

rDNA-ITS분석에 의한 벚짚버섯 (*Agrocybe* spp.) 수집균주의 계통분류학적 특성구분

정종천^{1*} · 이명철² · 장갑열¹ · 전창성¹ · 이찬중¹

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, ²국립농업과학원 농업유전자원센터

Phylogenetic Relationships of Mushroom *Agrocybe* spp. Based on rDNA-ITS Analysis

Jong-Chun Cheong¹, Myung-Chul Lee², Kab-Yeul Jang¹, Chang-Sung Jhune¹ and Chan-Jung Lee¹

¹Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science,
Rural Development Administration(RDA), Suwon 441-707, Korea

²National Agrobiodiversity Center, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon

(Received February 25, 2009. Accepted April 8, 2009)

ABSTRACT: Phylogenetic relationships were investigated in the mushroom genus *Agrocybe* based on sequence data from the internal transcribed spaces(ITS) of nuclear ribosomal DNA(rDNA). Thirty strains including *Agrocybe aegerita*, *A. gyrocybe cylindracea*, *A. gyrocybe praecox*, *A. gyrocybe pediades* and Unknown *Agrocybe* species were subjected for the analysis. The *Agrocybe* spp. were separated into eight distinct groups. Phylogenetic analysis divided these species into eight groups as follows: *A. chaxingu* within group I, *A. salicicola* within group II, *A. cylindracea* and *A. aegerita* within group III, *Agrocybe* sp. within group IV and V, and other *Agrocybe* spp. were grouped within VI, VII, and VIII.

KEYWORDS: *Agrocybe* spp., ITS rDNA sequences, Phylogenetic relationships

벚짚버섯속(*Agrocybe*) 버섯은 주름버섯목(Agricales), 소꿉버섯과(Bolbitiaceae)에 속하며, *Agrocybe aegerita*, *A. cylindracea*, *A. chaxingu*, *A. praecox*, *A. pediades* 등이 보고되어 있다. 이중 버들송이(*Agrocybe aegerita*와 *A. cylindracea*)는 활엽수의 고사목이나 그루터기에 다발지어 발생하는 사물기생균이다. 버섯 갓의 색깔은 어릴 때는 암갈색, 성숙하면 연노랑 또는 연갈색을 띤다(今關 & 本郷, 1958; Singer, 1949). 이 버섯의 학명은 *Agrocybe cylindracea* (DC. ex Fr.) Maire로 통용되고 있으나(今關 등, 1997; 이, 1988), 일부 학자들은 *A. aegerita* (Brig.) Singer {Syn. *Pholiota aegerita*} (Singer, 1949)로 명명한 바 있다. 이 버섯은 한국, 일본, 북미, 유럽, 아프리카 등지에서 자생하고(今關 & 本郷, 1958), 우리나라에서는 1987년 경기도 광릉에서 이 버섯을 채집하여 처음으로 분류동정 되었다(이, 1988). 1988년에는 이 균을 소나무톱밥에 밀기울을 첨가한 톱밥배지 병재배로 인공재배법을 개발하여, 1989년에 농가실증시험을 실시하였다(김 등, 1988, 1989). 다른 버섯에 비하여 섬유질이 많고 독특한 촉감과 향이 있어 대중의 기호에 맞아 병재배 시설을 이용한 연중생산에 유망한 버섯이다. 그러나 이 버섯은 균배양기간이 길고 배양중에 잡균오염율이 높아 병재배법이 보급된 이후 15년이 경과하였는데도 농가에서 널리 재배되지 못하고 있는 실정이다.

