

국내 수집 차가버섯 균주의 배양특성과 유전적 유연관계 분석

이봉훈^{1*} · 박현² · 박원철¹ · 윤갑희¹ · 장지연¹ · 유성열¹ · 가강현¹

¹국립산림과학원 화학미생물과, ²산림청 산림정책팀

Phylogenetic Relationships and Cultural Characteristics among *Inonotus obliquus* Strains Collected in Korea

Bong-Hun Lee^{1*}, Hyun Park¹, Won-Chull Bak¹, Kab-Hee Yoon¹, Ji-Youn Chang¹,
Sung-Ryul Ryu¹ and Kang-Hyeon Ka¹

¹Division of Wood Chemistry and Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

²Forest Policy Team, Resources Policy Bureau, Korea Forest Service, Daejeon 302-701, Korea

(Received May 29, 2007)

ABSTRACT: Fruiting bodies of *Inonotus obliquus* were collected from the trunk of *Betula ermani* at 1,100 m of Mt. Odae. Diameter range of the trees at breast height (DBH) was 10~50 cm and size range of the sclerotia was 8 × 5 ~ 20 × 16 cm. Relationships between the examined strains and *Inonotus obliquus* strain registered in National Center for Biotechnology Information (NCBI) were very near. And all of 10 strains except strains registered in NCBI showed high homologous characteristics by neighbour joining analysis of ITS sequence. Mycelial growth showed a big difference among strains. Mycelial growth of KFRI 744 was fastest and KFRI 739 was slowest. Difference of mycelial growth between KFRI 735 and 738 was slight, but the difference of mycelial growth between KFRI 744 and 739 was almost twice. Also weight reduction rate among strains showed some difference. KFRI 744 was highest and KFRI 741 was lowest. Vegetative incompatibilities were observed in all mycelial pairings except for KFRI 740-741 and KFRI 742-743 combinations.

KEYWORDS: *Betula ermani*, Incompatibility, *Inonotus obliquus*, Mt. Odae, Relationships

차가버섯을 바라보는 시각에는 크게 두 가지가 있는데, 하나는 유럽지역에 자생하는 *Betula pendula*를 부패시키는 대표적인 균이라는 보고나 자작나무에 canker-rot을 일으킨다는 보고에서와 같이 '병원균'에 초점이 맞추어져 있는 것이고 또 다른 하나는 발효시킨 차가버섯 분말의 간 기능에 대한 효과를 확인하기 위한 연구에서와 같이 뛰어난 '약효'에 주목하는 시각이 그것이다(Blacnchette, 1982; Cha *et al.*, 2006; OECD, 2003). 물론 수목을 보호하고자 하는 측과 약용물질을 탐색하고자 하는 측 간의 시각차이인 하겠지만 어쨌든 우리나라에서는 앞서의 간 기능 효과에 대한 연구 이외에도 차가버섯 추출물을 장기 간 처리했을 때 대장암 및 위암세포에 대한 항암효과가 증가한다거나 여성초와 같은 다른 물질을 첨가했을 때 항암효과가 상승했다는 등 상당수의 연구가 차가버섯의 약용 가능성에 초점이 맞추어져있다(차 등, 2004; 황 등, 2003).

이러한 상황은 비단 우리나라만이 아니며, 러시아는 이미 오랫동안 민간약제로서 차가버섯을 사용하고 있고 차

가버섯의 학명으로서 *Fuscoporia obliqua*를 독자적으로 사용하고 있는 일본에서도 다양한 차가버섯 가공품들이 판매되고 있다(심 등, 2003).

