

한국산 민자주방망이버섯의 유전적 변이

김승희 · 김종봉*

대구가톨릭대학교 생물학과

Received October 9, 2003 / Accepted December 20, 2003

Genetic Variation of Korean *Lepista nuda*. Seung-Hee Kim and Jong Bong Kim*. *Department of Biology, catholic university of Daegu, Kyeonbuk Kyeongsan 712-702, Korea* – *Lepista nuda* is a world-wide species which has and international reputation as a excellent edible species. In this study, we investigated the genetic variation and taxonomic relationship of *L. nuda* and other five Tricholomataceae species were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). 15 kinds of random primers were used. The distance matrix was calculated using UPGMA and phylogenetic relationship were inferred by neighbor-joining (NJ) method. Various bands of 100bp~1600bp were observed in electrophoretic patterns of RAPD. Nei's genetic distance was calculated using a total of 228 DNA bands identified, and phylogenetic tree was made. The Nei's genetic variations of *L. nuda*, *Lepista sordida*, *Collybia peronata*, *Collybia confluens*, *Lyophyllum cinerascens*, *Laccara laccata* were 0~21.3%, 21.2~28.0%, 15.4~23.0%, 14~21.8%, 16.5~34.6%, and 12.4~27.4%, respectively. The consistency index, the retention index and homoplasmy index were 0.5217, 0.5769 and 0.5156, respectively. Also, two groups could be made by NJ tree. The genetic distance between *L. nuda* and *C. confluens* was closer than that between *L. nuda* and *L. sordida*.

Key words – *Lepista nuda*, genetic variation, Random Amplified Polymorphe DNA

민자주방망이버섯 [*Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke]은 분류학적으로 담자균문(Basidiomycota), 진정담자균강(Eubasidiomycetes), 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae), 자주방망이버섯속(*Lepista*)에 속하며, 우리나라의 경우 자주방망이버섯속에는 민자주방망이버섯(*L. nuda*), 광릉자주방망이버섯 [*L. irina* (Fr.) Bigelow], 자주방망이버섯아재비 [*L. sordida* (Schum. ex Fr.) Sing] 세 종이 있다. 민자주방망이버섯은 우리나라의 대부분에서 서식하며, 일본, 중국, 유럽의 북반구 일대와 오스트레일리아에 서식하고 있으며 늦가을부터 초겨울에 걸쳐 정원, 잡목림, 혼합림 내 땅위에 단생 또는 군생하는 낙엽 분해성과 외생 균근성 버섯으로 균류를 형성한다.

민자주방망이버섯은 맛과 향이 뛰어나 구미나 중국 등지에서는 식용으로 널리 이용하고 있다. 또한 유리아미노산 28종, vitamin B₁, pectin, lignin 등의 성분을 함유하고 있고, ìbrin 분해 활성도가 매우 높으며[7], 항종양작용이 높은 것으로 보고되었다[10].

민자주방망이버섯은 식용으로 기호성이 뛰어나기 때문에 기의 재배 방법을 개발하고 품종을 개량을 위한 기초 연구들이 이루어져 왔다[1,5,14]. 민자주방망이버섯은 세계적으로 널리 분포하고 있어 서식지의 생태학적 조건에 따라 특성의 차이를 나타낸다[13]. 또한 프랑스 및 호주산 민자주방망이버섯의 자실체 형성 최적조건을 비교해보면 호주산이 프랑

스산보다 높은 온도를 필요로 하였다고 보고되었다[13]. 프랑스산 민자주방망이버섯의 여러 품종을 교배하여 품종 개량한바있다[1,5]. 또한 Hha와 HinfI 등의 제한효소와 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker를 이용하여 프랑스와 호주의 민자주방망이버섯 및 자주방망이버섯 아재비를 분석한 결과 각각 같은 종으로 판명되었으나 중간 혹은 같은 종이라도 서식지가 다르면 교배가 이루어지지 않았다[13].

