

ITS 부위의 PCR-RFLP 및 STS 마커를 이용한 차가버섯의 종 및 계통간 유연관계 분석

신평균, 공원식, 유영복, 이금희¹, 오세종², 최만수^{3*}

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과, 국립식물검역원 중부격리재배관리소¹, 국립식량과학원 맥류사료작물과², 전작과^{3*}

Identification and Phylogenetic Relationships of *Inonotus obliquus* Strains by PCR-RFLP of ITS sequences and STS markers

Pyung-Gyun Shin, Won-Sik Kong, Young-Bok Yoo, Keum-Hee Lee¹, Se-Jong Oh², and Man-Soo Choi^{3*}

Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-707, ¹Jungbu Post-Entry Regional Office, National Plant Quarantine Service, Suwon 430-016, ²Winter Serial & Forage Crop Division, National Institute of Crop Science, Iksan 570-080, ³Upland Crop Research Division, National Institute of Crop Science, Suwon 441-857, Korea

(Received October 6, 2009. Accepted October 13, 2009)

ABSTRACT : Because the import of *Inonotus obliquus* have been rapidly increased in Korea, we developed the *Inonotus* species-specific marker by using various sequences including ITS sequences, PCR-RFLP and STS primers and used this marker to determine both genetic relatedness and strains discrimination of *Inonotus* spp. Total 17 different *Inonotus* spp. were examined by using ITS sequences and classified into 2 different groups. One strain, ASI74008 isolated from Kamchaka island of Siberia, showed the high sequence identity (98%) at the nucleotide level to the other *I. obliquus* DSM strain, indicating the ASI74008 belong to *I. obliquus* species. Comparison of banding patterns after restriction enzyme digestions with PCR amplicons of ITS region revealed some variations depending on the species and strains. However, PCR products amplified with STS primer showed species specific patterns. Therefore, use of both STS primers and PCR-RFLP could help for better strain identification.

KEYWORDS : *Inonotus obliquus*, ITS sequences, Phylogenetic relationship, PCR-RFLP, STS marker

서론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 담자균문의 소나무버섯 버섯과(*Hymenochaetaceae*), 시루뻐버섯(*Inonotus*)속에 속하는 약용버섯으로 주로 북방한랭지역인 시베리아, 캐나다, 일본 홋카이도 및 시베리아 캄차크반도에서 자생하는 검은 자작나무에 기생하는 균핵덩어리 형태로 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠며 향암(Kim *et al.*, 2006), 향당뇨(양, 2005), 향산화(Cui *et al.*, 2005), 항염증(Park *et al.*, 2005), 면역 강화(Kim *et al.*, 2005) 항혈전(Hyun, 2006) 효과 등으로 인해 기능성 식품으로 각광을 받고 있다(김, 2003; 유, 2004; Wangum *et al.*, 2006). 최근에는 건강식품으로 두부(박, 2004), 냉면(박, 2004), 음료(박, 2005) 및 소주(영광학원, 2004) 등에도 첨가하여 특허를 획득하여 시중에 시판되고 있다. 차가버섯에 대한 사람들의 관심이 높아지면서 중국, 러시아, 북한 등을 통해 차가버섯 유사종 *Inonotus mikadoi*, *Inonotus hispidus*, *Inonotus xeranticus* 등이 미동정된 상태에서 차가버섯(*Inonotus obliquus*)으로 시판되거

나 인공재배도 시도되고 있으며(이, 2005), 저가로 대량 수입되어 고가로 판매되면서 차가버섯의 진위에 관련된 품종 구별 문제를 발생시킬 우려가 있다. 이러한 품종 구별에 대한 방법으로 형태적 방법과 유전적 방법이 존재하는 데 형태적인 방법만으로는 판단하기가 어려운 실정이어서 유전적 판별방법이 병행되어야 할 것으로 본다. 유전적 방법으로 가장 널리 이용하고 있는 기술은 ITS 부위의 염기서열을 이용한 유사성 분석을 통해 분류체계를 확립하거나 종속간 유연관계를 해석하고 있다(Wagner and Fischer, 2001, 2002). 또한 ITS 부위의 PCR-RFLP를 이용하여 계통학적 유연관계나 종 특이성을 비교분석하고 있다(장 등, 2006). 특히, 일본에서는 1997년에 'DNA 품종식별검토회'를 구성하여 RFLP, RAPD, AFLP, CAPS (PCR-RFLP), SSR, ISSR, SNP 등의 분석방법을 도입하여 실제로 버섯 품종의 분쟁해결에 사용되고 있다. 최근에는 Perez *et al.*(2009)은 느타리버섯에서 텔로미어(telomere) 부위중 반복염기서열수의 차이와 서브텔로미어(subtelomere) 부위의 크기 차이에 의한 종 특이성을 제시하였다. 우리나라는 김 등(2003, 2004, 2005) 및 이 등(2007)이 ITS(Internal Transcribed

