

## Di-mon 교배에 의한 영지버섯균주의 화합성 검정

김경수<sup>1)</sup> · 공원식<sup>2)\*</sup> · 최선규<sup>2)</sup> · 유창현<sup>2)</sup> · 고미석<sup>3)</sup> · 서건식<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>농민버섯연구소, <sup>2)</sup>농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과, <sup>3)</sup>경상대학교 농학과, <sup>4)</sup>한국농업전문학교

### Compatibility test of *Ganoderma* strains based on Di-mon mating

Kyung-Soo Kim<sup>1)</sup>, Won-Sik Kong<sup>2)\*</sup>, Sun-Gyu Choi<sup>2)</sup>, Chang-Hyun You<sup>2)</sup>, Mi-Suk Ko<sup>3)</sup>, and Geon-Sik Seo<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Nongmin Mushroom Institute, Anseong 456-810

<sup>2)</sup>Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707

<sup>3)</sup>Dep. of Agronomy, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

<sup>4)</sup>Korea National Agriculture College, Hwasung, Kyonggi, 445-893, Korea

**ABSTRACT :** Compatibility test of the 115 world-wide collections of *Ganoderma* strains including 61 of Korean origin, were performed by di-mon mating with tester strains *G. lucidum* G001-1 (A1B1) and *G. tsugae* 1109-16 (A1B1). Unexpected results were found in that 75 strains, formerly considered to be *G. lucidum* exhibited clamp connections in mating with the tester 1109-16. This observation suggests that these strains require further examination prior to taxonomic classification. Interestingly, this compatibility could be confirmed more easily by the finding of distinct confrontation line between two strains on plate.

**KEYWORDS :** *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae*, di-mon mating, chlamydospore

영지 (*Ganoderma*)는 우리 나라를 비롯한 중국, 일본, 대만 등 아시아 국가에서는 옛날부터 불로장생하는 영약으로 여겨 일명 불로초라고도 하였으며, 일본에서는 萬年버섯 (マンネンタケ)으로 불려지고 있다. 영지는 전 세계적으로 널리 분포하는 버섯으로서 보통 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst을 말한다. *Ganoderma* 속의 버섯은 250여종이 알려져 있으며 (Moncalvo, 1995), 우리 나라에서는 지금까지 *G. applanatum*, *G. lucidum* 및 *G. neo-japonicum* 등 3종이 보고되어 있다 (배, 1994). 온대지방인 우리 나라에서 자생하고 있는 영지의 대부분이 아열대~열대지방에서 자생하는 *G. lucidum*으로 발표되고 있어 (도·김, 1986, 현 등, 1990, 김·남, 1984, Lee and Lee, 1991, 박 등, 1986, 신·서, 1989), 이들의 확실한 종을 구별할 필요가 있다. 영지속 중 *G. lucidum*은 *G. tsugae*의 자실체 형태와 매우 비슷하기 때문에 자실체 형태만으로는 그 분류가 매우 어렵다. *G. lucidum*은 아열대~열대지방에서 발견되고 균사체가 35℃의 고온에서도 생장이 양호하나 *G. tsugae*는 온대지방에서 주로 발생하고 35℃에서는 균사 생장이 매우 불량하다. 또한 *G. lucidum*은 균사체가 후막포자를 형성하는 반면에 *G. tsugae*는 후막포자를 형성하지 않는 차이가 있다 (Adaskaveg and Gilbertson, 1986). 따라서 우리 나라에서 재배하고 있는 영지 1, 2호를 비롯하여 수집 균주들의 종을 재검토할 필요가 있다고 생각되었다.