하지만 차가버섯의 약리적 효과 규명 외에도 중요한 부분이 있는데, 바로 유전자원의 확보 부분이다. 2008년이 되면, 표고가 국제식물신종보호동맹(UPOV) 협약에 따라 품종보호제도 체제에 편입된다. 그 이후에는 더 많은 유전자원에 대해서 선진국들의 공세가 가해질 것이다. 그러나 약용버섯으로서 중요한 유전자원이 될 수도 있는 차가버섯이 2005년에 들어서야 국내에서 처음 확인되었다는 것은 그만큼 연구자들의 관심이 적었다는 것을 의미한다(박 등, 2005). 뿐만 아니라 우리나라 삼림에서 채집되는 차가버섯들 간에 또는 다른 나라 균주들과의 유연관계가 확인된 적이 없었다. 다만 김 등(2004)이 ITS 분석을 통해서 수입 차가버섯을 포함한 국내 유통 중인 약용버섯의 분류를 시도했을 뿐이다.

따라서 이렇게 우리나라 고유의 균주에 대한 중요성이 점점 높아지고 있는 시점에 새로운 유전자원 확보를 위해 국내최초 보고지역인 점봉산 이외의 지역에서 새로운 차가버섯 균주를 채집하고자 했으며, 국립산림과학원에서

*Corresponding author <E-mail: bonghun90@naver.com>

보관하고 있는 차가버섯 균주들 간의 유연관계 확인을 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

차가버섯 채집 및 균 분리

강원도 평창에 소재한 오대산 일대에 자생하는 자작나무류로부터 차가버섯 자실체를 확보하기 위해 해발고도 800 m 이상에서 채집했다. 채집은 2006년 12월에 실시되었고 채집된 자실체에서의 균 분리는 박 등(2005)과 같은 방법인 자실체 바로 아래 부분에서 이루어졌다.

유전적 유연관계분석

공시균주: 오대산 일대에서 채집된 균주와 국립산림과학원에서 보관하고 있는 균주 및 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 차가버섯 균주 등 총 12균주를 분석에 사용하였다(Table 1).

DNA 분리: 균주들을 PDB 배지에서 2주일 배양한 후, -70°C 에서 얼렸다. Extraction buffer(200 mM Tris-HCl, pH 8.0: 250 mM NaCl: 25 mM EDTA, pH 8.0: 0.5% SDS) 300 μl 를 넣어 pestle을 이용해 세포를 부수어준 후 원심분리를 통해 상등액을 취했다. 그런 다음 phenol/chloroform(1 : 1)을 넣고 혼합한 뒤 13,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등액은 새로운 튜브에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가한 후 13,000 rpm에서 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을

세척하여 진공 건조한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCL, pH 8.0: 1 mM EDTA, pH8.0) 20 μl 에 용해하였다. 여기에 10 mg/ml RNase 2 μl 를 넣어 37°C 에서 30분 처리하여 RNA를 제거 하였다. DNA 함량은 spectrophotometer의 260 nm의 파장에서 측정하였다.

PCR 증폭 및 Sequence multi-alignment: 각각의 DNA로부터 rDNA의 ITS(Internal Transcribed Spacers) 영역을 증폭하기 위하여 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer를 pair로 사용하였다(White *et al.*, 1990). PCR 반응은 QIAGEN 사의 Kit를 이용하였다. 반응조건은 94°C 에서 2분간 pre-heating시킨 다음, 94°C 에서 1분간 denaturation, 50°C 에서 30초간 annealing, 72°C 에서 2분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 32 cycle을 반응시킨 다음 72°C 에서 10분 동안 post extension하고 4°C 로 유지하였다. 증폭된 DNA는 1.8% agarose gel에서 확인한 후 gel extraction kit(Bioneer)를 이용해 추출하고 sequencing을 수행하였다. 균주간의 염기서열 차이 분석은 ClustalW 분석프로그램(www.ebi.ac.uk/clustalW)을 이용하였다.

