

T0000763

GOVP1200506501

최 종
연구보고서

목질진흙버섯의 분자유전학적 진단시스템
개발에 관한 연구

연구기관 : 부산대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “목질진흙버섯의 분자유전학적 진단시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 07월 23일

주관연구기관명 : 부 산 대

총괄연구책임자 : 이 재 동

세부연구책임자 : 전 홍 기

연 구 원 : 김 기 영

연 구 원 : 남 병 혁

연 구 원 : 박 형 식

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

협동연구기관명 : ○ ○ ○

협동연구책임자 : ○ ○ ○

I. 제 목

목질진흙버섯의 분자유전학적 진단시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 약리, 면역학적인 효과가 인정되면서, 고가임에도 불구하고 소비가 급증하고 있는 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 분자유전학적 감별 진단법을 개발하는데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 목질진흙버섯의 분자유전학적 진단시스템 개발을 위하여 Internal Transcribed Spacer (ITS), 28S ribosomal DNA (rDNA), 및 18S rDNA부위의 염기서열을 분석하고, 이를 토대로 한 종특이적인 유전자탐침 개발에 기초를 두고 있다. 개발되어진 유전자탐침은 현재 재배종과 수입종 그리고, 공시균주를 비교하여 개발되어졌다. 종간 구별을 위해서는 변이가 심한 ITS부위가 가장 유용하였으며, 유전자탐침의 개발 또한 용이하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구결과 현재 국내에 유통되고 있는 종 중에서는 목질진흙버섯(*P. linteus*)은 거의 확인이 되지 않았으며, 이와 유사종인 *P. baumii*, *P. igniarius*, 및 *P. pini*가 대부분을 차지하고 있었다. 목질진흙버섯으로 확인된 종 또한 원목에 재배한 것이 아니라, 주로 병 재배를 한 것임을 알 수 있었다. 진흙버섯속은 너무나 방대한 종이 분포하므로, 이들의 분류 및 종간구별을 위해서는 genomic DNA를 대상으로 Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 및 다양한 분자생물학적인 방법이 총 동원되어 지속적으로 실험이 실시되어야 할 것으로 사료된다. 최종적으로 본 실험의 결과 현재 유통중인 버섯의 종자관리가 시급한 문제로 대두되며, 지속적인 관리체제가 필요할 것으로 사료된다.

SUMMARY

Species of *Phellinus* were known to harmful fungi causing white pocket rot and severe plant disease such as canker or heart-rot in living trees in the West, but some species, especially *P. linteus* and *P. baumii* have been used to traditional medicines in the Orient for a long time. In this study, we investigated the sequences of internal transcribed regions (ITS), partial 28S ribosomal DNA (rDNA), and 18S rDNA for the phylogenetic analysis and the development of species-specific probes. The phylogenetic tree displayed the presence of five groups in the *Phellinus* genus, which were distinguished based on their morphology. Most of the *P. linteus* appeared a cluster which was highly significant with other species compared with the sequences of ITS, 18S rDNA, and 28S rDNA. To detect *P. linteus* and complex species, we developed the PCR primer. The primer showed the specific amplification of *P. linteus* and complex species, which is permitted to medicinal mushroom in the East. The results make a potential to be incorporated in a PCR identification system that could be used for the rapid identification of these species from its related species. In addition to, we little found *P. linteus* from domestic and out-come species. This study will have continuingly gone to identify the *P. linteus* and complex species and managed the specific species permitted with agricultural R & D promotion center (ARPC) and Korea Food & Drugs Administration (KFDA).

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary of this study	6
1-1. Aims and contents of this study	6
1-2. Necessity of this study	10
Chapter 2. Developmental status in domestic and foreign	11
2-1. ITS DNA sequencing	11
2-2. A prospect from now on	12
2-3. Reasonableness of technology import	12
Chapter 3. Contents and results of this study	14
3-1. Materials and methods	14
3-2. Results	45
Chapter 4. Achievement and conduction in this study	53
Chapter 5. Practical use of results in this study	57
Chapter 6. Foreign-scientific information collected in this study	58
Chapter 7. References	59

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	6
1-1. 연구개발의 목표 및 내용	6
1-2. 연구개발의 필요성	10
제 2 장. 국내외 기술개발 현황 문제점.....	11
2-1. ITS DNA의 염기서열 분석.....	11
2-2. 앞으로 전망	12
2-3. 기술도입의 타당성	12
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	14
3-1. 재료 및 방법	14
3-2. 결과	45
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	53
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	57
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	58
제 7 장. 참고문헌	59

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

본 연구에서는 목질진흙버섯과 그 유사종들의 18S ribosomal DNA (rDNA) 염기서열을 분석하여 확보된 data와 고안된 probe를 개발하고자 한다. 고안된 probe가 목적하는 목질진흙버섯을 특이성 있게 검출하는 지를 보기 위하여 특이성(specificity)을 우선적으로 조사해야 하며 특이성 조사를 통해서 확인된 probe만을 PCR검증에 적용할 계획이다. 모든 probe가 효과적으로 hybridization(혼성화)하는 여러 가지 조건을 조사하여 PCR 반응조건을 확립하고자 한다. 이러한 방법이 확립되고 나면 단 시간 내에 확실하고 안정된 결과를 얻을 수 있어 목질진흙버섯과 그 유사종을 구별하는데 유용한 방법이 될 것이다.

가. 목질진흙버섯 및 그 유사종들의 ITS, 28S rDNA, 및 18S rDNA 염기서열 분석 및 상호 유연 관계조사

나. 목질진흙버섯 신속 동정을 위한 rDNA probe 개발

다. 종특이적인 DNA probe를 현장에서 적용

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2000-2001)	목질진흙버섯 및 근연종들의 ITS sequencing을 통한 gene data base 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 실험 균주 확보 - 현 보유 균주의 characterization - 보유 균주의 DNA 추출 및 정제 - ITS sequence data base 구축 - Sequence alignment를 통한 gene probe design - Gene probe의 data base 구축
2차년도 (2001-2002)	지속적인 gene probe data base 확장을 통한 종특이적인 PCR probe 개발 및 현장 실험	<ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 실험 균주의 확대 및 확보 - 확보된 균주의 지속적인 sequence analysis 확장 - Probe design 및 probe data base 확장 - 검증된 결과의 data base화 - 고안된 probe로부터 현장의 기초실험에 적용 및 가능성 검토
3차년도 (2002-2003)	목질진흙버섯 및 근연종들의 gene data base 완성 및 PCR/southern blotting을 통한 검증, 개선	<ul style="list-style-type: none"> - 검증된 ITS sequence의 Genbank 등록 - 개발된 gene probe의 특허화 - 전체 분석결과의 data base화 및 관련 Internet site에 게재 - 18S rDNA염기서열분석에 의한 지속적인 유전자탐침개발 - 실제 재배 및 유통 버섯을 통한 신뢰성 조사 - 종특이적인 probe의 검증 및 개선

제 2 절. 연구개발의 필요성

본 연구는 약리, 면역학적인 효과가 인정되면서, 고가임에도 불구하고 소비가 급증하고 있는 목질진흠버섯(*P. linteus*)의 분자유전학적 감별 진단법을 개발하는데 있다.

목질진흠버섯(*P. linteus*)을 포함한 목재부후 민주름버섯류의 분류는 아직도 해결해야 할 문제점들이 많이 남아 있다. 그 이유는 민주름버섯류가 그만큼 특징들이 다양하고, 형태는 유사하여 기원이 다른 이질적인 종류들로 구성되어 있기 때문이다.

민주름버섯류의 분류 대가인 Donk도 자신이 추구하는 분류체계에 스스로 만족하지 못하고 후대의 학자들이 도전해야 할 문제점들을 자주 제시한 적이 있다. 이는 형태에 의존하던 기존의 방법과는 다른 새로운 방법을 모색하게 하였다. 그 중에서도 *P. linteus*로 알려진 목질진흠버섯에 대한 동북아 각국의 견해가 조금씩 다르게 나오고 있다. 목질진흠버섯은 중국의 본초강목 중 본초목에 처음으로 소개되었고, 중약대사전에는 말뚝진흠버섯 (*P. igniarius*)가 목질진흠버섯으로 소개되었다. 또한, 1989년에 발표된 중국의 약용진균문헌에는 말뚝진흠버섯 (*P. igniarius*)를 정식으로 상황버섯으로 채택하였다. 그러나, 1975년 발표된 일본의 균류도감에는 *P. linteus*를 상황버섯으로 채택하였으며, 목질진흠버섯(*P. linteus*)와 *P. baumii*가 동일종으로 발표되었다. 하지만 최근 Dai의 발표에 따르면 *P. linteus*와 *P. baumii*가 명확히 다르다고 명시하고 있다.

인공재배된 목질진흠버섯(*P. linteus*)는 1Kg에 3-4백만원에 이르고, 자연산은 이의 2배에 이르는 가격으로 유통되고 있다. 이렇게 비싼 가격에도 불구하고, 이들의 진위여부는 아직까지는 미지수다. 뽕나무의 그루터기에서 자생하므로 상황버섯이라고 알려진 *P. linteus*와 *P. igniarius*가 *Phellinus*속의 균종 중에서도 매우 강력한 종양저지율을 나타내는데, 이들의 자실체 추출물이 각각 96.7% 및 87.4%의 높은 항암능을 나타내는 것으로 보고되어 있고, 또한 이들 버섯 균사체 추출물에 대해서도 항 종양작용, 면역조절 효과 및 임상실험에 의한 안정성이 입증되었으며 각종 산업적인 측면에서의 응용연구가 활발하게 진행되기에 이르렀다. 한편, *Phellinus*속내의 여러 균종에서 제한효소의 전기영동 pattern의 비교로 *Phellinus*속의 종들이 동일 속으로 분류되기에는 대체로 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며, *Phellinus*속이 속해 있는 Hymenochaetaeaceae(소나무비늘버섯)과 내의 유사한 속들을 비교 연구해야 한다고 보고된 적이 있다. 이러한 보고를 바탕으로 본 연구에서는 아직까지 정확하게 분류체계가 확립되어 있지 않은 *Phellinus*속의 계통관계를 명확히 하는 수단으로 rDNA에 대하여 PCR-amplified ITS부위의 sequence를 비교 분석하여, *P. linteus*만이 공통으로 지니는 염기서열 부분을 probe로 개발하여 이들의 신속동정을 가능케 하고자 한다. 따라서, 본 연구는 항암능이 뛰어난 상황버섯만을 선택적으로 선별할 수 있는 전문 선별용 kit를 만들기 위한 연구로서, 이들 종에 대한 유전자 분석을 통하여 종 특이적인 염기서열을

찾아내어 '1차 database' 화하고 이로부터 PCR을 위한 종특이적인 probe를 개발하여 '2차 database' 를 구축하고자 한다. 본 연구에서 확립될 database는 PCR을 이용한 종특이적인 진단 probe개발의 기반이 될 것이며, 이것이 모델이 되어 다른 진균류나 농축산에 중요한 미생물의 database로 확대될 수 있고, 환경미생물과 병원미생물에의 응용은 그 가치가 더욱 높을 것으로 사료된다.

1. 기술적 측면

가. 현재의 기술수준으로는 목질진흙버섯의 진위여부를 그들의 형태적 특징으로 구별하고 있지만 형태적으로 유사한 종들을 구별하는데는 아직까지 확실한 기법이 개발되지 않은 현실이므로 분자유전학적 기술이 절실히 요구되는 시점이다.

나. 이미 병원성 세균을 비롯한 여러 세균류의 분류에서는 분자유전학적 기법을 이용한 계통분류학적인 연구가 활발하게 이루어지고 있을 뿐만 아니라, 이러한 데이터들의 축적에 의해 전체적인 계통 분류군이 확립되고 있는 실정이다.

다. 따라서 유효성이 입증된 rDNA 상의 ITS sequencing data를 축적하고 이들간의 유연관계를 고찰하며, 목질진흙버섯에만 특이적으로 작용할 수 있는 gene probe를 개발함으로써 신속하게 목질진흙버섯을 동정할 수가 있다.

2. 경제·산업적 측면

가. 현재 목질진흙버섯은 국내 재배단지 뿐만 아니라 중국 및 북한으로부터 저가로 수입되어 유통되고 있는 실정이다. 하지만 이들에 대한 정확한 감별이 이루어지지 않아 국내 재배자를 비롯하여 많은 소비자들이 심각한 어려움에 처해있는 실정이다. 그러므로 이에 대한 농림부를 비롯한 정부차원의 종합적인 연구가 수행되어야 할 것이며, 그 피해를 최소화 할 수 있는 적절한 대처방안이 강구되어야 한다.

나. 목질진흙버섯의 신속동정을 위한 gene probe의 개발은 국제경쟁력 제고를 위한 특허 출원에도 일익을 담당할 수 있을 것이다.

다. 목질진흙버섯의 유사종을 감별할 수 있는 PCR이나 southern blotting을 위한 probe의 개발은 여러 면에서 발생할 수 있는 피해를 감소시켜 얻을 수 있는 경제적 측면에서의 이점뿐만

아니라 요즘 심각하게 대두되고 있는 식물 병원성 균들을 신속하게 조기진단 할 수 있는 oligonucleotide probe의 개발로까지 적용이 가능하므로 이 연구로 인한 경제적, 산업적 파급효과는 상당히 클 것으로 확신한다.

3. 사회·문화적 측면

가. 현재 우리나라의 농업계는 매우 어려운 상황에 처해 있다. WTO 체제의 출범으로 수입농산물이 전면 개방되고 있으며, 이로 인하여 농민과 농업계는 심각한 불안감을 가지고 있다.

나. 이러한 상황에서 농업기술개발사업으로 정확한 목질진흠버섯을 농민이 재배할 수 있고, 소비자가 구입할 수 있도록 함으로써 우리나라 버섯농가에 종사하는 농민들에게 일어날 수 있는 피해를 최소화하고, 이에 따라 발생하는 문제를 신속하게 해결해 줄 수 있다는 확신을 심어 줄 수 있다. 또한 전체 농민들이 장래에 희망과 자신감을 갖고 농업에 지속적으로 종사할 수 있는 기반을 마련해 줄 수 있을 것이다.

제 2 장. 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

제 1 절. ITS DNA sequencing

60년대에 Donk가 목질진흙버섯(*P. linteus*)이 속한 Hymenomychetaes(소나무비늘버섯)과에 대하여 형태, 배양조건, 영양생활 등을 조사하여 이들을 분류하고자 하였으나, 스스로 한계에 부딪혀 그 과업을 후대에 남겨 놓았다. 현재 서울대에서는 국내에서 자생하는 균주 및 여러 균주센타에서 분양받은 *Phellinus*속에 관하여 mitochondrial DNA를 이용한 계통분석을 통하여 목질진흙버섯(*P. linteus*)을 동정하려고 하고 있으나, 변이가 적어서 정확한 분류학적인 위치를 찾지 못하고 있으며, 목질진흙버섯(*P. linteus*)을 복합종(complex species)으로 최근에 균학회에서 발표를 하였다. 발표 논문에 따르면 *P. linteus*, *P. baumii*, 및 *P. weirianus*를 복합종으로 명시를 하고 있는데, 1998년 Dai가 발표한 논문에서는 *P. linteus*와 *P. baumii*는 명확하게 다른 종임을 명시하고 있다. 그의 발표에 따르면 *P. linteus*는 열대 및 아열대에서 자생하며, *P. baumii*는 온대지방에서만 자생한다고 발표하였다. 여기서, 또 하나의 의문점은 그럼 현재까지 유통된 우리나라의 모든 *P. linteus*(목질진흙버섯)는 모두 가짜인가 하는 것이다. 이렇듯 많은 사람이 이러한 논란에 대하여 실험을 하고 있으나, 정확한 그들의 분류학적인 위치는 애매 모호하다.

