

발간등록번호

11-1541000-000492-01

보안과제(), 일반과제(●)

과제번호 107007-03-CG000

국내 자생종 느티만가닥버섯의 육종을 통한 신품종 개발

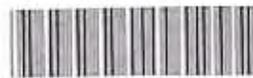
Development of new varieties of an edible mushroom

Hypsizigus marmoreus

연구기관

그린합병회사

농림수산식품자료실



0004948

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 자생종 느티만가닥버섯의 육종을 통한 신품종 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “느티만가닥버섯 육종을 위한 분자유전학적 마커개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2010 년 05 월 29 일

주관연구기관명 : 그린합명회사

주관연구책임자 : 이 창 윤

연 구 원 : 김 동 규

연 구 원 : 박 근 화

연 구 원 : 이 혜 정

연 구 원 : 이 동 창

연 구 원 : 남 윤 중

연 구 원 : 박 홍 준

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 노 현 수

연 구 원 : 김 진 주

연 구 원 : 임 윤 정

연 구 원 : 석 선 량

연 구 원 : 김 상 우

요 약 문

I. 제 목

국내 자생종 느티만가닥버섯의 육종을 통한 신품종 개발

Development of new varieties of an edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 식용버섯은 년 8,000억원 이상의 시장을 형성하고 있으나 버섯의 종류는 양송이버섯, 새송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯의 5종으로써 일본, 중국 등에 비해 재배버섯의 다양성이 적어 소비자의 Needs에 부합하기 어려우며, 재배종 다양성의 부족으로 급변하는 기후조건과 다양한 환경변화에 따른 적응성이 결여되고, 일부 대농들의 생산성 향상으로 버섯이 과잉생산되어 생산 수익성은 날로 감소하고 있는 추세임.

국내버섯의 생산량과 재배면적을 비교할 때 버섯재배면적은 2004년 1,058 ha에서 2008년 531 ha로써 2배가량 줄어들었으나, 버섯 생산량은 2004년 141,796톤에서 2008년 152,030톤으로 1만톤 정도가 증가되는 자료를 근거로 버섯재배는 노동력위주에서 기계화로 전환되었음을 반증하고 있으며 기계화 전환이 이루어지면서 버섯생산이 과잉되어 가격이 하락하여 버섯 재배농들의 경영은 악화되고 있음.

이러한 국내 현실에서 버섯재배농민들에 새로운 활력을 불어넣을 수 있는 새로운 품목의 개발이 필요하며, 소비자들에게는 새로운 버섯을 접할 수 있는 기회를 제공하고 성장일로에 있는 국내 버섯의 수출을 위한 새로운 성장 동력이 필요함.

이러한 새로운 품목의 필요성에 부합하는 느티만가닥버섯은 일본에서는 2008년 108,206톤(일본 임야청;2009)이 생산되어 팽이버섯 131,092톤 다음으로 생산량이 높은 버섯으로 성장잠재력이 큰 버섯임.

그러나 버섯재배를 위해 선행되어야 할 요건중에 가장 선행되어야 할 요건인 품종에 관련하여 한국은 일본의 버섯 품종등록 현황을 살펴보면 2009년 3월 현재 일본이 9종의 버섯에서 360종이 등록되었으며, 한국은 8종의 버섯에 49종(자료출처 : 국립종자원)으로 **약 7배의 차이**를 보이고 있어 절대적인 품종의 열세로써 품종보호제도가 실효되는 **2010년부터는 품종사용에 대한 로열티 문제가 대두될 것을 예측됨.**

그리고 본 연구에서 개발하고자 하는 느티만가닥버섯의 경우는 일본에서 2001년

부터 등록된 품종 현황을 보면 29종이 등록 되어있으며(자료출처 : 일본 임야청, 2009년), 현재 출원중인 품종은 10건(자료출처 : 일본 임야청, 2009년)으로 지속적으로 품종개발이 이루어지고 있으나, 국내의 경우는 그린합명회사에서 선행 연구과제의 수행으로 개발된 품종을 품종 명칭 등록(그린피스 5호;느티만가닥버섯, 2008년 4월 2일)한 1개 품종과 국립원예특작과학원에서 1988년도에 “만가닥1호”, 1993년도에 “만가닥2호” 2010년도에 품종보호출원한 “해미”가 있으나 만가닥 1, 2호는 품종개발된지 오래되어 급변하는 소비자의 Needs에 대응하기 어려워 거의 상용재배되기에는 적합하지 않으므로 현재 국내에서 재배상용화가 가능한 품종은 2종류(그린피스 5호, 해미)에 국한되어있어 국내에서 재배면적이 증가할때 품종의 다양성이 결여되어 급변하는 환경변화에 상당한 문제점으로 대두될수 있음.

이러한 어려운 여건의 버섯업계와 버섯농가의 새로운 형태의 고부가가치의 품종을 개발하여 품종의 다양성을 확보하고, 그것을 기반으로 버섯 산업의 발전을 도모하고 농가의 소득증대에 이바지 하기 위하여 연구를 수행하였음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 주관연구과제(그린합명회사)

- ◎ 국내외 유전자원의 확보 및 재배적 특성 검증 및 육종균주의 선발
 - 야생버섯 균주은행 및 각 연구기관 보유 느티만가닥버섯 유전자원의 수집 및 확보
 - 수집된 유전자원의 재배 및 생리학적 특성검증
 - 육종을 위한 우량균주 선발(선발기준 : 대선형성, 수량성, 갯색깔, 재배일수, 맛, 갯모양)
 - 국내에서 자생하는 유전자원 확보
- ◎ 선발된 균주의 단핵균사 분리 및 교잡
 - spore printing 기법을 통한 포자의 분리
 - 분리된 포자에서 monokaryon 균사 분리
 - mono-mono mating을 통한 교배종의 생성
 - 돌연변이 균주와 정상균주와의 교잡을 통한 교배종 생성
 - 목표특성을 가진 신품종 스크리닝 기술 개발
- ◎ 교잡균주의 재배적 특성의 검증을 통하여 품종등록
 - 모균주와 교배종의 재배적 특성검증
 - 돌연변이 단핵균사와 정상 단핵균사와의 교배종의 재배적 특성검증

2. 협동연구과제(경상대학교)

- ◎ 확보된 국내외 유전자원의 분자유전학적인 품종구분
 - 수집된 유전자원 30종의 유전체 분리
 - RAPD를 위한 primer의 선정
 - RAPD 및 유전자 maker의 염기서열을 분석 및 해석

- ◎ 교잡된 균주의 단핵균사의 돌연변이 유도
 - MMS등 돌연변이 유도체 처리를 통한 돌연변이 균주 생성조건 확립
 - 생성된 돌연변이 균주의 잿배시험
 - 돌연변이된 단핵균사의 유전적 특징 검증

- ◎ 교잡된 균주의 품종구분 maker의 확립
 - 교배종 품종등록을 위한 특이적 msker개발
 - 품종간 구분을 위한 maker의 탐색 및 확립

IV. 연구개발결과

1. 주관연구과제(그린합명회사)

국내외의 유전자원 29종과 국내 야생종(GPHm3-10 ; 덕유산에서 채취) 1종을 확보하여 실증재배를 실시하여 수량성과 모양등이 우수한 GPHm1-1을 선발하여 국내 야생종 GPHm3-10과 단핵균사 교배를 위한 재배를 실시함.

- GPHm1-1과 GPHm3-10균주의 단포자를 각각 150개씩 분리하여 균사의 생리적인 특성을 검증하여 특성이 다른 단핵균사를 각각 20개씩 선발하여 교배를 수행하여 400종의 교배종을 생성함.
- 생성된 교배종 400균주의 실증재배를 실시하여 수량성, 갯색깔, 재배일수, 맛, 갯모양이 우수한 58개의 균주를 선발하고, Methylmethane sulfonate를 처리하여 돌연변이된 단핵균사간 교잡을 통하여 얻어진 79개 돌연변이주의 실증재배를 실시하여 재배성능이 우수한 2개균주를 선발하여 총 60개의 균주를 선발함.
- 60개의 균주의 2차재배를 실시하여 본 연구과제의 목표특성에 알맞은 균주를 8균주(GPHm4-3, 4-4, 15-3, 15-4, 15-5, 16-1, 16-2, 17-5) 선발하여, 3차재배를 수행하여 배양일수가 단축되고 수량성과 모양이 우수한 2품종 GPHm15-4, GPHm17-5 수량성과 모양이 우수한 1품종 GPHm15-3을 선발하여 각각 “그린피스H2호”, “그린피스H3호”, 그린피스H1호로 명명하여 국립종자관리원에 품종보호출원 하였음.

2. 협동연구과제(경상대학교)

- 느티만가닥 버섯 균주 30 종에 대한 유전자원의 분자유전학적인 품종구분법 개발: 느티만가닥 버섯 30종을 수집하였으며 이들에 대한 분자유전학적 분류를 실시하였음. 그 결과 수집종들은 모두 4개의 그룹으로 분류되었음. 야생종 Hm3-10의 경우 다른 재배종들의 어느 그룹에도 속하지 않는 새로운 strain임을 확인하였음.
- 국내 수집 야생종 Hm3-10 을 이용한 돌연변이균주 제작: 새로운 느티만가닥 품종 육성을 위하여 Hm3-10의 포자 돌연변이법을 개발하였음. 돌연변이를 위하여 돌연변이 유도제 MMS 처리 조건을 확립하였고, 이를 이용하여 단포자 돌연변이를 실시하였음. 그 결과 성장이 우수한 단포자 균사체 20종을 선발하였고, 이들간의 mating을 통하여 400종의 돌연변이 균주를 제작하여 주관기관에 제공하였음.
- 교잡균주 및 야생균주 구분 DNA 마커 개발: 교잡품종, 야생종의 품종 특이적 DNA 마커 개발을 실시하였음. RAPD 상 특이 DNA band들을 cloning 하고 염기서열을 결정하였음. 이를 통하여 품종 특이적 마커를 개발하였음. 최종적으로 개발된 마커 4종을 이용하여 야생종과 일본유래 품종, 교배종을 특이적으로 구분할 수 있었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

◎ 품종 보호 출원

그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호 3개품종 품종보호출원함.

- 1) 그린피스H1호 : 수량성과 모양이 우수한 품종
- 2) 그린피스H2호 : 배양일수가 단축(기존 85일에서 70일로 15일 단축)되고 수량성이 우수한 품종
- 3) 그린피스H3호 : 배양일수가 단축(기존 85일에서 70일로 15일 단축)되고 수량성과 모양이 우수한 품종

◎ 특허출원

- 1) 느티만가닥 품종구분을 위한 DNA 마커: 2010. 7월 출원.....

◎ 논문발표

1) 저널

① Quy Vang Le, Hyo-Kyung Won, Tae-Soo Lee, Chang-Yun Lee, Hyun-Sook Lee and Hyeon-Su Ro (2008) Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism Strain Fingerprinting Markers Applicable to Various Mushroom Species. Mycobiology 36, 161-166

② Chang-Yun Lee, Jeong-Eun Park, Bo-Bae Kim, Sun-Mi Kim and Hyeon-Su Ro (2009) Determination of Mineral Components in the cultivation Substrates of Edible Mushrooms and Their Uptake into Fruiting Bodies. Mycobiology 37, 109-113

③ 임윤정, 이창윤, 박정은, 김상우, 이현숙, 노현수.(2010) 느티만가닥버섯의 분자유전학적 분류 및 품종특이적 DNA 마커 탐색. 한국균학회지 38. (투고중)

2) 학회발표

발표자	발표회명	발표논문제목	발표일	발표장소
임윤정 이창윤 노현수	한국균학회 춘계학술대회	Molecular genetic classification of <i>Hypsizigus marmoreus</i> by random amplified polymorphic DNA	2008.5.23	충남대
레귀방 이현숙 노현수	한국균학회 춘계학술대회	Cross-species REMAP markers for the fingerprinting of mushroom species and strains	2008.5.23	충남대
임윤정 이창윤 노현수	Int. Meet. Fed. Kor. Microbiol Soc.	Molecular genetic markers for the differentiation of <i>Hypsizigus marmoreus</i>	2008.10.16	교육문화회관
이혜정 윤금란 노현수 김종국 이창윤	한국균학회 춘계학술대회	Development fo new cultivar of <i>Hypsizigus marmoreus</i> by crossing between wild and commercial strains.	2009.05.21	강릉원주대 학교해양생물연구교육 센터
박정은 이창윤 노현수	Int. Meet. Fed. Kor. Microbiol Soc.	Development of molecular markers for the identification of <i>H. marmoreus</i>	2009.10.22	교육문화회관
이혜정 노현수 김종국 이창윤	한국균학회 춘계학술대회	Development of new cultivar of brown <i>Hypsizigus marmoreus</i> by crossing between wild and commercial strains.	2010.05.13	대천 한화리 조트

2. 성과 활용 계획

- ▶ 본 연구를 통하여 개발된 3가지 품종(그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호)을 재배농민의 재배여건에 알맞은 품종의 홍보와 교육을 통하여 현재 사용하고 있는 TAKARA bio.의 품종(상표명 : 백일송이)을 대체하여 재배 실시권을 유상 판매할것임.
- ▶ 본 연구를 통해서 개발된 3가지 품종의 재배조건확립을 지속적으로 수행하여 개발된 품종을 사용하는 재배농가에 재배최적화 기술을 이전할 것임.
- ▶ 협동연구과제에서 개발된 품종구분 maker를 이용하여 수출시 발생될 수 있는 해외의 농가의 품종 무단사용을 차단할 예정임.

SUMMARY

Hypsizygus marmoreus belongs to basidiomycetes fungal group, which forms edible fruiting bodies to produce basidiospores as its reproductive cycle. The fruiting body of which has been a good source of food and becomes one of the popular edible mushrooms worldwide. In order to develop new varieties of this mushroom, we firstly obtained various strains of *H. marmoreus* from various stocks. The diversity of the collected strains was assessed by a randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. The result has shown that 29 strains fell into 4 distinct groups while a wild strain collected from DeogYu Mt. did not belong to any of the groups. With this information, we nextly tried to develop new varieties of this mushroom either by breeding or by chemical mutagenesis. We did picked out 3 strains (GPHm1-1, GPHm3-8, and GPHm3-10) that exhibited excellent morphological characteristics. The spores of the strains were collected and 150 of their monokaryon mycelia were selected by dilution method. The 20 slected monokaryon mycelia were crossed by GPHm3-10 × GPHm1-1 and GPHm3-10 × GPHm3-8 and then we picked up dikaryotic mycelia which did not form clamp connection. We acquired 400 dikaryons from GPHm3-10 × GPHm1-1 and 70 from GPHm3-10 × GPHm3-8 with the mating rates of 100% and 70%, respectively. Total 470 dikaryon strains were cultivated and then 58 strains with good morphological and cultivation characteristics were selected. The differences of the 58 strains were verified by somatic test, mophology of fruiting bodies and RAPD. Finally we selected 6 new strains (GPHm15-3, GPHm15-4, GPHm15-5, GPHm16-1, GPHm16-2, GPHm17-5) and among them GPHm15-3, GPHm15-4, and GPHm17-5 were named "GreenpeaceH1ho", "GreenpeaceH2ho", and "GreenpeaceH3ho", respectively, and registrated to the KOREA SEED & VARIETY SERVICE.

Meanwhile, chemical mutagenesis has been conducted on the basidiospores too. Various concentrations of an alkylating agent methanesulfonic acid methyl ester (MMS) was treated on the spores of *H. marmoreus* (10^7 spores / ml) for an hour at 25 °C. The treated spores were spreaded on a potato dextrose agar medium and incubated for 1 week. Mycelia at the condition of 5% survival

rate, which was achieved at the concentration of 5 ml/ml MMS, were isolated. The genomic DNAs of the isolates were extracted and their genetic variations were assessed by a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. The RAPD results revealed that significant variations in the genomic DNA, indicating that the MMS treatment was efficient way to create a pool of mutants. 36 mutant isolates were subjected to mating with 20 haploid mycelia of wild type strain. Analysis on the mating result revealed that a quarter of the total mating yielded diploid mycelia.

Lastly, in order to develop molecular markers that can identify mushroom strains/cultivars in farmlands, we analyzed 29 *H. marmoreus* strains collected from various sources, including commercial farms, research institutes, and wild mushroom bank. The total chromosomal DNAs were extracted from the mushroom mycelia which were grown on PDA media and were subjected to the random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis using 3 commercially available random primer sets. The resulting PCR products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis. The strain-specific DNA markers were developed by determining the sequences of unique DNA fragments and designing the strain-specific primer sets. The resulting DNA markers were applied for the identification of the strains and employed for the molecular breeding of *H. marmoreus*.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	15
Section 1. Purposes.....	15
Section 2. Necessities.....	15
Section 3. Scopes.....	17
1. Investigational subject for Green.co.ltd	17
2. Investigational subject for GNU.....	18
Chapter 2. State-of-the-art report.....	20
Section 1. Technology development.....	20
1. Mushroom breeding	20
2. Molecular genetics of mushroom.....	22
Section 2. Position and impact of the technology.....	23
1. Collection of wild strains and genetic resources.....	23
2. Development of mushroom mutagenesis technology.....	23
3. DNA marker development for the identification of varieties.....	23
4. Development of new cultivars with decreased bitter taste.....	24
5. Development of cultivars with higher production yield.....	24
6. Development of cultivars with no "tosu disease"	24
Chapter 3. Results.....	25
Section 1. Theoretical backgrounds and experimental approaches.....	25
1. Methods for breeding of new cultivasr.....	25
2. Molecular genetics method for the differentiation of culitvars.....	29
Section 2. Research contents.....	30
1. Collection of wild and commercial strains.....	30
2. Cultivation characteristics of collected strains.....	32
3. Physical characteristics of collected strains.....	37
4. Collection of monokaryon mycelia for breeding and mutagenesis.....	38
5. Obtaining chromosomal DNA.....	125
6. Determination of DNA marker sequences.....	125
7. DNA fingerprinting.....	131
8. Chemical mutagenesis of <i>Hypsizigus marmoreus</i>	132
9. Development of molecular genetic marker for breeding.....	135
Section 3. Overall results.....	140

Chapter 4. Scientific and Socio-economic contributions.....	141
Section 1. Year-by-year Purposes	141
1. The first year.....	141
2. The second year.....	142
3. The third year.....	143
Section 2. Achievement of the project and contribution to related technologies.....	144
1. Achievement of the project.....	144
2. Contribution to related technology development.....	145
Chapter 5. Application plans.....	147
Section 1. Plans for practical use and industrialization.....	147
1. Plans for practical use.....	147
2. Plans for industrialization.....	147
Section 2. Plans for technology spreading.....	150
1. Plan for public promotion of the developed technologies.....	150
2. Plan for public education	150
Section 3. Plans for the aquisition of intellectual properties and publications of project outcome.....	150
1. Patent aquisition.....	150
2. Registration of cultivars	151
3. Publication of project outcome.....	169
Section 4. Plans for additional research and other applications.....	169
1. Additional research.....	169
2. Other applications.....	170
Chapter 6. Acquired international information.....	171
Chapter 7. References.....	172

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	15
1절.	연구개발의 목적.....	15
2절.	연구개발의 필요성.....	15
3절.	연구개발의 범위.....	17
	1. 주관연구과제(그린합명회사).....	17
	2. 협동연구과제(경상대학교).....	18
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	20
1절.	국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황.....	20
	1. 국내·외 품종 육종 분야.....	20
	2. 국내·외 개발된 품종의 구별성 확립을 위한 분자생물학 분야.....	22
2절.	연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치.....	23
	1. 국내에서 자생하는 느티만가닥버섯 유전자원의 확보.....	23
	2. 돌연변이체의 유도조건의 구명.....	23
	3. 품종간의 구분을 위한 마커의 구명.....	23
	4. 쓴맛이 적은 품종의 개발.....	24
	5. 고수량성 품종의 개발.....	24
	6. 토수병 발병이 없는 균주의 개발.....	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	25
1절.	이론적, 실험적 접근방법.....	25
	1. 품종 육종 방법.....	25
	2. 품종의 구분을 위한 분자생물학적인 방법.....	29
2절.	연구내용.....	30
	1. 야생균주은행 및 각 기관보유 느티만가닥버섯 유전자원 수집및 확보.....	30
	2. 수집된 균주의 재배적 특성 검증.....	32
	3. 수집된 균주의 생리적 특성 검증(대선 형성 중심으로).....	37
	4. 교배육종 및 돌연변이를 위한 선발된 균주의 단핵균사 확보.....	38
	4. 유전체의 확보.....	125
	6. 분자유전학적 마커 염기서열의 결정.....	125
	7. DNA fingerprinting 방법을 이용한 느티만가닥버섯 품종 구분.....	131
	8. 느티 만가닥 버섯 돌연변이균주 제작.....	132
	9. 느티 만가닥 버섯육종을 위한 분자유전학적 마커개발.....	135
3절.	연구결과.....	140

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	141
1절.	연도별 연구목표.....	141
1.	1차년도.....	141
2.	2차년도.....	142
3.	3차년도.....	143
2절.	연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도.....	144
1.	연구개발목표의 달성도.....	144
2.	관련분야의 기술발전예의 기여도.....	145
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	147
1절.	실용화·산업화 계획(기술실시 등).....	147
1.	실용화 계획.....	147
2.	산업화 계획.....	147
2절.	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등.....	150
1.	홍보계획.....	150
2.	교육, 지도 계획.....	150
3절.	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등.....	150
1.	특허출원.....	150
2.	품종보호출원.....	151
3.	논문발표.....	169
4절.	추가연구, 타연구에 활용 계획 등.....	169
1.	추가연구.....	169
2.	타연구에 활용 계획.....	170
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	171
제 7 장	참고문헌.....	172

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

배지재료 가격의 상승과 버섯생산과잉으로 인하여 침체된 버섯업계와 버섯농가의 새로운 형태의 고부가가치의 품종을 개발하여 품종의 다양성을 확보하고, 그것을 기반으로 버섯 산업의 발전을 도모하고 농가의 소득증대에 기여하는 것이 본 연구의 목적임.

2절. 연구개발의 필요성

우리나라의 식용버섯은 년 8,000억원 이상의 시장을 형성하고 있으나 버섯의 종류는 양송이버섯, 새송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯의 5종으로써 일본, 중국 등에 비해 재배버섯의 다양성이 적어 소비자의 Needs에 부합하기 어려우며, 재배종 다양성의 부족으로 급변하는 기후조건과 다양한 환경변화에 따른 적응성이 결여되고, 일부 대농들의 생산성 향상으로 버섯이 과잉생산되어 생산 수익성은 날로 감소하고 있는 추세임.

이에 따른 내용으로 표 2, 3에서 보는 바와 같이 국내버섯의 생산량과 재배면적을 비교할 때 버섯재배면적은 2004년 1,058 ha에서 2008년 531 ha로써 2배가량 줄어들었으나, 버섯 생산량은 2004년 141,796톤에서 2008년 152,030톤으로 1만톤 정도가 증가되는 자료를 근거로 버섯재배는 노동력위주에서 기계화로 전환되었음을 반증하여 버섯재배농민들에 새로운 활력을 불어넣을 수 있는 새로운 품목의 개발이 필요하며, 소비자들에게는 새로운 버섯을 접할 수 있는 기회를 제공하고 성장일로에 있는 국내 버섯의 수출을 위한 새로운 성장 동력이 필요함.

느티만가닥버섯은 일본에서는 2008년 108,206톤(일본 임야청;2009)이 생산되어 팽이버섯 131,092톤 다음으로 생산량이 높은 버섯으로 성장잠재력이 큰 버섯임 (표 1 참조).

일본의 경우 느티만가닥버섯의 생산량이 1991년 36,623톤이었던 것이 2008년에 108,206톤으로 생산량이 3배이상 증가하고, 상대적으로 느타리버섯의 경우 1991년 30,866톤에서 2008년 2,578톤으로 10배이상 생산량이 감소한 요인으로는 첫째 느티만가닥버섯은 느타리버섯에 비해 병재배로의 전환이 용이하였으며, 둘째 저장기간이 느타리버섯 7일에 비해 느티만가닥버섯은 30일로써 유통에 유리하며, 셋째로는 고유의 맛을 가지지 않아 어떤 요리에도 섞일 수 있는 장점 때문이었음.

국내에서는 느티만가닥버섯이 양송이버섯, 새송이버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 표고버섯의 5종의 버섯외에 새로운 품목으로 대체할 가능성이 가장 높지만 팽이버섯(배양일수 25일, 재배일수 30일), 새송이버섯(배양일수 40일, 재배일수 18일) 등에

비하여 85일~120일로써 배양일수가 길고, 버섯의 특성상 후숙 기간을 많이 필요로 하여 고체종균을 사용함에 따른 접종원의 안정성 유지가 어려우며, 재배적인 측면에서 팽이버섯과 새송이버섯에 비해 상당한 고습을 유지함에 따라 재배에 사용되는 기기들의 부식 및 전기 설비의 누전등의 문제가 심하여 우수한 저장성등의 장점에도 불구하고 재배자들에게 외면되어왔음.

그러나 현재 국내의 재배현실은 새로운 버섯의 생산이 절실히 요구되고있어 느티만 가닥버섯의 가장 단점으로 생각되는 배양일수를 단축하고 쓴맛이 적은 품종등을 개발하여 재배농민과 소비자의 Needs에 부합되도록 우선적으로 국내 자생종 느티만 가닥버섯을 이용한 새로운 품종을 개발할 필요성이 있다.

<표 1. 일본의 버섯 생산량 비교>

(생산량=M/T)

버섯종류	1991년	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년
느티만가닥버섯	36,623	88,066	99,787	103,249	108,996	108,206
팽이버섯	95,123	112,997	114,542	114,630	129,770	131,092
일새버섯	7,950	46,036	45,111	45,985	43,610	43,406
느타리버섯	30,866	4,655	4,074	3,384	3,024	2,578

자료출처 : 일본 임야청 자료(2009 년도)

<표 2. 국내 년도별 버섯 재배면적 변화>

(단위 : ha)

버섯종류	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년
느타리버섯	596	556	305	311	260
팽이버섯	85	84	49	49	54
새송이버섯	183	249	207	231	155
양송이버섯	194	174	74	60	62
계	1,058	1,063	635	651	531

자료출처 : 2008 특용작물 인삼생산실적, 농림식품부

<표 3. 년도별 국내 버섯생산량의 변화>

(단위 : M/T)

구분	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년
느타리	52,211	56,866	45,782	45,957	40,071
팽 이	32,796	40,161	34,400	36,864	55,231
새송이	32,736	43,230	43,256	46,357	45,906
양송이	24,053	18,985	11,892	11,150	10,822
계	141,796	159,242	135,330	140,328	152,030

자료출처 : 2008 특용작물 인삼생산실적, 농림식품부

3절. 연구개발의 범위

1. 주관연구과제(그린합명회사)

가. 국내외 유전자원의 확보 및 재배적 특성 검증 및 육종균주의 선발

- (1) 야생버섯 균주은행 및 각 연구기관 보유 느티만가닥버섯 유전자원의 수집 및 확보
- (2) 수집된 유전자원의 재배 및 생리학적 특성검증
 - (가) 선행연구로 조합된 배지 톱밥 47%, 콘코프 20%, 대두피 6.5%, 미강 20%, 비트펠프 6.5%로 조성하여 조합한 재배용 배지를 이용한 재배실험으로 균주의 선발
 - (나) 갓모양, 수량성, 갓색깔, 배양일수를 기준으로 선발
- (3) 육종을 위한 우량균주 선발
 - (가) 선발기준 : 대선형성, 수량성, 갓색깔, 재배일수, 맛, 갓모양
- (4) 국내에서 자생하는 유전자원 확보
 - (가) 덕유산에서 자생하는 느티만가닥버섯 균주 확보(GPHm3-10)

나. 선발된 균주의 단핵균사 분리 및 교잡

- (1) spore printing 기법을 통한 포자의 채취
 - (가) GPHm3-10, GPHm1-1균주의 액체종균제조(350cc, 24℃ 15일 배양)
 - (나) 액체종균을 톱밥(콘코프, 톱밥, 미강, 대두피)배지에 접종 : 85일 배양 후 23일 재배
 - (다) 재배완료된 버섯에서 갓의 형성이 고른 버섯을 채취하여 포자 채집
- (2) 분리된 포자에서 monokaryon 균사 분리
 - (가) 멸균 증류수에 dilution법으로 1개의 PDA plate에 30개의 포자가 생장하도록 하여 smearing.
 - (나) 24℃ 7일동안 배양후 발아된 포자를 100개 분리
 - (다) 현미경 검경을 통하여 clampconnection이 없고, 균총의 모양이 구분 가능한 monokaryon mycelia 각각 20개씩 분리
 - (라) 분리된 단핵균사를 경상대에 단핵균사의 유전적 특징검증을 위해 발송.
- (3) mono-mono mating을 통한 교배종의 생성
 - (가) GPHm1-1, GPHm3-10균주에서 분리한 각각 20개의 monokaryon 균사를 PDA plate에 접종하여 mating.
 - ① PDA plate에 각 균주의 monokaryon 균사를 3×3mm 크기로 잘라내에 서로 다른 균사를 1cm 간격을 두고 동일한 plate에 접종(400개 조합)

- ② 접종 7일후 두 개의 균사가 융합된 것을 확인 후 현미경 검경을 실시하여 clamp connection이 있는 균사만을 선발
- (4) 목표특성을 가진 신품종 스크리닝 기술 개발
 - (가) 교배균주를 재배하여 대조품종과의 비교를 통하여 우수한 균주의 선발
 - ① Dikaryon으로 확인된 균주의 액체종균 제조(350cc;대두분배지, 24℃ 15일 배양)
 - ② 액체종균을 톱밥(콘코브, 톱밥, 미강, 대두피)배지에 접종 : 85일 배양 후 23일 재배
 - ③ 실증재배를 통하여 얻어진 버섯의 개체수, 갓모양, 수량성, 갓색깔, 맛, 대치선형성의 6가지 항목에 부합되는 균주 선발
 - ④ 1차선발된 58개 균주의 유전적 특성 검증을 위해 경상대에 발송

다. 교잡균주의 재배적 특성의 검증을 통하여 품종등록

- (1) 돌연변이 단핵균사와 정상 단핵균사 교배종과 정상 단핵 균사간 교배종의 재배적 특성검증
- (2) 만가닥2호(품종등록시 대조품종으로 사용) 교배종의 재배적 특성검증
 - (가) 배양소요일수가 적은 1개 품종 등록
 - (나) 고수량성인 1개 품종 등록
 - (다) 쓴맛이 적은 1개 품종 등록

2. 협동연구과제(경상대학교)

가. 수집된 유전자원의 유전체 분석

- (1) 특이적 유전자 마커서열을 분석함.
 - (가) 30종의 수집균주 유전체 분리
 - (나) 유전자마커의 PCR 및 염기서열분석
- (2) 분자유전학적인 품종 구분 방법 확립
 - (가) RAPD를 위한 primer 선정
 - (나) RAPD수행 및 결과의 해석

나. 돌연변이 균주 생성조건 확립 및 돌연변이된 단핵균사의 유전적 특징검증

- (1) 돌연변이 균주와 정상균주와의 교잡을 통한 교배종 생성
 - (가) 돌연변이 단핵 균주(20종) × 돌연변이 단핵 균주(20종) 교배
 - (나) 돌연변이 단핵 균주(20종) × GPHm3-10 야생균주(20종) 교배
- (2) 자외선등 돌연변이 유도제 처리를 통한 돌연변이 균주 생성조건 확립
 - (가) 단포자 유래 균사에 대한 UV처리하여 생존율 및 돌연변이율 조사
 - (나) DNA methylation을 유발하는 methylmethane sulfonate(이하 MMS)를

처리 : 느티만가닥버섯 단포자 10^7 개/ml dp 0~10 ml MMS 1시간 처리후
생존율 및 돌연변이율 조사

(3) 단핵균사의 유전적 특징 검증

(가) 각 돌연변이 균주의 plate 배양

(나) 배양된 균주의 chromosomal DNA분리

(다) 3가지의 primer(OPS-1, OPL-13, OPS-5)를 사용하여 RAPD 실시 후 결과분석

다. 교잡된 균주의 품종구분 maker의 확립

(1) 교배종 품종등록을 위한 특이적 maker개발

(2) 품종간 구분을 위한 maker의 탐색 및 확립

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

1. 국내·외 품종 육종 분야

한국과 일본의 버섯 품종 등록 현황은 일본이 9종의 버섯에서 360종이 등록되었으며 한국은 8종의 버섯에 49종 (표 4, 5참조)으로 약 7배의 차이를 보이고 있어 절대적인 품종의 열세로써 품종보호제도가 실효되는 2010년부터는 품종사용에 대한 로열티 문제가 대두될 것을 예측됨.

