

Nuclear Ribosomal DNA Intergenic Spacer(IGS) I 영역의 분석에 의한 목질진흙버섯의 계통분류학적 위치

류영현* · 이진형¹ · 김종국¹

경상북도농업기술원 농업환경연구과, ¹경북대학교 미생물학과

Phylogenetic Analysis of Nuclear Ribosomal DNA Intergenic Spacer (IGS) I Region of *Phellinus linteus*

Young-Hyun Rew*, Jin-Hyung Lee¹ and Jong-Guk Kim¹

Dept. of Agricultural Environment, Kyungbuk Agricultural Technology Administration, DaeGu 702-708, Korea

¹Dept. of microbiology, KyungPook National University, DaeGu, 702-701, Korea

(Received October 1, 2004)

ABSTRACT: This study was carried out to elucidate phylogenetic relationship of a yellow lump, *Phellinus linteus* by comparing the nuclear ribosomal intergenic spacer (IGS) I region with that of other genera of basidiomycetes retrieved from Genbank. IGS I region of *Phellinus linteus* was 730 bp long and sequence homology was conserved in the 5' region, in particular 1~280 bp, and decreased in the direction toward the 3' end. ITS region was widely studied in phylogenies related to basidiomycetes, but IGS region was not well understood yet. Our study indicated that IGS region can be a good tool in phylogenetic study of basidiomycetes.

KEYWORDS: IGS I, *Phellinus linteus*

Phellinus linteus(Berk. et Curt) Aoshima(목질진흙버섯)는 민주름버섯목(Aphyllphorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 주로 참나무와 뽕나무같은 활엽수에서 발생, 생육하며 자실체는 코르크질로 다년생으로 알려져 있으며 나무에 부착된 말굽종형으로 너비 10~15 cm, 두께 5~8 cm 정도로 자라는 것으로 알려져 있다. *Phellinus linteus*는 송 등(1994), 정 등(1997), 이 등(1999), 손 등(1999), 이 등(2000), 그리고 Cho 등(2002)에 의해서 자실체 및 균사체로부터 추출된 여러 종류의 다당류의 화학적 특성 및 항종양 활성에 관한 연구가 많이 진행되어 진흙버섯에 대한 관심도가 증가하였고 송 등(1997)과 홍 등(2002)에 의하여 진흙버섯의 인공재배에 대한 체계적인 연구가 발표된 바 있다.

목질진흙버섯균에 대한 경제적 관심도가 증가하면서 전통적인 형태적 분류와 함께 분자생물학적인 분류동정이 많이 시도되었는데 정 등(1999), 김 등(1999) 그리고 Shin (2001)에 의해서 ribosomal DNA의 ITS 영역의 분석을 통해서 그리고 박 등(2002)에 의해서는 25S rDNA 영역의 분석에 의해서 진흙버섯의 분류와 동정에 대해서 연구가 이루어진 바 있다. 특히 Lim *et al.*(2003)에 의해

서는 세계각지에서 수집된 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 균주에 대한 ITS 영역의 PCR 증폭 및 제한효소 처리에 의한 RFLP 방법을 실시한 결과 ITS 영역의 제한효소 RFLP 방법이 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*에 대한 효과적인 typing method가 될 수 있음을 제시하였다.

Swann and Taylor(1993)과 Wilmotte *et al.*(1993)에 의해서는 nuclear 18S rRNA 영역의 경우 그 보존성이 높기 때문에 목간의 분류에 이용될 수 있음을 제시하였고 Moncalvo *et al.*(1995) 등에 의해서는 ITS 영역은 변이가 크기 때문에 genus 내의 species간의 분류에 이용될 수 있음을 제시하였다.

Wagner and Fischer(2002)는 100여 균주의 *Phellinus* 및 *Inonotus*속 균들의 25S rDNA의 5'부분의 영역을 분석하여 *Phellinus*속의 몇몇 종들을 *Inonotus*속으로 새로이 명명할 것을 주장한 바 있는데 25S rDNA이외에 nuclear small subunit, intergenic spacer 및 mitochondrial ribosomal DNA에 대한 분석이 총체적으로 진행된다면 *Inonotus*속과 *Phellinus*속에 대한 정확한 정리가 가능할 것이다. Ganley *et al.*(1998)은 ribosomal spacer 길이의 변이는 IGS 영역내의 반복배열의 복제숫자의 차이에 의한 것을 밝혀내어 기능적인 역할을 수행하는 ribosomal DNA에 비해서 구조적인 역할을 담당하는 ribosomal intergenic

*Corresponding author <E-mail: molgene@gba.go.kr>

spacer 영역에 대한 연구가능성이 많음을 시사해 준다.

