

ITS II 영역의 DNA 염기서열 분석에 의한 불로초(*Ganoderma*)속의 계통분류학적 고찰

박동석* · 고승주 · 류진창 · 성재모¹

농업과학기술원 분자유전과, ¹강원대학교 농생물학과

Phylogenetic Study of *Ganoderma* spp. Based on the DNA Sequences in ITS II Region

Dong Suk Park*, Seung Joo Go, Jin Chang Ryu and Jae Mo Sung

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

¹Department 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 *Ganoderma* spp. were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. Sequences from 9 species including *Ganoderma lucidum*, *G. tsugae*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*, *G. australe-applanatum*, *G. oregonense*, *G. neo-japonicum*, *G. applanatum* and *Inonotus xeranticus* as an out-group were compared. The spacer regions of them were 247~257 nucleotides in length and contained partial sequences of 5.8S and 25S gene. The reciprocal homologies of each ITS II sequence of the species were in the range of 70~100% except outgroup species, *I. xeranticus*. According to the analysis of ITS II sequences, *Ganoderma* spp. constructed 5 clusters. *Ganoderma lucidum* isolates were to be divided into two groups. One group was consisted of isolates from South Korea. The other group comprised isolates from UK. *G. lucidum* isolates belonging to the group I were closely related with *G. tsugae*. These results suggested that *G. lucidum* from Korea should be *G. tsugae*, otherwise *G. tsugae* was to be synonym of *G. lucidum*.

KEYWORDS: *Ganoderma*, ITS II, Ribosomal DNA, Homology

Ganoderma lucidum (Fr.) Karst.은 민주름버섯목(Aphyllophorales)의 가장 큰 그룹 중의 하나인 불로초속(*Ganoderma*)에 속하는 종으로, 고대부터 한국, 중국, 일본 등 동양권에서 신비의 약초로 취급되어 영지, 불로초, 만년버섯 등의 여러 이름으로 불려왔다. 불로초는 1881년 Karsten에 의해 *Polyporus lucidus* Ley: Fr.로 처음 명명되었다. 그 후 여러 분류학자들에 의해 불로초속 균들이 다수 보고되어 왔으며 이 속은 1930년 초까지 Polyporaceae(구멍장이버섯과)로 구분되었다. 그러나 Donk(1933)에 의해 불로초아과로 분리되었고 1964년에 불로초과(*Ganodermataceae*)로 승격시켜 새로운 분류체계를 확립하였다.

지금까지 보고된 불로초속 균류는 약 240여종이 보고되었으나 형태분류학자들간에 의견이 일치하지 않아 다소 혼란이 있었다. 특히, Zhao(1989)는 "The Ganodermataceae in China"에서 형태적 분류에 따라 35종을 신종으로 보고하였으나, Lief(1994)는 불로초속 균류의 형태적 분류에 대한 문제점들을 지적한 바 있다. 이러한 문제점을 해결 및 보완하고자 생화학적 및 분자생물학적 방법을 이용하여 분류에 새로운 해석 방법을 모색하게 되었다(Hseu and Wang, 1991; Park *et al.*, 1994; 배 등, 1995; 박 등, 1996). 그 중

rDNA는 종간 및 속간 계통분류에 많이 이용되고 있는데(White *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1995), 그 주된 이유는 모든 생물체 내에 고루 분포되어 있으며 coding region과 non-coding region으로 나뉘어 종에 따라 수백에서 수천까지 반복 배열이 존재하는데 coding region은 염기 배열이 보존적이나 non-coding region은 속 및 종간에 다양성을 보여 분류에 적합하기 때문이다.

본 연구에서는 국내 자생 및 재배 종인 불로초(*G. lucidum*)에 대하여 정확한 분류학적 위치를 분자생물학적 방법으로 조사하고자 국내의 불로초 및 기타 동일 속 균류의 rDNA ITS II 부위의 염기서열들을 조사, 비교하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 Table 1과 같다. 사용된 배지는 PDB(Potato dextrose broth)로서 Difco Co.의 제품을 이용하였다. 30°C에서 23일간 정체 배양된 균사를 실험에 사용하였다.