본 실험실에서는 미국 ATCC 균주와 우리나라 자생종 및 여러 균주센타에서 분양 받은 균주의 Internal transcribed spacer 1, 2와 5.8S rDNA를 비교하였을 때 현재 우리나라에서 재배되는 균주 중에서 일부분이 목질진흙버섯(*P. linteus*)의 염기서열과 일치함을 알 수 있었다. 현재 본 실험실에서는 목질진흙버섯을 감별해내기 위한 연구를 수행하여 특정부위의 DNA를 cloning하여 GenBank에 등록하고, 이들의 감별을 위한 균종 간 특이적인 염기서열을 확보하여 database를 확립하는 중에 있다. 이와 더불어 현재까지의 축적된 기술을 바탕으로 ITS 부위보다 변이율이 높은 부위를 탐색하여 훨씬 신뢰도가 높은 gene probe를 개발하는데 노력하고 있으며, 개발된 gene probe를 특정 종을 신속하게 동정하기 위한 탐침으로 개발하기 위하여 최선을 다하고 있다.

기존에 알려진 유전자에 관한 정보만으로는 이들 상황버섯에 대한 특정 유전자나 특정 부위에 국한된 염기서열의 특이성을 이용하여 간편하고 정확한 probe를 만들기는 쉽지 않다. 따라서 이러한 한계를 극복하여 실제 자연상태나 소비자가 구입시에 손쉽게 확인할 수 있는 oligonucleotide probe를 제작하기 위해서는 기초연구로서 적절한 목표유전자나 염기서열 부위에 대한 풍부한 *Phellinus*속의 유전자 구조(염기서열)의 정보가 축적되어 database화되고 이를 바탕으로 컴퓨터에 의한 분석과정을 거쳐서 유용한 염기서열을 발굴하여 이들을

역시 database하며, 이 database를 기반으로 이러한 유전자 탐침의 개발이 진행되어야만 한다.

제 2 절. 앞으로 전망

이제까지 버섯의 분류는 형태적 특징에 근거한 것으로 화학적 분류나 분자생물학적 수준의 계통분류가 아니므로 목질진흠버섯(*P. linteus*)의 분류와 동정이 용이하지 못하였다. 본 실험실에서는 1996년부터 계속해서 목질진흠버섯(*P. linteus*)의 계통분석을 연구하기 위해서 ribosomal DNA sequencing을 수행하여 오고 있다. 그 과정에서 현재 우리나라에서 유통되고 있는 많은 목질진흠버섯과 북한산, 중국산에 목질진흠버섯(*P. linteus*)이 아닌 이와 유사한 종이나 변종이 유통되고 있음을 확인하였다. 따라서, 본 실험에서는 외국 및 국내의 균주센터에서 다양한 균을 확보하고, 또한 우리나라와 아시아에서 유통되고 있는 목질진흠버섯을 확보하여, 유전형 감별을 위하여 Internal Transcribed Spacers(ITS) 부위를 PCR로 증폭하여 cloning하여 확보한 뒤, 이를 염기서열 분석하여 염기서열을 database화 하고자한다. 본 연구에서 database화 하고자 하는 ITS 지역은 ribosomal operon에 속하며, 18S rDNA와 28S rDNA 사이의 약 600-800bp 지역이다. 이 부위는 기존의 연구에서 많이 연구되어 있는 18S rDNA보다 다형성이 풍부하여 최근 유전형감별을 위한 목표지역으로 주목을 받고 있지만 아직 연구가 초기단계이므로 ITS가 밝혀지지 않은 중요한 균주들이 많아서 본 연구에서 최초로 cloning하여 특허화하고 GenBank에 보고할 경우 특허권을 주장할 수 있을 가능성이 매우 높다. 또한, 무엇보다도 유사종에 대한 약리, 병리학적인 효과가 밝혀져 있지 않으므로, 이러한 분류학적인 체계를 기반으로 하여 목질진흠버섯(*P. linteus*)와 유사종에 대한 약리, 면역학적인 연구기반을 마련하고자 한다. 또한 이러한 database로부터 획득되어진 gene probe를 활용한 정확한 신속동정법의 개발은 일반 연구실 단위에서 손쉽게 목질진흠버섯을 종수준의 동정을 가능하게 할 것이다.

제 3 절. 기술도입의 타당성

목질진흠버섯과 유사종에 대한 유전자 감별 진단법은 아직까지 세계적으로 연구가 실시된 예가 없으며, 현재 우리나라의 과학기술만으로도 신속동정용 probe의 개발이 충분히 가능하므로 외국으로부터의 기술도입보다는 우리 기술을 하루 빨리 개발하여 특허화 할 필요가 있다. 이러한 시도는 국내 농업의 안정적 발전과 버섯 재배자 및 소비자들의 안정적인

수요 및 공급을 유도할 수 있고, 또한 이러한 기술을 바탕으로 다른 응용분야로의 기술도입이 용이하므로 기술향상의 측면에서도 중요할 것으로 사료된다. 이 과제에 성공으로 수입농산물과 국내농산물을 구별해야하는 여러 농산물 검사에 유용하게 이용될 수 있는 기초기술을 확립하게 된다. 그 결과 우리 농가를 보호하고 우리나라 농업을 보호할 수 있다. 또한 이와 관련된 분야의 실무자들은 필수 불가결한 개발분야임을 실감하고 있는 만큼 관련제품의 대한 발전가능성은 예측하기 힘들 정도로 잠재성이 높은 개발 분야라 할 수 있다. 전세계적으로 유용한 벼나 배추와 약용식물 등의 주요 농작물의 유용 유전자를 확보하려는 각축전을 벌이고 있는 상황에서 목질진흙버섯을 비롯한 유용작물의 유전자를 확보하여 특허권 등의 우선권을 확보하여 국가적으로도 지적재산권을 확보할 수 있어 이러한 산업에서의 우위를 확보할 수 있을 것으로 예상된다. 현 상황에서 이러한 분야에 연구투자를 게을리 한다면 기술낙후뿐만 아니라 우리나라의 유용한 농작물 등의 자원 소유권을 빼앗기게 될 수도 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 연구에서 사용된 *Phellinus* 속의 종들을 Table 1에 나타내었다. 총 25균주의 *Phellinus* 종들이 American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, U. S. A.), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, Netherlands), the Institute for Fermentation (IFO; Osaka, Japan) and Korea Collection for Type Cultures (KCTC; Dae-Jeon, Korea)에서 준비되었다. *P. linteus* (MPNU7001 and MPNU7002)와 *P. baumii* (MPNU7004 and MPNU7005)의 4균주는 본 연구실에서 직접 분리한 것이다. 배양에 필요한 배지와 조건은 ATCC, CBS, IFO and KCTC catalogues에서 제시된 대로 실험하였다.

2. 배양과 DNA 추출

각각의 균주 센터에서 분양 받은 균주를 Potato-Dextrose Agar (PDA; 0.4% potato extract, 2% dextrose, 1.5% agar)배지에서 충분히 배양해서 colony를 Potato-Dextrose Broth (PDB; 0.4% potato starch, 2% dextrose)배지로 옮겨 계속 배양했다. 2-3주 후 mycelia가 플라스크에 가득 자라면 dehydration시킨 후 -70°C 에 보관했다.

Phellinus 종으로부터 total chromosomal DNA를 추출하기 위해서 benzyl chloride 방법과 extraction kit (Bioneer co.)방법을 사용했다. 첫 번째 방법은 extraction buffer [100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM EDTA], benzyl chloride and 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)를 처리해서 cell lysis 시켰다. 여기에 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)을 처리해서 단백질을 제거하고, ribonuclease를 처리해서 RNA를 제거한 후 ethanol precipitation과정을 거쳐서 농축했다. 두 번째 방법은 제조(Bioneer Co.) manual에 따라 실험을 수행했다.

Benzyl chloride 방법은 높은 농도의 chromosomal DNA를 얻을 수 있었지만, 몇 가지 문제가 있었다. 대부분의 *Phellinus* 종들이 mycelia 성숙에 있어서 pigment가 나타나고, 이 pigment가 primer의 chromosomal DNA로의 binding을 방해해서 PCR amplification이 되지 않아 product를 얻기가 쉽지 않았다. 또한, benzyl chloride 방법은 negative extraction method로 chromosomal DNA를 중심으로 다른 성분들을 하나씩 제거하는 방법이기 때문에

Table 1. List of *Phellinus* species used in the nucleotide sequence analyses

Strains*	Species	Accession no.(18S)	Accession no. (ITS)
ATCC 26710	<i>P. linteus</i>	AY178007	AF153010
IFO 6989	<i>P. linteus</i>	AY178008	AF200226
CBS 454.76	<i>P. linteus</i>	AY178009	AF082101
MPNU 7001	<i>P. linteus</i>	AY178010	AF200227
MPNU 7002	<i>P. linteus</i>	AY178011	AF200228
MPNU 7004	<i>P. baumii</i>	AY178012	AF200229
MPNU 7005	<i>P. baumii</i>	AY178013	AF200230
CBS 618.89	<i>P. weirianus</i>	AY178014	AF110989
ATCC 60051	<i>P. johnsonianus</i>	AY178015	AF250931
ATCC 26713	<i>P. rhabarberinus</i>	AY178016	AY189698
ATCC 12240	<i>P. pini</i>	AY178017	AF250930
ATCC 26729	<i>P. gilvus</i>	AY178018	AF250932
KCTC 6228	<i>P. igniarius</i>	AY178019	AF056192
KCTC 6229	<i>P. laevigatus</i>	AY178020	AF053226
CBS 213.48	<i>P. nigricans</i>	AY178021	AF200239
KCTC 6651	<i>P. biscuspidatus</i>	AY178022	AY189699
KCTC 6652	<i>P. ferruginosus</i>	AY178023	AY189700
KCTC 6657	<i>P. robustus</i>	AY178024	AY189701
KCTC 6658	<i>P. spiculosus</i>	AY178025	AY189702
KCTC 6659	<i>P. tremulus</i>	AY178026	AY189703
KCTC 16881	<i>P. pomaceus</i>	AY178027	AY189704
KCTC 16883	<i>P. pectinatus</i>	AY178028	AY189705
KCTC 16884	<i>P. chrysoloma</i>	AY178029	AY189706
KCTC 16888	<i>P. ribis f. ulicis</i>	AY178030	AY189707
KCTC 16890	<i>P. igniarius</i>	AY178031	AY189708

* American Type Culture Collection, Manassas, USA (ATCC)

Institute for Fermentation, Osaka, Japan (IFO) Korean Collection for Type Culture (KCTC)

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Micro. lab. of Pusan National Uni. (MPNU)

확인되지 않은 다른 성분들에 의해서도 추출과 PCR증폭에 있어서 방해요인으로 작용했다. extraction kit (Bioneer co.)방법은 benzyl chloride방법보다 높은 농도의 chromosomal DNA를 얻을 수는 없었지만, positive extraction method로 chromosomal DNA이외의 다른 성분들을 wash해서 정제된 chromosomal DNA를 추출했다.

3. Primers와 PCR 증폭

가. ITS 부위 (ITS1 and ITS2) 와 5.8S rDNA의 universal primers를 보존적 영역의 18S의 끝 부위와 28S의 앞 부위 (White *et al.*, 1990)에서 각각 PCR증폭을 위해서 design 했다 (Fig. 1).

Sense (ITS5F); 5'-ggaagtaaaagtggtaacaagg-3' (22mer)

Anti-sense (ITS4R); 5'-tcctccgcttattgatatgc-3' (20mer)

나. Partial 18S rDNA universal primers (Ito and Hirano, 1997)가 *Saccharomyces cerevisiae* 1284-1306 and 1766-1785위치에서 rDNA의 18S 보존적 영역으로부터 design 되어졌다(Fig. 1). Design된 primer는 25균주의 *Phellinus*종들에서 추출된 chromosomal DNA로 reactivity가 test되어졌다. primers sequences는 다음과 같다.

Sense (18SF); 5'-gttggtggagtgattgtctgc-3' (22mer)

Anti-sense (18SR); 5'-taatgatcctccgcaggtt-3' (20mer)

다. PCR reaction (Gene Amp PCR System 2400 Perkin-Elmer)을 20 μ l의 PCR PreMix (Bioneer Co.; 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 μ M dNTP, 1 unit of Taq polymerase, stabilizer and tracking dye)로 20 pM 의sense and anti-sense primers를 첨가해서 수행했다. PCR 조건은 다음과 같다. : Pre-denaturing at 94°C for 5 min, denaturing at 94°C for 1 min, annealing from 43°C to 55°C for 1 min, extension at 72°C for 1min, post-extension, 30 cycles. PCR products는 2.0% agarose gel에서 전기 영동을 통해서 확인했다. Gel bands가 QIAGEN gel elution kit (Qiagen, Wartworth CA)를 사용해 정제했다.

