

느타리속 버섯 계통의 분자생물학적 유연관계의 비교연구

조해진¹ · 이재성¹ · 윤기남¹ · Nuhu Alam¹ · 이경림¹ · 심미자² · 이민웅³ ·
정종천⁴ · 신평균⁴ · 유영복⁴ · 이우윤¹ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생명과학부, ²서울시립대학교 생명과학과, ³동국대학교 생명과학과, ⁴농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Comparative Molecular Phylogenetic Relationships in Different Strains of *Pleurotus* spp.

Hae Jin Cho¹, Jae Seong Lee¹, Ki Nam Yoon¹, Nuhu Alam¹, Kyung Lim Lee¹, Mi Ja Shim², Min Woong Lee³, Jong Chun Cheong⁴, Pyung Gyun Shin⁴, Young Bok Yoo⁴, U Youn Lee¹ and Tae Soo Lee^{1*}

¹Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772

²Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743

³Department of Life Science, Dongguk University, Seoul 100-715

⁴Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707

(Received December 14, 2010. Accepted December 21, 2010)

ABSTRACT: *Pleurotus* spp. have been used for edible and medicinal purposes in Asian countries for a long time. The fruiting bodies of the *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus salmoneostramineus* contained many physiologically beneficial substances for human health. Therefore, it is necessary to study the genetic diversity of *Pleurotus* mushroom cultivars commercially cultivated in Korea. Eleven strains of *Pleurotus* spp. were collected from different geographical regions in South-East Asia and ITS regions of rDNA and RAPD of genomic DNA were analyzed. The size of the ITS1 and ITS2 regions of rDNA from the different strains varied from 167 to 254 bp and 156 to 213 bp, respectively. The sequence of ITS1 was more variable than that of ITS2, and the 5.8S sequences were identical. A phylogenetic tree based on the ITS region sequences indicated that selected strains could be classified into 4 clusters. Eleven *Pleurotus* species were also analyzed by RAPD with 20 arbitrary primers. Ten of these primers were efficiently amplified the genomic DNA. The number of amplified bands varied with the primers and strains, with polymorphic fragments in the range from 0.1 to 2.0kb. The results revealed that genetic diversity of selected strains of *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus* and *P. salmoneostramineus* is low.

KEYWORDS : Genetic diversity ITS, *Pleurotus* spp. RAPD analysis

서 론

버섯의 자실체에는 항산화, 항비만, 고혈압, 항암, 면역 활성화 등에 효과에 있는 여러 종류의 생리 활성물질이 함유되어 있다는 것이 알려져 있으며 특히 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 느타리속 버섯에 이들 물질의 함유량이 높다고 보고되어있다(Khan and Garcha, 1984). 느타리속에 속하는 버섯은 전 세계적으로 약 30 여종이 보고되어 있으며, 약 10여종이 재배되고 있다. 최근 우리나라에서 많이 재배되고 있는 느타리속 계열의 버섯에는 느타리(*Pleurotus ostreatus*)와 큰느타리(*Pleurotus eryngii*)가 있으며 이들 버섯 외에 새로 재배가 시도되고 있는 느타리속에는 노랑느타리(*Pleurotus citrinopileatus*)와 분홍느타리(*Pleurotus salmoneostramineus*)가 있다. 노랑느타리는 자실체의 색깔이 밝은 노란색을 띠기

때문에 요리에 예쁜 색깔을 낼 수 있고 또한 느타리속 중에 가장 다양한 종류의 생리활성물질도 함유하고 있어서 건강 식품으로서의 가치가 높다(Park and Lee, 1999). 이 버섯은 우리나라에 자생하는 것으로 보고되어 있으나 실제로 야생에서 발견하기가 어려워 국내의 여러 균주보존기관에서 보존하고 있는 균주의 수가 매우 적으며, 국내에서 육종을 통해 개발된 품종은 “금빛”과 “순정”이 있다. 분홍느타리는 자실체의 색깔이 연한 분홍색을 띠는 버섯으로 노랑느타리에 비해 생리활성물질을 적게 함유하고 있으나 자실체에 들어있는 수용성 분홍 색소는 요리를 맛깔스럽게 보일 수 있게 하는 장점을 갖고 있어 요리의 부재료로도 이용이 가능한 것으로 알려져 있으며 최근 “노을”과 “적단” 등 새로운 품종이 육성되었다. 과거에는 노랑느타리와 분홍느타리를 재배하기 위해서 일본, 중국, 대만 등 외국에서 품종을 도입하여 사용해 왔으나 앞으로는 우리가 개발한 품종을 재배할 수 있게 되어서 국제식물신품종보호동맹(UPOV)과의 문제가 발생되지

*Corresponding author <E-mail: tslee@incheon.ac.kr>

않을 것으로 사료된다. 따라서 최근 우리나라에서 육성된 품종이나 재배되는 품종이 외국에서 재배되고 있는 품종들과 분자생물학적으로 어떠한 차이점이 있는지에 대해서 비교연구가 필요하다고 사료되었다.

