

URP-PCR핵산지문에 의한 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica*.)와 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*) 유전적 다양성분석

김종군^{2,3} · 강희완^{1,3*}

¹한경대학교 바이오정보기술대학원

²JK 바이오테크(주)

³한경대학교 유전공학연구소

Genetic Diversity of *Paecilomyces japonica* and *Cordyceps militaris* Strains by URP-PCR Fingerprinting

Jong-Kun Kim^{2,3} and Hee-Wan Kang^{1,3*}

¹Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

²JK BioTech Co Ltd, Gyonggi, Ansung 456-747, Korea

³Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

(Received 16, November 2011., Accepted 21, November 2011)

ABSTRACT: This study was carried out to identify the genetic characteristics among isolates of *Paecilomyces* spp. and *Cordyceps* spp. by URP-PCR analysis. Twenty URP (universal rice primer) primers of 20 mer which were designed from repetitive sequence of rice, were used for producing PCR DNA fingerprints of the mushrooms. Of them, 5 URP primers, URP2F, URP2R, URP9F, URP4R, and URP17R amplified genomic DNA of the mushrooms with polymorphic PCR patterns. On isolates of *Cordyceps militaris*, primers URP1F, URP2R, URP6R and URP17R produced PCR polymorphic bands of 4 types. Isolates of *Cordyceps* sp. that are isolated from different area of Korea were identical to isolate of *C. militaris*, while other species of *Cordyceps* were different to the PCR profiles. However, the URP primers did not identify the polymorphism of PCR profile on isolates of *P. japonica*.

KEYWORDS: *Cordyceps* spp., *Paecilomyces* spp., Genetic diversity, URP-PCR

서 론

동충하초는 곤충의 유충, 번데기, 성충 등의 전생육기에 외부에 침입 하여 종내에서 생장을 지속하여 자실체를 형성하거나 충체위에 포자과를 형성 한다. 현재까지 800여종이 전 세계적으로 분포하는 것으로 보고 있다 (남 등 1999; Sung *et al.*, 1993). 분류학상 동충하초는 자낭균과 (Ascomycetes)의 맥류목 (Clavicipitales), 동충하초과 (Cordycipitea)에 속하며 대표적으로 *Cordyceps* 속, *Torrubiella*속, *Paecilomyces* 속, *Hirsutella* 속이 알려져 있으며 300여종이 분류 보고 되어 있다. 종 분류는 기주특이성을 고려하여 수행되고 있으며 국내에서는 *Cordyceps* 속 48종, *Hirsutella* 속, *Paecilomyces* 속에서 70여종이 보고되고 있다 (남 등, 1999; Sung *et al.*, 1993).

동충하초는 고대로부터 중국에서는 불로장생의 비약으로 결핵, 천식, 황달치료 및 면역기능 강화제로서 이용되어온 고가의 한방약재이다. 근래에는 자실체의 성분분석등을 통하

여 자실체의 유용 대사산물이 밝혀지고 있으며 항암, 항균 효과가 있는 것으로 보고 되고 있어 의약품 개발에 이용되고 있다 (조 등, 2009; 심 등, 2000; Ohmori *et al.*, 1986; Shin *et al.*, 2001). 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica*.)와 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*)가 국내기술에의하여 인공재배에 성공하여 자실체 및 균사체의 대량기술체제 개발 과 아울러 유용 약리 성분이 밝혀지면서 여러 연구기관 및 산업체에서 실용화 연구가 활발히 진행되고 있다 (최 등, 1999). 동충하초의 산업화 가치로 인하여 동충하초의 우량 균주선발에 경쟁적인 연구가 이루어지고 있으며 종내 품종, 계통이 중요한 유전자원으로 인식 되고 있다. 특히, 국제식물신품종보호동맹 (UPOV)과 나고야의정서 등이 발동됨으로 외국에서는 품종의 지적 재산권 권리 수호를 위한 로열티 요구 등 제제가 예상 되고 있다. 이에, 국내 등록품종의 유전적 특성을 조사하여 이를 바탕으로 우리 고유 품종의 특성을 보호하고 품종 육성을 위한 기초자료로 이용하기 위하여 정확한 품종구분법이 요구 되고 있다.