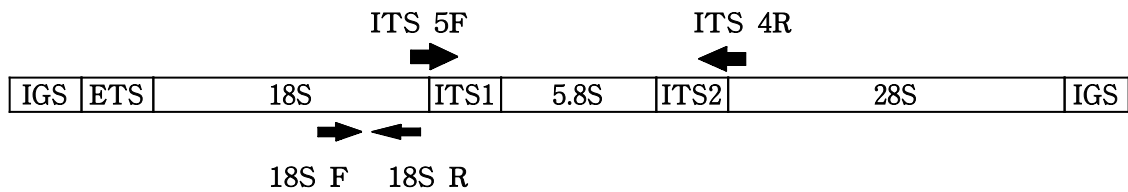


Fig. 1. Location and orientation of primers for ITS and 18S partial site. The gray arrows are sense and anti-sense ITS primers. The white arrows are partial 18S sense and anti-sense primers

4. DNA sequencing

DNA sequencing reactions이 Bigdye Terminator Cycle DNA sequencing v2.0 Kit (PE Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., Branchbrug, New Jersey, U. S. A)를 사용해서 수행했다. Nucleotide sequence가 ABI 377 fluorescent DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., Branchbrug, New Jersey, U. S. A)와 ABI 310 auto DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., Branchbrug, New Jersey, U. S. A)를 통해서 분석했다. ITS1, 2와 5.8S부위의 염기 서열분석을 통해 sequence alignment를 이용하여 *Phellinus*속 25군주의 염기서열을 비교했다 (Fig. 2). 또한 18S에서도 *P. linteus*를 포함한 근연종들의 염기서열 비교를 Fig. 3에 나타내었다.

```

6989_ITS_ -----G-----C--GG
7002_ITS_ -----G-----C--GG
7001_ITS_ -----G-----C--GG
26710_ITS_ -----T-----C-----
16890_ITS_ -----CACAGT--GAA--T--CTGCGG
454.76_ITS_ -----TAG-GT--GAA--C--CTGCGG
60051_ITS_ -----AA--G--GA-----T-----
26713_ITS_ -----GAATC-AAACTTTCGGCAC-GT--GAA--TTT-T-C--GG
7004_ITS_ -----G--CGGAA--G--GA--T-----
7005_ITS_ -----G--CGGAA--G--GA--T-----
618.89_ITS_ -----G-T--A--G--GT--GAAC--TG--C--GG
12240_ITS_ -----A--A--G--GA-----T-C-----
16884_ITS_ CGTCCTCCGCGGG-----A--G--GA-----C-C-----
26729_ITS_ -----A--A--G--GA-----T-C-----
6652_ITS_ -----A--A--GTC--GAA--TTTTT-C--GG
16883_ITS_ -----CACCT--A--GTC--GAA--TC--TGC--GG
213.48_ITS_ -----GC--GG-----
6228_ITS_ -----GTA--G--GT--GA--ACC--TGC--GG
6229_ITS_ -----
16881_ITS_ -----CAT-----GT--GA--ATC--TGC--GG
6659_ITS_ -----ACTT-----TTCCGACCTT--CATC--CGC--GG
6658_ITS_ -----C-T-----TC--A-----GC--GG
6651_ITS_ -----CTT-----TCGGACCCTTGCTTC--TGC--GG
16888_ITS_ -----TTCCAC-----ACGGT--GA--TCC--TGC--GG
6657_ITS_ -----GCCGA-AT--A--GTC--GAA--TCT--TGC--GG
      . . . . . * . . ** . . . . # **

6989_ITS_ AAGGATC-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
7002_ITS_ AAGGATC-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
7001_ITS_ AAGGATC-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
26710_ITS_ -A-----T-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
16890_ITS_ -AGGAAC-T-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
454.76_ITS_ AAGGATC-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
60051_ITS_ -----C-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
26713_ITS_ AAGGAAC-AC-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-GG---
7004_ITS_ -----C-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
7005_ITS_ -----C-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AA---GC-G---AG-A---
618.89_ITS_ AAGGATC-AT-TA---TCGAGTT-TTG-A-AAGCGCGC-G---AG-A---
12240_ITS_ -----AT-TA---TC-GAGTT-TTT-A-AAA---TC-G---AG-GG---
16884_ITS_ -----AA-TA---TC-GAGTT-TTT-A-AAA---TC-G---AG-GG---
26729_ITS_ -----AT-TA---TT-GAATT-TT-----GA--AGCGGGG
6652_ITS_ AAGGAAC-AC-TA---TACGAGTT-TT-----GT--AGTGGGT
16883_ITS_ AAGGAAC-AT-TACCTA-GAGTT-T-----GT--AG-----
213.48_ITS_ AAGGATC-AT-TA---ATGAATT-T-G-A-AAG---GC-G---AG-GG---
6228_ITS_ AAGGATC-AT-TA---ATGAATT-T-G-A-AAG---GC-G---AG-GG---
6229_ITS_ AAGGATC-AT-TA---ATGAATT-T-G-A-AAG---GC-GG--AG-G---
16881_ITS_ AAGGAAC-C-ATA---ATGAATT-TTG-A-AAG---GC-G---AG-GG---
6659_ITS_ GAGGATC-ATATA---ATGAATT-TTG-T-AAC---GC-A---AG-GG---
6658_ITS_ GAGGACC-ATATA---ACGAGTT-T-GTA-AAC---C-GT--AC--GG---
6651_ITS_ GAGGATC-ATATA---ATGAGTT-T-GTA-AAG---C-G---G--GG---
16888_ITS_ AAGGAACTA--TA---ACGAGTTGT-G-A-AAG---C-GG--AGT---
6657_ITS_ -AGGAACCA--TA---ACGAGTT-----AGAA-----CGGTGGAG-G---
      :****. # ## ## . . ##. ## *** # ##. *# # ## : :

```

Fig. 2. Sequence alignments of 5.8S include ITS1 and ITS2 ribosomal DNA sequences of *Phellinus* species. Clustal G (1.1) multiple sequence alignment programs was used. A hyphen represents a gap and four characters, '#', '*', ':', '.', indicate positions that are 80%-100%, 60%-80%, 40%-60% and 20%-40% identical, respectively.

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ITS_  ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
7002_ITS_  ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
7001_ITS_  ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
26710_ITS_ ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
16890_ITS_ ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
454.76_ITS_ ---CCT-GCTGCTGGTG---C---GA-----AATC-----
60051_ITS_ ---CTT-GCTGCTGGCG---C---G---A-----ATTTTTTAAATT
26713_ITS_ ---CTT-GCTGCTGGCG---C---G---G-----ATTT-----
7004_ITS_  ---CTT-GCTGCTGGCG---C---GAATGA-----ATTT-----
7005_ITS_  ---CTT-GCTGCTGGCG---C---GAATGA-----ATTT-----
618.89_ITS_ ---CTT-GCTGCTGGCG---C---GA-----AATC-----
12240_ITS_ ---CTT-GATGCTG---G---CG-TG---GAAA-C---A---C-----
16884_ITS_ ---CTT-GA-GCTG---G---CG-TG---GAAA-C---A---C-----
26729_ITS_ CT-CTT-GA-GCTG---G---CACTG-----C---A-----
6652_ITS_  -TGCTT-GA-GCTG---G---CATTG-----C---A-----
16883_ITS_  -----A---CT-----T-----C-----
213.48_ITS_ ---CTT-GATGCTGGCG---C---G---G---A---G---A---C-----
6228_ITS_  ---TTT-GATGCTGGCG---C---G---G---A---G---A---C-----
6229_ITS_  ---CTT-GATGCTGGCG---C---G---G---A---A---A---C-----
16881_ITS_ ---CTT-GATGCTGGCG---C---G---G---A---G---A---C-----
6659_ITS_  ---CTT-GACGCTGGCG---C---G---G---A---A---A---C-----
6658_ITS_  ---CTT-GATGCTGGTGAAGTCT-TG---GTTA-CITTA---C-----
6651_ITS_  ---CTTCGA-GCTG---G---C---G---G---A---A---A---C-----
16888_ITS_ ---CT---GCTGCTG---G-----TGTA-G---A---A---ATGC-----
6657_ITS_  ---TT-GATGCTG---G-----TGC-----ATAT-ATTT-----
### # :######.# # .#. : :. #. :.

6989_ITS_  -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
7002_ITS_  -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
7001_ITS_  -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
26710_ITS_ -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
16890_ITS_ -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
454.76_ITS_ -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
60051_ITS_ TGCGCATG--TG-C-AC-G-GC-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
26713_ITS_ -GCGCATG--TG-C-AC-G-GT-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
7004_ITS_  TGCGCATG--TG-C-AC-G-GC-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
7005_ITS_  TGCGCATG--TG-C-AC-G-GC-C-TTCG-CG-CT---CA-AA
618.89_ITS_ -GCGCATG--TG-C-AC-G-GTT-C-CTCG-CG-CT---CA-AA
12240_ITS_ -GCA-CTG--TG-C-TC-G-GC-C-T---T-CG---TG---CTTAA
16884_ITS_ -GCA-CTG--TG-C-TC-G-GC-C-T---T-CG---TG---CTTAA
26729_ITS_ -G-----G-TG-C-TCA-GAGC-C-T---C-CA---T---TC---A
6652_ITS_  -G-----G-TG-C-TC-G-GCGAC-T---A-CA-CTCTCTC---A
16883_ITS_  -G-----G-T-C-T---GC-----T---A-C-----C---
213.48_ITS_ -GCGGATG--TG-C-AC-G-GC-C-CTT-GT-C---CT---C---AA
6228_ITS_  -GCGGATG--TG-C-AC-G-GC-C-CTT-GT-C---CT---C---AA
6229_ITS_  -GCGGATG--TG-C-AC-G-GG-C-TTCGT-C---CT---C---AA
16881_ITS_ -GCGGACG--TG-C-AC-G-GC-C-CTT-GT-C---CT---C---AA
6659_ITS_  -GCGGATG--TG-C-GC-G-GC-C-CTT-GT-C---CT---C---AA
6658_ITS_  -GC---ATG--TG-C-AC-G-G---C---TT-GT-CGTACT---C---AA
6651_ITS_  -GC---ATG--TG-C-AC-G-GC-C-C---CG---CG---CT---C---AA
16888_ITS_ -GC---ATG--TG-C-AC-G-GCT-C-T---GTGC---T---C---AA
6657_ITS_  -GT---TGATGTCGTACATGTGCT-CACCT--T-CACACT---CTTCA
###*.### ## # *# # #. # .##*: ** ## #: ##
```

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ITS_  --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
7002_ITS_  --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
7001_ITS_  --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
26710_ITS_ --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
16890_ITS_ --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
454.76_ITS_ --TTAG--T--AGC-----C--TG--A-----G----
60051_ITS_ --TTAG--T--AGT-----C--TG--A-----G----
26713_ITS_ --TTAG--T--AGT-----C--TG--A-----G----
7004_ITS_  --TTAG--T--AGT-----C--TG--A-----G----
7005_ITS_  --TTAG--T--AGT-----C--TG--A-----G----
618.89_ITS_ --TTAG--T--AGT-----C--TG--A-----G----
12240_ITS_ --TT--G--ACTTTGTAGTAGTGTTC--G--A--C--GCGAAA
16884_ITS_ --TT--G--ACTTTGTAGTAGTGTTC--G--A--C--GCGAAA
26729_ITS_ --TT--G--GGTA-----C--GG--A-----GCA--
6652_ITS_  --TT--G--AAT-----C--G--A-----GT--
16883_ITS_ --TT--T--CCT-----C--G-----GCG--
213.48_ITS_ --TTAG--T--AGT-----C--G--A-----GA--
6228_ITS_  --TTAG--T--AGT-----C--G--A-----GA--
6229_ITS_  --TTAG--T--AGT-----C--G--A-----AA--
16881_ITS_ --TTAG--T--AGT-----C--G--A-----GA--
6659_ITS_  --CTAG--T--AGT-----C--G--A-----GG--
6658_ITS_  --TTAG--T--AGT-----CC--G--ATCTCTGTTGGTTG--
6651_ITS_  --GGAGGCA--AGT-----C--GTTTATC--CT--TAGG--
16888_ITS_ CCTTAG--TGAGTAAGG-----C--G--A-----GCGT--
6657_ITS_  --TTG--TTATT--C-----CTTGTT--AG-----AAGCG--
###*###      #:# # # #

6989_ITS_  --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TTAG
7002_ITS_  --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TTAG
7001_ITS_  --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TTAG
26710_ITS_ --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TCAG
16890_ITS_ --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TTAG
454.76_ITS_ --G--T-----C--T-----TGTAAGTAA--TCAG
60051_ITS_ --G--T-----C--T--C--GT--CGTAAGTAAATTAG
26713_ITS_ --G--GT-----C--TGC--CT--TGTAAGTAA--TTAG
7004_ITS_  --G--T-----C--TGT--CT--TGTAAGTAA--TGAG
7005_ITS_  --G--T-----C--TGT--CT--TGTAAGTAA--TGAG
618.89_ITS_ --G--T-----C--T-----TGCAAGTAAATCAG
12240_ITS_ CTATG--GT--C-----GGCCT--TG--GCTGG--G-----A--TC--
16884_ITS_ CTATG--GT--C-----GGCCT--TG--GCTGG--G-----A--TC--
26729_ITS_ C--G--GTT--CA--TTTCCTTT--TT--G--G--G--
6652_ITS_  --T--GT--CA--TGAC--T--CT--G--A--
6652_ITS_  --G--GTC--C-----GCCCG-----CC--G--A--TT--
16883_ITS_ --G--ACG--AA--CA--C--T--TA--CG--GG--A--TTG--
213.48_ITS_ --G--GCG--AA--CA--C--T--TG--CG--GG--A--CTG--
6228_ITS_  --G--AC--AA--AAGC--T--TA--CG--C--A--TTG--
6229_ITS_  --G--ACG--AA--GGC--T--TG--CG--G--A--TCG--
16881_ITS_ --G--GCG--AA--AGC--T--TA--CG--G--A--TCG--
6659_ITS_  --G--GTG--AA--AGC--G--CGC--GT--A--TA--
6658_ITS_  --G--ATG--AA--CA--C--T--TAAT--TCTCTTG--A--ACGG
6651_ITS_  --GTGTGAGCACCAGTAGCC--TGAAGCGAGC--GTCTTTCA--TT--
16888_ITS_ --GGGTG--A--C--CCT--T--TCTG--GC--A--TTA--
#:#. .: .#.#. #. *. :#:::## #:::
```

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
7002_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
7001_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
26710_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
16890_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
454. 76_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
60051_ ITS_ -AAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
26713_ ITS_ --A-----CTT-----CGG--CT--TG----TCG--
7004_ ITS_ -AAA-A-T---CA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
7005_ ITS_ -AAA-A-T---CA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
618. 89_ ITS_ GAAA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
12240_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
16884_ ITS_ --AA-A-T-G-AT-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
26729_ ITS_ --AA-AGT-CTAA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6652_ ITS_ AAAA-AGT--TAA--TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
16883_ ITS_ ATAATAGT-----TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCA
213. 48_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6228_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6229_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
16881_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6659_ ITS_ --AA-A-T-G-AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6658_ ITS_ --AA-A---G-T---TACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6651_ ITS_ --AA-A-T---AATATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
16888_ ITS_ --AA-A-T---AA-ATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
6657_ ITS_ --AA-A-TACAAATATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
:## # # . ## #####

