

Fusarium section *Liseola* 균주들에서 rDNA Intergenic Spacer 부위의 PCR-RFLP 분석

이경은 · 최영길² · 민병례^{1*}

¹상명대학교 자연과학부 생명과학과, ²한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Fusarium section *Liseola*에 속하는 균주들의 rDNA IGS 부위를 증폭하고 여러개의 제한 효소로 처리하였다. 증폭된 IGS 부위의 길이는 *F. moniliforme* 12 만이 약 2.9 Kb 이고 나머지 균주들은 모두 약 2.6 Kb였다. 제한 효소 *EcoRI*, *HincII*, *Sall*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI* 등은 IGS 부위를 절단하여 11균주들에서 9 haplotypes을 확인할 수 있었다. 본 연구에서의 section *Liseola*에 속하는 균주들에 대한 결과에 앞서 연구되어진 section *Elegans*에 속하는 균주들의 결과를 종합하여 dendrogram을 그렸을 때, IGS 부위를 종내에서와 마찬가지로 종간, section 간의 관계를 밝힐 수 있는 가능성을 제시하여 주었다.

Key words □ *Fusarium*, haplotype, IGS, PCR-RFLP, restriction enzyme

rDNA cistron의 각 copy는 spacers 에 의하여 분리되는 3개의 rRNA coding region (18S, 5.8S, 28S)으로 구성되어 있다. ITS (internal transcribed spacers ITS-1, ITS-2)는 각각 18S와 5.8S, 그리고 5.8S와 28S coding region 사이에 존재한다. IGS (intergenic spacer)는 28S와 18S coding region 사이, 즉 rDNA의 repeating units 사이에 있는 non-transcribed spacer (NTS)부위로 알려져 있다. rDNA는 비교적 염기서열이 잘 보존되어 있는 것으로 보고 되어 있으나 rDNA 전체에서 찾아볼 수 있는 분자진화 과정에서의 변이는 coding regions 보다 non-coding 되어지는 부위에서 좀더 빠른 것으로 보고 되어 있다(9). 그 중에서 IGS는 상당한 구조적 변이를 보여주고 있으며 분자적 변이도 높은 비율로 일어났을 것으로 추정되고 있다(7). IGS는 여러 생물에서 DNA 복제, promoters, enhancers, transcription termination signals와 같은 여러 기능을 가지고 있고 IGS 부위의 길이의 변이는 기능에 따라 다른 것으로 설명되어 지고 있다(20). IGS 부위는 대부분의 동식물에서는 일반적으로 작은 subunit repeats 혹은 짧은 motif로 구성되어 있는 것으로 보고 되어 있으나, 균류의 IGS에 대한 연구는 극히 제한되어 있다. *Aspergillus* (21), *Rhizoctonia* (24) 외에 *Verticillium* (19)에서는 IGS의 subunit 구성에 대한 보고가 있다. 특히 *Armillaria*인 경우는 종을 신속히 동정하는데 중요한 genetic marker로 보고 있으며(23), *Saccharomyces* (14), *Laccaria* (8)에서도 종간의 변이가 보고되어 있다. *Fusarium* 균에 대하여는 *F. oxysporum* 한 종내에서의 변이가 보고되어 있을 뿐이다(1,2,6,10,28).

경제적으로 중요한 여러 종류의 식물에 질병을 일으키는 것으

로 알려진 *Fusarium* 균 중에서 section *Liseola*에 속하는 균주들은 형태적 분류기준의 하나인 macroconidia의 형태로는 구별이 안되기 때문에 종간 분류가 더욱 어려운 것으로 보고되어 있다(15). 그러한 이유로 Synder와 Tousson (22)은 *F. moniliforme* Sheldon 하나만을 section *Liseola*의 균으로 인정하였다. 그 후 Nelson 등(16)은 *F. moniliforme*, *F. anthophilum*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. succisae*로 구분하였고, Nirenberg (17)는 *F. anthophilum*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. succisae*와 *F. verticillioides*로 구분하였으나 아직도 논란이 되고 있다.

