

느타리 버섯류(*Pleurotus* spp.)의 생화학적 방법에 의한 품종구분

김동현¹ · 공원식* · 김경수 · 김영호 · 유창현 · 김영배¹

농업과학기술원 응용미생물과, ¹고려대학교 자연자원대학원 식품공학과

Identification of Varieties by Biochemical Methods in *Pleurotus* spp.

Dong-Hyun Kim¹, Won-Sik Kong*, Kyung-Soo Kim,
Young-Ho Kim, Chang-Hyun You and Young-Bae Kim¹

National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-707

¹Natural Resources Graduate School, Korea Univ., Seoul 136-701, Korea

ABSTRACT: To identify genetic difference of 13 strains in three *Pleurotus* species, analyses of rDNA, AP-PCR and RFLP were carried out. IGRI and ITS1-II regions of rDNA amplified by PCR were about 0.9 and 0.7 kb, respectively. These PCR products were digested with six restriction enzymes to analyse polymorphism. Especially, treatment of *Hae*III enzyme on ITS1-II regions showed specific bands in three *Pleurotus sajor-caju* strains. Genetic differences among three species were classified by similarity analyses based on rDNA polymorphism. Various band patterns of 2,500~150 bp were showed by AP-PCR. Identification of species and varieties in 13 *Pleurotus* strains was possible according to primers used in AP-PCR. In order to develop genetic markers, RFLPs using IGRI and ITS1-II probes derived from ASI 2180 and 2070 were carried out on eight *Pleurotus* varieties. RFLP patterns using IGRI probe were more various than that of ITS1-II probe.

KEYWORDS: *Pleurotus* spp., r-DNA, AP-PCR, RFLP, Identification of varieties

느타리버섯류에는 30개 이상의 종들이 존재한다. 우리나라는 그 중에서도 일반적으로 느타리버섯(*P. ostreatus*) 7품종을 비롯하여, 사철느타리(*P. florida*) 2품종, 여름느타리(*P. sajor-caju*) 2품종 등 형태적, 재배적 특성이 다른 13개 품종이 보급되어 있다. 이러한 종간·종내의 품종들은 생리적 조건을 비롯한 온도, 습도, 환기, 광 등과 같은 성장중의 미세환경에 의해서 그 자실체의 모양이나 색깔 등의 형태적인 변이가 생긴다. 더구나 종·속간 교배, 원형질체 융합 등에 의해 육종된 품종들은 형태적으로 구별하기 어려운 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 생화학적 방법을 이용한 분류 방법이 제기되었다(Chang, 1993; Hibbett와 Vilgalys, 1991). Ribosomal DNA(rDNA)의 분석은 rDNA 자체의 coding region의 서열이 보전적인 반면 non-coding region인 ITS, IGR 부분은 변이

가 커서 종간 변이를 연구하는데 이상적인 재료로 이용되고 있다(White 등, 1990; Hamer 등, 1989). 한편 Martin 등(1991)은 PCR을 이용해 ITS, IGR부위를 증폭하여 4 염기 인식 제한효소로 처리한 후 전기영동으로 band 양상을 관찰하였는데, 16-18S rDNA의 sequence를 비교분석하는 것보다 빠르고 쉽게 결과를 관찰할 수 있다고 하였다.

최근 분류를 위한 특이적인 유전 marker를 개발하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 결과에서 얻을 수 있는 특이적 band와 rDNA에서 얻을 수 있는 특이적인 DNA단편을 probe로 이용하여 계통들간의 finger printing을 시도한 보고가 있다. 실제로 Hamer 등(1989)은 도열병균 race를 쉽게 판별할 수 있는 probe를 개발하여, Magnaporthe Grisea Repeat(MGR) sequence들을 marker로 race들의 세계적 분포를 조사하기도 하였다. 한편 Welsh 등(1991)은 mouse에서 종을 분류하기 위하

*Corresponding author

여 특정 유전자에 대한 primer를 합성하고, 이들 중에서 임의의 한 primer를 사용하는 AP-PCR (Arbitarily Primed PCR) 방법을 사용하여 계통 분석을 수행하였다.

본 연구에 사용된 느타리 버섯은 형태적 분류가 어려운 점 외에도 출처가 불확실한 균주가 재배되는 경우가 많아 정확한 품종구분이 요구되고 있다. 따라서 RAPD의 단점을 보완하며 재현성과 변별력을 높이기 위하여 rDNA의 IGR, ITS부위 및 rDNA를 coding하는 특이적인 18~27 mer 크기의 specific primer를 사용하여 재배되고 있는 느타리 속 균주들의 중간 및 종내 품종들을 AP-PCR과 증폭된 rDNA절편을 probe로 사용한 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법으로 구분하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 시험에 사용된 균주는 농촌진흥청 농업과학기술원에서 보존 중인 3개 종의 13개 계통으로, 느타리버섯(*P. ostreatus*)에는 수집균주의 선발육종 및 단핵균주간 교배와 원형질체 융합에 의해서 육성된 7개 품종과 야생종 1균주가 사용되었고, 사철느타리(*P. florida*)에서 2품종, 여름느타리(*P. sajor-caju*)에서 2품종 및 야생종 1균주를 사용하였다

(Table 1).

