

GOVP1200608902

*Cryphonectria parasitica*의 신호전달 관련 저병원성화  
유전자 조절과 국내 특이 mycovirus를 이용한 식물병방제

Regulation of hypoviral-regulated genes in signal  
transduction of *Cryphonectria parasitica* and the bio-control  
of phytopathogenic fungus by mycovirus

전 북 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “*Cryphonectria parasitica*의 신호전달 관련 저병원성화 유전자 조절과 국내 특이 mycovirus를 이용한 식물병방제” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 김 대 혁

세부연구책임자 : 김 대 혁

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 차 병 진

## 요 약 문

### I. 제 목

*Cryphonectria parasitica*의 신호전달 관련 저병원성화 유전자 조절과 국내 특이 mycovirus를 이용한 식물병방제

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr는 밤나무에 줄기마름병을 유발하여 치명적인 손상을 야기하는 강력한 식물병원성 진균으로, 북미대륙에서는 밤나무 산림의 멸종을 야기한 바 있고, 국내 밤나무의 경우도 *C. parasitica*에 의해 심각한 수준으로 감염되어 있으며, 수령의 노화와 함께 병균에 의한 피해가 심각한 수준에 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 이러한 특징을 지니는 *C. parasitica*에 곰팡이 특이적인 mycovirus가 전파되어 감염을 일으키면, 병원균의 병원성이 감소되고 (Hypovirulence), 여러 가지 형태학적, 생화학적 및 분자생물학적 변화를 유발하게 되는데, 본 과제에서는 *C. parasitica*에 mycovirus CHV1의 감염에 의한 hypovirulence를 유도하는 *C. parasitica*의 신호전달체계를 규명하며, 국내 CHV의 다양성 및 유전체 분석을 통하여 mycovirus에 의한 진균의 저병원성화 기작을 분자, 개체, 집단 수준에서 밝히고자 하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

CHV1에 의해 영향을 받는 *C. parasitica*의 유전자 발현 조절 기작으로는, CHV1 감염이 *C. parasitica*의 정상적인 G-protein 관련 신호전달과정(signal-transduction pathway)을 제어한다는 가설이 제시되었으나, 최근의 본 연구진의 결과는 G-protein 외의 세포내 신호전달 과정의 Ser/Thr protein kinase(*cppk1*)가 mycovirus에 의한 진균의 유전자 조절에서 중요한 target이 된다는 것을 증명하게 되어, mycovirus에

특이적인 신호전달계의 주요 유전자에 대한 규명과 그들의 발현조절 기작을 연구할 필요성이 제기되고 있다. 따라서 본 과제에서는 첫째, CHV1에 의해 조절 받는 novel protein kinase(*cppk1*)의 특성 분석 및 *cppk1*과 interacting하는 단백질 및 유전자들을 분리·특성화하여 생물적 기능을 검색하여 *cppk1*-관련 신호전달체계를 규명하고자 하였으며, 둘째로는 국내의 *C. parasitica*에 존재하는 mycovirus의 다양성 및 type을 결정하고, 이들과 국내 *C. parasitica* 균주의 mycoviral symptom간의 상관관계를 확립하여 각 symptom당 특이 mycovirus 유전체를 분석함으로 국내 균주의 hypovirulence유도에 가장 효과가 있는 mycovirus를 규명하고자 했다.

이러한 연구의 결과로, CHV1에 특이적인 *C. parasitica* 신호전달 protein kinase 유전자(*cppk1*)의 성장과 관련된 생물적 기능을 확인하였고, 이 유전자 산물과 반응하는 세포내 단백질인 Enolase, Bck1 like MEKK, cPLC 유전자를 각각 cloning하고 특성을 밝혀 CHV1 관련 신호전달과정의 일부를 규명하였다. 그 외에 국내의 밤나무에서 분리된 *C. parasitica* 균주를 대상으로 균사융합성의 다양성을 알아보하고자 vegetative compatibility group (VCG)을 결정하였으며, 균주의 VCG type간 hyphal fusion을 통한 mycovirus의 병징을 확인하고 ds-RNA를 분리 특성화 한 뒤, 이를 바탕으로 저병원성 전이균주 제조하였다. 이들 저병원성 전이균주의 제조는 field trial의 기본적인 방제 방법으로 적용이 될것이다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국제적으로도 본 과제와 관련된 *C. parasitica* 균주를 대상으로 genomics, proteomics, 등의 연구가 시작되고 있으며, Dr. Nuss등에 의해 주도적으로 추진되는 세계적인 Genome project group에 본 연구진의 참여가 예상되고 있는데, 이는 본 과제를 통해 발표된 연구 결과물들이 국제적인 인정을 받았기 때문으로 생각된다. 또한 본 과제를 통해 밝혀진 균주의 유전적 다양성에 대한 field study가 분자생물학적 방법을 이용하여 분석되었는데, 이러한 방법은 환경 친화적 병방제를 추구하는 유사한 진균병의 생물적 방제에 응용 모델로 활용이 가능 할 것이다. 또한 본 연구는 새로운 형태의 병방제 기술에 관련된 기본 자료를 확보 하는 것 외에 사상성 진균의 유전자발현 및 조절에 관련된 분야이므로, 산업적으로 활용이 많은 진균을 통한 유용물질 생산을 극대화 할 수 있는 유전자 발현정보를 확보하였다고 할 수 있다. 따라서 이차대사 산물 또는 재조합 단백질 생산에 필요한 host로써의 진균의 이용가치를 더욱 높일 수 있을 것이다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

The chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* virtually eliminated the American chestnut tree in the early 20th century. However, strains that contain the double-stranded (ds) RNA virus *Cryphonectria hypovirus1*(CHV1) display characteristic symptoms of reduced virulence, i.e., hypovirulence, as well as diverse hypovirulence-associated traits, such as reduced pigmentation, sporulation, laccase production, and oxalate accumulation.

We previously isolated the *cppk1* gene encoded the Ser/Thr protein kinase of *Cryphonectria parasitica* and was transcriptionally up-regulated by the presence of hypovirus CHV1-EP713. To determine the biological function of *cppk1*, in this study, we constructed a *cppk1*-null mutant using targeted homologous recombination. The phenotype of pure *cppk1*-null mutant exhibited dramatic changes in colony morphology showing the characteristics of yeast-like microcolonial growth, no sporulation, and no hyphal differentiation into feeding hyphae. Moreover, hyphae of the *cppk1*-null mutant were shortened and hyperbranched with globose to bulbose cells. Electron microscopy of the *cppk1*-null mutant revealed the presence of intrahyphal hyphae, which was the most striking ultrastructural change, indicated that *cppk1* is important for coordinating growth with development and maintaining cell wall integrity.

To isolate the target proteins of Cppk1, we further analysed the cell-extracts of *C. parasitica* phosphorylated by Cppk1 using 2-D PAGE. Four distinctive protein spots were randomly selected and the MALDI-TOF MS analysis conducted, followed by a protein data base search was conducted. The homology search, based on the molecular weight of digested protein fragment, indicated that the proteins appeared seemed to be a fungal enolase, Bck1 like MEKK, and phosphatidyl inositol-specific phospholipase C (PLC) homologue. To get clone of the each genes, we conducted the multiple alignments of each proteins, designed several degenerated primers from the conserved region of each proteins, and PCR using the degenerated primers. The screening of the genomic  $\lambda$  library of *C. parasitica*, using the cloned fragments as a probe, we finally isolated *enol1*, *Bck1* like MEKK, and *cplc1* genes.

To better characterize fungal gene regulation by hypovirus, we selected the *cplc1* gene for further analysis, because hypovirus infection of the chestnut blight fungus *C. parasitica* is known to downregulate the fungal laccase1 (*lac1*), the modulation of which is tightly governed by the inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) and calcium second messenger system in a virus-free strain. Sequence

analysis of the *cplc1* gene indicated that the protein product contained both the X and Y domains, which are the two conserved regions found in all known PLCs, and the gene organization appeared to be highly similar to that of a  $\delta$  type PLC. Disruption of the *cplc1* gene resulted in slow growth and produced colonies characterized by little aerial mycelia and deep orange in color. Accordingly, reduced virulence of the *cplc1*-null mutant as compared to the wild type was observed, which can be ascribed to the growth defect. However, other PLC-associated characteristics including temperature sensitivity and osmosensitivity did not differ from the wild-type strain, indicating that the *cplc1* gene is required for normal mycelial growth rate and colony morphology, and regulates the *lac1* expression, which is also modulated by the hypovirus.

In this study, we also isolated a total of 87 *C. parasitica* strains showing hypovirulence from 670 *C. parasitica* isolates, which were collected from major chestnut plantations all over Korea. To determine the genetic diversity of the fungal strains, we classified all strains into 121 vegetative compatibility group, and among them, 40% of total strains were shown to belong in three major VC groups, indicating there are a few major VC group in Korea and it is possible to control the infection of *C. parasitica* by transfer dsRNA through hyphal fusion in nature. To determine the transfer of ds-RNA between fungal strains, we selected 7 strong virulent strains and 5 ds-RNA containing strains, tried hyphal fusion between them, and finally got 11 hypovirulent strains which containing same ds-RNA isolated from parental strains.

The results obtained through this studies we obtained the information of fungal signal transduction, that regulate many important mycovirus-specific genes related in the virulence of *C. parasitica*. These results will be help to understand the natural biological control of fungal pathogen at the molecular level, which can be applied for the establishment of better strategies to prevent fungal pathogen.

## CONTENTS (영 문 목 차)

Submission form -----	1
SUMMARY (Korean) -----	2
SUMMARY (English) -----	4
CONTENTS (English) -----	6
CONTENTS (Korean) -----	7
Chapter 1. Introduction -----	8
Part 1 Purpose of the R&D -----	8
Part 2 Necessity of the R&D -----	8
Chapter 2. Status of the technology-----	14
Part 1 Status of international research-----	14
Part 2 Status of domestic research-----	15
Chapter 3 Contents and Results of the R&D-----	16
Part 1 Determination of the signal transduction pathway of cppk1, which regulated specifically by mycovirus -----	16
Part 2 Determination Mycoviral diversity isolated from <i>C. parasitica</i> in Korea -----	22
Chapter 4. Achievement and contribution of the R&D-----	30
Chapter 5 Plan to apply the results of R&D-----	31
Chapter 6 R&D information collected from foreign country-----	32
Chapter 7 Reference-----	33
Attachment -----	34

## 목 차

제1장 연구개발과제의 개요 -----	8
제1절 연구개발의 목적 -----	8
제2절 연구개발의 필요성 -----	8
제2장 국내외 기술개발 현황 -----	14
제1절 국외의 기술 동향 및 수준 -----	14
제2절 국내의 기술 동향 및 수준 -----	15
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	16
제1절 <i>C. parasitica</i> 에서 mycovirus에 특이적인 신호전달 protein kinase, <i>cppk1</i> 의 pathway 규명 및 기능 확인 -----	16
1. <i>C. parasitica</i> 신호전달 protein kinase 유전자( <i>cppk1</i> )의 생물적 기능확인 ----	16
2. Cppk1 단백질의 <i>in vitro</i> 특성 확인 -----	16
3. Cppk1 target 단백질의 확인 및 분리 -----	18
4. Cppk1 target 단백질 coding 유전자의 cloning 및 특성화 -----	19
제2절 국내 <i>C. parasitica</i> 에 감염하는 Mycovirus의 다양성 -----	22
1. 국내 <i>C.parasitica</i> 집단에 존재하는 mycovirus의 typing -----	22
2. 균주의 VCG type간 hyphal fusion을 통한 mycovirus의 병징 확인 --	24
3. 국내 mycovirus의 유전자 구조를 기준으로한 typing -----	24
4. 국내 주요 mycovirus의 유전체 cloning 및 특성화 -----	26
5. 저병원성 전이균주 제조 -----	26
6. Vegetative compatibility를 이용한 전이 균주 선발 -----	26
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	30
제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	31
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	32
제7장 참고문헌 -----	33
별첨 -----	34



## 제1장 연구개발과제의 개요

### 제1절 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제에서는 밤나무 줄기마름병균인 *C. parasitica*에 mycovirus CHV1의 감염에 의한 hypovirulence를 유도하는 *C. parasitica*의 신호전달체계를 규명하며, 국내 CHV의 다양성 및 유전체 분석을 통하여 mycovirus에 의한 진균의 저병원성화 기작을 분자, 개체, 집단 수준에서 밝히고자 하였다.

이를 위해;

- ① CHV1에 의해 조절 받는 novel protein kinase(*cppk1*)의 특성 분석 및 *cppk1*과 interacting하는 단백질 및 유전자들을 분리·특성화하여 생물적 기능을 검색하여 *cppk1*-관련 신호전달체계를 규명하고자 하였으며
- ② 국내의 *C. parasitica*에 존재하는 mycovirus의 다양성 및 type을 결정하고, 이들과 국내 *C. parasitica* 균주의 mycoviral symptom간의 상관관계를 확립하여 각 symptom당 특이 mycovirus 유전체를 분석함으로써 국내 균주의 hypovirulence유도에 가장 효과가 있는 mycovirus를 규명하고자 했다.

### 제2절 연구개발의 필요성

#### 1. 과학 기술적 측면

*Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr는 밤나무에 줄기마름병을 유발하여 치명적인 손상을 야기하는 강력한 식물병원성 진균으로, 약 100여년 전에 밤나무 육종을 위하여 아시아에서 수입된 모본에 의해 감염되어 전파되기 시작한 북미대륙에서는 밤나무 산림의 멸종을 야기한 바 있다. 또한 비교적 저항성이 있는 것으로 알려진 국내 밤나무의 경우도 *C. parasitica*에 의해 심각한 수준으로 감염되어 있으며 (>30% among all canker area), 수령의 노화와 함께 병균에 의한 피해가 심각한 수준에 있는 것으로 보고되고 있다 (Ju et al., 2002).

이들이 이렇게 강력한 pathogen으로 작용하는 이유는 넓은 지역과 시간에 걸쳐 쉽게 퍼질 수 있는 다량의 spore를 갖고 있고, 다양한 환경 속에서도 숙주에 대한 특이성과 감염성이 매우 높아, 쉽게 감염하고 적응하여 숙주의 저항성을 피해 생존하는 능력이 뛰어나기 때문이다. 그러나 이러한 특징을 지니는 *C. parasitica*에 곰팡이 특이적인 mycovirus가 전파되어 감염을 일으키면, 병원균 내에 다양하고 새로운 특징을 나타나게 된다.

식물 병원성 진균에서 많이 보고되는 dsRNA로 구성된 virus 혹은 virus-like particle의 존재는 많은 경우에 mycovirus로서 일반적 현상으로 받아들여지고 있는데, 특히 *C. parasitica*의 경우 세포질에 존재하는 dsRNA로 구성된 mycovirus의 감염이 *C. parasitica*의 많은 형태적 차이 및 그와 관련된 병징을 나타내는 직접적인 원인임이 분자생물학적 수준에서 증명된 바 있다. 즉 mycovirus 감염경로는 이병균주 (virus-containing *C. parasitica*)와 건전균주간의 균사간 세포융합(anastomosis; hyphal fusion)에 의해서 이병균주에서 건전균주로 virus가 옮겨지는 것으로 알려져 있는데, 현재까지 mycovirus를 순수 분리하여 기주인 진균에 직접 접종하는 방법이 성공된바 없기 때문에 mycovirus를 포함하는 *C. parasitica*의 여러 변화가 mycovirus의 감염에 의한 것이 아니라 혹시 세포 융합중에 일어나는 기타 물질의 교환에 의한 것이 아니냐 하는 의문이 있어 왔으나, mycovirus의 병원성 재조합체 (infectious cDNA copy of dsRNA)로만 형질전환된 재조합 *C. parasitica*가 mycovirus를 포함하는 균주와 동일한 병징이 나타나는 것을 확인함으로써 mycovirus의 감염이 균주의 다양한 병징을 나타나게 하는 직접적 원인임을 증명하였다 (Choi and Nuss, 1992). 따라서 *C. parasitica*에서 밝혀진 mycovirus와의 상호관계는 지금까지 보고된 진균과 mycovirus간의 상호작용의 예 중에서 가장 많이 앞서서 연구되고 있고, 식물병원성 진균의 유전자 발현 기작 연구와 함께 *Neurospora*, *Aspergillus spp.*등에서 알려지지 않은 mycovirus에 의한 진균의 유전자 발현 및 조절부분과 이로 인한 식물에 대한 저병원성현상(hypovirulence)이 가장 잘 정립된 model system이기도 하다.

현재까지 알려진 바로는, *C. parasitica*에 mycovirus가 감염 되었을 때 나타나는 특징은 기주 특이적이기 보다는 mycovirus strain에 따르는 것으로 밝혀졌다. 즉 mycovirus의 어떤 strain에 감염되었는지에 따라 *C. parasitica*의 병징이 결정되는 것이다 (Chen and Nuss, 1999). 지금까지 가장 많은 연구가 이루어진 mycovirus strain인 *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)에 감염된 *C. parasitica* 균주의 병징은

아래와 같다.

