

하나의 나무에서 채집된 자작나무버섯의 균주간 유전적 동일성 확인

가강현* · 장지연 · 류성렬 · 윤갑희 · 박원철

국립산림과학원 화학미생물과

Confirmation of Genetic Homogeneity among Wild Strains of *Piptoporus betulinus* Collected from a Single Tree

Kang-Hyeon Ka*, Ji-Youn Chang, Sung-Ryul Ryu, Kab-Hee Yoon and Won-Chull Bak

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

(Received May 9, 2008. Accepted June 24, 2008)

ABSTRACT: Four strains of *Piptoporus betulinus* were isolated from a trunk of the *Betula ermani* in Seorak mountain. These strains were studied to observe whether they are originated from the same genet or not, by using the method of pairing culture between strains and by comparing part of the nuclear rDNA of ITS regions amplified with NS11 and ITS4B primers. The demarcation line was not formed on the potato dextrose agar plates in the combinations of two different strains. Partial nuclear rDNA sequences of the four strains were also the same. As a result, it is considered in high probability that they are derived from a single spawn.

KEYWORDS: *Betula ermani*, Genetic Homogeneity, ITS, *Piptoporus betulinus*

자작나무버섯(*Piptoporus betulinus*(Bull.) P. Karst.)은 갈색부후균으로 기주특이성이 매우 강하며 약한 기생성을 가진 종으로 알려져 있다(Schmidt, 2006). 이 버섯은 우리나라를 비롯하여 일본, 중국, 북아메리카, 유럽 등 전세계적으로 분포하며, 구멍장이버섯목(Polyporales)의 잔나비버섯과 자작나무버섯 속에 속하는 종이다(Kirk *et al.*, 2001). 우리나라는 이 속에 속하는 종이 한 종밖에 보고되어 있지 않으나, 세계적으로 자작나무버섯 속에는 19종 2개 form이 알려져 있다(www.indexfungorum.org).

자작나무버섯에 대한 우리나라의 기록은 거의 없는 상황이나(Lee, 1973), 북한에서는 이 버섯을 붓나무송편버섯이라고 부르며 백두산, 삼지연, 송진산, 칠보산, 오가산에서 죽은 자작나무 줄기와 가지에서 발생하는 것으로 알려져 있다(윤과 현, 1989).

최근에는 이 버섯에 대한 목질셀룰로오스 분해효소 평가(Valášková and Baldrian, 2006), 항생물질(Schlegel *et al.*, 2000), 항염증(Kamo *et al.*, 2003), 휘발성물질(Rösecke *et al.*, 2000) 등과 같은 부후균에 대한 기초연구와 약리적 활용 가능성 평가 연구가 이루어지고 있다.

자연상태에서 한 나무 혹은 한 지역에서 동일 버섯이 여러 개 발생하였을 때, 이들 버섯들 간에 유전자의 동일성 유무 판별은 매우 흥미로운 일이다. 이와 같은 접근법으로 뿔나무버섯류에서는 대치배양(Worrall *et al.*, 2004;

Bendel *et al.*, 2006)과 microsatellite 마커 분석(Worrall *et al.*, 2004)과 표고에서는 미토콘드리아 DNA 분석이 이루어졌다(Fukuda and Mori, 2003).

본 연구는 우리나라의 설악산에서 발견된 자작나무버섯이 하나의 사스레나무(*Betula ermani* Cham.)에 4개의 자실체가 발생하여 이들 버섯 간에 유전자원의 차이 유무를 대치배양 및 ribosomal DNA의 ITS 영역 일부의 염기서열 차이를 가지고 판별해보고자 하였다.

재료 및 방법

자작나무버섯 채취 및 균분리

자작나무버섯 자실체는 2006년 1월 12일 설악산의 용대리 쪽 중봉으로 오르는 계곡(해발 1,000 m, 북동사면)의 죽은 사스레나무(*B. ermani*)에서 채집되었다. 버섯 A와 B 그리고 버섯 C와 D는 인접해 있었고 이들 간에는 약 50 cm 정도 떨어져 위치해 있었다. 채집한 버섯은 실

Table 1. Sizes of fruiting bodies of *Piptoporus belutinus*

Position	Weight (g)	Pileus		
		Length (cm)	Width (cm)	Hight (cm)
A	144.1	10.5	13.5	9
B	81.9	10.5	13.5	4
C	108.1	11.5	17.5	4.5
D	92.8	10.5	16	5.5

*Corresponding author <E-mail : kalichen@yahoo.co.kr>



Fig. 1. Position of fruiting bodies of *Piptoporus belutinus* on a *Betula ermani* tree.

험실에서 상온 보관하면서 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 균을 분리하였다(Table 1, Fig. 1).

