팽이버섯의 핵형분석과 균주 사이의 핵형 다양성

이송희 · 이미경 · 김나리 · 이창윤¹ · 이현숙*

경상대학교 미생물학과, ¹그린피스 제 5농장

Electrophoretic karyotype of *Flammulina velutipes* and its variation among cultivars

Song Hee Lee, Mi-Kyoung Lee, Na-Ri Kim, Chang-Yun Lee¹ and Hyun-Sook Lee*

Department of Microbiology and Research Institute for Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

¹Korea Green Peace 5th Farm, 715-7 Haksanri, I-seomyun, Chungdogun, Gyeongbuk, Korea

ABSTRACT: The karyotype of *F. velutipes* Korean cultivar, Fv 3-6, was compared with those of Japanese cultivars, Fv 0-1, Fv 1-5, Fv 11-1, by CHEF gel electrophoresis. The Korean cultivar, Fv 3-6, showed the difference from the three Japanese cultivars in number and size of chromosomes; the Fv 3-6 had two and one more chromosomes than Fv 0-1 and Fv 11-4, and Fv 1-5 had, respectively. The karyotyping by CHEF gel electrophoresis is quite suitable to define new Korean cultivars against Japanese cultivars.

KEYWORDS: CHEF gel electrophoresis, *Flammulina velutipes*, Karyotype, Mushroom, Polymorphism

서 론

팽이버섯 (*Flammulina velutipes*)은 한국을 비롯한 세계 각지의 온대에서 한 대에 걸친 지역에 널리 분포하고 있다. 자연계에서는 활엽수의 부후목에서 많이 발견되고 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 주로 분해하여 영양에 이용하는 갈색 목재부후균이며, 한국에서는 늦가을부터 초겨울에 걸쳐 팽나무 그루터기에서 다발로 발생되고 있다. 이 버섯의 군사 생장 최적온도는 22-25°C이며 자실체 형성 최적온도는 14-17°C이다. 야생종은 재배종과는 다소 차이가 있는데 야생종은 자실체 색이 황갈색 내지 밤색이고

갓 직경과 대의 굵기가 크며, 대가 짧은 것이 특징이다. 그러나 인공재배 되고 있는 품종은 소비자의 기호에 맞추어 자실체의 색택을 백색 내지 다모항백색인 것으로 돌연변이 시키고 재배사의 CO₂농도 등의 환경을 조절하여 갓 크기는 10 mm, 대 길이는 100-140 mm, 직경은 2-4 mm로 야생종과는 형태가 다르게 재배하고 있다.

한국에서 재배되고 있는 버섯 중 팽이버섯과 같은 병재배 버섯은 자동 기계화 시설로 노동력이 절감되고, 연중 균일한 생산을 할 수 있다. 높은 단백질 함량과 항암효과 및 혈중 콜레스테롤 감소효과 (Ikekawa *et al*, 1985; Komatsu *et al*, 1963; Leung *et al*, 1997)가 밝혀져 국민소득 증가와 함께 소비량도 꾸준히 증가하고 있다. 하지만 국내 육성품종 점유율은 2011년 기준 21%이며, 품종등록이 제대로 이루어지지 않은 실정이다 (Knowledgeworks Co., 2012). 게다가 한국에서 1998년에 발효된 국제신품종보호동맹 (International Union for the Protection of New Varieties of plants, UPOV)에 2002년에 가입하였고, 2008년부터 팽이버섯이 품종보호 대상에 해당됨에 따라 종균분쟁 및 로열티 지급에 관한 문제가 대두되었으며, 일본과 개별계약에 의해 2010년 한 해 약 10억 원의 로열티를 지불하였다 (Knowledgeworks Co., 2012). 이에 따라 팽이버섯 종균의 국내 개발과 이 개발 종균의 권리보호가 중요해졌으며, 시장성을 가진 팽이버섯 종균개발 및 개발

J. Mushrooms 2014 March, 12(1):63-66
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2014.12.1.63
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
© The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
E-mail : hslee@gnu.ac.kr
Tel : +82-55-772-1321, Fax : +82-55-759-5199

Received February 14, 2014
Revised February 21, 2014
Accepted February 26, 2014

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. Condition of CHEF gel electrophoresis for the separation of chromosomal DNA

