

도열병균(*Magnaporthe grisea*)의 Ribosomal DNA의 ITS II 부위 핵산 염기서열을 이용한 균주간 근연관계 비교

배신철* · 이신우 · 이인구¹ · 예완해 · 류진창
농업과학기술원 분자유전과, ¹경북대학교 농과대학 농화학과

Comparison of Relationships in Intraspecies of *Magnaporthe grisea* Using DNA Sequence of Internal Transcribed Spacer II Region in Ribosomal DNA

Shin-Churl Bae*, Shin-Woo Lee, In-Koo Rhee¹, Wan-Hae Yeh and Jin-Chang Ryu
Molecular Genetic Division, National Agricultural Science and Technology Institute,
Suwon 441-707, Korea, ¹Department of Agricultural Chemistry,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT : This study was carried out to identify intraspecies of *Magnaporthe grisea*. Two primers from ribosomal DNA (rDNA) sequences were chosen to amplify the specific internal transcribed spacer (ITS) II region from *M. grisea*. The exact ITS II region with only one single band from all of the fungal species could be amplified by using two primers taken from the 3' -end of 5.8S rDNA and 5' -end of 28S rDNA. Several different isolates of *M. grisea* from rice as well as other hosts showed the same size of ITS II region except the one from the host plant, redtop. However, RFLP showed three different patterns when the PCR-amplified ITS II region of the fungal isolates was digested with *Hae*III and *Msp*I. The nucleotide sequence analysis of PCR-amplified ITS II region of *M. grisea* from rice, green foxtail, millet, crab grass and redtop indicated that the size of the ITS II region of *M. grisea* isolate (RT) from red top was larger than that of other species. The ITS II region from *M. grisea* isolates from rice (90-054), millet (G88-4), crab grass (G88-5) and green foxtail (G90-5) was identical in size, but variable in base composition. Based on the sequencing data, the isolates G88-4 and G90-5 appeared to be more closely related to 90-054 than RT.

Key words : *Magnaporthe grisea*, rDNA, ITS II region, RFLP, PCR

도열병균에 대한 병원성 차이는 1922년에 Sasaki (14)가 최초로 보고한 이래 Goto(1, 2)에 의하여 12개 벼 품종이 도열병균 레이스 판별품종으로 선발되어 13개 병원성 레이스를 동정되었다. 우리나라에서는 Lee 등(8)과 류 등(18)이 Goto가 선발한 판별품종을 사용하여 본격적으로 도열병균의 레이스 동정을 계속하여 왔으나, 1971년부터 통일계 품종 등 도열병 저항성품종이 보급됨에 따라 도열병균 레이스도 다양한 양상을 보여 이 등(19)에 의하여 선발된 한국 도열병균 레이스 판별품종을 사용하여 도열병균 레이스를 동정하고 있다. 그러나 판별품종에 의한 벼도열병균

레이스 판별은 지역적으로 판별품종이 다르거나 판별 품종의 생육조건이 양호하지 않는 경우에는 일관성이 없거나 상이한 결과가 나타나는 경우도 있기 때문에 (10) 이러한 문제점을 보완하기 위하여 restriction fragment length polymorphism(RFLP), ribosomal DNA (rDNA) 등을 이용한 핵산 구조 차이에 의한 레이스 분류 및 동정이 이루어지고 있다(9).

최근에는 rDNA의 염기서열 비교 분석은 분류학적 수준에서 계통분류의 유연관계를 분석하는데 매우 적당한 수단을 제공하고 있다(16). rDNA의 구성단위는 전사되는 지역(transcribed region)과 전사되지 않는 지역(nontranscribed region)으로 이루어져 있다. 전사 지역은 18S, 5.8S, 28S rRNA 순서로 이루어진 하나의

*Corresponding author.

전구체로 전사된 후 절단에 의하여 개개의 rRNA 구성원이 만들어진다(6). 전사되지 않는 지역에는 절단 과정에서 그 기능을 모르는 절단단편이 얻어지는데 이 부위는 바로 18S rDNA와 5.8S rDNA 사이 그리고 5.8S rDNA와 28S rDNA 사이이다. 이 부위를 internal transcribed spacer(ITS)로 명명하고 각각을 ITS I과 ITS II로 나누었다. 일반적으로 반복체내의 전사되는 지역내 coding region은 종의 진화과정 동안 큰 변화가 없어서 유연관계가 먼 종간에도 공통된 염기서열이 잘 보존되어 있기 때문에 과(family) 이상 수준의 계통분류에 이용된다(4, 17). 반면에 noncoding region 즉 ITS I과 ITS II 부위는 염기서열의 변화가 심하게 나타나 속 혹은 종뿐만 아니라 비교적 유연관계가 가까운 아종의 분류에도 사용되어진다(15).

