

계방산, 오대산 및 지리산 야생 표고균주의 유전적 변이

김돌이* · 박원철¹

농업과학기술원 분자유전과, ¹임업연구원 산림화학과

Genetic Variation of the Wild Strains of *Lentinula edodes* in Three Mountains of Korea

Dool-Yi Kim* and Won-Chull Bak¹

Molecular Genetic Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

¹Division of forest chemistry, Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

ABSTRACT: Genetic variation of the wild strains of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler in three regions of Korea was investigated by analyzing random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. A total of 32 strains of *L. edodes* were collected from Mt. Kyebang (10 strains), Mt. Odae (11), and Mt. Jiri (11), respectively. The genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using an arbitrary 10-mer primer. A total of 170 amplified fragments were observed, of which 161 fragments were polymorphic. The results of cluster analysis, performed on the basis of the presence or absence of amplified fragments of the same size, revealed that strains collected from both Mt. Kyebang and Mt. Odae in a single group. AMOVA analysis revealed that genetic variations between sites amounted to 12.5%, while 87.1% of total variations was explained by variations among strains within sites. Relatively high genetic relationships among the strains of Mt. Kyebang and Mt. Odae, which were high variance within populations. Whereas, all the strains of Mt. Jiri, which were low variance among populations from both Mt. Kyebang and Mt. Odae, which resulted in genetic isolation of the strains in Mt. Jiri.

KEYWORDS: *Lentinula edodes*, PCR, Genomic DNA

표고 [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]는 주로 한국, 일본, 중국에서 뉴질랜드에 걸친 환태평양 나라들에 분포하는 고등 담자균이다(古川 久彦, 1992).

표고는 우리 나라 뿐만 아니라 일본, 중국 등에서 가장 소비가 많이 되는 재배버섯으로 알려져 있다. 특히 근래에는 식용뿐 아니라 건강식에 대한 관심이 증대됨에 따라 항종양 활성을 나타내는 다당체나 혈중 콜레스테롤치의 저하물질 등의 생리활성물질이 포함되어 있다는 연구결과로 인해 약리 효과를 가진 기능성 식품으로서 주목받고 있다(Chihara *et al.*, 1969; 水野 卓과 川合正允, 1992). 또한 표고는 일본 등으로 수출하는 경제성 있는 임산물중의 하나로 농가 소득 증대에 많은 기여를 하고 있다. 이러한 수요에 힘입어 표고에 대한 품종개량 및 육성에 많은 노력을 기울이고 있는데, 우리 나라 고유의 야생 표고균주의 유전적 특성 및 변이에 관한 자료가 부족하여 이에 관한 기초 연구가 우량 품종 육종 차원에서 매우 중요한 실정에 와 있다.

담자균류에 대한 기존의 유전적인 변이에 대한 연구는 형태적 특징, 색깔, 크기, 배양적 특성이나 대치배양, 동위 효소 분석 등이 이용되어 왔으나(김 등, 1995), 생명공학의 발전과 더불어 근래에는 분류학, 계통학, 교잡종 동정, 연쇄관계분석, 유전적 유연관계 분석에 분자생물학적 방법이

이용되고 있다(Ito *et al.*, 1998). 특히, Williams(1990) 등이 random primer를 사용하여 PCR 증폭한 DNA 단편을 표지 인자로 사용할 수 있다고 보고하면서 종속간의 유연관계를 밝히는데 RAPD 분석법이 많이 이용되고 있다. 이는 비용면이나 기술적인 면, 시간적인 면에서 비교적 간단한 방법으로 대규모 집단 연구에 적합하여 strain구분과 유전 분석에 많이 이용되고 있으며(Rafalski *et al.*, 1993), 특히 담자균에서는 표고(*Lentinula edodes*), 느타리(*Pleurotus species*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 목이(*Auricularia auricula-judae*), 영지(*Ganoderma lucidum*) 등의 종, 속간 유전적인 변이를 밝히는데 많이 이용되고 있다(Hseu *et al.*, 1996; Khush *et al.*, 1993; 김 등, 1995; Kulkarin *et al.*, 1991; Sunagawa *et al.*, 1995).

