

동충하초의 계통분류 및 시판동충하초의 분류학적 위치

김순한* · 이영자 · 김인복 · 김미경 · 한정아 · 홍무기¹ · 이순호¹ · 이재동²

부산지방식품의약품안전청

¹식품의약품안전청 식품평가부

²부산대학교 생명과학부

Phylogenetic Analysis of the Entomopathogenic Fungal Species and Taxonomical Positions of Their Commercial Products

Soon-Han Kim*, Young-Ja Lee, In-Bok Kim, Mi-Gyeong Kim, Jeong-A Han,
Moo-Ki Hong¹, Soon-Ho Lee¹ and Jae Dong Lee²

Busan Regional KFDA, Busan 608-829, Korea

¹Food Evaluation Department, KFDA, Seoul 122-704, Korea

²Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

This study was carried out to identify the phylogenetic relationship and to know the distribution of the entomopathogenic fungi by comparing the DNA sequences of internal transcribed spacer regions (ITS1 and ITS2) and 5.8S ribosomal DNA (rDNA) repeat unit. The entomopathogenic fungi had their specific sequences in ITS1 and 2 regions depending on species. The comparison of the ITS sequences of standard strains indicated that the sequences ITS1 were more variable than those of ITS2. It seems that *Paecilomyces tenuipes*, *Isaria japonica* and *P. japonicus* are the same species but called as different names because of very similar sequences, and unidentified *Paecilomyces* sp. KACC 40220 and KACC 40656 showed identical sequences to *P. tenuipes*. Thirty six strains of the commercial products of entomopathogenic fungi used in this study were divided into four groups by the phylogenetic analysis based on 5.8S rDNA and ITS regions. We found twenty-three strains were *P. tenuipes/japonica*, eleven strains were *C. militaris*, and other two strains were *Beauveria bassiana* and *C. multiaxialis*, respectively.

Key words – ITS, phylogenetic analysis, entomopathogenic fungi, *Cordyceps*, *Paecilomyces*

서 론

동충하초(冬蟲夏草)라는 이름은 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에는 풀처럼 돌아나는 모습에서 연유된 것으로,

동충하초균이 곤충의 몸에 침입하여 기주의 영양분을 이용하여 내생균핵을 만든 다음, 밖으로 자실체를 형성하는데, 이것이 바로 동충하초 버섯이다[14]. 대부분의 동충하초균은 자낭균아문, 핵균강, 맥각균목, 동충하초과에 속하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 세계적으로 널리 알려져 있다[3,10]. 현재 곤충을 비롯한 절지동물, 균류, 또는 고등식품의 종자 등에 기생하는 균류에 속하는 모든 균류

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-51-610-6249, Fax :

E-mail : lambndog@kfda.go.kr

를 넓은 의미에서 동충하초라고 하며, 이들 중에서 곤충에 침입하는 동충하초균은 세계적으로 약 800여종이 알려져 있고, 버섯을 형성하는 것으로 알려진 것은 대부분 자낭균류의 동충하초속(*Cordyceps*)에 속하는 균들로서 약 300여종이 보고되었고[16], 한국에서 동충하초로 채집, 분류된 것은 70여종에 이른다[15].

중국의 고서들에 의하면 동충하초는 암질환, 간질환, 폐질환, 뇌질환, 순환기 질환, 심장병, 당뇨병 등에 탁월한 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 현대실용중약전에는 폐결핵, 노인쇠약성 만성결핵 빈혈, 허약체질 등을 치료한다고 나타나 있다. 최근에는 종양 억제율이 83%로 높은 항암효과 및 마약중독의 해독제로서도 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며[2,8,13], 자연 치유력을 가지고 있어서 심한 운동으로 체력소모가 많을 때 회복효과가 있다고 보고하고 있어 이에 대한 관심이 증가되고 있다[5,7]. 특히 우리나라의 경우 *Paecilomyces japonica*/*P. tenuipes*, *Cordyceps militaris*가 식품의 원료로, *C. sinensis*가 생약으로 허용되어 있어 수요가 점점 증가되고 있는 추세이다[1,9,18]. 수요증가에 따른 공급은 자연채집보다는 인공재배가 대부분을 차지하고 있으며, 이러한 제품의 대부분은 보존의 효율성을 위해 열풍건조되어 판매되고 있으며, 일부의 경우는 액상이나 분말상 또는 환 등으로 가공되어 있어 형태에 의한 종의 분류는 사실상 불가능하여 소비자들이 오인할 소지가 많고, 안전성이 확보되지 않는 균종의 유통으로 인한 심각한 문제를 초래할 수도 있어, 정확한 종의 동정이 절실히 요구되고 있다.

지난 10여 년 동안 버섯류, 곤충 및 식물병원균류에 대하여 생리화학적 배양분류나 분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류에 의거한 제3의 분류방법이 발달되어 왔다[3,16,17,19]. 이러한 시도들 중에서도 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되고 있다[6,10]. 특히 internal transcribed spacer (ITS)부위는 가운테의 5.8S를 포함하여 약 500bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고, 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균 종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 분자 진화속도가 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 유연관계 연구에 유용한 수단으로

평가되고 있다[3,11].

