

# Genetic Variation in Mutants Induced by Gamma Ray in *Hypsizigus marmoreus*

Jong-Bong Kim\* and Dong-Won Yu

Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702, Korea

Received August 12, 2014 / Revised October 30, 2014 / Accepted November 14, 2014

This research was carried out to evaluate whether gamma ray is a useful tool for breeding new strains of mushrooms. For this research, 5 mutant groups, 20 strains of *Hypsizigus marmoreus*, 2 strains of *Lyophyllum decastes*, and 1 strain of *Lyophyllum shimeji* were used. Monokaryon spores from one variety of *H. marmoreus* were irradiated with 50~2,000 Gy of gamma ray. The propriety dose was 50~200 Gy for mutagenesis. Mutant monokaryon mycelia crossed each other to become dikaryon mycelia. The internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA were amplified using PCR, and the products were sequenced. The sequences of the ITS regions (16 partial rDNA, complete ITS1, 5.8 rDNA and partial rDNA) were analyzed by PCR, and strains of *H. marmoreus*, *L. decastes*, and *L. shimeji* were auto-sequenced. The lengths of the sequenced ITSs were 1,052~1,143 nucleotides. Genetic matrices were calculated using Nei-Li's genetic distance coefficient based on ITS sequence. The dissimilarities were 0~3.35% in strains of *H. Hypsizigus*. In addition, a phylogenetic tree was constructed based on ITS sequences using the neighbor-joining (NJ) method. The phylogenetic tree revealed that 23 strains and 5 mutant groups were divided into 12 clusters; the mutant groups fell into different clusters. These results show that mushroom spores were mutated effectively by gamma ray; therefore, gamma ray could be a useful tool for breeding new strains of mushrooms.

**Key words :** *Hypsizigus marmoreus*, ITS sequence, mutagenesis gamma ray

## 서 론

새로운 품종의 버섯을 개발하기 위해서 일반적으로는 단핵 균사 간의 교배를 통하여 새로운 품종을 만든다. 그러나 교배 육종은 교배대상 균주를 기존의 품종에서 선발을 하여야 하기 때문에 우수 형질의 선발과 과정 등에 많은 시간이 걸릴 수 있으며, 교배자원의 제한 등의 문제점들이 있다. 또한 버섯의 형태적, 생리적 특성들은 재배조건에 따라 크게 달라질 수 있으므로 신품종으로 평가받기 위해 분자 유전적 근거가 요구되는 추세이다.

이러한 관점에서 불 때 돌연변이 육종은 특정 품종에 자외선, 이온화 방사선, 화학물질 등의 돌연변이 유발원을 처리하기 때문에 신품종으로 평가받기 위해 중요한 기준이 될 수 있는 유전자차원의 특성이 돌연변이에 의해 만들어 진다고 볼 수 있다. 또한 변이가 무작위적으로 전체 게놈에서 발생하므로 유전자원의 제한을 크게 완화시키는 효율적인 육종 방법이 될 수 있다. 특히 이온화 방사선은 대상 생물 외 유전체 전체에 임의적으로 돌연변이를 일으키기 때문에 다양한 형질

을 기대할 수 있고 자연계에서의 진화 과정과 유사한 변이를 일으킨다고 알려졌다[4].

느티만가닥버섯(*Hypsizigus marmoreus*)은 주름버섯목 송이과에 속하는 버섯으로 우리나라에서는 아직 널리 보급되지는 않았지만 일본에서는 인공재배 기술이 개발하고 팽이버섯 다음으로 많이 생산하는 버섯이다[12].

느티만가닥버섯은 항암, 항산화 효과[8, 9], 항 동맥경화 효과[9], 안지오텐신 전환 효소 저해 활성[15] 등 다양한 생리활성효과들이 보고되었다.

이에 따라 신품종 느티만가닥버섯을 개발하고자 교배 육종, 감마선, 돌연변이 육종[5], 느티만가닥버섯의 분자 마커 개발 [7] 등의 연구가 수행되어왔다.

