The Korean Journal of Mycology
© The Korean Society of Mycology

한국균학회지
Kor. J. Mycol. 38(1) : 48-53 (2010)

*Agrobacterium*을 이용한 팽이 버섯 주름조직의 형질전환

박순영[1] · Arend F. van Peer[1] · 장갑열[1] · 신평균[1] · 박윤정[1] · 유영복[1] · 박기문[2] · 공원식[1*]

[1]농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, [2]성균관대학교 생명공학부 식품생명공학전공

Agrobacterium-mediated transformation using gill tissue of *Flammulina velutipes*

Soon-Young Park[1], Arend F. van Peer[1], Kab-Yeul Jang[1], Pyung-Gyun Shin[1], Yunjung Park[1], Young-Bok Yoo[1], Ki-Moon Park[2] and Won-Sik Kong[1*]

[1]*Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707*
[2]*Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746*

(Rerceived June 4, 2010. Accepted June 15, 2010)

ABSTRACT: ***Agrobacterium*-mediated transformation was conducted in order to generate DNA insertional mutants of *Flammulina velutipes*. *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 harboring pBGgHg was transformed into gill tissues of *Flammulina velutipes* strain KACC42777. The transformants resistant on hygromycine (30 μg/ml) were confirmed by PCR. The targeted insertional sites were amplified by inverse PCR and sequenced. To find the phenotype variation of all generated transformants, bottle cultivation which followed by the standard cultivation protocol were conducted. Color variation was observed on the cultivated fruiting bodies. Futhermore, the transformant pool will be used as a good genetic resources for studying gene function.**

KEYWORDS : *Agrobacterium*-mediated transformation, *Flammulina velutipes*, Fruiting bodies, PCR analysis, Transformants

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 팽나무버섯이라고도 불리 우며, 담자균류의 주름버섯목(*Agaricales*) 송이과(*Tricholomataceae*)에 속하는 균으로 야생에서 팽나무, 뽕나무, 사시나무, 버드나무 등의 활엽수의 줄기나 뿌리를 분해하는 백색부후균의 하나이다(Eriksson 등, 1990). 팽이버섯은 맛과 향기가 좋을 뿐만 아니라, 영양적으로 우수하며(Hong 등, 1988; 1989; 1990), 단백질, 아미노산, β-glucan, 비타민 및 미량 원소 등이 함유되어(Lee 등, 1997; Hui 등, 2002) 있다. 또한 암의 치료와 진단에 이용되고 있는 렉틴이 분리되었고(Tsuda 등, 1979; Kim 등, 1999). 항암작용이 있는 것으로 보고된 flammulin(Komatsu 등, 1963)과 혈압강하 작용이 있는 flammutoxin(Lin 등, 1974)을 함유하고 있어 항종양 및 항바이러스, 콜레스테롤 저하작용(고혈압방지), 피부미용 등에 좋다고 알려져 있다. 우리나라에서 1990년대 초부터 국내의 일반농가에서 병재배시스템으로 재배되기 시작한 팽이버섯은 2008년 현재 55,231M/T이 생산되고 있다(농림수산식품부, 2008).

