

저장 배에서 분리한 *Penicillium*속의 배양적 특성과 RAPD에 의한 유연관계 분석

김주희* · 이왕휴¹ · 유영진 · 정성수 · 최정식

전라북도 농업기술원, ¹전북대학교 농과대학 생물자원과학부 농업과학기술부

Analysis of Genetic Relationship and Cultural Characteristics of *Penicillium* species Isolated from Postharvest Decay of Pear by Random Amplified Polymorphic DNA

Ju Hee Kim*, Wang Hyu Lee¹, Young Jin Ryu, Seong Soo Cheong and Joung Sik Choi

Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-704, Korea

¹Faculty Biological Resources Science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received March 22, 2002)

ABSTRACT: Fifteen isolates from pear, and sixteen isolates from KCTC, KCCM, and Chungnam Univ. of *Penicillium* spp. were investigated for the analysis of their relationships of cultural characteristics and RAPD genetic variation by RAPD. The cultural characteristics of *Penicillium* spp. were shown different growth rate, morphology, and color. In addition, the cultural characteristics and RAPD analysis were conducted for the pear rot pathogens and related isolates. RAPD patterns were applied to compare the taxonomic and genetic diversity of the *Penicillium* species between 15 groups isolated from pear fruits and 16 standard species. The genomic DNA were amplified from 0.1~2.0 kb by five URP primer and 744 bands were detected. The cluster analysis showed four genomic DNA RAPD groups and its similarity was 47.7%. Intraspecific relationships were 87.4, 97.5 and 95.2%, in *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. crustosum*, respectively. These results appeared to be that there were high similarities between isolates, and consistent with the results of cultural morphological characteristics analysis.

KEYWORDS: Genetic relationship, Pear, *P. crustosum*, *P. expansum*, *P. solitum*, RAPD

*Penicillium*속은 penicillin을 생산하는 의학미생물인 동시에 농작물 병해의 생물적 방제에 활용되는 등 다양한 기능을 가진 진균이면서 한편으로는 작물 생육기간 중에 병을 일으키는 병원체이기도 하다. 특히 수확 후 저장 또는 유통과정의 농산물이나 식품에 피해를 주는 균 중에서 가장 많은 피해를 주는 균으로 알려져 있다(Cho *et al.*, 1995; Holmes *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1991). 국내에서 식물병을 일으키는 균으로 보고된 *Penicillium*의 종은 *P. expansum*, *P. italicum* 등 총 10여종이 보고되었다(Kim *et al.*, 1998; Jo *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1991). 일반적인 *Penicillium*의 분류 동정은 균총의 형태적, 배양적 특성을 이용하고 있으나 이러한 특성만으로 종을 분류동정하기에는 여러 가지 어려운 점이 따른다. 이를 보완하기 위하여 생리적, 생화학적 특성을 이용하기도 하고 최근에는 DNA 염기조성(GC함량)에 의한 분류, PCR(polymerase chain reaction)방법을 이용한 RAPD, ITSs(Internal transcribed spacers) fingerprinting 및 genomic DNA의 제한효소절단 다형질 분석, rRNA(ribosomal RNA) 유전자의 염기서열과 같은 분자생물학적 기법을 이용하여 보다 정확한 종의 분류동정을 시도하고 있다. 본 연구는 저장 중 배에서 분

리한 *Penicillium*속의 정밀한 동정 수단으로 이용가능성을 검토하기 위하여 분리된 병원균과 기타 분양 받은 *Penicillium* 균주 간의 균학적 특성 차이에 따른 RAPD에 의한 유전적 유연관계를 상호 분석하였다.

재료 및 방법

시험재료

시험재료는 전북 고창, 김제, 정읍지역의 저온 저장고를 대상으로 이병과를 수집하거나, 수확한 배를 농과과원에 서 수집하여 전북농업기술원 저온저장고에 저장 조사하여 분리 동정한 *Penicillium expansum*(9 group)과, *P. solitum*(3 group), *P. crustosum*(3 group)의 3종과 KCTC, KCCM 및 충남대에서 분양을 받은 균주를 실험에 사용하였다 (Table 1).

균학적 특성 관찰

순수 분리한 균을 균일한 농도로 처리하기 위하여 Okuda (1994) 방법을 변형하여 사용하였다. Modified malt extract agar(MA) 사면배지에 7일간 배양한 후 200 μ l의 weak agar(0.05%)를 첨가하여 포자현탁액(10^2 spore/ml)의 20 μ l를 Czapek's agar(Cz), Czapek yeast extract agar(CYA)

*Corresponding author <E-mail: kjhjbres@hanmail.net>

Table 1. Standard isolates of *Penicillium* spp. supplied by KCTC, KCCM and Chungnam university

<i>Penicillium</i> spp.	Source ^a
<i>P. expansum</i>	KCCM 12034 ATCC 24692 KCTC 6434 ATCC 7861 KCTC 6929 CNU 7002
<i>P. solitum</i>	KCTC 6559 ATCC 24727 CNU 7003
<i>P. crustosum</i>	KCCM 60006 IFO 31913
<i>P. digitatum</i>	KCCM 60140 IFO 7137
<i>P. verrucosum</i>	KCTC 6265 ATCC 48957
<i>P. hirsutum</i>	JBR 20004
<i>P. echinulatum</i>	KCTC 6110
<i>P. italicum</i>	KCTC 6437 ATCC 10454 CNU 6013
<i>P. brevicompactum</i>	KCTC 6400 IFO 5844
<i>P. brevicompactum</i> var. <i>magnum</i>	KCTC 6396 ATCC 48473
<i>P. griseofulvum</i>	KCCM 11632 ATCC 1885

^aKCCM : Korcan Culture Center of Microorganism, KCTC : Korean Collection for Type Culture, ATCC : American Type culture Collection, IFO : Institute for Fermentation Osaka.

