

가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 속 균의 형태적, 분자생물학적 특징

유승헌* · 조혜선 · 김병련 · 박명수

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학식품학부

Morphological and Molecular Characterization of *Alternaria* Isolates from Solanaceous Crops

Seung Hun Yu*, Hye Sun Cho, Byung-Ryun Kim and Myung Soo Park

Division of Applied Biology, Chemistry and Food Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received July 8, 2003)

ABSTRACT: Twenty five isolates of *Alternaria* were obtained from various solanaceous crops in Korea. For all isolates, morphological characteristics of the conidia were determined and compared with those of representative isolates of *A. solani* and *A. tomatophila*. A selection of the isolates and the representative *Alternaria* isolates were evaluated for pathogenicity to potato, tomato, egg plant and red pepper. Molecular characteristics of 17 isolates of *Alternaria* including the representative isolates were determined using sequence analysis of ITS rDNA and histone H3 gene, and URP-PCR analysis. Based on morphological characteristics, the isolates from the solanaceous crops were grouped as identical or very similar to either *A. tomatophila* (ATO), *A. solani* (ASO), and unidentified *Alternaria* sp. (ASP). Isolates of ASO were moderately pathogenic to all the solanaceous crops tested, but ATO isolates were highly pathogenic to tomato and the ASP isolate was pathogenic only to potato. Among the molecular markers used in this study, the URP-PCR analysis was found to be appropriate for taxonomic resolution of these species. Based on the conidial morphology, pathogenicity test and molecular characteristics, *A. tomatophila* (early blight of tomato) could be distinguished from *A. solani* (early blight of potato), and the *Alternaria* sp. (ASP) from potato, which was closely related to ASO in conidial morphology, was considered as a new species.

KEYWORDS: *Alternaria solani*, *A. tomatophila*, *Alternaria* sp., Histone H3 gene, ITS, Morphology, Pathogenicity, Solanaceous crops, URP-PCR

*Alternaria*속은 불완전균류(mitosporic fungi), 총생균강(Hypomycetes), 암색균과(Dematiaceae)에 속하는 균류로서 전 세계적으로 100여종 이상이 알려져 있으며 이들은 다양한 환경에서 발생한다(Ellis, 1971, 1976; Joly, 1964; Simmons, 1992). *Alternaria*속 균류 중 일부 종(species)들은 부생균으로서 토양이나 죽은 식물체의 잔재에서 흔히 발견되지만 대부분의 *Alternaria*는 각종 작물의 잎, 줄기, 열매에 침입하여 다양한 병을 일으킬 뿐 아니라 각종 작물의 종자와 수확 후 농산물을 감염 또는 오염시켜 피해를 주기도 하는 매우 중요한 식물병원균이다(Rotem, 1994; Strandberg, 1992).

*Alternaria*속의 분류, 동정은 주로 분생포자 및 분생자경의 형태적 특징과 분생포자의 chain 형성양상에 기초하여 수행되고 있다. 그러나 이 균들은 환경조건에 따라 형태적 변이가 심하며, 동일한 기주에서 분리되는 단일 종 내에서도 포자형태가 다양하기 때문에 종(species)의 동정

이 어려운 경우가 많다. *Alternaria*의 이러한 다양성 때문에 학자에 따라 분류 개념에 차이가 많으며, 국제적으로 통일된 분류의 key가 마련되어 있지 않다. 또한 균류나 병해 관계의 문헌을 보면 *Alternaria*속의 동종이명(同種異名), 이종동명(異種同名)이 상당수 보고되어 있어 분류학상 혼란을 야기하는 경우가 많다.

*Alternaria*속 균류 중 대형분생포자를 형성하는 *A. solani* Soraur는 토마토, 감자, 가지, 고추와 같은 가지과 작물에 침입하여 겹무늬병(early blight)을 일으키는 병원균으로서 *Alternaria*속 중에서 가장 잘 알려진 경제적으로 매우 중요한 균이다(Ellis, 1971; Rotem, 1994). 국내에서도 토마토(Park, 1961; Cho *et al.*, 1997; Yu, 1992), 감자(Nakada and Takimoto, 1928; Park, 1961; Yu, 1992), 가지(Cho *et al.*, 1997), 고추(Cho *et al.*, 1997)에서 발생이 보고되어 있으며 그 중에서도 토마토, 감자에서 피해가 심하며 특히 토마토 시설재배에서 그 피해가 심하다.

*A. solani*의 분류는 학자에 따라 차이가 있어 일찍이 Neergaard(1945)와 Joly(1964)는 *A. solani*의 형태가 *A.*

*Corresponding author <E-mail: shunyu@cnu.ac.kr>

porri(과검은무늬병) 및 *A. dauci*(당근검은잎마름병균)와 유사함으로 이들을 동일종으로 통일시키고 하위분류로서 병원성 및 기주범위를 나타내는 분화형(*A. porri* f. sp. *solani*, *A. dauci* f. sp. *solani*)으로 구분할 것을 제창하였다. 이러한 분화형 시스템은 널리 통용되지 못하였고 가지과 작물의 겹무늬병균은 *A. solani*의 독립된 종으로서 *A. porri* 및 *A. dauci*와는 다른 종으로 지금까지 오랜 기간 전 세계적으로 통용되어 왔다(Ellis, 1971; Rotem, 1994).

그러나 최근 미국의 Simmons(2000)는 가지과 작물에서 분리되는 대형포자를 형성하는 *Alternaria*를 모두 *A. solani*로 동정하는 것은 잘못된 것이며 기주 종류에 따라 다른 종의 *Alternaria*가 관여한다고 보고하였다. Simmons(2000)는 감자겹무늬병균으로서 큰 피해를 주고 있는 *A. solani*는 토마토, 가지, 고추의 겹무늬병균과는 분생포자의 형태, 특히 부리(beak)의 특징에서 작은 차이가 인정되기 때문에 서로 다른 종으로 구별해야 한다고 하였다. 그는 가지과 작물 중 토마토에서 분리되는 것은 *A. tomatophila* Simmons, 가지에서 분리되는 것은 *A. beringerae* Simmons, 고추에서 분리되는 것은 *A. capsici* Simmons라는 신종으로 각각 명명하였다. 그러나 Simmons가 주장하는 형태적 차이는 아주 미미하기 때문에 분류학자가 아닌 식물병리학자들이 그 차이를 구분하기는 매우 어렵다. 더욱이 Simmons는 공시 균주들의 병원성검정과 같은 병리학 적 검토 없이 분생포자 형태, 특히 beak의 미미한 차이만으로 이들을 구별하였기 때문에 이들의 동정이 쉽지 않다.

최근 식물병원균의 분류에 분자유전학적 방법이 도입되면서 고전적인 형태적 분류의 제한점을 해결하려는 노력이 시도되고 있다(Kusaba and Tsuge, 1994; Cook et al., 1998; Morris et al., 2000; Prayer and Gilbertson, 2000). Weir et al.(1998)은 감자와 토마토에서 분리한 *A. solani* 35균주를 RAPD-PCR 분석을 통한 유전적 다양성을 조사하여 감자 분리 균주들과 토마토 분리 균주들 사이에는 유전적 거리가 멀기 때문에 *A. solani* 종내의 병원성 분화의 가능성을 제시하였다. 그러나 이들은 병원성검정을 실시하지 않았기 때문에 병원성 분화의 가능성만 제시하였고 정확한 결론은 유보하였다.

본 연구의 목표는 가지과 작물인 토마토, 감자, 가지, 고추에서 분리한 *Alternaria* 균주들을 공시하여 이들의 형태적 특징과 병원성을 조사함과 동시에, 분자생물학적 기법인 URP-PCR, ITS rDNA 및 histone gene sequences 분석을 통하여 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 균주들의 다양성 및 유연관계를 밝히고 이를 토대로 한 분류체계를 확립하며 병원균의 정확한 동정을 하는데 있다.

