

## Entomopathogenic Fungi의 ITS 영역에 대한 RFLP 분석

최인영\* · 유영진 · 최정식 · 이왕휴<sup>1</sup>

진라북도 농업기술원, <sup>1</sup>전북대학교 농생물학과

## Genetic Relationships of Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions on Entomopathogenic Fungi by RFLP

In-Young Choi\*, Young-Jin You, Joung-Sik Choi and Wang-Hyu Lee<sup>1</sup>

Chonbuk-do Agricultural Research and Extension Service, Iksan 570-140, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

**ABSTRACT:** A similarity coefficient were analyzed by RFLP of fourteen species of entomopathogenic fungi, isolated from inhabiting pupa and adult insect at forest. Each rDNA ITS I and ITS II with primers of ITS 1 and ITS 4 was amplified by PCR. The amplified products were conserved to 500 bp were not demarcated between genus and species. Four *Paecilomyces tenuipes*, two *Beauveria bassiana* and six *Cordyceps militaris* were treated by seven restriction enzymes and confirmed in species except JB3 by electrophoresis band. However, the band of *C. scarabaeicola* showed the identity with *B. bassiana*. The result of this experiment indicated that the teleomorph of *C. scarabaeicola* was the same as that of *B. bassiana*. *CfoI* and *HpaII* of seven restricted enzymes were easily discriminating in the genus between *Paecilomyces* and *Cordyceps*. Especially, *CfoI* was more effective to classify the genera of *Paecilomyces*, *Cordyceps* and *Beauveria* than other restriction enzymes. The band patterns of RFLP of *P. tenuipes*, *C. militaris*, *C. scarabaeicola* and *B. bassiana* were also analyzed by UPGMA program of NTSYS-pc and showed 100% significance. Thus, the similarity coefficient tended to be lower between genera by RFLP analysis, but was higher between species.

**KEYWORDS:** *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris*, Entomopathogen, ITS, *Paecilomyces tenuipes*, RFLP

폐 질환 및 면역력 증강효과 등(Sung *et al.*, 1999a)으로 알려진 동충하초는 곤충기생성균(entomopathogenic fungi)으로 800여종이 세계적으로 알려져 있고, 우리나라의 경우 70여종이 채집되어 보고되었다(Sung, 1996; Sung *et al.*, 1997). 대표적인 동충하초속군으로는 맥각균목(Clavicipitales)에 속하는 *Cordyceps* 속과 불완전균류의 *Paecilomyces* 속, *Podonectria* 속, *Torrubiella* 속, *Beauveria* 속 등이 있다(Sung, 1996). 동충하초속군에 대한 분류는 주로 자좌의 외부적인 특징, 자낭각이 자좌에 부착된 형태 및 자실체의 전체적인 형태에 의해 분류되었다. 초기에 Tulasne(see ref. Cho *et al.*, 1999)는 동충하초속군을 기생성에 따라 곤충을 기주로 하는 Entomogena와 땅속에 사는 균을 기주로 하는 Mycogena 두 군으로 나뉘었으며, 곤충을 기주로 한 군중에서 반 문헌형의 자낭각을 가진 종들은 *Eucordyceps* 절로, 반 돌출형의 자낭각을 가진 종들은 *Racemella*로 구분하였다. 1911년 Seveal은 *Cordyceps* 속을 Clavicipiteae 아과 Cordycipiteaetribe에 포함시켰으며, 북미의 *Cordyceps* 속 18종에 대하여 보고하였다. Kobayasi(1940)는 *Cordyceps* 속을 자낭포자의 형태에 따라 *Ophiocordyceps*, *Eucordyceps*, *Neocordyceps* 등 3개의 아속으로 크게 분류하였고, 아속을

다시 7개의 아절로 나누었다. 그 외에 Mains(1958)는 북미에서 59종의 *Cordyceps* 속에 관하여 보고하였으며, 최근에 Kobayasi(1982)는 *Cordyceps* 속 282종과 *Torrubiella* 속 73종에 관한 분류 검색표 및 불완전세대와 완전세대의 관계, 기주와 병원균간의 관계에 대하여 보고하였다.

