

수확 후 저장 배에서 분리한 *Penicillium*속 균의 유전적 다양성

한도숙¹ · 홍성기² · 강희완^{1,3,4*}

¹한경대학교 바이오정보기술대학원 ²국립농업과학원
³한경대학교 유전공학연구소, ⁴JK BioTech.

Genetic Diversity of *Penicillium* isolates Isolated from Pears with Postharvest Decay in Storage

Do-Suk Han¹, Sung-Kee Hong² and Hee-Wan Kang^{1,3,4*}

¹Graduate School of Bio.&Information Technology, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea

²National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

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

⁴JK BioTech Co. Ltd. Gyonggi, Ansong 456-749, Korea

(Received March 15, 2012. Accepted March 25, 2012)

ABSTRACT: This study was carried out to identify the genetic diversity of *Penicillium* isolates that were isolated from pears with postharvest decay in storage. URP-PCR was used to detect DNA diversity of 84 *Penicillium* isolates. Based on URP-PCR profiles, 18 *Penicillium* isolates were selected and their PCR polymorphic bands were produced by additional primers URP1F, URP2R, URP2F, and URP4R. UPGMA cluster analysis using the polymorphic bands showed four clustered groups and furthermore cultural and morphological features characterized the 18 *Penicillium* isolates. Group 1 was dominant, which occupies 70% in the four clustered groups and identified as *P. expansum* based on ITS sequence and morphological features.

KEYWORDS : PCR polymorphism, Pear, *Penicillium* isolates, Postharvest decay

서 론

우리나라 2011년 배 재배면적은 15,081 ha로 10년전보다 7%정도 감소하였으며, 총생산량은 연 467천 톤으로 신고 품종 재배 면적이 전체면적의 85%를 차지하고있다. 최근에는 유통시기를 조절하여 적정기의 값을 받기 위하여 직접 저장시설을 갖추고 배를 저장 유통하는 농가가 많이 늘어나고 있는 추세에 있다. 과실 저장적온은 과실이 저온장해를 받지 않을 정도의 온도로 0~2°C 유지되도록 하고 있다. 비록 저장고가 저온에 유지한다 하여도 고온, 상처는 미생물 등 에 의한 부패발생이 문제가 되며, 저장중에 병이 발생하면 배의 품질을 떨어뜨리며 밀집된 조건에서 급격히 병이 진전되어 큰 피해를 초래할 수 있다.

과일저장 중에 발생하는 병원균으로는 *Cladosporium* spp.와 *Alternaria* spp. *Fusarium* spp., *Botrytis* sp., *Penicillium* spp. 등이 알려져 있다(Agrios, 2005; Borecka, 1977; Hong *et al.*, 1988). *Penicillium* spp.는 농작물의 저장병에 관여하는 병원균으로서 가장 피해를

주는 균이다. 이 균은 전 세계적으로 배를 비롯하여 마늘, 사과, 감귤, 곡류, 버섯 등의 저장병을 일으켜 문제가 되고 있다 (Cho *et al.*, 1995; Borecka, 1977; Holmes *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1991; Jo *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2002). 저장병에 관여하는 *Penicillium* spp.는 푸른곰팡이 (Blue mold rot)와 초록곰팡이(Green mold rot)을 일으키는데 배 저장병의 주종을 이룬다(김 등, 2002; Shim *et al.*, 2002).

Penicillium 분류를 위하여 분생포자, 분생자경, Phialide의 모양을 포함한 형태적관찰과 배양적 특성에 따라 수행된 바 있으나 (권 등 2006; Pitt, 1985) 배양조건과 환경적인 영향으로 인한 분류적 난점을 배제할 수 없다 (Okuda, 1994). 이를 보완 하기위하여 Mycotoxin 검출 및 동위효소 검출법이 *Penicillium*의 분류에 적용 되었으나(Boysen *et al.*, 1996; Cigler *et al.*, 1973), 환경에 따라 발현 양상이 다르게 나타나 안정적으로 적용 하는데 한계점이 있다.

DNA분자검정법은 환경조건을 배제하고 안정적으로 균류의 종간, 종내 분류법에 이용될 수 있으며 PCR방법은 신속, 정확하게 균류의 종간, 종내의 유전적 특성구분에 일반적으로 사용 되고 있다(Caetano and Gresshoff, 1997; 강 2003). *Penicillium*균의 종 분류에 있어 기능성 유전자

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

인 β -tubulin gene sequence와 rDNA, mitochondria가 이용되고 있다(Kim *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2000). 그러나 rDNA분석법은 종내 계통 품종구분을 위해선 다형성검출에 한계가 있어 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Welsh *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990) 등의 높은 다형성을 나타내는 방법이 사용되어 왔다. 그러나 RAPD분석은 비 특이적 밴드의 증폭으로 PCR 다형성 결과가 안정적이지 못하여 재현성에서 문제점이 있는 것으로 인식되고 있다. 최근에는 이러한 점을 보완하여 URP (Universal Rice Primer)가 개발되어(Kang *et al.*, 2002), 다양한 미생물의 종간, 종내 분류에 유용하게 적용된바 있다(Kang *et al.*, 2002, 2001, 2003; 김 등, 2007; Park, *et al.*, 2003). URP primer는 10 mer보다 긴 염기인 20 mer이며, 55°C 이상에서의 annealing 반응을 적용하기 때문에 높은 재현성으로 PCR 다형성 밴드를 증폭 할 수 있는 특징이 있다.