공시균의 배양은 증류수에 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco Co.) 24 g/L를 넣고, 250 mL Erlenmeyer flask에 100 mL씩 분주한 뒤 살균하여 평판 배지위에서 자라고 있는 균사를 접종하였다. 균이 접종된 배지는 25°C에서 2주간 120 rpm으로 진탕배양하였다. Genomic DNA 분리는 배양된 균체를 동결건조하여 유발에서 액체질소로 마쇄한 후, CTAB buffer(1% Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide, 0.7 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% 2-mercaptoethanol, 0.2% SDS, 50 mM EDTA) method(Zolan and Pukkila, 1986)를 사용하였다. 분리된 DNA는 spectrophotometer(260 nm)에서 흡광률(O.D.)을 측정해서 template DNA농도를 조정하였다.

본 시험의 primer는 *Saccharomyces cerevisiae*의 sequence에서 설계된 ITS2 등 11종(Fig. 1)을 합성하여 사용하였다. rDNA 분석을 위한 PCR 반응조건은 White 등(1990)의 조건을 기본으로 하여 각각 100 pmole의 primer, 2.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 25~200 ng template DNA, 2.5 unit Taq polymerase(Boehringer Mannheim Co.)를 총 100 μL에서 반응시켰다. PCR의 반응조건은 94°C 5분 predenaturing, 94°C 1분 denaturing, 55°C 1분 anealing, 72°C 2분 polymerization으

Table 1. Strains of *Pleurotus* spp. and each description

Strain No. (ASI)	Scientific name	Year isolated	Origin	Characteristics and description
2001	<i>P. ostreatus</i>	1971	Korea	'Nonggi 2-1', Low-temp. variety
2018	<i>P. ostreatus</i>	1978	Korea(Seoul)	'Nonggi 201'
2027	<i>P. ostreatus</i>	1978	Korea(Yangsan)	Wild strain, Mid-temp. strain
2042	<i>P. ostreatus</i>	1979	Japan	'Aeneutari 1'
2072	<i>P. ostreatus</i>	1980	Korea(Crossed)	'Nonggi 202'
2180	<i>P. ostreatus</i>	1990	Korea(Fusant)	'Wonhyeungneutari 1'
2183	<i>P. ostreatus</i>	1990	Korea(Fusant)	'Wonhyeungneutari 2'
2194	<i>P. ostreatus</i>	1991	Korea	Aeneutari
2240	<i>P. ostreatus</i>	1994	Korea(Crossed)	'Wonhyeungneutari 3'
2016	<i>P. florida</i>	1976	German	'Sachulneutari', White
2181	<i>P. florida</i>	1990	Thailand	'Sachulneutari 2'
2070	<i>P. sajor-caju</i>	1982	India	'Yeoreumneutari'
2139	<i>P. sajor-caju</i>	1987	New Guinea	Wild strain, High-temp. strain
2333	<i>P. sajor-caju</i>	1995	Korea(Crossed)	'Yeoreumneutari 2'

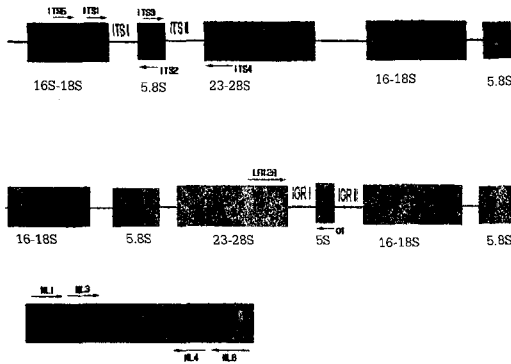


Fig. 1. Primer locations on nuclear and mitochondrial rDNAs for amplification using PCR. ITS1: internal transcribed spacer I, ITS2: internal transcribed spacer II, IGR1: intergenic region I, IGR2: intergenic region II. Arrowheads represent the 3' end of each primer. Primers sequences are as follows: ITS2: 5'-GCTGCGTTCATCG-ATGC-3', ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAA-CGCAGC-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3', ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGT-CGTAACAAGG-3', LR12R: 5'-CTGAACG-CCTCTAAGTCAGAA-3', O1: 5'-AGTCCT-ATGGCCGTGGAT-3', NS2: 5'-GGCTGC-TGGCACCAGACTGC-3', ML3: 5'-GCTG-GTTTTCTACGAAACATATTTAAG-3', ML4: 5'-GAGGATAATTTGCCGAGITTC-3', ML1: 5'-GATCTTTTGCATAATGGGTA-GGC-3', ML8: 5'-TTATCCCTAGCCTAACT-TTTATC-3'

