

## 한국산 송이버섯에서의 18s ribosomal DNA 서열

이상선\* · 홍성운

한국교원대학교 (생물교육전공)

### The 18s rDNA Sequences of the Basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea

Sang-Sun Lee\* and Sung-Woon Hong

Korea National University of Education, Cheong-Won Kun,  
Chung-Puk 363-791, Korea

**ABSTRACT:** The 18S rDNA sequences of *Tricholoma matsutake* (TM=*T. caligatum* var. *nauseoum*) collected in Korea were analyzed for the ectomycorrhizal fungi in the roots of *Pinus densiflora*. The 514 base pairs of rDNA region were synthesized by UF-5 and UR-6 primers, and double checked in the base pair. The sequence of four strains synthesized were all identical in this work, but different from those done by the previous workers. The basidiocarps collected in this work were identified to *T. matsutake* after searching the 18s rDNA by the BLAST in NCBI. Only several base pairs of 18S rDNA analyzed from other related basidiocarps were different from our analyses of 18S rDNA. The dendrogram were made based on the sequences of the 514 bp 18S rDNA by CLUSTAL-X alignment program. The groupings of the species at the level of genus in the dendrogram were well constructed.

**KEYWORDS:** 18S rDNA, *Tricholoma matsutake*, Sequences, Pine-mushroom, Basidiocarps, PCR

송이 [*Tricholoma matsutake* Singer=*T. caligatum* (Viv) Richen var. *nauseoum* (Blytt.) Bon; Courtecuisse & Duhem, 1995]는 높은 가격의 버섯으로, 우리 나라에서는 추석 전후로 채집된다(Lee, 1991). 최근, 송이는 임산 부산물에서 높은 농가 소득원으로 각광을 받고, 단위 시간당 생산량 혹은 농가 소득이 가장 높은 것으로 알려지고 있다. 우리 나라 전지역에서 송이가 생산된다고 보고되고 있지만, 지역적으로 동해안의 태백산맥을 낀 산악지역인 경북 청하 보경사 주변(영일군, 1986~87)에서 경북 울진 지역(울진군, 1989~1993)과, 강원 양양 지역(강원도, 1994~현재)으로 대량 송이 생산 지역이 북상하여 옮겨지고 있는 것으로 관찰되었다(KFR, 1981a; 1981b; 1984; 1986). 그러나, 우리 나라의 송이생산과 그 중요성에 비추어 볼 때에, 송이에 대한 기본적인 균에 관한 연구는 모두가 산발적이고 미진한 상태이다.

과거, 송이 생산은 일본으로 수출 목적으로 개발되어 자연 채취가 이루어졌으나, 최근에는 국내 수요에 대한 충당과 송이 생산지 보호를 중심으로 연구가 시도되고 있다. 특히, 최근 연구에서는 송이산지 중심으로 송이와 관련된 소나무의 균상을 중심으로 agro-forestry적인 연구가 임업 연구원 산림 미생물실을 중심으로 진행되고 있다. 송이 균사는 소나무(*P. densiflora*) 뿌리에서 관찰되고, 식물과의 관계에서는 외생균근(ectomycorrhizae)으로 설명하고 있다(Ogawa 등, 1978; 1980; Ohara와 Ogawa, 1982). 송이 자실체로부터 많은 균사들이 분리되어 연구되고 있지만, 아직 송이에 대한 인공 배양 기술은 거의 없다. 또한, 인공적인 버섯 생산으로 송이는 많은 시도에도 불구하고 아직은 많은 문제점을 안고 있다(Wang 등, 1995; 1996). 다만, 일본에서는 여러 나라에서 송이 수입과 자국의 송이생산을 위하여 많은 연구가 진행되고 있는 것으로 보고되고 있으나(Ogawa, 1976; 1977a; 1977b; 1977c; 1977d; 1978; 1979a; 1979b), 공

\*Corresponding author

식적으로 인위적인 송이 생산은 아직 보고되지 않고 있다.

