

PCR 다형성 분석에 의한 한국산 잣버섯의 유전적 다양성 및 유연관계

이재성¹ · 조해진¹ · 윤기남¹ · Nuhu Alam¹ · 이경림¹ · 심미자² · 이민웅³ · 이윤혜⁴ ·
장명준⁴ · 주영철⁴ · 정종천⁵ · 신평균⁵ · 유영복⁵ · 이우윤¹ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생명과학부, ²서울시립대학교 생명과학과, ³동국대학교 생명과학과,
⁴경기도 농업기술원 버섯연구소, ⁵농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship in Korean Strains of *Lentinus lepideus* Based on PCR Polymorphism

Jae Seong Lee¹, Hae Jin Cho¹, Ki Nam Yoon¹, Nuhu Alam¹, Kyung Lim Lee¹, Mi Ja Shim²,
Min Woong Lee³, Yun Hae Lee⁴, Myoung Jun Jang⁴, Young Chul Ju⁴, Jong Chun Cheong⁵,
Pyung Gyun Shin⁵, Young Bok Yoo⁵, U Youn Lee¹ and Tae Soo Lee^{1*}

¹Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772

²Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743

³Department of Life Science, Dongguk University, Seoul 100-715

⁴Mushroom Research Institute, Geonggi Agricultural Research and Extension Service

⁵Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707

(Received December 13, 2010. Accepted December 21, 2010)

ABSTRACT: *Lentinus lepideus*, known as train wrecker fungus, has been used for nutritional and medicinal purposes. Recently, commercial cultivation technique and a new cultivar of the mushroom were developed. To investigate the genetic diversity and phylogenetic relationship for identifying the mushroom strains and cultivar, one commercial and 13 strains of *Lentinus lepideus* from different geographical regions of Korea were analyzed by ITS regions of rDNA and RAPD of genomic DNA. Three strains of *Lentinus edodes* were also used for the analysis. The size of the ITS1 and ITS2 regions of rDNA from the different strains varied from 173 to 179 bp and 203 to 205 bp, respectively. The sequence of ITS1 was more variable than that of ITS2, while the 5.8S sequences were identical with 156 base pairs. A phylogenetic tree based on the ITS region sequences indicated that selected strains could be classified into four clusters, while 3 strains of *L. edodes* was divided into a new cluster. Ten primers out of 20 arbitrary primers used in the RAPD-PCR efficiently amplified the genomic DNA. The numbers of amplified DNA bands varied with the primers and strains, with polymorphic DNA fragments in the range from 0.2 to 2.6 kb. The results showed that phylogenetic relationship among Korean strains of *Lentinus lepideus* is high, but genetic diversity is low.

KEYWORDS: Genetic diversity ITS, *Lentinus lepideus*, Phylogenetic relationship, RAPD analysis

서 론

잣버섯 *Lentinus lepideus* (Fr. ex Fr.) Fr.은 주름버섯목 송이과, 잣버섯속에 속하는 버섯으로 초여름부터 가을에 걸쳐 소나무나 잣나무 등 침엽수의 그루터기, 고사목, 생나무에 단생 또는 속생하는 갈색부후균이다. 잣버섯은 표고버섯과 같이 저작감이 좋은 버섯으로 갖의 색깔은 백색~담황색이고, 지름은 5~20 cm로 처음에는 평판구형이나 차차 편평형으로 되고 성숙하면 갖의 가운데가 오목해 지고 소나무 특유의 송진 냄새를 낸다. 이 버섯은 북반구 일대에 널리 분포하며, 우리나라에서는 소나무나 잣나무 등의 침엽수가

분포하는 산림에서 발생한다(Park and Lee, 1999). 이 버섯의 자실체에는 아미노산, polyphenol, flavonoid 및 식이섬유 등이 풍부하게 함유되어 있어서 맛과 영양이 풍부하고 혈중 콜레스테롤과 지질의 함량을 저하시키는 효과도 있다. 이 버섯의 자실체에 함유된 eburicoic acid는 인체의 대사조절에 이용되는 스테로이드 호르몬을 합성하는 원료로도 사용되고 있다. 이외에도 이 버섯의 자실체에서 alcohol과 chloroform으로 추출한 물질은 생쥐의 고형암인 Sarcoma 180과 Ehrlich carcinoma 등의 세포 증식에도 높은 저해작용을 나타내는 것으로 보고되었다(Ying, 1987). 특히 잣버섯의 자실체에서 열수로 추출한 다당류인 Lepidan은 면역계세포인 cytokine TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12, IL-18의 분비를 촉진하여 면역력을 증강시키고, 조혈모 세포의 재생도 증가시키는 효과도