특히 느타리속의 버섯은 재배과정에서의 온도, 습도, CO₂ 농도, 조도 등 환경조건에 따라 자실체의 형태나 색깔의 변이가 커서 자실체의 외형이나 색깔만으로 계통이나 품종을 구분하는 데에 많은 어려움이 있다. 따라서 최근 버섯의 계통이나 품종을 판별하기 위해 염색체 DNA 내 rDNA의 ITS 영역을 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) 기법으로 증폭하여 ITS 영역의 염기서열의 변이를 분석하여 유전적 다양성과 품종이나 계통을 확인하는데 이용하고 있다. 이 방법은 종간의 차이점을 구별하는 데에 효과가 있으나 종내의 변이를 확인하는 데에는 약간의 어려움이 있다(Caetano and Gresshoff, 1997). 이러한 종 내의 문제점을 해결하기 위하여 RAPD법(Random Amplified Polymorphic DNA)이 개발되었다(Williams *et al.*, 1990). 이 방법은 느타리, 큰느타리, 느티만가닥 등의 종간 또는 종내 계통이나 품종의 다형성을 판별하는데 이용되고 있다(김 등, 2007; Alam *et al.*, 2009b; Lim *et al.*, 2010).

따라서 본 연구에서는 외국에서 도입하였거나 국내에서 육종한 노랑느타리, 분홍느타리 및 느타리 등 3종의 느타리속 버섯의 균주를 “버섯균주 및 DNA은행”으로부터 분양받아 이들 버섯의 균사체로부터 염색체 DNA를 추출하고 rDNA의 ITS 영역을 중합효소연쇄반응 기법을 이용하여 증

폭하여 ITS 영역의 염기서열을 밝히고, 또한 random primer를 이용하여 RAPD를 수행하여 이들 느타리속 버섯의 수집지역별 종 간 및 종 내에 유전적 다양성과 유연관계를 밝혀 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시품종

본 실험에는 인천대학교 버섯균주 및 DNA은행에서 보존 중인 노랑느타리(*Pleurotus citrinopileatus*) 4 계통, 분홍느타리(*Pleurotus salmoneoconineus*) 3계통, 느타리(*Pleurotus ostreatus*) 4계통 등 총 11계통을 사용하였으며 이외에 NCBI Genbank에 rDNA의 ITS 영역의 염기서열 정보가 등록되어있는 노랑느타리 3균주(각각 한국, 일본, 중국), 분홍느타리 2균주(한국과 중국) 및 느타리 1 균주(한국) 등 6균주의 정보를 내려 받아 본 실험의 분석결과와 통합하여 계통도를 작성하였다. 실험에 사용한 균주의 내용은 Table 1에 요약하였다.

염색체 DNA의 추출

노랑느타리, 분홍느타리 및 느타리의 균주로부터 염색체 DNA 추출은 PDA(potato dextrose agar)에서 7일간 25°C로 배양한 균사체를 이쑤시개를 이용하여 수확한 다음 멸균한 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하여 급냉시킨 상태에서 멸균한 막자공이로 마쇄하여 미세한 분말로 만들었다. 마쇄한 균사체 분말은 1.5 ml의 test tube에 옮기고 추출용 원충액

Table 1. List of *Pleurotus* strains used in this study

Strains	Name of the species	Date of collection	Location
IUM1307	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	01/31/2005	Taiwan (Taipei)
IUM2652	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	05/28/2006	China (Shenyang)
IUM3967	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	05/11/2009	Korea (cultivated, "Kumbit")
IUM4502	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	07/29/2010	Korea (Mt. Deogyu)
IUM3705	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i> L. Vass	06/14/2008	Korea (cultivated)
IUM3975	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i> L. Vass	06/04/2009	Korea (cultivated, "Jeogdan")
IUM4146	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i> L. Vass	11/20/2009	China (Kunming)
IUM1320	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. : Fr.) Kummer	01/31/2005	Taiwan(Taipei)
IUM1376	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. : Fr.) Kummer	02/28/2005	Korea (cultivated)
IUM1651	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. : Fr.) Kummer	06/12/2005	Korea (Taeon)
IUM3955	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. : Fr.) Kummer	05/11/2009	Korea (cultivated, "Goni")
AB115043	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	Genbank	Japan
AY265852	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	Genbank	Korea RDA
AY540318	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> (Sing.) Ohira	Genbank	China
AY265845	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i> L. Vass	Genbank	Korea RDA
EU424302	<i>Pleurotus salmoneostramineus</i> L. Vass	Genbank	China
AY368665	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. : Fr.) Kummer	Genbank	Korea RDA

