

RESEARCH ARTICLE

느티만가닥버섯 균주의 형태 및 유전적 유연관계 분석

김민경*

한국농수산대학

Analysis of Morphological and Genetic Relationships among Isolates of the Artificially Cultivated Mushroom, *Hypsizygus marmoreus*

Min-Kyung Kim*

Korea National College of Agriculture & Fisheries, Jeonju 54874 Korea

*Corresponding author: mk7802@nate.com

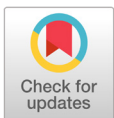
ABSTRACT

To investigate the morphological characteristics and genetic relationships among isolate of the artificially cultivated mushroom *Hypsizygus marmoreus*, 111 isolates were collected from Korea and other countries. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and ITS rDNA sequencing were used to confirm the genetic relationships among the collected *H. marmoreus* isolates. As a result of RAPD analysis using universal rice primer (URP)-PCR, all isolates of *H. marmoreus* clustered into three groups, which showed high sequence similarity (>90%). In addition, isolates with morphological and geographical differences formed independent clusters. However, it was impossible to distinguish between brown and white strains. Sixteen strains showing morphological and geographic differences were selected, and their ITS region sequences (640 bp) were aligned and compared. The ITS region sequences belonging to these isolates showed 94.8–99.1% similarities to those of publicly available *H. marmoreus* strains in GenBank. In conclusion, there were differences among isolates in terms of morphology and the area from which they were collected, but all the isolates used in the experiment were classified as *H. marmoreus*.

Keywords: Genetic relationship, *Hypsizygus marmoreus*, Morphology, URP-PCR

서론

느티만가닥버섯은 담자균류(Basidiomycota), 주름버섯목(Agaricales), 만가닥버섯과(Lyophyllaceae)에 속하는 식용버섯으로 영문명은 Beech mushroom이고 일본명은 Bunashimeji (ブナシメジ)로 불리고 있다. 현재 상업적으로 인공재배 되고 있는 만가닥버섯류는 *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead와 *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow 2종류이다. 일본에서 재배되고 있는 *H. ulmarius*와 *H. marmoreus*[1]는 형태학적 특성이 매우 유사하여 종 분류에 어려움이 많아 Nagasawa와 Arita[2]는 정확한 분류를 위하여 *H. marmoreus*와 *H. ulmarius*를 포자의 크기와 형태, 갓의 색과 반점 유무, 균사와 자실체의 형태적 특징을 비교하여 재분류한 바 있다.



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2020 September, 48(3): 313-323
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200030>

Received: September 01, 2020

Revised: September 11, 2020

Accepted: September 17, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Hypsizygus marmoreus*는 포자는 $4-6.4 \times 3.6-4.8 \mu\text{m}$ 의 비교적 작은 크기로 $5 \mu\text{m}$ 이하의 구형이거나 반구형이고, 갓에는 진한 색의 반점이 중앙 혹은 전면에 형성되며, 자실체는 밀생하는 특성이 있다. 균사는 분절, 후막포자를 형성한 반면에 *H. ulmarius*는 $5 \mu\text{m}$ 이상의 포자 크기($5-6.5 \times 4.5 \mu\text{m}$)에 반구형에 보통은 타원형의 포자를 형성하고, 갓에 반점이 없거나 불분명하고 미세인편상을 형성한다. 주로 단생하고 균사는 무성포자 형성을 하지 않는 것으로 보고된 바 있다[2,3].

전통적인 버섯의 분류는 자실체의 형태적 특성을 이용하였는데, 형태적 특징은 환경적 요인에 따라 달라질 수 있고 재배하여 확인하기에는 시간이 오래 소요되는 등 제약이 있다. DNA 검정법은 환경적 영향을 배제할 수 있으며, 적은 미생물 밀도에서 검출이 가능한 고도의 민감성과 신속성, 정확성 및 단순성을 특징으로 한다. Polymerase chain reaction (PCR) 기법으로 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [4], Arbitrary Primer (AP)-PCR [5]과 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [6] 등이 널리 적용 되어왔다. 느티만가닥버섯에 대한 RAPD 분석은 Lim [7] 등이 수집한 30균주에 대하여 OPS-1, OPS-10, OPL-13 primer를 이용하여 기원이 동일시되는 그룹과 국내 야생종을 구분하는 PCR다형성을 검출 하였다. 한편 균류의 PCR 핵산지문 분석에 광범위하게 이용 가능한 20-mer의 염기로 구성된 URP (Universal Rice Primer) [8]가 균류의 종간, 종내 PCR다형성검출에 유용하게 이용되어 왔다. URP-PCR은 *Pleurotus* spp. [9-13] 과 *Phellinus* spp. [14] 등 담자균류의 종내 품종, 계통의 유전적 분류에 이용했으며, 자낭균인 *Paecilomyces japonica* 와 *Cordyceps militaris* [15]의 유전적 다양성 검정 등 다양한 균류에 유용하게 적용 할 수 있었다.

