

635.8
L293L

최 중
연구보고서

GOVP 12001302

느타리버섯 무농약 신재배기술

Development of cultivation techniques
of oyster mushroom without chemicals

연구기관

옥천군농업기술센터

농 립 부



최 종 보 고 서

1998년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 느타리버섯 무농약 신재배 기술에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999 . 10 . 30.

주관연구기관 : 옥천군농업기술센터

총괄연구책임자 : 서 성 범 (인)

주관연구기관장 : 서 성 범

농림부장관 귀하

직인

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “느타리버섯 무농약 신재배 기술에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10 . 30 .

주관연구기관명 : 육천군농업기술센터

총괄연구책임자 : 서 성 범

연 구 원 : 정 병 호

연 구 원 : 이 판 옥

연 구 원 : 조 수 목

연 구 원 : 김 성 수

협동연구기관명 : 충북버섯종균연구소

협동연구책임자 : 주 문 수

요 약 문

I. 제 목

느타리버섯 무농약 신재배기술

II. 연구개발의 목적 및 중요성

느타리버섯 재배는 고도의 재배기술, 숙련된 인력 등이 필요한 농업이고 가장 중요한 요인으로 우량 품종 및 우량 종균공급에 있다. 우리나라에서 사용되는 느타리 품종은 원형 느타리버섯을 비롯한 10여 품종으로 종균의 질은 비교적 균일하나 배양소에서 사용하는 톱밥등 배지의 질이 다르고 배양온도와 기간 또는 보존기간 및 운반방법에 따라 다수의 종균이 불량해질 수 있다. 그러나 공급되는 원균의 질이 좋지 않을 경우는 모든 농가에 불량 종균이 공급될 위험성이 따를 것이다. 실제로 현지 농가에서 재배되는 느타리버섯에서 재배 환경 관리의 부족으로 인한 세균성 갈반병등 병해의 발생이 심각하고 균사활착 배양에 실패로 인한 어려움이 많다. 따라서 무병 및 내병성, 고품질 다수성 품질등의 특성을 지닌 우량 품종을 선발, 생산 공급하여야 하며 버섯 생육에 있어서 병발생 후 치료하는 것 보다는 병이 발생하지 않도록 미리 예방하는 방제법으로서 무농약 무병재배 기술이 개발 보급지도되어야 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 느타리버섯 무농약 신재배기술을 농가에 개발 보급하고자 우선적으로 고품질 다수성 신품종 선발을 실시하였다. 국내·외에서 재배되는 느타리버섯 15 품종을 수집

하여 그들의 인공 배양적 특성의 구명과 우량 종균 배양을 위한 단계별 생육 특성을 비교 검토하였다. 또한, 병재배 특성을 조사하여 15 품종중 품질 및 수량이 우수한 균주 HK-35를 선발하였다. 선발된 우수 균주는 배양 및 재배적 특성을 기존에 재배되는 품종 가운데 비교적 우수한 품종과 재 비교 검토한 다음 현지 농가에 적응 시험을 위하여 볏짚 및 폐면을 이용한 균상 재배를 실시하여 수량 및 품질에 대하여 조사함으로써 우리나라 환경에 적합하며 고품질 다수성의 na종으로 개발 가능성을 시사하였다. 균상 재배 과정중 1주기 재배 후 발생된 세균성 병해에 대한 저항성 정도를 간헐적으로 조사한 결과 세균성 갈반병에 대한 저항성이 있음이 관찰되었다. 선발 균주의 유전적 특성 검정 및 양질의 특성을 지닌 품종으로의 개량을 위하여 세포질 융합을 통하여 유전자 재조합 균주를 선발하여 그들의 형태적 특성 및 유전적 다양성이 검토되었다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구 결과는 주로 재배농민들이 활용한다. 신품종 종균을 구입하게되고 신재배기술을 습득하여 농가소득을 올리게 되면 타농민들도 버섯재배로 많은 전업을 하게 된다. 현재에도 외국산 농산물 수입으로 인한 아무런 영향을 받지않는 느타리버섯 재배를 선호하고 있으며 전업하는 농가가 늘고 있다. 다음으로는 종균생산 회사에서도 신품종 개발기술을 습득하게 될 것이다. 유용미생물 개발 및 생산기술결과는 새로운 기업화가 되기에 충분하므로 추가 연구대상이 될 수 있다.

SUMMARY

(영문요약문)

Today, cultivated strains with simple characteristics have been shown the various problems, such as environmental adaptability and serious damage by pests and pathogens etc.. New program is absolutely required for selection of farmers on cultivating strains; for example, enlarged development of new numerous varieties etc.. New breeding varieties could be adapted to environmental changes in course of cultivation and characters of cultivated region for safety-production in great quantities.

Pleurotus ostreatus is a wide cultivar among cultivated edible mushrooms in Korea. But, most of mushroom farmer is greatly lossed by various diseases, for example bacterial disease caused by *Pseudomonas tolaasii*. It necessitates the efficient method of oyster cultivation, that is, development of tolerant strain and cultivation method without chemicals.

Mushrooms with high quality was prior marketability, price and export. Therefore, the mushroom farmer must be consider the quality. On this purpose, it is important the breeding of new varieties with high qualities. For the developing of new varieties with high qualities and high yields, we selected the HK-35 strain as a superior strain among the *Pleurotus ostreatus* 15 strains to investigate the characteristics of morphology and product by bottle and bed cultivations. The selected HK-35 strain was a suitable variety with high quality in Korea. And also, this strain was investigated with a genetic diversity to be different cultivating other strains in Korea. In a point a view, we think that this strain offered mushroom farmer and spawn producer as a new source to do safety production and management.

CONTENTS

(영문목차)

Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Selection of superior strain of <i>Pleurotus ostreatus</i>	12
I Introduction	12
II Material and methods	13
1. Collection of <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
2. Cultural characteristics of <i>Pleurotus ostreatus</i>	13
3. Use of various substratè by <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
4. Cultivation chracteristics of <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
III Results and discussion	16
1. Collection and characters of <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
2. Cultural characteristics of <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
3. Use of various substrate by <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
4. Cultivation chracteristics of <i>Pleurotus ostreatus</i> HK-35 st.....	22
Chapter 3. Breeding of <i>Pleurotus ostreatus</i> with high quality and yield	28
I Introduction	28
II Material and methods	30
1. Breeding of <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
2. Genetic divesity of <i>Pleurotus ostreatus</i> by PCR	31
3. Morphological characteristics of fruiting bodies of fusants	31
III Results and discussion	32
1. Breeding of <i>Pleurotus ostreatus</i>	32

2. Genetic diversity of <i>Pleurotus ostreatus</i> by PCR	32
3. Morphological characteristics of fusants	36
Chapter 4. Selection of <i>Pleurotus ostreatus</i> with resistance against bacterial disease	37
I Introduction	37
II Material and methods	38
III Results and discussion	39
1. Selection of pathogens and non-pathogens	39
2. The resistance against bacterial disease of <i>P. ostreatus</i> HK-35	40
Chapter 5. Reference	41
Chapter 6. Summary	43

목 차

제 1 장 서 론	9
제 2 장 느타리버섯 우수 품종 선발	12
제1절 서 설	12
제2절 재료 및 방법	13
1. 느타리버섯의 수집	13
2. 느타리버섯의 배양적 특성	13
3. 느타리버섯의 인공배지별 배양 특성	14
4. 느타리버섯의 재배 특성 조사	14
가. 병재배 특성 조사	14
나. 선발 균주의 균상 재배 특성 조사	15
다. 선발 균주 HK-35의 현장 적용 시험	16
제3절 결과 및 고찰	16
1. 느타리버섯 수집 품종 및 특성	16
2. 느타리버섯의 배양적 특성	17
3. 느타리버섯의 인공배지 종류별 배양적 특성	17
4. 선발된 느타리버섯의 재배 특성	22
제 3 장 고품질 다수성 신품종 육성	28
제1절 서 설	28
제2절 재료 및 방법	30

1. 느타리버섯의 품종 개량	30
가. 원형질체 제조방법	30
나. 원형질체 융합과정	30
2. PCR핵산지문법에 의한 느타리 원형질 융합 계통의 유전형 판단	30
가. 느타리 균사체로부터 genomic DNA 분리	30
나. PCR 반응	31
다. PCR 산물의 전기영동	31
3. 융합주의 자실체 형태적 특성	31
제3절 결과 및 고찰	32
1. 느타리버섯의 품종개량	32
2. PCR핵산지문법에 의한 느타리 원형질 융합 계통의 유전형 판단	32
3. 융합주의 자실체 형태적 특성	36
제 4 장 내병성 품종 선발 및 특성	37
제1절 서 설	37
제2절 재료 및 방법	38
제3절 결과 및 고찰	39
1. 병원성 및 비병원성 균주의 선발	39
2. 선발 균주 HK-35의 세균성 갈반병에 대한 저항성	40
제 5 장 인 용 문 헌	41
제 6 장 요 약	43

