

형태적 특성과 PCR다형성 분석에 의한 국내 큰느타리버섯 계통의 유전적 다양성 분석

전선정^{1,2} · 김종근^{1,5} · 김금희² · 지정현³ · 서건식⁴, 강희완^{1,6*}

¹한경대학교 생물환경정보통신전문대학원, ²머쉬하트 영농조합, ³경기도 농업기술원,
⁴한국농업대학, ⁵(주)제이케이바이오테크, ⁶한경대학교 유전공학연구소

Genetic Diversity of *Pleurotus eringii* Strains in Korea Based on Morphological Characteristics and PCR Polymorphism

Sun-Jeong Jeon^{1,2}, Jong-Kun Kim^{1,5}, Gum-Hee Kim², Jeong-Hyun Chi³, Geon-Sik Seo⁴ and Hee-Wan Kang^{1,6*}

¹Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

²Mushheart Corp. 188-6 Beopjeon, Miyang, Ansong 456-840, Korea

³Gyonggi Province ARES, 464-870, Korea

⁴Korea National Agricultural College, Bongdam, Hwasung, Kyonggi 445-893, Korea

⁵JK Biotech. Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

⁶Genomic Informatics Center, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

(Received September 16, 2008. Accepted February 18, 2009)

ABSTRACT: This study was conducted to investigate genetic characteristics of 25 *Pleurotus eringii* strains that have been released in Korea based on cultural, morphological features and PCR fingerprints. Strains PER-007 and PER-012 showed distinct cultural characteristics in growth rate, morphological characteristics of mycelial colony and fruiting bodies when compared to those of other strains. Strain PER-007 did not form primordium initiation in sawdust medium and PER-012 also showed different phenotypes on fruiting bodies. Eleven URP primers were used to detect PCR polymorphic bands in *P. eringii* strains. Primers URP1F, URP2R, URP2F, URP4R, URP6R, URP9F and URP17R were selected as useful primers for amplifying PCR polymorphic bands in *P. eringii* strains. The genetic similarity index was calculated by using PCR polymorphic bands amplified by eight URP primers among the 25 strains. The *P. eringii* strains were grouped by four distinct clusters on the UPGMA analysis. The genetic similarity values ranged from 100% to 76% were observed in three major groups, suggesting close genetic relatedness of them. Exceptionally, PER-007 and PER-017 were involved in outgroup.

KEYWORDS: Cultural and morphological characteristics, genetic relationship, *Pleurotus eringii* strains, polymorphic bands, URP-PCR

큰 느타리버섯(*Pleurotus eringii*)은 분류학적으로 주름버섯목(Agaricales), 느타리버섯과(Pleurotaceae), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속한다(Rajarathnam and Bano, 1987). 큰느타리버섯은 주로 유럽남부, 중앙아시아, 북아프리카, 지중해 연안 및 러시아 남부 등 아열대지방의 건조성 초원지대에 자생하고 있으며, 산형과식물(*Eryngium campestre*), 분과식물(*Laserpitium latifolium*), 부처꽃과식물(Ammiaceae) 종과 같은 초본식물의 뿌리에 기생하는 특성이 있다(Zevakis et al, 2001).

우리나라에 큰 느타리버섯이 처음 소개된 것은 1995년 일본의 사이신(サイシン)중균개발연구소에서 “에링기”(エリソギ)라는 이름으로 재배보급한 이래 국내에 도입되었고(이 등, 2003), 국내에서도 품종이 개발되어 1997년 큰 느타리

1호, 2001년 큰느타리 3호가 품종으로 등록되었다. 큰 느타리버섯은 그 육질이 치밀하고 그 씹는 맛이 자연송이와 비슷하고, 일반 느타리버섯에 비해 대가 굵고 길며 저장성도 좋아 대중적 인기가 높은 버섯으로 1997년경부터 인공재배(강 등, 2000; 이 등, 2003)를 시작하였으며 “새송이”라는 상품명으로 시판되어 그 인기가 급증하였고 고소득 작목으로 농가소득 증대에 큰 역할을 하였다. 그러나, 생산농가의 급증과 대량생산체제 도입으로 인한 공급 과잉으로 가격이 급격히 떨어지는 현상이 나타나고 있다.

한편, 느타리버섯은 2000년부터 품종보호대상작목으로 지정되어 왔으나 품종생산판매신고만으로도 민간업체에서 쉽게 등록 할 수 있기 때문에 급속히 등록품종이 증가되어 현재까지 77품종의 느타리버섯이 등록 혹은 판매 신고되어 있으며, 76 %인 56품종이 민간업체에서 등록이 이루어지고 있다. 등록된 품종 중 일부는 품종의 유전적 특성 등을 고

*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

려한 기초 자료가 없으며 실증검정 자료가 미흡하여 품종의 정체성이 모호하고 동일 품종 내에서의 선발 방법, 외국 도입품종의 선발 등에 의한 품종육성이 예상되어 체계적인 느타리 품종의 특성 정립이 절실히 요구되고 있다.

큰 느타리버섯 품종은 현재 큰 느타리 1, 2, 3호 등 3품종이 등록되어 있다. 그러나, 아직까지 국내에서 자생하는 큰 느타리버섯이 보고되어 있지 않고 있으며 현재 재배되고 있는 품종은 외국도입 품종이거나 혹은 외국에서 도입하여 선발 육종한 품종이다. 국내의 각 연구기관과 농가에서 보유하고 있는 큰 느타리 균주의 근원을 형태적 특징으로 구분하기 어려워 동일한 품종이 복제되어 품종으로 난립할 가능성도 배제할 수 없어 국내 큰 느타리 품종의 체계적인 특성정립이 필요하다. 특히, 국제식물신품종보호동맹(UPOV) 발동에 따른 각국의 버섯 품종 보호가 실행되게 되면 일부 소수 외국도입품종에 의존하는 우리나라 버섯산업에 큰 타격이 가해질 가능성이 높다. 따라서 국내에서 재배되고 있는 큰 느타리 품종(계통)을 수집하여 유전적 특성을 확인하고 실태를 파악하는 것이 시급하며, 이는 우리 고유의 큰느타리버섯 품종 개발을 위한 기초 자료로 유용하게 활용 할 수 있다. 버섯의 종내 분류나 품종분류는 배양적, 형태적 특성에 의존하고 있으나 습도, 온도, 광, 영양원 등 환경조건에 따른 변이가 발생 가능성이 크기 때문에 미세한 차이의 품종간 특성 구분을 하기에 는 무리가 있다. 이에 객관적 판별기준으로 동위원소에 의한 분류 방법이 보고된 바 있으나(김 등, 1998; 이 등, 1998) 이는 배양조건에 따라 다른 결과를 나타내는 등 동위원소 마커의 제한성 때문에 다양한 품종의 특성을 조사하기에는 한계가 있다.

