

## 송이의 Genomic DNA에 특이적인 Probe

이상선 · 홍성운 · 정흥채 · 성창근<sup>1</sup> · 김재훈<sup>1</sup> · 가강현<sup>2</sup> · 김현중<sup>2</sup>

한국교원대학교 생물교육학과, <sup>1</sup>충남대학교 농과대학 식품공학과, <sup>2</sup>임업연구원 화학미생물과

### The Specific Probes Confirming the Genomic DNA of *Tricholoma matsutake* in Korea

Sang-Sun Lee\*, Sung-Woon Hong, Hung-Chae Chung, Chang-Kun Sung<sup>1</sup>,  
Jae-Hun Kim<sup>1</sup>, Kang-Hyeon Ka<sup>2</sup> and Hyun-Joong Kim<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chung-Nam National University,  
Yu-Seoung Ku, Taejon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Division of Wood Chemistry & Microbiology, Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

**ABSTRACT:** The specific DNA band appeared in PCR-RAPD analysis using OPO-2 primer was a very important for the researching Korean pine-mushrooms, *Tricholoma matsutake*. This DNA band, sequenced to be the 770 base pairs, existed as only a single copy in the whole genomic DNA's of Korean pine-mushrooms. However, this band was not presenting from the PCR-RAPD bands of other ectomycorrhizal fungi reacted with the OPO-2 primer or the dot blots. Also, this DNA sequence was not matched with those of the other genes known by NCBI and had low homology together with sequence of other proteins compared. Those results suggested that the specific DNA band can be used as probe for identification of *T. matsutake* and might be related to the informations rather than the gene for the proteins with analysis of protein sequence translated from the DNA sequence.

**KEYWORDS:** OPO-2 Primer, PCR-RAPD, Ectomycorrhizal fungi, *Tricholoma matsutake*

동양에서의 송이 [*Tricholoma matsutake* Singer = *T. caligatum* (Viv) Richen var. *nauseoum* (Blytt.) Bon; Courtecuisse & Duhem, 1995]는 값비싼 버섯이며, 외생균근으로 소나무 균락에서 생산되는 것으로 알려져 있다. 이에 대한 연구는 임학적인 방법으로 송이 생산지에 대한 환경과 생태 조사에 대해 오래 동안 연구되었다(KFR, 1981a, b, 1984, 1986). 또한, 송이에 관한 생태 및 균학 연구도 진행되었다(Lee, 1991; Lee and Sung, 1997; Lee and Hong, 1998). 과거, 일본에서 100여 년간 연구를 송이에 대한 연구는 경제적인 면에서 진행하였다. 현재, 우리 나라의 송이 생산량은 자꾸 떨어져 많은 문제점이 제기되는 일본과 동일한 실정에 있다. 많은 연구에도 불구하고 인공재배와 같이 근본적으로 해결하지 못하는 실정에서, 송이에 대한 분자 생물학적인 연구는 최소한 어떠한 방향을 제시하는 것으로 중요하다고 생각된다.

최근에 송이에 대한 입분 조사의 연구로 송이 생산량을 증가시키고, 또한 환경조절로 송이생산을 예측하려는 연구는 시도되었다. 또한, 각각 지역에서 분리된 송이 자실체에서 송이균사를 분리하여 지역적인 차이점과 송이균사의 배양 조건을 파악하였고(In press), 또한, 송이 생산에 관여되는 소나무의 뿌리와 균의 외생균근도 관찰하였다(Ogawa,

1976, 1979; Ohara and Ogawa, 1982). 이러한 연구는 단편적인 연구로서 어떤 해결책도 가지지 못하고, 단지 송이 균사에 대한 연구의 어려운 점이 크게 부각되었다(Wang *et al.*, 1995, 1996). 송이 균사의 성장은 다른 어떤 균보다 느리고, 고품 배지에서 성장이 불량한 것이 관찰되었다. 그러나, 액침 배양은 고품 및 한천 배지보다 더욱 좋으나(Min *et al.*, 1998), 성장이 느려 산업에 응용하기 어려운 것으로 생각된다. 현재, 송이 균사를 배양하면서 혹은 송이 자실체 생산을 위한 인공 배양을 하면서 문제점은 우리가 키우는 균사가 과연 송이의 균사인지 확인하는 것이 중요한 것으로 생각된다. 이러한 면에서 송이 자실체에서 분리된 송이 genomic DNA를 이용하여, 송이균사를 확인하는 primer나 probe 개발이 시급한 실정이다. 본 실험실에서 개발된 방법은 야외 송이 실험에서 송이 균사 확인이나 인공 접종된 소나무의 뿌리에서의 송이 균사의 확인 등 앞으로 송이 연구에 필요한 기초가 될 것으로 생각된다.