재료 및 방법

균주 수집

가지과 작물인 감자, 토마토, 가지, 고추의 겹무늬병(겹

등근무늬병, early blight)에 병든 잎을 전국의 주요 재배 단지에서 2002년 4월에서 9월에 걸쳐 수집하였다. 수집한 병반으로부터 *Alternaria* 균주를 분리하기 위하여 채집 직후에 병든 잎의 병반 가장자리를 포함한 신선한 병반을 10-mm² 절편으로 잘라 습지를 칸 플라스틱 페트리접시에 올려놓은 후 근자외선광(NUV lamp)이 1일 12시간씩 쬐지는 20~22°C 항온기(광조사시의 광도: 약 4000 lx)에서 1~2일 배양하였다. 해부현미경(×40) 관찰을 통하여 병반에 형성된 *Alternaria* 대형포자를 확인한 후 PDA 배지에 단포자 분리하여 25°C에서 배양하였다. 분리한 *Alternaria* 균주들은 시험관의 PDA 사면배지에 옮겨 25°C에서 7일간 배양한 후 5°C 냉장고에 보관하면서 필요한 실험에 사용하였다. 분리한 균주수는 감자에서 15균주, 토마토에서 7균주, 가지에서 2균주, 고추에서 1균주, 총 25균주였다.

한편 표준균주로서 미국의 Simmons로부터 분양받은 전형적인 *A. solani*(EGS 44-098)와 *A. tomatophila*(EGS 42-156)를, 네덜란드의 CBS(Centraalbureau voor Schimmelculture)로부터 분양받은 *A. solani*(CBS 34779)를 사용하였고, 대조 균주로서 CBS로부터 분양 받은 *A. elegans*(CBS 109159)와 본 연구팀이 당근에서 분리한 *A. dauci*(CNU3 408), 양파에서 분리한 *A. porri*(CNU 3366), 인삼에서 분리한 *A. panax*(CNU 3405)를 사용하였다. *A. elegans*는 가지과에서 보고된 균이며, *A. dauci*, *A. porri*는 *A. solani* group과 형태가 유사한 균들이다.

형태적 특징

분리 균주들을 V-8 agar 배지에서 배양한 후 분생포자와 분생자경의 형태적 특징을 조사하였다. 즉 *Alternaria* 균주들을 V-8 agar 배지에 접종하여 25°C 항온기에서 7~10일 배양한 후 분생포자 형성을 유도하기 위하여 균층의 기중균사를 scrapper로 긁어주고 근자외선광이 1일 12시간씩 쬐지는 20~22°C 항온기에서 1~2일 배양하였다. 균층에 형성된 *Alternaria*의 분생포자와 분생자경을 떼어 slide glass의 lactophenol 용액속에 넣고 cover glass를 덮은 후 복합현미경(×400)관찰을 통하여 형태적 특징을 측정하였고 drawing tube를 이용한 line drawing을 통하여 이를 구체화하였다.

병원성 검정

분리균주를 분생포자의 형태적 특징에 따라 4 group으로 구분한 후, 각 group 별로 대표균주를 2개씩(group 4는 1균주) 사용하여 감자, 토마토, 고추, 가지에 대한 병원성 검정을 실시하였다. 병원성 검정에는 토마토(품종 : 서광), 가지(품종 : 장옥대장), 고추(품종 : 녹광)의 종자를 원예용 상토를 넣은 포트에 파종하여 20~25°C의 온실에서 30일간 생육시킨 식물체를 사용하였고 감자(품종 : 대서)는 씨감자를 실내에서 모래를 깔은 밧트에서 발아시킨 후 원예용 상토를 넣은 포트에 옮겨 위와 같은 조건인

20~25°C에서 생육시킨 식물체를 사용하였다.

병원성 검정은 공시균주의 분생포자 현탁액(포자농도 10⁴/ml)을 식물체에 고르게 분무접종한 후 접종상에 넣어 25°C에서 48시간 포화습도를 유지시킨 후 20~25°C 온실로 옮겨 4~5일 후에 병반수를 세어 병 발생정도를 조사하였다.

분자생물학적 특징

가지과 작물에서 분리한 균주 중 분생포자의 형태적 특징을 고려하여 선별한 10균주와 Simmons 및 CBS에서 분양받은 대조균주 4균주, 그리고 *A. dauci*, *A. porri* 및 *A. panax* 각각 1균주를 공시하여(Table 1), ITS 염기서열 분석, Histone 유전자 염기서열분석 및 RAPD-PCR 분석을 통하여 분자생물학적 특징을 조사하였다.

DNA 분리: 공시균주는 PDA slant에 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후 균사 소량을 potato dextrose broth (PD broth)에 접종, 125 rpm으로 25°C에서 2일간 진탕배양하여 균사체를 얻었다. 균사체는 동결건조 후 소량을 1.5 ml tube에 넣고 마쇄한 뒤 400 µl의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]에 현탁하고 proteinase K 50 µg을 첨가, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 400 µl 2× CTAB solution[2% CTAB(w/v), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4 M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) Mr 40,000]을 첨가하여 섞어준 뒤 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1)로 추출하고 원심분리하여 얻은 상등액에 0.7 volume의 isopropanol을 첨가하여 DNA를 얻었다. TE buffer[Tris-HCl(pH 8.0) 10 mM, EDTA(pH 8.0) 1 mM]에 DNA를 녹이고 RNase를 첨가한

Table 1. List of *Alternaria* isolates used for molecular characterization

Isolate	Host	Location	Group ^a or species
CNU 3073	Tomato	Buyeo	Group 1(ATO)
CNU 3074	Tomato	Gyeongju	Group 1(ATO)
CNU 3585	Potato	Pyeongchang	Group 2(ASO1)
CNU 3591	Potato	Pyeongchang	Group 2(ASO1)
CNU 3601	Potato	Boeun	Group 2(ASO1)
CNU 3602	Potato	Boseong	Group 2(ASO1)
CNU 3448	Red pepper	Pyeongchang	Group 3(ASO2)
CNU 3503	Potato	Pyeongchang	Group 3(ASO2)
CNU A97-1	Egg plant	Nonsan	Group 3(ASO2)
CNU 3530	Potato	Yimsil	Group 4(ASP)
EGS 42-156	Tomato	USA(Simmons)	<i>A. tomatophila</i>
EGS 44-098	Potato	USA(Simmons)	<i>A. solani</i>
CBS 34779	Tomato	Netherlands(CBS)	<i>A. solani</i>
CBS 109159	Tomato	Netherlands(CBS)	<i>A. elegans</i>
CNU 3366	Onion	Geumsan	<i>A. porri</i>
CNU 3405	Ginseng	Geumsan	<i>A. panax</i>
CNU 3408	Carrot	Pyeongchang	<i>A. dauci</i>

^a*Alternaria* group designations: ATO = *A. tomatophila*, ASO(1) = *A. solani* type1, ASO(2) = *A. solani* type 3, ASP = *Alternaria* sp.

Table 2. Primer sets and their nucleotide sequences used for amplification of ITS region and histone H3 gene

Locus	Primers	Nucleotide sequence(5'→3')	Length
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20
Histone H3	H3-1a	ACT AAG CAG ACC GCC CGC AGG	21
	H3-1b	GCG GGC GAG CTG GAT GTC CTT	21

뒤 정량하여 4°C에 보관하였다.

ITS 영역 및 Histone H3 유전자의 염기서열 분석: 가지과 작물에서 발생하는 *Alternaria*의 rRNA 유전자(rDNA) 상에 있는 ITS 영역, 즉 ITS1과 ITS2, 그리고 5.8S의 ribosomal gene을 증폭하기 위해 ITS1과 ITS4 primer(White *et al.*, 1990)를 다카라코리아(Takara Korea) 바이오메디칼사에 의뢰하여 제작하였다. ITS 영역의 증폭은 15 ng의 genomic DNA, 각 0.5 pmol의 primer, 200 µM dNTP's, 2.5 units의 Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂에 H₂O를 첨가하여 최종 volume을 50 µl로 하였다. DNA 증폭은 initial denaturation 94°C에서 4분간 실시하고, denaturation 40초(94°C), annealing 1분(60°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycles을 실시하고 마지막으로 72°C에서 5분간 incubation 하였다. Histone H3 유전자의 증폭에 사용된 primer는 Glass(1995) 등의 H3-1a와 H3-1b를 한국 Bioneer사에 의뢰하여 제작하였다. PCR reaction mixture의 조성은 ITS 영역 증폭의 경우와 동일하였고, initial denaturation 92°C에서 2분간 실시한 뒤 denaturation 1분(92°C), annealing 1분(68°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycles을 수행하고 반응이 끝난 뒤 72°C에서 5분간 incubation하였다. PCR 증폭이 끝난 10 µl의 생성물을 1.2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 증폭 여부와 그 크기를 관찰하였다.

