

## 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 균류의 분자생물학적 특징

김병련<sup>1</sup> · 박명수 · 조혜선 · 유승현\*

<sup>1</sup>농촌진흥청 작물과학원, 충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

## Molecular Characterization of Small-Spored *Alternaria* Species

Byung Ryun Kim<sup>1</sup>, Myung Soo Park, Hye Sun Cho and Seung Hun Yu\*

<sup>1</sup>Crop Environment and Biotechnology, National Institute of Crop Science, RDA, Suwon 441-857, Korea  
Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences,  
Chungnam National University, 305-764, Korea

(Received on May 10, 2005)

To establish taxonomic system of morphologically similar species of small-spored *Alternaria*, phylogenetic analysis of internal transcribed spacer (ITS 1, ITS 2 and 5.8S rDNA) and mitochondrial small subunit (mt SSU) rDNA sequences and URP-PCR fingerprinting analysis from 11 species of *Alternaria* were performed. Phylogenetic analysis of ITS and mt SSU rDNA sequences revealed that 10 out of 11 species of the small-spored *Alternaria* were phylogenetically identical with a bootstrap value of 100%. *A. infectoria* only was phylogenetically differentiated from the other species. The results suggest that the 10 small-spored *Alternaria* species are very closely related evolutionally and the markers can not be used for differentiation of the small-spored *Alternaria* species. URP-PCR fingerprinting analysis from eleven species of small-spored *Alternaria* using 10 URP primers showed that it was possible to differentiate the species, although genetic similarities were found among the species. The *Alternaria* sp. from common pokeweed could be distinguished from other species by URP-PCR analysis, and it was considered as a new species. *A. infectoria* could be easily distinguished from the other 10 species by phylogenetic analysis of ITS and mt SSU rDNA sequences and the URP-PCR fingerprinting analysis.

**Keywords :** ITS, Mitochondrial small subunit, Small-spored *Alternaria*, URP-PCR

*Alternaria*속은 불완전균류(Deuteromycota) 총생균강(Hyphomycetes) 암색균과(Dematiaceae)에 속하는 균류로서 전 세계적으로 100여종 이상이 보고되어 있다(Ellis, 1971; Joly, 1964; Simmons, 1992). *Alternaria*의 일부 종들은 부생균으로서 토양이나 죽은 식물체의 잔재에서 흔히 발견되지만 대부분은 각종 작물의 잎, 줄기, 열매 등에 침입하여 점무늬병, 잎마름병, 검은무늬병 및 겹등근무늬병 등 여러 종류의 식물 병을 유발시킬 뿐 아니라, 여러 작물의 종자와 저장 농산물을 감염, 또는 오염시켜 피해를 주기도 하는 매우 중요한 균이다(Rotem, 1994).

*Alternaria*의 분류, 동정은 주로 분생포자 및 분생자경의 형태적 특징과 포자사슬의 형성 양상을 기초하여 수

행되고 있으며, 기주식물과의 관계 및 생리학적 특성도 부분적으로 분류의 기준이 된다(Neergaard, 1945). 그러나 분류의 기준이 되는 분생포자의 형태적 특성들은 환경 조건에 따라 변이가 심하며, 포자 크기의 범위도 종에 따라 구별되지 않는 경우가 많다. 더욱이, 동일한 기주에서 분리되는 단일 종 내에서도 포자형태가 다양하기 때문에 종의 동정이 어려운 경우가 많다. *Alternaria*의 이러한 형태적 다양성 때문에 학자에 따라 분류 개념에 차이가 많으며 균류나 병해 관계 분헌을 보면 *Alternaria* 균의 동종이명(同種異名), 이종동명(異種同名)이 상당수 보고되어 있어 분류학상 혼란을 야기하는 경우가 많다.

*Alternaria*에는 *A. alternata*나 *A. tenuissima*와 같이 소형의 분생포자를 형성하는 균들이 있으며 이들 소형의 포자형성 *Alternaria* 균 중에는 특히 형태적으로 유사한 균들이 많아 분류, 동정이 쉽지 않다. 기주특이적독소(host-specific toxin, HST)를 생성하는 7종의 *Alternaria*는 분생

\*Corresponding author

Phone) +82-42-821-5762, Fax) +82-42-823-8679

E-mail) shunyu@cnu.ac.kr

포자의 형태가 매우 유사하고, 분생포자 크기가 Simmons (1967)와 Ellis(1971)가 보고한 *A. alternata*와 동일한 범위에 있기 때문에 이들을 모두 *A. alternata*로 통합하여야 한다는 주장하였다(Nishimura 등, 1978; Rotem, 1994). HST 생성균 이외에도 각종 작물에서 분리되는 소형의 포자형성 *Alternaria*들은 분생포자의 유사성으로 인하여 *A. alternata*로 동정하는 경우가 대부분이다.

그러나 *Alternaria* 분류의 전문가인 미국의 Simmons는 *A. alternata*는 분류학적 특징이 뚜렷한 특수한 종으로서 소형의 포자형성 *Alternaria*를 폭넓게 *A. alternata*로 동정하는 것은 잘못된 것이라고 주장하였다(Simmons, 1990, 1992, 1995). 그는 소형의 포자형성 *Alternaria*의 분류에 분생포자의 형태적 특징 외에 포자사슬(chain) 형성 양상을 비교하면 유사 종간의 차이를 구별할 수 있다고 하였다. 그러나 포자사슬의 형성 양상이 같은 종 내에서도 다양하게 나타나는 경우가 있으므로 이의 구별도 쉬운 일이 아니다.