### 재료 및 방법

#### 균주

송이 균주는 임업연구원에서 1996년부터 1998년까지 여러 지역을 조사하여 얻은 것이며(Table 1), 그 외의 외생균근의 버섯도 송이 생산지 주변에서 1998년에 채집하였다.

\*Corresponding author

**Table 1.** List of mushrooms and its isolates used in this study

ID	Isolates marked	Localities <sup>1</sup>	Remarks	Collector
1	A (Basidiocarps)	Hong Chon	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I <sup>2</sup>
2	B (Basidiocarps)	China	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
3	D (Basidiocarps)	Wool Jin	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
4	E (Basidiocarps)	Young Duck	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
5	F (Basidiocarps)	Go Sung	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
6	G (Basidiocarps)	Yang Yang	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
7	H (Basidiocarps)	Ye Chon	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
8	I (Basidiocarps)	Chong Do	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
9	L (Basidiocarps)	Phal Gon Mt.	<i>Tricholoma matsutake</i>	Sang-Sun, Lee
10	K (Basidiocarps)	Chong Do	<i>Tricholoma matsutake</i>	Sang-Sun, Lee
11	O (Basidiocarps)	Ye Chon	<i>Tricholoma matsutake</i>	Sang-Sun, Lee
12	<i>Agaricus bisporus</i>		edible mushroom	Markets
13	<i>Flammulina velutipes</i>		edible mushroom	Markets
14	<i>Pleurotus ostreatus</i>		edible mushroom	Markets
15	<i>Lentinus edodes</i>		edible mushroom	Markets
16	<i>Lepista nuda</i>	Jo Ryong Mt.	Purple edible mushroom	Sang-Sun, Lee
17	<i>Boletus edulis</i>		<i>Boletus</i> sp.	Sang-Sun, Lee
18	<i>Russula emetica</i>	Sok Ri Mt.	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
19	<i>Russula aurata</i>	Sok Ri Mt.	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
20	<i>Boletus edulis</i>	Jo Ryong Mt.	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
21	<i>Russula foetnes</i>	Hong Chon	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
22	<i>Amanita vaginata</i>	Ji Ri Mt.	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
23	<i>Amanita pantherina</i>	Hong Chon	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
24	<i>Amanita subjunquillea</i>	Hong Chon	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
25	<i>Pholiota squarrosa</i>	Sok Ri Mt.	Wood rot fungi	Sang-Sun, Lee
26	<i>Suillus bovinus</i>	Hong Chon	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
27	<i>Russula rosacea</i>	Ji Ri Mt.	Ectomycorrhizae	Sang-Sun, Lee
28	<i>Trametes suaveolens</i>	Jo Ryong Mt.	Wood rot fungi	Sang-Sun, Lee
29	<i>Armillariella tabescens</i>		Pathogenic fungi	F. R. I.
30	<i>Armillariella</i> sp.		Pathogenic fungi	F. R. I
31	C (Basidiocarps)	Sam Cheok	<i>Tricholoma matsutake</i>	F. R. I
46	unknown fungi	Nam won	Rhizopogon species(?)	F. R. I

<sup>1</sup>Localities indicated the forestry areas near the city in Korea.

<sup>2</sup>The Basidiocarps or Mycelia stored at Lab. of soil microbiology in Korea Forestry Research Institute. The mycelia were directly isolated from the basidiocarps (the 1 to 17 marked) by a selective agars and applied to confirmations by the probe made in this work.

이들은 송이 발생기 전에 송이생산지를 방문하여 버섯을 채집한 후 동정하였다(Imazeki and Hongo, 1984; Singer, 1986; Smith, 1973). 이들 임업 연구원에서 채집한 버섯과 전년도까지 채집 조사된 버섯들을 냉장고에 보관하여 실험을 하였다. 채집된 버섯은 최소한 버섯에 관련된 3인 이상의 연구자에게 의뢰하여 동정하였다. 이들 버섯은 주로 소나무 림 주변에서 채집된 것으로 송이와 비교하기 위한 것들이며, 가능하면 자실체에서 genomic DNA를 추출하였다. 또한, 필요에 따라서, 채집된 송이들은 일반적으로 담자낭균 분리배지(GS; Ginterova and Janotkova, 1975)를 통하여 균사를 분리하였고(Lee, 1991) 송이 자실체는 냉동고에 보관하였다.