동충하초의 불완전세대에 관하여 초기에는 *Cordyceps* 속의 불완전세대가 *Isaria* 속으로 취급되어 왔으나 Hodge 등(1996, 1998)에 의해 *Akanthomyces*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Desmidiospora*, *Hirsutella*, *Hymenostibe*, *Mariannaea*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paraisaria*, *Paecilomyces*, *Toly-pocladium*, *Verticillium* 등 다양한 형태의 다른 속이 있는 것으로 밝혀졌다.

이러한 분류는 주로 형태적인 것들과 자생지에서 조사한 것들을 근거한 것인데, 최근에는 형태적 분류의 한계를 보완하는 자료로 soluble protein 분석 및 동위효소 분석법 등이 이용되고 있다(Park *et al.*, 1988). 현재 균 분류에 주로 사용되고 있는 방법 중의 하나로 genomic DNA에서 제한효소 부위의 유무에 의해 개체간 유연관계를 밝히는 RFLP 기술이 최근에 확립되었고, DNA sequence를 증폭시키는 PCR 방법이 동물, 식물, 미생물의 집단연구, 계통연구, 분류 등의 연구에 자주 사용되고 있다(Terashima *et al.*, 1998). 그리고 곰팡이에서 PCR이 계통분류와 집단연구

\*Corresponding author

구를 위해 이용되었는데(Bruns *et al.*, 1990; Forster *et al.*, 1990; Illingworth *et al.*, 1991), random primer를 사용하는 PCR이 세균, 식물, 곰팡이에서 다형성을 밝히기 위해 개발되었다(Welsh and McLelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

본 연구는 버섯 재배농가에서 동충하초의 인공자실체를 이미 형성하였거나 형성하고자 인공배양 중인 종들을 채집하고, 분자생물학적 방법인 rDNA-RFLP를 이용하여 동충하초 채집균주의 ITS 영역에 대한 종간, 종내의 유연관계를 분석함으로써 동충하초속균을 분류하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

본 실험에 사용한 동충하초속균은 총 3속 14균주로 *Paecilomyces tenuipes* 4균주, *Cordyceps militaris* 7균주, *Cordyceps scarabaecicola* 1균주, *Beauveria bassiana* 2균주이며, 야생에 서식하고 있는 번데기 및 성충에 감염된 기주의 자실체로부터 직접 동충하초속균 8종을 분리하였다. 또한 대조 균주로는 강원대학교 동충하초은행(EFCC) 및 농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과로부터 분양받았다(Table 1).

### Total genomic DNA 분리

동충하초속균의 DNA 분리는 Zolan과 Pukkila(1986)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 균사배양은 PDB(potato dextrose broth) 배지에서 15일간 정치 배양하여 생장한 균사체를  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 급랭시킨 후 동결 건조하였다. 건조된 균사는 액체 질소와 함께 유발에 넣고 미세하게 분쇄한다

음 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)를 넣고,  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 0.4 ml 취하여 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액을 1 volume 첨가하고 10분간 조심스럽게 흔든 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. Phenol 성분을 제거하기 위해, chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 용액을 동량 첨가하여 15분간 흔든 후 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. DNA가 들어 있는 상등액을 취하여 50 mg/ml 이 되도록 RNase를 넣고,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 2 volume의 absolute EtOH를 넣어 DNA를 침전시키고, 70% EtOH로 DNA를 3회 씻은 후, TE buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)에 녹였다. DNA 함량과 순도를 측정하기 위하여, DNA를 100배 희석하여 spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다. 추출된 DNA를 멸균수로 20 ng/ $\mu\text{l}$ 가 되도록 희석하여 template DNA로 사용하였다.

### Primer의 제조 및 polymerase chain reaction에 의한 rDNA 단편의 증폭

동충하초속균의 rDNA의 18S와 28S 사이의 ITS를 증폭하고자 primer는 White 등(1990), Anderson과 Stasovski(1992)가 제시한 ITS 1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), ITS 4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였다(Fig. 1).