최근, 종 동정·분류 혹은 계통분류 연구에서 18s 및 28s ribosomal DNA에 대한 연구가 진행되고 있으며(O'Donnell 등, 1997), 구멍장이 버섯목에 대한 연구로는 18s 및 5.8s와 ITS를 포함하는 ribosomal DNA에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ko 등, 1997). 18s rDNA의 서열은 계통발생학적으로 높은 보존성이 있으며, 속 간의 구별을 확실하게 할 수 있을 정도의 다양성은 가지고 있는 것이 밝혀졌고(Jasalavich 등, 1995), 이들의 연구들은 산림 속에 있는 다양한 외생균 균균 혹은 목재 부식균들에 대한 계통분류적인 연구를 rDNA의 서열을 분석함으로써 이루지고 있다. 송이도 외생균균으로 알려져 소나무 뿌리에서 관련성을 조사하였다(Terashima와 Nakai, 1996). 또한, 동일한 방법으로 식물의 병원균인 *Fusarium*에 대한 연구(Peterson, 1991)와 송이에 대한 연구(Hwang, 1995)가 있다. 이러한 것은 외생균균에 대한 숙주식물의 뿌리에서 외생균균 혹은 병원균의 감염에 대한 직접적인 증거를 확보하기 위한 실험이다. 본 연구는 우리나라 야생송이를 채집하여, 송이의 성격을 파악하는 연구로 진행되었으며, 18s rDNA에 염기 서열을 밝혔다. 송이의 18s rDNA 서열을 밝힘과 동시에 소나무 뿌리에 있는 균을 파악하기 위하여 기본 primer 제작을 위한 기초실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 송이

송이는 1996년 강원 삼척(C)과 홍천(A)에서 채집된 것과 임업연구원 산림 미생물실에서 얻었으며, 중국산 송이(B)는 시장에서 구입하였다. 위 지역은 임업연구원 산림 미생물실에서 중점적으로 재료를 채취하는 지역이다. 또한, 1997년 경북 팔공산 주변에서 송이(L)를 채집하여 동정하였다(Imazeki & Hongo, 1984; Singer, 1986; Smith, 1973). 채집된 송이는 깨끗이 세척한 후에 냉동고에 보관하였다.

### DNA추출

멸균된 막자사발에 냉동 보관된 송이와 균사체를 넣고 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 1g 당 3 mL의 extraction buffer(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS)를 넣고 잘 혼합하여 원심분리한 상등액에 1/6부피의 2-propanol을 넣고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 침전시켰다. 이 침전물에 5 mL의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하고, proteinase K와 RNase A를  $35^{\circ}\text{C}$ 에 50 min 간 처리한 후, 동일 부피의 PCI(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)에 1회, CI 용액(chloroform:isoamylalcohol=24:1)에 3회 처리한 후, 1/10 부피의 3M sodium acetate와 2부피의 ethanol을 가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 침전시켰다. 이를 원심분리하여 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 세척하고 건조시킨 후 500  $\mu\text{L}$ 의 TE buffer를 넣어 DNA를 용해시켜  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고 필요할 때마다 이용하였다. 이렇게 만들어진 genomic DNA는 Spectrophotometer로 260 nm과 280 nm에서 농도를 확인한 후에, 각각 1.0% agarose 전기영동을 통하여 단일밴드를 확인하였다.

### PCR반응

Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase, dNTP, 18s rDNA PCR primer인 UF5(5'-CGCCAGGGTT TTCC-CAGTCACGACGGTGGTGCATGGCCG-3')와 UR6(5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-ACCGCAGGTTTCACCTAC-3')는 (주)바이오니아에서 구입하여 이용하였다(Terashima와 Nakai, 1996). PCR 반응은 일반적인 방법(Williams 등, 1990)을 기준하여 약간의 변형을 가하였다; 각각의 용량이 50  $\mu\text{L}$ 인 PCR 반응액은 10 $\times$ reaction buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTP 250 nM, Taq<sup>TM</sup> DNA polymerase 1 unit, primer 20 pM, DNA 100 ng 등을 혼합하여 제조하였고, mineral oil을 등 부피로 첨가하였다. 반응조건은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 처리한 후,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 $\rightarrow$  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 1분 $\rightarrow$  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 30 cycles 진행시켰고, 최종적으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시킨 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다(Cook 등, 1996). 여기서 나온 PCR

product 5  $\mu$ l를 취하여 0.8% agarose gel에서 단일 밴드를 확인하였다.

#### DNA sequencing

위 용액에서 PCR 반응시에 사용한 mineral oil을 제거한 후 PCR 반응물을 DNA PrepMate™ ((주)바이오니아)로 정제하여 DNA sequencing을 하였다. 정제된 pellet을 template DNA로 이용하였다. template DNA 2  $\mu$ l을 포함하는 PCR 반응액은 10 $\times$  reaction buffer 4  $\mu$ l, Taq™ DNA polymerase 5 unit, primer 30 pM, d/ddNTP mixture 42  $\mu$ l(G,A,T,C tube 10  $\mu$ l씩 분주함)을 혼합하여 제조하였다. mineral oil을 동 부피로 첨가한 후에 94°C에서 3분간 처리한 후, 94°C에서 30초→55°C에서 30초→72°C에서 1분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 40 cycles 진행시켰다. PCR이 끝나면 4  $\mu$ l의 stop solution을 가하여 94°C에서 2분동안 가열한 다음 6% polyacrylamide gel에 전기영동하고, 전기영동한 유리판을 최종적으로 Silverstar™ staining Kit((주)바이오니아)을 사용하여 염색하였으며(Fig. 1), 자세한 사항은 (주)바이오니아의 사용 설명서를 따랐다.

