

RESEARCH ARTICLE

제주 동부지역에서 발견된 국내 미기록
자생버섯 보고이승학¹, 고평열¹, 전용철^{1,2*}¹제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부, ²제주대학교 아열대농업생명과학연구소Domestic Unrecorded Species Found in the
Eastern Part of Jeju IslandSeung Hak Lee¹, Pyung Yeol Ko¹, Yong Chull Jeun^{1,2*}¹Faculty of Bioscience and Industry, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea²Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

*Corresponding author: ycjeun@jejunu.ac.kr

ABSTRACT

In this study, we report the occurrence of four domestic mushrooms (among 317 samples) that were previously undocumented in the eastern part of Jeju Island in Korea. To identify the mushrooms, DNA sequences of the mushrooms were analyzed by comparing them with the data available in NCBI GenBank. Mushrooms were identified as *Agaricus flocculosipes*, *Amanita concentrica*, *Coprinopsis strossmayeri*, and *Favolus acervatus*, none of which have been previously documented in Korea. Furthermore, microscopic observations revealed that the morphology of the four mushrooms was consistent with the features of the species matched by the DNA sequences analysis.

Keywords: ITS, Morphological character, PCR, Taxonomy

OPEN ACCESS

Kor. J. Mycol. 2018 June, 46(2): 105-113
<https://doi.org/10.4489/KJM.20180014>

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Received: January 3, 2018**Revised:** May 2, 2018**Accepted:** May 14, 2018

© The Korean Society of Mycology



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

최근 생물다양성협약과 나고야의정서의 채택에 따른 국가 간의 생물유전자원의 확보가 중요 하지만, 다른 생물군에 비해 국내에서는 버섯 분야에 대한 연구가 아직까지도 미흡한 실정이다.

제주도는 한라산을 기준으로 남북지역의 기후가 다르고, 아열대에서 아한대까지의 다양한 기후가 존재하며, 타 지역에 비해 연 강수량이 높아서 이로 인하여 수분과 기온에 많은 영향을 받는 다양한 버섯류가 출현하고 있다[1]. 최근까지 제주도에 분포하는 고등균류는 총 2

문 9강 23목 87과 263속 718종 22변종 3아종 12품종 755분류군이 보고되어 있어[2] 종 다양성이 뛰어난 지역으로 인정받고 있다. 또한 기후 변화가 지속적으로 이루어지는 최근 변화에 따라 새로운 버섯 분류군들이 계속 발견되고 있어 제주지역에서의 고등균류의 연구는 지속적으로 이어져야 할 필요가 있다.

본 연구에서는 2016년 제주 동부지역에서 5월에서 9월까지 5개월 동안 채집된 317종의 버섯들 중 형태학적으로 국내의 기록된 종들과 차이를 보였던 4종을 선발하였고, 각각 미세구조 관찰과 염기서열 분석을 토대로 정확한 종을 동정하여 국내 버섯연구의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

제주 동부지역에 위치한 물영아리, 신례천-이승악 숲길, 교래곶자왓, 거문오름에서 2016년 5월부터 9월까지 5개월 동안 채집된 317종의 버섯 중 국내 미기록종으로 추정된 4종의 버섯에 대한 형태적인 특징[3]과 염기서열 분석을 통해 종을 동정하였다.

버섯의 형태를 관찰하기 위해 현장에서 사진 촬영을 하고, 포자가 혼입되지 않도록 유산지에 각각 따로 포장하여 채집 하였으며, 40°C에서 24~72시간 동안 건조기(HFD-7000HL; Hanil, Seoul, Korea)를 이용하여 열풍 건조하였다. 현미경 상 미세구조의 특징 관찰을 위하여 건조 버섯의 조직 중 포자를 포함한 부분 5 mm 내외의 절편을 잘라내어 70% 에탄올과 증류수에 번갈아 담가 원형으로 복구시킨 후 수수깡에 끼워 면도날로 얇게 자른 다음, 1% 농도의 congo red 용액과 1% phloxine 용액으로 각각 5 sec 동안 염색하였다. 그 다음 광학현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 포자와 담자기의 형태를 관찰하였다.

