

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균총형태 비교 및 PCR 기법을 이용한 동정

공원식* · 김동현¹ · 유창현 · 김영호 · 김경수 · 김광호²
농업과학기술원 응용미생물과, ¹고려대학교 자연자원대학원, ²건국대학교 농학과

Identification of *Phellinus linteus* by Comparison of Colony Shapes and Using PCR techniques

Won-Sik Kong*, Dong-Hyun Kim¹, Chang-Hyun You, Young-Ho Kim,
Kyung-Soo Kim and Kwang-Ho Kim²

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

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

²Department of Agronomy, Kon-Kuk Univ., Seoul 133-701, Korea

ABSTRACT: Twenty-two *Phellinus* strains were characterized using colony morphologies and polymerase chain reaction (PCR) to divide into *Phellinus linteus*. There were some differences in mycelial growth and colony shapes among the strains when they were grown on various media such as PDA, MCM, MEA and YM. *Phellinus linteus* was slowly growing, formed golden-yellow colony, and produced blue pigment on PDA media. When the regions of internal transcribed spacer (ITS) were amplified from ribosomal RNA (rRNA) coding genes of *P. igniarius* and *P. linteus* strains by means of PCR, two types of band (700 bp and 800 bp) were appeared, respectively. For the amplified intergenic region I (IGRI), *P. igniarius* strains showed a different band among 500, 600, 700 and 800 bp according to the strains, whereas *P. linteus* strains did one specific band of 700 bp. By polymorphism analysis after digesting the amplified products with 6 different restriction enzymes, a band specific to *P. linteus* was generated when the products for ITS region were digested with *Hae*III, suggesting that the enzyme digestion could provide effective method to distinguish between *P. igniarius* and *P. linteus*. And also, the analysis of genetic relationship showed that the genetic similarities were 89% and 95% in *P. igniarius* and *P. linteus* strains, respectively. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) analysis using multiple primer sets and arbitrarily primed PCR (AP-PCR) with ITS3 primer could also result in a reproducible way to identify *P. linteus* strains.

KEYWORDS: AP-PCR, *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius*, RAPD, rDNA

진흙버섯은 분류학적으로 담자균아문(Basidiomycotina) 민주름버섯목(Aphyllophorales) 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 목질진흙버섯(*P. linteus*), 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*), 찰진흙버섯(*P. robustus*), 낙엽송진흙버섯(*P. pini*) 등 전세계적으로 약 220종이 알려져 있으나(Larsen과 Cobb-Pouille, 1990), 한국에는 7종이 분포하는 것

으로 알려져 있다(정, 1994). 그러나 이들 종간의 형태가 유사하여 종 동정에 어려움을 가지고 있다. 특히 목질진흙버섯은 분류학적으로 열대와 아열대에 분포한 것으로 보고되어 있으나(Gilbertson과 Ryvarden, 1994), 중국과 일본은 물론 한국에서도 채집되고 있다. 이 버섯은 일반적으로 상항버섯으로 알려져 있으며 면역기능 항진, 위장기능 활성화, 해독작용 등 약리작용이 우수하고, 특히 동물실험에서 96.7%의 높은 중앙저지율이 있는 것으로 보고되어(水野, 1992) 관심이 증대되고 있다. 진흙버

*Corresponding author

섯류의 약효에 관한 연구는 중국, 일본 및 한국에서 활발히 이루어지고 있으며 종에 따라 약효가 상이한 것으로 알려져 있고, 특히 Ikegawa 등(1968)과 정 등(1994)은 목질진흙버섯의 항종양효과를 보고한 바 있으며 날로 그 이용성이 높아지고 있는 실정이다. 따라서 정확한 목질진흙버섯의 동정이 요구되고 있다. 본 연구에서는 국내 외에서 수집된 진흙버섯류의 배양적 특성 및 ribosomal RNA genes (rDNA) 분석을 토대로 정확한 목질진흙버섯을 구분하고자 수행하였다.

재료 및 방법

Strains and culture condition

본 시험에 사용된 균주는 미국 ATCC(American Type Culture Collection) 및 일본 IFO(Institute for Fermentation, Osaka)에서 균사체로 도입된 목질진흙버섯과 말뚝진흙버섯 8개 균주와 한국 및 일본에서 자생하는 버섯으로부터 분리한 균주 중 *Phellinus*속으로 분류된 14개 균주이다. 종 별로는

목질진흙버섯(*P. linteus*)이 11균주, 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*)이 8균주, 종명이 불확실한 균주가 3개 등 총 22개 균주이다(Table 1).

공시균주는 4°C 균주 보존실에 보존하면서 필요할 때마다 감자한천배지에 이식한 후 균총 직경이 3 cm 이상 자랐을 때 균총의 가장자리에서 직경 8 mm의 cork borer로 절편을 떼어 Table 2의 구성에 따른 4가지 배지에 각각 균을 접종하여 암상태의 25°C 항온기에서 7일간 배양 후 균사생장 길이, 균총 밀도를 조사하고, 14일 후에 균총의 색 및 형태적 특성을 조사하였다.