본 연구는 평택일원의 배 저장고로부터 부패된 배를 수집하여 병반부위로부터 다양한 *Penicillium*균을 분리하여 URP-PCR에 의한 DNA profile을 구축하고 *Penicillium* 균주의 종간, 종내 계통분류를 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

균주 분리

시험균주는 경기 평택 일원의 6개소의 배 저온저장고에서 이병과를 수집하여 병반부로부터 분리 되었다. 균 분리를 위하여 병반부위의 껍질을 벗겨내고 육질부분을 핀셋으로 분리하여 water agar (1%)에 올려놓고, 25°C에서 7일간 배양하였다. 병반부위에 형성된 포자 덩어리를 멸균수에 희석하여 백금선에 포자현탁액을 적신 다음, PDA (Potato Dextrose Agar)에 streaking 하여 4일 후에 형성된 단일 clone을 분리하여 PDA 배지에 옮겨 실험에 사용하였다.

균주의 균학적 특성 조사

Penicillium 균의 포자형성 자실체와 포자의 형태적 특성을 조사하기 위하여 PDA에서 7일간 암상태에서 배양한 균총을 200배 해부현미경과 400배의 복합현미경을 이용하여 관찰하였다. 조사항목으로서는 분생포자, 균사, Phialide의 형태적 특징이었다.

배양적 특징 조사

Penicillium 균의 성장률을 조사하기 위하여 200 μ l의 weak agar (0.05%)를 첨가하여 포자현탁액(10^2 spore/ml)의 2 μ l를 PDA배지의 중앙 부위에 접종 하고 25°C와 4°C에 각각 접종하고 12일간의 성장속도를 관찰 하였다. 배지에 따른 균총의 형태적 특성을 조사하기 위하여 포자현탁액(10^2 spore/ml)의 20 μ l를 Czapek's agar(Cz), malt extract agar(MEA), 3지점식 접종하여 7일간 25°C에서 배

양한 후 균총의 직경을 측정하여 성장비교를 하였으며 그 외에 균총의 형태, 색소의 형성 여부 등을 관찰하여 조사하였다.

병원성 검정

병원성 검정을 위하여 *Penicillium*균을 PDA에 접종하여 25°C에서 7일간 배양한 후에 형성된 분생포자를 멸균 증류수로 분생포자 현탁액 (포자농도 5×10^5 /ml)을 만들었다. 분생포자 현탁액 5 μ l를 2003년도 9월에 수확한 신고배에 상처를 주거나 주지 않고 접종하여 포화습도를 유지하기 위하여 밀부분에 물을 붓붙고 밀폐된 플라스틱상자에서 옮긴 후에 25°C와 4°C에서 암상태로 7일간 배양기에 배양 후 병반형성 유무를 관찰하였다.

Penicillium 균주의 Genomic DNA 분리

시험균주를 5 ml의 PDA broth 배지에서 진탕배양(200 rpm)으로 6일간 배양하였다. 배양된 균사체를 여지에 걸러낸 다음 동결건조를 하였다. 동결 건조한 균사체를 곱게 마쇄한 다음 100 μ g정도를 1.5 ml의 test tube에 옮기고 추출용 완충액(200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 400 μ l와 Proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 유리봉으로 buffer상에서 잘 혼합하여 준 다음 37°C 에서 1시간 동안 항온 하였다. 이 혼합액에 2 X CTAB buffer를 동량첨가 하여 65°C에서 15분간 방치하고 chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 넣고 철저히 혼합한후 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 μ l에 용해 하였다. 10 mg/ml RNase 2 μ l를 넣어 37°C에서 30분 처리하여 그 용액속에 함유된 RNA를 제거 하였다. DNA함량을 측정하기위하여 DNA를 100배로 희석하여 spectrophotometer의 260 nm의 파장에서 실시하였다.

PCR 다형성 및 rDNA분석

PCR 핵산지문 분석은 보고된 URP primer(Kang *et al.*, 2002)를 이용하여 수행 하였다. rDNA ITS 영역을 분리하기 위하여 사용된 primer는 primer ITS 1(5'-TCCGTAGGTGAACCGCGG-3')과 primer ITS 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')로 하였다. PCR반응 용액은 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 100 ng prime, 50 ng template DNA, 200 μ m dNTP(dCTP, dTTP, dATP, dGTP), 및 2.5 unit *Taq* polymerase(JK BioTech)를 넣고 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였다. PTC-200(MJ. Reasearch사)의 PCR기기를 이용하여 처음 DNA변성을 위하여 94°C에서 4

분간, 그 후 cycle에서 DNA변성은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분 및 DNA합성은 72°C에서 2분으로 총 35 cycle을 실시 하였으며, 최종 DNA합성은 7분으로 하였다. 증폭된 PCR산물들은 Agarose gel에서 분석 하였다. PCR산물은 1.5%의 agarose gel에 예 loading한후 5 vol/cm로 전기영동 하였다. Agarose 상에서의 DNA검출은 ethidium bromide용액에 염색하여 UV lamp하에서 DNA밴드를 하였다. rDNA의 ITS영역의 염기서열 분석을 위하여 0.5 kb의 ITS PCR산물을 pGEM-T vector(Promega)에 ligation한 후 *E. coli*(DH5) cell에 형질전환 하여 Ampicillium (50 ppm)과 X-gal 이 함유하는 LB plate에 도말 하여 37°C에서 16시간 방치한 후 흰색의 colony를 선발 하여 5ml의 LB broth에 overnight 배양하고 Wizard PCR Preps DNA purification system(Promega)으로 plasmid를 정제하고 염기서열분석(그린진바이오텍)을 결정 하였다.

