

교배형 분자마커를 이용한 신품종 밀리타리스 동충하초 ‘도원홍초 2호’의 품종 특성

이병주^{1*} · 이미애¹ · 김용균¹ · 이순계¹ · 최영상² · 이병의³

¹충청남도농업기술원 작물연구과

²예당버섯

³순천향대학교 화학과

Varietal characteristics of new *Cordyceps militaris* ‘Dowonhongcho 2ho’ improved by mating type molecular markers

Byung-joo Lee^{1*}, Mi-Ae Lee¹, Yong-Gyun Kim¹, Sun-Gye Lee¹, Young-sang Choi², and Byung-eui Lee³

¹Crop Research Division, Chungcheongnam-do Agricultural Research & Extension Services, Yesan 340-861, Korea

²Yedang Mushroom Institute, Yesan 340-861, Korea

³Department of Chemistry, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

ABSTRACT: The mushroom species *Cordyceps militaris* has been studied and cultivated as a medicinal mushroom due to its multiple valuable biological and pharmaceutical activities. For breeding new strains of *C. militaris*, multiplex PCR assays were performed using primers specific for its mating type genes, *MAT1-1* and *MAT1-2*. Mating types and mating status were confirmed, as evidenced by DNA bands at 233-bp and 191-bp for *MAT1-1* and *MAT1-2* respectively. The novel ‘Dowonhongcho 2ho’ was developed through mating; they were found to possess high-quality fruiting bodies when grown in artificial media. The stromata of the new strain were club-shaped, with a bright orange-red color, and measured 7.1 cm in length. They had an average cordycepin content of 0.33%. Compared to ‘Dowonhongcho,’ the new strain had a 7% higher yield, as well as firm fruiting bodies. The optimum temperature for mycelial growth was 20~25°C, and the optimum temperature for stroma development was 18~22 °C. The fruiting bodies developed after 49.1 days from inoculation. The use of mating type molecular markers improved the breeding efficiency of the new strain ‘Dowonhongcho 2ho.’ Thus, they may be valuable for artificial cultivation and industrial-scale production of *C. militaris* with excellent characteristics.

KEYWORDS: *Cordyceps militaris*, Fruiting body, Mating type, Molecular marker, Stroma development

서론

버섯은 식품학적 측면에서의 유용성분 뿐 아니라, 각종 성인병의 예방에 크게 기여할 수 있는 다양한 기능성 물질이 함유되어 있어 식품 신소재로서의 연구개발이 요구된다(Oh and Lee, 2010). 이에 따라 식용버섯에 함유된 각종 기능성 물질 및 영양성분을 활용한 다양한 식품개발로 국내외적으로 경쟁력을 높일 수 있는 품목으로서의 발전과 농가 소득증대에 기여할 것으로 전망된다.

동충하초는 대표적인 약용버섯으로, 그 중에서도 가장 높이 평가되는 것은 해발 3,600~5,000 m의 히말라야와 티베트 고원지대에서 박쥐나방(*Hepialus armoricanus* Oberthur)의 유충에서 자라는 박쥐나방 동충하초(*C.*

J. Mushrooms 2017 September, 15(3):111-117
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2017.15.3.111>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : byungjoo@korea.kr
 Tel : +82-41-635-6061, Fax : +

Received July 24, 2017
 Revised September 11, 2017
 Accepted September 15, 2017

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

sinensis syn. *Ophiocordyceps sinensis*)이다(Zhou *et al.*, 2009). 이 동충하초 자실체의 인공적인 생산을 위해 많은 노력을 해왔으나 아직까지 성공하지 못했다(Guo and Yang, 1999; Liu *et al.*, 1999; Jiang and Yao, 2003). 이와 같은 제한적인 분포, 인공재배의 곤란, 높은 가격에 의한 무분별한 채취 등으로 25년 전과 비교해서 생산량이 약 5% 이하로 감소하면서 자원이 고갈되고 있다(Huang *et al.*, 2009).

