

원형질체융합 기법을 이용한 산느타리 계통육성

권희민¹ · 이윤혜² · 김정환³ · 백일선³ · 강희완⁴ · 최종인^{5*}¹국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과²국립농업과학원 농업환경부 토양비료과³경기도농업기술원 친환경미생물연구소⁴한경대학교 생명공학부 원예생명공학전공^{5*}경기도농업기술원 환경농업연구과Breeding of new variety *Pleurotus pulmonarius* using protoplast fusion techniqueHee-Min Gwon¹, Yun-Hae Lee², Jeong-Han Kim³, Il-Sun Baek³, Hee-Wan Kang⁴, and Jong-In Choi^{5*}¹Fermented Processing Food Science Division, Department of Agrofood Resource, NIAS, RDA, Jeollabuk-do 55365, Korea²Soil and Fertilizer Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju, 55365, Korea³Eco-friendly Environment & Microorganism Research Institute, Gyenggi-Do Agricultural Research & Extension services, Gwangju, 12805, Korea⁴Department of Horticultural Biotechnology, Division of Biotechnology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea⁵Department of environmental agriculture research, Gyenggi-Do Agricultural Research & Extension services, Hwaseong 18388, Korea

ABSTRACT: In this study, monokaryons of “Heukari” (*Pleurotus ostreatus*) and “Hosan” (*Pleurotus pulmonarius*) were separated to remove the cell wall, and a cross-species protoplast fusion was developed through chemical treatment with polyethylene glycol. The protoplast-fused PF160306 and PF160313 strains have a culture period of 10 and 2 days shorter than that of the “Heuktari” and “Hosan” cultivars, respectively. Furthermore, the growth of the strains was faster than that of the existing cultivars. The yield was 135.9 g per bottle, which was approximately 8% higher than that of the commercially available “Hosan” cultivar; however, it was not statistically significant. A growth survey was conducted after treatment at five temperatures (15, 18, 21, 23, and 25°C). The growth of the strains accelerated with the increase in temperature. However, at 21°C, the yellow color of pileus was the brightest. Band pattern, assessed using URP Primer 7, was similar to that of the “Hosan” cultivar. The DPPH radical scavenging capacity and polyphenol content were 62.5% and 43.5 mg/mL, respectively, for “Sunjung” and 65.7% and 49.9 mg/mL, respectively, for PF160313. Furthermore, the antihypertensive activities of the “Sunjung” cultivar and PF160313 were similarly high at 74% and 75%, respectively. In conclusion, cross-species hybridization via the protoplast fusion technique can be used for obtaining primary data for mushroom breeding to develop new varieties. In addition, the protoplast fusion technique might aid in expanding the market for yellow mushrooms.

J. Mushrooms 2021 September, 19(3):166-175
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.3.166>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Hee-Min Gwon(Researcher), Yun-Hae Lee(Researcher), Jeong-Han Kim (Researcher), Il-Sun Baek (Researcher), Hee-Wan Kang (Professor), Jong-In Choi (Researcher)

*Corresponding author
 E-mail : cji190@gg.go.kr
 Tel : +82-31-229-5838

Received September 1, 2021
 Revised September 15, 2021
 Accepted September 25, 2021

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.

KEYWORDS: Bottle cultivation, Breeding, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus*, Protoplast fusion

서론

느타리 생산량은 균상재배에서 병재배 방식으로 변화되면서 1990년에 43,732ton에서 2003년에 80,323ton으로 1.8배 이상 급격히 증가하였다(Yoo *et al.*, 2016). 하지만 소비 시장의 한계로 생산량 증가는 2000년도에 가락동 농수산물에서 2 kg 중품 느타리 거래 가격이 10,480원에서 2018년 4,129원으로 급격한 가격 하락을 초래하였다(농림축산식품부, 특용작물생산실적 2018). 한편, 경기도는 국내 느타리 생산량의 71%를 생산하는 주 생산지역으로 농

가 소득 증진을 위하여 느타리 소비 확대 대책 마련이 시급한 실정이다. 1988년 원형질체 융합기법을 활용하여 사철느타리(*Pleurotus florida*)와 느타리(*Pleurotus ostreatus*)를 융합하여 육성한 '원형느타리 1호'(*Pleurotus spp.*)가 1990년대 균상 재배 농가에 대량 보급되었다(Yoo *et al.*, 1993). 느타리는 극성의 자웅이주성으로 단핵-단핵(mono-mono)과 이핵-단핵(di-mono)의 균사체를 접합하여 새로운 품종을 개발하고 있다(Kim *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2015). 단핵균사체를 이용한 육종 방법은 같은 종내 교배가 가능하지만, 종간의 유용한 유전자를 도입하기에는 불가능하다. 이에 유용한 유전자를 도입하기 위하여 원형질체를 이용한 체세포 잡종을 육성하려는 다양한 시도가 이루어졌다(Kiguchi and Yanagi, 1985; Peberdy, 1995; Cho and Park, 2014). Anne 등(1976)은 PEG solution을 이용하여 영양요구성 원형질체를 융합하였고 Dhitaphichit 등(2005)은 느타리와 분홍느타리(*Pleurotus djamor*)를 화학적 융합으로 모본보다 균사 성장 속도가 빠른 융합체를 획득하였다. 또, Djajanegara 등(2010)은 PEG solution을 이용하여 *Pleurotus florida*와 *Pleurotus cystidiosus* 간 저장성이 긴 품종을 육성하기 위해 원형질체 융합을 시도하였다. 이뿐만 아니라 Mallic과 Sikdar(2014)는 *Pleurotus florida*와 *Lentinula edodes* 간 PEG를 매개하여 원형질 융합체를 얻었지만 그 표현형은 *P. florida*와 유사하다고 보고하였다. Um 등(2010)은 일반느타리 13품종과 유색느타리 5종에 대해 생리활성 측정된 결과, 노랑느타리가 polyphenol 함량이 전 품종 대비 20 mg% 이상 높게 나타났고, DPPH IC₅₀ 값이 2.93 mg/mL로 항산화 활성이 우수하다고 하였다. 또한, 에탄올 추출물 1% 에서 신장암 세포에 대해 36.9%의 세포 억제율을 보였으며 ACE 저해 활성이 60.5%를 나타내었다. 에탄올 추출물 3% 처리에서 항혈전 활성은 혈액 속 섬유소 용해 효소인 plasmin과 동등한 활성을 보여 기능성 소재로의 활용 가능성이 매우 높다고 보고하였다. 하지만 섬유질이 많아 질긴 식감과 특유의 밀가루 냄새와 갓 부서짐이 쉬운 단점이 있어 대량 포장과 유통에는 어려움이 있다(Jang *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2006; 신비의 버섯 영양성분&기능성, 2011). 새로운 색깔의 농산물은 맛과 영양이 업그레이드되어 소비자의 구매욕구를 충족하고 있다. 이에 느타리도 트렌드에 맞춰 유색 느타리의 기능성 연구와 보급에 노력해왔다. 이에 본 시험에서는 원형질체 융합기법으로 느타리(*P. ostreatus*)와 산느타리(*P. pulmonarius*)를 종간 교배하여 기존 품종의 단점을 보완하고 다양한 형태로 육성된 산느타리 계통의 자실체 특성에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 균주는 경기도농업기술원 친환경미생

