

## 기주특이적 독소를 생성하는 *Alternaria* 병원균군의 RAPD 분석

김병련 · 강희완<sup>1</sup> · 유승헌\* · 伊藤靖夫<sup>2</sup> · 甲元啓介<sup>2</sup>  
충남대학교 농과대학 응용생물화학학부, <sup>1</sup>농업과학기술원 세포유전과, <sup>2</sup>日本 鳥取大學農學部

### RAPD Analysis of Host-specific Toxin (HST) Producing *Alternaria* species

Byung Ryun Kim, Hee Wan Kang<sup>1</sup>, Seung Hun Yu\*,  
Yasuo Itoh<sup>2</sup> and Keisuke Kohmoto<sup>2</sup>

Division of Applied Biology and Chemistry, College of Agriculture, Chungnam National University,  
Taejeon 305-764, Korea

<sup>1</sup>Cytogenetics Division, National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA,  
Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama, Tottori 680, Japan

**ABSTRACT:** RAPD analysis was performed from four host-specific toxin (HST) producing *Alternaria*, i.e., *A. kikuchiana*, *A. mali*, *A. longipes* and *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, nonpathogenic *A. alternata* and *A. brassicicola* to assess their phylogenetic relationship. DNA polymorphism was detected among species (pathotypes) of HST producing *Alternaria* by PCR amplification and differentiation of the species was recognized by RAPD analysis. Primer OPA-02 was the most profitable among 7 notified primers for differentiation of the HST producing *Alternaria* species. UPGMA analysis of the RAPD bands from *Alternaria* spp. revealed that HST producing *Alternaria* and nonpathogenic *A. alternata* are closely related

**Key words:** *Alternaria*, HST, Pathotype, RAPD.

*Alternaria*속의 균류는 각종 농작물의 잎, 줄기, 열매 등에 침입하여 점무늬병, 잎마름병, 검은무늬병 및 겹등근무늬병 등 여러 종류의 질병을 유발시킬 뿐 아니라, 각종 작물의 종자와 저장 농산물을 감염, 또는 오염시켜 피해를 주기도 하는 매우 중요한 균이다. 이들 *Alternaria*속의 병원균 중에는 기주특이적 독소(host-specific toxin, HST)를 생성하는 7종의 식물병원균이 보고되어 있다(6, 14). 배 검은무늬병균(*Alternaria kikuchiana*), 사과 점무늬낙엽병균(*A. mali*), 딸기 검은무늬병균(*A. alternata*), 토마토 줄기마름병균(*A. alternata* f. sp. *lycopersici*), 레몬 갈색점무늬병균(*A. citri*), tangerine의 갈색점무늬병균(*A. citri*), 담배 붉은별무늬병균(*A. longipes*) 등이 그것인데 이들은 각기 고유한 HST를 분비하여 명확한 기주범위를 나타내는 병원성을 발휘한다. 이들 HST 생성 *Alternaria* 균들은 모두 Neergaard의 *Alternaria* 분류체계의 장연쇄군(Longicatenate)에 속하며(12) 분생포자의 형태가 유사하다. 또한 환경 조건에 따라 형태적인 변이가 심하기 때문에 분류, 동정이 어려운 경우가 많다.

Lucas(10)는 담배 붉은무늬병균(*A. longipes*)과 비병원성

*A. alternata*의 형태적 특징이 유사하므로 *A. longipes*를 *A. alternata*로 개명하여야 한다고 주장하였고, 일본의 Nishimura와 Kohmoto 등은(13, 14) *A. longipes* 뿐 아니라 *A. kikuchiana*, *A. citri*, *A. mali* 등 HST 생성 *Alternaria* 병원균은 모두 그 형태적 특징이 비병원성 *A. alternata*와 일치한다는 것을 관찰해 이들이 *A. alternata*의 병원성 획득 변이 계통일 것으로 생각하였다. 따라서 종래 사용되어온 특정한 종명(種名) 대신에 이들을 모두 *A. alternata*로 통일시키고 대신에 하위 분류로서 특정 식물에 병원성을 나타내는 병원형(pathotype)으로서 명명할 것을 제창 하였다(6, 13, 14)(Table 1).

