

## 느타리버섯 속(*Pleurotus* spp.)의 계대배양에 따른 유전적 변이

강경홍\* · 송주희<sup>1</sup> · 김홍남<sup>2</sup>

전주대학교 자연과학부, <sup>1</sup>전주대학교 대학원 생물학과  
<sup>2</sup>전주대학교 자연과학종합연구소

### The Genetic Variations of *Pleurotus* spp. on Subculture

Kyung Hong Kang\*, Ju Hee Song<sup>1</sup> and Hong Nam Kim<sup>2</sup>

School of Natural Science, Jeonju University, Jeon-Ju 560-759, Korea

<sup>1</sup>Department of Biology, Graduate School, Jeonju University, Jeon-Ju 560-759, Korea

<sup>2</sup>The Natural Science Research Institute, Jeonju University, Jeon-Ju 560-759, Korea

(Received December 19, 2001)

**ABSTRACT:** The genetic variations and the rate of mycelial growth in the dikaryon and the monokaryon stages of *Pleurotus* spp. were surveyed during their subcultures. The highest growth rate was observed on both the 3rd and the 4th subcultures. The remarkably rapid growth rate was detected in *P. ostreatus* dikaryon. Genetic similarities in the dikaryon and the monokaryon of *P. ostreatus* were more than 57.5% and 85.7%, respectively, and those of *P. eryngii* were more than 85.2% and 84.8%, respectively. The genetic similarities of monokaryotic *P. ostreatus* were higher than those of dikaryotic. The topology of phylogenetic trees showed that the divergence and the clustering patterns of branch did not correlated with the number of subcultures. This suggests that genetic variations occur very randomly on mycelial cultures. These results suggest that the monokaryotic mycelia is genetically more stable than the dikaryotic in subcultures, and that it is very useful to stock monokaryotic mycelia for making spawns and breeding of *Pleurotus* spp.

**KEYWORDS:** Genetic similarity, Genetic variations, Growth rate, *Pleurotus* spp., RAPD, Subculture

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 세계적으로 소비량이 급격히 증가함에 따라 생산량이 증가하고 있으며 (Peberdy *et al.*, 1993), 현재 국내에서도 가장 많이 재배되는 버섯으로서 농가 소득에 매우 주요한 역할을 하는 경제작물이다.

버섯 유전자원은 유용한 자원의 확보라는 차원에서 뿐만 아니라, 종의 보존이라는 의미에서 매우 중요하다. 특히, 경제적으로 가치가 있는 버섯의 유전자원은 더욱 중요성을 가지며, 유전자원을 보존함에 있어서 유의해야 할 점은 자체의 유전적 변이의 방지 뿐만 아니라, 환경적 영향으로부터의 보호도 중요하다(Lee *et al.*, 1998).

균사체 보존 방법으로는 mineral oil 보존법(Kobayashi, 1984; Li and Chen, 1981), 액체질소보존법(Hwang, 1968; Jong, 1978), 멸균중류수보존법(McGinnis *et al.*, 1974; Boesewinkel, 1976; Ellis, 1979; Lee *et al.*, 1998), 동결건조보존법(Smith and Onions, 1983) 등이 있으며, 버섯류의 보존은 보통 계대배양에 의하며, 균사체를 계대배양하는 보존법이 안정성이 높다(Lambert, 1959). 그러나, 균사체가 성장하는 중에도 균총과 균사

내에 심한 유전적 또는 물리적 변화가 생길 수 있으며 (Peng and Wu, 1972), 계대배양의 횟수가 많아질수록 균균이 퇴화되고, 균주의 유전적 변화가 심하며, 생존율이 저조해진다(Lee *et al.*, 1999). 또한, 팽이버섯 톱밥 접종원으로 계대배양 횟수를 늘려갈수록 분얼자의 수가 증가하였으며, 리그닌 분해 효소인 laccase 활력이 감소되었고, 5회의 계대배양은 자실체의 수량 감소와 잡균의 오염율이 증가한다고 보고되었다(김 등, 1995).

최근 버섯의 분자 유전학적 및 계통학적 연구에 restriction fragment length polymorphisms(RFLPs)과 random amplified polymorphic DNAs(RAPDs), 염기서열분석 등이 사용되고 있다. 특히, RAPD는 Williams 등(1990)이 random primer를 사용하여 PCR 반응으로 증폭한 DNA 단편을 표지 인자로 사용할 수 있다고 보고하면서 품종구분과 유전분석 등에 널리 사용되어왔다. 이러한 연구에는 *Lentinula edodes* strain의 단핵균사와 이핵균사의 DNA 다형성(Chiu *et al.*, 1993) 및 재배종과 야생종과의 유연관계 조사(Sunagawa *et al.*, 1995), *Agaricus bisporus*의 담자포자 유래 균주에 대한 연구(Khush *et al.*, 1992), *Flammulina velutipes* 단포자 분리주의 유전적 변이연구(Kong *et al.*, 1997), 품종간 계통 관계 조사

\*Corresponding author <E-mail: kkh@www.jeonju.ac.kr>

(Zhang and Molina, 1995; Choi *et al.*, 2001) 등이 있으며, 이러한 방법은 생화학적 방법보다 안정적이고 짧은 시간내에 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