물연구소에서 보존 중인 '흑타리'(*P. ostreatus*), '호산'(*P. pulmonarius*)을 감자추출배지(PDA; BD, Sparks, MD)에 배양하였다. 배양된 균주는 톱밥+비트펄프+면실박(50:30:20, v/v)으로 구성된 생육용 배지에 접종하여 20°C 온도에서 30일 이상 배양하였다. 배양이 완료된 후 생육실로 옮겨 느타리 생육환경 조건에 맞추어 자실체를 발생시켰다.

단포자 분리 및 선발

각 모본의 자실체에서 얻은 포자에 멸균수를 첨가하여 10⁴~10⁶ 농도로 희석한 뒤 PDA 배지에서 25°C, 5일간 배양하였다. 독립적으로 발아한 포자를 선택하여 백금이를 이용하여 새로운 배지에 옮겨 배양하였다. 배양된 균사는 클램프의 존재 유무를 확인하고 클램프가 없는 단핵균사체를 선발하였다. 선발된 단핵균사체는 PDA 배지에 계대 배양하여 균사생장속도가 빠른 '흑타리'-13, '호산'-47 단포자를 선발하여 실험에 사용하였다.

원형질체 융합

1) 단핵 균사체 배양

PDA 배지(60 mm petri-dish)에 멸균한 셀로판지를 깔고 cork borer로 모본의 단핵 균사체를 직경 0.5 mm로 떼어내어 계대한 뒤 25°C에서 3~4일간 배양하였다. 이후 500 mL 삼각플라스크에 350 mL 액체 배지(1 L 기준으로 potato dextrose broth 200 g, glucose 20 g, dry yeast extract powder 3 g, peptone 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g)를 넣고 균질기(T-25, IKA, Germany)를 이용하여 균체를 잘게 분쇄하여 25°C에서 3일간 배양하였다.

2) 삼투압 조절 buffer 제조

0.2 M NaH₂PO₄와 NaHPO₄를 각각 87.7 mL, 12.3 mL를 혼합하고 pH 6.0으로 조절한 후 동량의 D.W.를 첨가하여 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0)를 만들었다. 그리고 삼투압 조절제로 0.6 M sorbitol을 첨가하였다.

3) 원형질체 나출

세포벽 분해 효소는 glucanex (15~20 mg·mL⁻¹)와 cellulase(10 mg·mL⁻¹)이며 균체 양에 따라 buffer 액을 조절하여 사용하였다. Powder 형태의 효소를 buffer에 충분히 녹인 후 0.45 μm syringe filter로 50 mL conical tube에 용액을 필터링하였다. 세포벽 분해 효소를 용해한 buffer에 균체를 넣고 2시간~2시간 30분 동안 110 rpm, 25°C에 두었다. 이후 c.f.g. 3,000~3,500 rpm, 15분, 4°C 조건으로 세포벽 분해 산물과 나출된 원형질체를 분리하였다. 10⁷ protoplast·mL⁻¹ 농도가 되도록 buffer 용액을 첨가하였다.

4) 원형질체 융합

10⁷으로 농도를 조절한 원형질체 동량을 25°C에서 10분 동안 혼합하였다. 혼합된 원형질체에 동량의 PEG solution (30% PEG 4000을 1 M Tris-HCl(pH 6.8)에 녹인 후 0.05 M

CaCl₂와 0.05 M glycine을 8:1:1의 비율로 혼합)을 첨가하여 25°C에서 10분 동안 정치하였다. 이후 PEG solution을 제거하기 위해 c.f.g. 1000 rpm, 8~10분간 원심분리후 상등액을 제거하였다. 원형질체의 삼투압 조절하기 위하여 버퍼 5 mL에 현탁하여 90 mm petri dish에 분주한 GMY 배지(1 L 기준, glucose 4 g, malt 10 g, yeast extract 4 g에 0.6 M sucrose를 삼투압조절을 위해 넣고 1.2% agar 첨가)에 200 µL씩 분주 후 low-melting agar(GMY 배지 조성 과 동일, agar만 low-melting agar 사용)로 그 위를 덮어주었다.

5) 원형질체 융합계통 분리 및 집중

약 2주간 지속적으로 관찰 후 균사체가 가장 빨리 재생되는 개체를 분리한 후 생육용 배지에 자실체 발생 여부를 확인하기 위해 집중하였다.

생육용 배지 제조 및 자실체 발생

모본 및 교배계통의 자실체 특성 조사를 위하여 내열성 플라스틱병(1,100 ml, 입구직경 75 mm)에 톱밥+비트펄프+면실박(50:30:20, v/v)으로 조성된 생육 배지를 입병하였다. 배지의 수분함량은 68%, 입병량은 680±20 g으로 넣은 후 고압 살균기로 121°C에서 90분간 살균하였다. 살균이 완료된 배지에 종균을 접종하고 온도 20°C±1, 습도 65±5%의 조건에서 균을 배양하였다. 배양 완료 후 온도 20°C, 습도 90~95%의 생육실로 옮겨 발이 및 생육 조건을 조절하여 자실체를 발생시켰다. 또한, 갖색 발현 최적 온도를 선정하기 위해 온도별 5 처리(15, 18, 21, 23, 25°C)하여 자실체 특성 조사를 실시하였다.

원형질체 융합계통의 재배적 특성 조사

1) 균사 생장 조사

PDA 배지(90 mm petri dish)에 cork borer로 원형질체 융합계통의 균사체를 직경 0.5 mm로 떼어내어 계대한 후 25°C에서 7일간 배양한 후 디지털 버니어캘리퍼스(CD-15CP, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 균사 생장 길이를 조사하였다.