그리고 본 연구에서 개발하고자 하는 느티만가닥버섯의 경우는 일본에서 2001년부터 등록된 품종 현황을 보면 29종이 등록 되어있으며(표 6참조), 현재 출원중인 품종은 10건임(표 7 참조)으로 지속적으로 품종개발이 이루어지고 있으나, 국내의 경우는 그린합명회사에서 선행 연구과제의 수행으로 개발된 품종을 품종 명칭 등록(그린피스 5호;느티만가닥버섯, 2008년 4월 2일)한 1개 품종과 국립원예특작과학원에서 1988년도에 “만가닥1호”, 1993년도에 “만가닥2호” 2010년도에 품종보호출원한 “해미”가 있으나 만가닥 1, 2호는 품종개발되지 오래되어 급변하는 소비자의 Needs에 대응하기 어려워 거의 상용재배되기에 적합하지 않으므로 현재 국내에서 재배상용화가 가능한 품종은 2종류(그린피스 5호, 해미)에 국한되어있어 국내에서 재배면적이 증가할때 품종의 다양성이 결여되어 급변하는 환경변화에 상당한 문제점으로 대두될수 있으므로 다양한 품종의 개발이 필요함.

<표 4. 한국과 일본의 버섯 품종등록 비교>

(2009년 3월 현재)

버섯류	등록건수	
	일본	한국
표고버섯	167	0
팽이버섯	32	6
앞새버섯	31	0
만가닥느티버섯	29	0
젯빛만가닥버섯	23	0
나도팽나무버섯	19	0
큰느타리버섯	17	2
느티만가닥버섯	29	0
느타리버섯	13	33
합계	360	41

자료출처 : 국립종자원

<표 5. 국내 품종 등록 현황>

(2009. 02. 28 현재)

구분	작물명	연도별 출원실적(건수)							등록실적
		합계	2004 까지	2005	2006	2007	2008	2009	
버섯류 (8)	소계	49	12	4	8	14	5	6	31
	느타리버섯	33	11	2	7	9	2	2	25
	영지버섯	1	1	0	0	0	0	0	0
	팽이버섯	6	0	2	0	0	1	3	0
	큰느타리버섯	2	0	0	1	1	0	0	2
	눈꽃동충하초	1	0	0	0	1	0	0	1
	반대기동충하초	3	0	0	0	3	0	0	3
	산느타리버섯	2	0	0	0	0	1	1	0
	노랑다발동충하초	1	0	0	0	0	1	0	0

자료출처 : 국립종자원(2009)

<표 6. 일본의 느티만가닥 버섯 품종등록 현황>

(2009년 3월 20일 현재)

▼一覧 (合計: 29件)

登録番号	品種名称	品種名称(カナ)	登録年月日	育成者権の消滅日	育成者権者名
9199	博多A-264	ハカA-264	2001/07/27		福岡県
9504	宝の華 K-2706	宝の華 K-2706	2001/10/18		タカラバイオ株式会社
9505	宝の華 K-3806	宝の華 K-3806	2001/10/18		タカラバイオ株式会社
9506	宝の華 K-3906	宝の華 K-3906	2001/10/18		タカラバイオ株式会社
9507	宝の華 K-6835	宝の華 K-6835	2001/10/18		タカラバイオ株式会社
9638	ホクト11号菌	ホクト11号菌	2001/11/22		ホクト株式会社
10362	大木娘413	オオキムスメ413	2002/06/20		大木町
10363	野々海146号菌	ノノ146号菌	2002/06/20	2008/06/21	株式会社ミスライフ
10749	ホクト12号菌	ホクト12号菌	2002/09/30		ホクト株式会社
10869	大木の穂T-1	オオキミノT-1	2002/11/14		大木町
10959	マーブレ88-8	マーブレハチハチ	2002/12/16		北海道
11228	長野農工研B-1号	ナガノウダケンB-1号	2003/03/17		社団法人長野県農村工業研究所, 全国農業協同組合連合会
11353	宝の華K-4528	宝の華K-4528	2003/03/26		タカラバイオ株式会社
11354	ホクト15号菌	ホクト15号菌	2003/03/26		ホクト株式会社
11581	チクマッシュH-100	チクマッシュH-100	2003/11/18	2006/11/21	株式会社千曲化成
11582	カヤノヒメ	カヤノヒメ	2003/11/18	2007/11/20	長野県
11850	チクマッシュH-110	チクマッシュH-110	2004/03/09		株式会社千曲化成
12049	ホクト16号菌	ホクト16号菌	2004/03/15		ホクト株式会社
12050	ホクト17号菌	ホクト17号菌	2004/03/15		ホクト株式会社
12051	宝の華K-4529	宝の華K-4529	2004/03/15		タカラバイオ株式会社
12052	宝の華K-4530	宝の華K-4530	2004/03/15		タカラバイオ株式会社
12053	宝の華K-4531	宝の華K-4531	2004/03/15		タカラバイオ株式会社
13293	宝の華K-4587	宝の華K-4587	2005/06/22		タカラバイオ株式会社
13294	ホクト白1号菌	ホクトシロ1号菌	2005/06/22		ホクト株式会社
13739	越のわらべ	コノワラベ	2006/02/27		新潟県
14295	NN-11	エヌエスエフ	2006/03/24		社団法人長野県農村工業研究所, 中野市農業協同組合
14665	KX-BS022号	ケイックスビーएसレイニイコウ	2006/12/14		株式会社キソックス
14666	ホクト18号菌	ホクトシロ18号菌	2006/12/14		ホクト株式会社
15884	チクマッシュH-120	チクマッシュH-120	2007/12/17		株式会社千曲化成

<표 7. 일본의 느티만가닥 버섯 품종출원 현황>

(2009년 3월 20일 현재)

▼一覧 (合計:10件)

出願番号	品種名称	品種名称(カナ)	出願日	出願公表日	出願者名
20974	NN-12		2007/04/19	2007/08/06	社団法人長野県農村工業研究所,中野市農業協同組合
21343	mamo20		2007/08/21	2007/12/05	ホクト株式会社
21408	KX-BS023号	KX-BS023ツ	2007/08/29	2007/12/05	株式会社キノックス
21409	KX-BS024号	KX-BS024ツ	2007/08/29	2007/12/05	株式会社キノックス
21734	黒姫S菌	カビノSキ)	2007/11/28	2008/02/19	株式会社ミスズライフ
23215	チクマッシュH-130	チクマッシュH-130	2008/12/02	2009/02/23	株式会社千曲化成
23278	宝の華K-4975	タカラハナK-4975	2008/12/16	2009/02/23	タカラバイオ株式会社
23279	宝の華K-4976	タカラハナK-4976	2008/12/16	2009/02/23	タカラバイオ株式会社
23280	宝の華K-4977	タカラハナK-4977	2008/12/16	2009/02/23	タカラバイオ株式会社
23281	宝の華K-4978	タカラハナK-4978	2008/12/16	2009/02/23	タカラバイオ株式会社

2. 국내 · 외 개발된 품종의 구별성 확립을 위한 분자생물학 분야

현재 UPOV에서는 분자생물학적인 품종 구분 방법을 채택하지 않고 있다. 그러나 국내의 농업과학기술원 및 기관들에서는 버섯 품종 구분을 위한 분자생물학적인 마커의 개발을 지속적으로 진행하고 있음. 특히 농업과학기술원에서 개발된 URP primer의 경우 느타리버섯의 품종구분을 위한 유용한 마커로 알려져 있음.

분자생물학적인 마커의 개발이 이루어지지 않을 경우 육종가에 의해 개발되어진 품종이 다른 재배자들에 의해 도용되었을 경우 재배적인 특성을 통하여 구분이 이루어져야 함.

재배를 통한 재배적 특성을 구분할 때 버섯의 특성상 재배환경 및 배지등의 여러 가지 요인에 의해 표현형이 다양하게 변화되는 문제들로 인해 객관성을 유지하기 어려우므로 분자생물학적인 다양한 방법(RAPD, SSR등)이 개발되어야 함.

팽이버섯의 경우는 개발된 품종들이 유전적인 유연관계가 너무 가까워 분자생물학적인 방법으로 품종을 구분하는데는 상당히 어려운 것으로 알려져 있음.

그러나 새송이버섯, 느타리버섯, 느티만가닥버섯등의 유연관계가 먼 버섯들에서는 분자생물학적인 마커를 이용한 방법이 유용하게 사용될것임.

그리고 분자생물학적인 마커가 개발되었을 때 선행되어야 할 문제는 특이적인 마커가 버섯재배에서 표현형을 나타내는데 관여하는가에 대한 정의가 선행되어야 함.

2절. 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

핵심기술 또는 성과물의 내용	목표 수준			
	세계 유일	선진7개국	우리실정에 맞게 변경	기타
1. 국내에서 자생하는 느티만가닥버섯 유전자원의 확보	○			
2. 돌연변이체의 유도조건의 구명		○		
3. 품종간의 구분을 위한 마커의 구명		○		
4. 쓴맛이 적은 품종의 개발			○	
5. 고수량성 품종의 개발	○			
6. 토수병 발병이 없는 균주의 개발		○		

1. 국내에서 자생하는 느티만가닥버섯 유전자원의 확보

- ▶ 느티만가닥버섯 국내 야생균주를 덕유산에서 채취하여 GPHm3-10으로 명명하여 세계에서 유일한 육종모본으로 활용할것임.

2. 돌연변이체의 유도조건의 구명

- ▶ DNA의 methylation을 유발하는 Methyl Methane Sulfonate(MMS)를 이용한 느티만가닥 버섯의 화학적 돌연변이 조건을 확립하여 느티만가닥버섯 품종개발에 선진국이라고 할수 있는 일본의 육종 기술과 비교하여 뒤지지 않는 기술을 확립함.
- ▶ 국내의 경우 단순교잡 육종을 보완하고 육종효율을 배가시킬 수 있는 기술이 확립됨.

3. 품종간의 구분을 위한 마커의 구명

- ▶ 본 연구과제를 통하여 개발된 품종구분 마커인 P-6, P-8, P-9, P-10이 개발되어 국내와 선진 7개국의 느티만가닥버섯의 품종 구분기술과 비교하여 PCR을

이용하여 용이한 품종구분 체계를 확립하여 품종 도용에 대한 안전장치를 마련함.

4. 쓴맛이 적은 품종의 개발

- ▶ 본 과제에서 돌연변이 유발에 의해 개발된 “Hmm25, Hmm26”균주는 쓴맛이 적은 품종으로 개발되었으나, 재배일수가 개발된 다른 품종에 비해 6일~8일 더 소요되어 현재 품종으로 사용은 어려우나 위의 균주를 육종 모본으로 사용하여 재배일수를 단축하고, 쓴맛이 적은 품종을 개발하는데 기여할 수 있음.

5. 고수량성 품종의 개발

- ▶ 본 과제를 통하여 개발된 “그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호”는 국내와 국외에는 그 유래를 찾아볼 수 없는 국내 자생종 느티만가닥버섯을 모본으로 하여 개발되었으므로 세계유일의 품종임.

6. 토수병 발병이 없는 균주의 개발

- ▶ 본 과제를 통하여 개발된 “그린피스H2호, 그린피스H3호”는 현재까지의 재배기간중 토수병의 발병이 없었고, 토수병의 발병율이 높아 대조구로 사용된 GPHm0-3균주에서도 토수병의 발병이 발생되지 않았으므로 토수병에 관련해서는 균주의 개량으로 접근하는 연구방식보다는 재배환경적인 요인에 대한 연구가 진행되어야 할 것임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 이론적, 실험적 접근방법

1. 품종 육종 방법

가. 교배육종

- (1) 목표특성에 적합한 균주의 선발
- (2) 자실체를 발생시켜 spore printing법에 의해 포자채취
- (3) 채취된 포자를 dilution법에 의해 30개체가 되도록 하여 PDA plate에 도말
 - ① 24℃에서 4일경과 후 포자에서 발아된 colony를 PDA plate에 이식
- (4) 균사의 현미경 검경을 통해 clamp connection이 없는 균사를 150개 분리
- (5) 분리된 균사중에서 균총모양과 성장속도를 관찰하여 서로다른 단핵균사를 20개씩 선발
- (6) 선발된 균사를 PDA plate에 3×3mm크기로 약 1cm간격을 두고 접종(400조합)
- (7) 균사접합이 일어난후 접합된 부위를 현미경 검경하여 clamp connection이 있는 균주를 선발
- (8) 선발된 균주를 톱밥배지에 접종하여 실증재배 실시
 - ① 톱밥배지 : 선행연구로 조합된 배지 톱밥 47%, 콘코프 20%, 대두피 6.5%, 미강 20%, 비트펄프 6.5%로 조성
 - ② 배양기간은 85일, 배양실내 온도는 20℃로 유지하여 85일동안 배양
 - ③ 균류기를 실시하고 병당 15cc의 물을 관수
 - ④ 발아과정은 온도 15℃, 습도 95%이상, 광 50~100 lux로 조절하여 11일동안 실시
 - ⑤ 생육과정은 온도 15℃, 습도 95%이상, 광 1,000~1,500 lux로 조절하여 11일동안 실시

- (9) 수확된 버섯의 수량성, 갯색깔, 개체수, 버섯 맛, 재배일수를 조사하여 최초 선발된 균주의 10~15%를 선발
- (10) 1차 선발된 균주를 2차 재배를 통해 10% 선발
- (11) 2차 선발된 균주중에서 육종목표에 적합하고 재배성적이 우수한 균주를 선발하여 품종등록 진행

나. 돌연변이육종

(1) spore count

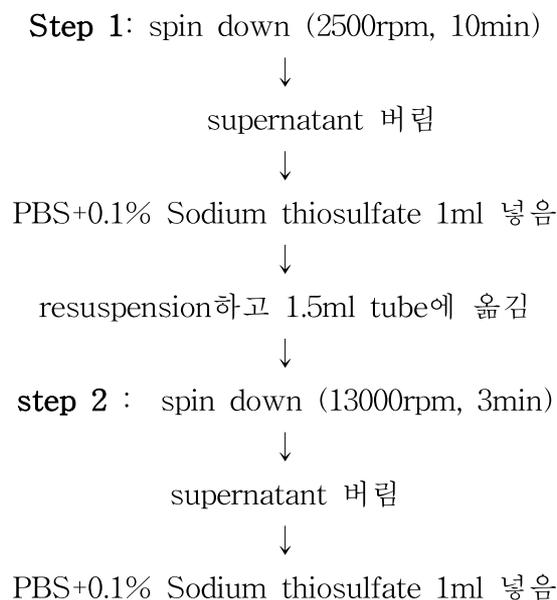
- ① spore tube에 액체퇴비배지(ABM) 20ml을 넣고
- ② spore solution 20ul를 따서 hemacytometer로 spore count :
큰 Gride(6×10^{-3} spore)세 개의 평균을 냄

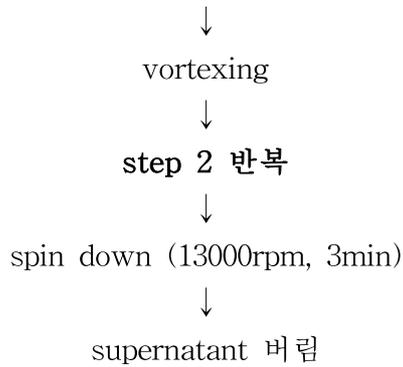
(2) Incubation

50ml conical tube에 25℃에서 6시간동안 배양한다.

(3) MMS treatment

15ml conical tube 6개에 3ml씩 배양한 spore solution을 넣고 각각의 tube에 MMS를 $0\mu\text{l}$, $4.5\mu\text{l}$, $5.5\mu\text{l}$, $6.5\mu\text{l}$, $7.5\mu\text{l}$, $9\mu\text{l}$ 씩 넣는다. ⇨ 25℃에서 1시간 incubation





(4) Plating

MMS를 wash한 pellet에 액체퇴비배지(ABM) 1ml 넣고 resuspension 각 sample당 5개 plate(퇴비배지(AB))에 spreading 한다.

*control의 경우 1X, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} 배 희석해서 spreading 한다.

25°C에서 일주일 incubation

다. 균주의 활력검증 방법(효소학적 방법)

(1) 2차 선발된 8개 균주와 육종에 사용된 모균주를 24°C, 15일동안 PDB에 진탕 배양

(2) 진탕배양 후 균사체와 배양액을 분리

(3) 배양액은 exo enzyme 측정에 사용하고, 분리된 균사체는 3차증류수에 3회 세척 후 beed beater를 이용하여 균사파쇄 후 endo enzyme 측정을 위한 시료로 사용

(가) α-amylase activity

① Reaction mixture

㉠ Enzyme sample 20 μ l

㉡ Distilled water 480 μ l

㉢ Starch solution 500 μ l

* Starch 10mg / 20mM potassium phosphate buffer(pH7.0) 1ml

② Condition of Reaction

* KEEP 30°C for 5 minute in waterbath

③ Method of Measurement

* DNS Method(Miller, 1959)

One unit was defined as the amount of enzyme which produced 1 μ mol of reducing sugar in 1min.

(ㄴ) β -glucosidase activity

① Reaction mixture

㉞ Enzyme sample 500 μ l

㉟ Salicin solution 500 μ l

* 17mM Salicin / 200mM sodium acetate buffer(pH 4.6)

② Condition of Reaction

* KEEP 30 $^{\circ}$ C for 30 minute in waterbath

③ Method of Measurement

* DNS Method(Miller, 1959)

One unit was defined as the amount of enzyme which produced 1 μ mol of reducing sugar in 1min.

(ㄷ) Chitinase activity

① Reaction mixture

㉞ Enzyme solution 1ml

㉟ Colloidal chitin 1ml

* 0.005% chitin / 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)

㊱ 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1ml

② Condition of Reaction

* KEEP 30 $^{\circ}$ C for 1hour in waterbath

③ Stopping of reaction

㉞ Heating at 100 $^{\circ}$ C

㉟ Centrifuge at 10,000rpm for 10min

③ Method of Measurement

* One unit of was defined as the amount of enzyme which produced 1 μ mol of NAG(N-acetyl-D-glucosamine) in 1min.

(ㄹ) Xylanase activity

① Reaction mixture

㉞ Enzyme solution 100 μ l

㉟ Oat spelts xylan 500 μ l

* oat spelts xylan(1.0%) / 100mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)

㊱ Sodium phosphate buffer(pH 7.0) 400 μ l

② Condition of Reaction

* KEEP 30°C for 20 minute in waterbath

③ Method of Measurement

* One unit of was defined as the amount of enzyme which produced 1 μ mol of reducing sugar in 1min.

2. 품종의 구분을 위한 분자생물학적인 방법

(1) 느티만가닥버섯균주 수집 및 배양

본 실험에 이용한 느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*) 균주는 일본유래 재배종 및 국내보존기관 보유종(야생버섯균주은행, 그린피스버섯연구소, 국립원예특작과학원), 덕유산에서 수집된 야생종 1종 등 총 30종의 균주를 사용하였다 (Table 1). 각 균주는 potato-dextrose agar(PDA) 배지에 계대배양하며 보관하였다. 버섯염색체의 추출은 다음과 같은 방법으로 수행하였다(Grimberg *et al.*, 1989). 먼저 PDA에서 키운 버섯균사를 모아서, 1X TE(Tris-EDTA) buffer에 현탁한 후 막자사발로 곱게 갈았다. 이를 microtube에 500 ml씩 분주하고 *Trichoderma harzianum* lysing enzyme(SIGMA) 2 mg을 가하여 잘 섞은 뒤에 2시간 동안 상온에서 교반하며 세포벽을 용해시켰다. 여기에 SDS-TE buffer(2% SDS, 0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 500 ml를 넣고 잘 섞은 후, 65°C에서 10분간 방치하여 세포를 파괴시켰다. 이후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액에 100 ml의 5 M ammonium acetate를 가하고, 2배 부피의 Isopropanol을 가한 뒤 -20°C에서 1시간 이상 방치하였다. 버섯 염색체를 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 침전물로 획득하였다. 이 침전물을 80% 에탄올로 씻고 에탄올을 완전히 제거한 후, 증류수 200 ml를 가한 뒤 3 M sodium acetate 20 ml를 넣어 37°C에서 10분간 방치하였다. 이렇게 얻어진 DNA 용액에 동량의 PCI(phenol/chloroform/isomyl alcohol, 25/24/1) 용액을 넣고 섞은 뒤 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하였다. 같은 조작을 한번 더 반복한 후, 최종적으로 얻어진 상등액에 100% 에탄올을 최종 농도 70%가 되게 가하였다. 침전된 DNA는 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 후 70% EtOH로 씻고 증류수로 녹였다.

(2) RAPD 분석

추출한 염색체 DNA를 주형(template)으로 하고, RAPD용 random primer(Qiagen) OPS-1(5'-CTA CTG CGC T-3'), OPS-10(5'-ACC GTT CCA G-3') 및 OPL13(5'-ACC GCC TGC T-3')을 이용하여 PCR을 수행하였다 (11). 반응액은 주형 DNA 2 ml, primer(100 mM) 1 ml, 10nM dNTP, Taq polymerase(Solgent Co.) 1 ml, 10X Taq buffer(Solgent Co.) 2 ml을 가하고 증

류수로 반응액의 부피를 20 RI로 조정하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분간 denaturation 후, 94℃ 45초, 40℃ 45초, 72℃ 3분로 40 cycle 증폭하였으며, 이후 72℃에서 10분간 방치하여 반응을 완결하였다. PCR 산물은 agarose gel electrophoresis(150V에서 1시간 30분)로 분리하였고 EtBr(ethidium bromide)염색 후 Gel documentation system(Vilber-Lourmat Bio-Vision 3000 model)를 사용하여 gel image를 획득하였다. 각 PCR 산물의 크기는 1kb DNA ladder(New England Biolabs)를 size marker로 사용하여 확인하였다.

(3) 계통분석

RAPD 결과로 얻어진 DNA 패턴은 특정 위치의 DNA band의 유무를 1과 0의 값으로 엑셀프로그램으로 정리하였고, FreeTree 소프트웨어(Pavlicek *et al.*, 1999)를 이용하여 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Average) 분석방법(Rohlf, 1989)으로 유연관계 분석하였다. 최종적으로 얻어진 데이터는 TreeView 소프트웨어(Page, 1996)를 이용하여 dendrogram으로 나타내었다.

(4) 품종특이적 마커의 클로닝

RAPD에서 나타난 특이적 DNA band를 품종 특이적 마커로 개발하기 위하여 각 DNA band의 염기서열을 결정하였다. 이를 위하여 각 품종별 특이 DNA band 18개를 선정하여 gel에서 추출하였다. 추출된 DNA를 pGEM Teasy vector(Promega)와 ligation 후, *Escherichia coli* DH5a competent cell에 열 충격(heat shock) 방법으로 삽입하였다. 형전전환 대장균은 LB-ampicillin(100 mg/ml)에 도말하고 37℃에서 12시간 배양하였다. 각 콜로니를 LB-ampicillin 액체배지에 배양한 후 plasmid를 추출하고 (plasmid prep kit, Solgent), 제한효소 *EcoRI*을 처리하여 insert 존재유무를 확인하였다. Cloning이 완료된 plasmid는 상업적 염기서열결정서비스 회사(Solgent)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

2절. 연구내용

1. 야생균주은행 및 각 기관보유 느티만가닥버섯 유전자원 수집및 확보

<표 8. 균주 보유 내용>

구분	균주수	비고
야생버섯균주은행(IUM)	2	표 9. 연번 22,23
경상대학교	6	표 9. 연번 16-21
주관기관 수집균주	15	표 9. 연번 1-15
주관기관 육종균주	1	표 9. 연번 24
국내 야생균주	1	표 9. 연번 29
기타 수집균주	4	표 9. 연번 25-28
합 계	29	

<표 9. 보유 균주 세부 내용>

연번	균주번호	도입일	유입경로	비고
1	Hm0-1	20070713	일본 재배종(나가노)	부나시메지
2	Hm0-2	20070713	일본 재배종(나가노)	"
3	Hm0-3	20070713	일본 재배종(교토)	"
4	Hm0-5	20070713	일본 재배종(나가노)	"
5	Hm0-6	20070713	일본 재배종(나가노,호쿠도)	"
6	Hm0-8	20070713	일본 재배종(니가타)	"
7	Hm0-10	20070713	일본 재배종(나가노,호쿠도)	"
8	Hm1-1	20070713	일본 재배종(후쿠오카)	부나시메지
9	Hm1-2	20070713	일본 재배종(교토)	하다께시메지
10	Hm1-3	20070713	일본 재배종(나가노)	하다께시메지
11	Hm1-4	20070713	일본 재배종(나가노)	부나시메지
12	Hm1-5	20070713	일본 재배종(나가노)	"
13	Hm1-6	20070713	중국 재배종(북경)	"
14	Hm1-9	20070713	일본 재배종(나가노)	"
15	Hm1-10	20070713	일본 재배종(나가노)	"
16	Hm2-1	20070709	경상대(L.u 2018)	"
17	Hm2-2	20070709	경상대(L.u 2109)	"
18	Hm2-3	20070709	경상대(L.u 2154)	"
19	Hm2-4	20070709	경상대(L.u 2180)	"
20	Hm2-5	20070709	경상대(L.u 2185)	"
21	Hm2-6	20070709	경상대(L.u 2191)	"
22	Hm2-7	20070720	야생균주은행(IUM 2129)	대만재배종
23	Hm2-8	20070720	야생균주은행(IUM 3082)	중국재배종
24	Hm3-2	20070806	그린피스 육종 품종	그린피스 5호
25	Hm3-6	20070921	-	기타수집균
26	Hm3-7	20070921	-	기타수집균
27	Hm3-8	20070921	-	기타수집균
28	Hm3-9	20070921	-	기타수집균
29	Hm3-10	20071013	국내야생종채집(덕유산)	
	"이하여백"			

2. 수집된 균주의 재배적 특성 검증

개발된 느티만가다버섯의 재배적·형태적 특성을 검증하기 위해서 표 10 에서 표시된 7 가지 측정 항목으로 측정하고 표 3-1 에 제시한 대조품종을 사용하여 개발된 품종의 성과를 비교함.

<표 10. 품종선발을 위한 7가지 측정 항목 기준표>

연번	구분 항목	1(나쁨)	2(보통)	3(좋음)
1	수량성	130g이하	131-180g	181g 이상
2	갯색깔	연갈색	진갈색	흑회색
3	재배일수	25일이상	21-24일	20일이하
4	개체수	20개미만	21-29개	30개이상
5	버섯맛	아주쓰다	보통쓰다.	쓴맛없다.
¹⁾ 6	갯모양	편평형	반반구형	반구형
7	배양일수	91일이상	90일	89일미만

* 측정기준 : 배양일수는 85일(온도 20 ℃), 재배습도 95%이상, 생육온도 14-15 ℃.

¹⁾신품종 심사를 위한 작물별 특성조사요령 중

특성 3. 갯 : 단면의 형태



<표 10-1. 개발된 품종의 성과 측정을 위한 일본 대조품종>

연번	균주번호	도입일	유입경로	비고
1	Hm1-1	20070713	일본 재배종(후쿠오카)	수량성대조구
5	Hm3-10	20070713	국내 야생종(한국)	모양 대조구

<표 11. 육종 모본 선발을 위한 6가지 측정 항목 기준에 따른 자료>

연번	균주 번호	수량성	갯색깔	재배 일수	개체수	버섯맛	갯모양	종합
1	Hm0-1	2	2	2	2	2	2	12
2	Hm0-2	-	-	-	-	-	-	흰색
3	Hm0-3	2	3	2	2	2	2	13
4	Hm0-5	2	1	1	3	1	3	11
5	Hm0-6	2	3	1	2	1	3	12
6	Hm0-8	2	2	1	3	2	3	13
7	Hm0-10	2	2	1	2	2	2	11
¹⁾ 8	Hm1-1	3	2	3	3	1	3	15
9	Hm1-2	-	-	-	-	-	-	흰색
10	Hm1-3	-	-	-	-	-	-	하다깨
11	Hm1-4	-	-	-	-	-	-	하다깨
12	Hm1-5	2	2	1	2	2	2	11
²⁾ 13	Hm1-6	2	2	3	3	2	3	15
14	Hm1-9	1	3	1	3	1	3	12
15	Hm1-10	-	-	-	-	-	-	흰색
16	Hm2-1	1	3	1	1	2	2	10
17	Hm2-2	1	1	1	2	2	1	8
18	Hm2-3	-	-	-	-	-	-	흰색
19	Hm2-4	3	1	1	3	2	2	12
20	Hm2-5	-	-	-	-	-	-	흰색
21	Hm2-6	2	2	1	2	2	2	11
22	Hm2-7	2	2	1	2	2	2	11
23	Hm2-8	2	2	3	2	2	3	14
24	Hm3-2	3	3	3	3	3	3	18
25	Hm3-6	3	2	2	3	2	1	13
26	Hm3-7	3	2	2	2	2	1	12
27	Hm3-8	3	3	1	2	2	2	13
28	Hm3-9	2	3	2	1	2	1	11
³⁾ 29	Hm3-10	1	2	2	2	3	1	11

¹⁾ Hm1-1 : 종합점수 18점 만점에 15점으로 육종 모본 및 개발품종의 대조품종으로 선발됨.