팽이버섯의 경우 갓의 모양과 색깔 및 병저항성 등이 소비자의 선택에 있어서 중요한 요소가 되며 대부분 전통적인 교배조합을 통해 다양한 품종을 만들어내고 있다. 그러나 이러한 전통적인 교잡육종법은 분자유전학적인 방법보다는 효율성이 떨어지고 지속적으로 같은 형질이 유지되는데 있어서 어려움이 따른다. 때문에 팽이버섯의 염기서열 분석이 이루어진다면 좀 더 다양한 우량품종들을 손쉽게 얻어낼 수 있다고 본다. 생물체의 전체적인 유전자의 기능을 분석하기 위해서는 각 유전자 기능이 소실된 돌연변이집단을 대량 육성하는 것이 가장 효과적인 핵심 원천기술 중의 하나로 알려져 있다. 버섯의 형질전환에는 electroporation, *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation(ATMT) 등이 사용되고 있는데, 이 중 ATMT방법은 *A. tumefaciens*가 host cell에 자신의 유전자를 삽입하는 특성을 이용한 것이다. De Groot 등(1998)은 filamentous fungi를 ATMT법으로 형질전환 하면서 actosyringone과 hygromycin 감응성도를 테스트 하였다. Chen 등(2000)은 *Agaricus bisporus*의 gill tissue에 ATMT법으로 hygromycin 유전자를 도입하여 형질전환 체계를 확립하였고 Cho 등(2006)은 ATMT법을 이용하여 팽이버섯의 gill tissue에 형질전환을 시도하였다. ATMT법은 *Agaricus bisporus*의 개발에 있어서도 매우 중요한 방법 중 하나이다(Chen 등, 2000; Mikosch 등, 2001). 근래에는 먹물버섯에서 돌연변이 유발처리에 의해 자실체 형성의 여러 단계에서 이상이 있는 변이체가 얻어졌다고 보고되었으며, 표고에 있어서도 자실체 형성과 관계가 있는 유전자가 단리 되어 염기서열분석과 단백질 기능의 분석이 이루어지고 있다(Kajiwara 등, 1992; Endo 등, 1994; Kondoh 등, 1995). 이와 같은 분자

*Corresponding author <E-mail : wskong@korea.kr>

유전학적 접근이 점차 증가되고 있는 실정이지만 전체적인 유전자의 기능 분석은 아직까지 이루어지고 있지 않은 상태이며 그에 관한 연구를 수행하기에는 매우 어려운 실정이다. 따라서 본 연구는 팽이버섯의 일부 유전자에만 국한된 것이 아닌 ATMT방법을 사용하여 대량의 돌연변이체를 생성하고 이를 분석하여 전체 유전자에 대한 정보를 얻고 팽이버섯의 분자육종의 기본 토대를 마련하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 (ATMT)

팽이버섯 균주(KACC42777)는 국립원예특작과학원 버섯과에서 제공받았다. 팽이버섯의 주름조직(gill tissue)은 표준 병재배법에 의해 재배한 자실체에서 얻었다. 팽이버섯의 형질전환을 위해서 *Agrobacterium* AGL-1을 이용하였다. AGL-1의 plasmid 벡터는 pBGgHg로 hygromycin 저항성 유전자를 포함하고 있다(Chen 등, 2000). 이 binary vector pBGgHg (9.6 kb)는 pCAMBIA1300를 backbone으로 하여 hygromycin B phosphotransferase(*hph*), EGFP genes, 양송이 glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase(*gpd*) promoter와 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S terminator로 구성되어있다.

*A. tumefaciens*은 50 ug/ml kanamycin의 Luria-Bertani (LB; yeast extract 0.5%, tryptone 1%, sodium chloride 1%, distilled water) agar plate에 28°C조건으로 2일간 배양한 후 단일 colony를 50 ug/ml kanamycin의 LB broth에 28°C의 조건으로 2일간 200 rpm에서 shaking 배양 하였고, 배양된 LB broth 2 ml을 minimal medium[MM; (K-buffer pH7.0 10 ml; K_2HPO_4 200 g/L, KH_2PO_4 145 g/L), (M-N solution 20 ml; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 30 g/L, NaCl 15 g/L), (1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 ml), (20% glucose 10 ml), (0.01% $FeSO_4$ 10 ml), (Spore trace elements 5 ml; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 mg/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 100 mg/L), (20% NH_4NO_3 2.5 ml), per L] 25 ml에 28°C의 조건으로 1일간 200 rpm에서 shaking 배양한다. 다시 MM에서 배양된 AGL-1을 600 nm에서 0.15의 농도로 희석하여 induction medium[IM; (1.25 M K-buffer pH4.9 0.8 ml; K_2HPO_4 184 g/L), (M-N solution 20 ml), (1% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 ml), (20% glucose 10 ml), (0.01% $FeSO_4$ 10 ml), (Spore trace elements 5 ml), (20% NH_4NO_3 2.5 ml), (50% glycerol 10 ml), (1M MES pH5.8 40 ml), (200 mM acetosyringone 2 ml), per L] 에서 28°C의 조건으로 6시간동안 200 rpm에서 shaking 배양한다. 크린벤치 내에서 팽이버섯의 gill tissue를 조직에서 칼로 분리시켜 멸균된 그릇에 모은 후 2~4 mm 크기로 자른 후 6시간동안 IM에서 배양된 bacteria액에 침지하여 함께 vaccum을 30분간 실시한 뒤 IM agar[(1 M MES buffer pH5.8 40 ml), (AB salt 10 ml; NH_4Cl 5%, $MgSO_4$ 1.5%, 1 M KCl 10%, 0.5 M $CaCl_2$ 0.7%, 10 mM $FeSO_4$ 5%), (20% glucose 5 ml), (200 mM acetosyringone 2 ml), (agar 1.8%), (cellophane membrane)]에서 25°C~28°C 조건으로 4일간 co-cultivation한다. IM agar에서 균사 형성이 확인되면 균사가 형성된 cellophane membrane을 1st selection medium(sucrose 10%, yeast extract 0.3%, casein hydrolysate enzymatic 0.3%, agar 1.5%, hygromycin B 30 ug/ml, 200 uM cefotaxim)에 옮겨서 25°C~28°C 조건으로 7일간 배양한다. 1st selection medium에서 활성을 보이는 균사체들만을 다시 2nd selection medium (malt extract 2%, peptone 0.5%, hygromycin B 30 ug/ml, 200 uM cefotaxime, agar 1.2 g)에 옮겨서 7일간 배양한 뒤 활성을 보이는 균사체들을 최종 선발하여 PDA(potato dextrose agar)에 옮겨 배양한다.