본 연구에서는 RAPD 분석법을 이용하여 임업연구원에서 보존하고 있는 야생 표고균주의 유전적인 특성과 각 지역간의 유전적인 변이에 관해 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에 사용된 균주들은 계방산, 오대산, 지리산에서 채집된 야생 표고균주들중 임업연구원 버섯연구실에서 보존 중인 계방산 10, 오대산 11, 지리산 11균주를 사용하여

*Corresponding author <E-mail: dykim020@hanmail.net>

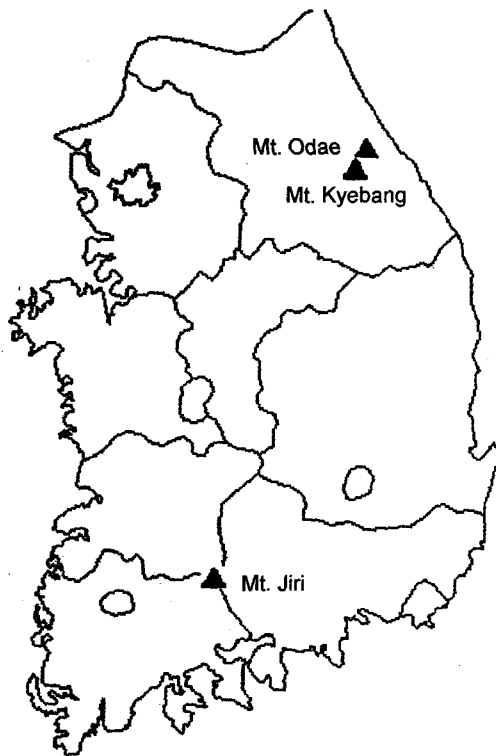


Fig. 1. Locations of Mt. Odae, Mt. Kyebang and Mt. Jiri in South Korea, where 32 wild strains of *Lentinula edodes* were collected.

Table 1. The strains of *Lentinula edodes* used in RAPD analysis

Serial numbers of strains	Strains	Source
1~10	K-1~K-10	Mt. Kyebang
11~21	O-1~O-11	Mt. Odae
22~32	J-1~J-11	Mt. Jiri

다(Fig. 1, Table 1).

균사체의 대량 배양

Genomic DNA의 추출을 위하여 보관중인 균주들을 PDA배지에서 일주일간 계대배양하였다. 다시 새로운 PDA 배지에 nylon membrane(Amersham)을 얹은 후, 코르크보러를 이용하여 배양하고 있던 균사를 5 mm 정도 잘라내어 nylon membrane을 얹은 PDA 배지에서 계대배양하였다. 약 한 달간 배양한 후 nylon membrane위에서 자란 균사들을 긁어 genomic DNA 추출에 사용하였다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA의 추출은 Möller(1992)의 방법을 일부 변형하여 추출하였다. 균사가 들어 있는 1.5 ml tube에 lysis buffer(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 100 µg Proteinase K) 500 µl를 넣어 55~60°C에서 1시간 동안 중탕하였다. 그리고 NaCl과 CTAB(Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 혼합한 용액을 넣어 65°C에서 10분간 처리한 후, 같은 양의 chloroform:

Table 2. Sequences of the 5'-oligonucleotides of the 10 primers used for RAPD analysis, total number of amplified DNA fragments, and number of polymorphic DNA fragments