DNA 분자검정법은 환경조건을 배제하고 안정적으로 균류의 종간, 종내 분류법에 이용될 수 있으며 PCR방법은 신속, 정확하게 균류의 종간, 종내의 유전적 특성구분에 일반적으로 사용되고 있다(Caetano and Gresshoff, 1997). 느타리버섯을 포함한 진균의 계통분류는 고전적인 DNA 영역인 ribosomal DNA의 ITS 등의 특정영역(Vilgalys and Sun, 1994; White *et al.*, 1990)과 mitochondrial DNA (Toyomasu *et al.*, 1992)의 염기서열 비교와 핵산지문분석에 의해 수행되어 왔다. 그러나 rDNA분석법은 종내 계통 및 품종 구분을 위한 다형성 검출에 한계가 있어 random amplified polymorphic DNA(RAPD)(김 등, 1998; Williams *et al.*, 1990; Zervakis *et al.*, 2001) 등과 같이 높은 다형성을 나타내는 방법이 사용되어 왔다. 그러나 RAPD분석은 비 특이적 밴드의 증폭으로 PCR 다형성 결과가 안정적이지 못하여 재현성에서 문제점이 있는 것으로 인식되고 있다. 최근에는 이러한 점을 보완한 URP(Universal Rice Primer)가 개발되어(Kang *et al.* 2002), 느타리버섯, 상황버섯 등을 포함하는 다양한 미생물의 종간, 종내 분류에 유용하게 적용된 바 있다(Kang *et al.*, 2002^a and 2002^b, 2003; 김 등, 2007; Park, *et al.*, 2003). URP primer는 20mer의 염기로 구성되며, 55°C 이상에서의 annealing 반응을 적용하기 때문에 높은 재현성으로 PCR 다형성 밴드를 증폭할 수 있는 특징이 있다.

본 연구는 국내의 연구기관, 농가 등 다양한 지역으로부터 수집 및 분리, 분양받은 25균주를 대상으로 하여 균총과 자실체의 형태적 특성과 URP primer를 이용한 PCR 다형성을 조사 하여 국내에 분포하는 큰느타리버섯 균주의 유전적 다양성을 구명 하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에 사용된 균주는 국내개발 품종, 재배농가 보유균주, 버섯연구소(KME), 한국균주보존센터(KTCT) 등에서 보존 중인 25 균주를 공시하였으며 자세한 정보는 Table 1과 같다.

배양적 특성 조사

큰느타리버섯 균주의 배양적 특성을 조사하기 위하여 수집된 25품종의 균사체를 PDA(Potato Dextrose Agar)에 접종하여 7일간 25±1°C의 암상태에서 배양한 후 균총(colony)의 모양 및 성장량 등을 조사하였다.

자실체 유도 및 생육 특성 조사

자실체 유도 및 생육 특성을 조사하기 위하여 톱밥 병 재배를 실시하였으며 배지는 탄소원, 질소원, 무기염류 등을 배합(톱밥, 밀기울, 소맥피, 콘코프, 건비지, 대두피 등)하여 병당 무게 720(+20)g을 기준으로 입병한 후 100°C에서 60분, 118°C에서 90분간 살균하고 방냉실에서 15시간 방냉하였다. 공시한 큰느타리버섯 균주를 PDA에 배양 후 직경 5 mm 크기로 잘라내어 버섯완전배지인 MCM (Glucose 20 g, Peptone 2 g, Yeast extract 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1 g) 액체 배지에 접종하여 25°C에서 120 rpm으로 15일간 배양하여 제조한 액체종균 25 cc를 취하여 톱밥 배지에 접종하였다. 온도 24°C, 습도 70%에서 30일간 균사 배양한 후, 균굵기를 하여 노화균을 제거하였다. 버섯 발이를 유도하고 생육시키기 위하여 발이실 환경을 습도 90%이상, 온도 17°C로 조절하였으며, 10일간 발이 유도 후, 습도 90% 이상, 온도 16°C의 생육실에서 8일간 생육하여 자실체를 형성시켰다. 큰느타리버섯의 균주들의 자실체 특성은 갓의 무늬형태, 갓의 색, 대길이, 대굵기, 생산량(g)/병 등을 분석하였다.