*Liseola*에 속하는 균주들의 electrophoretic karyotype 연구결과와 chromosomal length polymorphisms (CLPs)를 확인할 수 있었으며(13), 이러한 CLPs의 원인으로는 여러가지가 있으나 그 중의 하나는 다수의 tandem rRNA 염기서열 혹은 반복된 telomeric 염기서열을 포함하는 염색체와 연관이 되어진다고 알려져 있다. 본실험은 rDNA 중에서 IGS region을 택하여 종간 그들의 길이 변이를 비교하고 여러가지 효소로 절단하여 RFLPs를 비교하고자 하며, IGS가 종내 뿐만 아니라 종간의 변이를 비교하고자 한다. 더 나아가 기존에 발표된 section *Elegans* (10)의 결과와 비교하여 section *Liseola*와 section *Elegans*를 구분할 수 있는 genetic marker로서의 가능성을 보고자 본 실험을 계획하였다.

재료 및 방법

실험 균주 및 배양

Fusarium 균주 중에서 *Liseola*에 속하는 11균주를 택하였고 (Table 1), 배양은 Kim 등(10)의 방법을 따랐다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2287-5151. Fax: 02-394-9585
E-mail: genebang@sangmyung.ac.kr

IGS의 PCR에 의한 증폭

Kim 등 (10)의 방법에 의하여 순도 높은 genomic DNA 를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 primer CNL12 (5'-CTGAACG-CCTCTAAGTCAG-3')과 CNS1 (5'-GACAAGCTATATGACTA-CTG-3') (26)을 이용하여 IGS region을 증폭했으며 PCR 증폭 조건은 Kim (10)과 동일하였다. 증폭된 IGS region에 제한효소 처리 반응은 제조회사의 지시에 따라 행하였다. 전체 반응용액도 DNA, 10X buffer, 제한 효소와 D.W.를 20 μ l가 되게 하였다. 실험에 사용한 제한 효소는 모두 20종류로 *KpnI*, *BamHI*, *EcoRV*, *SphI*, *XbaI*, *HindIII*, *StuI*, *SacI*, *XhoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *TaqI*, *Sau3A*, *Sall*, *NruI*, *EcoRI*, *SmaI*, *PstI*, *HincII*이다.

각각의 반응용액은 효소에 따라 적정온도에 맞춘 항온수조에서 4 시간 동안 반응시킨 후 1.5% agarose gel 상에서 4 v/cm, 1시간동안 전기 영동하였다. Ethidium bromide로 염색하고 destaining 시킨 후 그 결과는 UV 상에서 polaroid 사진으로 기록하였다. 사진상으로 나타난 band들 중 동일한 거리로 이동한 fragment는 공동 band로 간주하였다. Data matrix의 경우 공통 위치에 있는 band를 1로, 공통 위치에 있지 않으면 0으로 하여 작성하였다. 이들은 PC-NTSYS (version 1.70) software를 사용하였고 program Qualitation을 통해 similarity matrix를 얻었다. Cluster analysis는 UPGMA를 사용하였고 program SHAN으로 similarity matrix를 얻었으며, dendrogram은 program TREE를 통해 얻을 수 있었다.

결과 및 고찰

IGS의 길이 변이

Section *Liseola*에 속하는 균주들의 IGS 부위를 primer CNL12와 CNS 1을 이용하여 PCR을 증폭한 결과 *F. moniliforme* 12만이 약 2.9 Kb로 증폭되었고 나머지 균주들은 모두 2.6 Kb였다(Fig. 1.A). 종간의 IGS길이는 변이를 *Saccharomyces* (14), *Amillaria* (23)등에서도 보고 되어 있다. Appel과 Gordon (2)이 *F. oxysporum*의 56 isolates를 대상으로 IGS 부위를 증폭했을 때 약 2.6 Kb가 생성되었다고 보고하였으나, Alves-Santos 등(1)은 *F. oxysporum* isolates에 크기가 다른 2.55 kb와 2.6 Kb 2가지 형이 있었다고 보고하고 있다. 또한 Kim 등(10)은 서로 다른 *F. oxysporum* f. sp. 22 균주에서 IGS 길이는 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*과 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* Korea 2균주에서만 2.5 Kb이고 나머지 *F. oxysporum* f. sp.에서는 모두 2.6 Kb로 보고 하여, IGS의 길이는 종내, 종간에서도 길이의 변이가 있음을 알 수 있다. 이러한 IGS부위의 길이 변이는 IGS부위 안에 있는 subrepeat units 배열에서 삽입 혹은 결실 등에 기인하는 것이고 이는 unequal crossing over의 결과로 생각되며 concerted evolution과정의 중간단계로 추정되어지고 있다(3).

