

11-1543000
-002343-01

발간등록번호
11-1543000-002343-01

벼와
고추침해
주요
공기
전반
병원성
곰팡이의
발병
유전체
분석 및
기능연구

최종
보고서

2018

농림축산식품부

포스트게놈다부처유전체사업
R&D Report

벼와 고추침해
주요 공기 전반
병원성 곰팡이의
발병 유전체 분석
및 기능연구
최종보고서

2018 . 8 . 22 .

주관연구기관 / 순천향대학교
협동연구기관 / 강원대학교
위탁연구기관 / 동아대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “벼와 고추 칩해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구”(개발기간 : 2014. 08. ~ 2018. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 08 . 22 .

주관연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단 (대표자) 김동학 (인)

협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 윤경구 (인)

위탁연구기관명 : 동아대학교 산학협력단 (대표자) 이재열 (인)

주관연구책임자 : 윤성환

협동연구책임자 : 김경수

위탁연구책임자 : 이정관

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	914009-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2014. 08. 23 ~2018. 08. 22	단 계 구 분	4/4
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	포스트게놈 다부처유전체사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구			
연구책임자	윤성환	해당단계 참여연구원 수	총: 20 명 내부: 20 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 840,000천원 민간: 천원 계: 840,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 20 명 내부: 20 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 840,000천원 민간: 천원 계: 840,000천원
연구기관명 및 소속부서명	순천향대학교 / 의료생명공학과			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 동아대학교			연구책임자: 이정관	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

- 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전체 정보 생산·분석을 통한 곰팡이 집단의 특성과 병 발생 메카니즘의 규명 및 곰팡이 진단마커 개발
- 연구결과의 산업화 지원 활용 및 우수 SCI 논문 발표
- 벼와 고추 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 유전적 다양성 분석
- 주요 공기전반 병원성 *Fusarium* 곰팡이, 고추 탄저병균 (*Colletotrichum acutatum*) 의 신규 유전체와 발병 전사체 해독 및 분석
- 공기전반 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 병원성과 포자형성 관련 주요 유전자의 기능 연구
- *In silico* AFLP-PCR 등을 활용한 식물병원성 곰팡이의 진단마커 개발
- 다식성 식물병원균 *C. acutatum*의 신규 유전체 해독 및 병 발생 관련 전사체학 분석을 통한 식물병 제어 기반 구축
- 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석
- 고추탄저병균의 공기전반 및 병원성유전자 기능연구를 위한 형질전환

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전체 정보 생산·분석을 통한 곰팡이 집단의 특성과 병 발생 메카니즘의 규명 및 곰팡이 진단마커 개발 ○ 연구결과의 산업화 지원 활용 및 우수 SCI 논문 발표 ○ 벼와 고추 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 유전적 다양성 분석 ○ 주요 공기전반 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이, 고추 탄저병균 (<i>Colletotrichum acutatum</i>) 의 신규 유전체와 발병 전사체 해독 및 분석 ○ 공기전반 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 병원성과 포자형성 관련 주요 유전자의 기능 연구 ○ <i>In silico</i> AFLP-PCR 등을 활용한 식물병원성 곰팡이의 진단마커 개발 ○ 다식성 식물병원균 <i>C. acutatum</i>의 신규 유전체 해독 및 병 발생 관련 전사체학 분석을 통한 식물병 제어 기반 구축 ○ 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석 ○ 고추탄저병균의 공기전반 및 병원성유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우리나라 벼, 고추 재배 지역 공기 중 병원성 <i>Fusarium</i>, <i>Colletotrichum</i> 곰팡이의 계절 별 분포 양상 최초 규명 ○ 국내 미기록 (미보고) <i>F. culmorum</i>의 분포 최초 보고 및 유전체 해독 ○ 우리나라 대표 벼 키다리병균 <i>F. fujikuroi</i> 균주의 유전체 해독 및 분석 관련 독일 연구진과 국제공동연구 기반 확립 ○ 벼 키다리병균 <i>F. fujikuroi</i> 집단 내 두 가지 병원형 (키다리형과 줄기마름형) 집단의 규명과 병원형 별 병원성 메카니즘의 최초 규명 ○ 벼 키다리병균 <i>F. fujikuroi</i>, 이삭마름병균 <i>F. graminearum</i> 의 감염 진단 마커 개발 ○ <i>F. graminearum</i> 의 유성생식을 통한 생존 전략 규명과 벼 키다리병 줄기마름 증상 관련 연구성과의 언론 홍보 2건 ○ 2015년, 2017년 유전학, 미생물학 분야 최상위 등급 (Q1)의 PLoS Genetics와 PLOS Pathogens 지에 각각 1편씩, 미생물학 분야 Q1 등급의 “Environmental Microbiology” 에 1편의 논문 게재 ○ 제1세부 위탁연구자와 협력하여 분리한 고추탄저병균의 집단 유전학 분석 ○ 고추작물로부터 분리한 탄저병균간의 교차 병원성 분석 ○ 고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(<i>de novo</i>) 유전체 NGS data 생성 및 <i>C. acutatum</i> genome assembly 및 유전자 예측 ○ 다른 <i>Colletotrichum</i> 종간 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해 ○ 고추탄저병균의 발달(균사생장, 포자생성, 부착기형성) 단계별 균학적 특성과 발병 특성 연구 ○ 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석 ○ REMI(restriction enzyme mediated integration) 형질전환기법 적용 ○ Homologous recombination을 통한 형질전환기법 적용 연구

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우리나라 주요 공기전반 곰팡이의 지역 별, 기주 별, 기주 별 분포 양상에 바탕을 둔 식물병 발생 예찰 시스템 구축 통한 공기전반 식물병원성 곰팡이의 연구기반 확립 ○ 주요 공기전반 식물병원성 곰팡이의 유전체 데이터베이스 구축 및 특정 병 발생 관련 유전자원의 특허화 ○ 병 발생 관련 유전자를 이용한 식물감염진단 마커 개발 및 내병성 작물의 분자유종 소재 개발 ○ 국내 진행 미생물 유전체 해독 기술력 향상을 통한 유용/유해 진행 미생물의 유전체 해독 연구력과 국제 연구경쟁력 향상 ○ 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전자의 확보로 식물병 방제를 위한 유전자원의 발굴 및 개발에 활용 가능 ○ 국산기술로 새로운 병 진단 kit 개발 기틀 마련 ○ 벼 곰팡이병 방제 및 방제 시스템 구축에 기여 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	공기전반	식물병원성 곰팡이	집단특성	발병유전체학	진단마커
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	air-borne	phytopathogenic fungi	population structure	pathogenomics	diagnosis marker

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1. 연구개발 목적	1
1-2. 연구개발의 필요성	3
1-3. 연구개발의 범위	5
2. 연구수행 내용 및 결과	7
2-1. 연구수행 내용	7
2-2. 연구수행 결과	13
가. 세부과제 결과(위탁포함)	13
나. 협동과제 결과	77
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	125
3-1. 목표	125
3-2. 성과목록	127
4. 연구결과의 활용 계획 등	136
붙임. 참고 문헌	137

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 과제별(세부·협동) 목적

<p>○ 연구개발의 최종목적</p> <ul style="list-style-type: none">- 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전체 정보 생산·분석을 통한 곰팡이 집단의 특성과 병 발생 메카니즘의 규명 및 곰팡이 진단마커 개발- 연구결과의 산업화 지원 활용 및 우수 SCI 논문 발표 (관련분야 상위 20% 이내 논문 2편 이상 포함) <p>○ 주요 연구 목적</p> <ul style="list-style-type: none">● 벼 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 집단 다양성 및 발병유전체학 분석 (1 세부)<ol style="list-style-type: none">1) 노지와 시설재배지역 내 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 포집, 동정 및 집단 분석2) 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 집단의 계통발생학 분석 및 병원성 검증3) 지역 별, 계절 별, 연차 별 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 분포 양상의 상세 분석4) 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 신규 유전체, 발병 관련 전사체 분석 및 유전자 기능분석5) 종 특이 또는 발병 단계 특이 유전자를 이용한 주요 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 진단 마커 개발● 고추침해 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구 (1협동)<ol style="list-style-type: none">1) 고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성 조사2) 고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(<i>de novo</i>) 유전체 해독 및 분석3) <i>C. acutatum</i> 의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석4) <i>C. acutatum</i> 의 공기전반 및 병 발생 관련 유전자 기능연구● 주요 곡류와 원예작물 침해 공기전반 병원성 곰팡이의 집단 분석 및 진단마커개발 (위탁과제)<ol style="list-style-type: none">1) 시설재배지역의 공기전반 병원성 곰팡이 분포 조사2) 공기전반 병원성 곰팡이 집단의 다양성 분석3) <i>In silico</i> AFLP-PCR 등을 활용한 병원성 곰팡이의 생물진단 마커 개발
--

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

<p>[제1세부 및 위탁]</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> 제목: 벼 침해 주요 공기전반 병원성곰팡이의 집단 다양성 및 발병유전체학 분석<input type="checkbox"/> 목표: 벼 침해 공기전반 주요 병원성 곰팡이의 종 분포양상 규명 및 주요 <i>Fusarium</i> 속 곰팡이의 발병유전체학 분석을 통한 공기전반 식물병 제어기반 구축<input type="checkbox"/> 연구개발 내용<ul style="list-style-type: none">○ 우리나라 벼 재배 지역의 대기 중 분포하는 식물병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이 집단의 다양성 분석
--

1) 균주 확보

- 세부과제, 위탁과제 책임자와 협력하여 우리나라 벼 재배 지역 (논 중심)내 공기전반 식물병원성 *Fusarium* 곰팡이의 포집 및 배양
- *Fusarium*곰팡이의 분리는 toxoflavin 첨가 선택배지 사용
- 국내외 기관으로부터 주요 표준균주와 근연종의 분양 (이미 확보된 *Fusarium* 속 곰팡이 균주 활용)
- 경남 김해지역 토마토, 딸기 대단위 시설재배지역의 공기전반 *Fusarium* 곰팡이의 포집 및 분류 (위탁)

2) 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 집단의 계통발생학 분석 및 병원성 검정

- 분리 곰팡이의 분자 마커 (예: *TEF1*, *RPB2* 등) 염기서열 비교를 통한 계통수 작성 및 종 동정 (위탁과 협력)
- AFLP를 활용한 집단의 다양성 분석 (위탁)
- 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 종 내 우점종 집단의 분석
- 주요 *Fusarium* 곰팡이 종의 병원성 검정 (위탁)

3) 지역 별, 계절 별, 연차 별 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 분포 양상의 상세 분석

- 우리나라 벼이삭마름병 (FHB) 의 원인 *Fusarium* 종의 명확한 동정

○ 주요 공기전반 식물병원성 *Fusarium* 속 곰팡이의 유전체/전사체 해독을 통한 병 발생 관련 유전자의 기능 분석

1) 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이의 신규 유전체 해독 및 생물정보학 분석

- 곡류 *Fusarium* 이삭마름병 (*Fusarium* head blight, FHB)의 원인균 (*F. sambucinum* 종 복합체, *F. tricinctum* 종복합체, *F. incarnatum-equiseti* 종복합체 소속 균주) 중 일부 종 균주 (최소 3 종이상) 의 유전체 해독 (Illumina sequencing)
- 기존 해독 *F. graminearum* 종복합체 일부 종 (*F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. boothii*, *F. meridionale* 등) 유전체와 비교 분석 및 병원균 진단용 종 프라이머 개발

2) 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이의 발병 관련 전사체 분석 및 유전자 기능분석

- 공기전반 병원성 *Fusarium* 곰팡이 균주의 기주 내 병 발생과 포자형성 단계에서 발현 되는 전사체 해독 및 단계 특이적 유전자 집단의 생물정보학 분석
- 발병 단계 특이적 유전자 집단 내 주요 유전자의 기능 분석

3) 종 특이 또는 발병 단계 특이 유전자를 이용한 공기전반 주요 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 진단마커 개발 (위탁)

- 공기 중 또는 식물 생체 내 감염(오염) *Fusarium* 곰팡이의 종 동정 및 병 발생 예찰에 활용
- *In silico* AFLP-PCR을 활용한 종특이적 진단마커 개발
- 식물 생체 내 감염 *Fusarium* 의 정량화 및 병 발생 예찰에 활용
- 식물 생체 내 *Fusarium* 발병 진단용 마커 개발 및 저항성 품종 검정에 활용

[제1협동]

- 제목: 고추 침해 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구
- 목표: 다식성 식물병원균 *C. acutatum*의 신규 유전체 해독 및 병발생 관련 전사체학 분석을 통한 식물병 제어 기반 구축
- 연구개발 내용
 - 고추재배 지역 내 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성 조사
 - 고추 노지재배 지역 내 탄저병균의 발생 조사 및 병리학적 특성 분석
 - 고추작물로부터 분리한 공기전반 탄저병균의 균학적 특성을 비교 분석
 - 제1세부 위탁연구자와 협력하여 분리한 고추탄저병균의 집단 유전학 분석
 - 고추작물로부터 분리한 탄저병균간의 교차 병원성 분석
 - 고추탄저병균(*C. acutatum*)의 신규(*de novo*) 유전체 해독
 - 고추탄저병균(*C. acutatum*)의 신규(*de novo*) 유전체 NGS data 생성
 - *C. acutatum* genome assembly 및 유전자 예측
 - 다른 *Colletotrichum* 종간 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해
 - 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석
 - 고추탄저병균의 발달(균사생장, 포자생성, 부착기형성) 단계별 균학적 특성과 발병 특성 연구
 - 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석
 - 고추탄저병균의 공기전반 및 병원성유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구
 - REMI (restriction enzyme mediated integration) 형질전환기법 적용연구
 - Homologous recombination을 통한 형질전환기법 적용 연구

1-2. 연구개발의 필요성

- 국내외 현황
 - 농작물 재배 지역 내 상시 존재하는 식물병의 주요 접종원은 대기 중 분포하는 병원성 곰팡이의 포자임
 - 식물병원성 곰팡이는 토양 또는 종자, 식물의 잔재물 등에서 여러 번식체 (propagule, 균사, 포자, 자실체 등) 로 일정기간 동안 생존 (또는 월동)을 한 후 그 중 일부는 식물의 생육기간 동안 포자를 형성하여 공기 전반을 통해 건전한 식물체를 감염함
 - 공기 중 분포하는 식물병원성 곰팡이의 분포 양상은 지역 내 재배 농작물의 종류, 생육단계, 작부 체계, 기상요인 등에 의해 결정되기 때문에 지역 별, 농작물 별, 계절 별 공기전반 곰팡이 분포 모니터링은 효과적인 병 발생 예찰 및 방제 시스템 확립에 필수적임
 - Fusarium 이삭마름병 (Fusarium Head Blight, FHB), 벼도열병, 흰가루병, 녹병, 탄저병 (*Colletotrichum* sp.) 등은 전 세계적으로 곡류와 원예작물에 발생하는 대표적인 공기전반 식물병해로서 매년 큰 경제적 손실을 초래함
 - 특히 고추탄저병균인 *C. acutatum* 과 *C. gloeosporioides*는 고추, 딸기, 사과, 토마토, 커피, 망고, 블루베리 등 다양한 종류의 경제작물에 감염하여 큰 손실을 야기함
 - 그동안 대부분 연구는 공기전반 식물병원성 곰팡이의 화학적 생물학적 방제에 주력함

- 병원균의 발달과 기주감염은 복잡한 신호전달에 의해 조절되기 때문에 개별 유전자 수준의 기능분석으로부터 유전체 수준 분석으로 연구 패러다임이 변화함.
- 이에 따라 일부 식물병원성 곰팡이 (예: *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum* 중 복합체 일부 중, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *C. gloeosporioides*, *C. graminicola*, *C. higginsianum*, *C. orbiculare* 등)의 유전체 염기서열이 해독되었음.
- 탄저병균에 대한 분자생물학적 연구는 계속 진행되어 왔지만, 현재까지 유전자 기능연구는 극소수에 불과함
- 해외 현황
 - 유럽의 경우, 국가 간 연구진흥 협력체계인 COST에서 곡류 발생 공기전반 병원균의 확산을 방지하기 위한 종합적인 전략으로 COST Action 817을 제정함. 주로 흰가루병과 녹병균을 대상으로 병원성 조사, 공기전반병 방제를 위한 작물 저항성 품종, 병원균 유전체 데이터베이스, 기주 저항성 유전자, 병역학적 요인, 살균제 감수성 등의 분야에서 종합적인 연구를 수행하고 있음
 - 미국의 경우 *Fusarium* 이삭마름병 방제를 위해 정부와 대학의 연구 컨소시엄인 US Wheat and Barley Scab Initiative를 발족시켜 FHB에 대한 다양한 병리학적, 역학적 연구와 분자유전학, 유전체학 연구를 수행하고 있음
- 국내 현황
 - 해외 선진국에 비해 공기전반에 중점을 둔 식물병원성 곰팡이의 병리학적, 유전체학적 연구는 미미함
 - 최근 위탁과제 책임자에 의해 우리나라 벼 재배 지역 대기 중 존재하는 곰팡이의 분포조사가 제한적으로 수행됨
 - 주요 곡물 내 오염 곰팡이 분포조사와 FHB 원인균인 *F. graminearum* 중복합체 소속 균주의 병 발생 관련 분자유전학, 유전체학 연구가 진행 중임
 - 최근 metagenomics 분석을 통한 서울 지역 대기 중 곰팡이 분포 조사가 수행됨
 - 곡물재배 지역 내 공기전반 병원균 중 벼도열병균 (*Magnaporthe oryzae*) 과 붉은곰팡이균 (*F. graminearum*, *F. asiaticum*)의 유전체 해독이 완료됨
 - 주요 식물병원성 곰팡이의 검출 및 동정을 위한 중 특이 PCR 프라이머 개발이 수행됨
 - *C. acutatum*에 대한 연구는 주로 병 방제 및 약제저항성 분야에서 이루어졌으며, 분자생물학적 접근방법을 통한 고추탄저병의 발병과 확산에 대한 연구는 거의 전무한 상황임
- 문제점과 전망
 - 작물 재배지역 내 전반 병원성 곰팡이 집단의 해외 연구는 주로 맥류와 옥수수의 흰가루병, 녹병, FHB 원인균에 집중되었으며, 우리나라 최대 작물인 벼와 고추의 공기전반 병원균에 대한 연구는 상대적으로 미미함
 - 다양한 공기전반 식물병원균 집단의 분포와 다양성 연구보다 특정 공기전반균에 대한 병리학적, 역학적 연구가 주로 이루어짐
 - 오히려 해외에서는 식물병원균보다 다양한 실내 환경과 야외 공기 중 분포하는 allergy, 천식 유발 인체 병원성 곰팡이의 집단 연구가 활발히 진행 중임
 - 최근 공기 중 분포 곰팡이 집단의 동정에 metagenomics 기법을 활용하는 추세이나 이 경

우, 속 수준 이하의 곰팡이 동정이 어려움

- 우리나라의 경우, 공기전반 병원성 곰팡이 집단의 동정과 분포 모니터링 조차 최근에 시작되어 전체적인 연구 수준이 해외 선진국에 비해 상대적으로 낮음
- 식물병원성 곰팡이의 집단 연구는 제한된 수의 분자마커에 의존하고 있으며 유전체 수준의 비교·분석 연구가 미흡함
- 고추탄저병에 의한 농작물의 피해와 방제비용이 계속적으로 증가하고 있음
- 기주별 고추탄저병원균 집단의 유전적 다양성이 보고되고 있음. 예를 들어 사과와 고추에서 분리한 *C. acutatum* 간에 서로 다른 병원성교차를 보임

□ 국내 연구개발의 필요성

- 지금까지 수행된 대부분의 공기전반 식물병원성 곰팡이의 유전체 연구는 미국과 유럽지역의 주요 작물인 밀, 보리 등 맥류와 옥수수를 중심으로 이루어져 우리나라 주요 작물인 벼나 고추 병원성 곰팡이에 대한 관련 연구는 국내외적으로 저조한 실정임
- 우리나라의 경우 지금까지 주요 공기전반 병원균으로서 벼 도열병균의 분포, 발생 생태, 병 예찰 등에 대한 연구가 주로 이루어졌으나 벼 재배지역 내 공기전반 병원성 곰팡이 집단에 대한 종합적이고 체계적인 모니터링과 후속 연구가 매우 부족한 실정임
- 또한 최근까지 벼에 발생하는 *Fusarium* 이삭마름병 (FHB) 을 *M. oryzae* 에 의한 이삭도열병 또는 *Burkholderia glumae* 에 의한 세균성 알마름병으로 오인하여 그 중요성에 대한 인식이 아직 부족하며, FHB 의 여러 원인균 중 *F. graminearum* 중복합체 일부 균주에 한해 연구가 진행 중임
- 단일 종, 단일 집단이 아닌 생태계 내에서 종간 상호작용에 기초한 생태연구 및 집단연구를 통해 병원균의 밀도 변화에 미치는 생물적 요인을 탐색하는 것이 필요함
- 고추탄저병원균은 다양한 식물(>300종)을 감염하여 병을 일으키는 곰팡이로서 고추를 포함한 중요 작물에 큰 경제적 손실을 초래함. 따라서 아직까지 국내외적으로 진행되지 않은 유전체 수준의 고추탄저병 발생과 확산 연구가 요구됨.
- 고추탄저병원균의 유전체는 기존에 해독된 다른 종의 유전체와 다양한 방식으로 비교생물학적 연구가 가능함.

1-3. 연구개발 범위

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차년도	2014	제1세부 및 위탁	벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체 해독	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 재배지역과 시설재배 지역 내 공기전반 곰팡이의 포집, 분리, 동정, 집단분석 - 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 신규유전체 분석 - 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 병원성 검정
		제1협동	고추작물 공기전반 탄저병원균의 균학적 병리학적 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 고추작물 공기전반 탄저병원균의 균학적 특성 조사 - 고추 탄저병원균의 상호 병원성 조사 - 고추탄저병원균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(de novo) 유전체 NGS data 생성

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
2차년도	2015	제1세부 및 위탁	벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체와 발병관련 전사체 해독	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 재배지역과 시설재배 지역 내 공기전반 곰팡이의 확보 및 집단의 유전적 다양성 분석 - 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 신규유전체와 발병 관련 (포자형성과 병발생 단계) 전사체 해독 및 분석
		제1협동	고추 탄저병균 (<i>C. acutatum</i>)의 신규 (<i>de novo</i>) 유전체 NGS data 생성	<ul style="list-style-type: none"> - 고추작물 노지 재배 시 공기전반 탄저병균의 발생 분석 - 고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 특성 조사 - 고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(<i>de novo</i>) 유전체 NGS data 생성 - <i>C. acutatum</i> genome assembly 및 유전자 예측 - 다른 <i>Colletotrichum</i> species간의 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해 - 고추탄저병균의 발달 및 발병연구

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
3차년도	2016	제1세부 및 위탁	벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병관련 전사체 분석과 진단마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 재배지역과 시설재배 지역 내 공기전반 곰팡이의 확보 및 집단의 유전적 다양성 분석 - 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병 관련 (포자형성과 병발생 단계) 전사체 해독 및 주요 유전자의 기능 분석 - 공기전반 식물병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이 생물진단 마커 개발
		제1협동	고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 고추 탄저병균의 상호 병원성 조사 - <i>C. acutatum</i> genome assembly 및 유전자 예측 - 고추탄저병균의 발달 및 발병연구 - 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석 - 다른 <i>Colletotrichum</i> species간의 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해 - REMI(restriction enzyme mediated integration)형 질전환 연구 - Homologous recombination을 통한 형질전환 연구

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
4차년도	2016	제1세부 및 위탁	벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병관련 전사체 분석과 진단마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 벼 재배지역과 시설재배 지역 내 공기전반 곰팡이의 확보 및 집단의 유전적 다양성 분석 - 벼이삭마름병 원인 <i>Fusarium</i> 종의 종합분석 - 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병 관련 (포자형성과 병발생 단계) 전사체 해독 및 주요 유전자의 기능 분석 - 공기전반 식물병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이 생물진단 마커 - REMI형질전환 연구
		제1협동	고추탄저병균의 공기전반 및 병원성유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구	<ul style="list-style-type: none"> - Homologous recombination을 통한 형질전환 연구 - 다른 <i>Colletotrichum</i> species간의 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구수행 내용

□ 추진전략 · 방법

■ 추진전략

본 연구에는 유전체와 전사체의 해독을 위한 생물정보학 분석 뿐 아니라, 공기전반 식물병원성 곰팡이의 확보, 집단유전학 분석, 유전자의 분자유전학적 기능분석 등 다양한 연구방법론이 필요함. 이를 위해 세부, 협동, 위탁 연구책임자 사이 뿐 아니라 국내외 관련 전문연구진 사이의 긴밀한 협력체계 구축과 운용이 필수적임.

○ 본 과제 연구진 사이의 유기적인 협력 체계 구축 및 강화

- 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 확보: 우리나라 벼와 고추 재배 지역으로부터 작물 생육시기 별 공기전반 병원성 곰팡이의 포집 및 분리를 위해 과제 책임자의 기관 소재 인근 지역을 적극 활용하였음. 특히 공기전반 곰팡이의 포집관련 세부 연구수행은 이 분야 전문가인 위탁과제 책임자와 긴밀히 협력함. 또한 시설재배 지역 내 공기전반 곰팡이의 포집은 위탁과제 수행기관 인근의 재배단지를 활용하였음
- 공기전반 곰팡이 집단의 계통발생학과 유전적 다양성 분석: 세부와 협동과제 책임자는 곰팡이의 집단유전학 분야 전문가인 위탁과제 책임자와 긴밀히 협력하여 관련 연구를 수행하였음
- 주요 공기전반 곰팡이의 병원성 검증: 곡류와 원예작물 대상 병원성 실험에 경험이 풍부한 관련 연구 시설을 갖춘 위탁과제 책임자와 긴밀히 협력하여 연구를 수행하였음
- 주요 병원성 *Fusarium* 과 *Colletotrichum* 곰팡이의 유전체와 전사체 해독 및 분석: 자낭균 곰팡이의 유전체와 전사체 해독 경험이 풍부한 1 세부 책임자와 긴밀히 협력하였음
- 주요 병원성 *Fusarium* 과 *Colletotrichum* 곰팡이의 발병 관련 유전자 기능분석: *C. acutatum* 의 경우, gene knock-out 에 의한 유전자 기능분석 시 필수적인 형질전환 시스템이 완벽히 구축되지 못하였음. 이를 극복하기 위하여 1 세부 책임자가 개발한 *C. acutatum* 의 형질전환용 균주와 벡터를 적극 활용하였음

○ 국내외 연구진 사이의 유기적인 협력 체계 구축 및 강화

- 본 사업단의 조기성과 창출과 참조유전체 구축 분야의 연구진과 소그룹 모임, 워크샵, 연구결과 공유 및 공동분석 등으로 긴밀히 협력하였음
- 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 확보와 특성 규명: 독성 *Fusarium* 곰팡이 관련 연구 수행 중인 농촌홍청 국립농업과학원과 벼도열병균, *Fusarium* 곰팡이 분야 전문가인 서울대 이용환 교수, 이인원 교수 연구진, *C. acutatum* 의 병원성과 약제저항성 분야 전문가인 충북대 김홍태 교수 연구진 등과 긴밀히 협력하였음
- 주요 병원성 곰팡이의 유전체 해독 및 생물정보학 분석: 곰팡이의 유전체 해독 경험이 풍부한 서울대 NICEM 기관, (주)인실리코젠, (주)테라젠 등의 전문 연구진 등과 긴밀히 협의함
- 세계적인 *Fusarium* 유전체 생물정보분석 전문기관인 독일 MIPS 연구소의 Ulrich 박사, *F. fujikuroi* 분자유전학 및 비교유전체학 분야 권위자인 독일 Münster 대학의 Bettina Tudzynski 교수 연구진과 긴밀히 협의하였음

■ 연구개발방법

[제1세부]

○ 우리나라 벼 재배 지역의 대기 중 분포하는 식물병원성 곰팡이 집단의 다양성 분석

1) 균주 확보

- 세부, 협동, 위탁과제 기관 소재 지역을 중심으로 공기전반 곰팡이를 포집함.
- *Fusarium* 속 곰팡이의 선택적 분리를 위하여 위탁과제 책임자가 개발한 toxoflavin 첨가 선택배지를 포함한 여러 종류의 배지를 사용하였음
- 곰팡이 포집 규모와 시기, 방법 등을 협동, 위탁과제 책임자와 긴밀히 협의 후 결정하였으며, 상세한 포집 방법은 다음과 같음
- 벼 재배 지역과 시설재배 지역의 공기 중 *Fusarium* 속 등 병원성 곰팡이의 분포 양상을 확인하기 위해 충남 아산, 경기도 평택, 전북 전주, 전남 곡성, 경남 김해 등지의 대단위 벼 재배지역, 강원도 춘천지역의 고추 재배지를 선정하여 공기 중 곰팡이 포자를 포집함. 경남 김해의 경우, 대단위 벼 재배지 주변의 시설재배지를 포함하여 노지와 시설재배지 내의 공기 중 포자 분포 양상을 비교하였음. 포자 채집을 위해 선택배지 배양기 (Petri dish)를 각 포장에 100 미터 간격으로 3 곳에 설치하였음. 채집 배지의 높이는 지상으로부터 1 미터, 배지의 공기 중 노출 시간은 30분, 채집시간은 오전 9시에 포자채집을 수행하였음. 채집시기는 벼의 경우, 출수가 시작된 시점을 기준으로 1주일에 1회씩 수행하고 황숙기까지 지속함. 포자 채집이 끝난 후 배지를 수거하여 배양기에서 3-5일 배양 후 재배양 및 단포자 분리를 통해 *Fusarium* 속 균주를 분리/동정함
- 포집된 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 집단의 계통수 작성과 다양성 분석을 위하여 국내외 기관 (농진청 농업유전자원센터, 서울대, 충북대, 캐나다 CBS 등)으로부터 주요 표준균주와 근연종을 분양받았음. 또한 본 연구진이 이미 확보된 *Fusarium* 속 곰팡이 균주도 적극 활용하였음

2) 공기전반 곰팡이 집단의 계통발생학 분석 및 병원성 검정

- 분리 곰팡이의 게놈 DNA 로부터 분자 마커 (예: *TEF1*, *RPB2* 등)를 증폭한 후 염기서열의 결정과 정렬을 바탕으로 Neighbour Joining, Maximum Parsimony 방법 등을 이용하여 계통수를 작성하였음
- 계통수의 topology 분석 등을 통해 분리 곰팡이 집단의 종 동정, 유전적 다양성 분석, 우점종 집단의 분석 (위탁과제와 협의) 등을 수행하였음
- 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 종 내 우점종 집단의 분석
- 벼와 밀 출수기에 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이 종의 무성포자 살포를 통한 병원성 검정 (위탁과제와 협의)

3) 지역 별, 계절 별, 연차 별 공기전반 곰팡이 분포 양상의 상세 분석

- 협동과 위탁과제 결과를 포함하여 지속적인 주요 공기전반 곰팡이 집단의 확보, 동정, 다양성 분석 등을 통해 우리나라 작물 재배 지역 내 공기전반 곰팡이 (주로 *Fusarium*)의 분포양상과 벼이삭마름병 원인균에 대한 종합적 분석수행

○ 주요 공기전반 식물병원성 *Fusarium* 속 곰팡이의 유전체/전사체 해독을 통한 병 발생 관련 유전자의 기능 분석

1) 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이의 신규 유전체 해독 전략

- 벼의 대표적인 공기전반 전염병인 *Fusarium* 이삭마름병의 원인균으로 알려진 *F. sambucinum* 중 복합체 (*F. graminearum*/*F. culmorum*/*F. cerealis* 등 A-type 의 트라이코제신 곰팡이독소 생성 그룹과 *F. poae/sporotrichioides/langsethiae* 등 B-type 독소생성 그룹 포함), *F. tricinctum* 중복합체 (*F. avenaceum/arthrosporioides/tricinctum*), *F. incarnatum-equiseti* 중복합체 소속 균주와 종자 전염병이지만 벼 생육 중 공기전반이 가능한 벼 키다리병균 (*F. fujikuroi*) 균주 중 최소 3 종을 선발하여 유전체 해독을 수행하였음. 이때 기존에 해독된 *F. graminearum* 중복합체 소속 *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. boothii* 균주는 제외함
 - 유전체 해독은 PAC Bio 방법 단독 또는 Illumina sequencing 방법과 병행으로 수행하였음. 최소 454 sequencer 해독 수준과 비슷한 결과를 목표로 하였음. 유전체의 assembly 를 위하여 기존 *F. graminearum* PH-1 과 *F. asiaticum* SCKO4 균주의 유전체와 *F. fujikuroi* B14 균주의 유전체 초안을 표준 유전체로 이용한 reference mapping을 수행하였음. 또한 Illumina 해독 data 만으로 유전체의 *de novo* sequencing 도 수행하였음.
 - 해독 유전체의 유전자 예측과 기능 추정 (gene annotation) 은 *F. graminearum* parameters 로 training 된 Augustus ver 2.5.5. (<http://augustus.gobics.de>) 와 그 밖의 *ab initio* 프로그램, RNA-seq 결과를 이용한 방법을 적절히 사용하였음
 - UniRef90 database 를 대상으로 한 BLASTP search 검색을 통해 예측 유전자 산물의 유사도 검사를 수행하였음
 - 해독 균주와 표준균주들의 유전체 내 공통으로 존재하는 부위를 중심으로 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 분석을 수행하였음. 또한 해독 균주 유전체 내 종 특이적 부위를 동정하여 해당 곰팡이의 진단마커 개발에 이용하였음
 - GO 분석과 protein domain 분석 등을 통해 해독 유전체의 기본적인 functional annotation을 수행하였음
 - 확보한 해독 균주의 근연종 곰팡이 등을 이용하여 종 특이 프라이머의 특이성을 검증함
- 2) 주요 공기전반 *Fusarium* 곰팡이의 발병 관련 전사체 분석 및 유전자 기능분석
- 유전체 해독이 완료된 공기전반 병원성 *Fusarium* 종 곰팡이 균주로부터 주요 병 발생 유전자 집단을 동정하기 위하여 기주 내 병 발생 단계 (벼 접종 후 3일, 7일 후) 와 포자형성 단계 (포자형성 인공 배지 사용) 등 에서 발현되는 전사체 해독을 수행하였음
 - Tophat Cufflink 프로그램 등을 이용하여 각 transcript를 해당 균주의 유전체 서열에 mapping 한 후 발현 수준을 RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) 수치로 환산한 다음, 병 발생 단계와 포자형성단계에서 특이적으로 발현되는 유전자 집단 (Differentially Expressed Gene, DEG)을 동정하였음
 - hierarchial clustering 분석을 통해 여러 생육 조건 별 유전자의 특정 발현 양상을 동정하였음
 - 정량적 실시간 PCR 증폭 방법 (quantitative real-time PCR)을 이용하여 주요 DEG 의 발현을 다양한 생육조건과 경시적으로 분석하였음
 - *Fusarium* 속 곰팡이의 유사 종 사이 주요 DEG 의 발현양상을 비교 하였음
 - 여러 분자유전학 기법을 이용하여 주요 DEG 의 기능분석을 수행하였음. 이에 필요한 *Fusarium* 속 곰팡이 용 분자유전학적 실험방법 (fungal transformation, targeted gene deletion, outcross, GFP targeting, *in vivo* protein-protein interaction assay 등) 은 본

과제책임자의 여러 선행 연구를 통해 개발·최적화되었음

3) 종 특이 또는 발병 단계 특이 유전자를 이용한 공기전반 주요 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 진단마커 개발

- 유전체 분석 결과 제작된 종 특이 프라이머를 이용하여 식물 생체, 잔재물 또는 대기 중 병원성 *Fusarium* 의 검출 및 정량화
- 기주 식물 내 감염 초기에 특이적으로 발현되는 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 유전자를 이용한 식물체 내 *Fusarium* 감염 진단용 마커 개발
- 이미 개발된 대부분의 분자마커는 유전자 염기서열 분석을 통한 단일염기다형성을 기반으로 하고 있음. PCR을 이용하여 간단한 병진단 및 동정이 가능하지만 단일염기다형성은 전체 집단을 대변하기엔 부족한 측면이 많고 실험의 재현성이 낮음. 이를 보완하기 위해 개발된 *In Silico* AFLP를 분자마커를 개발하는데 응용하고자 하였음. 유전체를 대상으로 각 곰팡이 종 집단에 존재하는 private allele을 발굴하여 이를 토대로 해당 종에 대한 dominant marker를 개발할 수 있었음. 또한 한 종에 특이적으로 존재하는 marker의 염기서열을 타 종과 비교하여 primer를 제작함으로써 한 번에 여러 종을 진단/동정할 수 있는 co-dominant marker도 개발할 수 있었음. 한편 RNA-seq을 통해 각 종의 발병 단계에 특이적으로 발현되는 유전자를 동정함으로써 식물에 병징이 나오기 전 감염 여부 및 발병 여부를 진단 할 수 있는 마커를 개발하고자 하였음

[제1협동]

1) 고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성조사

- 세부, 협동 위탁과제 지역 주변을 중심으로 고추 재배지역에서 고추탄저병균을 분리하고 동정하였음 (제 1 세부의 '균주확보' 부분 참조)
- 충남 아산과 경남 김해의 대단위 벼 재배지역, 강원도 춘천지역의 고추 재배지를 선정하여 공기 중 곰팡이 포자를 포집하였음. 채집시기는 최초 개화가 시작된 시기를 기준으로 적숙기까지 1주일에 1회씩 수행하였음
- 분리한 고추탄저병과 기존에 분리한 탄저병균, 그리고 충북대학교에서 분양받은 고추탄저병을 대상으로 균학적 특성 조사하고, 기주간의 교차병원성 매트릭스를 작성하였음
- 제1세부 위탁과제 책임자와 협력하여 기주별 지역별 수집한 탄저병균의 유전적 다양성과 우점종 집단의 분석을 수행하였음

2) 고추탄저병균(*C. acutatum*)의 *de novo* 유전체 해독

- 대표 고추탄저병균을 선발하여 유전체 염기서열을 해독하였음
- 유전체 해독은 PAC Bio sequencing 방법으로 수행하며, assembly을 위해서 Illumina sequencing 에 의한 data가 보완되었음. 최소 454 sequencer 해독 수준과 비슷한 결과를 목표로 하였음
- 상용 소프트웨어인 NGS Cell Assembly 패키지와 velvet, AByss 등의 open source 소프트웨어를 이용하여 assembly을 수행하였음
- 기존에 해독된 다른 *Colletotrichum* species의 유전체가 존재하므로, 이를 assembly에 이용하였음
- *C. acutatum* 유전체를 기존에 해독된 다른 *Colletotrichum* species의 유전체와 비교하여

구조적 변이를 비교분석하였음

- *C. acutatum* 의 유전자 예측은 비교적 높은 정확성을 보이는 fgenesh를 이용하였음. 이에 필요한 RNA-Seq data을 확보하였음. 그 외에 사용자 training set을 생성할 수 있는 AUGUSTUS, GlimmerHMM 등의 소프트웨어를 이용하여 종합적으로 예측하였음 (제 1세부의 '유전체 해독 전략' 참조)

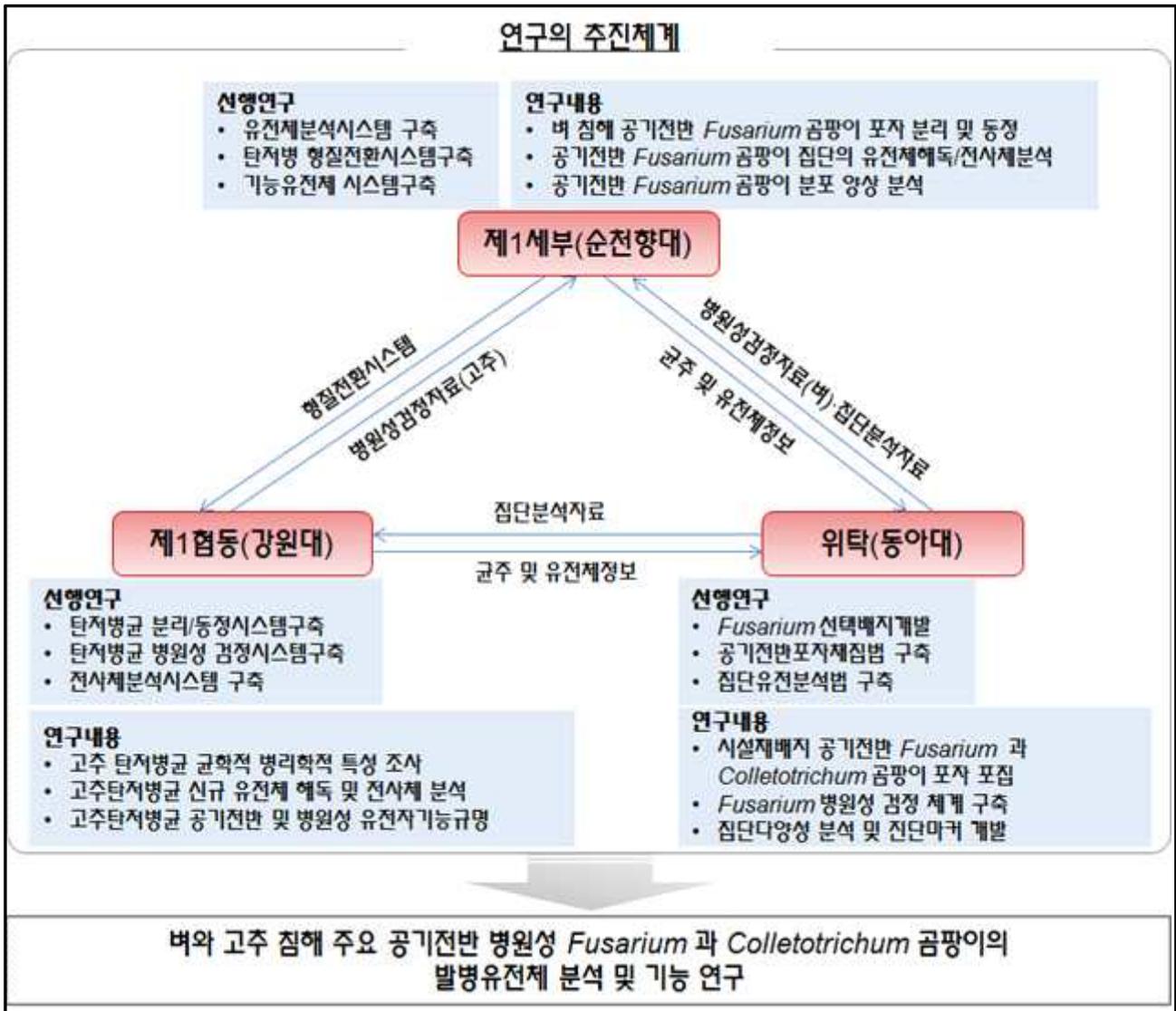
3) 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석

- 고추탄저병균의 균사생장, 포자생성, 부착기생성, 식물체 감염 단계로 RNA을 얻어 RNA-Seq을 수행하였음.
- Tophat Cufflink 프로그램 등을 이용하여 각 transcript를 유전체 서열에 mapping 한 후 발현 수준을 RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)로 수치화하여 단계별 특이 발현유전자를 선별하였습니다.
- Hierarchical clustering과 dendrogram 분석을 통해 단계별 발현 유전자군을 분석하였음
- qRT-PCR를 이용하여 일부 유전자에 대한 발현양상 확인과 다른 조건에서의 발현양상을 연구하였음

4) 고추탄저병균의 공기전반 및 병원성 유전자 기능연구

- 제1세부과제 연구진과 협력하여 REMI 방법을 이용하여 형질전환체를 만들고, 돌연변이체를 분석하였음
- 유전체 데이터를 활용하여 상동재조합을 통한 특정 유전자 결손돌연변이체를 만들기 위한 형질전환을 수행하였음. 결손돌연변이체가 성공적으로 만들어 질 경우, RNA-Seq data를 기초로 하여 포자와 발병 중 발현이 증가하는 유전자를 선별하여 그 기능을 분석하였다.