Code	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplified DNA	Polymorphic DNA
OPA-02	TGCCGAGCTG	21	19
OPA-03	AGTCAGCCAC	19	18
OPA-07	GAAACGGGTG	24	24
OPA-09	GGGTAACGCC	17	15
OPA-11	CAATCGCCGT	23	23
OPA-13	CAGCACCCAC	15	13
OPA-15	TTCCGAACCC	17	17
OPA-17	GACCGCTTGT	10	9
OPA-19	CAAACGTCCG	14	13
OPA-20	GTTGCGATCC	10	10
Total		170	161

isoamylalcohol(24 : 1, v/v)을 넣어 0°C에서 30분간 처리하여 4°C, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 새로운 tube에 상층액과 NH₄C₂H₃O₂을 넣어 얼음 위에서 30분간 처리한 후 4°C, 15,000 rpm에서 원심분리 하였다. 새로운 tube에 동량의 isopropanol을 넣어 1시간 처리한 후 다시 원심분리 하였다. 70% ethanol로 2~3회 세척한 후 진공펌프에 의해 남아 있는 ethanol을 모두 증발시킨 후 TE buffer로 현탁 하였다.

PCR 증폭

DNA증폭을 위한 random primer는 Operon사의 10-base oligonucleotide primer kit를 사용하였다(Table 2). PCR 증폭은 10 ng/µl의 genomic DNA template와 1.0 µM primer, 0.5 unit의 *Taq* polymerase(Takara), 1.5 mM MgCl₂, 1× reaction buffer, 각 2.0 mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)에 멸균수를 넣어 혼합한 20 µl의 reaction mixture를 0.2 ml의 PCR용 tube에 넣고 PCR 증폭기(Perkins-Elmer Cetus system 9600)를 사용하여 DNA를 증폭시켰다.

PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분간 denaturation과 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension으로 45 cycle까지 반복 실행하였으며, 처음 denaturation시간은 94°C에서 5분간 그리고 마지막 extension시간은 72°C에서 5분간 연장시킨 후 반응이 끝나면 4°C에서 유지되도록 하였다.

PCR 산물은 TBE buffer에서 1% agarose gel을 이용하여 3시간 전기영동 한 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide로 염색하여, U.V. transilluminator에서 결과를 확인한 후 polaroid film을 이용하여 촬영하였다. PCR에 의한 증폭산물은 100 bp DNA ladder marker(Pharmacia Biotech)를 사용하여 증폭된 산물의 크기를 추정하였다.

그리고 재현성 검증을 위해 일부의 primer에서 2회 반복 실험을 하였다.