6989_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
7002_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
7001_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
26710_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
16890_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
454. 76_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
60051_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
26713_ ITS_ -----TT-----ATT-
7004_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
7005_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
618. 89_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
12240_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
16884_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
26729_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6652_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
16883_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
213. 48_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6228_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6229_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
16881_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6659_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6658_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6651_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
16888_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
6657_ ITS_ TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
#####
```

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
7002_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
7001_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
26710_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
16890_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
454.76_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
60051_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
26713_ITS_ -----TTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
7004_ITS_ --C--TT---TCTTTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
7005_ITS_ --C--TT---TCTTTA-ATTG--A---AGGGCTT--GA--GGT---T
618.89_ITS_ --C--TT---TC-TTA-ATTGTGA---AGGGCTT--GA--GGT---T
12240_ITS_ --C--TTG---C-TTG--TA--A---AGG-CT-C-G--GG-GC-T
16884_ITS_ --C--TTG---C-TTG--TA--A---AGG-CT-C-G--GG-GC-T
26729_ITS_ --C--TTGATTTT-TT--TTG--A---A---T-C-GCTTGA-G--T
6652_ITS_ --A--TTGATTTT-TT--TTG--A---A---T-A-A--GA---T
16883_ITS_ --C--T-G---C-TT-----G--G-----
213.48_ITS_ --CC--TTG--T--TT--GTT--A---A--CT-C-G--GGTGTGT
6228_ITS_ --CC--TTG--T--TT--GTT--A---A--CT-C-G--GGTGTGT
6229_ITS_ --C--TTG--T--TT--CTT--A---A--CT-C-G--GGTG--T
16881_ITS_ --C--TTG--T--TTT--CTT--A---A--CT-C-G--GGCG--T
6659_ITS_ --C--TTG--T--TTT--CTT--A---A--CT-C-G--GGCG--T
6658_ITS_ --CC--TTG--T--TTTTGTT--A---A--CT-CGG--GGTG--T
6651_ITS_ --CC--AAG--TC-TT--TT--ATTTGA--CT-C-G--GG-GTAT
16888_ITS_ AGCCTCTTG-----TTAGGTT-----T--G--GATGGTT
6657_ITS_ --C--TT---T--TT--CTT--A---A---TTGAAGAA-GGGGC-T
#.#:#:#*##:##:# #:#:##:#:#:#:#:#

6989_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
7002_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
7001_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
26710_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
16890_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
454.76_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCG
60051_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTTTACTG-CTGG--CGC--C-T---TTCT
26713_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTTTACTG-CTGG--CGC--C-T---CITTCT
7004_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGGC-CGC--C-T---TTCG
7005_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGGC-CGC--C-T---TTCG
618.89_ITS_ TGGACTTGGAG-G---TTT--ACTG-CTGGGCCGC--C-T---TTCG
12240_ITS_ TGGATTTGGAG-GT---T-T-A-TG-CGG--C-C-TGCTT--C-ATTG
16884_ITS_ TGGATTTGGAG-GT---T-T-A-TG-CGG--C-CCTGCTT--C-ATTG
26729_ITS_ TGGATTTGGAG-GTT--TCT--A-TG-CTGG--C-C--C-T-C-A-CG
6652_ITS_ TGGAGTTGGAG-G---CCT--T-TG-CTGG--T-T--CGT--C-T-TG
16883_ITS_ TG---TTGG-GTG-----T-T-TGTCTG---C--C-T-C-TGG
213.48_ITS_ TGGACTTGGAA-G-----T---TG-CTGG--C-CC--C-TCCC-T-TG
6228_ITS_ TGGACTTGGAA-G-----T---TG-CTGGT-C-CC--C-T---T-TG
6229_ITS_ TGGACTTGGAG-G-----T---TG-CTGG--C-CC--CAT---T-TG
16881_ITS_ TGGACTTGGAA-G-----T---TG-CTGG--C-CC--C-T--C-T-CG
6659_ITS_ TGGACTTGGAA-G-----T---TT-CTGG--C-CC--C-T--C--CG
6658_ITS_ TGGACTTGGAG-G-----TTCA-TG-CTGG--C-TCTAC-T---T-TT
6651_ITS_ TGGACTTGAAG-G-----T---TG-CTGGT-C-CCC-CCT-----TG
16888_ITS_ TGGACTTGGAG-G-----CTT-T-TG-CTGGTGTGCGTGC-T--C-TGGC
6657_ITS_ TGGACTTGGAG-GATAATATACA-TG-CTGG-----T--AC-T-----G
##### # *#*## #### #:#. # # :*:.#
```

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ITS_ ---A-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
7002_ITS_ ---A-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
7001_ITS_ ---A-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
26710_ITS_ ---A-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
16890_ITS_ ---A-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-CT
454.76_ITS_ ---A-----TGGGT---CCGCCTC-CTCT--T-ATATACA-TTA-GCT
60051_ITS_ TCGA-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
26713_ITS_ -CAAAAAT--GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
7004_ITS_ --AAG-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
7005_ITS_ --AAG-----GGGGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
618.89_ITS_ ---A-----GTGGT---CGGC-TC-TTCT--T-AAATGCA-TTA-GCT
12240_ITS_ -----TCAGTTGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAATGCA-TTA-GCT
16884_ITS_ -----TC-GTTGT---CGGC-TC-CTCT--T-AAACGCA-TTA-CT
26729_ITS_ G---ATC---G---G-C-TC-CTCT--T-AAATACA-TTA-GCT
6652_ITS_ A---ATC---G---G-C-TC-CTCT--T-GAATGCA-TTA-GCT
16883_ITS_ -----T---GT---AGAC-TCGC-CT--T-AAA-ACAATTG-GC-
213.48_ITS_ -----T-G-GT---CGGC-T-CT-TCTT-AAATGTA-TTA-GCT
6228_ITS_ -----T-G-GT---CGGC-T-CT-TCTT-AAATGCA-TTA-GCT
6229_ITS_ -----T-G-GT---CGGC-T-CT-TCTT-AAATGCA-TTA-GCT
16881_ITS_ -----CC-G-GT---CGGC-T-CT-TCTT-AAATGTA-TTA-GCT
6659_ITS_ -----C-G-GT---CGG--T-CT-TCTT-AAATGCA-TTA-GCT
6658_ITS_ -----T-G-GTCAACCGGT-T-CT-T-T-AAAGGTA-TTAAGCT
6651_ITS_ -----T---GAC---CGGC-TC-CT-T-TGAAATGTA-TTA-GCT
16888_ITS_ -----T-GT-GT---CGGC-TC-C-TC-TGAAAAGCA-TTA-GCT
6657_ITS_ -----TC---TGAT---CGGC-TC-C-TC-TCAAATGCA-TTA-GCT
: : * : : ## ##### *# #### .# ##### :## ### ###
6989_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
7002_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
7001_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
26710_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
16890_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGG-GT---AATAGTTGAT-TCCAT
454.76_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
60051_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
26713_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
7004_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGCTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
7005_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGCTT---A-CGGTGT---AATAGTTGAT-TCCAT
618.89_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCGTTT---A-CGGTGC---AAC-GT--A-----AT
12240_ITS_ GGACTTTGGT-CT-GCG--TGT---TGGTGTG-A-TAGTT----TA--T
16884_ITS_ GGACTTTGGT-CC-GCG--TGT---CGGTGTG-A-TAGTT----TA--T
26729_ITS_ GAGCTTT--TACT--TGA-TGCAA-TGGTGT---AATAATT-A--TC--T
6652_ITS_ GGGCTTA--TGCT--CGA-TGCAA-CAGTGT---AATAATT-G--TT--T
16883_ITS_ -AGC-----C---G---GC---GT---A-T--TG-A-T---T
213.48_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCG-CTG-AA-CGGTGT---AATAGTA-G--TC--T
6228_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCG-CTG-AA-CGATGT---AATAGTA-A--TC--T
6229_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCG-TTG-AA-CGGTGT---AATAGTA-A--TC--T
16881_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCG-TTG-AA-CGGTGT---AATAGTA-A--TC--T
6659_ITS_ GGGCTTTG--GCTCGCG-TTG-AA-CGGTGT---A-TAGTA-A--TC--T
6658_ITS_ GGCCTTTG--GCTCGCG-TT--AACCAGGTGTG--A-TAGTA-A--TC--T
6651_ITS_ GGACTTTG--ACTCGCGTTTGTTA-CGGTGT---AATAGTA-A--C--T
16888_ITS_ GGACTTTG--GTTTGCG--CG-AA-TGGTGT---AATAGTA-ACGTG--T
6657_ITS_ GGACT-----G-T---A---GT-TGCA-TCGT-----T
##.##### *#####*#: .# ##### *##### .#: *#:#
```

(Next page continued)

(Fig. 2. Continued)

```
6989_ITS_ -----ACCT-CCT-----TCT--TGA-----C-----
7002_ITS_ -----ACCT-CCT-----TCT--TGA-----C-----
7001_ITS_ -----ACCT-CCT-----TCT--TGA-----C-----
26710_ITS_ -----
16890_ITS_ -----
454.76_ITS_ -----ACCT-CCT-----TCT--TGA-----C-----
60051_ITS_ -----G-TTATCT-CCTT-----TTTGTGA-CAC-CCCTT-G-
26713_ITS_ T-----G-TTAACTACCTT-----TCTACT-A-AACGTCCATT-GT-
7004_ITS_ -----G-TTACCT-CCTT-----T-T-T-----C-TT-GAC
7005_ITS_ -----G-TTACCT-CCTT-----T-T-T-----C-TT-GAC
618.89_ITS_ -----CCT-----
12240_ITS_ A-----G-----C-C-TT-----CT--TGA-----C-T-C-TTTG-
16884_ITS_ A-----G-----C-C-AT-----GT--TGA-----TGC-TT-GT-
26729_ITS_ AGAAAAAGG-GCAAC-C-TTTC--T-CTT-TGAC--TC-T-C-TT-G-
6652_ITS_ -----GG-G-AACA-C-TT-CGTT-CTC-TGA--TC-T-C-TTTG-
16883_ITS_ A-----G-T-ACA--TT-----TT-T-AC--AC-T-C-TT-G-
213.48_ITS_ -----G-TCG-C-C-TTC--A-TT--TGAC--AC-C--TT-G-
6228_ITS_ -----G-TCG-C-C-TTC--A-TT--TGAC--AC-C--TT-G-
6229_ITS_ -----G-TCG-C-C-TTC--A-CT--TGAC--AT-C--TT-G-
16881_ITS_ -----G-TTA-C-C-TTC--A-CT--TGAC--AC-C--TT-G-
6659_ITS_ -----G-TTG-C-CCTT--A-CT--TGA--AC-
6658_ITS_ -----G-T-GAC-CCTT--A-CA--TGACTTAC--TT-G-
6651_ITS_ -----GCTCG-T-C-TT--A-CT--TGAC--C-T--TTG-
16888_ITS_ -----G-T-GAC-C-TT--TGCT--TGAC--CGT--TT-G-
6657_ITS_ -----G-----C-----TT-----T-----
* : : # . # : # * . . : # # * * . : . . * * *

6989_ITS_ ACC--T-----TTGA-----C--C-T
7002_ITS_ ACC--T-----TTGA-----C--C-T
7001_ITS_ ACC--T-----TTGA-----C--C-T
26710_ITS_ -----
16890_ITS_ -----
454.76_ITS_ ACC--T-----GTGA-----C--CAT
60051_ITS_ ACC--TCAAATCA--GG-TAGGA--TTA-----C--C-C
26713_ITS_ ACC--T-----G-T-A-----TTG-----C--C-T
7004_ITS_ ACC--T-----TTGA-----C--C-T
7005_ITS_ ACC--T-----TTGA-----C--C-T
618.89_ITS_ -----
12240_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--AG-----G-GCTA-C--C-
16884_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--AGTTTAAAAAGTG-TA-C--C-
26729_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--AG-----G-GCTA-C--C-
6652_ITS_ ACC--TC-AAATCAA--GGT--AG-----G-ACTA-C--C-
16883_ITS_ ACC--TC-GGATCA--GGT--AG-----G-GATA-C--C-
213.48_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--A-----GG--A-----
6228_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--A-----GGTT-A-C--C-
6229_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT-----
16881_ITS_ ACC--TC-AAATCA--GGT--A-----GGATTACC--C-
6659_ITS_ ACC--T-----T-----T-----G-----C--C-
6658_ITS_ ACCCAGTCCCAACTAAAAAGGT--CCCCC--G--AACTTAC-
6651_ITS_ ACC--TC-AAATC--GGGG--A-----GGATTA-C--C-
16888_ITS_ ACC--TC-AAATAA--GGT--AG-----G-AATA-C--C-
6657_ITS_ --C--T-----G-----
### # : : : : : * : : . . . * . : * * *
```

(Next page continued)

(Fig. 3. Continued)

```
12240_18S_ GTCTAG-CTGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
16884_18S_ GTCTAG-CTGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
26729_18S_ TTTTAG-CTGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6652_18S_ GTTTAG-CTGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
16888_18S_ GTTTAG-CTGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
16890_18S_ GTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6651_18S_ GTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
16881_18S_ ATCTAGTC-GACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6659_18S_ ATCTAGTC-GACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6228_18S_ GTCTAGTC-GACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6229_18S_ ATCTAGTC-GACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6658_18S_ GTCTAGTC-GACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6657_18S_ GTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
7001_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
7002_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
26710_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
454.76_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
6989_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
7004_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
7005_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
618.89_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
26713_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
60051_18S_ CTTTAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
16883_18S_ -TCAAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
213.48_18S_ -TCAAG-CCGACGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAG
: #. ##. *****

12240_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TTTT
16884_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TTTT
26729_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TTTT
6652_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--CTTT
16888_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TCTT
16890_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TCTT
6651_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TTTT
16881_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
6659_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
6228_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
6229_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
6658_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
6657_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TGTT
7001_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7002_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
26710_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
454.76_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
6989_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7004_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7005_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
618.89_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
26713_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
60051_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--T-TT
16883_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT--TATT
213.48_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACG66TCAAGCGAGT--TCTT
*****
: #. ##
```

(Next page continued)

(Fig. 3. Continued)

```
12240_18S_ TTTCTTGA-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16884_18S_ TT-CCTTGA-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26729_18S_ TTTCTTGA-CCGAAAGGTTATGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6652_18S_ TTTCTTGG-CCGAAAGGTCATGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16888_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16890_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6651_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16881_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6659_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6228_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6229_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6658_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6657_18S_ TT-CCTTGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7001_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7002_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26710_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
454_76_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6989_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7004_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7005_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
618_89_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26713_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
60051_18S_ TT-CCTGGC-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16883_18S_ -CACCTTGG-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
213_48_18S_ TCTCCT-GGACCGAAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
.# ### :# :##### :##### :##### :##### :##### :#####
12240_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
16884_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
26729_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6652_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
16888_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
16890_18S_ GGGGATAGAACATTGCAATTATTGTTTTCAACGAGGAATTCCTAATAAG
6651_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
16881_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6659_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6228_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6229_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6658_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6657_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
7001_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
7002_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
26710_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
454_76_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
6989_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
7004_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
7005_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
618_89_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
26713_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
60051_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGTTTTAAACGAGGAATTCCTAGTAAG
16883_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAG
213_48_18S_ GGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATTCCTAGTAAG
#####
```

(Next page continued)

(Fig. 3. Continued)

```
12240_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
16884_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
26729_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCAGCTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6652_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCAGCTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
16888_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
16890_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACCTCCCTGCCCTTTGTACACACCG
6651_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
16881_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6659_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6228_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6229_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6658_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6657_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
7001_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
7002_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
26710_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
454_76_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
6989_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
7004_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
7005_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
618_89_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
26713_18S_ CGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
60051_18S_ CGTAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
16883_18S_ CGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
213_48_18S_ CGCGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCG
#####