□ 추진 체계



2-2. 연구수행 결과

가. 세부과제(순천향대, 위탁: 동아대)

□ 벼 재배 지역 대기 중 분포하는 식물병원성 *Fusarium* 곰팡이 집단의 다양성 분석

○ 벼 재배 지역 (충남 아산시 소재 논)으로부터 확보한 공기전반 곰팡이 집단의 규모와 다양성

- 2014년 9월부터 2018년 7월까지 총 75회에 걸쳐 공기 중 포자를 채집하였음. 벼 황숙기와 수확기에 20회, 벼 잔재물이 남아 있는 추운 겨울 16회, 벼 모내기 시작 전부터 어린 묘가 자라는 봄 21회, 벼 분얼하는 여름 18회에 걸쳐 채집함. (표1-1).
- 기상청 날씨 분석 결과 기온분포 변화는1973년부터 2017년까지 4월~ 6월 평년기온 16.9℃이고, 최근 10년(2008년 ~ 2017년)은 17.4℃로 평년기온보다 0.5℃ 높음. 강수량 변화는 1973년 ~ 2017년 연평균 강수량 308.6mm 이고, 최근 10년(2008년 ~ 2017년)은 295.4mm로 연평균 강수량 보다 13.2mm 적음.

표 1-1. 벼 재배지역에서 대기 중 *Fusarium* 속 곰팡이 채집 시기와 기상 정보, 수집된 *Fusarium* 수

season	num ber	data	code	temper ature	Fusrium spp.	season	num ber	data	code	temper ature	Fusrium spp.	
fall	1	2014. 09. 23	A	21.5	20	summer	39	2016. 08. 17	16N	27.4	14	
	2	2014. 09. 30	B	20	7		fall	40	2016. 09. 01	16O	22.9	11
	3	2014. 10. 08	C	14.6	9			41	2016. 09. 13	16P	22.3	22
winter	4	2015. 01. 12	E	-3.4	0	42		2016. 09. 26	16Q	20.5	21	
	5	2015. 01. 27	F	-1.9	2	43	2016. 10. 12	16R	13.3	10		
	6	2015. 02. 13	G	-1.8	5	44	2016. 11. 01	16S	2	6		
spring	7	2015. 03. 03	H	4.3	1	45	2016. 11. 24	16T	-1.3	6		
	8	2015. 03. 27	I	7.3	2	winter	46	2016. 12. 13	16U	2.5	2	
	9	2015. 04. 07	J	7.9	4		47	2017. 01. 03	17V	2.1	6	
	10	2015. 04. 22	K	13.5	2		48	2017. 01. 25	17W	-7.2	1	
	11	2015. 05. 06	L	14	9		49	2017. 02. 13	17X	-1.2	2	
	12	2015. 05. 22	M	18.5	2		50	2017. 03. 06	17Y	1.5	0	
summ er	13	2015. 06. 05	N	17.8	3		spring	51	2017. 03. 28	17Z	6.1	3
	14	2015. 06. 16	O	23.6	16	52		2017. 04. 21	17A	11.9	1	
	15	2015. 07. 03	P	22.8	9	53		2017.05. 12	17B	18.9	2	
	16	2015. 07. 16	Q	24.3	9	54		2017. 05. 29	17C	21.7	14	
	summer	17	2015. 07. 31	R	28.1	0	55	2017. 06. 19	17D	23	7	
		18	2015. 08. 12	S	25.4	11	56	2017. 07. 12	17E	26.1	1	
		19	2015. 08. 26	T	22.5	11	57	2017. 07. 26	17F	25.7	24	
fall	20	2015. 09. 09	U	20.6	23	58	2017. 08. 18	17G	23.9	7		
	21	2015. 09. 23	V	19.7	35	fall	59	2017. 09. 05	17H	20.2	4	
	22	2015. 10. 07	W	17.3	4		60	2017. 09. 19	17I	20.9	19	
	23	2015. 10. 20	X	16	15		61	2017. 10. 13	17J	9.6	3	
	24	2015. 11. 06	Y	13.6	0		62	2017. 10. 25	17K	10.2	5	
	25	2015. 11. 19	Z	9.6	0		63	2017. 11. 15	17L	4.2	9	

winter	26	2015. 12. 09	15A	5.1	3	winter	64	2017. 12. 04	17M	0.5	9
	27	2015. 12. 29	15B	-3.6	2		65	2017. 12. 26	17N	-2.7	3
	28	2016. 01. 21	16C	-7.5	0		66	2018. 01. 19	18O	-0.8	0
	29	2016. 02. 17	16D	0.4	0		67	2018. 02. 06	18P	-4.5	16
spring	30	2016. 03. 03	16E	6.4	0	spring	68	2018. 02. 26	18Q	1.4	1
	31	2016. 03. 21	16F	8.6	4		69	2018. 03. 23	18R	4.7	1
	32	2016. 04. 12	16G	13.2	3		70	2018. 04. 10	18S	14.8	10
	33	2016. 05. 09	16H	18.4	0		71	2018. 05. 04	18T	13.2	19
	34	2016. 05. 23	16I	21	0		72	2018. 05. 24	18U	16.7	24
	35	2016. 06. 14	16J	22.3	27		73	2018. 06. 11	18V	19.6	3
summer	36	2016. 07. 06	16K	23.4	9	summer	74	2018. 07. 04	18W	25.9	1
	37	2016. 07. 19	16L	25.2	9		75	2018. 07. 23	18X	28.9	6
	38	2016. 08. 04	16M	27.3	55						

○ 벼 재배 지역 (경남 김해시 대동면 초정리 소재 논) 으로부터 확보한 공기전반 곰팡이 집단의 규모와 다양성

- 벼 재배지역 (경남 김해시 대동면 초정리 소재 논) 에서 2015. 1. 28 ~ 2015. 10. 06 까지 총 13회에 걸쳐 공기 중 포자를 29,643 균주를 채집함. (표1-2).

표 1-2. 벼 재배지역에서 대기 중 *Fusarium* 속 곰팡이 채집 시기와 기상 정보

number	date	location	temperature	wind speed(m/s)
1차	2015. 01. 28	초정리	1.8	NW 2.8
2차	2015. 02. 11	초정리	6.2	W 2.1
3차	2015. 02. 25	초정리	8.3	S 1.2
4차	2015. 03. 12	초정리	5.8	NW 4.4
5차	2015. 03. 26	초정리	10.7	SE 1.8
6차	2015. 04. 09	초정리	10.2	SE 2.2
7차	2015. 04. 30	초정리	17.8	ESE 1.4
8차	2015. 05. 14	초정리	19.6	WSW 2.6
9차	2015. 06. 04	초정리	21.9	SSE 2.1
10차	2015. 06. 19	초정리	23.6	SE 1.6
11차	2015. 08. 11	초정리	27.4	SE 1.6
12차	2015. 09. 11	초정리	23.2	SSE 1.7
13차	2015. 10. 06	초정리	18.9	SSE 1.1

- 우리나라 벼 재배 지역의 대기 중 분포하는 식물병원성 곰팡이 집단의 다양성 분석: 공기 중 포자 분포 양상을 비교하기 위하여 경남 김해시 대동면 초정리 논에서 Peptone PCNB agar + Kanamycin 배지를 지면에서 1m 위에 설치하여 30분 동안 거치하여 공기 중에 있는 포자를 수집하였다. 배지를 수거하여 25°C에서 4일 동안 배양 후 균주 성장타입에 따라 분류체계 확립하였음. 총 6,211 균주를 확보하였으며 이를 형태적으로 분류하여 총 39 그룹으로 분류하였음. 형태적 분류와 더불어 타입별 대표균주를 선별하여 곰팡이 게놈 DNA 추출과 종 동정을 위해 *TEF1* 유전자 분자 마커를 이용하여 계통학적으로 분류하였다. 또한 2015년 1월부터 10월까지 13회에 걸쳐 총 29,649 균주를 채집하였으며 이데 따른 기상정보(표1-3)와 분포비율(표1-3, 1-4)을 조사하였다.

표 1-3 분류 기준에 따른 분리 군주 개수

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9
1차	4	6	2	15	1	21	5	2	0	0	0	13	0	51	182	110	43	0	0	0
2차	0	14	0	13	3	0	7	24	1	8	1	4	0	4	273	61	22	10	11	0
3차	5	1	1	11	0	1	4	31	4	0	0	2	0	15	473	42	37	64	9	1
4차	0	0	0	9	0	0	3	31	1	0	15	2	2	5	399	483	21	2	0	0
5차	1	1	1	2	0	0	3	10	0	0	4	0	0	12	109	823	11	40	3	43
6차	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	37	310	0	2	0	0
7차	0	0	0	5	2	0	2	34	22	0	0	3	0	2	34	33	14	0	0	0
8차	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	0	221	0	5	132	17	25	4	0	1
9차	0	0	1	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	5	26	1	28	2	0	0
10차	0	0	0	1	0	0	1	3	1	0	0	1	0	1	38	5	18	1	0	0
11차	2	0	1	2	0	0	16	29	0	0	0	8	0	9	0	8	9	15	0	0
12차	0	0	0	2	1	0	1	24	0	0	0	4	0	5	67	13	32	1	0	1
13차	0	0	0	12	0	0	31	33	1	0	0	9	0	1	12	34	54	0	0	0

	B-10	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8	D-9	D-10	E	합계
1차	0	15	2	44	7	104	0	72	0	659	0	16	44	141	83	14	0	0	1656
2차	0	10	5	4	4	2	0	33	0	197	0	3	26	123	1	0	0	908	1772
3차	4	3	3	178	12	244	2	35	0	1263	160	11	61	184	3	144	0	53	3061
4차	0	1	2	223	0	0	0	45	0	331	0	0	0	279	0	15	0	24	1893
5차	199	0	2	22	1	15	58	6	10	488	16	19	296	96	4	118	0	25	2438
6차	0	1	2	4434	0	187	15	2276	0	25	2	7	30	49	0	7	0	88	7479
7차	0	1	1	311	1	2	7	54	122	0	0	31	36	19	12	0	0	14	762
8차	0	1	1	2148	0	0	10	131	58	0	0	17	0	0	2	0	1	77	2862
9차	0	1	3	9	8	1	11	29	161	7	0	95	18	0	1	0	0	2	418
10차	0	0	0	1	1	1	0	13	216	0	0	170	14	0	17	0	0	3	506
11차	5	1	0	118	1	152	2	16	67	259	309	26	53	5	553	80	0	8	1754
12차	0	0	2	78	2	36	17	13	26	49	233	31	343	0	0	9	0	17	1007
13차	0	8	3	491	6	66	31	1	35	210	0	32	168	0	2680	115	0	2	4035

표1-4. 차수별 분포 비율(%)

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9
1차	0.24	0.36	0.12	0.91	0.06	1.27	0.3	0.12	0	0	0	0.79	0	3.08	11	6.64	2.6	0	0	0
2차	0	0.79	0	0.73	0.17	0	0.4	1.35	0.06	0.45	0.06	0.23	0	0.23	15.4	3.44	1.24	0.56	0.62	0
3차	0.16	0.03	0.03	0.36	0	0.03	0.13	1.01	0.13	0	0	0.07	0	0.49	15.5	1.37	1.21	2.09	0.29	0.03
4차	0	0	0	0.48	0	0	0.16	1.64	0.05	0	0.79	0.11	0.11	0.26	21.1	25.5	1.11	0.11	0	0
5차	0.04	0.04	0.04	0.08	0	0	0.12	0.41	0	0	0.16	0	0	0.49	4.47	33.8	0.45	1.64	0.12	1.76
6차	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0.07	0.49	4.14	0	0.03	0	0
7차	0	0	0	0.66	0.26	0	0.26	4.46	2.89	0	0	0.39	0	0.26	4.46	4.33	1.84	0	0	0
8차	0	0	0	0	0	0	0	0.35	0.03	0	0	7.72	0	0.17	4.61	0.59	0.87	0.14	0	0.03
9차	0	0	0.24	0	0	0	0	2.15	0	0	0	0	0	1.2	6.22	0.24	6.7	0.48	0	0
10차	0	0	0	0.2	0	0	0.2	0.59	0.2	0	0	0.2	0	0.2	7.51	0.99	3.56	0.2	0	0
11차	0.11	0	0.06	0.11	0	0	0.91	1.65	0	0	0	0.46	0	0.51	0	0.46	0.51	0.86	0	0
12차	0	0	0	0.2	0.1	0	0.1	2.38	0	0	0	0.4	0	0.5	6.65	1.29	3.18	0.1	0	0.1
13차	0	0	0	0.3	0	0	0.77	0.82	0.02	0	0	0.22	0	0.02	0.3	0.84	1.34	0	0	0

	B-10	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8	D-9	D-10	E
1차	0	0.91	0.12	2.66	0.42	6.28	0	4.35	0	39.8	0	0.97	2.66	8.51	5.01	0.85	0	0
2차	0	0.56	0.28	0.23	0.23	0.11	0	1.86	0	11.1	0	0.17	1.47	6.94	0.06	0	0	51.2
3차	0.13	0.1	0.1	5.82	0.39	7.97	0.07	1.14	0	41.3	5.23	0.36	1.99	6.01	0.1	4.7	0	1.73
4차	0	0.05	0.11	11.8	0	0	0	2.38	0	17.5	0	0	0	14.7	0	0.79	0	1.27
5차	8.16	0	0.08	0.9	0.04	0.62	2.38	0.25	0.41	20	0.66	0.78	12.1	3.94	0.16	4.84	0	1.03
6차	0	0.01	0.03	59.3	0	2.5	0.2	30.4	0	0.33	0.03	0.09	0.4	0.66	0	0.09	0	1.18
7차	0	0.13	0.13	40.8	0.13	0.26	0.92	7.09	16	0	0	4.07	4.72	2.49	1.57	0	0	1.84
8차	0	0.03	0.03	75.1	0	0	0.35	4.58	2.03	0	0	0.59	0	0	0.07	0	0.03	2.69
9차	0	0.24	0.72	2.15	1.91	0.24	2.63	6.94	38.5	1.67	0	22.7	4.31	0	0.24	0	0	0.48
10차	0	0	0	0.2	0.2	0.2	0	2.57	42.7	0	0	33.6	2.77	0	3.36	0	0	0.59
11차	0.29	0.06	0	6.73	0.06	8.67	0.11	0.91	3.82	14.8	17.6	1.48	3.02	0.29	31.5	4.56	0	0.46
12차	0	0	0.2	7.75	0.2	3.57	1.69	1.29	2.58	4.87	23.1	3.08	34.1	0	0	0.89	0	1.69
13차	0	0.2	0.07	12.2	0.15	1.64	0.77	0.02	0.87	5.2	0	0.79	4.16	0	66.4	2.85	0	0.05

○ 기타 벼 재배 지역 (경기도 평택시 소재 논, 전북 전주시 소재 논, 전남 곡성군 소재 논) 으로부터 확보한 공기전반 곰팡이 집단의 규모와 다양성

- 2016년 여름부터 겨울까지 평택 소재 논에서 5회, 전주 소재 논에서 7회, 곡성에서 1회 공기 중 곰팡이를 채집하였음(표1-5).

표 1-5. 경기도, 전라도 지역 공기 중 채집 *Fusarium* 수

season	number	location	date	code	temperature	<i>Fusarium</i> spp.
summer	1	Pyeongtaek	2016. 08. 04	16PA	28.9	7
fall	2	Pyeongtaek	2016. 09. 01	16PB	23.7	11
	3	Pyeongtaek	2016. 10. 12	16PC	15.3	18
winter	4	Pyeongtaek	2016. 11. 24	16PD	-0.1	9
	5	Pyeongtaek	2016. 12. 13	16PE	2.6	3
summer	1	Jeonju	2016. 07. 27	16JA	28.7	28
	2	Jeonju	2016. 08. 09	16JB	29	23
	3	Jeonju	2016. 08. 24	16JC	28.9	22
fall	4	Jeonju	2016. 09. 05	16JD	25.4	23
	5	Jeonju	2016. 09. 19	16JE	21.2	22
	6	Jeonju	2016. 10. 05	16JF	20.0	13
	7	Jeonju	2016. 10. 27	16JG	14.8	10
winter	8	Jeonju	2016. 11. 24	16JH	1.4	23
	9	Jeonju	2016. 12. 14	16JI	1.4	11
summer	1	Gokseong	2016. 08. 09	16GA	27.4	3

○ 공기전반 곰팡이 집단의 계통발생학 분석 및 병원성 검정

1) 공기 중 채집된 집단의 계통 발생학 분석

- 충남 아산시 소재 벼 재배 지역의 공기로부터 포집한 곰팡이 종으로 *Epicoccum*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium*, *Periconia*, *Trametes*, *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Arthrinium*, *Cerrena*, *Bjerkandera*, *Nigrospora*, *Microdochium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Fusarium* 등이 다양하게 분포함
- 2014. 9. - 2018. 7. 동안 *Fusarium* 균주들은 총 722 주 수집되었음. 이 중 *F. incarnatum-equiseti* 중복합체 소속 균주가 총 478 주 포집되었으며, *F. fujikuroi* 중복합체 소속 51 주, *F. sambucinum* 중복합체 소속 41 주, *F. culmorum* 2 주 등이 포집되었음 (표1-5).
- 공기 중 곰팡이는 여름과 가을에 전체 수집의 76%가 채집되었음 (그림1-1).

표 1-6 . 충남 아산시 소재 벼 재배지역에서 채집된 *Fusarium* 곰팡이 분포양상

year		2014		2015			2016				2017				2018		Total
species complex	species	fall	spring	summer	fall	winter	spring	summer	fall	winter	spring	summer	fall	winter	spring	summer	
<i>F. sambucinum</i>	<i>F. graminearum</i>	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	3	1	41
	<i>F. asiaticum</i>	0	0	0	0	2	0	2	5	1	1	0	3	3	2	3	
	<i>F. armeniacum</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
	<i>F. langsethiae</i>	0	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>F. incarnatum-equiseti</i>	<i>F. lacertarium</i>	9	0	1	15	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	478

seti	<i>F. equiseti</i>	4	4	8	7	1	2	39	12	3	1	1	2	1	8	7	
	<i>F. incarnatum</i>	17	25	25	32	1	2	44	33	5	13	47	48	19	7	6	
	<i>F. acuminatum</i>	0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	4	8	10	
<i>F. nisikadoi</i>	<i>F. commune</i>	0	3	0	2	0	0	5	1	1	1	0	1	3	0	19	36
<i>F. tricinctum</i>	<i>F. avenaceum</i>	0	1	6	13	0	0	0	0	0	1	6	2	0	0	0	46
	<i>F. tricinctum</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	1	2	
	<i>F. lateritium</i>	0	1	4	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	1	0	1	2	0	1	13	4	3	1	2	1	5	12	9	55
<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. fujikuroi</i>	4	2	4	8	0	0	0	13	1	0	2	4	3	0	0	51
	<i>F. proliferatum</i>	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>F. andiyazi</i>	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
	<i>F. denticulatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	<i>F. sacchari</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>F. dimerum</i>	<i>F. lunatum</i>	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>F. solani</i>	<i>F. solani</i>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4	1	0	1	1	9
	<i>F. falciforme</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>F. lateritium</i>	<i>F. stilboides</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

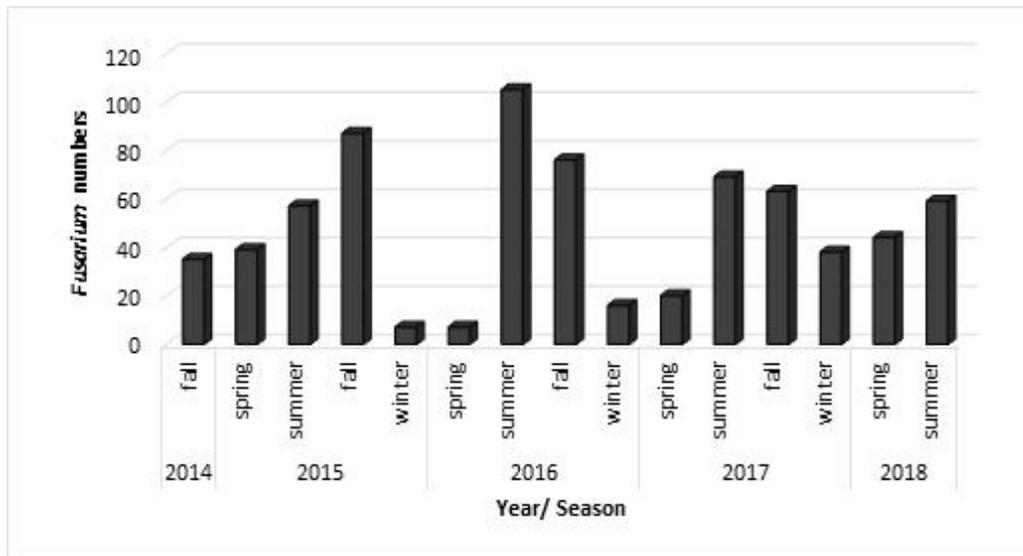


그림 1-1. 계절별 공기 중 수집된 *Fusarium* 곰팡이 수

- 공기 중 포집된 곰팡이 중 가장 빈도가 높은 종은 *F. incarnatum-equiseti* 66%, *F. fujikuroi* 7%이었으며, 종자 17 %와 벼 잔재물 26%로부터는 *F. asiaticum* 이 높은 빈도로 검출되었음 (그림1-1).
- 벼 낱알, 벼 잔재물 2곳으로부터 *F. incarnatum-equiseti* 이 가장 높은 빈도로 수집되었고, 논 물, 논 토양에서는 *F. commune*가 가장 많이 수집되었음(표1-7)(그림1-2).
- 수집된 균주 중 벼 낱알 25% 과 벼 잔재물 30%에서는 *F. asiaticum*이 높은 빈도로 검출됨, 논물 60 %과 논토양에서는 47% *F. commune*이 높은 빈도로 검출되었음(표1-7)(그림1-2).
- 공기 중 분포 곰팡이의 우점종과, 실제 벼에 감염되었거나 벼 잔재물에 존재하는 곰팡이의 우점종이 다름을 확인하였음. 벼 잔재물에서 발견되는 *Fusarium* 의 유래와 식물체 내 감염 또는 오염 경로를 알아보기 위해 추가적으로 논외 물과 논토양으로부터 곰팡이를 수집하여 분리 동정한 결과, 벼 잔재물에서의 우점종이 곧 벼 감염과 직접적으로 연관이 되어 있는 것으로 판단되었음

표 1-7. 충남 아산시 벼 재배지역 내 종자, 논물, 논토양, 잔재물로부터 분리한 *Fusarium* 곰팡이

		Rice grain	Rice water	Rice soil	Rice stem	total
<i>F. sambucinum</i>	<i>F. vorosii</i>	0	0	0	1	1
	<i>F. graminearum</i>	8	1	4	21	34
	<i>F. asiaticum</i>	19	1	8	124	152
	<i>F. boothii</i>	3	0	0	0	3
	<i>F. meridionale</i>	0	0	0	1	1
	<i>F. armeniacum</i>	0	2	3	41	46
<i>F. incarnatum-equiseti</i>	<i>F. equiseti</i>	17	5	54	82	158
	<i>F. incarnatum</i>	34	5	5	113	157
	<i>F. acuminatum</i>	0	2	9	11	22
<i>F. nisikadoi</i>	<i>F. commune</i>	10	39	231	32	312
<i>F. tricinctum</i>	<i>F. avenaceum</i>	13	0	0	1	14
	<i>F. tricinctum</i>	1	2	2	8	13
<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	1	8	80	10	99
<i>F. fujikuroi</i>	<i>F. fujikuroi</i>	3	1	0	10	14
	<i>F. proliferatum</i>	1	0	0	0	1
	<i>F. concentricum</i>	0	0	0	1	1
<i>F. lateritium</i>	<i>F.stilboides</i>	0	0	0	3	3
<i>F. solani</i>	<i>F.solani</i>	0	0	9	7	16

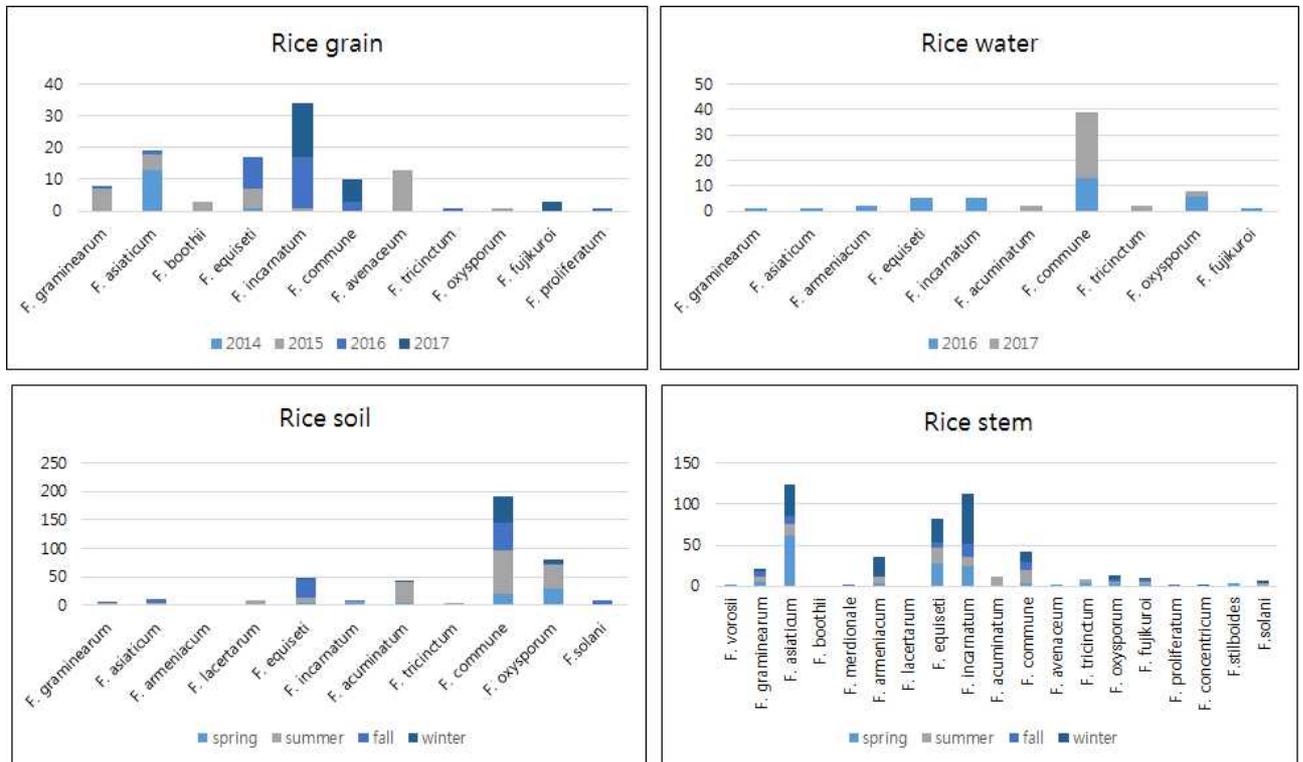


그림 1-2. 벼 낱알, 논 토양, 논 물, 벼 잔재물로부터 분리된 *Fusarium* 종의 분포.

- 경남 김해시 소재 벼 재배 지역에서 채집한 공기 중 분포하는 *Fusarium* 종으로는 *F. asiaticum*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. andiyazi*, *F. avenaceum*, *F. redolens*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. acuminatum* 등이 다양하게 분포함 (표1-8) (그림1-3)

표 1-8 *Fusarium* species 분류 결과

	<i>F. asiaticum</i>	<i>F. incarnatum</i> <i>F. equiseti</i>	<i>F. andiyazi</i> <i>F. avenaceum</i> <i>F. redolens</i>	<i>F. fujikuroi</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. solani</i>	<i>F. acuminatum</i>
01. 28	4	6	5	2	
02. 11		14	7	24	1
02. 25	5	1	4	31	4
03. 12			3	31	1
03. 26	1	1	3	10	
04. 09				2	
04. 30			2	34	22
05. 14				10	1
06. 04				9	
06. 19			1	3	1
08. 11	2		16	29	
09. 11			1	24	
10. 06			31	33	1
total	12	22	73	242	31

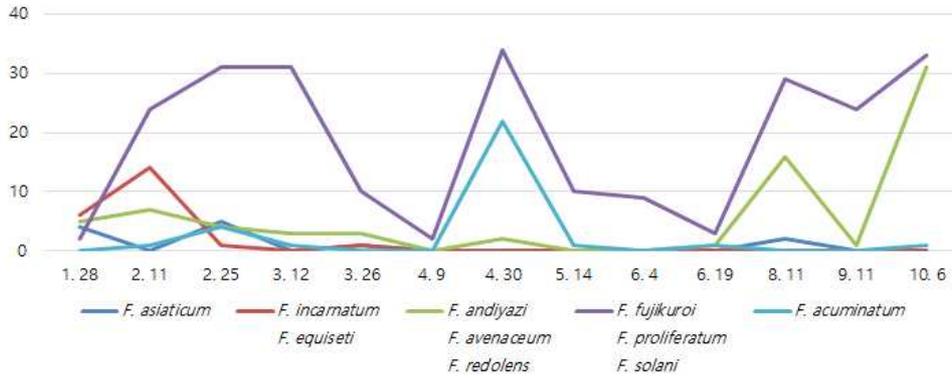


그림 1-3 *Fusarium* species 시기별 분포 양상

2) 공기 중 채집된 곰팡이 집단의 균학적 특성과 병원성 검정

- 충남 아산시에서 포집된 대표적인 5 균주의 분생포자를 밀의 낱알에 주사 접종한 결과, 접종부 위에만 병징을 보였으며, 보리의 이삭에 분무 접종할 결과, *F. lanatum* 제외하고 뚜렷한 병징을 보이지 않았음. 하지만 *F. asiaticum* 균주는 밀과 보리에서 모두 뚜렷한 병원성을 보였음 (그림 1-5).

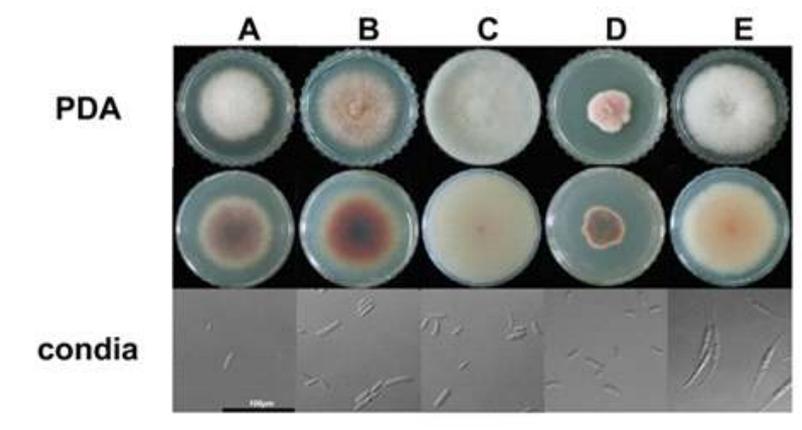


그림 1-4. PDA 배지 앞면과 뒷면의 모습과 YEM 배지에서 무성포자 사진. A. *F. fujikuroi* B. *F. acuminatum* C. *F. lanatum* D. *F. acuminatum* E. *F. lacertarum*.



그림 1-5. 밀과 보리에서 병징 발현. A: *F. fujikuroi*, B: *F. acuminatum*, C: *F. lanatum*, D: *F. acuminatum*, E: *F. lacertarum*.

3) 국내 미 기록 종 *F. culmorum* 의 동정

- 지금까지 *F. culmorum* 은 우리나라 전역에서 발견되지 않았으며, 현재 농림축산검역본부에 의해 관리병 (국내에 유입될 경우 농업환경에 피해를 입힐 수 있다고 평가되는 질병으로 농림축산검역본부장이 고시하는 병)의 병해충 (관리병해충) 으로 고시되어 있음. 본 연구를 통해 2015년 4월 7일 한차례 포집된 두 균주 (J1과 J2) 가 *F. culmorum* 과 유사한 특징을 보였음
- J1과 J2를 PDA와 CLA배지에 접종하여 성장비교 통해 형태학적으로 동정하였다. PDA 배지에서 J1, J2와 *F. culmorum* 표준 균주 (NRRL11427, NRRL14983), *F. graminearum* (PH-1, Z3643)의 균주의 성장 특징을 비교하였음. 비교한 균주 모두 PDA배지에서 균사가 빨리 성장하며 빨간 색소를 가지는 하얀 공중 균사를 가지고 있으며, 분생포자 (macroconidia)는 많이 생성하지만 소분생포자(microconidia)는 없었다. 한편, CLA 배지에서 J1, J2 균주의 macroconidia 형태비교 결과 *F. culmorum* 균주의 전형적인 형태학적 특징이 관찰함 : macroconidia 크기는 32 - 35 × 4 - 5 μm 길이와 폭으로 측정되었으며, 약간 곡선 형태이며 *F. graminearum* 균주와 비교해 짧고 통통했으며 3-4개의 두꺼운 격벽을 가지고 있었음. 끝단 세포(apical cells)의 경우, 둥글거나 뭉툭한 형태이며 기저 세포(basal cells)의 경우 독특한 발 모양을 가짐. J1과 J2의 macroconidia의 길이와 폭은 *F. culmorum* 표준 균주(NRRL11427, NRRL14983)와 매우 비슷하였으나, *F. graminearum* Z3643과 PH-1 보다는 길이는 짧고 폭은 더 통통하여 서로 명확히 구분됨 (그림 1-5).
- J1, J2 균주로부터 5개 유전자(*PHO*, *RED*, *TEF1*, *H3*, *URA*)를 증폭한 후 염기서열을 위의 순서대로 연결하여 (총 2,751 bp) 16 분류군(taxa)을 대상으로 Maximum Likelihood 방법을 이용한 계통발생학 분석을 수행함. 이러한 다중 염기서열 (MLS) 분석 결과, 모든 *F. culmorum* 균주는 *F. cerealis*, *F. pseudograminearum*, *F. graminearum*과 같은 근연종들과 명확하게 분리되어 독립적인 clade를 구성함. J1과 J2 균주는 *F. culmorum* 표준 균주 (NRRL3288, NRRL14983, NRRL25475, NRRL11427)과 높은 유사도로 연관되었음 [bootstrap (BS) 100%]. *F. culmorum* 은 형태학적으로 *F. cerealis* 와 자주 혼동되는 종인데 이들 표준균주와도 명확히 다른 clade 로 구분됨 (그림 1-6).
- 밀과 옥수수를 이용한 병원성 실험 결과, J1과 J2 모두 병원성을 보였지만 기주에 대한 병원성의 수준은 달랐음. J1 균주는 밀의 화기에 접종할 경우, 전형적인 마름병 (head blight) 의 증상을 보인 반면, J2 균주는 마름병 증상을 보이지 않았음. 옥수수 대에 접종할 경우, J1, J2 균주 모두 줄기 썩음 증상을 나타냈으며, J1 균주가 J 균주 보다 심한 증상을 일으킴(그림 1-7).
- J1, J2 균주와 아시아에서 발견된 *F. culmorum* 과의 유사성을 확인하기 위해 하나의 유전자(*TEF1*) 염기서열을 이용하여 계통 분석 결과 J1, J2 균주는 *F. culmorum* clade 안에서 일본 *F. culmorum* 균주(MAFF 236454)와 함께 subclade를 형성하였기 때문에 (BS 63 %) J1, J2 균주가 일본 균주와 진화적 관계를 가질 수 있음을 보여줌(그림1-8).
- 계통수 분석에 사용된 *F. culmorum* J1, J2, NRRL14983, NRRL11427 균주의 Translation elongation factor (*TEF1a*), Histone H3(*H3*), Phosphate permease(*PHO*), Reductase-like gene(*RED*), Ammonia ligase(*URA*) 유전자의 염기서열은 NCBI GenBank에 등록하였음 (표1-9).
- J1, J2의 *MAT* 유전자 확인을 위해 PCR 기법을 이용하였음. *MAT* 유전자 특이 primer 를 이용한PCR 결과, J1, J2 균주로부터 약 200bp 의 *MAT1-2* 특이 band 가 증폭되었음

며, *F. culmorum* 표준균주인 NRRL14983 로부터는 약 180bp 의 *MATI-1* 특이 band, NRRL11427 로부터는 *MATI-2* 특이 band가 관찰되었음. 이를 통해 J1, J2 균주는 *MATI-2* 의 교배형을 가지고 있는 heterothallic (자가불화합성) 균주임을 확인하였음 .

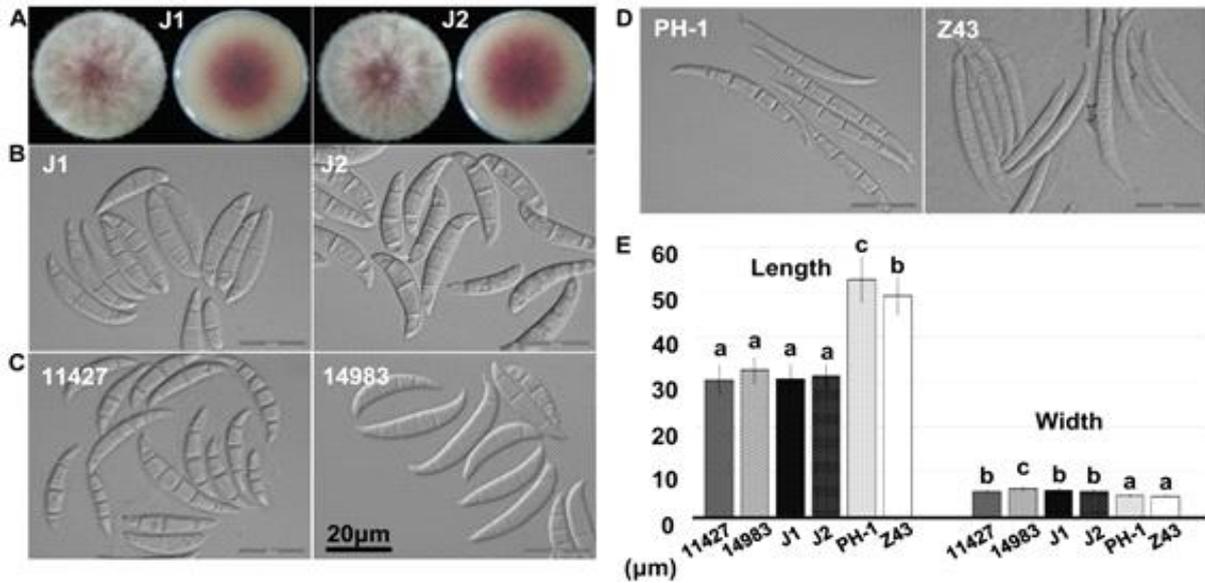


그림 1-6. CM 배지에서 균사생장 (A) 포자형태 (B - D), 크기 (E). J1 and J2: Korean *F. culmorum* isolates; 11427 and 14983: NRRL strains of *F. culmorum*; PH-1 and Z43: *F. graminearum* PH-1 and Z3643 strains.

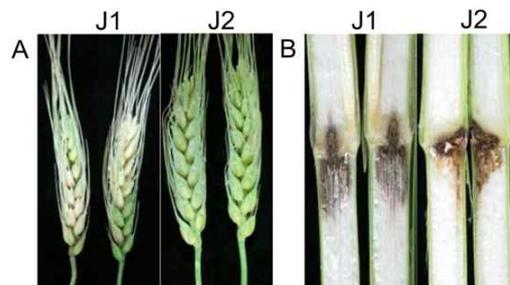


그림 1-7. 밀의 화기 (A) 와 옥수수 대 (B)에서 *F. culmorum* J1, J2 균주의 병원성.