Medium and isolation of genomic DNA

공시균의 배양은 증류수에 PDB(Potato Dextrose Broth, Difco Co.) 24 g/l를 넣고, 250 ml Erlenmeyer flask에 100 ml씩 분주한 뒤 살균하여 평판 배지 위에서 자라고 있는 균사를 접종하였다. 균이 접종된 배지는 25°C에서 2주간 120 rpm으로 진탕배양하였다. Genomic DNA 분리는 배양된 균체를 동결건조하여 막자사발에서 액체질소로

Table 1. List of strains used

Strain No. (ASI)	Nomenclature	Collected year	Source
26001	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC36121)
26002	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC46215)
26003	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC62780)
26004	<i>Phellinus linteus</i>	1993	Japan (IFO6989)
26005	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC46215)
26006	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC62780)
26007	<i>Phellinus igniarius</i>	1993	U.S.A (ATCC36121)
26008	<i>Phellinus igniarius</i>	1994	U.S.A (Alaska)
26009	<i>Phellinus igniarius</i>	1994	U.S.A (Alaska)
26010	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea (Jungseon)
26011	<i>Phellinus linteus</i>	1995	U.S.A (ATCC26710)
26013	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea (Pyungchang)
26014	<i>Phellinus</i> sp.	1995	Korea (Kangwon Pro.)
26015	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea (Kangwon Pro.)
26016	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea (Kangwon Pro.)
26017	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea (Kangwon Pro.)
26031	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea
26035	<i>Phellinus linteus</i>	1995	Korea
26070	<i>Phellinus linteus</i>	1996	Japan
26071	<i>Phellinus linteus</i>	1996	Japan
26089	<i>Phellinus</i> sp.	1996	Korea (Kimjae)
26090	<i>Phellinus</i> sp.	1996	Korea (Andong)

Table 2. Composition of media

Ingredient	Medium (g/l) ^a			
	PDA	MCM	MEA	YM
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5		
KH ₂ PO ₄		0.46		
K ₂ HPO ₄		1.0		
Peptone		2.0	5	5
Yeast extract		2.0		3
Malt extract			20	3
Dextrose		20		10
PDA (Difco)	39			
Agar		20	20	20

^aPDA (Potato Dextrose Agar), MCM(Mushroom Complete Media), MEA(Malt Extract Agar), YM (Yeast Malt).

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 DNA 농도를 조정하였다.

Polymerase Chain Reaction

본 시험에 사용된 primer들은 *Saccharomyces cerevisiae*의 rRNA coding gene(rDNA)의 sequence에서 설계된 것으로 ITS(internal transcribed spacer) I-II 부위를 증폭하기 위하여 ITS4와 ITS5 primer set를, IGR(intergenic region) I 부위를 증폭하기 위하여 LR12R과 O1 primer set를 각각 사용하였다(Fig. 1). PCR 반응액은 White 등(1990)이 사용한 조성을 따랐으며 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 predenaturation, 94°C 1분 denaturation, 55°C 1분 annealing, 72°C 2분 polymerization으로 35 cycle을 실행시키고, 정확한 증폭을 위하여 72°C 10분 동안 반응시켰다. 다형성 분석(polymorphism analysis)을 위해 IGR과 ITS1~II 부위에 대하여 증폭된 산물 20 μl에 6종의 제한효소(*Sau3AI*, *TaqI*, *Tru9I*, *HaeIII*, *RsaI*, *HpaII*)를 반응 당 2~4 unit로 첨가하여 37°C에서 1~16시간 반응시켰다. 전기영동은 TAE[40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA(pH 8.0)] buffer를 사용하여 2% agarose에서 전개되었으며, 50 V에서 1시간 동안 전기영동을 한 다음 ethidium bromide 용액(1 μg/ml)으로 염색하여 UV lamp 상에서 관찰 후 polaroid film(type 667)으로 사진 촬영하였다. 유전자 연관성 분석을 위해 NT-SYS (Numerical Taxonomy System using multivariate statistical programs Ver. 1.60)(Rohlf, 1990) program을 사용하였으며, 전기영동 결과 동일한 크기의 band가 있으면 1, 없으면 0으로 하여 분석하였다. 분류학적인 유전자 연관성 분석법은 Sneath와 Sokal(1973)의 방법 [$F=2m/(n+m)$, F: coefficients for two-state data, m: matches frequency, n: sample size]을 이용하였다. 이와 같이 구한 값으로 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic means)를 이용한 clustering을 하여 도식화하였다.

RAPD and AP-PCR

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)의 PCR 반응 조성은 Kong(1995)의 결과에 따라 100 ng template DNA와 150 ng primer,

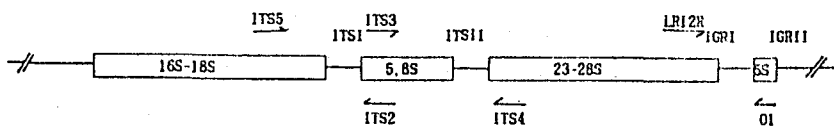


Fig. 1. Primer locations for amplification of the IGR and ITS in the repetitive rRNA coding gene of *Phellinus*. *ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCTGTAACAAGG-3', LR12R: 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3', O1: 5'-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3'.

2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM dNTP, 1 unit *Taq* polymerase를 넣은 후 최종 부피는 살균한 증류수를 첨가하여 20 µl로 맞추었다. Primer는 Operon 사로부터 구입한 kit내에 있는 OPAX 01~20 primer sets을 사용하였으며 PCR program은 94°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C 1분, 35°C 1분, 72°C 2분으로 40 cycle을 돌리고 4°C에서 유지하였다. AP-PCR 반응액의 조성은 Williams 등 (1990)의 방법을 다소 변형하여, 즉 20 µl의 반응액에 100 µM MgCl₂, 100 pmole primer, 25 ng의 DNA, 0.2 mM dNTP, 1 unit *Taq* polymerase를 첨가하였으며 PCR 반응조건과 전기영동은 다형성 분석과 동일한 방법으로 행하였다.