IGS의 RFLPs 분석

유전적 다양성을 비교하기 위하여 *KpnI*, *BamHI*, *EcoRV*, *SphI*, *XbaI*, *HindIII*, *StuI*, *SacI*, *XhoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *TaqI*, *Sau*

3A, *Sall*, *NruI*, *EcoRI*, *SmaI*, *PstI*, *HincII*등 20종류의 제한 효소로 실험하였을 때 *BamHI*, *EcoRV*, *SphI*, *XbaI*, *HindIII*, *KpnI*, *StuI*, *SacI*, *XhoI*의 효소들은 인지 부위가 없었다. 반면에 *HaeIII*, *HinfI*, *AluI*, *TaqI*, *Sau3A*, *Sall*의 경우에는 인지 부위가 매우 많아 절단 후에 전기영동에 의해 분리된 band들 간에 구분이 잘 되지 않으며 정확한 크기의 추정이 어렵고 각 균주들간의 band pattern 비교를 할 수가 없었다. 이러한 결과는 *F. oxysporum*을 *Sau3A*로 처리하였을 때(2,10)의 결과와 일치하고 있다. *F. oxysporum*이 속하는 section *Elegans*와 section *Liseola*는 매우 유연관계가 가까운 것으로 알려져 있다(5). 이 두 section은 chlamydospore의 형성유무, 유성세대의 유무 등으로 구분할 수 있으나(27), 이들 section의 구분은 논란의 대상이 되어 왔다(25). IGS부위에서의 각 제한효소에 대한 인지부위를 비교하여 본 결과 *EcoRV*, *SacI*, *SphI*, *StuI*, *XbaI* 등이 두 section 모두에서 인지부위가 없었다. *KpnI*과 *XhoI*은 section *Liseola*에 속하는 균주에는 인지부위가 없으나, *Elegans*에는 인지 부위를 가진 균주들이 있었다. 또한 *HindIII*의 경우는 두 section에 속하는 균주 중에서 유일하게 *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*에서만 하나의 인지 site를 가지고 있었다. 반면에 *PstI*은 section *Elegans*에는 인지부위가 없으나 section *Liseola*에 속하는 균주중에 인지 부위를 가진 종이 있었다. 따라서 section에 따라 제한효소에 의한 인지부위에 차이가 있음을 알 수 있었다.

20개의 효소 중에서 IGS의 인지부위가 1~3개로 각각의 band 크기를 정확하게 측정, 비교할 수 있는 *EcoRI*, *HincII*, *Sall*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI*등 6개의 효소에 의하여 생성된 절편들의 양

Table 1. List of *Fusarium* spp. used in this study

Species	Isolate Number	Source*	Section
<i>F. subglutinans</i>	13572	NRRL	<i>Liseola</i>
<i>F. fujikuroi</i>	13565	NRRL	<i>Liseola</i>
<i>F. proliferatum</i>	13285	NRRL	<i>Liseola</i>
<i>F. moniliforme</i>	S1	Seoul Univ. (Korea)	<i>Liseola</i>
<i>F. moniliforme</i>	7219	Sydney Univ. (Australia)	<i>Liseola</i>
<i>F. annulatum</i>	13614	NRRL	<i>Liseola</i>
<i>F. moniliforme</i>	25	Seoul Univ. (Korea)	<i>Liseola</i>
<i>F. moniliforme</i>	4	Seoul Univ. (Korea)	<i>Liseola</i>
<i>F. moniliforme</i>	12	Seoul Univ. (Korea)	<i>Liseola</i>
<i>F. sacchari</i> var. <i>elongatum</i>	13618	NRRL	<i>Liseola</i>
<i>F. proliferatum</i> var. <i>minus</i>	13617	NRRL	<i>Liseola</i>

*Source: NRRL (ARS Culture Collection, Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois, U.S.A)