와 malt extract agar(MEA), 25% glycerol nitrate agar (G25N) 평판배지에 3지점씩 접종하였다. 접종한 후, 25°C에서 7일간 암배양하여 배양적 특성을 관찰하였다. 분리된 균주들의 질소원 이용성 여부를 조사하기 위하여 nitrate sucrose agar(NSA)와 creatine-sucrose agar(CREA)에서 성장여부를 조사하였다. 접종 균주는 25°C에서 7일간 암배양한 후 균의 성장여부를 관찰하였고, CREA 배지에서 배양 5~7일내 색의 변화에 따라 산 생성 여부를 조사하였으며, 이후 균총의 색 변화에 따라 기초 대사물의 생성 여부를 조사하였다. 형태적 특성을 관찰하기 위하여 분리한 균을 각각 Cz, CYA 및 MEA 평판배지에 접종하여 25°C에서 3~4일간 배양한 후 관찰하였다.

RAPD 분석

Genomic DNA 분리. 시험균주는 PDB(potato dextrose broth) 배지에 10^6 spore/ml로 접종하고 25°C에서 15일간 배양하여 성장한 균사체를 동결 건조하였다. 건조된 균사는 액체질소와 함께 유발에 넣고 미세하게 분쇄한 다음, 0.2~1.0 g씩 채취하여 0.4 ml lysis buffer(1% 2-mercaptoethanol, 3% SDS, 50 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2)에 넣고 65°C에서 1시간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 0.4 ml 취하여 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)용액을 1 volume첨가하고 10분간 조심스럽게 흔든 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 반응 후 phenol 성분을 제거하기 위해, chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)용액을 동량 첨가하여 20분간 흔든 후 12,000 rpm에서 4°C, 20분간 원심 분리하였다. DNA가 들어 있

는 상등액을 취하여 RNase를 50 mg/ml이 되도록 넣고, 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 2 volume의 absolute EtOH를 넣어 DNA를 침전시켰다. 70% EtOH로 DNA를 씻은 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)에 녹였다. DNA 함량과 순도를 측정하기 위해 DNA를 100배 희석하여 spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다.

Primer: Genomic DNA의 RAPD 분석에 사용된 primer는 SRILS Uniprimer Kit(20mer)를 구입하여 사용하였고, DNA증폭을 위한 PCR stock은 반응액 총량을 20 μ l 기준으로 하여 template DNA 100 ng과 primer 20 ng, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 0.2 mM, Taq DNA polymerase 1 unit(Takara Biochemicals, Japan)로 맞추어 멸균수를 첨가하였다.

PCR 조건: PCR은 94°C에서 3분간 pre-heating시킨 다음, 94°C 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension을 1 cycle로 하여, 총 40 cycle을 돌린 후, 72°C에서 7분 동안 post extension 후 4°C로 유지하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 90 volt로 전개한 후 ethidium bromide에서 15분간 염색하여, UV transilluminator lamp상에서 밴드를 관찰하였다. Dendrogram은 균주간 유사도를 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용하여 군(cluster) 분석하였다. 또한 유사도와 dendrogram의 작성은 NTSYS-pc program Ver. 1.7을 이용하였다.

결과 및 고찰

배양형태적 특성

25°C에서 7일 배양 후 균총크기, colony형태 및 색, 분비색소와 포자형태 등의 특성에 따라 15개 group 3종으로 구분된 균주의 배양·형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과(Tables 2, 3, 4), 분리된 15개 그룹은 MEA, G25N, CREA와 NSA 배지에서는 배양특성이 유사하였으나, CYA와 Cz 배지에서는 group에 따라 차이가 있었다.

*P. expansum*은 MEA 배지상에서 7일 배양하면 균총은 30.9~35.9 mm 크기로 편평한 모양의 녹색의 균총을 형성하였고, 배지뒷면은 연한녹색을 띠었으나 배지에 색소를 분비하지는 않았다. CYA와 Cz 배지에서 균총은 30.4~52.4 mm크기의 홍생형(flocculus)과 양털모양(fasciculate) 형태로 연노랑색을 띠며 배지뒷면에 붉은 색소를 형성하였다. G25N 배지에서의 균총은 15.0~20.0 mm이며 흰색~연노랑색을 띠는 편평한 형태를 나타냈다. 또한 CREA 배지에서 잘 자라고, NSA 배지에서는 자라지 않는 공통적인 특성을 나타냈다. 포자는 2.5~3.4 μ m 크기의 구형~타원형으로 포자표면과 stipe 표면은 매끄럽고, phialide는 6.1~14.5×2.1~3.0 μ m이며 rami는 8.9~22.7×2.3~3.2 μ m 크기로 2~3개로 분지되었다.

