

# RAPD를 이용한 산느타리 (*Pleurotus pulmonarius*) 수집균주 유연관계 분석

이재홍 · 이남길 · 문윤기 · 정태성 · 권순배 · 김재록 · 김진원<sup>1,\*</sup>

강원도농업기술원 환경농업연구과, <sup>1</sup>서울시립대학교 환경원예학과

## Genetic relationship analysis of *Pleurotus pulmonarius* strains using RAPD

Jae-Hong Lee, Nam-Gil Lee, Youn-Gi Mun, Tae-Sung Jeong, Sun-Bae Kwon, Jae-Rok Kim and Jin-Won Kim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Environment Research Section, Gangwon Province Agriculture Research and Extension Services, Chuncheon 200-150, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental horticulture, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**ABSTRACT:** Genetic relationship analysis by PCR reactions with 25 primers could produce relevant classifications of the 21 *P. pulmonarius* (Fr) Quel. isolates collected from 2005. They were classified by two groups with similarity coefficient 0.37. All of the *P. pulmonarius* cultivars belonged to group 2. New cultivar ‘Hwasan’ presented high similarity coefficient to parental strains, and that of ‘Hosan’ and ‘Kangsan’ cultivars was very high owing to shared crossing parents, and that of two strains from China was high, as well.

**KEYWORDS:** *Pleurotus pulmonarius*, RAPD, Relationship

### 서론

버섯은 습도, 온도, 광, 영양원 등 발생지의 환경 조건에 따라 자실체의 형태가 다르게 나타나기 쉬워 형태적 방법에 의한 품종 식별이 어렵다(Kang *et al*, 1997; Kim *et al*, 2007). 특히, 주요 인공재배 버섯인 느타리버섯속은 현재 34~43종이 알려져 있으며, 이들의 분류는 다른 담자균류와 마찬가지로 형태적 분류도 유효하지만, 때에 따라서

한계가 있고 특히 자실체가 없이 균사체로만 종을 판단할 필요가 있을 때 균사체 상태에서의 특성에 기초하여 그 종을 분류하기란 매우 어려운 실정이다(Kim *et al*, 1995).

이러한 어려움을 극복하고자 환경적인 영향이 없는 유전자 및 DNA 분석법이 개발되어 이용되고 있다. RAPD 분석은 임의 프라이머(random primer)를 이용한 PCR 핵산지문법으로 간편한 장비만을 갖춘 실험실에서도 손쉽게 적용할 수 있는 DNA 및 유전자 상의 유전변이를 탐색할 수 있는 방법이다. 이 방법은 ISSR(Inter simple sequence repeat) 및 SRAP(Sequence-related amplified polymorphism)에 비하여 매우 간편하고 쉽게 적용할 수 있는 장점이 있으나, 최적의 분석조건을 구명하지 못할 경우 분석의 재현성이 저하되는 단점도 있다. 그러나 간단한 장비만으로도 유전분석이 가능하여 활용의 가능성이 매우 크며 널리 이용되고 있다.

따라서 본 시험에서는 산느타리버섯 수집균주들에 대해 RAPD를 이용하여 유전적 유연관계를 분석하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 수집균주

J. Mushrooms 2015 March, 13(1):37-40  
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2015.13.1.37  
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853  
© The Korean Society of Mushroom Science

\*Corresponding author  
E-mail : jwkim@uos.ac.kr  
Tel : +82-248-6102, Fax : +82-248-6100

Received February 16, 2015  
Revised March 24, 2015  
Accepted March 30, 2015

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.