로 35 cycle을 실행시키고, 정확한 증폭을 위하여 72°C 10분 동안 반응시켰다. 증폭된 IGRI과 ITS1-II 부위는 각각 *Sau3AI*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII*, *RsaI*, *HpaII*의 6개 제한효소를 반응 당 2~4 unit로 PCR 산물 20 µL에 직접 넣어 37°C에서 1~16시간 반응시켰다. 전기영동은 agarose를 2% 농도로 TAE[40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA(pH 8.0)]에 녹여 사용하였고, 50 V에서 1시간 전기영동하여 1 µg/mL ethidium bromide 용액으로 염색한 후 UV lamp 상에서 관찰하였다. 유연관계 분석을 위한 program은 NT-SYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Programs Ver. 1.60)(Rohlf, 1990)을 사용하였으며, 전기영동 결과 동일한 크기의 band가 있으면 1, 없으면 0으로 하여 data화 하

였다. 분류학적인 유연관계의 분석법은 Nei(1987)의 방법을 이용하였는데, 그 식은 다음과 같다. $F = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$, $m = \text{matrix}$. 이와 같이 구한 값으로 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic means)를 이용한 clustering을 하여 도식화 하였다.

AP-PCR 반응액의 조성은 기본적으로 Williams 등(1990)의 방법을 다소 조정하여 20 µL의 반응 총액에서 100 µM MgCl₂, 100 pmole primer, 25 ng의 DNA, 0.2 mM dNTP, 1 unit *Taq* polymerase를 첨가하였다. PCR 반응과 전기영동은 rDNA 분석조건과 동일하게 처리하였다.

RFLP 분석은 공시균주 가운데 8품종을 대상으로 DNA를 분리하여 Southern blotting을 시행하기 위하여 *Bam*HI과 *Hind*III 제한효소로 full digestion시킨 후 agarose gel에 전개하고 다시 nylon membrane에 전이시켰다. Probe는 원형느타리와 여름느타리의 ITS1~II, IGRI을 증폭한 후 agarose gel에 전개하여 각 band를 gel에서 잘라 Wizard PCR Prep. kit(Promega Co.)로 DNA를 추출하였으며 Dig(digoxigenin-dUTP) labelling system(Boehringer Mannheim Co.)으로 표지하여 사용하였다. Blotting시킨 나일론막을 standard hybridization solution(5×SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-laurorylsarcosine, 1% blocking reagent)으로 68°C 1시간 prehybridization시킨 다음 probe 2 µL와 standard hybridization solution으로 68°C 6시간 hybridization하였으며, color detection은 anti-DIG-AP(Alkaline Phosphatase) conjugated antibody를 첨가하고 제조 회사의 방법에 따라 발색시켜 band를 관찰하였다.

결 과

rDNA 분석에 의한 품종간 구분

공시된 13개 느타리균주들의 rDNA 분석을 위해서 우선 IGRI, ITSII, ITS1-II 부위를 증폭하였다. IGRI 부위의 증폭에는 primer O1과 LR12R, ITSII의 증폭에는 primer ITS3와 ITS4, ITS1-II의 증폭에는 primer ITS4와 ITS5를 각각 사용하였다. PCR 증폭 후 1% agarose gel에서 전기영동

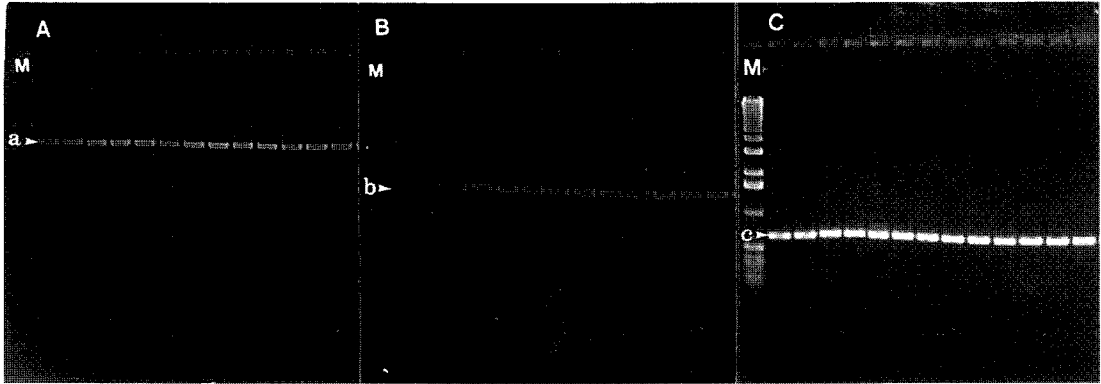


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis banding patterns of PCR products amplified to rDNA region of 13 *Pleurotus* strains. A: IGRI, B: ITSII, C: ITSII-II. Lane order is ASI 2016, 2181, 2240, 2018, 2072, 2042, 2180, 2183, 2001, 2027, 2070, 2333, 2139. M is 1 kb ladder marker. Arrowheads indicate about 0.9, 0.3 and 0.7 kb from a to c, respectively.