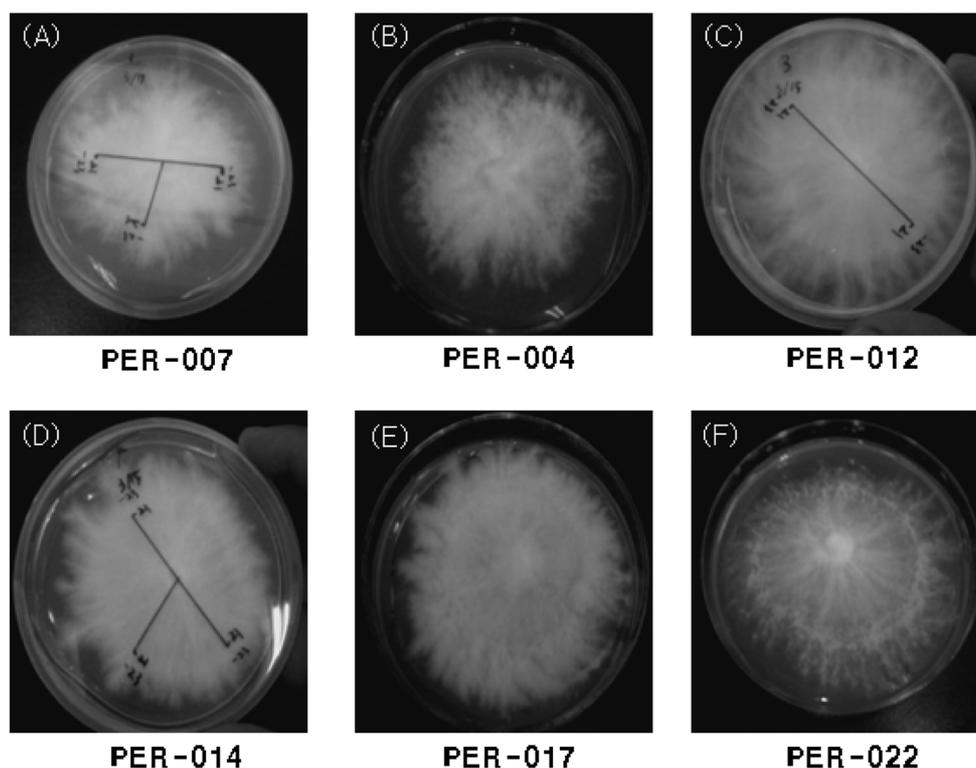
Genomic DNA 분리

Genomic DNA를 분리하기 위하여 7일간 PDA에서 배양한 다음 직경 5 mm의 균사체를 20 ml의 MCM 배지에 옮긴 후 진탕배양(120 rpm)으로 7에서 10일간 배양하여 균사체를 여지에 걸러낸 다음 동결건조를 하였다. 동결건조한 균사체를 곱게 마쇄한 다음 100 µg 정도를 1.5 ml의 Eppendorf tube에 옮기고 추출용 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 400 µl와 1 µl의

Table 1. *Pleurotus eryngii* strains used in this study

No.	Strains	Source ¹⁾
1	PER - 001	Commercial strain, 1997, Chiba, Japan
2	PER - 002	Commercial strain, 1998, Chiba, Japan
3	PER - 003	Keunneutari No. 1. 1999, ASI 2302, Korea
4	PER - 004	Keunneutari No. 2. 1999, ASI 2394, Korea
5	PER - 005	Commercial strain, 1998, China
6	PER - 006	KCTC 26060
7	PER - 007	KCTC 26061
8	PER - 008	Commercial strain, 2003, Gunma, Japan
9	PER - 009	Commercial strain, 2005, Hukuoka, Japan
10	PER - 010	Commercial strain, Keunneutari No. 1. 2005, Korea
11	PER - 011	Commercial strain, Keunneutari No. 2. 2005, Korea
12	PER - 012	Commercial strain, Keunneutari No. 3. 2005, Korea
13	PER - 013	KME 25001, Commercial strain, 2002, Icheon Mushroom Farm, Gyeonggi province, Korea
14	PER - 014	KME 25002, Commercial strain, 2002, Tottori, Japan
15	PER - 015	KME 25003, Commercial strain, 2002, Liao Ning Sheng, China
16	PER - 016	KME 25004, Commercial strain, 2002, Japan
17	PER - 017	KME 25005, Commercial strain, 2003, Nagano, Japan
18	PER - 018	KME 25006, Commercial strain, 2003, Kumanoto, Japan
19	PER - 019	KME 25007, Commercial strain, 2003, Boseong, Gyeongnam province, Korea
20	PER - 020	KME 25008, Commercial strain, 2004, Yangpyeong, Gyeonggi province, Korea
21	PER - 021	KME 25009, Commercial strain, 2005, Hukuoka, Japan
22	PER - 022	KME 25010, Commercial strain, 2005, Liao Ning Sheng, China
23	PER - 023	Commercial strain, 2005, Cheonan, Chungnam province, Korea
24	PER - 024	Commercial strain (K5PO, China), 2005, Cheonan, Chungnam province, Korea
25	PER - 025	Commercial strain, 2005, Anseong, Gyeonggi province, province, Korea

¹⁾KCTC : Korean Collection for Type Culture, Biological Resource Center, Kribb, Korea. KME : Kwangju Mushroom Experiment, ASI : Institute of Agriculture Science, RDA, Korea.