Total genomic DNA 분리

*Corresponding author

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

Species	Strains ^{a)}	Geographical	Accession No
<i>Ganoderma lucidum</i>	ASI 7004	Korea	AF110726
<i>Ganoderma</i> sp.	ASI 7050	USA	-
<i>G. lucidum</i>	CBS 176.30	UK	AF44490
<i>G. tsugae</i>	CBS 428.84	USA	X78756 ^{b)}
<i>G. tsugae</i>	ASI 7024	Japan	AF110728
<i>G. pfeifferi</i>	CBS 747.84	Netherland	X78759 ^{b)}
<i>G. resinaceum</i>	CBS 52416	Argentina	AF044273
<i>G. australe-applanatum</i>	JM 97/2	USA	AF060084
<i>G. australe-applanatum</i>	JM 97/3	USA	AF060085
<i>G. oregonense</i>	ASI 7067	USA	AF110727
<i>G. neo-japonicum</i>	ASI 7032	Korea	AF110725
<i>G. applanatum</i>	CBS 250.61	Austria	AF044494
<i>Inonotus xeranticus</i>	GBDS3089	Korea	AF110724

^{a)}ASI: Agricultural Science Institute, Suwon, Korea

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherland

ATCC: American Type Culture Collection, USA

JM: Dr. Moncalvo's Cultures in Duke University, USA

^{b)}Underlined numbers are sequences cited from Genbank

Graham *et al.*(1994)의 방법에 따라 냉동 건조시킨 1g 균 사체에 액체 질소를 넣고 마쇄한 다음 1ml의 추출 용액 (2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA)에 현탁한 후 58°C에서 50분간 열처리하여 다당체를 제거하였다. 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상등액에 phenol:chloroform(1:1)으로 5~6회 추출하여 그 상등액에 2.5 vol의 에탄올을 부가하여 DNA를 침전시켰다. 원심분리하여 침전된 DNA pellet을 70% 에탄올로 세척하고 200 μ l TE buffer(pH 8.0)에 녹여 사용하였다.

PCR primer 작성

*Ganoderma*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.

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

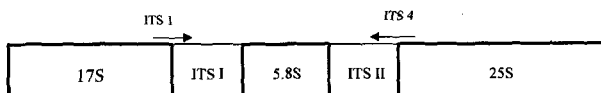


Fig. 1. A structure of rRNA gene cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification of ITS region.

ITS 1 (forward primer): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-C-3'(19 mer), ITS 4 (reverse primer): 5'-TCCTCCGC-TTATTGATATGC-3' (20 mer).

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 μ l의 10 \times buffer(100 mM Tris pH 9.0, 50 mM KCl, 10% Triton X-100), 2.5 mM MgCl₂, 50 ng genomic DNA를 멸균 증류수와 잘 섞어 총량을 50 μ l로 한 후 반응액의 증발을 막기 위해 30 μ l의 mineral oil을 증층으로 첨가하였다. PCR 반응 조건은 annealing 온도를 58°C로 하였으며 35회 반복하였다.

Cloning 및 sequencing

PCR로 증폭된 rDNA ITS II영역의 염기서열을 조사하기 위해서 먼저 이들 유전자 단편을 pGEM-T vector system (Promega Co.)을 이용해 클로닝하였다. 염기서열 결정은 T7 Sequencing Kit(Pharmacia Biotech.)를 사용하여 Sanger (1977)의 방법에 준하여 행하였다.

염기서열을 이용한 유연 관계 분석 및 염기서열 등록

계통 분류도 작성을 위해 이용된 rDNA ITS II 부위의 염기서열은 Clustal V 프로그램을 이용하여 정렬(alignment)시킨 후 수작업으로 보정하였다. Distance matrix는 Jukes & Cantor(1969)법으로 작성하였으며, 계통분류도는 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)의 neighbor-joining program에 의해 작성되었다. 결정된 ITS II 염기서열은 GenBank(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록하여 등록번호를 부여받았다(Table 1).