후 관찰한 결과(Fig. 2) 공시된 느타리 균주들이 모두 동일한 band 크기를 나타내었다. 즉, IGRI 부위에서는 약 0.9 kb, ITSII 부위에서는 약 0.3 kb, ITSII-II 부위에서는 약 0.7 kb 크기의 DNA가 각각 증폭되었다.

rDNA에서 증폭된 IGRI과 ITSII-II 부위를 *Sau3A*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII*, *RsaI*, *HpaII*의 6개 제한 효소로 처리하여 다형성을 비교한 결과(Fig. 3) IGRI 부위에 대한 *Sau3A* 처리는 5개 밴드, *TaqI*에서 1개 밴드, *Tru9I*에서 3개 밴드, *HaeIII*에서 3개 밴드, *RsaI*에서 2개 밴드, *HpaII*에서 3개 밴드를 나타낸 반면, ITSII-II 부위에서는 *Sau3A* 4개, *TaqI* 2개, *Tru9I* 2개, *HaeIII* 4개, *RsaI* 1개, *HpaII* 1개 밴드를 나타내었다. IGRI 부위의 밴드 형태 중 공시균주들간에 느타리(*P. ostreatus*) 종은 *Tru9I* 처리에서 약 100 bp에서 사철느타리(*P. florida*) 종과 여름느타리(*P. sajor-caju*) 종에 없는 밴드가 있었으며 그 외에는 중간 또는 종내 품종이나 균주들을 구별할 수 있는 뚜렷한 밴드는 없었다. 이와 같은 경향은 ITSII-II 부위에서도 동일하였으나 *HaeIII* 효소로 처리했을 때 여름느타리종 균주들은 약 500 bp에서 공통적인 특이한 밴드를 보였다(Fig. 3-d).

IGRI에서 증폭된 0.9 kb 절편과 ITSII-II에서 증폭된 0.7 kb의 절편을 6종류의 제한효소로 절단하여 나타나는 다형성을 밴드의 유무에 따라 data화하여 유연관계를 분석한 결과(Fig. 4) 공시된 13균

주의 유사도는 평균 82.5%를 나타내었고, 사철느타리 2균주, 느타리 8균주, 여름느타리 3균주가 group을 형성하여 rDNA분석이 종을 구분하는데 유용하게 이용될 수 있음을 보여주었다. 한편 사철느타리와 느타리는 약 92%의 높은 유연관계를 보였으며 여름느타리는 이들과 다소 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 실제의 교배실험에서도 사철느타리와 느타리는 교배가 가능한 반면 여름느타리는 교배가 안되는 것을 볼 수 있어 본 분석결과를 뒷받침한다고 사료되었다.

AP-PCR에 의한 품종의 구분

rDNA 분석에 사용되는 11개의 primer를 사용하여 AP-PCR을 수행하여 그 중 다형성을 보인 6개 primer에 대한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. AP-PCR 분석에서는 약 2.0 kb~150 bp의 다양한 밴드 양상을 보여 종간에는 물론 품종이나 균주간에도 차이를 볼 수 있었다. 종에 특이적인 밴드는 느타리에 있어서는 ITS2에서 약 600 bp, ITS3에서 약 500 bp, O1 primer에서는 약 1100 bp에서 찾아 볼 수 있었고, 사철느타리에서는 ITS2에서 약 200 bp에서 특이한 밴드가 있었고, ITS5 primer에서는 사철느타리에 대하여 뚜렷이 진한 단일 밴드가 약 340 bp(Fig. 5-c)에서 나타나 사철느타리의 종을 구분하는 유용한 marker가 될 수 있을 것으로 사료되었다. 여름느타리는 ML4 primer에서 약 1300 bp에서 다른 종보다 뚜렷한 밴드를 볼 수 있

