The Korean Journal of Mycology
© The Korean Society of Mycology
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2012.40.2.78

한국균학회지
Kor. J. Mycol. 40(2) : 78-85 (2012)

Universal Rice Primer (URP)-PCR에 의한 곰팡이 종의 유전적 다양성 검정

강희완[1,2,3]*

[1]한경대학교 바이오·정보기술대학원, [2]한경대학교 유전공학연구소, [3]JK BioTech.

Genetic Divesity Analysis of Fungal Species by Universal Rice Primer (URP)-PCR

Hee-Wan Kang

[1]*Graduate School of Bio.&Information Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea*
[2]*Institute of Genetic engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea*
[3]*JK BioTech, Ltd. Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea*

(Received June 4, 2012. Revised June 12, 2012. Accepted June 18, 2012)

ABSTRACT : URP primers that were derived from repetitive DNA sequence of rice weedy rice have been applied for producing PCR polymorphisms in different fungal species. URP-PCR protocol employed stringent PCR with high annealing temperature over 55 °C throughout the thermo-cycling reaction, giving high reproducibility. Under the PCR condition, Each single URP primer produced characteristic fingerprints from diverse genomes of different fungal species, indicating its universal applicability. URP-PCR has been accessed for applicability to various fungal species with 33 genus, 142 species and 1,489 isolates. Numerous related papers have demonstrated that URP-PCR profiles of fungal species are very useful for identifying fungal species at intra and inter species levels. The results were reviewed in this paper.

KEYWORDS : Fungal species, Genetic diversity, URP-PCR

곰팡이는 지구상에 지권, 수권, 기권에 다양하게 분포하며 식물병원체의 감염, 항생물질 생산, 식품발효, 자연 정화 및 식량자원(버섯)등 유용, 유해한 역할을 한다. 곰팡이 종의 동정방법으로 형태적, Isozyme 등 이화학적 분석방법(Micales *et al*., 1992)이 검정 지표로 이용하였으나 환경과 생육단계 등의 영향으로 변이가 발생하기 쉽고, 노력, 비용, 시간이 많이 소요되며 분석 하고자 하는 표지의 한계성으로 인하여 세분화된 종, 아종 및 종내 계통검정에 한계점이 있다. 1980년대 말부터 DNA를 이용한 미생물의 검정기술이 개발되어 종 다양성 검정 및 미생물 분류에 획기적인 전기를 마련 하였다. 이 DNA검정법은 위의 형태적, 이화학적방법에 비하여 환경적영향을 배제할 수 있으며, 적은 미생물 밀도에서 검출이 가능한 고도의 민감성과 신속성, 정확성 및 단순성을 특징으로 한다. 현재 DNA hybridization과 PCR방법이 개발되어 미생물의 특정종의 검출, 자연환경내의 검출 및 미생물의 유전적 유연관계 분석에 널리 이용되고 있다(Caetano-Anolles, 1994). 특히 PCR법은 적은 미생물 밀도와 DNA로 신속, 간단하게 적용할 수 있어 병원균이 진전되기전 병원균의 존재 유무를 확인할 수 있는 고도의 민감성으로 병원균의 조기 진단에 이용하고 있다(Babu *et al*., 2011).

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

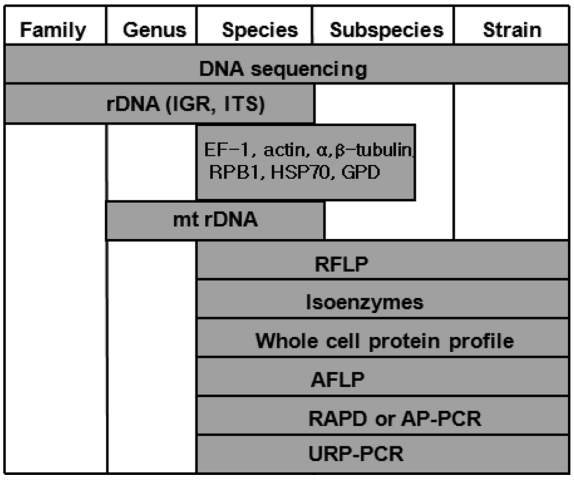

Fig. 1. Molecular markers to analyze genetic diversity of Fungal species.

Fig. 1에서 보여주는 것과 같이 다양한 DNA진단법이 미생물의 속, 종, 아종 및 strain type 동정에 이용되어 분자생물학적 지표가 분류에 있어 중요한 단서를 제공하고 있다. Ribosomal DNA(rDNA)영역의 Inter transscribed space(ITS)와 intergenic spacer region(IGR)영역을 특이적으로 PCR 증폭하여 염기서열 비교에 의한 균류의 종 동정은 보편적