또한, 균사의 생장력은 저장상태에 따라 달라지는데(이 등, 1996a, 1996b), 균사의 계대배양에 따라 생장력이 변하거나 발이능력이 상실되기도 한다. 따라서 계대배양에 따른 균주보관은 유전적으로 변화될 가능성이 있으며, 이러한 변화는 균주의 종균이용에 중요한 요인으로 작용할 것으로 생각된다. 이에 본 연구에서는 계대배양에 따라 일어나는 genome 상에서 유전적 변이의 양상 및 생장력의 변화 그리고 이들의 관계를 구명하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균 주

본 실험에 사용한 균주는 농촌진흥청에 보관된 느타리버섯, *Pleurotus ostreatus*(ASI 2018) 이핵 균주와 단핵 균주 및 본 대학이 보관하고 있는 큰느타리버섯, *P. eryngii* 이핵균주와 이로부터 단핵체를 분리하여 실험체로 사용하였다.

### 단포자 분리

성숙한 자실체에서 약 3~4시간 동안 낙하시킨 담자포자를 멸균수에 현탁하여 GMY 배지에 도말시킨 후 약 10~12일간 25°C에서 배양하였다. 멸균한 나무 접종침을 사용하여 독립된 균총을 BMP 배지 위에 옮기고 25°C에서 약 7~14일간 배양하였다. 단포자 여부를 조사하기 위하여 균총의 가장자리에서 멸균한 나무침으로 균사체를 채취하여 NS buffer에 넣고 DAPI(4, 6-diamidine-2-phenylindole, 1 µg/µl)로 염색하였다. 격쇠연결체 형성 여부와 세포내 핵을 형광현미경을 사용하여 확인하였다. 분리된 단포자를 MYP 사면배지에서 배양하여 4°C에서 보관하면서 원균으로 사용하였다.

### 계대배양 및 배양에 따른 균사의 생장속도 측정

MYP 사면배지에 보관 중인 원균을 새로운 BMP 평면배지에 배양하여, 이를 1차 계대배양으로 정하였다. 균사의 가장자리를 직경 10 mm의 크기로 동일하게 잘라서 새 배지에 옮겨 배양하였으며, 이렇게 10회 계대배양하였다. 균사생장속도를 조사하기 위하여 시험구 배치는 5개 구 3반복 완전임의 배치법으로 시행하였으며, 배양 2일 후부터 매일 균직경(mycelial diameter)을 측정하였다.

### Genomic DNA의 추출

BMP 평면배지에서 배양시킨 각 계대배양 균사체를 수거하였고, genomic DNA는 Graham 등(1994)의 방법을 변형하여 추출하였다. 균사체를 액체질소로 급냉시키어 미세하게 마쇄한 후 extraction buffer(2% CTAB,

**Table 1.** List of random primers used in this study

Species	Primer Name (and Sequence) <sup>a</sup>	G-C%
<i>Pleurotus ostreatus</i>	OPE-7(AGATGCAGCC)	60%
	OPE-14(TGCGGCTGAG)	60%
	OPE-15(ACGCACAACC)	60%
	OPE-16(GGTGACTGTG)	60%
	OPE-18(GGACTGCAGA)	60%
<i>Pleurotus eryngii</i>	OPE-12(TTATCGCCCC)	60%
	OPE-13(CCCGATTCGG)	60%
	OPE-15(ACGCACAACC)	60%
	OPE-18(GGACTGCAGA)	60%
	OPE-19(ACGGCGTATG)	60%

<sup>a</sup>Operon Series (Operon Technologies Inc., Alameda, Calif.).

100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)를 넣고 55°C에서 50분간 방치하였다. 여기에 chloroform : iso-amylalchol(24 : 1)의 혼합액을 동량 첨가하여 10분간 추출한 후 상온에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상청액을 새로운 튜브에 옮겨 반복 추출하였다. 이어서 상청액에 99% 에탄올을 첨가하여 DNA를 침강시켰고 70% 에탄올로 2회 세척한 후 건조시켰다. 건조된 DNA를 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 용해한 후 RNase(100 µg/ml)를 가하여 55°C에서 40분간 방치하였다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel로 영동하여 순도 및 양을 확인하였다.

### PCR 반응 및 전기영동

PCR 반응액은 200 ng DNA, 1×reaction buffer(20 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl), 50 µM dNTP(Promega), 20 pmol primer(Operon Technologies Inc., Table 1), 2.5 unit Taq DNA polymerase (Promega)와 멸균된 증류수로 total volume이 50 µl가 되도록 조제하였다. 반응 조건은 pre-denaturation 94°C에서 3분, denaturation 94°C에서 1분, annealing 37°C에서 2분, extension 72°C에서 1분, final extension 72°C에서 10분으로 설정하였고 이 조건에서 45 cycle을 수행 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) 하였다. PCR 산물을 0.8% agarose gel로 영동하여 DNA 증폭 여부를 확인하였다. Data 분석을 위해서 PCR 산물 10 µl를 2%의 Nusive 3 : 1 Agarose gel에서 40 V로 전기영동 한 후, EtBr로 염색하고 UV조사 하에서 Polaroid 667 film으로 촬영하였다. 또한, 재현성을 확인하기 위하여 동일 조건에서 PCR 증폭을 반복 수행하였다.

