

Genetic Variation Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Sequences in *Lepista nuda*

Yang Suk Lee¹, Nam Woo Kim¹ and Jong Bong Kim^{2*}

¹Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-220, Korea

²Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Received August 2, 2012 / Revised November 16, 2012 / Accepted November 23, 2012

A genetic variation of *Lepista nuda* and two genus *Lepista* species (*L. irina* and *L. sordida*) were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis. In the resulting RAPD analysis, 22 out of 40 random primers amplified polymorphic RAPD fragment patterns, the amplified bands were 355, and DNA fragment sizes were 200-400bp. Intraspecific genetic dissimilarity of the 10 *L. nuda* strains were calculated to range from 0% to 21.60%, *L. sordida* from 16.93% to 24.82%, *L. irina* were 20.62% to 25.54%, and intraspecific genetic dissimilarity of *L. sordida* and *L. irina* was 23.49%. The 673 base pairs were sequenced during the analysis of the ITS I and II region; six *L. nuda* strains intraspecific genetic dissimilarities ranged from 1.58% to 11.47%, *L. nuda* and *L. sordida* from 3.83% to 12.88%, *L. nuda* and *L. irina* from 7.11% to 15.61%, and intraspecific genetic variation between *L. sordida* and *L. irina* was 4.79%. The findings showed that RAPD and ITS sequencing could be used for developing molecular genetic markers and screening of unidentified genus *Lepista* species.

Key words : Mushroom, genetic variation *Lepista nuda*, RAPD, ITS

서 론

버섯(Mushroom)은 담자균강(Basidiomycota)과 일부의 자낭균강(Ascomycota)에 속하는 고등균류로 자연계에서는 분해자 역할 뿐만 아니라 기원전부터 식용 및 약용의 목적으로 사용하여 왔다[13]. 최근 연구에서 버섯에는 생체기능 조절, 항암, 항산화 및 면역활성을 나타내는 여러 종류의 생리활성 물질이 함유되어 있다고 알려지면서 버섯에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다[24].

전세계적으로 약 15,000종의 버섯이 있으며, 그 중 약 2,000 종이 식용이 가능하다[23]. 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*)은 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae), 자주방망이버섯속(*Lepista*)에 속하며, 우리나라의 *Lepista*속에는 *L. nuda*, *L. sordida* (자주방망이버섯아재비), *L. irina* (광릉자주방망이버섯)가 있다. *L. nuda*는 저온 서식성 버섯으로서 우리나라 전역에 늦가을부터 초겨울에 혼잡림의 습한 음지에서 서식하며, 아열대지역을 제외한 전 세계에 분포하고 있다[15]. 특히 연보라색을 띄며 독특한 맛과 향을 지니고 있어 구미나 중국 등지에서는 식용으로 널리 이용하고 있다. 특히 유럽에서는 주름버섯 중 2번째로 선호도가 높은 식용버섯으로 28종의 유리아미노산과 7종의 미량금속원소를 함유하며[18], 우수한 항산화성[10]과 항암성[11], 항균성[3], 당대사조절 및 혈전 용해능이 우수한 버섯으로 알려져[5,6] 영양학적, 약리학적 가치뿐

만 경제적 가치가 뛰어난 버섯이다. 전세계적으로 분포하는 민자주방망이버섯의 유전학적 연구는 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 방법에 의한 송이과 버섯 5종과 *L. nuda*의 종내, 종간의 계통분류학적 유연관계[22], CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)와 RAPD를 이용한 *Lepista* 속간의 유연관계 및 배양특성[4], 재배법 개발 및 품종개량[9]에 대해 연구, 보고된 바 있다.

종내 및 종간의 형태적 분류 및 분류학상의 위치를 확인하기 위해 유전자 수준에서의 분자적 변이를 분석하기 위해 RAPD, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Ampolified Fragment Length Polymorphism) 등 DNA marker를 이용한 유전변이 및 유연관계 분석이 널리 이루어지고 있다[23,27]. 이 중 RAPD는 DNA 증폭 부위의 염기배열에 관한 정보가 필요하지 않으며, 단 한 종류의 합성 primer를 사용하므로 절차가 단순하여 품종분류 및 종내, 종간 변이분석, 유연관계 비교 등에 널리 이용되고 있다[25,27]. 그러나 RAPD는 PCR 반응과 한 종류의 primer에 의해 분석이 이루어지므로 반응 조건의 차이에 의해 검출되는 밴드의 숫자나 강도에 변화가 생기는 문제점이 발생할 수 있으며, 마그네슘 등의 첨가물 농도나 반응온도 등의 여러 요인들에 의해 영향을 받을 수 있다[4,9]. 최근에는 ITS (Internal transcribed spacer) 영역의 염기서열을 이용한 유연관계 연구가 증가하고 있는데 18S rDNA는 변이가 적게 일어나는 반면 ITS 영역은 변이가 많이 일어나며, 전체 genome 상에서 반복되는 부위가 많아 추출하기 쉬우며, 600 bp 정도로 작아 손쉽고 효과적인 분석이 가능하다[1,26]