최근 식물 병원균류의 분류에 분자생물학적 방법이 도입되면서 전통적인 형태적 분류의 제한점을 해결하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. DNA 다형성 검출법은 균의 성장 단계나 환경 등에 영향을 받지 않아 안정적으로 이용할 수 있으며, 전통적인 종의 동정 방법인 형태적 특징에 비하여 빠르고 정확한 유전적 정보를 제공할 수 있다. 또한 종 수준 이하의 종내 다양성도 비교할 수 있어 형태적인 분류에서 제한적인 보다 풍부한 종간, 종내 다양성을 확보하여 균 분류에 유용한 자료로 이용할 수 있다(Moritz와 Hillis, 1996). 그러나 분자생물학적인 분류도 사용하는 marker의 종류에 따라 상반된 결론이 유도되는 경우가 있어 혼란이 일기도 한다. 일본의 Kusaba 등(1994, 1995)은 HST 생성 *Alternaria*의 rDNA-RFLP 분석과 ITS 영역의 염기서열 분석을 실시하여 이들이 *A. alternata*와 동일한 종임을 주장하였고, 미국의 Roberts 등(2000)은 HST 생성균을 비롯한 소형의 포자형성 *Alternaria*의 RAPD 분석결과 이들은 형태적으로 구별될 뿐 아니라 유전적으로도 구별되는 독립된 별개의 종이라고 주장하였다. 이와 같이 소형의 포자형성 *Alternaria*의 분류는 형태적 분류 뿐 아니라 분자생물학적 분류에서도 상반된 주장이 있어 이에 대한 전반적인 검토가 필요한 실정이다.

본 연구는 국내외에서 수집한 기주특이적독소를 생성하는 3종의 *Alternaria* 병원균 즉, *A. gaisen*, *A. mali*, *A. longipes*와 그밖에 소형의 포자를 형성하는 8종의 *Alternaria*를 공시하여 rRNA의 internal transcribed spacer(ITS)와 mitochondrial small subunit rDNA(mt SSU rDNA)의 염기서열 분석 및 universal rice primers(URPs)에 의한 PCR

핵산분석 방법들을 이용하여 DNA 다형성 및 그들 간의 계통학적 유연관계를 DNA 수준에서 조사하여 형태적인 유사성을 갖고 있는 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 균류의 분류학적 체계를 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

본 연구에 사용한 *Alternaria* 균주들은 Table 1에서와 같다. *A. gaisen*은 배에서 분리한 5균주와 일본 Tottori 대학에서 분양받은 8균주를 공시하였고, *A. mali*는 사과에서 분리한 4균주와 일본 Tottori 대학에서 분양받은 7균주, 그리고 일본 IFO(Institute for Fermentation)에서 분양받은 1균주를 공시하였다. *A. tenuissima*는 무궁화, 벼, 코스모스, 딸기에서 분리한 14균주와 영국 IMI(International Mycological Institute)에서 분양받은 2균주, 덴마크 IBT(Institute of Biotechnology)에서 분양받은 2균주를 공시하였으며, *A. longipes*는 담배에서 분리한 6균주와 일본 Tottori 대학에서 분양받은 1균주를 공시하였다. *A. citri*는 감귤에서 분리한 5균주를 공시하였고 *A. arborescens*는 덴마크 IBT에서 분양받은 2균주와 일본 Tottori 대학에서 분양받은 4균주를 공시하였다. *A. infectoria*는 덴마크 IBT에서 2균주를 분양받아 공시하였고, *A. nelumbii*는 연에서 분리한 6균주를 공시하였다. *A. gossypina*는 목화에서 분리한 4균주를 공시하였고, 자리공에서 분리한 6균주를 *Alternaria* sp.로 공시하였다. *A. alternata*는 달래, 배, 사과에서 분리한 15균주와 영국 IMI에서 분양받은 2균주, 그리고 미국의 Simmons로부터 분양받은 1균주를 공시하였다. 분류 대조균주로는 *A. brassicicola*, *A. porri*, *A. brassicae*를 각각 1균주씩 공시하였다. 공시균주들은 PDA(potato dextrose agar) 사면배지에 옮겨 배양하여 5°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### DNA 분리 및 PCR 증폭

공시균주는 PDA slant에 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후 균사 소량을 potato dextrose broth(PDB)에 접종, 125 rpm으로 25°C에서 2일간 진탕배양 하여 균사체를 얻었다. 균사체는 동결건조 후 소량을 1.5 ml tube에 넣고 마쇄한 뒤 400  $\mu$ l의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]에 현탁하고 proteinase K 50  $\mu$ g을 첨가, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 400  $\mu$ l의 2 $\times$  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)]을 첨가하여 섞

