

한국 산 송이에서 분리된 균사

이상선* · 성창근¹

한국교원대학교 생물교육학과, ¹충남대학교 농과대학 식품공학과

The Mycelia Isolated from the Basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea

Sang-Sun Lee* and Chang-Kun Sung¹

Graduate School (Biological Science and Education)

Korea National University of Education, Cheong-Won Kun 363-791

¹Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Chung-Nam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT: *Tricholoma matsutake* (TM=*T. caligatum* var. *nauseoum*) is, for an agricultural income earned by Forestry by-products, a very important mushroom in Korea. The mycelia isolated from the basidiocarps were compared with basidiocarps of TM by the random amplified polymorphisms of RAPD-DNA bands. The mycelia were confirmed to be originated from the basidiocarps of TM by cluster analyses of the DNA-bands made from RAPDs and Southern blotting with the band (0.75 kb) identified. The mycelia defined were observed to grow very slowly at the rate of 10 cm per month at 25°C and also to be semi-transparent and submerged in on PDA. The method developed in this work was considered to be very useful for confirming the mycelia originated from the ectomycorrhizal mushrooms and also to be applied for the fungal mycelia isolated from the commercial useful mushrooms.

KEYWORDS: Mycelium, isolates, Basidiocarps, RAPD, PCR, Southern blotting

동양에서는 송이 [*Tricholoma matsutake* Singer=*T. caligatum* (Viv) Richen var. *nauseoum* (Blytt.) Bon; Courtecuisse & Duhem, 1995]는 최고의 버섯으로, 우리나라에서는 추석 전후로 채집된다(Lee, 1991). 최근, 송이는 임산 부산물에서 높은 농가 소득원으로 각광을 받고, 단위시간당 생산량 혹은 농가소득이 가장 높은 것으로 알려지고 있다. 우리나라에서는 전지역에서 송이가 생산되고 있지만, 지역적으로 동해안의 태백산맥을 낀 산악지역으로 경북 청하 보경사 주변(영일군, 1986-87)에서 경북 울진지역(울진군, 1989-1993)으로, 강원 양양 지역(강원도, 1994-현재)으로 대량 송 생산지역으로 알려진 곳이다. 이러한 송이 생산지역을 볼 때, 대량 송이 생산은 북상하여 옮겨지고 있는 것이 관찰되었다(KFR, 1981ab; 1984; 1986). 그러나, 우리나라

의 송이생산과 그 중요성에 비추어 볼때에, 송이에 대한 기본적인 균에 관한 연구는 모두가 산발적이고 미진한 상태이다.

송이 균사는 소나무(*P. densiflora*) 뿌리에서 관찰되고 있으며, 식물과의 관계에서는 외생균근(ectomycorrhizae)으로 설명하고 있다(Ogawa와 Ohara, 1978; Ogawa 등, 1978; 1980; Ohara와 Ogawa, 1982). 송이 자실체로부터 많은 균사가 분리되어 연구되고 있지만, 아직 송이 균사에 대한 기본적인 생리적 연구는 거의 없으며, 또한 인공적인 송이생산에 대한 보고도 찾아 보기 힘들다(Hall 등, 1992; Wang 등, 1995; 1996). 다만, 일본에서는 여러나라에서 송이 수입과 자국의 송이생산을 위하여 많은 연구가 진행되고 있는 것으로 보고되고 있으나(Ogawa, 1976; 1977abcd; 1978; 1979ab), 공식적으로 인위적인 송이 생산은 아직 보고되지 않고 있다. 그러나, 송이생산과 관련된 소나무 및 주

*Corresponding author

변 분포지에 관한 연구는 임업연구원 토양미생물 연구실을 중심으로 연구되고 있다(KFR, 1981ab; 1984; 1986).

송이에 대한 생활사는 일반버섯의 생활사와 같다고 생각하고, 포자채집과 균사배양을 시도하였으며, 이러한 노력은 많이 진행되었다고 생각된다 (Wang, 1996; Wang 등, 1995). 이는 송이의 경제적인 가치가 다른 버섯 혹은 농산품에 비해 월등히 높기 때문이다. 그러나, 이에 대한 기본적인 연구자료는 아직 없다. 이러한 이유는 여러가지가 있는데, 우선적으로는 송이 자실체에서 분리된 균사가 아직도 진정한 송이의 균사인지 확인이 없기 때문이라고 생각된다. 또한, 송이균사는 실험실 조건에 아주 서서히 자라고, 자실체형성에 대한 연구자료도 없는 것이 하나의 큰 이유가 된다. 일본은 수십년 동안 송이에 대한 연구가 체계적으로 이루어졌으며(Ogawa와 Ohara, 1978; Ogawa와 Yambe, 1980; Ogawa, 1979ab), 우리나라도 본인을 포함하는 균학자들이 약 10년간 연구한 것으로 생각되나(한국임업연구원; KFR), 이에 대한 결과는 없었다. 본 연구는 송이 자실체에 대한 균사를 분리하여, 직접 RAPD 기술을

이용하여(Cook 등, 1996ab; Gosselin 등, 1995; Gruble, 등, 1995ab; Peterson, 1995), 송이균사를 확인하는 것이 목적이다. 또한 이러한 연구는 앞으로의 송이생산과 소나무의 외생균근 형성과 생리를 위하여 필요한 것으로 사료된다.

