

약용버섯의 계통분류 및 국내유통 *Inonotus*속내 종간 구별을 위한 신속동정법 개발

김성윤^a · 정민정^{1,a} · 김기영² · 박재민 · 김문옥 · 문동오³ · 이태호 · 이재동^{*}

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹경상북도 산림환경연구소
²동의대학교 한의학임상연구센터, ³부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실

Phylogenetic analysis of the medicinal mushroom and taxonomical positions of their commercial products

Cheng-Yun Jin^a, Min-Jung Jeong^{1,a}, Gi-Young Kim², Jae-Min Park, Mun-Ok Kim,
Dong-Oh Moon³, Tae-Ho Lee and Jae-Dong Lee^{*}

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

¹Gyeongsangbuk-do Forest Environment Research Institute, baeban-dong, Gyeongju 780-936, Korea

²Clinical Research Center of Oriental Medicine, Donggeui University, Pusan 614-710, Korea

³Department Microbiology & Immunology, Pusan National University College of Medicine, Pusan 602-739, Korea

^{*}These two authors were equally contributed in this work.

ABSTRACT : The Aphyllporales is a large order containing about 2,000 known species. Many of these are the bracket and coral fungi. The vast majority of these fungi are saprophytic on the plant debris. Many species are significant in decomposing plant remains, as they are able to digest cellulose or lignin that occurs in plant cell walls. Many of these fungi have been involved in everyday human affairs. A few were used medicinally by the Greeks and Romans as a remedy for many complaints, including colic, fractured limbs and bruises. Other bracket fungi have been used as curry combs for horses, as snuff, as razor strops and as a source of dye for clothing. The texture of the basidiocarp may be similar to that of cork, wood, leather, paper, or cartilage. Unlike the basidiocarps of the Order Agaricales, the basidiocarps of the Aphyllporales are not fleshy and moist. Division of the members of the Aphyllporales into genera was originally made on the basis of gross morphology of the basidiocarp and hymenium and Donk(1964) recognizes 22 families in this order. The species and genus whose typical in Aphyllporales were listed in Table. with related information. The ITS region sequence of some genus were found by BLAST search. Sequences retrieved from GenBank were visually aligned by the program CLUSTAL G. As a result, the medicinal mushroom was separated in four groups. In this multiple alignment, the sequence analysis among *Fomes* group, *Inonotus* group and *Phellinus* group showed high genetic similarity except *Hericium* group and *Sparassis* group.

KEYWORDS : *Inonotus*, *Phellinus*, Medicinal mushroom, ITS and Phylogentic analysis

민주름버섯목(Aphyllporales)은 약 2,000의 균종을 포함하는 큰 목으로, 통상 "bracket fungi" 혹은 "coral fungi"로 불리는 균군이다. 대부분의 균종은 소위 말하는 목재부후균으로 식물체의 구성분인 셀룰로스나 리그닌의 분해능을 가지는 특징이 있으며 실험실에서의 배양은 비교적 용이하다.(Donk 등, 1964; 이재동, 1998).

최근 약용버섯에 대한 사람들의 관심이 높아지면서 기존에 연구되어진 상황버섯 외에도 기타 약용버섯들이 고가임에도 불구하고 소비가 급증하고 있는 실정이다. 이들 약용버섯은 국내산이 소부분을 차지한 반면, 대부분은 중국, 러시아, 북한 및 동남아시아로부터 저가로 수입되어 고가로 시판되고 있다. 주로 자작나무버섯(*Inonotus obliquus*),

말굽버섯(*Fomes fomentarius*), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 및 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*) 등의 약용버섯들이 주로 수입되고 있다.

차가버섯은 barren flower (종자번식을 할 수 없는 식물) 종류로서 포자로 번식되지 않고 자작나무에 침투한 바이러스가 자작나무와 싸우면서 생겨나는 특이한 생명체이며 시베리아 등 혹한 지역의 살아있는 자작나무에서 자생하는 매우 독특한 버섯이다. 구소련의 폐쇄정책으로 러시아 내에서만 사용되던 차가버섯이 세계에 알려지게 된 것은 노벨 문학상으로 유명한 구소련 반체제 작가 알렉산드로 솔제니친 (Aleksandr Isayevich Solzhenitsyn) 의 자전적 소설 "암병동(癌病棟, Rakovy korpus)"에 의해서입니다. "암병동"은 현재도 우리나라 3~4개 출판사로부터 번역본이 출간되어지고 있다. 그리고 차가버섯에 대한 본격적인

*Corresponding author: <leejd@pusan.ac.kr>

연구는 1951년 소련 과학아카데미 산하 V. L. 코마로프 식물학연구소와 약제연구소에서 시작되었다.

