

보문

젯빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*)의 ITS 영역염기서열 및 RAPD에 의한 계통학적 유연관계 분석

우성미*, 박용환, 유영복¹, 신평균, 장갑열, 진용주, 성재모²

한국중균생산협회, 농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과¹, 강원대 응용생물학과²

Phylogenetic relationships of *Lyophyllum decastes* on the based of ITS region sequences and RAPD

Sung-Mi Woo*, Yong-Hwan Park, Young-Bok Yoo¹, Pyung-Gyun Shin, Kab Yeul Jang,
Yong-ju Jin, Jae-Mo Sung²

The Korean Society of Spawn Production, Chungbuk Eumsong 369-840, Korea
¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Department of Applied Biology Graduate School, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received April 22, 2009. Accepted September 5, 2009)

ABSTRACT : Phylogenetic relationships of *Hypsizygus mamoreus* and *Lyophyllum decastes* artificial cultivated using ITS sequences and RAPD polymorphism have been analyzed. Based on ITS region sequences of 14 strains, we could divide into 2 group as group1 to *Hypsizygus mamoreus* and the control isolated group2 to *Lyophyllum decastes* were identified as the same species. Restrict analysis of rDNA ITS region which was amplified by PCR, 14 collected strains could be classified into 4 clusters. There was approximately 58% genetic similarity between cluster I (SPA 100, 101, 102) and cluster II (SPA 200, 208 and SPA 201, 202), 41% between cluster III (SPA 104, 103, 203) and cluster IV (SPA 204, 206, 207, 205) by BLAST analysis. RAPD polymorphisms were used to analyze the species diversity of artificially cultivated *Lyophyllum decastes* SPA 202. As a result, similarity between SPA 202 and SPA 203 was 75%, at the same time, similarity between SPA 202 and *Pleurotus eryngii* SPA 103 and SPA 104 was 65%.

KEYWORDS : *Hypsizygus mamoreus*, *Lyophyllum decastes*, Artificial Cultivation

서론

젯빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes* (Fr.:Fr.) Sing.)은 분류학적으로는 균계(Mycota), 담자균문(Basidiomycota), 진정담자균류강(Eubasidiomycetes), 송이버섯목탁(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae), 만가닥버섯속(*Lyophyllum*)에 속하며 자실체의 특징으로는 송이형-에기버섯형이며, 갓은 크기가 35-85mm로 초기 모양은 반구형-밥밥구형이고 끝은 안쪽으로 말려 있으나, 성장하면서 거의 편평하게 퍼지며 종종 중앙이 약간 볼록하거나 드물게는 중앙이 약간 오목하고, 끝 부위는 다소 파상으로 굴곡이 있다. 표면은 평활하고 회갈색-암올리브갈색을 띠나 점차 옅은 회갈색으로 된다. 조직은 중앙부위가 두껍고 갓의 끝쪽으로는 얇으며, 육질형-섬유상육질형으로 탄력성이 있고, 백색-옅은 회색이다. 맛은 부드럽고 향기는 불분명하다. 주름살은 대에 완전 붙은 주름살-짧은 내린 주름살이고 뺨뺨하며, 주름

살 끝은 평활하고 성장 초기에는 유백색이다. 대는 34-75×4-9mm로 원통형이고 상하 굵기가 같거나 기부가 약간 굵으며, 약간 뒤틀려 있고, 드물게는 갓에 편심형으로 부착되기도 한다. 표면은 평활하며 종으로 섬유질이 있고, 상부에는 백색의 분질이 있으며, 초기에는 백색, 백회색-옅은 회갈색을 띠고, 탄력성이 있다. 가을에 참나무림, 침엽수림 내 지상 또는 도로변, 정원, 화전지에 다수 군생한다. 분포는 한국, 일본, 중국, 유럽, 북미 북아프리카 등에서 서식한다 (Valerie et al., 2002).

