-KFR1 180 10%, KFR1 1 80%-KFR1 180 20%, KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 등 4개 처리구에서 자실체가 발생되었으며, 발생된 버섯들은 외형적으로 기형이었으나 주름살을 정상적으로 만들었다(Fig. 6). 비록 전 처리구에서 자실체가 발생하지는 않았지만, 그나마 다른 혼합 처리구에 비해서 구별성이 높았던 KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 처리구에서 자실체가 발생되었다는 것만으로도 균주혼입이 자실체발생 유무에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 확인한 결과라고 볼 수 있다.

요 약

서로 다른 두 가지 표고 균주가 혼합되었을 때의 생리 및 유전적 변화에 대한 조사를 시도하였다. 균사생장은 KFR1 180이 82 mm, KFR1 1 80 mm로 조사되었다. KFR1 1은 2.4% 증량감소가 이루어졌으며, KFR1 180은 1.6% 감소된 것으로 나타났다. 성형종균은 배양 과정 중

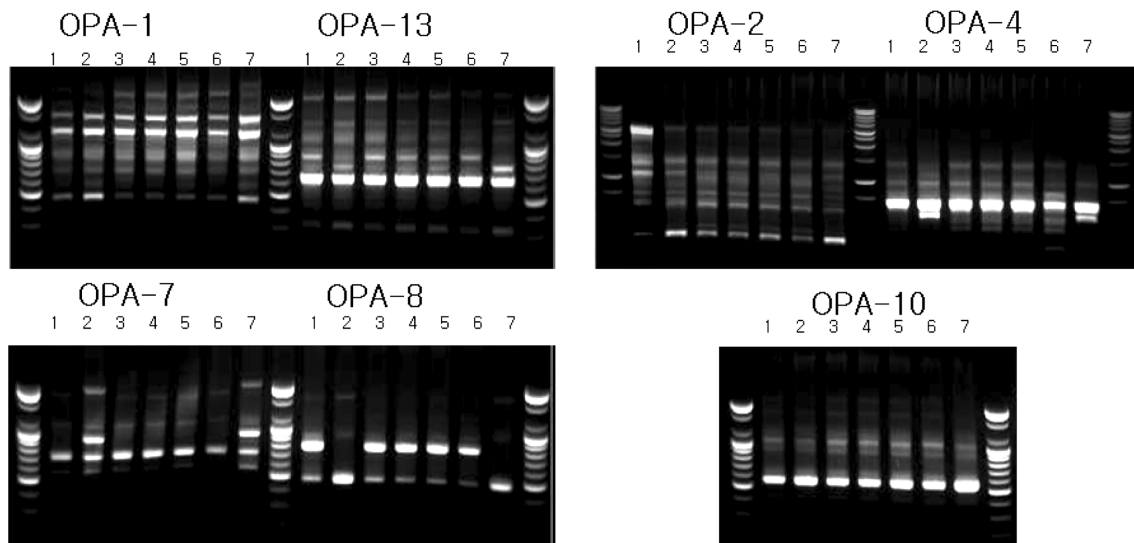


Fig. 5. Confirmation of isolates reestablished from plug-shaped spawn made by mixed shiitake strains based on RAPD band patterns. 1, KFR1 100%; 2, KFR1 180 100%; 3, KFR1 1 90%-KFR1 180 10%; 4, KFR1 1 80%-KFR1 180 20%; 5, KFR1 1 70%-KFR1 180 30%; 6, KFR1 1 60%-KFR1 180 40%; 7, KFR1 1 50%-KFR1 180 50%.



Fig. 6. Fruiting body formed on sawdust spawn made by KFR1 1 50%-KFR1 180 50% ratio of shiitake strains.