* Corresponding author : <pgshin@korea.kr>

Spacers) 부위 DNA 염기서열 분석으로 종간의 유사성을 분석하였고, 또한 차가버섯만이 유전자증폭이 되는 종 특이적 마커를 개발하였으나 비교할 수 있는 다른종종에서는 유전자증폭 산물이 나타나지 않아 비교분석이 곤란하였다. 본 연구에서는 ITS(Internal Transcribed Spacers) 부위 DNA 염기서열 분석을 통하여 종간분류학적 유연관계를 확립하고, STS(SubTelomere Sequences) 부위를 이용하여 종간 밴드 크기의 차이를 나타내었고, ITS 부위의 PCR 증폭산물을 제한효소로 처리하는 방법인 PCR-RFLP를 이용하여 종간

뿐만아니라 계통간의 차이점을 분석하였다.

재료 및 방법

균주분리 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에서 보관하고 있는 균주 및 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 차가버섯 및 유사종의 염기서열을 유연관계 분석에 사용하였다. 공시균

Table 1. List of *Inonotus* spp. included in the phylogenetic analysis; source of fungal material; and GenBank accession number

Species	Strain or Geographical origin	Accession number
<i>Inonotus micadoi</i>	Korea ASI74001 (Suwon)	—
<i>Inonotus micadoi</i>	Korea ASI74002 (Haenam3670)	—
<i>Inonotus micadoi</i>	Korea ASI74003 (Suwon RDA 2649)	—
<i>Inonotus hispidus</i>	Korea ASI74004 (Siberia)	—
<i>Inonotus xeranticus</i>	Korea ASI74005 (Isac 501)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74006 (Isac 502)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74007 (Isac 503)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74008 (Isac 504)	AY279001
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74009 (KCTC26147, CBS314.39)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74010 (KCTC26136, DSM8659)	AF311017
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74011 (KCTC26152, NCWRF298C)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74012 (KACC50857)	—
<i>Inonotus obliquus</i>	Korea ASI74013	—
<i>Inonotus chondromyelus</i>	New Zealand (915.11.1995)	* AF311009
<i>Inonotus circinatus</i>	Canada (QFB-813)	* AF237728
<i>Inonotus cuticularis</i>	Germany (97-97)	* AF311010
<i>Inonotus dryadeus</i>	Germany (93-929)	* AF311011
<i>Inonotus dryophillus</i>	France/Corsica (87-1023a)	* AF311012
<i>Inonotus glomeratus</i>	Canada (CBS 359.34)	* AF247968
<i>Inonotus hastifer</i>	Germany (84-1023a)	* AF311013
<i>Inonotus hispidus</i>	Germany (92-829)	* AF311014
<i>Inonotus nidus-pici</i>	Hungary (CBS 475.72)	* AF311015
<i>Inonotus nodulosus</i>	Germany (87-115)	* AF311016
<i>Inonotus radiatus</i>	Germany (TW 704)	* AF311018
<i>Inonotus rheades</i>	Germany (TW 385)	* AF311019
<i>Inonotus subiculosus</i>	China (Dai 2103)	* AF311020
<i>Inonotus tamaricis</i>	Italy/Sicily (96-415)	* AF311021
<i>Inonotus tomentosus</i>	British Columbia (05-10-07)	* AF237729
<i>Phellinus pini</i>	France (TW 11.4.97)	* AF311037

ASI(Agricultural Science Institute), KCTC(Korea Collection for Type Culture), CBS(Centraalbureau voor Schimmelcultures), DSM(Deutsche Sammlung Mikroorganismen), NCWRF(National Collection of Wood-Rotting Macrofungi), KACC(Korea Agricultural Culture Collection), *The species from GenBank database enrolled by Wagner & Fischer(2001, 2002) and Germain et al(2002).

주는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 접종하여 15일마다 계대배양하면서 공기균주로 사용하였다(표 1).