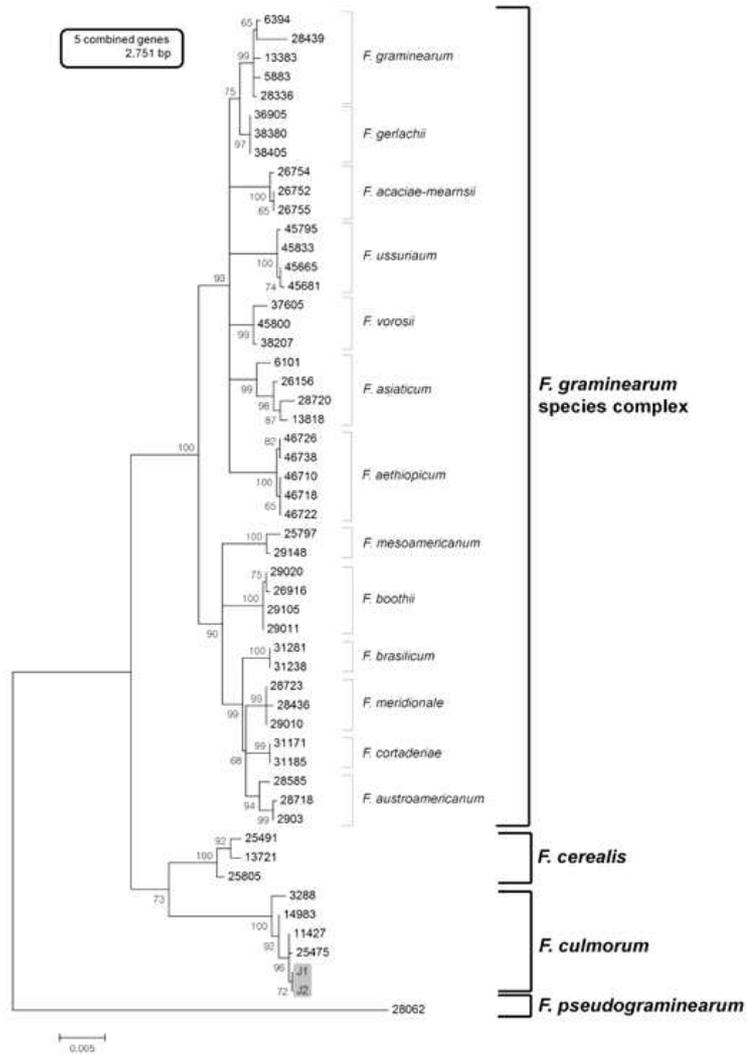


그림 1-8. 5 종 유전자(*PHO*, *RED*, *TEF1*, *H3*, *URA*)의 염기서열을 이용하여 작성한 계통수.

표 1-9. 계통수 분석에 사용된 J1, J2 균주 마커 유전자의 GenBank accession numbers.

Isolate	<i>H3</i>	<i>TEF1</i> α	<i>PHO</i>	<i>RED</i>	<i>URA</i>
J1	KU198290	KU198294	KU198298	KU198302	KU198306
J2	KU198293	KU198295	KU198299	KU198303	KU198307
NRRL 14983	KU198292	KU198296	KU198300	KU198304	KU198308
NRRL 11427	KU198291	KU198297	KU198301	KU198305	KU198309

□ *F. culmorum* J1 균주의 표준유전체 해독

○ *F. culmorum* J1 균주의 유전체 해독

- 국내 미 보고 *F. culmorum* J1 균주의 유전체를 PAC Bio sequencing 방법을 이용하여 해독함. 해독 유전체의 크기는 37.8 Mb 이며, 해독 염기서열은 총 11 개의 contig 로 assembly 되었음 (표1-10). 이 중 4 개 contig (contig 1, 2, 3, 11) 의 길이가 약 8Mb 이상이기 때문에 대부분의 reads 는 4 개의 주요 contig 내에 assembly 되었음 (표1-11). 이를 통해 *F. culmorum* J1 균주는

F. graminearum 유전체 (4 개의 chromosome 보유)와 비슷한 chromosome 구조를 가지고 있을 것으로 추정함. 이 정도의 유전체 염기서열 assembly 는 표준유전체로서 분석할 만한 수준이라고 판단됨.

표 1-10. Polished assembly 결과

Data	# of contigs	Polished contig max length	Polished contig N50	Polished contig Total length
Assembled contigs	11	11,805,886	9,545,867	37,808,623

표 1-11. *F. culmorum* J1 균주의 해독 유전체 contig 길이 (bp)

Contig 1	7,993,450	Contig 5	18,639	Contig 9	24,161
Contig 2	11,805,886	Contig 6	21,646	Contig 10	4,366
Contig 3	9,545,867	Contig 7	20,531	Contig 11	8,196,833
Contig 4	149,427	Contig 8	27,817		

- *F. culmorum* J1 균주의 해독 유전체를 대상으로 (주)테라젠이텍스에서 개발한 유전체 예측 workflow를 이용하여 유전자 예측과 유전자 기능 추정 (annotation)을 수행하였음 (그림 1-10). *ab initio* 방법을 이용하여 총 12,810 개의 유전자를 예측하였으며, 이 중 12,778 유전자의 기능이 functional annotation (Uniprot, NCBI) 과 domain 검색 (InterProScan) 방법을 통해 추정되었음 (표 1-12). 이 때 Taxonomy Profiling 을 이용한 근접 종 (*F. graminearum*) 의 단백질 서열 선택을 통해 Protein Hint를 생성하였으며, Repeat 영역의 유전자 정확도를 높이기 위해서 Masked Genome 과 Non-masked Genome 서열을 모두 이용하였음

표 1-12. *F. culmorum* J1 균주 유전체 내 예측 유전자의 annotation 현황

#Transcripts	Uniprot	NCBI nr	InterProScan	Annotated Gene	(%)
12,810	7,404	12,771	10,849	12,778	99.8

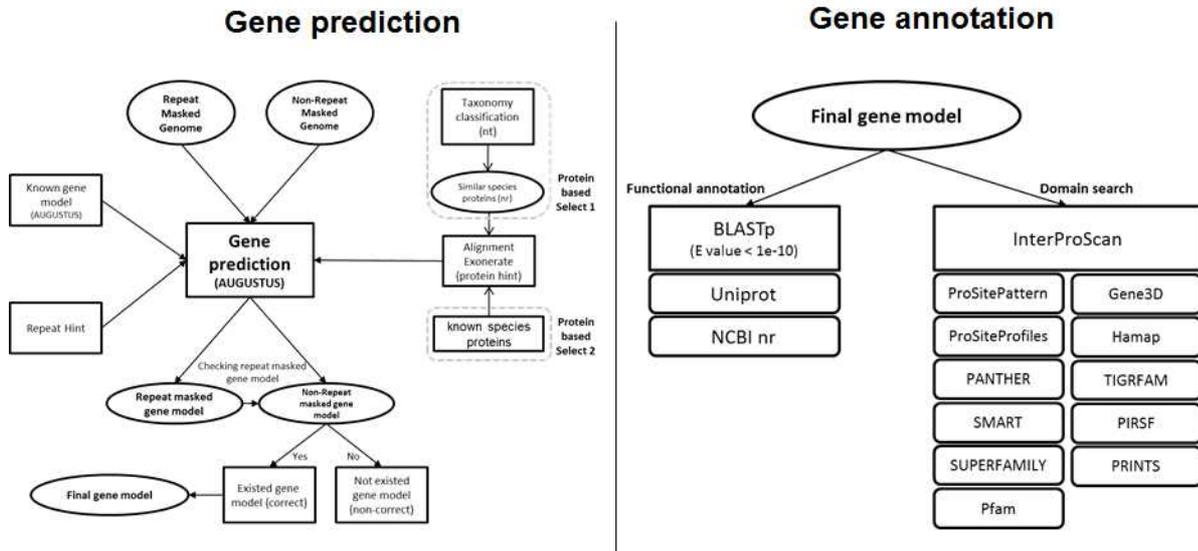


그림 1-9. *F. culmorum* J1 해독 유전체의 유전자 예측 (gene prediction) 과 기능 추정 (gene annotation) 을 위한 work flow.

□ 우리나라 벼 키다리병원균 우점종 대표균주인 *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 유전체와 발병 전사체 해독

○ *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 유전체 해독

- *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주는 모두 우리나라 벼 낱알로부터 분리하였으며, 계통발생학 분석을 통해 종 동정이 확인되었음. 하지만 이 두 균주는 기주인 벼에서 서로 다른 기작으로 병원성을 나타냄. B20 균주는 벼 유묘의 총 길이와 마디 길이를 무처리와 비교 최소 1.5 배 이상 증가시키는 전형적인 키다리병 증상을 보인 반면, B14 균주의 접종 후 벼 유묘 길이의 뚜렷한 변화는 보이지 않음. 하지만 B14 균주는 벼 유묘의 뿌리 부분에 심한 갈변과 괴사를 일으킴. 따라서 우리나라 벼에 분포하는 주요 벼 키다리병원균인 B20과 B14 균주의 유전체 해독과 기능 연구를 통해 *F. fujikuroi* 의 일반적인 병 발생 메카니즘 뿐 아니라 B20 과 B14 균주 사이의 서로 다른 병 발생 메카니즘의 비교 연구가 가능할 것으로 기대함

1) B20 균주 유전체의 신규 해독

- B20 균주 유전체의 해독은 TSLR 방법으로 수행하였으며, Celera assembler 에 의해 유전체 assembly를 수행함
- 독일 MIPS 연구소와 협력연구를 통해 현재까지 총 318 개의 scaffold 수준까지 assembly를 완성하였으며, 이후 scaffold 의 수는 좀 더 감소할 것으로 예상됨
- 독일 MIPS 연구소의 work flow 에 의해 총 15,933 개의 유전자가 예측되었으며, 이에 따른 gene annotation 완료하였음
- 유전체 assembly 와 annotation 결과를 PEDANT 분석에 load 시킴. 결과는 아래 link에서 확인 가능

http://pedant.helmholtz-muenchen.de:8045/pedant3htmlview/pedant?Method=start_method&Db=p3_i2_t5127_Fus_fujik_B20

2) *F. fujikuroi* B14 균주 유전체의 재분석

- B14 균주의 유전체 resequencing 은 독일 MIPS 연구소와 공동 수행함. 분석 결과, B14 균주 유전체를 12 개의 염색체 scaffold 와 41 개의 추가 contig 수준으로 assembly 하였음. 해독 결과는 아래 link에서 확인 가능함. 총 15,833 개의 유전자가 예측되었으며, 그에 따라 gene annotation 이 완료됨

http://pedant.helmholtz-muenchen.de:8045/pedant3htmlview/pedant3view?Db=p3i2_t1215603_Fus_fujik_B14

- 위의 결과 확인을 위한 아이디와 비밀번호는 요청 시 제공가능

3) B20 과 B14 유전체의 paralog 관계 분석

- B20 과 B14 균주에 공통으로 존재하는 유전자는 총 14,897 개이며, B20 균주 유전체에만 존재하는 유전자는 1,036 개, B14 균주 유전체에만 존재하는 유전자는 총 938 개가 확인됨

○ *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 벼 발병 단계 전사체 해독

- *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 발병 전사체 해독을 위한 벼 접종은 양액에서 재배된 벼의 유묘를 대상으로 수행하였음. 두 균주의 균체 agar block를 유묘 뿌리에 접종 한 후 3 일차, 6일차 생장 이 후 식물체의 뿌리와 줄기 부분을 수확하여 그로부터 total RNA를 추출하였음 (B20P3, B20P6, B14P3, B14P6). 발병 전사체 분석 시 reference 는 감자 액체 배지 (PDB)에서 3일 동안 배양하여 확보한 균주 균체의 total RNA (B20PDB, B14PDB) 를 사용하였음 (표 1-13).
- *F. fujikuroi* 감염 벼 시료로부터 해독한 전사체 reads를 우선 벼의 유전체에 mapping 하여 벼 유래 전사체를 제외한 후, unmapped 된 나머지 전사체 reads를 *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 유전체 서열에 mapping 하였음. B20 균주 접종 벼로부터 확보한 전사체 중 62-76% 가 벼 유래 전사체 이었으며, B14 균주 접종 벼의 전사체 중 약 90% 는 벼 전사체 이었음. 한편 벼의 reference 유전체에 unmapped 된 B20 유래 전사체 중 79-89% 는 B20 유전체에 mapping 되었으며, unmapped 된 B14 유래 전사체 중 66-76 % 는 B14 균주의 유전체에 mapping 되었음 (표 1-14).

표 1-13. *F. fujikuroi* 균주 전사체 reads 의 alignment 결과

Name	Raw	Clean	Mapped	Uniquely Mapped	READ 1/ READ 2	Strand(+)/ Strand(-)	Splice
B20PDB	133,364,578	133,364,578 (100.0%)	126,996,149 (95.2%)	125,005,287 (93.7%)	62,732,065 62,273,222	62,488,886 62,516,401	20,014,316 (15.0%)
B20P3	21,570,728	21,570,728 (100.0%)	17,216,983 (79.8%)	16,971,983 (78.7%)	8,526,808 8,445,175	8,474,526 8,497,457	3,091,352 (14.3%)
B20P6	50,040,566	50,040,566 (100.0%)	44,688,583 (89.3%)	43,323,194 (86.6%)	21,836,288 21,486,906	21,588,693 21,734,501	5,642,117 (11.3%)
B14PDB	100,868,752	100,868,752 (100.0%)	93,554,640 (92.7%)	93,370,955 (92.6%)	46,969,143 46,401,812	46,665,556 46,705,399	13,758,594 (13.6%)
B14P3	7,323,738	7,323,738 (100.0%)	4,845,439 (66.2%)	4,840,651 (66.1%)	2,431,374 2,409,277	2,419,384 2,421,267	901,392 (12.3%)
B14P6	8,474,688	8,474,688 (100.0%)	6,521,549 (77.0%)	6,517,473 (76.9%)	3,281,101 3,236,372	3,256,878 3,260,595	1,061,194 (12.5%)

표 1-14. *F. fujikuroi* 균주의 병 발생 단계 별 DEG 의 수

Group 1 (G1)	Group 2 (G2)	Genes		
		Sum	Up (G2 only)	Down (G1 only)
B20PDB	B20P3	924	339 (68)	585 (341)
B20P3	B20P6	965	610 (406)	355 (129)
B20PDB	B20P6	1,403	707 (137)	696 (410)
B14PDB	B14P3	971	245 (69)	726 (437)
B14P3	B14P6	640	436 (133)	204 (72)
B14PDB	B14P6	981	343 (105)	638 (395)

- *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 발병 시기 별 DEG (differentially-expressed gene) 의 수는 표 1-14 와 같음. B20 의 경우, reference 에 비해 발병 3일차에 up-regulation 된 유전자는 339 개, down-regulation 된 유전자는 585 개 이었으며, B14 의 경우 각각 245개, 725 개였음. 6일차에 B20 균주의 경우 707 개의 up-regulation 유전자, 696 개의 down-regulation 유전자가 동정되었음. B14 균주의 발병 6일차의 경우, 343개, 638 개 유전자 집단이 각각 동정되었음 (표 1-15).

표 1-15. 발병 시기 별 *F. fujikuroi* 균주 DEG 의 발현 양상

B14		B20	
Type	Gene No.	Type	Gene No.
UU	7	UU	6
UF	148	UF	220
UD	21	UD	45
FU	260	FU	172
FF	12075	FF	12674
FD	110	FD	179
DU	29	DU	24
DF	255	DF	214
DD	1	DD	1

* U: Up, F: Flat, D: Down

- *F. fujikuroi* 의 발병 단계 특이 유전자 집단 (DEG)를 발병 시기별 발현 양상으로 분류하면 표 1-14와 같이 9 가지로 구분할 수 있음. 예를 들어 감자 액체 배지로부터 얻은 reference 전사체의 발현 수준과 비교하여 발병 3일차에 up-regulation (U) 되고, 3일차 발현 수준에 비해 6일차에 up-regulation (U)된 유전자는 “UU” 그룹에 속함. 또한 액체 배지 발현 수준 기준 발병 3일차에 up-regulation 되는 유전자 중 3일차 발현 수준에 비해 6일차 발현 수준에 큰 변화가 없을 경우 “UF”, 6일차 발현이 감소한 경우 “UD” 그룹에 속하게 됨 (표 1-16).
- 위의 구분에 따르면 UU, UF, UD, FU 그룹에 속하는 유전자들이 병 발생 단계에서 특이적으로 발현이 증가하는 유전자로 추정할 수 있음. B20 균주의 경우 443 개, B14 균주의 경우 436 개 유전자가 이러한 그룹에 속함. 한편, B20 균주의 경우 총 15,933 개 유전자 중 75.7%에 해당하는 12,075 개 유전자는 발현 수준 기준으로 병 발생 단계와 상관이 없는 것으로 밝혀짐. 또한 B14 균주의 경우 총 15,835 개 유전자 중 80%에 해당하는 12,674 개 유전자가 이러한 그룹에 속함 (표 1-17).

표 1-16. *F. fujikuroi* B20 과 B14 DEG 중 UU 그룹에 속하는 유전자

category	B20	B14	proposed functions
B20UU	FFB20_02635	nd	probable potassium transporter hak-1
B20UU	FFB20_06916	FFB14_09718	related to peptide transporter
B20UU	FFB20_07047	FFB14_11390	related to alpha-glucoside transport protein
B20UU	FFB20_07870	FFB14_12334	uncharacterized protein
B20UU	FFB20_11668	FFB14_08634	related to permeases - unknown function
B20UU	FFB20_12821	FFB14_04176	uncharacterized protein
B14UU	FFB20_01726	FFB14_00544	probable beta-glucosidase
B14UU	FFB20_11378	FFB14_01579	related to ceramidase
B14UU	FFB20_08921	FFB14_03627	probable cellulose 1,4-beta-cellobiosidase
B14UU	FFB20_01988	FFB14_08444	probable alpha-glucosidase (maltase)
B14UU	FFB20_14460	FFB14_13462	probable alpha-glucosidase (maltase)
B14UU	FFB20_14461	FFB14_13463	probable maltose permease (MalP)
B14UU	FFB20_06210	FFB14_15384	probable triacylglycerol lipase precursor

- *F. fujikuroi* B20 과 B14 의 DEG 중 “UU” 그룹에 속하는 유전자의 추정 기능은 표 1-15와 같음. 흥미롭게 B20 균주의 6개 UU 그룹 유전자 중 4 개는 transporter 또는 permease 와 같

은 세포막 단백질 정보를 암호화하고 있는 반면, B14 균주의 7개 UU 그룹 소속 유전자 대부분은 탄수화물 또는 지질 대사에 관여하는 단백질 정보를 암호화 하고 있음. 또한 두 균주의 UU 그룹 소속 유전자 중 중복되는 것은 없음. 이를 통해 B20 과 B14 균주의 발병 메카니즘 또는 벼 식물체 내 유전자 발현 양상이 매우 다름을 알 수 있었음.

표 1-17. *F. fujikuroi* 균주의 발병 시기 별 지베렐린 생합성 유전자의 발현 양상

B14 gene	expression category	Function	FPKM PDB	FPKM P3	FPKM P6
FFB14_03130	UF	gibberellin cluster - C13-oxidase	1.14126	36.036	69.2232
FFB14_03131	UU	gibberellin cluster - kaurensynthase	9.62685	177.200	375.768
FFB14_03132	UU	gibberellin cluster - GGPP-synthase	22.3077	511.967	1435.28
FFB14_03133	UU	gibberellin cluster - C20-oxidase	53.1516	325.129	956.129
FFB14_03134	UU	gibberellin cluster - GA14-synthase	15.7447	517.779	1576.14
FFB14_03135	UU	gibberellin cluster - kaurenoxidase (diterpencyclase)	9.35998	193.944	699.399
FFB14_03136	UU	gibberellin cluster - GA4-Desaturase	21.8757	656.972	1861.39
B20 gene	expression category	Function	FPKM PDB	FPKM P3	FPKM P6
FFB20_09260	FF	gibberellin cluster - C13-oxidase	213.191	277.697	342.742
FFB20_09261	FD	gibberellin cluster - kaurensynthase	948.019	953.603	428.709
FFB20_09262	FD	gibberellin cluster - GGPP-synthase	2407.58	2515.14	1316.64
FFB20_09263	FF	gibberellin cluster - C20-oxidase	1064.64	1395.37	1376.14
FFB20_09264	~UF	gibberellin cluster - GA14-synthase	2034.73	3223.26	3406.2
FFB20_09265	FF	gibberellin cluster - kaurenoxidase (diterpencyclase)	728.101	1023.93	852.386
FFB20_09266	UF	gibberellin cluster - GA4-Desaturase	1388.4	3304.7	3800.53

- 벼 발병 시기 별 *F. fujikuroi* B20, B14 균주의 주요 병원성 인자인 지베렐린 (GA) 생합성 유전자의 발현 양상을 비교 분석하였음 (표 1-17). 예상과 달리, 전형적인 벼 키다리병 증상을 일으키지 않는 B14 균주의 모든 GA 생합성 유전자의 발현양은 감자 액체 배지 조건에 비해 벼 접종 후 3일, 6일 동안 급격히 증가하였음. 반면 전형적인 키다리병 증상을 일으키는 B20 균주의 대부분 GA 생합성 유전자는 감자 액체 배지 조건에 비해 발현양의 차이가 거의 없었음. 이와 같은 결과는 B20 균주의 경우, 감자 액체 배지와 벼 식물체 내 모두에서 GA 생산이 높은 수준으로 이루어지기 때문에 두 조건에서 유전자 발현양의 차이가 뚜렷이 나타나지 않을 수 있음을 시사함. 반면, GA 생산력 자체가 미미할 것으로 추정되는 B14 균주의 경우, 벼 식물체 내 발병 단계 조건에서 감자 액체 배지 조건에 비해 GA 생합성 유전자의 활성이 높아진 것으로 추정할 수 있음. 실제로 B20 균주의 벼 접종 후 3일 차 GA 유

전자의 발현 FPKM 수치는 B14 균주에 비해 5-9 배 이상 높았음. 하지만 B14 균주의 이와 같은 벼 식물체 내 GA 유전자 발현 수준이 실제 벼 키다리병 증상 발현에 필요한 GA 생산에 부족한 지는 추후 연구가 필요함

□ *F. fujikuroi* 의 무성포자 생성 조절체계 구성 유전자의 기능 분석

○ 우리나라 우점종 벼 키다리 병원균의 대표균주 (B14, B20)의 무성포자 생성 조절 관련 14 종 유전자의 기능 및 조절 체계 분석

1) 무성포자 생성 조절 관련 유전자의 기능분석

- 벼 키다리 병은 *F. fujikuroi* 중 복합체 소속 *F. fujikuroi* 에 의해 발생하며, 식물체의 비정상적인 길이 생장, 잎이 노랗게 변색 됨, 분얼 감소, 낱알이 여물지 않음 등의 병징을 보임. 본 연구진에 의해 수집된 B14 와 B20 균주를 대상으로 모델 곰팡이 종인 *Aspergillus nidulans* 의 무성포자 조절 유전자 집단의 해당 유전자를 삭제한 돌연변이체를 만든 후 돌연변이체의 포자형성 표현형 변화를 통해 유전자 기능 분석.
- B14 균주의 균학적, 병리학적 특성: 식물생장 호르몬인 지베렐린과 곰팡이독소인 푸모니신을 동시에 생산하며, 전형적인 벼 키다리병 증상이 아닌 식물체 뿌리 갈변과 썩음 증상을 보임. B20 보다 균사 생장이 조금 빠르고, 공중 균사가 적으며, PDA 배양 시 배지 뒷면의 색이 하얀색임.
- B20 균주의 균학적, 병리학적 특성: 전형적인 벼키다리 병징을 나타내며, B14 와 달리 뿌리 썩음 증상을 일으키지 않음. PDA 뒷면 가운데 부분이 짙은 보라색을 띰.
- 모델 사상성 곰팡이인 *Aspergillus nidulans* 의 대표적인 무성포자 조절 유전자 14개를 대상으로 이들의 유사 유전자 (orthologue)를 *F. fujikuroi* B20 과 B14 유전체로부터 탐색함 (표 1-18).

표1-18. *F. fujikuroi* 의 무성포자 생성 조절 유전자 정보

<i>A. nidulans</i> gene name	ortholog	<i>A. nidulans</i> gene name	ortholog	<i>A. nidulans</i> gene name	ortholog
<i>abaA</i>	FFUJ_00702 FFB14_04032 FFB20_04305	<i>flbD</i>	FFUJ_12231 FFB14_06701 FFB20_12282	<i>veA</i>	FFUJ_01649 FFB14_11903 FFB20_03646
<i>brlA</i>	FFUJ_03147 FFB14_00584 FFB20_01682	<i>flbE</i>	FFUJ_04436 FFB14_09251 FFB20_03331	<i>velB</i>	FFUJ_01561 FFB14_11998 FFB20_14180
<i>flbA</i>	FFUJ_04920 FFB14_14445 FFB20_11301	<i>fluG</i>	FFUJ_07403 FFB14_02395 FFB20_14537	<i>vosA</i>	FFUJ_03093 FFB14_00633 FFB20_15053
<i>flbB</i>	FFUJ_01507 FFB14_12055 FFB20_04522	<i>laeA</i>	FFUJ_11786 FFB14_10806 FFB20_00933	<i>wetA</i>	FFUJ_07285 FFB14_02270 FFB20_13800
<i>flbC</i>	FFUJ_02801 FFB14_00941 FFB20_04806	<i>sfgA</i>	FFUJ_10976 FFB14_10237 FFB20_11215		

FFUJ_: *F. fujikuroi* IMI58289; FFB14_: *F. fujikuroi* B14; FFB20_: *F. fujikuroi* B20.

- 각 유전자의 삭제를 위한 split marker construct를 제작함 (연구방법 참조). 그 중 *flbD* 유전자의

경우, 3' flanking 부분에서 B14와 B20 균주 사이의 synteny 가 상이함을 발견함 (그림 1-10).

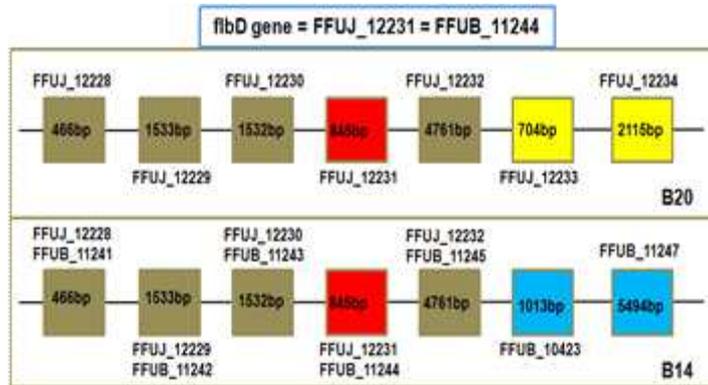


그림 1-10. *F. fujikuroi* B14 균주의 flbD 유전자 부위의 구조

- 이들 유전자 중 *veA-laeA-veIB* 유전자의 산물은 여러 사상성 곰팡이에서 단백질 복합체 형성하며, 곰팡이 성장과 분화, 이차대사에 관여하는 것으로 알려짐.
- 유전자 삭제 돌연변이체의 균사생장: PDA 배지에서 7일간 배양 후 관찰한 결과, 각각 12개 유전자가 삭제된 돌연변이체는 야생형 균주와 비교하여 균학적으로 큰 차이가 없었음. 단지 ΔveA 와 $\Delta veIB$ 의 경우, 공중 균사가 감소하고 색소형성은 증가하였음. 한편 B20 균주의 ΔveA 와 $\Delta veIB$ 형질전환체에서는 더 짙은 색소의 형성이 관찰됨 (그림1-11).

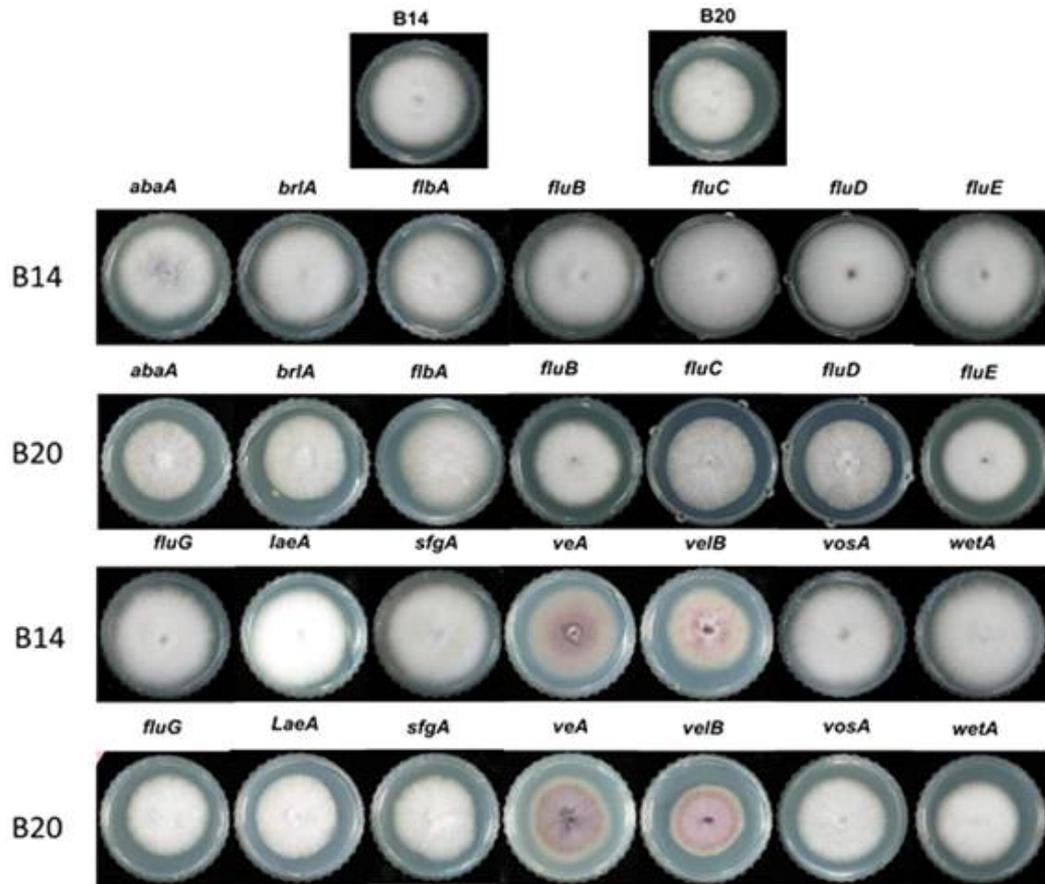


그림 1-11. 감자한천배지(PDA)에 접종 후 25℃, 어둠 조건에서 5일 배양.

- 유전자 삭제 형질전환체의 무성포자 형성: V8 배지에서 7일간 배양 후 무성포자를 현미경으로 관찰 결과, 야생형 균주 B14와 B20을 비교하였을 때, $\Delta briA$, $\Delta flbA$, $\Delta fluB$, $\Delta fluC$, $\Delta fluD$, $\Delta fluE$, $\Delta fluG$, $\Delta laeA$, $\Delta sfgA$, $\Delta vosA$ 균주는 포자 모양에 큰 차이를 보이지 않음. 하지만 phialide 분화에 필수적인 유전자로 알려진 $abaA$ 이 삭제된 $\Delta abaA$ 균주는 macroconidia와 microconidia를 모두 형성 못하였음. 또한 ΔveA 와 $\Delta velB$ 균주는 macroconidia의 길이가 야생형 균주보다 1.3~1.5배 정도 길어졌음. $wetA$ 는 conidial wall 형성에 관여하는 유전자로 알려졌는데, B14 균주의 $wetA$ 삭제 돌연변이체는 macroconidia를 거의 형성하지 못하였으나, B20 균주의 $wetA$ 삭제 돌연변이체에서는 macroconidia의 양끝이 둥글고 격벽이 잘 관찰되지 않았음 (그림1-12, 그림1-13).

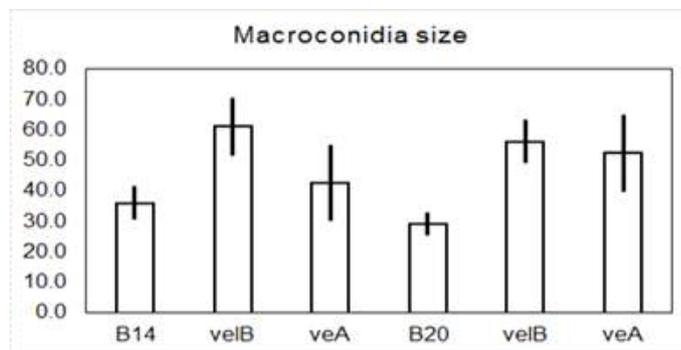


그림 1-12. V8배지, 빛 조건에서 형성된 macroconidia 길이 (단위: μm).

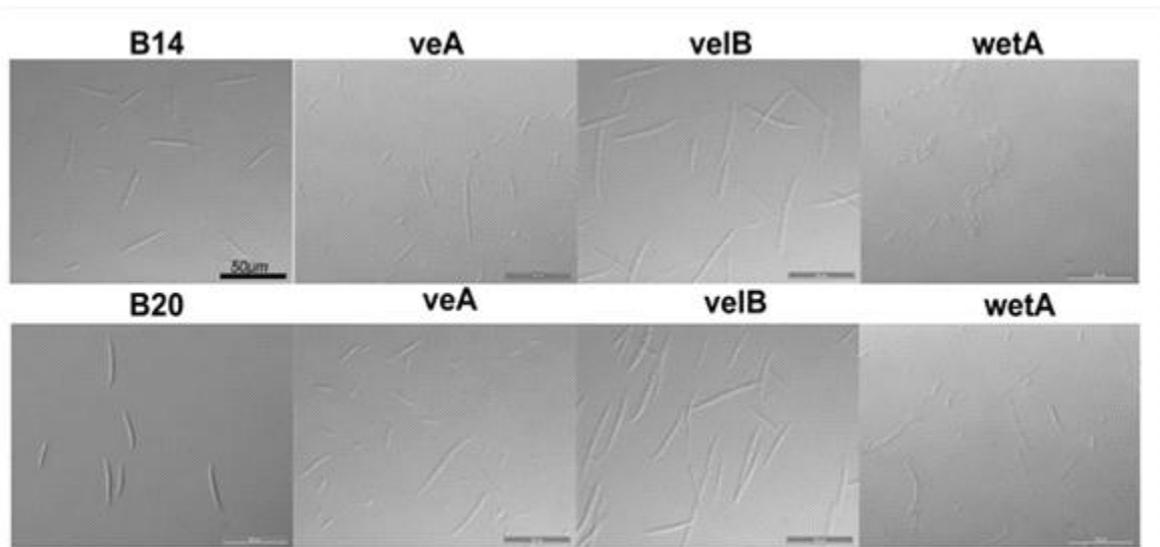


그림 1-13. V8배지 위 빛 조건에서 macroconidia와 microconidia 의 형성.

- V8배지에서 야생형 모균주와 각 무성포자 형성 관련 유전자 삭제 형질전환체의 무성포자 수를 측정함.
- B14 균주의 무성포자 형성 유전자 삭제 형질전환체 중 macroconidia(Ma)와 microconidia(Mc) 모두 형성하지 못한 균주는 $\Delta abaA$ 이고, 절반 이하로 감소한 균주는 $\Delta flbA$, $\Delta fluE$, $\Delta wetA$ 이며, macroconidia(Ma) 또는 microconidia(Mc) 둘 중 하나가 절반 이하로 감소한 균주는 $\Delta fluC$ (Mc ↓), $\Delta fluD$ (Mc ↓), ΔveA (Ma ↓)이고, 둘 중 하나가 증가한 경우는 $\Delta fluB$ (Ma ↑), ΔveA (Mc ↑) 임 (그림1-14).
- B20 균주의 무성포자 형성 유전자 삭제 형질전환체 중 macroconidia(Ma)와 microconidia(Mc) 둘 다 형성하지 못한 균주는 $\Delta abaA$ 이고, macroconidia(Ma)만 형성 못하는 균주는 $\Delta fluB$, $\Delta fluE$, macroconidia(Ma)와 microconidia(Mc) 모두 절반 이하로 감소한 균주는 $\Delta flbA$, $\Delta fluC$, $\Delta fluD$, $\Delta fluG$, $\Delta sfgA$, ΔveA , $\Delta veIB$ 이며, 둘 중 하나만 절반이하로 감소한 균주는 $\Delta brlA$ (Mc ↓), $\Delta laeA$ (Mc ↓), $\Delta vosA$ (Mc ↓) 임. 또한 둘 중 하나가 증가한 경우는 $\Delta fluB$ (Mc ↑), $\Delta fluE$ (Mc ↑) 임 (그림 1-14).

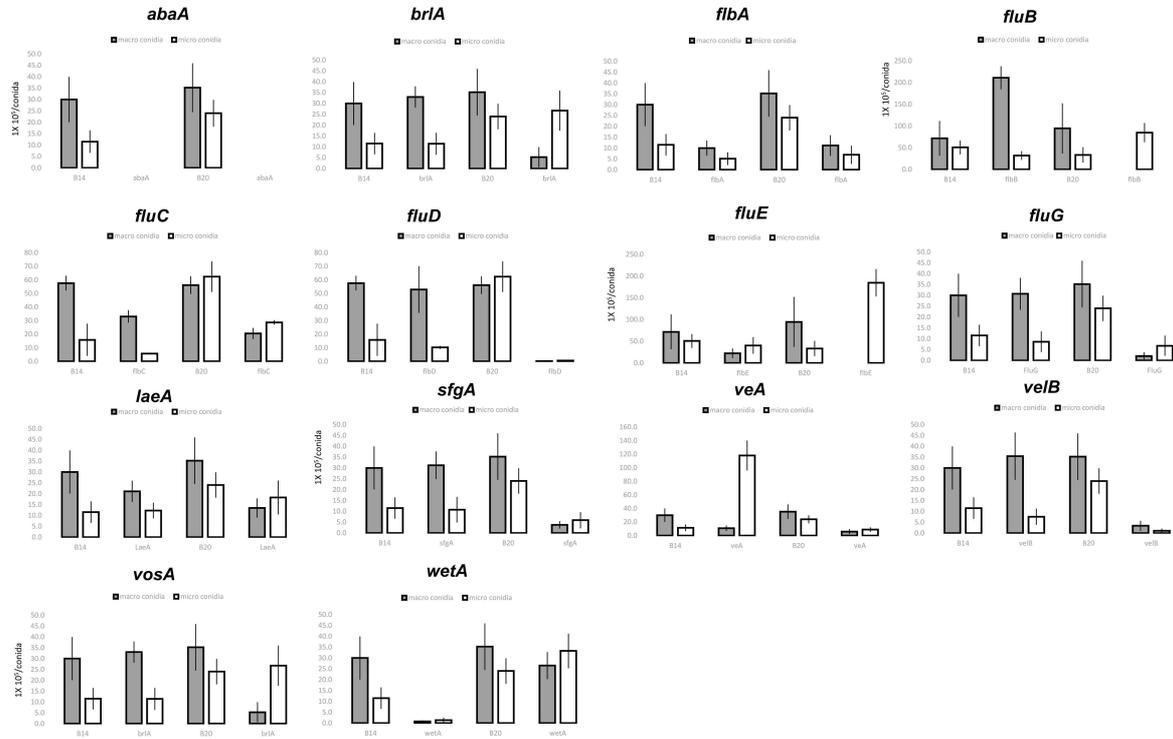


그림 1-14. V8배지 빛 조건에서 7일간 배양 후 분생포자 수 측정

표 1-19 . V8배지 빛 조건에서 7일 배양 후 분생포자 수를 야생형 포자수에 나눈 비율

gene	B14		B20		gene	B14		B20	
	macro	micro	macro	micro		macro	micro	macro	micro
$\Delta abaA$	no conidia	no conidia	no conidia	no conidia	$\Delta fluG$	NC	NC	0.06 ↓	0.28 ↓
$\Delta brlA$	NC	NC	0.15 ↓	NC	$\Delta laeA$	NC	NC	0.38 ↓	NC
$\Delta flbA$	0.33 ↓	0.44 ↓	0.32 ↓	0.29 ↓	$\Delta sfgA$	NC	NC	0.11 ↓	0.25 ↓
$\Delta flbB$	2.95 ↑	NC	no conidia	2.54 ↑	ΔveA	0.36 ↓	10.26 ↑	0.17 ↓	0.37 ↓
$\Delta flbC$	NC	0.36 ↓	0.37 ↓	0.46 ↓	$\Delta velB$	NC	NC	0.10 ↓	0.05 ↓
$\Delta flbD$	NC	↑	no conidia	no conidia	$\Delta vosA$	0.45 ↓	NC	0.22 ↓	0.48 ↓
$\Delta flbE$	0.31 ↓	NC	no conidia	5.54 ↑	$\Delta wetA$	0.03 ↓	0.12 ↓	NC	NC

2) *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 무성포자 생성 조절 체계 분석

가. *A. nidulans*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* 유전자삭제 돌연변이체의 포자형성 표현형 변화 비교 분석

- B20과 B14 균주로부터 제작한 총 14 종 유전자의 삭제 돌연변이체 균주는 해당 야생형 균주와 비교하여 macroconidia 또는 microconidia 생성 수 감소/증가, 포자 형태 비정상 등의 뚜렷한 차이를 보였기 때문에 이 들 유전자는 B20 또는 B14 균주에서 직간접적으로 포자형성에 관여함이 증명됨 (표1-20 a).

