

## Ribosomal DNA의 ITS 염기서열에 의한 동충하초속균의 유연관계

남성희 · 황재삼 · 조세연 · 구태원  
농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

### Genetic Relationship of *Cordyceps* spp. Based on Internal Transcribed Spacer Sequences of Ribosomal DNA

Sung-Hee Nam, Jae-Sam Hwang, Sae-Yun Cho and Tae-Won Goo  
National Institute of Agricultural Science and Technology Department of Sericulture and Entomology, R.D.A. Suwon, Korea.

#### ABSTRACTS

The genetic relationships among six *Cordyceps* spp. were investigated based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. A portion of the these genes was amplified by PCR. Approximately 590 base pairs were successfully amplified, cloned, sequenced, compared. The nucleotide sequence of the six amplified fragments were aligned by the clustal W program. As a result, *Cordyceps militaris* shared 87, 96, 98, 90 and 97% sequences homology with *Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500 and *Cordyceps sinensis*, respectively. *Paecilomyces japonica* also shared 87, 88, 92 and 87% sequence similarity with *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500 and *Cordyceps sinensis*, respectively.

Key words : *Cordyceps* spp. rDNA, ITS

#### 서 론

동충하초는 분류학상 자낭균강(Ascomycetes)의 맥각균목(Clavicipitales), 동충하초과(Cordycipiteae) 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하는 곤충기생균의 일종으로 감염곤충으로부터 신장된 형태의 직립한 유색 자실체를 형성한다. 원래 동충하초는 중국에서 박쥐나 방과에 속하는 유충에 발생된 *Cordyceps sinensis*로부터 유래되었는데 “Vegetable wasps and Plant worm” “Winter worm summer grass” 또는 “Cordyceps” “동충초” “충초” 등으로 불리우며 불로장생의 비약으로 여겨 결핵, 황달치료 및 아편중독의 해독 등에 사용되었다(Edward, 1963).

또한 최근의 연구결과에 의하면 동충하초(*Cordyceps* spp.)에서 추출된 polysaccharide는 saccoma 180에 항암활성을 나타내며(Ohmori *et al.*, 1989), *Cordyceps militaris*에서 분리한 Cordycepin에서도 항암, 항균 등의 효능이 입증되어 주목을 받고 있다(Cunningham *et al.*, 1950).

현재까지 알려진 곤충기생균은 약 800여종으로 전 세계적으로 널리 분포하며 그 가운데 동충하초는 Kobayasi(1940)에 의해 *Cordyceps*속 282종과 *Torribiella*속 73종의 분류검색표가 발표되었으며 기주특이성을 고려한 특정 곤충감염 동충하초균 300여종이 분류되었다(Simizu, 1994). 또한 국내에서도 *Cordyceps*속 48종, *Hirsutella*속 8종 *Paecilomyces*속 9종등 76종이 보고되어 있다(성, 1996). 그런데 동충하초의 전통적 분류방법은 자실체, 포자 및 균사의 형태, 색 등의 유사성에 기초한 형태적 특징에 의존하여 왔는데 환경적 요인과 생리적 조건변화로 인한 분류학적 문제점을 가지고 있다(Toyama, Ogawa, 1974 ; Ulezlo *et al.*, 1974).

한편, 최근 비섯분류는 생리학적 분류법에 분자생물학적 계통분류 기준을 첨가하여 체계적인 유연관계를 구명하였는데 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) 및 핵 ribosomal DNA를 이용한다. 그 중 rDNA에 의한 분류방법은 계통분류에 많이 응

용되는데 그것은 모든 생물체내에 고루 편재되어 있으며 coding 영역과 noncoding 영역으로 구분되어 종에 따라 수백에서 수천까지 보존적인 염기서열을 가지고 있으나 noncoding 영역은 종속간에 다양성을 나타내기 때문이다(Anderson *et al.*, 1989 ; Suh *et al.*, 1993). 특히 rDNA중 비교적 진화속도가 빠른 Internal transcribed spacer(ITS) 구간은 계통적 유연관계 추정에 유용하게 이용되고 있다.

본 연구에서는 동충하초 속군의 6종에 관하여 ITS region을 PCR로 증폭, 클로닝, 염기서열을 비교하여 이들 동충하초 속군의 상동성을 살펴보았다.