### Data 분석

DNA band의 유무에 따라 +와 -로 표시하여 matrix를 작성하였고, 이 matrix를 기초로 하여 similarity index를 Lynch(1990)의 방법으로 계산하였다. Neighbor-Joining (N-J) tree(Saito and Nei, 1987)는 이핵체를 outgroup

로 하여 작성하였다. data matrix의 +와 -를 각각 a와 t로 설정하여 CLUSTAL W(Thompson *et al.*, 1994)로 multi-alignment하여 1,000회 Bootstrap를 수행하여 tree를 작성하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균사 성장력 조사

계대배양 횟수가 증가함에 따라 성장속도가 다양하게 변한 것을 알 수 있었으며, 균주에 따라 성장속도가 다양하여 동일한 크기의 Petri dish를 채우는데 걸리는 배양 기간이 각기 달랐다. 균주들에서 공통적으로 1회와 2회 계대배양은 완만하게 증가하는 성장속도를 보였고, 3회와 4회 계대배양에서는 빠른 성장속도를 나타내었다. 그 이후의 계대배양에서는 점점 성장속도가 감소하기 시작하여 8회째 계대배양에서는 성장속도가 급격히 감소하여 1회 계대배양 때의 성장속도보다 느린 경우가 많았다(Fig. 1).

류(1996)는 느타리버섯 균사체가 PDA 배지에서 계대배양 횟수별 성장력이 6회 이상부터 감소하였고, 톱밥배지에서는 별 차이가 없다고 보고하였다. 그러나, 본 연구에서는 5회 이후부터 성장력이 감소하였으며 8회 이후부터는 급격히 감소하였는데, 이러한 약간의 차이는

연구에 사용된 품종 또는 계통의 차이로 볼 수 있으며, 3회와 4회째 계대배양에서 균사의 성장속도가 빠른 것으로 보아 이때에 가장 높은 성장활성을 나타내고, 이후부터는 활성이 점점 감소하여 균 성장력의 퇴화를 유도하는 것으로 생각된다. 이러한 성장력 감소로 인한 균의 퇴화가 버섯 발이능력의 상실 또는 변형된 버섯의 발생을 유도할 수 있는지는 알 수는 없었으나, 이러한 결과는 종균으로 사용하기 위한 균사체 배양의 지표로서 사용할 수 있을 것이다.

이핵과 단핵 균주간의 균사 성장 속도에 있어서는 이핵 균주가 단핵 균주보다 빨랐으며, 특히 균사 성장 속도가 빨랐던 3회째 계대배양에서 가장 큰 차이를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 *P. flabellatus*(Yusof and Graham, 1977), *Flammulina velutipes*(Lee and Kinugawa, 1981) 및 *Collybia velutipes*(Takemaru, 1957)의 균사 성장력 연구에서 밝혀진 바와 같이 이핵균주가 단핵균주보다 대체로 성장속도가 빠르다는 결과와 유사하다. 그러나, Chandrashekar 등(1981)에 의한 *P. flabellatus*의 연구 결과와는 다른데, 그들은 Yusof와 Graham(1977)이 사용한 것과 동일한 종을 사용하였음에도 불구하고 모균주의 이핵균주가 단핵균주보다 성장속도가 늦다고 보고하였고, 이러한 차이를 단순히 실험에 사용된 모균주의 차이에 기인한 것으로 설명하였으나, 다른 종에서도 동

