

Phylotype에 의한 수종의 *Phellinus*속의 분류체계 확립 및 종간구별을 위한 신속동정법 개발

김성윤 · 이재윤 · 김기영 · 이기원 · 박재민 · 김문옥 · 이태호 · 이재동*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Taxonomical Classification and Species-specific Detection of Genus Some *Phellinus* using Phylotype

Cheng-Yun Jin, Jae-Yun Lee, Gi-Young Kim, Ki-Won Lee, Jae-Min Park,
Mun-Ok Kim, Tae-Ho Lee and Jae-Dong Lee*

Department of microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received November 20, 2003)

ABSTRACT: This study was carried out to identify the phylogenetic relationship of *Phellinus* species and to know its distribution by comparing the DNA sequences of internal transcribed spacer regions(ITS1 and ITS2) and 5.8S ribosomal DNA (rDNA) repeat unit. The *Phellinus* species had their specific sequences in ITS1 and 2 regions depending on species. The comparison of the ITS sequences of standard strains indicated that the sequences of ITS1 were more variable than those of ITS2. Nine strains of the commercial products of *Phellinus* species used in this study were identified as *P. linteus*, *P. baumii*, *P. igniarius*, and *P. pini*. Most of commercial species were *P. pini* and *P. baumii*, and *P. gilvus* was not found. Also, *P. linteus* was only found in forms of mycelial culture rather than fruiting body. Moreover, the species-specific primers were designed based on ITS sequence data. Each species-specific primers were bound in *P. linteus*(ITSF-PL2R), *P. baumii*(PB1F-ITS4R), *P. igniarius*(IF1-IR3), *P. pini*(PF1-PR3), and *P. gilvus*(GF2-GR4), respectively. These primer sets would be useful for the detection of specific-species among unidentified *Phellinus* species rapidly.

KEYWORDS: Gene probe, *Phellinus*, Phylogentic analysis

진흙버섯속(*Phellinus*)은 담자균아문(Basidiomycotina), 모균아강(Hymenomycetidae), 민주름버섯목(Aphyllphorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)에 속하는 그룹으로 균종은 일반적으로 명료한 형태의 자실체를 형성하며, 자실체는 평활, 치아상, 망상, 관공상, 또는 주름 모양을 나타내고 담자기과의 표면은 평활한 자실층으로 되어 있으며, 섬유질에서 딱딱한 것까지 자실체는 다양하다. 민주름살버섯목의 각 속간의 분류에는 담자기과의 자실층의 형태를 기본으로 Donk(1964)에 의해 22과로 분류되었다(이재동, 1998).

진흙버섯속은 백색부후균으로 주로 참나무, 뽕나무와 같은 활엽수 뿐만 아니라, 소나무, 전나무와 같은 침엽수에서도 서식하며, 자실체는 목질로 대가 없다. 진흙버섯류는 형태적으로 모두 변이가 심하고 종류가 다양할 뿐만 아니라 자실체는 코르크질로 단년생 또는 다년생으로 알려져 있으며 자실체는 나무에 부착된 편반구형으로 보통 상하가 서로 연결되어 있는 균생 형으로 발생하며 크기는 지

름 5~12 cm 정도로 상층표면은 암황갈색으로 움모가 있고 가장자리는 갖에 비해서 색이 옅고 관공의 표면은 암자갈색으로 mm당 6~8개가 있으며, 포자는 4~5×3~3.5 μm로 타원형이며 표면은 평활하다고 알려져 있다. 또한, 다른 버섯과는 달리 감자연결(clamp connection)을 형성하지 않는 특징이 있으며, 독특한 화학적 성질의 하나로써 KOH 용액에 닿으면 영구적으로 검게 변하는 특성을 지니고 있으므로 손쉽게 확인할 수 있다(Donk 등, 1964).

근래 상황버섯이라고 알려진 목질진흙버섯(*P. linteus*)과 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*)은 *Phellinus*속의 균종 중에서도 매우 강력한 종양 저지율을 나타내며, 이들의 자실체 추출물이 각각 96.7% 및 87.4%의 높은 항암능을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Ikekawa 등, 1986; Shibata 등, 1968). 이들 버섯 균사체 추출물에 대해서도 항 종양작용, 면역조절 효과 및 임상실험에 의한 안정성이 입증되었으며(Lee 등, 1996; 배 등, 1996; Jong 등, 1991), 각종 산업적인 측면에서의 응용연구가 활발하게 진행되기에 이르렀다. 한편 *Phellinus*속 내의 여러 균종에서 제한효소의 전기영동 pattern의 비교로 *Phellinus*속의 종들이 동일 속으

*Corresponding author <E-mail: pdyma@daum.net>

로 분류되기에는 대체로 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며, *Phellinus*속이 속해 있는 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae) 내의 유사한 속들을 비교 연구해야 한다고 보고된 적이 있다(정 등, 1994). *Phellinus*속이 속하는 민주름버섯(Aphyllphorales)목은 약 2,000의 균종을 포함하는 매우 크고 heterogenous한 목이다. 많은 연구자들은 형태학적, 생리학적, 그리고 세포학적 관점에서 이 목에 포함되는 균종의 분류를 시작하였으며, 현재까지도 이러한 흐름을 따르고 있다.