2003년 현재까지 수집된 벚짚버섯속 30균주를 대상으로 다

른 버섯들의 종 구분과 마찬가지로 균종의 형태, 균배양 속도 등 균사의 배양적 특성, 버섯발생 여부, 재배기간 등 재배적 특성과 버섯의 외부 형태를 비교하고 우수균주를 선발하고자 일련의 실험을 진행하였다. 보존 균주의 특성을 잘 모를 경우 재배하고자하는 균주의 선택에 어려움이 따르고 이를 해결하기에 많은 시간과 노력이 따른다. 버들송이에 대한 구분은 다른 버섯 종의 구분과 마찬가지로 균사의 배양적 특성, 버섯의 외부형태적, 재배적 특성 등에 대한 차이와 대치배양시 다른 균주와의 대치선 형성 유무 등으로 판정(古川, 1992; 임업연구원, 1993)하여 왔다. 그러나 균주목록에는 같은 종으로 등재되어 있어도 배양 및 재배적 특성과 버섯의 형태에 많은 차이가 있어서 이들의 결과를 해석하기가 어려웠다. 또한 버섯의 분류동정은 자연상태에서 발생한 버섯의 형태적 특징을 기준으로 하여 이루어졌기 때문에 인공재배된 버섯에 대한 육안적 형태 비교만으로는 수많은 균주간의 유전적 변이를 분석하는데 많은 시간과 노력이 소요될 뿐 아니라 환경적인 제약요인 등으로 신뢰도가 낮을 수밖에 없다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 분자생물학적 방법을 사용하고 있다.

본 연구는 rDNA ITS 염기서열분석에 의한 벚짚버섯속 보존균주간의 유전적 유연관계를 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에 사용한 균주는 국립원예특작과학원 버섯과에

*Corresponding author <E-mail:jccheong@rda.go.kr>

보존하고 있는 벚꽃버섯속(*Agrocybe* spp.) ASI 19001~19032 중 30균주를 사용하였다(Table 1). 이중에서 ASI 19029은 네덜란드(CBS 127.88, *A. aegerita*)에서 분양받아 본 연구에서 종 구분을 위한 분자생물학적 유연관계 분석에 대조 균주로 사용하였다. 그리고 균의 증식을 위해서 PDA (potato dextrose agar; Difco 213400) 배지를 이용하여 25°C에서 15일간 배양하고 4°C에 보관하면서 사용하였다.

Genomic DNA의 분리 및 rDNA ITS영역의 PCR 증폭

공시균주를 PDB (potato dextrose broth; Difco 254920) 액체배지에 15일간 정치배양 후 균사체를 여과·동결건조한 다음 Graham(1994)의 방법에 따라 genomic DNA를 추

출하여 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다. 공시균주의 rDNA ITS 영역을 증폭하기 위하여 White 등(1990)에 의해 보고된 primer ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 primer ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 합성하여 사용하였다. PCR 반응을 위해 2.5 mM dNTP, 10 μ l의 10 $\times$ buffer (100 mM tris pH 9.0, 50 mM KCl, 10% triton X-100), 25 mM MgCl₂, 100 pmol primer, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Promega Co.), 30 ng genomic DNA를 멸균수와 함께 혼합하여 총량 100 μ l의 반응액을 만든 후 PTC-100 TM (MJ Research Co.)을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에 4분간 predenaturation 후, 95°C에 1분간 denaturation, 58°C에 1분간 annealing, 72°C

Table 1. List of *Agrocybe* species used in this study

Isolate	Scientific name	버섯이름	Source	GeneBank accession No.
ASI 19001	<i>A. dura</i>		일본 (WC 217)	
ASI 19002	<i>A. aegerita</i>	버들송이	미국 (WC 370)	AY 168825
ASI 19003	<i>A. cylindracea</i>	버들송이 1호	국내	AY 168826
ASI 19004	<i>A. aegerita</i>	버들송이	독일	AY 168827
ASI 19005	<i>A. aegerita</i>	버들송이	일본	AY 168828
ASI 19007	<i>A. cylindracea</i>	버들송이	일본	
ASI 19008	<i>A. aegerita</i>	버들송이	미국 (12924)	
ASI 19009	<i>A. pediades</i>	황토벚꽃버섯	광릉 1625	AY 168829
ASI 19010	<i>A. pediades</i>	황토벚꽃버섯	이천	
ASI 19011	<i>A. erobia</i>	보리벚꽃버섯	미국 (WC 181)	AY 168830
ASI 19012	<i>Agrocybe</i> sp.		미국 (4319)	
ASI 19013	<i>Agrocybe</i> sp.		춘천 4376	
ASI 19014	<i>Agrocybe</i> sp.		서울 1009	
ASI 19015	<i>A. erobia</i>	보리벚꽃버섯	제주 1046	AY 168831
ASI 19016	<i>A. aegerita</i>	버들송이	일본	
ASI 19017	<i>Agrocybe</i> sp.		칠갑산 2971	
ASI 19018	<i>Agrocybe</i> sp.		계룡산 3084	
ASI 19019	<i>A. aegerita</i>	버들송이	일본 3336	
ASI 19020	<i>A. aegerita</i>	버들송이	일본 (군마51호)	
ASI 19021	<i>A. cylindracea</i>	버들송이	중국 (상해농업과학원)	
ASI 19022	<i>A. chaxingu</i>	차신고	중국 (상해농과대학)	AY 168832
ASI 19023	<i>A. chaxingu</i>	차신고	중국 (농학원 HB 911호)	AY 168833
ASI 19024	<i>A. cylindracea</i>	버들송이	중국 (경공업연구소)	
ASI 19025	<i>A. aegerita</i>	버들송이	중국 (진균연구소)	
ASI 19026	<i>A. salicicola</i>		중국 (농학원)	
ASI 19027	<i>A. salicicola</i>		일본 (호꾸도연구소)	
ASI 19028	<i>A. erobia</i>	보리벚꽃버섯	백담사 (KACC 500231)	
ASI 19029	<i>A. aegerita</i>		네덜란드 (CBS 127.88)	AY 168834
ASI 19031	<i>Agrocybe</i> sp.		중국	
ASI 19032	<i>Agrocybe</i> sp.		중국	