인 분류방법으로 분류학적체계에 수용되고 있으며 유전자 은행에 광대한 정보가 축적 되어 속간, 또는 종간 분류에 매우 유용하게 이용되어 왔다(Cooke and Duncan, 1997; Habbit, 1992; Jeon *et al*., 2010; White, *et al.,* 1990). 그러나, 종간 식별이 어려운 염기서열 편중성 등으로 인한 계통발생학적 해석의 한계점이 들어남에 따라 더 많은 DNA정보가 필요하게 되었다. 최근 elogation factor-1a(EF-1a), actin, α/β-tubulin, RNA pol II, HSP70, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GPD) 등의 단백질 coding 유전자영역의 염기서열 비교에의한 방법으로 종간의 유전적 유연관계분석에 적용되고 있다(Hong, 2002; O'Donnell *et al*., 2000; Roger *et al*., 1999). 그러나 아종, 병원형, race 등의 종내 균주간의 DNA다형성검출에는 한계점이 있다. 곰팡이 종내 균주들의 DNA 다형성 검출을 위하여 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)(Williams *et al*., 1990), Arbitrary Primer(AP)-PCR(Welsh and McClelland, 1990)과 Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP)(Vos *et al*., 1995) 등의 PCR 기법이 널리 적용되어 왔다. 위의 PCR 기법들은 곰팡이의 종간, 종내 유전적 다양성을 분석하기위한 유용한 DNA 마커이기는 하지만 비특이적인 PCR 다형성밴드 검출 등으로 재현성이 문제점으로 지적되어 왔다.

Kang 등(2002)은 벼 반복배열 DNA로부터 universal rice primer(URP)를 개발하여식물, 동물 및 미생물의 종간, 종내의 유전형 판별에 매우 유효하게 적용 할 수 있는 것으로 보고한 이래로 다양한 곰팡이 종간, 종내에 URP-PCR방법이 적용되어 왔다. 본 논문은 2002년 URP-PCR 방법이 개발된 이래로 다양한 곰팡이 종에 적용 결과를 종합 분석하고 DNA마커로서의 URP-PCR의 특성을 기술하여 곰팡이 종의 유전적 다양성검출 적용을 위한 유용한 자료를 공급하고자 한다.

URP-PCR의 특성

URP primer는 한국재래적미(Korean red rice)로부터 분리된 1,187 bp의 벼 repetitive sequence(pKRD)로부터 유래 되었다(Kang *et al.*, 1998). pKRD는 Em/Spm CACTA-like transposon 특성을 가진 반복배열 DNA로 벼 염색체 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12상에 670 copy로 다양하게 분포 하는 것으로 확인되었다(Kang and Kang, 2008). pKRD(1,187 bp)로부터 15에서 20 mer의 45 종류의 PCR primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과 벼 품종 특이적인 다수의 PCR 다형밴드를 형성하였다. 이들 primer를 식물, 동물, 미생물 종에 적용하여 PCR을 수행한 결과 종간 특징적인 PCR 다형성밴드가 생산되어 다양한 생물종에 primer와 부착하는 보존영역이 존재하고 있을 것으로 추정할 수 있었다(Kang *et al*., 2002). 이러한 다양한 primer의 적용성에따라 Universal Rice Primer (URP)로 명명 되었으며 현재에 이른다.

URP-PCR방법은 단일 primer로 이용하는 측면에서는 기존에 개발된 RAPD나 AP-PCR과 유사한 원리로서 적용될 수 있으나, primer가 20개의 염기로 구성되어 있고 초기 PCR반응부터 55 °C 높은 annealing 온도에서 수행한다. PCR 조건은 최초 주형 DNA의 열변성 (denaturation): 94 °C에서 4분으로 하고denaturing: 94 °C 1분, annealing: 55 °C 1분, DNA합성: 72 °C 2분을 35 반복 cycle로 하는 것을 기본으로 하고 있다. 이러한 PCR조건은 primer와 template DNA간의 특이적 결합을 유도하는 반응 조건으로서 상기의 RAPD와 AP-PCR 방법과는 차별화 된다. RAPD의 기본 원리는 10 mer 내외의 짧은 primer를 genomic DNA에 비특이적인 조건에서 부착하게 조건을 설정하면 primer가 무작위로 수형 DNA에 부착함으로서 primer가 부착 되는 시점에서 PCR산물이 증폭 된다(Williams *et al*., 1990). 증폭된 DNA의 변이성은 합성 primer의 염기배열을 임의로 바꾸어 이용하므로써 매우 다양한 DNA band pattern의 변이를 얻을 수 있다. 현재, Operon사 등의 시약회사에서 프라이머 종류에 따라 kit로 판매되고 있어 편리하게 수행가능하다. 그러나 다량의 primer의 screening이 요구되고 낮은 annealing온도조건 등으로 인하여 비 특이적 밴드의 검출 등 재현성이 떨어지는 단점이 지적되고 있다. AP-PCR은 RAPD방법을 개선한 방법으로 RAPD의 원리와 거의 같으나 primer염기조성이 20 mer로서 RAPD primer보다 길고 PCR 증폭조건을 다양한 profile을 적용함으로서 발생되는 AP-PCR 산물은 RAPD와는 달리 50-500 bp의 저 분자량이 증폭 됨에 따라 Agarose gel에서는 DNA 다형성을 검출하기 어렵고 Polyacrylamide gel에 PCR산물을 전기영동하고 방사선 동위원소 labelling 또는 은 염색으로 밴드를 검출한다 (Wels and McClelland, 1990). AFLP방법은 genomic DNA를 제한효소로 이중절단한 후 그 DNA 단편들의 양끝을 adaptor로 표식한 다음, 표지부위의 DNA 염기서열을 바탕으로 작성한 primer를 사용하여 특정 제한효소 조합에 의해 생성된 DNA 단편을 증폭시킨 후 이 증폭산물의 차이 유무를 비교하는 것이다(Vos *et al*., 1995). AFLP용으로 이용되는 primer는 adaptor와 제한효소 인식좌의 sequence(공통부위) 와 증폭하고자 하는 특정 DNA 단편 양쪽 말단의 2~3 bp sequence(변이부위)로 만들어진다. AFLP는 높은 DNA 다형성을 검출 할 수 있으나 제한효소 처리, 접합, PCR 증폭 및 전기영동 검출법 등 분석과정이 복잡하여 DNA순도, 시약의 상태 등 일정한 처리가 어려워 재현성이 떨어지는 단점이 있다. URP-PCR은 annealing 온도를 초기부터 55 °C로 함으로서 특이적인 PCR산물을 증폭할 수 있어 RAPD와 AP-PCR의 낮은 annealing 온도에 따른 낮은 재현성 문제를 극복 하였다는 점에서 특징을 볼 수 있다. 또한 PCR 다형성 밴드를 agarose gel 상에서 검출 가능하기 때문에 간단, 신속하게 분석가능 하다. annealing온도에 따른 URP-PCR 특성을