Aphyllphorales목의 분류체계는 거의 전적으로 자실층의 형태에 기초를 두고 있는데, Martin's(1961) classification scheme을 기초로 하여 Friesian classification을 만들었으나 이 역시 연구자의 주관적인 견해가 많이 내포되어 있다는 것이 큰 문제점으로 지적되어 왔다.

최근의 연구에 의하면 국내에서 재배되고 있는 균종이나 수입되어 유통되고 있는 상황버섯 및 유사종은 말뚝진흙버섯(*P. igniarius*), 목질진흙버섯(*P. linteus*), 장수상황버섯(*P. baumii*), 낙엽송진흙버섯(*P. pini*) 및 마른진흙버섯(*P. gilvus*) 등의 5종으로 분류되고 있다. 그 중에서도 상황버섯으로 알려진 *P. igniarius* 및 *P. linteus*에 대한 동북아 각국의 견해가 조금씩 다르게 나오고 있다. *P. linteus*는 중국의 본초강목 중 본초강목에 처음으로 소개되었으며, 중앙 대사전에는 *P. igniarius*가 상황버섯으로 소개되었다. 1989년에 발표된 중국의 약용진균문헌에는 *P. igniarius*를 정식으로 상황버섯으로 채택하였지만, 1975년에 발표된 일본의 균류도감에서는 *P. linteus*를 상황버섯으로 채택하였다. 또한 *P. linteus*와 국내에서 재배되고 있는 상황버섯의 대부분을 차지하는 *P. baumii*(장수상황버섯)가 일본의 균류도감에서는 동일종으로 발표되었지만, 최근 Dai(1998)의 발표에 따르면 *P. linteus*와 *P. baumii*는 명확히 다르다고 명시하고 있다.

진핵세포의 ribosomal RNA 유전자(rDNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 각각의 rDNA 사이에 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다 초기에는 5.8S 부위에 대한 염기서열의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었다(Hori 등, 1986; Robert 등, 1995; Kwon 등, 1997). 그렇지만 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고, 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 염기서열을 나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 난점이 있었다. 이후 분자생물학적인 실험 기법의 발달과 더불어 Nishida 등(Nishida and Sugiyama, 1993)은 *Taphrina*속, *Saitoella*속 그리고 다른 고등균류사이에서의 계통분석에 18S rDNA 염기서열을 이용하였고, Hendriks 등(Hendriks 등, 1991)은 의학적으로 중요한 *Candida*속 내의 계통분석에, Swann 등(Swann, 1993)은 담자균류의 분류에 18S의 부분 염기서열을 결정하여 분류의 지표로 사용하였다. 18S 및 28S rDNA는 통계적으

로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보전이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다. 그러나 18S와 28S는 각각 1600 bp와 3300~4800 bp로 그 전 염기서열을 결정하는 것은 많은 시간과 노력을 요구하고, 부분염기서열은 보다 광범위한 계통발생학적 진화관계를 가지는 속간의 비교에는 대상으로 하는 염기서열의 부족으로 분류지표로 이용될 수 있는 정보량이 적은 난점이 지적되었다. 반면에 ITS는 가운데의 5.8S를 포함하여 500 bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약이 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일속 내의 중간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다.

이러한 보고를 바탕으로 본 연구에서는 아직까지 정확하게 분류체계가 확립되어 있지 않은 *Phellinus*속의 계통관계를 명확히 하는 수단으로 rDNA에 대하여 PCR-amplified ITS 부위의 염기서열을 비교 분석하였고, 또한 *P. igniarius*, *P. linteus*, *P. baumii*, *P. pini* 및 *P. gilvus*에서 특이적으로 나타나는 염기서열 부분을 probe로 개발하여 이들의 신속동정을 가능케 하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

본 실험을 위하여 계통분류에 사용할 기준종으로서 American Type Culture Collection(ATCC), Korean Collection for Type Culture(KCTC), Korea Food & Drug Administration(KFDA), Mycological Lab. of Pusan National University(MPNU)로부터 *Phellinus*속의 균주를 분양받았다. 또한 현재 국내재래시장 및 농가재배사로부터 국내산, 중국산, 북한산 및 캄보디아산 등의 자실체버섯을 분양받았다. 균주번호, 종명, 원산지 및 accession number를 Table 1에 나타내었다.

