

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*의 Electrophoretic Karyotype

김영태 · 김홍기*

충남대학교 농과대학 농생물학과

Electrophoretic Karyotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Young Tae Kim and Hong Gi Kim*

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

ABSTRACT: Strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from Korea, Japan and U.S.A. were used for electrophoretic karyotype (EK) analysis. Chromosome separations on FastLane agarose gels (FMC BioProducts, Rockland, ME), called pulsed field gel electrophoresis (PFGE), were performed by CHEF-DRII apparatus (Bio-Rad Laboratories, Melville, NY) using TAE as a running buffer. To obtain optimal condition for separation of chromosome sized DNAs, variable running conditions such as field strengths, swithching intervals, and running time were applied in CHEF gel electrophoresis. We were able to resolve 9 to 11 chromosome sized DNAs ranging in size from 0.76 to 6.41 Mb in isolates from Korea and estimate that the total genome size was ranging from 35.29 to 38.92 Mb. Distinct differences in length range and genome size exist among isolates from different countries. Isolates from Japan and U.S.A. were resolved 9 to 11 chromosome sized DNAs ranging in size from 1.24 to 6.85 Mb and estimated that the total genome size was ranging from 35.32 to 43.87 Mb. Isolates from variable provinces in Korea had the same or similar chromosomal polymorphism and showed different chromosomal DNA patterns compared to isolates from the other countries.

KEYWORDS: CHEF gel electrophoresis, Chromosomal polymorphism, Electrophoretic karyotype, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Pulsed field gel electrophoresis

*Fusarium oxysporum*은 매우 넓은 기주범위를 지니고 있어 지금까지 약 70여종의 분화형으로 구분되고 있으며 (Armstrong and Armstrong, 1981; Booth, 1971) 경제적으로 중요한 작물들의 도관을 침입해 시들음병이나 뿌리 썩음 및 모잘록병을 일으킨다. 또한 세계적으로 널리 분포하며 후막포자로 토양 중에 생존하여 농산물의 안정 다수확을 저해하는 가장 주요한 토양전염성 병원균으로 알려져 있다. 그중 토마토(*Lycopersicon esculentum*)에 시들음병을 일으키는 *F. oxysporum*이 Clayton(1923)에 의해 처음 알려진 이래 한국에서는 Park(1958)에 의해 최초로 보고되었다. 현재 이 토마토 시들음병균은 Snyder와 Hansen(1940)의 분류 체계에 따라 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*로 표기하여 사용되고 있고 토마토 품종에 따른 병원성의 차이에 따라 race 1, 2, 3으로 세분하고 있다(Gerdemann and Finley, 1951; Grattige and O'Brien, 1982). 또한 이들의 체세포 화합성 (vegetative compatibility)에 따라 여러 VCG(vegetative compatibility group)로 구분되어 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*는 VC 003 group으로 표기되며 그 안에 현재까지 VCG 0030, 0031, 0032, 0033 등 4개의 Group이 보고되어 있다 (Correll, 1991; Elias and Schneider, 1991; Kistler et al., 1998; Marlatt et al., 1996; Puhalla, 1985).

대부분의 진균이 지닌 염색체는 전통적인 방법인 광학현미경으로 관찰하기에 너무 작아 정확한 분석이 어렵다. 한편 염색체 수나 크기를 조사하기 위한 방법으로 유전학적인 접근법을 활용하려면 연구 대상 진균의 유성생식이 가능해야함은 물론 염색체상의 연관군을 결정할 수 있는 다양한 genetic marker들도 필요하다. 하지만 식물병원진균류에 대해 알려진 genetic marker는 극히 빈약하며 특히 *F. oxysporum*은 유성세대를 형성하지 않아 위와 같은 방법으로 염색체에 대한 연구를 하는 것은 매우 어렵다. 따라서 chromosome sized DNA를 전기영동할 수 있는 pulsed field gel electrophoresis(PFGE)가 Schwartz와 Cantor(1984)에 의해 처음 제시되었다. 이후로 PFGE는 지속적인 개선을 통해 Chu 등(1986)의 contour clamped homogeneous electric field(CHEF) gel electrophoresis 방법으로 개발되어 진균류의 electrophoretic karyotype(EK)를 연구하기 위한 새로운 실험 방법으로 쓰일 수 있었다. 따라서 Migheli 등(1993)은 CHEF gel electrophoresis system을 이용하여 *F. oxysporum*으로부터 0.8~6.7 Mb에 이르는 11~14개의 chromosome sized DNA를 분리하였고 그 total genome size는 41~51.5 Mb임을 밝힌 바 있다. 한편 각 분화형에 대한 EK가 계속 조사되어 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*에서 0.9~4.4 Mb 범위의 5~10개의 chromosome sized DNA가 분리되었고(Kim et al., 1993) *F. oxysporum* f. sp. *cubense*에서도 9~14개의

*Corresponding author

chromosome sized DNA가 분리되어 그 total genome size가 32.1~58.9 Mb임을 알 수 있었다(Boehm *et al.*, 1994).