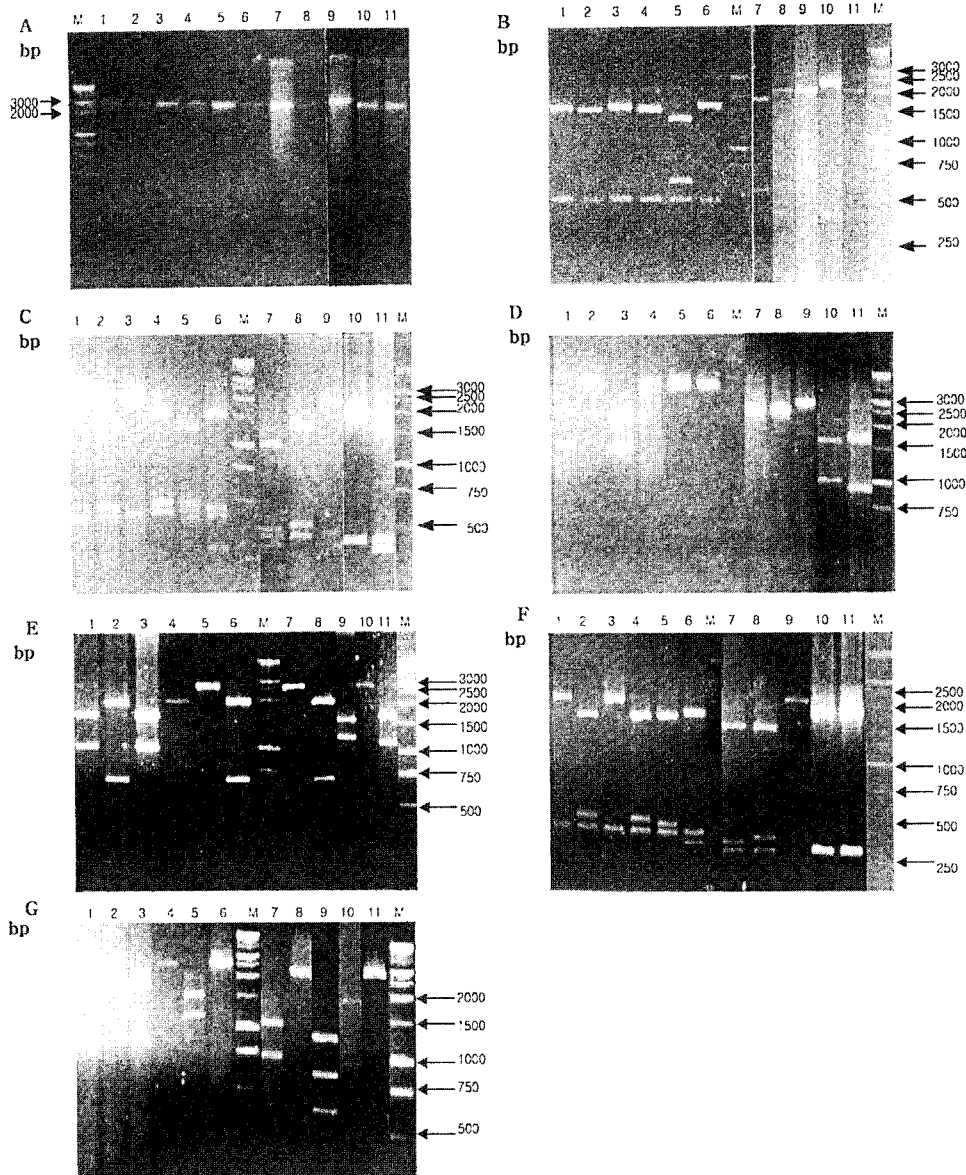


Fig. 1. Agarose gels showing: (A) amplification of the IGS region: and restriction patterns of PCR-amplified rDNA digested with *EcoRI* (B), *HincII* (C) *NruI* (D), *PstI* (E), *SalI* (F) and *SmaI* (G). M. DNA size marker of 1 Kb ladder, 1. *Fusarium subglutinans*, 2. *F. fujikuroi*, 3. *F. proliferatum*, 4. *F. moniliforme* s1, 5. *F. moniliforme* 7219, 6. *F. annulatum*, 7. *F. moniliforme* 25, 8. *F. moniliforme* 4, 9. *F. moniliforme* 12, 10. *F. sacchari* var. *elongatum*, 11. *F. proliferatum* var. *minus*.

상을 비교하였다(Fig. 1). 이들 효소에 의하여 생성된 절편의 크기와 양상을 참고로 하여 IGS haplotype을 비교하여 본 결과 11 균주 중에서 9 haplotype으로 구분할 수 있었다(Table 2).