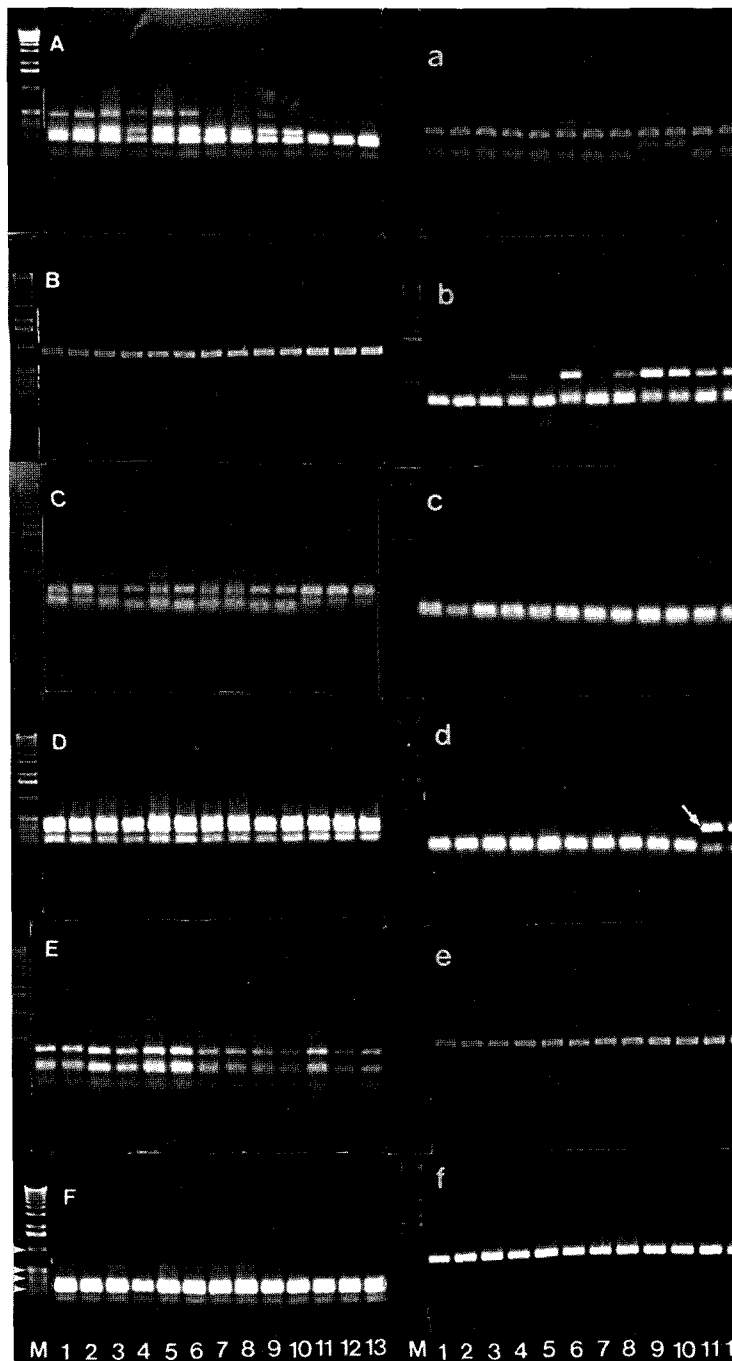


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis banding patterns of restriction fragments digested with six restriction enzymes from IGR and ITS1~II of rDNA region of the *Pleurotus* strains. A-F are IGR digested with *Sau3AI*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII*, *RsaI* and *HpaII* from 13 strains. a-f are ITS1~II digested with *Sau3AI*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII*, *RsaI* and *HpaII* from 13 strains. Lane order is ASI 2016, 2181, 2240, 2018, 2072, 2042, 2180, 2183, 2001, 2027, 2070, 2333, 2139. M is 1 kb ladder marker. Arrowheads indicate 1018, 506, 396 and 220 bp, respectively from upper to bottom. Arrow indicates a common band of *P. sajor-caju* strains.

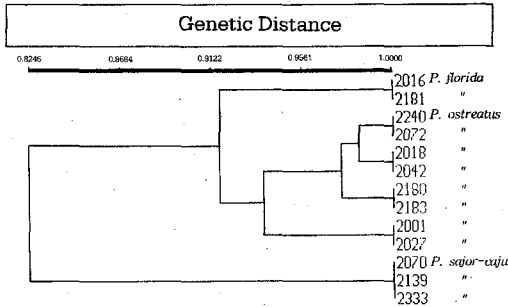


Fig. 4. Dendrogram of similarity based on restriction fragments digested with six restriction enzymes from IGRI and ITS1-II of rDNA region of the *Pleurotus* strains. Genetic similarities are calculated by Nei (1987) method and analyzed by the UPGMA clustering.

었으나 다른 primer에서는 균주간 차이가 컸는데 이는 수집지역의 지리적 차이가 크기 때문인 것으로 생각되었다.

한편 AP-PCR에 의한 종내 품종간 구별이 가능하였는데 O1 primer에서는 사철느타리2호(ASI 2181)가 약 700 bp에서 사철느타리(ASI2016)와 구분할 수 있는 밴드를 보였고, 여름느타리(ASI 2070)와 여름느타리2호(ASI2333)는 ITS3에서 약 300 bp, ITS5에서 약 1400 bp, O1에서 약 1100 bp, NS2에서 약 250 bp, ML4 primer에서는 약 600 bp에서 구분되는 밴드를 찾을 수 있었다. 느타리에서는 농기2-1호(ASI2001)가 O1 primer에서 약 1000 bp에서 단일 밴드를 보였고, 농기201호(ASI2018)는 O1 primer에서 약 1400 bp에 구분되는 밴드가 있었으며, 농기2-2호(ASI2072)는 NS 2에서 약 400 bp의 밴드로 다른 느타리와 구분할 수 있었다. 한편 원형느타리(ASI2180)와 원형느타리2호(ASI2183)는 사용된 모든 primer에서 구분할 수 없었으나 원형느타리3호(ASI2240)와는 ITS5 primer에서 약 1800 bp의 밴드로 품종간 구분이 가능하였다.