**Table 1.** Isolates of small-spored *Alternaria* species used in this study

Species	Isolate	Host	Origin	
			Source <sup>a</sup>	Isolated location
<i>A. gaisen</i>	AK-11	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Daejeon, Korea
	AK-21	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Daejeon, Korea
	AK-42	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Daejeon, Korea
	K-1	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	K-2	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	K-3	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	K-4	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	K-5	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	No.15A	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	O-274	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	O-275	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	TU	Tottori, Japan
	CNU-SS704	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-SS706	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Chonnam, Korea
<i>A. mali</i>	IFO-8984	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	IFO	Unknown
	AM-17	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Chungnam, Korea
	AM-22	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Chungnam, Korea
	AM-28	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Chungnam, Korea
	M-69	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	M-70	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	M-71	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	M-72	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	M-88	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	M-89	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	O-153	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	TU	Tottori, Japan
	O-T-M1	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Daejeon, Korea
<i>A. tenuissima</i>	IMI-289679	Unknown	IMI	Unknown
	IMI-79630	Unknown	IMI	Unknown
	IBT-8398	Unknown	IBT	Unknown
	IBT-8400	Unknown	IBT	Unknown
	CNU-A005	<i>Oryza sativa</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-A006	<i>Oryza sativa</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-A007	<i>Oryza sativa</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-A013	<i>Cosmos bipinnatus</i>	CNU	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A014	<i>Cosmos bipinnatus</i>	CNU	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A015	<i>Cosmos bipinnatus</i>	CNU	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A017	<i>Hibiscus syriacus</i>	CNU	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A020	<i>Hibiscus syriacus</i>	CNU	Gyeongbuk, Korea
	CNU-A030	<i>Fragaria × ananassa</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A031	<i>Fragaria × ananassa</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A032	<i>Fragaria × ananassa</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A067	<i>Oryza sativa</i>	CNU	Chonnam, Korea
	STR N-1	Unknown	CNU	Unknown
O-T-L	Unknown	CNU	Unknown	
<i>A. longipes</i>	AT-204	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	AT-246	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	AT-2a-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	AT-2b-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	AT-34b	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	AT-3b-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	CNU	Daejeon, Korea
	O-205	<i>Nicotiana tabacum</i>	TU	Tottori, Japan
<i>A. citri</i>	CNU-A082	<i>Citrus unshiu</i>	CNU	Cheju, Korea
	CNU-A083	<i>Citrus unshiu</i>	CNU	Cheju, Korea
	CNU-A084	<i>Citrus unshiu</i>	CNU	Cheju, Korea
	CNU-A085	<i>Citrus unshiu</i>	CNU	Cheju, Korea
	CNU-A086	<i>Citrus unshiu</i>	CNU	Cheju, Korea

Table 1. Continued

Species	Isolate	Host	Origin	
			Source <sup>a</sup>	Isolated location
<i>A. arborescens</i>	IBT-8410	<i>Lycopersicon esculentum</i>	IBT	Unknown
	IBT-8414	<i>Lycopersicon esculentum</i>	IBT	Unknown
	O-227	<i>Lycopersicon esculentum</i>	TU	Nagoya, Japan
	O-228	<i>Lycopersicon esculentum</i>	TU	Nagoya, Japan
	O-229	<i>Lycopersicon esculentum</i>	TU	Nagoya, Japan
	As-27	<i>Lycopersicon esculentum</i>	TU	California, USA
<i>A. infectoria</i>	IBT-8418	Unknown	IBT	Unknown
	IBT-8423	Unknown	IBT	Unknown
<i>A. nelumbii</i>	CNU-A008	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Kangwon, Korea
	CNU-A063	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Chonbuk, Korea
	CNU-A064	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Chonbuk, Korea
	CNU-A087	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Chonbuk, Korea
	CNU-A088	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Chonbuk, Korea
	CNU-A089	<i>Nelumbo nucifera</i>	CNU	Chonbuk, Korea
<i>A. gossypina</i>	CNU-A048	<i>Gossypium indicum</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A049	<i>Gossypium indicum</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A050	<i>Gossypium indicum</i>	CNU	Chungnam, Korea
	CNU-A051	<i>Gossypium indicum</i>	CNU	Chungnam, Korea
<i>Alternaria</i> sp.	CNU-A068	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
	CNU-A069	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
	CNU-A070	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
	CNU-A071	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
	CNU-A072	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
	CNU-A073	<i>Phytolacca esculenta</i>	CNU	Daejeon, Korea
<i>A. alternata</i>	EGS 35-193	Unknown	SCC	Unknown
	IMI-147909	Unknown	IMI	Unknown
	IMI-89343	Unknown	IMI	Unknown
	CNU-A079	<i>Allium monanthum</i>	CNU	Kangwon, Korea
	CNU-NI701	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-NI715	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-NI716	<i>Pyrus serotina</i> cv. Nijisseiki	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-HW703	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-HW704	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-HW712	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-SS701	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-SS702	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-SS703	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-SS705	<i>Pyrus serotina</i>	CNU	Chonnam, Korea
	CNU-HR701	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Kyonggi, Korea
	CNU-HR702	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Kyonggi, Korea
CNU-HR703	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Kyonggi, Korea	
CNU-HR704	<i>Malus pumila</i> var. <i>dulcissima</i>	CNU	Kyonggi, Korea	
<i>A. brassicicola</i>	O-264	<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>	TU	Tottori, Japan
<i>A. porri</i>	AP-934	<i>Allium fistulosum</i>	CNU	Daejeon, Korea
<i>A. brassicae</i>	L-1	<i>Brassica campestris</i> subsp. <i>napus</i> var. <i>pekinensis</i>	CNU	Daejeon, Korea

<sup>a</sup>CNU, Laboratory of Plant Pathology, Chungnam National University, Daejeon, Korea; TU, Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, Tottori, Japan; IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japan; IMI, International Mycological Institute, Surrey, UK; IBT, Institute of Biotechnology, Denmark; SCC, Simmons Culture Collection, USA.

어준 뒤 chloroform:isoamylalcohol(24:1)로 추출하고, 원 심분리하여 얻은 상등액에 0.7 volume의 isopropanol을 첨

가하여 DNA를 얻었다. TE buffer [Tris-HCl(pH 8.0) 10 mM, EDTA(pH 8.0) 1 mM]에 DNA를 녹이고 RNase를 첨가한

뒤 정량하여 4°C에 보관하였다.