최근 국내에서도 인공 재배되어 시장을 확장하고 있는 만가닥버섯류의 분류학적 위치를 재정립하기 위하여 국내외에서 109 균주와 국내에 판매되고 있는 2 균주를 포함하여 111 균주를 수집하였고, 인공재배를 통하여 자실체를 형성시켜 형태적 특징 등을 조사하였다. Redhead [16,17] 와 Nagasawa 등[2]이 보고한 형태적 특징을 기초로 하여 외형적 특징인 갓의 색과 형태, 반점 무늬 유무를 확인하고, 현미경적 특징으로 균사의 껍질연결, 분절포자 및 후막포자 형성, 담자포자의 크기 등을 조사하였는데, 몇몇 균주를 제외하고 분절포자와 후막포자의 형성을 확인할 수 있었다. 미세구조 상으로 확실한 종내 분류가 이루어지지 않아 다음 실험으로 종간, 종내 분류에 많이 사용되고 있는 URP-PCR과 ITS (Internal transcribed spacer) rDNA분석을 하여 수집된 균주 간의 형태적 특성 및 유전적 유연관계를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

공시균주

느티만가닥버섯 유전자원은 국내외 균주 보존기관에서 분양받거나, 시판버섯과 국내에서 자생하는 버섯에서 조직분리법으로 분리하여 확보하였다. 이 중 한국농수산대학 보유 균주가 19균주이며, 농촌진흥청 농업과학원에서 44균주, 인천대학교에서 48균주를 각각 분양 받았다(Table 1). 이들 균주의 수집 지역별 분포는 한국 자생균주 5균주, 중국 도입균주 35균주, 대만도입균주 13균주이고 나머지는 명확하지 않으나 일본에서 수집된 것으로 추정된다.

공시균주는 20% Glycerol용액에 침지하여 -70°C 에 보관하였으며 PDA (Potato dextrose agar) 배

Table 1. List of *Hypsizygus marmoreus* isolates and the related species.

Isolate	Source and geographic origin ¹⁾		Isolate	Source and geographic origin ¹⁾	
HYM-001	MKACC50205	Japan	HYM-057	IUM 1378	Taipei
HYM-002	MKACC50363	Jeju, Korea	HYM-058	IUM 1406	China
HYM-003	MKACC50636	China	HYM-059	IUM 1408	China
HYM-004	MKACC50710	Unknown	HYM-060	IUM 1414	China
HYM-005	MKACC51135	Unknown	HYM-061	IUM 1502	China
HYM-006	MKACC51976	Unknown	HYM-062	IUM 1515	Taipei
HYM-007	MKACC51978	Unknown	HYM-063	IUM 1523	Taipei
HYM-008	MKACC51979	Unknown	HYM-064	IUM 1562	Taipei
HYM-009	MKACC51980	Mangadak No.1	HYM-065	IUM 1588	Taipei
HYM-010	MKACC51981	Unknown	HYM-066	IUM 1591	Taipei
HYM-011	MKACC51983	Unknown	HYM-067	IUM 1621	China
HYM-012	MKACC51985	Unknown	HYM-068	IUM 1652	China
HYM-013	MKACC51986	Unknown	HYM-069	IUM 1879	Korea
HYM-014	MKACC51987	Unknown	HYM-070	IUM 2021	China
HYM-015	MKACC51988	Unknown	HYM-071	IUM 2129	Taipei
HYM-016	MKACC51989	Unknown	HYM-072	IUM 2140	Taipei
HYM-017	MKACC51990	Unknown	HYM-073	IUM 2142	Taipei
HYM-018	MKACC51991	Unknown	HYM-074	IUM 2145	Taipei
HYM-019	MKACC51992	Unknown	HYM-075	IUM 2157	Taipei
HYM-020	MKACC51993	Unknown	HYM-076	IUM 2232	China
HYM-021	MKACC51994	Unknown	HYM-077	IUM 2277	China
HYM-022	MKACC51995	Unknown	HYM-078	IUM 2279	China
HYM-023	MKACC51996	Mangadak No.2	HYM-079	IUM 2306	China
HYM-024	MKACC51997	Unknown	HYM-080	IUM 2326	China
HYM-025	MKACC51998	Unknown	HYM-081	IUM 2638	China
HYM-026	MKACC51999	Unknown	HYM-082	IUM 2641	China
HYM-027	MKACC52000	Unknown	HYM-083	IUM 3375	China
HYM-028	MKACC52001	Unknown	HYM-084	IUM 3376	China
HYM-029	MKACC52002	Unknown	HYM-085	IUM 3377	China
HYM-030	MKACC52003	Unknown	HYM-086	IUM 3383	China
HYM-031	MKACC52004	Unknown	HYM-087	IUM 3390	China
HYM-032	MKACC52005	Unknown	HYM-088	IUM 3391	China
HYM-033	MKACC52006	Unknown	HYM-089	IUM 3405	China
HYM-034	MKACC52007	Unknown	HYM-090	IUM 3406	China
HYM-035	MKACC52008	Unknown	HYM-091	IUM 3434	Taipei
HYM-036	MKACC52009	Unknown	HYM-092	IUM 3444	China
HYM-037	MKACC52010	Unknown	HYM-093	IUM 3455	China
HYM-038	MKACC52011	Unknown	HYM-094	IUM 3555	China
HYM-039	MKACC52013	Unknown	HYM-095	IUM 3556	China
HYM-040	MKACC52014	Unknown	HYM-096	IUM 3564	China
HYM-041	MKACC52015	Unknown	HYM-097	IUM 3750	China
HYM-042	MKACC52016	Unknown	HYM-098	IUM 3835	China
HYM-043	MKACC52017	Unknown	HYM-099	IUM 3845	China
HYM-044	MKACC52018	Unknown	HYM-100	IUM 3868	China
HYM-045	MKACC53978	Unknown	HYM-101	IUM 3880	China
HYM-046	MKACC54026	Unknown	HYM-102	IUM 3883	China
HYM-047	MKACC54367	Unknown	HYM-103	IUM 3891	China
HYM-048	MKACC54368	Unknown	HYM-104	IUM 3897	China
HYM-050	MKACC54876	Unknown	HYM-105	IUM 3900	China
HYM-051	MKACC54877	Unknown	HYM-106	Hm-001	Japan
HYM-052	MKACC54878	Unknown	HYM-108	ASIS18894	Korea
HYM-053	MKACC55125	Unknown	HYM-109	ASIS19043	Korea
HYM-054	MKACC55200	Unknown	HYM-110	ASIS19210	Korea
HYM-055	Commercial white fruit body		HYM-111	Turbo48	Japan
HYM-056	Commercial brown fruit body				