*Corresponding author <E-mail: tslee@incheon.ac.kr>

있는 것으로 나타났다(Jin *et al.*, 1996). 이와 같이 잣버섯의 자실체에 함유되어있는 다당류는 인체의 생리활성을 조절하고 면역을 증강시키는 역할을 하기 때문에 앞으로 건강식품이나 항암제의 개발에 이용할 수가 있을 것으로 사료된다. 그러나 우리나라에서는 최근에 이르러서야 이 버섯의 신품종이 육성되고 톱밥 재배법이 개발되면서 재배면적과 소비가 점차 증가되는 추세에 있다(김, 2010).

따라서 잣버섯은 앞으로 우리나라에서 식용과 약용으로 소비가 증가될 것으로 예상되고 있지만 아직까지 계통이나 품종의 구분은 이루어지지 않고 있어서 본 연구에서는 잣버섯의 계통이나 품종을 구분하기 위한 방법으로 여러 계통의 잣버섯 균사체를 “버섯균주 및 DNA 은행”으로부터 분양받아 이들 균사체로부터 염색체 DNA를 추출하고 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)법을 이용하여 rDNA의 ITS 부위를 증폭하여 염기서열을 분석하고 또한 20 종류의 arbitrary primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하여 우리나라에서 수집되고 품종으로 육성된 잣버섯 균주의 유연관계와 유전적 다양성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

공시품종

본 실험에는 인천대학교 생명과학부의 “버섯균주 및 DNA 은행”에서 균사체의 형태로 보존중인 잣버섯(*Lentinus lepideus*) 14균주와 표고(*L. edodes*) 3 균주 등 총 17 균주를 분양받아 사용하였는데 그 내용은 Table 1에 요약하였다.

염색체 DNA의 추출

잣버섯의 균주로부터 염색체 DNA 추출은 PDA(potato dextrose agar)에서 7일간 25°C로 배양한 균사체를 이쑤시개를 이용하여 수확한 다음 멸균한 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하여 급냉시킨 상태에서 멸균한 막자공이로 마쇄하여 미세한 분말로 만들었다. 마쇄한 균사체 분말은 1.5 ml의 test tube에 옮기고 추출용 완충액[동량의 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA (pH 8.0), 1%의 50 mM sarkosyl] 500 µl를 첨가하여 유리봉으로 잘 섞어 준 다음 65°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 500 µl의 PCI(25 ml phenol, 24 ml chloroform, 1 ml isoamyl-alcohol)를 첨가한 후 실온에서 30분간 정치 후 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상등액만 취하여 새로운 tube에 옮기고 99.9%의 ethanol 1,000 µl을 넣고 4°C에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 상등액을 제거하였다. 침전된 DNA에 70%의 ethanol 500 µl를 첨가하여 동일한 조건으로 원심 분리하고 2회 세척한 후 물기를 제거하고 상온에서 5분간 건조한 후 멸균한 3차 증류수에 녹여 spectrophotometer (Optizen, Daejeon, Korea)를 이용하여 260 nm와 280 nm의 파장에서 측정하여 DNA의 양을 정량하였다 (Cubero *et al.*, 1999).

