

재조합 DNA probe에 의한 *Fusarium oxysporum* 분화형간의 분류 및 유전적 변이 분석

김영태 · 김홍기*

충남대학교 농과대학 농생물학과

Classification and Genetic Variation Analysis Among Formae Speciales of *Fusarium oxysporum* by Using Recombinant DNA Probes

Young-Tae Kim and Hong-Gi Kim*

Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

ABSTRACT: Five formae speciales of *Fusarium oxysporum* in Korea were examined using RFLP analysis to find the possibility for classification and analyze genetic variations. DNAs from *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *cucumerinum*, *fragariae*, *garlic* and *sesami* were used with three recombinant probes such as pFC46, pFC52 and pFC57. Distinct differences among five formae speciales of this fungus were detected in RFLP band patterns based on southern hybridization of genomic DNA using each recombinant clone, which was a repetitive copy probe. Strains belong to four formae speciales could be very stable in genetic variation except f. sp. *sesami* which has more variation than the others based on the RFLP analysis. They formed their own cluster which has high similarity within the same formae specialis resulted from the UPGMA analysis for genetic relationship analysis and each cluster represented its own formae specialis. The method using three recombinant DNA probes could be a good tool for classification of formae speciales in *F. oxysporum*.

KEYWORDS: *Fusarium oxysporum*, formae speciales, recombinant DNA probe, repetitive copy clone, genetic variation, classification

*Fusarium oxysporum*은 매우 넓은 기주범위를 지니고 있으며 경제적으로 중요한 작물들의 도관을 침입해 시들음병이나 모잘록병을 일으키고 후막포자로 토양중에 생존하며, 세계적으로 널리 분포되어 농산물의 안정 다수확을 저해하는 가장 주요한 토양전염성 병원균으로 알려져 있다. 또한 동일 종내 각각의 병원성 균주들은 서로 다른 제한된 기주범위를 지니고 있기 때문에, 예전부터 *Fusarium oxysporum*은 특정 기주에 대한 병원성에 따라 여러 가지 분화형(formae specialis)으로 나누고, 더 나아가 판별품종에 대한 병원성을 기초로 하여 다시 race로 세분하고 있다(Gerdemann 등, 1951; Grattidge 등, 1982). 그러나 분화형의 구분은 접종 방법, 접종 농도, 식물체의 생육 정도, 관측자의 판

정 기준 등에 따라 좌우되는 등 때때로 정확한 분류에 어려움이 많아 근래 많은 연구자들은 *Fusarium oxysporum*을 분류할 수 있는 새로운 방법들을 시도하기에 이르렀다. 즉 Isozyme pattern의 분석(Bosland 등, 1987)을 비롯하여 균의 변이를 유기시키고 유전학적 성질에 근거하여 그들간의 체세포 화합성을 조사하는 VCG(Vegetative Compatibility Grouping)검정에 의한 방법(Correll 등, 1987; Puhalla, 1985)이 이용되었다. 그러나 이들 방법 역시 판별의 기준이 균의 표현형에 근거하고 있고 결과를 얻기까지의 과정이 쉽지 않아 때로는 정밀한 분류를 하는데 한계가 있어 최근에 와서는 VCG의 결과를 검토하고 *Fusarium oxysporum*을 유전자 수준에서 보다 근본적으로 분류하고자 분자생물학적인 방법도 도입되기에 이르렀다. 그중 하나가 재조합 DNA probe를 이용한 RFLP(Restrict-

*Corresponding author

tion Fragment Length Polymorphism) 분석 (Kistler 등, 1991; Manicom 등, 1987; Manicom 등, 1990)으로 본 실험은 국내의 *Fusarium oxysporum*의 여러 분화형에 대해 유전자 수준에서의 차이를 genomic DNA상에 나타나는 RFLP로 분석하여 유전적 변이 정도를 분석하고 국내 균주간의 유연관계를 알아보며 그 결과에 근거하여 특정 probe에 의한 분류 가능성을 밝히고자 하였다. 아울러 그로부터 나타난 결과가 분화형 및 지역간 차이등과도 어떤 연관성을 나타내는지 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

국내의 충청북과 경남북 등의 재배 포장의 이병 기주로 부터 분리하여 병원성 검정을 마친 f. sp. *lycopersici*를 중심으로 f. sp. *cucumerinum*, *fragariae*, *garlic*, *sesami* 등 5가지 분화형의 *Fusarium oxysporum*들을 공시하였다(Table 1). 이들 균주는 PDA 배지상에, 27°C에서 5일간 배양시킨 후 4°C에 보존하면서 이용하였다.

