

## Secondary Structure of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of *Hypsizygus marmoreus*

Ju-Ri Woo<sup>1</sup>, Hyeokjun Yoon<sup>1</sup>, Young-Hyun You<sup>1</sup>, Chang-Yun Lee<sup>2</sup>, Won-Sik Kong<sup>3</sup> and Jong-Guk Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Greenpeace Mushroom Co., Cheongdo, Gyeongbuk 714-852, Korea

<sup>3</sup>Mushroom Research Division, NIIHS, RDA, Eumseong 714-853, Korea

Received July 12, 2013 / Revised October 4, 2013 / Accepted October 7, 2013

The ribosomal DNA (rDNA) clusters of *Hypsizygus marmoreus* 3-10 and *H. marmoreus* 1-1 were analyzed in this study. The small subunit (SSU) and intergenic spacer 2 (IGS 2) was partially sequenced. The internal transcribed spacer 1 (ITS 1), 5.8S, internal transcribed spacer 2 (ITS 2), large subunit (LSU), intergenic spacer 1 (IGS 1), and 5S were completely sequenced. The rDNA clusters of *H. marmoreus* 3-10 and *H. marmoreus* 1-1 were 7,049 bp in length. The sequence of SSU rDNA, which corresponded to 18S rDNA, was 1,796 bp in length, and the sequence of LSU rDNA, which corresponded to 28S rDNA, was 3,348 bp in length. The ITS region that variable region and IGS region that non-transcribed spacer was 462 bp and 1,290 bp in length. The sequence of 5.8S rDNA and 5S rDNA was 153 bp and 43 bp in length, respectively. The 17 bp of the rDNA cluster in the *H. marmoreus* 3-10 strain was different to that in the *H. marmoreus* 1-1 strain, with 2 bp in the SSU, 3 bp in the ITS, 9 bp in the LSU, and 3 bp in the IGS. The analysis of the secondary structure revealed that the ITS regions of *H. marmoreus* 3-10 and *H. marmoreus* 1-1 have five stem-loop structures. Interestingly, among these structures, one different nucleotide sequence resulted in a different secondary structure in stem-loop V.

**Key words** : *Hypsizygus marmoreus*, rDNA cluster, ITS region, secondary structure

### 서 론

버섯(Mushroom)은 약 15,000종 정도가 전세계적으로 분포하고 있으며, 식용 가능한 버섯은 약 2,000종으로 알려져 있다. 자연계에서 분해자 역할을 하는 버섯은 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어왔으며[2, 13, 17, 21], 버섯에 대한 연구가 활발히 이루어진 결과, 항암활성, 면역활성, 항진균 활성, 항종양 효과 등을 가지는 여러 종류의 생리활성 물질들이 밝혀졌다[3, 10, 14, 22].

느티만가닥[*Hypsizygus marmoreus* (Peck.) Bigelow]버섯은 너도밤나무, 단풍나무, 고목 줄기나 그루터기에 군생하는 버섯이다. 최근에, 영양학적인 가치뿐 아니라 독특한 맛과 질감, 긴 저장성 덕분에 수출용 버섯으로 각광받기 시작하였으며, 경제적 가치가 뛰어난 버섯이라 할 수 있겠다. 다발성이 강한 것이 특징인 이 버섯의 갓은 둥근 반구 형태를 보이다가 퇴화가 일어나면서 평평하게 벌어지며, 가운데가 대리석 모양의

독특한 담회색 색깔을 나타낸다. 주름은 백색이며 조밀한 조직이 특징이다. 분류학적으로 담자균류(Basidiomycetes), 주름버섯목(Agaricales), 송이과(Tricholomataceae)에 속하며 일본에서는 bunashimeji 또는 honshimeji로 불리며, 서양에서는 winter mushroom으로 알려져 있다[4, 15]. 한국을 비롯한 동아시아 지역과 유럽에 주로 분포하고 있으며, 전세계적으로 1972년 이후 꾸준히 생산량이 증가해왔다[13].

일반적으로 식용버섯의 대부분은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등을 분해하여 영양분을 얻는 목재 후부균으로 자연으로부터 얻은 영양분을 통하여 자실체로 성장함으로 특용임산물로 생각되어 왔으나, 현재는 인공재배법이 개발되어 대량생산이 가능하게 되었다. 느티만가닥버섯은 팽이버섯과 같이 일본에서 처음으로 인공재배가 성공하였으며, 국내에 생산 기술이 보급되었다. 현재, 병 재배 시스템을 이용한 대량생산이 이루어지고 있으며, 그 덕분에 생산량이 증가하고 있는 추세이다.

