

PCR 다형성 분석에 의한 비늘버섯 속 계통의 유연관계 분석

권운혁² · 박혁² · 백민재² · 조우진² · 최우정² · 안치범² · 신도빈¹ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생명과학부, ²제물포고등학교

Phylogenetic relationships in different strains of *Pholiota* species based on PCR polymorphism

Woon-Hyuk Kwon², Hyuk-Park², Min-Jae Baek², Woo-Jin Cho², Woo-Jeong Choi²,
Chi-Beom Ahn², Do-Bin Shin¹ and Tae-Soo Lee^{1*}

¹Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon 406-772

²Jemulpo High School, Incheon 400-190, Korea

(Received June 11, 2013. Accepted June 20, 2013)

ABSTRACT – *Pholiota* species were collected from different geographical regions of the world. Genetic diversity and phylogenetic relationships were analyzed by rDNA-ITS sequences and RAPD polymorphism. The sizes of rDNA-ITS PCR amplicons of *Pholiota* spp. varied from 233~271, 158~223 and 174~219 bp, respectively. A phylogenetic tree was constructed on the ITS region sequences and *Pholiota* strains were classified into 8 clusters. Twenty strains in seven *Pholiota* spp. were classified into seven clusters by RAPD polymorphism using 15 arbitrary primers. Our experimental results suggested that rDN-ITS and RAPD analysis are useful tool for classifying *Pholiota* spp. and strains.

KEYWORDS – PCR, *Pholiota* species, Phylogeny, Polymorphism

서 론

버섯의 자실체에는 향산화, 항비만, 고혈압, 항암, 면역 활성화 등에 효과에 있는 여러 종류의 생리 활성 물질이 함유되어 있어서 우리의 건강에 큰 도움을 준다는 것이 알려져 있으며, 비늘버섯속(*Pholiota*)에 속하는 버섯은 전 세계적으로 약 30 여종이 알려져 있고, 우리나라에서 보고된 비늘버섯속 버섯 15종 중 맛비늘버섯(*P. nameko*)와 검은비늘버섯(*P. adiposa*) 등 2종의 버섯이 재배되고 있다(Khan and Garcha, 1984; Park and Lee, 2003). 비늘버섯속에 속하는 버섯 대부분의 특징은 자실체의 갓 표면에 인편이 존재하며, 습하면 갓이나 대의 표면에 강한 점성 물질을 분비하는 특징이 있어서 속을 구분하는 데에 큰 문제가 없었으나 자연 상태에서 온도, 습도, CO₂농도, 조도 등 환경조건이 변하게 되면 이에 따라 자실체의 색깔이나 형태에도 변이가 나타나 자실체의 색깔이나 외형만으로 각각의 종을 구분하는 데에는 많은 어려움이 있다. 이에 따라 버섯의 종이나 계통을 판별하기 위

해 염색체 DNA의 rDNA ITS(Internal Transcribed Spacer) 영역을 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)법을 이용하여 증폭하여 ITS 영역의 염기서열의 변이를 분석하여 종간 유전적 다양성과 품종과 계통을 구별하는데 이용하고 있다. ITS 영역에 대한 염기서열 변이 분석법의 장점은 종간 차이점을 확인하는 데에는 그런대로 효과가 있으나 동일한 종 내의 변이를 확인하는 데에는 어려움이 있다(Caetano and Gresshoff, 1997). 따라서 이러한 종 내의 변이를 확인하기 위하여 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)법이 개발되었다(Williams *et al.*, 1990). 버섯에서 RAPD법은 느타리와 큰느타리의 종간 및 종내의 계통과 품종의 다형성을 확인하는데 이용되고 있다(Alam *et al.*, 2009b).

따라서 본 연구는 국내에서 채집하였거나 또는 외국에서 수집한 비늘버섯속 19 균주를 인천대학교 버섯균주 및 DNA은행으로부터 분양받아 이들 버섯의 균사체로부터 염색체 DNA를 추출하고 rDNA의 ITS 영역을 중합효소연쇄반응 기법을 이용하여 증폭하여