제 1 장 서 론

느타리버섯은 그 맛이 굴과 같고 향취가 뛰어나서 오래전부터 우리나라에서 대중화되어 왔으며 이는 송이버섯과에 속하는 버섯으로서 1970년에 자연생 미류나무버섯 또는 버드나무버섯에서 원목재배로 인공재배되었으며 대량재배는 1973년부터 벗짚균상재배로 시작하여 현재 폐면재배와 병행되고 있다. 동양인의 기호에 알맞는 느타리버섯은 한국을 위시한 중국, 일본에서 애용되어 왔으나 근래에 이르러 미국, 캐나다, 그리고 유럽 여러나라에서 양송이 다음으로 생산량이 증가하고 있다. 우리나라에서는 과거 20년간 느타리버섯 대량재배기술과 품종개발에 많은 발전을 이룩하였다. 따라서 많은 농가에서는 느타리버섯 재배를 선호하여 현재 국내 전체 버섯생산량의 80%인 6만여톤이 생산되고 있으며 모두 국내 소비에 충당되고 있다. 재배농가와 면적이 나날이 늘어나 생산량과 소비량 모두 증가하였다. 그러나 근년에 와서 오래된 버섯농가는 집단적으로 재배를 중단하여 폐농일로에 있고 대부분의 농가는 버섯재배에 실패를 거듭하고 있다. 느타리버섯재배는 요일 및 계절 시세 변동이 크고 고도의 재배기술습득, 고가의 자동화 시설, 숙련된 인력 등이 필요한 농업이다. 그렇지만 가장 중요한 것은 우량 품종 및 우량 종균공급에 있다. 우리나라에서 사용되는 느타리 품종은 대부분 원형 느타리(가을, 겨울, 봄)와 여름 느타리(여름) 품종이 사용되며 진흥청에서 원균을 분양받아 60여개소 종균배양소에서 종균을 생산하여 농가에 공급한다. 그러므로 종균의 질은 비교적 균일할 수가 있다. 종균제조 재료와 과정이 동일하다면 양질의 종균이 생산공급될 것이다. 그러나 현실적으로 배양소에서 사용하는 톱밥등 배지의 질이 다르고 배양온도와 기간 또는 보존기간 및 운반방법에 따라 다수의 종균이 불량해질 수 있다. 그러나 공급되는 원균의 질이 좋지 않을 경우는 모든 농가에 불량 종균이 공급될 위험성이 따를 것이다. 여기에 문제점이 있다. 실제로 현지 농가에서 재배되는 느타리버섯에서 virus병징이 많이 발견되고 있고 농가마다 배지 재료 및 제조과정과 살균방법에 차이가 난다고 하더라도 근래에 와서 균사활착 배양에 실패가 너무 많아져서 재살균 재접종하는 농가가 허다하다. 재접종하는 경우 성공률은 70%이하가 대부분이며 생산비 추가 또는

완전실패로 농가는 어려움을 맞이하게 되는 것이다. 다음으로 중요한 문제점은 군사배양 후 버섯생육불량 및 병해감염에 원인이 발견되고 있다. 가장 중요한 병은 갈변병과 황변병으로 알려지는 세균성 질병으로서 그 피해가 가장 크며 심할 경우 폐상에 이른다. 다음은 느타리virus병이다. 이 병은 발이과정부터 기형버섯이 나오거나 큰 버섯이라도 기형내지 생육지연으로 불량한 상품이 되며 이 경우 세균병과 합병된다면 그 손실 매우 극심하다고 본다.

국내에서 현재 사용되는 우량품종 원형느타리는 농촌진흥청 균이과에서 1990년에 개발 보급한 고품질 다수성 품종으로서 P72 와 P49을 얻었으며 이는 갓모양이 깔대기형들인 사철느타리와 농기 201호의 유전자특성을 모두 갖는 P5-M43을 다시 우산형 느타리 2-1에 원형질체 융합으로 얻어진 우량 신품종이었다. 이는 그동안 5-6년 동안 재배되는 동안 주요병해에 많은 피해를 받으며 다수성 특성을 기대할 수 없게 되었다. 국내의 대치 가능한 신품종 육성이 시급히 필요하다고 본다.

1976년 독일, 1984년 프랑스등에서 느타리버섯의 무포자성균주를 얻었으며, 1985년 홍콩에서는 사철느타리로부터 돌연변이를 유기하여 무포자 또는 매우적은 양의 포자를 발생시키는 신품종들을 개발하였다. 이들은 호흡기 포자알레르기를 일으키는 재배농민들에게 좋은 결과를 주고있으나, 현재 우리나라에서는 많이 사용되지 않고 있다. 1892년 헝거리에서는 사철느타리와 헝거리의 자연생으로서 저온성 느타리와 교잡하여 여름철에 재배가능한 고온성 백색느타리를 개발하였다. 우리나라에서도 여름재배시에 사용할 다양한 신품종들이 요구되고 있다. 특히 근래의 우리나라의 느타리 재배는 각종 병에 시달리어 재배실패로 폐농농가가 늘고있어 병충해를 미리 예방할 수 있는 신품종 육성이 필요하다. 느타리버섯 재배중에 병방제를 위하여 많은 농약등이 사용되기도 한다. 살균제, 항생제, 살충제등이 사용될 경우 이들의 약해로 인한 피해도 상당하다.

느타리버섯은 건강식품이므로 가능한 농약사용을 하지 않는 무농약 신품종 재배기술을 시급히 연구개발하여야 할 것이다. 또한 신품종 및 신재배기술이 개발되더라도 종균 생산에 허점을 보완하지 않으면 안된다. 우리나라의 종균배양소들은 그 숫자가 많은 편이나,

시설과 제조방법이 대부분 열악한 환경이고 독자적인 연구개발이 거의 불가능한 조건이다. 안정된 종균 생산보급체계 확립 또한 시급히 연구될 문제점으로 지적된다.

따라서 본 연구팀은 거액의 손실을 거듭하는 느타리버섯 재배농민과 병마에 시달리는 느타리버섯을 위하여, 그리고 걱정을 같이하는 버섯 종균배양소 직원 및 각 기관 버섯연구자, 지도자 및 재배 농민과 뜻을 같이하며 상기의 문제점들을 해결하기 위하여 고품질 다수성 품질을 지닌 우량품종을 선발하고 버섯 생육에 있어서 병발생 후 치료하는 것보다는 병이 발생하지 않도록 미리 예방하는 방제법으로서 무농약 무병재배 기술의 기초 자료로 제시하고자한다.

제 2 장 느타리버섯 우수품종 선발

제1절 서 설

국내에서 현재 사용되는 우량품종 원형느타리는 농촌진흥청 균이과에서 1990년에 개발 보급한 고품질 다수성 품종으로서 P72 와 P49을 얻었으며 이는 갓모양이 깔대기형들인 사철느타리와 농기201호의 유전자특성을 모두 갖는 P5-M43을 다시 우산형 느타리 2-1에 원형질체 융합으로 얻어진 우량 신품종이었다. 이는 그동안 5-6년 동안 재배되는 동안 주요 병해에 많은 피해를 받으며 다수성 특성을 기대할 수 없게 되었다. 국내의 대처 가능한 신품종 육성이 시급히 필요하다고 본다.

1976년 독일, 1984년 프랑스등에서 느타리버섯의 무포자성균주를 얻었으며, 1985년 홍콩에서는 사철느타리로부터 돌연변이를 유기하여 무포자 또는 매우적은 양의 포자를 발생시키는 신품종들을 개발하였다. 이들은 호흡기 포자알레르기를 일으키는 재배농민들에게 좋은 결과를 주고있으나, 현재 우리나라에서는 많이 사용되지 않고 있다. 1892년 헝거리에서는 사철느타리와 헝거리의 자연생으로서 저온성 느타리와 교잡하여 여름철에 재배가능한 고온성 백색느타리를 개발하였다. 우리나라에서도 여름재배시에 사용할 다양한 신품종들이 요구되고 있다. 특히 근래의 우리나라의 느타리 재배는 각종 병에 시달리어 재배실패로 폐농농가가 늘고있어 병충해를 미리 예방할 수 있는 신품종 육성이 필요하다. 느타리재배중에 병방제를 위하여 많은 농약등이 사용되기도 한다. 살균제, 항생제, 살충제등이 사용될 경우 이들의 약해로 인한 피해도 상당하다. 느타리버섯은 건강식품이므로 가능한 농약 사용을 하지 않는 무농약 신품종 재배기술을 시급히 연구개발하여야 할 것이다. 또한 신품종 및 신재배기술이 개발되더라도 효율적인 종균 생산을 위하여 안정된 종균 생산보급체계 확립이 필요하다.

따라서, 본 연구는 새로운 품종의 육성을 위하여 느타리버섯 품종을 다양한 방법으로 수집하고 그들의 생리적 특성 및 재배적 특성을 고려하여 우수한 품종을 선발하고자 실시하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 느타리버섯의 수집

우리나라의 느타리버섯 재배농가에서 수집된 버섯과 농촌진흥청으로부터 분양된 균주를 실험에 사용하였으며 일부는 자연에 분포하는 버섯을 채집하여 조직분리를 통하여 원균을 분리 사용하였다. 또한, 중국 및 유럽 등지에서 재배되는 균주를 도입하여 기존의 재배 균주와 비교 조사한 다음 자실체 수량 및 배양이 용이한 균주를 선발 사용하였다.