유연관계분석

*Penicillium*균주의 PCR 다형성밴드 비교는 동일한 크기의 밴드여부로 행하였고, 밴드의 유무에 따라 0과1로 나열하여 UNI coefficient로 유사도를 구하고 UPGMA (unweighted paired group methods using arithmetic average)에 의한 집괴분석을 실시 하였다. 유사도와 UPGMA 분석은 NTSYS-pc program(Ver.2.1)을 이용 하였다.

결과 및 고찰

저장배로부터 진균의 분리

평택지역의 6 배 저장고로부터 수집한 300여개의 이병배로부터 253점의 곰팡이 균주를 분리 하였다. Table 1은 분리된 균 중에서 곰팡이 속의 분포를 나타내고 있다. 이병 부위로부터 분리된 곰팡이 종류는 *Penicillium* 균주가 총 300개의 이병배중에서 253점으로 84%를 나타내고 있으며 *Alternaria* 종은 5%, *Fusarium* 종은 4%, 기타 곰팡이 종이 7.5%를 나타내었다. 기타에 속하는 곰팡이로서는 대체적으로 부생균으로 널리 알려져 있는 *Rhizopus* 종, *Cladosporium* 종으로 동정 되었다. 저장고에서 자연적으

Table 1. Fungal species isolated from pears with postharvest decay in storage

Origin (Infected Pears)	Fungal species			
	<i>Penicillium</i> species	<i>Alternaria</i> species	<i>Fusarium</i> species	Others
A (60)	47	5	3	5
B (40)	35	2	1	2
C (50)	43	3	2	2
D (50)	42	2	2	4
E (50)	45	2	2	1
F (50)	43	1	2	4



Fig. 1. Pears with Postharvest Decay in Storage.

로 감염된 병반은 초기에는 수침상으로 작게 형성 되다가 병이 진전 됨에 따라 병반주위가 무르고 균사체와 포자덩어리가 병반부에서 형성 되며(Fig. 1) 2차감염을 위한 원인을 제공 하게 된다.

PCR 다양성분석 및 유전적 유연관계

PCR 다형성 분석을 위하여 저장 배의 병반부로부터 분리한 *Penicillium* 균주 중에서 형태적으로 유사한 것을 제외하고 최종 84 *Penicillium* 균주를 본 실험에 이용 하였다. URP primer (Kang *et al.*, 2002)로 84 *Penicillium* 균주의 genomic DNA를 주형 DNA로 하여 PCR반응을 실시 하였다. PCR 다형성분석으로 다양한 *Penicillium* 균주의 PCR profile을 생산하여 중복된 균주를 제외하고 균동정을 위한 *Penicillium* 균주를 선발하는데 있다. 기대한 것과 같이 URP-2R primer는 84 *Penicillium* 균주에서 다양한 PCR 다형성밴드를 증폭 하였다. 각각의 균주의 PCR 다형성밴드로 Fig. 2의 lane 3의 PCR 다형성을 보인 균주가 59균주로 70% 주요한 PCR다형성 균으로서 형성하고 있었다. 이는 lane 3(S-15)의 PCR 다형성 *Penicillium* 균주가 저장배에서 우점균주로 생각 될 수 있으며 lane 1 (P-13), lane 2(P-10), lane 8(P-21), lane 9 (P-21), lane 11 (SP-1), lane 13 (HP-13), lane 16 (PP-67), lane 18 (P-30), lane 19 (PP-67), lane 21 (PP-25), lane 23 (KP-1-1), lane 25 (KP-4-2), lane 32(KP-19-1), lane 34 (PP-75), lane 36 (SP-21), lane 44(HP-4), lane 50 (PP-92), lane 54(SP-17-1), lane 65(SP-32), lane 79 (SP-17), 등이 lane 3 (S-15)의 밴드패턴과 구별되는 DNA 다양성을 보였다. 이들 18 균주는 URP-1F, URP-2F, URP-4R, URP-2R primer를 이용하여 다시 PCR다형성분석을 수행 하였다.

Fig. 3은 다양한 URP primer의 적용에따른 18 *Penicillium* 균주의 PCR profile 을 나타낸 것으로 P-13, P-10, P-21, SP-15, PP-75, SP-21, SP-1, HP-13, PP-67, HP-4, SP-17-1, PP-25 등이 유사한 band pattern을 보였으며, P-30, KP-