DNA의 분석 방법은 DNA상에 특정부위를 증폭하는 기술로 널리 알려진 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 것들인데, 그 중 하나는 RAPD기술이다.(Gherbawy et al., 2002) RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)는 짧은 primer를 이용하여, 전체 genome에서 비 특이적인 서열의 증폭되는 pattern을 보는 것으로, 같은 종에서 같은 primer로 증폭 시에 같은 부위에 DNA단편을 표지인자로 사용할 수 있다고 보고되어, random primer를 이용한 PCR

* Corresponding author <E-mail: sungmi13@hanmail.net>

genomic fingerprinting으로 strain 구분과 유전분석에 사용되고 있다. RAPD 방법은 소량의 DNA만을 필요로 하고 시간과 경제성에 있어서 RFLP에 비해 종 속간 집단 유전학과 계통분류학 연구에 많이 이용되고 있다 (Laroche et al., 1995).

버섯의 경우 종간의 형태가 비슷하여 동정에 어려움이 있으며 변이가 심하고 종류가 다양할 뿐만 아니라 현재까지도 계통학적 분류가 불분명하여 많이 혼란을 일으키고 있다. 따라서 최근에는 이러한 문제점을 극복하기 위하여 분자 생물학적 정보를 이용한 계통분류법이 많이 이용되고 있는 실정이다(Choi et al., 2003). 이 중에서 ribosomal DNA의 5.8S를 포함하는 ITS I, IV 부위 유전자의 경우, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며 유전자 변이가 적어 보존성이 높은 5.8S부위를 포함하고 있으므로 ITS부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속의 종 및 속간의 유연관계 연구에 이용되고 있어 유전자로 분류학적 다양성을 구명하고자 하였다(Mitchell et al., 1995).

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 국립원예특작과학원, 일본 연구소인 각현버섯연구센터에서 균주를 분양 받고, 느티만가닥버섯(*Hypsizygos mamoreus*), 잣빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*) 포함하여 14개 균주를 본 시험에 사용하였다. 사용한 균주 목록은 Table 1. 과 같다.

ITS PCR 증폭 및 염기서열

PCR 증폭은 ITS I·IV primer를 ABI PCR SYSTEM

9700을 이용하였으며 PCR 반응조건은 predenaturation을 94°C에서 5분간 반응 후 denaturation는 94°C에서 1분, annealing는 56°C에서 1분, extension은 72°C에서 2분을 1cycle로 하여, 총 35 cycle을 돌린 후 PCR산물을 4°C에 보관하여 다음 시험에 사용하였다. PCR을 수행한 후 1.5% agarose gel과 1 × TAE buffer(40 mM trisacetate, 1mM EDTA, glacial acetic acid pH 8.0)에서 전기영동 하여 UV transilluminator에서 ITS I·IV PCR 산물을 확인한 후 DNA band를 Gel extraction kit (TakaRa Bio Inc., Shiga, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

PCR 증폭된 rDNA ITS 영역의 염기서열을 조사하기 위하여 이들 유전자 단편을 pGEM-T easy vector system (Promega, Co)을 이용하여 재조합하였다 (Fujimori et al., 1994).

25ng PCR 산물, 50ng vector, 3unit T4 DNA ligase, 1 μl 10X buffer 및 dH₂O를 혼합하여 전체 부피를 10μl로 맞추고 4°C에서 4시간 반응시켰다. 연결된 벡터의 형질전환을 위해 2μl의 반응물을 50μl competent cell(DH 5 α, 1X10⁸ cfu/μg DNA)을 조심스럽게 혼합하여 얼음에서 20분간둔 다음, 42°C에서 45~50초간 열충격을 거친 세포를 LB배지(0.2%, maltose, 10mM MgSO₄)에서 1시간 동안 진탕배양(200 rpm/min)한 다음 원심분리(12,000rpm/min)하여 적당량의 LB에 현탁배양 후, LB(amp+) 고체배지에 도말하였다. Blue/white screening에 의해 white colony를 배양한 후 ITS I·IV rDNA 유전자 단편의 삽입여부를 확인하였다.