따라서 본 연구는 동충하초 균들의 ITS sequences에 의한 분류가 효과적인 수 있다는 일부 보고[3,10,11]를 참조하여, ITS 1, 5.8S rDNA 및 ITS 2부위의 염기서열을 비교함으로써 다양한 동충하초균들에 대한 계통발생학적 분석방법을 검토하였고, 아울러 국내에서 유통중인 동충하초 제품들에 대한 분류와 종분포도에 관하여 광범위하게 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

정확한 균의 동정을 위해 KACC, KCTC 등 다양한 균주 분양센터에서 분양을 받아 표준균주로서 사용하였으며, 일부 균주는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.gov>)에서 ITS sequences가 등재되어 있는 것을 사용하였다 (Table 1). 이러한 표준균주들은 PD (Potato Dextrose) broth 100ml에 접종하여 25°C에서 일주일간 회전 진탕 배양시킨 후 filtration과 원심분리를 통하여 균사체를 모아 냉동 보관하여 이후의 실험에 사용하였다.

아울러 국내 유통중인 동충하초의 분류학적 위치를 조사하기 위하여 전국 각지에서 36종을 구입하여 본 연구에 사용하였다 (Table 2).

DNA추출 및 PCR amplification

DNA추출은 균사체 0.2g을 액체질소를 넣어 마쇄한 후, DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 3차중류수에 녹여 일부는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 DNA를 확인한 후 다음의 사용을 위해 -20°C에서 보관하였다. ITS1, ITS2 및 5.8S rRNA gene을 coding하고 있는 rDNA영역을 각 균주 및 sample들로부터 polymerase chain reaction (PCR)에 의해 증폭하였다. PCR에 사용된 primer는 ITS sequencing에 범용적으로 사용되는 White 등이 보고[22]한 ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG-3')와 ITS4R (5'-TCCTCCG-CCTATTGATATGC-3')를 각각 사용하였으며 (Fig. 1), 분리한 DNA로부터 ITS1, 5.8S rDNA 및 ITS2부분을 증폭하기 위하여 PCR premix (Bioneer Co., Korea)에 template DNA

Table 1. List of fungal species and GenBank accession number of the genus *Cordyceps*, *Paecilomyces* and related taxa used in this study

Fungal species	Strains *	Accession No.
<i>Cordyceps militaris</i>	KCTC 6862	-
<i>Cordyceps militaris</i>	KACC 50810	-
<i>Cordyceps militaris</i>	KACC 40226	-
<i>Cordyceps militaris</i>	KACC 40655	-
<i>Cordyceps nutans</i>	KACC 50169	AF224274
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	KCTC 6473	AF208524
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	KCTC 16017	AF199592
<i>Cordyceps sinensis</i>	MPNU 8002	AF291749
<i>Isaria japonica</i>	DGUM 32001	AF200370
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	EFCC-C240	AF200368
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	EFCC-C660	AF200369
<i>Paecilomyces japonicus</i>	KACC 40503	AF224689
<i>Paecilomyces</i> sp.	KACC 40219	AF224690
<i>Paecilomyces</i> sp.	KACC 40220	AF224691
<i>Paecilomyces</i> sp.	KACC 40221	AF291750
<i>Paecilomyces</i> sp.	KACC 40656	AF224273
<i>Paecilomyces variotii</i>	KACC 40246	AF291869
<i>Paecilomyces variotii</i>	KCCM 60009	AF291870
<i>Beauveria bassiana</i>	KACC 40024	AF291872
<i>Beauveria bassiana</i>	KACC 40218	AF291871
<i>Metarhizium anisopilae</i>	KACC 40029	AF293842
<i>Metarhizium</i> sp.	KACC 40230	AF293843

*KACC: Korean Agricultural Culture Collection, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea

KCTC: Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon, Korea

KCCM: Korea Culture Center of Microorganisms, Korea

MPNU: Mycological lab. of Pusan National University, Pusan, Korea

EFCC: Entomopathogenic Fungal Culture Collection, Kangwon National University, Korea

DGUM: Microbiology lab. of Dongguk University, Kyongju, Korea

Table 2. List of the commercial products of Entomopathogenic fungi used in this study

Product No.	Product Type	Geographical Origin
1	Fruiting-body	China
2	Fruiting-body	Chungbuk
3	Fruiting-body	Kangwon
4	Powder	Kangwon
5	Powder	Kangwon
6	Fruiting-body	Kangwon
7	Fruiting-body	Kangwon
8	Fruiting-body	Kangwon
9	Fruiting-body	Kangwon
10	Powder	Kangwon
11	Fruiting-body	Chungbuk
12	Fruiting-body	Chungnam
13	Fruiting-body	Kyungbuk
14	Fruiting-body	Kyunggi
15	Fruiting-body	Kyungnam
16	Fruiting-body	Kyunggi
17	Fruiting-body	Kyungbuk
18	Pill	Chunbuk
19	Fruiting-body	Chunbuk
20	Fruiting-body	kyunggi
21	Fruiting-body	Kyunggi
22	Fruiting-body	Chunbuk
23	Powder	Kyunggi
24	Pill	Chunbuk
25	Fruiting-body	Chunbuk
26	Fruiting-body	Kangwon
27	Fruiting-body	Kangwon
28	Fruiting-body	Kangwon
29	Fruiting-body	Chungnam
30	Fruiting-body	Chunnam
31	Fruiting-body	Kangwon
32	Fruiting-body	Kangwon
33	Fruiting-body	Kangwon
34	Fruiting-body	Seoul
35	Fruiting-body	Chunbuk
36	Fruiting-body	Chunbuk

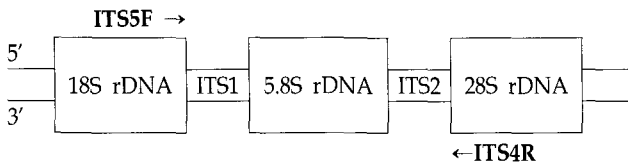


Fig. 1. A map of the ribosomal DNA region containing ITS1, 2 and the 5.8S rDNA. Arrows indicate the position of the primers used for PCR and sequence analysis.