PCR 반응액은 총량을 100  $\mu\text{l}$  기준으로 template DNA 10~50 ng과 primer 50 pmol,  $\text{MgCl}_2$  100  $\mu\text{M}$ , dNTP 200  $\mu\text{M}$ , Taq polymerase(Perkin Elmer Co.) 2.5 unit로 조정된 후, 멸균수를 첨가하였다. PCR 반응조건은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 4분간 pre-heating시킨 후,  $94^{\circ}\text{C}$  1분 denaturation,  $58^{\circ}\text{C}$  1분 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$  2분 extension으로 36 cycle을 돌렸다. 그 다음 PCR DNA의 정확한 증폭을 위하여,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 8분간 유지한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하였다. 처리한 PCR 산물을 1.0% agarose gel 상에서 전기영동한 후, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ethidium bromide(EtBr)로 염색한 다음 UV transilluminator(Polaroid type 667)에서 관찰하였다(Yoon, 1992).

Table 1. Fungal isolates used in this study for RFLP

No.	Strains	Species	Origins	Hosts	Formation of fruiting body
1	C240	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	EFCC <sup>a</sup>	pupa	F <sup>c</sup>
2	C660	<i>P. tenuipes</i>	EFCC	pupa	F
3	JB200	<i>P. tenuipes</i>	Chinan	pupa	F
4	JB300	<i>P. tenuipes</i>	Chinan	pupa	F
5	C18	<i>Cordyceps militaris</i>	EFCC	pupa	F
6	C738	<i>C. militaris</i>	EFCC	pupa	F
7	KACC58	<i>C. militaris</i>	Chinan	pupa	NF
8	KACC59	<i>C. militaris</i>	Chinan	pupa	F
9	JB2	<i>C. militaris</i>	Chinan	pupa	F
10	JB100	<i>C. militaris</i>	Chinan	pupa	F
11	JB3	<i>C. militaris</i>	Chinan	pupa	NF
12	C252	<i>C. scarabaecicola</i>	EFCC	pupa	F
13	RDA1	<i>Beauveria bassiana</i>	RDA <sup>b</sup>	pupa	NF
14	JB4	<i>B. bassiana</i>	Chinan	adult	NF

<sup>a</sup>EFCC; Entomopathogenic Fungal Culture Collection in Kangwon National University.

<sup>b</sup>RDA; Rural Development Administration in Korea.

<sup>c</sup>F; formation, NF; non formation.

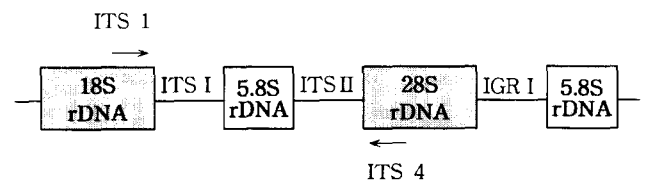


Fig. 1. Primer sites used amplification of the ITS in the repetitive ribosomal RNA, gene of entomopathogenic fungi. To amplify the ITS regions, the follow two oligonucleotides were synthesized and used nuclear ITS.

ITS 1 : 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'.

ITS 4 : 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'.

**RFLP 분석**

PCR 증폭이 확인된 rDNA를 ethanol로 침전시킨 후 50  $\mu$ l의 TE에 녹이고 약 1  $\mu$ g이 되도록 정량한 후 7가지 (*Cfo*I, *Eco*RI, *Hea*III, *Hpa*II, *Rsa*I, *Sau*3AI, *Tru*9I) 제한효소를 이용하여 절단하였으며, 절단방법은 제조회사(Takara Biochemical, Japan)의 방법에 따라 수행하였다. 절단된 단편들은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 염색하여 밴드를 관찰하였다.

유연관계 분석은 rDNA-RFLP에 의해 확인된 결과를 바탕으로 하였다. data 분석은 밴드의 유무에 의해 특정부위에 밴드가 있으면 "1", 동일한 위치에 밴드가 없으면 "0"으로 구분하였다(Smith and Anderson, 1989). 균주간의 유사도(similarity coefficient)는 Nei(1987)의 방법에 따라 F값을 구하였다.

$F = 2 \sum N_{xy} / (\sum N_x + \sum N_y)$ . F : similarity coefficient.

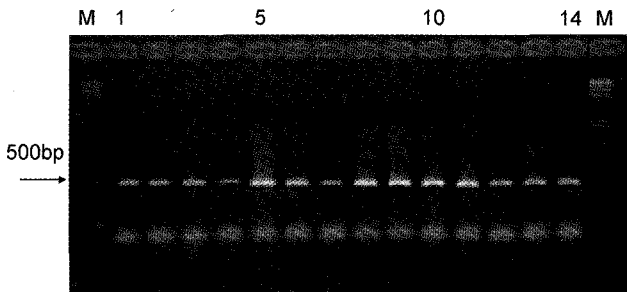
$N_{xy}$  : The number of PCR products shared by isolates X and Y.