**Fig. 1.** Mycelial characteristics of *P. eryngii* strains on PDA media.

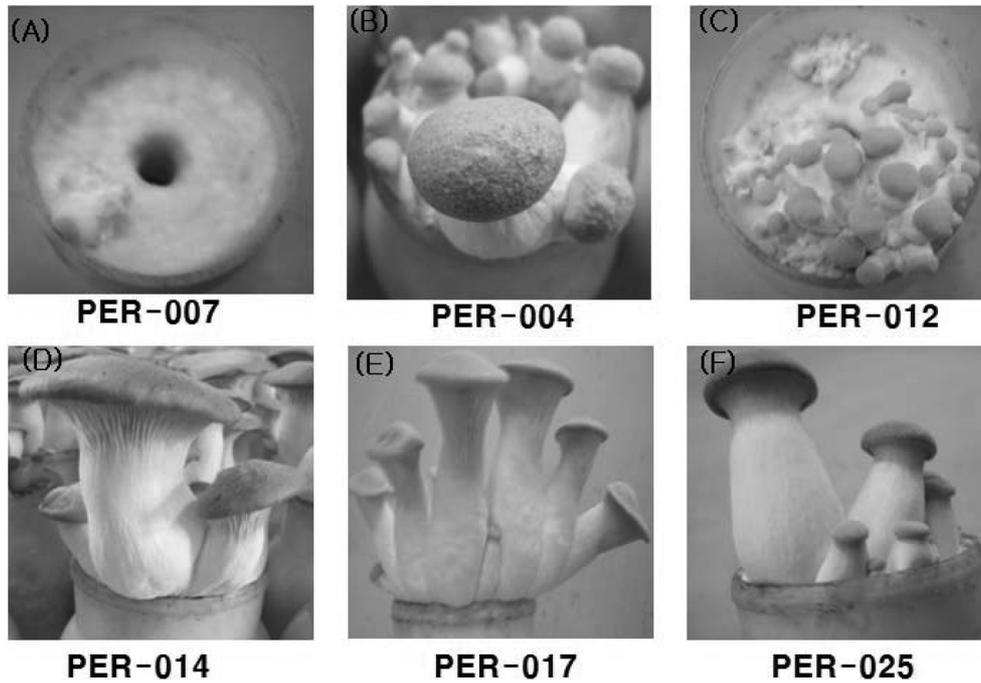


Fig. 2. Morphological characteristics of fruiting bodies of *P. eryngii* strains obtained from sawdust bottle cultivation.

Table 2. Morphological characteristics of mycelia and fruiting bodies of *P. eryngii* strains

Strains	Mycelial growth (cm)	Length of stipe (cm)	Width of stipe (cm)	No. of fruiting body a bottle	Yield(g)/bottle
PER-001	6.5	7.65	2.8	8.3	56
PER-002	7.1	6.75	2.5	7.5	42
PER-003	7.5	4.75	2.1	0.0	ND
PER-004	6.3	5.65	4.05	6.3	46
PER-005	6.9	7.2	3.5	8.2	96
PER-006	7.2	6.25	2.6	7.3	42
PER-007	7.0	ND	ND	ND	ND
PER-008	6.7	7.35	2.35	8.2	47
PER-009	6.6	6.85	2.4	7.2	84
PER-010	7.1	7.45	2.75	8.5	48
PER-011	7.3	6.95	2.35	7.7	49
PER-012	7.3	ND	ND	ND	ND
PER-013	6.7	9.1	2.9	11	66
PER-014	6.9	7.0	2.25	7.9	49
PER-015	6.5	7.9	2.9	8.2	72
PER-016	6.8	7.0	2.9	8.2	40
PER-017	6.9	9.1	2.25	7.0	45
PER-018	7.2	6.75	2.7	7.9	42
PER-019	7.4	7.5	3.1	8.7	56
PER-020	6.4	8.9	3.1	11.5	52
PER-021	7.7	9.85	2.85	9.5	40.5
PER-022	7.5	9.35	2.6	ND	ND
PER-023	7.0	6.7	2.85	9.5	42
PER-024	7.1	6.45	2.4	7.6	42
PER-025	7.2	9.45	3.4	10.3	67.5

¹⁾Mycelial growth was observed after 7days on PDA at 25±1°C culture.

²⁾Cultivation conditions for all isolates were described in Material and Method.

Table 3. Applicability of URP primers to *Pleurotus eryngii* strains

URP primers	Sequences(5'-3')	PCR polymorphic bands
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	11
URP2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG	8
URP2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC	12
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC	12
URP6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC	12
URP9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	13
URP17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	12
URP25F	GATGTGTTCTTGAGCCTGT	4
URP30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA	0
URP32F	TACACGTCTCGATCTACAGG	3
URP38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC	10

proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 잘 섞어주었다. 이 혼합액에 2×CTAB buffer (2% CTAB [w/v], 100 mM Tris [pH 8.0], 1.4 M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone Mr 40,000)를 400 μ l 첨가하여 65°C에서 30분간 방치하고 chloroform: isoamylalcohol (24 : 1)을 넣고 혼합 한 후 12,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 tube에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공 건조한 후 1×TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA) 50 μ l에 용해하였다. 10 mg/ μ l RNase 2 μ l를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 추출한 용액에 함유된 RNA를 제거하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer 260 nm 파장으로 정량 분석을 실시하였다.

URP-PCR 조건

URP-PCR 핵산지문 분석은 Kang 등 (2002)에 의하여 개발된 Table. 3의 primer와 protocol에 준하여 수행하였다. URP primer를 이용한 기본적인 PCR반응 조건은 100 ng 정도의 DNA 5 μ l에 10×PCR buffer(10 mM Tris-HCl, pH.8.0, 50 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin) 5 μ l와 URP primer (20 pmol) 1 μ l, 2.5 mM dNTP 4 μ l, *Taq* polymerase (JK BioTech.) 0.25 μ l에 D.W.를 첨가하여 total volume을 50 μ l로 하여 PCR 반응액을 만들었다. 큰 느타리버섯의 genomic DNA로 URP-PCR을 수행함에 있어서 안정적이고 재현성 있는 PCR 결과를 얻기 위하여 PCR 반응용액의 구성요소인 template DNA(50에서 500 ng), primer의 농도 (5 pmol에서 50 pmol), annealing 온도(36°C에서 60°C)를 각각 다른 조건으로 하여 PCR 조건을 조사하였다. PCR 증폭산물은 1.5%의 agarose gel 상에서 전기영동 한 뒤 ethidium bromide에 염색하여 UV lamp하에서 PCR 다형성밴드를 관찰 하였다.

유연관계분석

큰 느타리품종에서 검출된 동일한 크기의 URP-PCR 다형성밴드를 유무로 하여 database 한 후 유사도 (similarity coefficient)를 산출하고, Dendrogram은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods using arithmetic average)에 의한 집괴분석을 실시하였다 유사도와 UPGMA 분석은 NTSYS-pc program(Ver.2.1, Rohf, 2000)을 이용하였다.

결과 및 고찰

배양적 특성

큰느타리버섯의 배양적 특성을 알아보기 위하여 수집된 25품종의 균사체를 PDA에 접종 후 7일간 암 상태에서 배양하여 균사생장과 균총의 형태 등을 조사하였다. PDA 배지 상에서 성장한 각 균주의 균사의 성장을 측정된 결과 직경 6.3에서 7.3 cm 범위내에서 성장하여 균주간 큰 차이를 보이지 않았으나(Table. 3), 배지에 형성된 균총의 형태에서 차이를 나타냈다(Fig. 1). 대체적으로 큰느타리 균사체는 흰색의 솜과 같은 모양의 기중균사의 형태로 나타났지만(Fig. 1의 B, C) PER-022균주는 특이하게 균사가 뭉치듯이 자라나는 양상을 보였다.