PCR 증폭된 ITS 영역과 histone H3 유전자는 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)으로 정제하고, sequencing 반응은 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit(Perkin-Elmer Co.)를 이용, template 40 ng, primer 3.2 pmol, terminator ready reaction mixture 8 µl에 H₂O를 첨가하여 20 µl의 volume으로 조절한 뒤 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 25 cycles의 PCR 반응을 수행하였다. 반응에는 각각 ITS4 primer와 H3-1b primer를 사용하였다. Sequencing 반응이 완료된 후 반응생성물은 ethanol 침전하여 건조시킨 뒤 한국생명공학연구원(Ver. 3.1, Chun)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열은 PHYDIT program(Ver. 3.1, Chun)을 이용하여 align하였다.

URP-PCR 분석: 본 실험의 PCR 핵산지문 분석에는 서린생명과학연구소(SRILS)의 SRILS UniPrimerTM kit를 사용하였다. 12종의 UniPrimer 중에서 미약한 증폭생성

물을 보이는 URP-07과 URP-12를 제외한 10종의 primer를 사용하였다. PCR 증폭은 7.5 ng의 genomic DNA, primer 100 ng, dNTP's 200 μ M, Taq DNA polymerase 1 unit, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ 에 H_2O 를 첨가하여 최종 volume을 20 μ l로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation 94°C에서 4분간 실시하고, denaturation 1분(94°C), annealing 1분(55°C), extension 2분(72°C)으로 35 cycles을 실시한 뒤 72°C에서 7분간 incubation하였다. PCR 반응 이후, 15 μ l의 생성물을 1.2% agarose gel에서 80 V, 5시간 동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

각 균주의 primer에 의한 증폭 pattern의 비교는 동일한 크기의 band 존재 여부로 행하였고, band의 유무에 따라 0과 1로 나열하여 UN1 coefficient로 유사도(similarity)를 구하고 UPGMA(unweighted paired group methods using arithmetic average)에 의한 집괴분석을 실시하였다. 유사도와 UPGMA 분석은 NTSYS-pc program(Ver. 2.1, Rohlf, 2000)을 이용하였다.

결 과

형태적 특징

가지과 작물인 감자, 토마토, 고추, 가지의 검무늬병반에서 분리한 *Alternaria* 25균주들을 V-8 agar 배지에서 배양한 후 분생자경과 분생포자의 형태적 특징을 조사하였다. 분리균주들은 모두 대형포자를 분생자경의 선단에 보통 1개씩 형성하였고 간혹 2개의 분생포자가 chain으로 연결되기도 하였다. 분생자경의 특징은 균주간에 큰 차이가 없었고 분생포자의 형태와 부리(beak)의 특징에 따라 분리 균주들은 4개의 형태적 group으로 구분할 수 있었다.

Group 1 균주들이 형성하는 분생포자의 형태적 특징은 다음과 같다. 분생포자는 긴 계란형-긴 타원형이며 group 2에 비하여 포자몸통(spore body)의 폭이 약간 좁았다. 매우 길고 실 모양인 부리(beak)를 갖고 있고 부리는 몸통의 시작되는 부위에서 급격히 좁아지며 부리 끝까지 균일한 폭으로 가늘고 길게 이어진다. 한 개의 부리를 갖는 분생포자와 두개(간혹 3개)의 부리를 갖는 분생포자의 비율이 비슷하며 분생포자의 크기는 한 개의 부리를 갖는 것은 $85\sim 110\times 15\sim 22$ (몸통의 길이 \times 폭) + $95\sim 200\times ca. 2$ (부리의 길이 \times 폭) μ m, 두 개의 부리를 갖는 것은 $80\sim 110\times 15\sim 20 + 80\sim 185\times ca. 2$ μ m, 세 개의 부리를 갖는 것은 $83\sim 105\times 15\sim 22 + 50\sim 165\times ca. 2$ μ m였다. 격벽(septa)의 수는 7~12개의 종격벽과 1~여러 개의 횡격벽을 갖고 있다(Fig. 1). 이러한 특징은 *A. tomatophila*의 대표균주의 특징과 유사하였고 Simmons(2000)가 기술한 *A. tomatophila*의 특징과도 유사하였다.

Group 2 균주들이 형성하는 분생포자의 형태적 특징은 다음과 같다. 분생포자는 계란형, 곤봉형이고 비교적 긴

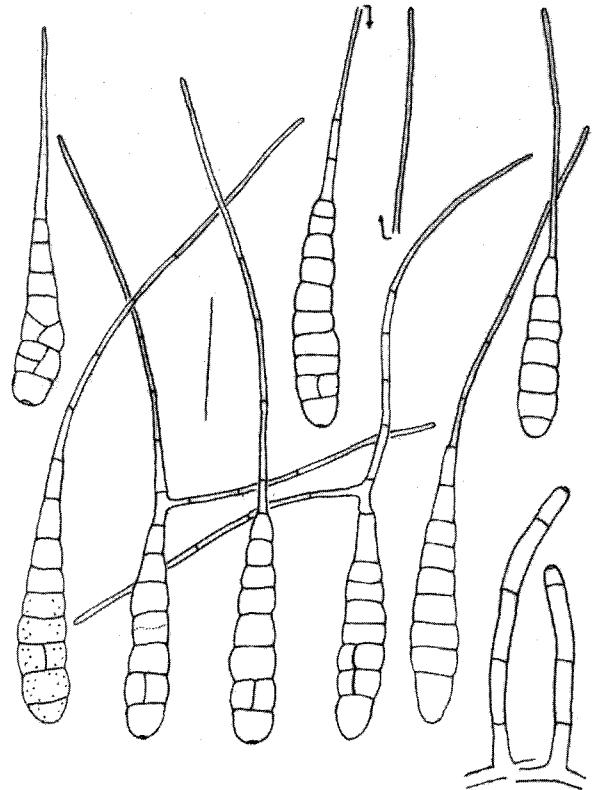


Fig. 1. Conidia and conidiophores of *Alternaria tomatophila* (group 1, CNU 3073) from culture. Bar = 50 μ m.

부리를 갖고 있으며 몸통에서 부리가 시작되는 부위가 넓고($4\sim 8$ μ m) 부리 끝부분(2.5 μ m)으로 서서히 좁아진다. 대부분 분생포자에 한 개의 부리가 있으나 간혹 부리가 분지하여 두개의 부리를 갖는 것도 있다. 분생포자의 크기는 한 개의 부리를 갖는 것은 $85\sim 112\times 17\sim 25 + 75\sim 140\times 5\sim 8 \rightarrow 2.5$ μ m, 두개의 부리를 갖는 것은 $80\sim 108\times 15\sim 22 + 58\sim 88\times 4\sim 5 \rightarrow 2.5$ μ m였다. 격벽(septa)의 수는 6~11개의 종격벽과 1개~여러 개의 횡격벽을 갖고 있다(Fig. 2). 이러한 특징은 *A. solani* 대표균주의 특징과 유사하였고 Simmons(2000)가 기술한 *A. solani*의 특징과도 유사하였다.