#### DNA추출

멸균된 막자사발에 냉동 보관된 송이와 균사체를 넣고 액체질소를 넣은 후, 갈아서 분말로 만든 후 genomic DNA를 추출하였다(Lee and Sung, 1997). Taq polymerase와 dNTP는 (주)바이오니아(<http://www.bioneer.co.kr>)에서, primer는 Operon Technologies Inc(<http://operon.com>)에서 구입한 OPO kit(ten-mer)를 이용하였다(Lee and Sung, 1997; Lee 등, 1997). 25  $\mu$ l인 PCR 반응액에는 10 $\times$  reaction buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 10 nM, Taq polymerase 1 unit, primer 0.2 pM, DNA 25 ng 등을 혼합하였다. 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 전 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 37 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 40 cycles 진행시켰고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다(Cook 등, 1996a, b). 이때 주로 사용한 primer는 -5' ACGTAGCGTC 3'-(OPO-2)를 사용하였

며, 각각 추출된 genomic DNA에 반응시켰다. 위 용액에서 PCR 반응에 사용된 mineral oil을 제거한 반응물을 DNA PrepMate™((주)바이오니아)로 정제하여 DNA sequencing을 하고 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)를 혼합하여 제조하였다. PCR이 끝나면 4  $\mu$ l의 stop solution을 가하여 94°C에서 2분 동안 가열한 다음 6% polyacrylamide gel에 전기영동하고 (Lee and Hong, 1998), 전기 영동한 유리판을 최종적으로 Silverstar™ staining Kit ((주)바이오니아)을 사용하여 염색하였으며, 자세한 사항은 사용 설명서를 따랐다.

#### Dot blot

송이의 genomic DNA에 존재하는 0.75 kb DNA fragment의 copy수를 확인하기 위해 송이버섯으로부터 genomic DNA를 추출한 다음 제한효소로 500~2,000 ng의 DNA를 절단하였다. 제한 효소를 처리한 genomic DNA는 40V에서 8시간 동안 1.2% agarose gel 상에 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 후 gel 중에 존재하는 DNA를 membrane에 transfer하여 southern blot을 하였다. 이때 probe는 OPO-2 primer를 이용한 RAPD 분석시 야생 송이에 특이적으로 나타나는 0.75와 1.5 kbp DNA bands를 사용하였다. Agarose gel에서 DNA를 분리하기 위하여 gene clean kit (Bio 101, USA)를 사용하였고, southern blot 및 dot blot의 방법으로 송이를 확인하였다. 이때, PCR 반응에서 나타난 bands를 짧게 자른 후에 NaCl 용액 400  $\mu$ l를 넣고 50°C에 5분간 용해하였다. 분리된 DNA band를 일반적으로 사용하는 방법으로 원심 분리하여 보관하였다(Biochemica). South-

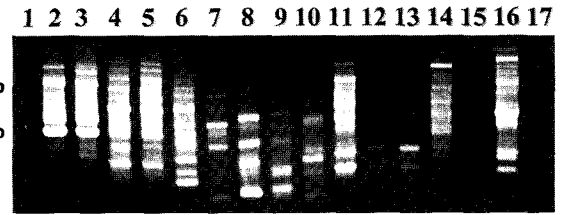


Fig. 1. Polymorphism of the PCR-RAPD of the genomic DNA's of the various ectomycorrhizal fungi reacted with the OPO-2 primer. 1. Marker, 2. B (Basidiocarps) China, 3. E (Basidiocarps), Young Duck, 4. *Russula aurata*, 5. *Boletus edulis*, 6. *Russula foetnes*, 7. *Amanita vaginata*, 8. *Russula emetica*, 9. *Amanita pantherina*, 10. *Amanita subjunquillea*, 11. *Pholiota squarrosa*, 12. *Suillus bovinus*, 13. *Russula rosacea*, 14. *Trametes suaveolens*, 15. *Armillariella tabescens*, 16. *Armillariella* sp.

ern blot과 dot blot는 ECL(Enhanced Chemiluminescence) directed nucleic acid labelling system(Amersham, USA)을 이용하여 관찰하였다(Bothwell 등, 1990; Kazan 등, 1993).

## 결 과

#### 채집

송이 균사는 본 실험실과 임업연구원 버섯 연구실에서 서로 다른 방법을 통하여 분리하였다. 본 실험실에서는 송이 자실체를 이용하여 genomic DNA를 분리하였으며, 자실체에서 분리된 균사는 사용하지 않았다. 송이는 과거 3~4년 전에 채집하여 보관된 자실체를 실험에 사용하였다. 송이의 genomic DNA는 각 지역에서 채집한 송이에서 추출하였으며 이를 비교하기 위한 외생균근균의 버섯은 모두 송이 발