IGS부위가 절단된 효소들 중에서 가장 다양한 양상을 보이는 것은 *HincII* (Fig. 1C)로서 실험한 모든 균주에서 1~3곳에 인지부위가 있었다. *EcoRI* (Fig. 1B)과 *SalI* (Fig. 1F)은 각각 1~2곳의 인지부위가 있었으며, *NruI* (Fig. 1D)과 *PstI* (Fig. 1E)은 인지부위가 균주에 따라 없거나 한곳에서 절단이 되었다. *SmaI* (Fig. 1G)은 *F. moniliforme* 12에서만 인지부위가 2곳이 있고, 나머지 균주들은 인지부위가 없거나 한곳에 인지부위가 있었다. 실험한 *F. moniliforme*는 국내 균주 4균주와 외국균주 1균주등 5균

주에서 haplotype II, III, IV, V, VIII의 각각 다른 IGS type을 보여주고 있었다. *F. moniliforme* 종은 유성세대인 *Gibberella fujikuroi*에 속하는 종이며 특히 경제적으로 중요한 농작물에 해를 줄 뿐만 아니라 사람, 동물에 까지도 독성을 가지고 있고 (11,12), 생장호르몬인 gibberellin을 생성하는 균주로서 알려져 있다. 최근에는 *F. moniliforme*라는 명칭도 *F. verticillioides*로 바뀌어져야 한다고 주장되고 있어(18) 아직도 균의 명칭과 분류에 대하여 논란의 대상이 되고 있는 균주이다. Xu와 Leslie (29)는 *F. moniliforme*의 IGS를 증폭하여 *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *EcoRV*, *SalI*등의 제한효소로 처리했을 때 polymorphism을 밝힐 수 없다고 보고한 바 있다. 그러나 본 실험의 결과 *BamHI*,

Table 2. Restriction fragment size (in base pairs) and pattern analysis of IGS region digested with *EcoR* I, *Hinc* II, *Nru* I, *Pst* I, *Sal* I and *Sma* I in *Fusarium* spp.

Strains	<i>EcoR</i> I	<i>Hinc</i> II	<i>Nru</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Sma</i> I	IGS haplotype	IGS band pattern
<i>F. subglutinans</i>	2200, 400	2200, 400	1650, 950	1600, 1000	2200, 400	1700, 900	I	A B C E B B
<i>F. fujikuroi</i>	2200, 400	1650, 550, 400	2600	2000, 600	1650, 500, 450	2600	II	A D B B E A
<i>F. proliferatum</i>	2200, 400	2200, 400	1650, 950	1600, 1000	2200, 400	1700, 900	I	A B C E B B
<i>F. moniliformes</i> 1	2200, 400	1650, 550, 400	2600	2000, 600	1650, 550, 450	2600	III	A D B B D A
<i>F. moniliforme</i> 7219	1600, 600, 400	1300, 500, 450, 350	2600	2600	1650, 500, 450	1500, 1100	IV	C F B A E C
<i>F. annulatum</i>	2200, 400	1600, 400, 350, 250	2600	2000, 600	1750, 450, 350	2600	VII	A E B B C A
<i>F. moniliforme</i> 25	1600, 600, 400	1300, 500, 450, 350	2600	2600	1650, 500, 450	1500, 1100	V	C F B A D C
<i>F. moniliforme</i> 4	2200, 400	1650, 550, 400	2600	2000, 600	1650, 500, 450	2600	II	A D B B E A
<i>F. moniliforme</i> 12	2200, 700	2400, 500	2900	1600, 1250	2400, 400	1400, 850, 650	VIII	B A A C A D
<i>F. sacchari</i> var. <i>elongatum</i>	2300, 400	2200, 400	1650, 950	2600	2200, 400	1700, 900	IX	D B C A B B
<i>F. proliferatum</i> var. <i>minus</i>	2200, 400	1850, 400, 350	1700, 900	1600, 1050	2200, 400	2600	VI	A C D D B A