배양조건

균주의 복원을 위하여 Potato Dextrose Agar(PDA) 배지에 삼점배양을 하고 25°C 암실에서 3일에서 일주일간 배양하여 오염의 여부를 확인하였다. 순수배양이 완료되면 PDA 사면배지에 균을 접종하여 25°C에서 15일간 배양 후 4°C에 보관하고 일부는 유동파라핀을 사용하여 보관균주를 만들고 -70°C에서 반영구적으로 보존하였다.

DNA 추출

PDA 배지에 배양한 배양물을 Whatman No. 1 filter

Table 1. List of *Phellinus* species used in this study for the nucleotide sequence analyses

Strains*	Species	Geographical origins	Accession no. (ITS)
KCTC 6228	<i>P. igniarius</i>	-	AF056192
MPNU 7005	<i>P. baumii</i>	-	AF200230
ATCC 26710	<i>P. linteus</i>	-	AF153010
ATCC 12240	<i>P. pini</i>	-	AF250930
ATCC 26729	<i>P. gilvus</i>	-	AF250932
KFDA P021	<i>P. igniarius</i>	북한산(송암영농)	AF436628
KFDA P016	<i>P. linteus</i>	한국산(현미균사체)	AF436626
KFDA P017	<i>P. pini</i>	중국산	AF436620
KFDA P019	<i>P. pini</i>	중국산(경동시장)	AF436619
KFDA P020	<i>P. pini</i>	중국산(경동시장)	AF436621
KFDA P023	<i>P. pini</i>	북한산(부산항 및 경동시장 유통)	AF436622
KFDA P015	<i>P. baumii</i>	버섯돌이	AF436623
KFDA P022	<i>P. baumii</i>	북한산(부산항 및 경동시장 유통)	AF436624
KFDA P029	<i>P. baumii</i>	한국산채배	AF436625

*American Type culture collection, Manassas, USA(ATCC).

Korean collection for Type Culture(KCTC).

Korea Food & Drug Administration(KFDA).

Micro. lab. of Pusan National Univ.(MPNU).

paper로 여과한 후 TE buffer(10 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8.0)로 세척하였다. DNA 추출은 QLAGEN사의 DNAeasy Plant Mini kit 제품을 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 간략히 설명하면 균체 0.5 ml 혹은 0.1 g에 Plant Lysis Buffer 400 μ l와 Proteinase K를 20 μ l를 넣고 60°C에서 10분간 방치한 후 400 μ l의 Binding Buffer를 넣고 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액을 새 tube로 옮긴 후 Isopropanol 100 μ l를 넣고 binding column이 결합된 2 ml collection tube에 넣고 원심분리하였다. Binding column을 두차례에 걸쳐 새 collection tube로 옮긴 후 W1(washer Buffer 1) 500 μ l와 W2(washer Buffer 2) 500 μ l를 넣고 원심분리하였다. Binding column을 새 1.5 ml collection tube로 옮긴 후 Elution Buffer 50 μ l를 넣어 원심 분리해서 DNA를 모은 후 1% agarose gel에서 전개하였다.

DNA로부터 ITS1과 5.8S 그리고 ITS2 부분을 증폭하기 위해서 Bioneer사에서 구입한 20 μ l용 PCR premix를 사용하였으며 증폭을 위한 DNA 농도는 40 ng으로 조절하였다. 반응용액은 PCR premix에 DNA 1 μ l, forward primer (20 pM) 1 μ l, reverse primer(20 pM) 1 μ l, 3차 증류수 17 μ l를 넣어 섞은 후 10초간 원심분리를 하여 mineral oil 20 μ l를 첨가하였다. PCR 반응조건은 96°C에서 5분간 pre-heating시킨 다음, 96°C에서 1분간 denaturation, 48°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 30 cycle 돌린 후, 2°C에서 5분 동안 post extension하고 4°C로 유지하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 100 volt로 전개한 후 ethidium bromide(EtBr)에서 15분간 염색하여, UV transilluminator lamp상에서 밴드를 관찰하였다.

PCR primers and PCR amplification

*Phellinus*속의 rDNA의 ITS 영역을 증폭하기 위한 primer는 White 등(1990)이 제시한 것을 사용하였으며, 각 primer의 sequence 및 부착부위는 Fig. 1에 나타내었다. 분리한



Fig. 1. A structure of rDNA cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS regions used in this study. ITS5F (forward primer): 5'-GGA-AGT-AAA-AGT-GGT-AAC-AA-3' (20 mer). ITS4R (reverse primer): 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-T AT-GC-3' (20 mer). ITS: Internal Transcribed Spacers. IGS: Intergenic Spcer. ETS: External Transcribed Spacer.

