천마버섯(*Armillaria gallica*) 자실체 조직배양체의 특성

유영복^{1*} · 오진아² · 오연이¹ · 문지원¹ · 신평균¹ · 장갑열¹ · 공원식¹

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 화학물질안전과

Characterization of cultures isolated from fruiting body tissue in *Armillaria gallica*

Young-Bok Yoo^{1*}, Jin A Oh², Youn-Lee Oh¹, Jiwon Moon¹, Pyung-Gyun Shin¹,
Kab-Yeul Jang¹ and Won-Sik Kong¹

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA Chungbuk Eumseong 369-873, Korea

²Chemical Safety Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Suwon, Korea

(Received May 28, 2013. Accepted June 17, 2013)

ABSTRACT –The fruiting body of honey mushroom, *Armillaria gallica*, was collected from *Gastrodia elata* cultivated fields. Pure cultures were isolated from fruiting body tissue of the mushrooms, and cultured on MCM (mushroom complete medium) or PDA (potato dextrose agar) medium. Then, 12 different types of mycelial growth characteristics such as growth rate, colony morphology and rhizomorph formation were obtained. The vitality of the mycelial growth and rhizomorph formation of the fruiting body culture isolates were better on MCM than PDA, suggesting that the optimal culture medium for *A. gallica* mycelia was MCM. To observe the feature of colony morphology, the subculture of isolates were incubated on MCM. Consequently, we could find the segregated or differentiated colony morphology from isolate type 11 that was similar morphology to isolate type 12. For phylogenetic analysis of the 12 isolates, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) were performed. The isolate type 12 was not only shown different band patterns of RAPD variation in other 11 isolates, but also commercial strain known as Chunmagyun No. 1. Among the tissue culture isolates of fruiting, strains with better mycelial growth characteristics than Chunmagyun No. 1 were selected. We expect that the new strain can be substituted to commercial strain Chunmagyun No. 1.

KEYWORDS –*Armillaria gallica*, Commercial strain Chunmagyun No. 1. Fruiting body culture isolates, Honey mushroom, RAPD, Rhizomorph formation

서 론

우리나라에서 팽나무버섯 속(*Armillaria*)에 관한 연구는 Sung 등(1989; 1994)에 의하여 많은 연구가 이루어졌다. 성 등(1997)은 1985년부터 1993년까지 강원도 일대에서 야생균주를 채집하여 20균주를 확보하였다. 자실체는 주로 6-10월까지 발생하였고 이들 균주의 DNA다형성 분석 결과 5종으로 구분하였는데 *A. mellea*, *A. ostoyae*, *A. tabescens*, *A. gallica*, 다른 한 종은 미기록 종이라고 하였다.

우리나라에서 천마는 약용 및 식용으로 오래 전부터 이용되어 왔다. 현재 재배농가 수도 100여 농가가 넘는다고 추정된다. 하지만 공생하는 천마버섯 품종은 2개가 보급되었으나 1품종만이 실제로 농가에서 재배에 이용되고 있다. 실제 이용되는 천마균1

호는 미국에서 도입된 것으로 1994년에 선발 보급되어 농가에서 재배에 이용된지 거의 20년이 되었다. 장기간 보존 사용된 이유로 새로운 품종 개발이 무엇보다 필요하다. *Armillaria* 속에서 *A. mellea*종은 자실체가 원목에서 형성되나(김 등, 1992), 천마버섯종(*A. gallica*)은 자실체가 원목에서는 형성이 거의 되지 않고 토양에서 발생되기 때문에 버섯 인공재배가 어렵다(성 등, 1995; 유 등, 2013). 오 등(2012)은 rDNA 분석으로 천마균1호가 *A. gallica*종으로 확인하였다.

장기간 품종을 사용하면 균사생장이 점차 불량해질 수도 있다. 또한 천마재배에 이용되는 천마버섯균은 우리가 인공재배하는 다른 버섯 종류에 비해 균사생장이 느린 편이며, 이로 인해 종균제조에 애로사항이 있다. 따라서 우리나라 자연상태에서 발생한 버섯

*Corresponding author: ybyoo@korea.kr

자실체를 채취하여 조직배양 하였다. 자실체 조직배양은 육종 방법 중의 하나로 이용되고 있다.