	Condition 1 ^a			Contion 2 ^b		
	Block 1	Block 2	Block 3	Block 1	Block 2	Block 3
Run time (hr)	30	72	40	48	72	40
Switch time (sec)	1500-1800	900-1500	300-1200	1500-1800	900-1500	900-1200
Voltage (V/cm)		1.8			1.8	
Angle (°)		106			106	

^aCondition 1; Condition of CHEF gel electrophoresis for *F. velutipes* cultivars, Fv 3-6, Fv 0-1 and Fv 11-4.^bContion 2; Condition of CHEF gel electrophoresis for *F. velutipes* cultivars, Fv 1-5 and Fv 11-4.

종균 권리보호를 위한 근거 마련이 시급하다. 하지만 현재 분류되고 있는 형태적인 특징에 의한 종균 구분은 환경조건에 따라 자실체의 형태가 달라지고, 새로운 종균을 개발하더라도 각 버섯종류마다 소비자가 선호하는 형태가 한정되어 있어 새로운 종균이 개발되더라도 기존과 비슷한 형태의 종균이 개발 될 수밖에 없기 때문에 분류의 기준이 적합하지 않은 상황이다. 이에 따라 종균 개발자는 자신의 권리를 보호하고 종균분쟁에 대응하기 위해 분자생물학적 마커 개발을 위한 연구를 진행하고 있으나 (Palapala *et al*; 2002, Su *et al*; 2008, Zhang *et al*; 2010), 마커 탐색을 위한 유전자 정보가 제한적 이다. 이에 본 연구에서는 종균에 따라 핵형이 매우 다양하게 나타나는 선행 연구자들의 팽이 버섯 핵형분석 결과 (Kim *et al*; 2000, Park *et al*; 2010, Tanesaka *et al*; 2003)를 바탕으로 최근 국내에서 개발한 종균인 Fv 3-6과 일본에서 수집한 Fv 0-1, Fv 1-5, Fv 11-4 종균의 핵형 차이점을 확인하여 종균분쟁 시 이에 대응하기 위한 자료 확보 및 각 종균의 분자생물학적 마커를 탐색하는데 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 균주 배양

균주는 팽이 버섯 중에서 한국 농촌진흥청에서 육종하여 한국 그린피스 제 5농장에서 분양한 Fv 3-6 (백설)과 일본 품종인 Fv 0-1, Fv 1-5, Fv 11-4를 사용하였다. 균사는 평판 배지에서 일차 배양한 후, 균사체를 직경 1 cm의 디스크 형태로 떼어내어 500 ml의 MCM배지에 재 접종한 뒤 25°C, 120 rpm에서 10일 동안 배양하였다.

균주의 핵 분리

준비된 균사를 액체질소에 담그고 막자사발로 갈아 가루형태로 만들었다. 여기에 균사량 4배의 extraction buffer (10 mM Tris-HCl; pH 9.5, 10 mM EDTA, 100 mM KCl, 0.5 M sucrose, 4 mM spermidine-HCl, 1 mM spermine, 10% 2-mercaptoethanol)를 가하여 15분간 방치하였다. 이

를 Miracloth를 이용해 거른 뒤 1/200 부피의 Triton X-100을 첨가하여 15분간 더 방치하였다. 균사용액을 400 g, 4°C에서 30분간 원심 분리하여 침전물에서 핵을 수거하였다. 이를 약 300 μ l의 extraction buffer (0.5 M EDTA; pH 9.5, 1% *N*-lauroylsarcosine, 1 mg/ml proteinase K)에 녹인 뒤 50°C에서 5분간 예열한 다음 동량의 1.6% InCert agarose (Lonza)와 균질화 하여 Plug Mould (Bio-Rad)에 넣어 굳혔다. 굳은 plug들은 lysis buffer에 넣은 뒤 24시간 동안 반응 시켰다. 이를 50 mM EDTA에서 3회 세척 한 다음 50 mM EDTA를 가하여 4°C에서 보관하였다.

Contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) gel electrophoresis

14°C의 1 X TAE electrophoresis buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)와 0.8% chromosomal grade agarose를 이용해 CHEF Mapper system (Bio-Rad)에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 조건은 Table 1에 정리하였다. 전기영동이 끝난 뒤 분리된 chromosome을 ethidium bromide에서 30분간 염색시킨 후 확인하였으며 size marker로는 *Schizosaccharomyces pombe*와 *Hansenula wingei*의 chromosome을 사용하였다.

결과 및 고찰

CHEF 젤 전기영동을 이용한 팽이버섯의 핵형분석

한국에서 개발된 팽이버섯 균주인 Fv 3-6과 일본에서 수집한 팽이버섯 균주인 Fv 0-1, Fv 1-5 및 Fv 11-4의 핵형을 분석하였다. 마커인 *S. pombe*와 *H. wingei*의 chromosomes과 크기를 비교한 결과 Fv 3-6은 약 4.6, 4.4, 4.0, 3.7, 3.3, 3.0, 2.9, 2.8, 2.3, 2.0, 1.7 Mb의 11개의 chromosome이 존재하였고, Fv 0-1은 약 4.4, 4.0, 3.7, 3.1, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 1.6 Mb의 9개의 chromosome이, Fv 1-5는 약 4.4, 4.0, 3.7, 3.5, 3.3, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 1.6 Mb의 10개의 chromosome이, Fv 11-4는 약 4.4, 4.0, 3.7, 3.3, 3.0, 2.9, 2.8, 2.7, 1.6 Mb의 9개의 chromosome이 존재하였다

Fig. 1. Electrophoretic karyotype of *F. velutipes* cultivars. (A) Electrophoretic karyotype of *F. velutipes* cultivars, Fv 3-6, Fv 0-1 and Fv 11-4. (B) Electrophoretic karyotype of *F. velutipes* cultivars, Fv 1-5 and Fv 11-4. (C) The profiles of chromosomal DNA bands of Fv 3-6, Fv 0-1, Fv 1-5 and Fv 11-4. Fv 3-6; *F. velutipes* cultivar newly developed in Korea. Fv 0-1, Fv 1-5, Fv 11-4; *F. velutipes* cultivars collected in Japan. *S. pombe* and *H.wingei*; Size markers.

Table 2. Estimated size of chromosomal DNA *F. velutipes* cultivars.

Chromosome No.	Chromosome size (Mbp)			
	Fv 3-6	Fv 0-1	Fv 1-5	Fv 11-4
I	4.6	4.4	4.4	4.4
II	4.4	4.0	4.0	4.0
III	4.0	3.7	3.7	3.7
IV	3.7	3.1	3.5	3.3
V	3.3	3.0	3.3	3.0
VI	3.0	2.9	3.0	2.9
VII	2.9	2.8	2.9	2.8
VIII	2.8	2.7	2.8	2.7
IX	2.3	1.6	2.7	1.6
X	2.0		1.6	
XI	1.7			
Total size	34.7	28.2	31.9	28.4

(Fig. 1). 이들 4 종류 균주의 핵형을 비교해 보았을 때 4 종류의 균주 모두 chromosome의 전체 길이가 달랐으며, chromosome의 개수 또는 특정 chromosome의 길이가 다른 것을 확인하였다 (Table 2). 특히 Fv 3-6의 경우에는 다른 3종의 균주와 비교했을 때 Fv 0-1, Fv 11-4 보다는 2개의 chromosome이 더 존재하였으며 Fv 1-5 보다는 1개의 chromosome이 더 존재하는 등 핵형 패턴이 비슷한 일본 균주들과는 다른 핵형패턴을 나타내었다. 이는 한국에서 개발한 Fv 3-6 균주가 일본에서 수집한 나머지 세 균주와는 모균주가 다른 것으로 판단되며, 이는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 이용해 한국, 중

국 및 일본 중균의 품종 구분 연구를 한 결과 한국과 일본 균주의 유전적 변이도가 30-45% 차이나는 것을 확인한 연구 (Kim and Jeong, 2011)와 유사하다.