*Corresponding author

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

E-mail : jbkim@cu.ac.kr

그러나 국내의 여러 지역과 *L. nuda*의 선호도가 높은 유럽 3개 지역(프랑스, 포르투갈, 스위스) 균주와 *Lepista*속에 속하는 *L. sordida* 및 *L. irina*의 종내, 종간에 대한 연구는 이루어진 바 없다. 이에 본 연구에서는 *Lepista*속 3종에 대한 유전적 변이를 random primer를 이용한 RAPD 방법과 ITS 방법으로 분석하여 지역 종내, 종간의 유전적 유사도와 그 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

채집 및 배양

*L. nuda*는 2003년 7월부터 12월까지 전국의 6지역(강화 마니산, 경기 구리, 경기 용인, 전북 덕유산, 경북 경산, 경북 하양)에서 *Lepista*속의 *L. nuda* 5개 균주와 *L. sordida*, *L. irina*를 각각 1 균주씩 채집하였으며, 5 지역(경기 김포, 인천 서구, 인천 부평, 경기 용인, 제주)에 대해서는 인천대학교 야생버섯 균주 은행(IUM; Inchon University Wild Mushroom Strain Bank)으로부터 분양 받았다. 또한 유럽 3개 지역의 *L. nuda*는 프랑스 국립 농학연구소(Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Bprdeaix, France)에서 분양받아 본 실험을 위한 재료로 사용하였다(Table 1).

배양 및 Genomic DNA의 추출

국내에서 채집된 *L. nuda*, *L. irina*, *L. sordida*와 IUM과 INRA에서 분양받은 *L. nuda*는 potato dextrose agar media (BD and Company, Sparks MD, USA)에 접종하여 25°C±1°C의 조건에서 25일간 배양하여 genomic DNA 추출을 위한 균사로 사용하였다.

DNA 추출은 Lee 등[8]의 방법에 따라 균사체 0.2 g을 액체 질소로 동결시켜 마쇄한 다음 1.5 tube에 옮긴 다음, 500 µl의 lysis buffer [1% 2-mercaptoethanol, 3% SDS, 50 mM EDTA in pH 7.2 50 mM Tris-HCl]를 넣고 65°C에서 1시간 동안 반응

시켰다. 반응 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 다른 1.5 tube에 옮긴 후 동량의 PCI (phenol 25 : chloroform 24 : isoamylalcohol 1)을 첨가하고 잘 섞은 뒤 4°C의 조건에서 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 채취하여 새 tube에 옮겼다. 채취된 상층액의 동량에 해당하는 99.9%의 차가운 에탄올을 첨가하여 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 확인한 후, 상층액을 제거하고 500 µl의 70% 에탄올을 첨가, 다시 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 제거하였다. 1.5 tube에 남아 있는 pellet은 실온에서 건조시킨 다음, 100 µl의 3차 증류수를 넣고 DNA를 용해시킨 후, -20°C에서 보관하면서 PCR 반응용액의 template DNA로 사용하였다.

RAPD 증폭

RAPD 분석을 위해 PCR에 사용한 primer는 10개의 oligo-nucleotid로 구성된 Operon primer (Operon Technologies INC. Alameda, Ca, USA)로 OPA 1~20과 OPB 1~20까지 총 40개의 primer를 사용하였으며, 대부분 G-C의 함량이 60-70%으로 반응이 나타난 code name과 sequence는 Table 2에 나타내었다. PCR 반응 혼합액의 조성은 Taq polymerase 1U, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, dNTPs mixture 250 µM, MgCl₂ 1.5 mM였으며, 여기에 genomic DNA 1.0 µl, primer 1.0 µl (Operon Technologies INC. Alameda, Ca, USA)를 넣고 3차 증류수로 20 µl를 맞추었다. PCR에 사용한 thermal cycler는 PTC-150HB (minicycler MJ research INC, MA, USA)를 사용하였으며, PCR 조건은 template DAN denaturation을 위해 94°C에서 3분간 predenaturation 한 다음 94°C에서 30초 denaturation, 40°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 5분간 extension 하였으며, 이 과정을 45회 반복하였으며, 최종적인 합성을 위하여 72°C에서 5분간 extension 하였다.