¹⁾MKACC (Mushroom-Korean Agricultural Cultural Collection), RDA(Rural development administration); IUM, Incheon University Mushroom.

지에 계대 배양하여 5°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

DNA 분리

공시한 느티만가닥버섯류 균주를 50 mL의 potato dextrose broth (이하 PD broth)에 접종하여 $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 에서 7일간 정치 배양시켰다. 배양된 균사체는 nylon mesh (pore size 50 μm)를 이용하여 세척하고, 동결건조하여 마쇄하였다. 마쇄된 균사체 100 mg에 400 μL 의 extraction buffer [200mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)]에 현탁하여 50 μg 의 proteinase K 을 첨가하고 37°C 에서 1시간동안 반응시켰다. 여기에 400 μL 의 2× CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) (Mr 40,000)]을 첨가하여 섞은 뒤, chloroform : isoamylalcohol (24:1)로 추출하고 원심분리하여 얻은 상등액에 0.7 vol.의 isopropanol을 첨가하여 DNA pellet을 얻었다. TE buffer [Tris-HCl(pH 8.0) 10 mM, EDTA(pH 8.0) 1 mM]에 DNA pellet을 녹이고 RNase를 첨가한 뒤 정량하여 4°C에 보관하였다.

URP-PCR 핵산지문 및 ITS 염기서열 분석

URP-PCR은 11종의 URP primer 중에서 증폭생성물이 가장 확연하게 보인 URP1F, URP2F 2종을 사용하였다. PCR은 15 ng genomic DNA, primer 200 nM, dNTP's 125 μM , Taq DNA polymerase 0.5 unit, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 에 H_2O 를 첨가하여 최종 volume을 20 μL 로 조정하였다. DNA의 증폭에 사용된 PCR 증폭기는 Mycycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)을 사용하였고, DNA 증폭은 initial denaturation을 94°C 에서 3분간 실시하고, denaturation 1분 (94°C), annealing 1분 (55°C), extension 3분 (72°C)으로 40 cycle을 실시한 뒤 72°C 에서 7분간 incubation하였다. PCR 반응 후, 15 μL 의 생성물을 1.2% agarose gel에서 80 V, 3시간동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

각 균주의 증폭 산물의 pattern의 비교는 동일한 크기의 band 존재 여부에 따라 0과 1로 나열하여 유사도 (similarity coefficient)를 구하고, unweighted pair group methods with arithmetic average (UPGMA)에 의한 집괴분석을 실시하였다, 유사도와 UPGMA 분석은 NTSYSpc (ver. 2.1, www.winzip.com)를 이용하였다.

URP PCR fingerprint 와 UPGMA 결과, 형태적 특징을 종합하여 분류하였고, 각 그룹 중 표본 균주를 선발하여 ITS 영역에 대한 염기서열 분석을 위하여 ITS1 primer (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 와 LR3 primer (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3')를 이용하여 ITS1 영역과 28S (D1/D2 region) 영역에 대한 증폭산물의 염기서열을 의뢰하여 분석하였다. 분석한 염기서열은 Bioedit clustalW와 Mega (ver. 5)프로그램[18]을 이용하여 정렬하고 Kimura2-parameter model을 적용한 neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

PCR 다형성분석에 의한 유연관계

공시 균주에 대한 예비 실험으로 증폭반응을 확인하고, 가장 확실한 증폭 band를 형성한 URP 1F와 URP 2F primer 2종을 본 실험에 사용하였다.