Kim 등[5]은 느티만가닥버섯의 원형질체를 나출시키고 감마선을 조사하여 여러 가지 형질의 돌연변이체를 얻었다고 보고하였으나 URP-2F와 URP-6R의 primer를 사용하여 이들에 대한 DNA 지분을 분석한 결과 뚜렷한 유전적 차이가 나타나지 않았다고 하였다.

이에 따라 본 연구에서는 감마선을 포자에 조사하여 돌연변이 유발 효과를 분석하기 위해 분자계통 유전분석에 자주 사용하는 이들에 대한 ITS 서열을 비교 분석하여 육종의 수단으로서 감마선의 가능성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

감마선을 느티만가닥 포자에서 조사하고 이를 교배하여 만

### \*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3775, Fax : +82-53-850-3727

E-mail : jbkim@cu.ac.kr

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.



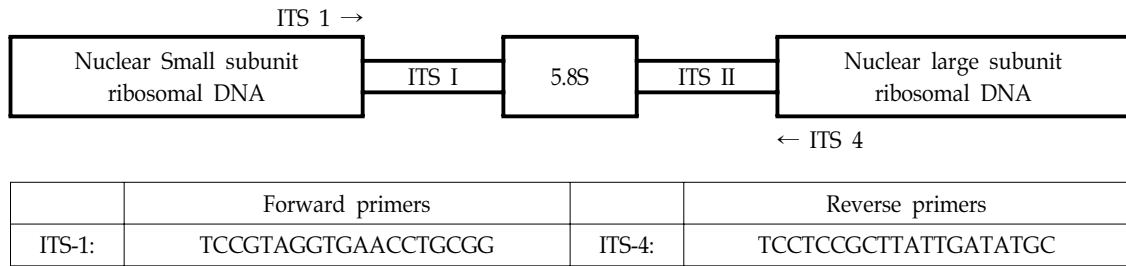


Fig. 1. Location and sequences of primers for the amplification and sequencing. ITS primers were those designed by White et al. (1990).

primer들을 사용하였다(Fig. 1). 증폭은 Bioneer PCR kit를 사용하였다. 본 실험은 MJ Research PTC 150 minicycler에서 수행하였으며 thermal cycle의 program은 primer ITSP 1과 2, ITSP 3과 4를 달리하여 사용하여 반응시켰다.

PCR을 위한 reaction mixture의 조성은 EmeraldAmp<sup>®</sup> GT PCR Master mix (TaKaRa, Japan)를 사용하였다. Master mix에 genomic DNA 1.0 µl, primer 1.0 µl를 넣고, 전체 반응 용액이 20 µl가 되도록 3차 증류수를 첨가하였다. DNA 증폭반응은 MJ Reserch PTC 150 minicycler에서 thermal cycle의 program은 Park et al의 방법에 따라 수행하였다.

정제된 PCR product를 Perkin-Elmer applied biosystems ABI 377A sequencer (Perkin-Elmer Co1010100., USA)를 이용하여 protocol에 따라 PRISM Dye Dideoxi Terminator Cycle Sequencing Kit를 이용하여 분석하였다[3, 13]. 염기서열은 Sequencher (Gene codes Co., USA), Clustal X를 이용하여 alignment 시킨 후 최종 세부 정렬은 수작업으로 보강하였다. 분석된 염기 서열의 phylogenetic analysis는 PAUP 4.0b version [14]을 사용하여 parsimony analysis를 실시하였으며 분지도는 UPGMA 방법을 사용하였다. 분석방법으로는 Heuristic search를 사용하고 이에 따른 option으로 ACCTRAN, MULPARS 및 TBR을 이용하였다[11]. Two-parameter method로 산출된 염기변이 값을 기초로 neighbour joining tree (NJ)를 작성하였다. 그리고 그 종간의 유전적 유사도 계수 (similarity coefficient)는 Sneath와 Sokal [15]의 방법에 따라 구하였다. 또한 각 분계도의 지지정도는 Jack-knifing [1, 2]를 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**감마선의 돌연변이 유발 효과**