Table 1. The source and locality of strains

Species and Strain No.	Locality	Source	Analysis
<i>L. nuda</i> 01	Mt. Manisan, Ganghwa-gun Inchon, Korea	collecting	RAPD
<i>L. nuda</i> 02	Kimpo Gyeonggi-do, Korea	IUM00003*	RAPD
<i>L. nuda</i> 03	Seo-gu Inchon, Korea	IUM00547*	RAPD
<i>L. nuda</i> 04	Bupeong-gu Inchon, Korea	IUM00617*	RAPD
<i>L. nuda</i> 05	Guri-si Gyeonggi-do, Korea	collecting	RAPD
<i>L. nuda</i> 06	Yongin-si I, Gyeonggi-do, Korea	collecting	RAPD
<i>L. nuda</i> 07	Yongin-si II, Gyeonggi-do, Korea	IUM00379*	RAPD
<i>L. nuda</i> 08	Mt. Deogyu Muju-gun Jeollabukdo, Korea	collecting	RAPD, ITS
<i>L. nuda</i> 09	Gyeongsan Gyeongbuk, Korea	collecting	RAPD, ITS
<i>L. nuda</i> 11	Jeju, Korea	IUM00181*	RAPD, ITS
<i>L. nuda</i> 12	France	INRA	ITS
<i>L. nuda</i> 13	Swiss	INRA	ITS
<i>L. nuda</i> 14	Portugal	INRA	ITS
<i>L. irina</i>	Yongin-si Gyeonggi-do	collecting	RAPD, ITS
<i>L. sordida</i>	Hayang Gyeongbuk	collecting	RAPD, ITS

* Inchon wild mushroom strain bank number

Table 2. Random amplification of polymorphic DAN primers used in this study

Primer NO.	Sequence (5' to 3')	Primer NO.	Sequence (5' to 3')
OPA-1	CAGGCCCTTC	OPA-18	AGGTGACCGT
OPA-2	TGCCGAGCTG	OPA-19	CAAACGTCGG
OPA-3	AGTCAGCCAC	OPB-1	GTTTCGCTCC
OPA-4	AATCGGGCTG	OPB-4	GGACTGGAGT
OPA-7	GAAACGGGTG	OPB-5	TGCGCCCTTC
OPA-9	GGGTAACGCC	OPB-6	TGCTCTGCCC
OPA-10	GTGATCGCAG	OPB-7	GGTGACGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT	OPB-8	GTCCACACGG
OPA-13	CAGCACCCAC	OPB-10	CTGCTGGGAC
OPA-15	TTCCGAACCC	OPB-11	GTAGACCCGT
OPA-17	GACCGCTTGT	OPB-12	CCTTGACGCA

PCR한 product는 1.2% agarose에서 1×TAE(Tris-acetate-EDTA) buffer에서 150분간 50 volt로 전기영동한 후, 0.5% µg/ml의 ethidium bromide로 염색하여 UV 상에서 나타나는 band를 관찰하였다.

rDNA의 ITS 영역 증폭

rDNA의 ITS 영역을 증폭하기 위해 White 등[26]에 의해 보고된 primer ITS 1F (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)와 ITS 2R (GCTGCGTTCATCGATGC), ITS 3F (GCATCGATGAAGAACGCAGC)과 ITS 4R (TCCTCCGCTTATTGATGTC)를 사용하였다. PCR 반응 혼합액의 조성은 RAPD와 동일하며, thermal cyler는 PTC-150HB (minicycler MJ research INC, MA, USA)를 사용하였으며, PCR 조건은 ITS 1과 2, ITS 3, 4의 반응 조건을 달리하여 수행하였다. ITS primer 1과 2의 반응 조건은 template DNA 변형을 위해 94℃에서 3분간 pre-denaturation 한 다음, 94℃에서 30초 denaturation, 50℃에서 30초 annealing, 72℃에서 1분간 extension하였으며, 이 과정을 40회 수행하였다. ITS primer 3과 4의 반응 조건은 94℃에서 3분 pre-denaturation 한 다음, 94℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 extension 1분간 처리하였으며, 이 과정을 40회 수행하였다. DNA 증폭이 끝난 후 최종적인 합성을 위해 72℃에서 5분간 안정화하였다. rDNA를 PCR한 product는 1.0% agarose gel에서 확인한 다음 gel extraction kit를 이용하여 증폭된 DNA band를 gel로부터 추출하여 Perkin-Elmer applied biosystems ABI 377A sequencer (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 분석하였다.

Data 분석

RAPD 분석을 위해 반응이 나타난 22개의 primer에 대한 결과는 각 band를 하나의 형질로 취급하여 유무에 따라 '1'과 '0'으로 코드화 하였으며, 전체 코드화한 자료를 바탕으로 자료행렬을 작성하였다[20,26]. rDNA의 ITS 영역에 대한 염기서열은 Sequencher (Gene codes Co., USA), Clustal X를

이용하여 alignment 시킨 후, 최종 세부 정렬은 수작업으로 보정하였다.