채집된 버섯의 DNA 추출은 버섯 내부의 깨끗한 조직을 면도칼을 이용해 1 cm³ 내외의 크기로 잘라내어 막자사발에 넣고 액체질소로 얼려 막자로 잘게 부순 후, 곱게 갈린 가루 100 mg을 1.5 mL 마이크로튜브에 담아 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA)로 추출하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 universal primer인 ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 이용하였고, 온도 설정은 predenature (94°C, 5 min), denature (94°C, 1 min), annealing (56°C, 1 min), extend (72°C, 1 min), post extend (72°C, 10 min)으로 설정하였고 35 cycles 반복하였다. 위 과정으로 증폭된 염기서열의 분석은 분석 전문 업체인 마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열 자료를 확보하였고, 분석된 염기서열을 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 홈페이지의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 유사도를 확인한 후 형태를 바탕으로 동정하였다. 동정된 종의 학명은 www.indexfungorum.org에 등록된 명명에 따랐다.

염기서열의 alignment는 MEGA 5.2 [4]의 ClustalW를 이용하여 수행하였다. 종간 유사도는 본 실험에서 추출된 염기서열과 NCBI에 등록된 근연종의 시퀀스를 Kimura's two-parameter test [5]로 계산하여 확인하였으며, 외그룹(outgroup)으로는 동일한 과(family) 중에서 형태적으로 가장 유사한 속(genus)을 선정하여 이들 염기서열 간의 연관관계를 함께 비교하였다. 통합된 데이터는 MEGA 5.2 프로그램의 neighbor-joining (NJ) 방식을 이용하여

계통수를 그렸으며(bootstrap 분석 1,000회 반복) 본 실험을 통해 추출된 염기서열은 GenBank에 등록하였다.

결과 및 고찰

국내 미기록종으로 추정되는 4종의 버섯에서 분리한 DNA 염기서열을 분석한 결과 다음과 같이 국내 미기록종으로 밝혀졌다.

흑갈색주름버섯(신칭) *Agaricus flocculosipes* R.L. Zhao, Desjardin, Guinb. & K.D. Hyde, in Zhao, Hyde, Desjardin, Raspé, Soytong, Guinbertau, Karunarathna & Callac, *Mycoscience* 53: 302 (2012).

[분류학적 위치] 주름버섯과(Agaricaceae), 주름버섯목(Agaricales), 주름버섯강(Agaricomycetes), 담자균문(Basidiomycota)

[발생시기 및 서식 환경] 여름에서 초가을 사이 상록활엽수림 속 지상에서 단생하거나 산생

[시료 채집] 2016. 09. 01. 서귀포시 남원읍 수망리 물영아리오름

[Sample no.] JU16007

[육안적 특징] 갓 크기는 5~10 cm이며, 어릴 때는 반구형이었다가 시간이 지나면 볼록한 모양에서 점차 평평해진다. 표면은 부드럽고 담갈색에서 흑갈색으로 되며 갈색에서 흑갈색의 미세한 인편이 갓 전체에 덮여 있으나 비를 맞으면 벗겨진다. 주름살은 초기에는 백색에서 담