RFLP에 의한 품종 구분

원형느타리의 ITS1-II와 IGRI를 probe로 사용하여 RFLP를 실시한 결과 ITS1-II probe(Fig. 6A)에서는 밴드가 단순하고 느타리와 사철느타리에서는 공통된 밴드를 보였으나 여름느타리(ASI

2070)에서는 밴드를 형성하지 않았으며, IGRI probe(Fig. 6B)는 품종에 따라 크기가 약간씩 차이가 있었으나 사철느타리(ASI2016)와 여름느타리의 밴드 양상은 느타리 품종과 다른 밴드 양상을 보였다.

여름느타리의 ITS1-II와 IGRI를 probe로 사용하여 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리한 DNA에서 RFLP를 실시한 결과 ITS1-II probe(Fig. 6C)에서는 원형느타리의 probe에서와 같이 느타리 품종간에는 밴드의 차이가 적었고 여름느타리에서는 전혀 다른 밴드 형태를 보였다. 반면 IGRI probe(Fig. 6D)는 더 다양한 다형성을 보이면서 약 3 kb에서 종에 관계없이 모든 품종에 공통된 밴드를 나타내었고, 약 4 kb에서 원형 느타리(ASI 2180)에 특이적인 band를 보였다. 따라서 ITS1-II에 비해 IGRI 부위가 품종이나 종간에 변이가 크다는 것을 알 수 있었으며, 다양한 PCR의 증폭산물을 사용하여 품종을 구분하는 유용한 marker를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

고 찰

rDNA에서 증폭된 PCR 산물들을 *Sau*3AI, *Taq*I, *Tru*9I, *Hae*III, *Rsa*I, *Hpa*II 등의 4염기 인식 제한효소로 처리한 결과를 종합해 볼 때, 그림 3과 같이 약 92%의 유사도를 기준으로 3군으로 나누어져 사철느타리(*P. florida*), 느타리(*P. ostreatus*), 여름느타리(*P. sajor-caju*)로 구분지을 수 있었다. 사철느타리와 여름느타리는 종내의 변이를 볼 수 없었고, 느타리는 종내에서도 ASI2240과 2072, ASI2018과 2042, ASI2180과 2183, ASI 2001과 2027은 100% 동일한 유사도를 보였으나, 이 4 group간에는 다소의 차이를 관찰할 수 있었다. 배(1994)는 영지버섯과 느타리버섯에서 ITSII 부위가 종의 구분에 적당하다고 하였고 Royse와 Nicholson(1993)은 IGR부위에 대해서는 *Len-tinus edodes*의 경우 균주간 변이는 없었으나, *L. edodes*와 *L. boryana*는 큰 차이를 보였다고 하였다. 또한 공(1997)은 팽나무버섯 종내에서 수집균주들간에 비교를 하는데에는 IGR부위나 ITS부위의 비교로는 한계가 있다고 하였다. 본 연구에서도