중합효소연쇄반응

rDNA의 ITS 영역 증폭과 유연관계 분석

각각의 균주로부터 추출한 염색체 DNA에서 rDNA의 ITS(internal transcribed Spacers)영역을 증폭하기 위하여

Table 1. List of *Lentinus lepideus* strains used in this study

Strains	Name of the species	Date of collection	Location
IUM0010	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	05/27/2001	Korea (Kimpo)
IUM0119	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	09/08/2001	Korea (Kimpo)
IUM0321	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	07/07/2002	Korea (Seoul)
IUM0344	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	07/13/2002	Korea (Mt. Songni)
IUM0752	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	10/03/2003	Korea (Kimpo)
IUM1086	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	07/02/2004	Korea (Mt. Songni)
IUM1756	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	07/05/2005	Korea (Taean)
IUM1941	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	08/05/2005	Korea (Seoul)
IUM2544	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	10/08/2006	Korea (Seoul)
IUM3260	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	09/03/2007	Korea (Guri)
IUM3994	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	06/19/2009	Korea (Mt. Deogyu)
IUM4448	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	06/26/2010	Korea (Mt. Deogyu)
IUM4458	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	06/26/2010	Korea (Mt. Deogyu)
IUM4459	<i>Lentinus lepideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	07/07/2010	Korea (cultivar, “Solhyang”)
IUM3178	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	06/30/2007	Korea (Mt. Sorak)
IUM4422	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	05/29/2010	Korea (Mt. Deogyu)
IUM4513	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler	09/09/2010	Korea (Mt. Sorak)

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 등의 universal primers를 사용하였다(White *et al.*, 1990). 중합효소연쇄반응 조건은 0.2 ml의 PCR 시험관에 2 µl의 10X PCR buffer, Taq DNA 중합효소 1 µl, 10 mM dNTP 1.6 µl, 염색체 DNA 1 µl, 각각의 10 pmol primer 0.5 µl 그리고 14.2 µl의 증류수를 넣은 후 PCR을 수행하였다. PCR은 Verti사의 thermal cycler (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 95°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 이어서 94°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 35회 반복하여 polymerization을 한 다음 마지막으로 72°C에서 10분간 방치하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 1 kb 크기의 ladder를 추가해 전기영동을 하여 확인 후 sequencing을 수행하였다. 균주 간 유연관계 분석을 위한 염기서열의 차이 분석은 ClustalW 분석프로그램(Thompson *et al.*, 1994)을 사용하였다. 계통수는 CLC free bench Program을 이용하여 근린결합분석법(neighbor-joining method)으로 작성하였다. 계통수와 내부 분지들에 대한 신뢰도를 검증하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 반복하여 실시하였다(Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987).

RAPD분석

다형성 분석을 위하여 각각의 균주에서 추출한 염색체 DNA를 RAPD-PCR 방법을 이용하여 증폭하였다(Williams *et al.*, 1990). 10 base의 oligonucleotide (Operon Technologies, Inc., Alameda, California)로 구성된 20개의 random primer 사용하였고 그 내용은 Table 2에 요약하였다. PCR의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation시키고, 이어서 94°C에서 1분간, 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 35회 반복하여 polymerization을 한 다음 72°C에서 7분간 방치하였다. 증폭된 PCR의 산물은 1x Tris-Actate-EDTA 완충액이 들어있는 1.4% agarose gel에서 100 V로 75분간 전기영동하였으며 이 때 1 kb 크기의 DNA ladder를 size marker로 사용하였다. Gel은 전기영동 후 ethidium bromide 용액으로 염색하고 Gel documentation system(Kodak Image Station 4000R, USA)을 사용하여 image를 확인하고 기록하였다.

RAPD 결과의 계통분석

20개의 primer를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하고 전기영동 후 agarose gel상에 나타난 각각의 band를 하나의 형질로 취급하여 band가 존재하면 (1), 존재하지 않으면 (0)으로 코드화하여 자료행렬(data matrix)을 만들었다. 유사도 계수(similarity coefficient) S는 모든 균주 간 RAPD-PCR 후 나타난 band의 수를 이용하여 $2N_{xy}/(N_x + N_y)$ 로 계산하였다. 이때 N_{xy} 는 각각의 두 균주가 공유하는 band의 수이고, N_x 와 N_y 는 두 균주 각각의 band 수이다(Nei and Li, 1979). Dendrogram은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGMA (unweighted paired

Table 2. List of RAPD primers used in this study

Primers	Sequence (5' to 3')
OPA-1	CAGGCCCTTC
OPA-2	TGCCGAGCTG
OPA-3	AGTCAGCCAC
OPA-4	AATCGGGCTG
OPA-5	AGGGGTCTTG
OPA-6	GGTCCCTGAC
OPA-7	GAAACGGGTG
OPA-8	GTGACGTAGG
OPA-9	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TGCGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC
OPA-16	AGCCAGCGAA
OPA-17	GACCGCTTGT
OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-19	CAAACGTCCG
OPA-20	GTTGCGATCC

group methods with arithmetic average)법을 이용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

