THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vol. 29, No 1, p34-40 April 2001
Copyright © 2001 by The Korean Society of Mycology
Printed in S. KOREA

한국에서 채집한 Entomogenous fungi의 형태와 RAPD에 의한 유연관계 분석

최인영* · 최정식 · 유영진 · 이왕휴[1]

전라북도 농업기술원, [1]전북대학교 농생물학과(농업과학기술연구소)

Analysis of Genetic Relationship of Entomogenous Fungi in Korea by Morphological Characteristics and RAPD

In-Young Choi*, Joung-Sik Choi, Young-Jin Yu and Wang-Hyu Lee[1]

Jeonbuk-do ARES, Iksan 570-704, Korea
[1]Department of Agricultural Biology, Jeonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT: RAPD test and the observation of morphological, cultural characteristics of fourteen selected entomogenous fungi were conducted to investigate the analysis of their internal relationships. *Paecilomyces tenuipes* showed snow flower form attached to numerous white conidiophores, produced globular and semi-egg types on the club types of phialides. *Cordyceps militaris* formed globosely conidiophores, dark yellow fruiting body on pupa. The phialide as on Acremonium-type in global conidiophores. *Beauveria bassiana* covered with conidia was not formed fruiting body and adhered conidia on conidiophore of zigzag type. The PDA and SDAY medium were confirmed as an optimum growth of them. *P. tenuipes* showed to velvet and plane types in several media whereas *C. militaris* was belong to centrally raised and floccose in the morphological type. In contrast, *B. bassiana* covered with conidia on velvet shape. The size of amplified products were analyzed by RAPD using URP primer and were from 100 bp to 2.0 kb with 10~14 genomic DNA. Total similarities of two groups were by dendrogram of UPGMA analysis. The homology of *P. tenuipes* groups was 94.8 to 100%. It also showed 70.1 to 96.6% in *C. militaris* group and *B. bassiana* was higher similarity than any other. The internal change of *C. militaris*, produced telemorph fruiting body, was higher seperated in species than *P. tenuipes* and *B. bassiana* in the RAPD.

KEYWORDS: *Beauveria bassiana*, *Cordyceps militaris*, Entomogenous fungi, *Paecilomyces tenuipes*, RAPD

곤충을 기주로 자실체를 형성하는 entomogenous fungi는 폐질환 및 면역력 증강에 대한 효능이 인정되어 수요가 급증하는 한편 이용 및 인공재배에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그중 *Cordyceps sinensis*는 불로장생의 비약으로 폐기능 장애 등의 치료에 이용되며(Sung, 1996), *C. militaris*는 생리활성 물질인 cordycepin을 함유하여 항세균 및 항암제로 사용되어 왔다(Yamanaka *et al.*, 1998).

인공재배에 관하여 쌀, 옥수수, 현미 등의 곡물배지를 이용한 *C. militaris* 자실체 생산과(Choi *et al.*, 1999b; Pen, 1995), 누에를 이용한 *Paecilomyces tenuipes* 인공재배법 개발로 가잠 누에 및 버섯 재배농가들의 부가가치가 향상되고 있다(Cho *et al.*, 1999).

Entomogenous fungi는 주로 맥각균목에 속하는 *Cordyceps* 속과 불완전균류인 *Paecilomyces*, *Podonectria*, *Torrubiella*, *Beauveria* 속 등이 있다. Entomogenous fungi는 자낭포자나 분생포자 상태로 존재하고 있다가 온·습도가 높은 6~9월에 곤충의 호흡기, 소화기, 마디 등의 부드러운 표피로 침입하여 몸안의 단백질, 지방 등의 영양분을 섭취하면서 균사체로 증식된 후 자실체가 표피를 뚫고 나와 형성된다(Sung, 1996).

*Corresponding author <E-mail: choiiy@lycos.co.kr>

Entomogenous fungi의 분류는 기주에 발생한 자실체의 모양, 생활기주, 완전세대와 불완전세대의 형태적 특징으로 분류되어 왔다(Kobayasi, 1982). 그러나 동일 종내에서도 채집지역의 조건에 따라 자실체 형태 및 색, 분리된 균주의 배양에 따른 균총색, 균사생장속도 등이 상당한 차이를 나타낸다(Sung *et al.*, 1999).

최근에는 protein banding pattern의 비교검색에 의한 분류와 isozyme 분석이 보고되었으며(Sung *et al.*, 1995, 1998), ribosomal DNA내의 ITS와 IGR을 대상으로한 PCR, PCR-RFLP, RAPD 기법 등이 분류에 이용되고 있다(Sung *et al.*, 1999).

따라서 채집지역과 지리적 위치가 다른 곳에서 채집된 균에 대한 형태적·배양적 특징과 더불어 분자생물학적 자료를 이용한 유전적 변이와 다양성에 관한 비교분석으로 동충하초속균의 분류에 대한 접근이 필요하므로 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 동충하초속균은 *Paecilomyces tenuipes*

Table 1. Fungal isolates used in this study

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

[a]EFCC; Entomopathogenic Fungal Culture Collection in Kangwon National University.
[b]RDA; Rural Development Administration in Korea.
[c]F; formation, NF; non formation.

