

## 먹물버섯류(*Coprinus* spp.)의 ITS II 영역 염기서열에 의한 유연관계 분석

박동석\* · 고승주 · 김양섭 · 석순자 · 송재경 · 여윤수 · 류진창 · 성재모<sup>1</sup>

농업과학기술원 분자유전과, <sup>1</sup>강원대학교 농생물학과

### Genetic Relationships of *Coprinus* spp. on the Basis of Sequences in ITS II Region

Dong Suk Park\*, Seung Joo Go, Yang Sup Kim, Soon Ja Seok,  
Jae Kyeong Song, Yun Soo Yeo, Jin Chang Ryu and Jae Mo Sung

Division of Molecular Genetics, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

**ABSTRACT:** The internal transcribed spacer II regions (ITS II) of the ribosomal DNA gene repeat from *Coprinus* spp. were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. Sequences from 11 species including *Coprinus comatus*, *C. atramentarius*, *C. micaceus*, *C. lagopus*, *C. cinereus*, *C. rhizophorus*, *C. flocculosus*, *C. radians*, and *C. echinosporus* were compared. The spacer regions of them were 253~275 nucleotide in length and partially contained 5.8S and 25S. The reciprocal homologies of each ITS II sequence among these strains were in the range of 50.6~100%. According to the analysis of ITS II sequences, *Coprinus* spp. were classified into three clusters. Cluster I consisted of *Coprinus lagopus*, *C. cinereus*, *C. echinosporus*, *C. rhizophorus*, *C. niveus*, and *C. atramentarius*. Cluster II comprised *C. micaceus*, *C. flocculosus*, *C. radians*, and *C. disseminatus*. On the other hand *C. comatus* is in Cluster III even though this species is belonging to the section *Coprinus* in morphological aspect. These results suggest that *Coprinus comatus*, which was considered as a type species of the genus *Coprinus* in morphological classification, gives a doubt of monophyletic evolution and is assumed to be paraphyletic or polyphyletic.

**KEYWORDS:** *Coprinus*, ITS II, Ribosomal DNA, Homology, Paraphyletic, Polyphyletic

먹물버섯은 주름버섯목(Agaricales)의 먹물버섯과(*Coprinaceae*)에 속하는 그룹으로 갓(cap)이 액화현상을 일으키며 검정색의 먹물이 유발되는 점을 주요 특징으로 꼽을 수 있다.

먹물버섯은 Buller(1922, 1924, 1931)의 고전적인 연구에서 근세의 교잡 유전자형 연구(May *et al.*, 1991)에 이르기까지 곰팡이 연구에 중심적 역할을 담당해 왔고, 이들 그룹에 대한 분류학적 연구는 Fries(1821)가 이들 그룹을 *Agaricus* 속내에 한 종들로 처음 보고하면서 시작되었다. *Coprinus*속은 Buller(1922), Smith(1971) 등에 의해 자연 속(natural genus)의 한 예로서 제안되었고 단일 조상계보(monophyly)를 유지하며(Buller, 1922, 1924, 1931; Kühner and Romagnesi, 1978) 독특한 형태학적 특성을 갖고있는 것으로 알려져 있다. Buller(1922)는 non *Coprinus* type의 버섯과 *Coprinus* type의 버섯을 구별할 수 있는 일곱가지 특성을 나열하였고, 이들 특성 중에서 라멜라의 액화현상과 담자기의 inaequihymeniferous 생장을 가장 큰 특징으로 꼽았다. 그러나 이 2가지 특성은 먹물버섯 속의 모든 종들에서 발견되지 않고 있다. 그 예로 *C. plicatilis*에서는 측사가 존재하지 않는다.

