

# Ribosomal RNA 유전자를 이용한 한국산 세포성 점균의 분자생물학적 분류(I)

장 남 기·홍 영 빈  
(서울대학교 생물교육과)

## I. 緒 論

세포성 점균(Cellular Slime Molds: Acrasiales)은 유기적으로 씹어가는 낙엽과 같은 식물 유기물에 주로 서식하며 토양 박테리아를 섭식하는 매우 작은 생물이다(Cavender 1980). 이 생물은 단세포 아메바형의 동물 단계로부터 포자를 형성하는 식물단계로의 변화 과정을 갖는 특이한 생활사적 특징 때문에 세계적으로 세포의 분화, 발생, 유전, 분류 및 생태 연구에 많이 이용되어 왔으며, 비교적 쉽게 실험적으로 조작할 수 있는 다세포생물로의 진화에 대한 모델을 제시하고 있어 관련 생물학자들에게 많은 흥미와 관심의 대상이 되어 왔다. Raper, Cavender, Hagiwara 등에 의한 약 40여년에 걸친 세포성 점균에 관한 연구는 이 생물에 대한 이해를 상당히 넓혀 주었으며, 다양한 분야의 연구를 증가시키는 데 공헌하였다. 최근에는 이 생물에 관한 생태적 연구와 분자 발생학적 연구가 주를 이루고 있다.

1869년 Brefeld가 *Dictyostelium mucoroides*를 처음 발견하여 기록한 이래 최근까지 약 70여 종의 세포성 점균이 세계적으로 분포하고 있다고 밝혀졌다. 세포성 점균의 분류는 Bonner (1967), Olive (1967,1975), Raper (1984), Hagiwara (1989) 등에 의해 주로 수행되어 왔다. 특히 1984년 Raper는 세포성 점균에 관한 연구의 역사적 배경과 발표한 종을 상세하게 기록하고 있고, 1989년 Hagiwara는 일본의 세포성 점균을 분류학적으로 정리 기록하여 이 생물의 계통과 분포양상 및 종 다양성을 이해하는데 기여하였다. 국내에서의 세포성 점균에 대한 출현과 분포에 대한 연구는 최와 김(1981)의 보고 이래로 홍과 장(1990, 1992, 1993), 권과 장(1996), 강 등(1998)에 의해 한국산 미기록종에 대한 보고가 있었으며, Hong과 Chang(1992a, 1992b), Shim과 Chang(1996)에 의한 한국 특유의 신종에 대한 보고가 있었으며, 현재 전국적으로 총 33종의 세포성 점균이 분포하는 것으로 밝혀졌다.

세포성 점균의 포자는 종종 포자과립을 갖고 있다. 그들은 대부분 포자의 양극에 위치해 있으나, 어떤 종에서는 중앙이나 아극에 분포하는 것도 있다. 이러한 양극의 과립을

“polar granules”라 하며, 보통 “PG”라 부른다(Traub and Hohl, 1976). 대부분의 세포성 점균에서 포자의 PG 유무는 광학현미경하에서 쉽게 관찰된다. 세포성 점균에 관한 최근의 분류학적 연구들은 우선적으로 포자의 PG 유무를 강조하고 있다(Traub and Hohl, 1976; Raper, 1984; Hagiwara, 1989). PG 유무 이외에도 발생과정, 자실체 형성 후의 포자 생성, 정단과 기부 모양, 포자와 자실체의 색깔, 가지의 모양과 규칙성 등과 같은 형태적인 특징들이 지금까지의 분류학적 연구의 주 관심대상이 되어왔고 지금까지 발표된 모든 종들은 이러한 형태적인 특징을 기반으로 발표되었다.

그러나 최근의 국내의 연구사례들을 보면 뚜렷한 특징을 지닌 종들을 제외하고는 형태적인 특징만으로 분류하기에는 어려운 종들도 많이 있다. 따라서 이전까지의 연구와는 다른 방법으로 종을 명확히 구별할 필요가 있었다.