선발된 재조합 clone은 EcoRI 제한효소처리와 전기영동에 의해 ITS유전자의 vector 삽입여부와 크기를 1.5% agarose gel과 1 × TAE buffer(40 mM trisacetate, 1mM EDTA, glacial acetic acid pH 8.0)에서 전기영동 하여 확인하였고, DNA marker는 1kb DNA ladder (Bioneer)를 사용하였다.

Table. 1. *Hypsizygos* spp and *Lyophyllum* spp species strains used in this study.

Strains No.	Collection year	Species	Geographic origin
SPA 100	2008	<i>Hypsizygos mamoreus</i>	Korea
SPA 101	2008	<i>Hypsizygos mamoreus</i>	
SPA 102	2008	<i>Hypsizygos mamoreus</i>	
SPA 103	2008	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 104	2008	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 200	2004	<i>Lyophyllum decastes</i>	Japan
SPA 201	2004	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 202	2004	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 203	2005	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 204	2006	<i>Lyophyllum decastes</i>	Korea
SPA 205	2006	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 206	2006	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 207	2006	<i>Lyophyllum decastes</i>	
SPA 208	2006	<i>Lyophyllum decastes</i>	

Table. 2. List of primers used for the PCR amplification of the URP and ITS rDNA regions

Primer source	Sequences
ITS I *	5' -ATCCAAGGTCCGAGACAACC-3'
ITSIV	5' -CCCAGCAACTGATCGCACAC-3'
URP01**	5' -ATCCAAGGTCCGAGACAACC-3'
URP02	5' -CCCAGCAACTGATCGCACAC-3'
URP03	5' -GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3'
URP04	5' -AGGACTCGATAACAGGCTCC-3'
URP08	5' -ATCATCGCAAGTGACACAGG-3'
URP09	5' -AATGTGTGGCAAGCTGGTGG-3'

*ITS; Internal transcribed spacer of Bioneer PCR Primer Kit.
 **Accession numbers of SRILS UniPrimer Kit (Seolin Sci Co.)

RAPD에 의한 균주 간 유연관계 분석

URP-PCR은 (Bioneer PCR Premix kit) Premix Kit에 genomic DNA 2µl, primer 1µl, 멸균수 17µl를 첨가하였다. RAPD의 조건은 template predenaturation는 94°C에서 5분간, denaturation는 94°C에서 1분간, annealing은, 55°C에서 1분간, extension은 72°C에서 2분간을 1cycle로 하여, 총 35 cycle을 돌린 후 PCR산물을 1.5% agrose gel에서 전기영동 하였고 EtBr로 염색하여 UV illuminator 위에서 band를 확인하였다. URP primer의 sequence는 Table 2 과 같으며 URP primer kit를 이용한 PCR 결과 7개의 다형성을 보이는 band를 하나의 형질로 취급하여 band가 있으면 '1', band가 없으면 '0',으로 구분하여 유연관계를 분석하였다. 분류학적 유연관계는 Nei의 방법에 따라 F값을 구하여 UPGMA(Unweighted pair-Group method with Arithmetic means)을 이용하여 군(cluter)분석하였다 (Park et al., 2006).

결과 및 고찰

ITS 염기서열에 의한 종 속간 유연관계 분석

ITS I·IV rDNA 영역의 염기서열로 유연관계를 알아보기 위하여 공시된 느티만가닥버섯류, 잣빛만가닥버섯 계통 유전자 단편의 염기서열 분석결과는 BLAST (Bnsic Local Alignment Search Tool)에서 Genebank (http://www.ncbi.nlm.gov)에 등록된 계통을 포함하여 염기서열을 비교 분석하였다. (Mitchell et al., 1995) 이들의 상동성은 58% 이상이었으며 *Hypsizygus mamoreus* SPA 100, 101, 102 매우 낮은 상동성을 갖는 것으로 나타났다. 염기서열의 상동성 비교를 통하여 분지도를 작성해 본 결과 크게 2개의 type으로 구분되었다. *Lyophyllum decastes* 41% 이상으로 조사되었다.