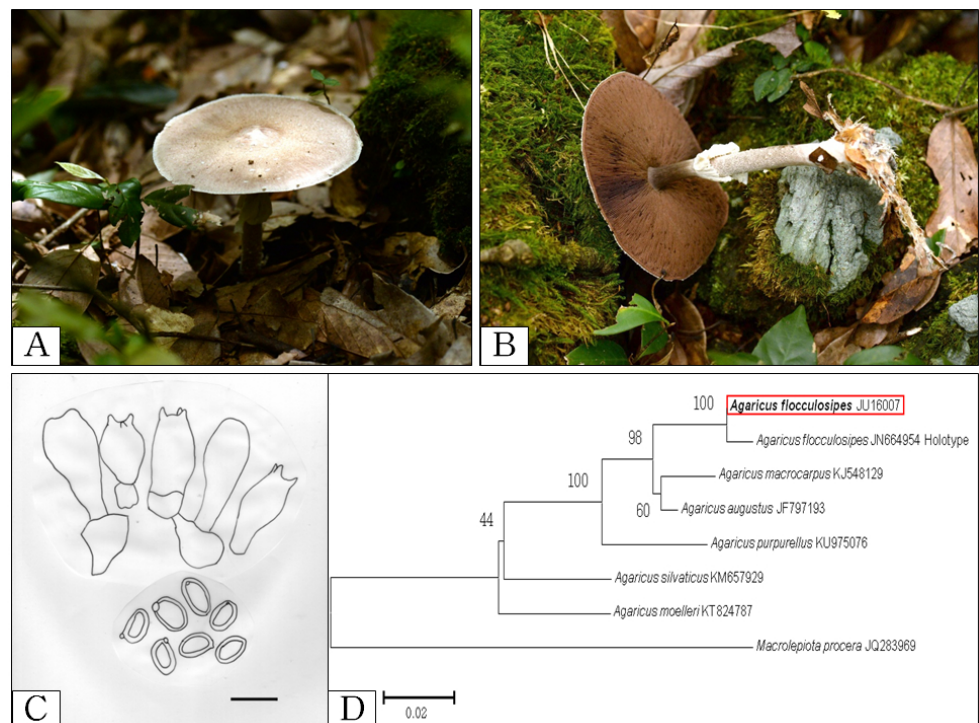


Fig. 1. Photographs of pileus (A) and gill (B) of *Agaricus flocculosipes* JU16007 at Muryeongarioreum in 2016 May; (C) Spores and basidia ($\times 1,000$; scale bar = 10 μm); (D) Phylogenetic position of *A. flocculosipes* JU16007 (box).

분홍색이나 포자가 성숙해지면 자실체 전체가 흑갈색으로 변해간다. 자루는 흑갈색 바탕에 담갈색의 미세한 인편이 전체적으로 덮여 있으며 상부에는 인편이 없고 흑갈색이다. 턱받이는 담갈색으로 막질이다. 가운데는 비어 있으며 쉽게 찢어진다(Fig. 1A, 1B).

[현미경 관찰] 담자기는 14.3~24 μm 의 길이의 곤봉형이며, 포자는 타원형에 크기는 7~8.6 μm 이다(Fig. 1C).

[유사종과의 비교] *Agaricus flocculosipes*는 *A. moelleri*와 유사하나 *A. moelleri* (NCBI accession no. KT824787)의 경우 대 기부를 잘랐을 때 황색으로 변하는데 반해 *A. flocculosipes*는 변하지 않았다. 또한 자루나 기부는 *A. silvaticus* (KM657929)와 유사하나 갖의 인편이 좀 더 미세하고 고르게 덮여있다[3].

[염기서열 분석] 채집된 버섯은 *Agaricus flocculosipes* (NCBI accession no. JN664954)의 완모식종(holotype)과 99.8%의 상동성을 보였다(Table 1). 동 속의 종 간 염기서열 분석 결과, *A. flocculosipes*는 *A. augustus* (JF797193) 및 *A. macrocarpus* (KJ548129)와 각 96.4%, 97.3%의 상동성을 보여 가장 근연한 종인 것으로 나타났다(Fig. 1D) [6].

Table 1. Sequence comparison of the unrecorded mushrooms with the reference in NCBI GenBank

Sample no.	Matched species	Accession no.	Identity (%)
JU16007	<i>Agaricus flocculosipes</i>	MG981025	99.8
JU16006	<i>Amanita concentrica</i>	MG981024	100
JU16585	<i>Coprinopsis strossmayeri</i>	MG981027	100
JU16273	<i>Favolus acervatus</i>	MG981026	100

NCBI, National Center for Biotechnology Information.