ITS 영역의 염기서열을 통한 유연관계 분석

실험에 사용한 잣버섯 14균주의 ITS1와 ITS2 영역의 염기의 수를 분석한 결과 총 염기의 수는 551에서 564 bp로 균주 간 13 bp의 차이가 있었으며 이 중 ITS2 영역의 염기 수는 205 bp로 모두 동일하게 나타나서 ITS1 영역의 염기 수의 차이가 ITS2 영역의 차이보다 크게 나타났다. 특히 ITS1와 ITS2 영역의 중간에 위치한 5.8S의 염기 수는 모두 156 bp로 동일하였는데 이는 동일한 종의 5.8S 염기의 수는 균류의 경우 대부분 동일한 것으로 보고되었던 것과 같은 결과였다(White *et al.*, 1990). 그러나 본 실험에서 대조군으로 사용한 표고 3계통 중 IUM 4422과 4513 등 2균주의 5.8S 염기 수는 각각 157 bp이었으나 IUM 3178 균주의 염기 수는 155 bp로 2 bp 적게 나타났다. 이렇게 5.8S 영역에서 염기의 수가 부족하게 나타난 것은 염기의 결실에 인한 것으로 판단된다(Table 3). 실험균주 간 유연관계를 분석하기 위해 ITS영역의 염기서열을 neighbor-joining method를 이용하여 분지도를 작성한 결과 크게 3개의 그룹으로 나누어지는데 각각의 그룹간의 차이는 크게 나타나지 않았다(Fig 2). 맨 첫 번째 클

Table 3. Nucleotide distribution, ITS1, 5.8S, and ITS2 of rDNA sequences in different strains of *Lentinus lepideus*

Strain	Nucleotide distribution						Sequence information			
	A	C	G	T	G+C (%)	A+T (%)	ITS1	5.8S	ITS2	Length (bp)
IUM0010	120	130	132	169	47.5	52.5	174	156	205	551
IUM0119	122	131	135	170	47.7	52.3	177	156	205	558
IUM0321	121	131	135	169	47.8	52.2	178	156	205	556
IUM0344	121	130	135	170	47.7	52.3	174	156	205	556
IUM0752	121	131	137	170	47.9	52.1	177	156	205	559
IUM1086	120	130	132	170	47.5	52.5	173	156	205	552
IUM1756	121	131	135	170	47.8	52.2	173	156	205	557
IUM1941	123	132	137	165	48.3	51.7	177	156	205	557
IUM2544	134	129	141	164	47.5	52.5	179	156	203	568
IUM3260	122	132	137	169	48.0	52.0	178	156	205	560
IUM3994	124	131	137	172	47.5	52.5	178	156	205	564
IUM4448	122	131	133	171	47.4	52.6	173	156	205	557
IUM4458	122	130	137	170	47.8	52.2	178	156	205	559
IUM4459	125	132	139	172	47.7	52.3	178	156	205	568
IUM3178	165	120	143	254	38.6	61.4	186	155	205	682
IUM4422	166	119	143	257	38.2	61.8	186	157	205	685
IUM4513	166	119	141	256	38.1	61.9	186	157	205	682

A- adenine, C- cytosine, G- guanine, T- thymine.