일반적으로 세포성 점균류의 경우 액체배지에서 배양이 잘 안되기 때문에 몇몇 종을 제외하고는 분자적 수준의 연구를 수행하고 있지 못하고 있다. 본 실험실에서도 액체배지에서 키운 세포성 점균류의 amoeba에서 DNA를 추출하려 하였으나, 배양자체가 되지 않기 때문에 많은 어려움을 겪었다. 그러나 최근에 고체 배지에서 amoeba를 얻을 수 있는 방법을 자체 개발함에 따라 DNA 추출을 성공하였다. 따라서 본 실험은 이 방법에 의해 지금까지의 연구를 다시 확인함과 동시에 명확한 종 분류를 위해 세포성 점균류의 분자적 분류 방법을 수행하였다. 현재 대부분의 분류학 연구가 이미 rRNA 등을 이용한 종(species)간의 유전적 차이를 규명하고 있기에 본 연구에서도 세포성 점균류의 DNA를 직접 추출하고, rRNA를 이용한 세포성 점균류 간의 계통학적 분류 혹은, 분류의 기준을 다시 제시하려 하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 조사지

기존 연구에서는 강화, 남산, 수락산, 관악산, 안양천, 곡릉천, 팔당호 연안, 용문산, 태백산, 진부령, 거진, 간성, 속초, 설악산, 울릉도 등 중부 지역과 지리산, 한라산, 속리산, 여수, 남해, 남부도서 지역, 계룡산, 덕유산, 소백산을 중심으로 한 남부지역을 조사하여 세포성 점균류를 분리해내 동정하였다. 그러나, 세포성 점균류의 보존 방법 미숙으로 인해 기준에 동정한 세포성 점균류가 보전되어 있지 않으므로 다시 전국의 세포성 점균류를 채집하여 한국형 세포성 점균류를 동정하였다. 본 연구에서는 북쪽의 백두산과 남양주의 주금산, 안산의 제부도, 서울의 남산, 남쪽의 월출산에서 세포성 점균류를 채집해 동정하였다.

## 2. 세포성 점균류의 채집과 동정

토양 시료의 채집은 Cavender (1969), 홍과 장 (1992, 1993)의 방법을 이용하여 유기물이 풍부하고 세포성 점균류의 먹이인 bacteria가 풍부한 Humus 층과 Fermentation 층에서 이루어졌다.

토양에서 세포성 점균류를 분리할 때에는 건초배지 (Hay Infusion Agar Media)를 사용했다(홍과 장 1992, 장 등 1996a, Shim 1996). 토양을 50:1로 희석하여 *Esherichia coli*  $10^7$ - $10^8$  cell/ml을 세포성 점균류의 먹이로 제공하고 20-22°C의 항온기에서 배양한 후 7일 후에 분리하였다. 분리된 종은 0.1% LP 배지(Lactose-Peptose Agar Media)를 20-22°C의 항온기에 *E. coli*를 제공하여 배양하여 세포성 점균류의 발생과정과 자실체 형성 후의 포자, 정단, 기부, 색깔, 가지의 모양 등을 중점적으로 관찰하였다.

위 관찰 사항을 토대로 Raper(1984), Hagiwara(1989), 홍(1992), 심(1998)의 분류체계를 기초 자료로 동정하였으며, 항온기에서 20-25°C 범위에서 배양하면서 계대 배양을 통해 그 특징이 명확히 드러날 때까지 동정하였다.

## 3. genome 추출과 rDNA의 분리

세포성 점균류의 genome의 추출은 세포성 점균류의 life cycle 중 myxamoeba 시기에 서 수행했다. 우선 amoeba를 harvest하고, 0.2ml Solution A(10mM Tris, 10mM EDTA, pH 7.5)를 넣고 resuspend하였다. 다시 0.2ml Solution B(10mM Tris, 0.7% SDS, 100 $\mu$ g/ml proteinase K)를 넣고 흔들어 준 뒤 65°C에서 30분간 방치한 뒤, 0.02ml의 1M Tris(pH 8.4)와 8M LiCl을 넣고 흔들어 주었다. 10분 후 같은 양의 phenol(pH 7.4)를 넣고 흔들어 준고, 원심분리후 상층액을 새 tube에 옮겼다. ethanol 1ml을 넣어주고 다시 원심분리하여 상층액을 버리고 pellet을 TE buffer에 녹였다. 추출된 genome은 agarose gel electrophoresis로 확인했다.

