

Fusarium 종에서의 RAPD-PCR분석

민병례^{1*} · 양연주 · 최영길²

상명대학교 생물학과¹, 한양대학교 생물학과²

Fusarium 균에 속하는 16종 21균주를 대상으로 RAPD-PCR방법을 이용하여 DNA 다형성을 분석하여 계통 유전학적 유연관계를 검토하였다. 40개의 random primer로 시험하여 실험한 모든 종에서 다형성을 나타내는 11개의 primer를 선별하였다. RAPD 분석결과 평균 23.9개씩 모두 263개의 크기가 다른 RAPD 밴드들을 조사할 수 있었다. 각 primer에 대해 각각 독특한 DNA 다형성을 나타내었고, 증폭된 DNA 크기는 0.1-3.0 kb 범위에서 형성되었다. 각 균주간의 genetic similarity를 계산하여 유연 관계를 dendrogram으로 나타내었다. Genetic similarity 0.627을 기준으로 하여 크게 4그룹으로 나눌 수 있었다.

KEY WORDS □ *Fusarium*, genetic similarity, RAPD, PCR, UPGMA

식물병원성균으로 알려져 있는 *Fusarium* 속은 전세계에 널리 분포하고 광범위한 숙주식물에 기생하는 불완전 균류이다. 많은 *Fusarium* 종들로부터 생성된 여러 독성물질(deoxynivalenol, mivale-nol, T-2 toxin과 유도체들, zearalenone, trichothecene)은 경제적으로 중요한 농작물을 감염시켜 *Fusarium* head blight disease, vascular disease, 뿌리, 줄기, 열매 등에 질병을 일으킬 뿐만 아니라(47) 사람이나 가축등에도 질병을 일으키고 있다(36).

기존의 방법으로는 현미경상에서 관찰 가능한 형태적 특징들과 colony 특성으로 *Fusarium* 속내 종 동정이 가능하였으나(12), 형태적 특징과 영양요구성 분석 방법은 안정성이 부족하여 주관적일 수 있다(19). 최근에는 단순한 동정, 분류뿐만 아니라 진화적인 유연관계 연구에 분자생물학적인 방법들이 많이 이용되고 있다. 이런 방법에는 G-C%함량(24), direct sequencing(39), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석(22), ribosomal RNA sequencing(38), Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 분석(43) 등이 있다.

그 중 RAPD 방법은 하나의 짧은 random primer를 사용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실시한 후, 그 DNA 단편들을 DNA marker로 사용할 수 있고(43), 적은 양의 template DNA로도 효과적인 분석이 가능하고, 많은 sample을 분석할 수 있어 경제적이며, 미리 template DNA의 염기서열 정보를 모르고 있더라도 유전적 다양성(genetic diversity)을 평가할 수 있는 방법으로 소개되고 있다(33). 또한, PCR를 시행한 결과 만들어진 specific DNA fragments는 유전자 지도(genome mapping), 균주의 동정(identification), molecular ecology에 응용할 수 있으며(3), RFLP에 비해 순도가 낮거나 적은 양의 DNA를 가지고도 방사선 동위원소를 사용하지 않고 쉽게 실행할 수 있어 1990년 Williams 등(43)에 의하여 소개된 후로 곰팡이를 비롯한 다양한 생물의 경우 genus 수

준에서(2) 혹은 species(7)에서 또는 subspecies 수준에서(1) 유전적 다양성을 분석하는데 이용되고 있다.

*Fusarium*균에 대한 RAPD 보고로는 *F. solani* f. sp. *curbitae*의 race 1과 race 2 간을 구분하는 marker로서 보고하였고(8), *F. oxysporum* f. sp. *pisi*(13), *F. graminearum*의 19 strains(33), *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*(20), *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*(25), *F. oxysporum* f. sp. *cubense*(4), *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*(37), *F. moniliforme* 46 isolates (17) 등 대부분이 race간 또는 isolates간의 유전적 다양성을 비교하였다.

본 연구에서는 *Fusarium* 속 중에서 6 sections에 속하는, 16종 21균주를 대상으로 genomic DNA를 추출한 다음 여러 개의 primer를 이용하여 PCR을 이용한 RAPD pattern을 비교하여 균주간의 DNA 다형성을 분석하여 균주간의 유사도를 분류하고 유전적 유연관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용된 균주는 ATCC, NRRL, Australia의 Sydney대학, 서울대 농업생명과학대학 등에서 분양받은 *Fusarium* 16종 21균주를 대상으로 하였고 Table 1과 같다.

균체의 배양

모균주의 배양은 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco) 고체 사면배지에 포자를 접종하여 28 °C 항온 배양기(Jeio-Tech)에서 5-7일간 배양한 후 4 °C에서 보관하였다. 모균주에 멸균증류수 10 ml를 넣어 포자현탁액을 만든 후, 이 포자현탁액 7 ml(약 1.0×10⁹ spores/ml)를 취하여 250 ml 삼각 플라스크에 들어있는 50 ml PDB(Potato Dextrose Broth, Difco) 액체배지에 접종하고, rotary shaker(Vision, KMC-8480 OSR)에서 28 °C에서 24시간 180 rpm으로 진탕배양하였다. 여기서 얻어진 균사체와 포자 혼합 현탁액을 10 ml 취하여 500 ml 삼각

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 02-2287-5151, Fax : 02-396-6133
E-mail : genebang@sangmyung.pine.ac.kr

Table 1. List of *Fusarium* strains.