$N_x + N_y$  : Total number of PCR products in isolates X and Y, respectively.

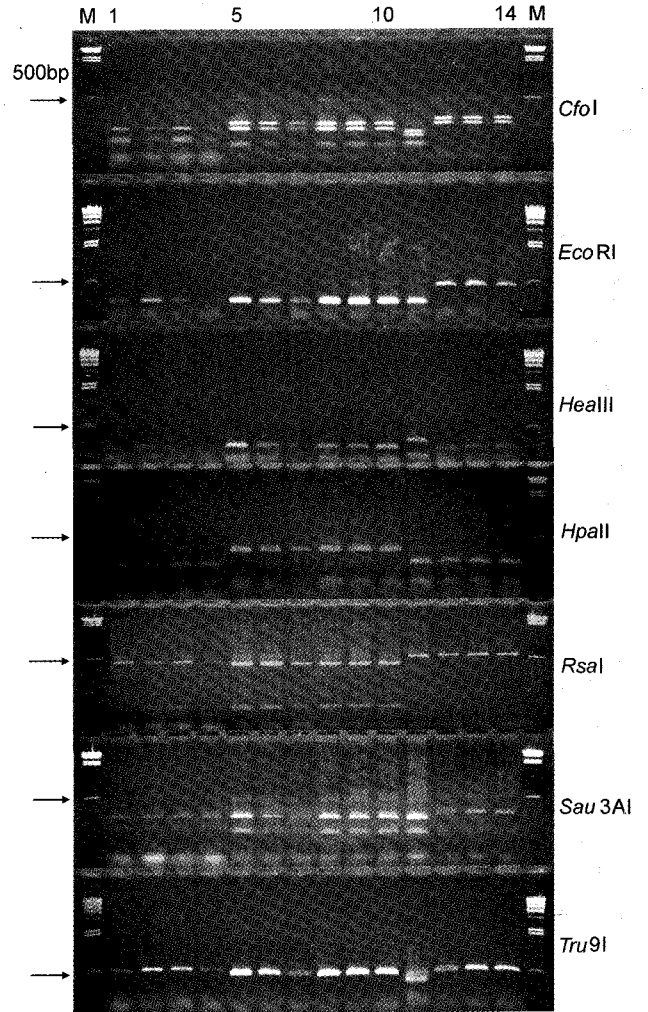
Dendrogram은 위의 유사도를 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용하여 군(cluster) 분석을 하였다. 또한 유사도와 dendrogram의 작성은 NTSYS-pc program Ver. 1.70을 이용하였다(Rohlf, 1988).

**결과 및 고찰**

수집된 균주의 분자생물학적 유전정보를 이용하여 각 균주간 유연관계를 분석하고자 rDNA의 ITS 부위를 PCR 방법으로 증폭한 뒤 7종의 제한효소로 절단하였다. 먼저, 수집된 각 균주의 rDNA의 ITS I과 II 부위를 primer ITS1과 ITS4를 사용하여 PCR에 의해 증폭된 결과 entomopathogen의 밴드 위치는 500 bp로 증폭되었다(Fig. 2). 이 영역은 중간 또는 속간에 차이가 없이 잘 보존되어 있어 서로 구분되지 않았다. 또한 각 균주의 유연관계를 분석하고자 PCR에 의해 증폭된 산물을 7종의 제한효소로 절단하여 밴드상을 관찰하였다(Fig. 3).



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified rDNA-ITS regions of entomopathogenic fungi. The number noted above corresponding to Table 1.



**Fig. 3.** Restriction fragment length polymorphism of entomopathogenic fungi rDNA-ITS amplification products digested with *Cfo*I, *Eco*RI, *Hea*III, *Hpa*II, *Rsa*I, *Sau*3AI, *Tru*9I, respectively.