러스터에 속하는 균주는 김포시에서 채집한 IUM 0119이나 뒤의 2, 3, 4번째의 클러스터와도 유연관계가 매우 가까운 균주이다. 두 번째 클러스터에는 각각 서울의 종묘, 신품종으로 육성된 “솔향”, 덕유산, 서울의 종묘 등에서 수집된 균주인 IUM 2544, 4459, 3994, 1941 등 4개의 균주로 이 클러스터에 포함된 균주 간에도 상호간 유연관계가 가까웠다. 특히 경기 버섯연구에서 개발한 솔향은 서울의 종묘와 덕유산에서 채집한 균주와의 유연관계가 매우 높게 나타나서 육종과정에서 이들 균주가 모본으로 이용되었을 가능성과 또는 이들 버섯과 유연성이 높은 다른 균주와의 교배를 통해 육성되었을 가능성이 높다고 사료되었다. 세 번째 클러스터는 IUM 3260, 0752, 1086, 0010, 4458, 0344 등의 균주로 구성된 가장 큰 클러스터로 이들 균주는 각각 구리시, 김포시, 속리산, 김포시, 덕유산, 속리산 등 6개 지역에서 채집된 균주로 채집한 거리상으로는 김포시에서 채집한 2균주를 제외하고는 다른 균주들은 채집거리가 멀리 떨어져 있음에도 유연관계가 가까웠다. 또한 네 번째 클러스터인 IUM 1756과 0321 등 태안과 서울의 창경궁에서 채집된 2개 균주로 묶였는데 앞의 3번째 클러스터보다 유연관계가 가까웠다. 따라서 우리나라 각지에서 수집하여 실험에 사용된 잣버섯은 지역에 관계없이 대부분 유연관계가 매우 가까웠다. 따라서 ITS영역을 기반으로 작성된 계통도를 분석한 결과 실험에 사용한 균주는 크게는 모두 단일한 계통군에 속해서 모두 동일한 잣버섯으로 확인되었다. 특히 상황버섯의 경우 rDNA의 ITS 영역을 PCR로 증폭

하여 종이나 품종 간 특이한 염기서열의 존재가 확인되면 이를 primer 제작에 이용해 증폭시켜 종이나 품종을 동정하는데 사용이 가능하다고 보고하였다(Park *et al.*, 2001). 노루궁뎅이의 경우에도 rDNA의 PCR을 통해 종과 계통 간 분자생물학적으로 구분이 가능하다고 보고한바 있다(Park *et al.*, 2004).

RAPD를 이용한 잣버섯의 계통분석

우리나라의 여러 지역에서 수집된 14 계통의 잣버섯과 3 계통 표고의 분자유전학적 다양성 분석을 위하여, 고체배지 상에서 7일 배양한 균사체를 수확하여 염색체 DNA를 추출하였다. 추출된 염색체를 주형으로 하여 OPA-1에서 OPA-20까지 총 20가지의 primer를 이용하여 RAPD-PCR 반응을 수행하고 전기영동을 한 결과, 20개의 primer 중에 OPA-1, 2, 3, 4, 9, 10, 11, 13, 16, 18 등 10개의 primer가 염색체 DNA를 효과적으로 증폭시키는 것으로 나타났다(Table 4, Fig. 1-4). 이 반응에서 분자량 250~2600 bp 정도 크기의 DNA 단편이 분리되었는데, 이는 균주 당 가장 적은 것은 5개에서 많은 것은 37개로 평균 약 20개의 DNA의 단편이 증폭됨을 확인하였다. 이 실험에 사용된 20개의 primer는 곰팡이의 종내 유연성과 유전적 다양성을 밝히기 위해 널리 사용되고 있는 primer 중 하나이다(Williams *et al.*, 1990). 따라서 각각의 균주별 나타난 DNA 단편의 패턴을 UPGMA 방법을 이용하여 클러스터링(clustering)하였는데 크게 4개의 클러스터(cluster)로 나눌 수가 있었다(Fig. 5). 첫 번째 클러스터는

Table 4. DNA bands in different strains of *Lentinus lepideus* by random amplification of polymorphic DNA assay using 10-base OPA primers

Primers	DNA band (kb)	Lanes																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
OPA-1	1.1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	0.8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	0.7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPA-2	1.6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.2	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	0.9	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	0.8	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPA-3	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
OPA-4	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1.6	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.3	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
	1.0	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
OPA-9	0.7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	0.6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	0.4	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	0.3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	0.2	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-10	1.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	0.9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
OPA-11	0.3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	0.6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
OPA-13	2.6	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	2.0	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	1.5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	1.3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	0.7	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
OPA-16	0.4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	1.5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Table 4. Continued.