#### 유사도 분석

*Tricholoma matsutake*의 18s rDNA sequence를 NCBI의 GenBank에 등록된 11종, 16개체의 sequences를 비교하였다. 조사된 18s rDNA sequences는 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih>)의 BLAST search를 통하여 GenBank와 EMBL와 DDBJ와 PDB에 등록된 자료를 이용하였으며, *T. matsutake*와 비슷한 종들의 DNA sequences에 대한 자료를 가지고 계통분류를 하였다. 사용된 DNA 명은 base pair(bp)로 표현하였다(Altschul 등, 1990). 우선, DNA alignment를 한 후에, DNA sequence를 이용하여 서로 다른 DNA bp 사이에 유사도를 비교하였다. CLUSTAL\_X (window interface)를 이용하여 multiple alignment analysis를 하였다(Thompson 등, 1997). 유사도는 PHYLIP 3.5c의 DNADIST를 이용하여 분석하였으며, Treeview32를 이용하여 유사

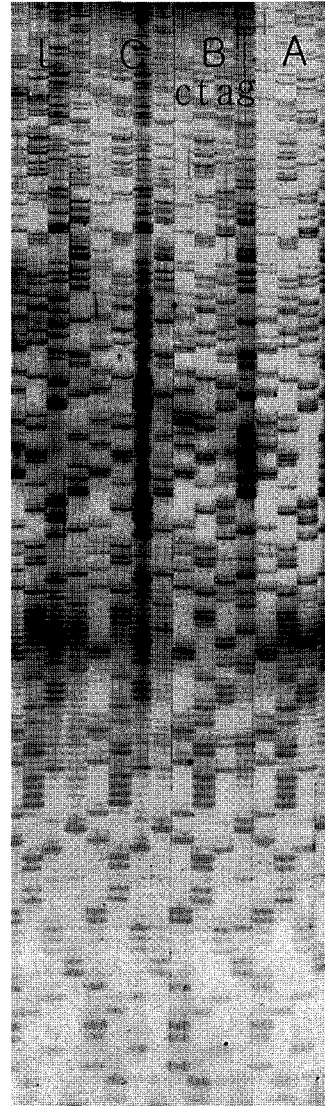


Fig. 1. Analyses of 18s rDNA-514 base pairs using PCR-RAPD synthesized by the primers, UF-5 (GATCAGCTTCTCAGCAATAAGG) and UR-6 (AATAAGGTCGCCGGTGT TTT CGG). The basidiocarps were collected from the areas of Sam-Cheok (marked, C), and Hong-Cheon (marked, A), Kang-Won, and the mountains of Pal-Gong mountain (marked, L) and purchased from China (marked, B). The base pairs of a; adenine, c; cytosine, g; guanine, and t; thymine in the analysis of DNA sequence.

도(dendrogram)를 완성하였다(Felsenstein, 1993).

결 과

송 이

송이는 현재 16군데에서 채집된 자실체(Basidiocarp)가 있으나, 중점적으로 연구된 홍천(A)과 삼척(C)에서 1996년 가을에 채집된 것을 사용하였다. 또한, 대구 팔공산에서 1997년 10월경에 채집한 송이(L)와 중국산 송이(B)를 구입하여 실험에 이용하여 분석하였다. 이러한 송이의 선택은 모든 송이 자실체를 이용하여 18s rDNA를 분석할 수 없어 대표적으로 4개를 선택하여 실험하였다. UF5와 UR6 primer를 이용하여 18s rDNA를 증폭하였다. 증폭된 18s rDNA의 514 bp를 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1은 18S rDNA를 sequencing한 것으로 이를 토대로 sequence를 읽었으며, 그 결과를 결정된 것이 Fig. 2이다. DNA sequence에서 514 bp를 관찰한 것으로 가장 뚜렷하게 나온 것을 실험 결과로 사용하였다. 모두 4개의 다른 지역에서 채집된 송이의 DNA sequence를 한 plate을 사용하여 double checking 하였다.