그러나 *Alternaria* 분류 전문가인 Simmons(18)는 *A. longipes*와 *A. alternata*는 형태적으로 분명히 차이가 있는 다른 종이라고 보고하였으며 최근 Yu(22)도 *A. longipes*는 *A. alternata*에 비하여 beak가 긴 분생포자를 형성한다고 보고하였다. Nishimura와 Kohmoto의 pathotype system은 일본을 비롯한 일부 지역에서 사용되고 있으나 아직 각국의 식물병리학자들은 기존의 종명을 그대로 사용하고 있는 경우가 많아 균의 동정 및 분류에 혼동을 야기하는 경우가 많다.

최근 식물병원균류의 분류에 분자생물학적 방법이 도

\*Corresponding author.

**Table 1.** *Alternaria alternata* pathotype system proposed by Nishimura and Kohmoto

Pathotype of <i>A. alternata</i> (Synonym)	Disease	Host	Toxin
Apple pathotype ( <i>A. mali</i> )	Leaf blotch of apple	Apple cv. Starking	AM-toxin
Strawberry pathotype ( <i>A. alternata</i> )	Black sopt of strawberry	Strawberry	AF-toxin
Japanese pear pathotype ( <i>A. kikuchiana</i> )	Black spot of Japanese pear	Pear cv. Nijisseiki	AK-toxin
Rough lemon pathotype ( <i>A. citri</i> )	Brown spot of rough lemon	Rough lemon	ACR-toxin
Tangerine pathotype ( <i>A. citri</i> )	Brown spot of tangerine	Tangerine	ACT-toxin
Tobacco pathotype ( <i>A. longipes</i> )	Brown spot of tobacco	Tobacco	AT-toxin
Tomato pathotype ( <i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> )	Stem canker of tomato	Tomato cv. First	AL-toxin

입되면서 고전적인 형태학적 분류의 제한점을 해결하려는 노력이 시도되고 있다. *Alternaria*의 계통분류에 관하여 Kuninaga와 Yokozawa는 DNA-DNA 상동성 분석으로(8), Kusaba와 Tsuge는 rDNA를 probe로 한 RFLP 분석으로(9), Petrunank와 Christ는 starch gel 전기영동으로(15), 高 등은 rDNA ITS영역의 염기서열분석으로(7) 유전자 분석을 시도하였다. 그러나 이들 대부분이 특정 HST를 생성하는 1~2종의 병원형(pathotype)과 비병원성 *Alternaria*를 비교하는 단편적인 분석으로 각각의 병원형에서 많은 균주를 공시한 종합적인 분석이 없고 특히 RAPD 분석에 의한 *Alternaria* 균의 분류에 관한 보고는 없다. 따라서 본 연구는 한국 및 일본에서 분리한 HST 생성 *Alternaria* 균들을 공시하여 이들의 RAPD 분석의 유전자 분석 방법으로 HST를 생성하는 각 병원균의 분류 및 균주간의 유연 관계를 계통분류학적으로 밝히고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

**공시균주.** 기주특이적 독소(HST)를 생산하는 한국산 *Alternaria* 균주와 일본산 *Alternaria* 균주를 공시하였다(Table 2). 한국산 *Alternaria* 균주는 각각의 기주식물의 병반부위에서 단포자분리하여 병원성을 확인한 후 충남대학교 농생물학과에서 보관중인 균주이며, 일본산 균주는 일본의 Tottori대학 식물병리학 연구실에 보관중인 균주를 공시하였으며 공시균주의 DNA를 분양받아 사용하였다. 영국 IMI로부터 분양받은 비병원성 *Alternaria alternata* 균주와 양배추에서 분리한 *A. brassicicola*를 비교종으로 공시하였다.

**DNA 분리.** 공시균주를 PDA slant에 접종하여 25°C에서 3일간 배양한 후 균사 소량을 PD broth에 접종, 125 rpm으로 25°C에서 2일간 진탕배양하여 균사체를 얻었다. 균사체는 동결 건조 후 액체질소로 급냉, 마쇄한 뒤 extraction buffer(LiCl 100 µM, EDTA 10 µM, Tris-Cl (pH 7.4) 10 µM, 0.05% SDS)에 현탁하고 이 현탁액을 phenol:chloroform(1:1)으로 추출하여 DNA를 얻었다(17). 분리된 DNA는 흡광도를 측정하여 정량한 뒤 4°C에 보관하였다.