느티만가닥버섯 단포자를 각각 저준위(50~500 Gy), 고준위(1,000~2,000 Gy)에서 조사한 결과 발아율은 Fig. 1과 같다. 저준위 50~500 Gy에서 각각 82.6%, 64.4%, 61.3%, 21.5%, 6.7%로 나타났으며, 반면 고준위 1,000 Gy에서 3.4%, 1,500 Gy, 2,000 Gy에서는 발아한 단포자를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

본 실험결과 포자에 감마선에 의한 반치사선량(LD50)이

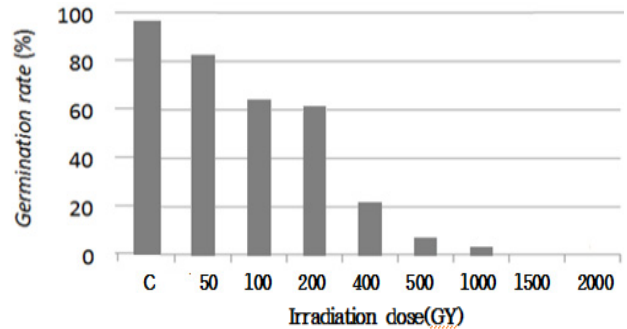


Fig. 2. Germination rate of *H. marmoreus*. spores treated with gamma ray. \*C: control group.

200 Gy (61.3%)~400 Gy (21.5%)사이 인 것으로 확인했다. 따라서 느티만가닥버섯 단포자를 이용한 감마선 적정 선량은 50~400 Gy로 저준위선량이 적합한 것으로 나타났다. 그러나 Kim et al.(2011)은 느티만가닥버섯 균사를 배양하여 grinding 후 원형질체를 이용한 감마선 조사 돌연변이 실험에서 1,000 Gy에서 80%의 치사율을 나타내었으며, 1,400 Gy에서는 95% 이상의 치사율을 보였고, 1,800 Gy 이상의 처리구에서는 균사체 콜로니가 형성되지 않았다. 이러한 차이는 단핵포자와 이핵원형질체라는 세포의 유전체 및 세포의 구조적 차이에 기인한 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 어떠한 시료에 방사선을 조사하느냐에 따라 선량을 달리하여야 한다는 것을 의미하며 반치사 선량이라 하더라도 많은 무작위적 돌연변이가 발생하기 때문에 효율적 육종을 위한 적정 선량 설정을 위해 이에 대한 다각적 분석이 필요하다고 생각된다.

본 연구에 따르면 그러나 원형질체 나출이라는 과정을 거치지 않고 단핵포자에 대한 방사선 처리만으로도 효과적으로 돌연변이를 일으킬 수 있음이 확인 되었다.

유전적 비유사도 지수행렬에 의하면 느티만가닥버섯의 종내 변이는 0에서 3.35%사이로 나타났으며, 갯빛만가닥버섯은 18.53%의 변이를 나타내었다. 그리고 JV-2를 바탕으로 방사선에 노출시켜 얻은 돌연변이체들의 변이는 0.48%에서 4.18%이었다. 이러한 유전적 비유사도 지수행렬은 같은 종 내에서의 품종간은 유전적으로 가깝고 다른 종과는 유전적 비유사도가 큰 것으로 나타나지만 돌연변이체의 비유사도는 종 내의

비유사도보다 약간 크게 나타나므로 감마선은 효과적으로 돌연변이를 유발시킨다는 것을 보여주었다. 정렬된 염기서열을 근간으로 전체 분류군을 PAUP (4.0b) program을 이용하여 UPGMA를 수행한 결과 phylogenetic tree를 얻을 수 있었다 (Fig. 3). 즉, ITS가 제한된 크기의 염기서열이라는 점을 볼 때 다른 유전자들에서 다양한 변이가 발생하였을 것으로 추정된다. 이들에 대한 추후 검색을 통하여 육종자원으로 개발 할 수 있을 것으로 사료된다.