정리된 RAPD 결과와 염기서열의 phylogenetic analysis는 PAUP 4.02b version [20]을 사용하여 parsimony analysis를 실시하였으며, 분지도는 UPGMA (unweighted pair-group method, arithmetic average method) 방법을 사용하였으며, 분석방법으로는 Heuristic search를 이용하였다. 또한 Nei[14]의 유전적 거리지수를 다소 변형한 Nei-Li의 거리지수를 이용하여 상사도 행렬을 도출하여 neighbour joining tree (NJ)를 작성하였다[19], 그리고 종내, 종간의 유전적 유사도계수 (similarity coefficient)는 Sneath와 Sokal [21]의 방법에 따라 구하였으며, 이러한 분석방법은 1,000회 반복 실시하여 이를 통한 계통수를 작성하였다.

결과 및 고찰

RAPD 분석을 이용한 유전적 유사도 분석

국내산 *Lepista* 속의 *L. nuck* 10균주(strain 1~10)와 *L. irina* 그리고 *L. sordida*의 유전적 변이를 알아보려 RAPD 방법을 이용하여 fungus의 종내 유연성과 유전적 다양성을 밝히기 위해 널리 사용되고 있는 10개의 oligonucleotide로 구성된 G + C의 함량 60-70%의 random primer [23] 40개에 대해 분석한 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 22개의 random primer에서 반응이 나타났다. 증폭된 RAPD fragment는 약 200~4,000 bp의 사이에서 355개가 관찰되었으며, 이중 재현성이 우수한 OPA-1과 OPA-18은 Fig. 1과 2와 같다. 관찰된 scabble RAPD marker를 근거로 Nei-Li's의 방법을 이용한 유전적 거리지수를 이용하여 비유사도 지수를 도출하였다(Table 3).

*L. nuck*의 종내 변이는 0~21.60%였으며, *L. irina*는 20.62~25.54%, 그리고 *L. sordida*는 16.93~24.82%의 변이를 나타내었다. 전체 분류군을 PAUP 프로그램을 이용하여 분석한 결과 전체 771단계의 길이를 갖는 전체 58개의 가장 짧은 계통수를 얻었다. Consistency index (autapomorphy 제외)는 0.453,

Table 3. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei-Li's genetic distance coefficient based on RAPD analysis

	<i>L. nuda</i> 01	<i>L. nuda</i> 02	<i>L. nuda</i> 03	<i>L. nuda</i> 04	<i>L. nuda</i> 05	<i>L. nuda</i> 06	<i>L. nuda</i> 07	<i>L. nuda</i> 08	<i>L. nuda</i> 09	<i>L. nuda</i> 10	<i>L. irina</i>
<i>L. nuda</i> 02	0.1126										
<i>L. nuda</i> 03	0.0878	0.0851									
<i>L. nuda</i> 04	0.0878	0.0851	0.0000								
<i>L. nuda</i> 05	0.0797	0.0834	0.0598	0.0598							
<i>L. nuda</i> 06	0.1037	0.1017	0.0751	0.0751	0.0736						
<i>L. nuda</i> 07	0.1596	0.1533	0.1322	0.1322	0.1268	0.1411					
<i>L. nuda</i> 08	0.1452	0.1492	0.1367	0.1367	0.1411	0.1290	0.1588				
<i>L. nuda</i> 09	0.1050	0.1367	0.0918	0.0918	0.1004	0.1190	0.1722	0.1218			
<i>L. nuda</i> 10	0.2034	0.1724	0.1894	0.1894	0.1954	0.1740	0.2160	0.2127	0.1933		
<i>L. irina</i>	0.2062	0.2118	0.2273	0.2273	0.2092	0.2075	0.2554	0.2399	0.2284	0.2316	
<i>L. sordida</i>	0.2184	0.2482	0.2105	0.2105	0.2217	0.2434	0.1693	0.2301	0.2103	0.2233	

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Table 1

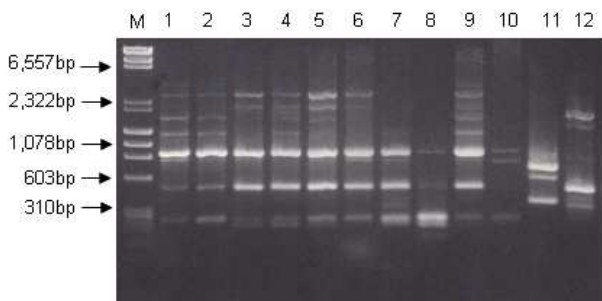


Fig. 1. Electrophoretic patterns of RAPD using primer OPA-1. Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III + ϕ ×174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-10 indicate *L. nuda*01 to 10, lane 11 indicate *L. sordida* and lane 12 indicate *L. irina*.