Species name	Source ^a	Strain number	Section
<i>F. sambucinum</i>	NRRL	13500	<i>Discolor</i>
<i>F. sambucinum</i>	NRRL	13836	<i>Discolor</i>
<i>F. sporotrichioides</i>	Korea	C Jungsun1	<i>Sporotrichiella</i>
<i>F. sporotrichioides</i>	NRRL	3510	<i>Sporotrichiella</i>
<i>F. tricinatum</i>	NRRL	3299	<i>Sporotrichiella</i>
<i>F. poae</i>	NRRL	3287	<i>Sporotrichiella</i>
<i>F. anguoides</i>	ATCC	20351	<i>Arthrosporiella</i>
<i>F. acuminatum</i>	ATCC	16560	<i>Gibbosum</i>
<i>F. acuminatum</i>	NRRL	13552	<i>Gibbosum</i>
<i>F. equiseti</i>	Korea	C Kosung 6	<i>Gibbosum</i>
<i>F. proliferatum</i>	Sydney	7459	<i>Liseola</i>
<i>F. proliferatum</i>	NRRL	13285	<i>Liseola</i>
<i>F. proliferatum</i> var. <i>minus</i>	NRRL	13617	<i>Liseola</i>
<i>F. sacchari</i> var. <i>elongatum</i>	NRRL	13618	<i>Liseola</i>
<i>F. anthophilum</i>	Sydney	7481	<i>Liseola</i>
<i>F. subglutinans</i>	NRRL	13572	<i>Liseola</i>
<i>F. annulatum</i>	NRRL	13614	<i>Liseola</i>
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL	13565	<i>Liseola</i>
<i>F. roseum</i>	Korea		<i>Liseola</i>
<i>F. caucasicum</i>	ATCC	18791	<i>Martiella</i>
<i>F. solani</i>	ATCC	11712	<i>Martiella</i>

^aContributing sources of isolates. NRRL (ARS Culture Collection, Northern Regional Research Center Illinois U.S.A.). ATCC (American Type Culture Collection, U.S.A.)

플라스크에 들어있는 250 ml PDB 액체 배지에 접종하고, 28 °C에서 24시간 동안 180 rpm으로 진탕배양하였다. 배양한 균사를 증류수로 배지성분을 제거한 다음, 동결건조하여 유발에 넣고 액체 질소로 급속 냉동시켜 미세하게 분쇄하였다.

Genomic DNA 추출

DNA 추출은 Kim 등(21)의 방법을 변형하여 사용하였다. 마쇄한 0.1 g의 균사체에 1 ml의 CTAB extraction buffer (700 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol[v/v], 1% hexadecyltrimethylammonium bromide[CTAB][w/v])에 넣고, 65 °C에서 1시간 동안 15분마다 조심스럽게 섞어주며 반응시킨 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액을 동량 첨가하고 15분간 조심스럽게 흔들어 준 다음 9,000×g, 4 °C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. Phenol 성분을 제거시키기 위하여 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 용액을 동량 첨가하여 15분간 흔든 후 9,000×g, 4 °C에서 15분간 원심분리 하였다. DNA가 녹아 있는 상등액을 취하여 50 mg/ml이 되도록 RNase A (Promega)를 넣고 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 2 volume의 absolute EtOH(Merck)를 넣어 -70 °C에서 DNA를 침전시킨 뒤, 70% EtOH로 DNA를 세척한 후 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹였다. DNA 함량과 순도를 측정하기 위하여 DNA를 100배 희석하여 spectrophotometer(Shimadzu UV-120) 260 nm와 280 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다. 추출된 DNA를 멸균수로 20 ng/μl가 되도록 희석하여 template DNA로 사용하였다.

실험에 사용된 random primer의 선정

Random primer는 Operon Technologies(Alameda, USA)에서 합성된 임의의 sequence를 가진 10-mer oligonucleotides OPA, OPB, OPV, OPW, OPX, OPY, OPZ kits 중에서 40개와 농촌진흥청 농업유전공학연구소에서 기증받은 primers FGL03과 FGL12를 사용하였다.

PCR 반응

RAPD 조건은 Welsh와 McClelland(42)와 Williams 등(43)의 방법을 변형하여 시행하였다. RAPD 전체 반응 용액은 25 μl가 되게 하였으며, 반응 중 반응 용액의 증발을 막기 위해 mineral oil을 한 방울 첨가하였다. Thermojet Cycler (Japan)를 이용하여 DNA 변성, annealing, 합성의 시간들을 여러조건으로 시행하여 최적의 조건을 찾았다. 증폭된 DNA는 1X TAE buffer(4 mM Tris-acetate, 0.1 mM EDTA), 1.4 % agarose gel에서 5 V/cm로 전기영동하고, EtBr(Ethidium bromide, Sigma)로 염색한 후 증류수에서 염색액을 제거하여 관찰하고 UV transilluminator(UVP Ultraviolet transilluminator)에서 가시화한 후 polaroid 사진으로 기록을 남겼다. 매 실험은 적어도 3회 이상 실시하여 분석하였다.

유연관계 분석

유사도 분석은 pc-NTSYS(numerical taxonomy system) software(version 1.70)를 이용하였다. 먼저 Nei와 Li(30)의 방법에 따라 RAPD 실험결과를 특정위치에 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 구분하여 SIMQUAL의 계수를 계산하였고, 이 계수를 이용하여 유사성 혹은 비유사성의 계수를 구하고, UPGMA(unweighted pair-group method)를 이용하여 군(cluster)분석을 하여 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

실험에 사용된 random primer의 선정

Kubelik과 Szabo(23)에 의하면 곰팡이를 재료로 한 RAPD 분석을 하는데 있어 60-70% G+C contents를 갖는 primers가 효과적이라는 보고에 따라 primers를 선별하였다. 또한 40개의 random primers로 시험하여 모든 균주들과 반응하여 PCR 단편들을 생성하며 DNA 다형성을 비교할 수 있는 11개의 primer를 선정하였다(Table 2).