2. 형질전환 변이체의 PCR 및 Southern hybridization 분석

형질전환 선발 배지에서 균사생장이 확인된 균주들은 PDA에서 25°C에서 7일간 정치 배양한다. 배양된 균사체를 동결건조 하여 액체질소를 사용하여 powder화하여 DNA 추출에 사용하였다. DNA는 TOYOBO사의 Mag Extractor (Plant DNA purification kit)를 이용하여 추출하였다. 동결 건조한 균사를 액체질소로 곱게 마쇄하여 균사 500 mg에 lysis buffer 600 μl를 넣고 65°C에서 10분 반응시킨 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 600 μl 첨가하고 vortexing한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액만 취하였다. 여기에 흡착액 600 μl와 자성비드 40 μl를 넣은 후 trapper에 튜브를 끼워 자성비드에 DNA가 붙게 하였다. 자성비드를 세정액과 70% 에탄올로 2번씩 washing한 후 상온에서 10분간 건조시켜 100 μl의 3차 멸균수에 녹였다. trapper에 튜브를 끼워 자성비드와 DNA가 녹아있는 액을 분리한 후 DNA만 새 튜브에 옮겨 4°C에 보관, PCR을 위한 template DNA로 사용하였다.

PCR은 *gpd-FH* (5′-GAAGAAGCTTTAAGAGGTCCGC-3′)와 *hph-R* (5′-GGCGACCTCGTATTGGGAATC-3′)를 primer로 하여 수행하였다 (Chen 등, 2000). 형질전환체를 Southern hybridization으로 분석하기 위하여 Genomic DNA에 *Eco*RI과 *Sac*I 제한효소처리를 한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. Anagarose gel은 UV254 nm로 2분간 처리한 후 250 mM HCl에 20분간 depurination 시켰다. 이후 gel은 denaturation buffer(0.5 M NaOH; 1.5 M NaCl, pH 7.5)에 30분 담그고 마지막으로 neutralization buffer(0.5 M TrisHCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl)에 10분간 담근 후 10 × SSC(1.5 M NaCl, 0.15 M sodiumcitrate) 용액을 사용하여 nylon membrane (Amersham)으로 20시간 capillary transfer 하였다. 이후 membrane은 80°C에서 2시간 구웠다(Sambrook 등, 1989). Prehybridization과 hybridization은 hybridization solution (5 × SSC, 50% formamide, 5 × Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 25 μg/ml denatured salmon sperm DNA)을 사용하여 42에서 Prehybridization은 3시간, hybridization은 24시간 동안 수행하였으며, probe는 *gpd-FH*와 *hph-R*을 primer로 하여 증폭한 PCR 산물을 [a-^{32}P] dCTP(Ladderman™ Labeling kit, Takara)로 제공된 protocol에 준하여 labelling

하여 사용 하였다. membrane은 imaging screen (Fuji)에 18시간 노출시킨 후 DNA band를 personal molecular imager systems(Bio-Rad)으로 확인하였다.