현재 약용으로 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려진 자작나무버섯(차가버섯)의 학명에 대해 일본에서는 *Fuscoporia oblique*로 명명하였고, 러시아와 핀란드에서는 *I. obliquus*라고 명명하였다. 그러나, 1980년대 이후 학술 교류가 진전되면서 동일종을 임에도 불구하고 두개의 학명이 존재한다는 사실이 밝혀지면서 국제관례에 따라 먼저 등록한 *I. obliquus*를 사용하게 되었다. 최근의 연구에 의하면 현재 국내에서 자작나무버섯으로 수입되어 시판되고 있는 균주들로는 *I. obliquus*외에 이와 형태학적으로 아주 유사하지만 아직 약효나 독성에 대해 확인된바가 없는 *I. mikadoi*, *I. dryophilus*, *I. hispidus* 등의 종들도 함께 유통되고 있는 실정이다(김 등, 2003).

이외에도 말굽버섯(*F. fomentarius*) 꽃송이버섯(*S. crispa*), 노루궁뎅이버섯(*H. erinaceum*)을 포함한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 등의 약용버섯 및 유사종들이 외국으로부터 수입되어 미 동 정상 상태에서 시판되고 있었으며 특히 이들 약용버섯 중 검은자작나무버섯(*I. obliquus*)이 대부분을 차지하고 있었다. 기존의 연구에 의하면 국내에서 재배되고 있는 균종이나 수입되어 유통되고 있는 이들 약용버섯들은 형태학적으로 유사할 뿐만 아니라, 환경조건 및 재배조건에 따라서 다양한 형태의 자실체를 형성하고 있으므로 상호간의 구별이 용이하지 않다(김 등, 2003; 정 등, 1994). 또한 이들 균종간의 계통분류학적인 연구는 전무후무한 상태이며, 약용버섯에 대한 신속동정용 유전자 탐침개발 또한 전혀 이루어지지 않고 있다.

이러한 보고를 바탕으로 본 연구에서는 현재 국내에서 유통되고 있는 이들 약용버섯이 판매단계에서 상황버섯과 같은 한약재의 진위에 대한 중구별 문제 발생이 우려되므로 먼저 이들 약용버섯들의 정확한 계통분류학적인 유연관계를 확립을 위해 ribosomal DNA(rDNA)의 Internal Transcribed Spacer(ITS)영역에 대한 염기서열을 분석하여 상호간에 진화적 유연관계를 분석하였고, *I. obliquus* 특이적인 유전자 탐침 개발에 초점을 두고 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

본 실험에 사용되어진 표준종은 American Type Culture Collection, (ATCC), Korean Collection for Type Culture (KCTC), Mycological lab. of Pusan National University (MPNU), Korea Food & Drug Administration (KFDA) 등에서 분양을 받아 사용하였으며, 일부 균주는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank database에 등록된 ITS

염기서열을 사용하였다. 또한 현재 국내재래시장 및 농가 재배사에 유통 중인 국내산, 중국산, 일본산 및 기타 외국산 등의 자실체버섯을 수집하여 사용하였다(Table 1).

배양조건

균주의 복원을 위하여 Potato Dextrose Agar (PDA) 배지에 삼점배양을 하고 25°C 암실에서 3일에서 일주일간 배양하여 오염의 여부를 확인하였다. 순수배양이 완료되면 PDA 사면배지에 균을 접종하여 25°C에서 15일간 배양 후 4°C에 보관하고 일부는 유동과라핀을 사용하여 보관균주를 만들고 -70°C에서 반영구적으로 보존하였다.

DNA 추출

PDA 배지에 배양한 배양물을 Whatman No.1 filter paper로 여과한 후 TE buffer(10 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8.0)로 세척하였다. DNA 추출은 QLAGEN사의 DNeasy Plant Mini kit 제품을 제조사의 설명에 따라 사용하였다. 간략히 설명하면 균체 0.1 g에 Plant Lysis Buffer 400 μ l와 Proteinase K를 20 μ l를 넣고 60°C에서 10분간 방치한 후 400 μ l의 Binding Buffer를 넣고 12000 rpm에서 원심분리하였다. 상등 액을 새 tube로 옮긴 후 Isopropanol 100 μ l를 넣고 binding column이 결합된 2 ml collection tube에 넣고 원심분리하였다. Binding column을 두 차례에 걸쳐 새 collection tube로 옮긴 후 W1(washer Buffer 1) 500 μ l와 W2(washer Buffer 2) 500 μ l를 넣고 원심분리하였다. Binding column을 새 1.5 ml collection tube로 옮긴 후 Elution Buffer 50 μ l를 넣어 원심 분리해서 DNA를 모은 후 1% agarose gel에서 전개하였다.

PCR증폭

rDNA의 ITS영역을 증폭하기 위한 primer는 White 등(1990)이 제시한 것을 사용하였으며, 각 primer의 sequence 및 부착부위는 Fig. 1에 나타내었다. 분리한 DNA로부터 ITS1과 5.8S 그리고 ITS2 부분을 증폭하기

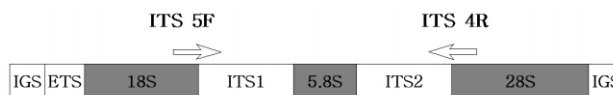


Fig. 1. A structure of rDNA cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS regions used in this study.

