

최 중
연구보고서

유용 버섯자원의 발굴과 대량 재배기술 개발

The screening of some beneficial mushrooms and
development of their large cultivation techniques

연구기관

동국대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유용버섯 자원의 발굴과 대량 재배기술 개발” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

2000. 11.

주관연구기관명 : 동 국 대 학 교
총괄연구책임자 : 이 민 옥
연 구 원 : 심 재 옥
연 구 원 : 이 태 수
연 구 원 : 이 윤 수
연 구 원 : 손 서 규

협동연구기관명 : 한국교원대학교
협동연구책임자 : 이 상 선
연 구 원 : 김 미 혜
연 구 원 : 오 창 호
연 구 원 : 정 홍 채
연 구 원 : 홍 성 훈

최 종 보 고 서

1997년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 유용버섯자원의 발굴과 대량 재배기술개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 11. 30.

주관연구기관 : 동 국 대 학 교

총괄연구책임자 : 이 민 응 (인)

주관연구기관장 :

농 립 부 장 관 귀 하

요 약 문

I. 제목

유용 버섯자원의 발굴과 대량재배기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

오늘날 세계 각국은 농산물의 수출입이 자유로운 체제하에 있으므로 자국의 농산물 보호를 위해 국가간에 심각한 문제를 초래하기도 하는데, 자원이 빈약하거나 기술현황이 미비한 국가는 그 심각성이 더하다고 하겠다. 우리나라도 농산물 특히, 수입에 의존하는 특정 임산물의 경우, 그 사정이 더욱 심각하다고 본다. 본 연구자들은 이러한 문제를 해결하기 위한 수단으로서 수입하여 한약제로 쓰이는 지령의 수입대체효과를 이룩하고, 또한 수요량이 증가하는 버섯류의 수요를 충족시키기 위해 연구하고자 하며, 특히 검은비늘버섯에 관해 연구함으로써 경쟁력 있는 산물을 개발하고자 하였다.

본 연구에서 연구된 공시 균종으로는 지령(*Grifola umbellata*)과 검은비늘버섯(*Poliota adiposa*)을 선정, 공시하고 이들 균종의 배양적, 형태적, 유전적 및 인공재배법과 날로 늘어나는 농가폐자원의 활용화 방안을 집중 실험하였고, 지령의 관핵생산과 검은비늘버섯이 식용 및 의약품의 용도로 개발이 가능한지에 대하여 실험하였다.

이 연구의 성과가 유용생물자원 확보로 이어지게 할 수 있도록 하고, 더 나아가 경쟁력을 갖춘 농산물의 개발로 수입대체 효과를 거둘 수 있고 물질

특히 확보로 지적 소유권을 획득하는 기초자료를 얻고자 실험하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

저령은 우리나라에 자생 분포하지 않아 약용으로 쓰이는 저령의 균핵 전량을 수입에 의존하고 있으며 연간 소비량이 금액으로 백만달러를 넘는 것으로 다량 소비되는 실정이고, 검은비늘버섯은 다량으로 폐기되는 밤껍질과 같은 농가부산물을 이용하는 기술적용이 요구된다. 특히, 농산물의 가격 안정과 안정 공급이라는 문제가 있으므로 저령 및 검은비늘버섯의 인공재배법 개발은 약용 및 식용버섯류의 안정생산과 발국성과가 이루어져 특정 농산물에 대한 가격안정을 꾀하고, 더 나아가 수입대체효과를 거두며 의학적 기여가 클 것으로 생각하여 이를 연구목적으로 한다.

즉 본 연구에서는 아래와 같이 연구항목을 설정하였다.

1. 저령의 생산지 환경을 고려한 인공재배 조건을 설정하므로 국내 배양 환경 특성을 알아내도록 하고 수율 향상을 위한 조건 연구로 대량생산의 기반을 확립한다.
2. 검은비늘버섯은 농가 폐부산물을 이용하는 배양법과 원목에 의한 생산 조건을 밝힌다.
3. 공시버섯종에 대한 배양조건을 알고 적합한 이용 기질의 종류를 규명한다.
4. 저령균의 공생성 확인과 우수한 공생 균종의 균주를 찾는다.
5. 공시버섯종의 유전 특성 확인과 육종을 시도한다.

6. 저령 및 검은비늘버섯의 유용물질 성분을 규명하고, 이 성분 물질의 약리 및 생리기능성을 밝혀 의약품으로의 실용화 가능성을 확인하고자 함.
7. 저령 균핵의 인공 생산 기법과 검은비늘버섯의 사실체 생산을 최종 목표로 한다.

이러한 일련의 연구로서 유용버섯의 안정 생산과 적기 공급은 물론 유용자원의 확보에 따른 불건 특허와 지적소유권의 확보가 가능할 것으로 전망함.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 공시권 확보

저령의 균종은 *Grifola umbellata* GUA, *G. umbellata* GUB, *G. umbellata* GUC, *G. umbellata* GUE, *G. umbellata* GUF, *G. umbellata* GUS, *G. umbellata* GUT 등 총 7개의 균주를 확보하였고, 이들 균주중 *G. umbellata* GUA, *G. umbellata* GUB, *G. umbellata* GUC, *G. umbellata* GUF *G. umbellata* GUS, *G. umbellata* GUT 균주를 선별하여 실험에 공시하였다.

검은비늘버섯은 확보한 총 20균주들로 *Poliota adiposa* P1, *P. adiposa* P2, *P. adiposa* P3, *P. adiposa* P4, *P. adiposa* P5, *P. adiposa* P6, *P. adiposa* P7, *P. adiposa* P8, *P. adiposa* P9, *P. adiposa* P10, *P. adiposa* P11, *P. adiposa* P12, *P. adiposa* P13, *P. adiposa* P14, *P. adiposa* P15, *P. adiposa* P16, *P. adiposa* P17, *P. adiposa* P18, *P. adiposa* P19 및 *P. adiposa* P20 이었고 이중 중, *P. adiposa*의 P1, P4 및 P6 균주를 선별하여 실험에 공시하였다. 따라서 이 연구를 수행하여 저령과 검은비늘버섯의 버섯균종 유전

자원을 확보하게 되었다.

2. 균사체 배양을 위한 배양 조건

공시된 저령균주의 균사체 배양을 위한 배지환경의 최적 조건으로 온도는 18℃였고, pH는 4~4.5가 가장 적합하였다. 영양원 선발에서 탄소원은 maltose, 무기질소원은 sodium nitrate, 유기질소원으로 soytone이 균사생장에 가장 좋았다. 무기인산원으로 sodium phosphate가 가장 좋았다. 그러나 비타민과 아미노산은 균사생장에 특별한 영향을 주지 못했다.

저령의 균사체 배양을 위한 최적 배지를 합성하였으며, 이를 KKL배지라 하고 이 조성은 Fructose 20g, maltose 10g, soytone 3g, peptone 3g, NaH₂PO₄ 1g, NaNO₃ 1g, MgSO₄ 0.5g이며, 이 배지는 다른 복합배지에 비해 1.5배의 균사체 성장 증가를 보였다. KKL 배지로 명명된 저령배양 배지는 앞으로 필요 연구자에 따라 저령의 균사체의 대량 배양에 활용 할 수 있다.

3. 야외접종을 위한 공시 버섯 종의 균주선발 및 배양 특성

저령을 톱밥배지에 접종하여 생육을 비교한 결과 단풍나무와 굴참나무 톱밥배지에서 생육이 우수하였다.

검은비늘버섯은 자실체형성이 우수한 품종을 육종하기 위해 단포자를 분리하여 mating 실험을 한 결과 dikaryon이 monokaryon보다 균사생장과 자실체 형성에서 우수하였고, 우수 균주로 *P. adiposa* PA1-32와 PA1-37 균주를 선발하였다.

4. 공시한 균종의 육종 및 유전적 특성

분양받은 저령 균주들간의 유전적 유연관계와 저령균핵에서 분리한 균주 GUS와 생저령균핵을 재료로한 균체와의 유전적 유연관계를 실험한 결과, PCR-RAPD에서는 *G. umbellata*의 GUA, GUB, GUC, GUF, GUS 균주들이 균핵을 재료로한 균체에서 band pattern이 유사함을 나타내었으며 ITS sequencing 결과, 저령의 ITS1-5.8S-ITS 2 영역의 길이는 586~610 bases 였고, 개통도를 그려 보았을 때 GUT 균주는 저령의 균핵과 상당히 거리가 있어 달랐고 특히, GUE 균주는 저령과 전혀 다른 균주로 밝혀졌다. 생저령의 균핵과 가장 유사한 분리균주는 *G. umbellata* GUC 균주로 97.5%의 유사도를 나타내었다. 본 실험으로 생저령의 균핵에서 분리한 균주의 유전적으로 동일한 2개의 균주를 확보할 수 있었다.

검은비늘버섯의 경우 RAPD를 통해 동일 속내 서로 다른 종들과 다른 속간의 버섯들과 유전적 유연관계를 조사하였으며, primer OPD-18에서 *Pholiota* 속의 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다.

제집지가 다른 검은비늘버섯을 이용하여 검은비늘버섯의 육종에 대한 기초 자료로 교배형을 조사하였다. 검은비늘버섯의 교배형에서 Bipolar system이 발견되었다. 지역간의 분리된 단포자로 교배시킨 것을 현미경관찰을 통하여 꺾쇠 연결(clamp connection)이 관찰되었으며, 이는 또한 톱밥 배지에 넣어서 자실체 생성을 확인하였다. 그 결과 지역 간 다른 검은비늘버섯은 유전적으로 혹은 교배형으로 다르고, 교배되어서 자실체를 형성하는 것으로 계속적인 실험이 필요한 것으로 여겨진다.

5. 형태학적인 특징

저령은 뽕나무버섯(*Amellaria mellea*)과 공생관계를 가지는 것으로 알려져 톱밥배양에서 자란 저령의 균핵 유사체에 뽕나무버섯의 균사속이 접근되면 저령의 균사생장이 촉진됨을 확인하였다. 또한 전자현미경하에서 저령과 뽕나무버섯의 세포간 접촉이 뚜렷이 관찰되었고, 저령균핵 내부로 침입한 뽕나무버섯의 균사속 내부에서 저령이 형성하는 결정체들을 관찰할 수 있었다.

6. 생리적 특성

저령과 뽕나무버섯의 공생성에 관한 특성을 밝히기 위해 2 균종에 대한 CMCase, β -glucosidase, chitinase, Xylanase, α -amylase 등 5가지 효소 활성도를 측정된 결과, extra cellular enzyme의 경우 저령은 β -glucosidase, CMCase, Chitinase가 4배정도 높았으며, intra cellular enzyme의 경우, 저령은 뽕나무버섯에 비해 CMCase, β -glucosidase, chitinase, Xylanase, α -amylase 전부가 4배정도 높았다.

7. 저령의 균핵 추출물의 동정

저령균핵의 성분을 에탄올로 처리하여 추출하고 다시 헥센, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 부탄올을 이용하여 4개의 분획으로 나누었으며, 열수 추출물은 알콜에 석침하고, 알코올 추출물로 부터 5개의 물질을 분리 하였으며, 이것들은 각각 adenosine, uridine, uracil, ergosta-4, 6, 8(14), 22-tetra-3-one, ergosta-5, 7, 22-triene-3 β -ol로 동정하였다.

위 화합물은 항암 세포 발달에 대한 억제능력이 있으므로 앞으로 식품 및 의약품 등에 활용할 수 있다.

8. 동물세포에 미치는 영향

동물세포에 미치는 영향 및 효과로는 알코올 조추출물과 각 분획, 그리고 단리된 ergosterol 물질을 이용하여 자궁암(HeLa S3) 및 유방암(MCF-7) 세포에 활성을 확인하였다. 열수 추출하여 얻어 정제한 다량의 동물세포에 대한 활성은 위암(KATOIII), 단핵백혈병(K-562), 두경부암(HTB-120), 간암세포(Hep-G2), 자궁암(HcLa)에 각각 실험하였다.

알코올 추출물의 경우 ergosterol 물질의 활성인 IC₅₀ 값이 10 μ g 이하로 높은 활성을 나타내었으며 열수 추출물의 경우 위암(KATOIII) 250 μ g, 단핵백혈병(K-562) 250 μ g, 두경부암(HTB-120) 62.5 μ g, 간암세포(Hep-G2) 125 μ g 및 자궁암(HcLa) 500 μ g, 농도에서 암세포 50% 억제율을 보였다.

간암세포와 위암세포의 경우 최고 억제율이 각각 80%, 75%의 억제율을 보였으며, 면역조절능에 대한 실험에서는 15.8~62.5 μ g에서 다소 면역세포를 증가시켰으나 현저한 증식은 보이지 않았다. 복수암의 경우 22%가량 억제됨을 확인하였고 고형암의 경우 36%가 억제되는 것을 확인하였다.

이로서 지령 추출 성분은 항암에 관련되는 세포의 발달을 억제하는 능력을 확인 하였고 식품 및 의약품에 첨가제로 활용 할 수 있으리라고 전망한다.

9. 농가 부산물을 이용한 버섯재배

농가부산물을 이용한 유용버섯의 재배 실험에서 밤껍질의 외피보다 내피를

이용한 배지에서 느타리와 노루궁뎅이의 균사생장도 우수할 뿐만 아니라 자실체의 형성도 좋았다.

10. 저령균핵의 생산기법

저령균주에 따른 균핵체의 인공형성 유도를 실험하였다. *G. umbellata* GUS 균주를 톱밥 : 미강 : 톱밀 = 6 : 3 : 1로 혼합한 배지에 2개월 간 20℃에서 배양하여 저령의 균사체를 완전히 배양시킨 다음, 뽕나무버섯균을 접종 배양시킨 30×100(지름×길이)cm 단목에 지름 1cm 의 구멍을 뚫어 저령의 균사가 자란 톱밥을 접종하여 토양에 매몰하였다. 1년 후에 저령균의 균사발달 및 균핵 형성 유무 등을 관찰하였으나, 균사발달 및 균핵형성은 되지 않았다.

단풍나무가지와 참나무가지를 2×10(지름×길이)cm로 잘라 증기감압멸균한 뒤 여기에 뽕나무버섯 균주(AM666, AM777)을 접종하여 6주간 배양하여 균사속을 잘 발달시켜 접종용으로 준비하고 여기에 저령의 종핵은 생균핵을 2~5×2~5cm 의 크기로 절단하여 종핵으로 하였다. 접종은 성장 중에 있는 참나무와 단풍나무 뿌리 주변 땅속을 파고 준비된 뽕나무버섯 균사속이 발달한 접종원 나무가지와 저령을 뿌리에 부착 접종하였다. 접종부는 20cm의 토양과 5cm의 낙엽을 피복하여 매몰하였다. 1년 후에 균사체 발달과 균핵형성을 관찰한 결과, 접종한 단목 뿐만 아니라 참나무와 단풍나무의 살아있는 뿌리조직에서 2~4×10~35(길이×두께)cm 크기의 균핵이 형성되었다.

그러나 소나무의 뿌리 주변에 매몰한 저령에서는 새로운 균핵형성이 관찰되지 않았다.

대조구로서 톱밥배양에서 얻은 저령의 균핵유사체 덩어리를 접종원으로 처리한 접종구에서는 톱밥은 부패하고 균핵형성이나 균사체발달은 관찰할 수가 없었다. 이 실험으로 톱밥에서 형성된 균핵유사체는 저령의 균핵 생산을 위한 접종원으로서는 적합하지 못하였다.

저령의 균핵을 접종원으로 한 생산법은 아직 국내에 보고되지 않은 약용버섯 재배법의 하나이며, 이 결과를 농촌에 보급할 경우, 농가의 특용작물 재배법의 하나로 장려하므로 인한 고소득의 부가가치를 높이는 실용화 방안으로 활용할 수 있다.

이 실험으로 저령의 균핵 생산은 배양기술의 향상과 개선으로 저령의 생산기간을 3년에서 1년으로 단축시킬 수 있다고 판단되며, 검은비늘버섯의 실제 생산은 일반적인 재배법 뿐만 아니라 농가의 폐 부산물도 이용이 가능하다는 것이 큰 결과라 하겠다. 특히 아직 우리나라에서는 발견된 적이 없는 저령의 균핵을 인공생산화하는 기법개발을 창안하게 됨을 보고합니다.

V. 활용방안

1. 저령의 균핵형성에 관한 보완연구로 실제 농가에 저령 균핵 생산법 기술 보급이 가능해 진.
2. 저령의 액체배양 기술의 진보로 균사체 대량생산이 가능하고, 또한 저령 균핵유사체의 생산기술 개발로 농가보급을 가능케 함.
3. 저령 추출물에 대한 화학구조 성분규명이 되어 생리 및 약리적 특성이 밝

혀지게 되고, 이는 식·의약품 재료로서 가치를 제고할 수 있음.

4. 검은비늘버섯 재배에 농가 폐부산물 이용기술개발로 농가부산물처리 효과가 있다.
5. 저령과 검은비늘버섯의 유전자적 특성 규명으로 이를 지적 소유권화 할 수 있다.
6. 경제적 활용성이 높은 균류자원으로 활용 가능성이 높아졌다.
7. 저령 및 검은비늘버섯의 인공재배 기술을 첨단 영농기술 방법에 하나로 활용하여 농촌의 소득증대를 도모하며, 개발된 기술을 농가에 보급하여 농촌 경제의 향상을 기한다.
9. 버섯 유전자원의 확보로 자원개발의 기초자료로 활용토록 한다.
10. 공시버섯종에 대한 유용물질의 계속 탐구는식품 및 의약적 효능을 검증하고, 균사체의 산업적 이용과 활용에 관한 방안을 창출하게 된다.

Summary

Nowadays we are under the WTO system for the trade in export and import of agricultural products, many countries are often facing some difficult in managing such an agricultural products for their uses or handling the prices in their internal market, especially the country which are far behind in technique and poor in natural resources.

Since we have imported a lot of agricultural products from foreign countries for purposes of food and medicinal use, our country are also faced with a position to solve some troubles of trade.

We are trying to solve such a serious and difficult problems for the farmer or consumer in our nation by developing a new technique and finding new methods for production such an agricultural materials by ourselves to cope with the importation such an agricultural products.

To substitute an increase import of herbal medicines and induce mass production capable of corresponding to the demand of many users, we have carried out some researches based on the *Grifola umbellata* and *Poliota adiposa*, as edible fungi. Especially we researched on the production of sclerotium of *Grifola umbellata* in artificial ways using tree trunk or wood log and also try to produce fruiting body of *P. adiposa* with various waste agricultural by-products such as peel of galic, saw

dust and peel of chestnut

Our research will promote and enhance income of farmers by applying new technique and methods in production such a fungal sclerotium and fruiting body by artificial ways. This new finding will contribute economic growth in part and also make a nation in competitiveness in world market.

We investigated a cultural characteristics, morphological features through microscope, physiological properties, genetical specialty and artificial methods of production of sclerotium and fruit body of *G. umbellata* and *P. adiposa*. The goal of this experiments will make profitable to farmer, obtain a useful resources of biological specimens, and finally pursue to gain a patent of fungal specimens. The results obtained are as follows;

1. Fungal isolates used in this study

We selected seven strains such as *G. umbellata* GUA, *G. umbellata* GUB, *G. umbellata* GUC, *G. umbellata* GUE, *G. umbellata* GUF, *G. umbellata* GUS, and *G. umbellata* GUT. Among them, *G. umbellata* GUA, *G. umbellata* GUB, *G. umbellata* GUC, *G. umbellata* GUF, *G. umbellata* GUS and *G. umbellata* GUT were used in this study. Also, we selected twenty strains such as *P. adiposa* P1, *P. adiposa* P2, *P. adiposa* P3, *P. adiposa* P4, *P. adiposa* P5, *P. adiposa* P6, *P. adiposa* P7, *P. adiposa* P8,

P. adiposa P9, *P. adiposa* P10, *P. adiposa* P11, *P. adiposa* P12, *P. adiposa* P13, *P. adiposa* P14, *P. adiposa* P15, *P. adiposa* P16, *P. adiposa* P17, *P. adiposa* P18, *P. adiposa* P19, and *P. adiposa* P20. Among them, *P. adiposa* P1, *P. adiposa* P4 and *P. adiposa* P6 were used in this study. All of tested fungal isolates were kept as good gene resources of fungal species.

2. Cultural characteristics

The optimum temperature and pH for mycelial culture of *G. umbellata* were 18°C and 4.0~4.5, respectively. In the selection of optimal nutrients to mycelial growth, inorganic nitrogen source screened sodium nitrate and organic nitrogen source was soytone. Sodium phosphate was good in growth factor of tested fungi. But tested amino acid and vitamins were poor nutrient factor for mycelial growth. Based on these results, we made a synthetic new optimal medium for mycelial growth *G. umbellata*, named KKL medium. The composition of KKL medium was as follows; 20g Fructose, 10g Maltose, 3g Soytone, 3g Peptone, 1g NaH₂PO₄, 1g NaNO₃, 0.5g MgSO₄.

This new complex medium was superior effect on the mycelial growth of *G. umbellata* than other known complex medium as 1.5 times.

3. Culture and Breeding of useful mushrooms

As a result of mycelial growth of *G. umbellata* among sawdusts, oriental oak tree(*Quercus variabilis*) and maple tree(*Acer palmatum*) were most effective on the growth of *G. umbellata*.

New breeding line of *Poliota adiposa* by mating technique was superior to produce basidiocarp, especially the dikaryon of *P. adiposa* was superior effect on the basidiocarp production than monokaryon. The excellent two strains were selected as PA1-32 and PA1-3.

4. Genetic characteristics of useful mushrooms

Investigation of the genetic relationship among the tested organisms of *G. umbellata*, GUA, GUB, GUC, GUF, GUS and sclerotium of *G. umbellata* showed similar characteristics in band pattern by PCR-RAPD. Also, at the result of ITS sequencing, the length of ITS1-5.8S-ITS2 region of *G. umbellata* was 586~610 bases. *G. umbellata* GUT strain showed a far distance of genetic relationship with other strains of *G. umbellata* in the phylogenetic tree. Especially, GUE strain had no relationship with *G. umbellata* in specificity. The most closed strain in the genetic relationship with sclerotium of *G. umbellata* obtained in field was GUC strain. It's genetic similarity matrix was 97.5%. As a result of this study, we insured two isolates similar to sclerotium of *G. umbellata* genetically.

The basic informations for mating types of basidiospore were investigated from the basidiocarps and mycelia collected from the different sites. Two

kinds of mating system, bipolar and tetrapolar system, were observed from the basidiospores originated from the different areas. The bipolar system observed from basidiospores collected from Mt. Wol-Ak was different from tetrapolar system from Mt. Sok Ri in Korea. The matings made in this work were confirmed by both microscopic observations of clamp connection and formations of basidocarp in sawdust media. The different polymorphism of PCR-RAPD by using seven primers was not obtained between different mating types or among the dikaryotic mycelia, but few common bands sized 1.5 to 2.5 kbps were found in the mycelia of *Pholiota* species

5. Morphological characteristics

G. umbellata was known to have the symbiotic relationship with *Armillaria mellea*. We confirmed that the mycelial growth of sclerotium like structure(pseudo-sclerotium) was accelerated it's growth in the contact with rhizomorph of *A. mellea*. Morphological feature in cell to cell contact between *G. umbellata* and *A. mellea* was observed by scanning electron microscope. We proved the crystals presence in the inner region of the sclerotium of *G. umbellata* invaded by rhizomorph of *A. mellea*.

6. Physiological characteristics

For the investigation of the characteristics of a symbiotic relationship

between *G. umbellata* and *A. mellea*, we tested the enzyme activity of *G. umbellata* and *A. mellea*, such as CMCCase, β -glucanase, chitinase, Xylanase and α -amylase.

In case of extra cellular enzymes, CMCCase, β -glucanase and chitinase of *G. umbellata* were 4 times higher than those of *A. mellea*. Also, in case of intra cellular enzymes, all of CMCCase, β -glucanase, chitinase, Xylanase and α -amylase of *G. umbellata* were 4 times higher than those of *A. mellea*.

7. Bio-activity of extracts of sclerotium of *G. umbellata*

Extracts were sampled from sclerotium of *G. umbellata* by EtOH and hot water. The extracted substance was separated into four fractions by four solvents such as Hexane, Ethylacetate, Dichloromethane and n-Butyl alcohol and then we purified five compounds. Five compounds were identified such as adenosine, uridine, uracil, ergosta-4,6,8(14)22-tetra-3-one and ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol, respectively.

We tested the bio-activity of EtOH-extracts of the sclerotium of *G. umbellata* against the hystero carcinoma(HeLa S3) and the mamma cancer(MCF-7). Extract was obtained from hot water-extracts in against the stomach cancer(KATO III), the mononuclear-leukemia(K-562), the derencephalus cancer(HTB-120) and the hepatocarcinima cell(Hep-G2) and the hystero carcinoma(HeLa S3), respectively.

The bio-activity of EtOH-extract showed high activity that IC₅₀ value was under 10 μ g, and also, of hot-water extracts showed 50% inhibition rate of against each cancer cell in the concentration of 250 μ g, 250 μ g, 62.5 μ g, 125 μ g and 500 μ g, respectively.

Especially, In case of the stomach cancer(KATO III) and the hepatocarcinima cell(Hep-G2), the inhibition rates of the EtOH-extract and hot-water extracts were 80% and 75%, respectively. Also, each extract showed immuno-activity in the range of 15.8~62.5 μ g as the aspect of an increase of the number of immune cells.

Also, we confirmed that each extract of inhibition rate of ascitic tumor and solid tumor was about 22% and 36%, respectively.

8. Artificial production of sclerotium of *G. umbellata*

In observation of sclerotial induction and production, *G. umbellata* GUS was incubated at 20°C for 2 months on sawdust media (sawdust : rice bran : wheat bran : wheat = 6 : 2 : 2 : 1) and its mycelial mass was fully grown. And then, the mycelial mass of *G. umbellata* was inoculated into the wood log well developed rhizomorph of *A. mellea* sized 30×100cm(diameter×length). And then, we buried the wood log tested with two fungal species under ground beneath 20cm from above ground level. After one year, we investigated whether the development of mycelial mass and existence of sclerotial formation or not observed them.

Another ways of inoculation, Well developed rhizomorph of *A. mellea* on the branch of maple and oak tree of size of 2×10cm(diameter×length) used as for inoculum. We piled and buried together the branch well developed rhizomorph of *A. mellea* and natural sclerotium of *G. umbellata* sectioned the size of 2~5×2~5cm in depth of 25cm of the rhizosphere of maple and oak tree, and then, treated wood logs and inoculum under 20cm depth soil with covered fallen leaves of 5cm depth.

After 1 year, the sclerotium of *G. umbellata* was newly formed not only the branch of maple and oak tree but also on the root of maple and oak tree. But the sclerotium of *G. umbellata* was not developed in the burying site of under the rhizosphere of *Pinus densiflora*. Also, in the control site treated the sclerotia like structure fully grown on the saw dust media as inocular source, the development of sclerotium of *G. umbellata* was not observed.

On the basis of this study, the sclerotia like structure fully grown on the saw dust media as inocular source was not suitable for artificial production of sclerotium of *G. umbellata*.

9. Cultivation of useful mushrooms using agricultural by-product

The cheaper and high quality media are necessary to produce the useful mushroom. we used the peel of chestnut for cultivation of *Pleurotus*

ostreatus and *Hericeum erinacium*. The inner nutshell of chestnut showed superior effects on the mycelial growth and basidiocarp formation of *P. ostreatus* and *H. erinacium* than outer nutshell of that.

In this study, we improved the method of artificial cultivation of sclerotium of *G. umbellata*, and possibly shortened the period of artificial cultivation from 3 years into 1 year.

We want to report the new finding of techniques and methods for artificial production of sclerotium of *G. umbellata* and production of fruiting body of *P. adiposa*.

Contents

Chapter 1. General introduction	32
Section 1. Necessity of research development	32
Section 2. Contents and purpose of research development	37
Section 3. Strategy and method	40
Section 4. System of research development	42
Section 5. Expectants	43
Section 6. Practical device	44
Section 7. Next step after in achievement of research	44
Chapter 2. Cultural condition and medium for cultivation of <i>Grifola</i> <i>umbellata</i>	46
Section 1. Introduction	46
Section 2. Materials and Methods	47
1. Fungal isolates used in this study	47
2. Materials and Methods	48
Section 3. Results and Discussion	49
1. Temperature and pH	49
2. Nutrition source	51
3. Characteristics of complex medium	54
References	58

Chapter 3. Breeding of <i>Poliota adiposa</i>	62
Section 1. Introduction	62
Section 2. Materials and Methods	63
1. Fungal isolates	63
2. Isolation of single spore	63
3. Mating type for breeding	64
Section 3. Results and Discussion	64
1. Isolation of single spore	64
2. Mating type for breeding	67
References	71
Chater 4. Genetic characteristics of tested fungal isolates	75
Section 1. Introduction	75
Section 2. Materials and Methods	78
1. Genetic relationship of <i>G. umbellata</i> strains by PCR-RAPD	78
2. Genetic relationship of <i>P. adiposa</i> by PCR-RAPD	81
3. Genetic relationship of <i>P. adiposa</i> breded	83
4. Genetic relationship of <i>G. umbellata</i> strains by ITS sequencing	86
Section 3. Results and Discussion	90
1. Genetic relationship of <i>G. umbellata</i> by RAPD	90
2. Genetic relationship of <i>P. adiposa</i>	95
3. Genetic relationship of Breded <i>P. adiposa</i>	100

4. Genetic relationship of <i>G. umbellata</i> strains by ITS sequencing	108
References	117
Chapter 5. Symbiotic relationship between <i>G. umbellata</i> and <i>Armillaria mellea</i>	
<i>Armillaria mellea</i>	121
Section 1. Introduction	121
Section 2. Materials and Methods	122
1. Histological characteristics of sclerotium of <i>G. umbellata</i>	122
2. Symbiotic relationship between <i>G. umbellata</i> and <i>A. mellea</i>	123
Section 3. Results and Discussion	124
1. Histological characteristics of sclerotium of <i>G. umbellata</i>	124
2. Symbiotic relationship between <i>G. umbellata</i> and <i>A. mellea</i>	130
Chapter 6. Enzyme assay of tested fungal isolates	
Section 1. Introduction	143
Section 2. Materials and Methods	143
Section 3. Results and Discussion	146
References	149
Chapter 7. Analysis of extracts and biological activity of Sclerotium of <i>G. umbellata</i>	
of <i>G. umbellata</i>	152

Section 1. Introduction	152
Section 2. Materials and Methods	152
1. Purification and analysis of extracts	153
2. Biological activity of extracts of sclerotium of <i>G. umbellata</i>	153
Section 3. Results and Discussion	156
1. Purification and analysis of compound of extracts	156
2. Bio-activity of extracts of sclerotium of <i>G. umbellata</i>	168
References	177
Chapter 8. New substrate for tested fungi with by-products of agriculture	180
Section 1. Introduction	180
Section 2. Materials and Methods	182
1. Fungal isolates	182
2. Media	182
3. Formation of fruiting body	183
Section 3. Results and Discussion	184
1. Culture of various mushrooms	184
2. Cultivation on the chestnut peal	187
3. Cultivation with complexed chestnut peal	188
Section 4. Discussion	193
References	195

Chapter 9. Artificial production of tested fungal species	199
Section 1. Introduction	199
Section 2. Materials and Methods	201
1. Artificial production	201
A. Fungal isolate	201
B. Induction of seed sclerotium of <i>G. umbellata</i> by <i>in vitro</i>	201
C. Sclerotium production by field test	205
2. Artificial Cultivation of <i>P. adiposa</i>	210
A. Fungal isolates	210
B. Induction of fruiting body using a sawdust media	210
Section 3. Results and Discussion	211
1. Artificial production of sclerotium of <i>G. umbellata</i>	211
2. Artificial production of fruit-body of <i>P. adiposa</i>	219
References	222

목 차

제 1 장 총 론	32
제 1 절 연구개발의 필요성	32
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	37
제 3 절 추진전략 및 방법	40
제 4 절 연구개발 추진체계	42
제 5 절 기대효과	43
제 6 절 활용방안	44
제 7 절 연구개발성공시 다음 단계 조치사항	44
제 2 장 저령의 배양조건과 배양용 배지개발	46
제 1 절 서론	46
제 2 절 재료 및 방법	47
1. 공시균종	47
2. 재료 및 방법	48
제 3 절 결과 및 고찰	49
1. 온도 및 pH에 의한 조건	49
2. 영양원에 의한 조건	49
3. 합성배지의 제조 및 특징	51
참고문헌	55

제 3 장 검은비늘버섯의 육종	58
제 1 절 서론	58
제 2 절 재료 및 방법	59
1. 공시균	59
2. 단포자 분리	59
3. 육종을 위한 교배형	60
제 3 절 결과 및 고찰	60
1. 단포자 분리	60
2. 육종을 위한 교배형	63
참고문헌	67
제 4 장 공시버섯균의 유전적 특징	71
제 1 절 서론	71
제 2 절 재료 및 방법	43
1. 저령 균주별 PCR-RAPD를 통한 유전적 유연관계	43
2. PCR-RAPD를 통한 검은비늘버섯의 유전적 유연관계	46
3. 육종된 검은비늘버섯 (<i>Pholiota adiposa</i>)균의 유전적 유연관계	48
4. 저령 균주별 ITS 영역을 이용한 유전적 유연관계	51
제 3 절 결과 및 고찰	55

1. RAPD를 이용한 저령의 종내 유전적 유연관계	55
2. 검은비늘버섯의 종내 유전적 유연관계	60
3. 육종된 검은비늘버섯 (<i>Pholiota adiposa</i>)균의 유전적 유연관계	65
4. ITS 영역을 이용한 저령의 유전적 유연관계	73
참고문헌	82
제 5 장 저령과 뽕나무버섯과의 공생관계	86
제 1 절 서론	86
제 2 절 재료 및 방법	87
1. 저령균핵의 조직학적 특성 조사	87
2. 저령과 뽕나무버섯과의 공생관계	88
제 3 절 결과 및 고찰	89
1. 저령균핵의 조직학적 특성	89
2. 저령과 뽕나무버섯과의 공생관계	95
제 6 장 공시균종의 효소적 특성	108
제 1 절 서론	108
제 2 절 재료 및 방법	108
제 4 절 결과 및 고찰	111

참고문헌	114
제 7 장 저령의 추출성분분석 및 생리활성	117
제 1 절 서 론	117
제 2 절 재료 및 방법	117
1. 추출성분정제 및 분석	118
2. 생물학적 활성	118
제 3 절 결과 및 고찰	121
1. 추출성분의 정제 및 분석	121
2. 생물학적 활성	132
참고문헌	141
제 8 장 농가 폐부산물의 이용성 실험	144
제 1 절 서 론	144
제 2 절 재료 및 방법	146
1. 공시균	146
2. 배지	146
3. 발이	147
제 3 절 결과 및 고찰	148
1. 다양한 버섯 균종의 배양	148

2. 밥껍질에 재배	151
3. 밥껍질과 혼합 배양	151
제 4 절 고 찰	157
참 고 문 헌	159
제 9 장 공시버섯종의 인공생산	163
제 1 절 서 문	163
제 2 절 재 료 및 방 법	165
1. 저령의 인공생산	165
가. 사용균주	165
나. 기내배양을 통한 종핵형성유도	165
다. 야외 접종에 의한 균핵생산	169
2. 검은비늘버섯의 인공생산	174
가. 공시균	174
나. 톱밥배지를 이용한 자실체 형성유도	174
제 3 절 결 과 및 고 찰	175
1. 저령의 인공생산	175
2. 검은비늘버섯의 인공생산	183
참고문헌	186

제 1 장 총론

제 1 절 연구개발의 필요성

세계 자유무역체제(WTO)의 영향으로 무역질서가 재편되어 자원과 기술이 부족한 나라는 받는 충격이 크고, 특히 농산물의 안정생산과 수급에 큰 문제를 제기하고 있다. 우리 나라도 이러한 영향을 받아 농민에 대한 정책적 지원 및 수익성이 보장된 특용작물의 발굴과 개발이 시급해지는 상황에 처하고 있다. 특히 중국을 비롯한 아시아 국가들의 값싼 농산물의 대량유입은 농민의 생활을 직접적으로 위협하고 있어 문제화 되고있는 실정이다. 더욱이 식품·의약용으로 쓰이는 버섯자원의 발굴과 보존 활용에 관한 기초 및 응용연구는 중요하다.

천연자원의 하나로 알려진 버섯은 세계적으로 현재 3,000여종이 알려져 있고, 우리 나라에도 900여종이 채집 분류되고 있다. 이중 식용 가능한 버섯은 300여종에 이르고 약용버섯도 100여종으로 보고되고 있다. 이와 같이 버섯 자원은 필요에 따라 식용뿐만 아니라 의약품으로서 이용화 방안도 시도되어 이들을 채집하고 동정하여 유용유전자원으로써 이용 가능성을 연구하며 활용 가능성이 큰 일부 야생버섯은 필요성에 따라 인공재배를 서두르고 있다.

최근 생활수준이 향상되면서 난치병의 종류가 많아지고 또한 발생빈도도 증가하는 경향을 보임에 따라 이들 질병의 퇴치를 위해 널리 쓰였던 합성의약품의 사용 한계점을 보이고 있다. 이를 극복하기 위해 자연산 버섯을 재료로 신물질 발굴을 시도하고, 난치병 치료목적에 대한 새로운 방법의 창안

과 개발에 박차를 가하고 있다.

최근 영지버섯이나 상황버섯류의 성분을 이용하면 혈압조정, 정혈작용, 감당 작용, 천식 또 알러지의 억제, 면역증진 및 항암 등의 효과가 있다고 알려져 있어서 버섯류를 재료로 한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 버섯에 관한 신물질 발견은 고대 중국의 한약 또는 동양의 신물질로 물질 특허제도와 지적 소유권협약의 체결로 인해 각 나라마다 자국자원의 이용과 활용을 서두르며 자원의 개발에 크게 관심을 두고 중요한 역점사업으로 제각기 추진하고 있다. 현재 의약품의 약 40%가 천연물로부터 추출된 것이며 우리나라의 경우 의약품으로 쓰이는 기초재료는 상당량 수입에 의존하고 있다. 이러한 수입물질의 대체를 추진하는 국내의 연구는 미흡하므로 이에 대한 필요성이 점차 커지고 있다. 그러나 최근에 식용 및 건강식품 재료 또는 의약품 재료로서의 주목되는 약용버섯들도 괄목할만한 연구가 이루어져야 할 것이라고 생각하여 이를 위한 기초연구도 이루어진바 있다.

본 연구에서는 자원화가 가능한 경제적 버섯류로 저령과 검은비늘버섯을 쓰고, 이들 균종에 대한 재배적 조건을 알기 위해 농가부산물물의 처리방안 및 기질 이용성 여부의 하나로 폐농가 부산물 이용실험, 원목재배실험, 저령 공생성으로 알려진 뽕나무버섯균과 관계를 현미경검사로 확인하고, 공시한 균종에 대한 육종과 관련한 유전연구, 톱밥과 원목을 쓴 인공재배실험, 공시한 균종으로 부터 확인된 물질이 동물세포에 미치는 영향을 실험하므로, 경제성을 갖는 버섯균종으로의 개발과 육성을 목적으로 연구하고자 하였다.

이 연구 성과는 유용물질을 함유한 버섯의 자원화로 농가 수익사업에 직접 일익을 담당 할 수 있는 약용버섯으로 저령과 검은비늘버섯을 인공재배하는

방법을 확립하고, 의학적으로도 그 연구가치가 높은 신물질 특허를 위한 기초자료를 제공 할 수 있을 것으로 믿는다.

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 1). 실내 및 실외 조건에서 유용 버섯자원종으로 저평과 검은비늘버섯균(공시버섯종)을 생산하는 기법 개발.
- 2). 공시버섯종의 균주 개량
- 3). 농가 폐부산물 및 원목을 이용한 및 대량재배 기술의 개발.
- 4). 공시버섯종의 유전적 특성 규명.
- 5). 공시버섯균종의 성분규명과 생물학적 활성 검사.
- 6). 유용버섯의 재배, 배양에 관한 생태 특성 규명.

나. 경제·산업적 측면

- 1). 공시버섯종의 생산 배양기간을 단축시킬 수 있으며, 이로 인한 생산수율을 높여 경제적 가치를 높일 수 있다.
- 2). 공시버섯종의 대량 생산체계를 이루어 안정생산으로 수요를 충족시켜 농가의 소득향상을 꾀한다.
- 3). 공시버섯종에 대한 유용물질의 분석으로 약리적 이용 및 효율성을 규명한다.
- 4). 농가 폐자원(부산물)을 인공재배 기술로 재활용하는 방안을 모색할 수 있어 환경 정화를 꾀 할 수 있다.
- 5). 수입 대체 효과 및 수출 전략 상품으로서 개발이 가능하다.

- 6). 공시버섯종의 생산물을 안정적으로 공급하므로, 자원화 버섯으로 육성할 수 있다.
- 7). 지식 소유권의 확대가 가능하다.

다. 사회·문화적 측면

- 1). 버섯재배 농가의 소득 증대로 농촌 경제의 부흥을 꾀한다.
- 2). 농가부산물을 활용하여 적극적 실용화하는 방안이 창출되어 농업 생산체계의 개선책이 확립된다.
- 3). 불가피한 농산물의 수입 대체 효과를 거둘 수 있고, 유용버섯 소비의 안정성을 유지 할 수가 있다.
- 4). 날로 다양화해 가는 생물자원의 조기 확보로 외국의 물질특허 공세를 사전 예방한다.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

본 연구와 관련된 연구 내용의 일부로서 약용으로 널리 쓰이는 복령의 인공 배양에 관한 연 (박 등, 1980), 복령의 항균력에 관한 연구(이 등, 1982), 복령의 배양학적 특성에 관한 연구(홍과 이, 1990), 복령의 형태 및 균사배양(홍 등, 1991), 복령의 상리적 특성 및 인공재배(홍, 1992)이 연구되었다.

재배조건으로서 버섯 성장에 미치는 고품배지와 폐기물 재료를 이용한 인공 재배법에 관한 실험을 추진하여 폐기물 재료의 활용성을 심도 있게 검토하는 연구가 상당 부분 진척되어 있다. 그러나, 아직도 해결하고 추진해야 할 다음 몇 가지의 문제점이 지적된다.

가. 유용버섯종을 자원화 하는데 필요한 배양. 재배조건을 실험 해야하고

- 나. 생태적 특성에 하나로 버섯생육을 위한 환경조사가 제대로 되어있지 않은 점과 이들 자원용 버섯류에 대한 토양환경 조사를 해야하는 점,
- 다. 공시버섯종의 인공생산에 관한 기술(배양조건, 기질종류) 연구가 미흡하다.
- 라. 현재 각종 버섯류를 이용한 난치병 치료제의 개발 가능성에 관한 연구가 미흡하다
- 마. 유용버섯종에 관한 육종연구를 더 해야하는 실정이다. 그러므로, 이와 같은 연구를 기초로 하여 야생 유용버섯(공시버섯종)의 대량생산 및 인공재배법을 개발하여, 실용화를 계획하고자 한다. 특히 최적 기질 조사의 최적화로 공시균의 양산 체재가 가능한 형태의 인공재배법을 확립한다.
- 바. 저령의 균핵 이외 균사체 생산기술의 확보로 균핵의 산업적 이용에 보완체계를 마련한다.
- 사. 염기서열 조사를 통해 공시균주의 특이적 probe를 찾고 현미경적 조사와 조직학적 자료를 통해 자연산 균핵과 균핵유사체의 상동성 정도를 파악한다.
- 자. 농가 부산물에 관한 활용기술의 혁신을 가져오고, 경제적 영농방법을 제고한다.
- 차. 저령의 유용물질 분석으로 식품·의학적으로 이용 가능성 확인.
- 파. RAPD를 통한 유전적 primer개발 및 저령균과 검은비늘버섯의 분류 기준이 되는 ITS 영역규명.
- 하. 자원용 버섯의 인공생산에 관한 기내배양 기술 및 대량재배법 연구

카. 저령의 유용불질 분석 및 의학적으로 이용 가능한 버섯다당체의 신물질 규명하고 기초를 확보한다.

3. 앞으로 전망

가. 이 연구를 통해 유용버섯자원 중 하나로서 저령 및 검은비늘버섯에 관한 배양 및 재배법 등의 자료가 체계화 될 수 있고 농가 폐자원의 활용을 적극 유도할 수 있다.

나. 저령 및 검은비늘버섯의 인공재배법 기술의 성과는 수입 대체효과를 거둘 수 있다.

다. 저령의 공생 이론이 더 자세하게 밝혀진다.

라. 저령의 성분이 사람질병에 미치는 영향을 조사하므로 이용화 방안을 창출한다.

마. 농산물의 수입대체에 관한 실용화 연구가 이루어지므로, 이 분야의 연구 활성화와 국가경제에 도움을 가져온다.

바. 이 연구는 국민의 보건 향상은 물론 지적 소유권의 확보를 통한 수익의 증대를 꾀할 수 있을 것으로 전망한다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

경제력 향상으로 식품의 고급화와 건강식 중심의 생활개선으로 식용 또는 약용버섯의 종류는 증가 할 것이며 소비는 날로 증대되고 또한 보건

향상 또는 면역기능 증진과 같은 문제를 중요시하게 되므로 약용버섯의 소비 및 그 이용은 점차 증대되리라 전망된다. 더욱이 수요를 충족시키기 위한 특정 버섯류의 국내수입이 불가피한 실정이어서 상당량의 수입이 이미 이루어지고 있다. 따라서 국내 수요는 물론 식·의약용으로 쓰이는 특정 버섯류의 안정 생산과 대체효과를 거두기 위해서는 이에 관한 적절한 연구가 필요하다고 본다. 그 중 하나인 저령 및 검은비늘버섯의 연구를 통해 인공재배가 이루어지지 않고 있는 약용 및 식용버섯의 인공재배법 개발 및 신물질 규명을 통한 경제성 증대와 자원화 증진 효과를 거두는 기초를 제공하고자 한다.

가. 저령의 생산지 환경을 고려한 인공재배 조건 설정으로 국내 환경 특성을 알아내고 수율 향상을 위한 조건 연구로 대량생산의 기반을 확립한다.

나. 검은비늘버섯은 농가 폐부산물을 이용하는 배지개발과 원목 접종법에 의한 생산 조건을 밝힌다.

다. 공시버섯종에 대한 배양조건을 알고, 적정 기질의 종류를 규명한다.

라. 저령균의 공생성의 확인과 우수한 공생 균종의 균주를 찾는다.

마. 공시 균종의 유전 특성 확인과 육종을 시도한다.

바. 저령 및 검은비늘버섯의 유용물질을 얻고, 이 성분 물질의 약리, 생리 및 기능성을 밝혀 대체 의약품으로의 실용화 가능성을 확립함.

라. 이러한 일련의 연구로서 유용버섯의 안정 생산과 공급은 물론 유용자원의 확보에 따른 물질 특허와 지적소유권의 확보가 가능할 것으로 전망함.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1996)	○ 제 1 세부과제 우수벼섯균주의 확보 ○ 제 2 세부과제 재배벼섯의 현황과 재배 기술의 문제 개선	- 균주의 수집 분류 - 채집지역 토양조사 - 물리 화학적 환경특성 조사 - 수집균주의 배양적 특징 - 재배 벼섯의 현황과악 - 재배 벼섯에 대한 기질 실험 - 고품배지에 대한 성장 조건
2차 년도 (1997)	○ 제 1 세부과제 균체배양법의 개량 ○ 제 2 세부과제 자원 가능 균주의 계속 발굴과 기질개발	- 저령 및 검은비늘벼섯(공시벼섯균)의 수집과 분류(계속 채집) - 공시벼섯균종의 배양기질 선발 - 야외실험 - 실내 배양과 자실체 형성 유도 - 채집균주의 특성조사 (유전자 자원 조사) - 분리 균주의 특성조사 - 농가 부산물의 이용 실험 - 병 재배등 균의 특성조사
3차 년도 (1998)	○ 제 1 세부과제 저령 및 검은비늘벼섯균 의 유전자 자원화 ○ 제 2 세부과제 저령과 검은비늘벼섯의 육종과 재배실험	- 공시벼섯균의 유전자 분석 - 공시벼섯균의 자원화 가능성 조사 - 공시벼섯균의 균사체 생산기술 확보 - 공시벼섯균의 육종·재배법 조사 - 공시벼섯균의 배양기법 개발 (병재배 및 야외재배)
4차 년도 (1999)	○ 제 1 세부과제 저령 및 검은비늘벼섯균 의 유전자 자원화 ○ 제 2 세부과제 저령과 검은비늘벼섯의 육종과 재배실험	- 공시벼섯균의 유전자 분석 - 저령의 균핵 및 자실체 형성조사 - 저령의 균사체 생산기술 확보 - 공시벼섯균의 육종·재배법 조사 - 공시벼섯균의 배양기법 개발 (병재배 및 야외재배) - 저령과 뽕나무벼섯간의 공생성 규명 - 효소활성도 비교 - 저령의 유용물질 분석 - 저령 및 공생균의 유용물질 비교

제 3 절 추진전략 및 방법

1. 공시균종의 생육과 배양방법

가. 저령균주의 검은비늘버섯균주의 계속 채집과 분리로 새로운 균주를 확보.