본 연구는 CHEF gel electrophoresis를 통해 국내에서 일찍이 이루어지지 않았던 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 대한 염색체 수준의 분석을 실시하였다. 따라서 *F. oxysporum*의 보다 효과적인 chromosome sized DNA 분리 방법을 제시하고 chromosomal polymorphism과 EK를 밝혀내고자 하였다. 얻어진 EK 분석 결과는 기존의 형태적 분류 및 병원성 검정 등에서 얻지 못한 *F. oxysporum*의 유전적 변이와 다양성에 대한 기본적인 정보를 제공할 것이다. 또한 여러 분자생물학적 연구 방법과 더불어 활용시 보다 효과적인 균의 유전 분석이 가능하리라 예상된다.

재료 및 방법

공시균주 VCG 및 race가 밝혀진 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*로서 충남대학교 농생물학과 식물병리학 연구실에 보존중인 균주들을 사용하였으며 외국 균주들은 일본의 東日本學園大學과 미국 Florida대학에서 분양 받아 이용하였다(Table 1).

원형질체 추출 공시 균주를 PDA에 접종하여 25°C에서 4일 배양 후 분생포자만 모아 PD broth에 접종해 25°C, 125 rpm상에서 5~8일간 배양하였다. 증식된 분생포자를 4겹의 거즈로 걸러 2,000 rpm에서 20분간 원심 후 모아진 pellet을 PD broth에 접종하고 125 rpm에서 10시간 배양하여 발아관

을 형성시켰다. 이 발아한 포자들을 앞서 기술한 방법대로 원심해 모으고 멸균수로 두 번 세척한 후 1.4 M MgSO₄·7H₂O, 50 mM sodium citrate(pH 5.8) 용액 10 ml를 가해 현탁하였다. 이어서 1.2 M sorbitol, 50 mM sodium citrate(pH 5.8), Glucanex(Novo Nordisk Ferment Ltd., Switzerland) 17 mg/ml 용액 3 ml를 첨가하였다. 그리고 1.2 M sorbitol, 50 mM sodium citrate(pH 5.8) 용액을 가해 총량을 20 ml로 맞추어 현탁하고 2~4시간 동안 천천히 진탕하며 원형질체를 추출하였다.

Agarose plug 제조 원형질체 추출액을 3,000 rpm에서 10분간 원심 후 상층에 부유해 있는 원형질체들을 wide-mouth pipet tip으로 조심스럽게 수거하여 새 튜브로 옮겼다. 모아진 원형질체들은 0.8 M sorbitol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris(pH 7.4) 용액에 현탁하고 2,000 rpm에서 20분간 원심하여 세척 후 모아진 펠릿을 다시 위의 용액에 원형질체의 농도가 10⁸~10⁹ protoplast/ml가 되도록 현탁했다. CHEF 전기영동을 위한 agarose plug의 제조는 Orbach 등(1988)의 방법에 따랐다. 우선 원형질체를 42°C로 잠시 증탕한 후 원형질체 용액 볼륨의 1.5배가 되는 양의 0.8 M sorbitol, 50 mM EDTA, 1% low melting point agarose를 가해 잘 현탁하고 즉시 냉각된 sample mold에 넣었다. 이어서 굳어진 agarose plug를 NDS buffer [0.5 M EDTA, 1% N-lauroylsarcosine, 10 mM Tris(pH 9.5)]에 담그어 50°C에서 24~48시간 incubation한 뒤 50 mM EDTA 용액으로 세척하고 같은 용액에 넣어 4°C에 보관하였다.

Contour clamped homogeneous electric field (CHEF) 전기영동 Chromosome sized DNA를 분리하기 위해 CHEF-DRII pulsed field electrophoresis system(Bio-Rad Laboratories, Melville, NY)과 running buffer로 1×TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 사용하였다. Buffer는 전기영동시 계속 14°C로 유지되었고 매일 새것으로 교환하였다. Running gel은 FastLane agarose(FMC BioProducts, Rockland, ME)를 사용하였으며 molecular weight standard는 *Shizosaccharomyces pombe*(Bio-Rad), *Saccharomyces cerevisiae*(Bio-Rad) 그리고 *Hansenula wingei*(Bio-Rad)를 이용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide(0.5 µg/ml)에 30분간 염색하고 이를 증류수에 담가 수차례 물을 교환해가며 12시간 동안 destaining한 후 UV transilluminator에서 사진 촬영을 하였다.