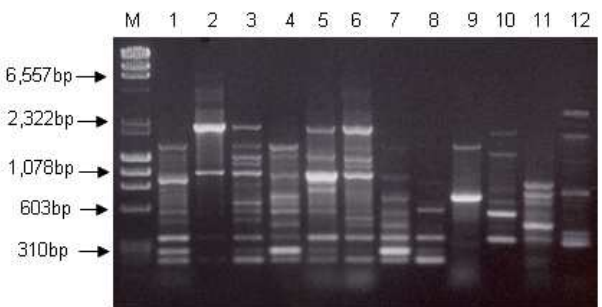


Fig. 2. Electrophoretic patterns of RAPD using primer OPA-18. Lane M is the size marker of λ DNA/*Hind*III + ϕ ×174RF DNA/*Hae*III fragments. Lane 1-10 indicate *L. nuda*01 to 10, lane 11 indicate *L. sordida* and lane 12 indicate *L. irina*.

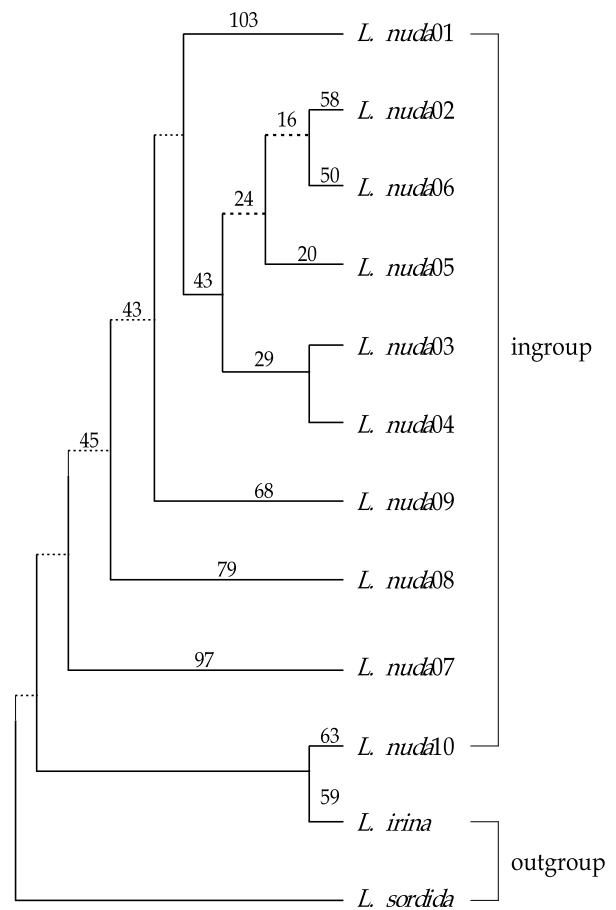


Fig. 3. Strict consensus tree of the 58 most parsimony trees about *Lepista* RAPD result. Tree length is 771 steps, consistency index (CI) is 0.453, retention index (RI) is 0.369 and homoplasy index (HI) is 0.547. The number of changes is indicated above branches.

homoplasy index는 0.547, 그리고 retention index는 0.369로 나타났으며, RAPD에 기초한 tree는 3개의 cluster를 형성하였다(Fig. 3). 첫 번째로 *L. sordida*가 가장 기부에 위치하고 있으며, 두 번째 cluster는 *L. irina*와 제주에서 채집된 *L. nuda*10으로 각각 59개의와 63개의 autapomorphic change와 84개의 synapomorphic change를 나타내었다. 세 번째 cluster는 국내의 9개의 지역에서 채집된 *L. nuda*로 서로 상이한 6개의 자매군을

형성하였으며, *L. nuda*03과 04는 0.031의 band change와 16개의 synapomorphic change를 나타내며, 100%의 jack-knife의 지도도를 나타내었다.

Table 4. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei-Li's genetic distance coefficient based on ITS region sequencing analysis

	<i>L. nuda</i> 08	<i>L. nuda</i> 09	<i>L. nuda</i> 10	<i>L. nuda</i> 11	<i>L. nuda</i> 12	<i>L. nuda</i> 13	<i>L. irina</i>
<i>L. nuda</i> 09	0.0956						
<i>L. nuda</i> 10	0.1147	0.0285					
<i>L. nuda</i> 11	0.1024	0.0237	0.0459				
<i>L. nuda</i> 12	0.1005	0.0269	0.0491	0.0190			
<i>L. nuda</i> 13	0.0991	0.0158	0.0364	0.0158	0.0174		
<i>L. irina</i>	0.1561	0.0711	0.0935	0.0854	0.0871	0.0743	
<i>L. sordida</i>	0.1288	0.0383	0.0606	0.0557	0.0574	0.0480	0.0480