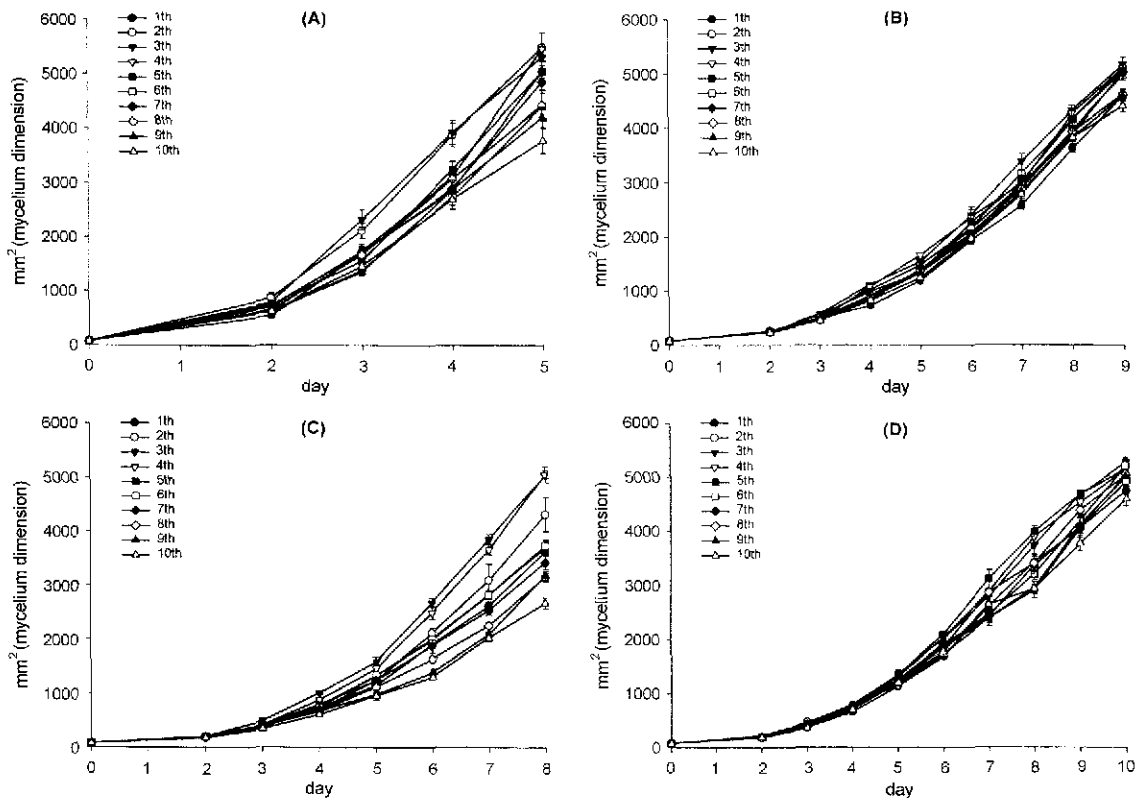


Fig. 1. Comparisons of the growth rates on subcultures. (A), (B), (C) and (D) indicate *Pleurotus ostreatus* dikaryon, *P. ostreatus* monokaryon, *P. eryngii* dikaryon and *P. eryngii* monokaryon, respectively.

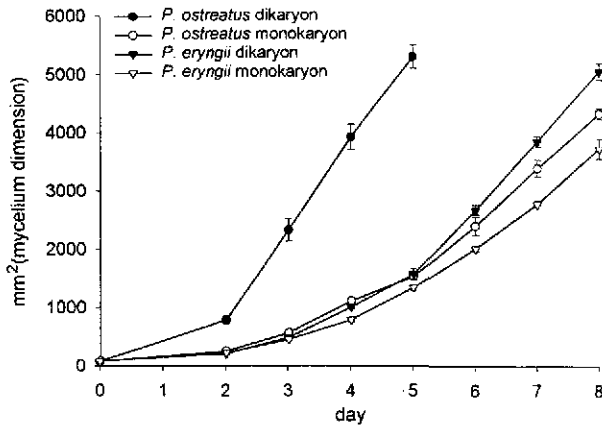


Fig. 2. Comparisons of the growth rate in dikaryon and monokaryon of *Pleurotus* spp. on the 3rd subculture.

일하게 나타나는 현상을 단순히 모균주의 차이로 설명하기에는 무리가 있고, 이는 선발하여 실험에 사용한 단핵균주의 차이에 기인한 것으로도 생각할 수 있다. 또한, 균사성장력에 관여하는 유전자의 대립인자의 발현정도에 의한 것으로도 생각하여 볼 수 있다. 즉, 이핵체에서는 이와 관련된 2개의 대립인자가 발현하거나 적어도 1

개의 대립인자가 발현에 관여하게 될 것이며, 이에 이핵체가 단핵체보다 빠르거나 적어도 동일한 성장력을 보이게 되는 것으로 생각된다.

또한, 느타리버섯 이핵체와 큰느타리버섯 이핵체의 성장을 비교하기 위하여 성장력이 가장 빨랐던 3회째 계대배양의 5일 동안을 비교해 보면, 느타리버섯은 약 53 cm<sup>2</sup> 정도 성장하였고, 큰느타리버섯은 약 16 cm<sup>2</sup> 정도 성장하여, 느타리버섯이 큰느타리버섯 보다 약 4배 빠르게 성장한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 현상은 *P. eryngii*는 일정한 온도구간에서 *P. ostreatus*나 *P. florida*에 비해 성장력이 낮았다는 연구(Zadrazil, 1978)와 일치하였으며, 이러한 현상은 종 특성의 차이에 의한 결과로 볼 수 있다.

### DNA 다형성 조사

계대배양에 따른 genome의 변화를 추적하기 위하여 random primer를 사용하여 RAPD를 수행하였다. 20개의 primer를 사용하여 PCR 증폭을 하였을 때 primer에 따라서는 증폭하지 않는 시료도 있었다. 이러한 시료는 여러 조건에서 반복하여 반응을 유도하여도 전혀 증폭하지는 않았으나 overestimate의 가능성을 제거하기 위