[동량의 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA (pH 8.0), 1%의 50 mM sarkosyl] 500 μ l를 첨가하여 유리봉으로 잘 섞어 준 다음 65°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 500 μ l의 PCI(25 ml phenol, 24 ml chloroform, 1 ml isoamyl-alcohol)를 첨가한 후 실온에서 30분간 정치 후 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상등액만 취하여 새로운 tube에 옮기고 99.9%의 ethanol 1,000 μ l을 넣고 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 상등액을 제거하였다. 침전된 DNA에 70%의 ethanol 500 μ l를 첨가하여 동일한 조건으로 원심분리하고 2회 세척한 후 물기를 제거하고 상온에서 5분간 건조한 후 멸균한 3차 증류수에 녹여 spectrophotometer(Optizen, Daejeon, Korea)를 이용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 측정하여 DNA의 양을 정량하였다(Cubero *et al.*, 1999).

중합효소연쇄반응

rDNA의 ITS 영역 증폭

각각의 균주로부터 추출한 염색체 DNA에서 rDNA의 ITS(Internal Transcribed Spacers)영역을 증폭하기 위하여 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 등의 universal primers를 사용하였다(White *et al.*, 1990). 중합효소연쇄반응 조건은 0.2 ml의 PCR 시험관에 2 μ l의 10X PCR buffer, Taq DNA 중합효소 1 μ l, 10 mM dNTP 1.6 μ l, 염색체 DNA 1 μ l, 각각의 10 pmol primer 0.5 μ l 그리고 14.2 μ l의 증류수를 넣은 후 PCR을 수행하였다. PCR은 Verti사의 thermal cycler(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 이어서 94°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 35회 반복하여 polymerization을 한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 방치하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 1 kb 크기의 ladder를 추가해 전기영동을 하여 확인 후 sequencing을 수행하였다.

균주 간 유연관계의 분석

ITS영역의 염기서열 분석에는 각 버섯의 종별 및 지역별로 신뢰성 있는 자료를 만들기 위하여 이미 ITS 영역의 염기서열의 분석이 끝난 11개의 균주 외에 NCBI의 GenBank로부터 ITS 영역의 염기서열 정보가 등록되어있는 노랑느타리 3균주(한국, 일본, 중국), 분홍느타리 2균주(한국, 중국), 느타리 1균주 등 총 6개 균주의 자료를 받아 총 17개의 균주를 대상으로 분석을 수행하였다. 균주 간 ITS 영역의 유연관계 분석은 ClustalW 분석프로그램을 사용하였다(Thompson *et al.*, 1994). 계통수는 CLC free bench program을 이용하여 근린 결합분석법(neighbor-joining method)으로 작성하였다. 계통수와 내부 분지들에 대한 신뢰도를 검증하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 반복하여 실시하였다 (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987).

RAPD분석

다형성 분석을 위하여 11개의 느타리속 버섯의 균주에서 추출한 염색체 DNA를 RAPD-PCR 방법을 이용하여 증폭하였다(Williams *et al.*, 1990). 10 base의 oligonucleotide (Operon Technologies, Inc., Alameda, California)로 구성된 20개의 random primer 사용하였고 그 내용은 Table 2에 요약하였다. PCR의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 이어서 94°C에서 1분간, 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 35회 반복하여 polymerization을 한 다음 72°C에서 7분간 방치하였다. 증폭된 PCR의 산물은 1x Tris-Actate-EDTA 완충액이 들어있는 1.4% agarose gel에서 100 V로 75분간 전기 영동하였으며 이 때 1 kb 크기의 DNA ladder를 size marker로 사용하였다. Gel은 전기영동 후 ethidium bromide 용액으로 염색하고 Gel documentation system(Kodak Image Station 4000R, USA)을 사용하여 image를 확인하고 기록하였다.

