

ITS 영역 증폭에 의한 소나무 송이균 뿌리 감염 확인 및 RAPD에 의한 타 균근과의 비교*¹

김명길*^{2†} · 유선화*² · 박원철*² · 박현*² · 가강현*² · 손희경*²

Identification of *Tricholoma matsutake* in a Pine Root by ITS Region Amplification and RAPD Analysis with Different *Mycorrhiza* *¹

Myungkil Kim*^{2†} · Sun-Hwa Ryu*² · Wonchull Bak*² · Hyun Park*² ·
Kang-Hyeon Ka*² · Hee-Kyung Sohn*²

요 약

대량 배양된 송이 균사를 배양병 안에 있는 소나무에 접종한 접종묘를 실시하였는데, 접종묘 내 소나무 뿌리 내로 송이 균사가 침투하여 감염이 되었는지를 판별하는 방법으로 ITS (Internal transcribed spacer) 영역에서 특이 primer set인 ITS1-ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC)를 선택하여 정하고, 그를 바탕으로 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)와 홍릉수목원(서울시 동대문구 청량리 2동) 내에서 수집한 다른 균근과 비교하고자 RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) 기법으로 각각 6종, 10종의 균근을 동정하였다.

ABSTRACT

A simple method for identifying of ectomycorrhizal fungi was presented, using the polymerase chain reaction (PCR) to amplify the ITS (Internal transcribed spacer) regions of the nuclear ribosomal repeat. The sequences analyzed 6 species, *Pisolithus tinctorius*, *Chroogomphus rutilus*, *Leucogyrophana pinastri*, *Suillus granulatus*, *Lactarius laeticolorus*, and *Suillus bovinus* at hongreung forest, and analysed 10 species, *Craterellus lutescens*, *Thelephoroid mycorrhizal*, *Lactarius*

*¹ 접수 2006년 8월 25일, 채택 2006년 10월 23일

*² 국립산림과학원 화학미생물과 Div. Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

† 주저자(Corresponding author) : 김명길(e-mail: mkkim@foa.go.kr)

quieticolor, *Tricholoma matsutake*, *Lactarius chrysorrheus*, *Sarcodon aspratus*, *Russula versicolor*, *Suillus luteus*, *Tricholoma terreum*, and *Amanita vaginata* at hongcheon forest. Finally, the amplification by PCR with ITS1-ITS4 primers offers good results over classical identification for ectomycorrhizal fungi species.

Keywords: ITS region, *Tricholoma matsutake*, Mycorrhiza, RAPD

1. 서론

외생 균근은 산림에서 중요한 역할을 담당하는 존재로서, 북반구에서는 거의 대부분의 산림 지역에서, 남반구에서는 주로 너도밤나무 림에서 발견된다. 외생 균근의 생리적 특성 및 분류를 위해서는 산림생태계를 잘 이해하는 것이 중요한데, 일반적으로 자실체 생산 과정에서 공생하는 기주식물이 오염되지 않는 수준에서 다른 식용 버섯과 같이 나타나는 경우가 많다 (Amicucci *et al.* 2000, 2001; Paolocci *et al.* 1999). 보통 외생 균근을 분류함에 있어 버섯의 색깔이나 모양의 특성을 살핀 거시적인 특성과 미세적인 현미경적 특성을 살핌으로서 이루어졌다. 그러나 대부분 버섯의 형태학적 특성이 자세히 기술되지 않고 형태학적 특성만으로는 기주식물의 근계 시스템과 연관하여 완전한 분류 작업을 하기 어려운 형편이다 (Comandini & Pacioni 1997; Zambonelli *et al.* 1997, 1999).

최근에 DNA 수준에 기초한 분류 방법이 많이 발전되고 있는 상황에서, ribosomal DNA region을 지표로 하여 이루어지는 분류 방법이 널리 사용되어지고 있다. 여기에는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 기법, Species specific primers 이용, conserved rDNA의 염기서열 결정에 의한 분류 방법들이 있다 (Horton & Bruns 2001; Hotron 2002, Landeweert *et al.* 2003; Kaldorf *et al.* 2004; Karen *et al.* 1997; Paolocci *et al.* 1995).