재료 및 방법

균주

송이는 서울 경동시장에서 구입하였으며, 전남 남원, 강원 양양, 삼척, 및 충북 연풍의 자생지에서 직접 채집하여 동정하였다(Imazeki & Hongo, 1984; Singer, 1986; Smith, 1973). 채집된 송이들은 일반적으로 담자낭균 분리배지(GS; Ginterova & Janot-kova, 1975)를 통하여 균사를 분리하였고(Lee, 91), 송이자실체는 냉동고에 보관하였다. 채집된 송이와 분리된 송이균사는 Table 1과 같으며, 균사(mycelium)는 PDA(Potato Dextrose Agar; Difco)에 계대배양하여 보관하였다. 분리·보관 중인 균사를 PDA 배지에서 30일간 배양한 균사체와 송이 자실체를 이용하여, 각각 genomic DNA를 추

Table 1. The mycelia isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* and others

Marks	The genomic DNA collected from	States of materials
T- 1	Basidiocarps of <i>Pleurotus specis</i> (unknown) purchased	Basidiocarps
T- 2	Basidiocarps of <i>Ramaria botrytis</i> , collected from Mt. Cho-Ryeong	Basidiocarps
T- 3	Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> purchased from Kyoung-Dong	Basidiocarps
T- 4	Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> collected from Yang-Yang	Basidiocarps
T- 5	Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> collected from Hong-Cheon	Basidiocarps
T- 6	The mycelium isolated from Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> (collected from Nam-Won, Jeon-Puk on Sep. 12, 1995)	Mycelia (TM-10) ^a
T- 7	The mycelium isolated from Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> (collected from Mt. Cho-Ryeong, Chung-Puk on Sep., 1994; on Sep. 21, 1993)	Mycelia (TM-4)
T- 8	The mycelium isolated from Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> (collected from Yang-Yang, Gang Won Do; FRI-91009b collected on Oct. 15, 1994)	Mycelia (TM-7)
T- 9	The mycelium isolated from Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> (collected from Mt. Cho-Ryeong, Chung-Puk on Sep. 14, 1994)	Mycelia (TM-8)
T-10	The mycelium isolated from Basidiocarps of <i>T. matsutake</i> (collected from Sam-Cheok, Gang Won Do; FRI-91008 collected on Oct. 15, 1994)	Mycelia (TM-9)
T-11	Mycelium isolated from Basisocarps of <i>Pl. ostreatus</i> var. Wong-Hyeon obtained from Kyoung-Gi Rural Institute of Agriculture	Mycelia (Won-Hyon)

^aThe makers of *T. matsutake* (TM-series) collected in this Lab and the basidiocarps of TM (T-3,4,5) were collected by Mr. Ka, Kang-Hyeon in Lab. Of Soil Microbiology in Forestry Research Institute.

^bThe numbers of *T. matsutake* collections made by the Forestry Research Institute.

출하였다.

DNA추출

멸균된 막자사발에 냉동 보관된 송이와 균사체를 넣고 액체질소를 부은 후 같이 분말로 만들고 1g 당 3 mL의 extraction buffer(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS)를 넣고 잘 혼합하여 원심분리한 상등액에 1/6부피의 2-propanol을 넣고 -20°C 에서 30분 동안 침전시켰다. 이 침전물에 5mL의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하고, proteinase K와 RNase A를 35°C 에 50 min 간 처리한 후, 동일 부피의 PCI(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)에 1회, CI 용액(chloroform:isoamylalcohol=24:1)에 3회 처리한 후, 1/10 부피의 3 M sodium acetate와 2부피의 ethanol을 가하여 -20°C 에서 30분간 침전시켰다. 이를 원심 분리하여 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 세척하고 건조시킨 후 500 μL 의 TE buffer를 넣어 DNA를 용해시켜 -20°C 에 보관하고 필요할 때마다 이용하였다. 이렇게 만들어진 genomic DNA는 uv로 농도확인한 후에, 각각 1.0% agarose 전기영동을 통하여 단일밴드를 확인하였다.