3. 형질전환 변이체의 Inverse PCR

PCR 및 Southern hybridization으로 확인된 균주들은 배양된 균사체를 동결건조하여 액체질소를 사용하여 powder화하여 MagExtractor- Plant Genome-Nucleic Acid Purification Kit (TOYOBO)를 사용하여 DNA를 추출하였다. AGL-1 pBGgHg은 항생제 저항성 유전자를 포함하고 있는 T-DNA 부분만이 transformants의 내부로 삽입되는 특성을 이용하여 vector의 T-DNA 부분의 염기서열을 분석한 뒤 Inverse PCR에 사용될 제한효소를 선택하였다. 형질전환체 gDNA 100 ng을 사용하였으며 제한효소 처리는 *EcoR*I 10U를 사용하며 Self-ligation은 T4 DNA ligase(400U/ul, SolGent)를 사용하였다. Inverse PCR을 위한 1st PCR primer set 는 IPCR-F/R(IPCR-F 5´-ACAGTTTGCCAGTGATACACATG-3´, IPCR-R : 5´-TAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAG-3´)를 사용하였으며 PCR 조건은 95°C 2분간 변성시킨 후, 95°C 20초, 60°C 40초, 68°C 10분의 사이클을 40회 한 후 68°C에서 20분간 반응시켰다. 2nd PCR primer set는 IPCR-F1/R1(IPCR-F1 : 5´-TGTAGTGTATTGACCGATTCCTTG-3´, IPCR-R1 : 5´-TCGCTCATGTGTTGAGCATATAAG-3´)를 사용하였으며 PCR 조건은 95°C 2분간 변성시킨 후, 95°C 20초, 60°C 40초, 68°C 10분의 사이클을 20회 한 후 68°C에서 20분간 반응시켰다. 2nd PCR 후 증폭산물이 410 bp 이상 band를 선발하여 Gel extraction(Quiagen)하여 Solgent사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

4. 형질전환 변이체 병재배 특성조사

형질전환 변이체의 자실체를 발생시키기 위해서 PDA 평판배지에서 7일간 배양한 후 미송톱밥과 미강을 80 : 20으로 혼합(수분 함량은 65%내외)하여 850 ml 병에 580~600 g이 되도록 입병한 후 121°C에서 90분간 고압살균하고 냉각한 후 균 절편을 접종하여 16~18°C에서 30일간 배양하였다. 배양이 완료된 병은 표면의 오래된 균사체를 균긁기한 후 생육실로 옮겨 버섯발이를 유도하였다. 재배실 규모는 23의 판넬재배사로, 발이시 온도는 14°C, 습도 93%를 유지하였으며, 버섯이 병목에서 1 cm에 이르면 온도를 7°C, 습도 85%로 조절하여 생육시켰다. 자실체의 크기가 5 cm에 이르면 종이권지를 씌워 대 생장을 유도하였다. 수확시기는 자실체 갓의 크기가 2 cm가 되는 개체가 나타났을 때로 잡았으며 자실체의 갓직경, 대직경, 대길이 등은 농촌진흥청 농업과학기술연구 조사분석기준(농촌진흥청, 2003)에 준하여 실시하였다.

결과 및 고찰

팽이버섯 주름조직을 이용하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환을 수행한 결과 Hygromycin B를 선발 marker로 사용하여 형질전환체를 선발할 수 있었다. 팽이버섯의 hygromycin B 감수성 시험을 거쳐서(데이터 생략) 확실한 선발이 가능한 30~100 ug/ml의 농도를 검토한 결과 30 ug/ml에서 14.25%의 선발효율을 보여 효율적으로 transformants를 선발 할 수 있음을 알 수 있었다(Table 1). Cho 등(2006)은 A*grobacterium*을 이용해서 팽이버섯의 내부로 유전자의 도입을 유도하였으며 항생제 marker에 대한 적정 수준의 hygromycin 농도는 50 ug/ml로 보고한 바 있으나 본 연구에서는 팽이버섯과 느타리를 병행 해본 결과 각각 hygromycin 30 ug/ml, 100 ug/ml를 나타냈다. 이는 시험에 사용한 균주의 차이일 수도 있으며 느타리보다 팽이버섯이 항생제에 대한 감수성이 높아 좀 더 효율적인 분자 유전학적 연구 대상이 될 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 Cho 등(2006)이 보고한 형질전환의 빈도는 16%로 본 연구 결과인 14.25%와 비슷한 결과를 보였다.