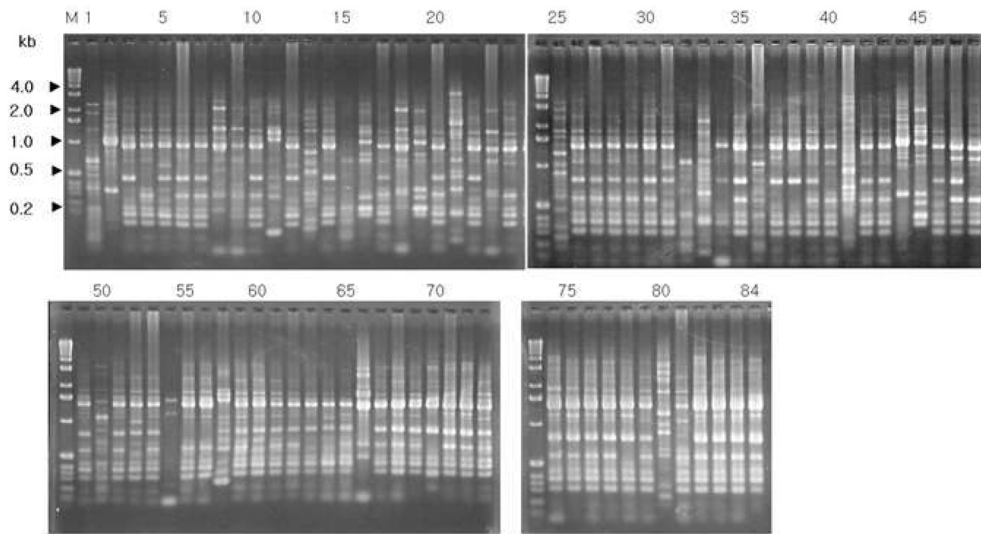


Fig. 2. PCR profile of 84 *Penicillium* isolates produced by primer URP2R.

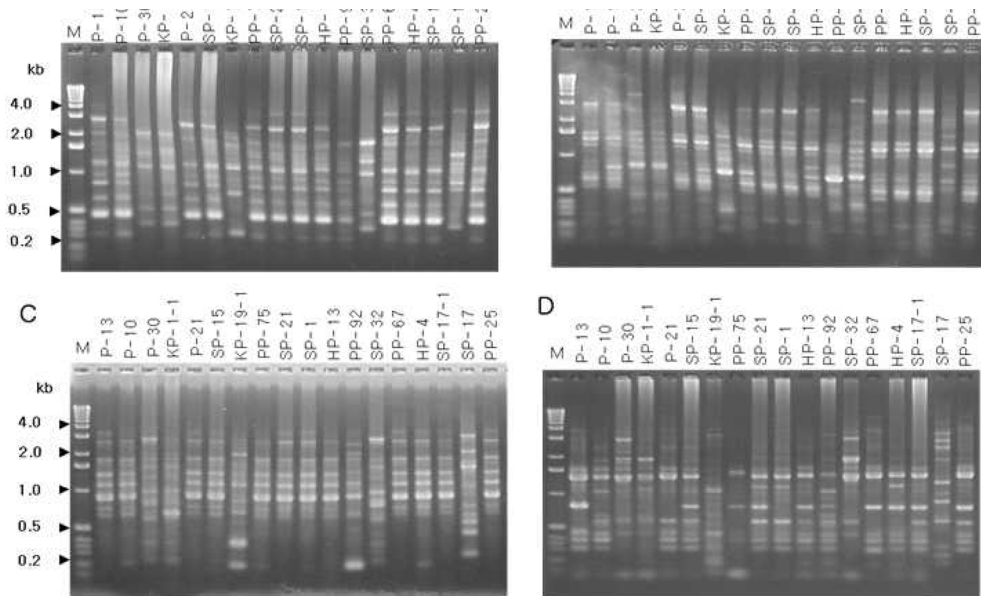


Fig. 3. PCR fingerprints of 18 *Penicillium* isolates by primers URP1F (A), URP2F (B), URP4R (C), URP2R (D)

1-1, SP-32, PP-92가 유사 band pattern을 보였으나 SP-17은 다른것과 다른 독특한 PCR 다형성밴드를 형성 하였다. URP-2R의 경우에는 적용된 다른 URP primer보다 다양한 PCR다형성 밴드를 증폭 하였으며 종내 계통분류에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 사료 되었다. 18개 균주에 의해 생성된 345개의 PCR다형성밴드(Fig. 3) 형성 유무를 입력하여 NTSYS-pc의 UPGMA program으로 dendrogram을 작성하였다(Fig. 4). 그 결과 4개의 대 Group으로 분류 되었다. Groupe 1은 4개의 subgroup으로 나뉘어져 있으며 subgroup 간에 군 80-85%의 상동성을 보였다. SP-21, SP-1, HP-4, SP-17-1, HP-13, PP-67, PP-25는 Groupe 1내의 subgroup중에서 가장 많은 분포를 보였으

며 그들 간에는 88-95%의 높은 상동성을 보였다. P-13과 P-10균주는 제 1 subgroup에 속하며 다른 subgroup과는 80%의 가장 원연관계를 이루었다. Groupe 2는 PP-92균주가 속 하였으며 Groupe 1과 70%의 유연관계를 보였다. 그러나 다른 groupe3, 4간에는 각각 56%-52%로 원연 관계를 이루고 있었다. Groupe 3는 P-30, KP-1-1, SP-32, KP-19-1이 속 하였으며 P-30과 KP-1-1사이에 90%로 가장 근연관계를 이루고 있었으나 KP-19-1은 다른 subgroup 간에 60%의 낮은 유사도를 나타내었다. Group 4는 SP-17균주가 속하며 다른 Group 간에 52%의 낮은 유사도를 보였다. 결론적으로 PCR 다형성분석에서 DNA다형성근거로 분리한 균주간의 유전적 유사도를 Dendrogram에서