Table 2. Comparisons of cultural characteristics of *Penicillium* groups isolated from pear and *Penicillium* species supplied by KCCM, KCTC, CNU

Strain	Colony on CYA			Colony on MEA			Colony on Cz		
	Growth (mm)	Color	Pigment	Growth (mm)	Color	Pigment	Growth (mm)	Color	Pigment
Group 1	36.8	SY ^a	N	33.6	Gr	N	33.6	W	PRBr
Group 2	39.2	PY	N	35.9	Gr	N	35.9	W	PRBr
Group 3	39.7	SY	N	35.4	Gr	N	35.4	W	PRBr
Group 4	41.2	GGr	Pb	30.8	Gr	N	30.8	W	PRBr
Group 5	42.6	SB	Pb	31.0	Gr	N	31.0	W	PRBr
Group 6	53.2	SY	Rb	32.6	Gr	N	32.6	S	PBr
Group 7	50.8	SY	Rb	32.1	Gr	N	32.1	S	PBr
Group 8	45.4	W	N	30.9	Gr	N	30.9	S	N
Group 9	48.3	PY	N	33.2	Gr	N	33.2	GGr	PBr
Group 10	26.6	WB	N	21.2	Gr	N	21.2	WB	N
Group 11	23.7	GB	N	23.9	Gr	N	23.9	GGr	N
Group 12	24.7	GB	N	20.1	Gr	N	20.1	DGr	PBr
Group 13	23.8	DGGr	N	19.5	Gr	N	19.5	DGr	PBr
Group 14	35.7	DGGr	Pb	18.6	Gr	N	18.6	DGr	PBr
Group 15	24.5	DGGr	Dg	18.5	Gr	N	18.5	G	PBr
KCCM 12034	44.0	SY	N	34.7	Gr	N	31.3	W	DO
KCTC 6434	38.0	SBr	N	42.0	Gr	N	36.3	W	DO
KCTC 6929	40.0	PBr	N	35.3	DGr	N	22.3	PBr	N
CNU 7002	32.7	PP	N	44.0	DGr	N	28.0	W	N
KCTC 6559	26.0	PB	N	23.0	Gr	N	23.7	PBr	N
CNU 7003	27.0	Gr	N	26.3	Gr	N	21.0	SBr	N
KCCM 60006	32.3	DG	N	38.3	Gr	N	21.3	PGr	RBr
KCCM 60140	25.0	DY	N	27.3	Gr	N	17.7	DB	N
KCTC 6265	20.0	PBr	N	15.7	Gr	N	16.3	OB	N
KCTC 6110	30.0	Db	N	32.0	Gr	N	24.7	DB	N
KCTC 6437	28.0	W	N	39.7	Gr	N	14.0	W	N
CNU 6013	27.7	PY	N	28.7	Gr	N	18.0	PY	N
KCTC 6400	25.7	PY	N	15.0	Gr	N	17.0	W	N
KCTC 6396	35	PY	N	19.0	Gr	N	18.0	PY	N
KCCM 11632	20.7	DB	N	20.3	Gr	N	11.0	WPu	N
JBR 20004	28.7	YBr	N	32.0	Gr	N	16.3	TBr	N

^aSY : Straw yellow, PY : Pale yellow, GGr : Gray green, SB : Straw blue, W : White, DGr : Dull green, WB : White blue, Gb : Gray blue, DGGr : Dark gray green, G : Gray Gr : Green, SBr : Straw brown, PBr : Pale brown, PP : Pale pink, N : None, OB : Orange blue, RO : Reddish orange, S : Straw, PGr : Pale green, DB : Dark blue, OBr : Orange brown, WPu : Whitish purple, YB : Yellow brown, PRBr : Pale reddish brown.

*P. solitum*은 MEA 배지에서 녹색의 균총과 배지뒷면에 진노랑색을 나타냈으며 균총은 편평한 모양이었다. CYA 배지에서 24.7~26.6 mm 크기의 주름진 청녹색 양털모양 (fasciculate), 벨벳 모양으로 배지뒷면은 진한 오렌지색~연갈색을 나타냈다. Cz 배지에서는 균청색 균총 또는 청색을 띤 흰색 균총으로 벨벳, 양털모양이었으며, G25N 배지에서는 균총은 15.0~20.0 mm이며 흰색~연노랑색을 띤 편평한 형태를 나타냈다. CREA 배지에서는 풍부한 산을 생성하였고 NSA 배지에서는 성장하지 않았다. 포자는 2.6~3.2 μm 크기의 구형~타원형으로 포자표면과 stipe 표면은 우둘투둘하고, phialide는 7.7~10.9 \times 2.3~3.0 μm 이며 rami는 12.5~20.1 \times 2.5~3.2 μm 크기로 2개 분지되었다.

*Penicillium crustosum*은 MEA 배지에서 편평한 형태의

녹색 균총으로 크기는 12.3~24.7 mm이었다. CYA 배지에서 편평한 모양의 진회색~균청색 양털모양 균총으로 주변부가 청녹색을 띤 연노랑색 균총을 나타냈으며, Cz 배지에서는 주변부가 흰색을 띤 균청색이었다. CREA 배지에서는 풍부한 산을 생성하였고 NSA 배지에서는 성장하지 않았다. 포자는 2.5~3.1 μm 크기의 구형~타원형으로 포자표면과 stipe는 rough하고, phialide는 7.5~11.4 \times 2.1~2.9 μm 이며 rami는 8.6~19.6 \times 2.4~3.2 μm 크기로 2개로 분지되었다.