수집된 각 균주는 Potato dextrose agar (PDA) 배지에 계대 배양한 다음 이를 10% PEG 용액이 든 2 ml vial에 한천 절편으로 넣은 후 -70°C 에 보관하였고 필요시 PDA에 계대하여 사용하였다.

2. 느타리버섯의 배양적 특성

수집된 느타리버섯의 최적 배지를 선발하기 위하여 감자한천배지 (PDA)를 비롯한 7종의 배지를 사용하였으며 그들의 조성은 다음과 같다.

배지조성

- Czapek's agar(CA); NaNO_3 1.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, KCl 0.25g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005g, sucrose 15g, agar 10g, D.W. 500ml (Sucrose is added after sterilization).
- Mushroom complete medium(MCM); dextrose 10g, MgSO_4 0.25g, KH_2PO_4 0.23g, K_2HPO_4 0.5g, yeast extract 1g, peptone 1g, agar 10g, D.W. 500ml.
- Malt extract agar(MEA); malt extract 10g, peptone 2.5g, yeast extract 1.5g, agar 10g, D.W. 500ml
- Oatmeal agar(OA); oatmeal 30g, bacto agar 6.25g, D.W. 500ml.
- Potato dextrose agar(PDA); potato 100g, dextrose 10g, agar 10g. D.W. 500ml
- Dextrose-peptone agar(DPA); dextrose 10g, peptone 2.5g, agar 10g. D.W. 500ml

○ Yeast-malt extract agar(YMA); yeast extract 15g, malt extract 3g, peptone 2.5g, dextrose 5g, agar 10g, D.W 500ml.

배양 조건은 27℃에서 7일간 petri-dish에 배양한 다음 그들의 균총 직경을 조사 비교하였으며 실험은 3반복으로 수행하였다. 또한, 배양 pH별 균사 성장 정도는 감자한천 액체 배지를 pH4.5에서 6.5까지 조절한 다음 250ml 삼각 플라스크에 50ml씩 분주 살균한 후 직경 7mm의 균총 절편 5개씩 접종하여 27℃에서 15일간 배양하였다. 균사 배양 정도는 10 5℃에서 건조 중량이 항량이 될 때 까지 건조한 다음 측정 비교하였다.

3. 느타리버섯의 인공배지별 배양 특성

수집 균주의 재배 및 종균 배양에 적절한 기질의 선택과 배양 속도의 비교 검토를 위하여 직경 4mm, 길이 200mm의 유리관에 길이 150mm로 절취한 벧짚(수분함량 10%)을 담아 65%의 수분 함량으로 조절한 후 균사 성장 속도를 측정하였다. 또한, 느타리버섯의 종균 생산에 기본적으로 사용되는 톱밥 배지 (참나무 톱밥과 미강의 8 : 1 혼합물, 수분함량 80%)를 850cc 종균병에 담아 균사 생육정도를 조사하였다. 느타리버섯의 대량 재배용 배지 선발을 위하여 주요 기질로 사용되는 벧짚 및 폐면을 사용하여 일반적으로 사용되는 느타리버섯 재배 방법과 동일하게 벧짚과 폐면을 준비한 다음 상자 재배를 실시하였으며 폐자원인 종이수건의 경우 물에 충분히 침수한 다음 살균하여 상자 재배하였다. 이때 환경 조건은 균사 생장은 25℃에서 20일간 배양한 다음 균사가 완전히 자라면 15℃로 옮겨 자실체를 유기하였다. 자실체 발생 초기인 원기 형성의 소요 일수를 비교 조사하여 그들의 이용성 정도를 측정하였다.

4. 느타리버섯의 재배 특성 조사

가. 병재배 특성 조사

느타리버섯의 제조과정중 영양분으로 사용되는 톱밥과 미강을 이용하여 병재배 특성을

조사하였다. 배지 제조는 참나무톱밥과 미강을 8대 1로 혼합한 다음 수분 조절을 80% 정도로 맞춘 다음 850cc 포트병에 담아 121℃에서 살균 후 실험에 사용하였다. 접종원은 PDA 배지에 7일간 배양한 원균을 사용하였다. 균사 생장 적온은 5℃ 간격으로 조절된 균상에서 배양하면서 균사의 생장 길이로 비교 조사하였으며 균사 생장이 완료된 종균의 경우 10℃에서 30℃까지 5℃ 간격으로 조절된 균상으로 옮겨 초발이 및 자실체 발생에 따른 실험을 수행하였다. 조사 항목은 초발이 소요일수, 발생 자실체의 개체중, 갖의 섹터 그리고 다발이성을 각각 조사하였다.

나. 선발 균주의 균상 재배 특성조사

노타리버섯의 고품질 다수성 특성 조사를 위하여 벗짚을 사용하여 일반적으로 사용되는 노타리버섯 상자 재배 방법으로 선발된 4 균주의 형태적 특성 및 개체중, 부위별 크기를 비교 조사하였으며, 벗짚과 폐면간에 재료별 수량의 차이를 상자 재배를 통하여 조사하였다.

다. 선발 균주 HK-35의 현장 적용 시험

노타리버섯 균주중 고품질 다수성의 HK-35 품종 현장 적용성 시험은 일반적인 재배사 내에서 폐면 및 벗짚을 이용하여 균상 재배를 실시하였다. 조건은 입상후 65℃에서 8시간 이상 살균 한 다음 50-55℃에서 2일간 후발효시키고 각 균주를 접종하였다. 접종 후 생육 온도는 15-18℃로 조절하였으나 외기 온도의 영향으로 온도의 편차가 심하게 발생하였다. 습도는 85-90%로 조절하면서 생육시켰다. 균사체 접종 후 계속해서 폐면 및 벗짚 배지 균상에서 균사 배양 상태 및 초발이 형성과 자실체 형성 정도를 조사하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 느타리버섯 수집 품종 및 특성

실험 균주는 총 15 균주로 농촌진흥청에서 분양 받은 5 균주와 우리나라 재배 농가에서 얻어진 3균주, 중국에서 도입된 1 균주, 그리고 화란에서 도입된 6 균주를 사용하였다(표 1).

이들 균주 중 농촌진흥청 균주는 현재 농가의 보급 균주로 일반 농가에서 재배되고 있으나 오랜 기간 동안 사용되어 여러 가지 문제점을 안고 있다. 특히 병해충에 민감한 균주들이 대부분이고 버섯의 수량이 감소되는 경향이 있다. 따라서 본 실험에서는 새로 도입되거나 농가로부터 습득된 균주 위주로 실험하였으며 일부 진흥청 균주는 대조구로 사용하였을 뿐 실험 결과에는 설명하지 않았다.

표 1. 실험에 사용된 균주 목록

Strain No.	Scientific Name	Collection site	Collection date
사철	<i>Pleurotus florida</i>	Taejon	1996. 11.
원형 1호	<i>P. ostreatus</i>	ASI	1996. 11.
원형 2호	<i>P. ostreatus</i>	ASI	1996. 11.
여름	<i>P. sajor-caju</i>	ASI	1996. 12.
2019	<i>P. ostreatus</i>	ASI	1997. 3.
K206	<i>P. ostreatus</i>	Okcheon	1997. 3.
201	<i>P. ostreatus</i>	ASI	1997. 2.
김제1호	<i>Pleurotus</i> sp.	Kimje	1997. 2.
중국산	<i>Pleurotus</i> sp.	China	1997. 2.
3014	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.
3030	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.
3040	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.
4055	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.
K 26	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.
HK-35	<i>Pleurotus</i> sp.	Netherlands	1996. 12.

ASI : 농촌진흥청 농업과학기술원

2. 느타리버섯의 배양적 특성

가. 느타리버섯의 최적배지 선발

수집된 느타리버섯의 배양적 특성을 구명하기 위하여 배지별 실험은 PDA를 비롯한 7종의 천연배지 및 합성배지를 사용하여 균총의 직경을 측정 비교하였다. 그 결과 표 2에 보는 바와 같이 15균주 모두 PDA에서 생육이 가장 양호 하였으며 그외에 YMA, MCM, MEA등에서 생육의 속도가 양호하였다. 균주별 비교시 화란에서 도입된 HK-35 균주, 중국산 느타리버섯 균주, 김제 1호의 생육이 다른 균주에 비하여 양호하였으며 화란에서 도입된 3014, K 26, 4055 균주는 다른 균에 비해 생육이 불량하였다.

즉, 수집된 균주의 배지의 선호성은 유사하였으나 수집된 지역별로 차이가 약간 보였으며 같은 지역에서 수비된 균주간에도 생장의 차이를 일부 보였다. 이러한 결과는 차등(1991)이 저술한 내용과 일치하는 경향을 보였다.

나. 느타리버섯의 pH에 따른 생육 정도

수집된 느타리버섯 균주중 배지 실험에서 생육이 양호한 원형 2호, 김제 1호, 중국산 및 화란에서 도입된 HK-35 균주에 대한 pH에 따른 생육 정도를 비교 조사하였다. 그 결과 실험에 사용된 균주 모두 pH 5.5에서 가장 양호한 생육 정도를 보였다(표 3). 특히, 느타리버섯 HK-35균주의 경우 다른 균주와는 달리 5.0에서 6.0까지 모두 생육이 양호한 양상을 보여 넓은 spectrum을 보여 주었다. 이러한 결과는 최적 배지의 결과 마찬가지로 차등(1991)이 보고한 결과와 유사한 양상을 보여 주고 있다.

