

AFLP 분석 및 체세포 불화합성에 의한 느타리 유사품종의 확인

서경인¹ · 유영복¹ · 장갑열¹ · 신평균¹ · 오연이¹ · 김광호² · 공원식^{1*}

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ¹건국대학교 식량자원학과

Genotypic Identification in Commercial Strains of *Pleurotus ostreatus* based on AFLP and VCGs

Kyoung-In Seo¹, Young-Bok Yoo¹, Kab-Yeul Jang¹, Pyung-Gyun Shin¹, YounLee Oh¹, Kwang-Ho Kim² and Won-Sik Kong^{1*}

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA Chungbuk Eumseong 369-873

²Department of Crop Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ABSTRACT : We already reported four groups which contains some similar strains based on URP-PCR in the previous paper. The objective of this study was to confirm those strains by the amplified fragment length polymorphism (AFLP) and vegetative compatibility group (VCG). AFLP analysis showed no difference among these strains except ASI 2595 and 2183 in Weonhyeong group and ASI 2829 in Suhan group. They showed specific DNA bands only in the result of P + AG/M + AAG and P + GT/M + ATG primer combinations out of eight different combinations. The AFLP primers produced a total of 330 fragments between 80 and 1000 bp in length for 31 *Pleurotus ostreatus* strains. At a genetic similarity of 0.96, the UPGMA analysis separated the isolates into four distinct clusters. Each group was classified by similar strains. Confrontation test by vegetative compatibility groups (VCGs) also showed distinct line between strains from different groups, but no line between similar strains within the cluster. Our results indicate that most of similar strains was not distinctness. Thus, similar strains are considered to be very close on the genealogy of their parent or same strain with different name.

KEYWORDS : AFLP, Phylogenetic relationship, *Pleurotus ostreatus*, Strain identification, VCG (Vegetative Compatibility Group)

서 론

국내에서 소비성이 높으며 이제까지 많이 재배되었던 느타리 품종으로는 원형느타리, 춘추2호, 수한 품종이 있

다. 원형느타리는 원형질체 융합법에 의해 육성되었으며, 유효경수가 다른 품종에 비해 많고 다발이 크며, 불량으로 버려지는 버섯이 거의 없어 상품화율이 높다. 춘추2호는 국외에서 도입된 품종으로 균사생장이 양호하고 다수성이며 자실체 색깔이 회색이다. 자실체 형태는 환경에 따라 다소 균일하지 못한 경우가 있으나 생산량이 적은에서 아주 높은 편이며 병 재배 또는 봉지 재배시 가장 많이 재배되고 다른 품종에 비해 발이 및 생육이 빠르다. 수한은 중국에서 도입된 품종인데 내서성, 내한성이 강하며 수량이 높고 품질이 우수하며 자실체 갓이 흑회색으로 자실체의 저장성이 강하여 많이 재배하는 품종 중의 하나이다. 지금까지는 느타리를 구분할 때 주로 자실체의 형태, 개체의 발달과정 등을 이용하여 왔으나 이러한 방법들은 환경에 따른 모양, 색깔, 크기의 변이성 때문에 정확한 버섯 품종 구분의 요구에 부응하지 못하고 있다. 그렇기 때문에 유전적, 생화학적 방법들에 의한 분류가 요구되고 있다. 따라서 버섯 품종의 구분을 명확히 할 수 있는 분자 marker를

Kor. J. Mycol. 2013 March 41(1): 14-20
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.1.14
pISSN 0253-651X
© The Korean Society of Mycology

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

Received March 19, 2013
Revised March 25, 2013
Accepted March 26, 2013

© 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.

개발하는 것이 버섯 품종유통의 혼선을 피할 수 있으며, 버섯 품종육종에서도 큰 도움이 될 것이다(Seo *et al.*, 2011a, b).

AFLP 기법은 사용된 제한효소의 인지부위와 3' 말단 부위에 첨가된 selective nucleotide의 G, C 함량 및 primer의 조합형에 따라 AFLP band의 수와 다형성이 크게 좌우되며 일반적으로 적절한 primer와 제한효소의 선발에 의해 약 50~100개의 유효한 band를 나타낼 수 있다고 알려져 있다(Aarts *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 1997). Paran 등(1998)은 AFLP 분석법이 RAPD에 비해 4배 정도의 다형성 band를 나타내며 AFLP의 genotype에 따라 품종생태형을 뚜렷하게 구분할 수 있다고 하였다. 이 방법은 지금까지 벼(Zhu *et al.*, 1998, Kang *et al.*, 2003) 등과 같은 여러 작물에서 유전적 변이 및 유연관계를 밝히는데 사용되어 왔다. 하지만 AFLP 기법을 이용한 국내 느타리 유통품종에 대한 유연관계 분석은 보고된 바가 없어 본 연구에서는 URP-PCR 분석에서 같은 band pattern을 보인 균주들을 대상으로 이들 간에 품종간 차이를 좀 더 알아보기 위해 제한성이 좋고 DNA 다형성을 상세히 볼 수 있는 AFLP 분석을 하였다.