분석된 염기서열을 GenBank의 BLAST search를 통하여 기존에 알려진 이들 통해 염기서열들이 잣빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*) 유전자 서열임을 확인할 수 있었다.(Fig. 2) 비교분석할 결과 유사성에 있어서 잣빛만

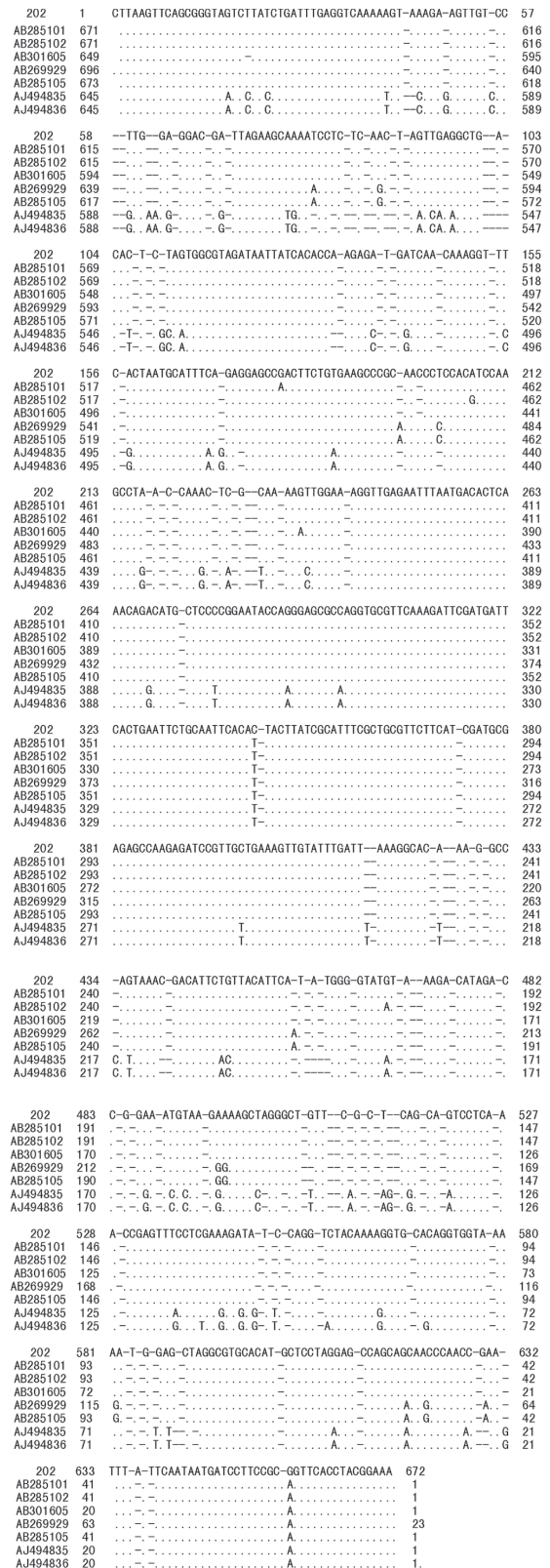


Fig. 1. Alignment of the nucleotide sequences of SPA 202 and the original strain. **Lyophyllum decastes* : SPA 202, AB285101, AB285102, AB301605, AB269929, AB285105, AJ494835, AJ494836; GenBank ACCESSION No