²⁾ Hm1-6 : 종합점수 18점 만점에 15점이지만 표 7.에 의거하여 Hm1-1번과 동일균주임.

³⁾ Hm3-9, 10 : 종합점수 18점 만점에 11점이지만 국내 자생종으로 선발됨.

* 표3의 측정항목 7 의 배양일수는 85일을 기준으로 실험.

<표 12. 품종선발을 위한 6가지 측정 항목 기준에 따른 사진 자료>

연번	균주번호	수확전	연번	균주번호	수확전
1	Hm0-1		6	Hm0-8	
2	Hm0-2		7	Hm0-10	
3	Hm0-3		8	Hm1-1	
4	Hm0-5		9	Hm1-2	배양중 오염으로 사진없음 (하다께시메지)
5	Hm0-6		10	Hm1-3	배양중 오염으로 사진없음 (하다께시메지)

연번	균주번호	수확전	연번	균주번호	수확전
11	Hm1-4		16	Hm2-1	
12	Hm1-5		17	Hm2-2	
13	Hm1-6		18	Hm2-3	
14	Hm1-9		19	Hm2-4	
15	Hm1-10		20	Hm2-5	

연번	균주번호	수확전	연번	균주번호	수확전
21	Hm2-6		26	Hm3-7	
22	Hm2-7		27	Hm3-8	
23	Hm2-8		28	Hm3-9	
24	Hm3-2		29	Hm3-10	
25	Hm3-6				

3. 수집된 균주의 생리적 특성 검증(대선 형성 중심으로)

<표 13. 29개 균주의 대선형성 자료>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	*	x	x	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
2		*	x	x	x	x	x	x	x	x	○	x	x	x	○	x	x	○	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3			*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4				*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5					*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6						*	x	x	x	x	○	x	x	x	○	x	x	x	x	○	x	x	x	x	x	○	x	x	x
7							*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x
8								*	x	x	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x	○	x	x	x	x	x	x	x
9									*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10										*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11											*	x	x	○	x	x	○	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12												*	x	x	○	x	x	x	x	○	x	x	x	x	x	○	x	x	x
13													*	x	x	x	x	x	x	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x
14														*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15															*	x	x	○	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16																*	x	x	x	○	x	x	x	x	x	○	x	x	x
17																	*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18																		*	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x	x
19																			*	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
20																				*	x	x	x	x	x	x	x	x	x
21																					*	x	x	x	○	x	x	x	x
22																						*	x	x	x	x	x	x	x
23																							*	x	x	x	x	x	x
24																								*	x	x	x	x	x
25																									*	○	x	○	x
26																										*	x	○	x
27																											*	x	x
28																												*	x
29																													*

* 대선형성(x) : 다른균주 / 대선미형성(○) : 동일균주
 * 번호1,2,3...29번은 표 12의 연번과 동일함.

<표 14. 29개 균주의 대선행성에 따른 균주 분류>

번호	연번	균주번호	동일균주	비고
1	1	Hm0-1	(5) Hm0-6	2종
2	2	Hm0-2	(11) Hm1-4 (15) Hm1-10 (18) Hm2-3 (20) Hm2-5	5종
3	3	Hm0-3	-	1종
4	4	Hm0-5	-	1종
5	6	Hm0-8	(12) Hm1-5 (16) Hm2-1 (21) Hm2-6 (27) Hm3-8	5종
6	7	Hm0-10	(22)Hm2-7	2종
7	8	Hm1-1	(13)Hm1-6 (23)Hm2-8	3종
8	9	Hm1-2	-	1종
9	10	Hm1-3	-	1종
10	14	Hm1-9	-	1종
11	17	Hm2-2	-	1종
12	19	Hm2-4	-	1종
13	24	Hm3-2	-	1종
14	25	Hm3-6	(26)Hm3-7 (28)Hm3-9	3종
15	29	Hm3-10	-	1종

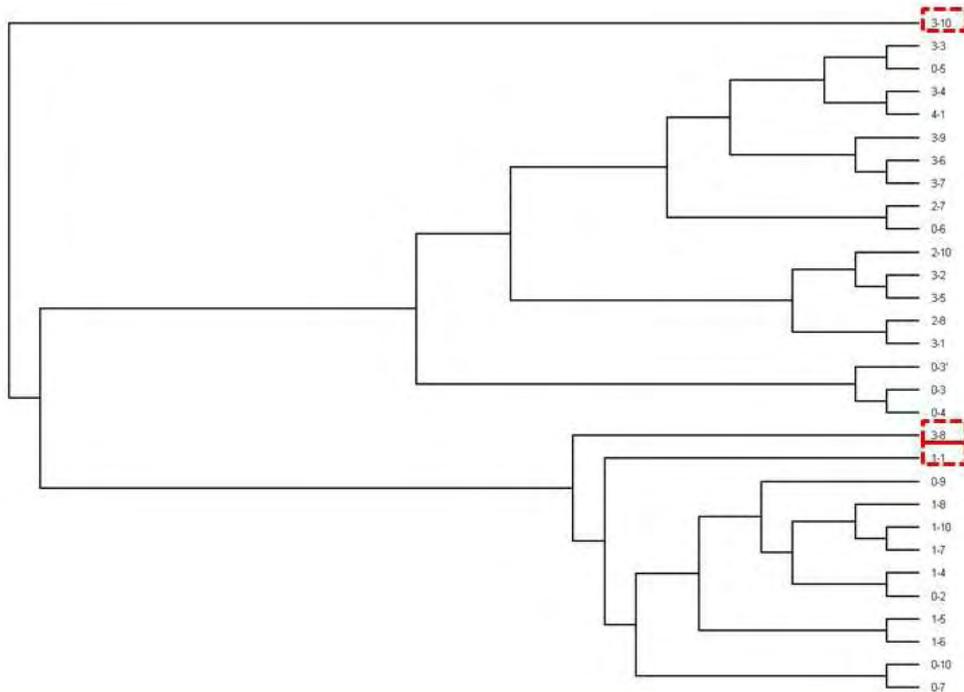
* 연번1,2,3...29번은 표 12의 연번과 동일함.

표 13과 표 14를 참조하여 대치성형성에 따른 수집균주의 분류는 Hm1-1(연번 1), Hm0-2(연번 2), Hm0-8(연번 6), Hm0-10(연번 7), Hm1-1(연번 8), Hm3-6(연번 25)의 group로 나뉘고 기타 group으로 Hm0-3, Hm0-5, Hm1-2, Hm1-3, Hm1-9, Hm2-2, Hm2-4, Hm3-2, Hm3-10으로 나뉘어 수집균주 29종은 15종의 서로다른 균주로 판명되었음.

4. 교배육종 및 돌연변이를 위한 선발된 균주의 단핵군사 확보

1차년도에 수집된 29 종의 느티만가닥 버섯을 RAPD방법을 사용하여 품종간 유연관계를 분석하였으며 이때 사용된 primer는 OPS-1, OPL-13, OPS-5를 사용한 결과는 그림 1 과 같음(협동과제, 1차년도 보고서). 실증재배를 실시하여 표 15와 같은 결과를 얻어 육종모본으로 사용하였음(버섯 사진은 그림 2 참조).

<그림 1> RAPD방법에 의한 균주간 유연관계 분석.



<표 15> 육종을 위한 선발균주의 특성 및 사진

균주번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	최종종합
Hm1-1	3	2	3	3	1	3	15
Hm3-8	3	3	1	2	2	2	13
Hm3-10	1	2	2	2	3	1	11

<그림 2> 선발 균주의 사진

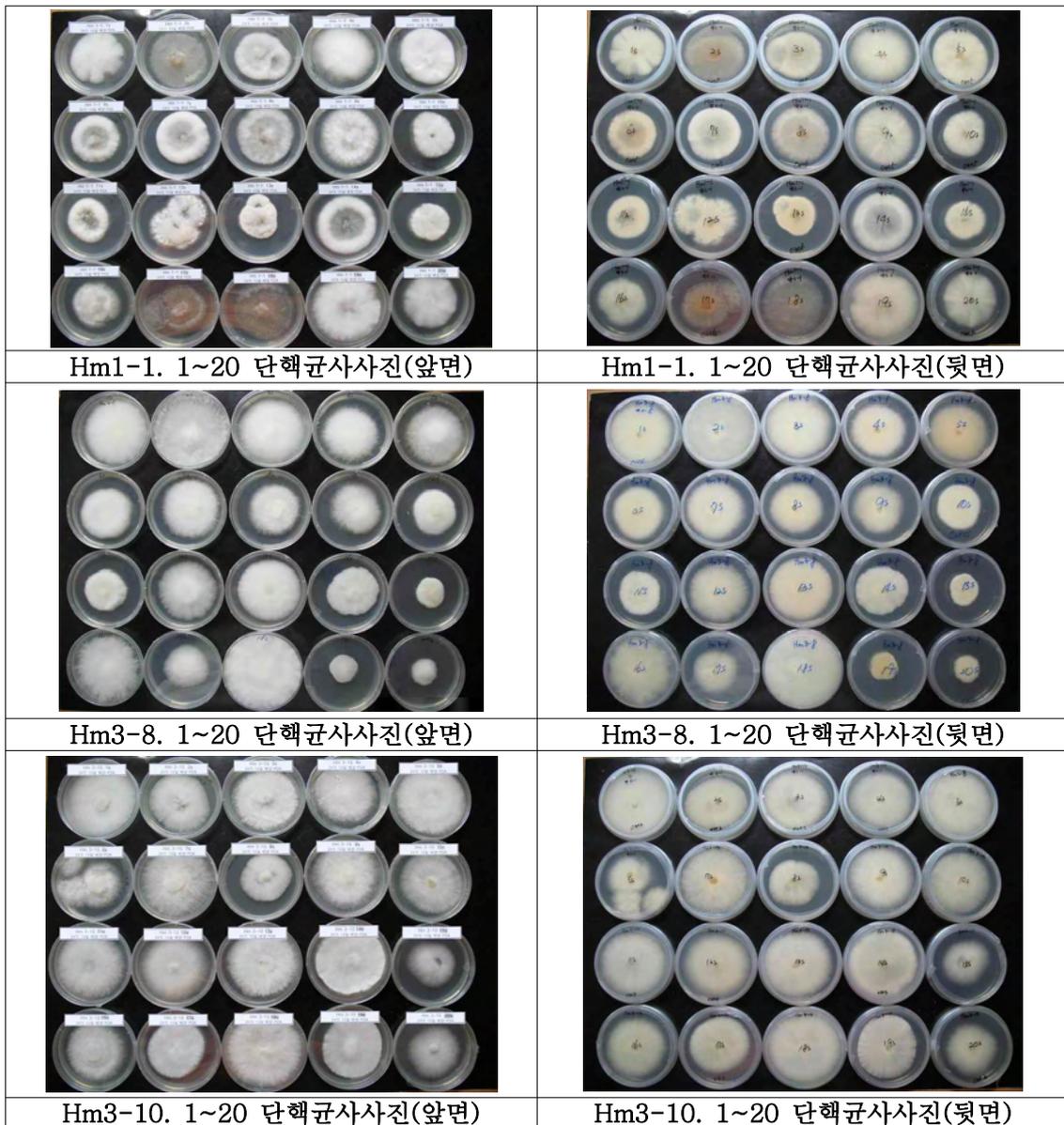


가. 단핵균사 확보를 위한 재배방법

(1) Hm3-10, 3-8, 1-1균주의 액체종균제조(350cc;대두분배지, 24℃ 15일 배양).

- (2) 액체종균을 톱밥(콘코프, 톱밥, 미강, 대두피)배지에 접종 ; 85일배양후 23일 재배.
- (3) 재배완료된 버섯에서 갓의 형성이 고른 버섯을 채취하여 포자수집.
- (4) 수집된 포자를 DW에서 dilution하여 1개의 PDA plate에 30개가 되도록 smearing.
- (5) 24℃ 7일 동안 배양 후 발아된 포자를 100개를 분리.
- (6) 현미경 검경을 통하여 clamp connection이 없고, 균총의 모양이 구분 가능한 균사 monokaryon 60균주(Hm3-10 ; 20균주, Hm3-8 ; 20균주, Hm1-1 ; 20균주)을 선발 (그림 3 참조).

<그림 3> Hm1-1,3-8,3-10 단핵균사 사진



- (7) 교잡된 느티만가닥버섯의 재배적·형태적 특성을 검정하기 위해서 <표 2> 에서 표시된 7 가지 측정 항목으로 측정하고 <표 1>에 제시한 대조품종을 사용하여 개발된 품종의 성과를 비교함.

나. 균주간 단핵균사 교잡을 통한 교배종 생성

- (1) PDA plate에 각 균주의 monokaryon 균사를 3×3mm 크기로 잘라내어 서로 다른 균사를 1cm간격을 두고 동일한 plate에 접종(400개 조합).
- (2) 접종 7일후 두 개의 균사가 융합된것을 확인후 현미경 검경을 실시하여 clamp connection 유무를 확인하여 clamp connection이 있는 균사만을 선발.
- (3) 현미경 검경결과 Hm3-10, Hm1-1 교잡에서는 400개 조합 모두 clamp connection이 존재하는 dikaryon 균사로 확인.

다. 목표특성을 가진 신품종 스크리닝 기술 개발

- (1) Dikaryon으로 확인된 균주의 액체종균 제조 (350cc;대두분배지, 24℃ 15일 배양).
- (2) 액체종균을 톱밥(콘코프, 톱밥, 미강, 대두피)배지에 접종 ; 85일 배양 후 23일 재배.
- (3) 실증재배를 통하여 얻어진 버섯의 개체 수, 갓 모양, 수량성, 갓 색깔, 맛, 대치선 형성의 6가지 항목에 부합하는 58개(표 16 참조 ; 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 19, 20, 24, 28, 34, 36, 38, 47, 48, 55, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 80, 82, 93, 94, 101, 102, 103, 104, 108, 153, 154, 221, 222, 227, 228, 247, 248, 249, 302, 304, 307, 311, 312, 315, 321, 324, 342, 343, 344, 348, 347, 358, 360) 균주 선발 (선발균주 사진 그림 4 참조).

<표 16> Hm3-10과 Hm1-1 교잡균주의 재배 결과표

육종번호	수량성	갓색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갓모양	배양일수	총점수
1	2	2	3	3	2	3	3	18
2	2	1	3	3	2	3	3	17
3	3	2	3	3	2	3	3	19
4	2	2	3	2	2	3	3	17
5	3	1	2	1	2	3	3	15
6	3	1	2	1	2	2	3	14
7	2	2	3	3	2	3	3	18
8	2	2	3	2	2	3	3	17
9	3	1	2	1	2	3	3	15
10	2	1	2	1	2	3	3	14
11	2	1	2	2	2	3	3	15
12	2	3	2	1	2	3	3	16

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
13	3	1	2	2	2	3	3	16
14	2	1	2	1	2	3	3	14
15	2	2	2	2	2	3	3	16
16	발이불량							
17	배양 중 오염							
18	배양 중 오염							
19	2	1	2	3	2	3	3	16
20	3	1	2	3	2	2	3	16
21	2	2	3	2	2	2	3	16
22	2	2	3	1	2	1	3	14
23	2	2	3	3	2	2	3	17
24	2	2	3	2	2	2	3	16
25	2	1	2	2	2	3	3	15
26	1	3	2	2	2	1	3	14
27	2	2	3	3	2	2	3	17
28	2	2	3	2	2	2	3	16
29	2	1	2	2	2	1	3	13
30	발이불량							
31	2	1	2	1	2	2	3	13
32	2	1	2	1	2	2	3	13
33	3	2	2	1	2	3	3	16
34	2	2	2	1	2	3	3	15
35	2	1	2	1	2	2	3	13
36	3	1	2	1	2	1	3	13
37	2	1	2	2	2	1	3	13
38	2	1	2	2	2	1	3	13
39	2	1	2	2	2	1	3	13
40	3	1	2	2	2	1	3	14
41	1	2	3	3	2	1	3	15
42	1	2	3	1	1	1	3	13
43	배양 중 오염							
44	배양 중 오염							
45	배양 중 오염							
46	1	2	2	2	2	2	3	14
47	2	2	3	1	2	2	3	15
48	2	1	3	2	2	2	3	15
49	1	2	3	2	1	1	3	13
50	2	1	2	3	1	2	3	14
51	1	2	2	1	2	3	3	14
52	2	1	3	2	1	2	3	14
53	2	2	3	1	2	3	3	16
54	2	2	3	1	2	2	3	15
55	2	2	2	2	2	3	3	16
56	생육부진							
57	1	1	2	1	2	1	3	11
58	2	1	3	1	1	1	3	12
59	배양 중 오염							
60	배양 중 오염							
61	3	1	3	3	2	1	3	16

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
62	3	1	3	3	2	1	3	16
63	2	2	3	2	2	2	3	16
64	2	1	3	3	2	2	3	13
65	2	2	2	1	2	1	3	13
66	생육부진							
67	2	2	3	3	2	1	3	16
68	2	1	3	3	2	1	3	15
69	2	2	2	2	2	1	3	14
70	생육부진							
71	2	2	3	1	1	2	3	14
72	2	2	2	3	1	2	3	15
73	2	2	2	3	2	2	3	16
74	3	2	3	2	1	1	3	15
75	2	2	2	3	1	2	3	15
76	생육부진							
77	2	2	2	3	2	1	3	15
78	2	2	3	3	2	2	3	17
79	1	1	2	3	1	1	3	12
80	2	2	3	3	1	2	3	16
81	배양 중 오염							
82	2	2	3	3	2	2	3	17
83	2	3	3	1	1	3	3	16
84	배양 중 오염							
85	2	2	2	3	1	2	3	15
86	2	2	2	3	1	2	3	15
87	2	2	3	3	2	2	3	17
88	2	1	3	3	2	2	3	16
89	배양 중 오염							
90	2	2	2	3	1	2	3	15
91	2	2	2	3	2	2	3	16
92	2	2	2	3	2	2	3	16
93	3	3	3	3	2	3	3	20
94	3	3	3	3	2	3	3	20
95	배양 중 오염							
96	1	2	2	1	3	2	3	14
97	배양 중 오염							
98	2	2	2	3	2	2	3	16
99	1	2	2	1	2	2	3	13
100	2	2	2	3	2	2	3	16
101	2	2	3	3	1	3	3	17
102	2	3	2	3	1	2	3	16
103	2	2	3	3	1	3	3	17
104	2	1	2	3	2	2	3	15
105	배양 중 오염							
106	배양 중 오염							
107	1	1	2	3	1	2	3	13
108	2	2	3	1	2	1	3	14
109	1	2	2	1	2	2	3	13
110	1	2	2	1	1	3	3	13

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
111	2	2	2	2	2	3	3	16
112	1	3	2	1	3	2	3	15
113	배양 중 오염							
114	3	1	2	2	2	3	3	16
115	2	3	2	2	1	2	3	16
116	2	2	2	3	1	3	3	16
117	배양 중 오염							
118	배양 중 오염							
119	1	2	2	1	2	2	3	13
120	1	2	2	1	2	2	3	13
121	2	1	2	3	3	3	3	17
122	1	1	2	1	1	2	3	11
123	1	2	2	1	2	2	3	13
124	1	2	2	1	1	2	3	12
125	1	2	2	1	2	2	3	13
126	배양 중 오염							
127	1	2	2	1	1	2	3	12
128	배양 중 오염							
129	1	1	2	1	1	2	3	11
130	1	1	2	1	1	2	3	11
131	배양 중 오염							
132	1	2	2	1	3	2	3	14
133	1	2	2	1	2	2	3	13
134	2	2	2	2	2	3	3	16
135	배양 중 오염							
136	1	3	2	1	2	2	3	14
137	배양 중 오염							
138	1	1	3	2	2	3	3	15
139	1	2	2	1	2	2	3	13
140	1	3	2	1	2	2	3	14
141	2	2	3	3	2	2	3	17
142	2	2	3	3	2	2	3	17
143	2	1	3	2	1	2	3	14
144	2	2	3	3	2	2	3	17
145	배양 중 오염							
146	1	2	3	1	1	2	3	13
147	2	2	3	3	2	3	3	18
148	3	2	3	3	2	2	3	18
149	2	2	3	3	1	2	3	16
150	1	2	2	1	2	3	3	14
151	1	2	2	1	3	3	3	15
152	1	2	2	1	3	3	3	14
153	2	2	2	1	3	3	3	16
154	2	2	2	1	3	2	3	15
155	1	2	2	1	3	2	3	14
156	1	3	2	1	3	2	3	15
157	배양 중 오염							
158	2	2	3	2	3	2	3	17
159	1	2	3	1	2	2	3	14

육종번호	수량성	갯색갈	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
160	2	2	3	2	2	2	3	16
161	3	1	3	3	3	1	3	17
162	3	1	3	3	3	2	3	18
163	1	1	3	1	2	3	3	14
164	1	1	3	1	2	2	3	13
165	1	1	2	1	2	2	3	12
166	2	2	3	2	3	1	3	14
167	3	1	3	3	3	2	3	18
168	3	1	3	3	3	2	3	18
169	2	2	3	2	3	2	3	17
170	1	1	2	2	3	2	3	12
171	1	2	3	1	2	3	3	15
172	1	1	3	1	3	2	3	14
173	2	1	2	2	2	2	3	14
174	2	1	2	1	2	2	3	13
175	1	2	2	1	3	3	3	15
176	1	2	2	1	2	2	3	13
177	2	1	3	2	3	1	3	15
178	2	2	3	1	3	3	3	17
179	2	1	3	2	3	2	3	16
180	2	1	3	2	3	2	3	16
181	1	1	3	1	1	2	3	12
182	배양 중 오염							
183	2	1	2	2	2	2	3	14
184	2	1	3	2	2	2	3	15
185	3	2	2	1	3	2	3	16
186	1	2	3	1	1	3	3	14
187	1	2	3	2	2	2	3	15
188	1	1	3	1	3	3	3	15
189	2	1	2	1	1	2	3	12
190	2	1	2	1	2	2	3	13
191	1	2	3	1	3	3	3	16
192	1	1	2	2	2	2	3	13
193	2	2	2	2	2	2	3	15
194	3	1	2	2	3	2	3	16
195	2	1	2	2	2	2	3	14
196	1	2	3	1	2	3	3	15
197	1	1	2	1	2	1	3	11
198	2	1	2	2	3	2	3	15
199	2	1	2	1	2	2	3	13
200	2	2	2	2	3	2	3	16
201	배양 중 오염							
202	1	1	3	1	3	1	3	13
203	3	1	3	1	1	2	3	12
204	1	2	3	2	3	2	3	16
205	1	3	3	1	2	2	3	15
206	1	2	2	1	3	2	3	14
207	1	2	3	2	3	2	3	16
208	1	2	3	2	3	2	3	16
209	1	2	2	1	3	1	3	13

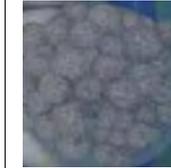
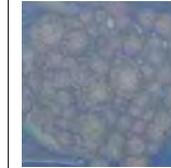
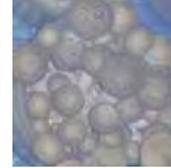
육종번호	수량성	갓색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갓모양	배양일수	총점수
210	1	2	2	1	2	2	3	13
211	1	3	3	1	2	3	3	16
212	1	3	3	1	2	3	3	16
213	1	2	3	1	2	3	3	15
214	1	3	3	1	2	3	3	16
215	1	3	3	1	2	3	3	16
216	2	3	3	1	2	3	3	17
217	1	1	3	1	1	1	3	11
218	1	2	3	1	3	3	3	16
219	1	2	3	1	1	2	3	13
220	1	2	3	1	3	3	3	14
221	1	2	3	1	3	1	3	14
222	2	2	3	2	2	2	3	16
223	1	2	3	1	3	2	3	15
224	1	2	3	1	2	1	3	13
225	1	3	3	1	3	2	3	16
226	1	2	3	1	3	1	3	14
227	2	2	3	3	2	2	3	17
228	2	2	3	3	3	2	3	18
229	1	2	3	1	2	1	3	13
230	1	2	2	1	2	2	3	13
231	1	2	2	1	2	2	3	13
232	1	3	2	1	3	2	3	15
233	2	2	2	3	2	2	3	14
234	2	2	2	1	2	3	3	15
235	1	2	2	1	3	2	3	14
236	1	3	2	1	3	2	3	15
237	2	1	3	1	2	1	3	13
238	2	2	3	2	2	2	3	16
239	1	2	3	1	3	1	3	14
240	3	2	3	2	2	2	3	17
241	1	1	3	1	1	2	3	12
242	1	1	3	1	1	2	3	12
243	1	2	3	1	2	3	3	15
244	1	1	3	3	1	2	3	14
245	1	2	2	1	3	3	3	15
246	1	1	2	1	3	1	3	12
247	2	2	3	3	3	3	3	19
248	2	1	3	3	1	3	3	16
249	1	1	2	1	3	2	3	13
250	1	1	2	1	3	2	3	13
251	1	3	3	1	3	3	3	17
252	1	1	3	1	2	2	3	13
253	1	2	3	1	3	2	3	15
254	1	2	3	1	2	3	3	15
255	1	1	3	1	1	3	3	13
256	1	2	3	1	3	2	3	15
257	1	1	3	1	2	2	3	13
258	1	1	3	1	3	3	3	15
259	1	1	3	1	2	2	3	13

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
260	1	2	3	1	3	2	3	15
261	1	1	3	1	1	2	3	12
262	1	1	3	2	1	2	3	13
263	1	1	3	1	1	3	3	13
264	1	1	3	1	1	2	3	12
265	생육부진							
266	1	2	3	1	2	2	3	14
267	1	2	3	1	2	2	3	14
268	2	1	3	1	1	1	3	12
269	1	2	3	1	2	2	3	14
270	생육부진							
271	생육부진							
272	생육부진							
273	생육부진							
274	1	2	3	1	3	3	3	16
275	생육부진							
276	생육부진							
277	1	1	3	1	2	1	3	12
278	1	1	3	1	3	3	3	15
279	1	1	3	1	2	2	3	13
280	1	2	3	1	2	3	3	15
281	1	2	3	1	2	1	3	13
282	1	2	3	1	2	2	3	14
283	1	2	3	1	1	3	3	14
284	1	2	3	1	3	2	3	15
285	배양 중 오염							
286	1	3	3	1	2	2	3	15
287	1	2	3	2	2	2	3	15
288	2	1	3	2	1	2	3	14
289	1	2	3	1	2	1	3	13
290	1	3	3	1	2	1	3	14
291	1	3	3	1	3	2	3	16
292	1	2	3	1	3	2	3	15
293	1	2	3	1	2	3	3	15
294	1	2	3	1	3	3	3	16
295	1	3	3	1	3	3	3	17
296	생육부진							
297	1	2	3	1	1	1	3	12
298	1	2	3	1	3	3	3	16
299	1	2	3	1	2	1	3	13
300	배양 중 오염							
301	1	1	3	3	2	2	3	15
302	2	1	3	2	2	2	3	15
303	1	2	3	1	2	2	3	14
304	3	1	3	2	2	2	3	16
305	1	2	3	1	3	2	3	15
306	1	2	3	1	3	2	3	15
307	2	2	3	2	3	2	3	17
308	2	1	3	3	2	2	3	16
309	1	2	3	1	2	2	3	14

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
310	1	1	3	1	3	2	3	14
311	1	2	3	1	3	2	3	15
312	1	2	3	1	2	2	3	14
313	1	2	3	1	3	2	3	15
314	1	2	3	1	2	2	3	15
315	1	2	3	1	3	2	3	15
316	1	2	3	1	3	2	3	15
317	1	1	3	1	1	1	3	11
318	2	2	3	2	2	2	3	16
319	1	1	3	1	2	1	3	12
320	2	2	3	1	3	2	3	16
321	1	1	3	1	3	2	3	14
322	1	1	3	3	2	2	3	15
323	1	2	3	1	2	3	3	15
324	1	2	3	1	3	2	3	15
325	1	2	3	1	3	2	3	15
326								
327	1	2	3	1	3	3	3	16
328	1	1	3	1	3	3	3	15
329	1	2	3	1	2	2	3	14
330	1	1	3	1	3	2	3	14
331	1	2	3	1	3	2	3	15
332	1	2	3	1	2	2	3	14
333	1	2	3	1	2	3	3	15
334	1	2	3	1	3	3	3	16
335	1	2	3	1	1	2	3	13
336	1	2	3	1	3	2	3	14
337	1	1	3	1	3	1	3	13
338	1	2	3	1	2	2	3	14
339	1	1	3	1	2	2	3	13
340	1	2	3	1	2	3	3	15
341	1	2	3	3	3	1	3	16
342	1	1	3	1	2	2	3	13
343	1	2	3	2	2	3	3	16
344	2	1	3	3	2	2	3	16
345	1	3	3	1	1	3	3	15
346	1	2	3	1	2	2	3	14
347	2	1	3	3	3	2	3	17
348	1	1	3	2	3	2	3	15
349	1	2	3	1	2	2	3	14
350	1	2	3	1	2	3	3	15
351	1	2	3	1	3	3	3	16
352	1	2	3	1	3	2	3	15
353	1	3	3	1	3	2	3	16
354	1	2	3	1	3	3	3	16
355	1	2	3	1	3	2	3	15
357	1	1	3	1	2	1	3	12
358	2	1	3	2	2	2	3	15
359	1	1	3	1	3	1	3	13
356	1	2	3	1	2	3	3	15

육종번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	총점수
360	2	2	3	2	1	2	3	15
361	배양 중 오염							
362	2	1	3	2	2	2	3	15
363	2	2	3	1	2	3	3	16
364	1	2	3	1	3	2	3	15
365	1	2	3	1	2	2	3	14
366	1	2	3	1	2	2	3	14
367	배양 중 오염							
368	1	1	3	2	1	2	2	12
369	배양 중 오염							
370	발이불량							
371	발이불량							
372	발이불량							
373	발이불량							
374	발이불량							
375	발이불량							
376	발이불량							
377	1	2	3	1	2	1	3	13
378	발이불량							
379	발이불량							
380	1	2	3	1	2	3	3	15
381	1	2	3	1	3	2	3	15
382	1	2	3	1	1	2	3	13
383	1	2	3	1	2	3	3	13
384	1	2	3	1	1	2	3	13
385	발이불량							
386	배양 중 오염							
387	1	1	3	1	2	3	3	14
388	1	1	3	1	3	2	3	14
389	배양 중 오염							
390	1	2	3	1	1	2	3	13
391	1	2	3	1	3	3	3	16
392	1	2	3	1	3	3	3	16
393	1	2	3	1	3	2	3	15
394	1	2	3	1	2	3	3	15
395	1	2	3	1	2	2	3	15
396	1	2	3	1	3	2	3	15
397	1	1	3	1	2	1	3	12
398	1	1	3	1	3	3	3	13
399	1	2	3	1	1	2	3	13
400	1	2	3	1	3	3	3	16

<그림 4. 1차 선발된 58개 교잡 균주 사진>

					
1	2	3	4	8	11
					
12	13	14	19	20	24
					
28	34	36	38	47	48
					
55	67	68	69	71	72
					
73	80	82	93	94	101
					
102	103	104	108	153	154
					
221	222	227	228	247	248
					
249	302	304	307	311	312

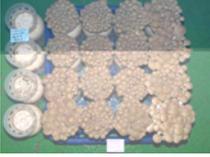
					
315	321	324	342	343	344
					
347	348	358	360		

(4) 2차 실증재배를 통하여 버섯의 개체 수, 갯 모양, 수량성, 갯 색깔, 맛, 대치선 형성의 6가지 항목에 부합하는 6개 균주 (93, 104, 304, 307, 342, 343)를 선발하여(그림 5참조) 각각 GPHm15-3, GPHm17-5, GPHm15-4, GPHm15-5, GPHm16-1, GPHm16-2으로 명명하고 배양일 60일(그림 6, 7, 8, 21, 26참조), 70일(그림 9, 10, 11, 22, 27참조), 80일(그림 12, 13, 14, 23, 28참조), 90일(그림 15, 16, 17, 24, 29참조), 100일(그림 18, 19, 20, 25, 30참조) 배양으로 재배를 실시하여 배양일수가 단축되고 수량성이 우수한(표 17, 18) 3품종을 선발하여 그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호로 명명하였음.