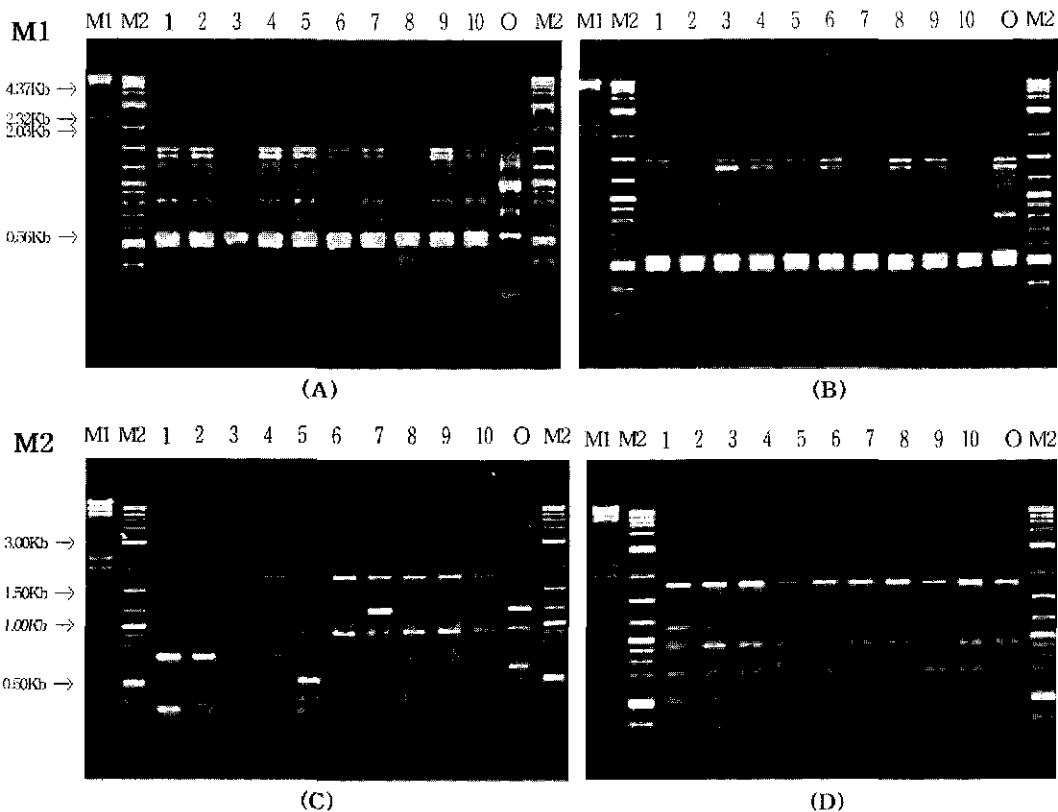


Fig. 3. The electrophoresis pattern of DNA fragments on subculture. (A) and (B) indicate *Pleurotus ostreatus* dikaryon and *P. ostreatus* monokaryon reacted with primer OPE-18, respectively. (C) and (D) indicate *P. eryngii* dikaryon and *P. eryngii* monokaryon reacted with primer OPE-13, respectively. M1,  $\lambda$ /Hind III marker; M2, DNA Ladder marker; lane 1-10, subculture numbers and lane O is outgroup.

하여 본 연구에서는 제외되었다. 따라서 본 연구에서 사용한 종과 계대배양에 따라 다형성을 보인 primer를 선발하여 RAPD를 수행하였다(Table 1).

Primer에 따라서 다양한 DNA band 양상을 나타내었

으며 대부분 2.0 kb에서 0.3 kb 범위였다. 특히, primer OPE-18를 사용하였을 때 느타리버섯의 이핵균주와 단핵균주에서는 각각 11개와 8개의 DNA band가 관찰되었다. 큰느타리버섯에서는 primer OPE-13를 사용하여

**Table 2.** Genetic similarity coefficient matrix among the subcultures based on RAPD markers

Rate	1th	2th	3th	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th
2th	1.000									
3th	0.667	0.667								
4th	0.989	0.989	0.676							
5th	0.957	0.957	0.693	0.968						
6th	0.935	0.935	0.712	0.923	0.957					
7th	0.946	0.946	0.703	0.935	0.968	0.989				
8th	0.633	0.633	0.700	0.615	0.658	0.675	0.667			
9th	0.979	0.979	0.667	0.968	0.936	0.913	0.925	0.608		
10th	0.864	0.864	0.667	0.874	0.864	0.814	0.828	0.575	0.909	
out	0.329	0.329	0.200	0.333	0.354	0.312	0.333	0.281	0.354	0.329
(A)										
Rate	1th	2th	3th	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th
2th	1.000									
3th	0.857	0.857								
4th	0.870	0.870	0.961							
5th	0.923	0.923	0.904	0.944						
6th	0.882	0.882	0.921	0.960	0.958					
7th	0.906	0.906	0.889	0.930	0.925	0.943				
8th	0.870	0.870	0.883	0.895	0.861	0.907	0.901			
9th	0.939	0.939	0.892	0.904	0.899	0.917	0.912	0.932		
10th	0.952	0.952	0.873	0.886	0.939	0.899	0.923	0.857	0.925	
out	0.753	0.753	0.894	0.857	0.800	0.843	0.810	0.810	0.815	0.795
(B)										
Rate	1th	2th	3th	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th
2th	0.906									
3th	0.875	0.882								
4th	0.862	0.899	0.957							
5th	0.818	0.857	0.857	0.845						
6th	0.727	0.765	0.765	0.780	0.771					
7th	0.757	0.769	0.795	0.810	0.800	0.945				
8th	0.720	0.785	0.785	0.800	0.815	0.913	0.966			
9th	0.718	0.780	0.756	0.771	0.786	0.947	0.935	0.946		
10th	0.789	0.800	0.907	0.895	0.805	0.841	0.894	0.884	0.854	
out	0.400	0.377	0.377	0.371	0.394	0.415	0.380	0.400	0.386	0.395
(C)										
Rate	1th	2th	3th	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th
2th	0.846									
3th	0.825	0.925								
4th	0.795	0.849	0.827							
5th	0.757	0.865	0.842	0.841						
6th	0.765	0.864	0.843	0.789	0.857					
7th	0.775	0.850	0.902	0.800	0.816	0.916				
8th	0.722	0.778	0.784	0.776	0.824	0.880	0.892			
9th	0.759	0.810	0.889	0.784	0.800	0.829	0.914	0.822		
10th	0.767	0.849	0.853	0.824	0.783	0.842	0.907	0.866	0.919	
out	0.759	0.810	0.790	0.784	0.773	0.732	0.741	0.685	0.725	0.757
(D)										

(A), (B), (C) and (D) indicate *Pleurotus ostreatus* dikaryon, *P. ostreatus* monokaryon, *P. eryngii* dikaryon and *P. eryngii* monokaryon, respectively.