표 1-20 a. 유전자삭제 돌연변이체의 무성포자 형성 관련 표현형 변화의 비교 분석

gene	<i>A. nidulans</i>	<i>F. fujikuroi</i> B20	<i>F. fujikuroi</i> B14	<i>F. fujikuroi</i> IMI58289*	<i>F. graminearum</i> **
<i>fluG</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: NC -micro: NC	nd	nd
<i>flbA</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: ↓ -micro: ↓	nd	nd
<i>flbB</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro:미생성 -micro: ↑	-macro: ↑ -micro: NC	nd	nd
<i>flbC</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: NC -micro: ↓	nd	-macro: ↓
<i>flbD</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro:미생성 -micro:미생성	-macro: NC -micro: ↑	nd	-macro:미생성
<i>flbE</i>	fluffy 균총, 무성포자 생성 지연 또는 감소	-macro: 미생성 -micro: ↑	-macro: ↓ -micro: NC	nd	nd
<i>sfgA</i>	-Δ <i>fluG</i> : 포자 생성 -WT:정상	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: NC -micro: NC	nd	nd
<i>brlA</i>	포자형성 초기 vesicle 구조 미생성	- macro: ↓ - micro: NC	-macro: NC -micro: NC	nd	-macro: NC
<i>abaA</i>	포자 형성 초기 vesicle 형성 후 metulae 구조만 형성	-macro:미생성 -micro:미생성	-macro:미생성 -micro:미생성	nd	-macro:미생성
<i>wetA</i>	포자 형성 후기 포자 벽 미발달	-macro: 비정상 형태 -micro: NC	-macro: ↓ -micro: ↓	nd	-macro:비정상 형태, 미성숙, microcycle conidiation유도
<i>veA</i>	포자 수 증가	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: ↓ -micro: ↑	-macro: NC -micro: ↓	nd
<i>velB</i>	포자 수 감소	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: NC -micro: NC	-macro: NC -micro: ↓	-macro: ↓
<i>vosA</i>	포자 viability 없음	-macro: ↓ -micro: ↓	-macro: ↓ -micro: NC	nd	nd
<i>laeA</i>	conidial chain elongation 감소, conidiophores 증가	-macro: ↓ -micro: NC	-macro: NC -micro: NC	-macro: NC -micro: ↓	-macro: NC

NC: 해당 야생형 (WT) 균주와 비교하여 변화 없음

↓ 또는 ↑: 해당 WT 균주와 비교하여 포자 생성 수의 감소 또는 증가

*from Wiemann et al (2010) Mol. Microbiol. 77: 972 - 994.

**from Lee et al (2012) Microbiology 158: 1728-1733, Kim et al (2013) PLoS One e68441, Son et al (2013) PLoS One e72915, Son et al (2014) Eukaryo. Cell 13: 87-98.

- 기존에 상세히 분석된 *A. nidulans* 의 결과와 비교할 경우, 포자형성의 upstream regulators 에 해당하는 *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE* 유전자의 삭제 돌연변이체 표현형은 *F. fujikuroi* B20, B14 균주와 *A. nidulans* 균주 사이 뿐 아니라 B20, B24 균주와 같은 속 균주인 *F. graminearum* 사이에서도 대체로 비슷하였다 (대부분 경우, 포자 형성 수 감소). 따라서 이러한 유전자들은 *A. nidulans* 와 마찬가지로 *F. fujikuroi* 에서도 포자 형성을 positive 하게 조절하는 것으로 추정됨 (즉, activator 로서 역할). 하지만 이와 달리, *flbB* 유전자 삭제 돌연변이체에서 macroconidia (B20 균주) 또는 microconidia (B14 균주) 생성 수 증가, *flbE* 삭제 돌연변이체에서 microconidia (B20 균주) 의 생성 수 증가는 *F. fujikuroi* 에서 *flbB* 와 *flbE* 유전자의 포자 형성 repressor 로서 기능을 뒷받침함. 한편, 전사조절인자 유전자인 *flbD* 의 삭제 돌연변이체의 경우, *A. nidulans* 균주와 달리 B20과 *F. graminearum* 균주에서 포자 형성이 완전히 억제되어 *Fusarium* 속 곰팡이의 *flbD* 유전자는 *A. nidulans* 와 다른 체계로 포자 형성을 조절하는 것으로 추정됨 (표 1-20a)

- 하지만 각 유전자의 발현 분석을 통해 이들 upstream regulators 의 포자생성 조절 방식과 upstream regulators 사이의 발현 조절 체계는 *F. fujikuroi* 와 *A. nidulans* 사이에 뚜렷이 다름이 증명됨 (그림 1-15a)
- 한편, *A. nidulans* 에서 포자 형성의 central regulators 로 알려진 *briA*, *abaA*, *wetA* 유전자 중 *abaA*, *wetA* 의 삭제 돌연변이체의 경우, *A. nidulans*, *F. fujikuroi* B20, *F. graminearum* 에서 모두 표현형이 일치하였음. 포자의 phialide 생성을 조절하는 *abaA* 가 삭제되었을 경우, 3종의 곰팡이에서 모두 무성포자가 생성되지 않았으며, 포자의 세포벽 성숙에 관여하는 *wetA* 삭제 돌연변이체에서도 비정상적인 포자 형태가 관찰되었음. 이를 통해 *abaA*, *wetA* 유전자에 의한 무성포자 생성 및 성숙 조절 경로 (activator 로서 역할) 는 *A. nidulans*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* 에서 모두 보존되어 있음이 증명되었음 (그림 1-15a)
- 하지만 *A. nidulans* 에서 포자형성 초기 단계인 stalk 으로부터 vesicle 형성 과정을 조절하는 *briA* 유전자의 ortholog 가 *F. fujikuroi* B20, B14, *F. graminearum* 에서 삭제되었을 경우, *A. nidulans* 와 달리 포자 형성에 큰 변화가 없었음. 이는 *Fusarium* 속 곰팡이가 *A. nidulans* 와 달리 포자형성 과정 중 vesicle을 형성하지 않는 점과 매우 밀접하게 관련되어 있을 것으로 추정됨 (그림 1-15a). 즉, *Fusarium* 속의 *briA* 유전자는 포자형성 과정에 직접적으로 관여하지 않을 수 있음을 나타내며, 이는 qPCR을 통한 이들 유전자의 발현 조절 체계 분석을 통해서 다시 한 번 증명됨 (그림 1-15b)

나. 포자형성 조절 유전자의 발현 분석

- B20 과 B14 균주 유래 14 종 유전자의 삭제 돌연변이체를 V8 배지에서 7일 동안 배양한 후 균체로부터 total RNA를 추출하여 각 유전자의 상대적인 발현량을 qPCR 방법으로 결정하였음. 이를 통해 각 유전자 사이의 발현 조절 양상 (activation or repression) 과 계층적 발현 조절 체계 (hierarchical relationship)를 분석하였음 (표 1-20b,1-20c)

표 1-20b. qPCR을 이용한 B20 균주 내 포자 형성 조절 유전자의 발현양 분석

	B20	B20	$\Delta flbA$	$\Delta flbB$	$\Delta flbC$	$\Delta flbD$	$\Delta flbE$	$\Delta fluG$	$\Delta abaA$	$\Delta briA$	$\Delta laeA$	ΔveA	ΔveB	$\Delta vosA$	$\Delta sfgA$	$\Delta wetA$
<i>flbA</i>	4.4	1.0		0.7	7.4	1.1	0.9	4.6	0.6	2.3	1.4	33.0	20.1	0.3	4.1	0.8
<i>flbB</i>	68.4	1.0	2.1		1.2	2.4	0.6	1.0	0.5	4.4	3.4	1.1	1.6	1.5	2.5	2.5
<i>flbC</i>	18.7	1.0	1.9	0.7		2.6	1.0	6.4	0.6	3.4	10.8	0.1	444.5	0.3	14.2	1.7
<i>flbD</i>	592.7	1.0	2.7	0.9	1.1		0.4	3.3	0.2	3.7	4.2	0.6	2.9	0.3	2.4	0.8
<i>flbE</i>	103.2	1.0	2.9	0.2	25.7	0.7		2.4	0.1	0.5	2.2	7.0	4.8	0.1	3.4	0.4
<i>fluG</i>	7.5	1.0	2.5	1.0	0.6	1.3	0.4		3.1	2.2	5.7	0.1	1.3	1.0	3.3	0.4
<i>abaA</i>	1.0	1.0	3.5	1.0	5.0	5.5	0.7	24.8		3.9	9.1	0.2	41.9	0.1	11.0	3.7
<i>briA</i>	9.6	1.0	3.4	1.9	2.6	1.2	2.0	9.5	0.9		6.3	6.2	12.0	0.1	3.9	1.1
<i>laeA</i>	0.6	1.0	5.2	1.8	56.5		4.1	0.8	3.2	0.1		1.1	3.5	3.6	1.1	3.6
<i>veA</i>	77.1	1.0	2.7	1.1	7.7	0.3	1.5	2.8	0.6	1.4	12.9		5.7	0.2	5.5	1.1
<i>veB</i>	6.7	1.0	4.0	1.0	3.2	2.5	1.3	3.0	1.7	2.4	5.5	1.7		0.5	4.9	12.1
<i>vosA</i>	1.2	1.0	8.2	0.6	22.3	6.4	0.4	13.8	0.7	9.4	15.0	45.6	39.1		9.8	0.6
<i>sfgA</i>	1.7	1.0	3.6	0.7	20.7	0.7	1.1	1.6	4927.4	0.8	0.6	0.4	61.6	0.2		0.6
<i>wetA</i>	10.2	1.0	2.1	1.1	9.6	0.0	0.3	6.6	0.0	0.0	9.5	1.9	4.0	0.0	3.7	

표1-20c. qPCR을 이용한 B14 균주 내 포자 형성 조절 유전자의 발현양 분석

	B14	B14	$\Delta flbA$	$\Delta flbB$	$\Delta flbC$	$\Delta flbD$	$\Delta flbE$	$\Delta flbG$	$\Delta abaA$	$\Delta briA$	$\Delta laeA$	ΔveA	ΔveB	$\Delta vosA$	$\Delta sfgA$	$\Delta wetA$
<i>flbA</i>	1.0	1.0		0.3	0.2	1.6	1.7	1.4	0.5	0.3	0.6	2.5	0.8	1.0	1.0	1.9
<i>flbB</i>	9.3	1.0	4.1		0.5	1.6	2.3	1.5	3.2	3.6	5.4	5.1	2.9	7.9	4.1	5.8
<i>flbC</i>	5.7	1.0	17.1	7.5		3.3	2.3	3.8	0.4	2.5	2.5	1.2	0.6	1.1	4.0	1.1
<i>flbD</i>	249.7	1.0	1.9	2.6	0.1		0.8	1.3	0.7	0.6	1.5	0.6	1.0	1.0	1.4	0.4
<i>flbE</i>	13.3	1.0	2.8	3.8	1.3	2.2		1.1	0.3	0.5	0.8	0.5	0.6	1.2	1.1	0.3
<i>fluG</i>	0.9	1.0	3.6	7.4	3.0	2.0	1.6		1.5	3.2	4.0	8.0	0.5	3.5	3.9	4.8
<i>abaA</i>	1.0	1.0	6.5	4.1	0.3	2.3	1.3	1.8		0.7	0.5	0.8	0.3	0.6	1.6	2.3
<i>briA</i>	1.2	1.0	6.8	6.5	4.8	12.1	3.6	3.8	0.8		2.4	5.8	1.6	1.8	3.2	8.7
<i>laeA</i>	0.005	1.0	0.7	3.6	270.1	0.2	2.8	1.0	8.1	0.1		14.9	1.3	86.6	0.1	4.2
<i>veA</i>	2.3	1.0	39.7	34.6	25.0	28.1	6.0	5.5	0.2	28.6	7.0		3.5	10.2	2.5	9.0
<i>veB</i>	1.7	1.0	1.2	4.1	2.3	1.0	0.2	1.1	4.6	2.6	1.8	0.3		0.7	1.5	4.6
<i>vosA</i>	0.7	1.0	8.9	7.4	1.7	10.5	2.1	2.9	0.8	1.9	3.2	0.5	0.2		2.6	1.2
<i>sfgA</i>	0.4	1.0	1.0	14.8	0.8	3.6	0.9	0.6	0.1	1.0	0.2	1.0	0.5	0.7		1.8
<i>wetA</i>	0.017	1.0	3.8	2.7	14.5	46.9	8.7	3.6	3.3	7.3	3.8	1.8	1.9	1.7	3.0	

- 특정 유전자 A가 삭제되었을 경우, 유전자 B의 발현이 WT 균주에 비해 증가하였을 경우 (표 1-20b, 1-19c에서 노랗게 표시), WT 균주에서 유전자 A는 유전자 B의 발현을 억제하는 repressor의 역할을 하는 것으로 추정하였음. 또한 유전자 A 삭제 돌연변이체에서 유전자 B의 발현이 감소하였을 경우 (표 1-20b, 1-20c에서 초록색으로 표시), WT 균주에서 유전자 A는 유전자 B의 발현을 증진 또는 활성화 시키는 activator로서 역할을 하는 것으로 추정하였음

- 포자형성을 위한 upstream regulator 유전자 사이의 조절 체계:

*A. nidulans*에서는 upstream regulators로 알려진 6개 유전자 (*fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*) 사이에 유전자 발현 activation 기능에 바탕을 둔 상하의 발현 조절 관계 (hierarchical relationship)가 존재하나 [그림 1-15a 참조, 예: *fluG*에 의한 *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*의 발현 증진 (activation), *flbE*와 *flbB*에 의한 *flbD*의 발현 증진, *sfgA*에 의한 *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*의 발현 억제 (repression)], *F. fujikuroi* 균주에서는 이러한 양식의 조절 체계가 관찰되지 않았을 뿐 아니라 대부분 유전자 사이의 발현 조절은 repression의 기능에 의해 이루어지는 것으로 추정할 수 있음 (그림 1-15a). *F. fujikuroi* B20에서 뚜렷한 유전자 발현 activation 관계는 *flbB* → *flbE* 뿐이며, B14에서는 *flbC* → *flbA*, *flbC* → *flbD*, *flbB* → *flbA*임. 하지만 B20 균주의 경우, *fluG*에 의한 *flbA*, *flbC*, *flbD*, *flbE*의 발현 억제가 관찰되어 *fluG*가 이들 유전자의 상위 조절인자라는 점은 *A. nidulans*의 비슷하다고 할 수 있으나 조절 양상은 반대임. B14 균주의 경우, B20과 달리 *flbB*와 *flbA* 유전자가 상위에서 다른 유전자의 발현을 억제함이 증명됨 (그림 1-15a)

- 포자형성을 위한 upstream regulators에 의한 central regulators의 조절 체계:

*A. nidulans*에서는 위의 upstream regulator 유전자가 activator로서 central regulator 유전자인 *briA*의 발현을 증진시킴. 하지만 *F. fujikuroi* B20과 B14의 경우, upstream regulators에 의한 *briA*의 발현 증진은 관찰되지 않았음. 대신 이들 유전자에 의한 *briA*의 발현 억제가 확인되었음 (그림 1-15a, 1-15b). 특히 *F. fujikuroi*에서 upstream regulator와 central regulator 사이의 발현 조절 체계 중 명확히 증명이 된 경로는 B20 균주에서 *flbB*와 *flbE*에 의한 *briA*의 발현 억제 (*flbB*에 의한 *flbE*의 발현 활성화 또는 증진, *flbE*에 의한 *briA* 발현 억제)임 (그림 1-15a). 이는 B20 균주의 *flbB*와 *flbE* 삭제 돌연변이체에서 microconidia 생성 수의 증가로 다시 한 번 뒷받침되었음 (표 1-20a)

- 포자형성을 위한 **central regulators** 사이의 조절 체계:

*A. nidulans*에서는 *brlA*에 의한 *abaA*의 발현 증진과 *abaA*에 의한 *wetA*의 발현 증진 관계가 존재함. 하지만 *F. fujikuroi* B20과 B14 균주에서는 *brlA*에 의한 *abaA*의 발현 증진이 확인되지 않았음. 오히려 B20 균주에서는 *brlA*에 의한 *abaA*의 발현 억제 관계가 관찰되었으며, B14 균주에서는 두 유전자 사이의 직접적인 발현 조절 관계가 확인되지 않았음 (그림 1-15a, 1-15b). 하지만 B20 균주에서 *abaA*에 의한 *wetA*의 발현 증진은 확인되어 *F. fujikuroi*에서도 무성포자 형성 과정 중 phialide로부터 포자의 생성과 성숙에 필요한 조절은 *A. nidulans*와 비슷하게 조절됨이 증명됨. 한편, B14에서는 *abaA*에 의한 *wetA*의 발현 억제가 관찰되었을 뿐 아니라 실제로 야생형 균주에서 *wetA*의 발현양이 B20에 비해 매우 낮았음 (표 1-20b). 이를 통해 같은 키다리병균이라도 B20과 B14 사이에 무성포자 조절 체계가 다르게 작동함을 추정할 수 있음

- **global regulators (veA complex)**에 의한 포자 형성 조절:

곰팡이에서 무성포자 형성 뿐 아니라 균사생장, 유성생식, 이차대사 등을 상위에서 조절하는 global regulators (veA complex로서 *veA*, *ve1B*, *vosA*, *laeA* 등으로 구성)에 의한 무성포자 형성 조절을 대체로 *A. nidulans*와 *F. fujikuroi* 사이에 큰 차이는 없었음. 하지만 *veA*는 *A. nidulans*와 *F. fujikuroi* 사이에서 서로 반대의 역할을 하는 것으로 추정됨. 즉, *A. nidulans*의 *veA* 삭제 돌연변이체에서는 무성포자의 생성이 증가하였으나, *F. fujikuroi*의 경우, 무성포자 생성이 감소하였음 (표 1-20b)

다. *F. fujikuroi* B20 균주와 B14 균주 사이 무성포자 생성 조절 체계의 차이점

유전자삭제 돌연변이체의 표현형 변화를 기준으로 두 균주 사이에 가장 큰 차이를 보인 유전자는 *flbD*와 *flbE*임 (표 1-20a). B20 균주의 삭제 돌연변이체에서는 무성포자가 전혀 형성되지 않은 반면, B14 균주의 경우 macroconidia는 정상적으로 형성되었음. 이러한 차이는 유전자 발현 조절 분석을 통해서도 뒷받침되었음. 이 외 두 균주 사이에서 차이를 보인 유전자는 *fluG*, *stgA*, *wetA*임. 하지만 이 경우 *flbD*, *flbE*와 달리 무성포자의 형성은 제대로 이루어졌으며 단지 생성 수에 차이가 있었음. 한편 두 균주 모두 *abaA* 삭제 돌연변이체에서 무성포자가 전혀 생성되지 않았기 때문에 *F. fujikuroi*에서 phialide 형성에 관여하는 *abaA*의 중요성이 증명되었음.

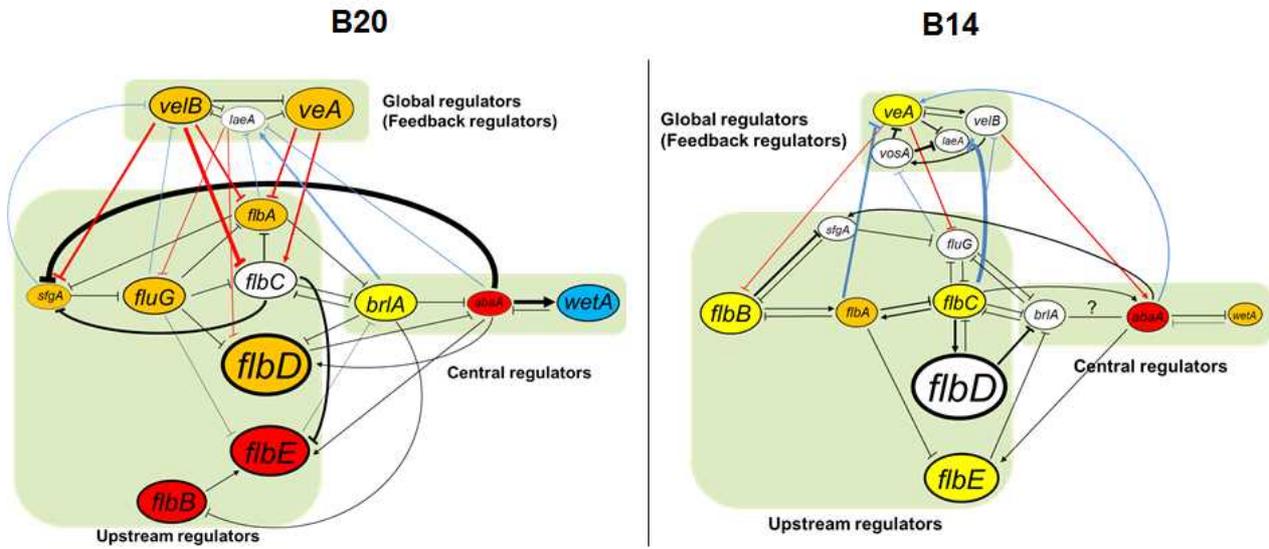


그림 1-15a. 무성포자 형성 관련 유전자의 발현 조절 체계. 야생형 균주에서 각 유전자의 발현양은 유전자 이름 font 의 크기와 비례함. 유전자삭제를 통해 무성포자 생성 억제를 조래한 유전자는 빨간색, 두 종류의 무성포자 (macro- & microconidia) 의 생성 수 감소를 조래한 유전자는 주황색, 최소 한 종류 무성포자의 생성 감소를 조래한 유전자는 노란색, 포자 형성에 아무런 영향을 미치지 않은 유전자는 하얀색으로 표시함. global regulator 에 의한 유전자 발현 조절은 빨간색, 무성포자 조절 유전자에 의한 global regulator 유전자의 발현 조절은 파란색으로 표시됨.

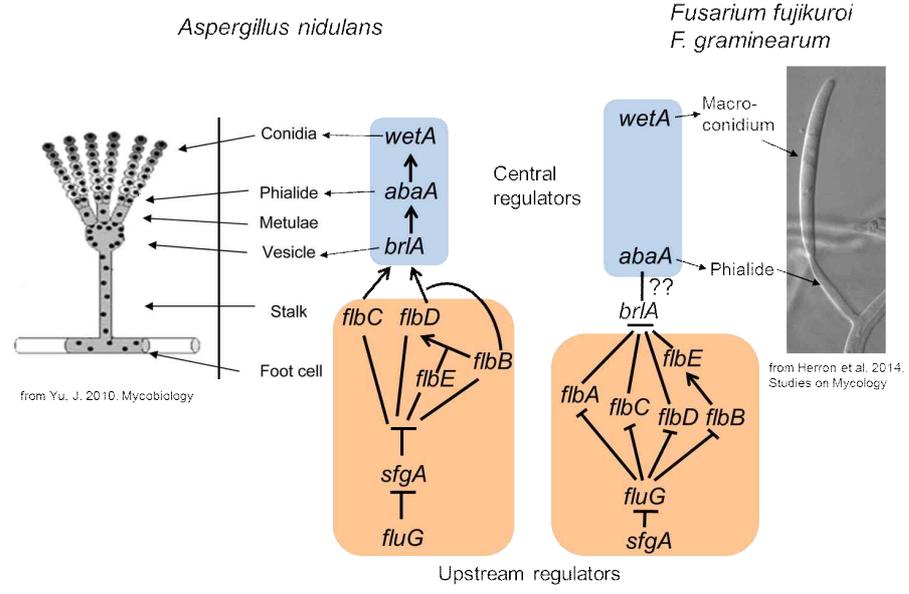


그림 1-15b. *A. nidulans* 와 *F. fujikuroi* 균주 사이 무성포자 생성 관련 유전자의 조절체계 비교.

○ 버 키다리 병원균 대표균주 (B14, B20) 의 무성포자 생성 조절 관련 유전자삭제 돌연변이체의 병원성 분석

1) 병원성 표현형 변화 분석

- 살균된 시험관에 3.5cm~4cm 길이의 버의 유묘를 살균된 상토에 심은 후, CM 배지에서 배양된 무성포자 생성 조절 유전자 삭제 돌연변이체 균주의 5 mm² agar block를 접종한 후, 7일 동안 18

시간 빛 조건과 6시간 암 조건에서 생장 관찰함 (표 1-20d, 그림 1-16a, 그림1-16b, 그림1-17, 그림1-18a, 그림1-18b).

- B14 균주는 벼 유묘의 길이 생장 증진을 일으키지 않으며, 무처리와 비슷한 길이 생장을 보임. 하지만 뿌리 갈변 및 썩음 증상을 일으켰음. B20 균주는 B14 균주보다 벼 유묘의 길이를 1.5배 이상 증진시킴. 는 B20 균주가 지베렐린 (GA) 을 많이 생산하여 벼 유묘의 키 생장을 증진시키는 전형적인 벼키다리병 증상을 일으키는 균주임을 증명함. 반면 B14 균주는 GA 생성량이 상대적으로 미미하여 전형적인 키다리병 증상을 일으키지 않았음
- 벼 키다리 병원균 B14 균주의 무성포자 생성 조절 유전자 삭제 돌연변이체 균주의 병원성 실험 결과, 벼 유묘의 총 길이와 마디길이 기준으로 $\Delta FlibC$ 균주는 무처리구에 비해 약 1.3배의 길이 생장 증가 (\uparrow)을 일으키며, $\Delta FlibD$, $\Delta veIB$ 균주 접종 시 마디가 가늘어 질 뿐 아니라 마디 사이 길이가 5일 이후부터 급격히 증가하여 1.2배 ~ 1.5배의 길이 생장 증가(\uparrow)를 보임. 반면, $\Delta FlibE$, $\Delta FlibG$ 균주 접종 이후 벼 유묘의 길이는 무처리구에 비해 0.7배 수준이었음 (\downarrow)
- B14 균주의 접종 결과 벼 유묘의 뿌리 부위가 검게 변하는 증상을 보임. 반면, B14균주 유래 무성포자 생성 조절 유전자 삭제 돌연변이체 중 ΔveA , $\Delta brlA$ 균주 접종 시 뿌리 갈변 증상이 일어나지 않아 무처리 유묘와 비슷한 수준의 깨끗한 뿌리가 관찰됨. $\Delta veIB$ 균주 접종 시 유묘 뿌리의 갈변이 약간 진행되었으나 깨끗한 뿌리도 함께 보임. 아마도 곰팡이 균체 agar block 과 뿌리가 만나는 부분에서만 갈변 증상이 보인 것으로 추정됨
- B20 균주는 벼 유묘의 총 길이와 마디 사이 길이 생장의 뚜렷한 증가를 보일 뿐 아니라 뿌리의 갈변 증상도 일으킴. 무성포자 형성 유전자삭제 돌연변이체 균주 중 $\Delta brlA$ 균주 접종 시 B20 균주보다 1.2배 길이 생장 증가 (\uparrow)와 1.5 배 마디 사이 길이 생장 증가(\uparrow)가 관찰됨. 또한 $\Delta laeA$ 균주 접종의 경우, 총길이와 마디 사이 길이 생장이 B20 균주보다 1.2배 증가(\uparrow) 함. 반면, $\Delta FlibD$, ΔveA 균주는 총 길이와 마디 사이의 길이 생장이 무처리구에 비해 0.7배 수준이었음 (\downarrow). $\Delta FlibB$ 균주의 경우는 마디사이 길이생장이 무처리구에 비해 0.8배 수준이었음 (\downarrow).
- B20 균주의 접종 결과, B14 균주의 경우 보다 상대적으로 미미하나 어린 유묘의 갈변이 생길 뿐 아니라 줄기의 과도한 길이 생장으로 인하여 쉽게 줄기가 꺾임. 무성포자 생성 조절 유전자 삭제 돌연변이체 중 ΔveA 균주는 갈변 증상을 일으키지 않아 건강한 유묘 뿌리 상태를 보임. 한편, B20 균주의 경우와 달리 $\Delta brlA$ 균주는 벼 유묘 뿌리를 연한 갈색으로 변화시킴

표 1-19d. 접종 7일 후 유묘 길이 변화

gene	B14		B20		gene	B14		B20	
	총길이	마디길이	총길이	마디길이		총길이	마디길이	총길이	마디길이
$\Delta abaA$	12.3	6.3	22.4	11.8	$\Delta ftuG$	10.7	4.2	22.6	14.3
$\Delta brlA$	15.6	6.9	30.0	22.9	$\Delta laeA$	14.8	5.8	28.8	17.2
$\Delta flbA$	11.6	8.3	22.1	15.1	$\Delta sfgA$	16.2	6.8	21.7	14.6
$\Delta flbB$	11.6	5.9	22.7	9.5	ΔveA	16.4	7.4	16.7	7.8
$\Delta flbC$	19.9	10.2	22.3	14.4	$\Delta veIB$	18.2	8.6	27.4	16.2
$\Delta flbD$	15.5	7.3	16.7	6.7	$\Delta vosA$	15.1	6.3	22.6	14.5
$\Delta flbE$	12.4	4.1	17.8	12.3	$\Delta wetA$	15.4	5.7	25.0	15.7

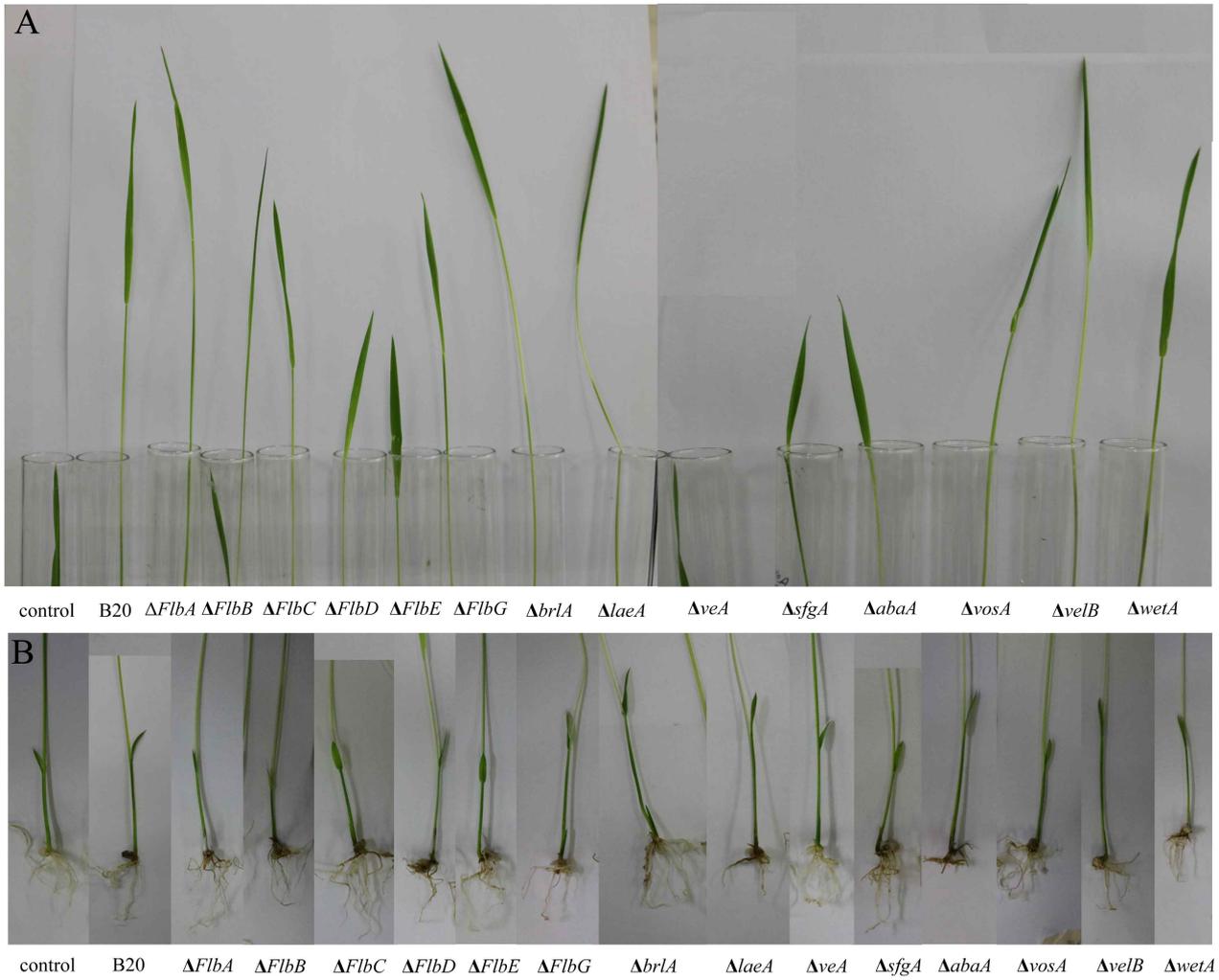


그림 1-16a. B20유래 유전자삭제 돌연변이체 어린 유묘(인공토양)

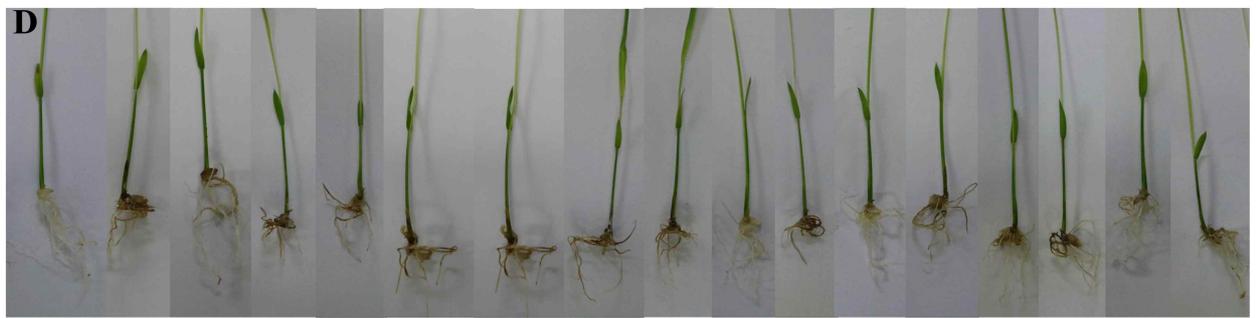


그림 1-16b. B14 균주 유래 유전자삭제 돌연변이체 어린 유묘(인공토양)

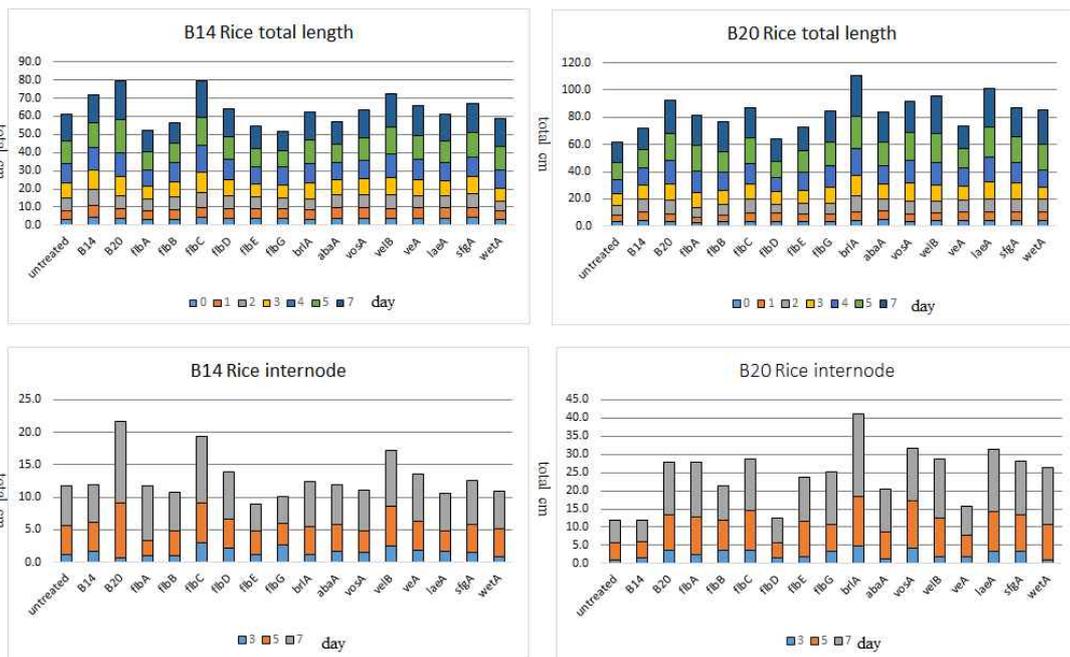


그림 1-17. 7일 동안 성장한 어린 벼 유묘를 사용하여 병 접종 후, 0일부터 7일 동안 매일 총 길이와 3일 5일 7일간 마디와 마디사이의 길이 측정 결과를 누적하여 나타냄

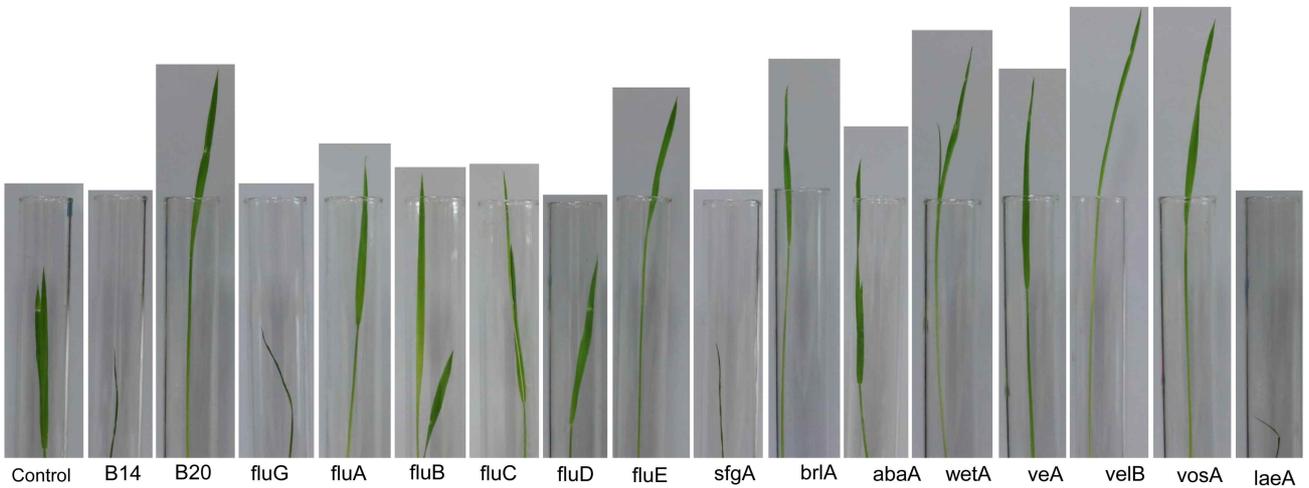


그림 1-18a. B20 균주 유래 유전자삭제 돌연변이체 어린 유묘(액체 배지)

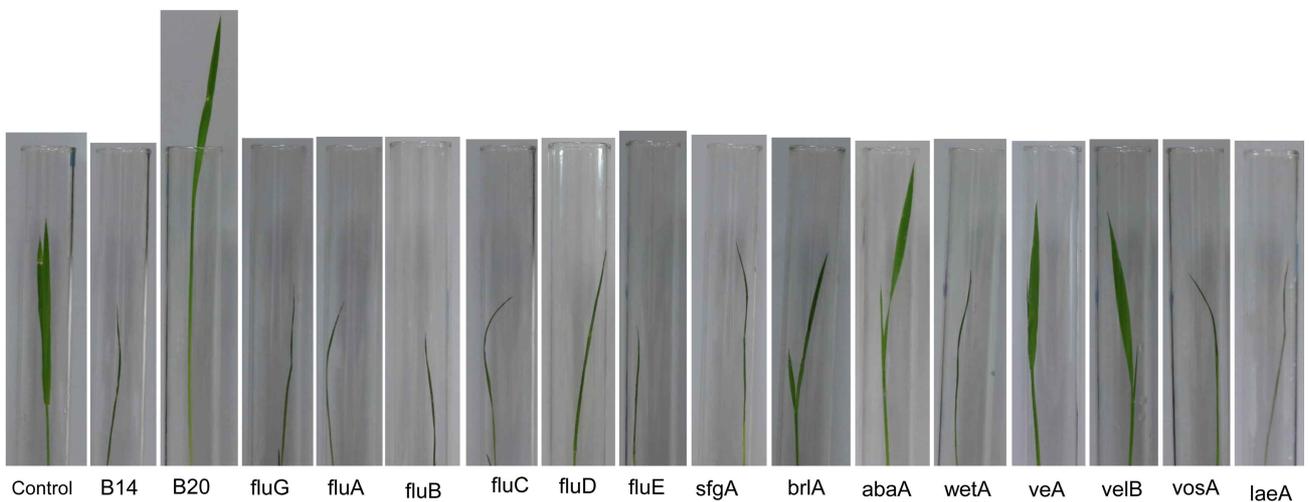


그림 1-18b. B14 균주 유래 유전자삭제 돌연변이체 어린 유묘(액체 배지)

2) 병 발생 단계 중 *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주 사이 포자형성 유전자의 기능 비교 분석

- B20 균주 유래 유전자삭제 돌연변이체의 병원성 표현형 변화 결과, *flbB*, *flbD*, *flbE*, *veA* 유전자는 B20 균주의 대표적인 병원성 메카니즘인 GA 생합성을 positive 하게 조절하는 것으로 추정됨 (activator 로서 역할). 특히 *flbD* 의 GA 생합성 경로 활성화는 매우 뚜렷하게 증명됨 (그림 1-19). 한편, *brlA*, *laeA*, *vosA* 유전자는 GA 생합성을 negative 하게 조절하는 것으로 추정됨 (repressor 로서 역할) (그림 1-15c). 특히 *brlA* 유전자는 *A. nidulans* 와 달리 *F. fujikuroi* B20 균주에서 포자형성에 큰 역할을 하지 않은 데 반해 GA 생합성 경로 조절에 중요한 역할을 하는 것이 증명됨. 또한 포자 형성에서도 중요한 역할을 하는 *flbB*, *flbD*, *flbE* 유전자는 GA 생합성 경로의 조절에도 깊이 관여하는 것이 밝혀짐
- B14 균주의 경우, *flbG* 와 *flbE* 는 GA 생합성 경로의 활성화, *flbC* 와 *velB* 는 GA 생합성 경로의 억제에 관여하는 것이 밝혀짐 (그림 1-19). 하지만 B14 균주의 미미한 GA 생성 수준을 고려할 경우, *flbG* 와 *velB* 의 역할이 보다 뚜렷할 것으로 추정됨. 한편, B14의 대표적인 병 발생 메카니즘인 뿌리 갈변 (썩음) 증상은 *brlA* 와 *veA* 에 의해 증진됨이 밝혀졌음
- B20 과 B14 균주 사이에서 병 발생 단계 중 유전자의 역할 차이가 뚜렷한 것은 *brlA* 임. B20 균

주에서 *brlA* 는 GA 생합성 억제를 통해 키다리 증상 억제에 관여하는 반면, B14 균주에서는 뿌리 갈변(썩음) 증상 발현을 활성화 시키기 때문에 병 발생 단계에서 *brlA* 의 기능은 두 균주 사이에서 반대로 작용함을 알 수 있음 (그림 1-19, 표 1-19e). 그 외 병원성에 관여하는 유전자는 두 균주에서 공통적인 기능하지 않음. 즉 특정 유전자가 한 균주에서 병원성에 관여할 경우, 다른 균주에서는 뚜렷한 역할을 하지 않음 (예: *fluG*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *veA*, *veIB*, *vosA*, *laeA*). 유일하게 두 균주에서 공통적으로 병원성에 관여하는 유전자는 *flbE* 임 (표 1-19e). 한편 global regulator 인 *veA* complex 구성 유전자도 GA 생합성이나 뿌리 갈변에 관여하나 그 역할은 두 균주 사이에서 뚜렷이 차이가 남. B20 균주에서 *veA* 는 GA 생합성을 증진시키며, 이는 *F. fujikuroi* 표준균주인 IMI58289에서 *veA* 에 의한 GA 생합성 유전자의 발현 증가를 뒷받침함. 이에 반해 B14 에서는 *veA* 가 GA 생합성 경로 조절 보다 뿌리 갈변에 보다 뚜렷이 관여함. 한편 B20 균주에서 *vosA* 와 *laeA* 는 *veA* 와 달리, GA 생합성을 억제하는 역할을 함. 하지만 이는 *F. fujikuroi* IMI58289에서 *laeA* 에 의한 GA 생합성 유전자의 발현 증가와 반대의 결과임 (표 1-19e)

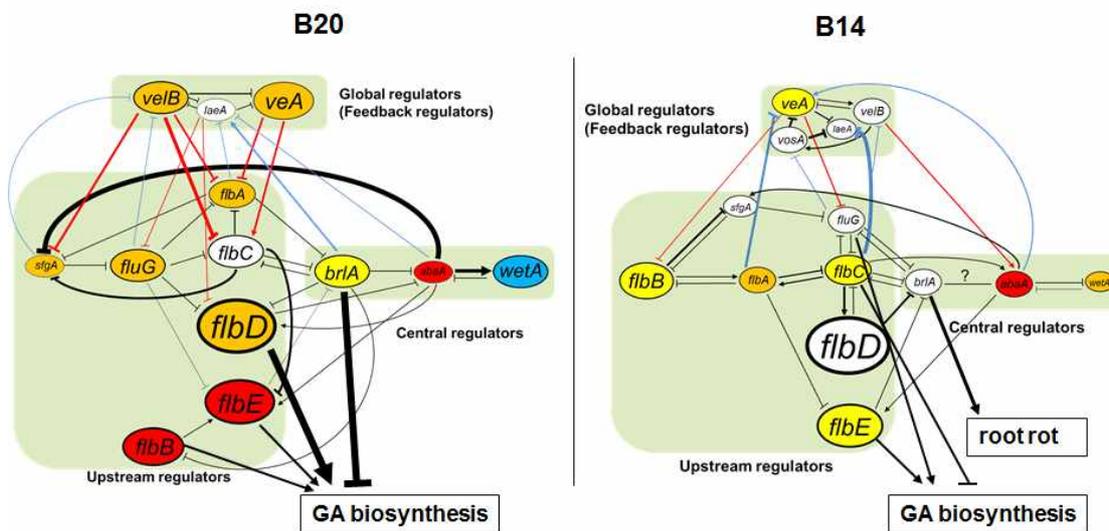


그림 1-19. *F. fujikuroi* B20 과 B14 균주의 무성포자 형성과 GA 생합성 경로 조절체계. 그림 1-19a 의 설명 참조.