Gel extraction 및 정제

PCR에서 증폭된 DNA를 EtBr이 있는 1% agarose gel에서 확인하고 gel을 오려낸 후 QX1(QIAEX 1) buffer와 QX2(QIAEX 2) buffer를 넣고 50°C에서 10분간 gel을 녹였다. 녹인 시료를 원심분리하여 상등액을 제거한 후 PE buffer를 넣고 재차 원심분리하여 건조시켰다. 건조된 시료에 200 μ l 3차 증류수를 넣어 원심분리하고 여기에 3M sodium acetate와 absolute 에탄올을 넣은 후 -70°C 혹은 -20°C에서 1시간 방치해서 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 시료에 70% 에탄올을 넣고 원심분리하여 상등액을 따라낸 후 건조시키고 멸균된 3차 증류수를 넣어 녹여서 sequencing용 시료로 사용하였다.

DNA Sequencing

Big dye PCR은 forward와 reverse 두 방향으로 하였다.

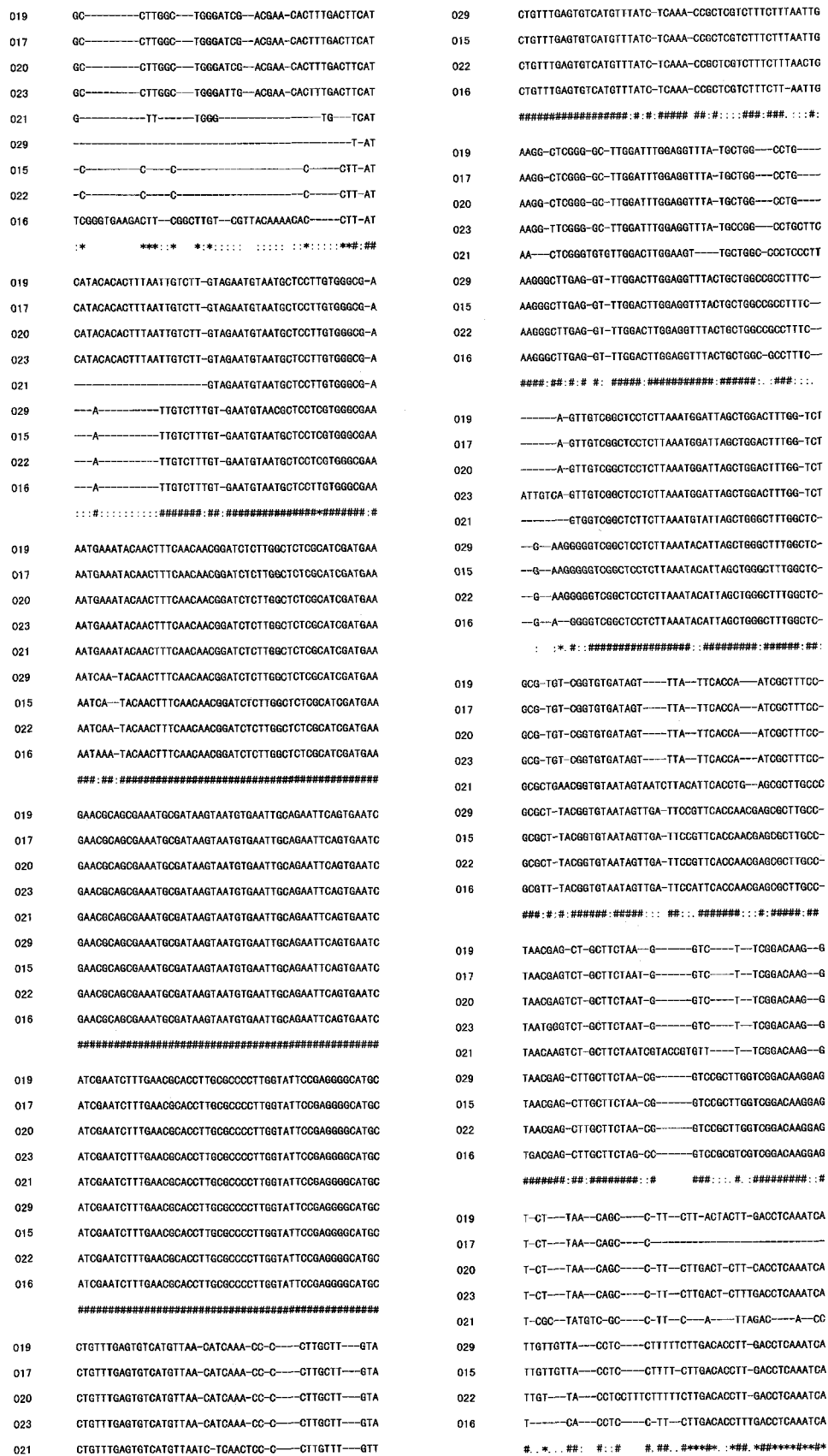


Fig. 2. Alignment of the ITS1, 5.8S rDNA, and ITS2 sequences. The alignment was generated by the multiple alignment program Clustal G using a gap weight of 5.0 and a gap length weight of 0.1. A hyphen represents a gap and four characters, '#', '*', ':', and '.', indicate positions that are 80%~100%, 60%~80%, 40%~60%, and 20%~40% identical, respectively.