*Cfo*I로 절단한 결과 *P. tenuipes* 4균주는 220 bp, 150 bp, 130 bp로 절단되었으며, *C. militaris*는 250 bp, 220 bp, 30 bp로 절단되었고, *B. bassiana*는 280 bp와 220 bp로 절단되었다. 따라서 속간에는 차이를 보였으나 종간에는 차이가 없었다. 그러나 *Cordyceps* 속에 속하는 *C. scarabaeicola*(C252)는 *Beauveria* 속과 같은 밴드상을 보였으며, *C. militaris*인 JB3 균주는 같은 그룹내의 *C. militaris*와 다른 밴드상을 보였다. 또한 *Cfo*I에서는 *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Beauveria* 속의 모든 균주에서 같은 크기의 동일 밴드가 관찰됨으로 이들 속간에 유연관계가 인정되었다.

*Eco*RI로 절단한 결과 동충하초속군 중 *P. tenuipes*와 *C. militaris*는 250 bp와 그 이하에서 절단되는 밴드상을 보였으며, *C. scarabaeicola*와 *B. bassiana*는 *Eco*RI 제한효소에서 절단되지 않았다. 따라서 *Eco*RI로 절단할 때 *Paecilomyces* 속과 *Cordyceps* 속은 동일한 선상으로 절단되어 있기 때문에 이 두종의 속간 구분에는 부적합하며, 다만 *Paecilomyces* 속, *Cordyceps* 속과 *Beauveria* 속을 구분하는

데 용이한 제한효소로 생각된다.

*HeaIII*로 절단한 결과 3가지속 모든 균주에서 primer와 같은 위치에서 절단되었으며, *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Beauveria* 속간에는 밴드상 차이가 없기 때문에 구분이 어려웠다. 그러나 *C. militaris* 중 JB3 균주는 outgroup으로 다른 균주 보다 약 50 bp 위쪽에서 절단되었다.

*HpaII*로 절단한 결과 *Paecilomyces* 속과 *Beauveria* 속은 380 bp, 100 bp, 20 bp에서 절단되었으며, *C. militaris*는 400 bp와 100 bp로 *Paecilomyces* 속과 *Beauveria* 속과 비교했을 때 두 개의 밴드로 나타나 *Paecilomyces* 속과 *Beauveria* 보다 다양성이 적었다. 그러나 *C. militaris*로 간주된 JB3와 *C. scarabaeicola*는 *B. bassiana*와 같은 크기의 밴드상을 보였다.

*RsaI*으로 절단한 결과 *Paecilomyces*, *Cordyceps* 속은 450 bp와 50 bp의 동일한 크기로 절단되어 각각 같은 그룹으로 분류되었으나 *B. bassiana*는 *RsaI*에 의해 절단되지 않았다. 또한 *HpaII*로 절단한 결과와 같이 *C. militaris*로 간주된 JB3와 *C. scarabaeicola*는 *B. bassiana*와 마찬가지로 절단되지 않았다.

*Sau3AI*으로 절단한 결과 *Paecilomyces* 속과 *C. militaris*는 모두 같은 크기로 절단되었으나 *C. scarabaeicola*와 *Beauveria* 속은 *C. militaris* 보다 약 50 bp 위쪽에 절단되는 밴드상을 나타냈다.

*Tru9I*으로 절단한 결과 공시균주 모두 절단되지 않았으므로 각 속간 구분이 용이하지 못하였다. 그러나 *C. militaris*로 간주된 JB3 균주만 절단되는 특이적인 밴드상을 나타냈다.

이상의 동충하초속군 rDNA의 ITS 영역을 PCR로 증폭하여 7종의 제한효소로 절단한 결과 수집된 *P. tenuipes* 4 균주와 *B. bassiana* 2균주는 각각 동일한 종으로 판정되었다. 그러나 *C. militaris* 중 JB3는 *HpaII*, *RsaI*에서 *B. bassiana*와 같은 밴드상을 보였으며, *CfoI*, *HeaIII*, *Tru9I*에서 outgroup으로 분류되었다.