그 중에서도 ITS영역에 대한 specific primer에 관한 연구 (White *et al.* 1990; Gardes & Bruns, 1993)가 많이 되어 있어 rDNA의 부분 염기서열에 의한 균근을 포함한 외생 균근의 분류에는 유용하다 (Fig. 2,

Table 1).

본 연구에서는 대량 배양된 송이 균사를 배양병 안에 있는 소나무에 집중된 접종묘를 실시하였는데, 접종묘 내 소나무 뿌리 내에 송이 균사가 침투하여 감염이 되었는지를 판별하는 방법으로 ITS primer set를 선택하여 동정하고, 그를 바탕으로 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)와 홍릉수목원(서울시 동대문구 청량리 2동) 내에서 수집한 다른 균근과 비교하고자 RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) 기법을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

접종묘 내의 소나무 뿌리에 송이 균이 감염되었는지 여부를 알아보려고 접종묘 내 소나무 뿌리를 채취하여 실시하였다. 송이균 외 다른 균근과의 RAPD 비교를 위해 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)와 홍릉수목원(서울시 동대문구 청량리 2동) 내에서 수집한 23개의 샘플을 대상으로 실시하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 균근의 genomic DNA 추출 및 PCR

동결건조한 후 또는 액체 질소에서 곱게 간 소나무 뿌리, 균사체, 및 자실체를 lysis buffer를 넣고 잘 섞은 후 65°C에 1 시간 반응시켜 동량의 phenol : chloroform을 넣고 원심 분리하여 DNA를 포함한 상

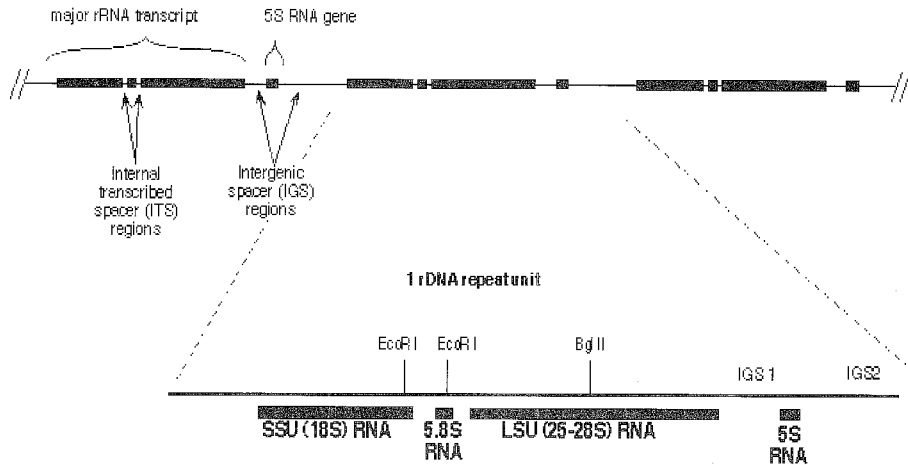


Fig. 1. rDNA scheme of ectomycorrhiza.

Table 1. Specific primers of ITS region

primer name	sequence (5'→3')	comments	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		White <i>et al</i> , 1990
ITS2	GCTGCGTTCCTTCATCGATGC	is similar to 5.8S below	White <i>et al</i> , 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	is similar to 5.8SR below	White <i>et al</i> , 1990
ITS4	TCCCTCCGCTTATTGATAIGC		White <i>et al</i> , 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	is similar to SR6R	White <i>et al</i> , 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA		Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG		Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG		Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG		Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG		Vilgalys lab

충부를 새 튜브로 옮겼다. 3 M NaOAc로 침전시키고 isopropanol로 세척하여 genomic DNA를 회수하였다 (Lee & Taylor, 1990). 분리한 유전자를 증폭하기 위하여 ITS primer set은 Table 1에 명시된 대로 ITS1/ITS2, ITS1/ITS4 및 ITS1/ITS 5.8 primer set 으로 하여 94°C에서 4 분간 one cycle, 94°C에서 1 분간, 58°C에서 1 분간, 72°C에서 1 분간 set을 35 cycles로 하고, 72°C에서 7 분간 one cycle로 PCR을 수행하였다.