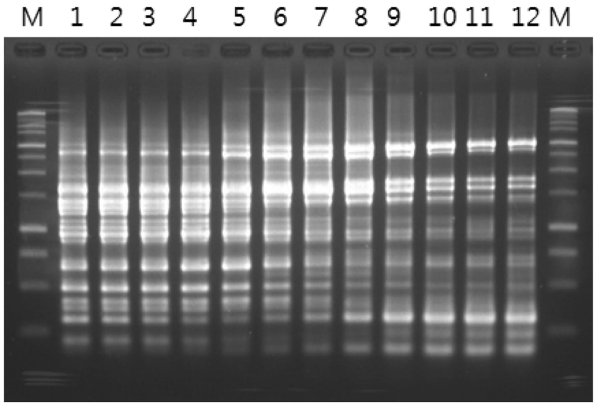

Fig. 2. Affect of annealing temperature on URP-PCR amplification. The genomic DNA of *P. ostreatus* (Chunchu) was amplified by URP 2 on a gradient annealing temperatures ranged from 37 to 61 °C; Lane M: 1-kb ladder, lanes 1-12: 36 °C, 38 °C, 40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C, 50 °C, 52 °C, 55 °C, 58 °C, 61 °C.

조사하기위하여 느타리버섯(춘추) genomic DNA(100 ng)을 이용하고 37 °C에서 61 °C 사이의 annearing 온도조건으로 하여 PCR반응을 수행 하였을 경우 모든 annealing 온도 조건에서 PCR다형성 밴드가 증폭되었다. 37 °C 에서 45 °C annealing 온도에서 밴드가 다수 검출되었으며 특히, 52 °C 이상 에서 안정된 다형성 밴드양상을 보여 고온에서의 다형성 밴드 형성하였다(Fig. 2).

10 mer의 염기로 구성된 primer를 사용하는 RAPD primer의 경우에는 40 °C이상에서는 거의 PCR 다형성밴드가 검출 되지 않으며 20 mer의 AP-PCR에 사용된 primer의 경우도 53 °C annealing 온도 이상에서는 PCR밴드를 형성 하지 않는 것으로 보고되었다(Kang *et al*., 2002). 고온의 annealing 온도에서의 PCR다형성 증폭산물은 primer와 template 간에 특이적인 결합에 의한 결과이며 (Caetano-Anolles and Gresshoff, 1997) 곰팡이종에 URP primer가 부착하는 특이적인 보존영역이 다수 존재하고 있음을 시사한다. 따라서 URP-PCR은 재현성 있게 곰팡이 종에 PCR다형성밴드를 검출할 수 있는 유용한 PCR방법으로 사료된다.

URP-PCR를 이용한 곰팡이 종의 유전적 다양성 분석

Kang 등(2002)에 의하여 12 URP primer가 보고 된 이래로 지난 10여년 동안 URP primer를 이용한 PCR 핵산 지문분석은 국내외적으로 다양한 곰팡이 종에 적용하여 왔으며 논문에서만 밝혀진 공식적인 것만 하여도 33속 142 종 1489 균주에 이르는 것으로 조사 되었다 (Table 1). 그 적용범위는 불완전균, 자낭균, 효모균, 점균, 담자균에 이르기까지 다양하게 적용 가능한 것으로 보인다. 곰팡이는 식물병원균, 식품발효균, 버섯 등 인간에 유해 또는 유용한 자원이다. 식물병원균의 동정은 병 방제와 예찰에 중요하며 검역식물병원균 자연계에 존재하는 특히 URP-PCR은 소수의 primer로 종간, 종내 특이적인 PCR 다형성 profile을 검출 할 수 있는 장점이 있다. Aggarwal 등(2010)은 URP-PCR로 밀의 spot bloch병을 일으키는 *Bipolaris sorokiniana* 균주의 유전적 다양성을 조사하였다. 흥미롭게도 적용된 URP primer는 균주들이 분리 지역간에 특징적인 구룹으로 PCR다형성이 형성되어 특정지역 균주의 유전적 특성을 구분할 수 있다 하였다. 캐나다 콩, 목화, 완두콩으로부터 charcoal dry root rot를 일으키는 *Macrophomina phaseolina*를 40균주를 분리하고 URP-PCR을 수행 하였던 바 분리된 기주별로 특징적인 PCR 다형성이 나타나 기주 특이적인 균주 검출에 매우 유용하게 적용 될 수 있을 것으로 보고 하였다(Jana *et al*., 2005). 발효식품, 주류제조에 사용되는 *Saccharomyces cerevisiae*, 6균주 *Debaromyces hansenii*, 5균주 *Issatchenkia orientalis*, 4균주 *Saccharomyces fermentati*, 2균주 *Schizosaccharomyces pombe*, *Endomyces fibuliger*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida tropicalis*로 구성된 23 효모균주를 대상으로 RAPD, inter simple sequence repeat(ISSR), URP-PCR을 수행 하여 결과를 비교 분석 하였다(Neemisha *et al*., 2010). 적용된 primer중에서 URP primer가 효모균의 종간 특이적인 PCR 다형성을 형성하는 최적 primer로 평가 되었다.