- ① 저병원성화 (Hypovirulence): CHV1 감염으로 인하여 밤나무에 대한 *C. parasitica*의 병원성이 감소된다(Anagnostakis, 1982; Van Alfen, 1982; Van Alfen et al., 1975).
- ② 형태적 생화학적 변화 (Biraghi et al., 1953, Day et al., 1977; Hillman et al., 1990):
  - 색소체 형성 감소
  - 유성 및 무성포자 형성 감소
  - laccase (polyphenol oxidase) 생성 감소
  - Oxalate 생성 감소
- ③ 분자생물학적 변화: CHV1감염이 *C. parasitica*의 특정 유전자들의 발현에 영향을 미치며, 그 기작으로는 이들 특정 유전자들의 전사과정을 억제 (transcriptional down-regulation)하는 것이 확인되었다(Kim et al., 1995; Rigling and Van Alfen, 1991; Zhang et al., 1993; Kazmierczak et al., 1996). CHV1의 존재에 의해 특이적으로 down-regulation되는 *C. parasitica*의 유전자들은 아래와 같다 (Kim et al., 1995; Zhang et al., 1993; Zhang et al., 1994; Varley et al., 1992).
  - *LacI*; extracellular laccase gene
  - *CrpI*; cell surface associated-fungal hydrophobin gene
  - *Mf2/1 & 2/2*, mating pheromone gene
  - *Cut1*; cutinase gene

이상의 virus 감염에 의해 나타나는 *C. parasitica* 병징의 특징을 요약하면, 다른 virus의 감염의 경우와는 달리 기주인 *C. parasitica*의 특정유전자들의 전사과정을 억제하며, 그 결과 균사의 생장 등 영양생식에는 영향을 주지 않으나 유·무성포자생성 등과 균사의 분화 및 발달과정(differentiation, development)에 영향을 끼쳐 미성장 상태(juvenile stage)에 머물도록 하는 특징을 나타내는 것을 알 수 있으며, 이러한 병징과 관련된 특징들은 mycovirus에 의한 진균의 유전자 발현 조절을 관찰·연구하는데 좋은 marker로서 활용이 가능하다.

CHV1에 의해 영향을 받는 *C. parasitica*의 유전자 발현 조절 기작으로는, CHV1

감염이 *C. parasitica*의 정상적인 신호전달과정(signal-transduction pathway)을 "disturb"한다는 가설이 G-protein( $G_{\alpha i}$  와  $G_{\beta}$ )의 cloning과 이들 유전자를 knock-out 시킨 null mutant에서 보여 지는 부분적인 viral symptom-like phenotype들을 통해 제시되었으나(Gao and Nuss, 1996), 이들 G protein의 발현에 대한 mycovirus CHV1의 직접적인 인과관계는 좀 더 연구가 필요한 현실이다(Zhang et al., 1998). 그러나 최근 본 연구진의 결과는 G-protein외의 세포내 신호전달 과정의 Ser/Thr protein kinase(*cppk1*)가 mycovirus에 의한 진균의 유전자 조절에서 중요한 target 이 된다는 것을 증명하게 되어 (Kim et al., 2002), mycovirus에 특이적인 신호전달 계의 주요 유전자에 대한 규명과 그들의 발현조절 기작을 연구할 필요성이 제기되고 있다. 이러한 유전자 조절의 결과로 얻어지는 병징간의 1:1 대응관계를 정립하는 연구를 시행하여, virus에 의한 기주의 유전자 발현 조절 기작이라는 기초학문분야와 생물적 방제의 분자수준의 이해 및 활용이라는 응용면에서도 많은 기여를 하리라 기대 되어 지속적인 관심과 연구가 필요하다고 하겠다.

## 2. 경제·산업적 측면

국내의 경우 밤은 표1에서와 같이 단일 임산물로는 가장 경제성이 높을 뿐 아니라, 단일 농산물로는 가장 수출이 많은 품목이다. 하지만 최근의 연구에 의하면 비교적 저항성으로 알려진 국내 밤나무의 경우도 *C. parasitica*에 의해 심각한 수준으로 감염 되어 있으며 (Ju et al., 2002), 그로 인한 생산성 저하는, 저가의 가격으로 수입되는 중국산 밤과의 경쟁력 또한 심각한 수준으로 떨어져 이에 대한 대책이 필요한 실정이다.

*C. parasitica*의 병방제를 위한 외국의 연구진에 의한 시도를 살펴보면, mycovirus의 DNA copy(infectious cDNA copy of dsRNA)를 이용하여 병원성 균주를 형질전환 시켜 병원성 균주를 저병원성균주로 전환하는데 성공하였다(Choi and Nuss, 1992). 따라서 이렇게 얻어진 형질전환체를 *C. parasitica*의 집단내에 살포함으로 병방제를 시도하고 기대하였으나, 이들 형질전환체의 genome에 삽입된 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)의 전사과정 결과 생기는 dsRNA는 CHV1과 마찬가지로 *C. parasitica*의 유성생식을 억제하기 때문에(Zhang et al., 1993), 염색체 내에 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)를 포함하면서 다양한 체세포 융합군 (Vegetative Compatibility Group)에 속하는 progeny를 기대하기 어렵게 되어 전체적인 집단내의 mycovirus의 전파를 이용한 식물병 방제에 한계를 드러냈다.

현재 밤나무 줄기마름병균에 대한 방제를 위해 다각적인 노력을 기울인 결과, CHV1이 감염된 저병원성 균주로부터 병원성 균주로의 CHV1의 전달이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 그러나 이와 같은 CHV1의 매개방법은 순수 분리한 CHV1 particle을 병원성균주로 직접적으로 감염시킬 수 없기 때문에 현재까지 그 유일한 매개방법으로는 저병원성균주와 근접한 병원성 균주간의 균사융합(hyphal fusion or anastomosis)을 통한 것이 유일한 것으로 밝혀졌다. 따라서 효과적인 생물적 방제를 위해서는 전체 *C. parasitica* 집단에서 균주간 균사융합을 가능하게 하는 vegetative compatibility group(VCG)의 조성이 매우 중요한 것으로 보고되고 있다. 실제 유럽의 경우에는 유럽전체의 *C. parasitica*가 2 또는 3개의 VC group에 속함으로 VCG 조성이 매우 단순하여 집단내 어느 한 균주에 mycovirus가 감염되게 되면 집단내 VCG 조성이 단순한 관계로 주위의 다른 균주와 균사융합이 용이하여 쉽사리 CHV1의 전파가 이루어져 전체 집단이 저병원성화 됨으로 식물병 방제의 효과가 매우 높으나, 북미대륙의 경우는 전체 *C. parasitica*의 VC group이 매우 다양하여 집단내에 어느 균주에 mycovirus가 감염되어도 저병원성 균주와 주위의 다른 균주와 VC group이 상이한 관계로 균사융합을 이루지 못함으로 결과적으로 이들 mycovirus의 전파가 이루어지지 않게 되어 높은 방제효과를 거둘 수가 없음이 증명되어 이를 이용한 방제에서 한계를 나타내었다.

하지만 본 연구진은 그 간의 연구결과 (Ju et al., 2002) 국내 균주의 VCG 조성이 비록 복잡하나 어느 한 VCG가 대부분을 차지하는 우점 현상이 존재하며, 따라서 이들 균주에 dsRNA를 도입하여 적극 활용한다면 국내 전체 population을 대상으로 한 효과적인 생물적 방제가 가능하리라 기대하고 있으며, 예비 실험결과 국내에도 dsRNA로 구성된 mycovirus가 존재함으로 국내 균주에 대한 효과적인 국산 mycovirus의 탐색과 특성 규명이 시급하다고 하겠다.

### 3. 사회·문화적 측면

사상성 진균의 유전자 발현 및 조절에 관한 본 연구는 유용물질의 생산 및 활용에서 두각을 나타내는 고부가가치 진균의 생명공학적 가치를 제고 할뿐만 아니라, hypovirulence에 대한 정확한 기작 규명은 식물병 방제에서 환경 및 생태계에 많은 부정적인 영향을 미치는 화학적 약제처리를 대체하는 생물학적 방제에 대한 기초지식을 제공하여 이미 자연계에 존재하는 기주-기생체간의 상호관계를 응용함으로써 환경

친화적이며, 따라서 사회적 인식측면에서도 긍정적인 효과를 나타내리라 기대한다.

표1. 국내 밤 생산량 및 경제적 가치

(unit):백만원

구 분	Nut and Fruit (ton)							
	밤 (Chestnut)		호도 (Walnut)		대추 (Jujube)		잣 (Pinenut)	
년도	수량	금액	수량	금액	수량	금액	수량	금액
1986	58,411	45,110	880	3,601	3,274	12,518	429	2,025
1987	57,048	64,283	972	5,296	4,636	25,054	785	4,356
1988	77,652	75,115	1,290	5,674	4,522	24,168	1,127	4,349
1989	78,752	87,681	1,297	5,984	5,064	28,549	1,164	4,519
1990	85,043	95,931	906	4,516	5,953	38,010	869	3,436
1991	89,748	104,931	1,023	6,220	7,578	57,313	715	5,023
1992	101,742	106,338	1,118	6,566	11,216	66,320	436	2,513
1993	80,994	189,397	1,173	7,072	7,038	52,182	970	4,766
1994	100,163	221,255	1,514	10,289	12,600	69,587	1,579	4,338
1995	93,655	193,012	1,311	10,737	13,180	73,868	1,085	5,423
<b>1996</b>	<b>108,346</b>	<b>223,652</b>	<b>1,149</b>	<b>9,876</b>	<b>13,969</b>	<b>80,057</b>	<b>497</b>	<b>3,488</b>

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국외의 기술 동향 및 수준

현재 국외의 경우 *C. parasitica*의 hypovirulence 연구 분야에서 많은 업적을 남기는 group으로는 미국 U. of California at Davis 대학의 Dr. N. K. Van Alfen 교수와 U. of Maryland의 Dr. D. L. Nuss 그리고 Cornell 대학의 Dr. M. G. Milgroom 등이 있다.

먼저 Dr. Van Alfen 교수의 경우는 *C. parasitica*의 존재하는 ds-RNA와 hypovirulence와의 관계를 제시하였고, ds-RNA의 감염에 의해 *C. parasitica*의 주요 유전자가 down-regulation됨을 처음으로 증명하였으며(Kazmierczak et al., 1996), 이들 특정 유전자들의 생물학적인 기능을 유전자 치환의 방법에 의해 연구함으로써 병원성에 밀접한 유전자의 확보에 관한 연구를 계속 수행하고 있다(Kim et al., 1995).

Dr. N. L. Nuss의 경우는 hypovirulence의 연구에서 특히 mycovirus인 CHV1의 유전자지도와 이들의 기능(Choi et al., 1991) 그리고 앞서 기술한 바처럼 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)를 이용하여 병원성 진균을 형질전환함으로써 이들을 저병원성 균주로 유도할 수 있음을 증명하였으며(Choi and Nuss, 1991) 또한 이와 같은 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)를 이용하여 *C. parasitica*와 유연관계에 있는 다른 진균에서도 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)를 도입하면 진균의 세포질 내에 ds-RNA의 mycovirus가 생성됨을 제시함으로써 hypovirulence 현상이 다른 여러 진균에서도 이용될 수 있음을 제시하였다(Choi and Nuss, 1992). 또한 이렇게 얻어진 형질전환체를 *C. parasitica*의 집단내에 살포함으로써 병방제를 시도하고 기대하였으나, 이들 형질전환체의 genome에 삽입된 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)의 전사과정 결과 생기는 dsRNA는 CHV1과 마찬가지로 *C. parasitica*의 유성생식을 억제하기 때문에(Zhang et al., 1993), 염색체내에 병원성 재조합체(infectious cDNA copy of dsRNA)를 포함하면서 다양한 체세포 융합군 (Vegetative Compatibility Group)에 속하는 progeny를 기대하기 어렵게되어 전체적인 집단내의 mycovirus의 전파를 이용한 식

물병방제에 한계를 드러냈다. 또한 최근에는 CHV1 감염에 의한 *C. parasitica*의 signal transduction pathway에 관련된 G-protein유전자를 cloning 하여 이들의 생물학적 기능에 관한 연구에 많은 관심을 기울이고 있다(Chen et al., 1996).

Dr. M. G. Milgroom은 *C. parasitica*의 population biology에 많은 연구를 하고 있으며, 북미지역의 균주는 많은 종류의 VC group으로 구성되어 있음을 밝혔으며 이로 인해 균사간의 세포융합이 용이하지 못하고 따라서 mycovirus의 전파가 억제되므로 북미 지역에서는 CHV1에 의한 효과적인 방제가 이루어질 수 없었음을 제시하고 있다(Milgroom and Lipari, 1995). 하지만 현재 유럽의 경우에는 유럽전체의 *C. parasitica*가 2 또는 3개의 VC group에 속함으로 VCG 조성이 매우 단순하여 집단 내 어느 한 균주에 mycovirus가 감염되게 되면 집단내 VCG 조성이 단순한 관계로 주위의 다른 균주와 균사융합이 용이하여 쉽사리 CHV1의 전파가 이루어져 전체 집단이 저병원성화 됨으로 식물병 방제의 효과가 매우 높게 나타나고 있다.

## 제2절 국내의 기술 동향 및 수준

국내의 경우 *C. parasitica*의 존재와 피해에 관한 부분적인 역학 조사가 오래전에 보고된 이후 이에 대한 연구가 미미하였으나 최근 산림환경연구원을 비롯하여 *C. parasitica*에 관한 오랜 연구를 수행하고 귀국한 강원대학교의 이종규 박사님 그리고 충북대학의 차병진 교수님 등에 의해 etiology에 관한 연구가 진행되고 있다. 또한 mycovirus에 의한 버섯의 병해 등에 관하여는 경상대학교의 이현숙 박사님에 의해 mycovirus의 동정 및 특성화에 관한 연구가 활발하며, 서울대학교의 이용환 박사님 등에 의해 분자생물학적인 방법으로 *Fusarium spp.*에서 dsRNA와 병원성과의 상관관계에 관한 연구 및 *Magnaporthe grisea*에서 cAMP 와 PKC등이 관련된 신호전달에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 밖에 경상대학교의 이창원 교수님에 의해 사상성 진균에서 PLC의 cloning 및 기능에 대한 연구가 진행되고 있으며, 진균의 proteomics에 대한 연구도 진행 중이다.



## 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절 *C. parasitica*에서 mycovirus에 특이적인 신호전달 protein kinase, *cppk1*,의 pathway 규명 및 기능 확인

1. CHV1에 특이적인 *C. parasitica* 신호전달 protein kinase 유전자(*cppk1*)의 생물적 기능확인

#### 1) *cppk1* 유전자의 특징 및 발현 양상

*cppk1* full-length 유전자를 cloning 하여 sequencing 하여 분석한 결과 모든 kinase의 conserved한 domain을 가지는 Ser/Thr protein kinase임을 확인하고, homology search를 실시하여 진균에서 다른 homologue를 검색하였다. 또한 *cppk1* 유전자의 발현을 Northern blot analysis를 이용하여 분석한 결과 이 유전자는 mycovirus에 의해 특이적으로 발현이 증가하는 up-regulation되는 유전자임을 확인하였다 (Fig. 1).

#### 2) *cppk1* mutant 제조

*C. parasitica* 신호전달 protein kinase 유전자(*cppk1*)의 생물적 기능확인을 위하여 이 유전자의 기능이 결손된 null-mutant를 제조하였다. 이를 위해 항생물질 저항성 유전자인 hygromycin 유전자를 *cppk1* 유전자 내에 치환시켜 재조합 벡터를 제조한 후 진균에 형질전환하여 재조합 벡터상의 DNA와 진균의 chromosome에 존재하는 DNA간의 2차에 걸친 homologous recombination (double crossover)을 유도하였다. Target 유전자가 치환된 null-mutant의 선발은 치환된 유전자의 염기서열에서 유도된 PCR primer를 이용하여 각각의 형질전환체의 DNA로부터 PCR을 실시 한 후 예상되는 DNA의 증폭 유무를 가지고 1차 검증하고, 나아가 restriction enzyme을 사용하는 Southern blot analysis를 실시하여 최종 확인하였다 (Fig. 2).

