식물병연구
Res. Plant Dis. 12(3) : 168-177 (2006)

Research in Plant Disease
©The Korean Society of Plant Pathology

한국농업미생물자원센터(KACC)에 보존중인 *Colletotrichum gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 재동정

김대호 · 전영아 · 고승주 · 이종규[1] · 홍승범*
농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농업미생물자원센터, [1]강원대학교 산림과학대학 산림자원보호학과

Reidentification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* Isolates Stored in Korean Agricultural Culture Collection (KACC)

Dae-Ho Kim, Young-Ah Jeon, Seung-Joo Go, Jong-Kyu Lee[1] and Seung-Beom Hong*
Korean Agricultural Culture Collection, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea
[1]Tree Pathology and Mycology Laboratory, Division of Forest Resources, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received on October 26, 2006)

Thirty-nine strains of *Colletotrichum gloeosporioides* and 5 strains of *C. acutatum* stored in Korean Agricultural Culture Collection (KACC) were re-identified based on molecular characteristics of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and partial β-tubulin gene and cultural characteristics on potato dextrose agar (PDA) and Benomyl-added PDA. As the results, 19 strains were identified as *C. acutatum* with 13 strains of group A2, 5 strains of group A3, and 1 strain of group A4. In addition, 20 strains were identified as *C. gloeosporioides* with 18 strains of ribosomal DNA group (RG) 4 and 2 strains of RG6. The rest were identified as *C. boninense* RG5 (2 strains), *C. coccodes* RG2 (2 strains), and *C. dematium* RG12 (1 strain). Out of domestic 31 strains, 12 strains were identified as *C. acutatum* A2, one strain as *C. acutatum* A3, 14 strains as *C. gloeosporioides* RG4, 2 strains as *C. gloeosporioides* RG6, one strains as *C. boninense* RG5 and one strain as *C. dematium* RG12. We also discussed taxonomy of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* and composition of *C. gloeosporioides/C. acutatum* isolates from major crops in Korea.

***Keywords* : *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, KACC, Re-identification**

한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)는 1995년에 설립되어 국내 토착미생물을 수집하고 외국표준균주를 도입하여 국내외의 관련 연구자들에게 필요한 균주를 제공하고 있다. 현재 3,000여점의 곰팡이자원을 보유하고 있으며 연 700여 균주를 관련연구자에게 분양하고 있다. 이들 보존자원 중에 국내유래균은 주로 농과계대학, 농촌진흥청 및 관련기관으로부터 도입되었으나 초기에는 취약한 인력사정으로 기탁자의 정보에 의존하여 수탁하고 철저한 동정 과정없이 장기 보존되었다. 비록 해당분야의 전문가로부터 균주를 도입하였다 하더라도 이들이 국내외의 여러 연구에 표준 및 참고균주로 활용되는 점을 고려할 때 동정과 특성평가에 대하여 더욱 신중하여야 함은 마땅하다. 이에 KACC에서는 2005년부터 분류용 핵심유전자의 염기서열을 포함한 분자생물학적 특성평가와 형태적 특성평가를 통하여 보유균주에 대한 재동정을 실시하고 있다. 127 균주를 보유하고 있는 *Colletotrichum*속균에 대한 재동정을 실시하던 중에 *C. gloeosporioides* 39 균주에서 흥미로운 결과를 얻었다. 이에 *C. gloeosporioides*와 이와 형태적으로 구분이 명확하지 않은 *C. acutatum*의 분류용 유전자 염기서열분석과 배양적 특성에 의한 종의 재동정 결과를 소개하고자 한다.

*Corresponding author
Phone) +82-31-299-1796, Fax) +82-31-299-1798
E-mail) sbhong@rda.go.kr

재료 및 방법

사용균주. 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural

Table 1. KACC strains of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* used in this study