*Hind*III, *Eco*RV은 *F. moniliforme*의 IGS에 인지 부위가 없었고, *Pst*I은 균주에 따라 인지부위가 없는 균주와 있는 균주로 구분되었었으며, *Eco*RI과 *Sal*I은 실험한 *F. moniliforme*에서 1~2곳의 인지부위가 있어 polymorphism을 확인할 수 있었다. *F. subglutinans*와 *F. proliferatum*은 동일한 IGS haplotype I에 속하였다. *F. subglutinans*와 *F. proliferatum*은 각각 Booth (4)에 의하여 모두 *F. moniliforme*로 분류되어졌었으나 Nelson 등(16)에 의하여 *F. subglutinans*와 *F. proliferatum*으로 각각 구분되어진 종이다. 형태적인 특징, 핵형, 2차 생성물 등에 있어서 이 두 종은 매우 유사하지만 rDNA의 ITS region의 RFLP를 비교했을 때(25), *F. proliferatum*은 type II로 *F. subglutinans*는 type I으로 설명되어진 바 있다. *F. proliferatum* var. *minus*는 Booth (4), Nelson 등(16)에 의하여 *F. moniliforme*에 포함시켰으나 형태가 곤봉모양의 microconidia 형성과 잎이 두꺼운 식물에 주로 기생하는 것이 특징으로 되어있다. 또한 *F. proliferatum*과는 형태적으로 유사하지만 기준 균사가 cottony-like이고 sporochia가 많이 생성되며 pyriform microconidia가 형성되지 않는 등의 차이로 인하여 Nirenberg (17)에 의하여 *F. proliferatum*과 구별되었다. IGS에서도 *F. proliferatum*과는 다른 type VI을 가지고 있다. *F. fujikuroi*는 ITS region의 RFLP type은 *F. proliferatum*과 동일한 type에 속하는 것으로 보고되어 있으나(25), IGS는 *F. proliferatum*과 다른 type II로서 *F. moniliforme* 4와 동일한 형을 가지고 있었다. *F. sacchari* var. *elongatum*의 rDNA ITS type은 *F. subglutinans*와 동일한 type을 가지고 있으나, IGS는 *F. subglutinans*와 다른 효소에 대한 절편양상은 유사하였으나 *Pst*I에 의한 인지부위가 *F. sacchari* var. *elongatum*에는 없어서 type IX로 구분되었다. *F. annulatum*은 *F. fujikuroi*와 유사한 RFLP pattern을 가지고 있으나 *Hinc*II에 대한 인지부위가 하나 더 있어 haplotype VII로 구분되었고 ITS type은 동일한 II type을 보여주었다. Appel과 Gordon (3)에 의하면 *F. oxysporum*에서 IGS 부위의 poly-

morphism는 유성생식이 결여된 종에서는 공통된 IGS 염기서열을 유도할 수 없기 때문에 설명하고 있으며, rDNA의 ITS II type의 변이도 또한 동일한 경우로 설명되어지고 있다(17).

균주들간의 유사도를 비교하였을 때(data not shown) 유사도는 48.9%에서 100% 사이로 크게 차이가 났고 이를 기본으로 dendrogram을 구하였을 때 크게 4 groups으로 나뉘었다(Fig. 2). Group I에는 *F. subglutinans*와 *F. proliferatum*, *F. sacchari* var. *elongatum*, *F. proliferatum* var. *minus*가 포함되어 haplotype I, VI, IX이 속하였고, 다음의 두 번째 group으로는 *F. fujikuroi*와 *moniliforme* 4, *moniliforme* S1과 *annulatum*이 속하여 haplotype II, III, VII이 포함되었다. 3번째 groups은 *moniliforme* 7219와 *moniliforme* 25가 포함되어 haplotype IV와 V가 있고 haplotype VIII인 *moniliforme* 12는 따로 group 되어져 있었다. *F. moniliforme*는 동일종이면서 3 group으로 나누어져 있었다. *F. moniliforme* 7219와 25는 지리학적으로 전혀 다른 두 균주임에도 한 group으로 나뉘어졌으며 이는 IGS haplotype은 pathogenicity, vegetative compatibility 혹은 geographic origin과도 관계가 없다는 보고와 일치하고 있다. *F. moniliforme* 12는 다른 나머지 균주와 48.9에서 61.7%의 낮은 유사도를 나타내어 다른 group으로 구분되어 왔으며 좀 더 다른 방법을 통해서 연구해야 하는 균주로 생각된다.

Section *Liseola*와 section *Elegans*의 구별은 끊임없이 논란이 되어왔다(25,27,17). 본 실험에서 section *Liseola*에 속하는 균주들과 이미 발표한 section *Elegans* 균주들(10)의 결과들을 참고로 하여 이들 section들에서 동시에 비교할 수 있는 *Eco*RI, *Hinc*II, *Hind*III, *Nru*I, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xho*I, *Kpn*I 등 9개의 제한 효소로 절단된 RFLP를 비교하여 similarity를 구하고 dendrogram을 구하였다(Fig. 3). 그 결과 *moniliforme* 12는 다른 모든 균주들과 낮은 유사도를 보여 주고 있으며 *moniliforme* 7219와 *moniliforme* 25가 속하는 group는 section *Liseola*와 section *Elegans*의 중간에 위치하였다. *F. moniliforme*을 제외한 다른 균