먹물버섯속(*Coprinus*)은 4개의 절로 나뉘어 있다(Singer, 1986). Section *Hemerobii* Fr.와 *Setulosi* Lange에 속하는 먹물버섯들은 거의 액화 현상을 보이지 않으며(Kühner and Romagnesi, 1978; Reijnders, 1979), 이러한 결과로 Kühner(1928)는 이들을 구분키 위해 *Pseudocoprinus*란 새로운 속을 제안하였다. 또한, Section *Lanatuli* Fr.에 속하는 종들에는 inaequihymenial 성장이 일어나지 않고 있다(Pukkila *et al.*, 1984). 이러한 불일치는 이 속의 단일 계통 진화에 있어서 의문점을 남기고 있다.

한편, 한국에서의 먹물버섯류에 대한 기록은 鑛木德二(1940)에 의하여 “鮮滿實用林業便覽”에 한국산 주요 菌蕈 163종 중 *Coprinus atramentarius* (Fr.) Fr., *C. micaceus* (Fr.) Fr. 및 *C. disseminatus* (Fr.) S. F. Gray 3종을 한국명 없이 목록만 기록된 것이 최초이며, 지금까지 18종이 보고되었다. 그러나 한국산 먹물버섯류의 학명 및 한국명에 대한 통일성이 부족한 상태이고 각 버섯에 대한 기록은 목록만 있거나 기타 버섯류와 함께 기록 중 약간의 기술만 수록되어 있을 뿐 한국산 먹물버섯류에 대하여 분류학적 체계 분석에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 먹물버섯류의 체계적인 분류학적 분석을 위해 기존 형태 분류체계와 분자 생물학적 방법을 이용하여 ITS II(5.8S 그리고 25S 일부 포함)의 염기서열을 이용한 분석을 실시함으로써, 분

\*Corresponding author

류학적 접근 방법의 새로운 모델을 구명하고자 실시하였다.

**재료 및 방법**

**공시균주 및 배양조건**

본 실험에 사용된 균주는 Table 1에 나타나 있다. 본 균의 배양을 위해 이용된 배지는 SAB(Sabouraud dextrose broth)로서 Difco Co.의 제품을 이용하였다. 25°C에서 약 15일간을 진탕 배양하였다.

**Total genomic DNA 분리**

Graham 등(1994)의 방법에 따라 냉동 건조시킨 1g 균사체를 액체 질소에 넣고 곱게 마쇄한 다음 1 ml의 추출 용액을 완충액(2%(wt/vol) hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)에 고르게 현탁한 후 58°C에서 50분간 열처리 하였다. 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한후 새 튜브로 옮긴 상등액에 phenol:chloroform(1:1)으로 5~6회 추출한 다음 상등액을 에탄올 침전하여 DNA를 응집시켰다. 응집물을 70% 에탄올로 세척하고 200 µl TE buffer(pH 8.0)에 녹여 사용하였다.

**PCR primer 작성**

*Coprinus*속 및 기타 균주의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 White 등(1990)에 의해 보고된 곰팡이류의 ITS 영역 증폭 primer를 이용하였으며 이들의 oligomer의 염기서열은 Fig.

1과 같다.

위의 primer는 DNA synthesizer(Applied Biosystem Model 381A, CA, USA)를 이용하여 합성한 후 OPC™ cartridge를 이용하여 정제하였으며 합성된 primer의 양은 UV분광도계(O.D. 260 nm)로 측정하였다.

**rDNA의 ITS II 영역 증폭**

PCR 반응은 0.5 ml microcentrifuge tube에서 실시하였고 2.5 mM dNTP, 100 pmol primer, 2.5 unit Taq DNA polymerase(Promega Co.), 5 µl의 10×buffer(100 mM Tris pH 9.0, 50 mM KCl, 10% Triton X-100), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng genomic DNA 등을 멸균수와 잘 섞어 총량을 50 µl로 한 후 반응액의 증발을 막기 위해 30 µl의 mineral oil을 첨가하였다. PCR 반응 조건은 annealing 온도를 58°C로 하였으며 cycle은 35회 반복하였다.