2) 배양 및 생육 기간 조사

배양 일수는 종균 접종 이후부터 전체 병 수의 90% 이상이 배양 완료된 시점까지의 일수, 발이 일수는 균 굵기 이후부터 원기형성이 전체 병 수의 70% 이상 완료된 시점까지의 일수, 생육 일수는 발이일 이후로부터 전체 병 수의 70% 이상이 수확 가능한 시점까지의 일수로 정하여 측정하였다.

자실체 특성 조사

생육이 완료된 자실체의 특성 조사 항목으로는 갖의 색(Hunter), 갖직경, 대직경, 대길이, 수량을 조사하였다. 갖의 색도는 색차계(CR-400, Chroma meter, Japan)를 사용하여 Hunter 값으로 나타내었다. 갖직경, 대직경, 대길이

는 디지털 버니어캘리퍼스(CD-15CP, Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

항산화활성 분석

1) 항산화활성 전처리 및 추출

본 실험에 사용된 교배 모본과 원형질체 융합계통은 경기도농업기술원 친환경미생물연구소에서 재배한 생버섯을 수확한 후 동결 건조하여 분말화하였다. 동결 건조 시료 40배(w/v)의 증류수를 가하여 50°C 배양기에서 150 rpm으로 5시간 30분 동안 추출하였다. 이후 30분간 8000 rpm으로 원심분리 후 상층액을 거름종이(Whatman No.2, Advantec Toyo Co., Japan)로 필터링하여 사용하였다.

2) DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH radical scavenging activity는 Williams 등(1994)의 방법을 변형하여 측정하였다. 99.9% methanol에 녹인 0.05 mM DPPH radicals(D9132, Sigma) 3.9 mL에 물 추출물을 0.1 mL를 넣었다. 추출물은 10초간 잘 혼합한 후 빛을 차단한 상태에서 30분간 상온에서 반응시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정(A-5082, Tecan, Austria)하였다. Positive control은 ascorbic acid(A5960, Sigma)를 사용하였으며, DPPH radical 소거능은 시료 용액의 첨가량과 무첨가량 사이의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

3) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis colorimetric method 방법(Swain 등, 1959)에 따라 약간의 수정을 하여 측정하였다. 즉, 추출 시료 0.1 mL에 증류수 8.4 mL와 2 N Folin-Ciocalteu phenol reagent(F9252, Sigma)를 0.5 mL 첨가하고 잘 혼합한 뒤 3분간 암실에서 실온으로 방치하였다. 여기에 20% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 1시간 암실에서 실온으로 방치하였다. 이후 UV spectrophotometer(A-5082, Tecan, Austria)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 화합물은 gallic acid(G7384, Sigma)를 이용한 표준 곡선으로 함량을 구하였다.

항고혈압활성(ACE; Angiotensin I-converting enzyme) 분석

동결 건조된 자실체의 분말을 증류수에 30배 희석하여 30°C, 200 rpm, 24시간 추출하였다. 추출물은 5000 rpm, 15분 원심 분리하고 상층액을 거름종이(Whatman No.2, Advantec Toyo Co., Japan)와 0.45 µm syringe filter로 필터링 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 0.1M sodium tetraborate decahydrate와 0.3M NaCl를 혼합한 후 HCl로 pH 8.3으로 적정하여 제조하였다. Sodium borate buffer에 rabbit lung acetone powder(L0756, Sigma)를 넣고 아이스에서 8시간 이상 진탕하여 추출한 뒤 3000 rpm, 3분간 원심분리하여 상층액만 실험에 사용하였다. 버퍼 50 µL에 동결건조한 시료 1 mg 기준으로 녹여 실험에 사용하였다. 추출액 50 µL를 제조한 sodium borate buffer

100 μ L와 혼합 후 Hippuryl-His-Leu를 1 mL/150 μ L 기준으로 용해한 50 μ L 넣고 마지막으로 rabbit lung powder에서 추출한 ACE 용액 150 μ L를 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 250 μ L의 1N HCl로 반응을 정지시켰다. 이후 1 mL ethyl acetate를 첨가 후 30초간 진탕한 뒤 3,000 rpm, 15분간 원심분리하였다. 상등액을 회전 농축기에 30분간 처리한 후 sodium borate buffer를 1 mL 첨가하여 1시간 동안 진탕하여 buffer에 hippuric acid를 유리시켰다. 반응액에 유리된 hippuric acid의 양을 228 nm에서 흡광도를 측정하여 값을 산출하였다. 시료 무침가구를 대조구로 하여 저해율(%)을 구하였다.

베타글루칸 분석

버섯 수확 후 즉시 동결 건조하여 분말화하여 실험에 사용하였다. 베타글루칸 함량은 megazyme kit(Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure K-YBGL)을 이용하여 분석하였다. Total glucan 값은 $\Delta E(\text{reaction absorbance-blank absorbance}) \times F(100/D\text{-absorbance of glucose standard})/\text{sample weight} \times 90$ 으로 계산하였고 α -glucan 값은 $\Delta E \times F/W \times 9.27$ 으로 계산하였다. 총 β -glucan(% w/w) 값은 total glucan에서 α -glucan을 뺀 값으로 계산하였다.

1) Total glucan 측정(α -glucan+ β -glucan)

분쇄된 시료를 90 mg씩 tube에 담고, 2 mL sulphuric acid(12M, 72% w/w)를 넣고 ice-water bath에서 2시간 두고 간헐적으로 vortex mixer를 이용하여 섞어주었다. Test tube에 4 mL 증류수를 넣고 10초간 진탕한 후 6 mL 증류수를 넣어 주었다. 10초간 추가적으로 진탕한 후 끓는 물에 2시간 진탕하였다. Tube를 꺼내어 충분히 식혀준 다음 10 M KOH 6 mL를 넣고 혼합 후 100 mL 부피플라스크에 옮겨 넣고 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 볼륨을 맞추었다. 이후 centrifuge 용기에 옮겨 10분간 4000 rpm에서 원심분리를 한 후 상층액만 측정에 사용하였다. 분리된 상층액을 새로운 test tube에 0.1 mL 넣고 exo-1,3- β -glucanase(20 U/mL)와 β -glucosidase(4 U/mL)를 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 혼합한 용액을 0.1 mL 첨가하여 vortex mixer로 섞어 준 뒤 60분 동안 40°C water bath에서 진탕하였다. Test tube에 3 mL glucose oxidase/peroxidase mixture(GOPOD)를 넣고 다시 20분 동안 40°C water bath에서 진탕 후 spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) α -glucan 측정(phytoglycogen 및 starch)