ITS5F (forward primer): 5'-GGA-AGT-AAA-AGT-GGT-AAC-AA-3' (20 mers)

ITS4R (reverse primer): 5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-T AT-GC-3' (20 mers)

ITS: Internal Transcribed Spacers

IGS: Intergenic Spacer

ETS: External Transcribed Spacer

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

Number	Strains or Geographical origin	Species or product Type	Accession no. (ITS)
1	Desjardin 7410	<i>Sparassis cystidiosa</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>	AY218441
5	YCD 2145	<i>Sparassis crispa</i>	AY218423
6	Isolate 1111	<i>Inonotus radiatus</i>	AY354217
7	ASI 74010	<i>Inonotus obliquus</i>	AY251310
8	ASI 74005	<i>Inonotus hispidus</i>	AY251309
9	Taxon 119081	<i>Inonotus rheades</i>	AY237731
10	Taxon 120825	<i>Inonotus glomeratus</i>	AF247968
11	Taxon 119080	<i>Inonotus radiatus</i>	AF237732
12	Taxon 119079	<i>Inonotus cuticularis</i>	AF237730
13	Taxon 119082	<i>Inonotus tomentosus</i>	AF237729
14	Taxon 119078	<i>Inonotus circinatus</i>	AF237728
15	Isolate 2213	<i>Inonotus rickii</i>	AY072028
16	Isolate 0193	<i>Inonotus quercustris</i>	AY072027
17	Isolate 0013	<i>Inonotus rickii</i>	AY072026
18	Isolate 2339	<i>Inonotus patouillardii</i>	AY072024
19	Taxon 91752	<i>Hericium erinaceum</i>	AB084622
20	Taxon 91752	<i>Hericium erinaceum</i>	AF397469
21	ATCC 52480	<i>Hericium erinaceum</i>	AF287981
22	Taxon 91752	<i>Hericium erinaceum</i>	AB084623
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	Taxon 48001	<i>Hericium erinaceum</i>	AY534587
28	Taxon 48002	<i>Hericium erinaceum</i>	AF146779
29	Taxon 40442	<i>Fomes fomentarius</i>	AY354213
30	Isolate 8246	<i>Fomes fomentarius</i> (Fruiting-body)	-
31	Japan 1112	<i>Fomes fomentarius</i> (Fruiting-body)	-
32	KFDA P019	<i>Phellinus pini</i>	AF436619
33	KFDA P017	<i>Phellinus pini</i>	AF436620
34	KFDA P020	<i>Phellinus pini</i>	AF436621
35	KFDA P023	<i>Phellinus pini</i>	AF436622
36	KFDA P015	<i>Phellinus baumii</i>	AF436623
37	KFDA P022	<i>Phellinus baumii</i>	AF436624
38	KFDA P029	<i>Phellinus baumii</i>	AF436625
39	KFDA P016	<i>Phellinus linteus</i>	AF436626
40	ATCC 26710	<i>Phellinus linteus</i>	AF153010
41	KFDA P021	<i>Phellinus igniarius</i>	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	Mycelium	-
46	KCTC 26152	Mycelium	-
47	KCTC 26136	Mycelium	-
48	KACC 50137	Mycelium	-
49	CBS 32090	Mycelium	-
50	CBS 32086	Mycelium	-
51	Japan 32058	Powder	-
52	Japan 6517	Powder	-
53	Japan 9352	Powder	-
54	Japan 9788	Powder	-
55	KCTC 6646	pill	-
56	Korea PROPOLIS	Fruiting-body	-
57	Nam san young nong	Fruiting-body	-
58	INOGUS	Fruiting-body	-
59	China	Fruiting-body	-
60	China	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)

위해서 Bioneer사에서 구입한 20 μ l 용 PCR premix를 사용하였으며, 증폭을 위한 DNA농도는 40 ng으로 조절하였다. 반응용액은 PCR premix에 DNA 1 μ l, forward primer (20 pM) 1 μ l, reverse primer (20 pM) 1 μ l, 3차 증류수 17 μ l를 넣어 섞은 후 10초간 원심분리를 하여 mineral oil 20 μ l를 첨가하였다. 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 cycle 돌린 후, 72°C에서 5분 동안 post extension한 후 4°C로 유지하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 100 volt로 전개한 후 ethidium bromide (EtBr) 에서 15분간 염색하여, UV transilluminator lamp상에서 밴드를 관찰하였다.