본 연구에서는 비교적 보존성이 높다고 알려진 ITS 영역 이외에 아직까지 연구가 비교적 적게 이루어진 ribosomal DNA intergenic spacer(IGS) I 영역의 염기배열에 대해 다른 담자균류와 비교함으로써 IGS I 영역 수준에서의 *Phellinus linteus*의 계통분류적 위치를 밝히고자 하였다.

본 실험에 사용한 *Phellinus linteus*는 1997년도에 저자에 의해서 경북 문경지역 뽕나무에 발생된 자실체로부터, *Phellinus baumii*는 경북 안동지역에서 재배중인 자실체로부터 분리한 균주이다. 비섯균주보관용 배지는 Potato Dextrose Agar(PDA Difco사, USA)를 사용하였으며 균사체를 PD broth(Difco사) 배지에 접종하여 25°C에서 30일간 정치배양한 후 그로부터 DNA 추출은 Kim *et al.*(1990)의 방법으로 수행하였다. PCR 증폭을 위한 primer는 <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>을 참조하여 forward primer로는 IGS I F(5'-GAACGCC-TCTAAGTCAGAATCC), reverse primer로는 IGS I R(5'-ACCGCATCCCCTGTGAT)를 사용하였다. 추출된 게놈 DNA를 주형으로 아래의 조건으로 IGS I 영역을 증폭하였다. 초기 denaturation: 94°C에서 4분, 29 cycle의 증폭(94°C 2분, 56°C 1분, 72°C 2분), extension으로 72°C에서 5분간 반응. 증폭된 PCR 산물을 Gel Purification Kit(Bioneer, DaeJeon, Korea)로 순화한 후 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, USA)에 삽입하여 클로닝하였다. 벡터 삽입 DNA의 염기서열을 결정한 후 NCBI blastn을 이용하여 ribosomal DNA IGS I 영역과의 상동

성을 확인하였다. Clustal X 프로그램(ver 1.8, Thompson *et al.*, 1997)에 의한 염기서열정렬 결과 *P. linteus*의 IGS I 영역은 730 bp로 나타났다. 같은 속의 *P. baumii*는 640 bp로 확인되었으며 NCBI에서 확인된 *P. nigrolimitatus*의 IGS I 영역은 480 bp로 나타나 큰 크기변이를 보였는데 이에 대한 보다 정확한 확인이 필요한 것으로 보인다. 주름버섯류에 속하는 *Tricholoma*속의 균주들은 287~456 bp 정도로 작은 편에 속하였고 *Lepiota*속의 균주들은 약 900 bp 정도의 비교적 비슷한 크기를 보였으며 민주름 버섯류에 속하는 *Ganoderma*속의 균주들은 평균적으로 1,100 bp 정도의 비교적 길고 균일한 크기를 보였다.

NCBI Genbank에 등록된 13종의 다른 담자균류 유래의 IGS I 영역의 염기배열을 비교한 결과 5' 말단부위의 1~280 base까지는 각 균주들간의 보존성이 높게 나타났고, 특히 *P. linteus*의 158 bp에서 278 bp까지의 120 bp 정도는 비교된 모든 종에서 거의 일치하는 것으로 나타났다. 하지만 3' 말단부위로 갈수록 보존성은 감소하다 다시 증가하는 경향을 보였다. Ribosomal ITS 영역의 경우 균주간에 보존성이 높은 편에 속하고 비교영역의 크기가 작기 때문에 신속하고 용이하게 분석할 수 있어서 현재까지 분자생물학적인 유연관계의 연구에 널리 이용되어 왔는데 IGS 영역의 경우 크기변이가 다양하고 종간의 차이가 뚜렷하기 때문에 IGS영역에 대한 분석결과가 축적되면 유연관계 분석의 지표로 이용될 가능성이 높을 것으로 기대된다. *Phellinus*속의 균주들은 다른 속의 담자균류와 비교 시 IGS I 영역의 크기변이가 다양한 것으로 나타났는데 이것은 다른 *Phellinus*속 균주의 IGS I 영역의 염기배열을 결정할 경우 정확하게 그 유연관계를 비교분석할 수 있기 때문에 앞으로 이 부분에 대한 많은 연구가 필요할 것이다.