Group 3 균주들이 형성하는 분생포자들의 특징은 다음과 같다. 분생포자의 형태는 group 1 균주들에 비하여 몸통이 길고 두개 이상의 부리를 갖는 분생포자의 비율이 한 개의 부리를 갖는 분생포자의 비율보다 높았다. 또한 몸통에서 부리가 시작되는 부위가 넓고($4\sim 7$ μ m) 부리 끝부분으로 서서히 좁아진다. 분생포자의 크기는 한 개의 부리를 갖는 것은 $92\sim 140\times 15\sim 22 + 95\sim 205\times 4\sim 7 \rightarrow 2$ μ m, 두 개의 부리를 갖는 것은 $85\sim 125\times 15\sim 20 + 70\sim 195\times 4 \rightarrow 2$ μ m, 세 개의 부리를 갖는 것은 $80\sim 115\times 15\sim 20 + 60\sim 180\times 4 \rightarrow 2$ μ m였다. 격벽의 수는 7~13개의 종격벽과 1~여러 개의 횡격벽을 갖고 있다(Fig. 3). 이 group의 균들은 부리가 길고 분지한 것이 많은 점은 group 1의 균

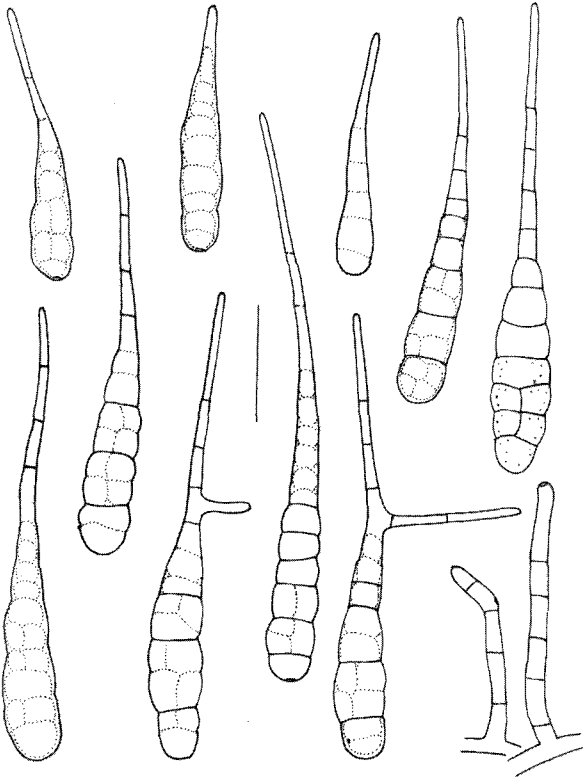


Fig. 2. Conidia and conidiophores of *Alternaria solani* type 1 (group 2, CNU 3591) from culture. Bar = 50 μ m.

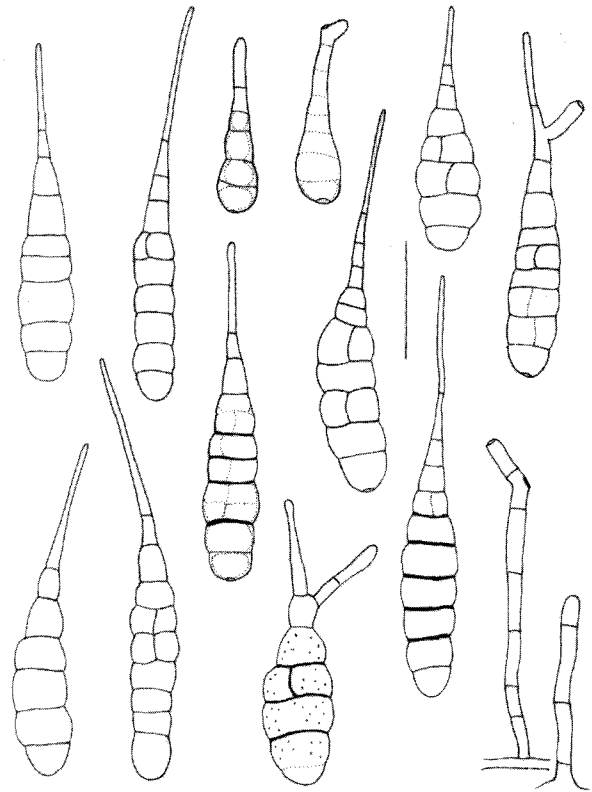


Fig. 4. Conidia and conidiophores of *Alternaria* sp. (group 4, CNU 3530) from culture. Bar = 50 μ m.

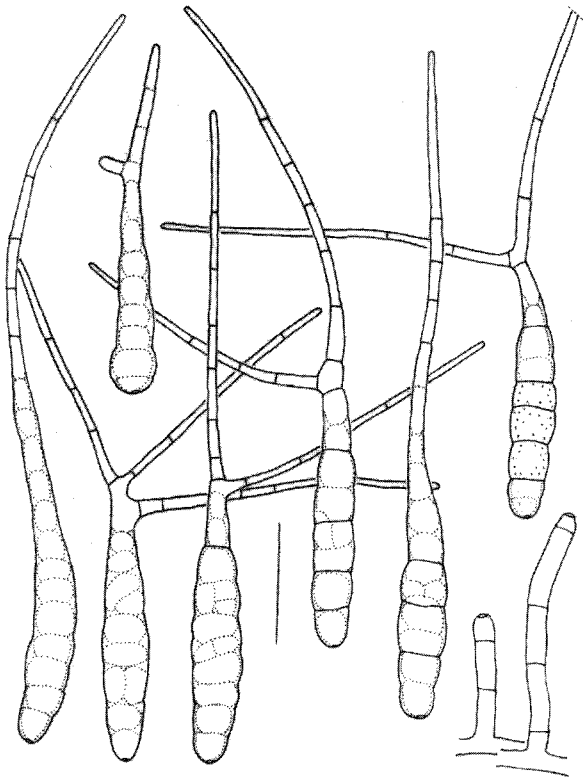


Fig. 3. Conidia and conidiophores of *Alternaria solani* type 2 (group 3, CNU 3503) from culture. Bar = 50 μ m.

들과 유사하였다. 그러나 몸통부위에서 부리로 이어지는 부위가 급격히 좁아지지 않고 서서히 좁아지며 부리의 폭이 두꺼운 점은 group 2(*A. solani*) 균주들의 특징과 유사하였으며 전체적으로 *A. solani*의 범주에 들어감으로 이 group은 *A. solani* type 2로 구분하였다.

Group 4 균주가 형성하는 분생포자의 특징은 다음과 같다. 분생포자는 서양배형-계란형 이고 다른 group의 균주들에 비하여 짧은 부리를 갖고 있다. 부리는 몸통의 시작부위에서 급격히 좁아지는 것과 서서히 좁아지는 것이 있다. 대부분 분생포자에 한 개의 부리가 있으며 간혹 부리가 시작되는 몸통의 끝부분에서 2차 분생자경이 형성되기도 한다. 성숙한 포자는 횡격벽이 뚜렷하며 격벽부위가 움푹 들어가 세포가 2차 비후하여 팽대해진다. 종종 부리의 끝부위가 팽대하기도 한다. 격벽의 수는 5~9개의 종격벽과 1~여러 개의 횡격벽을 갖고 있다. 분생포자의 몸통의 크기는 52~95(-105) \times 15~22(-30) μ m였고 부리의 크기는 + 17~95 \times ca. 2 μ m 또는 15~70 \times 3~5 \rightarrow 1.5 μ m였다(Fig. 4). 이 group의 균주는 group 2의 균주들에 비하여 성숙한 포자의 몸통의 폭이 두껍고 횡격벽이 뚜렷하며 가늘고 짧은 부리를 갖는다는 점에서 구별이 되었다.

병원성 검정

*Alternaria*의 각 group별로 2개의 대표균주를 선택하여

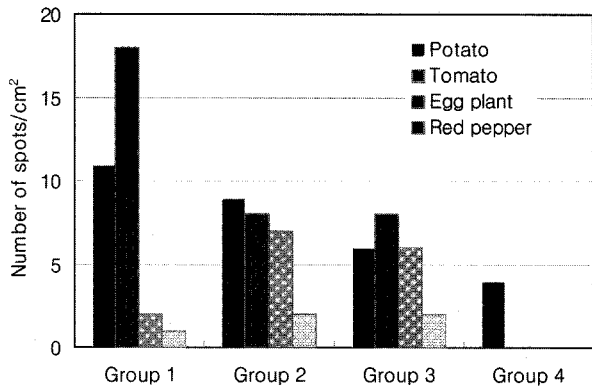


Fig. 5. Pathogenicity of *Alternaria* isolates from group 1 (*A. tomatophila*), group 2 (*A. solani* type 1), group 3 (*A. solani* type 2), and group 4 (*Alternaria* sp.) based on results from artificial inoculation test.