버섯의 중간 교배는 종을 구별하는 하나의 수단이기 때문에

(Hseu and Wang, 1991, Nobles, 1948) 자실체의 외형적인 형태로 중간 구분이 어려우나 교배시험을 통하여 구분 할 수 있다. Adaskaveg와 Gilbertson (1986)은 북미산 *G. lucidum*과 유럽산 *G. resinasium*의 교배결과 두 균은 교배가 이루어지고, 한편 Chang과 Chen (1986)은 *G. lucidum*과 *G. multipilea*의 단핵균주의 교배 결과 교배가 이루어져 동일 종일 것이라고 하였다. Hseu와 Wang (1989)은 대만과 일본에서 도입된 *G. lucidum*을 di-mon 교배 결과 대만과 일본에서 수집한 종은 서로 구별이 되었다고 하였으며, *G. lucidum* 단핵균주와 *G. applanatum*, *G. boninense*, *G. formosanum*, *G. fornicatum*, *G. lucidum*, *G. neo-japonicum* 및 *G. tropicum*의 2핵 균주와 di-mon 교배 결과 종이 다를 경우 모든 조합에서 불화합성을 보였다고 하였다. 한편 *G. lucidum*의 경우 총 9개의 균주 중에서 3개 균주는 클램프가 형성되었고, 3개 균주는 위클램프 (pseudo-clamp), 3개 균주는 클램프가 형성되지 않아 3개 그룹으로 구분되며, 영지 단핵균주의 교배형은 여러 종에서 4극성 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>)을 보이는 것으로 알려져 있다 (Hseu and Wang, 1987). 본 연구에서는 국내외에서 수집된 영지 유전자원을 대상으로 외국에서 도입된 *G. lucidum* 및 *G. tsugae* 단핵균주를 표준 균주로 사용하여 di-mon 교잡에 의한 화합성 검정으로 종을 확인하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 공시 균주

시험에 이용된 영지 균주는 농업과학기술원 응용미생물과

\*Corresponding author : <E-mail: wskong@rda.go.kr>

에 수집 보존중인 *G. lucidum* ASI 7001 등 115개 균주로써, *G. applanatum* 3, *G. lobatum* 1, *G. lucidum* 87, *G. neo-japonicum* 4, *G. oregonense* 5, *G. tropicum* 3, *G. tsugae* 6, *G. valesiacum* 1 및 *G. sp.* 5개 균주가 포함되어 있다.

화합성 검정을 위하여 *G. lucidum* 영지1호(ASI7004)에서 분리한 단핵균주(7004-1)와 *G. tsugae* ASI7115의 단핵균주(p-1)를 사용하였으며, 표준 균주는 대만에서 도입된 단핵인 *G. tsugae* 1109-16 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 및 *G. lucidum* G001-1 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 이었다 (Hseu and Wang, 1996).

## 배지

화합성 검정에 사용한 배지는 영지완전배지(Ganoderma Complete Medium; GCM)로 그 조성은 dextrose 30 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, yeast extract 10 g, peptone 4 g, sucrose 20 g, casamino acid 5 g, agar 20 g을 1,000 ml 증류수에 녹인 후 121 °C에서 15분간 살균한 후 사용하였다.

## 영지균주의 화합성 검정

Di-mon 교배에 의한 균주간 화합성 검정은 먼저 단핵균주를 GCM에서 1주일 정도 성장시킨 후 이들로부터 2핵균주를 1 cm 정도 떨어지게 접종하였다. 접종 후 15일간 배양한 1핵 균사체의 가장자리에서 균사를 분리하여 GCM에 계대배양하며 현미경으로 clamp 형성 여부를 조사하여 균주간의 화합성 여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 화합성 검정

우리 나라에서 재배되고 있는 영지1호 (ASI 7004)를 비

롯한 11개 균주와 *G. tsugae* ASI 7115에서 분리한 단핵균주 p-1 및 *G. lucidum* 이라고 분류된 ASI 7004의 단핵균주 7004-1을 di-mon 교배를 실시한 결과 (표 1), p-1과 7004-1은 모두 *G. lucidum* 이라고 분류된 ASI 7004 등 6 균주와 clamp가 형성되었으며, 또 다른 *G. lucidum* 2 균주 ASI 7022, 7050과는 clamp가 형성되지 않았다. 또한 *G. oregonense*, *G. applanatum*, *G. tropicum* 균주와도 화합성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 실험에 사용된 두 개의 단핵균주가 서로 동일종일 가능성을 보인 것이며, 두 단핵균주간 교배에서도 clamp가 형성되어 이와 같은 결과를 밑받침하였다(data not shown). 특히 clamp가 형성되지 않은 5개 균주는 종이 다른 균주들은 물론, *G. lucidum*이라고 표기된 2개의 균주가 포함되어 있는데 이들 균주는 clamp가 형성된 균주와는 달리 35 °C의 고온에서도 균사생장이 양호하고 후막포자를 형성하는 균주였다. 따라서 우리나라에서 재배되고 있는 영지 1호 (ASI 7004)를 포함한 대부분의 균주가 *G. lucidum*으로 분류된 것에 대하여 검토할 필요가 있는 것으로 판단되었다.

