The Korean Journal of Mycology
© The Korean Society of Mycology

한국균학회지
Kor. J. Mycol. 37(1) : 28-32 (2009)

아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 균주의 유전적 유연관계

최재선[1] · 이동희[2] · 장후봉[1] · 강보구[1] · 구창덕[2]*
[1]충북농업기술원 농업환경과, [2]충북대학교 산림학과

Genetic Relationship of *Pleurotus ferulae* Strains

Jae-Sun Choi[1], Dong-Hee Lee[2], Hu-Bong Chang[1], Bo-Gu Kang[1] and Chang-Duck Koo[2]

[1]*Department of Agricultural Environment, Chungbuk Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 363-881, Korea*
[2]*Department of Forestry, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

(Received April 17, 2009. Accepted June 12, 2009)

ABSTRACT: This study was carried out to investigate the genetic relationship of *Pleurotus ferulae*, an edible mushroom found on a medicinal plant, *Ferula assa-foetida*, in central China. The genetic relationships of 15 *Pleurotus* species strains, including five *P. ferulae* strains were analyzed. The strains were divided into seven groups at 80% genetic similarity level according to random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Four out of the seven groups consisted of two to four strains, while the other three groups consisted of three strains. In each of the three groups, the three strains were from each of three different *Pleurotus* species (*P. cornucopiae*, *P. florida* and *P. sajor-caju*). Other strains grouped together for genetic similarity were *P. eryngii* 26060 and *P. fuscus* var. *ferulae* 26065, three strains of *P. ostreatus*, and four *P. ferulae* strains (Bakdal, Awi, Cheonsan 1, and Yesan). However, Japanese Seolyi which belongs to *P. ferulae* and Heukpyung which belongs to *P. ostreatus* were together in a separate group.

KEYWORDS: Genetic relationship, *Pleurotus. eryngii*, *Pleurotus ferulae,* RAPD analysis

아위(阿魏)버섯(*Pleurotus ferulae*)은 우리나라에서는 최근에 소개되어 일부농가에서 배지를 수입하여 재배가 이뤄지고 있다. 이 버섯은 중앙아시아 일대의 초원에서 자생하는 아위(阿魏, *Ferula assa - foetida*)라는 약용식물에 기생 혹은 부생하는 버섯으로, 형태는 느타리버섯 모양으로 버섯 갓은 자루의 한쪽에 치우쳐있고 반구형이다. 갓 표면에는 연한 갈색의 줄무늬가 있으며, 버섯 주름은 아래로 자라서 버섯자루의 중심부까지 뻗는다 (Mao, 2000), 중국에서는 1988년경에 톱밥, 면자각, 밀기울을 섞어 인공재배에 성공하였으며, 단포자 교잡으로 우수한 균주를 확보하여 복건성, 신강성 등지에서 광범위하게 사용되고 있다 (장, 2005).

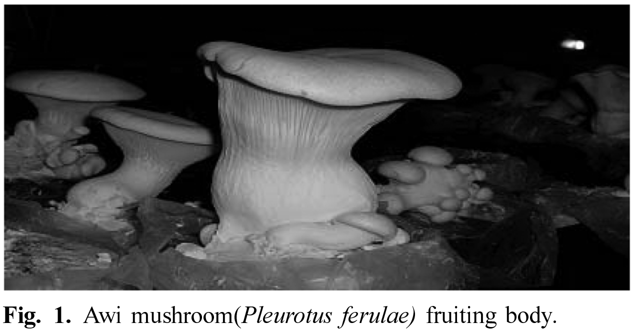

Fig. 1. Awi mushroom(*Pleurotus ferulae)* fruiting body.