(눈꽃동충하초), *Cordyceps militaris*(동충하초), *Cordyceps scarabaeicola*(풍뎅이동충하초), *Beauveria bassiana*(백강균)이다. 공시균주는 1998년 전북 진안군 야산에서 채집하여 자실체로부터 분리한 단포자이며, 대조균주는 강원대학교 동충하초은행(EFCC) 및 농업과학기술원 응용미생물과로부터 분양을 받았다(Table 1).

완전세대 및 불완전세대 관찰

동충하초속균 중 완전세대인 자실체의 외부 형태적 특징 관찰은 광학현미경 및 주사전자현미경(SEM)을 이용하였으며, 육안과 광학현미경으로 형태적 특징인 자실체 모양, 색, 크기와 자실체에 부착된 자낭, 자낭포자의 모양과 크기 등을 조사하였다.

불완전세대의 형태적 특징은 PDA(potato dextrose agar) 배지에 이미 배양된 균총의 선단부를 cork-borer No. 6 (φ12 mm)으로 절단하여 접종한 후 25±1℃, 암 조건에서 배양하여 관찰하였다. 12일 동안 배양한 각 균의 외부 형태적 특징, 무성포자인 분생포자의 모양, 분생자경의 형태 등을 광학현미경 및 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 채집된 동충하초속균들은 분양받은 대조균주와 비교하여 1982년 Kobayasi의 "Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*"의 방법으로 동정하였다.

배양적 특징 관찰

동충하초속균의 균사배양에 적합한 배지를 선발하고자 배지별 colony 크기를 측정하였으며, pH에 따른 colony의 색과 morphological type을 조사하였다. colony의 직경은 접종원을 배지별로 접종하여 25±1℃로 조절된 배양기내에서 10일간 암배양한 후 측정하였다. morphological type은 PDA 배지에 10일간 암 배양된 균총의 평면과 측면 집락 구조를 矢口(1997) 방법에 따라 관찰하였다.

RAPD에 의한 다형성 비교

Genomic DNA 분리. 동충하초속균의 DNA 분리는 Zolan과 Pukkila(1986)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 균사배양은 PDB(potato dextrose broth) 배지에서 15일간 정치 배양한 균사체를 깨끗이 2차 증류수로 세척한 후 동결 건조하였다. 건조된 균사는 액체질소와 함께 유발에 넣고 미세하게 분쇄한 다음 0.2~1.0 g씩 취하여 0.4 m*l* lysis buffer를 넣고, 65℃에서 1시간 반응시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 0.4 m*l* 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 원심 분리하였다. DNA가 들어 있는 상등액을 취하여 50 mg/m*l*이 되도록 RNase를 넣고, 37℃에서 1시간 반응시킨 후 냉각된 2배량의 absolute EtOH를 넣어 DNA를 침전시키고, 70% EtOH로 DNA를 3회 씻은 후, TE buffer(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0)에 녹였다. 또한 추출된 DNA를 멸균수로 20 ng/μ*l*가 되도록 희석하여 template DNA로 사용하였다.

Primer. DNA 증폭을 위한 PCR stock는 반응액 총량을 100 μ*l* 기준으로 하여 template DNA 100 ng과 primer 15 ng, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNPT 1.5 mM, Taq polymerase 1 unit(Takara Biochemicals, Japan)로 맞추어 멸균수를 첨가하였다. Primer(20 mer)는 시제품으로 SRILS UniPrimer Kit I(Seoulin Co.)을 구입하여 사용하였다.

PCR 조건. PCR은 94℃에서 4분간 pre-heating시킨 다음, 94℃ 1분 denaturation, 55℃에서 40초간 anncaling, 72℃에서 2분 동안 extension을 1 cycle로 하여, 총 40 cycles를 돌린 후 4℃에서 유지하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 90 volt로 loading한 후 ethidium bromide에 5분간 염색하여, UV transilluminator lamp 상에서 밴드를 관찰하였다. Dendrogram은 균주간의 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

Entomogenous fungi의 형태

동충하초는 7~8월경 신선한 청정계곡내 낙엽층이 퇴적된 곳에서 주로 발생하며, 부착된 자실체의 기주는 곤충의 번데기 및 성충이 주를 이루었다. 수없이 많은 흰색 분생포자가 자실체(synnemata)에 붙어 눈꽃모양을 나타내는 *Paecilomyces tenuipes*는 자실체가 20.0~114.5 × 0.5~1.1 mm 크기로 나뭇가지형이었다. 또한 누에 번데기에 인공접종하

Table 2. Morphological characteristics of fruiting body and anamorph of entomogenous fungi