KACC No.	Name by depositor	Name changed (current name in KACC)	Host/Geographical origin (Other collection No.)	Isolated date	Group by DNA analyses[a].	Growth on PDA (mm)	Growth on PDA with Benomyl (mm)	
							0.5 *mg/ml*	2.0 *mg/ml*
40004	*Colletotrichum gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Daejeon	Unknown	A2	40	16	14
40007	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Daejeon	Unknown	A2	39	17	14
40040	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Vitis* sp./*Philippines* (ATCC 32097)	Unknown	A2	37	15	12
40042	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Korea	Unknown	A2	34	15	12
40689	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Pyeongtaek	02/1998	A2	39	17	13
40691	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Hoengseong	08/1998	A2	39	18	14
40700	*C. acutatum*	*C. acutatum*	*Carthamus tinctorius*/Jecheon	06/1998	A2	35	13	12
40801	*C. acutatum*	*C. acutatum*	*Carthamus tinctorius*/Uiseong	06/1998	A2	42	18	16
40804	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Capsicum annuum*/Gapyeong	08/1996	A2	45	18	14
40805	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Lycopersicon esculentum*/Yangpyeong	09/1996	A2	39	18	15
40847	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Malus pumila* var. *dulcissima*/Andong	10/1999	A2	38	23	21
40848	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Malus pumila* var. *dulcissima*/Yeongju	10/1999	A2	36	20	17
42089	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Punica granatum*/Hapcheon	04/2006	A2	27	13	11
40980	*C. acutatum* f. *pineum*	*C. acutatum* f. *pineum*	*Pinus radiata*/New Zealand (CBS 797.72)	Unknown	A3	39	20	14
41831	*C. acutatum*	*C. acutatum*	*Persea americana*/Australia (CBS 293.67)	06/1967	A3	35	19	13
41832	*C. acutatum*	*C. acutatum*	*Malus sylvestris*/Italy (CBS 786.86)	11/1986	A3	40	20	18
41838	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Lycopersicon esculentum*/Unknown (CBS 490.92)	11/1922	A3	38	16	13
41932	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Spiraea prunifolia* var. *simpliciflora*/Geoje	05/2002	A3	40	17	13
41837	*C. gloeosporioides*	*C. acutatum*	*Malus sylvestris*/Unknown (CBS 285.50)	04/1950	A4	41	15	12
40003	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Capsicum annuum*/Daejeon	Unknown	RG4	65	0	0
40299	*Glomerella cingulata*	*Glomerella cingulata*	*Malus pumila* var. *dulcissima*/Daejeon	08/1997	RG4	56	0	0
40300	*G. cingulata*	*G. cingulata*	*Malus pumila* var. *dulcissima*/Gunwi	08/1997	RG4	60	0	0
40690	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Capsicum annuum*/Cheongsong	02/1998	RG4	56	0	0
40692	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Limonium shinuatum*/Namwon	10/1998	RG4	58	0	0
40694	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Limonium shinuatum*/Suwon	11/1998	RG4	57	39	24
40695	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Fragaria* x *ananassa*/Geochang	03/1999	RG4	59	31	24
40696	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Fragaria* x *ananassa*/Milyang	03/1999	RG4	57	23	13
40698	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Actinidia arguta*/Muan	10/1998	RG4	62	0	0
40699	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Actinidia arguta*/Muan	10/1998	RG4	59	0	0

Table 1. Continued

KACC No.	Name by depositor	Name changed (current name in KACC)	Host/Geographical origin (Other collection No.)	Isolated date	Group by DNA analyses[a]	Growth on PDA (mm)	Growth on PDA with Benomyl (mm)	
							0.5 mg/ml	2.0 mg/ml
40812	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Fragaria* x *ananassa*/Hwaseong	09/1998	RG4	58	0	0
40897	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Malus pumila* var. *dulcissima*/Suwon	09/2000	RG4	61	0	0
40892	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Cactus* sp./Jeju	07/1999	RG4	55	22	16
40961	*G. cingulata*	*G. cingulata*	*Portulaca oleracea*/Sancheong	08/2001	RG4	69	0	0
41740	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Stylosanthes* sp./Australia (CBS 510.97)	02/1997	RG4	39	0	0
41833	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Malus sylvestris*/Germany (CBS 111.14)	Unknown	RG4	55	0	0
41836	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Diospyros kaki*/Japan (CBS 272.51)	02/1951	RG4	66	10	9
42113	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Citrus nobilis*/Iran	12/2004	RG4	59	0	0
40893	*C. gloeosporioides*	*C. boninense*	*Cactus* sp./Jeju	09/1999	RG5	-	-	-
42098	*C. gloeosporioides*	*C. boninense*	*Begonia* sp./Iran	06/2005	RG5	-	-	-
40693	*C. gloeosporioides*	*C. gloeosporioides*	*Limonium shinuatum*/Jeju	11/1998	RG6	61	20	12
40895	*G. cingulata*	*G. cingulata*	*Perilla frutescens* var. *japonica*/Yeongi	09/2000	RG6	48	8	0
40041	*C. gloeosporioides*	*C. dematium*	*Capsicum annuum*/Unknown	Unknown	RG12	-	-	-
41834	*C. gloeosporioides*	*C. coccodes*	*Citrus* sp./USA(CBS 114.14)	Unknown	RG2	-	-	-
41835	*C. gloeosporioides*	*C. coccodes*	*Anthurium*/Germany(CBS 150.33)	02/1933	RG2	-	-	-

[a]A2, A3 and A4 - *C. acutatum* group; rDNA group (RG) 2 - *C. coccodes* group; RG4 - *C. gloeosporioides* group; RG5 - *C. boninense* group; RG6 - *C. gloeosporioides* group; RG12 - *C. dematium* sensu lato group.

Culture Collection, KACC)에서 보유하고 있는 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum* 44 균주(국내 31 균주, 국외도입 13 균주)를 실험에 사용하였으며 분리지역, 분리기주, 분리일자 등의 자세한 내용은 Table 1에 요약되어 있다. 균주들은 Potato Dextrose Agar(PDA) 사면배지에 배양하여 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

rDNA ITS와 β-tubulin 유전자 염기서열 분석에 의한 계통도 작성. 균주를 Potato Dextrose Broth(PDB)에 접종하고 25°C에서 3일간 진탕배양하여 균사체를 수확하였다. 1.5 m*l* microtube에서 동결건조한 균사체를 마쇄한 뒤 Lee와 Taylor(1990)의 방법으로 genomic DNA를 추출하였다.