지금까지, rDNA cluster는 다양한 분자적 수준의 접근 방법을 통한 생물 종의 계통학적 유연관계 분석에 성공적으로 사용되어왔다[21, 23]. ITS 1과 ITS 2 영역은 변이가 적게 일어나는 18S rDNA에 비해, 변이가 많이 일어나므로 종속 구별에 유용하다[2, 11, 12, 19, 20, 24]. 특히 이 영역은 500~600 bp 정도로 사이즈가 작아 손쉽게 분석이 가능하며 단순성, 일반성, 재현성 등의 이점으로 중간 유전변이 탐색 등을 위해 널리

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : Kimjg@knu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이용되었다[4]. 따라서 ITS 영역은 분자생물학적 수준에서 생물 종 간, 종 내에서의 차이를 확인하고자 사용되는 tool임이 틀림없다[23].

현재, 세계는 국제 분쟁으로 인한 여러 사례가 급격히 증가하고 있다. 환경, 무역, 통상 등 여러 가지 분쟁이 발생되고 있으며, 미래 식량자원으로 각광 받는 버섯도 예외일수는 없게 되었다. 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본에서도 느티만가닥 버섯이 생산 및 수출입 되고 있는 상황에서 국가 간 분쟁에 대비하여야 하는 시점이 되었다. 국내에서 생산된 느티만가닥 버섯은 대부분 일본 품종을 사용하고 있지만, 몇몇 업체에서 국내 개발 품종을 사용하고 있다. 수출 시장에서 일본 품종이 우세한 위치에 있기 때문에 국내 개발 균주에 대한 보호가 중요한 상황이 되었으나, 이에 따른 연구가 미비한 실정이다. 또한 다양한 느티만가닥버섯 균주를 구별하기 위한 쉽고 간단하며 효과적인 방법의 개발이 중요하다[10].

우리나라는 중위도 온대성 기후대에 위치해 있으며 여름에는 고온 다습하며 겨울에는 춥고 건조한 날씨를 나타내는 반면, 일본은 섬나라이기 때문에 지리적으로 남북의 차이뿐 아니라 바깥 일본과 안 일본 간의 기후 차이가 심하며 여름 겨울의 연간 기후도 현저한 차이를 보인다고 알려져 있다. 이런 환경적 차이에도 불구하고, 느티만가닥버섯은 형태학적 측면에서 육안으로 구별하기가 쉽지 않음으로, 분자생물학적 수준에서 차이를 확인하고자 하였다. 현재까지 느티만가닥버섯의 지리학적 차이에 기초한 균주 간의 차이를 확인하고자 한 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주가 비록, 종속은 같을지라도 지리학적으로 큰 차이가 있음으로 rDNA의 ITS region에 기초한 유전 정보 차이를 확인하여, 국가간 분쟁에 대비할 기초 자료를 마련하고자 하였다.

본 연구에서는 국내 덕유산에서 채집된 *H. marmoreus 3-10* 균주와 일본 후쿠오카에서 채집된 *H. marmoreus 1-1* 균주 간의 차이를 확인 위하여, Ribosomal DNA (rDNA) cluster 서열을 분석하여, 이들 간의 분자적 수준에서의 차이를 밝히고자 하였으며, rDNA 영역의 서열을 확보한 후 2차구조 분석을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 느티만가닥 균주 배양

본 연구에서 사용된 느티만가닥버섯 *H. marmoreus 3-10*의 기원은 전북 덕유산이며, *H. marmoreus 1-1*은 일본 후쿠오카에서 채집되었다. 두 균주는 그린 합명회사에서 보존하고 있는 균사체를 분양 받아 실험에 사용하였으며, Potato dextrose agar (PDA; potato peptone 4.0 g, glucose 20.0 g and agar powder 15.0 g, 1 l distilled water, Scharlau Chemie S.A, Spain) 배지로 24°C, 13일간 배양하고, Potato dextrose broth

(PDB; Potato peptone 4.0 g, Glucose 20.0 g were dissolved 1 l of distilled water pH 5.6 and sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min) 액체배지에서 15일간 24°C, 80 rpm으로 배양하였다. DNA manipulation에 사용된 *Escherichia coli* strain은 DH5  $\alpha$  (Donginbiotech Co.)로 pGEM-T plasmid vector는 cloning과 sequencing에 사용되었다.