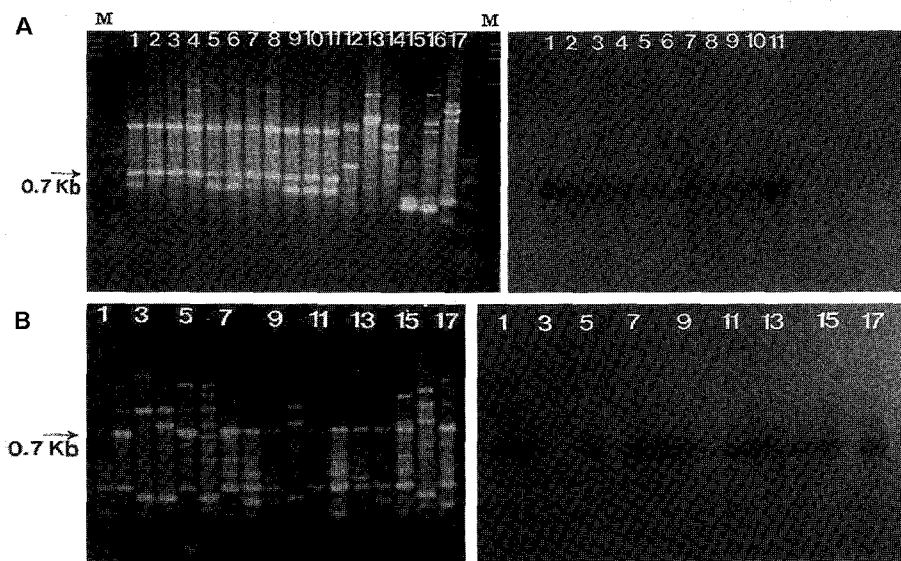


Fig. 2. Polymorphism of the PCR-RAPD of the genomic DNA's of *T. matstake* (A) and various cultivated fungi (B) reacted with the OPO-2 primer. The right figures indicated the results of Southern hybridization with 0.75 kbp DNA bands: The upper marked: Lane M, DNA sizes marked, 1-17 the basidiocarps of *T. matstake*. The bottoms marked: Lane M, DNA size marked: 1-11 *T. matstake*, 12. *Agaricus bisporus*, 13. *Flammulina*, 14. *Pleurotus* sp. 15. *Lentinus edodes*, 16. *Lepista nuda*, and 17. *Boletus* sp.

생지인 홍천(1998년 9월), 충북 괴산 조룡산(1995, 6, 7년의 8~9월) 및 충북 괴산의 월악산(1998년 9월)에서 채집하여 본 실험에 이용하였다(Table 1). 이들 연구 결과, primer OPO-2를 이용하여 PCR을 했을 때, 송이에 대해 특이한 bands를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이때 사용한 버섯은 송이와 느타리, 표고, 및 팽이와 같이 재배되는 버섯과 Agaricales인 양송이도 구입하여 사용하였다. 그 외의 외생균근의 버섯은 주로 그물버섯 종류와 무당버섯과 광대버섯 종류로 소나무 군락에서 많이 나오는 버섯들이고, 대개는 버섯 채취시에 나무 뿌리가 있는 것을 확인하였다(Table 1). 이러한 버섯들을 이용하여 추출한 genomic DNA의 PCR-RAPD을 비교했을 때, 송이만이 primer OPO-2에 대해 특이적인 1.5와 0.75 kbp band가 확인되었다(Fig. 1, 2). 위에서 조사된 특이적인 band에 southern blot과 dot blot을 수행하였을 때, 송이의 genomic DNA에서만 반응되는 것을 관찰하였다(Fig. 2, 3). 여러 가지 버섯들의 genomic DNA의 southern blot을 비교하였을 때, 1.5 kbp band에 대하여는 몇 개의 버섯 DNA에서 반응하였으나, 0.75 kbp band에 대하여는 송이 genomic DNA만 반응하고 다른 것은 없었다(Fig. 2). 또한, dot blot에서도 비슷한 결과가 확인되었다(Fig. 3(A), (B)). 이러한 실험 결과를 통해 송이 genomic DNA에만 특이적으로 반응하는 band를 발견하였다. 송이 genomic DNA에서 이러한 특수한 밴드가 몇 개나 있는가를 파악하기 위하여, 제한 효소를 처리하여 실험하였다(Fig. 3(C), (D)). 우선, 송이 genomic DNA를 주어진 제한효소

(restriction enzymes)로 처리하여 여러 개의 절편을 얻은 후, southern blot를 하였다. 그 결과, 한개의 DNA 절편에서 southern blot이 일어난 것으로 보아 한 copy 정도가 있는 것으로 나타났다. 그러나 여러 개의 제한효소에 의한 송이 genomic DNA에 대한 절편들은 본 실험실에서 명확하게 나타나지 않았다.