공시균주의 rDNA-ITS영역을 증폭하기 위해 White 등(1990)이 사용한 primer ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였고 β-tubulin 영역의 증폭을 위해서는 T1(5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3') (O'Donnell and Cigelnik 1997)과 bt2b(5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass and Donaldson 1995)를 사용하였다. ITS 영역의 증폭을 위하여 2.5 mM dNTP 3 μ*l*, 10X buffer 5 μ*l*, 100 uM primer 0.4 μ*l*, 1.5 unit/μ*l* *Taq* DNA polymerase(SolGent Co., Ltd.) 0.3 μ*l*, genomic DNA 1 μ*l*를 멸균수와 함께 혼합하여 최종 volume을 50 μ*l*로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 predenaturation 4분 후에 95°C에서 denaturation 1분, 58°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 2분을 35회 반복하고 최종 72°C에서 extension 7분하여 ITS1, 5.8S, ITS2 영역과 일부의 18S와 28S 영역을 포함한 약 570 bp의 단일밴드를 증폭시켰다. β-tubulin의 reaction mixture는 프라이머를 제외하고는 ITS의 경우와 동일하였고, PCR 조건 역시, annealing 64°C를 제외하고는 ITS와 동일한 조건으로 exon 1~Intron 6 영역과 일부의 exon 6 영역을 포함하는 약 750 bp의 밴드를 증폭시켰다.

증폭된 유전자는 PCR_{96} Cleanup Plates(Millipore Corp., Bedford., MA 01730)로 정재한 후 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit(ABI 0401041)를 사용하여 sequencing PCR 반응을 하였고 반응에는 증폭에 사용한 것과 동일한 prime를 사용하였다. Sequencing PCR 산물을 Montage SEQ_{96} Sequencing Reaction Cleanup Kit(Millipore Corp., Bedford., LSKS 096 24)로 정재한 후 ABI 3100 DNA Sequencer를 사용하여 염기서열을 해독하였다. 해독한 염기서열은 DNASTAR의 Seqman II를 이용하여 정리한 후에 MEGA v3.1의 Neighbor-Joining(NJ) (Kumar 등, 2004)의 방법을 이용하여 ITS는 18S와 28S 영역을 제외한 ITS1, 5.8S, ITS2 영역만을 이용하여 계통수를 작성하고 β-tubulin은 exon 3~Intron 6 영역과 일부의 exon 6 영역을 이용하여 계통수를 작성하여 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다. 국내균주의 분류학적 위치를 비교하기 위해서 NCBI GenBank의 염기서열을 획득하여 함께 유연관계도를 작성하였다.

PDA 배지와 Benomyl 배지에서 생장 측정. 분자적 분석결과 *C. gloeosporioides*나 *C. acutatum*으로 예상되는 39 균주를 cork borer(Ø6 mm)로 균사체 일부를 포함한 배지를 취하여 PDA배지 중앙에 접종한 후 25°C에서 5일 동안 암배양하고 균총의 직경을 측정하였다(Fig. 3A). 이와 함께 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 구별에 사용되는 Benomyl-PDA에서의 생장량도 측정하였다. 위와 동일한 방법으로 균사체 일부를 취하여 PDA에 Benomyl [벤레이트 수화제; 신젠타 코리아(주)]을 각각 0.5 mg/m*l*, 2 mg/m*l*를 첨가한 배지에 치상하여 25°C에서 5일간 암배양한 후에 균총의 직경을 측정하였다(Table 1, Fig. 3B).

결 과

rDNA ITS와 β-tubulin 유전자에 의한 계통도. Ribosomal DNA ITS의 계통도(Fig. 1)에서 *C. gloeosporioides*로 KACC에 기탁되었던 국내분리 29 균주 중에서 고추, 사과, 다래, 선인장, 감, 딸기, 스타티스, 쇠비름 등에서 분리한 14 균주는 Moriwaki 등(2002)의 *C. gloeosporioides* ribosomal DNA group(RG) 4에, 스타티스, 들깨에서 각각 분리한 KACC 40693과 KACC 40895는 Moriwaki 등(2002)의 *C. gloeosporioides* RG6에 그리고 선인장에서 분리한 KACC 40893은 Moriwaki 등(2002)의 *C. gloeosporioides* RG5에 위치하였다(Table 1). 그러나 사과, 홍화, 고추, 토마토, 석류 등에서 분리한 10 균주는 Talhinhas 등(2005)의 *C. acutatum* A2 그룹에 그리고 조팝나무에서 분리한 KACC 41932는 Talhinhas 등(2005)의 *C. acutatum* A3 그룹에 위치하였다. 또한 고추에서 분리한 KACC 40041은 Moriwaki 등(2002)의 *C. truncatum/C. dematium* RG12에 위치하였다. 국외의 미생물자원센터로부터 *C. gloeosporioides*로 도입된 10 균주 중에서 4 균주는 Moriwaki 등(2002)의 *C. gloeosporioides*의 RG4에 그리고 한 균주, Iran 336 (KACC 42098)는 *C. gloeosporioides*의 RG5에 위치하였으나 ATCC 32097, CBS490.92, CBS 285.50은 각각 Talhinhas 등(2005)의 *C. acutatum* A2, A3, A4 그룹에 소속되었으며 CBS 150.33(KACC 41835)와 CBS 114.14(KACC 41834)는 *C. coccodes*의 RG2에 소속되었다. 하지만 *C. acutatum*으로 KACC에 도입된 국내 2 균주와 국외 3 균주는 모