이핵균주와 단핵균주에서 각각 17개와 10개의 band를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

DNA band의 유무로 작성된 matrix를 기초로 similarity index(Table 2)가 계산되었다. 조사된 2종의 단핵균주가 이핵균주보다 비교적 높은 유사성을 가지고 있었다. 느타리버섯의 이핵체와 단핵체는 각각 57.5%와 85.7%, 큰느타리버섯의 이핵체와 단핵체는 각각 71.8%와 72.2% 이상의 유사성을 나타내었다. 유사성 계수를 평균하였을 때 느타리버섯의 이핵체와 단핵체는 각각 74.1%와 91.1%, 큰느타리버섯 이핵체와 단핵체는 각각 85.2%와 84.8%이었다.

유사성 지수에서 현저한 차이를 보이는 것은 느타리버섯 이핵체가 가장 낮은 유사성을 갖는다는 것이다. 이는 원형느타리 품종인 1호, 2호 그리고 3호간의 유사성의 정도가 50~75%(Kim and Kang, 1998)이라고 한 결과와 양송이 버섯 품종간의 유사도가 약 42.9~80.4%인 것(Song *et al.*, 2000)과 비슷한 수준이다. 이러한 결과는 연속적인 계대배양에 의해 품종으로 분화 될 만큼의 유전적 변이가 일어난 것으로 볼 수 있으며, 이의 원인으로서는 본 연구에서 조사한 성장력과 관련이 있는 것으로 생각된다(Fig. 2). 성장속도가 빠르다는 것은 동일한 시간에 많은 세포분열을 한 것으로 보여지며, 세포분열 횟수가 증가함에 따라 genome 상에서 유전적 변화가 일어날 가능성이 높아진다.

또 다른 원인으로는, 느타리버섯의 이핵체에서 핵간에 예상외로 많은 빈도의 유전자 교환이 일어났을 가능성으로도 생각해 볼 수 있다. 큰느타리버섯에서는 이핵체와 단핵체의 성장속도와 유사성의 정도가 거의 동일하다. 느타리버섯과는 다른 성장속도 양상을 보이는 것은 종 특성의 차이로 볼 수 있으나 또한 다음과 같은 설명도 가능하다. 즉, 두 종은 동일한 속에 속하지만 이는 형

태적 분류에 의한 것이나, 실제로는 현재 분류학상에서 인식하는 것보다는 유연관계가 더 먼 종일 수도 있으며, 만일 더 먼 종이라면 생리적인 면이나 genome 구조에 있어서 현저한 차이를 나타낼 것이다. 종에 따라서는 서로 다른 생존전략을 가지고 있으므로 큰느타리버섯은 느타리버섯과는 달리 두 핵간에서 일어나는 유전자 교환에 대한 어떤 특별한 shelter를 갖고 있어 변화에 적응하고 있을 수 있다. 그러나, 두 종간의 생리적·유전적 및 생태적 차이가 명확히 알려져 있지 않아 그 원인을 명확히 해석하기는 어렵다.

band matrix를 기초로 Neighbor-Joining(N-J) tree와 parsimony tree가 작성되었다. 두 tree는 유사한 topology이었으므로 N-J tree만을 나타내었다(Fig. 4). bootstrap 확율은 매우 낮았을지라도 각 branch의 분기 및 clustering 양상이 무작위하다. 이는 genome 상에서 유전적 변이가 매우 무작위하게 일어나고 있음을 시사하는 것이다.

또한, RAPD에서 나타나는 DNA band는 genome 상에서 우연히 일치하는 primer 부위에서 증폭한 DNA이므로 동일한 크기일지라도 primer 내부의 염기서열의 유사성은 기대할 수 없다. 또한 동일한 DNA 크기에서의 변이를 DNA band 크기만으로 추적은 불가능하다. 따라서 본 연구에서 사용한 DNA maker는 tree의 topology에 영향을 줄 수도 있으며, genome 상에서 일어나는 유전적 변이에 대한 정보는 보다 정확히 제공하여 줄 수 있는 maker로 확인되어야 할 것이다.