PCR로 ribosomal RNA 분리하기 위해 18S RNA와 28S RNA의 염기 서열을 이용하여 primer를 합성했다(Fig. 1).

primer 1 5' - CAC ACC gCC CgT CgC TCC TAC CgA TCg - 3'

primer 2 5' - ggA CCg ATg TCA TCA TgT gCg TTC AAC - 3'

primer 1→

5'-	NTS	ETS	17S	ITS-1	5.8S	ITS-2	26S	-3'
-----	-----	-----	-----	-------	------	-------	-----	-----

← primer2

<Fig. 1> Ribosomal DNA structure of *Dictyostelium discoidium*

taq polymerase  $0.5\mu\text{l}$ (10 unit), primer 각  $1\mu\text{l}$ (100pmol), buffer  $10\mu\text{l}$ , template DNA  $1\mu\text{l}$ (100ng), dNTP  $8\mu\text{l}$ , DW to  $100\mu\text{l}$  의 조건으로 각 단계별로 denaturing temperature는  $94^{\circ}\text{C}$  1분, annealing temperature는  $56^{\circ}\text{C}$  1분, extension temperature는  $72^{\circ}\text{C}$  1분으로 PCR 을 수행했다.

PCR이 끝난 후 이것을 agarose gel상에서 확인하고, product를 정제하여 *E. coli* plasmid vector(pT7BlueR, Novagen)로 cloning했다.

#### 4. 염기서열 분석과 계통도 조사

cloning된 plasmid를 *E. coli*에서 추출하여 DNA sequencing을 수행했다. sequencing data는 Clustal X 라는 computer software를 이용하여 분석하고 계통도도 조사했다.

### III. 結果 및 論議

본 연구에서는 각 조사지에서 3-10종의 세포성 점균류를 동정할 수 있었다. 분류된 세포성 점균류는 모두 10종이었으며, 세계적으로 가장 잘 알려져 있으나 아직 한국에서는 발견된 적이 없는 *Dictyostelium discoideum*은 생명공학원에서 구입하였다. 동정된 11개

<Table 1> GC ratios and the lengths of ITS I, 5.8S rDNA and ITS II region of the cellular slime molds

species	ITS1			5.8S RNA			ITS2			Total		
	length	G+C	GC %	length	G+C	GC %	length	G+C	GC %	length	G+C	GC %
<i>D. dimigraformum</i>	315	83	0.263	160	70	0.438	457	132	0.289	932	285	0.306
<i>D. gigatum</i>	298	115	0.386	160	71	0.444	451	170	0.377	909	356	0.392
<i>D. aureosipes</i>	320	104	0.325	170	86	0.506	604	185	0.306	1094	375	0.343
<i>D. purpureum</i>	310	70	0.226	160	69	0.431	400	109	0.273	870	248	0.285
<i>D. minutum</i>	312	89	0.285	161	68	0.422	485	125	0.258	958	282	0.294
<i>D. discoidum</i>	331	91	0.275	160	68	0.425	575	248	0.431	1066	407	0.382
<i>D. polycephalum</i>	327	131	0.401	160	72	0.450	548	238	0.434	1035	441	0.426
<i>P. violaceum</i>	206	49	0.238	160	69	0.431	384	67	0.174	750	185	0.247
<i>P. candidum</i>	189	51	0.270	161	63	0.391	626	195	0.312	976	309	0.317
<i>P. pallidum</i>	179	37	0.207	160	72	0.450	635	160	0.252	974	269	0.276
<i>P. tenuisimum</i>	182	39	0.214	160	72	0.450	639	157	0.246	981	268	0.273

의 종과 구입한 1종은 모두 액체 배지에서 배양되어 genome을 추출하였고, 이것을 이용하여 PCR 및 cloning에 성공하였다. cloning된 DNA는 DNA 염기서열법에 의해 분석되었고, 이것을 토대로 계통도를 조사하였다.