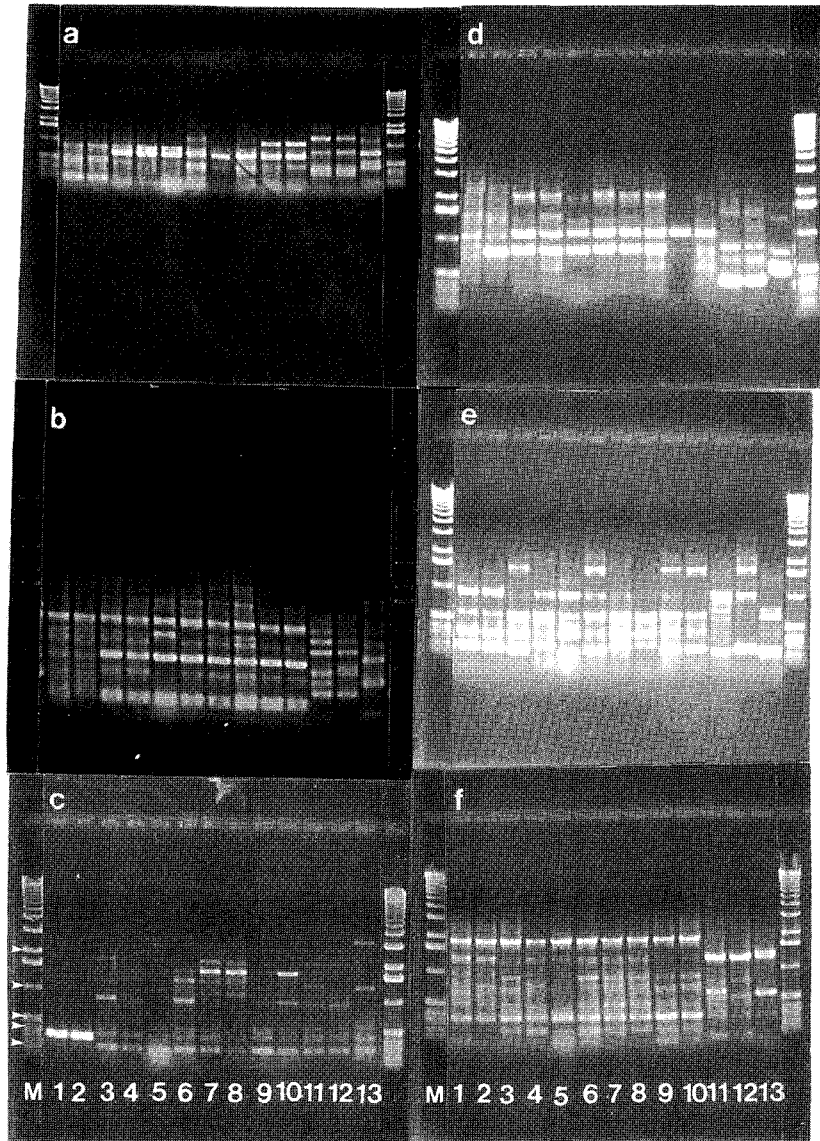


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis banding patterns by AP-PCR of the 13 *Pleurotus* strains. a-f are amplified by primer ITS2, ITS3, ITS5, O1, NS2, ML4, respectively. Lane order is ASI 2016, 2181, 2240, 2018, 2072, 2042, 2180, 2183, 2001, 2027, 2070, 2333, 2139. M is 1 kb ladder marker. Arrows indicate 2036, 1018, 506, 396 and 220 bp, respectively from upper to bottom.

rDNA 분석은 종내의 품종구분보다는 종간의 구분에 유용한 방법으로 생각되었다.

AP-PCR에 사용된 primer는 rDNA 분석에 사용된 primer들 중 임의의 1개의 primer를 사용하였는데 총 11개의 specific primer 중 ITS4, LR12R, ML3, ML1, ML8의 5개는 다형성을 보이지

않았고, 다형성을 보인 primer는 총 6개로 ITS2, ITS3, ITS5, O1, NS2와 ML4이었다. 이들 다형성을 보여준 primer들의 특징은 GC 함량이 40~66%로 GC 함량이 높은 primer가 AP-PCR의 finger printing에 적합하다는 Kublik과 Szabo(1995)의 결과와는 다소 차이가 있었다.

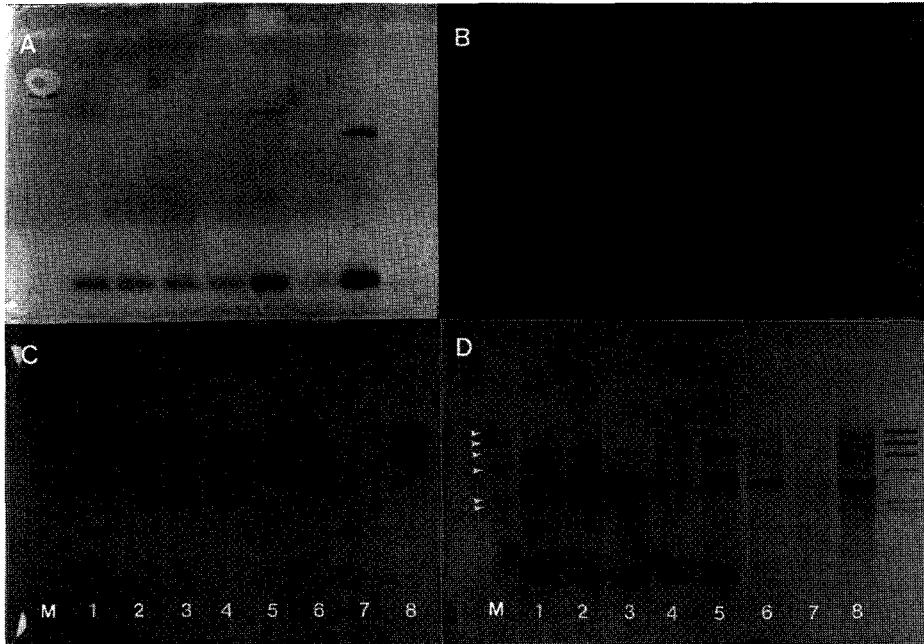


Fig. 6. Comparison of varieties based on RFLP used probe from amplified ITS1-II and IGR1 in the 8 *Pleurotus* strains restricted *Bam*HI and *Hind*III. A: RFLP by ITS1-II probe of ASI 2180, B: RFLP by IGR1 probe of ASI 2180, C: RFLP by ITS1-II probe of ASI 2070, D: RFLP by IGR1 probe of ASI 2070. Lane order is ASI 2180, 2001, 2018, 2042, 2194, 2016, 2181, 2070. M is λ DNA/*Hind*III fragments marker. Arrowheads indicate 23130, 9416, 6557, 4361, 2322 and 2027 bp, respectively from upper to bottom.