### 재료 및 방법

#### 1. 공시균주 및 배양

본 실험에 사용한 동충하초 6균주 중 5종 *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500은 농업과학기술원 병해충연구실 채집균이며 *Cordyceps sinensis*는 중국의 식용버섯연구소에서 분양받았다(Table 1). 균분리는 water agar상에서 분리된 포자를 이용, PDA(Potato dextrose agar)배지에서 배양하였으며 균총을 떼어내 PD(Potato dextrose)배지를 이용하여 24°C에서, 14일간 회전진탕(150 rpm)하여 배양된 균사체를 12,000 rpm에서 10분 원심하여 얻었다.

#### 2. Genomic DNA분리

균사체는 액체질소를 첨가해 마쇄한 다음 25 mg을 취해 lysis buffer(50mM Tris-Hcl(pH 7.2), 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoethanol) 700 µl를 첨가하여 65°C에서 1시간 열처리하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심후 상등액을 phenol/chloroform(1 : 1)으로 3회 추출한 다음 에탄올로 침전하여 1x TE에 녹인후 genomic DNA로 사용하였다.

#### 3. Polymerase Chain Reaction(PCR)에 의한

#### ITS의 증폭

PCR에 사용된 Primer는 White *et al.*(1990)에 보고된 ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 정제 후 사용하였으며 Template DNA 1 µl(100 ng/µl)와 각각의 프라이머는 1 µl(100 pmol)를 취하여 premix(한국 바이오니아 제작)를 이용 증폭하였다.

반응조건은 initial denaturation step은 94°C에서 5분, denaturation, annealing 그리고 extension time은 각기 94°C 1분, 65°C 1분, 74°C 1분 30초간 25회 반복하였고(Takara PCR Thermal Cycler MP), 1.2 % agarose gel에 전기영동하여 PCR 산물을 확인하였다.

#### 4. DNA회수 및 PCR 산물의 클로닝

염기서열 분석 목적으로 사용될 PCR product DNA는 GeneClean kit II(Bio 101 Inc., U.S.A)를 사용하여 제조회사의 방법에 따라 회수하여 pGEM-T Easy vector system (Promega Co.)을 이용 재조합하였다. 25 ng의 PCR산물, 50 ng의 vector, 3 unit의 T4 DNA ligase, 1 µl의 10×buffer 및 증류수를 혼합하여 전체 부피를 10 µl로 맞춘 후 4°C에서 3시간 반응시켰다. 재조합된 벡터의 형질전환을 위해 2 µl의 반응물과 50 µl competent cell(JM109, Promega Co.)을 혼합하고 얼음에 20분간 둔 다음 42°C에서 45~50초간 열충격을 가하고 1~2분간 얼음에 방치하였다. 형질전환 과정을 거친 세포를 LB배지에서 1시간 동안 진탕배양(200 rpm)한 다음 원심분리(12,000 rpm, 1 min)하여 적당량의 LB에 현탁한 후 ampicillin이 첨가된 LB 고체배지에 도말하였다. Blue /white screening에 의해 선발된 white colony를 배양하여 유전자 단편의 삽입 여부를 확인하였다.

#### 5. 자동 염기서열 및 Data 분석

형질전환된 *E. coli* colony를 취해 ampicillin이 첨가된 50 ml의 LB배지에 배양한 후 Wizard Plus SV Minipreps kit(Promega Co.)를 이용해 plasmid DNA

Table 1. List of Entomogenous specice used ITS region analysis

No.	Fungal species	Locality	Date	Host	Stage
J1	<i>Cordyceps militaris</i>	Kangwon, Mt. Sorak	'95. 9. 2	<i>Agrius convolvuli</i>	pupa
J2	<i>Paecilomyces japonica</i>	Dyunggi, Mt. Kyangkyo	'95. 9. 14	<i>Dendrolimus spectabilis</i>	pupa
J3	<i>Paecilomyces</i> sp. J300	Chungnam, Mt. Mansu	'96. 7. 7	-	pupa
J4	<i>Paecilomyces farinosa</i>	Kyungi, Mt. Youngin	'95. 9. 28	-	pupa
J5	<i>Paecilomyces</i> sp. J500	Chungbuk, Mt. Choryong	'96. 8. 1	-	pupa
J6	<i>Cordyceps sinensis</i>	China, Edible Fungi Institute	'97. 8. 25	<i>Endoclyta excrescens</i>	larva