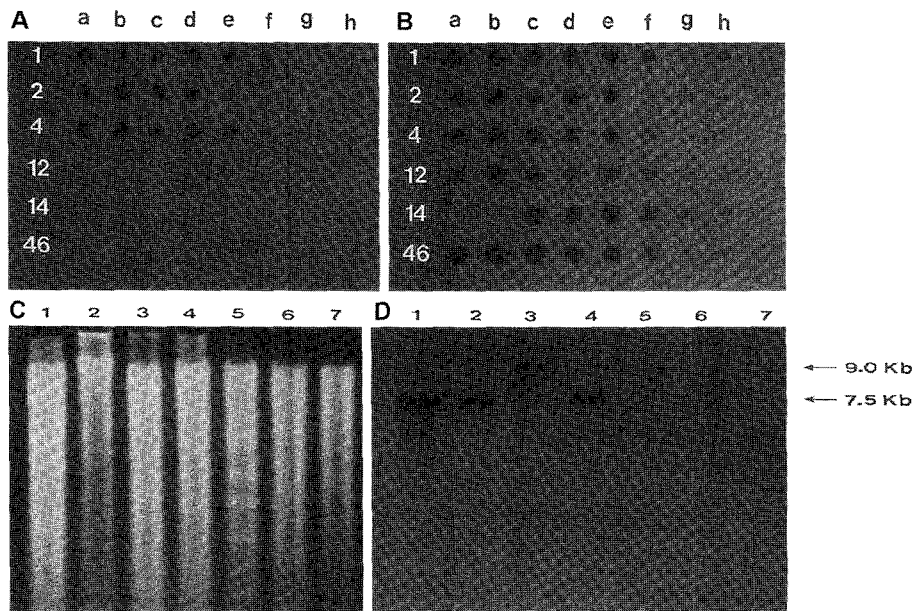
**염기서열**

분리된 750 bp의 특이적인 band가 염기서열에서 770 bp의 염기로 분석되었다. 이들은 (주)바이오니아에서 시판하

```

5'-ACGTAGCGTCGTGCCAGCCCAAAAGTCTTCCTTCAATTTTGCCTACATCAGGAATGGTGGTTGCATGA
CTTTGGCTGGACACTTACCACCAAGGCTTGTTCACCAAGAGTCCGAGCTCGTCTAGTTTCGAGCCGCGGACG
AAGTCCAGTCCAGCACAACACCCCAATAGAAGGAAGGGCAAACATACGTAGAGCGTGACAAAT
TCGACAAGTACAGATTTCAAAGGACAGAGGCATGTGAACAGTTCAACCACGTTCAGAGACCCGATGATG
AGTGGGCCACAGCGATGTGAGCGTGCAGAAATCGTTACATGCCTTGAATTAACCTCGAAATACTTGTGTTG
TTGTAAGAAGGCGGAATGATTTGCGCGTTTGCTATCCGCAATCCGAAATACACGTTTGGTAGTCTCAA
CCGATCCTATAGACTTCTCAAATCGACATAGATACGACCCGATAAGTTTCCCGTCAATGACGACGGTTC
AGGTGCTGCTTTAGAGGCTTCAGCGTCCGTTGCCGAGATGATATTGTATGCGTCCCTCCGCAACGTCT
AGTCCATCTATCCAGTCCCAAGAAGTGATACGAGCTTTCTTTGGCTTGAATGGACAGGTTGTAAACA
GGCGGAAAGACTACGGACCCCTGACGAGACCCCGTTATGTGTGTAGCATGGCGTAAAGCGGAAACAGCGG
GAACGTGCTTGAATTTATTTTATGCCCAATCCGAAACCTCGTGGTAAAGGCGTGTACGATGTTTC
TTGTTTCTGTTTCTCCCTCATGGACGCTACGT-3'
    
```

**Fig. 4.** The DNA sequences of the 750 bp band made from the reactions of PCR-RAPD with the OPO-2 primer. The ten letters underlined at both ends are the sequences of the primer OPO-2.



**Fig. 3.** Dot blot of various genomic DNA's hybridized with the 750 bps and 1.5 kbps manipulated by the Primer OPO-2 and PCR-RAPD (A, B). The lanes indicated the concentrations of *T. matsutake*: a 150 ng, b 100 ng, c 75 ng, d 35 ng, e 20 ng, f 10 ng, g 2 ng, and h 1 ng of genomic DNA's. The columns marked: 1, 2, 4; *T. matsutake*, 12 *Agaricus bisporus*, 14 *Pleurotus* sp., and 46 unknown species of *Rhizopogon* sp collected from NamWon. Southern blots of the whole genomic DNA of *T. matsutake* digested with the restriction enzymes (C, D); The 2,200 ng of genomic DNA (lane 1) digested with *EcoRI* (1), The 2,200 ng with *SalI* (2), 2000 ng with *PstI* (3), 2000 ng with *HindIII* (4), 2000 ng with *BamIII* (5), 2000 ng with *EcoRI* (6) and 1000 ng with *EcoRI* (7), respectively; The digestions (C) and Southern hybridizations (D).

