

Rhizina undulata rDNA ITS 영역의 PCR 검정 및 염기배열 분석

이선근¹ · 이종규¹ · 김정희² · 이승규² · 이상용^{1*}

¹강원대학교 산림자원보호학과, ²국립산림과학원 산림병해충과

PCR Detection and Sequence Analysis of the rDNA ITS Regions of *Rhizina undulata*

Sun Keun Lee¹, Jong Kyu Lee¹, Kyung Hee Kim², Seung Kyu Lee² and Sang Yong Lee^{1*}

¹Department of Forest Resources Protection, College of Forest and Environmental Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Division of Forest Insect Pests and Disease, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

요 약: *Rhizina undulata*의 PCR 검정 및 유전적 특성 분석을 목적으로, rDNA ITS 영역의 염기배열 해석 및 PCR 방법에 의한 토양으로부터 *R. undulata*의 진단법을 개발하였다. 18S rDNA 부분의 염기서열 분석 결과, 공시한 4종의 균주 모두 1,375 nt의 크기로 동일하였으며, 염기배열도 100% 일치하였다. 한편, rDNA ITS 영역의 염기배열은 585 nt이었고, PDK-1, PTT-1 및 PDJ-9 균주는 염기배열이 100% 동일하였으나, PDS-5 균주에서는 두 곳에서 염기의 치환이 발견되었다. 이와 같은 염기배열을 분석하여 제작한 *R. undulata* rDNA ITS 영역 특이적 primer를 이용한 PCR 검정 결과, *R. undulata* 균주들에서만 약 525 bp 크기의 ITS 영역 특이적인 증폭산물이 검출되었다. PCR 방법에 의하여 검출할 수 있는 토양 중의 *R. undulata* 최소 균사량의 한계를 확인하기 위해서, 순수 배양한 *R. undulata* 균사 현탁액을 순차 희석하여 100 g의 사양토에 혼합한 다음, 농도별로 균사 혼합한 각각의 토양 시료로부터 추출한 total DNA의 PCR 증폭산물을 분석한 결과, PCR 방법에 의하여 100g의 토양 중에 1 ng의 *R. undulata* 균사가 함유되어 있는 경우까지 검출이 가능하였다.

Abstract: To investigate genetic diversity and PCR detection of *Rhizina undulata*, PCR detection and sequence analysis of rDNA ITS region of *R. undulata* in soil were analyzed and developed. The length of partial 18S rDNA from four *R. undulata* isolates were 1,375 nt. The sequence similarity of *R. undulata* isolates was 100%. The rDNA ITS regions of *R. undulata* isolates were 585 nt long. Nucleotide sequencing of the ITS regions showed that PDK-1, PTT-1 and PDJ-9 isolates had 100% sequence identity. But, PDS-5 isolate differed from the three isolates by two nucleotide substitution. *R. undulata*-specific primers designed by the sequence of ITS region were used in PCR detection of *R. undulata*. PCR products about 525 bp size, which is specific to *R. undulata*, were amplified from total DNAs of *R. undulata* isolates. To assay the sensitivity of PCR detection by *R. undulata* ITS-specific primer, purely cultured mycelial suspension of *R. undulata* was serially diluted and mixed with 100g of sterile sandy loam soil, respectively. And then, PCR products of total DNAs extracted from each mycelium-soil mixtures were analysed. The PCR protocol could detected up to 1ng mycelium of *R. undulata* within 100g of soil.

Key words : *Rhizina undulata*, 18S rDNA, ITS specific primer

서 론

소나무 리지나뿌리썩음병의 병원균은 *Rhizina undulata* Fr ex Fr. (Syn. *Rhizina inflata*(schaeff) Karst, 과상땅해파

리버섯)로, 주로 *Pinus* 속 수목의 뿌리를 부후시켜 임목을 집단으로 고사시키는 병원균으로 알려져 있는데, 프랑스 및 독일에서 1880년에 처음으로 *Pinus* 속의 피해현상이 보고된 이래, 구미 각국에서 *Pinus* 속 이외에도 *Abies*, *Picea*, *Tsuga*, *Larix* 및 *Pseudotsuga* 속 등의 수목에 피해가 있음을 보고한 바 있다(Germmen, 1971; Gibson, 1970; Thompson and Tattar, 1973; Weir, 1915). 한편, 우리나라 경우는 1981년 경주 남산의 산불 임지에서 소나무

*Corresponding author

E-mail: sangyong@kangwon.ac.kr

이 연구는 “강원대학교 산림과학연구소”의 지원에 의하여 수행되었음.