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

ID No.	Strain No.	Year of collection	Remarks
1	GWM20107	2005	Wild strain, Baeckdamsa
2	GWM20112	2005	Wild strain
3	GWM20139	2005	Wild strain
4	GWM20140	2006	Wild strain
5	GWM20141	2006	Wild strain
6	GWM20143	2006	Wild strain
7	GWM20144	2006	Wild strain
8	GWM20145	2006	Wild strain
9	GWM20148	2006	'Bongmigo', China
10	GWM20149	2006	'Yonghae', China
11	GWM10161	2007	'Hosan'
12	GWM10164	2008	'Kangsan'
13	GWM20176	2012	Wild strain, Manisan
14	GWM20177	2012	Wild strain, Deukyusan
15	GWM20178	2012	Wild strain, Manisan
16	GWM20179	2012	Wild strain, Deukyusan
17	GWM10180	2010	'Hyangsan'
18	GWM10182	2013	'Hwasan'
19	GWM20169	2010	'Yeorumnutari2ho'
20	GWM20170	2010	'Yeorumnutari'
21	GWM20172	2010	'Sambok'

맛과 향이 우수한 산느타리버섯 품종 육성을 위하여 다양한 경로를 통하여 유전자원을 수집하였고(Table 1), 수집균주들에 대한 유연관계 분석을 실시하였다. 1~8번 계통과 13~16번 계통은 국내에서 수집된 계통이고, 9번과 10번 계통은 중국에서 도입한 계통이며, 19~21번 계통은 국내에서 육성된 여름느타리버섯이다. 11, 12, 17, 18번 계통은 국내에서 육성된 산느타리버섯 품종으로서 각각 '호산', '강산', '향산', '화산'이다. 11번 '호산' 품종은 백담사에서 수집한 1번 계통과 농촌진흥청에서 분양받은 3번 계통간 교배에 의하여 육성되었고, 12번 '강산' 품종은 1번 계통과 중국에서 도입한 9번 계통간의 교배에 의하여 육성되었다. 17번 '향산' 품종은 12번 '강산' 품종과 8번 계통간의 교배로서 만들어진 품종이고 18번 '화산' 품종은 17번 '향산' 품종과 여름느타리버섯인 21번 '삼복' 품종간의 교배에 의하여 육성되었다.

**Genomic DNA 추출**

Genomic DNA 추출을 위하여 균사가 잘 성장한 페트리접시(87×15 mm)에서 표면을 긁어 시료 약 200 mg을 채취하였다. 이를 2 ml 튜브에 옮긴 후 Tissue Lyser II (Qiagen Co.)를 이용하여 마쇄한 후 Raz와 Ecker (1997)

**Table 2.** DNA sequence information of RAPD primer used in this study

Primer name	DNA sequences	Primer name	DNA sequences
A-01	CAGGCCCTTC	A-15	TTCCGAACCC
A-02	TGCCGAGCTG	A-16	AGCCAGCGAA
A-03	AGTCAGCCAC	A-17	GACCGCTTGT
A-04	AATCGGGCTG	A-18	AGGTGACCGT
A-05	AGGGGTCTTG	A-19	CAAACGTCGG
A-06	GGTCCCTGAC	A-20	GTTGCGATCC
A-07	GAAACGGGTG	A-21	GTTTCGCTCC
A-08	GTGACGTAGG	A-22	TGATCCCTGG
A-09	GGGTAACGCC	A-23	CATCCCCCTG
A-10	GTGATCGCAG	A-24	GGACTGGAGT
A-11	CAATCGCCGT	A-25	TGCGCCCTTC
A-12	TGCGCGATAG	A-26	TGCTCTGCC
A-13	CAGCACCCAC	A-27	GGTGACGCAG
A-14	TCTGTGCTGG	A-28	GTCCACACGG

**Table 3.** The number of polymorphic bands according to RAPD primer

Primer name	No. of polymorphic bands	No. of total bands	Primer name	No. of polymorphic bands	No. of total bands
A-01	10	36	A-15	9	47
A-02	6	11	A-16	6	29
A-03	5	26	A-17	5	17
A-04	6	17	A-18	10	44
A-05	3	21	A-19	8	15
A-06	-	-	A-20	9	49
A-07	4	31	A-21	13	60
A-08	2	6	A-22	6	35
A-09	5	27	A-23	12	45
A-10	9	46	A-24	6	50
A-11	10	47	A-25	3	8
A-12	8	26	A-26	-	-
A-13	8	35	A-27	-	-
A-14	7	24	A-28	6	21

의 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 UV-VIS(Nanodrop, Thermo Scientific Co.) 뭇가 빠졌음 비색계나 spectrophotometer를 이용하여 20 ng/μl 농도로 정량한 후 분석에 이용하였다.