PCR 산물 정제

PCR에서 증폭된 DNA를 Agarose gel에서 확인하고 gel 을 오려낸 후 QX1 (QIAEX 1) Buffer와 QX2 (QIAEX 2) Buffer를 넣고 50°C에서 10분간 gel을 녹였다. 녹인 시료를 원심분리하여 상등액을 제거한 후 PE Buffer를 넣고 재차 원심분리하여 건조시켰다. 건조된 시료에 200 μ l 3차 증류수를 넣어 원심분리하고 여기에 3 M sodium acetate 와 absolute 에탄올을 넣은 후 -70°C 혹은 -20°C에서 1 시간 방치해서 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 시료에 70% 에탄올을 넣고 원심분리하여 상등액을 따라낸 후 건조시키고 멸균된 3차 증류수를 넣어 녹여서 sequencing용 시료로 사용하였다.

염기서열 분석

Big dye PCR은 forward와 reverse 두 방향으로 하였다. 200 μ l PCR tube에 Big dye (Applied biosys-tems. USA) 4 μ l, DNA시료 5 μ l, 5 pmol primer 1 μ l를 넣고 10 μ l로 PCR 하였다. PCR시 조건은 pre-denaturation을 96°C에서 2초; denaturation을 96°C에서 10초; annealing을 50°C에서 5초로 하여 25회 반복한 후 extension을 60°C에서 4분간 Big dye PCR을 진행하였다. Big dye PCR된 시료를 새 1.5 ml tube에 담아 NaOAc와 95% 에탄올을 넣어 침전시키고 원심 분리한 후 상등 액을 제거하고 건조시켰다. 건조된 시료에 TSR Buffer를 넣어 녹여낸 후 single strand 로 만들고 실험전까지 보관하였다. Sequencing반응은 제조사가 제공한 protocols에 따라 AmpliTaq DNA polymerase가 포함된 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 상용한 MJ Research Gradient Cycler에서 행해졌다. 각각의 정제된 PCR product들을 대상으로 single-pass sequencing을 하였으며, fluorescent-labeled fragment들은 에탄올-침전법에 따라 unincorporated terminators로부터 정제되었다. 이러한 시료들은 ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 각 시료

에 대해 ITS5F (forward) 와 ITS4R (reverse) 의 두 primer를 사용하여 염기서열을 분석하였고, 최종 결과를 비교하였다.

유연관계 분석

각 균주의 결정된 염기서열을 Clustal X multiple alignment 를 시행하여 비교하였고, Neighbor-Joining 과 most parsimonious analysis 법을 이용하여 tree를 그렸다 (Tobias 등, 2001; Tobias 등, 2002).

결과 및 고찰

rDNA 염기서열 비교분석

NCBI에 등록되어 있는 공시균주와 전국각지로부터 수집한 외국인산 국내유통약용버섯중에서 중요한 속 및 대표적인 종들에 대하여 ITS1, 5.8S rDNA, 및 ITS2부위의 염기서열을 분석한 후 alignment를 수행하였다. 이 ITS 영역의 PCR 산물 크기는 500~600base 정도로 각 염기서열들의 앞부분에 존재하는 ITS1 부위에서는 종간 변이율이 높았으며, 5.8S rDNA 부위에서는 모든 대상에서 거의 같은 상동성을 나타내어 종간 변이율이 매우 낮았다. 또한 ITS2 부위에서도 많은 염기서열상의 차이를 보이고 있으나 ITS1부위보다는 변이율이 높지 않았으며 특히 같은 속내에서도 ITS1부위가 ITS2부위보다 변이율이 높은 것으로 확인되었다. 이상의 결과는 보존성이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 그리고 변이가 심한 부분이 공존하고 있는 염기서열 중에서 ITS1부위가 속 및 종간의 유연관계의 해석 및 종특이적인 probe의 디자인이 유용할 것으로 판단되었다.

국내 약용버섯의 계통분류학적 유연관계 분석

기존에 등록되어 있는 공시균주와 전국 각지에서 수집한 국내에서 약용버섯으로 주로 유통하고 있는 *Phellinus*속, *Inonotus*속, *Hericium*속, *Sparassis*속, *Fomes*속의 60균주에 대한 염기서열을 결정하여 alignment를 수행한 후 Neighbor-Joining phylogenetic tree를 그려 확인해 본 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 국내유통약용버섯은 2개의 큰 그룹 A와 B로 나누어짐을 알 수 있었다. Fig. 2 "A"에는 *Inonotus* sp group: <*I. rickii* (15,17), *I. patouillardii*, *I. quercustris*, *I. cuticularis*, *Inonotus* sp. (japan 9788-mycelium), *Inonotus* sp. (KCTC 26136-mycelium), *Inonotus* sp. (inogus), *Inonotus* sp. (Korea propolis), *Inonotus* sp. (nam san), *Inonotus* sp. (china), *Inonotus* sp. (KCTC 26147-mycelium) and *I. obliquus*>과 *P. baumii* group: <*P. baumii* (36,37,38) and *I. sp* (japan 32058-mycelium)> 그리고 *P. linteus* group: <*P. linteus* (39,40), *Inonotus* sp. (japan 6517-mycelium) and *I. glomeratus*>이외에 *P. igniarius* group: <*P. igniarius*, *I.*