나. 공시버섯균 종의 최적 배양조건(온도, 산도) 규명.

다. 기질 및 영양원(톱밥 등)의 종류에 따라 균핵과 균사체의 생산기술을 규명한다.

라. 공시균의 균체량 증대를 위한 최적배지 개발

2. 공시균종의 유전적 특징

가. 저령 및 검은비늘버섯의 유전적 분석은 염기서열 조사를 통한 특이적인 probe를 찾는다.

나. PCR을 이용한 분석으로 종 특성 규명

3. 원목 및 톱밥배양

가. 야외 매물 실험과 기내 병배양을 통해 공시버섯균의 특성을 조사하고, 대량재배 가능성을 실험함

나. 저령의 균사체생산 및 균핵생산 최적화 조건과 기술을 확보한다.

4. 형태학적 특징조사

가. 저령의 현미경 관찰을 통해 조직학적으로 균핵 발달과정을 규명하고

저령의 특징을 조사하며 뽕나무버섯과의 공생성 관계를 규명하는 기초 자료로 이용이 가능하게 한다.

5. 생리적 검사

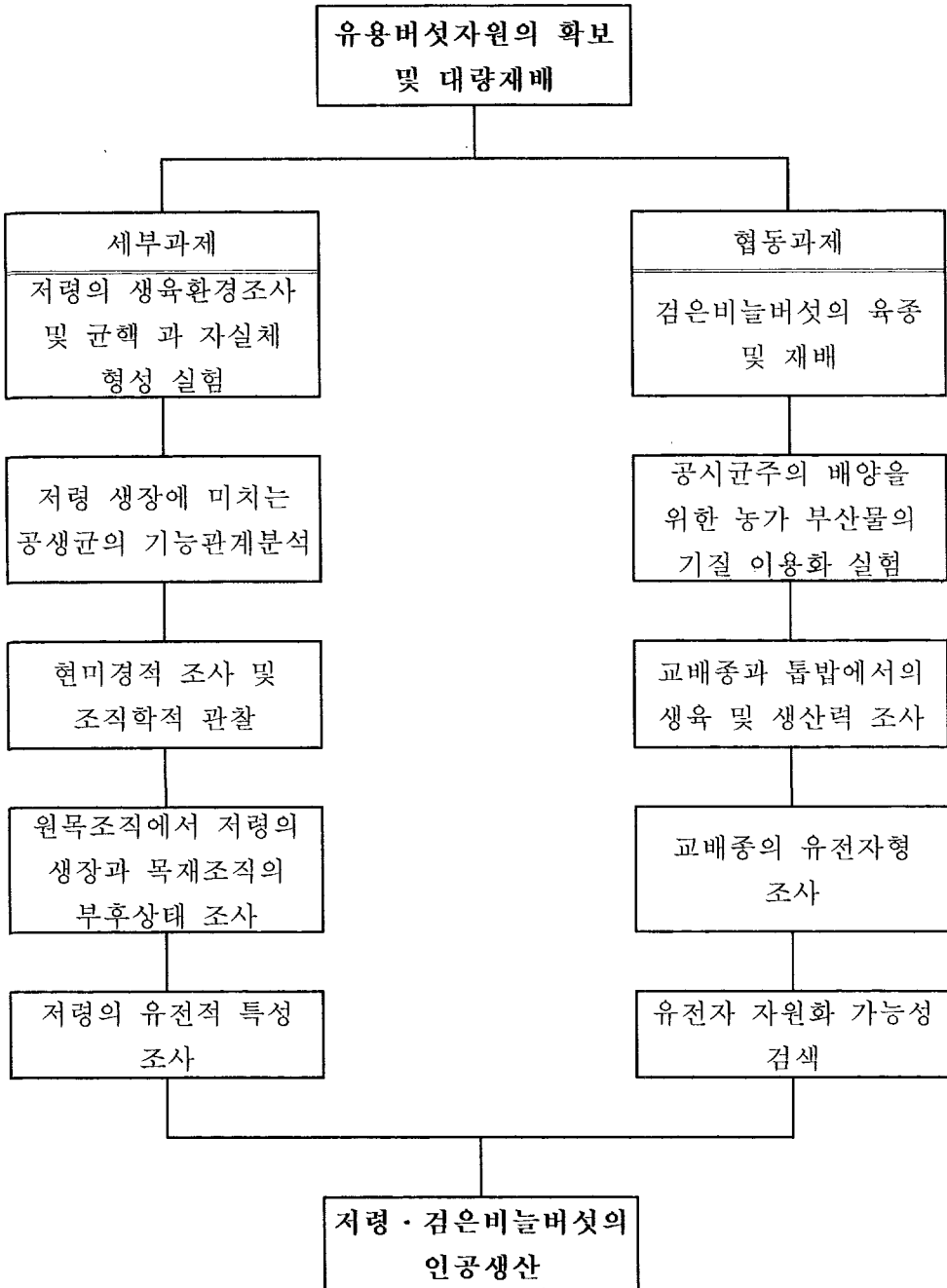
가. 저령 및 뽕나무버섯의 효소 활성도를 조사하여 공생관계의 기작을 규명한다.

나. 생리활성 또는 약리적 특성을 조사하여 그 이용 가능성을 실험한다.

6. 동물세포에 미치는 영향

저령 균핵의 추출물이 동물의 암세포에 미치는 영향을 조사하므로 기능성 식품 및 약품으로의 개발 가능성을 실험한다.

제 4 절 연구개발 추진체계



제 5 절 기대효과

1. 기술적 측면

- 가. 공시버섯균종(저령과 검은비늘버섯)의 배양용 배지개발, 배양기질에 관한 기술 자료 제공.
- 나. 공시버섯균종의 인공재배법과 생산기술의 방법제시.
- 다. 저령의 균생성에 관한 자료제공.
- 라. 농가 폐 부산물의 이용 기술개발에 일익을 담당함.
- 마. Sequencing을 통해 저령의 특이적인 probe를 찾는다.
- 바. 현미경적 조사와 조직학적 관찰로 저령 균핵형성 과정을 자연산 저령 균핵과 배양유도 균핵유사체의 상동성 정도를 규명한다.
- 사. 최종 기질의 조사와 최적화 조건 규명으로 공시균종의 양산체제가 가능한 형태의 인공재배법을 확립한다.
- 아. 균핵 이외 균사체의 진보된 배양 기술로 균사체를 이용하는 산업적 이용에 보완 체계를 마련한다.
- 자. 저령의 유용물질 분석과 동물실험으로 식품 및 의학적 목적으로 이용 가능성 확인.

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 저령 및 검은비늘버섯의 인공재배 기술의 확립으로 농촌의 경제 활성화와 고용증대에 간접효과를 거둘 수 있다.
- 나. 수입 대체효과로 외화 절감 효과가 생김.

다. 버섯자원의 안정공급을 꾀하여 부족한 버섯물량을 보급할 수 있다.

라. 대체 의약품 및 식품으로서 이용 가능성 실험 연구를 확대시킬 수 있다.

제 6 절 활용방안

1. 첨단 영농기술 방법에 하나로 활용될 것임.
2. 버섯자원의 개발기술 향상으로 농촌의 소득증대를 도모하며 개발된 기술을 농가에 보급하여 농촌 경제의 부흥을 기한다.
3. 버섯 유전자원을 체계적으로 확보하여 자원개발의 기초자료로 활용토록 한다.
4. 특정자원의 유전자를 지적 소유하는 방법이 도출 되도록 한다.
5. 공시버섯종에 대한 유용물질의 계속 탐구는 의약적 효능을 검증하고, 균사체의 산업적 이용과 활용에 관한 방안을 창출한다.

제 7 절 연구개발성공시 다음 단계 조치사항

본 연구를 수행하여 얻은 결과는 다음과 같은 사항으로 연계 조치될 수 있다.

1. 저령의 종핵형성에 관한 보완연구로 실제 농가에 균핵 생산법 기술 보급.
2. 액체배양 기술의 진보로 균핵유사체 생산기술 보급을 가능케 함.
3. 생리 및 약리적 특성을 규명하므로 식·의약품 재료로서 가치를 제시할 수 있음

4. 검은비늘버섯 재배에 폐부산물 이용기술의 편이로 농가재배가 쉬워 진다.
5. 지령과 검은비늘버섯의 유전자원의 확보로 지적 소유권화 할 수 있다.
6. 지적 소유권 및 물질특허로 국가경쟁력을 가지며 수입 대체효과를 거둔다
7. 경제적 활용성이 높은 균류자원으로 발전 가능성을 제시한다.

제 2 장 저령의 배양조건과 배양용 배지개발

제 1 절 서론

저령(*Grifola umbellata*)은 진균분류학적으로 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 담자균으로 식용버섯이다(Lee, 1988). 저령은 해발 1000-2000m에 위치한 부식토에서 주로 자생하고, 이 버섯의 균핵(sclerotia)은 지하 토양에서 식하며, 균핵의 표피는 흑갈색이며 내피는 백색이거나 연한 황색을 띠는데, 이 균핵에서 발생된 자실체는 시간이 경과함에 따라 토양표면으로 나오게 된다. 예로부터 야외에서 채취된 저령은 한의학에서 특수한 약용식물로 취급되어 신장염 등을 치료하는데 사용되었으며(Yoo *et al.*, 1994), 현대의학에서도 자실체로부터 추출한 다당류, 즉 β -glucan을 사용하여 폐암, 경부암과 같은 난치병을 치료하는데 탁월한 효과를 보고 있다(Sato *et al.* 1984). 또한 버섯은 종속영양생물에 속하기 때문에 각종 영양원을 균체 외에서 흡수하여 성장해야 한다. 그러므로, 버섯을 재배하는데 있어서 염두에 두어야 할 것은 우수한 균주를 선발하는 것과 더불어 적절한 배지를 선택하는 것과 선택된 그 배지가 어떠한 조성분으로 되어 있는가에 따라서 버섯의 생산이 좌우될 수 있으며, 균주와 배지의 조건이 결정된 후에는 외부의 환경조건이 버섯의 생산을 결정지을 수 있다. 버섯의 자실체 형성을 위한 조건에는 탄소원, 질소원 등 여러 가지 적절한 영양조건과 빛, 온도, 습도, pH등과 같이 버섯의 배양에 알맞은 환경조건을 필요로 한다. 그러나, 저령이 세계시장에서 유망한 식용버섯으로 점차 각광을 받고 있다고 해도 우리가 시급히 해결

해야 할 문제는 많은 사람들의 수요에 부응할 수 있도록 저령을 인공적으로 대량재배를 할 수 있는 방법을 개발해야 하는 것이다. 지금까지 저령의 인공재배에 관한 연구는 중국에서 활발하게 진행되어 왔지만, 우리 나라에서는 아직도 저령에 대한 연구가 미진한 실정으로 있기 때문에 상당량의 저령을 외국으로부터 수입하는 실정이다. 이러한 문제점은 연구를 위한 투자액의 부족에도 원인이 있겠으나, 저령의 생리, 생태적인 생장조건이 해발 1000m 이상의 고산지대에서 적합하기 때문에 그 동안 버섯재배 농가로부터 큰 주목을 받지 못한 점도 하나의 원인이 될 수 있는 것이다. 따라서 본 연구는 실내에서 저령에 대한 학술적 연구를 위해서 뿐만 아니라 야외에서 저령의 대량재배시도를 위한 첫 단계의 일환으로 저령이 적절한 생장을 할 수 있는 환경 및 기초 영양 생리 조사를 수행하였고, 그러한 결과를 참고로 하여 기존의 버섯생장배지보다도 저령의 균사의 생장이 우수한 합성배지를 개발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시균종

공시균종으로 쓰이는 균주로 *G. umbellata* GUS균주와 검은비늘버섯의 PA 외 균주들을 PDA에 계대하고 5℃ 냉장고에 보존하여 실험에 사용하였다.

2. 재료 및 방법

가. 저령의 균사체 배양을 위한 조건 및 영양원 조사

저령의 균사체 배양조건을 확인하기 위하여 온도별로 각각 17℃~30℃ 내의 온도별 균사생장을 확인하였고 산도의 영향을 조사하기 위해 pH 4~6까지 균사생장을 확인하였다. 최소배지로서 Czapek-dox 배지를 선정하여 각 영양원을 일정량 첨가하여 항온배양기 내에서 30일간 배양한 다음 관찰하였다. 탄소원으로 Glucose 외 15종의 탄소원을 최소배지에 3%의 양을 처리한 다음 조사하였으며 질소원으로 질소원 11종을 0.1% 첨가하여 사용하였고 C/N 율은 생장에 가장 좋은 탄소와 질소원을 농도별 10 : 1 ~ 50 : 1로 첨가하여 생육에 좋은 농도비를 구하였다. 유기질소원 6종을 0.3% 첨가하여 균사생장을 확인하였고 인산원과 비타민 아미노산의 이용도 각각 20mM의 농도를 첨가하여 확인하였다.,

나. 합성배지의 제조 및 특징과 균사생장비교

기존에 쓰이던 균 배양용 배지를 선택하고, 새로 합성, 개발한 배지를 써서 균사체 발달과 성장량을 조사하여 개발한 배지의 성적을 비교하였다. 의 균사체 양을 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 온도 및 pH에 의한 조건

가. 온도에 의한 생장

저형의 균사가 최적으로 생장할 수 있는 온도는 Fig. 2-1에서 나타난 것처럼 배양온도를 각각 17°C, 20°C, 25°C, 30°C로 구분하여 PDYM배지에서 30일간 균사생장을 조사한 결과, 17°C에서 16.25mm로 균사생장이 가장 양호하였고, 30°C에서 균사생장이 가장 저조하였다.

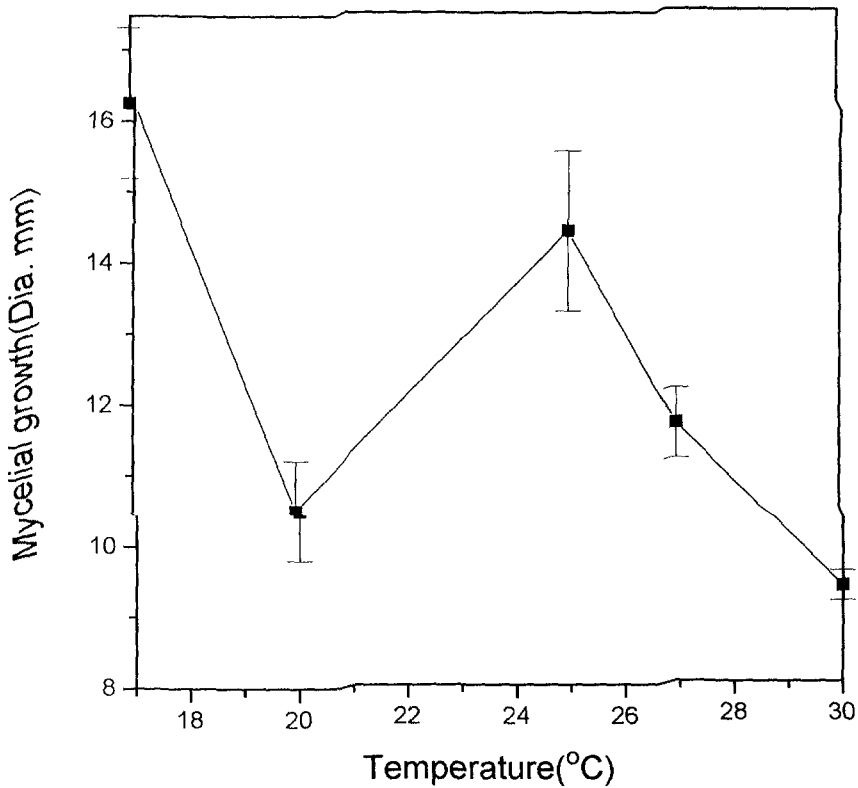


Fig. 2-1. Mycelial growth of *Girifola umbellata* on PDYM at different temperatures for 30 days at 23°C

나. pH에 의한 생장

지령의 생장을 위한 최적의 pH를 조사하기 위해 PDYM배지의 pH를 pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0으로 각각 조정한 후 지령의 생장을 조사한 결과, pH4.0으로 처리한 배지에서 균체량이 0.27g으로 가장 양호하였으며, 배지의 pH가 높아질수록 균사의 생장은 저조하였다.

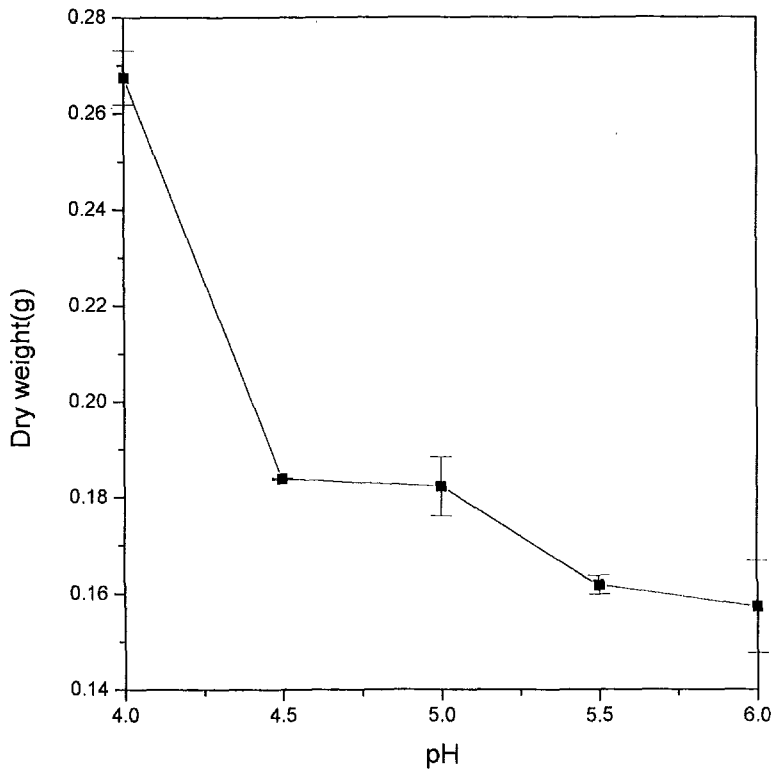


Fig. 2-2. Mycelial growth of *Grifola umbellata* on PDYM at different pH for 30days at 23°C.

2. 영양원에 의한 조건

가. 탄소원의 영향

저령의 배양을 위하여 16종의 탄소원을 Czapek-dox agar 배지에 넣은 후 18°C로 30일간 배양한 결과, ebiose를 첨가한 배지에서 38mm의 가장 양호한 균사직경을 나타내었으며 이당류인 maltose가 37.5mm로 그 다음을 차지하였다. saccharose, lactose 및 CMC에서는 균사의 생장을 확인할 수 없었다. 배지에서 나타난 균사의 밀도(mycelial density)에서는 이당류인 maltose와 단당류인 fructose가 다른 탄소

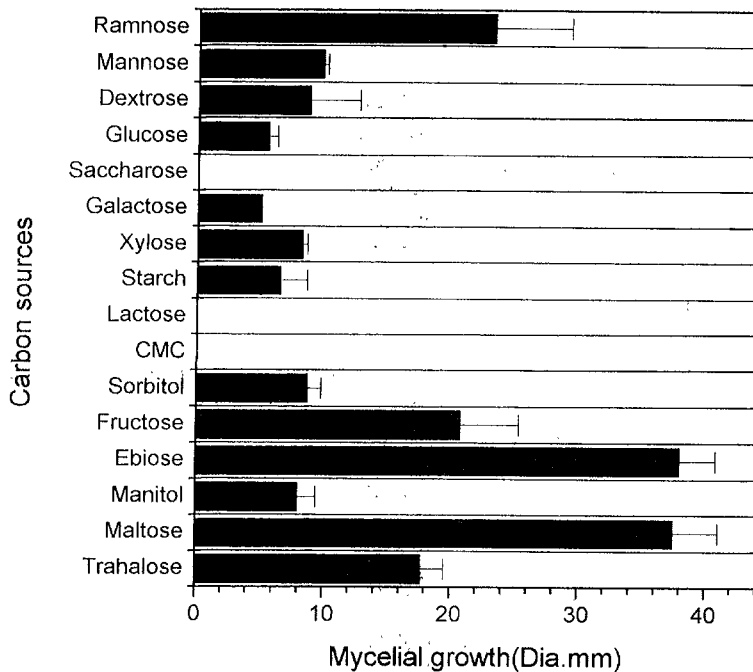


Fig. 2-3. Utilization of carbohydrates as carbon sources for the mycelial growth of *G. umbellata*. Cultivation was carried out at 18°C for 30days in the Czapek-dox agar. The final concentration of carbohydrate was 1%(w/v)

원을 첨가한 배지보다도 균사의 밀도가 탁월한 반면, ebiose의 균사 밀도는 매우 빈약하였다.

나. 질소원의 영향

1) 무기질소화합물

총 11종의 무기질소화합물을 배지에 처리하여 배양한 후 18°C로 30일간 배양한 결과, 균사의 생장은 calcium nitrate를 첨가한 배지에서 가장 좋았으나, 배지 위에서 균사의 밀도는 calcium nitrate를 첨가한 배지가 매우 빈약한 반면, sodium nitrate를 첨가한 배지에서 가장 탁월한 밀도를 보여주었다.

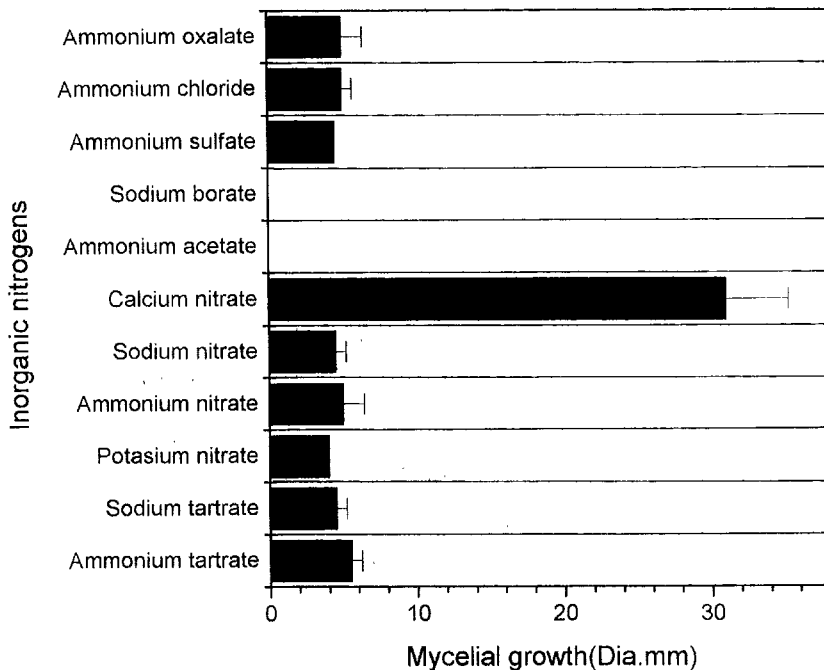


Fig. 2-4. Utilization of inorganic nitrogen sources for the mycelial growth of *G. umbellata*. Cultivation was carried out at 18°C for 30 days in the Czapek -dox agar. The final concentration of carbohydrate was 1%(w/v)

2) 유기질소화합물

6종의 유기질소화합물을 배지에 처리하여 18°C로 30일간 배양한 결과, soytone이 첨가된 배지에서 18.75mm로 균사의 성장과 균사의 밀도가 가장 양호하였으며, peptone이 첨가된 배지에서도 15.00mm의 균사 성장과 양호한 균사의 밀도를 나타냈으며 skim milk가 첨가된 배지에서 균사의 성장은 가장 빈약하였다.

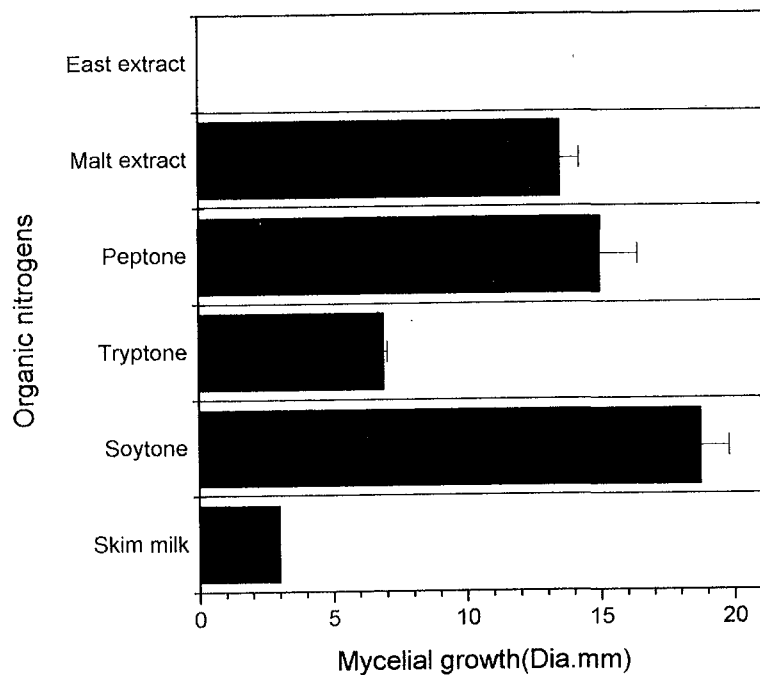


Fig. 2-5. Utilization of carbohydrates as organic nitrogens for the mycelial growth of *G. umbellata*. Cultivation was carried out at 18°C for 30days in the Czapek-dox agar. The final concentration of carbohydrate was 1%(w/v)

다. 인산의 영향

인산을 배지에 처리하여 18°C로 30일간 배양한 결과, sodium

phosphate(monobasic)를 첨가한 배지에서 41.0mm의 균사생장과 양호한 균사의 밀도를 기록하였다. ammonium phosphate를 첨가한 배지는 균사생장이 전혀 발생하지 않았다.

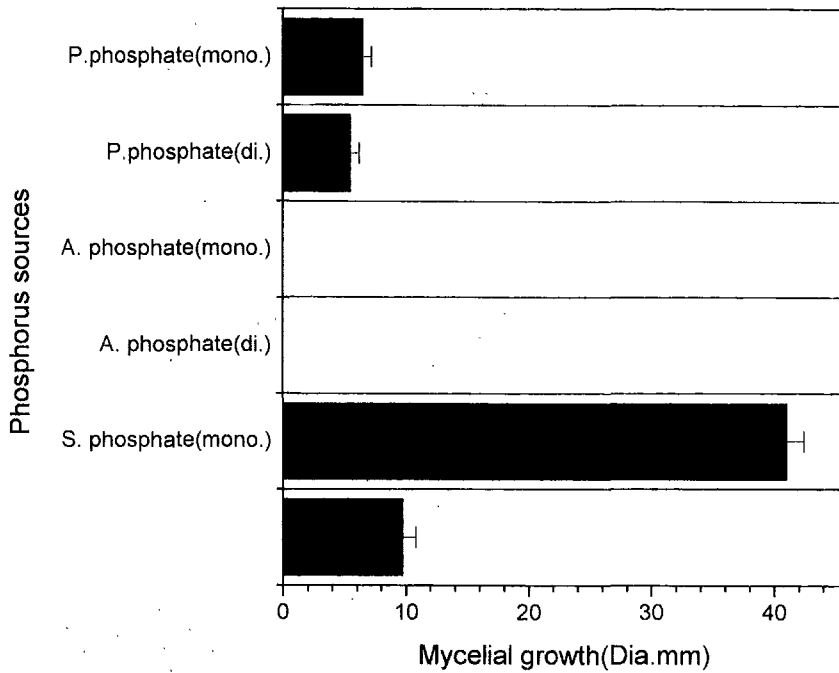


Fig. 2-6. Utilization of phosphorus sources for the mycelial growth of *G. umbellata*.
 Cultivation was carried out at 18°C for 30days in the Czapek -dox agar.
 The final concentration of carbohydrate was 1%(w/v)
 P; Potasium, A; Ammonium, S; Sodium

3. 합성배지의 제조 및 특징

저령의 균사생장을 촉진할 수 있는 합성배지의 제조는 위에서 열거한 온도, 습도 및 영양생리실험을 기초로 배지(fructose 20g, maltose 10g,

soytone 3g, peptone 3g, sodium nitrate 1g, magnesium sulphate 0.5g 및 sodium phosphate(monobasic) 1g)를 제조한 후 진탕배양기에서 20℃의 온도로 45일간 배양한 다음 저령의 균사의 건중량을 조사하였고, 그 결과를 다른 13종의 배지와 비교하였다. GUM2 배지에서 균사의 건중량은 0.13g을 나타내었고, 그 결과는 다른 13종의 배양기에서 조사한 저령 균사의 건중량 보다 월등하였다.

Table 2-1. Composition of complex media used in this study.

Nutritional reagent	Media(g/ l of D.W)									
	Hamada	Czapeck	YM	Henner berg	Lilly	Lutz	Hopkins	PDA	GP	GT
Dextrose	20		10					20		
Ebiose	5									
Yeast extract	3		3						10	3
Hyponex	3									
Sucrose		30								
Peptone			5						10	
Malt extract			3			10			15	
Glucose				50			10		10	5
Maltose					10					
Asparagine					2					
Potatoes								200		
Tryptone										10
NaNO ₃		3		2						
K ₂ HPO ₄		1				1				
MgSO ₄		0.5		0.5	0.5	0.1	0.5			
KCl		0.5								
FeSO ₄		0.01								
CaCl ₂				0.1						
KH ₂ PO ₄				1	1		0.1			
KNO ₃				2			2			
NH ₄ NO ₃						1				
(NH ₄) ₂ HPO ₄						1				
MnSO ₄						0.025				
NaCl										
Glycerol										
Dextrin										

Table . Continued

Nutritional reagent	Media(g/ l of D.W)									
	MCM	PDM	CDY	GS	CVM	KKL	ACM	YMM	MEM	MEA
Dextrose		20								
Ebiose										
Yeast extract	2		5		6		6	3		
Hyponex										
Sucrose										
Peptone	2				4		4	5	5	0.8
Malt extract		5						3	20	
Glucose	20		30	10	20		20	10		
Maltose										13
Asparagine										
Potatoes		200								
Tryptone										
NaNO ₃			3							
K ₂ HPO ₄	1		1		1			1		
MgSO ₄	0.5		0.5	1	0.5			0.5		
KCl			0.5							
FeSO ₄			0.01	0.01				0.01		
CaCl ₂				0.1						
KH ₂ PO ₄	0.5			1	0.5					
KNO ₃										
NH ₄ NO ₃										
(NH ₄) ₂ HPO ₄										
MnSO ₄										
NaCl			0.5							
Glycerol										3
Dextrin										3

Table 2-2. The composition of new synthetic medium(KKL) for stimulating mycelial growth of *Grifola umbellata*

Chemicals	Amounts
Fructose	20g
Maltose	10g
Soytone	3g
Peptone	3g
Sodium nitrate	1g
Magnesium sulphate	0.5g
Sodium phosphate(monobasic)	1g
Distilled water	1 ℓ

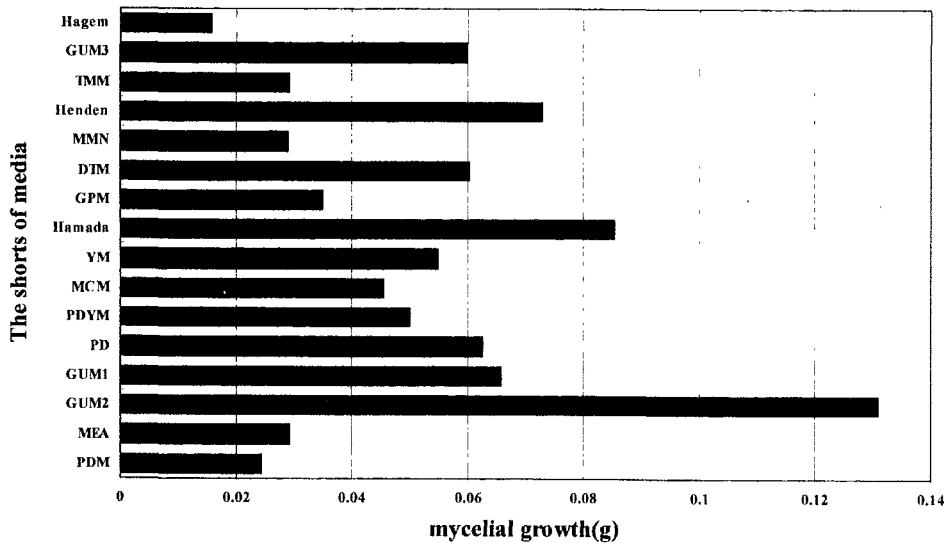


Fig. 2-7. Mycelial growth of *Grifola umbellata* on different culture media

참고문헌

- Azuhata, Y., and Sugiyama, K. 1994. Antitumor-promoting effect of kampo formulations on rat urinary bladder carcinogenesis (VI). effect of ergosterol on rat urinary bladder carcinogenesis in long-term assay. *J. of Traditional Medicines* 11:344-345.
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1991. Studies on the structure and nature of sclerotia of *Grifola umbellata*. 10(4):312-317.
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1993. Genesis and function of defense structure of sclerotia of *Grifola umbellata* after *Armillariella mellea* infection. *Acta Mycologica Sinica* 12(4): 283-288. *Acta Mycologica Sinica*
- Inaoka, Y., Shakuya, A., Fukazawa, H., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Tsuji, K., Kuroda, H., Okada, M., Hukushima, M., and Kosuge, T. 1994. Studies on active substances in herb used for hair treatment.-effect of herb extracts on hair growth and isolation of active substance from *Poylporus umbellatus*. *Chem. Pharm. Bull.* 42(3): 530-533.
- Ito, H., Fujii, K., Naruse, S. and Miyazawa, T. 1973. *Mie Medical Journal* 23:117.
- Kim, H. Y., Leem, Y. E., Choi, H. T., and Song, H. G. 1995. Decolorization of dyes by white rot fungi. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 298-304.
- Lee, J. Y. 1988. Compendium of Korean mushroom. Academic Press. 166pp.
- Lu, W., Adachi, I., Kano, K., Yasuta, A., Toriizuka, K., and Ueno, M. 1985. Platelet aggregation potentiators from Cho-rei. *Chem. Pharm. Bull.* 33:5083-5087.
- Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H., and Yadomae, T. 1978. Structural

examination of antitumor, water-soluble glucans from *Grifola umbellata* by use of four types glucanase. *Carbohydrate Research*. 65:235-243.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Yamada, Y., Hsu, H. Y., and Ito, H. 1979. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifola umbellata*. *Carbohydrate Research* 69:165-170.

Ohta, K., Yaoita, Y., and Kikuchi, M. 1996. Sterols from sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. *Natural Medicines* 50(5):366.

Ohta, K., Yaoita, Y., Matsuda, N. and Kikuchi, M. 1996. Sterol constituents from the sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. *Natural Medicines* 50(2):179-181.

Sato, K., Osawa, M., Suzuki, Y. and Oikawa, S. 1984. Difference in fruiting capability of stocks in *Grifola frondosa* and its allied species. *Trans. Mycol. Soc. Japan*. 25:205-209.

Stamet, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press.386pp.

Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S., and Lee, M. W. 1997. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* 25(3):209-218.

Thomas, W. J., Choi, S., and Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.

Ueno, Y., Abe, M., Yamauchi, R., and Kato, K. 1980. structural analysis of the alkali-soluble polysaccharide from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. *Carbohydrate Research* 87: 257-264.

Ueno, Y., Okamoto, Y., Yamauchi, R., and Kato, K. 1982. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide(and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. *Carbohydrate Research* 101:160-167.

You, J. S., Hau, D. M., Chen, K. T., and Huang, H. F. 1994. Combined effects of Chuling(*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *Amer. J. Chinese Medicine* 22(1):19-28.

제 3 장 검은비늘버섯의 육종

제 1 절 서론

검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*)은 주름버섯목(Agaricales) 독청버섯과(Strophariaceae) 비늘버섯속(*Pholiota*)에 속하는 버섯으로 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 죽은 가지, 그루터기에 군생하고 주로 북반구 일대에 분포한다(박, 1991). 일본에서는 이미 같은 *Pholiota* 속인 맛버섯(*Pholiota nameko*)이 단백질 함량이 높고 맛이 좋은 버섯이기에(Cha *et al*, 1989) 기업생산 체계를 갖추어 생산하고 있으며(Cha *et al*, 1978) 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*.(Fr) Kummer)도 오래 전부터 음식으로 사용하고 있는 목재 부후균적 식용버섯의 하나로 생산하고 있다(Ikuo *et al*, 1980). 뿐만 아니라 이 군에 대한 활발한 연구들이 이루어졌으나(Ikuo & Kimito, 1969; Hashioka & Arita 1977, 1979; Ikuo, 1979; Ikuo *et al*, 1980) 우리나라에서는 그 연구사례가 거의 없고, 단지 Park *et al*(1978)이 우리나라에서 자생하는 야생버섯 중 형태와 육질이 우수하고 기호에 알맞는 것에 대한 인공재배 가능성을 검정한 실험에서 띠비늘버섯(*Pholiota squarrosa*(Fr.) Quel.)이 참나무 톱밥에서 인공재배가 가능함을 보고하였다. 이에 본 연구실은 식용버섯의 대체 산물로 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*)을 이용하여 자실체 형성의 기초 자료와 *P. adiposa*의 교배형을 찾아 유전적 변이에 의한 향상된 종균을 개발하는 것과 같은 육종법에 응용하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 광사균

1996년부터 충북 보은군 범주사 주변에서 채집하여 동정하였다. 이들의 자실체를 이용하여 WA(Agar 20g, Distilled Water 1 l) 및 GS (Ginterava & Janotkova, 1975)를 통하여 균사를 분리하였다. WA나 GS 에서 자란 개개의 균사들은 현미경 관찰로 clamp connection이 관찰되는 것을 따로 분리하여, 균과 성숙하는 형태에 따라 담자낭균으로 인정되는 분리균(PA-1, PA-2, PA-3)을 채집하였다. 또한, 채집 분리된 분리균은 다음 실험을 위하여 일부를 사면 배지에 이식하여 배양 한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다(Table 3-1).

2. 단포자 분리

Pholiota adiposa(P1)를 톱밥배지에 접종시켜 수확한 자실체를 멸균한 petri-dish위에서 포자지분법으로 분리하였다. 이를 멸균수에 넣어 spore suspension($10^{-4} \sim 10^{-6}$)을 만들어 멸균한 tip을 사용하여 0.3ml/plate를 취해 PDA배지 위에 도말 한 후 항온기(25℃)에 넣어 10일 동안 발아시켰다.

비슷한 시기에 발아되는 포자들을 각각 분리하고 현미경하에서 clamp connection과 hyphae characteristics를 확인한 후 이를 본 실험의 단포자 분리균으로 사용하였다(Suthaphun & Angkana,1991). 분리균은 발아되는 순으로 번호를 매겨 1차로 약 60개의 단포자를 분리하였고 이 중에서 균

사형태나 성장속도가 비슷한 것을 위주로 하여 최종적으로 23개의 단포자 분리균주를 선발하였다. 이들을 PDA 배지에 접종하여 25℃ 배양기에서 5일간 배양 후 colony의 크기를 측정하여 각각에 대한 성장력(cm/5 days)을 비교하였다.

3. 육종을 위한 교배형

교배는 세 개의 단핵 균주를 같은 petri-dish에 15mm정도 띄워 접종한 다음 25℃에서 7~10일간 배양하였다. 배양 후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어내어 현미경으로 clamp의 존재를 확인하여 이를 mated된 2핵 균사로 간주하여 교배가 된 것으로 보았다(Chase and Ullrich, 1985).

제 3 절 결과 및 고찰

1. 단포자 분리

균사 성장력은 전체적으로 비교하였을 때 dikaryon인 PA1이 monokaryon의 단포자들 보다 성장력이 훨씬 좋았다. 특히 균 접종 후 5일간은 비슷한 성장을 보였으나 배지에서 안전하게 활착이 된 후부터는 성장 속도에서 많은 차이를 나타내어 10일 후에는 평균 1.5cm 정도의 차이를 나타내었다. 이는 Lee *et al.*(1981)이 *Flammulina velutipes*에 대한 육종 실험에서 대개 단핵 균주보다 이핵 균주의 균사생장이 빠르다는 보고와,

Yusof & Graham(1977)의 단핵주가 모균주인 이핵주보다 성장속도가 느리다는 보고와 일치한다. 각 교배형 내에서는 먼저 $A_1B_1(7/23)$ 의 경우 PA1-32와 PA1-37이 가장 빨리 성장하였고, $A_1B_2(8/23)$ 에서는 PA1-30과 PA1-07이, $A_2B_2(6/23)$ 에서는 PA1-05와 PA1-29가 15일 동안 거의 7.2cm 정도로 성장하였다. 반면에 $A_2B_1(2/23)$ 인 PA1-13과 PA1-27 2균주 모두 다른 분리균주와 마찬가지로 15일 동안 6.0cm 정도의 성장력을 나타내었다. 그리고 가장 느린 성장력을 나타낸 것은 A_1B_2 의 PA1-15였다. Lee *et al.*, (1981)의 균사생장이 좋은 것이 발이 능력도 좋으며, 영양생장이 나쁜 것은 생산 능력도 낮다는 보고와 Kneebone *et al.*, (1977)의 양송이(*A. bisporus*)에서 단포자 기원의 균사체 선발에 의해 미국에서 재배되고 있는 품종들보다 생산량이 높은 12계통의 균주를 얻었다는 결과에 근거하여 다음 실험 단계로서 각 교배형 내에서 가장 빠른 성장을 한 분리균과 가장 느린 성장을 한 분리균들을 mated 시켜 자실체 형성능력과 균사생장력 등을 서로 비교하여 우수한 품종을 육성할 예정이다.

교배는 세 개의 단핵 균주를 같은 petri-dish에 15mm정도 띄워 접종한 다음, 25℃에서 7~10일간 배양하였다. 배양 후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어내어 현미경으로 clamp의 존재를 확인하여 이를 mated 된 2핵 균사로 간주하여 교배가 된 것으로 보았다(Chase and Ullrich, 1985).

Table 3-1. Sources of the fungal mycelia or the fruiting bodies collected for this works.

Marks	Expression	Descriptions of the fungal mycelia or basidiocarps collected
P1	PA-1	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>Pholiota adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P2		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-1) cultivated on Oak sawdust on July, 1997 ^b
P3		Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (PA-1) cultivated on Poplar sawdust on Sep., 1997 ^b
P4	PA-2	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P5		Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (PA-2) cultivated on DA petri dish on Feb.,1998 ^b
P6	PA-3	The Mycelium isolated from basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P7		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-3) cultivation on Oak sawdust on Sep.,1997 ^b
P8		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-3) cultivation on Poplar sawdust on Sep.,1997 ^b
P9	PA-4	Basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk on Sep.,1997 ^b
P10	PT	Basidiocarps of <i>P. terrestris</i> collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk on Sep.,1997 ^b
P11	TM-3	Basidiocarps of <i>Tricoloma masutake</i> collected from Yang-Yang, Gang Won Do on Nov.,1997 ^c
P12	TM-7	Basidiocarps of <i>T. masutake</i> obtained from Yang-Yang, Gang Won Do on Nov.,1997 ^c
P13	LE	Basidiocarps of <i>Lentinus edodes</i> purchased in Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P14	AB	Basidiocarps of <i>Agaricus bisporus</i> purchased in Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P15	PO	Basidiocarps of <i>Pleurotus ostreatus</i> purchased from Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P16	FV	Basidiocarps of <i>Flammulina velutipes</i> purchased from Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P17	PB	Basidiocarps isolated from <i>Polyporus brumalis</i> cultivated on Oak sawdust on Sep.,1996 ^b
P18	HE	Basidiocarps of <i>Hericium erinaceum</i> collected from Yang-Yang, Gang Won Do on Nov., 1997 ^c
P19	RB	Mycelium isolated from basidiocarps of <i>Ramaria botrytis</i> obtained from Yang-Yang,ang Won Do on Nov.,1997 ^b
P20	SC	Basidiocarps isolated from <i>Schizophyllum commune</i> cultivated on Oak sawdust on Sep.,1997 (collected from Mt. Cho-Ryeong,hung-Puk on Sep.,1996 ^c

^aThe mycelia isolated from the basidiocarps stored in the laboratory of mushrooms in RDC of Chung-Puk.; ^bThe mycelia isolated from the basidiocarps obtained directly and stored in our laboratory.; ^cSee the previous works of Lee & Sung (1997) in detail.

Table 3-2. Development of the fruiting bodies of *P. adiposa* on sawdust bottles under the artificial cultivations^a.

Isolates	Days of mycelial inoculation	Days of old mycelia removed	Mycelial growth (% /bottle) ^b	The day harvested
PA1	97.4.14.	97.7.10	90%	97.7.30 (Oak sawdust)
PA1	97.4.14.	97.7.10	95%	97.9.02 (Poplar sawdust)
PA3	97.4.14.	97.7.10	90%	97.8.18 (Oak sawdust)
PA3	97.4.14.	97.7.10	95%	97.10.06 (Poplar sawdust)

^aThe sawdust of oak (scientific name) or poplar (scientific name) mixed with the rice bran at the rate of 80:20 (v/v) and sterilized at 125 °C for 20 min. The basidiocarps were developed until the day harvested after the cold treatment on the day of the old mycelia removed

^bThe growth rate of mycelia on the sawdust bottles on the day of removal of mycelia when the white mycelia grown were measured under naked eyes.

2. 육종을 위한 교배형

교배형은 접종 후 10일이 경과한 뒤에 관찰한 것으로 각 균주들 사이에서 뚜렷한 특징이 나타내었다. 균주 간 불화합성을 나타내는 경계선을 선명하게 볼 수 있으며, PA1-21과 PA1-25 간의 barrage현상을 관찰할 수 있었다(Table 3-3). 또한 PA1-03,25,38의 접종에서는 a line of demarcation인 갈색 경계선이 나타났다. 반면에 PA1-01과 PA1-25는 화합성임을 알 수 있었다. 이와 같은 방법에 의해 *P. adiposa* 1(PA1)은 4가지 교배형을 형성하였는데, A₁B₁ 형은 A₂B₂ 형, 그리고 A₁B₂ 형은 A₂B₁ 형과 결합하는 tetrapolarity를 나타내었다. 이것은 Ikuo & Kimito(1969)가 bipolarity라고 보고한 것과 차이가 있다.

Table 3-3. Matings of the basidiospores isolated from the spore print of *P. adiposa* (PA-1) cultivated on the sawdust bottles under the artificial cultivations^a.

The isolates of Basidiospore ^b		Matings between the two isolates of the marked (PA1 basidiospores) ^c																					
		A ₁ B ₁				A ₁ B ₂				A ₂ B ₁		A ₂ B ₂											
		01	09	26	28	32	37	39	03	07	15	19	20	30	31	38	13	27	02	05	21	23	25
A ₁ B ₁	PA1- 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-c	-	-	-d	+	+	+	+	+	+	
	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	37	-	-	-	-	-	-c	-	-	-	-	-	-	-	-	-d	-d	+	+	+	+	+	+
	39	-	-	-	-	-c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
A ₁ B ₂	03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-d	-	-	-	-	
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-c	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	31	-	-	-c	-	-	-	-	-	-	-d	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
A ₂ B ₁	13	-	-	-	-	-c	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-d	-d	-	-	-d	-	
	27	-	-	-c	-	-c	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
A ₂ B ₂	02	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-d	-	-	-	-	-	-	-	
	05	+	+	+	+	+	+	-	-d	-	-	-	-	-	-d	-	-	-	-	-d	-	-	
	21	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-d	-	
	23	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-d	-	-	-	-	
	25	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-d	-	-	-	-c	-	-	-	
	29	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

^aThe sawdust of oak (scientific name) or poplar (scientific name) mixed with the rice bran at the rate of 80:20 (v/v) and sterilized at 125 °C for 20 min.

^bThe basidiospore isolated from the PD agars containing penicillin-G (10 IU/ml) after serial dilutions and plate counting methods and stored at 4 °C. The mating type (A₁B₁) was determined without any reference, here.

