

## 능이버섯의 ITS염기서열과 유전적 변이

김 종 봉\*

대구가톨릭대 생물학과

Received September 24, 2004 / Accepted November 19, 2004

**The Base Sequence of ITS and Genetic Variation in *Sarcodon Aspratus*.** Jong Bong Kim\*. Dept. of biology, Catholic University of daegu, Kyongbuk 712-702, Korea – The sequence of ITS (partial 16S ribosomal DNA, complete ITS1, 5.8S ribosomal DNA and ITS2, and partial 28S ribosomal DNA) was analysed by PCR and autosequencing in *Sarcodon aspratus*. The ITS length of *S. aspratus* was 716 base pair. As this sequence compared with other reports on *S. aspratus* (acc No AF335110), the sequence variation based on nucleotide deletion and substitution was 1.8%. This nucleotide variation rate in same species was very higher than in other species. Also, the sequence variation rates between this *S. aspratus* and *S. imbricatus*, and *S. squamus* were 8% and 10%, respectively. This results suggested that the high sequence variation of *S. aspratus* might be caused specific host and inhabitat enviroment which limited gene flow.

**Key words** – *Sarcodon aspratus*, ITS sequence, Genetic Variation

능이버섯(*Sarcodon aspratus*)은 민주름목 굴뚝버섯과(*Teloporaceae*) *Sarcodon*속에 속하는 종으로서 주로 한국, 중국, 일본 등지에서 서식하고 있다. 한국에서 자생하는 버섯으로 *Sarcodin* 속에 속하는 버섯으로는 능이버섯 외에 노루털버섯(*Sarcodon imbricatus*), 무늬노루털버섯(*Sarcondon scabroculus*) 등이 보고 되었으며, 중국은 7종의 *Sarcodon*속이 보고되었다. [14] 이 속에 속하는 버섯들의 중요 특징은 형태상의 자실체 갓에 주름이 없고 인편이 있으며 자실체가 성숙함에 따라 갈색 혹은 흑갈색을 띤다는 점과 활물기생을 한다는 점이다. 이로 인하여 노루털버섯은 소나무, *S. squamus*는 가문비나무 등이 숙주이며 능이버섯은 참나무 등이 숙주인 것으로 보고 되어 있다.[4]

따라서 인공재배가 안되고 있고 이에 대한 연구도 이들이 자생하고 있는 3개국에서 주로 능이버섯의 성분, 약리효과 등에 관하여 이루어져 왔다.

특히 고기를 먹고 채했을 때 이를 복용해왔다는 것과 관련하여 능이버섯의 단백질 분해효소의 활성도, 특성 아미노산 서열 및 단백질 분해효소 유전자 염기서열들이 규명되었다.[1,2,6,7] 약리효과와 관련하여 무기염류[12,13], ergosterol [9] 추출물의 항암효과[10]등에 대하여 보고되었으며, mitogen activity가 높고, 대식세포로 하여금 암세포 괴사인자인 TNF- $\alpha$ 와 NO의 생성을 유도하는 fucogalacton이 함유되었다고 밝혀졌다.[11]

Ribosomal DNA gene의 subunit들의 염기서열은 담자균 등에서도 중간 혹은 종내의 유전적변이와 유연관계 및 이의 진화적 의미를 밝히는데 매우 유용한 지도가 될 수 있는 것

으로 평가받고 있다. 이에 따라 이를 이용하여 담자균의 계통과 진화를 밝히고자 하는 많은 연구들이 이루어졌다.[3,4,5,9] 그러나 능이버섯의 분자유전적 관점에서 유연관계나 진화 관계에 대해서는 보고된 바가 없고 GenBank에 능이버섯의 ribosomal ITS 유전자 염기서열 보고(cacc No 35110)가 하나 있을 뿐이다.

특히 능이버섯이 엄격히 활물기생을 함으로서 자연상태에서 교배가 어렵다는 점에서 서식지가 다를 경우 종내의 변이가 클 가능성이 있고 유럽이나 중국 등에는 여러 가지 *Sarcodon*속에 속하는 종들이 있는 반면 한국에 3종뿐이 없고 이중 능이버섯은 아시아의 3개국에만 보고되어 있어 이의 기원을 밝히기 위해서는 노루털버섯 및 무늬노루털버섯등과의 유연관계가 밝혀져야 할 것이다.