항생제 배지에서 균사활력을 보이는 균주를 선발하여 (Fig. 1) 실제로 형질전환이 이루어졌는지를 확인하기 위하여 pBGgHg 벡터의 양쪽 border 내에 존재하는 *gpd-FH*, *hph-R* primer를 사용하여 PCR로 확인한 결과(Fig. 2) 모든 균주

Table 1. Selection efficiency of the transformants at the different hygromycin concentration

Strain	Agrobacterium	Hygromycin (ug/ml)	Efficiency of selection (%)
KACC42777	AGL1 pBGgHg	30	14.25
		50	8
		80	0.5
		100	0.25

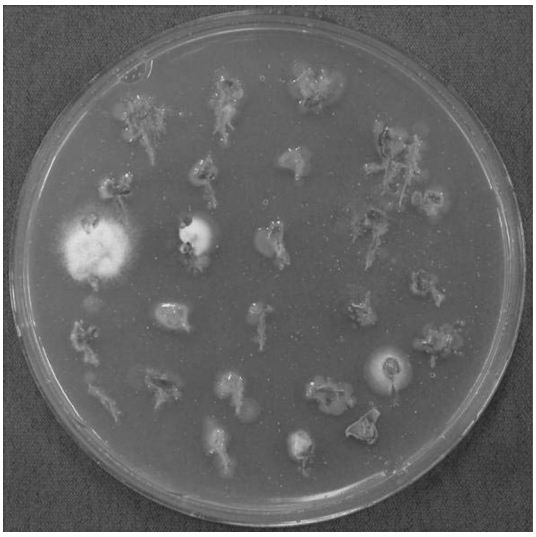

Fig. 1. Selection of transformants which showed viable mycelial growth at the 1st selection medium containing hygromycin antibiotics.

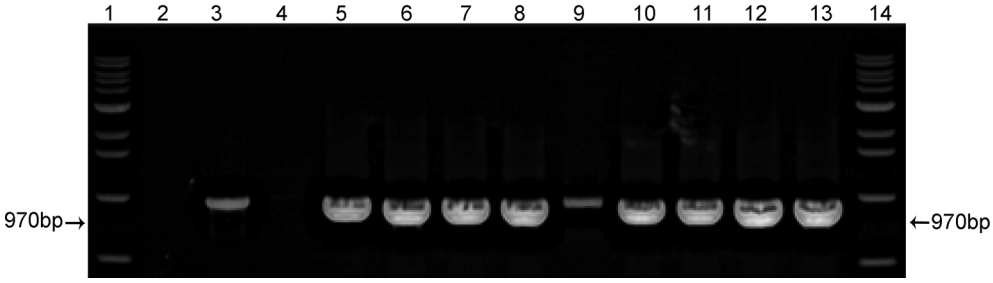

Fig. 2. PCR analysis of DNA isolated from the hygromycin resistant transformants of *F. velutipes*. lane2: negative control, lane3: positive control with vector pBGgHg, lane4: water, lanes 5 to 13: transformants, lanes 1, 14: DNA molecular size markers, primer: gpd-FH, hph-R.

에서 예상했던 970bp의 밴드를 나타내어 형질전환체임을 확인할 수 있었다.