3. 느타리버섯의 인공배지 종류별 배양적 특성

가. 볏짚 이용성

수집된 느타리버섯 균주들의 기질 이용성을 조사하기 위하여 볏짚을 이용한 시험관 배양법을 수행하였다.

표 2. 배지 종류에 따른 느타리버섯 균사 생장 정도

Strain No.	Diameter of mycelium (mm/27°C/7days)						
	PDA	MCM	MEA	OMA	YMA	DPA	CA
사철	72	57	56	64	73	53	42
원형 1호	74	56	54	53	68	54	32
원형 2호	71	54	56	50	68	57	46
여름	65	48	49	42	68	46	32
2019	72	48	54	45	64	48	36
K206	73	57	54	66	69	53	38
201	67	48	59	58	62	57	43
김제 1호	80	67	58	68	76	58	45
중국산	75	63	65	65	72	62	52
3014	56	48	52	56	58	46	38
K 26	52	43	46	48	56	36	26
3030	64	54	48	42	65	47	30
3040	74	64	56	65	72	45	32
4055	57	43	36	32	52	42	28
HK-35	80	68	58	54	74	56	45

* Czapek's agar(CA); NaNO₃ 1.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.25g, KCl 0.25g, FeSO₄ · 7H₂O 0.005g, sucrose 15g, agar 10g, D.W. 500ml (Sucrose is added after sterilization); Mushroom complete medium(MCM); dextrose 10g, MgSO₄ 0.25g, KH₂PO₄ 0.23g, K₂HPO₄ 0.5g, yeast extract 1g, peptone 1g, agar 10g, D.W. 500ml; Malt extract agar(MEA); malt extract 10g, peptone 2.5g, yeast extract 1.5g, agar 10g, D.W. 500ml; Oatmeal agar(OA); oatmeal 30g, bacto agar 6.25g, D.W. 500ml; Potato dextrose agar(PDA); potato 100g, dextrose 10g, agar 10g. D.W. 500ml; Dextrose-peptone agar(DPA); dextrose 10g, peptone 2.5g, agar 10g. D.W. 500ml; Yeast-malt extract agar(YMA); yeast extract 15g, malt extract 3g, peptone 2.5g, dextrose 5g, agar 10g, D.W. 500ml.

표 3. 배지 산도별 균사 생장량

균 주	pH 별 균사 생장량 (mg/15일)				
	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
원형 2 호	342	389	402	398	382
김제 1 호	368	412	430	442	401
중 국 산	358	424	437	428	369
HK-35	363	418	463	457	426

그 결과 그림 1에서 보는 바와 같이 도입종인 HK-35 균주가 생육이 가장 양호 하고 균사 밀도가 치밀하였으며 생육 속도 또한 빨랐으며 3014, 3030 균주는 생육 속도는 비교적 빠르나 균사 밀도가 조밀하지 못하였다. K 26 균주의 경우 그림에서 보듯이 벚짚 배지에서 생장하지 못하였다. 이러한 결과는 균주간에 벚짚의 이용성 정도가 다양함을 시사하고 벚짚을 이용한 대량 균상 재배시 도입종 HK-35 균주가 생육인 왕성할 것으로 사료되었다.

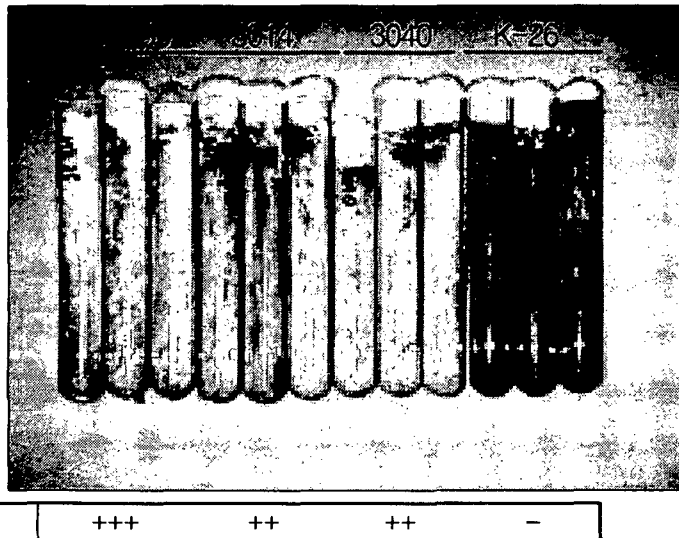


그림 1. 벚짚 배지에 대한 느타리버섯의 생육정도 비교

나. 톱밥 배지에서의 생육 정도

느타리버섯의 균일하고 완숙된 종균은 병 재배 또는 벗짚 재배등에 필수 불가결한 요인이다. 따라서, 생육이 균일하고 생육 속도가 빠른 균주의 선발이 필요하고 완숙된 종균의 경우 보존 기간 혹은 보존 온도에 대한 안전성이 오래동안 유지되는 특성을 지닌 품종이 유리하다. 균사의 생장이 다른 균주에 비해 양호한 HK-35 균주를 비롯한 3균주에 대하여 톱밥 배지를 850cc 종균병에 담아 사용하여 균주간의 생육 정도를 비교 조사하였다. 그 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 벗짚 배지에서와 마찬가지로 HK-35 균주가 생육 속도가 가장 빠르고 빠른 시기에 종균이 안정화 되었다.

또한, HK-35 종균을 이용하여 벗짚을 이용한 상자 재배를 실시한 결과, 그림 3에서 볼 수 있듯이 자실체의 생육 상태가 양호하고 품질이 우수하며 다발성으로 종균으로서 안정성이 확인되었으며 이는 추후 HK-35 균주를 농가 보급하여 다수확 및 고품질의 품종으로 장려될 수 있음을 시사한다. 따라서 추후 얻어진 결과들은 HK-35 균주를 주 대상으로 실험을 수행하였다.

HK-35 3014 3030 K26



생육상태	+++	++	+	-
------	-----	----	---	---

그림 2. 톱밥 종균을 이용한 느타리버섯의 생육 정도

그림 3. 느타리 자실체 형태.

배양 조건은 850cc 광구병에 살균된 톱밥배지에 종균을 접종한 후 25℃에서 균 배양 후 15℃, 95% 조건에서 발이 및 자실체 배양한 후 자실체의 형태를 관찰함. 총 배양일수는 45일임.



A. HK-35



B. 원형 느타리버섯

기존에 사용되는 배지 재료인 볏짚 및 폐면과 다른 폐자원 종이수건에 대한 상자 재배를 통한 재배 과정을 통해 HK-35 균주와 대조구로 원형 2호, 중국산 및 김제 1호 품종을 사용하여 자실체 초발이 소요 일수를 조사하였다. 그 결과 표 4에서 보는 바와 같이 폐 종이수건을 기질로 사용한 경우 다른 기질과 균주간에는 생육의 차이가 보이지 않았으며 HK-35 균주의 경우 다른 균주에 비해 공시된 모두 재료에서 대조구 균주에 비해 초발이 소요일수가 15 내지 18일로 10일 정도 단축되었다.

표 4. 배지 종류에 따른 초발이 소요일(day)수

균 주	벗 짚	폐 면	폐종이수건
원형 2 호	26	30	30
김제 1 호	23	26	26
중 국 산	15	18	18
HK-35	15	18	16

이러한 결과는 HK-35 균주가 앞에서 설명한 것처럼 다른 균주에 비해 벗짚 및 톱밥배지의 양호한 생육 상태와 빠른 균사 성장속도와 더불어 배지 종류간에 차이 없이 버섯 발생 시기가 빠름을 시사하며 기존에 사용된 기질외에 폐 종이수건의 이용에 대한 가능성을 높이 시사하고 있다. 추후 폐 종이수건을 이용한 느타리버섯 대량배양 재배방법에 대한 연구를 계속 수행할 계획이다.

4. 선발된 느타리버섯의 재배 특성

가. 병재배 특성

재배 및 생리적 특성 등의 품종 특성을 조사하여 선발된 느타리버섯 HK-35 균주의 농가 보급 가능성을 대조구와 비교 검토하여 타진한 결과 기존의 농가 재배용인 원형 느타리버섯과 큰 차이를 보이지 않았다. 즉, 우리나라의 기후 및 여러 환경 등에 적합함을 알 수 있었다 (표 5).

나. 벗짚 및 폐면을 이용한 균상재배시 자실체의 특성

느타리버섯의 대량 재배시 자실체의 형태적 특성 및 수량성을 조사하기 위하여 자실체의 형태의 경우 벗짚 균상 재배시에 수량성은 벗짚과 폐면을 기질로 사용하여 선발 균주인 HK-35 균주와 일부의 대조구에 대하여 비교 조사하였다.

