

강원도 지역 구름버섯균의 rDNA의 ITS 부위 염기서열 분석

이미정 · 전상철 · 황일기 · 최한구 · 김규중*

강릉대학교 자연과학대학 생물학과

Analysis of rDNA ITS Region from *Trametes* spp. in Kangwon Province, Korea

Mi-Jeong Lee, Sang-Cheol Jun, Il-Ki Hwang, Han-Ku Choi and Kyu-Joong Kim*

Dept of Biology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

(Received July 7, 2004)

ABSTRACT: Nineteen strains of *Trametes* species were collected from the area of Kangwon Province, Korea. They have a variety of color bands and line-up markings on fruit bodies. Most strains were categorized into four types based on color bands, that is, dark brown, light brown, dark gray and light gray. They also have line-up marking shapes from sparse to compact on fruit bodies. In this study, we tried to investigate the relationship between the genetic variation and morphological appearance of these species using the nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 region sequence, we used nineteen strains collected in nature and four species of five standard strains (*T. versicolor* KCTC16781, KCTC26203, *T. villosa* KCTC06866, *T. suaveolens* KCTC26205 and *T. hirsuta* KCTC26200). The data of ITS sequences indicated that nineteen strains of *T. versicolor* have the difference of 1~6 base pairs, comparing with standard strains of *T. versicolor* KCTC16781, and KCTC26203. Phylogenetic analysis of the *Trametes* species showed that they grouped into a wide range of single clade. Standard strains except *T. versicolor* KCTC16781 and KCTC26203, formed separated subgroup.

KEYWORDS: ITS region sequence, *Trametes versicolor*

Trametes versicolor(L.) Lioyd(*Coriolus versicolor*(L.) Quel)는 분류상으로 담자균문(Basidiomycota), 담자균강(Basidiomycetes), 구멍장이 버섯목(Polyporales), 구멍장이 버섯과(Polyporaceae)에 속하는 목재부후균(Paul, 1981)으로 구름버섯 또는 운지(雲芝)버섯으로 알려져 있다(정, 1994). 본 종은 목재에 부생하여 백색부후를 일으키며, 항암성분이 최초로 발견된 약용버섯으로(Tsukagoshi, 1974), 최근에는 배양된 *T. versicolor*의 균사체로부터 단백단당체를 추출하여 이를 제약 및 식품산업의 제품에 이용하고 있다(이 등, 1992). 또한 본 종은 담자균류 중에서 목재의 섬유질과 리그닌을 함께 분해하는 효소들(lignin peroxidase, manganese peroxidase 및 laccase)을 가지고 있어 목재를 가장 활발히 부후시키는 백색부후균류에 속한다(Vares and Hatakka, 1997; Collins *et al.*, 1999; Tuomela *et al.*, 1999).

*T. versicolor*는 가정집의 정원에서부터 삼림에 이르기까지 우리나라의 전역과 동아시아, 북미, 유럽대륙에 널리 분포한다. *T. versicolor*의 특징은 지름 1~5 cm, 두께 1~2 mm 이내로 반원형이고, 갓은 가죽질로 윗면은 털로 덮혀 있고 아랫면은 직경 0.1~0.2 mm 내외의 작은 관공이 발달하여 있고 그 속에 담자포자가 형성되며, 가장자리

얇고 예리한 것으로 알려져 있다. 이 균의 외형적 요소는 다양한 형태를 지니고 있는데 색깔은 진한갈색, 연한갈색, 진한회색, 연한회색 등의 색상을 띠고 있으며, 무늬도 몇 개의 영성한 형태에서 촘촘히 배열되어 있는 다양한 형태가 관찰되고 있다. 한편 *T. versicolor*는 한국어명으로는 종종 송편버섯(*Trametes*)과 구름버섯(*Coriolus*)으로 혼용되어 명명되고 있다. 이는 두 속간의 균종들이 버섯분류의 기준이 되는 형태적, 배양생리적, 생화학적 및 생태적 특성이 유사하기 때문으로 판단된다. Donk(1971)는 민주름버섯목을 세포분열 형태, 포자와 담자의 미세구조, sterile elements 등의 특징에 따라 23개과로 분류하였으며, Donk의 분류체계는 현재까지 많은 담자균 분류학자들에게 인정받고 있다. 새로운 분류체계에 따라 하위분류군이던 국수버섯과(Clavariaceae), 고약버섯과(Corticaceae), 턱수염버섯과(Hydniaceae), 구멍장이버섯과(Polyporaceae) 및 꽃구름버섯과(Stereaceae)에 속하는 몇몇 속들은 많은 분류적 이견들이 제시되고 있으며(Ryvarden, 1991; Parmasto, 1995), 특히 Ryvarden(1991)은 구멍장이버섯과에 속해 있던 11개 속(*Coriolopsis*, *Cryptoporus*, *Daedaleopsis*, *Datronia*, *Pycnoporus*, *Trametes* 그리고 *Trichaptum*)을 균사의 유사분열, non-amyloid, 포자특징과 백색부후의 특징에 따라 정리하여 *Trametes* 그룹으로 정리하였다. 이에 *Trametes*

*Corresponding author <E-mail: kyujkim@kangnung.ac.kr>

속과 *Coriolus*속이 포함된 구멍장이 버섯과에 속하는 분류군들은 현재 재분류에 대한 작업들이 이루어지고 있으며(Ko and Jung, 1999), 최근 분자생물학적 방법을 이용한 새로운 분류학적 연구가 담자균의 분류에서도 활발히 이루어지고 있다(Johnson, 1997; Ko and Jung, 1999; Kim and Jung, 2000).

본 연구에서는 강원도 오대산, 소금강, 대관령 등에서 채집한 구름버섯으로 예상된 19종의 표본들을 채색 유형에 따라 4개의 군으로 구분하고, 각 *T. versicolor* 유형군을 대상으로 고유 번호를 부여하여 채색, 담자기 및 담자포자의 특징을 조사하였다. 한국생명공학연구원 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC)으로부터 분양 받은 표준균주 *Trametes*속 4종-5균주와 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)에 등록되어 있는 구멍장이버섯과(Polyporaceae)에 속하는 균종들의 rDNA의 ITS1과 ITS2 염기서열을 비교하여 각 채집 균주를 동정하고, 염기서열 자료를 이용하여 *Trametes*속 내에서 종간 유연관계를 조사하였다. 또한 동정된 균주를 대상으로 자실체의 채색유형에 따른 분류군과 rDNA의 ITS 염기서열 내 변이와 상관관계 유무를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 균주들은 1995년 강원도 오대산, 소금강, 대관령 등지에서 채집하여 분리한 균주로 자실체로