RAPD 결과의 계통분석

20개의 primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행한 결과 Gel 상 나타난 각각의 band를 하나의 형질로 취급하여 band가 존재하면 (1), 존재하지 않으면 (0)으로 코드화하여 자료행렬(data matrix)을 만들었다. 유사도 계수(similarity coefficient) S는 균주 간 모든 primer를 사용하여 RAPD-PCR 후 나타난 band의 수를 이용하여 $2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 로 계산하였다. 이때 N_{xy} 는 각각의 두 균주가 공유하는 band의 수이고, N_x 와 N_y

Table 2. List of RAPD primers used in this study

Primers	Sequence (5' to 3')
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPA-2	TGCCGAGCTG
OPA-3	AGTCAGCCAC
OPA-4	AATCGGGCTG
OPA-5	AGGGGTCTTG
OPA-6	GGTCCCTGAC
OPA-7	GAAACGGGTG
OPA-8	GTGACGTAGG
OPA-9	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TGCGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-19	CAAACGTCCG
OPA-20	GTTGCGATCC

는 두 균주 각각의 band수이다(Nei and Li, 1979). Dendrogram 은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

ITS 영역의 염기서열을 통한 유연관계 분석

한국, 일본 및 중국에서 수집한 노랑느타리 4균주, 분홍느타리 3균주, 느타리 4균주 등 총 11균주의 ITS1와 ITS2 영역의 염기의 수를 분석한 결과 총 염기의 수는 507에서 663 bp로 나타났는데 이 중 가장 염기의 수가 적은 것은 중국에서 수집한 IUM-2652의 노랑느타리와 가장 많은 것은 한국산 분홍느타리인 IUM-3975였다. 전체 ITS 영역의 염기 수를 조사한 결과 각각의 종과 균주에 따라 차이가 있었지만 ITS1 영역의 염기 수는 167에서 254 bp였고, ITS2 영역의 염기 수는 156에서 213 bp를 나타냈다. DNA에서 차지하는 총 G+C와 A+T의 비율은 각각 39.5-47.0%와 53.0-60.5%였다. 그러나 각각의 종의 5.8S 영역 염기 수는 모두 동일하였다. 5.8S 영역의 노랑느타리의 염기 수는 158 bp이었고, 분홍느타리와 느타리는 각각 157 bp로 염기의 수가 동일하였다(Table 3). 느타리속 3종의 버섯 간 및 각각의 버섯 종 내의 유연관계를 분석하기 위해 ITS영역의 염기서열을 neighbor-joining method를 이용하여 계통도를 작성하였다. 또한 각 버섯의 종별 및 지역별로 신뢰성 있는 자료를 만들기 위하여 이미 PCR을 통해 분석이 끝난 11개의 균주 외에 NCBI의 GenBank로부터 ITS 영역의 염기서열 정보가 등록되어있는 노랑느타리 3균주(한국, 일본, 중국), 분홍느타리 2균주(한국, 중국), 느타리 1균주 등 총 6개 균주의 자료를 받아 총 17개의 균주를 대상으로 계통도를 작성하였다. 계통도 작성결과 실험에 사용한

느타리속 3종의 17균주는 크게 4개의 클러스터로 나누어지는 것으로 나타났다. 계통도 상에 가장 큰 차이를 나타낸 종은 IUM-3955인 흰느타리 “고니”와 IUM-2652인 중국산 노랑느타리였다. 특히 직접 ITS 영역의 증폭을 통해 계통도가 작성된 분홍느타리와 느타리의 모든 균주는 큰 틀안에서는 하나의 클러스터에 속했지만 각각의 종은 클러스터 안에서 각기 서로 다른 2개의 소그룹으로 나누어졌다. 또한 앞에서 분석한 분홍느타리와 느타리의 ITS 염기서열 정보와 GenBank로부터 내려받은 분홍느타리와 느타리 3균주의 ITS 영역의 염기서열 정보를 비교 분석한 결과 분홍느타리와 느타리 간에는 약 99-100%의 상동성이 존재하는 것으로 나타났다. 또한 실험에 사용한 노랑느타리 4균주의 ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과 한국의 농촌진흥청에서 육종한 품종인 IUM-3967 균주인 “금빛”과 덕유산국립공원의 고로쇠나무의 고목에 발생한 자실체에서 채집하여 분리한 IUM-4502 균주와는 상동성이 거의 100%에 이르는 등 유연관계가 매우 높았으며 대만에서 수집한 IUM-1307과 중국에서 수집한 IUM-2652도 유연관계가 98%이상 높게 나타났다. 그러나 GenBank에 ITS 영역의 염기서열 정보가 수록된 AB-115043(일본), AY-540318(중국), AY-265852(한국) 등 3균주 간에는 상동성도 98% 이상 높았으나 앞에서 실험을 통해 분석한 4균주의 노랑느타리와는 상동성이 비교적 낮아서 GenBank에 등록된 균주와 IUM 균주 간의 유연관계는 비교적 낮게 나타났다. 특히 클러스터 간의 유전적 변이의 폭은 동일한 그룹 내의 변이에 비해 폭이 컸다. 이는 버섯의 ITS 염기서열을 분석하면 일반적으로 동일한 종은 유전적으로 상동성이 높아서 동일한 클러스터에 묶이게 되고, 종이 다를 경우에는 상동성이 낮아져 다른 클러스터에 묶이게 되어 종의 구별이 쉬워지는 경향이 있다. 따라서 이제까지 서로 다른 종간 rDNA의 ITS 영역의 염기서열을 분석하게 되면 변이의 차이가 커서 종을 판별