* Strain ASI19006 was conformed *Lentinus* sp., ASI19030 has been contamination.

에 2분간 polymerization을 35회 반복하고, 72°C에서 8분간을 유지하였다.

PCR 증폭이 확인된 rDNA의 산물을 정제하기 위하여 PCR 산물 양의 2배에 해당하는 100% 에탄올과 1/10에 해당하는 양의 3 M NaAcOH을 첨가하여 -70°C에서 1시간 처리한 후, 5분간 원심분리 (12,000 rpm)하여 DNA를 침전시키고 다시 70% 에탄올로 세척하여 건조한 후 멸균한 3차 증류수 30 μ l 에 녹였다. Spectrophotometer (Beckman DU-650)로 파장 260 nm와 280 nm에서 PCR 산물의 흡광도를 측정하여 1 μ g/ml의 농도가 되게 정량하였다.

PCR 산물의 클로닝 및 염기서열 분석

PCR 증폭된 rDNA ITS 영역의 염기서열 분석을 위하여 이들 유전자 단편을 pGEM-T vector system (Promega Co.)을 이용하여 cloning 한 후, *E. coli* DH5a competent cell에 형질전환하고, ampicillin (25 μ g/ml), X-gal 및 IPTG가 첨가된 LB 고체배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)에 *E. coli*를 도말한 후 37°C에서 하룻밤 배양하여 white colony를 선발하였다.

형질전환된 *E. coli*의 colony 중 한 strain당 5개의 colony를 무작위로 선발하여 3 ml의 LB 액체배지에 37°C에서 하룻밤 진탕배양한 후 Qiagen Mini kit (Qiagen Co.)를 이용해서 plasmid를 분리정제하였다.

염기서열을 결정하기 위하여 Sanger 등(1977)의 dideoxy chain termination method를 응용한 Bigdye Terminator Sequencing kit Ver1.0 (ABI Co.)을 사용하여 sequencing PCR을 수행하였다. PCR 반응은 96°C에 10초간 denaturation, 50°C에 5초간 annealing, 60°C에 4분간 polymerization을 35회 반복하였다. 반응액을 정제하기 위하여 에탄올로 침전시킨 후 염기서열 분석에 사용하였다. 염기서열 분석을 위한 전기영동은 acrylamide와 urea, TBE을 섞어 4.5% polyacrylamide gel을 만든 후 Automatic sequencer (Perkin Elmer, ABI 377)를 사용하였다. Jukes와 Cantor(1969)의 방법을 이용하여 evolutionary distance matrix를 작성하고, 계통학적 유연관계 분석을 위하여 DNASTAR software (Lasergene Co.)의 Megalign program을 이용하여 rDNA-ITS의 염기서열을 cluster V algorithm으로 분석하였다.