**RAPD 및 전기영동**

산느타리버섯 수집균주의 RAPD 분석을 위하여 28개의 프라이머를 이용하였다(Table 3). Williams 등(1990)의 방

법으로 RAPD를 수행하였으며, 반응액은 10 ng의 template DNA, 200 nM의 임의 primer, 각각 100  $\mu$ M의 dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 1 x *Taq* polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin)와 0.8 unit의 *Taq* DNA polymerase(Bioneer Co. Korea)를 포함한 25  $\mu$ L로 하였다. 반응조건은 94°C에서 3분간 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분간 변성, 37°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 2분간 합성(extension)과정을 45회 반복하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동한 후(4 V/cm), Ethidium bromide (0.5 g/ml)로 염색한 다음 UV상에서 촬영하였다(Hoefer Co. USA).

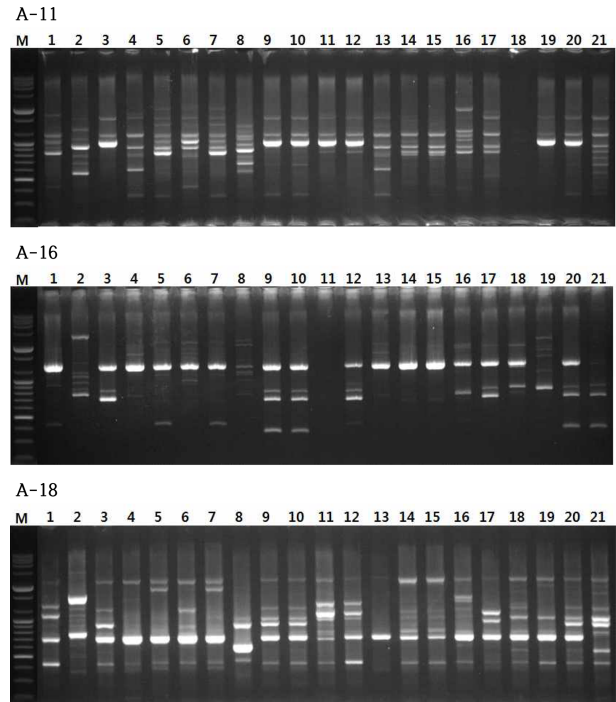
### 품종 내 변이 및 품종간 유사도 분석

품종내 변이 및 품종간 유사도 분석을 위하여 28개의 프라이머를 이용하여 균주별로 증폭된 밴드를 조사하였고, 이중 PCR반응이 좋고 다형성이 풍부한 25개 프라이머를 선발하였다. 선발한 프라이머를 이용하여 증폭된 176개 다형성밴드를 유무에 따라 0과 1로 조사한 후 이 조사자료를 이용하여 Nei와 Li(1979)의 방법으로 품종간 유사도를 산출하였다. 균주간 유사도의 계산 및 유연관계분석은 MVSP(ver 3.13p, Kovach Computing Service)프로그램을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

국내외에서 수집한 산느타리버섯 21균주들의 유전적 유연관계를 분석하기 위하여 28종의 RAPD 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 조사하였고, 다형성 밴드의 수는 Table 3과 같다. A-06, A-26, A-27 등 3종 프라이머의 PCR 반응은 명확한 밴드패턴이 나타나지 않아 제외하였고, 나머지 PCR 반응이 양호한 25종의 프라이머를 이용한 PCR 반응을 분석하였다. 이중 A-01, A-11, A-18, A-21 및 A-23 프라이머는 다형성 밴드의 수가 10개 이상으로 많았으며, A-05, A-07, A-08 및 A-25 프라이머는 5개 미만으로 적었다. 평균적으로 프라이머 당 7개의 다형성 밴드가 관찰되었으며, 밴드의 재현성도 매우 좋아 유연관계분석의 정확성이 매우 높을 것으로 판단되었다. 프라이머 당 PCR 밴드의 수도 많을 뿐만 아니라 다형성 밴드의 비율도 높아 버섯의 품종간 차이가 뚜렷하게 볼 수 있었다. 이 중 밴드의 강도가 높고 재현성이 높다고 판단되는 것만으로 품종간 유연관계 분석에 이용하였다.