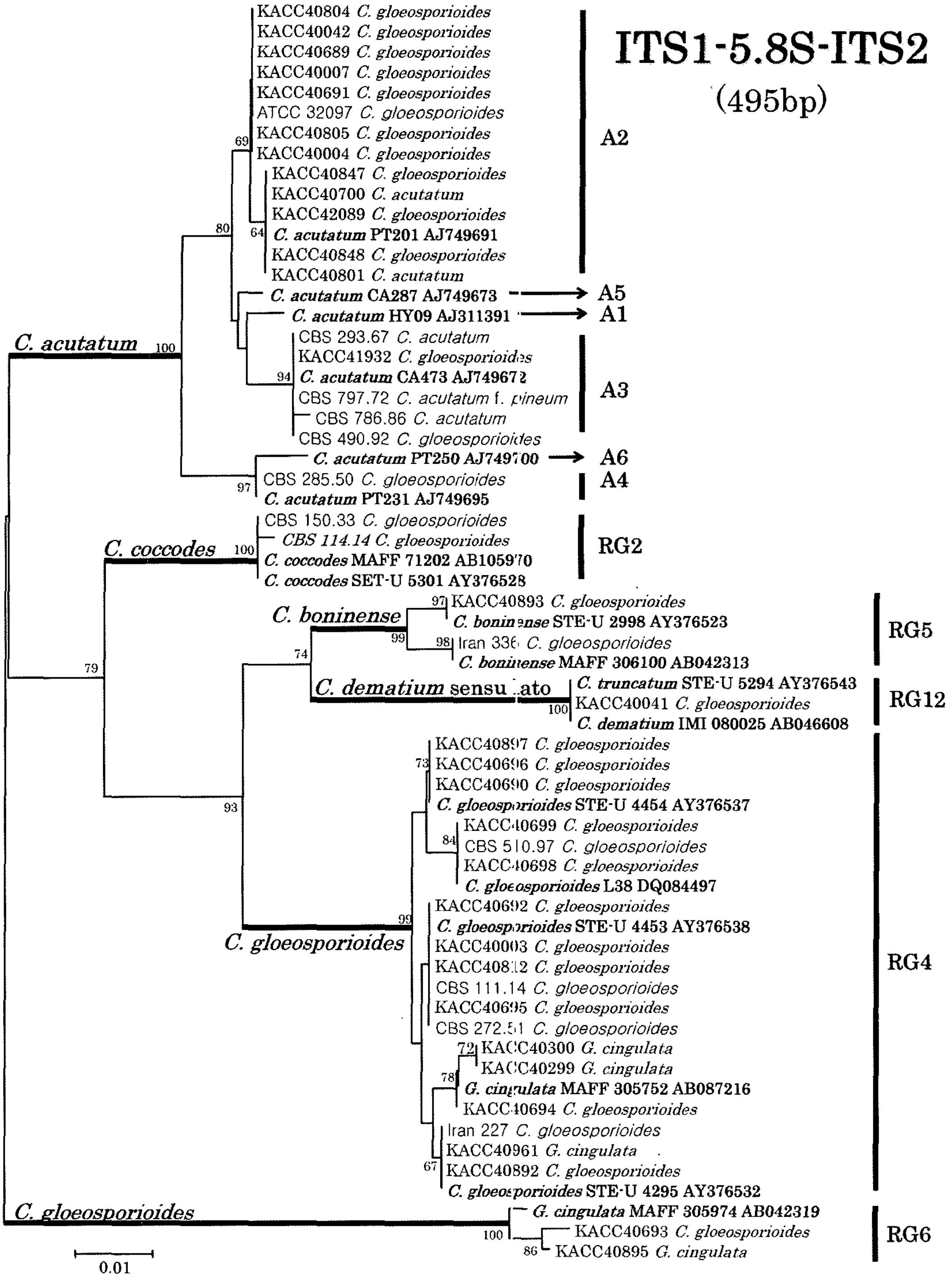

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* strains held in KACC. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of rDNA-ITS sequence. ITS sequence of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* strains written with bold were obtained from Thalhinhas *et al.* (2006), Carolien *et al.* (2004) and Moriwaki *et al.* (2002) for reference. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 60% (out of 1,000 bootstrap replication).

두 *C. acutatum* 그룹인 A2, A3에 위치하였다.

β-tubulin 부분 유전자의 염기서열에 기초한 계통도(Fig. 2)에서도, 일부 균주 간에 근연관계가 조금 다르거나 bootstrap value에서 차이가 있었지만, 균주들의 clustering은 ITS 계통도와 일치하였다.