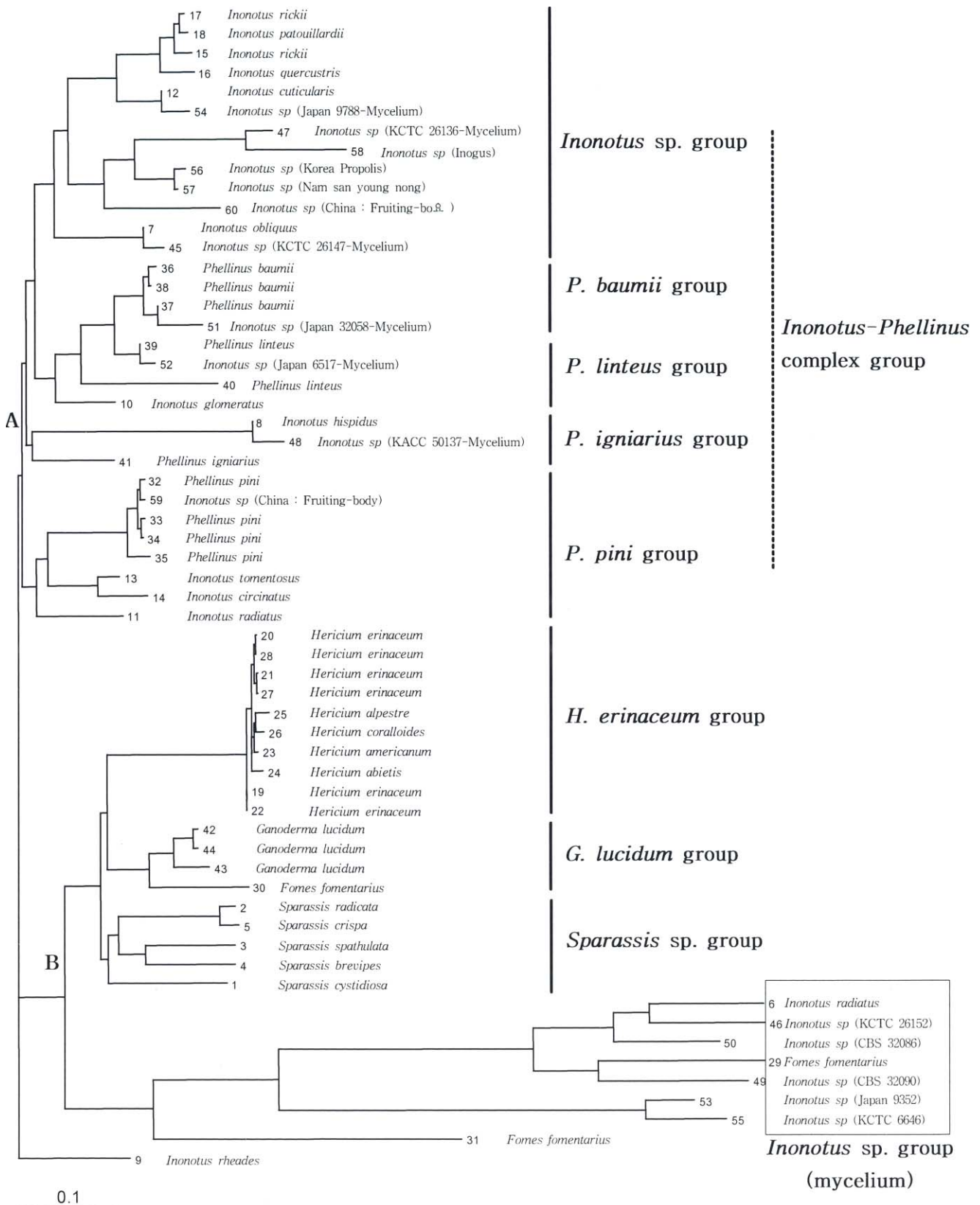


Fig. 2. Phylogram obtained by neighbour joining analysis of ITS1, 2 and 5.8S rDNA sequences of 60 taxa of the Medical mushroom species. Phylograms were generated from 1,000 bootstrap replications from data recorded as described in Materials and Methods. Clusters A and B proposed generic designations are explained in the text.