결 과

Chromosome sized DNA의 최적 분리 조건 Chromosome sized DNA의 분리에 적합한 CHEF 전기영동 조건을 찾고자 영동 시간 및 전압 그리고 switching interval 등의 조건을 다양하게 바꾸어 가며 실험하였다. Switching interval을 40~800 sec로 하였을 때 0.7에서 1.3 Mb에 해당하는 저 분자량의 DNA 밴드들이 잘 분리되었다. 그러나 그와 같은 조건에서 전기영동 시간을 증가시켜 보았지만 전체

Table 1. Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* used in this study

Isolate	Geographic origin	VCG ^c	Race
FL302	Chungwon-gun, Chungbuk	0034 ^d	-
FL402	Puye-gun, Chungnam	0034 ^d	-
CF 11	Puye-gun, Chungnam	0034 ^d	1 ^e
CF 20	Puye-gun, Chungnam	0034 ^d	-
CF 31	Puye-gun, Chungnam	0034 ^d	2 ^e
CF 75	Kyongju-shi, Kyongbuk	0034 ^d	1 ^e
FL511	Dalsung-gun, Taegu-city	0034 ^d	-
FL602	Kimhae-shi, Kyongnam	0034 ^d	-
IFO31213 ^a	Japan	0031	2
JFL-No.1 ^a	Japan	0033	2
SUF119 ^a	Japan	0030	1
Tomato V ^a	Japan	0031	1
AFL548 ^b	U.S.A.	0030	2
AFL626 ^b	U.S.A.	003	1
AFL7400-1 ^b	U.S.A.	0030	3

^a It was provided from Dr. Kuninaga, Higashi Nippon Gakuen University, Japan

^b It was provided from Dr. J. P. Jones, University of Florida, U.S.A.

^c The code follows the system of Puhalla (1985). First three numbers refer to the forma specialis to which the isolate belongs, and the fourth refers to the VCG within the forma specialis.

^d It was based on the result of Yoo *et al.* (1995), Chungnam National University, Korea

^e It was based on the result of Yoo *et al.* (1995), Chungnam National University, Korea.

분자량에 걸친 chromosome sized DNA 밴드의 분리에는 부적합하였다(not shown data). 따라서 보다 큰 분자량의 chromosome sized DNA를 분리하기 위해서는 switching interval의 initial time에서 final time을 향해 그 시간을 점진적으로 줄여나가는 조건이 필요하였다. 0.8% agarose gel 상에서 switching interval을 전체 영동 시간인 72시간에 걸쳐 1,500에서 300 sec로 서서히 변화하도록 하고 2.0 V/cm 전압으로 CHEF 전기영동을 실시하였다. 그 결과 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 total DNA로부터 0.9 Mb에서 5.7 Mb에 이르는 DNA들이 분리되었다(Fig. 1). 그러나 gel 상에서 5.7 Mb 내외 분자량의 밴드는 ethidium bromide 염색 후 관찰시 그 감도가 기타 다른 밴드에 비해 상대적으로 강해 이들은 2개 이상의 DNA 밴드가 동시에 존재하는 것으로 여겨졌다. 따라서 전체 분자량에 걸친 각각의 chromosome sized DNA 밴드를 분리하기 위해서는 지속적인 CHEF 전기영동 조건의 탐색이 필요하였다. 따라서 우선 앞서 실시한 조건과 동일하게 한 후 전기영동 시간만 120시간으로 증가시켰다. 그 결과 0.9~5.7 Mb에 이르는 밴드가 국내 균주에서 9개, 외국 균주에서 7~10개로 분리되어 국내의 균주간에 염색체의 수와 크기에 많은 차이가 있음을 어느 정도 파악할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 예전에 완전히 분리되지 않았던 5.7 Mb 부근의 한 밴드는 국내의 균주 모두 2개 정도로 더 분리되었을 뿐 아직도 그 감도가 다른 밴드에 비해 강해 수 개의 chromosome sized DNA 밴드가 더 공존하고 있을 가능성이 높았다. 그리하여 보다 정밀한 분리를 위하여 switching interval의 시간을 증가시켜 3,600~1,000 sec로 하고 전압을 1.5 V/cm로 낮춘 다음 영동 시간을 184시간으로 늘려 재차 CHEF 전기영동을 실시하였다. 그 결과 5.7 Mb 이상 큰 분자량의 chromosome sized DNA 밴드들로부터 0.9 Mb 이하의 밴드에 이르기까지 각 분자량에 걸쳐 잘 분리되었다(Fig. 3, Fig. 4).