이러한 연구 결과들은 민자주방망이버섯이 많은 유전적 변이가 있으며 이를 바탕으로 육종 할 수 있음을 보여준다. 그러나 우리나라 민자주방망이버섯에 대한 연구는 자실체, 포자 등의 형태학적 특징에 기반을 둔 연구나 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 방법 등에 의한 단편적인 종적 특성에 대한 보고와[6] 배양학적 특성과 토양생태학을 토대로 한 특성뿐이고[18], 민자주방망이버섯 내의 유전적 변이나 같은 속 혹은 과 내의 다른 종들과의 유연관계에 분자유전학적 방법에 대한 연구는 이루어진 바 없었다. 그리하여 본 연구에서는 random primer를 이용한 RAPD를 실시하고 PAUP (4.0b version, Swofford, 2001)을 이용하여 민자주방망이버섯 종내의 개체간 변이 및 송이과 버섯간의 *Collybia. confluens*, *C. peronata*, *L. sordida*, *Laccare. laccata*, 및 *L. cinerascens*의 계통분류학적 유연관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

채집 및 배양

가랑잎애기버섯, 밀버섯, 솔버섯, 황토벚꽃버섯, 및 민자주

*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3775, Fax : +82-53-850-3775

E-mail : jbkim@cu.ac.kr

방망이버섯은 경상북도 경산시 하양읍의 야산등 7곳과 제주도에서 채집한 민자주방망이버섯과 광릉에서 채집한 자주방망이버섯아재비를 각각 1종을 채집하였다. 민자주방망이버섯과 자주방망이버섯아재비 외에 가랑잎애기버섯, 밀버섯, 솔버섯, 줄각버섯, 만가닥버섯 등을 비교 분석 재료로 하였다. 채집한 버섯의 주름살 일부분 떼어 potato dextrose agar (PDA)배지에서 접종하여 25°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 균사는 감자연결, 모양, 색깔 등을 보고 기존의 문헌[6,11]에서 서술된 내용과 일치되는 균사를 분리하여 계대배양하였고, 그 중 같은 시기에 계대한 균주를 분리하여 실험에 사용하였다.

일반적으로 버섯균사의 배양실험에 많이 사용하는 PDA 배지를 선정하였다. PDA배지는 PDA 39.0 g/L, pH 5.4로 조제하여 121°C, 1.5기압에서 30분간 멸균하고, clean bench 하에서 멸균된 직경 87 mm의 petri dish에 50 ml씩 분주하여 완전히 식힌 후, 직경 5 mm의 Cork borer로 자른 후 접종하였다. 접종 후 25±1°C의 incubator에서 25일간 배양하였다.

Genomic DNA의 분리

Genomic DNA 분리에 사용한 균사는 PDA배지에서 25일간 배양한 균사를 사용하였다. DNA분리 방법은 Yoon 등 [16]의 방법을 약간 변형시켜, 배양한 균사체의 약 0.5 g을 액체질소로 동결시켜 유발로 갈아서, 마쇄한 분말을 1.5 ml eppendorf tube에 옮기고, lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM EDTA (pH 8.0), 3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% 2-mercatioethanol] 500 µl를 넣어서 잘 섞고, 65°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 중에는 10분마다 두 세 번씩 뒤집어서 섞어주었다. 다음에는 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상층액을 micropipet으로 채취하여 다른 1.5 ml tube에 옮겼다. 채취한 양과 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 넣어 잘 섞은 뒤, 15,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 채취하여 새 tube에 옮긴 후 채취액의 2배의 냉장보관 한 70% ethanol을 넣고 15,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. pellet을 확인한 후, 상층액을 제거하고 실온에 20분 정도 건조시킨 다음, TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 100 µl를 넣어서 DNA를 용해시킨 후 -20°C에서 보관하여 PCR 반응용액의 주형 DNA로 사용하였다.

PCR 반응액의 조성과 PCR 조건

PCR에 사용한 primer들의 code name과 sequence는 Table 1에 나타내었다. 대체로 G-C의 함량이 60~70%이었다. PCR을 위한 반응 혼합액의 조성은 Taq polymerase 1 U, Tris-HCl (pH9.0) 10 mM, dNTPs mixture 250 µM, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM였고 여기에 genomic DNA 1.0 µl, primer 2.0 µl (Genotech)를 넣고 3차 증류수를 20 µl까지 채