Table 1. List of *Trametes* spp. used in this study

No.	Species	Color	Strains
1	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9515
2	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9502
3	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9505
4	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9543
5	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9506
6	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9508
7	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9509
8	<i>Trametes versicolor</i>	dark brown	KN9524
9	<i>Trametes versicolor</i>	light brown	KN9525
10	<i>Trametes versicolor</i>	light brown	KN9526
11	<i>Trametes versicolor</i>	dark gray	KN9507
12	<i>Trametes versicolor</i>	dark gray	KN9522
13	<i>Trametes versicolor</i>	dark gray	KN9523
14	<i>Trametes versicolor</i>	light gray	KN9503
15	<i>Trametes versicolor</i>	light gray	KN9514
16	<i>Trametes versicolor</i>	light gray	KN9520
17	<i>Trametes</i> sp.		KR11W
18	<i>Trametes versicolor</i>		KR22W
19	<i>Trametes versicolor</i>		KR65W
20	<i>Trametes villosa</i>		KCTC06866
21	<i>Trametes versicolor</i>		KCTC16781
22	<i>Trametes hirsuta</i>		KCTC26200
23	<i>Trametes versicolor</i>		KCTC26203
24	<i>Trametes suaveolens</i>		KCTC26205

보존된 16균주(KN균주)와 균사체로 보존된 3균주(KR균주)를 포함한 19개의 균주와 한국생명공학연구원의 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures; KCTC)으로부터 분양받은 표준균주 4종-5균주를 사용하였으며 자세한 정보는 Table 1에 나타나 있다.

자실체와 포자의 형태적 분석

19종의 KN 및 KR균주 중 16종의 KN균주를 대상으로 자실체와 담자포자의 형태적 분석을 실시하였다. 16종의 KN균주는 육안관찰을 통하여 자실체의 채색과 무늬 유형에 따라 4가지 분류군(Table 1)으로 구분하였다. 16균주의 해부학적 형태관찰은 자실체 갓 부분을 일부 잘라내어 절편을 만든 다음, 20배율의 해부현미경과 750배율의 광학현미경을 이용해 담자포자와 담자기, 균사체의 형태적 특징을 관찰하였다. 균사체로 보존된 3균주(KR균주)는 형태적 분석에서는 제외되었다.

균사체 분리 및 배양

균사체의 분리는 표본으로 보관중인 구름버섯의 자실체 갓 부분을 75% 에탄올에 약 5초 동안 표본을 소독한 후 5% 치아염소산으로 표면을 살균하였다. 살균된 자실체는 멸균 증류수로 3회 세척한 후 수분을 제거하고 Malt Extract Agar(MEA) 배지에 옮겨 계대배양하면서 순수 분리하였다. 배양 조건은 25°C에서 7일간 배양하였으며, 염색체 DNA를 추출하기 위한 균사배양은 배지 상에서 균사체의 직경이 5 cm 이상 되었을 때 균사 조각을 약 0.5 cm 크기로 잘라내어 표면에 멸균된 셀로판지를 깔아 놓은 MEA 배지에 접종하여 5일간 배양하였다.

Total DNA 추출

염색체 DNA 추출은 셀로판지로부터 배양된 균사를 건어내어 멸균 막자사발에 균사체와 액체질소를 넣고 급냉시킨 상태에서 미세하게 분쇄하였다. 균사분말 400 mg당 400 μ l의 protein lysis buffer(SDS 3%, EDTA 50 mM, Tris-HCl pH 7.2 50 mM, 2-mercaptoethanol 1%)를 첨가하여 강하게 섞어준 후 65°C에서 1시간 반응하였다. 반응 후 400 μ l의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 첨가하여 섞어준 후 실온에서 30분간 정치한 후 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상등액만 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 3 M sodium acetate와 isopropanol을

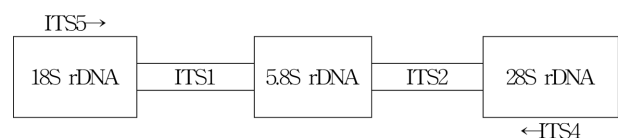


Fig. 1. Location of primers used for the amplification and sequencing of ITS region in rDNA of the *Trametes* spp.

각각 10%와 54% 되게 첨가하여 약하게 섞어 준 다음 4°C에서 30분간 반응한 후 4°C, 12,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전된 DNA만 취하였다. 침전된 DNA에 500 μ l의 70% ethanol을 가한 뒤 동일 조건으로 원심 분리하여 2회 세척한 후 상온에서 5분간 건조한 후 멸균 3차 증류수에 녹여 정량하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)

추출한 염색체 DNA로부터 rDNA의 ITS1과 ITS2 영역

을 증폭하기 위해 사용한 primer는 White *et al.*(1990)이 효모 균류의 ribosomal DNA영역을 증폭하기 위해 제작한 universal primer로서, ITS5(forward)와 ITS4(reverse) set를 이용하여 중합효소연쇄반응에 사용하였다. 중합효소연쇄반응 조건은 0.2 ml PCR tube에 Taq DNA 중합효소 2.5 U, dNTP 250 μ M, 염색체 DNA 50 ng, primer 각 20 pmole, KCl 40 mM, MgCl₂ 1.5 mM이 되게 50 μ l의 10 mM Tris-HCl(pH 9.0)로 조절한 다음 96°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1



Fig. 2. Morphological appearance of fruitbodies from *Trametes* species collected in nature. A: KN9515, B: KN9502, C: KN9505, D: KN9543, E: KN9506, F: KN9508, G: KN9509, H: KN9524, I: KN9525, J: KN9526, K: KN9507, L: KN9522, M: KN9503, N: KN9514, O: KN9520.

분간 extension 순으로 35 cycle을 실시하였으며, 증폭된 ribosomal DNA 부위는 Fig. 1과 같이 18S rDNA 일부분과 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 및 28S rDNA 일부분이다.

증폭산물의 정제

중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 DNA는 1.8% agarose gel 상에서 100 V, 60 mA의 전압과 전류로 1시간 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 증폭된 rDNA 조각의 크기를 100 bp DNA size maker를 이용하여 확인하였다. 크기가 확인된 rDNA는 gel purification kit(Bioneer Corporation, Korea)를 이용하여 rDNA를 회수, 정제 후 다시 1.8% agarose gel에 전기영동하여 rDNA의 정제상태와 양을 확인하였다.