결 과

균총 형태 비교에 의한 균주간 비교

공시균주 22개에 대한 균총의 특성을 비교하기 위하여 PDA 배지의 3개 배지(MCM, MEA, YM)에서 각각 균사생장 및 균총의 색깔 등을 비교한 결과(Table 3, Fig. 2), 배지 종류에 따른 배양특성의 차이는 크지 않았으나 일부 종에 있어서는 다소 큰 차이를 보였다. 즉, 일본의 IFO에서 도입된 ASI 26004와 ATCC에서 도입된 ASI 26011의 균사생장은 44~60 mm/14일로 생장이 늦었으며 균총의 색깔은 진한 황색을 띠고 특히 배지를 푸르게 변색시키는 특징을 보였다. ATCC에서 도입된 말뚝진흙버섯(ASI 26001, 26002, 26003, 26005, 26006, 26007)은 4가지 배지에서 모두 빠른 생장(74~83 mm/14일)을 보이고 황백색으로 배지를 변색시키지 않은 반면, 알래스카에서 도입된 말뚝진흙버섯(ASI 26008, 26009)은 모든 배지에서 균사생장이 늦었으며 진한 갈색에 흰 균사가 있었으며 배지를 진갈색으로 변색시켰다. 한편 이들 도입 균주들의 특징을 기초로 한국과 일본에서 수집된

Table 3. Mycelial growth and morphological characteristics of twenty-two *Phellinus* strains grown on four different media

Strain (ASI)	Mycelial growth (mm/14 days)				Colony characteristics on PDA			
	PDA	MCM	YM	MEA	Colony color	Growing type	Colony density	Pigmentation
26001	77	76	77	73	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26002	74	83	80	83	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26003	82	83	83	83	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26004	56	54	57	60	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26005	74	80	83	83	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26006	81	83	82	83	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26007	79	83	80	81	Yellowish white	Fluffy	Dense	Non-pigment
26008	23	31	25	32	Brownish white	Strandy	Sparse	Pigmented
26009	36	34	44	53	Brownish white	Strandy	Sparse	Pigmented
26010	33	48	38	38	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26011	44	52	51	52	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26013	46	45	47	51	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26014	40	35	29	43	Brownish white	Strandy	Sparse	Non-pigment
26015	38	42	46	47	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26016	43	36	51	55	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26017	59	62	61	61	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26031	44	55	47	39	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26035	43	50	49	53	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26070	52	54	53	56	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26071	58	59	59	53	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26089	77	71	73	79	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented
26090	62	52	56	80	Golden yellow	Strandy	Sparse	Pigmented

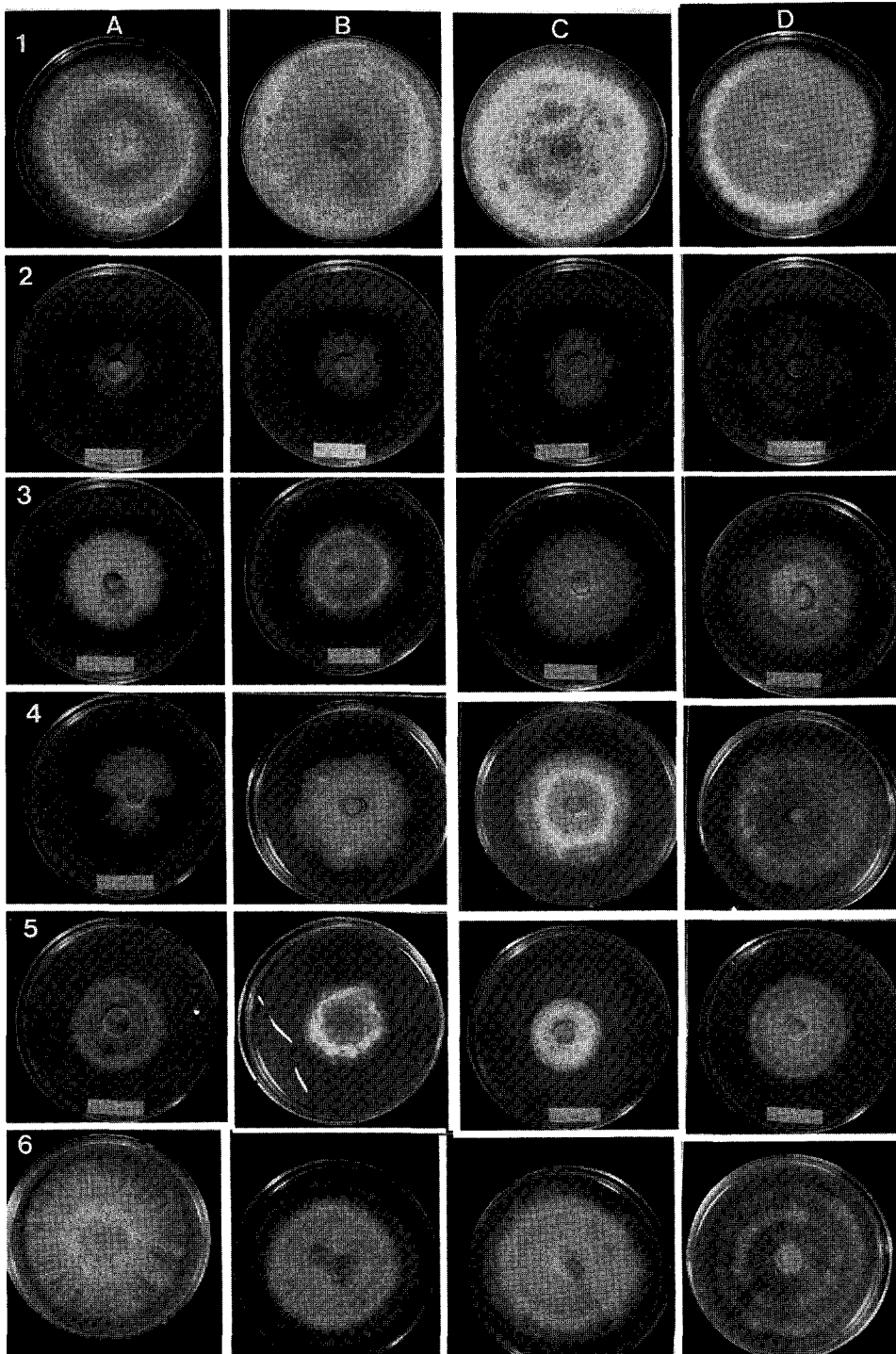


Fig. 2. Colony shapes of the representative strains of each group in the *Phellinus* strains (A, PDA; B MCM; C, YM; D, MEA). *Phellinus igniarius* complex (1, ASI 26001; 2, 26009), *Phellinus linteus* (3 26004; 4, 26011), *Phellinus* sp. (5, 26014; 6, 26089).