Table 3. Nucleotide distribution, ITS1, 5.8S, and ITS2 of rDNA sequences in *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus*

Strain	Nucleotide distribution						Sequence information			
	A	C	G	T	G+C (%)	A+T (%)	ITS1	5.8S	ITS2	Length (bp)
IUM1307	129	130	126	160	47.0	53.0	185	158	204	545
IUM2652	123	115	116	153	45.6	54.4	167	158	172	507
IUM3967	140	143	133	180	46.3	53.7	208	158	212	596
IUM4502	149	115	142	213	41.5	58.5	208	158	213	619
IUM3705	145	126	125	218	40.9	59.1	239	157	210	614
IUM3975	169	132	130	232	39.5	60.5	254	157	210	663
IUM4146	140	143	132	181	46.1	53.9	240	157	211	596
IUM1320	131	120	116	168	44.1	55.9	210	157	168	535
IUM1376	141	128	128	166	45.5	54.5	197	157	156	563
IUM1651	146	134	131	185	44.5	55.5	219	157	201	596
IUM3955	147	149	126	182	45.5	54.5	222	157	202	604

A- adenine, C- cytosine, G- guanine, T- thymine.

하기가 비교적 쉬웠으나 동일한 종 내의 변이의 차이를 구분하기가 어려워서 곰팡이나 버섯의 분자생물학적 분류에서는 ITS 영역의 염기서열 정보는 주로 종을 구분하는데 사용되어왔다(Choi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004). 따라서 작성된 계통도를 분석한 결과 실험에 사용한 느타리속의 버섯 3종의 균주는 각각 단일한 계통군을 이루어 동일종으로 확인되었다.

RAPD를 이용한 계통분석

우리나라의 여러 지역에서 수집된 노랑느타리, 분홍느타리 및 느타리 등 느타리속 3종의 버섯 다양성을 RAPD를 이용하여 분자생물학적인 방법으로 조사를 수행하였다. 이들 3종의 버섯 11균주는 고체배지 상에서 7일 배양하고 균사체를 수확한 후 염색체 DNA를 추출하였다. OPA-1에서 OPA-20까지 총 20가지의 primer를 이용하여 추출된 염색체를 대상으로 RAPD 반응을 수행하여 primer 별로 DNA를 증폭시키고 전기영동 후 확인한 결과, 20개의 primer 중에 OPA-2, 3, 4, 9, 10, 11, 13, 16, 18, 19 등 10개의 primer가 염색체 DNA를 효과적으로 증폭시키는 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 2-4). 이 RAPD 반응에서 약 100~2000 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되어 분리되었는데, 이는 균주 당 10개의 DNA의 단편이 증폭됨을 확인하였다. 이 실험에 사용된 20개의 primer는 곰팡이의 종내 유연성과 유전적 다양성을 밝히기 위해 널리 사용되고 있는 primer 이다(Alam *et al.*, 2009a). 따라서 균주별 나타난 각각의 DNA 단편을 UPGMA 방법을 이용하여 클러스터링(clustering)한 결과 크게 3개의 클러스터(Cluster)로 나뉘지는 것으로 나타났다(Fig. 5). 첫 번째 클러스터에는 4개의 느타리균주가 포함되어있는데 이 클러스터는 각각 2개의 균주로 이루어진 2개의 소그룹으로 나누어진다. 첫 번째 소그룹은 대만에서 수집한 IUM-1320 균주와 한국에서 수집한 IUM-1376 균주로 이들 균주의 상동성이 100%에 가까웠으며 2번째의 소그룹에는 한국의 태안에서 수집한 회갈색 느타리인 IUM-1651과 농촌진흥청 버섯과에서 육종한 흰느타리 “고니”(IUM-3955)가 높은 상동성을 보여주고 있다. 따라서 “고니”는 회갈색을 띠는 보통의 느타리(*Pleurotus ostreatus*)가 돌연변이나 교배를 통해 자실체의 색깔이 흰색으로 변된 것으로 판단된다. 이들 4균주 느타리의 RAPD 분석결과는 앞에서의 ITS 영역의 염기서열을 이용해 작성한 계통도와 매우 유사하게 나타났다. 두 번째 클러스터에는 3개의 분홍느타리 균주가 포함되어있는데 강화의 버섯농가에서 재배 중인 분홍느타리 IUM-3705와 중국의 곤명에서 수집한 분홍느타리 IUM-4146가 첫 번째 소그룹을 이루고 있으며 이 소그룹의 외곽에는 경기도농업기술원의 버섯연구소에서 육성한 분홍느타리 “적단”이 있는데 이 균주는 앞의 분홍느타리와의 유연관계가 높게 나타나지 않아 “적단”은 실험에 사용된 외국산 분홍느타리와는 RAPD를 통해 계통이나 품종으로서의 차별화 가능한 것으로 나타났다. 세 번째 클러스터에는 모두 4개의 노랑느타리 균주가 포함되어 있는데