Fig. 2의 A는 *cppk1*의 genomic DNA주위의 여러 제한효소 site를 이용하여 *cppk1*-null mutant의 유전자 지도이다. Fig.2의 B는 hygromycin에 의해 치환된 *cppk1*의 유전자 결손을 *cppk1* 및 hygromycin 유전자를 probe로 하여 확인한 그림이다. 본 실험을 통해 확보된 prototype의 형질전환체는 *cppk1*-null type의 핵과

cppk1-wild type의 핵이 하나의 세포에 동시에 존재하는 heterokaryon임을 확인하였으며, cppk1-null type의 핵으로만 된 clone을 확보하기 위하여서는 heterokaryon을 배양하여 무성포자를 획득한 다음 형질전환에 사용된 선택표지인 hygromycin이 있는 배지에서 배양함으로써 cppk1-null mutant type의 핵을 가진 균사를 선별적으로 획득할 수 있었으며, 순수 분리된 cppk1-null mutant는 포자형성을 하지 못하는 것으로 확인되었다.

## 2) *cppk1*-null mutant의 형태적 세포 생물학적 특징

유전자 치환 방법으로 유도된 *cppk1*-null mutant는 PDAMB 배지에서 형태적으로 효모의 colony (yeast-like micro-colonial growth)와 같은 형태로 성장을 했다. 이를 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰 했을때 hyphae의 성장이 크게 제한되는 것으로 나타났으며 제한된 hyphae의 모양이 실모양이 아니고 구형의 모습으로 나타났다. 또한 전자현미경을 통해 관찰 했을때 hyphae 내에 또 다른 hyphae가 존재하는 intrahyphal hyphae(hyphae within hyphae) 형태로 성장하고 있음을 확인했다. 이는 세포벽의 합성에 문제가 있는 것으로 생각되어 mutant의 cell-wall을 염색해 본 결과 비 정상적인 chitin의 축적으로 인한 것으로 나타났다 (Fig. 3).

## 3) *cppk1*-null mutant와 wild type 간의 *cppk1*유전자의 발현 확인

*cppk1* null-mutant와 wild type 간의 hypovirulent symptom관련 특징을 비교하기 위해서는 methionine과 biotin을 포함하는 potato dextrose agar (PDAMB) plate에서의 hypovirulent symptom과 상관관계에 있는 pigmentation, sporulation, laccase production의 감소현상등을 관찰하고, 수피접종을 통한 virulence test를 수행하고자 하였으나 growth 자체가 wild-type 균주와 차이가 컸으므로 이를 직접 비교하는 것은 의미가 없는 것으로 사료되어 mutant에서의 *cppk1*의 발현을 *cppk1*-specific antibody를 사용해서 확인하였다 (Fig 4).

## 2. Cppk1 단백질의 *in vitro* 특성 확인

### 1) 활성있는 재조합 Cppk1 단백질의 발현, 분리 및 정제.

단백질의 순수 분리를 위해 *cppk1* cDNA 클론을 대장균 전용의 expression vector에 삽입시켜 대장균에 형질전환 시킨 뒤 발현시켜 세포를 초음파 파쇄하여

SDS-PAGE를 통해 유전자 산물을 확인하였다. 이렇게 발현된 단백질 산물은 6개의 His-아미노산을 포함하는 fusion protein으로 발현됨으로, 발현된 단백질의 말단에 붙은 6xHis-tag에 대한 특이성을 지닌 Ni-affinity chromatography (Novagen Inc.)를 이용하여 순수 분리하였다 (Fig. 5). 본 연구에서는 전체 cppk1 유전자를 발현시켰고 kinase domain 이 포함된 partial 유전자도 발현하여 확인하였다.

## 2) Cppk1의 *in vitro* phosphorylation assay 확립

순수 분리된 Cppk1의 kinase assay는 Myelin basic protein (MBP)를 substrate로 하고 방사성 동위원소로 표식된 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP를 이용하여 실시 한 뒤 SDS-PAGE를 수행하여 kinase activity를 확인하였다. Fig. 6에 나타냈듯이 대장균에서 분리 정제된 Cppk1 단백질은 MBP에 대하여 kinase activity가 있음이 확인됐다. 따라서 cppk1 유전자를 *E. coli*를 이용하여 다음 단계인 cppk1-interacting protein을 검색할 수 있는 assay 방법을 확보하였다.

## 3. Cppk1 target 단백질의 확인 및 분리

### 1) cell-free extract를 substrate로 이용하여 Cppk1 assay

*C. parasitica* 내에서 Cppk1의 target protein의 수 및 크기를 확인하고자 cell-free extract를 substrate로 하여 *in vitro* phosphorylation assay를 진행했다. 그 결과 50 kDa 및 44 kDa의 크기를 갖는 단백질 band를 확인했다 (Fig. 7).

### 2) Cppk1 단백질의 target 단백질을 2-D analysis를 통해 분리 및 동정

Cppk1 단백질의 target 단백질을 분리 확인하기 위하여, *In-vitro* kinase assay를 통해 동위원소로 표식된 target protein (50kDa and 44kDa)들을 2-DE(dimensional electrophoresis) 과정을 통해 확인 분리하고자 시도하였다. 그 결과 두 개의 spot을 2-D gel 상에서 확인하였다 (Fig. 8).

### 4) MALDI, Q-TOF를 통한 target 단백질 sequence 결정

*E. coli*에서 발현시켜 순수·분리정제된 재조합 CpPK1 단백질에 의해 kinasing되는 *C. parasitica*의 단백질을 2-D PAGE를 실시하여 각각의 단백질을 PAGE gel에 display 하였으며 이때 확인된 spot 들은 Tandem Mass를 이용하여 부분적이 단백질

sequence를 확인한 결과 4개의 interacting candidate를 선발할 수 있었으며 (Fig. 9), 그 4개는 다음과 같다.

- 2개의 signal transduction 관련 유전자
  - a) BCK1 homologue
  - b) PLC homologue
- 2개의 metabolic 유전자
  - c) enolase
  - d) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

#### 4. Cppk1 target 단백질 coding 유전자의 cloning 및 특성화

##### 1) Cppk1 target 단백질 coding 유전자의 cloning

###### (1) Enolase 유전자의 cloning

GenBank Database를 검색하여 진균 유래의 enolase 아미노산서열을 분석하여, 공통으로 나타나는 부위를 대상으로 degenerated primer (forward: 5'-CTTGAATCTTCCCCAGTTA-3', reverse: 5'-TTCACCTAACTACCGGCCAA-3')를 합성한 후 *C. parasitica*의 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하였다. 이렇게 확보된 PCR replicon은 DNA 염기서열을 통해 유전자 진위를 확인하고 이를 방사선 동위원소로 labeling하여 *C. parasitica* genomic library에서 screening하여 확인하였다. 이때 확인된 clone은 subcloning 과정을 거쳐 유전자 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하고 유전자 분석을 실시하였다 (Fig. 10, Fig 11).

###### (2) Bck1 homologue 유전자의 cloning

GenBank Database를 검색하여 진균 유래의 Bck1 like MEKK 아미노산서열을 분석하여 (Fig. 12), 공통으로 나타나는 부위를 대상으로 degenerated primer를 상기와 같은 방법으로 제작하여 *C. parasitica*의 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하였다 (Fig 13). 이렇게 확보된 PCR replicon은 DNA 염기서열을 통해 *C. parasitica*의 Bck1 like MEKK유전자로 확인됐고 현재 subclonig 중에 있다. 이는 향후 subcloning 과정을 거쳐 유전자 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하고 유전자 분석 및 세포내에서의 기능이 밝혀질 것이다.

### (3) PLC homologue 유전자의 cloning

GenBank Database를 검색하여 진균 유래의 PLC 단백질의 아미노산서열을 분석하여 공통으로 나타나는 X와 Y부위인 SSHNTY 및 GYVLKP를 대상으로 degenerated primer를 제작하였다 (Forward: 5'-CAGYTCNCAYAAAYACNTAYCT-3', Reverse: 5'-CGGGATCCGGYTTNAGNACRTANCC-3'). 이를 이용하여 *C.parasitica*의 염색체 DNA를 대상으로 PCR fragment를 확보했고 이렇게 확보된 PCR replicon은 DNA 염기서열을 통해 유전자 진위를 확인하고 이를 방사선 동위원소로 labeling하여 *C. parasitica* genomic library에서 screening한 후 cloning 하였다. 이때 확인된 clone은 subcloning 과정을 거쳐 유전자 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하고 유전자 분석을 실시하였다. 본 연구에서 확보한 *C.parasitica* 유래의 PLC 유전자는 736 bp의 PLC-delta type으로 분석되었다(Fig. 14 및 Fig. 15).

#### ① PLC 유전자가 결손된 mutant의 분리

*C. parasitica* 신호전달 protein kinase 유전자(*cppk1*)의 target 유전자로 확인된 PLC 유전자의 생물적 기능을 확인하기 위하여 이 유전자의 기능이 결손된 null-mutant를 제조하였다. 이를 위해 항생물질 저항성 유전자인 hygromycin 유전자를 cPLC 유전자 내에 치환시켜 재조합 벡터를 제조한 후 진균에 형질전환하여 재조합 벡터상의 cPLC와 진균의 chromosome에 존재하는 cPLC간의 2차에 걸친 homologous recombination (double crossover)을 유도하였다. Target 유전자가 치환된 null-mutant의 선별은 치환된 유전자의 염기서열에서 유도된 PCR primer를 이용하여 각각의 형질전환체의 DNA로부터 PCR을 실시 한 후 예상되는 DNA의 증폭 유무를 가지고 1차 검증하고, 나아가 restriction enzyme을 사용하는 Southern blot analysis를 실시하여 최종 확인하였다 (Fig. 16). Fig. 16의 A는 cPLC의 genomic DNA주위의 여러 제한효소 site를 이용하여 cPLC-null mutant의 유전자 지도이다. Fig.16의 B는 hygromycin에 의해 치환된 cPLC의 유전자 결손을 cPLC 및 hygromycin 유전자를 probe로 하여 Southern blot analysis를 확인한 그림이다.

#### ② cPLC 유전자가 결손된 mutant의 생리적 특징

본 실험을 통해 확보된 cPLC-null 형질전환체의 생리적 특징을 살펴보고자 temperature sensitivity, osmosensitivity 등을 wildtype과 비교하였다 (Fig. 17 및 Fig. 18). 또한 cPLC 유전자의 기능을 확인하기 위하여 yeast *Saccharomyces*

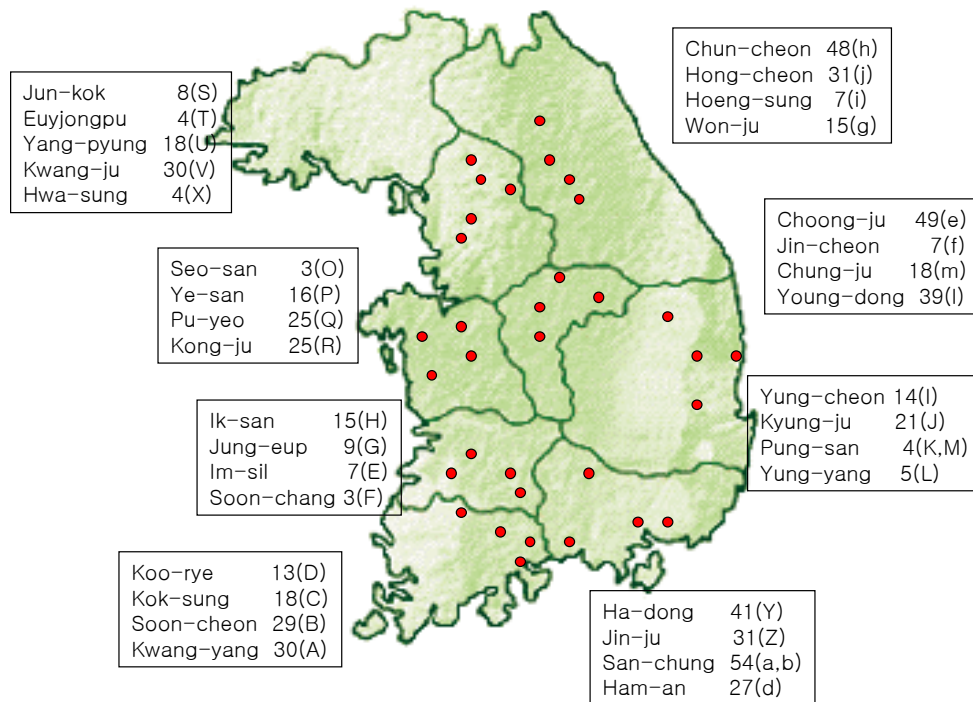
*cerevisiae* 유래의 PLC를 이용하여 complementation을 실시하였다 (Fig. 19). 또한 cPLC에 의해 조절되는 유전자의 종류를 알아보기 위하여 laccase 유전자를 비롯한 marker 유전자를 대상으로 Northern blot analysis를 시도하였다 (Fig. 20). 그 결과 cPLC 유전자가 결손된 mutant는 정상균주 보다 성장이 느리고 aerial mycelia가 거의 없는 어두운 오렌지색을 띠는 mycelial growth 특징을 나타내었다 (Fig. 21). 따라서 병원성 테스트에서 정상균주 보다 병원성 정도가 약하게 나왔으나 이는 mutant 균주의 growth-defect에 의한 것으로 사료된다. 그 외에 temperature sensitivity, osmosensitivity 등은 정상균주와 큰 차이가 없었고 lac1 유전자의 발현이 cPLC 유전자에 의해 조절 받는 것으로 나타났다. lac1 유전자는 효모의 PLC complementation에 의해 발현이 회복되는 것으로 나타났다. 따라서 cPLC 유전자는 정상적인 growth 및 colony morphology를 위해 반드시 필요하며 hypovirus에 의해 조절되기도 하는 lac1 유전자의 발현에 반드시 필요한 유전자인 것으로 판명되었다.

## 제2절 국내 *C. parasitica*에 감염하는 Mycovirus의 다양성

### 1. 국내 *C. parasitica* 집단에 존재하는 mycovirus의 typing

#### 1) 균주 확보

아래 그림에 나타나 있는 각 지역으로부터 총 670여 균주의 *C. parasitica*를 분리해 내었다. 이들의 균총모양은 균총이 전체적으로 노란색을 띠면서 포자를 많이 만드는 것, 균총의 가운데만 노랗고 가장자리는 하얀균사로 둘러싸인 것, 그리고 균총이 전체적으로 흰 균사들로만 이루어져 있으며 포자형성도 아주 불량한 것 등 3가지 정도로 크게 나눌 수 있었다. 또한, 균총의 가장자리가 균일한 것과 불규칙한 것으로 구분할 수 있었다. 병원성이 센 균주들은 대개 균총의 색은 노랗고 가장자리의 모양은 불규칙한 것들이었으며, 분리한 균주들은 대개 이런 범위에 속하는 것들이었다.



## 2) Bavendamm test

*C. parasitica* isolate들의 phenol oxidase 활성을 조사한 결과(Fig. 21) 분리균주의 대부분인 576균주가 병원성인 것으로 보였으며, 87균주가 저병원성인 것으로 보여 저병원성 균주로 보이는 것의 비율이 약 13%에 달했다. 저병원성으로 보이는 이들 균주는 mycovirus, 즉 ds-RNA에 감염되어 있을 가능성이 높은 것들이라고 할 수 있다.

## 3) *C. parasitica* isolate들의 vegetative compatibility

*C. parasitica*는 유전적 변이가 심하여 균주간에 균사융합성이 다양한 것으로 알려져 있는 진균이다. 미국에서는 동등한 비중의 64개의 VC group이 밝혀져 있으며, 유럽에서는 지역에 따라 큰 차이가 있지만 미국에서보다는 다양성이 적은 것으로 알려져 있다. 그러나 우리나라의 균주들을 대상으로 한 이번 연구의 결과(Fig. 22)를 보면 우리나라에는 121개의 VC group이 존재하는 것으로 밝혀져 *C. parasitica*의 유전적 다양성이 다른 나라보다 우리나라에서 훨씬 더 심함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 mycovirus에 감염된 저병원성 균주를 이용한 생물적 방제의 걸림돌이 될 수도 있다. 하지만, 다행스러운 것은 다양한 VC group 중에서도 지역적으로 우점을 하고 있는 group들이 존재한다는 사실이다. 실제로 VC group 중 KR-VC104에는 총 670여 균주 중 164균주가 속해있었으며, KR-VC105에는 62균주, KR-VC43에는 42균주가 속해있어 이 세 group에 속하는 균주들이 전체의 40%에 이르고 있었다. KR-VC104는 전북을 제외한 어느 지역에서나 가장 높은 빈도를 보이고 있었다. 따라서 KR-VC104를 우리나라의 우점 *C. parasitica* VCG로 판단해도 무리가 없을 것으로 보인다.

## 4) 수피접종시험

저병원성 표준균주인 UEP-1보다 작은 병반을 만드는 균주는 총 670균주 중 164 균주였으며, 병원성 표준균주인 EP 155-2보다 큰 병반을 만드는 균주는 모두 378 균주였다. 나머지 128 균주는 UEP-1보다는 크고 EP155-2보다는 작은 병반을 만들었다.