PCR반응

Taq polymerase와 dNTP는 한국생공(주)에서, primer는 Operon Technologies Ins.(<http://operon.com> 100 Atlantic Av., Suite 108, Alameda, CA 94501, USA)에서 구입한 OPD kit (tenmer)를 이용하였다(Yu, 등, 1996). PCR 반응은 일반적인 방법(Williams 등, 1990)을 기준하여 약간의 변형을 가하였다; 각각의 용량이 25 μL 인 PCR 반응액은 10x reaction buffer 2.5 μL , dNTP 10 nM, Taq polymerase 1 unit, primer 0.2 pM, DNA 25 ng 등을 혼합하였다. 반응조건은 94°C 에서 전반응시킨 후, 94°C 에서 1분 \rightarrow 35°C 에서 1분 \rightarrow 72°C 에서 2분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 35 cycles 진행시켰고, 최종적으로 72°C 에서 5분간 반응시킨 후 4°C 에서 보관하였다(Cook 등, 1996ab).

분석

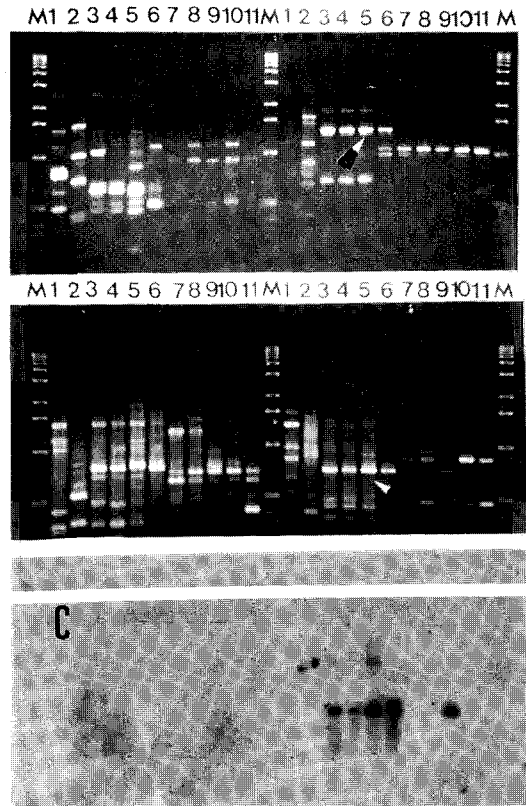


Fig. 1. Polymorphic patterns detected in genomic DNA bands of five mushrooms and six mycelia and Southern blottings (A: reacted with Operon Primer C-Kits of 20 (left) and 12 (right) in the above figures; B: Operon Primer C-Kits of 10 (left) and 15 (right); and C, Southern blotting obtained and hybridized with the 0.75 kpb's band (arrow in Fig. 2B) of Hong-Cheon mushrooms labeling with Dig-DNA labelling system eleven mushrooms amplified with the primer OPD-10).

증폭된 PCR product에 대해 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 7.9)를 사용하여 1.4% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 15분간 염색하고 증류수에서 20분간 염색액을 제거한 다음, uv transilluminator 상에서 polaroid film 667을 이용하여 각각의 나타난 밴드들을 촬영을 하였다 (Fig. 1; Sambrook 등, 1989). 여기서, 송이 자실체에 공통적으로 나타나는 밴드로 확인된 것을 이용하

여, 0.75 kb인 band(Fig. 1B left)을 이용하여 Southern blotting을 하였다(Biochemica, 1993; Grube 등, 1995). 각각의 primer에서 나온 DNA 밴드의 유무를 1과 0으로 코드화하여 집괴분석(SPSSPCplus)을 하였다(Yu 등, 1996).

균사관찰

송이에서 분리된 균사는 계속하여, 언급된 내용으로 25°C에서 계대배양을 하였고, 현미경관찰도 시도하였다. 현미경관찰에서 슬라이드배양은 너무 기간이 오래 걸리고(2~3개월), 많은 오염이 있었으며, 직접 배양된 배지에서 채취하여 Cotton blue 혹은 Melzer's solution로 염색하여 관찰하였다.

결 과

시료의 채집

송이버섯 발생은 소나무 군락에서 많이 생산되고 있고, 송이버섯의 자루 밑바탕에는 가는 균사와 소나무뿌리가 서로 엉켜져 있는 것을 관찰하였다(Fig. 2A). 외생균근을 형성한 소나무뿌리로부터 균사채취를 시도하였으나, 송이균사분리는 하지 못 하였다. 채집 혹은 구입된 송이부터 균사를 채취 분리하