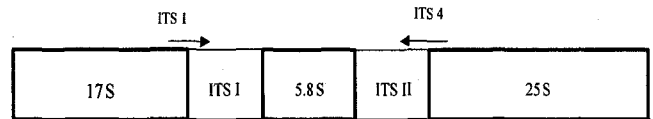


Fig. 1. A structure of rRNA gene cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS region used in this study.

ITS 1(forward primer):5'-TCCGTTAGGTGAACCTGCGC-3'(19mer), ITS 4(reverse primer):5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'(20mer).

**Table 1.** The list of species and Genbank accession number of *Coprinus* spp. used in this study

Species	Strains <sup>a)</sup>	Geographical origins	Genbank Accession No
<i>Coprinus comatus</i>	GBDS536	Mt. Kwanggyo, Kyunggi-do	AF043656
<i>Coprinus comatus</i>	GBDS1035	Suwon, Kyunggi-do	AF043657
<i>Coprinus atramentarius</i>	GBDS2061	Suwon, Kyunggi-do	AF059598
<i>Coprinus atramentarius</i>	GBDS1008-1	Seoul	AF044060
<i>Coprinus atramentarius</i>	ATCC22313	USA	AF043673
<i>Coprinus lagopus</i>	GBDS460	Mt. Kwanggyo, Kyunggi-do	AF043659
<i>Coprinus lagopus</i>	GBDS1415	Kwangju, Kyunggi-do	AF043660
<i>Coprinus cinereus</i>	GBDS2249	Nepal	AF043666
<i>Coprinus disseminatus</i>	GBDS2221	Nepal	AF043665
<i>Coprinus niveus</i>	ASIS5212	Mt. Halla, Cheju-do	AF043672
<i>Coprinus echinosporus</i>	GBDS1669	Kwangneung, Kyunggi-do	AF043667
<i>Coprinus rhizophorus</i>	ASI20013	Haenam, Cheollanam-do	AF043668
<i>Coprinus flocculosus</i>	ASIS5574	Suwon, Kyunggi-do	AF043671
<i>Coprinus micaceus</i>	GBDS1004	Seoul	AF043662
<i>Coprinus micaceus</i>	GBDS1388	Mt.Kwanggyo, Kyunggi-do	AF043661
<i>Coprinus micaceus</i>	GBDS2112	Suwon, Kyunggi-do	AF043663
<i>Coprinus micaceus</i>	GBDS2056	Suwon, Kyunggi-do	AF043664
<i>Coprinus radians</i>	GBDS1075	Seoguipo, Cheju-do	AF043669

<sup>a)</sup>GBDS: GenBank Dried Specimen, Molecular Genetics Division, NIAST, Suwon

ASIS: Agricultural Science Institute Seok, RDA, Suwon

ASI: Agricultural Science Institute, RDA, Suwon

ATCC: American Type Culture Collection, USA



55 bp, 82 bp, 200 bp, 227 bp에서 각각 다른 종들이 모두 공통적으로 갖는 염기서열과는 다른 염기를 갖고 있거나 gap으로 밝혀져 이 종이 다른 종들과 멀리 떨어지는 결정적인 염기들로 조사되었으며 그 일부는 Fig. 2에 나타나있다.

**ITS II 영역을 이용한 분석**

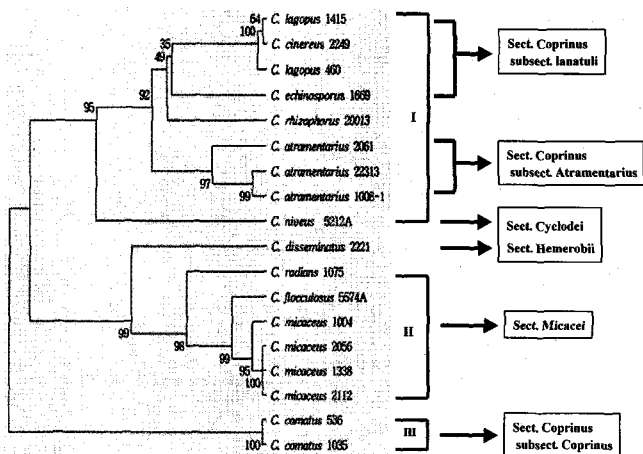
공시된 18균주의 ITS II 영역에 대한 균주간 염기서열 상동성은 Table 2에 나타나 있다.