Morphological characteristics	*Paecilomyces tenuipes*	*Cordyceps militaris*	*C. scarabaeicola* Sung (1996), Kobayasi (1940)	*Beauveria bassiana*
Fruiting body	Synnemata			
Stroma				
Shape	snow-flower	clavate, club, stick	clavate, club	-[b]
Color	white	intensive yellow, orange	yellow	-
Size (mm)	20.0~114.5 × 0.5~1.1	20.3~150.0 × 1.5~6.0	10.0~35.0 × 3.0~4.0	-
Perithecia				
Shape	-[a]	*semi-egg, club*	*semi-egg*	-
Size (μm)	-	30.0~151.0 × 90.0~161.0	275.0~400.0 × 180.0~200.0	-
Asci				
Shape	-	cylindrical narrow	cylindrical narrow	-
Size (μm)	-	357.0~700.0 × 3.0~6.5	130.0~155.0 × 4.0~4.5	-
Ascospore				
Shape	-	filiform, multiseptate	filiform, multiseptate	-
Size (μm)	-	2.0~5.0 × 1.0~2.3	5.0~1.0 × 1.0~1.5	-
Anamorph				
Phialides			conidiogenous cell	conidiogenous cell
Shape	clavate, club	*Verticillium* like phialides	-	-
Size (μm)	7.5~20.3 × 1.2~4.0	0.59~1.47 × 4.41~18.82	2.0~5.0 × 3.0~4.0	3.0~6.0 × 3.0~5.0
Conidia	chains	groups	groups, zigzag type	groups, zigzag type
Shape	ellipsoidal, obovoid	globose, lemon, long-clavate	globose, oval	lemon, globose
Form	Paccilomyces-type	Acremonium-type	Acremonium-type	Acremonium-type
Size (μm)	3.5~7.9 × 1.5~2.5	1.5~3.0 × 1.5~8.8	1.6~2.0 × 1.0~2.2	0.9~1.2 × 1.5~1.7
Length : Width	5 : 2, 1 : 1	1 : 1, 3 : 1	1 : 1	1 : 1

[a]Fruiting body of *P. tenuipes* was formed in the anamorph.
[b]Fruiting body of *B. bassiana* was not formed in the sexual stage.

여 배양병에서 형성된 자실체는 자루(柄)가 8~17개로 야생에서 채집한 표본보다 많으며, 크기도 2~5배 신장하였다. PDA배지에서 배양된 *P. tenuipes* 형태는 Paecilomyces-type으로 구형 또는 타원형의 분생포자가 연쇄상을 이루며, phialides는 곤봉형이었다(Table 2, Fig 1).

*Cordyceps militaris*는 인시목의 번데기에서 2~5개의 담황색 자실체를 형성하며, 방망이 모양으로 크기는 20.3~150.0 × 1.5~6.0 mm이었다. 자실체에 부착된 자낭각은 반달갈모양이며, 내부에는 원주상의 자낭을 형성하였다. *C. militaris*의 불완전세대는 *Verticillium*으로 구형 또는 레몬형 분생포자가 phialides에 부착되어 있으며, Acremonium-type이었다(Table 2, Fig 2).

*Beauveria bassiana*는 흰색의 분생포자가 하늘소에 뒤덮인 형태로 자실체를 형성하지 않았다. 흰색의 분생포자는 균사에서 분생자경을 형성한 다음 그 위에 둥근 플라스크 모양의 작은 자루를 형성하며, 작은 자루에서 여러 마디가 이어지고, 각 마디마디에 1개씩 분생포자가 붙은 형태로 백강균의 특징인 zigzag형이었다. 분생포자는 구형 또는 레몬 형태로 크기는 0.9~1.2 × 1.5~1.7 μm이었다(Table 2, Fig. 3).

이와 같은 Entomogenous fungi의 형태는 성 등(1995, 1997)과 최 등(1999a, b)이 보고한 내용과 같은 결과로 *P.*

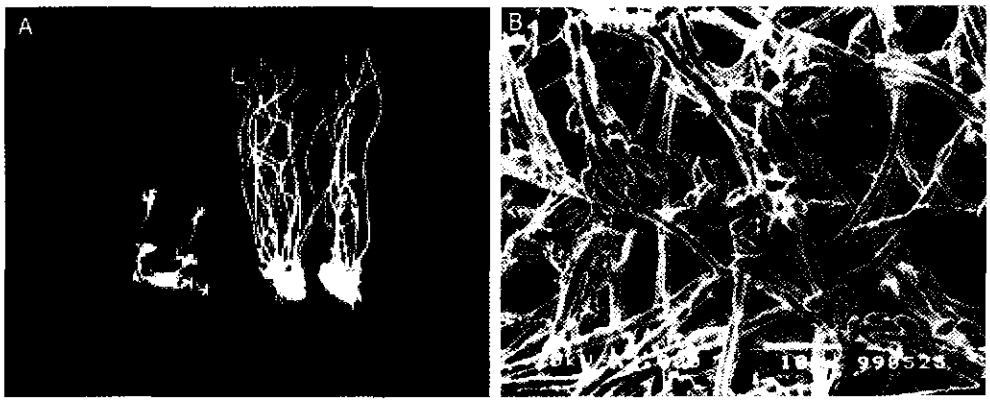

Fig. 1. Natural, artificial fruiting body (A), phialide and conidia (B) of *Paecilomyces tenuipes* (JB200).

