

최 중
연구보고서

느타리버섯의 고품질 · 내재해성 · 내병성
육종소재 개발 및 분자유전학적 특성연구

Studies on molecular characterization and development
of new strains for color trait, cold tolerance or disease
resistance in *Pleurotus ostreatus*

건국대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯의 고품질·내재해성·내병성 육종소재 개발 및 분자유전학적 특성연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 9월 15일

주관연구기관명 : 건 국 대 학 교
총괄연구책임자 : 이 창 수

세부연구책임자 : 이 창 수
연 구 원 : 조 중 호
연 구 원 : 김 남 국
연 구 원 : 박 혜 란
연 구 원 : 임 중 현
연 구 원 : 송 민 진

세부연구책임자 : 조 봉 금
연 구 원 : 유 수 기
연 구 원 : 유 제 현
연 구 원 : 김 양 환
연 구 원 : 류 호 성

협동연구기관명 : 충 북 대 학 교
협동연구책임자 : 차 재 순
연 구 원 : 장 후 봉
연 구 원 : 정 재 은
연 구 원 : 박 상 용

요 약 문

I. 제목

느타리버섯의 고품질·내재해성·내병성 육종소재 개발 및 분자유전학적 특성연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

전 세계적으로 종자는 작물 재배의 기본적 자재라는 개념을 바탕으로 미래의 농업발전을 좌우할 핵심요소로서 인식되어 그 관심이 증대되고 있다. 이러한 가운데 국내의 주요 생산 작물이며 국제적으로도 우리나라가 종주국으로서 인식되는 작물은 느타리버섯이라 할 수 있다. 이러한 국내 중요 작물인 느타리버섯은 국내 육종가의 요구에 대해서 충분한 품종을 보유하지 못하고 있으며, 국제 경쟁력을 가지는 품종 또한 미미하다고 할 수 있어 새로운 품종개발에 대한 요구가 크다. 또한 국제화 시대에서 고유한 품종으로 인정을 받으면서 그 품종에 대한 권리를 보호받기 위해서는, 우량 신품종 개발과 동시에 신품종에 대하여 첨단 과학에 기초한 분석법을 통한 고유한 유전자 표지인자 개발을 위한 기초적인 연구가 함께 수행되어야만 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 국제식물신품종 보호동맹 (UPOV: The International Union for the Protection of New Varieties of Plants)의 가입에 의해 느타리버섯이 보호품종으로 등록되어 우리나라 고유의 다양한 느타리버섯의 품종개발이 더욱 절실히 요구되고 있다.
- 생활 수준 향상에 따른 국내 소비자의 기호와 육종가의 요구에 적합한 품질의 느타리버섯을 생산하기 위한 육종 소재의 개발 기술이 필요하다.
- 현재 느타리버섯 재배는 주로 봄·가을재배용으로 품종이 육성되어 있으며, 여름에는 여름느타리가 재배되나 겨울철에 적당한 저온성 품종이 없으므로 농민들의 요구에 적합한 형태와 품질의 저온성 느타리버섯 신품종 개발이 필요하다.
- 느타리버섯의 세균성갈색무늬병은 경제적으로 피해가 매우 심각하며, 그 방제가 매우 어려우나, 느타리버섯에서 세균성갈색무늬병 품종저항성에 대한 연구가 미미하다.

- 현재 본 연구진에 의해 최초로 보고된 느타리버섯의 EST분석에 대해서 실용적으로 활용할 수 있는 기회를 가짐으로써, 유전적 연구에서 경쟁력을 갖출 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

- 느타리버섯은 쌀, 사과 등 70가지 주요 농산물 중 단위면적 당 소득이 가장 높은 농산물로서 농가의 소득 증대에 기여하는 바가 크다.
- 최근 중국으로부터 느타리버섯의 종균이 수입되어 국내 버섯산업의 기반을 위협하고 있다.
- 버섯류에서 유용유전자 개발 및 이용이 증가하고 있어 식품적인 가치 이외에 산업적 이용에 관한 연구도 활성화되어야 한다.

다. 사회·문화적 측면

- 무농약·무공해 식품은 소비자 선호도 1위로서 버섯은 자연 친화적 식품의 대표이며, 소비자로부터 사랑을 받고 또한 대외 경쟁력 있는 농민들의 고소득 작목으로서 느타리버섯이 계속 유지되어야 한다.
- 버섯류 중 양송이는 유럽으로 대변되고 있고, 표고와 팽이버섯은 일본이 종주국으로 인정받는 것처럼 느타리버섯은 우리나라가 종주국이라는 입지를 굳힐 수 있게 세계적으로 인정받는 학문적, 실용적 연구업적과 연구그룹이 육성될 수 있도록 뒷받침되어야 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 육종 목표에 의한 모균주의 선정 및 교잡 균주의 제작 선발
 - 모균주 선정 및 교잡균주의 제작
 - 모균주와 교잡균주의 특성 분석
- 느타리 균주의 저항성 검정을 통한 우수 저항성 모균주의 선발
 - 세균성갈색무늬병 저항성의 검정방법 개발
- 온도 적응성 유전분석과 DNA profile 작성
 - 선발 균주의 유전양식 구명
 - 자실체의 특성 조사
- 자실체 내 발현 프로테옴의 프로파일 작성
 - 자실체 특성에 따른 프로테옴의 발현 분석

- 교잡균주의 유전자 발현의 특성 분석
 - 우량 선발균주의 DDRT-PCR법을 통한 발현의 특성 분석
 - 특이발현 유전자의 분석

- 우수 저항성 품종의 육성 및 유전 분석
 - 우수 모균주의 교배에 의한 저항성 유전분석 및 저항성 품종의 육종
 - 세균성갈색무늬병 돌연변이 균주의 육종

- 우수 선발균주의 생산력 검정 및 우량균주의 선발
 - 우수 선발균주의 생산력 검정
 - 우량 균주의 선발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종개발에의 연구

느타리버섯의 우량균주라 함은 자실체의 갓색이 중요한 요인으로 작용하여, 흑회색의 갓색을 가지는 품종을 고품질로 평가되고 있다. 그러나 재배과정 중 흑회색 버섯의 생산이 낮은 온도 유지 등의 환경적 조절과 그에 따르는 고비용으로 어려움을 겪고 있다. 그래서 이를 해결하기 위해 흑회색 느타리버섯의 제작을 시작하였고, 제작용 모균주로서 농가의 재배과정 중에서 수집된 흑색 변이주와 갓색과 자실체의 형태가 우수한 수한 품종을 선정하였다.

그 후 모균주의 포자를 채취하여, 단포자를 분리하였고, 분리된 단포자의 교배를 통하거나, 다포자 발아과정을 통해 총 333개의 교잡균주를 제작하였다. 이러한 교잡균주를 이화학적 또는 재배적 특성 분석하여 조사한 뒤, 갓색이 좋고 계대의 재현성이 있는 6개의 교잡균주 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24 를 선발할 수 있었다. 1~2차 대량 병재배를 통해 갓색도 진하며 모균주에 비해 보다 많은 수확량과 유효경수를 확인하였다. 특히 KU-BM12×SM2 균주는 수량이 많고 품질이 우수한 것으로 나타나 재배 품종으로 등록이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 우량 교잡균주는 추가로 실제 농가 현지적응성 조사 후 그 우수성을 검정할 예정이다. 또한 이 품종은 농가확대 재배를 실시하여 품종등록을 추진할 계획이다.

한편, 색 변이주간 발현차이 단백질을 동정하기 위하여 각각을 group화 한 후 이미지 분석을 수행하였고, 그 결과 서로 다른 발현양상을 보이는 6개의 단백질을 확인할 수 있었다. 6개의 발현차이 단백질은 gel로부터 분리한 후 MALDI-TOF 와 ESI-MS/MS 방법을 통해 단백질을 동정하였다. 각각의 단백질은 동정된 자료를 토대로 본 실험실에서 구축한

느타리버섯 EST database 와의 비교 분석을 통하여 단백질을 암호화하는 유전자 염기서열을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 단백질과 유전자 수준에서 분자유종을 위한 중요한 자료가 될 것으로 판단된다.

○ 저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

저온성 우량 신품종을 육성하기 위하여 수집균주의 특성 분석을 통하여 8개의 교배모본을 선발하였다. 이들로부터 2차년도에 4개 교배조합, 3차년도에 7개 교배조합으로부터 총 622개 교배이핵균주를 육성하여 병 및 상자재배를 통하여 재배특성을 조사하였다. 3차년도에는 농가 균상재배와 동일한 배지를 사용하여 겨울철 최소 생육할 수 있는 저온상태(12℃ 이하) 에서 시험을 하여 최대한 저온에 견디는 힘이 강한 교잡주를 선발하였다.

조합별로 교잡주의 우수성은 다소 차이가 있었으나 조합별 1균주는 품종이나 육종소재(모본)로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 수량이 높고 품질이 우수한 것으로 ASI2183 x ASI2344 의 KU-254, ASI2183 x ASI2706 의 KU-415 로 나타나 재배 품종으로 등록이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 우수한 교잡주들은 추가로 실제 농가 실증시험을 통하여 그 우수성을 검증할 필요가 있다. 이 우수 교잡주에 대해 참여기업과 공동으로 농가확대 재배를 실시하여 품종등록을 추진할 계획이다.

○ 내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

본 연구를 통해 느타리 자실체를 이용한 세균성갈색무늬병의 발병심각도 조사를 통한 저항성 검정법을 확립하였다. 그러나 이 검정법은 앞으로 실험간 결과의 변이를 줄이고 결과를 조사하는데 조사자의 주관울 줄이고 객관화하는데 더 많은 검토가 요구된다.

국내 주요 등록 품종의 병 저항성을 검토하였으며 연구 결과 느타리에서 세균성갈색무늬병의 저항성은 다인자 양적형질(QTL)로 유전되는 것으로 추정되었다.

교배균주 중 병 저항성이 높고 자실체의 특성이 우수하게 판정된 균주는 품종화 가능성이 높은 균주로서 농가확대 재배를 실시중에 있다.

SUMMARY

Studies on molecular characterization and development of new strains for color trait, cold tolerance or disease resistance in *Pleurotus ostreatus*

Various strains of edible and medicinal mushroom are cultivated all over the world. Of these mushrooms, *Pleurotus ostreatus* known as oyster mushroom is one of the most widely cultivated edible mushrooms. During recent years, the world production of oyster mushroom has increased tremendously and now is ranked second to the button mushroom. *P. ostreatus* is especially appreciated in Asia including Korea for its edibility. The fruiting bodies are highly prized because of its delicious flavor and it has a high dietetic quality because of their high protein and vitamin content and its important level of unsaturated fatty acids. It is an important products in low calorie diets. The protein content of *P. ostreatus* is important and higher than in most of plants, excluding some pulse plants. But, new strains of fruiting body in *P. ostreatus* are still poorly developed. Also, the molecular mechanism of fruiting body in *P. ostreatus* is still poorly understood. The objectives of this study are to develop new strains for color trait, cold tolerance or disease resistance in *P. ostreatus*.

1. Development of new strain for pileus color trait in *Pleurotus ostreatus*.

The pileus color of fruiting bodies may be one of the important traits for strain improvement of mushrooms. To develop new strain for color trait, black mutant strain and ASI2504(Suhan) strain were selected as parental strains for crossing. The cross combination of black mutant strain and ASI2504(Suhan) strain produced 333 combination strains. Mushroom pileus color was evaluated by using UV/VIS spectrometer and colorimeter. The texture property of fruiting body was tested by the texture analyzer. Cultivating characteristics of 333 combination strains were tested from the cultivation with the plastic tray and the bottle, and the color density of pileus was measured. Six combination strains were selected under the basis of color and productivity traits. Specially KU-BM12×SM2 is supposed to be registered as a practical cultivar after actual practice in the farm. For the molecular study of color difference, we compared

the expression profiles of mushroom proteome between two mutants of black and white color pileus by two-dimensional electrophoresis. More than 700 protein spots were detected on each gel. We found that 6 spots were expressed differently among different colored strains. These selected 6 spots were identified as two unknown proteins, ATP synthase, enolase, manganese superoxide dismutase and cyclophilin. It must be studied about the relationship between differently expressed proteomes and color difference of mushrooms.

2. Development of new strain for cold tolerance in *Pleurotus ostreatus*.

To develop a new superior strain, eight strains passed an examination of cultivation characteristics of collected commercial strains were selected as parental strains for crossing. Characteristics of 622 crossed dikaryotic strains derived from four cross combination in the second year and seven in the third year were tested in the bottle and plastic box cultivation. In the third year, selected strains and developed dikaryotic strains were tested again and finally one strain in each crossing combination was selected in the natural condition of low temperature (below 12°C) with the box cultivation which use just like same substrate to the mushroom farm in the winter. Final selected strains must have the tolerance to the low temperature. Even though there are some variations in their superior characteristics according to their combination, selected ones in each combination deserve to be commercial strains or breeding materials. Specially KU-254 from ASI2183 x ASI2344 and KU-415 from ASI2183 x ASI2706 are supposed to be registered as a practical cultivar after actual practice in the farm. We have a plan to expand productivity test for cultivar registration to the mushroom farm in association with corresponding company.

3. Development of new strain for disease resistance in *Pleurotus ostreatus*.

The brown blotch disease causes significant loss of cultivated mushroom crops. This is mainly due to *Pseudomonas tolaasii*. To develop new strain resistant to brown blotch disease, we firstly developed photoshop index which is calculated from digital camera and photoshop program for the rapid and accurate screening against the disease detection. The optimal conditions for photoshop index were examined, and the index values were compared with the results of eye index.

Using the eye index and photoshop index, we selected the resistant strains and the sensitive strains to brown blotch disease as parental strains for crossing from the collected commercial strains of *Pleurotus* species. The distribution pattern of disease severity was examined from the mating strains of CBNU9(resistant strain) and CBNU25(sensitive strain). The result with normal distribution curve suggested that the disease-resistant traits may be regulated by multifactors, not single factor. For screening superior strains resistant to brown blotch disease, two strains of CBNU9 and CBNU25 were crossed and the CBNU9 25-97 strain showing the most disease resistance and good productivity was selected. This CBNU9 25-97 strain is supposed to be registered as a practical cultivar after actual practice in the farm.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of project report on development of research-----	11
Chapter 2. Status of research in Korea and other countries-----	16
Chapter 3. Contents and Products of the development of research-----	19
1. Development of new strain for pileus color trait in <i>Pleurotus ostreatus</i> -----	19
2. Development of new strain for cold tolerance in <i>Pleurotus ostreatus</i> -----	63
3. Development of new strain for disease resistance in <i>Pleurotus ostreatus</i> -----	109
Chapter 4. Achievements and contributions of the studies to the related fields-----	140
Chapter 5. Plans for the applications of the research-----	146
Chapter 6. Informations on scientific techniques at other countries-----	148
Chapter 7. Reference-----	151

목 차

제1장 연구개발 과제의 개요-----	11
제2장 국내외 기술개발 현황-----	16
제3장 연구개발 수행내용 및 결과-----	19
1. 흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종개량에의 연구-----	19
2. 저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구-----	63
3. 내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구-----	109
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	140
제5장 연구개발 결과의 활용계획-----	146
제6장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	148
제7장 참고 문헌-----	151

제 1 장 연구개발 과제의 개요

1. 연구개발의 목적

전 세계적으로 종자는 작물 재배의 기본적 자재라는 개념을 바탕으로 미래의 농업발전을 좌우할 핵심요소로서 인식되어 그 관심이 증대되고 있다. 이러한 가운데 국내의 주요 생산 작물이며 국제적으로도 우리나라가 종주국으로서 인식되는 작물은 느타리버섯이라 할 수 있다. 이러한 국내 중요 작물인 느타리버섯은 국내 육종가의 요구에 대해서 충분한 품종을 보유하지 못하고 있으며, 국제 경쟁력을 가지는 품종 또한 전무하다고 할 수 있어 새로운 품종개발에 대한 요구가 크다고 할 수 있다. 또한 국제화 시대에서 고유한 품종으로 인정을 받으면서 그 품종에 대한 권리를 보호받기 위해서는, 우량 신품종 개발과 동시에 신품종에 대하여 첨단 과학에 기초한 분석법을 통한 고유한 유전자 표지인자 개발을 위한 기초적인 연구가 함께 수행되어야만 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 국제식물신품종 보호동맹 (UPOV: The International Union for the Protection of New Varieties of Plants)의 가입에 의해 느타리버섯이 보호품종으로 등록되어 우리나라 고유의 다양한 느타리버섯의 품종개발이 더욱 절실히 요구되고 있다.
- 생활 수준 향상에 따른 국내 소비자의 기호와 육종가의 요구에 적합한 품질의 느타리버섯을 생산하기 위한 육종 소재의 개발 기술이 필요하다.
- 현재 느타리버섯 재배는 주로 봄·가을재배용으로 품종이 육성되어 있으며, 여름에는 여름느타리가 재배되나 겨울철에 적당한 저온성 품종이 없으므로 농민들의 요구에 적합한 형태와 품질의 저온성 느타리버섯 신품종 개발이 필요하다.
- 느타리버섯의 세균성갈색무늬병은 경제적으로 피해가 매우 심각하며, 그 방제가 매우 어려우나 느타리버섯에서 세균성갈색무늬병 품종저항성에 대한 연구가 미미하다.
- 현재 본 연구진에 의해 최초로 보고된 느타리버섯의 EST분석에 대해서 실용적으로 활용할 수 있는 기회를 가짐으로써, 유전적 연구에서 경쟁력을 갖출 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

- 느타리버섯은 쌀, 사과 등 70가지 주요 농산물 중 단위면적 당 소득이 가장 높은 농산물로서 농가의 소득 증대에 기여하는 바가 크다.

- 최근 중국으로부터 느타리버섯의 종균이 수입되어 국내 버섯산업의 기반을 위협하고 있다.
- 버섯류에서 유용유전자 개발 및 이용이 증가하고 있어 식품적인 가치 이외에 산업적 이용에 관한 연구도 활성화되어야 한다.

다. 사회·문화적 측면

- 무농약·무공해 식품은 소비자 선호도 1위로서 버섯은 자연 친화적 식품의 대표이며, 소비자로부터 사랑을 받고 또한 대외 경쟁력 있는 농민들의 고소득 작목으로서 느타리버섯이 계속 유지되어야 한다.
- 버섯류 중 양송이는 유럽으로 대변되고 있고, 표고와 팽이버섯은 일본이 종주국으로 인정받는 것처럼 느타리버섯은 우리나라가 종주국이라는 입지를 굳힐 수 있는 세계적으로 인정받는 학문적, 실용적 연구업적과 연구그룹이 육성될 수 있도록 뒷받침되어야 한다.

3. 연구개발의 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	<p><흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종개발에의 연구></p> <p>○ 흑회색 느타리버섯의 교잡균주제작</p> <p>○ 느타리버섯의 발현 프로파일 분석용 조건 확립</p> <p><저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구></p> <p>○ 수집균주의 저온성 검정</p> <p>○ 교배형 분리</p> <p><내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구></p> <p>○ 세균성갈색무늬병 저항성의 검정법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 모균주로부터 단핵균주 육성 <ul style="list-style-type: none"> - 선발균주의 자실체 발생 후 포자를 채취 - 포자도말 과정 후 단포자분리 • 교배형 검정을 통한 교배형의 결정 <ul style="list-style-type: none"> - 단포자의 교잡을 통하여 4극성 분리 - 각 그룹으로 분류 • 느타리버섯 자실체의 색도, 물성특성 분석조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 자실체의 맛, 자루의 색도를 객관화 함 - 물성 측정기로 분석 할 수 있는 자실체 이 화학적 특성 분석 조건 확립 • 느타리버섯 cDNA library 제작 • 버섯 단백질의 시료 조제법 검토 • 버섯 단백질의 분리 조건 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 추출용액 및 추출과정에 조건 검토 • 버섯 단백질의 정량 프로그램의 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - bradford법을 응용한 버섯 단백질의 정량 조건 확립 • 수집 균주의 저온 적응성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 저온 발생을 통한 생력 검사 • 효율적인 온도특성의 검정법 개발 • 우수 모균주의 선정 • 선발된 모균주로부터 단핵균주 육성 • 교배형 검정을 통한 교배형의 결정 • 균사를 이용한 저항성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 균사체에 병원균 접종 후 생장력 검사 • 자실체를 이용한 저항성 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 자실체 발생 후 병원균 접종하여 감염률 조사 • 저항성인자 및 특성 분석

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2004)	<흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종개발에의 연구>	<ul style="list-style-type: none"> • 단핵균주와 교잡균주의 특성분석과 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 단핵주와 교잡주의 균사체 성장력 조사 • 교잡균주 특성분석의 재현성을 통한 우량균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 계대배양을 통한 발현특성의 재현성 확인 • 선발균주의 이화학적 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 선발균주간 발현차이 유전자 단편의 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - DDRT-PCR (differential display reverse transcription -PCR) - 선발 균주간의 유전자 발현 차이를 RNA level에서 분석
	<저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구>	<ul style="list-style-type: none"> • 계통간 교잡 <ul style="list-style-type: none"> - 교배형 분리에 따라 이핵균주 제작 - 교배된 이핵균주의 후대검정 • 교잡주의 DNA profile 작성 <ul style="list-style-type: none"> - 온도특성에 대한 분리비를 조사하고, 이와 관련된 유전자의 수를 추정하고 교배형과의 연관 등을 조사함으로써 유전양식을 구명 • 분자생물학적 교배 확인
	<내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구>	<ul style="list-style-type: none"> • 국내외에서 느타리버섯 균주 수집 • 우수 저항성 모균주의 선정
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세균성갈색무늬병의 저항성 정도 비교 ○ 세균성갈색무늬병 저항성 모균주 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 국내외 수집균주의 저항성 검정을 통한 우수균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 세균성갈색무늬병의 균이 접종되어 있는 배지에 균사를 접종하여 저항성 우수 균주 선정

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2005)	<p><흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종개발에의 연구></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 선발균주간 변화 단백질 및 발현차이 유전자의 특성 분석 ○ 확대재배를 통한 우량균주 검정 <p><저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 교잡균주의 특성 분석과 선발 <p><내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 모균주 교배에 의한 저항성 품종 육성과 유전분석 ○ 병저항성 돌연변이 균주의 육종 ○ 우수선발 균주의 생산력 검정 	<ul style="list-style-type: none"> · 흑회색 교잡균주의 후대 유대 유전양식 분석 · 발현차이 유전자 및 단백질의 특성분석 · 실제 농가형 재배를 통한 현장적응성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 대량 재배를 통하여 실제 농가에서의 균주 적응성 조사 · 교잡균주의 저온 적응성 평가 · 자실체 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 병 재배로 자실체의 저온적응성을 포함한 수량 및 자실체의 형태적 특성을 조사 · 저항성이 강한 균주와 약한 균주의 교배주의 포자 채취 · 후대의 저항성 검정을 통한 세균성 갈색무늬병의 유전양식을 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 저항성이 강한 균주와 매우 약한 균주를 교배하여 포자를 얻고 후대에 저항성 검정을 통해서 세균성갈색무늬병의 유전양식을 분석 · 자외선 혹은 EMS 처리를 통한 느타리버섯의 돌연변이 균주 제작 · 돌연변이체의 자실체에 병원균 접종 · 저항성이 우수한 균주 선발 · 농가 재배 시험을 통한 우량균주 선발 · 육종 목표에 적합한 우량균주 선발 · 유망 균주의 육종소재로 이용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 국외 연구동향

국외 버섯 연구동향은 현재 양송이버섯의 품질이 매우 안정적이며 국제적으로도 무리 없이 잘 유통되고 있으며 기술과 자원 등 모든 면에서 국제적인 경쟁력을 갖추므로 인해 후발 연구 국가가 경쟁에 뛰어들 엄두도 못 내고 있다. 이것은 1990년대 말까지 버섯의 생리적 특성분석 및 육종에 관한 국제적인 연구가 양송이버섯에 집중된 성과가 바탕이 되었기 때문이다. 이러한 연구의 성과는 자국의 양송이버섯 산업을 발전시켰으며, 그 결과 전세계적으로 양송이버섯에 대한 대부분의 소비와 재배는 이들 나라의 다국적 기업에서 생산하는 품종과 종균을 사용하고 있다.

그러나 점차적으로 양송이 연구와 함께 느타리버섯에서 유전육종 및 생리적 특성분석 분야의 연구도 점차 증가되고 있다. 품종개발 분야에서는 느타리버섯의 품종개발이 주된 연구가 되고 있고, 재배 연구에 대한 내용에서도 느타리버섯이 전 세계적으로 주목을 받고 있다. 초기의 느타리버섯의 연구에서는 자실체에서 발현되는 물질(hydrophobin)에 대한 연구로부터 시작되었으나, 차츰 느타리버섯의 난분해 물질에 대한 분해능력에 대해 주목하기 시작하였다. 1990년대 말 이후로 시작된 난분해물질의 분해효소인 laccase 및 manganese peroxidase의 활성연구가 느타리버섯의 주요 연구과제로서 지속적으로 연구되고 있고, 최근에는 이들 효소들의 미백효과와 환경쓰레기 처리능력 등에 대해서도 크게 관심을 보이고 있다.

느타리버섯의 형질전환 연구도 최근 활성화되기 시작하여 manganese peroxidase 등의 유전자 조작을 통한 과발현 등의 기능연구 등이 수행되고 있다. 2000년대 초기에 들어서서 수행된 느타리버섯 자체에 대한 분자 유전학적 연구는 군사 생장, 품질 및 생산형질에 관여하는 게놈상의 QTL 분석이 스페인의 연구팀에 의해 진행되고 있다. 일본의 연구팀들도 느타리버섯의 형질전환에 많은 관심을 가지고 있는 실정이다. 이와 같이 전 세계적으로 느타리버섯의 연구 활성화가 점차 높아지고 있는 반면에 식용으로만 인정되는 양송이버섯에 대한 연구 활동은 크게 감소하는 추세에 있다. 식용뿐만 아니라 약리효능이 있는 느타리버섯을 연구하는 나라는 유럽의 스페인, 그리스, 네덜란드, 독일, 체코로 기존 양송이버섯에 대한 관심이 점차 느타리버섯으로 이어지고 있으며, 미주국가에서는 멕시코가, 그 외에 아시아에서는 일본, 인도, 이스라엘 등의 나라에서도 느타리버섯에 대한 연구가 집중적으로 수행되고 있다. 약용 느타리버섯에 관심이 많은 중앙아시아와 동유럽 국가를 포함하면 이제 전체 버섯 시장에서 양송이버섯 다음의 2번째의 생산량을 가지는 느타리버섯에 대한 연구의 관심은 전 세계적이라고 할 수 있다.

○ 국내 연구동향

이러한 전 세계적인 느타리버섯 연구의 정세에 대해서 국내의 연구도 매우 급박하게 진행이 되고 있다고 할 수 있다. 느타리버섯의 생리적 특성분석 및 육종에 관한 연구가 다수 진행되었으나, 농진청에서 제작한 원형 느타리버섯 품종 개발을 제외하면 크게 성과를 가져오지 못했다. 그것은 기초적인 연구의 부재로 인한 한계에 기인하였고, 그러므로 최근 느타리버섯의 발생의 기작을 분자수준에서 해석하기 위한 노력들이 진행이 되어 전체의 약 30%에 이르는 4,000개 유전자가 동정되고, 최초 느타리버섯 유전자의 데이터베이스도 구축이 되었으며, 나아가 이러한 유전자들을 이용하여 발생단계에서 발현되는 유전자 발현 프로파일이 작성되어, 이 분야에서는 세계에서 가장 강력한 기초 연구 성과가 축적이 되어 있는 상황이다.

또한, 느타리버섯의 형질전환에 대한 지속적인 투자를 통해, 현재 최고의 기술을 갖춘 일본의 연구자들과 비슷한 수준의 기술을 가지고 있으므로, 기초적인 연구 결과의 성과가 빠르게 도출되기를 기대하고 있다.

* 국내외 연구동향

	연구기관	현재 기술현황	취약점 및 문제점
국외	미국	느타리버섯의 Tandem mass spectrophotometry	Proteome 동정의 어려움
	이탈리아	Olive mill 부산물로부터 느타리버섯의 재배	약리 효능의 검증 필요
	멕시코	커피와 밀의 부산물로부터 느타리버섯의 재배	약리 효능의 부재
	스페인	느타리버섯의 genetic mapping	유전자 특성분석 요구됨
	스페인	느타리버섯의 품질과 생산량을 조절에 대한 QTL분석	유전자 동정의 어려움
	이탈리아	느타리버섯 Laccase 유전자 promoter에 관한 연구	형질전환체계의 불안정성
	일본	Particle bombardment를 이용한 느타리버섯의 형질전환	목적 유전자의 선발 요구
	일본	느타리버섯으로부터 manganese peroxidase 유전자의 발현	자실체 상의 발현 문제
	러시아	느타리버섯의 항균, 항세포 독성 활성연구	약리 물질의 동정 필요
	일본	느타리버섯 효소의 bisphenol A의 분해능	분해 효소의 동정 필요
국내	경상대학교	느타리버섯의 외가닥 RNA mycovirus에 관한 연구	Virus의 병원성 검증
	건국대학교	느타리버섯 재배에서의 병해발생과 방제연구	병 원인의 분자수준 연구
	영남대학교	느타리버섯균의 배지내 리그닌분해효소 생산	다량의 재배 필요
	농업과학기술원	느타리버섯의 PEG법 이용 Ura3유전자 형질전환 연구	형질전환의 효율 증대
	본 연구기관	Macroarray 기법을 통한 유전자 발현 프로파일 작성	다량 유전자 분석 어려움
	"	2DE 기법을 이용한 버섯 프로테옴 분석	프로테옴 동정의 어려움
	"	느타리버섯의 기내 자실체 발생유도	발생의 불안정성
	"	형광성 슈도모나스를 이용한 버섯의 성장촉진 연구	성장 촉진기작 연구 필요
	"	느타리버섯의 발생단계에 따른 EST 분석 연구	유전자의 특성 분석 요구
	"	단포자 분리를 통한 느타리버섯의 임성단핵균주 분리	발생 기작의 연구
	"	느타리버섯의 유전자 database 구축	data의 충분한 활용
	"	REMI 법에 의한 느타리버섯의 형질전환 시스템 연구	과리 발현 체계 완성 요구

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절. 흑회색 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

느타리버섯은 국내에서 가장 중요한 작물 중의 하나로서 고품질의 안정적인 버섯의 품종은 국내 버섯 농가에게 절실히 요구되고 있으며, 농산물 개방화에 대해 필수적으로 수행되어야 할 국가적인 개발 과제에 해당된다. 느타리버섯의 품종은 자실체의 갓 색이 중요한 요인으로 작용하여, 흑회색의 갓색을 가지는 품종을 고품질로 평가된다. 그러나 재배과정 중 흑회색 버섯의 생산은 낮은 온도 유지 등의 환경적 조절이 필수적이거나, 그에 따르는 고비용이 재배과정의 어려움이라 할 수 있다. 또한 갓색과 더불어 수확 및 유통과정에서의 갓의 깨짐 등의 변형에 의한 품질의 저하도 많은 문제점이라 할 수 있다. 그러므로 품종의 개발과정에서 버섯의 물성도 크게 고려하여야 한다. 또한 국제화 시대에 경쟁력을 가지는 고품질 버섯품종의 보호를 위해서는 품종개발과 동시에 분자유전학적인 보호 장치의 개발이 필수적이다. 다양하고 유용한 버섯 품종으로부터 고품질의 안정된 형질을 가지는 버섯 품종을 개발하고, 동시에 그 형질에 대해 분자유전학적인 분석을 수행함으로써, 국제 경쟁력을 가지는 우수한 품종육성을 위한 유전자원의 확보를 목표로 하고 있다.

1. 흑회색 느타리버섯의 교잡균주 제작

1990년 품종으로 등록된 후 최근까지도 많이 재배되고 있는 품종인 원형느타리 1호의 재배농가에서 자실체색이 백색 또는 흑색인 색소돌연변이체와 자실체가 기형인 버섯이 발생하여 농가의 소득을 감소시키고 있을 뿐만 아니라 농가와 종균을 공급한 배양소간의 분쟁이 발생되고 있다. 이와 더불어 버섯의 상품성을 결정하는 요인 중 자실체 색은 매우 중요한 요소로 평가받고 있는 중요한 형질 중 하나임에도 불구하고 현재까지 자실체색의 표현에 있어 객관적 측정기준이 마련되어 있지 않고 육안적 평가에 의존하고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위하여 객관적인 측정법 및 그 지표를 확립하고 흑회색 느타리 버섯 교잡균주 제작을 실시하였다.

가. 재료 및 방법

1) 느타리버섯 육종모본의 선정

가) 모균주의 선정 : 수집된 모균주는 각각 고품질의 특성을 가지는 균주로서 수량이 적거나, 재배가 어려운 것, 재배의 속도가 느린 점 등의 단점을 가지고 있어, 이러한 단점

을 보완하고, 고품질의 버섯을 생산하는 균주를 제작하는 것을 목표로 한다. 이러한 목표에 따라 이미 분석된 균주의 특성 자료를 기준으로 모균주를 선정한다(Figure 1.1).

나) 모균주의 재배적 특성분석 : 선발된 모균주를 버섯완전배지 (MCM)에서 배양시킨 후 정단 부위의 접종원을 만들어 이 접종원을 다시 버섯 완전배지에 접종하여 28℃에서 배양시켜 균사의 성장속도와 균총형태를 확인하여, 균사의 성장속도를 비교 분석한다. 또한, 선발 모균주의 자실체를 발생시키기 위하여, MCM 배지에 접종하여 배양하고, 톱밥병 재배의 접종원으로 사용한다. 접종된 톱밥병은 28℃에서 15-20일간 배양시키고, 균사가 완전히 배양된 후 18℃, 95% 이상의 습도 조건에서 자실체를 발생시킨다. 자실체 발생은 최소한 5개 반복으로 시험한다. 자실체 발생 시작부터 원기가 생성되는 시간을 관찰하고, 계속적으로 자실체를 발생시킨다. 자실체의 발생과정이 정지되는 발생불량 균주를 선발하고, 발생된 자실체는 버섯 품질 특성 분석 기준에 따라 형태, 갓의 색을 관찰한다.

다) 자실체의 색·물성 측정

(1) UV/VIS Spectrophotometer 측정 : 원형느타리 균주와 흑색 변이주에 대하여 각 갓 껍질과 줄기(대)로 분리한 후 액체질소로 마쇄하여 melanin 함량 분석에 이용하였다. 멜라닌은 버섯의 자실체색을 나타내는 색소물질로 알려져 있으며, 세포벽에 집적(wall-bound melanin)되거나 세포밖(extracellular melanin)으로 배출되어 존재한다. 균사체나 포자의 세포벽에 멜라닌이 집적되면 자실체나 포자의 색이 진하게 되며, 외부 자극에 대한 내성이 증가된다. 또한 세포밖으로 분비되는 멜라닌 물질에 의해 배양중인 배지의 색이 형성되는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 Tyrosinase, catechol, DOPA, DHN, GHB등과 목재의 lignin이 분해되면서 형성된 Phenolic compound로부터 합성되며, Tyrosinase, Laccase, Peroxidase, Phenol oxidase등의 효소가 멜라닌합성에 관여한다(Alois et. al. 1986).

준비된 각 시료 0.1g에 추출용액(1M KOH, Potassium hydroxide)을 1ml 가하여 4℃에서 10분간 Vortex한 후 5분간 Sonication을 수행한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 측정시료로 이용하였다. UV/VIS Spectrophotometer(Perkin Elmer UV. WinLab) 측정시 Blank는 추출용액을 사용하였다. 측정조건은 Scan 시작 780.0nm에서 scan 끝 380.0nm로 하였으며 data interval은 1.00nm였다. Cycle time은 0.10초이며, UV Lamp와 VIS Lamp가 모두 활성화되어 있는 조건에서 측정하였다. 측정과정에 결정은 가시광선의 색깔에 따른 최대흡수과정에 근거하였다. 그리하여 갓 껍질과 줄기(대)로 분류하여 멜라닌을 추출하여 그 함량을 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 비교하였다(Figure 1.5-6).

(2) Minolta colorimeter 측정 : 현재까지의 버섯 특성분석에서 갓색은 육안으로 식별하여 분석하였다. 그러나 분석 기준의 객관성이 없으므로, 품종의 특성을 규정하기에는 불충분한 기준이라고 볼 수 있다. 그러므로 객관적인 측정법을 확립하여 분석기준을 정확히 하였다. 먼저, 사물의 색은 a^* 와 b^* 그리고 Lightness factor인 L^* 로써 색도좌표에서 정확하게 표시할 수 있다. $L^*a^*b^*$ 체계(Figure 1.4)는 CIE(Commission Internationale de l'Eclairage,1976)에 많은 색체계의 결정 방법 중에 하나로써(Berger-Sehunn,1994), $L^*a^*b^*$ 체계를 본 연구에 적용한 이유는 실제 육안으로 관찰하는 색을 입증하는데 가장 적합한 방법이기 때문이다(Billmeyer and Saltzman,1966). Minolta colorimeter는 CM-50801(Minolta camera Co., Ltd, Japan)을 사용하였으며, 원형느타리 균주와 흑색 변이주에 대하여 갓을 분리하여 실제 육안으로 관찰되는 표면에 색을 측정하였다(Figure 1.5).

(3) 자실체 물성 측정 : 원형느타리 균주와 흑색 변이주의 자실체를 갓, 줄기(대)로 분류하여 물성측정기(Texture analyzer)로 물성을 측정하였다. 물성측정기는 식품을 구성하는 조직의 파열, 경도 및 연도, 침투, 전단력, 응력 완화에 의한 탄성 및 점성, 인장강도, 표면장력 등을 종합적으로 측정할 수 있는 장비로서 본 실험에서는 전단력만을 비교하였다. 측정 조건으로서 Test speed는 30cm/min이며 Sweep speed는 20cm/min으로 설정하였다. Load range는 5kg이고 자실체의 갓과 줄기(대) 크기는 가로, 세로 10.0mm × 10.0mm로 설정하여 준비하였다(Figure 1.6).

2) 계통간 교배에 의한 교잡균주 육성

발생된 자실체의 포자는 자실체 갓의 지름이 3.5cm인 건강한 자실체의 갓 부위를 잘라 샐레 위에서 24시간 동안 정치하여 포자를 채취한다. 채취한 포자로부터 단포자를 분리하여 배양시켜, 각 균주를 MCM 배지 상에서 교배시험하여, 그 교배형을 결정한다. 각 결정된 교배형에 따라 교잡균주를 제작하고, 위의 자실체 특성분석법에 따라 자실체를 발생시킨다.

나. 결과 및 고찰

1) 느타리버섯 육종모본의 선정

가) 모균주의 선정 : 흑회색 느타리버섯 균주를 제작하기 위해 농가의 재배 과정에서 수집된 흑색 변이체를 수집하였다. 흑색 변이체는 원형1호의 재배 과정 중 분리되었으며, 육안으로도 갓색의 특이적임이 확인이 가능하고, 줄기의 색도 정상의 균주와 다르게 회

백색을 나타내기도 하였다(Figure 1.1). 고품질의 품종 개량을 위해 흑회색 버섯 균주와의 교배를 위해서 한국특산 품종인 ASI2029 균주를 먼저 선발하고, 그 특성분석을 수행하였으며(Table 1.1), 그 외에 현재 재배되는 고품질 버섯으로서 갓색과 자실체의 형태가 좋은 수한 품종, 흑평 품종을 선정하였고, 품종의 특성을 분석하였다.

나) 모균주의 재배적 특성분석 : 흑회색 느타리버섯을 제작하기 위하여 농가의 재배 과정에서 수집된 흑색 변이주를 수집하였다. 흑색 변이주는 원형 1호의 재배 과정 중 분리되었으며, 육안으로도 갓색이 특이적임이 확인 가능하였고, 줄기의 색도는 정상의 균주와 다르게 회백색을 나타내기도 하였다. 고품질의 품종 개량을 위해 흑색 변이주의 특성 분석을 수행하였으며(Table 1.1), 그 외에 현재 재배되는 고품질 버섯으로서 갓색과 자실체의 형태가 좋은 ASI2504(수한)를 선정하여 품종의 특성을 분석하였다.