*Corresponding author: tslee@incheon.ac.kr

Table 1. The mushroom species used in this study

Scientific name	Local name	Strain	Origin
<i>Hypholoma sublateritium</i>	개암다발버섯	JF692745	England (Hampshire)
<i>Hypholoma sublateritium</i>	개암다발버섯	IUM3301	Korea (Seoul)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM0155	Korea (Seoul)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM3796	Korea (Seoul)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM0909	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	JF719544	Korea
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM0154	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM1183	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM4240	Korea (Incheon)
<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	IUM2693	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota spumosa</i>	노란갯비늘버섯	AF345654	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota spumosa</i>	노란갯비늘버섯	IUM4860	Korea (Jeollabuk-do)
<i>Pholiota terrestris</i>	땅비늘버섯	IUM0877	Korea (Incheon)
<i>Pholiota terrestris</i>	땅비늘버섯	KC122896	USA (California)
<i>Pholiota nameko</i>	맛비늘버섯	FJ810174	China (Jiangsu)
<i>Pholiota nameko</i>	맛비늘버섯	IUM4650	Japan
<i>Pholiota nameko</i>	맛비늘버섯	IUM2776	Japan (Hokkaido)
<i>Pholiota nameko</i>	맛비늘버섯	IUM4722	Japan (Osaka)
<i>Pholiota squarrosa</i>	비늘버섯	IUM0792	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota squarrosa</i>	비늘버섯	JQ765683	Sweden
<i>Pholiota squarrosa</i>	비늘버섯	IUM0819	Korea (Gangwon-do)
<i>Pholiota squarrosa</i>	비늘버섯	IUM1432	Korea (Gangwon-do)
<i>Pholiota alnicola</i>	진노랑비늘버섯	IUM0636	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota alnicola</i>	진노랑비늘버섯	IUM0526	Korea (Kyonggi-do)
<i>Pholiota alnicola</i>	진노랑비늘버섯	IUM0846	Korea (Incheon)
<i>Pholiota alnicola</i>	진노랑비늘버섯	IUM0845	Korea (Jeollabuk-do)

ITS영역의 염기서열을 밝히고, 또한 arbitrary random primer를 이용한 RAPD PCR을 수행하여 비늘버섯속 버섯의 수집지역별 종 간 및 종 내에 유연관계를 밝혀 이를 비늘버섯속 버섯의 종을 동정하는데 이용할 수 있는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험 버섯 균주

실험에 사용한 버섯균주는 인천대학교 버섯균주 및 DNA은행에서 보존 중인 균주를 분양 받아 사용하였으며, -80°C 에 보관중인 버섯균주를 신속하게 해동시켜 감자한천배지 [Potato Dextrose Agar (PDA)] 배지에 접종하여 1주일 배양하여 실험에 사용하였으며, 또한 개암다발버섯 (한국), 검은비늘버섯 (한국), 노란갯비늘버섯 (한국), 땅비늘버섯 (미국), 맛비늘버

섯 (중국), 비늘버섯 (스웨덴) 등 6종의 버섯균주는 rDNA의 ITS 염기서열 정보가 등록되어 있는 NCBI의 GenBank에서 rDNA의 ITS 영역의 염기서열 정보를 내려 받아 본 실험의 분석결과와 통합하여 계통도를 작성하였다. 실험에 사용한 버섯균주의 내용은 Table 1에 요약하였다.

버섯균사체 배양

분양받은 버섯균주는 PDA 배지에 옮겨 1~2회 세대 배양하여 순수한 균사체를 얻었다. 또한 배양된 균사는 현미경을 이용하여 담자균의 2차 균사에서 나타나는 형태적인 특징인 껍새연결(clamp connection)을 확인한 후 실험에 사용하였다.

DNA의 추출

PDA plate에서 7일 배양된 균사체를 5 mm 직경의

cork borer로 떼어내어 Potato Dextrose Broth (PDB) 액체배지에 100 ml당 5개씩 접종하고 25°C에서 120 rpm으로 10일간 진탕 배양하였다. 진탕 배양이 끝난 균사체는 Whatman No. 1 여과지로 거르고 살균증류수로 세척한 후 동결건조(freeze drying)하고 막자에 넣은 후 액체 질소를 첨가하여 급속 냉동된 상태에서 막자사발로 곱게 마쇄하여 샘플이 용해되는 것을 방지하였다. 1.5 ml micro tube에 마쇄된 균사 500 mg와 500 µl의 protein lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA (pH 8.0), 1% sarkosyl)를 첨가하여 vortex로 강하게 섞어준 후 65°C에서 1시간 가량 반응시켰다. 반응 후에는 500 µl의 P.C.I (Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol, 25 : 24 : 1)를 첨가하여 섞어준 후 실온에서 30분 가량 정치하고 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 상등액만을 취하여 새로운 tube로 옮기고 500 µl의 에탄올을 넣어 4°C에서 5분 동안 12,000 rpm으로 원심분리 하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 제외한 나머지 용액은 제거하고 500 µl의 70% 에탄올을 넣어 12,000 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심분리하여 응집된 DNA를 세척하였다. 그 후 tube 내의 에탄올을 제거한 후 순수한 DNA pellet에 멸균수를 넣고 DNA를 녹이고, spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 순도와 양을 계산하고 Total DNA로써 실험에 사용하고 남은 DNA는 -20°C에 보관하여 추후의 실험에 사용하였다(Cubero *et al.*, 1999).