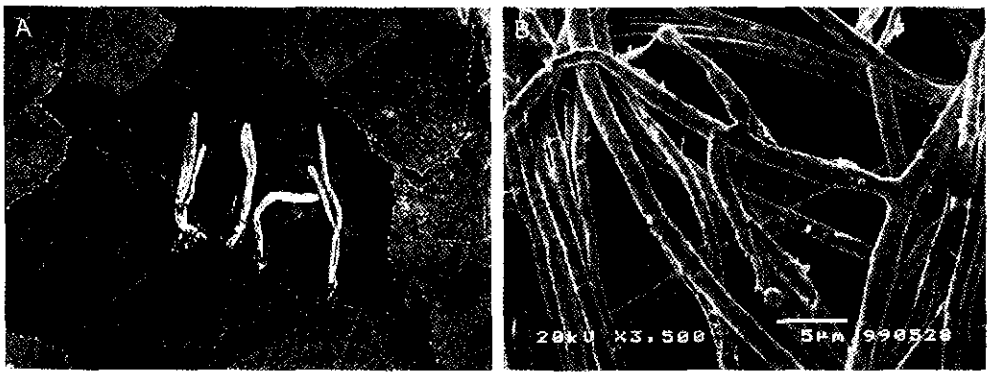

Fig. 2. Natural, artificial fruiting body (A), phialides and conidia (B) of *Cordyceps militaris* (JB100) (Cultural media was hulled rice).

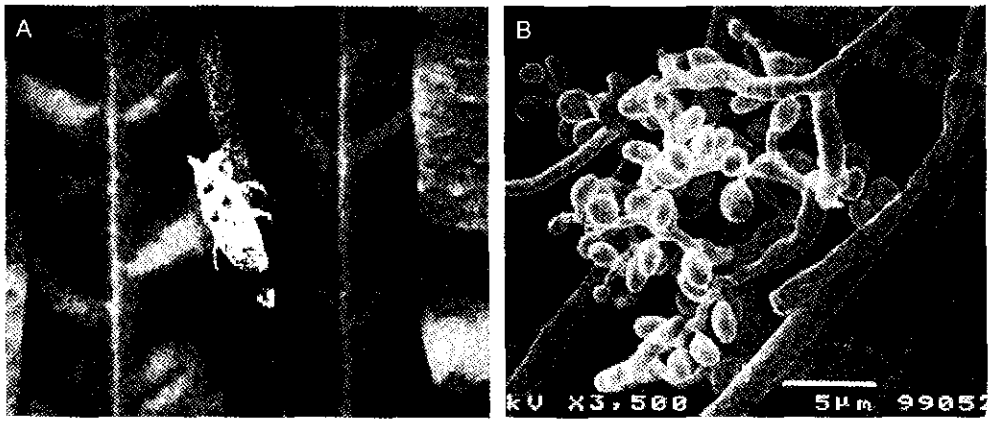

Fig. 3. Infected *Cerambycidae* (A), conidiophore, conidia (B) of *Beauveria bassiana* (JB4).

*tenuipes*는 자실체가 분생포자로 형성되어 있기 때문에 건드리면 쉽게 분생포자가 비산하며, 1~20본 정도의 나뭇가지나 빗자루형으로 머리 부분이 부풀어 있을 뿐만 아니라 균사배양에 의해 형성된 분생포자는 ellipsoidal 형태이며, 수지형의 특징을 갖는다고 보고하였다. 또한 *C. militaris*는 곤봉형 또는 원주형의 등황색 자실체가 인시류의 번데기 등에서 2~3본이 나오며, 반나생의 자낭각내에 원주상의 자낭과 eucodyceps형의 자낭포자를 형성한다고 보고하였다. 분생자경과 분생포자 형태에 대하여 Liang(1990)은 *C. militaris*는 분생포자가 분생자경 두부에 뭉쳐있는 Acremonium-type이며, *C. militaris*의 불완전세대인 *P. militaris*는 분생포자가 분생자경 끝에서 연쇄상으로 연결되어 Paecilomyce-type으로 보고한 바와 같이 본 실험에서도 같은 형태로 관찰되었다. *C. militaris* 불완전세대는 단생의 phialide가 conidiophore 위에 직립하며, 끝으로 갈수록 가늘어지고, 레몬이나 구형의 분생포자를 형성하는 것으로 이미 보고된 내용과 같은 결과였다(Evans and Samson, 1982; Sung, 1999). 또한 Sung 등(1997)도 *Cordyceps* 속 동충하초의 자낭포자로부터 분리된 균주를 이용하여 water agar상에서 불완전세대를 관찰한 결과 *C. militaris*는 *Verticillium* 속의 분생포자인 dry conidia와 slime conidia를 모두 형성하여 *Verticillium* sp.로 동정한 바 있다. Hodge 등(1998)과 Shimazu 등(1988)은 *Cordyceps*의 불완전세대는 *Akanthomyces*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Hymenostibe*, *Mariannaea*, *Metarhrizium*, *Nomuraea*, *Paraisaria*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Verticillium* 등이며, Hywel-Jones(1995a, b, c)는 딱정벌레 유충에 감염된 *C. brunneapunctata*의 불완전세대로 *Hirsutella* sp., *Hemiptera*에 감염된 *C. nutans*는 *Hymenostilbe nutans*, 벌동충하초인 *C. sphecocephala*는 *H. sphecocephala*로 보고하였고, 거미에 감염된 *C. cylindrica*는 *Normuraea atypicola*(Hywel-Jones and Sivichai, 1995)로 보고하였다.