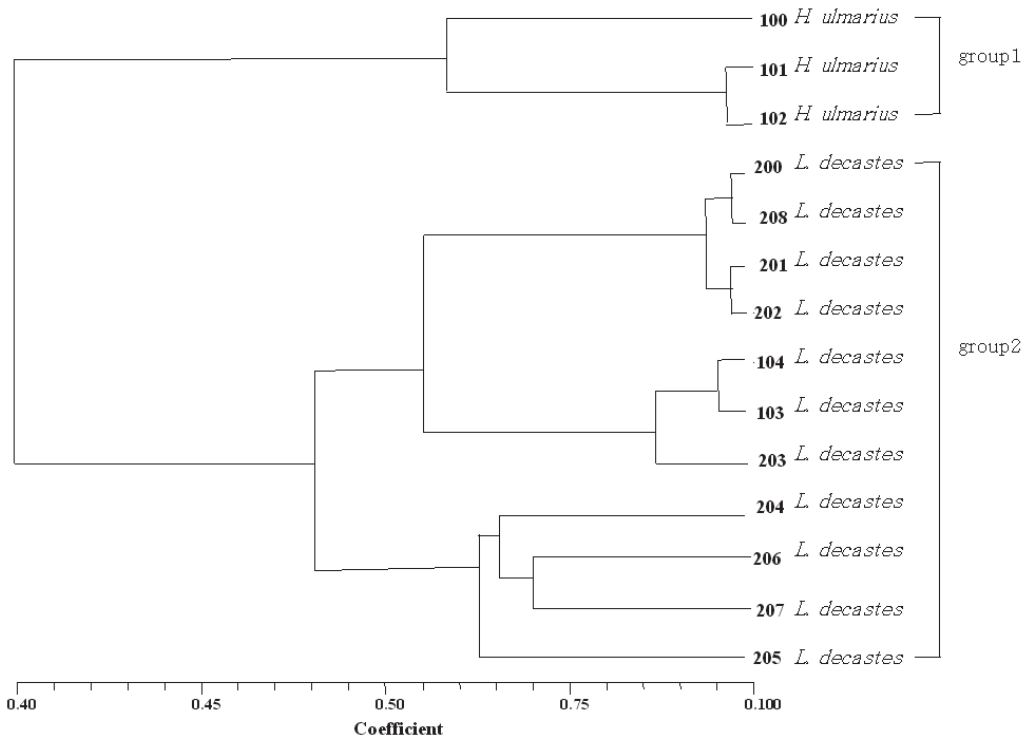


Fig. 2. Dendrogram tree of *Hysizygos* spp. and *Lyophyllum* spp. based on ITS1 and ITS4 region sequence data.

*ASSA; SolGent co.

가닥버섯에 유사성이 가장 높게 나타났으며 만가닥버섯 (*Hysizygos mamoreus*)은 유사성이 낮게 나타났다. 또한 잣빛만가닥버섯과 만가닥버섯의 ITS영역을 PCR하여 염기서열의 상동성을 비교분석한 결과 인공재배 된 유전자 염기서열인 잣빛만가닥버섯 (AB285101, AB285102, AB301605, AB269929, AB285105), SPA 202와 99%의 homology를 나타내었고, 만가닥버섯 (AJ494835, AJ494836), SPA 100, 101, 102 와 85%로 낮게 나타났으며 ITS염기서열 분석에 의한 계통분석에서 SPA 202가 잣빛만가닥버섯과 상동성이 가장 양호하였다 (Fig. 1).

RAPD에 의한 다형성 검정

URP primer는 다양한 생물 종에 적용 가능하며 농업, 식물 및 인체 등에 관련된 곰팡이, 세균 및 버섯 등의 미생물 종간, 종내 동정을 할 수 있어서 매우 유용하는 것으로 시험결과는 다음과 같다.

본 실험에서는 URP primer를 이용하여 만가닥버섯과 잣빛만가닥버섯 균주를 대상으로 PCR분석을 실시하였다.

Primer에 따라 6개 PCR 다형성 band를 보였다.

RAPD 결과를 UPGMA (Unweighted pair-Group method with Arithmetic means)법에 따라 정리하여 작성한 결과는 Fig. 3와 같다 (Kang et al., 2002).