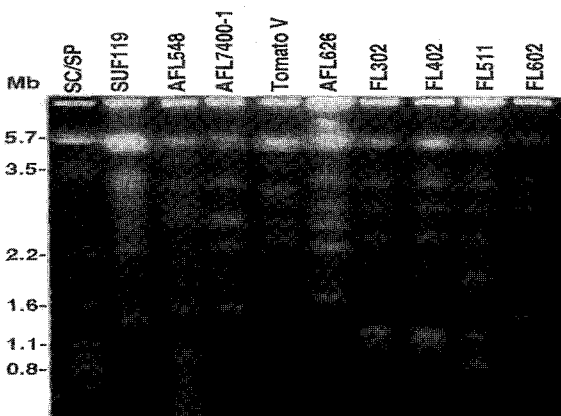


Fig. 1. Separation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* chromosomes by CHEF gel electrophoresis. Electrophoresis conditions: 0.8% FastLane agarose gel, switch time: 1,500 s decreasing to 300s during 72h; field strength: 2.0 V/cm. The molecular weight markers are given on the left: SP, from *Schizosaccharomyces pombe*; SC, from *Saccharomyces cerevisiae*.

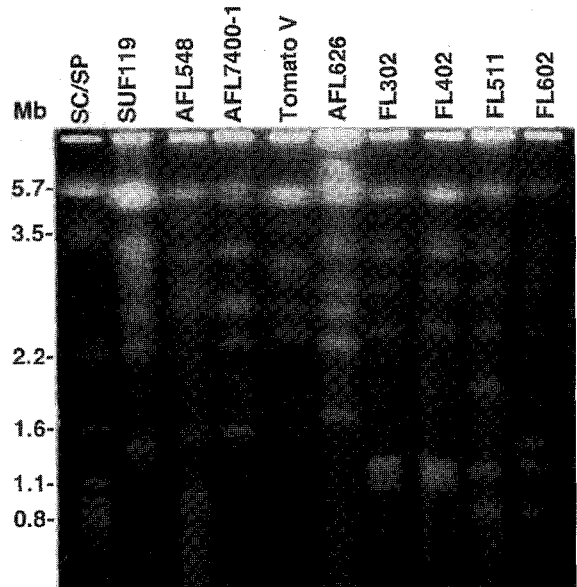


Fig. 2. Separation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* chromosomes by CHEF gel electrophoresis. Electrophoresis conditions: 0.8% FastLane agarose gel, switch time: 1,500 s decreasing to 300s during 120h; field strength: 2.0 V/cm. The molecular weight markers are given on the left: SP, from *Schizosaccharomyces pombe*; SC, from *Saccharomyces cerevisiae*.

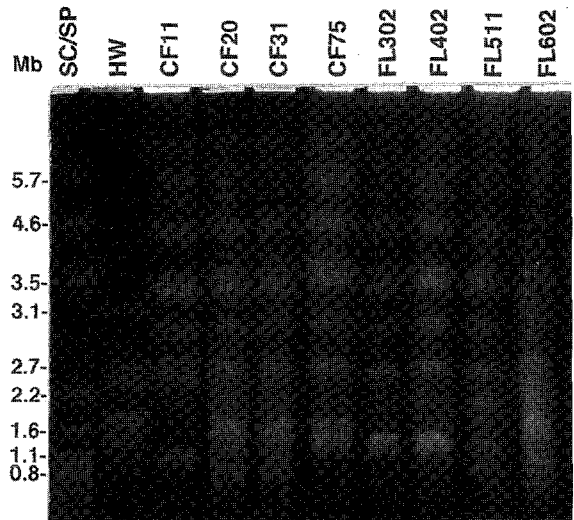


Fig. 3. Separation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* chromosomes by CHEF gel electrophoresis. Electrophoresis conditions: 0.8% FastLane agarose gel, switch time: 3,600 s decreasing to 1,000s during 184h; field strength: 1.5 V/cm. The molecular weight markers are given on the left: SP, from *Schizosaccharomyces pombe*; SC, from *Saccharomyces cerevisiae*; HW, from *Hansenula wingei*.