시험에 사용된 대부분의 영지 균주가 *G. tsugae*의 단핵균주와 교배가 이루어지므로 *G. lucidum*이 아닐 수 있다는 상기의 결과를 보다 명확하게 하고, 우리 나라에서 *G. lucidum* 이라고 분류된 다수의 영지 종의 확실한 구분을 하고자 대만에서 도입한 *G. lucidum* G001-1 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 및 *G. tsugae* 1109-16 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 단핵 균주를 표준균주로 하여 농업과학기술원에 보존 중인 115개 영지 균주와 di-mon 교배를 실시하여 중간 구분을 검토하였다 (표 2).

*G. tsugae* 단핵균주 1109-16은 115개 균주중 75개 균주와 clamp를 형성하였으며, 특히 우리 나라에서 재배되고 있는 영지 1호 (ASI 7004)와 2호 (ASI 7071), 그리고 자실

**Table 1.** Mating reaction between monokaryon isolates of *G. tsugae* ASI 7115, *G. lucidum* ASI 7004, and dikaryotic strains of *Ganoderma*

Strains of dikaryon(ASI)	Sources	Monokaryons	
		<i>G. tsugae</i> 7115 p-1	<i>G. lucidum</i> 7004-1
<i>G. lucidum</i> 7004	Yeongji-1ho, Korea	+	+
<i>G. lucidum</i> 7013	Chuncheon, Korea	+	+
<i>G. lucidum</i> 7053	Zucc, USA	+	+
<i>G. lucidum</i> 7071	Yeongji-2ho, Korea	+	+
<i>G. lucidum</i> 7082	KNU k75, Korea	+	+
<i>G. lucidum</i> 7091	KNU k89, Korea	+	+
<i>G. lucidum</i> 7022	Unknown, Korea	-	-
<i>G. lucidum</i> 7050	MRI5008, USA	-	-
<i>G. oregonense</i> 7063	MRI8003, USA	-	-
<i>G. applanatum</i> 7105	China	-	-
<i>G. tropicum</i> 7112	Taiwan	-	-

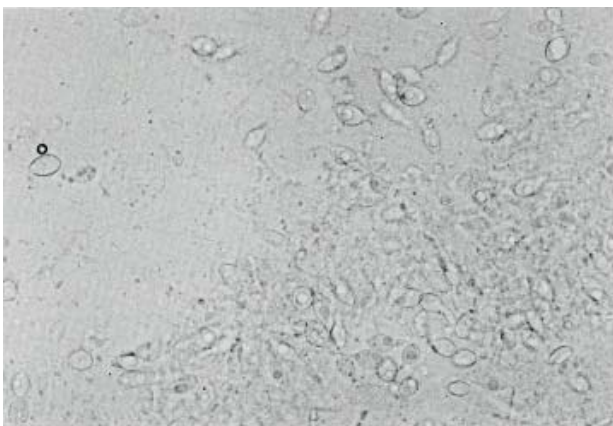
\* + : Form clamp connection, - : No clamp connection

**Table 2.** Clamp connection in di-mon crossing between *G. tsugae* 1109-16 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) and collected dikaryotic strains