DNA 염기서열 및 유연관계 분석

DNA 염기서열 분석은 Bioneer사의 DNA 염기분석 팀에 의뢰하여 실시하였다. 염기서열이 확인된 각 균주의 rDNA는 SeqEd[®] program(PE Applied Biosystems, USA)을 이용하여 정렬한 후 SeqPup program(version 6.0f, Indiana Univ., USA)으로 rDNA의 염기서열을 분석하였다. 대상 분류군간의 계통학적 유연관계는 Phylogenetic Analysis Using Parsimony(PAUP version 4.0b3a for Macintosh, Swofford 2000) program을 사용하여 근린결합분석(neighbor joining analysis)과 비가중산술결합(unweighted pair-group method with arithmetic means)을 통해 수행하였다. 근린결합분석에서 염기의 치환율은 Kimura 2-parameter model(Kimura, 1980)을 선택 계산하여 근린결합 계통수를 구축하였다. 분지의 단계통성에 대한 신뢰도를 파악하기 위하여 2,000회의 bootstrap resampling(Felsenstein, 1985) 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

형태적 특징

구름버섯균으로 예상된 종들을 대상으로 채색, 무늬형태, 갓의 지름, 관공, 담자기 및 담자포자의 크기 등을 분석하였다. 분석결과, 구름버섯균으로 동정된 버섯들은 활엽수의 썩은 줄기나 가지위에 군생하였다. 자실체는 숙주식물의 줄기에 반착생하여 엽상이 여러 층으로 겹쳐 있었다(Fig. 2). 자실체는 반원형으로 크기는 지름 1~5 cm, 두께 1~2 mm 이내로 얇았다. 자실체의 윗면에는 짧은 털이 뽁뽁하게 나 있었으며, 채색은 흑색, 회색, 황갈색, 암갈색 등의 다양한 환문이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 강원지역에서 채집된 균주(KN 시리즈)는 환문 및 채색의 특징으로 진갈색, 연갈색, 진회색 그리고 연회색 등으로 구분할 수 있었다(Fig. 2). 자실체의 아랫면에는 다각형 또는 원형의 관공이 있고, 관공은 1 mm²에 약 3~5개 정도 형성되며, 채색은 백색, 황색, 회갈색 및 검은색 등으

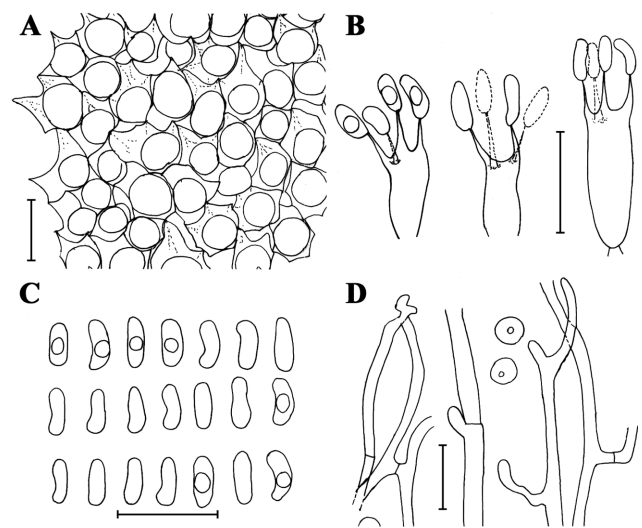


Fig. 3. Microscopic features of *Trametes* species. A: Tube pores in surface view, B: Longitudinal section view with basidia and basidiospores, C: Released spores, D: Hyphae in longitudinal section. Scale bars : A = 0.25 mm, B~C = 10 μ m.

로 관찰되었다. 자실체의 종단면에서 자실층사는 그물모양의 혼선형으로 그 끝에 담자기가 생성되어 있었다(Fig. 3). 종단면에서 담자기는 격벽이 없는 4개의 담자기를 만들고 그 위에 담자포자가 형성되었다. 담자포자는 백색의 원통형 또는 소시지 모양이었으며, 크기는 길이 5~8 μ m, 직경 1.5~2.5 μ m 정도였다(Fig. 3A~D). 이상의 형태해부학적 관찰 결과 강원지역에서 분리한 균주(KN 시리즈)는 채색 및 환문의 차이에도 불구하고 뚜렷한 차이가 없는 동일종으로 분석되었다.

ITS1과 ITS2 염기서열 분석

강원지역에서 채집 분리한 19종의 실험균주(KN 및 KR 시리즈)와 한국생명공학연구원 유전자은행에서 분양받은

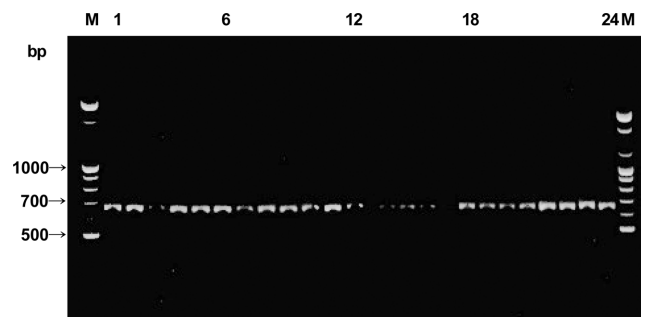


Fig. 4. Amplification products from twenty-four strains of total genomic DNA with ITS4 and ITS5 primer pairs in the genus *Trametes*. PCR products were electrophoresed in a 1.8% agarose gel and stained with ethidium bromide. Lanes M : 100 bp DNA ladder, Lanes 1~24 : strain No. of Table 1.