대조균주로 사용된 *P. expansum*인 KCCM 12034, KCTC 6434, KCTC 6929와 CNU 7002는 MEA 배지에서 편평한 모양의 녹색 균총을 형성하고 34.7~44 mm 크기였다. KCTC 6929와 CNU 7002는 진녹색을 띠며 배지 뒷면은 연한 오렌지색~연갈색을 나타냈다. CYA 배지에

Table 3. Observation of morphological characteristics grown on malt extract agar media

Isolate	Spore		Phialide (μm)	Rami	Stipe
	Shape	Size (μm)			
Group 1	Globose~subglobose	2.5~3.0	8.6~14.5 × 2.4~2.6	2~3	Smooth
Group 2	Globose~subglobose	2.8~3.6	7.9~10.4 × 2.1~2.5	2~3	Smooth
Group 3	Globose~subglobose	3.2~3.6	9.6~11.6 × 2.1~2.5	2~3	Smooth
Group 4	Globose~subglobose	2.8~3.6	8.6~10.4 × 2.2~2.3	2~3	Smooth
Group 5	Globose~subglobose	3.2~3.4	6.1~ 8.9 × 2.1~2.5	2~3	Smooth
Group 6	Globose~subglobose	2.9~3.6	7.1~ 9.4 × 2.1~2.9	2~3	Smooth
Group 7	Globose~subglobose	2.8~3.6	8.9~10.4 × 2.1~2.5	2~3	Smooth
Group 8	Globose~subglobose	2.5~3.0	10.1~12.4 × 2.5~3.2	2~3	Smooth
Group 9	Globose~subglobose	2.6~2.8	6.8~ 7.9 × 2.3~3.0	2~3	Smooth
Group 10	Globose~subglobose	2.6~3.1	8.3~10.2 × 2.5~2.9	1~2	Smooth
Group 11	Globose~subglobose	2.8~3.0	7.7~10.4 × 2.3~2.5	1~2	Rough
Group 12	Globose~subglobose	2.8~3.2	8.8~10.9 × 2.7~3.0	1~2	Rough
Group 13	Globose~subglobose	2.7~3.0	7.5~ 9.1 × 2.1~2.5	1~2	Rough
Group 14	Globose~subglobose	2.8~3.1	7.5~10.3 × 2.2~2.5	1~2	Rough
Group 15	Globose~subglobose	2.5~3.0	10.5~11.4 × 2.1~2.9	1~2	Rough
KCCM 12034	Globose~subglobose	2.8~3.3	10.6~13.6 × 2.5~2.7	2~3	Smooth
KCTC 6434	Globose~subglobose	2.8~3.1	8.6~13.4 × 2.3~2.5	2~3	Smooth
KCTC 6929	Globose~subglobose	2.9~3.3	8.9~12.6 × 2.6~3.5	2~3	Smooth
CNU 7002	Globose~subglobose	2.8~2.9	7.8~10.9 × 2.4~2.6	2~3	Smooth
KCTC 6559	Globose~subglobose	3.2~3.6	9.0~11.6 × 3.0~3.3	2~3	Rough
CNU 7003	Globose~subglobose	2.9~3.5	10.2~12.2 × 3.3~3.4	2~3	Rough
KCCM 60006	Globose~subglobose	2.5~3.6	10.3~15.4 × 2.5~3.9	1~2	Rough
KCCM 60140	Globose~subglobose	2.5~3.9	8.6~11.3 × 2.5~3.2	2~3	Rough
KCTC 6265	Globose~subglobose	2.6~3.6	7.8~11.0 × 2.3~3.5	1~2	Rough
KCTC 6110	Globose~subglobose	2.6~3.8	10.2~13.4 × 2.5~3.7	1~2	Rough
KCTC 6437	Cylindrical with rounded ends	2.8~5.3	10.4~12.9 × 3.8~5.1	2~3	Smooth
CNU 6013	Globose~subglobose	2.6~3.7	7.8~10.3 × 2.7~3.6	2~3	Rough
KCTC 6400	Globose~subglobose	2.5~3.5	7.5~ 9.9 × 2.8~3.8	1~2	Smooth
KCTC 6396	Globose~subglobose	2.6~3.8	9.5~11.9 × 2.4~3.6	1~2	Smooth
KCCM 11632	Globose~subglobose	2.5~3.7	8.5~11.2 × 2.6~3.4	1~2	Smooth
JBR 20004	Globose~subglobose	2.5~3.9	7.6~10.6 × 2.7~3.8	2~3	Rough

서 KCCM 12034는 담황색~담청색의 주름진 총생형이고 KCTC 6434는 CYA에서 담갈색의 주름진 총생형이며 KCTC 6929는 편평한 연갈색이었다. CNU 7002는 편평하고 연한 분홍빛을 띤 흰색 균총을 형성하였다. Cz 배지에서는 KCCM 12034와 KCTC 6434는 양털형의 흰색~담황색의 균총을 형성하고 배지뒷면에 짙은 오렌지색소를 형성하였다. KCTC 6929는 양털형의 얼은 배지색의 균총을 형성하고 CNU 7002는 편평한 흰색의 균총을 형성하였다. NSA 배지에서 KCTC 6929는 잘 성장하였으나 KCTC 6434, KCCM 12034, CNU 7002는 성장하지 않았다. CREA 배지에서 CNU 7002는 성장하지 않았으며 KCTC 6434, KCCM 12034, KCTC 6929는 잘 자랐으며 풍부한 산을 생성하였다.