^cThe status of matings between two basidiospores: The sign of plus(+) indicated the formation of clamp formation (compatibility); minus (-) no clamp (incompatibility); The letter 'd' a line of demarcation (incompatibility) showing the brown line on a plate when two isolates inoculated and grown on the PD agar.

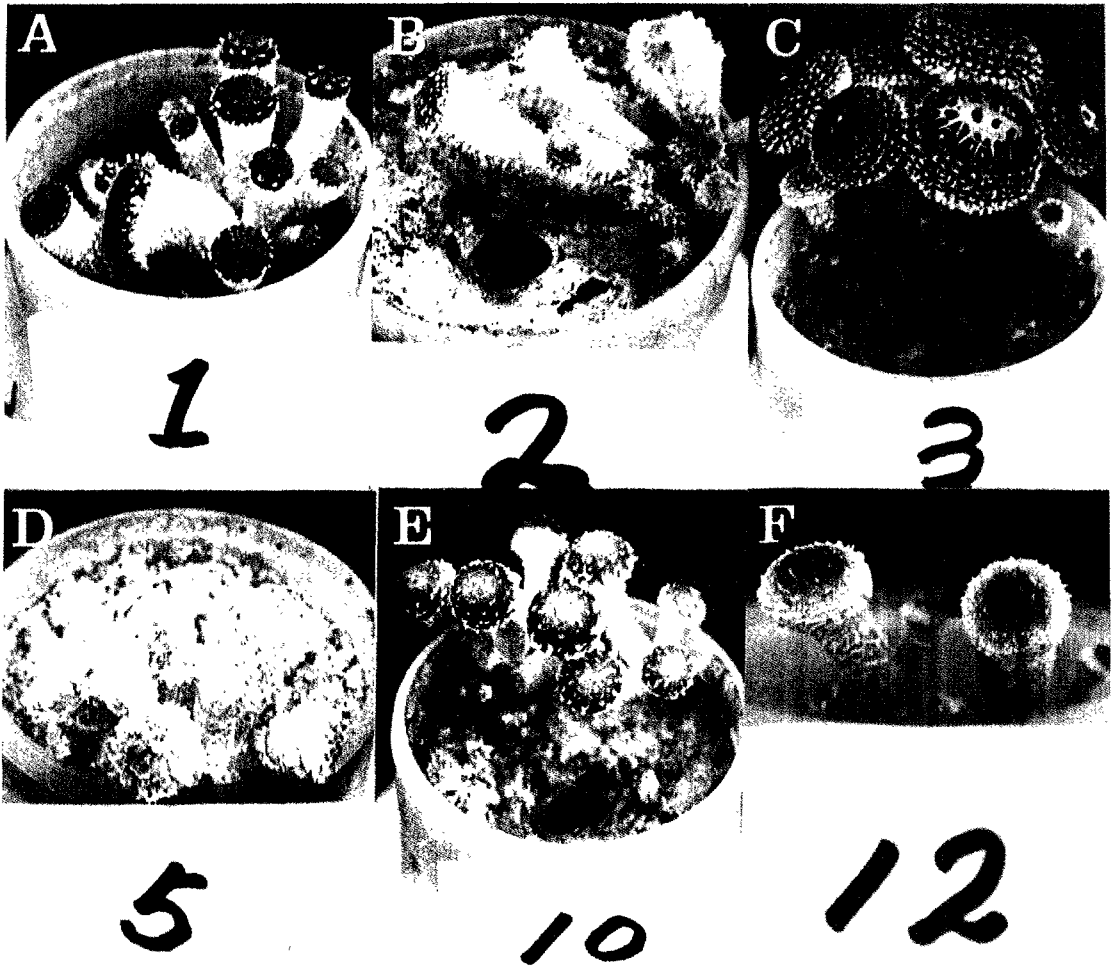


Fig. 3.1. The various morphologies of the unmatured basidiocarps developed from the dikaryon mycelia mated from various basidiospores. The various types of basidiocarps were speculated from the varieties of genetics of basidiospores. Unmatured basidiocarps of P2 was omitted because of similar E Figure; A) indicated the basidiocarps mated between P2-32 and 05, B) P2-37 and 29, C) P2 07 and 27, D) P2- 01 and 23, E) P2-28 and 21, F) P2-31 and 27

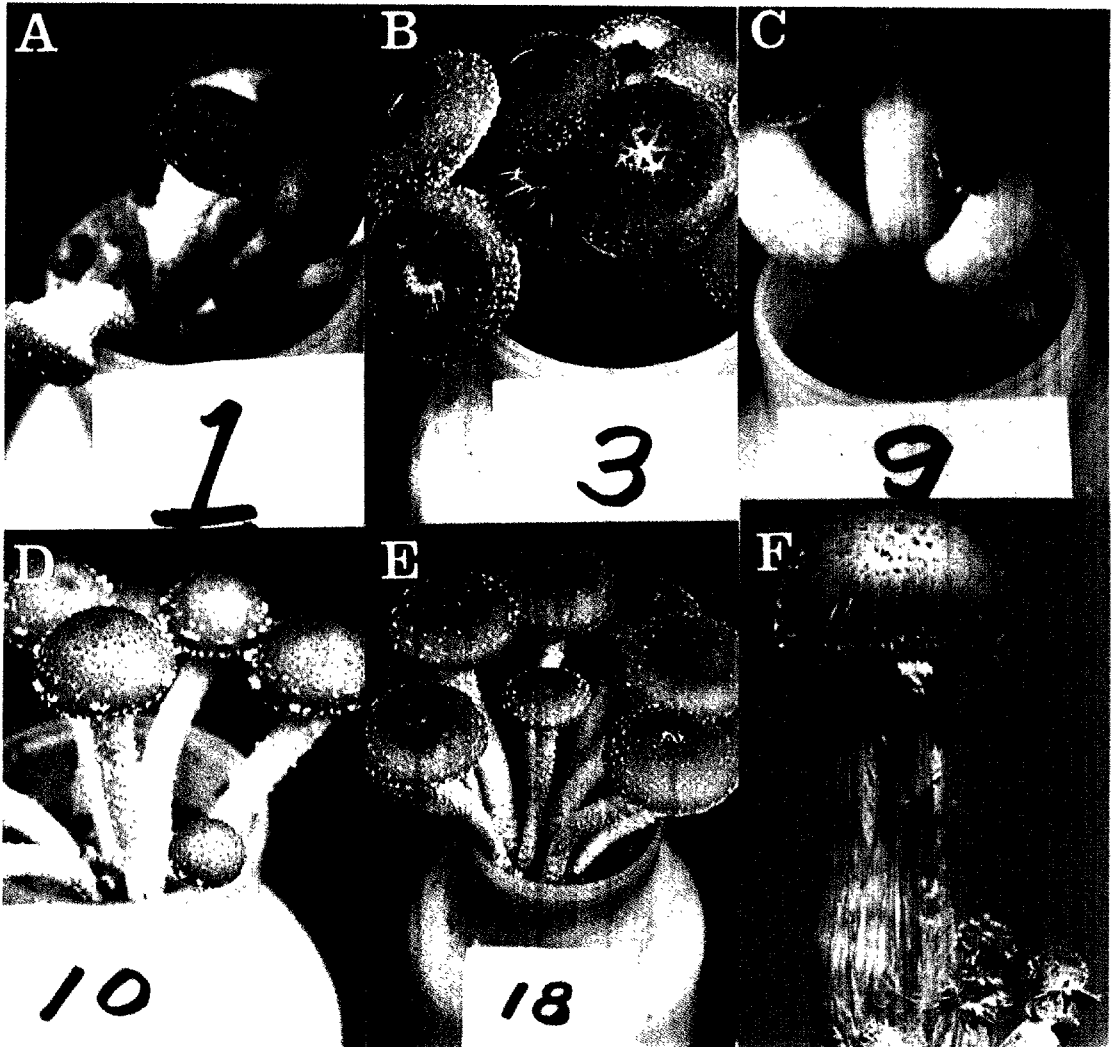


Fig. 3-2. The various morphologies of the basidiocarps developed from the dikaryon mycelia mated from various basidiospores. The various types of basidiocarps were speculated from the varieties of genetics of basidiospores: A) indicated the basidiocarps mated between P2-32 and 05, B) pP2-07 and 27, C) P2-05 and 09, D) P2 28 and 21, E) the parental dikaryon isolate of P2, F) the mark lost.

Fischer(1987)가 *Phellinus tremulae*를 bipolarity라 한 것에 대해 Mallett & Myrholm(1995)는 tetrapolarity(1995)라고 한 것과 비슷한 경우로 이것은 실험한 균주가 다르고, 오랜 시간의 흐름과 환경적 변화에 의한 유전적인 변이가 요인이 되었을 것이다. 각 교배형에 속하는 단포자 균주 수는 A_1B_2 형이 8개로 가장 많았고, A_2B_1 는 2개의 균주에서만 형성되었다.

참고문헌

Cha, D.Y. 1981. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushrooms(II). *Kor. J. Mycol.* 9: 123-128.

Chung, K.S. 1982. Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea(II). *Kor. J. Mycol.* 10(1): 33-39.

Fischer, M. 1994. Pairing tests in the *Phellinus pini* group. *Mycologia* 86: 524-539.

Ginterava, A. and Janotkova, O. 1975. A Simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi, *Folia Microbiol.* 20: 519-520.

Huang, S. I., Yasuo, I., Keisuke, K., Hiroshi, O. and Motoichiro, K. 1996. Hyphal anastomosis and complementary growth of fused cells in *Alternaria alternata*. *Mycoscience* 37: 1-13.

Ikuo, A. 1979: Cytological studies on *Pholiota*. *Rept.Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 17:1-18.

Ikuo, A. Atsuko, T. and Yukiko, S. 1980: The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 18:107-113.

Ikuo, A. and Kimito, M. 1968: The mating system in some Hymenomycetes II. The mating system in *Favolus arcularius* (BATSCH ex FR.) AMES, *F. mikawai* (LLOYD) IMAZ., *Pholiota adiposa* (FR.) QUEL. and *Pleurotus cornucopiae* (PAUL. EX PERS.) ROLL. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 7:51-58.

Johnson, J. E. and Petersen, R. H. 1997: Mating systems in *Xeromphalina* species. *Mycologia* 89: 393-399.

Kazuhiko, N., Yuichi, Y. and Keizo, K. 1994. Mating type of isolates derived from the spermogonial state of *Puccinia coronata* var *coronata*. *Mycoscience* 35: 131-135.

Kim, H. K., Park, Y. H., Cha, D. Y. and Chug, H. C. 1987. Studies on the Artificial cultivation of *Lentinus edodes* on sawdust media. *Kor. J. Mycol.* 15(1): 42-47.

Lee, G. O. 1979. Wild Mushroom as Food Source. *Kor. J. Mycol.* 7: 125-134.

Lee, P. J. and Kinugawa, K. 1981: A breeding method for *Flammulina velutipes*. 1. Selection of monokaryotic strains by the use of testers. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 22: 89-102.

Lee, P. J. and Kinugawa, K. 1982: A breeding method for *Flammulina velutipes*. 2. Selections from the intercrossing and the following intracrossing. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 23: 177-186.

Lee, S. S. and Choi, K. J. 1995. Solid cultures of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* 24: 274-279.

Park, Y. H., Kim, Y. S. and Cha, D. Y. 1978. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.

Peberdy, J. F., Aidah, M. H. and J. Jia. 1993: New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. pp 55-62. Edited by S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. The Chinese University Press.

Rizzo, D. M., Rentmeester, R. M., and Burdsall, H. H. 1995. Sexuality and somatic incompatibility in *Phellinus gilvus*. *Mycologia* 87: 805-820.

Triratana, S. and Chaiprasert, A. 1991. Sexuality of *Ganoderma lucidum*. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (ed.) Balkema, Rotterdam. ISBN 90. Pp.57-63.

Wong, G. J. 1993. Mating and fruiting studies of *Auricularia delicata* and *A.fuscosuccinea* *Mycologia* 85: 187-194.

Yu, K. W., Seong, C. K., Lee, S. S. and Yoo, J. Y. 1996. Studies on the fungal isolates of Mucorales collected from Korean home made mejus and nuluks. *Kor. J. Mycology* 24: 280-292.

박완희 1991. 원색도감 한국의 버섯. (주)교학사.

박용환. 1997. 최신 버섯학. 한국버섯원균영농조합. Pp. 21-24.

이응래. 1973. 버섯 재배. 華學社.

이지열. 1988. 원색 한국 버섯 도감. 아카데미서적

제 4 장 공시버섯균의 유전적 특징

제 1 절 서론

과거에는 버섯의 계통 분류에 형태적인 특징 으로 색깔, 크기, 자실체모양, 자실체 생산과 균사 생장에 대한 최적 온도를 참고로 하였다(Park *et al.*, 1997). 물리적인 성질과 pairing tests(Fisher, 1994)가 식용버섯의 동정에 사용되기도 한다(Fukuda & Tokimoto,1991). 이러한 방법은 환경적 차이에 의해 일어나는 불확실한 특성들과 그 영향들 때문에 어렵다(Park *et al.*, 1997). 이러한 난점을 극복하기 위하여 다양한 방법들이 개발되었는데(Park *et al.*, 1997), 단백질의 전기영동적 패턴 양상(Kawamura & Goto, 1980 Itavaara, 1988)이나 여러 효소들의 활성도, 특히 동위효소(isozyme)분석(Zervakis *et al.*, 1992: Damaj *et al.*, 1993: Fukuda & Tokimoto, 1991))과 같은 생화학적 기법들이 주로 이용되었다. 그러나 단백질의 전기영동적 분석은 그 밴드수가 너무 많아 각 균주에 대한 분명한 분화를 제공해주지 못하고(Lee *et al.*, 1997), 배지조건, 배양시기, 온도변화 등의 요인에 의해 실험 결과가 다르게 나타날 수 있기에(Song *et al.*, 1996), Polymerase Chain Reaction(PCR) 기법이 소개되면서 부터(Khush *et al.*,1991) 보다 근본적이고 안정적인 실험을 위해 생물체의 유전정보를 간직하고 있는 DNA 분석(Lee *et al.*, 1997)과 같은 분자생물학 연구가 개발되어 쓰이게 되었다되었다.(Vosberg,1989: Erlich *et al.*, 1991). Saiki(1988)가 PCR 기법을 이용하여 β -globin의 genomic sequences를 증폭할 수 있다는 등의 연구가 보고된

후 유전자 지도 작성, 식물병원체의 빠른 동정, cDNA의 증폭을 통한 mRNA의 탐색 및 발현등 생명 과학 관련 분야에서 폭넓게 이용되고 있다 (Park *et al.*, 1997). 최근에는 PCR 반응으로 증폭된 DNA 길이 차이에 의해 유전적 다형성을 검출하는 방법으로 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs) 법이 개발되어, 유전자 지문(DNA fingerprinting)법이 나, RFLP(Chiu *et al.*, 1993)법과는 달리 실험 절차가 간단하고(이와 상, 1995) 소량의 DNA만을 사용하므로 시간과 경제성에서 RFLP보다 뛰어나 (Lee *et al.*, 1997) 미생물 연구에 많이 사용되고 있다. 특히 Williams 등 (1990)이 AP-PCR에 의해 증폭된 DNA 단편들을 유전자 표지인자(DNA markers)로 사용할 수 있다고 보고하였고, Khush등(1991)이 *A. bisporus*의 육종연구에서 RAPD markers가 동형핵상의 분리균주들과 fingerfrinting strains 사이에서의 교배에 대한 isolation과 monitor-특히 inbreed와 near isogenic lines간-을 할 수 있는 수단으로 육종 연구의 효과를 증가시킬 수 있다고 하였다. Lee *et al.*,(1997)도 한국의 대표적인 표고 품종에 대한 RAPD를 실시하여 품종간의 구분이 가능한 patten을 보여주었다. 교배형을 결정하는데 이 방법이 대치접종과 같은 고전적인 방법보다 시간이 많이 절약되며 PCR분석에 의한 교배형 결정을 다른 자낭균류들에도 응용할 수 있을 것이라고 하였다.

지령은 아직 국내에서 발견되었다는 보고가 없으며 국내에서 채집된 바가 없다. 현재까지 지령은 전량을 중국에서 수입하고 있으며, 국내에 보관 중인 균주들도 대부분 중국에서 분양 받았거나, 중국에서 입수한 균핵으로부터 분리한 균주들이다. 세계적으로 지령에 대한 연구는 중국에서 일부 행해지

고 있으며 저평의 유전학적인 연구도 상당히 미흡한 실정이다.

담자균강에 대한 생리학적인 배양분류나 분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류에 의한 제3의 분류방법이 발달되어 왔다. 이러한 분자 생물학적인 시도 중에서 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 의한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되어 왔다. 균류를 포함한 진핵생물의 ribosomal DNA의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribe spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되어져 왔지만, 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고, 매우 보존적이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 sequences를 나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 난점이 있었다. 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화에 적합한 수단으로 취급되었다. 그러나, 18S와 28S는 각각 1600 bp와 3300~4800 bp로 그 전 염기서열을 결정하는 것에 많은 시간과 노력을 요구한다.

그 중에서 ITS 영역은 유용한 계통분류의 수단으로 간주하고 있을 뿐만 아니라, 속 및 종 수준의 신속동정에 적합한 probe의 개발 가능성을 강하게 시사하고 있다. ITS는 가운데의 5.8S를 포함하여 500bp 정도로 그 염기서열을 결정하기가 간편하고, 시간적 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 또한 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하다. 이러한 풍부한

정보량과 간편성으로 동일 속내의 종간 및 속간의 유연관계 연구에 유용한 수단이 되어왔다.

본 연구에서는 RAPD를 통해 저령 균주들 간의 유전적 근연성을 조사하였고, 현재 진균류의 계통분류에서 유력한 분류방법으로 이용되고 있는 ITS 영역의 sequencing을 통한 저령의 rDNA의 염기서열을 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 저령 균주별 PCR-RAPD를 통한 유전적 유연관계

가. 저령 균주별 배양학적 특성 조사

저령의 각 균주를 PDA 평판배지에 8mm cork borer로 disk를 만든 다음 접종하여 25℃ 암조건에서 25일간 배양하면서 집락의 특성과 성장 속도를 측정하여, 각 균주별 생리적 특성을 조사하였다.

나. PCR-RAPD

저령의 각 균주를 PDA plate에 cellophane film을 깔고 4주간 25℃에서 배양한 다음 균사체만 수확하였다. 수확한 균사체를 SDS-lysis buffer, 2X cTAB, Chloroform: Isoamylalcohol=24:1 용액에 차례로 처리한 다음, Isopropanol로 genomic DNA를 침전 시켰다. 침전된 DNA를 70% EtOH로 행구어준 다음, TE buffer에 녹인 gn 다음 spectrophotometer로 5~50ng으로 조절한 다음 PCR 반응에 사용하였다. 본 실험에 사용한 primer

는 operon사의 OPA-01, OPA-11, OPA-19, OPD-18, OPO-2, 그리고 Bioneer사의 primer No.23, No.28을 각각 사용하였다(Table 4-2).

PCR mixture는 template DNA $2\mu\ell$ (10ng/ $\mu\ell$), 0.5mM의 Primer, 20mM의 dNTP mixture, $10\times$ reaction buffer, 1 unit의 *Taq* polymerase를 total volume $20\mu\ell$ 로 하여 실시하였다.

PCR 반응은 94°C 에서 5분간 predenaturation한 다음, 94°C 에서 1분간 denaturation, 37°C 에서 2분간 annealing, 72°C 에서 3분간 extension 과정을 40cycles를 수행한 다음 72°C 에서 5분간 처리후 마무리 하였다. PCR products는 1.5% agarose, 120V에서 전기영동한 다음 ethidium bromide(10mg/ml)에 염색하고 UV transilluminator에서 확인하였다.

각 균주별 primer에 의한 증폭 pattern의 비교는 동일한 크기의 band의 존재여부로 판별하여 같은 크기의 band는 동일한 것으로 취급하였다. 균주간의 유사도(similarity coefficient)는 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$F = 2N_{XY}/(N_X+N_Y)$$

F: Similarity coefficient.

N_{XY} : The number of PCR products shared by isolates X and Y.

N_X+N_Y : Yotal number of PCR products in isolates X and Y, respectively.

Dendrogram은 위의 유사도 값을 근거로 UPGMA(Unweighted Paired Group Methods with Arthmetic Average)법을 이용하여 작성하였다. 유사도와 dendrogram의 작성은 SPSS-WIN(Ver. 9.0) 프로그램을 이용하였다.

Table 4-1. List of the mycelia isolated from the mycelia of *Grifola umbellata* and its related other race.

Marks	The genomic DNA sources collected from	States
1 GUA	The mycelium isolate from NIAST.	Mycelia
2 GUB	The mycelium isolate from KFRI.	Mycelia
3 GUC	The mycelium isolate from NIAST.	Mycelia
4 GUE	The mycelium isolate from NIAST.	Mycelia
5 GUF	The mycelium isolate from Institute of Medicinal Plant in Chinese Academy of Medical Science Center.	Mycelia
6 Sclerotia	Directly obtained from Sclerotia of <i>G. umbellata</i> collected from China.	Sclerotia
7 GUT	The mycelia isolated from American Type of Culture Collection ATCC64721	Mycelia
8 GUS	The mycelium isolate from Dongguk University	Mycelia
9 GF	The mycelium of <i>Grifola frondosa</i> isolated from KFRI	Mycelia

The mycelium of *Grifola umbellata*(1 to 8 lines) and of *G. frondosa*(line 9) NIAST; National Institute of Agricultural Science and Technology
KFRI; Korea Forest Research Institute

Table 4-2. The list of primers and their base sequences used for RAPD.

Primer NO.	Base sequences(5' to 3')	Remark
#28	5'-CCCGCCCTTG-3'	Bioneer Co.
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	Operon Co.
OPO-02	5'-ACGTAGCGTC-3'	Operon Co.
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	Operon Co.
OPA-19	5'-CAAACGTCGG-3'	Operon Co.
OPD-18	5'-GAGAGCCAAC-3'	Operon Co.

2. PCR-RAPD를 통한 검은비늘버섯의 유전적 유연관계

가. DNA추출

Zolan & Pukkila(1986)의 방법을 일부 변형한 것으로 멸균된 유발에 균 사체를 넣고 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 0.3g 정도를 eppendorf tube(1.8ml)에 넣어 60°C의 extraction buffer(2% CTAB), 1.4M NaCl, 100mM Tris-HCl(pH 8.0), 50mM EDTA, 0.2% β -mercapto-ethanol) 1.2ml에 넣어 잘 혼합한 후 60°C water bath에서 80분 동안 반응시키고 원심분리(12000rpm, 4°C, 15min)시켜 그의 상등액에서 동량의 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1를 첨가하여 다시 원심분리(12000rpm, 18°C, 15min)하였다. 흰색층이 형성되면 상등액 만을 취해 RNase A(Sigma: 50 μ g/ml, 30°C, 50분)와 Proteinase(Sigma: 100 μ g/ml, 48°C, 60분)처리를 하고 CI(Chloroform : Isoamylalcohol = 24 : 1)용액에 3회 세척하였다. 다시 100% Isopropanol용액(x0.6 volume)을 넣어 -20°C, 1시간 정도(또는 overnight)반응시키고 이를 원심분리하여 pellet의 형성을 확인한 후, pellet이 튜브에서 떨어지지 않도록 주의하면서 용액을 버리고 1.0ml의 washing solution(10mM Ammonium acetate 또는 70% Ethanol) 처리를 2회 반복한 다음, 멸균지에 얹어서 50분 동안 건조시킨 후 TE beffer(10mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA) 100 μ l를 넣어 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. DNA의 농도(20 μ l/ml)와 순도는 흡광광도계(Spectrophotometer)로 260nm와 280nm에서 흡광도(optimal density: O.D.)로 측정하였고, 농도를 맞춘 DNA를 PCR 반응의 주형DNA(template DNA)로

이용하였고 남은 genomic DNA는 -20°C 냉동실에 보관하여 필요할 때마다 사용하였다.

나. PCR 반응

PCR 반응액은 공통 시료를 모두 혼합하여 0.5ml의 eppendorf tube에 넣어 냉동 건조한 (주)Bioneer사의 primer-Top 제품을 사용하였고, 사용된 primer는 OPD-18은 Operon사에서, #28과 #36은 Bioneer(주)에서 구입하였다(Table 4-3). PCR반응은 Williams의 방법(Williams *et al*, 1990)을 기준으로 약간의 변형을 가하였다. ; premix-Top에 10pM의 primer $1\mu\text{L}$ 와 20ng의 template DNA $1.5\mu\text{L}$ 에 $17.5\mu\text{L}$ 의 증류수를 넣어 전체 부피가 $20\mu\text{L}$ 이 되도록 맞춘 후 동량의 mineral oil을 첨가하여 PCR시켰다. 반응 조건은 $94^{\circ}\text{C}\rightarrow 5$ 분간 predenaturing, $94^{\circ}\text{C}\rightarrow 1$ 분간 denaturing, $37^{\circ}\text{C}\rightarrow 2$ 분간 annealing, $72^{\circ}\text{C}\rightarrow 3$ 분간 elongation의 3단계를 1 cycle로 하여 총 40회를 진행하였으며 최종적으로 72°C 에서 5분간 안정화시킨 다음 전기영동하기 전까지 4°C 에서 보관하였다(Cook *et al*, 1996). 증폭된 PCR product는 1x TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하였고, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 stain과 destain을 각각 15분간 한 후, UV transilluminator 상에서 polaroid film 667을 이용하여 각각의 밴드들을 촬영하였다 (Fig. 4-6).

Table 4-3. Nucleotide sequences used in this work.

Primer No.	Sequences	Ann. T _m (°C)	Purchased Company
primer-28	5'-CGCTCCCGAA-3'	35	Bioneer Co.
primer-36	5'-GGGCCCGAGG-3'	36	Bioneer Co.
OPD-18	5'-GAGAGCCAAC-3'	32	Operon Co.

3. 육종된 검은비늘버섯 (*Pholiota adiposa*)균의 유전적 유연관계

가. 공시균의 분리

1996년부터 충북 보은군 범주사 주변에서 채집하여 동정하였다 (이, 1988; 김, 1979; 박, 1991). 이들은 자실체에서 균사체를 분리하여, clamp connection을 확인한 후에 일반적으로 사용하는 참나무 톱밥배지에 배양하여 자실체를 얻었다 (Lee *et al*, 1998). 얻어진 자실체는 채집 시 얻어진 사진자료와 비교하고, 재 동정을 하여 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*)인 것을 확인한 후에, 유산지에 포자를 받았다. 단, 담자낭포자(basidiospores)는 멸균수로 희석하여 (spore suspension; $10^{-4} \sim 10^{-2}$), GS agar (Ginterava & Janotkova, 1975)에 도말하였다. 약 15°C에 1~2주일 동안 발아되는 균사를 채집하여 현미경 관찰을 통하여 clamp connection이 없는 균사만 채집하여 분리하여 MN배지(Lee, 1991)에 저장하였다. 이때 세균의 오염을 방지하기 위하여 멸균수 혹은 GS agar에 Penicillin-G 또는 Ampicillin을 약 10 μ g/ml 첨가하였다. 또한 채집 분리된 분리 균은 다음 실험을 위하

여 일부를 사면 배지에 계대하여 배양한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다 (Table 4-7).

나. 발이

병 배지를 이용하여 검은비늘버섯의 자실체 형성 여부를 실험하기 위해 충북 농촌 진흥원 응용미생물과에서 직접 입병한 참나무배지(참나무 : 미강 = 80 : 20 v/v)와 미루나무배지 (미류나무 : 미강 = 80 : 20 v/v)를 고압증기멸균(121℃, 1.5기압, 60분)한 후, 검은비늘버섯의 균사를 접종하여 암실에서 25℃, 90일 동안 균사를 배양하였다(차 등, 1989). 균사가 충분히 성장된 병 배지는 균 긁기를 하고 물을 충분히 적셔준 후 다시 엷어서 물기 제거작업을 하여 온도 12~14℃, 습도는 80~85%를 유지하여 발이 시켰다 (Lee *et al.*, 1988).

다. PCR-RAPD

액체 배양을 통하여 얻어진 혹은 MN agar에서 배양된 균사체를 넣고 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 0.3g 정도를 eppendorf tube (1.8ml)에 넣어 60℃의 extraction buffer(2% CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.0), 50mM EDTA, 0.2% β -mercaptoethanol) 1.2ml 넣어 잘 혼합하여 genomic DNA를 분리하였다 (Lee *et al.*, 1998). PCR 반응액은 추출된 genomic DNA를 모두 혼합하여 0.5ml의 eppendorf tube에 넣어 냉동 건조한 primer-Top 제품으로 증폭시켰다 (Bioneer Co.

Williams *et al*, 1990; Cook *et al*, 1996). 사용된 primer는 OPA-1(5'-CA GGCCCTTC-3'), OPA-7(5'-GAAACGGGTG-3'), OPA-11 (5'-CAATC GCCGT-3'), OPA-12(5'-TCGGCGATAG-3'), OPA-19(5'-CAAACGTC GG-3'), OPD-18(5'-GAGAGCCAAC-3') 와 #6(5'-AGCCAGCGAA-3'; Bioneer Co.)를 사용하였다. 증폭된 PCR product는 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)을 사용하여 1.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하였고, 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 stain 과 destain 을 각각 15분간 한 후, UV transilluminator 상에서 polaroid film 667을 이용하여 각각의 밴드들을 촬영하였다 (Fig. 4-9)

라. 교배 DNA 추출

비슷한 시기에 발아되는 포자들을 각각 분리하고, 현미경하에서 clamp connection과 hyphae characteristics를 확인한 후 이를 본 실험의 단포자 분리균으로 사용하였다(차, 1989). 분리균은 발아되는 순으로 번호를 매겨 1차로 10~30개의 단포자에서 발아된 균사를 분리하였고, 이 중에서 균사 형태나 성장 속도가 비슷한 것을 위주로 하여 단포자 분리 균주를 선발하였다 (차 등, 1989). 이들을 PDA 배지에 접종하여, 성장을 잘 하는 균을 위주로 인위적으로 배양하여 교배시켰다. 교배는 세 개의 단핵 균주를 같은 Petri-dish에 15mm정도 띄워 접종한 다음, 25 $^{\circ}$ C에서 7~10일간 배양하였다. 배양 후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어내어 현미경으로 clamp connection의 존재를 확인하여 이를 mating된 2핵 균사로 간주하여 교배가 된 것으로 보았다.

4. 저령 균주별 ITS 영역을 이용한 유전적 유연관계

가. Total genomic DNA 분리

냉동건조 시킨 균사체 1g 에 액체 질소를 넣고 곱게 마쇄한 다음, DNA 추출용액 (2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4M NaCl, 20mM EDTA) 1ml에 고르게 현탁한 후 58℃에서 60분간 열처리하였다. 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 시킨 후 70% 에탄올로 세척하고 200 μ l TE buffer(pH 8.0)에 녹인 DNA를 사용하였다.

나. rDNA의 ITS 영역 증폭

저령의 각 균주 및 기타 균주의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 White(1990)에 의해 보고된 곰팡이류의 ITS 영역 증폭 primer(Fig. 4-1)를 사용하였다. PCR 반응은 2.5mM dNTP, 100pmol primer, 2.5 unit Taq DNA polymerase(Promega Co.), 5 μ l 10X buffer, 50ng genomic DNA를 멸균수와 잘 섞어 총량을 50 μ l로 한 후 PCR 반응을 하였다. PCR thermal cycler는 MJ research사의 제품을 사용하였고, PCR 반응은 Predenaturation 95℃ 4분, Denaturation 95℃ 1분, Annealing 58℃ 1분, Extension 72℃ 2분으로 하여 총 35회 반복하였다. PCR 산물을 정제하기 위해 2 volume의 100% 에탄올과 1/10 volume의 3M sodium acetate (pH 4.8)을 첨가하여 -80℃에서 45분간 처리한 후, 15분간 15,00 rpm에서 원심분리하여 DNA를 침전시키고 다시 70% 에탄올로 세척하여 건조하여 20

μl TE buffer에 녹였다.

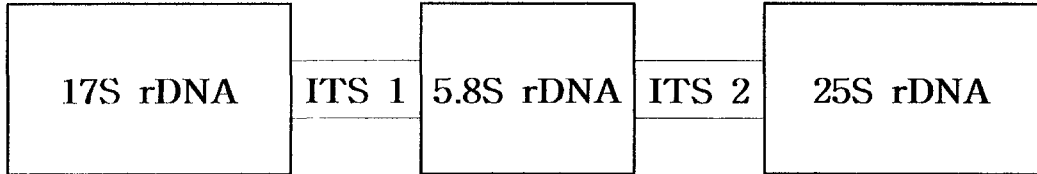


Fig. 4-1. A structure of the ribosomal DNA containing ITS region. Arrows indicate the positions of the primers used for PCR amplification and sequencing of ITS region.

Table 4-4. Primers used for amplification of ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequences.

Primer	Sequence
ITS 1 (Forward)	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3' (19mer)
ITS 4 (Reverse)	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (20mer)

Table 4-5. PCR mixture and PCR condition.

PCR mixture	PCR Condition	Cycler
1μl of DNA(50ng) 8μl of dNTP(2.5mM) 0.5μl of Forward primer(100pmol) 0.5μl of Reverse primer(100pmol) 1μl of Taq polymerase(2.5units) 10μl of 10X buffer 79μl of D.W Total volume : 100μl	Denaturation 94°C, 4min Denaturation 94°C, 1min Annealing 58°C, 1min Extention 72°C, 2min Extention 72°C, 7min	35 cycles PTC-100™, (MJ Research Inc.)

다. PCR 산물의 cloning

PCR로 증폭된 rDNA ITS 영역의 염기서열을 조사하기 위해 먼저 이들 유전자 단편을 pGEM-T vector system(Promega Co.)에 재조합 하였다. 재조합을 25ng PCR 산물, 50ng vector, 3units T4 DNA ligase, 1 μ l 10X buffer 및 D.W를 혼합하여 전체 부피를 10 μ l로 하여 14°C에서 2시간 이상 실시하였다. 재조합 된 벡터의 transformation을 위해 2 μ l의 반응물과 50 μ l competent cell (DH5 *a*, 1 \times 10⁸ cfu/ μ g DNA)을 조심스럽게 혼합하고 얼음에 20분간 둔 다음 42°C의 heat block에서 47초간 heat shock을 준 후 2분간 얼음에 보관하여 transformation을 하였다. 형질전환 과정을 거친 세포를 LB broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에서 1시간 진탕배양(210rpm)한다. Ampiciline이 첨가된 LB agar plate에 X-gal 도말한 후 배양액 150 μ l를 취하여 다시 도말한다. blue/white colony 방법으로 유전자의 삽입여부를 조사하였다. 형질전환된 *E. coli*의 white colony를 취하여 3ml의 LB broth 배지에 배양한 후 QIAGEN Mini Kit를 이용하여 Vector를 분리 정제하였다.

분리한 plasmid는 *EcoR* I restriction enzyme을 사용하여 inserting을 확인하였다. Inserting check를 위한 mixture는 plasmid 2 μ l, 10 \times H buffer(Takara Co.) 1 μ l, restriction enzyme 1 μ l, 그리고 D.W 6 μ l로 하여, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액은 1.5% agarose에서 전기영동한 다음, EtBr에 10분간 염색하여 확인하였다.

Plasmid를 terminator 기법으로 direct sequencing하기 위해, plasmid를 M13 primer를 이용하여 PCR하였다. PCR 반응액은 Terminator mix(Big

DyeTM Terminator RR mix) 2 μ l, plasmid 1.5 μ l, M13 forward primer 1 μ l, M13 reverse primer 1 μ l 그리고 D.W 4.5 μ l로 총 10 μ l volume으로 하였다. PCR cycling은 96 $^{\circ}$ C에서 30초, 50 $^{\circ}$ C에서 15초 그리고 60 $^{\circ}$ C에서 4분의 과정을 25회 반복하는 것으로 하였다. PCR product의 정제는 다음과 같은 방법으로 실시하였다. PCR product 10 μ l에 D.W 40 μ l를 첨가하고, 다시 3M NaOAc(Sodium acetate, pH 5.0) 5 μ l를 첨가하였다. 여기에 100% EtOH 125 μ l를 넣고 잘 섞어준 다음 ice에서 30분간 처리하였다. 이 혼합액을 13,000rpm, 상온에서 원심분리 하였다. 상등액을 조심스럽게 제거하고 7-% EtOH 250 μ l로 헹궈준 다음 다시 13,000rpm에서 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 centrifugal concentrator에서 건조하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

라. 전기영동

정제된 PCR product를 ABI 377 기종의 autosequencer(Perkin-Elmer Co.)를 이용하여 Dry terminator sequencing 기법으로 protocol에 따라 실시하였다.

마. 염기서열 분석 및 계통학적 유연관계 분석 및 염기서열의 등록

계통학적 유연관계를 분석하기 위해 이용된 rDNA ITS부위의 염기서열은 DNASYS 프로그램을 이용하여 정렬시킨 후 MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) 프로그램(Kumar *et al*, 1993)의 neighbor-joining 과 Juke & Cantor(1996)의 방법을 이용하여 evolutio

-nary distance matrix를 작성하였고 이들 자료를 통해 생성된 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하였다. 그리고, 계통학적 유연관계에 대한 통계적 안정성을 검증하기 위해 1000회의 resampling에 근거한 bootstrap 분석을 반복 실시하였다.

일련된 과정을 거쳐 결정된 저령의 ITS1, ITS2 그리고 5.8S rDNA의 염기서열은 GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. RAPD를 이용한 저령의 종내 유전적 유연관계

PDA 배지에서 저령 각 균주별 성장 특성은 일반적인 버섯균 보다는 느렸는데, 그 중에서 A, B 그리고 C 균주는 GUS나 P 균주 보다는 빨랐고, 배지에 검은색의 색소를 많이 분비하였다(Fig. 4-2, Fig. 4-3). 특히, Gus 균주의 색소분비가 많았다. 그러나, 나머지 다른 균주는 중국에서 국내의 균주 보존기관을 거치는 동안 상당한 수의 계대가 되어서, 균의 활력이 떨어졌음을 알 수 있었다. GUS 균주 또한 계대의 횟수가 많아질수록 PDA배지상에서 집락의 형태가 균사가 뭉쳐서 자라기보다는 균사생장 위주의 집락 특성을 나타내었고, 검은색의 색소 분비 또한 감소하는 경향을 나타내었다.

유전자 분석을 위해 6개의 균주를 농업과학기술원, 임업연구원 및 ATCC

(American Type Culture Collection) 및 중국의 북경과학원으로부터 분양받았고, 저령의 균핵은 중국 산서성 곽현 지방의 저령 재배단지에서 직접 채집하였다 (Table 4-1).

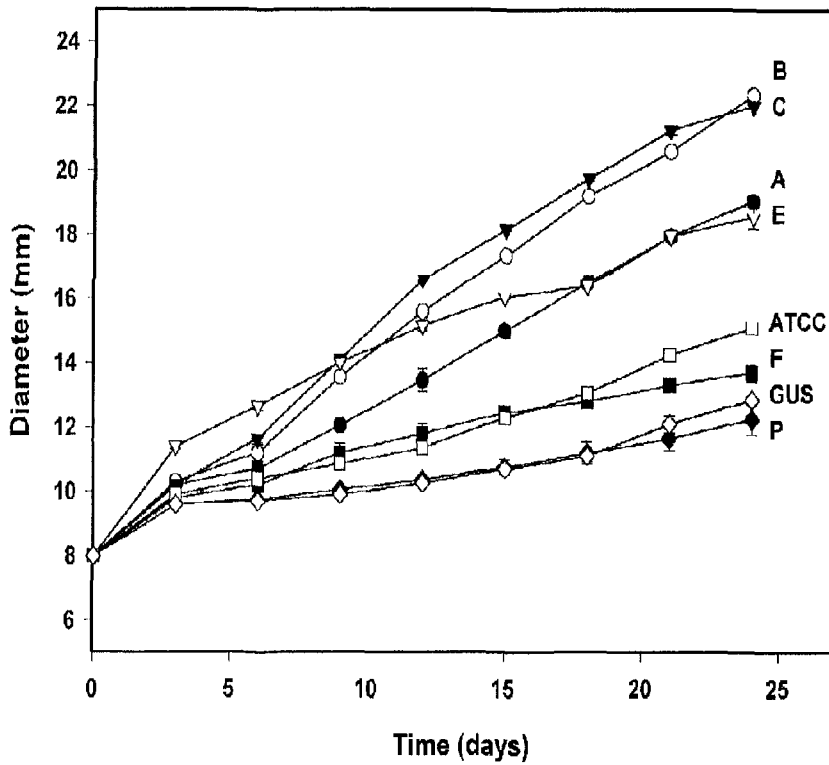


Fig. 4-2. The growth diameter of *G. umbellata* isolates on PDA plates for 24 days' incubation at 20°C

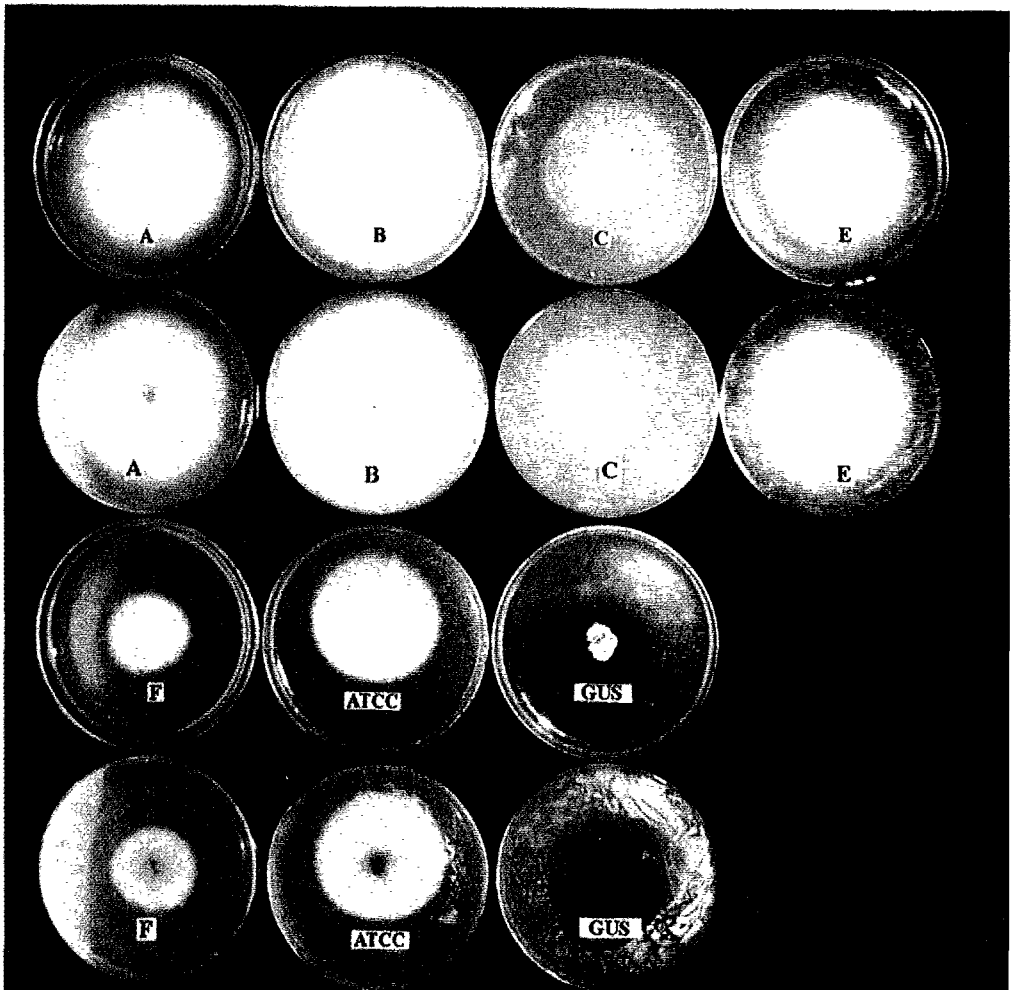


Fig. 4-3. The cultural characteristics of *Grifola umbellata* isolates: Top; forward, Bottom; Backward of the isolates of *G. umbellata* collected from various sources mentioned in Table-1

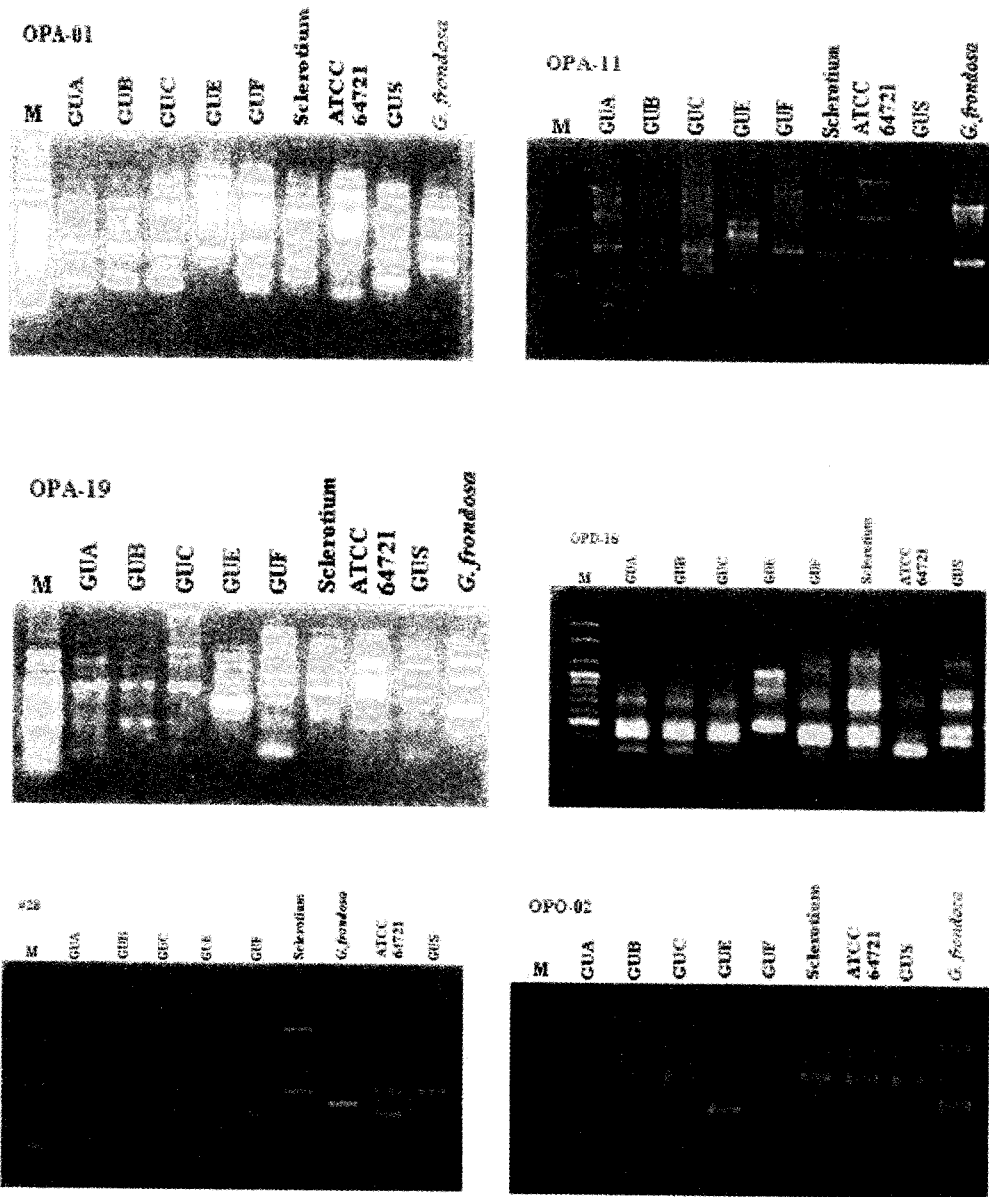


Fig. 4-4. PCR amplified genomic DNAs from the eight isolates of *Grifola umbellata* and *G. frondosa*. Lane M is molecular weight marker and strain name on top of the lane indicate the isolate name of each strain as shown in Table 4-1. The primers used were # 28, OPA-01, OPA-11, OPA-19, OPD-18 and OPO-02.