표 1-19e. 유전자삭제 돌연변이체의 벼 키다리병 증상 비교 분석

gene	<i>F. fujikuroi</i> B20	<i>F. fujikuroi</i> B14	<i>F. fujikuroi</i> IMI58289*
<i>fluG</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: ↓ -뿌리갈변: NC	nd
<i>flbA</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>flbB</i>	-길이생장: ↓ -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>flbC</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: ↑↑ -뿌리갈변: NC	nd
<i>flbD</i>	-길이생장: ↓↓↓ -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>flbE</i>	-길이생장: ↓ -뿌리갈변: NC	-길이생장: ↓ -뿌리갈변: NC	nd
<i>sfgA</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>brlA</i>	-길이생장: ↑↑↑	-길이생장: NC	nd

	-뿌리갈변: ↑	-뿌리갈변: ↓↓	
<i>abaA</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>wetA</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>veA</i>	-길이생장: ↓ -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: ↓↓	gibberellin 생성: ↓
<i>velB</i>	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	-길이생장: ↑ -뿌리갈변: NC	nd
<i>vosA</i>	-길이생장: ↑ -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	nd
<i>laeA</i>	-길이생장: ↑ -뿌리갈변: NC	-길이생장: NC -뿌리갈변: NC	gibberellin 생성: ↓

NC: 해당 야생형 (WT) 균주 접종 결과와 비교하여 변화 없음

↓ 또는 ↑: 해당 WT 균주 접종 결과와 비교하여 감소 또는 증가

*from Wiemann et al (2010) Mol. Microbiol. 77: 972 - 994.

□ 벼 키다리균의 두 가지 병원형 대표균주의 이차대사산물 생합성 관련 유전자의 기능분석

○ 발병 과정 중 주요 이차대사산물 생합성 유전자군 (gene cluster) 의 발현 양상 분석

- B14, B20 균주를 벼 유묘에 접종한 후 3 일, 6 일 후 각각 식물체로부터 total RNA 를 추출하여 전사체 해독을 수행하였음. 전사체 중 7 종의 이차대사산물 생합성 유전자군의 발현 양상을 감자한천배지 위 영양생장 단계의 전사체와 비교 분석하였음 (표1-20)
- Gibberellin 생합성 유전자군: B20 균주의 경우, 생육 시기 (영양생장, 발병 단계)에 관계 없이 상시 발현되었으나, B14 균주의 경우 발병 단계 특이 양상을 보였음 (즉 영양생장단계 발현양보다 발병 3일차, 6일차의 발현양이 크게 증가하였음)
- Fusaric acid 생합성 유전자군: B14 와 B20 균주 사이 발현 양상의 차이는 크게 없었으며, 발병 3 일차의 발현 수준이 나머지사기에 비해 높았음
- Fumonisin 생합성 유전자군: B20 균주의 경우, 유전자군 소속 6 종 유전자가 유전체 내 존재하지 않았음. 또한 나머지 유전자군의 발현양도 B14 에 비해 매우 미미하였음 (거의 발현이 되지 않은 수준). 하지만 B14 의 경우, 유전자군에 속하는 모든 유전자가 존재하였을 뿐 아니라 발현 양도 생육 시기에 상관없이 B20 에 비해 매우 높았음
- Apicidin F 생합성 유전자군: B14 균주의 경우, 유전자군 소속 유전자 대부분이 유전체에 존재하지 않음. 하지만 B20 의 경우, 모든 유전자가 존재할 뿐 아니라 발현 양상은 초기 발병 단계 (3 일차) 에 특이적이었음
- *PKS51* 생합성 유전자군: 아직 산물이 동정되지 않은 *PKS51* 생합성 유전자군은 오직 B14 균주의 유전체에만 존재하였음. 모든 유전자는 생육 시기와 관계없이 상시 발현되었음
- Fusarin C 생합성 유전자군: B14 의 경우, 유전자의 발현 수준이 미미하였으나, B20 의 경우 발병 6일차 특이적 발현양상을 보였음
- Beauvericin 생합성 유전자군: B14 와 B20 균주에서 모두 발현되었으며, 영양생장 단계에서 발현 수준이 발병 단계 보다 높았음
- 위와 같은 발현 분석 결과, B14 에서는 fumonisin 와 *PKS51* 생합성 유전자군이, B20 에서는 apicidin F 와 fusarin C 생합성 유전자군이 특이적으로 발현되었음. 이를 통해 B14 균주가 일으키는 stunting type 의 병징은 최소한 fumonisin 과 *PKS51* 의 생합성과 관련이 있을

것으로 추정할 수 있음

표 1-20. 벼 발병 과정 중 주요 이차대사 산물 생합성 유전자의 발현양

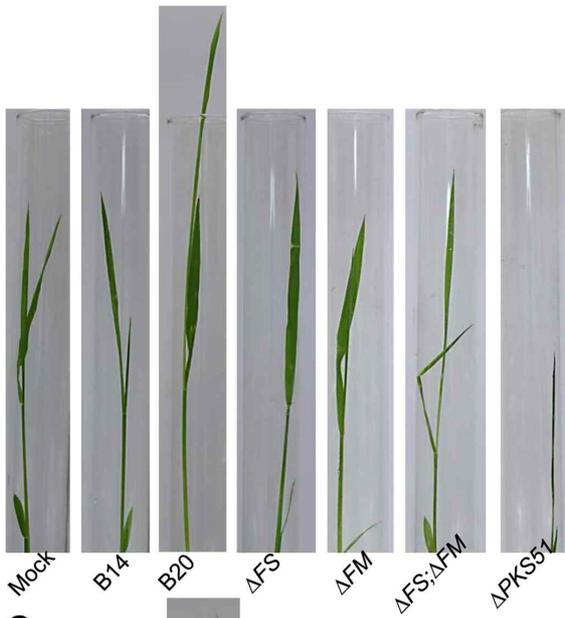
Metabolite	Gene	B14 gene	B20 gene	FPKM(B14)			FPKM(B20)		
				PDB	3 dpi	6 dpi	PDB	3 dpi	6 dpi
Gibberellins	C13-oxidase	FFB14_03130	FFB20_09260	1.1	36	69.2	213.2	277.7	342.7
	kaurensynthase	FFB14_03131	FFB20_09261	9.6	177.2	375.8	948	953.6	428.7
	GGPP-synthase	FFB14_03132	FFB20_09262	22.3	512	1,435.30	2,407.60	2,515.10	1,316.60
	C20-oxidase	FFB14_03133	FFB20_09263	53.2	325.1	956.1	1,064.60	1,395.40	1,376.10
	GA14-synthase	FFB14_03134	FFB20_09264	15.7	517.8	1,576.10	2,034.70	3,223.30	3,406.20
	kaurenoxidase	FFB14_03135	FFB20_09265	9.4	193.9	699.4	728.1	1,023.90	852.4
	GA4-desaturase	FFB14_03136	FFB20_09266	21.9	657	1,861.40	1,388.40	3,304.70	3,800.50
Fusaric acid	<i>FUB12</i>	FFB14_01637	FFB20_13390	725.4	459.3	24.6	1,500.5	1,847.7	432.8
	<i>FUB11</i>	FFB14_01636	FFB20_13389	483.6	85.5	19.9	1,500.5	1,847.7	432.8
	<i>FUB10</i>	FFB14_01638	FFB20_13391	94.7	90.5	4.9	249.2	435.8	117.8
	<i>FUB9</i>	FFB14_01639	FFB20_13392	163.0	862.0	16.1	419.0	947.5	159.7
	<i>FUB8</i>	FFB14_01640	FFB20_13393	63.7	295.2	12.3	115.5	196.5	33.7
	<i>FUB7</i>	FFB14_01641	FFB20_13394	362.9	2090.3	50.6	888.0	3,081.8	414.6
	<i>FUB6</i>	FFB14_01642	FFB20_13395	224.5	1324.1	46.5	487.5	1,634.8	181.5
	<i>FUB5</i>	FFB14_01647	FFB20_13400	51.2	461.7	10.6	152.9	718.9	52.6
	<i>FUB4</i>	FFB14_01648	FFB20_13401	175	1,206.80	27.5	620.8	2,352.40	164.9
	<i>FUB3</i>	FFB14_01649	FFB20_13402	41.7	340.3	4.1	108.8	672.5	67.6
	<i>FUB2</i>	FFB14_01650	FFB20_13403	150.2	1,756.90	13.3	822.7	3,469.10	820.4
	<i>FUB1(PKS6)</i>	FFB14_01651	FFB20_13404	94.6	301.3	5.8	128	286.2	18
Fumonisin	<i>FUM16</i>	FFB14_08429	-	114.3	130.2	428.6	-	-	-
	<i>FUM15</i>	FFB14_08430	-	74.2	51.5	333.4	-	-	-
	<i>FUM14</i>	FFB14_08431	-	166.9	118.6	576.2	-	-	-
	<i>FUM13</i>	FFB14_08432	-	73.7	81.4	315.5	-	-	-
	<i>FUM21</i>	FFB14_08433	-	133.8	79	407.5	-	-	-
	<i>FUM11</i>	FFB14_08434	-	85.6	91.6	229.6	-	-	-
	<i>FUM10</i>	FFB14_08435	FFB20_01979	383.5	177.8	728.2	0	0	0
	<i>FUM3</i>	FFB14_08436	FFB20_01980	268.2	162.2	879.4	0	0	0
	<i>FUM8</i>	FFB14_08437	FFB20_01981	203.2	127.1	459.1	0	0.4	0.3
	<i>FUM7</i>	FFB14_08438	FFB20_01982	249.4	143.5	964	0.7	0	0.1
	<i>FUM6</i>	FFB14_08439	FFB20_01983	134.6	77.8	271.8	0	0	0.1
	<i>FUM1(PKS11)</i>	FFB14_08440	FFB20_01984	112.1	62.1	296.4	0	0.3	0.3
	<i>FUM21</i>	FFB14_08441	FFB20_01985	140.5	96.5	95.3	34	86.3	74.6
Apicidin F	<i>APF1(NRPS31)</i>	-	FFB20_12133	-	-	-	0	2.6	0.8
	<i>APF11</i>	FFB14_11346	FFB20_12134	2.5	0	0	32.5	50.6	24.8
	<i>APF9</i>	-	FFB20_12135	-	-	-	0.5	497.1	110
	<i>APF8</i>	-	FFB20_12136	-	-	-	0	139	42.8
	<i>APF7</i>	-	FFB20_12137	-	-	-	0	104.8	43.7
	<i>APF6</i>	-	FFB20_12138	-	-	-	0.4	45.4	15
	<i>APF12</i>	-	FFB20_12139	-	-	-	0	16.5	3.6
	<i>APF5</i>	-	FFB20_12140	-	-	-	0.3	15.9	2.2
	<i>APF4</i>	-	FFB20_12141	-	-	-	9.4	262	44.2
	<i>APF2</i>	-	FFB20_12142	-	-	-	0.4	13.1	4.5
<i>APF3</i>	-	FFB20_12143	-	-	-	2.6	19.7	25	
unknown		FFB14_06367	-	142.1	36	314.9	-	-	-
		FFB14_06368	-	495.4	62.4	494.9	-	-	-
		FFB14_06369	-	1,202.4	168.6	2,393.1	-	-	-
		FFB14_06370	-	1,553.8	212.4	2,227.6	-	-	-
		FFB14_06371	-	894.9	139.2	1,464.1	-	-	-
	<i>PKS51</i>	FFB14_06372	-	82.4	10.1	135.2	-	-	-
		FFB14_06373	-	475.7	31.2	907.4	-	-	-
		FFB14_06374	-	190.4	19.8	361.6	-	-	-
	FFB14_06375	-	1,794.2	181	4,446.4	-	-	-	
Fusarin C	<i>FUS1(PKS10)</i>	FFB14_07606	FFB20_08594	0.1	0.2	0.0	2.5	1.0	16.8
	<i>FUS2</i>	FFB14_07607	FFB20_08595	2.6	2.1	0.0	53.4	28.2	227.8
	<i>FUS3</i>	FFB14_07608	FFB20_08597	1.9	9.3	0.0	97.7	83.1	417.9
	<i>FUS4</i>	FFB14_07609	FFB20_08598	0.6	0.0	0.0	2.6	0.6	9.4

	<i>FUS5</i>	FFB14_07610	FFB20_08599	2.8	5.0	0.0	38.5	13.8	227.3
	<i>FUS6</i>	FFB14_07611	FFB20_08600	6.6	2.3	0.0	81.4	18.6	184.6
	<i>FUS7</i>	FFB14_07612	FFB20_08601	0.2	1.3	0.0	34.6	21.5	179.1
	<i>FUS8</i>	FFB14_07613	FFB20_08602	3.0	3.6	0.4	56.7	27.0	226.8
	<i>FUS9</i>	FFB14_07614	FFB20_08603	0.3	0.0	0.0	14.2	4.7	138.9
Beauvericin	<i>BEA1(NRPS22)</i>	FFB14_08385	FFB20_01939	12.9	2.0	1.0	196.1	35.2	5.6
	<i>BEA2</i>	FFB14_08386	FFB20_01940	17.0	7.2	2.7	216.5	64.2	5.6
	<i>BEA3</i>	FFB14_08387	FFB20_01941	111.6	13.3	5.3	457.0	95.9	23.9

○ 벼 키다리 병원균의 대표적 이차대사산물인 fusaric acid, fumonisin, gibberellin(GA), apicidin F 의 병원성 관련 기능 분석

- 벼 키다리병의 마름병징 (stunting type) 을 일으키는 대표 균주인 B14 균주를 대상으로 이들 이차 대사산물의 생합성과 stunting 병징 발현의 연관 여부를 분석하기 위하여 fusaric acid 생합성 polyketide 유전자 (*FUB1; PKS6*)와 fumonisin 생합성 polyketide 유전자 (*FUM1; PKS1*), 아직 산물이 알려지지 않은 *PKS51* 유전자를 각각 또는 동시에 함께 삭제한 돌연변이체를 제작함. 전형적인 키다리병원균인 B20 균주에서도 *PKS51* 유전자를 제외한 동일한 유전자와 apicidin 생합성 NRPS 유전자 (*NRPS31*) 를 같은 방식으로 삭제함
- 어린 유묘를 대상으로 병원성 실험을 수행한 결과, B14 의 fusaric acid 생합성 유전자삭제 돌연변이체 (ΔFS) 와 fumonisin 생합성 유전자삭제 돌연변이체 (ΔFM) 를 접종한 유묘에서는 마름병징의 발현이 1 -2 일정도 지연됨을 확인할 수 있었음. 또한 두 유전자가 동시에 삭제된 돌연변이체인 $\Delta FS;\Delta FM$ 균주를 접종하였을 경우에도 마름 병징의 발현이 1-2 일정도 지연되었음. 한편 *PKS51* 유전자 삭제돌연변이체인 $\Delta PK51$ 균주를 접종하였을 경우, 야생형 B14 균주 접종경우 보다 일찍 마름병 증상이 나타났음 (그림 1-20)

A
5 dpi



B
7 dpi



C
9 dpi



D
9 dpi

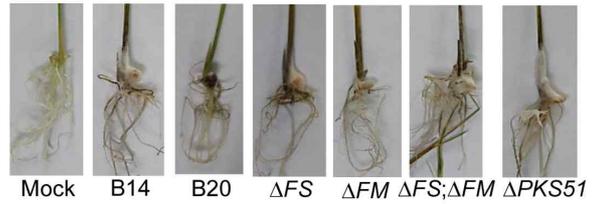


그림 1-20. B14 균주의 이차대사 관련 유전자 삭제 돌연변이체의 병원성.

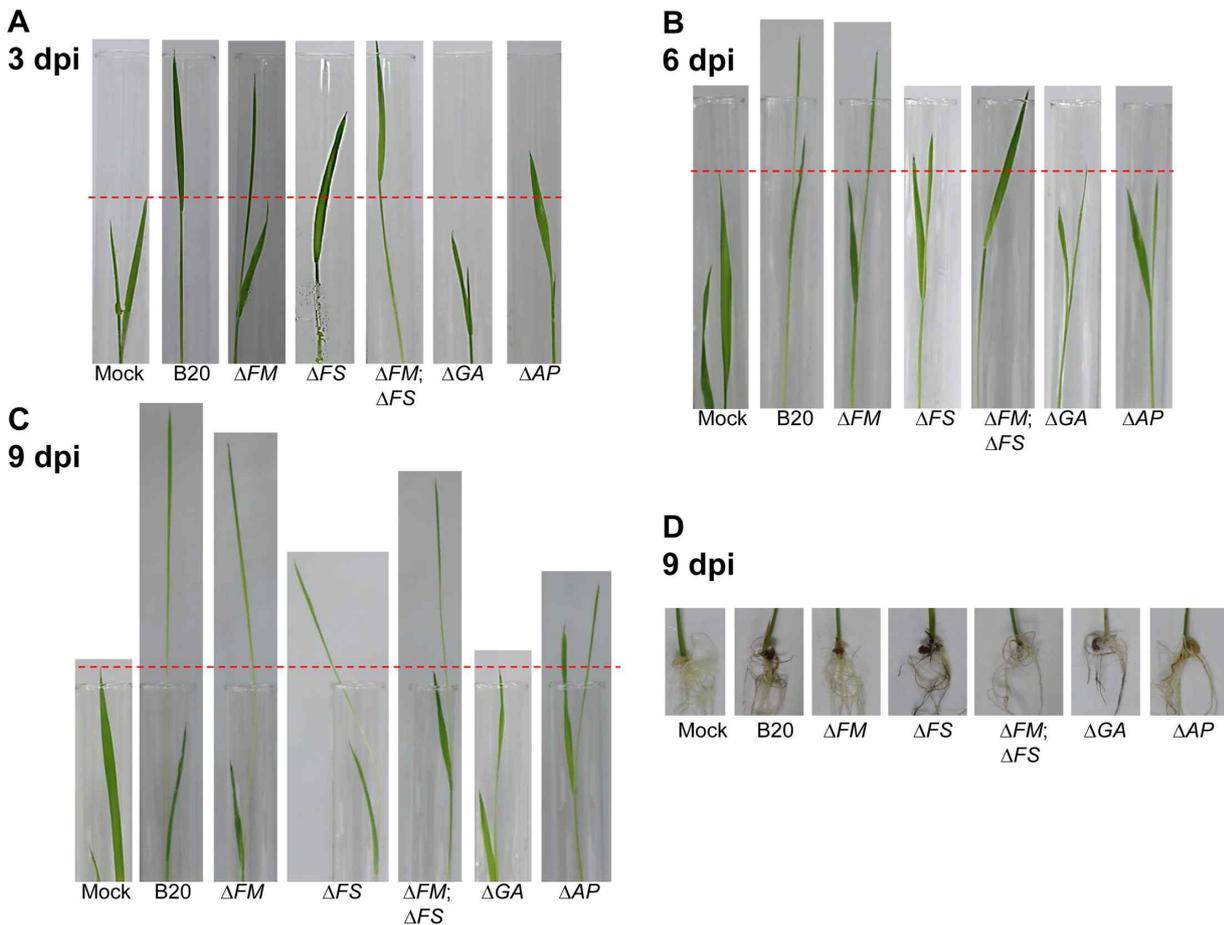


그림 1-21. B20 균주의 이차대사 관련 유전자 삭제 돌연변이체의 병원성.

- 벼 키다리병균 B20 균주를 대상으로 앞서 언급한 해당 유전자 삭제돌연변이체를 제작하여 벼 유묘에서 병원성 검정을 수행하였음. B14의 경우와 달리 모든 유전자 삭제 돌연변이체는 야생형 B20 균주와 마찬가지로 유묘에 전형적인 키다리 병징 (elongation) 을 유발하여 병원성의 차이를 보이지 않았음 (그림 1-21). 단지 지벨렐린 생합성 유전자 삭제 돌연변이체인 ΔGA 균주를 접종한 경우, 키다리 병징이 나타나지 않았음 (그림 1-21). 하지만 B20 균주의 유전체에만 존재하는 apicidin F 생합성 유전자군의 key enzyme 유전자인 *NRPS31* 을 삭제한 돌연변이체의 경우, 야생형 B20 균주와 달리 벼 유묘에 stunting type 의 병징을 유발하였음

○ B14 와 B20 균주 사이 병 발생 메커니즘 조절 비교

- 위에서 언급한 무성포자 생성 경로 조절 유전자와 이차대사 산물 생합성 유전자의 삭제돌연변이체를 이용한 병원성 실험 결과, 발병 단계 중 균주 사이 이차대사 생합성 조절 변이가 벼 키다리병균 병원형 변이 (stunting type, elongation type)의 주요 원인이라고 추정할 수 있음
- 마름 병징형 B14 균주의 경우, 벼 식물체 안에서 gibberellin 생성량 수준 (생합성 유전자 발

현 수준 포함)은 elongation type B20 균주에 비해 매우 낮은 반면, fumonisin 의 생성량 및 유전자 발현 수준은 매우 높았음. 또한 fumonisin 생합성 유전자 삭제돌연변이체의 병원성 감소 (마름 병징의 발현 지연) 를 통해 fumonisin 생합성은 B14 균주의 마름 병징 발현에 중요한 역할을 한다는 점이 밝혀짐. 하지만 fusaric acid 생합성 유전자 삭제돌연변이체의 병원성 감소를 통하여 마름 병징 발현에 fumonisin 외 fusaric acid 와 그 밖의 다른 요인이 더 작용한다고 추정할 수 있음. 한편 PKS51 삭제돌연변이체의 병원성 증가 (마름 병징의 조기 발현)를 통해 PKS51 이 마름 병징 발현의 negative regulator 로 작용할 가능성이 제기됨

- 이와 함께 무성포자 생성 조절 체계에 관여하는 전사조절인자인 *brlA*, *abaA* 와 global regulator 인 *veA*, *velB* 유전자의 삭제돌연변이체가 보인 병원성 감소를 통해 이들 인자들이 마름 병징의 발현 또는 fumonisin 과 fusaric acid 의 생합성을 활성화 시키는 역할을 할 것으로 예상됨
- 전형적인 키다리 증상을 보이는 B20 균주의 경우, gibberellin 생합성 유전자군의 상시 발현 과 fumonisin 생합성 유전자군의 미발현이 키다리 병징 발현에 가장 중요한 요인으로 추정할 수 있음. 단지 B20 균주 특이적 apicidin F 이 B20 균주에서 마름 병징 발현 억제 역할을 하는 지에 대해서 추가적인 검정이 필요함. 하지만 이와 관련하여 무성포자 생성 경로 전사조절인자인 *fluG*, *sfgA* 와 이차대사의 global regulator 인 *laeA* 유전자의 삭제돌연변이체가 마름 병징을 일으킨 결과는 이들 인자가 apicidin F 와 더불어 B20 균주에서 마름 병징 관련 요인 (fumonisin, fusaric acid) 을 억제한다는 가능성을 뒷받침 함. 한편 또 다른 전사조절인자인 *fluD* 의 삭제 돌연변이체의 병원성 감소 (키다리 병징 소멸)는 *fluD* 가 gibberellin 생합성을 활성화 시키는 역할을 한다는 추론을 뒷받침 함

□ 벼 키다리병균의 병원형 [줄기마름형(stunting)과 키다리형(elongation)] 구분 분자 마커의 개발

- 벼 키다리 발병 양상은 벼 생육 단계 별로 다양하게 나타남. 육묘과정에서 발병하여 고사하거나 육안으로 구분이 안 될 정도로 약하게 감염된 건전 묘가 본답 이양으로 이동된 후 조기 고사하거나, 모판에서 중간 정도로 감염된 종자로부터 전형적인 키다리병 증상 등이 나타남. 또한 육묘 시기 조기 고사를 하지 않더라도 본답 이양 후 출수가 되지 않고 말라 죽거나, 출수가 되더라도 여물지 않는 이삭이 발생함.
- 이러한 증상은 식물체 내 벼 키다리병균의 gibberellin 생산에 의해 발생하는 키다리 병징 과 직접 관련이 있음. 하지만 벼 키다리병균의 감염에 의한 증상 중 육묘나 성체식물의 키다리 증상 뿐 아니라 육묘의 키가 오히려 작아지고 말라 죽는 마름병 증상도 빈번히 발생함. 그러나 이러한 마름병 증상은 육묘 시기 발병하지 않을 경우 성체 시기까지 뚜렷한 병징으로 진전되지 않는 경우가 있거나, 간혹 벼 밑둥이 썩는 증상 (foot rot) 으로 진전됨.
- 두 가지 벼 병원형의 벼 키다리병균을 대상으로 수행한 유전체 해독과 벼 발병 단계 전사체 해독을 통해 B14 균주와 B20 균주의 유전체에만 각각 존재하여 발현되는 *PKS51* 유전자와 *NRPS31* 유전자 (apicidin F 생합성) 의 염기서열을 이용하여 벼 키다리병균의 감염 여부 뿐 아니라 병원형 구분 및 병 진전 양상을 신속 정확하게 예측할 수 있는 분자 마커를 개발함

○ 벼 키다리병균 집단을 대상으로 병원형 동정 및 계통발생학 분석

- 2012년부터 2016년까지 논 재배지역 공기 중과 벼 잔재물로부터 분리한 총 140 주의 벼 키다리병균 집단을 대상으로 분자 마커를 이용하여 병원형을 동정하고, 그 중 일부의 병원성을 검증함
- 병원성 실험 결과, B14 균주와 같은 마름 병징을 보이는 9 균주와 B20 균주와 같은 키다리 병징을 보이는 6 균주를 추가로 확보함 (그림 1-22A). 또한 이들 균주로부터 *TEF1* 과 *RPB2* 유전자의 염기서열을 확보하여 계통수를 작성한 결과, 두 병원형에 속하는 균주는 예외 없이 계통수 내 서로 다른 subclade 에 속하였음 (그림 1-22B)
- 한편, *PKS51* 과 *NRPS31* 유전자 유래 primer 를 이용한 PCR 결과, B14 균주와 같은 마름 병징을 보인 9 균주는 모두 B14 와 같은 증폭 양상 (*PKS51* 만 증폭)을 보였으며, B20 균주와 같은 키다리 병징을 보인 6 균주 모두 B20 과 같은 증폭 양상 (*NRPS31* 유전자만 증폭)을 보였음 (그림 1-22C).
- 또한 나머지 야생형 균주 집단을 대상으로 병원성 실험 없이 분자마커만을 이용한 PCR 증폭 결과, 각각의 병원형을 구분할 수 있었으며, 이들의 계통수도 이러한 병원형 구분을 예외 없이 뒷받침하였음 (그림 1-23B). 한편, 마름 병징 (stunting type) 병원형 균주는 벼 낱알 유래 균주집단의 약 65%, 벼 재배지역 공기 유래 균주집단의 80%, 옥수수 유래 균주집단의 100% 을 차지하여 우리나라 분포 벼 키다리병균 집단 중 우점을 차지하고 있음 (표 X)

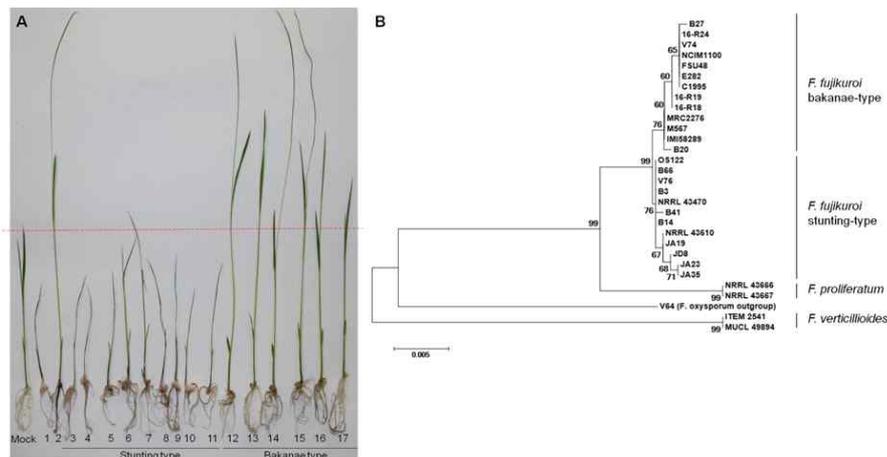


그림 1-22. 벼 키다리병균 집단의 병원성 검증 및 계통발생학 분석. A: 벼 유묘에서 병원성 검증. B: 병원성 검증 균주의 계통수.

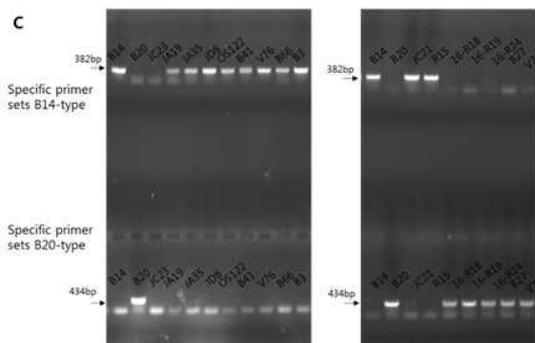


그림 1-22C. 벼 키다리병균 병원형 구분 PCR 증폭.

표 1-21. 기주 별 벼 키다리병균 집단의 병원형 분포 양상

Year	Origin	Pathotype	# of isolate	Year	Origin	Pathotype	# of isolate
2009	rice	stunting	23	2010	rice	stunting	15
		elongation	10			elongation	7
		unknown	6			unknown	7
	corn	stunting	16		corn	stunting	10
		elongation	0			elongation	0
		unknown	0			unknown	0
Year	Origin	Pathotype	# of isolate	Year	Origin	Pathotype	# of isolate
2014	air	stunting	2	2015	air	stunting	4
		elongation	0			elongation	0
		unknown	4			unknown	3
Year	Origin	Pathotype	# of isolate				
2016	air	stunting	33				
		elongation	7				
		unknown	4				

*unknown: PCR amplification of neither bands nor both bands

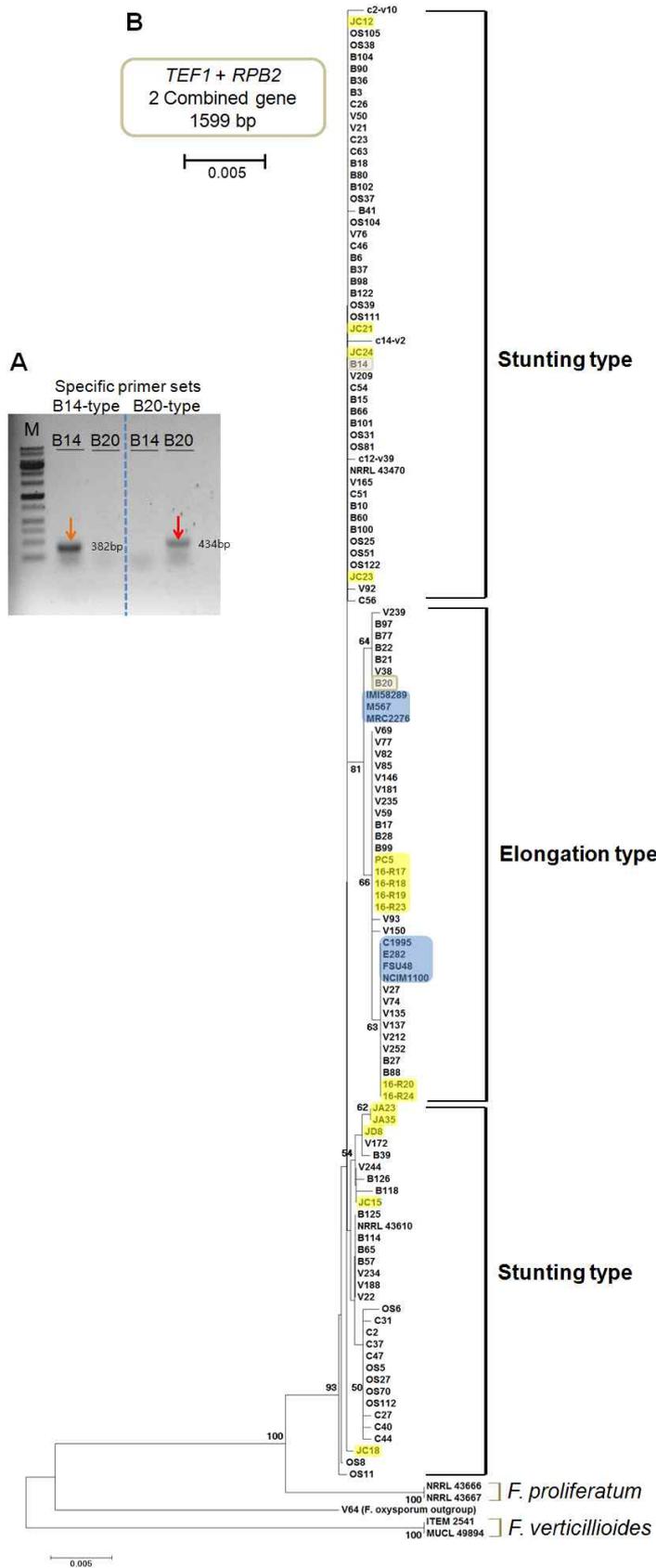


그림 1-23. 분자 마커를 이용한 벼 키다리병균 야생형 집단의 병원형 구분 (A) 과 계통수 분석 (B).

○ 벼 키다리병균의 줄기마름증상을 나타내는 B14 균주의 병원성 관련 유전자의 기능분석

표 1-22. *F. fujikuroi* B14 균주 병 발생단계 전사체 분석 중 발현 높은 선발된 유전자

number	B14 gene	B14PDA4	B14P3	B14P6	description
1	FFB14_10648	0	16.8	31.1	related to alpha-N-arabinofuranosidase / alpha-L-arabinofuranosidase
2	FFB14_10277	27.2	745.4	838.1	related to myo-inositol transport protein ITR1
3	FFB14_11191	0	26	417.5	related to cellulose binding protein CEL1
4	FFB14_12518	0	73.4	302.4	probable putative endoglucanase type F
5	FFB14_09847	0	51.6	350.8	probable cellulose 1,4-beta-cellobiosidase II precursor
6	FFB14_09646	5.6	202	402.4	related to alpha-glucosidase b
7	FFB14_07324	2.2	73.8	91.6	related to sulfatase
8	FFB14_00037	0	3.6	13.1	related to HNMI-Choline permease
9	FFB14_05138	0	0	46.4	uncharacterized protein
10	FFB14_15791	4.2	21.5	151.3	related to nicotinamide mononucleotide permease
11	FFB14_09998	1.6	33.1	127.6	related to integral membrane protein PTH11
12	FFB14_12673	0	0	21.1	related to allantoate permease
13	FFB14_10571	1.6	18.4	164.5	related to monooxygenase
14	FFB14_07149	2.5	3.6	108.7	related beta-lactamase
15	FFB14_04817	0.9	8.3	36	related to transcriptional activator acu-15
16	FFB14_00042	0	0	48.5	related to GDP-mannose 4,6-dehydratase
17	FFB14_10297	3.4	75.5	325.2	related to integral membrane protein PTH11
18	FFB14_08444	3.5	103.9	2138.8	probable alpha-glucosidase (maltase)
19	FFB14_12659	79.6	10.5	4724.1	related to 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase
20	FFB14_08409	3.6	24.7	5844	related to Y.lipolytica GPR1 protein and Fun34p
21	FFB14_04679	12.8	3028.9	1773.7	probable aspartic proteinase precursor
22	FFB14_15114	1.5	311.8	632.6	probable PGU1-Endo-polygalacturonase
23	FFB14_06191	0.9	617.3	23.2	uncharacterized protein
24	FFB14_09842	0.3	396	813	probable endo-1,4-beta-xylanase A precursor
25	FFB14_11450	30.6	361.9	118.5	uncharacterized protein
26	FFB14_08715	0	240.1	24.6	uncharacterized protein
27	FFB14_13306	12.7	191.5	0	uncharacterized protein
28	FFB14_03126	3.9	191	124.8	related to phosphoglycerate mutase family protein
29	FFB14_11480	3.1	188.9	31	related to lipoxygenase 1
30	FFB14_05971	16.1	184.5	76.1	uncharacterized protein
31	FFB14_07649	1.6	158.2	66.5	uncharacterized protein
32	FFB14_10117	0.7	156.3	392.1	related to acid beta-fructofuranosidase precursor
33	FFB14_06510	2	148.6	288.2	related to alpha-galactosidase precursor
34	FFB14_01702	0.3	140.6	214.5	related to fumarylacetoacetate hydrolase
35	FFB14_12410	1.9	137.7	51.8	probable scytalone dehydratase
36	FFB14_09927	20.9	135.6	45.5	probable autophagy protein (Atg22)
37	FFB14_07650	0.2	134.5	34.7	uncharacterized protein
38	FFB14_04333	4.5	132	31.9	related to aquaporin
39	FFB14_08720	3.5	126.4	39.6	related to proteoglycan
40	FFB14_06231	0.4	116	1103.3	related to Ammonium transporter 2
41	FFB14_12527	14	115.9	215.6	related to acetyltransferase
42	FFB14_01959	11.9	112.6	141.1	related to NADH oxidase
43	FFB14_05933	1.2	106.8	95.7	uncharacterized protein

44	FFB14_01669	0.3	99.8	163.1	probable gentisate 1,2-dioxygenase oxidoreductase
45	FFB14_00072	3.3	90.5	17	related to amidase family protein
46	FFB14_12133	4.1	88	19	uncharacterized protein
47	FFB14_09886	1.9	79.7	64.8	uncharacterized protein
48	FFB14_01441	0.5	78.9	28.7	uncharacterized protein
49	FFB14_12099	0.8	78.1	254.4	related to esterase D
50	FFB14_00631	21.4	76.6	92.4	related to multidrug resistance protein
51	FFB14_07653	0.5	76.4	22.3	uncharacterized protein
52	FFB14_06278	3.2	75	21.8	related to GTT1-glutathione S-transferase
53	FFB14_04799	9.2	74.7	94.1	probable L-amino-acid oxidase
54	FFB14_07651	0.1	73.9	31.8	uncharacterized protein
55	FFB14_09649	1	73.7	185.6	uncharacterized protein
56	FFB14_01848	0.4	73.6	61.4	uncharacterized protein
57	FFB14_00158	6.5	71.7	37.1	probable pectin lyase precursor
58	FFB14_00260	18.5	71.5	24.1	related to aminopeptidase Y precursor, vacuolar
59	FFB14_08717	2.8	71.5	106.4	uncharacterized protein
60	FFB14_11620	5.7	70.8	10	uncharacterized protein
61	FFB14_12086	0.6	70.5	122.2	Endo-1,4-beta-xylanase A
62	FFB14_15592	3.7	70	190.6	uncharacterized protein
63	FFB14_12102	6.1	68.6	48.6	related to L-sorbose dehydrogenase
* <i>F. fujikuroi</i> B14 균주를 감자한천배지(PDA)에 4일 배양과 개화한 벼에 병원균 접종 후 3일(P3), 6일(P6)					

- 벼 키다리병 마름증상을 나타내는 B14 균주를 이용하여 병 발생 단계에서 전사체 분석 결과 발현이 높게 유지되는 유전자 집단을 선발함(표1-22).
- 각 유전자를 Double join PCR 방법을 사용하여 geneticin 항생제 마커로 치환하여 돌연변이체를 제작함. 모든 형질전환체는 PDA 배지에 배양 후, 균사 생장과 무성포자생성을 야생형과 비교하여 차이가 없음을 확인함.
- 제작한 돌연변이체는 5일간 발아하여 뿌리를 내린 어린 벼에 무성포자를 1×10^5 농도로 접종하여 7일간 관찰 후 사진촬영과 관찰 기록함.
- 어린 유묘를 대상으로 병원성 실험을 수행한 결과, 60개 유전자 삭제 돌연변이체는 B14 균주와 마찬가지로 줄기마름 병징 (stunting type)을 보이고 뿌리 갈변 및 썩음 증상이 나타남(그림1-24a, 그림1-24b).
- 야생형과 다른 증상을 보이는 3 유전자로서 FFB14_15791 삭제 돌연변이체는 야생형과 유사하나 오히려 키다리 병징 (elongation type)이 나타났으며, FFB14_04817 삭제 돌연변이체는 마름 병징이 덜하여 줄기의 녹색부분이 관찰되었고, FFB14_09927 삭제 돌연변이체는 뿌리에 생성된 공중 균사량이 적고 마름 병징이 덜한 것을 확인할 수 있었음(그림 1-24b).