1 μ l (40ng), primers (ITS5F 및 ITS4R) 각 1 μ l (20pmol), 증류수 17 μ l를 넣어 총 20 μ l로 만들었다.

PCR (GeneAmp PCR system 9600, Applied Biosystems) 조건은 pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C/5분, 30cycles (denaturation 94 $^{\circ}$ C/30초, annealing 50 $^{\circ}$ C/30초, 그리고 extension 72 $^{\circ}$ C/1분)로 증폭하였으며, 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 연장반응을 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보존하였다. 증폭후의 PCR product들은 TBE buffer로 1.6% agarose gel상에서 전기영동을 행하여 순도를 확인하였으며, 이러한 PCR product의 정제는 전기영동상에서 나타난 band를 잘라 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)로서 정제하여 sequencing에 사용하였다.

Auto-Sequencing

Sequencing 반응은 제조사가 제공한 protocols에 따라 AmpliTaq DNA polymerase가 포함된 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied biosystems, U.S.A.)를 사용한 MJ Research Gradient Cycler에서 행해졌다.

각각의 정제된 PCR product들을 대상으로 single-pass sequencing을 하였으며, fluorescent-labeled fragment들은 ethanol-침전법에 따라 unincorporated terminators로부터 정제되었다. 이러한 시료들은 3차 증류수로 재현탁하여 ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems)에서 전기영동함으로서 염기서열을 분석하였다. 각 시료에 대해 ITS5F (forward)와 ITS4R (reverse)의 두 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였고, 최종 결과를 비교하였다.

Data analysis

각 균주의 결정된 염기서열을 Clustal X multiple alignment [20]를 시행하여 비교하였고, Neighbor-Joining method [12]로서 계통분석도를 그렸다. Distance values분석을 위

하여 DNADIST in PHYLIP version 3.5[4]을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Sequence alignment 및 distance values

표준균주 22종과 전국 각지에서 구입한 제품 36건의 PCR product들에 대해 alignment를 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2부위의 distance values를 구하여 Table 3에 나타내었다. 각 sequence들의 앞부분에 존재하는 ITS1 부위에서는 중간 변이율이 높은 것으로 나타났으며, 5.8S rDNA 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성을 나타내어 중간 변이율이 매우 낮게 나타나고 있었다. 또한 뒷부분에 나타나는 ITS2 부위에서도 많은 염기서열상의 차이를 보이고 있으나 ITS1 부위보다는 변이율이 높지 않았다. 특히 *C. militaris*로 알려진 표준균주 4종과 구입한 제품 11종에서 조사된 전 부위(ITS1, 5.8S rDNA, ITS2)에서 수 개의 염기서열 차이만을 보이고 있으며, 그 외에도 같은 종으로 확인된 표준균주들과 구입한 제품들에서는 1~4 bp 정도의 차이만을 보이고 있는 것으로 나타났다. 이것으로 판단해 볼 때 보존성이 높은 부분, 중간정도의 부분, 그리고 변이가 심한 부분이 공존하고 있는 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2부위의 염기서열을 비교함으로써 속(genus) 및 종(species)간의 유연관계의 해석에 유용할 것으로 판단된다.

Fig. 2와 Table 3에서 나타난 바와 같이 *P. tenuipes* EFCC- C240, C-660, *I. japonica* DGUM 32001 및 *P. japonicus* KACC 40503은 multiple alignment분석에서 동일한 sequence (즉 계통분류학적 거리값이 0.0000)을 가지고 있어, 이들 세 종은 같은 종이지만 다른 이름으로 불리고 있다고 판단되며, 이러한 결과는 Park 등[11]의 연구결과와도 일치하고 있다. 아울러 *Paecilomyces* sp. KACC 40220과 KACC 40656도 동일한 sequence를 가지고 있어 *P. tenuipes*로 생각된다.

아울러 아직 동정되지 않은 *Paecilomyces* KACC 40219 및 KACC 40221은 *C. nutans* KACC 50169와 유사한 염기서열을 가지고 있는 것으로 나타났는데, 이는 *Paecilomyces* 속과 *Cordyceps*속간의 유·무성세대간의 밀접한 관련성으로 설명될 수 있다.