우리나라에 분포되어 있는 대표적인 밀리타리스 동충하초(*C. militaris* (L.) Link)는 땅속 나비목(*Lepidoptera*)의 번데기에 기생하는 곤충기생균(Entomopathogenic fungi)으로서 곤충의 유충, 번데기, 성충 등에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성한다(Holliday and Cleaver, 2008). 분류학적으로 자낭균문(*Ascomycota*), 자낭균강(*Ascomycetes*), 육좌균목(*Hypocreales*) 맥각균과(*Clavicipitaceae*), 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하고 있으며 한국을 비롯해서 중국, 일본, 영국, 노르웨이, 네팔 등 전 세계적으로 400여종, 국내에 80여종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다(Mains, 1958; Hawksworth and Rossman, 1997; Liang, 2001; Isaka *et al.*, 2005; Stensrud *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). 특히 액체배양, 현미 또는 번데기 등을 이용한 다양한 배지에서 인공재배가 가능하고(Harada *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1999; Sato and Shimazu, 2002; Sung *et al.*, 1999, 2002; Gao, 2008; Jo *et al.*, 2008), 다양한 생리활성물질이 존재하는 것으로 알려진 가운데 박쥐나방 동충하초의 주요 생리활성물질로 알려진 코디세핀(Cordycepin) 함량이 훨씬 많은 양으로 검출되었다(Wu *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2010). 코디세핀의 약리적인 기능은 매우 다양하여 항종양, 면역조절, 항염증, 항바이러스, 항백혈병, 항암, 항당뇨, 비만억제 등에 대한 많은 연구가 이루어져왔다(De Julian-Ortiz *et al.*, 1999; Yoo *et al.*, 2004; Masuda *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Patel and Ingalhalli, 2013). 이와 같이 밀리타리스 동충하초는 박쥐나방 동충하초와 유사한 약용 가치가 있어 그 대체품으로 사용되면서 좋은 개발 전망을 가지고 있다(Tan *et al.*, 2011).

밀리타리스 동충하초는 이극성 자웅이주(bipolar heterothallic) 자낭균으로서(Shrestha *et al.*, 2004), 서로 다른 두 개의 교배형(*MAT*) 균주 즉 *MAT1-1*과 *MAT1-2*에 의해 교배의 화합 및 불화합이 결정되고 UV에 의한 돌연변이와 단포자 교배 및 이를 통한 새로운 품종이 육성되고 있다(Che *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2010). *MAT* 유전자는 단일 유전자좌의 α -*BOX*를 가지고 있는 *MAT1-1*과 *HMG-BOX*를 가지고 있는 *MAT1-2*로 구별되고, 각각의 유전자에 특이적인 프라이머(primer)를 합성하여 교배형 및 교배여부를 확인 할 수 있는 분자마커로 이용된다

(Turgeon, 1998; Turgeon and Yoder, 2000; Yokoyama *et al.*, 2004). 이와 같은 분자마커를 이용하면 전통적인 방법에 의한 단포자 분리, 자실체의 자낭각 생산여부를 통한 단핵균주 확인, 교배확인을 위한 자실체의 생산 등에 소요되는 시간, 수고 및 비용을 상당히 줄일 수 있다.

본 연구는 밀리타리스 동충하초 단포자로부터 분리된 단핵균주의 교배형을 분자마커를 통해 확인하고 서로 다른 교배형 간의 교배와 선발과정을 거쳐 육성된 재배적 특성이 우수한 새로운 동충하초 ‘도원홍초 2호’의 주요한 품종특성을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

본 시험에 이용된 균주는 2012년 충남 예산 및 부여지역에서 채집된 밀리타리스 동충하초에서 단포자를 채취하여 분자마커를 사용한 교배형 확인 및 교배 그리고 특성검정과 선발과정을 수행하였으며, 그 중 수량 및 품질이 우수한 계통을 최종 선발하여 농가실증시험을 거쳐 2016년 농촌진흥청 신품중심의위원회를 거쳐 국립종자원에 ‘도원홍초 2호’로 품종 출원하였다. 단포자 분리는 WA(Water agar)배지가 분주된 페트리디쉬에 자낭포자를 낙하하여 24°C 인큐베이터에서 2일간 발아시킨 후 단핵균주로 추정되는 균사체를 각각 분리하여 YMA(Yeast malt agar)배지에 접종하여 24°C에 10일간 배양한 후 접종원으로 사용하였다.