최적의 RAPD 반응조건 결정

추출된 DNA의 순도와 PCR amplification에 작용하는 여러 요인이 RAPD 과정의 효율을 높이는 것으로 알려져 있다(14). 반응용액 중에서 특히 Mg²⁺의 농도가 영향을 미치는데(34). Mg²⁺의 농도가 2 mM보다 높았을 때는 nonspecific reactions이 일어나 products가 전기영동 시 smear되는 결과가 나타났고, 반대로 Mg²⁺의 농도가 2 mM보다 낮았을 때는 products가 관찰되지 않았으며 이는 Weising 등(41)이 보고한 내용과 일치하였다. 또한, Mg²⁺의 농도는 template, primer, dNTPs의 reaction mix의 특성에 의해 영향을 받는다(44)는 보고에 따라 primer와 dNTPs의 양을 조절하였는데, primer의 양은

Table 2. List of the primers used in RAPD reaction

Primer	Sequences (5' → 3')	G-C contents (%)
OPB14	TCCGCTCTGG	70
OPB01	GTTTCGCTCC	60
OPW16	ACACCCACACA	60
OPB06	TGCTCTGCC	70
OPA08	GTGACGTAGG	60
FGL12	GGGACGTTGG	70
OPV01	TGACGCATGG	60
OPA05	AGGGGTCTTG	60
OPB04	GGACTGGAGT	60
FGL03	GCGGTTGAGG	70
OPA07	GAAACGGGTG	60

50ng, dNTPs의 농도는 100 μ M이 적당하였고 그 이상일 경우는 smear 현상이, 그 이하일 경우에는 products 양이 적게 관찰되었다. Taq DNA polymerase의 양이 1.25 units보다 많았을 때는 전기영동시 smear현상이 일어났고, 양이 1.25 units보다 적었을 때는 증폭의 효과가 줄어들었으며, 이는 Sobral과 Honeycutt(35)의 결과와 일치하였다. RAPD 분석에 보통 사용되는 PCR program에는 비교적 짧고 임의의 sequence를 가진 primer를 사용하기 때문에 annealing 온도를 보통의 경우보다 낮게 설정하여야 한다(18)는 보고에 따라 annealing 온도를 35 $^{\circ}$ C로 결정하였다. Annealing 온도를 35 $^{\circ}$ C보다 낮게 설정하면 nonspecific 밴드가 만들어졌고, 35 $^{\circ}$ C보다 높을 경우에는 밴드가 나타나지 않았다. Cycle의 수는 40보다 작으면 충분히 증폭된 products가 만들어지지 않고, 반대로 그 이상인 경우는 전기영동시 smear 현상이 나타났으며, 이러한 결과는 Munthali 등(28)의 보고와 일치하였다. 위의 여러 요인들을 고려하여 조건을 잡은 결과 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs(Sigma,USA), 50 ng primer, 40 ng template DNA 그리고 1.25 unit Taq DNA polymerase로 반응용액을 만들었다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 35 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 40회 반복하며, 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 최종적으로 DNA를 합성시켜 준 결과 가장 재현성 있는 RAPD marker들이 증폭되었다.

PCR에 의한 *Fusarium* 속 내의 RAPD 결과 분석

Schilling 등(34)은 *F. graminearum*, *F. culmorum*과 *F. avenaceum*을 구별하기 위하여 120 primers를 사용하였을 때 이들 3종을 구별할 수 있는 것으로 31 primers(35%)라고 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 *Fusarium* 16종 21균주의 genomic DNA를 template로 40개의 random primer를 예비 실험을 실시하여 그 중 모든 균주에서 DNA 다형성을 관찰할 수 있는 primer가 11개였다.

11개의 random primer로 실시한 RAPD 분석 결과 각 primer당 21균주에서 나타난 밴드 수는 평균 23.9개씩 모두 263개의 RAPD 밴드들을 조사할 수 있었다(Fig. 1. A-K). Primer 모두 독특한 DNA 다형성을 나타내었고 크기는 0.1~3.0 kb 범위에서 형성되었으며 0.4~2.5 kb에서 가장 많은 밴드를 나타내었다.

Gram-negative bacteria인 *Thiobacillus ferrooxidans*의 8개 strains을 재료로 RAPD fingerprinting한 Novo 등(32)의 연구에서는 OPB, OPC kit의 primers 30개를 사용하여 실험을 하였을 때, 0.3-3 kb의 범위에서 269개의 polymorphic 밴드를 보고한 바 있다. 일반적으로 *Fusarium*을 재료로 RAPD를 분석한 보고(46, 13)와 다른 곰팡이를 재료로 한 보고(9, 15)에서는 RAPD 밴드가 평균 0.5~3.0 kb 크기로 0.1~3.0 kb 크기인 본 연구결과는 좀더 넓은 범위에서 polymorphic 밴드가 생성되었음을 알 수 있었다.

각각의 primer에서 생성된 DNA절편들을 대상으로 균주들 간의 유전적 유사도를 구하였을 때(Table 3) 종간의 가장 낮은 유사도는 *F. tricinctum* NRRL3299과 *F. anthophilum* 7481간의 0.627였고 가장 높은 유사도는 *F. sporotrichioides* NRRL3510과 *F. poae* NRRL3287 사이의 0.884로 종간의 유사도가 비교적 높았다. 동일종 내에서도 *F. sambucinum* NRRL13500과 NRRL13836 사이가 0.743, *F. sporotrichioides* C Jungsun 1과 NRRL3510 사이는 0.863, *F. acuminatum* ATCC16560과 NRRL13552는 0.751, *F. proliferatum* 7459와 NRRL13285는 0.726의 높은 유사도를 나타내어, 비교적 낮은 genetic diversity를 나타내고 있는데, 이는 *F. graminearum*의 19strains을 대상으로 한 RAPD patterns 비교에서(33) strains의 구별은 가능하지만 낮은 유전적 변이를 나타낸다는 보고와 일치하고 있다.