Primers	DNA band (kb)	Lanes																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
OPA-18	2.0	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

lane 1, IUM-0010; lane 2, IUM-0119; lane 3, IUM-0321; lane 4, IUM-0344; lane 5, IUM-0752; lane 6, IUM-1086; lane 7, IUM-1756; lane 8, IUM-1941; lane 9, IUM-2544; lane 10, IUM-3260; lane 11, IUM-3994; lane 12, IUM-4448; lane 13, IUM-4458; lane 14, IUM-4459; lane 15, IUM-3178; lane 16, IUM-4422; lane 17, IUM-4513 - indicate absence of DNA band, + indicate presence of DNA band.

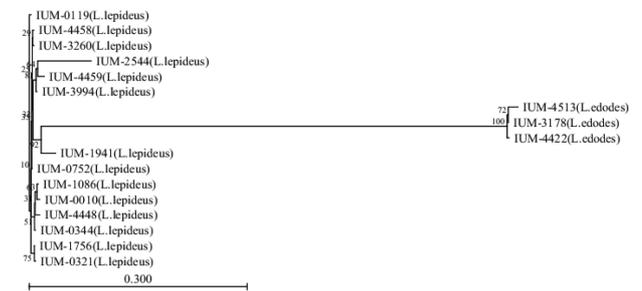


Fig. 1. Phylogenetic tree of fourteen strains of *Lentinus lepideus* and three strains of *Lentinus edodes* based on the nucleotide sequences of the ITS regions using neighbor-joining method with 1,000 boot-strapping trails.

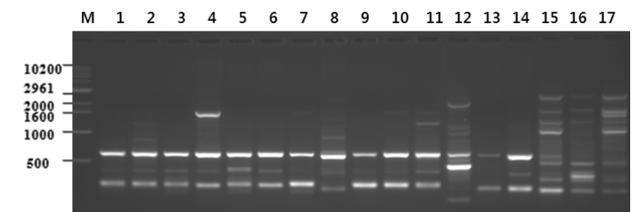


Fig. 2. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Lentinus lepideus* using OPA-1 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-0010; lane 2, IUM-0119; lane 3, IUM-0321; lane 4, IUM-0344; lane 5, IUM-0752; lane 6, IUM-1086; lane 7, IUM-1756; lane 8, IUM-1941; lane 9, IUM-2544; lane 10, IUM-3260; lane 11, IUM-3994; lane 12, IUM-4448; lane 13, IUM-4458; lane 14, IUM-4459; lane 15, IUM-3178; lane 16, IUM-4422; lane 17, IUM-4513.

김포시에서 채집한 IUM 0119의 1개 균주가 포함되었는데 이는 앞의 실험인 ITS 영역의 분석결과와 유사한 것으로 나타났다. 두 번째 클러스터는 5개의 균주가 포함되어 있으나 편의상 이 그룹은 3개의 소그룹으로 나눌 수 있다. 이 소그룹에는 3개의 표고버섯(IUM 4513, 3178, 4422) 균주가 포함되어 있어서 이 클러스터에 속해있는 잣버섯과 차이점을 확인할 수 있었다. 세 번째 클러스터는 각각 속리산, 김포시, 덕유산에서 채집한 IUM 1086, 0010, 4458 등의 균주가 포함되어 있으며, 4번째 클러스터에는 태안에서 채집한 IUM

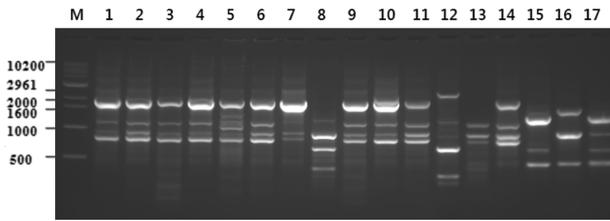


Fig. 3. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Lentinus lepideus* with OPA-11 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-0010; lane 2, IUM-0119; lane 3, IUM-0321; lane 4, IUM-0344; lane 5, IUM-0752; lane 6, IUM-1086; lane 7, IUM-1756; lane 8, IUM-1941; lane 9, IUM-2544; lane 10, IUM-3260; lane 11, IUM-3994; lane 12, IUM-4448; lane 13, IUM-4458; lane 14, IUM-4459; lane 15, IUM-3178; lane 16, IUM-4422; lane 17, IUM-4513.