*Corresponding author <E-mail : koocdm@chungbuk.ac.kr>

야생 아위버섯은 무게가 20~50 g, 인공재배 버섯은 100~150 g 되는 것으로 균사 생육의 최적온도는 25°C, 최적 pH는 6.0, 최적 탄소원은 전분이나 말토스이다 (김, 2002; 채 등, 2002). 이 버섯은 유리 아미노산을 많이 함유하여 맛이 뛰어나고(차 등, 2004), 콜레스테롤저하, 지방흡수저해 등의 약리 성분도 가지고 있다(홍, 2004a). 그리고 이 버섯의 추출물은 뇌세포에서 아세틸콜린분해효소 억제효과로 치매예방효과, 유해산소 제거기능으로 노화를 예방한다(홍 등, 2004b). 이 버섯의 추출물 중에서 cheimonophyllon 물질은 소나무재선충을 죽이기도 한다(Li *et al,* 2007). 하지만 버섯생산에 기초 자료가 되는 품종구분이 이루어지지 않았다.

버섯 분류의 기준으로는 자실체의 형태 및 미세 구조적 특징, 시약을 이용한 조직의 색반응, 기주 특이성, 개체의 발달 과정 등을 이용하여 왔다. 그러나 최근에는 분자 생물학적 방법으로 분류학적 연구가 이루어고 있다(강 등, 1997; 공, 1997; 공 등, 1998; 김 등, 1998; 김, 2003). 특히 제한효소를 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP), pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), southern hybridization 등의 방법이 동정과 분류에 사용되고 있다. 그리고 특정 DNA 부분을 빠른 시간 내에 증폭할 수 있는 PCR 기술과 random primer를 이용한 RAPD(random amplified

polymorphic DNA) 기술이 종내 분류군 또는 중간 분류군 비교 및 계통유전학적 연구 등에 폭넓게 이용되고 있다 (Nelson *et al*, 1994). 또한 RAPD marker로 알려진 증폭된 DNA fragment는 밀접한 근연종의 분류에 이용되고 있다 (Ro *et al.,* 2007). 그리고 RAPD 지문분석은 근연 종을 구별하는 DNA 서열분석보다 종내 균주를 구분하는데 효과적인 것으로 알려져 있다 (Lopandic *et al*., 2005).

따라서 이 연구에서는 식용과 약용버섯으로서 가치가 높은 아위버섯을 다른 느타리속 버섯과의 DNA 유연관계를 RAPD 기술로 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 *P. ferulae* 5개균주, *P. fuscus* var. *ferulae* 와 그밖에 *P. eryngii* 2균주를 포함한 총 15 *Pleurotus* 균주가 사용 되었으며 각 균주들의 특성은 Table 1에 요약하였다. 각 균주는 농업과학기술원 응용미생물과와 충북 영동, 충남 예산 그리고 강원 원주에 소재한 농가 등에서 수집하였다. 수집된 균주는 Potato Dextrose Agar(PDA, Difco) 배지를 사용하여 25 ± 1°C의 항온 조건에서 배양한 후, 4°C에서 보관하며 계대배양에 사용하였다.

Table 1. List of *Pleurotus* species used in this study

Strain No.	Korean name	Species	Origin
P-1	Bakdal	*P. ferulae*	Youngdong, Chungbuk-do
P-2	Awi	*P. ferulae*	MRD NIHHS
P-3	Janpan Seolgi	*P ferulae*	Wonju, Gangwon-do
P-4	Cheonsan 1	*P. ferulae*	Wonju, Gangwon-do
P-5	Awi Yesan	*P. ferulae*	Yesan, Chungnam-do
P-6	26065	*P. fuscus* var. *ferulae*	KCTC 26065
P-7	26060	*P. eryngii*	KCTC 26060
P-8	Keunneutari	*P. eryngii*	CBARES
P-9	Norangneutari	*P. cornucopiae*	CBARES
P-10	Sacheol 2	*P. florida*	CBARES
P-11	Suhan 1	*P. ostreatus*	CBARES
P-12	Wonhyeong 1	*P. ostreatus*	CBARES
P-13	Chunchu 1	*P. ostreatus*	CBARES
P-14	Heukpyeong	*P. ostreatus*	CBARES
P-15	Yeoreum 2	*P. sajor-caju*	CBARES

MRD NIHHS, Mushroom research Division National Institute of Horticultural & Herbal Science; CBARES, Chungbuk Agricultural Research and Extension Services.