자실체의 형태적 특성

공시한 큰느타리버섯 균주를 톱밥배지에 인공 재배하여 자실체의 발이 특성 및 생육 단계별 형태학적 특성을 조사하였다. PER-003, PER-007, PER-012, PER-022 균주는 균총의 형태적 차이를 보이지는 않았지만 자실체가 형성되지 않거나(PER-007, PER-022) 또는 자실체가 형성되더라도 발이가 불규칙(PER-003, PER-022)하여 농가에서의 인공 재배용 품종으로는 부적합하였다. 특히, PER-007균주는 발이가 되지 않아 균주가 퇴화 또는 변이에 의해 자실체형성 능력을 상실하였거나 환경 조건이 부적합한 것으로 사료되었다. PER-014균주는 갓이 회색으로 대형이며 대가 굵고 길이가 짧은 형태를 보였으며 PER-017균주는 짙은 배지색에서 갈색을 띄고 갓 길이가 긴 것이 다른 균주와 비교되었다. 그밖에 공시한 균주들은 균총의 형태에서 약간의 차이를 보였지만 자실체 특성은 PER-025균주와 유사한 특성을 보였다. Table. 3은 공시 균주의 균사생장, 자실체형태를 종합하여 정리한 것이다. 결론적으로 본 연구에 공시한 균주들은 균총의 형태에 있어서는 거의 유사한 특성을 보인 반면에 자실체 형성시에 균주에 따라 발이불능, 부정형자실체형성, 발이는 정상적으로 이루어지나 발이 후 더 이상 성장하지 않는 등 수확량과 상품가치에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 유전 요인을 갖고 있는 것으로 판단되었다. 갓모양은 불룩반구형, 평판구형 등 다양하게 나타났다. 한편 본 연구에 공시한 균주는 대부분 재배 농가에서 버섯을 재배 생산하는 균주로 재배 환경에 따라 자실체의

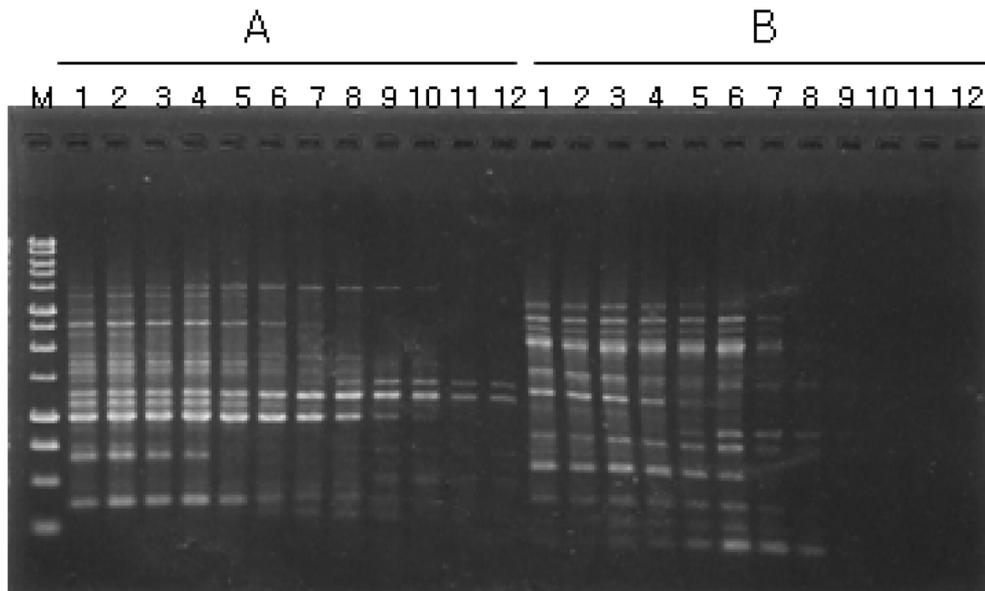


Fig. 3. Effect of PCR annealing temperatures on the PCR polymorphism. M : 1 kb ladder marker. PCR polymorphism of *P. eryngii* PER-001. A : URP 2F, B : URP 2R. lane 1-12: annealing temperatures 45°C, 46°C, 47°C, 49°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 61°C, 63°C, 64°C and 65°C, respectively.

표현형질이 다르게 나타날 수 있기 때문에 각 균주의 최적 재배 환경 조건을 검토할 필요가 있을 것으로 사료된다.

URP-PCR 반응조건

수집된 *P. eryngii* 균주의 PCR 다형성밴드를 생성하기 위한 URP primer의 최적 반응 조건을 설정하기 위하여 primer 농도, annealing 온도 등을 조사하였다. URP2F와 URP2R primer의 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 pmol로 조정하여 PCR 증폭한 결과, *P. eryngii* 균주는 15에서 25 pmol 사이의 농도에서 PCR 증폭밴드가 가장 명확하게 형성되었으나, 30 pmol 이상에서는 밴드의 배경이 불투명하게 나타나기 시작하였다. 한편 *P. eryngii*의 template DNA양은 100ng에서 200ng사이에서 가장 좋은 PCR 결과를 보였다. Fig. 3은 URP PCR 반응시 annealing 온도의 영향을 조사한 것으로서 45°C에서 52°C사이에서 PCR다형성 밴드가 가장 잘 증폭됨을 확인하였다. 그러나, 52°C 이상의 annealing 온도에서는 PCR다형성 밴드의 수가 다소 감소하기 시작하여 56°C 이상에서는 밴드의 수가 급격히 감소하는 현상이 나타났다. 결과적으로, *P. eryngii*에 대한 URP primer의 PCR 다형성밴드를 생성하는데 최적 annealing 온도는 49°C에서 52°C로 판명되어 50°C에서 annealing 온도로 따르는 실험에 적용 하였다.