분쇄된 시료를 100 mg씩 tube에 담고, 2 M KOH 2 mL를 넣고 뚜껑을 닫은 후 20분 동안 ice bath에 넣고 5분 간격으로 vortex mixer를 이용하여 혼합하였다. 1.2 M sodium acetate buffer(pH 3.8) 8 mL를 넣고 invertase (500 U/mL)가 첨가된 amyloglucosidase(1630 U/mL)를

0.2 mL 넣고 다시 30분간 40°C water bath에서 진탕하였다. 4000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액 0.1 mL을 새로운 test tube에 넣고 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 0.1 mL, GOPOD 3 mL 넣고 20분 동안 40°C water bath에서 진탕 후 spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

URP-PCR 분석

1) DNA extract

7일간 25°C에서 배양 후 셀로판지 위로 자란 균사를 1.5 mL microtube에 0.5 g씩 긁어모아 분석에 사용하였다. BioFact 제품을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균사를 pestle로 짓이긴 후 cell lysis solution 300 μ L 넣고 그라인더를 이용하여 강하게 갈아준 뒤 2 μ L proteinase K (25 mg/mL)를 넣고 짧게 vortexing 한 뒤 55°C 1시간 동안 반응시켰다. 이후 protein precipitation solution을 130 μ L 첨가 후 강하게 vortexing 한 뒤 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 Isopropanol 300 μ L이 들어 있는 micro tube에 옮긴 뒤 1분 동안 inverting 하였다. 다시 위의 조건으로 원심분리 후 상등액을 버리고 70% 300 μ L 에탄올로 세척 하여 다시 원심분리하였다. 상등액을 버리고 상온에서 충분히 건조 후 DNA hydration solution을 50 μ L 첨가 후 짧게 vortexing 하였다. 2 μ L Rnase A를 혼합 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1.2% agarose gel에 100V, 30분간 전기영동 하여 DNA 밴드를 확인하였다. DNA 농도를 UV spectro photometer를 이용하여 260 nm, 280 nm 파장의 값으로 농도를 측정하여 PCR에 사용하였다.

2) PCR 조건

PCR 조건은 95°C에서 3분간 preheating 시킨 다음, 95°C에서 20초간 denaturation, 50.4°C에서 10초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 1 cycle로 하여 총 35 cycle 반응을 시킨 후 72°C에서 5분간 post extension 후 4°C로 유지하였다. PCR 산물은 1.2% Agarose gel에서 100V로 37분간 전개한 후 GelGreen로 10분간 염색하여 UV Universal HoodIII(Lab, Bio-Rad, Italy)에서 밴드를 관찰하였다.

3) URP primer

실험에 사용한 URP Primer의 염기서열은 아래의 Table 1과 같다(Kim *et al.*, 2014).

Table 1. Sequences of URP primer used in this study.

Primer number	Sequences
URP7	5'-GGTGAACAGTGAGATGAACC-3'

Table 2. The colony diameter and mycelial density of protoplast fusants and two parents.

Strain name	Mycelial growth length (cm)	Mycelial density (Index)
PF160306	4.5 b ^x	+++
PF160313	4.8 b	++
‘Hosan’(<i>P. pulmonarius</i>)	5.8 a	++
‘Heuktari’(<i>P. ostreatus</i>)	4.9 b	++

^xDifferent letters within a column represent a significant difference ($p < 0.05$) by DMRT.

통계처리

본 연구에서는 3회 이상 반복 시행한 결과를 mean±SD 로 나타내었으며, 통계는 SAS (Statistical Analysis system, North Carolina, USA) 를 이용하였다. 측정치 비교는 $p < 0.05$ 의 유의수준에서 Duncan’s multiple range test로 평균값들에 대한 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

원형질체 융합계통 육성과 자실체 형태

형태적 특성 개량을 위해 ‘흑타리’ 단핵과 ‘호산’ 단핵의 원형질체 융합을 실시하여 새로운 계통을 육성하였다. Low-melting agar로 overlay한 플레이트를 25°C에서 배양하여 2주간 균사 생장을 관찰하였다. 2핵 균사는 단핵 균사보다 균사 생장 속도가 빠른 것으로 알려져 (Toyomatsu and Mori, 1987) 관찰 기간 동안 가장 빨리 재생되는 개체를 다른 균사와 접합하지 않게 멸균된 이쑤시개를 이용하여 계통 분리하였고, 새로운 배지에 계대하여 생육용 배지에 접종하였다. 2핵 균사는 핵 교환으로 클램프를 형성하고 자실체를 형성하며 이는 단핵 균사와 구별되는 가장 큰 특징이다. 생육용 배지에서 접종한 499 계통 중 발생한 자실체는 총 18 계통으로 자실체 발생률은 약 3.6%였다. 이 중 ‘흑타리’의 갓 모양과 같이 둥글며 갓색이 흑색~갈색 계통이 3 계통, ‘호산’과 같이 갓이 주름진 형태의 계통이 15 계통이었다. 갓이 주름진 계통 중에서도 갓색이 갈색 계통이 7 계통, 노란색 계통이 8 계통

이었다(Data not shown). 형태적 특성 개선을 위한 목적으로 실시한 본 실험에서 갓색이 노란색 계통과 모본의 자실체 사진은 Fig. 1과 같다. 갓이 둥근 ‘흑타리’와 달리 육성된 계통은 갓의 가장자리가 주름진 ‘호산’과 비슷한 형태였으나, 갓의 색이 갈색인 ‘호산’에 비해 밝은 노란색을 띄었다. 갓 주름의 정도는 계통에 따라 다소 차이를 보였다. 동일한 조합의 융합주 이지만 유전형질이 다르게 분리된 Yoo 등(1993)의 결과와도 유사하였다. 이에 본 연구에서는 향후 유색느타리 시장성을 고려하여 갓색이 다소 선명한 PF160306과 PF160313 계통을 선발하여 그 특성을 조사하였다.