곰팡이 균류에서 형태적으로 분류하기 어려운 난 분류균으로 *Alternaria* spp. *Trichoderma* spp.. *Penicillium* spp. *Phytophthora* spp, *Aspergillus* spp 속을 들 수 있으며 rDNA영역 등의 보존적인 염기서열을 이용한 분류체계가 종 분류에 한계점이 있어 부가적인 분자생물학적인 분류체계가 요구 되고 있다.

*Alternaria*속은 전세계적으로 100종이 분포하며 다양한 형태적, 생화학적 특성을 보유 하고 있다. 특히, 크게 대형포자군과 소형포자군으로 분류하고 형태적 특징에의하여 분류 하여 왔다. 그러나, 기주특이적 독소(Host Specific Toxin, HST)를 생산하는 7 종의 *Alternaria*와 부생균인 *A. alternata*간에 형태적으로 너무 유사하여 형태적구별에 한계점이 있어 독소생성 능에의하여 분류되어 왔다. Kang 등(2003)은 URP-PCR을 활용하여 *A. gaisen* 그룹, *A. mali* complex 그룹과 *A. logipes*으로 분류한 바 있다. 이는 기존의 RAPD와 rDNA방법보다 더욱 진전된 세분화된 유연관계 정보를 제공 한 바 있으며 *A. alternata*로부터 HST생산 *Alternaria* 종이 획득 되었다는 기존의 분류학적 견해가 HST 생산 *Alternaria*는 고유의 특성으로 분류되어야 한다는 단서를 제공 할 수 있었다. Kim 등 (2005)은 소형 포자를 형성하는 11 *Alternaria* spp.의 98균주의 유전적 다형성을 조사하기 위하여 ITS rDNA영역과 mitochontrial small subunit rDNA (mt SSU rDNA)의 염기서열 분석과 URP-PCR의분석 결과를 비교 분석 하였다. ITS rDNA과 mt SSU rDNA의 분석결과 *A. infectoria*를 제외하고는 모든 *Alternaria* spp. 균주는 같은 그룹으로 complex 군을 이루어 각각의 *Alternaria* 종간 분류가 불가능 한 것으로 나타

Table 1. List of the fungal species analyzed by URP-PCR

Fungai species	Isolates/Species	URP-PCR profiling			
		species	subspecies	strain	References
Rhizoctonia solani	37/ 1	+++	++	+++	Jeon *et al*., 2010
Magnaporthe grisea	22/ 1	+++		++	NAAS
Aspergillus spp.	19/ 7	++		+++	NAAS
Fusarium spp.	34/ 5	++		+++	NAAS
Trichoderma spp.	24/3	++		+++	Choi *et al*., 2003
Penicillium spp.	250/45	+++		+++	Han *et al.* 2012, HKNU
Phytophthora spp.	96/14	+++		+++	Park *et al*.,2003
Alternaria spp.	45/12	+++	++	+++	Kang, *et al*. 2003; Kim *et al*., 2003; Yu *et al*., 2003
Bipolaris sorokiniana	40/1	+++		+++	Aggarwal *et a*l.2010,
Collectotrichum spp.	30/2	+++		+++	Hong, *et al.*, 2008
Macrophomina phaseolina	40/1	+++		+++	Babu, *et al*., 2011, Jana *et al.* 2005
Tilletia indica	23/1	+++	+++	+++	Aggarwal *et al*. 2010,
Botritis spp.	35/2	++		+++	Hong, 2002
Hypocrea sp	20/1	+++		+++	Seo *et al*., 2002
Yeast					
Sacharomyces spp.	27/2	+++		+++	Neemisha *et al*. 2010
Debaromyces hansenii	6/1	+++		+++	
Schizosacharomycess pomb	2/1	+++		+++	
Endomycess fibulinger	1/1	+++			
Brettanomyces bruxellensis	1/1	+++			
Canadian tropicalis	1/1	+++			
Issatchenkia orientalis	5/1	+++		+++	
Mushrooms					
Cordypces spp	13/3	+++		+	Kim *et al.* 2011
Hypsizygus spp.	150/3	+++		++	Kim *et al*., 2011, IMR
Pleurotus spp	225/8	+++		+++	Kang *et al.*, 2001; Kim *et al.,* 2007; Jeon, *et al*., 2009; Seo *et al*., 2008, RIM
Paecilomyces spp	6/3	+++		++	Kim *et al*., 2011
Auricularia auricula-judae	63/1	+++		+++	RIM
Agrocybe aegerita	37/7	+++		+++	RIM
Phellinus spp	40/8	+++		+	Kang *et al.*, 2002
Lentinus Lepideus	35/1	+++		+++	Lee *et al.*, 2008
Lentinula edodes	23/1	+++		+++	MRI
Ganoderma lucidum	96/1	+++		+++	CNU
Grifola frandosa	31/1	+++		+++	MRI
Flammulina velutipes	12/1	+++		ND	HKNU
Total	1,489/142				