균류가 자연 상태에서 이질핵체를 만드는 데는 상당한 선택의 압력이 있으며 장벽이 있는데, 그 이유는 대부분의 균류가 핵에 의해 암호화된 '이질핵체 불화합성'(het) 유전자좌를 가지고 있기 때문이다. 예를 들면 *Neurospora crassa*는 불화합성 유전자좌가 최소 10개 있고, 각 유전자좌에는 2개의 대립유전자가 있는데, 그에 따라 잠재적으로 2개의 상이한 영양적 화합성군(Vegetative Compatibility Groups, VCGs)이 있다. 서로 다른 VCG의 균주를 교배시키면 접촉 지점에서 군사가 융합한 다음 서로 다른 정도의 세포질 불화합성이 나타나는데, 두 균주가 공통적으로 가지고 있는 het 유전자 좌리의 수에 따라 최소한 부분적으로라도 그 정도가 달라진다. 따라서 이러한 현상을 이용하여 버섯 품종 판별을 하는 대치배양에 의한 균주간 화합성 검정을 하였다.

본 연구에서는 국내에서 생산·판매 신고되어 유통되고 있는 느타리 품종 중 군사체와 자실체 형태로 품종 구분을 할 수 없는 균주를 대상으로 AFLP 분석 및 균주간 대치배양을 이용하여 품종의 유사성을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 시험에 사용된 균주는 국립원예특작과학원 인삼특작부 버섯과의 보존 균주 중 ASI 2180 외 2균주와 2731 외 4균주, 2504 외 15균주, 2344 외 6균주로 총 31균주이다. 각 균주들의 품종명은 Table 1에 나타내었다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출을 위한 군사 배양은 PDA (potato

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

Lane No.	Group No.	ASI No.	Commercial name
1	I	2180	Wonhyeong
2		2183	Wonhyeong2
		2595	^a Suhan2
3	II	2826	Sinnong22
4		2729	Cheongdo21
5		2731	Wangheukpyeong
6		2732	Nongong98
7		2733	Chiak3
8	III	2829	Jangpung
9		2828	Samgu9
10		2825	Sinnong14
11		2504	Suhan
12		2549	Sinnong94
13		2598	Sinnong46
14		2707	Kimjae9
15		2709	Jangan2
16		2718	Kimjae7
17		2721	Jangan5
18		2727	Sinnong12
19		2734	Chiak4
20		2794	Chiak5
21		2795	Chiak7
22		2796	Samgu5
23		2797	Samgu8
24	IV	2344	Chunchu2
25		2487	Cheongpung
		2488	^a Myeongweol
26		2708	Kimjae10
27		2711	Jangan3
28		2719	Kimjae8
29		2597	Sinnong8

^aStrains using in Fluorescent-AFLP.

[†]ASI, Agricultural Sciences Institute, Suwon, Korea.

dextrose agar) plate에 군사를 접종하여 26°C의 incubator에서 7일간 배양하였다. 그 후 MCM 액체배지에 PDA plate에서 자란 군사를 옮겨 접종하였고, 7일간 액체배지에 배양하여 군사를 동결 건조시킨 후 본 실험에 사용하였다. DNA는 TOYOBO사의 Mag Extractor(Plant DNA purification kit)를 이용하여 추출하였다. 동결 건조한 군사를 액체질소로 곱게 마쇄하여 군사 500 mg에 lysis buffer 600 µL를 넣고 65°C에서 10분 반응시킨 후, phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 600 µL 첨가하고 vortex 한 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 wash 한 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.

AFLP 조건과 데이터 분석

AFLP 분석은 Vos 등(1995)의 방법을 조금 변형하여 수행하였다. 유전자의 발현에는 여러가지 방식이 존재하는데, 염색체 상태에서 보면 euchromatin은 발현이 되는 부분이고 heterochromatin의 부분을 가지고 있는 부분은 발현이 안되는 부분이다. Centromere 부분에 있는 heterochromatic region과 chromosome의 끝부분은 고도의 methylation과 낮은 재조합 비율을 가지고 있으며, *Pst*I과 같은 제한효소는 methylation에 민감하기 때문에 *Pst*I과 *Mse*I 조합의 primer를 사용하면 유전적으로 active한 euchromatin region (진정염색질 부분)에서 marker의 빈도를 증가시킨다는 연구보고가 있었다(Young *et al.*, 1999; Menz *et al.*, 2002). 따라서 본 실험에서는 *Pst*I과 *Mse*I을 이용하여 분석하였다.