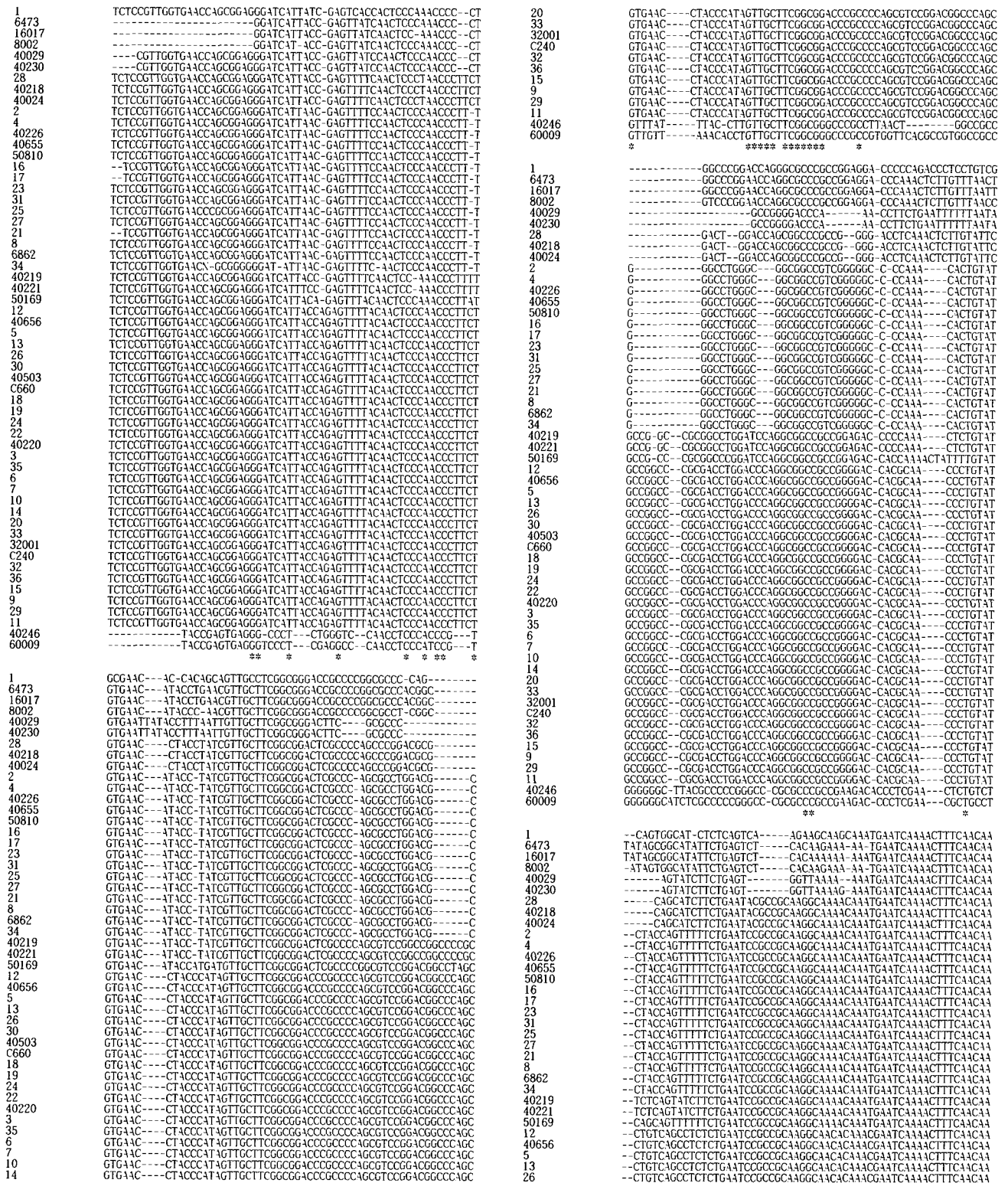


Fig. 2. Alignment data of ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 region sequences. The alignment was generated by the multiple alignment program CLUSTAL X using a gap weight of 5.0 and a gap length weight of 0.1. A hyphen represents a gap and an asterisk indicates position having identical base.