*P. solitum*인 KCTC 6559는 MEA 배지에서 편평한 형태의 녹색을 띠고 CYA 배지에서는 약간 융기된 벨벳형태로 균총 가장자리가 흰색을 띤 연푸른색의 주름진 균총을 형성하였다. Cz 배지에서는 융기된 벨벳형태의 중앙부와 흰색가장자리가 형성된 연갈색을 균총을 형성하였다. CNU

7003은 MEA 배지에서 편평한 녹색으로 배지뒷면이 진노랑색을 나타냈다. CYA 배지에서는 총생형태로 가장자리가 흰색이며 중앙부는 녹색을 띤 균총을 형성하였으며 뒷면은 진노랑색을 나타냈다. Cz 배지는 균총의 중앙부는 담갈색 벨벳형태로 융기되었고, 가장자리는 편평한 형태의 진녹색을 나타내며 배지뒷면은 진노랑색을 나타냈다.

*P. crustosum*인 KCCM 60006은 CYA 배지에서 주름진 편평한 형태의 균체~진회색 균총을 형성하였고 Cz 배지에서 편평한 형태의 연녹색 균총으로 붉은 갈색색소를 생성하였다. G25N 배지에서는 청색의 균총을 형성하였다.

대조균주로 사용된 *P. expansum*인 KCCM 12034, KCTC 6434, KCTC 6929, CNU 7002의 포자는 부드러운 표면을 가진 구형~타원형으로 크기는 2.8~3.3 μm 이고 phialide는 병모양으로 7.8~13.6 × 2.3~3.5 μm 크기가었고, rami는 표면이 부드럽고 2~3개 분지하였다. *P. solitum*의 포자형태는 KCTC 6559 균주의 경우 포자 표면이 부드러운 반면 CNU 7003은 표면이 돌기모양이 형성되어 거칠며 크기는 2.9~3.6 μm 의 구형~타원형 모양이었다. phialide는

Table 4. Reaction of *Penicillium* spp. on growth and production of acid and basic metabolites on creatine sucrose agar and nitrate sucrose agar

Strain	Creatine sucrose agar			Nitrate sucrose agar	
	Growth ^a	Acid ^b	Base ^c		
<i>P. expansum</i>	Group 1~9	++	++	++	-
<i>P. solitum</i>	Group 10~12	++	++	++	-
<i>P. crustosum</i>	Group 13~15	++	++	++	-
<i>P. expansum</i>	KCCM 12034	++	++	++	-
	KCTC 6434	++	++	++	-
	KCTC 6929	++	++	++	+
	CNU 7002	-	-	-	-
<i>P. solitum</i>	KCTC 6559	++	++	++	-
	CNU 7003	++	++	++	-
<i>P. crustosum</i>	KCCM 60006	++	++	++	-
<i>P. digitatum</i>	KCCM 60140	-	-	-	+
<i>P. verrucosum</i>	KCTC 6265	-	-	-	+
<i>P. hirsutum</i>	KCTC 6110	++	++	++	+
<i>P. echinulatum</i>	KCTC 6437	-	-	-	+
<i>P. italicum</i>	CNU 6013	++	++	++	-
	KCTC 6400	-	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	KCTC 6396	-	-	-	+
<i>P. brevicompactum</i> var. <i>magnum</i>	KCCM 11632	-	-	-	-
<i>P. griseofulvum</i>	JBR 20004	-	-	-	+

^a++ : Growth nearly as on Czapek's yeast extract agar, - : as on water agar.

^b++ : Abundant acid production (the agar turns from violet to yellow in 5~7 days), - : no color change.

^c++ : Production of basic metabolites after the production of acid (color change back from yellow to violet after 8~21 days), - : no change back from acid reaction.

^d+ : Growth nearly as on CYA agar, - : as on water agar.

병모양으로 9.0~12.2×3.0~3.4 μm으로 stipe의 표면이 거칠었다. KCCM 60006(*P. crustosum*)의 포자는 구형~타원형의 부드러운 표면이며 stipe의 표면은 돌기모양으로 거칠었다.

RAPD 분석

배에서 분리한 15개 group 대표균주와 표준균주인 *Penicillium* spp.의 genomic DNA RAPD 분석에 5개의 URP primer를 사용하였다. DNA template, primer, dNTP 등의 농도는 예비실험을 통하여 뚜렷한 band pattern을 나타내도록 조정하였다. 사용한 primer는 *Penicillium* spp. 균주를 분류하는데 유용한 polymorphism을 나타냈다. 5개의 primer에 의해 증폭된 fragment는 각 primer당 12~21개의 genomic DNA fragment를 형성하였다. 31개 균주에 의해 생성된 band는 총 744개로 URP primer 5에서 255개로 가장 많았고, URP primer 7에서 83개로 가장 적었으며, 증폭된 genomic DNA fragment의 크기는 약 0.1~2.0 kb 였다(Fig. 1).