### 느티만가닥버섯의 DNA extraction과 PCR amplification

Möller등의 방법[16]을 이용하여, *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주의 Genomic DNA를 추출하였다. 약 4.0 g의 자실체를 막자 사발을 이용하여 액체질소 첨가 후, 10분동안 물리적으로 파쇄하였다. 15 ml의 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS) 처리 후 55°C에서 2시간 반응시킨다. 5 M NaCl은 10% CTAB buffer에 처리하여 총 부피의 1/10이 되게 한다. 그 후 65°C에 1~2시간 처리하였다. PCR을 이용하여 rDNA cluster를 증폭하였으며, ITS region을 증폭하기 위하여 White *et al* [24]에 보고된 방법을 이용하여 100 pmole의 ITS 1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였다. SSU rRNA gene, 5.8S rRNA gene, LSU rRNA gene, IGS 1 region, 5S rRNA gene, IGS 2 region을 증폭하기 위하여 사용한 primer는 23개로 Table 2에 명시되어 있다. 50  $\mu$ l의 부피로 10x Ex Taq buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT), 2.5 mM dNTP mixture, 100 pmol primer, sterilized distilled water, Ex Taq polymerase (TaKaRa Co.)를 첨가하여 PCR로 증폭하였다. SSU rRNA gene, LSU rRNA gene과 IGS region은 사이즈가 크기 때문에 직접 디자인한 primer를 이용하여 증폭하였다(Table 2). PCR 반응 조건은 95°C, 2분간 pre-denaturation한 후, 95°C에 1분간 denaturation, annealing 온도는 각 primer의 조건에 맞게 설정한 후, 72°C에서 3분 extension한 후, 25 cycle 증폭하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 extension시켰다.

### 느티만가닥버섯의 rDNA-ITS 영역의 염기서열 분석

PCR로 증폭한 산물을 확인하기 위하여 0.5x TAE에 0.7% agarose를 첨가한 겔 상에  $\lambda$  DNA-HindIII Digest와 함께 전기영동 하였다. Ethidium Bromide (EtBr)로 염색하여 UV light 상에서 증폭한 DNA band를 확인하였다. 정확하게 증폭된 증폭산물을 gel에서 회수하여 Gene cloning kit (Qiagen Co.)를 이용하여 정제하였으며, 그 뒤 얻은 이들 유전자 단편을 pGEM T-easy vector system (Promega Co.)에 삽입하였다. DH5  $\alpha$  (HIT Competent cell ; Donginbiotech Co.)에 형질전환 시켰으며, ampicillin을 첨가한 LB 고체 배지에 도말하여 37°C, 14~16시간 배양하여 white colony를 선발하였다. 형질 전환된 colony를 한 strain당 8개를 무작위적으로 선발하여 3 ml의 LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.2) 액체배지

에 37°C에서 16시간 진탕 배양 한 후, plasmid mini-prep kit (Solgent Co.)를 이용하여 재조합 plasmid DNA를 분리 정제 하였다. 팽이버섯의 rDNA cluster 증폭산물의 염기서열을 분석하기 위하여 분리한 plasmid DNA를 T7과 SP6 primer를 이용하여 염기서열 분석하고, 각 시료의 rDNA region 염기서열을 확정하였다.

느티만가닥버섯의 2차 구조 분석

Jukes와 Cantor [7]의 방법을 이용하여, DNASTAR software (Lasergene Co.)의 MegAlign program을 이용하여 *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주의 rDNA-ITS region 염기서열을 CLUSTAL X algorithm으로 정렬하였다[1]. 각 시료 rDNA-ITS 염기서열인 ITS 1, 5.8S, ITS 2 영역은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)에 등록된 염기서열과 비교한 후, 결정하였다. 두 균주의 ITS region의 2차구조

분석은 mFold (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>)에 의해 산출되었다. 본 연구에서는 ITS region에 포함되는 ITS 1과 ITS 2, 5.8S가 2차 구조 분석에 사용되었다.

결과 및 고찰

rDNA cluster의 염기서열 분석

*H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주의 rDNA-cluster의 염기서열을 얻기 위하여 universal primer인 ITS 1과 ITS 4를 포함한 23개의 primer를 디자인하였다(Table 1). 두 균주의 rDNA-cluster의 염기서열을 확보하고자 PCR 산물을 증폭하여 분석한 결과는 Table 2에 나타내었으며, 이들 *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주의 rDNA-cluster는 Small subunit gene (SSU), ITS 1, 5.8S rDNA gene, ITS 2, Large subunit gene (LSU), Intergenic spacer 1 (IGS 1), 5S