rDNA ITS영역의 PCR 증폭

추출된 각 DNA들의 ITS region 증폭을 위하여 White 등(1990)에 의해 보고된 곰팡이류에서 많이 사용되는 ITS region 증폭용 primer set인 ITS1 (forward: 5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3')와 ITS4(reverse: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 이용하였다.

PCR(중합효소연쇄반응)은 Bioneer사의 Taq polymerase kit을 사용하였으며 tube 당 반응액의 부피가 20 µl가 되도록 각 첨가물의 양을 조절하였다. 14.2 µl의 3차 멸균수; 2 µl의 10X PCR buffer (100mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH8.3); 1.6 µl의 dNTPs(0.2 mM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0.5 µl (50 pmol/µl)의 ITS1 primer; 0.5 µl (50 pmol/µl)의 ITS4 primer; 0.2 µl의 Taq DNA polymerase (5U/µl, Bioneer, Korea); 1 µl의 DNA 희석액 (100 µg/µl)을 섞어주었다. PCR반응은 96°C에서 30초간 denaturation,

55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 순으로 30 cycle의 조건으로 실시하였다.

DNA 염기서열 결정

PCR이 끝난후 생성된 PCR product를 염기서열을 밝혀내기 위하여 염기서열 분석 전문회사인 Solgent(Daejeon, Korea)사에 염기서열의 분석을 의뢰하였으며 밝혀진 염기서열과 기타 data를 email로 전달받아 실험 결과의 분석에 사용하였다. 이때 염기서열 분석과정에서 염기가 제대로 밝혀지지 않은 부분의 보완을 위해 모든 sequence들을 수작업으로 보정하였으며 밝혀진 sequence들은 유전자은행인 NCBI (National Center for Biotechnology Information) website(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 기존에 등록되어있는 버섯들의 ITS region sequence들과의 상동성을 비교하여 PCR 증폭의 성공여부를 확인하였다.

DNA 염기서열 및 유연관계 분석

컴퓨터 상에서 기존에 NCBI에 등록되어있는 버섯들의 ITS region sequence들을 토대로, ITS1 primer binding site(18S rDNA partial sequence)와 ITS1 region, 5.8S rDNA, ITS2 region, ITS4 primer binding site(28S rDNA partial sequence) 등의 염기서열을 정리하였다. 또한 신뢰성 있는 자료를 만들기 위하여 이미 ITS 영역의 염기서열의 분석이 끝난 20개의 균주 외에 NCBI의 GenBank로부터 ITS영역의 염기서열 정보가 등록되어 있는 개암다발버섯 (한국), 검은비늘버섯 (한국), 노란갓비늘버섯 (한국), 땅비늘버섯 (미국), 맛비늘버섯 (중국), 비늘버섯 (스웨덴) 등 총 26개의 균주를 대상으로 유연관계 분석을 수행하였다. 그 후 정리된 염기서열은 하나의 text file로 병합하여 염기서열 전문분석 프로그램인 clustalX로 정렬(alignment)시켰다. 이렇게 정렬된 sequence들을 또 다른 분석프로그램인 PAUP 4.0 (for WIN)으로 옮겨서 분석한 후 계통도를 작성하였다. 본 연구에서 사용된 분석방법은 근린산술결합법(Neighbor-Joining method)로서 최근 유연관계 분석에 가장 많이 사용되고 있다. 또한 이 방법에 bootstrapping을 병행하여 1000회를 반복 분석하였다. 이렇게 얻은 결과로 1000번의 결과 중 50% 이상의 유의성이 있는 결과만을 추려 한가지의 계통도로 작성하였다(Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987).