본 연구에서는 벼와 벼 이외의 화본과 식물로부터 분리한 26균주의 도열병균에 대한 ITS II 부위를 PCR로 증폭하여 얻은 단편의 polymorphism 및 염기서열분석 결과를 이용하여 도열병균 생리형 분류에

기초 자료를 제공하고자 이 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 배양 및 DNA 분리. 벼에서 분리한 14종의 레이스들과 벼 이외의 화본과 식물에서 분리한 12종의 도열병균(Table 1)을 28°C에서 분당 90회 속도로 4~5일간 진탕배양하여 얻은 균사체를 냉동건조하였다. 냉동건조한 균사체로부터 게놈DNA를 분리하고자 액체질소에 균사체 1g을 첨가하여 잘게 마쇄한 다음 Graham 등(3)이 사용한 추출용액 [2% (w/v) hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 100 mM Tris-Cl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA] 1 ml에 고르게 현탁한 후 상등액을 phenol : chloroform(1 : 1)으로 5~6회 추출하고 상등액을 모아서 에탄올 침전에 의하여 DNA를 순수 분리하였다.

Polymerase chain reaction 증폭. rDNA의 ITS II 부위를 증폭하기 위해 Fig. 1에서와 같이 White 등(15)

Table 1. Isolates of *Magnaporthe grisea* collected from rice and other hosts

Isolate	Race	Host (scientific name)	Place of collection
90-059	KJ-101	Rice (<i>Oryzae sativa</i>)	Icheon
88-080	KJ-105	"	Sunchang
92-257	KJ-107	"	Jinju
87-134	KJ-201	"	Cheolwon
90-054	KJ-301	"	Yeocheon
91-041	KJ-401	"	Jinju
90-007-3	KI-1113	"	Sangju
AB-7	KI-197	"	Suwon
85-036	KI-209	"	Hongcheon
90-006	KI-313	"	Sunchang
85-242	KI-315a	"	Daedeog
88-013	KI-315b	"	Sunchang
84-419	KI-315b	"	Icheon
AB-14	KI-401	"	Suwon
G88-5	- ^a	Crab grass (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	Kwangyang
G90-1	-	"	Hoengseong
H93-1	-	"	Jinju
G88-1	-	Italian millet (<i>Setaria italica</i>)	Youngweol
G90-2	-	"	Wonju
G90-5	-	Green foxtail (<i>Setaria viridis</i>)	Youngweol
GF2	-	"	Suwon
G90-6	-	Timothy (<i>Phleum pratense</i>)	Suwon
G88-7	-	Barnyard grass (<i>Echinochloa crusgailli</i>)	Icheon
G91-4	-	Tall fescue (<i>Festuca elatior</i>)	Suwon
G88-4	-	Millet (<i>Panicum millaceum</i>)	Hongcheon
RT	-	Redtop (<i>Agrostis alba</i>)	Suwon

^a - : not determined.

이 사용한 5.8S rDNA의 3'-말단부위에서 primer A: 5'-CCCGGGAATTCGCATCGATGAAGAACGACGC 3'와 28S rDNA의 5'-말단부위에서 primer B: 5'-CCCGGGATCCTCCGCTTATTGATATGC-3'를 합성하여 사용하였다. 이때 각 primer의 말단에는 *EcoRI*과 *BamHI* 제한효소가 인식하는 염기서열을 삽입하여 PCR로 증폭된 단편의 클로닝을 용이하게 하였다. PCR 반응은 Sambrook 등(12)의 방법으로 반응용액을 100 µl로 하고 Kosco 회사에서 구입한 Taq DNA polymerase를 사용하였고 annealing temperature/time은 58°C/1분으로 30회 반복하여 행하였다.

DNA의 염기서열 및 컴퓨터분석. PCR에 의하여 증폭된 DNA를 4 base pair를 인지하는 제한효소인 *HaeIII*와 *MspI*으로 처리한 후 3% metaphor agarose (FMC사) gel에서 전기영동하여 RFLP 분석을 행하였다. PCR로 증폭된 단편을 pTZ 19U(NEB사) 벡터에 클로닝하여 Sanger 등(11)의 dideoxy chain termination 방법을 이용하여 forward sequencing primer와 reverse sequencing primer(NEB사)로 염기서열 분석을 행하였다. 주어진 염기서열 결과를 이용한 각 균주간의 distance matrix 값은 Kimura(7)가 사용한 two parameter 방법을 이용하였고 비교 균주간의 유연관계