원형질체 융합계통 균사 특성

균사 직경으로 균사 생장 길이를 나타냈고, 균사의 밀도가 높아 배지가 보이지 않는 정도를 ‘+++’으로, 배양된 균사 아래로 배지가 살짝 비치는 정도를 ‘++’로 표기하여 Table 2와 같이 나타내었다. 원형질체 융합계통 갓의 형태는 ‘호산’과 유사하나 균사 직경은 다소 짧았으며, 오히려 ‘흑타리’와 비슷하였다. 균사 밀도는 PF160306 계통이 높았으며, 나머지는 중간 수준이었다.

원형질체 융합계통 재배 및 자실체 형태적 특성

PF160306과 PF160313의 배양일수는 25일, 발이일수 3일, 생육일수 5일이 소요되었다. ‘호산’의 재배기간은 37일로 배양일수 27일, 발이일수 4일, 생육일수 6일이 소요되었다. ‘흑타리’의 재배기간은 48일로 배양일수 35일, 발

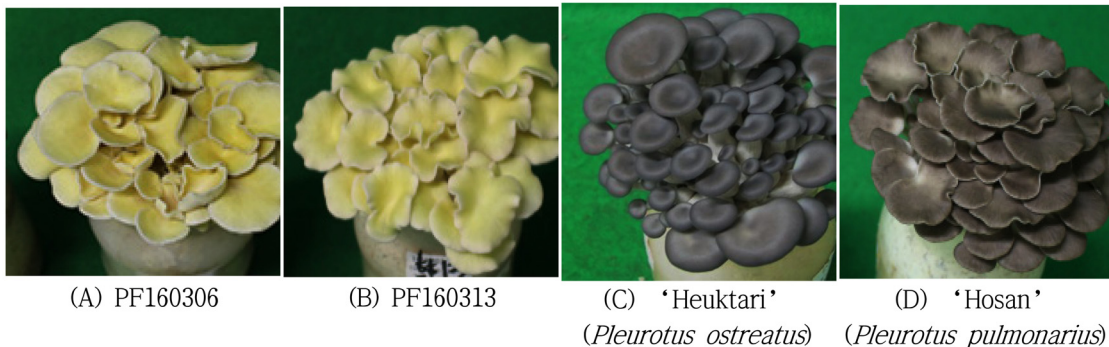


Fig. 1. Fruiting body of protoplast fusants and parents. (A), (B) : Somatic hybrids of light yellow colored, (C), (D) : Two parents used in this study.

Table 3. Cultivation characteristics of protoplast fusants and parents.

Strain name	Spawn run period (days)	Primordial development period (days)	Fruitbody development period (days)
PF160306	25	3	5
PF160313	25	3	5
'Hosan' (<i>P. pulmonarius</i>)	27	4	6
'Heuktari' (<i>P. ostreatus</i>)	35	5	8

Table 4. Morphological characteristics of protoplast fusants.

Strain name	Diameter (mm)		Stipe length (mm)	Pileus color		
	pileus	stipe		L	a	b
PF160306	36	8	54	72.84	-0.55	26.57
PF160313	37	8	54	74.63	-1.96	25.68
'Hosan' (<i>P. pulmonarius</i>)	31	6	58	35.17	4.79	8.85

L : Brightness[dark(0~50), light(51~100)]

a : Redness[red(positive number), green(negative number)]

b : Yellowness[yellow(positive number), blue(negative number)]

Table 5. Investigation of yield by protoplast fusants.

Strain name	1st	2nd	3rd	CV(%)	Average (g/bottle)	Yield index (%)
PF160306	141.3	137.2	129.2	4.5	135.9 a ^x	107.9
PF160313	107.7	109.0	120.1	6.0	112.2 b	89.1
'Hosan' (<i>P. pulmonarius</i>)	132.8	125.8	119.4	5.3	126.0 a	100.0

^xDifferent letters within a column represent a significant difference ($p < 0.05$) by DMRT.

이일수 5일, 생육일수 8일이 소요되었다. PF160306과 PF160313 융합계통의 배양기간은 모본인 '호산'에 비하여 5일, '흑타리'에 비하여 15일 정도 단축되었다. 또한 발이 및 생육일수는 '흑타리'와 '호산'에 비하여 각각 3일, 1일 단축되었다(Table 3).

원형질체 융합계통인 PF160306의 자실체는 갓크기 36 mm, 대굵기 8 mm, 대길이 54 mm를 나타내었다. PF160313 계통은 갓크기 37 mm, 대굵기 8 mm, 대길이 54 mm를 나타내었다. 육성계통은 모본에 비하여 갓이 크고 대는 굵고 짧은편이었다. 갓색은 갈색의 모본인 '호산'에 비해 PF160306, PF160313 계통은 모두 노란색(L*값 70 이상)을 나타내었다(Table 4). PF160306 계통의 수량은 135 g으로 PF160313 계통보다 24 g 정도 높아 유의차가 있었으며, 대조품종인 '호산'에 비하여 9 g 정도 높았으나 유의차는 없었다.

생육온도에 따른 원형질체 융합계통 재배기간 및 자실체 특성 변화

생육온도 차이(15, 18, 21, 23, 25°C)에 따른 재배기간 및 자실체의 특성을 조사하였다(Table 6). 생육온도가 23°C 이상으로 증가할수록 발이기간 및 생육기간은 감소하였지만, 갓색이 탈색되고 생육 중 이취 발생 등의 문제가 발생하였다. 갓색도는 생육온도 21°C에서 선명한 노란

Table 6. Cultivation period of protoplast fusants grown at different temperature.