동충하초의 분류는 기주특이성, 자실체, 포자, 색 등의 형태적 특성과 단백질 양상에따라 분류한 바 있으나 (Burgess

*Corresponding author <E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr>

et al., 1995; Sung *et al.*, 1995) 환경적 요인과 생리적 조건에 따라 형태적, 생리적 특성 변화가 심하여 정확한 종 분류에 문제점이 있다.

분자생물학적기법의 발달로 핵산지문법(DNA fingerprinting)이 개발되어 환경적 영향을 배제하고 genome 상에 나타나는 변이를 효율적으로 검출 할 수 있어 미생물의 종 다양성 검정에 획기적인 전기를 마련하였다. 특히, 중합효소연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)법은 적은 노력과 비용으로 다량의 샘플을 신속, 간단하게 분석할 수 있는 것이 특징이다. rDNA의 ITS 및 IGR영역을 이용한 DNA 다형성분석이 진균류와 버섯류의 종간, 종내의 계통 발생학적 유연관계에 널리 이용 되고 있으나(강, 2003; Hibbit, 1992; White *et al.*, 1990) 버섯 품종과같은 종내의 유전형 판별에는 한계점이 있다. 따라서, RAPD (random amplified polymorphic DNA)법 등과 같은 PCR핵산지문법이 적용되어 미생물의 종내 계통 또는 품종간 특이적 DNA 다형성을 검출하는데 이용 하였다 (강, 2003; Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). 그러나, RAPD방법은 재현성에 있어 문제점이 지적 되고 있어 이를 개선하고자 Kang 등 (2002)은 벼 반복배열 DNA로부터 식물, 동물 및 미생물 등의 PCR 핵산지문 분석에 다범위로 이용 할 수 있는 20 mer의 염기로 구성된 URP (universal rice primer)을 개발하였다. URP-PCR 방법은 다양한 진균류를 포함하여 느타리버섯, *Phellinus* spp.의 종내 품종, 계통의 유전적 감별에 성공적으로 이용 된 바 있다 (Kang *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003). 최근에는 URP primer를 변형 고안 하여 버섯, 곰팡이 종간, 종내 유전적 감별에 유효한 PCR핵산지문 Kit가 실용화 (JK BioTech) 되어 시판 되고 있다.

본 연구는 URP-PCR방법을 이용한 국내 눈꽃동충하초 (*P. japonica*)와 번데기동충하초 (*C. militaris*) 종내 계통의 유전적 다양성을 조사하고 표준지표를 제공하여 균주 또는 품종특이성 확인과 육종의 기초자료로 이용 하고자 실시 하였다.

재료 및 방법

동충하초 균주 및 genomic DNA분리

동충하초균주는 전라북도농업기술원, 광주버섯사업장, 잠사곤충부로부터 3종 16균주의 *Cordypces spp.*와 2종 8균주 *Paecilomyces spp.*를 분양 받아 공시 하였다.(Table 1) Genomic DNA를 분리 하기위하여 7일간 PDA (potato dextrose agar)에서 배양한다음 직경 5 mm의 균사체를 50 ml의 PD broth 배지에서 옮긴후 진탕배양 (120 rpm)으로 균주에 따라 20°C에서 30일간 배양 하여 균사체를 여지에 걸러낸다음 동결 건조를 하였다. 동결 건조한 균사체를 이쭉시게로 곱게 마쇄한 다음 100 µg정도를 1.5 ml의 test tube에 옮기고 추출용 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM

Table 1. Isolates of *Cordypces* spp. and *Paecilomyces* spp. used in this study

Species	Isolates	Source
<i>Cordypces militaris</i>	JBARES 100	Cheonbuk ARE
<i>Cordypces militaris</i>	JBARES 401	Cheonbuk ARE
<i>Cordypces militaris</i>	JBARES 402	Cheonbuk ARE
<i>Cordypces militaris</i>	KEFC-C738	Cheonbuk ARE
<i>Cordypces militaris</i>	KME 47006	Cheonbuk ARE
<i>Cordypces scarabaeicola</i>	KEFC-C252	Kangwon Uni.
<i>Cordypces sinerisis</i>	KdM-1	NAAS
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47001	Kwang-Joo IMR
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47002	Kwang-Joo IMR
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47003	Kwang-Joo IMR
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47004	Kwang-Joo IMR
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47007	Kwang-Joo IMR
<i>Cordypces</i> sp.	KME 47009	Kwang-Joo IMR
<i>Paecilomyces japonica</i>	KEFC-C660	Kangwon Uni.
<i>Paecilomyces japonica</i>	40530	NAAS
<i>Paecilomyces japonica</i>	KME47009	Kwang-Joo IMR
<i>Paecilomyces</i> sp.	JBARES 200	Cheonbuk ARE
<i>Paecilomyces</i> sp.	JBARES 200	Cheonbuk ARE
<i>Paecilomyces farinosa</i>	40504	NAAS