균사생장력 조사

수집된 분리균 및 국립산림과학원에서 보관 중인 다른 차가버섯 균주의 균사생장력 비교를 위해 균들을 PDA에 옮겨서 배양한 다음 5 mm cork borer를 이용해서 가장 잘 성장하고 있는 균총의 선단부위를 떼어내어 다시 새로운 PDA에 치상하였다. 그리고 23°C 에서 14일간 배양한

Table 1. List of the strains of *Inonotus obliquus* used in analyses of phylogenetic relationships

No.	KFRI No.	Origins	Plants	Contents	Source	Genebank	Reference
1	735	Mt. Seorak (Korea)	<i>Betula davurica</i>	-	-	-	-
2	736	Mt. Odae (Korea)	<i>B. ermani</i>	-	-	-	-
3	738	Obtain from researcher	-	-	-	-	-
4	739	Russia	-	-	-	-	-
5	740	Mt. Jumbong (Korea)	<i>B. costata</i>	-	-	-	-
6	741	Mt. Jumbong (Korea)	<i>B. costata</i>	isolated from the same fruit body as KFRI 740, but a isolated region differed	-	-	-
7	742	Mt. Odae (Korea)	<i>B. ermani</i>	-	-	-	-
8	743	Mt. Odae (Korea)	<i>B. ermani</i>	isolated from the fruit body occurred on the same branch as KFRI 742	-	-	-
9	744	Mt. Odae (Korea)	<i>B. ermani</i>	-	-	-	-
10	745	Mt. Odae (Korea)	<i>B. ermani</i>	isolated from the fruit body occurred on branch separated from KFRI 736	-	-	-
11	-	-	-	-	MDJCBS88	DQ103883	Unpublished
12	-	-	-	-	IFO 8681	AY558593	J. Clinical Microbiology, Feb. 982-987 (2005)

후 균사생장 정도를 조사했으며, 5반복으로 수행 하였다.

배지의 증량감소를 조사

자작나무톱밥 80%, 미강 19%, 설탕 1% 비율로 섞은 톱밥배지를 함수율 60%로 조정해서 150 mm×22 mm 시험관에 단단하게 넣은 다음 충전된 배지 길이를 100 mm, 배지무게 38 g으로 균일화 시켰다. 그리고 121°C에서 90 분 살균하여 실험에 사용하였다. 살균 후, 무균실에서 균을 5 mm cork borer로 떼어내어 배지의 윗면에 치상한 다음 시험관 입구를 실리콘마개로 막았으며, 균을 접종하지 않은 것을 무처리로 하였다. 23°C에서 50일 배양 후 증량감소율을 조사하였으며, 10반복으로 수행 하였다.

대치배양

보관 중이던 차가버섯 균주들을 새로운 PDA에 옮겨서 배양했다. 적당히 배양된 균주들은 5 mm cork borer로 떼어내어 균주 간에 일정한 거리를 두고 PDA 배지에서 서로 대치 시켰다. 23°C에서 100일 배양 후 대치선 형성 유무를 조사하였으며, 3반복으로 수행 하였다.

결과 및 고찰

새로운 균주 확보

오대산의 해발고도 약 1,110 m 부근의 사스래나무 (*Betula ermani*) 3그루에서 차가버섯 자실체 5개를 채집했다(Table 1). 나무들은 모두 반경 20 m 안에 있었으며, 채집 시기가 겨울이어서 잎이 모두 떨어진 상태였고 차가버섯 자실체 색은 검기 때문에 자실체의 확인이 쉬웠다(Fig. 1). 나무의 흉고직경은 10~50 cm이었으며, 차가버섯 균핵의 크기는 8×5~20×16 cm이었다. 그리고 Table 1에서 보는 바와 같이 거제수나무(*Betula costata*), 물박달나무(*Betula davurica*), 사스래나무 등과 같은 *Betula*속 식

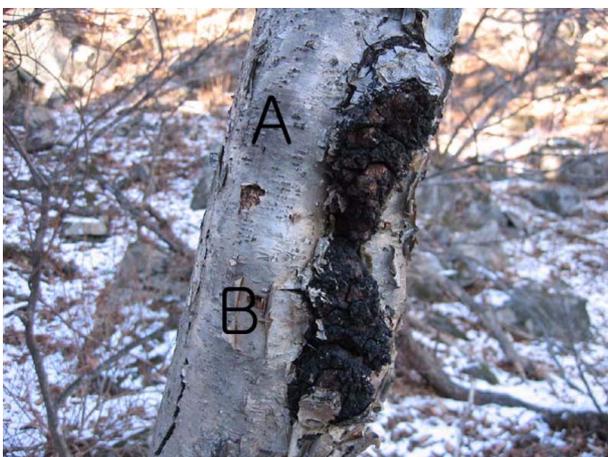


Fig. 1. Fruit bodies of *Inonotus obliquus* occurred on *Betula ermani* at Mt. Odae. A: KFRI 742, B: KFRI 743.