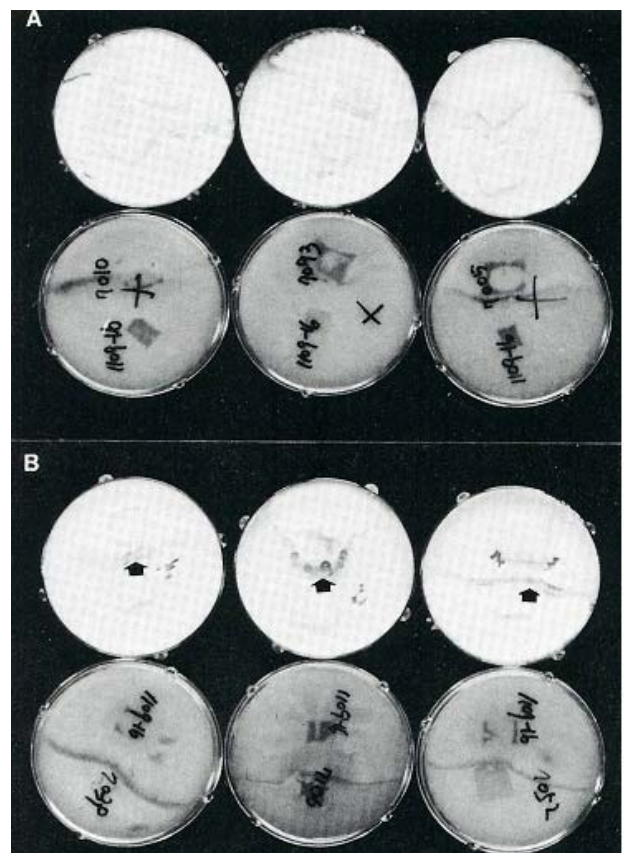
Clamp connection	No. of strains	Strains (ASI)										
		7001	7002	7003	7004	7005	7007	7009	7010	7011	7012	7013
Formed	75	7014	7015	7016	7018	7019	7020	7021	7023	7024	7025	7026
		7027	7030	7031	7037	7038	7040	7041	7042	7044	7046	7048
		7053	7057	7058	7059	7060	7068	7071	7072	7073	7074	7075
		7076	7077	7078	7080	7081	7082	7083	7085	7086	7087	7088
		7089	7090	7091	7092	7093	7094	7095	7096	7097	7098	7099
		7100	7101	7102	7103	7104	7107	7108	7111	7115		
Not formed	40	7006	7008	7017	7022	7028	7029	7032	7033	7034	7035	7036
		7039	7043	7045	7047	7049	7050	7051	7052	7054	7055	7056
		7061	7062	7063	7064	7065	7066	7067	7069	7070	7079	7084
		7105	7106	7109	7110	7112	7113	7114				

체가 녹각형인 ASI 7013이 *G. tsugae* 단핵 균주와 교배가 이루어져 국내에서 수집되어 대부분 *G. lucidum*으로 분류된 75개 균주는 *G. tsugae* 일 것으로 판단되었다. 반면 *G. tsugae* 단핵균주와 clamp가 형성되지 않은 것은 *G. applanatum*인 ASI 7035, 7105, 7106, *G. neo-japonicum*인 ASI 7028, 7029, 7043, 7045, *G. oregonense*인 ASI 7049, 7062, 7063, 7067, 7070, *G. lobatum*인 ASI 7061 및 *G. valesiacum* ASI 7065, *G. tropicum* ASI 7112, 7113, 7114이거나, 균사체 배양시험 결과 35°C의 고온에서 균사 생장이 양호하고 GCM에서 후막포자를 형성하였던(그림1) *G. lucidum* ASI 7022, 7050, 7051, 7052, 7054, 7079, *Ganoderma* sp. 7032, 7033, 7034 등과 미국에서 도입된 *G. tsugae* ASI 7055, 7064, 7109, 7110 등이었다. 따라서 이러한 결과로 부터 북미에서 발견되는 *G. tsugae*와 대만에서 분류된 *G. tsugae*와는 다른 종일 것으로 생각되었다. 한편 또 다른 표준균주인 *G. lucidum* G001-1(A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 단핵균주는 시험한 모든 균주와 전혀 clamp가 형성되지 않아 추후 연구 검토가 필요할 것으로 생각되었다.

영지의 화합성 검정을 위한 교배시에는 현미경을 검경하

**Fig. 1.** Chlamydospores of *G. lucidum* ASI 7022.

여 clamp connection을 확인하여야 하는데 이는 많은 시간이 소요되는 일이라 할 수 있다. 그러나 본 실험에서 di-mon 교배는 육안으로 구별이 가능한 뚜렷한 특징을 보였는데 그림 2에서 보는 바와 같이 교배가 이루어진 조합은 두 균주가 만나는 부분에 대선이 명확하지 않은 반면, 교배가 되지 않는 조합에서는 뚜렷한 대선을 나타내어 교배 조

**Fig. 2.** Mated and unmated mycelial morphology between *G. tsugae* monokaryon and *Ganoderma* dikaryotic strains. A) Mated B) Unmated