표 5. 병재배 방법에 따른 고유 특성

군 주	균사생장 적온(℃)	버섯발생 적온(℃)	초발이 소요일수	개체중(g)	갓 색택	다발성 (개/다발)
원형 2 호	25~30	10~16	26	22.7	회갈색	18
김제 1 호	25~30	10~15	23	25.4	회갈색	33
중 국 산	25~30	15~20	15	24.6	연회색	21
HK-35	25~30	10~20	15	28.6	회 색	18

그 결과, HK-35의 자실체 형태는 반우산형으로 원형 2호와 김제 1호와 유사하였으며 개체중은 28.6g으로 다른 군주에 비해 높았다. 그외에 부위별 크기는 갓 직경이 중국산 보다는 크나 다른 대조구 보다는 작은 경향을 보였으며 다른 특징은 대체적으로 유사하였다 (표 6).

표 6. 재배 자실체의 형태적 특성

군 주	갓 형태	개 체 중 (g)	부위별 크기 (mm)			
			갓직경	갓두께	대직경	대길이
원형 2 호	반우산형	22.7	66×63	9	12	86
김제 1 호	반우산형	25.4	66×63	11	10	64
중 국 산	갈대기형	24.6	46×52	5	11	65
HK-35	반우산형	28.6	56×58	8	8	76

벗짚 및 폐면을 이용한 균상 재배시 선발된 HK-35 균주의 수량은 3.3m²당 각각 58 및 61kg으로 대조구로 사용된 균주들보다 높게 나타났다 (표 7)

표 7. 자실체 수량

군 주	수 량 (kg/3.3m ²)	
	벗 짚	폐면
원형 2 호	43	46
김제 1 호	52	50
중 국 산	56	58
HK-35	58	61

이러한 결과는 선발된 HK-35 군주가 기존에 재배되고 있는 품종과 비교시 자실체 형태에 있어서 고품질을 지니고 수량성이 뛰어난을 시사함으로 추후 고품질 다수성 품종으로 보급될 수 있을 것으로 사료된다.

다. 선발 군주 HK-35의 현장 적용 시험

느타리버섯 군주 HK-35의 현장 적응성 실험은 그림 4에서 보는 바와 같이 일반적인 재배사내에서 폐면 및 벗짚을 이용하여 균상 재배를 실시하였다. 조건은 입상후 65℃에서 8시간 이상 살균 한 다음 50-55℃에서 2일간 후발효시키고 각 군주를 접종하였다. 접종 후 생육 온도는 15-18℃로 조절하였으나 외기 온도의 영향으로 온도의 편차가 심하게 발생하였다. 습도는 85-90%로 조절하면서 생육시켰다. 표 8은 느타리버섯 HK-35 군주의 폐면 및 벗짚 배지 균상에서 균사 배양 상태 및 초발이 형성과 자실체 형성 정도를 비교한 결과이며 표 9는 느타리리버섯 원형 2호 군주의 폐면 및 벗짚 배지 균상에서 균사 배양 상태 및 초발이 형성과 자실체 형성 정도를 비교한 결과이다.

균사 배양시기는 폐면 및 벗짚 모두 HK-35가 원형 2호에 비해 빨랐으며, 초발이 소요일수는 HK-35의 경우 폐면 및 벗짚 모두 22일로 원형 2호와는 3일 정도 빠른 경우를 보였다. 1 주기 재배시 수확시기가 원형 2호에 비해 4-5일 정도 빠른 일수를 보여 HK-35가

원형 2호보다 균사 생장 및 자실체 발생 시기가 빠르고 자실체 형성 빈도도 높았다. 또한, 1주기 수확후 온도 편차의 심화로 재배가 불안정한 조건이 주어졌으며 세균성 갈반병의 발생으로 원형 2호의 경우 거의 재배를 하지 못한 실정이나 HK-35의 경우 재배 온도가 중고온 상태인 2주기에서도 버섯의 발생이 양호하였다.

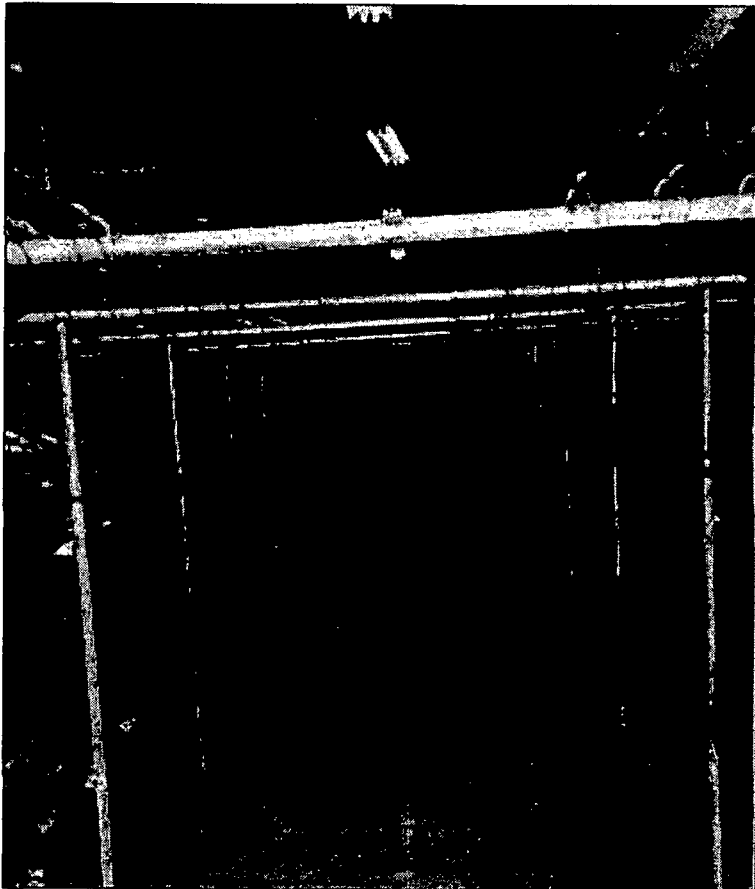


그림 4. 재배사 전경

표 8. 느타리버섯 HK-35 균주의 배지별 균상 재배 특성


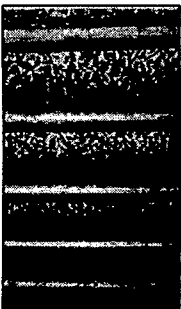
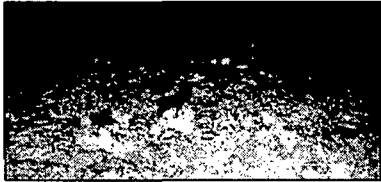
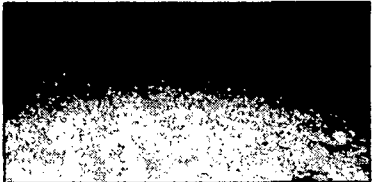
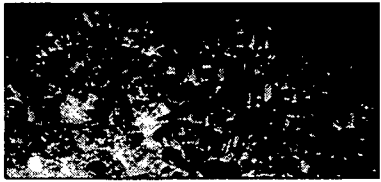
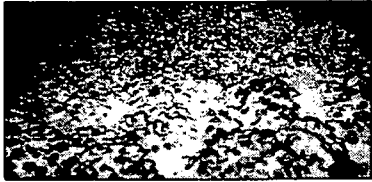
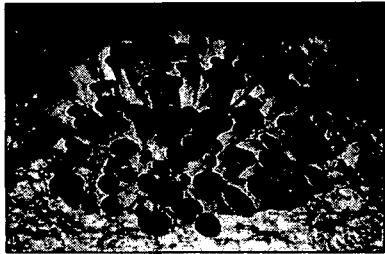
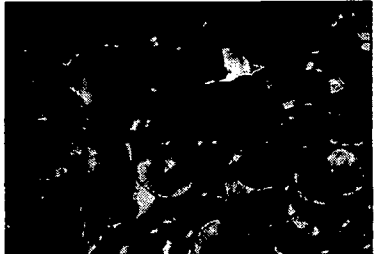
재배시기	특 성	배지 종류	
		폐 면	벗 짚
접종 후 18일	폐면:균배양 완료 벗짚:균배양 완료		
		상단면	하단면
접종 후 22일	폐면:초발이 벗짚:초발이		
접종 후 32일	폐면:어린 자실체 형성 벗짚:어린 자실체 형성		
접종 후 42일	폐면:성숙 자실체 발생 및 수확 벗짚:성숙 자실체 발생 및 수확		

표 9. 느타리버섯 원형 2호 균주의 배지별 균상 재배 특성

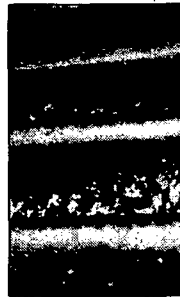
배양일수	균상상태	배지 종류	
		폐 면	벗 짚

접종

접종 후 18일
 폐면: 균배양 2/3 완료
 벗짚: 균배양 2/3 완료



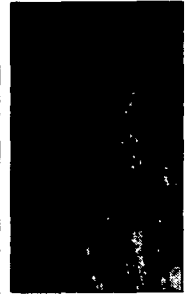
상단면



하단면



상단면



하단면

접종 후 25일
 폐면: 초발이



접종 후 38일
 폐면: 어린 자실체 형성



접종 후 48일
 폐면: 성숙 자실체 발생 및 수확



제 3 장 고품질 다수성 신품종 육성

제1절 서 설

국제 경쟁화시대에 접하여 고품질 다수성 및 내병성 신품종 육성개발 보유는 필연적이며 종균생산의 현대화로 농민에게 우량종균 공급의 필요성이 절실하다. 신품종 개발 및 보급은 증산을 꾀하여 농민의 경제적 향상을 주며 다량 생산시 가공하여 국외수출 촉진할 수 있다. 이를 위하여 새로운 품종의 육성을 위하여 다양한 기술의 도입이 필요하며 OECD 가입으로 인한 우리나라의 고유 품종 보유 및 보호정책이 필요하다. 따라서, 이러한 여러 가지 문제점을 극복하기 위하여 수집된 균주들의 유전적 다양성의 분석과 더불어 새롭게 육종된 품종에 대한 유전적 고유성을 확인 할 필요성이 있다.