결과 및 고찰

ITS II 영역의 구조분석

고등균류의 rDNA gene cluster는 Fig. 1과 같으며 ITS II 영역은 5.8S와 25S 사이에 존재하였다. ITS II 영역의 전반적인 크기는 247 bp~257 bp 사이로서 종간에 10 bp 정도의 변이 폭을 보여주었다. 공시된 균주중 ITS II 영역의 길이가 가장 긴 종들은 *G. neo-japonicum*과 *G. pfeifferi*로서 257 bp였으며 길이가 짧은 종들은 *G. lucidum*(ASI 7004), *G. tsugae*(ASI 7024)로서 각각 247 bp였다. 정렬된 ITS II 전체 영역의 배열에서 1~68 bp, 251~273 bp는 각각 5.8S와 25S가 부분적으로 포함된 보존부위(conserved region)로 조사되었고, 69 bp~250 bp는 변이부위(variable region)로 나타났다(Fig. 2). 특히 조사된 분류군중 *G. neo-japonicum*는 238-240 bp, 194-195 bp에서 각각 다른 종들이 모두 공통적으로 갖는 염기서열과는 다른 염기를 갖고 있거나 gap이 존재하므로 이 종이 다른 종들과 비교적 먼 원연 관계임을 알 수 있었다(Fig. 2) 지금까지 보고된 곰팡이류의 ITS 부위는 종내 및 종간 변이가 많은 것으로 보고되어 왔으나(White, 1990; Mitchell, 1995) ITS I과 ITS II 각각의 특성에 대해서는 논의된 바가 거의 없었다. 본 실험의 ITS II 분석 결과에

Numbering of ITSII region(bp)	1	58
<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. sp</i> ASI7050	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. lucidum</i> CBSS 176.30	TTATTGATA-SCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. tsugae</i> CBSS 428.84	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>G. applanatum</i> CBSS 250.61	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	TTATTGATATGCTTAAGTTCAGC-GGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAGAG-GTC	
Numbering of ITSII region(bp)	59	118
<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	A-TAA-AGCT-GTCTT-ATAGAGCGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. sp</i> ASI7050	A-TAA-AGCT-GTCTCA-CAGGCAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. lucidum</i> CBSS 176.30	A-TAA-AGCT-GTCTTC-AGCGAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. tsugae</i> CBSS 428.84	A-TAA-AGCT-GTCTTC-AGCGAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024	A-TAA-AGCT-GTCTT-----ATAGAGCGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	A-TAA-AGCT-GTCTCA-CAAGCAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	A-TAA-AGCT-GTCTCA-CAAGCAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	A-TAA-AGCT-GTCTCT-CAATAGAGCGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	A-TAA-AGCT-GTCTCT-CAATAGAGCGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067	A-TAA-AGCT-GTCTCA-CAAGCAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	A-TAA-AGCT-GTCTTC-ATACAGAGCGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>G. applanatum</i> CBSS 250.61	A-TAA-AGCT-GTCTCT-CAAGCAGACGTTAGAACTGCGCCAAA-CGCTTCACGG-T	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	AATGATGATTGCTTCCGTTGAGAAAGCGTTGCGAAA--GCAAGCCGTTACGAAAGCG	
Numbering of ITSII region(bp)	119	179
<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AACCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. sp</i> ASI7050	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. lucidum</i> CBSS 176.30	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. tsugae</i> CBSS 428.84	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>G. applanatum</i> CBSS 250.61	CAC-GGCGTAGACATTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	CGCCAAATGATGAAGTTATCACACCGA-GAGCCGATCCGCAAG-AATCAAGCTAATGCAITTT	
Numbering of ITSII region(bp)	180	240
<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. sp</i> ASI7050	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. lucidum</i> CBSS 176.30	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. tsugae</i> CBSS 428.84	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>G. applanatum</i> CBSS 250.61	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	AAGAGGAGCCGACGATA-ACGG-CCGACAAGCCTCCAAAGT-CCAAGCTACAAA-CC-	
Numbering of ITSII region(bp)	241	272
<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	ACAAAAGC-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. sp</i> ASI7050	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. lucidum</i> CBSS 176.30	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. tsugae</i> CBSS 428.84	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>G. applanatum</i> CBSS 250.61	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	GCMAAGGT-TTGTAGTTGAGGATTCATGAC	

Fig. 2. Hypervariable regions shown on the sequence comparison of ITS II region between isolates of *Ganoderma* spp.

서는 종간의 변이는 발견되었으나 종내 변이는 거의 없는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2).