2.2.2. 부분 염기서열 결정

pGEM-T Easy Vector System을 이용하여 ligation하고, 여기에서 얻어진 competent cell을 42°C에서 90 초 동안 heat shock 후 얼음에 5 분 동안 방치하고 LB broth를 첨가해 37°C에서 1 시간 배양한 후 spin 해서 100 µl로 양을 줄인 후, 배지에 도말하여 white colony를 선발하였다. 선발한 colony를 배양하여 lysis buffer와 fresh lysozyme으로 선별하고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol

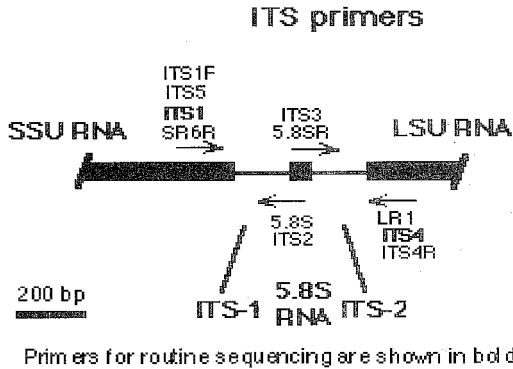


Fig. 2. ITS region of rDNA.

(25/24/1)을 가하여 원심 분리하여 상층을 떠낸 후, NaOAc를 가하고 EtOH를 첨가하여 플라스미드 정제 과정을 거쳐 염기서열 결정을 하였고 BLAST search 검색을 위하여 GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에서 균주를 동정, 분류하였다.

2.2.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)에 의한 분류

이미 알려진 Operon Technologies primers 중에서 OPA4 primer: AATCGGGCTGGGGTG로 하여 92°C에서 1분간 one cycle, 35°C에서 1분간, 72°C에서 2분간 set을 45 cycles로 PCR을 수행하였고(Maki *et al.* 2001; Zhang & Molina, 1995), 밴드의 상동성 검색은 Fingerprinting II Informatix Software (Bio-Rad) program에 의해 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 접종묘 내에서의 확인

결정된 primer pair에 의한 증폭 결과로 얻은 염기서열 결정으로 접종묘 내의 소나무 뿌리에 송이 균이 감염되었는지 여부를 알아보려고 접종묘 내 소나무뿌리를 채취하여 실시하였다. 무균 소나무 뿌리, 송이접

종 소나무 뿌리 및 잡균이 오염된 소나무 뿌리시료에서 DNA 추출 및 확인을 하였고 여기에서 잡균 오염 뿌리는 송이 접종 소나무 생산과정에서 발견된 것을 말하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 무균 소나무 뿌리 (lanes 1~3)의 경우에는 ITS 영역 증폭에 의해 PCR 산물이 나타나지 않았고, lanes 4~6에 해당하는 다른 균으로 오염된 것처럼 보이는 뿌리에서는 ITS1/ITS4 set에 의한 PCR 증폭이 제대로 이루어지지 않은 반면, 송이 균이 들어간 뿌리는 확실한 PCR 증폭 산물(lanes 5~7)을 얻을 수 있었다.

그 결과로부터 얻은 PCR 산물의 sequencing 결과 잡균을 포함한 뿌리는 푸른곰팡이(*Penicillium spp.*) 균으로 확인되었고, 송이 접종 소나무 뿌리는 sequencing 결과 *Tricholoma matsutake* (우리나라 송이)를 포함하고 있음을 확인하여 접종묘 내 감염 여부를 판단하는 primer set로 ITS1/ITS4로 확정하였다.

3.2. 타 균근과의 비교

3.2.1. DNA 추출 및 PCR Band 확인

송이 균 외 다른 균근과의 RAPD 비교를 위해 국립 산림과학원 내 홍릉 수목원(서울시 동대문구 청량리 2동)에서 수집한 7개의 균근성 버섯 및 control로 강원도 양양 서면에서 생산된 송이버섯과 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 15개의 균근성 버섯 중 1, 11, 12, 15, 18, 19 lanes를 제외한 16개의 다른 균주의 genomic DNA는 대체적으로 잘 분리되었다. 여기에서 잘 분리되지 않은 6가지의 균주는 여러 가지 PCR 조건을 맞추어 가면서 분리를 계속 시도하였으나 잘 분리되지 않아 이 균주들은 제외하고 부분 염기서열 결정에 들어갔다.