ARE : Agricultural research & extention service, IMR : Institute of Mushroom research, NAAS : National Academy of Agricultural Science

EDTA; 0.5% SDS) 400와 Proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하여 유리봉으로 buffer상에서 잘 섞어 준 다음 37°C에서 1시간 동안 항온 하였다. 이 혼합액에 2 X CTAB buffer를 동량첨가 하여 65°C에서 15분간 방치하고 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 넣고 철저히 혼합 한후 12,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하고 실온에서 10분간 방치후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 침전하였다. 70%의 ethanol로 DNA침전물을 세척 하여 진공 건조한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) 100 µl에 용해 하였다. 10mg/ml RNase 2 µl를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 그 용액속에 함유된 RNA를 제거 하였다. DNA함량을 측정하기위하여 DNA를 100배로 희석하여 spectrophotometer의 260 nm의 파장에서 실시하였다.

PCR반응

PCR 핵산지문 분석은 URP-PCR 핵산지문 Kit (JK BioTech)에서 구입하여 제공된 방법에 준하여 실시하였다 PCR 핵산지문 분석은 URP -PCR 핵산지문 Kit(JK BioTech.)에서 구입하여 제공된 프로토콜에 준하여 수행하였다. PCR 반응 용액은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl,

1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 100 ng prime, 50 ng template DNA, 200 dNTP(dCTP, dTTP, dATP, dGTP), 및 2.5 unit *Taq* polymerase(Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 µl 가 되게 하였다. PTC-200(MJ. Reasearch사)의 PCR기기를 이용하여 처음 DNA변성을 위하여 94°C에서 5분간, 그 후 cycle에서 DNA변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분 및 DNA합성은 72°C에서 2분으로 총 36 cycle을 실시 하였으며, 최종 DNA합성은 5분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 TBE 완충액(45mM Tris-borate, 1 mM EDTA pH 8.0)에 녹인 1.8%의 agarose gel에 loading한후 5 vol/cm로 전기영동 하였으며, Ethidium bromide용액에 염색 하여 UV lamp하에서 DNA밴드를 확인 하였다.

유전적유연관계분석

URP-PCR 다형성밴드를 유무로 하여 database 한 후 유사도 (similarity coefficient)를 산출하고 하고, Dendrogram은 위의 유사도의 값을 근거로 UPGA (unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용 작성 하였다. 유연관계분석을 위한 program은 Ntsys (numerical taxonomy system using multivariate statistical programs Ver. 1.60)을 이용 하였다.

결과 및 고찰

URP-PCR분석에 의한 종간, 종내 유전적 다양성

균류의 종 분류에 rDNA이방법이 많이 사용 되어 왔다. 즉 진균 및 버섯류는 5.8S rDNA영역을 가운데두고 18S 와 23S rDNA영역 양쪽에 변이가 많은 ITS와 IGR영역을 특 이적으로 PCR증폭 하여 염기배열을 비교분석 또는 PCR 산물을 제한효소로 절단 전기영동으로 DNA다형성을 검출 하는 방법이다(강 등, 2003). 그러나 이 방법은 근연종 또는 종내의 균주간의 DNA다형성 검출에는 효율적이지 못하다.