Table 3. Distance values between the 5.8S rDNA and ITS sequences of the Entomopathogenic fungi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. <i>C. militaris</i> KACC 40226	-	0.0000	0.0000	0.0018	0.0769	0.0789	0.0894	0.1718	0.1714	0.1701	0.1788	0.1784	0.0829	0.0866	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0993	0.3454	0.3640
2. <i>C. militaris</i> KACC 40656		-	0.0000	0.0018	0.0769	0.0789	0.0894	0.1718	0.1714	0.1701	0.1788	0.1784	0.0829	0.0866	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0993	0.3454	0.3640
3. <i>C. militaris</i> KACC 50810			-	0.0018	0.0769	0.0789	0.0894	0.1718	0.1714	0.1701	0.1788	0.1784	0.0829	0.0866	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0993	0.3454	0.3640
4. <i>C. militaris</i> KCTC 6862				-	0.0788	0.0807	0.0912	0.1697	0.1694	0.1680	0.1807	0.1804	0.0847	0.0884	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0991	0.0993	0.3475	0.3661
5. <i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40219					-	0.0018	0.0457	0.1724	0.1717	0.1728	0.1906	0.1902	0.0839	0.0876	0.1172	0.1172	0.1172	0.1172	0.1172	0.1174	0.3512	0.3775
6. <i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40221						-	0.0475	0.1748	0.1741	0.1753	0.1929	0.1925	0.0859	0.0896	0.1192	0.1192	0.1192	0.1192	0.1192	0.1194	0.3512	0.3762
7. <i>C. nutans</i> KACC 50169							-	0.1734	0.1730	0.1759	0.1988	0.1946	0.0944	0.0980	0.1201	0.1201	0.1201	0.1201	0.1201	0.1204	0.3607	0.3824
8. <i>C. ophioglossoides</i> KCTC 6473								-	0.0099	0.0243	0.1520	0.1496	0.1640	0.1680	0.2073	0.2073	0.2073	0.2073	0.2073	0.2077	0.3290	0.3554
9. <i>C. ophioglossoides</i> KCTC 16017									-	0.0264	0.1432	0.1407	0.1677	0.1717	0.2089	0.2089	0.2089	0.2089	0.2089	0.2093	0.3305	0.3546
10. <i>C. sinensis</i> MPNU 8002										-	0.1472	0.1447	0.1643	0.1684	0.2053	0.2053	0.2053	0.2053	0.2053	0.2058	0.3260	0.3494
11. <i>M. anisopilae</i> KACC 40029											-	0.0072	0.1766	0.1766	0.1965	0.1965	0.1965	0.1965	0.1965	0.1969	0.3224	0.3532
12. <i>Metarhizium</i> sp. KACC 40230												-	0.1762	0.1976	0.1922	0.1922	0.1922	0.1922	0.1922	0.1925	0.3217	0.3524
13. <i>B. bassiana</i> KACC 40218													-	0.0036	0.1261	0.1261	0.1261	0.1261	0.1261	0.1264	0.3559	0.3755
14. <i>B. bassiana</i> KACC 40024														-	0.1261	0.1261	0.1261	0.1261	0.1261	0.1264	0.3602	0.3796
15. <i>P. tenuipes</i> EFCC-C240															-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3573	0.3831
16. <i>P. tenuipes</i> EFCC-C660																-	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3573	0.3831
17. <i>I. japonica</i> DGUM 32001																	-	0.0000	0.0000	0.0000	0.3573	0.3831
18. <i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40220																		-	0.0000	0.0000	0.3573	0.3831
19. <i>P. japonicus</i> KACC 40220																			-	0.0000	0.3573	0.3831
20. <i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40656																				-	0.3573	0.3819
21. <i>P. variotii</i> KACC 40246																					-	0.1235
22. <i>P. variotii</i> KACC 40009																						-

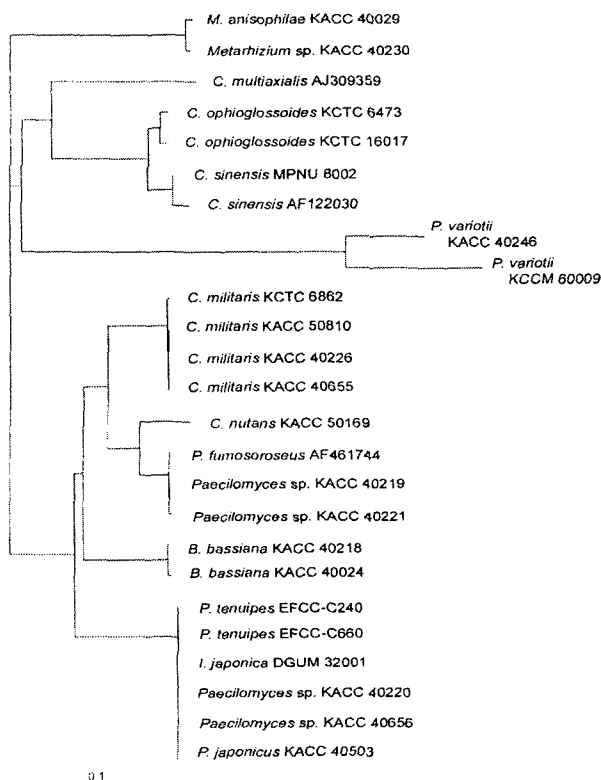


Fig. 3. Phylogenetic tree based on ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 region sequences of the typed entomopathogenic fungi by Neighbor-Joining method. *M. anisopilae* KACC 40029 and *Metarhizium* sp. KACC 40230 were used as outgroup taxa. Bar represented 100 nucleotide substitutions per 1000 nucleotides in ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences.

rDNA ITS 영역의 G+C함량 및 nucleotide 길이

ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 및 전체부위(ITS1-5.8S-ITS2)의 G+C함량 및 nucleotide길이를 조사하였다(Table 4). *Cordyceps* 속에서 ITS1-5.8S-ITS2의 total G+C 함량은 54.7%(*C. nutans* KACC 50169)에서 56.8%(*C. militaris* KCTC 6862)였으며, *Paecilomyces*속에서는 56.0%(*Paecilomyces* sp. KACC 40219)에서 61.1%(*P. variotii* KCCM 60009)로 나타났다. *P. tenuipes* EFCC-C240, C-660, *I. japonica* DGUM 32001 및 *P. japonicus* KACC 40503은 모두 60.4%의 같은 G+C함량을 보이고 있으며, 특히 *Paecilomyces* sp. KACC 40219와 KACC 40221는 다른 G+C함량을 가지고 있어 *P. tenuipes*종과는 다른 균종으로 판단된다. 아울러 *Cordyceps*속에서 G+C함량은 57%이하로 나타난 반면, *Paecilomyces*속의 경우는 일부 균종을 제외하고 60%이상으로 나타났는데, 이러한 G+C함량의 비교는 *Paecilomyces*속과 *Cordyceps*속을 분류·동정하는 데 기본적인 정보를 제공할 수 있다[21]. 한편 5.8S rDNA 부위에서의 G+C함량은 조사된 22종의 균종에서 45.0~49.7%로 안정하게 나타났으나, ITS1부위(43.7~65.1%)와 ITS2 부위(59.0~68.1%)는 G+C함량에서 많은 차이를 보이고 있다. 이러한 차이는 앞서 밝힌 각 부위별 염기서열상의 변이를 차이와도 일치한다.