DNA 추출 및 PCR 증폭

보관된 13균주를 PDA 배지에서 배양한 후 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN Co.)를 이용하여 균사체로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 각각의 게놈 DNA로부터 rDNA의 ITS 영역을 증폭하기 위하여 Wagner and Fischer(2001)가 만든 LROR-5(ACC CGC TGA ACT TAA GC) 및 LR7-3(TAC TAC CAC CAA GAT CT)와 같이 primer를 디자인하여 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응은 Bioneer사의 Kit를 사용하였고, PCR 조건은 96°C에서 5분간 Pre-heating 시킨 다음, 96°C에서 1분간 denaturation, 52°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 하여, 총 30 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 5분동안 post extension 하고 4°C로 유지하였다.

염기서열 및 유연관계 분석

ITS 부위 영역의 증폭된 DNA는 2% agarose gel에서 확인한 후 GeneClean Kit II(Biolab101)를 이용하여 추출하였고, 추출된 DNA를 제한효소AluI, HaeIII 등으로 처리하여 밴드의 변화를 관찰하였다. 균주간 염기서열 분석은 ClustalW 분석프로그램을 이용하여 유연관계를 분석하였다. 또한 STS(SubTelomere Sequences)부위 영역의 primer 합성은 인간 subtelomere부위의 염기서열 중에서 앞부분과 뒷부분으로 나누어 STS15(AGT TAC TCT GGG GTC CCC TC), STS13(CCC CTA TTA CAA CTT GGG

CA) 및 STS25(CCT GCA GCA ATT TGT CAT TTT), STS23(ATT CAC CAT CAA TGA AGC CC) 두 종류의 primer를 디자인하여 PCR 증폭산물을 통해 종 및 계통간 차이점을 분석하였다.

결과 및 고찰

ASI(Agricultural Science Institute)에 수집 등록된 *Inonotus* 13균주와 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 공시균주의 염기서열을 사용하여 유연관계를 분석하였다(표 1). 본 실험에서는 감차카 반도에서 수집된 차가버섯 74008 균주의 게놈 DNA를 분리하여 ITS 영역을 Wagner and Fischer(2001)가 사용한 LROR과 LR7의 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다. 증폭결과 약 900bp를 얻어 염기서열을 분석한 후 NCBI에 등록하였다(GenBank Accession no. AY279001). 분석된 염기서열과 NCBI에 등록되어 있는 염기서열간의 alignment를 수행한 결과를 그림 1에 나타내었다. 그림 1에 나타난 결과는 *Inonotus*를 크게 2그룹으로 나누어졌으며, A group에는 *Inonotus obliquus* ASI74010(DSM8659), *Inonotus obliquus* ASI74008, *I. nidus-pici*, *I. hispidus*, *I. dryophilus*, *I. tamaricis*, *I. hastifer*, *I. nodulosus*, *I. subiculosus*, *I. dryadeus*, *I. chondromyelus*이며, B group에는 *I. glomeratus*, *I. radiatus*, *I. rheades*, *I. cuticularis*, *I. circinatus*, *I. tomentosus*로 분류되었다(*Phellinus pini*: outgroup). 감차카 반도에서 수집된 차가버섯 ASI74008 균주는 *I. obliquus* ASI74010(DSM)의 공시균주와 유사성이