## 5) ds-RNA의 검출

현재 총 670균주 중 650균주에서 ds-RNA의 존재를 검정한 결과 77균주에서



ds-RNA 특이적 밴드를 검출할 수 있었다. 우리나라의 *C. parasitica*가 mycovirus에 감염되어 있는 양상은 모두 4 종류로서(Fig. 23), ds-RNA의 크기별로 12 kb에만 감염되어 있는 것, 12 kb와 2.7 kb에 감염되어 있는 것, 3 kb에만 감염된 것, 그리고 3 kb와 2 kb, 1.8 kb에 동시에 감염되어 있는 것이었다. 이 중 12 kb에 단독 감염된 것이 46 균주로 가장 많았으며, 다음이 12와 2.7 kb로 25 균주, 그리고 나머지 두 종류는 각각 3 균주씩이었다.

우리나라에 존재하는 121개의 VCG 중 29개에서 ds-RNA를 검출할 수 있었으며, 다행스럽게도 KR-VC104를 비롯하여 빈도수가 높은 VCG들은 모두 감염되어 있었다. 지역적으로는 경기와 강원을 제외한 나머지 도에서는 모두 ds-RNA 감염균주를 찾을 수 있었으나, 충북에서는 단 1 균주, 충남과 전북에서는 5 균주, 경북에서 7 균주 등 중부지방에서는 매우 적었다. 반면에 밤나무의 주 재배지역인 경남에서 43 균주, 전남에서 16 균주가 ds-RNA에 감염되어 있음을 확인하였다.

또한, ds-RNA 검출 결과와 Bavendamm test 결과를 비교하여 보면, Bavendamm test에서 저병원성으로 보이던 87 균주 중 45 균주에서만 ds-RNA가 검출되었고, 병원성으로 보이던 균주 중 32 균주에서 역시 ds-RNA를 분리할 수 있었다. 밤나무 가지에 접종하였을 때의 병원성과 비교하면, UEP1 보다 병원성이 낮은 균주 중 20 균주만이 ds-RNA에 감염되어 있었으며, EP-155-2보다 병원성이 큰 균주 중 44 균주가 감염된 것이었다. ds-RNA의 존재와 잘 부합하는 특성은 균총의 형태였다. 일반적으로 병원성인 것으로 이해되고 있는 노란 균총을 만드는 450개의 균주 중 단 8 균주만이 ds-RNA에 감염되어 있었고, 중간형태 또는 흰 균총을 만드는 균에서 69 균주가 감염되어 있었다.

## 2. 국내 균주의 VCG type간 hyphal fusion을 통한 mycovirus의 병징 확인

10개 VCG에서 선발된 균주로부터 약 300개의 유도균주가 선발되었다(Fig. 24). 이들 균주는 현재 dsRNA 분리와 병원성 검정, phenol oxidase 활성 검정 실험 중에 있다.

## 3. 국내 mycovirus의 유전자 구조를 기준으로한 typing

### 1) ITS-RFLP를 이용한 유연관계 비교

189개 균주의 DNA를 ITS-PCR로 증폭하여 제한효소를 처리한 결과, 178개 균주

가 대조구로 사용한 유럽의 CHV1 균주와 동일한 밴드 형태를 보였으며, 11개의 균주만이 다른 밴드 형태를 보였다. *AluI* 을 처리했을 때 CHV1은 430 bp와 220 bp의 2가지 밴드를 보인 반면 이들 11개 균주는 절단되지 않았다. 또한 *CfoI* 을 처리했을 때, CHV1 균주가 290 bp와 50 bp 밴드를 보인 것과는 달리, 이들은 300, 270, 그리고 80 bp의 밴드를 보였다(Fig. 25). 밴드 형태가 다른 11개의 균주 중 9균주가 전남에서, 2균주는 경남에서 분리된 균주였으며, 6균주에서는 dsRNA가 검출되었다. 12.7 kb dsRNA를 가진 것은 2균주였으며, 각각 전남과 경남에서 분리된 균주들이었다. 4균주는 3.0 kb 또는 3.0+2.0+1.8 kb를 가진 균주로 3균주는 전남에서, 1균주는 경남에서 분리되었다. 11개 균주 중 전남에서 분리된 4균주는 VCG-14에 속해 있었으며, 나머지 7개 균주는 각각 다른 7개의 VCG에 속해 있었다.

## 2) RT-PCR을 이용한 유연관계 비교

*C. parasitica*에서 검출되는 dsRNA의 다양성을 알아보기 위해 cDNA를 이용해 증폭한 결과 5' non-coding region에서 약 600 bp, ORF B에서 1200 bp 크기의 PCR 산물을 얻었으며(Fig. 26), dsRNA의 염기서열은 유럽의 CHV1-EP713과 비교하였다.

### ① 5' non-coding region

총 14개의 균주는 5개의 그룹으로 나뉘었으며(Fig. 27) 유럽의 EP713과는 약 90% 이상의 유사성을 보였다. 우리나라 균주간의 유사성을 보면 전남에서 분리된 AS112와 경남의 ZS312 등 두 균주의 염기서열은 100%로 동일하였으며, 같은 장소에서 분리된 aN422와 aS522는 0.2%의 차이를 보였다. 경남의 aS522와 경북의 IE412는 92.7%로 가장 낮은 유사성을 보였다. BS222는 ITS-RFLP에서 특이한 밴드 형태를 보였던 균주였으나 Y121과 98%의 높은 유사성을 보였다.

### ② ORF B

5' non-coding region과 비슷하게 5개의 그룹으로 나뉘었고(Fig. 28) EP713과는 약 81% 이상의 유사성을 보였다. IE412와 RN421, aN422와 aS522가 각각 99.8%와 99.5%로 유사성이 가장 높았으며, 5' non-coding region에서 염기서열이 동일했던 AS112와 ZS312는 92.3%의 유사성을 보였다. 특히 전북에서 분리된 HE522는 유럽의 EP713과 98.1%의 높은 유사성을 보였다.

#### 4. 국내 주요 mycovirus의 유전체 cloning 및 특성화

분리된 dsRNA 중 L-dsRNA인 12.7 kb를 제외한 3.0 kb, 2.7 kb, 2.0kb, 1.8 kb dsRNA를 정제하였다(Fig. 29). 이들 dsRNA는 외국에서 보고되어 있는 s-dsRNA보다 크기가 더 작으며 L-dsRNA가 존재하지 않는 균주에서도 존재했다는 점에서 우리나라 균주의 특징일 가능성이 매우 높다. 이 dsRNA들이 L-dsRNA의 일부인지를 확인하기 위하여 분리된 ds-RNA들을 정제하였으며, 다시 RT과정을 통해 cDNA 합성을 하였고 현재 cloning 과정에 있다. Cloning 결과가 나오면 우리나라 *C. parasitica*의 특이성을 확인할 수 있을 것이다.

#### 5. 저병원성 전이균주 제조

위의 Fig. 21에서도 볼 수 있듯이 같은 VCG에 속하는 균주들끼리는 대치배양으로 유도한 균사융합에 의하여 mycovirus에 감염됨, 즉 저병원성이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, VCG가 다른 균주들끼리는 이러한 대치배양에 의하여 저병원성 전이균주를 만들어 낼 수 없었다. VCG가 다른 균주들 간에는 균사융합이 일어나지 않고 대치한 자리에서 균사가 더 이상 자라지 않는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 PDA에서 뿐만 아니라 수피에 접종하였을 경우에도 마찬가지였다. 따라서, VCG가 다른 균주간에 대치배양법에 의하여 새로운 저병원성 균주를 만들어 내는 것은 가능성이 매우 낮다고 결론지었다.

그러나, 식물의 경우 바이러스가 침입하려면 반드시 상처가 있어야 하지만, 식물세포의 원형질체를 사용하면 상처 없이도 바이러스가 침입하여 감염이 되는 현상을 이용하면 저병원성 균주가 없는 VCG의 병원성 균주들로부터 전이균주를 유도해 낼 수 있는 가능성을 찾을 수도 있을 것이다. 따라서, *C. parasitica*의 원형질체를 만들고 이에 저병원성 균주에서 분리한 dsRNA를 접종하는 방법도 제안이 가능하다.

#### 6. Vegetative compatibility를 이용한 전이 균주 선발

##### 1) 사용 균주

1999~2000년 전국의 밤나무 재배단지에서 분리한 균주 중 VC group 104에서 병원성 6 균주, 저병원성 5 균주, 그리고 VCG 85의 병원성 1균주(a1)를 사용하였다. VCG85의 균주, a1은 다른 VCG 균주 사이의전이 가능성을 알아보기 위해 사용하였다.

##### - 병원성 균주

	Colony type	Phenol oxidase	pathogenicity	ds-RNA
a 1	Irregular yellow	+++	10.23	-
B411	Irregular yellow	+++	7.77	-
Q1	Irregular yellow	+++	7.63	-
QE412	Irregular yellow	+++	9.2	-
R112	Regular center yellow	+++	9.86	-
RW412	Regular center yellow	+++	8.63	-
Ya	Irregular yellow	+++	8.8	-

- 저병원성 균주

	Colony type	Phenol oxidase	pathogenicity	ds-RNA
AS112	Irregular center yellow	+	5.03	+
IE311	Regular white	+++	3.86	+
RN421	Regular white	++	1.97	+
Y112	Irregular white	++	3	+
ZW411	Regular white	++	2.91	+

2) 균주의 선발

선발된 12 균주는 PDA에서 25℃, 4일간배양 후, 1/4 PDA 배지에 병원성 균주와 저병원성 균주 한쌍을 나란히 치상하였다. 또는 25℃, 3일간배양 후 두 균주의 균사가 맞닿는 부분을 해부현미경(40X)으로 관찰하여 균사가 융합한 것으로 보이는 균사를 잘라 PDA에 치상하였다. 분리된 균사는 25℃, 4일간 배양하였고 섹터가 생기는 부분은 균일한 균층으로 자랄 때 까지 계속해서 계대 배양하면서 분리하였다. 이렇게 분리된 균주는 colony type, phenol oxidase activity, VC test, ds-RNA detection을 조사하였다 (phenol oxidase activity test: bavendamm 배지, VC test: PDAvc 배지, ds-RNA detection: cellulose chromatography 방법 이용). 그 결과 1/4 PDA에서 균사가 융합된 것으로 보이는 314개의 균주를 분리했다 (Table 3).

3) 선발된 균주의 vegetative compatibility test

VCG 104 분리 균주들은 모균주와 모두 균사 융합성을 보였고, VCG 85균주는 배지 상에 약한 경계를 형성하였다.

#### 4) Colony type

분리된 이들 균주들의 균총 형태는 대부분 병원성 균주의 균총과 유사했으며 (Fig. 30), 이들 중 10 균주만이 저병원성 균주와 비슷하게 나타났다. 즉 균총색이 하얀색은 아니지만 균사가 일정한 형태로 균일하게 자라는 형태를 보였다(Fig. 31).

#### 5) phenol oxidase activity

분리된 314개의 균주의 phenol oxidase activity를 조사한 결과, 총 75개의 균주가 병원성 모균주보다 활성이 낮았고 저병원성 모균주와는 비슷하거나 낮았다 (Table 4)). 특히 괄호로 표시되어 있는 9 균주는 병원성 모균주와 저병원성 모균주보다 phenol oxidase activity가 낮게 나타났다. 또한 균총의 형태는 저병원성 균주와 비슷했지만 하얀색을 띠지는 않았고 병원성 균주보다 포자형성과 색소침착이 줄어든 것을 볼 수 있다 (Fig. 32).

#### 6) ds-RNA의 검출

314개 균주의 ds-RNA를 확인한 결과, 11개의 균주에서 ds-RNA가 검출되었다. 다른 VCG인 VCG 85에서 분리한 a1-전이균주와, 동일한 VCG인 B411, Q1-전이균주에서는 전혀 검출되지 않았다. 이렇게 dsRNA가 검출된 11개균주는 상기의 실험에 의해 분리된 9 균주와 Ya-RN421 1균주, R112-IE311 1균주이다 (Table 5). 이 들 균주에서는 저병원성 모균주에서 관찰되었던 ds-RNA가 존재함을 알 수 있었다(Fig. 33).

#### 7) 생물적방제용 Field trial

현재까지 체세포 융합성을 통해 분리한 전이균주들에 대해 CHV1의 full genome이 삽입되었는지 정확하게 확인하지는 못하였지만, 전기영동에서 보여준 크기를 보면 정상적으로 전이가 된 것으로 여겨지며, 전이균주와 저병원성 모균주의 ds-RNA는 차후 ds-RNA의 염기서열 비교로 가능할 것으로 생각된다. 하지만, Chen & Nuss (1999)은 CHV1 cDNA clone을 삽입했을 때 모균주와 동일한 phenotype을 보였다고 보고했었으나, 현재 본 연구진에 의해 분리된 전이균주들의 병원성은, 저병원성 모균주와 동일한 형태를 보이고 있지는 않다. 따라서 계대배양을 통해 균주를 안정화시키고 이에 따른 변화는 지속적인 실험을 통해 확인하여야 할 것이라 사료된다. 끝

으로 현재 ds-RNA가 확인된 11개 균주를 이용하여 Field trial을 시도하여야 하나 계절상 현재 시점에서는 늦가을이기 때문에 실험 조건이 좋지 않아 접종에 관련된 data는 포함시키지 않았다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표	평가의 착안점	목표 달성도 및/ 기술발전 기여도
1차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CHV1에 특이적인 <i>C. parasitica</i> 신호전달 protein kinase 유전자(<i>cppk1</i>)의 생물적 기능확인</li> <li>○ Cppk1 단백질의 <i>in vitro</i> 특성 확인</li> <li>○ 국내 <i>C.parasitica</i> 집단에 존재하는 mycovirus의 typing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>cppk1</i>의 생물적 기능 및 kinase assay 확립</li> <li>○ 국내 Mycovirus의 순수 분리 및 다양성 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ CHV1에 특이적인 <i>C. parasitica</i> 신호전달 protein kinase 유전자(<i>cppk1</i>)가 결손된 mutant를 제작하여 그 생물적 기능을 확인하여 목표치 100% 달성 함</li> <li>○ Cppk1 단백질의 <i>in vitro</i> phosphorylation 특성 확인 하여 목표치 100% 달성함</li> <li>○ 국내 <i>C.parasitica</i> 집단의 VCG typing 하여 목표치 100% 달성함</li> </ul>
2차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cppk1 target 단백질의 확인 및 분리</li> <li>○ Cppk1 target 단백질 coding 유전자의 cloning 및 특성화</li> <li>○ 국내분리의 mycovirus 접종실험 및 특성화</li> <li>○ 국산 mycovirus를 이용한 hypovirulence 유도</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>cppk1</i>의 target 단백질 분리 및 특성화</li> <li>○ 국내 특이 Mycovirus의 유전체 결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2-D PAGE 및 phosphorylation 방법을 적용하여 4 종류의 Cppk1 target 단백질의 확인 및 분리로 목표치 100% 달성</li> <li>○ VCG에 따른 mycovirus의 분리 및 typing으로 목표치 100% 성공함</li> </ul>
3차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>cppk1</i> 관련 pathway의 확립</li> <li>○ 저병원성 유도균주의 유성생식에 의한 새로운 VC group의 출현 검색</li> <li>○ 생물적방제</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>cppk1</i> pathway 규명</li> <li>○ 국내 mycovirus 및 재조합 균주를 이용한 생물적 방제효과 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <i>cppk1</i> 는 enolase, Bck1 like MEKK 및 PLC관련 신호전달 과정에 관련 된 것으로 결론 하여 100 목표 달성</li> <li>○ 국내 mycovirus를 이용하여 저병원성 유도균주 제조 및 생물방제 기초 확립</li> </ul>

## 제5장 연구개발결과의 활용계획

본 연구의 수행을 통해, 식물병의 중요한 부분을 차지하며 나아가 최근 유용 단백질을 생산하는 생명공학 분야에서 간단한 진핵세포 생물로 관심을 가지게 되는 진균의 유전자 발현에 대한 기작을 신호전달체계와 함께 일부 규명하였고, 비교적 많은 기초 연구가 선행된 일부 진균에서는 존재하지 않지만, 그 외의 다양한 많은 종류의 진균에서 그 존재가 보고되는 mycovirus 혹은 dsRNA에 의한 조절작용을 연구하므로써 본 연구 결과는 기초 분자생물학적 분야에서 비교적 새롭고 독창적인 유전자조절 model system 을 제공하였다. 또한 기주(*C. parasitica*)-기생체(mycovirus)간의 상호작용 결과에 대한 유전자 조절은 식물병(밤나무 줄기마름병)에 대한 안전하고 좋은 생물적 방제의 기초자료로 사용이 가능하므로 환경친화적인 생물적 방제의 학문적 근거와 응용의 예를 제시할 것으로 사료된다.