를 도식화하기 위하여 PHYIP package(Felsenstein, J., University of Washington)의 Neighbor-joining 방법을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

한국 도열병균 판별품종의 반응에 따라 레이스가 동정된 균주들에 대하여 ITS II 부위를 PCR 방법으로 증폭을 행하였다. 14개의 벼 도열병균과 벼 이외의 화본과 식물에서 분리한 12균주(Table 1)에 대한 ITS II 부위의 길이를 비교한 결과 RT 균주(레드톱 이병주로부터 분리한 도열병균)만이 다른 균주들보다 큰 DNA 단편이 증폭되었으며 그 이외의 모든 균주는 약 370 bp의 동일한 크기로 하나의 단편만이 확인되었다(Fig. 2).

단순한 PCR 증폭에 의하여서는 균주들간에 DNA 크기 차이를 확인할 수 없었기 때문에 ITS II 부위를 포함하는 rDNA 단편에 대한 RFLP를 조사하였다. PCR로 증폭한 DNA 단편을 제한효소로 처리하여 그 패턴을 조사하는 방법은 동시에 많은 시료를 조사할 수 있는 장점을 가지고 있으므로 4개의 염기배열을 인지하여 절단하는 제한효소 *HaeIII*와 *MspI*을 증폭된 ITS II 부위의 DNA에 처리하였다. 그 결과 벼도열병균 레이스간에는 제한효소 종류에 상관없이 RFLP 양상의 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 그러나 벼 이외의 기주 도열병균의 경우는 *HaeIII* 제한효소로 절단하게 되면 크게 3군으로 분류되었는데 첫번째 군은 G88-5(Fig. 3b, lane 1), G90-1(Fig. 3b, lane 2) 그리고 G90-6(Fig. 3b, lane 8)의 균주들은 똑같은 길이를 가진 3개

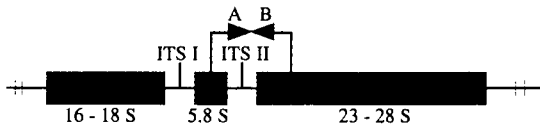


Fig. 1. The location of primers for the PCR amplification of ITS region of rDNA of *Magnaporthe grisea*. ITS : internal transcribed spacer.

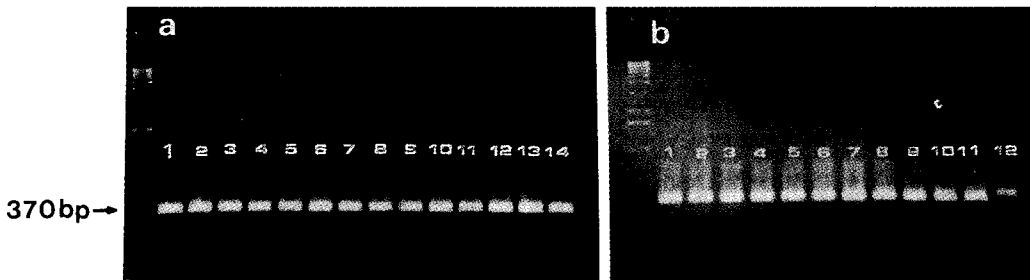


Fig. 2. Amplification of ITS II region of the rDNA of *Magnaporthe grisea* isolates from rice (a) and other graminaceous hosts (b). a: Lane 1, 90-059; lane 2, 88-080; lane 3, 92-257; lane 4, 87-134, lane 5, 90-054, lane 6, 91-041; lane 7, 90-007-3; lane 8, AB-7; lane 9, 85-036; lane 10, 90-006; lane 11, 85-242; lane 12, 88-013; lane 13, 84-419; lane 14, AB-14. b: Lane 1, G88-5 from crab grass; lane 2, G90-1 from crab grass; lane 3, G93-1 from crab grass; lane 4, G88-1 from Italian millet; lane 5, G90-2 from Italian millet; lane 6, G90-5 from green foxtail; lane 7, GF2 from green foxtail; lane 8, G90-6 from timothy; lane 9, G88-7 from barnyard grass; lane 10, G91-4 from tall fescue; lane 11, G88-4 from millet; lane 12, RT from redtop.