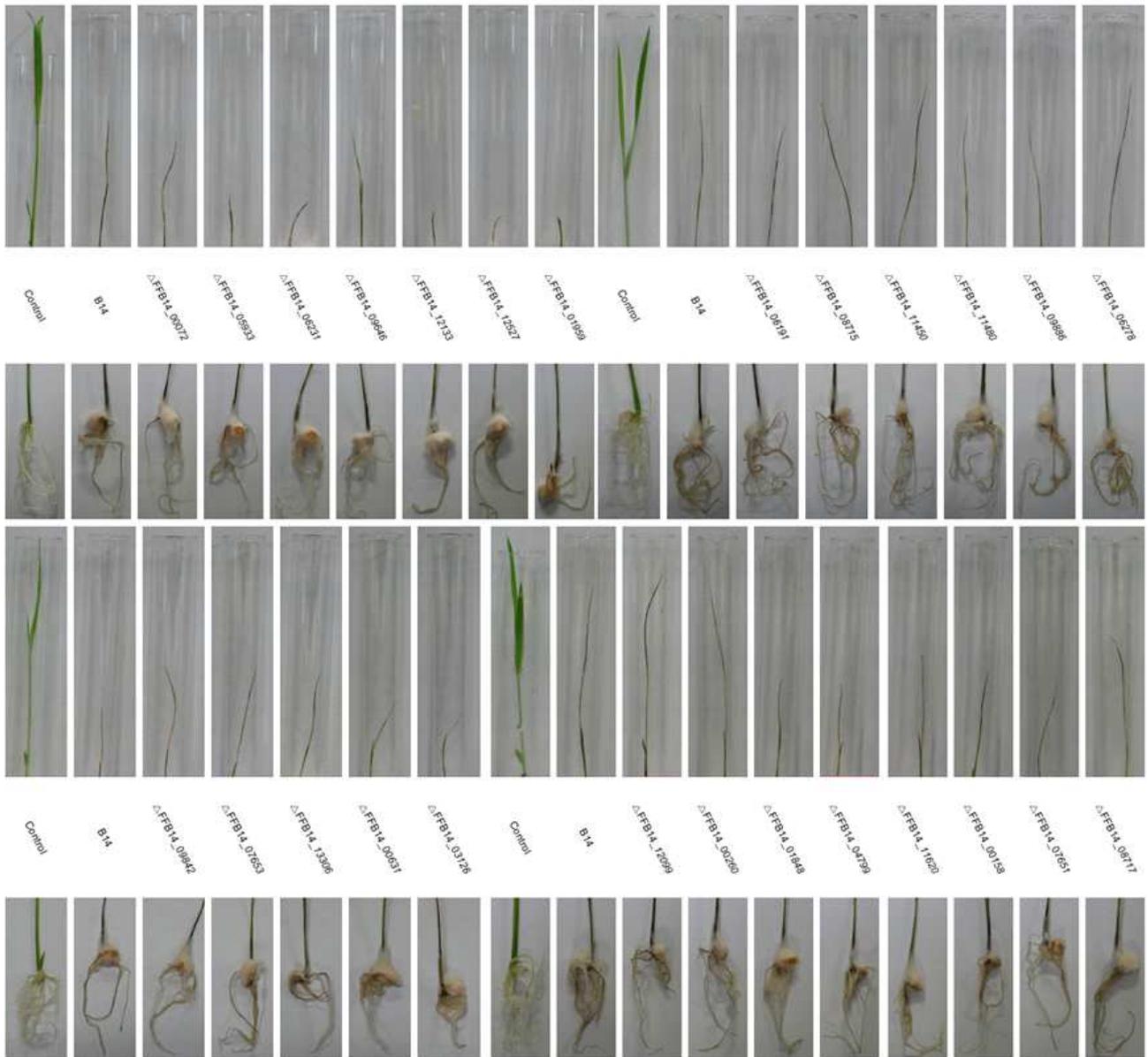


그림 1-24a. B14 균주 유래 유전자 삭제 돌연변이체 병원성 실험 7일차 버 병원성 결과

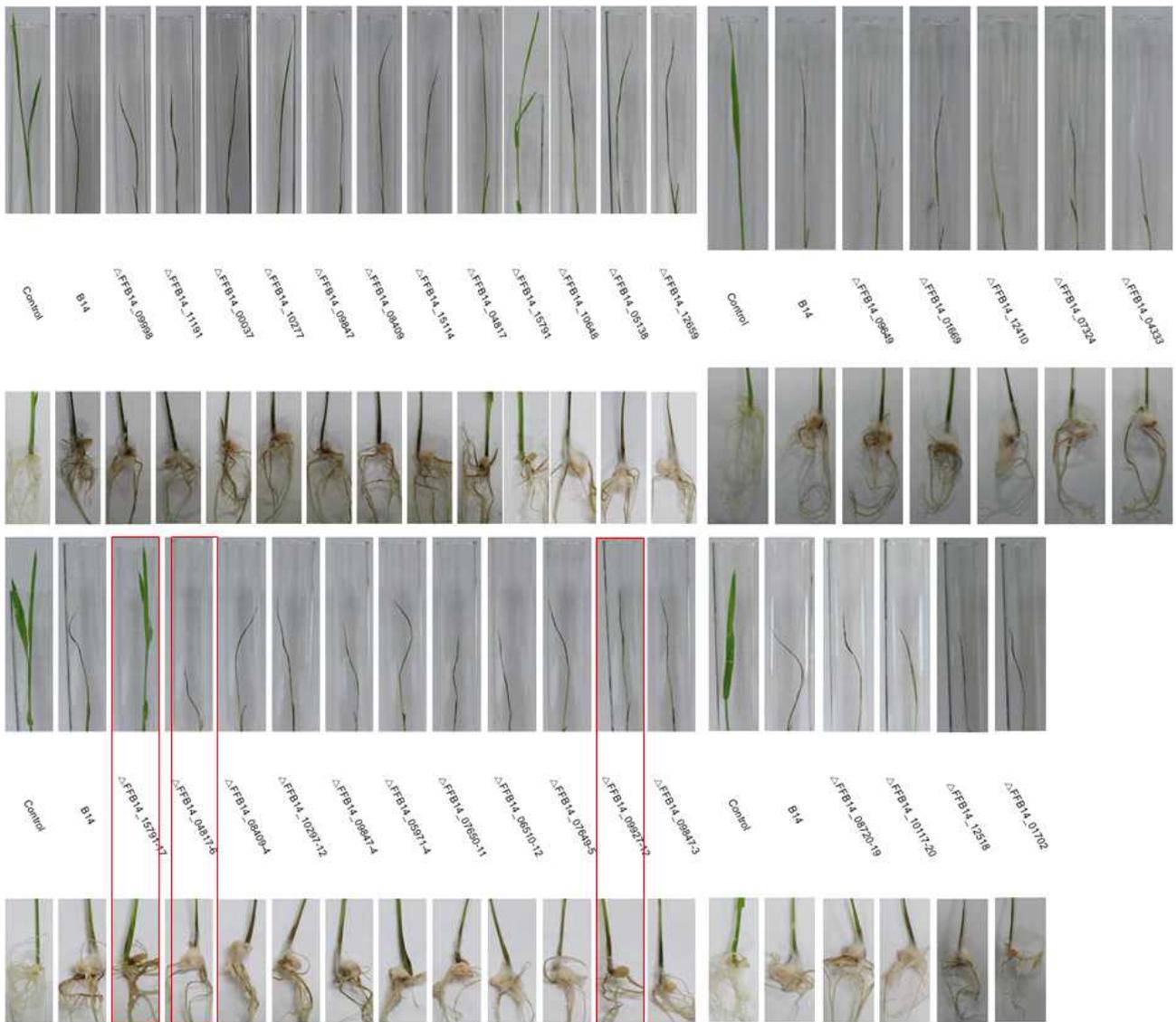


그림 1-24b. B14 균주 유래 유전자 삭제 돌연변이체 병원성 실험 7일차 벼 병원성 결과

□ 벼 키다리병원균 집단 내 병원형 균주 사이 농약 내성 검정

- 벼 키다리병원균의 방제에 사용되는 농약을 이용하여 두 병원형 소속 야생형 균주 8 주 (B14 와 B20 포함) 를 감자한천배지(PDA) 배지와 농약 첨가 PDA 배지에서 4일 동안 배양 후 성장률 측정하였음
- 벼 키다리병 전문약제 제품 키맨 [(주)한농, 8% ipaconazole 성분] 과 수도원예용 살균제 제품인 선두주자 [(주)성보화학, 20% pyibencarb 성분] 를 공시 약제로 선정함
- 살균제처리 권장양 (400ppm ipaconazole, 1000ppm pyibencarb)과 1,000배 희석한 양(0.4ppm ipaconazole, 1ppm pyibencarb)을 각각 PDA에 첨가하였음
- 살균제 무첨가 PDA 배지에서 마름병징형 균주 (B14, JD8, 16JC1, 16PBW7)의 균사 성장률은 키다리병징형 균주 (B20, 16R17, 16R18, 16R23)에 비해 30% 가량 높았음
- 농약 첨가 배지에서 균사성장 관찰 결과, PDA+400ppm ipaconazole 에서는 모든 벼키다리병원균이 자라지 않아 생육억제효과가 우수함을 확인하였음. 그러나 PDA+1,000ppm pyibencarb 배지에서는 모든 키다리병원균의 균사 생장이 확인되었음. 특히 마름병징형 균주의 균사 성장 수준이 키다리병징형 균주보다 50% 정도 높았음. 이를 통해 벼 키다리병원균은 pyibencarb 약제에 대한 내성을 지니고 있으며, 마름병징형 균주의 내성이 키다리병징형 균주에 비해 2 배가량 높았음 (그림 1-25)

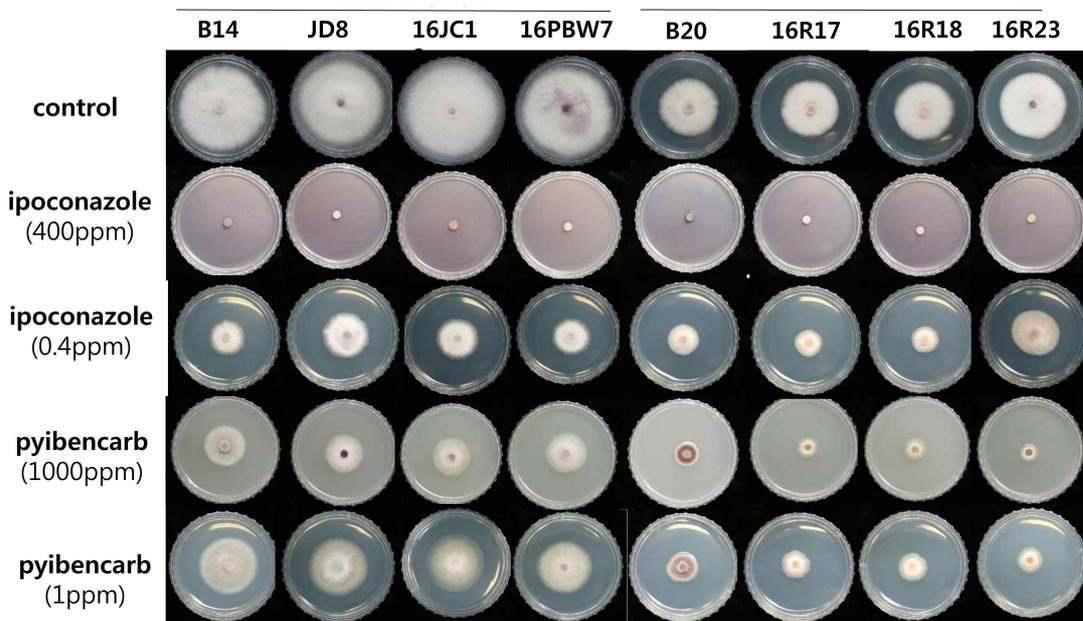


그림1-25. 벼키다리병원균의 약제 내성 검정

□ 벼 키다리병원균 마름증상과 키다리증상을 나타내는 두 균주 간 병원성 강도

- 마름증상을 보이는 B14 균주의 무성포자를 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 농도로 준비하여 병원성을 확인하였다. 가장 낮은 1×10^3 농도까지 마름 증상이 관찰됨 (그림 1-26a).
- 마름증상을 보이는 B14균주와 키다리 증상을 보이는 B20 균주의 무성포자를 1×10^5 의 동일한 농도로 혼합하여 병원성 실험을 한 결과 마름증상이 관찰됨(그림 1-26a).
- B14 균주의 무성포자 1×10^4 농도와 B20 균주의 무성포자 1×10^5 농도로 혼합하여 병원성 실험결과 마름증상이 관찰됨(그림 1-26b).
- B14 균주의 무성포자 1×10^3 농도와 B20 균주의 무성포자 1×10^5 농도로 혼합하여 병원성 실험결과 반복 중 한 식물체에서 좀 더 키가 크고 약간의 마름 증상이 천천히 진행됨을 관찰하였고, 다른 한 식물체에서는 키다리 증상이 관찰됨(그림 1-26b).
- 벼 키다리병원균의 벼 마름증상은 벼 키다리 증상보다 100 배 이상 강한 병원성을 보임.

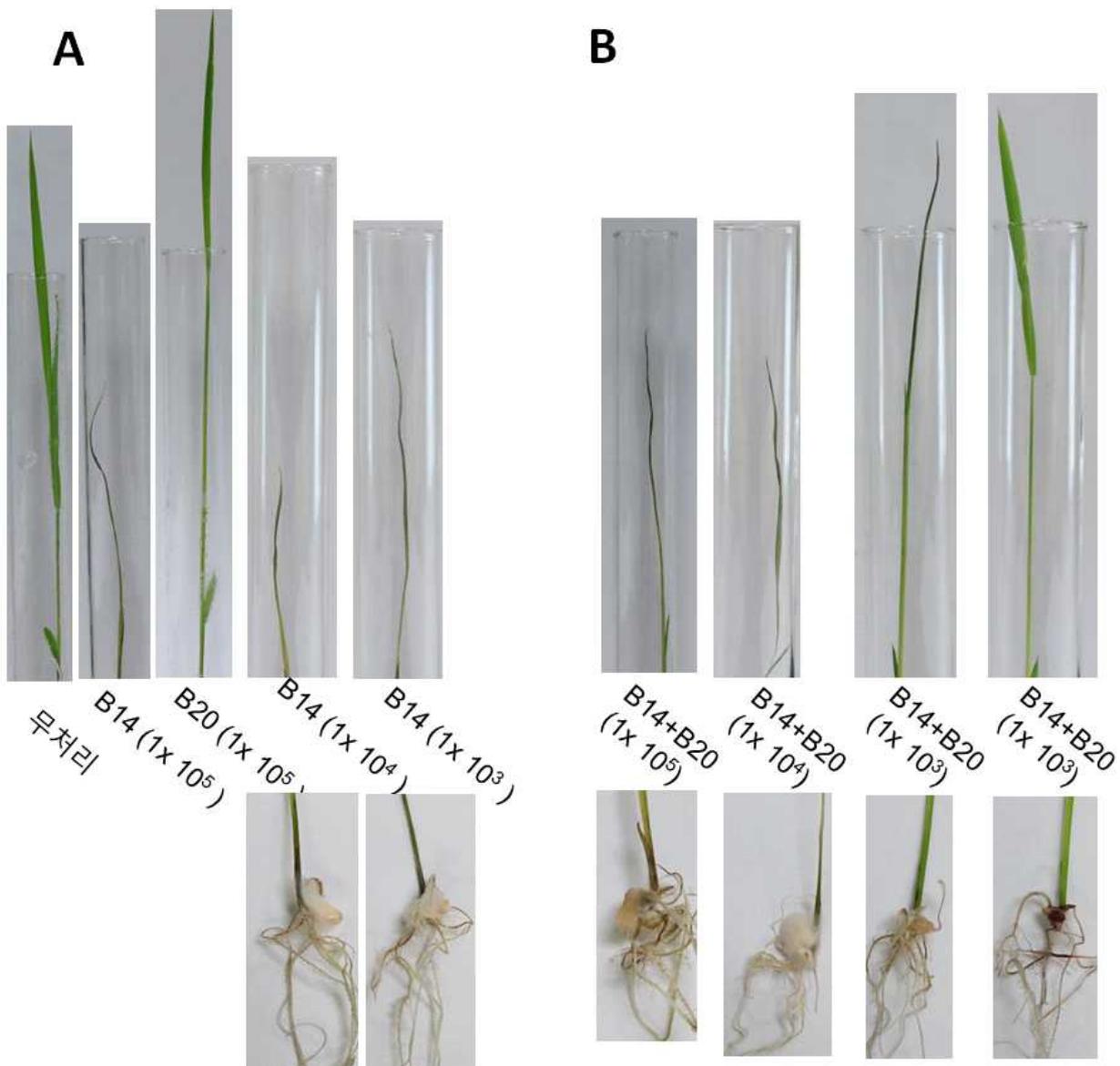


그림1-26. 두 균주 간 (B14, B20)의 무성포자 농도별 병원성 결과

□ 마름병징형 벼 키다리병균 균주의 유전체 추가 해독

- 벼 유묘에 대한 병원성 검정, 분자마커 증폭, 계통발생학 분석 등을 통해 동정된 마름병징형 유발 *F. fujikuroi* JA19 (그림1-23) 균주의 유전체를 PacBio sequencing 장비를 이용한 Single-Molecule Real Time (SMRT) sequencing 방법으로 해독하였음 (표 1-23)

표 1-23. *F. fujikuroi* JA19 균주 유전체 해독 기본 정보

Library ID	No. Reads	No.Bases	No. Bases (Gb)	Ave. length
SMRT cell 1	726,487	5,768,771,448	5.76	7,940

표 1-24. *F. fujikuroi* JA19 균주 해독 유전체의 크기와 contig 수

	No. of sequences	Total bases	Longest	N50	N90
Contig	73	44,430,762	4,835,809	2,986,180	1,526,759

- JA19 유전체 염기서열의 *de novo* assembly 결과, 44 Mb 크기의 유전체로부터 총 73 개의 contig 를 생성하였으며 (표 1-29), *ab initio* (AUGUSTUS) 와 homology 기반의 분석 방법을 통하여 총 15,331 종의 유전자를 예측하였음 (표 1-25)

표 1-25. JA19 균주 유전체내 유전자 예측 정보

Gene prediction results	Quantification
Total no. of gene models predicted	15,331
Unique gene models (No.)	14,628
Genes with isoforms (No.)	703
Average gene length (bp)	1,547 bp
Total bases of gene models (Mbp)	23.73 Mbp
Genes in the draft genome (%)	53.41
No. of exon	46,146
Average no. of exon per gene	3.00
Average exon length (bp)	459 bp
No. of intron	30,815
Average no. of intron per gene	2.00
Average intron length (bp)	81 bp
Exons in the draft genome (%)	47.75
Introns in the draft genome (%)	5.66

- 이 들 유전자의 단백질 정보를 다양한 데이터베이스 (UniProt, NCBI nr, Interproscan)에서 탐색하여 총 예측 유전자의 99.8% 에 해당하는 15,300 유전자의 기능을 추정 (gene annotation) 할 수 있었음 (표 1-26)

표 1-26. *F. fujikuroi* JA19 균주 유전체 내 기능 추정 (annotation) 유전자 수

Unique + Isoform	UniProt	NCBI nr	InterProScan	Annotated Gene	(%)
15,331	8,618	15,294	12,994	15,300	99.80

- 한편, JA19 균주 유전체 내 반복 서열은 총 유전체 크기의 2.7% 가량 차지하는 것으로 분석됨 (표 1-27)

표1-27. *F. fujikuroi* JA19 균주 유전체 내 반복 서열 정보

Type	Reference based - RepBase (20150807)		<i>de novo</i>		combined	
	Length (bp)	(%) in genome	Length (bp)	(%) in genome	Length (bp)	(%) in genome
Retrotransposons	77,186 bp	0.17%	4,980 bp	0.01%	82,166 bp	0.18%
DNA transposons	62,574 bp	0.14%	0 bp	0.00%	62,574 bp	0.14%
Unclassified	0 bp	0.00%	636,893 bp	1.43%	636,893 bp	1.43%
Simple repeats	274,912 bp	0.62%	255,658 bp	0.58%	282,115 bp	0.63%
Total	505,838 bp	1.14%	1,195,385 bp	2.69%	1,292,464 bp	2.91%

- 현재 JA19 균주의 유전체를 기존 해독된 마름병징형 B14 균주와 키다리병징형 B20 균주의 유전체와 비교 분석 중임

□ *F. graminearum* 의 빛 감지 조절인자에 의해 조절되는 유성생식능 규명

- 벼 재배 지역 내 분포하는 주요 공기 전염 병원성 *Fusarium* 곰팡이인 *F. graminearum* 중복합체 소속 종은 유성포자 또는 무성포자를 생성한 후 벼, 밀, 보리 등의 화기를 통해 침투하여 이삭마름병 (head blight) 증상을 일으킴. *F. graminearum* 중복합체 소속 곰팡이는 앞서 기술한 *F. culmorum* 과 함께 전 세계 곡물 이삭마름병의 대표적인 원인균 임. *F. graminearum* 은 자가화합성 방식의 유성생식 과정을 통해 식물의 잔재물에서 자실체인 자낭각을 형성하고, 이 안에 자낭과 자낭포자를 형성함. 자낭각은 식물의 잔재물에서 겨울 동안 생존하여 이듬해 봄 강수 조건에서 자낭포자를 분출시켜 새로운 기주의 화기를 공기 전반에 의해 감염시킴. 따라서 *F. graminearum* 의 유성생식은 병원균의 월동 및 생존에 필수적인 과정임
- 붉은 곰팡이의 유성생식 유도는 빛 조건에 의해 유도됨. 빛을 감지하는 photoreceptor 의 역할에 의해 유성생식 조절을 확인하기 위해 *FgWc-1*(FGSG_07941), *FgWc-2*(FGSG_00710), *FgFph*(FGSG_17004) 유전자의 기능을 분석함 (농진청 차세대유전체사업 과제와 공동사사).
- 3 개 유전자를 각각 삭제하였을 경우, 야생형 균주(Z3643) 와 비슷하게 균사생장과 독소생성, 병원성에 변화가 없었으며, 무성포자 생성은 *FgWc-1* 삭제 돌연변이체와 *FgWc-2* 삭제 돌연변이체 모두 2~5 배 정도 감소함.
- 유성생식 유도 배지인 당근배지에서 *FgWc-1* 와 *FgWc-2* 를 각각 삭제한 균주에서는 야생형 균주에 비해 자낭각 형성이 증가 되었으며, *FgWc-1*, *FgWc-2* 를 동시에 삭제 균주에서도 자낭각 생성 수가 증가함. 유성생식이 유도되지 않는 complete media (CM) 에서 $\Delta FgWc-1$, $\Delta FgWc-2$ 균주 뿐 아니라 $\Delta FgWc-1; \Delta FgWc-2$ 균주에서 자낭각과 자낭포자가 형성됨 (그림 1-27).

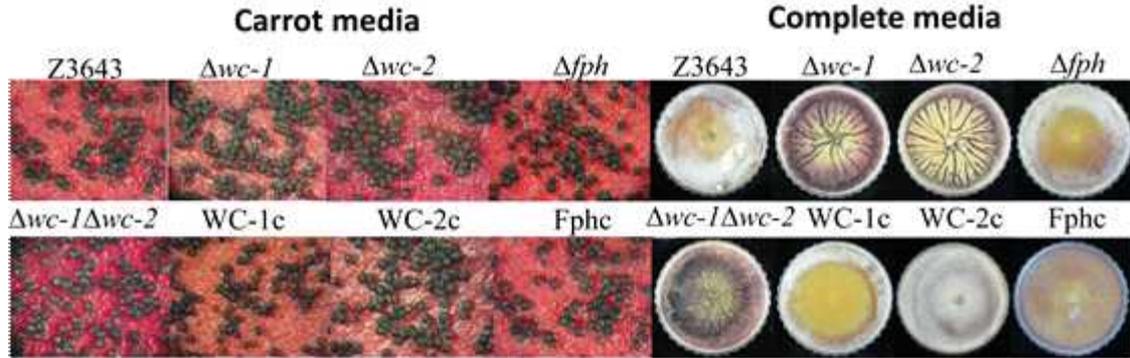


그림 1-27. 당근배지와 CM 배지에서 빛 감지 조절 유전자 삭제 돌연변이체($\Delta wc-1$, $\Delta wc-2$, Δfph , $\Delta wc-1\Delta wc-2$)와 빛 감지 조절 유전자를 회복시킨 (WC-1c, WC-2c, Fphc)의 사진. 당근 또는 CM 배지에서 7일 배양 후, 균사 제거 24시간 빛 조건에서 7일 배양함.

□ 공기 전염성 *F. graminearum* 의 생존에 필수적인 유성생식 조절체계의 규명

○ 페로몬/페로몬 수용체 유전자에 의한 자가화합성 *F. graminearum* 의 유성생식 조절체계

- 지금까지 *F. graminearum* 은 자가화합성 (homothallic) 방식으로 유성생식을 진행하여 자낭포자를 생성하기 때문에 *F. graminearum* 의 페로몬과 페로몬 수용체 유전자는 자가불화합성 (heterothallic) 곰팡이에 비해 그 역할이 미미할 것으로 추정하였음. 하지만 본 연구를 통해 *F. graminearum* 의 페로몬 (*GzPPG1*, *GzPPG2*) 과 페로몬 수용체 (*GzPRE1*, *GzPRE2*) 유전자도 교배형 유전자와 [mating type (*MAT*) loci, *MATI-1* & *MATI-2*] 에 의해 특이적으로 조절되며, 이에 따라 유성생식 초기 수정 (fertilization) 과 핵융합 (nuclear parining and fusion) 이 진행됨이 증명됨
- *F. graminearum* 의 교배형 유전자좌에 의한 페로몬과 페로몬 수용체 유전자의 조절 방식을 규명하고자 유성생식 초기 단계 (당근배지 위 자낭각 형성 유도 3일차)에 진입한 유전자좌 삭제 돌연변이체로부터 total RNA를 추출한 후, 그로부터 qPCR 방법을 이용하여 각각의 페로몬, 페로몬 수용체 유전자의 발현양을 상대적으로 비교하였음 (표 1-28).
- 분석 결과, *GzPPG1* 의 발현양은 WT 균주에 비해 모든 *MAT*-deletion 균주 ($\Delta MATI-1-2$ 제외) 에서 감소하였음. 이를 통해 WT 균주에서 *GzPPG1* 의 높은 발현양을 고려할 경우, *GzPPG1* 은 오직 WT 균주와 $\Delta MATI-1-2$ 균주에서만 높은 수준으로 발현되지만 발현양상은 교배형에 특이적이라고 할 수는 없음. 반면, *GzPPG2* 의 발현은 $\Delta MATI-2$ 균주와 $\Delta MATI-1;\Delta MATI-2$ 균주에서 감소하지만 $\Delta MATI-1$ 와 $\Delta MATI-1-1$ 균주에서는 급격히 증가하였음. 이를 통해 *GzPPG2* 가 오직 WT 와 $\Delta MATI-1$ 균주에서만 발현되어 *MATI-2* 유전자좌에 특이적인 발현 양식을 보인다는 것이 밝혀짐.
- 한편 페로몬 수용체 유전자인 *GzPRE1* 은 $\Delta MATI-1$ 과 $\Delta MATI-1;\Delta MATI-2$ 균주에서 발현이 감소하였으나 WT 균주와 $\Delta MATI-2$ 균주에서 상당량 발현이 유지되었기 때문에 *MATI-1* 유전자좌에 특이적으로 조절됨이 밝혀짐. 또한 *GzPRE2* 는 모든 *MAT*-deletion 균주에서 발현이 증가하였기 때문에 모든 균주에서 항상 일정 수준 발현됨을 추정할 수 있음. 그리고 *MATI-1-1* 유전자의 삭제에 따른 페로몬/페로몬 수용체 유전자의 발현 변화 효과가 다른 *MAT* 유전자 삭제의 경우보다 매우 컸기 때문에 *MATI-1-1* 유전자가 페로몬/페로몬 수용체 체계를 조절하는 가장 중요한 인자라고 결론내릴 수 있음

표 1-28. 자낭각 형성 초기 단계 *F. graminearum* 교배형 유전자 삭제 돌연변이체 균주 내 페로몬/페로몬 수용체 유전자의 발현양 비교

gene	Fungal strains						
	WT	$\Delta MAT1-1-1$	$\Delta MAT1-1-2$	$\Delta MAT1-1-3$	$\Delta MAT1-1$	$\Delta MAT1-2$	$\Delta MAT1-1;$ $\Delta MAT1-2$
<i>GzPPG1</i> ^a	1.00±0.0	0.0±0.0	0.8±0.3	0.3±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>GzPPG2</i> ^a	1.00±0.0	91.5±6.3	1.0±0.1	0.5±0.0	10.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>GzPRE1</i> ^a	1.00±0.0	2.5±2.6	10.3±4.9	5.3±0.7	0.3±0.2	0.7±0.4	0.3±0.4
<i>GzPRE2</i> ^a	1.00±0.0	62.9±11.6	3.2±1.5	3.0±1.0	5.0±2.0	1.7±0.5	2.4±1.2
<i>GzPPG1</i> ^b	1669.0±93.7	1.0±1.4	1395.1±167.2	572.2±64.8	0.4±0.2	0.8±0.3	0.3±0.4
<i>GzPPG2</i> ^b	98.0±13.7	8961.1±310.5	98.2±25.6	51.2±6.0	976.6±52.2	4.0±1.6	2.4±1.3
<i>GzPRE1</i> ^b	1.0±0.0	2.5±2.6	10.3±4.9	5.3±0.7	0.3±0.2	0.7±0.4	0.3±0.4
<i>GzPRE2</i> ^b	4.7±1.5	295.3±37.1	14.9±1.7	14.3±3.8	23.4±3.8	7.9±2.4	11.1±0.4

Numbers represent the average relative amount of each gene transcript with standard deviation. The numbers in bold were significantly different from the reference data according to Tukey's test ($P < 0.05$).

^aThe data were obtained by using the transcript level of each gene from WT was used as a reference.

^bThe data were obtained by using the transcript level of *GzPRE1* from WT was used as a reference.

- 표 1-28 에 나타난 qPCR 분석 결과를 바탕으로, *F. graminearum* 의 유성생식 과정 초기 페로몬/페로몬 수용체에 의한 배우자 세포사이의 수정 과정 조절 체계를 추정할 수 있음 (그림 1-28). 이 체계도에 대한 자세한 설명은 본 과제 성과물인 논문 [Kim et al (2015) PLoS Genet. 11(9): e1005486]에서 참조할 수 있음.

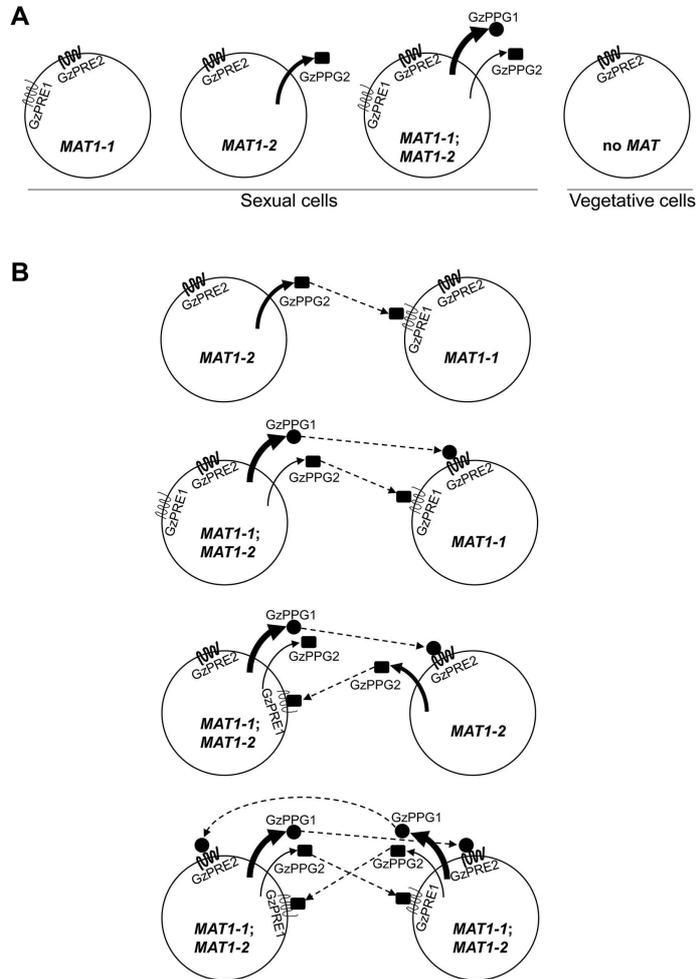


그림 1-28. *F. graminearum* 에서 교배형 유전자좌에 의해 조절되는 페로몬/페로몬수용체 발현 모식도 (A) 와 가능한 교배 조합 (B).

□ *Trichoderma spinulosum* (*Chromocrea spinulosa*)의 unidirectional mating-type switching 관련 유성생식 메커니즘의 규명

- *Trichoderma* 는 온실과 같은 시설원에 재배환경의 공기 중에 높은 빈도로 분포하는 곰팡이 속으로서 온실 내 대표적인 공기 전염원임. 하지만 이 중 *T. spinulosum*는 분생포자 형성능을 상실한 대신 붉은곰팡이 *F. graminearum*와 같은 자가화합성 (homothallism) 을 이용하여 유성포자인 자낭포자를 생산함
- 하지만 *T. spinulosum*를 자가 교배한 후 얻은 자손 균주의 50% 는 부모와 달리 자가불화합성 (heterothallism) 의 유성생식능을 가짐. 나머지 50% 의 자가화합성 유성생식능을 지니고 있는 자손 균주를 다시 자가 교배하였을 경우, 새로운 자손의 50% 는 여전히 자가불화합성으로 유성생식능이 전환되었음. 이와 같은 교배형의 전환은 출아형 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 관찰되는 "bidirectional mating-type switching" 과 다른 "unidirectional mating-type switching" 이라 명명됨
- *T. spinulosum* 의 "unidirectional mating-type switching" 관련 메커니즘의 이해는 *Trichoderma* 뿐 아니라 *F. graminearum* 을 비롯한 주요 공기 전염 사상성 곰팡이의 유성생식 및 포자형성 조절 시스템의 진화를 이해하는 데 큰 도움이 될 것으로 기대함
- 이를 위해 다양한 PCR 방법을 통해 *T. spinulosum*의 교배형 유전자 부위 (26 kb)를 증폭하여 염

기서열을 결정한 후 *F. graminearum*의 교배형 유전자좌와 비교하였음

- *T. spinulosum*의 자가화합성 균주인 Cs23 은 *F. graminearum* 과 매우 비슷한 구조의 교배형 유전자좌를 가지고 있음 (그림1-29). 즉 *MATI-1* 유전자좌에 총 3 종의 transcripts (*MATI-1-1*, *MATI-1-2*, *MATI-1-3*) 가 위치하며, *MATI-2* 유전자좌에 1 종의 transcript (*MATI-2-1*) 이 위치함. 그리고 두 *MAT* 유전자좌는 서로 인근에 위치할 뿐 아니라 각 유전자의 전사방향, *MAT* 유전자좌 인근에 위치한 다른 유전자의 종류와 배열 순서 등이 *F. graminearum* 과 매우 비슷함 (그림 1-29)
- 하지만 *T. spinulosum* Cs23 균주의 *MAT* 유전자좌에는 *F. graminearum* 과 달리 116 bp 크기의 반복서열 (direct repeats) 가 *MATI-2-1* 의 5' 과 3' 말단 부위에 존재함 (그림 1-29)
- 흥미롭게도 Cs23 균주는 *MATI-1* 과 *MATI-2* 유전자좌가 함께 존재하는 염색체 뿐 아니라 *MATI-1* 유전자좌만 존재하는 염색체도 함께 가지고 있음. 하지만 공통의 세포질 내 *MATI-1* 염색체의 분포 비율은 *MATI-1*; *MATI-2* 염색체의 비율에 비해 월등히 높았음 (Southern blot 과 정량적 PCR 분석)
- 한편, *T. spinulosum* 의 자가불화합성 균주인 Cs27 의 유전체에는 오직 *MATI-1* 유전자좌만 존재함 (그림 1-29)

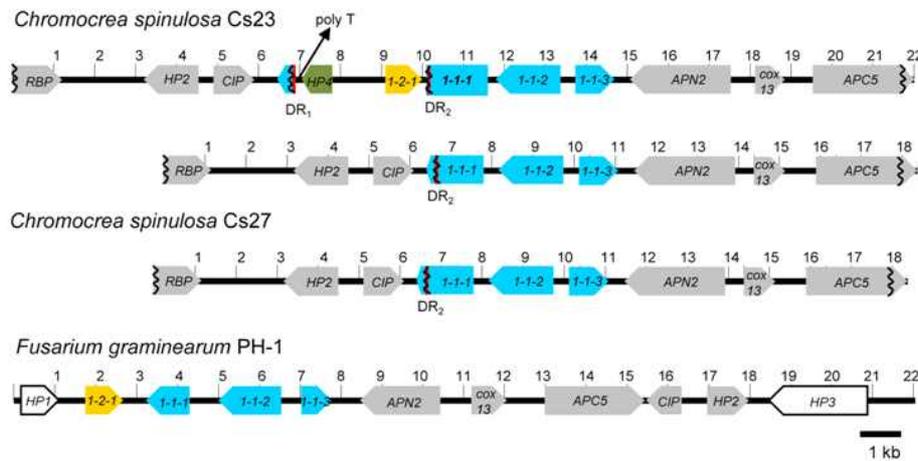


그림 1-29. *T. spinulosum* 과 *F. graminearum* 균주의 교배형 유전자좌의 구조 비교. DR: direct repeat.

- *T. spinulosum*의 unidirectional mating-type switching의 메커니즘을 교배형유전자좌의 구조 변환의 관점에서 규명하기 위하여 자가화합성 Cs23 균주의 *MAT* 유전자좌에 존재하는 반복서열 중 한 개를 targeted gene deletion 방법에 의해 삭제하였음 (그림 1-30). 하지만 *T. spinulosum* 의 형질전환 및 homologous recombination 에 의한 targeted gene deletion 빈도가 매우 낮아 원하는 반복서열 삭제돌연변이체를 얻는 데 매우 오랜 시간이 걸림
- 반복서열 삭제돌연변이체 (T10) 은 Cs23 과 달리 *MATI-1*; *MATI-2* 구조의 염색체만 지니고 있음이 확인되었음 (그림 1-30). 하지만 예상과 달리 T10 은 자가교배시 자손을 형성하지 못하였음

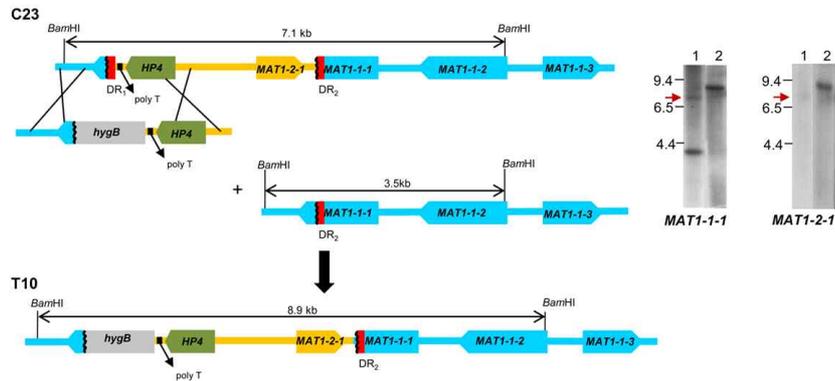


그림 1-30. targetd gene deletion 방법을 이용하여 *T. spinulosum* Cs23 균주의 *MATI-1;MATI-2* 염색체로부터 반복서열 중 한 개를 삭제함.