5.8S rDNA의 nucleotide의 길이는 *P. variotii* KACC 40246에서 156 nucleotides를 제외하고 모두 157 nucleotides로서 동일하였다. ITS1과 2부위의 길이에 따라 전체

Table 4. G+C content and nucleotide length of the ITS1, ITS2, and 5.8S rDNA sequences

Fungal strain	ITS1		5.8S rDNA		ITS2		Total	
	GC content (%)	Length (nt)	GC content (%)	Length (nt)	GC content (%)	Length (nt)	GC content (%)	Length (nt)
<i>C. militaris</i> KCTC 6862	55.0	161	45.6	157	64.8	164	56.8	482
<i>C. militaris</i> KACC 50810	55.0	161	45.6	157	64.2	164	56.6	482
<i>C. militaris</i> KACC 40226	55.0	161	45.6	157	64.2	164	56.6	482
<i>C. militaris</i> KACC 40655	55.0	161	45.6	157	64.2	164	56.6	482
<i>C. nutans</i> KACC 50169	54.0	186	45.0	157	60.1	167	54.7	510
<i>C. ophioglossoides</i> KCTC 6473	53.9	163	45.0	157	64.9	164	56.2	484
<i>C. ophioglossoides</i> KCTC 16017	52.1	163	45.0	157	65.2	165	55.7	485
<i>C. sinensis</i> MPNU 8002	56.3	160	47.1	157	66.7	156	56.7	473
<i>I. japonica</i> DGUM 32001	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>P. tenuipes</i> EFCC-C240	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>P. tenuipes</i> EFCC-C660	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>P. japonicus</i> KACC 40503	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40219	57.1	180	45.0	157	60.9	165	56.0	502
<i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40220	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40221	59.1	181	47.1	157	63.4	164	56.8	502
<i>Paecilomyces</i> sp. KACC 40656	61.5	183	46.2	157	68.1	162	60.4	502
<i>P. variotii</i> KACC 40246	57.4	176	49.4	156	66.7	168	58.0	500
<i>P. variotii</i> KCCM 60009	65.1	186	49.7	157	66.9	181	61.1	524
<i>B. bassiana</i> KACC 40024	56.2	162	49.0	157	66.7	165	57.4	484
<i>B. bassiana</i> KACC 40218	56.2	162	48.4	157	66.1	165	57.0	484
<i>M. anisopilae</i> KACC 40029	43.7	135	45.9	157	59.0	178	50.3	555
<i>Metarhizium</i> sp. KACC 40230	44.1	136	45.9	157	59.0	178	50.3	555

길이에서 차이를 보이고 있는데, 이러한 nucleotide 길이에 의해서도 균종에 대한 기초적인 정보를 얻을 수 있는데, *Paecilomyces*속의 nucleotide 길이는 *Cordyceps*속의 길이보다 긴 것으로 나타났다.

계통분류학적 분석

본 실험에 이용된 분류방법의 유효성을 판단하기 위하여 표준균주 22종의 염기서열과 NCBI의 GenBank database에서 추출해 온 3종의 염기서열에 대해 alignment를 수행한 후 phylogenetic tree를 그려본 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

*C. militaris*로 묶어지는 한 group (KCTC 6862, KACC 50810, KACC 40226, KACC 40655), *P. tenuipes*로 대표되는 한 group (EFCC-C240, EFCC-C660, DGUM 32001, KACC 40220, KACC 40656, KACC 40503), *Beuveria bassiana* 두 종 (KACC 40218, KACC 40024)이 한 group으로, 그리고 중국

에서 약용으로 사용되는 *C. sinensis* (MPNU 8002, AF122030)와 *C. ophioglossoides* (KCTC 6473, KCTC 16107)가 한 group으로 grouping되고 있으며, 나머지 다른 균종들 역시 근연종끼리 묶어짐을 확인할 수 있었다.

이와 같이 분석된 25종 모두가 계통도에서 나타난 바와 같이 정도의 차이는 있으나 사용된 모든 종들이 서로 일정한 거리로 계통관계가 떨어져 있어 종의 구분이 명확하게 나타나는 유용한 분류방법임을 다시 확인할 수 있었다.