이들 먹물버섯(*Coprinus* spp.)의 염기서열 상동성은 50.6% 이상이었으며, *C. comatus*는 기타 먹물버섯 종들과 일반적으로 상동성이 매우 낮았다. 염기서열의 상동성 비교를 통해 작성된 분류도에 의하면 크게 3가지 cluster로 구분되었다(Fig. 3). Cluster I 내 종간 최저 유사도는 64.8%, Cluster II 내에서는 83.1%로 조사되었다. Cluster III에 속하는 *C. comatus* 종은 형태분류학에서 먹물버섯 속의 대표종으로 간주되고 있었으나 분자 생물학적 분류에서는 가장 먼 그룹을 형성하였다. 분류도에서 분지에 대한 신뢰도는 신뢰 수준 이하로 나타나 매우 예상외의 결과로 조사되었다. Cluster I에는 *Coprinus lagopus*, *C. cinereus*, *C. echinosporus*, *C. rhizophorus*, *C. atramentarius* 및 *C. niveus*이 속하는 것으로 조사되었다. *C. disseminatus*, *C. radians*, *C. flocculosus*, *C. micaceus*이 Cluster II에 속하는 분류군으로 나타났다.

Singer(1986)의 형태적 분류체계를 보면 먹물버섯속은 4개 절로 나뉘어 있고 각 절에 여러 개의 아절이 있다. 그의 분류체계에 따라 조사된 균주 중 *Coprinus* 절 및 각 아절에 포함되는 종들을 보면, *Coprinus* 절의 *Coprinus*(Annulati Lange 1915) 아절에 *C. comatus*, *Atramentarius*(Fr. 1838) 아절에 *C. atramentarius*, *Lanatulii*(Fr. 1833) 아절에 *C. lagopus*, *C. cinereus*, *C. rhizophorus*, *C. echinosporus*가 각

각 속해 있고, *Micacei* Fr.(1838) 절의 *Exannulati* Lange (1915) 아절에 *C. micaceus*, *Domestici* Lange(1848) 아절에 *C. flocculosus*가 포함되며, *Cyclodei* Fr.(1838)절에 *C. niveus*, *Hemerobii* Fr.(1838)절에 *C. disseminatus*이 분류되어 있다. 이와 같이 전통적 분류체계와 ITS II 영역의 염기서열로 결정된 분류도(tree)와 비교해 보면, Cluster I에 속하는 분류군과 *Coprinus*절에 속하는 분류군이 *C. comatus*를 제외하고는 모두 일치하는 경향을 나타내었고, Cluster II에 속하는 종들과 형태적 분류체계의 *Micacei* 절, *Cyclodei* 절, *Hemerobii* 절과도 일치하는 양상을 보여 주었다. *C. lagopus*와 *C. cinereus*는 과거 분류학자들 사이에서 동종이 명시비로 논란이 많았던 그룹으로 본 결과에서는 같은 그룹으로 나타났으나 두 종간에 가지가 엇갈리는 결과가 도출되었다. 그러나 이 그룹은 허균을 형성하는 점에서 *C. rhizophorus*가 *C. lagopus* 및 *C. cinereus*와 같은 아 그룹에 놓인 것은 형태 분류와 일치하는 의미 있는 결과를 보여주었다. 반면 *C. echinosporus*는 분류도에서 보는 바와 같이 Cluster I에 속해 있으나 분지에 대한 신뢰도는 다소 떨어지는 결과가 나타났다. *C. lagopus*(GBDS460)의 형태적 특징은 본 연구에 서술되지는 않았으나 조사 과정에서 다른 strain과 다소 상이한 점이 미세구조에서 발견되었다. 그러나 다른 종으로 구분하기에는 좀더 충분한 조사를 필요로 하여 이번 보고에서는 같은 계통으로 묶어 조사하였다. 한편 이들과 유사한 결과를 보여준 *C. micaceus*(GBDS1004)도 그룹내에서 다른 strain과 다소 차이를 보여 본 종과 유사한 다른 종일 가능성을 나타내었다. 가장 종내 그룹에서 다양한 양상을 보여준 그룹은 *C. atramentarius*로, ATCC 도입 균주와 국내 균주와의 비교 분석에서 2개의 그룹으로 나뉘어 지는 현상을 확인 할 수 있었다. 당초 저자는 이들의 갓 표면에 돌아 있는 인편(scale)의 유무에 따라 그룹이 나뉘어질 것으로 예측했으나 예상과는 달리 이 특성은 무관하다는 결과를 얻었다. 그러므로 이들이 2개의 그룹으로 나뉘어진 주된 이유를 기타 다른 형태적 특성에 근거하여 재조명하는 일이 필요하다고 사료되었다.