최근 분자생물학적 기법의 발달로 DNA 마커를 이용한 DNA를 이용한 미생물의 검정 기술이 개발되어 종 다양성 검정 및 미생물 분류에 획기적인 전기를 마련하였다. 이 DNA 검정법은 형태적, 이화학적방법에 비하여 환경적 영향을 배제할 수 있으며, 적은 미생물 밀도에서 검출이 가능한 고도의 민감성과 신속성, 정확성 및 단순성을 특징으로 한다. 현재 DNA hybridization과 PCR (polymerase chain reaction)방법이 개발되어 미생물의 종간, 종내 분류, 계통간 교배조합의 확인 등 미생물의 유전적 유연관계 분석에 널리 이용되고 있다. 특히 PCR법은 적은 미생물 밀도와 DNA로 신속, 간단하게 적용할 수 있어 병원균이 진전되기전 병원균의 존재 유무를 확인할 수 있는 고도의 민감성으로 병원균의 조기 진단에 이용하고 있다. PCR법은 RFLP법보다 간단, 신속하게 핵산지문 분석에 적용가능 하며, RAPD (random amplified polymorphic DNA)(Williams et al, 1992), CAPs (cleavable amplified polymorphic DNA)(Konieczny et al, 1993), SSLP (single sequence length polymorphism)(Panaud et al, 1996) 및 AFLP (amplified fragment length polymorphism)(Vos et al, 1995)등 다양한 기법이 개발되어 DNA유전분석에 그 이용이 급증하고 있다. 그중 RAPD방법은 10-12 mer의 짧은 염기를 임의적으로 제작된 primer를 이용하여 genomic DNA 을 PCR증폭 한 후 전기영동하여 DNA 다형성을 검출하는 기술이다. 이 방

법은 세균, 진균 등 다양한 미생물의 종간 종내의 계통발생학적 유연관계 분석에 이용 할수 있으며 대상 미생물의 사전 유전정보지식을 모르더라도 적용이 가능하고 primer가 제품화 되어 유수 시약회사로부터 구입이 용이함으로 신속하고 간단하게 적용된다. 그러나, primer 특성으로 인하여 PCR반응시 저온의 annealing 온도(36-37 °C)을 채택하고 있어 DNA순도 또는 PCR조건에 따라 PCR 결과가 변하는 등의 원인으로 재현성에 대한 문제점이 지적 되고 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 최근 벼의 반복배열의 염기서열로부터 고안 제작된 20개의 염기로 구성된 Oligomer URP (Universal rice primer) 프라이머가 개발되었다. 이 URP 프라이머는 동물, 식물, 미생물에 이르기 까지 다양한 생물종에 적용 가능하며, PCR 반응시 55°C 이상에서 annealing을 할 수 있기 때문에 주형 DNA와 primer간에 정확한 부착 가능으로 높은 재현성의 PCR 결과를 얻을 수 있다. 특히, URP 프라이머는 벼, 곰팡이의 종간, 종내 계통간의 PCR 핵산지문에 매우 뛰어난 것으로 확인 되었다. 따라서 본 연구에서는 우리나라에 보급되는 느타리버섯 품종과 개발된 HK-35간의 유전적 다양성에 대한 구별과 새로운 품종 육성을 위하여 개발 품종과 원형느타리 2호와의 원형질 융합을 통하여 얻어진 융합체의 확인을 위하여 URP primer를 이용하였다.

제2절 재료 및 방법

1. 느타리버섯의 품종 개량

가. 원형질체 제조방법

Petri-dish에 PDA를 분주한 다음 배지 표면에 cellophane membrane 을 고르게 편 다음 느타리버섯균을 접종한 다음 27℃에서 4일간 배양한 다음 배양된 균총을 세포벽 분해효소인 Novozym 234가 들어 있는 삼각 플라스크에 옮긴 다음 shaker incubator에서 27℃에서 120 stroke로 반응하여 원형질체를 나출하였다. 나출된 원형질체는 glass filter로 여과하고 원심분리한 다음 침전물에 0.6M의 sucrose 용액을 넣어 희석하고 재생용 배지인 R-MCM 배지에 접종하여 배양한 후 배양된 colony는 MCM 배지에 계대 배양하여 단일 균주를 얻어 실험에 사용하였다.

나. 원형질체 융합 과정

위의 과정에서 Novozyme 234를 사용하여 HK-35 균주와 원형 2호 균주의 나출된 원형질체를 $1\sim 2 \times 10^7$ /ml 농도로 fusion tube에 1:1로 섞은 다음 약 10분간 원심하여 상등액을 제거하고 0.6M sucrose로 2회 세척한 후 30% PEG (PEG 6000 containing 0.01M calcium chloride and 0.5M glycine, pH 7.0)를 1ml 첨가하여 30℃에서 60분간 융합하였다. 융합체는 재생 배지에 분주한 다음 0.75% agar 배지를 overlapping한 다음 각각 배양된 단일 균총을 재생 배지에 옮긴 후 재생이 완료된 것을 융합 균주로 확보하여 다음 실험등을 수행하였다.

2. PCR핵산지문법에 의한 느타리 원형질 융합계통의 유전형 판별

가. 느타리 균사체로부터 genomic DNA분리

느타리버섯을 PDA broth 배지에서 진탕배양 (120 rpm)으로 균주에 따라 20에서 30일간 배양 하였다. 배양된 균사체를 여지에 걸러낸다음 동결건조를 하였다. 동결 건조한 균사체를 이쑤시게로 곱게 마쇄한 다음 100 μ g정도를 1.5ml의 test tube에 옮기고 추출용 완

층액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS) 400 μ l와 proteinase K (20mg/ml)를 첨가하여 유리봉으로 buffer상에서 잘 썬어 준 다음 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 항온 하였다. 이 혼합액에 2 X CTAB buffer를 동량첨가 하여 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하고 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 넣고 철저히 혼합한 후 12,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공 건조한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) 100 μ l에 용해 하였다. 10mg/ml RNase 2 μ l를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분 처리하여 그 용액속에 함유된 RNA를 제거하였다. DNA함량을 측정하기위하여 DNA를 100배로 희석하여 spectrophotometer의 260nm의 파장에서 실시하였다.

나. PCR 반응

PCR반응 용액은 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 100ng prime, 50 ng template DNA, 200 μ m dNTP(dCTP, dTTP, dATP, dGTP), 및 2.5 unit *Taq* polymerase(Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였다. PTC-100(MJ. Reasearch사)의 PCR기기를 이용하여 처음 DNA변성을 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간, 그 후 cycle에서 DNA변성은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1분 및 DNA합성은 72 $^{\circ}$ C에서 2분으로 총 36 cycle을 실시 하였으며, 최종 DNA합성은 5분으로 하였다.

다. PCR산물의 전기영동

증폭된 PCR산물은 Agarose gel과 Polyacrylamide gel분석 방법을 병행하여 실시 하였다. Agarose gel분석은 PCR반응용액 (15 μ l)를 TBE 완충액(45mM Tris-borate, 1mM EDTA pH 8.0) 에 녹인 1.8%의 agarose gel에 loading한후 5 vol/cm로 전기영동 하였으며, ethidium bromide용액에 염색하여 UV lamp하에서 DNA밴드를 확인하였다.

3. 융합주의 자실체 형태적 특성

융합주의 형태적 특성은 2장에 기술한 병재배와 동일하게 수행하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 느타리버섯의 품종 개량

고품질 다수성 신품종 육성을 위하여 원형질체를 Glucanex와 Novozym 234 세포벽 분해 효소를 이용하여 각각 나출 및 재생하여 조건을 구명한 다음 나출된 원형질체를 PEG와 함께 처리하여 융합주를 얻었다. 얻어진 융합주들은 재배적 특성을 조사하기 위하여 배양중이며 각각의 효소에 의한 원형질 나출 및 재생율, 융합된 균주수는 표 10에 나타냈다.

표 10. 세포벽 분해 효소에 의한 원형질체 재생율 및 융합 균주수

균 주	Novozym 234		Glucanex	
	재생율	융합주	재생율	융합주
HK-35	0.21 %	106	0.15 %	33
원형 2호	0.17 %		0.08 %	

원형 2호에 비해 HK-35 균주가 원형질체의 재생율이 비교적 높았으며 융합주는 원형질체 나출량이 많은 Novozym 234 분해액에서 많이 얻어졌다. 나출 재생된 두 균주간 융합주는 균사체 배양을 통하여 PCR 지문법에 의한 유전형질을 판단하고 그 중 융합된 것으로 사료되는 일부 균주는 병 재배를 통하여 균사의 성장 및 자실체의 형태적 특성을 조사하였다.