또한 본 연구는 밤나무 origin에 속하는 북동아시아의 한 축인 국내 밤나무에 감염된 *C. parasitica*에서 존재하는 mycovirus의 유전적, 생태적 다양성에 대한 연구를 진행하였으므로 mycovirus의 전파 및 오랜 역사를 지닌 우리지역에서 mycovirus의 진화에 대한 기본적인 data를 제공할 수 있게 되었다. 이는 세계적인 분포를 지닌 mycovirus의 genotype과 국내 특이적인 genotype의 확인을 통해 기주-기생체간의 coevolution을 설명할 수 있으며, 이는 독립된 지역에서 가장 잘 적응한 genotype을 유추하여 가장 효과적인 생물적 방제를 실시하는데 기초자료로 또한 기여할 수 있게 된다.

이상의 결과들은 국내 연구진으로 하여금 진균의 유전자 발현 및 mycovirus에 의한 진균의 유전자 조절 그리고 mycovirus의 다양성 및 진화에 관한 과학 기술적 측면에서 국내뿐 아니라 세계적으로 선도적 역할을 가능하게 하리라 기대되어 본 연구에 대한 지속적인 지원이 기대된다.



## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구과제와 관련된 균주인 *C. parasitica*를 대상으로 High throughput 연구를 통한 genomics, proteomics, 등의 연구가 본 과제와 유사한 방법으로 시작되고 있으며, 일부 보고되고 있다. 또한 Dr. Nuss등에 의해 주도적으로 추진되어오는 본 균주에 대한 Genome project의 funding이 가시화되고 있다는 소식과, Genome project group에 본 연구진의 참여를 제안 받았는데, 이는 본 과제를 통해 발표된 연구 결과물들이 국제적인 인정을 받았기 때문으로 생각된다. 본 연구를 통한 결과 및 향후의 연구 결과들은 추후 본 연구진이 세계적인 Genome project group에 참여하여 연구하는데 결실을 맺어 크게 기여하는 부분이 생기리라 기대된다.

## 제7장 참고문헌

1. Biraghi,A. 1953. Rep. Congr. Int. Union Forest Res. Org. 11th Rome, 1953 pp. 643-645.
2. Chen,B., Gao,S., Choi,G.H. and Nuss,D.L. 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:7996-8000.
3. Choi,G.H., Pawlyk,D.M. and Nuss,D.L. 1991. Virology 183:747-752.
4. Choi,G.H., and Nuss,D.L. 1992. Science 257:800-803.
5. Choi,G.H., Chen,B., and Nuss,D.L. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:305-309.
6. Day,P.R., Dodds,J.A., Elliston,J.E., Jaynes,R.A., and Anagnostakis,S.L. 1977. Phytopathology 67:1393-1396.
7. Hillman,B.I., Shapira,R., and Nuss,D.L. 1990. Phytopatology 80:950-956.
8. Ju, Y.J., Kim, D.H., and Cha, B.J. 2002. Plant Pathol. J. 18(1):23-29.
9. Kang, H.S., Choi, J.W., Park, S.M., Cha, B.J., Yang, M.S., and Kim, D.H. 2000. Plant Pathol. J. 16:142-146.
10. Kazmierczak,P., Pfeiffer,P., Zhang,L., and Van Alfen,N.K. 1996. J. Virol. 70: 1137-1142.
11. Kim,D.H., Rigling,D., Zhang,L., and Van Alfen,N.K. 1995. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:259-266.
12. Kim, M.J., Choi, J.W., Park, S.M., Cha, B.J., Yang, M.S. and Kim, D.H. 2002. Mol. Microbiol. 45: 933-941.
13. Rigling,D. Van Alfen,N.K. 1991. J. Bacteriol. 173:8000-8003.
14. Van Alfen,N.K., Jaynes,R.A., Anagnostakis,S.L., and Day,P.R. 1975. Science. 189:890-891.
15. Van Alfen,N.K. 1982. Ann. Rev. Phytopathol. 20:349-362.
16. Varley,D.A., Podila,G.k., and Hiremath,S.T. 1992. Mol. Cell. Biol. 12:4539-4544.
17. Zhang,L., Churchill,A.C.L., Kazmierczak,P., Kim,D.H, and Van Alfen,N.K. 1993. Mol. Cell. Biol. 13:7782-7792.

## 별첨연구결과

Table 2. Characteristics of 11 Korean isolates of *Cryphonectri parasitica* which had different band patterns in ITS-RFLP

Isolates	Province	VCG	dsRNA type (kb)	Characteristics		
				Pathogenicity	Colony type	Phenol oxidase activity
AE322	Jeonnam	VCG-8	3.0	high	white	moderate
AN122	Jeonnam	VCG-14	none	low	white	moderate
B211	Jeonnam	VCG-13	none	low	white	moderate
B422	Jeonnam	VCG-58	none	moderate	white	moderate
BW112	Jeonnam	VCG-14	none	low	white	moderate
BW412	Jeonnam	VCG-14	none	high	white	moderate
BS222	Jeonnam	VCG-14	12.7	high	yellow	moderate
BS322	Jeonnam	VCG-16	3.0+2.0+1.8	high	white	moderate
BN122	Jeonnam	VCG-17	3.0+2.0+1.8	low	center yellow	moderate
aW411	Gyeongnam	VCG-65	12.7+2.7	low	white	moderate
bS131	Gyeongnam	VCG-83	3.0	high	white	moderate

Table 3. Isolation of hypovirulent by hyphal fusion.

		hypovirulent				
		AS112	IE311	RN421	Y112	ZW411
virulent	a 1	23	3	16	20	3
	B411	8	1	1	14	3
	Q1	7	23	9	13	-
	QE412	9	12	2	9	3
	R112	6	21	10	5	1
	RW412	14	17	11	16	-
	Ya	2	5	9	12	3

Table 4. Numbers of the hypovirulent strains shown low phenol oxidase activity.

		hypovirulent				
		AS112	IE311	RN421	Y112	ZW411
	a 1	7	1	1	4	
	B411	4	-	1	1	-
	Q1	3	3	-	3	-
virulent	QE412	4 (2)	5 (3)	-	1	-
	R112	3	8	4 (1)	1	1
	RW412	5 (3)	2	5	1	-
	Ya	1	4	6	1	3

Table 5. Numbers of the hypovirulent strains containing dsRNA molecule.

		hypovirulent				
		AS112	IE311	RN421	Y112	ZW411
virulent	QE412	2	3	-	-	-
	R112	-	1	1	-	-
	RW412	3	-	-	-	-
	Ya	-	-	1	-	-

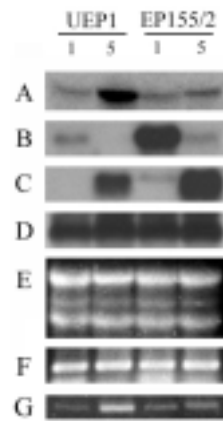


Fig. 1. Northern blot (A-D) and RT-PCR (F and G) analysis of marker gene expression in virus-infected UEP1 and virus-free wild type EP155/2 strains. A; cppk1, B; cryparin, C; Mf2/1, D; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd), F; gpd, G; cppk1, E; EtBr-stained RNA gel for equal loading of RNA samples



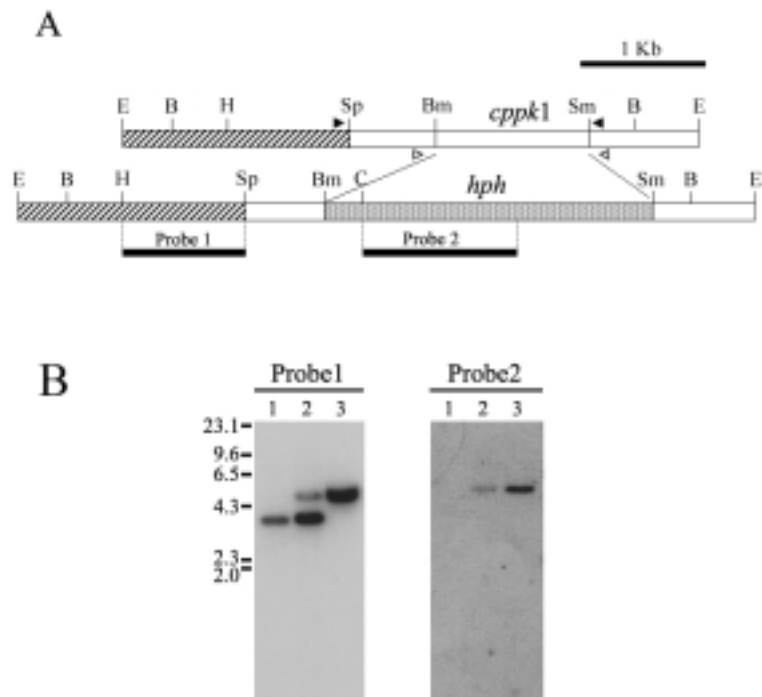


Fig. 2. Restriction map and Southern blot analysis of heterokaryotic parental strain and pure *cppk1*-null mutant. Note that heterokaryotic parental strain contains both wild type nuclei and *cppk1*-null type nuclei in the same mycelia due to the coenocytic (multiple nuclei in a single cell) characteristics of filamentous fungi.

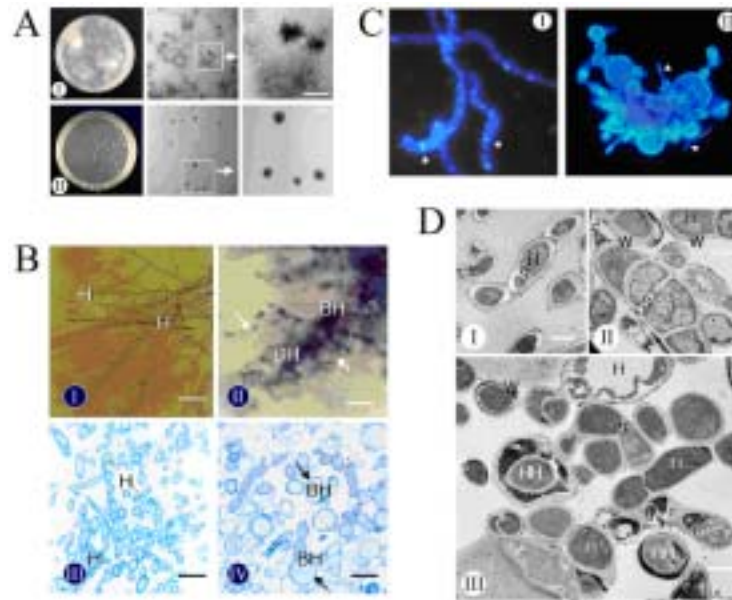


Fig 3. Phenotypic characteristics of *cppk1*-null mutant.

- (A) Morphology of colony forming units of a heterokaryotic spore suspension (TdPK1) grown on non-selective (I) and selective (II) PDAMB plates. The characteristic colony types are shown in enlargements of the areas marked by boxes. Both cultures are 10 days old.
- (B) Microscopic observations of the wild type EP155/2 (I and III) and *cppk1*-null mutant TdPK1-1 (II and IV). Bars, 25 mm (I, II) and 10 mm (III, IV).
- I. Typical extended filamentous hyphae (H) are seen in the wild type EP155/2.
- II. Bead-like catenulate hyphae (BH) consisting of bulbous and globose cells (arrows) are seen in the *cppk1*-null mutant TdPK1-1.
- III. Transverse and longitudinal sections of the wild-type EP155/2 strain showing normal fungal hyphae (H).
- IV. Transverse and longitudinal sections of the *cppk1*-null mutant TdPK1-1 showing parts of bead-like hyphae (BH). Note that all the fungal cells are markedly hypertrophied to varying degrees.
- (C) Fluorescent microscopy to detect chitin accumulation. Young hyphae of wild type EP155/2 (I) and *cppk1*-null mutant TdPK1-1 (II) were stained with 10 mg/ml Calcofluor White for 20 min and photographed through a fluorescence microscope. Septa are indicated by arrowheads. Photographs were taken at a magnification of x 400.
- (D) Transmission electron microscopic images of mycelia of the wild type EP155/2 (I), and hypertrophied globose cells (II) and intrahyphal hyphae (III) of the *cppk1*-null mutant TdPK1-1. H, hyphae; S, septae; HH, intrahyphal hyphae; W, cell wall; Bars, 2 mm.

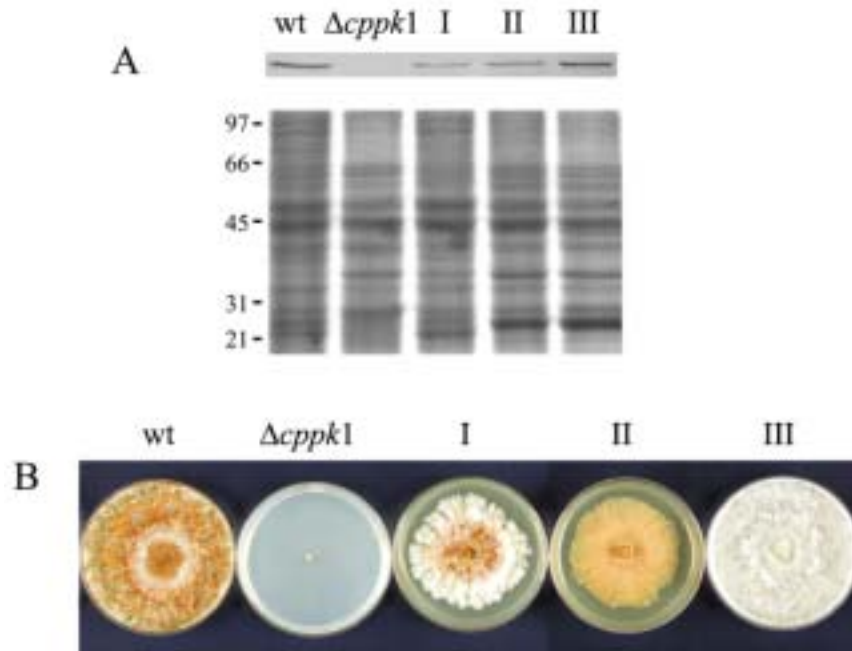


Fig. 4. Western blot analysis (A) and colony morphology (B) of representative *C. parasitica* strains transformed by anti-sense copies of *cppk1*.

(A) Western blot analysis of representative anti-sense transformants. Total cell-free extracts prepared from wild type EP155/2 (wt), *cppk1*-null mutant TdPK1-1 (*cppk1*), and representative anti-sense transformant types I, II, and III were probed with CpPK1-specific antisera. The numbers at left are the protein size in kDa.

(B) Colony morphology of representative anti-sense transformants. Three examples of representative types of colony morphology of the anti-sense transformants are shown in comparison with the nontransformed wild-type EP155/2 strain and the *cppk1*-null mutant TdPK1-1.

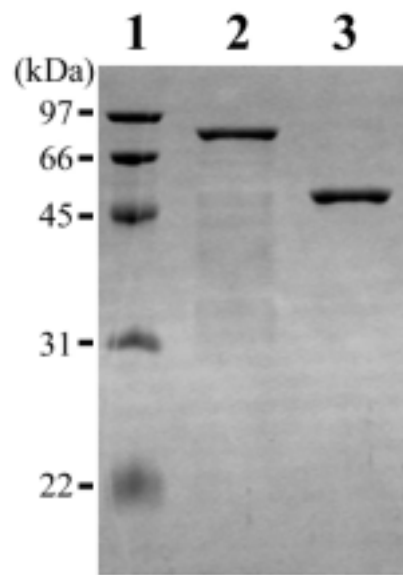


Fig. 5. SDS-PAGE of purified *E. coli*-expressed full-length and truncated CpPK1. Lanes 2 and 3 contain *E. coli*-expressed full-length and truncated CpPK1, respectively. Lane 1 contains the size markers and numbers at left refer to the protein sizes in kDa.

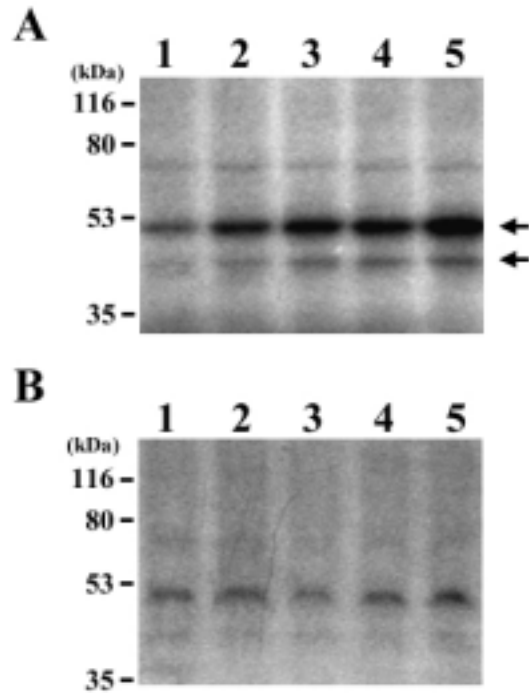


Fig. 6. Kinase assay of CpPK1 using cell-free extracts. (A) Lane 1 shows the phosphorylation pattern of endogenous proteins without *E. coli*-expressed CpPK1. Lanes 2, 3, 4, and 5 are phosphorylation patterns of endogenous proteins with 2 ng, 4ng, 8ng, and 16ng of *E. coli*-expressed CpPK1, respectively. (B) Kinase assay using bovine serum albumin as a control. Each lane contains the same amount of BSA as described above. Arrows indicate the potential intracellular substrates of CpPK1. Numbers at left refer to the protein sizes in kDa.