및 해송이 이 병에 의하여 고사된 것이 처음으로 발견되어 이 병을 “리지나뿌리썩음병”이라 명명한 것을 시작으로 하여(이창근 등, 1982), 1987년에는 강릉 해안림에서 이로 인한 소나무의 집단고사현상이 발생되었다(이상용과 김완규, 1990). 이후, 경북 울진 및 강원도 고성에서도 소나무 및 해송림의 피해가 발생하였으며, 최근에는 동해안 지역뿐만 아니라 서해안인 충남 태안지역의 해송 해안림에서도 많은 피해가 나타나고 있어 (Lee *et al.*, 2005), 이에 대한 현실적인 방제 대책의 수립이 필요한 실정이다.

한편, 리지나뿌리썩음병의 효율적인 방제를 위하여서는 감염지의 신속하고 정확한 진단이 선행되어야 하는데, 현재까지 효과적인 진단 방법은 개발되지 않은 상태이며, 기존의 포착목(捕捉木)을 이용한 감염지의 진단법(八幡一彦와 作山建, 1982)은 오랜 시간과 많은 노동력을 필요로 하며 비효율적이기 때문에 실용화에는 많은 문제점이 있다.

균류에 의한 식물병의 진단 방법으로 최근 들어 PCR 검정법이 주목받고 있으며, 여기에 사용되는 primer는 주로 rDNA의 ITS 영역의 염기배열을 이용하고 있는데, 그 이유는 ITS영역의 염기배열이 균류의 종(species) 특이성이 있으며 종(species) 간의 변이가 비교적 많이 발생하는 영역이기 때문이다. 따라서 균류의 유전적 유연관계 분석에도 ITS 영역의 염기배열이 유용하게 활용되고 있다 (Chao *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Ranjard *et al.*, 2001). 한편, *R. undulata*의 DNA 수준에서의 연구는 아직 초보 단계에 머무르고 있으며 PCR 진단에 필요한 ITS 영역의 염기배열 분석 연구도 미비한 상태이다.

따라서 이 연구는 우리나라와 일본에서 분리한 *R. undulata* 균주들의 18S rDNA 부위 및 ITS 영역의 염기배열을 해석하고자 하였으며, 이를 기초로 *R. undulata* rDNA ITS에 특이적인 primer를 제작하여 PCR 검정의 이용 가능성 및 실용성을 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시 균주 및 균사 배양

공시한 *R. undulata* 균주는 이상용과 김완규(1990)의 방법에 따라서 자실체로부터 직접 분리 배양한 균주를 사용하였는데, 자실체의 채집 지역 및 기주 수목은 Table 1과 같다. 대조 균류는 본 실험실에서 분리 배양하여 보관중인 *Botrytis cinerea*, *Cenangium ferruginosum*, *Fusarium solani*, *Laetiporus sulphureus*, *Raffaelea* sp., *Rhizoctonia solani*를 사용하였다. 공시 균주 중, *C. ferruginosum*은 MSPA배지(Malt extract 3%, Soya peptone 0.3%, Agar 1.5%)에서 15°C 약 20일간 배양하였으며, 그 이외 균주들은 PDA배지에서 25°C 약 7일간 배양하였다. 한편, total DNA의 추출을 위하여, 각 균주들의 배양 배지 위에

Table 1. Descriptions of *Rhizina undulata* isolates used in the study.