시판 동충하초 제품의 분류학적 위치

전국 각지에서 구입한 동충하초 제품 36건에 대한 염기서열을 결정하여 alignment를 수행한 후 phylogenetic tree를 그려본 결과, 국내에서는 3개의 종이 유통되고 있음을 확인하였고, 중국에서 구입된 동충하초 1건은 다른 group들과는 상당한 계통분류학적 거리가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

동충하초의 계통분류 및 시판동충하초의 분류학적 위치

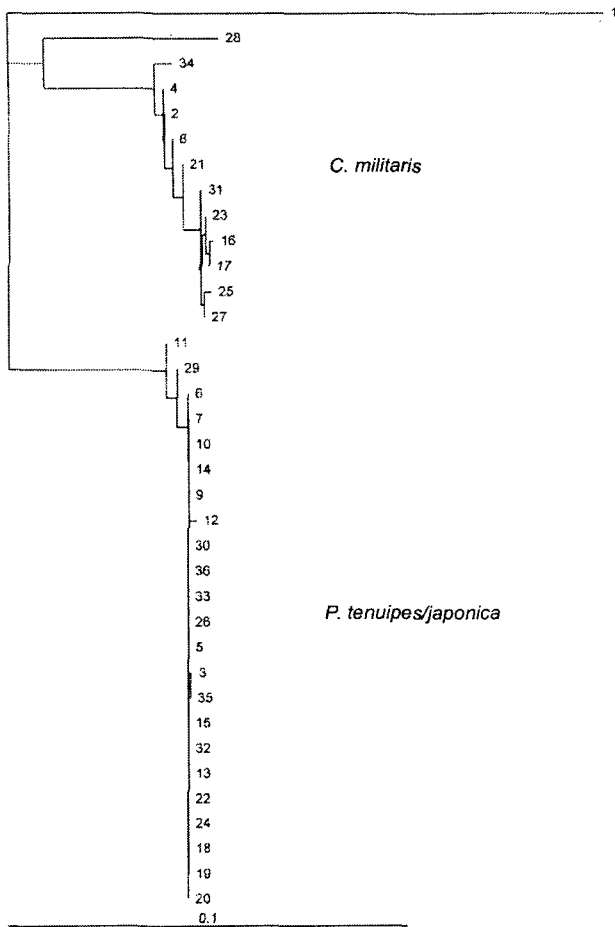


Fig. 4. Phylogenetic tree based on ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 region sequences of the commercial products of entomopathogenic fungi by Neighbor-Joining method. Bar represented 100 nucleotide substitutions per 1000 nucleotides in ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences.

이러한 유통제품들의 균종에 대한 분류학적 위치를 알아보기 위하여 일부 표준균주와 동시에 phylogenetic tree를 그려 확인해 본 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

국내에서 유통중인 동충하초 제품들은 크게 *C. militaris*와 *P. tenuipes/japonica*의 두 group으로 구분되었고, 각 group내에서 sequence가 동일하거나 1~4bp 정도의 차이만을 보여 같은 균으로 분류될 수 있었다. 특히 23균주가 *P. tenuipes / japonica*로 분류되었으며, 11균주가 *C. militaris*로 분류되었다.

이러한 두 group들과 구분되어지는 한 제품은 국내에서 식품원료나 생약으로 허용되지 않는 *B. bassiana* (백강균)으

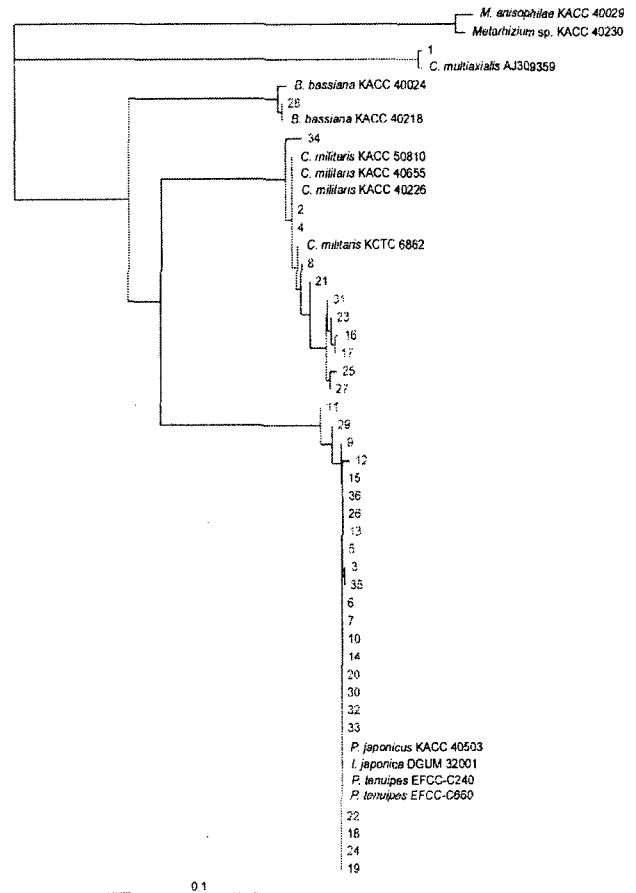


Fig. 5. Phylogenetic tree based on ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 region sequences of entomopathogenic fungi and their commercial products by Neighbor-Joining method. Bar represented 100 nucleotide substitutions per 1000 nucleotides in ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences.

로 분류되었으며, 중국에서 *C. sinensis*로 구입한 제품은 이번 연구에서 *C. sinensis*군과는 계통분류학적 거리가 다소 먼 *C. multiaxialis*군으로 밝혀졌다. 이는 법적으로 안전성이 확보되지 않은 동충하초제품이 유통될 수 있다는 사실을 암시해 주는 것으로 제도권내에서의 관리가 필요하다고 판단된다.