분리된 4개 균주는 PDA 배지상 25°C에서 균사생장을 3반복 측정하였다. 그리고 각각 분리된 균주들은 PDA 배지상에서 1개월간 대치배양을 통해 균주 간의 동질성 여부를 파악하였다.

DNA 분리 및 PCR

DNA 분리. 균주들은 potato dextrose broth(PDB) 배지에서 1주일 배양한 후, 균사체는 -70°C에서 동결하였다. DNA 분리는 extraction buffer(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS) 300 μ l를 넣어 pestle을 이용해 세포를 깨 주었다. 원심분리를 통해 상등액을 취한 후, phenol/chloroform(1 : 1) 넣고 혼합한뒤 13,000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 13,000 rpm에서 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA 침전물을 세척하여 진공건조한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCL, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) 20 μ l에 용해하였다. 10 mg/ml RNase 2 μ l를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 RNA를 제거하였다. DNA 함량을 spectrophotometer의 260 nm의 파장에서 측정하였다.

PCR 증폭 및 Sequence alignment

각각의 균사체로부터 분리한 DNA는 rDNA의 ITS(Internal Transcribed Spacers)영역을 증폭하기 위하여 Primer NSII(5'-GATTGAATGGCTTAGTGAGG-3')과 ITS4B(5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3')를 pair로 사용하였다(Martin and Rygiewicz, 1999; Gardes and Bruns, 1993). PCR 반응은 QIAGEN 사의 Kit를 이용하였다. 반응조건은 94°C에서 2분간 pre-heating시킨 다음, 94°C에

서 1분간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 30 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 10분 동안 post extension하고 4°C로 유지하였다. 증폭된 DNA를 0.8% agarose gel에서 확인한 후 gel extraction kit(Bioneer)를 이용하여 증폭 DNA band를 gel로부터 추출하여 (주)바이오닉스에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 균주간의 염기서열 차이 분석은 ClustalW 분석 프로그램(www.ebi.ac.uk/clustalw)을 이용하였다.

결과 및 고찰

자작나무버섯 균주의 성장조사와 균주간 대치배양

자작나무버섯은 버섯조직으로부터 PDA 배지상에서 1주일 안에 균사분리가 가능하였다. 균사는 매우 빠르게 자라는 것으로 나타났다(Fig. 2). 4가지 균주간 PDA 배지상에서 대치배양시 모두 대치선이 나타나지 않았다(Fig. 3).