ITS II 영역의 염기서열을 이용한 상동성 분석

공시된 9종 13균주의 ITS II 영역에 대한 균주간 염기서열의 상동성은 Table 2와 같다. 이들 불로초 속(genus) 균들(*Ganoderma* spp.)의 염기서열은 균주간 69.9% 이상의 상동성을 보여주었다. 염기서열의 상동성을 기초로하여 *G. lucidum*의 균주간 상동성을 분석한 결과 지리적 분포에 따라 87.4%의 상동성을 보였다. 특이할 만한 것은 수집 지역이 지리적으로 서로 다른 *G. lucidum* 균주중 몇 균주는 *G. tsugae*와 87.0%~99.6%의 동일성을 보였다. 더욱이 국내에서 재배되고 있는 *G. lucidum*(ASI 7004)은 일본산 *G. tsugae*(ASI 7024)와 99.6%의 동일성을 보여 종내보다 더 상동성이 높게 나타났다. 이러한 결과는 동위효소의 밴드패턴을 이용한 불로초의 분류적 특성을 박 등(1994)이 보고한 결과와 Random amplified polymorphic DNA(RAPD) 및 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)을 이용한 불로초 속(genus)의 유연관계를 조사한 박 등(1996)의 보고와 일치하는 결과이다. 그러나 이와같이 종내보다 중간 유연관계가 가깝게 나타나는 것은 실험상 문제점이 있을 수 있으므로 Moncalvo(1995)에게 국내산 *G. lucidum* 5균주에 대한 rDNA ITS 부위의 염기서열의 상동성을 의뢰하여 조사한 결과 국내에서 *G. lucidum*으로 보고된 종은 *G. tsugae*인 것으로 추정하였다(personal communication). Hseu(1991)는 국내 농가에서 재배되는 불로초의 형태적 특성을 보고 *G. tsugae*라고 확인한 바 있다. 그의 견해에 의하면 *G. lucidum*은 발생지가 열대 및 아열대 지역으로 제한되어 있는 반면 *G. tsugae*는 발생지가 온대지방으로 발생지의 차이가 나며 자실체 형태도 말굽형의 *G. tsugae*와 같다는 것이다. 현재 인터넷을 통해 National Center for Biotechnology Information(NCBI) GenBank에 등록된 *G. lucidum*에 대한 rDNA의 ITS 부위의 염기서열 자료를 분석해 보면 지리적 분포에 따라 다양한 염기 변이가 관찰되는데 몇몇 *G. lucidum*의 ITS I region에서는 종내에서 다양한 염기변이를 발견할 수 있었고, ITS II region에서는 종내(intraspecies)에서 거의 차이가 없는 것으로 조사되었다(Moncalvo, 1995). 한편 불로초 속내 중간 분류를 위하여 상동성을 분석한 결과 69.9%~92.5%의 분포를 보였으며 특히 *G. lucidum*은 *G. neo-japonicum*과 75.3%로 공시한 *Ganoderma* 균중 가장 먼 원연관계를 보여주었다. *G. pfeifferi*는 *G. neo-japonicum*과 상동성이 69.9%로 가장 낮았다. 그러나 이러한 결과는 Hseu(1991)의 보고와 상이하였다. Hseu는 불로초 속 22균주에 대한 균의 배양적 특성 조사 및 동위효소(laccase)와 API-ZYM test를 이용한 유연관계 분석에서 *G. lucidum*의 모본, 부분, 교잡종에서 분리된 균주가 다른 종과 뒤섞여 종내 균주간 상동성이 중간 균주보다 원연으로 나타나기도 하였다. 특히 *G. lucidum*(0708)와 *G. neo-japonicum*(VZ, 0813)간의 유연관계가 본 결과와는 달리 가깝게 나타나는 것은 사용된 균주가 서로 다르기 때문일 수도 있으나 *G. lucidum*이 한 군(Clade)내에 한 집단으로 cluster를 형성하지 않았고, 여러 종들과 유연

Table 2. Levels of similarity based on ITS II sequences from *Ganoderma* spp.

Organisms	% ITS II sequence homology													
	<i>Ganoderma lucidum</i> ASI 7004	<i>Ganoderma</i> sp. ASI 7050	<i>G. lucidum</i> CBS 176.30	<i>G. tsugae</i> CBS 428.84	<i>G. tsugae</i> ASI 7024	<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84	<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16	<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2	<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3	<i>G. oregonense</i> ASI 7067	<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032	<i>G. applanatum</i> CBS 250.61	<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089	
<i>G. lucidum</i> ASI 7004	100	85.4	87.4	87.0	99.6	80.6	87.0	88.9	88.7	84.6	75.3	87.9	47.8	
<i>G. sp</i> ASI 7050		100	88.9	88.1	85.8	92.5	91.3	86.9	84.5	92.1	72.4	83.4	43.3	
<i>G. lucidum</i> CBS 176.30			100	94.9	87.9	83.3	83.7	86.9	84.9	82.5	73.0	85.7	45.6	
<i>G. tsugae</i> CBS 428.84				100	87.4	82.2	83.0	86.1	84.5	81.8	71.9	85.0	46.6	
<i>G. tsugae</i> ASI 7024					100	81.0	87.4	90.3	89.1	85.0	75.7	88.3	47.4	
<i>G. pfeifferi</i> CBS 747.84						100	88.2	82.9	82.9	87.7	69.9	78.3	42.0	
<i>G. resinaceum</i> CBS 524.16							100	84.1	83.7	87.0	71.7	82.2	42.1	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/2								100	92.4	84.5	77.0	87.7	45.6	
<i>G. australe-applanatum</i> JM97/3									100	82.1	76.9	86.5	47.0	
<i>G. oregonense</i> ASI 7067										100	69.6	79.8	42.3	
<i>G. neo-japonicum</i> ASI 7032											100	79.4	44.7	
<i>G. applanatum</i> CBS 250.61												100	48.2	
<i>Inonotus xeranticus</i> GBDS 3089													100	