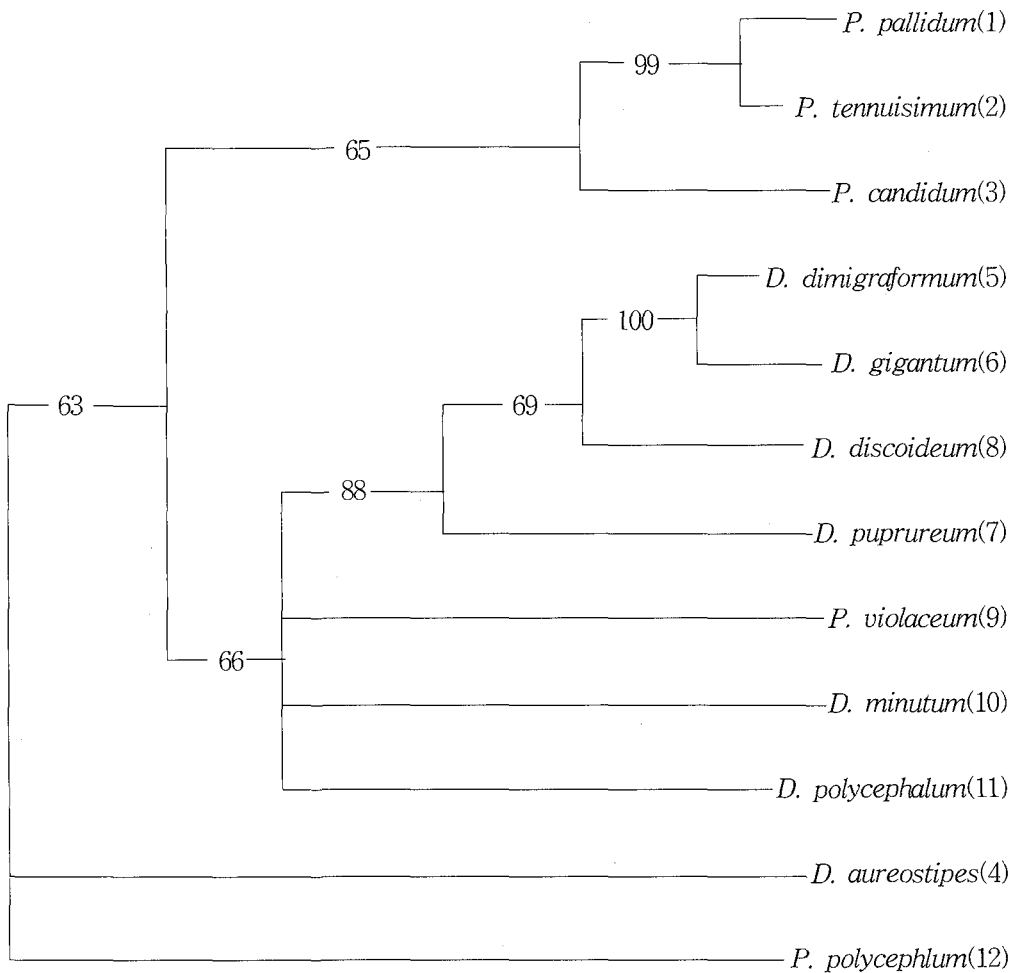
대개의 taxonomy 연구의 경우 18S RNA, 5.8S RNA, 28S RNA, 5S RNA와 cytochrome oxidase, cytochrome b 등과 같은 structural gene을 sequencing 하여 종 간의 차이점을 밝혀냈지만, 세포성 점균류의 경우 structural gene의 경우 genome 내의 copy 수가 적고 중간 차이가 심해 primer의 설계가 어려울 수도 있고, ribosomal RNA의 경우도 다른 eucaryotic cell과는 달리 18S 대신 17S, 28S 대신 26S RNA를 갖는 등 genome 상의 차이가 있기 때문에 (Ozaki *et al.* 1984, Hoshikawa *et al.* 1983) primer 위치로서는 좋지 않을 뿐만 아니라, 같은 속(Genus)내의 종의 경우 18S RNA나 28S RNA는 homology가 거의 같기 때문에 분류하기 어렵다. 따라서 이 실험에서는 18S RNA와 5.8S RNA 사이의 ITS-1, 혹은 5.8S RNA와 28S RNA 사이의 ITS-2를 사용하였다.

본 연구 이전의 실험에서 ITS1만을 PCR을 수행하였을 때 slime의 두 속(genus)에서 그 길이의 차이가 있음을 발견했었다. 본 연구에서 ITS1, 5.8S RNA, ITS2를 모두 염기서열을 분석한 결과 genus별로 특이점이 있음을 알 수 있었다(Table 1). ITS 1의 경우