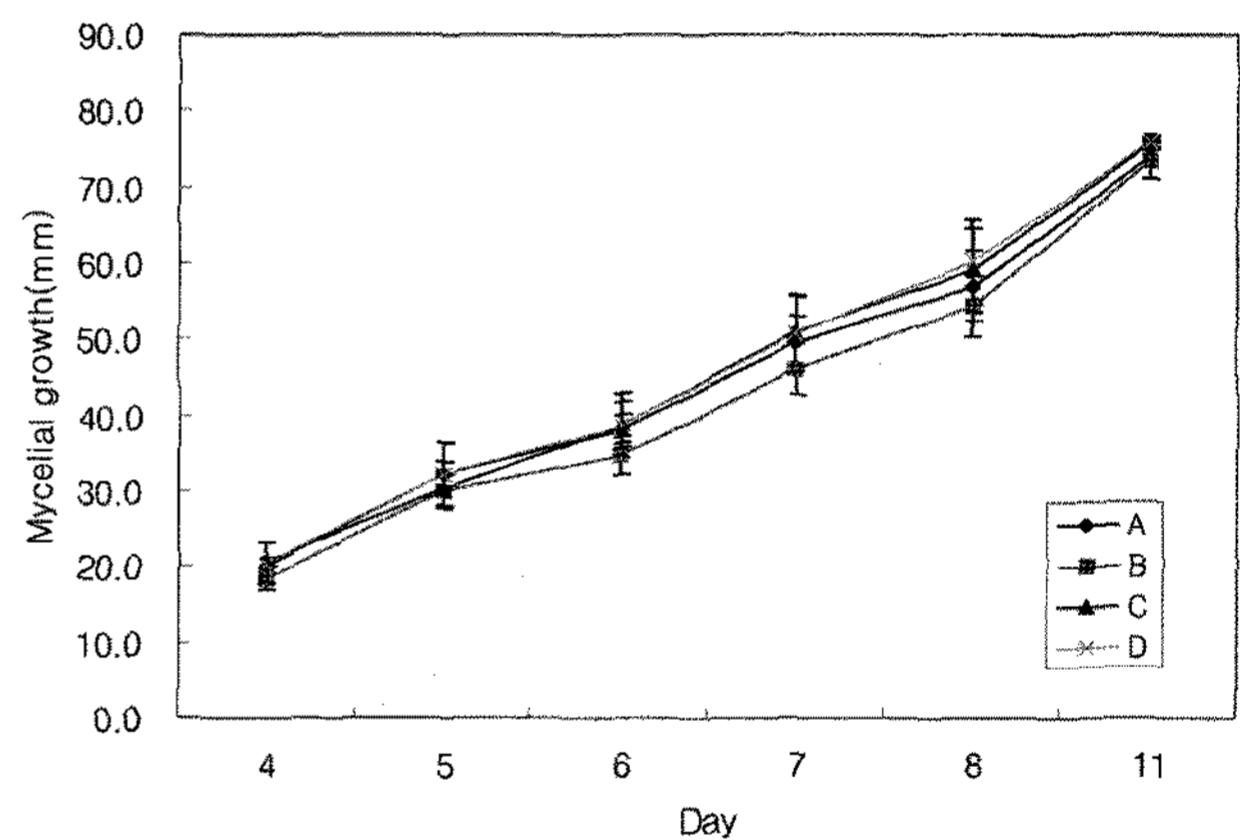


Fig. 2. Mycelial growth of four strains of *P. belutinus* on PDA plate for 11 days at 25°C incubator.

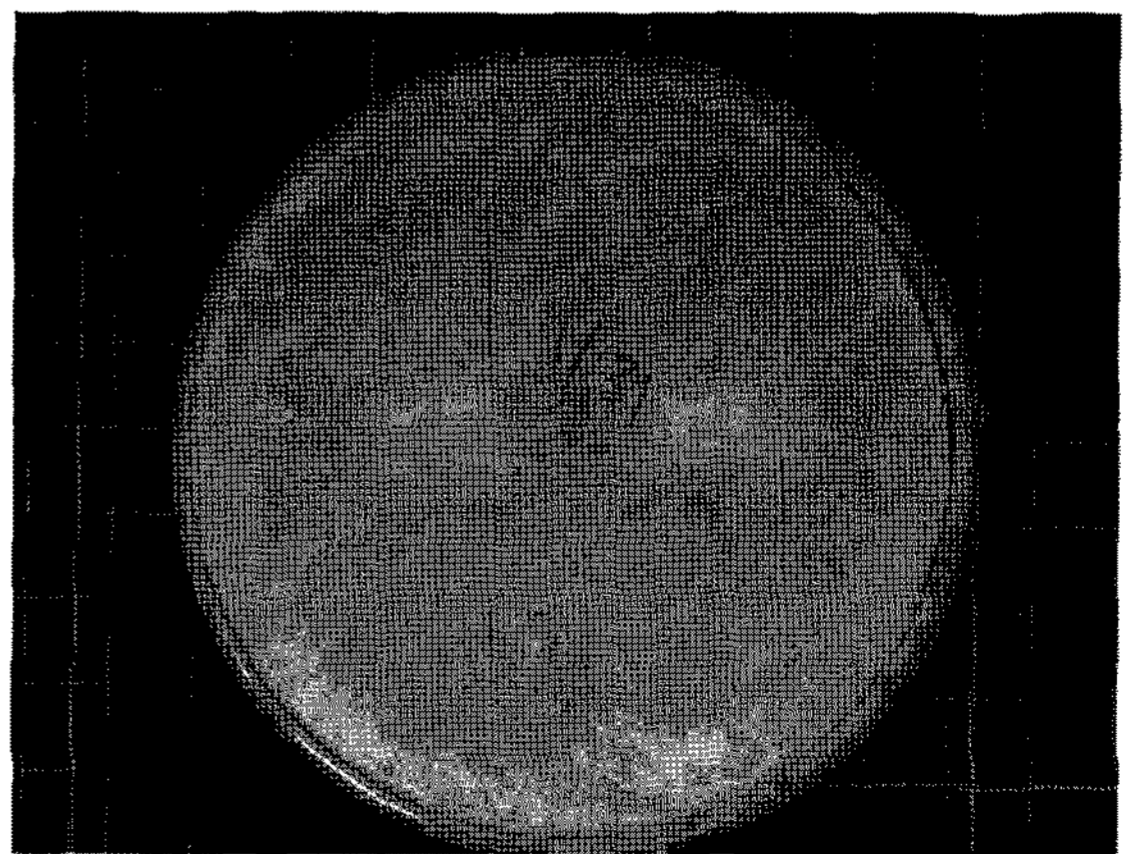


Fig. 3. Somatic compatibility between two strains (strain A and D) on PDA plate for one month.

체세포 불화합성(somatic incompatibility) 실험은 이핵 균주간의 genet 동정에 일차적으로 사용되는 방법이다 (Worrall *et al.*, 2004; Bendel *et al.*, 2006). 체세포 불화합성 실험에서 대치선이 생기는 것은 두 균주간에 체세포 불화합성과 다른 유전자형을 가지는 것으로 알려져 있다 (Worrall, 1997). 4개 균주간의 체세포 화합성이 일어났기에 하나의 유전자형을 가지는 것으로 말할 수 있었다.