Neighbor joining method(Saitou and Nei, 1987)를 이용한 Phylogenetic tree 분석 결과(Fig. 1) *Phellinus*속은 *Trichaptum abietinum*과 같은 그룹을 형성하였는데 실험에 사용된 *P. baumii*의 경우 *P. nigrolimitatus*보다 먼 관계에 위치하고 있어 국내산 *P. baumii*에 대해서는 *P. linteus*와의 ribosomal DNA 비교 분석이 필요한 것으로 여겨진다. *Fomitopsis*의 경우 같은 *Aphyllorphorales*에 속하는 *Ganoderma*속과 같은 그룹을 형성하였다. *P. linteus*가 같은 속에 속하는 *P. baumii*, *P. nigrolimitatus*보다 *T. abietinum*과 더 가까운 유연관계를 보였는데 Ko and Jung(2002)에 의해서 *Trichaptum*속에 대한 ITS 영역의 분석이 이루어진 바 있으나 *Phellinus*속과 *Trichaptum*속 균주간의 유연관계에 대해서는 심층있는 비교분석이 필요한 것으로 여겨진다. Phylogenetic tree의 결과에서 나타나듯이 비교 가능한 *Phellinus*속들의 IGS I 염기배열이 충분치 않아 정확한 비교가 어려우나 다른 rDNA 영역에서처럼 자료가 축적된다면 관련 종 및 속간의 정밀한 phylogenetic tree의 작성이 가능할 것이다.

Table 1. List of the rDNA IGS I sequences used in this study

Species	NCBI Genbank access No.
<i>Chlorophyllum brunneum</i>	AY081250
<i>Chlorophyllum rachodes</i>	AY081249
<i>Fomitopsis rosea</i>	AJ415564
<i>Ganoderma applanatum</i>	AY332529
<i>Ganoderma cupreum</i>	AY332532
<i>Ganoderma incrassatum</i>	AY332533
<i>Ganoderma pfeifferi</i>	AY332534
<i>Ganoderma</i> sp.	AY332535
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	AF174459
<i>Hebeloma helodes</i>	AF174458
<i>Lepiota castaneidisca</i>	AF391078
<i>Lepiota cristata</i>	AF391069
<i>Lepiota hymenoderma</i>	AF391083
<i>Phellinus baumii</i> (collected)	this work
<i>Phellinus linteus</i> (collected)	this work
<i>Phellinus nigrolimitatus</i>	AJ289614
<i>Pleurotus eryngii</i> var <i>ferulae</i>	AY463033
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	AY463034
<i>Schizophyllum commune</i>	AF249532
<i>Trichaptum abietinum</i>	AJ309811
<i>Tricholoma magnivelare</i>	AF309551
<i>Tricholoma matsutake</i>	AF280462

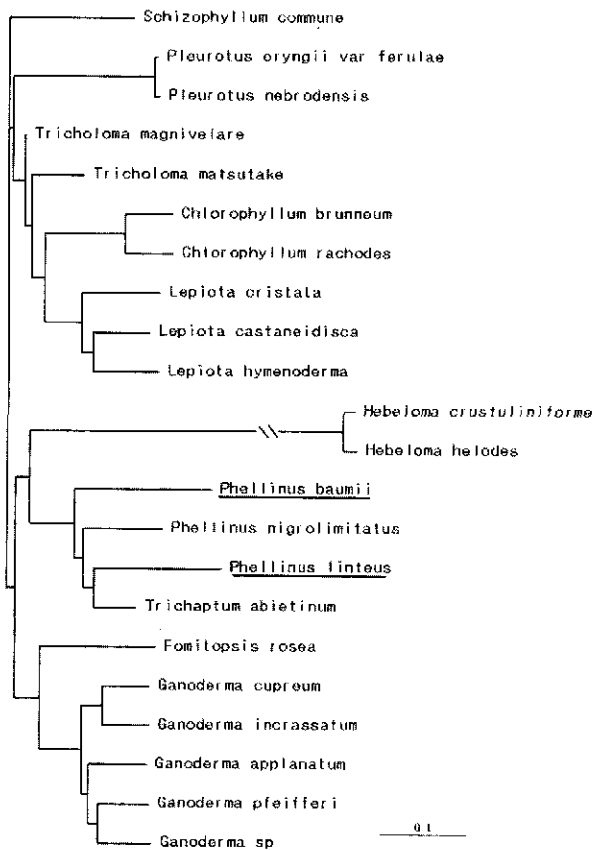


Fig. 1. The phylogenetic tree based on nuclear ribosomal DNA intergenic spacer region of *Phellinus linteus* and other basidiomycetes by Neighbor-Joining method.