교배형을 확인하기 위해 NucleoSpin Microbial DNA kit (Macherey-nagel, Germany)를 이용하여 균사체로부터 Genomic DNA를 추출하였으며, primer *MAT1-1*은 accession no. AB124614 (forward, 5'-CCATCTCATCGCGGATG-3'; reverse 5'-GGGCAAACGACCATTG-3'), *MAT1-2*는 accession no. AB124626 (forward, 5'-ACATACGCTTGTCAGA-3'; reverse 5'-AGGAGAGCCTTCTTGAT-3')를 이용하였고(Yokoyama *et al.*, 2004; Zhang and Liang, 2013), PCR 조성은 template DNA 2 μ L에 각각의 10 pM primer 1 μ L, 멸균증류수 14 μ L로 총 final volume 20 μ L가 되도록 하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분간 반응시킨 뒤, 94°C에서 30초, 53°C에서 30초, 72°C에서 30초로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 72°C에서 10분으로 하여 multiplex PCR을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물은 4% agarose gel에서 전기 영동한 후, Gel Documentation system을 사용하여 DNA band를 확인 하였다.

서로 다른 온도에서의 균사생장을 측정하기 위해 항온기 10, 15, 20, 25, 30°C에서 20일 경과후 3반복으로, 한 반복당 3방향에서 측정한 다음 평균값을 사용하였다. 각각의 배지별 균사생장은 YMA 배지상에서 자라고 있는 균사의 가장자리 끝 부분에서 직경 5 mm의 균총을 떼어 내 동충하초 균사생장이 양호하였던 MCM(Mushroom

complete media), SDAY(Sabouraud’s dextrose agar yeast extract), YMA 배지를 사용하였다(Lee *et al.*, 2013). 이와 같은 배지실험은 완전임의배지 3반복으로 2회 실시하였다.

자실체 발생을 위해서는 Polypropylne 배양병(850 ml)에 현미 80 g과 증류수 100 ml를 넣어 30분간 고압 멸균하여 각각의 단포자 분리균주에 대한 자실체 및 자낭각을 검정하는 방법으로 단핵균주를 확인하였고, 이렇게 확인된 단핵균주는 24°C, 조도 500lux 조건의 YMB(Yeast Malt Broth) 액체배지에서 2~3일간 혼합접종 하여 교배를 실시한 후, 버섯발이를 위해 생육실에서 20~22°C, 조도 500lux, 습도 80~90% 조건을 유지하면서 50~60일후 인공자실체를 형성하였다.

코디세핀에 대한 정량분석은 Nano Space SI-1 (Shiseido, Japan), Column은 Water PLC C-18을 사용하였으며, 25°C로 유지하면서 20mM-KH₂PO₄ 유출용매를 1.0 µl/min로 흘려보냈으며 UV 검출기로 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 일반성분 분석은 AOAC법에 준하여 분석하였고 농촌진흥청 토양 및 식물체 표준분석법에 따라 전탄수화물은 Tyurin법으로 전질소는 Kjeldahl법, P₂O₅는 비색법, CaO, MgO 및 K₂O는 원자흡광분석법으로, pH는 건조시료 5 g을 증류수 25 ml에 30분간 침적시킨 후 pH-Meter(Fisher model-50)으로 분석 측정하였고, 색도측정은 색차계(Chromameter, CR-200, Minolta, Japan)를 이용하여 L(명도)값, a(적색도)값 및 b(황색도)값을 측정하였고 색차(ΔE) = √(L-L')²+(a-a')²+(b-b')²으로 계산하였다.

결과 및 고찰

전통적으로 밀리타리스 동충하초의 신품종 육성을 위해서는 자낭포자를 분리한 후 균사생장, 균사밀도, 자실체 및 자낭각 형성 여부 등에 대한 검토를 거쳐, 그 중에서 단핵이면서 특성이 우수한 균주를 이용하여 교배와 선발 과정을 거치게 된다. 이번에 육성한 신품종 동충하초 ‘도원홍초 2호’의 균사체는 YMA 배지에서 주황색을 띠며, 자실체는 주황색 곤봉형이다(Fig. 1). ‘도원홍초 2호’의 자



Fig. 1. Mycelium(left) and Fruiting body(right) of new *Cordyceps militaris* cv ‘Dowonhongcho 2ho’.