본 실험에서 흑색 변이주와 ASI2504(수한)의 재배적 특성에서 육안으로 가장 큰 차이를 보이는 것은 자실체의 갓과 줄기의 색깔에서 나타났다. ASI2504(수한)은 다른 일반 균주들처럼 갓색이 짙은 회색이며, 줄기(대)가 모두 흰색으로 재배적 특성이 서로 비슷하였다. 반면에 흑색 변이주는 갓색이 검은 색에 가까웠으며, 줄기(대)도 밝은 회색으로 특이한 것을 볼 수 있었다. 흑회색 느타리버섯을 제작하기 위한 흑색 변이주의 이러한 특성은 고품질 버섯 육종모본으로서의 이용가능성이 충분히 있음을 알 수 있었다.

다) 자실체의 색·물성 측정

(1) 모균주 갓의 색도 비교 : UV/VIS Spectrophotometer 를 이용하여 멜라닌의 함량분석은 육안 검사시 가장 짙은 색을 나타내는 흑색 변이주가 가장 높은 흡광도를 나타내었으며, 한국야생 자생느타리와 원형느타리 1호의 순서로 나타났다. 흡광도란 $A=abc$ 로 계산되는 수치이다. A는 흡광도(absorbance), a는 흡광계수, b는 빛살경로 길이(cell path length), c는 농도(concentration)를 의미한다. 가장 높은 흡광도를 나타내는 흑색 변이주와 가장 낮은 값을 나타내는 원형느타리 1호의 측정결과로 육안 관찰과 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 모든 색은 각각의 가시광선 영역에서 가장 높은 흡광도를 나타낸다. 따라서, 붉은색이나 푸른색의 자실체 갓 색깔도 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 색의 정도를 측정하는데 이용 가능한 것이다(Figure 1.2-3).

Minolta 색차계 측정 결과 모두 색도 좌표에서 L^*, a^*, b^* 의 수치로 유의적인 좌표에 값을 나타내었다(Table 4). L^* 은 명도(선명도), a^* 은 적색도, b^* 는 황색도를 나타내며, $-a^*$ 는 녹색도, $-b^*$ 은 청색도를 나타내며 각 수치에 따라 3차원적 형상의 색도좌표의 위치를 추정할 수 있다. 원형느타리와 한국야생 자생느타리(ASI2029) 그리고 흑색 변이주를 측정하였다. 이들 3균주는 붉은색이나 청색 등 특이적 색의 변이체가 아니므로 a^* 나 b^* 의 값은 그리 유효하지 않으나, 색의 어두운 정도인 L^* 값으로 그 색의 정도를 비교할 수 있었다. 측정 결과, 명도(L^*)는 원형느타리 1호가 가장 높게 나왔으며, 한국야생 자

생느타리와 흑색 변이주의 순으로 나타났다. 이 결과로 육안적 관찰시 예상할 수 있는 값과 일치하는 결과를 확인하였다(Table 1.2).

(2) 모균주의 자실체의 물성 비교 : 물성측정기(Texture analyzer)를 이용하여 측정된 느타리버섯의 갓 전단력은 원형1호, 흑색 변이주 그리고 한국 야생 자생느타리의 순으로 크게 나타났다. 줄기(대) 전단력은 원형1호, 한국 야생 자생느타리 그리고 흑색 변이주의 순으로 크게 나타났다. 또한 갓과 줄기(대)의 전단력 비교에서는 세 균주가 모두 갓보다 줄기(대)에서 크게 나온 것으로 확인되었다. 본 실험 결과 각 균주간의 전단력 비교를 할 수 있었으나 특이적으로 유의적인 차이는 발견할 수 없었다(Table 1.3).

2) 계통간 교배에 의한 교잡균주 육성

4개의 극성을 가지는 버섯 균주에 대하여 계통간의 교배를 통한 신품종의 육성을 위해서는 먼저 모균주의 단핵 균주에 대한 교배형 결정이 우선되어야 한다. 이렇게 결정된 교배형에 따라 각각 화합성 균주간의 교배를 통한 신품종의 버섯 균주의 개발이 수행될 수 있다. 그러므로 수집된 모균주의 자실체로부터 포자를 수집하고, 각 수집된 단포자 분리 및 교배형 결정을 수행하였으며(Table 1.4), 수집된 모균주에 대해 순차적으로 진행을 하였다. 그러나 단포자의 분리 및 교배형 결정은 4개 극성의 교배형이 모두 수집 및 분석이 되어야 하는데, 4개의 극성이 수집이 안될 경우에는 그러한 수집 및 분석이 반복이 되어야 한다. 그러므로 차례로 수행된 버섯 균주에 대한 교배형 결정을 하였고, 수한과 흑평의 교배형 결정도 완료하였다.

3) 고찰

흑회색 느타리버섯 균주를 제작하기 위해 농가의 재배과정에서 수집된 흑색 변이주를 수집하였다. 또한 고품질의 품종개량을 위한 균주로는 한국특산 품종인 ASI2029 균주와 현재 시중에 유통되고 있으며, 갓색과 자실체의 형태가 좋은 수한 품종을 선정하였다. 이들 버섯 품종의 특성 분석 기준에 의해 재배적 특성을 조사하였다. 또한 이화학적 특성 분석을 위해서 조직분석기와 색도계를 이용한 부위별 색도 측정을 실시하였다. 이렇게 선발된 흑색 변이주와 수한 균주의 자실체에서 채취한 포자를 배양시켜 단핵균주를 얻었다. 이를 버섯완전배지(MCM)에서 교배하여 새로운 교잡균주를 제작하거나, 또는 채취한 포자를 혼합하여 다포자 발아과정을 이용하기도 하였다.



Figure 1.1 Fruiting bodies of new selected strains.

a: ASI 2029, b: Wonhyong 1, c: Black strain, d: ASI 2504(수한), e: ASI 2706(흑평)

Table 1.1 The cultivating characterization of Black strain, Wonhyong 1 and ASI2029 strain.

Strains	Mycelial growth ^a		Day to Primordia	Color of Pileus		Color of stipe	Formation of spore ^b
	MM	MCM		Young	Mature		
ASI2029	L	L	3.5	dark grey	brown	white	5
Wonhyong 1	L	L	3.7	dark brown	grey	white	5
Black strain	M	L	5.5	black	dark brown	bright grey	5
ASI2504	M	L	4.5	dark grey	brown	white	5
ASI2706	L	L	4	dark grey	brown	white	5

^aValues in parenthesis represent percentage of variants. L : largely(over 40mm diameter) and densely growing colony. M : medium colony(from 25 to 40mm diameter of colony). S : small colony (below 25mm diameter of colony)

^bLevels of sporulation were visually scored from 0(no spore) to 5(normal sporulation)

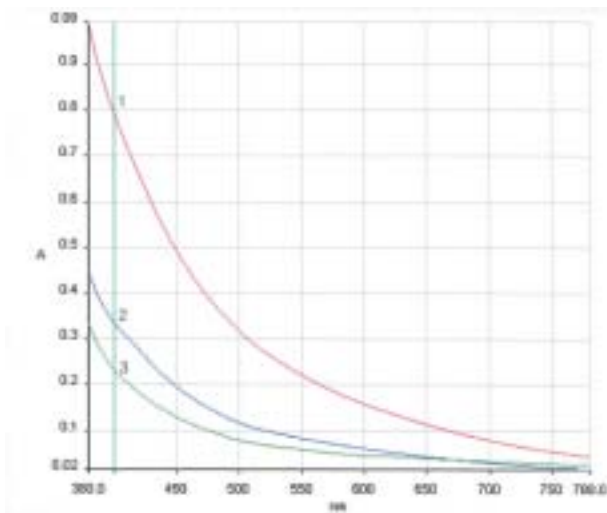


Figure 1.2 Scan graph of UV/VIS Spectrophotometer with a coat of Pileus of ¹Black strain, ²ASI 2029 and ³ASI 2180(Wonhyeong 1).

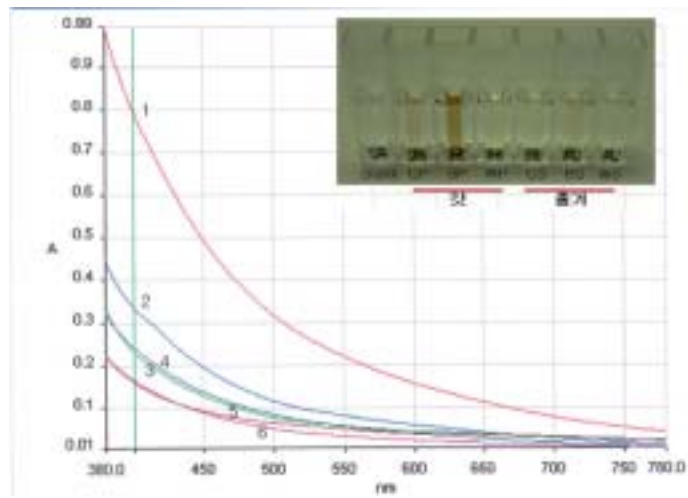


Figure 1.3 Scan graph of UV/VIS Spectrophotometer with the coat of Pileus(No.1,2,3) and the stipe(No.4,5,6) of ^{1,4}Black strain, ^{2,5}ASI 2029 and ^{3,6}ASI 2180 (Wonhyeong 1)

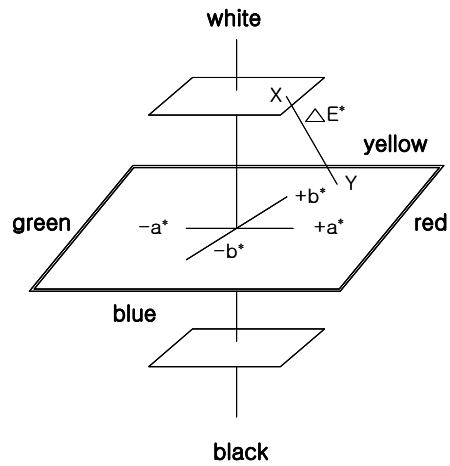


Figure 1.4 A graphical representation of the $L^* a^* b^*$ color space. The baseline color is represented by X and the specimen color by Y. The difference in color between X and Y is given by ΔE^*



Figure 1.5 Colorimeter(Minolta, Japan) to test the Pileus color of fruiting bodies.

Table 1.2 The color measurement of Black strain, Wonhyong 1 & ASI2029 by Minolta colorimeter.

Strains	L*	a*	b*
ASI2029	58.42	1.25	8.04
Wonhyong 1	64.48	1.55	9.64
Black strain	38.60	3.72	6.40

+L*: brightness, -L*: dark, +a*: red, -a*: green, +b*: yellow, -b*: blue

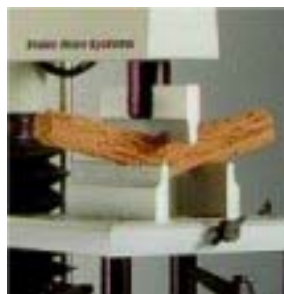


Figure 1.6 Texture analyzer to test the texture of fruiting bodies.

Table 1.3 Shearing test of fruit bodies by the texture analyzer.

Range	Test Speed	Sweep Speed
5000g	30 cm/M	20 cm/M

Strains and texture	ASI2029		Wonhyong 1		Black strain	
	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe	Pileus	Stipe
Strength (g)	256	344	304	526	269	209
Total energy (erg)	2893	2945	2067	5578	1916	1304
Shearing Val (g/cm)	256	344	337	526	269	209
Shearing energy(erg/cm)	289314	294533	206719	557845	191614	130481
Height	0.5	1	1	1.5	0.5	0.7
Diameter	0.5	1.3	0.9	1.4	0.3	0.7

Table 1.4 ASI2029 균주의 교배형 결정

		A1B1						A1B2						A2B1		A2B2															
		1	2	7	11	14	15	20	24	27	29	30	32	34	35	36	37	39	40	3	8	9	10	12	13	16	21	22	23	25	26
A1B1	1																			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20																				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A1B2	27																			+	+										
	29																			+	+										
	30																			+	+										
	32																			+	+										
	34																			+	+										
	35																			+	+										
	36																			+	+										
	37																			+	+										
A2B1	39									+	+	+	+	+	+	+															
	40									+	+	+	+	+	+	+															
A2B2	3	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	8	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	9	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	10	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	12	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	13	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	16	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	21	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	22	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	23	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	25	+	+	+	+	+	+	+	+																						
	26	+	+	+	+	+	+	+	+																						

2. 느타리버섯의 프로테옴 분석조건 확립

현재 버섯은 식용 및 약용으로 사용되고 있다. 게다가 버섯은 많은 연구자들에 의해 분자유전학적 연구가 활발히 이루어지고 있으나 아직 단백질 차원의 연구는 미비한 실정이다. 또한 버섯의 기능 관련 단백질은 밝혀지지 않은 부분으로서 앞으로 꾸준한 연구가 진행되어야 할 사항이다. 이를 위해 본 연구에서는 프로테옴 분석법을 확립하기 위하여 느타리버섯의 균사체와 자실체로부터 그 분석 조건을 찾고자 하였다.

가. 재료 및 방법

1) 버섯의 균사체와 자실체로부터 단백질의 분리

각 균주의 균사체는 250ml 플라스크에 버섯 완전배지를 각 100ml씩 분주하여 고체배지 균사(직경 0.75cm) 4조각씩을 넣어 10일간 27°C에서 정치 배양하였고 자실체는 톱밥배지에서 수확하였다. 배양된 균사체는 멸균된 차가운 증류수에 세척하여 액체 배지성분을 제거하였고, filter paper (Whatman no.1)로 여과하여 수집하였다. 각 시료들은 액체 질소에 마쇄하여 준비하였다. 단백질의 추출은 Molloy 등(1998)의 방법을 수정, 보완하여 수용성 및 불수용성 단백질, 그리고 총단백질로 구분하여 추출한다. 이 중 수용성 단백질은 0.5g의 시료에 0.6ml의 추출용액 (0.1M sodium phosphate, pH8.3)을 첨가하여 4°C에서 40분간 vortex하며 현탁하였다. 15,000rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 취하여 SDS-PAGE에 이용한다.

2) 단백질의 정량 및 SDS-PAGE 분석

동일량의 단백질은 전기영동하여 비교 분석하기 위해서 단백질의 정확한 정량 과정이 필요하다. 단백질의 정량은 Bradford법을 기초로한 protein assay system (Bio-rad, USA)을 이용한다. Standard protein으로는 BSA(bovine serum albumin)를 이용하고, 시료들은 SDS reducing 용액과 100°C에서 5분간 처리하고 polyacrylamide gel은 5%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 구성한다. 단백질은 200 μ g을 SDS reducing 용액과 함께 전기영동 한다. 전기영동의 running 조건은 70 Volt에서 한시간 동안 그리고 85 Volt에서 12시간 가량으로 수행한다.

3) 이차원전기영동 분석

각 시료의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 염색방법에 따라 각 0.1mg과 1mg의 단백질을 이용한다. 각 단백질은 17cm길이의 immobilized pH gradient strip(Bio-Rad, 3-10NL)에 16시간동안 재수화(rehydration) 시킨 후 등전점전기영동(isoelectric focusing)을 실시한다. 등전점전기영동은 20℃에서, 각 strip에 전류가 50 μ A 이상 넘지 않도록 설정하며 100V에서 1시간, 500V에서 1시간 전개 후 순차적으로 8,000V까지 상승시켜 총 45,000Vhr와 80,000Vhr가 될 때까지 실시한다. 등전점전기영동 후 분자량에 따른 분리를 위하여 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 12% acrylamide gel(18cm \times 20cm)을 이용하여 최소 10mA에서 1시간동안 전개 후, 염색시약이 gel 바닥면까지 전개될 때까지 20mA에서 전개한다. 분리된 단백질의 분자량과 pI값은 2D SDS-PAGE용 표준물질(Bio-RAD, USA)을 이용하여 측정한다.

4) Gel 염색

분리된 단백질을 가시화하기 위하여 coomassie stain과 silver stain을 이용하여 실시한다. Coomassie stain은 gel을 40% methanol과 5% phosphoric acid가 포함된 용액에서 3시간동안 고정화하고, 0.1% coomassie brilliant blue G-250이 포함된 염색용액을 이용하여 전개된 단백질을 가시화 시킨 후, gel 표면에 남아있는 염색시약은 증류수를 이용하여 탈색시켜 단백질 spot을 확인한다.

Silver stain은 EMBL(Shevchenko 등, 1996)방법에 기초하여 실시한다. 전기영동이 끝난 후 50% methanol, 5% acetic acid에서 20분간 고정화시킨 후 50% methanol과 증류수를 이용하여 gel을 충분히 씻어준 뒤 0.2% sodium thiosulfate를 이용하여 1분간 반응시킨다. 0.1% silver nitrate에서 20분간 반응시킨 후 증류수를 이용하여 남아있는 silver nitrate를 충분히 제거하고, 0.04% formaldehyde와 2% sodium carbonate를 포함한 용액을 이용하여 발색반응을 유도한다. 발색반응이 충분히 진행되면 5% acetic acid를 이용하여 반응을 정지시킨다.

나. 결과 및 고찰

1) 버섯의 균사체와 자실체로부터 분리한 단백질의 분석

느타리버섯의 균사체와 자실체에서 단백질 분리를 위한 최적의 조건을 확립하기 위하여, 다양한 참고문헌을 통해 여러 가지의 조건이 시험되었다. 먼저 가장 많은 종류의 단백질이 용이한 분리가 가능한 soluble protein의 추출이 시험되었고, 이렇게 추출된 단백질은 정량 조건이 확립된 Bradford법을 통하여 정량되었다. 정량된 단백질은 먼저 1D 분석을 통하여 각 종간 차이가 비교 분석되었다 (Figure 1.7).

기존의 품종과 다른 특이적인 형질을 가지는 흑색변이체의 경우, 단백질의 패턴으로부터 그 원인 요소 및 특이 단백질에 대한 분석이 가능하다. 그러므로 2-DE 단백질 분석법을 통하여 정상 균주와의 비교 분석을 통해 형질과 관계하는 단일 단백체를 분리할 수 있으며, 특이적인 형질을 나타내는 분자 수준에서의 원인 분석 및 고유의 분자지표의 분석이 가능하다. 이에 정상 균주와의 2-DE 분석을 통한 흑색변이체 특이 단백체를 동정을 위한 실험을 수행하였다(Figure 1.8).

2) 고찰

느타리버섯의 균사와 자실체로부터 버섯 단백질의 분리 조건을 확립하기 위해 다양한 추출용액 및 추출과정을 시험하여, 1D와 2D 분석에 대한 최적조건을 확립하였다. 또한 Bradford법을 응용한 버섯 단백질의 정량조건을 확립하여, 버섯 단백질의 정량 프로그램을 표준화하였다. 위에서 확립된 느타리버섯의 프로테오믹 최적 분석조건 하에서 단백질의 발현 분석과 동정을 실시하였다. 또한, 동정된 단백질들은 본 실험실에서 구축한 느타리버섯 EST database와 비교 분석을 통하여 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열을 확인할 예정이다.

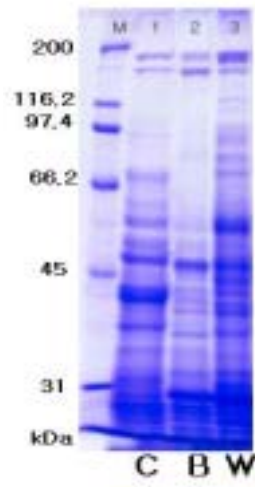


Figure 1.7 단백질의 1D 분석결과
 C: ASI2029, B: 흑색변이체, W: 원형1호

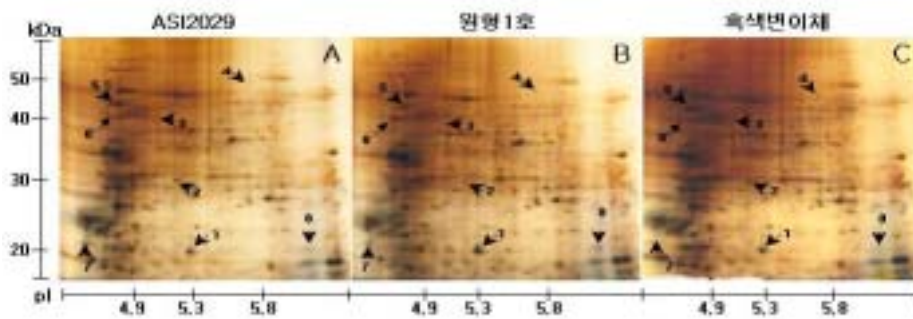


Figure 1.8 흑색 변이체와 정상 균주간의 2D 비교 분석

3. 우량 교잡균주 선발

흑색 변이주와 수한 균주에서 단핵균주간의 교배와 다포자 발아과정을 통해 교잡균주가 제작되었고 재배적 특성을 분석하였다. 교잡균주의 자실체 갓색에 대한 이화학적 특성을 조사하기 위해서 색차계를 이용하였다. 또한 버섯 자실체의 갓과 줄기(대)에서 전단력을 측정하기 위해 물성측정기를 이용하였다. 여기서 교잡균주의 재배적 특성에 따라 갓 색에서 가장 흑회색에 가까운 균주들을 선발하였다. 이 후, 계대배양을 통한 발현특성의 재현성을 확인하여 우량 교잡균주를 선발하였다.

가. 재료 및 방법

1) 단핵균주와 교잡균주의 특성분석과 선발

가) 새로운 교잡균주에 대하여, 버섯완전배지 (MCM) 에서 배양시킨 후 정단 부위의 접종원을 만들어 이 접종원을 다시 버섯 완전배지에 접종하여 28℃에서 배양시켜 균사의 성장속도와 균총 형태를 확인하여, 균사의 배양 특성을 각각 분석한다. 선발 교잡균주의 자실체를 발생시키기 위하여, MCM 배지에 접종하여 배양하고, 톱밥 병 재배의 접종원으로 사용한다. 접종된 톱밥병은 28℃에서 15-20일간 배양시키고, 균사가 완전히 배양된 후 18℃, 95% 이상의 습도 조건에서 자실체를 발생시킨다. 자실체 발생은 최소한 5개 반복으로 시험한다. 자실체 발생 시작부터 원기가 생성되는 시간을 관찰하고, 계속적으로 자실체를 발생시킨다. 자실체의 발생과정이 정지되는 발생불량 균주를 선발하고, 발생된 자실체는 버섯 품질 특성 분석 기준에 따라 형태, 갓의 색을 관찰한다.

나) 이렇게 분석된 버섯 특성 분석 결과를 통해 새롭게 제작된 교잡균주에 대해서 고품질의 흑회색 버섯 균주의 특성을 가지는 육종 후보 균주를 선발한다.

2) 선발균주의 이화학적 특성 분석

가) 적은 수로 새롭게 선발된 교잡균주에 대하여, 버섯특성 분석을 재분석한다. 또한 이 균주의 특성에 대한 객관적 분석을 통한 객관적 결과를 얻기 위해 이화학적 특성 분석을 실시한다. 버섯의 이화학적 특성 분석은 다음의 과정으로 진행하였다. 발생시킨 자실체를 채취하여 갓 부위와 줄기부위에 대해서 색차계를 이용하여 갓색에 대한 명도, 황색도, 녹색도 (l, a, b value)를 우선 측정하였으며, 버섯의 물성은 물성측정기를 이용하여, 버섯 자실체의 시료를 가로세로 1cm X 1cm로 정확히 잘라 준비하여 측정하였다. 반복된 시료를 준비하여 반복 측정된 값의 평균값을 산정하였다.

나) 분석된 버섯 특성 분석 결과를 통해 다수의 새롭게 제작된 교잡균주로 부터 신고품질의 흑회색 버섯 균주를 선발하였고, 그 균주에 대한 특성을 파악하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 우량 교잡균주의 제작 및 선발

농가의 재배 과정에서 수집된 흑색 변이주는 육안으로도 특이적 갓색을 지니고 있음의 확인이 가능한 균주이며, 고품질의 품종 개량을 위해 현재 재배되는 고품질 버섯으로서 갓색과 자실체의 형태가 좋은 수한 품종을 교배주로 사용하였다. 우선 이러한 모균주의 포자를 채취하여, 단포자를 분리하였고, 분리된 단포자의 교배를 통하거나, 다포자 발아과정을 통해 총 333개의 교잡균주를 제작하였다. 이렇게 분석한 교잡주 모두의 특성분석을 수행하여 조사하였다. 각 균주는 모두 3-5반복의 시험 성적을 분석하여 정리하였고, 이러한 시험 성적을 통해 우리는 6개의 우량 교잡균주 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24 를 선발할 수 있었다.

2) 선발균주의 이화학적 특성 분석

가) 선발균주의 재배적 특성 : 흑회색 느타리버섯 제작을 위한 교잡균주 선발을 위해 모균주와 교잡균주를 비교하였다. 균사 생장속도는 버섯완전배지(MCM), 감자배지(PDA), 버섯최소배지(MM)에서 KU-BM16×SM23 균주를 제외하고 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM20×SM24 균주가 모균주보다 빨랐다. 원기 발생기간은 모든 교잡균주가 흑색 변이주보다 짧았지만 수한보다는 느렸으며, 교잡균주 중 KU-BM20×SM24가 가장 짧았다. 흑색 변이주와 ASI2504(수한)은 모균주로서 자실체의 갓과 줄기(대)의 색이 육안으로 확인 가능할 정도로 차이가 보였다. ASI2504(수한)은 다른 일반 균주들처럼 갓색이 회갈색이며, 줄기(대)가 흰색이었으나 흑색 변이주는 갓색이 검은 색에 가까웠으며, 줄기(대)도 회백색으로 서로 다른 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이 결과로 모균주인 수한과 교잡주사이의 갓색의 유의적 차이는 확인하기 어려웠다. 따라서 이화학적 특성분석인 갓 색도의 비교로 객관적 수치가 필요로 하겠다(Table 1.6).

나) 선발균주의 갓 색도의 비교분석 : Minolta 색차계 측정 결과 모두 색도 좌표에서 L*,a*,b*의 수치로 유의적인 좌표에 값을 나타내었다(Table 4). L*은 명도(선명도), a*은

적색도, b^* 는 황색도를 나타내며, $-a^*$ 는 녹색도, $-b^*$ 은 청색도를 나타내며, 각 수치에 따라 3차원적 형상의 색도좌표의 위치를 추정할 수 있다.

모균주인 수한과 흑색 변이주와 6개의 선발된 교잡균주의 색도를 측정하였다. 그 결과 명도(L^*)는 흑색변이주가 가장 낮게 나왔으며, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM20×SM24, KU-BM12×SM2 순으로 나타났다. 반면에 KU-BM13×SM25, KU-BM16×SM23는 수한보다 명도(L^*)가 높게 측정되었다. 여기서 색차계의 측정 결과는 명도(L^*) 값이 낮을수록 흑색에 가까우며 높을수록 흰색에 가깝다고 할 수 있다. 이 결과로 육안적 관찰시 구별할 수 없는 색의 정도 차이를 객관적 값으로 비교 할 수 있었고, 교잡균주의 위와 같은 특성은 고품질 흑회색 버섯의 우량균주로의 가능성을 보여 주었다. 앞으로 우량 교잡균주에 대해서 대량재배를 통하여 실제 농가에서 균주 적응성을 조사할 것으로 사료된다(Table 1.7).

다) 선발균주 자실체의 전단력 비교분석 : 물성측정기(Texture analyzer)를 이용하여 측정 한 느타리버섯의 갓 전단력의 수치가 수한이 가장 높았으며 KU-BM20×SM24, KU-BM13×SM25, KU-BM12×SM2, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM14 ×SM24의 순이며 흑색 변이주가 가장 낮았다. 줄기(대) 전단력의 수치도 수한이 가장 높았으며 KU-BM16×SM23, KU-BM14×SM25, KU-BM13×SM25, 흑색 변이주, KU-BM20 ×SM24, KU-BM12×SM2 순이며, BM14×SM24가 가장 낮았다. 줄기(대)가 갓보다 전단력이 모두 크며 균주간의 전단력 비교에서 대체로 수한, 교잡균주, 흑색 변이주 순의 크기로 정리 되었다. 본 실험 결과 모균주에 비해 교잡균주의 자실체 전단력이 크게 차이 나지 않음을 알 수 있었다(Table 1.8).

3) 고찰

모균주의 포자를 채취하여 단포자를 분리하였고, 분리된 단포자의 교배를 통하거나, 다포자 발아과정으로 교잡균주를 제작하였다. 제작된 교잡균주의 재배적·이화학적 특성을 조사하여 흑회색에 가까운 갓색과 자실체의 형태가 좋은 균주로 우량 교잡균주를 선발하였다. 선발된 우량 교잡균주는 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24로서 총 6개이며 이들은 확대재배를 위하여 대량의 병재배를 통한 우량 균주검정을 할 것이다.

Table 1.6 The cultivating characterization of new strains.

Strain	Mycelial growth(mm)			Day to Primordia (day)	Shape		Color	
	MCM	PDA	MM		Pileus	Stipe	Pileus	Stipe
Wonhyong 1	60	51	48	6.7	편편형	굵고 긴형	회백색	흰색
Black strain	44	38	39	7.1	편편형	가늘고 짧은형	흑색	회백색
Suhan	56	45	47	3.9	깊은 깔대기형	굵고 긴형	회갈색	흰색
KU-BM12×SM2	25	57	47	4.3	얇은 깔대기형	가늘고 긴형	회백색	흰색
KU-BM13×SM25	68	67	55	6.4	얇은 깔대기형	굵고 긴형	회갈색	흰색
KU-BM14×SM24	58	51	49	6.5	깊은 깔대기형	굵고 짧은형	회갈색	흰색
KU-BM14×SM25	60	68	54	6.7	얇은 깔대기형	굵고 짧은형	회갈색	흰색
KU-BM16×SM23	19	21	15	6.7	깊은 깔대기형	가늘고 짧은형	회갈색	흰색
KU-BM20×SM24	49	52	50	4.1	얇은 깔대기형	가늘고 짧은형	회갈색	흰색

Table 1.7 Measurement of surface color with normal and new strains by the Minolta colorimeter.

Strain	L*	a*	b*
Wonhyong 1	79.73	1.07	10.38
Black strain	52.22	3.95	9.65
Suhan	66.16	1.84	9.93
KU-BM12×SM2	65.53	0.85	8.32
KU-BM13×SM25	77.99	0.8	12.57
KU-BM14×SM24	61.69	2.4	9.96
KU-BM14×SM25	63.19	3.43	12.3
KU-BM16×SM23	75.53	1.41	9.46
KU-BM20×SM24	65.21	0.53	7.62

+L*: brightness, -L*: dark, +a*: red, -a*: green, +b*: yellow, -b*: blue

Table 1.8 Searching test of new strains by the texture analyzer.

Range	Test Speed	Sweep Speed	Sample's size			
5000g	30 cm/M	20 cm/M	10.0×10.0mm			

	Wonhyong 1		Black strain		Suhan	
	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe
Strength (g)	111	615	132	655	251	863
Total energy (erg)	4305 ↑ 1	4037 ↑ 2	6084 ↑ 1	3389 ↑ 2	4983 ↑ 2	4481 ↑ 2
Shearing Val (g/cm ²)	111	615	132	655	251	863
Shearing energy (erg/cm ²)	43055	403734	60844	338962	498331	448141

	KU-BM12XSM2		KU-BM13XSM25		KU-BM14XSM24	
	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe
Strength (g)	175	575	176	692	135	554
Total energy (erg)	3761 ↑ 2	3168 ↑ 2	3823 ↑ 1	3613 ↑ 2	4728 ↑ 1	4456 ↑ 2
Shearing Val (g/cm ²)	175	575	176	692	135	554
Shearing energy (erg/cm ²)	376140	316860	38235	361349	47285	445652

	KU-BM14XSM25		KU-BM16XSM23		KU-BM20XSM24	
	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe	Pileus	Stripe
Strength (g)	145	737	142	738	206	603
Total energy (erg)	3590 ↑ 1	4657 ↑ 2	5006 ↑ 1	4943 ↑ 2	4377 ↑ 1	3503 ↑ 2
Shearing Val (g/cm ²)	145	737	142	738	206	603
Shearing energy (erg/cm ²)	35905	465749	50064	494351	43776	350346

4. 선발균주의 발현차이 유전자 및 프로테옴 분석

생명체의 발생, 분화, 세포주기의 조절, 퇴화 등의 과정에서 표현되어 나타나는 유전자들은 전체 유전자들 중에서 아직 알려져 있지 않은 중요한 기전을 통해 그 세포의 기능에 맞게 일부가 선택되어 나타나는 것이라고 할 수가 있다. 최근 연구에서 PCR을 이용하여 새로운 유전자를 찾아내는 방법으로 DDRT-PCR을 사용하는데 이는 서로 다르게 증폭된 PCR 산물을 선택하여 증폭된 DNA가 특정세포에 특징적으로 발현되는 유전자인지를 확인하는 방법이다. 본 실험에서 선발된 우량 교잡균주의 발현차이 유전자를 분석하기 위해 DDRT-PCR를 이용하였다. 또한 자실체내 발현차이를 보이는 단백질을 분석하기 위해 앞서 확립한 프로테옴 분석법을 이용하여 실험을 실시하였다.

가. 재료 및 방법

1) 선발 균주간 발현차이 유전자 단편의 탐색

○ DDRT-PCR (differential display reverse transcription-PCR) 분석

분석하려는 시료로부터 Trizol (Invitro -gen 사)을 이용하여 total RNA를 준비하였고, 전기영동과 흡광도 분석을 통해 RNA량과 질을 분석하였다. 이렇게 준비된 RNA (1ug)을 주형으로 하여, cDNA를 합성한 후, DEG 분석용 키트 (씨젠, 한국) 를 이용하여, 1차 20개의 프라이머에 대한 DDRT-PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 밴드는 이미지 분석 장비를 통해 시료간의 밴드 강도를 비교 분석하였고, 차이가 있는 DNA 밴드에 대한 유전자 동정을 수행하였다.

2) 자실체내 발현 프로테옴의 프로파일 작성

가) 버섯의 균사체와 자실체로부터 단백질의 분리

각 균주의 균사체는 250ml 플라스크에 버섯 완전배지를 각 100ml씩 분주하여 고체배지 균사(직경 0.75cm) 4조각씩을 넣어 10일간 27℃에서 정치 배양하였고 자실체는 톱밥배지에서 수확하였다. 배양된 균사체는 멸균된 차가운 증류수에 세척하여 액체 배지성분을 제거하였고, filter paper (Whatman no.1)로 여과하여 수집하였다. 각 시료들은 액체 질소에 마쇄하여 준비하였다. 단백질의 추출은 Molloy 등(1998)의 방법을 수정, 보완하여 수용성 및 불수용성 단백질, 그리고 총단백질로 구분하여 추출하였다. 이 중 수용성 단백질은 0.5g의 시료에 0.6ml의 추출용액 (0.1M sodium phosphate, pH8.3)을 첨가하여 4℃에서 40분간 vortex하며 현탁하였다. 15,000rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 취하여 SDS-PAGE에 이용하였다.

나) 단백질의 정량 및 SDS-PAGE 분석

동일량의 단백질은 전기영동하여 비교 분석하기 위해서 단백질의 정확한 정량 과정이 필요하다. 단백질의 정량은 Bradford법을 기초로한 protein assay system (Bio-rad, USA)을 이용 한다. Standard protein으로는 BSA (bovine serum albumin)를 이용하고, 시료들은 SDS reducing 용액과 100℃에서 5분간 처리하고 polyacrylamide gel은 5%의 stacking gel과 10%의 separating gel로 구성되었다. 단백질은 200 μ g을 SDS reducing 용액과 함께 전기영동하였고, 전기영동의 running 조건은 70 Volt에서 한 시간 동안 그리고 85 Volt에서 12 시간 가량을 수행하였다.

다) 이차원전기영동 분석

각 시료의 단백질 발현양상을 분석하기 위하여 염색방법에 따라 각 0.1mg과 1mg의 단백질을 이용하였다. 각 단백질은 17cm길이의 immobilized pH gradient strip(Bio-Rad, 3-10NL)에 16시간동안 재수화(rehydration) 시킨 후 등전점전기영동(isoelectric focusing)을 실시하였다. 등전점전기영동은 20℃에서, 각 strip에 전류가 50 μ A이상 넘지 않도록 설정하며 100V에서 1시간, 500V에서 1시간 전개 후 순차적으로 8,000V까지 상승시켜 총 45,000Vhr와 80,000Vhr가 될 때까지 실시하였다. 등전점전기영동 후 분자량에 따른 분리를 위하여 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 12% acrylamide gel (18cm \times 20cm)을 이용하여 최초 10mA에서 1시간동안 전개 후, 염색시약이 gel 바닥면까지 전개될 때까지 20mA에서 전개하였다. 분리된 단백질의 분자량과 pI값은 2D SDS-PAGE용 표준물질(Bio-RAD, USA)을 이용하여 측정하였다.

라) Gel 염색

분리된 단백질을 가시화하기 위하여 coomassie stain과 silver stain을 이용하여 실시한다. Coomassie stain은 gel을 40% methanol과 5% phosphoric acid가 포함된 용액에서 3시간동안 고정화하고, 0.1% coomassie brilliant blue G-250이 포함된 염색용액을 이용하여 전개된 단백질을 가시화 시킨 후, gel 표면에 남아있는 염색시약은 증류수를 이용하여 탈색시켜 단백질 spot을 확인하였다. Silver stain은 EMBL(Shevchenko 등, 1996)방법에 기초하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 50% methanol, 5% acetic acid에서 20분간 고정화시킨 후 50% methanol과 증류수를 이용하여 gel을 충분히 씻어준 뒤 0.2% sodium thiosulfate를 이용하여 1분간 반응시켰다. 0.1% silver nitrate에서 20분간 반응시킨 후 증류수를 이용하여 남아있는 silver nitrate를 충분히 제거하고, 0.04% formaldehyde와 2% sodium carbonate를 포함한 용액을 이용하여 발색반응을 유도하였다. 발색반응이 충분히 진행된다면 5% acetic acid를 이용하여 반응을 정지시킨다.

마) 특이 발현 프로테옴의 동정

모든 2DE-gel 이미지는 PD-Quest program을 이용하여 분석하였고, 분석된 각 프로테옴 스팟의 발현량은 통계적인 처리를 통해 분석하였다. 이러한 결과를 통해 선발된 스팟은 Coomassie staining된 gel 상에서 spotting을 수행하였고, 이렇게 분리된 proteome spots은 Intogene사에 MS/MS 분석을 의뢰하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 선발 균주간 발현차이 유전자 단편의 탐색

DDRT-PCR (differential display reverse transcription-PCR) 분석법은 빠른 시간 내에 간단하게 비교하려는 샘플 간에 유전자 발현량의 차이를 검증하는 매우 효과적인 방법이라 할 수 있다. 이에 우리는 이러한 방법을 버섯의 색에 관련하여 발현량이 증감하는 유전자의 탐색을 위해 사용하였다. 이 실험은 total RNA의 준비가 매우 중요한 결과의 요인이므로, 주의를 해서 준비해야 한다(Figure 1.9). 이렇게 준비된 total RNA는 cDNA합성의 주형으로 사용되고, 이 cDNA는 또한 DDRT-PCR의 주형으로 사용된다. 200개의 특이 스크린용 프라이머 중에서 일단 20개의 프라이머에 대해 실험하였으나 특이 pattern의 band는 확인되지 않았다(Figure 1.10).

2) 자실체내 발현 프로테옴의 프로파일 작성

우선 느타리버섯 원형 1호를 모균주로 사용하여 흑색 변이주와 흰색 변이주를 획득하였다. 2- DE 단백질 분석을 위하여 변이주로부터 단백질을 추출하고 200 μ g의 단백질을 이용하여 gel상에서 전개하였다. 은 염색법에 의해 가시화된 gel은 이미지 분석용 software를 통하여 각 단백질의 발현 양상을 확인하였다. 이미지프로그램을 통하여 약 20개의 spot을 관찰하였으며 단백질의 발현양상이 분자량은 10~50kDa, pI값은 4~7 범위에 대부분의 단백질이 분포함을 확인 할 수 있었다(Figure 1.9).