Isolate code	Host Species	Geographic origin
PDK-1	<i>Pinus densiflora</i>	Gosung, Kangwon
PDS-5	"	Samcheok, Kangwon
PDJ-9	"	Iwate, Japan
PTT-1	<i>P. thunbergii</i>	Taeon, Chungnam

cellulose membrane(CelluSep T4, Membrane Filtration Products Inc., USA)을 깔고 그 위에 각 균주들을 접종하였으며, cellulose membrane상에서 증식한 균사체만을 채취하고 정량하여 실험에 사용하였다.

2. 공시 primer

18S rDNA의 5' 말단부위를 cloning하기 위한 PCR용 primer는 White 등(1990)의 방법에 따라서 기존에 보고된 18S rDNA 부분에 공통적으로 존재하는 염기배열인 primer NS1, NS2, NS3, NS4, NS5 및 NS6를 사용하였는데, 즉, NS1~NS2, NS3~NS4 및 NS5~NS6의 세 부분으로 나누어 PCR 및 cloning을 실시하였다. 한편, ITS 영역의 PCR 및 cloning은 primer ITS1과 ITS4를 사용하였다(Figure 1).

3. Total DNA의 추출

균사체로부터 total DNA의 추출은 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega Co.)의 “Isolation of Genomic DNA from Yeast Method”를 변형하여 실시하였다(이상용 등, 2006). 토양으로부터 total DNA의 추출은 Power soil DNA isolation Kit(MOBIO)를 사용하였다. 즉, 토양 내에 존재하는 *R. undulata*를 PCR로 검정할 수 있는 가능성을 확인하기 위하여, *R. undulata* 배양 균사 1 g을 막자사발에서 마쇄한 다음 리지나뿌리썩음병이 발생하지 않은 강원대학교 구내림에서 채취한 사양토 100 g과 혼합하고 이 토양 중 0.4 g으로부터 total DNA를 추출하였다. 또한, PCR로 검정할 수 있는 토양 내에 존재하는 *R. undulata*의 최소 균사량의 한계를 확인하기 위하여, 균사 1 g을 멸균증류수 1 ml에 현탁하여 막자사발에서 마쇄한 다음 1 mg/ml에서 1 pg/1 ml 까지 순차적으로 희석한 용액을 각각의 토양 100 g에 혼합하고 그 중에서 0.4 g의 토양시료로부터 total DNA를 추출하였다.

4. Polymerase chain reaction(PCR)

PCR reaction mixture는 total DNA 2 µl, 각각의 primer



Figure 1. Locations of PCR primers on nuclear rDNA (18S rDNA and ITS region).

1 μ l(5pM), *Taq* polymerase 2.5 units(Promega Co.), $MgCl_2$ 2.5 μ l(2.5 mM), 10x *Taq* buffer 2.5 μ l, dNTP 1 μ l(0.4 mM) 및 증류수로 총 25 μ l로 조성하였다. PCR 반응은 Minicycler(MJ Research)를 사용하였고, PCR cycling의 조건은 95°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing과 72°C에서 2분간 extension으로 총 45 cycle을 반복 실행하였으며, 처음 denaturation은 95°C에서 3분간, 그리고 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실시하였다.

5. Cloning 및 염기배열 해석

PCR 증폭 산물은 agarose gel로부터 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega Co.)을 이용하여 추출한 후, pGEM-T easy vector(Promega Co.)에 삽입 및 *Escherichia coli* JM109 competent cell(Promega)에 형질 전환시켰으며, 대장균으로부터 플라스미드의 추출은 Wizard™ Miniprep DNA Purification System(Promega Co.)을 이용하였다.

cDNA의 염기배열은 High throughput DNA sequencer (MJ Research)에 의하여 분석하였으며, 염기배열의 유사성 분석은 DNASTAR Program(Ver. 2.01 : USA)을 이용하였다.