DNA에 *Pst*I과 *Mse*I 제한효소(New England Biolabs, USA)를 처리한 다음 DNA 단편에 *Pst*I과 *Mse*I adaptor를 첨가하여 14°C에서 12시간 ligation하였다. Ligation된 DNA는 1:20으로 희석하여 Pre-amplification을 하기 위한 재료로 사용하였다. pre-amplification은 adaptor에 상보적인 염기서열을 가진 AFPP-O와 AFMP-A primer를 이용하여 제한효소로 절단된 DNA의 특정부위만 증폭시켰고, PCR 반응 혼합액은 총 30 µL로 하여 희석된 DNA 6 µL에 primer 각각 5 pmole씩 넣었으며 1× buffer, dNTP 200 uM, 1U Taq polymerase(Nurotics)를 첨가하였다. PCR 반응은 95°C 1분을 첫 cycle, 95°C 20초, 60°C 30초 그리고 72°C 1분으로 총 20 cycle을 실시하였고 72°C에서 10분간 final

extension을 수행하였다. Selective amplification은 첫 번째 PCR에 의해 증폭된 산물을 1:40으로 희석하여 희석된 DNA 4 µL에 2와 3 selective nucleotide를 각각 8 pmole과 1× buffer, dNTP 200 uM, 0.5U Taq polymerase를 첨가하였다. PCR 반응은 95°C에서 20초, 68°C에서 30초, 72°C에서 1분간 실시한 후 annealing 온도를 1°C씩 감소시키면서 8 cycle을 반복한 뒤 마지막으로 95°C에서 20초, 63°C에서 20초, 72°C에서 1분을 32 cycle 반복하고 72°C 10분을 최종 extension step으로 반응을 종료하였다. PCR을 touch-down으로 한 것은 비특이적 증폭산물의 과도한 출현을 억제하기 위해서였다.

최종 반응이 끝난 후 PCR 산물에 formamide loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 4 µL를 첨가한 후 95°C에서 5분간 가열하여 denaturing 시키고 바로 얼음을 이용하여 급냉하였다. Amplified product 중 4 µL를 55°C로 미리 가열된 5% denaturing long ranger polyacrylamide gel(acrylamide:bisacrylamide, 19:1), 7.5M urea, 0.5× TBE (45 mM Tris-boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 loading 하고 1850V, 80W에서 2시간정도 전기영동한 다음 silver staining(SILVER SEQUENCE™ Staining Reagent Kit, Promega)으로 염색하여 결과를 분석하였다.

실험에 사용한 adaptor와 primer의 sequence는 Table 2에서 보여주었다. 통계처리는 silver staining된 gel 상에서 확인된 DNA 단편들을 band의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code를 작성하고 품종간 다형성 수준을 산출하였다. 품종간 근연관계는 NTSYS program을 이용하였고, UPGMA를 이용한 SHAN clustering 방법으로 dendrogram을 작성하였다.

Table 2. AFLP adapters and primer sequences used in this study

Adapter	<i>Pst</i> I	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'
		5'-TGTACGTCAGTCTAC-3'
	<i>Mse</i> I	5'-CATGCGACGATGAGTCCTGAG-3'
		5'-TACTCAGGACTCATCGTCG-3'
Preamplification Primer	AFPP-O	5'-CGTAGACTGCGTACATGCAG-3'
	AFMP-A	5'-GCGACGATGAGTCCTGAGTAAA-3'
Selective amplification primer	<i>Pst</i> I	AC AGACTGCGTACATGCAGAC
		AG AGACTGCGTACATGCAGAG
		GT AGACTGCGTACATGCAGGT
		TG AGACTGCGTACATGCAGTG
		AT AGACTGCGTACATGCAGAT
		GA AGACTGCGTACATGCAGGA
	<i>Mse</i> I	AAG GACGATGAGTCCTGAGTAAAAG
		AAC GACGATGAGTCCTGAGTAAAC
		ACT GACGATGAGTCCTGAGTAAACT
		ATG GACGATGAGTCCTGAGTAAATG
		AGA GACGATGAGTCCTGAGTAAAGA

*A total of 8 *Pst*I/*Mse*I primer combinations were used in this study.