Table 1. A list of major primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3'), (5'←3')	GC (%)	Tm	Length (bp)
SR1R(1)	(5'→3') TACCTGGTTGATTCTGCCAGT	47.6	51.2	21
NS4(1)	(5'←3') CTCCGTC AATTCCTTTAAG	40.0	46.2	20
NS3(2)	(5'→3') GCAAGTCTGGTGCCAGCAGC	65.0	58.1	20
NS8(2)	(5'←3') TCCGCAGGTTACCTACGGA	60.0	57.7	20
ITS1(4)	(5'→3') TCCGTAGGTGAACCTGCGG	63.2	55.7	19
ITS4(4)	(5'←3') TCCTCCGCTTATTGATATGC	45.0	49.6	20
5.8SR(5)	(5'→3') TCGATGAAGAACGCAGCG	55.6	53.0	18
LR16(5)	(5'←3') TTCCACCCAAACACTCG	52.9	46.4	17
LR0R(6)	(5'→3') ACCCGCTGAACCTAAGC	52.9	44.7	17
LR6(6)	(5'←3') CGCCAGTCTGCTTACC	58.8	45.9	17
LR3R(7)	(5'→3') GTCTTGAAACACGGACC	52.9	41.7	17
LR10(7)	(5'←3') AGTCAAGCTCAACAGGG	52.9	41.7	17
LR8R(8)	(5'→3') AGCAGGTCTCCAAGGTG	58.8	44.4	17
5SRNA(8)	(5'←3') ATCAGACGGGATGCGGT	58.8	50.4	17
LR12R(9)	(5'→3')GAACGCCTTAAGTCAGAAATCC	50.0	51.5	22
invSR1R(9)	(5'←3') ACTGGCAGAATCAACCAGGTA	47.6	51.2	21
F.v up2(3)	(5'→3')GCAACGGCAGCTTGTTACTGAGAA	50.0	59.5	24
F.v dn4(3)	(5'←3')CCCAGACGTGCACGTACGAAGAC	58.3	61.5	24
F.v up7	(5'→3')CGTGGAGGTTTGTGAAGAAGCCTT	50.0	59.6	24
F.v up8	(5'→3')CATTGTCAGGTGGGGAGTTGGCT	54.2	62.0	24
F.vup9	(5'→3')CATAAGATTCGCTTGTTCGCAACA	41.7	58.1	24
F.v up8-2	(5'→3')TCCTTCTCCGTGCTTATACTTAG	41.7	48.8	24
F.v up9-2	(5'→3')GGTAAGTAGGCATAAAAAGGCTGTT	41.7	52.4	24

Table 2. Different nucleotide sequences of *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1*

Sample strain <sup>a</sup>	Different nucleotide sequence (bp) <sup>b</sup>				
<i>Hm 3-10</i> and	18S rDNA	ITS region	5.8S rDNA	28S rDNA	IGS 1 region
<i>Hm 1-1</i>	2 / 1,796	3 / 615	0 / 153	9 / 3,348	3 / 390

<sup>a</sup>Comparison of the different nucleotide sequences determining from *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1* was indicated. <sup>b</sup>Of the total sequences of each region in rDNA cluster, we determined the number of different sequences. The results were yielded using the Meg align program of Lasergene (CLUSTAL W)