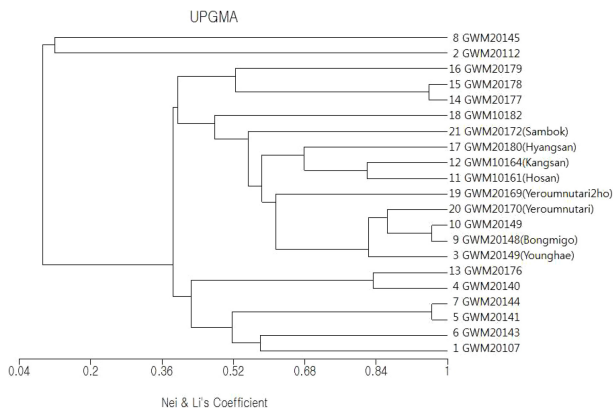
주요 프라이머에 대한 RAPD 밴드패턴은 Fig. 1과 같다. A-11 프라이머를 이용한 RAPD 밴드패턴을 보면 5번과 7번 계통, 9번과 10번 계통, 11번과 12번 계통, 14번과 15번 계통, 그리고 19번과 20번 계통이 유사하게 나타났다. 9번과 10번 계통은 중국에서 도입한 종이고, 11번과 12번 계통은 각각 ‘호산’과 ‘강산’ 품종으로 같은 교배모본을



**Fig. 1.** RAPD patterns obtained from the 21 *Pleurotus pulmonarius* strains with primer A-11 (upper), A-16 (middle), and A-18 (lower). M is size marker standard, and 1-21 are the isolates shown in Table 1.

공유하기 때문으로 생각되며, 19번과 20번 계통은 여름느타리버섯이기 때문으로 판단된다. A-16 프라이머를 이용한 결과에서는 1, 4, 6, 13, 14, 15번 계통, 5번과 7번 계통, 9번과 10번 계통, 그리고 12번과 17번 계통의 밴드패턴이 유사하였다. 여기에서 12번과 17번 계통이 유사한 것은 17번 ‘향산’ 품종이 12번 ‘강산’ 품종을 교배모본으로 이용하여 육성되었기 때문이다. 본 연구에서 17번 ‘향산’ 품종은 8번 계통과 12번 ‘강산’ 품종을 교배모본으로 육성되었고, 18번 ‘화산’ 품종은 17번 ‘향산’ 품종과 21번 ‘삼복’ 품종을 교배모본으로 육성되었다. A-18 프라이머를 이용한 산느타리버섯 수집균주의 RAPD 밴드패턴에서는 17번 ‘향산’ 품종과 18번 ‘화산’ 품종의 밴드패턴이 교배모본의 밴드패턴과 상이하다는 것을 알 수 있다. 따라서 A-18 프라이머는 산느타리버섯의 품종육성 시 이용할 수 있는 유용한 프라이머라고 판단된다.

재현성이 높은 176개의 밴드만을 이용하여 21개 품종의 유연관계를 분석하였다. 유사도 0.37을 기준으로 구분을 하면 21개 품종은 두 개의 그룹으로 나누어진다(Fig. 2). 그룹 1에는 1, 4, 5, 6, 7, 13번 계통이 분포하고, 그룹 2에는 나머지가 분포하였다. 그룹 1은 모두 국내에서 수집한 계통이고, 그룹 2에는 중국 도입종, 국내 육성품종 및 여름느타리버섯이 모두 여기에 속하였다. 또한 2번과 8번 계통은 많은 프라이머의 RAPD 패턴에서 특이한 밴드를 형성하였고, 나머지 품종들과는 유전적인 유사성이



**Fig. 2.** The phylogenetic tree of *Pleurotus pulmonarius* 21 strains generated by UPGMA cluster analysis of Nei and Li's similarity coefficient based on 176 RAPDs.