는 염기서열 분석 kit를 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 여기서 사용된 primer OPO-2의 염기서열에 대한 것이 양끝에 있으므로 우리가 분석한 750 bp의 DNA 절편으로 판독되었다(Fig. 4). 이러한 것은 5'→3'과 3'→5'쪽의 양방향에 있는 염기서열과도 일치하였다. 이들을 NCBI

을 이용하여 다른 DNA sequence과 protein에 대한 유전자에 관하여 조사하였다(Fig. 5). 그 결과, 단 19~23 bps의 염기서열만이 다른 알려진 유전자와 동일한 것으로 나타났다. 이들은 아주 짧은 염기서열로 상동성이 상당히 높게 나타났다. 이러한 염기서열에 대한 단백질에 대한 조사도 최소

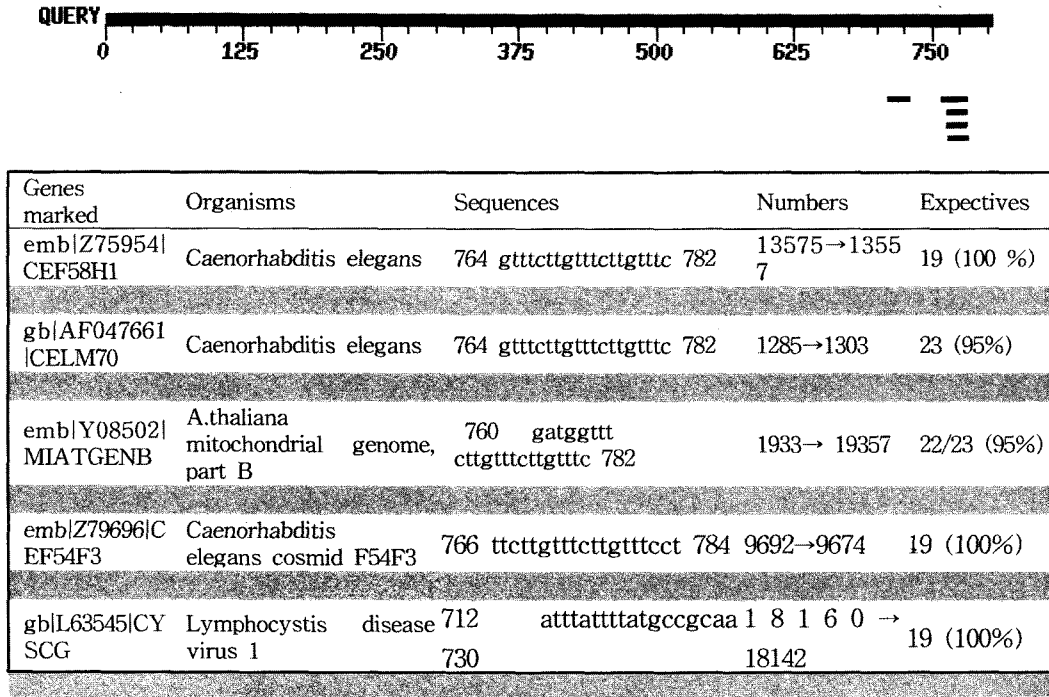


Fig. 5. The DNA sequences matched with the blast researchings by NCBI.