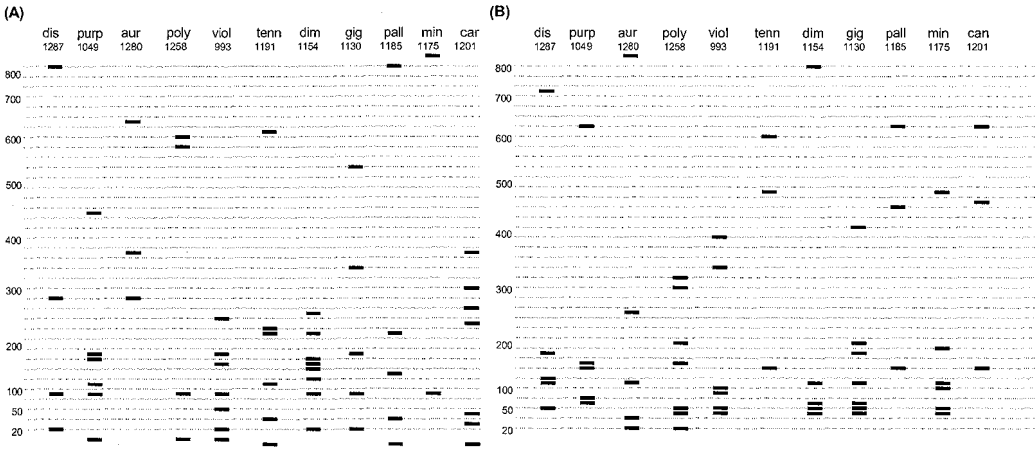
<Table 2> Sequence divergences of 5.8S rDNA of the cellular slime molds. Observed numbers of nucleotide differences(pairwise comparison) are shown below the diagonal, and Mean distances(adjusted for missing data)are shown above diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>D. dimigraformum</i>		0.011	0.178	0.451	0.689	0.678	0.685	0.722	0.633	0.652	0.678	0.585
2. <i>D. gignatum</i>	1		0.167	0.439	0.689	0.678	0.685	0.711	0.633	0.652	0.678	0.585
3. <i>D. purpureum</i>	16	15		0.463	0.670	0.659	0.656	0.670	0.604	0.644	0.648	0.595
4. <i>D. discoideum</i>	37	36	38		0.744	0.732	0.765	0.768	0.756	0.728	0.768	0.488
5. <i>P. violaceum</i>	62	62	61	61		0.011	0.156	0.242	0.341	0.600	0.571	0.548
6. <i>D. polycephalum</i>	61	61	60	60	1		0.144	0.231	0.352	0.589	0.582	0.548
7. <i>D. minutum</i>	61	61	59	62	14	13		0.233	0.278	0.522	0.511	0.595
8. <i>P. pallidum</i>	65	64	61	63	22	21	21		0.363	0.522	0.582	0.619
9. <i>P. tenuisimum</i>	57	57	55	62	31	32	25	33		0.444	0.516	0.595
10. <i>P. candidum</i>	58	58	58	59	54	53	47	47	40		0.622	0.643
11. <i>D. aureostipes</i>	61	61	59	63	52	53	46	53	47	56		0.738
12. <i>P. polycephalum</i>	24	24	25	20	23	23	25	26	25	27	31	

Dictyostelium은 길이가 298-331bp인 반면, Polysphondylium은 179-206bp로 Dictyostelium에 비해 약 100bp 정도 짧았다. 5.8S RNA는 두 genus 모두 160-161bp이나, *D. aureostipes*만 170bp로 다른 종들과 차이가 있었다. ITS 2의 경우는 Dictyostelium은 400-548bp이고 Polysphondylium은 *P. violaceum*(384bp)를 제외하고 모두 626-639bp로 Dictyostelium보다 100bp 이상 긴 것으로 밝혀졌다. 따라서 ITS 1, 5.8S RNA, ITS 2 모두의 길이를 합칠 경우 *P. violaceum*을 제외하고 genus에 관계없이 모두 길이가 909-1094bp사이였다.



<Fig. 2> 50% majority-rule consensus tree of the 5.8S rDNA



<Fig. 3> Prediction of RFLPs with Dra I(A) and Dpn I(B) of the ITS 1, 5.8S RNA, and ITS 2 of the slime molds  
 dis: *D. discoideum*, purp: *D. purpureum*, aur: *D. aureostipes*, poly: *D. polycephalum*, viol: *P. violaceum*, tenn: *P. tennisimum*, dim: *D. dimigriformum*, gig: *D. giganteum*, pall: *P. pallidum*, min: *D. minutum*, can: *P. candidum*.

염기서열 분석후 이 염기 서열의 중간 차이를 분석하였으며(Table 2), 이를 토대로 세포성 점균류의 계통도를 작성하였다(Fig. 3).