*C. scarabaeicola*는 7종의 제한효소 모두에서 *B. bassiana*의 밴드상과 일치함으로써 *C. scarabaeicola*의 불완전세대는 *Beauveria* sp.라는 결과를 얻었다. 또한 *Paecilomyces* 속과 *Cordyceps* 속의 속간 구분에 용이한 제한효소로는 *CfoI*, *HpaII*이었으며, *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Beauveria* 속 모두 다른 밴드상을 보인 *CfoI*는 이들 속간의 구분에 용이한 제한효소로 생각된다. 또한 *HeaIII*에서 각 균주간 절단부위는 primer와 같은 위치에 있는 것으로 보아 본 실험균주는 *HeaIII* 제한효소를 인식하는 염기서열이 없기 때문에 절단되지 않았던 것으로 생각된다.

이들 7종의 제한효소에 대한 밴드의 유무에 따라 각각 1, 0 값을 기초로 data matrix를 만들고, UPGMA clustering으로 동충하초속군간의 유전적 유사도(similarity coefficient)를 분석한 결과는 Fig. 4와 같이 전체적으로 51.7%의 유의수준을 보였다.

rDNA-RFLP 분석에 대한 유전적 유사도는 4개의 군은

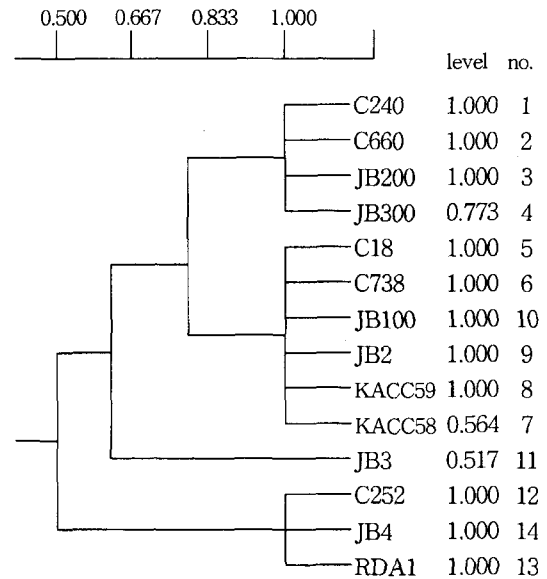


Fig. 4. Dendrogram of similarity based on restriction fragments digested with seven restriction enzymes of ITS in rDNA regions of entomopathogenic fungi.

로 세분할 수 있었다. 첫 번째 군은 *P. tenuipes* 그룹, 두 번째 군은 *C. militaris* 그룹, 세 번째 군은 JB3 균주, 네 번째 군은 *C. scarabaeicola* 균주(C252)와 *B. bassiana* 그룹으로 세분되었으며, 이들 그룹내의 균주간에는 모두 100% 유의수준을 나타냈다. 따라서 동충하초속군간 rDNA-RFLP를 이용한 유연관계 분석에서 속간의 유연성은 적은 것으로 분류되었으나 종간의 유연관계는 가까운 것으로 판단된다. 또한 *C. scarabaeicola*(C252) 균주는 유전적 유사도를 나타내주는 dendrogram에서도 *B. bassiana* 그룹으로 분류되었다.

이와 같이 genomic rDNA의 profile은 채집지역과 기주에 따라 유전적 분화가 다양하게 발생하고 있음을 나타내주는 결과로 rDNA는 종간 및 속간 계통분류에 많이 이용되는데, 이는 모든 생물체 내에 고루 분포되어 있을 뿐만 아니라 coding region과 non-coding region으로 나뉘어 반복 배열이 존재하며, coding region은 염기배열이 보존적이거나 non-coding region은 속 및 종간 다양성을 보여주기 때문이다.

속간 낮은 유의성을 나타낸 결과는 Chew 등(1997)이 *Paecilomyces farinosus*, *Beauveria bassiana*, *P. fumosoroseus* 균주간 rRNA-RFLP 분석에서 *P. farinosus* 균주는 entomopathogens인 *B. bassiana*, *P. fumosoroseus*와 매우 다른 유전적 밴드상을 갖는다고 보고한 바와 같은 내용으로 유전적 변이의 원인이 기주의 유전적 특성이나 지리적 거리에 따른 원인인지 좀더 구체적인 접근 방법으로 보완되어야 할 것이다. 또한 성 등(1999b)은 변태기동충하초(*C. militaris*)의 경우 배양적 특성과 불완전 세대의 형태적인 차이가 있더라도 유전적 거리는 큰 차이가 없다고 보고하였으며, 변태기동충하초의 유전적 차이는 동성생식(homo-