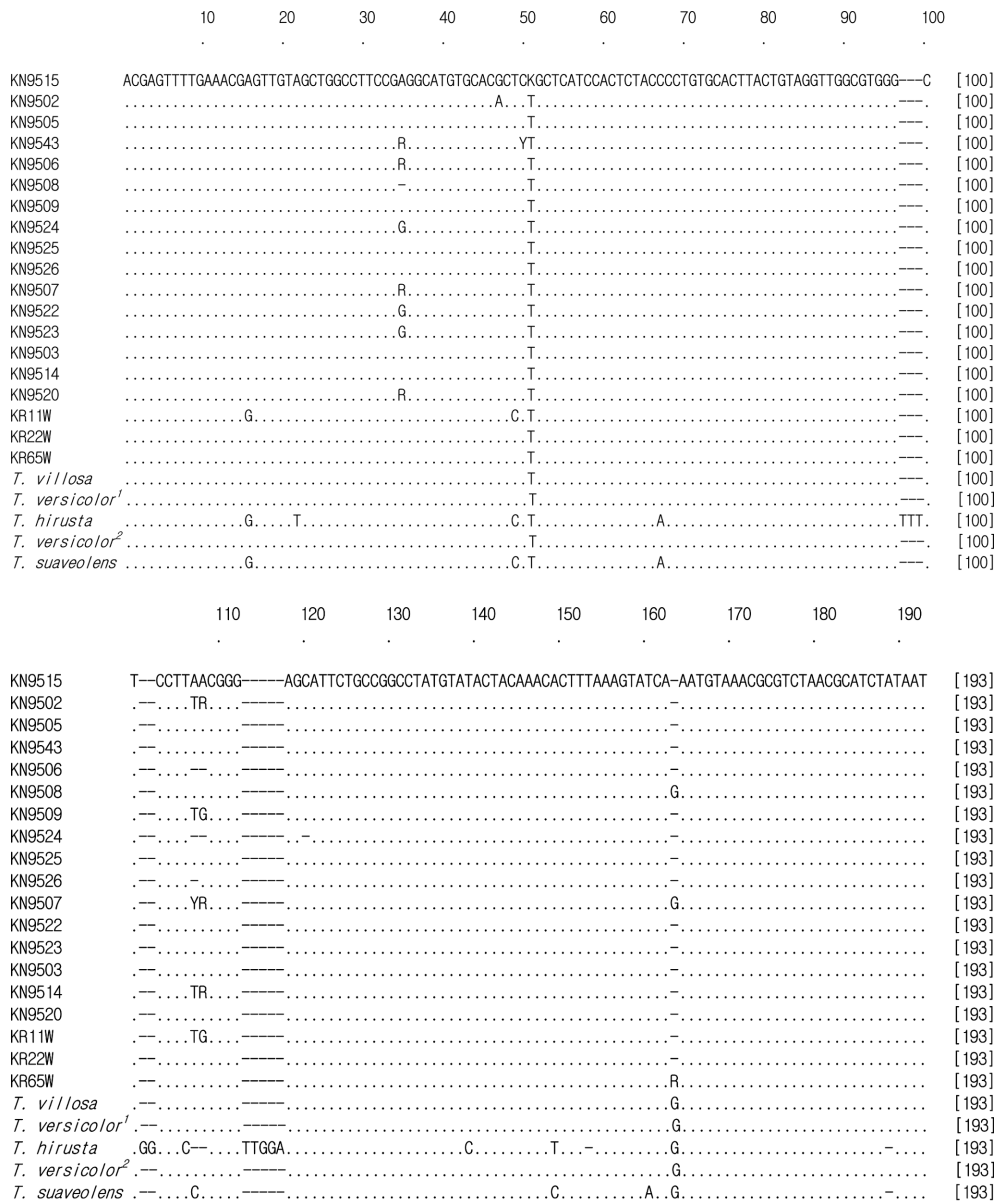


Fig. 5. Alignment and comparison of the ITS1 region sequences of twenty-four *Trametes* spp. *Trametes versicolor*¹: KCTC16781, *Trametes versicolor*²: KCTC26203, *Trametes villosa*: KCTC06866, *Trametes hirsuta*: KCTC26200, *Trametes suaveolens*: KCTC26205. Bars (-) indicate missing data and dots (.) indicate matched sequences to the first taxon.

표준균주 4종-5균주를 대상으로 rDNA의 ITS1과 ITS2 영역의 염기서열을 분석하였다(Fig. 4, 5, 6). 분석결과, ITS1의 염기쌍은 모두 183 bp로 동일하였다(Fig. 5, Table 3). ITS1 영역에서는 183 bp 중 13 bp(7.1%)에서 염기치환이 확인되었으며, 11 bp의 염기결실이 존재하였다(Fig. 5). G+C 비율은 47~49%로 조사되었다. ITS2의 염기쌍은 192~193 bp 중 19 bp(9.8%)에서 염기치환이 확인되었으며, 2 bp의 염기결실이 확인되었다(Fig. 6). G+C 비율은 45~46% 범위였다.

실험균주들 간의 ITS1과 ITS2 영역의 염기차이는 0~8 개(0~2.1%)의 차이로 변이를 보였으며 실험균주와 표준균주 *T. versicolor* KCTC16781 및 *T. versicolor* KCTC26203

간의 염기차이는 0~6개(0~1.6%), 실험균주와 *T. villosa* KCTC06866 간의 염기차이는 5~11개(1.3~1.9%), 실험균주와 *T. suaveolens* KCTC26205 간의 염기차이는 8~13 개(2.1~3.4%), 실험균주와 *T. hirsuta* KCTC26200과는 15~22개(4.0~5.9%)의 염기변이를 ITS1과 ITS2 영역에서 확인하였다(Table 2).

본 연구에 사용된 ITS1과 ITS2 영역 염기서열은 근린 결합분석(Neighbor joining analysis)과 비가중산술결합[unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA)]에 의해 계통수를 작성하였다(Figs. 7, 8).

근린결합 계통수(Fig. 7)에서 *Trametes*속 균류는 외군인 *T. hirsuta* KCTC 26200과 *T. suaveolens* KCTC26205, 그