저자들이 ITS II 영역이 종내의 변이가 없다는 주장을 갖고 상기 결과를 해석하는 이유는 그간 종내 여러 strain의 염기서열을 조사한 결과, 거의 모두 동일한 양상을 보여주었기 때문이었다(data not shown). 물론 염기서열을 해독하는 과정이나 유전자 증폭과정에서의 오류가 발생할 확률을 예상하더라도 그 오차의 범위가 5% 이내에서의 유사도를 가져야 한다고 보며 종내에서 95% 이하의 상동성을 보인다면 그것은 다른 그룹으로 보아야 한다고 보는데, 대상으로 하는 유전자의 염기서열의 크기에 따라 그 변동의 폭은 크거나 작아 질 것이다. 이번 연구에서 조사된 영역은 종의 진화 과정을 엿볼 수 있는 정보를 가지고 있다고 이미 학계에 널리 입증된 것(White *et al.*, 1990)으로 계통 분석에 매우 유용한 것으로 보이며 본 결과에서도 그러한 주장을 입증시켜 주는 결과가 다수 도출되었다. 그간 학자들 사이에 자연 속로 믿어 오던 먹물버섯속의 종들이 액화현상의 유



**Fig. 3.** Dendrogram based on a comparison of ITS II region sequences from *Coprinus* spp.

The branch pattern was generated by neighbor-joining method. The number at the node indicates the levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data set. The arrows indicate the Singer's taxonomic system based on morphological characters.

무, 자실체의 담자층 배열상태 차이점이 이들의 주요 특징으로 인식되어 왔지만 실제 이들의 형태적 분류에 대한 의문점이 지적되어 왔다(Pukkila *et al.*, 1984; Hopple *et al.*, 1994). Cluster I과 Cluster II에 속하는 종들의 발생지를 보면 Cluster I의 경우에는 주로 초본과 식물 또는 초본류를 섭식하는 동물의 배설물에서 발생하고 II의 경우는 목본과 식물에 기생하는 형태로 종들이 나뉘어 짐을 발견할 수 있었다. 그러므로 이들의 기주를 분류의 기준으로 설정하여 검색표를 재작성 해보는 시도도 필요하다고 사료되었다. 한편, 형태분류 학자들이 새로운 속인 *Pseudocoprinus*으로 분리시켰던 *C. disseminatus*는 먹물 버섯 그룹 내에서 Cluster II에 포함되는 결과로 보아 분리시킨 것은 다소 적합치 못하다는 점을 보여주었다. 분류도에서 이들 결과를 종합해 볼 때, 차후 좀 더 깊은 연구가 선행되어야 하겠으나 형태적 분류에서 이들 그룹의 기준종인 *C. comatus*가 다른 종들과의 상동성에서 50% 수준의 유사도를 보인 것과 분지에 대한 신뢰도에서 상기의 결과를 나타낸 것은 이들 그룹이 단일계통진화 주장 및 형태적 분류 방법의 검색표 작성에 다소 의문점을 남겨주었다.