실체 발생을 위해서는 현미배지에서 액체균을 접종후 생육실에서 버섯발생을 위해 18~22°C, 조도 500lux, 습도 80~90% 조건을 유지하면서 45일후 인공자실체를 형성하였다.

전통적인 밀리타리스 동충하초 신품종 육종을 위해서는 단핵균주 및 교배여부 확인을 위해서 자실체 발생 및 자낭각 확인 등의 과정이 필요한데, 이 방법은 상당한 정도의 수고와 비용 뿐 아니라 대상 균주 수에 따라서 많은 시간이 소요된다. 그러나 본 연구는 교배형 *MATI-1* 및 *MATI-2*를 프라이머를 사용한 PCR 분석방법으로 확인하여 이 과정을 단축할 수 있었다. 특히 신품종 ‘도원홍초 2호’ 및 대조품종 ‘도원홍초’ 그리고 교배에 사용된 단핵균주 CM031209-29와 CM031238-63에 교배형 유전자 분석을 multiplex PCR 조건에서 실시하였다. 이와 같이 두 종류의 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 얻어진 PCR 분석은 *MATI-1*과 *MATI-2*에 대하여 각각 233-bp와 191-bp에서 DNA 밴드를 형성하였고, 이를 통해 신품종 ‘도원홍초 2호’와 대조품종 ‘도원홍초’의 교배형 유전자는 *MATI-1*과 *MATI-2* 두 종류를 포함하는 것으로 나타나 두 품종 모두 교배된 것을 확인할 수 있었으며, ‘도원홍초 2호’의 교배를 위해 사용된 단핵균주는 각각 *MATI-1*과 *MATI-2*의 유전자형을 갖고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

신품종 ‘도원홍초 2호’ 및 ‘도원홍초’의 온도별 균사생장을 보면 두 품종 모두 15°C~25°C 범위에서 양호하였으며, 10°C와 30°C에서는 균사의 생장이 현저하게 느렸다. 품종간 차이를 보면 신품종 ‘도원홍초 2호’가 대조품종인 ‘도원홍초’에 비해 균사생장이 다소 양호한 것으로 나타났으며, ‘도원홍초 2호’의 경우 20°C 및 25°C에서 다른 온도에 비해 균사의 생장이 가장 빠르게 나타난 것으로 보아 균사생장 적온은 20°C~25°C로 판단된다(Fig. 3).

동충하초 ‘예당 3호’와 ‘도원홍초’의 배지별 균사생장은 SDAY, MCM, YMA 등의 배지에서 양호(Lee *et al.*, 2013, 2015)하였다. 이러한 결과를 바탕으로 25°C조건에서 배지의 종류에 따른 동충하초 신품종 및 대조품종에 대한 균사생장을 조사한 결과, 두 품종간에 다른 양상을

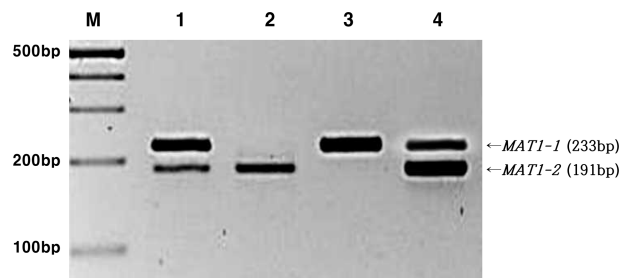


Fig. 2. PCR assay for the identification of *C. militaris* mating types (*MATI-1*, *MATI-2*). M: 100bp DNA ladder, 1: ‘Dowonhongcho 2ho’, 2: CM031209-29, 3: CM031238-63, 4: ‘Dowonhongcho’.

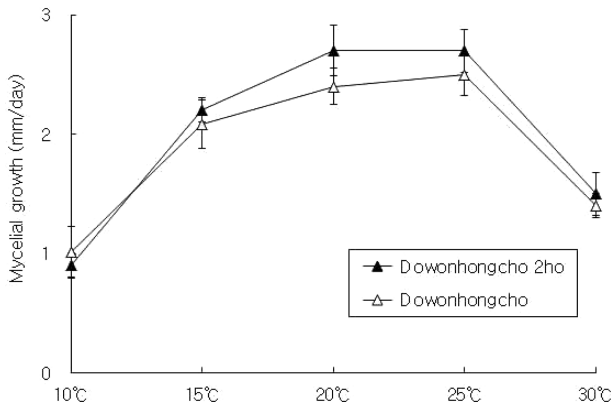


Fig. 3. Mycelial growth of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho' at different temperatures on SDAY medium.