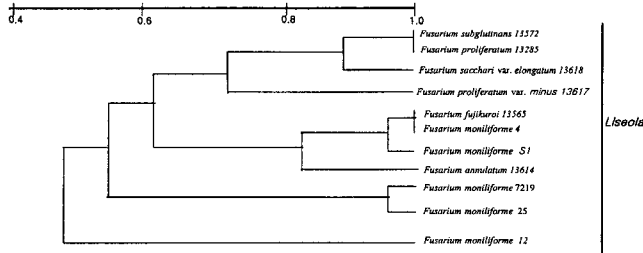


Fig. 2. UPGMA dendrogram showing relationship among the 11 strains of section *Liseola* based on restriction site data.

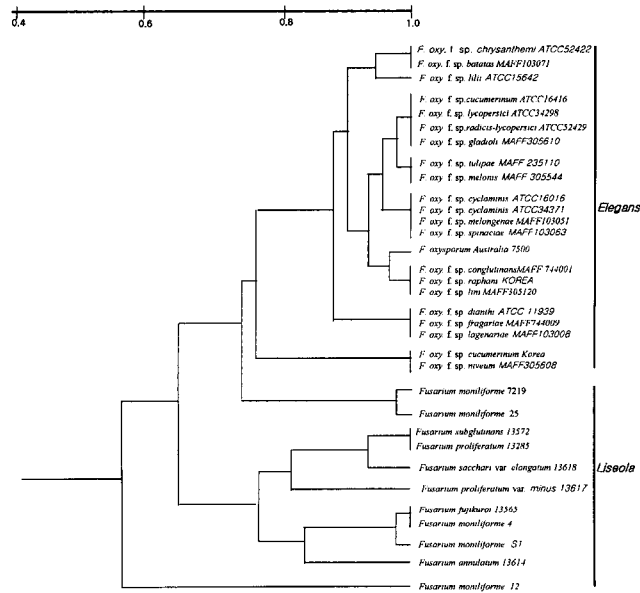


Fig 3. UPGMA dendrogram showing relationship among 11 strains of section *Liseola* based on restriction site data combined section *Elegans*.

주들에서는 대체로 *Liseola*에 속하는 균주와 section *Elegans*에 속하는 균주들이 구분되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 IGS는 section 간의 구별을 할 수 있는 가능성을 제시하고 있으나 좀더 정확한 정보는 염기서열과 좀더 많은 균종의 실험을 통해서 얻을 수 있을 것이다.

최근에 section *Liseola*의 유성세대인 *Gibberella fujikuroi* species complex를 구성하는 중에서 여러 가지 핵내 유전자를 이용하여 그들의 염기서열을 비교함으로써 새로운 계통유전학적인 연구가 이루어지고 있으나(18,19) 무성세대인 *Liseola*에 대한 정확한 계통분류연구는 앞으로 좀더 많은 균주와 좀더 다양한 유전자에 대한 연구가 계속 이루어져 combined data base가 이루어져야 할 것이다.