**Primers.** 본 실험에 사용된 10-base oligonucleotide primer 중 GT-O2, RC-O2, RC-O7, RC-O8은 Nippon Gene Co., LTD에 의뢰하여 합성하였고, OPA-01~20은 Operon Technologies, Inc., Alameda, CA로부터 구입하여 사용하였다. Primer의 선발을 위해 각각의 종으로부터 2균주씩을 선택하여 25개의 primer로 RAPD를 행하였고, 이 결과를 토대로 중간 다형(polymorphism)을 보이는 7개의 primer를 선발하였다(Table 3).

**PCR 조건.** DNA 증폭을 위한 PCR stock은 template DNA 15 ng, primer 200 nM, dNTPs 125 µM, *Taq* polymerase(TaKaRa Biochemicals, Japan) 0.5unit, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001%(w/v) gelatin에 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 최종 volume을 20 µl로 조정하였다(20). DNA의 증폭에 사용된 PCR증폭기는 Perkins/Elmer Cetus gene Amp PCR System 9600(Norwalk, CT)를 사용하였고, DNA 증폭은 먼저 pre-heating을 94°C로 3분간 실시하고, denaturation 1분(94°C), annealing 1분(35°C), extension 3분(72°C)으로 40 cycle을 실시하였다(4). PCR 반응 이후, 15 µl의 생성물을 1.2% agarose gel에서 35V, 8시간 동안 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다.

**RAPD bands의 분석.** 각 균주의 primer에 의한 증폭 pattern의 비교는 동일한 크기의 band 존재 여부로 행하였고, 같은 크기의 band는 동일한 것으로 취급하였다. 균주간의 유사도(similarity coefficient)는 다음의 공식으로 계산하였다.

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

F: Similarity coefficient

N<sub>xy</sub>: the number of PCR products shared by isolates X and Y

N<sub>x</sub>+N<sub>y</sub>: total numbers of PCR products in isolates X and Y, respectively

Dendrogram은 위의 유사도 값을 근거로 UPGMA(un-weighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용 작성하였다. 유사도와 dendrogram의 작성은 NTSYS-pc program Ver. 1.70(16)을 이용하였다.

Table 2. Isolates of *Alternaria* spp. used in this study

Code	Isolates	Species	Host	Origin	Year isolated
1	M-62	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
2	M-69	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
3	M-70	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
4	M-71	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
5	M-72	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
6	M-73	<i>A. mali</i>	Apple	Toyama, Japan	1974
7	M-87	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1986
8	M-88	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1986
9	M-89	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1986
10	O-153	<i>A. mali</i>	Apple	Nagoya, Japan	1971
11	O-154	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1971
12	O-156	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1974
13	O-157	<i>A. mali</i>	Apple	Nagano, Japan	1974
14	AM-17	<i>A. mali</i>	Apple	Taejon, Korea	1989
15	AM-28	<i>A. mali</i>	Apple	Taejon, Korea	1989
16	O-274	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Akasaki, Japan	1993
17	O-275	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Akasaki, Japan	1993
18	O-276	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Akasaki, Japan	1993
19	No.15A	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Japan	1989
20	K-1	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Koyama, Japan	1971
21	K-2	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Koyama, Japan	1971
22	K-3	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Koyama, Japan	1971
23	K-4	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Koyama, Japan	1971
24	K-5	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Koyama, Japan	1971
25	23	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Akasaki, Japan	1994
26	AK-11	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Yesan, Korea	1988
27	AK-21	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Yesan, Korea	1988
28	AK-42	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Yesan, Korea	1989
29	AK-61	<i>A. kikuchiana</i>	Pear	Yesan, Korea	1989
30	O-202	<i>A. longipes</i>	Tobacco	Koyama, Japan	1980
31	O-203	<i>A. longipes</i>	Tobacco	Koyama, Japan	1980
32	O-204	<i>A. longipes</i>	Tobacco	Koyama, Japan	1980
33	AL-25	<i>A. longipes</i>	Tobacco	Boeun, Korea	1980
34	AL-26	<i>A. longipes</i>	Tobacco	Boeun, Korea	1980
35	O-228	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomato	Nagoya, Japan	1984
36	O-229	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomato	Nagoya, Japan	1984
37	As-27	<i>A. alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomato	Tottori, Japan	
38	IMI-89343	<i>A. alternata</i>	Nonpathogenic	IMI Culture Collection	
39	BC-2	<i>A. brassicicola</i>	Cabbage	Taejon, Korea	1996