의 단편으로 절단되었으며 두번째 군은 G93-1(Fig 3b, lane 3), G88-1(Fig. 3b, lane 4), G90-2(Fig. 3b, lane 5), G90-5(Fig. 3b, lane 6), GF2(Fig. 3b, lane 7), G88-7(Fig. 3b, lane 9), G91-4(Fig. 3b, lane 10) 그리고 G88-4(Fig. 3b, lane 11)이 벼 도열병균과 같은 *Hae*III 제한효소 절단형태를 나타내었다. 세번째 군은 RT 균주로 *Hae*III 제한효소 자리가 없어 다른 균주와 유별할 수 있었다. *Msp*I 경우도 *Hae*III 제한효소 절단패턴과 거의 유사한 양상을 보였는데 벼 도열병균 레이스간에는 차이가 없었으나, 벼 이외의 기주 도열병 균주간에는 G88-5, G90-1 그리고 G90-6 균주가 한개 군으로 구별되고 GF2와 RT가 또 다른 군으로 구분되었다. G93-1, G88-1, G90-2, G90-5, G88-7, G91-4, 그리고 G88-4 균주가 다른 한 개 군으로 나눌 수가 있어 GF2를 제외하고는 *Hae*III로 절단하였을 때 나타난 형태와 같았다.

2가지 제한효소 절단형태를 종합해 보면 벼 이외의 기주 도열병균주 중에서 벼도열병균과 같은 제한효소 절단형태를 보이는 균주는 G93-1, G88-1, G90-2, G90-5, G88-7, G91-4 그리고 G88-4였다.

한 등(5)에 의하면 MGR-586 탐침을 이용하여 벼 도열병균과 벼 이외 기주 도열병균의 RFLP분석을 행하였을 때 G91-4와 G93-1 균주의 도열병균이 벼 도열병

균과 70%의 유사성을 가지며 G88-5, G90-1, G88-1, G90-2, G90-5 그리고 G88-7균주와는 50% 이하의 유사성을 나타내었다고 보고하였다. G91-4와 G93-1 균주들은 벼에 병원성이 있는 것으로 나타난 반면 그 밖에 다른 기주로부터 분리한 균주들은 벼에 병원성이 없는 것으로 나타나 MGR-586 탐침에 의한 RFLP 결과가 DNA 수준에서 기주에 대한 병원균의 병원성을 구분할 수 있는 것으로 발표하였다. 이러한 결과와 본 실험에서 사용한 ITS II 부위의 제한효소 절단패턴에 의한 분류와 비교해 보면 G91-4와 G93-1 균주가 같은 군으로 구분되는 것은 MGR-RFLP 결과와 일치하나 G88-1, G90-2, G90-5 그리고 G88-4 균주 등은 상당한 차이를 보이고 있다. 그러므로 rDNA의 ITS II 부위의 제한효소 절단패턴에 의한 균주의 분류는 기주의 병원성 요인이 되지 못한 것으로 사료된다.

ITS II 부위의 PCR 증폭으로 그 길이 차이와 제한효소 처리에 의한 도열병균의 레이스 구분이 부적절하므로 primer A와 B를 사용하여 PCR 증폭한 DNA 단편의 염기서열을 분석하였다. 5' 부위의 98 bp와 3' 부위의 9 bp는 5균주 모두 DNA 염기배열이 동일하였기에 Fig. 4에서는 제외하였다. 벼도열병균의 90-054, G90-5, G88-4, G88-5 그리고 RT 균주들의 ITS II 부위를 포함한 rDNA 염기서열을 비교 분석한 결과 90-