DNA 추출

수집한 균주로부터 DNA를 추출하기 위해 Graham *et al* (1994)의 방법을 응용하였다. 각각의 종균을 PDB(potato dextrose broth)배지에 접종한 후 25 ± 1°C, 120 rpm 진탕 조건에서 10일간 배양한 후, 균사를 분리하였다. 각각의 배양 균사체를 액체 질소를 사용하여 유발에서 마쇄한 다음, 마쇄한 분말을 1.5 ml 튜브에 옮기고 Lysis 완충액(50 mM Tris-HCl:pH7.2, 50 mM EDTA:pH7.2, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol) 500 μl를 넣어서 잘 혼합한 후, 65°C의 Water bath에서 10분 간격으로 상하로 위치를 바꿔가면서 1시간 동안 배양하였다. 배양한 튜브를 12,000 rpm 에서 10분간 원심분리하고 상층액을 마이크로 피펫으로 채취하여 다른 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 채취한 양과 동일한 양의 phenol-chloroform(1 : 1)을 넣어 잘 섞은 뒤 12,000 rpm 에서 5분간 원심분리 하였다. 다시 상층액을 채취하여 새 튜브에 옮긴 후 채취 액의 2배 양의 70% 에탄올을 넣고 12,000 rpm 에서 3분간 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 펠릿을 제외한 용액은 버리고, 냉장 보관한 80% 에탄올을 200 μl 넣어 섞은 후 12,000 rpm 에서 3분간 원심분리 하였다. 펠릿을 제외한 용액을 다시 버린 후, 30분 정도 실온에서 건조시키고, TE buffer 100 μl을 넣어서 DNA를 용해시킨 후 PCR의 시료로 사용하였다.

RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석

실험에 사용한 프라이머는 이(1994)의 실험에서 사용한 것들을 참고로 (주)바이오니아 사에 주문제작하여 사용하였다. 사용한 프라이머의 코드와 시퀀스는 OBP01 : 5'-GTT TCG CTC C-3'; OBP02 : 5'-TGA TCC CTG G-3'; OBP10 : 5'-CTG CTG GGA C-3'; OBP14 : 5'-TTC GCT CTG G-3'; OBP18 : 5'-CCA CAG CAG T-3'였고, 이들의 G + C 함량은 60~70%이었다.

PCR을 위한 reaction mixture로는 Takara PCR kit(주: TAKARA)를 사용하였다. 느타리버섯 균주의 genomic DNA 2.0 μl에 Taq polymerase 0.15 μl(Takara), 10 × buffer 2.5 μl (Takara), dNTPs mixture 1.5 μl(Takara), primer 1.5 μl (bioneer)를 넣고 증류수를 25.0 μl까지 채웠다. PCR은 thermal cycler(Techne사, Progene)를 사용하였고, 조건은 이(1994)의 방법에 따랐다. 즉, Denaturation을 위해 94°C에서 3분간 1 cycle을 program하고, 40 cycle을 94°C에서 30초간 denaturation, 37°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension한 후 최종적으로 1 cycle을 72°C에서 10분간 extension 하였다.

PCR 얻은 시료에 ethidium bromide를 첨가한 1.0% agarose gel에서 1 × TAE buffer를 사용하여 120volt에서 1시간 동안 전기영동한 후 UV상에서 나타나는 밴드를 관찰하였다.

자료 및 유연관계 분석

유연관계 분석을 위한 프로그램은 NT-SYS(Numerical

Taxonomy System Using Multivariate Statistical Programs Ver. 1.60)을 사용하였으며, 전기영동 결과 동일한 크기의 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 하여 데이터화 하였다. 데이터화된 자료를 Saitor(1987)의 UPGMA(unweighted method with arithmetic means)을 이용하여 dendrogram으로 도식화하여 유연관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

RAPD 밴드 양상

느타리버섯속 15개 균주는 RAPD 분석결과 프라이머에 따라 다양한 DNA 다형성을 나타내었으며, 밴드는 대부분 0.3~0.8 Kb 범위 안에서 형성되었다. 프라이머 OBP02를 사용하였을 때는 2~5개의 밴드를 얻을 수 있었지만(Fig. 3), 프라이머 OBP01, OBP10, OBP14, OBP18을 사용했을 때는 밴드가 5~9개씩 나타났다(Figs. 2, 4, 5, 6).