자작나무버섯 균주의 NSI1/ITS4B primer pairs의 PCR과 ClustalW 분석

자작나무버섯은 primer NSI1/ITS4B pairs의 PCR 산물은 0.8-1 Kb 사이의 밴드가 검출되었다. 이들 PCR 산물은 염기서열을 분석한 결과, 860 bp 크기로 분석되었다. 그리고 4개의 자작나무버섯의 균주는 NCBI blast 분석에서 자작나무버섯인 AY966448.1와 99%의 동일성을 나타내어 본 실험에 사용한 버섯의 형태적인 모양과 염기서열 분석결과 일치성을 토대로 자작나무버섯임을 확인할 수 있었다. 또한 4개 자작나무버섯 균주는 염기서열 한 것을 토대로 ClustalW 분석 분석결과, 4개 균주가 동일한 것으로 판명되었다. 자작나무버섯의 DNA 염기서열은 NCBI에 등록하여 EU294161 번호를 받았다.

하나의 사스래나무에서 발견된 4개의 자작나무버섯은 대치배양 결과와 ClustalW 분석결과를 토대로 보았을 때, 동일한 유전자형(genotype)을 가지고 있을 것으로 추정되었다(Worrall *et al.*, 2004). Worrall *et al.*(2004)은 각각의 체세포 화합성 그룹의 microsatellite 마커 분석에서 하나의 대립유전자 세트를 가지는 것으로 보고하였다. 비록 본 실험에서 microsatellite 분석을 하지 않아서 동일한 유전자형을 가지는 것은 알 수 없으나, 대치배양과 ITS 염기서열 분석을 통해 동일한 것으로 나타났고, Worrall *et al.*(2004)의 결과에 비치어 보았을 때 동일한 유전자형으로 추정할 수 있었다(Bendel *et al.*, 2006).

자작나무버섯이 한 나무에서 발생한 것을 근거로 대치배양법과 ITS 분석법으로 유전자원의 동질성 유무를 판별하기 위하여 연구하였지만, 앞으로 microsatellite 마커와 SNP 마커 등의 기법을 적용하여 유전자형의 상동성 유무를 판별하여야 될 것으로 여겨진다.

적 요

자작나무버섯의 4개 균주는 설악산의 사스래나무 한 나무에서 분리하였다. 균주들은 균주간의 동일성 유무를 대치배양과 ITS 영역의 일부를 증폭하는 NSI1과 ITS4B primer pairs를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 균주들간의 대치선은 PDA 배지상에서 나타나지 않았고, rDNA

염기서열도 동일하게 나타났다. 결론적으로 이들 균주들은 동일한 균으로부터 기원한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 실험을 수행할 수 있도록 버섯 샘플을 제공해주신 이재성씨에게 감사를 드립니다. 그리고 이 연구는 국립산림과학원 일반과제(FP0801-2005-01) 연구비로 수행되었다.

참고문헌

윤영범, 현운형. 1989. 조선포자식물2. 과학백과사전종합출판사. 377pp.

Bendel, M., Kienast, F. and Rigling, D. 2006. Genetic population structure of three *Armillaria* species at the landscape scale: a case study from Swiss *Pinus mugo* forests. *Mycological Research* 110:705-712.

Fukuda, M. and Mori, Y. 2003. Genetic differences in wild strains of *Lentimula edodes* collected from a single fallen tree. *Mycoscience* 44:365-358.

Gardes, M. and Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology* 2:113-118.

Kamo, T., Asanoma, M., Shibata, H. and Hirota, M. 2003. Anti-inflammatory lanostane-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*. *J. Nat. Prod.* 66:1104-1106.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. and Stalpers, J. A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Ninth edition. CABI Bioscience.

Lee, J. Y. 1973. The list of the fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* 1:35-43.

Martin, K. J. and Rygielwicz, P. T. 1999. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts (Agronomy abstracts). American Society of Agronomy, Madison, Wis.

Rösecke, J., Pietsch, M. and König, W. A. 2000. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* 54:747-750.

Schlegel, B., Luhmann, U., Härtl, A. and Gräfe, U. 2000. Piptamine, a new antibiotic produced by *Piptoporus betulinus* Lu 9-1. *The Journal of Antibiotics* 53:973-974.

Schmidt, O. 2006. *Wood and Tree Fungi*. Springer.

Valášková, V. and Baldrian, P. 2006. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology* 157:119-124.

Worrall, J. J. 1997. Somatic incompatibility in basidiomycetes. *Mycologia* 89:24-36.

Worrall, J. J., Sullivan, K. F., Harrington, T. C. and Steimel, J. P. 2004. Incidence, host relations and population structure of *Armillaria ostoyae* in Colorado campgrounds. *Forest Ecology and Management* 192:191-206.