대치배양 검정

분자 marker를 이용한 실험결과에서 유사한 품종으로 판단된 균주들을 대상으로 균총의 가장자리에서 직경 5 mm의 cork borer를 이용하여 절편을 떼어내어 직경 55 mm petri dish의 PDA 배지에 1 cm 간격으로 배지 중앙에 대치하여 이식한 후 26°C의 배양실에서 12일간 배양하여 균사의 대치선 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

AFLP 분석에 의한 느타리 유사품종의 유전적 다형성 분석

AFLP 분석 1차 실험에서는 29개 느타리 품종을 대상으로 선정된 AFLP primer를 이용해서 증폭해본 결과 $P + AG/M + AAC$, $P + AG/M + AAG$ 로 실험하였을 때 느타리버섯의 DNA는 약 80~1000 bp 사이에서 증폭이 되었으며 40~50개의 band가 증폭되었다. 품종간 band의 크기는 4 가지 유사품종 group간의 차이가 확연하게 구분이 가서 그 차이를 육안으로 확인할 수 있어 다형성 분석에 어려움이 없었다. 유사품종 group내 품종간 band 차이는 $P + AG/M + AAG$ 의 primer 조합에서 URP-PCR 결과 수한과 100% 유사성을 보인 품종군 중 ASI 2828 품종이 약 160 bp 부분에서 다른 품종들에서는 나타나지 않는 1개의 band를 보였다(Fig. 1). 그러나 다른 품종군에서는 URP-PCR 분석 결과와 일치하며, 모두 같은 다형성 band가 존재함으로 이러한 결과로 미루어 볼 때 국내에서 유통되고 있는 느타리 품종들 중 유사한 품종이 상당수 있음을 추정해 볼 수 있었다. 또 본 연구에서 RAPD 및 AFLP marker를 이용하여 유전적 유사도를 분석하였을 때 marker의 종류에 따라 100%의 유사도를 보이는 품종들은 marker의 종류를 달리 하여도 매우 높은 유사도를 나타내어 이들 품종들은 유전적으로 매우 근연관계임을 확인할 수 있었다.

AFLP 분석 2차 실험에서는 원형 품종과 유사한 형태를 보이는 수한2호 품종을 추가하였고, Seo 등(2008)의 보고에서 URP-PCR 결과 청풍과 100% 유전적 유사성을 보인 명월을 추가하여 원형, 왕흑평, 수한, 춘추2호 유사품종 4

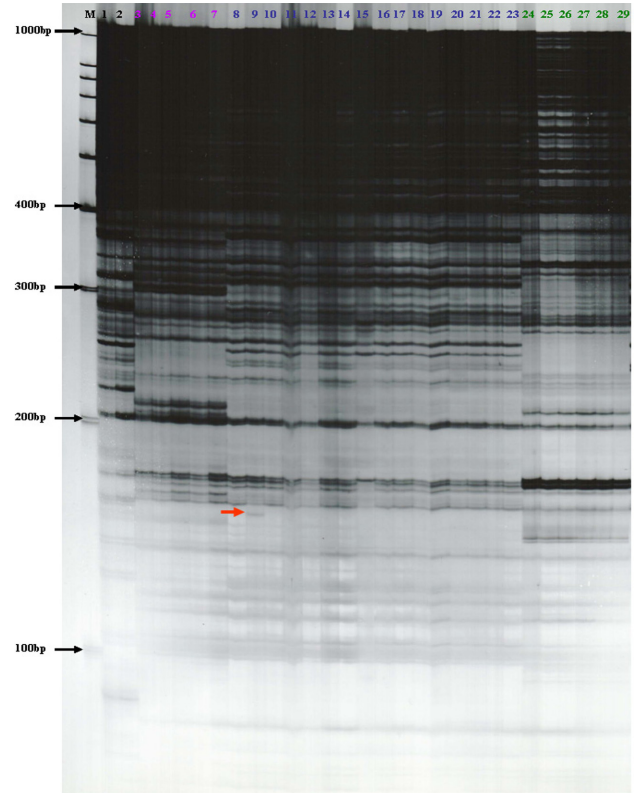


Fig. 1. AFLP band patterns amplified by *Pst*I + *AG/Mse*I + *AAG* primer combination in *Pleurotus ostreatus*. Arrows indicate specific band.

group에서 유사품종간 차이가 나는지를 알아보려고 하였다(Table 1). 6개의 형광 primer 조합을 이용하여 분석을 수행한 결과, band 수가 많이 나온 조합형은 $P + AC/M + ACT$ primer 조합으로 총 62개의 band가 나타났고, 그 중 polymorphic band의 수가 45개 검출되어 polymorphism은 0.73을 나타내었다. Primer 조합형 중에 band 수가 적게 나온 조합으로는 $P + GA/M + AAG$ primer로 유사품종간에 차이를 보이는 band가 나타나지 않았으며 총 45개의 band 중 polymorphic band의 수가 34개로 0.76의 polymorphism을 나타내었다(Table 3). Urbanelli 등(2007)은 *P. eryngii*, *P.*