아위버섯(P1~P5)의 RAPD 분석결과 5종의 primer에서 P3계통과 나머지 계통이뚜렷하게 구분되는 band를 확인할 수 있었으며, P1과 P2, P4와 P5는 거의 유사 한 band 패턴을 보였다. 큰느타리버섯 균주를 분석한 결과 P7, P8 두 계통에서 유사한 band 패턴이 확인되었으므로 같은 그룹내에서도 유전적 연관성이 높은 것으로 보였다. OBP10 primer에서는 P3, P14 사이에 동일한 3개의 band 형태가 나타나므로 하나의 그룹을 형성하였다(Fig. 4). OBP10, OBP14, OBP18 primer에서 P11, P12, P13 분석결과 공통된 band가 1~2개 정도 확인되므로 같은 그룹 내에서도 유전적 거리가 매우 가까운 것으로 보인다(Figs. 4, 5, 6). OBP18 primer에서 P9, P15 분석결과 약 800bp에서 동일한 band가 보이므로 같은 종 내에서도 유전적 연관성이 높은 군으로 분류되었다(Fig. 6).

RAPD에 의한 균주간 유연관계

본 실험에서 5종류의 10-mer primer 사용하여 15개 균주들의 유연관계를 분석한 결과 다형성이 매우 높았다. 유연관계 80%을 기준으로 나눌 때 7개의 군으로 구분되었다(Fig. 7; Table 2). 각각 하나의 품종만 사용한 P-9(노랑느타리: *P. cornucopiae*), P-10(사철 2호: *P. florida*), P-15(여름 2호: *P. sajor-caju*)는 각각 다른 군으로 분류 되었다. 그리고 큰느타리 균주인 P-7(26060)과 P-8 그리고 *P. fuscus* var. *ferulae* 균주인 P-6(26065) 3개 균주가 하나의 군으로 분류되었다. 4개의 느타리 균주 중에서 P-14(흑평)를 제외한 P-11(수한1호), P-12(원형1호), P-13(춘추1호)이 하나의 군을 형성하였고, 아위버섯 균주 중 P-3(

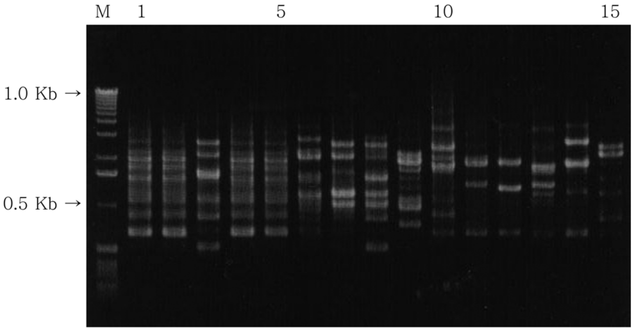

Fig. 2. RAPD analysis using OBP01 primer sets in 15 *Pleurotus* strains.
M : DNA size marker(1.0 Kb ladder), Lane 1~15 means P-1~P-15.

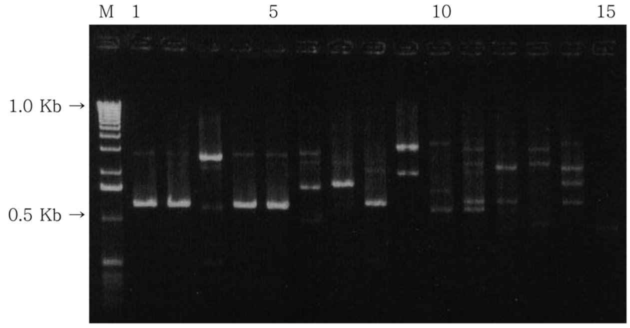

Fig. 3. RAPD analysis using OBP02 primer sets in 15 *Pleurotus* strains.
M : DNA size marker(1.0 Kb ladder), Lane 1~15 means P-1~P-15.