## 결 과

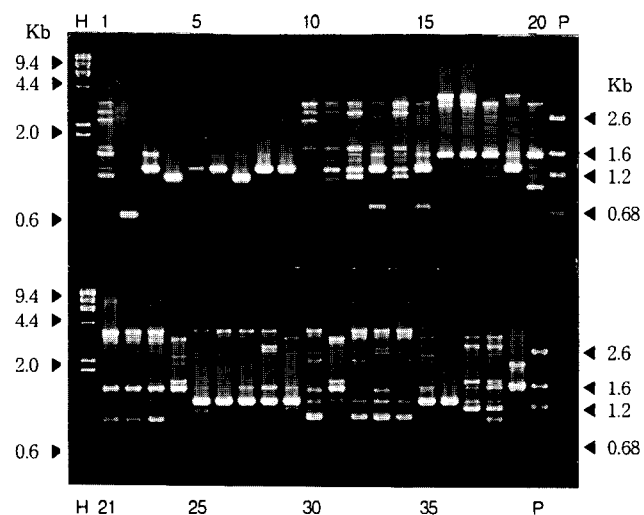
선발된 primer에 대한 증폭생성물은 Table 3에서와 같이, primer 별로 증폭된 band의 수에 차이를 보였다. 공시한 39개 균주에서 생성된 총 band의 수는 343개였으며, OPA-13 primer에서 77개로 가장 많았고 OPA-02 primer에서 43개로 가장 적었다. 또한 균주들의 평균 증폭 band는 OPA-02에서 6개이고 이외의 공시 primer에서는 9~12개로 비슷한 결과를 나타내었다. 균주별 가장 적은 증폭 band 수는 2개였다.

OPA-18 primer에 의한 증폭생성물은 Fig. 1에서 보는바와 같이 종간 특이한 증폭 pattern은 나타나지 않았다. *A.*

*mali* 균주들은 균주간에 다양한 증폭 band를 갖고 있었지만 *A. kikuchiana* 균주들의 증폭 pattern은 O-274~O-276균주, K-1~K-5균주, 그리고 23~AK-61균주의 세 group으로 구분할 수 있었다. 특히 23~AK-61 균주들의 증폭 band는 균주간에 매우 유사하였다. *A. longipes* 균주들도 서로 유사하게 증폭되었지만 O-203 균주는 *A. kikuchiana* K-5 균주와 유사한 증폭 pattern을 나타내었다. 이런 경향은 OPA-03, OPA-04, OPA-05 primer에서도 나타났다. *A. alternata* f. sp. *lycopersici* 균주중에서 O-228과 O-229는 동일한 증폭 band를 보인 반면 As-27은 이들과는 다른 증폭 pattern을 나타내었는데 이는 OPA-03 primer에서도 마찬가지였다.

**Table 3.** Primers used in this study, and the number of RAPD bands generated from *Alternaria* isolates

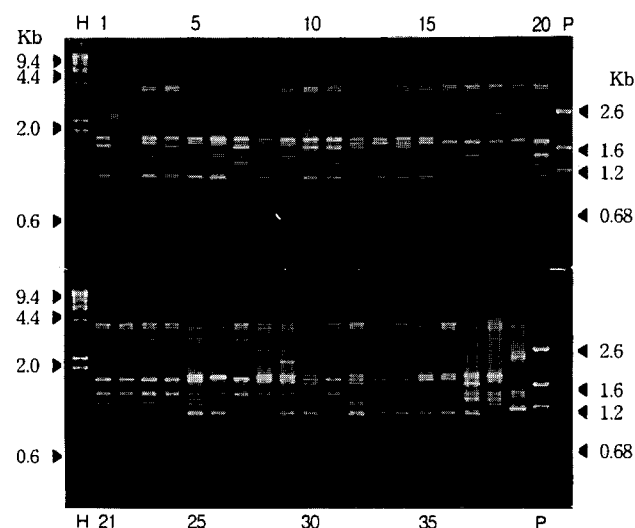
Primer	Sequence (5' to 3')	(G+C) content (%)	RAPD bands			
			Total	One isolate		
				Max.	Min.	Average
GT-O2	TGGTGGGTCC	70	44	17	6	8.51
OPA-02	TGCCGAGCTG	70	43	12	3	6.05
OPA-03	AGTCAGCCAC	60	54	14	6	9.59
OPA-04	AATCGGGCTG	60	63	15	5	10.48
OPA-05	AGGGGTCTTG	60	70	17	2	8.64
OPA-13	CAGCACCCAC	70	77	18	5	12.26
OPA-18	AGGTGACCGT	60	69	16	4	10.28