결 과

1. 18S rDNA 부분의 염기배열

3종의 우리나라 균주(PDK-1, PDS-5, PTT-1)와 1종의 일본 균주(PDJ-9)에 대하여 NS1/NS2, NS3/NS4, NS5/NS6 및 ITS1/ITS4 primer를 사용하여 18S rDNA 및 ITS부분을 PCR에 의하여 증폭하였다(Figure 2). NS1~NS6 primer에 해당하는 18S rDNA 부위의 증폭 산물의 cloning 및 염기배열분석 결과, 우리나라 및 일본 균주에서 모두 1,375 nt 길이의 증폭산물이 생성되었고 염기배열도 100% 일치하는 것으로 나타났다. 또한, NCBI Genbank에 보고

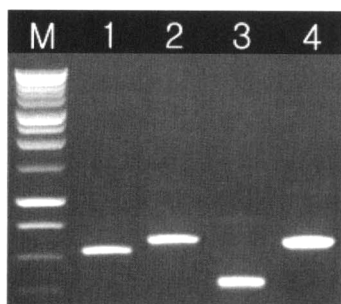


Figure 2. PCR products of *R. undulata* rDNA by primer NS1/NS2(Lane 1), NS3/NS4(Lane 2), NS5/NS6 (Lane 3), and ITS1/ITS4(Lane 4) were analysed on 1.5% agarose gel. M represents 1 kbp ladder(Promega Co.).

된 *R. undulata* 균주(Accession No. U42664, DQ471009)와의 nucleotide의 유사성은 미확인된 염기배열을 포함하여도 99% 이상의 유사성을 보였다(Figure 3). 한편, NCBI Genbank의 MEGABLAST를 이용하여 *R. undulata*의 18S rDNA의 NS1~NS6 부분에 대한 염기서열을 비교 분석하였을 때, *R. undulata*는 자낭균류의 *Pezizales*목과 불완전균류의 *Lecophagus*, *Cephalophora*, *Pulchromyces*속에 속하는 균류들과도 97~99%의 높은 유사성을 나타내었다.

2. rDNA ITS 영역의 염기배열

우리나라 및 일본에서 분리한 *R. undulata* 균주들의 rDNA ITS 영역의 염기배열을 비교 분석한 결과(Figure 2), 총 염기수는 585 nt로 PDS-5 균주를 제외한 다른 균주들은 모두 동일한 염기배열을 나타내었으나, PDS-5 균주는 두 곳의 위치에서(311 및 332번째) 염기 변이가 확인되었다(Figure 4).

3. 배양 균사의 PCR 검정

R. undulata rDNA의 ITS 영역의 염기배열을 기초로 하여 제작한 리지나뿌리썩음병균 특이적 primer, 즉 upstream primer는 ITS의 31~50 nt의 부분에 해당하는 5'-GAGGTCAAACCTCTGAGAGTC-3'와 downstream primer는 ITS의 536~555 nt 부분의 상보적인 염기배열인 5'-CCG CACGTTTCATACAACCC-3'을 이용한(Figure 4) PCR 검정의 효율성을 각 공시 균주의 배양 균사를 대상으로 검정한 결과, *R. undulata* 균주에서는 약 525 bp 크기의 증폭산물이 검출되었으나 *B. cinerea* 외 5종에서는 같은 크기의 증폭산물을 발견할 수 없었다(Figure 5-A). 한편, 토양에서의 *R. undulata*의 진단 가능성을 검정한 결과, 대조구로 사용한 토양에서는 *R. undulata* rDNA ITS 영역 특이적인 증폭산물이 검출되지 않았으나, *R. undulata* 균사체를 혼합한 토양에서는 약 525 bp의 *R. undulata* 특이적인 증폭산물이 검출되었다(Figure 5-B).

4. PCR 검정에 의한 균사량의 검출 한계

PCR 검정 방법에 의하여 토양으로부터 검정할 수 있는 *R. undulata* 최소 균사량의 한계를 확인하기 위해서, 1 mg~1 pg의 *R. undulata* 배양 균사를 토양 100 g에 혼합한 후, 그 중 0.4 g의 토양시료로부터 total DNA를 추출한 다음, *R. undulata* 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 실시한 결과, 토양 100 g당 1 mg~1 ng의 *R. undulata* 균사를 혼합한 토양에서는 약 525 bp의 증폭 산물이 발견되었으나, 100 pg이하의 *R. undulata* 균사를 혼합한 토양에서는 *R. undulata* 특이적인 증폭 산물이 발견되지 않았다(Figure 6).