Treatment (°C)	Primordial development period (days)	Fruitbody development period (days)
15	6	9
18	4	6
21	3	5
23	2	4.5
25	2	4.5

색을 나타내었으나, 생육온도 18°C 이하에서는 갓 가장자리 부분에서 백색을 나타내는 현상을 보였다. 노란색의 갓색을 유지하기 위해서는 생육온도 21°C에서 재배하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다(Fig. 2). 자실체의 갓색 발현은 생육온도가 높을수록 백색에 가까게 변하는 것은 Jhune 등(2006)의 연구 결과와 동일하나 저온으로 갈수록 갓색이 짙어진다는 결과와는 상반되는 결과를 나타내었다. '원형느타리 1호'의 백색 돌연변이체로부터 단포자를 분리하여 F1을 육성하였을 때 후대유전양상은 모두 백색을 나타내어 색소 변이가 후대(F1)으로 유전되는 것으로 추정하였으나(Lee 등, 강원도농업기술원 시험연구보고서, 2008), 본 연구에 결과에서는 갓색이 갈색과 노란색으로

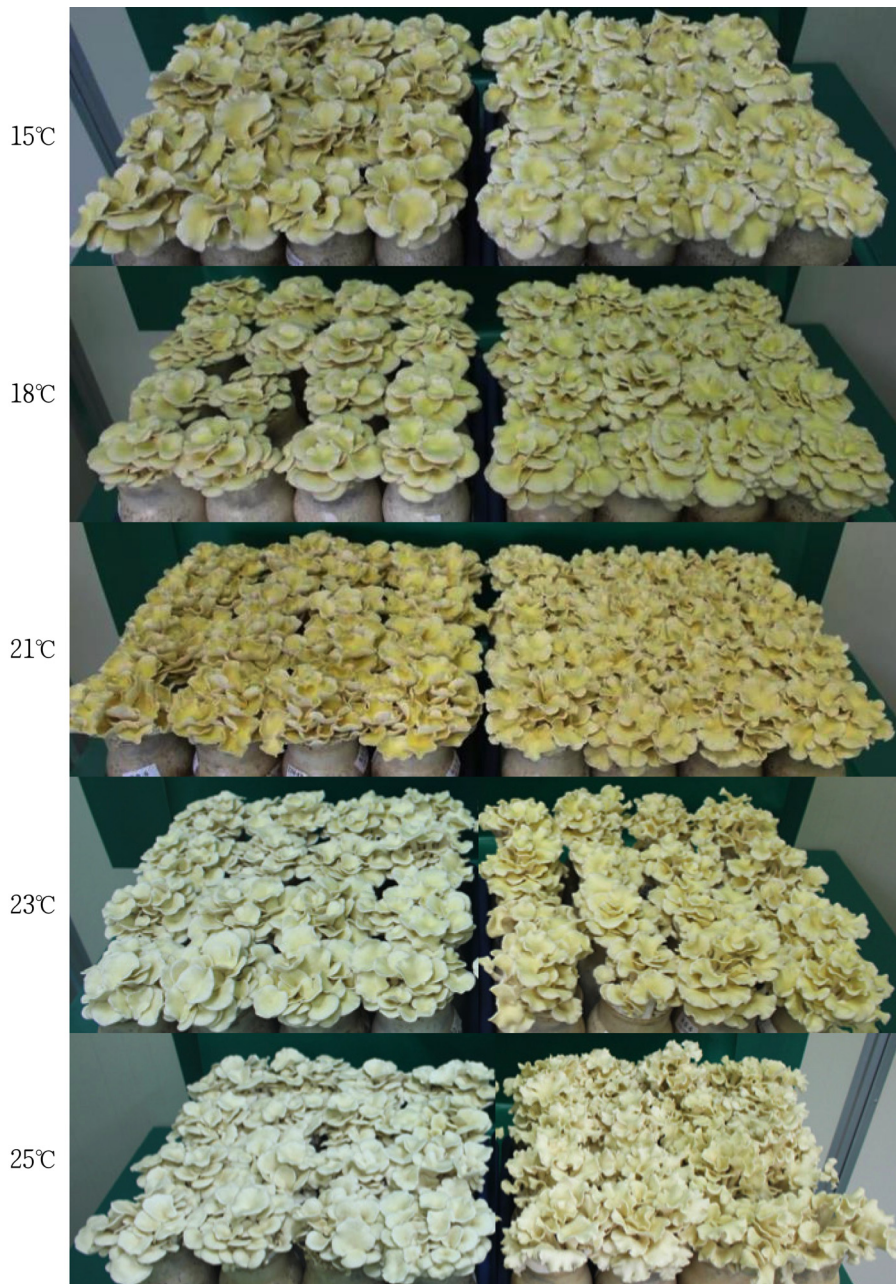


Fig. 2. Color change of pileus by growth temperature. (left side : PF160306, right side : PF160313)

다양하게 발현됨으로써 색소 돌연변이에 의한 갖색의 발현된 것이 아니라 원형질체 융합으로 세포질 융합에 의하여 생성된 새로운 계통임을 알 수 있었다.

융합 확인을 위한 원형질체 융합계통 URP-PCR 분석과 대선 형성

원형질체 융합에 사용한 단핵균사와 원형질체 융합계통을 URP primer 7을 이용하여 PCR 밴드 패턴을 확인하였다. 원형질체 융합계통의 밴드 패턴은 ‘호산’ 단핵균사와 유사한 패턴을 나타내었다. 하지만 두 모본과 비교하였을 때, 원형질체 융합계통은 550bp 위치에서 ‘호산’ 단핵균

사에서 나타나지 않는 밴드가 생성된 것을 확인하였다 (Fig 3). 또한 ‘흑타리’ 단핵균사에서 동일한 위치에 밴드가 있었다. 원형질체 융합으로 인해 두 단핵균사의 DNA 밴드가 원형질체 융합계통에서 모두 나타나지 않는 이유는 유전자 재조합에 의해 소실되거나 중복되는 부분이 발생하는 것으로 사료된다. Kang 등(2012)은 UPR primer로 느타리 (*P. ostreatus*) 10 품종, 사철느타리 (*P. florida*) 2 품종, 여름느타리 (*Pleurotus sajor-caju*) 2 품종에서 품종 특이 URP-PCR 다형성을 보여줌으로써 품종 구분을 위한 유용 PCR 마커로 사용할 수 있다고 하였다.

Jeon 등(2018)은 품종간 균사 대치 배양 후 대선을 형성

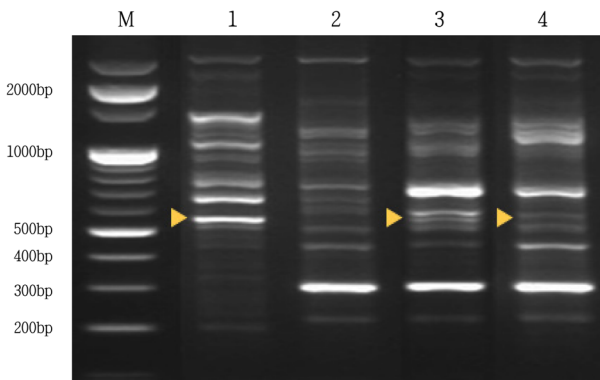


Fig. 3. URP-PCR polymorphism parents and fusants.
Marker size : 100bp, 1: monokaryon of 13 from ‘Heuktari’,
2; monokaryon of 47 from ‘Hosan’, 3; PF160306, 4; PF160313

할 경우 다른 품종임을 알 수 있다고 하였다. 이에 원형질체 융합계통과 모본을 대치 배양하여 대선 형성 유무를 확인하였다. 원형질체 융합계통은 각 모본과 대치 배양시 모두 대선을 형성하였다(Fig. 4). 이상의 결과로 원형질체 융합계통은 ‘흑타리’와 ‘호산’과 구별되는 다른 품종임을 확인할 수 있었다.