PCR 증폭은 15 ng의 genomic DNA, 각 0.5 pmol의 primer, 200 µM dNTP, 2.5 unit의 *Taq* DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>에 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 최종 volume을 50 µl로 하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 2분간 실시하고, denaturation 40초(94°C), annealing 1분(60°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycle을 실시하고 마지막으로 72°C에서 5분간 incubation 하였다. rDNA의 ITS 영역은 ITS 1과 ITS 4 primer(White 등, 1990), mitochondrial small subunit rDNA의 증폭을 위해서 MS 1과 MS 2 primer(White 등, 1990)를 이용하여 증폭하였다.

### 염기서열 및 계통분석

PCR 산물은 Wizard PCR prep kit(Promega, Madison, WI, USA)으로 정제하고, sequencing 반응은 BigDye terminator cycle sequencing kits(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)를 이용, template 40 ng, primer 3.2 pmol, Terminator ready reaction mixture 8 µl에 물을 첨가하여 20 µl의 volume으로 조절한 뒤 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 25 cycle의 PCR 반응을 수행하였다. 반응에는 각각의 PCR 반응에 사용한 동일한 primer를 사용하였다. Gel 전개 및 염기서열 분석에는 ABI Prism 310 Genetic analyzer(PE Applied Biosystem)를 이용하였다. 염기서열은 CLUSTAL X(Thompson 등, 1997)와 PHYDIT program version 3.0(Chun, 1995 available at <http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit>)으로 정렬하였고, 애매하게 정렬된 부분은 분석에서 제외하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c package(Felsenstein, 1985)를 사용하여 Kimura's 2-parameter distance model(Kimura, 1980)에 의해 작성되었다. Tree의 topology를 조사하기 위하여 1000 반복의 bootstrap 분석을 실시하였다.

### PCR 핵산지문 분석

**PCR 증폭.** 본 실험의 PCR 핵산지문 분석에는 서린 생명과학연구소(SRILS)의 SRILS UniPrimer™ kit를 사용하였다. 12종의 UniPrimer 중에서 미약한 증폭생성물을 보이는 URP-07과 URP-12를 제외한 10종의 primer를 사용하였다. PCR 증폭은 15 ng의 genomic DNA, primer 100 ng, dNTP's 200 µM, *Taq* DNA polymerase 2.5 unit, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>에 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 최종 volume을 20 µl로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 4분간 실시하고, denaturation 1분(94°C), annealing 1분(55°C), extension 2분

(72°C)으로 35 cycle을 실시한 뒤 72°C에서 7분간 incubation 하였다. PCR 반응 이후, 15 µl의 생성물을 1.2% agarose gel에서 60V, 5시간 동안 전기영동하고 ethidium bromide 로 염색하여 관찰하였다.

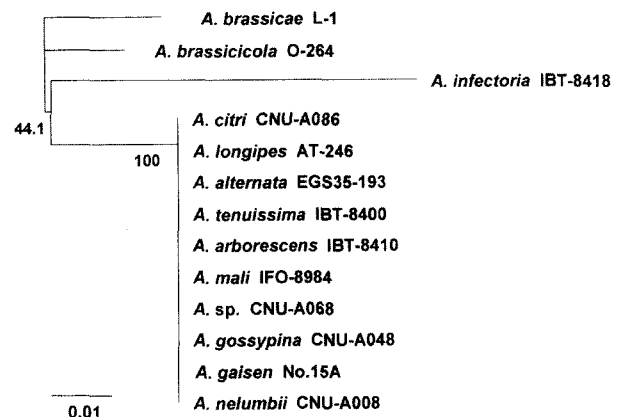
**URP-PCR bands의 분석.** 각 균주의 primer에 의한 증폭 pattern의 비교는 동일한 크기의 band 존재 여부로 행하였고, band의 유무에 따라 0과 1로 나열하여 UNI coefficient 로 유사도(similarity)를 구하고 UPGMA(unweighted paired group methods using arithmetic average)에 의한 집괴분석을 실시하였다. 유사도와 UPGMA 분석은 NTSYS-pc program(Ver. 2.1, Rohlf, 2000)을 이용하였다.

## 결 과

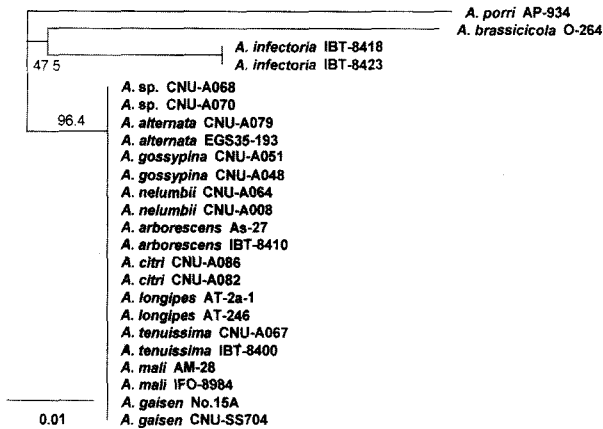
### rDNA의 ITS 영역 및 미토콘드리아 SSU rDNA의 계통 분석

소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들의 계통분석을 하기 위하여 ITS 1과 ITS 4 프라이머를 이용하여 rDNA의 ITS 영역을 증폭한 결과 600 bp 정도의 증폭 산물을 얻었다. 이들 염기서열을 바탕으로 Kimura's two-parameter 모델로 distance 분석을 한 결과 Fig. 1과 같다. *A. infectoria*를 제외한 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들은 monophyletic 그룹을 형성하였고, 이들 그룹은 100%의 높은 bootstrap 값으로 지지하였다. 이들 그룹의 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들은 염기서열도 모두 동일하였다. *A. infectoria*는 다른 소형의 포자형성 종들과 다른 그룹을 형성하였다.