3.2.2. 부분 염기서열에 의한 동정

GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통한 BLAST 검색결과, 서울시 동대문구 청량리 2동 국립산림과학원 내 홍릉수목원에서 수집한 6개의 균근은 Table 2에서 보는 바와 같이 상동

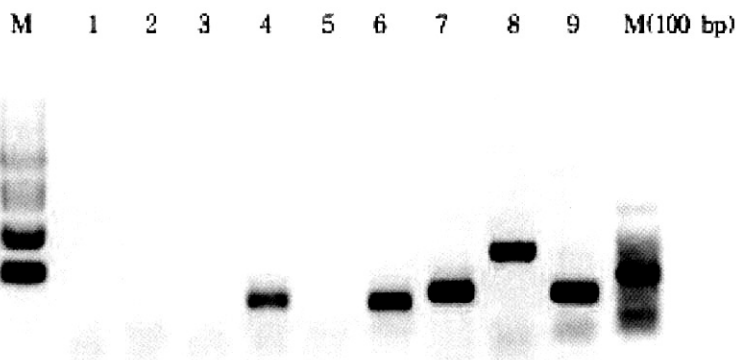


Fig. 3. PCR amplification of genomic DNA from three pine roots by ITS primer. M, Molecular marker 100 bp DNA ladder (Bioneer); lanes 1~3, not inoculated with *Tricholoma matsutake* (KFRI 689), ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s; lanes 4~6, may be contaminated other microorganism, ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s; lanes 7~9, inoculated with *Tricholoma matsutake* (KFRI 689), ITS1/ITS2, ITS1/ITS4, ITS1/ITS5.8s.



Fig. 4. PCR amplification of DNA from ectomycorrhiza. M, Molecular marker 100 bp DNA ladder(Bioneer); lanes 1~7, ectomycorrhiza collected at Hongreung Forest; lanes 8, *Tricholoma matsutake* collected at Yangyang Seo-myeon; lanes 9~23, ectomycorrhiza collected at Hongcheon Forest.

성이 매우 높게 나타났다. 그러나 형태학적으로 노랑 민길그물버섯(*Phylloporus bellus*)은 BLAST 검색에 의한 결과로는 *Leucogyrophana pinastri*로 판명이나 차이가 있음을 나타냈다. 형태학적인 분류가 먼저나 유전자 수준에서의 동정이 우선이나는 아직 결론이 나지 않은 문제이고 또한 BLAST 데이터에도 저장되어 있지 않은 균주도 많이 있어 본 논문에서 결론을

내리기보다 차이점을 제시하는 것으로 대신하려고 한다. 한편 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 균주 들은 10 개의 균주로 검색되었다(Table 3). 홍천에서의 시험 결과도 무늬노루털 버섯(*Sarcodon scabrosus*)이 BLAST 검색 결과는 *Thelephoroid mycorrhizal*로 나왔으며, 첫버섯아재비와 노랑무당버섯은 같은 속이긴 하지만 종명은

Table 2. Identification of ectomycorrhizal fungi at Hongreung forest

No.	Korean name	Scientific name	Identified name by BLAST	Base (%)
2	모래발버섯	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>	611/626 (97%)
3	못버섯	<i>Chroogomphus rutilus</i>	<i>Chroogomphus rutilus</i>	480/487 (98%)
4	노랑민길 그물버섯	<i>Phylloporus bellus</i>	<i>Leucogyrophana pinastri</i>	173/176 (98%)
5	젓비단 그물버섯	<i>Suillus granulatus</i>	<i>Suillus granulatus</i>	623/637 (97%)
6	호박젓버섯	<i>Lactarius laeticolorus</i>	<i>Lactarius laeticolorus</i>	427/435 (98%)
7	황소비단 그물버섯	<i>Suillus bovinus</i>	<i>Suillus bovinus</i>	650/641 (99%)