머들광대버섯(신칭) *Amanita concentrica* T. Oda, C. Tanaka & Tsuda, *Mycoscience* 43(1): 81 (2002)

[분류학적 위치] 광대버섯과(Amanitaceae), 주름버섯목(Agaricales), 주름버섯강(Agaricomycetes), 담자균문(Basidiomycota)

[발생시기 및 서식 환경] 여름철 상록활엽수림 내 지상에서 단생 하거나 산생

[시료 채집] 2016. 07. 09. 서귀포시 남원읍 신례리 이승악 숲길

[Sample No.] JU16006

[육안적 특징] 갓 크기는 6~14 cm이며, 어렸을 때 반구형에서 점차 평평하게 자란다. 갓의 색은 백색에서 황백색을 띠며, 표면에 옅은 갈색의 뿔 모양의 돌기가 뺨뺨하게 부착되어 있다. 조직은 백색이며 치밀하다. 자실층은 떨어진 형이며 백색이며 약간 뺨뺨한 주름살이다. 자루는 흰색이며 속은 차 있고 표면에 솜털과 같은 인편이 있다. 기부는 구근상이며 찢어진 돌기가 환문을 이루고 있다(Fig. 2A, 2B) [3].

[현미경 관찰] 담자기는 35.8~60 μm 의 길이의 곤봉형이며, 포자는 원형에 크기는 11.6~14.1 μm 이다(Fig. 2C) [7].

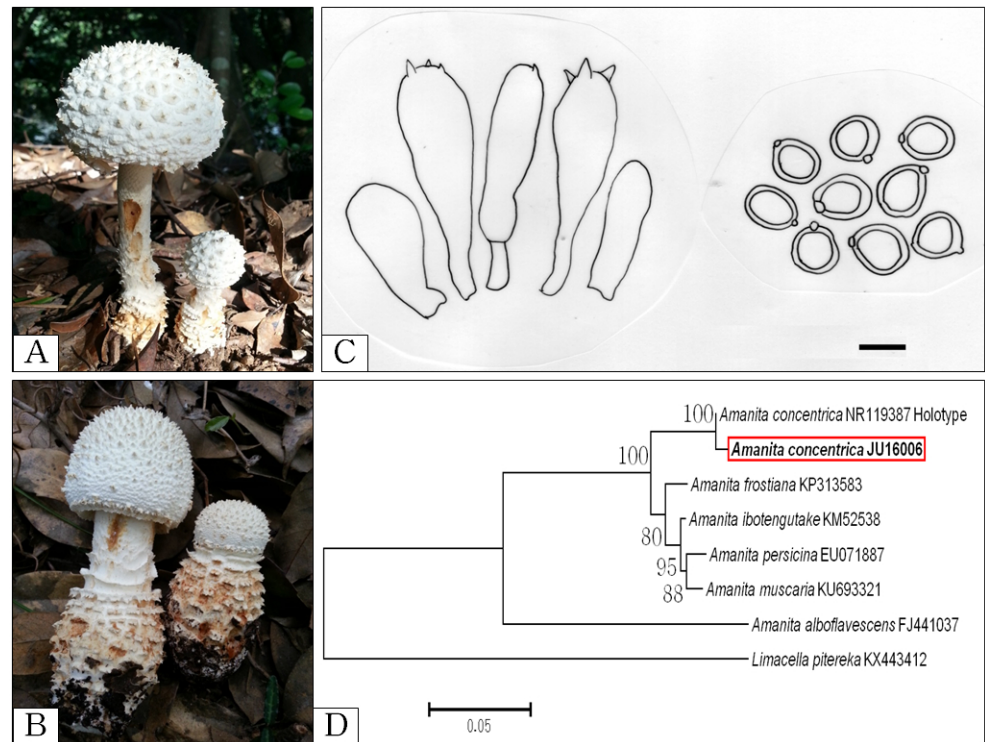


Fig. 2. *Amanita concentrica* JU16006 at Sillyecheon-Iseungak forest path in 2016 May. (A, B) Photographs of mushrooms; (C) Spores and basidia ($\times 400$; scale bar = 10 μm); (D) Phylogenetic position of *A. concentrica* JU16006 (box).

