

Ribosomal DNA의 Internal Transcribed Spacer(ITS) 부위의 염기서열분석에 의한 *Phellinus*속의 계통분석에 관한 연구

정지원 · 김기영 · 하명규¹ · 이태호 · 이재동*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹기초과학지원연구소 부산분소

Phylogenetic Analysis of the Genus *Phellinus* by Comparing the Sequences of Internal Transcribed Spacers and 5.8S Ribosomal DNA

Ji-Won Chung, Gi-Young Kim, Myung-Gui Ha¹, Tae-Ho Lee and Jae-Dong Lee*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University Pusan 609-735, Korea

¹Korea Basic Science Institute, Pusan branch 609-735, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to identify the phylogenetic relationship among *Phellinus* species by comparing the DNA sequences of the 5.8S ribosomal DNA (rDNA) and the internal transcribed spacers (ITSs), ITS1 and ITS2 regions. Two primers from the 3' end of 18S rDNA and the 5' end of 28S rDNA sequences were chosen to amplify the specific ITS regions of *Phellinus* spp. *Phellinus* strains used in the study were divided into four clusters by the phylogenetic tree based on the amplified regions of ITS and 5.8S rDNA sequences. The first cluster consist of *Phellinus hartigii* IMSNU 32041 and *Phellinus robustus* IMSNU 32068, and the second cluster consists of *Phellinus linteus* strains and *Phellinus weirianus* IMSNU 32021. *Phellinus laevigatus* KCTC 6229, KCTC 6230 and *Phellinus igniarius* KCTC 6227, KCTC 6228 belong to the third cluster. Finally, *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225 and *Phellinus chrysoloma* KCTC 6226 are the fourth cluster. In the second cluster the differentiation between *Phellinus linteus* strains and *Phellinus weirianus* species were not possible by the comparison of the ITS sequences. These results revealed that *Phellinus linteus* and *Phellinus weirianus* cannot be established the concept of species level only by the ITS sequences. Therefore, both physiological and molecular biological methods as well as the sequences of type strains are necessary to classify the strains of these two species accurately. The comparison of the ITS sequences of four *Phellinus* species indicated that the sequences of the ITS1 generally are more divergent than those of the ITS2. Although the ITS sequences are varied in some species, the conserved regions in both ITS1 and ITS2 are useful tool to differentiate the species. *Phellinus linteus* and related species have their specific sequences in the ITS1 compared to the other species.

KEYWORDS: Phylogeny, *Phellinus* spp., Internal transcribed spacer (ITS).

지난 10년 동안 담자균강 특히, 버섯과 식물병원균류에 대하여 생리화학적 배양분류나 분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류에 의거한 제3의 분류방법이 발달되어 왔다. 이러한 다양한 분자생물학적인 시도중에서도 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되었다. 균류를 포함한 진핵생물의 리보솜 RNA 유전자(리보솜 DNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었지만(Hori and Osawa, 1986; Robert *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1997), 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길이가 상당히 짧고, 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들사이에서는 거의 동일한 sequences를

나타내므로 이들 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 단점이 있었다. 실험시약 및 방법의 발달과 실험기기의 첨단화로 염기서열을 결정하는데 드는 시간과 노력이 감소됨으로 말미암아, Nishida와 Sugiyama(1993)는 *Taphrina*속, *Saitoella*속 그리고 다른 고등균류사이에서의 계통분석에 18S rDNA 염기서열을 이용하였고, Hendriks 등(1991)은 의학적으로 중요한 *Candida*속내의 계통분석에, Swann과 Taylor(1993)는 담자균류의 분류에 18S의 부분염기서열을 결정하여 분류의 지표로 사용하였다. 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다. 그러나 18S와 28S는 각각 1600 bp와 3300-4800 bp로 그 전 염기서열을 결정하는 것은 많은 시간과 노력을 요구하고, 부분염기서열은 보다 광범위한 계통발생학적 진화관계를 가지는 속간의 비교에는 대상으로 하는 염기서열

*Corresponding author

의 부족으로 분류지표로 이용될 수 있는 정보량이 적은 단점이 지적되었다.

Annette 등(1996)은 *Suillus sensu lato* 종으로 인식된 38종을 포함한 47개 분리군으로부터 ITS 염기서열을 분석하여 계통발생적 분류체계를 결정하였고, Bae 등(1996)은 ITS2 부위의 염기서열에 의해 느타리버섯 종간의 관계를 규명했으며, Moncalvo 등(1995)은 ITS 부위와 25S rDNA 염기서열에서 *Ganoderma*속을, Daniel 등(1996)은 *Morchella esculenta*와 *Morchella conica*의 비교에 ITS 부위를 이용하였다. 특히, O'Donnell(1992)은 다양한 지역으로부터 분리된 *Fusarium sambucinum*의 86군주에 대한 ITS sequence를 비교함으로써 종특이적인 probe를 개발하였고, Morton 등(1995)은 *Verticillium alboatrum*과 *Verticillium dahliae*의 ITS sequence를 결정하여 이 결과를 토대로 probe의 개발에까지 연결시키고자 하였다. 이상과 같은 일련의 보고에서 저자들은 한결같이 ITS를 유용한 계통분류의 수단으로 간주하고 있을 뿐만 아니라, 속 및 종 수준의 신속동정에 적합한 probe의 개발 가능성을 강하게 시사하였다. ITS는 가운데의 5.8S를 포함하여 500 bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다.

진흙버섯류는 고등균류의 담자균문(Basidiomycota), 균실강(Hymenomycetes), 민주름버섯목(Aphyllloporales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)의 진흙버섯속(*Phellinus*)으로 분류되는 균종을 지칭한다. 이들은 참나무, 상수리나무, 밤나무, 자작나무, 단풍나무, 아까시나무, 버드나무, 뽕나무, 오리나무, 너도밤나무 및 뽕나무와 같은 활엽수와 소나무, 가문비나무 및 전나무와 같은 침엽수에 서식하며 살아있는 나무와 생활력이 약해진 나무의 줄기나 뿌리, 죽은 나무의 기부, 또는 고목의 그루터기에서 발생한다. 또한 목재를 표백시키는 전형적인 백색부후균류(white rot fungi)에 속하며(정, 1989; Gilbertson *et al.*, 1986) 중에 따라서는 산림에 막대한 피해를 주기도 한다(Gilbertson, 1980; Manion, 1981).