하늘소 등을 기주로 하며, 기주의 전 생육단계에 걸쳐 표면에 흰색 분생포자를 형성하는 *B. bassiana*는 둥근 플라스크 모양의 작은 자루에서 지그재그 모양의 여러 마디에 1개씩 분생포자가 붙은 형태이며, 백강균처럼 무수히 많은 분생포자를 형성하는 불완전 균류는 서식환경에 크게 영향을 받지 않고, 기주가 없는 토양과 같은 부생적 환경에서도 생존하는 비특이적 조건적 기생균(unspecialized facultative parasite)이다. 이들은 무수히 많이 포자를 형성하기 때문에 포자를 이용한 해충의 생물방제가 가능하다고 Shimazu 등(1988)은 보고하였다.

배양적 특징

동충하초속균의 배양적 특징은 각종 배양배지에서의 균사생육 정도, pH별 colony색도 및 morphological type 등에

Table 3. Colony growth and color of entomogenous fungi grown on various media at 25°C[a]

No./Strain	Size of colony on medium (mm/days)				Colony characteristics on PDA									
					Color of colony on pH				Morphological type					
	PDA	SDAY	YM	MEA	4	6	7	9	velvet	floccose	powdery	plane	radiately sulcate	centrally raised
1 C240	18.2	20.4	21.3	18.5	WY[b]	WY	WY	Y	+	-	-	+	-	-
2 C660	12.1	21.3	14.0	12.0	W	WY	WY	DY	-	-	-	-	+	-
3 JB200	19.4	24.3	8.3	19.4	W	WY	WY	Y	+	-	-	+	-	-
4 JB300	11.7	7.9	12.5	17.6	WY	Y	Y	DY	+	-	-	+	-	-
5 C18	30.1	20.5	27.3	19.4	W	WY	WY	WY	-	+	-	+	-	-
6 C738	23.2	21.5	21.4	17.5	W	W	WY	DY	-	+	-	±	-	+
7 KACC58	25.5	20.5	21.5	20.0	W	Y	Y	DY	-	+	-	+	-	±
8 KACC59	20.4	21.4	20.5	15.0	WY	WY	Y	DY	-	+	-	-	-	+
9 JB2	29.4	20.5	25.4	18.5	WY	WY	WY	WY	-	+	-	-	-	+
10 JB100	22.3	20.3	20.0	16.4	W	WY	WY	DY	-	+	-	-	-	+
11 JB3	25.7	17.6	13.6	18.4	W	W	WY	WY	±	+	-	-	-	+
12 C252	17.5	24.5	19.5	10.0	WY	WO	WO	YO	-	+	-	-	-	+
13 RDA1	10.7	9.8	7.6	7.4	W	WY	WY	DY	+	-	+	+	-	-
14 JB4	9.8	8.7	8.0	8.0	W	WY	WY	DY	+	-	+	+	-	-

[a]The colony color and morphological type were observed after 10 days incubation.
[b]W; white, Y; yellow, D; dark, O; orange.

관하여 조사하였다. 공시한 배지중 동충하초속균의 배양에 적합한 배지는 PDA, SDAY, YM 배지로 균사생육이 양호할 뿐만 아니라 균사밀도가 조밀하며, 각각 균의 배양적 특징인 morphological type을 유지하고 있었다. 또한 균사 생장은 *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces tenuipes*, *Beauveria bassiana* 순으로 균사가 신장하였다.

PDA상에서 pH별 colony 색도는 *Paecilomyces*, *Cordyceps*, *Beauveria*에서 모두 같은 경향으로 pH가 증가할수록 배지의 색이 황색이나 담황색으로 진하게 변하였다. 또한 morphological type으로 *Paecilomyces*는 평면이 벨벳형이며 평탄한 단면구조 모양으로 배양되었으나, C660 균주는 균총이 벨벳형보다 입상이며, 방사상으로 생육하였다. *C. militaris*는 양모상으로 생육하였으며, 단면은 중앙융기하는 형태로 생육하여 *Cordyceps*의 배양특징으로 조사되었다. 또한 *B. bassiana*는 무수히 많은 흰색 분생포자에 의해 분가루를 흩어 뿌린 모양으로 생육하였다.