Table 1. Strains of *Fusarium oxysporum* formae speciales used in this study

Strain	Forma specialis	Geographical origin		Source
FL301	<i>lycopersici</i>	Cheongwon-gun	Chungbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL302	<i>lycopersici</i>	Cheongwon-gun	Chungbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL303	<i>lycopersici</i>	Cheongwon-gun	Chungbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL306	<i>lycopersici</i>	Cheongwon-gun	Chungbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL401	<i>lycopersici</i>	Puyo-gun	Chungnam	<i>Lycopersicon</i>
FL402	<i>lycopersici</i>	Puyo-gun	Chungnam	<i>Lycopersicon</i>
FL403	<i>lycopersici</i>	Puyo-gun	Chungnam	<i>Lycopersicon</i>
FL404	<i>lycopersici</i>	Puyo-gun	Chungnam	<i>Lycopersicon</i>
FL502	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL504	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL505	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL506	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL507	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL508	<i>lycopersici</i>	Kyungju-shi	Kyeongbuk	<i>Lycopersicon</i>
FL509	<i>lycopersici</i>	Dalseong-gun	Taegu-city	<i>Lycopersicon</i>
FL511	<i>lycopersici</i>	Dalseong-gun	Taegu-city	<i>Lycopersicon</i>
FL602	<i>lycopersici</i>	Kimhae-shi	Kyeongnam	<i>Lycopersicon</i>
FL603	<i>lycopersici</i>	Kimhae-shi	Kyeongnam	<i>Lycopersicon</i>
FL606	<i>lycopersici</i>	Kimhae-shi	Kyeongnam	<i>Lycopersicon</i>
FL607	<i>lycopersici</i>	Kimhae-shi	Kyeongnam	<i>Lycopersicon</i>
FS402	<i>sesami</i>	Taeduk-gu	Taejon-city	<i>Sesamum</i>
FS407	<i>sesami</i>	Kongju-shi	Chungnam	<i>Sesamum</i>
FS408	<i>sesami</i>	Kongju-shi	Chungnam	<i>Sesamum</i>
FS411	<i>sesami</i>	Kongju-gun	Chungnam	<i>Sesamum</i>
FCU404	<i>cucumerinum</i>	Cheongyang-gun	Chungnam	<i>Cucumis sativus</i>
FCU405	<i>cucumerinum</i>	Cheongyang-gun	Chungnam	<i>Cucumis sativus</i>
FF408	<i>fragariae</i>	Nonsan-gun	Chungnam	<i>Fragaria</i>
FF803	<i>fragariae</i>	Hampyeong-gun	Junnam	<i>Fragaria</i>
FA401	<i>garlic</i>	Yusung-gu	Taejon-city	<i>Allium sativum</i>
FA402	<i>garlic</i>	Yusung-gu	Taejon-city	<i>Allium sativum</i>

DNA 분리

공시균주들을 50 ml의 PDB 배지에 접종하고 27°C에서 5일간 정처배양한 후 균사체를 여러겹의 가아제로 걸러 -40°C에 얼린 다음 냉동건조 시켰다. 그리고 total genomic DNA를 냉동건조된 균사체로부터 Kistler 등의 방법에 따라 분리하고 -20°C에 보관하였다(Kistler 등, 1991).

RFLP probe

공시된 probe는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*의 genomic DNA 단편으로 재조합된 pFC46, pFC52 그리고 pFC57 클론을 이용하였다(Kim 등, 1994).

Southern hybridization

분리된 공시균의 genomic DNA를 *Hind*III로 절단한 후 0.7% agarose gel에 22V로 19시간 동안 전기영동하고 capillary action을 이용한 방법에 따라 Schleicher & Schunell사의 Nytran membrane으로 DNA를 전이시켰다(Sambrook 등, 1989). 그리고 labelling된 probe DNA는 기질로서, dig-dUTP가 첨가된 deoxynucleotides와 primer인 random hexanucleotides 및 DNA polymerase I인 Klenow fragment를 이용해 합성되었다. Hybridization은 65°C에서 17시간 동안 실시하였고 dig-dUTP의 immunological detection은 non radioactive method인 Boehringer-Mannheim사의 Dig-detection kit을 이용하여 제조 회사의 권장 방법에 따라 실시하였다.