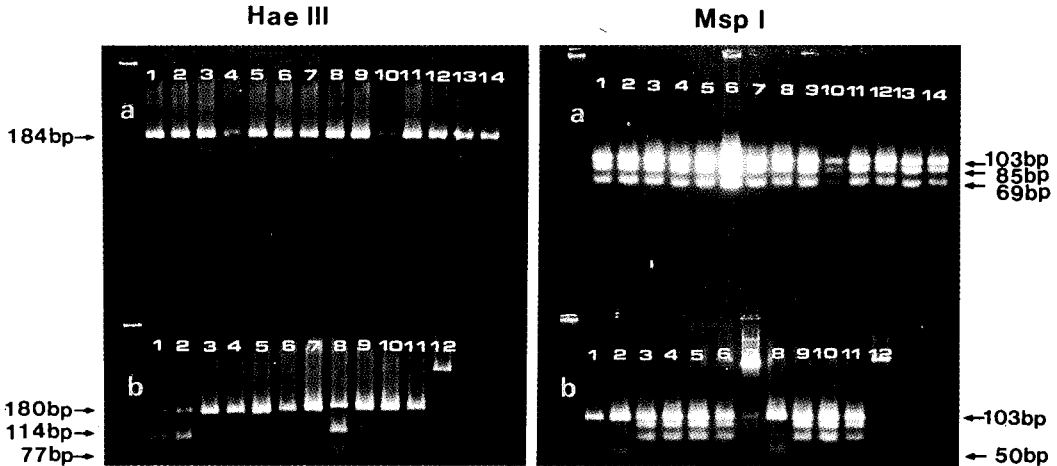


Fig. 3. RFLP patterns of PCR products of ITS II region from genomic DNA of *Magnaporthe grisea* isolates. PCR products were digested with *Hae*III and *Msp*I. (a) : Isolates from *Oryzae sativa*: Lane 1, 90-059; lane 2, 88-080; lane 3, 92-257; lane 4, 87-134; lane 5, 90-054; lane 6, 91-041; lane 7, 90-007-3; lane 8, AB-7; lane 9, 85-036; lane 10, 90-006; lane 11, 85-242; lane 12, 88-013; lane 13, 84-419; lane 14, AB-14. b : Isolates from other species in Gramineae: Lane 1, G988-5 from crab grass; lane 2, G90-1 from crab grass; lane 3, G93-1 from crab grass; lane 4, G88-1 from Italian millet; lane 5, G90-2 from Italian millet; lane 6, G90-5 from green foxtail; lane 7, GF2 from green foxtail; lane 8, G90-6 from timothy; lane 9, G88-7 from barnyard grass; lane 10, G91-4 from tall fescue; lane 11, G88-4 from millet; lane 12, RT from redtop.