본 연구에서는 능이버섯의 ITS gene subunit 즉 18S ribosomal DNA ITS1 5.8S ribosomal DNA ITS2, 28S ribosomal DNA sequence를 분석, 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### DNA추출

본 실험에 사용된 능이버섯은 경북 울진 매전면에서 채집한 것이다. 능이가 배양이 되지 않기 때문에 Gardes등의 방법 [3]에 따라 자실체에서 직접 DNA를 추출하였다. 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris-Hcl, 20 mM EDTA 및 2% CTAB의 lysis buffer에 동결건조한 능이버섯 자실체를 넣고 65°C에서 90분간 처리하였다. 이를 2000 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였고 상층액과 같은양의 chloroform을 첨가하였다. 분리된 액상에서 상층액을 제거한다음 2배의 isopropanol을 첨가한후 -20°C에서 1시간 처리하여 DNA를 침전시켰다.

\*Corresponding author

Tel : +82-53-850-3775, Fax : +82-53-850-3775

E-mail : jbkim@cu.ac.kr

13000 g에서 30분간 원심분리하여 침전된 DNA pellet을 추출하였고 이를 70% ethanol로 세척한 다음 공기건조한 후 100 µl의 TE buffer (10 mM Tri-Hcl, 1 mM EDTA)를 첨가하였다.

**ITS Primer**

*Sarcodon aspratus* 및 *Lepista*속 균주의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 White 등[16]에 의해 보고된 fungi의 ITS 영역 증폭 primer를 이용하였으며, 이들의 oligomer 염기서열과 진균류의 일반적인 rDNA gene cluster로서 16S ribosomal DNA, ITS I 과 5.8S ribosomal DNA 그리고 ITS2 영역 및 28S ribosomal DNA 등을 증폭하였으며 이 중 16S ribosomal DNA 와 28S ribosomal DNA 는 일부분을 나머지는 전부분을 증폭하였다.

**반응액의 조성과 PCR 조건**

ITS 영역 증폭을 위한 PCR reaction mixture의 조성은 RAPD 방법과 동일하게 Bioneer PCR kit를 사용하였다. 본 실험은 MJ Research PTC 150 minicycler에서 수행하였으며 thermal cycle의 program은 primer ITS 1과 2, ITS 3과 4의 반응 조건을 달리하여 실험하였다.

ITS primer 1과 2의 반응 조건은 template DNA 변형을 위해 94°C에서 3분간 predenaturation 한 다음, 94°C에서 30초간 denature, 50°C에서 30초 annealing, 72°C에서 extension을 1분씩 처리하여 DNA를 증폭시키는 것을 1 cycle로 하여 40 cycle로 수행하였다. ITS primer 3과 4의 반응 조건은 94°C에서 3분간 predenaturation 한 다음, 94°C에서 30초간 denature, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 elongation을 1분씩 처리하여 DNA를 증폭시키는 것을 1 cycle로 하였다. 이번 실험에서는 40 cycle로 수행하였으며, DNA 증폭이 끝난 후 최종적인 합성을 위해 72°C에서 5분간 안정화한 다음, 4°C에서 보관 사용하였다.

**PCR product의 정제 및 ITS 염기서열 분석**

ITS 영역의 PCR product는 5 ng/100 ml의 농도로 ethidium bromide를 첨가한 1%의 agarose gel (Sigma Co.)에서 1 X TAE buffer에서 50 mV로 electrophoresis하였다. UV

transilluminator상에서 나타나는 DNA band를 확인한 후, QIA-quick PCR purification kit (Qiagen Inc., USA)를 이용하여 정제하였다.

정제된 PCR 산물을 이용하여 Perkin-Elmer applied biosystems ABI 377A sequencer (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 PRISM Dye Dideoxi Terminator Cycle Sequencing Kit로 분석하였다. 얻어진 염기서열을 Gen Bank 데이터베이스에 등록된 것들과 상동성을 비교하였다.

염기서열은 Sequencher (Gene codes Co., USA), Clustal X를 이용하여 alignment 시킨 후, 최종 세부 정렬은 수작업으로 보정하였다.