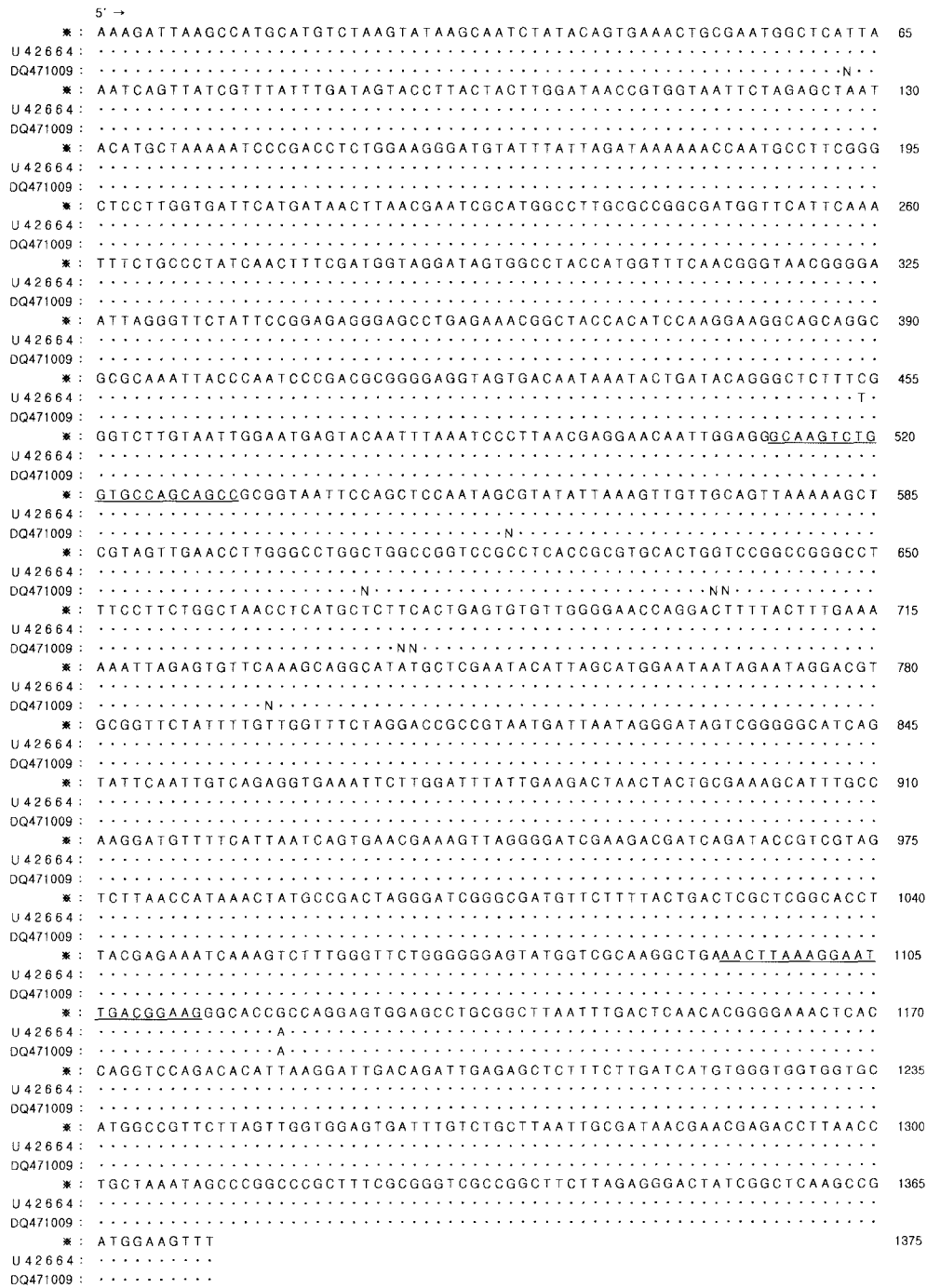


Figure 3. Sequence of the 18S rDNA region (NS1~NS6) of *R. undulata* isolates. Underlining sequence indicate primers NS3 and NS5. * represent the sequence of *R. undulata* isolates PDK-1, PDS-5, PDJ-9 and PTT-1.