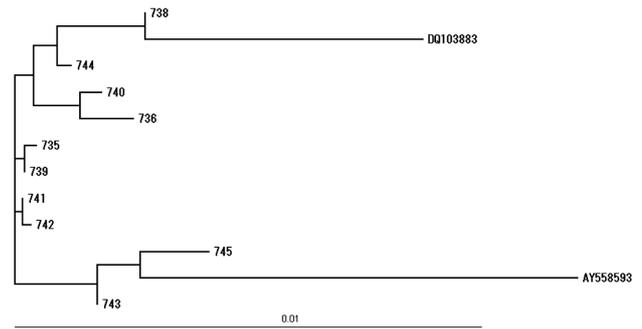


Fig. 2. Phylogenetic relationships among the strains of *Inonotus obliquus* based on analysis of ITS sequences (ITS1 and ITS4 primer pairs).

물들에서만 발견되었다.

유전적 유연관계분석

오대산에서 채집한 균주나 다른 보유균주 모두 서로 간에 높은 상동성을 보였으며, NCBI에 등록되어 있는 *Inonotus obliquus* 균주들과도 98% 이상의 높은 유연관계가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 같은 자실체에서 분리 위치만 달랐던 KFRI 740과 741은 상동성이 99%로 나왔고 같은 가지에서 채집된 KFRI 742와 743도 100% 동일한 것으로 나타났다. 설악산과 점봉산은 직선거리로 약 10 km 정도 떨어져 있고 점봉산과 오대산, 설악산과 오대산은 약 30 km 정도 떨어져 있다. 이 정도 거리라면, ‘대치배양’ 실험에서의 결과와 비교할 때, 아주 먼 거리 차이를 의미한다. 따라서 이들 지역에서 채집된 균주들 간에는 유전적으로 명백히 차이가 나는 부분이 있을 것이라고 생각되는데, 대치배양에서와 같은 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다. 표고에서도 균주 간에 진행된 대치배양의 결과와 OPA primer를 사용한 RAPD(Random Amplified Polymorphism DNA) 분석 간에 차이를 보였던 것처럼 이런 차이의 원인을 확인하기 위한 추가연구가 필요하다고

Table 2. Mycelial growth and weight reduction rate of *Inonotus obliquus*

KFRI No.	Mycelial growth (PDA, mm/14 days)	Weight reduction rate (sawdust, %/50 days)
735	49.4 ± 3.7cd ^a	1.20 ± 0.20ba
736	61.7 ± 12.8ba	1.14 ± 0.22ba
738	49.2 ± 2.5ed	1.18 ± 0.18ba
739	35.3 ± 1.3g	1.27 ± 0.19a
740	44.2 ± 1.5fe	1.17 ± 0.13ba
741	54.8 ± 1.0cd	1.07 ± 0.14b
742	57.9 ± 2.6bc	1.14 ± 0.20ba
743	39.1 ± 7.8fg	1.14 ± 0.25ba
744	67.4 ± 1.4a	1.28 ± 0.15a
745	55.2 ± 2.9bdc	1.24 ± 0.15a
con.		0.66 ± 0.17c

^aFollowed by LSD multiple range test (p<0.05).

판단한다(이 등, 2006).