200 μ l PCR tube에 Big dye(Applied Biosystems, USA) 4 μ l, DNA 시료 5 μ l, 5 pmol primer 1 μ l를 넣고 10 μ l로 PCR 하였다. PCR시 조건은 predenaturation을 96°C에서 2초; denaturation을 96°C에서 10초; anealing을 50°C에서 5초로 하여 25회 반복한 후 extension을 60°C에서 4분; storage을 4°C로 하여 Big dye PCR을 진행하였다. Big dye PCR된 시료를 새 1.5 ml tube에 담아 NaOAc와 95% EtOH를 넣어 침전시키고 원심 분리한 후 상등 액을 제거 하하고 건조시켰다. 건조된 시료에 TSR buffer를 넣어 녹여낸 후 single strand 로 만들고 실험전까지 보관하였다.

Sequencing 반응은 제조사가 제공한 protocol에 따라 AmpliTaq DNA polymerase가 포함된 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 사용한 MJ Research Gradient Cycler에서 행해졌다.

각각의 정제된 PCR product들을 대상으로 single-pass sequencing을 하였으며, fluorescent-labeled fragment들은 ethanol-침전법에 따라 unincorporated terminators로부터 정제되었다. 이러한 시료들은 3차 증류수로 재현탁하여 ABI 3700 sequencer(Applied Biosystems)에서 전기영동 함으로서 염기서열을 분석하였다. 각 시료에 대해 ITS5F (forward)와 ITS4R(reverse)의 두 primer를 사용하여 염기 서열을 분석하였고, 최종 결과를 비교하였다.

Data analysis

각 균주의 결정된 염기서열을 Clustal G multiple alignment를 시행하여 비교하였고, Neighbor-Joining method 로서 계통분석도를 그렸다.

결과 및 고찰

Sequence alignment

전국 각지에서 수집한 국내유통균주의 ITS1, 5.8S rDNA 및 ITS2부위의 염기서열을 분석한 후, alignment를 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 각 sequence들의 앞부분에 존재하는 ITS1 부위에서는 중간 변이율이 높은 것으로 나타났으며, 5.8S rDNA 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성을 나타내어 중간 변이율이 매우 낮게 나타내었다. 또한 ITS2 부위에서도 많은 염기서열상의 차이를 보이고 있으나 ITS1부위보다는 변이율이 높지 않았다. 특히 공시균주 5 종과 수집한 유통균주 9종에서 조사된 전 부위(ITS1, 5.8S rDNA, 및 ITS2)에서 많은 염기서열 차이를 보이고 있으나 같은 종으로 확인된 표준균주들과 수집균주들에서는 1~10 bp 정도의 차이만을 보이고 있는 것으로 나타났다. 이것으로 판단해 볼 때 보존성이 높은 부분, 중간정도의 부분, 그리고 변이가 심한 부분이 공존하고 있는 ITS1, 5.8S rDNA, 및 ITS2 부위의 염기서열을 비교함으로써 속 및 종간의 유연관계의 해석 및 종특이적인 probe의 디자인이 유용할 것으로 판단되었다.

인이 유용할 것으로 판단되었다.

국내 유통균주의 분류학적 위치

전국 각지에서 수집한 *Phellinus*속의 9균주에 대한 염기서열을 결정하여 alignment를 수행한 후 phylogenetic tree를 그려본 결과를 Fig. 3에 나타내었고 공시균주와 동시에 phylogenetic tree를 그려 확인해 본 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3과 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 국내 유통균주는 4개의 그룹으로 나누어짐을 확인하였고, 이

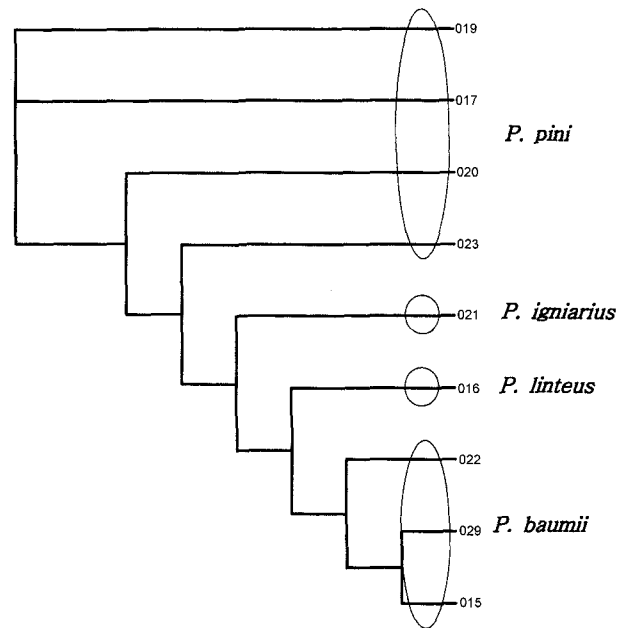


Fig. 3. Phylogenetic analysis by comparing with ITS sequences (from KFDA samples).