저령의 genomic DNA의 추출은 A, B, C, E, F, GUS, P 및 *G. frodosa*는 균사로부터 S는 저령의 균핵으로부터 직접 분리하였다. PCR-RAPD 결과 다양한 band 들이 증폭되었다. 저령은 primer #28에서 GUA, GUB, GUC, GUE, GUF, 저령균핵 그리고 GUS가 비슷한 양상의 band pattern을 나타내었고, primer OPD 18에서는 GUA, GUB, GUC, GUF, 저령균핵 그리고 GUS가 거의 동일한 band 양상을 나타내었다. primer OPA 11에서는 F와 저령균핵 ATCC가 유사한 pattern이었으며, primer OPA 1, OPA 19 그리고 OPO 2에서도 비슷한 결과들이 나왔다. 하지만 같은 속에 있는 *G. frondosa*의 경우 저령의 각 균주들과의 밴드양상은 전혀 달랐다(Fig. 4-4). 이를 근거로 UPGMA 분석 결과, 저령의 각 균주들은 유전양상이 (GUA, GUB, GUC), (GUF, GUS, and ATCC) 및 (GUE,)의 세 group으로 나뉘어 졌다(Fig. 4-5). 본 연구에서 GUE 균주는 PDA 배지상 colony의 특성도 저령과 달랐고 PCR-RAPD결과 저령과는 생리적, 유전적으로 거리가 있음을 알수 있었다.

본 연구결과, RAPD를 통해 공시 균주로 사용된 저령의 유전적 관계를 확인할 수 있었고, RAPD finger printing 결과 저령에 공통적으로 나타난 marker를 이용하여 *Grifola umbellata*-specific primer의 개발이 가능하리라 여겨진다.

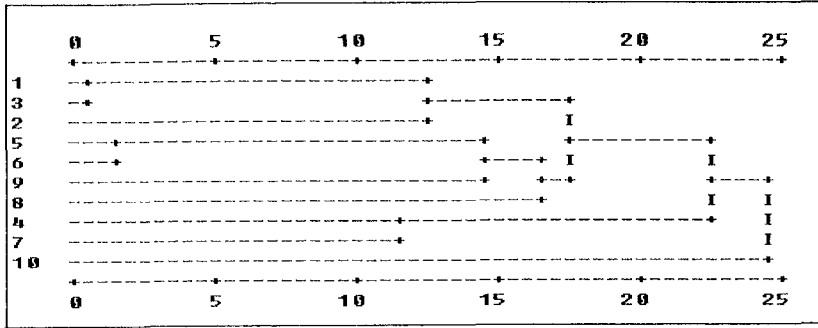


Fig. 4-5. UPGMA dendrogram showing the relationship among the lines of *G. umbellata* (1 to 9) and *G. frondosa* (10) isolates based on the polymorphic bands of DNA formed in 1.5% agarose gel in RAPD analysis: the number 6 indicated the sclerotium collected, 9 to the line of GUS directly collected, and 5 to the line of F, respectively.

2. 검은미늘미섯의 종내 유전적 유연관계

가. 동정(미늘미섯속의 종내 비교)

1996년과 1997년도 충북 보은군 주변에서 채집하여 동정한 5균주와 본교 미생물실에서 말아시킨 P1과 P4의 자실체를 각각 그 배지종류에 따라 구분하여 이들에게서 각각 DNA를 추출하고 PCR을 한 후 전기영동 하여 RAPD를 비교하였다(Fig 4-6). 본 실험 결과 Primer당 5-7개의 band가 형성되었고, *Pholiota*속의 common band는 primer #28(1.5Kb와 1.0Kb)과 Primer OPD-18(1.0Kb와 500bp)에서 형성되었다. 이 중 primer #28에 의한 P9 균주는 공통 밴드가 나타나지 않았으나 *Pholiota adiposa*의 동정에는 위의 두 primer(#28, OPD-18)를 동시에 사용하면 분류가 가능할 것으로 본다. primer #28에 의해 *P. terrestris*의 specific

band(900bp)가 동정되었고, Primer #36에 의한 실험에서는 같은 균주내에서는 같은 band pattern를 형성하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 서로 다른 균주들간에는 band pattern의 차이가 뚜렷하였다. P4와 P5가 2.03Kb에서 1종류의 band적 차이를 나타내었는데, 이는 P4가 자실체를 형성시키기 어려운 환경하에서 발아 되었기에 그의 DNA내에서 변이가 일어났을 것이라 여겨진다. 결과적으로 같은 *P. adiposa* 종이라도 균주가 다르면 유전적으로 차이가 있음을 알 수 있었고, 또한 자실체와 균사체의 DNA pattern이 동일하게 나타났는데, 이는 이(1997)가 표고의 한 계통내에서 형태에 관여하는 단백질의 전기영동상에서는 상당한 차이를 보였으나 그의 유전자인 DNA는 동일함을 보여준 것과 일치하는 결과이다.

나. 동정(다른 버섯속과의 비교)

1996년과 1997년도 충북 보은군 주변에서 채집하여 동정한 *Pholiota* spp.와 이들을 비교할 버섯들로 *Tricholoma masutake* 2균주의 8종류의 균주에서 각각 DNA를 추출하여 PCR을 한 후 전기영동하여 RAPD를 비교하였다(Fig. 4-6). 2종류의 Primer(OPD-18, OPO-2)에서 각 버섯들간에 다형적인 band pattern이 형성되었고, OPD-18에서는 *Pholiota*속이 다른 버섯들과 구별되는 specific band(1.0kb와 506bp)를 형성하였다. 비늘버섯속의 종내 실험에서는 사용하지 않은 primer OPO-2에 의해서 P1의 specific band(3.0kb) 1종류와 *P. terrestris*(P10)종만의 specific band(1.0Kb)가 나타났다. 따라서 primer OPD-18와 OPO-2에 의해서 비늘버섯속의 종내 구분과 다른 버섯과의 속내 구분이 가능함을 알 수 있

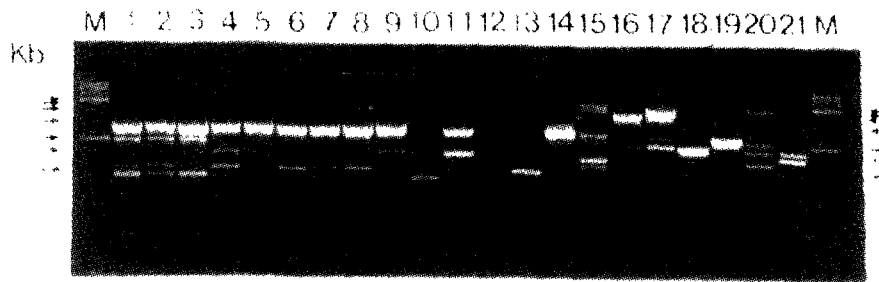
었다.

PCR-RAPD를 사용한 *P. adiposa*의 종내, 종간 동정 및 다른 버섯들의 비교에서 RAPD의 다형성이 형성되었고, primer OPD-18에 의해서 *Pholiota* 속의 특이적 밴드가 나타났다. 이는 RAPD기법이 종 동정에 유용하고 유전적 다형성과 계통 분류학적 분석을 할 수 있음을 여러 보고들(Khush *et al.* 1991; Guthrie *et al.* 1992)을 통해서도 알 수 있다.

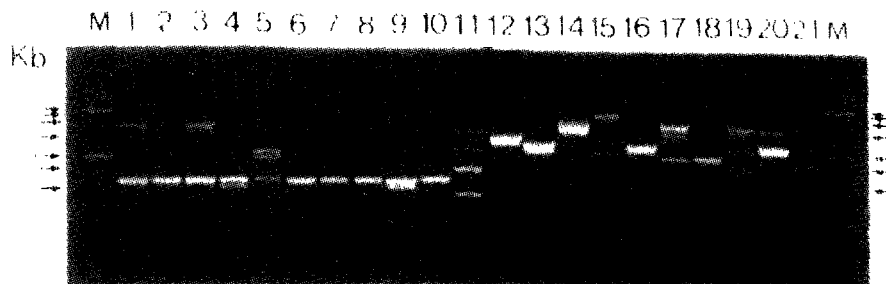
다. 유사도 분석

2종류의 PCR-RAPD에 의한 bands 자료(Fig. 4-6)를 기초로 하여 binomial matrix(code 0 또는 1)을 작성하고 이를 이용하여 Dice의 공식에 따라 산출된 각 균주간의 유사도를 토대로 UPGMA법을 이용하여 Dendrogram을 작성하였다(Fig. 4-7). 15종의 균주들은 전체적으로 3 group으로 나눌 수 있었고, 4 종류의 *P. adiposa*는 85%~71%의 높은 유사도를 가지고 같은 묶음을 이루었다. 반면에 같은 비늘버섯속인 *P. terrestris*는 *P. ostreatus*와 0.43%의 상동성으로 같은 그룹을 이루었고, *P. adiposa*와는 0.29%의 낮은 상동성을 보였다. 이는 실험에 사용한 primer의 수가 적고, primer OPO-2는 *P. terrestris*에 특이적인 band를 나타내었기에 *P. adiposa*와는 상동성이 낮게 형성되었을 것이다. 좀 더 많은 primer를 사용하여 실험을 하면 공통 밴드를 형성하는 부분이 많이 나타날 것이고 그 상동성은 높아질 것으로 기대된다. 비늘버섯속 5종은 다른 버섯들과는 거의 상동성을 가지지 않았다.

Primer-28



Primer-36



OPD-18

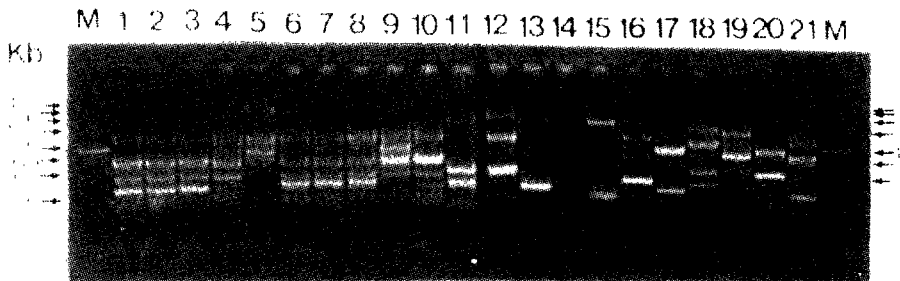


Fig. 4-6. The polymorphism of PCR-RAPD bands made from the mushroom genomic DNA after reacted with the different primers, 28, 36 and OPD-18. M; 1kb DNA ladders, Lane 1 to 10; *P. adiposa*, Lane 11; *Pholiota terrestris*(P11), Lane 12; *P. nameko*(P12), Lane 13; *Naematoloma sublateritium*(P13), Lane 14; *Tricholoma matsutake*(P14), Lane 15; *Lentinus edodes*(P15), Lane 16; *Flammulina velutipes*(P16), Lane 17; *Polyporus brumalis*, Lane 18; *Coprinus comatus*(P18), Lane 19; *Schizophyllum commune*(P19), Lane 20; *Ramaria botrytis*(P20), Lane 21; *Agaricus bisporus*(P21).

Table 4-6. Cosine similarity coefficient among the 21 isolates made by the polymorphism of the RAPD bands amplified with three primers.

Isolates	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
P1	1.0000										
P2	1.0000	1.0000									
P3	1.0000	1.0000	1.0000								
P4	0.8104	0.8104	0.8104	1.0000							
P5	0.8295	0.8295	0.8295	0.9770	1.0000						
P6	0.6351	0.6351	0.6351	0.6606	0.6761	1.0000					
P6	0.6351	0.6351	0.6351	0.6606	0.6761	1.0000	1.0000				
P8	0.6351	0.6351	0.6351	0.6606	0.6761	1.0000	1.0000	1.0000			
P9	0.7506	0.7506	0.7506	0.7707	0.7888	0.8667	0.8667	0.8667	1.0000		
P10	0.6742	0.6742	0.6742	0.5785	0.5922	0.7006	0.7006	0.7006	0.7006	1.0000	
P11	0.6928	0.6928	0.6928	0.6606	0.6761	0.5333	0.5333	0.5333	0.5333	0.4671	1.0000
P12	0.5164	0.5164	0.5164	0.3693	0.3780	0.3727	0.3727	0.3727	0.3727	0.3482	0.5963
P13	0.2828	0.2828	0.2828	0.2697	0.2760	0.4082	0.4082	0.4082	0.4082	0.2860	0.2449
P14	0.2372	0.2372	0.2372	0.2261	0.2315	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913	0.0000	0.2739
P15	0.3354	0.3354	0.3354	0.3731	0.3819	0.1936	0.1936	0.1936	0.2582	0.2261	0.3873
P16	0.2121	0.2121	0.2121	0.2023	0.2070	0.4082	0.4082	0.4082	0.3266	0.0953	0.2449
P17	0.2121	0.2121	0.2121	0.3371	0.2760	0.1633	0.1633	0.1633	0.1633	0.0953	0.1633
P18	0.2697	0.2697	0.2697	0.1928	0.1974	0.2335	0.2335	0.2335	0.1557	0.2727	0.2335
P19	0.0707	0.0707	0.0707	0.1348	0.0690	0.0816	0.0816	0.0816	0.0816	0.0953	0.0000
P20	0.2828	0.2828	0.2828	0.2697	0.2760	0.3266	0.3266	0.3266	0.3266	0.0953	0.1633
P21	0.3586	0.3568	0.3568	0.3419	0.3499	0.2760	0.2760	0.2760	0.2760	0.2417	0.2070

Table 4-6. Continued.

Isolates	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21
P12	1.0000									
P13	0.3651	1.0000								
P14	0.2041	0.2236	1.0000							
P15	0.3608	0.2372	0.2651	1.0000						
P16	0.2739	0.5000	0.2236	0.0791	1.0000					
P17	0.0000	0.1000	0.2236	0.0791	0.1000	1.0000				
P18	0.1741	0.2860	0.3198	0.2261	0.1907	0.2860	1.0000			
P19	0.0913	0.2000	0.1118	0.1581	0.2000	0.2000	0.2860	1.0000		
P20	0.3651	0.3000	0.1118	0.3162	0.3000	0.2000	0.0953	0.2000	1.0000	
P21	0.3086	0.3381	0.2835	0.2004	0.4226	0.0000	0.1612	0.2535	0.0845	1.0000

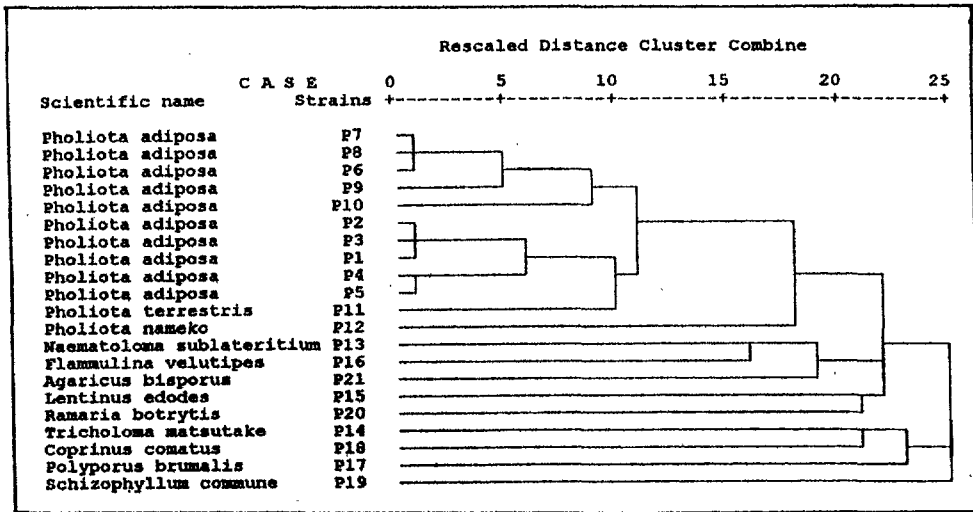


Fig. 4-7. The dendrogram calculated by the unweighted pair grouping method (the scale shown here indicated the Cosine similarity coefficient) as based on the PCR-RAPD bands made from the various mushroom genomic DNAs.

3. 육종된 검은비늘버섯 (*Pholiota adiposa*)균의 유전적 유연관계

가. 균주의 채집

1997년에서 2000년까지 가을에 월안산 조령산 및 법주사 주변에서 채집하였다. 그리고, 채집된 버섯은 우선 균사 배양을 통하여 조직 분리를 한 후에, 동정하여 *Pholiota adiposa*를 확인하였다 (김, 1979; 박, 1991; 이, 1988). 검은비늘버섯은 균사체에서는 어떤 다른 버섯과 비교될 만한 특징이 없었으나, 균사의 굵기가 상당히 좁았다. 그러나 채집된 버섯과 발이된 버섯은 특징적인 형태로 갈색의 갓 색깔과 흰점들이 갓 위에 산재되

어져 있었다. 또한, PDA 혹은 아무 배지에서 자실체가 생성되어 검은비늘버섯의 특징인 줄기에 연갈색의 인편이 형성되는 것을 관찰하였다. 여기서 P02균은 속리산에서 분리된 것이고, PAH와 PWH은 각각 시기가 다르게 채집된 검은비늘버섯으로 상당히 적은 버섯으로 도감에 나온 그림과 똑같은 것으로 나타났다 (김, 1979; 박, 1991). 그 외에 Chang-Ph와 PAL균주도 수집되었으며, 이와 관련된 종에 관한 것을 실험을 위하여 구입하였다.

채집된 균사는 배수체 균사 (dikaryotic mycelia; DM)를 자실체에서 손쉽게 분리 배양하여, 보관하였다. 또한, 자실체에서는 일반적으로 많이 포자를 분리하는 방법으로 분리하였다 (Lee *et al*, 1988; Lee *et al*, 1999; 차등, 1989). 그런데 앞 실험에서도 언급한 바로 세균의 오염이 많이 되어서 항생제인 Penicillin-G을 첨가하여 계속하여 단포자를 분리하였다. 이때 분리된 단포자 (monokaryotic or haploid mycelia; MM)는 우선 PDA에 옮겨 심고, 성장함과 동시에 균 보관배지에 넣고, 현미경 관찰을 통하여 clamp connection을 관찰하였다. 현재로써는 P02와 PAW의 DM을 이용하여 자실체를 형성하여 sporeprint을 이용하여 분리한 것을 series로 표현하였다 (Table 4-8).

나. 교배

전번 실험을 통하여 얻어진 자료, 즉 교배형에서 알려진 MM 균사인 P02 series를 이용하여 실험에 임하였다. 그리고, 전번 실험을 재확인하는 차원에서 사용된 형을 동일하게 AB (P2-26), Ab (P2-20), aB

(P2-29), 및 ab (P2-27)를 임의적으로 표시하였으며, 이것은 어떤 교배형의 생리적인 관점과 생화학적인 내용으로 사용한 것 이라기 보다는 실험의 편리성을 이용하여 사용하였다. PAH의 MM의 균사와 교배를 시켰을 때에 이상한 현상이 나타났다. 우선, PAH series의 단포자(MM)가 P02-series의 MM균사와 교배하여 4개의 교배형을 만드는 것으로 나와 있으나 자기끼리 교배에서는 동일한 교배형을 갖는 것으로 나타났다. 그 외 반면에 PAH series의 26, 29, 33 및 34 MM의 경우는 전부가 P02-series MM과 교배되는 형상이 나타났다. 자기끼리의 교배형에서는 극상으로 나타났다. 즉, PAH series의 MM 균사에서는 두 개의 교배형이 있는 것으로 나타났다. 아직, PAH-series MM 균사끼리 교배가 완전히 나온 것은 아니나 현재의 실험 결과는 PAH-07과 PAH-34가 주로 다른 PAH series의 MM과 주로 교배가 되는 것으로 나타났다. 월악산에서 채집된 검은비늘버섯은 법주사에서 채집된 P02 series와는 다른 교배양상이 나타나는 것으로 보였다. 이러한 것은 아직 검은비늘버섯의 유전학적인 특성은 채집된 지역의 검은비늘버섯과는 다르게 나타나는 것으로 보인다. 여기서 월악산의 검은비늘버섯은 일본의 검은비늘버섯(*P. adiposa*) 혹은 나마꼬 (*P. nameko*)와 동일한 교배형으로 bipolar system이 관찰되었다.

월악산에서 채집된 PAL series와 4개의 교배형인 P02-series와 교배시킨 결과는 Table 4-8과 Fig. 4-8에 표시하였다. 눈으로 관찰하여 구별할 수 없을 때는 주변 균사를 현미경 관찰한 결과이다. 균사들이 합하여 clamp connection이 관찰되었다. 이는 PAH와 P02의 MM 균사들끼리 교배한 것으로, 모두가 성의 구별없이 교배되었기 때문에 현미경적 확인과

함께 톱밥 배지에 직접 넣어서 배양하였다. 이 결과는 앞에서 교배된 PAH와 P02균사에서 자실체가 만들어지는 것이 톱밥 배지에서 관찰되었다. 이러한 현상은 아직 검은비닐버섯에 관한 성 혹은 교배형의 관계에서 알려지지 않은 내용으로 어떻게 자연적 설명을 하여야 할지가 문제이다. 여기서는 이러한 결과를 놓고 볼 때에 월악산 채집에서 얻은 검은비닐버섯과 속리산에서 채집된 것과는 다른 형태의 교배형이 나타나는 것으로 나타났다.

다. PCR-RAPD

한국에서 채집한 검은비닐버섯인 즉 채집지가 월악산 혹은 속리산의 균주에서는 모두 공동 밴드를 나타내는 primer는 #6에서 2.4~5Kb, OPA-1에서 2.2Kbp, OPA-7에서 1.5Kbp, 및 OPA-18에서 500bp 근방에서 2 bands들이 확인되었다(Fig. 4-9). 일본의 나메꼬버섯(*P. nemeko*)과의 비교에서 공통 밴드를 나타내는 것은 #6에서 1.5Kbp만 나타났다. 여기서 각각의 primer에서 만들어지는 polymorphism은 다르게 나타났으며, 최소한 일본의 *P. nemeko*와는 완전히 다르게 나타났다. 그러나 사용된 균사에서 *Pholiota*속의 종의 공통밴드는 사용된 다른 outgroup인 14에 의하여 다시 확인되었다. 여기서 나온 결과는 우리나라에서 자생하는 검은비닐버섯(*P. adiposa*)은 일본의 것과 다른 것이 관찰되었다(Lee *et al*, 1998). 사용된 단포자(MM)와 이핵포자(DM)의 비교실험에서 유무의 차이점이 관찰되었다 (Fig. 4-9;A, D, E); (A)에선 P2-5와 P2-26에서 1.5Kbp에서 밴드가 유무의 차이를 보였는데, mating 후에 DM인 P2-5×P2-26에선 밴드

가 떴다. 마찬가지로 (D)와 (E)에서 1Kbp에서 밴드의 유무에 의한 MM과 DM의 차이를 보였다. (D), (E), (F)의 경우에 P2균과 다른 DM간에 다른 밴드 패턴을 보였으며, P2균의 모균주인 P1균의 경우에도 약간의 차이를 보였다. (F)의 경우에는 MM의 P2-32의 900bp의 밴드가 DM인 P2-5×P2-32에서 뜨지 않았다. 밴드의 유무를 통해서 MM에서의 핵이 DM에서 공존한다고 생각된다.

Table 4-7. The list of *Pholiota adiposa* lines obtained or collected for this genetic works

No.	Marked	Descriptives
1	P-02	A line of <i>P. adiposa</i> isolated from Mt. SokRi, 1997 (Lee et al.,1999) The monokaryotic mycelia originated from the P-02-series basidiospores of P02 (originated from the basidiospores; P-02-20, 26, 27, and 29)
2	PAH	A line of <i>P. adiposa</i> isolated from Mt. WolAk, 1998 The monokaryotic mycelia originated from the PAH-series basidiospores of PAH
3	PWH	A line of <i>Pholiota adiposa</i> isolated from Mt. WolAk, 1999 PWH-series The monokaryotic mycelia from the basidiospores of PWH.
4	Chang-Ph	The dikaryotic mycelia isolated by Mr. Chang (ChungPuk NAIST)
5	PAL	Unknown dikaryotic mycelia isolated from Temple Beobju Sa
6		<i>P. nameko</i> obtained from NAIST
7		<i>C. cineris</i> obtained from NAIST
8	P-series	Several species of <i>Pholiota</i> collected and isolated (Several species)

Table 4-8. Matings^a made between the two mycelia originated from the basidiospores of *Pholiota adiposa* lines.

Numbers	Mating type	P-02				PAH							
		-20	-26	-27	-29	-07	-11	-12	-14	-26	-29	-33	-34
P2-26	AB	-	-	-	+								
P2-20	Ab	-	-	+	-								
P2-29	ab	-	+	-	-								
P2-27	aB	+	-	-	-								
PAH-07	aB	+	-	-	-	-	+	+	+				
PAH-11	ab	-	+	-	-	+	-	-	-				
PAH-12	a	+	-	-	+	+	-	-	-				
PAH-15		-	+	-	+								
PAH-14		+	+	+	+	+	-	-	-				
PAH-18		+	+	+	+								
PAH-23		+	+	+	+								
PAH-26		+	+	+	+					-	-	-	+
PAH-29		+	+	+	+					-	-	-	+
PAH-33		+	+	+	+					-	-	-	+
PAH-34		+	+	+	+					+	+	+	+
PAH-27		+	+	+	+								
PAH-28		+	+	+	+								

^aThe mating types of AB (P2-26), Ab (P2-20), aB (P2-29), and ab (P2-27), assuming the experimental results previously worked

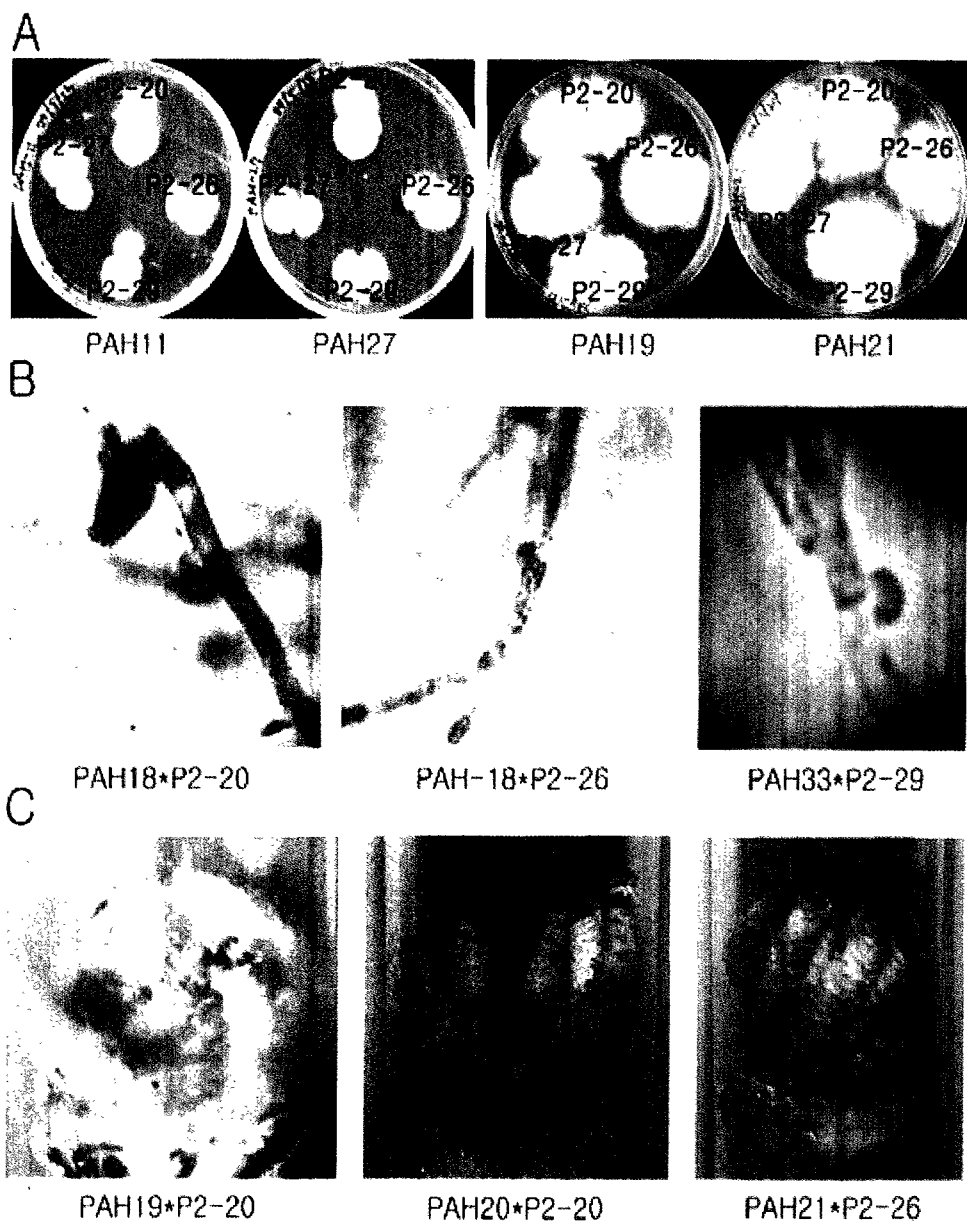


Fig. 4 8. (A) Matings of PAH 11 (left) and PAH-27 (middle, left) with the mycelia, respectively; (B) Matings of PAH-19 (middle, right) and PAH-21 (right) with the mycelia of P 02-20 (Ab), 26 (AB), 27 (ab), and 29 (aB), respectively. Microscopic observations of clamp connection formed from the mating (B) of P 02 20x PAH 18 (left), P 02-26x PAH-18 (middle), and P-02-29x PAH-33 (right). The basidiocarps developed on the sawdust cultures of mating (C) of P02 20x PAH 20 (left), P02 20x PAH-20 (middle), and P02-26x PAH-26, respectively.

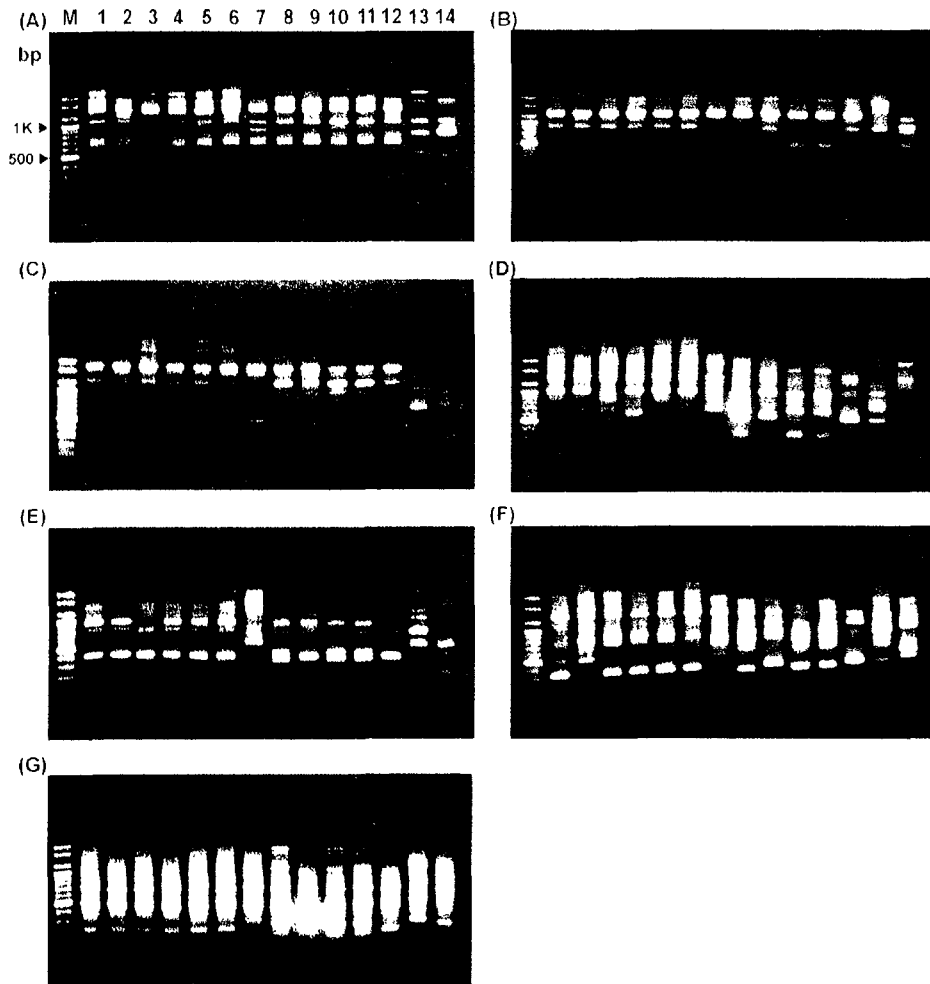


Fig. 4-9. Polymorphism of PCR-RAPD reacted with the different eight primers; (A) primers #6 obtained from Bioneer, and (B) OPA-1, (C) OPA-7, (D) OPA-11, (E) OPA-12, (F) OPA-19, and (G) OPD-18. The lanes indicated the ladder DNA (Marker, M) and the genomic DNA's extracted from the mycelia of 1 (P02-5); 2 (P02-26); 3 (P02-32); 4 (P02-5×P02-9); 5 (P02-5×P02-26); 6 (P02-5×P02-32); 7 (Chang-P); 8 (PAW); 9 (P01, dikaryotic mycelia); 10 (P02, dikaryotic mycelia); 11 (PAH, dikaryotic mycelia); 12 (PAL); 13 (*P. nameko*, dikaryotic mycelia); 14 (*C. cinereus*, dikaryotic mycelia).

4. ITS 영역을 이용한 저령의 유전적 유연관계

저령은 분류학상 민주름버섯목(Aphyllophorales), 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하며 아직 그 연구가 미흡한 실정이다. 특히 지하에 균핵을 형성한 후 몇 년이 지난 다음에 지상에 자실체를 형성하는 특성 때문에 東醫寶鑑을 제외하고 국내에는 아직 발견되었다는 보고가 없다. 또한 저령의 형태적 연구뿐만 아니라 유전적인 연구가 전혀 되어 있지 않고, 뿐만 아니라 GenBank에서 저령의 유전자는 전혀 검색이 되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 저령의 계통분류의 유용한 기초자료가 될 수 있는 5.8S rDNA를 포함한 ITS 영역의 염기서열을 밝혀 입수한 저령의 각 균주와 같은 속에 있는 잎새버섯(*G. frondosa*)의 진화적 유연관계를 밝히고자 하였다.

본 연구에서 전 세계적으로 공시된 저령의 균주는 ATCC에 2균주, NIAST에 2균주 그리고 임업연구원 1균주를 보관하고 있는 상태였다. 이번 연구에서 저령의 균핵으로부터 새로운 저령균주 2균주를 추가로 확보하였다(Table. 4-9). 그리고 저령과 잎새버섯의 ribosomal DNA의 염기서열을 처음으로 밝혔다.

Table 4-9. Isolates of *Grifola umbellata* and *G. frondosa* used in ITS sequencing.

Isolates	Abbreviation	Origin
Sclerotium	Sclerotium	Sclerotia of <i>G. umbellata</i> collected from China directly
<i>G. umbellata</i> A	GUA	Received from NIAST ^a
<i>G. umbellata</i> B	GUB	Received from NIAST ^a
<i>G. umbellata</i> C	GUC	Received from KFRI ^b
<i>G. umbellata</i> E	GUE	Buy from China
<i>G. umbellata</i> F	GUF	Received from Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science
<i>G. umbellata</i> S	GUS	Isolated from sclerotium of <i>G. umbellata</i>
<i>G. umbellata</i> ATCC	GUT	ATCC 64721
<i>G. frondosa</i>	GF	Isolated from fruit body circulated in a market

a; National Institute of Agricultural Science and Technology, Division of Applied Microbiology, b; Korean Forestry Research Institute.

White 등(1990)에 의해 보고된 진균류의 ITS 영역 증폭 primer(Table. 4-4)를 이용해 PCR한 결과 500~750bp 사이에서 단일 밴드가 확인되었다(Fig. 4-10). 이를 T-easy vector에 ligation 시킨 다음 *E. coli* DH5 α strain에 transformation하였다. 추출된 plasmid DNA를 *EcoR* I 제한효소로 절단한 결과 PCR 산물의 inserting을 확인하였다(Fig. 4-11).

PCR product의 sequencing 결과 저령의 ribosomal DNA의 ITS1, ITS2 그리고 5.8S rDNA의 염기수가 596~610개로 밝혀졌다(Fig. 4-12). 같은 속에 있는 앞세버섯은 저령보다 조금 긴 630base였다. G+C 함량은 저령은 44.31~45.57%였고, 앞세버섯은 50.48%로 저령보다 약간 높았다(Table

4-11). 각 영역별 염기의 비교는 각각의 균주마다 염기의 수가 달랐기 때문에 각각의 균주를 정확하게 비교하는 것은 어려웠다. 유사도를 조사한 결과, 저령균주들 간에는 90%가 전부 닮았으나, GUE 균주는 RAPD 결과와 마찬가지로 저령과는 전혀 관련이 없는 것으로 판명되었다. 저령과 잎새버섯의 유사도는 63.4% 이하로 낮게 나타났다. 특히, ATCC 64721 균주는 저령균주간에 가장 낮은 유사도를 보였다. 저령의 균핵과 가장 높은 유사도를 보인 균주는 GUC 균주로 97.5%의 유사도를 보였다. 밝혀진 rDNA 영역의 계통도를 살펴보면, GUS와 GUC가 같은 cluster를 형성하였고, 저령의 균핵과 GUA, GUB 가 같은 cluster를 형성하였다. 중국약용식물연구소의 GUF균주와 ATCC 64721 균주는 각각 다른 cluster를 형성하였다(Fig. 4-13).

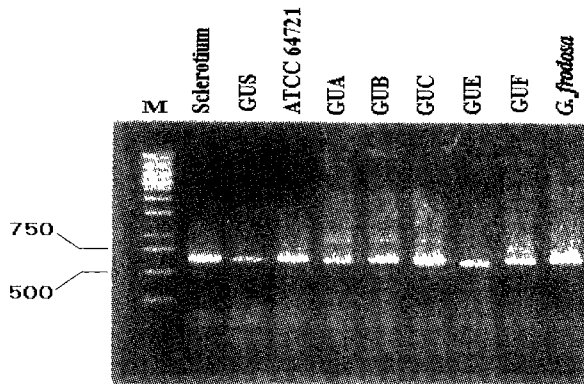


Fig. 4-10. PCR products of ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA of *Grifola umbellata* and *G. frondosa*. M; 1kb marker.

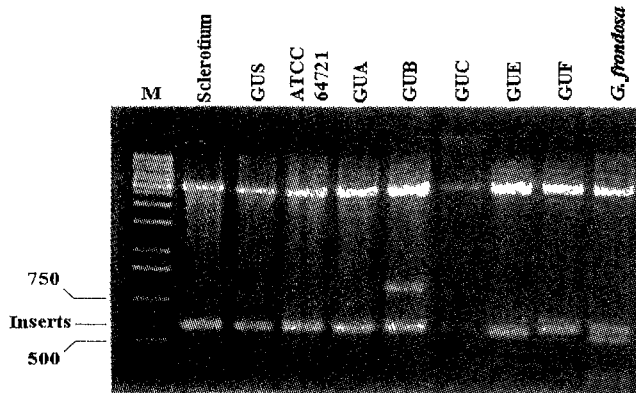


Fig. 4-11. Insertions of PCR products were confirmed by *EcoR* I digestion. Upper bands; t-easy vector, M; 1kb marker.

Table 4-10. List of isolates and GenBank accession number of the *Grifola umbellata* and *G. frondosa* in this study.

Isolates	Origin	Accession Number
Sclerotium	Sclerotia of <i>G. umbellata</i> collected from China	AF324252
<i>G. umbellata</i> GUA	Received from NIAST ^a	AF325117
<i>G. umbellata</i> GUB	Received from NIAST ^a	AF325118
<i>G. umbellata</i> GUC	Received from KFRI ^b	AF325119
<i>G. umbellata</i> GUF	Rceived from IMP-CAMS ^d	AF325120
<i>G. umbellata</i> GUS	Isolated from sclerotium of <i>G. umbellata</i>	AF325116
<i>G. umbellata</i> GUT	ATCC 64721	AF324254
<i>G. frondosa</i>	Isolated from fruit body circulated in a market	AF324253

a; National Institute of Agricultural Science and Technology, Division of Applied Microbiology, b; Korean Forestry Research Institute, d; Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science.

		10	20	30	40	50		
		AAGNATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGGTCTCTCA-CAAG						
Sclerotium		AAGNATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGGTCTCTCA-CAAG					45	
<i>G. umbellata</i> GUT		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGAAGCTGGTCTCTCA-CAAG					49	
<i>G. umbellata</i> GUS		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					48	
<i>G. umbellata</i> GUA		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGGTCTCTCA-CAAG					49	
<i>G. umbellata</i> GUB		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					48	
<i>G. umbellata</i> GUC		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					49	
<i>G. umbellata</i> GUE		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					49	
<i>G. umbellata</i> GUF		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					49	
<i>G. frondosa</i>		AAGGATCATTAATGAAGTCTTGACTTGGGTTGCAGCTGG-CTCTCA-CAAG					48	
							55	
		60	70	80	90	100		
		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC						
Sclerotium		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					98	
<i>G. umbellata</i> GUT		GCAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					97	
<i>G. umbellata</i> GUS		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					98	
<i>G. umbellata</i> GUA		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					98	
<i>G. umbellata</i> GUB		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					97	
<i>G. umbellata</i> GUC		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					98	
<i>G. umbellata</i> GUE		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					97	
<i>G. umbellata</i> GUF		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					97	
<i>G. frondosa</i>		GCAAAATGTGCTCAACCTTCTTCAAATCCACTCT-ACACCTGTGCACCTTAC					97	
							99	
		110	120	130	140	150		
		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT						
Sclerotium		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					145	
<i>G. umbellata</i> GUT		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					145	
<i>G. umbellata</i> GUS		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					147	
<i>G. umbellata</i> GUA		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					145	
<i>G. umbellata</i> GUB		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					144	
<i>G. umbellata</i> GUC		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					145	
<i>G. umbellata</i> GUE		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					147	
<i>G. umbellata</i> GUF		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					144	
<i>G. frondosa</i>		TGTAAATTTCTGGTGTCCCTTTTAAACCGGGGGGCTTGGGATCTGGGTT					145	
							145	
		160	170	180	190	200		
		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA						
Sclerotium		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					181	
<i>G. umbellata</i> GUT		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
<i>G. umbellata</i> GUS		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					181	
<i>G. umbellata</i> GUA		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
<i>G. umbellata</i> GUB		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
<i>G. umbellata</i> GUC		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
<i>G. umbellata</i> GUE		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					181	
<i>G. umbellata</i> GUF		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
<i>G. frondosa</i>		TTATACAAAAGCTTTGTAAAAGTATCAGAATGCCA-CTATTGGGATA					180	
							180	
		210	220	230	240	250		
		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG						
Sclerotium		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					241	
<i>G. umbellata</i> GUT		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUS		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUA		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUB		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUC		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUE		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					242	
<i>G. umbellata</i> GUF		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					241	
<i>G. frondosa</i>		ATTAAGGCATCTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCG					241	

Fig. 4-12. Comparison of nucleotide sequences alignment of *Grifola umbellata* and *G. frondosa*. ITS 1; 1~216 region, 5.8S rDNA; 217~424 region, ITS 2; 425~643 region. Strain name is the same as Table. 4-10.

CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT
 280 290 295 300
 Sclerotium CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUT CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUS CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUA CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUB CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUC CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUE CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. umbellata GUF CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388
 G. frondosa CATCGATGAAGAACCCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAAT 388

TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC
 310 320 330 340 350
 Sclerotium TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUT TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUS TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUA TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUB TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUC TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUE TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. umbellata GUF TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337
 G. frondosa TCAGTGAATCATCGAAATCTTTGAAACGCCACCTTGCGCTCCCTTGGT-ATTC 337

AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT-
 360 370 380 390 400
 Sclerotium AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUT AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUS AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUA AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUB AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUC AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUE AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. umbellata GUF AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382
 G. frondosa AAGGAGCACGCCCTGTTTGAGTGTGTGTAACCTCTCAACCTGCAAACTT- 382

-ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A
 410 420 430 440 450
 Sclerotium -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUT -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUS -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUA -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUB -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUC -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUE -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. umbellata GUF -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420
 G. frondosa -ACTTG-CAGGCTTGGACTTTGGAGGCTT-GTCGGGGC- - - -A 420

AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT
 460 470 480 490 500
 Sclerotium AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 469
 G. umbellata GUT AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUS AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUA AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUB AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUC AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUE AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. umbellata GUF AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471
 G. frondosa AGTTGGCTCCCTCTCAAAATGCATTAGCTTGG-TTCTTGTGGATCGGGCTT 471

Fig. 4-12. Continued.

Table 4-11. G+C contents and nucleotide length of the ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA sequence of *Grifola umbellata* and *G. frondosa*.

Isolates	ITS1		5.8S rDNA		ITS2		Total	
	GC content (%)	Length (Base)	GC content (%)	Length (Base)	GC content (%)	Length (Base)	GC content (%)	Length (Base)
Sclerotium of <i>G. umbellata</i>	14.93	204	15.94	208	13.96	184	44.80	596
ATCC 64721	14.59	203	14.59	200	16.393	207	45.57	610
GUA	14.72	204	15.10	201	14.89	193	44.65	598
GUB	14.91	203	15.24	200	15.10	194	45.23	597
GUC	14.72	204	15.10	202	14.55	192	44.31	598
GUF	14.72	203	15.10	201	14.89	194	44.65	598
GUS	15.19	201	15.02	194	15.02	191	45.22	586
<i>G. frondosa</i>	16.83	210	15.40	197	18.25	213	50.48	630

Table 4-12. rDNA similarity matrix of *Grifola umbellata* and *G. frondosa* by ITS1-5.8s rDNA-ITS 2 sequences.

	Sclerotium	GUT	GUS	GUA	GUB	GUC	GUE	GUF	<i>G. frondosa</i>
Sclerotium	100	90.8	92.0	97.8	96.5	97.5	40.3	96.0	63.4
GUT		100	75.8	90.5	91.1	89.0	42.0	90.8	63.0
GUS			100	89.9	91.1	90.4	41.0	90.6	61.4
GUA				100	96.3	97.2	40.8	97.5	57.5
GUB					100	94.8	41.7	98.5	63.1
GUC						100	39.9	96.0	55.9
GUE							100	40.6	45.3
GUF								100	63.0
<i>G. frondosa</i>									100

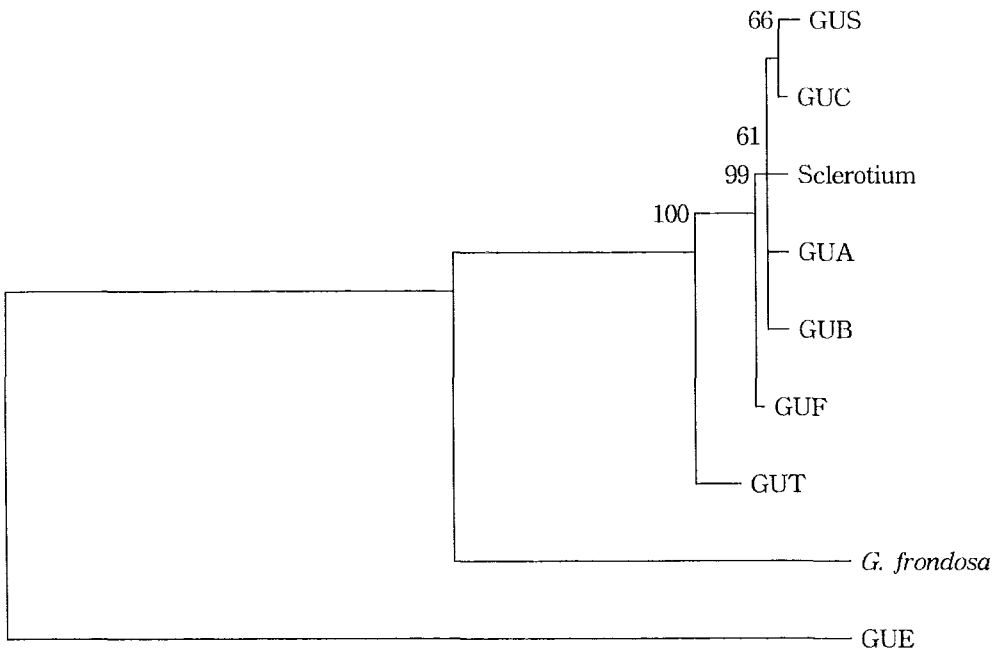


Fig. 4-13. The phylogenetic tree based on rDNA of ITS1 - 5.8s rDNA - ITS2 region sequences of *Grifola umbellata* and *G. frondosa*. The branch pattern was generated by Neighbor-joining method. The number of the node indicates the levels of bootstrap support based on the 1,000 bootstrap replications. Scale: each - is approximately equal to the distance of 0.003325, Juke & Cantor/ N-J tree

참고문헌

- 이창수, 상병찬. 1995. RAPD분석법에 의한 소 품종 판별용 표지인자의 검출 최적화 연구. 한국식품학회지. 15: 35-39.
- 李國均. 1986. 食用菌 栽培技術. 中國 沿邊 人民出版社. 366pp.
- 劉波. 1978. 中國 藥用真菌. 中國 山西省 人民出版社. 302pp.
- Chiu, S.W., Kwan, H.S. and Cheng, S.C. 1993. Application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species species with emphasis on *Lentinus edodes*. In Genetics and Breeding of Edible Mushroom. Edited by Shu-Ting Chang, John.A.Buswell, and Philip,G.Miles. Gordon and Breach science. Publishers. U.S.A
- Damaj, M., Jabaji-Hare, S.H. and Charesst, P.M. 1993. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytophatology* 83: 864-871.
- Erlich, H.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*. 252: 1643-1651.
- Fischer, M. 1994. Pairing tests in the *Phellinus pini* group. *Mycologia* 86: 524-539.
- Fukuda, M. and Tokimoto, K. 1991: Variation of isozyme pattens in the natural population of *Lentinus edodes*. *Proc. Jpn. Acad.* 67: 43-47.
- Itavaara, M. 1988. Identification of shiitake strains and some other basidiomycetes: protein profile, esterase and acid phosphatase zymograms

as an aid in taxonomy. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 295-304.