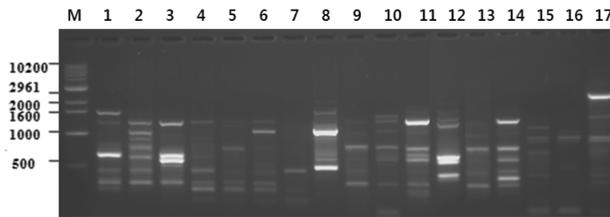


Fig. 4. Random amplification of polymorphic DNA profiles in different strains of *Lentinus lepideus* with OPA-13 primer. M- molecular size marker (1 kb DNA ladder), lane 1, IUM-0010; lane 2, IUM-0119; lane 3, IUM-0321; lane 4, IUM-0344; lane 5, IUM-0752; lane 6, IUM-1086; lane 7, IUM-1756; lane 8, IUM-1941; lane 9, IUM-2544; lane 10, IUM-3260; lane 11, IUM-3994; lane 12, IUM-4448; lane 13, IUM-4458; lane 14, IUM-4459; lane 15, IUM-3178; lane 16, IUM-4422; lane 17, IUM-4513.

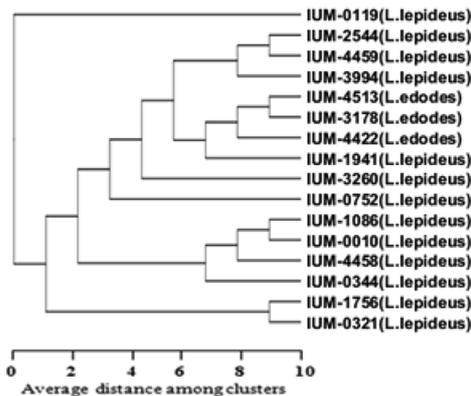


Fig. 5. Dendrogram constructed based on the random amplification of polymorphic DNA markers of *Lentinus lepideus* strains determined by the average linkage cluster.

1756과 서울의 창경궁에서 채집한 0321 균주가 포함되어 있다. 특히 RAPD-PCR을 통해 agarose gel상에 나타난 각각의 균주의 DNA band의 패턴을 분석한 결과, 앞에서의 rDNA ITS 영역을 증폭한 후 염기서열을 비교 분석한 결과와 매우 유사하였다. 이는 면적이 협소한 우리나라에서 채집한 잣버섯

은 채집된 지역 간 거리에 큰 관계없이 유연관계가 매우 가까울 수도 있다는 것을 보여준 사례이다. 따라서 다양한 primer를 이용하여 *Pleurotus eryngii*와 *Pleurotus nebredonsis*와 같은 느타리속 버섯을 RAPD-PCR 하여 동일한 종 내의 유전적 다양성을 밝혀 계통이나 품종 간의 차이점을 구분한 실험에서와 같이(Alam *et al.*, 2009a; Alam *et al.*, 2009b), 이 방법은 잣버섯의 계통이나 품종을 구별하는 데 사용할 수 있는 유용한 방법으로 사료된다. 이외에도 느티만가닥버섯의 계통이나 품종을 구분하기 위해서는 RAPD를 통해 밝혀진 각각의 종이나 계통 고유의 DNA의 단편의 염기서열 정보를 primer로 이용하면 버섯의 계통이나 종을 구분하는데 사용할 수 있다고 보고하였다(Lim *et al.*, 2010). 지금까지 보고된 바로는 균류의 ITS 부위는 종내 보다 종간 변이가 많은 것으로 보고되어있지만 본 실험이나 과거의 실험의 예를 보면 동일한 종내에서 PCR 방법을 이용하면 종의 구별도 가능한 것으로 보여진다(Ro *et al.*, 2007; Zervakis *et al.*, 2001).

따라서 잣버섯을 RAPD를 통해 계통도를 분석한 결과 한국산 잣버섯의 균주간 다양성이 적었으며, rDNA의 ITS 영역 염기서열의 유연관계를 분석한 결과, 균주 간 유연관계가 높아서 실험에 사용한 잣버섯은 모두 동일종으로 확인되었으며, 각각의 균주 간 차이점이 적은 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 버섯의 새로운 품종이 교배를 통해 육성될 경우 이들의 계통을 밝히는데 본 실험 방법이 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적요