<그림 5. 2차 실증재배를 통해 선발된 6개 균주 사진>

					
93	104	304	307	342	343
GPHm15-3	GPHm17-5	GPHm15-4	GPHm15-5	GPHm16-1	GPHm16-2
그린피스H1	그린피스H3	그린피스H2	-	-	-

<그림 6. 선발균주 60일 배양 사진 1차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

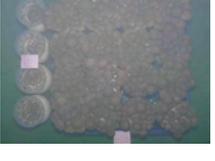
<그림 7. 선발균주 60일 배양 사진 2차>

연번	균주 번호	굽기 전	발이	수확 전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 8. 선발균주 60일 배양 사진 3차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

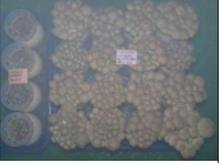
<그림 9. 선발균주 70일 배양 사진 1차>

연번	균주 번호	굽기 전	발이	수확 전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

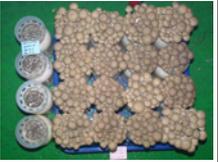
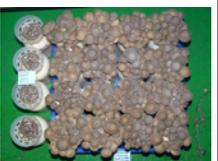
<그림 10. 선발균주 70일 배양 사진 2차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 11. 선발균주 70일 배양 사진 3차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 12. 선발균주 80일 배양 사진 1차>

연번	균주 번호	굽기 전	발이	수확 전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 13. 선발균주 80일 배양 사진 2차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 14. 선발균주 80일 배양 사진 3차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 15. 선발균주 90일 배양 사진 1차>

연번	균주번호	균기전	발이	수확전	
1	Hm15-3				
2	Hm15-4				
3	Hm15-5				
4	Hm16-1				
5	Hm16-2				
6	Hm17-5				

<그림 16. 선발균주 90일 배양 사진 2차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 17. 선발균주 90일 배양 사진 3차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 18. 선발균주 100일 배양 사진 1차>

연번	균주 번호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 19. 선발균주 100일 배양 사진 2차>

연 번	균주번 호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<그림 20. 선발균주 100일 배양 사진 3차>

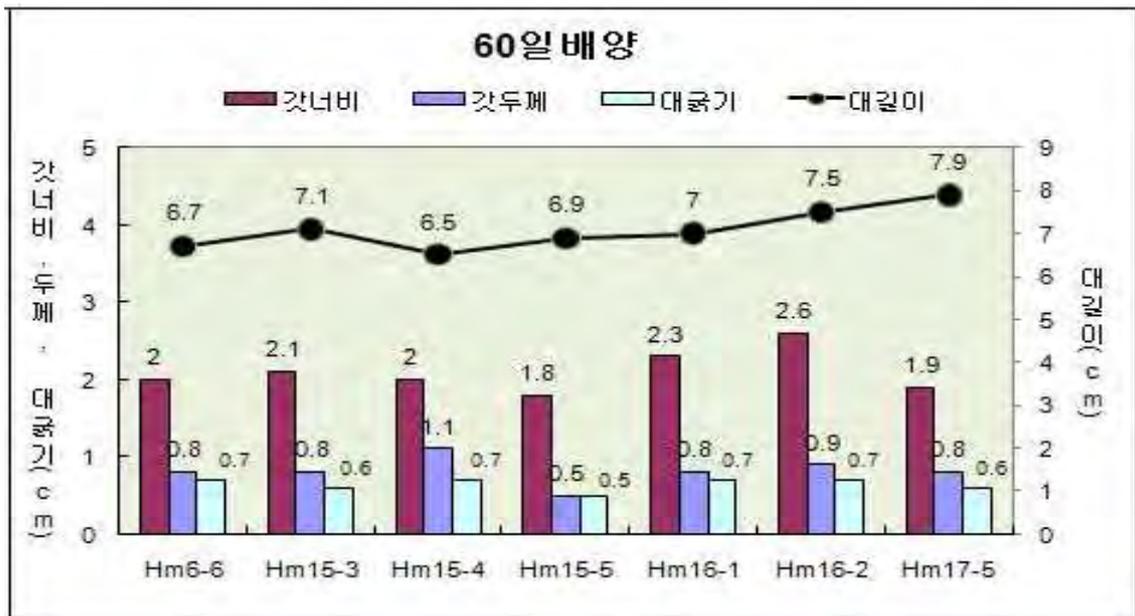
연 번	균주번 호	굽기전	발이	수확전	
1	Hm 15-3				
2	Hm 15-4				
3	Hm 15-5				
4	Hm 16-1				
5	Hm 16-2				
6	Hm 17-5				

<표 17. 배양일수에 따른 갯너비,갯두께,대길이,대굼기, 재배일수 비교>

단위:cm

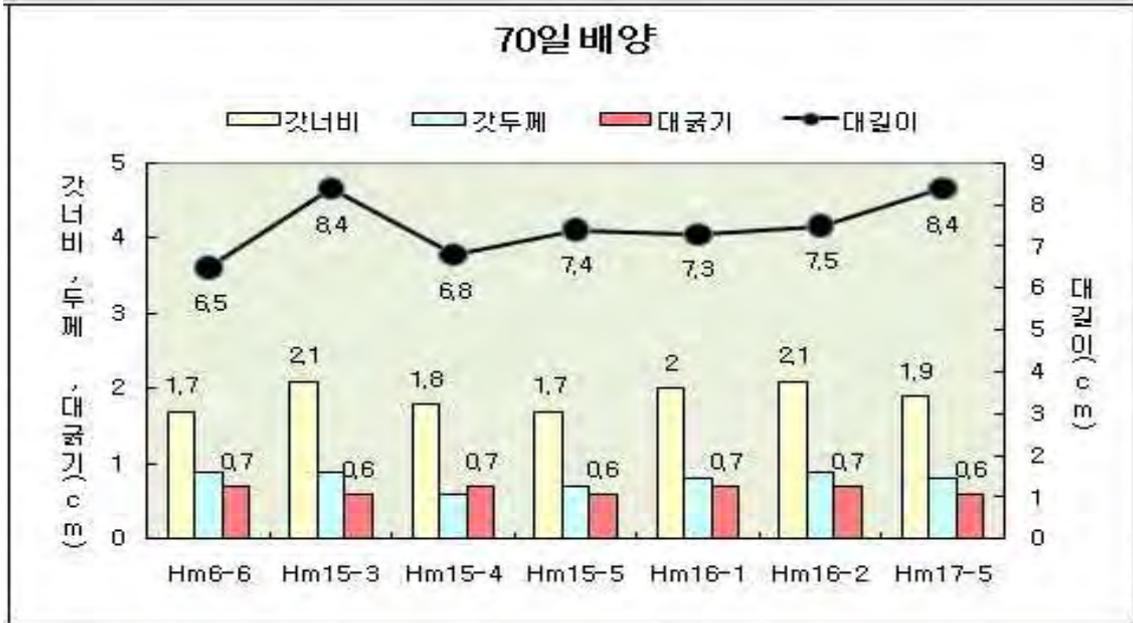
배양 일수	60일배양					70일배양					80일배양					90일배양					100일배양				
	갯너비	갯두께	대길이	대굼기	재배일수	갯너비	갯두께	대길이	대굼기	재배일수	갯너비	갯두께	대길이	대굼기	재배일수	갯너비	갯두께	대길이	대굼기	재배일수	갯너비	갯두께	대길이	대굼기	재배일수
Hm 6-6	2	0.8	6.7	0.7	34	1.7	0.9	6.5	0.7	29	2.2	0.7	5.8	0.9	28	1.8	0.8	7.1	0.7	28	1.9	0.7	6.5	0.8	26
Hm 15-3	2.1	0.8	7.1	0.6	28	2.1	0.9	8.4	0.6	25	2.2	0.8	7.7	0.6	25	0.6	0.7	7.3	0.6	24	2.2	0.9	7.9	0.7	22
Hm 15-4	2	1.1	6.5	0.7	23	1.8	0.6	6.8	0.7	21	1.9	0.7	7.3	0.7	21	1.8	0.7	7	0.7	20	2.3	0.8	7.8	0.7	20
Hm 15-5	1.8	0.5	6.9	0.5	24	1.7	0.7	7.4	0.6	23	1.3	0.5	6.8	0.5	20	1.8	0.7	7.1	0.8	21	1.7	0.6	7.6	0.7	19
Hm 16-1	2.3	0.8	7	0.7	22	2	0.8	7.3	0.7	20	2.2	0.8	7.6	0.7	20	2.2	0.8	5.9	0.7	19	2.3	0.8	7.1	0.7	20
Hm 16-2	2.6	0.9	7.5	0.7	21	2.1	0.9	7.5	0.7	20	2.2	0.9	7.2	0.6	19	2.2	0.8	7	0.8	20	2.6	0.9	8	0.7	20
Hm 17-5	1.9	0.8	7.9	0.6	23	1.9	0.8	8.4	0.6	21	1.6	0.7	7.2	0.6	20	1.6	0.7	7.7	0.7	19	1.5	0.7	7.1	0.7	19

<그림 21. 60일 배양에 따른 갯너비,갯두께,대길이,대굼기 비교>



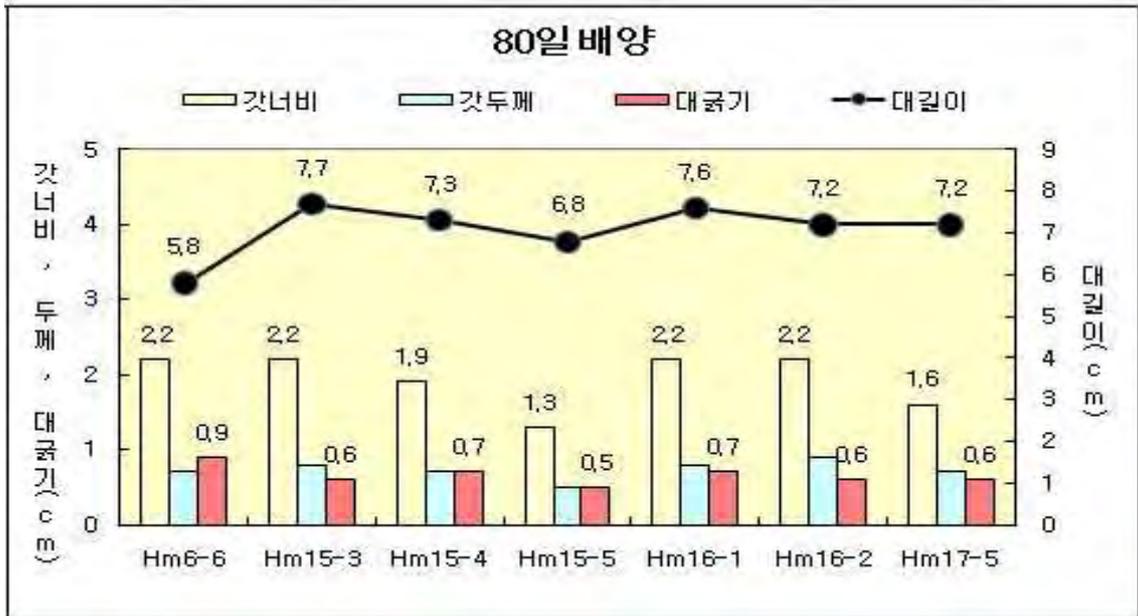
* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 22. 70일 배양에 따른 갯너비,갯두께,대길이,대굼기 비교>



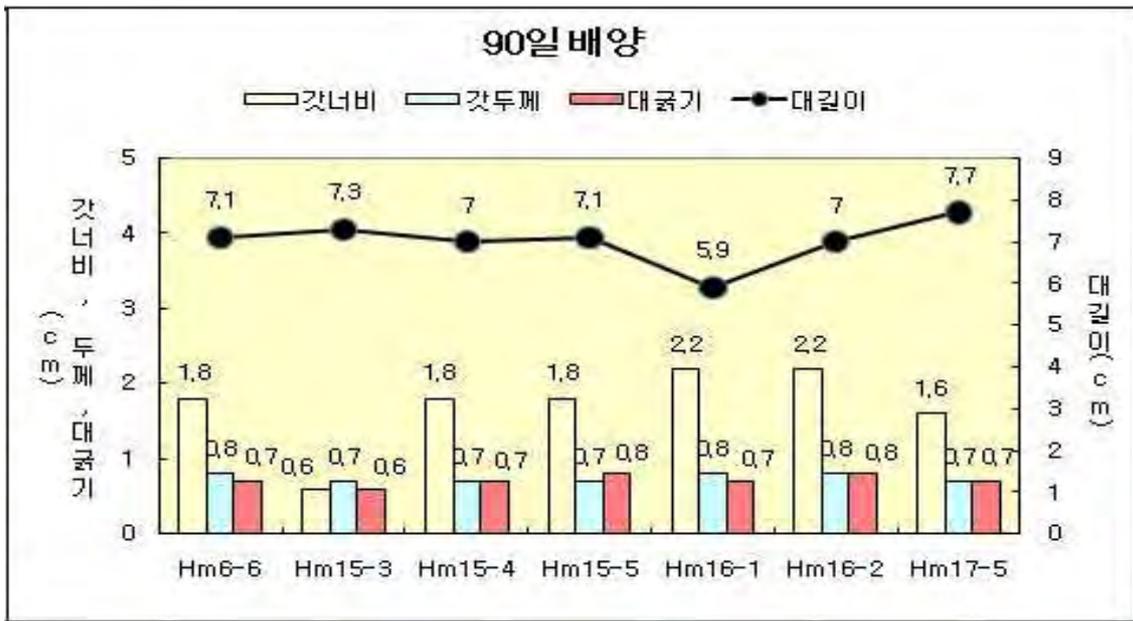
* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 23. 80일 배양에 따른 갓너비,갓두께,대길이,대굵기 비교>



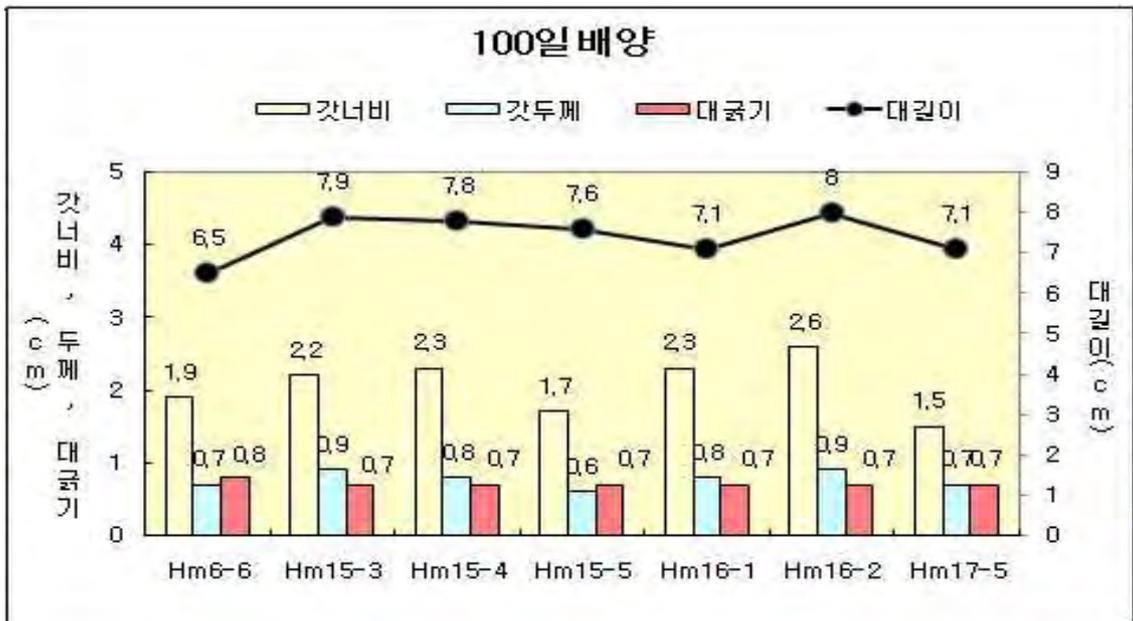
* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 24. 90일 배양에 따른 갓너비,갓두께,대길이,대굵기 비교>



* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 25. 100일 배양에 따른 갓너비,갓두께,대길이,대굵기 비교>



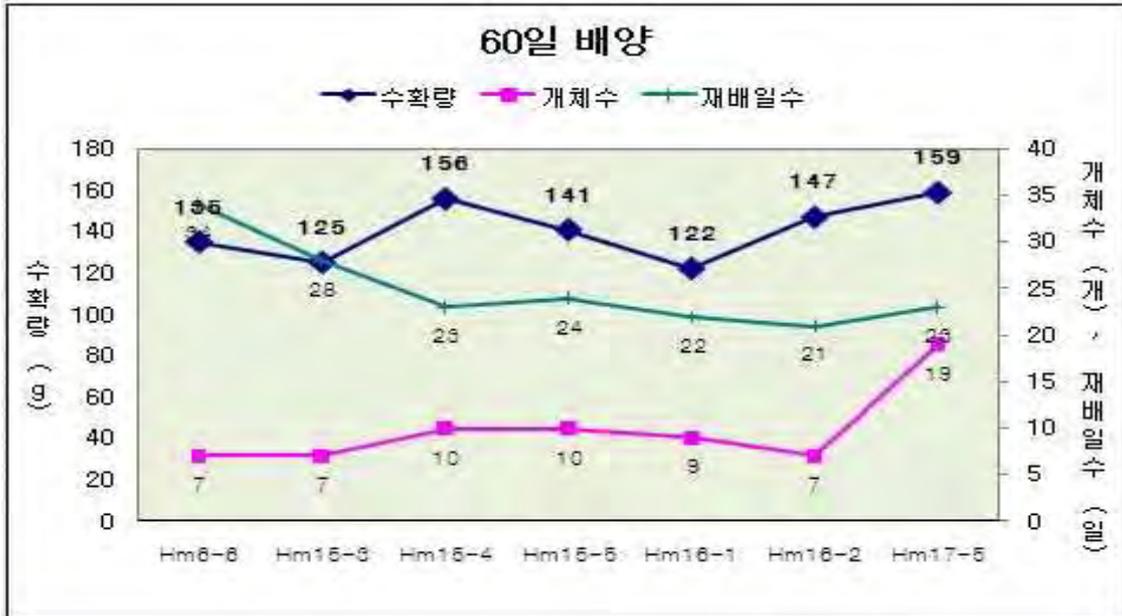
* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<표 18. 배양일수에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>

단위:cm

배양일수		60일배양			70일배양			80일배양			90일배양			100일배양		
		수 확 량	개 체 수	재 배 일 수												
Hm 6-6	1차	137	4	35	146	8	29	133	4	28	151	8	29	146	9	25
	2차	133	7	31	134	4	30	143	5	28	153	8	28	141	7	28
	3차	138	6	35	137	4	29	159	6	28	155	4	26	155	6	26
	평균	135	7	34	139	5	29	145	5	28	153	7	28	147	7	26
Hm 15-3	1차	123	7	27	150	15	25	164	16	25	165	18	24	154	11	22
	2차	120	6	29	138	9	25	153	9	24	157	10	24	153	8	21
	3차	133	8	29	133	9	26	161	9	25	149	7	23	160	8	22
	평균	125	7	28	140	11	25	159	11	25	157	12	24	156	9	22
Hm 15-4	1차	167	12	22	172	17	22	164	13	21	162	14	20	158	13	19
	2차	150	7	22	137	4	20	162	10	20	152	5	20	154	11	20
	3차	151	11	24	141	3	22	169	10	21	169	7	20	163	9	20
	평균	156	10	23	150	8	21	155	11	21	161	9	20	158	11	20
Hm 15-5	1차	169	12	24	180	21	24	161	12	22	168	18	21	155	14	19
	2차	105	10	24	132	7	22	129	5	20	143	5	21	146	7	19
	3차	149	8	23	174	9	22	146	8	19	159	7	20	142	7	18
	평균	141	10	24	162	12	23	145	8	20	157	10	21	148	9	19
Hm 16-1	1차	116	9	21	119	9	20	136	11	20	113	11	20	109	10	20
	2차	132	13	23	116	6	20	131	6	19	129	3	18	129	5	20
	3차	119	6	22	127	8	20	129	5	21	140	8	20	145	9	21
	평균	122	9	22	121	8	20	133	7	20	127	7	19	128	8	20
Hm 16-2	1차	140	8	22	142	7	21	145	11	20	129	8	20	152	7	21
	2차	149	6	20	150	6	21	149	5	20	145	5	20	154	7	21
	3차	151	6	20	162	6	18	148	5	19	148	5	19	163	7	18
	평균	147	7	21	151	6	20	147	7	19	141	6	20	156	7	20
Hm 17-5	1차	174	26	22	173	23	22	145	14	20	165	20	19	147	14	19
	2차	150	19	24	136	14	20	147	12	20	147	13	19	148	11	19
	3차	153	11	23	147	13	21	150	9	20	152	14	18	145	11	18
	평균	159	19	23	152	17	21	147	12	20	155	16	19	147	12	19

<그림 26. 60일 배양에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>



- * Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
- * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
- * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 27. 70일 배양에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>



- * Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
- * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
- * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 28. 80일 배양에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>



* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 29. 90일 배양에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>



* Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
 * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
 * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

<그림 30. 100일 배양에 따른 수확량, 개체수, 재배일수 비교>



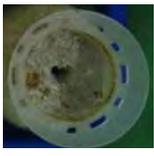
- * Hm6-6 : 만가닥 2호(품종보호출원을 위한 대조구로 사용)
- * Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : GPHm1-1×GPHm3-10 교배균주 400종중에서 선발된 6균주
- * Hm15-3:그린피스H1호, Hm15-4:그린피스H2호, Hm17-5:그린피스H3호로 품종보호출원

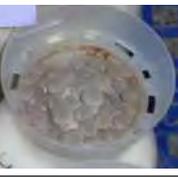
(4) GPHm3-10의 돌연변이 유발 균주의 실증재배를 통하여 버섯의 개체 수, 갓 모양, 수량성, 갓 색깔, 맛, 대치선 형성의 6가지 항목에 부합하는 2개 균주 (Hm25, Hm26)를 선발하여 재배일수에 따른 실험을 실시한결과 재배일수가 28일 이상 소요되어 재배품종으로 적합하지 않았음(표 19, 표 20참조)

<표 19. GPHm3-10 단핵균사 들연변이 균주의 교배종 재배>

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
1	1차				
	2차				불량
	3차				
2	1차				
	2차				불량
	3차				
3	1차				
	2차				불량
	3차				
4	1차				
	2차				불량
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
5	1차				
	2차				
	3차				
6	1차				
	2차				
	3차				
7	1차				
	2차				
	3차				

군주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
8	1차				
	2차				
	3차				
9	1차				
	2차				
	3차				
10	1차				
	2차				
	3차				불량

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
11	1차				
	2차				
	3차				
12	1차				
	2차				
	3차				
13	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
14	1차				
	2차				
	3차				
15	1차				
	2차				
	3차				
16	1차				
	2차				
	3차				

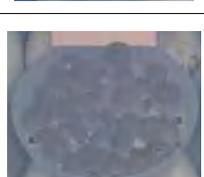
균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
17	1차				
	2차				
	3차				
18	1차				
	2차				
	3차				
19	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
20	1차				
	2차				
	3차				
21	1차				
	2차				
	3차				
22	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
23	1차				
	2차				
	3차				
24	1차				
	2차				
	3차				
25	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
26	1차				
	2차				
	3차				
27	1차				
	2차				
	3차				
28	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
29	1차				
	2차				
	3차				
38	1차				
	2차				
	3차				
39	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
40	1차				
	2차				
	3차				
41	1차				
	2차				
	3차				
42	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
43	1차				
	2차				
	3차				
44	1차				
	2차				
	3차				
45	1차				
	2차				
	3차				

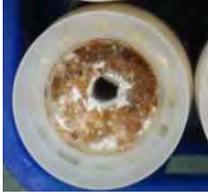
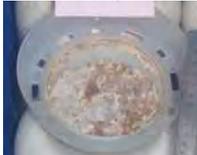
균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
46	1차				
	2차				
	3차				발이불량
48	1차				
	2차				
	3차				
49	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
50	1차				
	2차				
	3차				
51	1차				불량
	2차				
	3차				불량
52	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
53	1차				
	2차				
	3차				
54	1차				
	2차				
	3차				
55	1차				
	2차				
	3차				

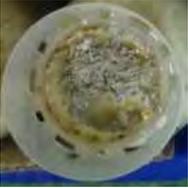
균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
56	1차				
	2차				
	3차				
57	1차				
	2차				
	3차				
58	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
59	1차				
	2차				
	3차				
60	1차				
	2차				
	3차				
61	1차				
	2차				
	3차				

균주명	30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항	
63	1차			불량	
	2차			불량	
	3차			불량	
64	1차				
	2차				
	3차				
65	1차				
	2차				
	3차				

군주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
66	1차				
	2차				
	3차				불량
67	1차				
	2차				
	3차				불량
68	1차				
	2차				
	3차				불량

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
69	1차				
	2차				
	3차				배양불량
70	1차				
	2차				
	3차				배양불량
71	1차				배양불량
	2차				
	3차				배양불량
72	1차				
	2차				
	3차				배양불량

균주명	30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항	
73	1차				
	2차				
	3차				배양불량
74	1차				배양불량
	2차				
	3차				배양불량
75	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
76	1차				
	2차				
	3차				배양불량
77	1차				
	2차				
	3차				배양불량
78	1차				배양불량
	2차				
	3차				
79	1차				
	2차				
	3차				

<표 20. GPm3-10 단핵군사 돌연변이 균주의 교배종 재배 성적표>

번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
¹⁾ Hmm1								불량
Hmm1								불량
Hmm1	1	2	1	x	1	3	3	11
Hmm2								불량
Hmm2								불량
Hmm2	1	2	1	x	2	3	3	12
Hmm3								불량
Hmm3								불량
Hmm3	1	2	1	x	1	3	3	11
Hmm4	1	2	1	x	2	2	3	11
Hmm4								불량
Hmm4	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm5	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm5	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm5	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm6	1	1	1	x	2	1	3	9
Hmm6	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm6	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm7	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm7	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm7	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm8	1	2	1	x	2	3	3	12
Hmm8	1	2	1	x	1	3	3	11
Hmm8	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm9	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm9	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm9	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm10	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm10	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm10								불량
Hmm11	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm11	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm11	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm12	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm12	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm12	1	1	1	x	2	3	3	11
Hmm13	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm13	2	2	1	1	3	3	3	15
Hmm13	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm14	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm14	2	2	1	x	3	3	3	14
Hmm14	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm15	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm15	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm15	2	1	2	1	3	3	3	15

* 각항목의 점수는 <표 10. 품종선발을 위한 7가지 측정 항목 기준표>에 준하여 측정함.