항산화 활성 분석

1) DPPH radical 소거능 측정

노랑느타리는 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있

는데, 본 실험에서 원형질체 융합계통 PF160313 계통의 DPPH radical 소거능은 65.7%로 노랑느타리 ‘순정’ (62.5%)과 비교하였을 때 유의하게 높았다. 모본인 ‘호산’은 43.1%, ‘흑타리’는 26.5%로 갖색이 노란 계통들이 비해 다소 낮은 radical 소거능을 보였다(Table 7). 노랑느타리는 추출 용매를 물, 에탄올 30%, 60% 와 90% 추출하여 농도별로 DPPH를 측정하였을 때 각 추출물에서 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가하였다. 특히 에탄올 추출물보다 물 추출물에서 31.15~70.22%로 radical 소거 능력이 유의적으로 높았으며 이는 본 연구의 결과와 유사하였다(Lee *et al.*, 2014).

2) 총폴리페놀 측정

물 추출물의 총폴리페놀 함량은 원형질체 융합계통인 PF160313과 PF160306 계통이 각각 49.9, 48.7 mg/mL로 유의하게 높았다. ‘순정’ 품종은 43.5, ‘호산’ 품종이 37.3, ‘흑타리’ 품종이 33.5 mg/mL 순으로 함유하고 있었다 (Table 7). Cho 등(2014)은 느타리 14계통에 대하여 추출 용매별 총폴리페놀 함량을 분석하였다. 총폴리페놀 함량은 70% 에탄올 추출에서 10.3 mg/g, 80% 메탄올 추출에서 9.8 mg/g, 열수 추출에서 10.6 mg/mL 라고 보고하였다. 모든 추출물에서 대부분 8~10 mg/g의 함량을 함유하고 있었는데, ‘흑타리’는 33.5 mg/mL로 높은 함량을 나타내었다.

항고혈압활성 측정

원형질체 융합 2 계통과 3 품종의 ACE 저해 활성을 검

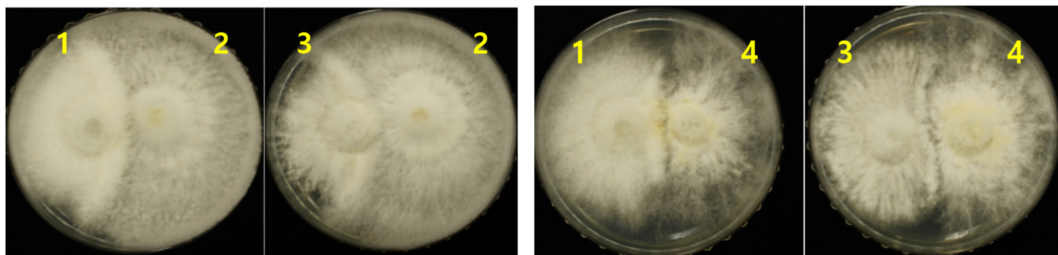


Fig. 4. Dual culture of parents and fusants.
1 : PF160306, 2 : ‘Heuktari’, 3 : PF160306, 4: ‘Hosan’

Table 7. Functional substance contents of water extract from fruiting bodies of fusants and others.

Strain name	DPPH ^x (%)	Total polyphenol (mg/mL)	ACE activity ^y (%)	β-glucan (mg/mL)
PF160306	55.4±0.32 c ^z	48.7±0.04 b	69±0.92 b	13.8±0.56 c
PF160313	65.7±1.81 a	49.9±0.02 a	75±0.92 a	9.2±0.33 d
‘Hosan’ (<i>P. pulmonarius</i>)	43.1±0.33 d	37.3±0.02 d	63±1.31 c	16.3±0.33 b
‘Heuktari’ (<i>P. ostreatus</i>)	26.5±0.56 e	33.5±0.04 e	46±1.65 d	38.1±0.81 a
‘Sunjung’ (<i>P. cornucopiae</i>)	62.5±0.11 b	43.5±0.02 c	74±2.02 a	14.5±0.24 c

^x1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity.

^yAngiotensin I-converting enzyme inhibitory activity.

^zDifferent letters within a column represent a significant difference (p<0.05) by DMRT.

토한 결과는 Table 7과 같다. Kim 등(경기도농업기술원 시험연구보고서, 2011)은 본태성고혈압쥐를 이용한 동물 실험에서 노랑느타리 추출물(600 mg)과 상업적 항고혈압제인 Captopril 100 mg이 혈압을 낮추는 효과가 있다고 보고하였다. 이처럼 항고혈압활성이 높은 노랑느타리(74.2%)와 비교하였을 때, PF160313 계통은 75%로 비슷한 활성을 보여 ACE 저해활성이 유의적으로 높은 것을 알 수 있었다. Um 등(2010)의 실험에서도 18품종의 자실체를 에탄올에 추출한 뒤 항고혈압활성을 측정한 결과, 노랑느타리가 60.5%로 가장 높았으며 ‘수한’ 품종이 7.2%로 가장 낮은 저해율은 나타내었다. 본 실험에서도 항고혈압 활성이 갖색이 노란 계통에서 높게 나타내는 유사한 결과를 보였다.

베타글루칸 분석

베타글루칸은 효모, 버섯, 보리와 귀리에 다량 함유된 다당류로 포도당 연결 구조와 효능은 유래된 품목에 따라 다소 차이가 있다고 보고하였다(Park 등, 2003). 자실체의 베타글루칸 함량은 ‘흑타리’ 품종이 38.1 mg/mL로 가장 높았고, 다음으로 ‘호산’ 16.3, ‘순정’ 14.5, PF160306 계통 13.8, PF160313 계통 9.2 mg/mL 순으로 유의적인 차이를 보였다(Table 7). Um 등(2010)의 실험에서는 노랑느타리가 37.7%로 가장 높았으며, 느타리(*P. ostreatus*) 품종들은 27.9~19.7%를 나타내었다. 본 실험 결과에서도 품종 및 계통에 따라 베타글루칸 함량 차이가 발생되었다.