균주들의 특성을 살펴보면 ASI 26014는 균사 생장이 늦고 배지를 변색시키지도 않아서 전혀 다른 특징을 보였으며 다른 12개 균주는 균총의 색깔과 그밖의 특성이 목질진흙버섯과 유사하였다. 다만 ASI 26089는 균사의 생장이 다른 균주에 비해 빨랐으며, ASI 26090 균주는 MEA배지에서 특히 빠른 성장을 보였다. 그러나 원래 이들 자실체의 형태적 분류는 말뚝진흙버섯(ASI 26010, 26035), 목질진흙버섯(ASI 26013, 26015, 26016, 26017, 26031, 26070, 26071, 26089) 혹은 미지종(ASI 26014, 26090)으로 기록되어 있었던 균주들이어서 미생물의 계통분류에 유용하게 이용되고 있는 ribosomal RNA genes(rDNA)에 대한 분석으로 분자생물학적인 분류 가능성을 검토하였다.

Ribosomal RNA genes(rDNA) 분석에 의한 균주 간 구분

공시된 22개 진흙버섯균주들의 rDNA 분석을 위해서 우선 ITS1-II와 IGRI 부위를 증폭하였다. ITS1-II의 증폭에는 primer ITS4와 ITS5, IGRI 부위의 증폭에는 primer O1과 LR12R를 각각 사용하였다. PCR 증폭 후 2% agarose gel에서 전기영동 후 관찰한 결과 말뚝진흙버섯(ASI 26001, 26002, 26003, 26005, 26006, 26007, 26008, 26009)의 ITS1-II 부위는 약 700 bp, 목질진흙버섯(ASI 26004, 26011)은 약 800 bp에서 밴드를 보였고, 다른 수집균주는 말뚝진흙버섯과 같은 크기의 밴드를 보인 ASI 26014를 제외하고는 모두 목질진흙버섯과 같은 밴드를 나타냈다(Fig. 3A). 이들 증폭된 DNA 산물을 6종류의 4염기인식 제한효소로 절단하여 그 다형성을 조사한 결과, *RsaI* 제한효소 처리에서는 모든 균주가 효소인식부위가 없었으며(Fig. 3b), 말뚝진흙버섯 균주들은 *HpaII*와 *HaeIII* 제한효소 절단시에 다소 균주간 차이가 있었으며, 목질진흙버섯인 ASI 26004와 26011은 *HpaII* 제한효소 절단시에만 밴드형태에 차이가 있었다. 다른 수집균주는 ASI 26014, 26089, 26090을 제외하고는 모두 목질진흙버섯과 같은 밴드 형태를 나타냈다(Fig. 3a~f). 특히 *HaeIII* 제한효소로 절단한 밴드 양상은 목질진흙버섯에서는 인

식부위가 없어 하나의 밴드를 나타낸 반면, 말뚝진흙버섯은 3개의 밴드가 나타나고, PCR 산물이 ASI 26004와 26011과 같은 크기를 나타낸 ASI 26089와 26090균주의 밴드 양상이 다르게 나타나 목질진흙버섯을 구분하는데 가장 효과적이었다(Fig. 3a).

IGRI 부위를 증폭한 결과는 말뚝진흙버섯은 균주에 따라 약 500, 600, 700, 800 bp에서 각각 다른 밴드를 보였으며, 목질진흙버섯은 약 700 bp에서 밴드를 보였고, 다른 수집균주 중 ASI 26014가 약 500 bp, ASI 26090이 약 900 bp를 나타낸 것을 제외하고는 모두 목질진흙버섯과 같은 밴드를 나타냈다(Fig. 4B). 6개 제한효소로 처리하여 다형성을 비교한 결과, 말뚝진흙버섯 균주들은 ASI 26001과 26007, 26002와 26005, 26003과 26006, 26008과 26009가 유사한 형태를 나타냈고, 목질진흙버섯인 ASI 26004와 26011은 *TaqI* 제한효소 절단시에만 밴드형태에 차이가 있었다(Fig. 4e). 다른 수집균주는 ASI 26014, 26089, 26090을 제외하고는 모두 목질진흙버섯과 같은 밴드 형태를 나타냈다(Fig. 4a~f).

ITS1-II와 IGR I에서 증폭된 DNA를 6종류의 제한효소로 절단하여 나타나는 다형성을 밴드의 유무에 따라 data화하여 균주간 유전자 연관성을 분석한 결과(Fig. 5) 공시된 22 균주들간의 유사도는 평균 68.7%를 나타내었고, 말뚝진흙버섯으로 도입된 ASI 26001, 26007, 26002, 26005, 26003, 26006는 89.1%로 같은 group을 형성하였다. 목질진흙버섯은 일본의 IFO에서 도입된 ASI 26004와 ATCC에서 도입된 ASI 26011과는 95.3%의 유사도를 나타내었고 그밖의 한국과 일본에서 수집된 균주들이 이 group에 포함되었다. 한편 균총형태 비교에서 다른 특성을 보인 ASI 26014와 균총의 형태는 유사하였으나 균사생장이 빨랐던 ASI 26089와 26090은 전혀 다른 group을 형성하였다. 따라서 이 균주들은 목질진흙버섯이나 말뚝진흙버섯으로 볼 수 없었다.