Kawamura, N. and M. Goto. 1980. Biochemical characteristics of the isolates of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Reports of the Tottori Mycological Institute. 18: 217-224.

Khush, R.S., Morgan, L., Becker, E. and Wach, M. 1991. A genetic linkage map for *Agaricus bisporus*. In genetic and breeding of *Agaricus*. Pp 73-80. Edited by L.J.L.D. Van Griensven. Pudoc. Wageningen, Netherlands.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The pennsylvania state University, University Park.

Lee, S.S., Kim, M.H., Shin, C.S., Chang, H.B., and Lee, M.W. 1988. Collection of *Pholiota adiposa* isolates in Korea. *Kor. J. Mycol.* 26: 574-582.

Lee, T.S., Bak, W.C., Kang, H.D., Kim, S.K., Byun, B.H., Yi, C.K., Lee, W.K. and Min, D.S. 1997. Classification of Korea *Lentinula edodes* strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 219-225.

Lee, S.S. and Hong, S.W. 1998. The 18s rDNA sequences of the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Korean Mycology* 26: 256-264.

Park, D. S., Go, S. J., Kim, Y. S., Seok, S. J., Ryu, J. C. and Sung, J. M. 1999. Phylogenetic Relationship of Genera *Corninus* and *Psathyrella* on the Basis of ITS Resion Sequences. 27(4): 274-279.

Park, W.M., Ko,H.G., Park,R.J., Hong, K.S. and Kim, G.H. 1997: Differentiation of *Lentinus edodes* Isolates in Korea by Isozyme Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Analysis. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 176-190.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Scharf, C., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.

1

Saitou, N. and Nei,M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Sato, K., Osawa, M., Suzuki, Y. and Oikawa, S. 1984. Difference in fruiting capability of stocks in *Grifola frondosa* and its allied species. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 25:205-209.

Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S., and Lee, M. W. 1997. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* 25(3):209-218.

Shim, J.O., Son, S.G., Yoon, S.O., Lee, Y.S., Lee, T.S., Lee, S.S., Lee, G.D.and Lee, M.W. 1998. The optimal factors for the mycelial growth of *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 26: 39-46.

Song, Y.J., Jeong, M.J., Kim, B.G. and Rho, Y.D. 1996. Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Kor. J. Mycology* 24: 186-205.

Tokao, S., Kamagata, Y. and Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* 93:217-222.

Thopson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment

through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Vosberg, H. 1989. The polymerase chain reaction : An improved method for the analysis of nucleic acid. 83: 1-15.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in Plants and Fungi. CRC press. pp 24-135.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 19: 6531-6535.

White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Eds., M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego, California. 482p.

Zervakis, G., Sourdís, J. and Balis, C. 1992: Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.

제 5 장 저령과 뽕나무버섯과의 공생관계

제 1 절 서론

구멍장이버섯과에 속하는 저령은 지하부에 균핵을 형성하는 데, 이 균핵의 생장을 돕는 것으로 알려진 균이 뽕나무버섯이다. 뽕나무버섯은 주름버섯목, 송이과, 뽕나무버섯속에 속한 담자균으로 일반적으로 가문비나무(*Picea jezoensis* Carr.)나 잣나무(*Pinus koraiensis* S. & Z.)에 뿌리썩음병을 일으키는 수목 병원균으로 알려져 있다. 그러나, 자연상태에서는 한약재로 쓰이는 천마, 저령 등과 공생관계가 있다. 뽕나무버섯은 균사속이라는 특이 구조를 형성하는데 이 균사속이 저령의 균핵 내부에 침입한다. 침입된 뽕나무버섯의 균사속은 일반 수목에서 병을 일으키는 것과 달리 저령의 균핵은 방어 구조를 형성하여 침입한 균사속으로부터 영양분을 흡수하게 된다. 저령의 균핵을 절단해 보면 뽕나무버섯의 균사속이 침입한 흔적을 쉽게 찾을 수 있다. 저령의 인공재배는 중국의 일부지역에서 이루어지고 있으며, 이러한 재배에 있어서 뽕나무버섯은 절대적으로 필요하다. 특히, 지하에서 균핵을 형성하는 저령은 뽕나무 버섯의 균사속이 저령의 균핵 발달에 관련하고 있다. 저령의 균핵 속으로 뽕나무 버섯의 균사속이 침입하여 저령의 균핵에 영양분을 제공할 뿐만 아니라, 저령의 균핵 내부에 특이적인 결정을 형성하도록 유도한다(Guo and Xu, 1991, 1993). 특히 균핵의 부피생장에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 그러므로 저령의 인공생산을 위한 뽕나무 버섯의 요건으로는 활발한 균사생장 뿐만 아니라 균사속 형성 정도도 중요하다.

본 연구에서는 약용 저령 균핵의 인공생산을 위해 저령 균핵의 성장 발육에 절대적인 뽕나무버섯과의 공생관계를 명확히 규명하기 위해 자연산 저령의 형태적 특징을 광학현미경과 전자현미경을 통해 조직학적인 특성을 조사하였으며, 균핵 내부에서 침입한 뽕나무버섯의 균사속의 형태적 특징을 조사하였다. 또한 인공재배에 있어서 새로 형성된 저령의 균핵의 특징을 자연산과 비교하였고, 뽕나무버섯의 균사속이 저령의 균사생장 및 균핵형성에 미치는 상호작용을 전자현미경과 광학현미경으로 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 저령균핵의 조직학적 특성 조사

가. 광학현미경을 이용한 저령의 형태적 특성 관찰

저령균핵을 재료로 하여 시료를 5mm×5mm 크기로 절취하여 Cryomicrotomb(Leica CM 1900)으로 7~10 μm 두께로 절단하고 증류수, Methylene blue, Iodine 그리고 Mlezer's reagent로 각각 염색하여 광학현미경 하에서 관찰 하였다.

나. SEM을 이용한 저령의 형태적 특성 관찰

SEM 관찰을 하기 위해 저령균핵의 조직을 5mm×5mm 크기로 절취하여 Karanovsky 1차고정액(0.05M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, 2%

paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde)에 4℃에서 3시간 고정한 다음 0.05M Phosphate buffer로 10분 간격으로 2회에 걸쳐 씻어주었다. 2차 고정을 위해 1% osmium tetroxide를 포함한 Phosphate buffer에 2시간 동안 고정하였다. 시료의 변형을 막기위한 탈수는 30%, 50%, 70%, 80%, 95%, 100%, 100%, 100%의 Ethanol에 각각 10분씩 단계적으로 실시하였다. 탈수를 한 다음 Isoamylacetate : EtOH = 1 : 3 용액에 20분씩 2회, Isoamylacetate : EtOH = 1 : 1 용액에 20분씩 2회, Isoamylacetate : EtOH = 3 : 1 용액에 20분씩 2회 그리고 Isoamylacetate에 20분씩 2회 처리로 시료를 완전히 치환하였다. 치환된 시료를 Stub 위에 올려 고정한 다음 시료를 Critical Point Dryer(HITACHI, HCP-2)로 40분간 완전히 수분을 제거하고, Gold Coating 하여 SEM(HITACHI, S-2380N)으로 관찰하였다.

2. 저령과 뿔나무버섯과의 공생관계

가. 저령과 뿔나무버섯의 동시배양

저령균핵에서 분리한 *G. umbellata* GUS 균주와 저령균핵의 인공생산에 사용된 뿔나무버섯(*A. mellea*) AM666 균주를 PDA 배지에 동시에 접종하여 7주간 배양하면서 두 균의 상호작용을 관찰하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 저령균핵의 조직학적 특성

일반적으로 저령(*Grifola umbellata*)의 균핵은 자연상태에서 검은 색의 불규칙적인 덩어리로 지하부에 형성된다. 손으로 누르면 탄력이 있으며 무게는 500g까지 되는 것도 있다. 저령의 균핵을 절단해 보면 유백색의 균가층내에 뽕나무버섯의 균사속이 침투한 흔적이 쉽게 관찰이 되며, 실제 그 부위에서 균을 분리하면 균사속침투시기가 초기인 균핵에서는 뽕나무버섯이 분리된다(Fig. 5-1).

저령의 내부를 광학 현미경으로 관찰하면 표피, 표피하층의 굵은 균사층 그리고 그 아래의 가늘고 뻣뻣한 균사층으로 이루어 진다(Fig. 5-5). 균핵의 표피는 균핵내의 수분과 유해성 토양균의 침입을 방어하는 역할을 하며 그 두께는 약 30~90 μm 이다. 표피내의 표피하층은 두께 20~30 μm 로 저령균핵의 전형적인 특징인 결정체들이 관찰된다(Fig.5-4).



Fig. 5 1. The cross section of sclerotium of *G. umbellata* invaded by rhizomorph of *A. mellea*.
 GS; Sclerotium of *G. umbellata*,
 R; Rhizomorph of *A. mellea*

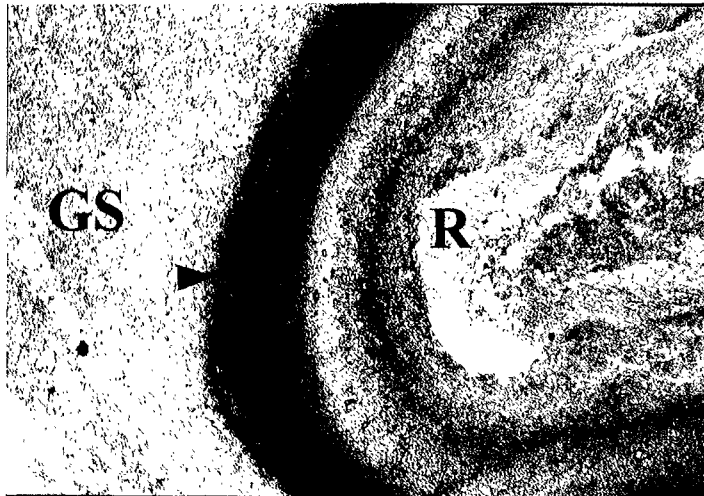


Fig. 5 2. Cross section of the rhizomorph of *A. mellea* invading to sclerotium of *G. umbellata*.
 Arrow indicates separation cavity, S; *G. umbellata*, R; rhizomorph of *A. mellea*

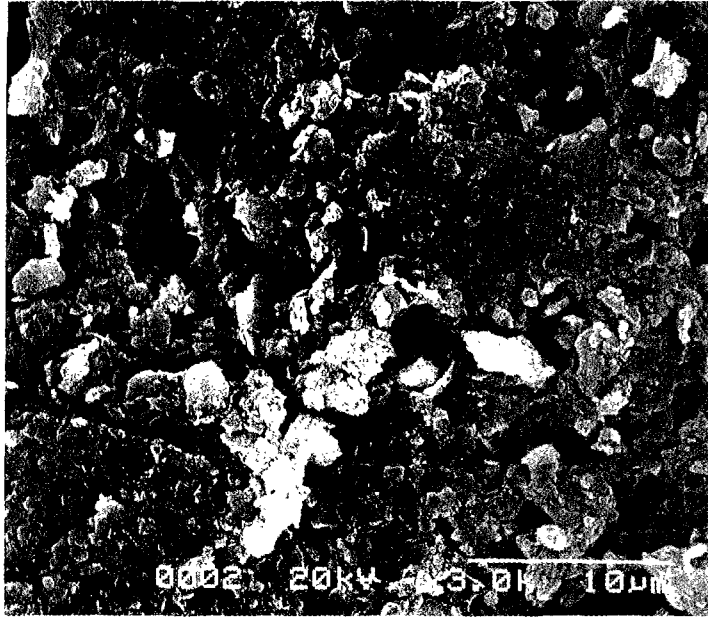


Fig. 5-3. The surface structure of sclerotium of *G. umbellata* the fungal cells lost it's shape forming fungal mass

이 결정체들은 저령의 나이가 오래된 것일수록 그 수가 많다(Fig. 5-4). 이 결정체는 세포내 액포에서 미세한 과립이 가라앉아 체적물이 증가하여 그 부피가 증가하여 일정한 크기가 되었을 때 세포벽이 과열되어 밖으로 방출되는 것으로 알려져 있으며 그 형태가 양끝이 모서리가 난 12면체의 일정한 형태를 가지며, 크기는 5~30 μ m로 다양하다(Fig. 5-4).



Fig. 5-4. Scanning electron micrograph of the crystals in the sclerotium of *G. umbellata*.
A; Mycelia of *G. umbellata*, C; Crystal

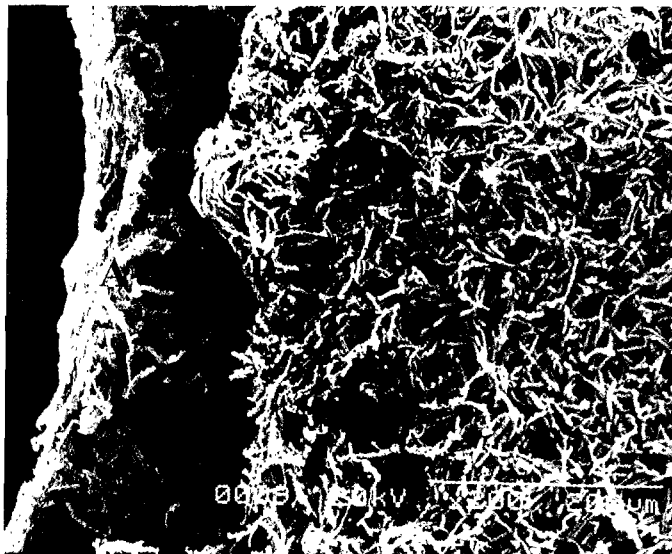


Fig. 5-5. The scanning electron micrograph of cross section of sclerotium of *G. umbellata*.
A; rind layer, B; cortex layer, C; medula layer



Fig. 5-6. Clamp connection of *G. umbellata*.
Arrow indicates a clamp connection.

자연산 저령 균핵 내부의 뽕나무버섯의 균사속이 침입한 부위를 확대해 보면 침입한 균사속을 두터운 벽이 둘러싸고 있다. 이는 침입한 균사속을 저령의 균사층과 격리시키기 위하여 저령의 균사층이 목질화 되어 완벽하게 균핵을 보호하고, 시간이 지날수록 뽕나무버섯의 균사속 내부에서 저령의 균사들이 역으로 침입하여 서서히 균사속으로부터 영양분을 흡수한다. 특히 저령의 균핵에 침투한 뽕나무 버섯의 균사속 내부에서 저령 균핵의 특징인 결정체들이 관찰되었다(Fig. 5-4). 이는 뽕나무버섯의 균사속 내부에 저령의 균사들이 이미 역침투한지 꽤 시간이 지났다는 것을 알 수 있다. 또한 저령의 균핵 내에서 균사속이 침투한 부위에서 결정체들이 침투하지 않은 부위보다 많은 것이 관찰되었다. 이는 뽕나무버섯의 균사속으로부터 흡수한 영양분이 많이 축적되었음을 알 수 있다.

저령의 균핵은 초기에는 원형인 백령으로 계속 발육하여 그 해 가을에 황색의 회령으로 변하고 그 다음해에 검은색의 흑령이 되어 그 크기가 더 이상 변하지 않는다고 알려져 있다.(Guo, 1993.) 일반적으로 저령이 약용으로서의 상품성 가치는 회령이나 흑령의 균핵인데, 흑령으로 발달한 wjfudd의 균핵은 그 자체적인 부피생장은 거의 하지 않고, 새로운 흰색의 균핵덩어리를 흑령의 한부위에서 나뭇가지가 뺏어나오듯이 부피생장을 하는데, 이때 균핵의 표피조직을 새로운 저령의 균사체들이 왕성한 생장으로 뚫고 나오는 것이 관찰되었다. 즉 뚫고나온 저령의 균사덩어리가 계속해서 부피생장을 하여 저령 균핵의 표피를 부풀게하여 터뜨린 다음, 계속해서 세포분열을 하여 백령을 형성하고, 형성된 백령은 그 자체적인 부피생장이 가능하며 균의 연령이 지남에 따라 그 부피가 일정한 크기로 성장하고, 균사의 세포벽이 두꺼워지며 균사의 밀도도 점점 증가하게 된다. 이런 기작으로 저령의 균핵은 그크기가 증대된다. 회령 흑령 시기로 넘어가는 것이다. 새로 부풀어오른 부위에서 왕성하게 부피생장을 하는 균사들은 일반적인 저령균핵의 표피하층 균사보다 훨씬 가늘었으며, 균사의 밀도도 높았다.

저령 균핵의 전형적인 특징 중, 균핵 내부의 결정체가 생기는 기작과 결정체의 성분에 대해서 지속적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

2. 저령과 뽕나무버섯의 공생관계

가. 동시배양에서 저령과 뽕나무버섯의 공생관계

저령과 뽕나무버섯의 동시배양에서 뽕나무버섯은 저령보다 균사생장이 빨랐으며, 균사속의 형성도 좋았다. 뽕나무버섯의 균사속은 배지 속과 위로 잘 발달하였다.

뽕나무버섯의 균사속은 저령의 균체속으로 침입하였을 때, 저령의 colony 위에는 짙은 갈색의 분비물이 형성되었다. 뽕나무버섯의 균사속은 저령에 침입은 하였어도 저령을 죽이거나 억제하지는 못하였다(Fig. 5-7). 저령의 균사체에서는 clamp connection 이 관찰되었고(Fig. 5-6), 저령의 균체위로 뽕나무버섯의 균사속은 저령의 균사들로 감싸여 있었다(Fig. 5-8).

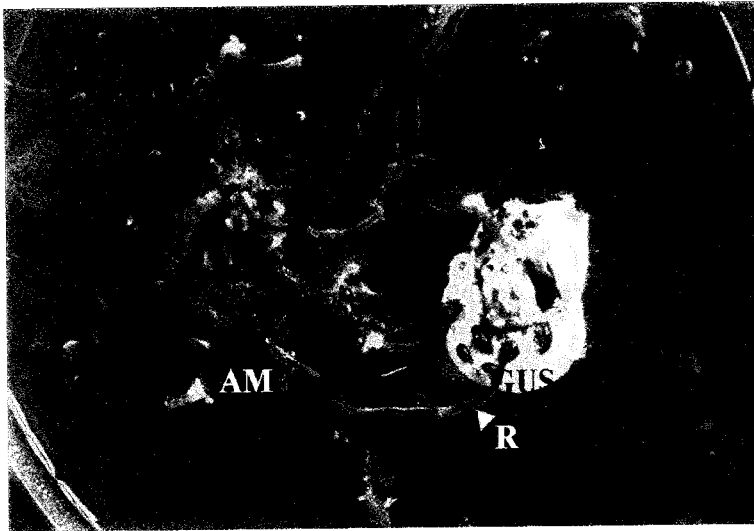


Fig. 5-7. The shape of mycelial mass of *G. umbellata* invaded by rhizomorph of *A. mellea* on PDA. AM; *A. mellea*, GUS; *G. umbellata*, R; Rhizomorph of *A. mellea*

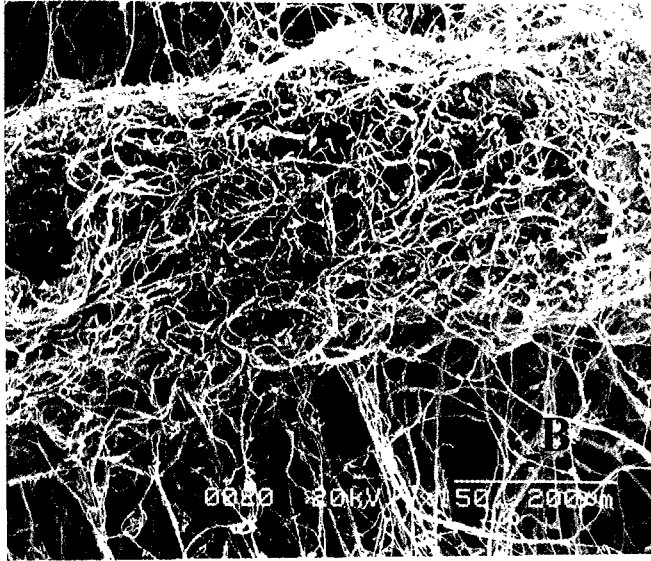


Fig. 5-8. The rhizomorph of *A. mellea* surrounded by mycelia of *G. umbellata*.

A; Rhizomorph of *A. mellea*

B; Mycelia of *G. umbellata*

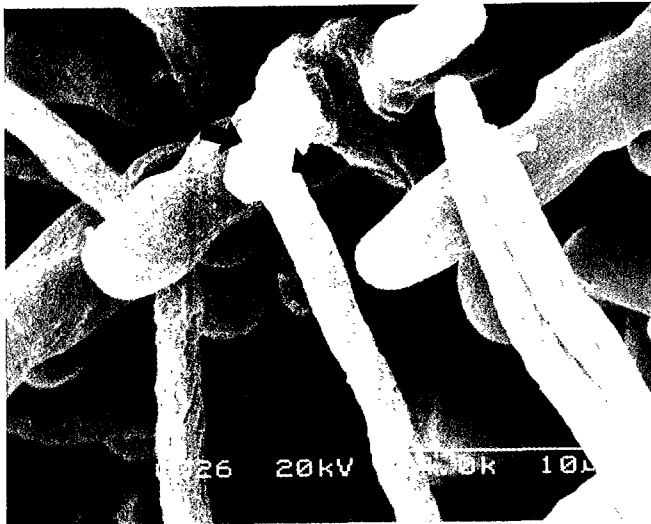


Fig. 5-9. Cell to cells contact of *G. umbellata* and *A. mellea* in dual culture. both fungi arrayed in hyphal tips contacted each other.

AM; *A. mellea*, GU; *G. umbellata*

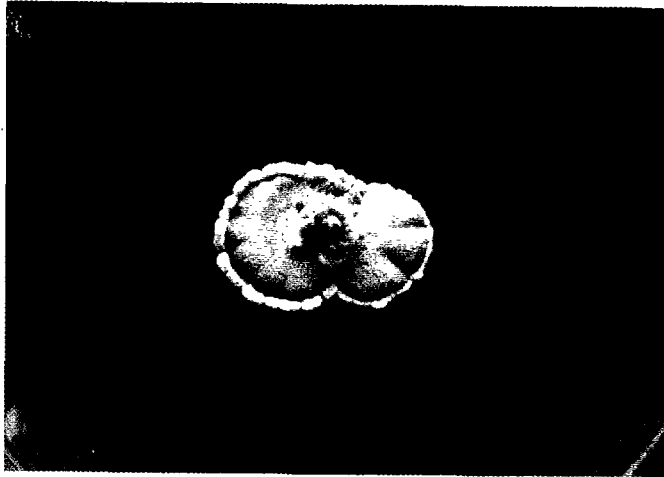


Fig. 5-10. The cultural characteristics of *G. umbellata* GUS growing on PDA media showed a swelling and thicker of hyphal mass such as sclerotium like structure. We name this as pseudo-sclerotium(mycelial mass) of *G. umbellata*.

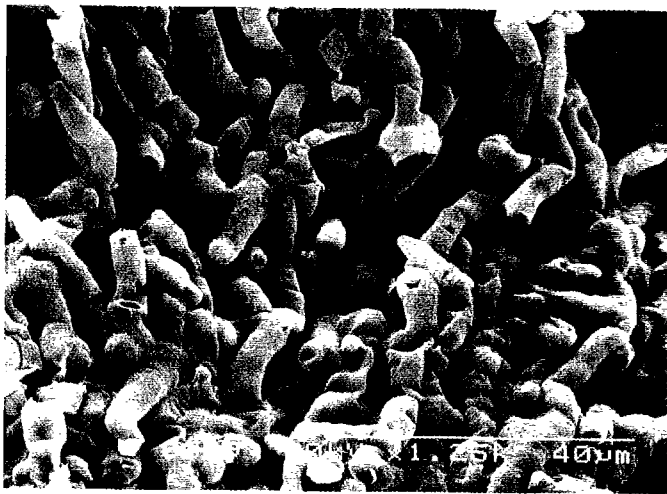


Fig. 5-11. The surface structure of pseudo-sclerotium growth on agar plate in Fig. 5-10. Cells lined two organism became lose of it's cells structure forming a epidermal structure as for function surface.

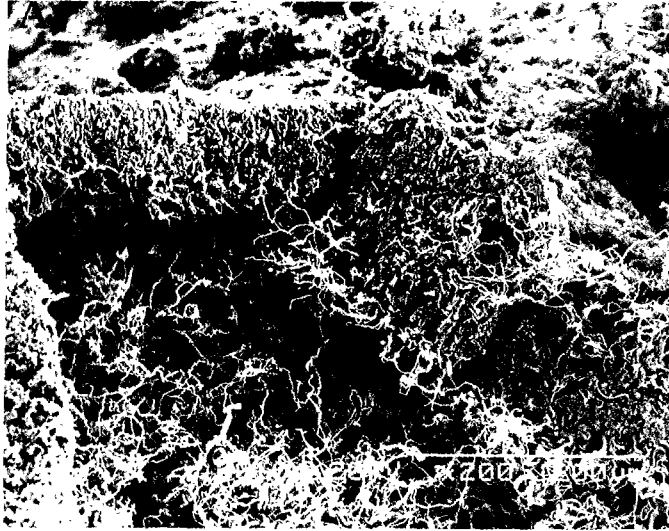


Fig. 5-12. Scanning electron micrograph of the cross section of pseudo-sclerotium.

A; rind layer, B; cortex layer, C; medula layer

나. 인공제배된 저령의 조직학적 특성 및 뽕나무버섯과의 공생관계

양수리 저령 인공제배 실험구에서 새로이 형성된 저령 균핵은 자연산 저령과 그 외부 형태가 같았고, 백령, 회령 그리고 흑령의 형태가 동시에 관찰되었다(Fig. 5-13).

저령이 표면에는 백색 구형의 균사체 덩어리들이 부풀어 오른 조직들이 관찰이 되었는데 이를 광학현미경으로 관찰한 결과 표피 아래의 균사체들이 기존의 저령의 표피를 뚫고 나오는 것이 관찰되었다. 이는 저령이 새로이 부피생장을 할 때, 내부의 균사체의 수가 증가하거나 균사체 자체의 부피가 증가하는 것이 아니라 표피 아래의 균사층에서 계속적이 분열을 하여 저령의 표피를 뚫고 나오는 것으로 보인다(Fig. 5-14). 이 부위를 전자현미경으로 확대했을 경우 저령 균핵의 표면위로 저령의 균사체

덩어리들이 저령 균핵의 표피를 뚫고 나오는 형태를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 5-15).

새로 형성된 저령의 주위에는 뽕나무 버섯의 균사속이 상당히 발달되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5-13). 하지만 집중한 저령이 토양내 잠균에 의해 썩어 있거나 새로운 저령이 형성되지 않은 원목에서는 뽕나무버섯의 균사속이 거의 발달하지 못하였다(Fig. 5-16). 이는 집중한 저령의 균핵에 뽕나무버섯이 침입하지 못하여 적절한 영양분을 공급해 주지 못하였고 토양내 기타 잠균으로부터 저령을 보호하지 못한 것으로 여겨진다.



Fig. 5-13. Development and formation of sclerotium on wood log one year after inoculation of the *G. umbellata*.

A; inoculated sclerotium as inoculum, B; maturing of sclerotium, C; newly developing sclerotium as white sclerotium

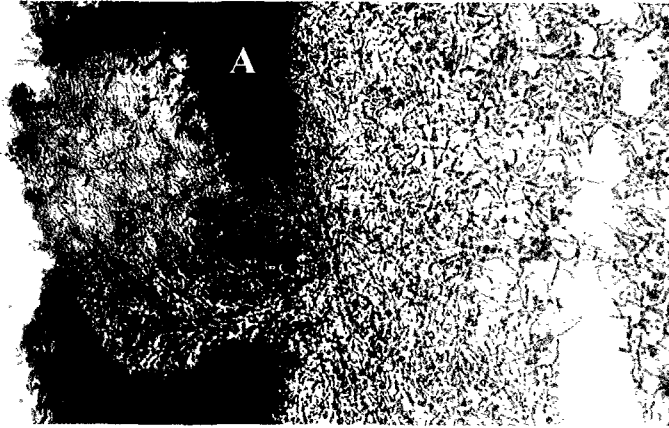


Fig. 5-14. The swelling part for volumetric growth of sclerotial development of *G. umbellata*. A; epidermis of sclerotium, B; sclerotial development of *G. umbellata*. Swelling of hyphal mass at left site initiate a newly growth of sclerotium.



Fig. 5-15. Scanning electron micrograph of newly formed sclerotium(Fig. 5-14). The newly formed tissues making a volumetric growth of *G. umbellata* in development of sclerotium. A; old part of sclerotium of *G. umbellata*, B; epidermal structure of *G. umbellata*, C; Newly development.

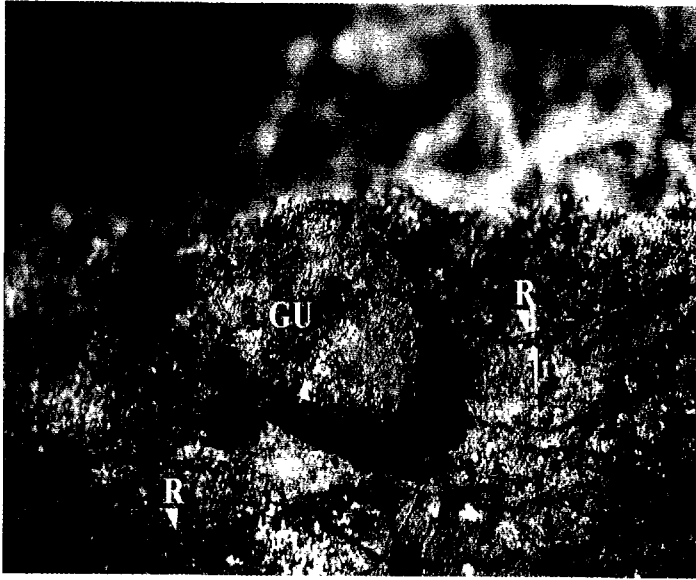


Fig. 5-16. Wood log with inoculated sclerotium. The inoculum was rotted and decomposed having a poor rhizomorph development surround the wood log.
 GU; inoculated sclerotium of *G. umbellata*, R; Rhizomorph of *A. mellea*

갈색부후균으로 참나무나 오리나무류에 기생하는 것으로 알려진 저령은 실제 톱밥 배양에서도 그 생장이 상당히 느리다. 그러나 백색부후균인 뽕나무버섯은 무한정 뻗어나갈 수 있는 균사속을 이용하여 원목에 완전히 균을 활착 시킬 수 있는 능력이 토양내 다른 균들보다 빠르며 저령과 원목 및 나무의 뿌리 주변의 근권에 강력한 세력을 형성하여 기타 잡균을 배제할 수가 있다. 하지만 뽕나무버섯균은 저령을 죽이는 균사속이 침투한 저령의 균핵은 그 즉시 뽕나무버섯과 균핵조직을 서로 격리시켜 저령 균핵의 조직을 보호하고 침투한 뽕나무버섯을 분해하여 양분을 흡수하게

된다. 즉 뽕나무버섯의 균사속은 저령의 균핵 내부로 침입하여 적절한 양분을 공급해 줄 뿐만 아니라 주위의 다른 토양미생물로부터 저령을 보호해주는 역할을 한다.

저령의 균핵 내부에 침입한 뽕나무 버섯의 균사속의 내부에는 저령의 균사들이 이미 침입해 있었고, 그 내부에 결정체들이 형성되어 있었다(Fig. 5-17).

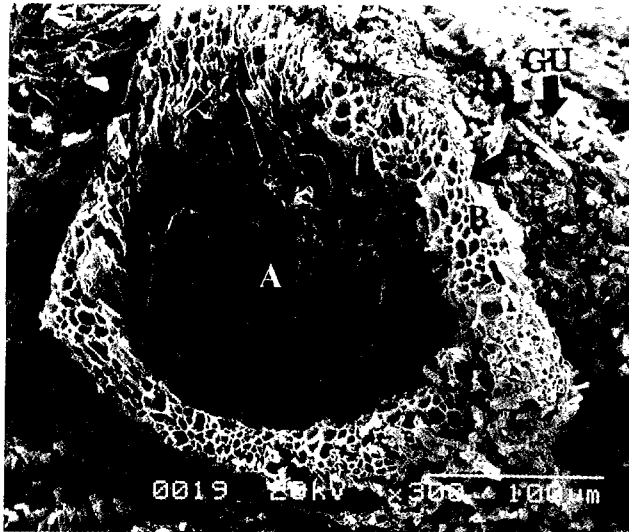


Fig. 5-17. Scanning electron micrograph of cross section of the rhizomorph of *A. mellea* invading to sclerotium of *G. umbellata*.

GU; *G. umbellata*, R; Rhizomorph of *A. mellea*

A; Mycelial mass of *G. umbellata*, B; Rhizomorph of *A. mellea*, C; Separation cavity



Fig. 5-18. Observation of crystal formed in *G. umbellata*. The more number of crista was shown in contact with rhizomorph of *A. mellea*.
 GU; *G. umbellata*, R; Rhizomorph, C; Crystal

뽕나무버섯의 균사속이 침입한 균핵의 내부를 관찰해 보면, 균사속 주위는 균사층의 밀도가 느슨 하였으며, 뽕나무버섯의 균사속이 침입한 주변에는 저령의 결정체들이 많이 모여있는 것이 관찰되었는데, 이는 저령이 뽕나무버섯의 균사속으로부터 흡수한 영양분이 많이 축적되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5-18).

뽕나무버섯의 균사속이 저령의 균핵에 침입하면, 우선 뽕나무버섯을 둘러싸는 방어층이 형성되기 시작한다. 뽕나무버섯을 둘러싼 균사들은 목질화되고, 이는 균사속과 균핵을 부분적으로 격리시키는 역할을 한다. 이 막은 그 두께가 90~150 μ m이었다(Fig. 5-19, 20).

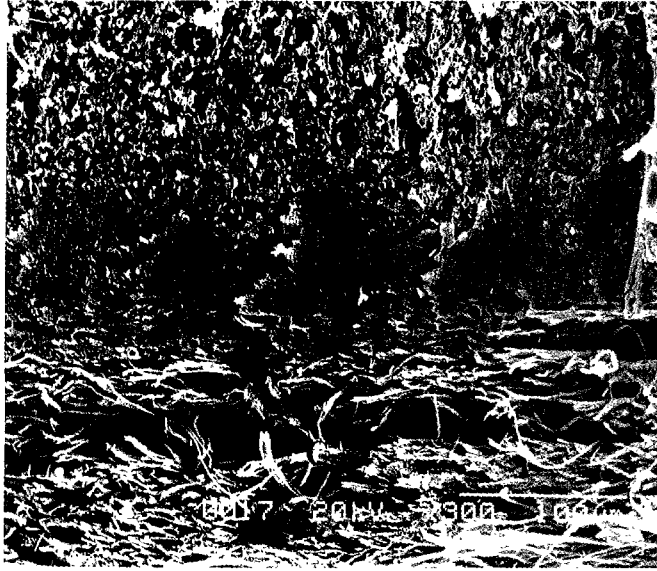


Fig. 5-19. View of cross section of symbiotic organism. Central part showed a separate cavity of both fungi. A; *G. umbellata*, B; Separation cavity, C; Rhizomorph.

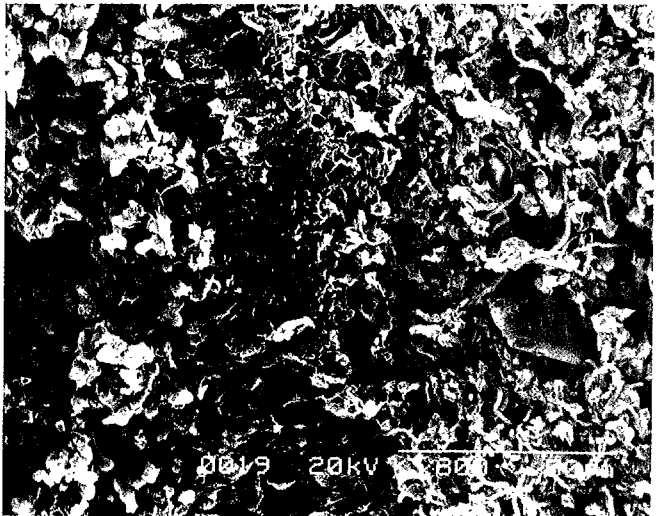


Fig. 5-20. Longitudinal section of symbiotic organisms crystals were showed in internal site of *G. umbellata*. A; *G. umbellata*, B; Separation cavity, C; mycelial mass of *G. umbellata* invading into rhiazomorph of *A. mellea*

그 다음 뽕나무버섯의 균사속을 서서히 분해하여 균사속 내부로 저령의 균사들이 침투하여 내부에 들어차기 시작하고, 저령의 균사층 사이에서는 저령 균핵의 특징인 결정체들이 형성된다(Fig. 5-20).

저령균핵의 성장과정을 살펴보면, 뽕나무버섯의 균사속이 저령균핵에 침입하여, 저령균이 외부로부터의 상이한 개체에 대해 방어기작을 자극하여 저령균사세포의 목질화로 균핵의 표피구조와 유사한 격리장을 형성하여, 뽕나무버섯의 균사속과 일부의 저령균사를 포위한다. 격리장 안의 균사속을 저령의 균사들이 부착하여 균사속의 신진대사 산물을 흡수하여 격리장 밖으로 전달한다. 이를 양분으로 저령의 균핵은 새로운 싹을 틔워 부피생장을 하게 된다. 즉 저령의 인공생산을 원활하게 하기위해서는 균사속의 발달이 우수한 뽕나무버섯의 균주개발이 필요할 것으로 본다.

참고문헌

李國均. 1986. 食用菌 栽培技術. 中國 沿邊 人民出版社. 366pp.

劉波. 1978. 中國 藥用真菌. 中國 山西省 人民出版社. 302pp.

Guo, S. X. and Xu, J. T. 1991. Studies on the structure and nature of sclerotia of *Grifola umbellata*. 10(4):312-317.

Guo, S. X. and Xu, J. T. 1993. Genesis and function of defense structure of sclerotia of *Grifola umbellata* after *Armillariella mellea* infection. Acta Mycologica Sinica 12(4): 283-288. Acta Mycologica Sinica

Hong, I.P., Lee, M.W., kim, K.P. and Lee, S.S. 1991. Studies on the morphology and the mycelial cultivation of *Poria cocos* (fr.) Wolf. Kor. J. Mycol. **19**: 54-60.

Kim, H. Y., Lcem, Y. E., Choi, H. T., and Song, H. G. 1995. Decolorization of dyes by white rot fungi. Kor. J. Mycol. 23(4): 298-304.

Lee, J. Y. 1988. Compendium of Korean mushroom. Academic Press. 166pp.

Stamet, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press.386pp.

제 6 장 공시균종의 효소적 특성

제 1 절 서 론

부후균의 경우 cellulase의 분비가 높은 균을 선별하여 퇴비제조나 목재가공에 많이 이용하고 있다. 그러나 본 연구에서 알아보고자 한 것은 공생균과의 관계 및 지령의 단독 성장능력에 관하여 조사하기 위해 효소적 특성을 조사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 시료 준비

지령으로부터 분리한 균주인 GUS균주를 50ml 삼각플라스크에서 30일간 18℃에서 배양한 다음 균체를 Whatman filter paper를 이용하여 거른 후 각각 균체와 배양액을 구분하여 coninng tube에 옮겨 담은 후 배양액은 그것을 시료로 사용하였으며 균체는 멸균 증류수로 3~5회 세척한다. 25mM phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가한 후 sonifire(Branson, Model 250)을 사용하여 균사를 마쇄한 후 7000rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 이를 시료로 사용하였다.

2. 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford method(Bradford, 1976)법으로 Bovine serum

albumin을 표준용액으로 사용하여 표준곡선을 그렸다.

3. 효소활성실험

가. α -amylase 활성

Danielsson 법(1974)을 변형하여 사용하였고 반응액은 효소 반응액 $20\mu\text{l}$ 에 증류수 $480\mu\text{l}$ 를 혼합하고 기질로 20mM phosphate buffer(pH 7.0)에 starch 용액(10mg/ml)을 녹인 용액을 $500\mu\text{l}$ 취하여 혼합한 후 3°C 에서 5분간 반응시킨 후 DNS법(Miller, 1959)으로 환원당을 확인하였다. Control로 D-glucose를 사용하였다. 단백질 활성의 1 Unit는 1분 동안 $1\mu\text{mol}$ 의 환원당을 생성하는 단백질의 양으로 하였다.

나. β -Glucosidase 활성

Tokao법(1985)을 사용하였고 효소 반응액 $500\mu\text{l}$ 과 200mM sodium acetate buffer(pH 4.6)에 17mM의 salicin 용액을 녹인 용액 $500\mu\text{l}$ 를 혼합한 후 30°C 에서 30분간 반응시킨다. 환원당은 DNS 법으로 하였고 단백질 활성의 1 Unit는 1분 동안 $1\mu\text{mol}$ 의 환원당을 생성하는 단백질의 양으로 하였다.

다. CMCase 활성

Kanda법(1976)을 사용하였고 효소 반응액 $500\mu\text{l}$ 와 200mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 1% CMC를 녹인 용액 $500\mu\text{l}$ 를 혼합하여 30°C 에서 30분간 반응시킨다. 환원당은 DNS 법으로 하였고 단백질 활성

의 1 Unit는 1분 동안 $1\mu\text{mol}$ 의 환원당을 생성하는 단백질의 양으로 하였다.

라. Xylanase 활성

Kim의 방법(1995)을 변형하여 사용하였고 효소 반응액 $100\mu\text{l}$ 와 100mM의 sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 oat spelts xylan(1%)를 녹인 용액 $500\mu\text{l}$, 100mM의 sodium phosphate buffer(pH 7.0) $100\mu\text{l}$ 를 섞어 30°C 에서 20분간 반응시킨다. Control은 D-Xylose로 하였다. 환원당은 DNS 법으로 하였고 단백질 활성의 1 Unit는 1분 동안 $1\mu\text{mol}$ 의 환원당을 생성하는 단백질의 양으로 하였다.

마. Chitinase 활성

Colloidal chitin을 정제하여 사용한 Hsu 와 Lockwood의 법(1975)을 변형하여 정제하였고 chitin의 정제는 HCl 400ml에 40g의 Chitin을 넣고 4°C 에서 50분간 반응시킨 후 증류수로 세척하고 여과지로 여과한 다음 105°C 에서 건조시켰다. chitinase 활성은 Jeong 과 Lee의 방법(1995)을 사용하였다. 효소 반응액 1ml과 200mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 0.005% colloidal chitin을 1ml 녹인 것을 섞고 30°C 에서 1시간 반응시켰다. 100°C 에서 반응을 정지시키고 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻은 다음 이것을 DNS법으로 환원당을 측정하였다. Control로 N-acetyl glucosamine(NAG)를 사용하였다. 1 Unit는 1분 동안 NAG가 $1\mu\text{mol}$ 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

제 4 절 결과 및 고찰

일반적으로 효소활성은 intra-cellular enzyme보다 extra-cellular enzyme의 활력이 크다. 저령의 경우 Chitinase, CMCase, β -glucosidase의 활성이 다른 효소에 비하여 높았다(Table 6-1). 그중 chitinase 활성이 가장 높으며 그 활성은 418.22Unit/mg protein이다.

Table 6-1. Characteristics of enzymes activities of *G. umbellata* and *A. mellea*

enzymes		specific activity(Unit/mg protein)	
		GUS	AM 777
extra cellular enzyme	CMCase	333.7709	77.84691
	β -glucosidase	329.789	72.61875
	chitinase	418.2283	92.55872
	Xylanase	38.27475	28.6091
	α -amylase	33.34981	26.05161
intra cellular enzyme	CMCase	42.88251	11.56051
	β -glucosidase	42.46264	10.96143
	chitinase	52.74943	12.26852
	Xylanase	52.74943	14.44701
	α -amylase	70.59385	24.68593

세포 외 효소의 경우와 달리 세포 내 효소의 경우 효소 활성은 낮다고 보고되어 있는데 그러나 이번 결과는 조금 다른 경향을 나타내었다.

Chitinase, CMCase, β -glucosidase는 세포 내 효소의 활성화에 비해 세포 외 효소의 활성화는 약 8배 가량이 높은 것으로 나타났지만 나머지 효소는 세포 내 효소의 활성화보다 낮은 결과를 나타내었다. 일반적인 다른 부후성 버섯의 경우 α -amylase는 높은 효소 활성을 가지고 있지만 저령의 경우 매우 낮으며 좀더 다른 점은 α -amylase의 세포 내 효소 활성이 세포 외 효소 활성보다 높다는 점이다. 이는 현미경 관찰했을 때 뽕나무 버섯의 균사속이 침입해 있는 부분에 amyloid 반응을 보이는데 저령이 chitinase로 뽕나무 버섯의 균사를 분해할 때나 뽕나무 버섯의 균사속이 분비하는 polysaccharide들이 경계지점인 세포벽 주변에 침적되어 있어 영양원으로 이용하기 EOans인 것으로 생각되어진다.

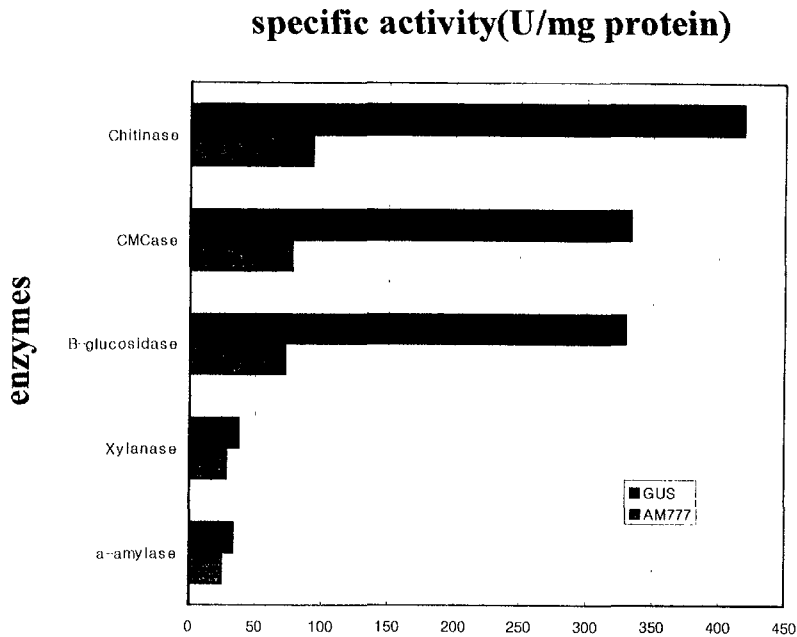


Fig. 6-1. The specific activities of extra-cellular enzymes in *G. umbellata*. Cultivation was carried out at 30°C for 45 days in the KKL broth.