본 연구는 *Paecilomyces* spp.의 genomic DNA내의 종내 의 균주간의 유전적인 특성 판별에 목적이 있었기 때문에 rDNA분석보다는 균주간 DNA다형성을 확인할 수 있는 PCR 핵산지문 방법을 선택 하게 되었다. PCR핵산지문 방법중에서 RAPD 분석에 이용되는 PCR primer는 주로 10 mer의 oligonucleotide로 구성된 random arbitrary primer를 이용한 RAPD법이 주종을 이루며 그 primer들은 상품화 되어 쉽게 구입 적용할수 있다. 그러나 그러한 종류의 primer들은 36°C 이하의 낮은 annealing 온도와 DNA순도정도, 또는 취급 자에 따라 그 분석결과가 다르게 나타나는 낮은 재현성이 큰 문제점으로 지적되어 왔다 (Kang *et al.*, 2002). 전에 강 등 (2002)은 식물, 동물 및 미생물의 PCR핵산지문에 다양 하게 이용 할 수 있는 URP primer가 거의 반복배열 DNA로 부터 개발 된 바 있다 (Kang *et al.*, 2002). URP primer는 55°C에서의 annealing온도와 20 mer로구성된 primer길이 등으로 재현성있게 PCR핵산 지문에 효율적으로 적용 가능한

것으로 알려져 있다. URP-PCR핵산지문법은 식물병원진균 또는 버섯의 종간, 종내유전적 특성 연구를 위해 다양하게 이용 되어 왔다 (김 등, 2007; 전 등, 2009; 최 등, 2009; Kang *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2001; Park *et al.*, Kim *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2002).

따라서 본 연구 에서는 URP primer를 이용한 *Cordyceps* spp. 와 *Paecilomyces* spp.의 PCR핵산지문 분석을 수행 하였다. 우선 다양한 생물종의 핵산지문에 적용 가능한 12종류의 URP primer의 유용성 여부를 알아보기 위하여 *P. japonica*균주의 genomic DNA를 이용하여 PCR증폭을 실시하였다. 그 결과 URP1F, URP2R, URP17R, URP6R 2.0 kb에서 0.3 kb사이5개에서 10여개의 PCR 다형성밴드를 증폭 하였으며 본 연구의 유용 primer로서 이용 되었다. 4종 류의 URP primer (URP1, URP2R, URP6R, URP17)로 16균주의 *Cordyceps* spp.와 8균주의 *Paecilomyces* spp.의 genomic DNA를 증폭하여 종간 균주간 PCR profile을 비교 하였다. *Cordyceps* spp.에서는 0.2 kb에서 3.0 kb의 범위에서 primer마다 특징적인 PCR 양상이 관찰 되었으며 종간에 뚜렷한 PCR 밴드차이를 보였고 *Cordyceps militaris* 균주 간에는 4가지 type의 PCR profile이 관찰되었다 (Fig. 1). 또한 종이 결정되지 않아 *Cordyceps* sp.로 명명한 균주들은 모두 *C. militaris*의 PCR profile의 4가지 type에 속하여 본 PCR profile은 종 동정에 기초자료로 이용될 수 있을것으로 사 료 되었다.

그러나 *Paecilomyces* spp.경우는 종간에는 명백히 다른

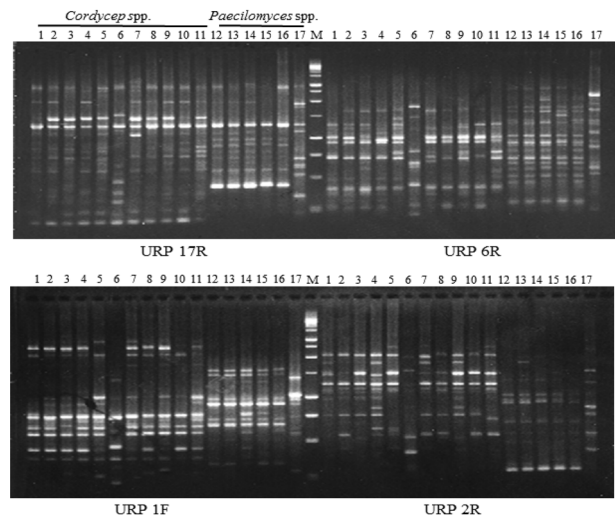


Fig. 1. URP-PCR fingerprinting of *Paecilomyces* spp. and *Cordyceps* spp. lanes 1-5: *Cordyceps militaris* (JBARES100, JBARES401, JBARES402, KEFEC-C738, KME 47006), 6. *Cordyceps scarabaicola* (KEFC-C252); lanes 7-11: *Cordyceps* sp. (KME47001, KME47002, KME47003, KME47004, KME47007); lanes 12-13: *Paecilomyces japonica* (KEFC660, KEFC40503); lanes 14-16: *Paecilomyces* sp. (JBARES200, JBARES300); lane 17: *Paecilomyces farinosa*.