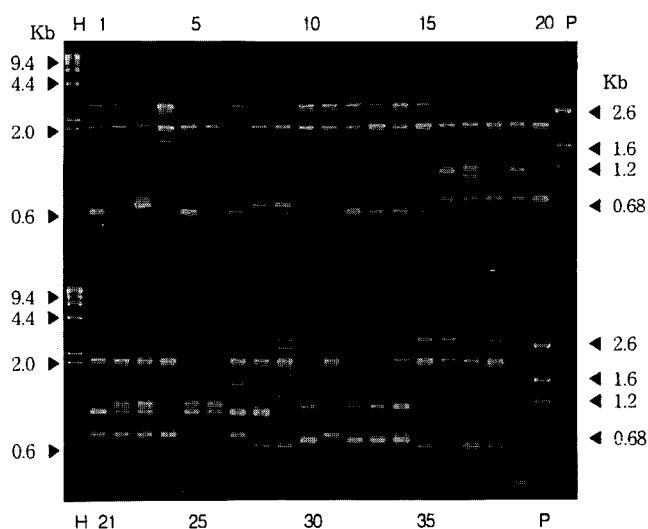
**Fig. 1.** Random amplified polymorphic DNA from 39 isolates of *Alternaria* spp. using primer OPA-18. Lanes marked 1 to 39 are isolates listed in Table 2. H indicates the molecular weight markers of  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III and P indicates the pGEM marker.

GT-O2 primer에 의한 증폭 생성물은 Fig. 2에서와 같이 전 균주에 걸쳐 거의 동일한 증폭 pattern을 보여주고 있으나 비병원성 *A. alternata*인 IMI-89343균주에서는 0.9 kb의 band는 존재하지 않았고, *A. brassicicola*인 BC-2균주는 1.1 kb band의 존재로 다른 종과 구별되었다.

OPA-02 primer에 의한 증폭생성물들은 Fig. 3에서와 같이 *A. mali*, *A. kikuchiana*, *A. longipes*, *A. alternata* f. sp. *lycopersici* 등 각 종별로 구별되는 증폭 pattern을 보여주었다. 2.1 kb의 band는 비병원성 균주를 포함한 전 균주에서 동일하게 나타났으며, *A. mali* 균주들은 0.65 kb의 특이적인 band가 관찰되었고 *A. kikuchiana* 균주들은 0.75 kb의 band로 *A. mali*와 구분되었다. 그러나 23, AK-11, AK-42, AK-61 균주들에서는 0.75 kb의 band가 존재하지 않았다. *A. longipes* 균주들은 0.68 kb의 특이적인 band를 갖고 있었지만 O-203 균주는 앞의 primer들과 같이 *A. kikuchiana*



**Fig. 2.** Random amplified polymorphic DNA from 39 isolates of *Alternaria* spp. using primer GT-O2. Lanes marked 1 to 39 are isolates listed in Table 2. H indicates the molecular weight markers of  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III and P indicates the pGEM marker.



**Fig. 3.** Random amplified polymorphic DNA from 39 isolates of *Alternaria* spp. using primer OPA-02. Lanes marked 1 to 39 are isolates listed in Table 2. H indicates the molecular weight markers of  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III and P indicates the pGEM marker.

K-5와 증폭 pattern이 동일하였다. *A. brassicicola*(BC-2)는 band pattern에 있어서 다른 균주들과 큰 차이를 보여주었다.