저령의 효소 활성 실험 결과를 통해 우리는 저령이 cellulose 분해능을 가지고 있다는 것을 알았고 저령의 그 효소활성은 뽕나무버섯보다 높음을 알 수 있었다. 그 중에서도 특이한 점은 저령에 있어서 chitinase 활성이 높다는 것이다. 이는 저령이 공생균을 가지고 균사속으로부터 영양원을 얻을 것이라는 추정을 뒷받침하는 결과인 것 같다. 그리고 공생균인 뽕나무버섯 균의 효소 활성은 저령의 효소 활성분포와 다른 결과를 나타내는데, 뽕나무 버섯의 효소 활성은 그리 높지 않지만 그 경향은 목재 부후성 버섯의 특징인 cellulase에 연관되는 CMCcase, β -glucosidase의 활성이 높고 다른 부후성균과 마찬가지로 α -amylase 활성이 높았다. 또한 뽕나무버섯균은 세포 내 효소에 비해 세포 외 효소가 높았다.

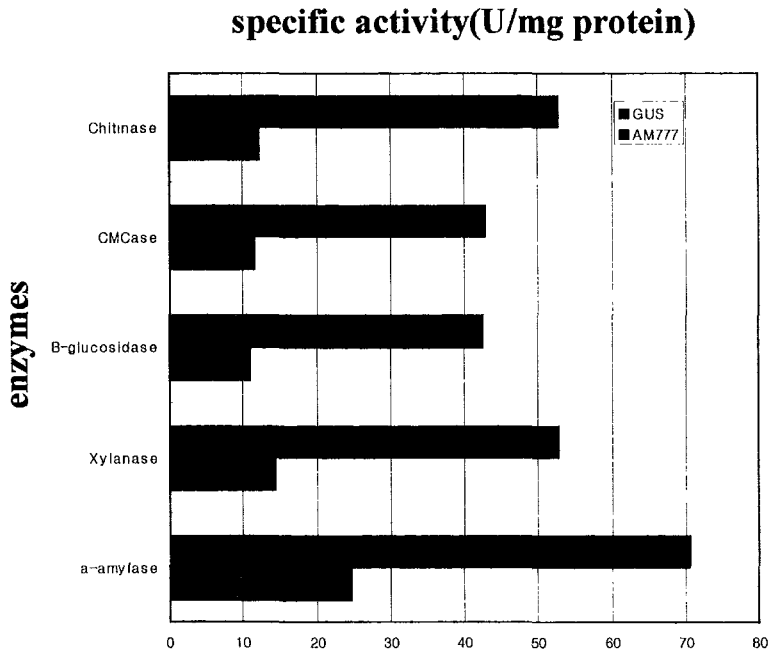


Fig. 6-2. The specific activities of intra-cellular enzymes in *G. umbellata*. Cultivation was carried out at 30°C for 45 days in the KKL broth.

참고문헌

- Danielsson, C. E. 1947. *Nature* 160: 899
- Tokao, S., Kamagata, Y. and Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci.Camb.* 93: 217-222
- Kim D.J., Shin, H.J., Min, B.H. and Yoon, K.H. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23(3): 304-213
- Kang A.s., Cha, D.Y., Kim, K.S. Hong,I.P., Suki C. Croan and Yu, S.H. 1994. Improved production of ligninase and laccase by *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Kor. J. Mycol.* 22(3): 254-259.
- Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nisizawa, K 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus*(*Polyporus tuliferae*). *J. Ferment. Technol.* 60: 381-383
- Jeong E.U. and Lee, Y.H. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitoooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 23(2): 187-196.
- Azuhata, Y., and Sugiyama, K. 1994. Antitumor-promoting effect of kampo formulations on rat urinary bladder carcinogenesis (VI). effect of ergosterol on rat urinary bladder carcinogenesis in long-term assay. *J. of Traditional Medicines* 11:344-345.
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1991. Studies on the structure and nature of sclerotia of *Grifola umbellata*. 10(4):312-317.
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1993. Genesis and function of defense structure of sclerotia of *Grifola umbellata* after *Armillariella mellea* infection. *Acta*

Mycologica Sinica 12(4): 283-288. Acta Mycologica Sinica

Inaoka, Y., Shakuya, A., Fukazawa, H., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Tsuji, K., Kuroda, H., Okada, M., Hukushima, M., and Kosuge, T. 1994. Studies on active substances in herb used for hair treatment.-effect of herb extracts on hair growth and isolation of active substance from *Poylporus umbellatus*. Chem. Pharm. Bull. 42(3): 530-533.

Ito, H., Fujii, K., Naruse, S. and Miyazawa, T. 1973. Mie Medical Journal 23:117.

Kim, H. Y., Leem, Y. E., Choi, H. T., and Song, H. G. 1995. Decolorization of dyes by white rot fungi. Kor. J. Mycol. 23(4): 298-304.

Lee, J. Y. 1988. Compendium of Korean mushroom. Academic Press. 166pp.

Lu, W., Adachi, I., Kano, K., Yasuta, A., Toriizuka, K., and Ueno, M. 1985. Platelet aggregation potentiators from Cho-rei. Chem. Pharm. Bull. 33:5083-5087.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H., and Yadomae, T. 1978. Structural examination of antitumor, water-soluble glucans from *Grifola umbellata* by use of four types glucanase. Carbohydrate Research. 65:235-243.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Yamada, Y., Hsu, H. Y., and Ito, H. 1979. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifola umbellata*. Carbohydrate Research 69:165-170.

Ohta, K., Yaoita, Y., and Kikuchi, M. 1996. Sterols from sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. Natural Medicines 50(5):366.

Ohta, K., Yaoita, Y., Matsuda, N. and Kikuchi, M. 1996. Sterol

constituents from the sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. Natural Medicines 50(2):179-181.

Sato, K., Osawa, M., Suzuki, Y. and Oikawa, S. 1984. Difference in fruiting capability of stocks in *Grifola frondosa* and its allied species. Trans. Mycol. Soc. Japan. 25:205-209.

Stamet, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press.386pp.

Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S., and Lee, M. W. 1997. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. Kor. J. Mycol. 25(3):209-218.

Thomas, W. J., Choi, S., and Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 42: 290-296.

Ueno, Y., Abe, M., Yamauchi, R., and Kato, K. 1980. structural analysis of the alkali-soluble polysaccharide from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. Carbohydrate Research 87: 257-264.

Ueno, Y., Okamoto, Y., Yamauchi, R., and Kato, K. 1982. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide(and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. Carbohydrate Research 101:160-167.

You, J. S., Hau, D. M., Chen, K. T., and Huang, H. F. 1994. Combined effects of Chuling(*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. Amer. J. Chinese Medicine 22(1):19-28.

제 7 장 저령의 추출성분분석 및 생리활성

제 1 절 서 론

저령은 식용 및 약용버섯으로 한국, 일본, 중국, 유럽 및 북미에 걸쳐서 분포하며, 오리나무나 참나무류의 뿌리에 기생하여 생장 같은 균핵을 형성한다(Lee, 1988). 저령의 균핵은 한방에서는 이뇨작용 및 암에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

버섯으로부터 추출한 단백질, steroid, flavonoid, lignin, alkaloid, terpenoid, 등과 같은 물질은 많은 연구자에 의해 규명되었으며 아직도 진행되고 있다(Inaoka *et al*, 1994; Lu *et al*, 1985). 저령의 경우 천연화합물이므로 부작용이 없다는 이점을 가지고 있어 많은 연구자들에 의해 *In vitro* 상에서 여러 종류의 암세포 억제능력에 대해 실험되어졌다(Ito *et al*, 1973; Miyazaki *et al*, 1978; Ueno *et al*, 1982). 또한 아시아에서는 한방의 약서에 기록되어있으며 약용으로 사용하고 있고 열수 추출물에는 다양한 약효성분이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 그 이용가치는 이미 확인되었다고 볼 수 있다.

본 연구는 버섯자원의 유효성분 이용을 목적으로 활성물질을 탐색하는 과정에서 단리 되어진 물질에 대해 분광학적 방법 등에 의하여 화합물들의 구조를 명확히 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 추출성분정제 및 분석

재료는 서울 경동시장에서 6Kg을 구입하여 분쇄기로 분쇄하여 실온에서 95% 에탄올에 72시간 침지시켜 3회 추출하였다. 얻어진 조추출물은 헥산(n-hexan), 디클로로메탄(DCM), 에칠아세테이트(Ethyl acetate)를 이용하여 순차연속 추출하여 분획하였다. 본 연구는 버섯자원의 유효성분 이용을 목적으로 활성물질을 탐색하는 과정에서 단리 되어진 물질에 대해 분광학적 방법 등에 의하여 화합물들의 구조를 명확히 하였다.

각 가용부는 용출용매를 결정하여 충전재로 Silica gel 과 Sephadex LH-20을 이용하여 분리하였다. 조추출물은 박층크로마토그래피 상에서 UV 및 황산발색염색을 통하여 확인하였다. 또한 다당 추출은 침적법에 의해 추출하였으며 이는 에탄올 추출 후 남은 저령 균핵을 열수 추출한 다음 열수추출에 의해 얻어진 용액을 다시 에탄올 처리하여 침전물을 필터페이퍼를 이용하여 거른 후 말려 이를 이용하였다. 단리한 화합물은 핵자기공명스펙트라(JEOL Alpha 500)와 질량스펙트라(JEOL JMS-600W)로 측정하였다.

2. 생물학적 활성

가. *In vitro* test

균핵추출물과 균사체 추출물의 조추출물, 각 분획물과 균핵추출물의 암세포에 미치는 활성을 실험하였다. 조추출물(EtOH)의 분획은 헥산(Hexan), 디클로로메탄(Dichloromethan), 에틸아세테이트(Ethyl acetate),

부탄올(Butanol)로 4개의 분획으로 나누었다. 세포생존율은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 사용한 암세포는 자궁암(HeLa S3), 유방암(MCF-7)을 사용하였고 다당류의 항암 활성은 위암(KATOIII), 단핵백혈병 세포(K-562), 간암세포(Hep-G2), 두경부암세포(HTB¹-120, 자궁경부암(HeLa)세포로 실험하였다. 그 방법은 대수기에 접어든 세포를 trypsin 처리하여 단일세포 부유액으로 만든 다음 Coulter Counter를 이용하여 세포수를 헤아리고 96-well에 3×10^3 cells/well의 농도로 세포를 심은 후 DMEM 150 μ l가 되도록 하여 배양하였다. 24시간 후 추출액을 농도별로 처리하고 다시 3일간 배양을 하였다. 50 μ l의 MTT 용액을 각 well에 넣고 4시간 후에 DMSO로 MTT의 환원체인 MTT formazan을 녹여내어 microplate reader를 이용하여 570nm에서 측정하였다. IC₅₀ 값은 세포생존 그래프를 통하여 세포의 50%생존율에 대한 추출물의 농도로써 결정하였다.

나. 면역조절에 관한 활성

Liu 등의(1989) 방법에 따라 Direct proliferation assay법으로 림프구의 증식을 조사하였다. 비장을 마쇄하여 원심분리 후 림프구를 취하였다. 림프구의 농도는 1×10^6 cell/ml이 되도록 하고 B cell, T cell, mitogen 과 함께 well 당 200ul의 림프구를 96-well plate에 각각 농도별 분취한다. 농도는 7.5~125 ug/ml 범위로 하였다. 10ul의 Lipopolysaccharides(LPS)와 concanavalin A(Con A)를 B cell과 T cell mitogen으로 각각 사용하여 최종농도를 1mg/ml이 되게 분취하였다. 배양은 37 $^{\circ}$ C,

5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다 대조군은 증류수 10ul의 증류수로 하였다. well의 총량은 100ul로 하였고 ELISA plate reader(Ceres UV 900 HDi, Bio-Tech Inc)를 이용하여 490nm에서 측정하였다.

다. *In vivo* test

1) 복수암 유발 농도

체중 약 28kg 정도의 ICR계열 생쥐를 중앙실험동물사로부터 구입하여 상온에서 12시간 간격으로 조명하여 사육한 생쥐를 사용하여 4주령의 ICR계열 숫컷 생쥐를 사육실에서 3일간 적응시킨 후 Sarcoma 180을 복막에 주입하고 배양한 뒤 5ml의 Phosphate buffer saline(pH 7.2)를 주입하고 암세포를 취하여 실험에 이용하였다. 거의 동일한 몸무게의 것을 선별하여 복수암세포를 농도별로 투여하여 암 발생 최저농도를 구하였다. 그 결과 암 발생 최소농도는 2×10^5 개로 나타났다. 이를 감안하여 암세포치리의 농도를 1×10^6 개로 정하였다.

2) 복수암에 대한 활성화

4주령의 ICR계열 숫컷 생쥐를 사육실 환경에서 3일간 적응시킨 후 평균 체중이 비슷한 것을 선별하여 복수암세포 처리군 10마리, 처리 전 저령 열수추출물 처리군 10마리씩 두 군으로 나누었다. 복수암 세포 Sarcoma 180을 쥐의 복막에 주입하여 암세포를 배양한 후 열수추출물을 PBS buffer(pH 7.2)에 녹이고 0.2 μ m의 syringe filter로 투과하여 생쥐 복강에 투여하였다. 추출물의 농도는 50mg/kg Body weight로 하여 암

세포 투여 전 9일 동안 하루 1회 복강에 투여하였다. 추출물 최종 투여 24시간 후에 생쥐의 복강에 투여하였다. 암세포 투여 후에 10일간 추출물을 매일 1회 복강에 투여하고 암세포 최종 투여 후 7일째 관찰하였다.

3) 고형암에 대한 활성

복수암과 동일한 방법으로 실험하였으며 10마리씩 처리군으로 하였다. 두군의 생쥐에 고형암을 유발시키기 위해 2×10^6 개의 암세포를 생쥐에 주사하고 열수추출물 처리군은 암세포주입 24시간 전에 50mg/kg body weight 의 저령 열수 추출물을 0.5ml PBS에 녹여 10일간 매일 1회씩 복강에 투여하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 추출성분의 정제 및 분석

분석 결과 steroid 화합물 2개와 alkaloid 화합물 3개를 단리하였다. 그 중 디클로로메탄(DCM) 가용부로부터 단리한 화합물은 ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol이고 부탄올 가용부로부터 Uridin, Uracil, adenosine을 단리하였다.

그 중 ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol의 그에 해당하는 NMR 결과를 보면 다음과 같다.

가. 화합물 VI(GDWI)

위의 DCM가용부를 여과하여 침전물(3.15g)을 얻었으며, 이중 50mg
를 취하여 benzene : EA :CHCl₃ (3 : 1 : 1, v/v)를 전개용매로 한
prep. TLC를 이용하여 전개시켜 백색분말로 화합물 VI(13mg)를 분리하
였다.

화합물 VI의 EI-MS m/z : 396(M⁺,base ion), 376, 363, 337, 271, 251,
211, 159, 69.

¹H NMR(500MHz, (CD₃)₂CO) : δ 0.65(3H, *d*, H₃-18), 0.83(3H, *d*,
J=6.7Hz, H₃-26), 0.84(3H, *d*, *J*=6.7Hz, H₃-27), 0.91(3H, *d*, *J*=6.7Hz,
H₃-28), 0.93(3H, *s*, H₃-19), 1.05(3H, *d*, *J*=6.0Hz, H₃-21), 1.29(3H, *m*,
H-1, 12, 17), 1.33(2H, *m*, H-15, 16), 1.47(2H, *m*, H-2, 25),
1.64(2H, *m*, H-11, 15), 1.73(2H, *m*, H-11, 16), 1.75(2H, *m*, H-1,
2), 1.83(2H, *m*, H-14, 24), 1.92(1H, *m*, H-9), 2.04(1H, *m*,
H-20), 2.07(1H, *m*, H-12), 2.23(1H, *m*, H-4), 2.38(1H, *m*, H-4),
3.48(1H, *m*, H-3), 5.22(1H, *dd*, *J*=7.6, 15.5Hz, H-23), 5.27(1H, *dd*,
J=7.6, 15.5Hz, H-22), 5.36(1H, *d*, *J*=2.7Hz, H-7), 5.51(1H, *d*,
J=2.7Hz, H-6).

¹³C NMR(125MHz, (CD₃)₂CO) : δ 12.36(C-18), 16.63(C-19),
18.06(C-28), 19.95(C-26), 20.30(C-27), 21.54(C-21), 21.74(C-11),
23.67(C-15), 29.03(C-16), 32.87(C-2), 33.83(C-25), 37.82(C-10),
39.26(C-1), 39.89(C-12), 41.32(C-20), 41.78(C-4), 43.53(C-13),
43.73(C-24), 47.15(C-9), 55.23(C-14), 56.51(C-17), 70.27(C-3),
117.40(C-7), 119.94(C-6), 132.71(C-23), 136.60(C-22), 141.33(C-5),

141.61(C-8).

HMBC correlatios : H-1→C-2/C-3/C-10/C-19, H-2→C-10, H-4→C-2/C-3/C-5/C-6/C-10, H-6→C-4/C-5/C-7/C-10, H-7→C-6/C-8, H-11→C-8/C-9/C-10/C-12/C-13, H-12→C-9/C-11/C-13/C-14/C-17, H-15→C-13/C-14/C-16/C-17/C-20, H-16→C-15, H-17→C-16/C-18, H-18→C-12/C-13/C-14/C-17, H-19→C-1/C-5/C-9/C-10, H₃-21→C-17/C-21/C-26/C-28, H-25→C-23/C-24/C-26/C-27/C-28, H₃-18→C-12/C-13/C-14/C-17, H₃-19→C-1/C-5/C-9/C-10, H₃-21→C-17/C-20/C-22, H₃-21→C-17/C-20/C-22, H-22→C-20/C-24, H-23→C-20/C-24/C-28, H-24→C-22/C-23/C-25/C-26/C-27, H-25→C-23/C-24/C-26/C-27/C-28, H₃-26→C-24/C-25/C-27, H₃-27→C-24/C-25/C-26, H₃-28→C-23/C-24/C-25.

NOESY correlatios : H-4↔H-6, H-15/H-16↔H-7, H-24↔H-22, H-20↔H-23, H-21↔H-23, H-28↔H-23.

이상의 결과 화합물 VI은 Ergosta-5,7,22-triene-3β-ol인 Ergosterol로 동정하였다.

이상과 동일한 방법으로 나머지 화합물도 구조 동정하였다.

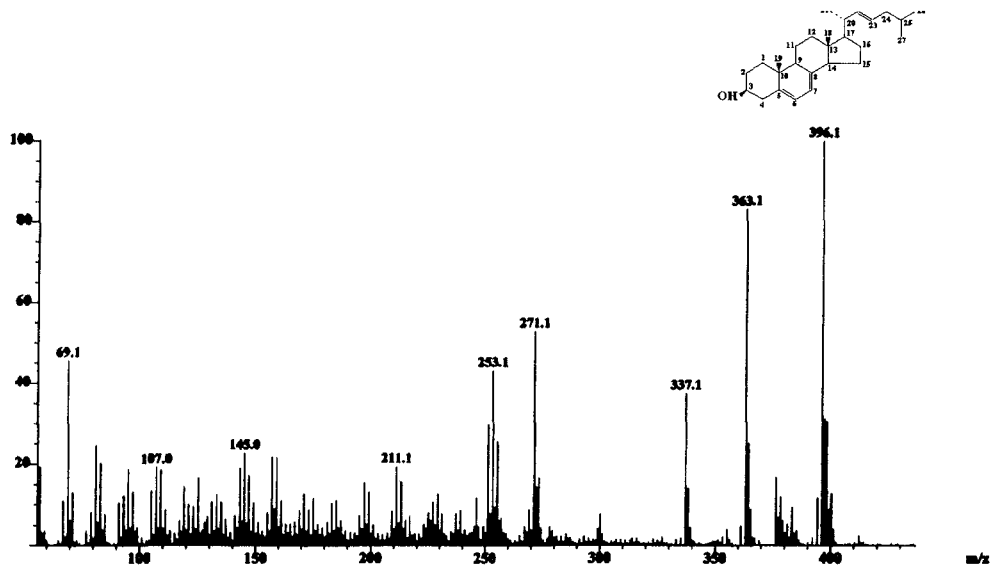


Fig. 7-1. EI-MS spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

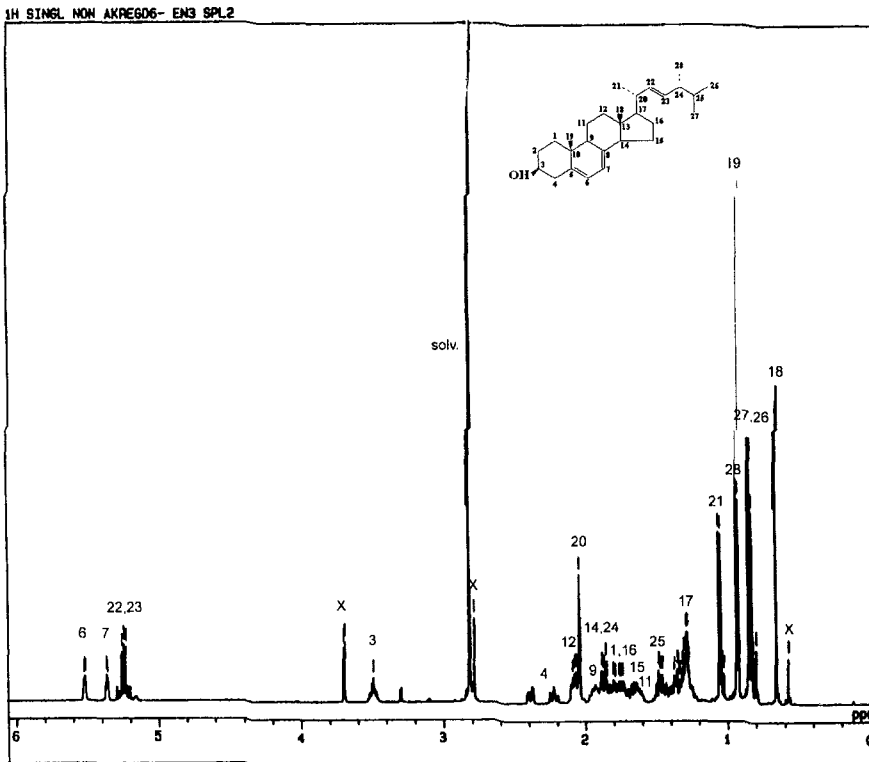


Fig. 7-2. ^1H -NMR spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

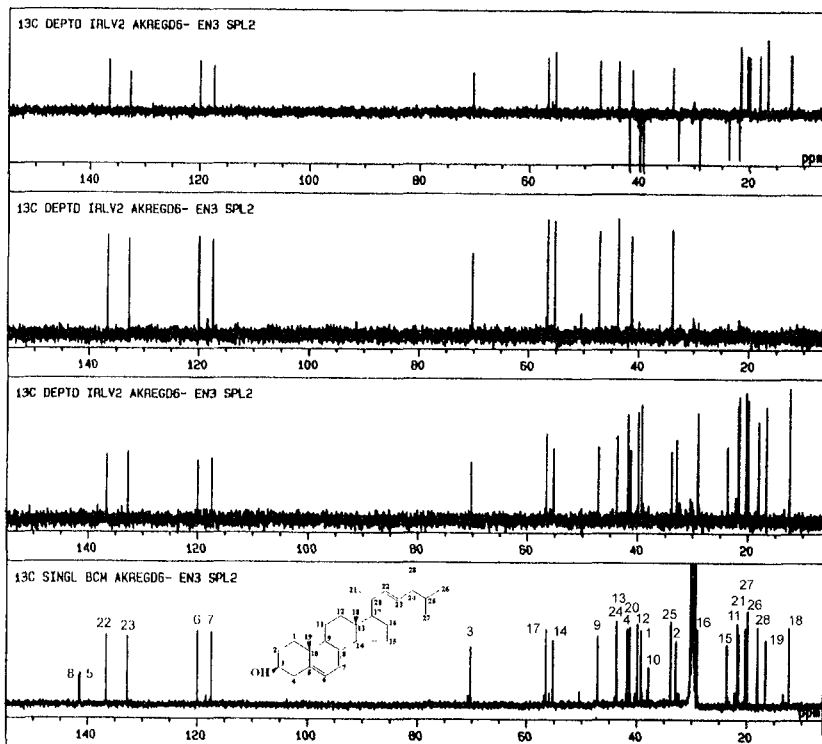


Fig. 7-3 . ^{13}C -NMR spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

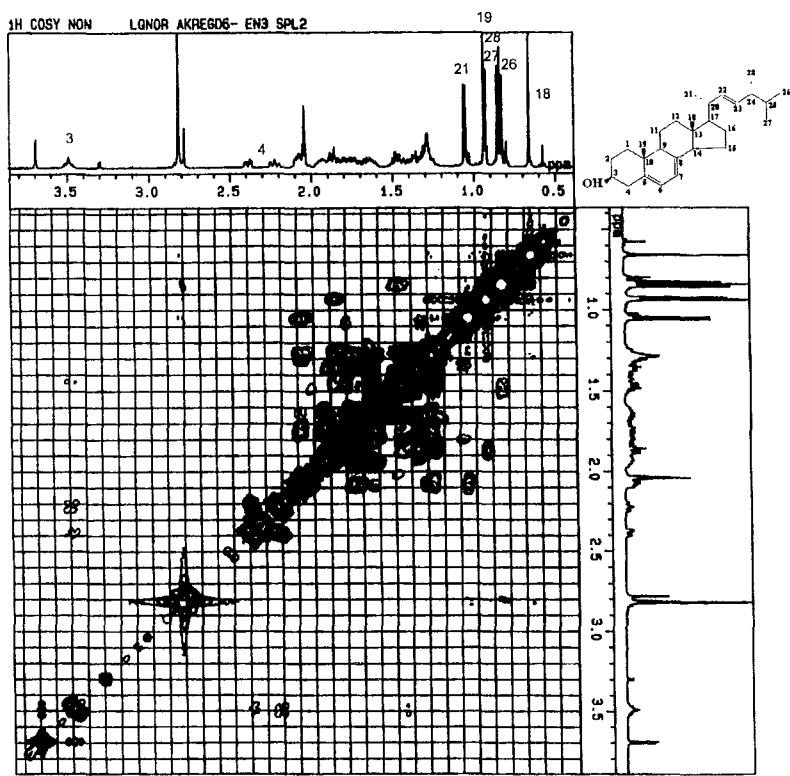


Fig. 7-4. ^1H - ^1H cosy spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

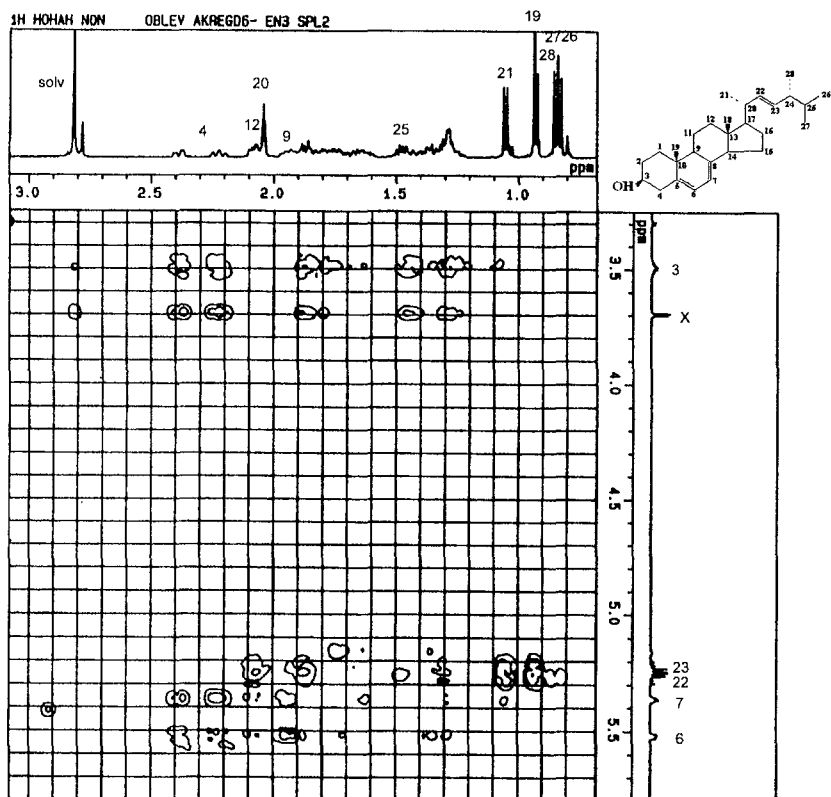


Fig. 7-5. HOHAH spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

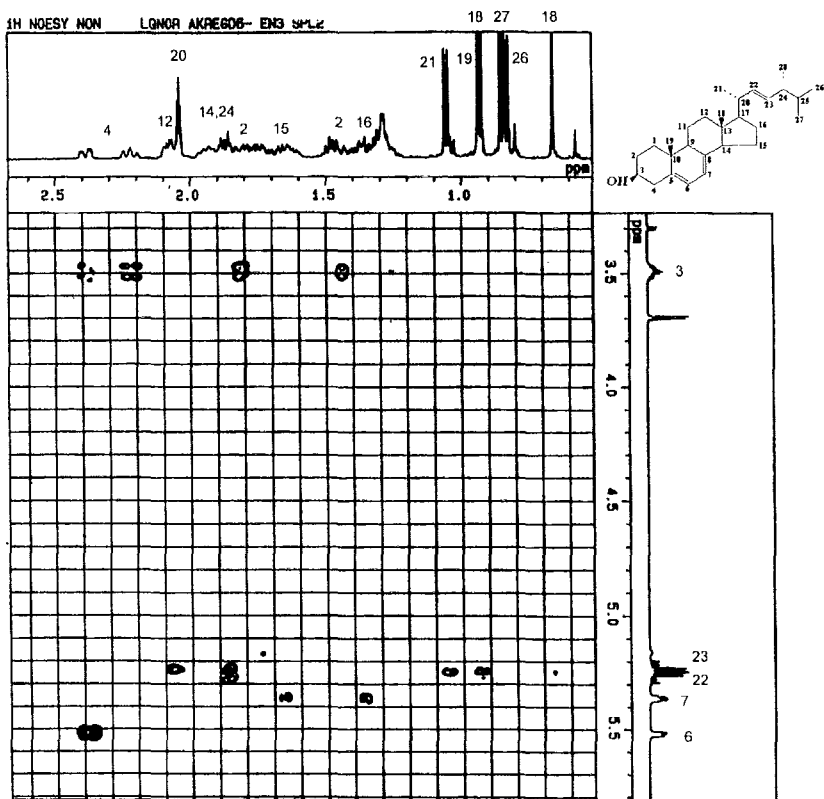


Fig. 7-6. NOESY spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

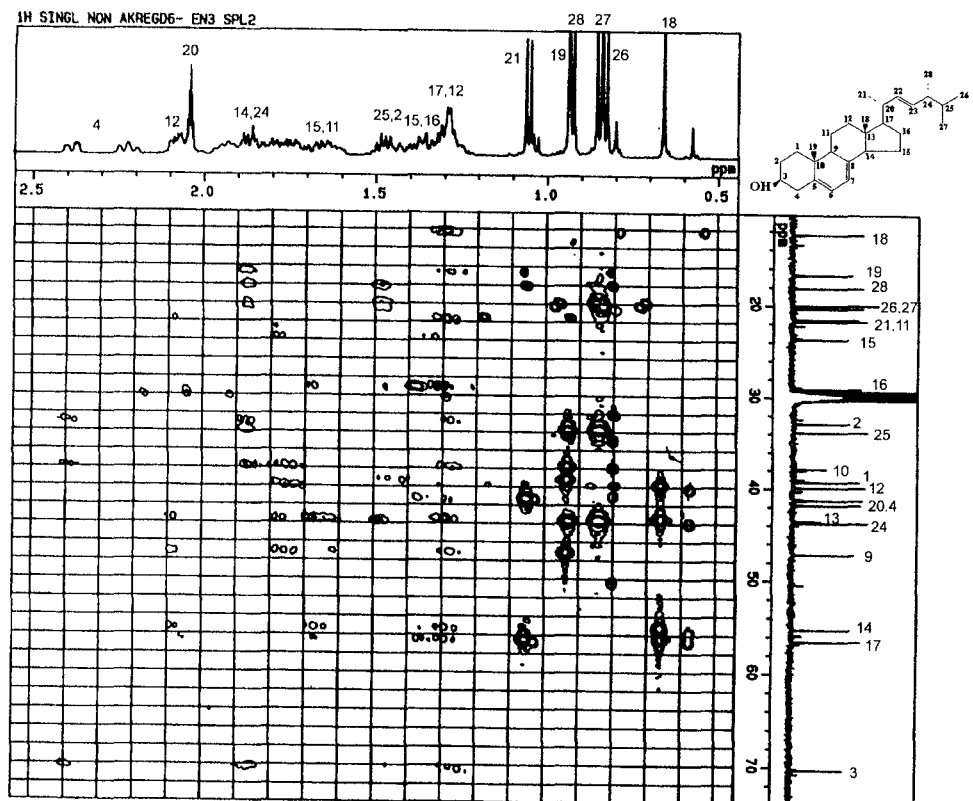


Fig. 7-7. HMBC spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol

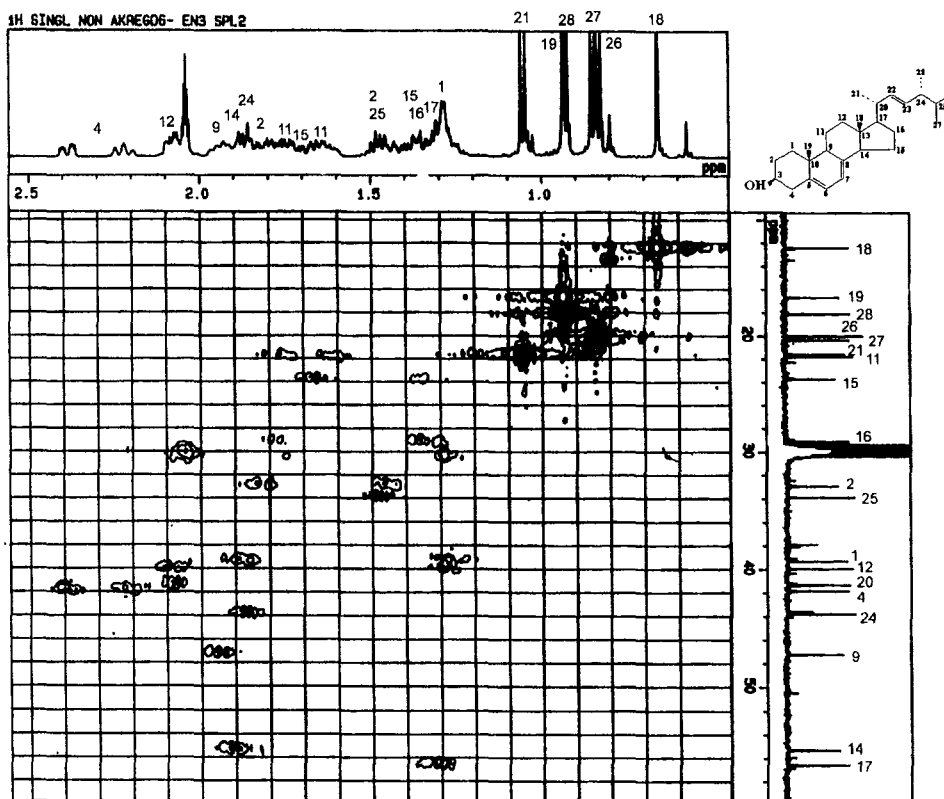
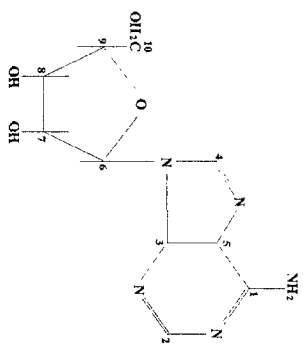
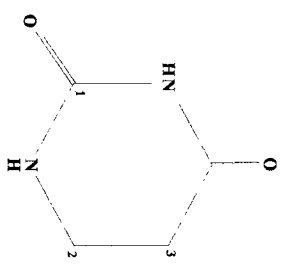


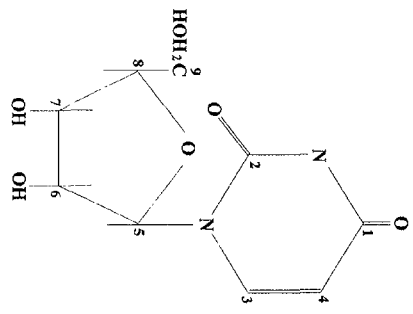
Fig. 7-8. HMQC spectrum of the ergosta-5,7,22-triene-3 β -ol



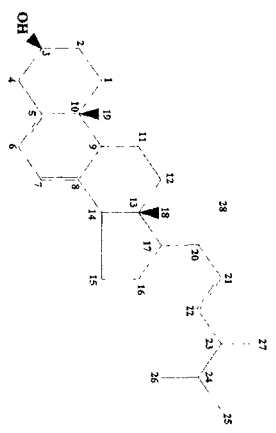
Adenosine
(compound 1)



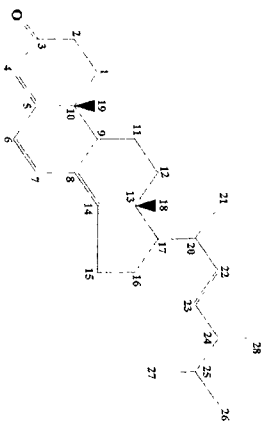
Uracil
(compound 2)



Uridine
(compound 3)



Ergosta-5,7,22-triene-3β-ol
(compound 4)



Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one
(compound 5)

Fig. 7-9. Compounds isolated from sclerotium of *G. umbellata*

2. 생물학적 활성

가. *In vitro* test

알코올 추출물의 경우 조추출물과 각분획 물을 비교하였다. 시료를 $50\mu\text{l}$ 처리하였을 시 유방암(MCF-7)의 억제율은 균사추출물의 경우 EtOH : 0%, Hexan : 15%, DCM : 24%, EA : 15%, Butanol 15%이었고 자실체의 경우 EtOH : 28%, Hexan : 82%, DCM : 65%, EA : 24%, Butanol 2%, 단리화합물은 97.5%의 억제율을 보였다. 자궁경부암(HeLa S3)에서는 균사추출물의 경우 EtOH : 0%, Hexan : 17%, DCM : 16%, EA : 14%, Butanol 11%이었고 자실체의 경우 EtOH : 48%, Hexan : 95%, DCM : 88%, EA : 21%, Butanol 10%, 단리된 화합물의 경우 97%의 억제율을 보였다.

열수추출물을 이용하였을 때 위암(KATOIII)의 경우 $7.8\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 첨가 시 암세포의 억제가 시작되어 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 50%가량 억제되었고 1mM 농도에서 약 75% 억제하였다. 단핵백혈병(K-562)의 경우 $125\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지는 억제효과가 관찰되지 않았으며 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 암세포 증식을 약 40% 정도 억제하였고 1mM 농도에서 약 92%까지 억제하였다. 두경부암(HTB-120)의 경우 $7.8\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 암세포 증식을 억제하여 $62.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 암세포 증식을 약 50% 가량 억제하였고 1mM 농도에서 약 60%까지 억제하였다. 간암세포(Hep-G2)의 경우 $7.8\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 암세포 증식을 억제하여 $125\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 암세포 증식을 약 66% 가량 억제하였고 1mM 농도에서 약 80%까지 억제하였다. 자

궁경부암(HeLa)의 경우 7.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도부터 암세포 증식을 억제하여 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 암세포 증식을 약 50%까지 억제하였고 1mM 농도에서 약 67%까지 억제하였다.

저령의 열수추출물은 두경부암에서 50% 억제에 필요한 농도인 IC₅₀이 가장 낮았으나(62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 최고 억제율이 55%에 지나지 않았다. 간암세포 (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 위암세포(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에도 비교적 높은 억제능을 보였는데 최고 억제율은 각각 80%와 75%로 나타났다. 단핵 백혈병 세포와 자궁암 세포에는 IC₅₀ 값이 비교적 높았으나(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 단핵백혈병 경우 최고 억제율이 92% 이었다. 따라서 저령의 열수 추출물은 암세포에 따라 그 효능이나 작용농도가 다르다는 것을 알 수 있었고, 각 암세포에 대한 유효 성분도 다를 것으로 판단된다.

Table 7-1. Effect of *Grifola umbellata* extract on superoxide radical generation.

Concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Superoxide radical ^a (A ₅₆₀)	Inhibition ratio (%)
0	0.654 \pm 0.07	0
5	0.554 \pm 0.017	15.3
25	0.332 \pm 0.012	49.2
100	0.143 \pm 0.008	78.1

a : The values of superoxide radical generation are mean \pm S.D.

Table 7-2. Effect of *Grifola umbellata* extract on microsomal lipid peroxidation

Concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MDA formation (A532)	Inhibition ratio (%)
0	0.510 ± 0.017	0
5	0.504 ± 0.023	1.2
25	0.512 ± 0.032	0
100	0.499 ± 0.028	2.2

a : The values of MDA formation are shown in mean \pm S.D.

Table 7-3. The concentration of *Grifola umbellata* extract needed to cause 50% inhibition of proliferation of various cancer cells.

Cell type	$\text{IC}_{50}(\mu\text{g}/\text{ml})$	Maximum inhibition ratio (%)
KatoIII	250	75
K-562	500	92
HTB120	62.5	55
Hep-G2	125	80
HeLa	500	65

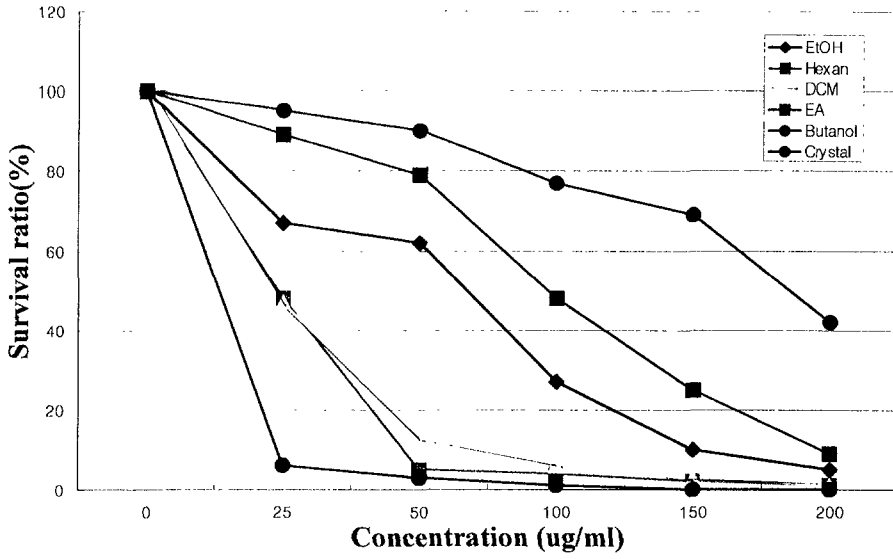


Fig. 7-10. *In vitro* cytotoxicity assay of fractions from sclerotia against Human uterus cancer cell line(HeLa S3)

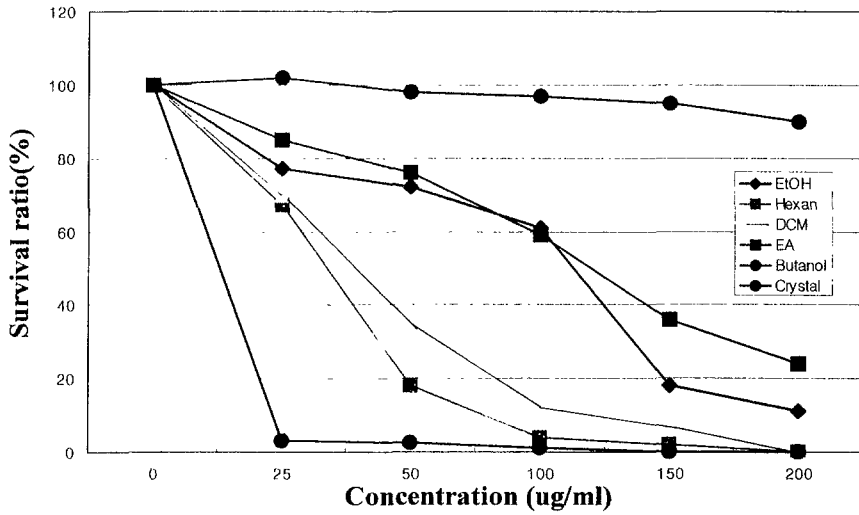


Fig. 7-11. *In vitro* cytotoxicity assay of fractions from sclerotia against human breast carcinoma cell line(MCF-7)

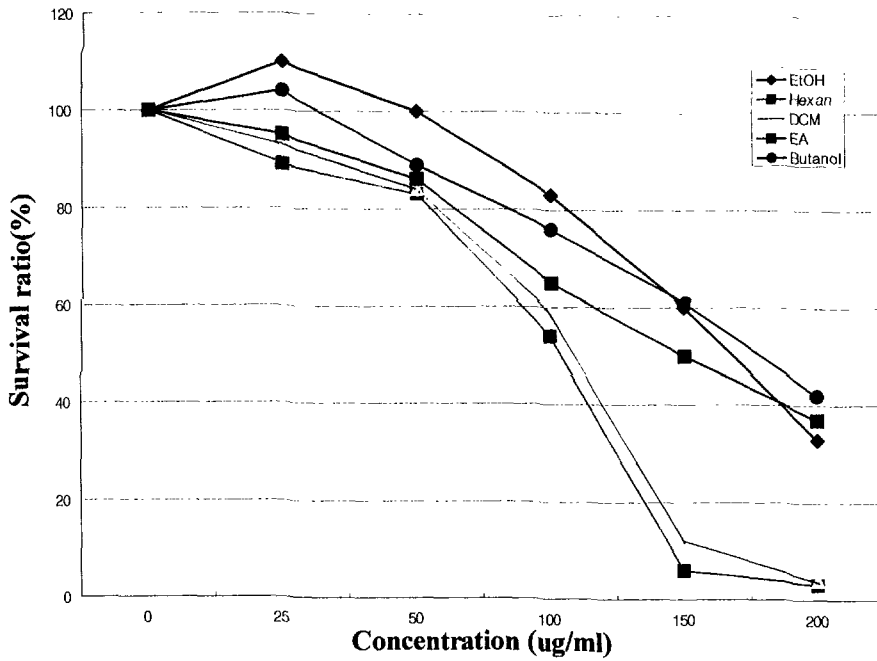


Fig. 7-12. *In vitro* cytotoxicity assays of fractions from mycelia against Human uterus cancer cell line(HeLa S3)

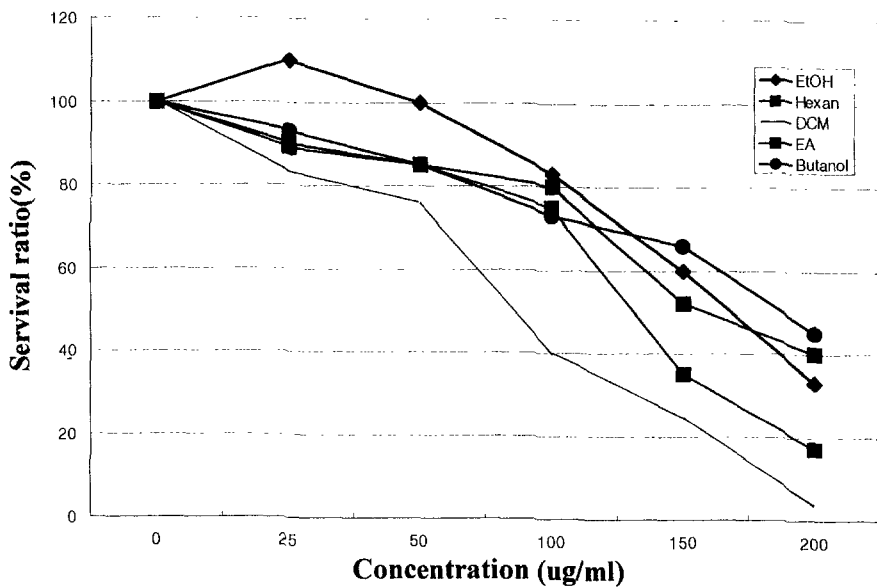


Fig. 7-13. *In vitro* cytotoxicity assay of fractions from mycelia against human breast carcinoma cell line(MCF-7)

나. 면역조절에 관한 활성

추출물의 약리적 세포독성에 관한 실험수행하기 위하여 림프구 증식효과를 실험한 한 결과 추출물 15.8~62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위에서 다소 면역세포를 증가시켰으나 뚜렷한 효과는 없었다(Table 7-4). 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서도 유의성 있는 효과는 나타나지 않았다. 저령 열수 추출물은 62.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하에서만 증가효과를 보이고 그 이상의 농도에서는 증가효과가 나타나지 않았다. 그러나 저령 열수 추출물의 림프구 증강정도는 최고 10%를 넘지 못하였다. 그러므로 저령의 열수추출물은 면역력 증강을 통해 항암효과를 보이는 것은 아닌 것으로 생각된다.