The abbreviations of introductory remarks are the same as in Table 1

*L. nuda*의 지역별 특성은 서식지의 지리적 거리와 비교하여 유전적으로 많은 차이를 나타내었다. *L. nuda*10 (제주)는 *L. irina*와 하나의 cluster를 이루었으며, 동일종인 *L. nuda*와 유전적으로 많은 차이를 나타내는 것은 지리적으로 섬으로 분리되어 있기 때문인 것으로 생각된다. Kim과 Kim [7]은 *Lepista*속의 *L. nuda*와 *L. sordida*, 그리고 송이과 버섯 4종, *Collybia confluens* (밀버섯), *Collybia peronata* (가랑잎애기버섯), *Laccaria laccata* (졸각버섯), *Lyophyllum cinerascens* (만가닥버섯)에 대한 유전적 변이를 측정 한 결과, *L. nuda*는 동일속의 *L. sordida*보다 밀버섯과 가랑잎애기버섯의 유전적 유연관계가 더 가까우며, *L. sordida*는 졸각버섯과 유전적으로 가깝다고 하였으며, 본 결과에서도 *L. sordida*는 유전적 유연관계가 가장 멀었다.

*L. nuda*와 *L. irina*, *L. sordida*의 종간의 유전적 차이는 출현시기와 형태적 특성의 분류학적 차이와 일치하였다. 그러나 6개의 자매군으로 형성된 세 번째 cluster에서 경기도 용인에서 채집된 *L. nuda*06과 동일한 지역에서 채집된 *L. nuda*07은 균주를 분양받아 일정기간 계대배양된 균주로 0.055의 band changer가 나타났으며, *L. nuda*06과는 하나의 cluster를 형성하였으나 유전적으로는 차이가 있었다. 버섯의 경우 자연적으로 발생된 버섯은 형태학적 분류로 정확하게 동정되었다고 하여도 정확하게 균사가 순수분리가 되었는지에 대한 유무가 명확하지 않으며, 장기간 보관 및 계대배양 시 오염될 수 있으므로 인공재배를 통한 자실체 발생으로 정확한 종의 동정이 가능하다. 그러나 인공재배가 잘 안되는 버섯이나 인공재배가 가능하더라도 장기간의 시간이 소요되는 어려움이 있다[2]. 따라서 *L. nuda*06과 07의 유전적 차이는 동일한 지역에서 채집된 종이라고 하더라도 자연적 발생 균주와 계대배양에 의한 유전적인 변이가 나타난 것으로 판단된다.

Alam 등[16]은 느타리 속 버섯은 RAPD 기법으로 동일한 종 내의 유전적 다양성을 밝혀 계통이나 품종간의 차이점을 구분할 수 있다고 하였으며, 느티만가닥 버섯에서도 계통이나 품종 구분시 RAPD를 통해 밝혀진 각각의 종이나 계통 고유의 DNA 단편 염기서열정보를 primer로 이용하면 버섯의 계통이나 종을 구분할 수 있다고 보고한 바 있다[26]. 지금까지 보고된 바로는 ITS 부위는 종내보다 종간이 많은 것으로 보고되어 있었으나, *L. nuda*에서의 결과로 미루어 보아 RAPD의 경우

40개의 primer중 22개의 primer에서 12종 모두 재현성이 뛰어난 band들이 나타났으며, primer에 따라 band 양상에 차이가 있어 이들 primer를 같이 사용할 경우 *Lepista* 속에 대한 차별화된 band를 확인할 수 있으므로 동일한 종내에서의 RAPD 기법으로 품종 및 종을 식별하는데 분자 marker로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

ITS 영역을 이용한 유전적 유사도 분석

국내에서 채집된 *L. nuda* 3개 균주, 프랑스, 스위스, 포르투갈에서 채집된 *L. nuda* 3개 균주, 그리고 outgroup으로 *L. irina*, *L. sordida*에 대한 ITS영역에 대해 약 673개의 염기서열을 분석하였으며, 이를 근거로 Nei-Li의 유전적 거리지수를 이용하여 비유사도 지수를 도출하였다(Table 4). 유전적 비유사도 지수행렬에 의하면 *L. nuda*의 ITS 영역 염기서열의 종내 변이는 1.58%~11.47%로 나타났으며, *L. nuda*와 *L. sordida*와는 3.83%~12.88%, 그리고 *L. nuda*와 *L. irina*는 7.11%~15.61%로 나타났으며, *L. sordida*와 *L. irina*와의 종간 변이는 4.79%로 나타났다. 정렬된 염기서열을 근간으로 전체 분류군을 PAUP (4.0b) program을 이용하여 분석한 결과, 161단계의 길이를 갖는 전체 21개의 가장 짧은 계통수를 얻었으며, consistency index (CI-autapomorphy 제외)는 0.758, homoplasy index (HI)는 0.242, 그리고 retention index (RI)는 0.692로 나타났다 (Fig. 4).