Electrophoretic karyotype (EK) 분석 Fig. 3 과 Fig. 4의 최적 전기영동 조건에서 국내 균주는 0.76~6.41 Mb 사이에 9~11개의 chromosome sized DNA 밴드를 형성하였고 외국 균주는 1.24~6.85 Mb에 걸쳐 9~11개의 밴드를 나타냈다. 따라서 CHEF 전기영동을 통한 EK 분석이 가능하였으

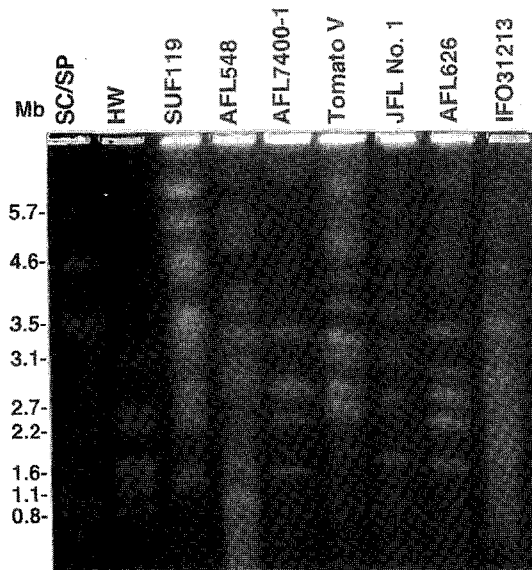


Fig. 4. Separation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* chromosomes by CHEF gel electrophoresis. Electrophoresis conditions: 0.8% FastLane agarose gel, switch time: 3,600 s decreasing to 1,000s during 184h; field strength: 1.5 V/cm. The molecular weight markers are given on the left: SP. from *Schizosaccharomyces pombe*; SC. from *Saccharomyces cerevisiae*; HW. from *Hansenula wingei*.

며 그 결과를 토대로 각 균주의 분자량별 chromosome sized DNA 밴드의 위치와 크기를 표시하면 다음 Table 2와 같다. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 total genome size는 약 35.29 Mb에서 43.87 Mb에 이르는 것으로 여겨지고 국내 균주는 35.29 Mb에서 38.92 Mb 정도인 것으로 분석되었다. 한편 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 균주들은 2.65 Mb에서 6.41 Mb까지 8개의 chromosome sized DNA 밴드 4, 9, 13, 17, 22, 25, 29, 34번 등이 동일하였다. 하지만 0.76 Mb에서 2.75 Mb에 이르는 밴드 33, 35, 37, 39, 40, 41, 42번들은 그 존재 유무가 균주에 따라 다소 다른 양상을 보였으나 그와 같은 국내 균주간 변이는 VCG나 race 그리고 국내 분리 지역들과는 무관하였다. 외국 균주들의 경우 국내 균주보다 변이가 더욱 다양해 CHEF 전기영동을 실시했던 외국 균주 모두가 동시에 동일한 크기의 밴드를 공유하는 경우는 없었다. 다만 밴드 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 28, 29, 31, 32, 34, 36, 37번들 중 3~9개의 밴드가 균주에 따라 서로 공유하기도 하였지만 그 관계는 국내 균주와 마찬가지로 VCG 및 race 등과 뚜렷한 연관성을 보이지 않았다. 한편 CHEF 전기영동을 통한 EK 분석으로 국내 균주와 외국 균주간의 염색체간 변이 정도를 파악할 수 있었다. 우선 국내 균주의 밴드 4, 9, 13, 17, 22, 29, 33, 34, 37, 39번들이 1~3개의 외국 균주들과 동일한 위치에 존재하여 국내외 균주간에 서로 유사한 분자량의 chromosome sized DNA를 공유하였다. 그러나 나머지 대부분의 밴드 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 38, 40, 41,

42번 등이 국내외 균주간에 차이를 보여 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*들은 외국 균주와 다른 별도의 chromosomal DNA pattern을 나타냈다.

Chromosomal polymorphism 각 균주의 염색체상 변이로 나타난 chromosomal polymorphism을 Table 3에 나타내었다. 국내 균주들은 genome size나 length range에서 약간의 변이가 있었을 뿐이지만 외국 균주들은 각기 서로 다른 polymorphism을 나타내 국내 균주보다 그 변이의 폭이 넓었다. 한편 각각의 VCG 그룹에 속하는 균주들의 genome 평균 크기는 VCG에 따라 다소 다르게 나타났다. 즉 국내 균주들이 형성한 하나의 VCG 그룹은 37.27 Mb로 기타 외국 균주의 VCG들에 비해 그 크기가 가장 적으며 VCG 0030이 39.14 Mb, VCG 0031이 42.97 Mb 그리고 VCG 0033이 42.56 Mb 이었다. 따라서 외국 VCG 그룹중 VCG 0030만이 genome 크기에서 국내 균주와 가장 유사하였고 나머지 VCG 그룹은 40 Mb 이상으로 차이가 남을 알 수 있었다. 한편 일본 균주인 SUF119는 미국 균주에 비해 국내 균주와 유사한 양상을 보였다. 즉 SUF119는 length range가 국내 균주와 가까운 1.48~6.41 Mb이었으며 total genome size 역시 35.32 Mb로 그 크기가 국내 균주와 비슷하였다.