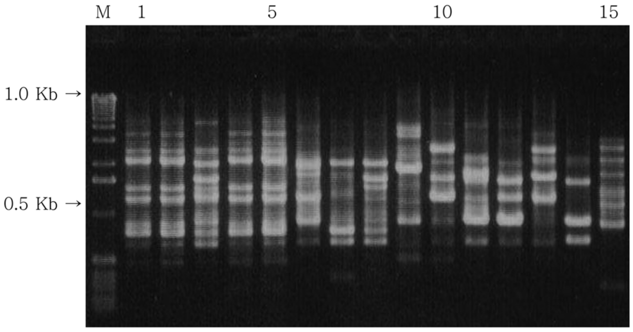

Fig. 4. RAPD analysis using OBP10 primer sets in 15 *Pleurotus* strains.
M : DNA size marker(1.0 Kb ladder), Lane 1~15 means P-1~P-15.

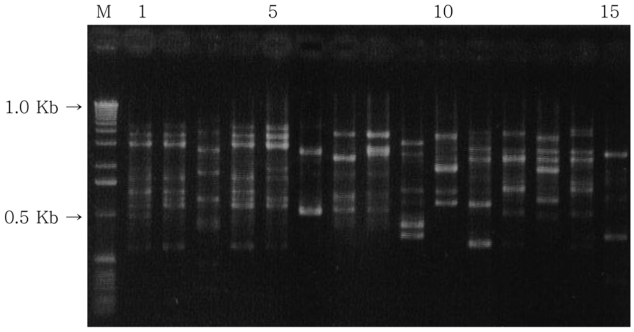

Fig. 5. RAPD analysis using OBP14 primer sets in 15 *Pleurotus* strains.
M : DNA size marker(1.0 Kb ladder), Lane 1~15 means P-1~P-15.

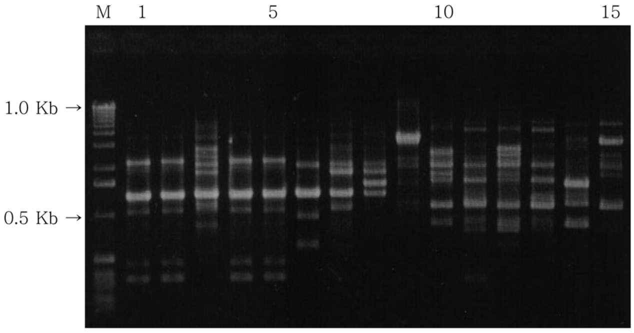

Fig. 6. RAPD analysis using OBP18 primer sets in 15 *Pleurotus* strains.
M : DNA size marker(1.0 Kb ladder), Lane 1~15 means P-1~P-15.

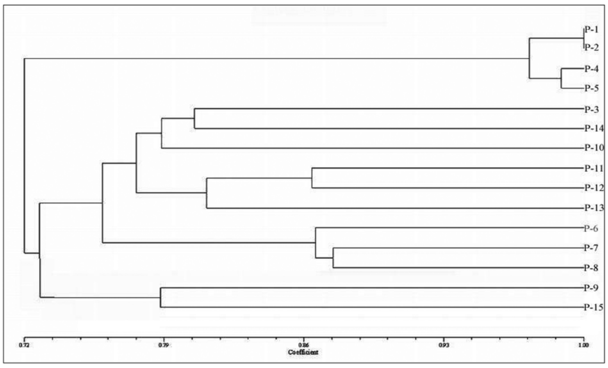

Fig. 7. Genetic relationships of *Pleurotus* strains based on RAPD analysis.