[유사종과의 비교] *Amanita virgineoides*와 유사하나 *A. virgineoides*는 전체적으로 백색이며, 막질의 턱받이가 있고, 자루의 기부 부분까지 분질상인데 비해 *A. concentrica*는 전체적으로 황백색을 띠며, 자루에 비늘과 같은 인편이 있다. 대 기부가 상체에 붉은색으로 변하며 균열이 일어난다. 또한 유균인 경우 과근상의 대주머니에 돌기가 뒤로 젖혀진 모양으로 돌출되어 있다. *Amanita echinocephala*와는 전체적으로 황백색을 띠는 것이 비슷하나 *A. echinocephala*는 기부가 백색이며, 유균의 돌기가 젖혀져 있지 않다[3].

[염기서열 분석] 채집된 버섯은 *Amanita concentrica* (NCBI accession no. NR119387)의 완모식종(holotype)과 100%의 상동성을 보였다(Table 1). 동 속의 중간 염기서열 분석 결과, *A. concentrica*는 *A. muscaria* (KU693321)와 94.8%, *A. frostiana* (KP313583)과 *A. ibotengutake* (KM052538)과 각 94.3%의 상동성을 보여 가장 근연한 종인 것으로 나타났다(Fig. 1D) [8].

다발두엄먹물버섯(신칭) *Coprinopsis strossmayeri* (Schulzer) Redhead, Vilgalys &

Moncalvo in Redhead, Vilgalys, Moncalvo, Johnson & Hopple, *Taxon* 50(1): 231 (2001)

[분류학적 위치] 눈물버섯과(Psathyrellaceae), 주름버섯목(Agaricales), 주름버섯강(Agaricomycetes), 담자균문(Basidiomycota)

타입종(Basionym): *Coprinus strossmayeri* Schulzer 1879

동종이명(Synonym): *Coprinus populicola* Mornand, *Docums Mycol.* 28(nos 109-110): 70 (1998)

Coprinus strossmayeri Schulzer, Verh. zool.-bot. Ges. Wien 28: 430 (1879)

Coprinus strossmayeri var. *populicola* (Mornand) Bon, Docums *Mycol.* 31(no. 124): 21 (2002)

Coprinus strossmayeri Schulzer, Verh. zool.-bot. Ges. Wien 28: 430 (1879) var. *strossmayeri*

[발생시기 및 서식 환경] 여름에서 초가을, 낙엽활엽수 부후목 밑동에서 속생

[시료 채집] 2016. 07. 28. 제주시 조천읍 교래리 교래곶자왓

[Sample no.] JU16585

[육안적 특징] 갓 크기는 2~5 cm이며, 어릴 때 길쭉한 타원형에서 점차 종모양으로 변해가고, 갓 가장자리부터 말려 올라가며 검게 액화된다. 표면에 방사상 줄무늬와 가운데로 갈수록 점차 진해지는 갈색 인편이 있다. 조직은 백색이나 액화 직전에는 회갈색을 띤다. 자루는 백색이며 가운데가 비어 있고, 솜털 같은 인편이 전체적으로 덮여 있다(Fig. 3A, 3B).

[현미경 관찰] 담자기는 18~35 μm 의 길이의 곤봉형이며, 포자는 타원형에 크기는 6.6~11 μm 이다(Fig. 3C).