결과 및 고찰

rDNA ITS 영역의 염기서열을 이용한 벚꽃버섯속균의 유연관계

본 시험에서 primer ITS1과 primer ITS4에 의해 증폭된 공시균주들의 ITS영역은 659~719 bp 범위로써 균주간 밴드 크기의 차이는 육안으로 구별할 수가 없었다. 벚꽃버섯속균 (*Agrocybe* species) 공시균주의 ITS 영역에 대한 염기서열 결과는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)에 기탁하

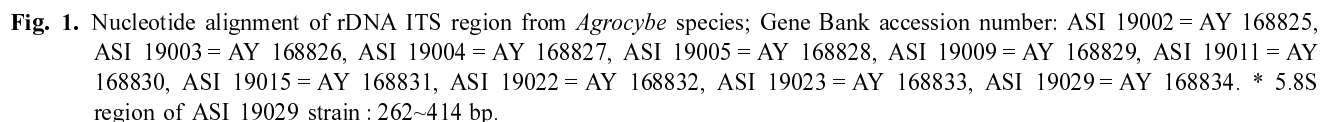
였다(Accession No. AY168825~168834). Clustal V algorithm을 이용하여 이들의 유사성을 분석한 결과는 Fig. 1과 같으며, 이들의 ITS 전영역에 대한 염기서열 상동성 비교분석은 Table 2에 나타내었다. 이들의 염기서열 유사도는 53% 이상이었으며 *A. erebia* (ASI 19001, 19010, 19011, 19012, 19013, 19015 이상 6균주), *A. pediades* (ASI 19009), *A. praecox* (19014) 및 ASI 19017, 19018 균주는 다른 종들과 매우 낮은 염기서열 유사도를 갖는 것으로 나타났다(Table 2).

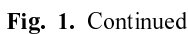
염기서열의 상동성 비교를 통하여 분지도를 작성해 본 결과, ASI 19002, 19003, 19004, 19005, 19029가 *A. cylindracea*; ASI 19007, 19016, 19019, 19020, 19021, 19022, 19023, 19024, 19025, 19026, 19027, 19028, 19031, 19032가 *A. chaxingu*; 19001, 19010, 19011, 19012, 19013, 19015가 *A. erebia*; 그리고 ASI 19008; ASI 19017과 19018; ASI 19009; ASI 19014 등 크게 8개의 group으로 구분되었는데, *A. chaxingu* 내의 균주간 최저 유사도는 95.6%, *A. cylindracea* 내에서는 95.2%, *A. erebia* 내에서는 95.2% 이상으로 나타났다(Fig. 2).

그런데 Fig 2의 분지도에서 *A. praecox* (CBS), *A. pediades* (KACC), *A. praecox*(KACC),는 NCBI의 GenBank에서 등록되어 있는 염기서열을 내려 받았으며, 각각 *A. praecox* (CBS 108.59)=AF124713, *A. pediades*(KACC500300)=AF345806 와 *A. praecox*(KACC500080)=AF345805는 Park 등(2001)의 보고를 인용하였다.

대부분 담자균의 경우 ITS 영역에서는 종내 변이가 적고 ITS 영역에서 종내 변이가 다수 있는 것으로 알려져 있으며, 자낭균의 경우는 이와 반대인 것으로 보고된 바 있다. 배 (1994)는 영지버섯과 느타리버섯에서 rDNA ITS 영역의 염기서열이 종 구분에 적당하였다고 하였다. Royse와 Nicholson (1993)은 26S ribosomal RNA 유전자의 3'-말단과 5S rRNA의 5'-말단 사이의 영역인 IGR (Intergenic region) 부위에 대해서 *Lentinus edodes*의 경우 균주간에는 염기서열에 차이가 없었으나 *L. edodes*와 *L. boryana* 등의 종간에는 큰 차이를 보였다고 하였다. 정 등(2004)도 망태버섯속(*Dictyophora*) 균들의 분자생물학적 관찰을 통하여 종(species) 구분한 결과들이 균배양 온도, 배지pH 등 배양적 특성(Cheong *et al.*, 2000)과 균배양기간, 버섯발생기간 등 재배적 특성 및 인공재배한 버섯의 형태적 특성을 종합하여 볼 때 각 방법에 의한 grouping이 거의 일치하는 경향으로서 rDNA ITS 영역의 염기서열을 이용한 분자생물학적 분석을 통하여 기준 균주와 비교함으로써 짧은 기간에 종 구분이 가능할 것이라고 보고하였다. 본 시험의 결과에서도 ITS II 영역이 종내의 변이가 거의 없는 것으로 보아 rDNA ITS I 영역의 염기서열을 이용한 종 동정이 가능할 것으로 본다.