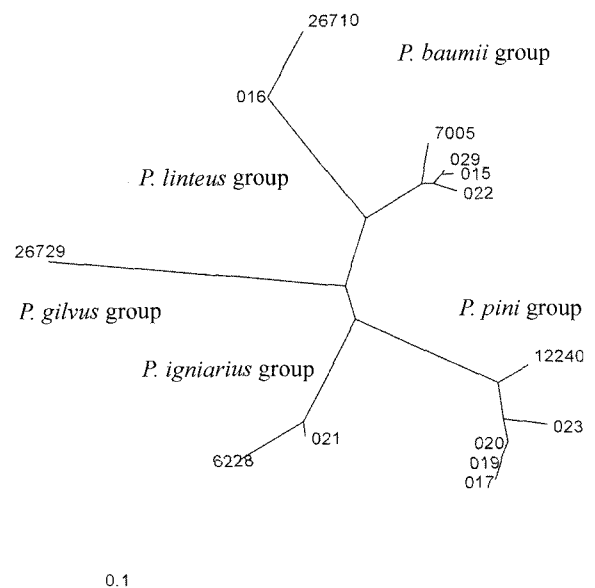


Fig. 4. Unrooted neighbor-joining tree using the analysis of ITS regions containing 5.8S rDNA.

에서 017, 019, 020, 023 균주가 동일한 염기서열을 나타내었다. 특히 이종들은 GenBank 염기서열과 대조한 결과 *P. pini*와 높은 상동성을 나타내었으며, 017 균주는 95%, 019 균주는 96.2%, 020 균주는 95%, 023 균주는 94%의

유의성을 보이는 동일종 또는 유사종으로 나타냄을 확인하였다. 그 외에 015, 022, 029 균주는 *P. baumii*와 각각 93%, 94%, 93%의 상동성을 나타내었으며, 021 균주는 *P. igniarius*와 96%, 016 균주는 *P. linteus*와 95%의 동일

Table 2. Designed primer sequences positioned in ITS regions

Species	Primer	Sequences(5'-3')	Expected product size(bp)
<i>P. igniarius</i>	IF1	5'-GGG-AGT-TAC-TAG-TCA-GAC-AG-3'	450
	IR3	5'-TTG-TCC-GAA-CAA-CGG-ACG-AT-3'	
<i>P. pini</i>	PF1	5'-TCT-TTC-CTC-CTT-AGT-TGG-AGC-CCG-C-3'	500
	PR3	5'-TTA-AAG-ACC-TTG-TCC-GAA-GAC-CAT-3'	
<i>P. gilvus</i>	GF2	5'-AGT-GAA-GTG-TCC-GCT-TTC-GTT-3'	400
	GR4	5'-TCA-CTA-GTT-ACA-TCG-GTG-AAG-ATA-3'	
<i>P. linteus</i>	ITS5F	5'-GGA-AGT-AAA-AGT-GGT-AAC-AAG-G-3'	700
	PL2R	5'-TGT-CAA-GAA-GGA-GGT-GAC-TC-3'	
<i>P. baumii</i>	PB1F	5'-AAG-TAA-TTG-TTA-GTT-AGT-AG-3'	600
	ITS4R	5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'	