MS 1과 MS 2 프라이머를 이용하여 *Alternaria* 종들의



**Fig. 1.** Neighbor-joining tree based on ITS/5.8S rDNA sequences showing relationships among small-spored *Alternaria* species. The percentage numbers below each branch indicate the levels of bootstrap support for the branch point based on 1000 resamplings. The bar represents 0.01 substitutions per site.



**Fig. 2.** Neighbor-joining tree based on mitochondrial SSU rDNA sequences showing relationships among small-spored *Alternaria* species. The percentage numbers below each branch indicate the levels of bootstrap support for the branch point based on 1000 resamplings. The bar represents 0.01 substitutions per site.

mt SSU를 증폭한 결과 600 bp 정도의 증폭 산물을 얻었다. ITS에서와 마찬가지로 *A. infectoria*를 제외한 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들은 monophyletic 그룹을 형성하였고, 이들 그룹은 96%의 bootstrap 값으로 지지하였다. 이들 그룹은 종간 염기서열의 차이를 보이지 않아 종간 구별이 불가능하였다(Fig. 2).

**URP-PCR 핵산지문 분석**

**PCR 증폭.** 연구에 사용된 12종의 URP primer는 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 균주들에 대해 많은 증폭 band를 형성하였으나, URP-07과 URP-12 primer는 전 균주에 걸쳐 매우 미약한 증폭반응을 나타내어 PCR 분석에서 제외하였다. URP primer URP-04, URP-06 및 URP-11에 증폭된 대표적인 pattern은 Fig. 3과 같다.

URP-04 primer에서는 모든 band가 동일한 농도로 증폭되었다(Fig. 3A). *A. gaisen*은 13균주 모두 동일한 pattern을 보이면서 다른 종들과 구별되는 증폭 pattern을 보여주었다. 그러나 *A. mali*, *A. arborescens*, *A. alternata*는 종내 균주간 1~3개 band에 차이를 보이며 다양한 pattern으로 증폭되었다. 특히 *A. arborescens*는 1.0 kb band의 유무에 따라 두 종류의 pattern을 보여주었다. *A. tenuissima*, *A. longipes*, 그리고 *A. citri*는 유사한 pattern을 갖고 있었다. 대부분의 종들은 서로 동일하거나 유사한 증폭 pattern을 보였지만, *A. infectoria*, *A. gossypina*, 그리고 자리공 분리균주들은 각각 독특한 pattern으로 증폭되었다. 특히 *A. infectoria* 두 균주는 서로 전혀 다른 증폭 pattern을 보여주었다.

URP-06 primer에서 *A. gaisen* 13균주는 다른 종들과 구별되는 band pattern을 나타내었으나, *A. tenuissima* 균주



**Fig. 3.** PCR fingerprinting patterns of small-spored *Alternaria* species amplified by primers URP-04 (A), URP-06 (B), and URP-11 (C): Ag; *A. gaisen*, Am; *A. mali*, Ate; *A. tenuissima*, Alo; *A. longipes*, Ac; *A. citri*, Aar; *A. arborescens*, Ai; *A. infectoria*, An; *A. nelumbii*, Ago; *A. gossypina*, Asp; A. sp., Aa; *A. alternata*. Group O are out group species as *A. brassicicola*, *A. porri*, and *A. brassicae*, respectively. Molecular weight marker are 1 kb DNA ladder.

들 중 벼에서 분리한 3균주의 band pattern은 *A. gaisen*의 AK-11, AK-21, AK-42, No.15A, O-275 균주와 동일하였다(Fig. 3B). *A. mali* 균주들은 균주 간에도 다양한 증폭 양상을 보여주었으며, O-153과 같은 일부 균주들의 증폭 band는 *A. tenuissima*와 *A. alternata* 균주들과 유사하였다. *A. longipes*, *A. citri*, *A. infectoria*, 그리고 자리공 분리균주들은 각각 종 특이적인 band pattern을 나타내어 다른 종들과 구별이 가능하였다. 이 primer에서도 *A. infectoria* 두 균주의 band pattern은 비슷하지만 다른 종들과는 명확한 차이를 보여주었다.

URP-11 primer에서는 대부분의 균주들이 유사한 증폭

pattern을 보여주었지만 750 bp~1.5 kb 영역의 band들은 균주간, 또는 종간에 2~6개의 band에 차이를 보여주었다(Fig. 3C). 종 내 균주간의 증폭 pattern은 각각 *A. nelumbii*, *A. gossypina*, 그리고 자리공에서 분리한 균주들만이 동일하였고, 나머지 종들에서는 균주간 다양한 pattern을 보여주었다. 또한 *A. gossypina*와 자리공 분리균주들은 각각 다른 소형의 포자 형성 종들과 구별되는 종 특이적인 증폭양상을 보여주었다. *A. infectoria* 두 균주는 역시 서로 다른 증폭 band를 보여주었는데, IBT-8418 균주는 *A. arborescens* As-27 균주와 동일한 band pattern을 보여주었다.