형질전환체의 Southern hybridization 분석에서는 벡터내에 동일한 위치에 존재하는 것으로 알려진 *Eco*RI과 *Sac*I으로 자른 genomic DNA를 사용하여 시험한 결과 동일한 밴드 패턴을 보일 것으로 예상하였으나 완전히 다른 양상을 보였다. 이에 벡터의 양쪽 border와 *gpd* promoter 부위에서 primer를 설계하여 염기서열을 재확인하였다(데이터 생략). 그 결과 probe로 사용한 hygromycin 부위에 *Eco*RI 제한효소 사이트가 있는 것을 확인하였다. *Sac*I으로 처리된 DNA와 *Eco*RI으로 처리된 DNA에 대한 Southern hybridization 분석은 *Eco*RI 쪽 밴드의 수가 2배로 되어 삽입된 벡터 수를 확인할 수 있을 것으로 예상하였으나 일부 lane은 밴드의 구분이 불가능하였다. 본 결과에서는 비록 밴드가 뚜렷하지 않아 정확한 copy 수를 확인하기는 어려웠으나 확실히 형질전환된 것을 알 수 있었으며 1개에서 3개까지 다양하게 삽입됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

PCR 및 Southern hybridization 분석으로 형질전환이 확인된 균주들에 대하여 inverse PCR을 통해서 형질전환체 genomic DNA 내부에 삽입된 외래유전자의 알려진 염기서열을 바탕으로 T-DNA 주변의 염기서열 정보를 얻을 수 있었다. inverse PCR의 2회 연속된 PCR 반응으로 얻어진 산물의 밴드 크기가 제한효소 위치에서 2nd PCR primer까지의 거리보다 큰 410 bp 이상인 밴드에 대하여 염기서열을 분석하여 BlastX로 분석한 결과이다(Table 2). 표에서 각

Table 2. Homologous genes to nucleotide sequences of 2nd inverse-PCR products of the transformants

transformants	Similar gene	Score	E value
1	peptidase [*Cryptococcus neoformans* var. neoformans JEC21].	61.6	4e 26
	aminopeptidase [*Agaricus bisporus*].	37.7	0.9
2	exocyst complex component sec8 [*Laccaria bicolor* S238N-H82].	99.4	3e 60
	hypothetical protein CC1G_01761 [*Coprinopsis cinerea* okayama7#130].	100	3e 57
3	hypothetical protein CC1G_01761 [*Coprinopsis cinerea* okayama7#130].	139	2e 56
	exocyst complex component sec8 [*Laccaria bicolor* S238N-H82].	138	5e 54
4	predicted protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82].	48.9	4e 04
	hypothetical protein [*Cryptococcus neoformans* var. neoformans JEC21].	42.4	0.017
5	predicted protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82].	97.1	8e 19

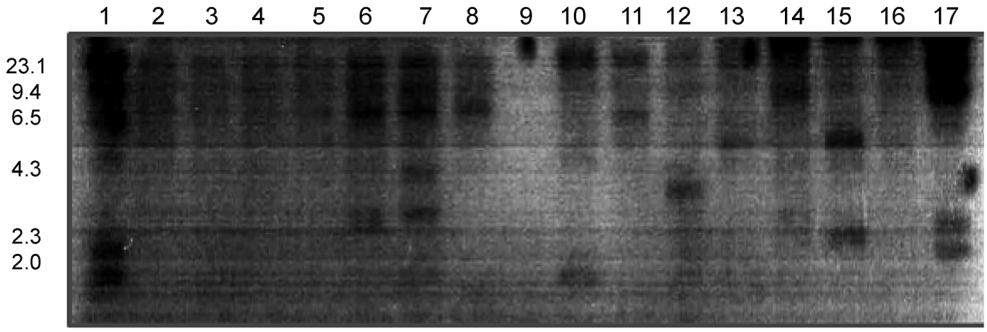

Fig. 3. Southern blot hybridization analysis of *F. velutipes* transformants. Genomic DNA from the transformants was digested with *Eco*RI, *Sac*I and probed with *hph* gene. Lanes 1, 17: *Hind* III marker. Lane 2 to 8: gDNA was digested with *Eco*RI. Lanes 10 to 16: gDNA was digested with *Sac*I.