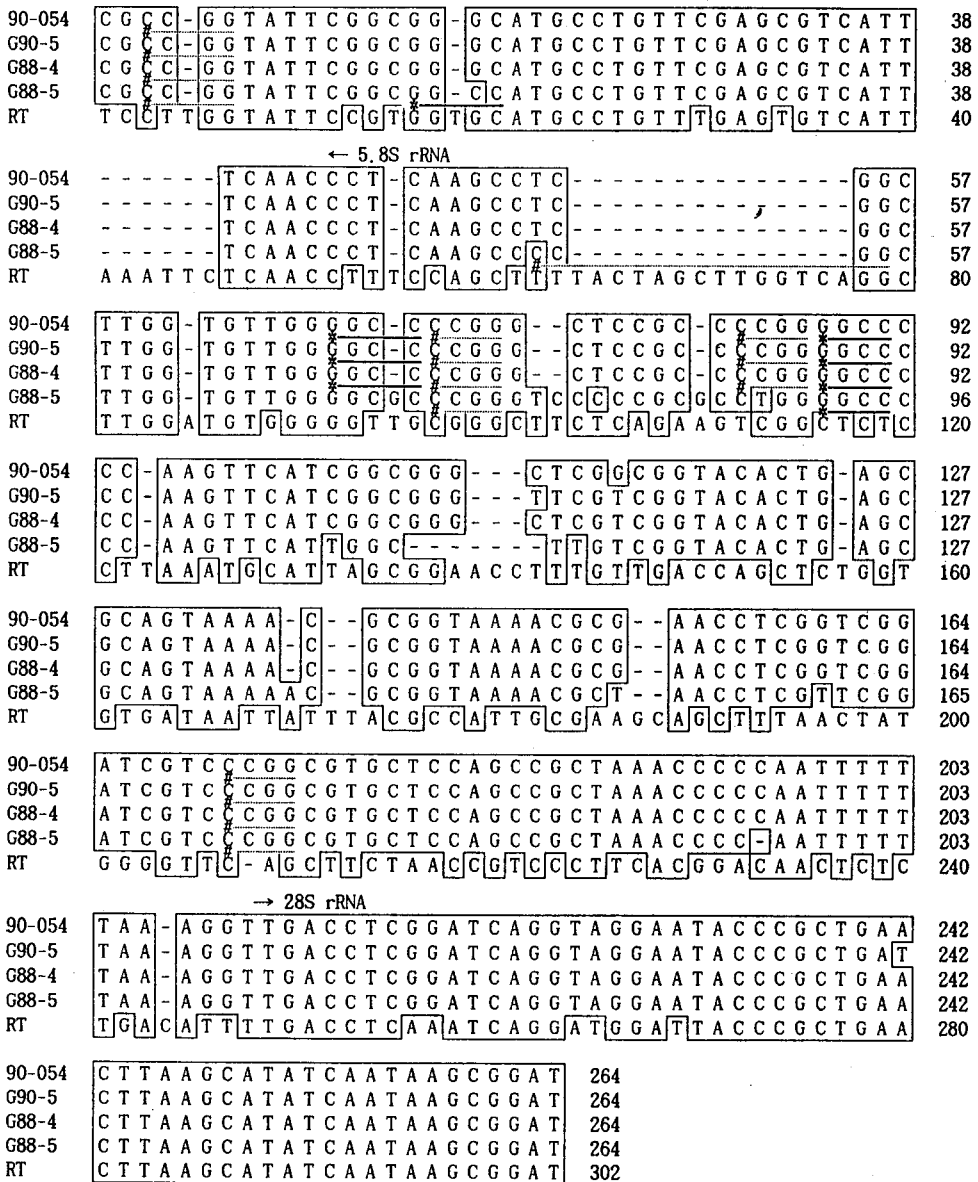


Fig. 4. Comparison of nucleotide sequence at ITS II region of *Magnaporthe grisea* isolates from rice and other graminaceous hosts: 90-054 from rice; G90-5, green foxtail; G88-4, millet; G88-5, crab grass; RT, redtop. *—, *HaeIII* site, #----, *MspI* site.

054, G90-5 그리고 G88-4 균주들 간에는 그 길이가 같았고 염기서열에 있어서도 매우 잘 보존된 것으로 나타났다. 90-054의 경우는 ITS II 부위에서 하나의 염기가 치환되었고 G90-5 균주는 ITS II 부위와, 28S rDNA 부위에서 각각 하나의 염기가 치환된 것으로 나타났다. RFLP 분석에서 첫번째 균으로 분류된 G

88-5 균주는 90-054, G88-4 그리고 G90-5 균주와의 DNA 단편의 길이 차이는 없었지만 ITS II 부위에서 DNA 염기의 치환이 6곳, 삼입이 5곳, 결손이 5곳이 있었다. 한편 RT 균주의 ITS II 부위의 길이는 90-054와 비교하면 38 bp가 더 첨가된 것으로 나타남으로 Fig. 2의 결과와 일치하였다. 90-054, G90-5 그리고

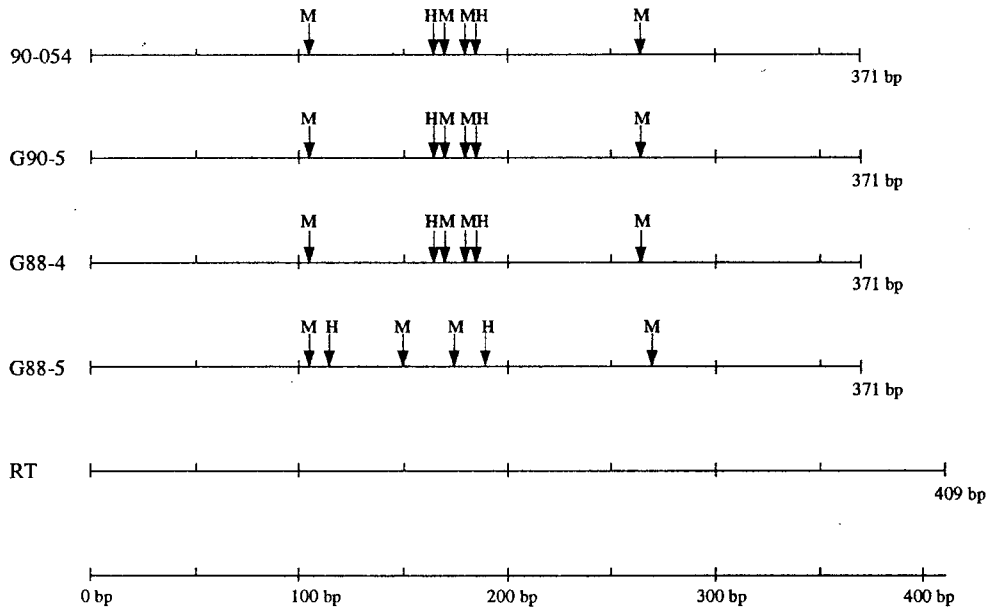


Fig. 5. Restriction sites on ITS II region of *Magnaporthe grisea* isolates from rice and other graminaceous hosts. *HaeIII* sites of 90-054 from rice, G90-5 from green foxtail and G88-4 from millet are located at 167 bp and 187 bp, and *MspI* sites at 102 bp, 171 bp, 183 bp and 268 bp. *HaeIII* sites of G88-5 from crab grass are located at 114 bp and 191 bp, and *MspI* sites at 102 bp, 152 bp, 172 bp and 269 bp. H, *HaeIII*; M, *MspI*.

