

자작나무를 이용한 차가버섯균의 인공접종

이봉훈* · 가강현 · 박현 · 이혜민 · 박원철 · 유성열

국립산림과학원 화학미생물과

Artificial Inoculation of *Inonotus obliquus* on *Betula platyphylla* var. *japonica*

Bong-Hun Lee*, Kang-Hyeon Ka, Hyun Park, Hye-Min Lee, Won-Chull Bak and Sung-Ryul Ryu

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

(Received October 31, 2008. Accepted December 15, 2008)

ABSTRACT: *Inonotus obliquus* could be isolated from *Betula platyphylla* var. *japonica* with diameter in the range of 6~13 cm that artificially inoculated by the fungus. The diameter and/or inoculation point of tree did not show any significant relationships with the infection rate of the fungus. *Inonotus obliquus* showed rapid growth on vertical direction of the infected tree while the growth was quite low on radial direction. The isolated fungus from the infected tree did not show vegetative incompatibility with the original fungus used for inoculation. We could isolate 8 contaminants from the inoculated area; *Trichoderma reesei*, *T. atroviride*, *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and 3 unknown species.

KEYWORDS : *Betula platyphylla* var. *japonica*, contaminants, Incompatibility, *Inonotus obliquus*, *Trichoderma*

유럽이나 러시아 등에서는 차가버섯이 일상생활 깊숙이 들어와 있고 접하기도 쉬우므로 약용으로서의 가치에 대한 연구가 활발하다. 하지만 국내에서는 산간지방의 재래시장에서나 가끔 국내산 차가버섯을 볼 수 있을 뿐 일반인들이 접하는 차가버섯의 대부분은 수입에 의존하고 있는 실정이다. 국내에서 생산이 이루어지지 않을 경우 아무리 좋은 효능관련 연구가 나온다 하더라도 재료는 수입으로 충당할 수밖에 없는 구조이기 때문에 생산량을 높이는 것이 급선무이다. 그러나, 2005년 점봉산에 자생하는 거제수나무에서 차가버섯이 최초로 확인된 이후 적지 않은 시간이 흘렀지만(박 등, 2005), 연구의 초점은 여전히 약용 가능성에 대한 연구에만 맞추어져 있을 뿐(Lee et al., 2007; Rhee et al., 2008), 차가버섯을 어떻게 생산할 것인가에 관한 연구는 전혀 진행되지 못하고 있는 실정이다.

차가버섯을 인공 재배하기 위해서는 차가버섯의 기주로 알려진 자작나무류, 오리나무류, 가래나무류, 너도밤나무류, 새우나무류 중에서 선택을 하는 것이 유리한데, 국내에서는 아직 자작나무류에 속하는 거제수나무나 사스래나무, 물박달나무 등에서만 차가버섯이 발견되고 있을 뿐 다른 수종에서는 발견되지 않았다(박 등, 2005; 이 등, 2007). 따라서 전국적으로 많이 조림되어 있는 자작나무를 재배에 이용하는 것이 현실적이라 할 수 있다. 또한 차

가버섯은 대부분 지면으로부터 1~4 m 내외에서 발견되는 것으로 알려져 있기 때문에(Breitenbach and Kränzlin, 1986), 이러한 특성을 이용한다면 차가버섯균을 접종하거나 채취하는 데에 상당히 유리한 조건을 제공할 수도 있을 것이다.

본 연구는 차가버섯 인공재배에 적당한 조건을 확인하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

공시균주 및 종균 준비

러시아 수집 균주인 KFRI 739와 오대산의 사스래나무에서 채집된 차가버섯 균주인 KFRI 744를 시험에 사용하였다. 접종에 사용된 종균은 톱밥종균을 사용하였으며, 신갈나무톱밥과 미강을 8:2 비율로 혼합하여 수분함량 60~65%로 조절하고 121°C에서 90분간 고압멸균하여 준비하였다. 그리고 차가버섯균을 접종한 다음 23°C에서 30일간 배양해서 준비하였다.

공시목 선정 및 접종

경기도 포천시 내촌면 음현리의 수령 20년 내외의 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japonica*)를 공시목으로 선정하였으며(Fig. 1A), 공시목들은 나무의 직경을 기준으로 6~9 cm, 10~13 cm, 그리고 14~17 cm 등 3가지로 구분하여 각 접종구당 13본씩을 선정하였다. 차가버섯균의

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



Fig. 1. Artificial inoculation of *Inonotus obliquus* on *Betula platyphylla* var. *japonica*. A, field; B, drilling; C, inoculation; D, closing with styrofoam; E, appearance of hyphae of *Inonotus obliquus*; F, cross section of tree (scale bar: 2 cm); G, vertical section of tree (A: inoculation site, Io: *Inonotus obliquus*); H, vegetative compatibility between KFR1 744 and isolated fungus.

접종을 위해 지면으로부터 60 cm, 90 cm, 120 cm 등 3군데 위치에 수간주사용 드릴을 사용하여 표고원목재배시 이용되는 방법과 같은 방법으로 직경 12 mm, 깊이 25 mm 정도의 구멍을 뚫었다(Fig. 1B, 박 등, 2006). 그리고 스프링봉 접종기를 이용하여 톱밥종균을 접종한 후 스티로폼마개로 입구를 막았다(Fig. 1C, D). 접종은 2007년 5월 2일에 실시하였다.