형질전환체에 두 가지 분석은 gDNA의 *Eco*RI 절단 후 self-ligate를 이용한 PCR 산물의 정방향과 역방향으로 나온 밴드를 염기서열 분석한 결과이며, 5번 형질전환체의 경우와 같이 한 방향의 결과를 얻는 것은 제한효소 site가 genome 사이에 너무 먼 곳에 위치하고 있는 것으로 예상되며 이때는 PCR 산물 얻지 못하게 될 것이며, 또 다른 가능성은 제한효소 site가 T-DNA의 left border 바로 다음에 위치한 것으로 예상된다. 5번 형질전환체의 경우 PCR 산물 size는 430 bp 정도인데이 것은 제한효소 site가 거의 그대로 나올 경우에 생길 수 있는 size로 분석이 불가능하였다. 표에서 보는 바와 같이 삽입 부위의 유전자는 다양하게 나타났으며 이중 일부는 그 기능이 알려진 것도 있으나 아직 기능이 명확하지 않은 유전자도 있었다. 이들 유전자의 기능을 밝히기 위해서는 그 유전자의 파괴로 인하여 나타날 수 있는 형질전환체의 생리적 또는 형태적 변이에 대한 심층적인 검토가 필요하다.

팽이버섯 형질전환체의 형태적 변이를 확인하기 위하여 표준 병재배 방법에 따라 재배한 결과(Table 3) genomic DNA에 외래유전자가 무작위적으로 삽입되어 이루어진 형질전환체는 유전자가 삽입된 부위에 따라 형태적인 변이를 보일 수도 있고 아무런 형태적 변이를 확인할 수 없는 경우도 있었다. 대부분의 형질전환체의 수량과 자실체의 재배적 특성을 보면 양적형질에서의 차이를 보이고 있으나 이는 환경변이나 균 생육상태에 따라 따르게 나타날 수 있어 정확하게 유전자의 기능으로 확인할 수는 없었다. 다만, wild type은 원래 갈색의 자실체를 형성하나 Table 3의 No. 9~12 등 에서는 백색을 나타내어 형질전환에 의하여 삽입된 부위 유전자가 기능을 잃어 나타났을 가능성이 있었다(Fig. 4). 또한 표에서는 나타내지 않았으나 일부 형질전환체는 전혀 발이가 되지 않거나 생육상태가 매우 좋지 못해서 관찰이 거의 불가능한 것들도 있었다.

*A. tumefaciens*를 이용한 형질전환은 다양한 부분에 임의로 삽입되는 것을 확인 하였고 이에 따라 본 연구에 사용한 inverse-PCR로는 확인하기 힘든 경우가 많았다. 이를 해결할 수 있는 방법의 개발이 더 필요한 것으로 판단되며, 형질전환체의 내부에 삽입된 부분에 의하여 유발되는 변이를 유전정보와 연관하여 해석하기 위해서는 팽이 유전체의 완전염기서열의 분석이 큰 도움이 될 것으로 본다.

Table 3. Characteristic of the transformants after bottle cultivation

No.	Weight (g)	No. of individuals	Cap (mm)		Fruitbody (mm)		Weight (3)	Color
			diameter	thickness	lenth	thickness		
Wild type	90	70	18	2.5	105	2.5	3	B
1	135	106.6	15	2.7	83.3	3	2	B
2	81	68.4	16.3	3.2	70	3.2	2	B
3	20	15	15.5	3.3	45	3.5	1.5	B
4	119	91.7	15	2.8	63	3.2	1.5	B
5	119.8	94.4	16.3	3	90	3.2	1.4	LB
6	118.9	112	14.6	2.7	110	3.3	2	LB
7	15	10	16	3.3	113	3.3	2.5	LB
8	124.4	96	15	2.3	97	3.3	1.5	LB
9	96.5	87.5	12.3	2	73	3.2	1.5	W
10	20	5	13	2	103	3.6	2.5	W
11	159.6	91.1	14	2	110	3.6	2	W
12	15	5	12.3	1.2	70	2	2	W

Fig. 4. Color variation of the Fruiting body of the transformants.