색 변이주간 발현차이 단백질 동정을 위하여 각각을 group화 한 후 이미지 분석을 수행하였고, 그 결과 서로 다른 발현양상을 보이는 6개의 단백질을 확인할 수 있었다. 6개의 발현차이 단백질은 gel로부터 분리한 후 MALDI-TOF 와 ESI-MS/MS 방법을 통해 단백질을 동정하였다(Table 1.9).

1301과 4802번의 단백질은 흰색 변이주에서 유의적으로 높은 발현량을 보였으며, 반대로 8203과 1804는 흰색 변이주의 낮은 발현량이 나타났다. 나머지 7301과 9002는 흑색 변이주, 흰색 변이주, 원형 1호 순으로 발현량이 높게 나타났다. 흰색 변이주에서 뚜렷하게 낮은 발현을 보였던 1804 단백질은 ATP synthase로 확인되었으며, 흰색 변이주에서 높은

발현량을 보였던 4802번의 단백질은 endolase로 나타났다. 또한 8203번의 spot은 Manganese superoxide dismutase로, 9002번 spot은 cyclophilin으로 확인 되었다. 그러나 2개의 단백질은 SWISS-PROT 및 NCBI database 내에서 검색한 결과 유의적인 단백질을 확인할 수 없었다. 동정된 단백질은 본 실험실이 가지고 있는 느타리버섯의 EST database를 이용하여, 유전자 염기서열을 분석할 수 있었다(Figure 1.10, Table 1.10).

각각의 단백질은 동정된 자료를 토대로 본 실험실에서 구축한 느타리버섯 EST database와의 비교 분석을 통하여 단백질을 암호화하는 유전자 염기서열을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 단백질과 유전자 수준에서 분자유종을 위한 중요한 자료가 될 것으로 판단된다(Figure 1,11-14).

3) 고찰

DDRT-PCR(differential display reverse transcription - PCR)분석법을 통해 버섯의 갓색과 관련하여 발현량에 차이가 나는 유전자를 탐색하였으나, 본 실험에 사용된 primer 종류에서는 발현차이 유전자를 검색할 수 없었다. 한편 앞서 확립된 버섯 균사체와 자실체의 단백질 분리를 위한 최적 조건하에서, 버섯 프로테오믹스의 발현 분석을 위한 2-DE 분석을 수행하였다. 기존의 품종과 다른 갓색 형질을 가지는 흑색 변이체의 경우, 단백질의 검출양상을 비교분석함으로써 갓색 관련 단백질을 검색할 수 있을 것이다. 따라서 2-DE 단백질 분석법으로 정상균주와 흑색 변이주와의 프로테오믹스의 비교분석을 통해 갓색 형질에 관여하는 후보단백질을 분리할 수 있으며, 갓색 형질을 분자수준에서의 해석도 가능할 것이다. 이에 정상균주와 흑색변이주의 2-DE 분석을 통해 각 프로테오믹스의 발현 분석을 실시하였고, 발현차이 나는 단백질들이 6개 선발되었다.

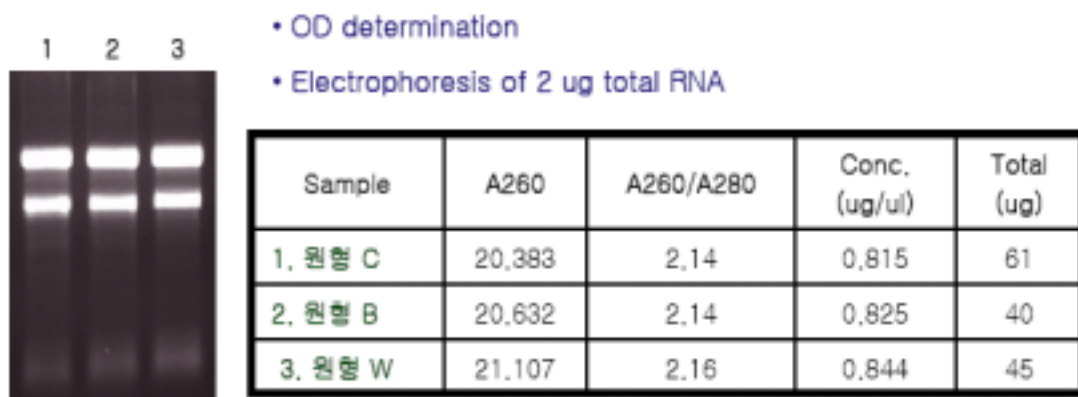


Figure 1.15 갓색 특이 버섯 균주로부터 분리한 total RNA와 분석

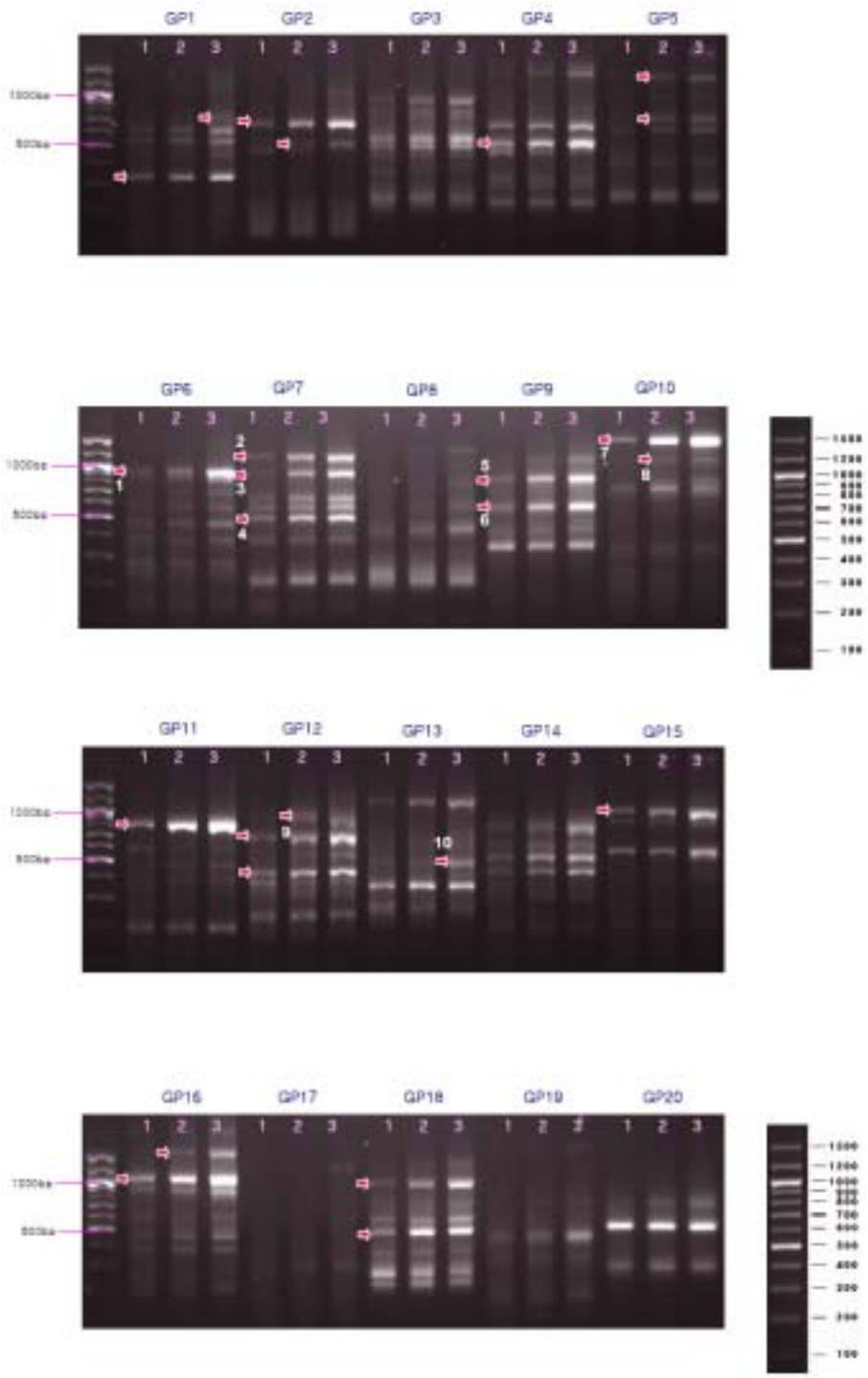


Figure 1.16 잣색 특이 버섯 균주와 정상균주 간에 수행된 DDRT-PCR 결과

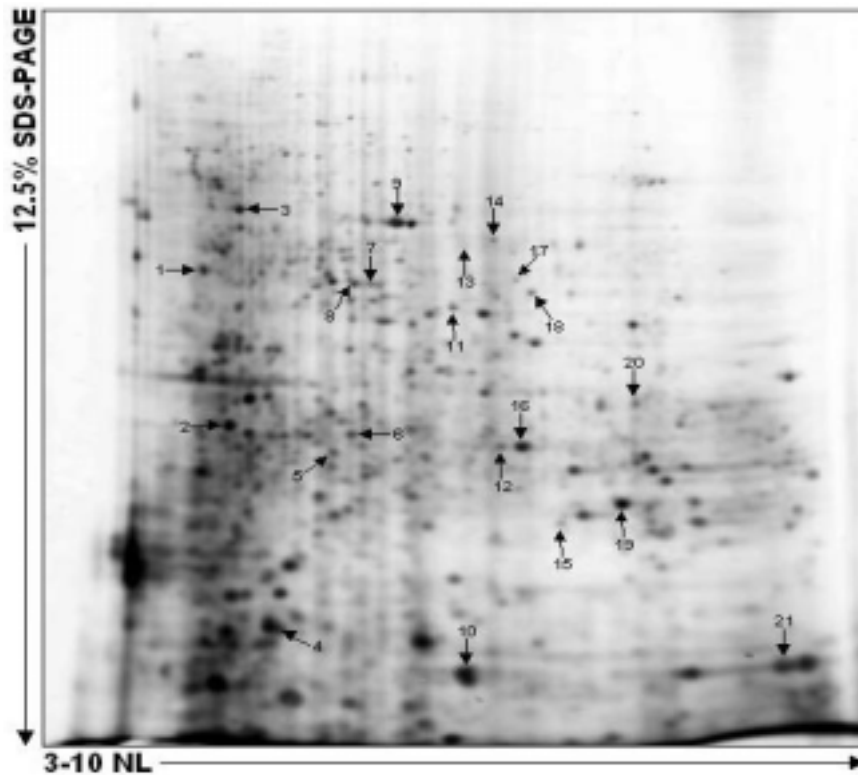


Figure 1.9 Comparative of wonhyong 1 and black strain 2DE analysis. Protein(200ug) was loaded on each gel. First, separation was performed in the pH range of 3-10NL and SDS gel(12.5% T) in the second.

Table 1.9 Characterization of differential expressed proteins from different color's mushroom.

Spot NO.	MW	pI	Wonhyong 1	Black strain	White strain
1301	29.69	4.67	5760.7	16762.1	796.7
1804	52.59	4.71	2433.3	219.6	3855
4802	50.29	5.2	4972	8300.8	4700.7
7301	28.67	5.56	7083.6	8820.9	10097.2
8203	25.55	5.86	8386.5	8047.7	10888.2
9002	17.62	-	3144.5	4153.5	10490.3

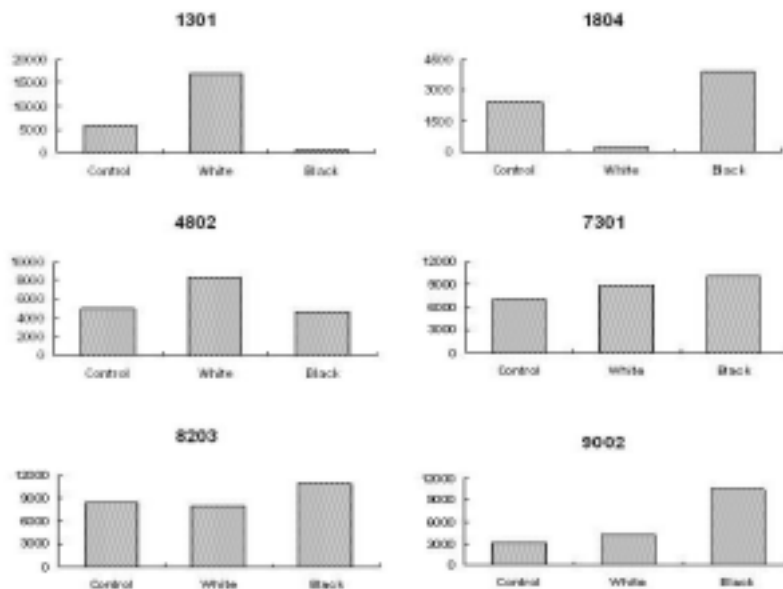


Figure 1.10 Expression profile of 6 spots between different color's mushroom.

Table 1.10 Protein analysis of different color's mushroom.

Spot NO.	Protein	Seq. Cov.	Organism
1301	Unknown protein	-	-
1804	ATP synthase	9%	<i>S. cerevisiae</i>
4802	Enolase	9%	<i>Corynebacterium</i>
7301	Unknown protein	-	-
8203	Manganese superoxide dismutase	11%	<i>Paxillus involutus</i>
9002	Cyclophilin	14%	<i>Pleurotus sp.</i>

ATGGCCGECAGAAATTGCOCTCAACTCTCTGAAGGTAGCGECTCGCCCGCGTTGTTTGCOCGCC
 TCATGTTGCTCTTTGGCCACGTCGTCGAAATCCACCACCCACCCGCGGAACGCGCTTCGGAGATCA
 TCAACAAGCTCCCTTTCGTCACCCAACTCATCAGAAAACCGGCACTGCCGTTCTCGGAACAGGG
 TTTGTCGCCACCCGCGATCTCGCAGGAGCTCTACGTGCTGAACGAGGAGTCCGCTCATTCTGCOGG
 GTCATTGATTCTCTTACCTATATTGSAAGGTGATAAGGGAACCGTACAAGGAGTGGGCTGAGA
 CGCAAATTGGACGGATTAGAGATATCCTGGCTAGTGCCTGCTGAGCACACGCAAACCGTCAAA
 GACCGCATTGATTCCGTCACCCAGATGAAGGATGTCGTCCTCCCTGACCGAAGGTCTCTTTGCTCT
 CTCCAGGAACTGCTCAAACCTTGAATCGGAGGTCTTCGTCAGAAAGCAGANGCGCTCTCGCCTCT
 GAGGTAAGTCCGTTGTAAGCTGGTTCCCTTGACAGCAGTTGANGAAGCCACAGCGGACTGACAN
 ACATATCNAANGTTNGCTGCTGANAGNANNTACGGCATCTCTACTGTCCNATGAACCTNNAAGAGG
 CTTACACTGCNCTANTCGGNGATGACCTCGGAAAAA

Figure 1.11 ATP synthase gene sequences to isolation from *Pleurotus spp.* EST database.

CCGCAGCTTACACACNTCTACCATGATGGCGCTGGACACGGTACTACCAGGGCCTCAGCGCTG
 CACTCATCCAAGGACCCGTCGCCCCGATTGGGGACACCGCCGCAAACGCGGGATTCTCGCGCTC
 TTGAACTCCAATTTCGTACATGAAGAACCCTGCCGTCGCTGGTCAAGACGGGATTGCGCTCTGTTGC
 TGCTGCTGCGTTCCAGGATGATCCTAACTCCCATCGACACAATCAAGACGACCCCTGCAGACGCAAG
 GCAGACCGGGGATGCAGATACTCAGAAACAGAATCAAAAACATACCGTATTGGGACCATGTGTTAC
 GCGCGTTTCGCAACGGCCGAGCCACGTTCCGTTGGGTATTACCCATGGTTCCGGACGTACAACCTA
 CCTGAACTCGCACCTTCTGAGTACGACACGGTGTATGAAAACGCTTTTTCGCGCAGGCATCATCGG
 ATTCTGCGCCTCGTACGTCACACGATCTCAATTCCTNGGGTGGTCAAACCTCAGCAGGTNACAA
 GCCGATCGGTTTGGATCGCAAGCGNTCCACATGATAGGCT

Figure 1.12 Enolase synthase gene sequences to isolation from *Pleurotus spp.* EST database.

TTTGTGRCCS999nATTnCGGCCWnWCGGCCCGGGATCGAAGTTACTTCTTGAATCTCAAAACAA
 TGGCCACACACTOCCACCTCTGCOCTACGCTTACGATGCOOCTCGAGCOOFTTCATCTCGAAGGAA
 ATAATGACGCTTCACCACACGAAGCATCATCAGACCTATGTCAACTCOCTTGAAOCGCGCTGAGGC
 CGCCTACGCCAAGGCATCTACTCCAAAGGAGAGAATCGCOCTCCAGGCTGCATTGAAGTTCAACG
 GAGGAGGCCATATCAOCCACTOBCCTCTTCTGGAOCAAOCCTTBCCTOCTTCCAAGAGOCGAGGCCAAG
 GGCAATGGTGGCGTTCTTGCTGCTGGCOOCCCTVAGCGATGCTATCGTCAAGGCTTTGCGCACCOCT
 GGACAAOCTGAAGAAGGAGTTCAAATGCTACCACAGCOGCGCATCCAAGGTTCCGGCTtGGGGATGG
 CTCGGATACAACCOGAGCACCAAGCTTCTCGAGGTTGTCAOCCOGBCTAACCAGGATCOCTCTYCT
 YACCCATGTCCOCCATCATCGGTGTTGATATCTGGGAGCAGCCTTTCTACCTCCAGTACAAGAAGC
 TGAAGgCTGATTACCTCAaCGCcaTCTGgAgCGTCATCACTTCAGGAACCSAAANCGCTGCTGAG
 CCACTCCaCTTCAGCTGtAASTATCACgTCGtaTTGAcTGaTGTGAGATGAACAATGAWAGAATGT
 MCATGMCTCCcTgATgCTGATCTGgAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 1.13 Manganese superoxide dismutase synthase gene sequences to isolation from *Pleurotus spp.* EST database.

GGGCCATCTGCTACTTNTNTACGACCATGGCACAACGTTCTACTTGGATATGNACANTTNACANT
 NAOOCTGCGGGTACTAATTGNNTTCAAGCTATTGACGATGTGFTTCCCAAAACTGCCAGAAACT
 TCCGAGAGCTCGCCACTGGCCAAAATGGCTTTGGATACGCTGGCTCTGGATTCCACCGTGTGATC
 CCTCATTCATGCTTCANGSTGGCCACTTNACCAANGGCAACGGCACTGGCNGAAATTCATTTACN
 GAAAG

Figure 1.14 Cyclophilin synthase gene sequences to isolation from *Pleurotus spp.* EST database.

5. 선발균주간 DNA의 발현차이 분석

유전자 다형 분석인 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에, 소량의 DNA만을 사용하여도 수행이 가능하므로 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다. (Williams et al., 1990, 1993). 그리고 이 방법은 대상생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA 절편을 비교함으로써 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있었다(Patway et al., 1994).

현재 많은 연구자들이 사용하고 있는 Operon primer(Operon Technologies, USA)는 10mer로 구성되어 있으며, PCR조건에서 annealing temperature가 36°C 전후로 낮아 비특이적인 반응으로 인해 실험의 재현성이 낮으며, 또한 많은 primer들 중 다형을 보이는 primer를 선정하는데 많은 시간과 노력이 소요되었다.

상기 문제점 때문에 본 연구에서는 repetitive sequence로부터 제작된(강 등, 1997) universal rice primer(URP)를 사용하였다. URP는 20mer로 구성된 primer로 55°C 이상의 annealing temperature에서 PCR을 하기 때문에 실험의 재현성이 매우 높을 뿐만 아니라 다수의 밴드가 증폭되어 충분한 다형성을 확보하는데 유리하였다.

가. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 모균주와 선발된 교잡균주는 버섯 재배사에서 배양, 생육하여 실험에 이용하였다. 느타리버섯 자실체의 genomic DNA를 Asahida et al.(1996)의 방법에 따라 분리하였으며, primer는 SRILS UniPrimer Kit (Seoulin Bioscience, Korea)를 사용하였다. 여기서 사용된 URP를 이용한 RAPD 분석 방법은 농업, 식품 및 인체 등에 연관된 곰팡이, 버섯, 세균류 등 다양한 종들에서 종 및 종내동정에 이용되고 있으며, 종 및 집단의 genotyping에 널리 이용되고 있는 것이다.

먼저 PCR 반응은 100ng genomic DNA, 10mM dNTPs mixture, 0.5 μ g/ μ l primer, 1.25 u Real Taq DNA Polymerase(RBC), 10X reaction buffer(100mM KCl, 20mM MgSO₄ · 7H₂O, 200mM Tris-HCl(pH 8.8), 1% Triton X-100, 100mM (NH₄)₂SO₄, 1mg/ml BSA)(RBC)가 포함된 총 25 μ l 혼합액에서 수행하였다. 그 다음 PCR 조건은 94°C에서 4분간 DNA를 변성한 다음, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 elongationdmf 각각 35회 반복한 후, 최종 DNA합성을 72°C에서 10분간 하였다. 마지막으로 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액에서 염색하여 UV lamp 하에서 DNA 밴드를 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 결과

Seoulin Bioscience 사의 20-mer로 구성된 12개의 Primer를 사용하여 재현성이 있으면서 다형성이 높은 primer를 탐색한 결과 Primer 12개 중에서 밴드가 분명하고 다형성이 높은 8개의 Primer를 선발하였다.

증폭된 PCR 산물들은 200~2000bp 까지 매우 다양하였으며, 총 45개의 DNA밴드를 얻었는데, 그 중 다형성을 보인 band는 15개로 33.3% 였다. 각 primer에 의해 증폭되는 수는 3~8개로 다양하였으며, 평균 5.6개의 DNA 밴드가 증폭되었다.

① Primer 1

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 8개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 2개이다. 또한 band intensity는 수한 균주의 1500bp 부근의 band가 가장 진하고, 다른 교잡균주와는 달리 특이적인 band pattern을 보이는 균주는 KU-BM14×SM24이었다(Figure 1.17).

② Primer 2

모균주와 교잡균주간 생성되는 band수는 8개이며, 다형성을 나타내는 band수는 3개이다. 또한 band intensity는 수한 균주의 800bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.17).

③ Primer 3

모균주와 교잡균주간 생성되는 band수는 7개이며, 다형성을 나타내는 band수는 4개이다. 또한 band intensity는 흑색 변이주는 3가지, 수한 균주의 500bp 부근 포함하여 2가지의 band가 가장 진하였다(Figure 1.17).

④ Primer 4

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 7개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 1개이다. 또한 band intensity는 수한 균주의 1500bp와 400bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.18).

⑤ Primer 5

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 3개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 1개이

다. 또한 band intensity는 모균주(수한, 흑색 변이주)의 500bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.18).

⑥ Primer 6

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 4개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 2개이다. 또한 band intensity는 모균주(수한, 흑색 변이주)의 400bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.18).

⑦ Primer 9

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 3개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 1개이다. 또한 band intensity는 모균주(수한, 흑색 변이주)의 1300bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.19).

⑧ Primer 11

모균주와 교잡균주간 생성되는 band 수는 5개이며, 다형성을 나타내는 band 수는 1개이다. 또한 band intensity는 모균주(수한, 흑색 변이주) 300bp 부근의 band가 가장 진하였다(Figure 1.19).

2) 고찰

본 실험에서 모균주와 교잡균주를 12개의 Uni Primer 종류에 의해 다양한 DNA 단편들이 증폭되었으며, DNA절편의 크기는 약200~1500bp 범위 내에서 주로 검출되었으며, 주요 검출 band 수는 primer 종류와 버섯개체에 따라 다양하게 나타났다. 또한 모균주와 흑색변이주의 DNA단편의 검출양상은 매우 뚜렷하고 다양하게 나타났으며, 교잡균주에서는 모균주에서 검출되지 않은 DNA단편은 관찰되지 않았다. 즉 교잡균주에서 검출되는 DNA단편은 모두가 모균주에서 관찰되었다. 그러나 교잡균주는 모균주에서의 DNA단편의 검출양상과 유사하지만, 모두가 일치하지 않는 즉 부분적으로 차이가 나는 서로 다른 균주임을 확인할 수 있었다.

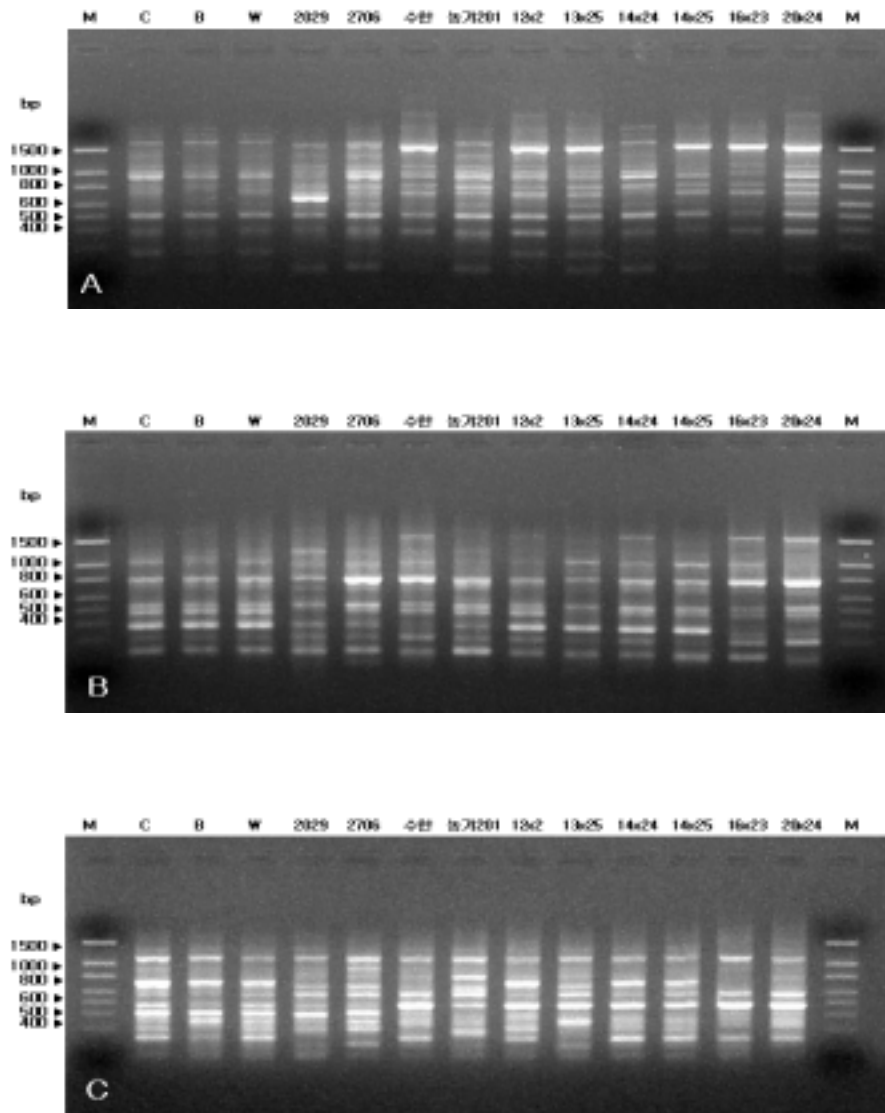


Figure 1.17 The Random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR banding profiles of *Pleurotus* spp. generated by URP primers. (A) URP 1 (B) URP 2 (C) URP 3 (M) 100bp DNA Ladder

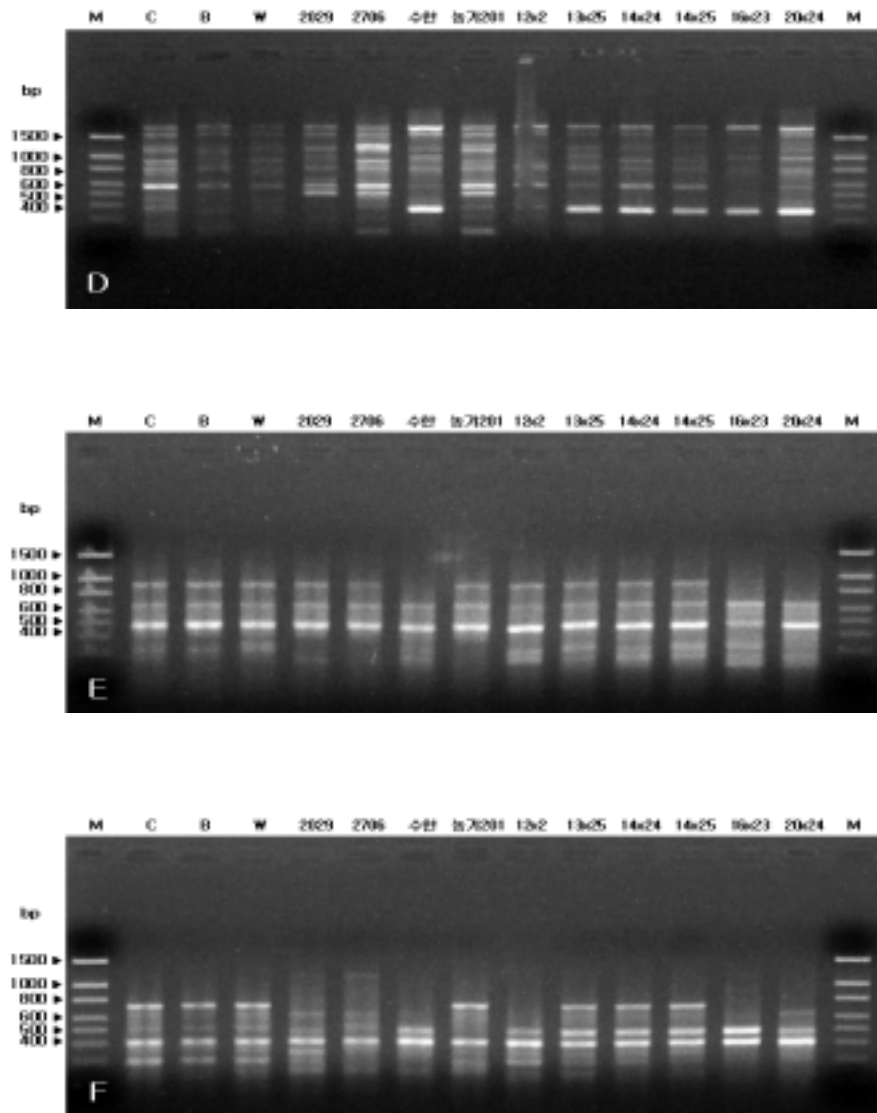


Figure 1.18 The Random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR banding profiles of *Pleurotus* spp. generated by URP primers. (D) URP 4 (E) URP 5 (F) URP 6 (M) 100bp DNA Ladder

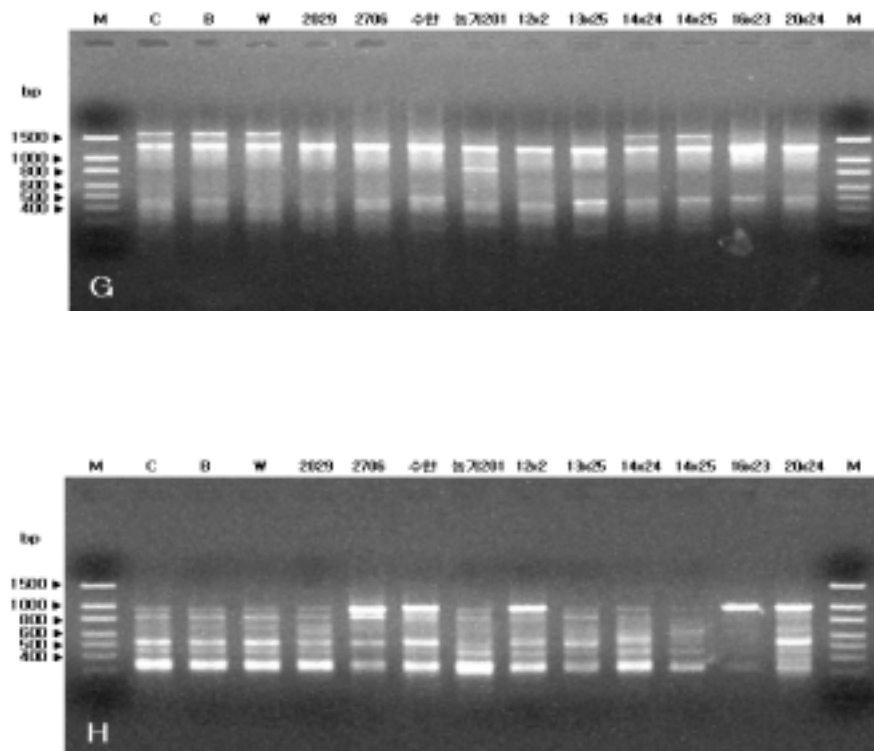


Figure 1.19 The Random amplified polymorphic DNA(RAPD)-PCR banding profiles of *Pleurotus* spp. generated by URP primers. (G) URP 9 (H) URP 11 (M) 100bp DNA Ladder

6. 확대재배를 통한 우량균주 검정

단포자 분리와 다포자 발아과정에 의해 생성된 교잡균주는 이화학적 또는 재배적 특성을 비교 분석하여 갖색이 좋고 계대의 재현성이 있는 6개의 교잡균주(KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24)를 선발하였다. 이러한 우량 교잡균주로 선발된 버섯은 대량 재배를 통하여 실제 농가에서 균주 적응성을 조사에 앞서서 농촌진흥청 농업과학기술원의 응용미생물과에 의뢰하여 병 재배를 수행하였다.

가. 재료 및 방법

선발된 우량균주의 자실체를 발생시키기 위하여 MCM 배지에 균주를 계대하여 배양하고, 톱밥 병 재배의 접종원으로 사용하였다. 접종한 톱밥 병은 28℃에서 15-20일간 배양시키고, 균사가 완전히 배양된 후 18℃, 95% 이상의 습도 조건에서 자실체를 발생시킨다. 자실체 발생은 최소한 5개 반복으로 시험하였다. 자실체 발생 시작부터 초발이가 생성되는 시간을 관찰하고, 계속적으로 자실체를 발생시켰다. 자실체의 발생과정이 정지되는 발생불량 균주는 제거하고, 정상적으로 발생된 자실체는 버섯품질 특성분석 기준에 따라 갖색, 유효경수, 수확량 등을 관찰하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 우량 선발균주의 재배적 특성분석 : 1차

병재배를 통한 우량 선발균주의 재배적 특성 검정을 위해 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24 균주와 모균주인 수한 품종을 비교하였다. 초발이 생장 소요일수는 수한과 교잡균주가 1일 정도로 큰 차이를 볼 수 없었다. 갖색은 KU-BM12×SM2, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25이 다른 교잡균주와 모균주에 비해 진한 회색을 보였다. 그리고 유효경수도 동일한 세 균주에서 같은 수량인 한 병당 22±5개이거나 3~4개 정도 많은 것을 알 수 있었다. 또한 수확량도 KU-BM12×SM2 균주는 수한 균주보다 평균 27g 정도 많이 수확됨을 확인하였으며, 갯모양은 모두 깔대기형으로 큰 차이가 없었다. 이렇듯 Table 1.17에서 보듯이 교잡균주인 KU-BM12×SM2 균주가 갖색도 진하고 모균주 수한보다 유효경수나 수확량이 많은 것으로 봐서 새로운 고품질 육종소재로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 1차 재배적 특성분석 후 재현성 확인을 위하여 2차 분석을 실시하였다(Table 1.11).

2) 우량 선발균주의 재배적 특성분석 : 2차

병재배를 통한 우량 선발균주의 재배적 특성 2차 검정을 위해 1차에서 중간 검정된 KU-BM12×SM2와 모균주인 흑색 변이주, 수한 품종을 3균주를 가지고 비교하였다. 초발이 생장 소요일수는 서로 1일 정도로 유의적 차이를 볼 수 없었다. 그러나 선발 균주의 수확일수는 모균주에 비해 2일 정도 빨랐으며, 수확량도 1차 분석과 마찬가지로 수한보다 21g씩이나 더 많은 생산을 하였다. 유효경수도 흑색 변이주보다는 한 병당 9개 정도 적었으나 수한보다는 7개 정도 많았다. 사실체는 대체로 넓고 얇은 갓에 긴 줄기(대)의 형태를 가지고 있었다. 2차에서도 마찬가지로 1차 분석처럼 갓색도 진하며 모균주에 비해 보다 많은 수확량과 유효경수를 확인하였다. 특히 수량이 많고 품질이 우수한 것으로 나타나 재배 품종으로 등록이 가능할 것으로 생각된다. 이러한 우량 교잡균주는 추가로 실제 농가 현지 적응성 조사 후, 그 우수성을 검정할 예정에 있다. 또한 이 품종은 농가확대 재배를 실시하여 품종등록을 추진할 계획이다(Table 1.12, Figure 1.20).

3) 고찰

본 실험에서 선발된 우량 교잡균주를 1, 2차에 걸친 대량 병재배를 통하여 재배적 특성 분석을 하였다. 그 결과, KU-BM12×SM2 인 선발균주가 갓색도 진하고 모균주인 수한보다 유효경수나 수확량이 많은 것으로 나타났다. 선발된 균주는 확대재배를 통해 균주의 농가 생산성을 검정한 뒤, 새로운 고품질 육종소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Table 1.11 우량 선발균주의 재배적 특성 분석 : 1 차

균주번호	초발이	갯색깔		유효경수	수확량	갯모양	품질		
	소요일수(일)	초기	후기	(개/병)	(g/병)		초기	중기	후기
KU-BM12XSM2 (06-001)	2	진청회색	진회색	27±2	168.0±11.0	깔대기	B	B	A
KU0-BM13XSM25 (06-002)	2	회색	연회색	18±4	136.1±11.3	깔대기	C	C	B
KU-BM14XSM25 (06-004)	2	진회갈색	회갈색	22±5	136.0±14.8	깔대기	C	C	B
KU-BM16XSM23 (06-005)	3	진회색	진회색	17±2	121.3±16.4	깔대기	C	C	C
KU-BM14XSM24 (06-003)	3	진회갈색	회갈색	25±7	117.0±7.8	깔대기	C	C	C
KU-BM20XSM24 (06-006)									
ASI2504 (수환)	2	진회색	진회색	22±5	141.2±10.1	깔대기	C	C	C

1) 대조구인 원형흑색변이체가 빠짐

2) 2006년 느타리 병재배(선발 1차) (1균주 -> 16병, 접종일(2006.3.21), 배양기간 26일), 발이실(2006.4.24), 발이온도(15 -> 13도) 배지-5:3:2

Table 1.12 우량 선발균주의 재배적 특성 분석 : 2 차

균주번호	초발이	수확일수 (일)	유효경수 (개/병)	수확량 (g/병)	갓(mm)		대(mm)		개체중 (g/개)	갓색깔		갓모양
	소요일수 (일)				직경	두께	굵기	길이		초기	후기	
KU-BM12XSM2 06-001	3	8	28±7	153.7±7.5	46.7±1.2	2.8±0.8	15.7±2.1	72.3±11.7	12	진회색	진회색	얇은갈대기형
Black strain	4	10	37±11	137.0±10.8	40.0±3.0	5.0±1.0	12.3±2.3	42.3±2.5	8	진회색	진회색	중고편편형
ASI2504 (수한)	3	10	21±5	131.9±8.8	45.3±2.3	5.7±0.6	20.0±3.0	41.7±7.6	13	진회색	회색	갈대기형

1) (2006.6.29 -) 건국대느타리 6균주 병발생조사 / 접종(6/9), 균급기(6/29), 배양기간(20일), 발생(14도-90%)-> 13도(7/7) -> 12도(7/8) , 배지(5:3:2)

Figure 1.20 2006년도 선발 교잡균주의 병 재배에 의한 자실체 형태



KU-BM12×SM2-(1)



KU-BM12×SM2-(2)



KU-BM13×SM25



KU-BM14×SM24



KU-BM14×SM25



KU-BM16×SM23



ASI2504(수한=SM)



Black strain(흑색 변이주=BM)

제 2 절. 저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

1. 수집균주의 저온성 검정

가. 재료 및 방법

현재 재배되고 있는 품종은 오랜 기간에 걸쳐 생산되는 만큼 우수한 특성들을 가진다고 볼 수 있다. 따라서 시중에서 유통되고 있는 56개 품종을 수집하여 이들의 저온적응성을 검토하여 새로운 저온성버섯을 육성하기 위한 모본을 선발하였다.