적 요

본 연구는 *Phellinus linteus*와 관련 담자균류 속간의 IGS I 영역의 분석에 기초한 분류체계를 정립하기 위해서 실시하였다. 실험에 사용된 *Phellinus linteus* 균주의 IGS I 영역은 730 bp였고 다른 담자균류의 IGS I 영역과 비교시 5' 말단부위의 1~280 base까지는 각 균주들간의 보존성이 높게 나타났으며 3' 말단부위로 갈수록 보존성이 감소하다가 다시 증가하는 경향을 보였다. 담자균류의 IGS 영역에 대한 연구가 앞으로 진행된다면 ITS 영역의 비교와 더불어 새로운 계통분류지표로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

김상희, 김수호, 성재모, Thomas C. Harrington. 1999. 형태적, 분자생물학적 방법에 의한 *Phellinus linteus*의 동정에 관한 연구. *Kor. J. Mycol.* 27(5): 337-340.
 송경석, 조수목, 고경수, 한만우, 유익동. 1994. 상황(*Phellinus linteus*) 배양 균사체의 2차 대사산물에 대한 화학적 연구. *한국농화학회지* 37(2): 100-014.
 송치현, 문혜연, 류충현. 1997. *Phellinus linteus*의 인공재배. *Kor.*

J. Mycol. 25(2): 130-132.
 이영경, 한명주, 박순영, 김동현. 2000. 상황버섯 자실체의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성. *Kor. Food Sci. Technol.* 32(2): 477-480.
 이준우, 백성진, 방광웅, 강신욱, 강상모, 김병용, 하익수. 2000. 목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체 유래 β -glucan성 다당류의 생리활성. *Kor. Food Sci. Technol.* 32(3): 726-735.
 이준우, 백성진, 방광웅, 김용석, 한만덕, 하익수. 1999. *Phellinus linteus* IY011의 자실체와 균사체 배양물로부터 분리한 다당류의 물리화학적 특성 비교. *Kor. J. Mycol.* 27(6): 424-429.
 정인창, 김신희, 권용일, 김소연, 이종숙, 박신, 박경숙, 이재성. 1997. 화학합성배지 및 곡물을 이용한 *Phellinus igniarius*의 균사체 배양조건. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 133-142.
 정지원, 김기영, 하명규, 이태호, 이재동. 1999. Ribosomal DNA의 Internal Transcribed Spacer(ITS)부위의 염기서열 분석에 의한 *Phellinus*속의 계통분석에 관한 연구. *Kor. J. Mycol.* 27(2): 124-131.
 Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
 Ganley, A. R. D. and Scott, B. 1998. Extraordinary ribosomal spacer length heterogeneity in a neotyphodium endophyte hybrid: implication for concerted evolution. *Genetics.* 150: 1625-1637.
 Park, H. S., Kim, G. Y., Nam, B. H., Lee, S. J. and Lee, J. D. 2002. The Determination of the partial 28S ribosomal DNA sequence and rapid detection of *Phellinus linteus* and related species. *Mycobiology* 30(2): 82-87.
 Hong, I. P., Sung, G. B., Chung, I. M. and Lee, W. C. 2002. Artificial cultivation of Mushroom, *Phellinus linteus* using Mulberry logs. *Kor. J. Seric. Sci.* 44(2): 74-81.
 Cho, J. H., Cho, S. D., Hu, H. B., Kim, S. H., Lee, S. K., Lee, Y. S. and Kang, K. S. 2002. The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanism of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis.* 23(7): 1163-1169.
 Kim, W. K., Mauthe, W., Hausner, G. and Klassen G. R. 1990. Isolation of high molecular weight DNA and double stranded RNAs from fungi. *Can. J. Bot.* 68: 1898-1902.
 Shin, K. S. 2001. Identification of Some *Phellinus* spp., *Mycobiology* 29(4): 190-193.
 Lim, Y. W., Lee, J. S. and Jung, H. S. 2003. Type studies of *Phellinus baumii* and *Phellinus linteus*. *Mycotaxon.* 85: 201-210.
 Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method : A new method for reconstructing phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.
 Shon, Y. H., Lee, J. S., Lee, H. W. and Nam, K. S. 1999. Antimutagenic potential of *Phellinus igniarius*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9(4): 525-528.
 Wagner, T. and Fischer, M. 2002. Proceedings toward a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia* 94(6): 998-1016.
 Ko, K. S. and Jung, H. S. 2002. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23(2): 112-22.
 Swann, E. C. and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of basidiomycetes : an 18S rRNA gene perspective. *Mycologia.* 85: 923-936.

- Wilmotte, A., van de Peer Y., Goris, A., Chapelle S., de Baere, R., Nelissen, B., Neefs, J. M., Hennebert, G. L. and de Wachter, R. 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *System. Appl. Microbiol.* **16**: 436-444.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. F. and Hsueh, R. S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. **87**: 223-238.