sp (KACC 50137-mycelium) and *I. hispidus* 및 *P. 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. 그중에서 *P. baumii*와 *P. pini* group은 비교적 정확한 자기들만의 그룹을 형성하는 것을 알 수 있었지만 *P. linteus*와 *P. igniarius* 및 *Inonotus*속내 종들은 계통분류학적인 유연관계가 아주 가까운 complex group 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Fig. 2 "B"에는 *Hericium*그룹과 *Ganoderma*그룹 및 *Sparassis*그룹과 국내 유통중인 *Inonotus mycelium* 그룹 그리고 *Fomes*그룹 등 역시 5개의 작은 그룹으로 나누어짐을 확인하였다. 그중 국내 유통중인 *Inonotus mycelium* 그룹은 *Inonotus sp. group*과는 유연관계가 먼 것으로 나타난 반면, group B와 유연관계가 아주 가까운 것으로 확인되었다. 본 연구에 인용되어진 NCBI에 등록되어 있는 총 43개 균주 중 *I. rheades*(AY237731)와 *I. radiatus*(AY354217) 등 두 균주는 *Inonotus*그룹과 아주 먼 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다. 이외에 등록되어 있는 *F. fomentarius*(AY354213)는 같은 과에 포함되어 있

는 *Ganoderma*속과 78%의 상동성을 나타내는 것으로 보아 유연관계가 아주 먼 반면에 본 연구의 조사에 의하여 수집된 30번 균주 *F. fomentarius*는 *Ganoderma*속과 92% 상동성의 유연관계 양상을 나타내는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터 미루어 볼 때 *I. rheades*(AY237731)와 *I. radiatus*(AY354217) 및 *F. fomentarius*(AY354213)는 분류시 오류가 있었던 것으로 사료되며 본 실험에서 조사되어진 30번 균주 *F. fomentarius*가 정확한 말굽버섯인 것으로 사료된다. 이외에 *Inonotus mycelium group*은 차가버섯속내 종들과 유사한 다른 종으로 사료된다.

시판 *Inonotus*의 분류학적 위치

시판 *Inonotus*의 분류학적 위치 및 *Phellinus*속과의 정확한 계통발생학적인 유연관계 분석을 위하여 Fig. 2 "A"에서 나타난 Complex group에 대한 염기서열을 결정하여 alignment를 수행한 후 most parsimonious phylogenetic tree를 그려 이들 사이의 유연관계를 확인해 본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 *Phellinus*속과 *Inonotus*속 역시 2개의 큰 그룹 A와 B로 나