집괴분석

각 probe의 Southern hybridization을 통해 얻어진 결과를 총괄하여 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 나열하였다. 그리고 Ntsys-pc를 이용하여 유사도(coefficient; UN1)를 구하고 비가중평균결합법(UPGMA)에 의한 집괴분석을 실시하여 RFLP에 따른 각 균주의 유연관계를 분석하였다(Rohlf 등, 1988).

결 과

공시균의 Genomic DNA를 분리하여 *Hind*III

로 절단한 후 전기영동하여 각각의 pFC clone을 probe로 사용해 southern hybridization을 실시하였다.

Probe pFC46은 각 분화형별로 독특한 RFLP를 나타내었으며 같은 분화형간에는 거의 동일한 양상을 볼 수 있었다. f. sp. *lycopersici*의 경우 전 공시균주가 5.1 kb, 2.8 kb, 1.7 kb 그리고 그 이하의 부근에 동일한 밴드를 형성하였고 이것은 다른 분화형의 것들과 뚜렷한 차이가 나타났다. 다른 분화형에서도 동일 분화형내 균주들의 밴드 패턴은 서로 유사했으며 분화형간에는 서로 다른 차이를 잘 나타내었다(Fig. 1A).

pFC52 clone은 밴드의 수는 다소 적으나 pFC46과 마찬가지로 같은 분화형의 균주들은 서로 동일한 위치에 밴드를 형성하여 분화형간의 구분이 확인하였다. 한편 f. sp. *sesami*에서 일부 균주가 다소 밴드양상의 차이를 보였지만 다수의 밴드는 서로 일치하였다(Fig. 1B).

Repetitive copy clone인 pFC57은 위 두 클론의 경우와 다른 독특한 RFLP를 나타내었다. 즉 f. sp. *lycopersici*에 대하여 14.1 kb부터 5.1 kb에 걸쳐 4~5개의 특이적인 밴드를 형성하였다. 이러한 현상은 오직 f. sp. *lycopersici*에서만 나타났으며 다른 분화형에서는 찾아 볼 수 없었다. 또한 다른 두 클론에 의해 볼 수 없었던 f. sp. *lycopersici* 내에서의 차이를 보여 14.1 kb 이하 2번째 위치에서 밴드의 유무를 달리하였다. 따라서 변이가 거의 없어 보이는 f. sp. *lycopersici*내에 극히 미미한 polymorphism이 존재하고 있었다. 그리고 f. sp. *sesami*는 역시 pFC52에 의한 분석시와 같이 밴드 패턴에 비교적 많은 차이를 보였으나 다른 분화형의 균주들은 분화형내에서 동일한 밴드 양상을 나타내었다(Fig. 2).

한편 pFC46, pFC52 그리고 pFC57의 Southern hybridization을 통해 얻어진 밴드 양상을 종합해 집괴분석을 실시하였다. 동일한 분화형에 속하는 균주들이 하나의 유사집단을 이루었으며 분화형간에는 서로 다른 유사군으로 나타났다. 즉 f. sp. *lycopersici* 균주들은 97%의 매우 높은 유사도로 유사군을 형성하였으며 f. sp. *sesami*는 그와는 다른 별도의 집단으로서 95%의 유사군을 형성하였고