URP 1F primer 에서는 1.0 kb와 1.3 kb에서 대부분 확실한 증폭 band를 보였고, 대부분 유사한 pattern으로 증폭되었다. URP 2F primer 에서도 1.0 kb 에 확실한 증폭 band를 보였고, 대부분 유사한 pattern으로 증폭되었다. 몇몇 균주들의 증폭이 2종의 primer에서 약간 다른 경향을 보였지만, 주된 증폭 band는 나타나기 때문에 큰 차이는 없는 것으로 보인다.

2종의 primer에 의해 생성된 band를 종합하여 UPGMA에 의한 분석을 한 결과는 Fig. 1과 같다.

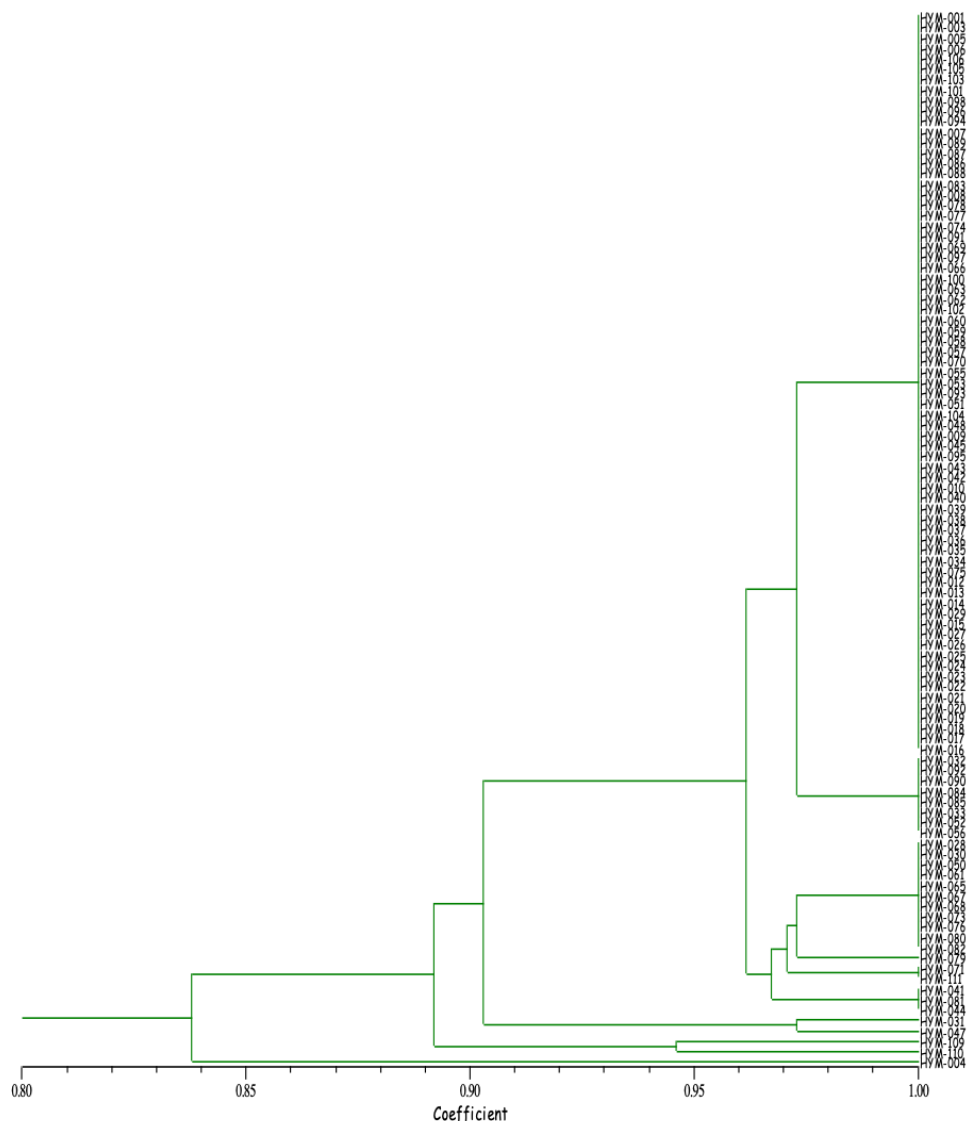


Fig. 1. Dendrogram of *Hypsizygus marmoreus* strains and related species based on band similarity. The scale on the bottom indicates the simple matching similarity coefficients obtained from two URP (Universal Rice Primer) - PCR data (URP 1F and 2F) in the cluster analysis.

대부분의 공시균주는 96–97%의 높은 유사도를 보였으나, 균사에 분절포자와 후막포자가 관찰되지 않았고, 인공재배에서도 자실체를 형성치 못한 HYM-004 균주는 가장 확연하게 다른 증폭 pattern을 보였다. 유사도에서도 84%로 유전적으로는 근연관계에 있다고 할 수 있으나, 같은 종인지는 확신할 수 없었다. 또한 국내 수집균주인 HYM-109와 HYM-110균주는 89% 정도의 유사도로 일본, 중국, 대만에서 수집된 균주들과는 구별되었다.