일반적으로 Dictyostelium 속과 polysphondylium 속의 종들이 서로 다른 그룹으로 묶여져 있으나, *P. violaceum*는 Dictyostelium 속의 종들과 더 유사한 것으로 밝혀졌다. 또한 *D. aureostipes*는 형태상으로도 다른 종들과는 유사성이 떨어지고, 유전자의 염기 서열로도 다른 종들과는 상당한 차이가 있음이 밝혀졌다. *P. pallidum*과 *P. tennisium*이나 *D. dimigriformum*과 *D. giganteum*은 서로 형태적으로 상당히 유사한데, 유전자 분석으로도 매우 가깝다는 것을 알 수 있다. 따라서 계통도 조사 결과와 형태적 분류는 그 결과가 유사하다는 것을 알 수 있었다.

일반적으로 세포성 점균류의 중간 유전자 변이의 차이는 다른 고등식물이나, 고등 동물에 비해 상당히 차이가 크다는 것을 알 수 있었는데, 그 이유는 세포성 점균류가 단세포 생물에서 다세포 생물로 진화하는 과정에서 출현한 생물이라 그 분화 정도가 다른 생물에 비해 훨씬 클 것이기 때문이다.

조사된 DNA 염기서열을 이용하여 제한효소의 인식부위를 찾았으며, 종별로 특이적인 제한효소 인식부위가 있음을 발견하였다. 이를 토대로 PCR product의 제한효소 특이적인 절단 단편(RFLP, restriction fragment length polymorphism)을 조사하였다(Fig. 4). RFLP

를 이용하여 염기서열 조사시간을 단축할 수 있으며, 형태적으로도 유사한 세포성 점균류의 신속한 동정을 할 수 있다.

#### IV. 要 約

지금까지 국내에서 발견된 세포성 점균류는 모두 33종이며, 각각은 발생과정과 자실체 형성 후의 포자, 정단, 기부, 색깔, 가지의 모양, 최적 생장온도, 빛에 대한 반응과 같은 형태적이고 생리적인 특징을 기준으로 동정되었다. 그러나 이러한 방법은 유사한 종을 구별하는 데에 적합하지 않았다. 따라서, 이 연구에서는 유전자의 염기서열 분석을 이용한 새로운 분류기준을 고안하고, 이를 국내에서 발견된 다음의 11종에 적용하였다 : *Diclyostelium dimigraformum*, *D. giganteum*, *D. discoideum*, *D. pupureum*, *D. minutum*, *D. aureostipes*, *D. polycephalum*, *Polysphondylium violaceum*, *P. candidum*, *P. pallidum*, *P. tenuissimum*. ribosomal RNA 유전자의 염기서열 분석결과에 의한 분류는 형태적 분류결과와 거의 일치했으며 RFLP를 이용한 신속한 분류방법도 찾아낼 수 있었다. 특히, 이러한 방법은 형태적인 특징이 유사한 종들을 구별하는 데 있어서 매우 적합한 방법으로 사료된다.

#### 參 考 文 獻

- 강경미, 홍영빈, 이재봉, 장남기, 1998. 남산에서 세포성 점균의 출현과 분포. 한국생태학회지, 21(5-3) : 687~694.
- 심규철, 1998. 한국에 있어 세포성 점균의 출현과 분포. 서울대학교 박사학위논문.
- 장남기, 심규철, 홍정수. 1996a. 우리나라 남부 지역이 주요 삼림에서의 세포성 점균의 출현과 분포. 한국잔디학회지, 10(1) : 89-101.
- 장남기, 홍정수, 심규철. 1996b. 우리나라 남부 지역의 식생에 따른 세포성 점균의 출현과 분포-남해안 및 도서 지역 상록수림에서의 세포성 점균. 한국잔디학회지, 10(1) : 81-88.
- 홍정수, 장남기. 1990. 한국의 주요 낙엽수림에서 세포성 점균의 출현과 분포. 식물학회지 33(3) : 159-168.
- 홍정수, 장남기. 1991. 인천 근해 도서지역의 해안식물 군락에 따른 세포성 점균의 출현과 분포. 한국생태학회지 14(4) : 457~467.
- 홍정수, 장남기. 1992. 한라산의 세포성 점균(III)-극남 양성 종의 기록-. 한국생태학회지,



35(4) : 307~316.