계대배양에서 얻어진 중요한 결론은 횟수에 따라 다양한 DNA band 양상을 보였고, 단핵체보다 이핵체에서 많은 변이가 일어난다는 것이다. 이는 *Flammulina velutipes* 백색 재배종에서 분리된 단핵균주가 모균주인 이핵균주에 비해 균사생장의 변이가 적었다는 보고(Kong *et al.*, 1997)와 일치하며, 균사 성장중에 genome

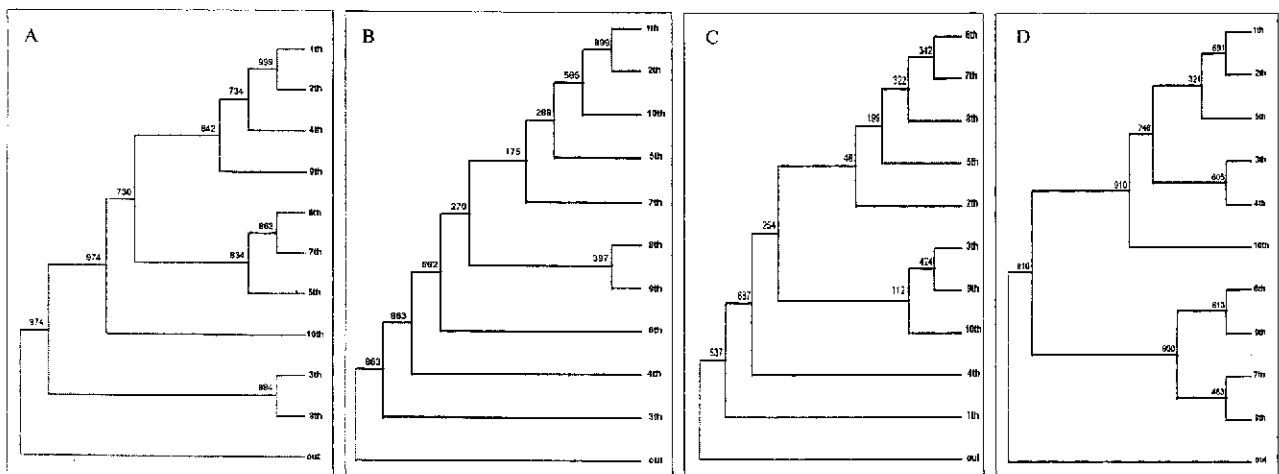


Fig. 4. Neighbor-Joining (N-J) tree made by genetic similarity matrix of subcultures on RAPD analysis. A, B, C and D indicate *Pleurotus ostreatus* dikaryon, *P. ostreatus* monokaryon, *P. eryngii* dikaryon and *P. eryngii* monokaryon, respectively. Values on the branch indicate the confidence of 1,000 bootstrap replicates.

상에서 어떤 유전적 변이가 일어났음을 의미한다. 이러한 작용이 균주의 장기적인 보존 사용으로 인한 균의 퇴화를 야기시킬 수도 있다.

본 연구의 결과로 균주의 계대배양 보존 시 빠른 생장을 하는 이핵균주보다는 단핵균주가 보다 유전적으로 안전한 것으로 판단된다. 따라서, 버섯 균사체의 변이를 최소화 하기 위해서는 단핵균주를 보존하여 필요시 교배하여 이핵균주로 만들어 사용하는 것이 더욱 유전적으로 안정적이고 새로운 신품종의 육성에도 유용할 것이다. 그러나 이러한 방법으로 균주를 보관하여 사용할 때에는 보존 전에 각 단핵균주의 유전적 특성이 조사되어야 하고 이를 기초로 이핵체로 융합하여 사용하여야 할 것이다.

## 적 요

본 연구의 목적은 느타리버섯과 큰느타리버섯의 균사체 계대배양에 따른 유전적 변이 양상을 조사하고, 각각의 이핵체와 단핵체를 RAPD 방법으로 계대배양 횟수에 따른 변이를 조사하는 것이다. 또한, 유전적 변이와 성장력과의 관계를 추적하기 위하여 계대배양 횟수 및 종에 따른 성장력을 조사하였다. 그 결과, 균사성장력은 대체적으로 3회와 4회째 계대배양 때의 성장속도가 가장 빨랐으며, 5회째 이상부터는 감소하였다. 느타리버섯 이핵체는 가장 빠른 성장속도를 보였으며, 느타리버섯 단핵체와 큰느타리버섯 이핵체, 단핵체는 거의 비슷한 속도로 성장하였다. 또한, 느타리버섯의 이핵체와 큰느타리버섯 이핵체 간의 성장속도는 동일한 조건에서 약 4배의 차이가 났다.

유사성 조사에서는 느타리버섯 이핵체는 57.5%, 단핵체 85.7%, 큰느타리버섯 이핵체는 71.8%, 단핵체 72.2% 이상의 유사성을 나타내었다. 균주의 변이는 성장속도와 균주의 type과 관계가 있는 것으로 생각된다. 성장속도가 빠른 균주가 느린 균주보다 변이가 많이 나타난다는 것을 알 수 있었으며, 이핵균주보다는 단핵균주가 유전적으로 안전한 것으로 판단된다. 그러나, phylogenetic tree에서는 종, 균주 type, 균주 성장속도 및 계대배양 횟수와는 무관하게 branch가 분기되고, grouping 되었다. 결론적으로, 균사체의 많은 계대배양은 성장속도를 저하시키고, 유전적 변이를 야기시키는 요인으로 작용하며, 동일한 조건의 배양에서 이핵균주로 배양 보존하는 것보다는 단핵균주로 배양 보존하는 것이 종균제조와 육종에 유리한 것으로 사료된다.

## 참고문헌

김영호, 김경수, 공원식, 유창현. 1995. 버섯 우량 형질 변화 방지에 관한 연구. 시험연 구보고서, 농촌진흥청 농업과학 기술원. Pp. 677-683.