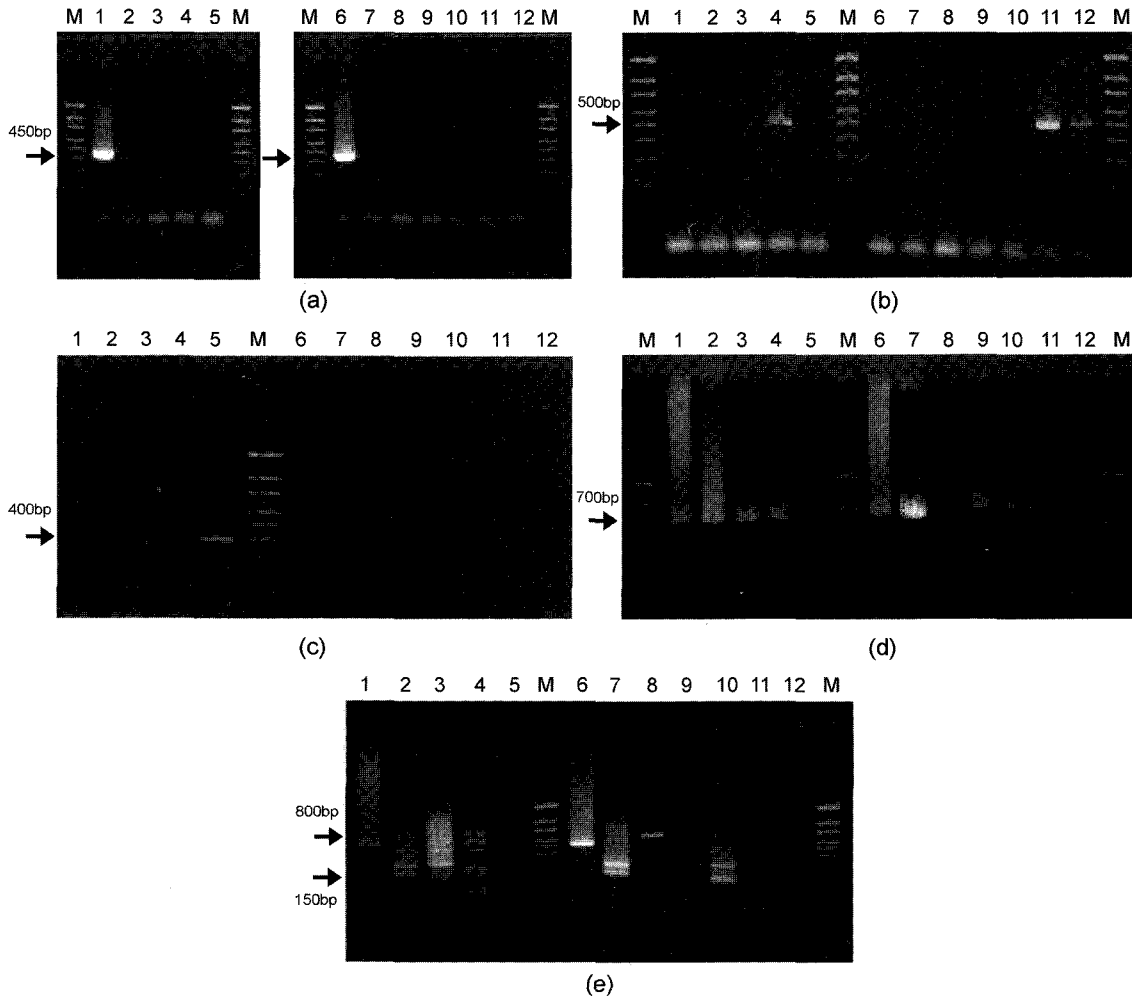


Fig. 5. PCR products using the species-specific of ITS sequences regions. (a) IF1-IR3 primer set for detecting *P. igniarius*. (b) PF1-PR3 primer set for detecting *P. pini*. (c) GF3-GR4 primer set for detecting *P. gilvus*. (d) ITS5F-PL2R primer set for detecting *P. linteus*. (e) BP1F-ITS4R primer set for detecting *P. baumii*. M; size marker. 1. *Phellinus igniarius* KCTC6228. 2. *Phellinus linteus* ATCC26710. 3. *Phellinus baumii* MPNU7004. 4. *Phellinus pini* ATCC12240. 5. *Phellinus gilvus* ATCC26729. 6. *Phellinus igniarius* 021 북한산. 7. *Phellinus linteus* 016 한국산. 8. *Phellinus baumii* 015 버섯돌이. 9. *Phellinus baumii* 022 북한산. 10. *Phellinus baumii* 029 한국산. 11. *Phellinus pini* 017 중국산. 12. *Phellinus pini* 019 중국산.

한 염기서열을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 현재 국내 시중에 유통되고 있는 종은 *P. linteus*와 *P. igniarius*는 각각 한 종씩 발견되었으며 *P. pini*가 대부분을 차지하고 있음을 알 수 있었으며, *P. gilvus*는 본 실험에서 확인되지 않았다.

종 특이적인 유전자 탐침의 개발 및 검증

본 연구에서는 최종적으로 공시균주의 ITS 염기서열을 이용하여 *P. igniarius*, *P. pini*, *P. gilvus* 및 *P. linteus*와 *P. baumii*에 대한 종 특이적인 유전자탐침을 개발하였으며 각 종에 대한 detection primer의 명칭, sequences, expected product size를 Table 2에 나타내었고, 종 특이적인 유전자 탐침의 검증 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Table 2에 나타낸 바와 같이 *P. igniarius*종에 대하여 디자인 한 detection primer 명칭을 forward primer로 IF1, reverse primer로 IR3로 명칭하였으며, *P. pini*는 PF1-PR3으로, *P. gilvus*는 GF2-GR4로, *P. linteus*는 ITS5F-PL2R로, *P. baumii*는 PB1F-ITS4R로 각각 명칭하였다. 그리고 디자인한 primer들의 expected product size는 *P. linteus*와 *P. baumii*가 각각 700 bp, 600 bp로 제일 길었고 *P. igniarius*, *P. pini*, *P. gilvus*은 각각 450 bp, 500 bp, 400 bp로 *P. linteus*와 *P. baumii*에 비하여 짧았다.