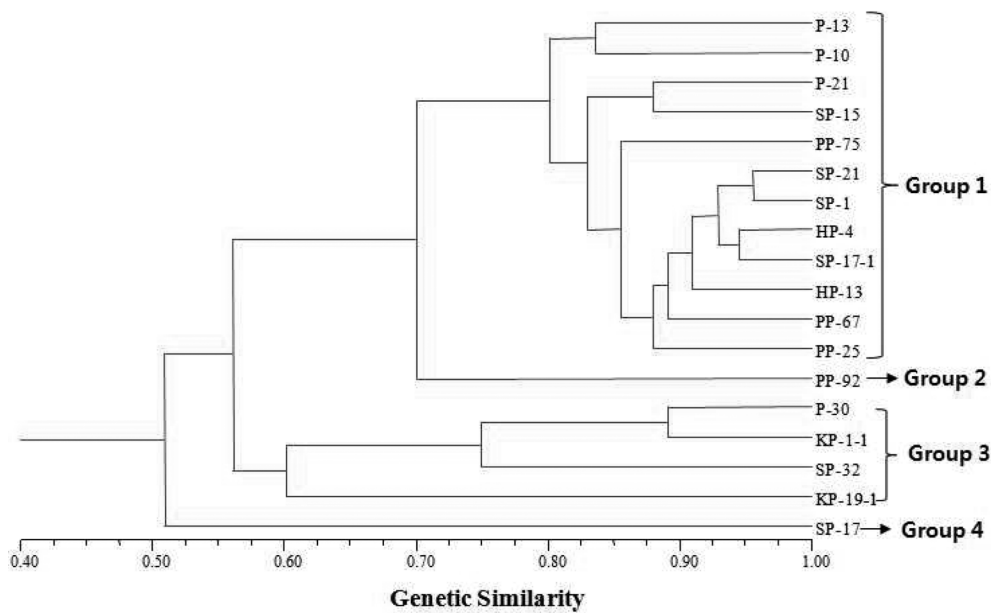


Fig. 4. UPGMA dendrogram derived from URP-PCR polymorphic bands in the 18 *Penicillium* isolates.

분석결과와 본 연구에서 적어도 3종의 *Penicillium* 종이 분리되었음을 추정 할 수 있었다. 특히 Group 1은 70% 이상의 *Penicillium* 균주가 속한 것으로 나타났다. 김 등(2002)은 수확 후 저장배에 *P. expansum*, *P. solitum*, *P. crustosum* 등 3종의 *Penicillium*이 존재 하였다고 하였으며 Shim 등(2002)은 이병 배로부터 *P. aurantiogriseum*를 분리 동정 하였다. 또한 포도에서 *P. bialowiezense*, *P. citrinum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*이 분리 동정 한바 있다(Kim *et al.*, 2007). 결론적으로, primer에 따라 차이는 있지만 본 연구에서 분리한 균주는 URP-PCR에서 크게 4종류의 독특한 균주간 구분을 형성 함으로서 4 종의 *Penicillium*이 존재 할것으로 추정 되었다.

Boysen 등(1996)은 기존에 두 변종으로 구분되어 있던 *Penicillium* group을 RAPD 방법을 응용하여 *P. roqueforti*, *P. carneum*, *P. paneum*의 3종으로 재분류한 바 있다. URP-PCR방법은 독소를 생성하는 *Alternaria* 병원균의 분류(Kang *et al.*, 2003), 느타리버섯균주의 품종, 계통간 분류(Kang *et al.*, 2001; 김 등 2007)에 적용한 바있으며 *Phellinus* 종의 종 특이적 분류와 특이 URP-PCR밴드를 이용한 종 특이 Nested PCR primer 개발(Kang *et al.*, 2002), 국내 *Phytophthora* 종의 종간, 종내의 유전적 다양성 평가(Park *et al.*, 2003)와 느타리버섯 병원성 *Hypocrea* 종의 핵산지문분석(Seo *et al.*, 2002)에 이용되었으며 진균류의 DNA 다양성분석에 매우 유용한 것으로 알려져 있다. Hyun 과 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 동일종이더

라도 분리원에 따라 유전적 분화가 다양해진 결과로 생각 된다.

동일종이면서도 *Penicillium*균주의 배양조건에따라 형태적 특징이 다양하여 형태적 분류의 한계점을 보완할 수 있는 방법으로 Sequeera 등(1997)은 RAPD와 RFLP에 의한 *P. nodositatum*의 분류적 위치를 연구하였고, Hockings 등(1998)은 밀의 근권에서 균을 분리하여 배양형태적 특성을 연구하고, secondary metabolites을 분석한 다음 RAPD PCR를 이용하여 *Penicillium radicum* sp. nov.를 동정한 바 있다. 이에 따라 본 연구의 URP-PCR profile은 *Penicillium* 종 동정에 유용한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