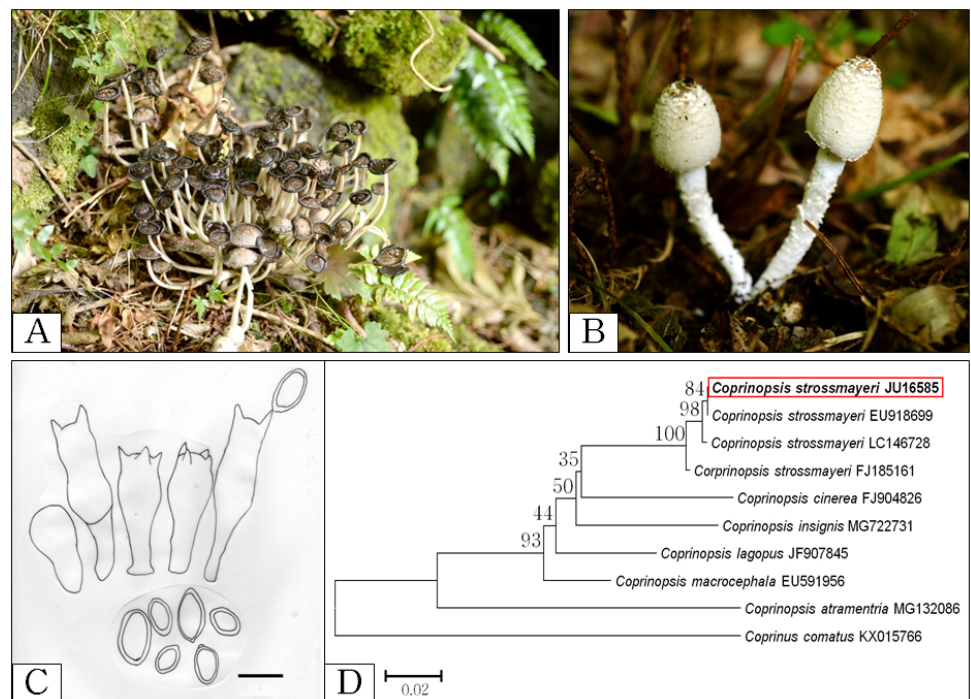


Fig. 3. *Coprinopsis strossmayeri* JU16585 at Gotjawal Sharing Foundation forest in 2016 Sep. (A, B) Photographs of mushrooms; (C) Spores and basidia ($\times 1,000$; scale bar = 10 μm); (D) Phylogenetic position of *C. strossmayeri* JU1658 (box).

[유사종과의 비교] *Coprinus rhizophorus*와 매우 유사하고, *C. rhizophorus*는 갓의 인편이 백색에 가까우나 *C. strossmayeri*는 갈색을 띤다. 또한 *C. rhizophorus*는 유기물이 많은 비옥한 땅에 속생하나 *C. strossmayeri*는 고사목 그루터기 주변에 속생으로 크게 군락을 이루어 발생한다. *Coprinopsis lagopus*와도 형태적으로 유사하며, *C. lagopus*는 퇴비나 부식질이 많은 곳에 단생으로 군락을 이루는 점이 다르다[3].

[염기서열 분석] 채집된 버섯은 *Coprinopsis strossmayeri* (NCBI accession no. EU918699)와 100%의 상동성을 보였다(Table 1). 동종인 *C. strossmayeri* (NCBI accession no. FJ185161, LC146728)와 각 99.3%, 99.7%의 상동성을 보였다. 동 속의 종 간 염기서열 분석 결과, *C. macrocephala*와 91.4%로 가장 가깝게 나타났다(Fig. 4D) [9].