요 약

5.8S rDNA를 포함한 ITS부위에 대한 염기서열 분석결과, 종에 따라 다양한 염기서열을 가지고 있어 분류에 이용될 수 있었으며, 특히 ITS2부위보다 ITS1부위에서 종에 대

한 변이율이 높은 것으로 나타났다. 아울러 균종에 따라 정도의 차이는 있으나 사용된 모든 종들이 서로 계통분류학적 거리가 멀어서 종간의 구분이 명확하게 나타났다. *P. tenuipes*, *I. japonica*, *P. japonicus*는 multiple alignment 분석에서 매우 유사한 염기서열을 가지고 있어, 이들 세종은 같은 종이지만 다른 이름으로 불리고 있는 것으로 나타났으며, 아울러 *Paecilomyces* sp. KACC 40220과 KACC 40656도 동일한 염기서열을 가지고 있어 *P. tenuipes*로 판단된다. 국내에서 유통되는 동충하초제품 35건과 중국산 1건에 대해 실험한 결과 23건은 *P. tenuipes* / *japonica*로, 11건은 *C. militaris*로, 1건은 *B. bassiana*로 분류되었으며, 중국산 제품 1건은 *C. multiaxialis*로 분류되었다.

참 고 문 헌

- Ban, K. W., D. K. Park, J. O. Shim, Y. S. Lee, C. H. Park, J. Y. Lee, T. S. Lee, S. S. Lee and M. W. Lee. 1998. Cultural characteristics for inducing fruiting-body of *Isaria japonica*. *Kor. J. Mycol.* **26**, 380-386.
- Bok, J. W., J. C. Ller, H. G. Klin and G. H. Neil. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* **51**, 891-898.
- Chen, Y. Q., N. Wang, L. H. Qu, T. H. Li and W. M. Zhang. 2001. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochem. Sys. Ecol.* **29**, 597-607.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Furuya, T. M. Hirotani and M. Matsuzawa. 1983. N6-(2-hydroxyethyl)adenosine, a biological active compound from cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria* species. *Phytochem.* **22**, 2509-2512.
- Ito, Y. and T. Hirano. 1996. First successful amplification of 18S ribosomal DNA of *Cordyceps* spp. by the PCR method. *Mycosci.* **37**, 109-110.
- Kiho, T., K. Ookubo, S. Usui, S. Ukai and K. Hirano. 1999. Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 966-970.
- Kinjo, N., Y. Kaizu, N. Taketomo and A. Tsunoo. 1996. Physiological activities of the extracts from cultured mycelia of *Cordyceps militaris* (Vnill.) Fr. *Gen. Educ. Tokyo Med. Dent. Univ.* **26**, 7-14.
- Moon, K. H., P. H. Kim, J. W. Yoon, J. M. Sung and S. W. Kim. 1997. Optimization of production medium for mass culture of *Beauveria* sp. C208. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 606-611.
- Nam, S. H., J. S. Hwang, S. Y. Cho and T. W. Goo. 1999. Genetic relationship of *Cordyceps* spp. based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. *Kor. J. Seric. Sci.* **41**, 174-179.
- Park, J. E., G. Y. Kim, H. S. Park, B. H. Nam, W. G. An, J. H. Cha, T. H. Lee and J. D. Lee. 2001. Phylogenetic analysis of Caterpillar fungi by comparing ITS 1-5.8S-ITS 2 ribosomal DNA sequences. *Mycobiol.* **29**, 121-131.
- Saitou, N. and M. Nei. 1989. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 189-204.
- Song, C. H., Y. J. Jeon, B. K. Yang, K. S. Ra and J. M. Sung. 1998. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 536-539.
- Sung, J. M., C. H. Kim, K. J. Yang, H. K. Lee and Y. S. Kim. 1993. Studies on the distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* **21**, 94-105.
- Sung, J. M., H. K. Lee, Y. S. Choi, Y. Y. Kim, S. H. Lee and G. H. Sung. 1997. Distribution and taxonomy of Entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**, 239-252.
- Sung, J. M., H. K. Lee and K. J. Yang. 1995. Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristics and protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* **23**, 92-104.
- Sung, J. M., H. K. Lee, Y. J. Yoo, Y. S. Choi, S. H. Kim, Y. O. Kim and G. H. Sung. 1998. Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* **26**, 1-7.
- Sung, J. M., Y. S. Choi, H. K. Lee, S. H. Kim, Y. O. Kim and G. H. Sung. 1999. Production of fruiting-body using cultures of Entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* **27**, 15-19.
- Takema, F., H. Sato and H. Kuviyama. 1997. Isolation, inoculation to insect host and molecular phylogeny of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Invertebrate Pathology* **70**, 203-208.
- Thomson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994.

- Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
21. Torres, R. J. A., M. Ganal and V. Hemleben. 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J. Mol. Evol.* **30**, 170-181.
22. White, T., J. Burns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 482. In Innis, M. A. D. H. Gelfand, J. J. Sinsky and T. J. White. (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California.

(Received March 26, 2003; Accepted July 29, 2003)