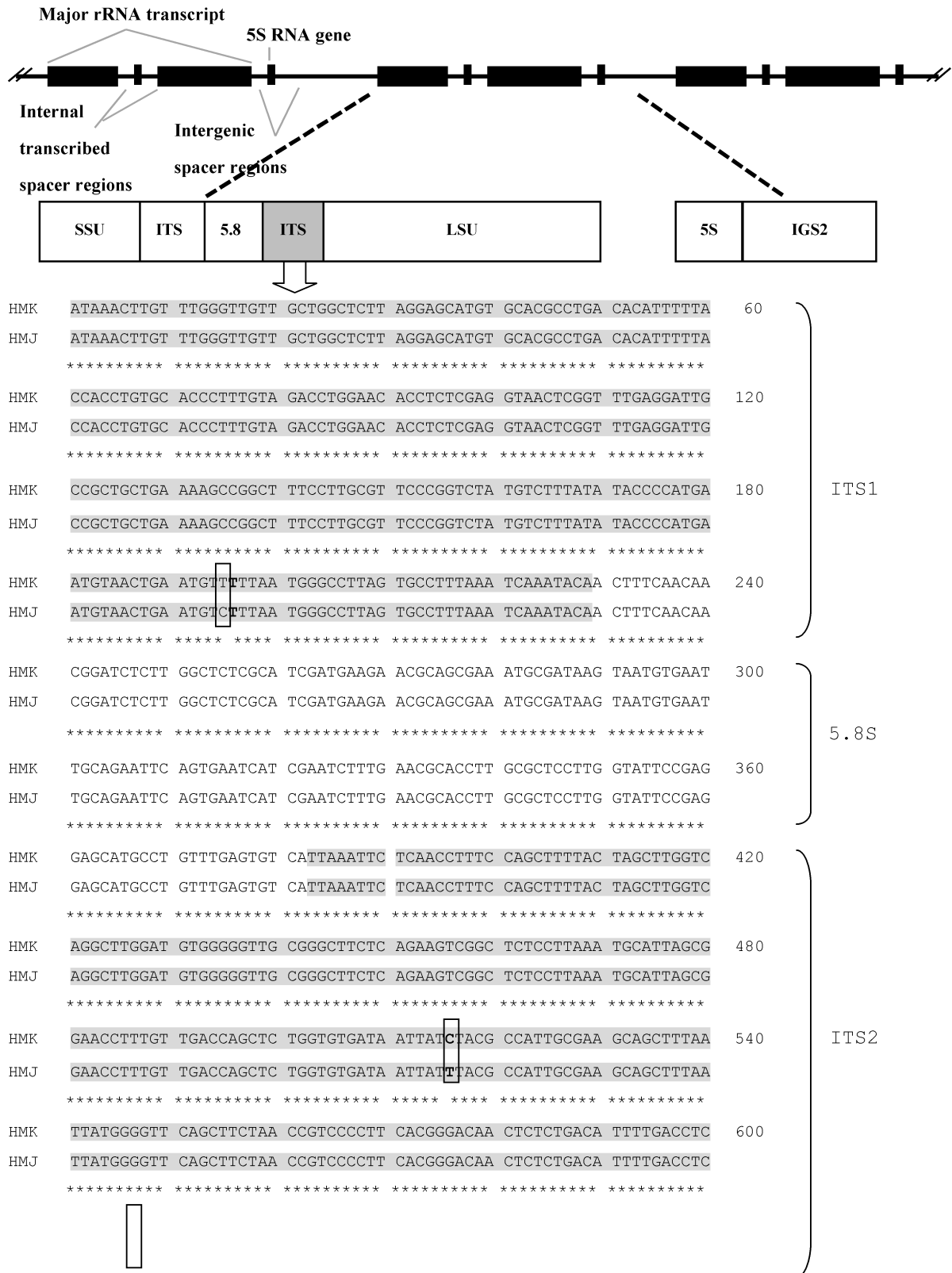


Fig. 1. Aligned nucleotide sequence of Internal transcribed spacer 1, 5.8S, Internal transcribed spacer 2 region of *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1*. Different nucleotide sequences between *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1* are indicated by the box. The conserved nucleotides in the internal transcribed spacer region of the two sequences are framed in an asterisks (\*). HMK: *H. marmoreus 3-10*, HMJ: *H. marmoreus 1-1*.

rDNA, 및 Intergenic spacer 2 (IGS 2)로 구성되어 있다.

SSU에 속하는 18S rDNA는 1,796 bp였고, LSU에 해당하는 28S rDNA는 3,348 bp임을 확인하였다. 변이가 발생하는 ITS 1과 ITS 2는 각각 229 bp, 233 bp였고, 보존적인 5.8S 영역은 153 bp임을 확인하였으며, ITS 영역의 nucleotide 서열은 Fig. 1에서 정렬하였다. 따라서 본 연구에서 2차구조 분석에 이용된 ITS 영역은 총 462 bp로 염기배열이 결정 되었으며, IGS 1은 390 bp, IGS 2는 900 bp임을 확인하였다. rDNA-cluster는 *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주가 동일하게 7,049 bp로 결정되었다.

rDNA cluster의 염기서열 결과는, NCBI (National center for Biotechnology Information)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)에 서열을 기탁하여 국내 개발 균주인 *H. marmoreus 3-10* (Accession No. KF150213)과 일본 유래 균주인 *H. marmoreus 1-1* (Accession No. KF192813)의 Accession No.를 받았다. 총 7,049 bp 중, 서열상에서 길이의 차이는 없었으나, 염기서열의 차이가 확인되었다. SSU에서 2개, ITS에서 3개, LSU에서 9개, IGS에서 3개 염기가 상이하다는 결과를 확인하였다(Table 2). 가장 큰 변이율을 나타내는 영역은 1.46%를 나타낸 ITS 영역임을 확인하였다. SSU는 0.11%, LSU는 0.26%, IGS 영역은 0.32%의 변이율을 확인하였다. 따라서 총 7,049 bp 중에서 17개 염기서열이 다른 것을 알 수 있었으며, 느티만가다버섯에서 가장 보존적인 영역은 SSU영역과 5.8S rDNA 영역임을 확인되었다.

최근에는 fungi에서 ITS 영역을 이용한 연구가 많이 이루어졌다. *Lentinus edodes*의 경우, 균주 간에는 ITS 영역의 염기서열 차이가 없었으나 *L. edodes*와 *L. boryana* 등의 종간에는 큰

차이를 보였다고 하였으며, 느타리버섯에서는 rDNA-ITS의 염기서열이 종(species) 구분에 적당하다는 연구 결과가 있었다. 또한, Dictyophora 균에서 배양적 특성, 재배적 특성과 형태적 특성을 종합하여 보았을 때 거의 일치하는 경향을 보임으로써, rDNA ITS 영역을 통한 분자생물학적 분석을 이용하는 방법이 종 구분에 유용할 것이라는 보고가 있었다[5]. 또한 ITS 영역을 이용한 다른 연구로 상황버섯에서 rDNA의 ITS 영역에 대해 종이나 품종간 특이한 염기서열의 존재가 확인되면 이를 primer 제작하여 종 수준의 동정에 활용이 가능하다고 한 연구 결과가 있다[9, 16].