일반적으로 URP primer의 annealing 온도는 55°C로 알려져 있으나 *P. eryngii*의 경우에는 그 보다 낮은 50°C에서 재현성이 있으며 다수의 PCR 다형성밴드를 검출 할 수 있었다. 이는 일반 느타리버섯 등 다른 미생물에 적용하였던 결과와 다르게 나타나, 아마도 다른 미생물과 달리 큰 느타리버섯 내에는 polysaccharide 함량 등 PCR 저해

요인이 영향을 주는 것으로 사료 되었다. RAPD는 1990년 Welsh 등에 의해서 개발된 방법으로 10~12 mer의 짧은 염기로 임의적으로 제작된 primer를 이용하여 genomic DNA를 PCR 증폭한 후 전기영동하여 DNA 다형성을 검출하는 기술이다. 이 방법은 세균, 진균 등 다양한 미생물의 종간, 종내의 계통발생학적 유연관계 분석에 이용할 수 있으며 대상 미생물의 사전 유전정보지식을 모르더라도 적용이 가능하고 primer가 제품화되어 있어 구입이 용이하며 분석이 신속, 간단하다. 그러나 primer 특성으로 인하여 PCR 반응시 저온의 annealing 온도(36~37°C)를 채택하고 있어 DNA 순도 또는 PCR 조건에 따라 PCR결과가 변하는 등 재현성에 문제가 있어 최근 이용도가 떨어지고 있다. 낮은 annealing 온도에서의 PCR반응은 비특이적인 밴드의 출현 등으로 재실험을 할 경우에 같은 결과를 도출하기 어려운 낮은 재현성이 문제점으로 지적되어왔다. 그러나 URP primer를 이용한 PCR반응은 50°C 이상의 annealing 온도를 적용함으로써 template DNA와 primer간의 특이적 결합력을 유도 할 수 있어 재현성을 높일 수 있는 장점이 있다. Kang^b 등(2002)은 품종 또는 종 특이 URP-PCR밴드의 염기서열 정보를 활용하여 상황버섯 특이검출 primer 제작에 이용하는 등, URP-PCR 밴드를 SCAR primer로 활용하여 종 특이 primer 개발에 유용하게 사용하였다. 따라서, 큰 느타리버섯의 품종 특이 primer는 품종 특이검출을 위한 SCAR primer 개발에 활용 할 수 있을 것으로 기대된다.

URP primer를 이용한 PCR다형성 검출

Table 3은 본 연구에 적용한 URP primer 중에서 큰느타리버섯에 적용할 수 있는 유용한 primer를 조사한 것이다.

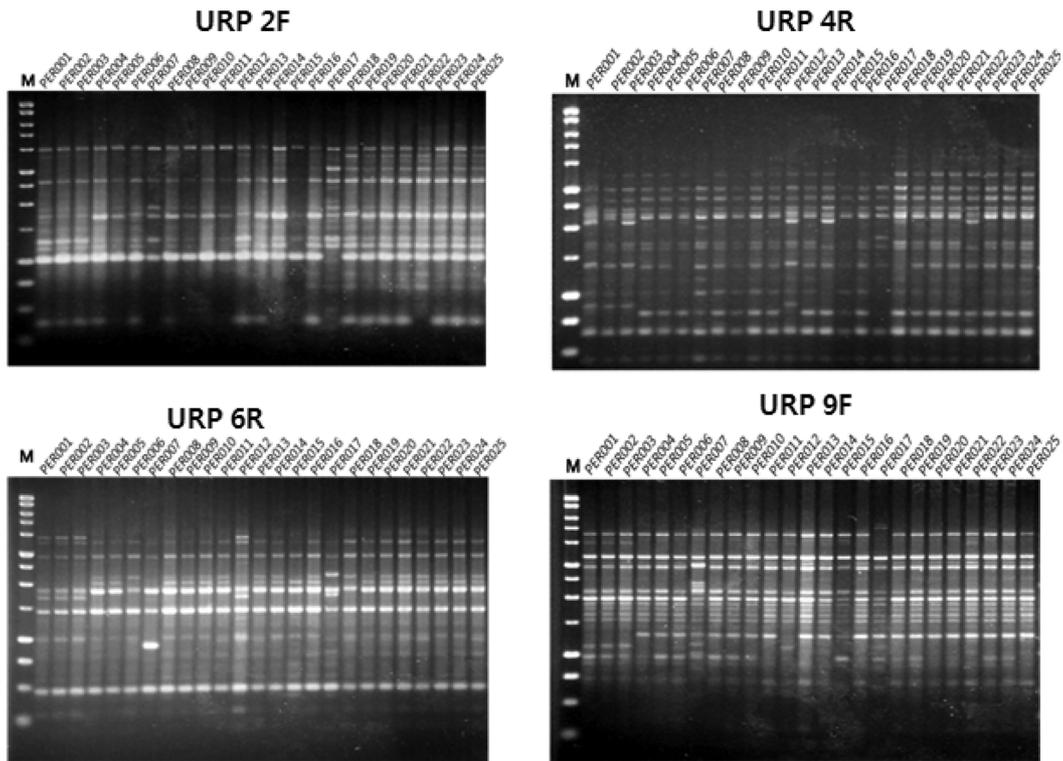


Fig. 4. URP-PCR profiles of *P. eryngii* strains. PCR amplicons were obtained by using primers URP2F, URP4R, URP6R and URP9F, respectively.

11종류의 URP primer중에서 10종류의 primer가 PCR다형성 밴드를 형성하였으며 그 중에서 URP1F, URP2F, URP2R, URP4R, URP6R, URP17R, URP38F는 10개에서 12개의 PCR다형성 밴드를 형성하여 *P. eryngii*의 PCR핵산지문을 위한 primer로서 가장 유용한 것으로 나타났다.