고찰

이상용 등(2006)은 12종의 우리나라 균주들과 1종의 일본 균주 간에 total DNA를 RAPD 로 분석하였을 때, 우리나라 균주들 간에는 유전적인 차이가 없었으나 우리나라 균주와 일본 균주 간에는 88%의 유사성을 나타내어 다소 유전적인 차이가 있는 것으로 보고하였다. 그러나, 18S rDNA(NS1~NS6) 부분의 염기배열을 분석한 결과, 우리나라와 일본 균주 모두 1,375 nt로 동일한 크기였으며 염기배

열 또한 100% 일치함이 확인되었다. 또한, NCBI Genbank 에 보고된 *R. undulata* 균주(Accession No. U42664, DQ471009)와 염기배열에 있어서 99% 이상의 유사성을 나타내었으며, 자낭균류의 *Pezizales*목과 불완전균류의 *Lecophagus*, *Cephalophora*, *Pulchromyces*속에 속하는 균류들과도 97~99%의 높은 유연관계가 확인되었다. 이러한 사실은 rDNA의 18S 및 26S 부위가 비교적 변이의 발생이 없는 부위로서, 동일 종(species) 내(intraspecific)의 균주들 간에는 말할 것도 없고, 비교적 형태 분류학적으로

```

5' →
PDK-1: TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGCTCIGAGAGTCAATGCATTGGGGGTT 65
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: AGAGGCTGGCGTTCCCGCTTCCCTGGCCTTTGGGCGAATGGTTTATTACTACGTCGGGGGCCGGGG 130
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: AGGGGACCTCCGCCTATGATTTTCAGCTGGGGTGGGCCACCGAATAGTGACCCACCGCCGCATG 195
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: ACCAAGCCTGGGCTTGAGGGGTTTGTGTGCTGACGCTCGAACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGA 260
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCCTGCAATTACATTACTTATCGCA 325
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: TTTTCGCTGCGTTTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTA 390
PDS-5: .....G.....C.....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: CATTTTTCGCGTCCGGAGACGCCTGTCAGACATGCGAGGTTCAAACATGAGTTCGCTGGGTCCCTC 455
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: CCGTGGGGGGGGCGGAGCCCCGGGGCGTGGCTGGCAGGCCCTTGCCGCACGGAAGCAACTTG 520
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....

PDK-1: GAGAGGTACACAGATGGGTTGTATGAAACGTGCGGGCGCTGGCCCGGGTTTTATTAATGATCCTT 585
PDS-5: .....
PTT-1: .....
PDJ-9: .....
    
```

Figure 4. Sequence of the ITS region of *R. undulata* isolates. Underlining sequence indicate the *R. undulata* specific up and down primer.

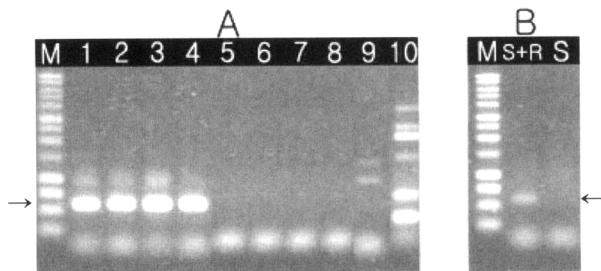


Figure 5. Analysis of PCR products from fungal DNA by *R. undulata* specific primers(A). Lane 1~10 of 1% agarose gel were PCR products of *R. undulata* PDK-1, (Lane 1), PDS-5, (Lane 2), PTT-1 (Lane 3), PDJ-9 (Lane 4), *Raffaelea* sp. (Lane 5), *R. solani* (Lane 6), *B. cinerea* (Lane 7), *F. solani* (Lane 8), *L. sulphureus* (Lane 9) and *C. ferruginosum* (Lane 10), respectively. Analysis of PCR products from total DNA in soil by *R. undulata* specific primer(B). S and S+R were PCR products from control soil (Lane S) and *R. undulata* mycelia-mixed soil (Lane S+R), respectively. M represents 1kbp ladder (Promega Co.). Arrows represent the predicted bands specific to *R. undulata*.