염기서열의 변이에 기초하여 neighbour-joining(NJ) 분석 결과, 4개의 cluster를 형성하였다. 첫 번째로 *L. sordida*는 0.025의 base change를 나타내며 가장 기부에 위치하였으며, *L. irina*는 0.011의 base change를 나타내며, 50개의 autapomorphic change와 14개의 synapomorphic change를 나타내었다. *L. nuda*08과 09는 0.001의 base change를 나타내며 1개의 synapomorphic change를 나타내었으며, 제주에서 채집된 *L. nuda*10은 58개의 autapomorphic change를 나타내며, *L. nuda*08, *L. nuda*09는 11개의 synapomorphic change가 나타났다. 두 번째 cluster는 *L. nuda*11, 12, 그리고 13(France, Swiss, Portugal)이 3개의 synapomorphic change를 나타내며, 국내에서 채집된 *L. nuda*와 유럽 3지역의 *L. nuda*와는 16개의 synapomorphic change를 나타내었다.

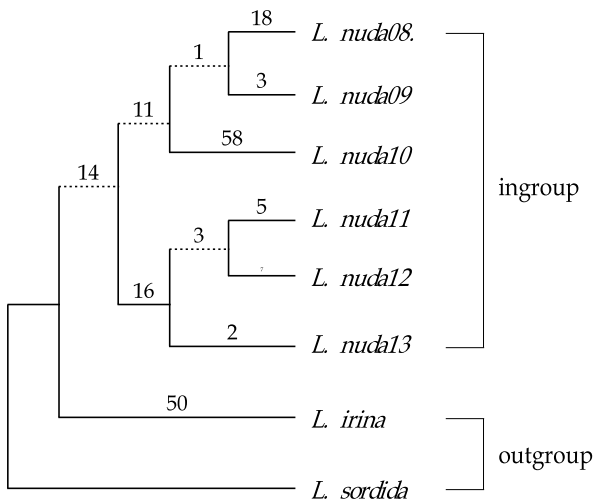


Fig. 4. Strict consensus tree of the 21 most parsimony trees about *Lepista* ITS I and II region sequence result. Tree length is 161 steps, consistency index (CI) is 0.758, retention index (RI) is 0.692 and homoplasy index (HI) is 0.242. The number of changes is indicated above branches and jack-knife values are found below branches.

우리나라에서 채집하여 실험에 사용한 *L. nuda*는 유럽종보다 유연관계가 매우 가까웠으며, ITS 영역을 기반으로 작성된 dendrogram을 분석한 결과에서도 하나의 cluster를 구성하였으며, *L. sordida*와 *L. irina*와도 명확하게 구분되었다. Park 등[16]은 상황버섯의 경우 rDNA의 ITS 영역에 대해 종이나 품종간 특이한 염기서열의 존재가 확인되면 이를 primer 제작하여 종이나 품종 동정에 활용이 가능하다고 보고하였으며, 노루궁뎅이 버섯에서도 rDNA의 PCR을 통해 종과 계통간 분자생물학적 구분이 가능하다고 보고한 바 있다[17]. 이에 본 연구결과 ITS 염기서열은 *L. nuda*의 지역간에 유의적인 차이가 있었으며, *Lepista*속 내에서도 구별할 수 있는 분자 지표나 종내, 종간의 유연관계 분석을 위한 자료로 모두 적합하다고 생각된다.