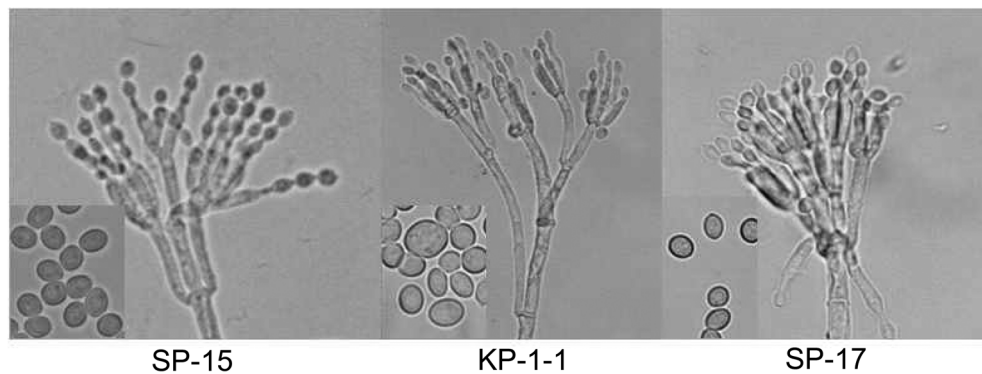
Penicillium 균주의 형태적 특성

PCR다형성을 조사하여 특징적인 밴드패턴을 보인 18 *Penicillium* 균주를 대상으로 하여 배양적 특성을 조사 하였다. Table 2는 Czapek Agar Cz와 Malt extract Agar (ME)에 공시한 *Penicillium* 균주를 접종 하고 7일 후의 colony 모양을 관찰한것이다. Cz 배지에서는 29 mm에서 40 mm의 균총성장을 보인 반면에 ME에서는 17에서 32 mm로서 Cz보다 성장이 저하 됨을 보여 주고 있다. URP-group 1의 *Penicillium* 균주에서 Cz 배지에서의 균총의 색깔은 대부분 회백색의 초록빛을 띠고 있었으며 연갈색또는 옅은 노랑색색소를 생산하며 균총의 형태는 벨벳, 양털모양이었다. 특징적으로 KP-1-1는 살색의 균총색을 보이며 담갈색의 짙은 색소를 생산하여 다른 균주와 구별 되는 특징을 보였다. 이균주는 URP-PCR분석에서도 독특한 PCR 다형성 밴드를 보였었다. P-21 과P-30는 균총주변에 회백색의 초록빛을 띠나 담갈색의 색소를 생산

Table 2. Comparisons of cultural characteristics of 18 *Penicillium* isolates

Isolates	Colony on Cz			Colony on MEA		
	Growth(mm)	Color	Pigment	Growth(mm)	Color	Pigment
P-13	38	GGr	SBr	28	PYGr	N
P-10	40	GGr	SBr	17	WGr	N
P-30	29	PY	SBr	29	PY	RO
KP-1-1	33	GGr	DBr	32	PY	N
P-21	31	GGr	SBr	20	WGr	N
SP-15	36	PY	N	29	WGr	N
KP-19-1	30	GGr	N	28	WGr	N
PP-75	38	GGr	SBr	37	WGr	N
SP-21	30	GGr	SBr	30	WGr	N
SP-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HP-13	33	GGr	N	18	PYGr	N
PP-92	36	GGr	DBr	31	PYGr	Y
SP-32	38	GGr	SBr	35	WOr	N
PP-67	32	ND	SBr	30	PYGr	N
HP-4	33	GGr	N	37	PYGr	N
SP-17-1	27	GGr	N	31	WGr	N
SP-17	37	PYGr	N	28	WGr	N
PP-25	39	PYGr	N	30	WGr	N

PY (Pale yellow), GGr (Gray green), PYGr (Pale yellow green), RO (Reddish orange), WOr (Whitish orange), WGr (Whitish green), ND (Not determined), N (No), SBr (Straw brown), DBr (Dark brown).

**Fig. 5.** Morphological charactics of *Penicillium* sp. isolates, SP-15, KP-1-1 and SP-17.

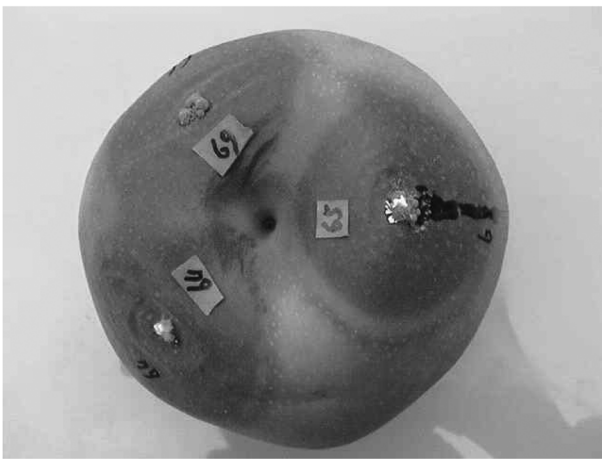
하는 특징을 보여 주고 있다. MEA배지에서 대체적으로 흰색 바탕에 녹색의 띠를 두른 균총과 배지뒷면에는 특별한 색의 색소를 생산 하지 않거나 진 노랑색의 윤문형 균총을 따라 형성 되었다. 균총의 성장은 17-37 mm로 나타났으며 P-10 균주는 Cz에서 40 mm로 성장이 가장 양호 하였으나 ME배지에서는 17 mm로 급격히 저조한 성장을 보였다. CYA배지에서 24.7~26.6 mm크기의 주름진 청녹색 양털모양(fasciculate), 벨벳 모양으로 배지뒷면은 진한 오렌지색~연갈색을 나타냈다. Cz배지에서는 균청색 균총 또는 청색을 띤 흰색 균, G25N배지에서는 균총은 15.0

~20.0 mm이며 흰색~연노랑색을 띤 편평한 형태를 나타냈다.