적 요

원형질체 융합 기술은 종·속간 유전적 한계를 넘어 육종과 그 소재로 활용하고자 목적이 있다. 본 연구에서는 ‘흑타리’(*P. ostreatus*)와 ‘호산’(*P. pulmonarius*)의 단핵균사를 이용하여 원형질체를 나출하고 나출된 원형질체를 융합하여 중간 교배 계통을 육성하였다. 육성계통의 균사생장속도는 ‘호산’, ‘흑타리’, PF160313, PF160306 계통 순으로 빠른 편이었다. 균사 밀도는 PF160306 계통이 가장 높았고, 나머지는 중간 수준의 밀도를 나타내었다. 원형질체 융합계통인 PF160306과 PF160313 계통은 ‘흑타리’ 품종보다 배양 기간이 10일, ‘호산’ 품종보다 2일 단축되었다. 자실체 성장 기간은 ‘흑타리’와 ‘호산’에 비하여 각각 3일, 1일 단축되었다. PF160306 계통의 생산량은 135.9 g/병으로 ‘호산’에 비하여 높았으나 통계적으로 유의차가 없었다. 자실체 발생기간은 15°C에서 9일, 25°C에서 4.5일로 온도가 높아짐에 빨라졌다. 자실체의 갖색은 21°C 노란색이 가장 선명하게 발현되었다. URP primer 7을 사용하여 PCR 밴드 패턴을 비교하였을 때, 전체적으로 ‘호산’ 품종과 유사하였다. DPPH radical 소거능과 폴리페놀 함량에 있어 ‘순정’은 각각 62.5%, 43.5 mg/mL였으며, PF160313 계통은 각각 65.7%, 49.9 mg/mL를 나타내어 계통간 유의

차가 있었다. ACE 활성은 ‘순정’ 74%, PF160313 계통 75%로 유사한 수준이었다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 Golden Seed 프로젝트 사업의 지원을 받아 연구되었으며(213007-05-5-SB120) 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Anne J and Peberdy JE. 1976. Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J Gen Microbiol* 92: 413-417.
- Cho JH, Park HS, Han JG, Lee GH, Sung GH and Jhune CS. 2014. Comparative analysis of anti-oxidant effects and polyphenol contents of the fruiting bodies in oyster mushrooms. *J Mushrooms* 12: 311-315.
- Cho KS and Park TH. 2014. Potato breeding via protoplast fusion. *J Plant Biotechnol* 41:65-72.
- Dhitaphichit P and Pornsuriya C. 2005. Protoplast fusion between *Pleurotus ostreatus* and *P. djamora*. *Songklanakarin. J Sci Technol* 27: 975-982.
- Djajanegara I and Masduki A. 2010. Protoplast fusion between white and brown oyster mushrooms. *Indones J Agric Sci* 11: 16-23.
- Jang IJ, Chung KC and Chang HY. 2005. Excellent strain selection and optimal mycelial growth condition of *Pleurotus cornucopiae*. *The Korean Society of Mushroom Science* 3: 40-44.
- Jeon D H, Lee YH, Choi JI, Gwon HM and Chi JH. 2018. Characteristics of a new *Grifola frondosa* Cultivar “Daebak” with stable pinheading and high yield. *J Mushrooms* 16: 203-207.
- Jhune CS, Kong WS, Yoo YB, Jang KY, Paik SB and Chun SC. 2006. Initiation and growth of fruitbody of oyster mushroom as affected by cultivation temperature. *J Mushrooms* 4: 33-38.
- Kang HW. 2012. Genetic diversity analysis of fungal species by universal rice primer(URP)-PCR. *Kor J Mycol* 40: 78-85.
- Kiguchi T and Yanagi SO. 1985. Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in *Coprinus macrorrhizus* by protoplast fusion of auxotrophic mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 121-127.
- Kim EJ, Shin PG, Jang GY, Kong WS, Han YS and Yoo YB. 2014. Nuclear DNA inheritance of intra-specific somatic hybrids by di-mono cross in *Pleurotus ostreatus* based on URP-PCR analysis. *J Mushrooms* 12: 96-106.
- Lee HJ, Do JR, Chung MY and Kim HK. 2014. Antioxidant activities of *Pleurotus cornucopiae* extracts by extraction conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 836-841.
- Mallick P and Sikdar SR. 2014. Production and molecular characterization of somatic hybrids between *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. *World J Microbiol Biotechnol* 30:2283-2293.
- Oh MJ, Kim EJ, Jung JH, Shin PG, Kim ES, Oh YL, Jang KY, Kong WS and Yoo YB. 2015. Characterization of a new commercial strain ‘Mongdol’ by intra-specific hyphal

- anastomosis in *Pleurotus ostratus*. *J Mushrooms* 13: 212-216.
- Park JH, Kang MS, Kim HI, Chung BH, Lee KH and Moon WK. 2003. Study on immuno-stimulating activity of β -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Korean J Food Sci Technol* 35: 488-492.
- Peberdy JE. 1995. Fungal Protoplasts. *Genetics and Biotechnology*. K. Ulrich(Ed), p.49-60.
- Swain T and Hillis WE. 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica* I quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10: 63-68.
- Toyomatsu T and Mori KI. 1987. Intra- and inter-specific protoplast fusion between some *Pleurotus* species. *Agric Biol Chem* 51: 935-937.
- Um SN, Jin GE, Park KW, Yu YB and Park KM. 2010. Physiological Activity and Nutritional Composition of *Pleurotus* Species. *Korean J Food Sci Technol* 42: 90-96.
- Williams WB, Cuvelier ME and Berset C. 1994. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u-Technol* 28: 25-30.
- Yoo YB, You CH and Cha DY. 1993. Strain improvement of the genus *Pleurotus* by protoplast fusion. *Kor J Mycol* 21: 200-211.
- Yoo YB, Kong WS, Jang KY, Kim IY, Oh SJ and Jhune CS. 2006. Characterization of a new commercial strain 'Gumbit'. *J Mushrooms* 4: 83-87.
- Yoo YB, Oh MJ, Oh YL, Shin PG, Jang GY and Kong WS. 2016. Development trend of the mushroom industry. *J Mushrooms* 14: 142-154.