고 찰

*F. oxysporum*의 electrophoretic karyotype(EK) 및 chromosomal polymorphism 분석은 그동안 수종의 분화형에서 시도되어 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans*와 *F. oxysporum* f. sp. *raphani*로부터 0.6~6.4 Mb에 이르는 8~11개의 chromosome sized DNA가 분리된 바 있다(Mills와 McCluskey, 1990). 또한 *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*에서도 7~12개의 chromosome sized DNA가 분리되었고 그 total genome size는 23.7~36.4 Mb이었다(Migheli 등, 1995). *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 경우 Migheli 등(1993)에 의해 10개의 chromosome sized DNA가 분리되었고 그 total genome size는 42.2 Mb이었다. 한편 To-Anun 등(1995)도 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*로부터 total genome size가 38.56 Mb에 달하는 10개의 chromosome sized DNA를 분리하였다. 본 실험의 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*로부터 약 0.76 Mb에서 6.85 Mb에 이르는 9~11의 chromosome sized DNA가 분리되었고 그 total genome size는 약 35.29~43.87 Mb로 나타나 위 두 연구자에 의해 얻어진 EK의 범주보다 다소 폭이 넓었다. 한편 국내 균주들은 2.65~6.41 Mb까지 동일한 크기의 chromosome sized DNA를 지녔으나 그 이하 0.76 Mb에서 2.08 Mb에 이르기까지 다소 변이를 나타내 균주에 따라서 결실되어 있는 경우도 있었다. 이와 같은 사실은 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 1 Mb를 전후로 한 B-chromosome들이 존재할 가능성이 있다. B-chromosome는 생물체의 생존을 위해 절대적으로는 필요하지 않으나 병리학, 생리학적으로 중요한 기능을 보유한 작은 염색체로 *Nectria haematococca*(Miao,

Table 2. Estimated size (Mb) of chromosome sized DNA molecules from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolates as determined by CHEF gel electrophoresis

Band	CF11	CF20	CF31	CF75	FL 302	FL 402	FL 511	FL 602	SUF 119	AFL 548	AFL 7400-1	Toma-to V	JFL No.1	AFL 626	IFO 31213
1											6.85				
2										6.70			6.70		6.70
3												6.55		6.55	
4	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41	6.41						
5															6.26
6											6.11				
7												5.97	5.97	5.97	
8										5.82					
9	5.67	5.67	5.67	5.67	5.67	5.67	5.67	5.67	5.67						5.67
10										5.53	5.53		5.53		
11												5.38			5.38
12										5.23				5.23	
13	5.09	5.09	5.09	5.09	5.09	5.09	5.09	5.09				5.09	5.09		
14									4.94						
15														4.80	
16											4.60				4.60
17	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50			4.50			
18											4.36		4.36	4.36	
19										4.21					4.21
20										3.92		3.92	3.92		
21									3.62						
22	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48	3.48							3.48
23											3.50				
24										3.33		3.33		3.33	
25	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25	3.25							
26													3.20		
27									3.15						3.15
28										3.10		3.10	3.10		
29	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00						3.00	3.00
30										2.95					
31									2.90		2.90	2.90			
32														2.85	2.85
33	2.75											2.75			
34	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65		2.65			2.65	
35							2.08								
36										1.84			1.84		
37		1.72	1.72	1.72				1.72			1.72			1.72	
38									1.48						
39		1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24		1.24					
40	1.12														
41	1.00						1.00								
42		0.76	0.76					0.76							
Total	38.92	37.77	37.77	37.01	35.29	35.29	38.37	37.77	35.32	43.87	38.22	43.49	42.56	40.46	42.45

1990), *Magnaporthe grisea*(Orbach, 1989) 그리고 *Colletotrichum gloeosporioides*(Masel 등, 1990)에서도 보고되어 왔다. 지금까지 *M. grisea*나 *C. gloeosporioides*의 B-chromosome상에는 어떤 생물학적 기능을 하는 functional

gene들이 발견되지 못했다. 그러나 *N. haematococca*에서 병원성에 관여하는 pisatin demethylase(*Pda*) gene이 1.6 Mb의 B-chromosome상에 존재함이 밝혀진 바 있다(Miao, 1990).