Table 3. Number of amplified fragment length polymorphism (AFLP) bands produced by six primer combinations in 31 *Pleurotus ostreatus* strains

Primer combination	Total number of AFLP bands	Number of AFLP bands in each strain	Total number of polymorphic AFLP bands	Percentage of polymorphic AFLP bands
$P + AC/M + ACT$	62	32-41 (33.6) ^a	45	72.6
$P + GA/M + AAG$	45	24-28 (26.3)	34	75.6
$P + TG/M + ATG$	55	30-37 (33.4)	37	67.2
$P + GT/M + ATG$	60	25-38 (31.0)	42	70.0
$P + AT/M + AAG$	48	21-27 (24.6)	39	81.2
$P + AT/M + AGA$	60	36-41 (40.1)	35	58.3
Total	330	168-212 (189)	232	70.8

^aNumber in parentheses indicates the average value.

ferulae, *P. nebrodensis*에 속하는 품종들을 *EcoRI*과 *TaqI* 제한효소를 이용한 AFLP 분석에서 각 품종과 종을 확실히 구분할 수 있었고 60~403 bp 부분에서 총 94개의 polymorphic band를 보였다고 하였다. 본 연구에서는 $P + AC/M + ACT$ primer 조합에서 62개의 polymorphic band를 보여 일반적인 수준으로 분석이 가능하였지만 앞으로 느타리버섯의 AFLP 분석방법에 있어 제한효소의 선정도 고려되어야 할 사항이라 생각된다.

본 실험에 사용된 primer 6개 조합 중 3개의 primer 조합에서 유사품종간 polymorphic band pattern을 나타내었다. 각 primer 조합당 나타난 평균 band 수는 55개였으며 6개의 primer 조합에서 얻어진 총 band 수는 330개였고, 그 중 polymorphism을 나타낸 band 수는 총 232개로 polymorphic band의 비율은 70.8%였다(Table 3). 실험에 공시한 ASI 2180과 2595 품종은 $P + GT/M + ATG$ primer 조합에서 특이 band가 나타났으며, $P + AT/M + AGA$ primer 조합에서는 ASI 2180과 2595 품종에서만 보이는 band가 각각 800 bp, 280 bp 부분에서 관찰되었다(Fig. 2). 재현성 면에서 오류를 범할 가능성도 있기 때문에 두 번의 실험을 하였으며 공통적으로 나타나는 band만을 data로 인정하였다.

AFLP 분석에서 나타난 band pattern에 근거하여 dendrogram을 작성한 것이 Fig. 3인데 여기서 유전적 유사도 값 1.00이라는 수치는 품종간 유전적 차이가 없다는 것을 의미한다. 하지만 실제로 다른 이름으로 유통되고 있는 품종들이 유사도 값 1에서 같은 group으로 묶이고 있는 결과는 우수한 형질을 가진 품종을 개발하기 위해 유사한 유전 자원을 교배모본으로 이용하였기 때문으로 추정된다. 이는 국내 느타리 품종의 육성재료가 제한되어 있기 때문에 나타난 현상으로 추측된다. 2829 품종은 유사도 0.96으로 $P + AT/M + AAG$ primer 조합을 이용하였을 때 다른 유사 품종들과 구분되는 band pattern을 보였고, 수한 group과 춘추2호 group은 유사도 지수 0.80으로 나타났으며, NTSYS-pc

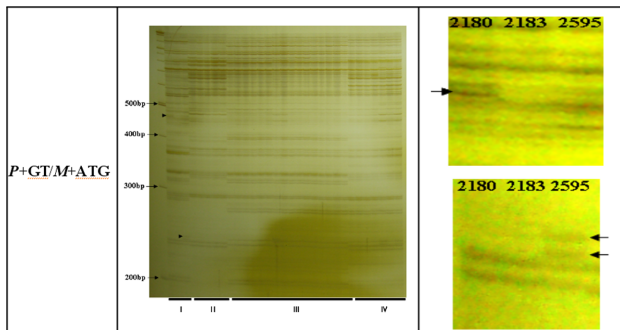


Fig. 2. AFLP band patterns for *Pleurotus ostreatus* strain groups. Arrows indicate polymorphic band between similar strains. I, Weonhyeong similar strains; II, Wangheukpyeong similar strains; III, Suhan similar strains; IV, Chunchu-2 similar strains.