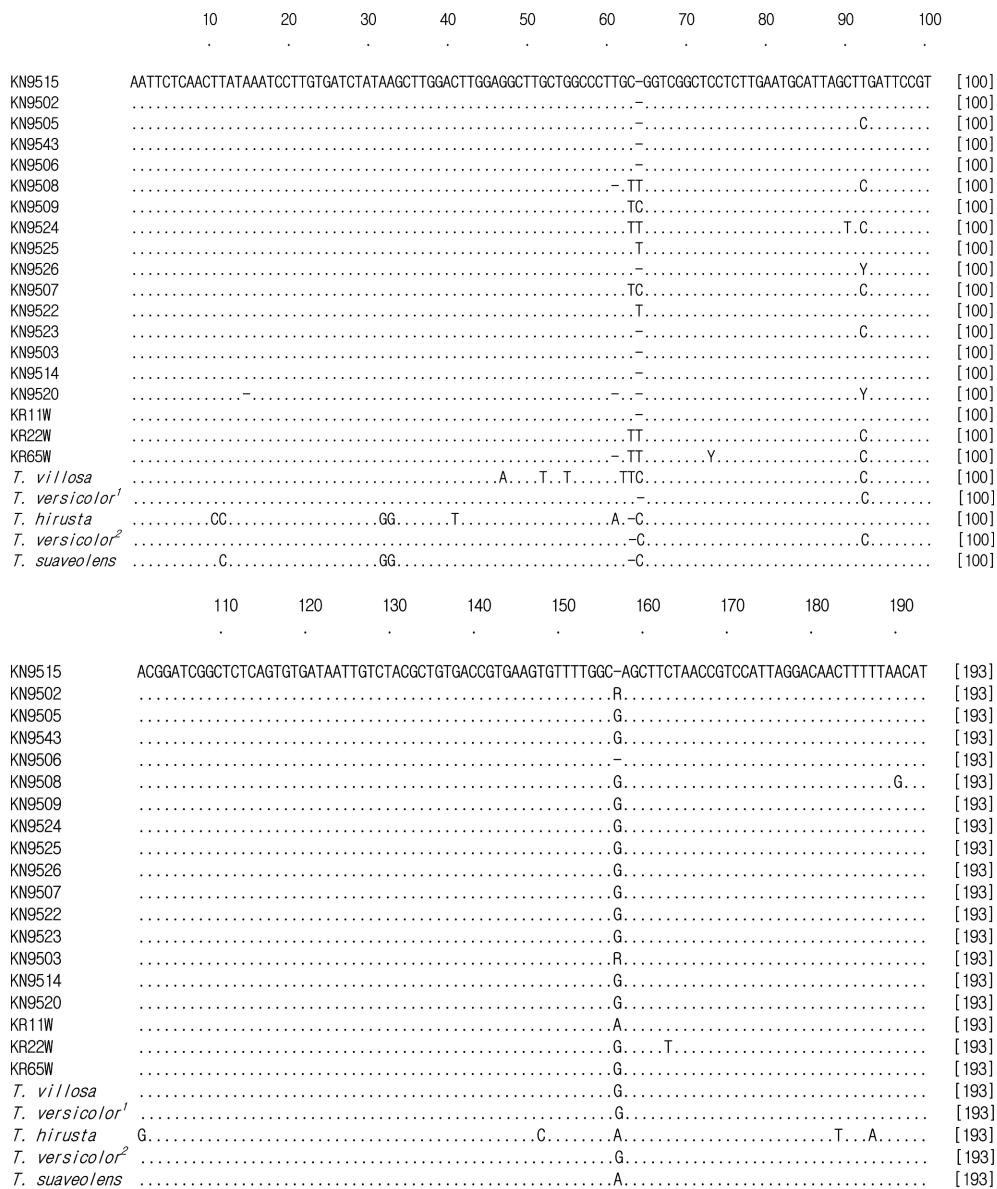


Fig. 6. Alignment and comparison of the ITS2 region sequences of twenty-four *Trametes* spp. *Trametes versicolor*¹: KCTC16781, *Trametes versicolor*²: KCTC26203, *Trametes villosa*: KCTC06866, *Trametes hirsuta*: KCTC26200, *Trametes suaveolens*: KCTC26205. Bars (-) indicate missing data and dots (.) indicate matched sequences to the first taxon.

리고 내군으로 *T. villosa* KCTC06866, *T. versicolor* KCTC16781, KCTC26203과 실험균주들은 강하게 지지 (99%)되는 단계통을 형성하였다. UPGMA로 분석된 계통수(Fig. 8)에서는 외군인 *T. hirsuta* KCTC26200와 *T. suaveolens* KCTC26205, 그리고 내군으로 *T. villosa* KCTC06866, *T. versicolor* KCTC16781, KCTC26203과 실험균주들로 구분되며, 내군인 *T. villosa* KCTC06866, *T. versicolor* KCTC16781, KCTC26203과 실험균주들이 75%로 지지되는 단계통을 형성하였다. 근린결합계통수(Fig. 7)는 UPGMA로 분석된 계통수(Fig. 8)와 분지양상에서 차이를 보여주고 있는데 이는 두 연구방법의 특성을 반영하는 것으로 UPGMA로 분석된 계통수(Fig. 8)는 염

기서열간의 차이점을 분석함으로써 표준균주의 염기서열과 실험균주의 염기서열을 비교하여 새로운 균주를 동정 (identification)하는데 장점이 있으며 근린결합계통수(Fig. 7)는 보존부위와 변이부위의 변이율 및 치환율 등이 반영된 분석법으로 계통진화를 연구하는데 유용한 방법으로 판단된다. 이러한 관점에서 Fig. 7에서 균사체 보존균주인 KR11W와 *T. villosa* KCTC 06866의 계통수에서의 위치는 실험균주와 표준균주에서의 변이부위의 치환율 및 보존부위에 기인하는 것으로 판단된다.

한편 KN균주의 자실체 채색유형에 따른 4가지 분류군과, 이들 균주의 rDNA ITS1 및 ITS2 영역의 염기변이 차이를 비교, 분석한 결과 유의한 상관관계를 찾을 수 없