2. PCR핵산지문법에 의한 느타리 원형질 융합계통의 유전형 판별

본 방법에서 이용된 DNA 분리 방법으로 느타리의 균사체로부터 높은 순도의 DNA를 분리할 수 있었다 (그림 5).

HK35
원형2

1 3 7 9 13 15 16 17 18 19 20 22 23 25 29 31 33 35 39 41 42 47 49 53 57 59 63 65 67 69 71 72 73 75 77 79

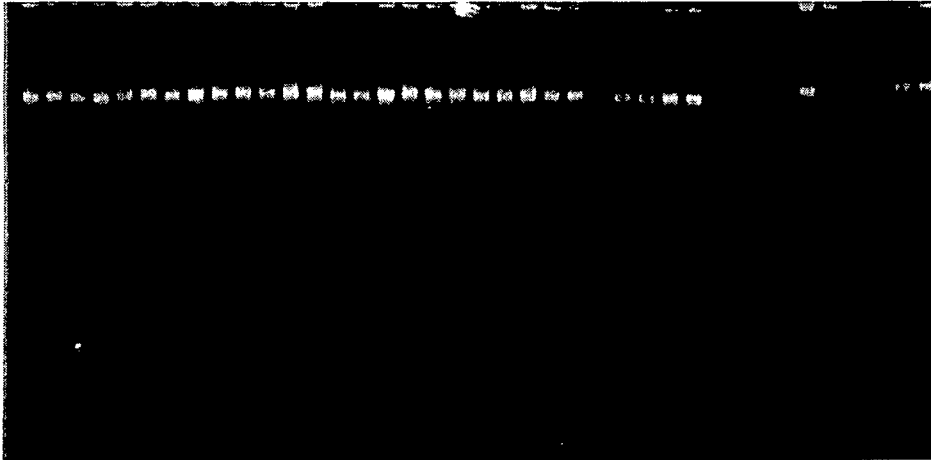


그림 5. 느타리계통으로부터 분리한 DNA

각 lane의 번호는 HK35와 원형2호간의 원형질 융합 계통을 나타낸다.

PCR에 의한 DNA 다형성 검출을 위하여 강 등(1997)에 의해 개발된 URP primer가 적용되었다. URP primer는 벼의 repetitive sequence의 정보로부터 고안, 제작된 것으로서 GC 함량이 50%-60%로 구성되어 있으며 20 mer의 oligonucleotide로 구성되어 있다. 12종류의 URP primer가 본 실험에 적용한 결과 URP2F, URP9F가 PCR DNA 다형성 검출에 유용하게 적용될 수 있었다. 그림 6와 그림 7은 URP2F와 URP9F에 의하여 증폭된 느타리 계통의 PCR DNA 다형성 결과로서 3.0 kb에서 0.3 kb사이에서 5-7개의 DNA 다형성 밴드를 증폭하였다.

그림 6의 결과에서 HK-35는 국내 등록 14 느타리버섯 품종과는 구별되는 DNA 다형성을 보였으며 HK-35와 원형 2호와의 원형질 융합에 의하여 재생된 느타리 36 계통내에서는 HK-35의 유전형질을 가지는 것이 20계통(1, 3, 7, 9, 13, 15, 16, 20, 22, 23, 25, 29, 31, 33, 41, 42, 49, 53, 57, 77)으로 55%로 나타났으며, 원형 2호 유전형질으로는 7 계통(39, 63, 65, 67, 69, 72, 75)으로 19.4%로 나타났다. 특징적인 계통으로는 전체적으로는 HK-35의 유전형질을 하고 있으며 PCR 밴드 1번을 결실 하고 있는 2계통(17, 73)이 검출 되었으며, 원형

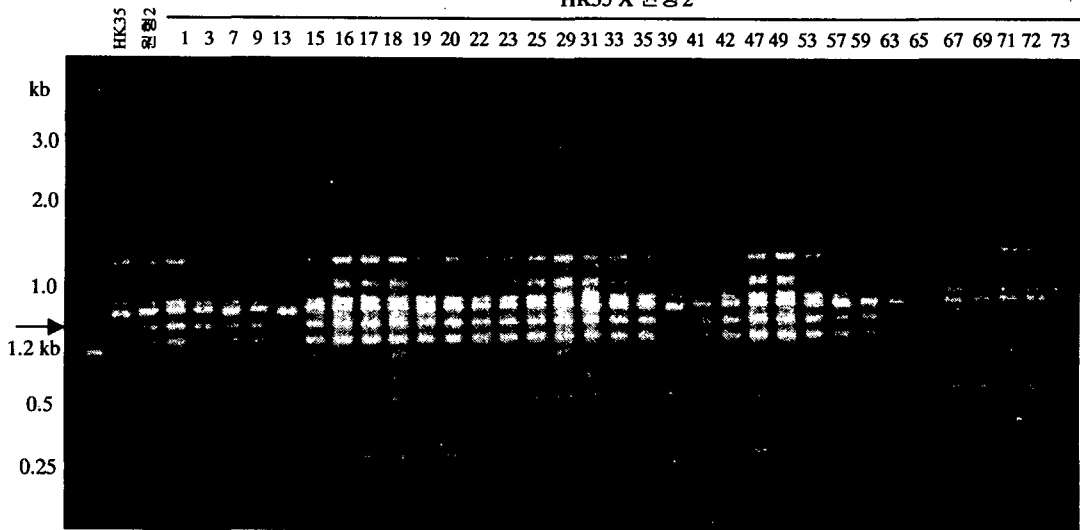


그림 7. URP9F primer에 의한 느타리계통의 PCR 핵산지문 양상

분석에 이용되는 PCR primer는 주로 10 mer의 oligonucleotide로 구성된 random arbitrary primer를 이용한 RAPD 법이 주종을 이루며 그 primer들은 상품화 되어 쉽게 구입 적용할수 있다. 그러나 그러한 종류의 primer들은 36 ℃이하의 낮은 annealing 온도와 DNA순도 정도, 또는 취급자에 따라 그 분석결과가 다르게 나타나는 낮은 재현성이 큰 문제점으로 지적되어 왔다. 반면에 본 실험에 이용한 URP primer는 위와같은 점을 보완하여 제작된 것으로서 55℃에서의 annealing온도와 20 mer로구성된 primer길이 등으로 재현성 있게 버섯의 PCR핵산 지문에 효율적으로 적용 가능 하였다. 균류의 종분류에 rDNA이방 법이 많이 사용 되어 왔다. 즉 진균 및 버섯류는 5.8S rDNA영역을 가운데두고 18S 와 23S rDNA영역 양쪽에 변이가 많은 ITS와 IGR영역을 특이적으로 PCR 증폭하여 염기배열 을 비교분석 또는 PCR 산물을 제한효소로 절단 전기영동으로 DNA다형성을 검출 하는 방 법이다. 그러나 이 방법은 근연종 즉 종내의 계통간의 분석에 한계점이 있다. 본 연구는 느타리버섯 종내의 계통간 유전형 판별에 목적을 두었기 때문에 rDNA분석보다는 계통간 DNA 다형성을 생산할 수 있는 핵산지문법을 선택하게 되었고 URP primer를 이용하게 됨 으로서 높은 재현성의 DNA 다형성을 유도할 수 있었다.

3. 융합주의 자실체 형태적 특성

PCR 기법을 통하여 HK-35 균주와 원형 2호의 융합주간에 유전적 다양성이 확인 되었다. 그중 원형 2호와 HK-35의 각각의 고유 band를 지닌 계통과 두 균주의 특성을 모두 지닌 계통, 그외에 전혀 새로운 band 양상을 보이는 계통에 대하여 병재배를 실시하였다. 그 결과 자실체의 형태적으로 두 가지 부류로 구별되었는데 하나는 원형의 형태와 유사하고 또 다른 하나는 HK-35와 형태적으로 유사한 것이다. 그러나 형태적으로 유사하나 73의 경우 다른 균주에 비해 생육 속도가 느리고 자실체의 색택이 진한 특성을 보여 이 계통의 경우 PCR 기법으로 분석한 결과와 유사하게 새로운 특성을 지님을 알 수 있었다 (그림 8). 추후 이들 선발 육종된 계통 중 균사 생장력이 강하고 자실체 수량이 많은 것을 선발하여 새로운 품종으로 확립할 예정이다.