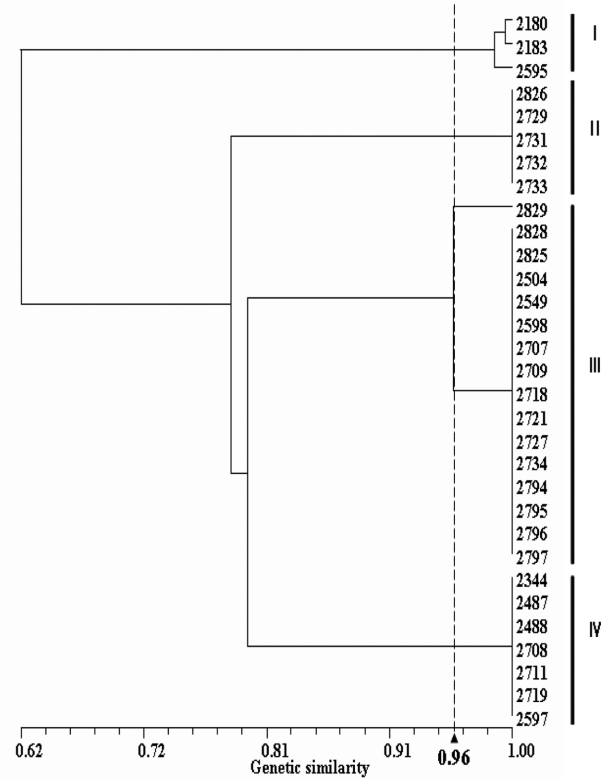


Fig. 3. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on genetic similarity coefficient using 330 AFLP bands of 31 *Pleurotus ostreatus* strains. I, Weonhyeong similar strains; II, Wangheukpyeong similar strains; III, Suhan similar strains; IV, Chunchu-2 similar strains.

를 이용한 근연관계 분석결과 유사계수의 범위는 0.62에서부터 1.00까지였다.

품종구분을 위한 분자 marker의 적용에 있어서 우선 고려되어야 할 사항은 사용한 marker의 수가 전체 공시품종의 유전적 특성을 대표할 만큼 충분한가 하는 점이다. 품종구분을 목적으로 할 경우에 사용하는 marker의 수가 많을수록 오류는 감소되고, 결과의 신뢰도는 증가할 것이다. 본 실험 결과는 총 8개의 selective primer 조합을 이용하여 공시한 4가지 group의 품종들이 group내 품종들간에 유전적으로 매우 밀접한 특성을 가지고 있다는 것을 재확인하였으며 이 결과는 이전에 Seo 등(2008)이 보고한 URP-PCR 결과와 매우 유사 하였으나 URP-PCR에서 동일한 band 양상을 보인 품종 중 일부는 유전적 차이가 나타나 AFLP 분석이 다른 방법보다 보다 세밀하게 유연관계를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

유사도가 높은 품종의 대치배양에 의한 판별

대치 배양은 균류에서 가장 쉽게 품종을 구분하는데 사용하는 방법이다. 생화학적 특성을 이용한 vegetative compatibility groups(VCGs; Leslie, 1993)는 균류집단 구조를 조사하는 연구에도 많이 이용되었다(Kausserud *et al.*, 2004;