National Academy of Agricultural Science (NAAS), Hankyong National University (HKNU), Mushroom Research Institute (MRI)

났다. 그러나, URP-PCR분석 결과는 *Alternaria* 종간 독립된 cluster를 형성하여 종간 구별이 가능 하였으며 미 동정 *Alternaria* 종을 URP-PCR 다형성 밴드와 비교하여 새로운 종 동정에 활용 할 수 있었다. 또한, 가지과 작물로부터 분리한 *Alternaria* 균주를 URP-PCR을 적용한 바 있으며 균주간의의 유전적 다양성과 종 특이적인 PCR profile을 검출 할 수 있었으며 형태적으로 구별이 어려운 *A. tomatophila*와 *A. solani* 종을 구분할 수 있는 분류학적 적용이 가능 하다고 하였다(Yu *et al.*, 2003).

느타리버섯으로부터 분리된 *Trichoderma* spp.를 *T.* cf. *virens*와 *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*을 구분하는 URP-PCR 다형성 양상을 보여 주었으며 rDNA분석과 비교 할 때 유사한 결과를 보였지만 종내 균주간의 특징을 구분하는 PCR 핵산지문분석정보를 제공 한 바 있다(Choi *et al.,* 2003). *Phytophthora*의 경우는 Korea Agricultural Culture Collection(KACC)에 보존중인 14종 96 균주로

부터 Genomic DNA를 분리하고 URP-PCR을 수행 한 바 있다(Park *et al.,* 2003). 21 균주의 *Phytophthora drechslei* 내에는 6 개의 URP-PCR패턴이 검출 되었으며 11균주의 *P. cryptogea*는 5개의 URP-PCR패턴을 보였으며 두 종간의 PCR다형성은 뚜렷한 차이를 보였다.

Fig. 3은 21균주의 고추역병균(*P. capsici*)와 5균주의 *P. cactorum,* 4균주의 *P. palmivora*의 URP-PCR결과로서 각각의 *Phytophthora*종간에 특징적인 PCR 다형성밴드를 형성하였다. *P. capsici*종내 균주간에 PCR다양성이 검출 되는 것을 알 수 있다. URP-PCR 패턴을 이용한 *Phytophthora* spp.의 종 동정 및 종 내의 유전적 다양성 검정을 위하여 유용 할 것으로 보고되었다.

Penicillium 정자의 URP-PCR적용성 검정에서 45종 250 *Penicillium*균주가 URP primer에의하여 PCR핵산지문을 실시 한 바 있으며 종간, 종내 특이적인 PCR양상을

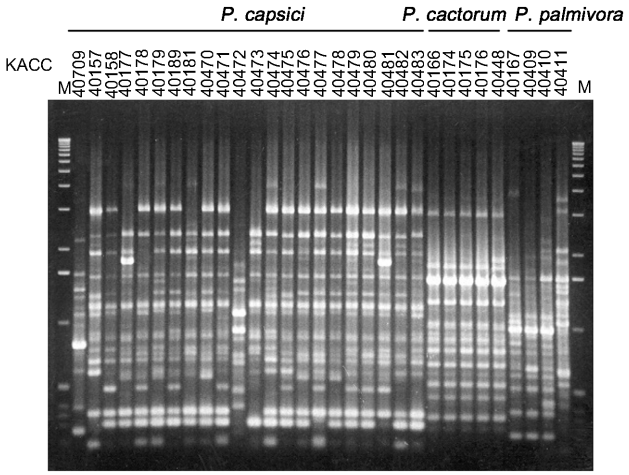

Fig. 3. URP-PCR polymorphic patterns among *P. capsici, P. cactorum* and *P. palmivora* isolates.

보였다. Fig. 4는 36종의 *Penicillium* spp.를 URP primer로 PCR 증폭한 것으로 종간에 독특한 PCR 양상을 보여 주고 있다. Fig. 4에서 화살표로 표시한 *P. chrysogenum*과 *P. glabrum*은 완전히 같은 PCR 양상을 보여 이 두 종은 같은 종일 가능성을 보여 주고 있다. *Penicillium* spp. 분류는 균체 colony 색, 포자, 균사 등의 형태적 특징에 기초로 하여 분류 되어 현재 200여종이 알려져 있다. URP-PCR방법은 하나의 primer로 각각의 종들의 유전적 특징 알 수 있기 때문에 그 DNA 다형성을 표준지표의 기준 마커로서 사용, 종 동정에 이용 할 수 있을 것으로 생각되었다. 최근, URP-PCR을 이용하여 수확 후 저장배에서 발생하는 *Penicillium*균주의 PCR profile을 성공적으로 적용 한 바 있다(Han *et al.*, 2012). 그 외에 느타리로부터 분리한 *Hypocrea* sp.의 URP-PCR분석을 실시 한 바 있으며(Seo *et al.*, 2002), Choi 등(2003)은 느타리버섯으로부터 분리한 *Trichoderma* spp.을 type culture strain과 비교하여 종 분류를 시도 한 바 있다. 첨가적으로 포도탄저병인 *Colletotrichum*과 *Botrytis* 종들의 URP-PCR분석으로 종간, 종내의 균주간의 유전적 다양성을 적용 한 바 있다 (Hong, 2002; Hong, *et al.*, 2008).