(group 4는 1균주) 감자, 토마토, 고추, 가지에 대한 병원성 검정을 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. Group 1(*A. tomatophila*)에 속하는 CNU 3073 균주와 EGS 42-156 균주는 토마토, 감자, 가지에 모두 병원성을 나타내었으나 특히 토마토에 강한 병원성을 나타내어 잎뿐만 아니라 잎맥과 줄기에도 심한 병반을 형성하였다. 고추에는 약한 병원성을 나타내었다. Group 2(*A. solani* type 1)에 속하는 CNU 3585와 CNU 3601 균주는 모두 감자에서 분리된 균주였지만, 감자, 토마토, 가지에 모두 병원성이 있었고 고추에는 약한 병원성을 나타내었다. Group 3(*A. solani* type 2)에 속하는 CNU 3448 균주(고추균주)와 CNU 3503 균주(감자균주)는 감자, 토마토, 가지에 모두 병반을 형성하였고 고추에는 약한 병원성을 보여 주었다. Group 4(*Alternaria* sp.)에 속하는 CNU 3530 균주는 감자에서만 특이적으로 병원성을 나타내었고 다른 작물에는 병원성이 없었다.

형태적 특징에 따라 분류한 4개의 group중 group 1(*A. tomatophila*)은 토마토에서 분리한 균주들로서 감자, 가지 등에도 병원성을 나타내었으나 토마토에 특히 강한 병원성을 나타내어 다른 group의 균들과 차이를 보여 주었다. Group 2(*A. solani* type 1)와 group 3(*A. solani* type 2)은 분생포자의 형태에는 다소 차이가 있었고 분리 기주도 감자, 가지, 고추로 다양하였지만 병원성은 큰 차이가 없이 감자, 토마토, 가지 등에 모두 비슷한 병원성을 보여 주었다. Group 4(*Alternaria* sp.)의 균주는 다른 group의 균들에 비하여 병원성이 약하여 단지 감자에만 약한 병원성을 보여 주었다.

분자생물학적 특징

ITS 영역의 염기서열 분석: 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 균주들의 ITS 영역은 PCR 증폭 결과 600 bp 정도의 크기를 갖고 있으며 17균주 모두 동일한 크기를

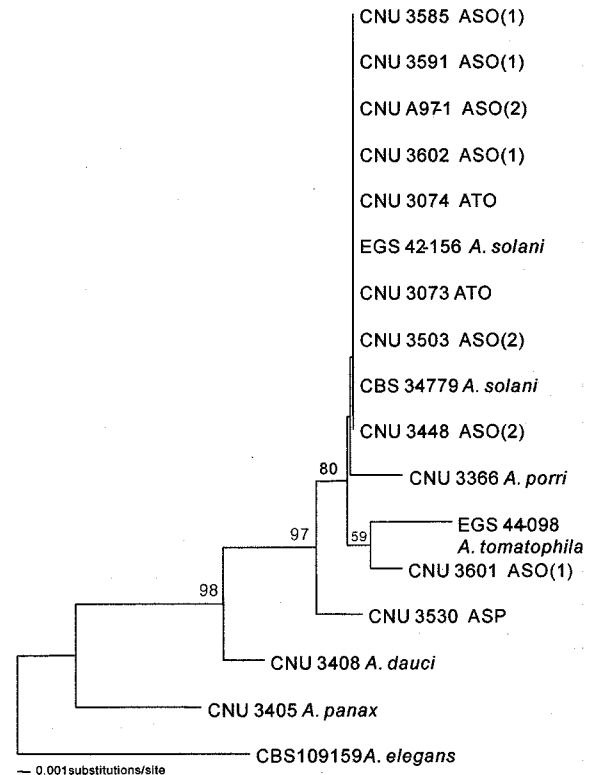


Fig. 6. Phylogenetic relationships of 17 strains of *Alternaria* species inferred by analysis of ITS-1, ITS-2, and 5.8S ribosomal DNA. The tree was obtained by neighbor-joining method using Kimura two-parameter model. The number above branch indicates bootstrap values of distance. The bootstrap values were obtained after a bootstrap test with 1000 replications. *Alternaria* group designations : ASO(1) = *A. solani* type 1, ASO(2) = *A. solani* type 2, ATO = *A. tomatophila*, ASP = *Alternaria* sp.

보여주었다. ITS 영역의 염기서열 분석의 상동성 비교를 통해 작성된 phylogenetic tree(Fig. 6)에서 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 균들은 대부분이 동일 cluster를 형성하여 이들이 근연의 관계에 있음을 알 수 있었고, 형태적 특징에 따라 구분한 group간에 구별되는 특성은 나타나지 않았다. 단지 감자에서 분리한 CNU 3530 균주는 독립적인 cluster를 형성하여 다른 균주들과 명확하게 구분되었다. 한편 대조균주로 사용한 *A. dauci*, *A. panax*, *A. elegans*는 구별되는 outgroup을 형성하였으나 *A. porri*는 *A. solani*의 cluster에 포함되어 이들이 유전적으로 유연관계가 높은 것을 알 수 있었다.

Histone H3 유전자의 염기서열 분석: Histone H3 유전자 염기서열의 상동성 비교를 통해 작성한 phylogenetic tree(Fig. 8)에서 *A. solani*를 포함하는 group 2(ASO 1)와 3(ASO 2)이 하나의 큰 cluster를 형성하였고, *A. tomatophila*를 포함하는 group 1(ATO)과 *Alternaria* sp.를 포함하는 group 4(ASP)는 각각 다른 cluster를 형성하였다

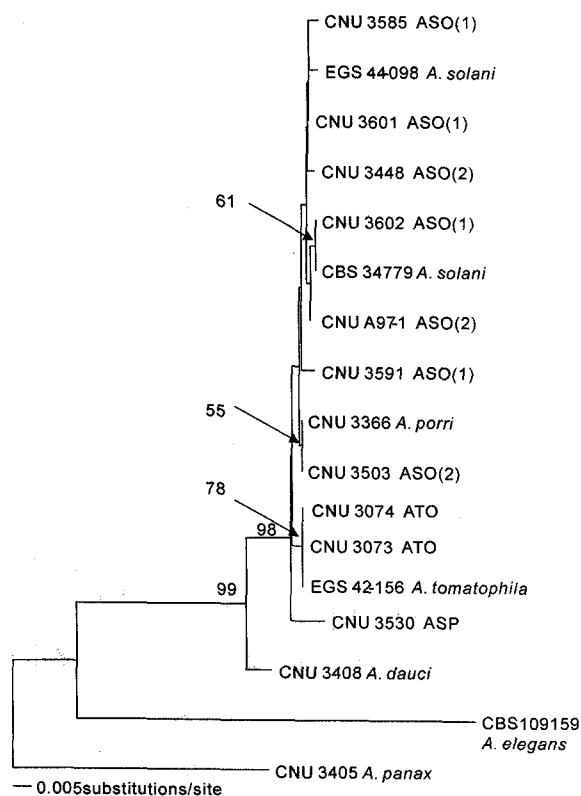


Fig. 7. Phylogenetic relationships of 17 strains of *Alternaria* species inferred by analysis of histone H3 gene. The tree was obtained by neighbor-joining method using Kimura two-parameter model. The number above branch indicates bootstrap values of distance. The bootstrap values were obtained after a bootstrap test with 1000 replications. *Alternaria* group designations : ASO(1) = *A. solani* type 1, ASO(2) = *A. solani* type 2, ATO = *A. tomatophila*, ASP = *Alternaria* sp.

(Fig. 7). 대조균주로 사용한 *A. dauci*, *A. panax*, *A. elegans*는 outgroup을 형성하였으나, *A. porri*는 ITS 분석에서와 같이 *A. solani*와 동일한 cluster를 형성하였다. ITS와 histon H3 data를 조합한 분석 결과는 histon H3 유전자의 염기서열 분석결과와 일치하였고, 높은 resolution을 보여주었다(Fig. 8).