RAPD분석

다형성 분석을 위하여 각각의 균주에서 추출한 염

Table 2. Random amplification of polymorphic DNA primers used in this study

Primers	Sequence(5' to 3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCCTG
OPA-06	GGTCCCTGAC
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TGCGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-19	CAAACGTCGG
OPA-20	GTTGCGATCC

색체 DNA를 RAPD-PCR 방법을 이용하여 증폭하였다(Williams *et al.*, 1990). 10 base의 oligonucleotide (Operon Technologies, Inc., Alameda, California)로 구성된 20개의 random primer 사용하였고 그 내용은 Table 2에 요약하였다. PCR의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 이어서 94°C에서 1분간, 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 35회 반복하여 polymerization을 한 다음 72°C에서 7분간 방치하였다. 증폭된 PCR의 산물은 1X Tris-Actate-EDTA 완충액이 들어있는 1.4% agarose gel에서 100 V로 75분간 전기 영동하고 이 때 1 kb 크기의 DNA ladder를 size marker로 사용하였다. Gel은 전기영동 후 ethidium bromide 용액으로 염색하고 Gel documentation system(Kodak Image Station 4000R, USA)을 사용하여 image를 확인하고 기록하였다. 20개의 OPA primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하고 전기영동 후 agarose gel상에 나타난 각각의 band를 하나의 형질로 취급하여 band가 존재하면 (+), 존재하지 않으면 (-)으로 코드화하여 자료행렬(data matrix)을 만든다. 유사도 계수(similarity coefficient) S는 모든 균주 간 RAPD-PCR 후 나타난 band의 수

를 이용하여 $2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 로 계산하였다. 이때 N_{xy} 는 각각의 두 균주가 공유하는 band의 수이고, N_x 와 N_y 는 두 균주 각각의 band 수이다(Nei and Li, 1979). Dendrogram은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용하여 작성하였다.