thallic)을 하기 때문에 다른 배우자와 접합시 일어나는 유전적 물질의 교환에서 기인되는 것이 아니라 감수분열시 일어나는 유전자의 재배열에 의한 원인과 유전자의 결실이나 삽입에 따라 생기는 것으로 추정할 수 있다고 보고하였다. 따라서 본실험에서도 채집 균주가 기주 및 채집 지역 그리고 자실체의 형성유무에 의해서도 유전적 변이가 다를 수 있다고 생각되지만, 종내의 세분화는 rDNA의 ITS 영역이 환경변화의 영향을 적게 받은 원인으로 여겨진다.

한편 버섯의 유연관계 분석으로 Park 등(1999 a, b)과 Bae 등(1996)도 불로초(*Ganoderma* spp.), 먹물버섯(*Corpinus* spp.) 및 느타리버섯(*Pleurotus* sp.)에 대하여 ITS II 영역의 염기서열을 분석함으로 종간 유연관계를 분석하였다. 또한 Kanematsu와 Naito(1995), Hong 등(1998)은 rDNA ITS 영역을 제한효소로 절단하여 *Rhizoctonia solani*의 균사융합 및 배양형태에 따라 종내 그룹을 분류하였으며, Terashima 등(1998)은 rDNA IGS 영역을 제한효소로 절단하여 *Armillaria*종을 분류·동정하였다.

## 적 요

야생에 서식하고 있는 번데기 및 성충에 감염된 기주의 자실체로부터 동충하초속균 3속 14균주를 분리하였고, RFLP에 의한 유전정보를 이용하여 ITS 영역에 대한 유연관계를 분석하였다. 수집된 각 균주의 rDNA ITS I과 II 부위를 primer ITS 1과 ITS 4를 사용하여 PCR에 의해 증폭한 결과 증폭된 산물은 500 bp 크기로 잘 보존되어 종간 또는 속간 서로 구분되지 않았다. 따라서 증폭산물을 7종의 제한효소로 절단하여 밴드상을 관찰한 결과 수집된 *Paecilomyces tenuipes* 4균주와 *Beauveria bassiana* 2균주, JB3 균주를 제외한 *Cordyceps militaris* 6균주는 각각 동일종으로 분류되었다. 한편 *C. scarabaeicola* 균주는 7종의 제한효소에서 모두 *B. bassiana*의 밴드와 일치하여 *C. scarabaeicola*의 불완전세대는 *B. bassiana*로 간주되었다. 제한효소 중에 *Paecilomyces* 속과 *Cordyceps* 속간 구분에 용이한 제한효소는 *CfoI*, *HpaII*이었으며, 그중 *CfoI*는 *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Beauveria* 속간 구분에 용이하였다. UPGMA 분석결과 *P. tenuipes*, *C. militaris*, *C. scarabaeicola*와 *B. bassiana*, JB3 균주 등 4개의 군으로 그룹화되었으며, 그룹간에는 100% 유의수준을 나타냈다. 따라서 rDNA-RFLP 분석에서 속간 유연관계는 적었으나 종간 유연관계는 가까운 결과를 얻었다.