Assigbetse 등(3)에 의하면 *Fusarium* sp.와 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*의 122 strains을 OPF06를 비롯한 11개의 primers로 RAPD 분석한 결과 본 연구의 결과보다 적은 범위에서 즉, 0.2에서 2.1 Kb까지 밴드가 관찰되었으며, 83개의 밴드 중 46개가 polymorphic 하다고 보고된 바 있으며 races 간에 약 50%의 유사도가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 동일한 종의 strain간에 밴드패턴이 다르게 관찰되었는데, 이와 같은 다형성이 생기는 기작은 DNA sequence의 삽입이나 결실 같은 mutation 뿐만 아니라 point mutation으로 인해 생긴 특이한 밴드의 유무에 의해 일어날 수 있는 현상으로 설명되어지고 있다(3).

Millan 등(26)에 따르면 Rosa 속에서 RAPD를 이용하여 intra-specific variation을 분석했을 때 유전적 유사성이 70-90% 범위에 있었으나 inter-specific variation을 분석했을 때도 매우 높은 유전적 다양성을 나타내어 유사도가 50% 이하라고 보고되어 있다. 균근류인 *Tuber*속에 대한 연구에서도 높은 종간의 variability가 발견되었고 소수의 종만을 제외하고는 대부분의 종에서 종내 변이가 있다고 보고되어 있다(11). 이들의 결과와 비교하였을 때 *Fusarium*군 내에서 종간의 변이는 비교적 크지 않았다.

Fusarium 속내의 유연관계 분석

RAPD 결과를 정리한 genetic similarity를 기본으로 dendrogram을 작성하였을 때 크게 네 group으로 나눌 수 있었고 대체로 형태적 특징에 의한 분류와 일치하고 있었다(Fig. 2). Section discolor에 속하는 *F. sambucinum* NRRL13500, *F. sambucinum* NRRL13836과 section *Sporotrichiella*에 속하는 종인 *F. sporotrichioides* C Jungsun 1, *F. sporotrichioides*