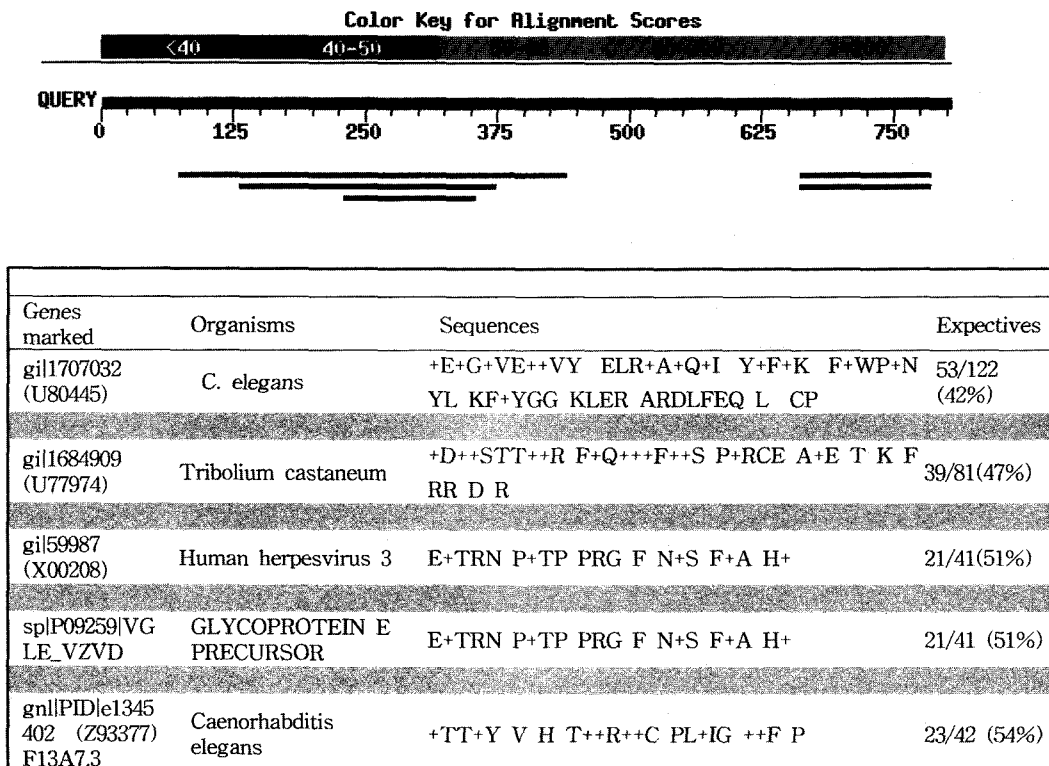


Fig. 6. The translations of DNA sequences.

한 동물의 단백질과 같은 것으로 나타났고(Fig. 6), 세포막 구조에 관련된 glycoprotein과 비슷하였다. 우선, 이미 진행된 연구에서 5개의 정보에서 122개의 단백질 서열과 비교하였고, 42~81개의 단백질 서열과도 비교하였었다. 그러나, 이러한 비교에서 각각의 단백질 서열에 대한 상동성은 41~51% 정도이었다(Fig. 6). 주어진 염기 서열을 이용하여 단백질의 서열을 염기서열의 첫째 (A)와 두 번째 (C) 혹은 세 번째 (G) 핵산 순서부터 단백질을 만들어 보았다. 각각의 경우 단백질에서 많은 stop sign이 나왔으며, 최소한 염기서열의 770 bps에서 2~3번씩이나 반복되었다. 이러한 자료는 NCBI와 한국의 유전자 bank에서 비교한 것으로 자료화하지 않았다.

## 고 찰

본 실험은 자연의 송이를 확인하는 방법으로 이용하게 될 primer와 probe개발에 관한 것이다. 이들은 간단히 송이 균사를 판독하는데 PCR-RAPD에서 나온 specific band와 dot blot의 결과를 서술한 것이다. 본 논문에서는 가능한 송이 산지에서 나온 외생균근 버섯을 여름과 가을 채집하여 검정하는데 이용하였다. 이들의 결과, 송이 생산지에 생산되는 외생균근의 버섯에서는 반응이 없었으므로, 송이만 갖는 특이적인 band로서 생각되어진다. 또한, 송이 genomic DNA를 제한효소로 처리한 결과해서도 한 개의 DNA절편에 southern blot이 일어나는 것으로 보아 송이 genomic DNA에 한 copy를 갖는 것으로 보인다. 이러한 결과는 앞으로 소나무 림 주변에서 송이 균락 판독에 도움이 될 것으로 생각된다. 염기 서열을 통하여 다른 gene bank에 포함된 다른 균의 genomic DNA와도 비교하였다. 또한, 염기서열이 확인된 이러한 probe DNA sequence를 이용하여 여러 가지 기본적인 조사를 하였다. 염기서열에 대한 조사에서는 알려진 염기서열에 대한 상동성이 발견되지 않았다. 또한, 단백질의 서열에서도 이러한 것이 발견되지 않았으며, 아미노산의 서열에서도 많은 stop sign이 있었다. 따라서 이들의 결과로 볼 때, 송이를 구성하는 단백질에 관련된 유전자가 아니고 정보에 관련된 유전자일 것으로 생각된다. 일단, 송이 구별에 중요한 DNA절편은 최근 2~3년간 연구한 내용에서 송이만 갖는 특이한 것으로 여겨진다. 여기서 유전에 대한 정보는 다른 생물의 유전자와의 상동성이 발견할 수 없는 유일한 것으로 밝혀졌다. 앞에서 언급한 대로 단백질에 대한 유전자의 가능성도 거의 없는 것으로 보아 송이에게 특이한 유전자로 생각되어지고, 어떤 기능적인 단백질의 유전자라기 보다는 다른 유전자로 생각되어진다. 본 연구의 결과는 최소한 야외에서 외생균근의 연구에 송이를 확인하는 방법으로 이 특이적인 DNA절편은 매우 중요한 것으로 생각된다.