1) 수집 균주의 저온 적응성 평가

저온 발생을 통한 생력 검사: 수집된 유통품종을 증식하여 병재배로 가장 적절한 15℃와 버섯발생 생육의 한계온도라고 할 수 있는 4℃에서 발생시킨 후 그 특성을 조사함으로써 저온에서의 능력을 측정하였다.

2) 효율적인 온도특성의 검정법 개발

저온기 상자재배: 저온기인 12월에서 3월에 걸쳐 가온을 하지 않은 재배사내 자연온도에서 상자재배를 실시하고 수집균주의 저온적응성을 검토하여 병에서의 인위적인 온도조절에 의한 저온 검정법과 비교함으로써 좀더 효율적인 온도특성 검정법을 개발하고자 하였다.

3) 우수 모균주의 선정

병 및 상자재배, 온도조절법과 자연재배법에서의 수량 및 자실체 색깔 등 균주의 유전적 특성을 종합적으로 평가하여 우수 모균주를 선발하였다.

나. 결과 및 고찰

시중에서 유통되고 있는 56개 품종을 수집하고 이들의 저온적응성을 검토하여 새로운 저온성버섯을 육성하기 위한 모본을 선발하였다.

1) 수집 균주의 저온 적응성 평가

- 저온 발생을 통한 생력 검사 :

가) 15℃ 병재배 : 초발이 소요일수는 품종에 따라 4-16일이 소요되었으며, 자실체의 색깔은 대개 초기에는 진한 색깔이었으나 갓이 커지면서 점차 옅어지는 경향이 보였다.

나) 4℃ 병재배 : 저온에서는 초발이가 늦어져 대개 8-20일이 걸렸으나 저온적응성이 약한 품종은 발이는 되지만 자실체의 성장이 극히 부진한 면을 보였다. 일부 균주는 발이가 되지 않는 것도 있었다.

2) 효율적인 온도특성의 검정법 개발

- 저온기 상자재배 : 저온기인 12월에서 3월에 걸쳐 가온을 하지 않은 재배사내 자연온도는 -1℃ - 14℃의 분포를 보였으며 이때 상자재배에서는 병재배에서와 같이 초발이가 지연되었다. 가장 빠른 발이는 ASI2228균주로 19일만에 발이되고 수량도 높았으나 자실체의 품질이 극히 떨어지는 것으로 보였다. 색깔은 품종에 따라 차이가 있으나 저온에서 자라기 때문에 비교적 진한 것으로 나타났다.

3) 우수 모균주의 선정

- 병 및 상자재배, 온도조절법과 자연재배법에서의 수량 및 자실체 색깔 등 균주의 유전적 특성을 종합적으로 평가하여 ASI 2183, 2344, 2504, 2018, 2194, 2706, 2728이 우수 모균주로 선발 되었다.

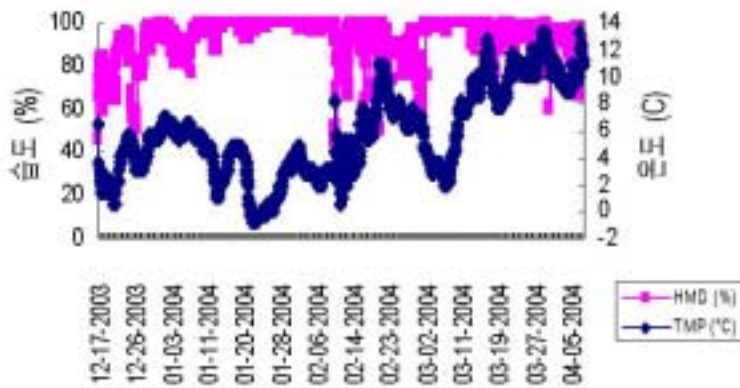


그림 2.1 겨울재배기간 온습도의 변화양상

2. 교배형 분리

가. 재료 및 방법

1) 선발된 모균주로부터 단핵균주 육성

희석평판법 : 자실체로부터 무균상태로 포자를 채취하여 10ml 멸균수에 연속 희석법으로 포자현탁액을 제조하고 이를 PDA 배지에서 발아시킨 후 현미경하에서 발아되는 단포자를 멸균된 요지를 사용하여 샬레 당 12개씩을 분리하였다. 분리된 단핵균주가 서로 닿기전에 현미경하에서 클럼프가 없는 것을 확인하여 최종 단핵균주를 선발균주당 30-50개씩 확보한 후 이를 4℃ 보존실에서 보존하며 실험에 사용하였다.

2) 교배형 검정을 통한 교배형의 결정

각 균주에서 분리된 단핵균주 20개씩을 선발하여 서로 교호로 교배하였다. 교배는 사레의 중앙에 서로 5cm 간격으로 대치배양을 시키고 교배가 이루어지는 시간을 두어 약 2주 후 클램프 컨넥션을 현미경으로 확인하여 4가지의 교배형을 결정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 선발된 모균주로부터 단핵균주 육성

2) 교배형 검정을 통한 교배형의 결정

- 선발 균주의 교배형 결정

균주번호(ASI)	AxBx	AxBy	AyBx	AyBy
2183	13, 29, 30	1, 2, 4, 14	31, 32	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 33
2344	1	4, 8, 13, 15, 16	2, 9, 10, 18	3, 7, 11, 12, 14, 17, 19, 20
2504	2, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 24, 26, 27	4, 5, 11	3, 7, 8, 25	1, 15, 23
2018	재검토			

3) 계통간 교배에 의한 교잡균주 육성

- ASI2183과 2344의 각 균주에서 분리된 단핵균주 20개씩을 선발하여 서로 교차로 교배하였다. 이들 교배균에서 모두 클램프가 관찰된 것으로 보아 두개의 교배형은 서로 다른 것으로 판단되었다.
- 교배 이핵균주는 병재배에서 다양한 변이를 보였다. 수량면에서도 모본보다 우수한 교배주도 다수 있었으며 색깔 등 품질도 다양한 것으로 나타났다. 따라서 이들 단핵균주 간 mon-mon 교배로 유용한 품종을 육성할 수 있을 것으로 사료되었다.

표 2.1 느타리 품종의 온도에 따른 병재배 발생 특성

군주번호 (ASI)	15도				4도			
	초발이 소요일수	초기색상	후기색상	수확 소요일	초발이 소요일수	초기색상	후기색상	수확 소요일
2001	6	흑회색	회색	12	14	진회색	진회색	37
2016	10	회백색	회백색	16	16	회백색	회백색	48
2018	6	진회색	연회색	12	17	X	X	X
2070	5	회색	회색	16	16	X	X	X
2072	9	회색	연회색	15	X	X	X	X
2180	4	회백색	회백색	7	10	회백색	X	X
2181	5	회백색	회백색	9	X	X	X	X
2183	6	회색	연회색	12	12	X	X	X
2194	7	진회색	회색	12	22	진회색	진회색	45
2228	4	연회색	연회색	8	13	진회색	회색	42
2240	15	회색	연회색	20	17	X	X	X
2302	13	연갈색	연갈색	20	X	X	X	X
2333	4	연회색	연회색	7	13	X	X	X
2344	5	진회색	회색	9	12	진회색	진회색	35
2477	6	회색	회색	11	13	회색	회색	38
2488	6	회색	회색	11	13	X	X	X
2504	5	진회색	진회색	9	13	진회색	회색	45
2505	6	진회색	진회색	11	13	진회색	진회색	40
2506	4	연회색	연회색	8	16	회색	회색	50
2535	6	회색	회색	9	12	진회색	진회색	40
2549	5	진회색	진회색	10	10	회색	진회색	48
2593	8	진회색	회색	13	17	X	X	X
2594	4	회백색	회백색	8	8	연회색	회백색	40
2595	7	연회색	연회색	12	9	회색	연회색	38
2596	4	연회색	연회색	7	15	회색	연회색	48
2597	6	흑회색	진회색	12	15	X	X	X
2598	5	진회색	진회색	10	8	흑회색	진회색	37
2706	5	회색	회색	10	12	연회색	회색	35
2707	7	진회색	진회색	12	13	연회색	회색	40
2708	5	진회색	회색	10	13	진회색	진회색	48
2709	4	흑회색	회색	9	11	진회색	회색	50
2710	7	진회색	회색	12	15	X	X	X
2711	6	진회색	회색	10	13	진회색	진회색	40
2718	6	진회색	진회색	11	11	진회색	진회색	45
2719	6	진회색	진회색	10	14	X	X	X
2721	5	회색	회색	10	11	진회색	X	X
2722	5	진회색	회색	10	13	연회색	회색	50
2724	8	흑회색	진회색	13	13	X	X	X
2725	8	회색	회색	14	16	X	X	X
2726	6	회색	회색	11	13	연회색	회색	48
2727	5	흑회색	진회색	11	14	X	X	X
2728	10	진회색	회색	15	14	진회색	회색	45
2729	6	진회색	회색	10	14	회색	회색	48
2730	6	회색	연회색	11	13	회색	X	X
2731	5	회색	연회색	10	12	회색	회색	50
2732	5	진회색	회색	9	11	회색	회색	48
2733	6	진회색	진회색	10	13	흑회색	진회색	40
2734	8	흑회색	진회색	12	11	X	X	X
2735	6	회색	회색	11	13	연회색	진회색	45
2736	5	진회색	진회색	10	12	진회색	진회색	40
2737	4	회색	회색	8	13	연회색	회색	38
2738	16	회색	회색	23	20	X	X	X

표 2.2 느타리 품종의 저온기(2003.12.3-2004.3.31) 상자재배 특성

품종(ASI)	초발이 소요일수	갓			대(mm)		개체중 (g)	수량 (g/850cc)
		색	직경(mm)	두께(mm)	굵기	길이		
2001	35.0	회색	46.2	3.6	13.0	15.4	10.6	914
2016	40.3	백색	43.8	3.4	12.2	19.4	10.6	1156
2018	39.0	연회색	43.4	4.8	17.0	30.6	15.3	1148
2072	44.0	회색	46.8	3.2	10.2	23.0	10.0	589
2180	39.7	회색	44.0	2.6	14.6	29.2	11.6	1185
2181	43.7	연회색	42.2	3.8	17.8	37.6	17.7	409
2183	42.0	회색	41.0	2.8	13.6	33.2	9.7	901
2194	38.7	회색	41.4	7.6	13.8	40.4	16.0	1071
2228	19.0	연회색	39.2	8.0	11.4	69.2	17.0	2003
2344	31.7	회색	41.4	3.2	10.8	38.8	11.0	1088
2477	38.7	회색	46.6	3.0	14.8	34.0	10.7	668
2488	35.0	진회색	41.8	4.6	14.4	30.8	12.7	1131
2504	31.0	진회색	41.8	8.0	15.0	25.6	13.7	920
2505	31.0	회색	35.0	8.6	10.0	33.6	9.7	1077
2506	39.3	회색	41.4	4.4	16.4	19.4	10.3	1176
2535	46.0	진회색	45.8	2.6	10.8	31.2	11.0	829
2549	33.0	회색	43.2	4.2	14.2	26.4	7.7	1004
2593	37.0	회색	45.2	4.2	13.6	34.4	10.0	286
2594	34.0	회색	39.6	3.4	14.0	44.0	13.3	1142
2595	60.0	회색	46.6	5.8	24.0	24.6	21.0	1101
2596	38.0	회색	46.8	3.2	10.0	19.4	13.3	896
2597	36.7	회색	42.2	2.8	10.4	31.8	11.3	1014
2598	34.7	진회색	42.4	3.6	19.8	22.0	15.0	1132
2706	41.0	회색	42.8	2.4	15.2	22.0	10.0	1498
2707	37.0	회색	47.6	3.8	19.0	22.6	17.0	1148
2708	33.0	회색	37.8	2.8	7.2	22.0	8.7	912
2709	31.7	진회색	42.0	3.8	22.0	30.2	16.3	1123
2710	39.0	연회색	44.6	3.6	18.8	22.4	10.0	308
2711	33.0	진회색	44.6	3.4	9.8	27.8	13.0	1181
2717	45.0	회색	40.2	4.2	16.0	20.2	11.7	668
2718	39.3	진회색	42.6	5.4	18.6	35.2	18.7	1056
2719	32.0	진회색	43.4	2.8	10.8	19.2	9.0	1088
2721	33.0	회색	43.6	4.6	21.8	29.0	16.3	1092
2722	34.3	회색	43.0	5.2	10.4	32.6	10.7	1205
2724	33.0	진회색	43.6	4.0	17.0	26.0	12.7	1000
2726	35.7	진회색	44.8	4.4	10.4	25.8	11.0	1387
2727	33.0	진회색	42.6	3.4	17.6	24.2	13.0	915
2728	38.0	진회색	44.6	8.2	13.0	35.0	15.0	1076
2729	36.7	회색	42.2	3.4	12.8	38.4	11.7	1352
2730	42.0	연회색	42.8	3.6	22.0	25.8	14.0	1229
2731	41.3	회색	49.6	8.8	15.4	22.4	10.7	997
2732	38.3	회색	41.4	6.0	14.0	41.8	18.7	1268
2733	32.3	회색	45.0	4.6	11.2	25.6	13.0	1054
2734	33.0	진회색	43.0	3.8	22.0	25.8	14.0	1042
2735	32.0	회색	38.0	8.8	15.4	22.4	10.7	999
2736	35.0	진회색	44.8	3.4	12.8	20.0	8.3	1278
2737	31.0	회색	36.6	5.6	15.4	40.8	15.0	849
2738	33.0	진회색	40.6	3.0	14.2	31.0	13.0	1039

표 2.3 저온성 육성모본 선발 균주의 특성

품종(ASI)	저온성	품 질
2183	아주 강	대가 굵고 자실체 모양이 양호
2344	강	수량성이 높음
2504	아주 강	갓이 짙은 흑회색
2018	보통	발이가 빠르고 대가 굵음
2194	아주 강	갓이 흑회색
2706	보통	갓이 흑회색
2728	강	수량이 많음

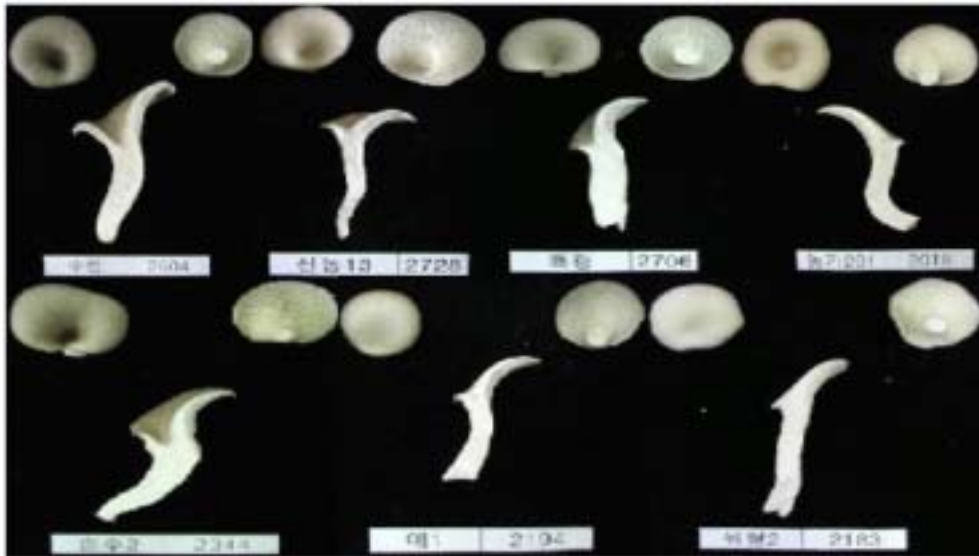


표 2.4 ASI2183의 단핵균주 교배형 결정

교배형	A1B1			A1B2				A2B1		A2B2										
	13	29	30	1	2	4	14	31	32	3	5	6	7	8	9	10	11	12	15	33
I	13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
II	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	31	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

표 2.5 ASI2344의 단핵균주 교배형 결정

교배형	A1B1		A1B2				A2B1				A2B2							
	1	4	8	13	15	16	2	9	10	18	3	7	11	12	14	17	19	20
I	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
II	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
III	2	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

표 2.6 ASI2504의 단핵균주 교배형 결정

교배형	A1B1										A1B2			A2B1				A2B2		
	2	6	9	10	12	13	14	24	26	27	4	5	11	3	7	8	25	1	15	23
I	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
II	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
III	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
IV	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

표 2.7 ASI2018의 단핵균주 교배형 결정- 재검토

교배형	1	4	6	8	10	16	18	3	14	17	20	2	12	19	5	7	9	11	13	15
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

표 2.8 저온성 선발균주간 교배에 의한 균주 육성

교배조합	수량(g/850c)	개체수	개체중(g)	갓 색깔	갓		대(mm)	
					크기	두께	굵기	길이
2344-18 X 2183-3	164	33	9	회색	42	4	9	52
2344-19 X 2183-6	160	10	10	회색	43	5	13	43
2344-22 X 2183-1	154	27	8	회색	48	3	8	67
2344-18 X 2183-9	153	26	9	연회색	45	6	9	65
2344-18 X 2183-6	149	36	7	회색	45	2	8	50
2344-8 X 2183-10	145	20	7	연회색	51	4	10	48
2344-15 X 2183-1	144	18	11	연회색	54	5	10	80
2344-19 X 2183-32	144	28	8	회색	45	3	11	64
2344-1 X 2183-1	141	17	6	미색	42	2	10	63
2344-21 X 2183-32	140	14	5	미색	37	3	8	53
2344-1 X 2183-11	135	23	6	연회색	36	5	8	62
2344-1 X 2183-2	134	13	7	연회색	48	5	12	41
2344-2 X 2183-7	134	17	14	회색	47	3	16	71
2344-15 X 2183-8	133	8	9	연회색	46	6	16	42
2344-8 X 2183-1	133	19	7	회색	45	3	9	52
ASI2344	133	20	7	회색	40	6	10	71
ASI2183	81	15	5	연회색	39	5	17	56

* 400교배 육성 균주 중 모본보다 수량이 높은 균주만 선발

3. 교잡 및 교잡균주의 유전분석과 DNA profile 작성

가. 재료 및 방법

1) 계통간 교잡

- 교배형 분리에 따라 이핵균주 제작 : 교배형 분석에 의하여 확보된 교배형 균주를 중심으로 계통간 이핵균주를 육성하였다. 교배는 PDA 사레상에서 각 단핵균주의 균절편을 약 10mm 거리로 대치배양하여 두 균이 맞닿은 후 약 5일간 배양한 뒤 접촉면에서 균사를 떼어내어 현미경 상에서 clamp connection의 유무를 관찰하여 이핵균주를 확인하였다. 이렇게 육성된 이핵균주는 새로운 배지에 이식하여 접종원균과 보존용 원균을 확보하였다. 접종원균으로는 DNA 추출을 위하여 삼각플라스크에 50ml의 PDB 배지에 접종하는 한편, 재배적 특성을 조사하기 위하여 포플라 톱밥에 20%의 미강을 혼합한 톱밥 접종원을 제작하여 이후의 병재배 및 상자재배를 위한 종균의 제조에 사용하였다.
- 교배된 이핵균주의 후대검정 : 각 계통에서 육성된 교배형 단핵균주와의 상호교배에 의하여 만들어진 이핵균주는 톱밥 병재배를 통하여 자실체 특성 및 생육특성을 1차로 조사하였으며, 폐면을 이용한 상자재배를 저온기인 12월에서 3월에 걸쳐 가온을 하지 않은 재배사내 자연온도에서 상자재배를 실시하고 수집균주의 저온적응성을 검토하여 병에서의 인위적인 온도조절에 의한 저온검정법과 비교하였다.

2) 교잡주의 DNA profile 작성 및 분자생물학적 교배 확인

- 버섯의 DNA분리는 Zolan과 Pukkila(1986)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. DNA profile을 작성하기 위하여 primer는 FGL17과 FGL18 random primer를 사용하였다 (Kim, 2001), PCR 반응 조건은 Kong(1995)의 결과에 따라 반응액 총량을 50 μ l 기준으로 하여 10X reaction buffer 5 μ l, template DNA 100ng과 primer 25pmol, MgCl₂ 2.5mM, dNTP 1.5mM, Taq polymerase 1 unit로 조정된 후 나머지는 살균한 증류수를 첨가하였다. PCR program은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 denature시킨 후 95 $^{\circ}$ C 1분, 37 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분으로 35cycle을 돌리고 72 $^{\circ}$ C 8분 extension 후 4 $^{\circ}$ C에서 유지하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 100V로 loading한 후 EtBr에 15분 염색하여 UV lamp상에서 밴드를 관찰하였다.
- 모본으로 사용된 시판품종에 대하여 위 primer를 사용하고 DNA profile을 작성하여 품종간 구분을 할 수 있는 분자 marker로 이용하였다

- 각 선발계통에서 만들어진 단핵균주와 이들간에 교배로 만들어진 이핵균주 중 우수균주에 대하여 PCR fingerprinting을 수행하여 육성된 이핵균주에 새로운 밴드를 확인함으로써 분자생물학적으로 재조합된 것을 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 계통간 교잡 및 병재배에 의한 특성 검정

시중에 판매되고 있는 느타리버섯 품종의 온도별 병재배 및 상자재배를 통하여 표 2.9와 같이 육종모본을 선발하였다. 선발된 육종모본은 저온성이 아주 강한 것으로 조사된 원형느타리3호와 수한느타리를 중심으로 수량이 높은 춘추2호 느타리와 자실체의 특성이 우수한 농기201호 및 흑평으로부터 포자를 받아 단포자 분리를 거쳐 육성된 단핵균주를 사용하였다. 우선 각 품종에서 육성된 단핵균주간 교호로 교배하여 교배형을 표 2.10과 같이 결정하였다.

선발된 품종에서 육성된 각 단핵균주는 새로운 우량계통을 육성하기 위하여 각기 ASI2018*ASI2504, ASI2183*ASI2344, ASI2183*ASI2504, ASI2183*ASI2706의 조합으로 단핵균주간 교배를 수행하였다.

먼저 각 교배조합에서 육성된 255개 이핵균주는 포플라 톱밥을 이용한 850ml 병재배를 통하여 자실체의 특성 및 재배적 특성을 조사하였다(표 2.11). 4개 교배조합에서 육성된 이핵균주의 병재배에서는 자실체의 갯형태가 반구형~깔때기형이었으며, 갯색깔은 양친의 색깔이외에 여러 단계의 색깔을 나타내었다. 그 중 2183-15×2504-5과 2183-12×2344-18 균주의 수량이 가장 높은 것으로 나타났다(표 2.11, 그림 2.2).

표 2.9 저온성 육성모본 선발 균주의 특성

품종(ASD)	저온성	품 질
2183	아주 강	대가 굵고 자실체 모양이 양호
2344	강	수량성이 높음
2504	아주 강	갓이 짙은 흑회색
2018	보통	발이가 빠르고 대가 굵음
2706	보통	갓이 흑회색

표 2.10 선발균주 교배형 분석

품종(ASD)	AxBx	AxB _y	A _y Bx	A _y B _y	비고
2183	3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 33	1, 2, 4, 14	31, 32	13, 29, 30	
2344	3, 7, 11, 12, 14, 19, 21, 22	4, 8, 13, 15, 18	2, 9, 10, 20	1	
2504	2, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 24, 26, 27	4, 5, 11	3, 7, 8, 25	1, 15, 23	
2018	1, 4, 6, 8, 10, 16, 18	3, 14, 17, 20	2, 12, 19	5, 7, 9, 11, 13, 15	뚜렷지 않음
2706	2, 14, 15, 16, 19	10, 11, 17, 20	4, 18	6, 8, 13	뚜렷지 않음

표 2.11 병재배에 의한 교배 이핵교배균주 자실체특성 (255개 교배 이핵교배균주)

교배조합	수량 (g/850cc)	개체수	수확 기간 (일)	갓		대		개체중	갓모양	갓색갈
				직경	두께	굵기	길이			
2018-20 x 2504-5	121±3.5	13±1.4	20	38.3	9.0	20.0	51.0	12.3	반구형	회갈색
2018-16 x 2504-5	114±6.2	11±1.0	17	46.7	11.0	17.0	32.7	13.7	깔때기형	진갈색
2018-17 x 2504-7	113±40.1	14±8.7	18	40.0	10.0	13.7	42.7	8.3	편평형	회색
2018-15 x 2504-5	98±17.1	10±2.5	18	40.7	9.7	14.7	49.3	9.3	오목반구형	갈색
2018-17 x 2504-1	98±6.4	12±2.0	17	45.0	9.7	13.3	45.0	9.7	오목반구형	회갈색
2183-12 x 2344-18	143±7.2	20±5.7	18	40.3	8.0	9.7	45.0	7.0	오목반구형	회색
2183-11 x 2344-18	136±17.3	19±2.5	16	40.0	10.7	13.0	62.7	10.3	편평형	진갈색
2183-13 x 2344-18	135±4.2	23±1.5	17	41.0	6.7	7.7	73.3	6.3	편평형	회갈색
2183-30 x 2344-19	134±3.5	19±9.0	16	42.0	9.0	11.0	45.7	6.3	깔때기형	회갈줄무늬
2183-8 x 2344-18	133±34.8	19±6.0	17	41.3	7.0	11.0	46.7	8.7	오목반구형	회갈색
2183-15 x 2504-5	146±14.2	12±3.2	16	44.3	14.7	16.0	65.0	17.7	편평형	흑회색
2183-8 x 2504-14	136±11.0	18±3.5	20	45.0	9.3	15.0	57.7	10.3	깔때기형	회색
2183-4 x 2504-14	133±7.6	20±2.0	17	39.7	8.3	10.7	60.3	7.3	오목반구형	연회색
2183-30 x 2504-14	132±12.9	13±2.1	19	42.0	8.7	14.7	87.7	10.7	오목반구형	청회색
2183-11 x 2504-14	126±9.2	11±6.4	19	43.3	9.0	14.7	67.3	11.7	깔때기형	진회색
2183-4 x 2706-14	112±11.2	20±9.3	15	31.7	7.7	8.3	47.7	4.3	오목반구형	회갈색
2183-4 x 2706-17	111±11.6	27±7.5	18	41.3	8.0	8.7	54.0	5.3	오목반구형	연회갈색
2183-13 x 2706-18	103±20.1	17±7.2	16	36.3	6.7	12.0	54.0	6.0	오목반구형	회갈색
2183-4 x 2706-12	100±24.4	19±6.0	17	38.3	8.7	10.7	48.7	6.0	편평형	회색
2183-13 x 2706-12	97±3.6	22±3.2	15	38.7	8.3	11.3	78.3	7.3	반구형	연회색
2504-모균주	57±33.2	4±1.4	17	46.5	11.0	22.5	47.0	14.0	깔때기형	진회색
2183-모균주	38±8.5	8±1.7	22	40.0	11.0	10.0	28.0	6.0	반구형	연갈색
2018-모균주	46±6.5	4±1.2	17	40.0	8.0	11.0	42.0	7.0	얇은깔때기형	갈색
2706-모균주	63±8.5	20±12.0	15	36.3	8.3	10.7	26.7	3.3	오목반구형	회갈색



그림 2.2 선발된 교배 이핵균주의 자실체 형태

2) 폐면 상자재배에 의한 저온성 검정

효율적으로 온도특성을 검정하기 위하여 저온기인 12월부터 가온을 하지 않은 재배사내 자연온도에서 상자재배를 실시하여 수집균주의 저온적응성을 검토하였으며, 다시 온도가 상승하는 3월부터 5월에 걸쳐 수량을 조사하여 온도가 높아짐에 따른 자실체의 특성 및 재배적 특성을 조사하였다.

자실체 형태가 좋았던 ASI 2018과 갓색 광택이 좋고 저온성이 아주 강한 ASI 2504의 단핵균주간 교배에서 63개의 교배균주에서(표 2.12) 총수량이 가장 높은 교배이핵균주는 2018-16 x 2504-12 이었으나 저온성을 나타내는 겨울재배성적은 2018-16 x 2504-2가 상자당 735g을 나타내어 이들 교배균주가 겨울 저온기에 적응하는 능력과 봄철 온도가 상승하는 시기의 버섯 생산능력에 차이가 있는 것을 알 수 있었다. 저온성 품종을 육성하기 위해서는 이와 같이 온도가 떨어지는 가을 재배에서 수량이 높은 균주를 선발해야 할 것으로 사료된다.

다른 교배조합에서도 이와 같은 경향은 마찬가지로었는데 아주 저온성인 ASI2183과 수량이 높은 ASI2344를 교배한 조합에서는 모두 72개균주를 검정한 결과 가장 수량이 높았던 2183-30 x 2344-18이 겨울 수량이 838g인 반면 2183-11 x 2344-2 교배균주는 겨울수량이 1058g이고 봄철에는 버섯이 나오지 않아 절대적인 저온성으로 고온에 적응하기 힘들 것으로 볼 수 있었다(표 2.13).

아주 저온성이 강한 두 품종 ASI2183과 ASI2504간의 교배에서는 72개 교배균주를 검정하였으며 병재배에서는 대의 굵기에 의하여 수량이 높았으나 상자재배에서는 대체로 높은 수량을 보이지 않았고 특히 저온기재배에서의 성적도 높지 않았다 (표 2.14). 그러나 사용된 모본은 둘 다 저온성이 아주 높은 품종들이었으므로 그 교배후대에서도 더 좋은 균주가 육성될 것으로 기대되며 더 검토가 필요하다고 생각된다.

저온성 품종인 ASI2183에 갓의 색택이 진한 ASI2706을 교배한 조합에서는 48개 교배주를 육성하였는데 병재배에서 수량이 높지 않았다. 그러나 상자재배에서는 비록 총수량은 다른 조합에서와 마찬가지로 나왔고 저온기의 수량은 다른 조합균주들과 유사하였다(표 2.15, 그림 2.3).

이상 모두 255개 교배균주로부터 총수량이 가장 높았던 균주 위주로 각 교배조합에서 다음과 같이 8개의 균주를 선발하였다. ASI 2018* ASI 2504 조합에서는 2018-16×2504-12, 2018-16×2504-2, ASI 2183* ASI 2504 조합에서는 2183-11×2504-2, 2183-15×2504-2, ASI 2183* ASI 2344 조합에서는 2183-30× 2344-18, 2183-11×2344-18, ASI 2183* ASI 2706 조합에서는 2183-11×2706-14, 2183-13×2706-12 이었다(표.2.16).

표 2.12 상자재배에 의한 이핵교배 균주 특성 (ASI2018*ASI2504: 63개 이핵교배균주)

교배균주	초발이 일수(일)	수량(g/0.16m ²)			개체중 (g)	갓모양	갓색갈	갓(mm)		대(mm)	
		겨울	봄	총수량				직경	두께	굵기	길이
2018-16 x 2504-12	13	420	680	1100	12.3	오목반구형	흑회색	51.7	8.0	22.3	30.0
2018-16 x 2504-2	10	735	259	994	12.0	깔때기형	진회색	44.3	8.0	23.3	40.7
2018-16 x 2504-14	13	677	228	905	7.7	오목반구형	회갈색	41.0	8.3	25.7	32.7
2018-17 x 2504-14	14	625	193	818	12.0	오목반구형	진회색	45.3	10.0	22.0	29.3
2018-17 x 2504-1	16	381	392	773	10.3	오목반구형	진회색	45.7	8.0	20.3	26.7
2018-1 x 2504-12	17	329	442	771	6.7	오목반구형	진회갈색	45.0	7.3	12.3	43.0
2018-17 x 2504-2	13	371	385	756	8.3	반구형	회색	40.3	7.7	21.3	21.7
2018-17 x 2504-25	9	560	181	741	10.7	오목반구형	진회색	42.0	9.3	14.3	46.0
2018-20 x 2504-25	10	321	411	732	7.0	깔때기형	진회색	37.7	8.0	16.7	33.3
2018-17 x 2504-5	11	731	0	731	10.0	오목반구형	회색	43.0	10.3	21.0	24.7
2018-16 x 2504-24	9	667	55	722	10.0	반반구형	진회갈색	45.0	10.0	17.0	38.7
2018-17 x 2504-12	14	467	251	718	8.3	오목반구형	진회갈색	48.3	8.0	19.0	38.0
2018-1 x 2504-5	10	168	545	713	8.0	깔때기형	진회색	42.3	9.0	17.3	34.0
2018-16 x 2504-15	16	330	383	713	7.3	얇은깔때기형	진회갈색	40.3	8.0	16.3	18.3
2018-15 x 2504-5	18	363	337	700	9.7	오목반구형	진회색	46.0	8.3	21.7	22.0
2018-16 x 2504-7	10	318	379	697	7.3	얇은깔때기형	진갈색	43.3	12.0	24.7	14.7
2018-17 x 2504-24	10	521	176	697	10.0	반구형	진회갈색	48.0	11.3	17.7	30.7
2018-10 x 2504-7	13	241	431	672	11.7	반구형	연회갈색	44.3	10.0	23.3	29.3
2018-16 x 2504-5	13	248	419	667	10.7	반구형	흑갈색	49.7	9.0	21.0	30.7
2018-1 x 2504-1	11	319	345	664	9.7	깔때기형	진회색	40.3	9.7	22.0	28.7
2018-모균주	10	270 ±353.6	132 ±186.7	402 ±166.9	10.0	편평형	회갈색	44.3	10.3	19.7	23.3
2504-모균주	9.5	397.5 ±61.5	349 ±157.0	746.5 ±95.5	10.0	얇은깔때기형	진회갈	41.3	9.7	21.5	28

표 2.13 상자재배에 의한 이핵교배 균주 특성 (ASI2183*ASI2344: 72개 이핵교배 균주)

교배균주	초발이 일수(일)	수량(g/0.16m ²)			개체중 (g)	갓모양	갓색깔	갓(mm)		대(mm)	
		겨울	봄	총수량				직경	두께	굵기	길이
2183-30 x 2344-18	13	838	381	1219	8.0	얇은깔때기형	회색	44.3	8.3	13.0	27.3
2183-11 x 2344-18	17	945	264	1209	11.3	오목반구형	회갈색	48.3	9.0	19.3	26.0
2183-12 x 2344-18	14	679	390	1069	13.0	오목반구형	진회색	46.0	8.7	14.7	44.0
2183-4 x 2344-12	14	841	217	1058	7.7	오목반구형	진회색	43.3	7.7	11.0	53.7
2183-11 x 2344-2	10	1058	0	1058	8.3	얇은깔때기형	진갈색	41.7	9.3	15.0	22.7
2183-13 x 2344-2	8	643	389	1032	10.0	편평형	갈색	47.7	8.3	14.7	39.0
2183-11 x 2344-9	9	1031	0	1031	9.7	얇은깔때기형	연회갈색	42.0	6.7	13.0	82.0
2183-14 x 2344-19	10	610	372	982	11.3	오목반구형	회색	33.3	9.0	12.0	72.7
2183-15 x 2344-9	8	979	0	979	11.0	얇은깔때기형	회갈색	38.0	10.0	12.0	68.7
2183-13 x 2344-19	9	570	391	961	10.7	오목반구형	진회색	36.7	8.7	12.7	78.0
2183-4 x 2344-19	10	502	457	959	12.3	깔때기형	진회갈색	47.0	9.3	13.7	61.0
2183-30 x 2344-1	10	920	0	920	13.0	오목반구형	회갈색	46.0	7.7	13.3	77.7
2183-11 x 2344-12	10	912	0	912	16.3	깔때기형	갈색	45.3	8.7	18.0	70.0
2183-13 x 2344-1	10	796	86	882	9.0	오목반구형	진회색	40.3	10.3	18.7	38.7
2183-30 x 2344-19	13	585	273	858	14.3	편평형	진회갈색	49.7	8.7	15.7	64.7
2183-11 x 2344-1	9	835	0	835	9.0	얇은깔때기형	연회갈색	39.3	9.7	13.3	50.7
2183-12 x 2344-19	10	524	311	835	13.7	오목반구형	진회색	42.3	8.3	16.3	61.0
2183-14 x 2344-15	10	814	0	814	16.3	반구형	회갈색	46.3	10.0	15.0	64.0
2183-30 x 2344-9	9	807	0	807	8.7	얇은깔때기형	연회갈색	43.7	8.7	12.7	44.3
2183-12 x 2344-12	10	799	0	799	16.0	얇은깔때기형	진회색	43.3	8.3	16.3	60.0
2183-모균주	11	410 ±82.0	143 ±201.5	553 ±283.5	8.0	반구형	회색	48.0	10.0	14.0	21.7
2344-모균주	6	721 ±217.8	305 ±120.9	1,026 ±338.7	10.7	얇은깔때기	회색	43.5	8.3	11.3	48.8

표 2.14 상자재배에 의한 이핵교배 균주 특성 (ASI2183*ASI2504: 72개 이핵교배균주)

교배균주	초발이 일수(일)	수량(g/0.16m ²)			개체 중(g)	갓모양	갓색갈	갓(mm)		대(mm)	
		겨울	봄	총수량				직경	두께	굵기	길이
2183-11 x 2504-2	7	527	421	948	10.3	깔때기형	흑회갈색	39.0	8.7	15.7	44.0
2183-15 x 2504-2	11	583	335	918	12.0	깔때기형	진흑회색	23.7	9.3	16.3	81.0
2183-30 x 2504-12	17	546	370	916	9.3		진회색	45.3	8.0	19.3	37.3
2183-4 x 2504-14	11	732	174	906	13.7	깊은깔때기	진회색	44.0	7.7	14.0	48.7
2183-30 x 2504-5	10	635	261	896	11.0	얇은깔때기형	회색	43.0	8.0	13.0	54.3
2183-30 x 2504-2	11	428	456	884	15.3	깔때기형	진회색	48.7	9.3	19.7	57.3
2183-12 x 2504-2	11	536	332	868	13.7	깔때기형	진회색	46.0	7.7	16.3	76.7
2183-14 x 2504-2	9	575	286	861	20.7	깔때기형	진회색	45.0	11.7	19.7	82.3
2183-13 x 2504-24	9	397	438	835	6.7	편평형	진회색	40.0	8.0	13.3	45.3
2183-14 x 2504-12	13	517	309	826	8.7	깔때기형	진회색	46.7	8.0	14.3	44.7
2183-8 x 2504-12	10	334	487	821	8.7	깔때기형	흑회갈색	33.0	7.7	15.0	61.3
2183-11 x 2504-5	10	804	0	804	16.0	깔때기형	진회색	42.0	9.0	13.7	86.7
2183-11 x 2504-14	10	601	187	788	20.0	깔때기형	진회색	51.0	8.0	19.3	86.7
2183-14 x 2504-1	11	390	397	787	8.0	깔때기형	진회색	48.0	9.3	17.3	18.7
2183-14 x 2504-14	8	436	323	759	9.0	오목반구형	회색	38.7	9.7	19.7	50.3
2183-14 x 2504-25	9	550	204	754	8.3	얇은깔때기형	흑회갈색	40.3	6.0	11.3	81.7
2183-13 x 2504-25	10	466	269	735	8.3	깔때기형	진회색	45.0	6.0	12.0	75.0
2183-15 x 2504-24	10	491	240	731	12.3	편평형	회색	44.3	7.7	14.7	61.3
2183-13 x 2504-5	9	407	304	711	11.3	편평형	연회색	48.7	9.0	19.0	28.7
2183-13 x 2504-12	14	357	346	703	11.0	오목반구형	진회색	51.7	7.3	21.0	37.0
2504-모균주	9.5	397.5 ±61.5	349 ±157.0	746.5 ±95.5	10	얇은깔때기	진회갈	41.3	9.7	21.5	28
2183-모균주	11	410 ±82.0	143 ±201.5	553 ±283.5	8.0	반구형	회색	48.0	10.0	14.0	21.7

표 2.15 상자재배에 의한 이핵교배 균주 특성 (ASI2183*ASI2706: 48개 교배 균주)

교배균주	초발이 일수(일)	수량(g/0.16m ²)			개체중 (g)	갓모양	갓색깔	갓(mm)		대(mm)	
		겨울	봄	총수량				직경	두께	굵기	길이
2183-11 x 2706-14	10	810	390	1200	7.3	반반구형	회색	46.3	6.3	9.7	51.3
2183-13 x 2706-12	10	792	267	1059	6.0	오목반구형	진회갈색	41.3	9.0	13.0	18.7
2183-11 x 2706-18	11	871	181	1052	7.0	얇은깔때기	연회갈색	44.3	10.7	12.3	31.0
2183-11 x 2706-12	11	926	59	985	8.0	편평형	진회색	43.0	8.7	13.3	41.3
2183-15 x 2706-14	12	843	63	906	11.0	오목반구형	진회색	43.3	9.3	15.0	48.0
2183-12 x 2706-17	14	723	181	904	12.7	편평형	회색	47.0	9.0	21.0	47.7
2183-8 x 2706-14	10	664	219	883	6.7	반구형	갈색	42.0	8.0	11.0	24.3
2183-30 x 2706-18	19	517	362	879	11.7	얇은깔때기형	진회갈색	45.0	8.7	20.3	35.0
2183-30 x 2706-11	19	262	605	867	11.7	깔때기형	진회갈색	47.0	8.7	19.0	24.0
2183-8 x 2706-12	12	574	268	842	8.7	오목반구형	진회색	41.0	7.7	18.3	31.3
2183-15 x 2706-12	15	723	50	773	8.7	편평형	회색	44.3	7.0	11.7	39.3
2183-12 x 2706-14	10	758	0	758	7.3	얇은깔때기형	갈색	45.7	6.7	10.3	48.7
2183-14 x 2706-14	12	467	250	717	10.7	오목반구형	회갈색	43.7	8.0	16.0	31.3
2183-4 x 2706-18	14	701	0	701	7.7	얇은깔때기형	진갈색	39.7	7.7	12.0	39.0
2183-4 x 2706-12	15	612	87	699	8.3	편평형	회색	42.0	10.0	15.7	32.0
2183-4 x 2706-20	13	400	287	687	7.7	편평형		45.3	8.7	14.3	37.7
2183-12 x 2706-18	10	525	157	682	6.7	편평형	진회갈색	44.7	9.3	13.3	29.0
2183-4 x 2706-14	14	428	200	628	12.0	편평형	진회갈색	51.3	8.0	15.3	45.7
2183-4 x 2706-17	16	364	239	603	8.7	편평형	진회갈색	43.0	6.3	19.7	51.7
2183-13 x 2706-20	22	132	460	592	11.0	깔때기형	진회갈색	31.7	7.0	15.7	49.7
2183-모	11	410± 82.0	143± 201.5	553± 283.5	8.0	반구형	회색	48.0	10.0	14.0	21.7
2706-모	14	687± 79.2	275± 136.5	962± 215.7	6.8	얇은깔때기	진갈색	48.3	8.0	14.2	22.3



그림 2.3 폐면 상자재배에 의한 교배 이핵균주의 자실체 형태

표 2.16 교배조합 및 육성 이핵균주수

교배조합	육성된 교잡균주수	선발 균주
2018×2504	63	2018-16×2504-12 2018-16×2504-2
2183×2344	72	2183-30×2344-18 2183-11×2344-18
2183×2504	72	2183-11×2504-2 2183-15×2504-2
2183×2706	48	2183-11×2706-14 2183-13×2706-12
계	255	8

3) 느타리 교잡균주의 유전분석

버섯을 육종하는데 아주 중요한 유전형질은 여러 가지가 있지만 이중에서 가장 중요시해야 하는 것은 자실체 수량이다. 이는 곧 배지에 생육한 균사체가 자실체로 환원되는 양을 의미한다. 수량은 수량구성요소로 구성된다. 여기에는 자실체 갓의 면적 크기, 갓 두께, 대의 직경, 대 길이, 자실체 무게 등이 관여된다. 이러한 양적형질에는 동의유전자(polymeric gene)와 같은 주동유전자(major gene)가 관여하거나 폴리진(polygene)과 같은 미동유전자(minor gene)가 관여한다. 2종류의 유전자가 모두 관여할 수도 있다.