PCR다형성이 검출되었으나 균주간에 특징적인 PCR profile 이 관찰되지 않아 균주간 유전형을 나눌 수 없었다. 이는 국내에 존재하는 *Paecilomyces japonica* 균주가 한계통으로 유통되고 있는지 또는 균주들은 유전적 변이가 낮게 나타나 는지를 확인 할 수 없어 더 많은 균주를 확보하여 검증하는 것이 타당 할 것으로 사료 되었다.

Fig. 1의 *Paecilomyces* spp.와 *Cordyceps* spp.의 PCR 다형성 밴드를 조사하고 중간, 또는 종내 계통간 band 유무에 따라 NTSYS-pc의 UPGMA program을 이용하여 dendrogram 을 작성 하였다 (Fig. 2). 그 결과 *Cordyceps militaris* 균주들은 90%이상의 유전적 근연관계를 보이면서 1개 group으로 분류 되었으며 *C. scarabaecicola*와 *P. farinosa*는 원연관계의 side group으로 분류 되었다. 한편, *Paecilomyces japonica* 균주는 모두 95%이상의 유사계통으로 분류 되었다. URP-PCR결과에서 *C. militaris*와 *P. japonica* 균주는 종내 특징적 인 PCR 다형성밴드를 형성 함으로서 PCR profile을 이용한 종 동정이 가능 할것으로 생각 되었으며 특히 URP2R primer 는 종내 다형성밴드를 형성하여 균주간 strain typing에 유효 할것으로 사료 되었다. URP-PCR profile를 이용한 동충하초 균주 동정을 test하기 위하여 동충하초를 경동시장에서 무 작위로 수집하여 genomic DNA를 추출하고 URP2R primer 로 PCR증폭하여 *C. militaris*와 *P. japonica*의 URP2R-PCR 다형성 밴드와 비교 하였다 (Fig. 3). 경동시장에서 수집한 동충하초는 각각 전형적인 *C. militaris*와 *P. japonica*와 유사한 PCR 다형성 밴드를 형성 하여 *C. militaris*와 *P. japonica*로 동정 할 수 있어 동충하초의 종 동정을 위한 PCR profile로 이용 가능 할 것으로 사료 되었다.

Ribosomal DNA의 ITS염기서열을 이용하여 *Cordyceps* spp.와 *Paecilomyces* spp.의 유전적 유연 관계를 조사한 바 있다 (남 등., 1999). 그러나 종간 또는 속간의 유연관계가 가능한 것으로 보였으나 종내 계통간에는 다양성을 검출 할

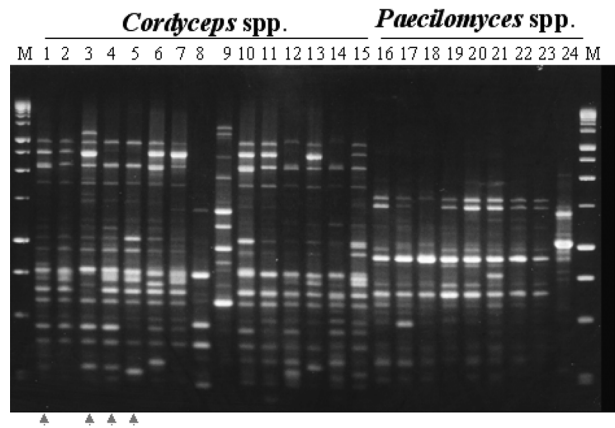


Fig. 3. Identification of *Cordyceps* and *Paecilomyces* strains using URP-PCR profile. Arrowheads indicates PCR types of *C. militaris*. lanes 1-5 : *C. militaris*(JBARES100, JBARES401, JBARES402, KEFEC-C738, KME 47006), 6-7 : *Cordyceps* sp. collected from Kyeongdong market, 8. *C. scarabaecicola*, 9. *C. smerisis*, 10-15 : *Cordyceps* sp (KME47001, KME47002, KME47003, KME47004, KME47007, KME47009) 16: *P. japonica* (KEFC-C660), 17-19 : *Paecilomyces* sp.collected from Kyeongdong market, 20-21 : *P. japonica*(40530, KME47005), 22-23 *Paecilomyces* sp. (KEFC660, KEFC40503), 24 : *P. farinosa*.