Table 1. Code and sequence of the primers used in the study

Code	Sequence (5' to3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
*OPA-05	AGGGGTCTTG
*OPA-06	GGTCCCGTAC
*OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
*OPA-09	GGGTAACGCC
*OPA-10	GTGATCGCAG
*OPA-11	CAATCGCCGT
*OPA-12	TGCCGATAG
*OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-19	CAAACGTCCG
OPB-1	GTTTCGCTCC
OPB-4	GGACTGGAGT
OPB-6	TGCTCTGCCC
*OPB-8	GTCCACACGG
OPB-14	TCCGCTCTGG
*MGL-1	GGGGGAAGC
MGL-2	GCGGTTGAGG
MGL-3	CGCACCAC
*MGL-4	TGGTCCCTGC
*MGL-5	CTGATGCTAC
*MGL-7	CTGAAGCTAC
*MGL-8	ACGGTACACT
*MGL-9	TAGGCGTATCACGACGCCCT
MGL-10	TACGGTGCCGAGCGCAGCA

*: Reaction primers

웠다. PCR에 사용한 thermal cycler는 영국 Techne사의 Progene였으며, PCR 조건은 박등[11]의 방법을 약간 변형하여 따라 주형 DNA를 변성(denaturation)시키기 위해 94°C에서 2분간 처리 후, 증폭을 위해 94°C에서 30초간 변성(denaturation), 40°C에서 1분간 부착(annealing), 72°C에서 5분간 중합반응을 확실하게 완성하였다. PCR한 product들은 ethidium bromide를 첨가한 1.0% agarose gel에서 1×TAE buffer (Tris base, glacial acetic acid, Na₂EDTA · 2H₂O)를 사용하여 70 volt로 전기영동한 후 UV상에서 나타나는 band들을 관찰하였다.

계통수 분석

RAPD결과는 각 밴드를 하나의 형질로 취급하여 유무에 따라 '1'과 '0'으로 표시하고 전체 OTU에 대한 자료형질을 작성하였으며, PAUP (4.02b version, Swfford, 2001)을 사용하여 parsimony analysis를 하였으며, 분석방법으로는 Heuristic search를 이용하였다. 또한 Nei [9]의 유전적 거리지수를 다소 변한 Nei-Li의 거리지수를 이용하여 상사도 행렬을

도출하였다. 도출된 자료행렬에 따라 유전적 유사도를 기초로 한 neighbor-joining (NJ) tree 를 산출하였다[14]. 또한 각 분계도의 지지정도를 알아보기 위하여 jackknifing [2], bootstrap [3]을 이용하였다. 이러한 분석방법은 1000회 반복하였으며 이를 통한 계통수를 찾아내었다.

결과 및 고찰

DNA의 PCR-RAPD pattern

본 연구에서는 Tricholomataceae과에 속하는 12균주의 유전적변이를 RAPD법을 이용해 분석하였다. RAPD분석을 위해 사용된 random primer는 총 28개였으며, 종간구별에 특이적인 primer는 15개 였다. 본 실험에서 반응이 일어난 15개의 primer 대부분 G+C content가 매우 높았으며(60~70%),

그 중 3번 반복 실험을 통해 분류군 전체에 반응이 일어난 것은 15개였다. 이러한 결과는 일반적으로 primer의 염기구성이 DNA의 증폭길이에 커다란 영향을 미치며[15], random primer에 있어서 G+C content가 높을수록 DNA 증폭은 매우 잘 일어난다는 견해와 일치하였다[4]. PCR 과정을 통하여 증폭된 RAPD 절편들은 1600bp에서 100bp사이의 구간에서 관찰되었고, RAPD marker의 수는 primer마다 3~8개로 다양하게 나타났으며, 종간에 서로 차이를 나타내거나 종내의 지역 개체군간에 동일하거나 서로 다른 밴드양상이 관찰되었다(Fig. 1 A.~Fig. 1 D.). 예를 들어 primer MGL-1을 이용한 PCR 결과 *Lepista nuda* A는 5개의 band가 나타나고 *Lepista nuda* C는 8개의 band가 나타났고 이는 band 굵기도 다양하게 나타났다. 이와 같은 양상은 모든 primer에서 관찰되었다.