Table 3. Identification of ectomycorrhizal fungi at Hongcheon forest

No.	Korean name	Scientific name	Identified name by BLAST	Base (%)
9	황금피꼬리버섯	<i>Craterellus lutescens</i>	<i>Craterellus lutescens</i>	110/121 (90%)
10	무늬노루털버섯	<i>Sarcodon scabrosus</i>	<i>Thelephoroid mycorrhizal</i>	610/620 (98%)
13	젓버섯아재비	<i>Lactarius hatsudake</i>	<i>Lactarius quieticolor</i>	595/612 (97%)
14	송이	<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>Tricholoma matsutake</i>	502/505 (99%)
16	노랑젓버섯	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	633/681 (92%)
17	능이	<i>Sarcodon aspratus</i>	<i>Sarcodon aspratus</i>	485/493 (98%)
20	노랑무당버섯	<i>Russula flavida</i>	<i>Russula versicolor</i>	155/185 (83%)
21	비단그물버섯	<i>Suillus luteus</i>	<i>Suillus luteus</i>	625/633 (98%)
22	땅송이	<i>Tricholoma terreum</i>	<i>Tricholoma terreum</i>	637/642 (99%)
23	우산버섯	<i>Amanita vaginata</i>	<i>Amanita vaginata</i>	399/420 (95%)

다른 것으로 결과를 얻었다. 완전한 동정을 위해서는 여러 가지 다른 검색을 통한 결과를 종합하여 이루어져야 할 것으로 보였다.

3.2.3. RAPD 기법에 의한 분류

3.2.3.1. OPA Primer에 의한 분류

Table 1에서 제시한 여러 가지 Operon primer RAPD 분석을 하였으나(데이터 제시 안함), 그 중에서도 OPA 4로 증폭한 결과가 대체적으로 밴드가 분류할 수 있는 수준으로 나와 송이 균과 다른 균주와의

비교에는 OPA 4 primer (Fig. 5)에 의한 연관 지도를 작성하는 것이 바람직하다고 결론지었다. OPA 4에 의한 RAPD 분류상 같은 속에 속하는 균근(*Lactarius* 속, *Tricholoma* 속)은 대체적으로 서로의 연관성이 90% 이상 되어 보였다. 또한, 젓버섯(*Lactarius*) 속에 속하는 균근들은 노랑무당버섯(*Russula flavida*: *versicolor*), 무늬노루털버섯(*Sarcodon scabrosus*: *Thelephoroid mycorrhizal*), 비단그물버섯(*Suillus luteus*) 및 우산버섯(*Amanita vaginata*)과 70% 이상의 연관성을 보였다. 또한, 같은 *Tricholoma* 속이라 할지라도 송이(*Tricholoma matsutake*)와 땅송이

OPA4 Primer에 의한 분류

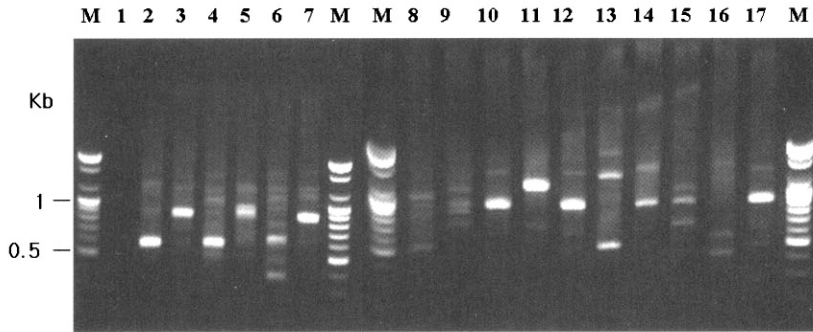


Fig. 5. RAPD fingerprinting of ectomycorrhizal fungi obtained with OPA 4 primer; lanes 1~6, ectomycorrhiza collected at Hongreung Forest; lanes 7, *Tricholoma matsutake* collected at Yangyang Seo-myeon; lanes 8~17, ectomycorrhiza collected at Hongcheon Forest.

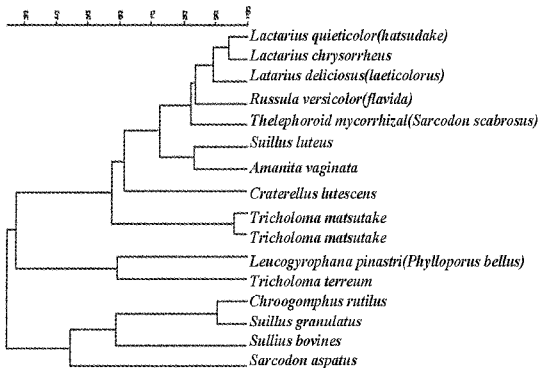


Fig. 6. Phylogenetic tree by OPA 4 primer.