균사생장력 조사

균사생장력은 균주간에 다소 큰 차이를 보였다(Table 2). KFRI 744이 가장 빠른 성장력을 보였고 KFRI 739가 가장 낮은 성장력을 보였다. 그리고 KFRI 744와 739 간에는 거의 두 배 가까운 성장력의 차이가 발생한 반면에 KFRI 735와 738 간에는 차이가 거의 없었다. 차가버섯균은 PDA에서 성장할 때, 불규칙적으로 성장하는 경향을 가끔 보이는데, 이러한 경향을 감안한다고 하더라도 균주 간에 두 배 가까운 차이가 발생한다는 것은 다른 한편으로 생각할 때 십 수 회 계대를 거친 KFRI 739 균주의 퇴화를 의심할 수도 있다. 하지만 KFRI 744와 동일한 시기에 분리해서 2회 이상 계대를 거치지 않은 KFRI 743도 739 균주와 비슷할 정도의 낮은 성장력을 보였다. 따라서 균사생장력이 떨어진다는 것만으로 균주의 퇴화를 논하기에는 시기상조라고 판단된다.

배지의 중량감소율 조사

균주 간의 중량감소율도 균사생장력 만큼은 아니지만

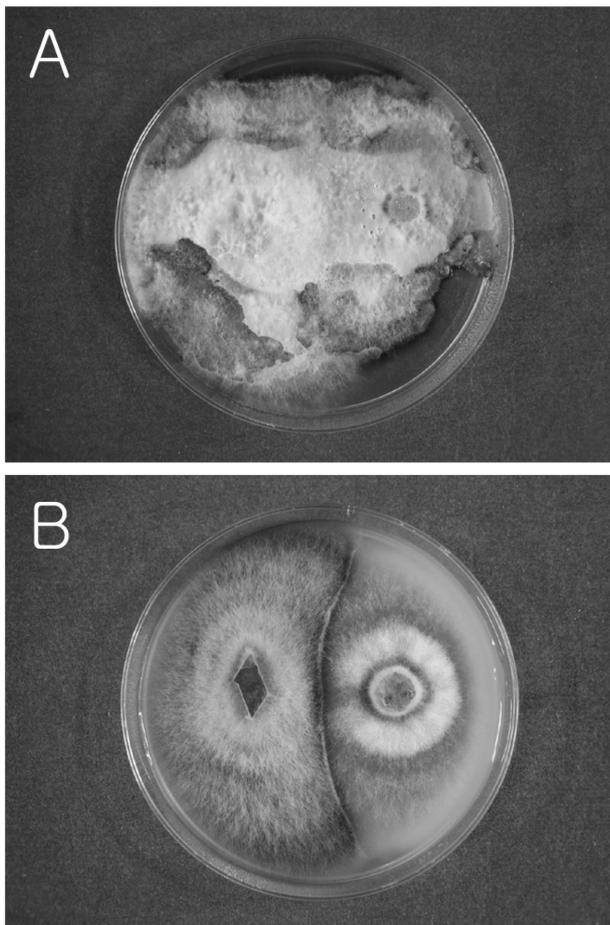


Fig. 3. Mycelial interaction in *Inonotus obliquus*. A: vegetative compatibility (KFRI 740-741), B: vegetative incompatibility (KFRI 744-739).

Table 3. Vegetative mycelial interactions between *Inonotus obliquus* strains on PDA

	KFRI No.									
	735	736	738	739	740	741	742	743	744	745
735	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
736		×	×	×	×	×	×	×	×	×
738			×	×	×	×	×	×	×	×
739				×	×	×	×	×	×	×
740					○	×	×	×	×	×
741						×	×	×	×	×
742							○	×	×	×
743								×	×	×
744									×	×

○: non formation of demarcation line, ×: formation of demarcation line.

약간의 차이를 보였다(Table 2). 중량감소율은 KFRI 744가 가장 높았으며, KFRI 741이 가장 낮았다. 특이한 점은 균사생장력 조사에서 2배 가까운 차이를 보였던 KFRI 739와 744가 중량감소율 조사에서는 나란히 가장 높은 감소율을 보였다는 점이다. 이는 높은 균사생장력과 높은 중량감소율 간에는 관련성이 낮음을 의미한다고 볼 수 있으며, 차가버섯 인공재배를 시도할 때 참고가 될 것으로 판단된다.