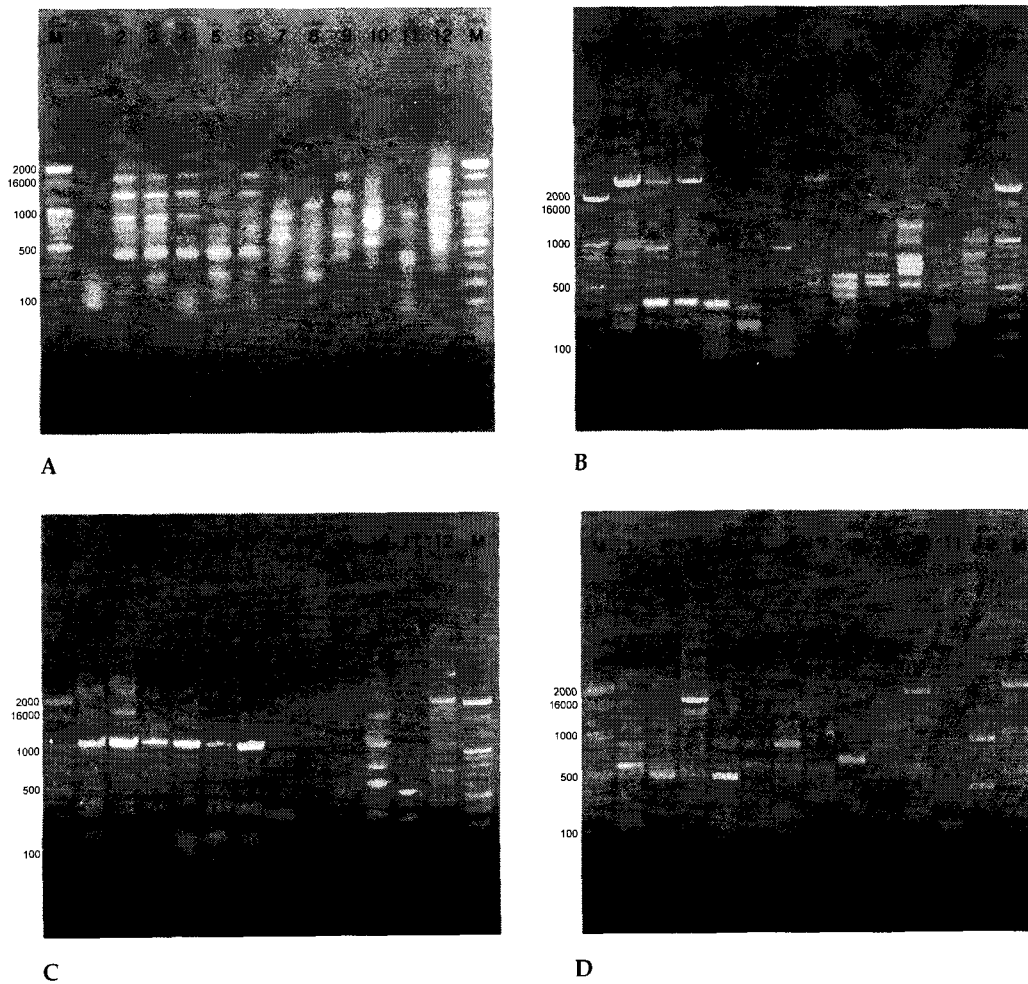


Fig. 1. RAPD pattern using various primers.

A: primer No. MGL-1, B: primer No. MGL-4, C: primer No. MGL-5, D: primer No. MGL-7.

M: 100 bp DNA Ladder

Lane 1: *Lepista nuda* A, Lane 2: *Lepista nuda* C, Lane 3: *Lepista nuda* G, Lane 4: *Lepista nuda* F, Lane 5: *Lepista nuda* H, Lane 6: *Lepista nuda* B, Lane 7: *Lepista nuda* I, Lane 8: *Lepista sordida*, Lane 9: *Collybia peronata*, Lane 10: *Collybia confluens*, Lane 11: *Laccaria laccata*, Lane 12: *Lyophyllum cinerascens*.

유전적 유사도

15개의 primer로부터 자료분석에 유용한 45개의 scorable RAPD marker가 최종분석에 이용되었고, 이를 근거로 Nei-Li의 유전적 거리지수를 이용하여 비유사도(상수도) 지수 행렬을 도출하였다.