였다. 공기의 흐름이 없는 곳에 표면살균을 통하여 송이의 갓 혹은 대(stipe) 부분을 찢어서 균사를 분리하였다; 이렇게 무균상태에서 채집된 송이의 조각을 GS 배지에 옮겨서, 상온에 2-3주가량 두어 균사의 성장을 관찰하였다. 일반적으로 버섯 균의 경우는 현미경 관찰을 통하여 clamp connection 이 관찰되는 버섯균사로 가정하여 제2차로 분리하였다. GS배지에서 자란 균사는 아직 이러한 일반적인 현상이 관찰되지 않았다. 다만, 송이 균사체로 생각되는 균총을 가능한 다른 공기 오염균을 제거시킨 후에 PDA에 옮겨서 보관하였다. 균총은 흰균사를 공기중에 노출시키며 눈과 같은 모양과 색깔로 자라는 균총(T-7), 투명한 균총에서 서서히 퍼지는 균총(T-6, 9) 등이 관찰되었다. 이중에 분리 균에서 균총의 자라는 형태가 비슷한 것끼리 묶어서, 대표되는 균사체를 표시하였다(Table 1). 가능한 동일 종류의 균사형이 아닌 이질적인 균사를 골라서, T-6에서 T-10으로 표시하였다. 그외 T-2,7,9 는 약 2년에 걸쳐, 충북 조룡산(충북 괴산군 연풍면 소재)에서 채집된 버섯자실체를 이용하여 실험하였다. T-11은 원형느타리에서 직접 GS배지를 통하여 분리하여 보관한 것이다. 송이의 자실체에서 직접 genomic DNA를 뽑아왔으며, 균사는 액체배양을 통하여 얻

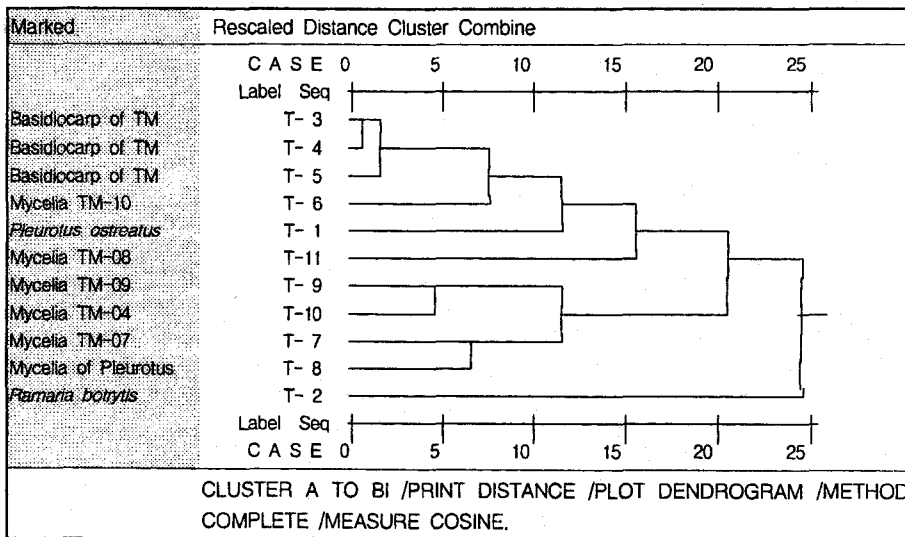


Fig. 2. Dendrogram using Complete Linkage of the 11 fungal isolates calculated by the unweighted pair grouping methods (the scale shown here indicated the cosine similarity coefficient. The rescaled distances originated from the programmings of SPSS PCplus (see the detail in Table 2).

어진 균사체를 이용하여 genomic DNA를 직접 얻었다.

RAPD

앞에서 언급된 버섯의 자실체와 균사체에서 뽑은 genomic DNA를 이용하여 PCR band를 1.0% agarose에 전개시켰다. 각각 다른 primer를 사용한 결과 나타난 그림은 Fig. 1과 같다. 우선 윗그림에서, M으로 표시한 것은 표준 DNA의 band로써, 10, 3, 2, 1.8, 1, 0.5 kb(kilobasepair, λ Hind III)로 나타난 것이다. 우선, Fig. 1A에서는 버섯 자실체와 균사체의 DNA에서 만들어지는 PCR-밴드는 3.0~0.5 kb와 2~0.5 kb로 각각 나타났다. 이중에서 나온 PCR-밴드를 이용하였다. Fig. 1B에서는 0~1.8 kb에서 모두 다양한 PCR-밴드들이 나타났다. 여기에서 결과를 본다면, 4개의 primer를 사용한 결과 평균 11~12개 PCR-밴드가 나타났다. 여기서 Fig. 1AB에서 보인 화살표는 각각 1.65 kb (Fig. 1A)와 0.75 kb (Fig. 1B)의 PCR-밴드를 이용하여, Southern blotting을 하기 위하여 DNA를 추출해 내었다. 뽑아낸 DNA는 방법에서 언급된 내용과 같이 southern blotting을 하였으며, 그 결과가 Fig. 1C에서와 같은 결과를 얻었다. 여기서 버섯균 T-3, 4,5,6에서 공통으로 나타난 PCR-밴드에 대한 것으

로 T-9의 균사체의 DNA 에도 나타났다. 여기서 사용되는 RAPD의 장점을 살려, 공통적으로 나타난 유전자를 확인하기 위한 방법으로 확인하였다; Fig. 1B에서 0.75 kb의 PCR-밴드를 확인한 결과, T-6과 T-9가 공동의 0.75 kb의 PCR-밴드를 같은 것으로 나타났다.