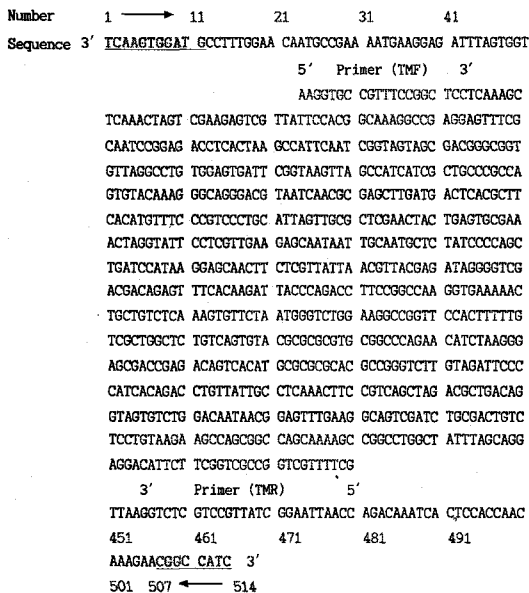


Fig. 2. The 514 nucleotide 18s rDNA sequence of *Tricholoma matsutake* mushrooms collected in Korea. Underline indicate the forward (primer 1 →) and the reverse primers (primer 2 ←).

분석 결과는 사용된 모든 송이의 18s rDNA가 동일하게 결과가 나타났으며, 대표적으로 보여준 Fig. 1은 분석 자료 결과로 나타냈으며, 보는 것과 같이 동일한 결과로 Fig. 2와 같다. 이러한 자료를 토대로 BLAST search을 이용하여 유사한 sequence를 나타내는 종을 분석하였다. 이때 사용된 Database는 NCBI의 GenBank와 EMBL와 DDBJ와 PDB로 구성되어 있다. 본 실험에서 분석된 18S rDNA sequence와 *T. matsutake*가 가장 유사한 것으로 나타났으며, 이는 다른 연구에서 514 bp에서 단지 4 bp가 다른 것으로 나타났다. 이 분석에서 경북 대학교 미생물학과에서 시도한 팔공산 송이(gb/U62538/TMU62538: *T. matsutake*)와는 4 bp가 다른 것으로 나타났고, 이외에 *Lepiota procera*(qb/L36659/LPORRDA: *Lepiota procera*) 및 *Agaricus bisporus*(qb/L36658/AEDRDA: *Agaricus bisporus*) 등이 선정되었다. 그러나, BLAST search에서 얻은 자료를 간단히 분석한 결과로 이루어진 score는 송이(경북대학교 미생물학과)가 가장 유사한 것으로 나타났다. 이들의 균에서 가장 적성도가 높고 관심이 되는 균에 관하여 유사도를 분석하였다. 그러나 현재 사용된 자료에서는 즉 18s rDNA sequence에서는 가장 가까운 종으로 *T. matsutake*로 나타났다.

18s rDNA sequence의 분석을 위해 자료를 취하여 유사도를 알아보았다. 우선, 각각의 균들의 분석을 위하여 18s rDNA sequence를 취하여 각 DNA sequence에 대한 alignment analysis를 하고 이에 대한 차이점을 Fig. 3에 나타내었다. 18s rDNA sequence에서 Fig. 2의 서열(이하 "서열") 27 bp째가 다른 담자낭균과 완전히 달랐으며, 서열 71-80 bp째 사이에서 다른 속의 버섯균과 차이가 났다. 여기서는 최소한 2 bp가 차이를 나타냈으며, 3 bp가 다른 것도 있었다. 송이속과 다른 버섯속간의 구별이 뚜렷하였다. 송이속에 대한 분류는 서열 73-80 bp가 속 분류를 구별할 수 있는 내용의 것으로 관찰되었다.

송이는 그 외 서열 101 bp와 290 bp까지는 크게 차이를 나타내지 않았으나, 서열 292-300 bp에서 최소한 2개 혹은 3개의 bp가 차이가 나타났다. 그러나 송이종과 속의 구분에서 다른 *Agaricus*속과는

Number	12	18	25	38	45	58	61	73	84	94	107	111	181	195	202	239
1	CC-GAA	GCCGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	AAGGCCG	AGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
2	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	AAGGCCG	AGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
3	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	AAGGCCG	AGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
4	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	ACGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
5	YC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATCCCGCG	ACGGCCA	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
6	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	AGTTCACG	ACGGCCG	GIITTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
7	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	ACGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	T	C	GATCCATAA	G	
8	CC-GNA	GCTGAA	GAN	A	A	CG	ATCCACG	ACGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	A	
9	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	G	CG	ATCCACA	ACGGCTG	GGTTTCG	CCTC	CA	C	T	GATCCATAA	G	
10	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATCCACG	GCGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	NATCCATAA	A	
11	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	GTCCACG	GCGGCCG	GGCTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
12	CC-GAA	CCTGAA	GAG	A	A	CG	ATCTCATG	ACGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
13	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	A	CG	ATTCCACG	ACGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
14	CC-GAA	GCTGAA	GAG	A	G	TC	GTCCACG	ACGGCCG	GGCTTCG	GTTT	CG	C	T	GATCCATAA	G	
15	CC-GAA	GCTGAA	NAG	A	A	TC	GTCTACG	ACGGCCG	GGCTTCG	GTTT	TG	C	T	GATCCATAA	G	
16	CC-GAA	GCTGAA	GAG	G	A	CG	ATCTCACG	AAGGCCG	GGTTTCG	CCTC	TG	C	T	GATCCATAA	G	
17	CC-GAA	GCTNAA	GAN	N	A	TC	GTCCACG	ACGGCCG	GGCTTCG	GTTT	TG	C	T	GATCCATAA	G	