유전적 상사도지수행렬에 의하면 민자주방망이버섯 사이의 변이는 0~21.3%이고 자주방망이버섯아재비는 21.2~28.0%이며 가랑잎애기버섯은 15.4~27.4%를 나타내었다. 전체 분류군을 PAUP프로그램을 이용하여 분석한 결과, 전체 79 단계의 길이를 갖는 전체 66개의 가장 짧은 계통수를 얻었으며, Consistency index (autapomorphy제외)는 0.5769, Retention index (RI)는 0.5217, Homoplasy index (HI)는 0.5156을 나타내었다. 조사된 전체 버섯분류군의 RAPD에 기초한 tree는 5개의 분계조를 형성하고 있다. 첫 번째 분계조는 만가닥버섯으로 가장 기부에 위치하고 있고 6개의 autapomorphic chang를 가지고 있다. 두 번째 분계조는 졸각버섯으로 7개의 synapomorphic chang와 자주방망이버섯아재비와 자매군을 형성하고 있다(8 autapomorphic chang). 세 번째 분계조는

가랑잎애기버섯으로 11개의 autapomorphic chang를 가지고 있다. 네 번째 분계조는 밀버섯으로 6개의 synapomorphic chang를 가지고 있다. 마지막 분계조는 I지역 민자주방망이버섯이 서로 상이한 7개의 분류군이 분계조를 형성하고 있으며, 이중 A지역 민자주방망이버섯과 C지역 민자주방망이버섯이 서로 1개의 autapomorphic chang를 가지고 H지역 민자주방망이버섯과 자매군을 형성하고 있으며(1개의 synapomorphic chang), 이들은 또 다시 G지역 민자주방망이버섯과 F지역 민자주방망이버섯이 하나의 커다란 분계조를 형성하고 있다(1개의 synapomorphic chang와, 48% bootstrap 지지도 그리고, 51% jackknifing 지지도). 염기변이에 기초하여 얻어진 neighbor-joining(NJ) tree 분석[2,14] 결과에 있어서도 최대절약계통수 분석과 같은 분계조를 형성하였다[2,3].

한편 Parsimony tree에서는 민자주방망이버섯 G지역과 F지역 사이의 관계설정이 확립되지 않았으나(Fig. 2) NJ tree에서는 두 분류군이 자매군을 형성하고 있음을 보여주었다(Fig. 3). RAPD의 연구결과는 민자주방망이버섯의 종내의 개체변이, 송이과 다른종과의 유연관계와 진화경향성을 파악

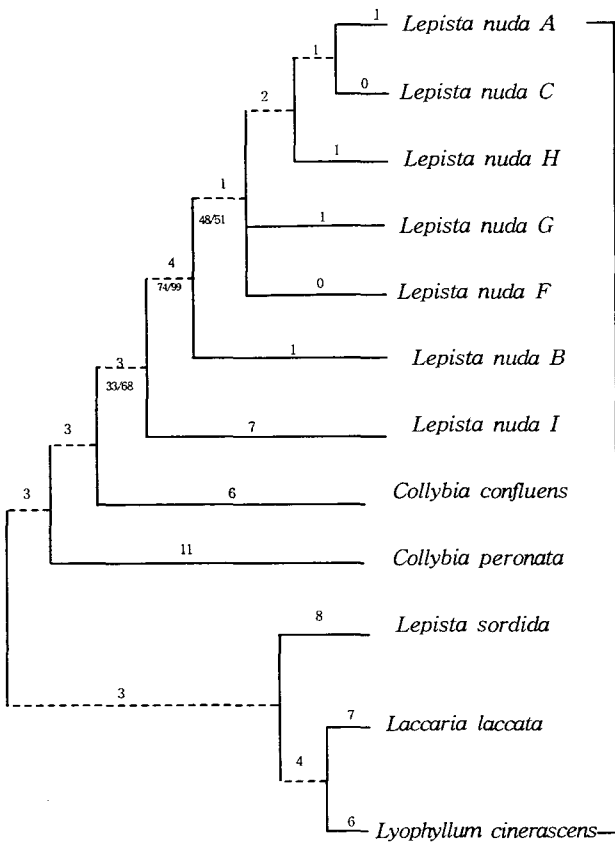


Fig. 2. Strict consensus tree of the 66 most parsimony tree (79 steps, C1=0.5769, R1=0.5217).

The number of changes is indicated above branches and bootstrap/jackknife values are found below branches. Dashed lines indicate the that collaps in the strict consensus tree.