12240_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATC-GCTT
16884_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATC-GCTT
26729_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGATTGGCTT
6652_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
16888_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATCGGCTT
16890_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6651_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
16881_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6659_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6228_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATCGGCTT
6229_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6658_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6657_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
7001_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
7002_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
26710_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
454_76_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
6989_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
7004_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
7005_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
618_89_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
26713_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
60051_18S_ CCCGTCGTTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTT
16883_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTT
213_48_18S_ CCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTT
#####
```

(Next page continued)

(Fig. 3. Continued)

```
12240_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACCT-T-G-TCGC-TGA-AA-GTTGGTCAA
16884_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACCT-T-G-TCG--TGA-AA-GTTGGTCAA
26729_18S_ CCGGGAGCC-GGAAACGGC-ACCTCT-G-TTGC-GGA-AA-GTTGGTCGA
6652_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACCT-T-G-TTGCTGGA-A--GTTGGTCAA
16888_18S_ -GGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-G-ATGC-TGAGAA-GTCGGTCAA
16890_18S_ -GGGAACC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTCGGTCAA
6651_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAAAA-GTTGGTCAA
16881_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC--TTGGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6659_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC--TTGGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6228_18S_ TGGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC--TTGGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6229_18S_ TGGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC--TCGGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6658_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACCC-T-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6657_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGAC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTCGGTCAA
7001_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
7002_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
26710_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
454.76_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
6989_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
7004_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
7005_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
618.89_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
26713_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGCCACC-CT-GGA-GC-TGAGAA-GTTGGTCAA
60051_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACGGC-ACC-CT-GGA-GC-TGA-AA-GTTGGTCAA
16883_18S_ CGAAGAG-GTGGCAACGACCACT-CT-GGA-GC-CGAGAAAGCTGGTCAA
213.48_18S_ CCGGGAGCC-GGCAACTACCACC-CA-GGA-GC-CGAGAA-GTTGGTCAA
#####

12240_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
16884_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
26729_18S_ ACTTGGTCATTTA-AGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTACGT-GGTGA
6652_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
16888_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
16890_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTACGT-GGTGA
6651_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
16881_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6659_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6228_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6229_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6658_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6657_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
7001_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
7002_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
26710_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
454.76_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
6989_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
7004_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
7005_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
618.89_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
26713_18S_ ACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
60051_18S_ ACTTGGTCATTTAAAGGAAGTAAAAGTCCTAACAGGTTTCCGTGGTGA
16883_18S_ ACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGA
213.48_18S_ ACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTGGTGA
#####
```

(Next page continued)

(Fig. 3. Continued)

```
12240_18S_ ACCTGCGGAAGG
16884_18S_ ACCTGCGGA-GG
26729_18S_ ACCTGCGGAAGG
6652_18S_ ACCTGCGGAAGG
16888_18S_ ACCTGCGGA-G-
16890_18S_ ACCTGCGGAAGG
6651_18S_ ACCTGCGGAAGG
16881_18S_ ACCTGCGGAAGG
6659_18S_ ACCTGCGGAAGG
6228_18S_ ACCTGCGGAAGG
6229_18S_ ACCTGCGGAAGG
6658_18S_ ACCTGCGGAAGG
6657_18S_ ACCTGCGGAAGG
7001_18S_ ACCTGCGGAAGG
7002_18S_ ACCTGCGGAAGG
26710_18S_ ACCTGCGGAAGG
454.76_18S_ ACCTGCGGAAGG
6989_18S_ ACCTGCGGAAGG
7004_18S_ ACCTGCGGAAGG
7005_18S_ ACCTGCGGAAGG
618.89_18S_ ACCTGCGGAAGG
26713_18S_ ACCTGCTGAAGG
60051_18S_ ACATGCGGAAGG
16883_18S_ ACCTGCGGA-G-
213.48_18S_ ACCTGCGGA-G-
#####
```

5. Data 분석

Sequenced data의 Gene bank accession numbers를 Table 1에 나타내었다. 근연종의 nucleotide alignments가 neighbor-joining method program 을 사용해서 수행되었다. 계통발생학적 유연관계가 1,000 bootstrap replications에 기초한 bootstrap analysis method에 의해서 계산되어졌다. 또한, PHYLIP 3.5 software package의 Njdist가 distance matrix reconstruction에 사용되었다. 5.8S rDNA를 포함한 ITS 부위의 염기서열 비교를 통한 계통발생학적 유연관계 분석을 Fig. 4 와 5에 나타내었고, 또한 18S rDNA부위에서도 25균주의 *Phellinus*종사이의 유연관계 분석을 통해 ITS 부위와 비교 하였다 (Fig. 6과 7).

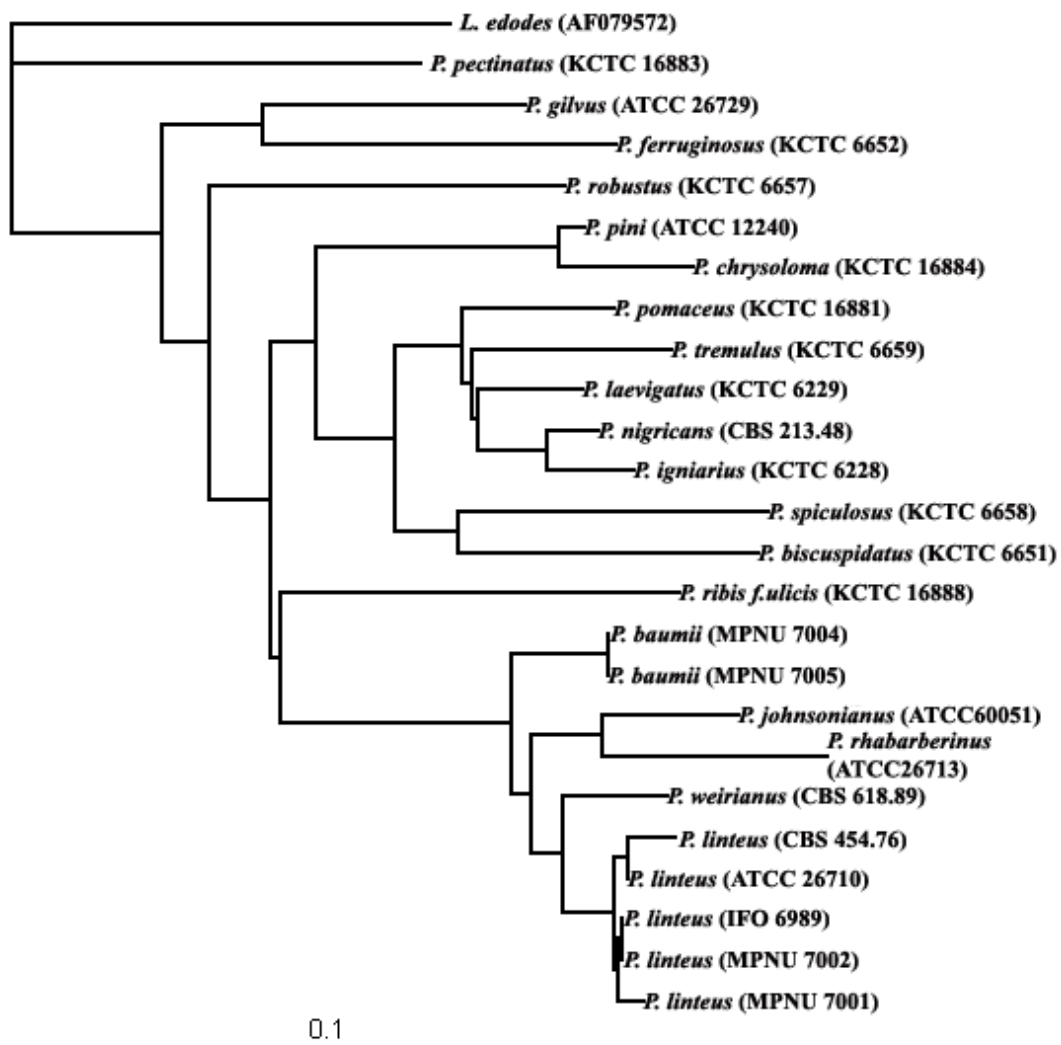


Fig. 4. Phylogenetic relationship of 5.8S ribosomal DNA, ITS1 and ITS2 in *Phellinus* species.

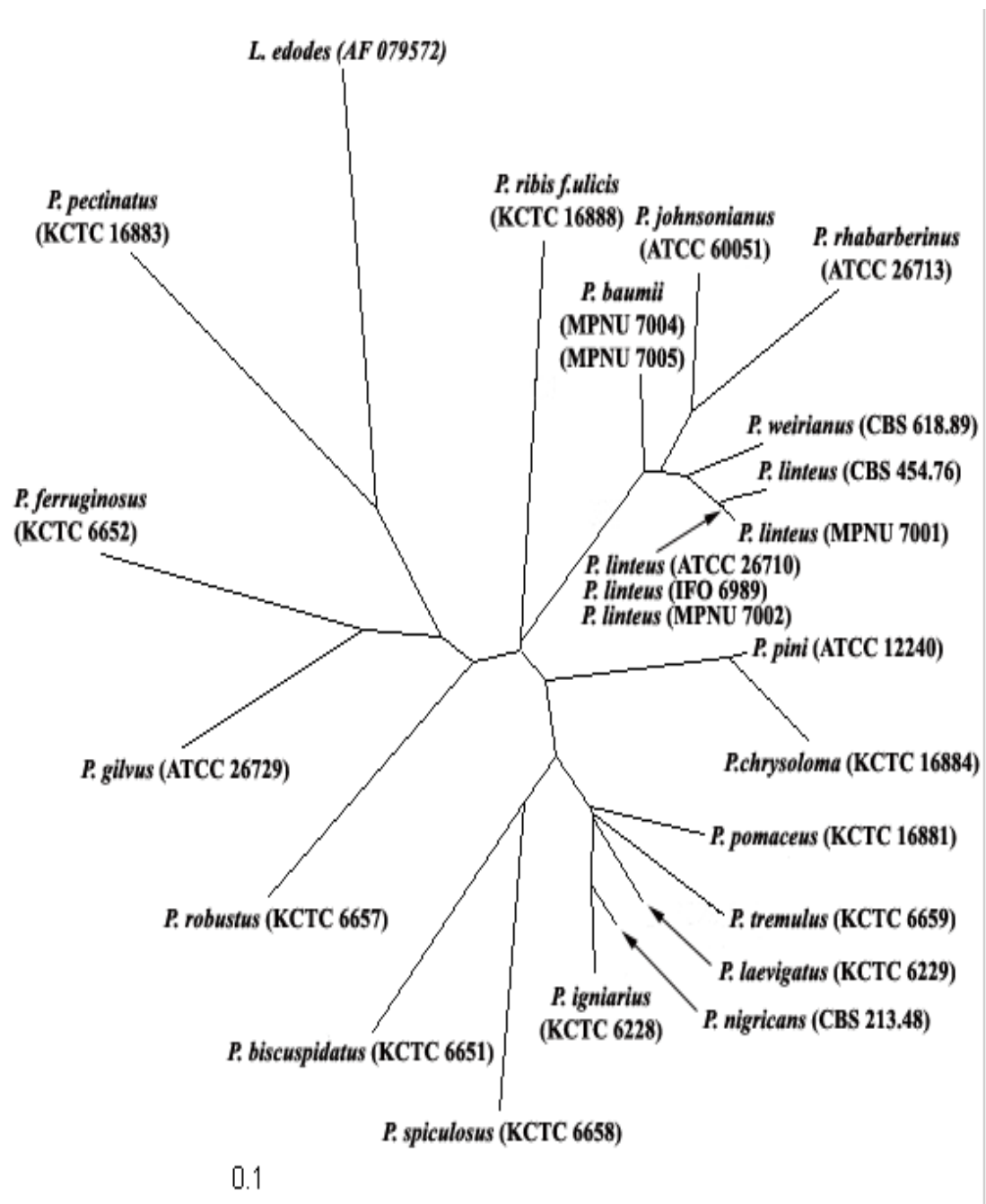


Fig. 5. Unrooted neighbor-joining tree basis on the analysis of 5.8S with ITS1 and ITS2 regions. The scale bar indicates the distance of 0.01 units. *P. gilvus* group : Group 1, *P. johnsonianus* group : Group 2, *P. baumii* group : Group 3, *P. linteus* group : Group 4, *P. pini* group : Group 5, *P. igniarius* group : Group 6.

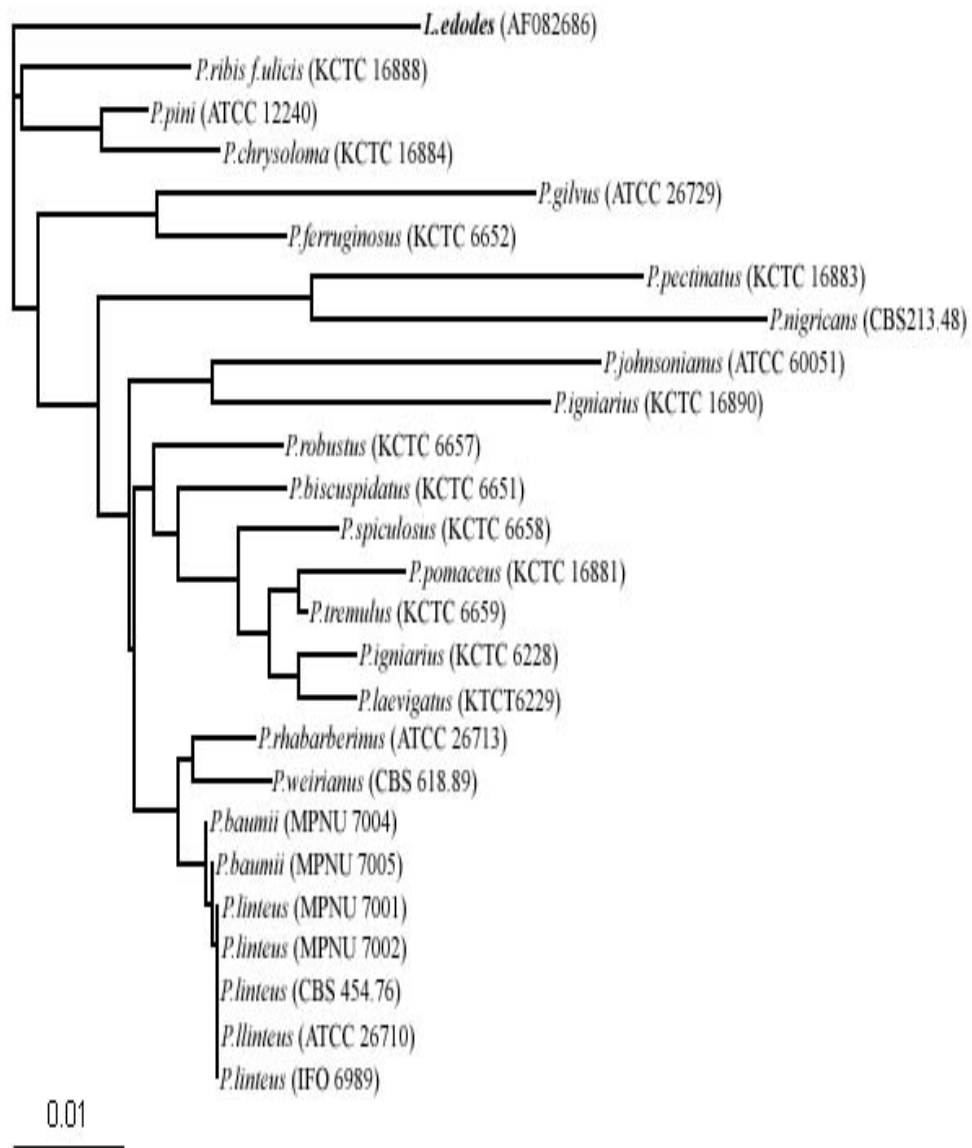
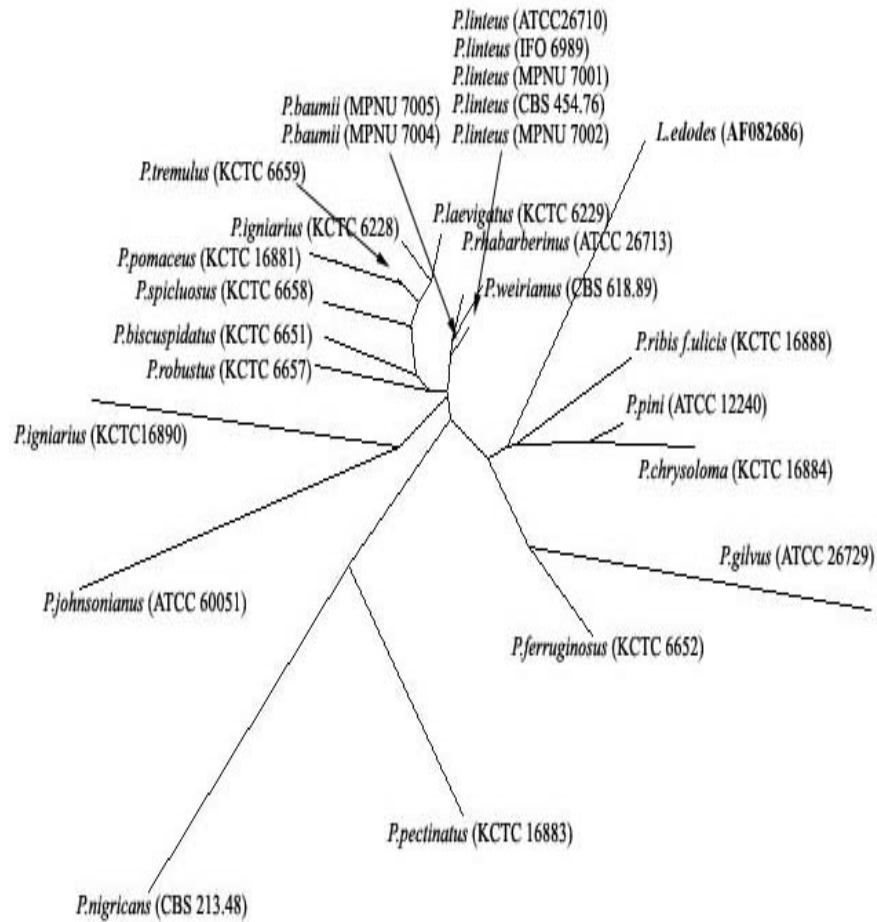


Fig. 6. Phylogenetic relationship of 18S ribosomal DNA in *Phellinus* species



0.01

Fig. 7. Unrooted neighbor-joining tree basis on the nucleotide sequence analyses of 18S partial region. The scale bar indicates the distance of 0.01 units. Group 1: *P. linteus* and *P. baumii* group, Group 2: *P. pini* group, Group 3: *P. gilvus* group, Group 4: *P. nigricans* group, Group 5: *P. johnsonianus* group, Group 6: *P. igniarius* group

6. Detection primer design

ITS 염기 서열분석을 통해 *Phellinus* 종에 대해서 *P. linteus* 만을 특이적으로 detection 할 수 있는 primer를 제작하였다 (Fig. 8).

PL1F sense primer ; 5'- TCTTGTAAGTAATTAGTAG-3' (19mer)

PL2R anti-sense primer ; 5'-TGTCAGAAGGAGGTGACTC-3' (20mer)

또한, detection primer를 18S rDNA partial sequence data를 바탕으로 design했다 (Fig. 9 and 10). *P. linteus*만을 18S rDNA 부위의 영역에서 특이적으로 detection 하기 위해서 2 nucleotides (C→G, A→T)를 변화시킨 the 18S 2F sense detection primer [5-CTTAATGCCGATTACGAA-3 (18 mer)]와 3 nucleotides (C →G, G→C, A→T)를 변화시킨 the 18S 3F sense detection primer [5-CTTAATGCCATTACGAA-3 (18mer)]를 design 했다. 또한 18S 4R anti-sense detection primers [5-GCCGGTCCAGGAGAAAGT-3 (18 mer)]를 design 했다.

MPNU 7002	106	TTAT-ATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGCCTGA-GGT----C-TTGTAAG-TAA-----TTAGTAGAA-GG--GCGAAAG-----CGAGT--CTT-	177
IPO 6989	106	TTAT-ATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGCCTGA-GGT----C-TTGTAAG-TAA-----TTAGTAGAA-GG--GCGAAAG-----CGAGT--CTT-	177
MPNU 7001	106	TTAT-ATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGCCTGA-GGT----C-TTGTAAG-TAA-----TTAGTAGAA-GG--GCGAAAG-----CGAGT--CTT-	177
ATCC 26710	97	TTAT-ATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGCCTGA-GGT----C-TTGTAAG-TAA-----TCAGTAGAA-GG--GCGAAAG-----CGAGT--CTT-	168
CBS 618.89	123	TTAT-ATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGTCTGA-GGT----C-TTGCAA-GTAA-----A-TCAGTAGAAAGGCGCGAAAGGGGGCGAGT--CTTT	204
KACC500411	114	TTATCATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGTCTGA-GGTGGGTC-TCGTAA-GTAATTGTTAGTTAGTAGAA-GG-GCGAAAG-----CGAGT--CTTT	199
MPNU 7005	115	TTATCATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGTCTGA-GGTCTGTC-TTGTAAG-TAA-----TGAGTAGAA-GG--GCGAAAGCGAG-CGAGT--GTT-	195
MPNU 7004	115	TTATCATATCGCGAGTCGAA--GTTAGTAGTCTGA-GGTCTGTC-TTGTAAG-TAA-----TGAGTAGAA-GG--GCGAAAGCGAG-CGAGT--GTT-	195
ATCC 60051	113	TTATTATATCGCGGGTCGAA--GTTAGTAGTCTGA-GGTC--TCGTGTAA-GTAA-----A-TTAGTAGAA-GG--GCGAAAG-----CGAGT--GTTA	190
KCTC 6228	116	CTAT-----G-G--GA--GTTACTAGTCAGACAGT-----A-----A-GT-----T-AGTAGT-----CGAGAGG---CGA-----	161
CBS 213.48	104	CTAT-----G-G--GA--GTTACTAGTC-GACGGTG-----ATTGTTA-GT-----T-AGTAGT-----CGAGAGA---CGA-----	154
KCTC 6229	100	TTAT-----G-G--GA--GTTACTAGTC-GGCAGTG----AT-----GT-----T-AGTAGT-----CGAAAGA---C-A-----	144
ATCC 12240	102	TTAT-----CGAA--GTTAGTAGTCT-----T---TCCTCCTTA-GT-----T--GGAGCC--GC--CG--GGGT--TGA---CTT-	153
ATCC 26729	93	TT-T-----GA--GAACCGATA--AGT-TG--GGT-----ACG-----G-AGCA-----CG--G--TTC-ATTCCITT	137
		###.*****#####.###. . .*.#:#***# *** . #.##### ** #####. . .###* .**.	

MPNU 7002	630	CTTGCTT-CTAG-CC-GTCC-GCGTC-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-T---C--A-CC-----TCCTT---C--TTGACAC--CTTTGACCT	691
IFO 6989	630	CTTGCTT-CTAG-CC-GTCC-GCGTC-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-T---C--A-CC-----TCCTT---C--TTGACAC--CTTTGACCT	691
MPNU 7001	630	CTTGCTT-CTAG-CC-GTCC-GCGTC-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-T---C--A-CC-----TCCTT---C--TTGACAC--CTTTGACCT	691
ATCC 26710	590	-----	614
CBS 618.89	637	-----TCC-AA-C---T-----T-G-C---CA--T---G-A---G-----C-----G-----CIT-G-CCT	661
K A C C 500411	662	CTCGCTTCCTAA-CCCGTCCGCGTC-GT-OG-GACA--AAG-G-A---G-T---GTTA-CCCCCCCCCTCCTT---C--TTGACAC--CTTTGACCT	737
MPNU 7005	662	CTTGCTT-CTAA-CG-GTCC-GCTTG-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-TTGTGTGA-CC-----TCCTTTTTG--TTGACAC--CTTTGACCT	732
MPNU 7004	662	CTTGCTT-CTAA-CG-GTCC-GCTTG-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-TTGTGTGA-CC-----TCCTTTTTG--TTGACAC--CTTTGACCT	732
ATCC 60051	651	CTTGCTT-CTAG-CC-GTCC-GCGTC-GT-OG-GACA--A-G-G-A---G-T---TGTTATC-----TCCTTTTTG--TTGACACCCCTT-GACCT	719
KCTC 6228	570	CT-GCIT-CTAATC--GTC---CGT-TGTTG-GACA--A-G-G-C---GCTC---GT---CG-----CCTT---CATTTGACAC--CIT-GACCT	631
CBS 213.48	568	CT-GCIT-CTAATC--GTC---CGTGTTTG-GACA--A-G-GTC---GCTT---GT---CG-----CCTT---CATTTGACAC--CIT-GACCT	632
KCTC 6229	550	CT-GCIT-CTAATC--GT----C----TTCG-GACA--A-G-G-C---G-TT---GT---CG-----CCTT---CACITGACAT--CIT-GACCT	605
ATCC 12240	597	CT-GCIT-CTAAT-G-GT----C-T---T-CG-GACA--A---G---G-TCT---TTAACAG-----CCTT---C--TTGAC---TCTTTGACCT	652
ATCC 26729	558	CTTGCTT-CTAATC--GTC--TCIT--GACCGAGACATTATAAGAAAAAGG----G---CAA-----CCITTTCTC-TTTGACTC-TCTT-GACCT	630
		##:###,##*,#,##*:#:#,*,## #### * * # * # *, .: : #, :###,..*,#####* ##:####	

Fig. 8. Primer designing sites in ITS regions. (a) Sense primer (PL1F) designing sites. (b) Anti-sense primer (PL2R) designing sites.