¹⁾Hmm은 Hypsizigus marmoreus Mutant의 약자표기

번호	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
Hmm16	2	2	2	x	3	3	3	15
Hmm16	2	1	2	x	3	3	3	14
Hmm16	2	2	2	1	3	3	3	16
Hmm17	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm17	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm17	2	1	2	1	3	2	3	14
Hmm18	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm18	2	2	2	1	3	3	3	16
Hmm18	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm19	2	1	1	x	3	2	3	12
Hmm19	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm19	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm20	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm20	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm20	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm21	1	1	1	x	1	1	3	8
Hmm21	1	1	2	x	3	2	3	11
Hmm21	1	2	2	x	1	2	3	11
Hmm22	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm22	1	1	2	x	3	2	3	12
Hmm22	1	2	2	x	3	2	3	13
Hmm23	2	1	2	x	3	2	3	13
Hmm23	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm23	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm24	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm24	2	1	1	1	1	1	3	10
Hmm24	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm25	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm25	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm25	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm26	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm26	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm26	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm27	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm27	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm27	2	1	2	1	1	3	3	13
Hmm28	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm28	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm28	2	1	1	1	1	3	3	12
Hmm29	1	2	1	x	2	2	3	11
Hmm29	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm29	1	1	1	x	2	3	3	11
Hmm38	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm38	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm38	1	1	1	x	2	3	3	11
Hmm39	1	1	1	x	2	3	3	11
Hmm39	1	1	1	x	1	3	3	10
Hmm39	1	1	1	x	1	3	3	10

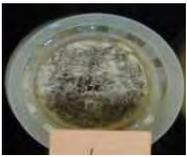
종군	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
Hmm40	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm40	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm40	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm41	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm41	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm41	1	2	1	x	2	3	3	12
Hmm42	1	2	1	x	1	3	3	11
Hmm42	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm42	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm43	1	1	1	x	2	3	3	11
Hmm43	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm43	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm44	1	2	1	x	3	2	3	12
Hmm44	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm44	1	1	1	x	3	2	3	11
Hmm45	2	2	1	1	1	2	3	12
Hmm45	2	1	1	1	2	3	3	13
Hmm45	2	1	2	x	3	3	3	14
Hmm46	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm46	1	2	1	x	1	3	3	11
Hmm46								불량
Hmm48	1	3	1	x	1	1	3	10
Hmm48	1	2	1	x	1	1	3	9
Hmm48	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm49	1	3	1	x	2	1	3	11
Hmm49	1	2	1	x	2	1	3	10
Hmm49	1	1	1	x	2	1	3	9
Hmm50	2	1	2	1	3	3	3	15
Hmm50	2	2	3	x	2	2	2	13
Hmm50	2	2	2	x	2	3	3	14
Hmm51								불량
Hmm51	2	1	2	x	1	3	3	12
Hmm51								불량
Hmm52	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm52	1	2	3	x	2	3	3	14
Hmm52	2	2	2	x	2	3	3	14
Hmm53	1	3	2	x	1	1	3	11
Hmm53	1	1	2	x	1	2	3	10
Hmm53	1	2	1	x	2	2	3	11
Hmm54	1	2	2	x	2	1	3	11
Hmm54	1	2	3	x	3	1	3	13
Hmm54	1	2	2	x	2	1	3	11
Hmm55	1	2	2	x	1	3	3	12
Hmm55	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm55	1	1	1	x	2	3	3	11

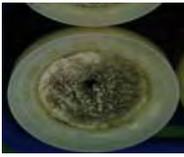
종군	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
Hmm56	1	1	2	x	3	3	3	13
Hmm56	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm56	1	2	1	x	2	3	3	12
Hmm57	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm57	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm57	1	2	2	x	1	2	3	11
Hmm58	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm58	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm58	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm59	1	2	2	x	1	3	3	12
Hmm59	1	2	2	x	1	3	3	12
Hmm59	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm60	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm60	1	1	2	x	2	2	3	11
Hmm60	1	1	2	x	2	2	3	11
Hmm61	1	2	2	x	3	3	3	14
Hmm61	1	1	2	x	2	2	3	11
Hmm61	1	1	2	x	1	3	3	11
Hmm63								불량
Hmm63								불량
Hmm63								불량
Hmm64								불량
Hmm64	1	1	1	x	3	3	3	12
Hmm64								불량
Hmm65	2	1	2	3	3	3		14
Hmm65	2	1	2	1	1	3	3	13
Hmm65	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm66								불량
Hmm66	1	2	1	x	3	3	3	13
Hmm66								불량
Hmm67	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm67	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm68	1	2	2	x	1	3	3	12
Hmm68	1	1	1	x	1	2	3	9
Hmm69	2	1	2	1	2	3	3	14
Hmm69	2	1	2	x	3	3	3	14
Hmm70	1	2	2	x	1	3	3	12
Hmm70	1	1	1	x	2	2	3	10
Hmm71								불량
Hmm71	1	1	2	x	1	3	3	11
Hmm72	1	1	2	x	2	2	3	11
Hmm72	1	1	2	x	1	3	3	11
Hmm73	1	2	2	x	2	3	3	13
Hmm73	1	2	1	x	2	3	3	11
Hmm74								불량
Hmm74	1	2	1	x	2	2	3	11
Hmm75	2	1	1	1	2	3	3	13
Hmm75	1	1	2	x	2	3	3	12
Hmm75	1	1	2	x	2	3	3	12

종균	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
Hmm76	1	2	1	x	2	2	3	11
Hmm76	1	3	2	x	2	3	3	14
Hmm76								불량
Hmm77	2	1	1	1	2	3	3	13
Hmm77	2	2	2	1	3	3	3	16
Hmm77								불량
Hmm78								불량
Hmm78	1	1	2	x	2	3	3	12
Hmm78	1	1	2	x	2	3	3	12
Hmm79	1	2	1	x	2	1	3	10
Hmm79	1	3	2	x	2	2	3	13
Hmm79	1	2	2	x	2	2	3	12

(5) GPHm3-10과 GPHm3-8균주에서 분리한 단핵균사 10개씩을 사용하여 교배를 실시한결과 70%의 교잡율을 나타내어 70개의 균주가 확보되었다. 70개의 균주를 1차재배실시한결과 버섯의 개체 수, 갯 모양, 수량성, 갯 색깔, 맛, 대치선 형성의 6가지 항목에 부합하는 균주를 선발하지 못하여 재배품종으로 적합하지 않았음 (표 21, 22참조)

<표 21. GPHm3-10 과 GPHm3-8 교잡 실험>

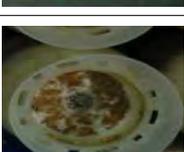
군주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
1	1차				
	2차				
	3차				불량
2	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
3	1차				
	2차				
	3차				
4	1차				
	2차				
	3차				

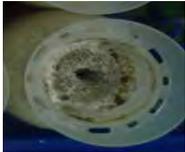
균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
5	1차				
	2차				
	3차				
6	1차				
	2차				
	3차				
7	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
8	1차				
	2차				
	3차				
9	1차				
	2차				
	3차				
10	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
11	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
12	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
13	1차				
	2차				
	3차				
14	1차				
	2차				
	3차				
15	1차				
	2차				
	3차				

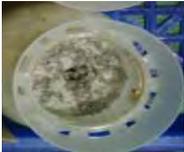
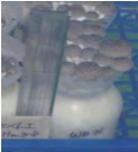
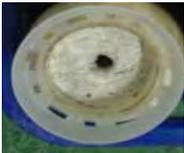
균주명		30일배양	13일재배	수확전	특이사항
16	1차				
	2차				
	3차				
17	1차				
	2차				
	3차				
18	1차				
	2차				
	3차				

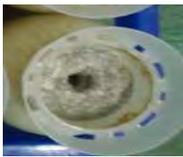
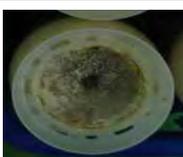
균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
19	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
20	1차				
	2차				
	3차				
21	1차				
	2차				
	3차				
22	1차				
	2차				
	3차				

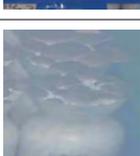
균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
23	1차				
	2차				
	3차				
24	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
25	1차				
	2차				
	3차				
26	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
27	1차				
	2차				
	3차				
28	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
29	1차				
	2차				
	3차				불량
30	1차				불량
	2차				
	3차				불량
31	1차				
	2차				
	3차				

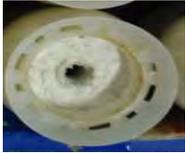
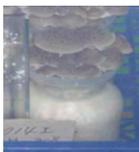
균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
32	1차				
	2차				
	3차				
33	1차				
	2차				
	3차				
34	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
35	1차				
	2차				
	3차				
36	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
37	1차				
	2차				
	3차				
38	1차				
	2차				
	3차				

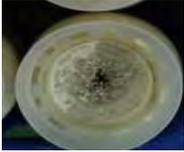
군주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
39	1차				
	2차				
	3차				
40	1차				
	2차				
	3차				
41	1차				
	2차				
	3차				
42	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
43	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
44	1차				
	2차				
	3차				
45	1차				
	2차				
	3차				
46	1차				
	2차				
	3차				

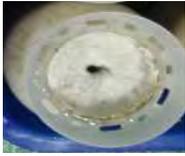
균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
47	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
48	1차				불량
	2차				
	3차				불량
49	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
50	1차				
	2차				
	3차				
51	1차				
	2차				
	3차				
52	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
53	1차				
	2차				
	3차				
54	1차				
	2차				
	3차				
55	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
56	1차				
	2차				
	3차				
57	1차				
	2차				
	3차				
58	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량
59	1차				
	2차				
	3차				

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
60	1차				
	2차				
	3차				
61	1차				
	2차				
	3차				
62	1차				
	2차				
	3차				
63	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
64	1차				
	2차				
	3차				
65	1차				
	2차				
	3차				
66	1차				
	2차				
	3차				
67	1차				불량
	2차				불량
	3차				불량

균주명		30일 배양	13일 재배	수확전	특이사항
68	1차				
	2차				
	3차				
69	1차				
	2차				
	3차				
70	1차				
	2차				
	3차				

<표 22. GPHm3-10 과 GPHm3-8 교잡 실험 성적표>

종균	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
¹⁾ WB1	1	2	2	0	3	2	3	13
WB1	2	2	2	2	2	3	3	16
WB1								불량
WB2								불량
WB2								불량
WB2								불량
WB3	1	3	1	0	3	3	3	14
WB3	1	2	1	0	2	3	3	12
WB3	1	3	1	0	2	3	3	13
WB4	1	1	1	0	2	2	3	10
WB4	1	1	2	0	3	3	3	13
WB4	1	2	2	0	3	3	3	14
WB5	1	2	2	0	2	3	3	13
WB5	1	1	2	0	3	3	3	13
WB5	2	1	2	13	2	3	3	13
WB6	2	3	1	1	2	3	3	15
WB6	1	2	1	0	2	3	3	12
WB6	1	3	1	0	1	3	3	12
WB7	1	2	1	0	2	2	3	13
WB7	1	1	2	0	3	3	3	13
WB7	1	3	2	0	2	3	3	14
WB8	1	2	1	0	2	2	3	11
WB8	1	2	1	0	2	3	3	12
WB8	1	2	1	0	1	3	3	11
WB9	1	3	1	0	2	3	3	13
WB9	1	3	1	0	2	3	3	13
WB9	1	3	1	0	2	3	3	12
WB10	2	2	2	1	3	3	3	16
WB10	2	3	3	1	3	3	3	18
WB10	2	3	3	1	3	3	3	18
WB11								불량
WB11								불량
WB11								불량
WB12								불량
WB12								불량
WB12								불량
WB13	1	1	2	0	3	3	3	13
WB13	1	3	3	0	2	3	3	15
WB13	1	1	2	0	1	3	3	11
WB14	1	2	2	0	3	3	3	14
WB14	1	2	3	0	3	3	3	15
WB14	1	2	3	0	3	3	3	15
WB15	1	2	2	0	3	3	3	14
WB15	1	3	3	0	3	3	3	16
WB15	1	2	3	0	2	3	3	14

* 각항목의 점수는 <표 10. 품종선발을 위한 7가지 측정 항목 기준표>에 준하여 측정함.
¹⁾WB는 GPHm3-10 과 GPHm3-8 교잡 균주의 약자표기

종균	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
WB16	1	2	1	0	2	3	3	12
WB16	1	2	1	0	2	3	3	12
WB16	1	1	1	0	2	3	3	11
WB17	1	3	2	0	1	3	3	13
WB17	1	3	1	0	2	3	3	13
WB17	1	3	2	0	2	3	3	14
WB18	1	3	2	0	3	2	3	14
WB18	1	2	2	0	2	2	3	12
WB18	1	2	3	0	3	1	3	13
WB19								불량
WB19								불량
WB19								불량
WB20	1	3	1	0	2	3	3	13
WB20	1	3	1	0	2	3	3	13
WB20	1	3	2	0	3	3	3	15
WB21	1	2	1	0	2	3	3	12
WB21	1	3	2	0	1	3	3	13
WB21	1	3	2	0	3	3	3	15
WB22	1	2	2	0	3	3	3	14
WB22	1	2	2	0	1	3	3	12
WB22	1	2	2	0	2	3	3	13
WB23	1	3	2	0	3	3	3	15
WB23	1	3	2	0	3	3	3	15
WB23	1	2	2	0	2	2	3	12
WB24								불량
WB24								불량
WB24								불량
WB25	1	3	1	0	3	3	3	14
WB25	1	3	1	0	1	3	3	12
WB25	1	3	2	0	3	3	3	15
WB26	2	2	1	1	2	3	3	14
WB26	2	2	2	1	2	3	3	15
WB26	2	2	2	1	2	3	3	15
WB27	1	2	1	0	2	3	3	12
WB27	1	2	2	0	2	3	3	13
WB27	2	2	1	1	3	3	3	14
WB28								불량
WB28								불량
WB28								불량
WB29	1	2	1	0	2	3		12
WB29	1	3	1	0	2	3	3	13
WB29								불량
WB30								불량
WB30	1	3	1	0	2	3	3	13
WB30								불량
WB31	1	2	1	0	2	2	3	11
WB31	1	3	1	0	3	3	3	14
WB31	1	2	1	0	3	3	3	13

종군	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
WB32	1	2	1	0	2	3	3	12
WB32	1	2	1	0	2	3	3	12
WB32	1	2	1	0	3	3	3	13
WB33	1	2	2	0	3	3	3	14
WB33	1	3	2	0	1	3	3	13
WB33	1	1	2	0	1	2	3	10
WB34	1	2	1	0	3	3	3	13
WB34	1	2	1	0	3	3	3	13
WB34	1	2	1	0	3	3	3	13
WB35	1	2	2	0	3	3	3	14
WB35	2	3	2	1	2	3	3	16
WB35	2	2	2	1	2	3	3	15
WB36								불량
WB36								불량
WB36								불량
WB37	1	2	1	0	2	3	3	12
WB37	1	3	2	0	2	3	3	14
WB37	1	3	2	0	2	3	3	14
WB38	1	1	1	0	2	3	3	11
WB38	1	3	2	0	2	3	3	14
WB38	2	2	2	1	1	3	3	14
WB39	1	2	1	0	3	3	3	13
WB39	1	2	1	0	3	3	3	13
WB39	1	2	1	0	3	3	3	14
WB40	1	2	1	0	2	3	3	12
WB40	1	3	2	0	3	3	3	15
WB40	1	3	2	0	1	3	3	13
WB41	1	2	1	0	1	3	3	11
WB41	1	2	2	0	3	3	3	14
WB41	1	2	1	0	2	3	3	12
WB42								불량
WB42								불량
WB42								불량
WB43								불량
WB43								불량
WB43								불량
WB44								불량
WB44	1	2	1	0	3	3	3	13
WB44	1	2	2	0	1	3	3	12
WB45	1	2	1	0	3	3	3	13
WB45	1	2	1	0	3	3	3	13
WB45	1	3	2	0	2	3	3	14
WB46	1	2	1	0	3	2	3	12
WB46	1	2	1	0	3	2	3	12
WB46	1	2	2	0	2	2	2	11
WB47								불량
WB47								불량
WB47								불량

종군	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
WB48								불량
WB48	1	2	1	0	2	3	3	12
WB48								불량
WB49								불량
WB49								불량
WB49								불량
WB50	1	1	2	0	1	3	3	11
WB50	1	3	2	0	2	3	3	14
WB50	1	2	1	0	3	3	3	13
WB51	1	2	2	0	3	3	3	14
WB51	1	2	1	0	1	3	3	11
WB51								
WB52								불량
WB52								불량
WB52								불량
WB53	1	3	1	0	2	3	3	13
WB53	1	3	1	0	1	3	3	12
WB53	1	2	1	0	3	3	3	13
WB54	2	2	2	0	2	3	3	14
WB54	1	2	2	0	2	3	3	13
WB54	1	2	2	0	2	3	3	13
WB55	1	2	2	0	2	3	3	13
WB55	1	2	2	0	3	3	3	14
WB55	1	2	2	0	3	3	3	14
WB55	1	2	2	0	3	3	3	14
WB56	1	2	2	0	2	3	3	13
WB56	1	2	2	0	3	3	3	14
WB56	1	2	2	0	2	3	3	13
WB57	2	2	2	1	1	3	3	14
WB57	2	2	2	1	1	3	3	14
WB57	2	2	3	1	3	3	3	17
WB58								불량
WB58								불량
WB58								불량
WB59	2	2	1	1	1	3	3	13
WB59	1	2	1	0	2	3	3	12
WB59	1	2	1	0	2	3	3	12
WB60	2	1	1	1	2	3	3	13
WB60	1	1	2	0	1	2	3	10
WB60	2	2	2	1	1	2	3	13
WB61	1	3	2	0	2	3	3	14
WB61	1	2	2	0	2	3	3	13
WB61	2	2	1	1	2	3	3	14
WB62	1	2	1	0	3	3	3	13
WB62	1	2	2	0	3	3	3	14
WB62	2	2	2	1	1	3	3	14
WB63								불량
WB63								불량
WB63								불량

종군	수량성	갯색깔	재배일수	개체수	버섯맛	갯모양	배양일수	합계
WB64	1	3	1	0	1	3	3	12
WB64	1	3	1	0	2	3	3	13
WB64	1	3	1	0	2	3	3	13
WB65	1	2	2	0	2	3	3	13
WB65	1	2	2	0	1	3	3	12
WB65	2	2	2	1	1	3	3	14
WB66	1	2	1	0	1	3	3	11
WB66	1	2	1	0	1	3	3	11
WB66	1	2	1	0	3	3	3	13
WB67								불량
WB67								불량
WB67								불량
WB68	1	2	1	0	3	3	3	13
WB68	1	2	1	0	3	3	3	13
WB68	1	2	1	0	3	3	3	13
WB69	1	2	1	0	2	3	3	12
WB69	1	2	1	0	2	3	3	12
WB69	1	2	1	0	2	3	3	12
WB70								불량
WB70								불량
WB70	1	2	1	0	2	3	3	12

(6) 표 23에서 보는 바와같이 교잡에 사용된 모균주 Hm1-1, Hm3-10과 Hm3-10 균주에서 돌연변이 처리된 Hm14-3, Hm14-4균주와, 교배육종이 진행되어 최종선발된 6개 균주의 α -amylase, β -Glucosidase, Chitinase, CMCCase, Xylanase의 효소활성도를 UV spectrometer를 사용하여 측정한 결과 각 효소의 특성상 exo-enzyme의 활성도가 높게 측정되었음.

α -amylase의 활성은 모균주 Hm1-1, Hm3-10을 제외하고 최대, 최소값의 범위는 Hm17-5에서 최소값으로 1.184×10^6 u/mg protein, Hm16-1에서 5.292×10^6 u/mg protein로 최대값을 나타내었음. β -Glucosidase의 경우는 Hm17-5에서 최소값으로 2.548×10^4 u/mg protein, Hm16-1에서 8.973×10^4 u/mg protein으로 최대값을 나타내었음. CMCCase의 경우는 Hm17-5에서 최소값으로 1.123×10^5 u/mg protein, Hm16-1에서 1.140×10^6 u/mg protein으로 최대값을 나타내었음. Chitinase의 경우는 Hm17-5에서 최소값으로 4.626×10^4 u/mg protein, Hm16-1에서 2.029×10^5 u/mg protein으로 최대값을 나타내었음. Xylanase의 경우는 Hm17-5에서 최소값으로 9.420×10^4 u/mg protein, Hm14-3에서 5.883×10^5 u/mg protein으로 최대값을 나타내었음.

그러나 enzyme의 활성도가 높은 Hm16-1균주의 표현형은 Hm17-5의 표현형에 비해 좋은 형질을 나타내지 않아 enzyme 활성도와 버섯의 품질 및 재배일수에는 큰영향이 없는 것으로 판단되었으나, 추후 지속적인 연구가 필요할것임.

<표 23. *Hypsizigus marmoreus*의 α -amylase, β -Glucosidase, Chitinase, CMCase, Xylanase의 exo-, endo- enzyme의 Specific Activity 측정표>

Strain NO.	Specific activity(u/mg protein)									
	α -amylase		β -Glucosidase		Chitinase		CMCase		Xylanase	
	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme	exo-enzyme	endo-enzyme
Hm1-1	1.505×10 ⁶	7.923×10 ⁴	4.214×10 ⁴	3.805×10 ²	7.016×10 ⁴	8.622×10 ³	4.324×10 ⁵	3.563×10 ²	4.505×10 ⁵	0
Hm3-10	9.789×10 ⁵	7.468×10 ⁴	2.218×10 ⁴	4.454×10 ²	3.649×10 ⁴	8.495×10 ³	2.032×10 ⁵	3.192×10 ²	2.408×10 ⁵	0
Hm14-3	2.593×10 ⁶	8.337×10 ⁴	5.565×10 ⁴	4.433×10 ²	9.299×10 ⁴	9.755×10 ³	5.837×10 ⁵	3.617×10 ²	5.883×10 ⁵	0
Hm14-4	1.901×10 ⁶	7.533×10 ⁴	4.231×10 ⁴	4.227×10 ²	7.068×10 ⁴	8.994×10 ³	4.499×10 ⁵	3.211×10 ²	4.495×10 ⁵	0
Hm15-3	2.340×10 ⁶	8.201×10 ⁴	5.487×10 ⁴	4.980×10 ²	9.480×10 ⁴	1.001×10 ⁵	5.983×10 ⁵	3.495×10 ²	5.745×10 ⁵	0
Hm15-4	1.250×10 ⁶	6.570×10 ⁴	2.860×10 ⁴	4.491×10 ²	4.691×10 ⁴	8.089×10 ³	2.952×10 ⁵	280.4×10 ²	2.750×10 ⁵	0
Hm15-5	2.834×10 ⁶	9.762×10 ⁴	6.131×10 ⁴	4.937×10 ²	1.078×10 ⁵	1.214×10 ⁵	6.108×10 ⁵	4.077×10 ²	4.823×10 ⁵	0
Hm16-1	5.292×10 ⁶	1.022×10 ⁵	8.973×10 ⁴	6.189×10 ²	2.029×10 ⁵	1.305×10 ⁵	1.140×10 ⁶	4.272×10 ²	5.085×10 ⁵	0
Hm16-2	1.890×10 ⁶	8.847×10 ⁴	3.899×10 ⁴	5.260×10 ²	7.254×10 ⁴	1.123×10 ⁵	4.099×10 ⁵	3.697×10 ²	1.746×10 ⁵	0
Hm17-5	1.184×10 ⁶	7.385×10 ⁴	2.548×10 ⁴	4.726×10 ²	4.626×10 ⁴	9.511×10 ³	1.123×10 ⁵	3.158×10 ²	9.420×10 ⁴	0

* Hm1-1, Hm3-10 : 교잡에 사용된 모균주

* Hm14-3, Hm14-4 : Hm3-10균주의 돌연변이 처리후 생성된 79개 교배균주 중에서 선발된 Hm25, Hm26균주임.

* Hm15-3, Hm15-4, Hm15-5, Hm16-1, Hm16-2, Hm17-5 : Hm3-10과 Hm1-1교배균주 중에서 선발된 6개균주임.

* Hm15-3, Hm15-4, Hm17-5균주는 각각 “그린피스H1호”, “그린피스H2호”, “그린피스H3호”로 명명하여 품종보호출원한 품종임.

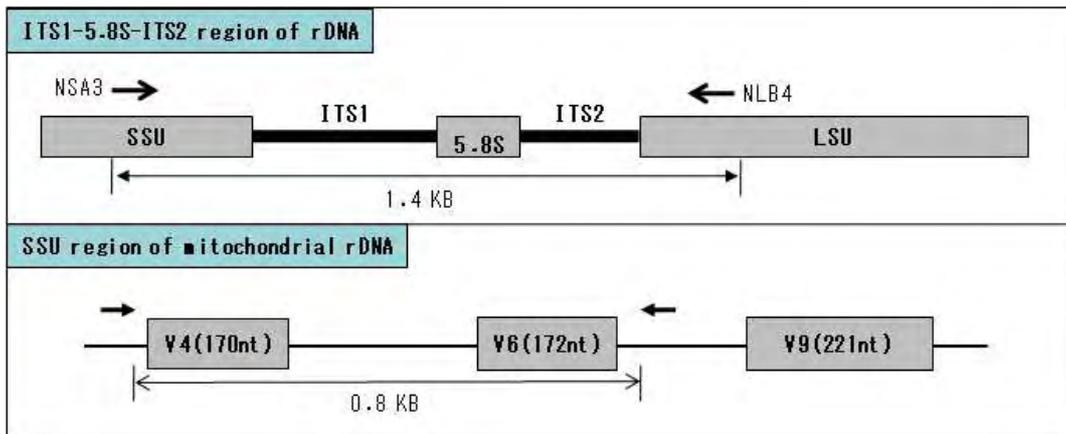
5. 유전체의 확보

느티만가닥버섯의 유전체분석을 위하여 주관기관 제공 총 30종의 균주로부터 유전체 추출을 시도하였다. 액체배양의 경우 배양속도가 너무 느렸기 때문에, 신속한 실험을 위하여 각 균주들을 PDA 고체배지에 배양하였다. 균사가 petri dish 의 전체를 덮을 정도로 자라면, petri dish 의절반에 해당하는 표면에서 균사체를 회수하였다. 회수된 균사체는 bead beater 를 이용하여 파쇄하였고, 파쇄된 균사체내의 유전체를 phenol 용액을 이용하여 추출하였다.

6. 분자유전학적 마커 염기서열의 결정

버섯 품종간의 구분을 위한 분자유전학적 마커들은 여러 종류가 있으나 본 연구실의 연구결과 ribosomal DNA 의 ITS1-5.8S-ITS2 sequence와 같은 genomic DNA sequence 보다는 미토콘드리아 rDNA 의 small subunit (SSU) 이 유용하게 적용될 수 있음을 확인하였다. SSU 정보를 느티만가닥버섯의 품종간 구분에 활용하기위하여 mitochondrial SSU 의 variable region 인 V6 와 V9 부분을 30종의 느티만가닥 품종에 대하여 두쌍의 primer 를 이용하여 증폭하였고 그 반응산물인 DNA fragment 들의 염기서열을 결정하였다. 사용된 primer set 은 V6을 위해서는 9F (5'-TTA GTC GGT CTC GGA GCA-3') 과 9R (5'-TGA CGA CAG CCA TGC AAC-3')를 사용하였고, V9을 위해서는 10F (5'-CCG TGA TGA ACT AAC CGT-3') 및 10R (5'-TTC CAG TAC AAG CTA CCT-3') 을 사용하였다.

<그림 30. 느티만가닥 분자유전학적 마커부분 (V6 및 V9) 의 위치>



그 결과로 결정된 염기서열을 ClustalW program 을 이용하여 multiple sequence alignment 하면 아래와 같다. 결과에서 보는 바와 같이 다른 종 (species) 의 버섯간의 품종구분에는 유용하게 사용되는 mitochondrial SSU 의 variable region 이 동일한 species 내의 품종간에는 전혀 차이를 보여주지 못하여 본 연구의 목표인 신품종 육종 품

중간 구분에는 사용될 수 없음을 확인하였다.