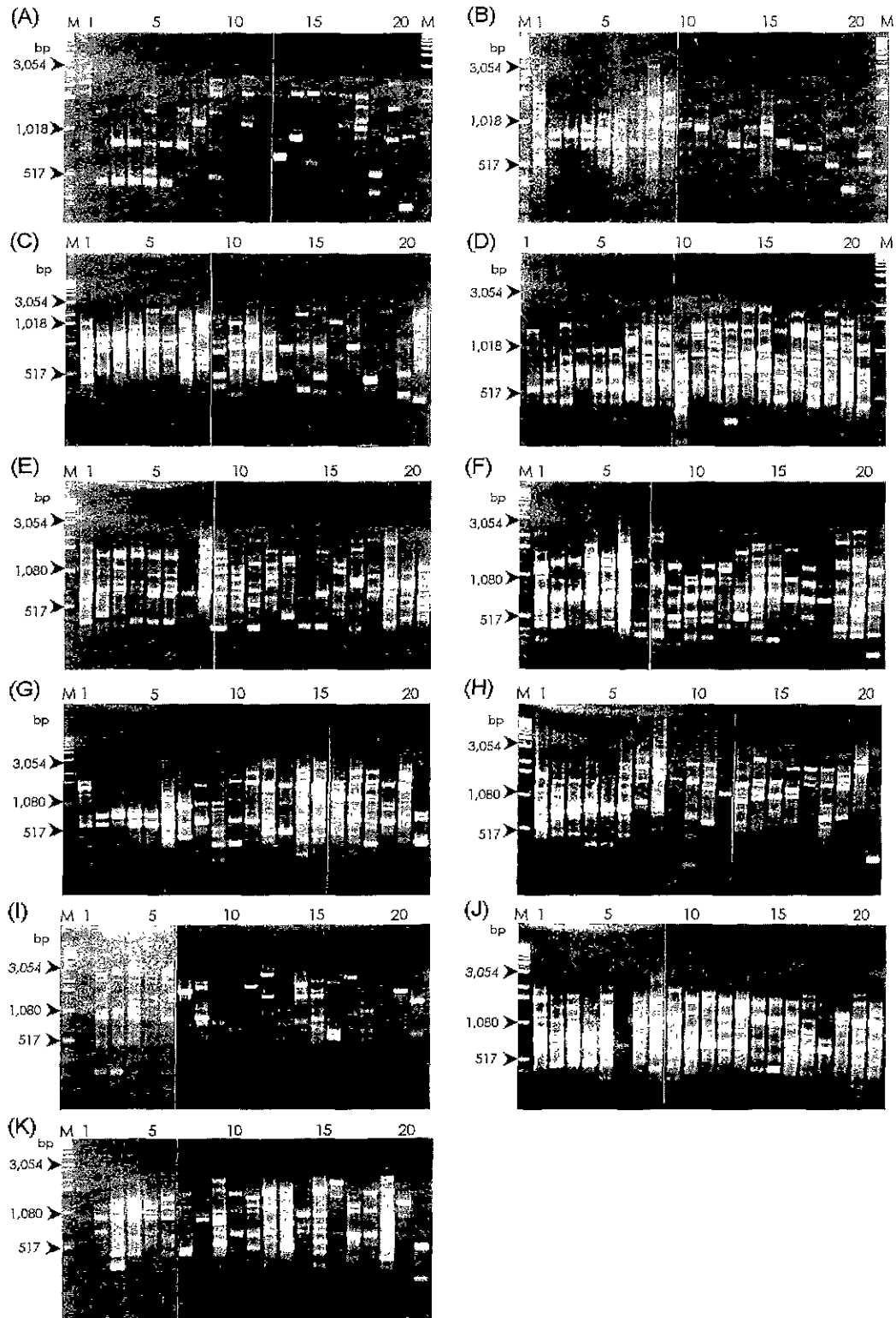


Fig. 1. Random amplification of polymorphic DNA from 21 strains of *Fusarium* spp. using the 10-mer primers OPB14(A), OPB01(B), OPW16(C), OPB06(D), OPA08(E), FGL12(F), OPV01(G), OPA05(H), OPB04(I), FGL03(J), and OPA07(K). Lanes 1, *F. sambucinum* NRRL 13500; 2, *F. sambucinum* NRRL 13836; 3, *F. sporotrichioides* C Jungsun 1; 4, *F. sporotrichioides* NRRL 3510; 5, *F. tricinctum* NRRL 3299; 6, *F. poae* NRRL 3287; 7, *F. anguioides* ATCC 20351; 8, *F. acuminatum* ATCC 16560; 9, *F. acuminatum* NRRL 13552; 10, *F. equiseti* C Kosung 6; 11, *F. proliferatum* 7459(from Sydney); 12, *F. proliferatum* NRRL 13285; 13, *F. proliferatum* var. *minus*; 14, *F. sacchari* var. *elongatum*, 15, *F. anthophilum* 7481(from Sydney); 16, *F. subglutinans* NRRL 13572; 17, *F. annulatum* NRRL 13614; 18, *F. fujikuroi* NRRL 13565; 19, *F. roseum* (from rice); 20, *F. caucasicum* ATCC 18791; 21, *F. solani* ATCC 11712; M, 1 kb ladder marker.

Table 3. Genetic similarity coefficient matrix among 21 *Fusarium* strains based on RAPD markers Matrix calculated from 263 DNA bands generated by 11 primers. Strains details given in Fig 1.

strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	1.000																					
2	0.743	1.000																				
3	0.722	0.842	1.000																			
4	0.743	0.838	0.863	1.000																		
5	0.722	0.834	0.817	0.863	1.000																	
6	0.701	0.822	0.863	0.884	0.855	1.000																
7	0.685	0.743	0.726	0.739	0.743	10739	1.000															
8	0.693	0.726	0.693	0.714	0.726	0.739	0.734	1.000														
9	0.685	0.685	0.685	0.680	0.693	0.697	0.693	0.751	1.000													
10	0.680	0.697	0.697	0.685	0.697	0.710	0.763	0.755	0.705	1.000												
11	0.651	0.660	0.676	0.656	0.651	0.680	0.734	0.718	0.710	0.763	1.000											
12	0.734	0.710	0.734	0.722	0.726	0.739	0.726	0.693	0.701	0.755	0.726	1.000										
13	0.656	0.689	0.705	0.718	0.689	0.718	0.730	0.722	0.697	0.710	0.714	0.755	1.000									
14	0.705	0.680	0.689	0.668	0.664	0.693	0.705	0.680	0.680	0.734	0.722	0.788	0.693	1.000								
15	0.651	0.635	0.651	0.647	0.627	0.656	0.693	0.660	0.651	0.680	0.660	0.784	0.697	0.788	1.000							
16	0.705	0.705	0.714	0.701	0.697	0.726	0.747	0.705	0.697	0.710	0.722	0.722	0.718	0.710	0.714	1.000						
17	0.651	0.668	0.676	0.664	0.676	0.697	0.710	0.710	0.660	0.722	0.793	0.726	0.705	0.730	0.701	0.772	1.000					
18	0.656	0.697	0.689	0.651	0.689	0.685	0.714	0.664	0.680	0.768	0.689	0.697	0.668	0.710	0.697	0.734	0.747	1.000				
19	0.672	0.680	0.714	0.726	0.705	0.726	0.722	0.730	0.689	0.685	0.697	0.705	0.718	0.701	0.680	0.701	0.714	0.660	1.000			
20	0.726	0.685	0.693	0.680	0.685	0.689	0.726	0.710	0.701	0.705	0.743	0.734	0.697	0.722	0.693	0.730	0.710	0.672	0.714	1.000		
21	0.705	0.739	0.739	0.710	0.772	0.734	0.730	0.739	0.680	0.751	0.680	0.722	0.676	0.685	0.647	0.726	0.689	0.693	0.701	0.730	1.000	