감마선을 조사한 균주인 JV-2와 돌연변이체인 RRB-4, RCB-8은 유전적으로 차이가 없고, 매우 가까운 유연관계를 나타내었다. 그러나 돌연변이 균주 RCB-4, RRB-6은 다른 양상을 나타내어 즉 독립적인 분계조를 형성하여 감마선에 의해 다양한 변이가 유발됨을 알 수 있었다.

염기변이에 기초하여 neighbour-joining (NJ) 분석 결과, 총 12개의 cluster를 형성했다. 일본 흰색만가닥(JV-1), 중국느티만가닥버섯(CW-5과 CW-7), 일본느티만가닥버섯 재래종(JW-1)이 cluster1에 속하고 한국야생느티만가닥 2종류(KW-3과

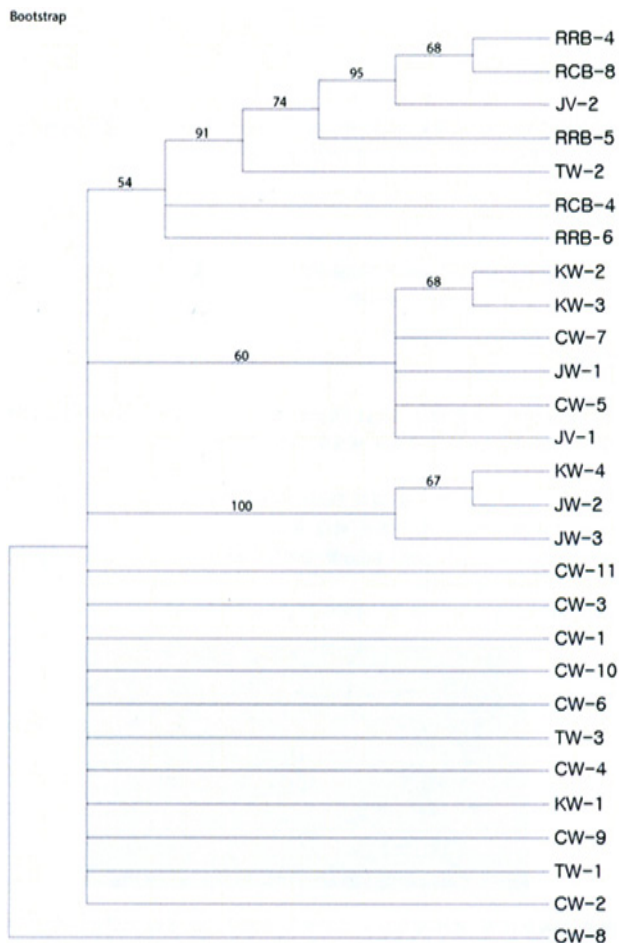


Fig. 3. Strict consensus tree by UPGMA using PAUP (4.0b) program based on ITS sequences of mushrooms. This tree showed the various dissimilarities in the genetic variation.

KW-2)가 cluster2를 이루었다. cluster4를 보면 중국재래품종 6개와 대만재래품종 1개가 포함되었다. 이는 어느 정도 국가별 주 서식지화의 관련성을 나타내었다. 한 조건 개발된 일본 느티만가닥버섯 JV-2에 감마선을 조사하여 얻은 돌연변이 균주 RCB-8과 RRB-4는 각 cluster 9, 11, 12를 이루었다(Fig. 4). 이러한 ITS 분석 결과 같은 종에서 국가에 따른 서식지에 따라 ITS의 차이가 나타나는 것은 드문 경우로써 이는 느티만가닥버섯이 자연상태에서 유전적 변이가 다른 종에 비해 상대적으로 더 많이 발생하였을 수도 있다고 본다.