이처럼 DNA barcode를 이용한 SNP (single nucleotide polymorphism)분석법은 쉽고 간편하며 PCR을 통한 증폭 산물의 사이즈가 적을 뿐 아니라, 재현성과 염기서열분석의 신뢰도가 높은 장점이 있다. 또한 0.1%의 SNP차이는 질병의 유무나 표현형의 다양성을 이끈다. 본 연구와 같이 유연관계가 같거나 비슷한 개체의 판별에는 DNA barcode를 이용한 SNP 분석법이 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

앞서 설명한 바와 같이 두 균주의 염기서열에 기초한 alignment 결과에서 3개 상이한 염기서열이 2차 구조 형성에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보하고자 2차 구조 분석을 수행하였다. Fig. 2에서는 *H. marmoreus 3-10* 균주와 *H. marmoreus 1-1* 균주의 ITS region의 염기서열을 이용하여 mFold 프로그램을 통한 2차 구조 분석을 수행한 것이다. 이들 균주의 ITS region은 5개 stem-loop 구조를 갖고 있음을 확인하였다. ITS 1 영역에서 나타난 한 개 염기서열 차이는 stem-loop V에서 볼 수 있듯이 2차 구조 형성에는 어떠한 영향도 주지 않음을 확인 할 수 있었다. Fig. 2B를 보면 화살표로 나타낸 부분이 상이한

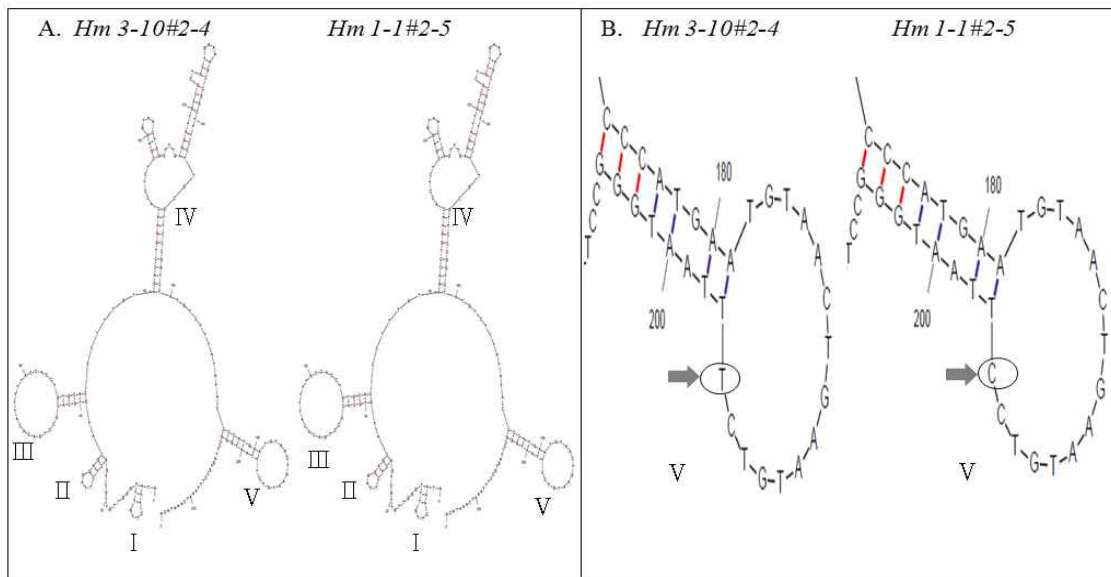


Fig. 2. Secondary structures of internal transcribed spacer 1 from *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1*. Five stem-loop structures were found in internal transcribed spacer 1 region. Despite different nucleotide of *H. marmoreus 3-10* and *H. marmoreus 1-1*, stem-loop V has same secondary structure. Locations of different nucleotides are indicated by arrows.