팽이 버섯에서 균주간의 유전적 변이도를 확인하고 특정 균주를 확인하기 위한 분자생물학적 마커를 개발하는 실험은 주로 팽이 버섯의 Simple Sequence Repeat (SSR) 또는 Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence를 이용하여 보고되어있다 (Kong *et al*, 1997; Kim and Jeong, 2011; Su *et al*, 2008; Zhang *et al*; 2010). 하지만 이러한 방법은 각 sequence 정보가 짧게 반복되며 chromosome 전체에 존재한다는 특성으로 인해 유의적인 차이를 찾는 데 문제가 있다. 따라서 유전체 정보 전체의 전체적인 패턴을 나타내는 핵형정보와 SSR, ITS 정보를 함께 이용한다면 각 균주의 염기서열이 다른 특정 부위를 찾고 이러한 차이점을 이용하여 각 균주의 분자생물학적 마커를 제작하여 더 확실한 품종구분을 하는데 도움이 될 것이다.

적 요

한국에서 개발된 팽이버섯 균주 Fv 3-6과 일본에서 수집한 팽이버섯 균주 Fv 0-1, Fv 1-5 및 Fv 11-4의 핵형을 CHEF gel electrophoresis 방법으로 분석 하였다. 그 결과 4종류의 균주 모두 chromosome의 전체 길이가 달랐으며, chromosome의 개수 또는 특정 chromosome의 길이가 다른 것을 확인하였다. 특히 Fv 3-6의 경우에는 다른 3종의 균주와 비교했을 때 Fv 0-1, Fv 11-4 보다는 2개의 chromosome이 더 존재하였고 Fv 1-5 보다는 1개의 chromosome이 더 존재하였으며 핵형패턴이 유사한 일본 수집 균주들과는 다른 핵형패턴을 나타내었다. 이러한

CHEF gel electrophoresis 방법은 품종간의 차이를 SSR이나 ITS 정보를 이용한 방법보다 더 정확하게 구분할 수 있을 것이라고 생각한다.

감사의 말씀

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발과제 (버섯수출 연구사업단)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ikekawa T, Maruyama H, Miyano T, Okura A, Sawaskai Y, Naito K, Kawamura K, Shiratori K. 1985. Proflamin, a new antitumor agent: preparation, physicochemical properties and antitumor activity. *Jpn J Cancer Res.* 76:142-148.
- Kanatsu N, Terakawa H, Nakanishi K, Watanabe Y. 1963. Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumour activities. *J Antibiot.* 16:139-143.
- Kim D, Tamai Y, Azuma T, Harada A, Ando A, Sakuma Y, Miura K. 2000. Analysis of the electrophoretic karyotype of *Flammulina velutipes*. *J Wood Sci.* 46:466-469.
- Kim JB, Jeong JI. 2011. Genetic variation in *Flammulina velutipes*. *J Life Sci.* 21:1434-1442.
- Knowledgeworks Co. 2012. Strategic plan for the 'Golden Seed Project' through analysis of the seed industry. *IPET*. Final report.
- Kong WS, Yoo CH, Cha DY, Kim DH, Kim KH. 1997. Genetic relationship of *Flammulina velutipes* based on ribosomal DNA and RAPD analysis. *RDA J Indus Crop Sci.* 29:28-40.
- Leung MYK, Fung KP, Choy YM. 1997. The isolation and characterization of an immunomodulatory and anti-tumor polysaccharide preparation from *Flammulina velutipes*. *Immunopharmacology.* 35:255-263.
- Palapala VA, Aimi T, Inatomi S, Morinaga T. 2002. ITS-PCR-RFLP method for the distinguishing commercial cultivars of edible mushroom, *Flammulina velutipes*. *J Food Sci.* 67: 2486-2490.
- Park YJ, Kim JK, Kong WS, Song ES, Lee CS, Kim H, Hahn JH, Kang HW, Lee BM. 2010. Electrophoretic karyotyping and construction of a bacterial artificial chromosome library of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Microbiol Res.* 165:321-328.
- Su H, Wang L, Liu L, Chi X, Zhang Y. 2008. Use of inter-simple repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *J Appl Genet.* 49:233-235.
- Tanesaka E, Kinugawa K, Okabe K, Kitamura Y, Ogawa M, Yoshida M. 2003. Electrophoretic Karyotype of *Flammulina velutipes* and its variation among monokaryotic progenies. *Mycoscience.* 44:67-69.
- Zhang R, Hu D, Zhang J, Zuo X, Jiang R, Wang H, Ng TB. 2010. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*. *JBB.* 110:273-275.