그러나 느타리 균상재배는 환경변이가 워낙 크기 때문에 미동유전자의 영향을 정확히 알기는 어려운 일이다. 그림 2.4-7은 4종류의 교잡조합에 따라 자실체 수량에 대한 분포를 나타낸 것이다. 대부분 부, 모에 대한 자실체 수량의 중간을 차지하는 교잡체가 대부분을 차지한다. 부, 모의 수량차이가 큰 조합인 2183 X 2344에서와 같이 수량차이가 클수록 양친의 수량보다 많은 교잡체의 수는 적었다. 양친의 수량차이가 적은 2183 X 2504는 양친보다 수량이 많은 교잡체의 수가 가장 많이 선발되었다.

질적형질인 자실체의 갓 색깔은 대부분 양친 색깔의 중간을 나타내는 양상이었다. 여기서 사용된 대부분의 모균주가 자실체 색깔이 모두 짙은 회색에 가까운데 이는 색깔이 짙은 회색일수록 상등품에 속하기 때문이다.

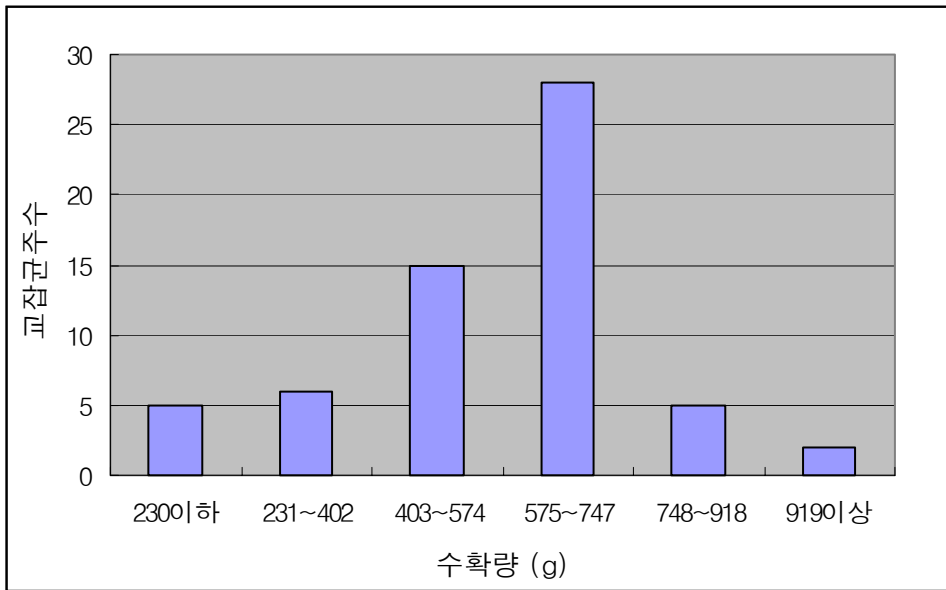


그림 2.4 느타리 2018 x 2504 교잡군주의 자실체 수량에 대한 분포.
 모군주의 자실체 수량 2018 : 402 ± 166, 2504 : 747 ± 95

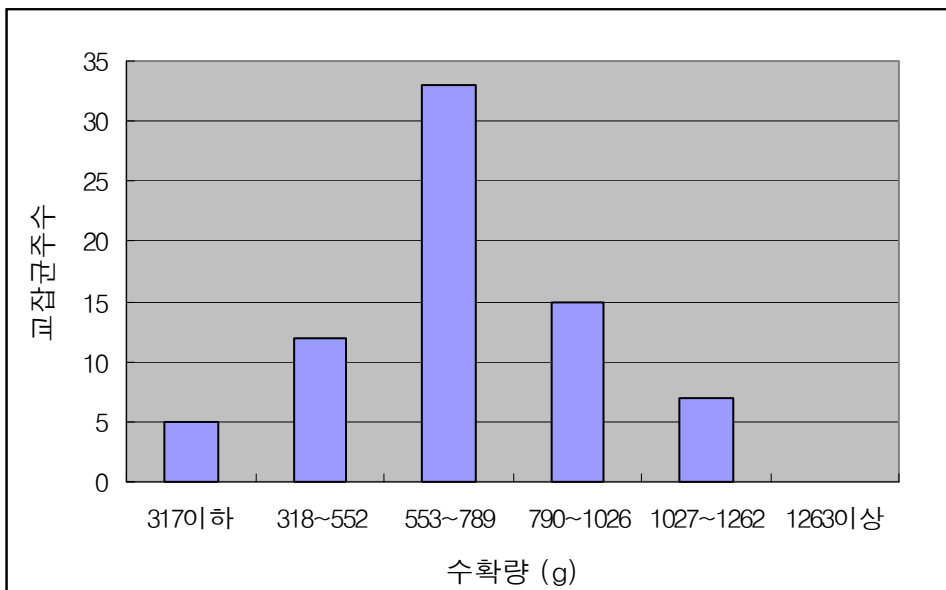


그림 2.5 느타리 2183 x 2344 교잡군주의 자실체 수량에 대한 분포.
 모군주의 자실체 수량 2183 : 553 ± 283, 2344 : 1026 ± 338

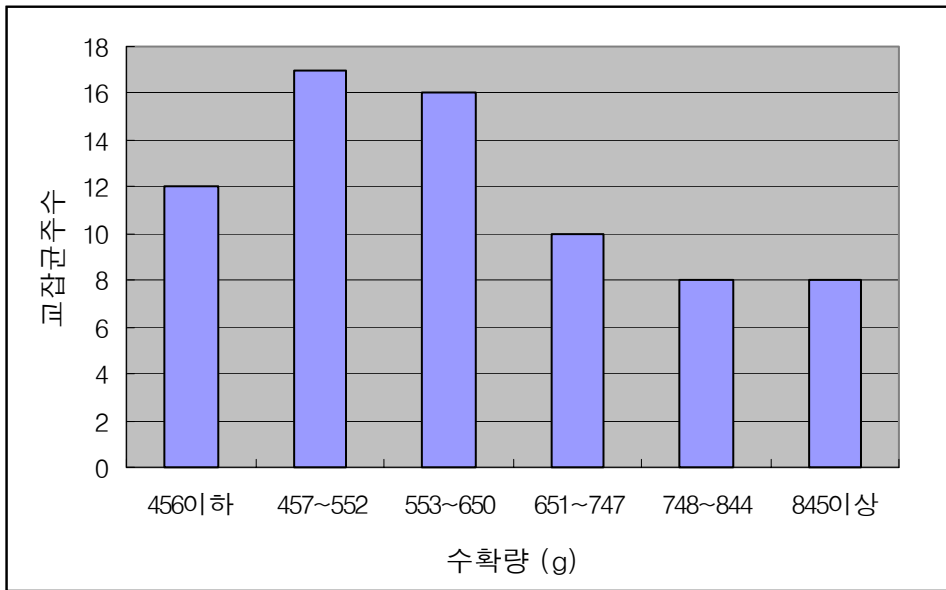


그림 2.6 느타리 2183 x 2504 교잡균주의 자실체 수량에 대한 분포
 모균주의 자실체 수량 2183 : 553 ± 283, 2504 : 2504 : 747 ± 95

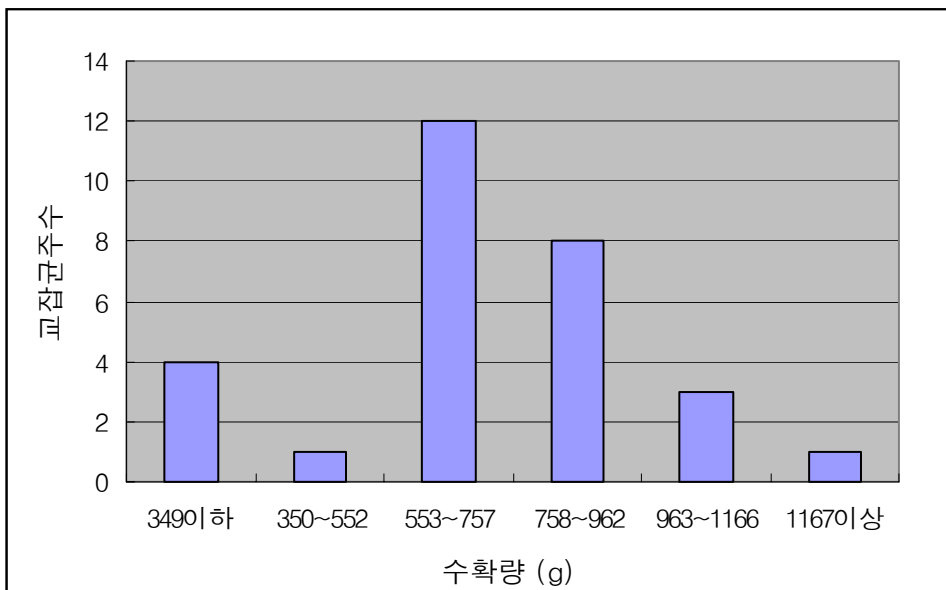


그림 2.7 느타리 2183 x 2706 교잡균주의 자실체 수량에 대한 분포
 모균주의 자실체 수량 2183 : 553 ± 283, 2706 : 2504 : 962 ± 215

4) DNA profile 작성

교잡주의 DNA profile을 작성하고 분자생물학적으로 교배이핵균주를 확인하기 위하여 느타리종(*Pleurotus ostreatus*)에 특이적인 밴드를 보이는 FGL17과 FGL18 primer를 사용하여 교배모본 선발에 사용된 시판 품종에 대하여 PCR fingerprinting을 수행하였다(그림 2.8-9). FGL17의 경우는 시험된 모든 품종에서 약 600bp에서 느타리종 특이밴드를 보였으며, FGL18 primer의 경우에는 1700bp에서 특이 밴드를 보였다. 또한 밴드양상은 FGL17의 경우가 더 다양한 polymorphism을 보여 이후의 균주간 교배를 확인하기에 적당할 것으로 사료되었다.

교배이핵균주를 확인하기 위하여 선발된 모균주로부터 분리된 단핵균주에 대하여 FGL17로 DNA profile을 조사한 결과 (그림 2.10), 집단내의 교배형과 연관된 특이한 밴드는 찾을 수 없었다. 그러나 모균주로 사용된 단핵균주 집단간에는 밴드에 차이가 확실하고, 집단내의 단핵균주간에는 변이 폭이 크지 않아서 교배를 확인하는 목적으로 사용하기에 적당할 것으로 사료되었다.

현재 교배이핵균주에서 균이 선발되었으므로 이 선발된 균주에 대하여 교배이핵주임을 확인하는 작업이 진행중에 있다.

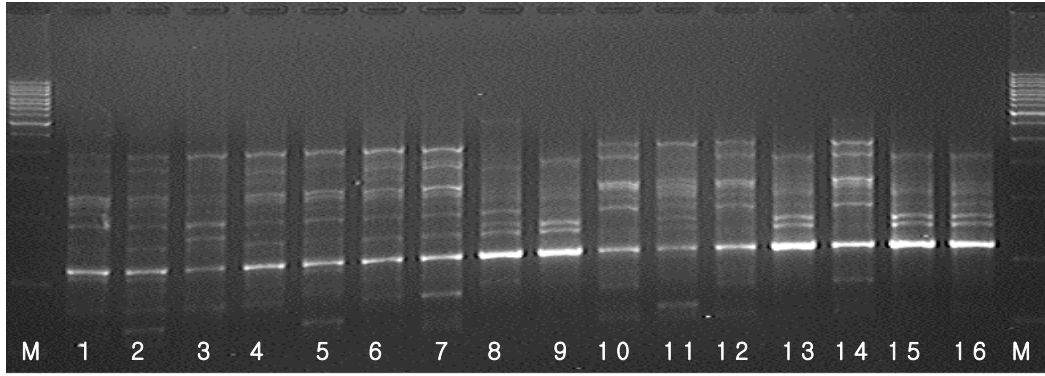


그림 2.8 FGL17 primer를 사용한 품종 간 profile

M : 1kb DNA marker, 1.ASI 2001 2.2018 3.2072 4.2180 5.2194 6.2183 7.2240 8.2228 9.2344 10.2706 11.2535 12.2506 13. 2505 14.2477 15.2487 16.2488

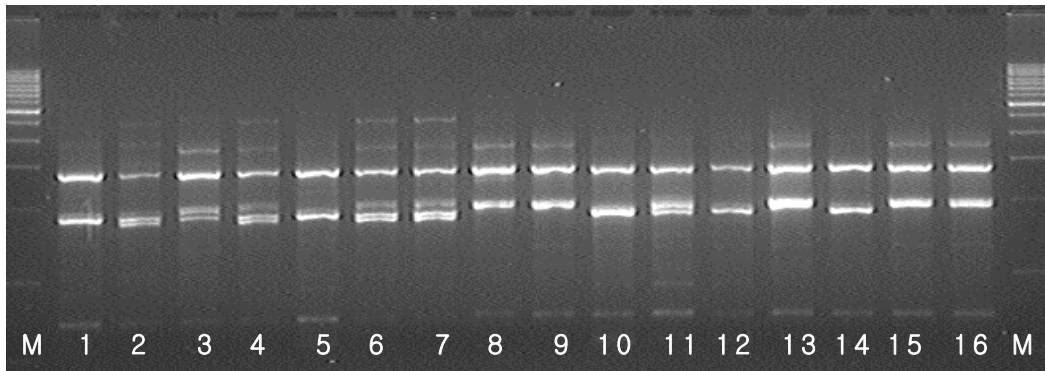


그림 2.9 FGL18 primer를 사용한 품종간 profile

M : 1kb DNA marker, 1.ASI 2001 2.2018 3.2072 4.2180 5.2194 6.2183 7.2240 8.2228 9.2344 10.2706 11.2535 12.2506 13. 2505 14.2477 15.2487 16.2488

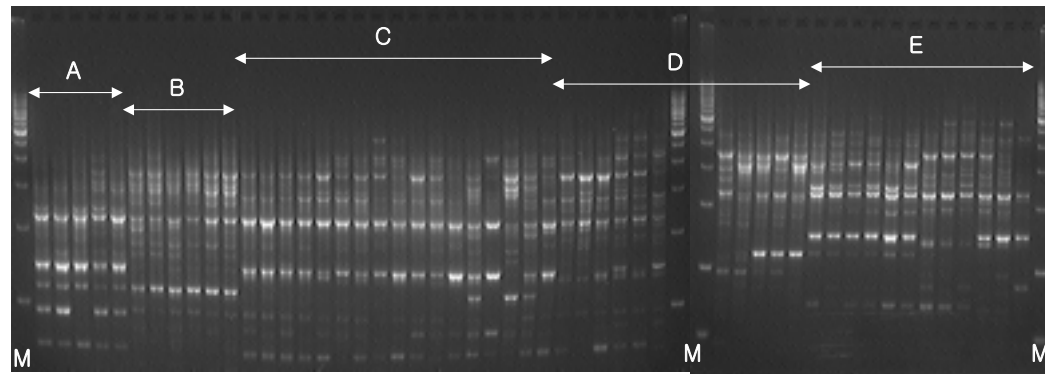


그림 2.10 FGL17 primer를 사용한 단핵균주 profile

M: 1Kb DNA marker, A: ASI2706의 단핵균주, B: ASI2018의 단핵균주, C: ASI2183의 단핵균주, D: ASI2344의 단핵균주, E: ASI2504의 단핵균주

4. 교잡균주의 저온 적응성 평가

가. 재료 및 방법

병재배로 선발된 균주를 중심으로 상자재배에서 자실체의 저온적응성을 포함한 수량 및 자실체의 형태적 특성을 조사하였다.

톱밥 병재배를 통하여 자실체 특성 및 생육특성을 1차로 조사하여 선발된 2004년 균주와 2005년 육성된 균주에 대하여 폐면을 이용한 상자재배를 저온기인 11월에서 3월에 걸쳐 가온을 하지 않은 재배사내 자연온도에서 40cm×40cm 플라스틱 상자를 이용하여 폐면상자재배를 실시하였다. 재배기간 중 재배사내평균 온도는 7.6℃였으며 평균 습도는 64.3이었다. 집중일은 10/18, 배양기간 17일, 2005년 11월4일 발이실로 옮겨 11/8 20도, 11/9 16도, 11/10 15도로 점점 온도가 내려가는 시기였다.

교배모본으로 사용된 균주는 표 2.17 과 같다. 저온성이 강한 ASI 2183을 비롯하여 2344, 2504가 사용되었으며 새로 수량성이 높으면서 저온성인 중간육성계통 1982가 새로 교배모본으로 추가되었다. 저온성이 다소 강하고 각기 품질 특성이 다른 2018, 2706에 새로 2730, 2194를 교배모본으로 추가하여 교잡 이핵균주를 육성하여 상자재배 실험에 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

병 및 상자재배로 선발된 균주를 중심으로 상자재배에서 자실체의 저온적응성을 포함한 수량 및 자실체의 형태적 특성을 조사하였다.

교배모본으로 선택한 5개 균주들간 단핵균주를 분리하여 교잡에 의하여 2004년도에 육성된 이핵교잡균주 4개 교배조합 271균주들에 대하여는 작년도에 병재배 및 상자재배를 거쳐 모두 29개의 균주가 선발되어 실험에 사용되었다(표 2.18). 2005년도에 새로이 3개 균주를 모본에 포함하여 새로이 교잡을 수행하여 7개 교배조합에서 모두 343개 이핵교배균주를 육성하였으며 이들은 병재배를 거쳐 일부 자실체 형성이 부진한 균주를 제외하고 총 224개 균주에 대하여 겨울철 상자재배를 통하여 저온 적응성을 평가하고 수량 및 특성을 고려하여 각 조합에서 1개 균주를 선발하였다.

1) 2004년 선발 균주의 상자재배 특성검정

1차년도에 시판되고 있는 느타리버섯 품종의 온도별 병재배 및 상자재배를 통하여 육종모본을 선발하였으며, 선발된 육종모본은 단핵균주를 분리하여 2차년도에 병 및 상자재배를 수행하여 특성을 조사하였다. 여기서 선발된 균주를 중심으로 3차년도에 농가의 현실에

맞추어 재배환경을 자연상태로하여 겨울재배를 폐면상자재배로 수행하였다. ASI2018 x 2504 조합에서 선발된 7개 균주를 재배한 결과 KU-144가 상자당 1294g이 생산되어 가장 수량이 높았으며 다발성이며 갯형태는 얇은 깔때기형으로 색택은 회색을 나타내었다 (표 2.19).

ASI2183 x 2344 조합에서 선발된 6균주에 대한 상자재배에서는 KU-254가 수량이 1372g/상자로 오목반구형이면서 진회색을 나타내어 품질이 우수하였다. 또한 초발이일수 및 수확일수도 다른 균주에 비하여 빠른 양상을 보였다 (표 2.20).

ASI2183x2504 조합에서 선발된 7개 균주 중에서는 KU-365균주가 상자당 1173g의 수량을 나타냈으며 색깔은 회색으로 얇은 깔때기형이었으나 초발이 소요일수는 다소 늦은 편이었다(표 2.21).

느타리버섯의 단핵균주 가운데 임성을 가지는 균주와 임성을 갖지 않아서 그 자체로 버섯을 만들지 못하는 단핵균주가 존재한다. 본 실험에서는 임성을 가진 균주를 기본적으로 교배에 사용하였으며 비임성인 단핵균주간 교배로 육성된 이핵교잡균주와의 차이를 보기 위하여 실험을 수행하였다. 전체적으로는 임성균주간 교잡으로 육성된 이핵균주가 비임성간 교잡으로 육성된 이핵균주보다 높은 수량성을 나타내었으나 표7에서 보는바와 같이 비임성교잡균주에서도 수량성이 높은 균주가 선발되었다. KU-524는 ASI2183 x 2706 교배조합으로 임성간 교잡으로 육성되어 선발된 표 2.22의 KU-415 보다 수량이 높게 나타났다. 그러나 선발된 다른 3개 균주는 그다지 높은 수량성을 보이지 않았다(표 2.23)

이상 2차년도에 선발된 4개조합 29개 균주에 대하여 상자재배를 통해 실제 농가 상황에 맞추어 저온성을 검정한 결과 교배조합별로 볼때 저온성이 강한 ASI2183과 모본의 수량성이 가장 높았던 ASI2344와의 조합군(KU-200)에서는 모본보다 다소 낮은 값을 보였으나, ASI2183 x 2706 교배조합군(KU-400)에서는 모본보다 좋은 성적을 보여 주었다. 한편 다른 두개 조합은 수량면에서는 앞의 두 그룹보다는 다소 낮은 수량성을 나타내었다. 각 조합에서 선발된 5개 균주는 비록 생산성 검정 및 농가확대재배시험을 거쳐야 하겠으나 충분한 저온조건에서도 비교적 우수한 생산성을 보인 균주이므로 앞으로 저온성품종을 육성하는데 중요한 육종모본으로서 그 가치가 인정된다고 사료된다.

2) 2005년 교배균주의 겨울 상자재배

2차년도에 수행된 교배조합에 3개 모본을 추가하여 2005년에 7개 교배조합 343개 이핵 교배균주를 육성하였으며 이 중 병재배에서 정상적으로 자실체를 발생시킨 224개 균주에 대한 폐면 상자재배를 수행하였다.

1982 x 2183의 교배조합으로 육성된 균주는 양 모본이 모두 연회색계통의 자실체를 가졌기 때문에 교배이핵균주도 대부분 회색을 나타내었다. 수량은 KKKU-105가 상자당 1527g으로 높게 나타났으나 초발이소요일수가 48일로 늦은 편이었다(표 2.24).

1982 x 2504의 교배조합으로 육성된 이핵교배균주는 K KU-100그룹과는 달리 모본인 ASI2504가 진회색이어서 그 후대 균주도 대체로 진회색을 나타내었으며(표2.32) 그 중 K KU-201 균주는 상자당 1427g의 수량을 보였으며 색깔은 흑회갈색을 나타내었다 (표 2.25). 1982 x 2730 교배조합으로 육성된 이핵교배균주에서는 K KU-416 균주가 상자당 1405g을 나타내었으며 자실체 색깔은 회색이었다(표 2.26).

ASI2183×2730 교배조합에서는 교배이핵균주 중 K KU-728 균주가 가장 수량성이 높아 상자당 1389g을 나타내었으며 갓색깔은 연회색을 나타내었다(표2.27). ASI2194×2344 교배 조합에서는 모본이 모두 진회색계통이어서(표 2.32) 후대에서도 대체로 진한 색깔을 나타 내었고, K KU-823 균주는 오목반구형 갓형태를 가지고 수량이 1521g을 나타내었다(표 2.28). ASI2194×2730교배조합에서는 K KU-1059 균주가 상자당 1447g을 나타내었으며 갓색 깔은 회색이었다(표 2.29). ASI2344×2730 교배조합에서는 K KU-1222와 K KU-1231로 가장 높은 1283g을 나타내었으나 K KU-1231 균주가 갓색깔이 흑회색이고 개체중도 무거워 품 질면에서 나온 것으로 생각되었다(표 2.30).

각 교배조합에서 임성을 보이지 않는 단핵균주간 교잡을 수행한 결과 2차 선발된 표2.23 에서의 결과와 같이 K KU-2124 균주는 ASI2344 x 2730교배조합에서 유래한 이핵교배균주 이나 다른 임성교배균주보다도 더 높은 수량성(1610g/상자)을 보였으며 다른 여타의 균주 는 대체로 수량성이 낮은 특성을 보여 주었다(표 2.31).

3) 느타리 교잡균주의 유전분석

수량성에 대한 유전분석을 수행하여 그림 2.14는 7종류의 교잡조합에 따라 자실체 수 량에 대한 분포를 나타낸 것이다. 느타리 균상재배에서는 환경변이가 워낙 크고 시험에 사 용한 균주수가 충분치 않았기 때문에 수량에 의한 분포가 정규분포를 따르지 않는 것을 볼 수 있다. 그러나 대부분 부, 모에 대한 자실체 수량의 중간을 차지하는 교잡체가 대부 분을 차지하지만 그러면서도 모든 교배조합에서 일부의 교잡이핵균주는 양친의 범위를 벗 어나는 것을 볼 수 있다.

특히 K KU-100조합에서는 양친의 수량보다 훨씬 높은 균주도 얻을 수 있었다. 이전 보 고서에서 고찰한 바와 같이 부, 모의 수량차이가 큰 조합의 경우 수량차이가 클수록 양친 의 수량보다 많은 교잡체의 수는 적고, 양친의 수량차이가 적은 조합에서는 양친보다 수량 이 많은 교잡체의 수가 많이 선발될 수 있었다고 하였는데 이번 결과에서도 K KU-400 교배 조합과 K KU-1000 교배조합에서와 같이 양친 모두 낮은 수량이었으나 교배이핵균주는 넓은 범위에서 수량성을 보여 양친보다 우수한 균주들을 선발 할 수 있었다. 또한 앞에서도 언 급한 바와 같이 질적형질인 자실체의 갓 색깔은 대부분 양친 색깔의 중간을 나타내는 양 상이었다.

4) DNA fingerprinting에 의한 교배균주의 확인

이상에서 각 교배조합별로 선발된 이핵교잡균주에 대한 교잡 여부를 확인하기 위하여 느타리 품종구분에 사용될 수 있는 URP primer를 사용하여 PCR fingerprinting를 수행 중에 있다.

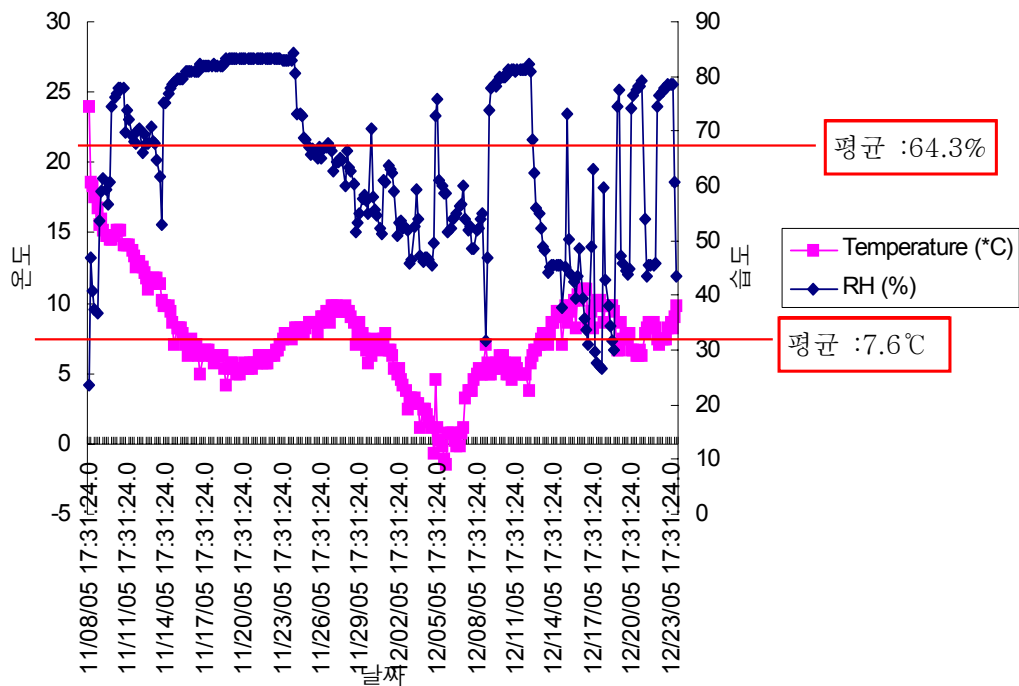


그림 2.11 겨울상자재배기간 중 재배사내의 온습도 변화

표 2.17 저온성 육성모본 선발 균주의 특성

균주번호(ASI)	기원	저온성	품 질
2183	교잡주	아주 강	대가 굵고 길며 자실체 모양이 양호
2344	네델란드	강	수량성이 높음
2504	중국	강	갓이 짙은 흑회색으로 품질이 우수
2018	한국	보통	발이가 빠르고 대가 굵음
2706	중국	강	갓이 흑회색
2730	중국	보통	갓이 진하고 형태가 좋음
2194	일본	아주 강	갓이 진하고 개체수가 많은 병재배용
1982	교잡주	강	수량성이 높음

표 2.18 육성된 교배이력균주의 교배내역 및 선발 균주수

교배년도	균주번호		교배조합	조합균주수	선발균주수
2004	KU-100	101 ~ 163	2018 x 2504	63	7
	KU-200	201 ~ 272	2183 x 2344	72	6
	KU-300	301 ~ 372	2183 x 2504	72	7
	KU-400	401 ~ 448	2183 x 2706	48	5
	KU-500	506,507,514,515	2018 x 2504	4	4
		519,520,525,526	2183 x 2344	4	
		521,522,527,528	2183 x 2504	4	
		523,524,529,530	2183 x 2706	4	
소계			271	29	
2005	KKU-100	101 ~ 124	1982 x 2183	24	11
	KKU-200	201 ~ 224	1982 x 2504	24	15
	KKU-400	401 ~ 424	1982 x 2730	24	12
	KKU-700	701 ~ 764	2183 x 2730	64	49
	KKU-800	801 ~ 840	2194 x 2344	40	29
	KKU-1000	1001 ~ 1064	2194 x 2730	64	49
	KKU-1200	1201 ~ 1240	2344 x 2730	40	27
	KKU-2000	2011 ~ 2019	1982 x 2183	9	32
		2021 ~ 2029	1982 x 2504	9	
		2041 ~ 2049	1982 x 2730	9	
		2071 ~ 2079	2183 x 2730	9	
		2081 ~ 2089	2194 x 2344	9	
		2101 ~ 2109	2194 x 2730	9	
		2121 ~ 2129	2344 x 2730	9	
소계			343	224	
모균주				8	8
총합				622	261

표 2.19 저온성 육성모본 선발 균주의 상자재배 특성(2018 x 2504)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대궂기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다발성	균덩이
								초기	후기		
KU-144	29	48	22.2±3.1	28.0±5.0	13.3	1294.0	얇은갈대기	회색	연회색	+++	
KU-156	30	54	21.9±8.9	8.3±3.6	11.8	1137.3	얇은갈대기	진회색	진회색	+	
KU-141	27	45	27.6±2.5	20.2±8.2	14.7	1134.7	갈대기	진회색	진회색	++	
KU-105	39	73	21.8±2.9	21.7±2.3	11.7	997.7	갈대기	진회색	진회색	+	++
KU-138	35	58	19.8±2.4	16.3±7.2	12.7	960.3	얇은갈대기	흑회색	흑회색	++	
KU-150	36	55	22.1±3.0	21.0±8.6	12.0	895.0	얇은갈대기	진회색	진회색	++	
KU-155	37	59	33.2±1.6	13.7±9.4	13.7	743.5	얇은갈대기	회색	회색	+	
KU-100 (평균)	33±5	56±14	23.7±5.7	18.5±8.9	12.8 ±3.0	1,037.2 ±294.7					
2018 (모균주)	39	61	20.0±0.9	34.5±4.1	12.3	338.5	얇은갈대기	회색	연회색	+++	
2504 (모균주)	25	56	26.7±3.7	27.6±8.8	13.1	1021.3	얇은갈대기	진회색	진회색	++	

표 2.20 저온성 육성모본 선발 균주의 상자재배 특성(2183 x 2344)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대궂기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다발성	균덩이
								초기	후기		
KU-254	27	38	20.2±1.1	51.7±7.4	20.1	1372.0	오목반구	진회색	회색	++	
KU-236	33	53	19.0±4.1	44.4±10.7	16.9	1132.0	얇은갈대기	진회색	회색	++	+++
KU-245	25	50	19.0±3.0	58.7±22.0	18.3	1076.3	오목반구	진회색	회색	++	++
KU-209	31	43	19.2±2.4	33.0±11.7	14.1	994.0	얇은갈대기	회색	진회색	++	+++
KU-238	28	52	15.5±1.5	41.8±23.7	11.0	955.5	오목반구	회색	연회색	+++	
KU-235	32	52	17.6±2.8	39.7±8.8	12.2	699.3	오목반구	회색	회색	++	
KU-200 (평균)	30±4	48±9	18.6±2.9	45.1±16.4	15.7 ±3.9	1,043.1 ±306.1					
2183 (모균주)	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	
2344 (모균주)	22	35	15.0±1.4	48.4±4.9	17.0	1567.0	얇은갈대기	진회갈색	진회갈색	++	

표 2.21 저온성 육성모본 선발 균주의 상자재배 특성(2183 x 2504)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다발성	균덩이
								초기	후기		
KU-365	33	54	21.3±4.7	36.3±14.1	15.1	1173.3	얇은갈대기	회색	연회색	+	
KU-356	29	54	21.1±2.4	55.4±12.9	16.2	1142.7	얇은갈대기	회색	회색	+	
KU-320	27	53	22.0±2.2	51.2±24.2	16.0	1068.3	갈대기	진회색	진회색	+	
KU-360	27	48	18.9±2.4	68.1±11.9	18.1	1055.0	얇은갈대기	진회색	회색	++	
KU-341	27	45	17.7±2.9	46.3±8.9	11.1	980.3	갈대기	진회색	회색	++	
KU-361	31	59	18.6±2.5	45.3±11.4	15.3	954.3	얇은갈대기	진회색	진회색	++	+
KU-314	31	53	21.3±4.6	31.9±18.1	12.0	654.3	갈대기	회색	회색	+	+
KU-300 (평균)	29±3	52±6	20.1±3.5	47.8±18.4	14.8 ±3.0	1,004.0 ±261.6					
2183 (모균주)	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	
2504 (모균주)	25	56	26.7±3.7	27.6±8.8	13.1	1021.3	얇은갈대기	진회색	진회색	++	

표 2.22 저온성 육성모본 선발 균주의 상자재배 특성(2183 x 2706)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다발성	균덩이
								초기	후기		
KU-415	31	49	18.8±2.6	41.7±6.3	11.8	1324.7	얇은갈대기	진회색	회색	+++	
KU-414	33	50	20.3±2.1	40.6±18.4	12.9	1300.0	오목반구	회색	회색	++	
KU-404	45	61	19.3±2.6	34.2±9.7	14.0	1121.0	오목반구	진회색	진회색	++	
KU-439	33	48	17.2±2.3	46.2±13.2	17.6	1117.7	오목반구	진회색	진회색	++	
KU-447	44	62	20.8±5.9	25.7±6.4	15.8	590.7	갈대기	회색	회색	+	
KU-400 (평균)	37±7	53±8	19.3±3.6	37.9±13.5	14.4 ±4.0	1,088.6 ±319.0					
2183 (모균주)	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	
2706 (모균주)	30	46	15.4±1.3	36.9±11.0	11.1	1298.3	오목반구	회색	회색	+++	++

표 2.23 저온성 육성모본 선발 균주의 상자재배 특성(비임성 교배균주)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/ 상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KU-524	39	58	17.4±1.1	33.2±11.3	13.1	1491.3	오목반구	진회색	진회색	+++	
KU-535	30	43	21.2±2.7	29.2±11.7	16.4	1164.7	얇은갈대기	진회색	진회색	++	++
KU-525	33	49	21.2±2.4	36.4±4.2	17.1	1065.3	오목반구	회색	회색	++	
KU-530	40	56	18.1±2.4	34.3±12.7	14.7	1055.3	오목반구	흑회색	흑회색	++	
KU-500 (평균)	35±6	52±8	19.5±2.8	33.3±10.4	15.3 ±2.5	1,194.2 ±265.6					