공시한 7개 primer에 의한 증폭생성물을 종합하여 UPGMA 분석을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. 작성된 dendrogram에서 각 종들은 각각 독립된 cluster를 형성하였다. 그러나 *A. longipes* 균주들은 *A. kikuchiana* 균주들과 비교적 유연관계가 높았고 특히 O-203 균주는 *A. kikuchiana* 균주

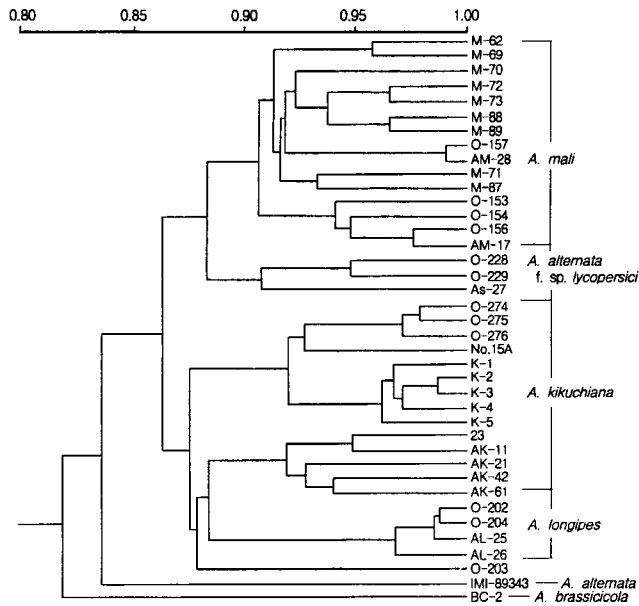


Fig. 4. UPGMA dendrogram of *Alternaria* isolates derived from RAPD profiles obtained by 7 primers used in this study.

들과 유연관계가 더 가까운 것으로 나타났다. 비병원성균인 *A. alternata* IMI-89343균주와 *A. brassicicola* BC-2균주는 outgroup을 형성하였으며 특히 *A. brassicicola*는 가장 먼 유연관계를 나타내었다.

## 고 찰

식물병원균의 유전자 수준에서의 분류법 중 RAPD 분석법은 비록 재현성의 문제점이 있기는 하나 반응이 신속하고 방법이 간단하므로 최근 많은 연구사례가 보고되고 있다. Welsh와 McClelland(19), Williams(21) 등은 임의적인 염기배열을 갖는 단일 primer에 의한 genomic DNA의 증폭기술을 근거로 유전자의 다양성 평가에 관한 간단한 방법을 제시하였다. 식물병원균류의 경우 *Fusarium*속 균의 RAPD 분석에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉 Kelly(5) 등은 이집트 콩에 발생하는 *F. oxysporum* f. sp. *ciceria*의 병원성 구분에 RAPD 분석법을 이용하여 황화증상과 위조증상의 병징과 정확히 일치하는 두개의 group으로 구분하였다. Manulis(11) 등은 이스라엘 내에 존재하는 카네이션 시들음병균인 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*의 race 구분에, Assigbetse(2) 등은 목화에 병을 일으키는 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*의 race 구분에 RAPD 분석법을 이용하였다. 또한 Crowhurst(3) 등은 미국과 뉴질랜드에 분포하는 *F. solani* f. sp. *cucurbitae*의 race 1과 2의 구분에 RAPD 분석법을 이용, 병원성 검정에 의한 기존의 race구분과 일치하는 결과를 얻었고, race의 판별이 불가능했던 균주들 까지도 그 race의 구분을 가능하게 하였다. 그러나

*Alternaria*균의 RAPD 분석에 관한 보고는 아직 없다.

본 연구에서는 HST 생성 *Alternaria* 병원균을 10 base의 primer로 PCR을 실시한 결과 각 primer별로 생성된 증폭 band의 수는 매우 다양하였다. 각각의 primer에서 종간의 특성을 명확히 구분할 수 있는 band pattern은 관찰되지 않았지만 각 종간의 grouping은 관찰되었다. 이것은 HST를 생성하는 *Alternaria* 병원균군의 개체군 유전 분석에 유용한 자료로서 활용될 수 있을 것이다. 또한 증폭 생성물은 primer에 따라 각 종의 특이적인 band의 수에 차이를 보였고, 또한 몇개의 특이적인 band를 제외하면 나머지 band들은 균주간, 종간 polymorphism을 나타내었다. RAPD band의 이러한 다양성은 기주특이적 독소를 생성하는 *Alternaria*속 균들의 유전적 다양성을 나타내 주고 있는 것으로 생각된다.