- 홍정수, 장남기. 1993. 한라산의 세포성 접균(IV)-극남 음성 종의 기록-. 한국생태학회지, 36(1) : 9~17.
- 홍정수. 1993. 한국산 세포성 접균의 2신종 꺾 및 집중탐구학습 모형의 개발과 적용. 서울대학교 박사학위 논문.
- Allen S. E., Grimshaw H. M., Parkinson J. A. and Quarmby C., 1974. The chemical analysis of Ecological materials. *Balckwell scientific publications*.
- Bonner J. T. 1967 The cellular slime molds. *Princeton Univ.*, Princeton. 205p.
- Cavender, J. C. 1969 The occurrence and distribution of Acrasieae in forest soil. *Am. J. Bot.* 56 : 989-992.
- Cavender, J. C. 1980. Cellular slime molds of the Southern Appalachians. *Mycologia*, 72 : 55~63.
- Cavender, J. C. and C. Hopka. 1986. Distribution patterns of Lhio soil dictyostelids in relation to physiology. *Mycologia*, 78 : 825-831.
- Cavender, J. C. and K. Kawabe. 1989. Cellular slime molds of Japan. I. Distribution and biogeographical considerations. *Mycologia*, 81(5) : 683-691.
- Hagiwara, H. 1989. The taxonomic study of Japanese dictyostelid cellular slime molds. *National science museum. Tokyo*. 131pp.
- Hong, J. S. and N. K. Chang, 1990. The occurrence and distribution of cellular slime molds in major deciduous forests of South Korea. *Korean Journal of Botany*, 33(3) : 159~168.
- Hoshikawa, Y., Iida Y., and Iwabuchi M. Nucleotide sequences of the transcriptional initiation regions of Dictyostelium discoideum rRNA gene and comparison of the initiation regions of the three lower eucaryotie' genes *NAR* 12 : 1725-1734.
- Landolt, J. C. 1990. Cellular slime molds in forest soils of West Virginia. *Mycologia*, 82 : 114~119.
- Nellen W. 1987 *Methods in cell biology*, Academic press 28 : 68-71.
- Olive, L.S. 1967 The Protostelida- a new order of the mycetozoa. *Mycologia*, 59 : 1-29.
- Olive, L. S. 1975 The mycetozoa: A revised classification. *Bot. Rev.* 59-89.
- Ozaki, T. Hoshikawa, Y. Iida Y. and Masaki I. 1984 sequence analysis of the transcribed and 5' non-transcribed regions of the ribosomal RNA gene in Dictyostelium discoideum *NAR* 12 : 4171-4184.
- Raper, K. B. 1984. The dictyostelids. Princeton Univ., Princeton. 453pr.
- Shim, K. C. and N. K. Chang. 1996. New dictyostelid in Mt. Surak, Korea;

- Dictyostelium valenstemmum* sp. nov. *Korean Turfgrass Sci.*, 10(2) : 117~124.
- Shim, K. C. and N. K. Chang. 1998. Dictyostelid cellular slime molds in Mt. Surak. *Korean Journal of Ecology*, 21(2) : 157~161.
- Shim, K. C. and N. K. Chang. 1998. New species of Dictyostelid in Mt. Seorak, Korea; *Dictyostelium caudabasis*-. *Korean Journal of Ecology*, 21(2) : 163~167.
- Stephenson, S. L. 1988. Distribution and ecology of myxomycetes in temperate forests. I. Patterns of occurrence in the upland forests of southwestern Virginia. *Can. J. Bot.* 66 : 2187-2207.
- Traub, F. and Hohl H. R. 1976 A new concept for the taxonomy of the family Dictyosteliaceae *Am. J. Bot.* 63 : 664-672.

<Abstract>

## Molecular Taxonomy( I ) of the Korean Cellular Slime Molds Using Ribosomal RNA Gene

Chang, Nam-Kee · Hong, Young Bin  
(Department of Biology Education, Seoul National University)

Thirty three species of cellular slime molds have been isolated in South Korea. They have been identified by the stages of the life cycles and morphological characteristics such as color, size, branch, polar granule, *etc.* However, this methods were often insufficient to classify the very similar species. In this context, this study was designed to suggest new criterion and apply it to eleven species : *Dictyostelium dimigraformum*, *D. giganteum*, *D. discoideum*, *D. pupureum*, *D. minutum*, *D. aureostipes*, *D. polycephalum*, *Polysphondylium violaceum*, *P. candidum*, *P. pallidum*, and *P. tenuissimum*. Results showed that classification by rRNA gene sequencing was similar to that by previous methods, and that the classification could be proper method for distinguishing between very closed species.