**결과 및 고찰**

진균류 ITS영역증폭 primer들을 이용하여 PCR하고 이를 DNA염기서열 자동분석기를 통하여 능이버섯 ITS영역의 염기서열을 분석한 결과 전체 716개의 염기 중 694개가 확인되었다(Fig. 2).

이를 NCBI, NIH등의 Gen Bank에 등록된 염기서열 분석 결과 가장 가까운 것이 같은 능이버섯의 ITS유전자에 관한 것이었다.(GenBank acc No. AF225110) 그리고 그 다음이 *S. imbricatus* (Gen Bank ass No. AF 103889) 였고 3번째 가까운 것이 *S. squamos* (GenBank ass NO. AF 103896)였다. *S. imbricatus*는 한국에 자생하는 것으로 보고되어 있지만 *S. squamos*는 보고되어 있지 않다. 본 연구결과에 의해서 밝혀진 능이버섯의 ITS유전자의 염기배열과 이미 보고된 능이버섯의 ITS유전자와의 비교하였다. 그러나 이미 보고된 능이버섯의 ITS영역은 ITS1과 5.8S ribosomal DNA의 전부분과 ITS2의 일부분이었기 때문에 비교가 가능한 염기배열은 716개의 염기 중 432개였고 이 중 414개가 일치하여 95%의 일치율을 보였다(Fig. 3).

불일치되는 곳의 염기서열을 보면 불일치 염기수가 18개 인데 이중 염기가 확인되지 않은 것이 10개, 결실되거나 다른 염기로 치환되어 불일치되는 것이 8개여서 확인되지 않은 것이 모두 일치하는 것으로 확인된다 하더라도 불일치율이 1.8 %이다(Fig. 3). 또한 2번째의 *S. imbricatus*와는 499개의

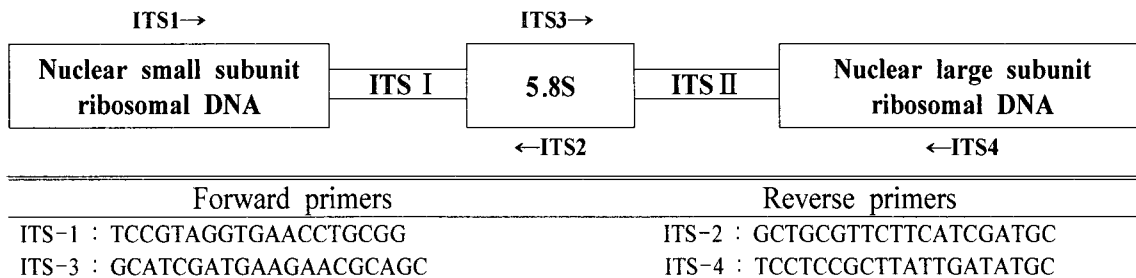


Fig. 1. Locations and sequences of primers for the amplification and sequencing. ITS primers were those designed by White et al., (1990).

NO	base sequence					
1	TAATACACCG	GGGAGATNCT	TTTGGGGAAN	CCCNGGCCAC	CNCTCTAGGA	GGGGGTATGT
61	GCNTTNCNCG	AATCGTATAT	ATCACTCCAC	TTTGCTTTAC	ACCCGTATGC	ACAACCTGTA
121	NCTTGGGATG	ATCACGGCAG	CGTGCCACTT	GTGTGGCCGC	ACTCGAATGC	CCTGGCTATG
181	AACGCTTTNA	TATAAACCCC	TTATAAAGTC	TTGTAGAATG	TCAATNAGCG	TGTAACAGCG
241	CGAAAAATAA	TACAACTTTC	AGCAACGGAT	CTCTTGGCTC	TCGCATCGAT	GAAGCAACGC
301	AGCGAAATGC	GATAAGTAAT	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAA	TNTTTGAACG
361	CACCTTGCGC	TNCTTGGTAT	NCCGAGGAGC	ATGCCTGTTT	GAGTGTCTATG	AAGTTCTCAA
421	CTGCTTTGAC	TTTGTGTGTG	AAGTGAAGTT	GGAGTTGGAG	GGCTTTGCT	GGCGTGGGCT
481	TGTTGTGTGG	NNTTGTCTACA	TGCTTGCTTG	CTTGTGCGCT	CCTCTFAAAA	GTATGAAACC
541	TTTCTGGTAG	ATCTTGCCGA	AAGAGTATCT	NTGACGTGAT	AATTATCTGC	GTCGTTGAGA
601	AAGCTCTCAG	GCCCCTACAA	NAAAACNTTT	GGTTGNAATG	NCNCTTANAT	GANGNTTGAC
661	CAATTCNCCT	TNAATCAGGN	GGACTCCCCC	TGNACTTAAN	CTNTCATTAN	CNGGGG