URP-PCR 핵산지문 분석

본 연구에 사용된 12종의 URP primer는 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 균주들에 대해 많은 증폭 band를 형성하였으나, URP-07과 URP-12 primer는 전 균주에 걸쳐 매우 미약한 증폭반응을 나타내어 PCR 분석에서 제외하였다. 공시한 균주는 10종의 primer 별로 증폭된 band의 수에 차이를 보였는데, URP-04 primer에서 52개로 가장 많았고 URP-08에서 21개로 가장 적었다. 대부분의 primer에서는 30~40개 정도의 band가 증폭되었고, 증폭산물의 농도 및 증폭효율에 가장 큰 영향을 미치는 annealing 온도는 권장 온도인 55°C에서는 smearing 현상이 발생하여

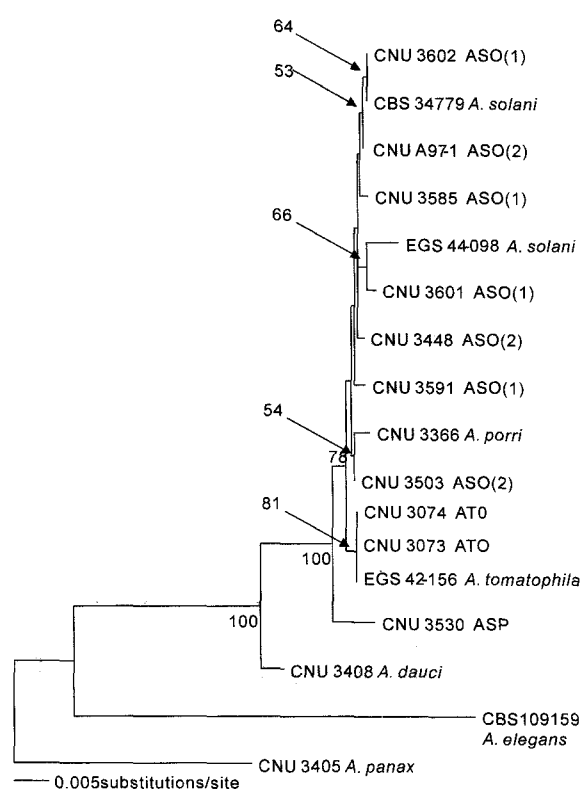


Fig. 8. Phylogenetic tree resulting from combined data sets (ITS-1, ITS-2, and 5.8S, histone H3 gene) of *Alternaria* species. The number above branch indicates bootstrap values of distance. The bootstrap values were obtained after a bootstrap test with 1000 replications. *Alternaria* group designations : ASO(1) = *A. solani* type 1, ASO(2) = *A. solani* type 2, ATO = *A. tomatophila*, ASP = *Alternaria* sp.

증폭 band의 수에 변화를 주지 않는 58°C에서 반응을 실시하였다.

본 연구에 사용한 10종의 URP primer들의 개별 primer에 의한 증폭 결과, 가지과 작물에서 분리한 14균주 모두 공통적인 band들이 많았고, 중간 균주간 차이를 나타내는 band들은 그 비율이 상대적으로 적었다. 그러나 URP-03, URP-05 그리고 URP-09와 같은 primer에서는 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 종들을 grouping할 수 있는 특이적인 증폭 pattern을 보여주었다. URP-03 primer의 경우 형태적 특징으로 구분한 4개의 group과 일치하는 증폭 pattern을 보여주었다(Fig. 9). Group 1에 속하는 균주들은 1.4 kb 부근의 band가 특이적으로 존재하고, group 2에 속하는 균주들은 0.9 kb의 band로 다른 group들과 구분되었으며 균주간에도 증폭 pattern에 약간의 차이를 보였다. Group 3에 속한 균주들은 group 1, 2와는 달리 0.75와 0.85 kb의 band가 관찰되었으며 group 4에 속하는 균주는 group 3에 속하는 균주들과 유사하게 증폭되었으나 0.3, 2.5 그리고 1.7 kb의 band의 존재로 다른 group들과 구별되었다.

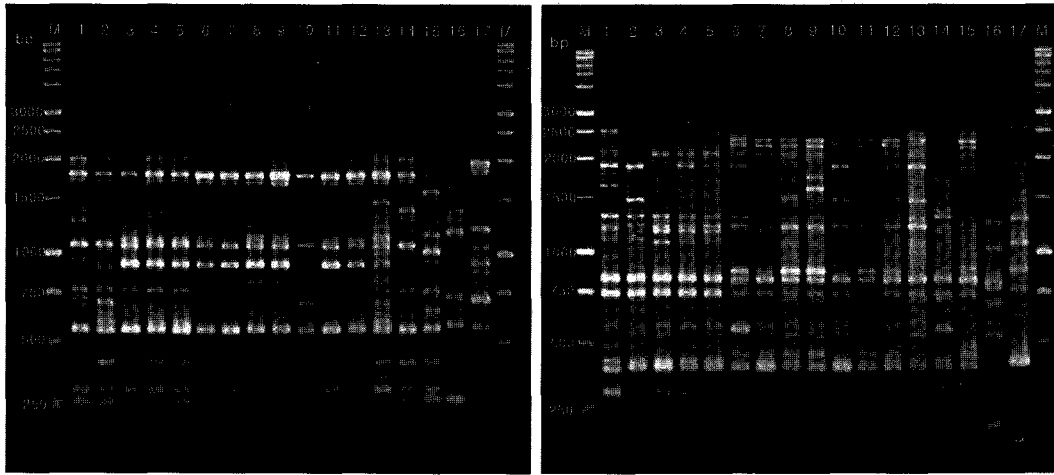


Fig. 9. PCR fingerprinting patterns of *Alternaria* species amplified by primers URP-03 (Left) and URP-09 (Right); lane 1, CNU 3530; 2, CNU A97-1; 3, CNU 3074; 4, CNU 3448; 5, CNU 3503; 6, CNU 3601; 7, CNU 3602; 8, EGS 44-098; 9, CBS 34779; 10, CNU 3073; 11, CNU 3585; 12, CNU 3591; 13, EGS 42-156; 14, CNU 3366; 15, CNU 3408; 16, CNU 3405; 17, CBS109159. Molecular weight markers are 1 kb DNA ladder.

URP-05 primer로 증폭했을 경우 0.6, 1.2 그리고 1.5 kb의 band가 가지과 작물에서 분리한 모든 균주에 공통으로 존재하였으며 group간에 약간의 차이를 보이는 band가 증폭되었다. Group1 균주에는 0.7 kb 정도의 band가 특이적으로 존재하였고 group 2와 3은 증폭 pattern이 매우 유사하였으나 group간 2~3개의 band에 차이를 보여주었다.

band를 종합하여 UPGMA에 의한 집괴분석을 실시한 결과이다. 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria*속 균들은 형태적 특징에 의해 구분한 것과 일치하는 4개의 group을 형성하였다. Group 1은 토마토에서 분리한 *A. tomatophila* 균주로서 이들은 약 91%의 유사도로 감자에서 분리한 *A. solani* 균주들이 속해 있는 group 2, 3과 구별되었다. Group 2에는 감자에서 분리한 균주들이 포함되었으며 group 3에는 감자, 고추 그리고 가지에서 분리한 균주