유사도

위에서 언급된 PAPD에서 나온 PCR-밴드를 이용하여, 버섯자실체와 균사간에 유사관계와 유사도를 만들었다(Table 2). 여기서, 집괴분석하였으며, 방법은 Table 2와 같이 여러 가지 방법을 사용하였다. 그 결과는 모두가 큰 범위내에서, 비슷하게 나왔으며, 가장 잘 나온 묶음의 자료는 cosine similarity이었다(Table 2). 여기서, T-3과 T-4는 가장 가까운 균으로 동일한 버섯 균으로 나타났으며, T-2는 가장 이질성이 큰 균으로 나타났다(Table 2). 이러한 것을 기초로 하여 dendrogram를 그렸다 (Fig. 2). 유사도 지도를 그린 결과, 송이 자실체는 지역에 관련없이, 한묶음(T-3, 4, 5)에는 T-6과 T-1로 구성되었다. 그의 균사체로는 T-9,10,7,8가 한 묶음으로 나타났다. 집괴분석에서, 가장 이질적인 균사체는 T-2인 싸리(*Ramaria botrytis*)으로 나타났다. 느타리(*Pleurotus ostreatus*; T-1)는 송 균사

Table 2. Cosine Similarity Coefficient between two fungal isolates. The values (1.00) in the box indicated the identical form of the fungal isolate and calculated by SPSS PCplus programs*

Case	T- 1	T- 2	T- 3	T- 4	T- 5	T- 6	T- 7	T- 8	T- 9	T-10
T- 2	.0000									
T- 3	.6272	.2250								
T- 4	.6272	.2250	1.0000							
T- 5	.6396	.1835	.9414	.9414						
T- 6	.5528	.1081	.6934	.6934	.7542					
T- 7	.1928	.2767	.2957	.2957	.3618	.4975				
T- 8	.4137	.1669	.5708	.5708	.6306	.6860	.7313			
T- 9	.3857	.2075	.4730	.4730	.5427	.4975	.5455	.6581		
T-10	.2843	.1529	.3922	.3922	.4667	.5500	.6030	.7276	.8040	
T-11	.5380	.1579	.4499	.4490	.5047	.3785	.4842	.6121	.3459	.45889

*Program Commands: CLUSTER A TO BI /PRINT DIST /MEASURE EUCLID /METHOD SINGLE/ PLOT DENDROGRAM or CLUSTER A TO BI /PRINT DISTANCE /PLOT DENDROGRAM/METHOD CENTROID or CLUSTER A TO BI /PRINT DISTANCE /PLOT DENDROGRAM /METHOD COMPLETE /MEASURE COSINE.

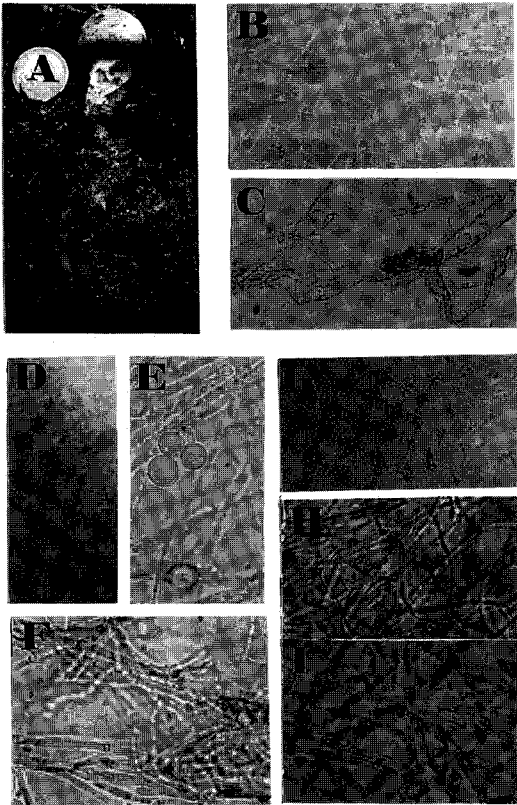


Fig. 3. Various colonies of the mycelia directly isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matutake* and the mycelia grown in PDA(T-7, T-10 and T-6); A) The basidiocarps and the base of stipe connected with white mycelia and aggregated with the fine pine feeder roots in the growund (soil); B) $\times 20$ Aerial mycelia, C) $\times 320$ hooked form of hyphae, and E) $\times 800$ clamydospores of the fungal mycelium of T-10; D) $\times 6$ semi-submerged hyphae, and F) $\times 800$ hooked and amyloid hyphae of the fungal mycelium of TM-9; G) $\times 18$ submerged hyphae, H) $\times 320$ hyphal mass, and I) $\times 800$ amyloid hyphae of the fungal mycelium of T-6.

와 많이 닮았으며, 싸리버섯과는 먼거리를 유지하였다.