KU-144



KU-254



KU-365



KU-415



KU-524

그림 2.12 2차년도 선발 교배 이핵균주의 폐면상자재배에 의한 자실체 형태

표 2.24 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성(p1982 x 2183)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-105	48	69	15.0±2.0	58.3±2.9	16.0	1527	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-101	53	69	14.0±1.0	50.0±3.0	15.3	1249	갈대기형	회색	회색	++	++
KKU-120	38	60	18.7±4.2	54.7±2.5	12.7	1215	오목반구형	연회색	연회색	+++	
KKU-121	37	59	18.0±1.0	74.0±9.5	12.7	1101	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-123	42	64	18.3±1.5	65.0±17.4	11.3	1055	오목반구형	회색	회색	+++	+++
KKU-106	44	63	13.3±1.2	73.3±5.8	10.7	1022	얇은갈대기형	회색	연회색	+++	
KKU-124	38	59	19.3±1.2	56.0±3.6	15.3	1012	오목반구형	회색	연회색	++	++
KKU-113	53	69	25.0±0.0	33.7±9.0	16.7	989	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-114	42	69				855	갈대기형	회색	회색		
KKU-103	40	63	14.3±2.3	65.0±5.0	10.7	825	갈대기형	진회색	회색	+++	++
KKU-119	45	65	27.7±3.8	19.7±3.1	13.3	725	얇은갈대기형	회색	회색	+	+
KKU-100 (평균)	41±9	67±9	18.4±4.9	55.0±17.7	13.5 ±2.2	994.2 ±292.8					
1982 (모균주)	39	61	14.3±1.4	60.0±13.4	11.7	803.7	갈대기	연회색	연회색	++	
2183 (모균주)	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	

표 2.25 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (1982 x 2504)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-201	24	34	22.3±2.5	41.3±2.3	15.7	1427	얇은깔대기형	흑회갈색	흑회색	++	+++
KKU-222	39	65	28.0±2.0	69.0±5.3	33.3	1354	깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-206	23	34	17.3±0.6	55.0±8.7	17.7	1319	얇은깔대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-205	32	43	28.7±0.6	50.3±1.5	24.0	1317	깔대기형	진회색	진회색	++	+++
KKU-204	45	69				1289		진회색	진회색		+++
KKU-218	31	52	25.7±2.5	44.3±2.1	21.3	1269	얇은깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-207	25	41	15.7±1.5	78.0±6.9	15.7	1214	얇은깔대기형	흑회색	흑회색	++	
KKU-203	33	48	12.3±2.5	32.3±6.8	10.0	1200	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-210	34	59	22.7±3.2	34.0±5.6	14.0	1106	깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-224	34	55	13.0±1.0	57.7±4.0	11.3	1103	깔대기형	흑회색	흑회색	++	+++
KKU-208	36	60	19.0±1.0	55.0±5.0	12.7	948	깔대기형	진회색	회색	+	
KKU-202	36	48	26.0±3.6	51.7±11.5	24.0	852	깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-216	36	59	17.7±1.2	39.0±1.7	12.0	851	깔대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-217	41	92	11.3±1.5	73.3±5.8	12.0	828	얇은깔대기형	회색	회색	+	
KKU-219	55	111	19.3±1.5	77.7±4.0	18.3	790	오목반구형	진회색	회색	+++	
KKU-200 (평균)	37±10	62±25	19.9±5.9	54.2±15.8	17.3 ±6.5	1,129.1 ±203.8					
1982 (모균주)	39	61	14.3±1.4	60.0±13.4	11.7	803.7	깔대기	연회색	연회색	++	
2504 (모균주)	25	56	26.7±3.7	27.6±8.8	13.1	1021.3	얇은깔대기	진회색	진회색	++	

표 2.26 상자재배에 의한 교배 이핵교배 군주 자실체특성 (p1982 x 2730)

군주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	군 덩 이
								초기	후기		
KKU-416	48	69	28.7±1.5	18.0±6.2	13.3	1405	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-422	37	60	16.0±1.0	63.0±8.9	8.0	1221	오목반구형	회색	연회색	+++	
KKU-424	43	64	32.0±3.0	14.3±1.2	10.7	1187	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-418	48	65	17.7±0.6	50.7±1.2	12.7	1084	갈대기형	회색	회색	+++	
KKU-401	33	55	15.0±1.0	70.0±5.0	16.0	1047	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-423	41	64	17.3±1.5	60.0±5.0	12.0	1013	얇은갈대기형	회색	회색	+++	
KKU-414	48	72	14.3±1.5	40.3±3.2	11.3	998	오목반구형	회갈색	연회색	++	
KKU-421	41	63	15.0±1.0	54.7±1.5	9.3	964	얇은갈대기형	회색	연회색	+++	
KKU-415	54	72	29.0±2.6	54.0±3.0	17.3	861	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-420	44	63	18.3±1.5	56.7±2.9	14.7	860	갈대기형	진회색	회색	+++	++
KKU-419	44	65	18.0±1.0	48.3±15.3	14.7	796	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-409	51	72	22.0±2.6	31.3±4.5	12.0	618	얇은갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-400 (평균)	45±6	70±19	20.3±6.2	46.8±17.7	12.7 ±2.7	956.2 ±265.9					
1982 (모군주)	39	61	14.3±1.4	60.0±13.4	11.7	803.7	갈대기	연회색	연회색	++	
2730 (모군주)	41	63	18.0±2.8	30.4±5.9	11.1	872.7	얇은갈대기	회색	회색	+	

표 2.27 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (2183 x 2730)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대굵기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-728	32	56	18.3±2.1	42.0±5.0	14.7	1389	오목반구형	연회색	연회색	+++	
KKU-761	34	48	22.0±2.0	48.3±2.9	19.3	1372	얇은깔대기형	진회색	회색	++	
KKU-725	39	60	13.0±0.0	59.7±8.7	10.0	1341	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-720	39	55	21.7±3.2	23.7±5.7	12.7	1267	깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-737	45	69	13.7±1.2	29.0±3.6	10.0	1266	얇은깔대기형	연회색	연회색	++	
KKU-749	41	56	17.7±1.2	47.7±6.8	13.3	1266	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-752	43	55	18.7±1.5	31.0±2.6	12.0	1208	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-706	39	58	18.0±1.0	37.7±2.5	13.3	1194	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-744	41	55	18.0±3.5	33.3±5.8	14.0	1170	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-732	40	59	18.3±2.3	42.7±2.5	16.0	1156	얇은깔대기형	회색	회색	+++	
KKU-702	45	64	11.7±0.6	25.0±7.8	8.0	1154	반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-727	36	58	15.0±1.0	52.7±2.5	10.0	1153	오목반구형	회색	연회색	+++	
KKU-717	45	59	19.0±1.0	37.3±3.8	8.7	1124	깔대기형	회색	회색	++	
KKU-746	39	55	20.3±1.2	57.0±2.6	20.7	1123	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-707	45	59	14.3±1.2	7.3±2.3	12.7	1098	오목반구형	진회색	진회색	+	
KKU-723	34	58	20.3±2.1	35.7±4.2	9.3	1062	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-750	49	65	13.0±1.7	34.3±5.1	10.0	1041	얇은깔대기형	회색	회색	+++	++
KKU-760	38	55	15.7±1.5	35.0±1.0	12.0	1030	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-741	37	56	21.7±3.1	55.0±5.0	22.7	1028	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-748	39	58	21.7±2.1	54.3±5.1	19.3	1022	얇은깔대기형	회색	회색	++	
KKU-757	41	56	23.7±1.2	39.3±1.2	20.0	988	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-705	41	69	22.0±1.0	19.7±0.6	16.7	974	얇은깔대기형	연회색	연회색	++	
KKU-754	41	56	20.7±1.2	42.7±16.9	20.0	974	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-704	42	56	15.3±4.2	19.3±4.0	10.7	969	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-703	42	58	19.3±1.5	25.0±3.0	11.3	942	오목반구형	회색	회색	++	

KKU-742	48	65	16.7±1.5	66.7±2.9	16.0	920	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-708	40	58	18.0±2.0	34.0±7.9	12.0	917	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-733	45	63	17.7±2.1	26.7±5.8	12.0	911	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-762	39	55	19.0±1.7	49.3±6.5	13.3	909	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-721	40	59	25.3±2.9	35.7±5.1	14.7	900	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-729	37	59	19.7±0.6	32.7±4.9	13.3	890	오목반구형	회색	연회색	+++	
KKU-747	40	63	17.0±2.0	45.7±5.1	11.3	867	오목반구형	연회색	연회색	+++	
KKU-755	41	58	21.3±1.5	30.0±4.6	14.0	850	오목반구형	진회색	진회색	+	
KKU-716	40	59	28.7±1.5	20.3±0.6	16.0	844	갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-764	45	64	15.7±1.2	20.7±4.0	8.7	792	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-753	43	83	20.3±0.6	43.0±5.6	22.0	790	오목반구형			+	
KKU-731	32	55	18.3±2.1	54.7±10.8	11.3	737	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-756	49	64	16.3±1.5	31.0±11.5	10.0	727	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-738	39	59	20.0±1.0	46.3±13.3	11.3	713	오목반구형	연회색	연회색	+	
KKU-722	40	63	22.7±4.9	33.3±1.5	14.7	710	얇은갈대기형	연회색	연회색	+++	
KKU-743	54	69	18.0±2.6	34.0±3.6	17.3	702	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-758	42	59	23.7±2.1	35.0±5.0	13.3	681	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-751	41	64	15.3±0.6	46.7±2.9	13.3	675	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-730	39	59	15.0±1.0	66.3±7.5	10.0	613	오목반구형	회색	연회색	+++	
KKU-701	43	59				600		진회색	진회색		
KKU-763	32	55	18.7±1.5	29.3±5.9	10.7	577	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-719	43	69	11.7±2.1	38.3±7.6	10.0	503	얇은갈대기형	연회색	연회색	++	
KKU-715	34	148	19.0±1.7	32.0±5.3	14.0	431	갈대기형	연회색	연회색	+	
KKU-726	41	65	14.0±1.0	51.7±7.6	8.7	375	오목반구형	연회색	연회색	+++	
KKU-700 (평균)	41±4	62±14	18.4±3.9	38.3±13.7	13.4 ±3.7	937.7 ±246.8					
2183 (모관주)	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	
2730 (모관주)	41	63	18.0±2.8	30.4±5.9	11.1	872.7	얇은갈대기	회색	회색	+	

표 2.28 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (2194 x 2344)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	자모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-823	37	55	15.3±0.6	51.3±8.1	14.7	1521	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-832	24	34	17.0±0.0	55.7±4.0	14.7	1273	오목반구형	회갈색	회갈색	+++	
KKU-831	24	72	17.0±1.7	34.0±8.5	13.3	1202	오목반구형	진회색	진회색	++	++
KKU-803	32	55	15.0±1.0	47.3±7.1	10.7	1161	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-836	42	69	13.0±0.0	15.3±5.5	9.3	1132	얇은깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-817	26	38	14.7±0.6	80.0±14.8	16.0	1114	얇은깔대기형	진회갈색	진회갈색	+	
KKU-822	25	41	14.0±0.0	53.3±5.8	12.0	1046	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-804	37	55	17.0±1.0	25.3±4.7	12.7	1036	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	+
KKU-801	32	55	13.7±0.6	43.7±7.2	10.7	1010	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-833	29	55	14.0±2.0	51.7±1.5	12.0	973	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-827	32	55	12.3±2.1	77.3±4.6	11.3	823	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-825	45	64	12.7±0.6	41.3±16.4	8.0	809	깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-808	40	65	12.7±1.5	48.7±8.5	10.0	783	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-805	37	55	16.0±1.0	56.0±3.6	16.0	781	얇은깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-802	32	58	17.0±1.0	58.3±5.1	13.3	780	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-828	34	59	10.0±2.0	36.7±3.5	8.7	737	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-839	32	48	19.0±1.0	32.3±5.5	12.0	732	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-816	53	72	8.7±0.6	20.0±2.0	6.0	723	얇은깔대기형	연회색	연회색	+	
KKU-835	42	55	14.7±0.6	38.3±7.6	14.7	721	오목반구형	진회색	진회색	+++	+++
KKU-809	37	55	14.7±3.1	36.7±5.8	10.7	673	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-837	29	43	18.0±1.0	53.3±5.8	15.3	649	오목반구형	흑회색	회색	++	
KKU-815	36	55	14.7±1.5	31.3±7.1	9.3	617	얇은깔대기형	진회색	회색	+	+++
KKU-811	39	51	15.0±0.0	27.3±2.3	7.3	616	오목반구형	진회갈색	진회갈색	+	
KKU-834	48	63	11.0±1.7	20.0±1.7	7.3	542	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-826	48	69	11.3±2.3	21.7±4.5	9.3	539	얇은깔대기형	회색	회색	+	
KKU-812	33	59	12.0±1.7	59.0±12.8	8.7	533	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-818	55	108	15.3±0.6	54.0±5.3	16.0	527	얇은깔대기형	진회갈색	회색	+++	
KKU-838	37	69	9.0±1.0	16.0±2.6	8.7	481	얇은깔대기형	회색	회색	+	
KKU-840	33	118	13.3±1.5	33.3±5.8	11.7	450	얇은깔대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-814	40	52	15.0±1.0	20.3±3.1	10.7	399	얇은깔대기형	흑회색	흑회색	+	
KKU-800 (평균)	36±8	60±17	14.1±2.7	41.3±17.8	11.4 ±2.8	817.0 ±273.3					
2194 (모균주)	44	72	14.7±1.8	24.2±15.3	8.7	870.3	오목반구	회색	회색	++	+
2344 (모균주)	22	35	15.0±1.4	48.4±4.9	17.0	1567.0	얇은깔대기	진회갈색	진회갈색	++	

표 2.29 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (2194 x 2730)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-1059	39	59	16.3±1.5	29.7±0.6	7.3	1447	얇은깔대기형	회색	회색	++	
KKU-1053	42	56	19.3±1.2	24.7±2.5	14.7	1272	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1022	44	55	16.3±2.9	61.3±1.5	18.0	1268	깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1015	40	55	24.0±1.0	35.0±5.0	18.0	1263	오목반구형	진회색	진회색	+	
KKU-1052	39	55	15.7±2.3	33.0±2.6	12.7	1252	깔대기형	진회색	회색	++	
KKU-1054	39	58	16.0±1.0	41.7±7.6	10.7	1244	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-1029	39	55	14.3±1.2	44.0±6.1	10.0	1135	깔대기형	회색	회색	++	
KKU-1051	39	55	15.7±0.6	35.0±8.7	12.7	1110	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-1055	40	55	17.0±0.0	27.0±3.6	10.7	1107	얇은깔대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1061	40	59	15.3±1.5	30.3±4.5	7.3	1091	오목반구형	회색	연회색	++	
KKU-1012	39	58	17.3±1.2	35.7±7.5	12.0	1081	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-1028	39	48	18.3±1.5	45.0±3.0	16.0	1080	깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-1045	45	63	16.7±0.6	17.7±2.1	6.0	1075	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-1039	40	58	18.7±1.5	40.0±5.0	14.0	1065	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-1062	39	59	15.0±1.0	33.3±6.7	10.7	1046	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-1060	39	59	16.3±1.2	22.7±9.3	9.3	1017	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-1037	40	59	21.3±2.3	19.0±3.0	10.7	1000	얇은깔대기형	회색	회색	++	
KKU-1050	37	58	15.0±2.0	31.0±1.7	8.0	992	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-1025		71	21.0±3.0	34.3±3.8	18.0	986	깔대기형	진회색	진회색	+	
KKU-1033	42	63	15.0±1.0	19.7±0.6	8.7	983	얇은깔대기형	회색	회색	++	
KKU-1036	39	55	16.3±0.6	32.7±7.5	10.7	952	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-1003	41	58	17.3±2.1	48.3±7.6	19.3	947	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-1049	43	63	16.0±3.5	20.0±0.0	8.7	945	얇은깔대기형	연회색	연회색	+++	
KKU-1004	40	58	12.3±0.6	19.0±1.7	8.0	943	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-1046	43	64	15.0±1.7	29.7±0.6	8.7	912	얇은깔대기형	회색	회색	++	

KKU-1032	51	65	18.3±1.2	29.7±0.6	12.7	887	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-1034	45	69	16.0±1.0	37.0±2.6	10.0	878	얇은갈대기형	연회색	연회색	++	
KKU-1017	54	69	22.3±2.1	18.0±4.6	12.0	863	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1047	40	58	17.3±1.5	43.0±2.0	10.7	822	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-1006	38	60	15.7±0.6	39.7±9.5	10.7	813	얇은갈대기형	회색	연회색	++	
KKU-1013	41	64	15.3±1.5	37.7±6.4	11.3	805	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-1007	37	58	18.3±1.2	33.7±3.1	11.3	786	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-1038	41	34	15.0±0.0	19.3±3.8	8.7	780	얇은갈대기형	연회색	연회색	+++	
KKU-1064	45	72	14.3±0.6	27.7±6.0	7.3	771	오목반구형	회색	연회색	++	
KKU-1056	41	59	16.0±1.0	24.3±3.8	9.3	755	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-1014	41	58	19.0±2.0	36.3±3.2	12.0	751	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-1063	39	56	20.0±1.0	35.0±4.4	13.3	747	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-1016	55	78	35.7±2.5	49.7±2.1	28.7	723	갈대기형	회색	회색	+	
KKU-1005	39	59	14.0±1.0	28.3±2.9	9.3	705	얇은갈대기형	진회색	회색	++	
KKU-1001	40	59	17.3±2.1	25.3±4.7	9.3	688	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1009	39	55	19.3±0.6	46.7±2.9	14.7	676	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-1030	36	55	13.7±1.5	50.7±16.8	10.7	636	오목반구형	연회색	연회색	++	
KKU-1002	40	58	18.0±1.0	47.0±6.1	12.0	625	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-1021	45	69	14.0±1.7	19.3±2.1	8.0	610	얇은갈대기형	연회색	연회색	++	
KKU-1057	48	64	19.3±3.5	16.3±3.2	8.0	563	얇은갈대기형	회색	회색	+	
KKU-1008	39	64	17.3±0.6	31.3±2.3	8.0	528	갈대기형	회색	연회색	+++	
KKU-1031	34	55	18.3±0.6	54.0±3.6	13.3	515	얇은갈대기형	진회색	진회색	+	+
KKU-1048	41	58	16.3±1.2	21.0±4.6	9.3	443	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-1041	41	58	20.7±1.2	30.7±4.0	9.3	270	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1000 (평균)	41±4	59±7	17.4±3.8	32.9±11.4	11.4 ±4.0	888.9 ±245.4					
2194 (모균주)	44	72	14.7±1.8	24.2±15.3	8.7	870.3	오목반구	회색	회색	++	+
2730 (모균주)	41	63	18.0±2.8	30.4±5.9	11.1	872.7	얇은갈대기	회색	회색	+	

표 2.30 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (2344 x 2730)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대굵기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	жат모양	жат색갈		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
KKU-1222	39	59	16.0±1.0	38.3±12.6	13.3	1283	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-1231	41	55	17.7±3.1	30.0±0.0	15.3	1283	얇은갈대기형	흑회색	흑회색	+++	++
KKU-1226	37	55	13.3±0.6	55.0±4.4	15.3	1250	얇은갈대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-1230	34	56	16.3±0.6	55.3±0.6	14.7	1220	오목반구형	진회색	진회색	++	+
KKU-1229	39	55	14.0±1.0	30.7±1.2	12.7	1213	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	+++
KKU-1238	43	58	14.0±1.0	27.0±2.0	11.3	1160	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1220	33	55	12.0±0.0	48.3±4.7	8.7	1134	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-1234	40	48	16.7±1.2	63.3±2.9	16.0	1109	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	+
KKU-1211	39	58	12.0±0.0	54.0±5.3	8.7	1104	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-1235	34	55	15.0±1.7	45.7±12.9	12.7	1089	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1239	45	69	17.0±2.6	20.3±6.7	10.7	1050	얇은갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-1207	41	65	12.3±1.2	41.0±1.7	10.0	1049	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1209	34	55	16.7±0.6	96.7±5.8	17.3	1047	오목반구형	진회색	회색	+++	
KKU-1225	33	48	20.0±2.0	46.0±1.0	18.7	1037	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1240	41	64	12.7±1.5	34.0±1.7	9.3	992	갈대기형	진회색	회색	+	
KKU-1237	34	48	23.3±2.9	48.3±5.8	18.0	876	갈대기형	진회색	진회색	++	++
KKU-1218	41	63	13.7±1.5	56.7±3.5	10.0	855	갈대기형	진회색	진회색	+++	+
KKU-1223	41	65	11.7±0.6	55.0±5.0	8.0	837	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1213	27	44	14.3±3.1	101.0±1.7	13.3	819	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1208	41	84	22.3±2.5	17.3±2.5	24.7	814	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-1212	34	45	19.7±4.7	45.0±5.0	16.0	796	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1219	34	48	14.7±0.6	79.3±4.0	18.0	790	갈대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-1210	29	45	13.3±0.6	105.0±5.0	14.0	787	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-1216	43	63	18.3±2.1	15.7±3.8	9.3	731	얇은갈대기형	진회색	회색	+	
KKU-1224	40	64	16.0±2.6	22.7±2.5	10.0	627	갈대기형	진회색	회색	++	
KKU-1206	39	65	12.3±1.2	39.0±1.7	10.0	613	오목반구형	회색	연회색	++	
KKU-1221	34	55	18.7±2.3	45.0±13.2	16.7	565	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-1200 (평균)	37±4	60±16	15.7±3.5	48.7±24.0	13.4 ±4.0	950.6 ±228.2					
2344 (모균주)	22	35	15.0±1.4	48.4±4.9	17.0	1567.0	얇은갈대기	진회갈색	진회갈색	++	
2730 (모균주)	41	63	18.0±2.8	30.4±5.9	11.1	872.7	얇은갈대기	회색	회색	+	

표 2.31 상자재배에 의한 교배 이핵교배 균주 자실체특성 (비임성 교배균주)

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 등 이
								초기	후기		
KKU-2124	38	55	16.3±1.2	60.0±8.9	17.3	1610	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-2126	37	48	19.0±2.0	43.0±10.4	17.7	1247	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-2074	43	65	11.7±1.2	15.7±3.1	8.0	1196	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-2029	37	55	20.7±3.2	31.0±5.2	17.3	1170	얇은갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-2027	25	41	17.7±1.2	27.7±5.9	13.0	1158	얇은갈대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-2077	53	69	15.3±2.5	32.7±2.5	13.3	1147	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-2025	31	45	27.3±1.5	39.3±9.7	16.0	1138	갈대기형	진회색	진회색	+	+++
KKU-2026	32	43	28.0±1.7	38.3±7.6	21.3	1126	갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-2101	41	65	12.7±1.5	39.7±2.5	9.3	1120	얇은갈대기형	회색	회색	+++	
KKU-2122	43	65	13.0±0.0	48.0±5.3	12.0	1098	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-2049	37	55	15.0±1.0	53.7±1.5	12.0	1023	얇은갈대기형	회색	회색	++	
KKU-2105	37	55	14.0±0.0	41.3±5.1	12.0	1022	오목반구형	진회색	회색	+++	++
KKU-2081	39	55	14.3±2.5	53.3±2.9	14.0	1015	얇은갈대기형	진회색	진회색	+++	
KKU-2011	48	69	14.3±1.5	52.3±2.5	10.7	1013	갈대기형	회색	회색	++	
KKU-2125	40	58	13.7±0.6	38.3±2.9	9.3	997	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-2106	34	55	13.3±0.6	33.7±7.1	10.7	977	얇은갈대기형	진회색	회색	++	
KKU-2087	32	48	13.7±3.8	64.3±22.9	12.0	919	갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-2028	41	64	15.3±3.1	42.0±7.5	12.7	915	얇은갈대기형	진회색	회색	++	
KKU-2109	33	56	15.7±1.2	63.3±10.4	15.3	878	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-2128	33	55	12.7±1.2	55.0±5.0	12.7	869	갈대기형	진회색	진회색	++	
KKU-2072	40	56	19.3±1.2	45.0±5.0	16.0	856	오목반구형	진회색	진회색	+++	
KKU-2102	41	59	17.7±1.2	40.0±1.0	12.0	805	얇은갈대기형	회색	회색	+++	
KKU-2103	34	58	12.7±1.2	51.3±4.0	8.7	795	오목반구형	진회색	회색	+++	
KKU-2104	37	58	11.0±0.0	38.3±6.5	6.7	789	오목반구형	회색	회색	+++	
KKU-2108	37	55	16.0±4.6	58.7±6.1	18.0	760	오목반구형	진회색	회색	++	
KKU-2024	25	41	19.0±2.6	58.0±9.8	14.3	759	갈대기형	흑회색	흑회색	++	
KKU-2078	43	59	24.3±1.2	34.3±5.1	13.3	740	오목반구형	회색	회색	+	
KKU-2107	37	58	12.3±1.2	57.7±4.0	8.7	673	오목반구형	회색	회색	++	
KKU-2017	44	64	14.0±1.0	60.0±5.0	9.3	666	중고편평형	회색	회색	+++	
KKU-2071	45	63	17.0±1.7	50.0±5.0	14.0	624	얇은갈대기형	회색	회색	+++	
KKU-2084	42	63	15.3±1.5	25.0±8.7	11.3	605	오목반구형	진회색	진회색	++	
KKU-2129	33	56	12.0±1.7	46.7±2.9	10.7	288	갈대기형	진회색	진회색	+	
KKU-2000 (평균)	38±6	57±7	16.1±4.4	44.9±13.2	12.8 ±3.3	937.4 ±246.3					

표 2.32 상자재배에 의한 모균주 자실체특성

균주 번호	초발이 소요일 수(일)	수확일 수(일)	대꺾기 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g/개)	수량 (g/상자)	갓모양	갓색깔		다 발 성	균 덩 이
								초기	후기		
2344	22	35	15.0±1.4	48.4±4.9	17.0	1567.0	얇은갈대기	진회갈색	진회갈색	++	
2706	30	46	15.4±1.3	36.9±11.0	11.1	1298.3	오목반구	회색	회색	+++	++
2183	29	53	17.3±1.0	39.7±7.7	10.3	1217.7	오목반구	연회색	연회색	++	
2504	25	56	26.7±3.7	27.6±8.8	13.1	1021.3	얇은갈대기	진회색	진회색	++	
2730	41	63	18.0±2.8	30.4±5.9	11.1	872.7	얇은갈대기	회색	회색	+	
2194	44	72	14.7±1.8	24.2±15.3	8.7	870.3	오목반구	회색	회색	++	+
1982	39	61	14.3±1.4	60.0±13.4	11.7	803.7	갈대기	연회색	연회색	++	
2018	39	61	20.0±0.9	34.5±4.1	12.3	338.5	얇은갈대기	회색	연회색	+++	
모균주 (평균)	34±8	56±13	17.7±4.5	36.7±14.1	12.0 ±3.1	1,027.4 ±386.0					



KKU-105



KKU-201



KKU-416



KKU-728



KKU-823



KKU-1053



KKU-1222



KKU-2124

그림 2.13 2005년도 교배 이핵균주의 폐면상자재배에 의한 자실체 형태

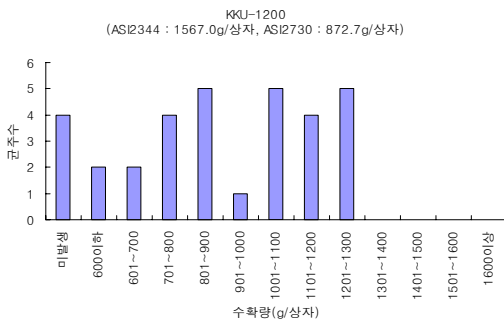
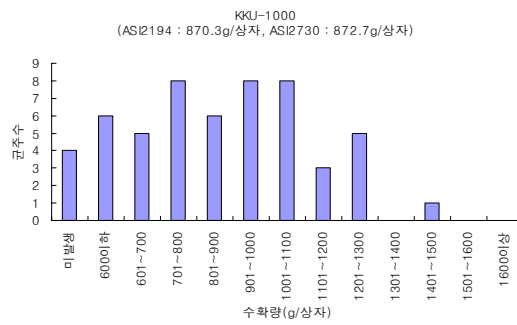
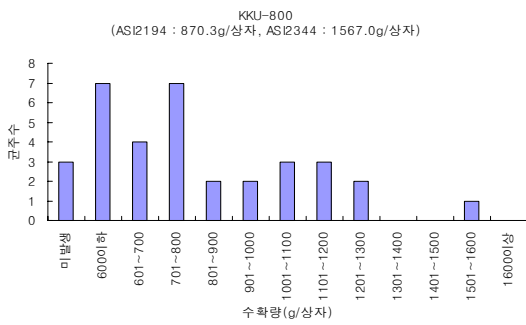
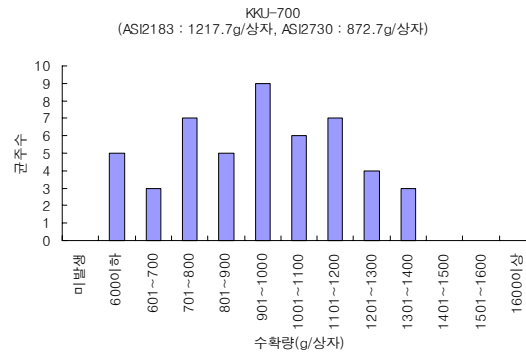
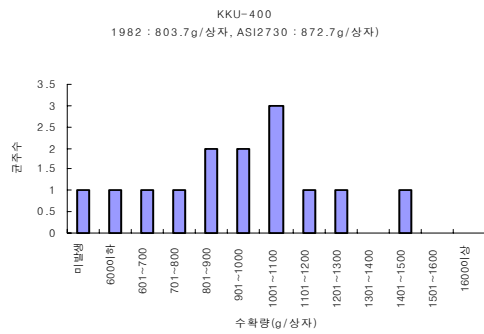
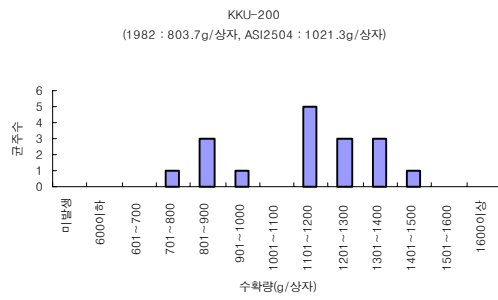
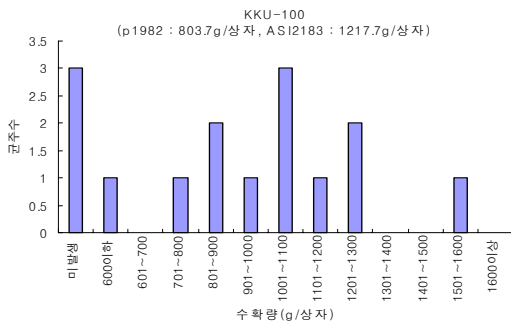


그림 2.14 2005년 교잡균주의 자실체 수량에 대한 분포.

제 3 절. 내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

느타리버섯에는 *Trichoderma* spp., *Hypocrea* spp. 등에 의한 푸른곰팡이병 또는 하이포크레아병, *Pseudomonas tolaasii*에 의한 세균성갈색무늬병(갈반병), oyster mushroom isometric virus (OMIV-I, OMIV-II)에 의한 바이러스병이 경제적 피해를 주는 주요 병해이다. 이들 병에 대한 저항성 육종이 모두 필요하지만 연구기간의 제약과 저항성 유전 및 저항성유전자원에 대한 기초자료의 부족 등으로 본 연구에서는 세균성갈색무늬병의 저항성 유전 및 육종에 집중하였다. 재배 현장에서 많은 경제적 피해에도 불구하고 느타리버섯에서 갈색무늬병에 대한 저항성에 대해서는 어떤 연구도 이루어지지 않아 이에 대한 정보가 전혀 없다. 문헌조사에 의하면 양송이에서 *P. tolaasii*에 의한 갈반병에 질적저항성은 존재하지 않으며 일반적으로 갈색종이 백색종이 보다 더 저항성이 크고, 저항성은 양적형질(QTL)에 의해 지배받는 것으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 저항성의 존재여부, 저항성 정도 파악, 저항성의 유전 및 육종에 등에 필수적인 저항성 검정법을 개발하고, 저항성 및 감수성 균주를 선발하여 이들 균주의 교배를 통해 얻은 F1세대에서 저항성 유전양식, 저항성이 우수한 교배균주를 이용한 저항성 품종 개발 연구를 수행하였다.

1. 세균성갈색무늬병 저항성 검정법 개발

느타리버섯의 세균성갈색무늬병(갈반병, bacterial brown blotch)에 대한 저항성을 정확하게 판별하는 검정법은 느타리버섯 병 저항성을 연구하는데 가장 중요한 도구이다. 이 저항성 검정법은 균주의 저항성을 쉽고 빠르게 정확하게 검정할 수 있는 방법이어야 한다. 특히 수백 또는 수천 개의 교배균주를 다루는 병 저항성 유전분석 또는 저항성 육종분야에서 저항성을 객관화할 수 있는 검정법은 필수적이다. 본 연구에서는 자실체를 이용한 저항성 검정법의 개발하였다.

가. 재료 및 방법

1) 버섯 배지 제작: 본 실험에는 3가지의 배지, 즉, 폐면배지, 압축배지®, 톱밥배지를 사용하였다. 폐면배지, 톱밥배지는 관행의 방법으로 조제하였으며, 압축배지(주성분 ; 볏짚, 톱밥, 면실피, 땅콩피, 옥피 등)는 부여의 (주)선농배지에서 구입하여 사용하였다. 각각의 배지를 식물조직배양용 플라스틱 용기에 폐면배지는 배지만 400 g, 톱밥배지는 배지 200 g과 증류수 250 ml, 압축배지는 배지 200 g과 증류수 220 ml를 넣어 혼합한 후 121℃, 30분간 고압멸균 한 뒤 20℃로 식혀서 사용하였다.

2) 느타리버섯 균사 접종 및 배양: PDA에서 약 1주일간 배양한 느타리 균총의 가장자리 부위를 cork borer No.2(직경 7 mm)로 떼어낸 다음 조제된 폐면, 압축, 톱밥배지의 표면에 5개의 조그만 구멍을 낸 후 각 구멍에 1개씩 이식 접종하였다. 접종한 배지는 충북대학교 식물외학과 버섯재배실에서 온도 27℃, 상대습도 90±3%의 조건으로 30일간 배양하였고, 자실체 발생을 유도하기 위해 4℃ 저온실에서 3일간 보관하여 저온 처리하였다. 저온 처리한 배양균을 다시 버섯재배실로 옮기고 온도 17-20℃ 상대습도 95±3%의 조건에서 자실체 발생을 유도하였다. 형성된 자실체를 수확하여 접종 실험에 사용하였다.

3) 병원세균의 접종: 세균성갈색무늬병 병원균 *P. tolaasii* 6680을 PAF에 접종하여 25℃에서 1일간 배양한 후 세균 세포를 취하여 멸균수로 세균현탁액을 만들었다. 분광광도계를 사용하여 현탁액의 탁도를 OD600=0.9(약 109 cfu/ml)로 조정하였고, 이 세균현탁액을 10배 희석법으로 희석하여 108 cfu/ml, 107 cfu/ml, 106 cfu/ml로 만들었다. 대조접종은 멸균수를 사용하였다. 사각 플라스틱 저장용기(lock and lock) 또는 쟁반에 물에 적신 종이타월을 깔고 그 위에 균주 별로 자실체의 갓과 대를 올려놓은 후 갓과 대에 3 μ l 또는 5 μ l의 세균현탁액을 점적 접종하였다.

4) 발병심각도 조사: 접종한 자실체를 2일간 20℃ 배양기에 둔 후 자실체 갓과 대에 나타난 변색과 파인 정도를 기준으로 발병심각도(disease severity)를 육안으로 조사하였다. 조사기준 0~3까지 4단계로 나누었다(Figure 3.1). 반복처리별 관측 값을 통계 프로그램인 SAS(ver. 8.1)를 사용하여 분산분석(ANOVA)과 Duncan 다중검정을 하여 처리 평균 간의 차이를 비교하였다. 또한 Duncan 검정결과를 좀 더 쉽게 나타내기 위하여 수치화하여 표시하였다(Table 3.2).

5) 디지털 사진 및 포토샵 프로그램 이용한 저항성검정의 결과의 객관화: 병징이 나타난 자실체를 디지털 카메라로 사진을 촬영하였다. 이때 사진 한 면의 4각 모퉁이의 빛(조도)을 동일하도록 조명을 조정하였다. 카메라의 사진을 컴퓨터에 저장하고 저장된 사진을 불러와 먼저 육안으로 발병심각도[-(0), +(1), ++(2), +++(3), (Figure 3.1)] 조사하였다. 병징 사진을 Photoshop 프로그램에서 불러와 병징과 주위의 배경의 RGB, L, a, b 값을 구해 평균값을 구하고 발병심각도를 가장 잘 나타낼 수 있는 parameter를 찾았다.

나. 결과 및 고찰

1) 자실체와 대에서 발병심각도 결과

느타리버섯 자실체의 대와 갓 위에 세균현탁액 5 μ l를 점적한 후 나타난 병징의 발병심각도를 조사한 결과 대에서보다 갓에서 심각도가 높았으며 균주간의 차이도 더 나타내었

다. 또한 접종한 세균의 농도가 높을수록 발병심각도가 높았다(data not shown). 세균농도 별 균주간의 발병심각도 차이는 10^6 cfu/ml에서는 균주 간 차이를 거의 나타내주지 못했으며, 10^8 cfu/ml과 10^7 cfu/ml 접종은 균주간의 차이를 보여주었다(Table 3.3).

느타리 갓에 접종한 결과로 보면 사철느타리2호(CBNU 9)와 여름느타리2호(CBNU11)의 병징심각도가 가장 낮았으며(Table 3.3에서 숫자의 합이 클수록 병징심각도는 낮고 반대로 숫자의 합이 낮을수록 병징심각도는 크다) 신농94(CBNU 25)와 장안7(CBNU124)의 심각도가 높았다.

2) 디지털 사진 및 포토샵을 이용한 결과

균주간의 차이를 더 크게 하기 위하여 접종세균의 농도를 높이고, 균주간의 발병심각도를 수치화하여 저항성의 정도를 양적으로 표현하면서 보다 객관적인 결과를 얻기 위해 포토샵을 이용하여 발병심각도를 측정하였다.

Table 3.4-5 에서 보면 자실체 위에 형성된 병반의 발병심각도를 눈으로 읽은 결과와 Photoshop index 중에서 b 값이 매우 잘 일치하고 있음을 알 수 있다. 즉 -는 0으로, +은 약 10, ++은 약 20, +++은 30 이상으로 나타났다. 이 값은 병반 주위의 건전부위 index 값을 뺀 값으로 느타리 자실체 색과 상관없이 병징의 정도를 양적으로 표현 할 수 있는 좋은 지표가 될 수 있음을 의미한다.

세균현탁액을 자실체 갓 위에 접종할 때 현탁액 방울이 맺히는 갓(O)과 맺히지 않고 바로 퍼지는 갓(X), 그리고 중간 정도의 갓(Δ)이 있었는데, 이 방울 맺힘과 발병심각도와 잘 일치하고 있음을 또한 볼 수 있다.

3) 고찰

본 실험에서 느타리버섯의 세균성갈색무늬병에 대한 저항성을 측정하는 생물검정법을 개발하고자 하였는데, 버섯 자실체에 병원세균 *P. tolaasii* 현탁액을 접종하여 균주 간 병반심각도의 차이를 구분할 수 있는 방법을 정립하였다. 본 실험결과를 종합하면 자실체 갓 위에 *P. tolaasii* 현탁액 10^8 cfu/ml, 10^9 cfu/ml를 접종 후 육안으로 발병심각도를 읽어 균주간의 차이를 구분할 수 있다. 이 실험에서 다양한 요인이 실험오차를 매우 크게 할 수 있다. 즉 자실체의 상태(발육 온도, 습도, 광도 등), 병원균의 상태(농도, 생리적 활성), 접종조건 등 많은 요인이 작용하여 실험간 차이를 크게 할 수 있다. 따라서 실험결과 재현성을 유지하기 위해서는 위와 같은 조건이 최대한 균일하도록 해야 한다.