수 없었다. 또한 한국산 번데기동충하초 (*C. militaris*)의 RAPD분석으로 종내 유전적 다양성을 보고 하였는데 크게 2 그룹으로 유전적유연관계를 이루는 것으로 보고한 바 있다 (성 등, 1999). 현재까지 버섯류에 있어서 *Pleurotus sajarcaju*, *P. florida*, *P. ostreatus* 등의 느타리버섯 종간과, 국내에서 널리 재배되고 있는 *P. ostreatus* 품종과 큰 느타리 품종을 URP-PCR 다형성밴드로 구별 한 바 있다 (김 등, 2007; 전 등, 2009; Kang et al., 2002). 또한 URP-PCR은

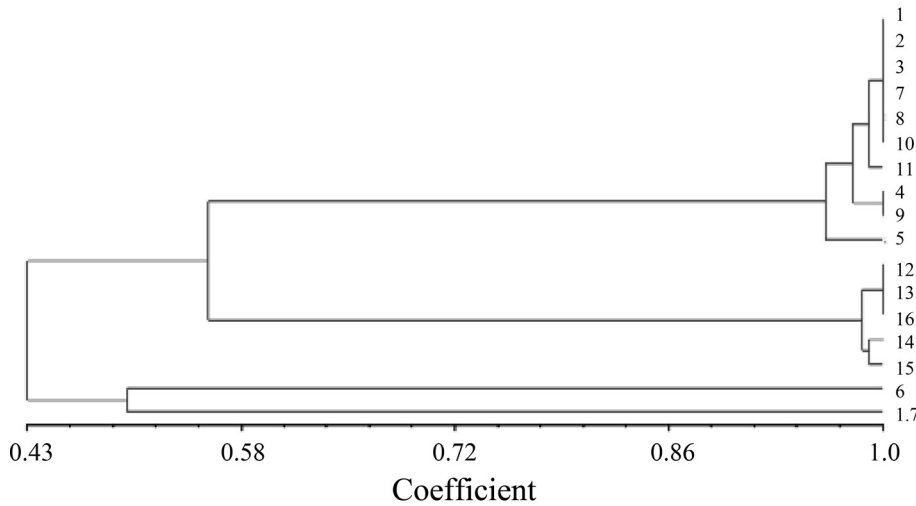


Fig. 2. Genetic relationship among different strains in *Paecilomyces* spp.and *Cordyceps* spp.

상황버섯 (*Phellinus* spp.)의 종간, 종내 계통의 유전적 다양성을 검출 하고 *Phellinus linteus* 특이 PCR다형성밴드를 분리하여 *P. linteus*를 특이적으로 검출 할 수 있는 PCR primer를 개발한 바 있다 (Kang *et al.*, 2002).

결론적으로 본 연구에서 적용한 동충하초 *Cordyceps* spp와 *Paecilomyces* spp.는 URP-PCR로 종간, 종내 특이적인 PCR다형성을 검출 할 수 있었으며 PCR profile은 *C. militaris*와 *P. japonica*의 종 동정을 위하여 효율적으로 적용 가능 할 것으로 생각 되었다.

적 요

본 연구는 URP-PCR 핵산지문법을 이용한 *Paecilomyces* spp.와 *Cordyceps* spp.의 종간, 종내 유전적 다양성분석을 실시 하였다. 12종류의 20mer의 URP primer가 적용된 바 URP2F, URP2R, URP9F, URP4R, URP17R는 종간에 특이적인 PCR다형성밴드를 형성하였으며 *Cordyceps militaris* 균주간에는 4가지 type의 PCR 다형성이 관찰되었다. 그러나 *Paecilomyces japonica*의 균주내에는 동일한 PCR 다형성을 나타내었다. URP-PCR profile을 이용하여 경동 시장에서 수집한 미 동정 동충하초를 동정 할 수 있었다.