- 그러나 T10은 자가불화합성 균주인 Cs27 과 교배 (outcross) 하여 자손을 생산할 수 있었음. 이러한 교배를 통해 T10 type 과 Cs27 type 의 자손이 생산되었으며, 예상과 달리 Cs23 type 의 자가화합성 자손도 10% 의 빈도로 생산되었음
- T10 균주 내 *MATI-1;MATI-2* 염색체의 안정적 유지와 T10의 자가불화합성 결과 등을 통해 unidirectional mating-type switching 관련 분자 수준의 모델을 제시할 수 있었음 (그림 1-31). 즉, Cs23 균주의 *MATI-1;MATI-2* 염색체내 존재하는 두 종의 반복서열 사이의 homologous recombination 에 의해 염색체로부터 *MATI-2-1* 유전자가 제거 되어 *MATI-1* 유전자좌만 존재하는 염색체로 전환될 수 있음 (그림 1-31A). 이러한 *MATI-2-1* 의 결실이 발생한 핵 (*MATI-1*) 과 그렇지 않은 핵 (*MATI-1;MATI-2*) 이 곰팡이의 균사 내 한꺼번에 존재할 경우, 교배는 서로 다른 교배형을 갖는 핵 사이에서만 일어난다고 가정할 수 있음. 이러한 교배가 이루어 질 경우, 자가화합성과 자가불화합성 자손이 각각 1:1 의 비율로 생산될 것임 (그림 1-31B)

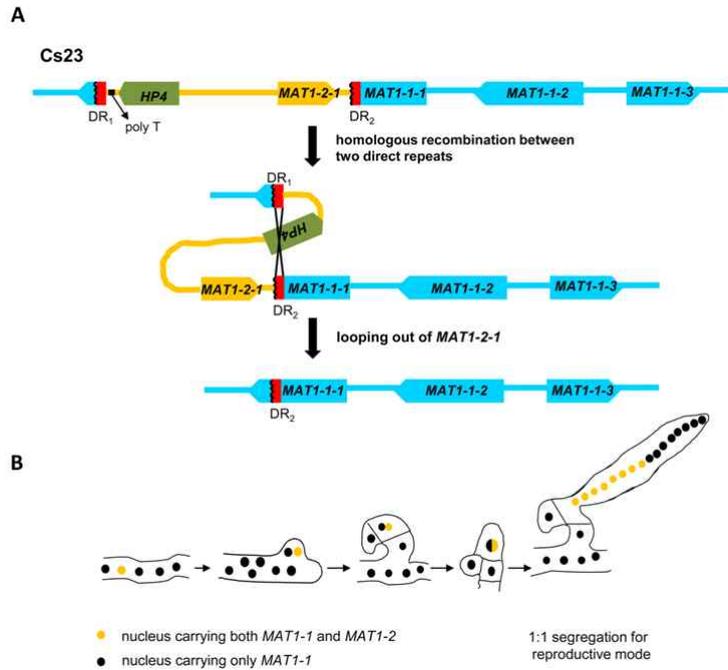


그림1-31. *T. spinulosum*의 unidirectional mating-type switching 관련 분자 수준의 메커니즘 모델. A: Cs23 균주의 교배형 유전자좌 내 homologous recombination에 의한 *MAT1-2-1* 유전자의 제거 B: *T. spinulosum*의 균사 내 서로 다른 교배형 구조를 갖는 핵 사이의 융합을 통한 교배의 결과.

- 위와 같은 결과를 통해, *T. spinulosum*의 자가화합성은 단지 같은 핵 안에 서로 다른 교배형 (*MAT1-1*과 *MAT1-2*)의 유전자가 함께 존재함으로써 유도되는 것이 아니라, 균사 내 서로 다른 교배형을 갖는 핵이 존재할 경우, 그들 사이의 자가불화합성 방식의 핵 융합 및 감수분열에 의한 교배의 결과임을 알 수 있었음. 따라서 *T. spinulosum*과 비슷한 교배형 유전자좌 구조를 갖고 있는 *F. graminearum*의 경우도 이와 비슷한 방식으로 교배가 이루어질 수 있다고 추론할 수 있음
- 본 연구를 통해 사상성 곰팡이의 unidirectional mating-type switching 관련 메커니즘이 최초로 규명되었음

□ 붉은곰팡이 유래 신규 곰팡이 프로모터의 개발

- 붉은곰팡이의 벼 발병 단계 전사체 분석 과정 중 발병 단계뿐 아니라 다양한 생육조건에서 발현양이 매우 높은 수준으로 유지되는 유전자 [FGSG_00681 (hypothetical protein)]를 동정함(표1-29). FGSG_00681 유전자는 58개 아미노산으로 이루어진 단백질의 정보를 담고 있음. 이를 붉은곰팡이를 비롯한 다른 사상성 곰팡이에서 상시 발현 프로모터로 사용 가능한지 검정하였음

표 1-29. 전사체 해독을 통한 벼 발병 단계 별 유전자 발현 수준

균주명	Gene_id	Normalized_FPKM	
<i>F. graminearum</i> PH-1	FGSG_00681	Rice3*	1,193
		Rice6*	1,996
		Rice9*	278
<i>F. asiaticum</i> SCK04	FASG_00796	Rice3*	3,452
		Rice6*	359
		Rice9*	698

<i>F. boothii</i> GWS263	GWC1CG07050	Rice3*	458
		Rice6*	7675
		Rice9*	188

*Rice 3, Rice 6, Rice 9 : 벼 접종 후 3일, 6일, 9일 차

- 곰팡이의 균사체 또는 자낭각(perithecia), 감염 식물체 등을 각각의 선택된 날짜에 채집함. 시료의 RNA를 추출 후, cDNA 합성하여 정량적 실시간 PCR (qPCR)으로 유전자 발현 확인함(표 1-30).

표 1-30. qPCR 분석을 통한 다양한 붉은곰팡이 생육 조건에서 선발 유전자의 상대적 정량 발현수준

	벼 발병 단계			균사 성장		무성포자 생성		독소 생성		유성 생식			
	rice3	rice6	rice9	M3	M6	C3	C6	T3	T6	cd3	cd6	kd3	kd6
PH-1	79	252	151	2,198	6,521	1,336	1,620	9,405	3,257	1,979	4,544	271	220
SC KO4	176	266	19	1,580	4,505	36,337	310	10,584	2,628	4,448	2,710	215	249
GW S263	165	70	125	1,177	1	3,261	1,699	7,187	21,020	1,346	5,104	416	129

- 붉은곰팡이 유래 FGSG_00681(hypothetical protein) 유전자의 번역개시 추정 코돈 시점 앞부터 추정 프로모터 부위는 268bp ~ 1,034bp까지 다양한 크기로 조각내어 프로모터와 루시퍼린 유전자를 융합하여 곰팡이의 유전체에 도입하였음
- 형질전환된 돌연변이체를 곰팡이의 다양한 생장 조건에서 배양 후, luminometer를 사용하여 루시퍼린의 활성도를 측정하여 각 프로모터의 발현강도를 확인함.
- FGSG_00681 유전자의 개시코돈 앞부터 1034bp까지 프로모터는 강력한 루시퍼린 활성도를 보이며 이는 유전체학 연구에서 상시 발현이 필요한 과발현체 제작에 적합한 프로모터로 사용할 수 있을 것으로 예상됨. FGSG_00648 1034bp의 프로모터는 특허 출원 진행 중.

□ *In silico* AFLP-PCR 등을 활용한 식물병원성 곰팡이의 진단 마커 개발 (위탁)

- *Fusarium* 속 곰팡이 진단용 프라이머 제작: 주요 공기전반 식물병원성 *Fusarium* 속 곰팡이의 신속한 진단을 위해 *In silico* AFLP는 컴퓨터 프로그램으로 AFLP 결과를 가상으로 확인 진행하는 것을 말함. *In silico*는 반도체에 주로 쓰이는 실리콘이라는 원소에서 이름을 가져온 것으로 시험관 내 또는 생체 반응을 컴퓨터로 예측하는 것을 말함. 따라서 *in silico* AFLP는 WGS를 가지고 있을때 컴퓨터로 진행하는 AFLP를 말하며, 직접 진행하는 AFLP와 비교하여 제한효소를 이용하여 처리하고 전기영동을 통해 확인하는 과정을 컴퓨터로 진행함. 주 목적은 WGS를 가지고 AFLP의 분석시간 축소와 여러 Primer를 제작 반복하여 한 번의 데이터 업로드만으로 실행 할 수 있어 다양한 primer를 제작하는데 용이함. 하지만 *In silico* AFLP는 주로 세균에 맞추어져 있어 자체의 데이터로 편집하고 업로드 하여 진행함.
- *In silico* AFLP를 이용하여 *F. fujikuroi* complex 소속 *F. fujikuroi* 종을 특이적으로 검출 할 수 있는 프라이머를 제작함(표 1-31)

표 1-31 . *In silico* AFLP를 이용한 종 특이적 프라이머 리스트

Primer	Primer sequence	Size of PCR product
KHfuji6F	CCTAGGCTCGAGCACCAGTTATTA	733 bp
KHfuji6R	GGATCCGAGCTCGTGGTCAATAAT	
KHfuji17F	CATATGCATGCCGAAGTCC	311 bp
KHfuji17R	GATCGATTCAAGCCAACG	

- 이를 위해 *F. fujikuroi* 계통을 contig별로 5 MB 용량의 *.txt 파일로 편집하여 양쪽에 특정 효소 염기서열(MboI, BamHI 등)을 설정하였음. 예상되는 단편들 중에서 PCR 분석에 용이한 크기를 선정하여 미국 국립 생물정보 센터(NCBI)와 Broad Institute of MIT and Harvard에서 BALST를 통하여 *Gibberella fujikuroi* complex와의 상동성 비교 후 프라이머를 제작하였음. 실제 PCR을 수행한 결과, *Gibberella fujikuroi* complex 균들을 대상으로 각각 733, 433, 311 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었고, 종에 따라 다양한 PCR 산물을 확인할 수 있음.(그림1-32)
- 종 특이적 프라이머의 종 특이성 검정은 2 종 (KHfuji6, KHfuji17) 특이 프라이머에 의한 PCR 산물 비교를 통해 수행함 (그림 1-32)

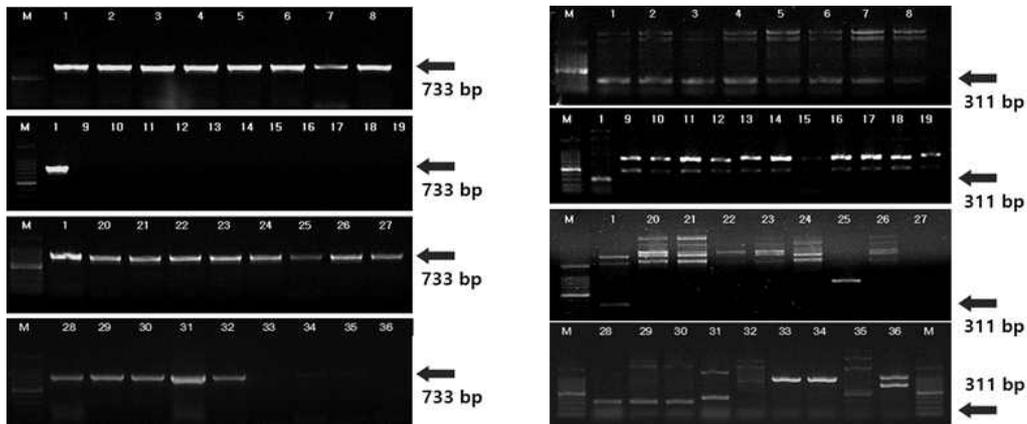


그림 1-32. KHfuji6와 KHfuji17을 이용한 PCR 산물 비교결과. M : 100 bp marker, 1 ~ 8, 28 ~ 30 : *F. fujikuroi*, 9 ~ 19 : *F. verticillioides*, 20 ~ 27, 31, 32 : *F. proliferatum*, 33, 34 : *F. oxysporum*, 35, 36 : *F. solani*.

- *F. fujikuroi*와 유전적으로 비슷한 *F. fujikuroi* complex 균들을 대상으로 각각 733, 311 bp 의 증폭산물을 생성시키는 종 특이적 프라이머를 얻어 반응 특이성을 조사한 결과 *F. fujikuroi* 균을 포함한 총 29균주에서 각각의 PCR 산물 확인하였음.
- 이를 통해 KHfuji6은 *Fusarium* species complex로부터 *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*의 특이적 증폭에 유용하며, 또한 KHfuji17은 *F. fujikuroi*와 *F. oxysporum* 균주의 특이적 검출에 유용할 것으로 확인됨
- 현재 해당되는 두 개의 프라이머 세트는 '푸자리움 푸지쿠로이 종복합체 구분을 위한 프라이머 선별방법 및 프라이머 세트 {METHOD AND PRIMER SET FOR SELECTING FUSARIUM FUJIKUROI}'라는 명칭으로 특허출원 하였음.

○ 붉은곰팡이 포자발아와 포자생성에 관련된 유전자 동정 및 기능 분석

□ 붉은곰팡이 포자 발아 후 단주기 분생포자 형성에 관련된 유전자의 동정 (위탁)

- 붉은곰팡이 전사조절인자 돌연변이체 집단에서 단주기 분생포자생성을 유도하는 돌연변이체를 선행연구에서 선발하였음
- 야생형 균주의 포자는 발아하여 발아관을 형성한 후 군사생장을 이어가는 반면, 돌연변이체는 포자 발아 후 군사생장을 하지 않고 분생포자를 형성하는 단주기 분생포자 형성 양상을 보임(그림 1-33)

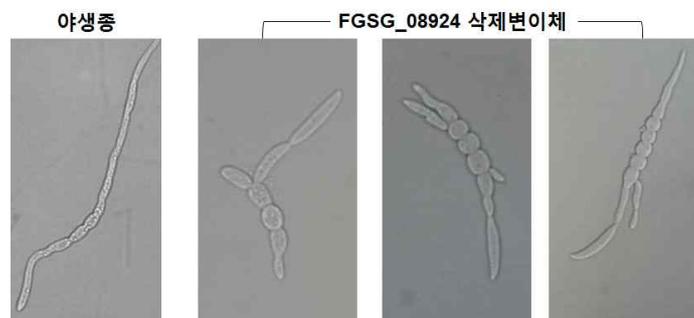


그림 1-33. 포자 발아 및 단주기분생포자 형성

- FGSG_08924 삭제변이체를 다시 제작하여 표현형을 확인하였고, 과발현체 및 형질복원체를 제작하여 FGSG_08924 유전자의 발현을 포자 발아 단계에서 확인한 결과, 삭제변이체에서는 전혀 발현이 되지 않았고 과발현체는 야생종에 비해 발현이 증가하였으며 형질복원체는 야생종 수준으로 발현이 복원된 것을 확인하였음(그림 1-34)

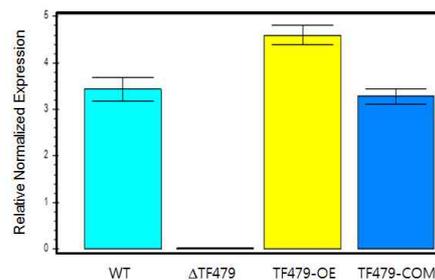


그림 1-34. FGSG_08924 발현양 비교.
WT: 야생종, ΔTF479: 삭제변이체,
TF479-OE: 과발현체, TF479-COM: 형질복원체

- 돌연변이체의 유성생식능 검정 결과, 자낭각 형성이 정상적으로 이루어진 반면 자낭포자의 발달은 야생종과 형질복원체에 비해 삭제변이체와 과발현체에서 늦어졌음(그림 1-35)

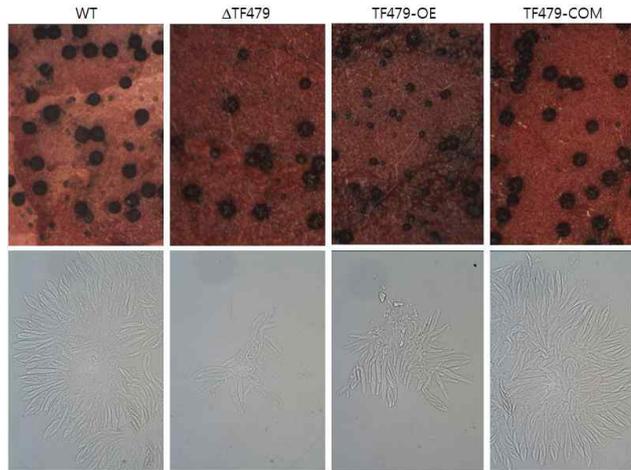


그림1-35. 유성생식 결과 유도된 자낭각(위)과 자낭(아래)

- 돌연변이체의 포자 발아 후 단주기 분생포자 형성을 확인한 결과, 야생종과 형질복원체는 포자 발아후 정상적인 균사 성장을 보이는 반면, 삭제변이체는 포자 발아 후 바로 포자를 만들었고 과발현 형질전환체는 발아관에서 포자가 만들었음 (그림 1-36)



그림 1-36. 포자 발아 및 단주기분생포자 형성

- Nox에 의해 생성된 superoxide가 곰팡이 성장단계조절에 관여한다는 타 연구 결과를 기반으로 붉은곰팡이에 존재하는 세 개의 nox 유전자를 삭제한 결과, noxA 와 noxB 삭제변이체 포자는 단주기 분생포자 형성을 보인 반면, noxC 삭제변이체는 표현형 변화가 없었으며 noxA, noxB를 모두 삭제한 변이체는 단일 삭제변이체에 비해 더 심각한 단주기 분생포자 형성을 보였음(그림1-37)



그림 1-37. Nox 유전자 삭제변이체의 단주기분생포자 형성

- Superoxide의 축적이 포자 발아와 단주기 분생포자 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포 내에 축적되는 superoxide 양을 염색한 결과, superoxide가 균사의 정단에 축적이 될 때 균사 생장이 일어나고 축적이 사라지면 분생포자가 형성된다는 것을 확인하였음 (그림 1-38)

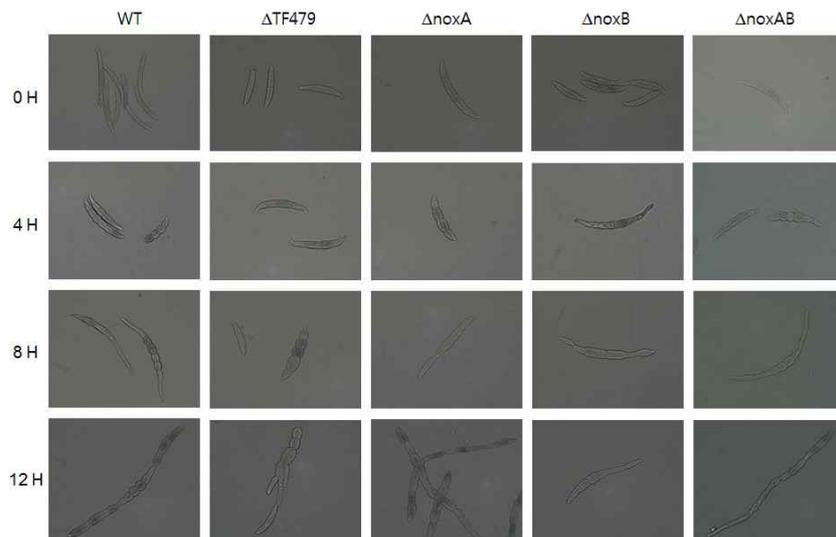


그림 1-38. 야생종 및 돌연변이체 포자 발아시 세포내에 축적되는 superoxide

- 야생종에 Nox 단백질 저해제를 처리했을 때 세포 내에서 superoxide의 축적이 사라지고 단주기분생포자가 형성됨을 확인하였음 (그림1-39)

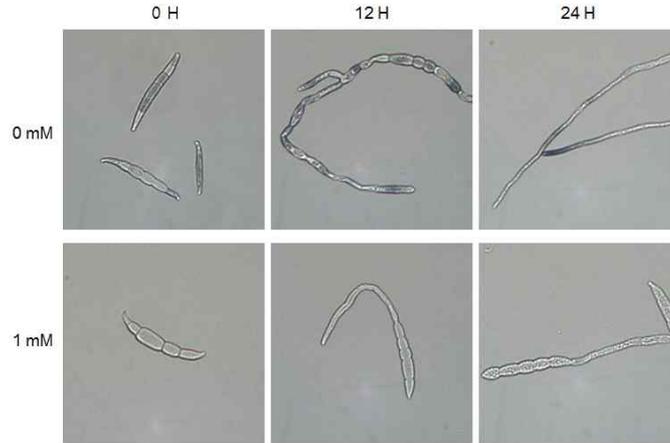


그림 1-39. 야생종 붉은곰팡이에 Nox 단백질 저해제 처리 시 superoxide 변화 및 단주기 분생포자 형성

○ 붉은곰팡이 분생포자 발아에 미치는 영향 분석

□ 붉은곰팡이 분생포자 발아에 미치는 영향 분석 (위탁)

○ 붉은곰팡이 분생포자 발아에 미치는 영향 분석: 단주기분생포자형성 단계에서 선택적으로 발현되는 유전자를 분석하고 동정하여 각 유전자의 삭제 돌연변이체를 제작하여 단주기 분생포자 형성 여부를 확인하였음. 그 결과, 활성산소의 생성과 억제가 분생포자 발아 뿐 아니라 분생포자 생성에도 관련이 있음을 확인하였음. 외부에서 과산화수소를 처리하여 분생포자 생성량을 확인한 결과, 0.5 mM에서는 분생포자 생성이 증가하는 반면, 5 mM에서는 급격하게 감소하였음(그림1-38). 분생포자에 옥살산을 처리하면 발아가 지연될 뿐 아니라 정상적인 발아가 일어나지 않고 단주기분생포자 현상이 나타남.(그림1-40).

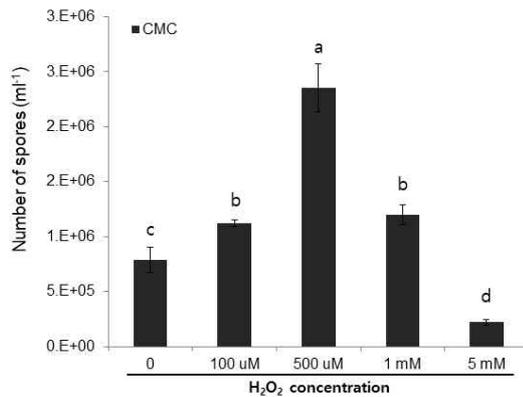


그림1-40. 과산화수소가 붉은곰팡이 포자생성에 미치는 영향

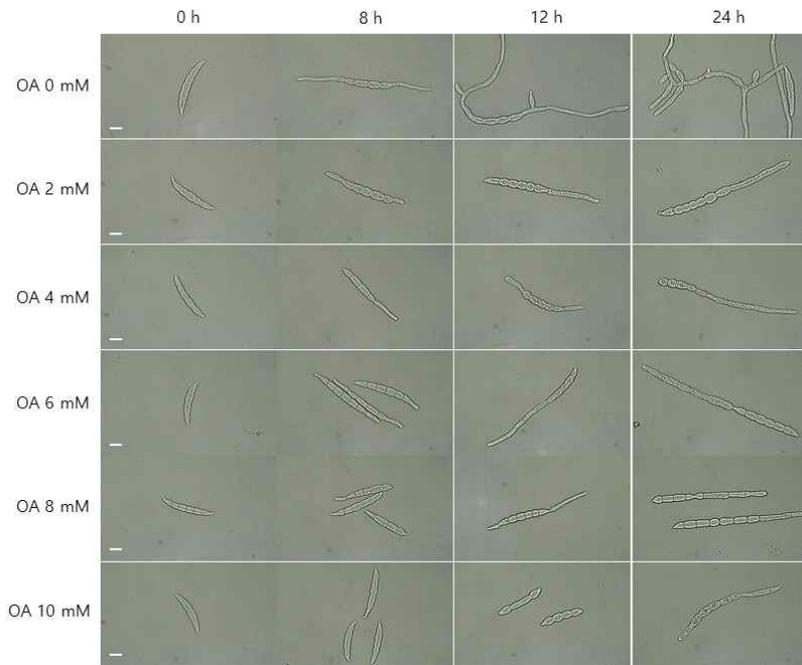
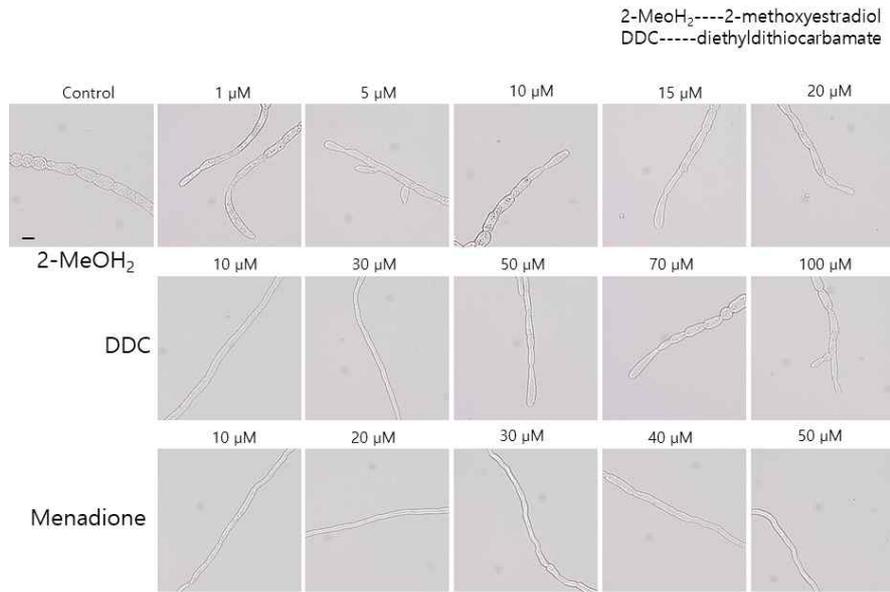


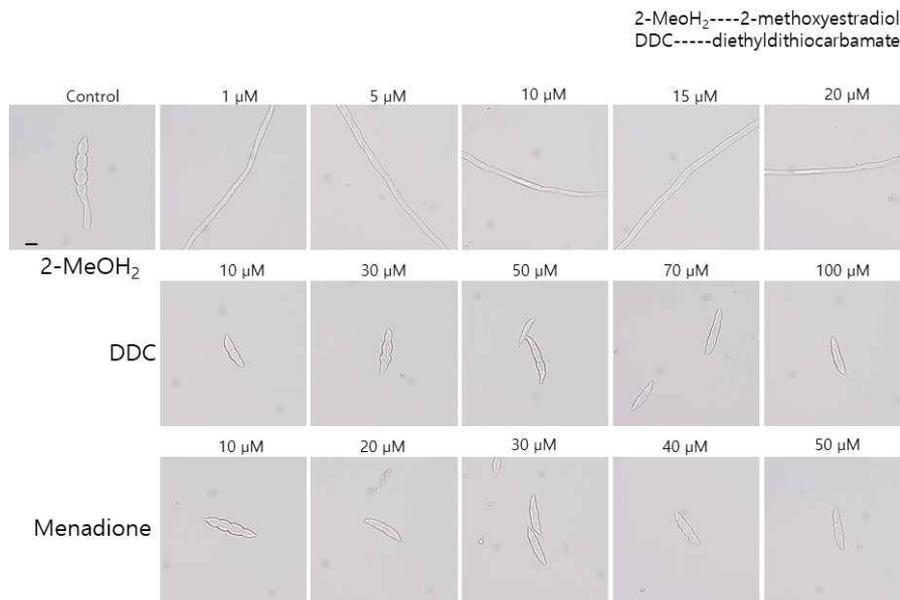
그림1-41. 옥살산이 붉은곰팡이 분생포자 발아에 미치는 영향

- 시더로포어가 붉은곰팡이 생장에 미치는 영향: 단주기분생포자를 형성하는 돌연변이체에서 시더로포어 관련 유전자들의 발현이 선택적으로 증가하였기 때문에 시더로포어를 외부에서 첨가했을 때 돌연변이체에서 보이는 균사생장의 지연이 회복될 것으로 기대했으나 영향을 주지 못했음. 시더로포어가 단주기분생포자 형성에 관여하는지 확인하기 위해 향후 액체배지에서 분생포자를 대상으로 실험을 할 계획임.
- 단주기분생포자 형성에 대한 과산화물제거효소(superoxide dismutase, SOD)의 영향 분석: SOD가 단주기분생포자 형성에 관련이 있는지 여부를 확인하기 위해 세포내 SOD를 억제하는 실험을 수행하였음. 낮은 농도의 2-MeOH₂를 처리하였을 때, 야생종에서도 단주기분생포자와 비슷한 현상이 나타났으며 고농도의 DDC에서도 비슷한 현상이 나타났음. 하지만 menadione을 처리한 야생종에서는 단주기분생포자형성을 관찰할 수 없었고 정상적인 균사 생장을 보였음(그림1-42). 같은 농도를 단주기분생포자 형성을 보이는 돌연변이체에 처리했을 때, DDC와 menadione은 포자 발아를 완전히 억제한 반면, 2-MeOH₂는 정상적인 균사생장을 보였음(그림-1-43). 결론적으로 돌연변이체에서 SOD를 저해시키면 정상적인 균사 생장을 하는 것으로 보아 균사 생장에 superoxide가 결정적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있음. 특히 생물체의 에너지공급을 주로 책임지고 있는 미토콘드리아에서의 superoxide 축적이 중요할 것으로 보임. 하지만, 야생종은 다른 경향을 보이기 때문에 활성산소 축적과 균사생장, 단주기분생포자 형성 사이의 관계를 밝히기 위한 추가적인 연구가 필요함.



GZ3639, 20 hours, Scale bar= 10 μm

그림1-42. SOD 억제제가 야생종 붉은곰팡이 분생포자 발아에 미치는 영향



TF479, 20 hours, Scale bar= 10 μm

그림-1-43. SOD 억제제가 단주기분생포자 형성 돌연변이체의 포자 발아에 미치는 영향

□ 붉은곰팡이 성장 억제 세균 분리 및 동정 (위탁)

- 공기 중 곰팡이 포자를 채집하던 중 붉은곰팡이 성장을 효과적으로 억제하는 세균을 분리하였다(그림1-44). 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *Pseudomonas fulva*와 99% 상동성을 보였다.

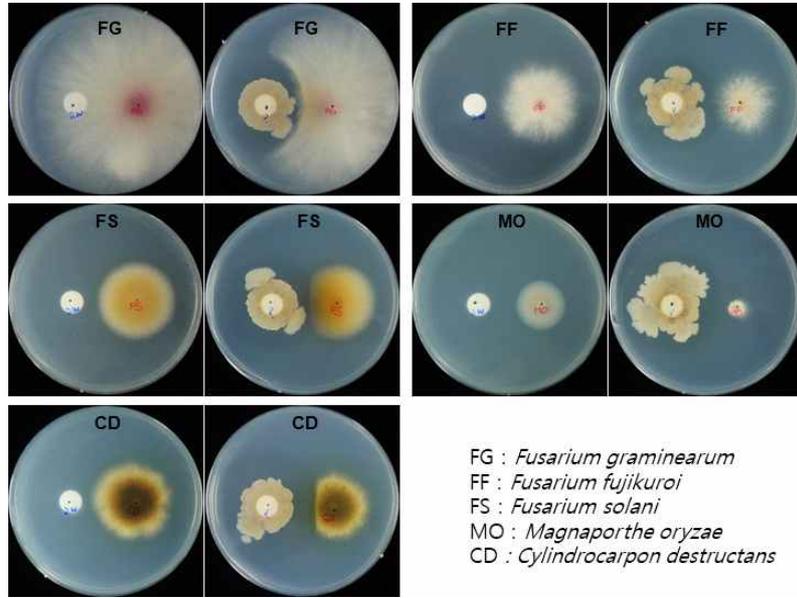


그림-1-44. 공기 중에서 분리한 *Pseudomonas fulva*의 곰팡이 성장 억제 효과.

나. 제 1협동 연구과제 결과

1. 고추작물 노지재배시 공기전반 탄저병균의 발생 분석

- 고추 노지재배시 발생하는 병을 모니터링

2014년 국내 주요 고추 생산지 충북(괴산, 음성, 단양, 제천, 충주, 증평, 보은), 충남(태안), 경북(영양, 의성 안동), 전북(고창, 임실, 정읍), 강원(춘천, 영월, 횡성)에서 고추 노지재배시 발생하는 병을 모니터링하였다 (그림 2-1). 강원도 지역을 제외한 충북, 충남, 경북, 전북 지역은 충북대 및 각 농업기술센터의 도움을 받아 시료 및 자료를 수집하였다. 그 결과, 고추에 가장 큰 피해를 주었던 역병과 탄저병 중에 역병에 대한 저항성 품종이 보급되면서 역병에 의한 피해가 줄고 탄저병에 의한 피해가 증가한 것을 알 수 있었다. 세균성 점무늬병은 과실보다 잎에 발생하면서 직접적으로 고추생산에 피해를 주는 병은 고추 탄저병이었다 (그림 2-2). 탄저병의 발생이 빠른 곳은 정식 이후 발생하여 고온다습하며 강우가 많은 시기에 대발생하였다. 과실에 발생하는 탄저병은 피해의 95% 이상을 차지하여 과실에만 병을 일으켜 그 피해가 컸다. 녹색의 미숙과와 빨간색의 성숙과 모두에 발생하며 발생 초기에 움푹 들어간 증상으로 시작하여 점차 확대되면서 병징부위에 흑색의 병반이 형성된다 (그림 2-3). 이 때 온·습도가 높을 때 병반에 홍색의 포자로 된 점질물이 발생하고, 포자로 이루어진 점질물이 비 또는 바람에 의해 전파되어 병을 퍼뜨렸다.



그림 2-1. 고추 노지재배시 발생하는 식물병 모니터링 지역



그림 2-2. 고추재배 시 주요 병해 발생 시기

- 고추탄저병균의 분리 및 동정

지역별로 수집된 탄저병균의 균학적 특성을 조사하기 위하여 각각의 병반을 소독된 칼로 잘라내어 PDA 항생제배지(Potato dextrose agar; potatoes infusion 20%(w/v), Bacto dextrose 2%(w/v), Bacto agar 1.5%(w/v), Streptomycin) 및 LB(Luria Bertani Agar; tryptone 1%(w/v), yeast extract

0.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v)]에 25℃에서 3일간 배양하였다. 모든 균주는 계대배양과 단포자 분리를 통하여 순수분리하고 PDA배지에서 7일간 배양시킨 뒤 건조하여 -75도 deep-freezer에 보관하며 실험을 진행하였다.

고추 이병체에서 채집하고 순수 분리한 균들의 동정을 위하여 ITS region(18s rRNA)의 염기서열 분석으로 동정하였다. DNA를 추출하기 위하여 PDA배지에서 키운 진균의 균사체를 알맞게 잘라내어 1.5 ml tube에 넣고 DNA Extraction buffer(1M Tris-Hcl (pH 8.0) 0.1%, 0.5M EDTA (pH8.0) 0.02%, KCl 0.07% 500 μ l)를 넣어주고 tube안의 균사체를 잘 갈아 5,000 RPM에 10 분 동안 원심 분리하였다. 그 다음 상층액만 새 1.5 ml tube에 옮기고 isopropanol 300 μ l를 넣어주고 반응시켜주었다. 그리고 -20℃ 냉동실에 20분 이상 놓아두고, 4℃에서 10,000 RPM으로 10 분 동안 원심 분리하였다. 이 후 상층액을 따라 버리고 70% EtOH 500 μ l를 넣어 washing한 후 말려서 TE buffer(50 μ l)를 넣고 녹여 DNA를 얻었다. 획득한 genomic DNA로 small subunit ribosome을 구성하는 18S rRNA(ITS region)지역을 유니버설 프라이머 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 그리고 염기서열 분석 결과를 NCBI database에서 BLASTN을 이용하여 동정하였다.

국내의 탄저병균은 1990년대에는 *C. gloeosporioides*로 보고되었지만, 최근에는 주된 병원균이 *C. acutatum*으로 변화되어 있다고 보고되었다 (Kim 등, 2008). 이처럼 포장에서의 병원균 집단은 시기와 지역 등에 따라서 크게 변화할 수가 있다. 2014년 고추 주요생산지에서 수집한 약 60여개의 고추탄저병균의 동정 결과 모두 *C. acutatum*으로 타나났다. 따라서 국내 고추에서 발생하는 탄저병은 주로 *C. acutatum*에 의한 것이라는 것을 알 수 있었다.



그림 2-3. 고추 노지재배지에서 수집된 고추탄저병 이병체

2. 고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 특성 조사

- *C. acutatum* KC-05의 분생포자의 특징

균학적 특성 조사 및 병원성 조사를 위하여 *C. acutatum*으로 동정된 균주 중 강원도 춘천에서

분리된 5번째 균주를 선발하였다. 그리고 *C. acutatum* KC-05로 명명하였다 (그림 2-4). KC-05균주의 분생포자 형태를 관찰하기 위하여 PDA 배지에 접종하여 25°C에서 7일간 빛조건에 배양하여 포자생성을 유도하여 분생포자의 크기 및 모양을 측정하였다. 그 결과, 분생포자의 길이는 평균 $10.43 \pm 2.59 \mu\text{m}$ 로 나타났으며, 너비는 평균 $3.43 \pm 0.60 \mu\text{m}$ 였다. 다른 연구들에서 *C. acutatum*의 분생포자의 길이는 $10 \sim 14 \mu\text{m}$ 로 알려져 있다. KC-05균주의 분생포자 길이는 조금 작은편에 속하는 것을 알 수 있었다. 그리고 일반적으로 알려져 있는 포자의 모양은 양쪽 끝이 둥근 cylindrical한 모양의 분생포자 모양으로 알려져 있으나, 자세히 살펴보면 KC-05의 분생포자는 한쪽 끝만 뾰족한 mixed된 모양이 62%로 가장 많았다. 그리고 양쪽 다 둥근 cylindrical한 모양이 25%정도 되었으며, 양쪽다 뾰족한 모양이 13%로 가장 적었다 (표 2-1). 이 결과는 *C. acutatum* 분생포자의 크기 및 모양은 분리된 host와 genotype에 의해 변이가 많은 것을 알 수 있다. 기존 다른 연구에서도 isolates에 따른 차이가 존재하기 때문이다.

표 2-1. *C. acutatum* KC-05의 분생포자 형태

Host	Pathogen	Isolate	Size (μm)		Shape (%)		
			Length	Width	Fusifor m	Mixed	Cylindri c
Pepper	<i>Colletotrichum acutatum</i>	KC-05	10.43 ± 2.59	3.43 ± 0.60	13	62	25



그림 2-4. 선발된 *C. acutatum* KC-05 균주의 morphology 및 conidia 현미경 사진 (Bar=10 μm)

- *C. acutatum* KC-05의 배양배지

곰팡이를 배양하는 일반적인 배지는 PDA배지를 사용한다. 그러나 그 균주의 특성이나 필요에 의해 다른 배지들도 사용하게 된다. 따라서 *C. acutatum*을 배양하는데 효율적인 배양조건을 알아보기 위하여 기존 곰팡이 배양에 사용되는 PDA배지를 포함하여 CM(Complete Media), V8(V8 juice)배지 그리고 OMA(Oat Meal Agar)배지를 사용하여 광조건과 암조건 하에서 25°C에서 배양하고 4일차 8일차에 관찰 및 포자 수를 측정하였다 (그림 2-5). 그 결과 고추 탄저병균은 4가지 배지에서 모두 성장하였다. 그러나 포자생성 수에서 암조건보다 광 조건에서 OMA배지가 가장 많았고, 다음으로 V8배지 그리고 PDA 배지 순이었다. CM배지는 일반적으로 균사를 생장시킬 때 필요한 배지지만 빛 조건에서 소량의 포자를 만드는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 colony의 색깔에서도 차이를 보였다. 광조건에서 PDA배지는 붉은 갈색을 띄었으며, V8배지에서는 초기에는 흰색으로 자라다가 점점 붉은 갈색으로 천천히 변하였다. OMA배지에서는 중앙에 분생포자들이 모여 있는 점액질이 많이 분포하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것

은 OMA배지는 Oat Meal을 재료로 하여 식물과 가장 가까운 형태의 배지로 탄저병원균 접종 시 식물체에 접종한 것과 비슷한 현상을 나타내는 보였다.