## 참고문헌

- Anderson, J. B. and Stasovski, E. 1992. Molecular physiology of northern hemisphere species of *Amillaria*. *Mycologia* **84**: 505-516.
- Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun, M. Y. and Lee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among *Pleurotus* species inferred from sequence data of PCR amplified ITS II region in ribosomal DNA. *Kor. J. Mycol.* **24**: 155-165.
- Bruns, T. D., Fofel, R. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungi herbarium specimens. *Mycologia* **82**: 175-184.
- Chew, J. S. K., Strongman, D. B. and Mackay, R. M. 1997. RFLP analysis of rRNA intergenic spacer regions of 23 isolates of the entomopathogen *Paecilomyces farinosus*. *Can. J. Bot.* **75**: 2038-2044.
- Cho, S. Y., Sin, K. H., Song, S. K. and Sung, J. M. 1999. Mass production and useful material development of the entomopathogenic fungi (*Cordyceps*) growing on the silkworm, *Bombyx mori* L. Res. Rept. RDA. p. 215-234 (In Korean).
- Forster, H., Coffey, M. D., Elwood, H. and Sogin, M. L. 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoospore fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**: 306-312.
- Hodge, K. T., Krasnoff, S. B. and Humber, R. A. 1996. *Toly-pocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis*. *Mycologia* **88**: 715-719.
- Hodge, K. T., Humber, R. A. and Wozniak, C. A. 1998. *Cordyceps variabilis* and the genus *Syngliocladium*. *Mycologia* **90**: 743-753.
- Hong, S. B., Go, S. J., Ryu, J. C., Kim, W. G. and Kim, I. S. 1998. Differentiation of intraspecific groups within Korean isolates of *Rhizoctonia solani* using PCR-RFLP of ribosomal DNA. *Korean J. Plant Pathol.* **14**: 157-163 (In Korean).
- Illingworth, C. A., Andrews, J. H., Bibeau, C. and Sogin, M. L. 1991. Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans* inferred from sequence comparisons of small subunit RNAs. *Experimental Mycology* **15**: 65-75.
- Kanematsu, S. and Naito, S. 1995. Genetic characterization of *Rhizoctonia solani* AG-2-3 by analyzing restriction fragment length polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **61**: 18-21.
- Kobayasi, Y. 1940. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci. Rept. Tokyo Bunrika Daikaku, Sect. B.* **5**: 53-260.
- Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **23**: 329-364.
- Mains, E. B. 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. *Mycologia* **50**: 168-222.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetic. Columbia University Press, New York. p. 106-107.
- Park, D. S., Go, S. J., Kim, Y. S., Seok, S. J., Song, J. K., Yeo, Y. S., Ryu, J. C. and Sung, J. M. 1999a. Genetic relationships of *Coprinus* spp. on the basis of sequences in ITS II region. *Kor. J. Mycol.* **27**: 27-31 (In Korean).
- Park, D. S., Go, S. J., Ryu, J. C. and Sung, J. M. 1999b. Phylogenetic study of *Ganoderma* spp. based on the DNA sequences in ITS II region. *Kor. J. Mycol.* **27**: 39-43 (In

- Korean).
- Park, Y. H., Byun, M. O. and Hiroshi, F. 1988. Comparison of electrophoretic isozyme band pattern of *Pleurotus* spp. in Korea. II. Isoelectric focusing. *Kor. J. Mycol.* **16**: 95-100 (In Korean).
- Rohlf, F. J. 1988. NTSYS-pc : Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.70. Exeter Software, Setanket, NY.
- Seaver, F. J. 1911. The Hypocreales of North America IV. *Mycologia* **3**: 207-230.
- Smith, M. L. and Anderson, J. B. 1989. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria* : Identification of north American biological species. *Mycological Research* **93**: 247-256.
- Sung, J. M. 1996. The insects-born fungus of Korea in color. Kyo-Hak Press. pp. 299 (In Korean).
- Sung, J. M., Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. Y., Kim, S. H. and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**: 239-252 (In Korean).
- Sung, J. M., Choi, Y. S., Lee, H. K., Kim, S. H., Kim, Y. O. and Sung, G. H. 1999a. Production of fruiting body using culture of entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* **27**: 15-19 (In Korean).
- Sung, J. M., Kim, S. H., Yoon, C. S., Sung, G. H. and Kim, Y. W. 1999b. Analysis of genetic relationship of *Cordyceps militaris* in Korean by random amplified polymorphic DNA. *Kor. J. Mycol.* **27**: 256-273 (In Korean).
- Terashima, K., Kawashima, Y., Cha, J. Y. and Miura, K. 1998. Identification of *Armillaria* species from Hokkaido by analysis of the intergenic spacer (IGS) region of ribosomal DNA using PCR-RFLP. *Mycoscience* **39**: 179-183.
- Welsh, J. J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research.* **18**: 7213-7218.
- White, T. J., Bruns, S. L. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications". (Eds by Innis, M. A. M, D. H. Gelfand, J. J. Sninski and T. J. White. Academic Press, San Diego. p. 315-322.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531-6535.
- Yoon, C. S. 1992. Examination of parameters affecting polymerase chain reaction on studying RAPD. *Kor. J. Mycol.* **20**: 315-323.
- Zolan, M. E. and Pukkila, P. J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 185-200.