이와 같은 배양적 특징은 동충하초속균의 분류에 기초자료로 활용되며, Cu에 내성을 보인 *C. militaris*와 *B. bassiana* 등(Baath, 1991)과, 고농도의 pH에서 생육이 가능하고 $CuCl_2$와 낮은 당농도에서 내성을 나타내는 *B. bassiana*의 배양적특징은 이들에 대한 선택적 분리에 활용된다(Shimazu and Sato, 1996). 또한 colony색과 colony 형태는 entomogenous fungi의 속간 분류 및 특징을 파악하는데 유용한 자료로 Wang(1989)은 *Cordyceps*의 배양특성 중 균총색, 균총형태, 균사 생장속도, 기중균사, 분생포자량 등에 관하여 보고한 바 있다.

RAPD에 의한 다형성 비교

채집된 동충하초속균간 rDNA의 RAPD 분석은 3개의 URP(universal rice primer)를 사용하되 DNA 절편이 뚜렷하고 재현성이 강한 RAPD pattern을 나타내는 primer를 RAPD profile분석에 사용하였다. DNA template, primer, dNTP 농도는 뚜렷한 band상을 나타내도록 예비실험을 통하여 조절하였다.

공시한 primer들은 동충하초의 속간, 종간 구분에 용이하였으며, 증폭된 산물의 크기는 100 bp에서 2.0 kbp 사이로 각 균주 당 생성된 genomic DNA fragment는 4~14개이었다. 선발된 primer에 대한 증폭산물은 primer별로 증폭된 밴드 수에 차이를 나타냈다. 공시한 균주에서 생성된 밴드 수는 총 262개이었으며, URP primer 1에서 157개로 가장 많았고, URP primer 2에서 45개로 가장 적었다.

동충하초속균의 각 균주별 band상 관찰결과 *P. tenuipes*

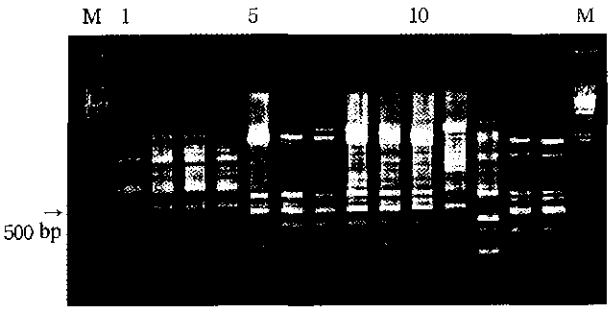

Fig. 4. Representative random amplified polymorphic DNA fingerprints using URP primer 1 of 14 isolates in entomogenous fungi. lane 1: C240; lane 2: C660; lane 3: JB200; lane 4: JB300; lane 5: C18; lane 6: C738; lane 7: KACC58; lane 8: KACC59; lane 9: JB2; lane 10: JB100; lane 11: JB3; lane 12: C252; lane 13: RDA1; lane 14: JB4.

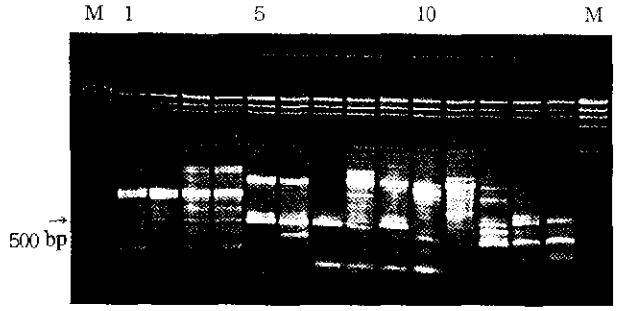

Fig. 5. Representative random amplified polymorphic DNA fingerprints using URP primer 2 of 14 isolates in entomogenous fungi. The designation of isolates was the same as in Fig. 4.

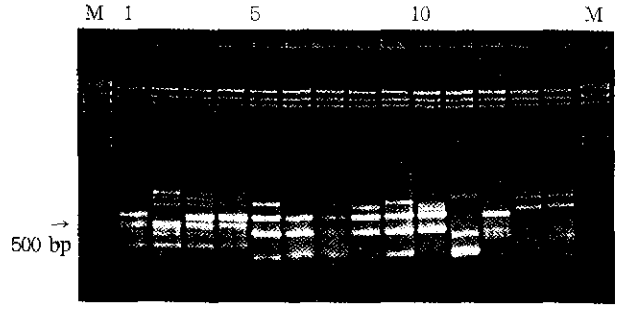

Fig. 6. Representative random amplified polymorphic DNA fingerprints using URP primer 6 of 14 isolates in entomogenous fungi. The designation of isolates was the same as in Fig. 4.