Table 2. Pairwise distances between taxa belong to the genus *Trametes*

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	KN9515	-	0.00533	0.00267	0.00000	0.00000	0.00800	0.00800	0.01067	0.00000	0.00000	0.00800	0.00267	0.00533	0.00000	0.00267	0.00000	0.01067	0.00800	0.00533	0.01600	0.00267	0.04595	0.00267	0.02413
2	KN9502	2	-	0.00800	0.00533	0.00267	0.01330	0.00532	0.01330	0.00532	0.00267	0.00798	0.00798	0.01067	0.00532	0.00267	0.00533	0.00800	0.01330	0.01064	0.02128	0.00800	0.04852	0.00800	0.02674
3	KN9505	1	3	-	0.00267	0.00267	0.00533	0.01067	0.00800	0.00267	0.00000	0.00533	0.00533	0.00267	0.00267	0.00533	0.00000	0.01600	0.00533	0.00267	0.01333	0.00000	0.05135	0.00000	0.02949
4	KN9543	0	2	1	-	0.00000	0.00800	0.00800	0.00800	0.00000	0.00000	0.00800	0.00000	0.00267	0.00000	0.00267	0.00000	0.01333	0.00800	0.00533	0.01600	0.00267	0.04865	0.00267	0.02681
5	KN9506	0	1	1	0	-	0.00800	0.00267	0.00800	0.00000	0.00000	0.00533	0.00000	0.00267	0.00000	0.00000	0.00000	0.00533	0.00800	0.00533	0.01600	0.00267	0.04595	0.00267	0.02145
6	KN9508	3	5	2	3	3	-	0.01330	0.00532	0.00798	0.00533	0.00798	0.00798	0.00533	0.00798	0.01067	0.00533	0.02133	0.00532	0.00266	0.01596	0.00533	0.05391	0.00533	0.03476
7	KN9509	3	2	4	3	1	5	-	0.01064	0.01064	0.00533	0.00266	0.01330	0.01333	0.00798	0.00267	0.00800	0.01067	0.01330	0.01064	0.01862	0.01067	0.04852	0.00800	0.02941
8	KN9524	4	5	3	3	3	2	4	-	0.01064	0.00800	0.00532	0.00798	0.00533	0.01064	0.01067	0.00533	0.01867	0.00798	0.00532	0.01862	0.00800	0.05930	0.00800	0.03476
9	KN9525	0	2	1	0	0	3	4	4	-	0.00000	0.01064	0.00266	0.00533	0.00000	0.00267	0.00000	0.01333	0.00798	0.00532	0.01862	0.00267	0.05121	0.00533	0.02941
10	KN9526	0	1	0	0	0	2	2	3	0	-	0.00267	0.00267	0.00267	0.00000	0.00000	0.00000	0.01067	0.00533	0.00267	0.01333	0.00000	0.04865	0.00000	0.02413
11	KN9507	3	3	2	3	2	3	1	2	4	1	-	0.01064	0.00533	0.00798	0.00533	0.00533	0.01333	0.00798	0.00532	0.01330	0.00533	0.05121	0.00267	0.02674
12	KN9522	1	3	2	0	0	3	5	3	1	1	4	-	0.00267	0.00266	0.00533	0.00000	0.01600	0.01064	0.00798	0.02128	0.00533	0.05391	0.00800	0.03209
13	KN9523	2	4	1	1	1	2	5	2	2	1	2	1	-	0.00533	0.00800	0.00000	0.01867	0.00800	0.00533	0.01600	0.00267	0.05405	0.00267	0.03217
14	KN9503	0	2	1	0	0	3	3	4	0	0	3	1	2	-	0.00267	0.00000	0.01067	0.00798	0.00532	0.01596	0.00267	0.04582	0.00267	0.02406
15	KN9514	1	1	2	1	0	4	1	4	1	0	2	2	3	1	-	0.00267	0.00800	0.01067	0.00800	0.01867	0.00533	0.04865	0.00535	0.02681
16	KN9520	0	2	0	0	0	2	3	2	0	0	2	0	0	0	1	-	0.01333	0.00533	0.00267	0.01333	0.00000	0.04595	0.00000	0.02681
17	KR11W	4	3	6	5	2	8	4	7	5	4	5	6	7	4	3	5	-	0.02133	0.01867	0.02933	0.01600	0.04054	0.01604	0.02145
18	KR22W	3	5	2	3	3	2	5	3	3	2	3	4	3	3	4	2	8	-	0.00266	0.01596	0.00533	0.05660	0.00533	0.03476
19	KN65W	2	4	1	2	2	1	4	2	2	1	2	3	2	2	3	1	7	1	-	0.01330	0.00267	0.05121	0.00267	0.03209
20	<i>T. villosa</i>	6	8	5	6	6	6	7	7	7	5	5	8	6	6	7	5	11	6	5	-	0.01333	0.06199	0.01067	0.04011
21	<i>T. versicolor</i> ¹	1	3	0	1	1	2	4	3	1	0	2	2	1	1	2	0	6	2	1	5	-	0.05135	0.00000	0.02949
22	<i>T. hirsuta</i>	17	18	19	18	17	20	18	22	19	18	19	20	20	17	18	17	15	21	19	23	19	-	0.05121	0.03235
23	<i>T. versicolor</i> ²	1	3	0	1	1	2	3	3	2	0	1	3	1	1	2	0	6	2	1	4	0	19	-	0.02941
24	<i>T. suaveolens</i>	9	10	11	10	8	13	11	13	11	9	10	12	12	9	10	10	8	13	12	15	11	12	11	-

Below diagonal: Total character differences, Above diagonal: Mean character differences (adjusted for missing data)

Table 3. Length variations and G/C contents of ITS1 and ITS2 sequences from twenty-four strains of *Trametes* species

Strains	ITS II		TS2	
	length	G+C (%)*	length	G+C (%)*
KN9515	183	48.0	192	45.1
KN9502	183	48.5	193	45.1
KN9505	183	47.8	192	45.8
KN9543	183	47.8	192	45.3
KN9506	183	48.6	192	45.0
KN9508	183	48.4	193	45.8
KN9509	183	48.4	193	45.1
KN9524	183	48.6	193	44.6
KN9525	183	47.8	193	45.1
KN9526	183	48.1	192	45.5
KN9507	183	48.9	193	45.6
KN9522	183	48.4	193	45.1
KN9523	183	48.4	192	45.8
KN9503	183	47.8	193	45.1
KN9514	183	48.1	192	45.3
KN9520	183	48.1	192	46.0
KR11W	183	49.5	192	44.8
KR22W	183	47.8	193	44.6
KR65W	183	47.8	193	45.0
KCTC06866	183	48.1	193	43.5
KCTC16781	183	48.1	192	45.8
KCTC26200	189	50.3	192	46.9
KCTC26203	183	48.1	192	45.8
KCTC26205	182	50.0	192	46.4

*Calculated from the G/C content of the PAUP version 4.0b-10 for MacIntosh.

었다. *T. versicolor*의 rDNA ITS1 및 ITS2 영역의 염기변이에 의한 개체 간 차이는 각 개체의 채색형태와 관련이 없는 것으로 생각된다.

구름버섯균(*Trametes versicolor*)이 외형적으로 나타나는 형태적 특징은 자실체 엽상의 다양한 채색과 무늬이다. 이러한 자실체의 외형적 다양성으로 구름버섯 균을 동정할 때 다른 유사종과의 구별에 혼란을 줄 수 있고, 또한 외형적 다양성은 무엇에 기인하는 지를 구명할 필요가 있다. 조 등(1998)에 의하면 자실체의 색깔은 인공재배 시 기질로 사용하는 목재에 따라 채색이 달라진다고 보고한 바 있다. 즉, 자실체의 색깔은 참나무톱밥을 기질로 사용하였을 때는 암갈색, 사과나무 및 버드나무 톱밥은 보통 갈색, 그리고 육송톱밥은 황갈색을 나타낸다고 보고하였다. 채색과 무늬의 다양성은 생장지의 환경조건, 대사적 및 유전적 특성에 따라 달라질 수 있을 것이란 예측이 가능하지만 앞으로 연구되어야 할 과제이다. 이상과 같이 외형적으로 다양한 특성에도 불구하고 현미경을 사용하여 세포학적인 형태관찰을 통해 어느 정도 종의 동일성을 알 수 있지만 이것 또한 다른 종과의 구별에 결정적인 증거가 될 수 없다. 따라서 ITS영역 염기서열분석을 통해 구