RAPD 및 AP-PCR에 의한 균주의 구분

수집된 *Phellinus* 균주를 보다 간편하게 구분하

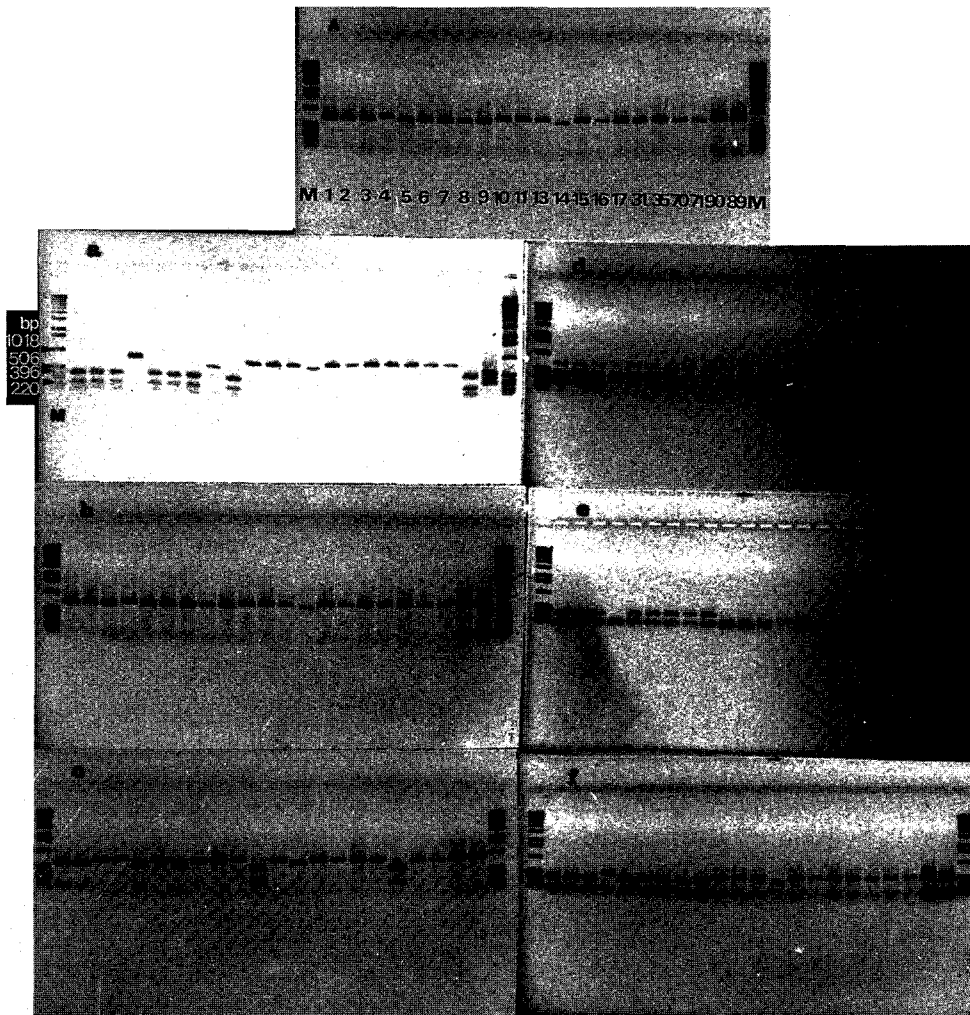


Fig. 3. Identification of the amplified products for ITS1-II region of rRNA coding gene by 2% agarose gel electrophoresis and restriction patterns. Panel A: The amplified products of ITS1-II region in the *Phellinus* strains. Panel a-f: Restriction patterns digested with *Hae*III, *Rsa*I, *Hpa*II, *Sau*3AI, *Taq*I and *Tru*9I, respectively. Lane M is DNA size marker (1 kb ladder). Lane 1-89 means ASI 26001-26089, respectively.

기 위하여 말뚝진흙버섯인 ASI 26001, 26002, 26003, 26005, 26007, 26008, 26009와 목질진흙버섯인 ASI 26011 및 유전자 연관성 분석에서 이 균주와 동일한 group에 속한 5개 균주 등 모두 15개 균주에 대하여 20종류의 OPAX primer sets를 사용하여 RAPD를 수행한 결과(data not shown) rRNA coding gene의 ITS1-II와 IGR I에 대한 분석보다 다양한 밴드 양상을 보였다. 즉 200 bp에서 3000 bp 사이에서 밴드가 나타났으나

주로 500~2000 bp에서 major band를 형성했으며, 밴드 수는 7~15개로 나타났다. OPAX primer 1, 4, 9, 18에 의한 RAPD 분석(Fig. 6)에서의 같이 말뚝진흙버섯 균주들은 3~4가지의 유형을 보이지만 모든 균주에 공통되는 뚜렷한 밴드는 찾을 수 없었으며, 목질진흙버섯 및 이 group에 속한 균주들은 사용된 primer에 따라 다양한 밴드 형태를 보이지만 OPAX-1 primer에서는 약 1600 bp와 800 bp, OPAX-4 primer에서는 약 400 bp, OPAX-18