참고문헌

- 강희완. 2003. PCR 에 의한 미생물 종 다양성 분석. 2003. 환경대 학교 논문집 35:283-292.
- 김종근, 임선화, 이대성, 지정현, 서건식, 주영철, 강희완. 2007. URP-PCR 다형성에 의한 국내 느타리 버섯품종의 유전적 특성 분석. 한국균학회 35:61-67.
- 남성희, 황재삼, 조세연, 구태원. 1999. Ribosomal DNA의 ITS 염기서열에 의한 동충하 초속균의 유연관계. 한국잡사학회 4: 174-179.
- 심진영, 이연실, 임순성, 신국현, 현진이, 김성연, 이은방. 2000. 눈꽃동충하초의 약물활성. 생약학회지 31:163-167.
- 전선정, 김종근, 김금희, 지정현, 서건식, 강희완. 2009. 형태적 특성과 PCR 다형성 분석에 의한 국내 큰 느타리버섯 계통의 유전적 다양성분석. 한국균학회지 37:19-27.
- 조수목, 박홍주, 서건식, 홍종덕. 2009. 배지조성이 번데기동충하 초의 영양성분 및 Cordycepin 함량에 미치는 영향. 한국균학회지 37:161-166
- 성재모, 김상희, 윤철식, 성기호, 김용욱. 1999. 한국산번데기동 충하초의 RAPD 분석에 의한 종내 그룹의 유전적 유연관계분 석. 한국균학회지 27:256-273
- 최인영, 최정식, 이왕휴, 유영진, 정기태, 주인옥, 최영근. 1999. *Cordyceps militaris* 인공자 자실체 형성조건. 한국균학회지 27:243-248.
- 최효원, 김정미, 김진희, 홍성기, 김완규, 천세철. 2009. 옥수수 이삭썩음병에 관여하는 *Fusarium* 속 균의 동정. 한국균학회지 37:121-129.
- Burgess, T., Malajczuk, N. and Dell, B. 1995. Variation in *Pisolithus* based on basidiom and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. *Mycol. Res.* 99:1-3.
- Hibbit, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 33:533-556.
- Ohmori, T., Tamura, K., Tsuru, S. and Nomoto, K. 1986. Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice. *Jpn. J. Cancer Res.* 77: 1256-1263.
- Kim, J. H., Lee, W. H., Ryu, Y. J., Cheong, S. S. and Choi, J. S. 2002. Analysis of genetic relationship and cultural characterization of *Penicillium* species isolated from postharvest decay of pear by random amplified polymorphic DNA. *Kor. J. Mycol.* 3:78-85.
- Kang, H. W., Lee, B. M and Yu, S. W. 2003. Analysis of genetic relatedness in *Alternaria* species producing host specific toxins by PCR polymorphism. *Plant pathol. J.* 19: 221-226.
- Kang, H. W., Park D. S., Go S. J and Eun M. Y. 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol. Cells* 13:281-287.
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., You, C. H., Lee, B. M., Go, S. J. 2001. Genomic differentiation among oyster mushroom cultivars released in Korea by URP-PCR fingerprinting. *Mycobiology* 29:85-89.
- Kang, H. W., Park, D. S., Park, Y. J., Lee, B. M., Cho, S. M., Kim, K. T., Seo, K. S., Go, S. J. 2002. PCR Based Detection of *Phellinus linteus* using Specific Primers Generated from Universal Rice Primer (URP) Derived PCR Polymorphic band. *Mycobiology* 30:202-207.
- Park, D. S., Kang, H. W., Lee, M. H Park, Y. J., Lee, B. M., Han, J. H and Go, S. J. 2003. DNA fingerprinting analysis of genus *Phytophthora* in Korea. *Mycobiology* 31:235-247.
- Seo, G. S., Kim, B. R., Park, M. S., Kim, M. K. and Yu, S. H. 2002. Morphological characterization and URP-PCR analysis of *Hypocrea* sp., a weed mould of oyster mushroom cultivation. *Kor. J. Mycol.* 3:86-94.
- Shin K. H., Lim, S. S. Lee, S. H. Lee, Y. S. and Cho, S. Y. 2001. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. *Healthy Aging for Functional Longevity* 928:261-273.
- Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S. 1993. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* 21:94-105.
- Sung, J. M., Lee, H. K. and Yang, K. J. 1995. Classification of *Cordyceps* spp. by morphological characteristics and protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* 23:92-104.
- White, J. J., Bruns, J. Lee, S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenics. A guide to methods and applications. Academic press, Pp.315-322.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams J.G.K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.