잣버섯(*Lentinus lepideus*)은 외국에서 철도의 침목을 부후시켜 기차가 탈선되는 원인을 제공하는 곰팡이로 알려져 있으나 예로부터 맛과 영양이 좋고 약리효과도 높아서 야생에서 채취하여 이용해왔다. 최근 이 버섯의 새로운 품종과 인공 재배법이 개발되면서 한국산 잣버섯의 유전적 다양성과 유연관계의 규명이 필요하게 되었다. 이에 우리나라의 여러 지역에서 수집한 14개의 잣버섯 균주와 3개의 표고균주를 대상으로 rDNA의 ITS region 염기서열과 genomic DNA의 RAPD-PCR을 수행하였다. ITS1과 ITS2 영역의 염기의 수는 각각 173에서 179와 203에서 205 염기쌍으로 계통에 따라 변이가 있었는데 ITS1 영역의 염기서열이 ITS2의 영역보다 변이가 많았고 5.8S 지역은 염기의 수가 156쌍으로 모든 균주가 동일하였다. 각각의 균주 간 유연관계를 알아보기 위해 ITS 영역의 염기서열을 이용하여 분지도를 작성해 본 결과 실험에 사용한 균주는 4개의 클러스터로 나뉘지는 것으로 나타났고 실험에 사용한 3개의 표고는 잣버섯과는 다른 새로운 클러스터로 나뉘졌다. 또한 20 종류의 primer를 이용하여 RAPD를 수행한 결과 10개의 primer가 효과적으로 염색체 DNA를 증폭하는 것으로 나타났다. 증폭의 양상은 잣버섯의 계통과 primer의 종류에 따라 변이가 있었는데, 증폭된 DNA

의 단편 수는 적은 것은 5개에서 많은 것은 37개, 단편의 크기는 0.2 kb에서 2.6 kb까지 다양하였다. 본 실험 결과 실험에 사용한 한국산 잣버섯의 계통과 품종간의 유연관계는 높았으나 유전적 다양성은 낮았다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(Agenda: 9-27-63; No. 200901OFT092763229)의 지원으로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김영호. 2010. 잣버섯 품종 “술향”의 품종생산수입판매신고; 신고번호 09-06-0004-2010-1. 산림청장.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009a. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* 37:183-188.
- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009b. Vegetative growth and phylogenetic relationship of commercially cultivated strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* 37:258-266.
- Cubero, O. F., A. Crespo, J. Fatehi and P. D. Bridge. 1999. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium stored, lichenized and other fungi. *Plant Syst. Evol.* 216:243-249.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Jin, M. L. 1996. A study on the activation of immune cell and transcription factor of pine nut mushroom. Ph. D thesis of Seoul National University Graduate School. pp. 1-121.
- Lim, Y. J., Lee, C. Y., Park, J. E., Kim, S. W. Lee, H. S. and Ro, H. S. 2010. Molecular genetic classification of *Hypsizigus marmoreus* and development of strain-specific DNA markers. *Kor. J. Mycology* 38(1):34-39.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269-5273.
- Park, D. S., Kang, H. W., Kim, K. T., Cho, S. M., Park, Y. J., Shin H. S., Lee, B. M. and Go, S. J. 2001. PCR-based sensitive detection of wood decaying fungus *Phellinus linteus* by specific primer from rDNA ITS regions. *Mycobiology* 29(1):7-10.
- Park, H. G., Ko, H. G., Kim, S. H. and Park, W. M. 2004. Molecular identification of Asian isolates of medicinal mushroom *Hericium erinaceum* by phylogenetic analysis of nuclear ITS rDNA. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:816-821.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 1999. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul. pp. 255-258.
- Ro, H. S., Kim, S. S., Ryu, J. S., Jeon, C. O., Lee, T. S. and Lee, H. S. 2007. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting and physiological characteristics. *Mycol. Res.* 111:710-715.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic.*
- White, T. J., Bruns, T., Lee S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocol: a guide to methods and applications, pp. 315-322. Eds., Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. San Diego, Academic Press.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Ying, J. Z., X. L. Mao, Q. M. Ma, Y. C. Zong, and H. A. Wen. 1987. Icons of medical fungi from China. Science Press, Beijing, China.
- Zervakis, G. I., Venturella, G. and Papadopoulou, K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology* 147:3183-3194.