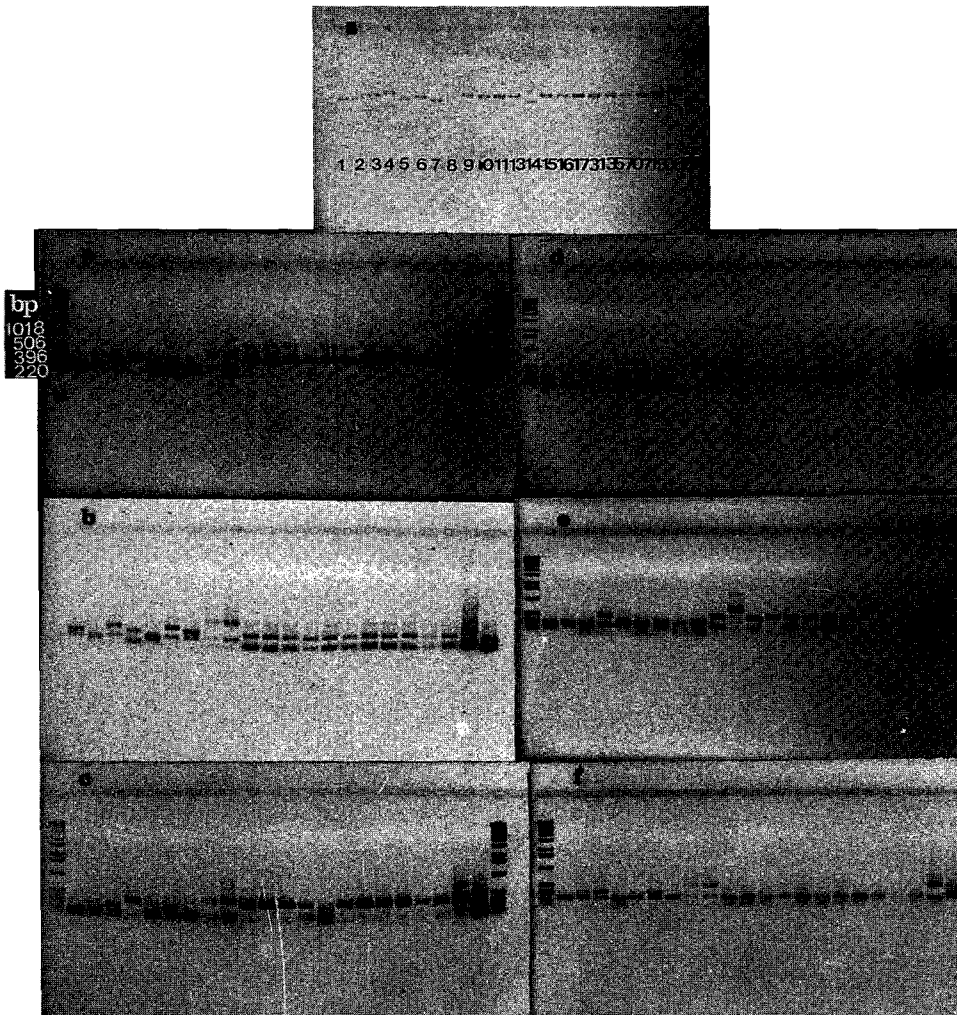


Fig. 4. Identification of the amplified products for IGRI region of rRNA coding gene by 2% agarose gel electrophoresis and restriction patterns. Panel B: The amplified products of IGRI region in the *Phellinus* strains. Panel a-f: Restriction patterns digested with *HaeIII*, *RsaI*, *HpaII*, *Sau3AI*, *TaqI* and *Tru9I*, respectively. Lane M is DNA size marker (1 kb ladder). Lane 1~89 means ASI 26001~26089, respectively.

primer에서는 약 900 bp에서 공통된 밴드를 볼 수 있었다. 한편 배양적 특성에 차이를 보인 ASI 26014는 RAPD에서의 밴드도 독특하게 전개되어 이 균주가 다른 종에 속할 것으로 추정되었다. 그러나 RAPD 분석은 짧은 primer를 사용하므로 너무 많은 밴드가 나타나고 재현성이 떨어지는 단점이 있어 확실한 검증이 필요하였다. 따라서 rDNA 분석에 사용되는 primer 중 20 bp 길이의 ITS3를 forward primer로 사용하여 AP-PCR을 수행한

결과(Fig. 7) 220~1500 bp에서 9개의 밴드를 나타냈으며 말뚝진흙버섯인 ASI 26001, 26003, 26006이 2개의 밴드로 동일한 형태를 보이고 ASI 26002, 26005는 동일한 3개의 밴드 형태를 나타냈으며 ASI 26007, 26008, 26009가 유사한 형태를 보였다. 말뚝진흙버섯 균주들에 공통적인 밴드는 약 300 bp에서 볼 수 있었다. 목질진흙버섯(ASI 26004, 26011)은 약 220 bp와 500 bp에서 뚜렷이 구분되는 밴드를 가지고 있었으며, rDNA의 유

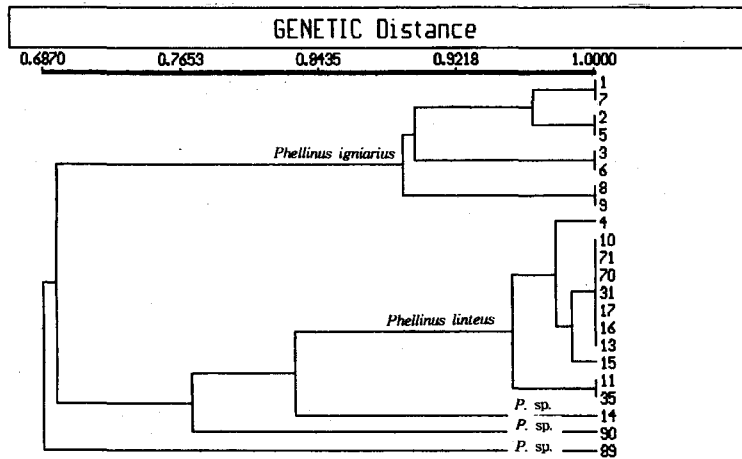


Fig. 5. Dendrogram of genetic similarity for ITSI-II and IGRI regions of rRNA coding gene in the *Phellinus* strains. Genetic similarities are calculated according to the method of Sneath and Sokal (1973) and analyzed by the UPGMA clustering.