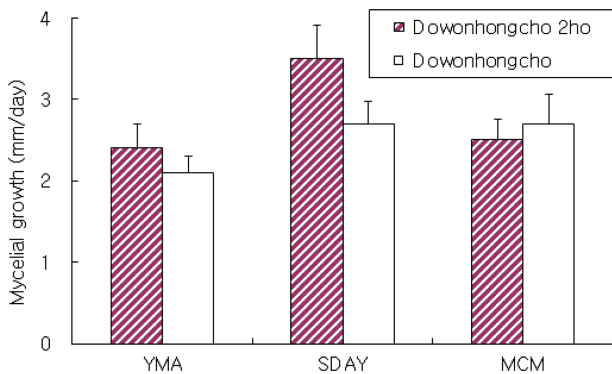


Fig. 4. Mycelial growth of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho' on different media.

보였는데, '도원홍초'의 경우 배지별 생육 차이가 크게 나타나지 않은 가운데, SDAY 및 MCM 배지에서 YMA 배지에 비해 다소 양호한 상태를 보인 반면, 신품종 '도원홍초 2호'의 경우 배지에 따른 급격한 차이를 확인할 수 있었으며, 특히 SDAY 배지에서 균사생장이 매우 우월하게 나타나 '도원홍초'와 비교했을 때에도 월등하게 빠른 생장을 보였다(Fig. 4).

재배적 특성을 보면 균배양시에는 두 품종간에 별 다른 차이를 보이지 않았으나, 자실체 생육시에는 소요기간의 차이를 나타내었는데, 동충하초 신품종인 '도원홍초 2호'의 균배양시 15.6일이 소요되었고, 이후 자실체 발생까지는 34.1일이 소요되어 접종부터 자실체 수확까지 전체 생육일수는 49.7일이었으며, '도원홍초'의 45.6일과 비교할 때 4.1일이 지연되었다(Table 1).

동충하초 신품종인 '도원홍초 2호'의 자실체의 형태적인 특성에 있어서는 '도원홍초 2호'의 병당 발이수는 124 개였고 자좌의 굵기는 3.5 mm, 자좌의 길이는 7.1 cm였다. 대조품종인 '도원홍초'의 141개/병의 발이수보다 자실체가 적게 발생하였으나, 자좌의 길이 및 굵기가 큰 특징을

Table 1. Cultural characteristics of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	Period(days)		Total
	Primordial formation	Development of fruit body	
Dowonhongcho 2ho	15.6	34.1	49.7
Dowonhongcho	15.4	30.2	45.6

Table 2. Characteristics of fruiting body of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	No of stroma (No/bottle)	Thickness of stroma (mm)	Length of stroma (cm)
Dowonhongcho 2ho	124	3.5	7.1
Dowonhongcho	141	3.1	6.2

Table 3. Color value comparison of the fruiting body of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	L ^a	a	b	ΔE
Dowonhongcho 2ho	61.52	21.37	44.63	2.13
Dowonhongcho	61.64	23.14	45.81	0

^aL : lightness, a : redness, b : yellowness; ΔE(color difference) = $\sqrt{(L-L')^2+(a-a')^2+(b-b')^2}$.

Table 4. Comparison of cordycepin, hardness and yield of the fruiting body of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	Cordycepin (%)	Hardness (kg/φ5mm)	Yield (g/bottle)	Yield index
Dowonhongcho 2ho	0.33±0.019	0.31	40.2 a	107
Dowonhongcho	0.31±0.024	0.28	37.6 b	100

* LSD(5%)=1.0514.

나타냄으로써 기호성이 높을 것으로 판단된다(Table 2).

자실체의 색도는 동충하초의 품질을 결정하는 중요한 요소 중의 하나인데, 일반적으로 소비자들은 선명한 주황색을 선호하는 경향이 있다. '도원홍초 2호'의 색도는 명도를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값, 황색도를 나타내는 b값이 각각 61.52, 21.37, 44.63으로 조사되었다. 대조품종인 '도원홍초'의 L값, a값, b값 61.64, 23.14, 45.81과 비교할 때 신품종인 '도원홍초 2호'의 적색도 및 황색도가 다소 감소하였으나, ΔE 값이 2.13을 나타내어 육안으로도 구별되는 미세한 차이가 확인되었다(Table 3).