또한 분자계통을 나타내는 원인은 두 가지로 추측해 볼 수 있다. 첫 번째는 우리나라와 중국, 대만 세 나라의 지리적인 거리가 가깝기 때문에 한 cluster로 묶였다고 추측해 볼 수 있으며, 다른 하나는 종의 분화도 높아 다양한 계통을 나타낸다고 볼 수 있다.

또한 방사선을 조사한 종은 각 각의 cluster를 형성한 것으로 보아 무작위적인 돌연변이가 발생한 것으로 보인다(Fig. 4).

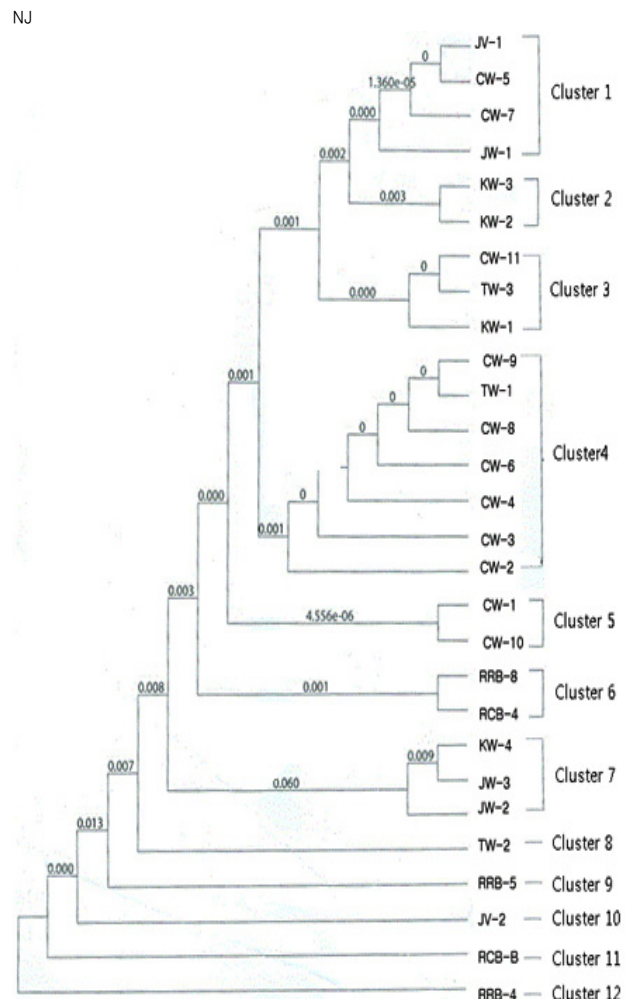


Fig. 4. The phylogenetic tree based on ITS sequence by neighbour-joining (NJ) method. The phylogenetic tree showed 12 clusters. Mutants were divided into different clusters.

위의 실험 결과로 보아 느티만가닥 버섯에서 국가 간의 서식지 차이에 따라 유전적으로 차이가 있으나, 느티만가닥버섯의 종 내에서는 유전적으로 유사한 것으로 분석되었다.

약간의 차이는 있으나 RAPD 분석 결과에서도(personal communication) ITS 분석결과와 유사한 것으로 분석되며, 형태적 분석 결과와도 일치하는 것으로 나타났다. 특히 ITS 서열이라는 제한DNA의 분석에 의해 유의적인 변이가 발생하였기 때문에 새로운 품종으로 평가 받을 수 있는 분자유전적 근거를 용이하게 얻을 수 있다고 생각된다. 따라서 버섯의 감마선 조사는 새로운 품종을 개발하는데 유용한 도구가 될 수 있다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 대구가톨릭대학교 지원에 의하여 수행되었습니다.