Fig. 5에서 나타난 바와 같이 그림 a, b, c, d, e는 각각 *P. igniarius*, *P. pini*, *P. gilvus* 및 *P. linteus*와 *P. baumii*에 대한 종 특이적인 유전자 탐침 결과를 나타낸 것이다. 그림 a, b, c에서 나타난 바와 같이 IF1-IR3, PF1-PF3, GF2-FR4 primer는 각각 *P. igniarius*, *P. pini*, *P. gilvus*종에 대하여 공시균주와 분리균주에서 모두 종 특이적으로 결합하였으나 그림 d와 그림 e에서 나타난 바와 같이 ITS5F-PL2R, PB1F-ITS4R primer는 *P. linteus*와 *P. baumii*종에 대하여 공시균주와 분리균주에서 모두 종 특이적으로 결합하지 않았다.

적 요

국내 유통균주에 대한 *Phellinus*속의 분류체계를 확립하고 종간구별을 위한 신속동정법을 개발하기 위해 계통학적 정보를 지니고 있는 ITS1, 5.8S rRNA 및 ITS2 부위의 염기서열을 밝히고 ITS1과 ITS2 부위의 다양한 염기서열을 이용하여 종 특이적인 유전자 탐침을 개발하였다. 본 연구에서 조사된 바에 의하면, 상황버섯으로 시판되고 있는 국내유통균주는 총 9균주로서 *P. pini*가 4종, *P. baumii*가 3종, *P. igniarius*와 *P. linteus*가 각각 1종으로 확인되었으며 *P. gilvus*는 조사되지 않았다. 그 중 *P. pini*는 대부분 중국에서 수입된 제품이었고 *P. igniarius*를 포함한 *P. baumii*는 주로 북한산 제품으로 조사되었다. 한편 *P. linteus*와 *P. baumii*는 변이가 높은 ITS1, ITS2 부위에서도 다른 종에 비하여 높은 상동성을 나타내어 종 특이

적인 유전자 탐침이 유효하지 않은 반면에 *P. igniarius*, *P. pini*, *P. gilvus*종에 대한 detection primer로 각각 IF1-IR3, PF1-PF3, GF2-FR4 primer는 유전자 탐침이 유효함을 확인하였다. 유연관계가 아주 가까운 *P. linteus*와 *P. baumii*에 대한 정확한 분석을 위해서는 변이가 심한 ITS 부위와 보존성이 높은 18S rDNA 부위의 염기서열을 함께 분석, 비교하여야 가능하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 Brain Busan 21사업 및 식약청 연구과제 지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 배만중, 박무희, 이재성. 1996. 고등균류 균사체의 번역조절 가능성에 관한 연구. *한국균학회* **24**: 142-148.
- 이재동. 1998. *균학연구* 제3권. 299-301.
- 정원진, 정확성. 1994. 미트콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 진흙버섯류의 계통분류. *한국미생물학회* **32**: 442-448.
- Annette, K., Li, Y., Szaro, T. and Bruns, T. D. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* **88**: 776-785.
- Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun, M. Y. and Rhee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among *Pliurotus* species species inferred from sequence data of PCR amplified ITS II region in ribosomal DNA. *Kor. J. Mycol.* **24**: 155-165.
- Daniel, W., Munch, J. C., Botton, B. and Buscot, F. 1996. DNA polymorphism in Morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella comica* (black morel). *Appl. Environ Microbiol.* **62**: 3541-3543.
- Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* **3**: 199-324.
- Hendriks, L., Goris, A., de Peer, Y. V., Neers, J., Vancanneyt, M., Kersters, K., Hennebert, G. L. and de Wachter, R. 1991. Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1223-1230.
- Hori, H. and Osawa, A. 1986. Evolutionary change in 5S rRNA secondary structure and a phylogenetic tree of 352 5S RNA species. *Biosystem* **19**: 163-172.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1986. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Jong, S. C., Birmingham, J. M. and Pai, S. H. 1991. Immunomodulatory substances of fungi origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**: 115-122.
- Kwon, S. K., hong, S. G. and Jung, H. S. 1997. Phylogenetic study of *Trichaptum* inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *J. Microbiol.* **35**: 79-86.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 213-218.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. H. and Hseu, R. S. 1995. Phyloge-

- netic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238.
- Morton, A., Carder, J. H. and Barbara, D. G. 1995. Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA gene and relationships between isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathol.* **44**: 183-190.
- Nishida, J. and Sugiyama, J. 1993. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 431-436.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum*. *Curr. Genet.* **22**: 213-220.
- Robert, M., Prillinger, H., Ibl, M. and Himmeler, G. 1995. Sequences of ribosomal genes and internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremonium ashbyi*, *Ashbya gossypii* and *Nematosporacoryli*, toward *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 31-42.
- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C. F., Fukuoka, F. and Nakanishim, M. 1968. Antitumor studies on some extracts of basidiomycetes. *Gann.* **59**: 159-161.
- Swann, E. and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: An 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* **85**: 923-936.