포토샵을 이용한 발병심각도의 수치화는 b값이 육안 검사 결과와 매우 유사한 값을 주었지만 반복실험의 결과 병반의 어느 부위를 읽느냐에 따라 b값의 차이가 매우 컸다. 현재로는 b값을 이용한 수치화는 이러한 기술적 문제를 해결해야 하는 문제점이 있다. 따라서 실험자의 판단에 의존하는 육안으로 읽는 방법이 현재까지는 가장 효과적인 방법이다.

본 실험에서 얻은 발병심각도가 균주의 진정한 포장저항성을 나타내느냐는 큰 의문에는

앞으로 좀 더 많은 실증실험이 따라야겠지만, 양송이 세균성갈색무늬병에 대한 저항성 연구결과 갯에서의 발병심각도와 포장저항성과 일반적으로 일치하는 경향이라는 보고가 있어 느타리 경우에도 둘 사이에 정의 상관관계가 있을 가능성이 크다. 많은 수의 자손을 분석해야 하는 저항성 유전분석 및 육종, 그리고 지금까지 등록하는 품종의 이 병에 대한 저항성 판별기준이 없는 상황에서 이 방법은 제한적이거나 매우 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

Table 3.1 *Pleurotus* species used in this study

Strain	Scientific Name	Variety Name or Source
CBNU 1	<i>P. ostreatus</i>	Nonggi 2-1
CBNU 2	<i>P. florida</i>	Sachulneutari
CBNU 3	<i>P. ostreatus</i>	Nonggi 201
CBNU 4	<i>P. ostreatus</i>	Nonggi 202
CBNU 5	<i>P. sajor-caju</i>	Yeureumneutari
CBNU 6	<i>P. ostreatus</i>	Wonhyeungneutari 1
CBNU 8	<i>P. ostreatus</i>	Wonhyeungneutari 2
CBNU 9	<i>P. florida</i>	Sachulneutari 2
CBNU 11	<i>P. sajor-caju</i>	Yeureumneutari 2
CBNU 12	<i>P. ostreatus</i>	Wonhyeungneutari 3
CBNU 13	<i>P. ostreatus</i>	Chunchuneutari 1
CBNU 14	<i>P. ostreatus</i>	Chunchuneutari 2
CBNU 15	<i>P. eryngii</i>	Keunneutari
CBNU 20	<i>P. sajor-caju</i>	Yeureumneutari(Sambok)
CBNU 21	<i>P. ostreatus</i>	Heukjinju(AM258)
CBNU 22	<i>P. ostreatus</i>	Cheongpung
CBNU 23	<i>P. ostreatus</i>	Myeongwol
CBNU 25	<i>P. ostreatus</i>	Shinnong 94
CBNU 26	<i>P. ostreatus</i>	Suhan 2
CBNU 27	<i>P. ostreatus</i>	Suhan 3
CBNU 28	<i>P. ostreatus</i>	Ilsung 2
CBNU 29	<i>P. ostreatus</i>	Shinnong 8
CBNU 30	<i>P. ostreatus</i>	Jangan PK
CBNU 34	<i>P. ostreatus</i>	Jangan 2
CBNU 43	<i>P. ostreatus</i>	Jangan 6
CBNU 45	<i>P. ostreatus</i>	DH1012
CBNU 47	<i>P. ostreatus</i>	Shinnong 12
CBNU 50	<i>P. ostreatus</i>	Cheongdo 22
CBNU 56	<i>P. ostreatus</i>	Bupyeongheukdan 4
CBNU 77	<i>P. floridanus</i>	Jinmi
CBNU 81	<i>P. pulmonarius</i>	Backdu 1
CBNU 82	<i>P. pulmonarius</i>	KCTC 26070
CBNU 84	<i>P. sapidus</i>	KCTC 26072
CBNU 91	<i>P. salmoneostramineus</i>	KCTC 26117
CBNU 92	<i>P. ostreatus</i>	KCTC 26118
CBNU 94	<i>P. sapidus</i>	KCTC 26122
CBNU 95	<i>P. pulmonarius</i>	KCTC 26124
CBNU 103	<i>P. columbinus</i>	KCTC 26135
CBNU 107	<i>P. columbinus</i>	KCTC 26051
CBNU 118	<i>P. ostreatus</i>	Bupyeongheukdan 4
CBNU 119	<i>P. ostreatus</i>	Sodang
CBNU 120	<i>P. ostreatus</i>	heukbae
CBNU 121	<i>P. ostreatus</i>	Bupyeongsoyeop 1
CBNU 122	<i>P. ostreatus</i>	Bupyeongbokhoi
CBNU 123	<i>P. ostreatus</i>	Yeongnong 1
CBNU 124	<i>P. ostreatus</i>	Jangan 7
CBNU 125	<i>P. ostreatus</i>	Samguhwanghak

Table 3.2 Value for Duncan's group against bacterial brown blotch disease

Duncan's group	Value
All group with 'a'	1
All group with 'b'	2
All group with 'c'	3
All group with 'd'	4
All group with 'e'	5
All group with 'f'	6
All group with 'g'	7

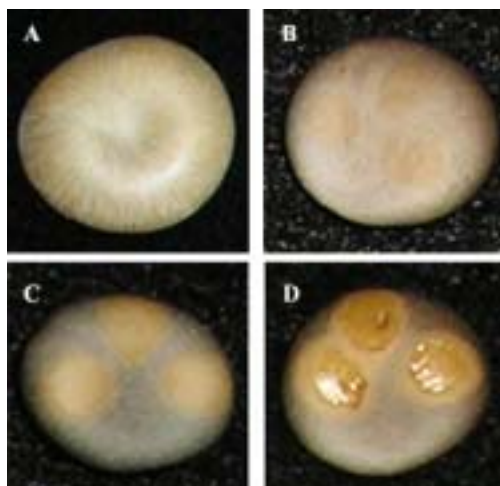


Figure 3.1 Index standard for photoshop analysis of bacterial brown blotch symptom on pileus. A: -, B: +, C: ++, D: +++.

Table 3.3 Duncan's group and sum of value of the cultivated oyster mushroom based on symptoms on pileus and stripe inoculated with *Pseudomonas tolaasii*.

Strains	Pileus			Sum of value	Stipe			Sum of value
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶		10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	
CBNU 1	def	de	e	13	bcdef	ab	b	5
CBNU 2	efg	e	e	15	cdefgh	b	b	7
CBNU 3	cde	de	de	11	fgh	ab	b	9
CBNU 4	fg	de	e	15	bcdefgh	ab	b	5
CBNU 5	cdef	e	e	13	bcdefgh	ab	b	5
CBNU 6	bc	bcd	e	9	ab	ab	b	4
CBNU 8	abc	bcd	de	7	abc	ab	b	4
CBNU 9	g	e	e	17	gh	b	b	11
CBNU 11	fg	e	e	16	efgh	b	b	9
CBNU 12	bcd	a	bc	5	abc	a	b	4
CBNU 13	bcd	abc	de	7	gh	ab	b	10
CBNU 14	bcd	bcd	e	9	bcde	b	b	6
CBNU 21	cdef	e	e	13	cdefgh	ab	b	6
CBNU 22	bc	e	e	12	cdefgh	ab	b	6
CBNU 23	ab	cde	de	8	bcdef	ab	b	5
CBNU 25	a	a	ab	3	efgh	ab	b	8
CBNU 27	def	ab	cd	8	a	ab	b	4
CBNU 30	efg	cde	e	13	bcdef	ab	b	5
CBNU 118	bc	de	e	11	defgh	ab	b	7
CBNU 119	def	e	e	14	cdefgh	ab	b	6
CBNU 120	cdef	de	de	11	abc	a	b	4
CBNU 121	bc	e	e	12	bcd	ab	b	5
CBNU 122	ab	ab	bc	4	bcdefg	ab	b	5
CBNU 123	ab	de	de	9	bcde	ab	b	5
CBNU 124	abc	a	a	3	abc	ab	a	3

Table 3.4 Results of eye index and Photoshop index of brown blotch on pileus inoculated with *P. tolaasii*, 10⁹ cfu/ml

Strain	Eye index	Photoshop index					Drop forming
		S	B	L	a	b	
CBNU 1	+++	25	9	4	0	35	O
CBNU 2	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 3	+++	26	1	-3	0	36	O
CBNU 5	++	18	2	-1	3	25	△
CBNU 8	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 9	+	17	0	-1	-10	13	O
CBNU 13	+	48	-7	-15	4	19	O
CBNU 14	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 21	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 22	+++	41	0	-7	1	43	O
CBNU 23	+++	51	-3	-1	-4	44	O
CBNU 25	+++	33	11	5	1	34	O
CBNU 27	+	17	1	-1	-3	13	X
CBNU 29	+++	55	-5	-13	7	41	O
CBNU 34	+	13	6	-1	1	12	X
CBNU 43	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 44	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 47	+++	28	5	-1	4	40	O
CBNU 50	+++	33	-2	-7	0	38	△
CBNU 56	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 82	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 84	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 92	+	10	0	-1	-5	12	X
CBNU 95	+++	39	21	14	4	38	O
CBNU 103	++	10	10	8	0	22	O

Table 3.5 Results of eye index and Photoshop index of brown blotch on pileus inoculated with *P. tolaasii*, 10⁸ cfu/ml

Strain	Eye index	Photoshop index					Drop forming
		S	B	L	a	b	
CBNU 1	++	1	13	10	1	18	O
CBNU 2	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 3	+	15	0	-3	0	12	O
CBNU 5	+	0	1	1	1	8	△
CBNU 8	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 9	-	0	0	0	0	0	O
CBNU 13	+	11	-2	22	0	8	O
CBNU 14	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 21	+	-4	10	11	-4	4	X
CBNU 22	+	20	-1	-1	-10	10	O
CBNU 23	-	0	0	0	0	0	O
CBNU 25	++	8	8	8	1	19	O
CBNU 27	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 29	+	10	-15	-15	-4	8	O
CBNU 34	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 43	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 44	+	10	-7	-6	-7	5	X
CBNU 47	-	0	0	0	0	0	O
CBNU 50	-	0	0	0	0	0	△
CBNU 56	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 82	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 84	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 92	-	0	0	0	0	0	X
CBNU 95	++	21	-5	-8	-8	19	O
CBNU 103	-	0	0	0	0	0	O

2. 세균성갈색무늬병 저항성 모균주 개발

본 연구에서 정립한 저항성검정법을 사용하여 본 연구를 위해 수집한 46균주(Table 3.1)의 세균성갈색무늬병 발병심각도를 조사하고, 저항성검정법 개발에 사용하여 얻은 균주별 발병심각도 결과를 종합하여 저항성 및 감수성 균주를 선발하였다.

가. 재료 및 방법

본 연구에 사용한 모든 재료 및 방법은 세균성갈색무늬병 저항성 검정법 개발 연구에 사용한 방법 및 재료와 동일하다.

나. 결과 및 고찰

1) 결과

본 연구에 사용한 46균주의 병반심각도를 조사한 결과 병반심각도가 1 미만으로 낮은 균주는 CBNU 26, 38, 53, 55, 59, 65 균주였으며, 병반심각도가 1.5 이상으로 높은 균주는 CBNU 3, 6, 25, 39, 43, 54, 57 균주이었다. 전체 발병심각도 3.0을 0.5씩 6단계로 구분하여 모든 균주의 발병심각도의 분포도를 그려본 결과(Figure 3.2) 전체 균주의 약 90%가 발병심각도의 중간 값인 1.5 이하로 분포되었다.

2) 고찰

본 실험의 결과 저항성검정법 개발 실험에서 지적한대로 균주에 따라 독립적인 실험간 발병심각도에 차이가 있었다. 이러한 문제점에도 불구하고 발병심각도 결과는 균주 간 차이를 보여주었다. CBNU 26을 포함한 6개의 균주가 저항성 균주로 나타나 이들 균주는 저항성 육종의 모본으로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다. 본 연구과정에서 국내에서 품종화된 균주 외에 야생종 균주를 구하기 힘들었다. 앞으로 보다 많은 야생종을 수집하여 검정한다면 보다 다양한 균주가 저항성 모본으로 사용될 수 있을 것이다. 또한 상업화를 떠나서 연구자가 사용할 수 있는 개방된 느타리 균주 은행의 설립 및 활성화가 새로운 느타리 품종 육종의 활성화에 꼭 필요함을 더욱 실감하였다.

균주의 발병심각도의 분포도를 보면 이 연구에 사용한 균주들이 발병심각도가 낮은 쪽으로 분포되어 있음을 알 수 있다. 즉 균주의 분포도와 교배주의 분포도(Figure 4)와 비교하면 그 차이가 확실히 해진다. 본 연구에 사용한 균주들이 모두 품종화된 균주임을 감안하면 국내 느타리 품종들에 세균성갈색무늬병에 대한 저항성인자를 가지고 있는 것으로 판단된다.

Table 3.6 Disease severity on the pileus of the strains of *Pleurotus* species

Strain	1st Exp. (Mean±SD)	2st Exp. (Mean±SD)	3rd Exp. (Mean±SD)	Overall (Mean±SD)
CBNU 1	1.33±0.49			1.33±0.49
CBNU 2	1.00±0.00			1.00±0.00
CBNU 3	1.58±0.51		1.50±0.45	1.54±0.48
CBNU 4	1.17±0.41			1.17±0.41
CBNU 5	1.43±0.51		1.33±0.65	1.38±0.58
CBNU 6		1.50±0.55		1.50±0.55
CBNU 7	1.29±0.47		1.33±1.06	1.31±0.77
CBNU 9	1.00±0.00			1.00±0.00
CBNU 14	1.10±0.32			1.10±0.32
CBNU 16	1.06±0.25			1.06±0.25
CBNU 17	1.00±0.00	1.17±0.75		1.09±0.38
CBNU 18	1.06±0.57	1.17±0.41		1.12±0.49
CBNU 20	1.33±0.49			1.33±0.49
CBNU 21	1.33±0.52	1.00±1.26		1.17±0.89
CBNU 22	1.40±0.70			1.40±0.70
CBNU 25	1.50±0.52			1.50±0.52
CBNU 26			0.63±0.52	0.63±0.52
CBNU 27	1.00±0.39			1.00±0.39
CBNU 28	1.50±0.71			1.50±0.71
CBNU 29	1.20±0.42	1.50±0.55		1.35±0.48
CBNU 33	1.00±0.00	1.17±0.75		1.09±0.38
CBNU 34	1.60±0.84		0.75±0.74	1.18±0.79
CBNU 38	1.13±0.35		0.75±1.04	0.94±0.70
CBNU 39	2.13±0.99		1.50±0.80	1.82±0.90
CBNU 43		1.50±0.55		1.50±0.55
CBNU 44	1.33±0.52	1.63±0.92		1.48±0.72
CBNU 45	1.38±0.52	1.40±0.84		1.39±0.68
CBNU 46	1.33±0.52			1.33±0.52
CBNU 47	1.10±0.32			1.10±0.32
CBNU 49	1.00±0.53			1.00±0.53
CBNU 50	1.63±0.52		1.20±0.67	1.42±0.60
CBNU 51	1.42±0.51	1.50±0.53		1.46±0.52
CBNU 53			0.50±0.53	0.50±0.53
CBNU 54	1.83±0.75		1.30±0.67	1.57±0.71
CBNU 55	0.83±0.41	0.83±0.75		0.83±0.58
CBNU 56	1.00±0.63			1.00±0.63
CBNU 57	1.33±0.52		2.00±1.05	1.67±0.79
CBNU 58	1.00±0.53	1.10±0.57		1.05±0.55
CBNU 59	0.83±0.41			0.83±0.41
CBNU 60	1.00±0.00	1.50±0.76		1.25±0.38
CBNU 61	1.25±0.46	1.50±0.76		1.38±0.46
CBNU 62	1.33±0.52	1.36±0.63		1.35±0.57
CBNU 64	1.00±0.63		1.63±0.52	1.32±0.58
CBNU 65	0.50±0.55			0.50±0.55
CBNU 77	1.00±0.00			1.00±0.00
CBNU 80	1.33±0.52			1.33±0.52

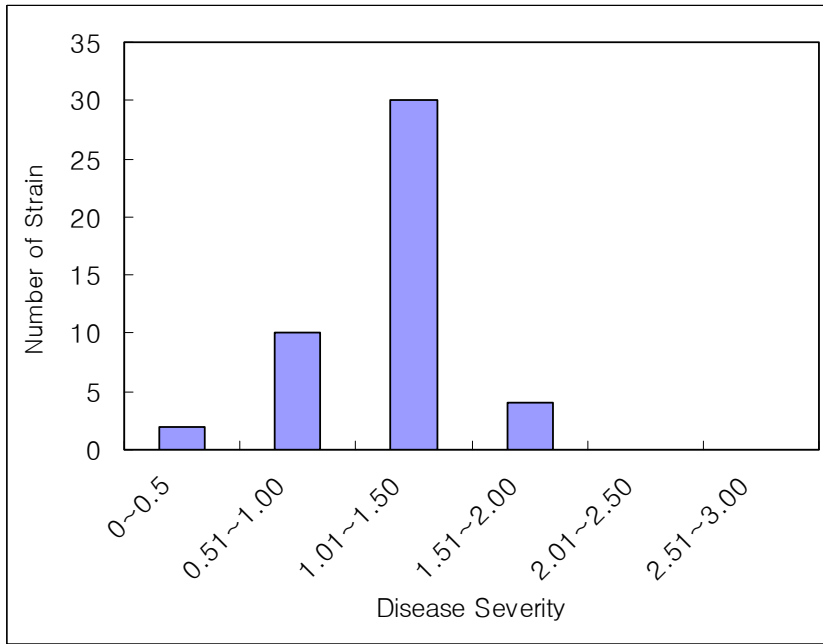


Figure 3.2 Distribution pattern of disease severity of the strains of *Pleurotus* species

3. 세균성갈색무늬병 저항성에 대한 유전분석

본 연구에서는 저항성 모균주 선발연구 결과로 얻어진 발병심각도가 낮은 CBNU 9(*P. florida*) 균주와 높은 CBNU 25(*P. ostreatus*) 균주를 각각 저항성 및 감수성 모균주로 하여 이들 균주의 교배를 통해 얻은 자손들의 발병심각도를 분석하여 저항성인자의 유전을 분석하고자 하였다.

가. 재료 및 방법

1) 느타리 버섯의 배양, 재배 및 자실체 유도, 병원세균의 조제 및 접종, 발병심각도 조사 등은 모두 저항성 검정법 개발 및 모균주 선발 연구에 사용한 방법과 동일한 방법 및 재료를 사용하였다.

2) 단포자 분리 및 단핵균주간 교배 : 교배 모균주의 자실체를 얻어 멸균 Petri dish에 놓고 27°C 배양기에 24시간 두어 포자를 얻었다. 얻어진 포자로 현탁액을 만든 후 10배 희석법으로 희석한 희석액을 PDA 배지에 도말하여 단일 균총을 얻었다. 각각의 단일 균총의 균사를 MEA 배지에 이식하여 배양하고, 자란 균사에서 clamp connection 형성 여부를 조사하여 단핵균주를 확인하였다. 교배할 2개의 단핵균주를 MEA 배지에서 3-7일 동안 대치 배양한 교배시킨 다음 자란 균사의 clamp connection 형성 여부를 조사하여 교배 여부를 확인하였다.

3) Clamp connection 조사: 조사할 균사를 조금 떼 내어 슬라이드그라스 위에 놓고 1 μ g/ml의 DAPI 용액 10 μ l를 균사에 떨어뜨린 후 암실에서 5분간 염색하였다. 염색된 균사 위에 커버그라스를 덮고 emersion oil을 넣고 광학현미경 1000배로 관찰하여 clamp connection 형성유무를 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 저항성 균주와 감수성 균주의 교배 결과

저항성 모균주 CBNU 9(*P. florida*)와 감수성 모균주 CBNU 25(*P. ostreatus*)의 자실체로부터 각각 얻은 포자로부터 단포자 분리와 단포자 균주의 clamp connection을 확인하여 CBNU 9번 균주로부터 100개(9-1~100)와 CBNU 25번 균주로부터 119개(25-1~119)의 단핵균주를 얻었다. 9번 단핵균주 각각에 25번 단핵균주를 조합하여 총 2106 조합의 교배를 실시하여 642개의 교배균주를 얻었다(Table 3.7). 균주별 조합에 차이가 있었지만 교배균주의 약 44%가 clamp connection이 형성되는 것으로 나타났다. 그런데 이 확률은 실제보다

약간 높은 값이다. 왜냐하면 교배 후 근사 생장이 좋지 않은 조합은 clamp connection 확인에서 제외했기 때문이다.

일부 교배균주의 자실체를 얻어 특성을 조사한 결과 교배균주별로 자실체의 색깔, 형태, 병에 대한 저항성에 있어서 매우 다양한 자실체가 발생하여 교배는 성공적으로 이루어 졌음을 확인 할 수 있었다(Figure 4).

2) 교배균주의 발병심각도

지금까지 273개의 교배균주 자실체를 이용하여 발병심각도를 조사하였다. 한 번의 독립된 실험에 6반복 실험하였으며 일부는 3번의 독립적 검정을 통해 발병심각도를 조사하였다(Table 8). 균주들의 발병심각도의 분포를 보면(Figure 3.4) 한쪽으로 치우침이 없이 정규분포를 보여주고 있다. 저항성 모균주로 사용한 CBNU 9(발병심각도 1)보다 발병심각도가 낮은 균주 수가 약 30균주이고, 소수의 균주가 매우 감수성인 2.0 이상의 발병도를 보여주었지만 전체 균주의 85% 이상이 발병도 1-2사이에 분포하고 있다.

3) 자실체의 소수성과 발병심각도

저항성검정법 개발을 위한 접종법에서 보여주었듯이 자실체에 세균현탁액이 방울로 맺어있는 경우 즉 갓 표면이 소수성인 경우 일반적으로 높은 발병심각도를 보여주었다. 본 연구에서 조사한 교배균주 1차 실험 결과로 얻어진 발병심각도와 자실체 갓의 소수성과의 관계를 t-test를 통해 알아보았다.

t-test 결과 O-△ 사이에는 $t_s = 1.4288 \leq t_{0.05(83)} = 1.9923$ 으로 ns이며, O-X 사이에는 $t_s = 3.98 \geq t_{0.05(91)} = 1.9897$ 로 * significant하며, △-X 사이에는 $t_s = 3.33 \geq t_{0.05(92)} = 1.9893$ 으로 * 하였다. 즉 O와 △와는 차이가 없으며, O나 △는 X와는 차이가 있다는 결과이다. 즉 갓 표면위의 소수성은 발병심각도와 관계가 있다 것을 의미한다.

4) 고찰

본 연구에서 저항성과 감수성 품종 간 교배를 통해 얻은 후손의 발병심각도를 조사한 결과 세균성갈색무늬병에 대한 저항성 유전은 단인자 또는 소수인자에 의해 결정되는 것이 아니라 여러 개의 인자 즉 다인자양적형질(QTL)에 의한 것으로 판단된다. 또한 본 연구를 통해 자실체의 소수성이 발병심각도를 결정하는 한 가지 인자임이 확인되었다. 자실체의 소수성이 어떻게 발병심각도에 영향을 미치는지에 대한 기작은 앞으로의 연구과제라 할 수 있다.

앞으로 본 연구에서 얻어진 자손 집단을 이용한 유전분석, 분자유전 마커 개발 등을 통한 QTL 유전연구는 느타리버섯에서 세균성갈색무늬병의 저항성 분자유종을 가능하게 할 것이며, 느타리 유전 및 육종의 발전에 초석이 될 것으로 믿는다.

Table 3.7 Results of mating between monokaryon strains of CBNU 9 and CBNU 25

Mating combination	No. of mating did not form clamp connection	No. of mating did form clamp connection	Total number of mating
9-2× 25*	30	18	48
9-3× 25	10	2	12
9-4× 25	24	18	42
9-5× 25	14	14	28
9-6× 25	27	11	38
9-7× 25	13	12	25
9-8× 25	34	9	43
9-9× 25	32	9	41
9-12× 25	58	19	77
9-13× 25	76	18	94
9-14× 25	47	25	72
9-22× 25	54	32	86
9-23× 25	87	14	101
9-24× 25	57	31	88
9-26× 25	70	19	89
9-27× 25	46	27	73
9-29× 25	42	24	66
9-30× 25	26	15	41
9-32× 25	51	21	72
9-34× 25	60	28	88
9-35× 25	38	25	63
9-37× 25	44	25	69
9-38× 25	42	16	58
9-39× 25	58	15	73
9-40× 25	55	24	79
9-41× 25	62	25	87
9-42× 25	44	21	65
9-43× 25	32	23	55
9-44× 25	46	22	68
9-45× 25	30	21	51
9-46× 25	34	22	56
9-47× 25	66	19	85
9-48× 25	56	18	73
Total	1464	642	2106



Figure 3.3 Some of the fruiting body from the CBNU 9 X CBNU 25 mating strains. Color, shape and disease severity of the fruiting body were different each other.

Table 3.8 Disease severity on the pileus of the mating strains of CBNU 9 xCBNU 25

Mating strain	1st Exp. (Mean±SD)	Drop form	2nd Exp. (Mean±SD)	Drop form	3rd Exp. (Mean±SD)	Drop form	Overall (Mean±SD)
CBNU 925-1			1.50±0.55	△	1.50±0.97	△	1.50±0.76
CBNU 925-2			1.50±0.93	△	0.80±0.63	O	1.15±0.78
CBNU 925-5			1.50±0.48	△	2.17±0.98	△	1.74±0.73
CBNU 925-6	1.33±0.52	△					1.33±0.52
CBNU 925-7			1.67±0.89	△			1.67±0.89
CBNU 925-10			1.25±0.71	△	1.40±0.97	△	1.33±0.84
CBNU 925-11					1.20±1.03	△	1.20±1.03
CBNU 925-12			1.33±0.52	△	1.17±0.41	△	1.25±0.47
CBNU 925-13			1.30±0.95	O			1.30±0.95
CBNU 925-14			2.17±0.75	O	1.20±0.74	O	1.64±0.75
CBNU 925-18			1.38±0.52	X			1.38±0.52
CBNU 925-19	1.83±0.75	△	1.83±0.98	△	1.00±0.00	△	1.55±0.38
CBNU 925-22	1.33±0.82	O			1.63±0.92	△	1.48±0.87
CBNU 925-23			1.70±0.95	△	1.33±0.45	△	1.52±0.70
CBNU 925-24					1.33±0.52	O	1.33±0.52
CBNU 925-26			1.28±0.75	△			1.28±0.75
CBNU 925-29			2.17±0.98	O	1.83±0.98	X	2.00±0.98
CBNU 925-30			1.33±0.82	△	1.50±0.53	△	1.42±0.68
CBNU 925-35	0.83±0.98	△					0.83±0.98
CBNU 925-40			2.00±0.63	△			2.00±0.63
CBNU 925-43					1.38±0.52	△	1.38±0.52
CBNU 925-48			1.00±0.74	△	0.92±0.29	△	0.96±0.52
CBNU 925-49	1.00±0.63	X					1.00±0.63
CBNU 925-50	0.83±0.75	X			1.25±0.46	△	1.04±0.60
CBNU 925-52					1.60±0.70	△	1.60±0.70
CBNU 925-58			1.50±0.53	O	1.25±0.75	△	1.38±0.64
CBNU 925-59			1.21±0.89	△	1.30±0.82	△	1.26±0.85
CBNU 925-62			1.67±0.82	△			1.67±0.82
CBNU 925-63					1.13±0.83	△	1.13±0.83
CBNU 925-64					1.42±0.79	△	1.42±0.79
CBNU 925-66					1.50±1.22	△	1.50±1.22
CBNU 925-67					1.25±0.71	X	1.25±0.71
CBNU 925-68			1.17±0.75	△	0.75±0.57	△	0.96±0.66
CBNU 925-69			1.13±0.35	△	1.25±0.71	△	1.19±0.53
CBNU 925-70					2.00±0.89	O	2.00±0.89
CBNU 925-71					1.50±0.55	△	1.50±0.55
CBNU 925-75					1.63±0.74	△	1.63±0.74
CBNU 925-76			1.33±0.52	△	1.00±0.53	X	1.17±0.53
CBNU 925-78			1.33±0.52	△	1.25±0.46	△	1.29±0.49
CBNU 925-79					2.50±0.76	△	2.50±0.76
CBNU 925-82					1.42±0.89	△	1.42±0.89
CBNU 925-83			1.25±0.46	△	1.17±0.39	X	1.21±0.42
CBNU 925-84			1.33±0.52	△	1.00±0.82	X	1.17±0.67
CBNU 925-85			1.50±0.55	△	0.88±0.35	△	1.19±0.45

CBNU 925-89			1.25±0.71	△			1.25±0.71
CBNU 925-90	0.83±0.75	O			2.00±0.00	△	1.42±0.38
CBNU 925-91	0.75±0.46	O			0.50±0.55	△	0.63±0.51
CBNU 925-93					1.50±0.71	△	1.50±0.71
CBNU 925-94			1.29±0.73	△	1.75±0.71	△	1.52±0.72
CBNU 925-95			1.33±0.52	△	1.00±0.53	O	1.17±0.53
CBNU 925-96	1.17±0.75	X					1.17±0.75
CBNU 925-97	1.00±0.63	O	1.38±0.74	△	2.17±0.75	△	1.52±0.71
CBNU 925-101					1.83±0.98	△	1.83±0.98
CBNU 925-103	0.80±0.92	X					0.80±0.92
CBNU 925-105					1.38±1.04	X	1.38±1.04
CBNU 925-106					1.50±0.80	△	1.50±0.80
CBNU 925-107					1.75±0.89	X	1.75±0.89
CBNU 925-113	1.17±1.17	X	1.33±0.52	△	1.25±0.89	X	1.25±0.86
CBNU 925-115			1.20±0.42	X	0.80±0.42	X	1.00±0.42
CBNU 925-120			1.50±0.53	△	1.10±1.17	△	1.30±0.85
CBNU 925-123			1.50±0.80	△	2.00±0.76	△	1.75±0.78
CBNU 925-131					1.10±0.63	O	1.10±0.63
CBNU 925-133			1.50±0.76	△			1.50±0.76
CBNU 925-134					1.90±0.99	O	1.90±0.99
CBNU 925-135					0.80±0.42	△	0.80±0.42
CBNU 925-136					1.75±1.16	△	1.75±1.16
CBNU 925-137			1.50±0.93	△	1.20±0.42	O	1.35±0.68
CBNU 925-139			2.17±0.75	△	2.38±0.74	△	2.28±0.75
CBNU 925-141					1.33±0.82	△	1.33±0.82
CBNU 925-142	1.33±1.03	△			2.00±0.82	△	1.67±0.93
CBNU 925-147			1.33±0.59	△	1.30±0.95	△	1.32±0.77
CBNU 925-149			1.50±0.55	O			1.50±0.55
CBNU 925-151			1.50±0.52	△			1.50±0.52
CBNU 925-152					1.40±0.52	O	1.40±0.52
CBNU 925-156					1.00±0.00	△	1.00±0.00
CBNU 925-157	1.33±0.82	△					1.33±0.82
CBNU 925-158					2.13±0.64	△	2.13±0.64
CBNU 925-159			1.50±0.55	△			1.50±0.55
CBNU 925-162					0.88±0.64	△	0.88±0.64
CBNU 925-164					1.38±0.74	O	1.38±0.74
CBNU 925-166					1.70±0.95	△	1.70±0.95
CBNU 925-167			2.00±0.76	△	1.38±0.52	△	1.69±0.64
CBNU 925-168			2.00±0.89	O	1.33±0.52	△	1.67±0.70
CBNU 925-170			1.00±0.43	△			1.00±0.43
CBNU 925-171			1.33±0.52	△			1.33±0.52
CBNU 925-174			1.33±0.82	O			1.33±0.82
CBNU 925-175			1.17±0.75	△			1.17±0.75
CBNU 925-177					1.17±0.41	O	1.17±0.41
CBNU 925-178			1.70±0.82	△			1.70±0.82
CBNU 925-179			1.38±0.74	△			1.38±0.74

CBNU 925-181			1.17±0.41	△			1.17±0.41
CBNU 925-182			1.75±0.89	O			1.75±0.89
CBNU 925-188			1.50±0.92	△			1.50±0.92
CBNU 925-193			1.00±0.00	X			1.00±0.00
CBNU 925-194			1.50±0.55	O			1.50±0.55
CBNU 925-195			1.17±0.75	O			1.17±0.75
CBNU 925-201	1.00±1.10	X					1.00±1.10
CBNU 925-202			1.40±0.70	△			1.40±0.70
CBNU 925-203	1.17±0.41	△					1.17±0.41
CBNU 925-204					0.75±0.46	X	0.75±0.46
CBNU 925-208	1.17±0.41	△	1.67±0.82	O			1.42±0.61
CBNU 925-209			1.58±0.90	△			1.58±0.90
CBNU 925-210			1.83±0.98	△			1.83±0.98
CBNU 925-211			1.80±0.63	O			1.80±0.63
CBNU 925-217			1.20±0.53	△			1.20±0.53
CBNU 925-218	1.50±0.64	O					1.50±0.64
CBNU 925-228	1.00±0.00	△					1.00±0.00
CBNU 925-229			1.20±0.42	△			1.20±0.42
CBNU 925-230			0.83±0.41	X			0.83±0.41
CBNU 925-235	1.67±0.52	O					1.67±0.52
CBNU 925-240					1.30±0.67	△	1.30±0.67
CBNU 925-241			1.10±0.32	△			1.10±0.32
CBNU 925-242	1.00±0.00	X	1.00±0.00	X			1.00±0.00
CBNU 925-243	0.83±0.75	O					0.83±0.75
CBNU 925-248			1.67±0.82	O			1.67±0.82
CBNU 925-254			1.33±0.82	△			1.33±0.82
CBNU 925-255					1.30±0.67	O	1.30±0.67
CBNU 925-260			1.50±0.84	△			1.50±0.84
CBNU 925-263			1.50±0.55	△			1.50±0.55
CBNU 925-265					1.75±1.14	△	1.75±1.14
CBNU 925-269			1.83±0.75	O			1.83±0.75
CBNU 925-272			1.83±0.83	△			1.88±0.83
CBNU 925-276			1.13±0.64	O			1.13±0.64
CBNU 925-277					1.33±0.78	△	1.33±0.78
CBNU 925-278					2.10±1.10	△	2.10±1.10
CBNU 925-283	0.83±0.75	X					0.83±0.75
CBNU 925-289			1.50±0.55	△			1.50±0.55
CBNU 925-292			1.25±0.71	△			1.25±0.71
CBNU 925-298			1.63±0.74	O			1.63±0.74
CBNU 925-299			1.33±0.52	X			1.33±0.52
CBNU 925-300			1.60±0.70	△			1.60±0.70
CBNU 925-301			1.25±0.46	△			1.25±0.46
CBNU 925-310					1.08±0.29	△	1.08±0.29
CBNU 925-311	1.17±0.41	O					1.17±0.41
CBNU 925-312			1.83±0.75	△			1.83±0.75

CBNU 925-313			1.33±1.37	△			1.33±1.37
CBNU 925-316					2.33±0.82	O	2.33±0.82
CBNU 925-322	1.25±0.46	O					1.25±0.46
CBNU 925-325	1.14±0.36	X	1.83±0.75	O			1.49±0.56
CBNU 925-326	1.30±0.82	△	1.63±0.52	O			1.47±0.67
CBNU 925-328	1.38±0.52	△					1.38±0.52
CBNU 925-329	1.00±0.00	O					1.00±0.00
CBNU 925-330	1.33±0.52	X					1.33±0.52
CBNU 925-331	1.60±0.52	O	1.67±0.82	O			1.64±0.67
CBNU 925-335	1.70±0.82	O	1.70±0.95	O			1.70±0.89
CBNU 925-336			2.00±0.93	△			2.00±0.93
CBNU 925-340	1.67±0.52	O	1.67±0.82	O			1.67±0.67
CBNU 925-341					1.90±0.88	O	1.90±0.88
CBNU 925-342	1.25±0.45	△	1.50±0.55	O			1.38±0.50
CBNU 925-343	1.00±0.00	X	1.17±0.41	△			1.09±0.20
CBNU 925-344					1.13±0.83	X	1.13±0.83
CBNU 925-348			1.33±0.52	△			1.33±0.52
CBNU 925-349			1.60±0.84	△			1.60±0.84
CBNU 925-350	1.25±0.46	X	1.50±0.55	△			1.38±0.51
CBNU 925-351			1.88±0.64	O			1.88±0.64
CBNU 925-353	0.88±0.35	X					0.88±0.35
CBNU 925-356	1.08±0.29	X	1.40±0.84	△			1.24±0.56
CBNU 925-359					1.00±0.00	O	1.00±0.00
CBNU 925-361			0.80±0.67	X			0.80±0.67
CBNU 925-362	1.33±0.52	X	1.30±0.74	X			1.32±0.63
CBNU 925-365			1.50±0.76	△			1.50±0.76
CBNU 925-366	1.08±0.29	X	1.38±0.52	△			1.23±0.41
CBNU 925-367					1.40±0.84	X	1.40±0.84
CBNU 925-369			1.83±0.98	△			1.83±0.98
CBNU 925-371			1.88±0.83	△			1.88±0.83
CBNU 925-372			1.83±1.17	△			1.83±1.17
CBNU 925-373	1.33±0.52	△					1.33±0.52
CBNU 925-375	1.17±0.75	O	1.33±0.82	△			1.25±0.79
CBNU 925-376	0.90±0.88	X					0.90±0.88
CBNU 925-378	1.13±0.35	△	1.50±0.84	△			1.32±0.59
CBNU 925-379	1.17±0.41	O	1.33±0.82	O			1.25±0.61
CBNU 925-380	1.25±0.46	O	1.83±0.98	O			1.54±0.72
CBNU 925-381	1.40±0.52	X	1.71±0.83	O			1.56±0.68
CBNU 925-385	1.00±0.60	X	1.33±0.52	△			1.17±0.56
CBNU 925-386			1.83±0.75	△			1.83±0.75
CBNU 925-394	1.36±0.74	X					1.36±0.74
CBNU 925-395	1.14±0.66	X	1.63±0.92	△			1.39±0.79
CBNU 925-396	1.40±0.52	△	1.44±0.81	△			1.42±0.67
CBNU 925-397					2.88±0.35	O	2.88±0.35