<표248. V6 region 의 느티만가닥 품종별 염기서열 비교>

Hm3-3F	CGTTTTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	59
Hm3-9F	---TTTTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm0-6F	-GTTATTTATACGAGAATACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	59
Hm2-8F	-GTTATT-ATACGAGAATACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	58
Hm1-1F	-----TATACGAGAATACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	53
Hm0-7F	---TANTTANACGAGAATACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm0-10F	-----ACGAGAATACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	49
Hm0-3-6-2F	--GTATTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	57
Hm3-8F	-----ACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	48
Hm3-6F	--GTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm0-4F	--GTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm1-7F2	-TGTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	57
Hm1-8F2	-TGTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	57
Hm3-1F	--GTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm2-7F	---TTATTAATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm3-10F	---TATTAATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	55
Hm0-9F	-----TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	42
Hm3-4F	--GTATTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	57
Hm4-1F	--GTATTTATACGAGAATACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	58
Hm2-10F	---TATTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm3-2F	----ATTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	55
Hm3-5F	-GTTATTTATACGAGA-TACGCGTAAAACCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	58
Hm0-3-6-1F	----ATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	54
Hm1-4F2	TGTTATTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	58
Hm1-10F	-----TTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	52
Hm3-7F	--GTTTTTATACGAGA-AACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	56
Hm1-6F	----TTTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	54
Hm0-2F	---ATTTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	55
Hm1-5F	-----TTTATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	53
Hm0-5F	---ATTTAATACGAGA-TACGCGTAAA-CCTTACCAGTTCTTGCATATCCAATCTGTTCT	55

***** *****

Hm3-3F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	119
Hm3-9F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	116
Hm0-6F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	119
Hm2-8F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	118
Hm1-1F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	113
Hm0-7F	TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTTAATAATTA	116

Hm0-10F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 109
 Hm0-3-6-2F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 117
 Hm3-8F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 108
 Hm3-6F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm0-4F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm1-7F2 TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 117
 Hm1-8F2 TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 117
 Hm3-1F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm2-7F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm3-10F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 115
 Hm0-9F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 102
 Hm3-4F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 117
 Hm4-1F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 118
 Hm2-10F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm3-2F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 115
 Hm3-5F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 118
 Hm0-3-6-1F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 114
 Hm1-4F2 TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 118
 Hm1-10F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 112
 Hm3-7F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 116
 Hm1-6F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 114
 Hm0-2F TAGATTTATCTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 115
 Hm1-5F TAGATTTATTTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 113
 Hm0-5F TAGATTTATTTAGGTTCTTTTTAATAAGTAAACAGATTGAGTGGTTTCTTTAATAATTA 115

***** *****

Hm3-3F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCA----- 156
 Hm3-9F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 154
 Hm0-6F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 157
 Hm2-8F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCA----- 155
 Hm1-1F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 151
 Hm0-7F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 154
 Hm0-10F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGT----- 144
 Hm0-3-6-2F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAAGAAGTAAAGTTTACGC 177
 Hm3-8F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAAG----- 149
 Hm3-6F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAAG----- 157
 Hm0-4F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 155
 Hm1-7F2 AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 155
 Hm1-8F2 AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAATGAA----- 160
 Hm3-1F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCA----- 153
 Hm2-7F AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA----- 154

Hm3-10F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAAGG-----	156
Hm0-9F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCA-----	139
Hm3-4F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	155
Hm4-1F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAAAGG-----	159
Hm2-10F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	154
Hm3-2F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	154
Hm3-5F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	157
Hm0-3-6-1F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	152
Hm1-4F2	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	156
Hm1-10F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	150
Hm3-7F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	154
Hm1-6F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	152
Hm0-2F	AAGAGATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	153
Hm1-5F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAA-----	151
Hm0-5F	AAGAAATCCGTTTACAGGTGTTGCATGGCTGTCGTCAATTTGACGCTGTTGCTTGGCTG	175
	*** ****	

<표 25. V9 region 의 느티만가닥 품종별 염기서열 비교>

Hm2-7F	-----ACTAACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	54
Hm0-10F	-----GGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	46
Hm0-3-6-2F	-----ACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	50
Hm3-2F	--CTGAACTTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	58
Hm0-9F2	-----AACTTACTTGGGGGA--CTGCCGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	54
Hm3-3F	-----ACTTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	54
Hm3-6F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm0-2F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm1-5F	-----TTACTTGGGGGA--CTGCCGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	51
Hm0-3-6-1F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm0-6F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm1-1F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm2-10F	-----AGCTTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	55
Hm3-9F	-----CTTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	53
Hm1-6F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm3-1F	-----TTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm2-8F	-----TACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	51
Hm4-1F	GTGGAAGTCTTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	60
Hm1-7F	-----AGCTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	54
Hm1-8F	-----AGCTACTTGGGGGA--CTGCCGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	53
Hm0-4F	-----AGCTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	54
Hm3-4F	-----CTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	52
Hm3-5F	-----ACTACTTGGGGGAAGTCCCGGAGGTTATAACTTTTTAAAGGAATATAAATT	53

Hm3-7F -----GGGACTACTTGGGGAACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 56
Hm3-8F ---CTGGACTACTTGGGGAACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 57
Hm1-4F -----ACTACTTGGGGAACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 53
Hm3-10F -----CTACTTGGGGAACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 52
Hm0-7F -----TACTTGGGGGA-CTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 50
Hm0-5F -----TACTTTGNGGGACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 51
Hm1-10F -----ACTTGGGGAACTGCCGCGAGGTTATAACTTTTTAAAAGGAATATAAATT 50

* ** *****

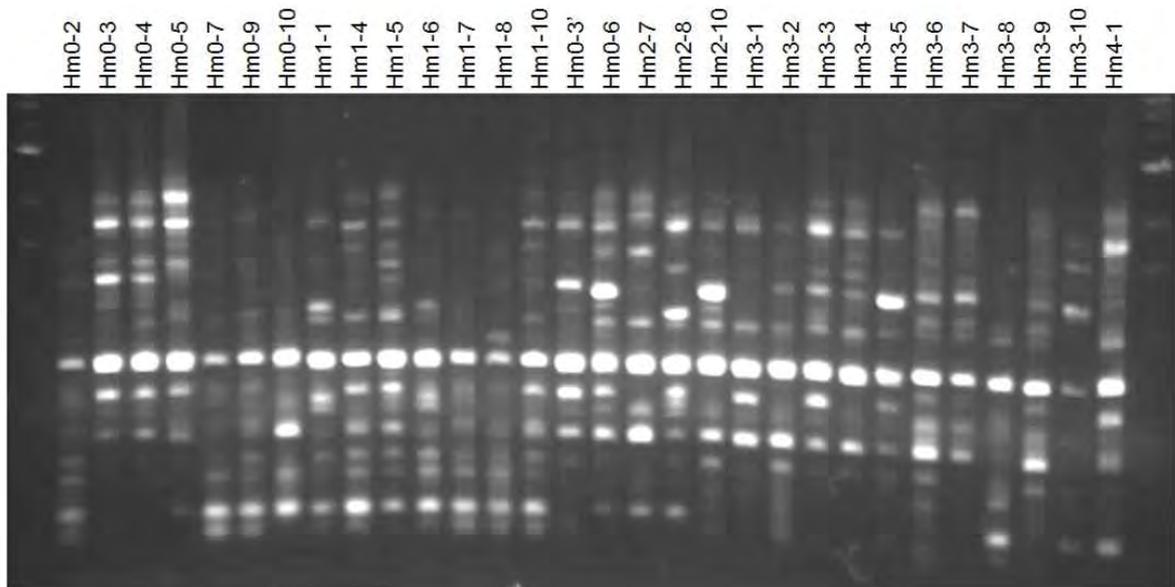
Hm2-7F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 114
Hm0-10F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 106
Hm0-3-6-2F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 110
Hm3-2F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 118
Hm0-9F2 AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 114
Hm3-3F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 114
Hm3-6F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm0-2F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm1-5F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 111
Hm0-3-6-1F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm0-6F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm1-1F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm2-10F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 115
Hm3-9F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 113
Hm1-6F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm3-1F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm2-8F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 111
Hm4-1F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 120
Hm1-7F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 114
Hm1-8F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 113
Hm0-4F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 114
Hm3-4F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm3-5F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 113
Hm3-7F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 116
Hm3-8F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 117
Hm1-4F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 113
Hm3-10F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 112
Hm0-7F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 110
Hm0-5F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 111
Hm1-10F AAATTATAATGGTTAATTTAAGTGTAGTTTGTATGCTAACCTTATTATTTAGAATTAAT 110

Hm2-7F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 174
Hm0-10F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 166
Hm0-3-6-2F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 170
Hm3-2F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 178
Hm0-9F2 TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 174
Hm3-3F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 174
Hm3-6F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm0-2F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm1-5F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 171
Hm0-3-6-1F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm0-6F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm1-1F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm2-10F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 175
Hm3-9F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 173
Hm1-6F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm3-1F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm2-8F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 171
Hm4-1F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 180
Hm1-7F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 174
Hm1-8F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 173
Hm0-4F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 174
Hm3-4F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm3-5F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 173
Hm3-7F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 176
Hm3-8F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 177
Hm1-4F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 173
Hm3-10F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 172
Hm0-7F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 170
Hm0-5F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 171
Hm1-10F TCTGTATTTAAGGTAATAGTCTTTTATTA AAAACACCTTTTTTAAGCTAATTAGTATCAG 170

7. DNA fingerprinting 방법을 이용한 느티만가닥버섯 품종 구분

가. 표 24, 25의 분자유전학적 마커 염기서열을 이용한 느티만가닥버섯 품종 구분연구에서 보는 바와 같이 진화학적으로 비교적 변이가 쉽게 일어나는 유전자 마커라 할지라도 육종에 의해서 생성되는 품종들간에는 거의 차이가 없음을 확인하였기 때문에, 본 연구에서는 좀 더 종간의 구분이 용이한 DNA fingerprinting 방법을 시도하기로 하였다. 여러 가지 DNA fingerprinting 방법이 있지만 가장 간편하고 일반적으로 사용되는 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 방법을 사용하였다. RAPD 를 위하여 상업적으로 확보 가능한 10mer random primer set (Invitrogen) 을 테스트 하였고 그 중 가장 다양한 DNA band pattern 을 보이는 3종의 primer set (OPS1, OPL13, OPS-5) 을 PCR primer 로 사용하였다.

<그림 32. OPS1 (CTACTGCGCT)을 이용한 14종의 느티만가닥버섯품종 RAPD 결과>



나. RAPD 결과는 위 그림과 같으며 품종마다 다르지만 많게는 25개에서 적게는 4개에 이르는 다양한 크기의 DNA 단편들이 도출되었다. 이러한 DNA band pattern을 Gelmarker program 을 이용하여 디지털 값으로 읽어 내었고, 그 결과를 FreeTree program 을 사용하여 분석하였다. 분석의 결과를 품종간의 차이를 보여주는 dendrogram 으로 표시하면 다음 그림 33과 같다.

다. Dendrogram 상에서 균주 Hm0-2, Hm0-7, Hm1-7, Hm1-8은 동일한 것으로 판명되었는데, Hm0-7, Hm1-7, Hm1-8은 모두 백색종으로 Hm0-7은 일본 호쿠도사의 제품이며, Hm1-7은 중국에서 입수된 균주이고, Hm1-8은 Hm1-7을 조직배양한 품종이다. 따라서 중국에서 입수된 Hm1-7, Hm1-8 품종은 일본 호쿠도사의 품종일 가능성이 높음을 알

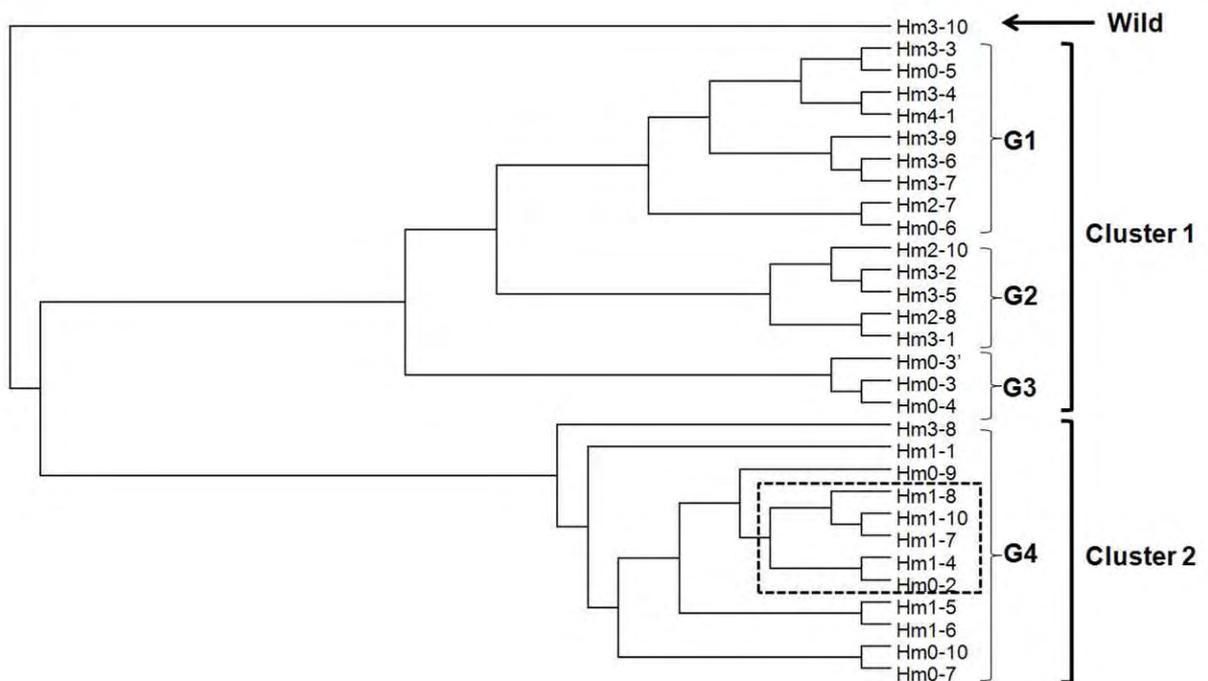
수 있다. 특이하게 Hm0-2 품종의 경우에는 갈색종으로 일본에서 입수된 품종으로 호쿠도사의 백색종과 같은 결과를 보였다 이는 아마도 육종의 모본이 유사한데서 나타난 결과일 것으로 추정된다. Hm0-10의 경우 갈색종으로 이들과 유연관계가 높은 것으로 봐서 역시 호쿠도사의 품종으로 판단된다.

라. Hm0-3 과 Hm0-4 품종은 동일한 종으로 나타났는데 실제로도 Hm0-4는 일본 다까라사의 갈색품종이며 Hm0-3은 Hm0-4를 조직 배양한 품종이다.

마. Hm1-1과 Hm1-6은 거의 동일한 품종으로 판단되나 1-1 은 일본, 1-6 은 중국에서 입수된 품종들이다. 모두 갈색 종이다.

바. Hm1-4, Hm1-10, Hm0-9, Hm1-5 품종들은 서로 유연관계가 높은 품종들이나 각각 갈색, 백색, 백색, 갈색 품종들로서 본 RAPD 결과들은 버섯 품종들의 색 특성은 반영하지 못함을 알 수 있다.

<그림 33. 14종 느티만가닥버섯품종의 유연관계>



사. 결론적으로 Hm0-3, Hm0-5, Hm0-4 품종은 일본 다까라사의 품종이며 나머지는 모두 일본 호쿠도사의 품종이거나 호쿠도품종과 관계가 있는 품종들이다.

8. 느티 만가닥 버섯 돌연변이균주 제작

가. 돌연변이법 검토

본 과제를 위한 돌연변이유도제로서, DNA methylation 을 유발하는 MMS

(methyl methane sulfonate) 와 UV 광선을 시험하였다. UV 광선을 조사하는 경우 전체 균사중 돌연변이 균사만을 screening 해야 하는 문제와 잦은 곰팡이 균의 오염 문제로 인하여 버섯 균사돌연변이법으로 적당하지 않았으며, 이에 따라 MMS를 돌연변이 유도제로 하여 버섯포자에 직접적으로 돌연변이를 유도하여 변이균을 분리하는 방법을 연구하였다. MMS (methyl methane sulfonate, C₂H₆O₃S)는 DNA 중 purine 염기를 methylation 하는 물질로서, double-stranded DNA break 를 일으켜서 돌연변이를 유발한다고 보고되어있다.

나. 돌연변이 protocol 확립

- (1) Spore Preparation: 느티만가닥버섯 spore 를 회수하여 액체퇴비배지(ABM) 20ml에 현탁시키고, 현탁액 20 ml 중 spore 수를 haemocytometer로 측정
- (2) Pre-incubation: 포자의 돌연변이 유도제에 대한 감수성을 높이기 위하여 포자를 액체퇴비배지 (20ml), 25°C조건으로 6시간동안 배양.
- (3) MMS treatment: 15ml conical tube 6개에 3ml씩 배양한 spore solution을 넣고 각각의 tube에 MMS를 0 μ l, 4.5 μ l, 5.5 μ l, 6.5 μ l, 7.5 μ l, 9 μ l씩 넣는다.
 - ⇒ 25°C에서 1시간 incubation ⇒ 3회 세척 (PBS+0.1% Sodium thiosulfate 1ml, 2500rpm, 10min)
 - ⇒ Plating (MMS 처리 Spore를 액체퇴비배지(ABM) 1ml로 현탁, plate 당 0.2ml씩 spreading)

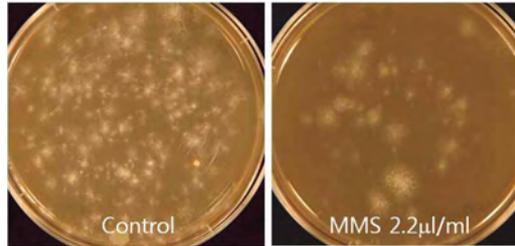
다. 돌연변이 결과

- (1) MMS농도에 대한 포자의 생존율을 조사하기 위하여 plate 당 15000개의 포자에 대하여, MMS 0, 1.5, 1.8, 2.2, 2.5, 3 μ l/ml 의 농도로 25°C, 1시간 처리하였다. MMS처리 포자를 ABM 배지에 plating 하고 1주일 후 각 plate의 colony 수를 측정하였고, 그 결과는 다음과 같다.

<표 26. MMS 처리에 대한 느티만가닥 포자의 생존율 >

MMS(ml/ml)	plate1	plate2	plate3	plate4	plate5
0	312				
1.5	72	72			
1.8	13	48	49		
2.2	23	31	42	42	
2.5	1	3	7		
3.0	3	5	6	6	10
Total spore : 15000					

<그림 34. 느티만가닥 포자 발아에 대한 MMS 효과>



(2) 실험조건에서 느티만가닥버섯 포자의 발아율은 약 2%였으며, MMS 의 농도 증가에 따라 발아율은 급격히 감소하였다. MMS 농도 2 ml/ml 에서 생존율이 약 10~15% 정도임을 확인하고, 이 농도를 느티만가닥 포자의 돌연변이에 사용하였다.

라. 돌연변이된 단핵균사의 유전적 특징검증

(1) 돌연변이 느티만가닥 단핵균주의 유전적 변이정도를 검사하기 위하여 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 분석을 실시하였다. 실험에 사용된 돌연변이균주는 총 35종으로 plate 상에서 single colony 를 형성하는 균주만을 선택하였다. RAPD 를 위한 primer set 은 OPS-1, OPS-10, OPL-13 을 각각 5'-CTACTGCGCT-3', 5'-ACCGTTCCAG-3', 5'-ACCGCCTGCT-3' 이었다. PCR 조건은 다음과 같다.

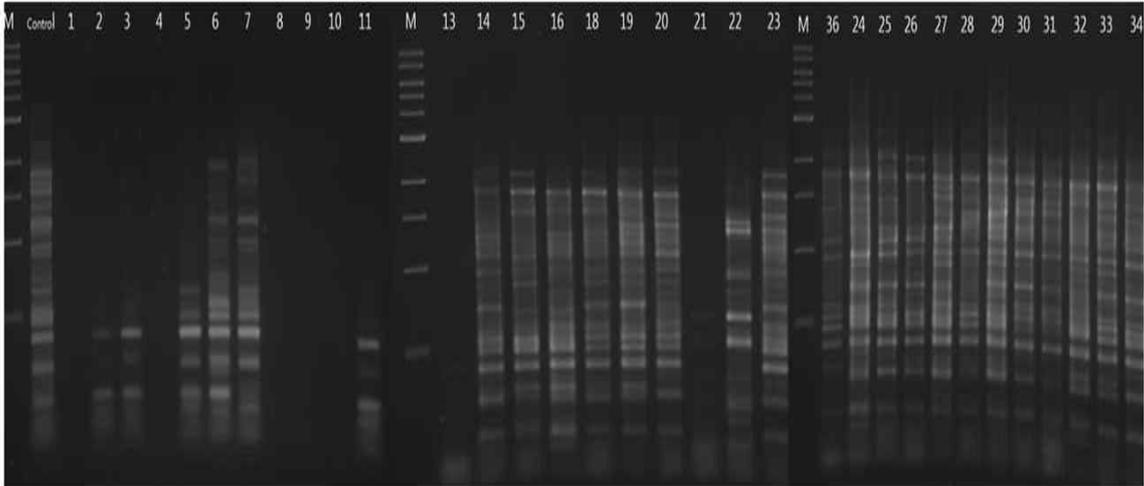
I. Chromosome isolation				
control~11 : Manual method 사용				
13~36 : QIAGEN kit 사용				
II. Hm mutants RAPD				
Template	3µl	Condition		
primer : OPS-1	} 0.3µl	Stage I	94 °C 5min	
OPS-10		} 40cycles	Stage II	94 °C 45sec
OPL-13			40 °C 45sec	
	70 °C 3min			
dNTP	0.5µl	Stage III	70 °C 10min	
Taq buffer	3µl			
Taq polymerase	0.5µl			
D.W	22.1µl			
	30µl			

(2) RAPD 결과

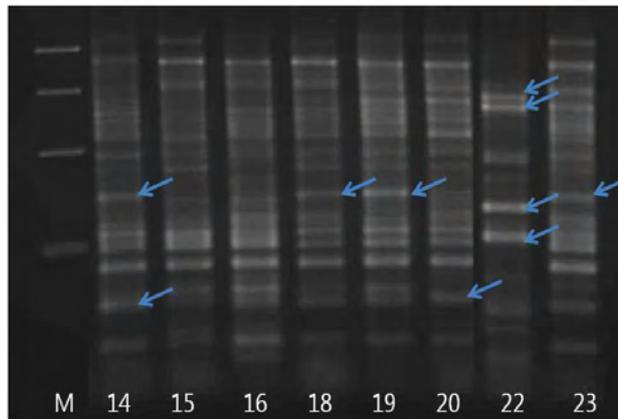
총 35종의 돌연변이균주에 대한 RAPD 결과는 아래와 같다. chromosome 1, 8, 9, 10, 13, 21의 경우에는 chromosome 의 순도와 양이 충분치 않은 이유로 PCR band 가 나타나지 않았으나, 나머지 chromosome 들에서는 다양한 DNA band 들이 나타남을 알 수 있다. DNA band pattern 을 분석하면, 예상한 대로

돌연변이 균주들의 chromosome 에서는 균주 특이적 band 들이 관찰되었으며 이는 돌연변이에 의한 chromosome의 부분적 변이에 기인한 것으로 판단할 수 있다.

<그림 35. 돌연변이균주에 대한 RAPD 결과>



<그림 36. 돌연변이균주에 특이적으로 나타나는 DNA band 분석>



9. 느티 만가닥 버섯육종을 위한 분자유전학적 마커개발

가. RAPD를 통한 느티만가닥버섯의 PCR 결과

수집된 30종 느티만가닥버섯의 계통분석을 위하여, 고체배지상에서 자란 균사체를 모아 염색체 DNA를 추출하였다. 추출된 염색체를 주형으로 하여 OPS-1, OPS-10, OPL-13 등 세가지 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 각 PCR 반응에서 분자량 200 bp~2500 bp 크기의 DNA 단편들이 균주당 30여개 씩 증폭됨이 확인되었다 (그림 32 참조).

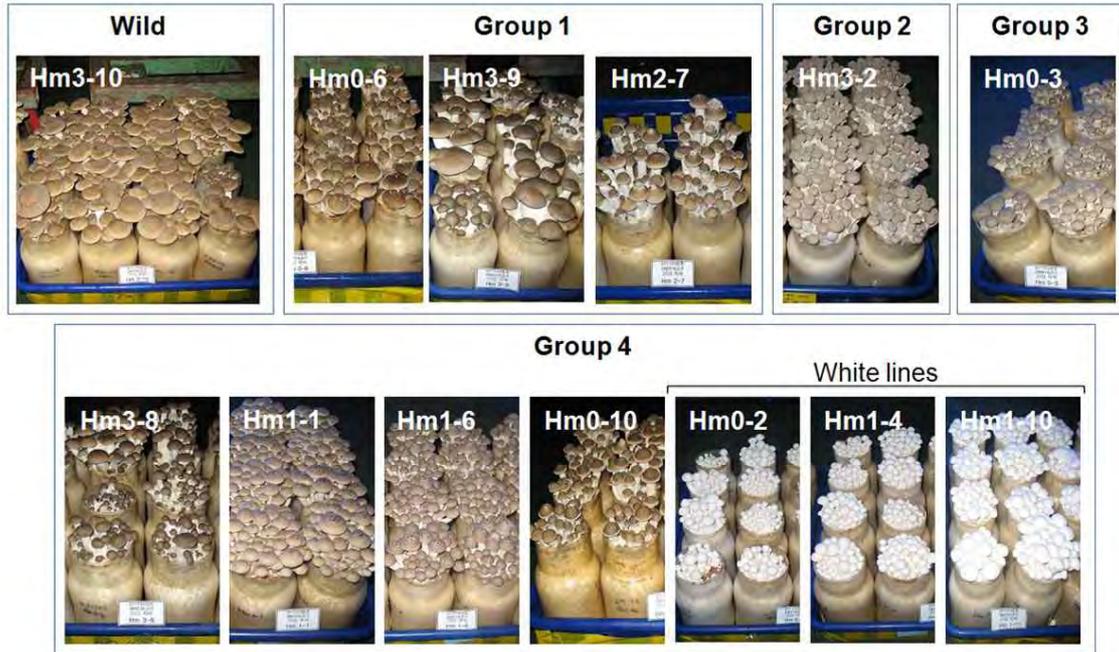
나. RAPD를 통한 느티만가닥버섯의 계통분석

그림 33에서 보는바와같이 이러한 DNA 단편들의 각 균주별 패턴을 UPGMA 방법으로 클러스터링(clustering) 하였다. 클러스터링 결과, 대부분의 느티만가닥버섯 품종은 Cluster 1 이나 Cluster 2, 둘 중 하나의 클러스터에 속하였으며, 특이하게도 한국 덕유산에서 채집된 야생종(Hm3-10)은 어느 클러스터에도 속하지 않는 독립된 종임을 알 수 있었다. 이러한 현상은 주로 일본, 중국, 대만 등지에서 수집된 느티만가닥 품종들이 대부분 유사한 기원에서 출발하였기 때문임을 추정할 수 있는데, 이는 아마도 이들 국가에서 유통 중인 느티만가닥버섯의 재배종 품종들이 대부분 일본의 재배기술과 함께 이들 국가로 흘러들어갔기 때문일 것으로 생각된다. 이들 가운데서 한국 야생종 균주 Hm3-10은 독특한 위치를 점하고 있기 때문에 향후 육종을 통한 균주개발의 중요한 자원이 될 것으로 생각된다. 각 클러스터를 살펴보면, Cluster 1의 경우에는 편의상 3개의 subgroup(G1, G2, G3)으로 나눌 수 있다. G1, G2에는 주로 각각 한국수집종 Hm3-3, Hm3-4, Hm3-6, Hm3-7, Hm3-9 및 역시 한국수집종 Hm2-10, Hm3-1, Hm3-2, Hm3-5등의 균주들이 포함되었다. G3는 주로 일본품종들이었다. Cluster 2의 경우는 dendrogram 상의 거리로 판단하면Hm1-1이나 Hm3-8등의 균주가 독립적으로 떨어져 있는 등, Cluster 1에 비하여 좀 더 많은 subgroup이 존재할 수 있을 것으로 생각되나, 편의상 하나의 그룹인 G4로 처리하였다.

다. 수집균주의 RAPD결과를 이용한 균주별 그룹 분석결과

이러한 RAPD 결과를 바탕으로 하는 느티만가닥버섯 그룹 분석결과를 각 그룹에 속하는 버섯들의 자실체 특성과 비교하여 그림 37에 나타내었다. 각 자실체들은 동일한 병버섯 재배조건에서 재배된 것이다. 먼저, Hm3-10 야생종의 경우 갓의 모양이 대표적 재배종버섯 Hm1-1에 비하여 크게 벌어져 있으며, 갓 색깔 또한 갈색으로 진한 갈색의 Hm1-1비하여 구분되는 특징을 가지고 있었다. Group 1의 버섯자실체들은 갈색이 강한 버섯들로서 병당 버섯개체수가 Hm1-1 비하여 작았다. Group 2와 Group 3의 버섯은 갓의 색이 회갈색이며, 갓 크기가 다른 Hm1-1비하여 작았다. Group 4의 버섯들은 재배형태학적으로 매우 다양한 특징들을 나타내었다. 대표적 재배품종인 Hm1-1은 진한 갈색 갓을 가지고 있으며, 많은 개체수와, 중간 크기의 갓크기 등의 특징을 가지나, 국내 품종인 Hm3-8의 경우 암갈색 갓에 불균일한 크기로 재배되었다. 이 그룹에는 특징적으로 흰색계통의 버섯인 Hm0-2, Hm1-4, Hm1-10 등이 하나의 subgroup을 형성하여 갈색 계통의 버섯들 독립적으로 존재한다. 이는 이들 흰색계통들이 원래 갈색계통의 버섯들에서 육종되어 개발된 품종임을 시사하는 것이다. 이상의 결과들을 종합하면, RAPD에 의한 느티만가닥버섯의 분자유전학적 구분법이, 버섯자실체의 재배형태학적 특성을 비교적 잘 반영하고 있음을 알 수 있다.

<그림 37. 수집균주의 RAPD를 통한 Grouping된 자실체 사진>



라. Hm0-4 품종 특이적 DNA마커 개발

위 실험들을 통하여 RAPD가 느티만가닥버섯의 품종구분에 사용될 수 있음을 보였다. 이와 더불어 RAPD는 버섯 각 품종별로 특징적인 DNA 단편들을 만들어 내기 때문에 RAPD의 각 DNA 단편들이 품종 특이적 마커로 사용될 수 있다. 본 연구에서는 이러한 가능성을 확인하기 위하여, Hm0-4, Hm0-7, Hm1-1, Hm1-4, Hm1-6, Hm2-7, Hm2-10, Hm3-6, Hm3-8, Hm3-10등 10 균주에 대하여, primer OPL-13으로 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과 얻어진 PCR 패턴으로부터 느티만가닥 품종 Hm0-4에서만 특이적으로 만들어 지는 250 bp DNA 밴드를 추출하여 TA-cloning 하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 바탕으로 18 뉴클레오타이드의 길이를 가진 primer를 제작하였고, 이들을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 아래 그림 C는 그 결과를 보여주는 것으로, Hm0-4 균주에서만 특이적인 250 bp의 DNA 밴드가 증폭됨을 확인하였다. Hm2-7 균주의 경우에도 DNA 밴드는 관찰되었으나, 목표크기보다 큰 비특이적 증폭의 결과였다. 이러한 결과는 RAPD에서 관찰되는 품종특이적 DNA 단편들이 각 품종을 구분할 수 있는 DNA 마커로서 개발될 수 있음을 보여주는 것이다.

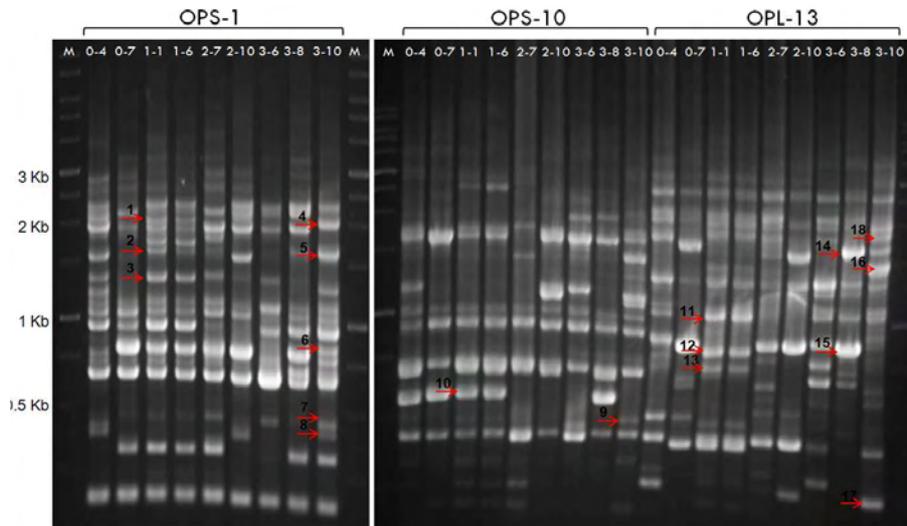
<그림 38. primer OPL-13을 이용한 PCR 반응 결과>



마. Hm1-1, Hm3-10 품종특이적 DNA마커 개발

재배종 품종인 Hm1-1과 야생종 Hm3-10의 품종특이적 마커 개발을 위하여 random primer OPS-1, OPS-10, OPL-13을 이용하여 RAPD 를 실시하였다(그림 39참조). 그 결과 아래 그림과 같은 18개의 특이적 DNA band를 선택하였고 이들을 pGEM-Teasy 벡터에 TA cloning 하였다.

<그림 39. primer OPS-1, OPS-10, OPL-13을 이용한 PCR 반응 결과>



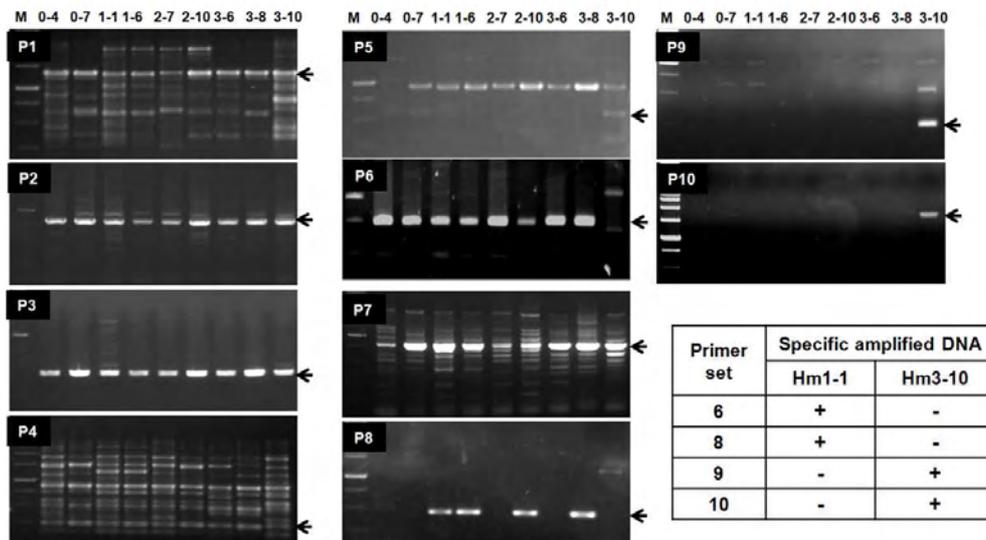
총 10개의 DNA에 대한 클로닝에 성공하여 DNA염기서열을 결정하였다. 염기서열은 GeneBank에 등록하였고 이들을 바탕으로 품종특이적 마커개발을 위한 PCR primer 를 제작하였다.