OPA-02 primer의 경우 그 증폭 pattern은 종간의 특성을 잘 나타내주고 있으며, 본 primer의 증폭생성물들만으로 dendrogram을 작성하였을 때에도 각 종별로 cluster를 형성하였다.

반면 GT-O2 primer의 증폭 band는 거의 대부분이 균주간 동일한 band들이었고 1~3개의 band만이 균주간 차이를 나타내었다. 이들 증폭 생성물들의 UPGMA 분석으로 작성된 dendrogram에서 HST 생성균들은 다른 primer에서 보다 높은 90% 정도의 유사도로서 group을 이루었고, 비병원성 균주와 *A. brassicicola*는 다른 primer에서 보다 낮은 유사도로서 outgroup을 형성하였다. 따라서 본 primer는 HST 생성균 이외의 *Alternaria*의 종간 구분에 유용할 것으로 생각된다.

*A. brassicicola*는 *A. alternata*와 같이 장연쇄군(Longicatentate)(12)에 속하며 소형의 분생포자를 형성하지만 분생포자의 형태적 특징이 *A. alternata*와는 차이를 나타내는 종인데 7종의 primer에 의한 증폭 생성물에서도 band pattern이 HST 생성균이나 비병원성 *A. alternata*와 큰 차이를 나타내어 이들 균간에는 유전적인 연관성이 낮은 것을 알 수 있었다.

증폭생성물에 대한 UPGMA 분석은 개별 primer에서보다 이들을 종합하였을 때 종간의 구분이 명확해짐을 알 수 있다. 또한 7개 primer에 대한 증폭 pattern을 종합한 dendrogram은 OPA-02 primer에서의 dendrogram과 가장 유사하므로 개별 primer로서 HST를 생성하는 *Alternaria* 종의 구별에는 OPA-02 primer가 적당한 것으로 생각되었다.

증폭생성물에 대한 UPGMA 분석은 HST를 생성하는 각종의 *Alternaria*가 각각의 독립된 cluster를 형성함을 나타낼 뿐 아니라 이들이 유전적으로 가까운 유연관계에 있음을 나타낸다. 즉 HST를 생성하는 *A. mali*, *A. alternata* f. sp. *lycopersici*, *A. kikuchiana*, *A. longipes*가 가까운 유연관계를 나타내었고 비병원성 *A. alternata*도 비록 outgroup을 형성하기는 하였지만 *A. brassicicola* 보다는 가까

운 유연관계를 나타내었다. 특히 *A. longipes*는 *A. alternata* 및 다른 HST 생성균들과는 형태적으로 차이가 있다는 보고가 있지만(18, 22) RAPD 분석 결과 유전적으로 *A. kikuchiana* 균주들과 유연관계가 매우 가까운 것으로 나타났다.

Kuninaga와 Yokozawa(8)는 HST 생성 *Alternaria* 균들의 DNA-DNA 상동성 분석에서 HST 생성 *Alternaria*와 비병원성 *A. alternata*는 80~95%의 상동성을 보인다고 하였고, Kusaba와 Tsuge(9), Adachi 등(1)은 *A. kikuchiana*의 rDNA를 probe로 하여 *Alternaria* 균들의 RFLP 분석을 실시한 결과 HST 생성균과 비병원성 *A. alternata*는 band pattern이 구분되지 않았고 다른 종의 *Alternaria*와는 확실히 구분되는 band pattern을 보인다고 하였다. 최근 高 등(7)도 HST 생성 *Alternaria* spp.의 rDNA의 ITS영역의 염기서열이 비병원성인 *A. alternata*의 염기서열과 서로 일치하였으며 *A. brassicicola*와는 30%의 염기서열 차이를 보인다고 하였다. 이상의 보고와 본 연구의 결과를 종합할 때 HST 생성 *Alternaria* 균들과 비병원성 *A. alternata*는 유전적으로 가까운 유연관계에 있는 균들임을 알 수 있었다.