와 *B. bassiana*의 균주는 사용된 URP primer 1, 2, 6 모두에서 서로 유사한 band상을 보였다. 그러나 *C. militaris* 균주들은 4~5개의 공통된 밴드를 형성하지만 종내의 세분화가 이루어져 종간 다른 밴드상을 보였다. 한편 *C. scarabaeicola*는 *C. militaris*와 *B. bassiana*의 혼합된 형태의 밴드상을 나타냈다(Fig. 4, 5, 6).

또한, band 유무에 따른 data matrix를 기초로 NTSYS-pc의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 7). 그 결과 동충하초속균의 14균주들은 다양한

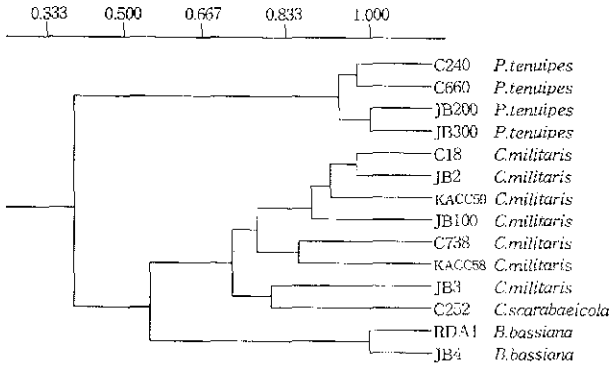

Fig. 7. UPGMA dendrogram derived from RAPD profiles of genomic DNA in the 14 isolates of entomogenous fungi with three URP primers.

유전적 분화를 나타냈고, 2개의 군으로 구분되었다. 첫 번째 군은 *P. tenuipes*로 94.8~100%의 상동성을 보였으며, 두 번째 군은 *C. militaris*와 *C. scarabaeicola*, *B. bassiana*이며, *C. militaris*간에는 70.1~96.6%의 상동성을 보였으며, *Paecilomyces* 그룹과는 36.9%의 유의성을 보였다. 따라서 수집된 동충하초속균간의 RAPD 분석결과 분류된 그룹내의 종간 세분화가 이루어졌으며, 특히 *P. tenuipes*와 *B. bassiana* 보다 *C. militaris*에서 종내 변화의 폭이 컸다. 이러한 원인은 *Paecilomyces*와 *Beauveria*의 발견시기와도 관련된 것으로 이들은 7~9월에 주로 발생하지만 9월 이후에도 발생하는 원인은 이들이 완전세대의 자실체를 형성하는 *Codyceps*와 비교하여 상대적으로 환경에 내성이 강한 것으로 추정된다. 따라서 완전세대에 자실체를 형성하는 *C. militaris*는 불완전세대로 채집되는 *P. tenuipes*와 *B. bassiana* 보다 RAPD에서 종내의 세분화가 이루어진 것으로 생각된다. 또한 genomic DNA의 RAPD profile은 채집지역과 기주의 종에 따라 분리된 균주들에서 유전적 분화가 다양하게 발생하고 있음을 나타내 주는 결과들로 생각된다.

Hyun과 Park(1996), Kim 등(1998)과 Koh 등(1998)은 식물병원균의 유전자 수준에서의 분류법 중 RAPD 분석은 각각 *Alternaria*와 *Phomopsis citri*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*의 유전적 다양성 분석을 위한 방법으로 사용하였는데, 비록 재현성의 문제점이 있기는 하지만 반응이 신속하고 방법이 단순하여 분류에 많이 활용된다고 보고하였다. 또한, Cho 등(1999)은 자생하는 동충하초 중 채집 분리된 *C. militaris*, *C. kyushuenisi*, *C. scarabaeicola* 균주간 RAPD 분석에서 *C. militaris*는 종내 약 82%의 상동성을 보였으며, *C. militaris*와 형태적으로 유사한 *C. kyushuensis*는 종내 90% 이상의 상동성을 보였고, *C. scarabaeicola*와는 75%의 상동성을 보였다고 보고하였다.

적 요

Entomogenous fungi의 수집된 14균주를 대상으로 종내 그룹의 상호 유연관계를 분석하고자 자실체 및 불완전세대의 형태적, 배양적 특징 관찰과 RAPD 검정을 실시하였다. *Paecilomyces tenuipes*는 수없이 많은 흰색 분생포자가 자실체에 붙어 눈꽃모양을 나타냈으며, 곤봉형 phialides 위에 구형 또는 타원형의 분생포자가 연쇄상을 이루었다. *Cordyceps militaris*는 담황색 자실체가 방망이 모양으로 번데기에서 형성되었으며, 불완전세대는 *Verticillium*으로 단생의 phialides에 구형의 분생포자가 Acremonium-type으로 부착되어 있었다. *Beauveria bassiana*는 자루에서 여러 마디가 이어지며, 각 마디에서 1개씩 분생포자가 붙어있는 zigzag type이었다. 또한 이들의 배양에 적합한 배지는 PDA, SDAY이며, 평면과 단면구조로 *Paecilomyces*는 벨벳과 평탄, *Cordyceps*는 양모상과 중앙융기로 생육하였고, *Beauveria*는 벨벳에 밀가루를 뿌린 모양이었다. URP