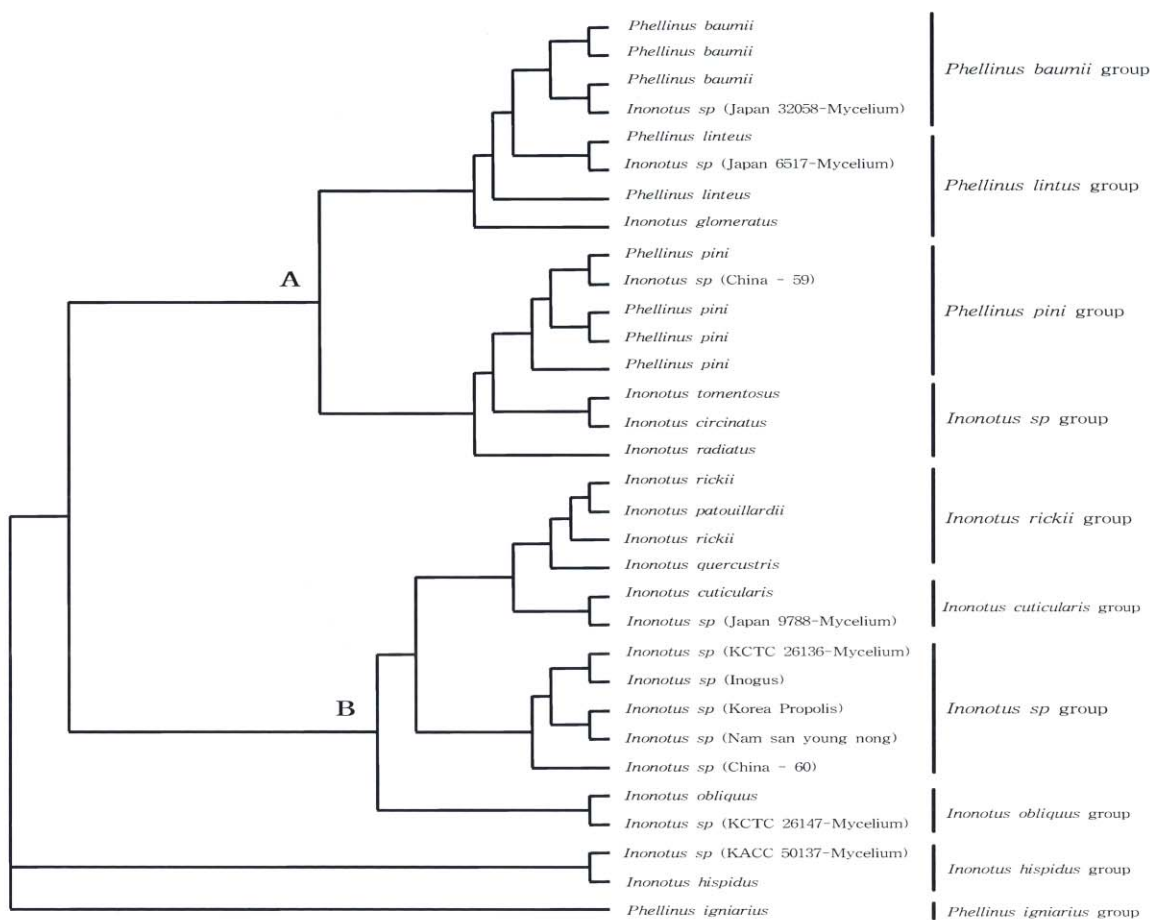


Fig. 3. Strict consensus tree of most parsimonious trees obtained from parsimony analysis of ITS1,2 and 5.8S rDNA sequences of 32 taxa of the *Inonotus* and *Phellinus* complex group. Clusters A and B proposed generic designations are explained in the text.

누어짐을 알 수 있었다.

Fig. 3 "A"는 2개의 작은 *P. baumii*와 *P. linteus* 그룹으로 다시 나누어 짐을 알 수 있었고 *P. baumii* group에는 *Inonotus* sp. (Japan 32058-mycelium) 균주가 함께 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 그리고 *P. linteus* group에는 *Inonotus* sp. (Japan 6517-mycelium) 균주와 NCBI에 등록되어 있는 *I. glomeratus*가 함께 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 이외에 *P. pini* group에는 *Inonotus* sp. (China : Fruiting-body) 균주가 함께 포함되어 있는 것으로 확인되었으며 NCBI에 등록되어 있는 *I. tomentosus*와 *I. circinatus* 및 *I. radiatus*는 *P. pini* group과 94%의 상동성을 나타내어 유사종으로 확인되었다.

Fig. 3 "B"는 3개의 작은 그룹으로 나누어짐을 알 수 있었고 대부분의 국내에서 일명 차가버섯으로 유통하고 있는 균주는 그룹B에 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 그중 *Inonotus* sp. (Japan 9788-mycelium) 균주는 *I. cuticularis*와 96%의 상동성을 나타내었고 *Inonotus* sp. (KCTC 26147-mycelium) 균주는 *I. obliquus*와 98%의 상동성을 나타내어 동일종으로 사료 되었다. 그리고 *Inonotus* sp. (KCTC 26136, Inogus, Propolis, Nam san, China) 등 균주는 *Inonotus* sp. (KCTC 26147) 균주에 비하여 *I. obliquus* 그룹과 상대적으로 먼 유연관계(81%)를 나타내는 것으로 확인되었다. 이외에 *Inonotus* sp. (KACC 50137) 균주는 *I. hispidus*와 92%의 상동성을 나타내었으며 이 두 균주는 *Inonotus*속에 비하여 *P. igniarius* 그룹과 상대적으로 더욱 가까운 유연관계를 가지는 것으로 확인되었다.

종 특이적인 유전자 탐침의 개발 및 검증

본 연구에서는 최종적으로 공시균주의 ITS염기서열을 이용하여 *I. obliquus*에 대한 종 특이적인 유전자탐침을 개발하였으며, 이들의 명칭, 염기서열, 예상되어지는 길이를 Table 2에 나타내었고, 종 특이적인 유전자 탐침의 검증 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Table. 2에 나타낸 바와 같이 *I. obliquus*에 대하여 디자인 한 특이유전자탐침의 명칭을 forward primer는 IOF1,2로 reverse primer는 IOR1,2로

Table 2. Combination of primer set for PCR amplification

species name	Primer name	Expected Product Size (bp)
<i>I. obliquus</i>	IOF1-IOR1	366
	IOF1-IOR2	452
	IOF2-IOR1	615
	IOF2-IOR2	462

IOF1 : 5'-AAA-GAG-TCG-GAG-GTC-AGT-AGC-C-3'
 IOF2 : 5'-GAA-CTG-CTT-GTA-GTA-TGT-CC-3'

IOR1 : 5'-CCA-CTA-CTC-CAT-TCG-GTC-AAG-3'
 IOR2 : 5'-GCG-TCT-TAG-TGA-AAC-GAA-TAT-3'

명명하였다. 그리고 디자인한 유전자탐침들의 예상되어지는 PCR산물의 길이는 IOF2-IOR1이 615bp로 제일 길었고 IOF2-IOR2와 IOF1-IOR2 및 IOF1-IOR1이 각각 462bp, 452bp, 366bp로 상대적으로 짧았다.