를 분리·정제하였다. 자동 염기서열은 ABI prism 377 DNA sequencer를 사용하였으며, cycling sequencing은 terminator ready reaction mixture 8  $\mu$ l와 template DNA (500 ng/ $\mu$ l), primer 2  $\mu$ l(3.0 pmol), 그리고 증류수를 첨가하여 전체 20  $\mu$ l volume으로 맞춰 PCR에 사용하였다. Sequencing에 사용한 primer는 T7 primer와 Sp6 primer이며, 94°C에서 5분간 denaturation하여 1.5  $\mu$ l씩 loading, 7시간 동안 running하여 염기서열을 읽은 후, Clustal W program을 이용하여 multialignment하여 종간의 homology를 분석하였다.

## 결 과

본 연구실 보존 동충하초균주의 유연관계를 조사하기 위하여 Primer ITS 1과 ITS 4를 사용하여 6종 (*Cordyceps militaris*, *Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500, *Cordyceps sinensis*)의 균주에 대해 ITS 영역을 증폭하여 590 bp 정도의 단일 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 1). 이들 염기서열을 조사한 결과 *Cordyceps militaris*는 588bp, *Paecilomyces japonica*는 590bp, *Paecilomyces* sp. J300은 589bp, *Paecilomyces farinosa*는 588bp, *Paecilomyces* sp. J500은 588bp 및 *Cordyceps sinensis*에서는 590bp였다. 얻어진 단편의 염기서열 분석을 위해 우선 pGEM-T Easy vector에 이들 단편을 클로닝하여, 단편의 삽입 여부를 확인하기 위해 pGEM-T Easy vector의 poly-

cloning site를 두가지 제한효소 *Pst* I 과 *Sph* I 으로 절단한 결과 3kb의 vector와 PCR로 증폭하여 얻어진 단편 크기의 insert를 얻을 수 있었다. 얻어진 클론의 염기서열은 ABI PRISM 377 automatic sequencer를 사용하여 염기서열을 결정하였고(Fig. 2), 결정된 염기서열은 Clustal W program을 이용하여 multialignment하여 종간의 homology를 분석하였다 (Table 2).

그 결과 *Cordyceps militaris*는 *Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces* sp. J500에 대하여 87, 90%의 상동성을 나타내었고, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Cordyceps sinensis*에 대하여는 96, 98, 97%의 높은 상동성을 나타내었는데 특히 *Cordyceps sinensis*는 중국 고산지대의 저온환경에서 생육하는 균으로 다른 균주가 20~25°C에서 생육이 활발한 것과 비교해 볼때 배양조건이 다르고, 이들 자실체의 형태와 색상에 있어서도 많은 차이점이 있는 것을 고려할 때 이들 높은 상동성은 균주의 유연관계와 자실체의 형태 혹은 생육조건 사이에 특별한 연관성은 없는 것으로 나타났다. 그러나 균주 가운데 배양형태와 분생자병 및 분생포자의 형태가 유사한 *Paecilomyces* sp. J300 및 *Paecilomyces farinosa*는 97%의 상동성을 나타내었으며 *Paecilomyces japonica*는 공시한 *Paecilomyces* 속균과의 배양 형태상 포자크기, 형태 면에서 차이점이 나타나는데 87~92%로 비교적 낮은 상동성을 나타내었다. 또한 *Cordyceps sinensis*는 *Paecilomyces farinosa*와 98%의 높은 상동성을 나타내었다.

이상의 결과에서 동충하초 속균들의 형태학적 분류방법에 있어 분생포자 및 분생자병의 형태 분류의 연관성과 상동성은 비슷한 경향을 나타내었으나, 자실체 형태와 상동성과의 관련성은 낮게 나타나 Lee(1991)가 보고한 Isozyme pattern에 의한 계통분류의 결과 기생하는 곤충이 동일 혹은 유사하더라도 동충하초의 균종간 동위효소 pattern은 상당히 상이하며 유연관계가 낮게 나타난 보고와 비교했을 때 동충하초의 분류는 간단하지가 않고 다양한 분류학적 시각으로 연구되어야 하겠다.