모든 균주를 대상으로 primer를 이용하여 RAPD 분석에 의해 얻은 744개의 band 유무에 따라 NTSYS-pc의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 4군으로 구분되었다. 첫 번째군은 KCCM 12034, KCTC 6434, group 1~9가 87.4~100%의 높은 상동성을

보였다. 두 번째군은 KCTC 6929, CNU 7002, CNU 7003, KCTC 6559, KCCM 60140, 10~12 group는 73.9~98.8%의 상동성을 보였으며, 세 번째군은 CNU 6013, JBR 2004, KCCM 11632, KCTC 6437이 70.4~75.3% 상동성을 보였다. 네 번째군은 KCTC 6265, KCTC 6396, KCCM 60006, KCTC 6110, KCTC 6400, group 13~15는 47.7~100% 상동성을 보였으며 전체적 유사도는 47.7% 상동성을 보였다. group 1, 2는 KCCM 12034과 96.3% 이상의 상동성을 보였고, KCTC 6434와 87.4% 이상의 상동성을 보였다. Group 4~9는 KCTC 6434와 94.2% 이상의 높은 상동성을 보였으며 KCCM 12034와 87.4% 상동성을 보였다. KCTC 6929, CNU 7002와 각각 72.4% 상동성을 보였다. Group 10~12는 CNU 7003과 97.5% 이상의 높은 상동성을 보였고 KCTC 6559와는 76.3% 상동성을 보였다. Group 13~15는 KCCM 60006과 61.1% 상동성을 보였다.

배에서 분리하여 배양형태적 특성에 따라 15개 group으로 구분한 균주는 RAPD 결과 3개 group으로 구분되어, 종내 밴드간 상동성이 높았으며, 대조 균주로 사용한 표준균주와도 밴드양상의 상동성이 높게 나타났다. 동일종이지만 질소원 이용성에서 차이를 나타내는 group 1~9, KCCM 12034, KCTC 6434와 KCTC 6929와 CNU 7002 간에는 상동성이 72.4%로 약간 낮았다. 배양형태적 특성

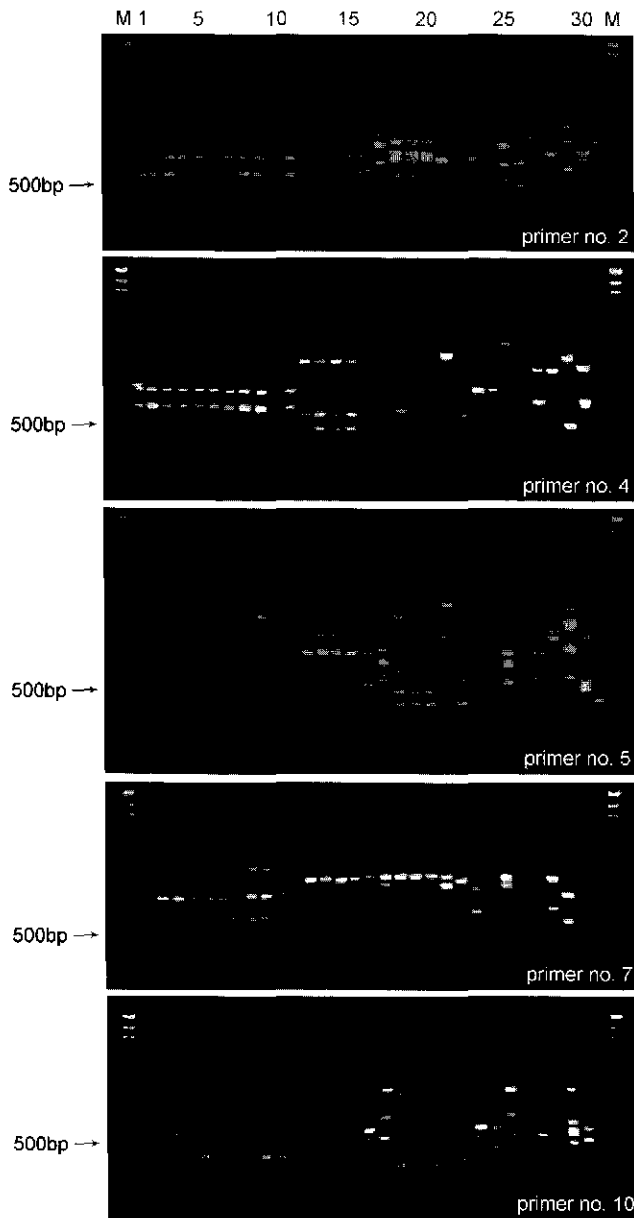


Fig. 1. Representative random amplified polymorphic DNA fingerprints using URP primers of the 31 isolates of *Penicillium* spp. Lane 1, KCCM 12034, lane 2, CAP 189, lane 3, SP 8, lane 4, CAP 131, lane 5, CAP 148, lane 6, CAP 107, lane 7, CAP 115, lane 8, CAP 114, lane 9, MAP 4, lane 10, MAP 17, lane 11, KCTC 6434, lane 12, CNU 7003, lane 13, MAP 25, lane 14, MAP 1, lane 15, SP 71, lane 16, KCTC 6559, lane 17, KCCM 60006, lane 18, CAP 126, lane 19, CAP 186, lane 20, CAP 117, lane 21, KCTC 6265, lane 22, KCCM 60140, lane 23, KCTC 6929, lane 24, CNU 7002, lane 25, KCTC 6110, lane 26, CNU 6013, lane 27, KCTC 6437, lane 28, JBR 20004, lane 29, KCTC 6400, lane 30, KCTC 6396, lane 31, KCCM 11632.