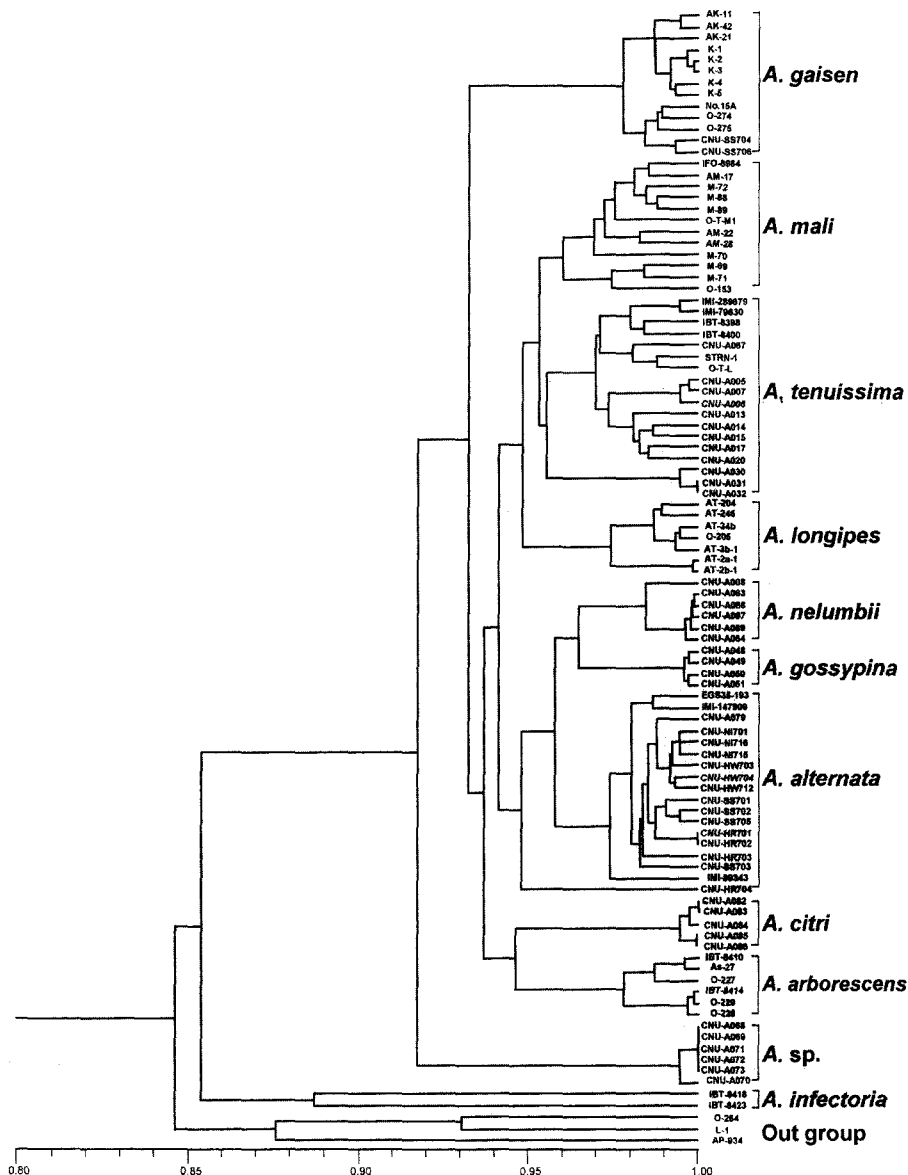


Fig. 4. UPGMA dendrogram of 97 small-spored *Alternaria* isolates based on band similarity. The scale on the bottom indicates the simple matching similarity coefficients obtained from URP-PCR data in the cluster analysis.

**URP-PCR bands의 UPGMA 분석.** Fig. 4는 10종의 primer에 의해 생성된 총 386개의 band를 종합하여 UPGMA (unweighted paired group methods with arithmetic average)에 의한 집괴분석을 실시한 결과이다. 작성된 dendrogram에서 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 균주들은 형태적 특징과 병원성에 근거하여 구분한 종에 따라 독립된 cluster를 형성하였으며, 종간의 유연관계도 서로 차이가 있음을 알 수 있었다. 종간의 유사도는 93~95%로 비교적 높았으며, 증폭 band의 양상에 큰 차이를 보였던 *A. infectoria*는 85% 정도의 낮은 유사도를 보였다. 또한 동일 종 내의 균주간의 유사도는 종에 따라 그 차이가 심하였다. 그중에서도 *A. mali*, *A. tenuissima*, *A. alternata*는 종 내 균주간의 유연관계가 다양하여 이들 종들은 타 종에 비해 유전적으로 다양함을 알 수 있었다. *A. gossypina*와 *A. nelumbii*는 중간 가장 가까운 유연관계를 나타내었으며 이들은 부생균인 *A. alternata*와도 근연의 관계에 있었다. *A. longipes*, *A. citri*, 그리고 *A. arborescens*는 가까운 근연관계 없이 cluster를 이루며 존재하였다. 종 특이적인 URP-PCR 양상을 보여주었던 자리공 분리균주들은 다른 소형의 포자형성 종들과 비교적 먼 유연관계를 나타내었고, 특히 *A. infectoria*는 다른 소형 분생포자를 형성하는 *Alternaria* 종들과 대형 분생포자 형성균들이 갖는 유전적 거리만큼 먼 유연관계를 나타내어 유전적으로 큰 차이가 있는 종으로 나타났다. 한편 *A. alternata* 균주인 CNU-HR704는 다른 *A. alternata* 균주들과는 달리 *A. nelumbii*, *A. gossypina* 및 *A. alternata*를 포함하는 3종의 cluster group에 포함되었다.

이상의 결과에서 개별 URP primer에 의하여 증폭된 PCR band에서는 모든 종에 대한 특이적인 증폭 pattern이 나타나지 않았지만, 여러 종의 primer에 의한 URP-PCR 결과를 종합하여 작성된 dendrogram에서 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*는 종간 유사도는 높았으나 각각의 종에 따라 서로 다른 유전적인 특징을 보유하고 있음을 알 수 있었다.