### References

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *J Evolution* **39**, 783-791.
- Farris, J. S., Albert, V. A., Källersjö, M., Lipscomb, D. and Kluge, A. G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**, 99-124.
- Hirashi, A. 1992. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett Appl Microbiol* **15**, 210-213.
- Jeong, H. Y. and Kim, K. R. 2010. Strain Improvement based on Ion beam-induced mutagenesis. *Korean J Microbiol Biotechnol* **38**, 235-243
- Kim, J. K., Moon, D. H., Seo, G. S. and Kang, H. W. 2011. Mutagenesis of *Hypsizygus marmoreus* by gamma ray irradiation. *Korean J Mycol* **39**, 231-234
- Lee, S. M. 1988. A rapid high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet Newsl* **35**, 23-24.
- Lim, Y. J., Lee, C. Y., Park J. E., Kim, S. W., Lee, H. S. and Ro, H. S. 2010. Molecular genetic classification of *Hypsizygus marmoreus* and development of strain-specific DNA markers. *Korean J Mycol* **38**, 34-39.
- Matsuzawa, T., Sano, M., Tomita I., Saitoh, J. and Ikekawa, T. 1997. Studies on the antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. I. effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of mice plasma. *Yakugaku Zasshi* **188**, 623-628.
- Matsuzawa, T., Saitoh, H., Sano, M., Tomita, I., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. 1998. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. II. effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi* **188**, 476-481.
- Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S. and Ikeda, M. 2008. Antiatherosclerotic effect of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*, *Grifola frondosa*, and *Hypsizygus marmoreus* in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr Res* **28**, 335-342
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Natur* **106**, 283-292.
- Ohashi, H. 2010. Trends of mushroom production and marketing, pp.18. In: Ohashi, H. *Annual report of mushroom 2010* Plant's world Co., Ltd.: Tokyo, Japan.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughers, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP-Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Ver.4.0b2. Academic Press, Sunderland, MA.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical taxonomy*, pp. 573, W. H. Freeman: San Francisco.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322, Academic Press Inc.: Sandiego, California.
- Zanabaatar, B., Kang, M. G., Seo, G. S., Lee, Y. W. and Lee, J. S. 2012. Analysis of nutritional characteristics and physiological functionality of *Hypsizygus marmoreus* (Brown cultivar). *Korean J Mycol* **40**, 104-108

**초록 : 느티만가닥버섯에서 감마선에 의한 돌연변이체들의 유전적 변이**

김종봉\* · 유동원

(대구가톨릭대학교 의생명과학과)

본 연구는 감마선이 새로운 품종의 버섯을 개발하는데 이용 될 수 있는지 평가하기 위하여 수행하였다. 본 연구를 한국, 일본, 대만 등의 느티만가닥버섯 20종류, 한국 잣빛느티만가닥버섯 5종류, 일본 땅지만가닥버섯 등의 3품종과 돌연변이체의 유전적 변이를 분석하였다. 50~2,000 Gy의 감마선을 느티만가닥버섯 포자에 조사하였다. 포자를 이용한 돌연변이 유발의 감마선 적정선량은 50~500 Gy의 저준위선량이었다. 돌연변이 단핵균사를 교배하여 이핵균주를 만들었다. 돌연변이 균주와 재래종의 버섯들로부터 DNA를 추출하여 16S ribosomal DNA, ITS의 전부분 28S ribosomal DNA의 일부분이 포함된 ITS서열을 분석을 하였다. 분석한 ITS서열의 길이는 1,052~1,143 뉴클레오티드였다. Nei-Li's 방법에 의해 유전적 유연 관계계를 분석하였다. 느티만가닥버섯 품종들간의 비유사도는 0~3.5%였다. 또한 Neighbor-Joining (NJ)방법에 의해 계통수를 작성하였다. 그 결과 느티만가닥버섯의 품종간의 비유사도는 0~3.5%였다. 또한 23품종과 5 돌연변이 이 그룹의 ITS서열을 바탕으로 한 계통수는 12 cluster를 나타내었다. 돌연변이 균주들은 서로 다른 cluster를 형성하였다. 무작위적인 돌연변이가 발생하였음을 알 수 있었다. 이상의 연구결과들을 감마선이 버섯의 품종개량을 위한 수단이 될 수 있음을 보여주었다.