<표 27. 새로 개발된 primer set >

Primer set	DNA Band No.	Size (bp)	Forward	Tm(°C)	Reverse	Tm(°C)
1	3	1279	GGACCGGAAGAGGA	59.6	GGGTAGAGCTAAGGT	45.5
2	6	797	GATGGTGGCTATCTG	48.6	ATTTCACTCATATGC	41.3
3	7	419	CGGTCTTTCCGCTCA	59.5	CAAGATGGAGGCAGT	51.6
4	8	379	TGGATATCTTCCAGT	43.9	CTACTCACCTCGCCC	54.4
5	9	558	CAGCGATCGAGGGGA	62.4	CCATTACTCACCGTC	48.6
6	10	755	GTCATAGTGCCCGCT	55.0	GATCCATCTCGTGGT	50.9
7	12	810	TTGCACCAATAAATT	46.2	TCTCGTCAGAAAACA	46.7
8	15	454	GCTGTTGATGGCTGA	54.2	TTCCCCCTCCAATCA	58.1
9	17	255	CACCACCTACGCGGA	60.4	GGTTTGAGGAGTGTC	47.1
10	18	1666	CCAAGTGTCTTTTCC	47.8	GCTTTGTGCCATAGA	50.0

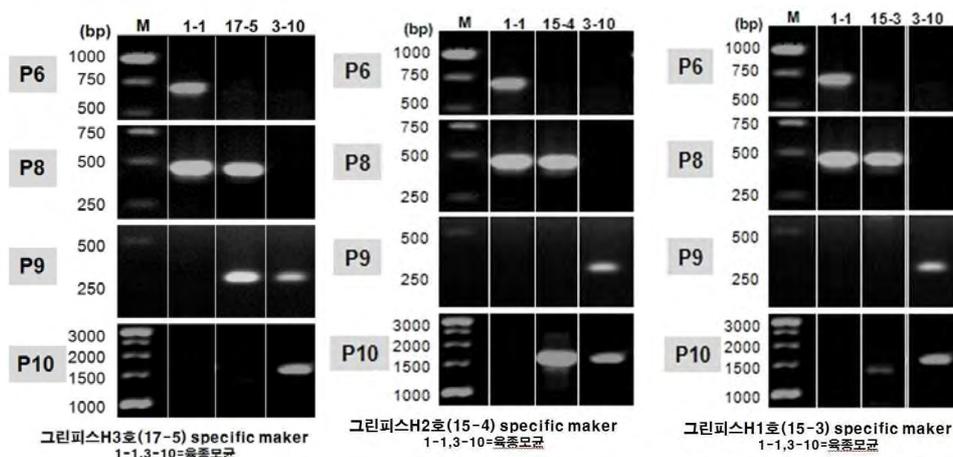
제작된 primer를 이용하여 10개의 품종에 대한 PCR을 수행하였다. 그 결과 마커 P1, P2, P3, P4, P5, P7은 전 품종에서 모두 목표 DNA band 가 검출되어 품종 구분에 실패하였으나, P7, P8은 Hm1-1을 포함한 여러 재배종 품종에는 나타났지만, Hm3-10에는 나타나지 않았고 반면, P9, P10은 Hm3-10에서만 나타났다. 따라서 이러한 primer set 을 이용하면 느티만가닥 품종 Hm1-1과 Hm3-10의 구분에 이용할 수 있다.

<그림 40. 새로 개발된 primer1~10번을 이용한 각 균주별 specific band>



위 4가지 마커는 특히 위 두 품종으로부터 새로운 품종 육성에 사용될 수 있는데 아래 그림은 Hm3-10, Hm1-1의 단포자 유래 균사의 mating에 의해 육성된 신품종 Hm17-5의 구분에 사용된 예이다.

<그림 41. 새로 개발된 primer6, 8, 9, 10을 이용한 개발품종의 품종구분>



3절. 연구결과

1. 국내 야생종 확보를 통한 일본 품종과 구별되는 육종모본(GPHm3-10) 확보
2. 그린피스 5호 품종명칭등록(선행연구결과)
3. 그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호 품종보호출원
4. RAPD를 이용하여 수집종의 품종구분을 위한 특이적 maker의 개발
5. 화학적 돌연변이(MMS 사용)를 이용한 느티만가닥버섯의 육종기술의 확립
6. GPHm1-1, GPHm3-10균주간 교잡을 통해 개발된 품종의 구별을 위한 특이 primer의 개발(P-6, P-8, P-9, P-10 primer).

Primer set	Size(bp)	Forward	Reverse
P6	755	GTCATAGTGCCCGCT	GATCCATCTCGTGGT
P8	454	GCTGTTGATGGCTGA	TTCCCCCTCCAATCA
P9	255	CACCACCTACGCGGA	GGTTTGAGGAGTGTC
P10	1666	CCAAGTGTCTTTTCC	GCTTTGTGCCATAGA

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연도별 연구목표

1. 1차년도

구분	연구개발의 목표 및 내용
주관	<ul style="list-style-type: none"> ○ 야생버섯균주은행 및 각 연구기관보유 만가닥버섯 유전자원의 수집 및 확보(30종 이상) <ul style="list-style-type: none"> - 야생버섯균주은행: 20여종 - 각 연구기관: 10여종 - 기보유균주: 5종 ○ 수집된 유전자원의 재배 및 생리학적 특성검증 <ul style="list-style-type: none"> - 자실체특성: 쓴맛의 정도, 색도 등의 균주간 특징을 계량화하여 분류함. - 재배특성: 토수병정도, 수확량 등을 계량화하여 조사함. ○ 위 재배 및 생리학적 특성을 바탕으로 육종을 위한 우량균주를 선발함.
협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수집된 유전자원의 유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 수집된 만가닥버섯 20여종을 액체배양하고 이로부터 유전체를 분리함. - 분리된 유전체의 RAPD 분석을 통하여 각 균주간 차이를 분석함. - 특이적 유전자 마커 (ITS region 1, 5.8s rDNA, ITS region 2, 18s rDNA, 28s rDNA, b-tubulin, EF1a, Histone H3) 서열을 분석함 ○ RAPD 및 유전자 마커의 염기서열을 이용한 분자유전학적인 품종 구분을 방법 확립함.

2. 2차년도

구분	연구개발의 목표 및 내용
주관	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선발된 균주의 단핵균사 확보 <ul style="list-style-type: none"> - RAPD를 통한 균주간 유연관계분석(1차년도 연구결과) - 선발균주의 재배를 통한 spore 채취 - 채취된 spore에서 무작위적으로 100개 monokaryon으로 추정되는 균사의 선발 - 현미경 검정으로 clamp connection유무 관찰 - 20개의 균사무늬, 성장속도의 특성이 서로 다른 monokaryon 균주 확보 ○ 균주간 단핵균사 교잡을 통한 교배종의 생성 <ul style="list-style-type: none"> - Hm3-10과 Hm1-1균주에서 분리한 각각 20개의 monokaryon 균사를 PDA plate 접종하여 mating하여 300종 이상 교배종 생성 ○ 목표특성을 가진 신품종 스크리닝기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 갓모양(반반구형), 수량(150g이상), 갓색깔, 배양일수(85일이하), 맛(쓴맛없음), 대치선형성 등의 6가지 항목
협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이 균주와 정상균주와의 교잡을 통한 교배종 생성 <ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이 균주와 정상균주와의 교배종 300종 이상 생성 ○ 자외선등 돌연변이 유도제 처리를 통한 돌연변이 균주 생성조건 확립 및 단핵균사의 유전적 특징 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이 생성조건 확립 - 단핵균사의 유전적 특성 검증

3. 3차년도

구분	연구개발의 목표 및 내용
주관	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌연변이 단핵군사와 정상 단핵군사 교배종과 정상 단핵군사간 교배종의 재배적 특성검증 <ul style="list-style-type: none"> - 실증재배를 통하여 <ol style="list-style-type: none"> 1) 갯모양(반구형), 2) 수량성 (150g이상 / 850cc), 3) 갯색깔(흑갈색), 4) 배양일수(85일이하), 5) 맛(쓴맛적음), 6) 개체수(대길이 5cm이상), 7) 대치선 형성(실증재배를 통해 선발된 균주에 한함) 의 7가지 항목을 조사하여 교배종의 재배적, 생리적 특성검증. ○ 모균주와 교배종의 특성검증(배양소요일수가 적거나 고수량성인 품종 개발) <ul style="list-style-type: none"> - 교배종의 실증재배를 통해 고수량성(170g/850cc병)인 1품종, 배양소요일수가 짧은(85일 이하) 1품종 등록. ○ 모균주와 교배종의 특성검증(쓴맛이 적은 품종 개발) <ul style="list-style-type: none"> - 단핵군사 교잡으로 생성된 교배종을 실증재배를 통해 쓴맛이 적은 1품종 등록.
협동	<ul style="list-style-type: none"> ○ 교배종 품종등록을 위한 특이적 마커 개발. <ul style="list-style-type: none"> - 실증재배를 통해 선발된 균주의 유전적 검증을 통한 특이적인 마커 개발 ○ 품종간 구분을 위한 마커의 탐색 및 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 탐색된 마커를 이용한 분자유전학적인 품종구분 방법의 확립

2절. 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 연구개발목표의 달성도

구분	연구개발목표	달성도	미달성사유
1차 연도	야생버섯균주은행 및 각 연구기관보유 만가닥버섯 유전자원의 수집 및 확보(30종 이상)	100	해당사항없음
	수집된 유전자원의 재배 및 생리학적 특성검증	100	"
	위 재배 및 생리학적 특성을 바탕으로 육종을 위한 우량균주를 선발함.	100	"
	수집된 유전자원의 유전체 분석	100	"
	RAPD 및 유전자 마커의 염기서열을 이용한 분자유전학적인 품종 구분을 방법 확립함.	100	"
2차 연도	선발된 균주의 단핵군사 확보	100	"
	균주간 단핵군사 교잡을 통한 교배종의 생성	80	- GPHm3-10과 GPHm1-1과의 교배가 이루어져 교배율이 일반적인 담자균류의 25%를 넘어서 100%의 교잡율을 나타내어 일차적으로 진행된 GPHm1-1과 GPHm3-10과의 교잡균주만을 대상으로 품종선발 진행함. - GPHm3-8과 GPHm1-1의 교배는 이루어졌으나 느티만가닥버섯의 재배특성상 재배일수가 100일로써 너무 길어 선발과정을 거치지 못함.
	목표특성을 가진 신품종 스크리닝기술 개발	100	해당사항없음
	돌연변이 균주와 정상균주와의 교잡을 통한 교배종 생성	100	"
	자외선등 돌연변이 유도제 처리를 통한 돌연변이 균주 생성조건 확립 및 단핵군사의 유전적 특징 검증	100	"

구분	연구개발목표	달성도	미달성사유
3차 연도	돌연변이 단핵군사와 정상 단핵군사 교배종과 정상 단핵군사간 교배종의 재배적 특성검증	100	"
	모균주와 교배종의 특성검증 (배양소요일수가 적거나 고수량성인 2품종 개발)	150	3품종 개발되어 초과달성함
	모균주와 교배종의 특성검증 (쓴맛이 적은 1품종 개발)	50	GPHm1-1과 국내야생종 GPHm3-10 균주와의 교잡에서는 쓴맛이 적은 품종이 선발되지 못함
	교배종 품종등록을 위한 특이적 마커 개발.	100	해당사항없음
	품종간 구분을 위한 마커의 탐색 및 확립	100	"

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

가. 야생버섯균주은행 및 각 연구기관보유 만가닥버섯 유전자원의 수집 및 확보

- ▶ 국내 야생종 느티만가닥 균주(GPHm3-10)를 확보하여 기존일본품종과의 유전적인 차별성을 확보하여, 앞의로의 느티만가닥버섯 육종효율을 배가시킬것임.

나. 수집된 유전자원의 재배 및 생리학적 특성검증을 통한 우량균주 선발.

- ▶ 본 과제를 수행하면서 획득된 유전자원의 재배 및 특성을 data base화 하여 차기 육종의 효율을 배가시킬것임.

다. 수집된 유전자원의 유전체 분석

- ▶ 수집된 유전자원의 유전체 분석을 통하여 각 균주간 유연관계를 구명하여 앞으로 수집될 느티만가닥버섯 균주들의 지속적인 유연관계를 확립할수 있는 기초기술을 확립함.

라. RAPD 및 유전자 마커의 염기서열을 이용한 분자유전학적인 품종 구분을 방법 확립함.

▶ 본 연구를 통해 선발된 OPS-1, OPS-10, OPL-13 primer의 사용으로 느티만 가닥버섯의 유연관계를 구명할 수 있는 범용 primer체계의 확립.

마. 자외선등 돌연변이 유도제 처리를 통한 돌연변이 균주 생성조건 확립 및 단핵균사의 유전적 특징 검증

▶ 단핵균사의 화학적 돌연변이 생성조건을 확립하여, 육종 품종의 다양성을 확보할 수 있는 기초를 마련함.

바. 배양소요일수가 적거나 고수량성인 품종 개발

▶ 느티만가닥버섯은 배양일수가 85일~120일로써 국내 재배농민들에게는 최고 단점이므로 본 연구과제를 통하여 개발된 배양일수가 70일로 단축된 품종이 개발되어 재배의 회전율을 높일수 있음.

▶ 고수량성 품종의 개발로 인해 재배원가 절감을 꾀할수 있음.

▶ 차기 육종에 사용되는 모균이 확보됨.

사. 품종간 구분을 위한 마커의 탐색 및 확립

▶ 외국에서 품종을 도용하여 사용하던 관행적인 악습에서 벗어나 본 연구 과제를 통해 개발된 품종의 육성권 보호를 위한 분자생물학적인 maker가 개발 됨.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

1. 실용화 계획

가. 현재 국내에서 느티만가닥버섯을 재배하고 있는 농가는 경북 청도 소재의 “그린피스농장”과, 강원도 홍천소재 “참맛드림 영농조합법인”, 충북 음성 소재의 “풀무원 영농조합법인” 3곳임.

나. 3개의 농가에서 사용하고 있는 느티만가닥버섯종균은 2종류로써 갈색품종으로 일본 다카라바이오사의 품종과 흰색품종으로는 조직배양을 통해 사용되고있는 것으로 알려져있음.

다. 이러한 현실에서 본 연구를 통해 개발된 “그린피스H1호”, “그린피스H2호”, “그린피스H3호”를 그린피스 농장과 참맛드림 영농조합법인에 2010년 하반기부터 실증재배를 실시하여 각 농장에서 적합한 품종을 선정하여 실시권을 2011년 하반기부터 유상 판매할 계획임.

2. 산업화 계획

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

국내의 느티만가닥버섯의 제품 생산량은 풀무원영농조합법인에서 흰색느티만가닥버섯을 90톤/년, 그린피스에서 갈색 느티만가닥버섯을 450톤/년, 참맛드림에서 450톤/년 생산하고 있으나, 국내에서는 풀무원에서 홈플러스, 롯데마트에 납품을 통하여 150g/2,300원의 가격으로 판매되어 팡이버섯 150g/300원, 새송이버섯 100g/500원에 비해 상대적으로 높은 가격이 형성되어 판매는 조합세를 이루고 있으나 본 연구를 통해 개발된 3개 신제품(그린피스H1호, 그린피스H2호, 그린피스H3호)이 각 농가에 보급되어 농가 자체로 판매가 이루어질 경우 첫째, 품종에 대한 로열티의 해외유출이 없어질 것이며 둘째, 국내 개발품종의 지속적인 생산기술개발을 통해 생산이 안정화될 경우 판매가격은 소비자 가격 기준으로 150g/1,000원~1,500원으로 낮추어지게 될 경우 느타리버섯의 200g/1,000원과 비교하여 비교우위를 점할 것으로 예측되어 판매가 촉진될 것임.

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

표 28 에서 보는바와 같이 일본의 경우 약 100,000여톤이 생산되고 있으며, 중국의 경우 2008년도에 399,221톤(중국식용균년보 : 2008년)이 생산되고 있어 국내에 비해 많은 생산이 이루어지고 있으며, 일본의 “호쿠도”사의 경우는 일본 전체 생산량의 40%를 생산하여 최대 생산회사이며, 중국은 상해의 Finc사에서 느티만가닥버섯의 생산을 주도하고 있으며, 현재 일본의 유키쿠니사등이 중국시장에 진출하여 느티만가닥버섯의 생산량은 증가하고 있음. 일본의 느티만가닥버섯 생산량의 대부분이 국내에서 소비되고있으나, 중국의 경우는 수출의 비중이 높아 해외에서, 특히 유럽과 동남아시아, 국내산 느티만가닥버섯과 경쟁이 치열함.

<표 28. 일본의 버섯 생산량 비교>

(생산량=M/T)

버섯종류	1991년	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년
느티만가닥버섯	36,623	88,066	99,787	103,249	108,996	108,206

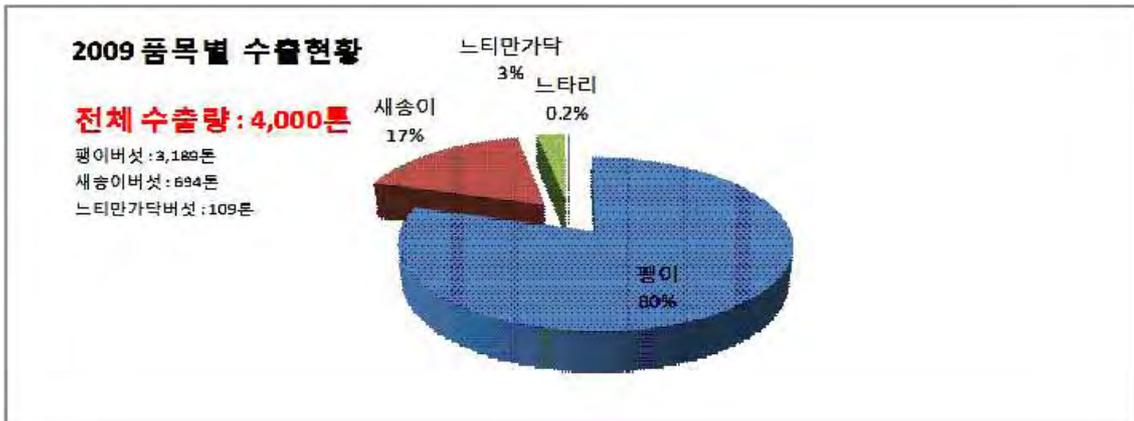
자료출처 : 일본 임야청 자료(2009 년도)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- (가) 본 연구과제를 통해 개발된 3개 품종의 최적 재배조건을 확립하여 생산 최적화를 이루어 현재 2개품종으로 다양성이 확보되지 못한 것을 개선하여 기존품종의 퇴화 또는 소비자 Needs의 변화에 적극적으로 대응이 가능하여 농가의 소득 증대가 기대됨.
- (나) 저장성이 7일인 느타리버섯보다 느티만가닥버섯은 저장기간이 30일로써 우수하여 2008년 기준으로 생산량이 40,071톤인 느타리버섯의 시장을 대체하는데 일조 할것임.
- (다) 2009년도 그린합명회사의 수출실적(그림 39 참조)을 근거로 전체버섯수출량 4,000톤 중에서 팽이버섯 3,189톤(80%), 새송이버섯 694톤(17%), 느티만가닥버섯 109톤(3%), 느타리버섯 7.6톤(0.2%)으로 느티만가닥 버섯은 저장성이 우수하여 생산량이 느타리버섯에 비해 약 30배(느타리버섯 40,071톤 : 느티만가닥버섯 1,000톤)가 적음에도 불구하고 느타리버섯에 비해 68배에 달하는 수출이 이루어져 팽이버섯과 새송이버섯을 대체할 수 있는 차세대 수출용버섯으로 전망이 밝음.

<그림 42. 2009년 품목별 수출현황>



<자료출처 : 그린합명회사 무역부>

다. 국내 판매

- (1) 2010년 까지 느티만가닥버섯의 국내 판매의 형태는 각 농장에서는 주문자생산방식으로 제품을 생산하고 풀무원이 생산된 버섯을 전량 납품받고 납품받은 제품은 대형유통업체로 재납품하는 방식으로 진행되어 왔음.
- (2) 이러한 유통구조가 형성된 원인으로는 재배에 사용되는 느티만가닥버섯 품종에 대한 계약을 풀무원이 일본 다카라사와 체결하여 품종 사용에 대한 로열티를 지급하였으므로 가능하였음.
- (3) 그러나 본 연구과제를 통해 개발된 3가지 품종의 재배가 실시될 경우 국내의 대형유통업체서의 판매와 병행하여 현행의 150g 트레이 포장에서 탈피하고, 포장방식을 다양화 하여 국내 경매시장에서의 경매를 통하여 아직까지 일반소비자에게는 잘 알려지지 않은 느티만가닥버섯의 대중화를 통해 시장을 점진적으로 확대하고, 현재 과잉생산으로 가격이 하락하고 있는 느타리버섯 시장을 대체하고 새로운 버섯에 대한 소비자의 Needs를 충족하여, 2015년 까지 현재의 년 생산량 1,000톤 규모를 10,000톤까지 증가 시킬 것임.

라. 해외 판매

- (1) 그림 39에서와 같이 느타리버섯은 연간 생산량 4만여톤에 비해 수출량은 10여톤으로 모두 국내에서만 소비가 되고있음을 반증함. 그 요인으로는 첫째 느타리버섯의 저장기간이 7일로써 장기운송을 요하는 수출품목으로는 적합하지 않으며, 둘째 수출대상국에서 가장 흔하게 재배되고 있는 버섯이라는 것이 주요 원인임.

(2) 느티만가닥의 경우는 저장기간이 30일로써 수출을 위해 요구되는 장기 보관에 적합하며, 느티만가닥버섯의 최대 생산국인 일본과 비교하여 생산비에서 우위를 점할 수 있어 수출 경쟁력이 있으며, 중국의 경우는 일본으로부터 품종 및 생산기술을 공급받는 대신 로열티를 지불하고 있어 본 연구과제로부터 개발된 국내고유품종을 사용한 재배와 지속적인 재배기술이 향상될것으로 예측되어 수출 대상국에서의 중국과의 경쟁에서도 우위를 점할것임.

2절. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

1. 홍보계획

품종출원된 3가지의 품종에 대해 국내 최고의 버섯 전문 잡지인 “월간버섯” 7월 호에 기사를 게재하고, 버섯수출연구사업단 홈페이지(www.mushroomkorea.com)에 개발된 내용 3품종을 공지하여 품종에 대한 대 농민 홍보를 진행할 것임.

2. 교육, 지도 계획

시기	대상	장소	내용
2010년 10월	그린피스 참맛드림	그린피스 (경북 청도)	3개 품종에 대한 특징 설명 - 접종원 분양
2010년 12월	그린피스 참맛드림	그린피스 (경북 청도)	- 배양상태 확인 및 지도
2011년 2월	그린피스 참맛드림	그린피스 (경북 청도)	- 재배상태 확인 및 지도
수시	그린피스 참맛드림	그린피스 (경북 청도)	재배에 관련된 문의 요청시 지도
품종보호출원 등록 시점	경기도버섯연구회	미정	3개 품종에 대한 특징 설명

3절. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

1. 특허출원

가. 느티만가닥 품종군분을 위한 DNA 마커: 2010. 7월 출원.....

2. 품종보호출원

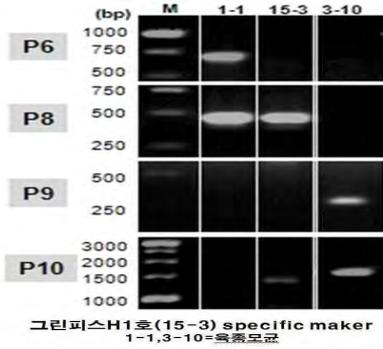
가. 그린피스H1호 품종보호출원 자료

접수인란		방식심사란		담 당	심사관		
품종보호출원서							
출원인	성명 (대표자)	박희주 외 1명		주민등록번호 (외국인은 국적)			
	주소	714-853 경북 청도군 이서면 서원리331-4번지 그린합명회사		지 분	80		
	법인명칭	그린합명회사		전화번호	054-373-8252		
대리인	성명 (대표자)			주민등록번호			
	주소						
	법인명칭			전화번호			
육성자	성명 (대표자)	박희주 외 1명		주민등록번호 (외국인은 국적)			
	주소	경북 청도군 이서면 서원리 331-4 그린합명회사		전화번호	054-373-8252		
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명	만가닥버섯 Hypsizigus marmoreus		품종의 명칭	그린피스에이치1호 (GREENPEACE H1ho)			
종자산업법 제27조제8항의 규정에 의한 우선권 주장	출원국명	출원일자	출원번호	증명서류			
				첨부	미첨부		
품종의 특성 설명	별첨						
품종육성과정의 설명	별첨						
<p>종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.</p> <p>2010년 6월 9일</p> <p>출원인(대리인) 그린합명회사 인)</p> <p>출원인(대리인) 이창윤 인)</p>							
국립종자원장 귀하							
구비서류				<table border="1"> <tr> <td>수수료</td> </tr> <tr> <td>38,000원</td> </tr> </table>		수수료	38,000원
수수료							
38,000원							
<ol style="list-style-type: none"> 1. 품종보호출원서 부분 1부 2. 출원품종의 사진 및 종자시료 3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부 4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다) 5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다) 6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다) 							

6. 품종 특성기술서

1. 작물명 (학명) : 만가닥버섯(<i>Hypsizigus marmoreus</i>)			
2. 출원품종명 : 그린피스H1호			
3. 출원품종의 주요 형태적 특성			
1) 갓의 모양은 반구형임.			
2) 갓의 너비는 2.2cm로 중간 크기임.			
3) 갓색은 중심부는 거북등모양의 느티만가닥버섯 특유의 무늬가 있으며 색깔은 진한 갈색임.			
4) 갓의 주변부는 갈색임.			
5) 갓의 두께는 중간정도임.			
6) 갓 주름살의 대부분 형태는 붙은 형태임.			
7) 갓 주름살의 측면의 모양은 평활형임.			
8) 갓 주름살의 밀도는 높음.			
9) 대의 밑부분의 형태는 끝이 가는 원통형임.			
10) 대의 길이는 7.7cm로써 길며, 굵기는 0.6cm로써 중간 굵기이고 대의 비율은 0.6(대굵기) : 7.7(대길이)로써 대조품종의 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)에 비해 가늘고 긴형임.			
4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성			
1) 대조품종과 대선행성으로 구별됨.			
2) 갓색의 주위부의 색깔이 대조품종의 회갈색에 비해 갈색으로 구별됨.			
3) 대 밑부분의 형태는 끝이 가는 원통형으로 대조품종의 끝이 굵은 원통형과 구별됨.			
4) 대길이는 7.7cm로써 대조품종의 5.8cm에 비해 1.9cm가 더 길어 구별됨.			
5) 대굵기는 0.6cm로써 대조품종의 0.9cm에 비해 0.3cm가 가늘어서 구별됨.			
6) 대의 비율은 0.6(대굵기) : 7.7(대길이)로써 대조품종의 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)에 비해 가늘고 긴형으로 구별됨.			
7) 수확일수가 대조품종 28일에 비해 24일로써 4일 단축되어 구별됨.			
8) DNA 밴드 패턴 분석			
- 사용한 마커수는 4종류이며 마커명은 P6, P8, P9, P10.			
- 마커의 염기서열			
Primer set	Size(bp)	Forward	Reverse
P6	755	GTCATAGTGCCCGCT	GATCCATCTCGTGGT
P8	454	GCTGTTGATGGCTGA	TTCCCCCTCCAATCA
P9	255	CACCACCTACGCGGA	GGTTTGAGGAGTGTC
P10	1666	CCAAGTGTCTTTTCC	GCTTTGTGCCATAGA

- PCR 결과(그린피스H1호;15-3 specific maker)



5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

1) 30개체를 3회반복 실험한 결과 출원품종의 이형주 발생을 없음

항 목	품종명	Hm15-3	대조품종
발이		고름	고르지 않음
수확일수		24일	28일

6. 출원품종을 구별하는데 도움이 되는 추가 정보

6.1 내병충성: 없음

6.2 품종시험을 위한 특별한 조건

- 1) 발 이 (균기후 13일) : 빛 50~100lux, 온도 15℃, 습도 95%이상
- 2) 생육중기(균기후 11일~수확까지) : 빛 1000~1500lux 온도 15℃, 습도 95%이상

6.3 기타 정보

갯색깔이 대조품종보다 진함.

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(LMO)입니까?

예(), 아니오(○)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(LMO)인 경우 ‘유전자변형생물체의 국가간이동등에 관한 법률(제정 2001.3.28. 법률 제6448호, 산업자원부)’에 따라 분야별 농림수산식품부 장관이 고시한 “유전자변형농산물의 환경위해성평가 심사지침(농림수산식품부고시 제2002-2호)”에 따라 환경위해성평가를 하였습니까?

예(), 아니오()

7.3 관련규정에 의해 실험을 실시한 경우, 환경위해성평가 심사결과를 첨부하였습니까?