접종목의 조사

접종한 후 14개월 정도 경과한 시점인 2008년 7월 15일에 접종 부위에 대한 육안 검사를 통해 차가버섯균의 활착 여부를 확인하였으며, 이들 중 일부 시험목을 절단하여 차가버섯균 동정 및 다른 오염균의 존재 여부를 확인하였다.

차가버섯균의 확인

접종목에서 차가버섯균의 활착을 확인하기 위하여 균을 분리하였으며 분리균의 균종과 균사의 특성을 조사하였다. 차가버섯균임이 확인된 균주는 5 mm cork borer로 떼어 내어 균주 간에 일정한 거리를 두고 본원에서 보관 중인 모균주와 PDA 배지에서 서로 대치하였으며, 대치배양은 23°C에서 40일 배양 후 대치선 형성 유무를 조사하였으며, 대치배양은 3반복으로 수행하였다.

오염균의 DNA 분리

차가버섯균이 활착되지 않은 부분에는 어떤 균들이 자리 잡고 있는지를 확인하기 위해 접종구멍 속 목부조직에서 오염균을 분리했다. 이렇게 분리된 오염균의 분류 동정을 위해 PDA 배지에서 23°C로 2주일간 배양한 균사체를 loop로 수거했으며, Cullings(1992) 및 Doyle과 Doyle (1987)의 방법에 따라 DNA를 얻었다.

PCR 증폭 및 동정

분리된 DNA로부터 rDNA의 ITS (Internal Transcribed Spacer) 영역을 증폭시키기 위하여 ITS 1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS 4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 primer pair로 사용하였다(White *et al.*, 1990). PCR 반응은 Bioneer사의 AccuPower® PCR premix kit를 사용하였다. 반응조건은 95°C에서 2분간 pre-heating시킨 다음, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 35 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 10분 동안 post-extension하고 4로 유지하였다. 증폭된 DNA는 1.0% agarose gel에서 확인한 다음 gel extraction kit(Bioneer, AccuPower Gel purification kit)를 이용하여 정제한 후 sequencing을 수행하였다. 그리고 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 균주와의 nucleotide 상동성을 비교하여 동정하였다.

결과 및 고찰

차가버섯균 접종목 관찰

접종한 차가버섯 종균의 활착 여부를 확인한 결과, KFR1 739는 나무 직경이 6~9 cm인 접종구에서만 활착이 확인되었으며, KFR1 744는 6~9 cm 접종구 뿐만 아니라 나무 직경이 10~13 cm인 접종구에서도 활착이 확인되었다(Fig. 1E, Table 1). 나무 직경과 차가버섯균의 활착 간에는 유의성이 없는 것으로 나타났으며, 접종 위치에 따른 활착 차이도 크지 않은 것으로 나타났다. 따라서 직경이 6~13 cm 범위 내의 자작나무라면 지면으로부터 120 cm 범위 내에서 차가버섯균을 접종해도 활착에 문제가 없을 것으로 판단된다. 다만 KFR1 744가 KFR1 739에 비해 활착 성공률이 더 높은데, 이는 KFR1 739에 비해

Table 1. Investigation of *Betula platyphylla* var. *japonica* inoculated with *Inonotus obliquus*

Strain	Dia. of tree ^a (cm)	Number ^a	Height of inoculation site		
			60 cm	90 cm	120 cm
KFRI 739	6~9	2a	+	—	—
	10~13	0a	—	—	—
	14~17	0a	—	—	—
KFRI 744	6~9	3a	+	+	+
	10~13	3a	—	+	+
	14~17	0a	—	—	—

^a the number of tree infected with *I. obliquus* (Followed by LSD multiple range test ($p < 0.05$)).

^b +, infected by *I. obliquus*; —, not infected by *I. obliquus*.

KFRI 744의 균사생장속도가 2배 정도 빠르는데도 그 원인이 있을 것으로 여겨지기 때문에(이 등, 2007), 접종에 사용되는 균주 선정 시 균사 생장속도도 고려되어야 할 것으로 판단된다. 또한 차가버섯균이 활착된 나무를 절단해 보면 방사방향으로는 접종 당시 뚫어준 넓이 이상 생장하지 못한 반면에(Fig. 1F), 아래 위 방향으로는 상당히 넓게 생장한 것을 확인할 수 있었는데 어떤 것은 위쪽으로 55 cm, 아래쪽으로는 20 cm까지 생장하고 있었다(Fig. 1G). 따라서 접종의 효율성을 높이기 위해서는 표고원목 재배 시 사용하는 지그재그 방법과 같이 열 간의 구멍 뚫기 위치가 서로 엇갈리게 하는 방법으로 구멍을 뚫어 주는 것이 좋을 것으로 판단하며, 더불어 나무가 강한 바람에도 부러지지 않을 정도의 적정 구멍 개수를 찾는 추가 연구도 필요하다고 판단된다.