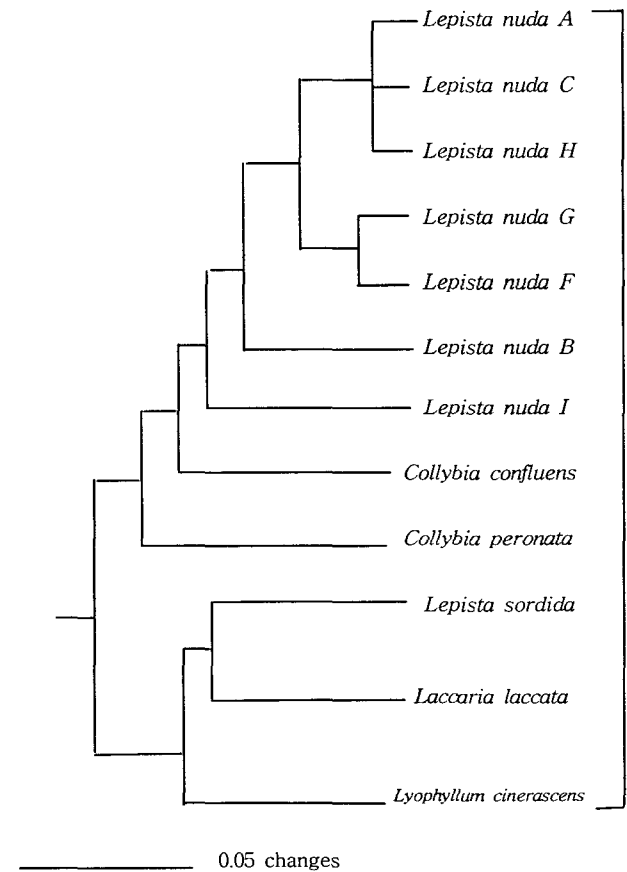


Fig. 3. Neighbour - joining (NJ) tree, of Tricholomataceae used to this study *Lepista nuda* base on RAPD.

This analysis showed that the genetic distance between *L. nuda* and *C. confluens* was closes than that between *L. nuda* and *L. sordida*.

하는데 도움이 되었다. A지역 민자주방망이버섯과 C지역 민자주방망이버섯이 유전적 거리지수가 12.3%로 가장 가까움을 나타내었고, 같은 자주방망이속인 자주방망이버섯아재비는 밀버섯보다 더 유전적 거리지수가 멀다는 것을 알 수 있었다. 갓은 지름 4~12 cm로 초기에는 평반구형이나 차차 편평형이 되며, 갓 표면은 평활하고, 갓 끝은 굽은형을 가지고 있으며, 포자문은 담홍색의 특징인 민자주방망이버섯은 본 연구결과 하나의 분계조를 형성하여 유전적으로는 안정된 형태를 이루고 있다. 그러나 갓은 지름 3~8 cm, 갓 표면은 초기에는 담자갈색이나 차차 황회갈색이 되며 갓 끝은 초기에는 굽은형이나 차차 위로 뒤집히는 등의 특징을 가지고 있는 자주방망이버섯아재비는 같은 속인 민자주방망이버섯과 같은 분계조를 형성하지 않고 오히려 졸각버섯과 분계조를 형성하고 있어 단계통군을 지지하고 있지 않다. 밀버섯과 가랑잎애기버섯은 같은 속이지만 하나의 분계조를 형성하고 있지 않아 차후의 단계통여부는 추가된 분류군의 실험이 요구된다. 한국, 중국 등지에 분포하는 만가닥버섯은 자주방망이버섯아재비와 졸각버섯과 아주 가까운 유연관계를 형성하고 있음을 보여 주었다(Fig. 3).

지금까지 민자주방망이버섯, 밀버섯, 가랑잎애기버섯, 자주방망이버섯아재비, 졸각버섯, 만가닥버섯 등의 유연관계가 외부형태학적 연구나 분자계통학적 연구가 수행한 바 없으나, 본 연구결과 이들의 유연관계 설정에 상당한 정보를 제공하였다. 하지만 각 종들의 객관적인 자료를 얻기 위해서는 각 속에 속하는 분류군의 첨가가 요구된다. 본 6종의 진화경향성은 각 마디의 붕괴로 아쉽게도 유추할 수는 없었다. 이러한 결과는 민자주방망이버섯의 분류체계를 확립하기 위한 자료로 아직 불충분하며, 이 문제를 해결하기 위하여 부가적인 분류군 및 RAPD와 같은 다른 유용한 marker를 이용하여 민자주방망이버섯을 논한다면 분류체계, 유연관계 및 진화경향성을 규명하는데 유용할 것으로 사료된다.