유연관계가 적은 과(family) 및 속(genus)에 속하는 균류들과도 높은 유사성을 나타냄을 재확인시켜 주었다(White et al, 1990).

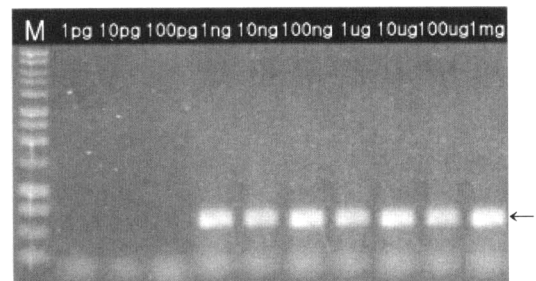


Figure 6. Sensitivity of the PCR detection on soil samples using *R. undulata* specific primers. Mycelia of *R. undulata* (1 mg~1 pg) were mixed serially in 100g of soil, and PCR products from the 0.4g of soil samples using *R. undulata* specific primer were analysed on 1% agarose gel. Arrow represents the predicted bands specific to *R. undulata*. M represents 1 kbp ladder (Promega Co.).

반면, 균류의 종(species) 간(interspecific)에는 변이가 많이 발생하여 종 (species) 특이성이 있는 부위로 알려져 있는 rDNA ITS 영역의 염기배열을 비교 분석한 결과, 그 크기는 공시한 *R. undulata*의 4균주 모두 585 nt로 동일하였고, 강원도 삼척의 소나무림에서 분리한 PDS-5 한 균주만이 2곳에서 염기 치환이 일어난 것이 확인되었다. 한편,

NCBI Genbank 상에 등록되어 있는 유전 정보 중에서는 *R. undulata*의 rDNA ITS 영역의 염기배열과 유연관계가 있는 생물종을 발견할 수 없었다. 일반적으로 균류의 동일 종(species) 내의 rDNA ITS 영역에서의 변이 발생 빈도가 1% 미만이기 때문에(Peterson and Kurtzman, 1991; Sugita *et al.*, 1999), ITS 영역의 염기배열을 기초로 하여 제작한 primer는 특정 균류의 PCR 검정에 많이 이용되고 있다(Kikuchi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002). 이 실험에서도 *R. undulata* rDNA ITS 영역 특이적 primer를 제작하여 각종 균류의 배양 균사로부터 PCR 검정을 실시한 결과, *R. undulata*에서만 약 525 bp 크기의 특이적인 증폭산물을 검출할 수 있었다.

한편, PCR을 사용하여 토양으로부터 특정 미생물 검정 시에 해결해야 할 문제점으로 토양 미생물들이 환경요인들에 내성을 나타내도록 하는 상대적으로 두꺼운 세포벽을 갖고 있고, 토양입자나 토양 유기물과 견고하게 결합되어 있으며, PCR에 의한 DNA의 증폭을 저해하는 각종 부식산(humic acid)이 존재 하는 점 등이 제시되어 왔으나 (Porteus *et al.*, 1994; Kreader, 1996; Cullen and Hirsch, 1998; Kageyama *et al.*, 2003), 최근에는 이러한 문제점을 보완하여 토양으로부터 total DNA를 효율적으로 추출할 수 있는 다양한 제품들이 시판되고 있다.

토양 병원균류의 일종인 *R. undulata*에 대한 이번 실험에서는, Power soil DNA isolation Kit(MOBIO)를 사용하여 토양으로부터 total DNA를 추출하고, *R. undulata* ITS 영역에 특이적인 primer를 사용하여 PCR 검정을 실시하였는데, 비교적 짧은 시간내에 소량(0.4g)의 토양 시료로부터 *R. undulata*에 특이적인 DNA 증폭 산물을 검출할 수 있었으며, 100g의 토양 중에 1 ng의 균사만 함유되어 있어도 검출이 가능하였다. 따라서, 이 방법을 이용하면 실제 *R. undulata* 감염지의 토양 진단도 효율적으로 수행될 수 있을 것으로 판단된다.