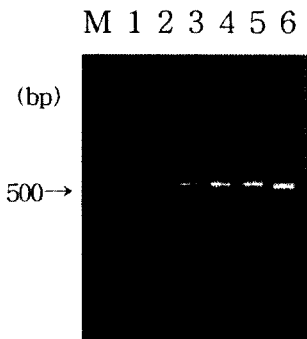


Fig. 1. Electrophoresis of PCR-amplified products targeted to the ITS region of *Cordyceps* spp.

M : PCR markers, 1 : *Cordyceps militaris*  
2 : *Paecilomyces japonica*, 3 : *Paecilomyces* sp. J300  
4 : *Paecilomyces farinosa*, 5 : *Paecilomyces* sp. J500  
6 : *Cordyceps sinensis*

## 고 찰

지금까지 rDNA 반복체 단위내에 존재하는 ITS 부위의 길이 차이에 의한 곰팡이 혹은 고등식물의 종 및 품종구분은 최근에 많은 연구가 되어왔다. 그러나

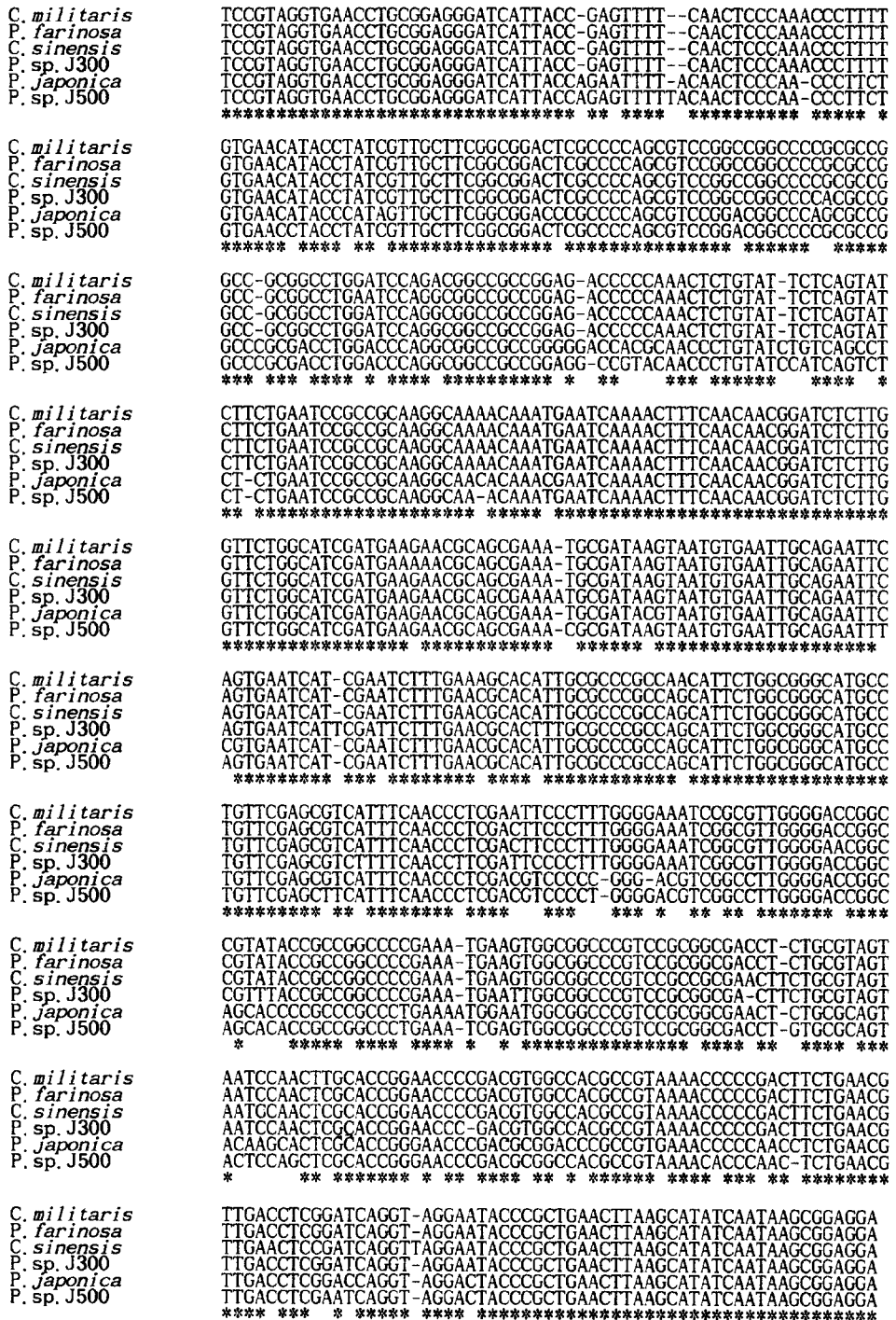


Fig. 2. Alignment of PCR amplified nucleotide sequences of the ITS region. The origins of the amplified *Cordyceps* spp. are indicated to the left. Asterisks(\*) indicate nucleotides common to all species.

**Table 2.** Levels of similarity based on ITS region of *Cordyceps* spp.

1. *Cordyceps militaris* 2. *Paecilomyces japonica* 3. *Paecilomyces* sp. J300  
 4. *Paecilomyces farinosa* 5. *Paecilomyces* sp. J500  
 6. *Cordyceps sinensis*

Fungal species	% rDNA gene sequence similarity					
	1	2	3	4	5	6
<i>Cordyceps militaris</i>	100					
<i>Paecilomyces japonica</i>	87	100				
<i>Paecilomyces</i> sp. J300	96	87	100			
<i>Paecilomyces farinosa</i>	98	88	97	100		
<i>Paecilomyces</i> sp. J500	90	92	89	90	100	
<i>Cordyceps sinensis</i>	97	87	96	98	89	100