또한 URP-PCR 분석 결과 백색과 갈색 자실체가 유전적으로 구분되지 않았지만, 인공재배에서 자실체의 형태적 차이가 컸던 HYM-031 와 HYM-047 균주도 90% 이상의 유사도를 보였고, 국내 야생균주는 일본 균주 등과 구분이 되었다. 이는 이 등[19]이 OPS-1, OPS-10과 OPS-13 primer를 이용한 RAPD 분석에서 야생균주와 재배균주의 구분이 가능하였고, 자실체의 형태에서도 차이를 보였다고 보고한 결과와 유사한 결과이며, 외국도입 균주의 유사도가 높고 하나의 cluster를 보이는 것은 외국에서 도입된 재배품종은 1~2균주를 모균주로 육종한 결과를 반영한 것으로 판단된다.

ITS rDNA 분석

URP primer를 이용한 RAPD-PCR fingerprinting과 UPGMA 결과를 기초로 각 group에서 16 균주를 선발하여 ITS 및 28S rDNA 영역에 대한 염기서열 분석을 하였다. ITS 영역은 대부분 중간에 염기서열이 많은 차이가 있지만, 종내에서는 그 차이가 극히 낮아지기 때문에 대부분의 종간 계통학적 유연관계 해석에 이용되고 있다 [20]. 안정적으로 염기서열 분석을 위하여 28S rDNA(D1/D2) 영역을 증폭하여 1,250 bp 정도의 염기서열을 확보하였다.

공시한 균주의 동정 및 분류를 위해서 대조구로 GenBank에서 제공되는 *Lyophyllum shimeji* HM572522, *L. semitale* HM572552, *H. ulmarius* FR686561와 *H. marmoreus* JN234835균주의 염기서열을 이용하여 정렬하였다.

Table 2와 같이 공시한 16균주 간의 상동성은 93.8–99.1%를 보였으며, *L. shimeji* HM572522와는 79.0–82.5%, *H. ulmarius* FR686561는 89.3–94.5%, *H. marmoreus* JN234835와는 94.8–99.1%로 높은 상동성을 보였다. 대조구로 사용한 *H. marmoreus* JN234835는 *L. shimeji* HM572522와의 상동성이 81.4%로 호가연한 차이를 보였고, 형태적 특성이 유사하여 혼란되었던 *H. ulmarius*와는 95.4%로 유전적으로도 매우 가까운 유연관계를 형성하고 있다. 이러한 결과로 공시한 16균주는 *H. ulmarius*보다는 높은 상동성을 보인 *H. marmoreus*에 가장 가까운 유연관계를 가지는 것으로 확인되었다.

후막포자와 분절포자가 없는 균사와 UPR-PCR에서도 outgroup으로 분류되었던 HYM-004균주의 ITS 염기서열분석 결과, 비교 대상인 *L. shimeji*와는 81.3%, *L. semitale*과는 86.3%, *H. ulmarius*는 93.4%이었고, *H. marmoreus*는 96.7%의 상동성을 보였다. *H. marmoreus*와는 염기서열상으로도 ITS1 영역에서만 몇 개의 염기 차이를 보일 뿐 큰 차이는 없었다. 다른 공시 균주와의 상동성도 93.8–97.5%으로 *H. marmoreus*에 가깝다고 판단된다.

Table 2. Similarity matrix based on aligned sequences of ITS1-28S rDNA region for *Hypsizygus marmoreus* strains and related isolates.

Strains	Accession NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1. <i>L. shimeji</i>	HM572522	-																			
2. <i>H. marmoreus</i>	JN234835	81.5	-																		
3. <i>H. ulmarius</i>	FR686561	79.7	95.6	-																	
4. <i>L. semitale</i>	HM572552	85.8	89	87.3	-																
5. HYM-004	MT984396	80.8	96.1	93.5	84.8	-															
6. HYM-008	MT984397	81.9	97.9	94.1	87.4	94.8	-														
7. HYM-024	MT984398	79.5	94.3	91.1	84.3	91.7	94.9	-													
8. HYM-031	MT984399	81.7	97.3	94.2	87.2	95	97.5	94.4	-												
9. HYM-041	MT984400	81.7	97.5	94.1	87.5	94.7	97.8	94.9	97.6	-											
10. HYM-047	MT984400	81.2	97	94.2	87.2	94.9	97	94.3	97.6	96.8	-										
11. HYM-055	MT984402	81.6	96.9	93.8	86.8	95.6	97.9	95.3	97.9	97.6	97.3	-									
12. HYM-056	MT984403	81.8	97.6	94.2	87.5	94.5	97.8	94.4	97	97.3	96.8	97	-								
13. HYM-069	MT984404	80.2	94.1	92.5	84.4	93.2	95.3	93.7	95.2	95.6	94.9	96.2	94.2	-							
14. HYM-071	MT984405	81.4	95.5	92.2	85.5	94.8	96.1	93.8	96.1	95.6	95.8	97	95.4	94.6	-						
15. HYM-080	MT984406	79.2	91.4	88	82.5	90.5	91.4	89.4	91.6	91.4	91.3	91.4	91.1	90.1	91.7	-					
16. HYM-086	MT984407	78.5	91.2	88	82.2	89.2	90.9	89	91.4	91.1	90.8	90.9	90.9	89	91.1	93.4	-				
17. HYM-089	MT984408	81.6	96.9	93.5	87.4	93.9	96.8	94.3	96.4	97	96.6	96.5	96.7	94.4	95.3	91.6	91.4	-			
18. HYM-090	MT984409	81.1	96.4	92.3	86.1	93.7	96.9	94.3	95.8	96.1	95.8	96.7	96	95.4	95.2	91.2	90.1	95.8	-		
19. HYM-109	MT984410	81.9	97.5	93.9	87.4	94.2	98.1	94.7	97.2	97.5	96.9	97.3	97.6	94.9	96.2	92.2	92.1	98.2	97	-	
20. HYM-111	MT984411	82.2	97.2	94.2	87.2	94.5	97.9	94.3	97.6	97.8	96.7	97.5	97.3	95.6	96.1	91.7	90.8	97.2	96.7	98.4	-