Fig. 4는 URP2F, URP4R, URP6R, URP9F primer에 의하여 검출된 큰 노타리버섯 25균주의 PCR 다형성밴드를 보여 주고 있다. 균주에 따라 특이적인 PCR다형성 밴드가 검출 되었으나 대체적으로 균주간에 유사한 URP-PCR 다형성밴드를 형성하고 있었다. PER-007과 PER-012균주의 경우는 자실체 형성시 발이가 되지 않거나, 발이는 정상적으로 이루어지나 개체수가 많고(병당 30~50개 또는 그 이상) 발이 이후의 생육이 정상적으로 진행되지 않는 특성을 보였다. URP-PCR 결과에서도 PER-007균주는 URP6R primer의 경우 0.8kb에서 다른 균주에서 발견되지 않은 독특한 밴드가 형성되었으며 URP9F primer에서는 2.5 kb 부분에서 특이밴드가 검출 되어 균주의 유전적 변이 또는 독특한 균주의 특성임을 나타내고 있다. PER-017균주의 경우는 대가 길고, 대 굵기가 가는 자실체 특성을 보여준 균주로서 URP2F primer에서 1.0 kb PCR밴드의 결실 등 특징적인 PCR다형성 양상을 보였다. 그러나 발이 이후 생육이 정상적으로 이루어지지 않는 PER-012균주의 경우는 다른 균주와 유사한 PCR 다형성 밴드 양상으로 나타났다. 따라서 국내에 재배 되고 있는 큰 노타리버섯은

대부분 유사한 균주일 가능성이 있음을 시사하고 있다. 실제적으로 국내에서 보유하고 있는 큰 노타리 균주 중에서 큰 노타리 1, 3호만이 품종으로 등록 된 바 있다. 다른 계통은 일본, 중국 등에서 도입하여 농가에서 사용되고 있는 것으로 추측되고 있다.

URP-PCR 다형성분석에 의한 유전적 유연관계 분석

7 종류의 URP primer 를 이용하여 PCR 다형성을 분석한 결과 25균주 중 PER-007, PER-009, PER-012, PER-015, PER-017균주가 특징적인 PCR다형성 밴드를 형성하였다. 이 중에서 특이하게 PER-007과 PER-017균주가 비슷한 양상을 보였고, PER-009와 PER-015균주가 비슷한 양상을 나타냈으며, PER-012균주는 약간 다른 양상을 보였다 (Fig. 5). URP-PCR 다형성밴드를 기초로 하여 큰 노타리 품종의 유전적 특성을 분류한 결과 크게 4개의 group으로 나눌 수 있었다. 여기에서 나타난 결과와 형태적인 특성을 종합하여 보면, PER-001, PER-002, PER-003균주가 포함된 group이 공시균주인 큰노타리 1호와 3호가 포함된 영역으로 PER-012균주를 제외하고 형태적으로 보아도 가장 상품 가치가 높은 group으로 나타났다. 가장 많은 균주를 포함하는 2번째 group은 첫번째 group과 80%이하의 유전적 유사성을 보이고 있었으며, PER-009와 PER-015균주가 속한 group은 갖의 색이 연한 특징을 나타냈으며(data를 보이지않음), 마지막으로 outgroup인 PER-007균주의 경우에는 유효 경수가

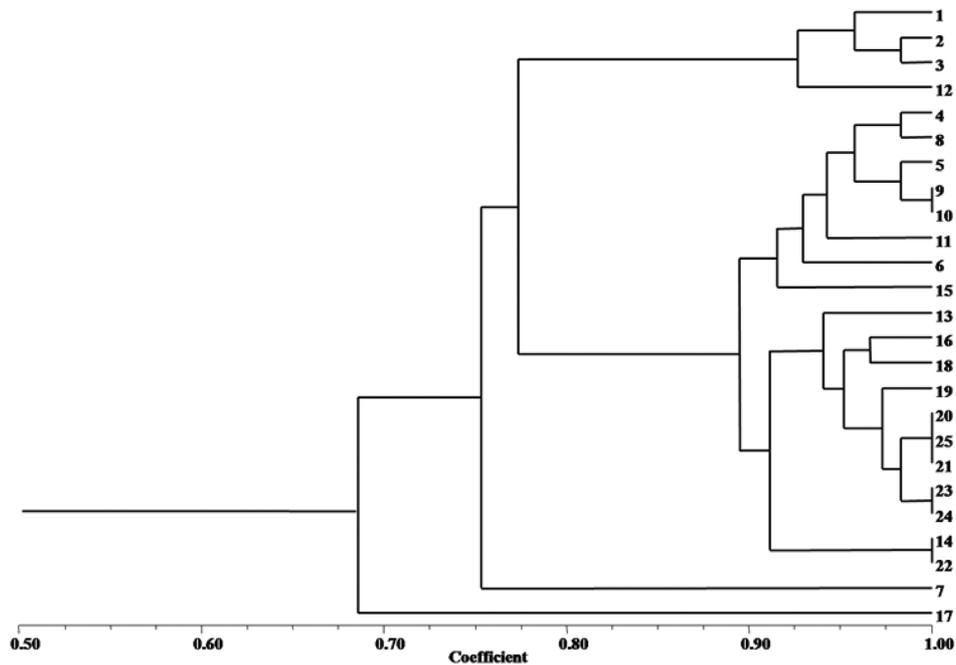


Fig. 5. Dendrogram derived from URP-PCR polymorphic bands of *Pleurotus eryngii* strains. The numbers accord with those of Table 1.