## 적 요

우리 나라에서 자생하는 송이 버섯의 구분 방법으로 제

조된 OPO-2 primer를 사용할 때 송이에게만 특이적인 band가 나타났다. 그리고 제한효소 처리와 dot blot의 결과에서 이들 특이적인 DNA 절편은 송이 genomic DNA에서 한개의 copy만 존재하는 것으로 나타났으며, 다른 외생균근 버섯의 DNA에서는 발견되지 않았다. 또한, 이들 DNA 절편의 염기서열을 분석한 결과 770 bps로 나타났다. 이러한 유전자의 정보를 이용한 NCBI Blast 염기서열 분석에서 높은 상동성을 갖는 유전자는 발견할 수가 없었고, 단백질 서열 분석에서도 거의 동일하게 나타났다. 따라서 translation 통한 아미노산 서열분석에서 이들 DNA 절편의 유전자는 단백질에 관한 유전자라기 보다는 다른 정보와 관련된 유전자로 생각되어진다.

## 감사의 글

본 연구는 '97, 8년도 농림수산 기술개발사업(첨단기술개발과제: 송이 발생예찰에 의한 환경 관리기술 개발)의 일환으로 임업연구원 산림미생물실과 공동으로 연구(협동과제: 송이 배양특성 규명 및 우수 균주 대량 증식법 연구)으로 개발된 것임.

## 참고문헌

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Biochemica. 1993. The Dig System User's Guide for Filter Hybridization. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Sandhofer Strasse 116, D-6800, Mannheim 31.
- Bothwell, A., Yancopoulos, G. D. and Alt, F. W. 1990. Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes. Tones & Bartlett Publishers, Inc. Boston, USA.
- Courtecuisse, R. and Duhem, B. 1995. Collins Field Guide Mushrooms & Toadstools of Britain and Europe. 3rd 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.
- Grube, M., Depriest, P. T., Gargas, A. and Hafellner, J. 1995. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycol. Res.* **99**: 1321-1324.
- Hall, I. R., Strong, G. G., Wang, Y. and Plattner, I. 1992. Progress in research on truffles and other edible fungi in New Zealand. *Mycologia e Vegetazione Mediterranea* VII (2); 271-274.
- Imazeki, R. and Hongo, T. 1984. Colored Illustrations of fungi of Japan. Hoikusha. Publishing Co. Ltd. p. 181. see pg. 24-28.
- KFR (Korean Forestry Reports). 1981a. Reports on the pine-mushrooms in Korea, Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 44 (Dec., 1981 published).

- KFR (Korean Forestry Reports). 1981b. Proceedings of Seminar on the pine-mushroom cultivations, Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 44 (Dec., 1981 published).
- KFR (Korean Forestry Reports). 1984. Proceedings of Research and Technique on the production of pine-mushroom, Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 58 (July, 1984 published).
- KFR (Korean Forestry Reports). 1986. Production technique and Research of forest mushrooms in Japan, Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 73 (May, 1986 published).
- Lee, S. S. 1991. Biology of *Tricholoma matsutake* found at *Pinus densiflora* communities in the areas of Kyoung Sang Do. *Kor. J. Mycol.* **19**: 203-213.
- Lee, S. S. and Hong, S. W. 1998. The 18s rDNA sequences of the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **26**: 256-264.
- Lee, S. S., Park, D. H., Sung, C. K. and Yoo, J. Y. 1997. Studies on the yellow fungal isolates (*Aspergillus* species) inhabiting at the cereals in Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**: 35-45.
- Lee, S. S. and Sung, C. K., 1997. The mycelia isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**: 121-120.
- Min, E. G., Chung, K. K. and Han, Y. H. 1998. Effect of Complex nitrogen source on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* **26**: 361-364.
- 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. 1979. 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.
- 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.
- 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. pg 981+pl 88.
- Smith, A. H. 1973. Agaricales and related secotioid Gastromycetes. pg 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., 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. Mosgiel, New Zealand.
- Wang, Y., Sinclair, L., Hall, I. R. and Cole, A. L. 1995. *Boletus edulis* sensu lato: a new record for New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **23**: 227-231.