담자균류의 종간, 종내 특이적 PCR 다형성 밴드검출을 위하여 URP-PCR이 *Cordypces spp.*, *Hypsizygus* spp., *Pleurotus* spp., *Paecilomyces* spp., *Auricularia auricula-judae*, *Agrocybe aegerita*, *Phellinus* spp., *Lentinus lepideus*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frandosa*, *Flammulina velutipes*에 적용되었다(Chi, 2009; Kang *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2001; Kim *et al*., 2007; Jeon, *et al*.,2009; Seo *et al*., 2008; Lee *et al.*, 2008). 이들 버섯류는 주로 식용, 약용으로 재배되고 있으며 종. 속간의 교배, 원형질체융합 및 우수도입품종 선발 등으로 품종이 육성 되어 왔다. 따

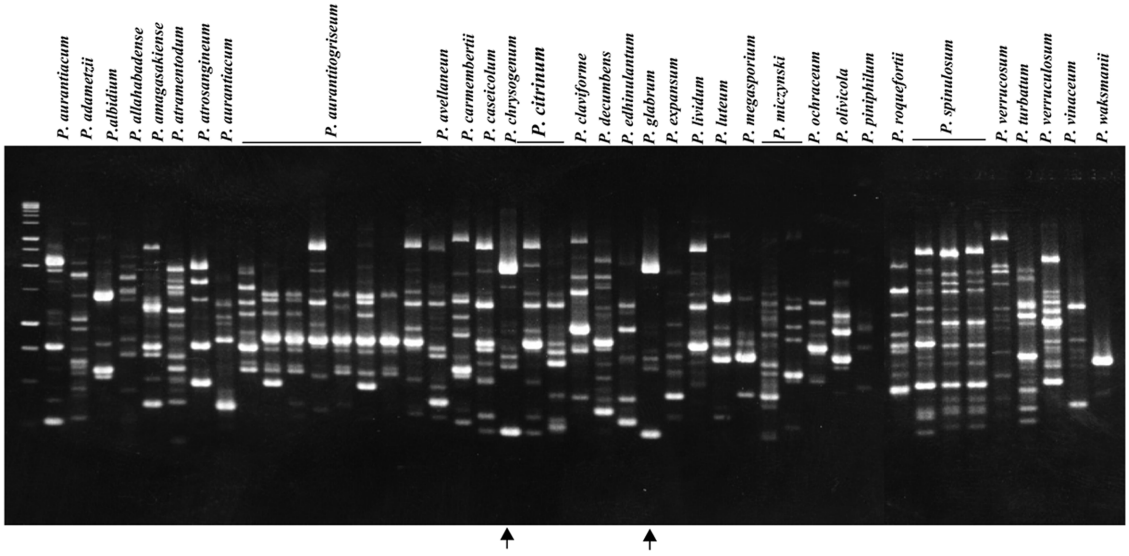

Fig. 4. URP-PCR polymorphism of *Penicillium* species.

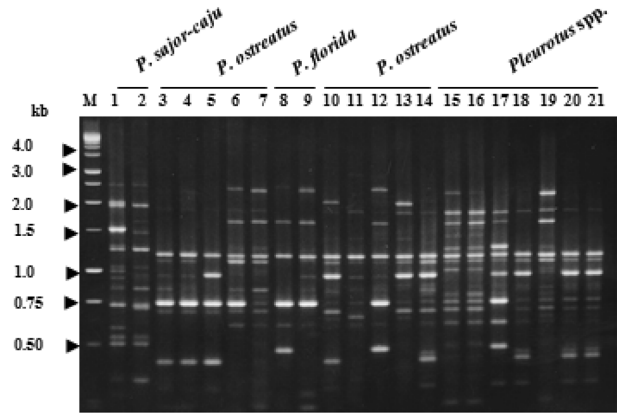

Fig. 5. URP-PCR polymorphism among different cultivars of *Pleurotus* spp. Lanes 1-14: Yeoleum 1, Yeoleum 2, Wonhyong 1, Wonhyong 2, Wonhyong 3, Chunchu1, Chunchu 2, Sacheol 1, Sacheol 2, 2-1, 201, 202, Aaneutari, Heukpyong; lanes 15-21: *Pleurotus* isolates collected from different mushroom farms. (Kang et al., 2001).