통계분석

PCR을 이용하여 증폭된 유전자의 RAPD 분석을 위해서

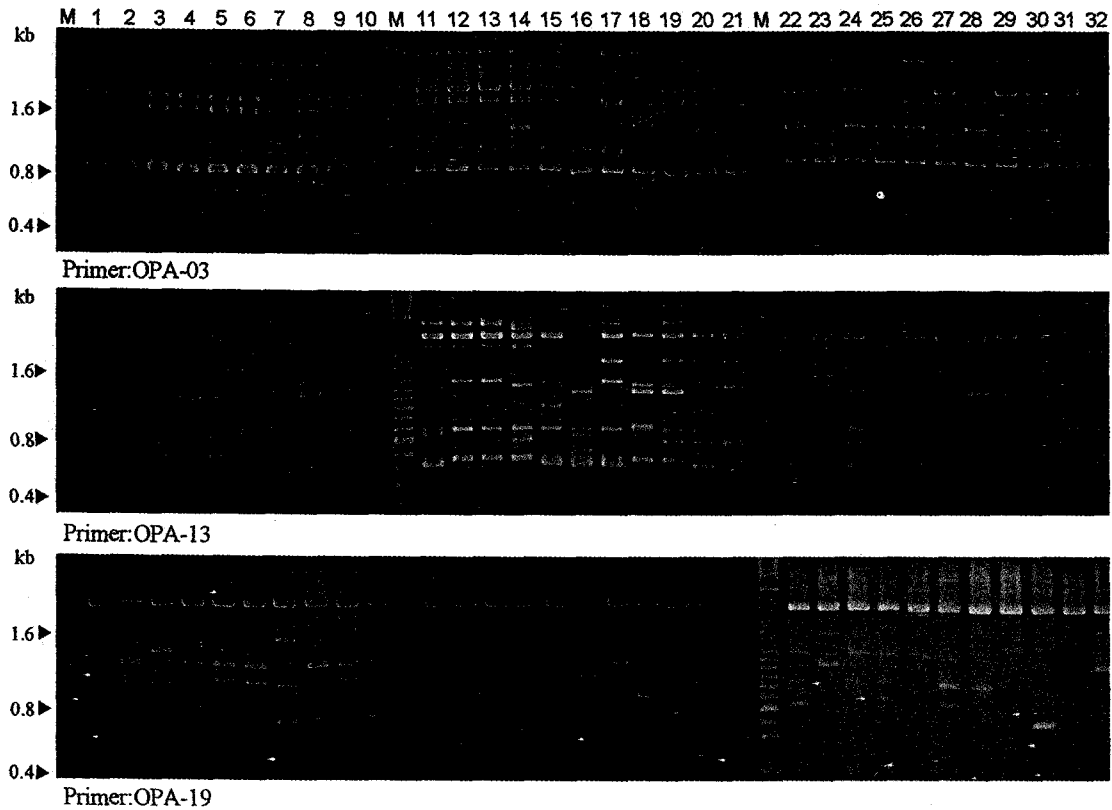


Fig. 2. Gel electrophoresis of RAPD fragments amplified by using 3 primers. Lanes marked as 1 to 32 denote 32 strains tested. Lane M denotes DNA size marker (100 base pair ladder, Pharmacia Biotech).

전기영동상의 밴드 유무에 대하여 Rohlf(1993)의 NTSYS-pc(version 1.80)를 이용하여 수행하였으며, 계산식은 다음과 같다.

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

F: Similarity coefficient

NXY: The number of PCR products shared by isolates X and Y.

NX+ NY: Total number of PCR products in isolates X and Y, respectively

Dendrogram은 위의 유사도 값을 근거로 UPGMA(Unweighted pair-group method with arithmetic means) 분석을 통해 각 균주들간의 유연관계를 밝혔다. 표고 천연집단의 유전변이 정도 및 유전적 이질성을 파악하기 위하여 집단별 분산을 구하였으며, Bartlett test를 실시하였다(Excoffier, 1995; Stewart와 Excoffier, 1996).

결과 및 고찰

우리 나라 3개 지역의 산, 계방산, 오대산, 지리산에서 채집한 야생 표고 각각 10개, 11개, 11개 균주들에 대해 RAPD분석에 의해 얻어진 결과로 각 균주간 유전 변이에 관해 비교 분석하였다(Fig. 1, Table 1).

10개의 random primer를 이용하여 각 균주들을 PCR 증

폭시킨 후 전기영동 한 결과, 증폭된 산물은 0.4~2.5 kb 사이에서 나타났다. 총 증폭산물은 170개였으며, 그중 다형성 증폭산물은 161개로 각 균주간 다양한 증폭산물의 분획양상이 관찰되었다(Fig. 2). 사용된 primer에서 표고의 공통 유전인자로 보이는 증폭산물이 0.6~1.0 kb, 1.6~1.9 kb와 2.0~2.2 kb에서 관찰되었다(Fig. 2).

반면, primer에 따라 각 균주간에 뚜렷한 유전인자의 차이를 나타낸 것도 있었으나, primer OPA-07과 같이 너무 많은 증폭산물이 나타나 뚜렷한 차이를 밝히기 어려운 primer도 있었다. 이것은 본 실험에 사용된 primer가 random primer이기 때문에 PCR 반응조건에서 template의 양이나 annealing 온도, extension 온도 등에 의해 필요이상의 증폭산물이 관찰되는 경우이므로 PCR조건의 확립이 중요했다(김 등, 1995). 또한 RAPD 분석법 외에 rDNA의 ITS(internal transcribed spacer)영역만을 증폭시켜 제한효소로 절단하여 유전적인 차이를 분석하는 PCR-RFLP 분석법이 분류학이나 계통분류학에서 많이 사용되고 있지만, ITS 영역이 유전적으로 안정된 영역이므로 종내 strains간의 차이를 밝히는 데는 오히려 적합하지 않은 점도 있다(박 등, 1999; 박 등, 1999).