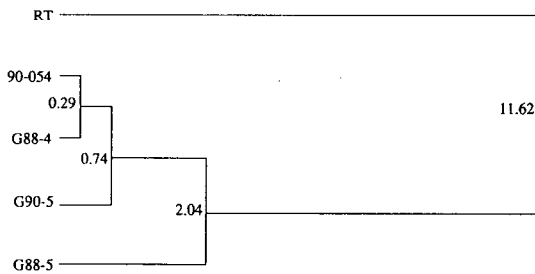


Fig. 6. Dendrogram of phylogenetic relationships of *Magnaporthe grisea* based on the DNA sequence of ITS II region. Numbers are dissimilarities. RT, redtop; 90-054, rice; G88-4, millet; G90-5, green foxtail; G88-5, crab grass.

G88-4의 Hae III 위치는 167 bp와 187 bp이었으며 *MspI* 위치는 102 bp, 171 bp, 183 bp 그리고 268 bp인 반면, G88-5의 *HaeIII* 위치는 114 bp와 191 bp이었으며 *MspI*는 102 bp, 152 bp, 172 bp 그리고 269 bp에 각 제한효소 위치가 존재하였다(Fig. 4). 따라서 PCR에 의해 증폭된 DNA 단편을 *HaeIII*로 절단하였을 때 Fig. 3에서와 같이 90-054, G90-5 그리고 G88-4는 184 bp, 167 bp 그리고 20 bp의 단편들을, G88-5는 180 bp, 114 bp 그리고 77 bp의 단편들 중에서 20 bp 단편을

제외한 나머지 단편들을 확인할 수 있었다. *MspI* 경우는 90-054, G90-5 그리고 G88-4는 103 bp, 102 bp, 85 bp 그리고 69 bp 단편들을, G88-5는 102 bp, 97 bp, 50 bp 그리고 21 bp 단편들 중에서 21 bp 단편을 제외하고 Fig. 3에서 확인할 수 있었다. 이들의 염기서열 분석을 기초로 하여 도열평균 5균주에 대한 2가지 제한효소 절단형태를 그려보면 90-054, G88-4 그리고 G90-5 균주가 동일한 *HaeIII*와 *MspI*의 제한효소 절단부위가 위치하고 있는 반면 G88-5 균주의 경우는 *MspI*, *HaeIII* 제한효소 절단부위가 90-054와 비교하여 다른 절단 형태를 나타내었고, RT 균주는 전혀 존재하지 않았다(Fig. 5).

결론적으로 보다 상세한 차이점을 조사하고자 기준 범위를 달리하는 5개 균주에 대하여 ITS II 부위의 염기서열을 컴퓨터 프로그램으로 비교하여 유연관계도를 조사하였다(Fig. 6). RT 균주를 제외한 4개 균주들은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 밀접한 유연관계를 나타내어 dissimilarity 값이 0.29~2.04로 아주 낮은 값을 보인 반면 RT 균주는 다른 4개 균주와 비교하였을 때 dissimilarity 값이 11.6으로 나타나 상대적으로 먼 유연관계를 보였다.

도열평균은 기주식물을 달리하는 것 뿐만 아니라,

벼에서 분리한 여러 가지 레이스들에 있어서도 ITS II 부위에 대한 연구결과는 진화적으로 상당한 동질성을 유지하는 한 종의 집단으로서 대체로 변이 폭이 좁다는 것을 시사하여 준다. 본 연구에서 사용한 ITS II 부위는 생물학적으로 기능을 갖지 않기 때문에 균의 생육에 크게 영향을 미치지 않아서 변이가 일어나더라도 도태되지 않고 같이 공존한다고 가정할 때 변이 빈도가 높은 것으로 예상되었으나, 기주식물을 달리 하는 도열병균간에도 동질성을 나타내었다. 그러나 병원성을 달리하는 많은 종류의 레이스들의 출현에 대한 분자생물학적 연구는 DNA 염기서열의 차이가 병원성에 직접적으로 영향을 미치는 유전자를 대상으로 하는 연구가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