primer를 이용한 rDNA의 RAPD분석 결과 증폭된 산물의 크기는 100 bp에서 2.0 kb 사이로 genomic DNA fragment 는 10~14개이었다. UPGMA 분석에 의한 dendrogram 작성 결과 다양한 유전적 분화를 나타내었으며, 2개의 군으로 그룹화 하였다. *P. tenuipes* 그룹은 94.8~100%, *C. militaris*와 *C. scarabaeicola*, *B. bassiana* 그룹은 54.3~100%의 상동성을 보였다. 또한 완전세대의 자실체를 형성하는 *C. militaris* 그룹은 불완전세대인 *P. tenuipes*와 *B. bassiana* 보다 종내의 변화의 폭이 컸으며, 종내의 세분화가 이루어졌다.

참고문헌

Baath, E. 1991. Tolerance of copper by entomogenous fungi and the use of copper-amended media for isolation of entomogenous fungi from soil. *Mycol. Res.* **95**: 1140-1152.

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. pp. 215-234 (In Korean).

Choi, I. Y., Choi, J. S. and Lee, W. H. 1999a. The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces japonica*. *Kor. J. Mycol.* **27**: 87-93 (In Korean).

Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Joung, G. T., Ju, I. O. and Choi, Y. K. 1999b. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **27**: 243-248 (In Korean).

Evans, H. C. and Samson. R. A. 1982. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **79**: 431-453.

Hodge, K. T., Humber, R. A. and Wozniak, C. A. 1998. *Cordyceps variabilis* and the genus *Synglíocladium*. *Mycologia* **90**: 743-753.

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.

Hywel-Jones, N. L. 1995a. *Cordyceps brunneapunctata* sp. nov. infecting beetle larvae in Thailand. *Mycol. Res.* **99**: 1195-1198.

Hywel-Jones, N. L. 1995b. Notes on *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of hemipteran bugs in Thailand. *Mycol. Res.* **99**: 724-726.

Hywel-Jones, N. L. 1995c. *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymemostilbe* sp. infecting wasps and bees in Thailand. *Mycol. Res.* **99**: 154-158.

Hywel-Jones, N. L. and Sivichai, S. 1995. *Cordyceps cylindrica* and its association with *Normuraea atypicola* in Thailand. *Mycol. Res.* **99**: 809-812.

Kim, B. R., Kang, H. W., Yu, S. H., Itoh, Y. and Kohmoto, K. 1998. RAPD analysis of host-specific toxin (HST) producing *Alternaria* species. *Korean J. Plant Pathol.* **14**: 92-98 (In Korean).

Kobayasi, Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans. mycol. Soc. Japan* **23**: 329-364.

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. *Korean J. Plant Pathol.* **14**: 171-176 (In Korean).

Liang, Z. 1990. Anamorph of *Cordyceps militaris* and artificial culture of its fruitbody. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* **3**: 1-6 (In Chinese).

Pen, X. 1995. The cultivation of *Cordyceps militaris* fruitbody on artificial media and the determination of SOD activity. *Acta Edulis Fungi* **2**: 25-28 (In Chinese).

Rohlf, F. J. 1988. *NTSYS-pc*: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.70. Exeter Software, Setanket, NY.

Shimazu, M. and Sato, H. 1996. Media for selective isolation of an entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes). *Appl. Entomol. Zool.* **31**: 291-298.

Shimazu, M., Mitsuhashi, W. and Hashimoto, H. 1988. *Cordyceps brongniartii* sp. nov., the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. *Trans. mycol. Soc. Japan* **29**: 323-330.

Sung, J. M. 1996. The insects-born fungus of Korea in color. Kyo-Hak Press. p. 299 (In Korean).

Sung, J. M., Lee, H. K. and Yoo, K. J. 1995. Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristic and protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* **23**: 92-104 (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 form Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**: 239-252 (In Korean).

Sung, J. M., Lee, H. K., Yoo, Y. J., Choi, Y. S., Kim, S. H., Kim, Y. O. and Sung, G. H. 1998. Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* **26**: 1-7 (In Korean).

Sung, J. M., Kim, S. H., Yoon, C. S., Sung, G. H. and Kim, Y. W. 1999. Analysis of genetic relationship of *Cordyceps militaris* in Korean by random amplified polymorphic DNA. *Kor. J. Mycol.* **27**: 256-273 (In Korean).

Wang, Z. N. 1989. Cultural characteristics of imported *Cordyceps* fungi and their pathogenicity to some insects. Report of the Taiwan Sugar Research Institute **126**: 13-25 (In Chinese).

Yamanaka, K., Inatomi, S. and Hanaoka, M. 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience* **39**: 43-48.

Zolan, M. E. and Pukkila, P. J. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 185-200.

矢口貴志. 1997. 實驗室における菌類の形態觀察と記錄法: 絲狀菌の觀察方法. 日菌報 **38**: 41-46.