Table 3. The relationship between VCG, race, chromosome number (CN), length range (LR) and genome size (GS) in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Isolate	VCG	Race	CN	LR (Mb)	GS (Mb)	GS Mean (Mb)
CF11		1	11	1.00-6.41	38.92	
CF20		-	11	0.76-6.41	37.77	
CF31		2	11	0.76-6.41	37.77	
CF75		1	10	1.24-6.41	37.01	
FL302	0034	-	9	1.24-6.41	35.29	37.27
FL402		-	9	1.24-6.41	35.29	
FL511		-	11	1.00-6.41	38.37	
FL602		-	11	0.76-6.41	37.77	
SUF119		1	9	1.48-6.41	35.32	
AFL548	0030	2	11	1.24-6.70	43.87	39.14
AFL7400-1		3	9	1.72-6.85	38.22	
Tomato V		1	10	2.75-6.55	43.49	
IFO31213	0031	2	9	3.00-6.70	42.45	42.97
JFL No.1	0033	2	10	1.84-6.70	42.56	42.56
AFL626	003	1	10	1.72-6.55	40.46	40.46

이와 같은 진균류의 chromosomal polymorphism은 B-chromosome 이외에도 염색체상의 translocation이나 deletion 등이 원인이 된다. 특히 염색체 변이는 *F. oxysporum*과 같이 감수분열이 결여된 불완전균류에서 완전세대를 형성하는 진균류보다 다양하게 나타나는 특징이 있다. 즉 Kistler와 Miao(1992)는 감수분열이 염색체의 변이를 선택적으로 보완하는 역할을 하고 있는데 만약 그러한 과정이 없다면 한번 일어난 염색체 변이는 보다 지속적으로 남게 될 수 있다고 가정하였다.

*F. oxysporum*의 chromosome sized DNA의 분리는 국내에서 Park과 Min(1995)이 시도하였으며 각 분자량의 전체 염색체를 한번에 효과적으로 분리하는 것은 CHEF 전기영동 조건의 확립 면에서 상당히 어려웠다. 본 실험에서는 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 chromosome sized DNA의 분리는 물론 EK 조사도 가능한 최적 CHEF 전기영동 조건을 얻을 수 있었다. 그리고 공시균의 EK 분석을 통해 국내 균주는 염색체상에서도 미국 및 일본 등지의 외국 균주와 비교시 상당한 차이를 보임을 알 수 있었다. 즉 외국 균주들의 염색체 수나 그 total genome size는 국내 균주와 유사하였으나 그들의 chromosome sized DNA 밴드의 분자량이 달라 국내의 균주간의 chromosomal DNA pattern상에 명백한 차이가 있음이 나타났다. 또한 외국 균주간에는 여러 크기의 DNA에서 다양한 변이가 관찰되었으나 국내 균주는 1 Mb 내외의 염색체 상에서만 변이를 나타냈을 뿐이다. 이와 같은 결과는 Kim 등(1997)에 의한 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 RFLP 분석 결과와도 유사하였다. 즉 genomic DNA의 RFLP pattern에서도 국내 균주들은 외국 균주들과

확연한 차이를 지니며 그들간에 변이가 적은 특징을 보였으나 외국 균주들은 서로간에 다양한 변이를 나타냈다. 따라서 국내 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*들은 유전적으로 변이가 적고 서로간에 유사한 집단으로서 외국균주와는 뚜렷이 다른 특성을 지니고 있음을 알 수 있다.

적 요

한국, 일본 그리고 미국 등지에서 수집된 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*의 electrophoretic karyotype(EK)을 분석하고자 CHEF-DRII pulsed field gel electrophoresis system(Bio-Rad Laboratories, Melville, NY)으로 각 공시균의 chromosome sized DNA를 분리하였다. EK 분석에 적합한 CHEF gel electrophoresis 조건을 얻기 위해 전기영동 시간 및 전압 그리고 switching interval 등의 조건을 다양하게 바꾸어 가며 실험하였다. 그 결과 국내 균주에서 0.76~6.41 Mb에 달하는 9~11개의 chromosome sized DNA가 분리되었으며 그 total genome size는 35.29~38.92 Mb 이었다. 또한 일본과 미국 균주로부터 1.24~6.85 Mb 범위의 9~11개의 chromosome sized DNA가 분리되었고 그 total genome size는 35.32~43.87 Mb 이었다. 이와같이 얻어진 각 공시균주의 EK는 chromosome sized DNA의 length range 및 total genome size에서 국내 균주와 외국 균주간의 차이를 잘 반영하였다. 또한 국내 균주의 chromosomal polymorphism은 그 변이가 적어 서로 동일하거나 유사하였으며 외국 균주와 뚜렷이 다른 chromosomal DNA pattern을 나타냈다.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. H. C. Kistler, University of Florida for his kind advice in technique throughout this study. The authors thank to Dr. S. J. Yoo, Chungnam National University, Korea, Dr. S. Kuninaga, Higashi Nippon Gakuen University, Japan and Dr. J. P. Jones, University of Florida, U.S.A. for providing the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. This research was supported by a grant of Korea Science and Engineering Foundation, which is gratefully acknowledged.