현미경 관찰

여기에서 나온 자료를 이용하여 분리된 균사체를 현미경을 통하여 관찰하였다(Fig. 3). 위의 결과를

이용하여, 대표적인 송이균사의 모양을 갖는 것과 이질적인 것으로 송이균사체로 뽑히는 균총을 비교하여 관찰하였다. T-10의 경우는 Table 1에서 언급된 것과 같이, 2년전에, 충북 조릉산에서 채집된 송이에서 뽑은 균사로 계속하여 계대배양한 것으로 본 실험실에 보관된 균사이다. 송이에서 뽑은 분리균은 대부분이 불안전 균의 균사체 조사에서와 같이 슬라이드 관찰을 이용하여 간단하게 무성생식기와 포자를 관찰하기에는 너무 오래동안 배양하기 때문에 많은 균의 오염이 일어나서 관찰할 수가 없었다. 그러나 PDA에서 성장한 균총은 칼로 적은 조각을 만들어 여러 가지 염색시약을 통하여 관찰하였으며, 그 결과 cotton blue와 Melzer 용액에 염색이 되었다; 주로 Metzer's solution 용액에 염색되는 균사는 amyloid hyphae로 표시하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 여기서 보인 송이는 전형적인 동해안의 산악지역에서 관찰되는 것이며, 버섯자루 끝에는 흰 균사덩어리와 소나무의 가는 뿌리가 서로 엉켜져 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3A); 여기서 보이는 흰 균사와 소나무 뿌리에 균사는 다른 이상한 종류의 균사들이 채집되었으나, 모두가 균일한 균총의 균사가 채집되지 않고 있으며, 너무 이질적인 균총이 관찰되었다. 이와반면에 송이 자실체에서 뽑은 균사는 모두가 흰색의 균총으로 눈송이와 같은 색깔의 균사(T-7) 혹은 반투명한 균총(T-6,10)으로 동일한 균총이 분리되어서 실험에 임하였다. 균총의 관찰 결과는 공기중에 균사를 노출시키는 균사(aerial hyphae; T-10)는 기질 속으로 침투하는 균사(submerged; T-6)가 다르게 관찰되었다. 그러나, 이들의 중간 형태의 균사도 발견되었다(T-9); 분리된 모든 균사는 염색이 되었으며, amyloid hyphae를 갖고 있으며, 다른 염색도 잘 되었다. T-10 균사의 경우는 후막포자의 형성도 되었고 갈고리모양의 균사체도 발견이 되었다. 그러나 T-6 균사의 경우는 이러한 균사체는 발견되지 않았다. T-9 균사의 균총은 모두가 T-10와 T-6균사의 중간 형태로 나타났다.

고 찰

본 연구는 송이에서 뽑은 균사와 송이의 DNA의

성격을 비교하여, 분리된 균사가 진정한 송이 균사인지를 확인하는 실험이다. 그리고, 이러한 균사는 송이의 성장에 필요한 자료를 얻기위한 것으로 일단 균사체를 얻는 것이 중요하다. 과거, 본실험실에서는 10년간 송이에 대한 연구가 진행되었으나, 연구된 자료는 단지 생태학적인 연구로 지역에 따른 차이점을 연구하는데 그쳤다(Lee, 1991). 이러한 연구는 송이 자실체에서 균사를 분리하였으나, 실험실 내에서 송이 자실체를 확인할 길이 없이 연구가 자주 지연되는 경우가 많았다. 이러한 것은 외생균근 균에 대한 것으로 실제 균사와 자실체간의 유전인자를 확인하거나, 혹은 균사를 이용한 자실체를 발생시켜서 확인하는 방법이 있다. 그러나 이러한 실험은 모두 현재 버섯생산에 관여되는 표고버섯, 느타리, 노루궁뎅이, 및 팽이 버섯의 경우가 많다. 그러나, 송이의 경우는 아직 이에 대한 보고는 전무한 상태이고, 다만 본실험에서 처음 시도되고 있다. 이러한 면에 송이과 송이의 균사에서 처음으로 genomic DNA를 이용한 PCR-PAPD를 이용한 기술을 활용하였다.

유사도에서 송이의 경우는 지역에 관계없이 동일 묶음이 나왔으며, 균사로 된 DNA 에서도 동일 묶음이 나왔다. 그외 짜리버섯과 느타리버섯에 관계에도 현재에 분류관계와 같이 나왔다(Fig. 2). 즉, 느타리버섯이 송이와 가깝고, 짜리버섯과는 먼 관계인 것을 보여서, 본실험은 유사도관계에서 옳게 나온 것으로 생각된다. 유사도 상관관계에서 T-6 균사가 위의 송이 자실체와 관계에서 가장 가까운 것으로 나타났다. 그외, 송이 자실체와 가깝게 나타난 것은 T-9 균사로 나왔다. 이러한 것을 보았을 때에 유사 관계나 유사도에서 T-6 균사는 송이의 DNA와 상당히 많이 닮았다. 이러한 관계로 볼 때, 즉 본실험이 모두 옳게 나왔다고 가정할 때는, T-6 균사가 송이와 같은 DNA가 있는 것으로 생각된다(Fig. 2). 그러나, PAPD에서 Southern blotting에서는 T-9 균사도 T-6균사와 동일하게 동일 PCR-밴드를 갖는 것으로 생각된다. 여기서, 각각의 genomic DNA를 관찰하였을 때에 적은 양의 DNA도 Southern blotting에서 관찰될 수가 있다는 것을 설명하는 좋은 예로 나타났다. 이러한 것을 보았을 때에, PCR-DNA 밴드를 비교하였을 때에 좋은 결과가 나타났