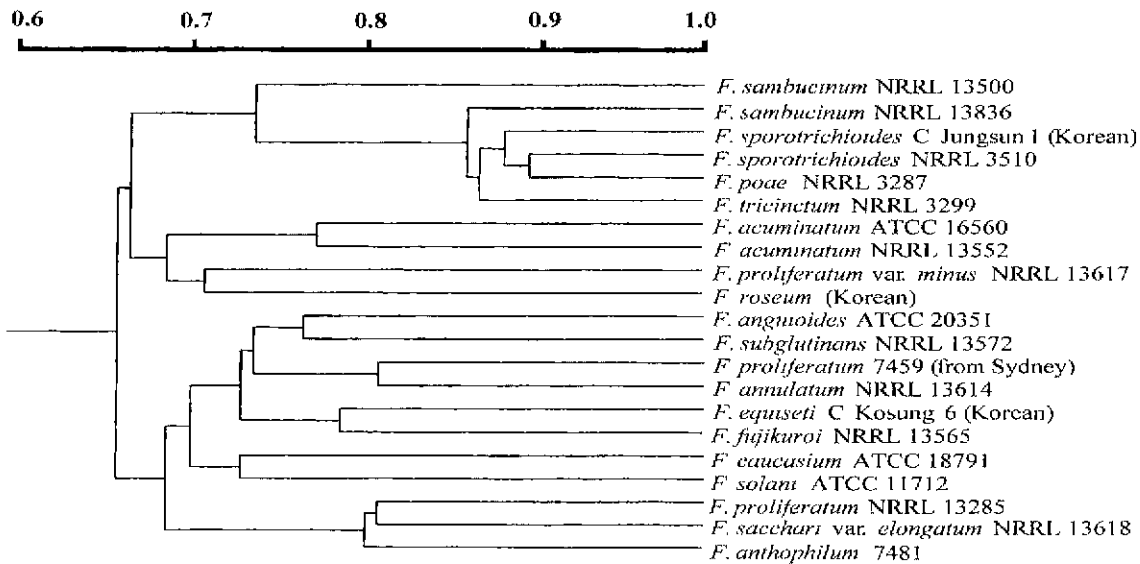


Fig. 2. Dendrogram of *Fusarium* spp. based on UPGMA cluster analysis in the program pc-NTSYS version 1.70 using genetic similarities calculated from RAPD-PCR analysis with 11 primers. The scale on the top indicated the simple matching similarity coefficients obtained from the RAPD data.

NRRL3510, *F. poae* NRRL3287과 *F. tricinatum* NRRL3299가 한 group으로 속하며 특히 section *Sporotrichiella*에 속하는 균들간에는 높은 유사도를 가지고 있었다. Section *Gibbosum*에 속하는 *F. acuminatum* ATCC 16560과 NRRL10552, 그리고 *F. proliferatum* var. *minus*와 *F. roseum*이 함께 하나의 group을 이루었다. 또한 Section *Liseola*에 속하는 *F. proliferatum* NRRL13285와 *F. sacchari* var. *elongatum*, *F. anthropilum* 7481이 한 group에 속하며 나머지 여러 section에 속하는 종들이 또 하나의 group을 이루고 있다.

Windels(45)은 *Fusarium* 속내에서 종을 구별하는 것은 macroconidia의 형태, microconidia의 존재유무와 그의 형태, microconidia가 chain으로 생기는가의 여부, microconidiophore의 type 등의 일차적인 특징과 chlamydospores의 존재 여부, chlamydospores의 형태·위치, sporodochia의 존재여부, colony의 형태, pigmentation, 생장률 등의 2차적인 특징으로 분류를 하지만 형태적인 특징에도 변이가 일어나기 때문에 분류체계는 완전하지 못하다고 보고하고 있다. RAPD patterns의 분석은 작은 group에서는 대체로 형태적인 분류에 의한 동

일한 section에 속하는 균주들이 grouping된 것을 알 수 있었다. 즉 일부 종에서는 예외도 있었으나 section *Sporotrichiella*에 속하는 균주들이 하나의 소 group으로, *F. acuminatum*의 2 strains(section *Gibbosum*), *F. proliferatum* 7459와 *F. annulatum*(section *Liseola*), *F. caucasicum* ATCC18791와 *F. solani* ATCC11712(section *Mastiella*), *F. proliferatum* NRRL13285와 *F. sacchari* var. *elongatum* NRRL13618, *F. anthophilum* 7481(section *Liseola*) 등은 동일 section에 속하는 종들이 소 group을 이루고 있다.

콩에 질병을 일으키는 곰팡이인 *Diaporthe phaseolorum*을 재료로 RAPD 분석한 Fernandez와 Hanlin(10)의 보고에서는 대략 0.5~1.63 kb 범위에서 밴드들이 만들어 졌고, 한 개의 isolate를 제외하고는 형태적 특징(colony 형성, color, stromata의 크기, anamorph의 존재 등)에 의해 분류되는 방법과 RAPD에 의해 분류되는 방법간에는 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. 분자적인 여러 다른 방법을 통한 분류가 모두 반드시 일치하는 것은 아니지만 부분적으로 일치하는 경우가 있다. 즉, Bosland와 Williams(6)는 지리적 기원에 따른 분류가 VCGs(vegetative compatibility groups)나 isozyme phenotype이나 pathotype과는 전혀 관계가 없다고 보고한 바 있으나, *Pseudocercospora herpotrichoides*(31), *Colletotrichum graminicola*(15)의 경우 유전적 다양성을 RAPD 분석을 통하여 평가하였을 때 지리적 기원에 따라 RAPD patterns가 다르다고 보고되어 있다. Na-miki 등(29)은 nuclear repetitive DNA sequences를 DNA fingerprinting 방법을 이용하여 *F. oxysporum* strains를 formae speciales 수준에서 분류했을 때 속주에 따라 나는 분류와 분자생물학적인 분류가 일치하는 것을 보고한 바 있다. Yli-Mathila 등(47)은 *Fusarium avenacium* 33 isolats에서 RAPD-PCR 분석과 isozyme 분석을 비교하였을 때 isozyme과 RAPD-PCR patterns와 지리적 기원과 host plants 사이에 분명한 관계는 발견하지 못했으나 isozyme에 의한 dendrogram과 RAPD-PCR analysis에 의한 dendrogram은 main group 수준에서는 어느 정도의 유사성을 발견했고 subgroup에서는 dissimilarities가 있다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 *Avena sterilis*(16)에서의 isozyme과 RAPD-PCR 분석 결과와 일치하고 있다.