Table 7-4. Immunomodulating effect of *Grifola umbellata* extract on cell line

Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	A ₄₉₀	% Activation
0	1.24 \pm 0.07	100
15.8	1.35 \pm 0.11	109
31.2	1.31 \pm 0.09	106
62.5	1.35 \pm 0.08	109
125.0	1.27 \pm 0.11	102

다. *In vivo* test

1) 복수암에 대한 활성

암세포 접종 전 9일간, 암세포 접종 후 10일간 지령 열수추출물 투여 시 복수암이 억제되는 것이 확인되었다. 1일 1회씩 3회 투여하고 하루 쉬고 총 9일간 투여한 후 24시간 후에 암세포를 접종하고 7일 후에 확인시 세포수는 약 30% 정도 억제됨을 확인하였다.

Table 7-5. Antitumor effect of *Grifola umbellata* extract on sarcoma 180^ascites tumor in the male ICR mice

Group	dose (mg/kg)	Number of mice	Number of sarcoma 180 cells recovered ^a ($\times 10^5$)	Inhibition (%) ^b
Control	PBS	10	405.3 \pm 271.5	0
Extract treated	25	10	282.6 \pm 158.3	30.3

a. The cancer cells were implanted intraperitoneally to mouse 24 hours after pretreatment of *Grifola umbellata* extract for 9 days and harvested with PBS buffer 7 days after the cancer cell implantation and counted under a hemocytometer.

b. inhibition (%) = $\frac{N_c - N_t}{N_c} \times 100$

where N_c is mean of the number of sarcoma 180 cells in the control mice and N_t is mean of the numbers of sarcoma 180 cell in the test mice.

항암효과의 지속정도를 확인하기 위하여 동일한 방법으로 9일간 열수추출

물(35mg/kg body weight)을 투여하고 14일 후에 암세포를 접종한 후 7일 후에 복수암 세포수를 조사하였다. 그 결과 약 22%정도의 억제를 확인하였다(Table 7-6).

이러한 결과는 비록 저령 열수 추출물의 항암 효능이 추출물 투여 직후에 암세포를 투여했을 때보다 약 8% 가량 억제능이 감소했지만 추출물 투여 14일 이후까지 약효가 비교적 효과적으로 지속됨을 시사한다.

Table 7-6. Antitumor effect of *Grifola umbellata* extract on the proliferation of sarcoma 180 ^ascites tumor cells in the male ICR mice.

Group	Dose (mg/kg)	Number of mice	Number of sarcoma 180 cells recovered ^a ($\times 10^5$)	Inhibition (%) ^b
Control	PBS	10	494 \pm 41.6	0
Extract treated	25	10	381 \pm 53.4	22.9

a. The cancer cells were implanted intraperitoneally to mouse 14 days after pretreatment of each sample for 9 days and harvested with PBS buffer 7 days after the cancer cell implantation and counted under a hemocytometer.

b. inhibition (%) = $\frac{N_c - N_t}{N_c} \times 100$

where N_c is mean of the number of sarcoma 180 cells in the control mice and N_t is mean of the numbers of sarcoma 180 cell in the test mice.

2) 복수암에 대한 활성

복수암과 동일한 방법으로 9일간 열수추출물(25mg/kg body weight)을 투여하고 접종한 후 28일 후에 고형암 용적을 약 36%가 억제되었다.

이런 결과로 미루어 저령의 열수추출물의 항암작용은 면역 증강효과에 의한 것이라기 보다는 암세포를 직접 억제하는 것으로 생각된다.

Table 7-7. Antitumor effect of *Grifola umbellata* extract on the proliferation of sarcoma 180 solid tumor^a in the male ICR mice

Group	Doses (mg/kg)	Number of mice	Average tumor ^b size (cm ²)	Inhibition ratio (%) ^c
Control	PBS	10	21.69 ± 6.92	0
Extract treated	25	10	13.85 ± 3.96	36.1

a. The cancer cells were transplanted subcutaneously to mouse 24 hours after pretreatment of each sample for 9 days.

b. Complete regression was determined at 35 days after transplantation.

c. Inhibition effect was determined at 28 days after transplantation

$$\text{Inhibition ratio(\%)} = 1 - \frac{\text{average tumor size of each treated group}}{\text{average tumor size of control group}} \times 100$$

참고문헌

- Azuhata, Y., and Sugiyama, K. 1994. Antitumor-promoting effect of kampo formulations on rat urinary bladder carcinogenesis (VI). effect of ergosterol on rat urinary bladder carcinogenesis in long-term assay. *J. of Traditional Medicines* 11:344-345.
- Camichael, J, W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and C. W. Hesseltine. 1974. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47:936-942
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1991. Studies on the structure and nature of sclerotia of *Grifola umbellata* 10(4):312-317.
- Guo, S. X. and Xu, J. T. 1993. Genesis and function of defense structure of sclerotia of *Grifola umbellata* after *Armillariella mellea* infection. *Acta Mycologica Sinica* 12(4): 283-288. *Acta Mycologica Sinica*
- Inaoka, Y., Shakuya, A., Fukazawa, H., Ishida, H., Nukaya, H., Tsuji, K., Tsuji, K., Kuroda, H., Okada, M., Hukushima, M., and Kosuge, T. 1994. Studies on active substances in herb used for hair treatment.-effect of herb extracts on hair growth and isolation of active substance from *Poylporus umbellatus*. *Chem. Pharm. Bull.* 42(3): 530-533.
- Ito, H., Fujii, K., Naruse, S. and Miyazawa, T. 1973. *Mie Medical Journal* 23:117.
- Kim, H. Y., Leem, Y. E., Choi, H. T., and Song, H. G. 1995. Decolorization of dyes by white rot fungi. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 298-304.
- Lee, J. Y. 1988. Compendium of Korean mushroom. Academic Press. 166pp.
- Lu, W., Adachi, I., Kano, K., Yasuta, A., Toriizuka, K., and Ueno, M.

1985. Platelet aggregation potentiators from Cho-rei. *Chem. Pharm. Bull.* 33:5083-5087.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H., and Yadomae, T. 1978. Structural examination of antitumor, water-soluble glucans from *Grifola umbellata* by use of four types glucanase. *Carbohydrate Research.* 65:235-243.

Miyazaki, T., Oikawa, N., Yadomae, T., Yamada, H., Yamada, Y., Hsu, H. Y., and Ito, H. 1979. Relationship between the chemical structure and antitumor activity of glucans prepared from *Grifola umbellata*. *Carbohydrate Research* 69:165-170.

Ohta, K., Yaoita, Y., and Kikuchi, M. 1996. Sterols from sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. *Natural Medicines* 50(5):366.

Ohta, K., Yaoita, Y., Matsuda, N. and Kikuchi, M. 1996. Sterol constituents from the sclerotium of *Polyporus umbellatus* fries. *Natural Medicines* 50(2):179-181.

Sato, K., Osawa, M., Suzuki, Y. and Oikawa, S. 1984. Difference in fruiting capability of stocks in *Grifola frondosa* and its allied species. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 25:205-209.

Stamet, P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press.386pp.

Shim, J. O., Son, S. G., Kim, Y. H., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Lee, T. S., Lee, S. S., and Lee, M. W. 1997. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* 25(3):209-218.

Thomas, W. J., Choi, S., and Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.

Ueno, Y., Abe, M., Yamauchi, R., and Kato, K. 1980. structural analysis

of the alkali-soluble polysaccharide from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. *Carbohydrate Research* 87: 257-264.

Ueno, Y., Okamoto, Y., Yamauchi, R., and Kato, K. 1982. An antitumor activity of the alkali-soluble polysaccharide (and its derivatives) obtained from the sclerotia of *Grifola umbellata* (Fr.) pilat. *Carbohydrate Research* 101:160-167.

You, J. S., Hau, D. M., Chen, K. T., and Huang, H. F. 1994. Combined effects of Chuling (*Polyporus umbellatus*) extract and mitomycin C on experimental liver cancer. *Amer. J. Chinese Medicine* 22(1):19-28.

제 8 장 농가 폐부산물의 이용성 실험

제 1 절 서 론

예로부터 많은 버섯이 자연계에서 채취되어 이용되었으나, 중요한 버섯은 인공재배법이 개발되었거나 자연 환경을 조절함으로 많은 양의 버섯을 생산하고 있다. 원목을 이용한 버섯의 인공 재배법이 연구된 후, 식용버섯의 인공재배가 상업화되기 시작되었다. 현재는 원목의 가격이 상승하고 구하기 어려워짐에 따라 톱밥 혹은 톱밥 대체 농산 부산물을 이용한 버섯재배가 연구되고 있다. 버섯 재배에 사용할 수 있는 수종이 참나무에 국한되어, 원목 생산과 함께 톱밥 생산은 버섯의 생산 단가를 높이는 요인으로 작용하고 있다. 외국에서는 톱밥대신 농가부산물을 이용한 버섯 재배에 관한 많은 연구사례가 있으나 아직 우리나라에서는 그 연구가 미진한 상태이다.

우리 나라에서의 느타리버섯재배에 관한 연구는 농촌진흥청에서 원목재배를 처음으로 연구 개발하였고(정 등 1989; 박과 고, 1974; Chang & Miles, 1989), 벗짚을 기질로 하는 재배(박 등, 1975; 1977; Chung *et al*, 1981; Go *et al*, 1981; Park *et al*, 1977; 1978)와 밀·보릿짚(Chang & Tan, 1989)을 재료로 하는 연구가 수행되었다. 근래에 여러 가지 버섯에 대한 재배로 아까시나무 톱밥 재배에 대한 연구(Lee, 1991; 1996; 1997)가 있었고, 다른 농산 부산물인 마늘껍질에 대한 연구(Lee, 1996)도 시도된 바가 있다. 최근에는 농가부

산물을 버섯 재배에 이용하는 연구(Sivaprakasan & Kundaswamy, 1981) 또는 폐기물인 폐면을 이용하는 재배연구(유 등, 1996)나 커피박, 땅콩피, 산패유, 사과 가공부산물 등과 같은 물질을 이용하여(정 등, 1989; 조 등, 1995; 1996; 송 등, 1993; 이 등, 1994; 박 등, 1992) 원목이나 톱밥을 대체하려는 연구가 활발해지고 있다.

버섯 생산에 대한 연구에서 버섯 균사 재배와 버섯 발이 문제가 중요시되며, 사용된 기질도 이러한 면에서 제한을 받고 있다. 버섯의 생장에 관한 기초연구로서는 아미노산 첨가에 의한 생장 촉진효과(Fraser & Fujlkawa, 1958; 유 등, 1994)와 탄수화물의 종류, 첨가량의 차이가 버섯발생에 영향을 준다는 보고(Hammond, 1986)와 지질 또한 버섯의 발생에 영향을 미친다는 보고(Song *et al*, 1989)도 있다. 또한, 느타리버섯 재배가 농가 고소득 작물(정 등, 1973)의 하나로 주목을 받아 대량으로 재배되는 과정에 여러 종류의 병이 발생하여(Hong *et al*, 1983; 1992) 균주 개량을 통한 내병성의 증대와 새로운 기술 개발연구가 진행되고 있다(차 등, 1994). 최근에 병 재배에 사용되는 톱밥과 미강은 균일한 재료의 확보와 높은 가격으로 인해 문제가 제기되어, 농가 폐부산물 및 산업 폐기물 등을 버섯 배지 자원으로 이용하기 위한 연구가 다각도로 이루어지고 있다(김, 1996; 경기도 농진원, 1993). 그래서 많은 농가 폐부산물을 이용한 버섯 생산 가능성이 대두되고 있다. 이러한 면에서 최근 밤의 수출이 늘면서 수집이 용이한 밤껍질에 대한 버섯재배 연구는 자원 활용 방안에서 중요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 농가에서 생산되는 농산 부산물의 하나인 밤껍질을 이용하여 여러 가지 버섯 생산에 관련된 자료를 얻기 위하여 실험을 하였다. 밤껍질을 이용한 느타리 및 표고버섯 재배를 시도하였으며, 이들 균사의

성장을 관찰하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 균주군

본 시험에 사용된 균주는 농업과학기술원에서 보급한 *Pleurotus* 속의 균으로 원형 느타리(*P. ostreatus* ASI2180; Won-Hyong), 시중에 판매되는 느타리 종균으로 흑평과 CBMO를 사용하였다. 표고버섯 (*Lentinus edodes*)은 임업협동조합 중앙회에서 판매되고 있는 임협 1, 5, 6, 및 7호를 분양 받아 시험에 공시하였다. 그 외 노루궁뎅이(*Hericium ramosum*)버섯과 검은비늘버섯 (*Pholiota adiposa*)은 강원도 양양과 충북 보은군 법주사 주변에서 채집 분리하였으며 상황(*Phellinus igniarius*)은 인공재배 되어 판매하는 자실체로부터 분리한 균주를 시험에 사용하였다. 위의 균주들은 PDA배지(Difco; Potato Dextrose Agar)에 증식하여 접종원으로 사용하였고 보관은 PDA배지에 5°C의 냉장고에 보존하였다.

2. 배지

버섯배양 배지로서 널리 쓰이는 톱밥(참나무)에 미강을 첨가한 배지로 밤껍질 배양을 비교하였다. 밤껍질은 대구시 협성산업에 의뢰하여 구입하였으며 외피와 내피로 나누었다. 외피는 밤의 껍질로 갈색의 껍데기만 포함한 것으로 딱딱

한 부분이 많았고, 대부분 건조한 상태였으며(Table 8-1), 내피는 밤의 알맹이 부분으로 갈색의 내피가 포함되어 있으며, 밤의 전분과 혼합된 상태로 수분 함량이 높았으며, 다른 미생물에 오염된 상태였다. 농산 부산물에 관한 성분은 KS 표준분석법으로 분석하였다. 대부분의 실험은 수집된 형태의 밤껍질에 대한 자연상태로 VITRO VENT(VV) container(DUCHFA, 식물 조직배양통)에 넣어서 멸균하여 직접 버섯균을 접종하여 배양하였다. 접종은 직접 PDA에 배양한 균사 덩어리를 agar block을 이용하여 일차적으로 접종하였다. 또한, 원목 재배용으로 사용되는 표고 균사 접종 콘(cone)에 균사를 배양하여 한 개씩 넣어서 접종원으로도 사용하였다. 각각의 고행배지에서 배양된 균사는 250ml 삼각플라스틱에 고무마개를 하여 생산되는 CO₂ 량으로 균사체를 정량하였다. CO₂ 생산량은 GC(Gas Chromatography)로 정량 하였으며 공기량을 상대적으로 환산하여 기록하였다. 또한, 실험에 사용한 무기물(minerals ; M)은 일차로 20배의 고농도 용액을 만든 후 사용할 때 필요한 농도로 희석하였다 (Lee, 1991; 2.0g MgSO₄ · 7H₂O, 4.0g K₂HPO₄, 0.6g KH₂PO₄, 4g CaCO₃ · 2H₂O, 0.04g FeCl₃ · 2H₂O, 4g (NH₄)₂SO₄, 0.04g Thiamine · HCl를 증류수 1L 에 첨가하여 무기물 첨가 용액을 만들었다).

3. 발이

배양 고행배지에서 배양이 끝난 버섯균들인 느타리, 표고 및 노루궁뎅이 버섯을 재료로 사용하였다. 균사의 생장이 완전히 끝난 상태에서 15~17℃의 저온 chamber (용량 18 L)에 넣은 후 습도는 일반적으로 사용하는 가습기를 이용하

여 조절하였다. 29일간의 균사 생장이 끝나고 자실체의 형성에 있어서 균일하게 발생시키기 위해 실내온도를 15℃ 이하로 하고 균류기 작업을 한 후 충분한 물을 주어 수분을 보충하였다. 또한 습도는 온도가 일정한 공간에 포화되도록 하였다. 생체 중량은 각 병에서 수확된 자실체의 무게를 g단위로 측정 조사하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 다양한 버섯 균종의 배양

밤껍질은 외피와 내피로 구분된 것을 대구 협성 농산에서 약 500 kg 씩 얻을 수가 있었다. 외피의 상태는 건조한 상태로 직접 균사 배양에 사용할 수가 있었으나, 내피의 경우는 물에 젖어 있어 다른 공기 오염 균에 오염이 많았다. 내피는 푸른 곰팡이(*Penicillium* sp. 와 *Trichoderma* sp.) 및 다른 균에 심하게 오염되어 있었으나, 건조시킨 후에 버섯 배지로 사용하였다. 이러한 상태의 밤껍질을 이용하여 일반적인 분석을 시도하였으며(Table 8-1), 구입된 밤껍질에 대해 분석한 결과 외피는 다른 나무 성분보다 리그닌 함량이 두 배 정도 많았으나 내피의 경우는 버섯 재배용 원목의 성분과 비슷하였다. 대부분의 균들이 내피에서는 잘 자랐으나 외피에서는 잘 자라지 않았다(Table 8-2). 내피에서는 균사성장 속도도 빠르고 균사밀도도 높았으나 외피에서는 균사밀도가 낮았다. 노루궁뎅이는 오염은 잘 되었으나 잘 자라고 자란 후에 곧 가는 자실체를 생산하였다. 그러나 야외에서 볼 수 있는 책꽃이 형(fan shaped coralloid) 자실체

는 VV 덮개를 닫은 후에 바깥쪽으로 생성되었다. 상황버섯은 오염율이 높고 균사의 성장이 거의 없었다. 그리고 Table 8-2와 같이 본 실험실에서 분리한 여러가지 균도 함께 시도하였으나 오염이 심하게 되어서 균사 배양이 어려웠다. 종균의 양을 늘리기 위해 표고버섯 재배에서 원목 접종원으로 사용되는 접종콘(cone)을 이용하여, 멸균된 밥껍질이 담겨 있는 VV속에 한 콘씩 접종하였다. 접종콘을 사용한 결과는 Table 8-2와 같이 비교적 오염이 적게 일어났으며 균사의 성장도 양호하였다.

Table 8-1. General compositions of the woods and outer and inner peels of fruits of *Castanea crenata*.

Scientific names	Korean Name	Holocellulose, %	Kraft Lignin, %	Ash. %
<i>Pinus densiflora</i> ^a	소나무	65.8	26.1	0.22
<i>Quercus serrata</i> ^a	졸참나무	78.2	21.8	0.61
<i>Quercus mongolica</i> ^a	신갈나무	78.4	18.8	0.35
<i>Castanea crenata</i> ^b	Outer peels	31.6	41.3	4.30 ^c
	Inner peels	76.4	18.1	-

J, Lee, CU, Park, SJ, Cho, NS, Cho, BM, 1993. Laboratory Works for woods and timbers. Kwang Il Culture Publisher Co., see p 474

^bDirectly measured by the methods mentioned by Ko, MH, Park, SJ, Lee, CU, Park, SJ, Cho, NS, Cho, BM, 1993. Laboratory Works for woods and timbers. Kwang Il Culture Publisher Co., see p 474

^cAnalyses of components (%): Total-Nitrogen 1.14, Total-Carbon 39.39, P₂O₅ 0.21, K₂O 1.09, CaO 2.48, MgO 0.52, pH(1:1), 6.5, EC 7.50 on the dried basis.

Table 8-2. Growth state of mushroom fungus in the polyethylene vinylbags containing the two types of seed peels (inner and outer peels) after an inoculum of agar block^a.

Varieties employed, (lines originated)		Seed peels of Japanese chestnut (<i>Castanata crenata</i>)		Methods of inoculation ^b (promodium developed ^d)
		Inner layers	Outer layers ^e	
<i>Lentinus edodes</i> ^c	ImHyub-6	4/5 (5/5) ^c	1/5 (5/5) ^c	Agar block ^b (promodium develope
	ImHyub-7	4/5 (5/5) ^c	2/5 (5/5) ^c	Agar block ^b (promodium develope
<i>Hericiium ramosum</i>	BubJuSa,	2/5	2/5	Agar block ^b (promodium develope
	YangYang	0/5	0/5	Agar block ^b (promodium develope
<i>Phellinus igniarius</i>		1/5	1/5	Agar block ^b
<i>Pleurotus ostreatus</i> ^c	CMBO	3/5 (5/5) ^c	3/5 (5/5) ^c	Agar block ^b (promodium develope
	HukHyung	9/10 (5/5) ^c	4/5 (5/5) ^c	Agar block ^b (promodium develope
	WongJyung	10/10 (5/5) ^c	5/5 (5/5) ^c	Agar block ^b (promodium develope
<i>Pholiota adiposa</i>		0/5	0/5	Agar block ^b
<i>Laetiporus sulphureus</i>		0/5	0/5	Agar block ^b
<i>Lepista nuda</i>		0/5	0/5	Agar block ^b
<i>Polyporellus brumalis</i>		0/5	0/5	Agar block ^b

^aGrowth states of fungus: Numbers of bags of good growth without any contaminations per total bags employed in this work. Inoculated on Jan. 5, 1998 and observed at the rooms of 20°C for 2-3 months. All mycelia were directly isolated from the basidiocarps and grown in PD agars.

^bThe inoculants were used by the 0.5 x 0.5 cm agar blocks grown in PD agars.

^cThe growth state of *Lentinus* and *Pleurotus* species were grown well and also not contaminated at all when the agar blocks replaced by the other cone inoculants.

^dA promodium developed 1~2 months later after inoculations.

^cThe fungal mycelia of *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* grow well on the only the outer peels but do not produce any promodia (6/30/98).

2. 밤껍질에 재배

세 종류의 느타리버섯(원형, 흑평, CBMO)을 접종 (2/10/98)한 후에, 성장 (3/10/98)을 관찰하였다. 내피에는 약간의 공기 오염균의 오염은 있었으나 잘 자라고 있었다. 거의 10~20일만에 내피에는 완전히 균사가 성장하고 버섯 자실체까지 형성하고 있었다. VV에 내피를 멸균하여, 접종 콘으로 접종후에 느타리버섯을 재배하였다. 내피에 접종한 후에 한 달만에 균사는 모두 자랐으며, 품종에 따라서 다르지만 7~8일 내에 모두 자실체를 형성하였다. 밤내피의 건조중량 44g에서 생버섯은 84.4~140.6g의 느타리가 생산되었다. 여기서 원형의 느타리가 가장 많이 생산되었으며, 자실체 생산 초발이 수도 가장 많았다. 표고버섯(임협 6, 7호)도 동일한 방법으로 밤껍질의 내피를 이용하여 접종하였다 (3/9/98). 거의 한달 만에 균사는 VV속을 꽉 채운 것으로 조사되었다(4/6/98). 균사는 느타리와 동일하게 잘 자라고, 15~16℃에서 발이를 거의 2달 동안 시켰으나, 버섯은 단 2~3개밖에 나오지 않았다. 여기서 표고의 경우 느타리와 같이 수행하였으며, 균사의 성장은 좋았으나, 버섯의 초발이수가 적게 발생하여 버섯의 자실체는 많이 얻지 못하였다.

3. 밤껍질과 혼합 배양

고체 배양에서 흔히 사용되는 톱밥 배지로서 참나무톱밥 : 미강을 8 : 2 비율로 섞어 250mL 삼각플라스크에 배양하였다. 그리고 균사가 배양되는 것을 시간 별 탄산가스 생산량을 측정하여, 균사의 성장을 관찰하였다. 사용된 버섯 균은 느타리 3품종과 표고 임협 6, 7호를 사용하였다. 혼합된 배지는 126°C로 30분간 멸균한 후에 균사가 자란 한천 배지를 이용하여 접종하였다. 한천배지에 균사가 약 1cm정도 균사가 퍼졌을 때를 0일째로 가정하여와 같은 결과를 얻었다. 이때에 나온 탄산가스를 공기 속의 탄산가스와 비교하여 피크를 비율로 표기하였다. 느타리 균사의 성장은 원형이 완만하게 자라고 다른 품종들은 모두 나중에 가서 최대치의 양을 나타내었다. 표고의 균사성장은 시간에 따른 차이가 있으나 일반적으로 비슷한 곡선을 만들었고 16일 후에 최대의 탄산가스 곡선을 만들었다. 이러한 자료를 기초로 밤껍질을 내피(Table 8-4)와 외피(Table 8-5)로 나누어 톱밥과 미강을 첨가하여 균사를 성장시켰다. 밤껍질 내피에는 느타리 3품종, 표고 2품종 및 노루궁뎅이를 사용하였다(Table 8-4). 느타리버섯의 경우는 7일째에 톱밥 배지보다는 잘 자라지는 않았으나 나중에 15일 후에는 모두 톱밥배지보다 성숙이 좋았다. 표고의 경우는 밤껍질의 내피에서 톱밥을 섞은 것이 좋게 나타났으며 미강을 혼합한 것도 좋게 나타났다. 노루궁뎅이는 모든 조건에서 다 잘 자라는 것으로 균사의 성장이 좋았다.

밤껍질 외피에는 표고와 느타리 모두가 자라지 않아서 내피실험에서 사용치 않은 금속첨가(Minerals) 실험을 더하였다(Table 8-5). 균사 성장에서 대조구와 톱밥·미강 배지에서 CO₂ 생산량이 내피 실험에 비하여 상당히 높았으며

이는 앞의 성장의 실험에서 시기적·계절적인 차이점도 있었다. 느타리의 경우는 원형만 사용하였는데, 미강을 첨가한 배지에서는 대조구인 톱밥 미강의 배지보다 균사의 성장이 좋았다. 그러나 표고의 경우는 느타리와 동일한 결과이나 미강만을 첨가한 배지에서 균사의 성장이 더 좋았다. 또한 Minerals(M)첨가 배지에서 톱밥 배지(대조구)보다 더 좋은 결과가 나타났으나 느타리의 경우에는 다른 성장결과가 나타났다. 노루궁뎅이버섯도 비슷한 결과를 낳았으며 이는 표고버섯과 성장의 경향이 일치하였다. 밤깍질 외피는 Minerals 첨가 혹은 미강 첨가한 것은 대조구에 비하여 균사의 성장이 높았다.

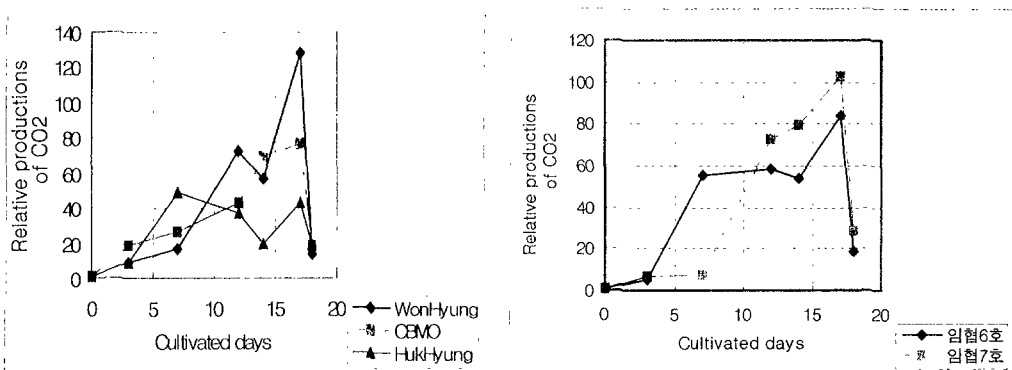


Fig. 8-1. Productions of carbon dioxide (cc/min) by the mushroom fungus on the sawdust media (left, *Pleurotus ostreatus*; Right, *Lentinus edodes*). See the detail in Tables 8-4 and 8-5.

Table 8-3. Average values and standard errors of the mushroom productions of *Pleurotus ostreatus*(CBMO, HukHyung, WonHyung)^a and their related parameters.

Mycelia of <i>Pl. ostreatus</i>	Numbers worked ^b	Days ^c	Fresh weight of mycelia mixed (g) ^d	Dry weight (g) ^e	Productions of Mushrooms (g)
CBMO	3	9.0±1.0	241± 35	44.3± 1.9	95.7± 12.9
HukHyung	5	6.8±1.6	255± 22	40.2± 2.4	84.2± 8.5
WonHyung	5	6.6±2.1	267± 7	48.3± 1.9	140.6± 17.0
Average	13	6.6±1.0	256± 11	44.3± 1.9	108.5± 10.5

^aVarieties of *Pleurotus ostreatus* purchased from Korea Federation of Culture Collection (KFCC)

^bNumbers of replications

^cThe days of promodium development at 10~15 °C

^dFresh weight of the substrates mixed with the mycelia before morphogenesis.

^eDried weight the substrates mixed with the mycelia after morphogenesis. This number might be indicated for utilizations of substrate by variety for further speculation.

^fFresh weight of mushrooms produced for the two weeks.

Table 8-4. Carbon dioxide productions of three mushroom fungi on the various solid substrates including in the agricultural-by products(Chestnut-Inner Peels).

Fungus and solid substrate ^a	CO ₂ productions (Rate per min air) ^b	
	7 days ^c	15 days ^c
<i>Pleurotus ostreatus</i> <WonHyung>		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	11.56	5.24
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	9.44	18.67
IPC (80 %)+SD (20 %)	9.56	12.43
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	20.51	13.34
<i>Pleurotus ostreatus</i> <HukHyung>		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	11.92	12.69
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	5.99	19.63
IPC (80 %)+SD (20 %)	12.66	7.15
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	16.51	16.08
<i>Pleurotus ostreatus</i> <CBMO>		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	24.14	11.67
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	14.94	49.87
IPC (80 %)+SD (20 %)	12.06	55.95
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	13.97	17.11
<i>Lentinus edodes</i> <ImHyub # 6>		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	5.40	9.33
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	5.13	9.07
IPC (80 %)+SD (20 %)	20.66	9.61
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	8.17	16.28
<i>Lentinus edodes</i> <ImHyub # 7>		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	17.85	10.08
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	14.24	13.75
IPC (80 %)+SD (20 %)	9.61	21.14
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	13.57	17.22
<i>Hericium ramosum</i> 노루궁뎅이		
Sawdust(SD, oak wood, 8)+RB(Rice bran, 2)	12.01	7.08
Inner peels of chestnut (IPC, 100 %)	21.81	12.38
IPC (80 %)+SD (20 %)	20.15	11.48
IPC (60 %)+SD (20%)+RB (20%)	18.89	12.62

^aEach ingredient were mixed by the hands and placed in the 250 ml erlenmeyer flasks.

^bThe carbon dioxide productions conducted with the duplicate works and determined by Gas chromatography. The rate of carbon dioxide productions for a min's incubation were divided by the carbon dioxide peak in the air. ^cDays of growth after inoculations at the room temperature.

The mycelia were grown at the room temperature from August 20 to September 10.

Table 8-5. Carbon dioxide productions of three mushroom fungi on the various solid substrates including in the agricultural-by products (Chestnut-outer Peels).

Fungi and solid substrate ^a	CO ₂ productions (Rate per air min) ^b	
	7 days ^c	15 days ^c
<i>Pleurotus ostreatus</i> <WonHyung>		
SD(Sawdust Oak, 8)+RB (Rice bran, 2)	55.50	24.03
OPC (Outer peels of chetnut)	31.98	29.60
OPC+SD (40%)+RB (20%)	124.37	80.78
OPC+RB (20%)	82.15	100.68
OPC, only+Minerals (5 ml) ^d	33.94	37.94
<i>Lentinus edodes</i> <ImHyub # 6>		
SD(Sawdust Oak, 8)+RB (Rice bran, 2)	69.22	72.42
OPC (Outer peels of chetnut)	62.50	107.45
OPC+SD (40%)+RB (20%)	100.21	81.93
OPC+RB (20%)	123.26	134.61
OPC, only+Minerals (5 ml) ^d	67.39	70.79
<i>Lentinus edodes</i> <ImHyub # 7>		
SD(Sawdust Oak, 8)+RB (Rice bran, 2)	66.79	100.10
OPC (Outer peels of chetnut)	65.74	109.22
OPC+SD (40%)+RB (20%)	86.66	136.21
OPC+RB (20%)	118.28	170.53
OPC, only+Minerals (5 ml) ^d	104.39	165.53
<i>Hericium ramosum</i> 노루궁뎅이		
SD(Sawdust Oak, 8)+RB (Rice bran, 2)	52.25	35.93
OPC (Outer peels of chetnut)	40.16	39.69
OPC+SD (40%)+RB (20%)	67.90	38.37
OPC+RB (20%)	84.55	74.73
OPC, only+Minerals (5 ml) ^d	52.96	45.98

^aEach ingredient were mixed by the hands and placed in the 250 ml erlenmeyer flasks.

^bThe carbon dioxide productions conducted with the duplicate works and determined by G chromatography. the rate of carbon dioxide productions for a min's incubation were divided the carbon dioxide peak in the air.

^cDays of growth after inoculations at the room temperature. The mycelia were grown at the room temperature from September 25 to October 15.

^dMinerals were the five times concentrates of Mineral solution: (NH₄)₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 2.0 MgSO₄ · 7H₂O 0.75 g, CaCl₂ 0.25 g, NaCl 0.075 g, FeCl₃ · 3H₂O 0.02 g per L of the distilled water.

제 4 절 고 찰

외피에서 균의 성장이 활발치 못한 것은 미생물이 사용할 수 있는 다른 필수 영양원이 없기 때문으로 생각된다. 이는 미강과 Minerals를 혼합한 배지에 나온 결과로 미루어 밤외피에는 내피보다는 Minerals과 전분 혹은 홀로셀룰로오스가 적은 것으로 생각된다(Table 8-5). 이러한 결과로부터 밤외피에 적절한 영양원을 첨가한다면 버섯 균사 배양 혹은 재배에 사용 가능할 것으로 생각된다. 밤껍질에 대한 연구에서 탄산가스의 생산 결과를 보면(Lee, 1991) 느타리와 표고는 성장형에 있어서 다소 차이가 있다. 표고는 느타리에 비해 서서히 자라고 나중에 가서 성장이 왕성한 것으로 나타났다. 이는 재배에서 아직 표고균에 대한 오염과 관련되어 표고버섯을 접종 때에 왕성한 원기가 있도록 하는 것이 중요한 것으로 생각된다(Lee, 1991). 그리고 다른 한편 표고가 느타리에 비하여 분해하기 어려운 난분해성의 물질을 효과적으로 분해하는 것으로 생각된다. 노루궁뎅이도 느타리보다는 표고와 더 가까운 균으로 생각되어 진다. 각각의 버섯 균사의 성장에 대한 것은 많은 연구가 되어야겠지만 목질화된 리그닌과 홀로셀룰로오스에 대한 연구가 되어져야 하겠다. 이러한 면에서 버섯 균의 기질에 대한 기본적인 연구는 점차적으로 식물의 생리적인 연구방법으로 해결해야 할 과제로 생각된다.

농가부산물을 이용하는 버섯 재배는 오래 전부터 시도된바가 있다 (박 등 1977; 이 등 1994; 유 등 1994; 조 등 1996; 1996; Lee *et al*, 1996; 1997). 밤껍질은 많은 양이 일반적으로 우리 나라의 농촌에서 발생되고 개인적으로 수거되고 있다. 그러나 최근에 와서는 밤에 대한 일본 수출이 활발해지면서 밤껍질이 환경오염원

으로 지적 받고 있다. 이러한 물질은 서서히 분해되어 자연계에 방치되면서 많은 오염원이 될 것으로 생각된다. 그러나 이러한 오염원을 버섯 재배에 적절히 사용하면 환경오염을 줄이고 버섯 생산에도 중요한 것으로 생각된다. 우선 껍질의 내피는 그대로 느타리버섯 재배에 사용할 수 있으며 자실체 형성도 잘되고 있다. 표고의 경우는 아직 몇 개의 자실체를 형성하였으나 완전히 잘 형성되는 것을 관찰하지 못하였다. 노루궁뎅이버섯은 성장도 잘되고 자실체도 잘 형성하였다. 내피는 전분의 함량이 많았고 공기 중 곰팡이에 의하여 많이 오염되었으나 버섯균사의 성장은 좋았다. 외피는 리그닌 함량이 높았으며 균사의 성장은 낮았으나 이는 필수 금속이온의 영양분이 없는 결과로 밝혀졌다. 느타리와 노루궁뎅이버섯은 밤 껍질의 내피에서 잘 성장하였고 자실체 형성도 잘되었다. 표고의 경우는 균사의 성장은 잘 되었으나 자실체 형성은 단 몇 개에 지나지 않았다. 기질에서 균사 성장은 탄산가스 생산량으로 조사하였으며 표고와 느타리의 성장은 서로 다른 면을 보이고 있었다. 밤외피는 균사 성장에 필요한 금속이온의 영양분이 부족한 것에 대해 다른 기질 첨가로 버섯재배의 원료로 사용할 수가 있을 것으로 생각된다. 현재 생산되는 밤껍질은 환경오염 물질로서 농산물 생산에 사용됨으로 일석이조의 효과를 낼 것으로 생각된다. 이러한 면에서 밤껍질을 이용한 버섯 재배는 환경오염을 줄이면서 농업 생산품을 생산한다는 의미에서 중요하다고 하겠다.

참 고 문 헌

1. 김순근. 1996. 농업부산물을 이용한 느타리버섯의 재배에 관한 연구. 한국교원대학교 석사학위논문.
2. 농촌진흥원 (경기도). 1993. 농업과학기술 연구개발. 시험연구사업설계서. pp 196-224.
3. 박원복, 송치현, 현재욱. 1992. 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 영양생리 및 기질개발. 한국균학회지. 20: 77-82.
4. 박용환, 고승주. 1974. 식용버섯 재배에 관한시험. 뽕나무 및 과수전정가지를 이용한 느타리 버섯 재배에 관한 시험. 농기연연구보고서. see pp 131-137.
5. 박용환, 고승주, 김동수. 1975. 볏짚을 이용한 느타리버섯 재배에 관한연구. 제1보 배지 재료에 관한 실험. 농사시험연구보고서 17: 103-107.
6. 박용환, 고승주, 장학길. 1977. 볏짚을 이용한 느타리버섯 재배에 관한연구. 제2보 배지 열처리에 관한 연구. 농사시험연구보고서 19: 93-97.
7. 송치현, 이창호, 허태린, 안장혁, 양한철. 1993. 팽나무버섯 자실체 생산을 위한 기질개발. 한국균학회지 21: 212-216.
8. 이재윤, 안원근, 이재동. 1994. 맥주효모 추출물을 이용한 표고버섯균사체의 심부배양에 관한 연구. 한국균학회지. 22: 266-275.
9. 유정, 이공준, 정기태, 나종성. 1994. 느타리버섯의 배지별 Amino acid함량변화에 관한 연구. 한국균학회지. 22: 338-342.

10. 유정, 이공준, 정기태, 나종성, 황창주. 1996. 느타리버섯 배지개발을 위한 폐면포 이용에 관한 연구. 한국균학회지 24: 176-179.
11. 조우식, 윤영석, 박선도, 최부술. 1995. 제지부산물을 이용한 느타리버섯 (*Pleurotus osteratus*) 자실체형성용 엽가배지 개발. 한국균학회지 23: 197- 201.
12. 조우식, 윤영석, 유영현, 박선도, 최부술. 1996. 사과 가공부산물 첨가배지 가팽이버섯 (*Flammulina velutipes*) 의 균사생장과 자실체에 미치는 영향. 한국균학회지 24: 223-227.
14. 정환채, 김영배, 박용환. 1973. 산림 및 식용버섯재배에 관한 시험. 느타리버섯재배에 관한 시험. 농기연 연구보고서. pp 211-238.
15. 정환채, 박정식, 박용환,. 1989. 느타리버섯재배재료 개발시험. 농기연연구 보고서 (생물부편) pp 598-602.
16. 차동열, 유창현, 김광포. 1994. 최신버섯재배 기술. 농진회. pp 107-187.
17. Chang, S.T. and P.G. Miles. 1989. Edible mushroom and their cultivation. CRC Press, Florida. p 189-223.
18. Chang, S.T. and Y.H. Tan. 1989. Past and future mushroom cultivation in Southeast Asia. Mushroom Science XII: 761- 807.
19. Chung, H.C., Y.H., Park, and Y.S. Kim, 1981. Basic information on the characteristics of strains of oyster mushroom. Kor. J. Mycol. 9:129-132.
20. Fraser, I.M., and B.S. Fujikawa. 1958. The growth promoting effects

- of several amino acids on the common cultivated mushroom, *A. bisporus*. *Mycologia* 50:538-549.
21. Flack, R. 1917. Über die Waldkultur des austern pilzes auf Laubholzstubben. *Z. Forest-Jugdwes* 49: 159-165.
 22. Hammond, J.B.W. 1986. Carbon and mushroom growth. *The Mushroom J.* 165: 316-321.
 23. Go, S.J., Y.H. Park, and D.Y. Cha. 1981. Studies on the artificial substrates with rice straw and the spawning for *Pleurotus florida* in Korea. *Kor. J. Mycol.* 9: 67-72.
 24. Hong, B.S., S.J. Kim, C.H. Song, S.Y. Hwang, and H.C. Yang. 1992. Development of substrate and cultural method for the cultivation of *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. J. Mycol* 20: 354-359.
 25. Hong, J.S., Y.J. Kwon, and G.T. Jung. 1983. Studies on basidiomycetes(2) Production of mushroom mycelium (*Pleurotus ostreatus* and *Auricularia auricula-judae*) in shaking culture. *Kor. J. Mycol.* 11:1-7.
 26. Lee, S.S. 1991. The role of the rice bran employed in the treditional spawn sawdust medium. *Kor. J. Mycol.* 19: 47-53.
 27. Lee SS, KJ Choi, and CH Oh. 1996. Sawdust-culture of *Lepista nuda*. *Korean J. Mycology* 24: 27-279.
 28. Lee, SS, SK Kim, TS Lee, and MW Lee. 1997. Cultivation of oyster

mushrooms using the garlic peels as an agricultural by products. The Korean J Mycology 25: 268-275.

29. Park, Y.H., H.G. Chang, and S.J. Ko, 1977. The effects of the quantities of the rice straw substrates and spawn on the yield of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Kor. J. Mycol. 5:1-5.
30. Park, Y.H., Y.S. Kim, and D.Y. Cha. 1978. Investigation on artificial culture for new edible wild mushrooms. Kor. J. Mycol. 6: 25-28.
31. Stametes P. and J.S. Chiton, 1983. The Mushrooms cultivator. Agarikon Press.
32. Sivaprakassam, K. and T.K. Kundaswamy. 1981. Waste materials for the cultivation of *Pleurotus sajaoor caju*. The Mushroom J. 101: 178-179.
33. Song, C.H., K.Y. Cho, N. G. Nair, and J. Vine. 1989. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. Mycologia 81: 514-522.

제 9 장 공시버섯종의 인공생산

제 1 절 서 론

버섯과 인간과의 관계는 그것을 식품으로 이용할 때로서, 동양인과 구미인은 특히 약이나 식용으로 이용하여 왔다(박, 1997). 우리나라는 김부식의 삼국사기(1145)나 정약용(조선시대, 1790)의 산림경제 등에서 송이, 표고, 복령에 대한 기록이 있는 것으로 보아 오래 전부터 버섯이 널리 이용되어 왔음을 알 수 있다(Kim *et al*, 1987). 현대에서는 저지방 고 단백질의 국민 건강 식품(Park *et al*, 1978)과, 항암작용 성분과 의약품(Chung, 1982)으로 버섯의 인지도가 높아져 그 수요는 급격히 증가하였다(Peberdy *et al*, 1993). 그러나 이러한 식용버섯의 수요급증에 대응하여 현재 야생 식용버섯 중 인공재배 되고 있는 것은 느타리나 표고, 양송이, 팽이 등이 주종을 이루고, 그 외에 팽나무버섯(*Armillaria mellea*), 복령(*Poria cocos*), 만가닥버섯(*Lyophyllum* sp.)의 인공재배가 시도된 바 있으나, 실제 농가에서 생산되는 것은 거의 알려지지 않고 있다(Lee & Choi, 1995).

저령(*Grifola umbellata*)의 자실체는 토양내의 균핵으로부터 형성되며 아시아의 여러나라에서 약제로 사용한다. 저령으로부터 추출한 다당과 β -glucan이 간암, 신장암, 위암과 자궁암에 대해 탁월한 효과(Lee, 1986)가 있다고 보고하였고, 이노작용에 대한 효과(Lu, *et al.*, 1985)와 백혈병(Ohsawa, *et al.*, 1992)과 다른 암에 대한 효과(You, *et al.*, 1994; Azuhaata, 1994)도 있다고 보고하였다. 많은 다른 연구자들에 의해 수행되었다(Ito.. 저

령의 인공배양 및 균사체 생산에 관해서는 80년대에 일본 특허청을 통하여 보고하였고 현재 중국에서 균핵을 종핵으로 사용하는 접종법으로 인공배양하고 있으며 그의 소요시간은 2-3년이 소요된다고 보고되고 있다. 현재 국내에서도 매년 저령의 수입이 늘고있지만 아직 국내 약용버섯 중 인공재배법이 개발되지 않은 버섯이다. 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*)의 인공재배 연구가 진행 중이며, 특히 일본에서는 이미 같은 *Pholiota* 속인 맛버섯(*Pholiota nameko*)이 단백질 함량이 높고 맛이 좋은 버섯이기에(Cha *et al.*, 1981), 기업생산 체계를 갖추어 생산하고 있다(Cha *et al.*, 1981). 뿐만 아니라 이 균에 대한 활발한 연구들이 이루어졌으나(Ikuo & Kimito, 1969; Ikuo, 1979; Ikuo *et al.*, 1980), 우리나라는 그 연구사례가 거의 없고, 단지 Park *et al.*,(1978)이 우리나라에서 자생하는 야생버섯 중 형태와 육질이 우수하고 기호에 알맞는 것에 대한 인공재배 가능성을 검정한 실험에서 락타리아(*Pholiota squarrosa*(Fr.) Quel.)이 참나무 톱밥에서 인공재배가 가능함을 보고하였다. 이에 본 연구실은 식용버섯의 개발을 목적으로 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*) 자실체 형성의 기초 자료와 최근 균류 연구에 많이 응용되는 PCR-RAPD법을 사용하여 채집된 *Pholiota* 속의 종들을 비교하고, 더 나아가 *P. adiposa*의 교배형을 찾아 유전적 변이에 의한 향상된 종균을 개발하는 것과 같은 육종법에 응용하고자 하였고 저령의 균핵 생산을 목적으로 하였다. 본 연구를 통하여 유용버섯종 재배법을 개발하고 국내 실정에 맞는 재배법을 발굴하여 농가에 보급하므로 농가의 부가가치가 높은 농산물 재배법에 기초자료를 제공하고자 이 연구를 수행하였다

제 2 절 재료 및 방법

1. 저령의 인공생산

가. 사용균주

저령(*Grifola umbellata* Pers. ex Fries.)는 중국 산서성에서 채집 보관한 균핵을 이용하여 균주를 분리하고 균핵은 채집품을 직접 사용하였다. 뽕나무버섯(*Amillaria mella*)은 본연구실에서 분리한 균(AM 777)과 분양받은 균종(AM 666)을 사용하였다. 이 균주를 PDA배지에서 계대하여 실험에 사용하였다.

나. 기내배양을 통한 종핵형성유도

1) 액체배양을 통한 종핵유도

배지는 실내조건에서 균핵유사체를 생산하여 종핵으로 사용하고서 다음과 같이 고안하여 실험하였다. 개발된 저령균 배지 KKL(fructose 20g, maltose 10g soytone 3g, peptone 3g, NaNO₃ 1g, MgSO₄ 0.5g, Na₂HPO₄ 1g)가 담긴 45×250mm의 시험관에 알루미늄 관을 3개 꽂고 긴 것중 하나는 산소 공급용, 다른 하나는 배양여액 이동용, 짧은 것은 하나는 공기 배출용으로 사용하였다. 접종 형태는 저령균과 뽕나무버섯균을 함께 접종하여 산소를 공급하고 약 30일간 배양한 것과 저령과 뽕나무버섯균을 단독으로 접종하여 30일간 배양한 뒤 Peristaltic pump를 이용하여 뽕나무버섯의 균사 배양여액을 저령의 균사배양 쪽으로 5ml를 이동시킨 것, 저

령의 균사를 단독으로 배양 후 직접 뽕나무버섯균을 접종한 것을 실험하여 관찰하였다(Fig. 9-1).