현재까지 동충하초의 분류법은 형태학적 분류체계에 의존하고 있으며 rDNA 구조 분석 등 분자생물학적 분류법에 대한 시도는 미약하므로 본 실험에서 rDNA 반복체 내에서 ITS부위의 PCR 증폭기법에 의하여 증폭한 단편을 분석하였다. 그 결과 6종의 동충하초에 관해 단편은 약 590bp 크기로 길이 차이는 없었다. *Cordyceps militaris*는 형태학상 실온에서 기주 표피로부터 1개 내지 여러개 곤봉형의 주황색 자실체를 형성하며 *Cordyceps sinensis*는 중국의 고산 저온지대에서 주로 채집되는 종으로 기주의 머리에 단 1개의 암적색 자실체만 형성되어(Shimizu, 1994) 두 종에 있어서 배양환경 및 자실체 형태면에서 많은 차이점을 가짐에도 불구하고 염기서열 분석 결과에서는 97%의 높은 상동성을 나타내었다. 또한 *Paecilomyces farinosa*는 2~8개의 자루모양의 흰색 자실체를 형성하는데 이 종 또한 *Cordyceps militaris*와 *Cordyceps sinensis*와 각각 98%로 높은 상동성을 나타내어 형태 분류학상에서 차이를 가지고 있었던 *Cordyceps* 속이 *Paecilomyces* 속과 매우 가까운 유연관계를 나타내고 있는 것을 확인할 수 있었다. 더욱이 *Cordyceps sinensis*는 *Paecilomyces* sp. J300과 96%의 상동성을 나타내고 있으며 같은 *Paecilomyces* 속 내에서도 *Paecilomyces japonica*는 다른 종과의 89% 내외의 상동성을 나타낸 것에 비추어 본 실험에 공시한 *Cordyceps* 속 2종과 *Paecilomyces* 속이 최고 98% 까지 상동성을 나타내는 것은 주목할 만한 일이다.

동충하초의 형태학상 분류법에 있어서 분생자병 혹은 분생포자의 배양형태는 거의 유사하여 전문가가 아니면 분류학상 오류를 범하기 쉽다. 또한 본 실험에서는 기존의 전통 분류방법인 형태분류에 의한 종

의 유연관계를 재확인할 수 있었으며, 형태학적으로 큰 차이에 의해 유연성이 멀것으로 추측되었던 *Paecilomyces* 속과 *Cordyceps* 속 2종이 매우 높은 상동성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 앞으로의 과제는 동충하초 속군의 정확한 분류 및 동정을 위해 형태적 분류법과 분자생물학적 기법을 병행하는 것이 이상적이라 사료되며 특히 약리효과 등의 시험에 사용되는 균주에 관하여 상동성과 관련한 체계적인 계통 분류가 이루어진 균주를 이용하여 생화학적 연구나 약효연구가 이루어져야 할것으로 본다.