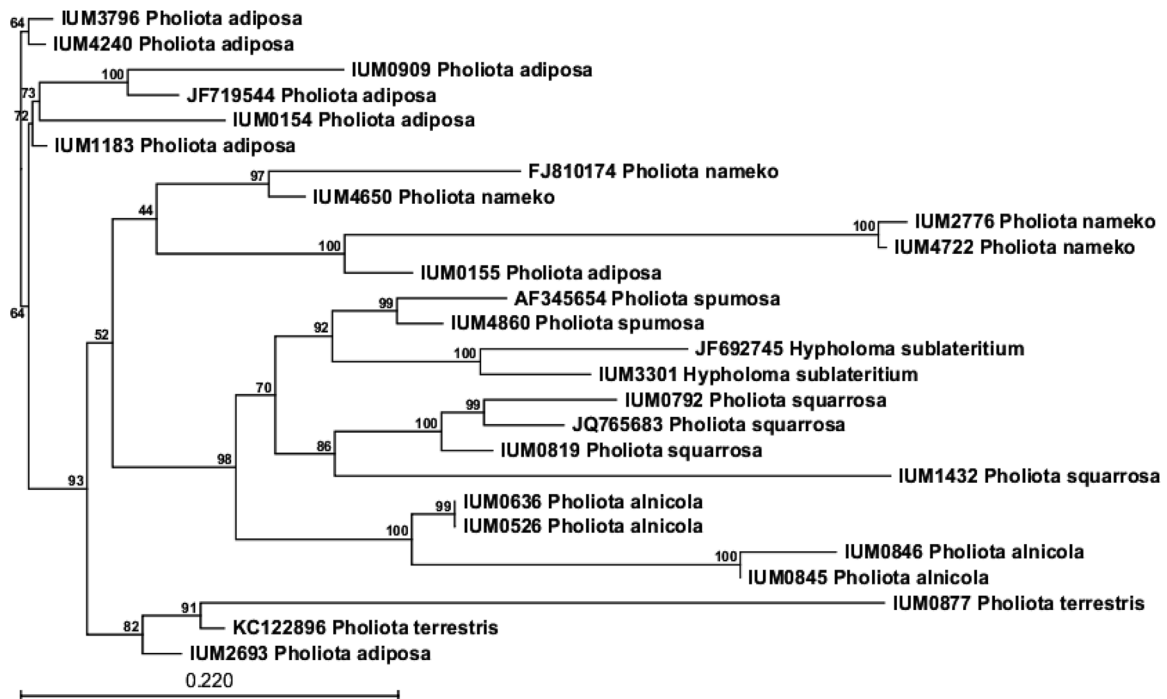
결과 및 고찰

ITS 영역의 염기서열을 이용한 유연관계 분석

실험에 사용한 비늘버섯 속 균주의 ITS1, 5.8S, ITS2 영역의 염기의 수를 분석한 결과 총 염기의 수는 595668 bp로 균주 간 73 bp의 염기 수의 차이가 있었다. ITS1 영역의 염기의 수는 233271 bp, ITS2 영역의 염기의 수는 174214 bp였다. 이 중 ITS1 영역과 ITS2 영역의 중간에 위치한 5.8S 영역의 염기의 수는 156223 bp를 나타내서 종에 따른 변이를 관찰할 수 있었다(Table 3). 5.8S 영역의 염기의 수는 ITS1과 ITS2 영역과는 달리 동일한 종의 경우 대부분의 염기의 수가 동일하였다. 검은비늘버섯의 염기 수는 모두 159 bp 였고 진노랑비늘버섯의 염기의 수는 모두 158 bp 였다. 일반적으로 균류의 5.8S 영역의 염기 수는 매우 보존적이어서 동일한 종의 5.8S 영역의 염기 수는 대부분 같다는 보고와 일치하였다(White *et al.*, 1990). 실험에 사용한 균주 간 유연관계를 분석하기 위해 rDNA의 ITS 영역 염기서열을 neighboring-joining method를 이용하여 계통도를 작성한 결과 크고 작은 2개의 클러스터로 나누어지고 이 클러스터는 다시 크고 작은 2개로 나누어지고 이 클러스터는 다시 2개의 크고 작은 2개의 클러스터로 나누어진다. 이 중 가장 큰 클러스터는 5개의 작은 클러스터로 구성되어 있다(Fig. 1). 따라서 실험에 사용된 버섯은 계통도에 따라 총 8개의 작은 클러스터로 나누어졌다. 첫 번째 클러스터에는 검은비늘버섯 2 균주가 묶여 있으며, 두 번째 클러스터에는 검은비늘버섯 4 균주가 2개의 소그룹으로 묶여 있는데 이 중 하나의 균주는 서울, 3균주는 경기도에서 채집된 균주였다. 세 번째 클러스터에는 상동성이 높은 맛비늘버섯의 2개 균주가 하나의 클러스터를 이루고 있으며 이 균주는 각각 중국의 장수성과 일본의 오사카에서 채집한 균주였다. 그러나 이 클러스터와 연결된 외곽에 맛버섯의 2 균주가 하나로 묶여 있는데 이들 균주는 각각 일본의 홋카이도와 오사카에서 온 균주로 지역이 달라도 상동성이 높게 나타났다. 네 번째 클러스터는 노란갯비늘버섯으로 하나의 균주는 전라

Table 3. Nucleotide distribution, ITS1, 5.8S, and ITS2 of rDNA base sequences in different mushroom species belong to *Pholiota* species

Strain	Name	Nucleotide distribution						Sequence information			
		A	C	G	T	G+C (%)	A+T (%)	ITS 1	5.8S	ITS2	Length (bp)
IUM 3301	<i>Hypholoma sublateritium</i>	161	119	131	216	33.9	60.1	237	158	219	614
IUM 0154	<i>Pholiota adiposa</i>	173	139	130	187	42.8	57.2	233	159	203	595
IUM 0155	<i>Pholiota adiposa</i>	148	102	114	166	40.8	59.2	233	159	203	595
IUM 0909	<i>Pholiota adiposa</i>	129	102	115	163	42.7	57.3	233	159	203	595
IUM 1183	<i>Pholiota adiposa</i>	160	125	132	192	42.2	57.8	233	159	203	595
IUM 2693	<i>Pholiota adiposa</i>	157	126	135	196	42.5	57.5	235	156	206	597
IUM 3796	<i>Pholiota adiposa</i>	159	129	130	192	42.5	57.5	233	159	203	595
IUM 4240	<i>Pholiota adiposa</i>	156	126	129	190	42.4	57.6	233	159	203	595
IUM 0526	<i>Pholiota alnicola</i>	134	143	147	196	46.8	53.2	237	158	214	609
IUM 0636	<i>Pholiota alnicola</i>	134	143	147	196	46.8	53.2	237	158	214	609
IUM 0845	<i>Pholiota alnicola</i>	127	145	135	162	49.4	50.6	237	158	214	609
IUM 0846	<i>Pholiota alnicola</i>	136	149	128	159	48.6	51.4	237	158	214	609
IUM 2776	<i>Pholiota nameko</i>	114	83	93	139	40.9	59.1	233	158	204	595
IUM 4650	<i>Pholiota nameko</i>	152	122	133	208	41.5	58.5	233	158	204	595
IUM 4722	<i>Pholiota nameko</i>	115	82	95	139	41.1	58.9	233	158	204	595
IUM 0792	<i>Pholiota squarrosa</i>	132	118	125	208	41.7	58.3	245	158	208	611
IUM 0819	<i>Pholiota squarrosa</i>	145	128	130	203	42.6	57.4	246	159	208	613
IUM 1432	<i>Pholiota squarrosa</i>	182	153	134	179	44.5	55.5	246	159	208	613
IUM 4860	<i>Pholiota spumosa</i>	142	128	134	211	42.6	57.4	271	223	174	668
IUM 0877	<i>Pholiota terrestris</i>	165	138	126	233	39.9	60.1	235	156	206	597

**Fig. 1.** Phylogenetic tree of 26 different mushroom strains of *Pholiota* species based on the nucleotide sequences of the ITS regions using neighbor-joining method with 1,000 bootstrapping trails.