## 고 찰

소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*속은 지구상에 광범위하게 분포를 하며 수많은 식물의 병을 일으킬 뿐 아니라 여러 작물의 종자와 저장중의 농산물에 발생하여 큰 피해를 주는 균이다(Rotem, 1994). 이들 *Alternaria*속의 분류, 동정은 주로 분생포자 및 분생자경의 형태적 특징과 포자사슬의 형성 양상을 기초하여 수행되어 왔지만, 형태의 다양성 때문에 형태적 특징을 기준으로 한 전통적인

분류에 서로 다른 견해가 있어 빈번히 논쟁의 대상이 되고 있다.

최근 식물 병원균류의 전통적인 형태적 분류의 제한점을 해결하고자 DNA 수준에서의 계통분류학적 연구가 활발히 진행되고 있다(Bruns와 Szaro, 1992; Moritz와 Hillis, 1996). 특히 rDNA의 염기서열 분석은 균류의 분류와 계통학에 유용한 정보를 제공하였다(Anderson과 Stasovski, 1992; Bruns와 Szaro, 1992; Guadet 등, 1989; Hibbett와 Vilgalys, 1991; Moody와 Tyler, 1990; Peterson과 Kurtzman, 1991). Kusaba와 Tsuge(1995)는 HST 생성 *Alternaria* 균들의 rDNA의 ITS 영역이 *A. alternata*와 차이가 없으므로 HST 생성균들 간의 형태적 차이는 종내의 변이 수준으로 해석하여야 한다고 주장하였으며, 소형의 포자형성 *Alternaria*들이 서로 근연의 관계에 있음이 많은 연구를 통하여 보고되었다(Kusaba와 Tsuge, 1994; Jasalavich 등, 1995; Go 등, 1997; Pryor와 Gilbertson, 2000). 또한 Weir 등(1998)에 의하면 감귤에서 분리한 세 종류의 *Alternaria* 균은 모두 *A. alternata*와 동일한 것으로 보고하여 이들이 *A. alternata*의 종내 변이체라는 주장에 동의하였다.

본 연구에서도 소형포자를 형성하는 *Alternaria* 종들은 ITS 영역 및 미토콘드리아의 small subunit rDNA 영역의 염기서열에서 소형포자를 형성하는 균류 간에는 차이가 없었다. 따라서 rDNA의 ITS와 미토콘드리아의 small subunit rDNA 영역에서 보여주는 100%의 상동성은 소형포자를 형성하는 균들이 유전적 배경이 동일한 근연의 균류인 것으로 해석할 수 있다.

Roberts 등(2000)은 소형의 포자를 형성하는 260균주의 *Alternaria*를 먼저 형태적인 group으로 나누고, 그 group을 대상으로 RAPD-PCR 분석을 실시한 결과, 각각의 형태적인 종 group은 서로 독립된 cluster를 이루어 rDNA 영역의 염기서열 분석 결과와 상반된 결과를 보고하였다. 그들은 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*는 형태적인 가변성을 최소화 하면 서로 형태적으로 차이가 있는 분류군으로 구별할 수 있다는 결론을 내렸다(Roberts 등, 2000).

자리공의 병반에서 분리한 *Alternaria* sp.는 rDNA의 ITS 영역과 미토콘드리아의 small subunit rDNA 영역의 염기서열을 분석한 결과 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들과 monophyletic group을 형성하고 염기성열이 100% 일치하였지만, URP-PCR 핵산지문분석에서 다른 소형의 포자 형성 균들과 다른 그룹을 형성하였고, 분생포자의 형태 및 포자사슬의 형성 양상에서도 차이가 있었다(자료 미발표). 이들 결과를 바탕으로, 자리공에서 분리한 *Alternaria*는 다른 소형의 포자 형성 균들과 구별되는 새



로운 종으로 예상된다.

*A. infectoria*는 분생포자의 형태적 특징이 다른 소형의 포자형성 균들과 많은 차이를 갖고 있으며 특히 ITS 영역 및 미토콘드리아의 small subunit rDNA 영역의 염기서열 및 URP-PCR 핵산지문 분석한 결과 다른 소형의 포자형성 종들과 뚜렷하게 구분되는 것을 볼 수 있었다. 이는 *A. infectoria*는 소형 분생포자를 형성하지만 다른 *Alternaria* 종들과는 진화적으로 차이가 있는 원연의 종으로 판단되어진다.

URP-PCR 핵산지문분석에서 보여주는 각 종간의 유전적 유사도는 93~95% 정도로 매우 높았다. 이것은 분생포자의 형태적 유사성, rDNA ITS와 미토콘드리아 small subunit rDNA 영역의 100% 상동성을 반영하는 것으로 생각된다. 즉, 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*는 각각의 종에 따라 서로 다른 유전적인 특징을 보유하고 있지만 그 차이는 적은 범위 내에서 존재할 것으로 추측할 수 있다. 기주특이적독소와 같은 병원성과 관련된 다수의 대사관련 유전자가 존재할 것이고, 이 유전자는 rDNA와 같이 일부의 유전자에 국한되지 않고 genomic DNA상에 다양하게 분포할 것으로 생각된다. 따라서 ITS와 같이 일부의 염기서열만을 대상으로 하지 않고, 전체 유전자를 대상으로 하는 핵산지문법은 각 종간 특징적인 결과를 얻을 수 있다. 추후, 다수의 copy로 구성된 repetitive sequence를 이용한 유전자의 핵산지문 분석을 통하여 보다 포괄적인 genome 분석을 실시한다면 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*의 계통분류에 관한 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 종들의 URP-PCR 핵산지문 분석 결과, *A. infectoria*를 제외한 10종의 *Alternaria*는 서로 높은 유연관계를 보이고 있지만 종에 따른 유전적인 특징을 보유하고 있음을 알 수 있었다. URP-PCR 핵산지문분석과 rDNA의 ITS 영역 및 미토콘드리아의 small subunit의 염기서열 분석 결과들을 종합할 때 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria*는 분생포자의 형태적 특징이나 병원성 등과 같이 각 종별로 고유의 특성을 어느 정도 보유하고 있지만 이들이 DNA 수준에서는 상당한 공통점을 갖고 있는 것으로 판단되었다.