Table 4. DNA bands in different strains of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* by random amplification of polymorphic DNA assay using 10-base OPA primers

Primers	DNA band (kb)	IUM Strains										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
OPA-2	2.0	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	1.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	0.9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	0.1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
OPA-3	1.5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
	1.0	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	0.8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	0.5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	0.2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
OPA-4	1.5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	0.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
OPA-9	1.2	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
	1.0	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	0.8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	OPA-10	1.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
0.7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
0.5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
OPA-11	1.6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	1.3	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	0.6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
OPA-13	1.3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
	1.0	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	0.3	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
OPA-16	1.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	0.7	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
OPA-18	1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	0.3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OPA-19	1.5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	1.0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	0.3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

lane 1, IUM-1320; lane 2, IUM-1376; lane 3, IUM-1651; lane 4, IUM-3955; lane 5, IUM-3705; lane 6, IUM-4146; lane 7, IUM-3975; lane 8, IUM-3967; lane 9, IUM-1307; lane 10, IUM-2652; lane 11, IUM-4502 - indicate absence of DNA band, + indicate presence of DNA band.

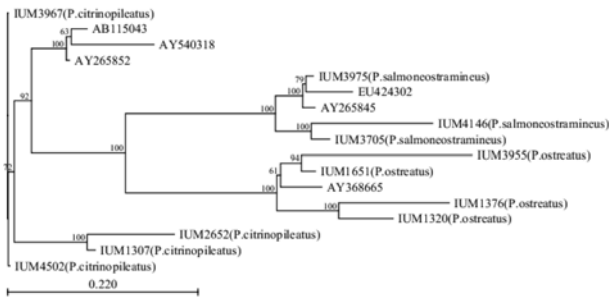


Fig. 1. Phylogenetic tree of seventeen strains of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* based on the nucleotide sequences of the ITS regions using neighbor-joining method with 1,000 bootstrapping trails.

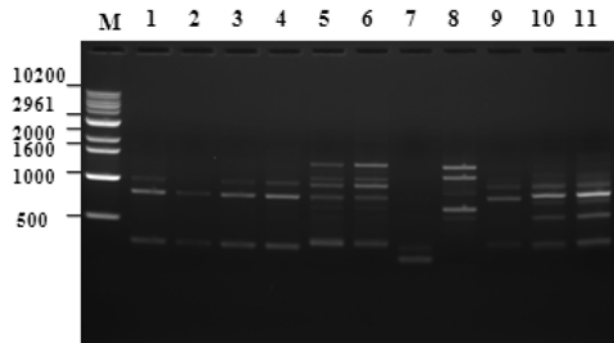


Fig. 4. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* with OPA-9 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-1320; lane 2, IUM-1376; lane 3, IUM-1651; lane 4, IUM-3955; lane 5, IUM-3705; lane 6, IUM-4146; lane 7, IUM-3975; lane 8, IUM-3967; lane 9, IUM-1307; lane 10, IUM-2652; lane 11, IUM-4502.

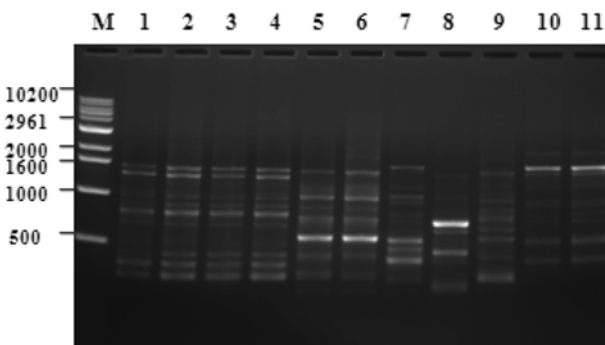


Fig. 2. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* with OPA-3 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-1320; lane 2, IUM-1376; lane 3, IUM-1651; lane 4, IUM-3955; lane 5, IUM-3705; lane 6, IUM-4146; lane 7, IUM-3975; lane 8, IUM-3967; lane 9, IUM-1307; lane 10, IUM-2652; lane 11, IUM-4502