이나 배양 후에 균사가 뭉쳐서 성형이 유지되는 것에는 전혀 문제가 없었고 이런 현상은 혼입비율 간에도 차이가 없었다. 또한 성형종균의 상태도 서로 간에 구별할 수 없을 정도로 비슷했다. 각 처리구별로 성형종균에서 분리한 균을 PDA에서 재배양했을 때, KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 처리구가 다른 처리구들에 비해 생장력이 떨어졌으며, 톱밥배지 시험관에서의 조사에서도 동일한 결과를 얻었다. 각 처리구별로 배양 중인 종균병의 외형을 관찰한 결과, KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 처리구 종균에 얼룩덜룩한 무늬가 형성된 반면에 다른 처리구들은 KFR1 1, 180과 구별될 수 있을 정도의 차이를 보이지 않았다. 대치배양을 통한 균주 확인을 시도한 결과, 두 균주가 섞인 것들은 혼합 비율과 관계없이 모두 KFR1 1 균주와 대치선

을 형성하지 않았다. 하지만 RAPD primer를 이용한 분석에서는 KFR1 1과 KFR1 180이 50% 섞였을 경우, KFR1 180의 밴드 유형을 나타냈기 때문에, KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 분리균에는 KFR1 180 균의 특성이 함께 존재할 것으로 판단된다. 균주가 혼입되었어도 자실체는 발생되는지를 확인하기 위해 종균병들을 표고 발생조건에 노출시킨 결과, KFR1 1 100%, KFR1 1 90%-KFR1 180 10%, KFR1 1 80%-KFR1 180 20%, KFR1 1 50%-KFR1 180 50% 등 4개 처리구에서 자실체가 발생되었으며, 발생된 자실체들은 외형적으로 기형이었으나 주름살은 정상적으로 만들어졌다.

참고문헌

- 김돌이, 박원철. 2001. 계방산, 오대산 및 지리산 야생 표고균주의 유전적 변이. 한국균학회지 **29**: 99-103.
- 박명규. 1984. 표고재배의 투자효과에 관한 연구. 한국임학회지 **63**: 61-68.
- 박원철. 1996. 선발육종 및 교잡육종에 의한 원목재배용 표고균주 육성. 한국임학회지 **85**: 309-315.
- 이원규, 이은영, 박원철, 이창근. 1993. 표고 신품종 육성(I). 임업연구원연구보고 **47**: 121-128.
- 이원규, 윤갑희, 이은영. 1988. 표고 보급종균의 생산성검정. 임업연구원연구보고 **36**: 115-119.
- 이원규, 이은영, 윤갑희, 홍순우. 1987. 동위효소의 전기영동분석법을 이용한 표고균주의 계통검정. 임업연구원연구보고 **35**: 115-122.
- 이태수, 박원철, 강호덕, 김세권, 변병호, 이창근, 이원규, 민두식. 1997. RAPD 검정을 이용한 한국 표고균주의 계통분류. 한국균학회지 **25**: 219-225.
- 이학주, 윤갑희, 박원철. 2003. 표고 자실체의 추출성분. 목재공학 **31**: 24-30.
- 최용순, 황원중, 한태형, 김남훈, 권진현. 1998. 표고 폐골목으로

- 제조한 목질보드의 성질. 삼림과학연구 **14**: 138-144.
- 홍순우, 신광수, 윤엽, 이원규. 1986. 표고 균주 JA01에서 분리되는 세포의 목재성분 분해효소에 관하여. 한국균학회지 **14**: 189-194.
- Hatvani, N. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int. J. Antimicrobial Agents* **17**: 71-74.
- Kim, N.-H. 2005. An investigation of mercerization in decayed oak wood by a white rot fungus (*Lentinula edodes*). *J. Wood Science* **51**: 290-294.
- Lee, C. C., Wong, D. W. S. and Robertson, G. H. 2001. Cloning and characterization of two cellulase genes from *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Letters* **205**: 355-360.
- Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp 282-287. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Eds. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. Sandiego.
- Maki, C. S., Teixeira, F. F., Paiva, E. and Paccola-Meirelles, L. D. 2001. Analysis of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. *Brazil. J. Microbiol.* **32**: 170-175.
- Miyazaki, Y., Nakamura, M. and Babasaki, K. 2005. Molecular cloning of developmentally specific genes by representational difference analysis during the fruiting body formation in the basidiomycete *Lentinula edodes*. *Fung. Genet. Biol.* **42**: 493-505.
- Sugui, M. M., Alves de Lima, P. L., Delmanto, R. D., da Eira, A. F., Salvadori, D. M. F. and Ribeiro, L. R. 2003. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food Chem. Toxicol.* **41**: 555-560.
- Zhang, Y. and Francis I. M. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiol. Letters* **131**: 17-20.
- Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D. and Moucheng W. 2005. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.* **5**: 811-820.