대치배양

대부분의 조합에서 대치선이 형성되었지만 KFRI 740과 741, KFRI 742와 743 조합에서는 대치선이 형성되지 않고 서로 섞였다(Fig. 3, Table 3). 하지만 만약 이들 균주의 기원을 고려한다면, 대치선이 형성되지 않거나 대치선을 형성하지 않을 가능성이 높다. 왜냐하면, Table 1에 언급한 바와 마찬가지로 KFRI 740과 741은 동일한 자실체에서 조직분리 위치만 달랐을 뿐이며, 742와 743은 같은 가지에서 가까운 거리를 사이에 두고 위아래로 발생한 자실체에서 분리되었기 때문이다. 그러나 KFRI 736과 745는 같은 나무에서 발생되었고 가지만 달랐을 뿐임에도 불구하고 대치선이 형성되었다. 이는 야생상태에서는 두 자실체 간의 거리가 약간만 벌어져도 대치배양을 통한 분석에서는 다른 균주로 판단될 수 있다는 것을 의미한다.

적 요

오대산의 1,100 m 부근에 자생하는 사스래나무에서 차가버섯을 채집하였다. 나무의 흉고직경은 10~50 cm이었으며, 차가버섯 균핵의 크기는 8×5~20×16 cm이었다. 시험 균주들과 NCBI에 등록되어 있는 *Inonotus obliquus* 균주 간의 유연관계가 아주 가까운 것으로 확인되었다. 그리고 NCBI 등록균주들을 제외한 10가지 균주 모두 ITS 분석에서 높은 상동성을 보였다. 균사생장력은 균주 간에 큰 차이를 보였다. KFRI 744가 가장 빠른 성장력을

보였으며, KFRI 739가 가장 낮은 성장력을 보였다. 그리고 KFRI 744와 739 간에는 거의 두 배 가까운 성장력의 차이가 발생한 반면에 KFRI 735와 738 간에는 차이가 거의 없었다. 균주 간의 중량감소율도 약간의 차이를 보였다. 중량감소율은 KFRI 744가 가장 높았으며, KFRI 741이 가장 낮았다. 대부분의 대치배양 조합에서 대치선이 형성되었지만 KFRI 740과 741, KFRI 742와 743 조합에서는 대치선이 형성되지 않았다.

참고문헌

- 김성윤, 이재윤, 김기영, 박재민, 김문옥, 이태호, 이재동. 2004. ITS 염기서열에 기초한 차가 버섯과 근연속간 유연관계분석. 한국균학회지 **32**: 152-157.
- 박현, 이봉훈, 박원철. 2005. 점봉산 거제수나무에서 분리한 차가 버섯의 배양특성. 한국버섯학회지 **3**: 71-74.
- 심재성, 이병화, 강석중. 2003. 차가버섯의 실체와 응용. (재)국제 농업개발원. Pp 178-244.
- 이봉훈, 박원철, 김명길, 유선화, 유성열. 2006. 표고 배양시 균주 혼입에 따른 생리 및 유전적 변화. 한국균학회지 **34**: 73-78.
- 차재영, 전병삼, 박정원, 문재철, 조영수. 2004. 차가버섯과 어성초 함유 발효 조성물이 인체 위암 AGS 및 대장암 HCT-15 세포 생육에 미치는 영향. 한국응용생명화학회지 **47**: 202-207.
- 황용주, 노건웅, 김선희. 2003. 차가버섯 추출물이 소화기계 암세포의 증식 및 Caspase-3 활성에 미치는 영향. 한국영양학회지 **36**: 18-23.
- Blanchette, R. A. 1982. Progressive stages of discoloration and decay associated with the canker-rot fungus, *Inonotus obliquus*, in birch. *Phytopathology* **72**: 1272-1277.
- Cha, J. Y., Jun, B. Sm, Yoom K. S., Hahm J. R. and Chom Y. S. 2006. Fermented chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) effects on hypolipidemia and hepatoprotection in otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats. *Food Sci. Biotechnol.* **15**: 12-127.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2003. Consensus document on the biology of european white birch (*Betula pendula* Roth). p. 34.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for polygenetics. Pp 315-322 In: Innis, M. A., Gelgand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. Eds. PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego.