

## ITS 염기서열에 기초한 차가버섯과 근연속간 유연관계분석

김성윤 · 이재윤 · 김기영 · 박재민 · 김문옥 · 이태호 · 이재동\*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

### Phylogenetic Relationships between the Genus *Inonotus* and its Related Genera Based on the Nucleotide Sequences of Internal Transcribed Spacers

Cheng-Yun Kim, Jae-Yun Lee, Gi-Young Kim, Jae-Min Park, Mun-Ok Kim, Tae-Ho Lee and Jae-Dong Lee\*

Department of microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received November 17, 2004)

**ABSTRACT:** In this study the ITS1, ITS2 and 5.8S ribosomal DNA sequences from 29 strains of the Genus *Inonotus* and its related genera were compared with 31 strains obtained from GenBank database. Using the neighbor-joining (NJ) method and most parsimonious analysis the phylogenetic tree was constructed. The hymenochaetales formed no monophyletic group and several non-hymenochaetales appeared as intermingled with the Hymenochaetales. Strains 6, 46, 49, 50, 53, 55 showed no certain affinities within the Hymenochaetales, whereas *Inonotus* sp. (51) was closely related to *Phellinus baumii*, and *Inonotus* sp. (52), and *Inonotus glomeratus* (10) was related to *Phellinus linteus*, and *Fomes fomentarius* (30) was related to *Ganoderma lucidum*. *Inonotus* sp. and *Phellinus* sp. formed no monophyletic groups and a subdivision in the following genera is accepted: *Inonotus* sp. *Phellinus baumii*, *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, *Hericium erinaceum*, *Ganoderma lucidum* and *Sparassis* sp. were confirmed and separated genera. The taxonomic status of *Inonotus* remained uncertain. Eight new combinations are proposed.

**KEYWORDS:** *Inonotus* and *Phellinus*, ITS, Phylogenetic analysis

만주름버섯목(Aphyllporales)은 약 2,000 균종을 포함하는 큰 목으로, 통상 “bracket fungi” 혹은 “coral fungi”로 불리워지는 균근이다. 대부분의 균종은 목재부후균으로 식물체의 구성분인 셀룰로스와 리그닌의 분해능을 가지는 특징이 있으며 실험실에서의 배양은 비교적 용이하다. Aphyllporales에는 상황버섯, 차가버섯, 영지버섯, 운지버섯, 꽃송이버섯과 노루궁뎅이버섯 등의 종들을 포함한 저명한 속이 많이 포함되어 있으며 최근에는 이들이 생산하는 유용한 대사산물에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2004). 또한 이들 중에는 인간생활과 밀접한 관계를 가지는 것이 많고 고대로부터 약제, 마취제 혹은 말뚝, 코담배, 면도칼을 가는 때 등으로 일상생활에도 널리 쓰여져 왔다(Donk *et al.*, 1964; 이재동, 1998). 최근 약용버섯에 대한 사람들의 관심이 높아지면서 기존에 연구되어진 상황버섯 외에도 기타 약용버섯들이 고가임에도 불구하고 소비가 급증하고 있는 실정이다. 이들 약용버섯은 국내산이 일부분을 차지한 반면에 대부분은 중국, 러시아, 북한 등 동남아시아로부터 저가로 수입되어 고가로 시판되고 있었으며 차가버섯(*Inonotus*

*obliquus*), 말굽버섯(*Fomes fomentarius*), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 및 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*) 등 약용버섯들이 주로 수입되고 있는 실정이었다.

특히 차가버섯의 학명에 대하여 일본에서는 *Fuscoporia obliqua*로 명명하였고, 러시아와 핀란드에서는 *Inonotus obliquus*라고 명명하였으나 1980년대 이후 학술 교류가 진전되면서 동일한 종류의 균을 놓고 두개의 학명이 존재한다는 사실이 밝혀지면서 국제관례에 따라 먼저 등록된 소련쪽의 학명인 *Inonotus obliquus*를 사용하게 되었다. 최근의 연구에 의하면 현재 국내에서 자작나무버섯으로 수입되어 시판되고 있는 균주들은 *Inonotus obliquus* 외에 이와 형태학적으로 아주 유사하지만 아직 약효나 독성에 대해 확인된 바가 없는 *I. mikadoi*, *I. dryophilus*, *I. hispidus* 등의 종들도 함께 유통되고 있는 실정이다(김 등, 2003).

이러한 보고를 바탕으로 현재 국내에 수입되어 유통되고 있는 일명 차가버섯들이 판매단계에서 진위에 관련한 종구별 문제를 발생시킬 우려가 있기 때문에 본 연구에서는 ITS(Internal Transcribed Spacers) 부위 DNA 염기서열을 이용하여 이들 차가버섯과 근연속들 사이의 유연관계를 밝히고자 하였다.

\*Corresponding author <E-mail: leejd@pusan.ac.kr>

**Table 1.** List of medical mushroom species used in the nucleotide sequence analyses

Number	Strain or Geographical origin		Species or product type		Accession no.
1	Desjardin	7410	<i>Sparassis cystidiiosa</i>	※	AY256891
2	Tenn	50232	<i>Sparassis radicata</i>	※	AY218450
3	Tenn	51767	<i>Sparassis spathulata</i>	※	AY218447
4	MPNU	1044	<i>Sparassis brevipes</i> (Fruiting-body)		AY218441
5	YCD	2145	<i>Sparassis crispa</i>	※	AY218423
6	Sweden	1111	<i>Inonotus radiatus</i>	※	AY354217
7	ASI	74010	<i>Inonotus obliquus</i>	※	AY251310
8	ASI	74005	<i>Inonotus hispidus</i>	※	AY251309
9	Canada	119081	<i>Inonotus rheades</i>	※	AY237731
10	Canada	120825	<i>Inonotus glomeratus</i>	※	AF247968
11	Canada	119080	<i>Inonotus radiatus</i>	※	AF237732
12	Canada	119079	<i>Inonotus cuticularis</i>	※	AF237730
13	Canada	119082	<i>Inonotus tomentosus</i>	※	AF237729
14	Canada	119078	<i>Inonotus circinatus</i>	※	AF237728
15	Argentina	2213	<i>Inonotus rickii</i>	※	AY072027
16	Argentina	0193	<i>Inonotus quercustris</i>	※	AY072026
17	Argentina	0013	<i>Inonotus rickii</i>	※	AY072025
18	Argentina	2339	<i>Inonotus patouillardii</i>	※	AY072024
19	Japan	91752	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AB084622
20	China	91752	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AF397469
21	ATCC	52480	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AF287981
22	Japan	91752	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AB084613
23	CBS	493.7	<i>Hericium americanum</i>	※	AF287980
24	CBS	243.48	<i>Hericium abietis</i>	※	AF287979
25	CBS	539.90	<i>Hericium alpestre</i>	※	AF287978
26	CBS	447.85	<i>Hericium coralloides</i>	※	AF173216
27	Korea	48001	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AY534587
28	Korea	48002	<i>Hericium erinaceum</i>	※	AF146779
29	Sweden	40442	<i>Fomes fomentarius</i>	※	AY354213
30	China	8246	<i>Fomes fomentarius</i> (Fruiting-body)		-
31	Japan	1112	<i>Fomes fomentarius</i> (Fruiting-body)		-
32	KFDA	P019	<i>Phellinus pini</i> (Fruiting-body)		AF436619
33	KFDA	P017	<i>Phellinus pini</i> (Fruiting-body)		AF436620
34	KFDA	P020	<i>Phellinus pini</i> (Fruiting-body)		AF436621
35	KFDA	P023	<i>Phellinus pini</i> (Fruiting-body)		AF436622
36	KFDA	P015	<i>Phellinus baumii</i> (Fruiting-body)		AF436623
37	KFDA	P022	<i>Phellinus baumii</i> (Fruiting-body)		AF436624
38	KFDA	P029	<i>Phellinus baumii</i> (Fruiting-body)		AF436625
39	KFDA	P016	<i>Phellinus linteus</i> (Fruiting-body)		AF436626
40	ATCC	26710	<i>Phellinus linteus</i> (Mycelium)		AF153010
41	KFDA	P021	<i>Phellinus igniarius</i> (Fruiting-body)		AF436628
42	OE	233	<i>Ganoderma lucidum</i>	※	AY636068
43	OE	234	<i>Ganoderma lucidum</i>	※	AY636059
44	OE	235	<i>Ganoderma lucidum</i>	※	AY636058
45	KCTC	26147	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
46	KCTC	26152	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
47	KCTC	26136	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
48	KACC	50137	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
49	CBS	32090	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
50	CBS	32086	<i>Inonotus obliquus</i> (Mycelium)		-
51	Japan	32058	<i>Inonotus mikadoi</i> (Mycelium)		-
52	Japan	6517	<i>Inonotus mikadoi</i> (Mycelium)		-
53	Japan	9352	<i>Inonotus mikadoi</i> (Mycelium)		-
54	Japan	9788	<i>Inonotus hispidus</i> (Mycelium)		-
55	KCTC	6646	<i>Inonotus hispidus</i> (Mycelium)		-
56	Korea PROPOLIS		<i>Inonotus obliquus</i> (Fruiting-body)		-
57	Nam san young nong		<i>Inonotus obliquus</i> (Fruiting-body)		-
58	INOBUS		<i>Inonotus obliquus</i> (Fruiting-body)		-
59	China		<i>Inonotus obliquus</i> (Fruiting-body)		-
60	China		<i>Inonotus obliquus</i> (Fruiting-body)		-

American Type Culture Collection, Manassas, USA (ATCC) Korean Collection for Type Culture (KCTC) Korea Food & Drug Administration (KFDA) Micro. lab. of Pusan National Univ. (MPNU) Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ※ The species from GenBank database.

### PCR 증폭 및 Sequence alignment

실험에 사용한 균주로는 Korean Collection for Type Culture(KCTC), Mycological lab. of Pusan National University(MPNU), Korea Food & Drug Administration (KFDA), Centraal Bureau voor Schimmelcultures(CBS), American Type Culture Collection(ATCC) 등 다양한 균주분양센터와 현재 국내 재래시장 및 농가 재배사에 유통 중인 국내산, 중국산, 일본산 및 기타 외국산 등의 자실체와 균사체 29균주를 확보했다. 이 후 비교분석을 위하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 차가버섯종과 근연종 총 31균주를 사용하였다(Table 1). 먼저 수집한 29균주를 PDA 배지에서 배양한 후 QIAGEN사의 DNeasy Plant Mini kit를 이용하여 균체로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 각각의 게놈 DNA로부터 rDNA의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 김 등(2003)이 제시한 primer 조합을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응조건은 96°C에서 5분간 pre-heating시킨 다음, 96°C에서 1분간 denaturation, 48°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 30 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 5분 동안 post extension하고 4°C로 유지하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel에서 확인한 후 gel extraction kit를 이용하여 증폭 DNA band를 gel로부터 추출하여 sequencing을 수행하였다. 이들 product size는 500~600 bp 정도로 각 sequence들의 앞부분에 존재하는 ITS1 부위에서는 중간 변이율(10±2%)이 높은 것으로 나타났으며, 5.8S rDNA 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성(99±0.5%)을 나타내어 중간 변이율이 매우 낮게 나타났었다. 또한 ITS2 부위에서도 많은 염기서열상의 차이(7±2%)를 보이고 있으나 ITS1 부위보다는 변이율이 높지 않았으며 특히 같은 속내 종들 사이에서도 ITS1 부위가 ITS2 부위보다 변이율이 2% 정도 높은 것으로 확인되었다. 따라서 ITS1, 5.8S rDNA 및 ITS2 부위 중 ITS1 부위가 속 및 종간의 유연관계의 해석과 종특이적인 probe의 디자인에 유용할 것으로 판단되었다.

### 국내 약용버섯의 계통분류학적 위치 및 유연관계

Clustal X multiple alignment 방법을 이용하여 각 균주의 결정된 염기서열을 정렬한 후 Neighbor-Joining method와 most parsimonious analysis법을 이용하여 계통수를 작성하였다(Tobias *et al.*, 2001, 2002) (Fig. 1). 국내유통 약용버섯은 2개의 큰 그룹 A와 B로 나누어졌다. "A" 그룹에는 *Inonotus* sp. group: <*I. rickii*(15, 17), *I. patouillardii*, *I. quercustris*, *I. cuticularis*, *I. sp.*(Japan 9788-mycelium), *I. sp.*(KCTC 26136-mycelium), *I. sp.*(inogus), *I. sp.*(Korea propolis), *I. sp.*(nam san), *I. sp.*(China), *I. sp.*(KCTC 26147-mycelium) and *I. obliquus*>과 *Phellinus baumii* group: <*P. baumii*(36, 37, 38) and

*I. sp.*(Japan 32058-mycelium)> 그리고 *Phellinus linteus* group: <*P. linteus*(39, 40), *I. sp.*(Japan 6517-mycelium) and *I. glomeratus*> 이외에 *Phellinus igniarius* group: <*P. igniarius*, *I. sp.*(KACC 50137-mycelium)와 *I. hispidus*> 및 *Phellinus pini* group: <*P. pini*(32, 33, 34, 35), *I. sp.*(China fruiting body), *I. tomentosus*, *I. circinatus* and *I. radiatus*> 등 5개의 작은 그룹으로 나누어짐을 확인하였다. 그 중 *Phellinus baumii*와 *Phellinus pini* group은 하나의 그룹을 형성하였지만 *Phellinus linteus*와 *Phellinus igniarius* 및 *Inonotus*속내 종들은 유연관계가 아주 가까운 양상을 나타내었다. "B" 그룹에는 *Hericium* group과 *Ganoderma lucidum* group 및 *Sparassis* group과 국내 유통 중인 *Inonotus mycelium* group 그리고 *Fomes fomentarius* 등 역시 5개의 작은 그룹으로 나누어짐을 확인하였다. 그 중 속내 유통 중인 *Inonotus mycelium* group은 "A" 그룹에 속했던 *Inonotus* sp. group과는 유연관계가 먼 것으로 나타난 반면 group B에 속하는 다른 균주들과 유연관계가 아주 가까웠다. 본 연구에 인용되어진 총 31종의 NCBI 등록 균주 중 *I. rheades*(AY237731)와 *I. radiatus*(AY354217) 두 균주는 *Inonotus* group과 아주 먼 유연관계를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 한편 기존에 한 균주만 등록되어 있는 *F. fomentarius*(AY354213)는 같은 과에 포함되어 있는 *Ganoderma*속과 유연관계가 아주 먼 반면에 본 연구에서 수집된 *F. fomentarius*(isolate 8246)가 오히려 *Ganoderma*속과 아주 가까운 유연관계 양상을 나타내었다.

### 시판 차가버섯의 분류학적 위치 및 상황버섯과의 유연관계

시판 차가버섯의 분류학적 위치 및 *Phellinus*속과의 정확한 계통발생학적인 유연관계 분석을 위하여 Fig. 1 "A"에서 나타난 Complex group에 대한 염기서열을 결정하여 alignment를 수행한 후 most parsimonious phylogenetic tree를 그려 이들 사이의 유연관계를 확인해 보았다. 분석 결과, *Phellinus*속과 *Inonotus*속 역시 2개의 큰 그룹 A와 B로 구분되었다(Fig. 2). "A" 그룹은 *P. baumii*와 *P. linteus* 그룹으로 다시 분화되었고 *Phellinus baumii* group에는 *Inonotus* sp.(Japan 32058-mycelium)균주가 함께 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 그리고 *Phellinus linteus* group에는 *Inonotus* sp.(Japan 6517-mycelium)균주와 NCBI에 등록되어 있는 *Inonotus glomeratus*가 함께 포함되어 있었다. 이외에 *Phellinus pini* group에는 *Inonotus* sp.(China: Fruiting-body) 균주가 있었으며 NCBI에 등록되어 있는 *I. tomentosus*와 *I. circinatus* 및 *I. radiatus*는 *P. pini* group과 유연관계가 아주 가까운 것으로 분석되었다. "B" 그룹에는 3개의 작은 그룹이 존재했는데 국내에서 일명 차가버섯으로 유통하고 있는 대부분의 균주는 그룹 "B"에 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 그중 *Inonotus*

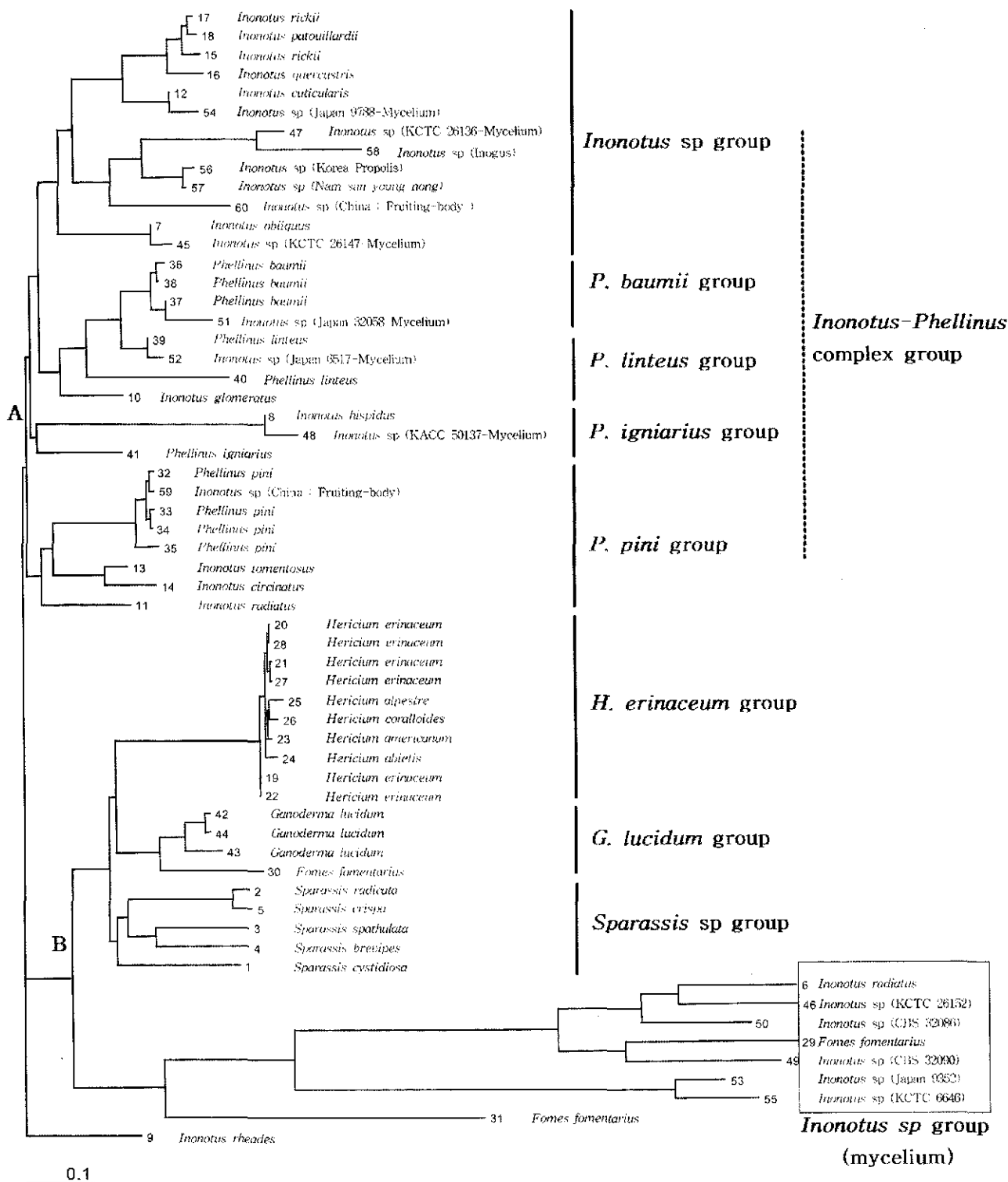


Fig. 1. Phylogram obtained by neighbour joining analysis of ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences of 60 taxa of the medical mushroom species.

sp.(Japan 9788-mycelium) 균주는 *I. cuticularis*와 아주 가까운 유연관계를 나타내었고 *Inonotus* sp.(KCTC 26147-mycelium) 균주는 *I. obliquus*와 유연관계가 가까웠다. 그리고 *Inonotus* sp.(KCTC 26136, Inogus, Propolis, Nam

san, China) 등 균주는 *Inonotus* sp.(KCTC 26147) 균주에 비하여 *Inonotus obliquus* group과 상대적으로 유연관계가 멀었다. 이외에 *Inonotus* sp.(KACC 50137) 균주는 *I. hispidus*와 아주 가까웠으며 이 두 균주는 *Inonotus*속에

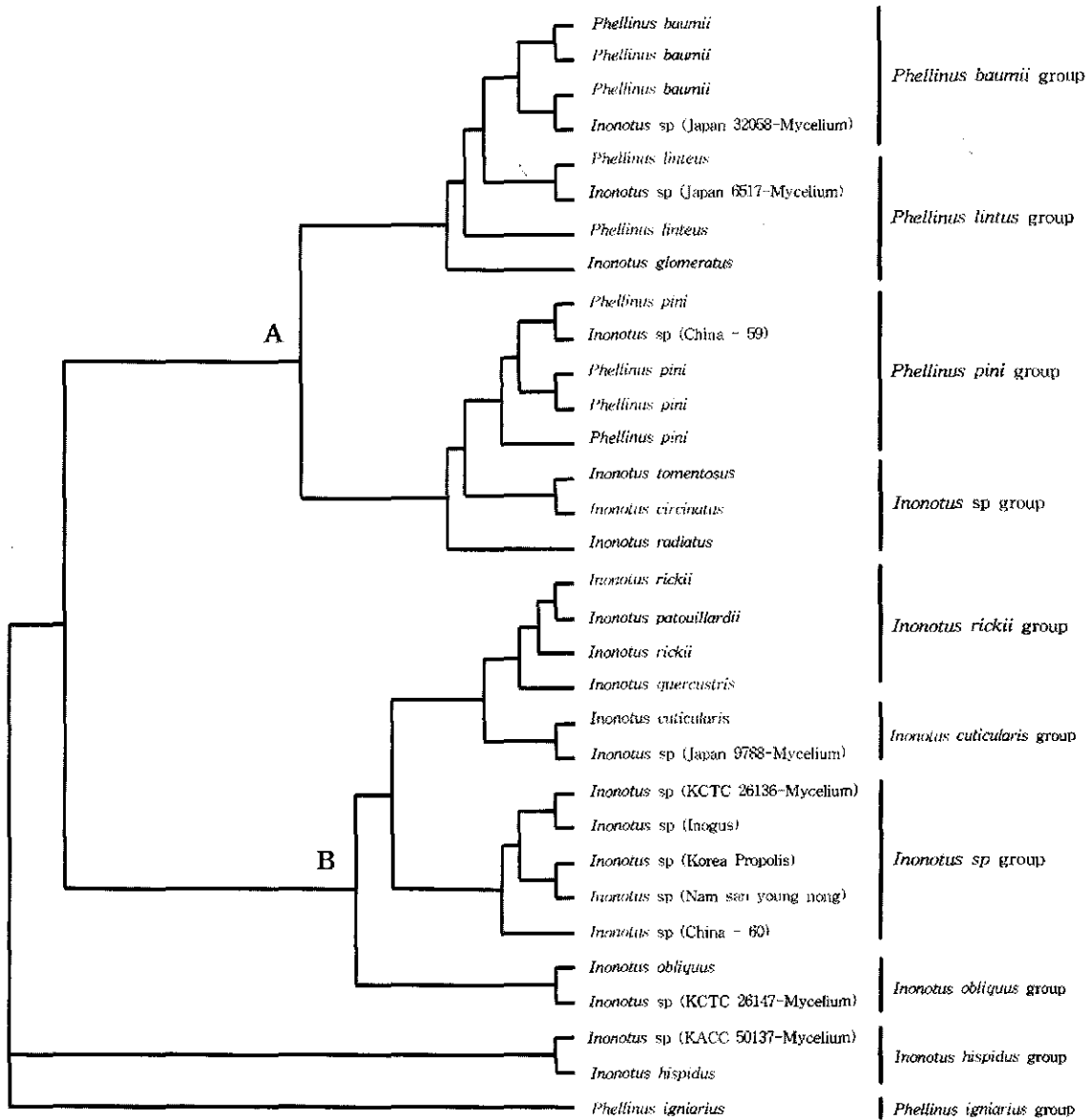


Fig. 2. Strict consensus tree of most parsimonious trees obtained from parsimony analysis of ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences of 32 isolates of the *Inonotus* and *Phellinus* complex group.

비하여 *Phellinus igniarius* 그룹과 상대적으로 더욱 가까운 유연관계를 가지는 것으로 확인되었다.

*Inonotus* sp.(32058, 6517, China-fruiting body, 9788, 26147, 50137) 균주의 ITS 부위의 염기서열을 정리하여 같은 그룹에 포함되어 있는 기존에 등록되어 있는 각종들과의 유사성을 비교해본 결과 Japan-32058 균주는 *P. baumii*와 91%, Japan 6517균주는 *P. linteus*와 93%의 상동성을 보이는 유사종으로, China-59는 *P. pini*와 99%, Japan 9788 균주는 *I. cuticularis*와 95%, KCTC 26147 균주는 *I. obliquus*와 96%, KACC 50137 균주는 *I. hispidus*와 95%의 상동성을 보이는 유사종으로 사료된다. 이외에 ITS 부위의 유전자 염기서열 분석을 통하여 일명 차가버섯으로 유통되고 있는 26136, Inogus, KP, NS, China-60

등 균주들은 *Inonotus*속내 종으로 사료되었으나 식약청으로부터 약용으로 허가된 *I. obliquus*와 유연관계가 가까운 유사종으로 사료된다.

하지만 본 연구에서 분석된 유연관계는 좀 더 다양한 방법, 예를 들면 ITS 와 달리 단백질 정보를 함유하고 있는 유전자의 염기서열 비교분석이나 AFLP 분석 등을 통해 확인되어야 할 것이다.

### 적 요

국내에 유통 중인 약용버섯의 분류체계 확립과 차가버섯 근연속간의 유연관계를 밝히기 위해 이들 버섯의 ITS 부위 염기서열을 비교 분석하였다. 조사결과, 약용

버섯으로 주로 시판되고 있는 국내유통균주는 총 6개의 속(*Phellinus*, *Inonotus*, *Sparassis*, *Fomes*, *Ganoderma*, *Hericium*)으로 나누어짐을 알 수 있었고 그 중에서 기존에 잘 알려진 상황버섯(*Phellinus linteus*)과 최근 들어 수입량이 급증하고 있는 차가버섯이 대부분을 차지하고 있는 것으로 확인되었다. 일명 차가버섯(*Inonotus obliquus*)으로 유통 중인 15개 제품 중 중국에서 수입되어진 한 균주(59번)가 *P. pini*로 확인되었으며 일본에서 수입되어진 균주(51, 52번)가 *P. baumii*와 *P. linteus*와 유사종 혹은 동일종으로 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 2004년도 식약청 연구과제 및 Brain Busan 21사업 지원 및 재외동포재단지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

김성윤, 이재운, 김기영, 이기원, 박제민, 김문옥, 이태호, 이재동,

2003. Phylotype에 의한 수종의 *Phellinus*속이 분류체계 확립 및 종간구별을 위한 신속동정법 개발. 한국균학회 **31**: 121-128.
- 이재동. 1998. 균학연구 제3판. 299-301.
- Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* **3**: 199-324.
- Kim, G. Y., Oh, W. K., Shin, B. C., Shin, Y. I., Park, Y. C., Ahn, S. C., Lee, J. D., Bae, Y. S., Kwak, J. Y. and Park, Y. M. 2004. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c+CD8+ DC and type I helper T cell-dominant immune state. *FEBS Lett.* **576**(3): 391-400.
- Tobias, W. and Michael, F. 2001. Natural groups and a revised system for the European poroid Hymenochaetales (basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycol.* **105**(7): 773-782.
- Tobias, W. and Michael, F. 2002. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycol.* **94**(6): 998-1016.