동충하초에 함유된 코디세핀은 항암 및 항산화, 항균, 면역증강 등의 효과가 보고되고 있다(Kim *et al*, 2001; Ying *et al*, 1987; Lee *et al*, 2004). 이로 인해 기능성식품 소재로 주목받게 됨으로써 동충하초의 품질을 결정하는 또 하나의 요소가 되기도 한다. '도원홍초 2호'의 코디세핀 함량은 0.33%였고 '도원홍초'는 0.31%로 '도원홍초 2

Table 5. Comparison of nutrients proximate constituents in the fruiting body of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	Calorie (kcal/100g)	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude lipid (%)	Carbohydrate (%)	Ash (%)
Dowonhongcho 2ho	52.24	86.25	5.04	0.12	7.75	0.84
Dowonhongcho	52.43	86.06	5.12	0.11	7.74	0.97

Table 6. Inorganic elements contents in the fruiting body of new *Cordyceps militaris* cv 'Dowonhongcho 2ho'.

Strain	Concentration (mg%)								
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
Dowonhongcho 2ho	28.2	0.24	3.91	184.9	27.5	0.21	9.1	141.3	2.31
Dowonhongcho	27.5	0.21	3.82	181.7	26.7	0.26	9.6	137.7	2.04

호'의 함량이 다소 높았다(Table 4). 또한 육중에 있어서 경도는 반드시 고려해야 할 중요한 사항으로, 경도가 높을수록 저장성이 양호하고 유통과정에서 있을 수 있는 변질이 쉽게 이루어지지 않는다. '도원홍초 2호'의 경도는 0.31 kg/φ5mm로 '도원홍초'의 0.28 kg/φ5mm에 비해 높았고, 수량은 40.2 g/병으로 '도원홍초'의 37.6 g/병에 비해 7% 증수되었다. 따라서 신품종은 재배에서의 수량적 측면과 함께 저장 및 유통과정에서 유리한 요인이 될 것으로 기대된다(Table 4).

현미배지를 이용한 신품종 동충하초 '도원홍초 2호' 자실체의 일반성분 함량의 경우 병재배에서 수확된 자실체의 수분함량은 약 86%였고, 영양성분 중에서 탄수화물은 7~8%, 단백질은 약 5%로 분석되었으며, 지방 및 회분의 함량은 미량으로 존재하였다. 두 품종 간에 일반성분 함량은 거의 유사한 것으로 조사되었다(Table 5).

신품종 동충하초 '도원홍초 2호' 자실체의 주된 무기성분은 K와 P가 가장 많았고, 그 다음으로 Ca, Mg, Na 순이었으며, 그 외에 Fe, Zn, Cu, Mn 등은 소량으로 분석되었다(Table 6). 중금속 성분이 검출되지 않았는데, 이는 식재료로서 양호함을 나타내는 것으로 판단된다. 이상에서 볼 수 있듯이 밀리타리스 동충하초 신품종은 자실체의 생육 및 수량성 뿐 아니라 코디세핀, 단백질, 그리고 무기성분 등이 풍부하여 농가의 새로운 소득원이 될 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 밀리타리스 동충하초의 교배형 유전자인 *MATI-1*과 *MATI-2* 두 종류에 특이적인 프라이머를 사용하여 multiplex PCR을 실시하였고, 그 결과 형성된 *MATI-1*과 *MATI-2*에 대한 233-bp와 191-bp에서 DNA 밴드를 통해 교배형 및 교배여부를 확인하였고 자실체 특성검정을 통해 품종특성이 우수한 새로운 동충하초 '도원홍초 2호'를 개발하였다. 신품종 '도원홍초 2호'의 자실체

는 곤봉형이고 밝은 주황색을 띠었으며, 코디세핀 함량은 0.33%였고 자좌의 굵기와 길이는 각각 3.5 mm와 7.1 cm였다. '도원홍초'와 비교할 때, 새로운 '도원홍초 2호'의 수량은 7%가 증수되었고 경도가 높은 특징을 보였다. 균사생장의 적온은 20~25°C였고 버섯 발생의 적온은 18~22°C였으며, 접종에서부터 자실체 발생까지의 기간은 49.7일이 소요되었다. 신품종 '도원홍초 2호'는 교배형 분자마커를 육종과정에 이용하여 효율성을 높였으며, 우수한 재배적 특성으로 동충하초 인공재배 및 산업적 생산에 기여할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구과제(과제번호 PJ010223052017) 지원사업에 의하여 수행된 연구결과입니다.