우리나라에서도 자생하는 천마버섯이 알려져 있지만 조직 배양되어 보존되는 균주는 극히 적으며, 이들의 품종화 노력은 거의 없다. 따라서 한국에서 자실체가 발생한 것을 채취하여 조직배양으로 빠르고 양호한 균사생장과 천마와의 공생을 통한 천마재배에의 활용성을 밝힌다면 훌륭한 품종을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

버섯 자실체 확보

농가에 보급된 천마균1호의 자실체로 생각되는 버섯을 채취하였다. 자실체 채취지역은 남양주와 상주이다. 남양주는 5년 전에 천마를 재배하고 현재는 천마를 재배하지 않는 지역이며 상주는 현재도 천마를 재배하는 지역으로 2012년 10월 17-18일경 채취하여 조직 배양하는데 사용하였다. 자실체는 대부분 성숙된 것이며 일부 어린 자실체도 사용하였다(유 등, 2013).

배지

감자배지와 버섯완전배지를 사용하였다. 감자배지(PDA)는 상품화된 PD Broth(Himedia)를 사용하였는데 구성 성분은 감자 200 g, Dextrose 20 g, Agar 20 g, 증류수 1000 ml이다. 버섯완전배지(MCM mushroom complete medium; Raper *et al.*, 1972)로 그 구성 성분은 Dextrose 20 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.46 g, K_2HPO_4 1.0 g, Yeast extract 2 g, Peptone 2 g, Agar 20 g, 증류수 1,000 ml이다. 균주의 배양은 버섯완전배지에 접종하여 25°C에서 하였다.

자실체 채취 및 조직배양

발생한 천마버섯 자실체를 채취하여 별도의 상자에 담아 상온에서 그늘에 두었다가 사용하였다. 자실체를 손으로 반으로 찢어 외부와 접촉이 없었던 내부의 조직을 살균한 이쑤시게로 절단하여 배지에 옮겼다. 조직은 갓 부위부터 대의 기부까지 골고루 사용하였으며 1사레에 4~7개 조직을 옮겨 20~25°C에서 배양하였다.

툽밥배지를 이용한 균사생장 시험

길이가 20.3 cm, 직경이 3.0 cm 되는 유리 시험관에 참나무, 미루나무 툽밥(1:1)과 미강 20%를 혼합

하여 수분 70%로 조정하여 121°C에서 20분 멸균 후 식혀서 조직배양체 27균주와 대조구 천마균1호를 접종하여 23°C에서 배양하여 2회 직경을 조사하였다.

RAPD에 의한 DNA 양상분석

자실체 조직배양체로부터 DNA를 분리하여 Bioneer PCR Premix kit를 이용하여 genomic DNA 50 ng 2 µl, URP primer 100 ng 1 µl, DDW 7 µl를 첨가하였다. PCR 증폭반응은 ABI PCR SYSTEM 9700을 이용하여 처음 DNA의 열변성을 위하여 94°C에서 5분간 1cycle, 그리고 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분간으로 총 35 cycle 실시하였으며, 최종 DNA의 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 1× TAE (40 mM Tris; 8.0, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA)완충용액에서 1.5%의 agarose gel로 전기영동한 후 1 µg/ml ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV transilluminator상에서 나타나는 DNA band를 확인하였다.

결과 및 고찰

자실체 조직배양체의 특성

자실체 조직배양체(fruiting tissue culture isolate)는 조직 부위와는 상관없이 모두 배지에서 양호하게 잘 성장하였다. 자실체 조직은 날이 갈수록 균사로 분화되었으며 1-2주가 지나면서 균사체로 완전히 성장하였다. 시간이 지날수록 몇 가지 형태로 구분되어 나타났다. 갈색 색소를 분비하는 것과 분비하지 않는 것, 균사속이 나와 배지 속으로 자라는 것과 균사속이 없는 것으로 구분되었다. 또한 균사생장이 빠른 것과 느린 것으로 구분되었다. 이러한 현상은 배지와도 다소 관련이 있었다. 감자배지에서는 버섯완전배지에 비하여 조직배양체 균총이 갈색 색소를 많이 분비하였고 균사속의 생육도 느린 편이었다. 감자배지나 버섯완전배지에서 동일한 조건에서도 조직배양체는 균사생장이 느리거나 균사속의 생육이 차이가 나타났다. 따라서 자실체 배양체 1,000여개 이상 중에서 버섯완전배지에서 생육한 조직배양체 279개의 균총형태와 생육 정도에 따라 12가지 형태로 나눌 수 있었다(Fig. 1).

버섯완전배지에서 생육한 조직배양체를 다시 배지에 계대 배양하여 생육한 결과 처음 것과는 다소 다르게 느리고 균사속의 형성이 적게 생육하였다. 윗줄 왼쪽부터 번호를 주어 12종류 중에서 3, 4번 형태가

Fig. 1. Mycelial colonies derived from fruiting tissue culture isolates of *Armillaria gallica* on PD and MCM(upper). Mycelial colonies of 1st subculture isolates on MCM(lower).