으며, 또한 southern blotting에도 같은 결과가 나타났다. 이러한 것을 기초로하여 간단하게 송이 혹은 다른 버섯의 균사를 확인하는 것을 개발하였다. 그러나 이러한 것에 대한 확인 더 많은 반복의 실험이 필요하고, 또한 다른 기술이 새로이 개발되어야 되겠다. 본 실험은 송이와 송이 균사에 대한 시도로써 그 의미가 크며, 앞으로의 연구의 문제점을 발표함에 따라서 조언을 얻고자하는 의미도 있다.

위의 사실을 갖고 현미경관찰으로 분리된 균사체를 관찰하였다. 현미경 관찰에서 과거 눈송이 같은 형태의 균총(T-10)은 모두가 송이균사로 잘 못 오인된 것으로 생각되며, 또한 반투명하고 기질 속으로 침투하는 균사(T-6,9)가 송이 균사로 확인할 수가 있었다. 송이균사도 한천배지 상에 갈고리 형의 균사가 발견되었다고 보고하여, nematode trapping rings으로 생각하고 있다(Wang, 1996). 본 연구에서도 균사의 성장(T-4,6,9)에서 균총의 색깔과 관계 없이 관찰되었다. 여기서 문제는 T-9 균사는 현미경적인 관찰에서 T-10 균사와 T-6 균사의 중간 형태이다. 눈으로 보기에는 T-4 균사와 T-9 균사는 크게 차이가 없었으며, 오래동안 실험실에서 계대배양하였을 때에 변화되는 것으로 생각된다. 이러한 것은 실험실적 면에 계속하여 일어나는 것으로 송이와 비교하여 확인한 뒤에 실험에 임하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 이러한 실험을 통하여 앞으로 많은 외생균근 균에 대한 쉬운 방법으로 균을 확인하는 것이 중요한 것으로 본 실험의 의의는 크다고 하겠다.

적 요

송이는 동양권 문화에서는 중요하며, 값비싼 버섯으로 알려져 있다. 채집된 송이의 자실체에 분리된 송이균사에서 추출된 DNA를 RAPD 방법을 통하여 비교하였다. 비교된 송이균사들은 각각 분리된 송이자실체에서 분리되었으며, PDA에서 성장이나 균총의 형태가 다른 것들을 취하여 비교하였다. 그런데, 이실험을 통하여, PCR 조건에서 만들어진 RAPD-밴드를 집괴분석한 것을 비교하였으며, 또 다른 방법으로는 Southern blotting 통하여 확인하였다. 그결과, 두 방법에서 송이균사로 추정되는

균사를 확인하여, 이들의 균사에 대한 실험실내의 성장과 균총을 확인하였다. 균사의 성장은 매우 느리며(10 cm per month), 균총은 반투명한 것이며, 현미경관찰하에 어떤 후막포자와 갈고리모양의 균사가 발견되지 않았다.

감사의 말씀

본 연구의 내용의 일부는 1996-7년도 농림수산기술평가사업 연구지원에 의하여 이루어진 것임(임업연구원, 위탁과제임).