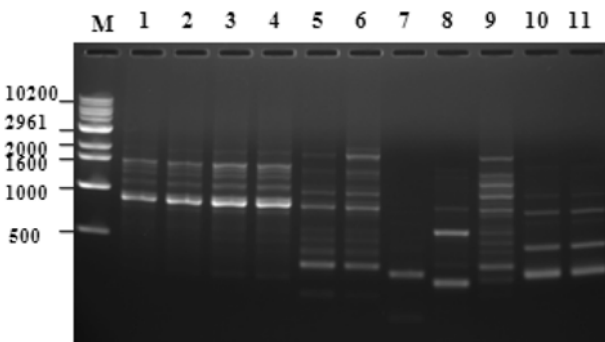


Fig. 3. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* with OPA-4 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-1320; lane 2, IUM-1376; lane 3, IUM-1651; lane 4, IUM-3955; lane 5, IUM-3705; lane 6, IUM-4146; lane 7, IUM-3975; lane 8, IUM-3967; lane 9, IUM-1307; lane 10, IUM-2652; lane 11, IUM-4502.

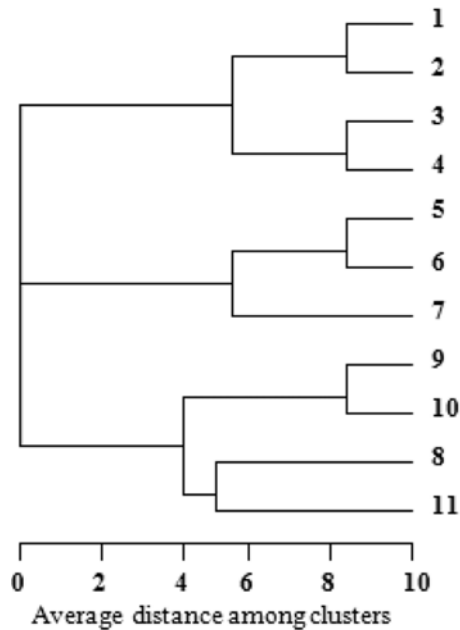


Fig. 5. Dendrogram constructed based on the random amplification of polymorphic DNA markers of *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus ostreatus* determined by the average linkage cluster.

이 클러스터는 각각 2개의 균주로 이루어진 2개의 소그룹으로 나눌 수 있다. 이 클러스터의 첫 번째 소그룹에는 대만에서

수집한 IUM-1307과 중국에서 수집한 IUM-2652로 구성되었으며 이들 버섯간의 상동성 또한 100%로 유연관계가 매우 높았다. 두 번째 소그룹에는 농촌진흥청 버섯과에서 개발한 IUM-3967인 “곰빛”과 덕유산에서 채집한 야생 노랑느타리인 IUM-4502로 구성되어있으며 이들 두 버섯 간의 상동성은 100%로 매우 높았다. 따라서 교배를 통해 육성한 노랑느타리 품종과 야생 노랑느타리간의 유연관계가 매우 높게 나타난 결과에 대해서는 앞으로 좀 더 검토가 필요할 것으로 사료된다. 이제까지 RAPD를 통해 전기영동 후 agarose

gel 상에 나타난 느타리속 버섯 3종의 계통별 DNA band 패턴을 분석한 결과와 앞에서 동일한 종과 동일한 계통의 느타리 속 버섯을 이용하여 rDNA의 ITS 영역을 증폭해서 얻어진 염기서열의 분석결과와 매우 유사한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험 결과 느타리속 버섯의 종 간 차이점은 rDNA의 ITS 영역의 증폭을 통해서도 판별이 가능했지만 RAPD를 통해서도 종과 계통 간의 구별이 가능한 것으로 나타났다. 특히 본 실험에 사용된 각각의 느타리속의 버섯 균주는 한국, 중국 및 일본 등 수집한 지역과는 상관없이 동일한 종 동일한 계통 간의 상동성이 매우 높았다. 따라서 본 실험 결과는 universal rice primer(URP)를 이용해 느타리버섯류 8종 81개 품종을 대상으로 한 품종의 구분 연구와 같이 특정한 primer를 이용하여 RAPD를 수행할 경우 종간의 구별은 물론 동일종 내의 품종 간의 구별도 가능한 것으로 나타났다(서 등, 2008). 또한 본 실험 결과는 느타리속의 버섯을 가장 많이 재배하고 소비하는 아시아 국가 간 느타리속 버섯의 이동이 활발하게 이루어진 결과로 판단되었으나 본 실험에 사용된 느타리속의 균주 수가 적어 두렷한 결론을 내릴 수는 없었다. 그러나 본 실험을 통해 느타리속 버섯의 종간 상동성이 매우 높은 것으로 나타나서 앞으로 종을 빠르고 간편하게 동정하기 위해서는 RAPD를 통해 각각의 종이나 계통별 나타난 특이한 band를 증폭시킬 수 있는 특정 primer의 개발이 필요할 것으로 판단된다(Lim *et al.*, 2010).