## 적 요

이 연구는 *Alternaria*속 균류 중에서 분생포자의 형태가 유사하여 분류, 동정이 매우 어려운 소형의 포자를 형성하는 11종의 *Alternaria*의 종간 유연관계와 분류체계를 확립하기 위하여 공시균들의 ribosomal DNA의 ITS 및 미

토콘드리아 small subunit 영역의 염기서열 분석, 그리고 URP primer에 의한 핵산지문분석을 실시하였다. 소형의 포자를 형성하는 11종 *Alternaria*속의 rDNA의 internal transcribed spacer(ITS) 영역과 미토콘드리아 small subunit rDNA의 염기서열을 분석하였던 바 *A. infectoria*를 제외한 10종의 *Alternaria*에서 100%의 상동성을 나타내었다. 이는 공시한 10종의 *Alternaria*가 유전적으로 매우 근연의 관계에 있음을 나타내며, 이 marker는 공시균들의 종구분에 이용할 수 없음을 나타내는 것이다. URP primer 10종을 공시하여 소형의 포자를 형성하는 *Alternaria* 균류의 핵산지문분석을 실시한 결과, 개개의 primer로는 종간의 구분이 불가능하였으나 여러개의 primer를 종합하여 UPGMA 분석을 실시할 경우 비록 종간 유사도는 높았지만 각각의 종은 독립된 cluster를 형성하여 종간 구별이 가능하였다. 자리공에서 분리한 *Alternaria* sp.는 URP-PCR 핵산지문 분석 결과 다른 *Alternaria* 종들과 차이가 인정됨으로 이 균은 미기록인 신종의 *Alternaria*로 사료되었다. *A. infectoria*는 다른 *Alternaria* 종들과 ITS 분석 및 URP-PCR 핵산지문분석에서 큰 차이를 보임으로서 뚜렷히 구별되는 종으로 판단되었다.

## 감사의 글

이 논문은 한국과학재단 기초과학연구사업(R052002000 0036502003)의 지원에 의해 수행된 연구의 일부분임.

## 참고문헌

- Anderson, J. B. and Stasovski, E. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84: 505-516.
- Bruns, T. D. and Szaro, T. M. 1992. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushroom. *Mol. Biol. Evol.* 9: 836-855.
- Chun, J. and Goodfellow, M. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* 16S rRNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 240-245.
- Ellis, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Go, S. -J., Hong, S. -B., Kang, H. -W., Yu, -S. H. and Ryu, J. -C. 1997. Phylogenetic relationship of host-specific toxin producing *Alternaria* spp. on the basis of sequences of internal transcribed spacer in ribosomal DNA. (in Korean) *RDA Journal of Crop Protection* 39: 1-9.
- Guadet, J., Julien, J., Lafay, J. F. and Brygoo, Y. 1989. Phylogeny

- of some *Fusarium* species determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Mol. Biol. Evol.* 6: 227-242.
- Hibbett, D. S. and Vilgalys, R. 1991. Evolutionary relationships of *Lentinus* to the Polyporaceae: evidence from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. *Mycologia* 83: 425-439.
- Jasalavich, C. A., Morales, V. M., Pelcher, L. E. and Seguin-Swartz, G. 1995. Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycol. Res.* 99: 604-614.
- Joly, P. 1964. Le Genre *Alternaria*. Ency. Mycologiquil. P. Lechevalier, Paris.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- 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.* 65: 903-909.
- Kusaba, M. and Tsuge, T. 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr. Genet.* 28: 491-498.
- Moody, S. F. and Tyler, B. M. 1990. Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyze the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2453-2461.
- Moritz, C. and Hillis, D. M. 1996. Molecular systematics: Context and controversies. In: *Molecular systematics* (2nd ed.). Edited by Hillis, D. M., Moritz, C., and Mable, B. K. pp. 1-13. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Neergaard, P. 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgaard, Copenhagen. 560 pp.
- Nishimura, S., Sugihara, M., Kohmoto, K. and Otani, H. 1978. Two different phases in pathogenicity of the *Alternaria* pathogen causing black spot disease of Japanese pear. *Journal of the Faculty of Agriculture, Tottori University* 13: 1-10.
- Peterson, S. W. and Kurtzman, C. P. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling yeast species. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 124-129.
- Pryor, B. M. and Gilbertson, R. L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol. Res.* 104: 1312-1321.
- Roberts, R. G., Reymond, S. T. and Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycol. Res.* 104: 151-160.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, NY.
- Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity. APS Press, St Paul, MN.
- Simmons, E. G. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycologia* 59: 67-92.
- Simmons, E. G. 1990. *Alternaria* themes and variation (27-53). *Mycotaxon* 37: 79-119.
- Simmons, E. G. 1992. *Alternaria* taxonomy: Current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria -Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Topics in secondary metabolism Vol. 3, pp. 1-35. Eds J. Chelkowski and A. Visconti. Amsterdam: Elsevier.
- Simmons, E. G. 1995. *Alternaria* themes and variation (112-144). *Mycotaxon* 55: 55-163.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- 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.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications*, ed. by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. pp. 315-322. Academic Press, San Diego.