라서, 교배집단과 유전자원의 유전형 판별과 개발된 고유 품종의 DNA 표식 등은 향 후 육종전략과 품종 보호 측면에서 매우 중요하다. 느타리버섯(*Pleurotus* spp.)의 경우 국가기관이 주도하에 느타리버섯의 종. 속간의 교배, 원형질체융합 및 우수도입품종 선발 등으로 품종이 육성되어 느타리버섯 (*P. ostreatus*) 10품종, 사철 느타리 (*P. florida*) 2품종, 여름느타리 (*P. sajor-caju*) 2품종 등 형태적, 재배적 특성이 다른 13개 품종이 보급된 바 있다. 그러나 2000년도부터 품종등록제에서 품종신고제가 되면서 민간업체에서 자체 품종을 육성 보급할 수 있게 됨에 따라 급속히 등록품종이 증가되어 현재까지 77품종의 느타리버섯이 등록 되고 있다. 국제식물신품종보호동맹(UPOV)이 발동됨으로 외국에서는 품종의 지적 재산권 권리 수호를 위한 로얄티 요구 등 제재가 예상 되고 있어 국내 등록품종의 유전적 특성을 조사하여 이를 바탕으로 우리 고유 품종의 특성을 보호하고 품종 육성을 위한 기초자료로 이용하기 위하여 정확한 품종구분법이 요구되고 있다. Fig. 5는 URP-PCR에의한 느타리품종 구분이 수행한 결과로서 느타리버섯(*P. ostreatus*) 10품종, 사철 느타리(*P. florida*) 2품종 , 여름느타리(*P. sajor-caju*) 2품종이 원형느타리 1, 2를 제외하고 품종특이 URP-PCR 다형성을 보여 주고 있다. Fig. 5의 15번에서 21 농가로부터 수집한 느타리버섯의 품종을 비교하여 보았을 때 15, 16을 제외하고 모두 육성품종과 유사한 것을 확인 할 수 있었다. 이를 바탕으로 국내등록된 80 느타리품종을 URP-PCR로 다양한 품종군으로 구분할 수 있었으며 농가에서 등록한 많은 품종 간에 동일한 URP-PCR 양상을 보여 중복 품종이 다수 존재하고 있음을 추정 할 수 있었다(Kim *et al.*, 2007). 이상과 같이 URP-PCR은 품종특이적인 PCR 다형성을 나타냄으로 향 후 PCR profile을 활용한 느타리 품종 구분을 위한 유용 PCR마커로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

PCR기법에의한 식물병원진균의 종 특이 고감도 검출은 자연상에서 저밀도 병원균의 신속동정과 조기진단에 유용하게 이용 될 수 있다. 품종 또는 종 특이적인 URP-PCR 다형성 밴드는 특정 종 동정을 위한 특이적인 PCR검출 분자마커로 이용할 수 있다. *Phellinus linteus*의 특이적 PCR 검출을 위하여 *P. linteus* 종 특이 URP-PCR밴드가 분리 되어 염기서열을 결정 하고 Sequence-characterized amplified region(SCAR) primer를 제작하여 Nested PCR 검출 primer로 이용한 결과 *P. linteus* 에만 특이적으로 단일밴드가 검출 할 수 있었다(Kang, *et al.,* 2002). 이 결과로 URP-PCR 다형성밴드는 종 특이적으로 형성됨을 알 수 있었으며 종 분화와 분자육종의 유용한 분자마커로 이용 가능성을 시사하고 있다.

결 론

지금까지 식물병원진균, 버섯균류, 식품발효효모균 등 다양한 곰팡이 종을 대상으로 URP-PCR의 적용성을 검정해 왔으며 종간, 종내 특이적인 PCR 다형성밴드를 형성하여 곰팡이 종 분류에 유용한 방법으로 확인 되었다. 특히, URP-PCR방법은 20 mer의 긴 primer를 고온의 annealing 온도를 적용함으로 하여 안정적인 PCR 다형성을 유도 할 수 있는 특장을 가지고 있다. Jana 등(2005)은 기주별 *M. phaseolina* 균주의 유전적 다양성 평가에서 URP-PCR은 기주 특이적으로 균주를 분류 할 수 있다고 하였으며 효모균 종간 분류에있어서 RAPD과 (ISSR)-PCR 보다 URP-PCR 방법이 종간, 종내분류에 우수하였다고 보고 하였다. 2-4 종류의 URP primer로 다범위 곰팡이 종에 적용 할 수 있기 때문에 곰팡이 자원의 대량 스크린과 DNA profile의 database구축으로 특이균주 유전적 특성 확인 등 다양한 목적에 매우 유용하게 활용 할 수 있다. 특히, 형태적으로 분류하기 어려운 *Alternaria, Phythopthora, Penicillium, Trichoderma* 종 등에 대하여 종간, 종내 균 주간 특이적인 PCR profile을 생산 할 수 있었다. 버섯의 경우도 종간뿐만 아니라 품종 특이적인 PCR 다형성밴드를 검출 할 수 있어 버섯육종시 파생되는 교배계통과 품종 특이검출을 위해 유용하다. 최근 URP primer를 기초하여 다범위 곰팡이 종에 간단하고 쉽게 적용할 수 있는 Kit가 개발 상용화되었다(www.jkbiotech.com). 향 후 URP-PCR방법은 농업분야의 곰팡이뿐만 아니라 인체진균, 동물, 환경, 식품 등 다양한 분야에 확대적용 하게 될 것으로 기대 된다.

적 요

20 mer의 URP primers 가 한국 재래적미의 반복배열

DNA 염기서열로부터 고안되어 다양한 곰팡이 종의 PCR 다형성검출에 적용 되어 왔다. URP-PCR 방법은 PCR반응중 55 °C이상의 고온에서 annealing반응을 함으로 하여 재생적인 PCR결과를 얻을 수 있으며 효모균류에서 담자균류의 고등 균류까지 33속, 142 종, 1,489 균주의 다양한 곰팡이 종의 유전체 DNA에 적용되어 그 유용성이 평가 되어 왔다. 본 논문은 URP-PCR의 특성과 지금까지 다양한 곰팡이 종 다양성 검정결과를 종합하여 보고 한다.