참고문헌

- Biochemica. 1993. The Dig system user's guide filter hybridization. Boehringer mannheim GmbH, Biochemica, Sandhofer Strasse 116, D-6800, Mannheim 31.
- Cook, D.E.L., Kennedy, D.M., Guy, D.C., Russell, J., Unkles, S.E. and Duncan, J.M. 1996a. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **100**: 297-303.
- Courtecuisse, R. and Duhem, B. 1995. Collins field guide Mushrooms & Toadstools of Britain and Europe. 3th eds HaperCollins Pub.
- Ginterova, A. and Janotkova, O. 1975. A simple method of isolation and purification of cultures of wood-rotting fungi, *Folia Microbiol.* **20**: 519-520.
- Gosselin, L., Jobidon, R. and Bernier, L. 1995. Assessment of genetic variation within *Chondrostereum purpureum* from Quebec by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycology Res.* **100**: 151-158.
- Grube, M., Depriest, P.T., Gargas, A. and Hafellner, J. 1995a. DNA isolation from lichen ascomata. *Mycol. Res.* **99**: 1321-1324.
- Hall, I.R., Strong, G.G., Wang, Y. and Plattner, I. 1992. Progress in research on truffles and other edible fungi in New Zealand. *Mycologia e Vegetazione Mediterranea VII* (2); 271-274.
- Imazeki, R. and Hongo, T. (1984): Colored Illustrations of fungi of Japan. Hoikusha. Publishing Co. Ltd. p. 181. see pg. 24-28.
- KFR (Korean Forestry Reports). 1981a. Reports on the pine-mushrooms in Korea (Jae 18 Ho), Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 44 (Dec., 1981 published).
- _____. 1981b. Proceedings of Seminar on the pine-mushroom cultivations (Jae 16 Ho), Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 44 (Dec., 1981 published).
- _____. 1984): Proceedings of Research and Technique on the production of pine-mushroom (Jae 22 Ho), Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 58 (July, 1984 published).
- _____. 1986. Production technique and Research of forest mushrooms in Japan (Jae 26 Ho), Forest Research Institute, Seoul, Korea. see pg 73 (May, 1986 published).
- Lee, S.S. (1991). Biology of *Tricholoma matsutake* found at *Pinus densiflora* communities in the areas of Kyoung Sang Do. *Kor. J. Mycology* **19**: 203-213.
- Ogawa, M. 1976: Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. III. *Tricholoma matsutake* in *Picea glehnii* and *Picea glehnii-Abies sachalinensis* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **17**: 188-198.
- _____. 1977a: Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. IV. *Tricholoma matsutake* in *Tsuga diversifolia*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **18**: 20-33.
- _____. 1977b: Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. V *Tricholoma matsutake* in *Tsuga sieboldii* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **18**: 34-46.
- _____. 1977c. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. VI. *Tricholoma fulvocastaneum* in *Quercus serrata-Quercus acutissima* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **17**: 188-198.
- _____. 1977d. Microbial ecology of mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing in Pine Forest III. Fungal flora in shiro soil and on the mycorrhiza. Bulletin of the Government Forest Experiment Station no. 293. Tokyo, Japan. July, 1977.
- _____. 1978. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. VII. *Tricholoma fulvocastaneum* Hongo in *Castanopsis cuspidata* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **19**: 37-46.
- _____. 1979a. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tri-*

- choloma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing and its allied species. IX. *Tricholoma ponderosum* in *Pseudotsuga menziesii*-*Tsuga heterophylla* and *Pinus contorta* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **20**: 370-382.
- _____. 1979b. Microbial flora of *Pinus thunbergii* in Forest of Coastal Sand Dune. Bulletin of The Forestry and Forest products Reserch Institute No. 305. Ibaraki, Japan August 1979. pp. 107-124.
- _____. Takeo, U., Shuji, K. and Kisoo, Y. (1978): Cultivation method of the mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. (I) Growing method of the pine saplings infected with *T. matsutake* in the field. *Japan For. Soc.* **60**: 119-128.
- Ogawa, M. and Ohara, H. 1978. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. VIII. *Tricholoma bakamatsutake* Hongo in *Quercus mongoloca* var. *grosserrata* forest and *Q. serrata* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **19**: 391-405.
- Ogawa, M. and Yambe, Y. 1980. Effects of Herbicide on the mycorrhizae of *Pinus densiflora* and Soil Microorganisms. 1977. Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute No. 311. Ibaraki, Japan. August 1980.
- Ohara, H. and Ogawa, M. (1982): Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* and its allied species. XI. *Tricholoma caligatum* in *Cedrus libanotica* forests. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **23**: 365-377.
- Peterson, S.W. 1995. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **99**: 1349-1355.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatic, T. 1989. Molecular cloning-A Laboratory manual. 2nd eds. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 6.1-6.19
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. Koeltz Scientific Books. D-6240 Koenigstein/Federal Republic of Germany. pg 981+ pl 88.
- Smith, A.H. 1973. Agaricales and related sectoid Gasteromycetes. pg 421-450 In: The fungi. G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman eds. IVB. Academic Press. N.Y. p 504.
- Wang, Y. 1996. Personal Communication; Reearchers for ectomycorrhizae. Crop & Food Research Invermay Agricultural center, Private Bag 50054, Mosgiel, New Zealand. wangy@crop.cri.nz.
- Wang, Y., Evans, L.A. and Hall, I.R. 1996. Growth of *Tricholoma* spp. in pure culture. Crop & Food Research Invermay Agricultural center, Private Bag 50054; In press.
- Wang, Y., Sinclair, L., Hall, I.R. and Cole, A.L.J. 1995. *Boletus edulis* sensu lato: a new record for New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **23**: 227-231.
- Williams, J.G.K., 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. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- Yu, K.W., Seong, C.K., Lee, S.S., and Yoo, J.Y. 1996. Studies on the fungal isolates of *Mucorales* collected from Korean home made mejus and nuluks. *Kor. J. Mycology* **24**: 280-292.