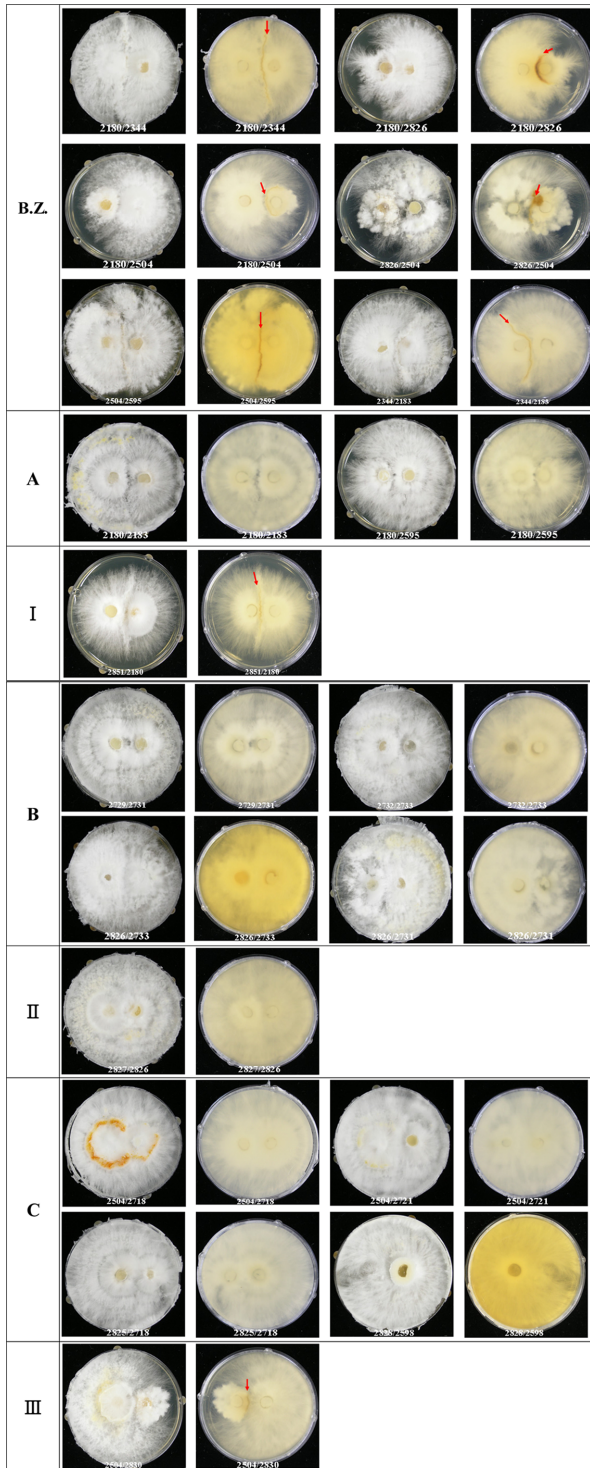


Fig. 4. The boundary zone formed between *Pleurotus ostreatus* similar strains on PDA medium. *A, Weonhyeong similar strains; B, Wangheukpyeong similar strains; C, Suhan similar strains; D, Chunchu-2 similar strains; B. Z, Boundary Zone; I, Weonhyeong group; II, Wangheukpyeong group; III, Suhan group; IV, Chunchu-2 group. Arrows indicate boundary zone.

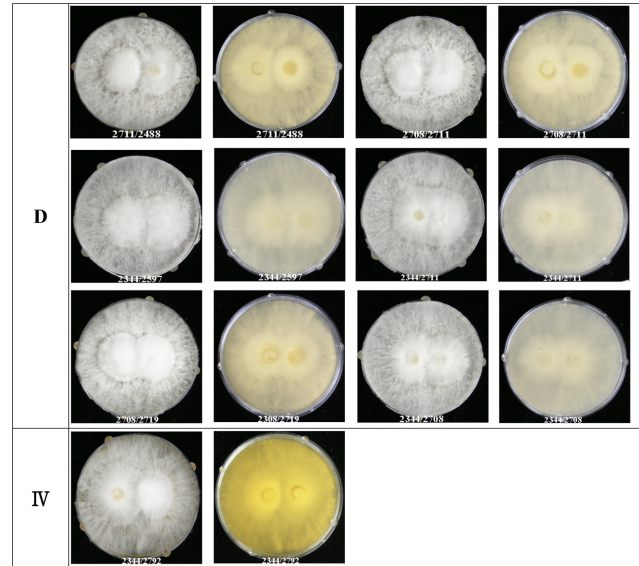


Fig. 4. Continued.

품종인 2180과 2344, 2180과 2504, 2180과 2826, 2826과 2504 균주간에는 뚜렷한 갈색 대치선이 생겨 서로 다른 균주임을 확실히 알 수 있었다. 형제계통인 2180과 2183 균주간에는 대치선이 생기지 않아 유전적으로 매우 유사함을 알 수 있었으며, 2595 균주도 2180과는 대치선이 생기지 않았다. 또한, AFLP 분석결과에서 수한 유사품종들 중 band 1개의 차이를 보인 2828 균주 역시 수한 유사품종들과 대치선이 생기지 않았다. 유사품종으로 추정된 균주들을 PDA plate에서 대치배양한 결과 유사품종들간에 대치선은 생기지 않았으며, 균총형태도 동일하게 나타났고 균사가 양쪽의 품종 간에 정상적으로 뻗어나가서 유사품종간의 화합성 여부를 육안으로 확인할 수 있었다(Fig. 4).