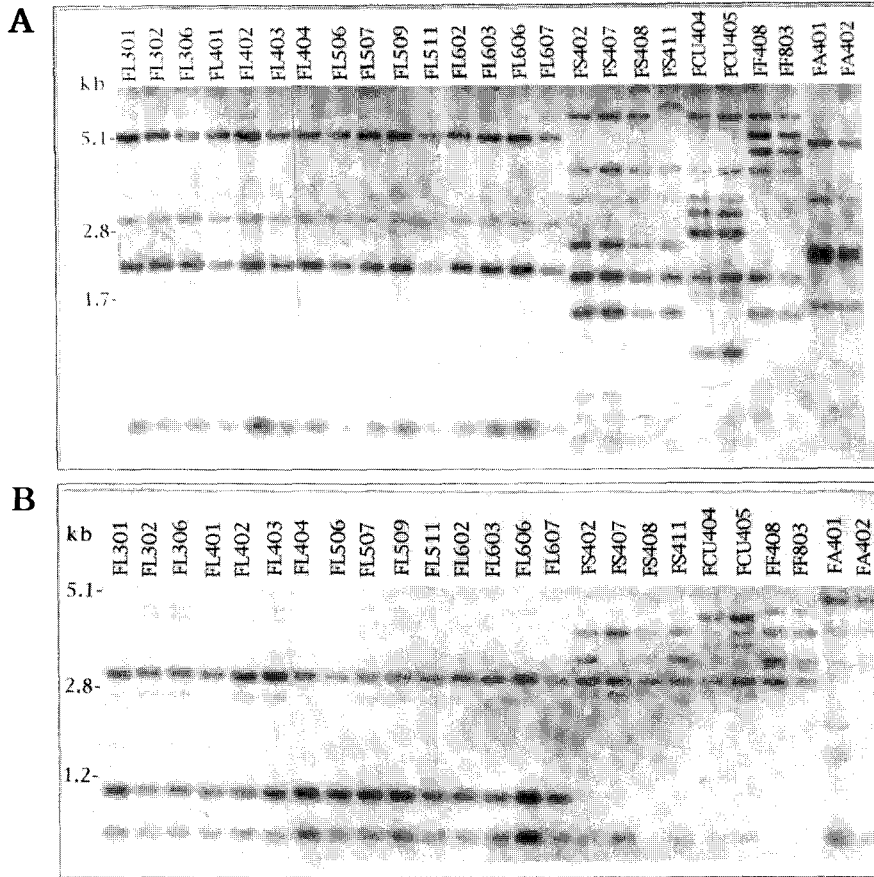


Fig. 1. Southern hybridization of moderate repetitive copy clones pFC46 (A) and pFC52 (B) to genomic DNAs from 5 formae speciales of *Fusarium oxysporum*. DNA was digested with *Hind*III.

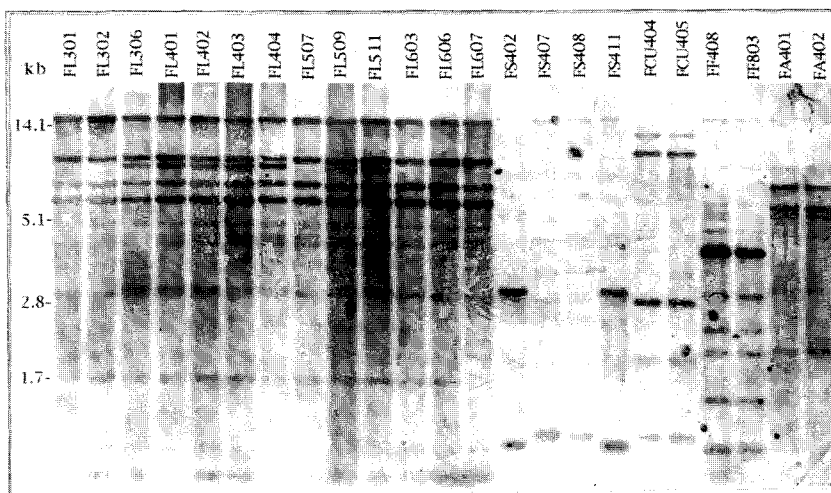


Fig. 2. Southern hybridization of a repetitive copy clone pFC57 to genomic DNAs from 5 formae speciales of *Fusarium oxysporum*. DNA was digested with *Hind*III.

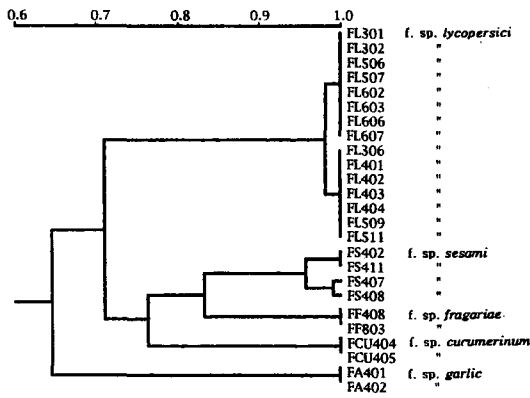


Fig. 3. UPGMA dendrogram constructed on the basis of relatedness between strains of *Fusarium oxysporum* formae speciales strains as revealed by RFLP analysis.