요 약

민자주방망이버섯은 우수한 식용버섯으로 세계적으로 분포하고 있는 종이다. 민자주방망이버섯과 5가지 송이과버섯 종들의 유전적인 변이와 분류학적 관계를 RAPD에 의해 분석하였다. RAPD에 15가지 random primer를 사용하였다. 버섯들의 유전적 거리는 UPGMA를 사용하여 측정하였고 계통유전학적 유연관계는 neighbor-joining (NJ) 방법을 사용하여 분석하였다. PCR에 의하여 증폭된 RAPD 절편들은 100 μ p에서 1600 bp이었다. Nei-Li의 유전적 거리는 228개의 DNA 밴드를 사용하여 계산하였고 이를 바탕으로 계통유전학적 계통수를 만들었다. 민자주방망이버섯, 자주방망이버섯아재비, 가랑잎애기버섯, 밀버섯, 만가닥버섯, 졸각버섯의 유전적 변이는 각각 0~21.3%, 21.2~28.0%, 15.4~23.0%, 14.0

~21.8%, 16.5~34.6%, 12.4~27.4%이었다. CI (Consistency index), RI (Retention index), HI (Homoplasy index)의 값은 각각 0.5217, 0.5769, 0.5156이었다. 또한 NJ tree로 두 그룹을 만들 수 있었다. 유전적 거리는 민자주방망이버섯과 자주방망이버섯아재비보다 민자주방망이버섯과 밀버섯이 더 가까웠다.

참 고 문 헌

1. Chen, M. O. H., J.T. Peng and J.T. Chen 2001. Study on the culture improvement of *Lepista nuda* J. Agric. res. China, **50**(1), 12-21.
2. Farris, J., M. Albert, D. Kallersjo and A. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**, 99-124.
3. Felsensten, J. 1985. confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 789-791.
4. Fritsch, P., A. Habson, C. D. Spore, P. E. Pack and L.H. Reiseberge. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol.* **11**, 10-20.
5. Guinberteau, J. and J. M. Oliver. 1995. A new of Blewit (*Lepista nuda*): Cultural investigations and flavour analysis. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Elliott (ed), ISBN9054105704, 45-51.
6. Kim, J. B. and S.G. Hwang 2001. A study on the mycelia culture and genetic characteristics in *Lepista nuda*. *Korean J. Life Science*, **11**, 496-501.
7. Kim, J. H., H. Y. Lee, K. H. YOO, Y. S. Kim, S. J. Seok, and Y. S. Kim 1998. The Screening of fibrolytics of extracts from mushroom in Mt. Chiak. *Kor. J. Mycol.* **26**(4), 589-593.
8. Mun, H. T., J. Namgung, Y. Y. Lee, J. Y. Lee, and J. H. Kim, 2000. Mass loss and changes of mineral nutrients during the decomposition of *Lepista nuda*. *Korean J. Ecol.* **23**(1), 33-37.
9. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* **106**, 283-292.
10. Park, W. H. and H. D. Lee. 1999. Illustrated book of korean medical mushroom, Kyo-Hak Publishing, Seoul, 186-187.
11. Park, W. M., H. G. Ko, R. J. Park, K. S. Hong, and G. H. Kim, 1997. Differentiation of *Lentinus edodes* isolates in Korea by isozyme polymorphisms and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Kor. J. Mycol.* **25**, 176-190.
12. Stott, K. and A. Broderick. 1996. Response of Australian strains of the mushroom *Lepista nuda* to temperature and substrate. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS press, Arlington, VA. 476-479.
13. Stott, K. G. 1998. Characteristics of Australian edible fungi in genus *Lepista* and investigation into factor affecting cultivation. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy, Univ. of Western Sydney Hawkesbur.

14. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molec. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
15. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalaski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acid. Res.* **18**, 6531-6535.
16. Yoon, C. S. and D. A. Glawe. 1991. P.D. Show., A method for rapid small-scale preparation of fungal DNA. *Mycologia* **83**, 835-838.