Fig. 2. Mycelial colonies of 2nd subculture isolates on MCM(upper) and PD(lower).

다소 빠르고 균사속 형성이 양호한 편이었다. 또한 이들을 감자배지에 계대 배양하여 관찰한 결과 버섯 완전배지에 비하여 생육이 느리고 갈색 물질이 많아 지고 균사속 발달이 많이 줄어들었다. 또한 계대배양에서는 균사속의 발달이 다소 감소되는 경향을 나타 내었다(Fig. 2). 이들 중 12번째 균주는 균총 형태가 특이하였다. 이 곰팡이는 오염된 것으로 간주할 수 있으나 여태껏 이러한 형태의 곰팡이를 본 적이 없다.

Table 1. Mycelial colony growth derived from tissue culture isolates of fruiting body in *Armillaria gallica* on sawdust media

Isolate type	No. Isolate	20 day(cm)	29 day(cm)
Control	ASI 10021 (Chanmagyun No.1)	4.9±1.6	8.2±1.0
Fruiting tissue culture type 1	TC1-01	7.1±0.8	10.3±1.4
	TC1-02	9.5±0.5	12.6±1.8
	TC1-03	5.9±1.0	8.1±0.6
	TC1-04	7.2±2.9	9.3±1.8
	TC1-05	8.1±1.0	11.2±4.2
	TC1-06	8.8±0.3	11.6±1.3
	TC1-07	9.3±0.6	13.1±0.3
	TC1-08	8.1±2.6	11.1±0.2
	TC1-09	7.8±3.0	10.4±2.6
	TC1-10	8.3±1.1	11.2±4.5
	TC1-11	7.4±2.5	10.3±1.1
	TC1-12	9.8±0.3	13.5±3.0
	TC1-13	8.9±2.3	11.8±0.5
	TC1-14	7.9±1.5	11.9±3.0
Fruiting tissue culture type 2	TC2-15	8.4±1.3	11.8±0.8
	TC2-16	8.1±1.1	11.5±1.0
	TC2-17	9.4±0.7	12.6±2.3
	TC2-18	8.2±2.1	11.3±1.0
	TC2-19	9.9±1.1	13.2±2.3
	TC2-20	9.1±0.6	12.5±0.3
	TC2-21	8.7±1.1	11.2±1.3
	TC2-22	9.1±1.2	12.8±2.0
	TC2-23	8.0±2.1	10.5±1.3
	TC2-24	7.4±0.9	10.7±2.8
	TC2-26	9.1±1.6	11.9±1.8
	TC2-27	7.3±2.4	10.0±1.2

또한 자실체 배양체 279개 중에서 이러한 형태가 3 균주나 나왔다. 따라서 조직배양체일 가능성이 높다고 생각된다. 만약 조직배양체라면 염색체 수가 다른 이배체나 배수성이 높은 균주일 가능성이 높다. 이러한 가능성을 더욱 뒷받침하는 것은 특히 2차 계대배양의 버섯완전배지에서 11번 균주도 균총 분리가 되면서 다시 분화되어 성장하였는데 한쪽 균총이 12번 균주와 유사한 양상을 나타내었다.

조직배양체의 균사생장을 톱밥배지에서 측정한 결과 29일 배양 시 가장 빠른 것이 13.5±3.0 cm로 대조구 천마균1호가 8.2±1.0 cm에 비하여 150% 이상 생육이 양호한 편이었다. 시험한 27균주 대부분 대조구에 비하여 생육이 양호하였으며 배양체간 커다란 차이는 나타나지 않았다(Table 1).

DNA 다형성 분석에서 조직배양체의 균총 형태가 다소 다르고 생장속도가 달라도 패턴은 동일하게 나타났다으며, 단지 12번 균주의 패턴 양상은 다르게 나타났다. URP primer 1-12번까지 패턴을 분석한 결과 우리가 보존하고 있는 천마균1호, 종균배양소에서 사용되고 있는 종균을 비교하여도 조직배양체와 동일한 DNA 패턴을 나타내었다. 이에 비해 다른 종에서는 다른 양상을 나타내었다(Fig. 3).

동일한 자실체에서 분리된 균주라 하더라도 이배체 등 배수성이 다르면 DNA패턴은 다르게 나타날 수 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 대부분의 버섯 종은 반수체이다. 하지만 *Armillaria* 종은 자연 상태에서 이배체일 수 있다(Carvalho *et al.*, 1995). DNA 양상이 전혀 다른 12번 형태의 자실체 배양체는 추후 rDNA 염기서열 분석으로 균주의 오염 여부가 더 구명되어야 할 것이다. 만약 다른종이라면 천마버섯 균과의 공생 곰팡이 여부도 밝혀져야 할 것이다.