Fig. 10은 10종의 primer에 의해 생성된 총 283개의

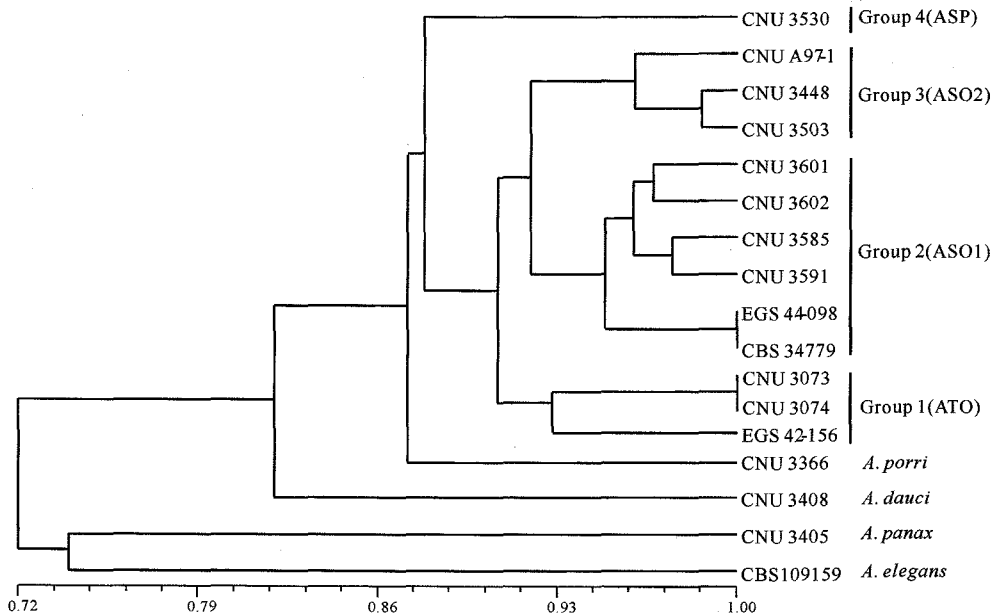


Fig. 10. Dendrogram of large-spored isolates of *Alternaria* based on band similarity. The scale on the bottom indicates the simple matching similarity coefficients obtained from URP-PCR data (URP-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, and 11) in the cluster analysis. *Alternaria* group designations : ATO = *A. tomatophila*, ASO(1) = *A. solani* type 1, ASO(2) = *A. solani* type 2, ASP = *Alternaria* sp.

들이 속해있었다. Group 4는 감자에서 분리한 CNU 3530 균주를 포함하고 다른 가지과 작물에서 분리한 균주들과 구별된 하나의 group을 형성하였는데 형태적 특징과 병원성 검정에서도 이 균주는 다른 그룹에 속한 균주들과 차이를 보여 지금까지 감자에서 보고된 종과는 다른 미기록의 새로운 종으로 생각되어진다. 가지과 작물에서 분리한 네 group의 *Alternaria*간의 유사도는 약 87% 정도였으며, 증폭 band의 양상에 큰 차이를 보였던 대조균주인 *A. panax*, *A. elegans*는 약 70% 정도의 낮은 유사도를 보였다.

고찰

*A. solani*는 대형포자를 형성하는 *Alternaria*속의 group으로서 일반적으로 chain을 형성하지 않고 긴 부리(beak)를 보통은 한 개씩 간혹 2~3개씩 갖고 있는 균이며 기주식물로는 감자, 토마토, 가지 등의 가지과 식물(*Solanaceae*)이 보고되어있다(Ellis and Gibson, 1975). *A. solani* 균주들은 형태적, 생리적 뿐만 아니라 병원성에 있어서도 다양성을 나타내기 때문에 이 종내에 레이스(race)가 존재한다는 주장이 일찍이 제기되었다. 일부 연구자들은 균주들의 배양적 성질, 포자의 크기, 포자형성능력 및 병원성 등의 차이에 의하여 레이스를 구분하였으나(Bonde, 1929; Neergaard, 1945; Rowell, 1953), 이런 형질들은 균주 및 배양조건에 따라 너무 다양하게 변하기 때문에 레이스 구분의 기준이 될 수 없다(Rotem, 1966). Petrunak and Christ(1992)는 isozyme의 다양성을 조사하여 *A. solani* 내에 12개의 전기영동 type이 있음을 보고하였고, Weir *et al.*(1998)은 *A. solani* 균주들의 RAPD-PCR 분석을 통하여 감자와 토마토에서 분리한 균주 집단간에 유전적 거리가 큼을 밝히고 *A. solani* 종내의 병원성 분화의 가능성을 제시하였다. 최근 Simmons(2000)는 가지과 작물에서 분리된 *Alternaria*를 여러 종으로 구별하였고, 특히 토마토, 가지 및 고추에서 분리된 *Alternaria*를 각각 *A. tomatophila*, *A. beringerae*, *A. capsici* 등의 신종으로 명명하고 이들이 감자에서 분리된 *A. solani*와 형태적으로 구별된다고 하였다.

본 연구에서도 국내의 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 균주들은 형태와 분자생물학적 특성에서 다양성이 인정되었다. 분리 균주들은 분생포자의 형태적 특징에 따라 네 group으로 나눌 수 있었는데 group 1은 토마토 분리균주들로서 *A. tomatophila*와 유사하였고 group 2와 3은 감자, 가지, 고추에서 분리한 균주들로서 형태적 차이가 인정되지만 모두 *A. solani*의 범주에 들어가며 group 4는 감자 분리균주로서 다른 group의 균들과 형태적으로 차이가 있고 현재까지 가지과 작물에서 보고된 바 없는 미기록 종으로 추정되었다.

가지과 식물에서 분리한 *Alternaria* 균주들의 유전적 다양성과 균주간의 유연관계를 각종 molecular marker로 분석한 결과, ITS 영역의 염기서열분석은 유전적 다양성 및

형태적인 종의 구별에 적합하지 않았다. ITS 영역은 진화적으로 매우 보존된 ribosomal DNA(rDNA) 보다 많은 변이를 갖고 있어 종간에는 염기서열에 많은 차이가 있지만 종내에서는 그 차이가 극히 드물기 때문에 대부분의 균류의 종간 유연관계 해석에 이용되고 있다(Gardes 등, 1990). 그러나 *Alternaria*속 균에서 소형포자 형성하는 종들은 ITS 영역의 염기 서열이 유사하여 종간 구분이 어려웠다(Kusaba and Tsuge 1994; Pryor and Gilbertson, 2000; Kim, 2002). Kusaba와 Tsuge(1995)는 ITS 영역의 염기서열 분석 결과를 통해 기주 특이적 독소(HST)를 생성하는 *Alternaria*속 균은 부생성 *A. alternata*와 구별할 수 없었고, 이들의 형태적 차이는 HST 생성균의 종내 변이로 해석해야 한다고 주장하였다. 본 연구에서도 ITS 영역의 염기서열 분석은 가지과 작물에서 분리한 대형포자를 형성하는 *Alternaria* 균들의 형태적으로 구별되는 종간 및 group 간의 구별에 적합하지 않은 marker임이 판명되었다.

Histone 유전자는 chromatin의 주요 구성성분인 histone 단백질질을 encoding하는 유전자이며(Igo-Kemenes 등, 1982; McGee and Felsenfeld, 1980), H2A, H2B, H3 및 H4 4개의 histone 단백질이 nucleosomal core를 구성하고 있다(Isenberg, 1979). H3 단백질을 encoding하는 유전자는 잘 보존되어 있고(Glass and Donaldson, 1995; Thatcher 등, 1994), 밀접하게 연관된 생물체의 분류 및 계통유전학적 연구에 많이 이용되고 있다(Donaldson 등, 1995; Thatcher 등, 1994). Steenkamp 등(1999)은 histone H3 유전자의 염기서열분석을 이용하여 *Fusarium subglutinans* 균주의 race를 구분하였다. Myburg *et al.*(2002)은 β -tubulin과 histone H3 유전자의 염기서열분석을 통하여 South Africa에서 분리한 *Cryphonectria cubensis*의 균주들은 Asia와 South America에서 분리한 균주들과 구별되는 종임을 보고하였다. 본 연구에서 histone H3 유전자의 염기서열분석은 *A. solani*와 *A. tomatophila*의 구별이 가능하였으나 *A. solani* 내의 형태적 차이에 의한 group의 구별은 불가능하였다.