Waalwijk(40)의 보고에서는 *Fusarium* 균들의 internal transcribed spacer(ITS) region을 RFLP 해 본 결과 모두 8가지 type이 존재하였는데 *F. anthophilum*, *F. sacchari* var. *elongatum*, *F. subglutinans*가 동일한 type I으로, *F. annulatum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*이 type II로 grouping되었는데, RAPD 분석방법을 이용한 본 실험에서는 *F. anthophilum* 7481(from Sydney)와 *F. sacchari* var. *elongatum*간의 유사도가 0.788로 하나의 소 group을 형성하고, *F. proliferatum* 7459(from Sydney)와 *F. annulatum* NRRL 13614 이 0.793의 유사도로 또 다른 소 group으로 나타나, ITS region의 RFLP pattern과 genomic DNA의 RAPD pattern으로 grouping하는데는 부분적으로는 일치하고 있다. 그러나 RAPD 분석에서는 *F. subglutinans* NRRL 13572는 *F. anguoides* ATCC 20351와 소 group으로 형성하였고, *F. fujikuroi* NRRL 13565는 *F. equiseti* C Kosung 6와 소 group을 이루어 일

치하지 않는 부분도 있었다. 또한 *F. sambucinum*과 *F. poae*는 ITS type IV로 동일하게 구분되는 것은 본문 RAPD분석과 일치하는 부분이었다. RAPD pattern과 또 다른 분류방법인 electrophoretic karyotype과의 비교에서 서로 다른 RAPD patterns는 보통 서로 다른 karyotype을 나타내지만 karyotype의 차이가 RAPD 차이와 항상 일치하지는 않는 것으로 보고되어 있다(5). Section *Sporotrichiella*에 속하는 4종의 karyotype 비교에서(27) *F. trincinctum*은 다른 3종과는 차이가 있어 다른 3종이 비교적 크기가 큰 염색체를 가지고 있었는데 반하여 *F. trincinctum*은 작은 크기의 염색체가 많았고 *F. sambucinum*은 주로 크기가 작은 염색체로 구성되어 있었으나 이들에 대한 연관은 앞으로 genome 분석이 더욱 연구되어야 할 것이다. 또한 RAPD patterns에서 동일 section *Gibbosum*에 속하는 *F. acuminatum*과 *F. equiseti*가 전연 다른 group에 속하는 것을 볼 수 있었는데 karyotype에서도 이 두 종은 동일 section에 속하면서도 전연 다른 karyotype을 가지고 있고 *F. equiseti*의 genome size가 *F. acuminatum*의 거의 2배를 갖고 있는 것을 볼 수 있었다(27). RAPD 분석에서 각각 다른 group에 속하고 있는 것으로 나타난 *F. proliferatum*의 핵형분석 결과(unpublished)에서도 핵형에 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. RAPD 분석과 그 밖의 다른 여러 가지 방법을 이용한 분석결과와의 관계는 앞으로 계속 연구할 과제이다.

RAPD 분석 방법은 DNA수준에서의 유전적 다양성을 연구하는 하나의 genetic marker로서 광범위하게 이용되고 있으며 종 수준에서 유전적 다양성을 분석하는데 간단하고 빠르고 RFLP 방법보다 효율적임을 알 수 있었다.

감사의 말

본 실험에 사용한 균주를 보내주신 O'Donnell(Northern Regional Research center)과 이원철 박사님(서울대 농업생명과학대학), Burgess(Australia) 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Achenbach, L.A. and J. Patrick. 1996. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause Soybean sudden death syndrome. *Plant Disease* **80**, 1228-1232.
2. Adams, R.P. and T. Demeke. 1993. Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNA. *Taxon* **42**, 553-571.
3. Assigbetse, K.B., D. Fernandez, M.P. Dubois, and J.P. Geigern. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Phytopathology* **84**, 622-626.
4. Bentley, S., K.G. Pegg, and J.L. Dale. 1995. Genetic variation among 3 world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycol. Res.* **99**, 1378-1384.
5. Boekhout, T. and A. van Belkum. 1997. Variability of karyotypes and RAPD types in genetically related strains of *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.* **32**, 203-208.
6. Bosland, B.W. and P.H. Williams. 1987. An evaluation of *Fie-*

- sarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographical origin. *Can. J. Bot.* **65**, 2067-2073.
7. **Brummer, E.C., J.H. Bouton, and G. Kochert.** 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*. **38**, 362-367.
 8. **Crowhurst, R.N., B.T. Hawthorne, E.H.A. Rikkerink, and M. D. Templeton.** 1991. Differentiation of *Fusarium Solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.* **20**, 391-396.
 9. **Durand, N., P. Reymond, and M. Fevre.** 1993. Randomly amplified polymorphic DNAs assess recombination following an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. *Curr. Genet.* **24**, 417-420.
 10. **Fernandez, F.A. and R.T. Hanlin.** 1996. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia* **88**, 425-440.
 11. **Gandebouef, D., C. Dupre', P. Roeckel-Drevet, P. Nicolas, and G. Chevalier.** 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can. J. Bot.* **75**, 36-45.
 12. **Gerlach, W. and H. Nirenberg.** 1982. The Genus *Fusarium*. A pictorial atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land. Forstw. Berlin-Dahlem **209**, 1-406.
 13. **Grajal-Martín, M.J., C.J. Simon, and F.J. Muehlbauer.** 1993. Use of random amplified polymorphic DNA(RAPD) to characterize race of *Fusarium oxysporum* 1. sp. *pisii*. *Phytopathol.* **83**, 612-614.
 14. **Griffin, H.G. and A.M. Griffin.** 1994. PCR technology Current Innovations CRC Press pp. 193-200.
 15. **Guthrie, P.A.I., C.W. Magill, R.A. Fredericksen, and G.N. Odvody.** 1992. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **82**, 832-835.
 16. **Heun, M., J. P. Murphy, T. D. Phillips.** 1994. Comparison of RAPD and isozyme analyses of *Avena sterilis* L. accessions. *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 689-96.
 17. **Huang, R., M. Galperin, Y. Levy, and R. Perl-Treves.** 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. *Pant Pathol.* **46**, 875-881.
 18. **Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White.** 1990. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
 19. **Katan, T., D. Zamir, M. Sarfatti, and J. Kantan.** 1991. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* **81**, 255-262.
 20. **Kelly, A., A.R. Alcalá'-Jime'nez, B.W. Bainbridge, J.B. Heale, I. Pe'rez-Arte's, and R. M. Jime'nez-Diaz.** 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris infecting chuchkpea*. *Phatopathology.* **84**, 1293-1298.
 21. **Kim, D.H., R.D. Martyn, and C.W. Magill.** 1992. Restriction fragment length polymorphism groups and physical map of mitochondrial DNA from *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathol.* **82**, 346-353
 22. **Klich, M. A. and E. J. Mullaney.** 1992. Molecular methods for identification and taxonomy of filamentous fungi, p. 84-97 In Dilip, K.A., R.P. Elander, and K.G. Mukerji(eds.), Handbook of applied mycology: vol.4. Fungal Biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York.
 23. **Kubelik, A.R. and L.J. Szabo.** 1995. High-GC primers are useful in RAPD analysis of fungi. *Curr. Genet.* **28**, 384-389.
 24. **Kurtzman, C.P.** 1985. Molecular taxonomy of the fungi, p. 33-63. In Bennett, J. W. and L. L. Lasure(eds.), Gene Manipulation in Fungi. Academic Press.
 25. **Manulis, S., N. Kogan, M. Reuven, and Y. Ben-Yephet.** 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathol.* **84**, 98-101.
 26. **Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A.M. Torres, and J.I. Cubero.** 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 273-277
 27. **Min, B.R., J.S. Jung, and Y.K. Choi.** 1998. Electrophoretic karyotyping by PFGE in the genus *Fusarium*. *Kor. J. Mycol.* **26**, 135-143.
 28. **Munthali, M., B.V. Ford-Lloyd, and H.J. Newbury.** 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods Appl.* **1**, 274-276.
 29. **Namiki, F., T. Shiomi, T. Kayamura, and T. Tsugue.** 1994. Characterization of the formae speciales of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbits by DNA fingerprinting with nuclear repetitive DNA sequences *Applied and Environmental Microbiol.* **60**, 2684-2691.
 30. **Nci, M. and W.H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5269-5273.
 31. **Nicolson, P. and H.N. Rezanoor.** 1994. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and direct variation in *Peudocercospora herpotrichoides*. *Mycol. Res.* **98**, 13-21.
 32. **Novo, M.T.M., A.P. Souza, G.J. Oswaldo, and L. M.M. Ottoni.** 1996. RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System. Appl. Microbiol.* **19**, 91-95.
 33. **Quellet, T. and K.A. Seifert.** 1993. Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology* **83**, 1003-1007.
 34. **Schilling, A.G., E.M. Moller, and H.H. Geiger.** 1994. RAPDs of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* for genotyping and identification. In : Schots, A. F.M. Dewey, R. Oliver, eds. *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi : Identification, Detection and Quantification*. Cambridge University Press ; 47-56.
 35. **Sobral, B.W.S. and R.J. Honeycutt.** 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 105-112
 36. **Sutton, J.C.** 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant. Pathol.* **4**, 195-209.
 37. **Tantaoui, A., M. Quinten, J.P. Geiger, and D. Fernandez.** 1996. Characterization of a single clonal lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* causing Bayoud disease of date palam in Morocco. *Phytopathology.* **86**, 787-792.
 38. **Terashima, Y. and T. Nakai.** 1996. Identification of the DNAs of the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake* using specific oligonucleotide probes and PCR primers. *Mycoscience* **37**, 371-375.
 39. **Thomas, E. D., C. Moritz, and J. D. Palmer.** 1990. Nucleic acid II : restriction site analysis, p. 250-317. In David. M. H. and C. Moritz(eds.), Molecular systematics. Sinauer Associates Inc, Massachusetts.
 40. **Waalwijk, C., R.P. Baayen, J.R.A. de Koning, and W. Gams.**

- 1996 Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* sections *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* **48**(1), 90-104.
41. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press pp. 114-120.
42. Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers *Nucl. Acids Res.* **18**, 7213-7218.
43. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
44. Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic markers. *Methods Enzymol.* **218**, 704-740.
45. Windels, C.E. 1991 Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology*, 1048-1051.
46. Woo, S.L., A. Zoina, G. Del Sorbo, M. Lorito, B. Nanni, F. Scala, and C. Novello. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology* **86**, 966-973.
47. Yli-Mattila, T.S. Paavanen, A. Hannukkala, P. Parikka, R. Tahvonen, and R. Karjalainen. 1996 Isozyme and RAPD-PCR analyses of *Fusarium avenaceum* strains from Finland. *Plant Pathol.* **45**, 126-134

(Received May 26, 1999/Accepted June 15, 1999)

ABSTRACT : RAPD- PCR Analysis in *Fusarium* species

Min, Byung-Re^{1*}, Yun-Joo, Yang, and Yong- Keel, Choi² (¹Department of Biology in Sang-Myung University, ²Department of Microbiology in Hanyang University, Seoul 110-743. Korea)

To assess genetic diversity among 21 strains from sixteen *Fusarium* species, we used RAPD(random amplified polymorphic DNA) analysis based on PCR(polymerase chain reaction). Eleven primers showing the polymorphism were chosen from the 40 random primers-tested. A total of 263 polymorphic bands were generated by the primers and the size of amplified DNA fragments ranged from 0.1 to 3.0 kb. Similarity coefficients between strains were calculated, and UPGMA cluster analysis was used to generate a dendrogram showing relationships among them. The results from RAPD-PCR analysis were grouped into four main groups at the similarity level of 0.627.