벼도열병균 14개 균주와 벼 이외 화본과 식물 도열병균 12개 균주를 대상으로 rDNA의 ITS II 부위를 증폭하여 그들의 핵산 구조 차이를 분석함으로써 도열병균 균주간 분류를 시도하였다. 5.8S rDNA의 3'-말단 부위와 28S rDNA의 5'-말단 부위의 sequence 중 5'-CCCGGGAATTCGCATCGATCGAATGAAGA-ACGCAGC-3'와 5'-CCCGGGATCCTCCGCTTATTGATATGC-3'를 이용하여 PCR 증폭을 하였을 때 벼도열병균 14개 균주는 동일한 길이의 단일 밴드를 형성하였으며 벼 이외 화본과 식물 도열병균에서는 레드톱 식물로부터 분리한 도열병균만이 나머지 균주보다 38bp가 더 큰 길이를 가진 밴드를 형성하였다. PCR로 증폭된 DNA를 *Hae*III와 *Msp*I 제한효소로 절단하였을 때 벼도열병균 레이스간에는 제한효소 절단에 의한 전기영동 밴드 형태 차이를 관찰할 수 없었으나, 벼 이외 화본과 식물 도열병균 12개 균주는 3개 군으로 구분할 수 있었다. 벼도열병균 90-054와 강아지풀에서 분리한 도열병균 G90-5, 기장에서 분리한 G88-4, 바랭이에서 분리한 G88-5 그리고 레드톱에서 분리한 RT 균주의 ITS II 부위의 DNA 염기서열 비교 분석에 의하면 G88-5균주는 90-054, G90-5 그리고 G88-4와는 다른 *Hae*III와 *Msp*I 제한효소 위치를 가지고 있었기에 제한효소 절단에 의한 전기영동 형태가 상이하였다. 또한 RT균주는 *Hae*III와 *Msp*I 위치가 존재하지 않았다.

감사의 말씀

도열병균 균주를 분양하여 주신 농업과학기술원 병

리과 한성숙 선생님께서 진심으로 감사 드립니다. 또한 컴퓨터 프로그램을 제공하여 주신 서울대학교 미생물학과 정학성 교수님에게 감사 드립니다.

참고문헌

- Goto, K. 1960. Progress report of the joint research on the race of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. *Special Bulletin of the Plant Disease and Insect Forecast Service* 5 : 1-89.
- Goto, K. 1965. Some physiologic race of *Pyricularia oryzae* in Japan. In : *The Rice Blast Disease*, pp. 237-242. The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- Graham, G. C., Mayers, S. P. and Henry, R. J. 1994. Amplified method for preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotechniques* 16 : 48-50.
- Hamby, R. K. and Zimmer, E. A. 1991. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematic. In : *Molecular Systematics of Plants*, ed. by P. S. Soltis, D. E. Soltis and J. J. Doyle, pp. 50-91. Chapman and Hall, New York, NY.
- Han, S. S. 1993. Molecular characterization of pathotype and variation of *Pyricularia grisea* from rice and other hosts in Korea. The First Korea-China Joint Seminar for Mycology, Seoul, Korea, pp. 91-113.
- Jorgensen, R. A., Cuellar, R. E., Thompson, W. F. and Kavanagh, T. A. 1987. Structure and variation in ribosomal RNA genes of pea. *Plant Molecular Biology* 8 : 3-12.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 : 111-120.
- Lee, S. C. and Matsumoto, S. 1966. Studies on the physiologic race of rice blast fungus in Korea during the period of 1962~1963. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 32 : 40-45.
- O'Donnell, K. and Gray, L. E. 1995. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8(5) : 709-716.
- Ou, S. H. 1985. Part III Fungus disease-Foliage disease. In : *Rice Disease*, pp. 109-201. CAB. Commonwealth Mycological Institute.
- Roder, M. S., Sorrells, M. E., and Tanksley, S. D. 1992. 5S ribosomal gene clusters in wheat: pulsed field gel electrophoresis reveals a high degree of polymorphism. *Mol. Gen. Genet.* 232: 215-220.

12. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, J. 1989. *In vitro* amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In : *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., pp. 14.1-14.35. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
13. Sanger, F. S., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1987. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12) : 5463-5467.
14. Sasaki, R. 1922. Existence of strains in rice blast fungus. *J. Plant Protect. Tokyo* 9 : 631-644.
15. White, J. J., Bruns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : *PCR Protocols, A Guide to Methods and Application*, pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
16. Woese, C. R. and Olsen, G. J. 1986. Archaeobacteria phylogeny: Perspectives on the urkingdoms. *Syst. Appl. Microbiol.* 7 : 161-177.
17. Zimmer, E. A., Hamby, R. K., Arnold, M. L., Leblance, D. A. and Theriot, E. C. 1989. Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution. In : *The Hierarchy of Life*, ed. by B. Fernholm, K. Bremer and H. Jornvall, pp. 205-214. Elsevier Science, Amsterdam.
18. 류재당, 예완해, 한성숙, 이영희, 이은중. 1987. 한국의 벼도열병균 레이스의 지역 및 연차적(1978~1985) 변동. *한식병지* 3(3) : 174-179.
19. 이은중, 유재당, 예완해, 한성숙, 이영희. 1987. 한국도열병균 레이스 판별품종체계에 대한 제안. *농시논문집(식환, 균이, 농가)* 29(1) : 206-213.