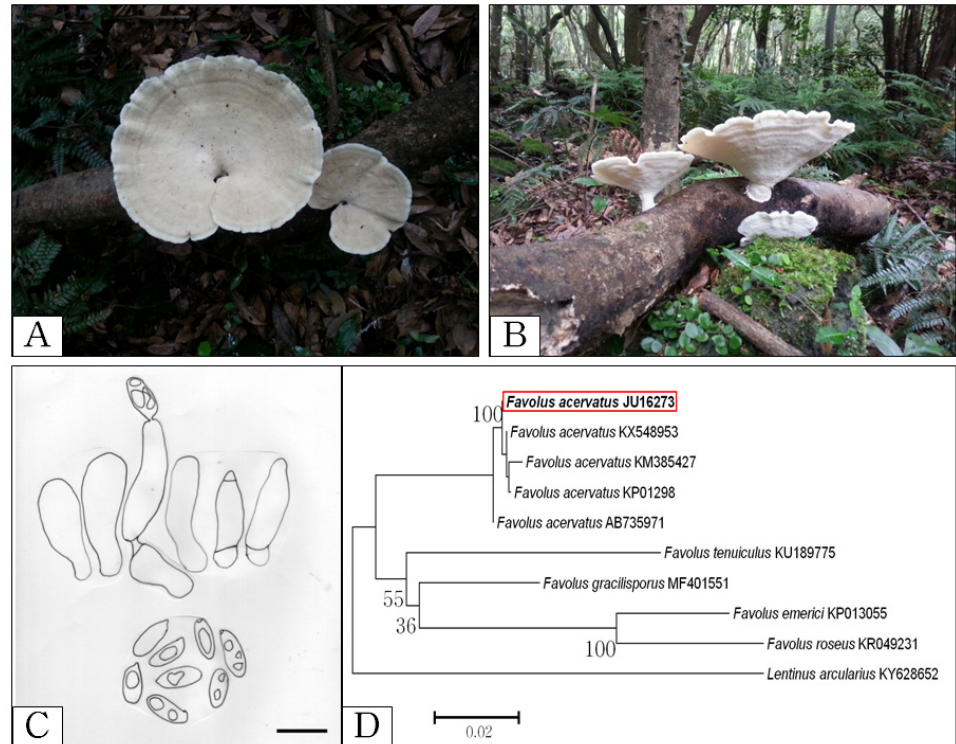


Fig. 4. Photographs of pileus (A) and gill (B) of *Favolus acervatus* JU16273 at Muryeong-arioreum in 2016 July; (C) Spores and basidia ($\times 1,000$; scale bar = 10 μ m); (D) Phylogenetic position of *F. acervatus* JU16273 (box).

환접시벌집버섯(신칭) *Favolus acervatus* (Lloyd) Sotome & T. Hatt. in Sotome, Akagi, Lee, Ishikawa & Hattori, *Fungal Diversity* 58(1): 254 (2013)

[분류학적 위치] 구멍장이버섯과(Polyporaceae), 구멍장이버섯목(Polyporales), 주름버섯강(Agaricomycetes), 담자균문(Basidiomycota)

타입종(Basionym): *Polyporus acervatus* Lloyd 1920

동종이명(Synonym): *Polyporus acervatus* Lloyd, *Mycol. Writ.* 6 (Letter 64): 1006 (1920) [1921]

[발생시기 및 서식 환경] 여름에서 가을 사이에 활엽수 부후목에서 군생

[시료 채집] 2016. 07. 14. 서귀포시 남원읍 수망리 물영아리오름

[Sample no.] JU16273

[육안적 관찰] 갓 크기는 10~20 cm이며, 오목한 깔때기형으로 성장한다. 자루의 굵기는 1~2 cm, 길이는 2~3 cm이며 백색이다. 자실체의 표면에는 희미한 환문이 있고 가장자리는 물결 모양이며, 회백색에서 담갈색으로 변해간다. 관공은 미세하며 백색이고 떨어진 형이다(Fig.

5A, 5B).

[현미경 관찰] 담자기는 16.3~24.6 μm 의 길이의 곤봉형이며, 포자는 긴 타원형에 크기는 7.6~10 μm 이다(Fig. 4C).

[유사종과의 비교] *Fabulus grammacephalus*와 유사하나 *F. grammacephalus*의 색은 황갈색이고 *F. acervatus*는 회백색에서 담갈색을 띤다. *F. acervatus*의 경우 자루가 매우 짧고 *F. grammacephalus* 보다 관공이 좀 더 미세하다. 또한 *F. grammacephalus*은 관공이 대 기부까지 이어져 있으나 *F. acervatus*는 갓과 자루의 구분이 명확하다.

[염기서열 분석] 채집된 버섯은 *Favolus acervatus* (NCBI accession no. AB735971)와 100%의 상동성을 보였으며(Table 1) 동일종인 KP012981, KM385427, KX548953과는 각 99.7%, 99.6%, 99.6%의 유사도를 보였다(Fig. 4D).

제주도의 기존 버섯 종 다양성 연구에서 종의 동정은 광학현미경을 이용한 형태적 분류에 의존하였다[10]. 그 이후 연구에서는 제주도 전 지역에서 발생한 버섯들의 발생 환경, 자실체의 형태 등을 조사하고, 광학현미경뿐만 아니라 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 기존 연구에서보다 좀 더 상세한 관찰을 통해 종을 동정하였다[11].