Number	257	287	293	308	344	377	385	393	405	413	423	436	444	458	463	501
1	CTCA	G	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	C	GGTCGCG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	G	T
2	CTCA	G	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGTCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
3	CTCA	G	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGTCGCG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
4	CTCA	T	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGCCGCTG	TGCTTCA	ACCGA	A	G	A	A
5	CTCA	G	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGACGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
6	CTCA	G	TTTTTTTG	GAG	A	G	TCAATC	TGACTGTC	G	GGACGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
7	CTCA	G	ACTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGACGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
8	CTCA	G	TTTTTTTG	GAG	G	N	TCNATC	CGACTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
9	CTCA	G	TTTTTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGACGCTG	CGTTTTCG	TCCGA	A	G	A	A
10	CTCA	G	TTTTTTTG	NAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	N	N	A
11	CTCA	G	TTTTCTTG	GAG	G	G	CCGATC	CGCTGTC	G	GGCTTCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
12	CCCA	G	TTTTCTTG	GGG	G	G	TCAATC	TGACTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
13	TTCA	G	ACTCTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	AGACGCTG	CGTTTTCG	ACTGA	A	G	A	A
14	CTCA	G	TTTTTTTG	GAG	G	G	ACGATC	CGTCTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A
15	CTNA	G	TTTTTATG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	T	G	A	A
16	TTCA	G	ACTCTTTG	GAG	G	G	TCGATC	CGACTGTC	G	AGACGCTG	CGTTTTCG	ACTGA	A	G	A	A
17	CTCA	G	TTTTTTTG	GAG	G	G	TCAATC	TGACTGTC	G	GGCCGCTG	CGTTTTCG	ACCGA	A	G	A	A

Fig. 3. The DNA sequences of 18s rDNA (18S ribosomal RNA gene, partial sequence, Length=514) in *Tricholoma matsutake* compared with those of the other mushroom species (A; adenine, C; cytosine, G; guanine, T; thymine in DNA (uracil in RNA), Y; C or T, N; A or C or G or T, and -; not known or null). 1. knue gb/UF-5: *T. matsutake*, 2. gb/U62538/TMU62538: *T. matsutake*, 3. dbi/D 84309/TM518SRDNA: *T. matsutake*, 4. qb/L36659/LPORRDA: *Lepiota procera*, 5. qb/L36658/AEDRGDA: *Agaricus bisporus*, 6. qb/AF026619: *Lycoperdon* sp., 7. dbj/AB002085/AB002085: *T. bakamatsutake*, 8. qb/AF026635/AF026635: *Stropharia rugosoannulata*, 9. qb/AF026605/AF026605: *Laxitextum bicolor*, 10. qb/U59091/PTU59091: *Pleurotus tuberregium*, 11. qb/M94337/BLSRGEA -*Boletus santanas*, 12. qb/AF026622/AF026622: *Calvatia gigantea*, 13. dbj/D85630/RHZ0017B: *Rhizoctonia solani*, 14. qb/AF026593/AF026593: *Phanerochaete chrysosporium*, 15. qb/AF026600/AF026600: *Daedalea quercina*, 16. dbj/D85639/RHZHAM11K: *Rh. solani*, 17. qb/AF026569/AF 026569: *Panus rudis*.

차이를 나타내지 않았다. alignment된 서열의 405 bp 와 430 bp 서열은 최소한 2-3 bp가 차이가 났으며, 서열 405 bp 및 418 bp가 다른 송이버섯속의 버섯과 구별되었다. 이러한 서열의 차이점을 이용하여, 서열에 대한 유사도를 그린 결과, PHYLIP 3.