NJ

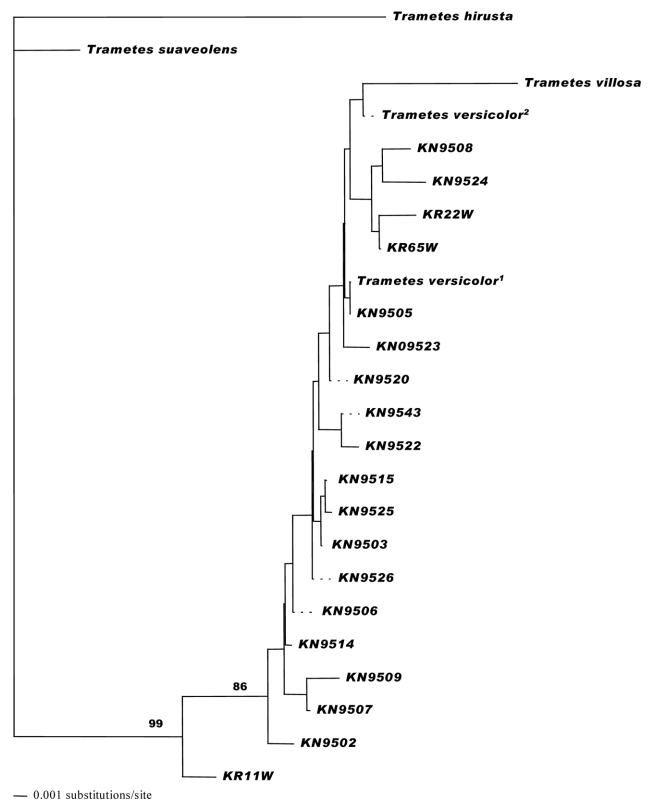


Fig. 7. Phylogenetic tree based on the ITS1 and ITS2 sequences of the *Trametes* spp. by neighbor joining method (NJ). *Trametes versicolor*¹: KCTC16781, *Trametes versicolor*²: KCTC26203, *Trametes hirsuta*: KCTC26200, *Trametes villosa*: KCTC06866, *Trametes suaveolens*: KCTC26205.

름버섯 균을 동정할 수 있는지 여부와 외형적 채색 및 무늬의 다양성과 ITS영역 염기서열과의 유연관계를 분석하고자 하였다.

ITS영역 염기서열 분석 자료는 mt-DNA등과 함께 최근 균류의 계통분류에 널리 사용되고 있으며(박 등, 1999a, b; 정 등, 1999; Kim *et al.*, 2001), ITS영역 염기서열상에서 종 특이성을 갖는 primer를 제작하여 PCR를 통해 특이종을 동정하는데 이용할 수 있다고 보고한 논문도 있다(Park *et al.*, 2001). 지금까지 보고된 바로는 균류의 ITS부위는 종내 및 종간 변이가 많은 것으로 알려져 왔다(Mitchell, 1995). 한편 ITS-1부위에 비해 ITS-2부위의 변이율이 더 높은 것으로 알려져 ITS-2부위 염기서열 분석을 통해 계통분류를 하고자 시도한 바도 있다(박 등, 1999a, b). 따라서 ITS부위 염기서열분석을 통해 종을 동정한다는 것은 ITS부위의 종내 변이가 가능한 없어야 한다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 실험대상으로 한 *Trametes*속에서 구름버섯 균을 동정하기 위해 표준균주를 대조군으로 하여 채집한 실험균주에 대해 ITS-1과 ITS-2부위 염기서열을 분석한 바에 의하면 채집한 실험균주는 표준균주와의 염기차이가

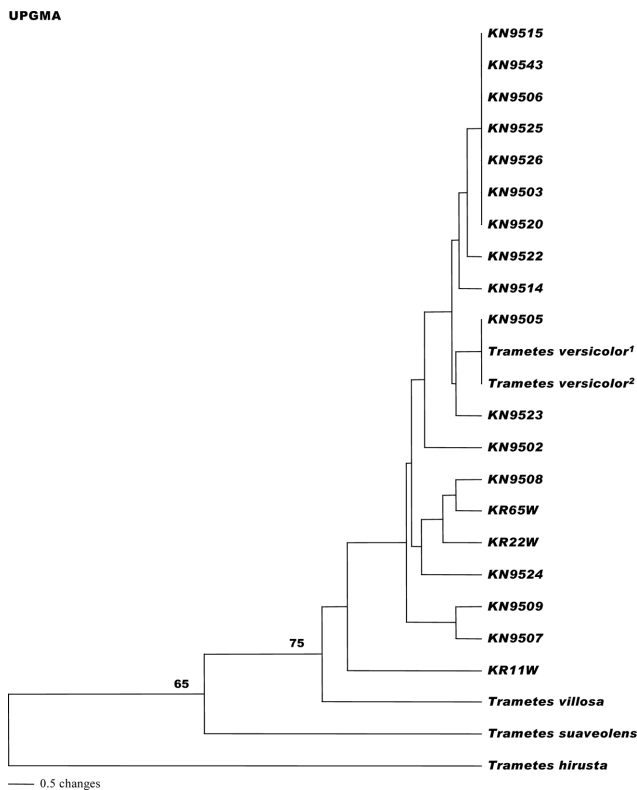


Fig. 8. Phylogenetic tree based on ITS1 and ITS2 sequences of the *Trametes* spp. by unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA). *Trametes versicolor*¹: KCTC16781, *Trametes versicolor*²: KCTC26203, *Trametes hirsuta*: KCTC26200, *Trametes villosa*: KCTC06866, *Trametes suaveolens*: KCTC26205.

0~6개로 변이 폭이 적었다. 계통수를 분석한 결과, 실험균주는 표준균주와 단일계통을 이루어 실험균주는 모두 동일종으로 판정되었다. 그러나 균사체 보존균주인 KR11W는 근린결합계통수(NJ)와 UPGMA에 의한 계통수 모두에서 다른 실험균주와는 낮은 지지율을 보였으며 *T. versicolor*로 동정하기에는 좀더 연구가 요구되는 균주이다.

종간 및 속간 ITS부위 염기서열 분석을 위해 표준균주로 *Trametes*속에 속하는 *T. villosa*(KCTC06866), *T. hirsuta*(KCTC26200), *T. suaveolens*(KCTC26205), 및 *T. versicolor*(KCTC16781, KCTC26203)외에 GenBank에 등록된 구멍장이버섯과 내의 구름버섯균 5종과 기타 속 6종을 선택하여 ITS-1과 ITS-2의 염기서열을 분석하였다(자료미제시). 염기서열을 분석한 결과, 속간 ITS-1과 ITS-2의 염기서열 변이 폭이 매우 컸다. *Trametes*속 내의 종간 변이 정도는 *T. trogii*(AJ438139)와 *T. hirsuta*(KCTC 26200)를 제외하고는 염기쌍 0-6개 정도로 변이 폭이 적었으며 ITS-1과 ITS-2의 변이부위도 일정하였다. 또한 알려진 바와 달리 ITS-1과 ITS-2부위의 변이율도 비슷하였다.