CBNU 925-398	1.00±0.00	X					1.00±0.00
CBNU 925-399	1.00±0.47	X	2.00±0.93	O			1.50±0.70
CBNU 925-400	1.21±0.70	X			0.83±0.41	X	1.02±0.56
CBNU 925-402	1.25±0.45	△	1.50±0.55	△			1.38±0.50
CBNU 925-403	2.63±0.74	△					2.63±0.74
CBNU 925-404	1.50±0.80	△	1.83±0.75	△			1.67±0.78
CBNU 925-406					1.00±0.00	X	1.00±0.00
CBNU 925-407	1.00±0.53	△	1.60±0.97	O			1.30±0.75
CBNU 925-408	1.67±0.82	O	1.50±1.05	△			1.59±0.94
CBNU 925-416	1.00±0.47	△	1.63±0.74	△			1.32±0.60
CBNU 925-422	0.88±0.35	X	1.33±0.52	△			1.11±0.44
CBNU 925-424	1.33±0.65	X	1.75±0.89	△			1.54±0.77
CBNU 925-425					1.58±0.00	△	1.58±0.00
CBNU 925-426	2.00±0.89	O					2.00±0.89
CBNU 925-427			1.75±0.89	O			1.75±0.89
CBNU 925-429	1.33±0.89	△	2.13±0.64	O			1.73±0.77
CBNU 925-430	1.63±0.92	△					1.63±0.92
CBNU 925-431	1.50±0.55	O	1.60±0.70	△			1.55±0.63
CBNU 925-433	1.33±0.52	△	1.25±0.46	△			1.29±0.49
CBNU 925-438	1.50±0.53	X	1.67±0.82	△			1.59±0.68
CBNU 925-439	1.67±0.82	X	1.40±0.70	△			1.54±0.76
CBNU 925-441	1.38±0.52	O					1.38±0.52
CBNU 925-442	1.50±0.67	X	1.67±0.52	X			1.59±0.59
CBNU 925-443					1.50±0.55	O	1.50±0.55
CBNU 925-444	2.00±1.10	O					2.00±1.10
CBNU 925-446	1.67±0.89	△	1.50±0.55	△			1.59±0.72
CBNU 925-447					1.33±0.49	△	1.33±0.49
CBNU 925-449	1.67±1.03	△	1.67±0.82	△			1.67±0.93
CBNU 925-450	2.67±0.89	X					2.67±0.89
CBNU 925-451	1.33±0.52	△	1.67±0.82	△			1.50±0.67
CBNU 925-453	1.33±0.52	O					1.33±0.52
CBNU 925-456	1.33±0.52	O					1.33±0.52
CBNU 925-459					1.75±0.46	△	1.75±0.46
CBNU 925-461	2.00±0.93	O	1.50±0.55	△			1.75±0.74
CBNU 925-462					1.13±0.35	O	1.13±0.35
CBNU 925-464	1.64±0.74	O	2.00±0.89	△			1.82±0.74
CBNU 925-465	1.33±0.52	△	1.67±0.52	△			1.50±0.52
CBNU 925-467	1.33±0.71	X	1.22±0.55	△			1.36±0.63
CBNU 925-468	2.13±0.83	X	1.33±0.52	X			1.73±0.68
CBNU 925-470	2.50±0.84	△	2.13±0.83	△			2.32±0.83
CBNU 925-472	1.80±0.79	O	2.00±0.93	O			1.90±0.86
CBNU 925-473	1.08±0.51	O	1.25±0.62	△			1.17±0.56
CBNU 925-474	1.60±0.70	O	1.40±0.84	△			1.50±0.77
CBNU 925-475			1.58±0.90	△			1.58±0.90
CBNU 925-476	1.33±0.52	X					1.33±0.52
CBNU 925-478	2.00±0.94	X	1.67±0.82	△			1.84±0.88
CBNU 925-480	1.67±0.52	O	1.67±0.52	△			1.67±0.52

CBNU 925-481			1.50±0.85	△			1.50±0.85
CBNU 925-483	1.14±0.53	X	2.00±1.10	△			1.57±0.81
CBNU 925-484			1.50±0.84	△			1.50±0.84
CBNU 925-490	1.33±0.52	△	2.00±0.76	△			1.67±0.64
CBNU 925-492	1.60±0.52	O	1.50±0.53	△			1.55±0.53
CBNU 925-493	1.25±0.46	O					1.25±0.46
CBNU 925-494	1.00±0.00	△	1.33±0.52	△			1.17±0.26
CBNU 925-499	1.00±0.39	X	1.50±0.53	△	2.00±1.55	X	1.50±0.82
CBNU 925-501	1.19±0.40	△	1.20±0.42	X			1.20±0.41
CBNU 925-502	1.70±0.67	△					1.70±0.67
CBNU 925-503	2.10±0.74	△	1.17±0.72	△			1.64±0.73
CBNU 925-505	1.93±0.62	O					1.93±0.62
CBNU 925-506			1.88±0.83	O			1.88±0.83
CBNU 925-508	1.75±0.89	X					1.75±0.89
CBNU 925-509	1.67±0.65	X					1.67±0.65
CBNU 925-511	2.13±0.71	O	1.40±0.84	X			1.58±0.78
CBNU 925-513			1.13±0.99	△			1.13±0.99
CBNU 925-514			1.50±0.76	△			1.50±0.76
CBNU 925-516	1.40±0.52	O					1.40±0.52
CBNU 925-517	1.19±0.40	X					1.19±0.40
CBNU 925-520	1.33±0.52	△	1.60±0.84	X			1.47±0.68
CBNU 925-521	1.50±0.55	O	1.83±0.98	O			1.67±0.77
CBNU 925-523	1.00±0.00	X					1.00±0.00
CBNU 925-524	1.33±0.49	O					1.33±0.49
CBNU 925-525	1.06±0.25	X	1.67±0.82	△			1.37±0.54
CBNU 925-528			1.40±0.70	△			1.40±0.70
CBNU 925-529			1.88±0.99	O			1.88±0.99
CBNU 925-530	1.64±0.84	△					1.64±0.84
CBNU 925-532	1.13±0.35	△	1.25±0.89	△			1.19±0.62
CBNU 925-534	1.29±0.73	X					1.29±0.73
CBNU 925-537	1.70±0.82	O	1.50±0.55	△			1.60±0.69
CBNU 925-538			2.00±0.63	O			2.00±0.63
CBNU 925-540			2.00±0.82	△			2.00±0.82
CBNU 925-542			1.00±0.00	△			1.00±0.00
CBNU 925-544			1.25±0.46	△			1.25±0.46
CBNU 925-547	1.50±0.53	△	1.63±1.06	△			1.57±0.80
CBNU 925-549	1.44±0.51	O					1.44±0.51
CBNU 925-550	1.40±0.52	△					1.40±0.52
CBNU 925-551					1.70±0.82	△	1.70±0.82
CBNU 925-553	1.00±0.00	X					1.00±0.00
CBNU 925-554	1.50±0.53	O					1.50±0.53
CBNU 925-567	1.17±0.41	X					1.17±0.41
CBNU 925-568					1.58±0.79	△	1.58±0.79
CBNU 925-573	1.00±0.53	△	1.25±0.71	△			1.13±0.62
CBNU 925-575	1.33±0.82	X	1.50±0.55	△			1.42±0.69
CBNU 925-580	1.33±0.52	X	1.50±0.84	△			1.42±0.68
CBNU 925-584	1.75±1.04	X	1.83±0.98	O			1.79±1.01

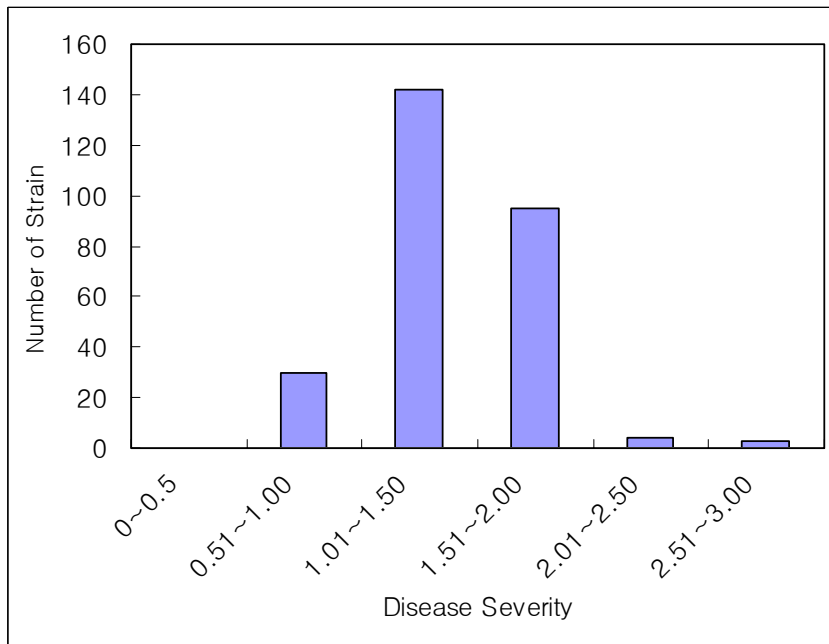


Figure 3.4 Distribution pattern of disease severity of the mating strains of CBNU 9 xCBNU 25.

4. 세균성갈색무늬병 저항성 품종 개발

본 연구에서 얻은 교배균주 중 자실체의 형태가 우수하고 저항성인 몇 개의 균주의 특성을 분석하여 품종화 가능성을 판단하였다.

가. 재료 및 방법

모 균주와 함께 톱밥 병재배를 하여 자실체의 특성, 수량성, 세균성갈색무늬병에 대한 포장저항성을 조사하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 자실체 특성 및 수량성

실험에 사용한 몇 개 균주 중 CBNU 925-97 균주가 가장 우수한 특성을 보여주어서 그 균주에 대한 특성을 조사하였다. 충북농업기술원과 진천의 느타리 재배농가 두 곳에서 실험을 실시한 결과 두 곳의 결과가 조금 차이가 나는데 그 이유는 충북기술원에는 온도 및 습도가 매우 정확하게 제어되는 시설에서 재배되었으며 자실체 생육온도도 15-16℃로 일정하게 유지되었다. 한편 진천의 재배사는 수막시설을 갖춘 재배사로 자실체 생육온도는 12-17℃이었다.

CBNU 925-97의 수량성은 우수하였으며, 자실체의 일반적인 특성은 첫 번째 실험에서는 모균주 CBNU-9균주에 더 유사하게 나타났으나 두 번째 실험에서는 모균주 CBNU-9와 -25번 균주 사이의 특성을 보여주었다(Table 3.9-10, Figure 2.5).

(2) 병 저항성

충북기술원의 재배사에서는 전혀 병이 발생하지 않았으나 진천의 재배사는 수막시설의 재배사로 습도가 높고 수분이 충분하였고 실험시기도 갈색무늬병이 많이 발생하는 시기이었다. Figure 2.6과 2.7에서 보여주는 것처럼 CBNU 25번 균주에는 상당히 많은 갈반병이 발생하였고, CBNU 9번 균주에도 병이 발생하였으나 CBNU 925-97 균주에는 병이 전혀 발생하지 않았다. 자실체가 더 자란 후에도 CBNU 25와 CBNU 9에는 병이 더 진전되었으나 CBNU 925-97번 균주에는 전혀 발생하지 않았다.

(3) 고찰

본 연구에서는 교배균주 중 저항성이 우수하고 자실체의 농업적 특성이 우수한 균주를 선발하여 저항성 품종을 개발하고자 하였다. 품종화 가능성을 검토한 여러 균주 중 CBNU 925-97균주는 자실체의 특성 및 병 저항성이 매우 우수하여 품종화 가능성이 높은 균주로

나타났다. CBNU 925-97번 균주는 결과로는 나타내지 않았으나 다른 균주에 비해 재배 환경의 변이에 더 안정적인 균주라고 판단되었다. 현재는 병 재배, 상자재배, 균상재배를 실시하여 재배농가에서 실증실험을 진행 중이며 또한 기존 품종과 유전적 유연관계를 검토하고 있다. CBNU 925-97 균주는 실증실험에서 좋은 결과를 얻으면 품종으로 등록할 예정이다.

Table 3.9 Characteristics of fruiting body and yield of CBNU 925-97 strain on 1st experiment carried out at Chungbuk Agriculture Research and Extension Service (CARES)

Strain	Yield	No. of stripe	Fresh wt. of each fruiting body	Dia. of pileus	Thickn ess of pileus	Dia. of stripe	Length of stripe	Shape of fruiting body	Photoshop index		
									L	a	b
CBNU -9	117 b	25 a	2.7 b	23.3 b	0.8 b	3.1 b	46 a	갈대기모양/ 중심생/다발성	63	4.1	20.3
CBNU -25	126 b	13 b	10.5 a	34.7 a	1.8 a	11.8 a	48 a	갈대기모양/ 측심생/다발성	55	2.8	15.2
CBNU 925-97	148 a	26 a	4.7 b	33.4 a	1.1 b	4.5 b	37 b	갈대기모양/ 중심생/다발성	45	6.3	16.5

Table 3.10 Characteristics of fruiting body and yield of CBNU 925-97 strain on 2nd experiment carried out at mushroom farm at Jincheon

Strain	Yield	No. of stripe	Fresh wt. of each fruiting body	Dia. of pileus	Thickness of pileus	Dia. of stripe	Length of stripe
CBNU-9	103 a	19.3 a	3.7 b	25.1 b	0.8 b	4.0 a	44 a
CBNU-25	81 b	8.7 c	5.0 ab	26.5 b	1.2 a	5.6 a	45 a
CBNU 925-97	114 a	13.3 b	4.6 b	31.1 a	1.0 a	5.3 a	34 b



Figure 3.5 Fruiting body of CBNU 925-97, CBNU-25, CBNU-9, CBNU925-49. at CARES.



Figure 3.6 Fruiting body of CBNU-25, CBNU 925-97, CBNU-9 from left to right at mushroom farm at Jincheon.



Figure 3.7 Close-up pictures of CBNU 25 and CBNU 925-97.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종 개량에의 연구

1. 연구개발목표의 달성도

가. 흑회색 느타리버섯 육종모본의 특성 분석

- 흑회색 느타리버섯 균주를 제작하기 위해 농가의 재배 과정에서 수집된 흑색 변이주를 수집하였다. 또한 고품질의 품종 개량을 위한 균주는 한국특산 품종인 ASI2029 균주, 현재 재배되는 고품질 버섯으로서 갯색과 자실체의 형태가 좋은 수한 품종을 선정함.
- 흑회색 버섯의 선발을 위해서는 그 이화학적 특성에 대한 객관적 지표를 필요로 하므로 갯색에 대하여 색차 측정계, melanin 측정을 통한 특성분석을 수행하였으며, 버섯의 물리적 특성에 대하여 물성측정기를 이용한 측정함.

나. 교잡균주의 제작, 선발 및 특성분석

- 수집된 모균주의 자실체로부터 포자를 수집하고, 단포자 분리 및 교배형 결정을 수행함.
- 흑색 변이주와 수한으로부터 분리한 단핵균주간의 교배 및 다포자발아 과정을 통해 333개의 교잡균주를 제작함.
- 교잡균주의 재배적, 이화학적 특성분석을 통하여 KU-BM12×SM2, KU-BM13×SM25, KU-BM14×SM24, KU-BM14×SM25, KU-BM16×SM23, KU-BM20×SM24의 6개를 선발함.

다. 선발 교잡균주간 유전 특성의 분석

- 모균주인 흑색변이주와 수한의 유전자 다형성 확인
- 모균주와 6개의 선발된 교잡균주간의 DNA 절편에서 유사한 band pattern을 가지고 있지만 모두 부분적으로 일치하지 않는 독자적인 특성을 확인함.

라. 병 재배를 통한 우량 교잡균주의 검정

- 우량 교잡균주로 선발된 버섯은 실제농가에 균주적응성 조사에 앞서서 병재배를 통하여 갯색, 수확량, 유효경수 등의 재배적 특성이 좋은 BM12×SM2 균주를 선발함.
- 이 균주가 수량이 많고 품질이 우수한 것으로 재배 품종으로 등록 가능성 확인.

마. 흑색 변이주의 프로테옴 발현 프로파일의 분석

- 색 변이주간 발현차이 단백질 동정하여 다른 발현 양상을 보이는 6개 단백질 확인.

- 느타리버섯 EST DB의 비교분석으로 동정된 단백질의 유전자 염기서열 확인.

2. 관련분야 기술발전예의 기여도

가. 느타리버섯의 이화학적·재배적 특성분석

- 색차, 물성, 펙틴 함량 등의 이화학적 특성 분석을 객관적인 수치화로 검증하여 이를 자실체를 인공재배하기 위한 기초 자료로 활용하고자 함.

나. 선발 교잡균주의 유전 특성의 분석

- 모균주와 교잡균주간의 유전 특성의 다형성을 통해 새로운 육종소재의 가능성을 제시함.

다. 흑색 변이주의 프로테옴 발현 분석

- 색 변이주간 발현차이 단백질 동정하여 다른 발현 양상을 보이는 6개 단백질 확인.

- 각각의 단백질의 동정된 자료를 느타리버섯 EST DB와의 비교분석으로 유전자 염기서열 확인함. 그 결과 단백질과 유전자 수준에서 분자육종을 위한 중요 자료로 판단됨.

3. 논문 발표 및 활용 실적

성과	명칭	저널·학회명	발표일	비고
포스터 발표	EST analysis and gene expression profile of <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국분자세포생물학 생화학분자생물학회 학술대회	2003. 8.	
포스터 발표	Proteome analysis of different colored mushroom cap in <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국미생물학회 연합 국제 학술대회	2003. 10.	
포스터 발표	Cloning of G-protein beta subunit gene and its mRNA expression during the development of <i>Pleurotus ostreatus</i>	한국미생물학회 연합 국제 학술대회	2003. 10.	
국내특허 출원	느타리버섯의 자실체 형성방법	대한민국	2004. 1.	
논문발표	느타리버섯의 기내 자실체 형성 및 그 유도조건에 관한 연구	한국버섯학회	2004. 3.	p.15-20
포스터 발표	A putative metalloprotease of <i>Pleurotus ostreatus</i> is regulated during developmental stages	한국균학회	2004. 5.	
논문발표	Isolation and Characterization of Dikaryotic Mutants from <i>Pleurotus ostreatus</i> by UV irradiation	Mycobiology	2004. 6.	p.32-35
논문발표	A putative metalloprotease of <i>Pleurotus ostreatus</i> is regulated developmentally and belonged to metzincin superfamily	FEMS microbiology letter	2004. 6.	접수번호: FEMSLE-04-06-0549
포스터 발표	Cloning of casein kinase gene and its mRNA expression during the development of <i>Pleurotus ostreatus</i>	극동아세아 버섯심포지엄	2004. 9.	
포스터 발표	Isolation and characterization of homokaryotic fruiting strain in <i>Pleurotus ostreatus</i>	극동아세아 버섯심포지엄	2004. 9.	
포스터 발표	Identification of differentially expressed proteins in specific colored mushrooms by proteome analysis.	한국인간프로테오믹스 국제학술대회	2005. 4.	
Section 발표	A New Metalloprotease Gene from <i>Pleurotus ostreatus</i> Belongs to Eucolycins Family.	한국미생물학회연합 국제학술대회	2005. 10.	
포스터 발표	Proteome Reference Map and Comparative Proteome Analysis of Two Developmental Stages in <i>Pleurotus ostreatus</i> .	한국미생물학회연합 국제학술대회	2005. 10.	
학술발표	식용버섯의유전체 및 단백질의 발현 프로파일 연구	국립산림과학원 학술심포지엄	2006. 6.	p.32-40

제 2 절. 저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

1. 연구개발목표의 달성도

가. 수집균주의 저온성 검정

- 느타리버섯 58품종을 이용하여 저온의 조건에서 병 및 상자 재배 조사
- 4품종의 우수 모균주의 선정
- 각 선발된 모균주의 자실체로부터 30-50개의 단핵균주 육성

나. 교배형 분리

- 각 품종의 단핵균주를 이용한 교배형 검정 조사

다. 교잡 및 교잡균주의 유전분석과 DNA profile 작성

1) 교배형 분리에 따라 이핵균주 제작

- 저온성이 강하고 자실체 특성이 좋은 5개의 모균주를 선발함
- 각 모균주에서 단핵균주를 육성하고 교배형을 분석함
- 4가지 교배조합에서 230개 교배이핵균주를 육성
- 톱밥병재배를 통하여 교배이핵균주의 자실체 특성을 조사
- 폐면 상자재배를 저온기 및 온도 상승기에 조사하여 저온성을 검정

2) 교배된 이핵균주의 후대검정

- 교배이핵균주의 수량에 대한 유전분석 결과 양친의 수량차이가 적을수록 교배후대에 서 양친보다 우수한 후대가 많았음

3) 교잡주의 DNA profile 작성

- 교배모본과 육성 단핵균주에 대한 DNA profile을 작성

4) 분자생물학적 교배 확인

- 각 교배조합에서 선발된 이핵균주에 대하여 FGL17 primer에 의한 교배를 확인

라. 교잡균주의 특성 분석과 선발

- 2차년도에 병 및 상자재배를 거쳐 선발된 4개 교배조합 29개 선발균주에 대하여 폐면 상자재배로 겨울재배를 수행하여 우수균주를 선발
- 2차년도 교배모본에 3개 균주를 추가하여 8개 교배모본에서 7개 교배조합 343개 균주를 육성
- 각 교배조합에서 저온성이 강하고 자실체 수량이 높은 11개 균주를 최종 선발
- 교배이핵균주의 수량에 대한 유전분석 결과는 2차년도 결과와 동일

2. 관련분야 기술발전예의 기여도

느타리버섯에서 현재 생산판매 신고된 약 80여개 품종이 유통되고 있으나 대부분이 도입된 품종이고 품종보호 등록된 품종은 9개에 지나지 않는다. 여기에 저온성이라 할 수 있는 것은 오래전에 육성된 농기2-1 및 원형계통 몇 품종에 지나지 않은 실정이다. 이번 연구에서 선발된 균주들은 저온성균주로서 농가의 재배법에 최대한 적응할 수 있도록 선발되었기 때문에 현재 사용에 빈약함을 느끼고 있는 겨울재배용 품종을 육성하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

3. 논문 발표 및 활용 실적

제 3 절. 내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

1. 연구개발목표의 달성도

가. 균사를 이용한 저항성 검정

느타리버섯 균사의 세균성갈색무늬병의 저항성은 병원균을 접종한 재배배지에 균사의 생장 정도를 판별하는 방법과 한천배지에서 병원균과의 대치배양에서 균사의 생장 정도를 판별하는 방법으로 비교하여 저항성 검정법에 활용하고자 하였다. 본 연구는 완결되었지만 저항성 정도 자실체를 이용한 검정결과와 비교분석하는 부분이 남아있다.

나. 자실체를 이용한 저항성 검정

느타리버섯 자실체에 병원균을 접종하여 나타난 병징을 비교하여 저항성 검정법을 확립하고자 하였으며, 저항성의 정도(양적저항성)를 객관화하기 위하여 병징의 색과 자실체의 색을 포토샵 프로그램을 이용하여 분석하여 수치화하고자 하였다.

다. 저항성인자 및 특성 분석

자실체를 이용한 병 접종실험에서 저항성으로 나타난 균주의 자실체의 저항성인자를 찾고자하는 연구로서 본 연구에서는 자실체 표면의 물리적 특성을 분석하는데 초점을 맞추었다. 첫 번째로 자실체 표면의 소수성과 병반형성과의 관계를 병원세균을 점적했을때 물방울이 유지되는지 아닌지로 간단하게 조사하여 상관관계를 알아보았고 자실체 표면의 전자현미경 사진을 찍어 분석하였다.

라. 수집균주의 저항성 검정을 통한 모균주 선발

1년차 연구에 의해 확립된 저항성검정법을 통해 수집균주의 저항성 및 다른 자실체의

특성을 고려하여 우수품종으로서의 특성은 낮지만 세균성갈색무늬병에 저항성인 균주와 품질이 우수하지만 세균성갈색무늬병에 매우 감수성인 균주를 선발하였다.

마. 세균성 갈색무늬병 저항성 육종소재 개발

모균주의 교배 및 교배균주의 저항성 검정: 각각 저항성 및 감수성균주의 자실체로부터 포자를 얻고, 단포자 분리를 통해 단핵균주를 얻은 후 이들을 교배하여 F1세대의 교배균주를 얻었다. 각각의 교배균주를 톱밥 병배양을 통해 자실체를 얻고, 자실체를 이용하여 저항성 검정을 실시하고 있다. 교배균주의 저항성 분포를 분석하여 저항성 유전양식을 파악하고, 교배균주의 자실체 특성을 분석하여 저항성 육종소재 균주를 확보할 수 있을 것이다.

바. 우수 모균주 교배에 의한 저항성 품종 육성과 유전분석

- 저항성이 강한균주와 약한균주의 교배주의 포자 채취
- 후대의 저항성 검정을 통한 세균성 갈색무늬병의 유전양식을 분석

사. 병저항성 돌연변이 균주의 육종

- 자외선 혹은 EMS 처리를 통한 느타리버섯의 돌연변이 균주 제작
- 돌연변이체의 자실체에 병원균 접종
- 저항성이 우수한 균주 선발

아. 우수선발 균주의 생산력 검정

- 농가재배 시험을 통한 우량균주 선발
- 육종 목표에 적합한 우량 균주 선발
- 유망 균주의 육종소재로 이용

2. 관련분야 기술발전예의 기여도

세균성갈색무늬병의 저항성 검정법은 느타리 품종등록, 병방제, 저항성 유전연구 및 육종에 매우 유용하게 사용될 것이다. 또한 느타리 갈색무늬병의 저항성 유전을 이해하는 데 크게 기여하였으며 이 병의 저항성에 대한 유전분석 및 분자유종의 초석이 될 것이다..더 나아가 세균성갈색무늬병에 저항성이 우수한 품종 개발에 크게 기여할 것이다.

3. 논문 발표 및 활용 실적

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 흑회색 느타리버섯을 이용한 고품질 품종 개량에의 연구

1. 추가 연구의 필요성

- 프로테옴 기법을 이용한 저온성·내병성 느타리버섯의 분자유전학적 특성 분석
- 느타리버섯이 최근 식용, 약용으로 주목을 받고 있는 측면에서, 다수로 선발된 유의한 유전자의 구조분석과 기능분석, 유전자 재조합을 통한 물질생산 및 생산 물질의 활성 측정 등의 연구

2. 타 연구에의 응용

- 버섯 품종의 보호를 위한 표지인자의 개발에 프로테옴 분석한 기초 자료를 이용
- 느타리버섯이 아닌 타 품종에도 분자유전학적 기법을 적용

3. 기업화 추진 방안

- 우량 교배균주에 대한 표지인자 개발을 통한 버섯균주의 품종 등록
- 우량 교배균주의 산업체 및 버섯균주 육종기관에 보급
- 우량 버섯균주의 개량 및 해외수출

제 2 절. 저온성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

1. 추가 연구의 필요성

생산력 검정시험 및 지역적응시험을 통한 품종 등록

2. 타 연구에의 응용

표1 은 11개 조합에서 우수한 수량성을 나타낸 교잡주 11개이다. 농가 균상재배와 동일한 배지를 사용하여 겨울철 최소 생육할 수 있는 저온상태(12℃ 이하) 에서 시험을 하여 최대한 저온에 견디는 힘이 강한 교잡주를 선발하였다. 조합별 1균주는 품종이나 육종소재(모본)로 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 수량이 높고 품질이 우수한 것으로 ASI2183 x ASI2344 의 KU-254, ASI2183 x ASI2706 의 KU-415 로 나타나 재배 품종으로 등록이 가능할 것으로 생각된다.

표1. 교배조합별 우수 교잡균주 육성 : 13균주

교잡조합	선발 우수균주	비고
2018 x 2504	KU-144	
2183 x 2344	KU-254	조합능력이 우수함
2183 x 2504	KU-365	
2183 x 2706	KU-415	
2183 x 2730	KKU-728	
1982 x 2183	KKU-105	
1982 x 2504	KKU-201	
1982 x 2730	KKU-416	
2194 x 2344	KKU-823	
2194 x 2730	KKU-1059	
2344 x 2730	KKU-1222	

3. 기업화 추진 방안

우수한 교잡주들은 추가로 실제 농가 실증시험을 통하여 그 우수성을 검정할 필요가 있으며, 참여기업과 공동으로 농가확대 재배를 실시하여 품종등록을 추진할 계획

제 3 절. 내병성 느타리버섯의 육종소재 개발 연구

1. 추가 연구의 필요성

본 연구를 통해 느타리 자실체를 이용한 세균성갈색무늬병의 발병심각도 조사를 통한 저항성 검정법을 확립하였다. 그러나 이 검정법은 앞으로 실험간 결과의 변이를 줄이고 결과를 조사하는데 조사자의 주관을 줄이고 객관화하는데 더 많은 연구가 필요하다.

2. 타 연구에의 응용

세균성갈색무늬병의 저항성 검정법은 느타리 품종등록, 병방제, 저항성 유전연구 및 육종에 매우 유용하게 사용될 것이다. 또한 느타리버섯이 아닌 타 품종에의 적용 가능성 제시

3. 기업화 추진 방안

교배균주 중 병 저항성의 높고 자실체의 특성이 우수한 품종을 등록하여 대량재배 생산

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Repetitive sequence로부터 제작된 universal rice primer

유전자 다형 분석인 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타날 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에, 소량의 DNA만을 사용하여도 수행이 가능하므로 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다. (Williams et al., 1990, 1993).

그리고 이 방법은 대상생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA 절편을 비교함으로써 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있다(Patway et al., 1994).

현재 많은 연구자들이 사용하고 있는 Operon Technologies, USA)는 10mer로 구성되어 있으며, PCR조건에서 annealing temperature가 36°C 전후로 낮아 비특이적인 반응으로 인해 실험의 재현성이 낮으며, 또한 많은 primer들 중 다형을 보이는 primer를 선정하는데 많은 시간과 노력이 소요된다.

상기 문제점 때문에 repetitive sequence로부터 제작된(강 등,1997) universal rice primer (URP)를 사용하기 시작하였다. URP는 20mer로 구성된 primer로 55°C 이상의 annealing temperature에서 PCR을 하기 때문에 실험의 재현성이 매우 높을 뿐만 아니라 다수의 밴드가 증폭되어 충분한 다형성을 확보하는데 유리하다. URP를 이용한 RAPD 분석은 농업, 식품 및 인체 등에 연관된 곰팡이, 버섯, 세균류 등 다양한 종들에서 종 및 종내동정에 이용되고 있으며, 종 및 집단의 genotyping에 널리 이용되고 있다(Kang et al., 1997).

2. 숲속의 버섯에서 나는 강력한 항균물질

Nature 10월 13일호에 실린 논문에 의하면, 유럽 북서부의 소나무숲에서 나는 버섯이 인간을 난치병으로부터 구해줄 지도 모른다. 연구자들에 의하면, 문제의 버섯은 페니실린과 반코마이신 등의 항생제와 같은 정도의 항균력을 갖는다고 한다. 실험실 및 동물시험에서 플렉타신(plectasin)이라고 불리는 펩타이드는 (기존의 항생제에 내성을 지닌) 수많은 세균들을 효과적으로 없애는 것으로 밝혀졌다.

"이 특별한 항균펩타이드는 폐렴, 인후염, 피부감염을 일으키는 세균에 대해 강력한 항균 활성을 갖는다. 인간을 대상으로 한 안전성 및 효능 테스트를 통과한다면, 플렉타신은 2012년이면 시장에 모습을 드러낼 수 있을 것이다."라고 연구진은 말했다.

더욱 흥미로운 것은 이번 발견이 항생제 개발의 역사에서 전혀 새로운 시대를 여는 것이라는 점이다. 항생제의 개발은 1929년 페니실린의 발견 이후 사실상 정체되어 왔다고 해도 과언이 아니기 때문이다.

"우리는 지난 15-20년간 동물과 식물로부터 생성되는 새로운 종류의 항생제를 찾아내기

위해 노력해 왔다. 진균류는 항생제 발견의 좋은 출발점이다. 왜냐하면 진균류가 만들어내는 화학물질은 인체와 양립하기 때문이다. 플렉타신은 인체 내에 투여하면 인체에는 손상이 없이 세균만을 제거한다.”라고 연구진은 말했다.

“항생제를 개발해 내는 표준방법은 배지에서 곰팡이 등을 배양한 다음, 그 배지로부터 일부를 덜어내어 항생물질이 있는가를 조사하는 것이다. 그러나 이같은 시나리오로 항균펩타이드를 만들어내는 것은 어렵다. 우리는 새로운 기법을 채용했다. 즉, 우리는 진균류 중에서 *Pseudoplectania nigrella*라는 종을 무작위로 선택한 다음, 생화학기술을 이용하여 유전정보를 해독해냈다.”라고 연구진은 말했다.

플렉타신을 동정해낸 것은 단지 첫걸음일 뿐이며, 다음 단계는 이 펩타이드를 실험실에서 재생해내는 것이다. 항생물질을 재생해내어 상업적으로 대량생산할 수 있어야 비로소 항생물질을 개발했다고 할 수 있기 때문이다. 「네덜란드 국립 항생제 및 감염통제센터」의 도움을 받아 연구진은 다양한 균주에 대한 실험실 연구를 마쳤다. 플렉타신은 많은 세균에 대해 효능이 있지만, 특히 폐렴의 주된 원인균인 *S. pneumoniae*(기존의 항생제에 대한 내성균 포함)에 대해 효과가 탁월했다. 마우스를 대상으로 한 시험이 끝나면 플렉타신의 안전성과 효능이 입증될 것이다. 과학자들은 다른 진균류로부터도 HIV 등을 치료할 수 있는 펩타이드가 발견될 수 있기를 바라고 있다.

SOURCES: Michael Zasloff, M.D., Ph.D., professor, surgery, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C.; Steven Projan, Ph.D. vice president, biological technologies, Wyeth Research, Cambridge, Mass., and fellow, American Academy of Microbiology; Oct. 13, 2005, Nature

3. 버섯균으로 다이옥신 분해하는 기술

일본 고베제철소, 시즈오카대학, 동경도임업 시험장의 공동 연구팀이 버섯과 가로수의 선정 가지 등을 조합해 만든 자재를 이용해 토양 중의 다이옥신을 고효율로 분해하는 오염 정화 기술을 개발했다. 한편 이의 개발을 위한 실험에서는 다이옥신을 약 4주 동안 60% 이상 분해해 무독화시킬 수 있는 것으로 확인되었다. 기존의 미생물에 의한 토양 정화는 효과를 거두는 데 수개월 내지는 1년 이상 소요되었으나 신기술은 대폭적인 기간 단축을 기대할 수 있다. 따라서 공동 연구팀은 특허를 공동으로 출원, 2003년도부터 동경도의 한 도시의 폐기물 처리 시설에서 다이옥신을 함유한 용지의 정화 시험 등을 실시해 실용화를 위한 기술 확립에 나설 방침이다. 이번에 개발한 기술은 미생물을 활용한 오염 정화 기술 “바이오리메디에이션”이라 불리는 방법으로, 버섯의 하나인 “고약 버섯”의 균을 사용하는 것이 특징이다. 오염 정화용 자재는 액체 배양으로 배양한 고약 버섯의 균사를 풀어, 분쇄한 선정 가지에 접종, 온도와 함유 수분 등을 관리해 제조한다. 천연 소재로만 구성되어 있고 보통 폐기 처분되는 선정 가지를 재활용할 수도 있어 일석이조인 셈이다. 다

이옥신 분해 메커니즘은 (1)고약 버섯이 발육할 때 선정 가지를 분해하는 효소를 만든다 (2)고약 버섯이 외부에 분출하는 효소가 부차적으로 다이옥신을 분해한다 - 이다. 실험은 1그램의 토양 중에 200피코그램의 다이옥신을 함유한 토양과 오염 정화용 자재를 10:3의 비율로 혼합, 정기적으로 섞어주면서 일정 기간 경과 후의 다이옥신 잔류량을 측정했다. 그 결과 고약 버섯은 실험 개시 약 4주 뒤에는 거의 남아있지 않았으나 다이옥신은 약 60%이상 분해되었다. 호기성인 고약 버섯의 균이 생육하는 조건을 가진 토양 표층에서는 90%이상의 분해율을 나타낸 지점도 있었다.

4. 단백질 칩 기술

단백질 칩(Protein chip)은 작은 기관 위에 수십 개에서 수만 개의 단백질을 고정시킨 후 그 단백질들의 결합을 동시에 분석하는 자동화 분석장치로, DNA 칩에 이어 생명공학 분야의 미래형 기술로 알려져 있다. 단백질 칩은 지금 활발히 연구개발 중인 기술로 단백질의 발현 및 기능연구나 단백질의 상호작용에 대한 기전, 질병의 진단, 신약개발뿐 아니라 식품환경 등 널리 이용될 수 있을 것으로 본다. 선진국에서는 이미 상품화에 성공하고 있으며, 국내에서는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 실용화에는 미흡한 실정이다.

5. 감자(*Solanum tuberosum L.*)에 Chitinase 내병성유전자의 도입 및 발현

식물체는 병원체의 침입시 여러 가지 방어기작을 발현시켜서 대응한다. 식물체내에 존재하는 chitinase는 병원체 침입시 그 활성도가 증가하여 곰팡이나 해충의 구성성분인 chitin을 분해하므로써 내병성을 나타나게 한다. 감자는 우리나라에서도 식용뿐만 아니라 칩 및 후렌치 후라이등 가공용의 소비가 급격히 증가하고 있는 중요한 자원식물이다. 그러나 갈색 씨름병, 겹등근무늬병, 데팅이병, 역병 등은 감자의 생산량 감소뿐만 아니라 품질도 저하시켜 상품성을 떨어뜨린다. 따라서 이러한 문제점을 해결하고자 내병성 감자를 개발하기 위하여 chitinase유전자를 가공용품종인 Belchip 품종에 형질전환시켰다. 형질전환시킨 후 선발배지에서 6-8주 후에 재분화 된 식물체들 중 PCR을 이용하여 NPT유전자가 발현되는 식물들을 선발하였다. 이렇게 1차 선발된 형질전환 감자는 Southern 분석 결과 내병성 유전자가 감자의 genome에 안정적으로 삽입되었음을 확인하였고 northern 분석을 실시하여 내병성유전자가 발현됨을 확인하였으며 형질전환체의 chitinase activity를 측정하였다.

제 7 장 참고문헌

- 1) 이영석(1996), 버섯산업의 정책과제와 육성방향. 한국농촌경제연구원.
- 2) “선진농업국의 첨단농업기술 개발동향” (1996), 농촌진흥청 기술협력관실
- 3) 2001 농업생명공학 연구집, 농업과학기술원
- 4) 버섯 정보 신문
- 5) 장현오, 박순애, 조우식, 김영수, 이경남 2003, 내손으로 재배하는 가정버섯, 문예마당
- 6) 성재모, 유영복, 차동열, 1998, 버섯학
- 7) 유영복 1995, 고등균류의 원형질체 I, II
- 8) 박재인, 민두식, 이상선, 박한오(2001), Improvement of *Lentinula edodes* by Genetic Analysis and Mating, and Variegation of Production Substrate., 충북대학교 (농림부보고서)
- 9) Staniaszek M, Marczewski W, Szudyga K, Maszkiewicz J, Czaplicki A, Qian G. (2002), Genetic relationship between Polish and Chinese strains of the mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., determined by the RAPD method., J. Appl. Genet. 43:43-7
- 10) Lee HI, Jeong KS, Cha JS.(2002), PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms., Lett. Appl. Microbiol. 35:276-80
- 11) Shen Q, Royse DJ.(2002), Effects of genotypes of maitake (*Grifola frondosa*) on biological efficiency, quality and crop cycle time., Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:178-82.
- 12) Kim MJ, Shim JO, Lee YS.(1996), Comparison of Soluble Protein Bands for *Pleurotus* Species and Interspecific Crosses of *Pleurotus* Species., Kor. J. Mycol.

25:20-25.

- 13) Sung JM, Lee HK, Yoo YJ, Choi YS, Kim SH, Kim YO, Sung GH(1998), Classification of Cordyceps Species Based on Protein Banding Pattern., Kor. J. Mycol. 26:1-7
- 14) Park WM, Hyun JW(1992), Genetic relation among isolates of citrus scab fungus(*Elsinoe fawcetti*)in Che-Ju island., Kor. J. Plant. Path. 8:164-169
- 15) Ramirez L, Larraya LM, Pisabarro AG.(2000), Molecular tools for breeding basidiomycetes., Int. Microbiol. 3:147-52
- 16) Lee HU, Lee MH, Cho DJ, Shin WK, Moon BJ(1996), Influence on *Pseudomonas* species causing bacterial blotch of mushrooms on the mycelial growth in *Pleurotus ostreatus* and *Flammulina velutipes*., RDA J. Agri. Sci. 38:887-892
- 17) Godfrey SAC (2001), Characterization by 16S rRNA sequence analysis of *pseudomonads* causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*., Appl. Envir. Microb. 67:4316
- 18) Moquet F(1998), Differences in susceptibility of *Agaricus bisporus* strains to bacterial blotch and in natural cap colour related to compost composition., Plant. Breed. 117(4) 385-388
- 19) Soler-Rivas C(1999), Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*., FEMS Microb. Rev. 23(5) 591-614
- 20) Park JY(2001), Cytological and physiological changes by wounding and expression of stress -related genes during bulblet formation of lily 'marcopolo' scale culture in vitro.,
서울대학교 대학원 박사학위논문
- 21) Ryu HM, Choi SJ, Cho HC, Lee SS, Koh CM, Park JY(2001), Characterization of gene expression pattern in human astrocytes using DDRT-PCR method., J. Bacteriol. Virol. 31(1) 47-54

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.