Fig. 2. ITS sequence of *S. aspratrus*. This ITS contained partial 16S ribosomal DNA, complete ITS1, 5.8S ribosomal DNA and ITS2, and partial 28S ribosomal DNA. The length of this ITS sequence was 716 base pairs.

Source NO	base sequence	
Query : 95	ctttacaccctgatgcacaacctgtancttgggatgatcacggcagcgtgccacttgtgt	154
Sbjct : 91	ctttacaccctg-tgcacaacctgtagcttgggatgatcacgg-ascgtgccacttgtgt	148
Query : 155	ggccgcactcgaatgcctcgtatgaacgctttatataaaccccttataaagtcttgt	214
Sbjct : 149	ggccgc-ctcgaatgcctcgtatgaacgctttatataaaccccttataaagtcttgt	207
Query : 215	agaatgtc-aatnagcgtgtaacagcgcgaaaaataatacaactttcagcaacggatctc	273
Sbjct : 208	agaatgncaaat aagcgtgtaacagcgcgaaaaataatacaactttcagcaacggatctc	267
Query : 274	ttggctctcgatcgatgaagcaacgcagcgaatgcgataagtaaatgtgaattgcagaa	333
Sbjct : 268	ttggctctcgatcgatgaag-aacgcagcgaatgcgataagtaaatgtgaattgcagaa	326
Query : 334	ttcagtgatcatcgaatntttgaacgcaccttgcgctncttggatnccgaggagcatg	393
Sbjct : 327	ttcagtgatcatcgaatctttgaacgcaccttgcgctccttggatnccgaggagcatg	386
Query : 394	cctgtttgagtgcatgaagtctcaactgctttgactttgttgttgaagtgaattgga	453
Sbjct : 387	cctgtttgagtgcatgaagtctcaactgctttgactttgttgttgaagtgaattgga	446
Query : 454	gttga-gggtctttgctggcgtgggcttgttgtt-ggntttgctacatgcttgccttgc	511
Sbjct : 447	gttggagggtctttgctggcgtgggcttgggttggnggggttgcctacatgcttgccttgc	506
Query : 512	ttgctggctcct	523
Sbjct : 507	ttgctggctcct	518

Fig. 3. This ITS sequence was compared with one of acc No AF335110 in *S. aspratrus*. Query is the base seqes of this *S. aspratrus*. Sbjct is the base sequence of acc No AF335110. The sequence variation based on deletion and substitution was 1.8%.

염기쌍 중 456개의 염기서열이 일치하여 91%, *S. squamos*와 90%의 일치율을 나타내었다. 이는 *S. imbricatus*와 *S. squamos*간의 ITS gene차이가 3%내외라는 점과 관련하여 볼 때 같은 능이버섯이고 한국에서 채집한 것 인데 능이버섯간의 염기서열 변이의 정도 종간의 차이정도라는 특이한 결과를 보여주었다. 이 보고에 따르면 *S. imbricatus*의 경우 300 km와 400 km

떨어진 곳에서 채집한 동일종간에 ITS염기구성이 완전히 일치한다고 한 반면 같은 지역의 *S. imbricatus*와 *S. squamos*의 변이는 3.2 %였다[4]. 본 연구결과와 비교한 GenBank에 등록된 능이버섯의 채집지는 충남이었고 본 실험에서 사용된 능이버섯은 경북울진이다. 이러한 점들과 관련하여 볼 때 이 능이버섯이 활물 기생으로 숙주식물에 엄격히 제한을 받고 있다는 점과 서식