Table 2. Genetic relationships of *Pleurotus* strains based on RAPD analysis

Group No.	Strain No.	Species	Korean name
Group 1	P-1	*P. ferulae*	Bakdal
	P-2	*P. ferulae*	Awi
	P-4	*P. ferulae*	Cheonsan 1
	P-5	P. ferulae	Awi Yesan
Group 2	P-3	*P. ferulae*	Japan Seolyi
	P-14	P. ostreatus	Heukpyeong
Group 3	P-6	*P. fuscus* var. *ferulae*	26065
	P-7	*P. eryngii*	26060
	P-8	*P. eryngii*	Keunneutari
Group 4	P-9	*P. cornucopiae*	Norangneutari
Group 5	P-10	*P. florida*	Sacheol 2
Group 6	P-11	*P. ostreatus*	Suhan 1
	P-12	*P. ostreatus*	Wonhyeong 1
	P-13	*P. ostreatus*	Chunchu 1
Group 7	P-15	*P. sajor-caju*	Yeoreum 2

일본설이)을 제외한 P-1, P-2, P-4, P-5 균주가 하나의 군을 형성하였다. 느타리 균주 중 P-14(흑평)와 아위버섯 균주 중 P-3(일본설이)이 하나의 군을 형성하였다.

본 실험 결과는 종에 따라 형성되는 군이 비교적 뚜렷하게 구분되었다. 이것은 큰느타리버섯과 아위버섯이 microsatelite 마커특징 분석(Della Rosa *et al*., 2004)과 DNA fragment 패턴분석에서(Ro *et al*., 20007)도 확연히 구분된 결과와 일치한다. 그러나 아위버섯 종인 P-3 균주와, 느타리 종인 P-14 균주가 하나의 군을 형성한 것이 특이하다. P-3과 P-14 균주의 군 형성이 계대배양의 횟수에 따라 균주의 유전적 변이가 일어난 것인지(송, 2002), 균주의 수집 지역에 따른 유전적 차이(이, 1994)로 인한 결과 인지는 좀 더 다양한 primer를 가지고 실험이 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

RAPD법은 같은 종 내에서 유연관계가 가까운 균주간의 차이를 구별하는데 좋은 방법이다(이, 1994). 그러나, 본 연구에서 사용한 10개 염기로 수행한 RAPD 분석 결과만으로 품종을 구분하는 것은 신뢰성이 떨어지므로 20개 염기로 구성된 universal rice primer(URP)를 사용하거나(서 등, 2008), 신뢰성을 높이기 위해서 대치배양법을 통한 육안 관찰이나 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 분석이 보충되어야 할 것으로 생각된다. 특히 락카아제 같은 특정 효소에 대한 RFLP나 AFLP 분석으로 아위버섯, 큰느타리버섯, 큰느타리버섯의 변종이 확연히 구분되므로(Urbanellis, *et al*., 2007), 이런 특정 효소와 관련된 DNA를 분석하여 균주간의 차이성을 감지할 필요가 있다고 생각한다.

한편 이 연구에서 5개의 primer를 이용한 RAPD 분석 결과만으로는 아위, 큰느타리, 느타리 버섯간의 유전적 연관성을 명확히 구분하는 한계가 있다. 이러한 RAPD의 단점을 보완하고 재현성과 변별력을 높이기 위해서는 계통발생학적으로 유전적 보존성이 높은 rDNA의 ITS 영역의 염기서열을 분석하는 것이 필요할 것이다. 느타리버섯 속에서 아위버섯의 유전적 관계에 대하여 염기서열내 보존부위와 변이부위의 변이율 이나 치환율 등을 종합적으로 분석하는 연구가 이루어져야 할 것이라고 생각한다.

적요

본 연구의 목적은 식용 및 약용버섯인 아위(阿魏)버섯(*Pleurotus ferulae*) 균주와 느타리버섯속(*Pleurotus* spp.) 종간의 유전적 유연관계를 이해하는 것이었다. RAPD 분석결과 이들 버섯 종들은 유사도 80% 수준에서 7개의 그룹으로 분류되었다. 노랑느타리(*P. cornucopiae*), 사철 2호(*P. florida*), 여름 2호(*P. sajor-caju*)는 각각의 그룹으로 분류 되었고, 큰느타리 균주인 26060과 *P. fuscus* var. *ferulae* 균주인 26065은 같은 그룹으로 분류되었다. 4개의 느타리 균주는 흑평을 제외한 수한 1호, 원형 1호, 춘추 1호가 한 그룹을 형성하였고, 아위버섯 균주 중 일본설이를 제외한 박달, 아위, 천산 1호, 아위예산 균주가 하나의 그룹을 형성하였다. 아위버섯 균주인 일본설이는 느타리 균주인 흑평과 같은 그룹에 속하였다.