또한 추후에는 동충하초 속군의 상동성을 분석함에 있어서 보다 많은 종을 공시하여 유연관계를 조사하면 이들 균주의 계통적 분류에 유용하게 이용될 수 있고 실험실에서 새롭게 개량된 변이주를 구분하는데 효과있는 tool로서 이용 가능할 것으로 생각된다.

## 적 요

동충하초속군 6종에 관하여 ITS 부위를 포함하는 ribosomal DNA 반복체를 PCR 증폭에 의하여 확인하였다. 결과 약 590 bp의 단편을 확인하였으며 ITS 부위의 염기서열 분석 결과 *Cordyceps militaris*는 *Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500, *Cordyceps sinensis*에 대하여 87, 96, 98, 90, 97%의 상동성을 나타내었고, *Paecilomyces japonica*에 대하여 *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500, *Cordyceps sinensis*는 87, 88, 92, 87%로 나타났으며 *Paecilomyces* sp. J300는 *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J500, *Cordyceps sinensis*에 대하여 97, 89, 96%로 나타났으며 *Paecilomyces farinosa*는 *Paecilomyces* sp. J500, *Cordyceps sinensis*에 대하여 90, 98%의 상동성을 나타내었으며 *Paecilomyces* sp. J500와 *Cordyceps sinensis*는 89%를 나타내었다. 또한 *Cordyceps* 2종은 *Paecilomyces farinosa*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces* sp. J500 3종과는 90~98% 범위의 높은 상동성을 나타내었다.

이상의 결과에서 *C. militaris*, *Paecilomyces* sp. J300, *Paecilomyces farinosa*, *C. sinensis*는 균 상호간에 95% 이상의 높은 상동성을 나타내었으며 *Paecilomyces japonica*는 다른 *Paecilomyces* 속과 상대적으로 낮은 상동성을 나타내었다.

## 인용문헌

- Anderson, J. B., S. S. Bailey and P. J. Pukkila.(1989) Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution* **43** : 1652-1662
- Cunningham, K. G., W.Manson, F. S. Spring and S. A. Hutchinson.(1950) Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*(Linn.) Link. Part. I Isolation and Characterization. *J. Chem. Soc.* pp. 2299-2300
- Edward A. Steinhaus(1963) *Insect pathology* Academic Press Vol 2, pp.273-289
- Kasuga, T., C. Woods, S. Woodward and K. Mitchelson (1993) Heterobasidion annosum 5.8S ribosomal DNA and internal transcribe spacer sequence : Rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Curr. Genet.* **24** : 433-436.
- Kobayasi, Yosio(1940) The genus *Cordyceps* and its allies, Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B., 56-260
- Ohmori, T., Tamura, K., Fukui, K., Kawanishi, G., Mitsuyama, M., Nomoto, K., and Miyazaki, T.(1989) Isolation of galactosaminoglycan moiety(CO-N) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and its effects against murine tumors. *Chem. Pharm. Bull.* **37** : 1019-1022
- Shimizu, D.(1994) Color iconography of vegetable wasps and plant worm. Seibundo Shinkosha. Japan, pp. 10-381
- Suh, Y., L. B. Thien, H. E. Reeve and E. A. Zimmer(1993) Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in witeraceae. *American Journal of Botany*, **80**(9) : 1042-1055.
- Toyama, N. and K. Ogawa(1974) Comparative studies on cellulolytic and oxidizing enzymes of edible and wood rotters. *Mushroom Science*, **9** : 745-760
- Ulezlo, V., V. upcrova and R. Feniskova.(1975) Oxidative enzymes of the lignindegrading fungus. *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*, **11** : 535-538
- 성재모(1996) 한국의 동충하초, 교학사, pp. 12-271
- 이준우, 이권행(1991) Isozyme patterns 차이에 의한 영지, 치마버섯 및 동충하초의 계통분류 *Kor. J. Mycol.* **19**(2) : 101-108