전기영동 결과 각 균주들 간에 가장 뚜렷한 차이를 나타낸 것은 계방산의 K-2 균주와 오대산의 O-6 균주로 다형성 증폭산물이 가장 많이 관찰되었다. 그리고 오대산의 O-2와 O-3 균주는 10개의 primer를 이용한 전기영동상의

결과, 모두에서 같은 증폭산물의 분획양상을 나타내어 동일 균주일 것으로 추정된다.

각 균주들간에 표고의 공통 유전인자로 생각되는 증폭산물 외에 다형성 증폭산물의 존재가 확인되었고, 특히 공시 32개 균주들을 수집한 각각의 지역에서 유전인자의 차이가 관찰 되어짐으로써 우리 나라 야생 표고균주들의 변이가 확인되었다. Sunagawa 등(1995)은 일본, 뉴기니아, 타이베이 등지에서 수집한 11개의 표고균주를 RAPD법에 의해 분석한 결과 3개의 random primer에서 각 지역에 따른 균주간의 변이를 확인하였다고 보고하였고, Zang과 Molina (1994)도 6개국에서 수집한 15개의 표고균주에서 역시 균주간에 뚜렷한 변이를 나타내었다고 하였다. 또한 이 등 (1997)은 표고의 우량품종 선발을 위한 표지인자 탐색을 위해 RAPD법을 이용하여 우리 나라 등록 품종간에 유전적인 차이를 밝혔다. 그러므로 이들 보고 내용들로 미루어 볼 때 표고균주의 지역간 유전적인 차이가 인정되어지며 균주간 변이가 일어나고 있다는 것을 알 수 있다.

또한 계방산, 오대산, 지리산에서 채집한 표고균주에 대하여 유연관계를 분석한 결과 계방산에서 채집한 균주들 중 K-5와 K-6은 유사도 0.938로 아주 높은 유연관계를 나타내었고, K-7과 K-10도 0.859로 높은 유연관계를 나타내었다. 반면 K-2 균주는 K-7 균주와 0.570의 아주 낮은 유연관계를 나타내었다(Fig. 3). 오대산에서 채집한 균주들 중 O-2와 O-3 균주의 유사도는 0.992로 거의 같은 균주임을 시사하였고, O-6 균주는 O-2 균주와 0.625의 낮은 유연관계를 나타내었다. 지리산에서 채집한 균주들 중에는 J-1과 J-3이 0.898로 높은 유연관계를 나타내었으며, 지리산 균주들간에는 거의 비슷한 유사도를 나타내면서 하나의 그룹이 형성되었다. 또한 집단간 유전적 분화정도를 알아보기 위하여 AMOVA 분석을 한 결과 비교적 낮게 나타났으며, 전체 변이중 12.5%의 집단간 유전적 차이를 나타내었다(Table 3). 각 지역간 유전적 거리는 계방산과 오대산이 0.164, 오대산과 지리산이 0.185 그리고 계방산과 지리산이 0.189를 나타내었다. 따라서 계방산과 오대산에서 채집한 균주들의 UPGMA 분석결과 뚜렷하게 별도의 그룹으로 구분되지 못하는 것은 계방산과 오대산은 그룹 내 분화가 큰 것이 주요 원인일 것으로 생각된다. 그러나 지리산 균주들은 지리산 균주들끼리 하나의 그룹이 형성되어 계방산과 오대산과의 유전적인 차이가 뚜렷이 나타나므로 계방산, 오대산과 지리산은 서로 유전적 격리가 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3).