본 연구에서 공시한 molecular marker 중 URP-PCR 핵산지문분석은 *Alternaria* 균주들의 형태적 종 및 group에 따라 독립된 cluster를 형성함으로써 형태적 특징을 잘 구분할 수 있는 marker로 판단되었다. DNA 증폭생성물에 대한 UPGMA 분석은 개별 primer에서보다 이들을 종합하였을 때 grouping이 명확해짐을 알 수 있었다. 또한 10개의 primer에 대한 증폭 pattern을 종합한 dendrogram은 URP-03 primer에서의 dendrogram과 가장 유사하므로 개별 primer로서 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria*속 균의 구별에는 URP-03 primer가 적당한 것으로 생각되었다. Weir *et al.*(1998)도 *A. solani* 균주 중에서 감자균주와 토마토 균주를 구별할 수 있는 marker로 RAPD가 유용하게 사용될 수 있음을 보고한 바 있다.

본 연구에서 분리 균주들의 기주, 분생포자의 형태, 병

원성검정 및 분자생물학적 특징을 종합할 때 토마토겉무늬병균인 *A. tomatophila*는 감자겉등근무늬병균인 *A. solani*와 구분이 되었다. 또한 감자분리 균주인 CNU 3530균주는 ITS영역과, histone H3 유전자의 염기서열분석으로 다른 종의 균들과 구별할 수 있었고, URP-PCR 핵산지문 분석에서도 증폭 band 양상에 큰 차이를 보이며 다른 종의 균들과 낮은 유전적 유사도를 보였으므로 기존에 보고된 *Alternaria* 균과는 다른 미기록 종으로 판단되며 이 균의 명명을 포함한 정확한 동정과 국내분포정도에 관한 추후검토가 필요하다. 대조균주 *A. porri*는 *Allium*속을 침해하는 병원균임에도 불구하고 ITS와 histone H3의 염기서열 결과 유전적으로 *A. solani*와 높은 유연관계를 보였다. 앞으로 *A. porri*의 많은 균주를 공시하여 *A. solani*와의 유전적 유연관계에 대한 검토가 필요하다.

적 요

국내의 가지과 작물에서 분리한 *Alternaria* 25 균주를 공시하여 분생포자의 형태적 특징을 조사하였고 *A. solani*와 *A. tomatophila*의 대표균주와 비교하였다. 분리균주 중 형태적으로 구별되는 몇 균주들과 대표균주를 공시하여 감자, 토마토, 가지, 고추에 대한 병원성 검정을 실시하였다. 대표균주를 포함한 *Alternaria* 17개 균주를 공시하여 ITS 영역과 histone h3 유전자의 염기서열분석, URP (universal rice primer)에 의한 핵산지문분석을 실시하였다. *Alternaria* 균주들은 분생포자의 형태적 특징에 의하여 *A. tomatophila*(ATO), *A. solani*(ASO) 및 미동정의 *Alternaria* sp.(ASP)의 group으로 나눌 수 있었고 *A. solani*(ASO)는 분생포자 부리(beak)의 특징에 의하여 다시 ASO(1)과 ASO(2)의 2 type으로 나눌 수 있었다. ATO와 ASO 균주들은 실험에 사용한 감자, 토마토, 가지, 고추에 모두 병원성이 있었고 ATO 균주는 특히 토마토에 강한 병원성이 있었으나, ASP 균주는 감자에만 병원성이 있었다. 이 연구에서 사용한 molecular marker 중 ITS와 histon H3 유전자의 염기서열 분석은 4개의 형태적 group을 명확히 구분할 수 없었지만, URP-PCR 핵산지문분석법은 이들 group을 명확히 구분할 수 있었다. 분생포자의 형태, 병원성검정, 분자생물학적 특징을 종합할 때 토마토겉무늬병에 관여하는 *A. tomatophila*는 감자겉등근무늬병에 관여하는 *A. solani*와 뚜렷이 구분할 수 있었다. 또한 감자에서 분리한 *Alternaria* sp.(ASP)는 *A. solani*(ASO)와 형태적으로 유사하였지만 분생포자의 폭이 두껍고 부리(beak)가 작다는 점에서 ASO와 구별되었으며 가지과 작물에서 보고된 바 없는 신종으로 추정되었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하

여 연구되었음(KRF-2001-002-G00007).

참고문헌

- Bonde, R. 1929. Physiological strains of *Alternaria solani*. *Phytopathology* **19**: 533-548.
- Cho, W. D., Kim, W. G., Jee, H. J., Choi, H. S., Lee, S. D. and Choi, Y. C. 1997. Compendium of Vegetable Diseases with Color Plates. National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon. 447 pp (in Korean).
- Cooke, D. E. L., Forster, J. W., Jenkins, P. D., Gareth Jones, D. and Lewis, D. M. 1998. Analysis of intraspecific and interspecific variation in the genus *Alternaria* by the use of RAPD-PCR. *Ann. of Appl. Biol.* **132**: 197-209.
- Donaldson, G. C., Ball, L. A., Axelrood P. E. and Glass, N. L. 1995. Primer sets developed to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes are useful in differentiating *Fusarium* species associated with conifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1331-1340.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. 608 pp.
- _____. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew. 507 pp.
- _____. and Gibson, I. A. S. 1975. *Alternaria solani* ££475 set 48. In : CM1 Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. CMI, Kew, Surrey, England.
- Gardes, M., Fortin, J. A., Mueller, G. M. and Kropp, B. R. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in the nuclear ribosomal DNA of four *Laccaria* spp.; *L. biolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. *Phytopathology* **80**: 1312-1317.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1323-1330.
- Igo-Kemenes, T., Horz, W. and Zachau, H. G. 1982. Chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **51**: 89-121.
- Joly, P. 1964. Le Genera *Alternaria*. *Ency. Mycologia*, **32**: 1-250.
- Kim B. R. 2002. Morphological and molecular systematics of small-spored *Alternaria* species. Ph. D. Thesis. Chungnam National University. Daejeon, Korea
- Kusaba, M. and Tsuge, T. 1994. Nuclear ribosomal DNA variation and pathogenic specialization in *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3055-3062.
- Morris, P. F., Connolly, M. S. and St Clair, D. A. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycol. Res.* **104**: 286-292.
- Nakada, K. and Takimoto, K. 1928. A list of plant diseases in Korea. *Bull. Korean Agri. Exp. Sta.* **15**: 1-146 (in Japanese).
- Neergaard, P. 1945. Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgard, Copenhagen, 560 pp.
- Park, J. S. 1961. Fungus Diseases of Plants in Korea(2). Coll. Agric. Chungnam. Natl. Univ. Bull. No. 2. 53pp.
- Petrunk, D. M. and Christ, B. J. 1992. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. *Phytopathology* **82**: 1343-1347.
- Pryor, B. M. and Gilbertson, R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationship amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mtSSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* **104**: 1312-1321.

- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria* - Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota, 326 pp.
- _____. 1966. Variability in *Alternaria porri* f. *solani*. *Isr. J. Bot.* **15**: 48-57.
- Rowell, J. B. 1953. Leaf blight of tomato and potato plants. Factors affecting the degree of injury incited by *Alternaria dauci* f. *solani*. Univ. R. I. Agric. Exp. Stn. Bull. 320.
- Simmons, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge, pp. 1-35. In J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Elsevier, Amsterdam. 573 pp.
- _____. 2000. *Alternaria* themes and variation (244-286). *Mycotaxon* **75**: 1-115.
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J. and Marasas, W. F. O. 1999. Differentiation of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* by histone gene sequence data. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3401-3406.
- Strendberg, J. O. 1992. *Alternaria* species that attack vegetable crops : biology and options for disease management. pp. 175-208. In J. Chelkowski and A. Visconti(eds.), *Alternaria : Biology, Plant Disease and Metabolites*, Elsevier, Amsterdam. 573 pp.
- Weir, T. L., Huff, D. R., Christ, B. J. and Romaine, C. P. 1998. RAPD-PCR analysis of genetic variation among isolates of *Alternaria solani* and *Alternaria alternata* from potato and tomato. *Mycologia* **90**: 813-821.
- Yu, S. H. 1992a. Occurrence of *Alternaria* species in countries of the Far East and their taxonomy. pp. 37-62. In J. Chelkowski and A. Visconti (eds.), *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*, Elsevier, Amsterdam. 573 pp.