References

- Che ZM, Wang Y, Zhou LL, Tang CL. 2004. Study on the breeding of a new variety of *Cordyceps militaris* by mutated with ultraviolet radiation. *Food Ferment Ind* 30:35-38.
- Choi IY, Choi JS, Lee WH, Yu YJ, Jong GT, Ju IO, Choi YK. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor J Mycol* 27:243-248
- Choi YS, Kim HK, Lee BJ, Kim YG. 2009. Characteristics and breeding of a new variety *Cordyceps militaris* 'Yedang 3'. *J Mushroom Sci Pro* 7:182-186.
- Das SK, Masuda M, Sakurai A, Sakakibara M. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia* 81:961-968.
- De Julian-Ortiz JV, Galvez J, Munoz-Collado C, Garcia-Domenech R, Gimeno-Cardona C. 1999. Virtual combinatorial syntheses and computational screening of new potential anti-herpes compounds. *J Med Chem* 42:3308-3314.
- Du AL, Zhang X, Zhang HZ. 2010. A new high cordycepin *Cordyceps militaris* cultivar 'Haizhou 1'. *Acta Horti Sin*

- 37:1373-1374.
- Gao XH. 2008. Mating system of *Cordyceps militaris*. *Acta Edulis Fungi* 15:6-10.
- Gu DX, Zhang GR, Wang JH, Liu X. 2006. A review and prospect on the studies of *Cordyceps sinensis* (Berk) Sacc. *J Chin Inst Food Sci Technol* 6:137-141.
- Guo, HP, Yang ZM. 1999. Progress in research of pharmacological of *Cordyceps sinensis*. *Traditional Herbal Drugs* 30:231-233.
- Harada Y, Akiyama N, Yamamoto K, Shirota Y. 1995. Production of *Cordyceps militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory. *Trans Mycol Soc Japan* 36:67-72.
- Hawksworth DL, Rossman AY. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathol* 87:888-891.
- Holliday J, Cleaver M. 2008. Medicinal value of the caterpillar fungal species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (*Ascomycetes*): A review. *Int J Med Mushroom* 10:219-234.
- Huang L, Li QZ, Chen YY, Wang XF, Zhou, XW, 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. *Afr J Microbiol Res* 3:957-961.
- Isaka M, Kittakoop P, Kirtikara K, Hywel-Jones, NL, Thebtaranonth Y. 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc Chem Res* 38:813-823.
- Jeong JW, Jin CY, Kim MO, Lee JY, Choi YH, Lee JD. 2009. RAPD analysis and cordycepin concentration of hybridized *Cordyceps militaris* strains by mating. *Kor J Mycol* 37:86-90.
- Jiang Y, Yao YJ. 2003. Anamorphic fungi related to *Cordyceps sinensis*. *Mycosystema* 22:161-176.
- Jo WS, Nam BH, Oh SJ, Choi YJ, Kang EY, Hong SH, Lee SH, Jeong MH. 2008. Hepatic protective effect and single-dose toxicity study of water extract of *Cordyceps militaris* grown upon *Protaetia dreujtarsis*. *Korean. J Food Sci Technol*. 40:1-5.
- Kim MN, Oh SW, Lee DS, Ham SS. 2001. Antioxidative and antimutagenic effects of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Kor J. Postharvest Sci, Technol*. 8(1):109-117.
- Lee BJ, Lee MA, Kim YG, Lee KW, Choi YS, Lee BE, Song HY. 2013. Cultural characteristics of *Cordyceps militaris* strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *J Mushroom Sci Prod* 11:124-130.
- Lee BJ, Lee MA, Kim YG, Lee KW, Choi YS, Lee BE. 2015. Varietal characteristics of newly cross-bred *Cordyceps militaris* 'Downhongcho'. *J Mushroom Sci Prod* 13:151-156.
- Lee HM, Lee YJ, Park TS. 2004. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 33, 59-65.
- Liang ZQ. 2001. Current situation and ponderation of *Cordyceps* Fr. research and exploitation in China. *Acta Edulis Fungi* 8:53-62.
- Liu XM, Cheng YH, Tian D. 1999. Progress in the research of pharmacological *Cordyceps* in China. *Natl Product Res Development* 11:87-91.
- Ma T, Feng Y, Wu XP, Zhang YH, Ma Y, Wang ZL. 2007. Primary investigation of a host insect of *Cordyceps militaris* and analysis of its main ingredients. *For Res* 20:63-67.