구름버섯 균의 ITS-1부위 염기서열에서 변이부위는 16~

50 bp, 100~110 bp 및 163 bp 영역이었으며, 보존부위는 0~15 bp, 50~100 bp, 120~160 bp 및 164~193 bp 부위였다. ITS-2 염기서열에서는 변이부위가 63~66 bp, 90~93 bp, 및 157~193 bp 영역이었으며, 보존부위는 0~62 bp, 67~90 bp, 및 94~156 bp 부위였다. 보존부위의 염기쌍들은 다른 종의 ITS 염기서열과 비교분석을 하면 구름버섯 균종의 특이한 primer개발의 가능성을 보여 주었다(Park et al., 2001).

적 요

본 연구는 강원도 지역에서 채집한, 구름버섯균으로 예상되는 19종의 실험균주의 외부형태와 내부구조의 특징을 파악하여 동정하고, 구름버섯균(*Trametes versicolor*)의 형태적 특징과 rDNA상의 ITS염기서열간의 상관관계 유무를 확인하기 위하여 *Trametes versicolor*와 동일 속(Genus)에 속하며 계통학적 유연관계가 가까운 *Trametes villosa* KCTC06866, *Trametes suaveolens* KCTC 26205, *Trametes hirsuta* KCTC26200, *Trametes versicolor* KCTC16781 및 KCTC26203의 4중-5균주와 함께 rDNA의 Internal Transcribed Spacers(ITS1 과 ITS2)영역의 염기서열을 비교 분석하였다.

분석결과, 채집된 실험균주는 *Trametes versicolor* KCTC16781 및 KCTC26203과의 염기차이가 0~6개로 매우 유사한 근연한 양상을 나타내었고 계통도를 분석한 결과, 구름버섯으로 예상된 실험균주들과 *Trametes versicolor* 종들이 단계통군을 이루어 실험균주는 모두 동일종으로 확인되었으며, *Trametes hirsuta* KCTC26200, *Trametes suaveolens* KCTC26205 그리고 *Trametes villosa* KCTC06866는 측계통을 이루었다.

채집된 19종의 균주는 외형상 다양한 채색과 무늬를 갖고 있으나 ITS1과 ITS2 영역의 염기서열을 분석한 계통수에서는 *Trametes versicolor*간의 색깔이나 무늬는 ITS1 및 ITS2의 염기서열과는 직접적인 유연관계가 없었다.

참고문헌

- 박동석, 고승주, 김양섭, 석순자, 송재경, 여윤수, 류진창, 성재모. 1999. 먹물버섯속(*Coprinus* spp)의 ITSII영역 염기서열에 의한 유연관계 분석. 한국균학회지 27(1): 27-31.
- _____, _____, 류진창, 성재모. 1999. ITSII 영역의 DNA염기서열분석에 의한 불로초(*Ganoderma*)속의 계통분류학적 고찰. 한국균학회지 27(1): 39-43.
- 이병우, 이명섭, 박기문, 김창한, 안평옥, 최춘언. 1992. 운지버섯 균사체 추출물의 항암효과에 관한 연구. 산업미생물학회지 20(3): 311-315.
- 조우식, 윤영석, 류영현, 박선도, 최부술, 엄재열. 1998. 구름버섯(*Coriolus versicolor*(Fr.) Quel.)의 인공재배법 개발. 한국균학회지 26(1): 25-30.
- 정지원, 김기영, 하명규, 이태호, 이재동. 1999. Ribosomal DNA의 Internal Transcribed Spacer(ITS)부위의 염기서열분석에 의

- 한 *Phellinus*속의 계통분석에 관한 연구. 한국균학회지 **27**(2): 124-131.
- 정학성. 1994. 한국산 목재부후균류의 분포상에 대한 연구(II). 한국균학회지 **22**(1): 62-99.
- Collins, P., O'Brien, M. M. and Dobson, A. D. 1999. Cloning and characterization of cDNA encoding a novel extracellular peroxidase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1343-1347.
- Donk, M. A. 1971. Progress in the study of classification of the higher Basidiomycetes, Pp 3-25. In: R. H. Petersen Ed. Evolution in the higher Basidiomycetes. The University of Tennessee Press, Knoxville, Tennessee, USA.
- Johnson, J. 1997. Phylogenetics of the Basidiomycetes genus *Lepiota* sensu lato: a framework for studying the evolution of insect-cultivated fungi. Ph.D. Thesis, Duke University, Durham, North Carolina. p. 150
- Kim, S. Y. and Jung, H. S. 2000. Phylogenetic relationships of the Aphyllophorales inferred from sequence analysis of nuclear small subunit ribosomal RNA. *J. Microbiol. Kor.* **38**: 122-131.
- _____, Park, S. Y. and Jung, H. S. 2001. Phylogenetic classification of *Antrodia* and related genera based on ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**(3): 475-481.
- Ko, K. S. and Jung, H. S. 1999. Phylogenetic re-evaluation of *Trametes consors* based on mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 181-186.
- Mitchell, J. I., Robert, P. J. and Moss, S. T. 1995. Sequence or Structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information on fungal taxonomy. *Mycologist* **9**(2), 67-75.
- Park, D. S., Kang, H. W., Kim, K. T., Cho, S. M., Park, Y. J., Shin, H. S., Lee, B. M. and Go, S. J. 2001. PCR-based sensitive detection of wood-decaying fungus *Phellinus linteus* by specific primer from rDNA ITS regions. *Mycobiology* **29**(1): 7-10.
- Parmasto, E. 1995. Corticioid fungi: a cladistic study of a paraphyletic group. *Can. J. Bot.* **73**(S): S843-S852.
- Ryvarden, L. 1991. Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. *Syn. Fung.* **5**: 1-363.
- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. 1974. Protein bound Polysaccharide Preparation, ps-k, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann.* **65**: 557-558.
- Tuomela, M., Lyytikainen, M. and P. Hatakka. A. 1999. Mineralization and conversion of phentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 65-74.
- Vares, T. and Hatakka, A. 1997. Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. *Can. J. Bot.* **75**: 61-71.
- White, T., Burns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Eds. Innis, M. A. D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Eds. Innis, Academic Press, San Diego, California. p. 482.