만가닥버섯과 잣빛만가닥버섯 품종은 URP1 primer에서 약 300bp부분에서 특이 band를 찾을 수 있다. URP2 primer에서는 SPA 200, 201, 202, 208, 204, 207, 103, 104, 206은 1,000bp부분에 band 부분을 볼 수 있다. URP3, URP4, URP8 primer에서는 대부분은 1,000bp부분에 많은 band 볼 수 있었다. URP9 primer에서는 1,600bp과 500bp사이에서 볼 수 있다.

수집균주간의 유전 유사도는 58%–61% 정도였고, 수집 균주 간 유전적 유연관계는 4개의 group 나누어졌는데 Group I은 *Hysizygos mamoreus* (SPA 100)과 Group II은 *Hysizygos mamoreus* (SPA 101, 102), GroupIII *Lyophyllum decastes* 10개 균주로 분류되었고 GroupIV은 *Lyophyllum decastes* (SPA 201)로 분류되었다. 이는 대체로 유연관계 실험결과 거의 일치하였다 (Fig. 4).

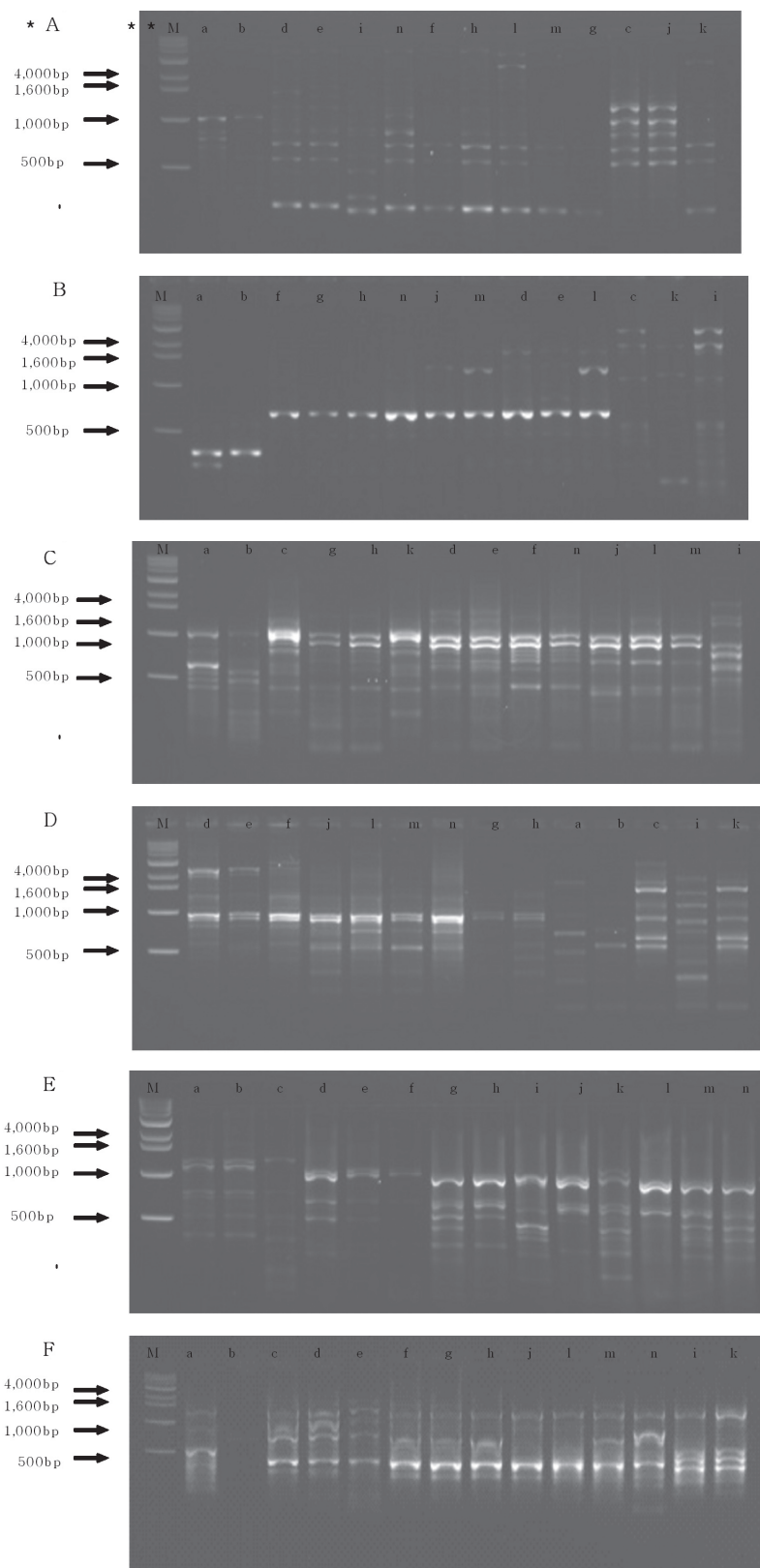


Fig. 3. PCR amplified profiles from genomic DNA of *Hypsizygus* spp and *Lyophyllum* spp. generated by primers URP.
 *A : URP1; B : URP2; C : URP3; D : URP4; E : URP8; F : URP9 **a : SPA 100; b : SPA 101; c : SPA 102; d : SPA 103; e : SPA 104; f : SPA 200; g : SPA 201; h : SPA 202; i : SPA 203; j : SPA 204; k : SPA 205; l : SPA 206; m : SPA 207; n : SPA 208

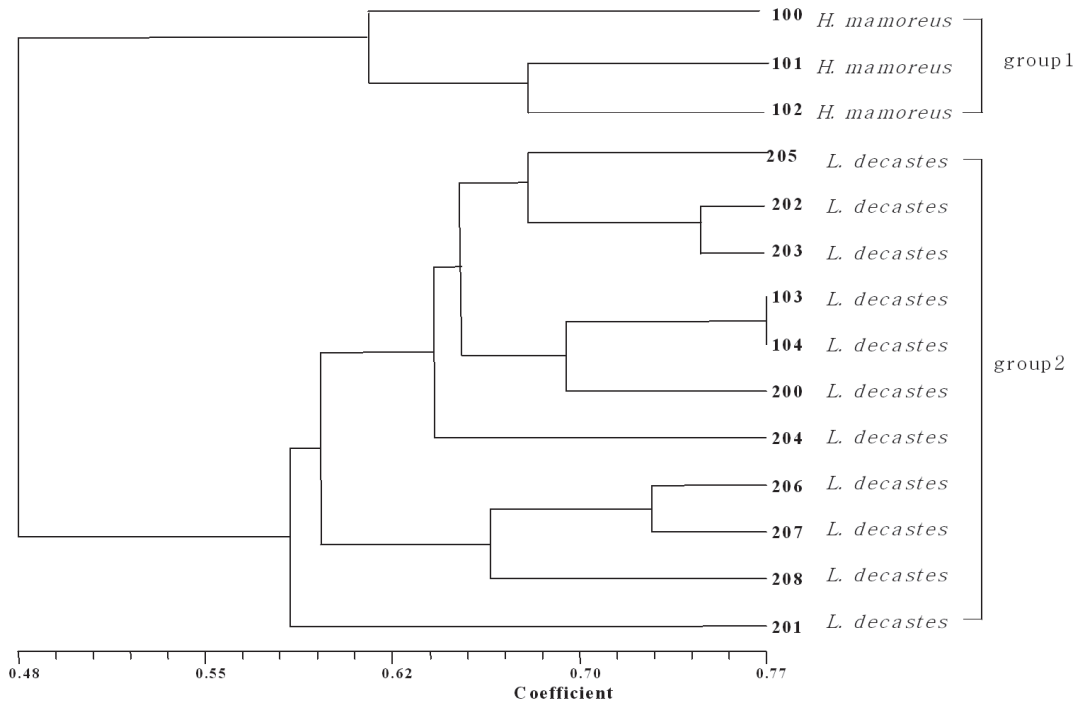


Fig. 4. Dendrogram of *Hypsizygus* spp. and *Lyophyllum* spp. based on RAPD analysis with tree random primers.