합간의 화합성 여부를 쉽게 구별이 가능하였다. 이와 같은 특징은 앞으로 새로운 균주를 육성하는데 필요한 많은 교배조합에 대하여 현미경 검정 시간을 단축할 수 있는 좋은 지표로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Hseu와 Wang(1987, 1989, 1991)은 일명 Buller 현상이라고 하는 di-mon 교배에 의해서 영지의 중간 구별이 가능하고, 분류동정에서도 단핵균주의 교배와 더불어 가장 효과적인 방법이라고 하였다. 그리고 *G. lucidum* 등 6개 영지 종에 대한 di-mon 교배결과 종이 다른 것은 클램프가 형성되지 않아 대만 종과 일본 종을 구별 할 수 있는 방법으로써 이용 가능하다고 하였다. 한편 공(1997)은 팽이버섯의 분열자에서 얻은 단핵균주로 di-mon 교배를 실시하여 효율적인 육종을 위한 교배형을 결정하는데 이용하기도 하였다. 따라서 본 시험 결과가 비록 영지버섯의 종을 확정지을 수 있는 결과로는 부족할 수 있으나, 시험균주의 배양적 특성 및 현미경적 특성과 함께 분자생물학적 특성 등의 검토를 통하여 보완된다면 영지의 종을 구분하는 하나의 증거로써 제시될 수 있을 것으로 생각된다.

## 적 요

영지1호를 비롯한 115개의 영지버섯 수집균주에 대하여 표준균주 *G. lucidum* G001-1 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 및 *G. tsugae* 1109-16 (A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>) 단핵 균주와 di-mon 교배를 통하여 화합성을 검정한 결과 *G. lucidum* 단핵균주는 어떠한 균주와도 clamp가 형성되지 않았으나, *G. tsugae* 단핵균주는 대부분 *G. lucidum*이라고 분류된 75개 균주와 clamp가 형성되어 이들 균주에 대한 재검토가 필요하였다. 또한 영지버섯의 di-mon 교배에서 불화합성 균주간에는 뚜렷한 대선을 형성하여 교배확인에 드는 노력을 감소할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술개발 사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로 이를 수행할 수 있도록 지원해 주신 것에 감사드립니다.

## 참고문헌

Adaskaveg, J. E. and R. L. Gilbertson. 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G.*

- tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complex. Mycologia 78(5) : 694-705.
- Chang, T. T. and T. Chen. 1986. Studies on nuclear behavior, mating type and heterokaryosis of several species of *Ganoderma* in Taiwan. Plant Prot. Bull. (Taiwan) 28 : 231-240.
- Hseu, R. S. and H. H. Wang. 1987. Application of dikaryon-monokaryon mating reaction to the identification of *Ganoderma* species. Jour. of the Chinese Agri. Chem. Society. 25(1) : 118-124.
- Hseu, R. S. and H. H. Wang. 1989. Characterization of *Ganoderma lucidum* di-mon mating. Sci. and Culti. of Edible Fungi XII(1) : 217-225.
- Hseu, R. S. and H. H. Wang. 1991. A new system for identifying cultures of *Ganoderma* species. Sci. and Culti. of Edible Fungi XIII(1) : 51-56.
- Hseu, R. S. and H. H. Wang. 1996. A study on sexuality of the *Ganoderma* species. Memoirs of the College of Agri. Nat'l. Taiwan Univ. 36(4) : 342-349.
- Lee, J. W. and K. H. Lee. 1991. Classification of isolates of *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp. by electrophoretic patterns of isozymes. Kor. J. Mycol. 19(2) : 101-108.
- Moncalvo, J. M., H. F. Wang, and R. S. Hseu. 1995. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequence. Comparison with traditional taxonomic characters. Mycol. Res. 99(2) : 1489-1499.
- Nobles, M. K. 1948. Studies in forest pathology. VI. Identification of culture of wood-rotting fungi. Canadi. J. Res. 26 : 281-431.
- 공원식. 1997. 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*) 수집균주의 유연관계와 새로운 균주육성에 관한 연구. 건국대 박사학위논문
- 김종협, 남정숙. 1984. 영지의 모노뉴클레오티드 성분의 분포에 관한 연구. 한국균학회지 12(3) : 111-116.
- 도재호, 김상달. 1986. 불로초가 생산하는 Cellulase 의 효소학적 성질. 한국균학회지 14(1) : 79-84.
- 박원목, 이용세, 김성희, 박용환. 1986. 전기영동법에 의한 영지버섯 계통의 특성. 한국균학회지 14(2) : 93-99.
- 배신철 1994. 버섯 및 도열병균의 분류를 위한 rDNA의 ITS와 IGR부위의 PCR 분석. 경북대 박사학위논문
- 신관철, 서건식 영지의 비자실체성 담자포자의 형성에 미치는 광의 영향. 한국균학회지 17(4) : 189-193.
- 현진원, 최응칠, 김병각 1990. 한국산 고등 균류의 성분 연구 (제67보) 영지버섯 자실체의 항암성분. 한국균학회지. 18(2) : 58-69.