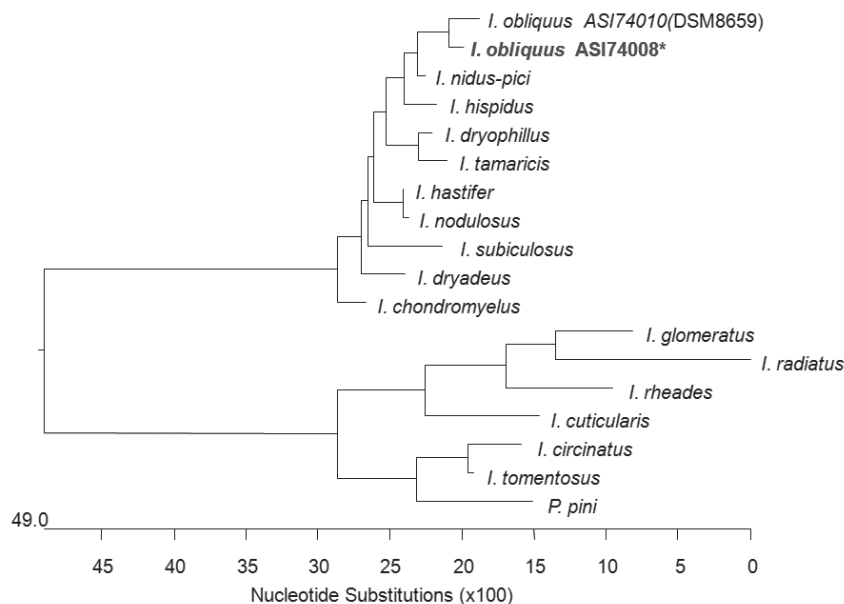


Fig. 1. Phylogenetic analysis by comparing with ITS sequences of 17 *Inonotus* spp. from GenBank Database.

*ITS sequence of *I. obliquus* ASI74008 enrolled into GenBank accession number AY279001(Shin *et al.*, 2003) by this study.

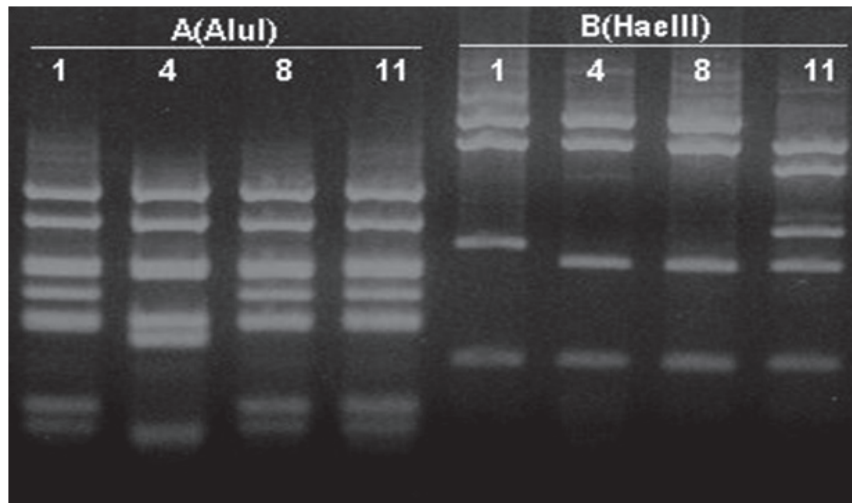


Fig. 2. PCR-RFLP of LSU rDNA from *Inonotus* spp. 1: *Inonotus mecadoi* ASI74001, 4: *Inonotus hispidus* ASI74004, 8: *Inonotus obliquus* ASI74008, 11: *Inonotus obliquus* ASI74010(DSM8659).

98%로 가장 높아 차가버섯으로 확인되었다.

하지만 염기서열을 이용한 유사성의 분석은 종간의 유연관계나 유사성을 분석하는 데에는 가장 좋은 방법이나 품종간의 차이를 비교분석하기는 어렵다. 따라서 종간, 계통간 차이를 구분하고자 증폭산물인 염기서열이 분석되지 않을 경우에 사용하는 방법으로 PCR 증폭산물을 특정제한효소로 절단하여 RFLP를 보는 방법, PCR-RFLP 일명 CAPS 방법으로 분석하였다. 수집된 공시균주 *I. mecadoi* ASI74001, *I. hispidus* ASI74004, *I. obliquus* ASI74008, *I. obliquus* ASI74010(DSM8659) 등 4균주를 사용하여 5개의 제한효소 처리 중에서 AluI과 HaeIII의 4base 제한효소를 처리한

결과는 그림 2에 나타내었다. 그림 2에서와 같이 AluI를 처리하였을 때 *I. hispidus* ASI74004 균주의 밴드 패턴이 다른 균주와 차이를 나타내었고, HaeIII를 처리하였을 때 *I. mecadoi* ASI74001 및 *I. obliquus* ASI74010(DSM8659)이 다른 밴드패턴을 보여주었다. 따라서 제한효소 AluI, HaeIII를 처리하면 종간 뿐만 아니라 차가버섯 내의 밴드패턴도 달라 품종 구분에도 이용이 가능함을 확인하였다.