참고문헌

강안석, 공원식, 석순자. 1997. 개암버섯 균주의 유전적 특성과 최적 배지조건에 관한 시험. 한국균학회지 25:152-160.

공원식, 김동현, 유창현. 1998. 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균총 형태 비교 및 PCR 기법을 이용한 동정. 한국균학회지 26:466-477.

공원식. 1997. 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*) 수집 균주의 유연관계와 새로운 균주 육성에 관한 연구, 건국대학교, 박사학위논문, pp 1-23.

김대식. 2002. 아위버섯균의 생리적 특성, 전남대학교, 석사학위논문, pp 1-35.

김동현, 공원식, 김경수. 1998. 느타리 버섯류(*Pleurotus* spp.)의 생화학적 방법에 의한 품종구분. 한국균학회지 26:173-181.

김승희. 2003. RAPD에 의한 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)의 계통유전학적 유연관계, 대구카톨릭대학교, 석사학위논문, pp 1-9.

서경인, 장갑열, 유영복, 바순영, 김광호, 고원식. 2008. Universal rice primer(URP)에 의한 DNA 핵산지문법을 이용한 느타리의 유통 품종간 구분. 한국균학회지 36:130-137.

송주희. 2002. 느타리버섯속(*Pleurotus* spp.)의 계대배양에 따른 유전적 변이, 전주대학교, 석사학위논문, pp 1-52.

이희경. 1994. 동위효소 및 RAPD 분석에 의한 느타리버섯속의 유연관계, 숙명여자대학교, 박사학위논문, pp 1-138.

장현유. 2005. 버섯. 2005년 최고농업경영자과정. 한국농업대학, pp. 296-301.

차월석, 이희덕, 김종수. 2004. 아위버섯의 성분에 관한 연구. *Journal of Life Science* 14:205-208.

채정기, 김대식, 서승현, 김현석, 장경수, 윤대령, 오득실, 차월석, 이병래. 2002. 아위버섯의 생리적 특성. 한국자원식물학회지 15:별책 2:58-58.

홍기형, 김병용, 김혜경. 2004a. 아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 영양성분 분석, 한국식품과학회지, 36:563-567.

홍기형, 김병용, 김혜경. 2004b. 아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 추출물의 생리활성 탐색. 한국식품영양과학회지 33:791-796.

Della Rosa, V., Cappuccio, I., Fanelli, C. and Urbanelli, S. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in two basidiomycete species: *Pleurotus eryngii* and *P. ferulae*. *Molecular Ecology Note* 4:271-273.

Graham, G. C., S. P. Mayer and R. T. Henry. 1994. Amplified Method for the Preparation of Fungal Genomic DNA for PCR and RAPD Analysis. *Biotechniques* 16:175-269.

Li, G., Wang, X., Zheng, L., Li, L., Huang, R. and Zhang, K. 2007. Nematicidal metabolites from the fungus *Pleurotus ferulae* Lanzi. *Annals of Microbiology* 57:527-529.

Lopandic, K., Molinar, O. and Prillinger, H. 2005. Application of ITS sequence analysis, RAOD and AFLP fingerprinting in characterizing the yeat genus, Fellomyces. *Microbiological Research* 160:13-26.

Mao, X. L. 2000. The Macrofungi in China. Hanan Science and Technology Press, pp. 64. Beijing.

Nelson, C. D., Kubisiak, T. L. Stine, M. and Nance, W. L. 1994. A Genetic Linkage Map of Long Leaf Pine Based on Random Amplified Polymorphic DNAs. *J. Hered.* 85:433-439.

Ro, H. Y., Kim, S. S., Ryu, J. S., Jeon, C. O., Lee, T. S. and Lee, H. S. 2007. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological Research* 111:710-715.

Saitor, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining Method : Anew Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol, Biol. Evol.* 4:406-425.

Urbanellis, S., Della Rosa, V., Punellim F., Porretta, D., Reverberi, M., Fabbri, A. and Fanelli, C. 2007. DNA fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:592-600.