```

12240_18S_ -CTTT-ATTGCCGCTCA-CG-AACGAG-ACCTTAACTGCTAAATAGCC
16884_18S_ -GCCA-ATT-CCGCCCA-CG-AACGAT-ATCTTAA-CCTGCTAAAGAGCC
26729_18S_ -CCTC-ACT-CCGATAA-CG-TGCGAG-ACCTTAA-CCCGCTAAAGAGCC
6652_18S_ -CTTA-AGT-CCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
16888_18S_ -CTT-A-CCCCGATCA-CG-AACG-CGATCTTAA-CCTGCTAAAGAGCC
16890_18S_ --CTG-A-TCCCGAT-ATCG-AACGAC-ACCTTAA-GCTGCTAAAGAGCC
6651_18S_ -CCTT-ACTTCCG-TCC-CGTAACGAT-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
16881_18S_ -CCTT-AATTCCTACCC-CG-AACGAG-ACCCTAA-CCTGCTAAATAGCC
6659_18S_ -CCTT-AATTCCTATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
6228_18S_ -GCTT-AATTCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAAGAGCC
6229_18S_ -GCTT-AAT-CCGATAC-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
6658_18S_ -CCTT-AATTCCTATAA-CG-AACGAC-ACCTTAA-CCGGCTAAATAGCC
6657_18S_ -CCTTGATT-CCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAGATAGCC
7001_18S_ -CTTA-A-TCCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
7002_18S_ -CTTA-A-TCCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
26710_18S_ -CTTA-A-TCCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
454_76_18S_ -CTTA-A-TCCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
6989_18S_ -CTTA-A-TCCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
7004_18S_ -C-----CCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
7005_18S_ -C-----CCCGATAA-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
618_89_18S_ -CCTA-A-TTCGGATTA-CG-AACGAG-ACCTTCA-CCTGCTAAATAGCC
26713_18S_ -CC-A-----CCG-TAA-T-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
60051_18S_ -CC-----CCCGATAA-CG-AACGAC-ACCTTAA-GCTGCTAAATAGCC
16883_18S_ -CCCC-AATTGCGATAA-CG-AACGAC-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
213_48_18S_ -CCTT-AACCGCGATAT-CG-AACGAG-ACCTTAA-CCTGCTAAATAGCC
***: #.*:#####.# ## #####. ##### #####

```

Fig. 9. Design of 18S 2F and 18S 3F sense detection primers in 18S partial sequences.

```

12240_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TTTT
16884_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TTTT
26729_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TTTT
6652_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---CTTT
16888_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TCTT
16890_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TCTT
6651_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TTTT
16881_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
6659_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
6228_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
6229_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
6658_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
6657_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TGT
7001_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7002_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
26710_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
454.76_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
6989_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7004_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
7005_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
618.89_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
26713_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGTACT-TT
60051_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---T-TT
16883_18S_ ATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAGCGAGT---TCTT
213.48_18S_ #####.#.##

12240_18S_ TTTCTTGA-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16884_18S_ TT-CCTTGA-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26729_18S_ TTTCTTGA-CCGGAAGGTTATGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6652_18S_ TTTCTTGG-CCGGAAGGTCATGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16888_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16890_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6651_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16881_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6659_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6228_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6229_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6658_18S_ TT-CCTTGG-CCGGAAGGTCCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6657_18S_ TT-CCTTGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7001_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7002_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26710_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
454.76_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
6989_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7004_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
7005_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
618.89_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
26713_18S_ CT-CCTGGA-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
60051_18S_ TT-CCTGGC-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
16883_18S_ -CACCTTG-CCGGAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
213.48_18S_ TCTCCT-GGACCGAAAGGTTCTGGGTAATCTTGTGAAACTCTGTCGTGCT
.#####:#:#####:#####

```

Fig. 10. Design of 18S 4R anti-sense detection primer in 18S partial sequences.

제 2 절. 결 과

1. Sequence alignments analysis

본 연구에서는 *Phellinus*속의 19종 25균주의 ITS(Fig. 4) 및 partial 18S rDNA 영역(Fig. 6)의 염기서열 분석을 통하여 계통 발생학적 유연관계를 밝혔다. Out-group은 *Lentinula edodes* [AF079572 and AF082686 from National Center for Biotechnology Information (NCBI)]가 사용되었다. 계통 발생학적인 유연 관계를 밝히기 위해서 unrooted neighbor-joining tree program and bootstrap N-J methods를 사용했다 (Fig. 5 and 7).

ITS 영역에서는 현재 유통되고 있는 상황을 크게 다섯 그룹으로 나누었다. *P. linteus*, *P. baumii*, *P. igniarius*, *P. pini* 그리고 *P. gilvus* group의 다섯 그룹 중에서 특히 *P. baumii*가 제일 *P. linteus*와 유사했으며, 여기에 *P. rhabarberinus*와 *P. johnsonianus*을 *P. linteus*와 가까운 한 그룹으로 추가했다. *P. weirianus*는 *P. linteus*와 *P. baumii* 사이의 complex한 종으로 나타났다.

18S ribosomal DNA partial region에서 *P. linteus*는 *P. rhabarberinus*, *P. weirianus* 그리고 특히 *P. baumii*와 매우 유사해서 같은 group으로 나누었다. 본 실험에서 사용된 5균주의 *P. linteus*는 18S rDNA부위에서의 염기 서열이 거의 일치하는 것으로 드러났다. *P. pini*, *P. ribis* f. *ulicis*와 *P. chrysoloma*를 group 2, *P. gilvus* 와 *P. ferruginosus*를 group 3, *P. pectinatus*를 포함한 *P. nigricans*를 group 4, *P. igniarius* (KCTC 16890) 와 *P. johnsonianus*를 group 5, *P. laevigatus*, *P. igniarius* (KCTC 6228), *P. tremulus*, *P. pomaceus*, *P. spiculosus*, *P. bicuspidatus* 와 *P. robustus*를 group 6로 나누었다.

이러한 계통발생학적인 유연 관계를 추적함에 있어서 ITS와 18S 부위에서의 nucleotide sequence의 길이(Table 2)나 염기 서열중의 G+C content(Table 3)가 조사되어졌다. sequence의 길이에 있어서는 ITS부위에서 다양한 염기 서열길이의 변화를 나타내는 것으로 보아 5.8S 보존적 영역 양쪽의 ITS1, 2부위가 매우 변이가 심한 것으로 생각되어지고, 진화 과정 중에서 진핵 생물의 특징인 전사 후 splicing 과정에서 제거되어지는 부분이기 때문에 생명체의 생명유지와 무관하게 많은 변화의 양상을 가졌던 것으로 사료된다. 그리고 G+C content에서 있어서도 보존적인 영역인 18S 보다 낮은 50%이하의 G+C content를 가지는 것으로도 다양한 변화가 예측되는 부위임에 틀림없다. 또한 염기서열간 similarity를 조사해서 더욱 정확한 계통발생학적인 유연 관계를 나타냈다(Table 4).

Table 2. Comparison of ribosomal DNA lengths of 18S partial and 5.8S with ITS1 and ITS2 ribosomal DNA

Fungal strain	18S partial*	5.8S with ITS1 and ITS2*
<i>P. linteus</i> ATCC 26710	489	614
<i>P. linteus</i> IFO 6989	489	706
<i>P. linteus</i> CBS 454.76	489	751
<i>P. linteus</i> MPNU 7001	489	706
<i>P. linteus</i> MPNU 7002	489	706
<i>P. baumii</i> MPNU 7004	484	747
<i>P. baumii</i> MPNU 7005	484	747
<i>P. weirianus</i> CBS 618.89	490	661
<i>P. johnsonianus</i> ATCC 60051	482	762
<i>P. rhabarberinus</i> ATCC 26713	484	564
<i>P. pini</i> ATCC 12240	489	695
<i>P. gilvus</i> ATCC 26729	488	673
<i>P. igniarius</i> KCTC 6228	488	654
<i>P. laevigatus</i> KCTC 6229	487	615
<i>P. nigricans</i> CBS 213.48	488	647
<i>P. biscuspidatus</i> KCTC 6651	489	702
<i>P. ferruginosus</i> KCTC 6652	488	654
<i>P. robustus</i> KCTC 6657	489	647
<i>P. spiculosus</i> KCTC 6658	488	715
<i>P. tremulus</i> KCTC 6659	488	641
<i>P. pomaceus</i> KCTC 16881	488	673
<i>P. pectinatus</i> KCTC 16883	488	546
<i>P. chrysoloma</i> KCTC 16884	485	707
<i>P. ribis</i> f. <i>ulicis</i> KCTC 16888	484	712
<i>P. igniarius</i> KCTC 16890	486	647

*shows the length of the nucleotide sequences (bp)

Table 3. G+C contents of 18S partial and 5.8S including ITS1 and ITS2 ribosomal DNA

Fungal strain	1 8 S partial*	5.8S with ITS1 and ITS2*
<i>P. linteus</i> ATCC 26710	52.8	47.5
<i>P. linteus</i> IFO 6989	52.8	47.4
<i>P. linteus</i> CBS 454.76	52.8	47.9
<i>P. linteus</i> MPNU 7001	52.8	47.4
<i>P. linteus</i> MPNU 7002	52.8	47.5
<i>P. baumii</i> MPNU 7004	53.3	47
<i>P. baumii</i> MPNU 7005	53.3	47
<i>P. weirianus</i> CBS 618.89	53.1	49.3
<i>P. johnsonianus</i> ATCC 60051	51.2	47.1
<i>P. rhabarberinus</i> ATCC 26713	51.7	48.6
<i>P. pini</i> ATCC 12240	51.3	46.3
<i>P. gilvus</i> ATCC 26729	50.8	41.5
<i>P. igniarius</i> KCTC 6228	52.4	48.3
<i>P. laevigatus</i> KCTC 6229	52.3	46.8
<i>P. nigricans</i> CBS 213.48	54.5	47.8
<i>P. biscuspidatus</i> KCTC 6651	52.8	47.2
<i>P. ferruginosus</i> KCTC 6652	51.4	42.8
<i>P. robustus</i> KCTC 6657	52.6	42.3
<i>P. spiculosus</i> KCTC 6658	52.5	46.3
<i>P. tremulus</i> KCTC 6659	51.6	48.2
<i>P. pomaceus</i> KCTC 16881	52.9	47.8
<i>P. pectinatus</i> KCTC 16883	52.9	47.8
<i>P. chrysoloma</i> KCTC 16884	52.8	47.5
<i>P. ribis</i> f. <i>ulicis</i> KCTC 16888	53.3	49
<i>P. igniarius</i> KCTC 16890	52.5	47.1

*shows G+C content

Table 4. Comparison of DNA similarity between taxa in 18S partial rDNA regions.

2. Rapid detection of *P. linteus*

가. ITS 부위의 염기 서열 분석을 바탕으로 *P. linteus*만을 특이적으로 detection하기 위해서 *Phellinus*속의 ITS 부위에서 unique한 부위를 찾아내었다. *P. linteus*만을 특이적으로 detection 한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. ITS detection primer를 확인하기 위해서 ITS universal primer와 함께 사용해서 그 결과를 나타내었다 (Fig. 11). PL1F-PL2R, ITS5F-PL2R 그리고 PL1F-ITS4R의 세 primer set을 조합하여 PCR 증폭 과정을 통해서 그 결과를 각각 확인하였다. PL1F-PL2R primer set이 *P. linteus*만을 특이적으로 570 bp single band를 증폭했고(Fig. 11A), ITS5F-PL2R도 700 bp의 *P. linteus* 특이적인 single band 나타냈으며 (Fig. 11B), PL1F-ITS4R은 550 bp single band를 예상했지만 특이성은 떨어졌다(Fig. 11C). Fig. 11 (B)와 (C)를 통해서 PL2R detection primer가 좀더 specific하다는 것을 알 수 있었다. PCR은 chromosomal DNA를 사용했으며 PCR에서 annealing temperature를 조절하여 뚜렷한 band를 증폭시켰다.

나. 18S rDNA 부위는 매우 보존적인 영역이지만 *Phellinus* 종 사이에서 몇 개의 특이적인 부위가 있는 것으로 확인되었고, 이를 바탕으로 detection primer를 제작했다. 18S 부위의 염기서열 분석을 통해 제작된 detection primer (18S 2F sense, 18S 3F sense and 18S 4R anti-sense primers)를 이용해 *P. linteus*만을 이 영역에서 특이적으로 detection 하는데 초점을 맞추었다. 18S 2F - 18S 4R primer set은 210 bp single band로 PCR 증폭되었다 (Fig. 12). Lane 1 에서 5까지의 *P. linteus*가 뚜렷한 PCR product를 증폭해 냈지만, lane 6, 7의 *P. baumii* (MPNU 7004 and MPNU 7005), lane 8의 *P. weirianus*, lane 10의 *P. rhabarberinus* 와 lane 21 of *P. pomaceus*등도 weak band pattern을 보였다. 2F sense primer 대신에 3 nucleoties를 변형시킨 3F sense primer와 4R anti-sense primer set은 *P. linteus*에 대해 sensitivity는 다소 떨어졌지만 land 1-5의 *P. linteus*만을 특이적으로 detection 했다 (Fig. 13).