PDA 배지와 Benomyl 배지에서 생장 측정. rDNA ITS

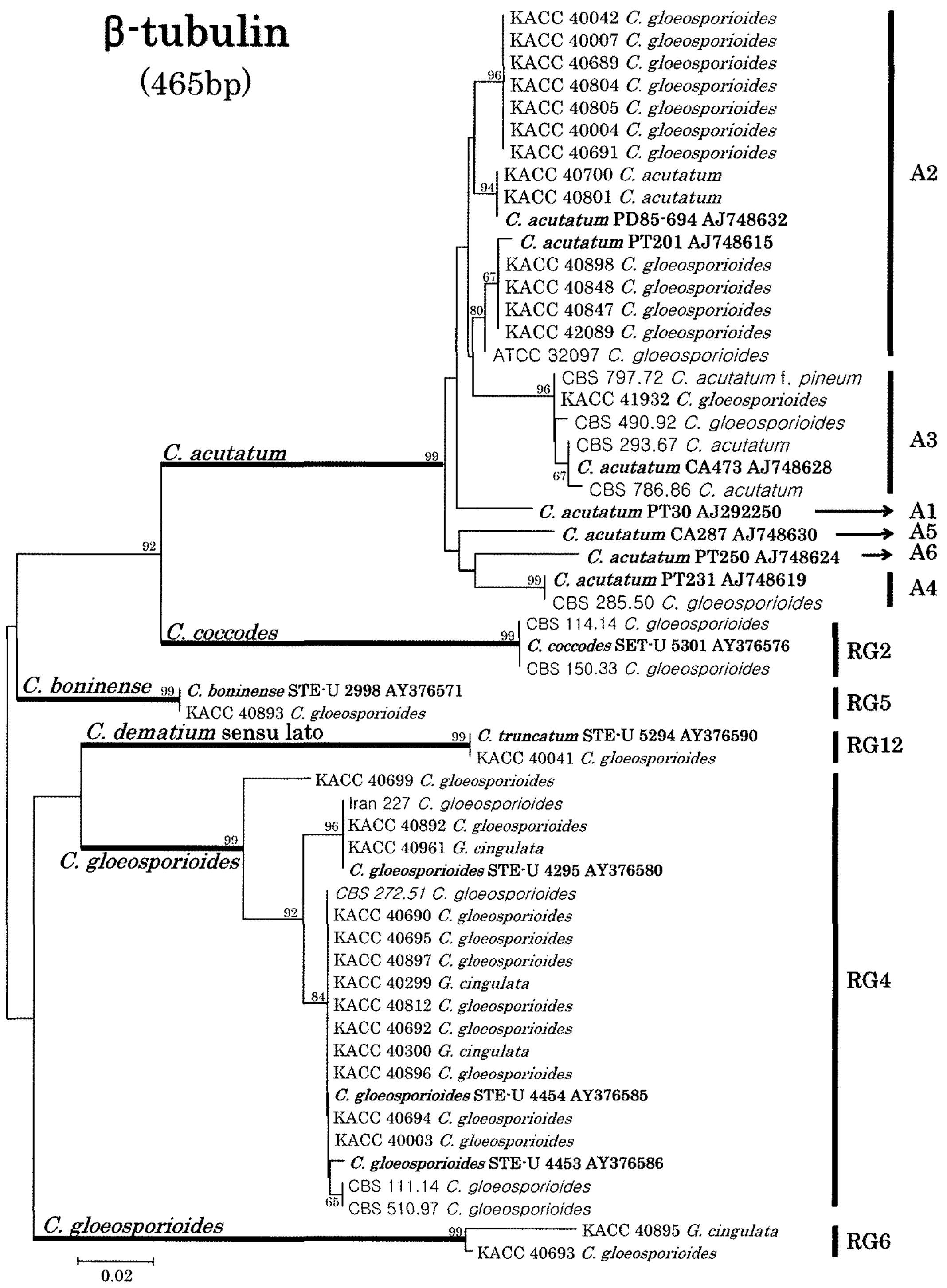

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* strains held in KACC. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of β-tubulin partial sequence. β-tubulin sequence of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* strains written with bold were obtained from Thalhinhas *et al.* (2006), Carolien *et al.* (2004) and Moriwaki *et al.* (2002) for reference. The numbers above the nodes represent bootstrap values of > 60% (out of 1,000 bootstrap replication).

와 β-tubulin 유전자의 유연관계도(Fig. 1, 2)에서 *C. acutatum* 그룹에 소속되었던 19 균주는 PDA 배지에서 5 일간 27~45(평균 38.1) mm 생장하였다(Table 1, Fig. 3). 반면에 *C. gloeosporioides* RG4에 소속되었던 18 균주 중