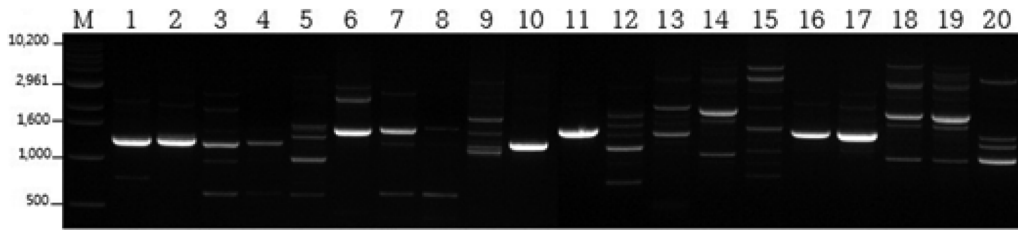


Fig. 2. Random amplification of polymorphic DNA profiles in 20 different strains of *Pholiota* species with OPA-1 primer.

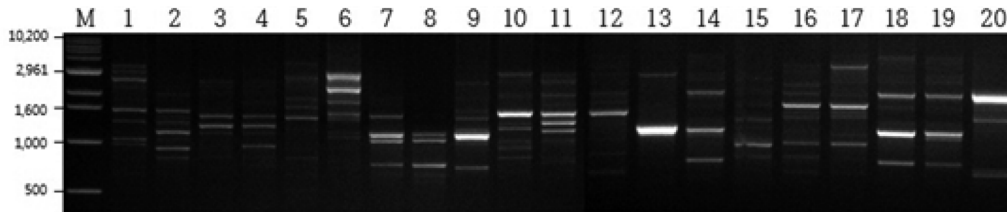


Fig. 3. Random amplification of polymorphic DNA profiles in 20 different strains of *Pholiota* species with OPA-3 primer.

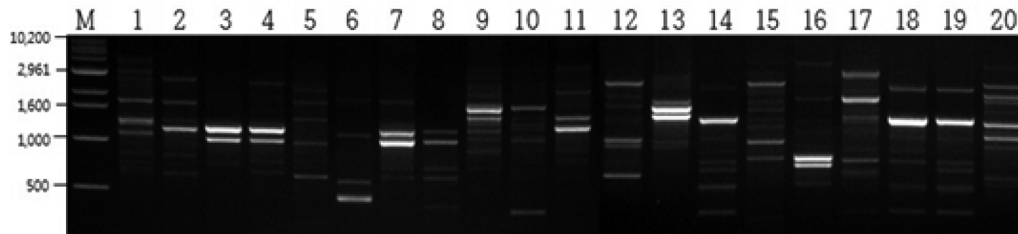


Fig. 4. Random amplification of polymorphic DNA profiles in 20 different strains of *Pholiota* species with OPA-5 primer. Fig.2-4; M, molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-0154; lane 2, IUM-0155; lane 3, IUM-0526; lane 4, IUM-0636; lane 5, IUM-0792; lane 6, IUM-0819; lane 7, IUM-0845; lane 8, IUM-0846; lane 9, IUM-0877; lane 10, IUM-0909; lane 11, IUM-1183; lane 12, IUM-1432; lane 13, IUM-2693; lane 14, IUM-2776; lane 15, IUM-3301; lane 16, IUM-3796; lane 17, IUM-4240; lane 18, IUM-4650; lane 19, IUM-4722; lane 20, IUM-4860.