관계가 가깝게 나타난 것이나 교배종인 *G. lucidum*(0926)이 모본인 *G. lucidum*(RZ)와 *G. lucidum*(G001)보다 매우 먼 유연관계로 나타난 사실은 이해하기 곤란하였다. 한편, 박 등 (1996)은 Tseng이 ATCC(American Type Culture Collection)에 기탁한 *G. lucidum* ATCC 64251의 ITS I, II 영역의 염기서열 분석시(GenBank accession No. AF 044274) 블로초 속 그룹에는 포함되나 PCR-RFLP 및 RAPD 실험 결과는 국내 블로초와 원연 관계임을 보고한 바 있다. 만약, 블로초가 썩나무버섯(*Armillaria mellea*)의 예(Anderson *et al.*, 1989, 1992)처럼 지리적 분포에 따라 생식적 격리가 발생하는 생물학적 종(biological species) 개념의 도입이 필요하다면 적어도 rDNA의 IGR(Intergeneric region)의 PCR-RFLP의 밴드양상에서 동일하거나 유사한 양상으로 나타날 것으로 판단되나 *G. lucidum* ATCC 64251과 국내에서 재배되고 있는 *G. lucidum*과는 차이가 있었다.

ITS II 영역의 염기서열에 대한 각 균주 및 종간의 상동성을 기초로 하여 계통분류학적인 계통수(tree)를 그려 본 결과 Fig. 3와 같다. 블로초속은 크게 4개의 그룹으로 구분되었으며 제 I 그룹에는 *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. merethidae*, *G. pfeifferi* 및 *G. oregonense*가 포함되었고, 제 II 그룹에는 *G. australe-applanatum*이 하나의 clade를 형성하였다. 제 I 그룹 중 *G. lucidum*과 *G. tsugae*는 가장 밀접하게 나타났으며 *G. lucidum*은 *G. neo-japonicum*과 가장 먼 유연관계를 보였다. 한편, *G. neo-japonicum*이 그룹 내에서 가장 먼 유연관계를 보인 것과 *G. applanatum*이 *G. neo-japonicum*보

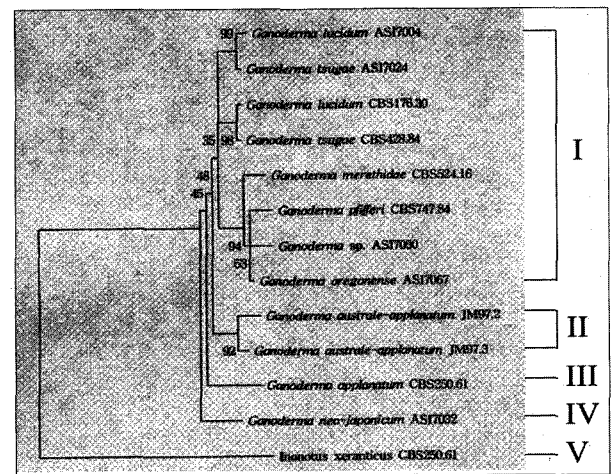


Fig. 3. Dendrogram based on a comparison of ITS II region sequences from *Ganoderma* spp. The branch pattern was generated by neighbor-joining method. The number at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data set.

다 그룹내에서 더 유전적 거리가 더 가깝게 나온 결과는 박 (1994)이 보고한 내용과 다소 차이가 있었고 *G. applanatum*은 분류학자들에 의해 *Elfvigia*속으로 분리되어 보고된 바도 있다.