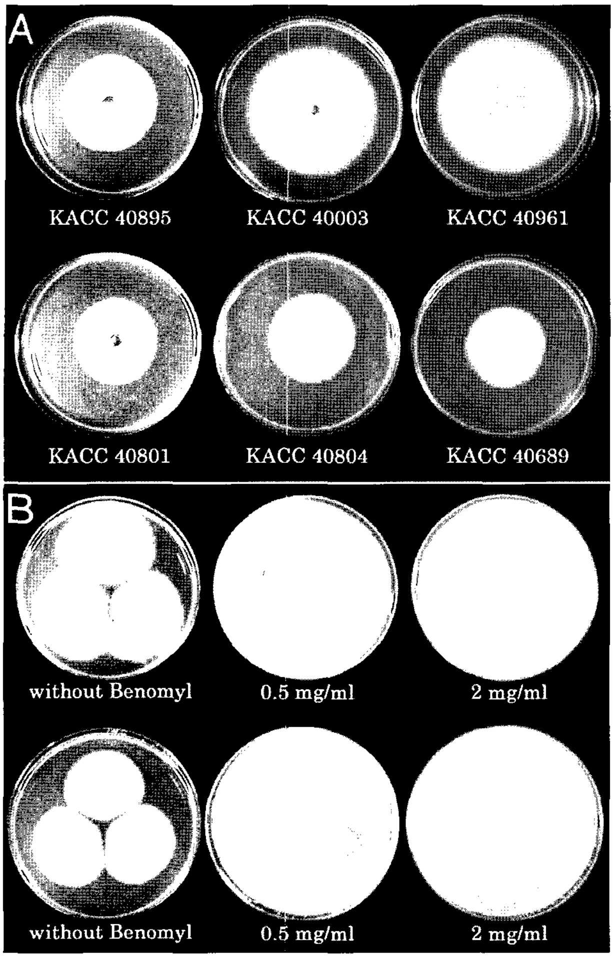

Fig. 3. Growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* on PDA with or without Benomyl. **A**, strains of *C. gloeosporioides* group (**upper**) and strains of *C. acutatum* group (**lower**) on PDA. **B**, *C. gloeosporioides* (KACC 40812) (**upper**) and *C. acutatum* (KACC 40804) (**lower**) on PDA with Benomyl.

에서 17 균주는 55~69(평균 59.5) mm 생장하였으나 CBS 510.97은 39 mm로서 예외적인 생장량을 보였다. *C. gloeosporioides* RG6 2 균주는 48, 61 mm 생장하였다.

0.5, 2.0 mg/m*l*의 Benomyl이 포함된 PDA 배지에서는 Fig. 1, 2의 유연관계도에서 *C. acutatum* 그룹에 소속되었던 19 균주는 0.5 mg/m*l*에서 1.3~2.3 cm, 2.0 mg/m*l*에서는 1.1~2.1 cm 자랐으나 *C. gloeosporioides* 그룹(RG4, 6)에 속했던 20 균주는 6 균주만이 0.5 mg/m*l*에서 0.8~3.9 cm, 2.0 mg/m*l*에서는 0.9~2.4 cm 자랐고 나머지 14 균주는 생장하지 못했다.

고 찰

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. (1884)로부터 *C. acutatum* J.H. Simmonds(1968)을 구분하는 중요한 특징은 분생포자의 형태로서 *C. acutaum*의 포자는 방추형(fusiform)으로서 *C. gloeosporioides*보다 포자의 끝이 뾰족하다는 것이었다(Sutton, 1980; 강 등, 2005). 하지만 이 특징은 두 종을 명확히 구분하는데 한계를 보였고(Freeman 등, 1998) RAPD와 ribosomal DNA-ITS, β-tubulin 유전자 염기서열 등의 분자생물학 특징들이 이들을 명확히 구분함으로서 두 종을 구분하는 핵심적인 특징으로 사용되었다(Talhinhas 등, 2005; Brooker 등, 1991; Freeman 등, 1993). 이들 분자적 특징에 근거하여 두 종을 신속히 구분할 수 있는 특이 프라이머들이 제작되었고 PDA 배지에서 생장속도, Benomyl에 대한 반응성 등이 이 두 종을 구분하는 중요한 표현형적 특징으로 대두되었다(Talhinhas 등, 2005; Kim 등, 2003).

위의 분류기준에 의하면 *C. gloeosporioides*로 KACC에 기탁된 39 균주 중에서 rDNA-ITS와 β-tubulin 유전자 계통도(Fig. 1, 2)에서 *C. acutatum* A2~6 그룹에 속하였던 14 균주는 *C. acutatum*으로 동정된다고 말할 수 있다. 이들 분자적 동정결과는 PDA 배지에서의 생장속도와 Benomyl에 대한 반응성에서도 대체적으로 일치하였는데 *C. acutatum*으로 재동정된 균주들은 PDA 배지에서 5일간 배양하였을 때 45 mm 이하(평균 38.1 mm)의 생장을 보였으며 Benomyl에 대하여 중도저항성을 보였다(Table 1, Fig. 3).

*C. acutatum*으로 재동정된 14 균주 중에서 11 균주는 국내로부터 그리고 두 균주는 CBS(Centraalbureau voor Schimmelculture, the Netherlands)에서 한 균주는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 도입되었는데 이와 같은 명명상의 문제는 국내외 구분 없이 동정상의 오류라기보다는 분자생물학적인 종개념의 도입에 의한 *C. acutatum/C. gloeosporioides*의 종개념의 변화에 기인한 것으로 볼 수 있다.

국내에서 분리되어 *C. acutatum*으로 (재)동정된 13 균주 중에서 고추, 홍화, 토마토, 사과나무, 석류나무 등의 12 균주는 Talhinhas 등(2005)의 A2 그룹으로 소속되었으며 조팝나무에서 분리된 한 균주는 A3 그룹에 속하였다.