기타 다른 분화형들도 공시 균주 수는 적었으나 제각기 100%의 동일한 집단을 이루었다(Fig. 3). 한편 *f. sp. lycopersici*의 균주들이 만든 두개의 유사군은 국내의 수집 지역간 차이와 무관하여 국내의 각 지역별 균주가 두 유사군간에 혼재하고 있었다.

고 찰

일찌기 Kistler 등은 십자화과 작물에 병원성인 세종류의 *F. oxysporum* 분화형에 대해 mtDNA의 RFLP를 관찰함으로써 RFLP가 분화형과 직접적으로 연관되어 있음을 지적하였다(Kistler 등, 1987). 그리고 Appel 등도 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*의 rDNA에 대한 RFLP 분석을 시도하여 그들의 지리적 분포 및 병원성에 따른 유연관계를 조사하고 13개의 IGS type으로 나눈바 있다(Appel 등, 1995). 그러나 Edel 등에 따르면 total genomic DNA에 대한 RFLP 분석법이 위와 같은 rDNA 등에 대한 RFLP 분석법보다 민감하여 60개의 *F. oxysporum* 균주를 40여개의 변이주로 구별해낼 수 있었다고 하였다(Edel 등, 1995). 본 실험은 위와 같이 보다 민감한 차이를 나타내는 것으로 알려진 total genomic DNA상의 RFLP에 근거하여 국내 *Fusarium oxysporum*간 유사도를 분석한 결과 같은 분화형일 경우 서로의 유연관계가 매우 가까울 뿐더러 서로 다른 분화형간에는 유연관계가

상대적으로 멀어 RFLP상으로도 분화형간의 구분이 확연함을 알 수 있었다.

또한 본 실험에서 이용된 probe DNA중 pFC46 클론은 분화형의 구별에 매우 유용한 특성을 나타내었으며 pFC52클론도 분화형간의 차이를 뚜렷하게 반영할 수 있었다. 따라서 이들은 병원성 검정과 더불어 *F. oxysporum*의 다양한 분화형을 조사하는 RFLP marker로서의 이용이 가능하리라 여겨진다. 또한 pFC57 클론도 국내의 *f. sp. lycopersici*에 대해 다른 분화형과 확실히 구분되는 독특한 밴드양상을 나타내므로 이 분화형의 검정에 유용하리라 기대된다.

한편 국내의 *f. sp. lycopersici* 균주들간에 작은 두 그룹으로 나뉘어 나타났으나 이것은 pFC57 클론에 의한 14.1 kb 미만 3번째 밴드 위치에서 1개의 밴드가 유무를 달리한 결과에 의한 것일 뿐이며 그로 인한 차이는 국내의 분리 지역과 무관하였다. 또한 국내의 균주들은 pFC57 이외의 pFC46과 pFC52 클론에서 모두 동일한 밴드를 나타냈으며 그결과 집괴분석시에도 97%의 높은 유사군으로 나타났다. 따라서 국내 *f. sp. lycopersici* 균주들은 충남북 및 경남북등지의 분리 지역에 관계없이 유전적으로 매우 유사한 집단인 것으로 추정된다. 기타 *f. sp. cucumerinum*, *fragariae*, *garlic* 등도 같은 분화형내의 변이가 적어 서로 다른 지역에 속하는 두 *f. sp. fragariae* 균주의 경우 RFLP에 차이가 없이 동일해 보였다. 하지만 *f. sp. sesami* 균주들은 같은 지역 분리군임에도 서로 다른 RFLP상의 차이를 나타내어 이들은 다른 분화형에 비해 보다 변이가 다양한 것으로 여겨진다.