*RAPD(Random amplification of polymorphic DNA)

적 요

인공재배된 만가닥버섯(*Hypsizygus mamoreus*)과 잣빛만가닥버섯(*Lyophyllum decastes*)을 ITS I·IV 부위의 염기서열에 의해 종속간 유연관계 및 RAPD 다형성을 분석하였다. ITS I·IV영역부위 종속간 유연관계에서 Group1 (SPA 100, 101, 102)은 만가닥버섯에 속하였으며, Group2 (11균주) 잣빛만가닥버섯의 대조 분리군 11균주는 동일한 종으로 동정되었다. ITS결과 14개 균주 시 4개 그룹으로 분류되었으며, Cluster I과 Cluster II는 58%의 유사도를 Cluster III과 Cluster IV는 41%의 유사성을 보였다. 또한 인공재배한 잣빛만가닥버섯의 종 다양성을 분석하기위해 RAPD를 수행한 결과 가장 수량이 양호하며 우량계통인 SPA 202는 잣빛만가닥버섯인 *Lyophyllum decastes* SPA 203과 그룹화 되었으며 75%의 유사성을 보여주었고, *Lyophyllum decastes* 공시균주인 SPA 103과 SPA 104의 유사성은 65%로 나타났다.

인용문헌

Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun, M. Y. and Rhee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among

Pleurotus species inferred from sequence data of PCR amplified ITS 2 region in ribosomal DNA. Korean J. Mycology 24 : 155-165

Choi, I. Y., Hong, S. B., Yadav, M. C. 2003 Molecular and Morphological Characterization of Green Mold, *Trichoderma* Spp. isolated from Oyster Mushrooms. Mycobiology 31 (2) : 74-80

Choi, S. G. 2005. Phylogenetic relationships of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. Based on ribosomal DNA sequence and RAPD analysis. Ph. D. Thesis. The Graduate School of Kyung-hee University, Republic of Korea.

Fujimori, F. and Okuda, T. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. *Fungi. J. Antibiot* (Tokyo) 47 : 173- 182

Gherbawy, Y. A., Farghaly, R. M. 2002 Mycoflora of Chicken-Viscera with Aid of RAPD Technique as a Tool for Confirmation. Mycobiology 30(1) : 5-12

Iracabal, B., Zervakis, G. and Labarere, J. 1995. Molecular systematics of the genus *Pleurotus* :

- analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology* 141 : 1479–1490
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., You, C. H., Lee, B. M., Eun, M. Y. and Go, S. J. 2001. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Microbiology* 29(2) : 85–89
- Katsuhiko, B., Hitoshi, N., Hitoshi M., 2007. megB1, a Novel Macroevolutionary Genomic Marker of the Fungal Phylum Basidiomycota. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* 71(8) : 1927–1939
- Laroche, A., Gaudet, D. A. Schaalje, G. B. Erickson, R. S. and J. Ginns 1995. Grouping and identification of low temperature using mating RAPD and RFLP analysis. *Mycol. Res.* 99, 297–310.
- Mitchell, J. I., Robert, P. J., and Moss, S. T., 1995. Sequence or Structure. A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. *Mycobiology* 9(2) : 67–75
- Miura, T., Kubo, M., Itoh, Y. 2002. Antidiabetic Activity of *Lyophyllum decastes* in Genetically Type 2 Diabetic Mice. *Biol Pharm. Bull.* 25(9) : 1234–1237
- Ranjiv, S. K., Becker E. and Wach, M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Envir. microbiol.* 58, 2971–2977.
- Valerie, H., Heinz, C., Rytyas V., Jaen, M. M., 2002. Phylogenetic analyses of the *Lyophylleae* (*Agaricales, Basidiomycota*) based on nuclear and mitochondrial rDNA sequences. *Mycol. Res.* 106(9) : 1043–1059