References

- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009. Physiogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* **37**, 183-188.
- Cheong, J. C., Lee, M. C., Kim, B. G., Park, D. S., Hong, S. B. and Park, J. S. 2004. Interspecific distinguish ability of veiled lady mushrooms (*Dictyophora* spp.) based on rDNA-ITS analysis. *Kor. J. Mycol.* **32**, 1-7.
- Dulge, B., Ergul, C. C. and Gucin, F. 2002. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia* **3**, 695-697.
- Kim, J. B., and Hwang, S. G. 2001. A study on the mycelia culture and genetic characteristics in *Lepista nuda*. *Korean J. Life Sci.* **1**, 496-501.
- Kim, J. H. 2005. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* **33**, 69-74.
- Kim, J. H., Yoo, K. H., Kim, Y. S., Seok, S. J. and Kim, Y. S. 1998. The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak. *Kor. J. Mycology* **26**, 589-593.
- Kim, S. H., and Kim, J. B. 2004. Genetic variation of Korean *Lepista nuda*. *J. Life Sci.* **14**, 115-120.
- Lee, S. B., Milgroom, M. G. and Taylor, J. W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* **35**, 23-24.
- Lee, S. S., Choi, K. J. and Oh, C. H. 1996. Sawdust cultures of *Lepista nuda*. *Kor. J. Mycol.* **24**, 274-279.
- Lee, Y. S., Park, D. C., Joo, E. Y., Shin, S. R. and Kim, N. W. 2005. Study on the antioxidant activity of the extracts from the *Lepista nuda*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 942-917.
- Lee, Y. S., Han, J. Y., Joo, E. Y., Shin, S. R. and Kim, N. W. 2005. Study on the antitumor effects of extracts from *Lepista nuda* Mushroom. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **34**, 317-322.
- 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. Mycol.* **38**, 34-39.
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S. and Hedgaroude, G. A. 2007. Immunomodulating and anticancer agent in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. Immunopharmacol.* **7**, 701-724.
- Nei, M. 1973. Genetic distance between populations. *America Nature* **106**, 283-292.
- Norkrans, B. 1950. Studies in growth and cellulolytic enzymes of *Tricholoma*. *Bot. Ups.* **11**, 1-126.
- Park, D. S., Kang, H. W., Kim, K. T., Cho, S. M., Park, Y. J., Shin, H. S., Lee, M. B. and Go, S. J. 2001. PCR-based sensitive detection of wood decaying fungus *Phellinus linteus* by specific primer from rDNA ITS regions. *Micobiology* **29**, 7-10.
- Park, H. G., Ko, H. G., Kim, H. S. and Park, M. W. 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. 1998. Studies on inorganic components of Korean wild edible mushrooms trace mineral elements of *Armillariella mella*, *Hygrophorous russula*, *Armillariella tabescens*, *Lepista nuda*, *Lepista sordida*, *Hygrocybe conica*. *Kor. J. Mycol.* **21**, 273-278.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Smith, L. M. Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughers, P., Dodd, C., Conner, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H. and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.

21. Sneath, R. R. and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco. pp. 573.
22. Stott, K., Desmerger, C. and Holford, P. 2005. Relationship among *Lepista* species determined by CAPS and RAPD. *Mycol. Res.* **109**, 205-211.
23. Stott, K. and Broderick, A. 1996. Response of Australian strains of the mushroom *L. nuda* to temperature and substrate. *J. Janic, Progress in New Crops*. In ASHS press Arlington. VA. pp. 476-479.
24. Wasser, S. P. 2002. Medical mushrooms as a source of anti-tumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258-274.
25. Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH.* **10**, 186-190.
26. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols-A guide to methods and application. Eds., Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. Academic Press Inc., San diego, California. pp. 315-322.
27. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.

초록 : RAPD와 ITS 영역에 의한 민자주방망이버섯의 유전적 변이

이양숙¹ · 김남우¹ · 김종봉^{2*}

(¹대구한의대학교 한약자원학과, ²대구가톨릭대학교 의생명과학과)

본 연구는 유럽에서 식용버섯으로 선호도가 높은 *Lepista nuda* (민자주방망이버섯)에 대하여 random amplified polymorphic DNA (RAPD)와 internal transcribed spacer (ITS) 염기서열을 이용하여 종내 및 종간의 유전적 변이를 분석하였다. RAPD 분석 결과 40개의 random primer 중 다형성을 나타내는 primer는 22개 였으며, 증폭된 밴드는 355개, DNA 단편의 크기는 200~4,000 bp의 사이에 위치하였다. RAPD band들을 marker로 하여 Nei-Li's의 방법을 이용한 비유사도 지수행렬을 조사한 결과 *L. nuda* 종내 유전적 변이는 0~21.60%로 나타났으며, *L. nuda*와 *L. sordida*의 종간에는 16.93~24.82%, *L. irina*와는 20.62~25.54%로 나타났으며, *L. sordida*와 *L. irina*와의 종간 변이는 23.49%로 나타났다. ITS I 과 II 영역의 673 bp의 염기서열을 분석하여 비유사도 지수행렬을 조사한 결과, *L. nuda*의 종내 변이는 1.58~11.47%였으며, *L. nuda*와 *L. sordida*와는 3.83~12.88%로 나타났다. 그리고 *L. nuda*와 *L. irina*는 7.11~15.61%였으며, *L. sordida*와 *L. irina*와의 종간 변이는 4.79%로 나타났다. 본 실험결과 RAPD와 ITS실험을 통해 확인된 primer와 염기서열은 *Lepista*속의 종을 검색 및 분류 시 유전적 표지 marker로서 이용할 수 있을 것으로 생각된다.