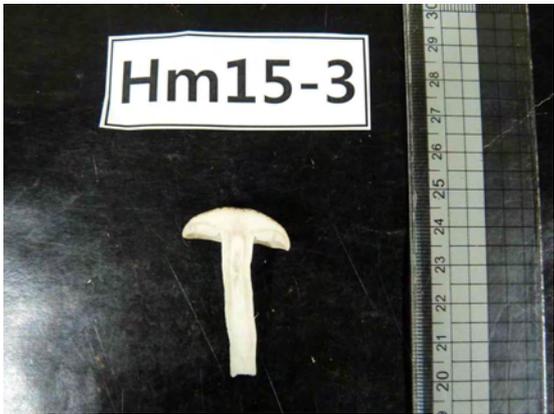
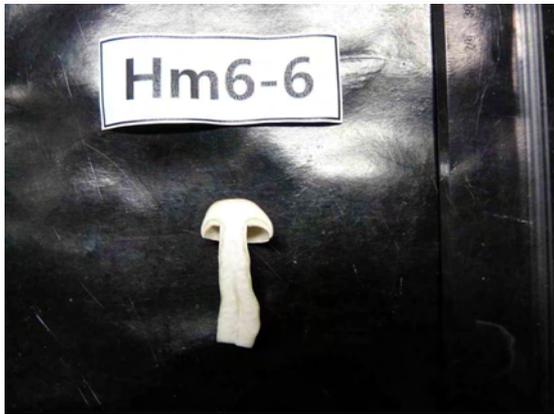
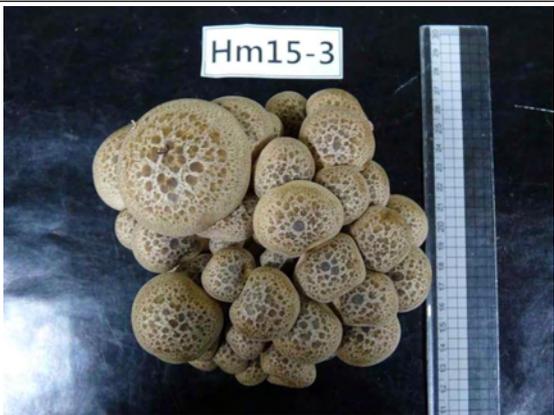
예(), 아니오()

※ 질문 7.3에서 ‘아니오’에 해당되는 경우, 환경위해성평가 심사결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입판매신고필증의 교부(품종생산·수입판매 신고품종의 경우)

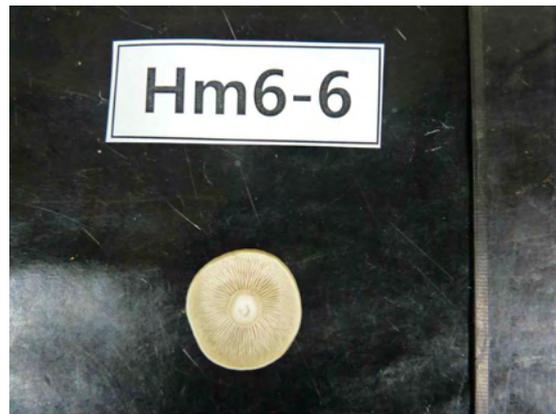
8. 품종특성사진

1. 대선형성사진	
	
대선형성 사진(앞)	대선형성 사진(뒤)
2. 갓을 세로로 자른모양	
	
출원품종	대조품종
4. 갓:색(중심부), 5. 갓:색(주위부)	
	
출원품종	대조품종

7. 대부착 형태, 9. 주름살:폭, 10. 주름살:밀도, 11. 주름살:색

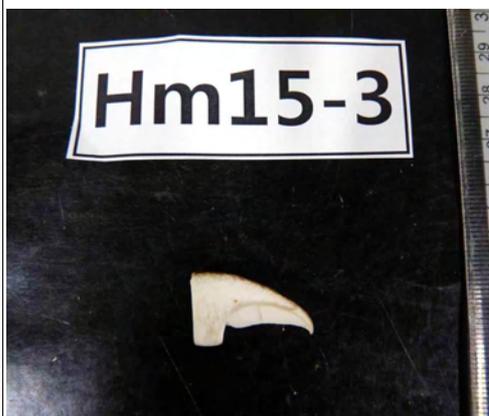


출원품종



대조품종

8. 주름살 측면의 모양



출원품종



대조품종

12. 자실체 밀부분 형태, 16. 대 : 색



출원품종



대조품종

17. 자실체 발생 형태



출원품종



대조품종

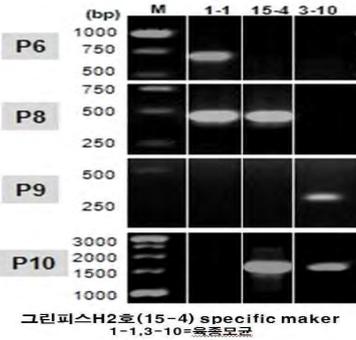
나. 그린피스H2호 품종보호출원 자료

접수인란		방식심사란		답 당	심사관		
품 종 보 호 출 원 서							
출 원 인	성 명 (대표자)	박희주 외 1 명		주민등록번호 (외국인은 국적)			
	주 소	714-853 경북 청도군 이서면 서원리331-4번지 그린합명회사		지 분	80		
	법인명칭	그린합명회사		전화번호	054-373-8252		
대 리 인	성 명 (대표자)			주민등록번호			
	주 소						
	법인명칭			전화번호			
육 성 자	성 명 (대표자)	박희주 외 1 명		주민등록번호 (외국인은 국적)			
	주 소	경북 청도군 이서면 서원리 331-4 그린합명회사		전화번호	054-373-8252		
품 종이 속하는 작물의 학명 및 일반명		만가닥버섯 Hypsizigus marmoreus		품종의 명칭	그린피스에이치2호 (GREENPEACE H2ho)		
종자산업법 제27조제2항의 규정에 의한 우선권 주장		출원 국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부		
품 종 의 특 성 설명		별첨					
품종육성과정의 설명		별첨					
<p>종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.</p> <p>2010년 6월 10일</p> <p style="text-align: right;">출원인(대리인) 그린합명회사  인)</p> <p style="text-align: right;">출원인(대리인) 이창문  인)</p> <p>국립종자원장 귀하</p>							
구비서류					<table border="1"> <tr> <td>수 수 료</td> </tr> <tr> <td>38,000원</td> </tr> </table>	수 수 료	38,000원
수 수 료							
38,000원							
<ol style="list-style-type: none"> 1. 품종보호출원서 부분 1부 2. 출원품종의 사진 및 종자시료 3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부 4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다) 5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다) 6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다) 							

6. 품종 특성기술서

1. 작물명 (학명) : 만가닥버섯(<i>Hypsizigus marmoreus</i>)			
2. 출원품종명 : 그린피스H2호			
3. 출원품종의 주요 형태적 특성			
1) 갓의 모양은 반구형으로 끝이 말려있음.			
2) 갓의 너비는 1.9cm로 중간 크기임.			
3) 갓색은 중심부는 거북등모양의 느티만가닥버섯 특유의 무늬가 있으며 색깔은 갈색임.			
4) 갓의 주변부는 갈색임.			
5) 갓의 두께는 중간정도임.			
6) 갓 주름살의 대 부착 형태는 붙은 형태임.			
7) 갓 주름살의 측면의 모양은 평활형임.			
8) 갓 주름살의 밀도는 높음.			
9) 대의 밑부분의 형태는 끝이 가는 원통형임.			
10) 대의 길이는 7.3cm로써 길며, 굵기는 0.7cm로써 중간 굵기이고 대의 비율은 0.7(대굵기) : 7.3(대길이)에 비해 대조품종은 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)로써 출원품종은 가늘고 긴형임.			
4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성			
1) 대조품종과 대선행성으로 구별됨.			
2) 갓 색의 주위부의 색깔이 대조품종의 회갈색에 비해 갈색으로 구별됨.			
3) 대 밑 부분의 형태는 끝이 가는 원통형으로 대조품종의 끝이 굵은 원통형과 구별됨.			
4) 대길이는 7.3cm로써 대조품종의 5.8cm에 비해 1.5cm가 더 길어 구별됨.			
5) 대굵기는 0.7cm로써 대조품종의 0.9cm에 비해 0.2cm가 가늘어서 구별됨.			
6) 대의 비율은 0.7(대굵기) : 7.3(대길이)에 비해 대조품종은 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)로써 출원품종은 가늘고 긴형으로 구별됨.			
7) 재배일수가 21일로써 대조품종의 28일에 비해 7일 단축되어 구별됨.			
8) DNA 밴드 패턴 분석			
- 사용한 마커수는 4종류이며 마커명은 P6, P8, P9, P10.			
- 마커의 염기서열			
Primer set	Size(bp)	Forward	Reverse
P6	755	GTCATAGTGCCCGCT	GATCCATCTCGTGGT
P8	454	GCTGTTGATGGCTGA	TTCCCCCTCCAATCA
P9	255	CACCACCTACGCGGA	GGTTTGAGGAGTGTC
P10	1666	CCAAGTGTCTTTTCC	GCTTTGTGCCATAGA

- PCR 결과(그린피스H2호;15-4 specific maker)



5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

1) 30개체를 3회반복 실험한 결과 출원품종의 이형주 발생을 없음

항 목	품종명	그린피스H2호	대조품종
발이		고름	고르지 않음
재배일수		21일	28일

6. 출원품종을 구별하는데 도움이 되는 추가 정보

6.1 내병충성: 없음

6.2 품종시험을 위한 특별한 조건

1) 발 이 (굽기후 13일) : 빛 50~100lux, 온도 15℃, 습도 95%이상

2) 생육중기(굽기후 11일~수확까지) : 빛 1000~1500lux 온도 15℃, 습도 95%이상

6.3 기타 정보

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(LMO)입니까?

예(), 아니오(○)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(LMO)인 경우 ‘유전자변형생물체의 국가간이동등에 관한 법률(제정 2001.3.28. 법률 제6448호, 산업자원부)’에 따라 분야별 농림수산식품부 장관이 고시한 “유전자변형농산물의 환경위해성평가 심사지침(농림수산식품부고시 제2002-2호)”에 따라 환경위해성평가를 하였습니까?

예(), 아니오()

7.3 관련규정에 의해 실험을 실시한 경우, 환경위해성평가 심사결과를 첨부하였습니까?

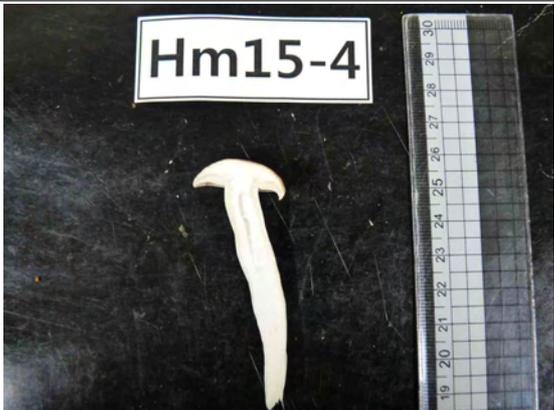
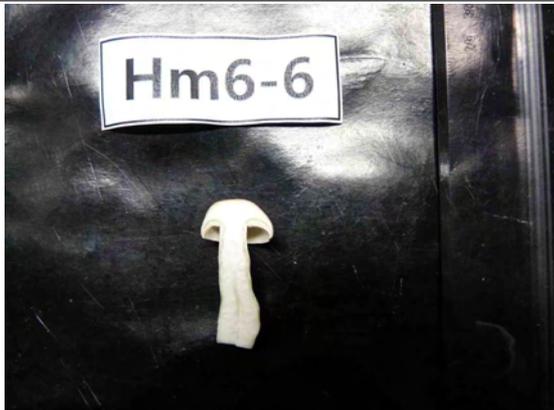
예(), 아니오()

※ 질문 7.3에서 ‘아니오’에 해당되는 경우, 환경위해성평가 심사결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입판매신고필증의 교부(품종생산·수입판매 신고품종의 경우)

8. 품종특성사진

1. 대선형성사진	
	
대선형성 사진(앞)	대선형성 사진(뒤)
2. 갓을 세로로 자른모양	
	
출원품종	대조품종
4. 갓:색(중심부), 5. 갓:색(주위부)	
	
출원품종	대조품종

7. 대부분착 형태, 9. 주름살:폭, 10. 주름살:밀도, 11. 주름살:색



Hm15-4

출원품종



Hm6-6

대조품종

8. 주름살 측면의 모양



Hm15-4

출원품종



Hm6-6

대조품종

12. 자실체 밑부분 형태, 16. 대 : 색



Hm15-4

출원품종



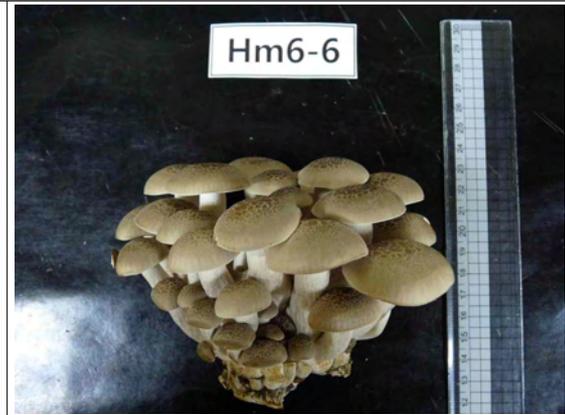
Hm6-6

대조품종

17. 자실체 발생 형태



출원품종



대조품종

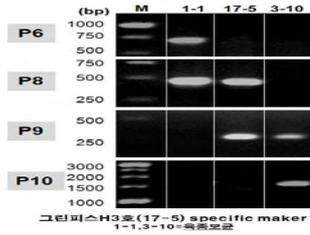
다. 그린피스H3호 품종보호출원 자료

접수인란		방식심사란		담 당	심사관
품 종 보 호 출 원 서					
출 원 인	성 명 (대표자)	박희주 외 1 명		주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주 소	714-853 경북 청도군 이서면 서원리331-4번지 그린합명회사		지 분	80
	법인명칭	그린합명회사		전화번호	054-373-8252
대 리 인	성 명 (대표자)			주민등록번호	
	주 소				
	법인명칭			전화번호	
육 성 자	성 명 (대표자)	박희주 외 1 명		주민등록번호 (외국인은 국적)	
	주 소	경북 청도군 이서면 서원리 331-4 그린합명회 사		전화번호	054-373-8252
품종이 속하는 작물의 학명 및 일반명		만가닥버섯 Hypsizigus marmoratus		품종의 명칭	그린피스에이치3호 (GREENPEACE H3ho)
종자산업법 제27조제2항의 규정에 의한 우선권 주장		출원국명	출원일자	출원번호	증명서류 첨부 미첨부
품 종 의 특 성 설명		별첨			
품종육성과정의 설명		별첨			
<p>종자산업법 제 26조 제1항 및 동법시행규칙 제28조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.</p> <p>2010년 6월 10일</p> <p>출원인(대리인) 그린합명회사  인)</p> <p>출원인(대리인) 이창윤  인)</p> <p>국립종자원장 귀하</p>					
구비서류				수 수 료	
1. 품종보호출원서 부분 1부				38,000원	
2. 출원품종의 사진 및 종자시료					
3. 품종보호출원 수수료 납부증명서 1부					
4. 우선권주장 수수료 납부증명서 1부 (우선권을 주장하는 경우에 한한다)					
5. 권리에 관한 지분을 증명하는 서류 1부 (지분이 약정되어 있는 경우에 한한다)					
6. 대리권을 증명하는 서류 1부 (대리인의 경우에 한한다)					

6. 품종 특성기술서

1. 작물명 (학명) : 만가닥버섯(<i>Hypsizigus marmoreus</i>)			
2. 출원품종명 : 그린피스H3호			
3. 출원품종의 주요 형태적 특성			
1) 갓의 모양은 반구형으로 끝이 말려있음. 2) 갓의 너비는 1.6cm로 좁음.			
3) 갓색은 중심부는 거북등모양의 느티만가닥버섯 특유의 무늬가 있으며 색깔은 진한 갈색임.			
4) 갓의 주변부는 갈색임.			
5) 갓의 두께는 두꺼움.			
6) 갓 주름살의 대부분 형태는 붙은 형태임.			
7) 갓 주름살의 측면의 모양은 평활형임.			
8) 갓 주름살의 밀도는 높음.			
9) 대의 밑부분의 형태는 끝이 가는 원통형임.			
10) 대의 길이는 7.2cm로써 길며, 굵기는 0.6cm로써 중간 굵기이고 대의 비율은 0.6(대굵기) : 7.2(대길이)로써 출원품종의 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)에 비해 가늘고 긴형임.			
4. 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성			
1) 대조품종과 대선행성으로 구별됨.			
2) 갓 너비가 1.6cm로써 대조품종의 2.2cm에 비해 0.6cm적어 구별됨.			
3) 갓 색의 주위부의 색깔이 갈색으로 대조품종이 회갈색이어서 구별됨.			
4) 갓 두께가 두꺼워 대조품종의 중간두께와 구별됨.			
5) 주름살의 색이 연한황색으로 대조품종의 미색과 구별됨.			
6) 대 밑부분의 형태는 끝이 가는 원통형으로 대조품종의 끝이 굵은 원통형과 구별됨.			
7) 대길이는 7.2cm로써 대조품종의 5.8cm에 비해 1.4cm가 더 길어 구별됨.			
8) 대굵기는 0.6cm로써 대조품종의 0.9cm에 비해 0.3cm가 가늘어서 구별됨.			
9) 대의 비율은 0.6(대굵기) : 7.2(대길이)로써 출원품종의 0.9(대굵기) : 5.8(대길이)에 비해 가늘고 긴형으로 구별됨.			
10) 수확일수가 대조품종 28일에 비해 20일로써 8일 단축됨.			
11) DNA 밴드 패턴 분석			
- 사용한 마커수는 4종류이며 마커명은 P6, P8, P9, P10.			
- 마커의 염기서열			
Primer set	Size(bp)	Forward	Reverse
P6	755	GTCATAGTGCCCGCT	GATCCATCTCGTGGT
P8	454	GCTGTTGATGGCTGA	TTCCCCCTCCAATCA
P9	255	CACCACCTACGCGGA	GGTTTGAGGAGTGTC
P10	1666	CCAAGTGTCTTTTCC	GCTTTGTGCCATAGA

- PCR 결과(그린피스H3호;17-5 specific maker)



5. 출원품종의 균일성과 안정성을 기술(대조품종 포함)

1) 30개체를 3회반복 실험한 결과 출원품종의 이형주 발생을 없음

항 목	품종명	그린피스H3호	대조품종
	밭이	고름	고르지 않음
	재배일수	20일	28일

6. 출원품종을 구별하는데 도움이 되는 추가 정보

6.1 내병충성: 없음

6.2 품종시험을 위한 특별한 조건

1)밭 이 (굽기후 13일) : 빛 50~100lux, 온도 15℃, 습도 95%이상

2)생육중기(굽기후 11일~수확까지) : 빛 1000~1500lux 온도 15℃, 습도 95%이상

6.3 기타 정보

갯색갈이 대조품종보다 진함.

7. 품종육성에 관한 정보

7.1 위 품종은 유전적 변형기술을 이용하여 육성된 품종(LMO)입니까?

예(), 아니오(○)

7.2 유전적 변형기술에 의한 품종(LMO)인 경우 ‘유전자변형생물체의 국가간이동등에 관한 법률(제정 2001.3.28. 법률 제6448호, 산업자원부)’에 따라 분야별 농림수산식품부 장관이 고시한 “유전자변형농산물의 환경위해성평가 심사지침(농림수산식품부고시 제2002-2호)”에 따라 환경위해성평가를 하였습니까?

예(), 아니오()

7.3 관련규정에 의해 실험을 실시한 경우, 환경위해성평가 심사결과를 첨부하였습니까?

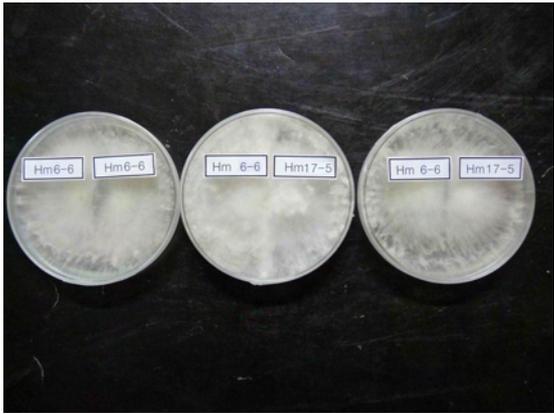
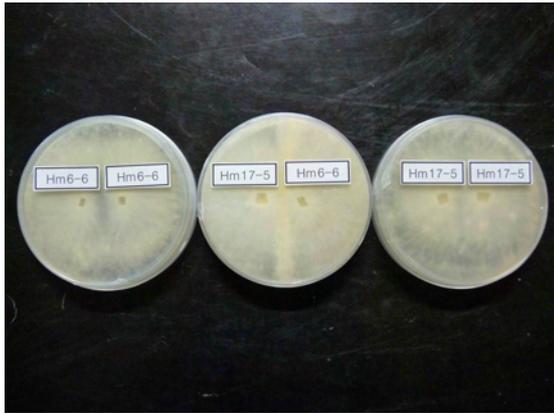
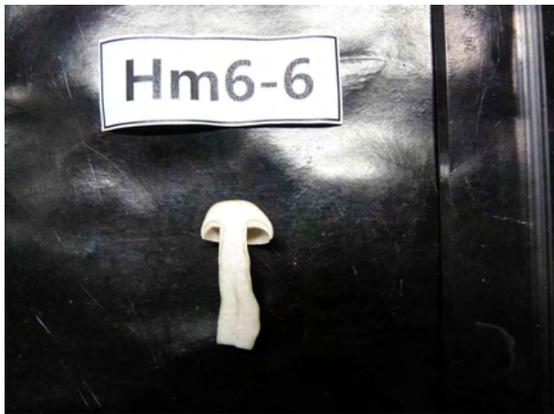
예(), 아니오()

※ 질문 7.3에서 ‘아니오’에 해당되는 경우, 환경위해성평가 심사결과가 제출되기 전에는 다음의 절차가 진행되지 않습니다.

가. 품종의 심사(품종보호출원품종의 경우)

나. 품종생산·수입판매신고필증의 교부(품종생산·수입판매 신고품종의 경우)

8. 품종특성사진

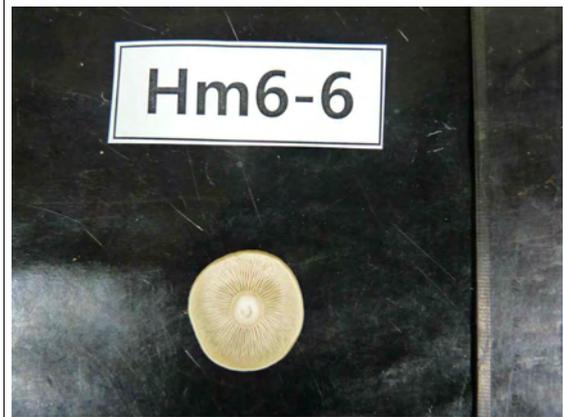
1. 대선형성사진	
	
대선형성 사진(앞)	대선형성 사진(뒤)
2. 갓을 세로로 자른모양	
	
출원품종	대조품종
4. 갓:색(중심부), 5. 갓:색(주위부)	
	
출원품종	대조품종

7. 대부착 형태, 9. 주름살:폭, 10. 주름살:밀도, 11. 주름살:색



Hm17-5

출원품종



Hm6-6

대조품종

8. 주름살 측면의 모양



Hm17-5

출원품종



Hm6-6

대조품종

12. 자실체 밑부분 형태, 16. 대 : 색



Hm17-5

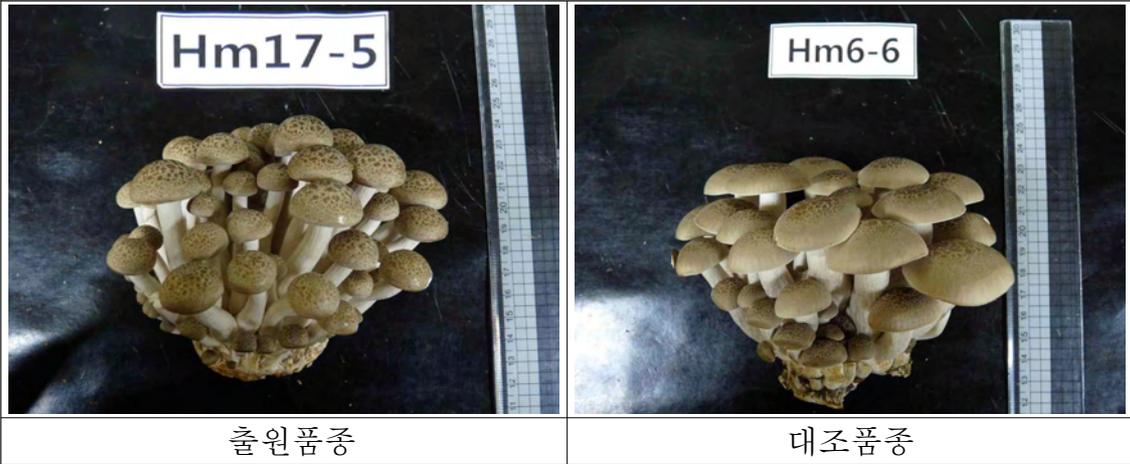
출원품종



Hm6-6

대조품종

17. 자실체 발생 형태



3. 논문발표

- 가. Quy Vang Le, Hyo-Kyung Won, Tae-Soo Lee, Chang-Yun Lee, Hyun-Sook Lee and Hyeon-Su Ro (2008) Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism Strain Fingerprinting Markers Applicable to Various Mushroom Species. Mycobiology 36, 161-166
- 나. Chang-Yun Lee, Jeong-Eun Park, Bo-Bae Kim, Sun-Mi Kim and Hyeon-Su Ro (2009) Determination of Mineral Components in the cultivation Substrates of Edible Mushrooms and Their Uptake into Fruiting Bodies. Mycobiology 37, 109-113
- 다. 임윤정, 이창윤, 박정은, 김상우, 이현숙, 노현수.(2010) 느티만가닥버섯의 분자유전학적 분류 및 품종특이적 DNA 마커 탐색. 한국균학회지 38.

4절. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 추가연구

- 가. 교배 육종에 의해 개발된 느티만가닥버섯 3품종의
 - (1) 모균주와의 기내배양학적 특성 규명(생리적 특성을 중심으로)
 - (가) 원균증식에 따른 기내배양의 물리적 조건의 확립 : 배양온도, pH
 - (나) Complex media(PDA, MCM, YM media)에 따른 원균 용 배지 탐색
 - (다) 단당류, 이당류, 다당류의 첨가에 따른 분석
 - (라) 유기질소원(Yeast extract, Peptone, Soytone) 첨가에 따른 영향 분석
 - (마) 무기질소원 첨가에 따른 영향 분석
- 나. 재배용배지의 조성때 따른 각 품종별 특성 규명
 - (가) 주재료로 사용되는 콘코브, 톱밥, 대두피의 첨가량에 따른 영향 분석
 - (나) 부재료로 사용되는 비트펄프, 미강, 밀기울, 건비지 첨가량에 따른 영향 분석
 - (다) 미량 첨가제로 사용되는 패화석, V1의 영향 분석
- 다. 재배환경인자에 따른 각 품종별 특성 규명
 - (가) 재배온도, 습도, 풍속, Co2의 변화에 따른 영향 분석

- 라. 재배중에 발생하는 오염원에 따른 각 품종별 저항성 규명
(가) 재배중에 노출되는 곰팡이와 세균류에 따른 영향 분석

2. 타연구에 활용 계획

- 가. 수집된 29종의 균주를 다른 느티만가닥버섯의 육종모본으로 사용.
- 나. 개발된 품종을 기능성 분석연구에 사용.
- 다. 개발된 분자생물학적인 마커를 이용한 새로개발될 느티만가닥버섯의 품조구 분 자료로 이용하고 팡이, 새송이버섯등의 품종구분에 응용.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항없음

제 7 장 참고문헌

- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009a. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiol.* 37:183-188.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009b. Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiol.* 37:258-266.
- Chang, J. S., Son, J. K., Gao, L. and Oh, E. J. 2004. Inhibition of cell cycle progression on HepG2 cells by hypsiziprenol A9, isolated from *Hypsizigus marmoreus*. *Cancer Lett.* 212:7-14.
- Chen, Y. C., Eisner, J. D., Kattar, M. M., Rassouljian-Barrett, S. L., Lafe, K., Bui, U., Limaye, A. P. and Cookson, B. T. 2001. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 39:4042-4051.
- Grimberg, J., Maguire, S. and Belluscio, L. 1989. A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:8893-8893.
- Gonzalez, P. and Labarere, J. 2000. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6, and V9 domains. *Microbiol.* 146:209-221.
- Ikekawa, T., Saitoh, H., Feng, W., Zhang, H., Li, L. and Matsuzawa, T. 1992. Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. I. Antitumoractivity of extracts and polysaccharides. *Chem. Pharm. Bull.* 40:1954-1957.
- Kim, H. S., Ha, H. C. and Kim, T. S. 2003. Research and prospects in new functional mushroom - *Tremella fuciformis*, *Grifora frondosa* and *Hypsizigus marmoreus*. *Kor. J. Food Sci. Ind.* 36:42-46.
- Lam, S. K. and Ng, T. B. 2001. Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 285:1071-1075.

- Lopandic, K., Molnar, O. and Prillinger, H. 2005. Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterising the yeast genus *Fellomyces*. *Microbiol. Res.* 160:13-26.
- Matsuzawa, T., Sano, M., Tomita, I., Saitoh, H., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. 1998. Studies on antioxidants of *Hypsizigus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizigus marmoreus* for antioxidants activities of tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi* 118:476-481.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12:357-358.
- Park, H. G., Ko, H. G., Kim, S. H. and Park, W. O. 2004. Molecular identification of asian isolates of medicinal mushroom *Hericium erinaceum* by phylogenetic analysis of nuclear ITS rDNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:816-821.
- Pavlicek, A., Hrda, S. and Flegr, J. 1999. FreeTree-freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45:97-99.
- Ro, H. S., Kim, S. S., Yu, J. S., Jeon, C. O., Lee, T. S., Yoo, J., Lee, C. W., Kim, J. W. and Lee, H. S. 2007. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting and physiological characteristics. *Mycol. Res.* 111:710-715.
- Rohlf, F. J. 1989. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.50. Exeter Publication, New York, USA.
- Tsuchida, K., Aoyagi, Y., Odani, S., Mita, T. and Isemura, M. 1995. Isolation of a novel collagen-binding protein from the mushroom, *Hypsizigus marmoreus*, which inhibits the Lewis lung carcinoma cell adhesion to type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 270:1481-1484.
- Tuchwell, D. S., Nicholson, M. J., McSweeney, C. S., Theodorou, M. K. and Brookman, J. L. 2005. The rapid assignment of ruminal fungi to presumptive genera using ITS1 and ITS2 RNA secondary structures to produce group-specific fingerprints. *Microbiol.* 151:1557-1567.

- Wang, L., Hu, X., Feng, Z. and Pan, Y. 2009. Development of AFLP markers and phylogenetic analysis in *Hypsizygus marmoreus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 55:9-17.
- Zervakis, G. I., Venturella, G. and Papadopoulou, K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiol.* 147:3183-3194.
- Zhang, J., Huang, C. Y., Ng, T. B. and Wang, H. X. 2006. Genetic polymorphism of ferulae mushroom growing on *Ferula sinkiangensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:304-309.

주 의

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