없으며 자실체 형성이 불량한 균주로서 유전적 변이로 인하여 환경적응성이 변화된 결과로 사료 되었다. Kang 등 (2002, 2007)은 국가기관에서 품종 등록된 13개 느타리버섯을 포함한 국내 65 느타리버섯 품종을 URP-PCR 다형성 분석을 실시하였으며 느타리버섯 품종은 URP-PCR로 15 type의 품종 소 분류군을 나눌 수 있었다. *P. ostreatus*의 품종군은 Group 1에서 Group 5까지를 포함하고 있었으며 그룹 간에 70%이상의 유전적 유연관계를 보였고 기 장려 품종으로 보급된 원형느타리 1, 2, 3호와 춘추 1, 2호, 농기2-1, 농기 201, 농기202 등 8품종은 group 1에서 4에 포함되어 있었다. group 5는 수한 및 신농 품종군이 밀접한 유전적 유사도를 보여 특징적인 품종군을 이루고 있었다. outgroup으로서는 전북느타리, 큰 느타리, 여름느타리, 백송이가 group 6과 group 7에 포함 되어 일반 느타리 균과의 큰 유전적 차이를 나타내었다. 결론적으로 본 연구에 사용된 큰 느타리 계통의 형태적, 재배적, URP-PCR핵산지문 분석결과로 국내에서 재배되고 있는 큰 느타리 품종은 3~4 종류의 품종이 주류를 이루고 있었으며 버섯의 변이체로서 퇴화현상을 보인 큰 느타리버섯 균주도 포함되어 있었다. 본 연구 결과 큰 느타리버섯 품종은 다양한 곳에서 수집 되었다고 생각 할 수 있었으나 URP-PCR 결과 동일한 큰 느타리 품종이 연구기관과 농가 등에서 다른 균주명으로 보존되어 종균으로 사용하고 있는 것으로 추측할 수 있다.

적요

25개의 큰느타리버섯 균주를 국내외의 다양한 지역에서

수집하여 본 실험에 사용하였다. PER-007과 PER-012균주는 다른 균주와 비교하여 볼 때 PDA 배지상에서 특징적인 균총 형태를 보였으나 대부분 균주간 유사한 균사생장률을 보였다. 자실체 유도 및 생육 실험에서 PER-007균주는 자실체가 형성 되지 않았고 PER-012균주의 발이가 되었으나 이후 성숙 자실체로 성장하지 않았으며 그 외의 공시한 균주의 자실체 대부분의 갓모양은 볼록반구형, 평판구형 등 다양하게 나타났다. URP primer의 PCR 반응 조건은 48°C에서 52°C의 annealing 온도에서 높은 다형성 밴드를 관찰할 수 있었으며 25개의 *P. eryngii* strains의 다형성은 11개의 URP primer 중 URP1F, URP2R, URP2F, URP4R, URP6R, URP9F, URP17R primer에서 계통간 PCR 다형성 밴드를 형성하였다. URP-PCR다형성밴드를 기초로 하여 유전적 유연관계를 분석한 결과 *P. eryngii* strain들은 76%~100%정도의 유전적 유사도를 가지는 3개의 주요 group으로 나눌 수 있었으며 PER-007과 PER-017 균주는 outgroup으로 원연관계를 형성하였다.

감사의 글

본 연구는 바이오그린 21의 연구지원 (과제번호 20070401034021)으로 수행한 것으로 이에 감사함을 전합니다.

참고문헌

강미선, 강태수, 강안석, 손형락, 성재모. 2000. 큰느타리버섯

- (*Pleurotus eryngii*)의 균사배양 및 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지 28:73-80.
- 김동현, 공원식, 김경수, 김영호, 유창현. 1998. 느타리버섯류 (*Pleurotus* spp.)의 생화학적 방법에 의한 품종 구분. 한국균학회지 26:173-178.
- 김한경, 정종천, 석순자, 김광포, 차동열, 문병주. 1997. *Pleurotus eryngii*균의 인공 재배. 한국균학회지 25:305-310.
- 김중근, 임선화, 이대성, 지정현, 서건식, 주영철 강희완. 2007. URP-PCR 다형성에 의한 국내 느타리버섯 품종의 유전적 특성 분석. 한국균학회지 35:61-67.
- 이대진, 김광포, 이병의. 2003. 큰느타리(*Pleurotus eryngii*)의 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지 31:192-199.
- 이희경, 유용복, 차동열, 민경희. 1998. 동위원소분석에 의한 느타리속의 종간 유연관계. 한국균학회지 26:163-172.
- Caetano, A. G. and Gresshoff, P. M. 1997. DNA markers: Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Vch, N.Y. pp. 364.
- Kang, H. W., Lee, B. M., and Yu, S. W. 2003. Analysis of genetic relatedness in *Alternaria* species producing host specific toxins by PCR polymorphism. *Plant pathol. J.* 19:221-226.
- Kang^a, H. W., Park, D. S., Go, S. J., and Eun, M. Y. 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol. Cells* 13:281-287.
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., You, C. H., and Lee, B. M. Go, S.J. 2001. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiology* 29:85-89.
- Kang^b, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., Lee, B. M., Cho, S. M., Kim, K. T., Seo, K. S., and Go, S. J. 2002. PCR Based Detection of *Phellinus linteus* using Specific Primers Generated from Universal Rice Primer (URP) Derived PCR Polymorphic band. *Mycobiology* 30:202-207.
- Park, D. S., Kang, H. W., Lee, M. H., Park, Y. J., Lee, B. M., Han, J. H., and Go, S. J. 2003. DNA fingerprinting analysis of genus *Phytophthora* in Korea. *Mycobiology* 31:235-247.
- Rajarathnam, R. and Bano, Z. 1987. *Pleurotus* mushrooms. Part IA. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. *Crit. Rev.Food Sci. Nutr.* 26:157-222.
- Toyomasu, T., Takazawa, H., and Zennyoji, A. 1992. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA from the basidiomycetes *Pleurotus* species. *Bioci. Biotechnol. Biochem.* 56:359-61.
- Vilgalys, R. J. and Sun, B. L. 1994. Ancient and recent patterns geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenic analysis of ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4599-4603.
- White, J. J., Bruns, J., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenics. A guide to methods and applications. Academic press, pp. 315-322.
- Williams J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zervakis, G., Venturella, G., and Papadopoulou, K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological character, *Mycobiology* 147: 3183-3194.