대치배양

대치배양 결과, 접종에 사용된 차가버섯균과 접종목에서 분리된 차가버섯균 간에 대치선이 형성되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 1H). 또한 균사생장력 조사에서도 둘 간의 차이가 거의 없었다. 차가버섯 균주들 간에 균사생장력의 차이가 많이 날 뿐만 아니라 같은 나무의 다른 가지에 형성된 차가버섯 균핵으로부터 분리된 균주들 간에도 대치선이 형성될 정도로 민감하다는 점을 고려할 때

Table 2. Fungi isolated from the inoculation site of *Inonotus obliquus*

Isolated fungi	KFRI 739			KFRI 744		
	A ^a	B	C	A	B	C
<i>Trichoderma reesei</i>	— ^b	+	+	+	+	—
<i>Trichoderma atroviride</i>	+	—	+	—	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i>	—	+	—	+	—	—
<i>Botrytis cinerea</i>	—	—	—	+	—	—
<i>Fusarium</i> sp.	—	—	+	—	+	—
3 unknown species	—	+	+	—	—	—

^a diameter of tree: A, 6~9 cm; B, 10~13 cm; C, 14~17 cm.

^b +, observed; —, not observed.

이 등, 2007), 본 연구를 위해 접종에 사용된 차가버섯균과 접종목에서 분리된 차가버섯균은 동일한 균임을 확인할 수 있었다.

오염균 확인

오염균을 분리해서 NCBI에 등록되어 있는 균주들과 nucleotide 상동성을 비교해본 결과, *Trichoderma reesei*, *T. atroviride*, *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp.와 명확하게 동정되지 않는 균 3종이 확인되었다(Table 2).

Trichoderma 속 균들은 다양한 버섯들의 해균으로 알려져 있고(Seaby, 1998; Ulhoa and Perberdy 1992), *Botrytis* sp.와 *Fusarium* sp.는 식물병원균으로서 잿빛곰팡이병과 시들음병, 모잘록병 등을 일으키며(Agrios, 2005), *Cryptococcus* sp.는 토양과 동물의 분변에 주로 존재하면서 과량을 흡입했을 때는 면역력이 약한 환자에게 화농성 질환인 cryptococcosis를 일으킨다는 보고가 있다(Ellis and Pfeiffer, 1992). 따라서 이 부분에 관한 추가 확인이 필요할 것으로 판단된다. 그리고 *T. atroviride*도 KFRI 739 접종목에서는 발견되지만, KFRI 744 접종목에서는 발견되지 않아 차후 보다 심층적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

적 요

차가버섯균을 접종한 자작나무를 조사한 결과, 6~13 cm 직경의 나무들에서 균이 확인되었다. 또한 나무 직경과 차가버섯균의 활착 간에는 유의성이 없는 것으로 나타났다. 또한 접종 위치에 따른 활착 차이도 거의 없었다. 차가버섯균이 활착된 나무의 절단면 관찰에서는 차가버섯균이 위아래 방향으로는 활발히 움직인 반면에 방사상으로는 그렇지 않음을 알 수 있었다. 그리고 나무에서 분리한 균과 보관균 간의 대치배양에서는 대치선이 형성되지 않았다. 차가버섯 접종목에서 8종(*Trichoderma reesei*, *T. atroviride*, *Cryptococcus neoformans*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., 명확하게 되지 않는 균 3종)의 오염균이 분리되었다.

참고문헌

- 박원철, 윤갑희, 가강현, 박현, 이봉훈. 2006. 표고재배 및 병해충 방제기술. 국립산림과학원 연구자료 제258호. pp. 87-90.
- 박현, 이봉훈, 박원철. 2005. 점봉산 거제수나무에서 분리한 차가버섯의 배양특성. 한국버섯학회지 3:71-74.
- 이봉훈, 박현, 박원철, 윤갑희, 장지연, 유성열, 가강현. 2007. 국내 수집 차가버섯 균주의 배양특성과 유전적 유연관계 분석. 한국균학회지 35:28-32.
- Agrios, N. G. 2005. Plant Pathology. Academic Press. pp. 535-538.
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. 1986. Fungi of Switzerland (Vol-

- ume 2. Non gilled fungi). Verlag Mykologia, Switzerland. pp. 252-253.
- Cullings, K. W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Ellis, D. and Pfeiffer, T. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Epidemiol.* 8:321-325.
- Lee, I. K., Kim, Y. S., Jang, Y. W., Jung, J. Y. and Yun, B. S. 2007. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17:6678-6681.
- Rhee, S. J., Cho, S. Y., Kim, K. M., Cha, D. S. and Park, H. J. 2008. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT* 41:545-549.
- Seaby, D. 1998. *Trichoderma* as a weed mould or pathogen in mushroom cultivation: *Trichoderma* and *Gliocladium*. CRS Press. pp. 267-272.
- Ulhoa, C. J. and Peberdy, J. F. 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 14:236-240.
- White, T. J., Bruns, T. D., 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 (M. A. Innis, D. H. Gelgand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds), Academic Press, San Diego. pp. 315-322.