진흙버섯류는 형태적으로 모두 변이가 심하고 종류가 다양할 뿐만 아니라 자실체는 줄기와 갖의 구분이 없으며 대가 없고 표면이 검고 포자가 있는 갖의 안쪽은 황갈색을 띤다고 보고되어 있다(Ying *et al.*, 1987; Larsen *et al.*, 1990). 또한 자실체의 균사가 갈색색소를 지니고 있으므로 갈색균류(brown fungi)로 불리며, 소나무비늘버섯과의 균류들이 지니는 독특한 화학적 성질의 하나로서 KOH 용액에 닿으면 영구적으로 검게 변하는 특성을 지니고 있으므로(Donk, 1964) 손쉽게 확인할 수 있다. 갖의 오래된 부분에서는 표

면의 균사가 분화하여 암색으로 되고 숲과 같이 딱딱하게 되기 때문에 각피를 둘러싸고 있는 것처럼 오해되지만 조직적 분화가 아니기 때문에 의각(pseudocrust)화라고 한다(Rokuya and Tsuguo, 1981). 그리고 다른 버섯들과는 달리 clamp connection을 형성하지 않는 특징이 있으며, 자실체는 막질, 콜크질, 목질 등으로 단단한 특징을 나타내며 자실층은 두터우며 평할, 치아상, 망상, 관공상, 주름모양 등을 나타내고 일반적으로 명료한 형태의 자실층을 형성하지만(Donk, 1964; Rokuya and Tsuguo, 1981; Lee, 1988), 다른 버섯류의 분류가 그러하듯 형태의 다양성과 유사성으로 인하여 동정이 어려운 분류군이다(Sagawa *et al.*, 1992).

뽕나무의 그루터기에서 자생하므로 상황버섯이라고 알려진 *Phellinus linteus*와 *Phellinus igniarius*가 *Phellinus*속의 균종중에서도 매우 강력한 종양저지력을 나타내는데, 이들의 자실체 추출물이 각각 96.7% 및 87.4%의 높은 항암능을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Shibata *et al.*, 1968; Ikekwa *et al.*, 1968). 또한 이들 버섯 균사체 추출물의 항종양작용, 면역조절 효과(Lee *et al.*, 1996; 배 등, 1996) 및 임상실험에 의한 안정성(Jong *et al.*, 1991)이 입증되었으며, 따라서 각종의 산업적 응용연구가 활발하게 진행되기에 이르렀다. 한편 *Phellinus*속내의 여러 균종에서 제한효소의 전기영동 pattern의 비교로 *Phellinus*속의 종들이 동일속으로 분류되기에는 대체로 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며, *Phellinus*속이 속해있는 소나무비늘버섯과내의 유사한 속들을 비교 연구해야 한다고 보고된 적이 있다(정, 1994). 이러한 보고를 바탕으로 본 연구에서는 아직까지 정확하게 분류체계가 확립되어 있지 않은 *Phellinus*속의 계통관계를 명확히 하는 수단으로 rDNA에 대하여 PCR-amplified ITS 부위의 sequence를 비교 분석하였고, 또한 *Phellinus linteus*만이 공통으로 지니는 특정 염기서열 부분을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

시용균주 및 보존

본 실험을 위하여 계통분류에 사용할 기준종으로서 한국과학기술연구원 생명공학연구소와 서울대학교 미생물연구소 표준미생물균주센터에서 진흙버섯속 7종 11균주를 분양 받았다. 또한 남산버섯영농조합에서 상황버섯의 인공재배를 위해 춘천에서 채집한 자연산 *Phellinus linteus*의 자실체로부터 순수분리한 Namsan No. 1 균주와 동국대학교(이, 1997)에서 상황버섯의 균사체 배양을 위해 여주, 경주에서 채집한 *Phellinus linteus*의 자실체로부터 순수분리한 DGUM 25003, DGUM 25004 및 DGUM 25007의 3균주를 실험균주로 사용하였다. 종명, 균주번호, European Molecular Biology Laboratory(EMBL)의 accession number 및 ITS1, 5.8S, ITS2의 크기를 Table 1에 나타내었다.

Genomic DNA의 분리 및 정제

Table 1. *Phellinus* strains used in the study and the nucleotide size of ITS1, 5.8S, ITS2 regions

Species	Sources ^{a)}	Size of ITS1 (bp)	Size of 5.8S (bp)	Size of ITS2 (bp)
<i>Phellinus chrysoloma</i>	KCTC 6225	268	156	200
<i>Phellinus chrysoloma</i>	KCTC 6226	265	157	199
<i>Phellinus igniarius</i>	KCTC 6227	230	156	157
<i>Phellinus igniarius</i>	KCTC 6228	225	156	204
<i>Phellinus laevigatus</i>	KCTC 6229	224	156	195
<i>Phellinus laevigatus</i>	KCTC 6230	224	156	151
<i>Phellinus linteus</i>	KCTC 6190	285	156	167
<i>Phellinus linteus</i>	Namsan No. 1	285	156	167
<i>Phellinus linteus</i>	DGUM 25003	285	156	167
<i>Phellinus linteus</i>	DGUM 25004	285	156	167
<i>Phellinus</i> sp.	DGUM 25007	314	156	170
<i>Phellinus linteus</i>	IMSNU 31014	285	156	168
<i>Phellinus weirianus</i>	IMSNU 32021	311	156	168
<i>Phellinus hartigii</i>	IMSNU 32041	293	156	171
<i>Phellinus robustus</i>	IMSNU 32068	208	156	170
<i>Thelephora terrestris</i>	JMT11606 (U83486 ^{b)})	199	157	218

^{a)}KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Korea, IMSNU: Culture Collection Center Institute of Microbiology Seoul National University, Seoul, Korea, Namsan No. 1: Namsan Mushroom Farming Association, Chuncheon, Korea, DGUM: Microbiology laboratory of Dongguk University, Kyongju, Korea(이, 1997).

^{b)}The determined ribosomal DNA sequences were submitted to the European Molecular Biology Laboratory(EMBL) data library and accession number are indicated in Table 1.

각 균주들의 genomic DNA의 분리를 위해서는 Heng (Heng *et al.*, 1993)의 방법을 사용하였으며 방법은 다음과 같다.

PD배지에 배양한 배양물을 Whatman No. 1 filter paper로 filtration한 후 TE buffer로 세척하였다. 균체 1g당 0.5 ml extraction buffer(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 40 mM EDTA), 0.3 ml benzyl chloride, 0.1 ml 10% SDS를 첨가하고, vortexing하여 50°C에서 30분간 반응하였다. 그 후 0.3 ml의 3M sodium acetate, pH 5.0를 첨가하여 얼음속에서 15분간 방치하고, 4°C, 12000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액과 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 넣고 30분 실온방치 후 동일조건으로 원심분리를 하였다. 상등액을 새 tube에 옮긴 후, RNase(1 mg/ml)를 처리한 후, 2.5 volume의 100% ethanol을 첨가하여 잘 섞은 후 -20°C에서 30분간 동안 방치하였다. 그 뒤 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버리고, 얻어진 DNA 침전물을 2 volume의 70% ethanol로 washing한 후 speed vac에서 건조하여 3차 증류수에 녹인 후 0.8% agarose gel상에서 확인하였다.

PCR(polymerase chain reaction) 및 primer 구성

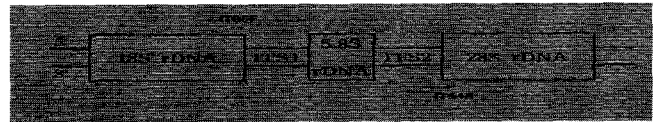


Fig. 1. The location of PCR primers at their complementary region in the rDNA units.

ITS 5F primer : 5'-GGA-AGT-AAA-AGT-CGT-AAC-AAG-G-3'
ITS 4R primer : 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'

분리한 DNA로부터 ITS1과 5.8S 그리고 ITS2 부위를 증폭하기 위해서 한국생공에서 구입한 20 μ l용 PCR premix를 사용하였으며 증폭을 위한 DNA농도는 40 ng으로 조절하였다. 반응용액은 PCR premix에 DNA 1 μ l, forward primer(20 pM) 1 μ l, reverse primer(20 pM) 1 μ l, 3차 증류수 17 μ l를 넣어 섞고 10초간 원심분리를 하여 mineral oil 20 μ l를 첨가하였다. PCR 반응조건은 96°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 30회 반복하였다. PCR primer는 *Saccharomyces cerevisiae*의 특정 부위와 상보적으로 합성되었고, 각 primer의 sequences는 다음과 같다. ITS의 증폭에는 다음과 같은 primer들이 사용되었으며 부착부위는 Fig. 1에 나타내었다.

PCR product의 정제

PCR product의 정제는 1% agarose gel에 PCR product를 100 V의 전압으로 25분간 전기영동한 뒤 EtBr로 염색하여 원하는 band를 잘라 QIAEX II Gel Extraction Kit(150)로 제조자의 설명대로 DNA를 elution하였다.

Band의 무게를 측정하고 3.0 volume의 buffer QX1을 넣고 vortexing한 후 QIAEX II 10 μ l를 넣고 50°C, 10분간 반응시키는 동안 매 2분마다 vortexing하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 1회의 500 μ l buffer QX1, 2회의 500 μ l PE buffer를 처리하여 상등액을 제거하고 남은 pellet을 speed vac에서 건조시키고 20 μ l 멸균수에 녹여 DNA를 QIAEX II에서 녹여내었다.

Auto-sequencing

PCR product를 ABI 377 기종의 auto-sequencer를 사용하여 Dry Terminator Sequencing 기법으로 protocol에 따라 실시하였다. Terminator 반응액 8.0 μ l와 정제한 PCR 반응액의 농도를 확인한 후, 10~30 ng/ μ l 농도 3~6 μ l와 primer 3.2 pM을 섞어 전체 반응액 20 μ l로 맞추었다. PCR 반응조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분의 과정을 25회 반복하는 것으로 하였다. Long range gel을 사용하였고, 90°C에서 heat shock시킨 반응액을 ice에 방치하고 loading하였다.

Clustal W multiple alignment

각 균주의 결정된 염기서열을 Clustal W multiple alignment(Thompson *et al.*, 1994)를 시행하여 비교하고, Neighbor-Joining method로 계통분석도를 그렸다.

결과 및 고찰

본 실험에서 사용한 전체균주에 대한 5.8S 부위의 염기서열을 비교한 multiple alignment를 시행한 후 이 결과를 Neighbor-Joining method에 의해 분석하여 작성된 phylogenetic tree를 Fig. 3에 나타내었다. Phylogenetic tree에서 이들은 전체적으로 3개의 cluster를 형성하였다. 첫 번째 cluster는 *Phellinus laevigatus* KCTC 6229와 KCTC 6230, 두 번째 cluster는 *Phellinus linteus* KCTC 6190, IMSNU 31014, DGUM 25003, DGUM 25004, *Phellinus* sp. DGUM 25007, Namsan No. 1과 *Phellinus igniarius* KCTC 6228과 KCTC 6229, *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225, *Phellinus weirianus* IMSNU 32021, *Phellinus hartigii* IMSNU 32041, *Phellinus robustus* IMSNU 32068로 이루어졌고, 세 번째 cluster는 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6226으로 이루어졌다.

그러나 5.8S 부위는 일반적으로 가장 보존성이 높은 부분이며, 본 실험에 사용된 전체 균주에서 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6226을 제외한 그 크기가 156 bp로 모두 동일하였고, 첫 번째 cluster내에서 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6229와 KCTC 6230은 단 1개의 염기차이를 보였고,

두 번째 cluster내에서는 *Phellinus linteus* DGUM 25003이 다른 *Phellinus linteus*와 역시 단 1개의 염기차이를 보였다. 세 번째 cluster인 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6226은 다른 균주들과는 달리 염기크기는 157 bp이었다. 그리고

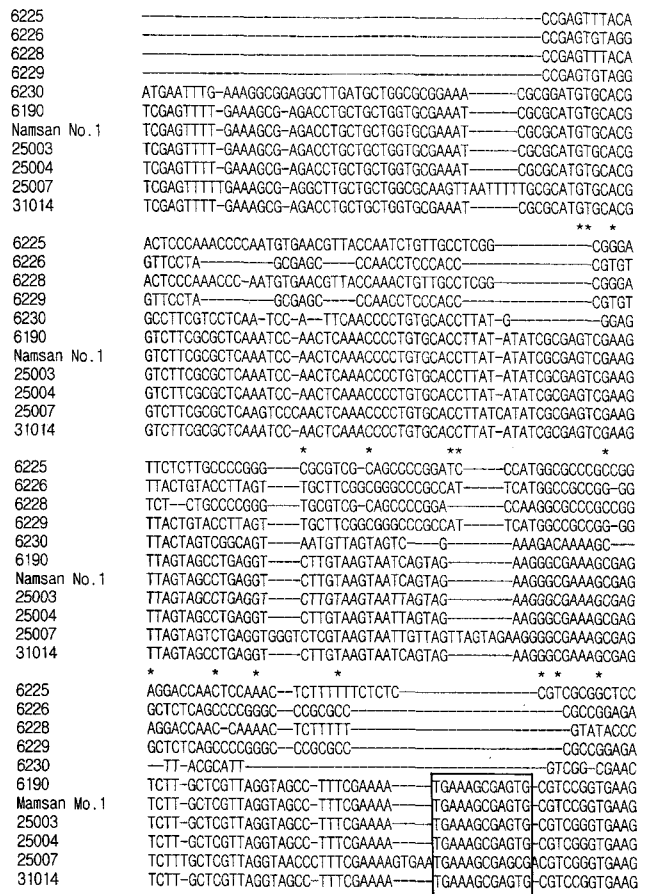


Fig. 2. Comparison of nucleotide sequence alignment of the Phellinus. ITS 1:1 - 316 region, 5.8S rDNA: 317 - 455 region, ITS 2: 456 - 648 region.

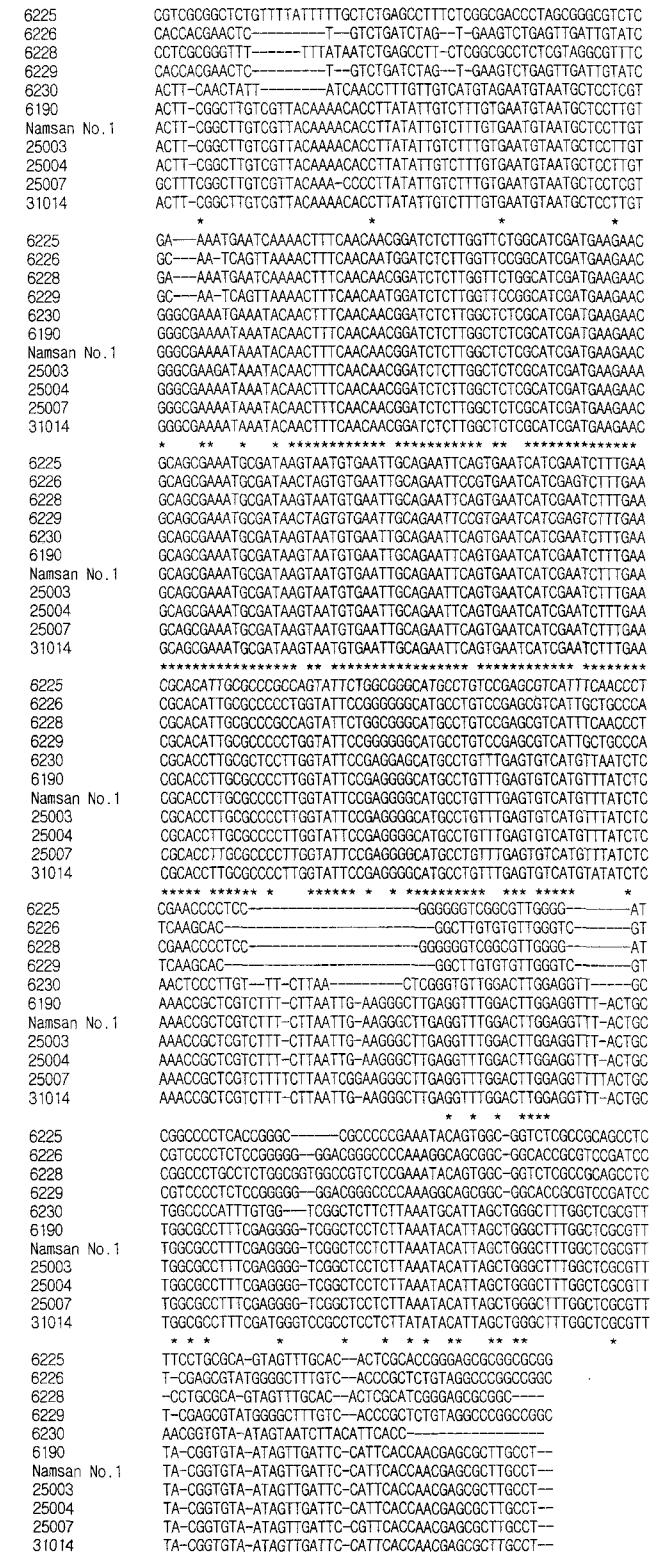


Fig. 2. Continued.

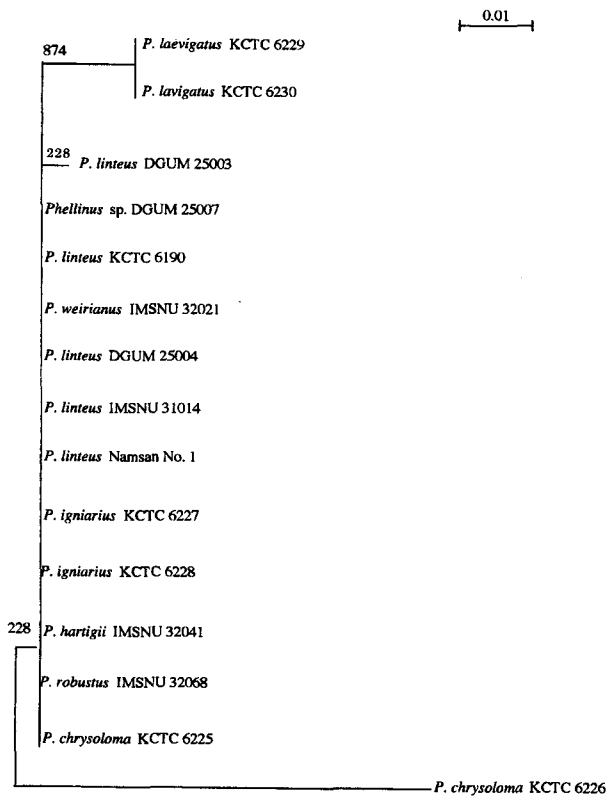


Fig. 3. The phylogenetic tree based on 5.8S rDNA sequences of the genus *Phellinus* by Neighbor-Joining method.

cluster간의 실제 염기서열의 차이는 첫 번째와 두 번째 cluster사이에선 3개, 첫 번째와 세 번째 cluster사이에서도 10개, 두 번째와 세 번째 cluster사이에서는 9개로 나타났다. Fig. 3에서 보듯이 분류모식도에서는 *Phellinus* 단일속을 대상으로 할 경우에 균종간의 계통분류학적인 유연관계가 전혀 파악되지 않으므로 보존성이 높은 5.8S 부위가 속이하의 하위분류군의 계통분류 수단으로는 적합하지 않았으며, 더욱이 종 단위의 특정 probe의 개발을 위한 분류지표로는 대단히 어려운 것으로 보여졌다.

ITS1과 ITS2 그리고 5.8S를 포함하는 ITS1-5.8S-ITS2 부위의 비교를 위해 multiple alignment를 시행해 본 결과, 모두 염기서열 전체 크기의 다양성으로 인해 각각의 균주를 정확하게 비교하는 것은 불가능한 결과로 나타났으며, 이때의 Clustal W multiple alignment를 Fig. 2에 나타내었다. Multialignment의 결과에서 보듯이 전체 ITS1 가운데 공동 염기서열로 표시된 부분은 44개 염기를 나타냈으며, 전체 ITS2 가운데에서는 54개 염기를 나타내었다. 일반적으로 균류에서는 ITS1 부위에 비해 ITS2 부위의 변이율이 높은 것으로 보고되어 있는 것에 반해, 본 실험에서 사용된 *Phellinus*속의 균종에서는 ITS1 부위의 변이율이 더 높은 것으로 나왔을 뿐만 아니라 ITS1 부위에서 그 크기가 각각 268 bp, 265 bp, 230 bp, 225 bp, 224 bp, 285 bp, 314 bp, 311 bp, 293 bp, 208 bp(Table 1 참고)로 인해 비교가 불가능하였다. 종 단위의 특이적인 부위인 ITS1과 ITS2의 multiple

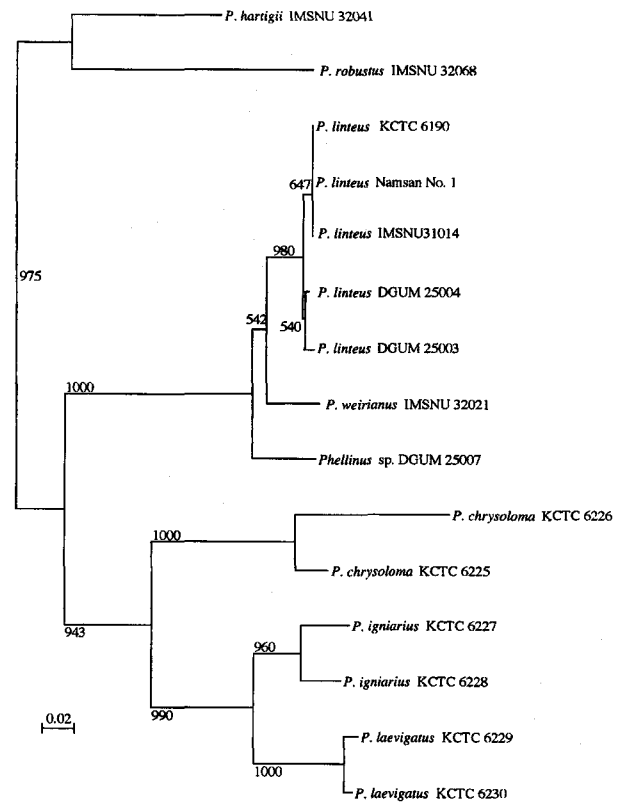


Fig. 4. The phylogenetic tree based on ITS 1 sequences of *Phellinus* by Neighbor-Joining method.

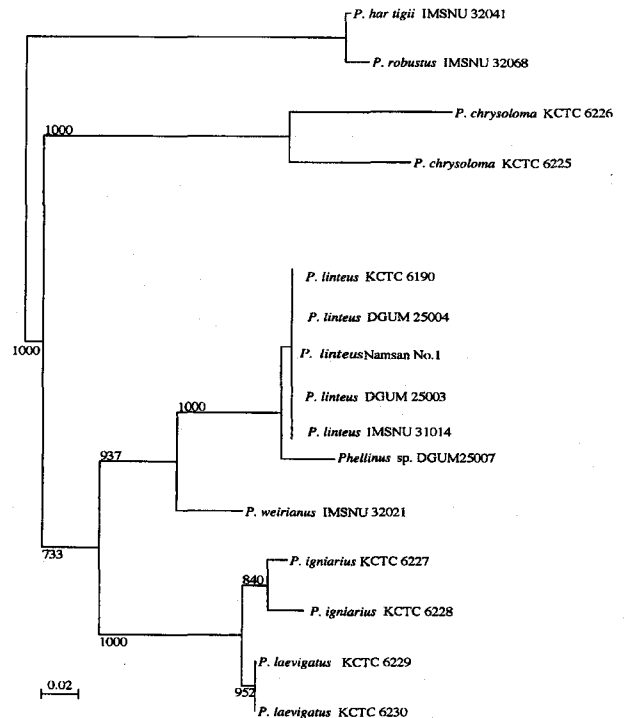


Fig. 5. The phylogenetic tree based on ITS 2 sequences of *Phellinus* by Neighbor-Joining method.

alignment를 계통분석하여 비교해 보았다. ITS1과 ITS2의 계통도는 Fig. 4와 5에서 보는 바와 같이 각각 크게 4개의

cluster를 형성하였다.

ITS1의 계통도를 살펴보면 *Phellinus hartigii* IMSNU 32041, *Phellinus robustus* IMSNU 32068이 한 개의 cluster를 형성하였고, *Phellinus linteus* KCTC 6190, IMSNU 31014, DGUM 25003, DGUM 25004, DGUM 25007, Namsan No. 1과 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021이 한 개의 cluster를, *Phellinus laevigatus* KCTC 6229, KCTC 6230과 *Phellinus igniarius* KCTC 6227, KCTC 6228이 한 개의 cluster를, 또 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225와 KCTC 6226이 마지막 cluster를 형성하였다.

첫 번째 cluster에서 *Phellinus hartigii* IMSNU 32041과 *Phellinus robustus* IMSNU 32068은 그 염기의 크기가 293 bp, 208 bp로 차이가 많아 비교가 불가능하였다.

뿔나무의 그루터기에서 자생하는 버섯으로 상황버섯이라고도 불리워지고 있는 *Phellinus linteus*는 항암효과가 다른 버섯들에 비해 월등히 높아 많은 관심이 집중되고 있는데, 지금은 인공재배가 가능하여 제품화되어 많이 보급되고 있지만 이 제품들이 진짜 상황버섯이냐하는 그 동정이 문제시되고 있다. 이러한 논란을 해결하기 위해 보관균주인 KCTC 6190, IMSNU 31014 *Phellinus linteus*와 남산버섯 영농조합에서 인공재배를 목적으로 춘천에서 자연산 상황버섯의 자실체로부터 순수분리한 Namsan No. 1과 동국대학교에서 상황버섯의 균사체 배양을 위해 여주, 경주에서 채집한 자연산 상황버섯의 자실체로부터 순수분리한 DGUM 25003, DGUM 25004, DGUM 25007의 ITS 부위를 비교하였다(Fig. 2 참고). DGUM 25007은 두 번째 cluster내에서 다른 *Phellinus linteus*들과 ITS1부위에서 48개의 염기차이가 보여 유연관계가 먼 것으로 나타났다. DGUM 25007을 제외한 나머지 균주들은 ITS1부위의 염기서열을 비교했을 때 2개 부위에서 염기차이를 나타낸 것을 제외하고는 완전히 일치했다. 그리고 *Phellinus igniarius*도 높은 항암효과를 나타내지만 *Phellinus linteus*와는 전혀 다른 cluster를 이루어 *Phellinus linteus*와는 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 그리고 *Phellinus linteus*와 유연관계가 가깝다고 알려진 *Phellinus weirianus*도 같은 cluster내에 포함되었으며 *Phellinus linteus* KCTC 6190과는 42개의 염기차이가 났으며 *Phellinus sp.* DGUM 25007과는 73개의 염기차이가 나타났다.

세 번째 cluster내에서 *Phellinus laevigatus* KCTC 6229, KCTC 6230은 3개의 염기차이를 보였고, *Phellinus igniarius* KCTC 6227, KCTC 6228은 17개의 염기차이를 나타냈다. 그리고 전체적으로는 20개의 염기차이를 보였다.

네 번째 cluster내에서는 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225, KCTC 6226은 31개의 염기차이를 보였다.

ITS2의 계통도를 살펴보면 ITS1의 계통도와 마찬가지로 크게 4개의 cluster를 나타내었는데 첫 번째 cluster내에 포함되어 있는 *Phellinus linteus* KCTC 6190, IMSNU 31014, DGUM 25003, DGUM 25004, *Phellinus sp.* DGUM 25007, Namsan No. 1과 *Phellinus weirianus* IMSNU

32021에서는 DGUM 25007이 8개, IMSNU 31014가 4개, 그리고 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021이 17개의 염기차이를 보였고, 두 번째 cluster에서 *Phellinus laevigatus* KCTC 6229와 KCTC 6230은 8개의 염기차이를 보였으며, *Phellinus igniarius* KCTC 6227과 KCTC 6228은 염기서열이 완전히 일치하였다. 세 번째 cluster에서 *Phellinus hartigii* IMSNU 32041과 *Phellinus robustus* IMSNU 32068은 9개의 염기차이를 보였고, *Phellinus igniarius* KCTC 6227과 KCTC 6228은 염기서열이 완전히 일치하였다. 그리고 마지막 네 번째 cluster에서 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225와 KCTC 6226은 34개의 염기차이를 나타냈다.

보존성이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 그리고 변이가 심한 부분이 공존하는 ITS1-5.8S-ITS2의 염기서열은 진화속도가 빠르므로 부분염기서열의 비교에 의한 속, 종의 유연관계의 해석에 유용하기 때문에 ITS1-5.8S-ITS2의 염기서열을 대상으로 한 전체 염기서열에 대한 계통분석도를 살펴보고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 계통도에서 보는 바와 같이 크게 4개의 cluster로 나누어졌다. *Phellinus hartigii* IMSNU 32041, *Phellinus robustus* IMSNU 32068이 첫 번째 cluster를 형성하였고, *Phellinus linteus* KCTC 6190, IMSNU 31014, DGUM 25003, DGUM 25004, *Phellinus sp.* DGUM 25007, Namsan No. 1과 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021이 두 번째 cluster를, *Phellinus*