그러나 RFLP에 근거한 지리적 개체군의 차이가 Kistler 등에 의해 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*에서도 나타난 바 있어(Kistler 등, 1991) 국내에 분포하는 균들이 지리적, 생태적으로 차이가 있는 외국의 균주와는 아주 다를 가능성도 배제할 수 없어 이들에 대한 분석이 추후 요망된다. 또한 Kuninaga 등 역시 *f. sp. lycopersici*에서 VCG가 다를 경우 유연관계가 다소 멀다고 한 바 있으며(Kuninaga 등, 1992) Elias 등도 *f. sp. lycopersici*에서 VCG 0030, 0031 그리고 0032간에 뚜렷한 차이가 있으며 같은 VCG군내에서는

RFLP 패턴이 서로 유사하다고 하였다(Elias 등, 1993). 따라서 국내의 f. sp. *lycopersici* 균주들이 RFLP 상에서 매우 유사한 하나의 그룹으로 나타난 것은 이들이 모두 동일한 하나의 체세포화합성군이기 때문일 가능성도 높다고 할 수 있어 앞으로 동일 분화형내 보다 많은 수의 균주들에 대한 분석이 필요하리라 본다.

적 요

재조합 DNA probe를 이용하여 국내 *Fusarium oxysporum* 분화형간의 분류 가능성을 탐색하고 그들의 유전적 변이를 분석하였다. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *cucumerinum*, *fragariae*, *garlic*, *sesami* 등 5종의 분화형을 공시하여 RFLP 분석을 실시하였다. Repetitive copy clone인 세종의 재조합 클론 pFC46, pFC52, pFC57을 이용하여 *HindIII*로 처리한 *F. oxysporum*의 genomic DNA에 대해 southern hybridization한 결과 나타난 밴드의 양상을 분화형에 따라 차이가 명확히 밝혀져 이들을 이용한 분류가 가능하였다. 또한 RFLP 분석 결과 f. sp. *sesami*는 다른 분화형에 비해 다소 변이가 심했으나 다른 분화형들은 변이가 거의 없어 f. sp. *sesami*를 제외한 f. sp. *lycopersici* 등 4종의 *Fusarium oxysporum* 분화형의 균주들은 채집 지역에 관계없이 대체로 유전적으로 안정되어 있는 것으로 판단되었다. Hybridization 밴드의 양상에 기초하여 유전적 유연관계를 집괴 분석한 결과 각 분화형별로 유사도가 매우 높게 별도의 유사군을 형성하였다.

참고문헌

- Appel, D. and Gordon, T. R. 1995. Intraspecific variation within population of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Exp. Mycol.* **19**: 120-128.
- Bosland, P. W. and Williams, P. H. 1987. An evaluation of *F. oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Can. J. Bot.* **65**: 2067-2073.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* **77**: 1640-1646.
- Edel, V., Steinberg, C., Avelange, I., Laguerre, G. and Alabouvette, C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* **85**: 579-585.
- Elias, K. S., Zamir, D., Lichtman-Pleban, T. and Katan, T. 1993. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **6**: 565-572.
- Gerdemann, J. W. and Finley, A. M. 1951. The pathogenicity of race 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* **41**: 238-244.
- Grattage, R. and O'Brien, R. G. 1982. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Dis.* **66**: 165-166.
- Kim, H. G., Kim, Y. T. and Yu, S. H. 1994. Potential application of recombinant DNA probes for relatedness analysis of *Fusarium oxysporum*. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**: 1-6.
- Kistler, H. C., Bosland, P. W., Benny, U. 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* **77**: 1289-1293.
- Kistler, H. C., Momol, E. A. and Benny, U. 1991. Repetitive genomic sequence for determining relatedness among strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 331-336.
- Kuninaga, S., Yokosawa, R. 1992. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **33**: 449-495.
- Manicom, B. Q., Bar-Joseph, M., Rosner, A., Vignodsky-Haas, H. and Kortze, J. M. 1987. Potential application of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the Fusaria. *Phytopathology* **77**: 669-672.
- Manicom, B. Q., Bar-Joseph, M., Kortze, J. M. and Bekcer M. M. 1990. A restriction frag-

- ment length polymorphism probe relating vegetative compatibility groups and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytopathology* **80**: 336-339.
- Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**: 179-183.
- Rohlf, F. J. 1988. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.50. Applied Biostatistics Inc.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 2nd ed. Cold spring harbor press. Cold spring harbor, NY.