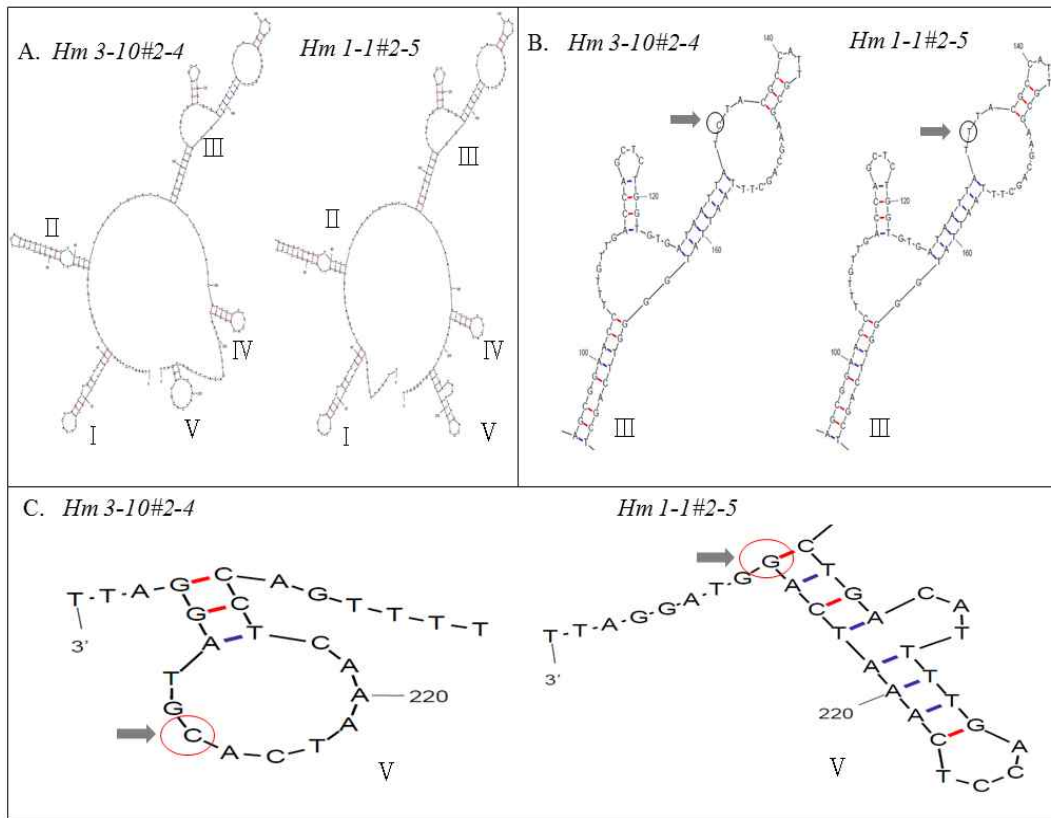


Fig. 3. Secondary structures of internal transcribed spacer 2 from *H. marmoreus* 3-10 and *H. marmoreus* 1-1. A. Five stem-loop structures were found in internal transcribed spacer 2 regions. B. Despite different nucleotide of *H. marmoreus* 3-10 and *H. marmoreus* 1-1, stem-loop III has same secondary structure. Locations of different nucleotides are indicated by arrows. C. Due to one nucleotide differences, stem-loop V showed different secondary structure.

염기임을 알 수 있다. Fig. 3A는 ITS 2 region의 전체 2차 구조를 나타내며, stem-loop III에서 한 개의 상이한 염기가 2차 구조에 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다. 하지만 stem-loop V을 보면 흥미롭게도 한 개의 염기 차이로 인하여 2차 구조 folding 패턴이 두 균주에서 명확하게 구분되었다.

본 연구는 국내 균주 *H. marmoreus* 3-10 균주와 일본 균주 *H. marmoreus* 1-1 간의 rDNA cluster에 기반한 염기서열 분석을 최초로 수행하였으며, 두 느티만가닥버섯 균주의 multiple alignment를 통하여 염기서열 차이를 확인하였다. 이에 ITS 염기서열은 지리학적 차이로 인하여 유의한 차이가 있음을 확인하였고, 국내 개발 균주와 일본 균주의 비교분석에 이용될 자료로 적합하다고 생각된다. 또한 느티만가닥 버섯의 균주들을 구별하기 위한 마커를 개발하기 위하여 분자유전학적 방법인 RAPD (Random amplified polymorphism), AFLP (Amplified fragment length polymorphic DNA) 등의 보완연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발사업

과 버섯수출사업단에서 연구비를 지원받았기에 이에 감사드립니다.

### References

1. Akavia, E., Beharav, A., Wasser, S. P. and Nevo, E. 2009. Disposal of agro-industrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Waste Manag* **29**, 1622-1627.
2. Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B. and Lee, T. S. 2009. Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebredonsis* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* **37**, 183-188.
3. Bao, H., Choi, W. S. and You, S. 2010. Effect of sulfated modification on the molecular characteristics and biological activities of polysaccharides from *Hypsizygus marmoreus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1408-1414.
4. Chen, S. L., Yao, H., Han, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, X. Li, X., Jia, X., Lin, Y. and Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* **5**, e8613.
5. Cheong, J. C., Kim, G. P., Kim, H. K., Park, J. S. and Chung,