이 유사하였던 group 10~12와 CNU 7003은 97.5% 이상의 높은 상동성을 보이며 KCCM 60140과도 87.7% 상동성을 나타낸 반면 배지상에서 배양성상이나 포자의 형태

에 차이가 있었던 KCTC 6559는 76.3%로 상동성이 낮게 나타났다. 또한 배지상에서 배양성상과 포자와 stipe 등 형태적 특성에서 뚜렷한 차이를 나타내는 group 1~9, group 10~12와 group 13~15간에는 64.3% 이상의 상동성을 보여 배양형태적 특성의 결과와 일치하였다.

RAPD 분석은 집단유전학에서 집단들간의 유전적 연관관계의 연구에 널리 이용되고 있는 기법 중의 하나로 균주간의 전반적인 유전적 연관성을 조사하는데 적합하여 단시간에 많은 시료를 사용할 수 있는 신속성과 경제적 이점이 있다. 이 방법을 이용하여 Kelly 등(1994)은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*의 pathotype 차이와 일치하는 두 group으로 구분하였고, Brand 등(1998)은 형태적 특성에 근거한 동정법의 단점을 보완하기 위하여 *Aspergillus fumigatus* 균의 분류동정에 RAPD를 이용한 방법을 도입하였다. Boysen 등(1996)은 기존에 두 변종으로 구분되어 있던 *Penicillium roqueforti* group을 RAPD 방법을 응용하여 *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. paneum*의 3종으로 재분류한 바 있다. 본 실험의 경우 대조 균주들과 동일종으로 동정된 배에서 분리한 균주들이 상동성이 낮은 결과는 분리원의 차이와 배양 형태적인 특성에서 다른 결과를 얻은 것과 관련이 있는 것으로 생각된다. Kim 등(1998)은 독소를 생성하는 *Alternaria* 병원균의 RAPD 분석 결과 4종의 *Alternaria* 균들의 유연관계가 80% 이상 상동이 높다고 보고한 바 있어 종이 다르더라도 속내의 종들은 상동성이 높음을 시사하였다. 그러나 Koh 등(1998)은 감귤 점무늬병균의 유전적 다양성을 분석한 결과 동일한 지역에서도 기주의 종에 따라 분리된 균주들 간에 유전적 분화가 다양하고 기주의 종이 동일하더라도 지역에 따라서 분리 균주들간에 유전적 분화가 보다 다양하게 발생함을 보고한 바 있다. Hyun과 Park(1996)은 딸기 시들음병균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*의 동일 종 내의 균주를 RAPD marker를 이용하여 유전적 변이를 조사해 본 결과 체세포화합성에 따라 두 group으로 구분되었으며 상동성은 31%임이 보고된 결과들과 마찬가지로 동일종이더라도 분리원에 따라 유전적 분화가 다양해진 결과로 생각된다.

동일종이면서도 배양형태적 특성이 다양하고 기존 분류된 종들의 계속되는 재분류 동정과 같은 *Penicillium*속 균의 배양형태적 특징에 의한 분류의 단점을 보완할 수 있는 방법의 하나로 Sequerra 등(1997)은 RAPD와 RFLP를 이용하여 *P. nodositatum*의 분류적 위치를 연구하였고, Hocking 등(1998)은 밀의 근권에서 균을 분리하여 배양·형태적 특성을 연구하고, secondary metabolites을 분석한 다음 RAPD PCR를 이용하여 *Penicillium radicum* sp. nov.를 동정한 바 있다. 이에 따라 RAPD 분석은 배양형태적, 생리적 특성을 근거로 한 분류체계에 분자생물학적 유인관계 분석을 부가하여 종동정에 유용한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