매우 낮은 것으로 파악되었다.

11번은 ‘호산’ 품종이고 12번은 ‘강산’ 품종으로서 유사도가 높게 나타났으며, 이것은 교배모본을 공유하기 때문으로 생각된다. 5번과 7번 계통, 14번 계통과 15번 계통은 국내 수집종으로 유사도가 매우 높았고, 9번과 10번 계통은 중국에서 수집한 종으로 유사도가 높았다.

‘화산’ 품종은 18번으로 그룹 2에 속해 있으며, 교배모본인 17번(향산) 및 21번(삼복)과 유사도가 높은 것으로 나타났다. 우리나라에서는 여름느타리버섯과 산느타리버섯을 생육온도 및 형태 등을 통해 다른 종으로 분리해서 재배되고 있다. 그러나 이번 유전자 분석 결과에서는 산느타리버섯과 여름느타리버섯이 차이가 없는 동종인 것으로 나타났다. 산느타리버섯과 여름느타리버섯의 단포자 분리 후 교배결과 클램프 형성을 확인하였고, 여름느타리버섯 ‘삼복’ 품종과 산느타리버섯 ‘향산’ 품종을 교배하여 ‘화산’ 품종을 육성하였기 때문에 여름느타리버섯과 산느타리버섯을 다른 종으로 구분하기는 어려울 것으로 생각된다. Huang(2009) 등에 의하면 *P. sajor-casu*는 *P. pulmonarius*와 동일하기 때문에 개명이 필요하다고 하였고, 위키피디아([http://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus\\_pulmonarius](http://en.wikipedia.org/wiki/Pleurotus_pulmonarius))에서는 *P. sajor-casu*는 잘못된 학명으로서 현재 *Lentinus sajor-casu*로 불린다고 하였는데 본 시험의 결과와 일치하였다.

## 적 요

RAPD를 이용한 유연관계 분석에서는 유사도 0.37을 기준으로 2번과 8번 계통을 제외하고 21개 품종은 두 개의 그룹으로 나누어졌다. 그룹 1에는 1, 4, 5, 6, 7, 13번 계통이 분포하고, 그룹 2에는 나머지가 분포하였다.

## 감사의 글

본 연구결과는 농촌진흥청 농업현장실용화기술개발과제(과제번호: PJ010223) 연구비지원의 일부 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

Kang AS, Kong WS, Seok SJ, Hong IP, Cha DY, Kim KP, Kim DH, Yu SH. 1997. The Genetic characteristics of strains and the optimal condition for mycelial growth of *Naematoloma sublateritium* on sawdust media. *Kor. J. Mycol.* 25(2):152-160.

Kim BG, Jeong MJ, Lee CS, Lee HK, Yoo YB, Ryu JC. 1995. Parameters affecting polymerase chain reaction in RAPD analysis of *Pleurotus* spp. *Kor. J. Mycol.* 23(3): 202-208.

Kim JK, Lim SH, Lee DS, Chi JH, Ju YC, Seo GS, Kang HW. 2007. Genetic analysis of cultivars in *Pleurotus* spp. of Korea by UPR-PCR polymorphism. *Kor. J. Mycol.* 35(2):61-67.

Huang L, Wu QP, Yang XB, Zhang JM. 2009. Taxonomic status of *Pleurotus sajor-caju* cultivated in China based on ITS sequence analysis. *Acta Edulis Fungi* 16(2):30-35.

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269-5273.

Raz V, Ecker J. 1997. DNA isolation from *Arabidopsis thaliana*. In: Birren B, Green E, Klapholz S, Myers R, Roskams J, eds. *Genome Analysis: a Laboratory Manual*, vol. 1. Newyork, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p2425.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.