또한, 종 특이적으로 품종 구분을 위하여 인간의 STS(SubTelomere sequence)영역 부위를 이용하여 primer로 디자인된 STS marker로 PCR를 수행한 결과 그림 3과 같이 나타내었다. 그림 3-A는 STS15 및 STS13 primers 디

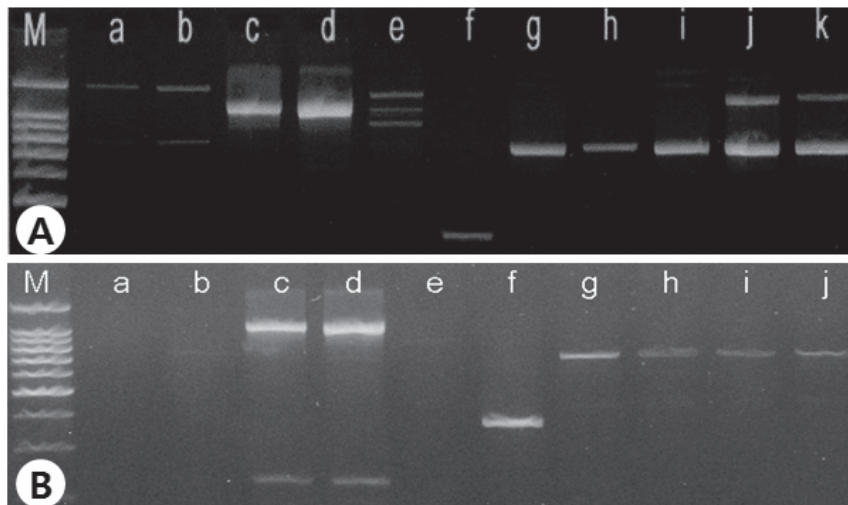


Fig. 3. PCR products of *Inonotus* spp. with STS primers. M : 100bp marker, STS15 and 13 primers(A) a and b : *Inonotus mecadoi* ASI74001 and ASI74002, c and d : *I. hispidus* ASI74004, e : *I. xeranticus* ASI74005, f : *I. obliquus* ASI 74007, h : *I. obliquus* ASI74008, j : *I. obliquus* ASI74009(CBS314.39), k : *I. obliquus* ASI74010(DSM8659). STS25 and 23 primers(B) a and b : *Inonotus mecadoi* ASI 74001 and ASI74002, c and d : *I. hispidus* ASI74004, e : *I. xeranticus* ASI74005, f : *I. obliquus* ASI74007, h : *I. obliquus* ASI74008, j : *I. obliquus* ASI74010(DSM8659).

자인을 subtelomere 부위 앞부분을, 그림 3-B의 STS25 및 STS23 primers는 뒷부분 영역을 이용하여 합성한 후 PCR를 수행한 결과 중간에는 밴드패턴이 다르게 나타났으나 계통간에는 동일하게 나타내어 STS marker는 중간구분은 가능하나 계통 즉 품종 구분은 어려운 것으로 나타났다.

이상과 같이 차가버섯의 품종 구분을 위해서는 빠르면서 신속정확하게 구분하기 위한 방법으로 STS marker를 이용하여 일차적으로 중간 구분을 한 다음 PCR-RFLP법을 사용하여 종 및 계통간 품종구분이 가능하리라 사료된다.