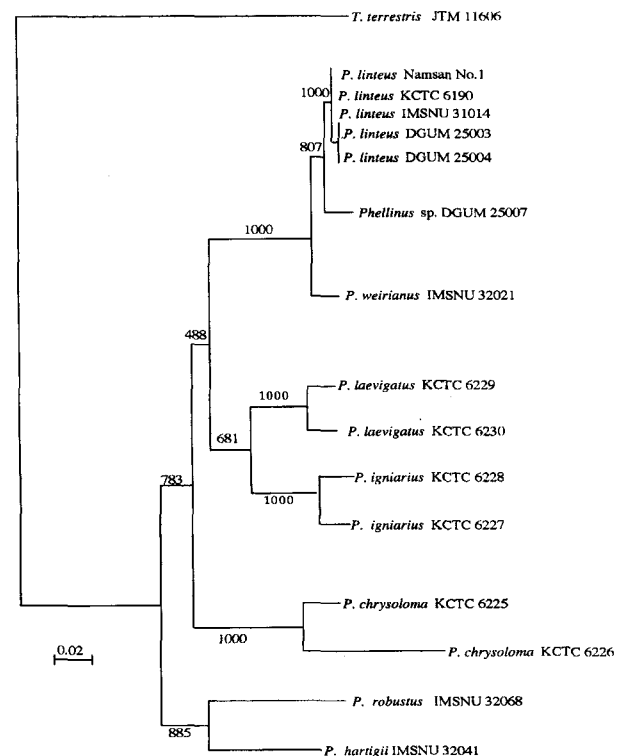


Fig. 6. The phylogenetic tree based on 5.8S rDNA and ITS1-ITS2 sequences of the genus *Phellinus* by Neighbor-Joining method.

laevigatus KCTC 6229, KCTC 6230과 *Phellinus igniarius* KCTC 6227, KCTC 6228이 세 번째 cluster를, 또 *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225와 KCTC 6226이 마지막 cluster를 형성하였다. Out group으로 선택된 *Thelephora*속은 고등균류의 담자균문(Basidiomycota), 균심강(Hymenomycetes), 민주름버섯목(Aphyllporales), 굴뚝버섯과(Thelephoraceae)의 한 속으로 자실층은 부드럽고 치아상, 관공상으로 되어 있다. 균사는 일반적으로 갈색을 띠며, KOH 용액에 닿으면 green색으로 변하는 특징이 있다.

*Phellinus linteus*로 culture collection에 보관되어 있는 KCTC 6190, IMSNU 31014와 자연에서 순수분리되어 자실체를 형성하여 현재 유통되고 있는 Namsan No. 1은 동일한 염기서열을 나타내었다. 그리고 자연에서 순수분리하여 *Phellinus linteus*로 동정된 DGUM 25003과 DGUM 25004는 *Phellinus linteus*로 culture collection에 보관되어 있는 KCTC 6190, IMSNU 31014와 단 3개의 염기차이를 나타내어 이들이 동일종내에 포함되는 것을 시사하고 있으며, 이는 형태학적인 분류결과와 일치하였다. 또한 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021은 *Phellinus linteus* KCTC 6190과 59개의 염기차이를 나타내면서 동일한 cluster 내에 포함되어 형태학적으로 유사하다는 사실을 증명시켰다. 그러나 자연에서 순수분리하여 *Phellinus* sp.로 동정된 DGUM 25007은 *Phellinus linteus* KCTC 6190과는 74개의 염기차이가 나고 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021과도 90개의 염기차이가 나타나 이들과는 다른 균종으로 재동정될 수 있음을 보여주고 있었다. 그리고 DGUM 25007의 경우에는 이 균주를 인공재배하여 제품화하였을 때 기존에 보고된 *Phellinus linteus*의 항암효과와 어떤 차이를 나타내는지를 재검정할 필요가 있을 것으로 간주된다. *Phellinus igniarius*는 같은 항암효과를 가지고 있는 *Phellinus linteus*와는 전혀 다른 cluster를 이루어 서로 유연관계가 먼 것으로 나타났다.

*Phellinus chrysoloma*의 두 균주 KCTC 6225와 KCTC 6226은 하나의 cluster를 형성하였으나 85개의 염기차이를 나타내어 동일종으로 보기에는 어려우며, 차후 type strain과의 정확한 염기서열 결과를 토대로 한 재동정이 필요할 것으로 사료된다.

*Phellinus laevigatus*의 두 균주 KCTC 6229와 KCTC 6230은 염기서열에서 3개의 염기차이를 나타내면서 하나의 cluster를 형성하여 동일종으로 보기에 무리가 없었다. *Phellinus igniarius*의 두 균주 KCTC 6227과 KCTC 6228은 염기서열에서 28개의 염기차이를 나타냈다. 그리고 *Phellinus laevigatus*와 *Phellinus igniarius*는 52개의 염기차이를 나타내면서 하나의 cluster를 이루어 이들 두 균종은 유연관계가 매우 가까운 근연종으로 판단된다.

그리고 전체 ITS1-5.8S-ITS2의 염기서열(Fig. 2)에서 알 수 있듯이 *Phellinus linteus*는 다른 균종들과 비교하였을 때 그들만의 특이적인 염기서열이 ITS1(223-236 부위) 부위에 존재하였고, 형태학적으로 유사한 *Phellinus weirianus*

또한 *Phellinus linteus*와 같은 특이적 염기서열을 동위치에서 찾을 수 있었다. 이들로 미루어 볼 때 *Phellinus weirianus*는 형태학적 뿐만 아니라 분자생물학적으로 *Phellinus linteus*에 매우 가까운 근연종 또는 변이에 의한 동일종으로 추정되며, 향후 이들 두 종간의 정확한 분류체계확립을 위해 균사체 배양과 같은 생리학적 배양분류나 18S rDNA의 full sequences같은 분자생물학적인 유전정보를 첨가하여 균종의 개념을 재고찰 할 필요가 있다고 보아진다.

이 실험의 결과에서 나타난 계통도에서 고찰된 것과 같이 정도의 차이는 있으나 여기에 사용된 모든 종들이 서로 일정한 거리로 계통관계가 떨어져 있으므로 *Phellinus*속의 종들이 대체로 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며, 종간 그리고 종내의 변이에 따른 각 균종의 분류학적인 개념이 확실하지 않은 것으로 판명되었다. 또한 본 실험에서 포함되지 않았던 각 균종의 type strain에 대한 ITS 부위의 염기서열을 결정하여 비교하면 보다 정확한 분석이 가능할 것이며, 보다 정확한 종간의 유연관계를 규명하기 위해서는 본 실험에 이용된 균종 이외의 더 많은 *Phellinus*속의 균종들을 연구대상으로 하여 ITS부위의 염기서열을 결정하여야 할 것이다. 한편으로는 소나무비늘버섯과에 포함되는 *Phellinus*속의 근연 속에 대해서도 이와 같은 방법으로의 연구가 계속되어야 한다고 사료된다.