이 등(1998)은 10균주의 야생 검은 비늘버섯의 유사도

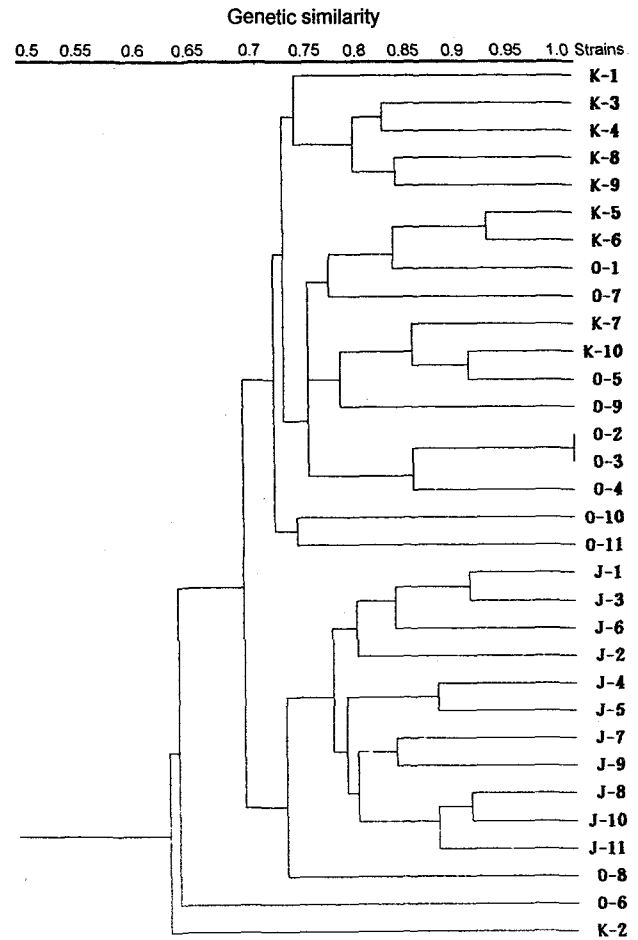


Fig. 3. UPGMA dendrogram derived from the RAPD profiles of genomic DNA in the 32 samples of *Lentinula edodes*. Genetic similarities were obtained by random amplified polymorphic DNA analysis with 10 primers.

검정에서 각각의 균주들이 5개의 그룹으로 나누어져 각 개체들간의 유전적 특성이 다름을 보고하였다. 조 등(2000)에 의한 11개 지역에서 채집한 송이의 유전변이를 조사한 결과 4개의 그룹으로 나누어지며, 또한 이들은 산지내 및 산지 내 개체간 변이를 관찰하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 계방산, 오대산 및 지리산지역의 야생 표고 균주들간에 유전적인 변이가 뚜렷이 관찰되었으며, 또한 각 지역의 다양한 유전인자의 존재도 확인할 수 있었다. 그러므로 우리 나라 야생 표고균주의 유전적인 특성과 각 지역의 유전 특성을 비교 분석하고, 외국 품종의 특성을 비교 분석하면, 현재 외국에서 들어오고 있는 표고균주들과 우리 고유의 표고 균주들을 구별할 수 있는 DNA marker를 찾을

Table 3. Analysis of molecular variance for 32 individuals sampled from 3 populations of *Lentinula edodes* using 161 RAPD markers

Source of variance	d.f	SSD ^a	MSD ^b	Variance component	% total	P-value
Among populations	2	106.130	53.065	3.0010	12.46	
Among individuals within populations	29	611.463	21.085	21.0849	87.54	<0.0099

^aSum of squared deviations.

^bMean squared deviations.

수 있을 것으로 생각된다. 또한 이들 야생 표고 균주의 유전적 특성을 잘 이용하면 새로운 표고 품종육성에도 이용할 수 있을 것이다. 그러므로 본 연구 결과는 앞으로 표고 품종 육성에 있어 분자생물학적 방법을 이용한 기초 연구 자료가 될 것으로 기대된다.