본 시험의 결과, ① *A. chaxingu* (ASI 19007, 19016, 19019, 19020, 19022, 19023, 19024, 19025, 19027, 19028, 19031, 19032 등 12균주), ② *A. salicicola* (19021, 19026 등 2균주), ③ *A. cylindracea* (ASI 19002, 19003, 19004, 19005, 19029 등





			G			A			G A			T G A C C T C			Contig#1
571	A	G	G	C	T	G	C	T	T	T	T	T	T	T	ASI19027
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19031
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19029
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19016
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19007
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19023
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19024
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19025
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19032
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19022
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19021
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19028
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19004
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19005
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19029
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19033
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19002
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19021
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19017
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19018
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19013
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19015
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19012
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19001
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19016
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19011
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19008(CBS)
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A. pediseta(KACC)
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	ASI19014
571	A	G	G	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A. piceos(KACC)

Fig. 1. Continued

Table 2. Percent similarity of ITS sequences from *Agrocybe* species

Strain	% similarity of the ITS regions																												
	01	02	03	04	05	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	31
19001																													
19002	54.2																												
19003	54.2	100																											
19004	53.3	99.0	99.0																										
19005	53.3	99.0	99.0	100																									
19007	59.2	72.2	72.2	76.1	76.1																								
19008	53.4	70.5	70.5	80.8	80.8	73.8																							
19009	89.1	56.9	56.9	56.6	56.6	58.6	53.3																						
19010	99.8	58.2	58.2	53.1	53.1	59.3	53.3	89.1																					
19011	99.8	58.2	58.2	53.1	53.1	59.3	53.3	89.1	100																				
19012	100	54.2	54.2	53.3	53.3	59.2	53.4	89.1	99.8	99.8																			
19013	100	54.2	54.2	53.3	53.3	59.2	53.4	89.1	99.8	99.8	100																		
19014	89.1	57.7	57.7	57.2	57.2	58.0	50.5	90.7	89.3	89.3	89.1	89.1																	
19015	100	54.2	54.2	53.3	53.3	59.2	53.4	89.1	99.8	99.8	100	100	100																
19016	59.2	72.2	72.7	76.1	76.1	100	73.8	58.6	59.3	59.3	59.2	59.2	58.0	59.2															
19017	61.2	66.5	66.5	66.3	66.3	63.7	60.2	61.3	61.2	61.2	61.2	61.2	59.5	61.2	63.7														
19018	61.6	66.8	66.8	60.4	60.4	63.9	60.2	61.8	61.6	61.6	61.6	61.6	59.9	61.6	63.9	99.8													
19019	59.2	72.2	72.2	76.1	76.1	100	73.8	58.6	59.3	59.3	59.2	59.2	58.0	59.2	100	63.7	63.9												
19020	59.2	72.1	72.1	75.9	75.9	99.9	73.6	58.6	59.3	59.3	59.2	59.2	58.0	59.2	99.9	63.6	63.7	99.9											
19021	58.9	71.0	71.0	70.9	70.9	98.8	64.9	58.4	59.0	59.0	58.9	58.9	58.1	58.9	98.8	63.7	63.9	98.8	98.7										
19022	54.2	79.7	79.7	80.4	80.4	95.7	74.3	57.8	54.3	54.3	54.2	54.2	57.7	54.2	95.7	63.9	64.0	95.7	95.5	94.8									
19023	58.1	80.5	80.5	77.6	77.6	96.2	75.6	57.7	58.1	58.1	58.1	58.1	52.2	58.1	96.2	64.5	64.6	96.2	96.1	95.0	98.0								
19024	57.6	80.3	80.3	81.1	81.1	95.0	74.2	57.8	57.6	57.6	57.6	57.6	55.5	57.6	95.0	58.3	58.4	95.0	94.8	94.4	96.2	95.2							
19025	57.5	79.5	79.5	80.2	80.2	94.2	66.4	57.7	57.6	57.6	57.5	57.5	58.3	57.5	94.2	65.1	65.3	94.2	94.0	93.6	95.4	94.6	99.1						
19026	57.6	79.7	79.7	79.6	79.6	95.2	66.2	58.0	57.6	57.6	57.6	57.6	58.2	57.6	95.2	65.7	65.9	95.2	95.0	96.4	95.6	97.4	93.2	92.5					
19027	59.0	72.1	72.1	75.9	75.9	99.9	73.7	58.4	59.2	59.2	59.0	57.8	59.0	99.9	63.6	63.7	99.9	99.7	98.7	95.6	91.4	94.0	95.0						
19028	54.3	81.5	81.5	78.7	78.7	94.3	74.4	58.7	54.5	54.5	54.3	54.3	53.5	54.3	94.3	59.0	59.2	94.3	94.2	93.7	95.8	95.3	98.0	96.1	93.2	94.2			
19029	53.3	99.0	99.0	100	100	74.3	80.8	56.6	53.1	53.1	53.3	53.3	57.2	53.3	76.1	66.3	60.4	76.1	75.9	70.9	80.4	77.6	81.1	80.2	79.6	75.9	78.7		
19031	59.2	72.2	72.2	76.1	76.1	100	73.8	58.6	59.3	59.3	59.2	59.2	58.0	59.2	100	63.7	63.9	100	99.9	98.8	95.7	96.2	95.0	94.2	95.2	99.9	94.3	76.1	
19032	53.3	80.4	80.4	81.2	81.2	94.1	64.9	56.4	53.1	53.1	53.3	53.3	59.5	53.3	94.1	62.8	62.8	94.1	93.9	94.2	95.4	95.3	97.3	98.2	87.7	93.9	97.3	81.2	94.1