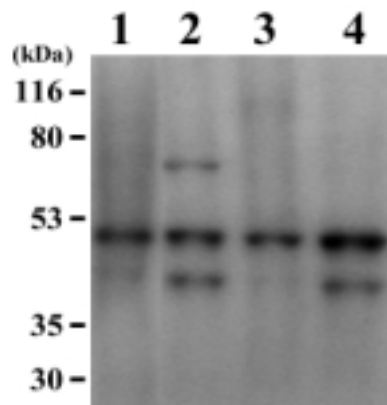


Fig. 7. Kinase assay of cell-free extracts. Kinase assay of endogenous proteins was conducted using cell-free extracts from 1-day and 5-day old culture of both Ep155/2 and UEP1. Lanes 1 and 2 contain endogenous proteins from 1-day and 5-day old culture of Ep155/2, respectively, and lanes 3 and 4 are from 1-day and 5-day old culture of UEP1, respectively. Arrows indicate the phosphorylated proteins, and numbers at left and right refer to the protein sizes in kDa.

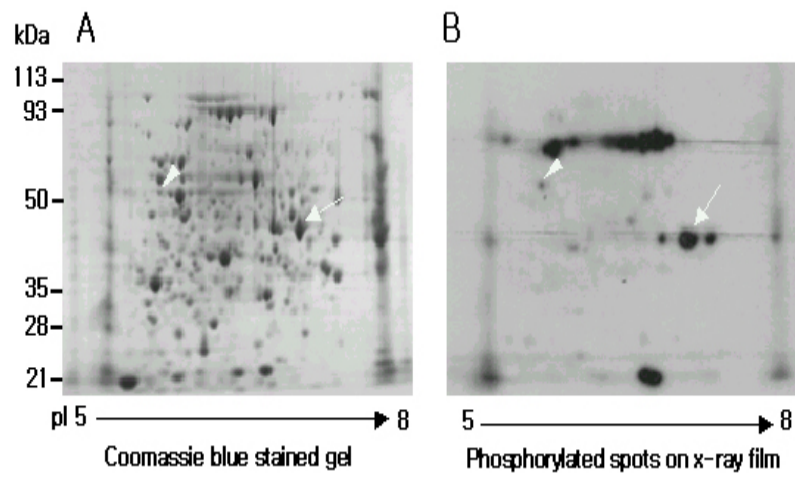


Fig. 8. 2D-PAGE of phosphorylated proteins of *C. parasitica*. A panel indicated the Coomassie blue stained gel and B panel shows the autoradiogram of the same PAGE gel.



Fig. 9. Results of MALDI-TOF analysis of one of CpPK1-dependent phosphorylated protein spot followed by the homology search using Mascot.



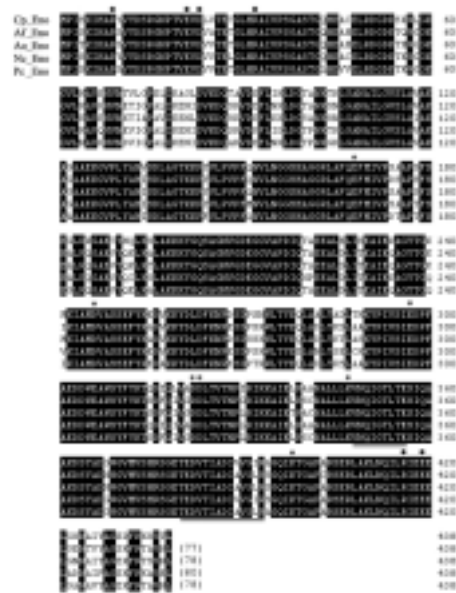


Fig. 10. Amino acid sequence alignment of predicted gene product with other homologous genes from filamentous fungi. Identical amino acids are highlighted in white on the black background. The homology (percent identity) of the *C. parasitica* gene in relation to other genes is given in parenthesis at the end of each sequence. The numbering of the residues from the N-terminus of the whole protein is shown on the right. Cp\_Eno, Af\_Eno, Ao\_Eno, Nc\_Eno, and Pc\_Eno are the enolases from *C. parasitica*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *N. crassa*, and *P. citrinum*, respectively.

```

-683          TTGAGCAGAGCCATTCAATCTGAGCTCTAAAGTGT
-648  GCCAGGACC CAGAGTGGTTCACTGCTTCTATCAGGGTGTGTACACAGATAATTCCTCCACCTTGAACA
-576  TEACCCGAC CCACTACGTACGGCCCTCCGATCTTACCTTTGGCCAGAGACCTTTTAAAGCGTGGAGTCTCC
-504  TCTACTGAACTCCCGTTTCTCACTCCCTCCGATCTTCCCTGCTTCTCGATAACTCCACCTCCCTCGAATAC
-432  TCTTACCTGACCAAAATCTCTTCCAAAGTGTGACTTCCAAATTTCCCTTCTGACCTCTTCCCTCTCTCTG
-360  GATGATCTGCTCTCTTGTGTGCTTCCATCCTCCAGGAGGAGTCTGAGGCTGACCTTGAAGGATATCTACTT
-288  GCTTCCCTGACTGTGTGCTGAGAGGAGTGTGAGAGGAGGAGGAGTAAAGGATGTTGAGTCTTCTTCTGAGC
-216  AACTTGGCCAACTGCTCTTCTGCTTCCGCTCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
-144  ATTCAATACATACAAATACCCGAGAGGCAATCTCTCTGTTGAGACATCTCTTCTCTTCTGAGGCTGAAA
- 72  CATTAGAAAGGAGTCTGAGGCTGAGAGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
1  ATGCTTATCTCAAGATTCAGGCCCGTTACCTCTACGACTCTCTGGGAAACCCGACTGTGGAGTGGAGCTC
  M P I S K I H A R Y V Y D S R G E P T V E V D L
73  GTTACCGAGACCGGCTTCAGGCTGCTGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
25  Y T E T G L H R A I V F S G A S T
145  CctttctgagatgaaatagacacctcctggcctgattctcaatgacatctcaaatcaaaatataGOTLAC
43  G G
217  ACSAGGATGCGAGCTCCGTGACGCTGACAAATCCAAATGAGTGGCTGGCAAGGAGTGTCTTGAAGCCGCTG
45  E E A C E L R D G D E S E W L D G V L R A V E
289  ATGTCAGCACTGCTCTGAGGCTGAGTGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
69  N V H T V L G P E L I K A G L D V K D Q T A V D
361  AFTTCTCTTCAAGCTCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
93  E F L I K L D G T A N E K T K L G A N A I L G V S
433  TGGCTGTGCTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
117  L A V A K A O A A E E G V P L Y A H V S D L A S
505  CCAGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
141  T K K P Y V L P V P P Q N V L N G G S H A G G R
577  TGGCTGTGCTCAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
165  L A F Q E F H I V P S A A P S F S E S L R M G A
649  AATCTTACCAAGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
189  E T T E Q L K S L A E E Y T G Q S A G H V G D E
721  GTGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
213  G G V A P D I Q T A E E A L E L I S E A I E E A
793  GCTACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
237  G Y T G E H K I A N D V A S S E F Y K E D V E K
865  ACDGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
261  Y D L D F K E P D S D P S E M L T T E Q L A A L
937  ACDGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
285  Y A D L T E K Y P I V S I E D P F A K D D W E A
1009  GGAAGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
309  M S Y P Y F E Y Q D I Q L V A D D L Y V T M F I R
1081  TCAAGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
333  I K E A I E L K A A N A L L L E V N Q I G T L T
1153  AATCCATTCAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
357  E S I Q A A K D S Y A D G W G Y H V S H R S D E
1225  CCGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
381  T E D V T I A D I V V D I R A S Q I K T S A P A
1297  GGTCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
405  R S E R L A K L N Q I L R I E E E L G S N A I Y
1369  CTGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
429  A G E D F R E S V T L ***
1441  CCAAACTATGTTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
1513  CTCTCTCAACTGCTCCGCCCAAGGAGGAGGATCTCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
1585  CAAAGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGG
1657  TGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1729  AATCATACTATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1801  TTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1873  ACACCACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1945  TGTGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
2017  CACACTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

```

Fig. 11. Nucleotide and deduced amino acid sequence of interacting gene from *C. parasitica*. The intron and 5'- and 3'-flanking regions are shown in small letters. The 7-bp conserved element is underlined and the transcription initiation site shown by a bold letter. The putative poly (A) signal is indicated in the box.

```

MYNPPGQRDATRPFHVPPPPPPMSPFPPTVGINNPMITIPPPFRHPNAPSTTGNVLLPFPFSGFPFNSGF
PNSAIAPPSALGSTAPVHGAWGRAYDGRFANIPPPPPGGGAGGGGGGGGGVLRAYDPKYHAQVLAALAA
NNGATYTVPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP
QQQQQQQQQQQQSDQMGALTSATYPOGDTYGEVGVIFGLGLEDSAGWNMMGAHLESATATPLDESSGRDR
LYAAMAQRGSSSTTSNATVSSVSVPELAACWPMKVLGWLQANSFSSHWQETRYKLGLDGARFLELGSSSH
GGRGNFMMHQQVYPRLLALSGPEWNOAREREEGKRMFRRLVRSIVTGRPVEVKGGRLGGGGQQQPQHAR
QNSTSAFPAVTGGGOTGNRISAESFNVSVDGFWDTGVTDADDGDKQTPNPKPFEFGFSRFRSQRATTMP
TSSSTMPDHRNMMKEIDTSRRHSPTLSESGEAGGTFRGGSTPLGGGGGGGGGGGGGRDPSAGSPNPAS
GLFSSSTAGNLSASPHSSRFQHRSPNSTDSVSSAAIYGSQVPAADAAAMLKSGMNIADVYNAARNANDRRH
AQDGGPPSPQESGGDRSAGEPPGSAKSGSFLSIFTRKKHGRKDDGFGDEDSPTSPGLSRPQSLGD
NFPQSSAGTYGHHHAGNVRANRGGPRVFLATADCWNYRMLDVTDIE TASLRQUCINLGLPESEGAHLIPT
ELGKFEHDGEALDDSKLLAIKTRADAIQTLKLFVRYGGPPQMRQTAGAIAMDEETYVKLNMRMRSSSSPPT
SRQNTLTGKEGEDKMLTAEAEYRTECLRKQKEYLAKRKOVAENNHVADRSPSSSIVGRTVDFDQPRHSPEE
DRKMDTLRQKRPFPAPSDPSATLIKANSUKKTHGHLRLSGDGGYHFRKRTSSDIRSSGDVYFEKQNRWGP
YADPSAGIGALLVGMSDGMASIAAPPFGGMMOCQPSPHRVATEPITSQELQRGKAMSTVNFQPAHQQR
ERSGSGGGSPFPGGMPGSPGTYWSSKNVPLVPDYSPNGTPAPPITASRMPDGGGNSGDGCLDQNHNH
QAQNGTIAKMRNVARAPSPGNVSPSSRRPSSDSFSSQAAWAKRKSHPD TDFDNDVTFSSASSTRASKY
DDSDSDDDSDGLFAPIAARNSSGPDKGTAPAE GNSGDSGASGTGTGRPRLNTRISGNSRAKKT
LSVAFVSPQSSSAGGKTPLEDSDSRRSSQRRGTPGTPQSEGGWDSEEKDSKISRRKSFEKDVWANRP
PTDALVNNLEDFFDLDVDFVLEEGVDQEPSPVAEGDENNOGSASVFPPLPPLPPLGLSTGKLTIFYNDND
TLGSDSTLKALESPPVSMQSLAHRISRRSGGGGGLGRMKSEIFVARGANEFGRYTOGPQIDAQSAAA
AGNRNTMLMRRKSTKMFNANIYQIDRGSLLMAMGGLTIPQDSLPTRSSTNSRESIPKROTTFRWFNGQLI
GKGTFGRVYLGMINATTGEFLAVKEVEVNPKAAGDKKIMQELVAALDQEIDTMQHLDHVNIYQYLGCERKE
TSISIFLEYISGGSIGSCLRKHGKFEFPVVASLTROTLSSGLAYLHREGILHRDLKADNILLDLDGTCKISDFGSK
KTDNIYGNDKTNSMOGSYFWMAPVRSQGE GYSAKVDIWSLGC VVLEMFAGRPPWSKEEAVGAIYKIANG
ETPPFEDIREVSPVAIARMLDCFTVSSERPTADVLLSQHPFCELDPTYSLDTELYAKIAGRVDLGRGO

```

Fig.12. Matched the peptide sequence with Bck1 like MEKK of *P. anserina* were indicated by red color. Using these peptide sequence, degenerate primers were generated.

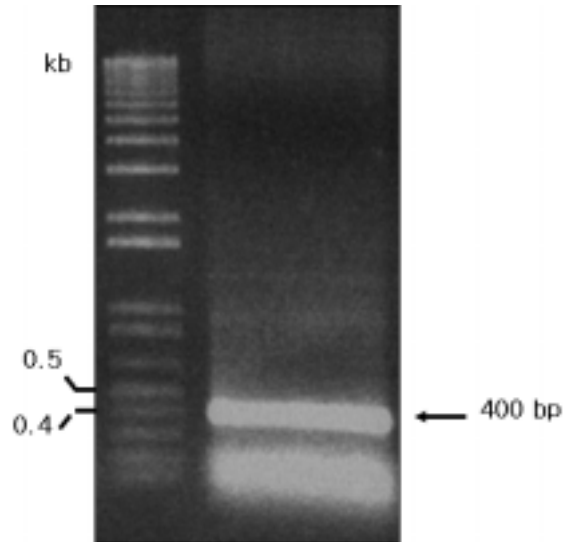


Fig.13. As a result of PCR amplification with two degenerate primers, 400bp DNA fragment was cloned. DNA sequence of this PCR amplicon was identified as a Bck1 like MEKK of *P. anserina*

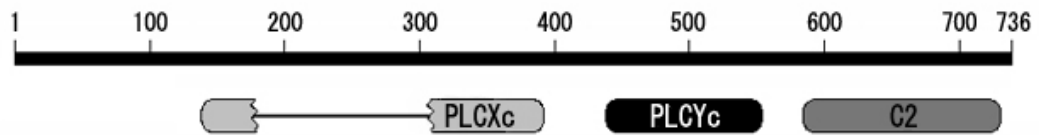


Fig.14. The schematic diagram of the predicted *cpl1* gene product. The conserved X, Y, and C2 domains are indicated in the boxes. The unique amino acid extension between the 2nd b-strand and the  $\alpha$ -helix of the TIM-barrel is indicated by a bold line. Numbering of the residues from the N-terminus of the whole protein is shown at the top.