류영현. 1996. 느타리 버섯 특성유지에 관한 시험. 농촌진흥청

연구사업연보, 농촌진흥청. Pp. 743-745.

이윤혜, 손서규, 박우길. 1996a. 느타리버섯 재배체계 개선 및 종균 활력 검사. 농촌진흥청 시험 연구사업연보, 농촌진흥청.

\_\_\_\_\_, 지정현, 복진덕. 1996b. 종균의 활력유지에 관한 연구. 농촌진흥청 시험연구사업연보, 농촌진흥청.

Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**: 183-185.

Chandrashekar, T. R., Bano, Z. and Rajarathnam, S. 1981. Incompatibility and growth in *Pleurotus flabellatus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**: 491-495.

Chiu, S. W., Kwan, H. S. and Cheng, S. C. 1993. Application of arbitrarily primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species with emphasis on *Lentinula edodes*. In: Shiu Ting Chang, John A. Buswell, and Philip G. Miles. Eds. Genetics and breeding of edible mushroom. Gordon and Breach Science Publishers. U.S.A.

Choi, I. Y., Choi, J. S., Yu, Y. J. and Lee, W. H. 2001. Analysis of genetic relationship of entomogenous fungi in Korea by morphological characteristics and RAPD. *Korean J. Mycology* **29**: 34-40.

Ellis, J. J. 1979. Preserving fungus strains in sterile waters. *Mycologia* **7**: 1072-1075.

Graham, G. C., Mayer, S. P. and Henry, R. T. 1994. Amplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques* **16**: 175-269.

Hwang, S. W. 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid-nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia* **60**: 613-621.

Jong, S. C. 1978. Conservation of the cultures. Pp 119-135. In: Chang, S. T. and Hayes, W. A. Eds. The biology and cultivation of edible mushroom. Academic Press. New York.

Khush, R. S., Becker, E. and Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2971-2977.

Kim, H. N. and Kang, K. H. 1998. Molecular identification of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* cultivars using DNA fingerprinting. *J. Natural Science Research Institute* **11**: 102-106.

Kobayashi, T. 1984. Maintaining cultures of Basidiomycetes by mineral oil method. I. *Bulletin of Forestry and Forestry Products Research Institute* **325**: 141-147.

Kong, W. S., Kim, D. H., Kim, Y. H., Kim, K. S., You, C. H., Byun, M. O. and Kim, K. H. 1997. Genetic variability of *Flammulina velutipes* monosporous isolates. *Korean J. Mycology* **25**: 111-120.

Lambert, E. B. 1959. Improving spawn cultures of cultivated mushroom. *Mushroom Science* **4**: 33-51.

Lee, D. H., Kim, C. J. and Shin, K. S. 1998. Preservation of mushroom cultures in sterile distilled water. *Korean J. Mycology* **26**: 91-96.

Lee, P. J. and Kinugawa, K. 1981. A breeding method for *Flammulina velutipes*. I. Selection of monokaryotic strains by the use of testers. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **22**: 89-102.

Lee, Y. H., Chi, J. H., Kim, Y. H. and Yu, S. H. 1999. Comparison in productivity of *Pleurotus ostreatus* sawdust spawn under different storage conditions. *Korean J. Mycology* **27**: 319-321.

Li, Z. Q. and Chen, Y. Y. 1981. An evaluation of mineral oil seal preservation of Basidiomycetes cultures. *Acta Microbiologica Sinica* **21**: 45-52.

Lynch, M. 1990. The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* **7**: 478-484.

- McGinnis, M. R., Padhye, A. A. and Ajello, L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic *Actinomyces* in sterile distilled water. *Appl. Microbiol.* **28**: 218-222.
- Peberdy, J. F., Hanifah, A. M. and Jia, J. H. 1993. New perspectives on the genetics of *Pleurotus*. In: S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. Eds. Mushroom biology and mushroom products. Pp. 55-62. The Chinese University Press.
- Peng, J. T. and Wu, L. C. 1972. Variations in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* **8**: 103-113.
- Saito, N. and Nei, M. 1987. The neighbor joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Smith, D. and Onions, A. H. S. 1983. A comparison of some preserving techniques for fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **80**: 333-337.
- Song, S., Zeng, W., Wang, Z. and Su, W. 2000. RAPD analysis of species diversity and genomic differences in *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* **15**: 191-200.
- Sunagawa, M., Neda, H. and Miyazaki, K. 1995. Identification of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mushroom Science* **14**: 141-145.
- Takemaru, T. 1957. Genetics of *Collybia Velutipes*. III. Growth rates of certain strains. *Biol. J. Okayama Univ.* **3**: 182-186.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Multiple alignment program. European Molecular Biology Laboratory. Meyerhofstrasse 1 D69117 Heidelberg, Germany.
- Williams, J. G. K., Kubeik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid Res.* **8**: 6531-6535.
- Yusof, N. and Graham, K. M. 1977. A preliminary genetic study of a local edible mushroom *Pleurotus flabellatus*. *Mol. Appl. Biol.* **6**: 59-66.
- Zadrzil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. *Mushroom Science* **5**: 524-530.
- Zhang, Y. and Molina, F. I. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**: 17-20.