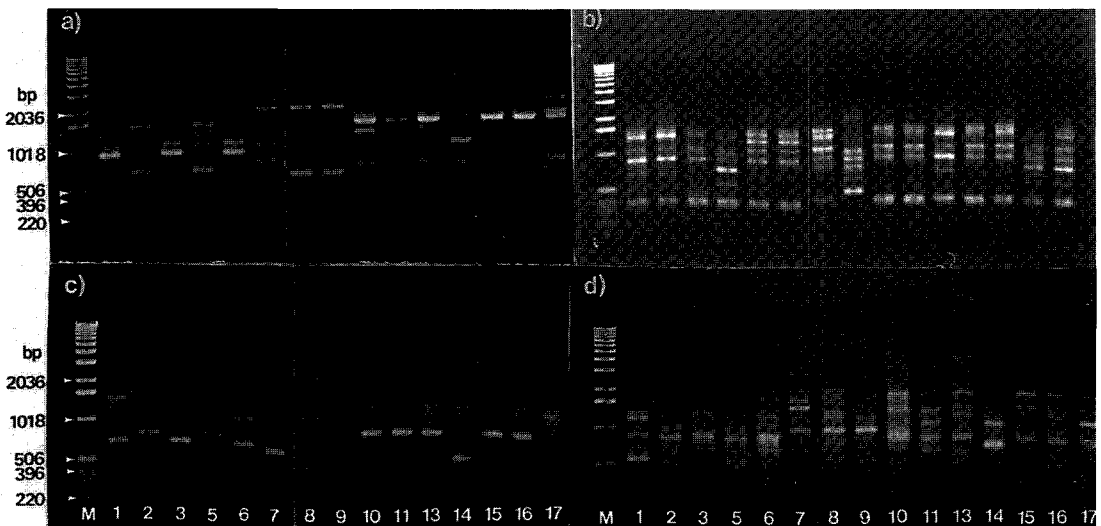


Fig. 6. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis using OPAX primer sets in 15 *Phellinus* strains. Panel a) Amplified by OPAX-1, Panel b) Amplified by OPAX-4, Panel c) Amplified by OPAX-9, Panel d) Amplified by OPAX-18, Lane M is DNA size marker (1 kb ladder). Lane 1~17 means ASI 26001~26017, respectively.

전자 연관 분석에서 목질진흠버섯과 동일한 group에 속한 ASI 26010, 26013, 26015, 26016, 26017, 26031, 26035, 26070, 26071에서도 이 두 개의 공통된 밴드를 볼 수 있었다. 또한 유전자 연관 분석에서 미지중으로 분류된 ASI 26014, 26089, 26090은 말뚝진흠버섯이나 목질진흠버섯의 밴드형태와는 다른 양상을 보여 이와 같은

AP-PCR 방법이 진흠버섯류의 종을 구분하는데 경제적이면서도 효과적인 것으로 판단되었다.

고 찰

진흠버섯속의 목질진흠버섯과 말뚝진흠버섯의 정

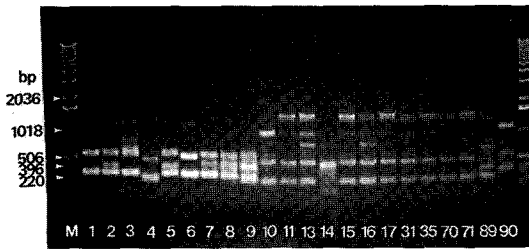


Fig. 7. Identification of the amplified products of twenty-two *Phellinus* strains using AP-PCR (primer: ITS3) in 2% agarose gel. Lane M is DNA size marker (1 kb ladder). Lane 1~89 means ASI 26001~26089, respectively.

확한 동정을 위한 판별법을 규명하기 위하여 ATCC와 IFO에서 도입한 표준균주와 국내외 수집 균주 총 22개 균주를 균 배양적 특성과 PCR기법을 사용하여 비교 검토하였다. 균총의 특성을 비교해 볼 때 목질진흠버섯은 균사생장이 낮고 배지를 푸르게 변색시키는 특징을 보였으며, 말뚝진흠버섯은 균사생장이 빠르고 배지를 변색시키지 않는 균주와 생장이 아주 낮고 배지를 진하게 변색시키는 균주가 있어 종간 또는 종내에서도 지리적인 기원에 따라 종류가 다양함을 알 수 있었다. 한국과 일본에서 수집된 대부분의 균주는 목질진흠버섯과 유사한 배양특성을 보였으나 ASI 26089와 26090은 균사생장이 빨라 차이가 있었다. 따라서 보다 세밀한 균주간의 구분 방법이 필요하게 되었다. 배(1994)는 영지버섯과 느타리버섯에서 ITSII부위가 종의 구분에 적합하다고 하였고 Royse와 Nicholson(1993)은 IGR부위에 대해서는 *Lentinus edodes*의 경우 균주간 변이는 없었으나, *L. edodes*와 *L. boryana* 등의 종간에는 큰 차이를 보였다고 하였다. 본 연구