5c의 여러 가지 분석 방법에서 가장 좋은 계통도를 보여주고 있다 Fig. 4. 여기서 *Rhizoctonia*속의 균들은 동일한 묶음과 송이버섯 속의 동일한 묶음으로 나타났다. 비록, 비슷한 균에는 비슷한 그룹이 형성되고 송이속과 식물 병원균인 *Rhizoctonia*속은 같은

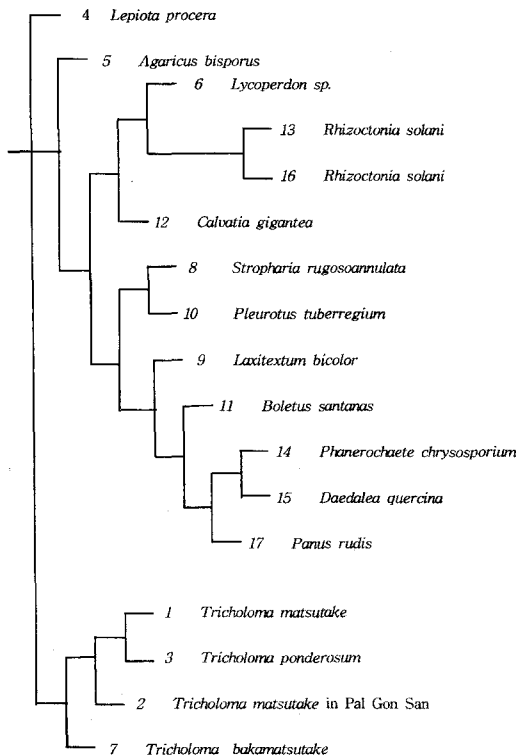


Fig. 4. Dendrogram using the analyses of the 18s rDNA (18S ribosomal RNA gene, partial sequence, Length=541) sequences in *Tricholoma matsutake* compared with those of the other mushroom species.

묶음이 형성되었으나, 다른 균들은 예상밖의 그룹이 형성되었다.

## 고 찰

채집되어 분석된 송이의 18s rDNA 서열이 모두 동일한 것으로 나타났으므로 상당히 보존적인 DNA 서열을 가지고 있는 것으로 보였다. 이러한 보존성이 18s rDNA 서열을 종의 분류에 사용하는 커다란 이유일 것이다(Jasalavich 등, 1995). 본 실험에서는 4개의 다른 지역의 송이를 각각 비교하였으나, 모두 18s rDNA가 동일한 것으로 다른 실험에서 연구한 것과 514 bp에서 4 bp가 다른 것으로 보아, 실험상의 차이점을 나타내는 것으로 생각된다. 우선, 실험의 동일성을 유지하기 위하여, 본 연구에서도 동일한 대구광역시 팔공산에서 채집된 송

이(marked L)를 사용하였다(Hwang, 1996), 그러나, 팔공산에서 채집되어 연구된 송이버섯(gb/U62538/TMU62538: *T. matsutake*)의 18s rDNA 서열과는 4 bp의 차이를 나타내고 있다. 다른 송이버섯속의 3종(*T. pondrosom*과 *T. bskamatsutake*)과 송이가 비교되었다. 다른 종들은 아직 등록되지 않은 것으로 비교할 수가 없었다. 18s rDNA 서열 비교에서는 다른 종과 함께 4 bp가 차이가 났으나, 유사도에서는 차이를 나타내었다. 이러한 것은 서열의 단순한 차이보다는 서열 중에 연속하여 서열의 변화 혹은 DNA 서열의 변화에 대한 질의 변화의 요소를 첨가한 것으로 생각된다. 그러나, 유사도 분석에서 송이버섯속의 종들이 한 그룹으로 나타났고, 식물병원균인 *Rhizoctoina*의 그룹을 볼 때에 18s rDNA 서열분석을 통해 종 동정과 종간 차이점을 구별할 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 rDNA 서열을 이용하여 담자낭균의 계통적인 분류를 시도하였다. 다른 많은 연구에서 이러한 시도가 상당히 긍정적인 결과를 얻었던 것으로 보고되고 있다(Ko 등, 1997). 그러나 본 유사도 분석에서 *Tricholoma*속이 한 묶음을 이루고 있으나, 느타리과에 속하는 버섯의 분석은 계통적인 결과와 일치하지 않았다. 일단 종 및 속의 동정에서 18s rDNA의 서열을 통한 유사도 분석은 만족스러운 결과가 나왔으나, 속 이상에서 균의 계통적인 분류에서는 좋은 결과가 나타나지 않았다. 현재 송이의 18s rDNA에 대한 514 bp의 서열을 밝혔고, 다른 연구자(경북대학교, 미생물학연구실: gb/U62538/TMU62538: *T. matsutake*)와 4 bp의 차이점을 나타내고 있다. 송이의 균사를 탐지할 수 있는 실험에서는 특수한 primer제작이 필요할 것이라고 생각한다. 아래와 같은 sequence를 가진 primer를 제작하여 사용한다면 외생균근균으로서 송이 균사를 탐지할 수 있으며, 토양 속에 있는 송이 균사체의 파악에 도움이 될 것이라 생각한다. 최소한 소나무 뿌리 혹은 토양 속에 있는 송이 균사를 얻어서 송이의 침입 혹은 생태적인 분포에 대한 연구를 위한 기초 실험의 자료로 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