지 환경의 특수성 등이 원인이 될 수 있을 것으로 생각된다. 능이버섯은 숙주가 5~10년생 참나무 등에 한정되어 있을 뿐 아니라 서식지의 독특한 환경조건을 요구한다. 본연구결과에 따르면 능이버섯은 50°~80°의 비교적 가파른 경사면에 분포하고 있으며 굽은 모래 등이 많이 섞여있어 물이 잘빠질 수 있는 토양에 주로 서식하고 있다.[14] 이와 같이 활물기생 버섯으로 숙주에 대한 요구조건이 엄격한데다가 여러 가지 특수 환경조건을 서식지로 하고 있어 자연상태에서 교배에 의한 유전자 교류가 상당히 제한될 수밖에 없을 것이고 이는 변이를 축적하는 결과가 될 수 있으리라고 사료된다. 이러한 점들과 관련하여 현재 능이버섯에 대하여 지역간의 형태적, 유전적 정밀한 분석이 요구된다.

요 약

능이버섯의 16S ribosomal DNA 일부분, IT1, 5.8S ribosomal DNA, ITS2의 전부분, 28S ribosomal DNA 일부분이 포함된 ITS영역의 염기서열을 분석하였다. 이 부분은 716개의 염기쌍으로 구성되었다. 이를 *Sarcodon* 속에 속하는 종들과 비교분석한 결과 같은 능이버섯의 ITS에 관한 다른 분석 결과 염기치환 및 결실을 근거로 하였을 경우 1.8%의 차이를 나타내었다. 또한 *S. imbricatus*와는 8%, *S. squamous*와는 10%차이를 나타내었다. 이는 능이버섯이 숙주, 서식지 환경 등의 특수성 때문에 자연상태에서 유전자교류가 일어나지 않기 때문인 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 대구가톨릭대학교 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Eun, J. S., J. H. Yang, D. Y. Cho and T. K. Lee. 1988. Studies on the Higher fungi (I), Activity of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *J. Kor. pharm. Sci.* **18(3)**, 127.
2. Eun, J. S., J. H. Yang, T. K. Lee, and D. S. Choi. 1989. N-terminal amino acid sequence and some properties of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*. *J. Kor. pharm. Sci.* **33(6)**.

3. Gardes, I. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns and J. W. Taylor, 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplication of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian J. Botany* **69**, 180-190.
4. Johannesson, H., S. Ryman, H.Lundmark and E. Danell. 1999. *Sarcodon imbricatus* and *S. squamous*-two confused species. *Mycol. Res.* **103(11)**, 1447-1452.
5. Lee, J. S., S. Ko and H. S. Jung. 2000. Phylogenetics analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences, *Microbiology letters* **187**, 89-93.
6. Lee, T.K. 1986. Purification and some characteristics of the proteolytic enzyme in fruitingbody of Neungee [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]. *J. Kor. Soc. Food. Nutr.* **17(1)**, 276.
7. Lee, T.K. J.S. Eun, J.H. Yang, D.Y. To and H.C. Yang. 1989. Studies on the Higher fungi (III), Purification and stability of proteolytic enzyme in *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *J. Kor. pharm. Sci.* **19(2)**, 84.
8. Kim, J.B. and H.O.Park, 2000. Identification of lansoterol and ergosterol in *sercodon aspratus*. *Korean J. Life Science* **10(6)**, 617-620.
9. Ko, S.K., H.S. Jung and L. Ryvarden, 2001. phylogentic relationship of *Hapalopolus* and related genera from mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequence *Micologia* **93(2)**, 270-270.
10. Maruyama, M., K. Yamazaki, S. Murofush, C. Konda and T. Ikekawa. 1989. Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J. Pharmacobiodyn.* **12(2)**, 118-23.
11. Mizuno, M., Y. Shiomi, K. Minato, S. Kawakami, and H. Ashida, H. Tsuchida. 2000. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacology.* **46(2)**, 113-121.
12. Park, W. H.1983 Studies on the components of *sarcodon aspratus* (I). *kor. j. Mycol.* **11(2)**, 85-89.
13. Park, W. H.1983 Studies on the components of *sarcodon aspratus* (II). *kor. j. Mycol.* **11(4)**, 159-162.
14. Park, W. H. and H. D. Lee. 1999. Illustrated book of Korean medical mushrooms. Kyo-Kak publishing Co. Ltd.
15. Ryu, K.S. 1989. Characterization of a serine protease from *Sarcodon aspratus* M.D. Thesis. Chonbuk National Univ.
16. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications, pp. 315-322. Academic Press, San Diego.