- B. K. 2000. Cultural characteristics of veiled lady mushroom, *Dictyophora* spp. *Mycobiology* **28**, 165-170.
6. Ikekawa, T. 1995. Bunashimeji, *Hypsizygus marmoreus* anti-tumor activity of extracts and polysaccharides. *Food Rev Int* **11**, 207-209.
7. Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (ed.), pp. 21, Mammalian protein metabolism, II. *New York Academic Press*.
8. Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.
9. Lee, Y. S., Kim, N. W. and Kim, J. B. 2012. Genetic variation based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Internal Transcribed Spacer (ITS) region sequences in *Lepista nuda*. *J Life Sci* **22**, 1470-1476.
10. Matsuzawa, T., Sano, M., Tomita, I., Saitoh, J. and Ikekawa, T. 1997. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus* I. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of mice plasma. *Yakugaku Zasshi* **117**, 623-628.
11. Mello, A., Ghignone, S., Vizzini, A., Sechi, C., Ruiu, P. and Bonfante, P. 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. *J Biotechnol* **121**, 318-329.
12. Miyashita, M., Sakane, T., Suzuki, K. and Nakagawa, Y. 2008. 16S rDNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences analysis of the genus *Myxococcus*. *FEMS Microbiol Lett* **282**, 241-245.
13. 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.
14. Mori, K., Kobayashi, C., Tomita, T., Inatomi, S. and Ikeda, M. 2008. Antiatherosclerotic effect of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*, *Grifola frondosa*, and *Hypsizygus marmoreus* in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutr Res* **28**, 335-342.
15. Nakamura, K. 2006. Bottle cultivation of culinary-medicinal Bunashimeji mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) bigel. (Agaricomycetideae) in Nagano Prefecture (Japan). *Int J Med Mushr* **8**, 179-186.
16. 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.
17. Ray, P. and Adholeya, A. 2008. Development of molecular markers of ectomycorrhizal fungi based on ITS region. *Curr Microbiol* **57**, 23-26.
18. Royse, D. J. 1995. Specialty mushrooms: cultivation on synthetic substrate in the USA and Japan. *Interdisciplin Sci Rev* **20**, 205-214.
19. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
20. Su, H., Wang, L., Liu, L., Chi, X. and Zhang, Y. 2008. Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *J Appl Genet* **49**, 233-235.
21. Uhart, M., Sirand-Pugnet, P. and Labarère, J. 2007. Evolution of mitochondrial SSU-rDNA variable domain sequences and rRNA secondary structures, and phylogeny of the *Agrocybe aegerita* multispecies complex. *Res Microbiol* **158**, 203-212.
22. Wasser, S. P. 2002. Medical mushrooms as a source of anti-tumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 258-274.
23. Won, H. and Renner, S. S. 2005. The internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in the gymnosperm *Gnetum*. *Mol Phylogenet Evol* **36**, 581-597.
24. White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA Genes for phylogenetic. In PCR protocols: A guide to methods and amplification. *J Academic Press San Diego California* 315-322.

초록 : 느티만가닥버섯의 ITS (internal transcribed spacer) 영역의 2차구조 분석

우주리<sup>1</sup> · 윤혁준<sup>1</sup> · 유영현<sup>1</sup> · 이창운<sup>2</sup> · 공원식<sup>3</sup> · 김종국<sup>1\*</sup>  
 (<sup>1</sup>경북대학교 생명과학부, <sup>2</sup>그린피스, <sup>3</sup>농촌진흥청)

본 연구에서는 *H. marmoreus* 3-10균주와 *H. marmoreus* 1-1균주의 ribosomal DNA (rDNA) cluster의 분석이 수행되었다. Small subunit (SSU)와 intergenic spacer 2 (IGS 2)는 부분적으로 염기서열이 결정되었고, internal transcribed spacer 1 (ITS 1), 5.8S, internal transcribed spacer 2 (ITS 2), large subunit (LSU), intergenic spacer 1 (IGS 1), 5S는 완전하게 염기서열이 결정 되었다. 팽이버섯 *H. marmoreus* 3-10균주와 *H. marmoreus* 1-1균주의 rDNA cluster는 총 7,049 bp로 결정되었다. SSU은 1,796 bp, ITS1은 229 bp, 5.8S은 153 bp, ITS2는 223 bp, LSU은 3,348 bp, IGS1은 390 bp, IGS2은 900 bp로 염기서열이 분석되었다. 결정된 rDNA cluster의 총 7,049 bp 중에서 17 bp가 다름이 확인되었고, 각각 SSU (2 bp), ITS (3 bp), LSU (9 bp), IGS (3 bp)에서 차이를 확인하였다. ITS regions의 2차 구조 결과 5개의 stem-loop가 있음이 드러났다. 흥미롭게도, 이들 stem-loop 사이에서 stem-loop V에서 한 개의 상이한 염기가 다른 2차 구조를 나타냄을 확인하였다.