형태적 특징과 분자유전학적 특징의 상관관계

인공 재배한 느티만가닥버섯 자실체의 가장 큰 형태적 차이는 갓의 색이 갈색, 백색과 회갈색으로 나뉘고, 회갈색의 갓에는 대리석 반점이 없거나 희미한 것이 특징이었다 (Fig. 2). 담자포자는 미성숙 포자를 제외하고 평균 5 µm 이하의 원형에 가까운 형태를 가졌다. 또한 갓 표면이 인편상이고, 색은 회갈색, 반점이 없거나 희미한 특징을 보여 *H. ulmarius*로 판단되었던 균주 HYM-031, HYM-047, HYM-109에서도 현미경적 특성 차이가 없이 분절포자 및 후막포자가 관찰되었다. 자실체의 갓 조직은 구형세포가 뭉쳐져 있는 배열이었고, 주름살 조직은 선형구조로 배열되었다. 담자기는 4개의 담자소병을 가지며 낭상체보다는 크게 형성되었고, 낭상체는 곤봉형으로 관찰되었다. 또한 같은 지역에서 수집되었음에도 인공재배에서 형태적으로 다른 특징들을 보이는 것은 유전적 다양성이 있는 것으로 판단하였지만, 갈색자실체와 백색자실체의 형태적 특징은 갓색을 제외하고 큰 차이는 없었다. 자실체의 갓 색을 제외한 형태적 특징이나 현미경적 구조상에서 종내 분류가 가능할 정도의 차이는 발견되지 않았다.

더 확실한 종간 분류를 위해서 URP-PCR 분석에서 선발한 16균주로 ITS 영역의 rDNA 염기서열 분석을 하여 ITS1부터 28S rDNA 영역을 *H. marmoreus* JN234835등 과 비교 분석한 결과 91.2–97.9%의 상동성이 확인되었었고, *H. ulmarius*가 형태적, 유전적으로도 매우 유사함이 확인되었다.

공시 균주는 염기서열 정렬 후, Kimura 2 parameter를 사용한 neighbor-Joining method를 이용하여

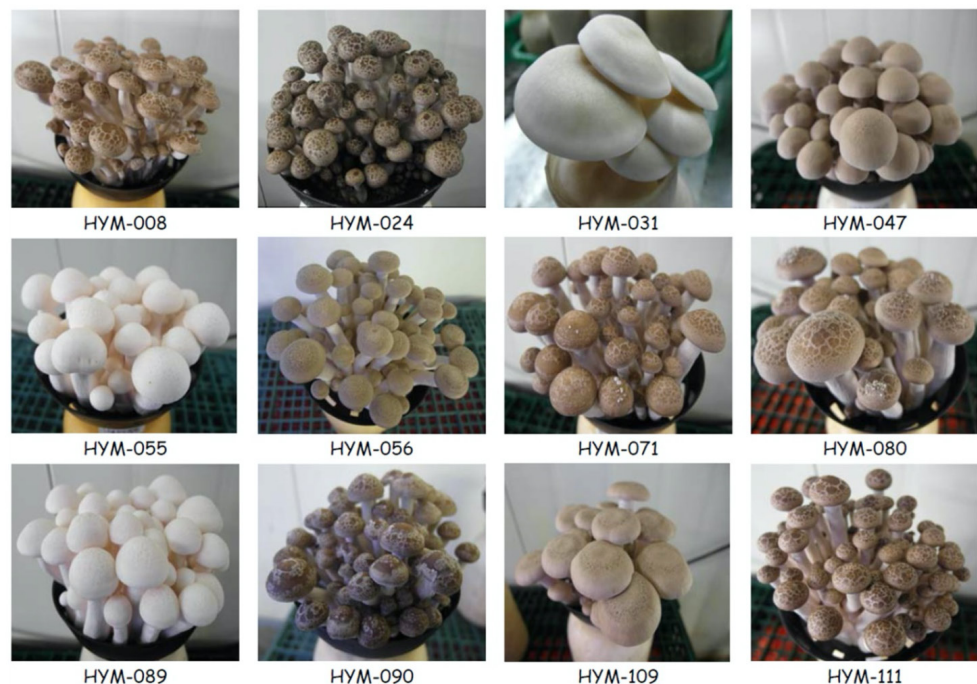


Fig. 2. Fruit bodies of *Hypsizygus marmoreus* generate by sawdust bottle cultivation. Geographic origin: unknown (HYM-008, 024, 031, 047), Taipei (HYM-071), China (HYM-080, 089, 090), Japan (HYM-111), Korea wild type (HYM-109), commercial strains (HYM-055, 056)

phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 3). 그 결과, 공시한 균주들간의 유전적으로 매우 가까운 유연관계를 형성하지만, 자실체 갖의 색택이나 반점의 유무, 지역적 특성이 나타나지 않아 유전적 다양성은 없는 것으로 판단된다.

자실체의 형태적인 차이에 의해 *H. ulmarius*로 판단했던 HYM-031과 HYM-047 균주는 현미경적 특징과 ITS 염기서열분석 등 결과를 종합해 볼 때, 품종 육성의 과정에서 형태적으로 변이가 생긴 것으로 판단된다. 또한 HYM-004 균주는 인공재배에서의 자실체 미형성으로 균주가 퇴화됐거나 환경조건의 부적절했다고 판단하였고, 균사의 현미경적 특성과 URP-PCR 결과 outgroup으로 분류되어 정체감이 모호했으나, ITS 영역의 염기서열 분석으로 HYM-004균주는 *H. marmoreus*에 속하는 것으로 확인되어, 균주에 변이나 퇴화 발생으로 균사에서 분절 및 후막포자 형성 뿐만아니라 자실체 형성능도 상실된 것으로 판단된다.

본 연구에 공시하고 인공재배에 사용된 균주들은 자실체의 형태적 특징 및 URP-PCR, ITS 영역 분석 등을 종합하여 볼 때, 모두 *H. marmoreus*에 속하며, 수집지역에 상관없이 거의 유사한 특성을 보여 1-2균주의 모균주에서 육성되어 재배되고 있는 것으로 판단되며, URP-PCR 분석에서 다른 그룹으로 분류된 국내 야생종은 새로운 품종의 육성을 위하여 사용 가능할 것으로 판단된다.

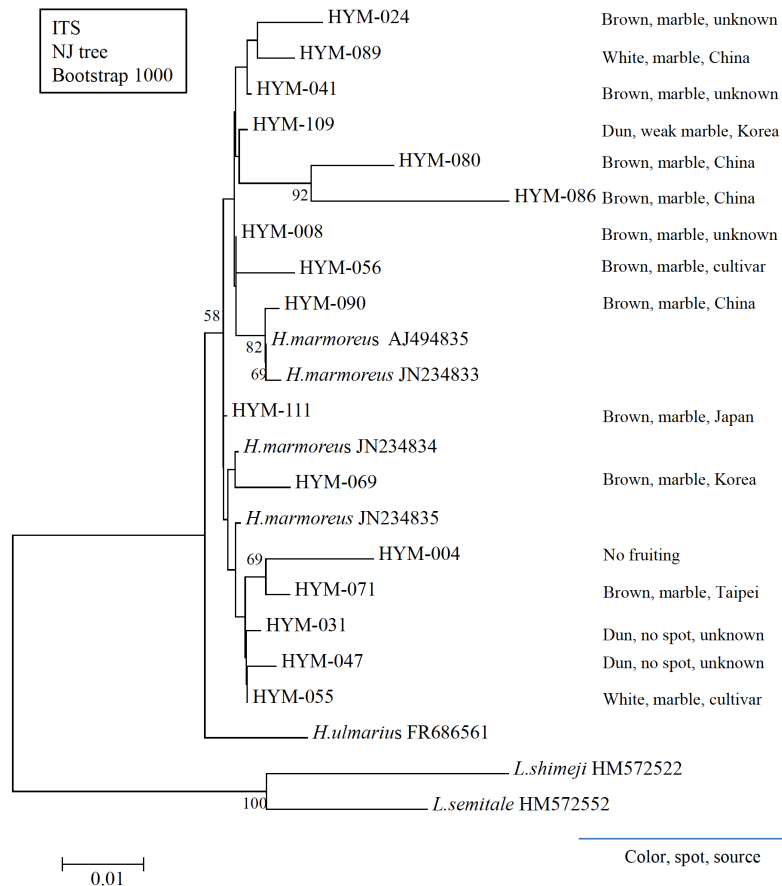


Fig. 3. Phylogenetic analysis of *H. marmoreus* strains and related isolates based on ITS1/28S rDNA sequences using the neighbor-joining method with Kimura2-parameter model.