버섯(*Tricholoma terreum*)의 연관성은 OPA 4 primer에 의해서는 낮았다(Fig. 6). 그러나 Operon primer는 대체적으로 fungi의 RAPD 분류에 잘 적용되는 것으로 알려져 있었으나(Maki *et al.* 2001), 외생 균근의 분류와 연관성을 검색할 때 적합한지는 좀 더 연구가 필요한 부분이며, 외생 균근에 적합한 marker 개발이 이루어져야 할 것으로 보였다.

4. 결 론

접종묘 내의 소나무 뿌리 내로 송이 균이 잘 감염되

었는지 여부를 알아보고자 ITS primer set으로 확인을 한 결과 가장 간단하면서도 확실한 결과를 얻을 수 있는 방법으로 적절하다고 사료되었다. 송이 균의 다른 균근과의 RAPD 비교를 위해 국립산림과학원 내 홍릉 수목원(서울시 동대문구 청량리 2동)에서 수집한 6개의 균근성 버섯 및 control로 강원도 양양 서면에서 생산된 송이버섯과 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 15개의 균근성 버섯 중에서 GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통한 BLAST 검색 결과, 서울시 동대문구 청량리 2동 국립산림과학원 내 홍릉수목원에서 수집한 6개의 균근을, 강원도 홍천 시험지(강원도 홍천군 동면 노천리)에서 수집한 균주 들은 10개의 균주로 검색되었고, OPA 4 primer에 의한 균주간의 연관 지도를 작성하였다.

참 고 문 헌

1. Amicucci A., C. Guidi, A. Zambonelli, L. Potenza, and V. Stocchi. 2000. Multiplex PCR for the identification of white *Tuber* species. FEMS Microbiology letters 189: 265~269.
2. Amicucci, A., A. Zambonelli, C. Guidi, and V. Stocchi. 2001. Morphological and molecular characterization of *Pulvinula constellatio* ectomycorr-

- hizae. FEMS Microbiology letters 194: 121~125.
3. Comandini, O and G. Pacioni. 1997. Mycorrhizae of asian black truffles, *Tuber bimalayense* and *T. indicum* Mycotaxon 63: 77~86.
 4. Horton, T. R. 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. Plant and Soil 244: 29~39.
 5. Horton, T. R and T. D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: Peeking into the black-box. Molecular ecology 10: 1855~1871.
 6. Irie, T., T. Sato, K. Saito, Y. Honda, T. Watanabe, M. Kuwahara, and H. Enei. 2003. Construction of a Homologous Selectable Marker Gene for *Lentinula edodes* Transformation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(9): 2006~2009.
 7. Kaldorf, M, C. Renker, M. Fladung, and F. Buscot. 2004. Characterization and spatial distribution of ectomycorrhizas colonizing aspen clones released in an experimental field. Mycorrhiza 14: 295~306.
 8. Kären, O, N. Högborg, A. Dahlberg, L. Jonsson, and J. E. Nylund. 1999. Inter and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. New Phytologist 136: 313~325.
 9. Kulkarni, R. 1991. DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shitake Mushroom. Applied & Environ. Microbiology. 57(6): 1735~1739.
 10. Landeweert, R., P. O. Leeftang, T. W. Kuyper, E. Hoffland, A. Rosling, K. Wernars, and E. Smit. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Applied and Environmental Microbiology 69: 327~333.
 11. Lee, S. B and J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282-287. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Eds. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic press. Sandiego.
 12. Maki, C. S., F. Teixeira, F. Paiva, and E. Paccola-Meirelles, L. D. 2001. Analysis of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. Brazilian J. of microbiology. 32: 170~175.
 13. Paolocci, F., P. Angelini, E. Cristofari, B. Granetti, and S. Arcioni. 1995. Identification of *Tuber* spp. and corresponding ectomycorrhizae through molecular markers. Journal of the Science of Food and Agriculture 69: 511~517.
 14. Paolocci, F., A. Rubini, B. Granetti, and S. Arcioni. 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. Ectomycorrhizae. FEMS Microbiology Ecology 28: 23~30.
 15. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic press, San Diego, pp. 315~322.
 16. Zhang, Y. and I. M. Francis. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Microbiology letters 131: 17~20.