## 적 요

먹물버섯속(*Coprinus* spp.)의 분자 생물학적 분류 가능성을 모색하기 위해 rDNA의 cluster중 ITS II 영역을 PCR 증폭하여 염기서열을 밝혔다. 이들의 ITS II 영역은 253~275염기쌍으로 이루어져 있었으며 균주간 ITS II 염기서열의 유사도는 50.3~100%로 나타났다. 이들의 염기서열을 이용해 분류도를 작성한 결과, Singer의 형태적 분류체계와 거의 유사한 결과를 보였으나 이들 그룹의 기준종(type species)인 *C. comatus*는 기타 종들과의 유사도에서 50% 수준의 저조한 상동성을 보여 주었다. 이와 같은 결과로 볼 때 이 종은 기존의 다수 학자들이 보고한 단일 계통진화를 해 온 속이란 점에서는 다소 의문점을 남기었고, ITS II 영역은 종내 변이는 없는 것으로 보이며 종내의 균주간의 변이가 밝혀진 그룹에 대해서는 종에 대한 재검토가 필요하다고 본다.

## 참고문헌

- 鏑木德二. 1940. 鮮滿實用林業便覽. pp. 1-5.
- Buller, A. J. H. 1922. Researches on Fungi. Vol. VII. Longman's Green and Co., London, United Kingdom. 492pp.
- Buller, A. J. H. 1924. Researches on Fungi. Vol. VIII. Longman's Green and Co., London, United Kingdom. 611pp.
- Buller, A. J. H. 1931. Researches on Fungi. Vol. IV. Longman's Green and Co., London, United Kingdom. 329pp.
- Fries, E. M. 1821. Systema Mycologicum I. Lund & Griefswald.
- Graham, G. C. Mayer, S. P. and Henry, R. J. 1994. Amplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques* **16**: 175-269.
- Hopple, J. S. and Vigalys, R. 1994. Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. *Mycologia* **86**(1): 96-107.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In: *Mammalian Protein Metabolism*. H. N. Munro, Ed, Academic Press, New York, N. Y.
- Kuhner, R. 1928. Le development et la position taxonomique de l' *Agaricus disseminatus* Pers. *Le Botaniste* **20**: 147-156.
- Kuhner, R. and Romagnesi. 1978. Flore Analytique des Champignons Superieurs. 1st Ed. Masson, Paris. 556pp.
- May, G., L. Le Chevanton, and P. J. Pukkila. 1991. Molecular analysis of *Coprinus cinereus* mating type A factor demonstrates an unexpectedly complex structure. *Genetics* **128**: 529-538.
- 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 to fungal taxonomy. *Mycologist* **9**(2): 67-75.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.
- Pukkila, P. J., B. M. Yashar, and D. M. Binnering. 1984. Analysis of meiotic development in *Coprinus cinereus*. In: *Controlling Events in Meiosis. Symp. Soc. Exp. Biol.* **38**: 177-194.
- Reijnders, A. F. M. 1979. Developmental anatomy of *Coprinus. Persoonia* **10**: 383-424.
- Singer, R. 1986. The Agaricales in Modern Taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Germany. 981 pp. + 88pl.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Smith, A. H. 1971. The origin and evolution of Agaricales. Pp. 481-504. In: *Evolution in the Higher Basidiomycetes*. R. H. Peterson. Ed. Univ. of Tennessee Press, Knoxville.
- White, T. J. Burns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Eds. Academic Press, San Diego, California. 482 pp.