References, which were taken from genbank database. Bar = 0.01

* HYM004 MT984396; HYM008 MT984397; HYM024 MT984398; HYM031 MT984399; HYM041 MT984400; HYM047 MT984401; HYM055 MT984402; HYM056 MT984403; HYM069 MT984404; HYM071 MT984405; HYM080 MT984406; HYM086 MT984407; HYM089 MT984408; HYM090 MT984409; HYM109 MT984410; HYM111 MT984411

적요

*Hypsizygus marmoreus*의 형태적 특성과 유전적 유연관계를 조사하기 위해 한국 및 다른 국가에서 111개의 균주를 수집하였다. RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 및 ITS rDNA 염기서열 분석을 이용하여 *H. marmoreus* 균주간의 유전적 관계를 확인하였다. URP-PCR을 이용한 RAPD 분석 결과, *H. marmoreus*의 모든 균주는 크게 3개의 그룹으로 분류되었으나, 90% 이상의 높은 유사성을 보였다. 또한 형태적 및 지리적으로 분류가 가능하였으나 갈색 균주 및 흰색 균주는 구별되지 않았다. 따라서 형태적, 지리적 차이가 있는 16개의 균주를 선별하여, 640 bp 길이의 ITS 염기서열을 정렬하고 비교하였다. ITS 염기서열의 유사성은 공시균주와 GenBank의 *H. marmoreus* 균주 사이에서 94.8-99.1 %였다. 수집지역과 형태에 차이가 있었지만, 실험에 사용된 공시균주는 모두 *H. marmoreus*에 가까운 유연관계를 형성하였다.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from Korea institute of planning and evaluation for the technology of food, agriculture, forestry and fisheries

REFERENCES

1. Bigelow HE. Omphalina in North America. *Mycologia* 1970;62:28-35.
2. Nagasawa E, Arita I. A note on *Hypsizygus ulmarius* and *H. marmoreus* in Japan. *Rept Tottori Mycol Inst* 1988;26:71-78 (in Japanese).
3. Dyakov MY, Kamzolkina OV, Shtaer OV, Bis'ko NA, Poedinok NL, Mikhailova OB, Tikhonova OV, Tolstikhina TE, Vasil'eva BF, Efremenkova OV. Morphological characteristics of natural strains of certain species of Basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions. *Microbiology* 2011;80:274-85.
4. Williams JGK, Kubelic AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18: 6531-5.
5. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-8.
6. Vos P, Hoger R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:4407-14.
7. Lim YJ, Lee CY, Park JE, Kim SW, Lee HSR, HS. Molecular genetic classification of *Hypsizygus marmoreus* and development of strain-specific DNA markers. *Korean J Mycol* 2010;38:34-9.
8. Kang HW, Park DS, Go SJ, Eun MY. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primer generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol Cells* 2002;13:281-7.
9. Jeon SJ, Kim JK, Kim GH, Chi JH, Seo GS, Kang HW. Genetic diversity of *Pleurotus eringii* strains in Korea based on morphological characteristics and PCR polymorphism. *Kor J Mycol* 2009;37:19-27.
10. Kang HW, Park DS, Park YJ, You CH, Lee BM, Eun MY, Go SJ. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiology* 2001;29:85-9.
11. Kim JK, Lim SH, Lee DS, Chi JH, Seo GS, Ju YC and Kang HW. Genetic analysis of cultivars in *Pleurotus* spp. of Korea by URP-PCR polymorphism. *Kor J Mycol* 2007;35:61-7.
12. Seo GS, Kim BR, Park MS, Kim MK, Yu SH. Morphological characterization and URP-PCR analysis of *Hypocrea* sp., a weed mould of oyster mushroom cultivation. *Kor J Mycol* 2002;3: 86-94.
13. Seo KI, Jang KY, Yoo YB, Park SY, Kim KH, Kong WH. Differentiation among commercial strains of *Pleurotus* spp. based on DNA fingerprinting using universal rice primer (URP). *Kor J Mycol* 2008;36:130-7.
14. Kang HW, Park DS, Park YJ, Lee BM, Cho SM, Kim KT, Seo GS, Go SJ. PCR based detection of *Phellius linteus* using specific primers generated from universal rice primer (URP) derived PCR polymorphic band. *Mycobiology* 2002;30:202-7.

15. Kim JK, Kang HW. Genetic diversity of *Paecilomyces japonica* and *Cordyceps militaris* strains by UPR-PCR fingerprinting. *Kor J Mycol* 2011; 39:180-4.
16. Redhead SA. Mycological observations 13-14: on *Hypsizygus* and *Tricholoma*. *Trans Mycol Soc Japan* 1984;25:1-9.
17. Redhead SA. Mycological observations 15-16: on *Omphalia* and *Pleurotus*. *Mycologia* 1986;78:522-8.
18. Hall TA. BioEdit: a use-friendly biological sequence alignment edit and analysis program for window95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999;41:95-8.
19. Lee CY, Park JE, Lee JA, Kim JK, Ro HS. Development of new strains and related SCAR markers for an edible mushroom, *Hypsizygus marmoreus*. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 327:54-9.
20. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of Ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton Leeuw Int J G* 1998;73:331-71.