원형질체 융합이나 핵 전이에 의한 융합체의 이배체 형성에서도 배노밀배지에서 균총 분리가 일어나는데 이배체일 경우 균사생장이 아주 빠르며 DNA 패턴도 다르게 나타난다(Kevei and Peberdy, 1979; Yoo and Shin, 1996).

자실체 조직배양체는 기존 품종에 비하여 균사생장이 양호하고 이들 중 균사속 발달이 양호한 균주를 많이 선발할 수 있는데 이것을 새로운 품종으로 개발하여야 할 것이다. 이러한 것은 우리나라에 이미 자

Table 2. Frequency distribution of 12 colony types derived from tissue culture isolates of fruiting body in *Armillaria gallica*

Mycelial colony type	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. of individual	14	13	21	18	25	21	18	20	33	43	50	3

생하는 버섯으로 되어졌기 때문이다. 유 등(2013)은 천마버섯의 생태학적 서식지 조사에서 5년 전에 재배한 적이 있는 곳에서 버섯이 발생됨을 보고한 것으로 보아 도입 계통이 이미 국내의 환경에 적응이 잘 되어 토착화 된 것으로 사료된다.

적 요

자연 상태에서 발생한 천마버섯 자실체의 다양한 부위로부터 분리한 조직을 버섯완전배지 및 감자배지에 배양하여 균사생장 속도, 균총 형태, 균사속 형성 정도에 따라 12종류로 구분할 수 있었다. 자실체 배양체(fruiting culture isolate; FC)의 균사생장과 균사속은 감자배지보다 버섯완전배지에서 빠르고 잘 형성되었다. 이들을 다시 2차 계대 배양한 결과 버섯완전배지에서 11번 균주가 균총 분리되면서 다시 분화되어 성장하였다. 균총 분리된 한 쪽의 균총이 12번과 유사하였고 이 12번 균주는 다른 종류와는 전혀 다른 특이한 양상을 나타내었다. 또한 RAPD에 의한 DNA 패턴 분석 결과 자실체 조직배양체는 천마균1호 품종과 동일한 양상을 나타냈으나 12번은 달랐다. 자실체 조직배양체 중에서 기존 천마균1호 품종보다 균사생장과 균사속 형성이 양호한 것을 선발할 수 있었다. 따라서 이들 조직배양체는 새로운 우량 계통으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ907021032012)의 지원에 의해 이루어진 결과이며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 김현중, 고민규, 이창근, 성재모. 1992. 뽕나무버섯의 인공균상재배. 한국균학회지 **20**(3) : 273-276.
- 성재모, 양근주, 김수호, T. Harrinton. 1997. 생물학적 특성과 DNA분석을 이용한 한국내 *Armillaria* 속균의 분류. 한국균학회지 **25** : 46-67.
- 성재모, 정범식, 양근주, 이현경, T. Harrinton. 1995. *Armillaria* 속균을 이용한 천마의 생산. 한국균학회지 **23** : 61-70.
- 오진아, 이찬중, 정종천, 유영복. 2012. rDNA의 ITS 부위 염기서열 분석에 의한 *Armillaria*속 수집 균주의 유전적인 유연관계 분석. 한국버섯학회지 **10**(3) : 143-149.
- 유영복, 오진아, 오연이, 문지원, 신평균, 장갑열, 공원식. 2013. 천마버섯(*Armillaria gallica*)의 생태학적 서식지 조사. 한국버섯학회지 **11**(1) : 36-40.
- Carvalho, D. B., Smith, M. L. and Anderson, J. B. 1995. Genetic exchange between diploid and haploid mycelia of *Armillaria gallica*. Mycol. Res. **99**(6) : 641-647.
- Kevei, F. and Peberdy, J. F. 1979. Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. Mol. Gen. Genet. **170** : 213-218.
- Raper C. A, raper J. R, and Miller R. E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia. **64** : 1088-1117.
- Sung, J. M., Cha, J. Y. and Kim, Y. S. 1989. Identification and culture of *A. mellea* complex associated with root rot disease of Korean pine. Korean J. Plant Pathol. **5**(3) : 317-327.
- Sung, J. M., Yang, K. J., Lee, H. K. and Harrington, T. C. 1994. Studies on Korean species of *Armillaria*. Kor. J. Pl. Path. **10**(4) : 261-269.
- Yoo, Y. B. and Shin, P. G. 1996. Intergeneric transfer of isolated nuclei from *Lentinus edodes* into protoplasts of *Pleurotus florida*. Korean J. Mycology **24**(2) : 111-126.