적 요

최근들어 수입량이 급증되고 있는 차가버섯의 분류체계를 확립하고, 이들 종 및 계통간의 유연관계 확립과 품종 구분을 위해 계통학적 정보를 지닌 ITS 영역의 염기서열, PCR-RFLP 및 STS 프라이머를 사용하여 종 특이적인 마커를 개발하였다. 시베리아 캄차카 반도에서 수집된 74008 균주의 염기서열을 이용하여 *Inonotus* spp.의 유연관계를 분석한 결과 2개의 그룹으로 나뉘어 졌고, *I. obliquus* DSM 856P균주와 약 98%의 가장 높은 유사성을 나타내어 차가버섯임이 확인되었다. 또한 ITS 증폭산물을 제한효소로 처리하여 밴드 패턴을 비교하였을 때 종 및 계통에 따라 밴드가 다르게 나타났으며, STS primer를 이용하여 증폭산물을 비교하였을 때 종간에는 밴드패턴이 다르나 계통내에서는 동일한 밴드 패턴을 보였다. 따라서 차가버섯의 품종 구분을 위해서는 STS 마커와 PCR-RFLP를 동시에 사용함으로써 품종 구분이 좀 더 명확하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- 김성윤, 이재운, 김기영, 박재민, 김문옥, 이태호, 이재동. 2004. ITS 염기서열에 기초한 차가버섯과 근연속간 유연관계분석. *한국균학회지* 32(2) : 152-157.
- 김성윤, 이재운, 김기영, 이기원, 박재민, 김문옥, 이태호, 이재동. 2003. Phylotype에 의한 수종의 *Phellinus*속의 분류체계 확립 및 종간구별을 위한 신속동정법 개발. *한국균학회지* 31(3) : 121-128.
- 김성윤, 정민정, 김기영, 박재민, 김문옥, 문동오, 이태호, 이재동. 2005. 약용버섯의 계통분류 및 국내유통 *Inonotus* 속내 종간구별을 위한 신속동정법 개발. *한국버섯학회지* 3(2) : 1-12.
- 김연풍, 최성후. 2003. 버섯을 이용한 기능성 식품. 특허출원 10-2003-0005540.
- 박상재. 2004. 기능성 두부의 제조방법(차가버섯 추출물 이용). 특허출원 10-2004-0014635.
- 박성혜, 신연환, 송유진, 한종현. 2005. 체내지질농도개선에 미치는 차가버섯 음료의 효과. *동의생리병리학회지* 19:407-411.
- 박영환. 2004. 차가버섯 및 차가버섯 분말, 팽잎분말을 첨가한 냉면제조. 특허번호 10-2004-0052792.
- 양병근, Kai Yip Cho, Michael A Wilson, 송치현. 2005. 차가버섯 균사체가 Streptozotocin으로 유발된 당뇨병쥐의 혈장 포도당과 지질농도에 미치는 영향. *한국균학회지* 33:64-66.
- 영광학원. 2004. 버섯의 실체 또는 균사체로부터 얻은 추출물을 함유한 기능성 소주 및 그 제조방법. 특허출원 10-2004-0006934.
- 유창현, 박정식, 이찬복, 이재성, 황태익, 이종수, 정일민. 2004. 고부가가치 창출을 위한 기능성 버섯의 개발 및 이용 연구. pp. 295. 농림부.
- 이봉연, 박현, 박원철, 윤갑희, 장지연, 유성열, 가강현. 2007. 국내수집 차가버섯 균주의 배양특성과 유전적 유연관계분석. *한국균학회지* 35(1):28-32.
- 이원호, 박영진, 김호경, 차주영, 김태웅, 성재모. 2005. 차가버섯 (*Inonotus obliquus*)의 배양조건 및 균핵형성. *한국균학회지* 33(2):59-63.
- 장윤희, 김태락, 김현수, 여익현, 이상윤, 하효철. 2006. Ribosomal DNA의 ITS 부위에 대한 RFLP 분석에 의한 *Phellinus baumii* PMO-P4의 유전학적 특성. *한국버섯학회지* 4(2):43-47.
- Cui, Y., Kim, D.S. and Park, K.C. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol.* 96(1-2):79-85.
- Germain, H., Laflamme G., bernierL., Boulet B. and Hamelin R.C. 2002. DNA polymorphism and molecular diagnosis in *Inonotus* spp. *Can. J. Plant Pathol.* 24(2):194-199.
- Hyun, K.W., Jeong, S.C., Lee, D.H., Park, J.S. and Lee, J.S. 2006. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides* 27(6) : 1173-1178.
- Kim, Y.O., Han, S.B., Lee, H.W., Ahn, H.J., Yoon, Y.D., Jung, J.K., Kim, H.M. and Shin, C.S. 2005. Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci.* 77(19) : 2438-2456.
- Kim, Y.O., Park H.W., Kim, J.H., Lee, J.Y., Moon, S.H. and Shin, C.S. 2006. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sci.* 79(1):72-80.
- Park, Y.M., Won, J.H., Kim, Y.H., Choi, J.W., Park, H.J. and Lee, K.T. 2005. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* 101(1-3) : 120-8.

- Perez, G., Pangilinan, J., Pisabarro, A.G. and Ramirez, L. 2009. Telomere organization in the ligninolytic basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(5) : 1427–1436.
- Wagner, T. and Fischer, M. 2001. Natural groups and a revised system for the european poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 105(7) : 773–782.
- Wagner, T. and Fischer, M. 2002. Proceeding towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l. and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia* 94(6) : 998–1016.
- Wangum, H.V.K., Hartl, A., Kiet, T.T. and Hertweck, C. 2006. Inotilone and related phenylpropanoid polyketides from *Inonotus* sp. and their identification as potent COX and XO inhibitors. *Org. Biomol. Chem.* 4 : 2545–2548.