요 약

RAPD 검정법을 이용하여, 우리 나라에 자생하고 있는 야생 표고균주의 지역간 유전변이에 관해 분석하였다. 사용된 야생 표고균주는 계방산 수집 10개, 오대산 수집 11개, 지리산 수집 11개의 야생 표고 총 32균주를 사용하였다. Genomic DNA를 추출하여 10개의 random primer를 사용하여 PCR 증폭시킨 후 전기영동 한 결과 170개의 밴드가 관찰되었으며, 그중 다형성 밴드는 161개가 검출되었다. 이들 전기영동 상에 나타난 밴드의 유무(1,0)로 cluster 분석을 한 결과, 계방산과 오대산 표고균주들이 하나의 그룹으로, 나머지 지리산 표고균주들이 다른 하나의 그룹으로 형성되었다. 또한 AMOVA 분석결과 세 지역의 집단간 유전적인 차이는 12.5%를 나타내었고, 각 균주들 간에는 87.5%임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 계방산과 오대산 균주들은 그룹 내 분화가 큰 것이 주요 원인일 것으로 생각되며, 반면, 지리산 균주들은 계방산과 오대산과는 유전적 격리가 존재함을 알 수 있었다.

참고문헌

- 김범기, 정미정, 이창수, 이희경, 유영복, 류진창. 1995. 느타리버섯 속의 DNA 다형성분석에 영향을 미치는 PCR 조건. 한국균학회지 23(3): 202-208.
- 박동석, 고승주, 김양섭, 석순자, 송재경, 여윤수, 류진창, 성재모. 1999. 떡갈버섯류(*Corprinus* spp.)의 ITSII 영역 염기서열에 의한 유연 관계 분석. 한국균학회지 27(1): 27-31.
- 박동석, 고승주, 류진창, 성재모. 1999. ITSII 영역의 DNA 염기서열 분석에 의한 불로초(*Ganoderma*)속의 계통분류학적 고찰. 한국균학회지 27(1): 39-43.
- 이상선, 김미혜, 장후봉, 신춘식, 이민웅. 1998. 야생에서 채집된 검은버섯(*Pholiota adiposa*)균에 관한 연구. 한국균학회지 26(4): 574-582.
- 이태수, 박원철, 강호덕, 김세권, 변병호, 이창근, 이원규, 민두식. 1997. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)검정을 이용한 한국 표고 균주의 계통분류. 산림과학논문 55: 169-17.
- 조덕현, 이경준, 한심희. 2000. I-SSR PCR을 이용한 한국의 11개 주요 산지에서 채집 한 송이의 유전변이에 관한 연구. 한국균학회지 28(1): 32-37.
- 古川 久彦. 1992.きのこ學. 共立出版株式會社 pp. 80-115.
- 水野 卓, 川合正允. 1992.キノコの 化學・生化學. 學會出版センター pp. 229-235.
- Chihara, S. T., Maeda, Y., Hamuro, J. and Sasaki, T. 1969. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688.
- Ecoffier, L., Smouse, P. and Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Ecoffier, L. 1995. AMOVA version 1.55.
- Ito, Y. H., Fushimi T. M. and Yanagi S. O. 1998. Discrimination of species and strains of basidiomycetes genus *Coprinus* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mycosience* 39: 361-365.
- Hseu, R. S., Wang, H., Wang, H. H. and Moncalvo, J. M. 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1354-1363.
- Khush, R. S., Becker, E. and Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphism of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Genetics* 133: 225-236.
- Kulkarni, R. K. 1991. DNA polymorphisms in *Lentinula edodes*, the shiitake mushroom. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1735-1739.
- Möller, E. M., Bahnweg, G. and Geiger, H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl. Acids Res.* 20(22): 6115-6116.
- Rafalski, A., Tingey, S. and Williams, J. G. K. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Plant mol. Bio. Manual* C8: 1-9.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system (version 1.80), Computer program distributed by Exeter Software, Setauket, NY.
- Stewart, C. N. Jr. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J. Evol. Biol.* 9: 153-171.
- Sunagawa M. H., Neda, H. S. and Miyazaki, K. R. 1995. Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers II. *Mokuzai Gakkashi* 41(10): 949-951.
- Williams, J. G. K., Kubeik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zang, Y. and Molina, F. I. 1994. Studies on the differentiation of *Lentinula edodes* strains by RAPD assay. *Acta Edulis fungi* 1(1): 22-27.