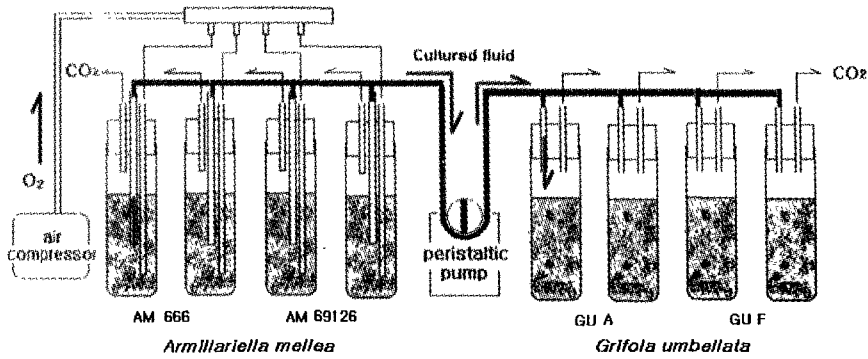


Fig. 9-1. Cultivated construct of *G. umbellata* and *A. mellea*

2) 톱밥배지를 통한 종핵유도

KKL배지를 25ml의 삼각플라스크에 저령 분리균을 접종하여 30일간 배양한 액체 종균의 조직입자를 무균상태에서 조직을 미세하게 마쇄한다. 시험관(24×150mm) 속에 참나무 톱밥과 미강, 콩, 밀보리를 4 : 1 : 1 : 1 : 1의 비율로 혼합하여 수분 65%로 만든 톱밥배지를 3cm 높이로 채운 후 121℃ 1.5기압 하에서 멸균한 다음 액체종균을 접종한다. 접종 후 18℃의 온도로 3달간 배양한 다음 종핵의 형태를 관찰하였다.

3) Petri-접시에서 종핵유도

ㄱ) 균사접종법

단풍나무와 참나무 단목을 12×70mm의 크기로 절단한 후 Plate에 놓고

PDA배지를 첨가하여 고형화 시킨 다음 뽕나무 버섯을 접종하여 배양한 후, 균사속이 발달하면 저령의 균사를 접종하여 함께 배양한다.

ㄴ) 저령균체의 접종법

저령으로부터 분리한 균을 아래와 같은 방법으로 섞어 만든 톱밥배지에 접종하여 저령이 성장하는 환경과 뽕나무버섯이 성장하는 환경을 구분하여 그 균들간의 변화를 관찰하였다. 톱밥배지 조성은 참나무톱밥, 미강, 호밀, 콩, 보리를 4:1:1:1:1의 비율로 혼합하여 수분 65%를 가하여 제조한 배지에 저령균사를 접종하여 18℃에서 45일간 배양하고 뽕나무버섯균은 PDA배지의 표면에 20mm 구멍을 내어 저령의 균사체를 접종하였다.

4) 배양병을 이용한 균핵형성

참나무 단목(20×40mm)이 들어간 삼각 플라스크 배양병(250ml) 안에 넣어 단목의 배양병 입구를 향하도록 세운 형태로 하거나 단목의 몸체가 배양병의 바닥에 눕도록 한 것 두 종류로 배지를 가하여 고형화시켰다. 외부배지는 PDA를 사용한 것과 톱밥과 모래를 섞은 배지 두 종류로 했다.

저령의 쥐종은 저령의 균사덩이를 이용한 것과 저령 균사를 직접 접종하는 방법을 사용하였다. 이중 균사덩이를 이용한 것은 균사생장 후 균핵화와 같은 표피층이 형성된 균사체 덩이만을 선별하여 사용하였다. 공생균으로 알려져 있는 뽕나무버섯은 참나무 단목과 단풍나무 단목을

20 × 40mm 크기로 자른 다음 수분을 보충한 단목에 먼저 1달간 배양한 후 균사속이 발달하여 외부로 나오면 균사덩이를 접종하고 멸균된 톱밥과 모래를 1:2의 비율로 혼합한 것을 채운 후 함께 배양하였다.

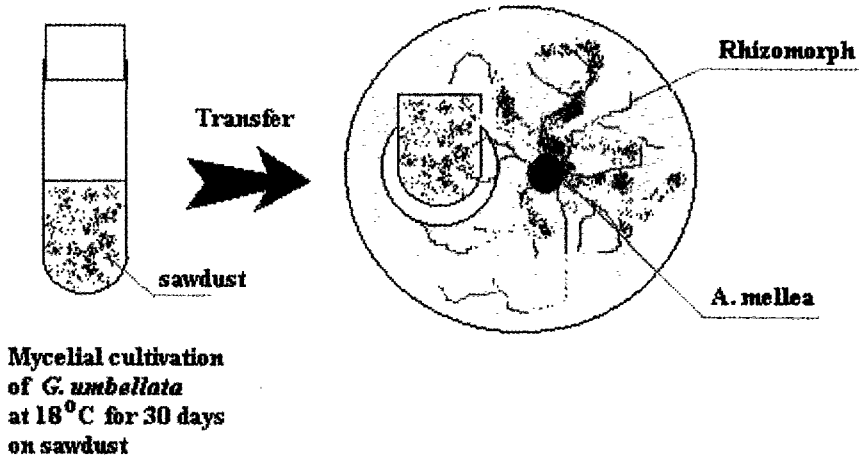


Fig. 9-2. View of cultivation of both fungi in PDA

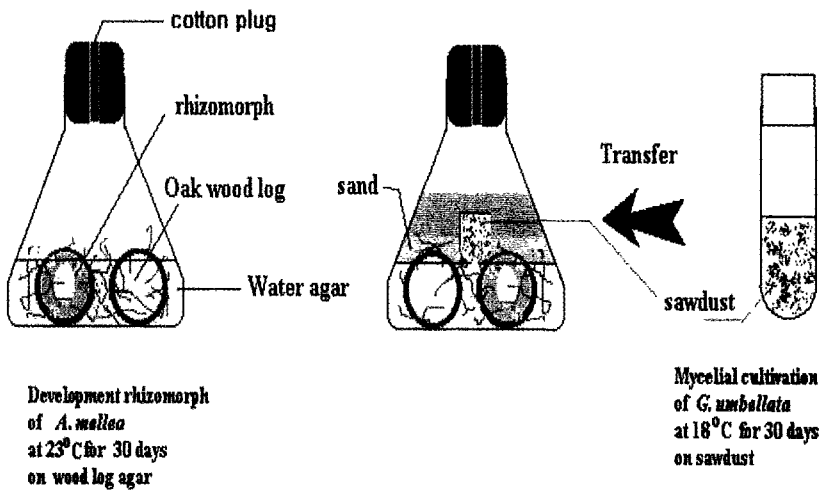


Fig. 9-3. Culture method in flask with mycelial mass as inoculum

다. 야외 접종에 의한 균핵생산

1) 균사체를 이용한 균핵생산유도

· 저령균사의 구멍접종법에 의한 균핵형성유도

참나무, 단풍나무, 은사시나무, 적송 70×400mm의 원목에 직경 12.5×20의 구멍을 푼자형으로 원목에 타공한 다음 뽕나무 버섯균을 접종하여 무균상태에서 3달간 배양하였고, 저령은 참나무톱밥과 미강을 4:1의 비율로 섞은 배지에서 2개월간 배양하였다. 그 후 균사속이 잘 발달한 뽕나무 버섯균이 있는 구멍 속에 톱밥으로 배양한 저령의 톱밥종균을 채운 뒤 스티로폴 마개로 막고 600×600mm의 구덩이에 멸균된 흙을 50mm높이로 피복한 다음 접종한 원목을 층으로 쌓았다. 쌓은 공간을 다시 멸균된 흙으로 덮고 그 위에 토양을 다시 덮었다. 실제 매몰한 모습은 Fig. 9-4, 9-5에 나타내었다.

2) 매몰법에 의한 균핵형성

ㄱ) 매몰지의 환경

남산과 양수리를 포함하여 총 9곳의 매몰지를 선정하여 골목을 이용한 매몰법과 살아있는 나무뿌리에 직접 접종하는 방법, 톱밥 배양균을 이용한 매몰법을 시행하였다. 총 매몰지의 월별 접종시기 및 수분, 유기물 함량, pH, 온도를 측정하였다. 마사토를 많이 함유한 토양을 선정하여 토양 내 수분의 배수를 좋게 하였고 오염을 막기 위해 숯과 모래를 섞어 매몰하였다. 유기물의 과다로 인해 토양 미생물의 침입을 고려하여

유기물을 제거하였고 매몰한 후 1년이 경과한 다음 채집하여 결과 정리 하였다.

ㄴ) 골목을 이용한 접종

중국 산서성에서 채집한 균핵체를 접종원으로 사용하였다. 뽕나무버섯 균사속이 발달한 골목을 사용하여 그림과 같이 접종하였다. 균사속의 발달은 길이 30cm 직경 15cm 의 참나무 단목과 단풍나무 단목에 3달간 23℃에서 뽕나무버섯을 무균상태로 배양하여 균사속을 발달시킨다. 저령 균핵의 보관은 냉장실에 무균된 모래와 숯을 4:1로 혼합하여

Table 9-1. Properties of soil for burying method of inoculated wood log under soil

Location	Date	Moisture (%)	organic metter (%)	pH	Tem.(℃)
양수리1	99. 4. 14	18.20	23.86	4.27	23.9
양수리2	99. 7. 12	16.51	22.06	4.31	22.0
양수리3	99. 8. 11	19.48	23.64	4.33	23.6
양수리4	99. 7. 12	16.46	21.87	5.54	22.9
양수리5	99. 8. 11	17.38	22.63	4.40	23.4
남산1	99. 4 .15	12.00	17.97	4.29	22.5
남산2	99. 4. 15	8.11	11.63	4.18	23.5
남산3	99. 4. 29	9.40	14.76	3.98	23.3
남산4	99. 4 .29	9.40	14.76	3.98	23.3

균핵을 잠깐이 들어가지 않도록 잘 봉하여 보관해 둔다.

집종원용 골목을 써서 경사30° 정도의 비탈에 가로 900×세로 450mm면
적의 구덩이를 500mm 깊이로 판다. 구덩이의 가장 밑부분은 3~5cm정도
두께의 벌칸된 모래를 깔고 그 다음 숯과 섞은 모래를 펼친다. 그 위에
나무 골목을 넣고 숯을 섞은 모래를 틀을 잡고 균사속이 발달한 골목과
저령 균핵을 적당한 크기로 잘단하고 절단된 부위를 균사속에 붙여 집종
한 다음 그 위에 다시 영양원이 되는 골목을 넣고 모래를 덮고 난 후 가
장 윗부분은 현지의 토양을 덮었다. 집종시기는 그해 늦가을에서 겨울에
시행하였다.(Fig. 9-4)

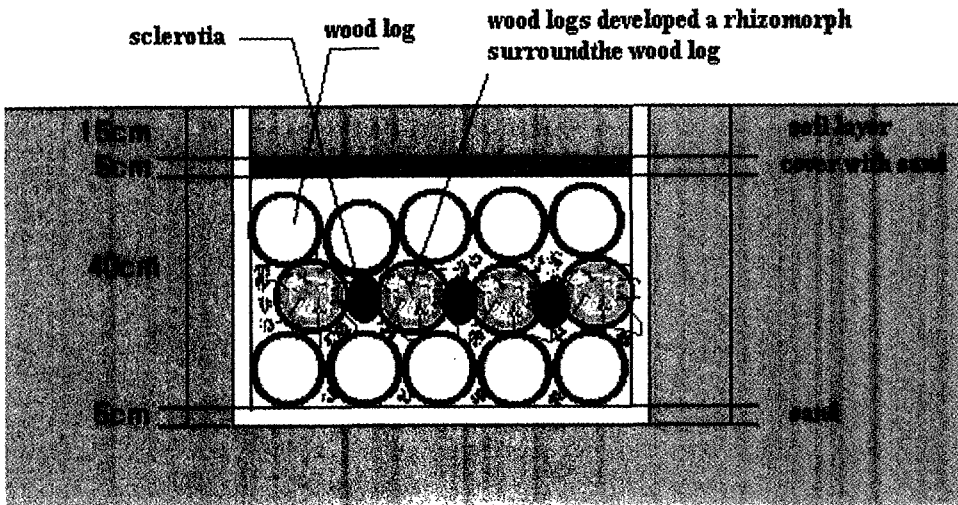


Fig. 9-4. Burying method of inoculated wood logs under soil layer

ㄷ) 나무뿌리에 직접접종

배물법을 응용하여 기생성 여부와 그 정도를 알고자 살아있는 참나무과

단풍나무의 뿌리에 뽕나무버섯의 균사속이 발달한 단목을 저령의 균핵과 함께 접종하였다. 나무뿌리 중 굵은 뿌리를 중심 축으로 하여 구덩이(가로 500 × 세로 400 × 깊이 300mm)를 파는 과정에서 살아있는 나무뿌리는 상하지 않도록 하였다. 구덩이의 가장 아래쪽은 숯을 섞은 모래를 30~50mm 정도로 깔고 그 위에 동일한 방법으로 영양원 단목(200×25mm)을 깔고 굵은 나무뿌리를 축으로 뽕나무 버섯의 균사속이 발달한 단목과 저령의 덩이를 접붙이듯 접종하였다(Fig. 9-15, 9-16). 접종된 부위의 위에 숯을 혼합한 모래를 덮고 그 위에 토양을 덮는다(Fig. 9-5). 실제 매물지의 모습은 Fig. 9-18에 나타내었다.

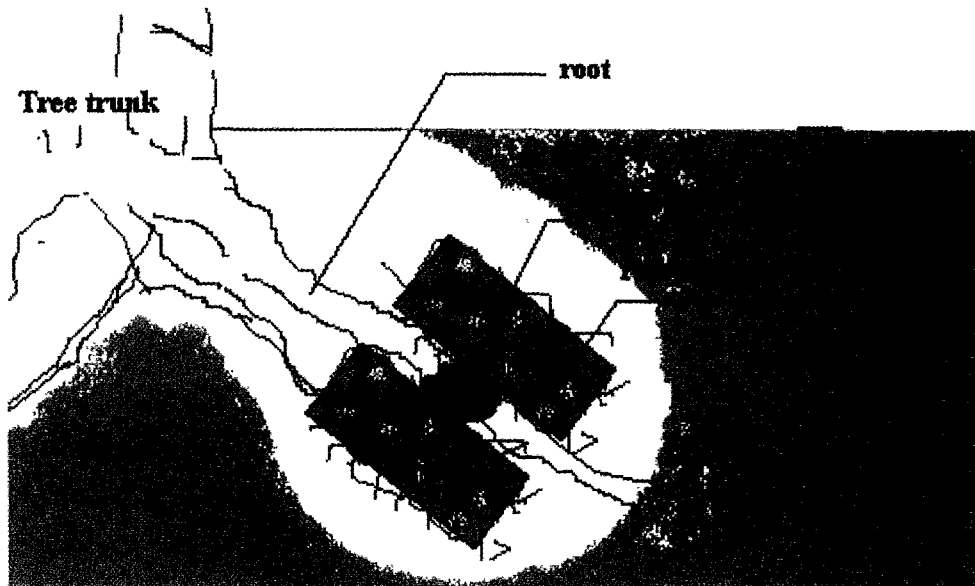


Fig. 9-5. View of inoculation of sclerotium of *G. umbellata* and *A. mellea*

3) 톱밥배양한 균을 접종원으로 사용하여 종핵의 인공적 생산 유도

저령 균핵에서 분리한 저령균을 이용하여 균핵을 유도하고 이를 접종원으로 하여 균핵을 다음과 같이 준비하여 실험하였다. 참나무톱밥, 미강, 호밀을 4:1:1의 비율로 섞고 수분함량을 65%로 하여 제조된 톱밥배지를 250ml 플라스크에 채운 다음 저령 균주를 접종하여 18℃~20℃에서 3개월간 배양한 다음 공기와 접촉하고 있는 면에 균핵화로 외피층이 만들어진 플라스크만을 선별하여 접종원으로 사용하였다(Fig. 9-8). 뽕나무버섯균이 발달한 단목을 접종원과 영양원으로 사용될 단목과 함께 땅속에 매몰하였다. 매몰의 형태는 골목을 이용한 매몰법과 동일한 방법으로 매립하였으나 접종원이 균사라는 점을 감안하여 참나무 톱밥을 첨가하였다(Fig. 9-21).

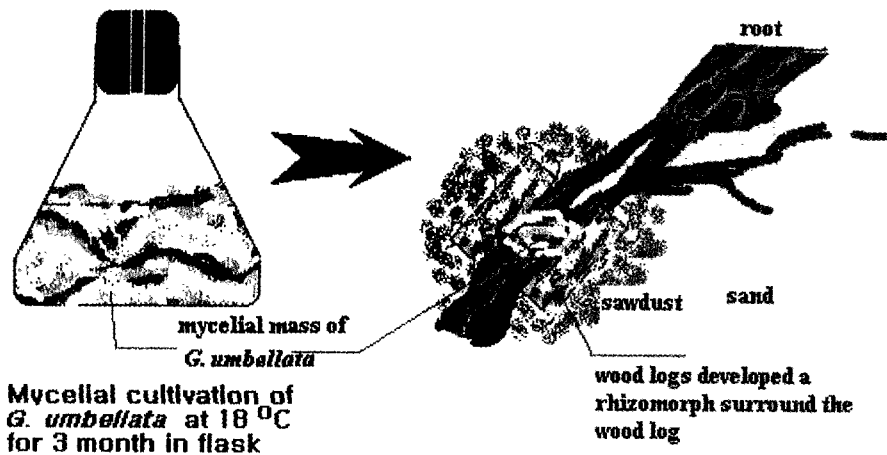


Fig. 9-6. View of inoculation method using inoculum grown on sawdust media.

2. 검은비늘버섯의 인공생산

가. 공시균

1996년부터 충북 보은군 법주사 주변에서 채집하여 동정하였다. 이들의 자실체를 이용하여 Water agar(WA; Agar 20g, Distilled water 1 ℓ) 및 GS agar(Ginterava & Janotkova, 1975)를 통하여 균사를 분리하였다. WA나 GS에서 자란 개개의 균사들은 현미경 관찰로 Clamp connection 이 관찰되는 것을 따로 분리하여, 균과 성숙하는 형태에 따라 담자낭균으로 인정되는 분리균(PA-1, PA-2, PA-3)을 채집하였다. 또한, 채집 분리된 분리균은 다음 실험을 위하여 일부를 사면 배지에 이식하여 배양 한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다(Table 9-1).

나. 톱밥배지를 이용한 자실체 형성유도

톱밥배지를 이용하여 검은비늘버섯의 자실체 형성 여부를 실험하기 위해 충북 농촌 진흥원 균이계에서 직접 입병한 참나무 톱밥배지(참나무; 미강 = 80: 20 v/v)와 미루나무 톱밥배지(미루나무; 미강=80:20 v/v)를 고압증기멸균(121℃, 1.5기압 하에서 60분간)한 후 본 실험실의 무균실에서 검은비늘버섯 3균주를 접종하여 암실에서 25℃, 90일 동안 균사를 배양하였다. 균사가 충분히 성장된 병배지는 균긋기를 하고 물을 충분히 적셔준 후 다시 얹어서 물기 제거작업을 하여 온도 12-14℃, 습도는 80~85%를 유지하도록 맞춘 냉장고에서 발이를 시켰다(Table 9-2).

Table 9-2. Development of the fruiting bodies of *P. adiposa* on sawdust bottles under the artificial cultivations^a.

Isolates	day of mycelial inoculation	The days of old mycelia removed	Mycelial growth (% /bottle) ^b	The day harvested
PA1	97.4.14.	97.7.10	90%	97.7.30 (Oak sawdust)
PA1	97.4.14.	97.7.10	95%	97.9.02 (Poplar sawdust)
PA3	97.4.14.	97.7.10	90%	97.8.18 (Oak sawdust)
PA3	97.4.14.	97.7.10	95%	97.10.06 (Poplar sawdust)

^aThe sawdust of oak (scientific name) or poplar (scientific name) mixed with the rice bran at the rate of 80:20 (v/v) and sterilized at 125 °C for 20 min. The basidiocarps were developed until the day harvested after the cold treatment on the day of the old mycelia removed

^bThe growth rate of mycelia on the sawdust bottles on the day of removal of mycelia when the white mycelia grown were measured under naked eyes.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 저령의 인공생산

가. 기내배양을 통한 종핵형성유도

1) 액체배양을 통한 종핵유도

배양 후 40일 정도가 지났을 때까지 저령의 균사는 단지 색깔이 변할 뿐 다른 변화를 관찰할 수가 없었다. 동시에 배양한 것의 경우 각자의

균사발달이 관찰되었지만 뽕나무버섯에 있어서 균사와 균사속의 발달이 저령보다 신속하여 저령의 균사생장이 저해를 받지만 뽕나무버섯의 균사와 저령의 균사가 유착하는 것을 관찰하였다. 각각의 균을 독자로 접종하여 배양한 다음 배양액을 뽕나무버섯의 배양액을 저령으로 이동시킨 후 배양한 결과, 저령의 균사생장발달은 큰 변화가 관찰되지 않았다. 또한 배양 후 뽕나무버섯을 직접 접종한 것도 처음의 것과 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 액체배양은 액체중균을 생산하기 위한 방법으로 이용하는 것이 더 좋을 것 같다.

2) 톱밥배지를 통한 종핵유도

저령의 균사는 18℃에서 배양하여 초기 균사를 발달시킨 다음 저령의 균핵 형성 유도를 위하여 20℃~23℃로 온도를 변화를 주었을 때 저령의 균핵은 발달하였다.

균핵의 형성을 균사로 시작할 경우, 온도에 의한 균사생육 유도는 필수적인 것 같다. 저령의 균사는 일단 20℃이하의 온도로 떨어뜨리지 않으면 균사자체가 늙어 노화가 먼저 일어나는 것으로 관찰되었다. 따라서 균사의 생육을 먼저 유도한 후 온도를 올려 균핵화를 유도한 결과, 저령의 공기와 접촉면에 회백색의 외피층이 형성되고 플라스크와 접하고 있는 곳은 부분적인 외피층을 관찰 할 수 있었다. 이 외피층은 부분적인 흑색의 표면이 형성되었으며, 균사의 양이 증가하여 균사덩이가 형성 된 것을 관찰하였다. 이러한 점을 응용하여 기내 배양을 통한 종핵 형성유도에 이용하였다.

3) Petri-접시에서 종핵유도

① 균사 접종법

균사속이 발달하여 저령의 균사에 겹치거나 침입한 형태가 나타나나 균사의 균핵화가 촉진되지는 않으나 균사와 균사속이 접한쪽은 상이한 균사간의 억제선이 나타나며 반대쪽은 균사가 확산되는 현상을 보인다. 그러나 그 억제선이 일반적인 다른 종간의 차이에서 오는 억제선과는 동일하나 균사속이 발달하여 저령의 균사속이나 겹하게 되는 부분은 균사속 주변의 균사와 결합되어있는 것을 볼 수 있다. 그것은 균핵에 균사속이 침입하거나 균핵 형성부위를 지날 때 저령의 균핵으로부터 새로운 균사가 자랄 때 촉진되는 역할을 하는 것으로 추정된다(Fig. 9-9)

② 균사체의 접종법

균사체는 외부 공기가 접촉부위에 노출되어 갈색의 변화가 일어나서 균핵과 유사한 형태를 만들고 뽕나무 버섯균의 균사속 또는 저령의 균사가 접촉하여 균사덩이가 형성되는 것이 관찰되었다. 또한 외벽을 형성한 곳에서 새로운 균사가 성장하여 나오는 것을 볼수 있었다. 그리고 이종간의 균사간 경계선이 나타났으나(Fig. 9-10) 뽕나무버섯의 균사속은 자신의 특정한 방향 없이 뻗어 나와 저령의 톱밥과 만난다. 이것이 특정한 유도물질에 의한 것인지는 확인하지 못하였다.

이 방법이 현재까지 기내 배양법으로는 가장 가능성이 좋은 것 같다.

자연 상태에서 생성되는 균핵처럼 검은 색을 띠지는 않지만 이 균사덩이는 부분적으로 검은색의 점무늬가 생기고 회령과 같은 회색빛의 균핵과 동일한 형태를 가지고 있었다(Fig. 9-5). 또한 균핵 유사체 조직의 표면으로부터 새로운 형태의 균사가 나오는 것이 아니라 백령과 같은 균사혹이 돌출 하는 것이 관찰되었다(Fig. 9-11).

이러한 현상은 종핵을 인위적으로 만드는 것이 가능 할 수 있다는 것을 암시하는 것으로 생각된다. 종핵 유사체를 생성하는데 소요된 시간은 3개월 미만이다.

저령의 인공생산에서 약재로서 사용하는 균핵을 재배하는데 균핵을 이용하여 재배할 경우 3-5년의 시간이 경과해야 상품에 이용할 수 있는 균핵의 크기로 만들 수 있다. 따라서 종핵을 인공적으로 생산 할 수 있다면 일반 다른 버섯과 같이 접종시기와 오염원을 차단한다면 언제든지 균핵을 대량 재배 할 수 있다는 것을 보여준다..

4)배양병을 이용한 균핵형성

PDA 배지를 외부배지로 이용하여 1개월간 배양한 결과, 저령의 균사를 이용한 것은 저령의 균사도 성장하였으나 뽕나무 버섯의 왕성한 균사생장으로 인해 저령의 균사가 완전히 피복 되었다. 또한 단목에도 뽕나무 버섯의 균사의 발달이 양호하였다. 균사속 생산이 매우 빠르고 많았다. 균사덩이를 이용한 경우 저령의 균사덩이가 균핵과 같이 성장하는 것을 보였으며(Fig. 9-13) 균사덩이 내부로부터 암갈색의 물질이 내벽에서 외벽 쪽으로 분비되어 나오는 것을 육안으로 확인하였다(Fig.

9-15). 저령의 생장은 뽕나무버섯의 균사속 발달 선단 부분에 저령의 균사덩이가 묻히는 것을 볼 수 있다. 저령의 균핵형성의 형태는 자연상태의 것과는 조금 다른 형태였다. 외부배지를 무엇으로 했느냐는 큰 차이가 없었으며 단 모래를 이용한 경우 균사보다는 균사속 형성유도에 는 더욱 효과적인 것 같았다

다. 야외접종에 의한 균핵생산

1) 균핵을 이용한 균핵생산

저령균사의 구멍접종법에 의한 균핵형성유도

저령 및 뽕나무버섯의 균사접종 처리 1년 후에 처리원목 매몰지의 토양을 파헤쳐 원목에 발달한 균 발육 상황을 관찰한 결과, 토양생물에 의해 저령 접종구가 오염 부패되었다. 매몰지역이 평지이고 토양은 황토를 함유하는 토양환경이므로 뽕나무버섯의 균사속은 외부로 잘 발달한 상태이나 부분적으로만 관찰되었다. 토양내부에 수분의 양이 많고 또한 많은 부생균들과 토양곤충들이 존재하였다. 이 결과 균사를 이용한 골목내 구멍접종법은 균핵 형성을 위한 저령의 접종법으로는 적합하지 못한 것 같았다.

2) 매몰법에 의한 균핵형성

1) 골목을 이용한 접종

접종 1년후에 접종·매몰지를 파헤쳐 새로운 균핵이 형성되었는지를 관찰하고 접종부위별 마다 새로운 균핵이 형성되었는지와 균핵의 크기

를 측정하였다(Fig. 9-16).이 경과한 다음 겨울철에 균핵의 발달을 측정하였다. 처음 접종원으로 사용한 균핵의 크기는 약 $38\text{cm}^2(50 \times 27\text{mm})$ 이고 중량은 약 8g이었다. 접종한 종핵은 발달한 종핵과 생장이 정지된 상태의 종핵, 일부가 썩은 종핵, 피사한 종핵으로 관찰되었다. 총 접종원 12개중에서 생장이 나타난 균핵이 3개, 정지된 채로 살아있는 균핵이 4개, 일부가 썩은 균핵이 2개, 피사한 균핵이 3개로 각각 조사되었다. 1년 후 새로 생성된 균핵의 크기는 $32.7\text{cm}^2(37.4 \times 28.2)$ 로 중량은 약 7g 정도가 새로 생성되었으며 표면에 나타난 균핵의 색상은 색은 진한 흑색(Magenta100+blackK50)이고 접종부위는 밤색(Cyan90+Magenta90+Yellow70+blackK50)과 짙은 갈색(C90+M100+Y100+K50)으로서 새로 성장한 부위의 색이 달라 쉽게 확인할 수 있었다. 균핵의 성장형태는 생장이 자라는 모양, 즉 무정 방사형의 형태로 성장하고 있었으며 골목과 골목사이의 공간을 향해 새로운 균핵을 형성중에 있었다. 비록 성장속도는 느리지만 균핵의 부피생장이 두드러지는 특징을 갖고 있었다. 새로 성장한 부위 중 작은 것은 접종원과 비교하여 67%가 성장하였고 큰 것은 접종원 보다 130%정도 자랐다. 백령의 형태는 관찰되지 않았다(Fig. 9-19).

참나무가 뽕나무버섯균 재배에 가장 적절한 수종으로 알고있는데, 천마 재배시 굴참나무에 발달한 뽕나무버섯균을 사용하지만 저령의 경우 참나무보다는 단풍나무의 단목에 접종된 균핵이 가장 좋은 성장형태를 가지고 있었다.

또한 참나무보다 단풍나무의 균사속을 비교해 보면 단풍나무가 참나무

보다 외부로 형성되어 나오는 군사속이 가늘고 풍부하였다. 이는 단풍나무가 참나무보다 수피층이 얇기 때문에 여겨지는데, 단풍나무에서만 저령의 균핵형성을 왕성하게 하는 것으로 보인다.

ㄴ) 나무뿌리에 직접접종

살아있는 참나무 뿌리에 뽕나무 버섯의 군사속이 발달한 단목을 저령의 균핵과 동시에 접종하고 1년이 지난 뒤 토양내 저령의 발달과 살아있는 나무에 미치는 효과 및 뽕나무 버섯과의 관계를 관찰하였다. 그 결과 균핵은 백령과 회령의 형태가 모두 나타났으며 부피 성장보다는 길이 성장이 매우 발달하였다. 골목에 접종한 경우 비록 성장속도는 느리지만 천마와 같이 부피가 큰 것을 확인할 수 있었으며 뿌리의 경우 지면으로부터 50mm아래의 지점까지 균핵의 성장이 확인되었다.

회수된 저령은 성장이 정지된 저령과 새로 형성된 저령, 괴사한 저령의 형태로 채집되었다. 총 접종원 6 개에서 성장한 저령 3 개, 성장을 멈춘 저령 2 개, 괴사한 저령 1 개로 채집되었다. 매몰법으로 재배한 저령과 비교해 볼 때 백령의 형태가 나타나는 점이 매우 다른 점으로 들 수 있으며, 또 다른 하나는 분지의 형태가 많이 형성되고 넓게 퍼진다는 점이다. 참나무의 경우 저령의 군사속이 침투하여 군사속이 살아있는 뿌리의 수피층에 침투한 것이 관찰되었다. 그러나 접종한 뿌리의 경우 접종한 뿌리 이외 다른 줄기의 뿌리로부터 많은 잔뿌리를 형성하고 있으며 살아있었다. 그러나 생장이 계속된다면 병원균으로 알려진 뽕나무버섯이 나무에 미치는 영향을 지금 알 수는 없었다(Fig.

9-18).

매몰법을 통하여 배양하는 저령 보다는 효율적인 면에서 매우 높은 결과를 보이지만, 매립지의 경사나 다른 종합적인 부분에서 조금씩의 차이가 있기 때문에 살아있는 나무에 접종을 하는 편이 더 나을지는 아직 시기 상조이다. 백령이 형성된 위치는 성장 축인 나무로부터 가장 아래쪽과 선단의 끝에 위치하고 균핵 형태는 한 줄기보다는 다 줄기 형태로 성장하였으며 주위에 있는 상당량의 모래의 입자들이 균핵 형성 시 성장공간을 차지하는 토양입자들간의 점성이 작음으로 인하여 균핵의 표면에 함입 되는 현상을 보였다. 균핵의 색깔은 검은색(M20+K100)과 갈색(C60+M100+Y100+K30), 붉은 갈색(M100+Y100+K50)과 회색(C0+M5+Y5+K50), 흰색(Y5)의 형태가 모두 관찰되었으며, 성장량은 종핵에 비해 15.1배, 7.1배 정도였다. 밤나무나 단풍나무나 수종에 따른 생장은 큰 차이를 보이지는 않았지만 깊이에 따른 생장의 차이는 나타났다. 균핵 형성의 깊이에 따른 차이는 상단에서 20cm 이하는 부피성장보다는 길이 성장으로 인해 많은 양의 균핵이 형성된 반면 20cm 이상의 경우 부피 성장에 의해 작은 양의 균핵이 형성되었다. 또한 겉가지의 분지는 앞의 것이 많이 나타난다.

3) 톱밥배양한 균을 접종원으로 사용하여 종핵의 인공적생산 유도
저령을 톱밥에서 배양한 뒤 살아있는 나무뿌리에 균사속이 발달한 뽕나무버섯과 같이 땅속에 매몰하여 매몰한지 1년이 경과하고 확인한 결과, 저령 톱밥배양균의 접종원은 균핵을 형성하지 않고 거의 접종원

이 죽은 형태로 관찰되었다. 이것은 저령이 토양 속에서 균사 상태로 있다는 점과 톱밥이 다량 존재한다는 것을 감안할 경우 톱밥의 수분 함유량의 증가나 다른 잡균의 침입에 의한 것으로 사료된다. 뽕나무버섯의 경우도 균사속이 외부로 많이 발달하지 못하고 거의 정지상태였다. 따라서 매물법에서 영양원을 보충하기 위해 톱밥을 넣어주는 것은 적합하지 않은 것으로 생각된다.

2. 검은비늘버섯의 인공생산

가. 공시균

1996년도 가을 빽주사 주변에서 같은 버섯을 채집하였고, 동정한 결과 *Pholiota adiposa*로 동정되었다. : 갓은 지름이 3~8cm로 처음에서는 반구형이나 차차 평반구형 또는 편평형이 된다. 갓 표면은 습하면 점성이 있고 황갈색이며, 갓 둘레는 담황색이고 갓 전면에 탈락성인 삼각형의 백색 인피가 있으나 나중에는 갈색이 된다. 주름살은 완전불은형이며 약간 뾰뾰하고 처음에는 황백색이나 차차 갈색으로 변한다. 대는 4~15×0.5 ~ 1.2cm로 위아래 굵기가 같고, 표면은 황갈색의 인피로 덮여 있고 조기탈락성의 담황색 턱받이가 있다. 포자는 6.5~8.5×3.5~4 μ m 로 타원형이며, 표면은 평활하고 발아공이 있으며, 포자문은 적갈색이다(박, 1991). 그와 반면 동일한 지역에서 익년 *Pholiota adiposa* (P9)와 *Pholiota terrestris*(P10)가 재채집되었다. 채집된 자실체는 GA나 WA을 이용하여, 표면을 멸균한 후에 균사체를 분리하였다. 이들의 균사체 분리는 각각 다른 곳에서 채집된 자

실체에서 분리된 것으로 P1, P4, P6은 1996년도에 분리하였으며, P9와 P10은 1997년도에 분리하였다(Table 9-3).

나. 톱밥배지를 이용한 자실체 형성유도

분리된 *Pholiota adiposa*(이하 PA라 함) 3균주(P1, P4, P6)를 PDA배지에 이식하여 생장시키고, 이를 접종균으로 하여 참나무와 미루나무 톱밥배지에 각각 접종하여 암실에서 25℃, 90일 가량을 균사 생장시킨 후, 본교 미생물실의 임시 발이실(12~14℃, 습도 80%)에서 자실체를 형성시켰다(Table 9-3). 자실체 P1과 P6 두 균주에서만 형성되었고, 참나무와 미루나무 톱밥 배지에서 많은 양의 자실체가 형성되었으나 참나무배지가 수확시기와 수확량이 더 많았다. 자실체 형성시기가 참나무배지보다는 늦지만 미루나무배지도 원기가 형성되기 시작하면서 자실체 형성량은 많았다. 이로써 검은비늘버섯의 인공재배에는 참나무가 용이함을 알 수 있었고, 최적의 자실체 형성 조건을 찾아 재배한다면 배지의 다양화와 수량의 대량화를 위해 미루나무뿐만 아니라 다른 톱밥배지들에서도 참나무배지와 비슷한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사려된다. P4 균주는 톱밥배지에서는 자실체를 형성시키지 못하였고 단지 밀봉된 PDA배지 상에서 1개의 자실체가 자연적으로 형성되었다.

Table 9-3. Sources of the fungal mycelia or the fruiting bodies collected for this works.

Marks	Expression	Descriptions of the fungal mycelia or basidiocarps collected
P1	PA-1	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>Pholiota adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P2		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-1) cultivated on Oak sawdust on July, 1997 ^b
P3		Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (PA-1) cultivated on Poplar sawdust on Sep., 1997 ^b
P4	PA-2	Mycelia isolated from the basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun,, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P5		Basidiocarps isolated from <i>P. adiposa</i> (PA-2) cultivated on DA petri dish on Feb.,1998 ^b
P6	PA-3	The Mycelium isolated from basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bo-Eun Gun, Chung-Puk on Sep. 1996 ^a
P7		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-3) cultivation on Oak sawdust on Sep.,1997 ^b
P8		Basidiocarps harvested from <i>P. adiposa</i> (PA-3) cultivation on Poplar sawdust on Sep.,1997 ^b
P9	PA-4	Basidiocarps of <i>P. adiposa</i> collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk on Sep.,1997 ^b
P10	PT	Basidiocarps of <i>P. terrestris</i> collected from Bub-Ju Temple, Chung-Puk on Sep.,1997 ^b
P11	TM-3	Basidiocarps of <i>Tricoloma masutake</i> collected from Yang-Yang,Gang Won Do on Nov.,1997 ^c
P12	TM-7	Basidiocarps of <i>T. masutake</i> obtained from Yang-Yang, Gang Won Do on Nov.,1997 ^c
P13	LE	Basidiocarps of <i>Lentinus edodes</i> purchased in Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P14	AB	Basidiocarps of <i>Agaricus bisporus</i> purchased in Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P15	PO	Basidiocarps of <i>Pleurotus ostreatus</i> purchased from Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P16	FV	Basidiocarps of <i>Flammulina velutipes</i> purchased from Dae-Jeon on Apr.,1998 ^c
P17	PB	Basidiocarps isolated from <i>Polyporus brumalis</i> cultivated on Oak sawdust on Sep.,1996 ^b
P18	HE	Basidiocarps of <i>Hericiium erinaceum</i> collected from Yang-Yang, Gang Won Do on Nov., 1997 ^c
P19	RB	Mycelium isolated from basidiocarps of <i>Ramaria botrytis</i> obtained from Yang-Yang,ang Won Do on Nov.,1997 ^b
P20	SC	Basidiocarps isolated from <i>Schizophyllum commune</i> cultivated on Oak sawdust on Sep.,1997 (collected from Mt. Cho-Ryeong,hung-Puk on Sep.,1996 ^c

^aThe mycelia isolated from the basidiocarps stored in the laboratory of mushrooms in RDC of Bung-Puk.

^bThe mycelia isolated from the basidiocarps obtained directly and stored in our laboratory.



Fig. 9-7. View of contact mycelial mass of *G. umbellata* with rhizomorph of *A. mellea* in tube.

G; Mycelia of *G. umbellata* R; rhizomorph

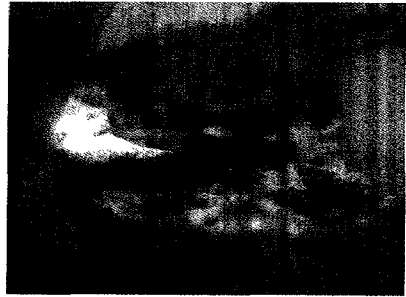


Fig. 9-8. Pseudo-sclerotium of *G. umbellata* in sawdust media

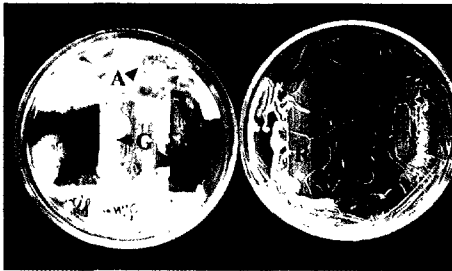


Fig. 9-9. Stimulation of mycelial growth of *G. umbellata* by rhizomorph of *A. mellea*
A; *A. mellea*, G; *G. umbellata*

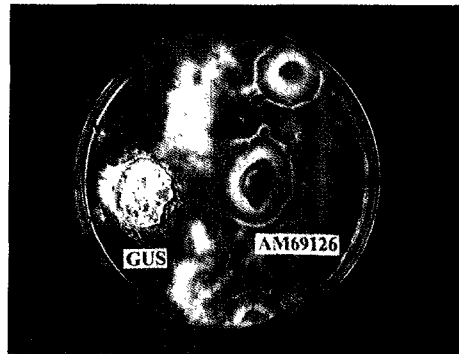


Fig. 9-10. Formation of pseudo-sclerotium of *G. umbellata* with *A. mellea* in dual culture



Fig. 9-11. Formation of new epidermal structure for protection of internal mycelial mass of *G. umbellata*

G; *G. umbellata*, AM; *A. mellea*



Fig. 9-12. View of inoculated sclerotia for Burying Method

GS; Sclerotium, R; Rhizomorph

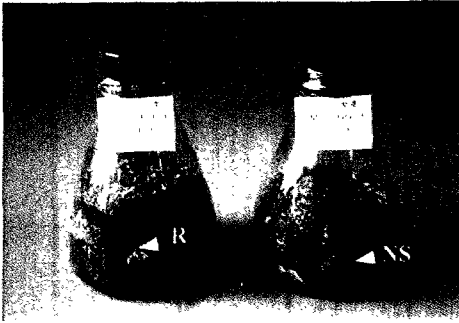


Fig. 9-13. Formation of new mycelial mass of *G. umbellata* by rhizomorph of *A. mellea* R; rhizomorph of *A. mellea*, NS; Newly formed sclerotia like structure of *G. umbellata*

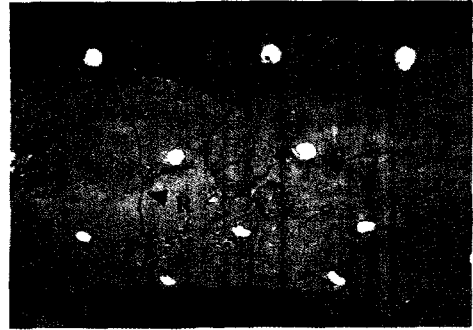


Fig. 9-14. Inoculation method in the hole on the log developed with rhizomorph of *A. mellea* G; *G. umbellata*, R; rhizomorph

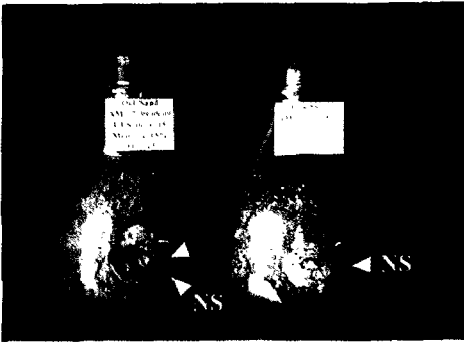


Fig. 9-15 View of mycelial mass of *G. umbellata* after 1 month



Fig. 9-16 New sclerotium of *G. umbellata* produced by burying method IS; Inoculum sclerotium, R; Rhizomorph, NS; New sclerotium



Fig. 9-17. Burying method area for production of sclerotia of *G. umbellata*

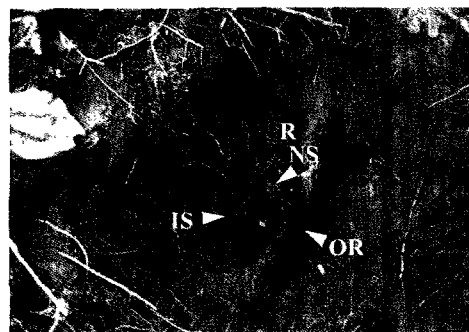


Fig. 9-18. Old and newly formed sclerotium at oak root IS; Inoculated sclerotium, NS; Newly formed sclerotium, R; rhizomorph OR; oak root

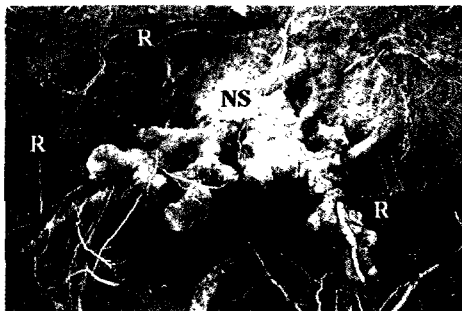


Fig. 9-19. Growing new sclerotium of *G. umbellata* forward with root
R; rhizomorph, NS; New sclerotium



Fig. 9-20. View of white Sclerotium
IS; Inoculum sclerotium, NS; New sclerotium, R; Rhizomorph
Arrow showed to white sclerotium of *G. umbellata*



Fig. 9-21. View of inoculated to mycelial mass of *G. umbellata* at lived root of oak
IG; Inoculated mycelial mass of *G. umbellata*,
R; Rhizomorph, AM; log was inoculated to *A. mellea*

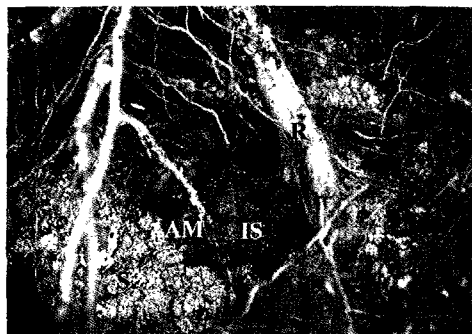


Fig. 9-22. View of inoculated to sclerotia of *G. umbellata* at lived root of oak
IS; Inoculated sclerotium of *G. umbellata*,
R; Rhizomorph,
AM; log was inoculated to *A. mellea*

참고문헌

- Cha, D.Y. 1981. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushrooms(II). *Kor. J. Mycol.* 9: 123-128.
- Chung, K.S. 1982. Studies on Constituents and Culture of the Higher Fungi of Korea(II). *Kor. J. Mycol.* 10(1): 33-39.
- Ginterava, A. and Janotkova, O. 1975. A Simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi, *Folia Microbiol.* 20: 519-520.
- Huang, S. L., Yasuo, I., Keisuke, K., Hiroshi, O. and Motoichiro, K. 1996. Hyphal anastomosis and complementary growth of fused cells in *Alternaria alternata*. *Mycoscience* 37: 1-13.
- Ikuo, A. 1979: Cytological studies on *Pholiota*. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 17:1-18.
- Ikuo, A. Atsuko, T. and Yukiko, S. 1980: The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 18:107-113.
- Ikuo, A. and Kimito, M. 1968: The mating system in some Hymenomycetes II. The mating system in *Favolus arcularius* (BATSCH ex FR.) AMES, *F. mikawai* (LLOYD) IMAZ., *Pholiota adiposa* (FR.) QUEL. and *Pleurotus cornucopiae* (PAUL. EX PERS.) ROLL. *Rept. Tottari Mycol. Inst. (Japan)* 7:51-58.
- Kim, H. K., Park, Y. H., Cha, D. Y. and Chug, H. C. 1987. Studies on the Artificial cultivation of *Lentinus edodes* on sawdust media. *Kor. J.*

Mycol. 15(1): 42-47.

Lee, G. O. 1979. Wild Mushroom as Food Source. *Kor. J. Mycol.* 7: 125-134.

Park, Y. H., Kim, Y. S. and Cha, D. Y. 1978. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.

Peberdy, J. F., Aidah, M. H. and J. Jia. 1993: New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. pp 55-62. Edited by S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. The Chinese University Press.

Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. Sven Koeltz Scientific Books. D-6240 Koenigstein / Federal Republic of Germany. Pp573-584.

Triratana, S. and Chaiprasert, A. 1991. Sexuality of *Ganoderma lucidum*. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (ed.) Balkema, Rotterdam. ISBN 90. Pp.57-63.

Wong, G. J. 1993. Mating and fruiting studies of *Auricularia delicata* and *A.fuscosuccinea* *Mycologia* 85: 187-194.

Yu, K. W., Seong, C. K., Lee, S. S. and Yoo, J. Y. 1996. Studies on the fungal isolates of Mucorales collected from Korean home made mejus and nuluks. *Kor. J. Mycology* 24: 280-292.

김양섭. 1979. 식용버섯 자원 개발. 야생식용버섯 분포조사. 농기원연구보고서. see Pp 337-353.

박완희 1991. 원색도감 한국의 버섯. (주)교학사.

박용환. 1997. 최신 버섯학. 한국버섯원균영농조합. Pp. 21-24.

이용래. 1973. 버섯 재배. 華學社.

이지열. 1988. 원색 한국 버섯 도감. 아카데미서적.

이창수, 상병찬. 1995. RAPD분석법에 의한 소 품종 판별용 표지인자의 검출

최적화 연구. 한국식품학회지. 15: 35-39.

차동렬, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배 기술. 상록사. Pp 417-426.