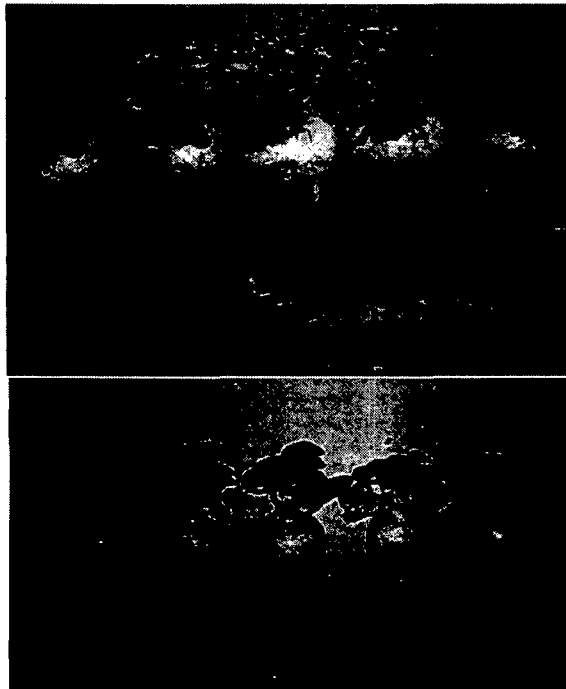


그림 8. HK-35와 원형 2호의 세포질 융합체의 자실체 형태

제 4 장 내병성 품종 선발 및 특성

제1절 서 설

느타리버섯 재배 과정중 자실체에 갈색 반점과 성숙된 자실체의 부패를 일으키는 세균성 갈반병이 문제시 되고 있으며 이 병은 느타리버섯 재배 농가의 수량 감소 뿐 만 아니라 형성된 자실체의 기형을 유발하여 상품으로써의 가치를 하락 시킨다. 따라서 느타리 세균성 갈반병에 대한 방제 대책이 시급한 문제로 대두되고 있어 우리나라의 여러 학자에 의하여 방제 대책이 논의 되고 있으나 이 병에 대한 저항성 품종 선발에 관한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구는 느타리버섯 세균성 갈반병에 대한 저항성 품종 선발을 위하여 1차적으로 생육이 양호하고 우리나라에서 재배되는 감수성 균주를 회피하여 새로운 균주를 개량 선발하고 재배 농가에서 분리된 병원성 균주에 대한 저항성 검정을 실험하고자 한다.

제2절 재료 및 방법

느타리버섯의 병해중 가장 문제시 되는 세균성 갈변병에 저항성을 지닌 느타리버섯 원균을 선발하고자 1차적으로 세균성 갈변병의 원인인 세균을 분리하여 병원성과 비병원성 균을 선발하였다. 병원 세균은 느타리버섯 재배사에서 이병자실체와 벚짚을 채취하여 King's B medium (Peptone 20g, Glycerol 15ml, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 6g, Agar 15g, D.W. 1L)에 희석평판 배양법으로 순수분리하여 fluorescent pigment 생성 여부, benzate 반응등의 세균 동정 실험을 하여 Allan과 Young(1970)의 분류체계와 비교하여 동정하고(Shin & Jeon, 1991) white line test를 통하여 *Pseudomonas tolaasii*에 대한 동정을 실시하였다. 분리된 병원균의 병원성 여부는 느타리버섯 자실체에 침 접종하여 괴저 증상을 나타내는 정도로 조사하였다. 세균성 갈변병의 수집은 1996년부터 1997년 동안 2년에 걸쳐 충북일대의 느타리버섯 농가에서 실시하였으며 병에 감염된 이병 자실체와 주변 균상을 수거하여 분리원으로 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 병원성 및 비병원성 균주의 선발

공시된 느타리버섯 품종가운데 선발된 HK-35의 병 저항성 검정을 위하여 최근에 문제 시 되고 있는 세균성 갈반병균인 *Pseudomonas tolaasii*를 충북일대 지역의 느타리버섯 재배 농가로부터 수집 분리하여 순수 분리하였다 (표 11). 그 결과 느타리버섯의 자실체로부터 분리한 세균류는 병원성 세균류로 59 균주가, 비병원성 34 균주가 각 분리되었다. 분리된 균주중 병원성을 지닌 59 균주 중 white line test 결과 49 균주가 *Pseudomonas tolaasii*로 확인되었으며 분리 지역 모두에 분포하고 있었다. 특히 이들 균주 중 침접종을 통한 병원성 실험에서 대부분의 균주 (39 균주)가 강한 병원성을 보였다. 분리 확보된 균주는 추후 선발된 느타리버섯 균주 HK-35에 병원성 실험을 실시하여 저항성 유도 반응을 검정할 계획이며 분리된 비병원성 34 균주의 경우 병원성과 대치하여 생물학적 방제원으로 이용할 계획이다.

표 11. 느타리버섯 자실체로부터 분리된 병원 및 비병원성 세균류

특징	총균주수	균주수 (병원성정도)				학명
		+++	++	+	-	
		병원성				
Brown pitting spot	49	39	5	5	-	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
Yellow spot	5	4	-	1	-	<i>P. spp.</i>
Brown spot	5	5	-	-	-	<i>P. spp.</i>
비병원성						
White line reacting	9	-	-	5	4	<i>P. reactants</i>
-	25	-	-	-	25	-

2. 선발 균주 HK-35의 세균성 갈반병에 대한 저항성

벚꽃을 이용한 균상 재배시 1주기 후 발생한 세균성 갈반병에 의한 원형 2호와 HK-35의 2주기의 생육 양상을 관찰한 결과 원형 2호는 거의 자실체가 발생하지 않았으나 선발된 HK-35 균주의 경우 그림 9에서 보는 바와 같이 건설한 자실체가 발생하였다. 이는 감염시에도 균사 생장이 활발히 이루어지고 어느 정도 병원균에 대한 저항성이 있음을 시사한다. 따라서 추후 분리된 병원 세균을 배양이 완료된 HK-35 균주의 균상에 농도별로 처리하여 균사의 형태적 관찰 및 수량성 등의 실험이 추가되어 고품질 다수성 품종으로 뿐만 아니라 세균성 갈반병균에 대한 저항성 품종으로 장려될 수 있을 것으로 기대된다.



그림 9. 느타리버섯 HK-35 균주의 폐면 균상에서 2주기 자실체 형태
화살표: 세균성 갈반병 감염 부위

제 5 장 인 용 문 헌

1. 신관철, 서건식, 박종성. 1988. *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst의 배양적 특성에 관한 연구. Res. Rep. Agri. Sci. Chungnam Nat'l Univ. 15:27-35.
2. 김한경, 박정식, 김양섭, 차동렬, 박용환. 1988. 버들송이의 균사생장 조건에 관한 연구. 농시논문집 30:141-150.
3. Garraway, M. C. and R. C. Evans. 1984. Fungal nutrition and physiology. 6. Vitamins and growth factors. Wiley interscience. 171.
4. Kang, H. W., Cho, Y. G., Go, S. J., and Eun, M. Y. June 1997. Korean patent 97-16981(in patent).
5. Kang, H. W., Y. G. Cho, and M. Y. Eun. January 1997. DNA fingerprint of rice varieties (*Oryza sativa* L.) using primers designed from repetitive sequence of Korean red rice and its application to other organisms. 5th International Conference on Plant and Animal Genome. San Diego, CA, U. S. A.
6. Konieczny. A, and F. A. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. The Plant Journal. 4: 403-410.
7. Lichfield, J. H. 1968. The production of fungi. In "Single cell protein" R. I. Mateles and S. R. Tannebaum(Ed.) p309. MIT press. Cambridge. Massachusetts and London. 15. Gray, W. D. 1966. Fungal protein for food and feeds. I. Introduction. Economic Botany. 20:89-93.
8. Lichfield, J. H. 1967. Submerged production of mushroom mycelium, p. 107-144. In H. J. Peppler(ed.), Microbial technology. Reinhold Publishing Corp., Amsterdam and London.

9. 차동렬, 유창형, 김광포. 1991. 최신펜섯재배기술. 농진회출판
10. Eger, G., Edem, G. and Wissing, E. 1976. *Pleurotus ostreatus*-Breeding potential of new cultivated mushroom. *Theor. Appl. Genet.* 47:15-163.
11. Panaud, O, X. Chen and SR McCouch. (1996) Development of microsatellite markers and characterization of single sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* 252 : 597-607
12. Pal Gyurko. 1982. Selecting new strains of the Oyster mushroom. *Mushroom J.*, 111:103-105.
13. Vos, P., R. Hoger., M. Bleeker., M. Reijans., T. V. Lee., M. Hornes., A. Frijters., J. Pot., J. Peleman., M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
14. Williams J. G. K., A. R. Kubelic., K. J. Livak., J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

제 6 장 요약

느타리버섯은 우리나라에서 재배되는 식용버섯 가운데 가장 많이 재배되는 품종이다. 그러나, 최근 각종 병해에 의하여 많은 농가에서 큰 피해를 입고 있다. 따라서, 병원균에 내성이 강한 새로운 품종과 농약을 사용하지 않는 새로운 재배방법이 필요하다. 또한 종균의 안정성 및 균일성을 위하여 생육이 안정되고 빠른 품종이 요구되고 있다.

본 연구는 느타리버섯의 무농약 신 재배기술 확립을 위하여 기초 실험을 실시한 결과 증온성으로 생산성이 높은 품종 HK-35 균주를 선발하였다. 또한, 내병원성 품종과 질이 좋은 버섯으로 개량하기 위하여 단핵체를 선발하여 그들의 유전적 다양성을 PCR 기법을 통하여 구명하였다. 선발된 HK-35 균주의 경우 기존의 재배 품종과는 다른 유전적 다양성을 보이는 고유 품종이었다. 병재배 및 균상재배를 통한 HK-35의 특성을 분석한 결과 대조구들보다 고품질 다수성 품종이었다.