- Mains EB. 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia* 50:169-222.
- Masuda M, Urabe E, Honda H, Sakurai A, Sakakibara M. 2007. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbiol Technol* 40:1199-1205.
- Oh SI, Lee MS. 2010. Functional activities of ethanol extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food & Nutr*. 23:15-22.
- Oh SW, Kim SH, Song HN, Han DS. 2003. Comparative chemical compositions of four kinds of Tochukaso. *Kor J Food Sci Technol* 35:15-22.
- Patel KJ, Ingallhalli RS. 2013. *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link – An important medicinal mushroom. *J Pharm Phytochem* 2:315-319.
- Sato H, Shimazu M. 2002. Stroma production of *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Appl Entomol Zool* 37:85-92.
- Shrestha B, Kim HK, Sung GH, Spatafora J, Sung JM. 2004. Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro. *Biotechnol Bioprocess Eng* 9(6):440-446.
- Stensrud Ø, Hywel-Jones NL, Schumacher T. 2005. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS rDNA sequence data confirm divergent lineage and paraphyly. *Mycol Res* 109:41-56.
- Sung JM, Choi YS, Lee HK, Kim SH, Kim YO, Sung GH. 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Kor J Mycol* 27:15-19.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Kuangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57:50-59.
- Sung JM, Choi YS, Shrestha B, Park YJ. 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Kor J Mycol* 30:6-10.
- Sung JM, Park YJ, Lee JO, Han SK, Lee WH, Choi SK, Shrestha B. 2006. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. *Kor J Mycol* 34:131-137.
- Tan Q, Cai T, Wel J, Feng A, Mao W, Bao D. 2011. Molecular identification of mating type genes in asexual spores of *Cordyceps militaris*. *ICMBMP7*.
- Turgeon BG. 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annu Rev Phytopathol* 36:115-137.
- Turgeon BG, Yoder OC. 2000. Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. *Fungal Genet Biol* 31:1-5.
- Wang L, Zhang WM, Hu B, Chen YQ, Qu LH. 2008. Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Diversity* 31:147-155.
- Wei HP, Xiao B, Hu KZ. 2004. Pharmaceutical values of *Cordyceps militaris*. *J Chin Med Mater* 27:215-217.
- Wong YY, Moon A, Duffin R, Barthelet-Barateig A, Meijer HA, Clemens MJ, De Moor CH. 2010. Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction. *J Biol Chem* 285:2610-2621.
- Wu YH, Zhu S, Ding YH, Lou H. 1996. Artificial cultivation conditions of *Cordyceps militaris* and the analysis of its fruitbody compositions. *Acta Edulis Fungi* 3:61-63.
- Wu FY, Yan H, Ma XA, Jia JQ, Zhang GZ, Guo XJ, Gui ZZ. 2011. Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. *Afr J Microbiol Res* 5:2743-2751.

- Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H. 1987. Icons of medical fungi from China. Science Press, Beijing, China. 60-85.
- Yokoyama E, Yamagishi K, Hara A. 2004. Development of a PCR-based mating-type assay for Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol Lett* 237(2):205-212.
- Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Son CG, Lee YW, Park SY, Cho CK. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharm Sinica* 25:657-665.
- Yu HM, Wang BS, Huang SC, Duh PD. 2006. Comparison of preventive effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *J Agric Food Chem* 54:3132-3138.
- Zhang G, Liang Y. 2013. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. *Arch Microbiol* 195:579-585.
- Zhou XW, Gong ZH, Su Y, Lin J, Tang KX. 2009. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. *J Pharm Pharmacol* 61:279-291.