적 요

본 실험은 진흙버섯류 7종 15균주에 대한 5.8S rDNA와 ITS 부위의 염기서열을 비교 분석함으로써 종간 및 종내의 유연관계를 조사하였다. 5.8S rDNA와 ITS 부위를 증폭하고자 18S rDNA의 3'말단 부위와 28S rDNA의 5'말단 부위에 두 개의 primer를 이용하여 PCR 증폭을 행하였다.

5.8S rDNA와 ITS 부위를 증폭하여 염기서열을 비교 분석한 결과 본 실험에 공시된 *Phellinus*속의 재균종은 크게 4개의 cluster를 형성하였다. 첫 번째 cluster는 *Phellinus hartigii* IMSNU 32041, *Phellinus robustus* IMSNU 32068로 이루어졌고, 두 번째 cluster는 *Phellinus linteus* KCTC 6190, IMSNU 31014, DGUM 25003, DGUM 25004, *Phellinus* sp. DGUM 25007, Namsan No. 1과 *Phellinus weirianus* IMSNU 32021, 세 번째 cluster는 *Phellinus laevigatus* KCTC 6229, KCTC 6230과 *Phellinus igniarius* KCTC 6227, KCTC 6228로 이루어졌으며, *Phellinus chrysoloma* KCTC 6225와 KCTC 6226이 마지막 cluster를 형성하였다.

결과적으로 ITS 염기서열의 결과만으로 볼 때 *Phellinus linteus*와 *Phellinus weirianus*는 명확하게 종 단위의 개념을 정립할 수 없었다. 따라서 정확한 분류를 위해 생리학적, 분자생물학적인 분류방법이 첨가되어야 하며, type strain에 대한 ITS 염기서열도 결정되어야 한다. *Phellinus*속의 균들에서는 ITS2 부위에 비해 ITS1 부위의 변이율이 높았다. ITS 염기서열은 종 구분에 유용한 도구이며, 다른

균종들과 비교해 보았을 때 *Phellinus linteus*와 *Phellinus weirianus*에서만 ITS1 부위에서 특이적인 염기서열을 가지고 있었다.

참고문헌

- 배만중, 박무희, 이재성. 1996. 고등균류 균사체의 면역조절 가능성에 관한 연구. *한국균학회지* **24**(2): 142-148.
- 이창윤. 1997. 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균사체 배양을 위한 최적 조건 및 균사의 효소활성. 동국대학교 석사 학위논문. pp 1-37.
- 정원진, 정확성. 1994. 미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 진흙버섯류의 계통분류. *한국미생물학회지* **32**: 442-448.
- 정확성, 1989. 목재부후균류(담자균 민주름버섯목)의 분류학적 고찰. *미생물과 산업* **15**: 20-23.
- Annette, K., Li, Y., Szaro, T., Bruns, T. D. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* **88**(5): 776-785.
- Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun M. Y. and Rhee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among *Pleurotus* species inferred from sequence data of PCR amplified ITS II region in ribosomal DNA. *Kor. J. Mycol.* **24**: 155-165.
- Daniel, W., Munch, J. C., Botton, B. and Buscot, F. 1996. DNA polymorphism in Morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta*(yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3541-3543.
- Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* **3**: 199-324.
- Gilbertson, R. L. 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* **72**: 1-49.
- Gilbertson, R. L. and Ryvarde, L. 1986. North America polypores. Vol. I. Fungiflora, Oslo.
- Hendriks, L., Goris, A., Peer, Y. V., Neers, J., Vancanneyt, M., Kersters, K., Hennebert, G. L. and Wachter, R. 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.
- Heng Z., Qu, F. and Zhu, L. H. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl. Acids Res.* **21**: 5279-5280.
- Hori, H. and Osawa. 1986. Evolutionary change in 5S rRNA secondary structure and a phylogenetic tree of 352 5S rRNA species. *Biosystem* **19**: 163-172.
- Ikekawa, J., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-157.
- Jong, S. C., Birmingham, J. M. and Pai, S. H. 1991. Immunomodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* **11**: 115-122.
- Ko, K. S., Hong, S. G., Jung, H. S. 1997. Phylogenetic study of *Trichaptum* inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *J. Microbiol.* **35**(2): 79-86.
- Larsen, M. J. and Cobb-Pouille, L. A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae): A survey of the world taxa. Fungiflora, Oslo.
- Larsen, M. J. and Cobb-Pouille, L. A. 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaceae) Pp 1-6. One Gifford Pinchot Drive Madison, WI.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linyeus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 213-218.
- Lee, J. Y. 1988. Coloured Korean Mushrooms. Vol. I. Academic Publishing Co. Ltd.
- Manion, P. D., 1981. Tree disease concepts. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. H. and Hseu, R. S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238.
- Morton, A., Carder J. H. and Barbara, D. G. 1995. Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA genes and relationships between isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathology* **44**: 183-190.
- Nishida, J. and Sugiyama, J. 1993. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 431-436.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum*. *Curr Genet* **22**: 213-220.
- Robert, M., Prillinger, H., Ibl, M. and Himmler, G. 1995. Sequences of ribosomal genes and internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremonium ashbyi*, *Ashbya gossypii* and *Nematospora coryli*, toward *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**: 31-42.
- Rokuya imazeki and Tsuguo hongo. 1981. Coloured illustrations of fungi of Japan. Vol. II. Hoikusha publishing Co., Ltd.
- Sagawa, I., Tanaka M. and Nagata, Y. 1992. Discrimination of mushrooms in genus *Pleurotus* by DNA restriction fragment length polymorphisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 597-603.
- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C. F., Fukuoka, F. and Nakanishim, M. 1968. Antitumor studies on some extracts of basidiomycetes. *Gann.* **59**, 159-161.
- Swann, E. and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: An 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* **85**: 923-936.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **11**: 4673-4680.
- Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. 1987. Icons of Medical Fungi from China. pp. 173-187, Science Press, Beijing.