*C. gloeosporioides*로 KACC에 도입된 균주 중에서 22 균주가 Moriwaki 등(2002)의 *C. gloeosporioides*의 ribosomal DNA 그룹(RG) 4, 5, 6에 속하였다. 이들 중의 대부분인 18 균주는 전형적인 *C. gloeosporioides* 그룹인 RG4에 속하였고 각각 2 균주가 RG5, 6에 속하였다. *C. gloeosporioides*로 동정된 균주들은 CBS 510.97(39 mm) 제외하고는 모두 55~69(평균 59.5) mm 생장하여 *C. acutatum*(45 mm 이하)보다 빠른 성장을 보였다. Benomyl 배지에서 생장은 대부분이 감수성을 나타내었으나 6 균주는 0.5 mg/m*l*에

서 0.8~3.9 cm, 2.0 mg/m*l*에서는 0.9~2.4 cm 자랐다. *C. gloeosporioides*로 최종 동정된 국내분리 17 균주는 고추, 사과, 다래, 선인장, 감, 딸기, 스타티스, 쇠비름 등의 14 균주가 Moriwaki 등(2002)의 RG4에 속하였고 선인장에서 분리한 KACC 40893은 RG5에, 스타티스(KACC 40693)와 들깨 (KACC 40895)에서 분리한 2 균주는 RG6에 속하였다.

Moriwaki 등(2002)에 의하면 일본에서 분리된 *C. gloeosporioides* 총 93 균주는 RG4가 73 균주, RG5가 12 균주, RG6가 8 균주로 구성이 되어 있었다. 이중 RG4 균주들은 전형적인 *C. gloeosporioides*의 특징을 나타내었으나, RG5는 분생포자가 scar를 가지며 형태적으로 RG4와 명확히 구분되었기 때문에 신종으로 다루어져야 한다고 하였으며, 2003년에 *Colletotrichum boninense* Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib.로 명명되었다. 그리고 RG6 균주는 oblong의 분생포자를 형성하며 PDA 배지에서 자낭각(perithecium)을 쉽게 만드나 RG4와 형태적으로 명확하게 구분되지 않는 것으로 보고하였다. 하지만 RG6와 RG4의 rDNA-ITS와 β-tubulin에서 유전적 거리가 RG4와 *C. acutatum*의 유전적 거리보다 더 큰 것을 고려한다면 Genealogical Concordance Phylogenetical Species Recognition(GCPSR) 개념(Taylor 등, 2000; Hong 등, 2005)에 따라 RG6 역시 신종으로 분리되어야 마땅할 것으로 생각된다. 결국 KACC가 보유한 *Colletotrichum* 균 중에서 RG4에 속한 18 균주만이 *C. gloeosporioides*이며 RG5의 두 균주는 *C. boninense*로 명명하여야 마땅할 것이며, RG6의 두 균주는 우선은 *C. gloeosporioides*로 명명할 수밖에 없으나 결국 다른 학명으로 바뀌어 질 것으로 예상된다.

*C. gloeosporioides*로 KACC에 기탁되었으나 *C. coccodes* RG2에 묶였던 CBS 150.33(KACC 41835), CBS 114.14 (KACC 41834)와 *C. dematium* RG12에 위치한 한국의 고추에서 분리된 KACC 40041은 동정상의 오류 혹은 KACC에서 취급상의 문제로 생각된다. 특히 이들 균주들은 낫형(falcate)의 분생포자를 가짐으로서 위의 주장을 명확히 하였다.

이상과 같이 *C. gloeosporioides* 39 균주와 *C. acutatum* 5 균주는 *C. gloeosporioides* 20 균주, *C. acutatum* 19 균주, *C. boninense* 2 균주, *C. coccodes* 2 균주 그리고 *C. dematium* 1 균주로 재동정되었다. 보유균주의 한계로 종합적인 결론을 도출하기는 어렵지만 국내 균주의 경우에 기주에 따른 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 분포를 보면 고추에서 분리된 균주는 6 균주가 *C. acutatum*이었고 2 균주가 *C. gloeosporioides*였는데 딸기와 스타티스의 경우는 3 균주 모두가 *C. gloeosporioides*이었다(Table 1). 한편 사과에서 분리된 5 균주는 2 균주가 *C. acutatum*이었고 2 균주가 *C. gloeosporioides*였다. 국내 재배 고추의 경우 탄저병의 주요 원인균이 *C. acutatum*으로 보고되었는데(Kim 등, 2003), 본 실험의 결과와 대체적으로 일치한다. 사과의 경우는 균주수가 작아서 경향을 이야기하기는 어렵지만은 KACC에 보존된 균주 내에서는 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 유사한 비율로 동정되었다. 딸기의 경우는 3 균주 밖이지만 모두 *C. gloeosporioides*로 동정되었다. *C. acutatum*과 *C. gloeosporioides*의 조성과 국내의 지역과 균주의 분리년도와는 특별한 상관관계를 보이지 않았다.