북도에서 채집한 균주였고 다른 하나는 경기도에서 채집한 균주인데 이들 균주 간 상동성은 매우 높았다. 다섯 번째 클러스터는 개암비늘버섯으로 구성되어 있는데 이들은 각각 서울과 영국의 Hampshire에서 채집한 균주인데 ITS 영역의 염기서열의 분석을 통해 상동성은 매우 높아 동일한 종인 것으로 확인되었다. 여섯 번째의 클러스터는 4개의 비늘버섯이 하나의 클러스터를 이루고 있는데 상동성이 매우 높은 3개의 균주가 하나의 그룹을 그리고 상동성이 떨어지는 하나의 균주가 묶여있다. 앞의 3개 균주의 채집지역은 각각 경기도, 스웨덴, 강원도였고 다른 하나도 강원도였다. 스웨덴 균주의 경우에는 NCBI의 GenBank에 보관되어 있는 염기서열 정보를 받아 분석한 결과 이들 균주 간 염기서열의 상동성이 매우 높아서 서식지역이 멀리 떨어져 있어도 rDNA ITS 영역의 염기서열 분석을 통해 동일한 종임을 확인할 수 있는 경우이다. 일곱 번째 클러스터에는 상동성이 매

우 높은 진노랑비늘버섯 2 균주와 이에 비해 상동성이 조금 떨어지는 진노랑비늘버섯 2개 균주가 하나의 클러스터를 이루고 있다. 이들 버섯은 모두 한국의 경기도, 경기도, 인천, 전라북도 등 다양한 지역에서 채집한 균주였지만 상동성이 높아 동일한 균주로 동정되었다. 마지막 클러스터에는 총 3개의 균주가 하나의 클러스터를 이루고 있는데 의외로 이들 균주 상동성이 높지 않았다. 이들 균주 중 2개의 균주는 땅비늘버섯인데 인천과 미국에서 채집된 것이고, 나머지 하나는 땅비늘버섯이 아닌 검은비늘버섯으로 경기도에서 채집한 것인데 동일한 클러스터에 묶여 있어 종을 확정하는데 어려움이 있었다. 이러한 결과가 나오게 된 원인으로는 검은비늘버섯의 rDNA ITS 영역의 염기서열의 변이의 범위가 커서 생긴 것일 수도 또는 비늘버섯 채집시 *Pholiota*속의 다른 종의 버섯을 오동정해서 생긴 문제점일 수도 있다고 사료되었다. 따라서 앞으로 PCR을 이용해

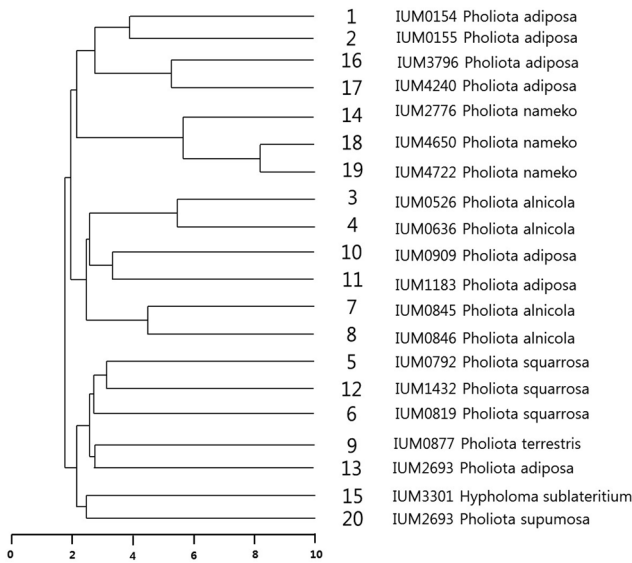


Fig. 5. Dendrogram constructed based on the random amplification of polymorphic DNA markers of *Pholiota* species determined by the average linkage clusters.

검은비늘버섯을 정확히 동정하기 위해서는 다양한 검은비늘버섯 균주를 대상으로 추가적인 PCR 분석이 필요하다고 판단되었다. 그러나 본 실험에서 PCR 기법을 이용해 비늘버섯속 버섯의 rDNA의 ITS 영역 염기서열을 분석한 결과 검은비늘버섯을 제외한 대부분의 비늘버섯속에 속하는 버섯의 종을 동정하는데 유용하였다. 또한 본 실험 결과는 Park 등 (2004)이 rDNA ITS 영역의 PCR을 통해 노루궁뎅이 버섯의 종이나 품종을 구분하는 것이 가능했다는 결과와 일치하였다.