포자형성체의 입체모양은 전형적인 빗자루모양을 하고 있었으며 포자는 2.5~4.2 μm 크기의 구형~타원형으로 포자표면과 stipe 표면은 우둘투둘하고, phialide는 병모양으로 7.7~10.9.3~3.0 μm 이었다(Table 2). KP-1-1은 특징적으로 다른 *Penicillium*과 구별되는 크기를 보였는데 다른 균주간에는 특별한 차이점을 발견 할 수없었다. Fig. 6과 같이 형태적 관찰에서 3가지 type의 형태를 가진 것으로 대별 할 수 있었으며, URP-PCR분석에서도 각각 다른

Table 4. Morphological characteristics of 18 *Penicillium* isolates

Isolates	Spore		Phialide (um)
	Shape	Size (um)	
P-13	Globose-subglobose	2.5-3.0	8.3-13.8 × 2.3-2.7
P-10	Globose-subglobose	2.7-3.1	8.6-14.2 × 2.4-2.6
P-30	Globose-subglobose	2.4-3.6	7.9-12.2 × 2.5-2.7
KP-1-1	Globose-subglobose	3.8-4.2	10.6-18.2 × 2.5-2.9
P-21	Globose-subglobose	2.9-3.3	8.4-10.2 × 2.5-2.6
SP-15	Globose-subglobose	2.8-3.2	7.8-14.2 × 2.4-2.6
KP-19-1	Globose-subglobose	2.5-3.2	8.6-14.2 × 2.4-2.6
PP-75	Globose-subglobose	2.6-3.1	8.6-14.2 × 2.4-2.6
SP-21	Globose-subglobose	2.7-3.2	8.6-14.2 × 2.4-2.6
SP-1	Globose-subglobose	2.5-3.0	8.6-14.2 × 2.4-2.6
HP-13	Globose-subglobose	2.6-3.2	8.6-14.2 × 2.4-2.6
PP-92	Globose-subglobose	2.8-3.1	8.6-14.2 × 2.4-2.6
SP-32	Globose-subglobose	2.5-3.1	8.6-14.2 × 2.4-2.6
PP-67	Globose-subglobose	2.8-3.1	8.6-14.2 × 2.4-2.6
HP-4	Globose-subglobose	2.7-3.2	8.6-14.2 × 2.4-2.6
SP-17-1	Globose-subglobose	2.5-3.3	8.6-14.2 × 2.4-2.6
SP-17	Globose-subglobose	2.8-3.3	8.2-14.2 × 2.3-2.5
PP-25	Globose-subglobose	2.6-3.2	7.6-13.2 × 2.4-2.6

**Fig. 6.** Symptoms of decay by artificial inoculation of *Penicillium* isolate SP-15. The spore suspension was inoculated on wound site of pear and the symptom was observed at seven days after inoculation at 25°C

PCR 다형성을 보여 주고 있다. 이 균을 Kim 등(2007)과 김 등(2002)의 방법에서의 형태적 관찰을 기준으로 하여 동정 한 바 SP-15는 포자형성체 및 포자모양이 *P. expansum*과 유사한 것으로 동정 되었으며, K-P1-1은 *P. commune*으로 SP-17은 *P. curantigriserum*으로 잠정적으로 동정 되었다(Fig. 5). SP-15 균주는 URP-PCR분석에서도 분리균

중 70%이상을 차지하는 우점종 으로 *P. expansum* 임을 확인하기 위하여 rDNA에서 ITS 영역을 PCR 증폭하여 염기서열을 결정하고 GenBank의 염기서열과 비교분석 하였던 바 *P. expansum* ITS 염기서열과 99%의 상동성을 보여 *P. expansum*으로 동정 할 수 있었다(data not shown). 따라서, URP-PCR profile 구축은 *Penicillium*종 동정을 위하여 유용하게 사용 할 수 있을 것으로 기대 되었다.

Penicillium 균주의 병원성

본 연구에서 분자생물학적, 형태적근거로 기초로하여 얻어진 균주를 이용하여 이들의 병원성을 조사 하였다. 병원성 조건으로는 상처를 주었을때와 주지않았을때를 구분하여 접종 한 후 25°C와 4°C에서 위치 한 후 25°C에서는 접종 후 7일 후에, 4°C는 접종 후 30일이 경과 된 후에 감염여부를 조사 하였다. 본 연구에서 분리한 18 *Penicillium* 균주는 25°C에서는 접종 3일 후부터 상처접종 부위에서 작은 윤문상의 수침병반이 형성 되다가 7일 후에는 강한 병원성을 보이면서 접종배를 심하게 부패 시켰으나(Fig. 6) 상처를 주지않았을때에는 병반을 형성 하지 않았다. 한편, 4°C의 경우에는 접종 후 14일 후부터 작은 병반이 형성 되다가 30일정도가 경과 됨에 따라 확실한 병반이 형성 되어 부패현상을 보였다. 본 연구결과에서 *Penicillium* 저장병균은 상처를 통하여 침입하며 저온시에는 병 발생이 병원균 침입 후 30일 정도가 경과되어야 병 발생이 진전 되는 것으로 사료 되었다. 따라서, 배 저장을 위하여는 과 수간의 마찰에 의한 상처와 자연상태의 상처와 장기간의 배 저장은 *Penicillium*에 의한 저장병에 있어 중요한 요인으로 작용 할 것으로 사료 되었다.