한편으로 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*의 분류적인 측면을 고찰할 때 rDNA-ITS DNA 염기서열에 의하여 두 종이 명확히 구분되었으며 β-tubulin 부분 염기서열 또한 ITS와 동일한 구분을 할 수 있었다. 하지만 본 실험의 결과에서는 *C. gloeosporioides* RG4의 18 균주 중에서 1 균주(CBS 510.97)의 성장이 *C. acutatum*의 성장범위와 겹치고 6 균주가 Benomyl에 대하여 중도저항성을 나타냄으로서 PDA와 Benomyl-PDA에서 생장특성이 두 종을 구분할 수 있다고 한 Talhinhas 등(2002)의 주장은 항상 옳은 것은 아닌 것으로 나타났으며 따라서 이들 특성들은 두 종을 구분하는 참고적인 특징으로만 사용할 수 있을 것으로 여겨진다. 따라서 rDNA-ITS와 β-tubulin 유전자 염기서열이 현재까지는 이 종을 구분할 수 있는 결정적인 특징으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

이와 같이 rDNA-ITS, β-tubulin 등의 분류용 핵심 염기서열들이 곰팡이 분류에서 차지하는 역할들이 상대적으로 커져가고 있으며, 형태적인 특징들은 매우 중요하지만 상대적으로 그 중요성이 줄어들고 있는 실정이다. 따라서 KACC에서는 서론에서 소개한 바와 같이 보유한 모든 균주에 대한 rDNA-ITS를 포함한 분류용 유전자의 염기서열을 분석하여 균주의 동정에 이용하고 나아가 이들을 데이터베이스화하여 상동성검색(BLAST 검색)이 가능하도록 제공하고자 한다. 아울러 KACC에 기탁되는 모든 균주에 대해서도 정식으로 등록하기 이전에 그들의 유전자 염기서열을 분석하여 동정을 확인하고 KACC에 등록하고자 한다.

요 약

한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 보존되어 있는 *Colletotrichum gloeosporioides* 39 균주와 *C. acutatum* 5 균주를 ribosomal DNA-ITS와 β-tubulin 부분염기서열과 PDA와 Benomyl-

PDA배지에서의 생장 특성에 의하여 재동정 하였다. 그 결과 13 균주가 Talhinhas 등의 *C. acutatum* A2 그룹으로, 5 균주가 *C. acutatum* A3 그룹으로, 1 균주가 *C. acutatum* A4 그룹으로, 18 균주가 Moriwaki 등의 *C. gloeosporioides* ribosomal DNA group(RG) 4로 2 균주가 *C. gloeosporioides* RG6로 2 균주가 *C. boninense* RG5로 2 균주는 *C. coccodes* RG2 그리고 1 균주는 *C. dematium* RG12 로 재동정되었다. 이들 중에서 한국에서 분리된 31 균주는 12 균주가 *C. acutatum* A2 그룹으로, 1 균주가 *C. acutatum* A3 그룹으로, 14 균주가 *C. gloeosporioides* RG4로 2 균주가 *C. gloeosporioides* RG6로 1 균주가 *C. boninense* RG5로 그리고 1 균주는 *C. dematium* RG12로 동정되었다. 더불어 *C. acutatum*/*C. gloeosporioides*의 분류적인 특징과 국내 주요 기주별 분포 등에 대하여 고찰하였다.

감사의 글

소중한 탄저병원균 균주를 KACC에 기탁해주신 권진혁, 김완규, 오인석, 이동혁 박사님께 감사드립니다. 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 : 20050401034815)의 부분적 지원으로 수행된 것으로 감사를 표합니다.

참고문헌

Adaskaveg, J. E. and Forster, H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. n: *Colletotrichum, Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction.* ed. by D. Prusky, S. Freeman and M. B. Dickman, pp. 317-336. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.

Brooker, A. E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L. W. 1991. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527.

Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant. Dis.* 82: 596-605.

Freeman, S., Pham, M. and Rodriguez, R. J. 1993. Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* 17: 309-322.

Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1323-1330.

Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97: 1316-1329.

강변관, 민지영, 김윤식, 박성우, Nguyen V. B., 김홍태. 2005. 고추 탄저병균 *Colletotrichum acutatum*의 포장 밀도 조사를 위한 반선택 배지의 확립 및 활용. 식물병연구. 11: 21-27.

Kim, J. T., Park, S. K., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. 2003. Identification of *Colletotrichum* spp. associated with pepper anthracnose in Korea. (abst.) *Plant Pathol. J.* 19: 331.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.

Lee, S. B. and Taylor, J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications,* ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. pp. 282-287. Academic Press, New York, USA

Lubbe, C. M., Denman, S., Cannon, P. F., Groenewald, J. Z. (Ewald), Lamprecht, S. C. and Crous, P. W. 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. *Mycologia* 96: 1268-1279.

Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D. and Freeman, S. 2006. Identification and characterization of Benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548.

Moriwaki, J., Sato, T. and Tsukiboshi, T. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience* 44: 47-53.

Moriwaki, J., Tsukiboshi, T. and Sato, T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequence. *J. Gen. Plant Pathol.* 68: 307-320.

Nirenberg, H. I., Feiler, U. and Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia* 94: 307-320.

O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116.

Sreenivasaprasad, S., Crown, A. E. and Mills, P. R. 1992. DNA sequence and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 265-281.

Sutton, B. C. 1980. *The Coleomycetes. Fungi Imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 696pp.

Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveira, H. 2002. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92: 986-996.

Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and

Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2987-2998.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S. and Fisher, M. C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31: 21-32.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, ed. by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, pp. 315-322. Academic Press, New York, USA.