참고문헌

- Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K. 1981. *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt disease*. pp391-399 in: *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. P. E. Nelson, T. A. Toussoun, R. J. Cook, eds. The Pennsylvania State Univ. Press, Univ. Park.
- Boehm, E. W. A., Ploetz, R. C. and Kistler, H. C. 1994. Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 7: 196-207.

- Booth, C. 1971. *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. pp. 130-154.
- Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R.W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. 1986. *Science* **232**: 65-68.
- Clayton, E.E. 1923. The relation of temperature to the Fusarium wilt of the tomato. *American J. Bot.* **10**: 71-88.
- Correll, J.C. 1991. The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **81**: 1061-1064.
- Elias, K.S. and Schneider, R.W. 1991. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* **81**: 159-162.
- 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 Disease* **66**: 165-166.
- Kim, D.H., Martyn, R.D. and Magill, C.W. 1993. Chromosomal polymorphism in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Phytopathology* **83**: 1209-1216.
- Kim, Y.T., Yoo, S.J. and Kim, H.G. 1997. Some genetic characteristics of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* **13**: 299-303.
- Kistler, H.C., Alabouvette, C., Baayen, R.P., Bentley, S., Brayford, D., Coddington, A., Correll, J., Daboussi, M.J., Elias, K., Fernandez, D., Gordon, T.R., Katan, T., Kim, H.G., Leslie, J.F., Martyn, R.D., Migheli, Q., Moore, N.Y., O'Donnell, K., Ploetz, R.C., Rutherford, M.A., Summerell, B., Waalwijk, C. and Woo, S. 1998. Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **88**: 30-32.
- Kistler, H.C. and Miao, V.P.W. 1992. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**: 131-152.
- Marlatt, M.L., Correll, J.C., Kaufmann, P. and Cooper, P.E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease* **80**: 1336-1342.
- Masel, A., Braithwaite, K., Irwin, J. and Manners, J. 1990. Highly variable molecular karyotypes in *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on *Stylosanthes*. *Mol. Cell Biol.* **8**: 4721-4726.
- Miao, V.P.W. 1990. Genes for phytoalexin detoxification in *Nectria haematococca*: Role in virulence on chickpea, and isolation on B chromosomes. Ph. D. Dissertation. Dept. of Plant Pathol., Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Migheli, Q., Berio, T. and Gullino, M.L. 1993. Electrophoretic karyotypes of *Fusarium* spp. *Exp. Mycol.* **17**: 329-337.
- Migheli, Q., Berio, T., Gullino, M.L. and Garibaldi, A. 1995. Electrophoretic karyotype variation among pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Pathol.* **44**: 308-315.
- Mills, D. and McCluskey, K. 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: The new cytology. *Mol. Plant. Microb. Interact.* **3**: 351-357.
- Orbach, M.J. 1989. Electrophoretic characterization of the *Magnaporthe grisea* genome. *Fungal Genetics Newslett.* **36**: 14.
- Orbach, M.J., Vollrath, D., Davis, R.W. and Yanofsky, C. 1988. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **8**: 1469-1473.
- Park, J.S. 1958. Fungus disease of plants in Korea(1). *College of Agriculture, Chungnam Nat'l Univ., Bull.* **1**. 62pp.
- Park, M.S. and Min, B.R. 1995. Megabase-sized DNA isolation and electrophoretic karyotype of *Fusarium oxysporum* Schlecht. *J. Microbiol.* **33**: 132-135.
- Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Bot.* **63**: 179-183.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67-75.
- Snyder, W.C. and Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *Amer. J. Bot.* **27**: 64-67.
- To-Anun, C., Nelson, H. and Ouchi, S. 1995. Electrophoretic karyotyping of *Fusarium oxysporum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* **61**: 350-356.
- Yoo, S.J., Kim, H.G. and Yu, S.H. 1995. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from Korea. *Korean J. Plant Pathol.* **11**: 330-337.
- Yoo, S.J., Lee, M.S. and Yu, S.H. 1995. Forma specialis and races of *Fusarium oxysporum* isolates from tomato in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* **11**: 324-329.