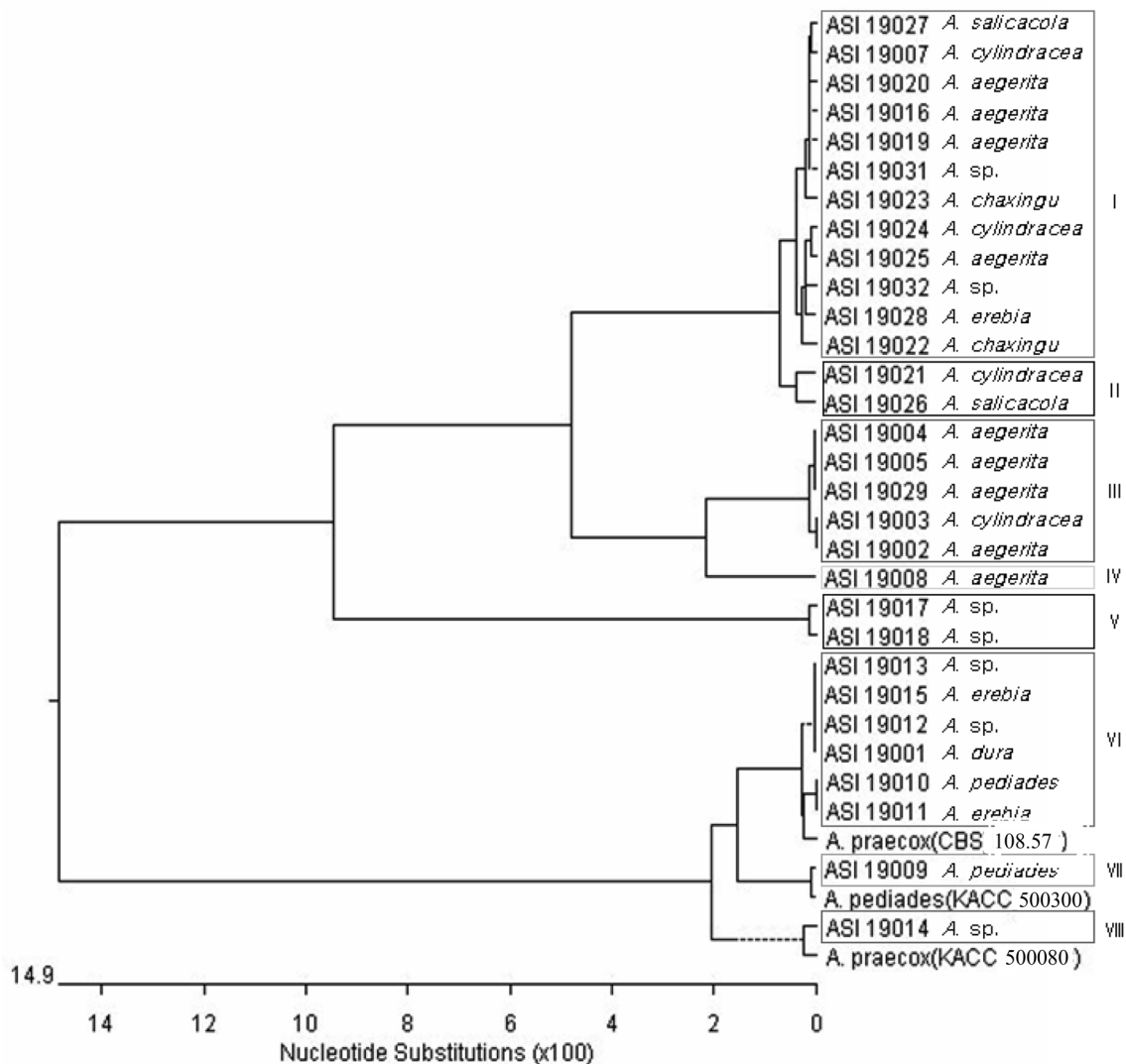


Fig. 2. Dendrogram based on nucleotide sequences of ITS region from *Agrocybe* species.

5균주), ④ *A. erebia* (19001, 19010, 19011, 19012, 19013, 19015 등 6균주), 그리고 ⑤ ASI 19008, ⑥ASI 19017과 19018, ASI 19009, ASI 19014 등 8그룹으로 구분되었다. 이 결과는 별도의 톱밥병재배 시험에서 자실체가 발생한 18균주 중, 버섯 발생이 잘되었던 ASI 19003 등 5균주 (*A. cylindracea*)와 ASI 19007 등 12균주(*A. chaxingu*와 *A. salicicola*)는 균의 배양속도, 자실체의 발생기간 및 생육기간 등 재배적 특성에서 그룹(species 수준) 간에 구분이 뚜렷하였는데, 이는 본 시험의 분지도에 나타난 *A. chaxingu*, *A. cylindracea*의 구분과 일치하였다. 따라서 rDNA ITS 영역의 염기서열분석은 *Agrocybe*속 보존균주의 종 구분에 있어서 선행적, 보충적 수단으로 활용하기에 충분하다고 판단된다. 또한 본 시험 등에서 조사한 벚꽃버섯속 균주들의 특성과 종 구분을 통하여 육종모본 선발 및 균의 특성에 맞는 재배관리와 소비자 기호에 맞는 균주 선택 등이 가능할 것으로 기대된다.

그리고 기 발표한 톱밥병재배 시험(석, 2006; Cheong *et al.*,

2007; 정 등, 2008; 정 등, 2009)에서 배양적, 재배적, 형태적 특징이 유사한 12균주와 본 시험의 분지도(Fig 2)에서 같은 그룹으로 구분된 14균주 중 중복되는 ASI 19007, 19016, 19019, 19020, 19021, 19022, 19023, 19024, 19025, 19026, 19027, 19032 등 12균주는 기존에 보고된 *A. chaxingu*에 ITS부위의 염기서열과 상동성이 100%일치하는 것으로 나타났다. 이는 ITS 영역 이외의 다양한 분자마커를 추가적으로 보완하여 다양한 분자생물학적 검정이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적요

벚꽃버섯속(*Agrocybe* sp.) 균의 분자생물학적 유연관계 분석을 통한 종(species) 구분을 위하여 국립원예특작과학원 버섯과에 보존중인 ASI 19001~19032중 30균주를 공시하고 rDNA의 ITS영역 염기서열을 비교하였다. 그 결과, ASI