인용문헌

1. 李相龍, 金完圭. 1990. 소나무 리지나뿌리썩음병에 관한 연구-*Rhizina undulata*의 生理的 特性 및 病原性. 韓國林學會誌 79: 322-329.
2. 이상용, 이선근, 이종규, 김경희, 이승규. 2006. 리지나뿌리썩음병균 분리주들의 배양 특성 및 RAPD에 의한 유전적 다양성 분석. 한국임학회지 95: 388-392.
3. 李昌根, 呂運鴻, 金教秀, 金京姬. 1982. 잣나무잎녹병等 樹木病害 3種에 관한 研究. 林業試驗場研究報告書 29: 253-262.
4. 八幡一彦, 作山建. 1982. マツつちくらげ病の病原菌の捕捉とマツ枯損進行との關係. 日本林學會東北支部會誌 34: 111-112.
5. Chao, C.C., Lee, J.T. and Tsung, C.C. 2004. Identification of Clinically Relevant Viridans Group Streptococci by Sequence Analysis of the 16s-23s Ribosomal DNA Spacer Region. Journal of Clinical Microbiology 42(6): 2651-2657.
6. Cullen, S.W. and Hirsch, P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. Soil Biology and Biochemistry 30: 983-993.
7. Germmen, J. 1971. *Rhizina undulata*. A review of research in the Netherlands. European Journal of Forest Pathology 1: 1-6.
8. Gibson, I.A.S., 1970. Disease of *Pinus patula* review. *Commonw. Forest Review* 49: 267-274.
9. Kageyama, K., Komatsu, T. and Suga, H. 2003. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil. The Phytopathological Society of Japan. 69: 153-160.
10. Kikuchi, K., Matsushita, N., Guerin-Laguette, A., Ota, A. and Suzuki K. 2000. Detection of *Tricholoma matsutake* by specific ITS primers. Mycological Research 104(12): 1427-1430.
11. Kreader C.A. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin of T4 gene 32 protein. Applied and Environmental Microbiology 62: 1102-1106.
12. Lee, J.K., Lee, S.Y., Lee, S.J. and Kim, K.H. 2005. Fruiting body development of a root pathogenic fungus, *Rhizina undulata*, after forest fire in eastern coastal pine forests of Korea. Forest Research 1: 33-37.
13. Lu, L., Li, J. and Cang Y. 2002. PCR-Based Sensitive Detection of Medicinal Fungi *Hericium* Species from Ribosomal Internal Transcribed Spacer(ITS) Sequences. Pharmaceutical Society of Japan. 25(8): 975-980.
14. Peterson, S.W. and Kurtzman, C.P. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. Systematic and Applied Microbiology 14: 124-129.
15. Porteus, L.A., Armstrong, J.L., Seidler, R.J. and Watrud, L.S. 1994. An effective method to extract DNA from environmental samples for polymerase chain reaction amplification. Journal of Applied Bacteriology 74: 78-85.
16. Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.C., Mougel, C., Thioulouse, J. and Nazaret, S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. Applied and Environmental Microbiology 67(10): 4479-4487.
17. Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R. and Shinoda, T. 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. Journal of Clinical Microbiology 37: 1985-1993.
18. Thompson, J.H. and Tattar, T.A. 1973. *Rhizina undulata* associated with disease of 80-year-old red spruce in Vermont. Plant Disease Reporter 57: 394-396.
19. Weir, J.R. 1915. Observation on *Rhizina inflata*. Journal

- of Agricultural Research 4: 93-95.
20. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In : M.A. Innis,

D.H. Gelfand, J.J. Snisky and T.J. White, ed. PCR Protocols. Academic Press, London.

(2007년 6월 14일 접수; 2007년 7월 11일 채택)