적요

느타리속에 속하는 버섯은 예로부터 인체에 이로운 생리 활성물질을 많이 함유한 버섯으로 알려져 왔다. 최근 우리나라에서 노랑느타리와 분홍느타리의 재배가 증가함에 따라 이들 버섯의 유전적 다양성과 유연관계의 규명이 필요하게 되었다. 이에 우리나라와 해외 지역에서 수집한 노랑느타리 4균주, 분홍느타리 3균주 그리고 느타리 4균주를 대상으로 rDNA의 ITS region 염기서열과 genomic DNA의 RAPD-PCR을 수행하였다. ITS1과 ITS2 영역의 염기의 수는 각각 167에서 254쌍, 156에서 213쌍으로 계통에 따라 변이가 있었고 5.8S 영역의 염기의 수는 노랑느타리 균주는 158쌍이었고, 분홍느타리와 느타리 균주는 157쌍으로 동일하였다. 각각의 균주 간 유연관계를 알아보기 위해 본 실험에 사용한 11균주와 NCBI GenBank에 염기서열이 등록되어있는 노랑느타리 3균주, 분홍느타리 2균주, 느타리 1균주의 ITS 영역의 염기서열을 이용하여 분지도를 작성한 결과, 4개의 클러스터로 나뉘는 것으로 나타났다. 분홍느타리와 느타리의 균주는 큰 클러스터 내에서는 하나의 클러스터에 속했지만 각각의 종은 이 클러스터 내에서 각기 서로 다른 2개의 소그룹으로 나누어졌다. 또한 20 종류의 primer를 이용하여 RAPD를 수행한 결과 10개의 primer가 효과적으로 염색체 DNA를 증폭하는 것으로 나타났다. 증폭의 양상은 느타리속의 계통과 primer의 종류에 따라 다르게 나타났는데, 증폭된 DNA의 단편 수는 균주 당

10개, 단편의 크기는 0.1 kb에서 2.0 kb까지 다양하였다. 본 실험 결과 실험에 사용한 느타리속 균주의 계통과 품종간의 유연관계는 높았고 느타리속의 동일한 종은 우리나라, 중국 및 일본에서 수집한 장소와 상관없이 상동성이 높았다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(Agenda: 9-27-63; No. 200901OFT092763229)의 지원으로 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김종균, 임선화, 이대성, 지정현, 서건식, 주영철, 강희완. 2007. URP-PCR 다형성에 의한 국내 느타리버섯 품종의 유전적 특성 분석. *한국균학회지* 35:61-67.
- 서경인, 장갑열, 유영복, 박순영, 김광호, 공원식. 2008. Universal rice primer(URP)에 의한 DNA 핵산지문법을 이용한 느타리 유통 품종간 구분. *한국균학회지* 36:130-137.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009a. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* 37:183-188.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo Y. B. and Lee, T. S. 2009b. Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* 37:258-266.
- Caetano, A. G. and Gresshoff, P. M. 1997. DNA markers: Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-Vch, N.Y. pp. 364.
- Choi, B. D., Ding, J. L. and Cha, W. S. 2007. Homology search of genus *Pleurotus* using internal transcribed spacer region. *Korean J. Chem. Eng.* 24(3):408-412.
- Cubero, O. F., A. Crespo, J. Fatehi and P. D. Bridge. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium stored, lichenized and other fungi. *Plant Syst. Evol.* 216:243-249.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol.* 39:783-791.
- Khan, P. and Garcha, H. S. 1984. *Pleurotus* mushroom, a source of food protein. *Mush. Newslett. Trop.* 4:9-14.
- Lim, Y. J., Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, S. W. Lee, H. S. and Ro, H. S. 2010. Molecular genetic classification of *Hypsizigus marmoreus* and development of strain-specific DNA markers. *Kor. J. Mycology* 38(1):34-39.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269-5273.
- Park, H. G., Ko, H. G., Kim, S. H. and Park, W. M. 2004. Molecular identification of Asian isolates of medicinal mushroom *Hericium erinaceum* by phylogenetic analysis of nuclear ITS rDNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:816-821.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 1999. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul. pp. 255-258.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal

- W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- White, T. J., Bruns, T., Lee S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocol: a guide to methods and applications, Eds., Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego, Academic Press, pp: 315-322.
- Williams, J. G, Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.