그러나 최근 DNA 염기서열 분석을 통하여 종의 동정 및 분류하는 방식이 새로이 이루어지고 있다. 국내 한 연구에서는 한국산 흑주름버섯속의 버섯들의 DNA 염기서열 분석을 통하여 더욱 정확하게 동정을 하였다[12]. 또한 채소 온실 내 발생한 버섯의 종 동정에서도 염기서열 분석을 통해 종 동정에 있어 더욱 정확성을 기하였다[13].

본 연구에서는 제주 동부지역에서 채집된 317종의 버섯 중 국내 미기록종으로 추정되는 버섯 4종을 선별하여 버섯의 DNA 염기서열을 분석한 결과 국내 미기록종으로 밝혀졌으며 이들을 광학현미경으로 관찰한 결과 DNA 염기 서열 분석에 의한 버섯과 동일하였다(Figs. 1~4). 따라서 이들 결과들을 통하여 제주 동부 지역에서 발견된 4종의 버섯을 국내 미기록종으로 보고하는 바이다.

적 요

본 연구에서는 2016년 5월에서 9월까지 제주 동부지역에서 채집된 317종의 버섯들 중 국내 미기록된 4종을 보고하고자 한다. 미기록종으로 추정되는 버섯의 정확한 동정을 위하여 채집된 자실체에서 분리한 DNA의 염기서열을 버섯의 유전자은행을 통하여 비교 분석한 결과 *Agaricus flocculosipes*, *Amanita concentrica*, *Coprinopsis strossmayeri*, *Favolus acervatus*로 동정되었으며 이들은 모두 국내 미기록종으로 확인되었다. 한편 현미경을 이용하여 버섯의 미세구조를 관찰한 결과는 모두 DNA 염기서열을 분석하여 동정한 버섯과 일치하였다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project on Taxonomical research of Korean mushroom and lichen flora at the living spaces and special biosphere in Korea in 2016 (KNA1-1-22, 17-2) funded by Korea National Arboretum, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Lee JB. The flora of higher fungi of Mt. Halla [dissertation]. Jeju: Jeju National University; 1998.
2. Ko PY. Study on species diversity of indigenous mushrooms in Jeju [dissertation]. Jeju: Jeju National University; 2013.
3. Breitenbach J, Kränzlin F. Fungi of Switzerland, Vol. 1-6. Lucerne: Verlag Mykologia; 1984-2005.
4. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.
5. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-20.
6. Zhao RL, Hyde KD, Desjardin DE, Raspé O, Soyong K, Guinberteau J, Karunarathna SC, Callac P. *Agaricus flocculosipes* sp. nov., a new potentially cultivatable species from the palaeotropics. *Mycoscience* 2012;53:300-11.
7. Thongbai B, Tulloss RE, Miller SL, Hyde KD, Chen J, Zhao R, Raspé O. A new species and four new records of *Amanita* (Amanitaceae; Basidiomycota) from Northern Thailand. *Phytotaxa* 2016;286:211-31.
8. Oda T, Tanaka C, Tsuda M. *Amanita concentrica*: a new species in *Amanita* section *Amanita* from Japan. *Mycoscience* 2002;43:81-3.
9. Badalyan SM, Szafranski K, Hoegger PJ, Navarro-González M, Majcherzyk A, Kües U. New Armenian wood-associated coprinoid mushrooms: *Coprinopsis strossmayeri* and *Coprinellus* aff. *radians*. *Diversity* 2011;3:136-54.
10. Ko PY. Ecological study on wild mushrooms at the Dongbaekdongsan of Seunheulgot in Jeju island [dissertation]. Jeju: Jeju National University; 2009.
11. Ko PY, Seok SJ, Jeun YC. Four new records of Agaricales from Halla mountain of Jeju island in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:127-31.
12. Seok SJ, Jin YJ, Kwon SW, Kim YS, Kim WG. A taxonomic study of genus *Melanophyllum* in Korea. *Kor J Mycol* 2013;41:205-11.
13. Seok SJ, Yoo KB, Jin YJ, Kim DI, Kim WG. Identification and characteristics of mushrooms grown in vegetable greenhouses. *Kor J Mycol* 2016;44:127-31.