에서도 배양 특성은 목질진흠버섯과 유사하지만 균사생장이 빨랐던 2균주는 rRNA coding gene (rDNA) 분석에서 목질진흠버섯과 다른 밴드 양상을 나타내어 rDNA 분석 방법이 유사한 형태를 가진 균주의 분류에 유용하고 종을 구분하는데 적합하다는 것을 알 수 있었다. rDNA 분석에 의한 유전자 연관성을 종합해 볼 때 말뚝진흠버섯 group 내에서 유전자 연관성이 다소 먼 것으로 보이는 것은 Gilbertson과 Ryvardeen(1994)이 말뚝진흠버섯을 형태적으로 분류하여 본 결과 분류가 모호한 *P. arctostaphyli*, *P. tremulae*, *P. pomaceus*를 *P. igniarius* complex로 분류한 것과 같은 결과로 생각되었다. 또한 이들은 목질진흠버섯의 분포가 열대 및 아열대인 것으로 서술하였는데 본 연구의 결과로 보아 한국과 일본에서 수집된 균주가 ATCC 균주와 유전자 연관성이 매우 높은 것으로 나타나 목질진흠버섯의 지리적 분포를 더 넓게 생각할 필요가 있다고 생각되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 (Table 4) 진흠버섯 균주 중 PDA 배지에서 푸르게 배지를 변색시키고 균총 색깔이 진한 황색으로 균사 생장이 낮은 균주가 목질진흠버섯임을 rRNA coding gene의 분석에서 확인할 수 있었다.

한편 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 방법은 각 종에 대한 특이적인 probe 및 상응하는 genetic marker를 개발할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Magdolen 등, 1995; Hamer 등, 1989). 본 연구에서 검토된 분자생물학적 분석으로부터 종에 특이적인 밴드를 marker로 이용할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 ITS 부위의 *Hae*III 처리에서 나타난 밴드는 목질진흠버섯에 특

Table 4. Classification of twenty-two *Phellinus* strains according to the cultural characteristics and colony morphologies on PDA media

Group	Pigmentation	Colony color	Growing pattern	Strain No. ^a	Assortment ^b
I	Absent	Yellowish white	Fast growth, dense	1, 2, 3, 5, 6, 7	<i>P. igniarius</i>
II		Brownish white	Slow growth, dense	14	<i>P. sp.</i>
III	A little	Brownish white	Slow growth, sparse	8, 9	<i>P. igniarius</i>
IV	Plentiful	Golden yellow	Fast growth, dense	89, 90	<i>P. sp.</i>
V			Slow growth, dense	4, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 31, 35, 70, 71	<i>P. linteus</i>

^a1 is ASI 26001 and 90 is ASI 26090, ^bAssortment is made by rRNA coding gene analysis.

이적으로 단일밴드를 보이므로 이들 균주를 분류하기에 유용한 probe로 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구의 rRNA coding gene 분석에서 목질진흙버섯과 말뚥진흙버섯을 구분했던 것과 마찬가지로 RAPD나 AP-PCR 분석 역시 종을 구분하는데 유용한 방법이 될 수 있었으며 이러한 분석이 rDNA 분석에 필요한 제한효소 처리 또는 sequencing과 같은 단계를 생략할 수 있어 종을 구분하는 보다 간편하고 유용한 방법이 될 수 있다고 생각되었다.

적 요

진흙버섯류 22개 균주를 균총의 형태와 PCR 기법을 사용하여 종간의 구분 방법을 찾고자 하였다. PDA 등 4가지 배지에서 균사생장 및 배지의 변색 여부 등을 기준으로 특성을 구분할 때 목질진흙버섯의 균총 색깔은 진한 황색으로 균사생장이 늦고 배지를 푸르게 변색시켰다. rDNA 분석 결과 ITS1~II 부위는 목질진흙버섯이 약 800 bp, 말뚥진흙버섯은 약 700 bp였고, IGRI 부위는 목질진흙버섯은 약 700 bp, 말뚥진흙버섯은 균주에 따라 약 500, 600, 700, 800 bp에서 4가지 각기 다른 밴드를 보였다. ITS1~II와 IGRI 부위의 증폭된 DNA를 6개의 제한효소로 절단하여 다형성을 비교해본 결과 ITS1~II의 HaeIII 절단으로 목질진흙버섯과 말뚥진흙버섯을 구분할 수 있었으며 이들 밴드를 이용하여 유연관계를 조사한 결과 목질진흙버섯은 95%의 유사도를 보였으며, 말뚥진흙버섯은 89%의 유사도로 complex를 형성하였다. 목질진흙버섯은 RAPD 분석과 AP-PCR에 의한 밴드 양상으로도 확실한 구분이 가능하였으며, ITS1~II 부위의 HaeIII 제한효소 처리로 나타난 밴드는 이종의 특이적인 marker로 사용할 수 있을 것으로 본다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발사업 연구비 지원에 의한 결과의 일부입니다.

참고문헌

- 공원식. 1995. 잔나비결상버섯(*Elfvigia applanata*) 균주의 RAPD에 의한 유형분석. 건국대 대학원 논문집. 42: 351-361.
- 배신철. 1994. 버섯 및 도열병균의 분류를 위한 rDNA의 ITS와 IGR부위의 PCR 분석. 경북대학교 대학원 박사학위논문.
- 정학성. 1994. 한국산 목재부후균류의 분포상에 대한 연구(II) - 담자균류 민주름버섯목의 분포에 대하여 -. 한국균학회지 22(1): 62-99.
- 정경수, 김신숙, 김희수, 한만우, 김병자. 1994. *Phellinus linteus* 균사 배양물로부터 분리한 단백질 다당체 Kp의 항암활성. 한국약학회지. 38(2): 158-165.
- 水野 卓, 川合正允. 1992. きのこの化学·生化学. Pp 35-45. 學會出版センター.
- Gilbertson, R. L. and Ryvarden, L. 1987. North American Polypores. *Megasporoporia-Whightoporia*. Fungiflora-Oslo-Norway. 885p.
- 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.
- Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59: 155-157.
- Larsen, M. J. and Cobb-Pouille, L. A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae): A survey of the world taxa. *Synopsis Fungorum* 3. Fungiflora-Oslo-Norway. 206p.
- 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.
- 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.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman. San Francisco. 573p.
- 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. 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 cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 195-200.