적요

평택일원의 6개의 배 저장고로부터 300개의 부패된 배를 수집 하여 병반부위로부터 곰팡이를이 분리 하여 조사한 결과 *Penicillium* 균이 이병배중에서 84%가 분리되었다.

84 *Penicillium* 균주를 대상으로 URP2R primer로 균주간의 DNA 다양성을 조사한결과 18 type의 *Penicillium* 균주를 검출 할 수 있었으며 URP1F, URP2F, URP2R, URP4R의 PCR 다형성밴드를 이용한 유전적 유연관계분석으로 4 group으로 나눌 수 있었다. 18 *Penicillium*균주의 형태적특징을 조사한결과 3가지의 특징적인 배양적 특징을 갖는 것으로 확인 되었으며 포자형성과 포자형태에서도 3가지 type이 관찰 되었는데 SP-15균주 type, KP-1-1 균주 type, SP-17 type으로 PCR 다형성결과와 유사한 경향을 나타내었다.

SP-15형은 형태적, rDNA의 ITS 염기서열 분석에서 *P. expansum*로 동정 되었으며 분리된 *Penicillium* 균주 중 70%를 차지하는 우점종인 것으로 나타났으므로 향 후

URP-PCR profile은 중간, 종내 계통 분류에 유용하게 이용 할 수 있다.

참고문헌

- 강희완. 2003. PCR 에 의한 미생물 종 다양성 분석. 2003. 환경대 학교 논문집 35: 283-292
- 김중균, 임선화, 이대성, 지정현, 서건식, 주영철, 강희완. 2007. URP-PCR 다형성에 의한 국내 느타리 버섯품종의 유전적 특성 분석. 한국균학회 35: 61-67
- 권진혁, 정선기, 홍승범, 채윤석, 박창석. 2006. *Penicillium expansum*에 의한 감 푸른곰팡이병 발생 식물병연구. 12: 290-293.
- 김주희, 이왕희, 정성수, 최정식, 류정, 최영근. 2002. 수확 후 배 푸른 곰팡이병을 일으키는 *Penicillium* 속의 종류 및 특성. 식물병연구 8: 107-112
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Fifth edition, Academic Press, New York
- Borecka, H. 1977. Fungi of the genus *Penicillium* on apples and pears during the storage period. *Acta Agrobot.* 30:213-227
- Boysen, M., Skouboue, 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.
- Caetano-Anolles G and Gresshoff, P. M. 1997. DNA markers: protocols, Applications, and overviews. WILEY-VCH, N.Y
- 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. 22.
- Cigler, T. D, D. I. Fennell, G. A. Sansing, R. W. Detroy, and G. A. Bennet. 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium idicatum*: classification into subgroups. *Appl. Microbiol.* 26: 271-278
- Hills, D. M. and Davis, S. K. 1988. Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *System. Zool.* 37: 63-66.
- Hocking, A. D., Whitelaw, M. and Harden. T.J. 1998. *Penicillium radicum* sp. nov from the rhizosphere wheat. *Mycol. Res.* 102: 201-806
- Holmes, G.J., Eckert, J. W. and Pitt, J. I. 1994. Revised description of *Penicillium ulaeense* and its role as a pathogen of citrus fruits, *Phytopathology* 84: 719-72720.
- Hong, S. G., Park, Y. D., Jeong, W. J. and Bae, K. S. 2000. Sequence comparison of mitochondrial small subunit ribosomal DNA in *Penicillium*. *J. Microbiol.* 38:62-65.
- Hong, S. Y., Kim, W. D. and Lee, Y. H. 1991. Fungi associated with storage disease of citrus. *Res. Rept. RDA(C.P)* 33: 12-17.
- Hyun, J. W. and Park, W. M. 1996. Diffentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Korean J. Plant Pathol.* 12:122.
- Jo. W.S., Rew, Y. H., Kim, S. H., Teun, J. T and Chol, B. S. 1999. Occurrence of bluish green mold of *Pleurotus eryngii* by *Penicillium coriophillum*, *Korea J. Mycol.* 27:412-414
- Kang, H. W, Lee, B. M and Yu, S. H. 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., and 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. and 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
- Kim, W. K., Sang, H. K., Woo, S. K., Park, M. S., Paul, N. C. and Yu, S. H. 2007. S Six Species of *Penicillium* Associated with Blue Mold of Grape. *Mycobiology* 35:180-185.
- 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.
- Okuda, T. 1994. Variation in colony characteristics of *Penicillium* strains resulting from minor variation in culture conditions. *Mycologia* 86: 259-262.
- Pitt, J. I. 1985. Laboratory guide to common *Penicillium* species. Common welth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde. Austria. 1-250.
- Sequerra, J., Marmesse, R., Valla, G., Normand, P., Capellano, A. and Moiround, 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
- Shim, J. O., Choi, K. D., Hahn, K. D., Lee, J. H., Hyu, I. H., Lee, T. S., Ko, K. I., Lee, H. P and Lee, M. W. 2002. Blue mold od pear caused by *Penicillium aurantiogriseum* in Korea. *Mycobiology* 30: 105-106.
- 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.