-1108 gtcgactgcttgcccaattggccgaggctttcttcogctccgagcgcgggttcagctccc  
-1045 gatgcatctgaagatgctgttggctgaggtatcttcttatagctcccagagatgagcgggaaggagg  
-972 gacagctgccccagagcccaaatcaaatgtcaaatggaaactgtgctataacgctgacctgacctca  
-899 cctaaagtagactgaatagggcaacaaaccactctagcagctgtaagccgcggtcgctgatttgtgt  
-827 tcttcttctcctgaaccatcggtttgcttccatctcgttcagggtccaacccccattatccgctcagaccct  
-755 ttaattcttgcggaggcagctaaaacgaagccccaatggaggctacgtgggcagccatattataagat  
-683 gggccaccggctttagcgggtccagccctgaaacgcccgaatctggcccagagagagagagaagg  
-648 gaaggaagcctcgaagctggcagctgtaggtgacgtcttagggtcctcggttgcctctccctctc  
-576 attttgggtcgggcgacggcaagtgaggatgaggtcgaaccaaaggaagccagagcattatcaagcttca  
-504 ggatgatgtgtacatgagccatcctgccttgattttcttcttactgcataaaacacatgtcattcccttac  
-432 tcgcccagtacacgggtgacacgagcgggtgtctcgctatccatttgcctcctcaaacgctcgagctcgt  
-360 ggtggggaaaagcccttgcgttaccacacaagctcgccgggaagaataaccactttcagggtcoga  
-288 ctccactctgtatcaaggcgaagctgggctccaaacctatcttctggagatcgccagcgggtgaggtg  
-216 gacgtggtgtcaaatgtaggacttgggtgagcggatggtgacacgtactcactcact  
-144 tactcgttgtctagcatagagtttcttctcccccgcctcgaagcctcctttatttggaaataacaga  
- 71 ttcccacatacctgtaacatctctccccgctccaggacagagtggtgcaaacactcctacaacagctcgtc  
1 ATGCGCGGGTGCACCAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAAAGGAGGAGGATGGAGAACTCCCTCCGCC  
1 M A A A A P Q E Q Q Q Q Q K E E D G E L P P P  
73 AGTGAGGCCATCACCCAGGCCGTTGGTGGCTCTCCGGCGCGGGTCCC GCCGACATCACCACTGTCTCC  
25 S E A I T Q A G G V S G A G P A R S I T T V S  
145 GCTGCTGTGCTCCCATACCTCGAGAAAATCTTCAACTGTCATGCCGACACCGCCAGCCGCTGGCAGGCG  
49 A A V L P Y L E K I F N C H A D T S Q A W H R G  
217 CAGGCAGAGACTTCATCCGATGCACTCAGGCTGGCAGCCGAAATGGCAGCAGCCAGGCTCCCTGCCGAC  
73 Q A E T F I R C T Q A G D P N G S A E G L P A D  
289 CTGGCTACCAAGGACGAGCTGGACTTCAATGATTTCTGGCTACATGACAGTGATGTACCAGCGCCGTC  
97 L A T K D E L D F N D F L R Y M T S D A T S A V  
361 ACACCCCTGAATGCACAAACGGGTGGGACCTGTCTATCCGCTGAGCAGCTACTTCATCTCCAGCAGCCAC  
121 T P L N A Q T G G D L S Y P L S S Y F I C S S H  
433 AACACGTACCTCACGGAAACCAGCTCAGCAGTGATGCCAGCACCGGACGCTACAGAACGTCCTGCTACGC  
145 N T Y L T G N Q L S S D A S T D A Y K N V L L R  
505 GGGTGTAGATGCATCGAGATTGATGTCGGGATGGGAGCAGTCAGACTCAGAGGCCGCTTACTCGTCG  
169 G C R C I E I D V W D G D E S D S E A S G Y S S  
577 AGTGACCTCGAGGATCATGCCCAAGAGCCGCTGCGAGCTCGCGCAAAGAGGAAAGGCAAAGGTCGAAAG  
193 S D L E D H D P K K A A A A R A K R K A K V D K  
649 GCCAAGCCAAGATTCCCAAGTCCGTGCTGCGAGAAGCTTGGCAGACATCGCTCGGCAAGAAGCTCGAGAAG  
217 A K A K I P K S V L Q K L E Q T S L G K K L E K  
721 TATGTCGAGAAGAGCAGGAGCCCAAGGCCCGCTCCCGCTACCTTCGTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA  
241 Y V E K K T E P K A P A S P S T S S A A A A A  
793 GCGCAGCGCCAGCACCCGACGCAAGGATGATTGAAAGTCAAAGTCCGACGACCGGCTCCTCTCTCTCT  
265 P A P A P A A K D D S K V K V A S Q A A S D  
865 GCGCGCCGTTGGTGGAGAAGCTCCCGCCCTCGCGCGGCTGTTATCGAACCCCGTGTACTACATGGTTAC  
289 A P P L V E K L P A L A A A V I E P R V L H G S  
937 ACGCTAACCAAGGAGGTCTCTCCGCGAGGTGTGTTTGGCTATCAAGGAGTACGCCCTTTTCCGTCAGGAT  
313 T L T K E V S F R E V C L A I K E Y A F A V T D  
1009 CTCCGCTACGTCGTCGAGGTGCATGCGAGGCCGTAACAGCAGGAGATCATGGTCAAGATCATGAAC  
337 L P L I V S L E V H A G P E Q Q E I M V K I M N  
1081 GAGACCTGGCCCGCCTCTACTCGATCCGCTGAGAAGGAGGCCGACGTAATCCCGTCCGCTAGCGACTG  
361 E T W A G L L L D P P E K E A D V L P S P S D L  
1153 CGTCGCAAAATCTCGTCAAGTCAAGTACGCCGCCCTGGCCAGGAGGTCTCTGCGGCCGCCGATCCGAC  
385 R R K I L V K V K Y A P P G Q E V S A A A A S D  
1225 GAGGATGTCCTACGCCGGCCAACTCGCTGCCCTGGGTCTCCAGAGCCAAAGAAAGAAGAAGCCCTCC  
409 E D V S T P G Q V A A P G S P E A K K K K P S  
1297 AAGATCATTCATGCTCTGAGTGCCCTGGGCATCTACACCAAGGCCGTTTCGTTCAAGTCCGTTCAACCAACCG  
433 K I I H A L S A L G I Y T K A V S F K S L H Q P  
1369 GAAGCCACTATGCCGTACACGCTCTTTCCCTGGGCGAGAAGAGCGTCAGAGAGGTGCACGAGAAGCGGT  
457 E A T M P S H V F S L G E K S V R E V H E K Q G  
1441 CAGGACCTGTTTGGACACAACCAGAAATATCTATGCGGGCGTACCCATCTGGCTTCAAGATTGGCTCGTCC  
481 Q D L F E H N R K Y L M R A Y P S G F R V G S S  
1513 AATCTGACCCCTACGCGTCTGGAGGAAGGGATCCAGATTGCCCGCTTGAACCTGGCAGCAGCTGGGATGAG  
505 N L D P T P F W R K G I Q I A A L N W Q H W D E  
1585 GGCATGATgtgagtgggaagcaaaagcatccagaagcgtggcctgattataattgctgaccatgtccct  
529 G M M  
1657 accatacccaccatacagGCTCAACGAGGGCATGTTTCCCGGCTCAGGCGGTACGTTCTCAAGCCTCAAG  
532 L N E G M F A G S G G Y V L K P P  
1729 GCTACCGACACGACAAGCCTAACGCGCCCGGAGACCGCCACGTGACAGCACCCGACGCTGGACCTCGAGA  
549 G Y R H D K P N A P A E T A H V Q H R T L D L E  
1801 TCAAGTTCTCGCCGCTCAGAACCTGCGCCTCCCGCCGACCTCGGTCAAGTCTGTTAACCTTACGTC  
573 L K V L A A Q N L P L P P E T S V K S F N P Y V  
1873 AGGTCGAGCTTACGTCGAAGCCGGTGGGAGCGCCACGGCCACTTCCCGCCGACGGTCAAGTGTGTGAC  
597 K V E L H V E A G G E R H G H F P A D G H E C D  
1945 TGGCCACCGCCCGCTGCCAAGGCCGAGCCGCGAGCGACGAGGACGATGAGGAGGTGAGGGGCGAGT  
621 L A T A A A A K A A A A R R S E D D E E V E G E

```

2017 ACAAGGCGCGACCAAGACCGCCAAGGCCACGTGCGATCCGGACTATAAGGGCGAAATACTCGAGTTCAAGG
645 Y K A R T K T A K A T C D P D Y K G E I L E F K
2089 CCATCCCAGGCGTCGTCGAGGAAGTGAAGCTTCGTGCGCTTCATCGTGC GCGACGACGTC AAGTTTAGGC GGG
669 A I P G V V E E L S F V R F I V R D D V K F R R
2161 ATGATCTCGCTGCATGGGCGTGTACGCTGGACCGGCTGCGGATGGGGTACCGCTTGTGAGACTTATGG
693 D D L A A W A C V R L D R L R M G Y R F V R L M
2233 ATGCCAAGGGGAAGGAGAGTGAGGGGGCTATTCTTGTCAAGGTCATGAAGAAGGTCATATTAGttcgggtga
717 D A K G K E S E G A I L V K V M K K V Y ***
2305 ttgggttgcggaagttttgtgtaaggggagacacacagagagagaatggagggagggtggggatatttagc
2377 actttcgtggctgctggccttggtacagagccagtcagtagtatccttccaacaggtttggggtaacataa
2451 aaatcaaagagagacagaaagggttccttatgattctataactctgttttatggccattgcatgctagtgtc
2523 tgtacagtcctgaaacgcaacaagtttgaatttcattctccatgtaactcccctgggcccattgctgtcctaatc
2595 gctgacccttaaaaaagcatgtcaaagttccataaacatctcgcactataaaatcgctgagagctcttccg
2667 gctgtttgatgtgggagcccttaaaaatccatttgctggcatatcaacgccaaactccattcatccctt
2739 ctgaaaatgacaat

```

Fig. 15. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *cpc1* of *C. parasitica*. The intron and 5'- and 3'-flanking regions are shown in small letters. The regions used to design degenerate PCR primers are indicated in the boxes. The amino acid residues of the X domain, Y domain, and C2 domain are underlined, double-underlined, and double-wavylined, respectively. The unique 133 amino acid extension (from the conserved Asp 176 to His 310) is indicated by a dotted lined. The transcription initiation site is shown by a bold letter, and the conserved hallmark residues for the binding of InsP<sub>3</sub> and calcium in the catalytic domain are highlighted. The putative poly (A) signal is underlined. The GenBank accession number for the *cpc1* sequence is AY692025.

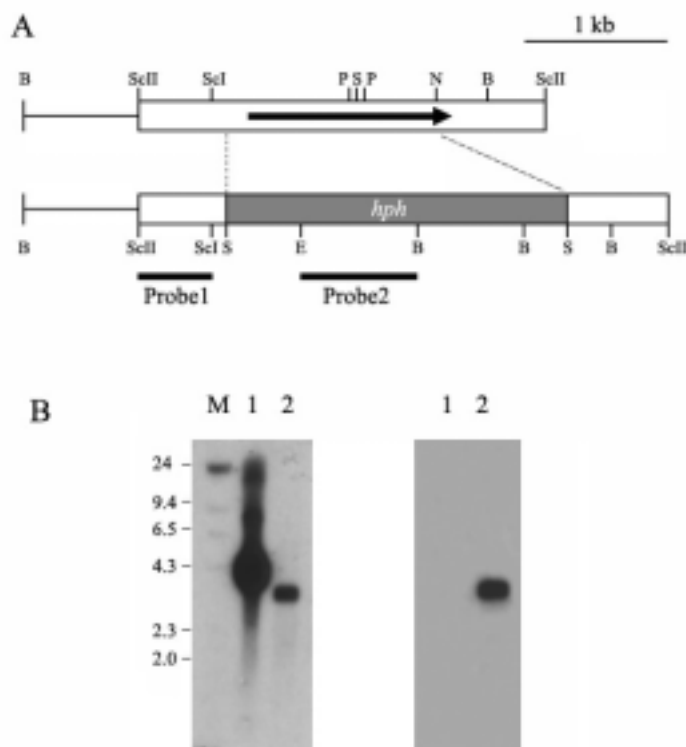


Fig 16. Restriction and Southern blot analyses of the *cplc1*-null mutant (TdPLC7) and the wild-type EP155/2. **(A)** Restriction map of the *cplc1* genomic region and the gene-replacement vector pDplc1, which contains 616-bp and 716-bp fragments from the 5'- and 3'-flanking regions, respectively. The arrows show the direction of transcription. The box and the line indicate regions in which the sequences have or have not been determined, respectively. B, *Bam*HI E, *Eco*RI N, *Not*I P, *Pst*I S, *Sa*I SacI, *Sac*II SacII, *Sac*II. **(B)** Southern blot analysis of the wild-type EP155/2 strain (lane 1) and the *cplc1*-replaced transformant TdPLC7 (lane 2). All of the DNA samples were digested with *Bam*HI. The blots were probed with the 0.6-kb *Sac*II/*Sac*I fragment (probe1) and the 0.8-kb *Eco*RI/*Bam*HI-*hph* fragment (probe2). The TdPLC7 transformant has undergone the desired replacement at *cplc1*, as evidenced by the changes in size of the fragments that hybridize with probe 1, and the lack of hybridization with probe 2. The probes are indicated in the restriction map of the *cplc1* gene in the upper panel (A).





Fig.17. Colony morphologies on PDAMB. The colony morphology after 14 days of cultivation is shown. The strains used, indicated above the panel, were the virus-free wild-type (EP155/2), its isogenic virus-containing hypovirulent strain (UEP1), the *cplc1*-null mutant (TdPLC1), and the *cplc1*-complemented strain (TcPLC1). Colony morphology on PDAMB.

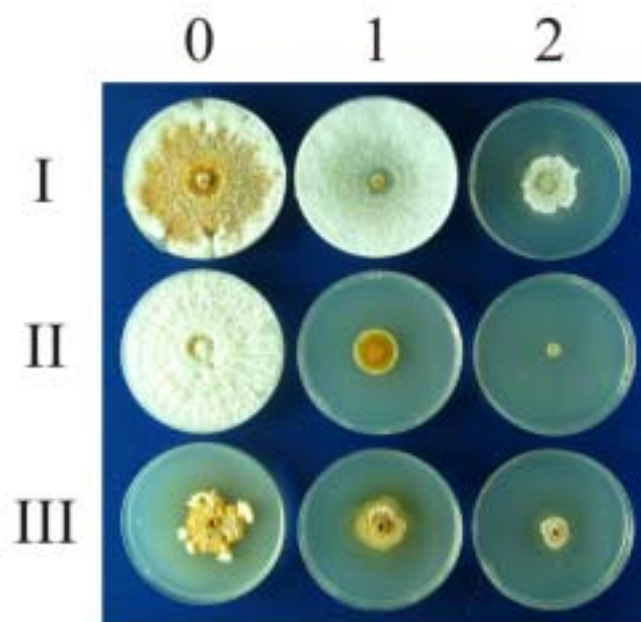


Fig.18. Colony morphology under the hyperosmotic conditions. The numbers on the top refer to molar concentrations of sorbitol. The numbers I, II, and III at left indicate the wild-type (EP155/2), the osmosensitive *cpmk1*-null mutant (TdMK1-23), and the *cpc1*-null mutant (TdPLC7).

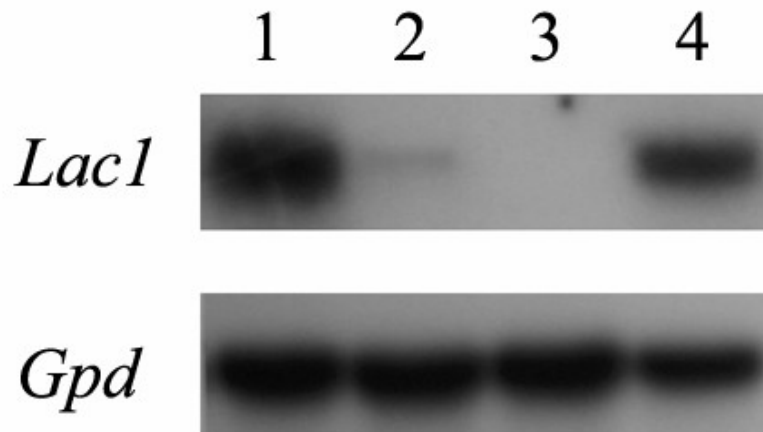
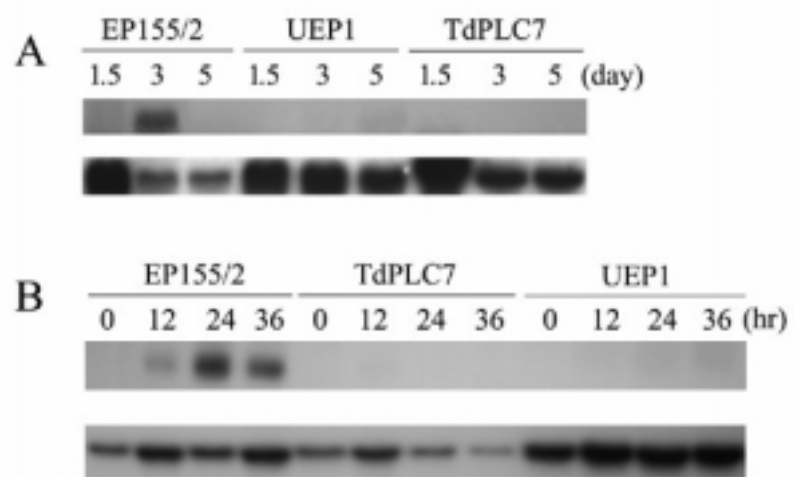


Fig. 19. Northern blot analysis of *lac1* using RNA samples from strains that were complemented with the yeast *PLC1* gene. The numbers 1, 2, 3, and 4 indicate the EP155/2, UEP1, *cplc1*-null mutant (TdPLC7), and yeast *PLC1*-complemented strains, respectively. RNA was prepared from mycelia that were grown on PDAMB plates, and equal loading of RNA samples is shown in the bottom panel with a parallel blot that was hybridized with the *Gpd* probe as an internal control.



**Fig. 20. Molecular characteristics of the *cpI1*-null mutant.** Northern blot analyses of *lacI* using RNA samples from liquid cultures (**A**) and CHX-induced plates (**B**). The identity of each strain is given above the line, and the numbers indicate days after inoculation (A) and hours after transfer to the CHX-containing medium (B). Equal loading of RNA samples is shown in the bottom panel, along with a parallel blot that was hybridized with the *Gpd* probe as an internal control

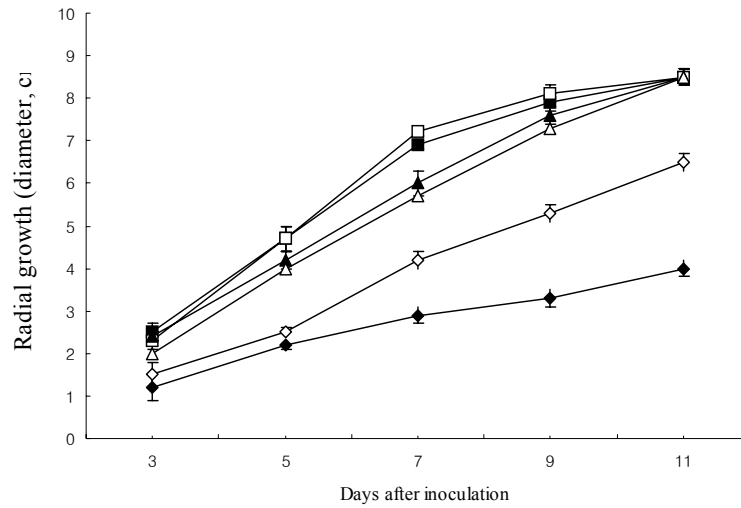


Fig. 4. Radial growth rate on PDAMB at 25°C. The square, triangle, and diamond indicate the EP155/2, UEP1, and *cplc1*-null mutant (TdPLC7) strains, respectively. Open and closed marks indicated the radial growth with and without Ca<sup>2+</sup> supplementation, respectively. Error bars represent the standard deviation of three replicates in three independent experiments. Of the three different Ca<sup>2+</sup> concentrations tested, representative experiments using 2.0 mM Ca<sup>2+</sup> supplementation are shown.

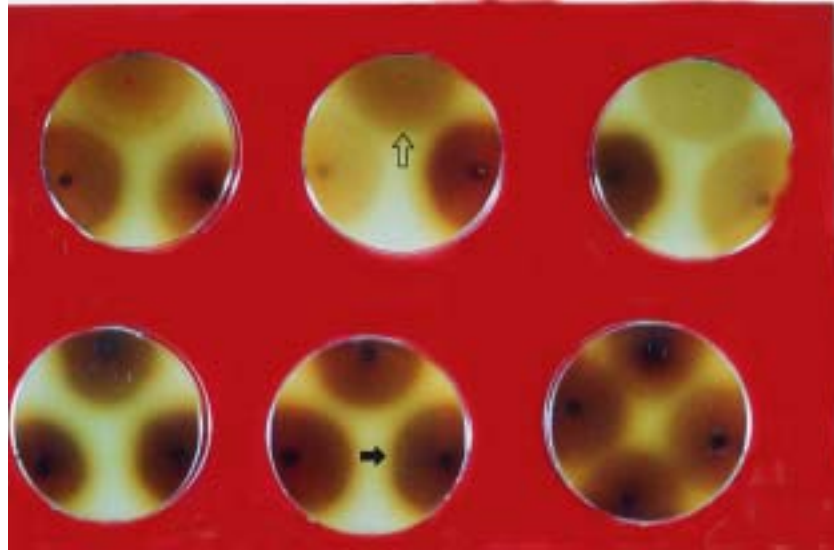


Fig. 21. Bavendamm test.

Colonies were grown on tannic acid-containing medium, as previously described (Rigling *et al.*, 1989). The level of brown coloration correlated with the laccase activity of each strain.



Fig. 22. Vegetative compatibility test

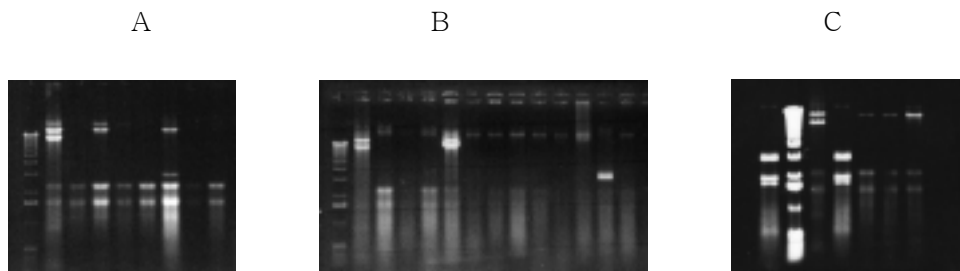


Fig. 23. Four types of ds-RNA infection of *Cryphonectria parasitica*. A: 12 kb and 12 kb + 2.7 kb, B: 3.0 kb, C: 3.0 kb + 2.0 kb + 1.8 kb.





Fig. 24. Construction of hypovirulent strain by hyphal fusion. A: virulent, B: hypovirulent, C: hypovirulent isolate (arrow) converted from virulent

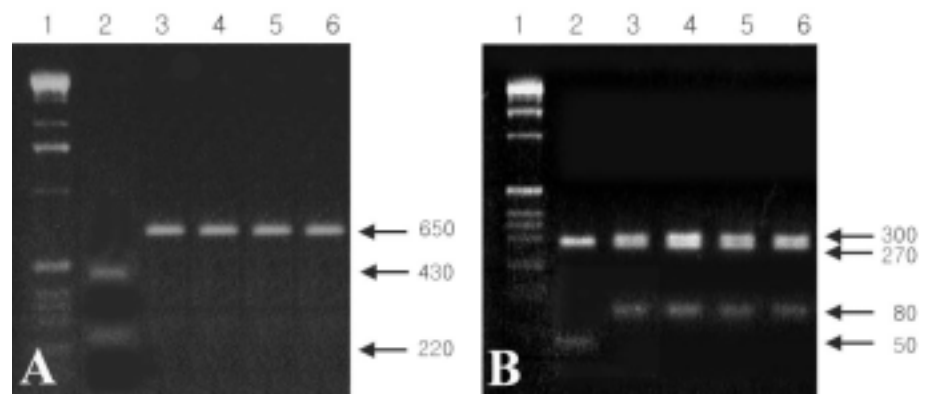


Fig. 25. Agarose gel electrophoresis of PCR products of 4 Korean *Cryphonectria parasitica* isolates digested with *Alu* I (A) and *Cfo* I (B). Lane 1: 1 kb DNA ladder, Lane 2: positive control (CHV1) isolates, Lanes 3-6: Korean isolates.

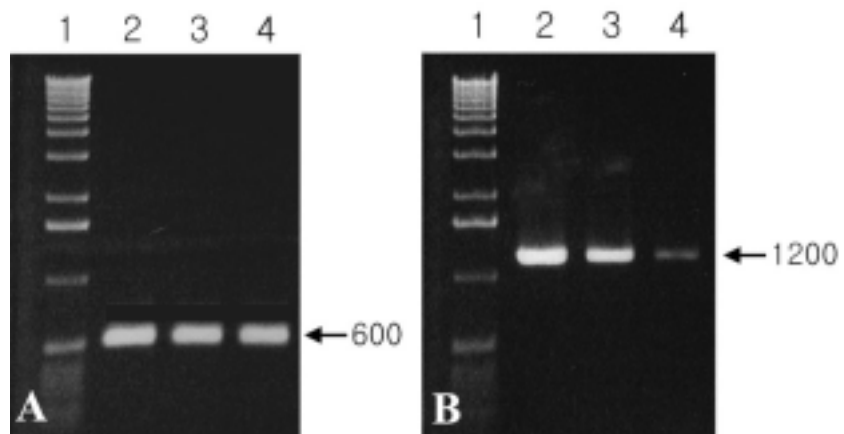


Fig. 26. Agarose gel electrophoresis of PCR products of 5' non-coding region (A) and ORF B (B) of Korean isolates of *Cryphonectria parasitica*. Lane 1: 1 kb DNA ladder, Lane 2: positive control (CHV1) isolates, Lanes 3-4: Korean isolates

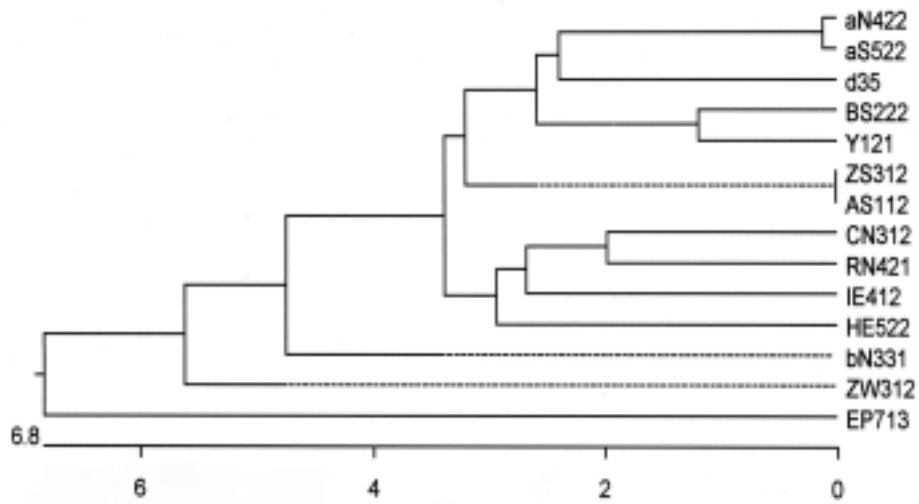


Fig. 27. Relationships among Korean isolates and European isolate (EP713) of *Cryphonectria parasitica* in sequences of 5' non-coding region. Horizontal distance indicates the degree of relatedness.

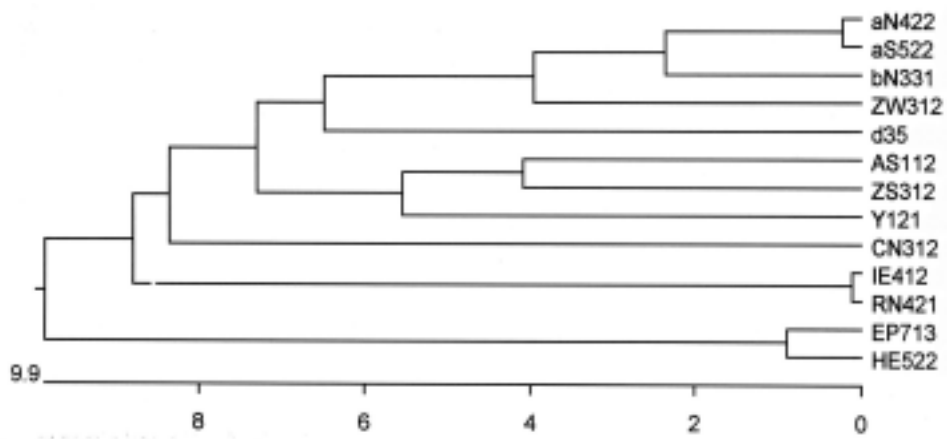


Fig. 28. Relationships among Korean isolates and European isolate (EP713) of *Cryphonectria parasitica* in sequences of ORF B. Horizontal distance indicates the degree of relatedness.

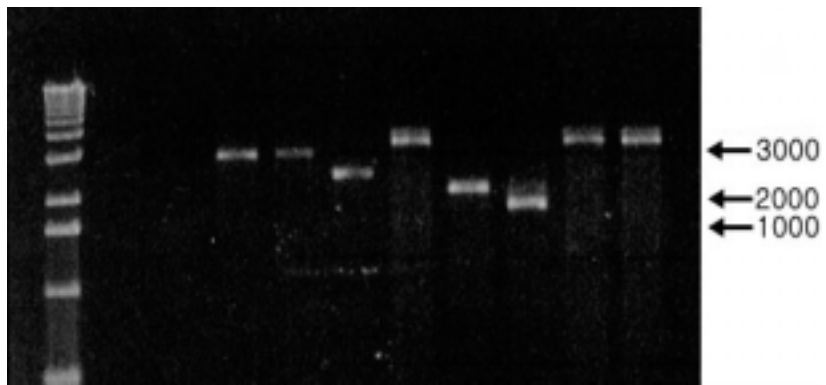


Fig. 29. dsRNA forms isolated from Korean type *Cryphonectria parasitica*

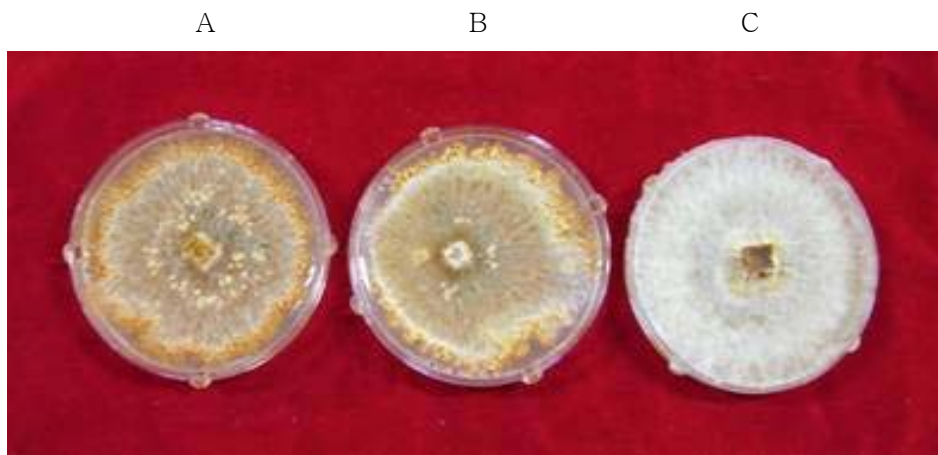


Fig. 31. Construction of hypovirulence strain by hyphal fusion. A, Virulent strain; B, Hyphal fused strain; C, Non virulent strain

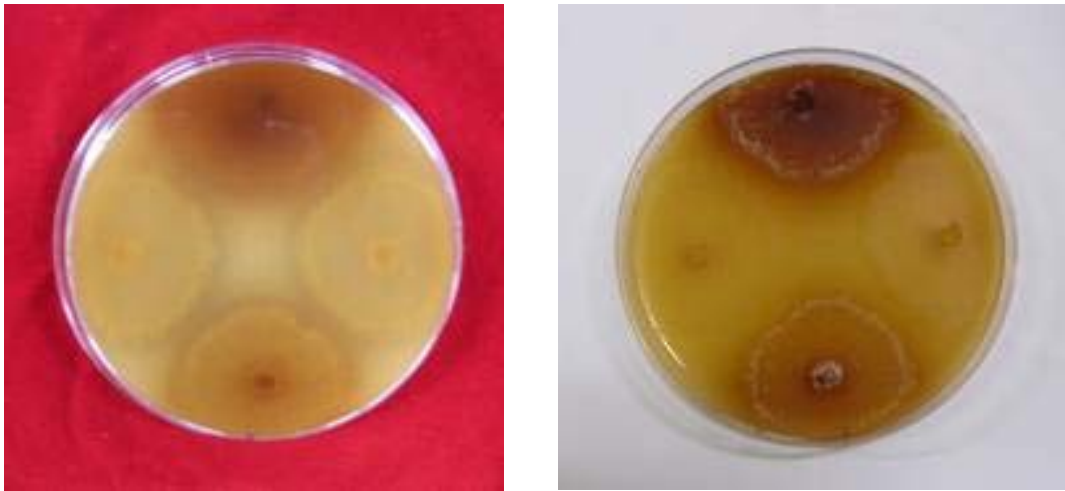


Fig. 32. Phenol oxidase activity of hypovirulent strains that constructed from the virulent strain and hypovirulent strain by hyphal fusion. Upper, Virulent strain, Lower, Hypovirulent strain, Left and Right, Hyphal fused strain



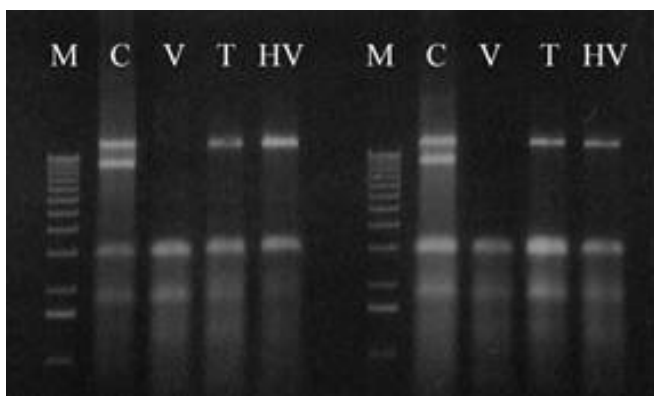


Fig. 33. dsRNA forms isolated from hyphal fused strains. M, DNA ladder; C:EP43 (CHV1); V, virulent strain; T, dsRNS transferred strain; HV: Hypovirulent parent strain