참고문헌

Aggarwal, R, Singh, V., Shukla, R., Gurjar, M., Gupta and Sharma, T. 2010. URP-based DNA fingerprinting of bipolaris sorokiniana isolates causing spot blotch of wheat. *J. Phytopath*. 158: 210-216

Aggarwal, R., Tripathi, A and Yadav, A. 2010. Pathogenic and genetic variability in *Tilletia indica* monosporidial culture lines using universal rice primer-PCR *Eur. J. Plant Pathol*. 128: 333-342

Babu, B. K., Mesapogu, S., Sharma, A., Somasani, S. R. and Arora, D. K. 2011. Quantitative real-time PCR assay for rapid detection of plant and humanpathogenic *Macrophomina phaseolina* from field and environmental samples. *Mycologia* 103: 466-473.

Caetano-Anolles G. and Gresshoff, P. M. 1997. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Wiley-Vch, N.Y

Caetano-Anolles G., Bassam, G. J. and Gresshoff, P. M. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Mol .Gen. Genet.* 235:157-165

Chi, J. H. 2009. Studies on genetic diversity and physiolological in artificial cultivation of *Grifola frondosa*. Hankyong National Univ. Ph.D. Thesis

Choi, I. Y., Hong, S. B and Yadav, M. C. 2003. Molecular and morphological characterization of green mold, *Trichoderma* spp. isolated from oyster mushrooms. *Mycobiology* 31:74-80

Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. 1997. Phylogenic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the rebosomal RNA gene repeat. *Mycol. Res.* 101:667-677.

Han, D. S., Hong, S. K. and Kang, H. W. 2012. Genetic diversity of *Penicillium* isolates isolated from pears with postharvest decay in storage. *Kor. J. Mycol*. 40(1):11-18 (in Korean).

Hibbit, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 33:533-556.

Hong, S. K. 2002. Morphology and molecular systematics of *Botrytis* spp. and allied genera in Korea. Chungnam National Univ. Ph D. Thesis.

Hong, S. K., Kim, W. K., Yun, H. G. and Choi, K. J. 2008. Morphological variations, genetic diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing grape ripe rot in Korea. *Plant Pathol. J.* 24:269-278

Jana, T. K., Singh, N. K., Koundal, K. R. and Sharma, T. R. 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina* phaseolina, into specific groups using URP-PCR *Canadian J. Microb*. 51:159-164.

Jeon, S. J., Kim, J. K., Kim, K. H., Chi, J. H. and Seo, G. S. 2009. Genetic diversity analysis of *Pleurotus eringii* strains in Korea based on morphological characteristics and PCR polymorphism. *Kor. J. Mycol.* 37:19-27 (in Korean).

Jeon, Y. A., Kim, W. K., Kim, D. H., Kwon, S. W. and Hong, S. B. 2010. Taxonomic position of Korean isolates of *Rhizoctonia solani* based on RAPD and ITS sequencing of ribosomal DNA. *Plant Pathol. J.* 26:83-89.

Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H. and Eun, M. Y. 1998. Rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:90-90

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. 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.

Kang, H. W. and Kang, K. K. 2008 . Genomic characterization of *Oryza* species-specific CACTA-like transposon element and its application for genomic fingerprinting of rice varieties. *Molecular Breeding*. 21:271-281.

Kim, B. R., Park, M. S., Cho, H. S. and Yu, S. H. 2005. Molecular characterization of small-spored *Alternaria* species. *Res. Plant Dis.* 11:56-65 (in Korean).

Kim, J. K. and Kang, H. W. 2011. Genetic diversity of *Paecilomyces japonica* and *Cordypces militaris* strains by URP-PCR fingerprinting. *Kor. J. Mycol.* 39:180-184 (in Korean).

Kim, J. K., Lim, S. H., Lee, D. S., Chi, J. H., Ju, Y. C., Seo, G. S. and Kang, H. W. 2007. Genetic analysis of cultivars in *Pleurotus* spp. of Korea by URP-PCR polymorphism. *Kor. J. Mycol*. 35:61-67 (in Korean).

Lee, Y. H., Jung, M. J. and Ju, Y. C. 2008. Analysis of URP-PCR polymorphism and mycelial growth characteristics in *Lentinus lepideus* strains. *Kor. J. Mycol.* 20:73-73 (in Korean).

Micales, J. A., Bonde, M. R. and Peterson, G. L. 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics in handbook of applied mycology. vol 4: Fungal biotechnology. pp.57-79.

Neemisha, P., Kanwar, S. S., Jhang, T., Koundal, K. R. and Sharma, T. R. 2010. Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas World. *J. Microbiol. Biotech.* 26:539-1547.

O'Donnell, K., Nirenberg, H. I., Aoki, T. and Cigelnik, E. 2000. A multigene ohylogeny of the *Giberella fujikuroi* species complex: detection of additionalphylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78.

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.

Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F. and Philippe, H. 1999. An evalution of elogation factor 1 a as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Mol. Bio. Evol.* 16:218-233.

Seo, K. I., Jang, K. Y., Yoo, Y. B., Park, S. Y., Kim, K. H. and

Kong, W. S. 2008. Differentiation Among commercial strains of *Pleurotus* spp. Based on DNA fingerprinting using universal rice primer (URP). *Kor. J. Mycol.* 36:137-137 (in Korean).

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 (in Korean).

Yu, S. H., Cho, H. S., Kim, B. R. and Park, M. S. 2003. Morphological and molecular characterization of *Alternaria* isolates from solanaceous crops. *Kor. J. Mycol.* 31:103-113 (in Korean).

Vos, P., R. Hoger., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.

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.