(Primer design)- Specific for *T. matsutake*  
Forward Primer-5'

AAGGTGCCGTTTCCGGCTCC 3'  
Reverse Primer-5'  
GCTTTTGTGGCCGCTGGCTTCTTAC 3"

## 적 요

한국에서 자생하고 소나무와 외생균근을 갖는 송이에 대한 18S ribosomal DNA의 DNA 서열을 조사하였다. 4개의 지역에서 채집된 송이의 514 bp 분석결과 18S rDNA의 서열은 모두 동일하였고, 경북대학교 미생물연구실의 연구 결과와는 4 bp 차이가 나타났다. NCBI의 BLAST search 결과, *T. matsutake*와 제일 유사한 것으로 나타났다. 분석된 514 bp의 서열비교에서는 다른 버섯균과 차이가 있는 서열 부분을 파악하였다. 또한, 이러한 자료를 이용하여 유사도 분석에서 각각의 속에 속하는 균들은 같은 묶음을 나타내고 있으나, 과 혹은 그 이상의 단위에서의 비교는 좋은 결과가 나오지 않았다. 본 연구를 통해 외생균근의 확인 작업에 필요한 primer 제작을 위한 사전 자료를 얻었으며, 또한 조사된 염기서열도 분석할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구 내용의 일부는 1996~7년도 농림수산기술포발사업 연구지원에 의하여 이루어진 것임 (임업연구원, 위탁과제임).

## 참고문헌

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* 215: 404-410.
- Cook, D. E. L., Kennedy, D. M., Guy, D. C., Russell, J., Unkles, S. E. and Duncan, J. M. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* 100: 297-303.
- Courtecuisse, R. and Duhem, B. 1995. Collins field guide Mushrooms & Toadstools of Britain and Europe. 3th eds HaperCollins Pub.
- Ginterova, A., and Janotkova, O., 1975. A simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi. *Folia Microbiol.* 20: 519-520.
- Gosselin, L., Jobidon, R. and Bernier, L. 1995. Assessment of genetic variation within *Chondrostereum purpureum* from Quebec by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycol. Res.* 99: 151-158.
- Grube, M., Depriest, P. T., Gargas, A. and Hafellner, J. 1995. DNA isolation from lichen Ascomata. *Mycol. Res.* 99: 1321-1324.
- Hwang, S. K. 1995. Genetic analysis of Ribosomal RNAs in *Tricholoma matsutake*: cloning, sequencing structural analysis and application to phylogenetic study. Ph D. thesis Department of Microbiology. The Graduate School. Kyungpook National University.
- Imazeki, R. and Hongo, T. 1984. Colored Illustrations of fungi of Japan. Hoikusha. Publishing Co. Ltd. p. 181. Pp. 24-28.
- Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E. and Seguin-Swartz, G. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Aler-naria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* 99: 604-614.
- Ko, K. S., Hong, S. G. and Jung, H. S. 1997. Phylogenetic analysis of *Trichaptum* based on nuclear 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 89: 727-738.
- Korean Forestry Reports. 1981a. Proceedings of Seminar on the pine-mushroom cultivations. Vol. 16, Forest Research Institute, Seoul, Korea. Pp. 44.
- Korean Forestry Reports. 1981b. Reports on the pine-mushrooms in Korea. Vol. 18, Forest Research Institute, Seoul, Korea. Pp. 44.
- Korean Forestry Reports. 1984. Proceedings of Research and Technique on the production of pine-mushroom. Vol. 22, Forest Research Institute, Seoul, Korea. Pp. 58.
- Korean Forestry Reports. 1986. Production technique and Research of forest mushrooms in Japan. Vol. 26, Forest Research Institute, Seoul, Korea. Pp. 73.
- Lee, S. S. 1991. Biology of *Tricholoma matsutake* found at *Pinus densiflora* communities in the areas of Kyoung Sang Do. *Kor. J. Mycology* 19: 203-213.
- Miller, O. Jr. 1981. *Mushrooms of North America*. E. P. Dulton. N. Y. p 368.
- Molina, R. 1980. Formation of ectomycorrhizal following inoculation of containerized Sika