Table 2. Primers of identification among inter-species and inter-varieties

Scientific name	Variety name	rDNA	AP-PCR
<i>P. sajor-caju</i>	'Yeoreumneutari'	ITS region(<i>Hae</i> III)	ITS3, ITS5, O1, NS2, ML4
	'Yeoreumneutari 2'		
<i>P. florida</i>	'Sachulneutari'	Unclassified	O1
	'Sachulneutari 2'		
<i>P. ostreatus</i>	'Nonggi 2-1'	IGR region(<i>Tru</i> 9I)	O1
	'Nonggi 201'		O1
	'Aeneutari 1'		ITS5
	'Nonggi 202'		NS2
	'Wonhyeungneutari 1'		ITS5
	'Wonhyeungneutari 2'		ITS5
	'Wonhyeungneutari 3'		ITS5

본 연구를 종합하여 각 종간에 유연관계를 관찰할 수 있는 primer들을 Table 2와 같이 나타낼 수 있었다. 즉, 여름느타리 종은 rDNA 분석시 ITS1-II 부위를 *Hae*III로 자른 결과 특이적인 band pattern을 볼 수 있었고, 느타리 종은 IGR1 부위의 *Tru*9I 처리에서 다른 종과 구분되었다. 품종간 구

별에 있어서는 사철느타리 1호와 2호 그리고 농기2-1호와 농기201호는 AP-PCR에서 primer O1을 사용하였을 때, 농기202호는 NS2를 사용하였을 때, 원형느타리 1, 2, 3호는 ITS5에서 종내의 품종구분이 가능하였다. 이와 같이 AP-PCR은 종간 및 품종들간의 구분에 있어 rDNA 분석에 의한 것보다 세

분화가 가능하였다. 한편 RFLP 방법은 각 종에 대한 특이적인 probe 및 상응하는 genetic marker 를 개발할 수 있는 것으로 보고되고 있는 바 (Magdolen 등, 1995; Hamer 등, 1989) 본 연구에서는 rDNA의 증폭 산물을 probe로 하여 RFLP를 시도하였으나 AP-PCR에서 얻어진 품종에 특이적인 band를 probe로 사용한다면 품종을 더 확실하게 구분할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

현재 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 느타리버섯류 중 *P. ostreatus*, *P. florida*, *P. sajor-caju*의 3개 종 13개 품종에 대하여 rDNA 분석 및 AP-PCR, RFLP를 실시하여 각 종 및 품종들에 대한 구분을 시도하였다. rDNA의 IGRI 부위는 약 0.9 kb로 증폭되었고, ITSI-II는 약 0.7 kb로 증폭되었다. 각 PCR 산물을 6가지 제한효소로 절단하여 polymorphism을 분석한 결과, ITSI-II 부위를 *HaeIII*로 처리시 여름느타리에 특이적인 band를 보였다. 또한 유연관계를 분석하여 중간 차이를 구분할 수 있었다. AP-PCR를 실시한 결과 약 2.0 kb~150 bp의 다양한 band를 볼 수 있었고 *P. florida*종은 marker로 사용 가능한 특이 밴드가 발견되었다. 또한 사용된 primer에 따라 종간의 구별이 가능하였을 뿐 아니라 품종간에도 차이를 보이는 primer도 찾을 수 있었다. 품종을 구분하기 위한 RFLP 분석에서는 ITSI-II보다 IGRI probe가 더 큰 변이를 보였다.

참고문헌

- 공원식. 1997. 팽나무 버섯(*Flammulina velutipes*) 수집균주의 유연관계와 새로운 균주 육성에 관한 연구. 건국대학교 대학원. 박사학위논문.
- 배신철. 1994. 버섯 및 도열병균의 분류를 위한 rDNA의 ITS와 IGR부위의 PCR 분석. 경북대학교 대학원 박사학위논문.
- Chang, S. T. 1993. The impact on mushroom production and mushroom products. First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products: pp. 1-35.
- Hamer, J. E., Farrall, L., Ortach, M. J., Valent, B. and Chunmley, F. G. 1989. Host species-specific conservation of a family of repeated sequence in the genomic of a fungal plant pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 9981-9985.
- Hibbett, D. S. and Vilgalys, R. 1991. Evolutionary relationships of *Lentinus* to the polyporaceae: Evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* **83**: 425-439.
- Kublik, A. R. and Szabo, L. J. 1995. High-GC primers are useful in RAPD analysis of fungi. *Curr. Genet.* **28**: 384-389.
- Magdolen, U., Magdolen, V., Schmitt, M. and Bandlow, W. 1995. Selection of specific gene probes by combined use of low-stringency PCR amplification and southern-blot hybridization. *Curr. Genet.* **27**: 390-392.
- Martin, G. B., Williams, J. G. K. and Tanksley, S. D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Prac. Natl. Acad. Sci.* **88**: 2336-2340.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia Press, New York, Pp. 106-107.
- Rohlf, F. J. 1990. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Royse, D. J. and Nicholson, M. S. 1993. Allozymes, ribosomal DNA and breeding in *Lentinula*. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* **31**: 162-167.
- Welsh, J., Peterson, C. and McClelland, A. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research.* **19**: 303-305.
- White, J. J., Bruns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenics. A guide to methods and applications. Academic Press, Pp. 315-322.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6513-6535.
- Zolan, M. E. and Pukkila, P. J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinerius*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 195-200.