19007, 19016, 19019, 19020, 19022, 19023, 19024, 19025, 19027, 19028, 19031, 19032 등 12균주가 *A. chaxingu*; ASI 19021, 19026 등 2균주가 *A. salicicola*; ASI 19002, 19003, 19004, 19005, 19029 등 5균주가 *A. cylindracea*; 19001, 19010, 19011, 19012, 19013, 19015 등 6균주가 *A. erebia*; 그리고 ASI 19008; ASI 19017과 19018; ASI 19009; ASI 19014 등 8그룹으로 구분되었다. 이 결과는 기존의 톱밥병재배 시험에서 자실체가 발생한 18균주 중에서 버섯 발생이 잘 되었던 ASI 19003 등 5균주(*A. cylindracea*)와 ASI 19007 등 10균주(*A. chaxingu*), ASI 19026 등 2균주(*A. salicicola*)는 균의 배양속도, 자실체의 발생과 생육기간 등 재배적 특성으로 그룹(Species 수준) 간에 구분이 뚜렷하였는데, 이는 본 시험의 분지도에 나타난 *A. chaxingu*, *A. cylindracea*의 구분 결과와 일치하였다. 따라서 rDNA ITS 영역의 염기서열분석은 *Agrocybe*속 버섯의 종 구분에 있어서 선행적, 보충적 수단으로 활용하기에 충분하다고 판단된다. 또한 본 시험 등에서 조사한 벚꽃버섯속 균주들의 특성과 종 구분을 통하여 육종 모본 선발 및 균의 특성에 맞는 재배관리와 소비자 기호에 알맞은 균주의 선택 등이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

- 김한경, 박정식, 김양섭, 차동열, 박용환. 1988. 버들송이(*A. aegerita*) 균사생장 조건에 관한 연구. 농사시험연구논문집 30(3):41-50.
- 김한경, 박정식, 김양섭, 차동열, 박용환. 1989. 소나무 톱밥을 이용한 버들송이 인공재배에 관한 연구. 한국균학회지 17(3):124-131.
- 배신철. 1994. 버섯 및 도열병균의 분류를 위한 rDNA의 ITS와 IGR 부위의 PCR 분석. 경북대학교 대학원 박사학위논문.
- 석동권. 2006. 버들송이버섯의 생육특성 및 인공재배에 관한 연구. 2006전국농업교사현장연구.
- 이지열. 원색한국버섯도감 p 137. 아카데미서적. 서울. 1988.
- 임업연구원. 1993. 버섯종균의 품종검정 및 종균심사규정. 임업연구원 훈령 제 113호(1993. 2. 4).
- 정종천, 이명철, 김범기, 박동석, 홍승범, 박정식. 2004. rDNA-ITS 분석에 의한 망태버섯속(*Dictyophora* spp.)의 종간 구분 가능성. 한국균학회지 32(1): 1~7.
- 정종천, 석동권, 김승환, 전창성, 이찬중. 2008. 벚꽃버섯속 ASI19003 (버들송이)과 ASI19016 (차신고)의 배양 및 재배적 특성. 한국버섯학회지 6(1):13-19.
- 정종천, 석동권, 김승환, 전창성, 이찬중. 2009. 벚꽃버섯속 보존균주의 여름철 인공재배시 재배 및 형태적 특성. 한국버섯학회지 7(1):1-8.
- 古川久彦. 1992.きのこ學: 158-181. 共立出版(株).
- 今關六也, 本郷次雄. 原色日本菌類圖鑑(I). p 58. 保育社. 大阪. 1958.
- 今關六也, 大吉雄, 本郷次雄. 日本のきのこ. p 218. 山と溪谷社. 東京. 1997.
- 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.
- Cheong, J. C., Seok, D. K., Kim, S. H., Jhune, C. S. and Lee, C. J. 2007. Cultural characteristics of artificially cultivated genus *Agrocybe*. Proceedings of the 8th China-Korea Joint Symposium for Mycology (Mycological Society of China): 156.
- Graham, G. C., Mayer, S. P. and Henry, R. J. 1994. Amplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques*. 16:175-269.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21~132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academy Press, New York, N. Y.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, Version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Park, D. S., Shin, H. S. and Seok, S. J. 2001. Phylogenetic relationship in the genus *Agrocybe* based on ITS region. *Molecular Genetics*. NIAST.
- Royse, D. J. and Nicholson, M. S. 1993. Allozymes, ribosomal DNA and breeding in *Lentinula*. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 31:162-167.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 74(12):5463-5467.
- Singer, R. 1949. The Agaricales in modern taxonomy. *Lilloa* 22:493.
- White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications. Eds by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninski, J. J. and White, T. J. Academic Press, San Diego, California. pp. 315-322.