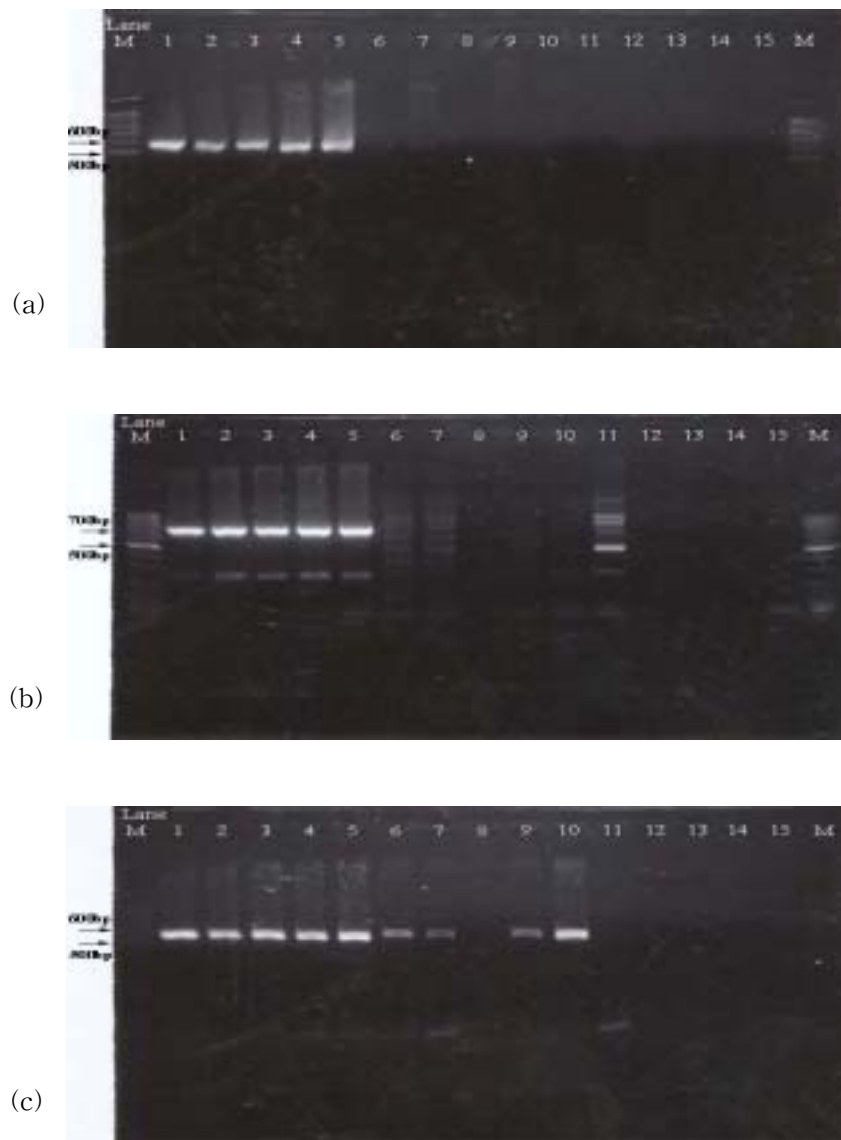


Fig. 11. PCR products of *Phellinus* species by specific primers for detection of *P. linteus*.

Primer sets: (A) PL1F-PL2R (B) ITS5F-PL2R (C) PL1F-ITS4R

Strains: 1-5) *P. linteus*, 6-7) *P. baumii*, 8) *P. weirianus*, 9) *P. johnsonianus*, 10) *P. rhabarberinus*, 11) *P. pini*, 12) *P. gilvus*, 13) *P. igniarius*, 14) *P. nigricans*, 15) *P. laevigatus*, M) 1.5kb ladder marker.

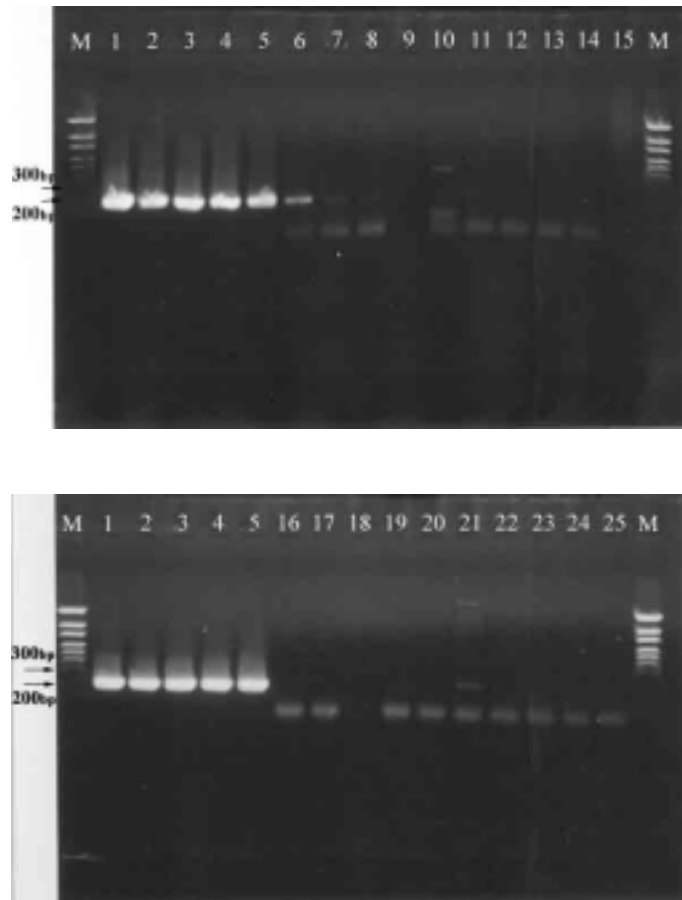


Fig. 12. PCR products of *Phellinus* species by specific primer set (18S 2F 18S 4R primer set) for detecting of *P. linteus*.

Strains: 1-5) *P. linteus*, 6-7) *P. baumii*, 8) *P. weirianus*, 9) *P. johnsonianus*, 10) *P. rhabarberinus*, 11) *P. pini*, 12) *P. gilvus*, 13) *P. igniarius*, 14) *P. nigricans*, 15) *P. laevigatus*, 16) *P. bicuspidatus* 17) *P. ferruginosus* 18) *P. robustus* 19) *P. spiculosus* 20) *P. tremulus* 21) *P. pomaceus* 22) *P. pectinatus* 23) *P. chrysoloma* 24) *P. ribis* f. *ulicis* 25) *P. igniarius* M) 1.5kb ladder marker.

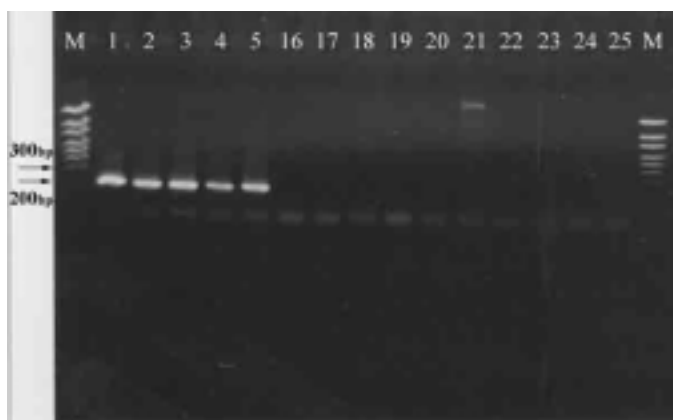
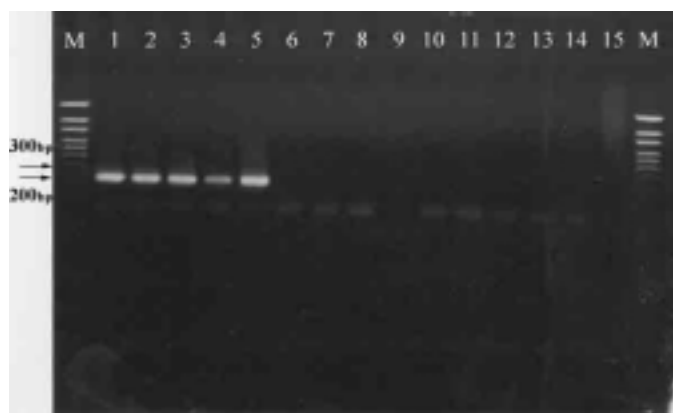


Fig. 13. PCR products of *Phellinus* species by specific primer set (18S 3F 18S 4R primer set) for detecting of *P. linteus*.

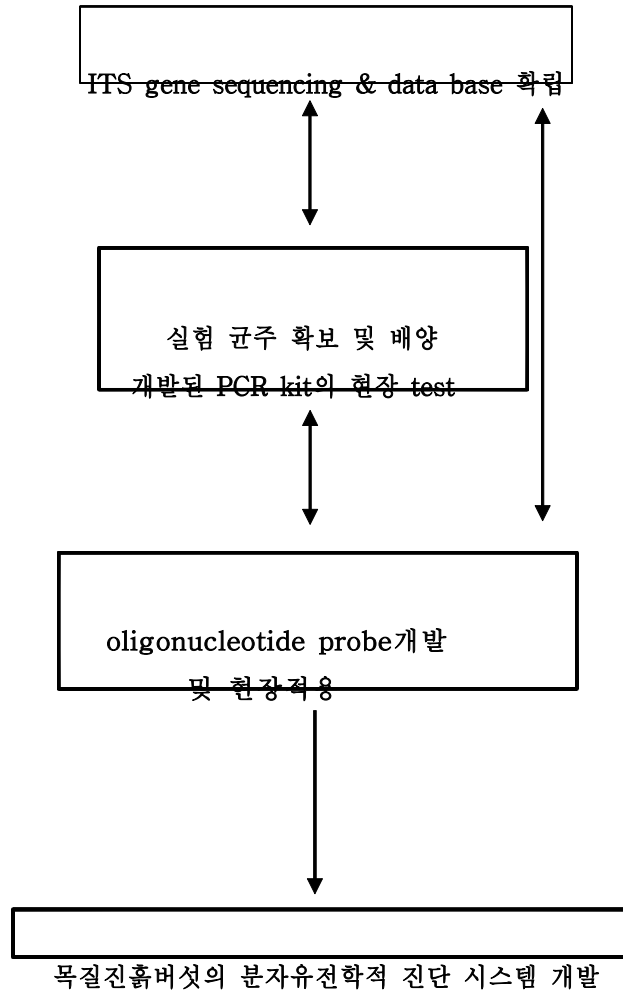
Strains: 1-5) *P. linteus*, 6-7) *P. baumii*, 8) *P. weirianus*, 9) *P. johnsonianus*, 10) *P. rhabarberinus*, 11) *P. pini*, 12) *P. gilvus*, 13) *P. igniarius*, 14) *P. nigricans*, 15) *P. laevigatus*, 16) *P. biscuspidatus* 17) *P. ferruginosus* 18) *P. robustus* 19) *P. spiculosus* 20) *P. tremulus* 21) *P. pomaceus* 22) *P. pectinatus* 23) *P. chrysoloma* 24) *P. ribis* f. *ulicis* 25) *P. igniarius* M) 1.5kb ladder marker.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

[표 4-1] 연구개발 추진계획 : 연차별 추진 체계

주관 연구기관		
부산대학교		
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 보유균주의 DNA 추출 및 정제 - ITS sequence data base 구축 - Sequence alignment를 통한 gene probe design - Gene probe의 data base 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 실험 균주 list 확보 - 현 보유균주의 characterization - 연구 대상 균주 확보 및 배양
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 균주의 지속적인 sequence analysis 확장 - Probe design 및 probe dB 확장 - 분석 검증된 결과의 data base화 	<ul style="list-style-type: none"> - 지속적인 실험 균주 확대 및 배양 - PCR을 통한 gene probe 검증 - southern blotting을 통한 확인
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 검증된 ITS gene sequence의 Genbank 등록 - 전체 분석결과의 data base화 및 관련 Internet site에 게재 	<ul style="list-style-type: none"> - gene probe의 현장 test
<p>목질진흙버섯의 분자유전학적 진단 시스템 개발</p>		

[표 4-2] 연구개발 추진계획 : 기능적 추진 체계



[표4-3] 연구분야의 달성도

	연구내용	척도 (%)	연구목표 달성도 (%)	목표 달성도 (%)
2000/ 2001년	목질진흙버섯 및 그 유사종의 ITS sequencing을 통한 gene data base	- 연구대상 균주 확보 및 배양(10) - 보유균주의 DNA 추출 및 정제(10) - ITS sequence data base 구축(15) - Sequence alignment를 통한 gene probe design(15) - Gene probe의 data base 구축(15) - PCR을 통한 gene probe 검증(35)	10 10 15 15 15 30	100
2001/ 2002년	지속적인 gene probe data base 확장	- 확보된 균주의 지속적인 sequence analysis 확장 및 28S rDNA 염기서열 분석(20) - 28S rDNA 염기서열분석에 따른 종간 유연관계 및 종특이적인 유전자탐침개발 (40) - Probe design 및 probe data base 확장(20) - 분석, 검증된 결과의 DB화(20)	20 40 20 20	100
2002/ 2003년	목질진흙버섯의 gene data base 완성 및 유전자 탐침을 이용한 현장 검증	- 18S rDNA 염기서열분석 및 유전자탐침개발 (20) - 검증된 염기서열의 GeneBank 등록(10) - 전체 분석결과의 data base화 및 관련 Internet site에 게재(10) - 현장 test (30) - Gene probe의 검증 및 개선 (30)	20 10 10 28 28	96
사업진도(%)				98.7

본 연구에서 목질진흙버섯(*P. linteus*)를 중심으로 한 유사종간 구별을 위하여 ITS, 28S, 및 18S 부위의 염기서열을 분석하여, 이를 토대로 종간 특이적인 유전자탐침을 개발하였다. 연구과정동안 분석되어진 다양한 염기서열은 NCBI의 Genbank에 등록되었으며, 4편의 국내 논문에 투고되었으며, 1개의 특허가 출원중에 있다. 본 연구의 결과를 기반으로 개발되어진 유전자탐침을 이용하여 종간 구별을 쉽게 하고자 하였다. 또한, 본 과제와는 무관하게 목질진흙버섯 추출물의 면역학적 효과에 관한 연구를 진행하여 국외 SCI지에 4편을 투고하였다. 본 연구결과를 중심으로 다양한 부위에서 종간 구별이 용이하기는 하였으나, *Phellinus*속은 200종이 넘는 방대한 버섯속으로 앞으로도 지속적인 관리가 필요하리라 사료된다. 또한, 본 연구의 최종단계에서 현재 국내 재배종과 수입종에서 목질진흙버섯을 구별하기위해서는 DNA추출을 용이하게 하기위한 지속적 방법이 개발되어야 하리라 사료된다. 본 연구는 전반적으로 100%에 가까운 목표를 달성하였으나, *Phellinus*속외에도 유사한 종이 많이 있어서 최종단계에서 어려움을 겪었다. 또한 약용으로 허가가 난 종과 독성이 검증되지 않은 중등 다양한 종이 국내에 유통이 되고 있으므로, 본 연구에서 알 수 있듯이 재배종과 수입종의 지속적인 관리가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 지속적인 과제의 지원이 있어야 하며, 다양한 분야의 전문가들이 한 자리에 모여서 다양한 토론의 장이 열려야 할 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서의 결과를 기초 토대로 하여 국내산 목질진흙버섯의 과학적인 품질관리가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 정부차원에서 종자보급에서 소비유통의 단계까지 과학적이고 객관적 실험을 통하여 목질진흙버섯의 품질을 관리하여야 할 것으로 생각된다. 또한, 목질진흙버섯이라 미명하에 무작위로 수입되고 있는 다양한 진흙버섯유사종간의 과학적인 품질관리의 기초자료가 될 것으로 사료된다. 최종적으로 국내산 목질진흙버섯의 수출 시 발생할 수 있는 국가적인 분쟁의 해결할 수 있을 것이다. 그러나, 현재 이들 진흙버섯 속은 200종이 넘는 방대한 그룹으로 정확한 종간 구별을 위해서는 더욱 다양한 분위의 염기서열 분석이나, 다양한 유전자탐침의 개발이 중요하다. 그러기 위해서는 지속적인 실험이 필요할 뿐만아니라, 현재 수입되는 종이나 재배종을 지속적으로 종명을 확인해 줄 수 있는 그룹에 우선 설정되어야 하리라 생각된다. 이렇게 정부차원의 그룹과 일선 농가, 그리고, 실제적으로 종간 확인이 가능한 그룹의 지속적인 유기관계만이 이러한 복잡한 문제를 해결할 수 있을 것이다.

또한, 본 연구에서 사용되어진 다양한 기법들을 토대로 하여 목질진흙버섯과 유사한 종간 구별의 문제가 대두될 수 있는 차가버섯이나 말굽버섯도 우선적으로 실험이 지속되어야 할 것이다. 추가적으로, 이러한 방법들은 다른 고부가가치 품종 및 병원성 세균으로의 기술 저변 확대가 가능하며, 최종적으로는 독성미생물과 비독성미생물의 구별에도 응용이 가능하리라 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재까지 보고되어진 목질진흙버섯관련 자료는 주로 항암효과와 면역세포에 미치는 효과에 대해서 주로 보고가 되어졌다. 또한 이들 버섯의 추출물이 antimutagenic 효과 또한 보고가 되었다. 하지만, 진흙버섯속과 관련된 계통분류학적인 유연관계에 대해서 어떠한 보고도 이루어지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 현재 국내에 유통중인 진흙버섯속의 계통분류학적인 유연관계를 처음으로 확립하였으며, 유사종의 구별을 위한 종특이적인 유전자탐침의 개발에 우선적인 초점을 두고 실험을 하였다. 본 실험을 결과로 *P. linteus*, *P. baumii*, *P. igniarius*, 및 *P. pini* 등 국내 유통중인 종들의 손쉬운 구별을 위한 유전자탐침의 개발이 이루어졌으며, 이를 이용하면 종간 쉬운 구별이 가능하게 되었다. 현재 유용하게 부가적으로, 목질진흙버섯의 추출물의 분리, 정제하여 구조를 분석하였으며, 이들이 면역세포에 미치는 영향을 조사한 결과 대식세포 및 B세포에 강력한 mitogen으로 작용하였다. 또한 이들 추출물이 type II collagen으로 유도되어진 관절염모델 마우스에서 억제효과를 나타내었다. 또한 이들 추출물은 MAPkinase를 경유하여, 다양한 면역학적인 효과를 나타내며, 이들과 관련된 다양한 면역효과와 신호전달체계에 대해서도 지속적인 실험이 이루어져야 하리라 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3, 199-324
2. Donk, M. A. 1971a. Progress in the study of classification of the higher Basidiomycetes. pp. 3-25 In: *Evolution in the higher Basidiomycetes*. Ed. R. H. Petersen. University of Tennessee Press, Knoxville, TN.
3. Donk, M. A. 1971b. Multiple convergence in the Polyporaceae. pp. 393-422. In: *Evolution in the higher Basidiomycetes*. Ed. R. H. Petersen. University of Tennessee Press, Knoxville, TN.
4. 정원진, 정학성. 1994. 미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 진흙버섯류의 계통 분류. *한국미생물학회* 32. 442-448.
5. 정학성. 1989. 목재부후균류 (담자균 민주름버섯목)의 분류학적 고찰. *미생물과 산업* 15, 20-23.
6. Gilbertson, R. L. and L. Ryvarden. 1986. North American polypores. Vol. I. *Fungiflora*, Oslo.
7. Gilbertson, R. L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* 72, 1-49.
8. Manion, P. D. 1981. Tree disease concepts. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.
9. Larsen, M. J. and Cobb-Poulsen, L. A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae) : A survey of the world taxa. *Fungiflora*, Oslo.
10. Sagawa, I., Tanaka, M., and Nagata, Y. 1992. Discrimination of mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length polymorphism. *J. Gen. Microbiol.* 38, 597-603.
11. Magee, B. B., T. M. D'Souza, and P. T. Magee. 1987. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphism in the ribosomal DNA respect of *Candidia* species. *J. Bacteriol.* 69, 1639-1642.
12. Benedicte, H., G. Chevalier, and F. Martin. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spaces. *Mycol. Res.* 98(1), 37-43.
13. Michael, S. N., B. A. Bunyard, and D.J. Royse. 1997. Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Mycologia*, 89(3), 400-407.
14. O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycetes *Fusarium samnucinum*. *Curr. Genet.* 22, 213-220.

15. Morton, A., J. H. Carder, and D. G. Barbara. 1995. Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA gene and relationships between isolates of *Verticillium alboatrum* and *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology*. **44**, 183-190.
16. Hendriks, L. A., Y. V. Goris and R. de Wachter. 1991. Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1223-1230
17. Swann, E. and J. W. Taylor. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: An 18S rRNA gene perspective. *Mycologia*, **85**, 923-936.
18. Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara, and F. Fukuoka. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann*. **59**, 155-157.
19. Lee, J. H., S. M. Cho, K. S. Song, S. B. Han, H. M. Kim, N. D. Hong, and I. D. Yoo. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **6**, 213-218.