이상의 결과와 국내 다수의 블로초에 대해 동위효소 및 DNA profile을 조사해 온 결과(박 등, 1994; 배 등, 1995; 박 등, 1996)를 종합해 보면 국내 재배되고 있는 균주는 거의

동일한 양상을 나타냈으며 계통수(tree) 분석 결과 *G. tsugae*는 *G. lucidum*과 하나의 분지를 이루거나 한 cluster 내에 존재하는 것으로 보아 두 종을 같은 종으로 묶는 것이 타당하다고 사료된다. 이러한 결과는 Moncalvo(1995)의 *G. lucidum* rDNA 염기서열 자료와 국내산 *G. lucidum*의 염기서열이 *G. tsugae*로 추측된다는 견해가 일치하였다(personal communication). 일반적으로 *G. lucidum*은 열대 및 아열대 지역에 야자수 등에 병원균으로 널리 알려져 있고 국내에서는 일본에서 발행된 도감에 준하여 기주의 특이성에 따라 이들 두 종을 구분해왔다(今關六也 등, 1989).

적 요

불로초의 계통 분류학적 조사를 위해 불로초속 중 8종 (*Ganoderma lucidum*, *G. tsugae*, *G. pfeifferi*, *G. resinaceum*, *G. australe-applanatum*, *G. oregonense*, *G. neo-japonicum*, *G. applanatum*) 12군주와 out-group 군주로는 *Inonotus xeranticus*의 rDNA ITS II를 PCR로 증폭하여 염기서열을 비교 조사하였다.

불로초 속 중 ITS II 영역의 길이는 247~257 bp로 분포하였고 중간 상동성은 70~100%로 조사되었다. 계통도를 분석한 결과는 5개의 군(cluster)을 형성하였고 *G. tsugae*는 각각의 *G. lucidum*과 하나의 clade를 이루어 두 종은 서로 매우 밀접하게 진화된 것으로 사료되었다. 본 조사에서는 국내에서 재배되고 있는 불로초(*G. lucidum*)는 그 발생지 및 국외 ITS 염기서열 자료와 비교 및 분석할 때 *G. tsugae*로 하는 것이 타당할 것으로 사료되었다.

참고문헌

- 박동석, 류영진, 석순자, 김양섭, 유영복, 차동렬, 성재모. 1996. RAPD 및 PCR-RFLP를 이용한 불로초속균들의 유연관계 분석. 농업과학논문집 38(2): 251-260.
- 배신철, 이신우, 김현정, 박동석, 이인구. 1995. 영지버섯속 계통간 분류를 위한 ITS II 부위의 PCR 분석. 농업과학논문집 37(1): 182-188.
- 今關六也, 本郷次雄. 1989. 原色日本新菌類圖鑑(II). 保育社.
- Anderson, J. B., Bailey, S. S. and Pukkila, P. J. 1989. Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution* 43(8): 1652-1662.
- Anderson, J. B. and Stasovski, E. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84(4): 505-516.
- Cantrell, S. A. and Hallin, R. T. 1997. Phylogenetic relationships in the family Hyaloscyphaceae inferred from sequences of ITS regions, 5.8S ribosomal DNA and morphological characters. *Mycologia* 89(5): 745-755.
- Corner, E. J. H. 1983. ad Polyporaceas I(*Amauroderma* and *Ganoderma*). *Beihefte zur Nova Hedwigia*.
- 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.
- Hseu, R. S. and Wang, H. H. 1991. A new system for identifying cultures of *Ganoderma* species. In *Mushroom Science XIII*. Vol 1. Michael J. Maher. A. A. Balkema, Netherland. 442pp.
- Jacobs, K. A. and Rehner, S. A. 1998. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of *Botryosphaeria* and related taxa. *Mycologia* 90(4): 601-610.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press. New York, N. Y.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.
- Lief, R. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma*? Proceeding of Contributed Symposium 59A,B 5th International Mycological Congress P.19-24.
- 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.
- Moncalvo, J. M., H. H. Wang, and R. S. Hseu, 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Park, D. S., Sung, J. M., Kim, Y. S., Yoo, Y. B., Ryu, Y. J. and Cha, D. Y. 1994. Analysis of interspecific allozyme variation within the genus *Ganoderma* by polyacrylamide gel isoelectric focusing. *RDA. J. Agri. Sci.* 36(1): 212-221.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger, F. S., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12): 5463-5467.
- 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. Academic Press, San Diego, California. 482 pp.
- Zhao, J. D. 1989. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica Band.*, 132. J. Cramer. Stuttgart.