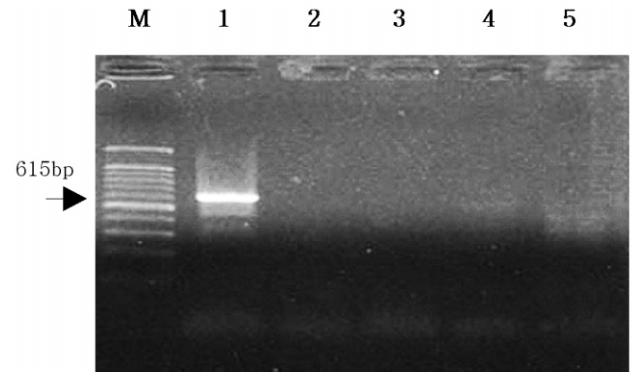


Fig. 4. PCR products using the species-specific of ITS sequences regions (IOF2-IOR1).

M; size marker 1. *I. obliquus* 2. *I. hispidus*
 3. *I. radiatus* 4. *I. quercustris* 5. *I. rickii*

Fig. 4에서 나타난 바와 같이 primer IOF2-IOR1을 이용하여 PCR을 진행해 본 결과 *I. obliquus*에 대하여 종 특이적으로 결합하였으며 PCR 산물은 정확히 615bp 부위에서 확인되었다. 반면 IOF2-IOR2와 IOF1-IOR2 및 IOF1-IOR1 등 기타 탐침자를 이용하여 확인해본 결과 모두 종 특이적으로 결합하지 않았다.

적 요

국내유통약용버섯의 분류체계를 확립하고 이들 속 및 종간의 유연관계확립을 위하여 계통학적 정보를 지니고 있는 ITS부위의 염기서열을 밝히고 ITS1과 ITS2부위의 다양한 염기서열을 이용하여 분류학적 위치를 확립하였고, 시판 *I. obliquus* 종의 진위여부와 계통분류학적인 유연관계 확립 및 종 특이적인 유전자 탐침을 개발하였다. 본 연구의 조사결과에 의하면, 약용버섯으로 주로 시판되고 있는 국내유통균주는 총 6개의 속(*Phellinus*, *Inonotus*, *Sparassis*, *Fomes*, *Ganoderma*, *Hericium*)으로 나누어짐을 알 수 있었고 그 중에서 기존에 잘 알려진 상황버섯과 최근 들어 수입량이 급증하고 있는 차가버섯이 대부분을 차지하고 있는 것으로 확인되었다. 본 연구에 사용되어진 일명 차가버섯으로 유통 중인 15개 제품 중 중국에서 수입되어진 59번 균주가 *P. pini*로 확인되었으며 일본에서 수입되어진 51, 52번 균주가 *P. baumii*와 *P. linteus*와 유사종 혹은 동일종으로 확인되었다. 한편 *I. rheades*(AY237731)와 *I. radiatus*(AY354217) 및 *F. fomentarius*(AY354213)는 NCBI 등록 시 문제점이 있는 것으로 사료되며 본 실험

에서 조사되어진 30번 균주 *F. fomentarius*가 정확한 말굽버섯인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 Brain Busan 21사업 지원과 재외동포재단지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 김성윤, 이재윤, 김기영, 이기원, 박재민, 김문옥, 이태호, 이재동. 2003. Phylotype에 의한 수종의 *Phellinus*속이 분류체계 확립 및 종간구별을 위한 신속동정법 개발. 한국균학회. 31: 121-128.
- 배만중, 박무희, 이재성. 1996. 고등균류 균사체의 면역조절 가능성에 관한 연구. 한국균학회 24: 142-148.
- 이재동. 1998. 균학연구 제3판. 299-301.
- 정원진, 정학성. 1994. 미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 진흙버섯류의 계통분류. 한국미생물학회 32: 442-448.
- Annette, K., Li, Y., Szaro, T. and Bruns, T. D. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato : Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* 88: 776-785.
- Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun, M. Y. and Rhee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among *Pliurotus* species inferred from sequence data of PCR amplified ITS II region in ribosomal DNA. *Kor. J. Mycol.* 24: 155-165.
- Daniel, W., Munch, J. C., Botton, B. and Buscot, F. 1996. DNA polymorphism in Morels : Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella comica* (black morel). *Appl. Env. Microbiol.* 62: 3541-3543.
- Donk, M. A. 1964. A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia* 3: 199-324.
- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1986. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59: 155-157.
- Jong, S. C., Birmingham, J. M. and Pai, S. H. 1991. Immunomodulatory substances of fungi origin. *J. Immunol. Immunopharmacol.* 11: 115-122.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Immunostimulating activity and characterization of polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 213-218.
- Moncalvo, J. M., Wang, H. H. and Hseu, R. S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.
- Morton, A., Carder, J. H. and Barbara, D. G. 1995. Sequences of the internal transcribed spacers of the ribosomal RNA gene and relationships between isolates of *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathol.* 44: 183-190.
- O'Donnell K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum*. *Curr. Genet.* 22: 213-220.
- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C. F., Fukuoka, F. and Nakanishim, M. 1968. Antitumor studies on some extracts of basidiomycetes. *Gann.* 59: 159-161.