RAPD를 이용한 계통분석

우리나라와 일본의 여러 지역에서 수집된 비늘버섯속 20점의 버섯 다양성을 RAPD 기법을 이용하여 실험을 수행하였다. 이들 7종의 버섯 20균주는 고체배지 상에서 7일 배양하고 균사체를 수확한 후 염색체 DNA를 추출하였다. OPA-1에서 OPA-20까지 총 20가지의 primer를 이용하여 추출된 염색체를 대상으로 RAPD 반응을 수행하여 primer 별로 DNA를 증폭시키고 전기영동 후 확인한 결과, 20개의 primer 중에 OPA-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19 등 15개의 primer가 염색체 DNA를 효과적으로 증폭시키는 것으로 나타났다(Figs. 2-4). 이 RAPD 반응에서 각각의 primer에 따라 증폭된 DNA의 단편 수는 적은 것은 1개 많은 것은 5개, 단편의 크기는 0.6 kb에서 1.7 kb까지 다양한 것으로 확인하였다. 이

실험에 사용된 20개의 primer는 곰팡이의 종내 유연성과 유전적 다양성을 밝히기 위해 널리 사용되고 있는 primer이다(Alam *et al.*, 2009a). 따라서 균주별로 나타난 각각의 DNA 단편을 UPGMA 방법을 이용하여 클러스터링(clustering)한 결과 이들 7종의 버섯 20균주는 7개의 소규모 클러스터로 나뉘었으며 각각의 작은 클러스터 내에는 채집지역은 달라도 동일한 종의 버섯균주가 묶이는 것으로 나타나 이는 rDNA의 ITS 영역의 염기서열을 이용해 작성한 계통도의 결과와 유사하게 나타났다. Lim 등(2010)에 의하면 종이나 품종 특유의 primer를 이용해 RAPD PCR을 수행해 만가다버섯의 종이나 품종을 구분할 수 있었다고 보고하였다. 따라서 본 실험을 통해 RAPD-PCR이 버섯의 종 내의 변이를 확인하는 것 외에도 버섯의 중간 분류와 동정에도 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 5).

적 요

우리나라와 전 세계의 여러 지역에서 수집한 비늘버섯속 18 균주와 개암비늘버섯 2 균주를 대상으로 rDNA의 ITS region 염기서열과 genomic DNA의 RAPD-PCR을 수행하였다. ITS1과 ITS2영역의 염기의 수는 각각 233~271, 158~233 그리고 174~219 염기쌍으로 종에 따라 변이가 있었는데 ITS2영역의 염기서열이 ITS1의 영역보다 변이가 높았고 5.8S지역의 염기의 수는 비교적 변이가 적었다. 각각의 균주 간 유연관계를 알아보기 위해 ITS영역의 염기서열을 이용하여 계통도를 작성한 결과 실험에 사용한 균주는 8개의 클러스터로 나누어지는 것으로 나타났으며 동일한 종의 버섯은 동일한 클러스터에 속하는 것으로 나타났다. 또한 20종류의 primer를 이용하여 비늘버섯속 버섯을 대상으로 RAPD-PCR을 수행한 결과 15개의 primer가 효과적으로 염색체 DNA를 증폭하는 것으로 나타났다. 증폭의 양상은 primer의 종류와 종에 따라 변이가 있었다. 이 결과를 토대로 계통수를 작성한 결과 계통수는 ITS 영역의 PCR 결과와 매우 유사하였다. 본 실험 결과, 실험에 사용한 비늘버섯속 버섯의 종과 계통 간의 유연관계는 높았으며, rDNA ITS 영역의 염기서열 분석 결과를 이용해 공시된 각각의 비늘버섯 종을 분류하는데 유용하게 사용이 가능하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 인천 제물포고등학교 R&E

프로그램 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009a. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebredonsis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* **37** : 183-188.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009b. Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* **37** : 258-266.
- Caetano, A. G. and Gresshoff, P. M. 1997. DNA markers: Protocols Applications, and Overviews. Wiley-Vch, N.Y. pp. 364.
- Cubero, O. F., A. Crespo, J. Fatehi and P. D. Bridge. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Syst. Evol.* **216** : 243-249.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: and approach using the bootstrap. *Evol.* **39** : 789-791
- Khan, P. and Garcha, H. S. 1984. *Pleurotus* mushroom, a source of food protein. *Mush. Newslett. Trop.* **4** : 9-14
- Lim, Y. J., Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, S. W. Lee, H. S. and Ro, H. S. 2010. Molecular genetic classification of *Hypsizigus marmoreus* and development of strain-specific DNA markers. *Kor. J. Mycology* **38**(1) : 34-39.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76** : 5269-5273.
- Park, H. G., Ko, H. G., Kim, S. H. and Park W. M. 2004. Molecular identification of Asian isolates of medicinal mushroom *Hericium erinaceum* by phylogenetic analysis of nuclear ITS rDNA. *J. Microbiol. Technol.* **14** : 816-821.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 2003. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd.. Seoul.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** : 406-425.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Eds., M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, San Diego, California, 482 p.
- Williams, J. G., 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.