감사의 글

본 실험에 사용된 균주를 보내주신 NRRL의 O'Donell 박사님, 서울대학교의 이인원 박사님, Australia의 Burgess 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- Alves-Santos, F.M., E.P. Benito, A.P. Eslava, and J.M. Diaz-Minguez. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3335-3340.
- Appel, D.J. and T.R. Gordon. 1995. Intraspecific variation within populations of *Fusarium oxysporum* based on RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. *Exp. Mycol.* 19, 120-128.
- Appel, D.J. and T.R. Gordon. 1996. Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *MPMI* 9, 125-138.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. C.M.I.Kew. p237.
- Bruns, T.D., T.J. White, and J.W. Taylor 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22, 525-564.
- Edel, V., C. Steinberg, N. Gautheron, and C. Alabouvette. 1997. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soil born populations. *Phytopathol.* 87, 693-697.
- Gonzalez, I.L. and J.E. Sylvestri, 1995. Complete sequence of the 43Kb human ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer. *Genomics* 27, 320-328.
- Henrion, B., F. LeTacon, and F. Martin, 1992. Rapid identification of genetic variation of Ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122, 289-298.
- Hills, M.D. and M.T. Dixon, 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66, 411-453.
- Kim, H.J., Y.K. Choi, and B.R. Min, 2001. The variation of intergenic spacer (IGS) region of ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. *J. Microbiol.* 39, 265-272.
- Kuhlman, E.G. 1982. Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74, 759-768.
- Leslie, J.F. 1991. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*) *Phytopathol.* 81, 1058-1060.
- Min, B.R., M.S. Ahn, and Y.K. Choi. 1999. Study of electrophoretic Karyotype in section *Liseola* *Fusarium*. *K. J. Microbiol.* 35, 192-196.
- Molina, F. I., S. Jong, and J.L.Huffman, 1993. PCR amplification of the 3' external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. *FEMS Microbio Lett.* 108, 259-264.
- Nagy, R. and L. Hornok. 1994. Electrophoretic Karyotypes difference between two subspecies of *Fusarium acuminatum*. *Mycologia* 86, 208-208.
- Nelson, P. E., T.A. Toussoum, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Penn. State. Univ. Press. p193.
- Nirenberg, H.I. 1989. Identification of *Fusaria* occurring in Europe on cereals and potatoes. p179-193. In *Fusarium mycotoxins*, taxonomy and pathogenicity. J. Chelkowski (ed.). Elisvier. New York.
- O'Donell, K., E. Cigelnik, and H.I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465-493.
- O'Donell, K., H.I. Nirenberg, T. Aoki, and E. Cigelnik. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41, 61-78.

20. Paraskevi, V.P., P.P. Antonion and M.A. Typas. 2000. The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: Intraspecific heterogeneity within the intergence spacer region. *Fungal Genet. Biol.* 29, 19-29.
21. Spreadbury, C.L., B.W. Bainbridge, and J. Cohen, 1990. Restriction fragment length polymorphisms in isolates of *Aspergillus fumigatus* probed with part of the intergenic spacer region from the ribosomal RNA gene complex of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1991-1994.
22. Synder, W.C. and Y.A. Toussoun. 1965. Current status of taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. *Phytopathol.* 55, 833-837.
23. Terashima, K., Y. Kawashima, J.Y. Cha, and K. Miura 1998. Identification of *Armillaria* species from Hokkaido by analysis of the intergenic spacer (IGS) region of ribosomal DNA using PCR-RFLPs. *Mycoscience* 39, 179-183.
24. Vilgaly, S.R. and D. Gonzalez, 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 80, 151-158.
25. Waalwijk, C., R.P. Baayen, J.R.A. De Koning, and W. Gams. 1996. Ribosomal DNA analysis challenge the status of *Fusarium* Section *Liseola* and *Elegans*. *Sydowia* 48, 90-104.
26. White, T.T., T.D. Bruns, S. Lee, and J. Taylor 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes from phylogenetics. p315-322. In: Innis M.A., Gel frand D.H., Sninsky J.J., and White T. J. (eds). PCR protocols. Academic Press. San Diego. California.
27. Windels, C.E. 1991. Current Status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathol.* 81, 1048-1051.
28. Woudt, L.P., A. Neuvel, A. Sikkema, M.Q.J.M. Van Grinsven, W.A.J. de Milliano, C.L. Campbell, and J.F. Leslie. 1995. Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. *Phytopathol.* 85, 1348-1355.
29. Xu, Jin-rong and J.F. Lesle 1996. A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetics* 143, 175-189.

(Received November 20, 2001/Accepted February 27, 2002)

ABSTRACT: PCR-RFLP Analysis of Ribosomal DNA Intergenic Spacer Region in *Fusarium* section *Liseola*.

Kyung-Eun Lee, Yong-Keel Choi,² and Byung-Re Min^{1*} (¹Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea, ²Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-600, Korea)

The intergenic spacer (IGS) region of the ribosomal DNA of species in *Fusarium* section *Liseola* was analyzed by amplification and subsequent digestion with several restriction enzymes. The length of the amplified IGS region was about 2.6 Kb in all strains except *F. moniliforme* 12 which was about 2.9 Kb. The enzymes, *EcoRI*, *Hinc II*, *Sal I*, *HindIII*, *PstI* and *SmaI*, digested the IGS region and nine haplotypes were identified among 11 strains. In the dendrogram based on PCR-RFLP of IGS region combined the results of section *Liseola* in this study and section *Elegans* in previous study, variation in the IGS appears to offer considerable potential to resolve intraspecific relationship as well as interspecies or intersection.