적요

팽이버섯의 다양한 유전자의 기능을 연구하기 위한 방법으로 팽이 자실체의 주름조직을 사용하여 *A. tumefaciens*을 매개로 한 형질전환을 수행하였다. Hygromycin 항생제 저항성 유전자를 포함하고 있는 AGL-1 pBGgHg를 팽이버섯의 자실체 조직에 도입시킴으로서 형질전환체들을 얻을 수 있었다. 형질전환체 선발은 첫 번째로 hygromycin 선발 배지에서 선발한 뒤 *gpd-FH, hph-R* primer를 이용하여 PCR로 확인 할 수 있었다. hygromycin은 30 ug/ml에서 선발 효율이 가장 높았다. 형질전환체 중 일부는 갈색 자실체를 갖는 wild type과는 달리 백색 자실체를 나타내었다. 형질전환체의 southern blot결과 외래유전자가 팽이버섯 내부에 하나 또는 그 이상의 다양한 copy 수로 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 또한 삽입된 유전자의 주변 염기서열에 대한 정보는 Inverse PCR을 통해 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 : 20070401034021)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

농림수산식품부 2009. 2008 특용작물생산통계.

농촌진흥청 2003. 농업과학기술연구 조사분석기준.

Chen, X., Stone, M., Schlagnhaufer, C. and Romaine, C. P. 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Appl. Environ Microbiol. 66:4510-4513.

Cho J. H., Lee S. E., Chang W. B. and Cha J. S. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of the winter mushroom, *Flammulina velutipes*. Mycobiology 34(2):104-107.

De Groot, M. J., Bundook, P., Hooykaas, P. J. and Beijersbergen, A. G. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nat. Biotechnol. 16:839-842.

Endo, H., Kajiwara, S., Tsunoka, O. and Shishido, K. 1994. A novel cDNA, priBC, endoding a protein with a Zn(II)2Cys6 zinc cluster DNA-binding motif, derived from the *basidiomycete Lentinus edodes*. Gene 139:117-121.

Eriksson, K. -E. L., Blanchette, R. A. and Ander, P. 1990, Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, pp. 20-31.

Hong, J. S., Kim, Y. H., Lee, K. R., Kim, M. K., Cho, C. I., Park, K. H., Choi, Y .H. and Lee, J. B. 1988. Composition of organic acid and fatty acid in *Pleurotus ostreatus, Lentinus edodes and Agaricus bisporus.* Korean J. Food Sci. Technol. 20:100-105

Hong, J. S., Kim, Y. H., Kim, M. K., Kim, Y. S. and Sohn, H. S. 1989 Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, P*leurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. Korean J. Food Sci. Technol. 21:58-62.

Hong, J. S., Kim, Y. H., Kim, M. K., Kim, T. Y. and Kim, K. J. 1990. Studies on the lipids composition of Korean edible mushrooms. Korean J. Dietary Culture 5:437-442.

Hui Y. F., Den E. S. and Chi T. H. 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. J Food Lipids 9:35-46.

Kajiwara, S., Yamaoka, K., Hori, K., Miyazawa, H., Saito, T., Kanno, T. and Shishido, K. 1992. Isolation and sequence of a developmentally regulated putative novel gene, priA, from the *basidiomycete Lentinus edodes.* Gene 114:173-178.

Kim, H. S., Son, S. Y., Hwang, S. Y. and Hong, B. 1999. Purification and characterization of the lectin from mushroom *Flammulina velutipes.* J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 42:304-309.

Kondoh, O. and Shishido, K. 1995. Characterization of the promoter region of a cell-adhesion protein gene derived from the *basidiomycete Lentinus edodes.* FEMS Microbiol. Lett. 130:189-192.

Komatsu, J., Tarekawa, H., Nakanishi, K. and Watanabe, Y. 1963. *Flammulina velutipes* with antitumor activities. J. Antibiot. Ser. A. 16:139-143.

Lee G. D., Chang H. G. and Kim H. K. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. Korea J Food Sci 29:432-436.

Lin, J. Y., Lin, Y. J., Chen, C. C., Wu, H. L., Shi, G. Y. and Jeng, T. W. 1974. Cardiotoxic protein from edible mushrooms. Nature 252:235-237.

Mikosch, T. S. P., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A. S. M. and van Griensven, L. J. L. 2001. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from mushroom *Agaricus bisporus*. Curr. Genet. 39:35-39.

Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tsuda, M. 1979. Purification and characterization of a lectin from the mushroom, *Flammulina velutipes.* J. Biochem. 86:1463-1468.