- spruce seedlings. Pacific Northwest Forest and Range experiment Station. Research Note, PNW-351.
- Murray, H. G. and Thompson, W. F. 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nakai, T. and Hishinuma, K. 1992. Studies of nucleic acids of some Basidiomycetes; (3) Specific oligo-DNA probe for *T. matsutake*. Proc. 36th Ann. Meeting Mycol. Soc. Japan 36: 69. (In Japanese.)
- Nicholson, M. S., Bunyard, B. A. and Royse, D. J. 1997. Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Mycologia* 89: 400-407.
- O'Donnell, K., Cigelink, E., Weber, N. S. and Trappe, J. M. 1997. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* 89: 48-65.
- Ogawa, M. 1976. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. III. *Tricholoma matsutake* in *Picea glehnii* and *Picea glehnii-Abies sachalinensis* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 17: 188-198.
- Ogawa, M. 1977a. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. IV. *Tricholoma matsutake* in *Tsuga diversifolia*. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 18: 20-33.
- Ogawa, M. 1977b. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. V *Tricholoma matsutake* in *Tsuga sieboldii* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 18: 34-46.
- Ogawa, M. 1977c. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. VI. *Tricholoma fulvocastaneum* in *Quercus serrata-Quercus acutissima* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 17: 188-198.
- Ogawa, M. 1977d. Microbial ecology of mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing in Pine Forest. III. Fungal flora in shiro soil and on the mycorrhiza. Bulletin of the Government Forest Experiment Station no. 293. Tokyo, Japan.
- Ogawa, M. 1978. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. VII. *Tricholoma fulvocastaneum* Hongo in *Castanopsis cuspidata* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 19: 37-46.
- Ogawa, M. 1979a. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. IX. *Tricholoma ponderosum* in *Pseudotsuga menziesii-Tsuga heterophylla* and *Pinus contorta* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 20: 370-382.
- Ogawa, M. 1979b. Microbial flora of *Pinus thunbergii* in Forest of Coastal Sand Dune. Bulletin of The Forestry and Forest products Research Institute No. 305. Ibaraki, Japan. 107-124.
- Ogawa, M. and Yambe, Y. 1980. Effects of Herbicide on the mycorrhizae of *Pinus densiflora* and Soil Microorganisms. 1977. Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute No. 311. Ibaraki, Japan.
- Ogawa, M., Kobayashi, T. F. and Fujita, H. 1980. On the primary stage in 'Shiro' formation of *Tricholoma matsutake*. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 21: 505-512.
- Ogawa, M., Takeo, U., Shuji, K. and Kisoo, Y. 1978. Cultivation method of the mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. (I) Growing method of the pine saplings infected with *T. matsutake* in the field. *Japan For. Soc.* 60: 119-128.
- Ohara, H. and Ogawa, M. 1982. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* and its allied species. XI. *Tricholoma caligatum* in *Cedrus libanotica* forests. Trans. *Mycol. Soc. Japan* 23: 365-377.
- Peterson, S. W. 1991 Phylogenetic analysis of *Fusarium* species using ribosomal RNA sequence comparisons. *The American Phytopathological Society.* 81(9): 1051-1054.
- Peterson, S. W. 1995. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 99: 1349-1355.
- Terashima, Y. and Nakai, T. 1996. Identification of the DNAs of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake* using specific oligonucleotide probes and PCR primers. *Mycoscience.* 37: 371-375.
- Thompson, J. D., Higgins, D. D., Gibson, T. J., Plewniak, F. and Jeanmougin, F. 1997 The CLUSTAL\_X window interface: flexible stra-



- tegies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatic, T. 1989. *Molecular cloning-A Laboratory manual*. 2nd eds. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Pp. 6.1-6.19.
- Singer, R. 1986. *The Agaricales in Modern Taxonomy*. Koeltz Scientific Books. D-6240 Koenigstein/Federal Republic of Germany. Pp. 981.
- Smith, A. H. 1973. *Agaricales and related sectoid Gasteromycetes*. Pp. 421-450 In: The fungi. G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow and A. S. Sussman eds. IVB. Academic Press. N. Y. p 504
- Wang, Y. 1996. *Personal Communication; Reeachers for ectomycorrhizae*. *Crop & Food Research Invermay Agricultural center*, Private Bag 50054, Mosgiel, New Zealand. wangy@crop.cri.nz.
- Wang, Y., Sinclair, L., Hall, I. R. and Cole. A. L. J. 1995. *Boletus edulis sensu lato*: a new record for New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **23**: 227-231.
- Wang, Y., Evans, L. A. and Hall, I. R., 1996. *Growth of Tricholoma spp. in pure culture*. *Crop & Food Research Invermay Agricultural center*, Private Bag 50054; In press.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- Yambe, Y., Ogawa, M. and Ishizuka, K. 1981. *Microbial flora and litter decomposition process in Chamaecyparis obtusa Forest*. Bulletin of the Forestry and Forest Products Reserch Institue No. 313. Ibaraki, Japan.
- Zolan, M. E. and Pukkila, P. I. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology* **6**: 195-200.