느타리 균주의 동일성 여부를 확인하고자 DNA 다양성 분석에서 유사품종으로 확인된 품종 간 대치배양을 실시한 결과, group내 품종들은 모두 화합성이 확인되어 생물적 검정으로는 근연품종으로 판단되었다. AFLP 결과 같은 group에 속하여 유전적 유연관계가 가까운 균주들간의 화합성 검정에서는 2851과 2180, 2504와 2830 균주사이에 대치선이 생겼으나, ASI 2344와 2792 균주는 대치선이 생기지 않아 같은 group에서 대치배양에 의한 이질핵화는 품종간 차이가 있는 것으로 나타났다. 본 연구결과로 대치선이 나타나는 균주간에는 서로 다른 품종인 것을 명확하게 알 수 있었으나 대치선이 나타나지 않는 품종이 반드시 동일한 품종이라고는 판단할 수 없었으므로 대치배양법은 간이적으로 대략적인 품종의 판별에 부분적으로 이용이 가능할 것으로 판단되었다.

적 요

Kauserud *et al.*, 2006).

원연 품종간에는 대치선이 생기는데, 본 연구에서 원연

URP-PCR 분석에서 유사품종으로 분류된 품종들을 이

용하여 AFLP 방법과 체세포불화합성(VCG)으로 품종간 다형성을 조사하였다. AFLP로 분석 한 결과 원형 유사품종군에서는 ASI 2595와 2183이 차이를 보였으며, 수한 유사품종군에서는 ASI 2829만이 차이를 보이고 다른 군주간에는 차이를 볼 수 없었다. 그 차이는 8개의 primer 조합 중 P + AG/M + AAG와 P + GT/M + ATG primer 조합에서만 나타났다. 31개 느타리 품종에 대한 AFLP분석은 80~1000bp에서 총 330개 밴드를 나타내었다. UPGMA 유연관계 분석에서는 유사도 0.96에서 4개의 분리된 집단으로 구분되었으며 각 집단은 유사품종들로 구성되었다. 군주간 화합성 검정을 하여 버섯 품종 판별을 시도한 결과 대치배양에 의한 이질핵화는 품종간 차이가 있는 것으로 나타났으나, 유사품종간에는 대치선이 나타나지 않았다. 유사품종들의 대부분이 구별성이 인정되지 않는 것으로 나타나 품종육성에 이용된 교배모본의 계보가 아주 가깝거나 혹은 동일한 품종이 복제되어 다른 이름으로 유통되는 것으로 추정할 수 있었다.

참고문헌

- Aarts, H. J., Van Lith, L. A. and Keijer, J. 1998. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 131-135.
- Kang, K. H., Jeung, J. U., Choi, S. H., Jeon, Y. H., Hwang, H. G., Ahn, B. O., Jeong, O. Y., Jeong, E. G. and Shin, Y. S. 2003. Identification of tiller angle specific AFLP marker in rice. *Kor. J. Breed. Sci.* 163-164.
- Kauserud, H. 2004. Widespread vegetative compatibility groups in the dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Mycologia* 96: 2322-239.
- Kauserud, H., Sætre, G. P., Schmidt, O., Decock, C., and Schumacher, T. 2006. Genetics of self/nonself recognition in *Serpula lacrymans*. *Fungal Genet. Biol.* 43: 503-510.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 31: 127-150.
- Menz, R. R., Klein, J. E., Mullet, J. A., Obert, Unruh, N. C. and Klein, P. E. 2002. A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. *Plant Mol. Biol.* 48: 483-499.
- Paran, I., Aftergoot, E. and Shiffriss, C. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*. 136: 257-264.
- Rusell, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- Seo, K. I., Jang, K. Y., Yoo, Y. B., Park, S. Y., Kim, K. H. and Kong, W. S. 2008. Differentiation among commercial strains of *Pleurotus* spp. based on DNA fingerprinting using Universal Rice Primer (URP). *Kor. J. Mycol.* 36: 130-137. (in Korean)
- Seo, K. I., Jang, K. Y., Yoo, Y. B., Park, S. Y., Kim, K. H. and Kong, W. S. 2011a. Development and Application of Weonhyeong strain-specific SCAR marker in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 39: 22-30. (in Korean)
- Seo, K. I., Jang, K. Y., Yoo, Y. B., Park, S. Y., Kim, K. H. and Kong, W. S. 2011b. Development of Suhan strain-specific SCAR marker in *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* 39: 31-38. (in Korean)
- Urbanelli, S., Della Rosa, V., Punelli, F., Porretta, D., Reverberi, M., Fabbri, A. A. and Fanelli, C. 2007. DNA- fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 592-600.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, P. J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Young, W. P., Schupp, J. M. and Keim, P. 1999. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theor. Appl. Genet.* 99: 785-790.
- Zhu, J., Gale, M. D., Quarrie, S., Jackson, M.T. and Bryan, G. J. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor. Appl. Genet.* 96, 602-611.