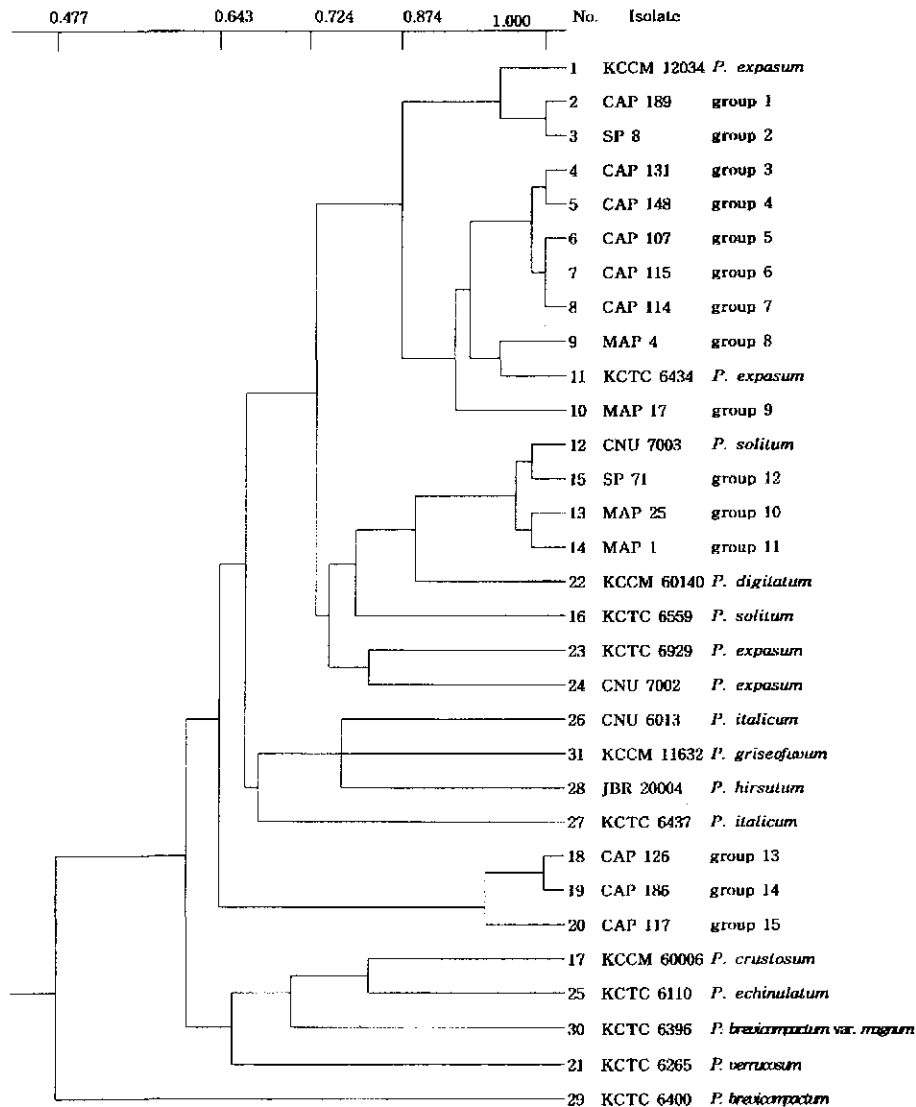


Fig. 2. UPGMA dendrogram derived from the RAPD profiles of genomic DNA in the 31 isolates of *Penicillium* spp. with 5 different random primers.

적 요

저장배에서 분리한 15그룹 3종을 KCTC, KCCM, 충남대에서 분양받은 16균주를 대상으로 상호 유연관계를 분석하고자 배양적 특성을 관찰하고 RAPD 검정에 의한 진단 가능성을 검토하였다. 병원균의 배양특성을 조사한 결과 배지상 생육형태, 색, 속도 등에 있어서 균주간 차이를 보였으며 배양적 특성과 RAPD에 의한 유연관계 분석 결과를 비교 분석하기 위하여 배에서 분리한 15개 균주와 16개 표준 균주의 중간 다형성을 관찰하였다. RAPD를 이용하여 유전적 다양성을 분석하기 위하여 5개의 URP primer를 이용하여 genomic DNA를 증폭시킨 결과 0.1~2.0 kb 크기의 총 744개 band들이 증폭되었다. cluster 분석 결과 전체 유사도는 47.7%로 31 균주들은 4개의 genomic DNA RAPD 집단으로 분류되었다. 배에서 분리한 *P.*

expansum 균주간에는 87.4% 이상의 상동성을 보였고, *P. solitum* 균주간에는 97.5%, *P. crustosum* 균주 간에는 95.1% 이상의 상동성을 보였다. 배에서 분리된 동일한 종 내에서는 배양적 특성에 의한 동정결과와 RAPD에 의한 분석결과와 일치하였다.

참고문헌

- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J. and Rossen, L. 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142: 541-549.
- Brand, M. E., Padhye, A. A., Mayer, L. W. and Holloway, B. P. 1998. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and taqman automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clinical Microbiol.* 36: 2057-2062.
- Cho, W. D., Kim, W. G., and Kim, H. M. 1995. Fungi associated

- with storage diseases of garlic. RDA. *J. Agri. Sci.* **37**: 325-329.
- Hocking, A. D., Whitelaw, M. and Harden, T. J. 1998. *Penicillium radicum* sp. nov from the rhizosphere of Australian wheat. *Mycol. Res.* **102**: 801-806.
- Holmes, G. J., Eckert, J. W. and Pitt, J. I. 1994. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Phytopathology* **84**: 719-727.
- Hong, S. Y., Kim, W. G., Cho, W. D. and Lee, Y. H. 1991. Fungi associated with storage disease of citrus fruits. *Res. Rept. RDA (C. P.)* **33**: 12-17.
- Hyun, J. W. and Park, W. M. 1996. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Korean J. Plant. Pathol.* **12**: 41-46.
- Jo, W. S., Rew, Y. H., Kim, S. H., Yeun, J. T. and Choi, B. S. 1999. Occurrence of bluish green mold of *Pleurotus eryngii* by *Penicillium corylophilum*. *Korean J. Mycol.* **27**: 412-414.
- Kelly, A., Alcalá-Jimenes, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. R., Perez-Artes, E. and Jimenez-Diaz, R. M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* **84**: 1293-1298.
- Kim, B. Y., Kang, H. W., Yu, S. H., Itoh, Y. and Kohmoto, K. 1998. RAPD analysis of host-specific toxin (HST) producing *Alternaria* species. *Kor. J. Plant Pathol.* **14**: 92-98.
- Koh, Y. J., Seo, J. K., Lee, T. S., Song, J. H., Kwon, H. M., Moon, D. Y., Moon, D. K. and Han, H. R. 1998. Genetic diversity of *Phomopsis citri* with random amplified polymorphic DNA (RAPD) and fungicide resistance. *Kor. J. Plant Pathol.* **14**: 171-176.
- Okuda, T. 1994. Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variation in culture conditions. *Mycologia* **86**: 259-262.
- Sequeria, J., Marmeisse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A. and Moiroud, A. 1997. Taxonomic position and intraspecific variability of the nodule forming *Penicillium nodositatum* inferred from RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer and random amplified polymorphic DNA. *Mycol. Res.* **101**: 465-472.