## 요 약

기주특이적 독소(HST)를 생성하는 *Alternaria* 병원균의 분류 및 계통학적 유연관계를 규명하기 위하여 HST를 생성하는 *A. mali*, *A. kikuchiana*, *A. longipes*, *A. alternata* f. sp. *lycopersici* 등 4종의 *Alternaria*균과 비병원성 *A. alternata*, 그리고 비교균으로 *A. brassicicola*를 공시하여 RAPD 분석을 실시하였다. HST를 생성하는 *Alternaria* 균들은 PCR 증폭에 의하여 다양성이 인정되었으며 RAPD 분석으로 종(병원형)간의 구별이 가능하였다. 종의 구별에는 공시한 7종의 primer 중 OPA-02 primer가 가장 적당하였다. *Alternaria* spp.로부터 얻은 RAPD band의 UPGMA 분석 결과 HST를 생성하는 4종의 *Alternaria*균들은 매우 가까운 유연관계를 나타내었고 비병원성 *A. alternata*와도 가까운 유연관계를 나타내었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 한국과학재단 핵심전문연구과제(과제번호 961-0603-024-2)의 연구비로 수행된 결과의 일부입니다.

## 참고문헌

- Adachi, Y., Watanabe, H., Tanabe, K., Doke, N., Nishimura, S. and Tsuge, T. 1993. Nuclear ribosomal DNA as a probe for genetic variation in Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3197-3205.
- Assigbetse, K. B., Fernandez, D., Dubois, M. P. and Geiger, J. P. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Phytopathology* 84: 622-626.
- Crowhurst, R. N., Hawthorne, B. T., Rikkerink, E. H. A. and Templeton, M. D. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics* 20: 391-396.
- Dieffenbach, C. W., and Dveksler, G. S. 1995. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY. pp.53-62.
- Kelly, A., Alcalá-Jimenez, A. R., Bainbridge, B. W., Heale, J. B., Perez-Artes, E. and Jimenez-Diaz, R. M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84: 1293-1298.
- Kohmoto, K. 1987. Recent advances in studies of host-specific toxins, with special reference to *Alternaria* toxins. *Korea J. Plant Pathol.* 3: 43-53.
- 高昇柱, 洪承範, 姜熙玩, 劉勝憲, 柳震彰. 1997. Ribosomal DNA의 ITS영역 염기서열 분석에 의한 기주특이적독소 생성 *Alternaria* spp.의 계통분류학적 유연관계. *作物保護論文集* 39(2): 1-9.
- Kuninaga, S. and Yokozawa, R. 1987. Taxonomic study of plant pathogens on the basis of DNA sequence homology. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 53: 368-369.
- 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.
- Lucas, G. B. 1971. *Alternaria alternata*, the correct name for *Alternaria tenuis* and *Alternaria longipes*. *Tobacco Science* 37: 39-42.
- Manulis, S., Kogan, N., Reuven, M. and Ben-Yephet, Y. 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Phytopathology* 84: 98-101.
- Neergaard, P. 1945. Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Einar Munksgaard, Copenhagen. 560pp.
- Nishimura, S. 1980. Host-specific toxins from *Alternaria alternata*, problems and prospects. *Proc. Japan Acad.* 56B: 362-366.
- Nishimura, S. and Kohmoto, K. 1983. Roles of toxins in pathogenesis. pp.137-157. In: *Toxins and Plant Pathogenesis*, ed. by J. M. Daly and B. J. Deverall. Academic Press. Australia.
- Petrunak, D. M. and Christ, B. J. 1992. Isozyme variability in *Alternaria solani* and *A. alternata*. *Phytopathology* 82: 1343-1347.
- Rohlf, F. J. 1988. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 1.70. Exeter Software, Setauket, NY.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring

- Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
18. Simmons, E. C. 1981. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon* 13(1): 16-34.
  19. Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24): 7213-7218.
  20. White, B. A. 1993. *PCR Protocols: Current Methology and Applications*. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 195-198.
  21. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafaiski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
  22. Yu, S. H. 1992. Occurrence of *Alternaria* species in countries of the far east and their taxonomy. In: *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*, ed. by J. Chelkowski and A. Visconti. pp.37-62. Elsevier, Amsterdam.

(Received January 16, 1998)