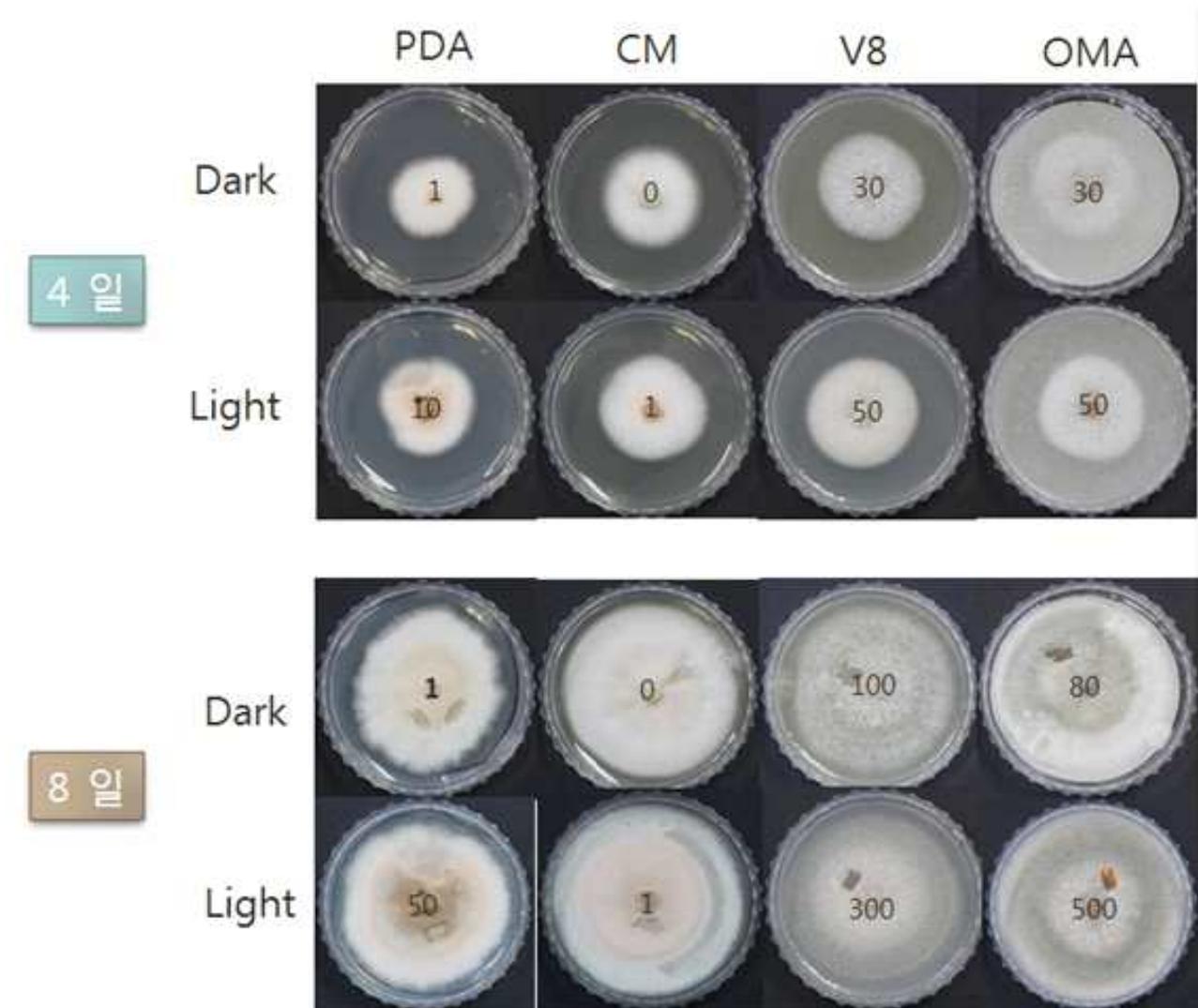


그림 2-5. *C. acutatum* KC-05의 배양배지에 따른 포자 수 측정

- *C. acutatum*의 저장법

각 분리한 균주들을 보관하는 저장방법을 고안하기 위하여 2가지 방법을 선택하였다. 첫 번째 방법은 포자현탁액을 모아 20% glycerol 농도로 섞은 뒤 -70℃에 보관하는 방법과 배지에서 배양한 뒤 알맞은 크기로 잘라 agar 배지 자체를 건조시켜 vial tube에 그대로 넣고 -70℃에 보관하는 방법이다. 앞에서 사용했던 PDA, V8, OMA배지에서 각각 배양하여 키운 뒤 두 가지 방법을 적용하였다. 그 결과 3가지 배지에서 모두 다 그리고 2가지 방법의 단기간 저장으로 다시 접종하였을 때 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 이 후에 두 가지 방법으로 장기적으로 보관하였을 때 적용가능한지 시험해 보고자 한다(그림 2-6).

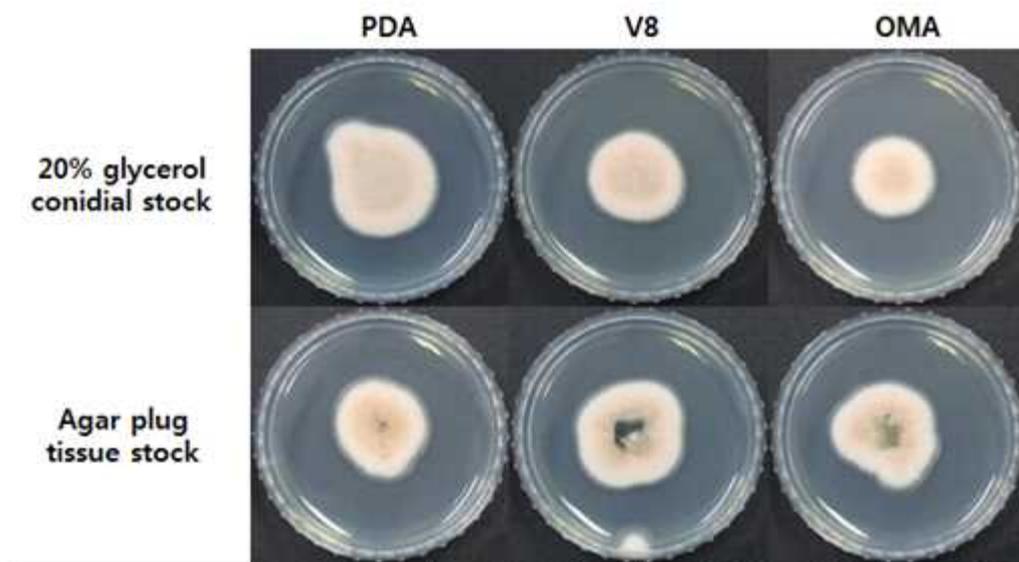


그림 2-6. *C. acutatum*의 두 가지 stock 방법적용 (재집종 후 4일차).

- *C. acutatum*의 KC-05의 분생포자 DAPI염색

고추탄저병균의 핵을 염색하고 관찰하였다. V8배지에서 8일동안 광 조건에 배양하여 포자를 얻은 후 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma)로 염색 후 형광현미경으로 관찰하였다. *Colletotrichum* sp.의 분생포자는 한 개의 세포로 이루어져 한 개의 핵이 존재한다. 그러나 관찰 결과 대부분이 한 개의 핵으로 이루어져 있었으나, 약 10% 정도는 두 개의 핵을 가지고 있는 것들도 관찰되었다 (그림 2-7). 이는 발아단계에 필요한 한 개의 핵에서 핵분열이 일어나 두 개의 핵이 만들어진 것으로 보였다. 따라서, 다음으로 성장단계별로 염색을 통한 관찰을 진행할 것이다.

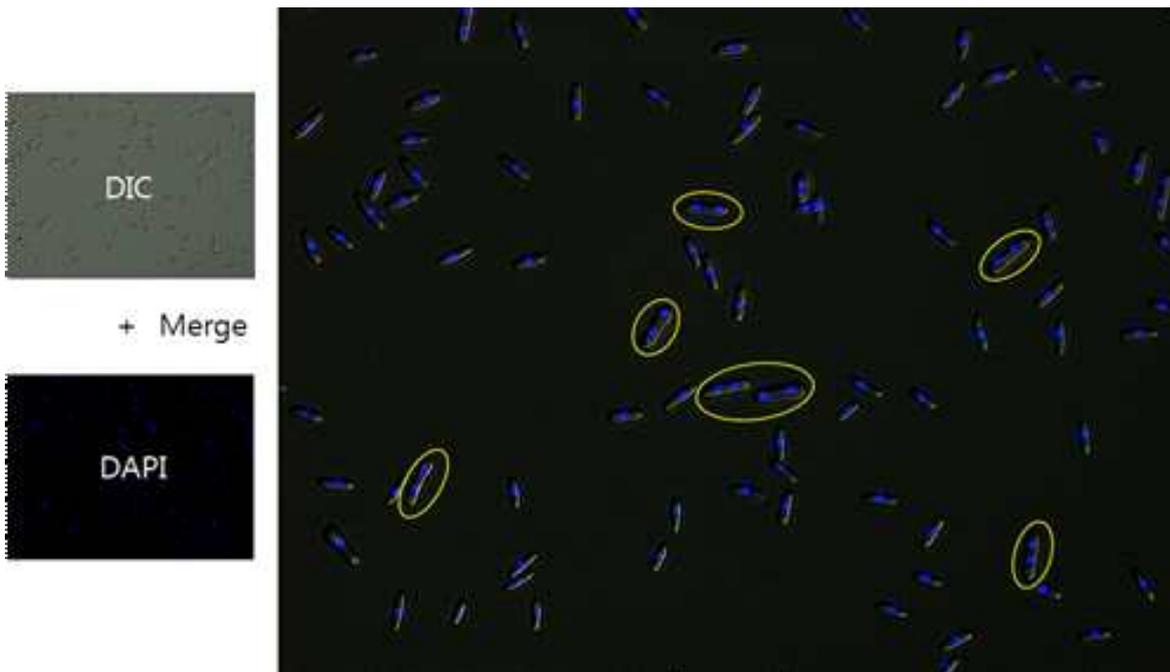


그림 2-7. *C. acutatum* 분생포자 DAPI염색 ($\times 400$)

- *C. acutatum*의 KC-05의 분생포자 형성

고추탄저병균의 분생포자가 생성되는 모양을 현미경으로 관찰하였다. OMA배지에 접종 후 포자가 형성되지 않은 균사 부분을 조각으로 잘라내어 습실 처리된 slide glass에 올려놓은 뒤 포자생성을 유도하였다. 그리고 24 hr 후에 생성된 포자를 현미경으로 관찰하였다. 배지에서 올라온 공중균사 끝 부분에 분생포자가 생성되어 있는 것을 볼 수 있었으며, 시간이 지나면 공중균사 곁가지를 뺀 균사 끝에서 분생포자가 생성되는 것이 관찰 되었다 (그림 2-8).

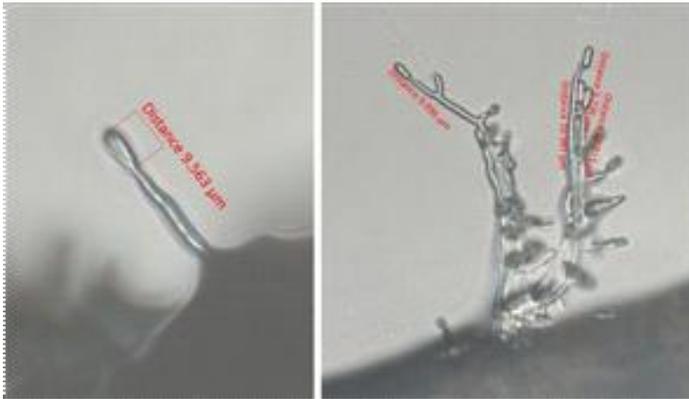


그림 2-8. *C. acutatum*의 분생포자 형성 (×200)

- *C. acutatum*의 부착기 생성

식물병원성 곰팡이 중 일부는 식물체를 뚫고 들어갈 수 있는 부착기(Appressorium)라고 하는 기관을 만들어 낸다. 따라서 고추탄저병균도 부착기를 만드는지 여부와 부착기를 만드는 조건에 대한 연구를 진행하였다. 부착기를 만드는데 필요한 조건은 식물체의 wax layer와 같은 소수성 표면과 분생포자의 washing을 통한 부착기 생성의 방해요소인 mucilage와 같은 inhibitor들을 없애주는 것이다. 따라서 V8배지에서 8일 광 조건에 키워 포자를 얻은 뒤 두 겹의 miracloth에 filter하여 균사를 제외한 포자를 얻을 수 있었다. 그리고 얻어진 균사 현탁액은 5,000 rpm, 10분 원심분리 후 상층액을 제거하는 방법으로 2회 진행하였다. 그리고 hemocytometer를 이용하여 1×10^4 conidia/ml의 농도로 하여 소수성 표면의 cover glass위에 drop하여 올려놓고 5시간 동안 습실 처리하였다. 그 결과 washing을 진행한 포자에서는 부착기를 형성하였는데, washing을 진행하지 않은 포자에서는 부착기를 생성하지 못하고 발아만 하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 부착기 생성에 있어 inhibitor의 washing 과정이 중요하다는 것을 알 수 있었다 (그림 2-9).



그림 2-9. Washig과정 (inhibitor제거)에 의한 *C. acutatum*의 부착기 생성 비교

고추탄저병균의 부착기 생성에 있어 소수성 표면은 과연 중요한지에 대한 연구를 진행하였다. 동일한 방법으로 washing 과정을 거친 분생포자를 준비하고 소수성 표면(cover glass)과 친수성 표면(slide glass) 위에 각각 포자를 올려놓아 광조건과 암 조건에서 부착기를 형성하는 비율을 측정하였다. 그 결과 광조건보다 암 조건에서 조금 더 부착기를 만드는 것이 보였지만 유의차는 없었다. 그리고 특이하게도 친수성 표면에서도 부착기를 형성하였으나 소수성 표면보다 적은 수의 부착기를 만들었다 (그림 2-10). 따라서, 고추탄저병균은 암 조건으로 소수성 표면에서 부착기를 형성시키는 것이 적절하다고 판단하였다.

암 조건으로 소수성 표면에서 가장 많은 부착기를 형성하였는데 시간별로 부착기 형성율을 측정하였다. 그 결과 접종 후 20 hr에서 50% 이상의 부착기 형성율로 가장 많은 부착기를 형성하였다. 그리고 24 hr 이상부터는 더 늘어나지 않고 유지되어 20hr이 가장 최대로 부착기를 만드는 것을 알 수 있었다 (그림 2-11). 부착기의 melanization은 식물체를 뚫고 들어가는 데 중요한 요소이다. 고추탄저병균의 부착기의 melanization은 접종 16시간 후부터 부착기의 색이 검게 변하는 것으로 관찰되었다 (그림 2-12).

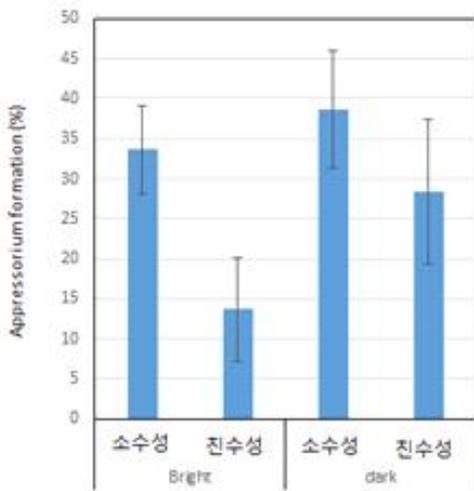


그림 2-10. 표면 성질에 따른 *C. acutatum*의 부착기 형성율 (12 hpi)

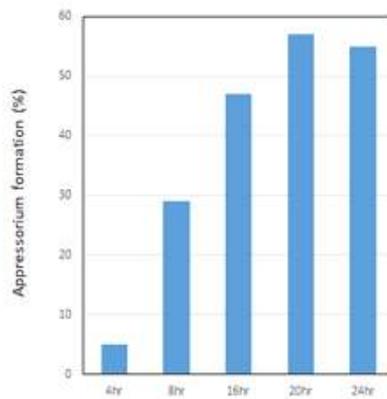


그림 2-11. 소수성 표면에서 시간에 따른 *C. acutatum*의 부착기 형성율

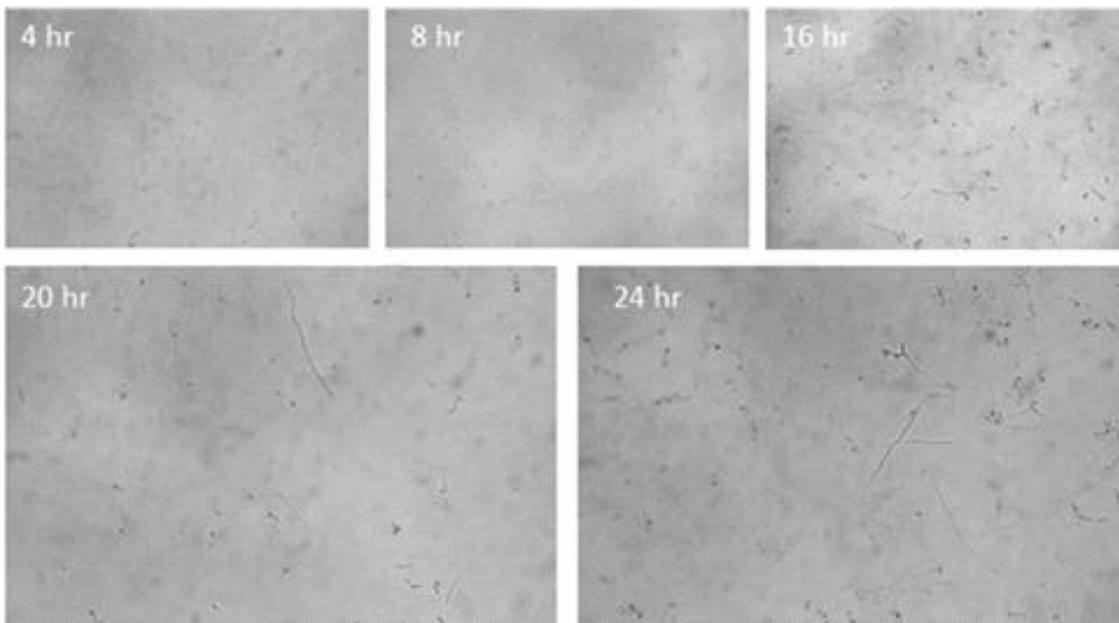


그림 2-12. 소수성 표면에서 시간에 따른 *C. acutatum*의 부착기 형성율

3. 주요 고추 탄저병균의 상호 병원성 조사

고추 탄저병원균인 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*은 다양한 기주식물을 가해하는 것으로 알려져 있으며, 국외 연구로 높은 수준의 생물학적 다양성이 보고되고 있다. 하지만, 국내에서는 일부 한정된 기주와 지역에서 분리한 고추탄저병원균에 대한 연구만이 진행된 실정이다. 그리고 고추 탄저병원균 집단에 대한 지역과 품종에 따른 유전적 다양성과 병원성에 관한 연구가 미흡하다.

단일 기주 식물에 서로 다른 탄저병원균이 침입한다는 것을 Howard 등 (1992)은 딸기의 탄저병균을 *C. fragariae*, *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* 등 세 가지의 탄저병원균이 병을 유발하는 것으로 보고하였다. Almond의 경우도 *C. gloeosporioides*와 *C. acutatum*이 동시에 병을 일으킨다. 위와는 반대로 동일한 한 종류의 탄저병원균이 다양한 기주를 침입하는 보고도 있다. 한 종류의 탄저병원균이 다양한 기주 식물을 침입하는 것은 매우 흔한 일로서 *C. gloeosporioides*는 almond, avocado, 사과, 딸기, 고추 등을 침입하는 다범성 병원균으로 보고되어 있다 (Freeman 등, 1998). 그러나 앞에 연구로 볼 때 최근 국내의 고추 탄저병을 일으키는 종은 *C. acutatum*이라 여겨지며 이와 더불어 병원성에 관한 연구가 전무하기 때문에 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다.

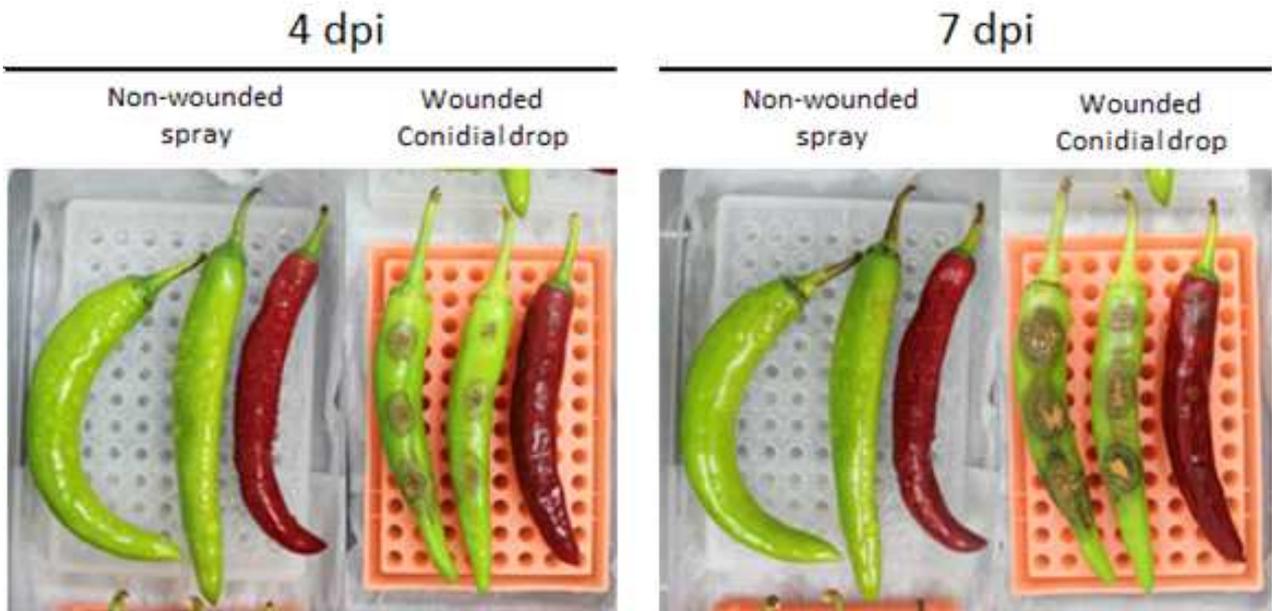


그림 2-13. 고추탄저병균의 상처 및 비 상처 집중

고추과실에 대한 탄저병 집중 방법을 알아내기 위하여 미성숙과와 성숙과로 실험을 진행하였다. *C. acutatum* KC05 strain 1×10^6 conidia/ml의 농도로 하여 spray처리를 하였다. 또한 과실에 syringe needle로 10번 찌어 상처를 내어 포자현탁액을 20 ul씩 집중하여 발병여부 및 관찰을 수행하였다. 그 결과 상처를 낸 처리 구에서는 미성숙과에서 4일차에도 병징이 나타나기 시작했다. 7일 차에는 병반이 커지며 포자 점진물이 생기면서 병이 크게 확대된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 성숙 과에서는 7일이 되어도 병이 발생하지 않은 것으로 보였다. 상처를 내지 않고 spray 처리한 처리 구에서는 4일차에서는 큰 변화가 없었고 7일 차 미성숙과에서 초기 병징 반점이 나타나기 시작하였다. 따라서 과실표면을 덮고 있는 wax layer가 탄저병이 병을 일으키는데 방어 작용을 한 것이라 생각되었다 (그림 2-13).

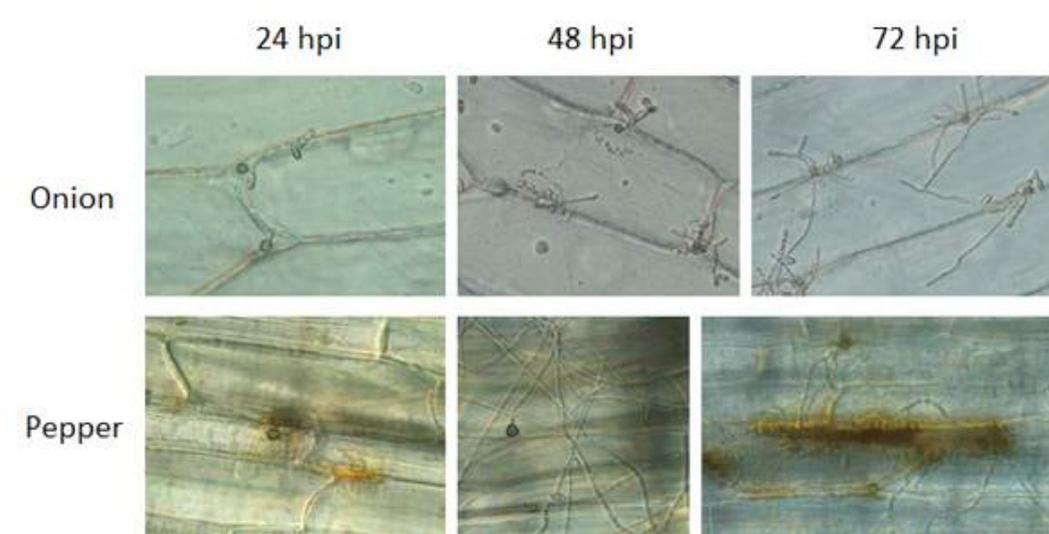


그림 2-14. 양파와 고추식물 세포에서 *C. acutatum*의 침입과정

식물세포 내로 침입하는 과정을 알아보기 위하여 양파와 고추 엽맥 부위를 얇게 잘라내고 그 위에 포자현탁액을 떨어뜨려 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 양파와 고추 식물세포에서 모두 부착기를 형성하였다. 그러나 양파에서는 72시간까지 식물세포를 뚫고 들어가는 2차 감염 군사를 형성하는 모습은 관찰할 수 없었다. 고추에서는 72시간 쯤 뚫고 들어가는 감염 군사가 확인되었지만 반복실험을 통하여 재확인을 해보아야 할 것으로 사료되었다 (그림 2-14).

식물 내 감염 구조 및 침입과정을 식물세포와 구분하여 자세히 관찰하기 위하여 *C. acutatum*에 GFP를 형광단백질을 삽입하였다. 먼저 형광단백질을 형질전환하기 위하여 원형질체를 만들었다. 먼저 V8 plate에 *C. acutatum*을 접종하여 포자유도 배양하였다. 포자가 자라면 멸균수를 첨가하여 포자를 끊어 포자 현탁액을 만들고 거즈로 걸러 주었다. 거른 포자현탁액은 ampicillin이 첨가된 CM broth 배지에서 2~3일간 자란 군사 현탁액을 mesh에 걸러 군사를 얻고 sucrose 용액으로 washing하여 주었다. Lysing enzyme를 사용하여 washing된 군사체에 넣고 incubation하였다(그림 2-15). 현미경 관찰을 통하여 protoplasting상태를 관찰하였으며, 원심분리를 통해 protoplast를 얻고 거즈로 걸러 깔끔하게 진행된 protoplast만을 획득하였다. 이후에 hemocytometer를 이용하여 5×10^7 protoplast/ml 농도로 맞추고 -80°C deep freezer에 보관하여 연구수행에 사용하였다. 만들어진 원형질체를 이용하여 GFP::Hygromycin B gene이 tagged 된 플라스미드 pIGPAPA를 형질 전환하여 GFP가 발현되는 형질 전환체를 얻었다 (그림 2-16). 만들어진 형질전환체로 식물체에 접종하여 관찰을 진행중에 있다.

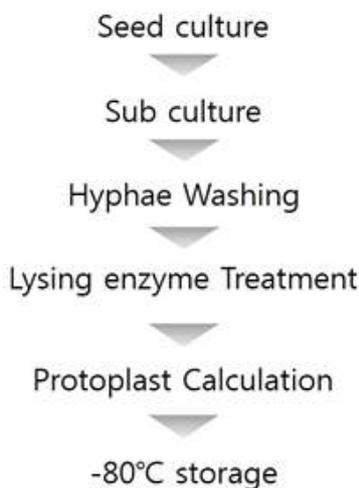


그림 2-15. 고추탄저병원균 *C. acutatum*의 원형질체 제작순서도.

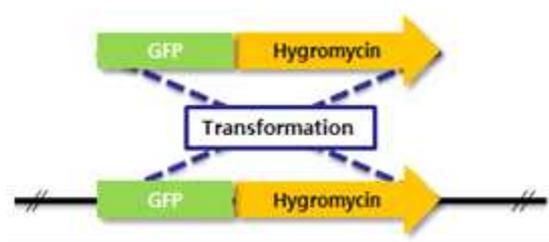
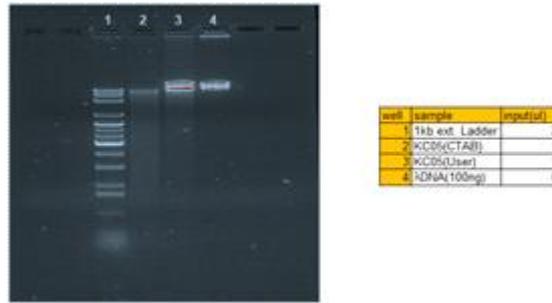


그림 2-16. GFP를 발현하는 고추탄저 병원균의 형질전환체 생성

4. 고추탄저병균 (*C. acutatum*)의 신규(*de novo*) 유전체 NGS data 생성

국내에서 대표적으로 고추에 가장 많은 문제를 일으키는 고추탄저병균 중에 선발된 *C. acutatum* KC-05 균주의 유전체를 해독하기 위하여 NICEM에 의뢰하여 PAC Bio sequencing 방법으로 수행하며, assembly을 위해서 Illuminia sequencing에 의한 data를 보완하는 두 가지 sequencing 방법을 사용하였다. sequencing을 위해 필요한 gDNA를 균사체에서 얻어 QC를 진행하였다. 그 결과 ratio 260/280 값 1.87에 농도 193.3 ng/ul로 전체농도 19.3 ug을 얻어 sequencing을 진행할 수 있었다 (그림2-17).



No.	Sample name	Conc. (ng/ul)	RIN (for RNA)	260/280 ratio	miRNA ratio	Total conc. (ug)	Sample QC result	Other (260/280)	Tube Name
1	KC05	193.3	0	1.87	0	19.3ug	Pass	0	KC05

그림 2-17. *C. acutatum* KC-05 gDNA QC결과

현재 PAC Bio RS II system (Pacific Biosciences, San Diego, CA)과 MiSeq system (Illumina, San Diego, CA)에 의한 genome sequencing분석이 완료되었다. 그 결과로 mitochondrial DNA의 분석을 먼저 완료하였다 (표.2-2).

표 2-2. *Colletotrichum acutatum*의 mitochondrial DNA 분석결과

Gene / region	Start-stop position	Spacer (+) Overlap (-)	Length (bp)	Start Codon	Stop codon	Strand
cob	1-1179	916	1179	ATG	TAA	L
tRNA-Cys	2096-2164	174	69			L
cox1	2339-3937	96	1599	ATG	TAA	L
tRNA-Arg	4034-4104	213	71			L
nad1	4318-5424	349	1107	ATG	TAA	L
nad4	5774-7105	153	1332	ATG	TAA	L
tRNA-Cys	7259-7327	322	69			L
atp8	7650-7814	55	165	ATG	TAA	L
atp6	7870-8661	1465	792	ATG	TAA	L
18S rRNA	10127-11637	175	1511			H
tRNA-Tyr	11813-11899	10	87			L
tRNA-Asn	11910-11980	74	71			L
cox3	12055-12864	243	810	ATG	TAA	L
tRNA-Gly	13108-13178	7	71			L
tRNA-Asp	13186-13258	32	73			H
tRNA-Ser	13291-13371	74	81			H
nad6	13446-14129	-10	684	ATG	TAG	L
tRNA-Val	14120-14191	8	72			H
tRNA-Sec	14200-14270	18	71			H
tRNA-Ile	14289-14359	31	71			H
tRNA-Ser	14391-14476	54	86			-

tRNA-Pro	14531-14603	173	73			H
28S rRNA	14777-17345	283	3093			H
	19189-19712	236				
rps3	17629-19050	138	1422	ATG	TAA	H
tRNA-Thr	19949-20019	9	71			H
tRNA-Glu	20029-20101	4	73			H
tRNA-Met	20106-20174	5	69			L
tRNA-Met	20180-20252	34	73			L
tRNA-Leu	20287-20369	5	83			H
tRNA-Ala	20375-20446	14	72			L
tRNA-Phe	20461-20533	5	73			H
tRNA-Leu	20539-20625	6	87			H
tRNA-Gln	20632-20704	1	73			H
tRNA-His	20706-20785	21	80			L
tRNA-Met	20807-20879	324	73			L
nad2	21204-22886	-1	1683	ATG	TAA	L
nad3	22886-23296	111	411	ATG	TAA	L
tRNA-Lys	23408-23480	217	73			H
atp9	23698-23922	252	225	ATG	TAA	H
cox2	24175-24927	1062	753	ATG	TAA	L
tRNA-Asn	25990-26060	1428	71			L
tRNA-Arg	27489-27559	115	71			H
nad4L	27675-27944	-1	270	ATG	TAA	H
nad5	27944-29935	153	1992	ATG	TAA	L
tRNA-Lys	30089-30161	731	73			H

그 결과, *C. acutatum* mitochondrial DNA는 30,892 bp의 길이로 되어 G+C content는 34.7%를 차지하였다. 그리고 15개의 코딩유전자와 22개의 tRNA, 그리고 2개의 rRNA로 구성되었다. 코딩유전자의 모든 시작 코돈은 ATG 였으며, nad6 유전자만 TAG의 종결코돈을 가지며 나머지는 TAA의 종결코돈을 갖고 있었다. 유전자들은 ATP-synthase subunits (atp6, -8, and -9), cytochrome oxidase subunits (cox1, -2 and -3), apocytochrome b (cob), NADH dehydrogenase subunits (nad1, -2, -3, -4, -4L, -5, and -6), 그리고 ribosomal protein S3 (rps3)를 포함하고 있었다. 그리고 tRNA의 길이는 69 bp - 87 bp까지 작은 사이즈로 존재하였으며, 18S rRNA는 1511 bp, 28S rRNA는 3093 bp의 길이를 갖고 있었다.

고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석을 위하여 고추탄저병균의 균사생장, 포자생성, 부착기생성, 식물체 감염 단계로 RNA를 얻어 RNA-Seq을 수행할 예정이다. 현재 균사, 포자단계에서 RNA를 추출하여 Library를 제작하고 있으며 부착기와 식물체 감염 단



그림 2-18. *C. acutatum*의 균사 단계 RNA sample 준비 그림 2-19. *C. acutatum*의 부착기 단계 RNA sample 준비

계는 RNA 샘플을 준비하고 있다. 균사에서 RNA를 얻기 위하여 CM broth배지에 24시간동안 가만히 두어 균사 생장을 하였다. 특이하게도 진탕배양을 하거나 24시간 이상이 넘어갈 경우 포자가 생성되었다 (그림 2-18). 그리고 포자 단계는 V8 배지에서 키운 뒤 포자를 miracloth에 걸러 원심 분리하여 고농도의 포자현탁액을 얻었다. 그리고 액체질소에 한 방울씩 떨어뜨려 RNA sample을 만들었다. 그리고 부착기 단계는 균학적 특징에서 진행하였던 washing과정과 소수성 표면위에서 20 hr 배양하여 부착기 생성 여부를 관찰한 뒤 이를 다시 거두어 filtering으로 한데모아 샘플을 얻었다. 식물체 감염 단계는 병원성 조사와 더불어 샘플을 만드는 방법을 고안 중에 있다 (그림 2-19).

5. 고추작물 노지 재배 시 공기전반 탄저병균의 발생 분석

고추탄저병에 의한 대부분의 피해는 고추과실에 직접적으로 발생하여 고추생산량에 큰 영향을 준다. 이러한 공기전반에 의한 병은 농작물 재배 지역 내에 상시적으로 존재하여 대기 중 분포하고 있는 포자에 의해 발생한다. 또한 고추탄저병원균을 포함한 식물병원성 곰팡이는 토양 또는 종자, 식물의 잔재물 등에서 여러 번식체(propagule, 균사, 포자, 자실체 등)로 일정기간 동안 생존(또는 월동)을 한 후 그 중 일부는 식물의 생육기간 동안 포자를 형성하고 공기 전반을 통해 건전한 식물체를 감염한다. 2015년에 이러한 병환에 의해 국내 주요 고추 생산지(충청도, 전라도, 강원도)에 고추탄저병이 발생하였다. 고추탄저병원균이 발생한 이병조직을 수집하였다(그림 2-20). 지역별로 수집된 탄저병균의 균학적 특성을 조사하기 위하여 각각의 병반을 소독된 칼로 잘라내어 PDA 항생제배지 (Potato dextrose agar; potatoes infusion 20%(w/v), Bacto dextrose 2%(w/v), Bacto agar 1.5%(w/v), Streptomycin) 및 LB(Luria Bertani Agar; tryptone 1%(w/v), yeast extract 0.5%(w/v), NaCl 0.5%(w/v)]에 25℃에서 3일간 배양하였다. 모든 균주는 계대배양과 단 포자 분리를 통하여 순수분리하고 PDA배지에서 7일간 배양시킨 뒤 건조하여 -75도 deep-freezer에 보관하며 실험을 진행하였다.

고추과실 외에 고추 잎에 발생한 병징을 알아보기 위하여 과실에 발생한 탄저병과 같은 방법으로 이병조직을 분리하고 순수분리하였다. 그 결과 탄저병원균은 발견되지 않았으며, *Gibberella moniliformis*와 *Alternaria brassicae*로 분석되었다(그림 2-21). 따라서 수확단계에 발생하는 탄저병은 과실에 발생하는 것이 확인되었다.

과실에서 분리하여 배양된 균들이 고추탄저병균인지 확인하기 위하여 PCR로 동정하였다. DNA를 추출하기 위하여 PDA배지에서 키운 진균의 균사체를 알맞게 잘라내어 1.5 ml tube에 넣고 DNA Extraction buffer(1M Tris-Hcl (pH 8.0) 0.1%, 0.5M EDTA (pH8.0) 0.02%, KCl 0.07% 500 μ l를 넣



그림 2-20. 국내 주요 고추 생산지에서 발생한 고추탄저병 및 수집한 고추탄저병 이병체.



그림 2-21. 수확단계의 고추 잎에서 분리된 병원균 2종.
 어주고 tube안의 균사체를 잘 갈아 5,000 RPM에 10 분 동안 원심 분리하였다. 그 다음 상층액만 새 1.5 ml tube에 옮기고 isopropanol 300 μ l를 넣어주고 반응시켜주었다. 그리고 -20 $^{\circ}$ C 냉동실에 20분 이상 놓아두고, 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 RPM으로 10 분 동안 원심 분리하였다. 이 후 상층액을 따라 버리고 70% EtOH 500 μ l를 넣어 washing한 후 말려서 TE buffer(50 μ l)를 넣고 녹여 DNA를 얻었다. 탄저병원균의 여부를 동정하기 위하여 획득한 genomic DNA에서 ITS region지역에서 디자인 된 *C. acutatum*에 종특이적인 Ca1-1 (CCAGGGGAAGCCTCTCGCGGGCCT)과 유니버설 프라이머인 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)를 한 쌍으로 하여 PCR로 증폭하였다.

그 결과, 밴드가 확인된 균주들은 총 60여개로 498 bp의 종특이적인 프라이머로 증폭된 것을 확인 하였다(그림 2-22).

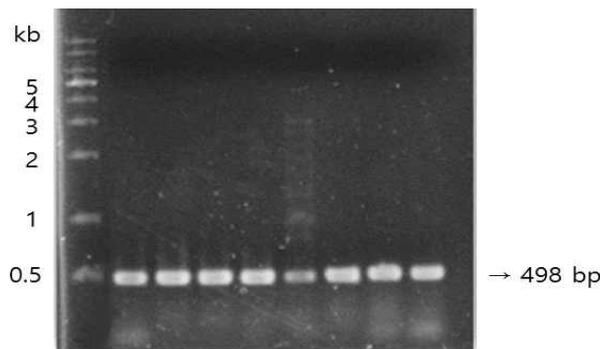


그림 2-22. *C. acutatum*의 종특이적 프라이머 Ca1-1과 유니버설 프라이머 ITS4를 이용한 PCR 동정 결과.

6. 고추작물 공기전반 탄저병원균의 균학적 특성 조사

각 지역에 따라 수집된 *C. acutatum* 균주들을 PDA배지에서 25 $^{\circ}$ C의 빛 조건에서 배양하여 자라는 colony의 모양(morphology) 및 색깔(pigmentation)을 비교하였다(그림 2-23). 그 결과, 충북, 충남, 경북, 강원도 지역 전반에 걸쳐 분홍색을 띠며 뒷면에는 약한 회색을 보이는 균주가 가장 많았다. 다음으로 오렌지색을 띠며 공중 균사가 적은 모양이 충북, 충남, 경북, 강원도에 걸쳐 지역마다 총 5균주가 분리되었다. 흰색 균사 위에 자색의 특징을 보이는 균주는 총 5균주로 충북과 경북에서만 분리되었으며 약 8%를 차지하였다. 그리고 자라는 모양이 각각 특이적인 9개의 균주가 분리되었다. 따라서 가장 많이 분리된 분홍색을 띠는 균주는 우리나라의 고추탄저병을 대부분 차지할

것으로 보였다. 오렌지색의 고추탄저병원균은 각 4개도에서 발견되어 진 반면에 자색을 띠는 고추탄저병원균은 충청과 경북에서만 특이적으로 분리되었다. 다른 모양(morphology) 및 색깔(pigmentation)을 나타내는 9개의 고추탄저병도 발견됨에 따라 다양한 유전적 다양성을 가질 것으로 예상하였다. 따라서 이들의 유전적 특성을 분석하였다.



그림 2-23. 국내 주요 고추 생산지(충청도, 전라도, 강원도)에서 분리한 고추탄저병의 모양(morphology) 및 색깔(pigmentation).

7. 고추탄저병원균들의 유전적 특성 조사 및 분석

유전적 특성을 분석하기 위하여 RAPD 시도하고자 하였다. 먼저 고추탄저병원균의 DNA를 추출하기 위하여 PDA배지에서 키운 진균의 균사체를 알맞게 잘라내어 1.5 ml tube에 넣고 DNA Extraction buffer(1M Tris-Hcl (pH 8.0) 0.1%, 0.5M EDTA (pH8.0) 0.02%, KCl 0.07% 500 μ l를 넣어주고 tube 안의 균사체를 잘 갈아 5,000 RPM에 10 분 동안 원심 분리하였다. 그 다음 상층액만 새 1.5 ml tube에 옮기고 isopropanol 300 μ l를 넣어주고 반응시켜주었다. 그리고 -20 $^{\circ}$ C 냉동실에 20분 이상 놓아두고, 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 RPM으로 10 분 동안 원심 분리하였다. 이 후 상층액을 따라 버리고 70% EtOH 500 μ l를 넣어 washing한 후 말려서 TE buffer(50 μ l)를 넣고 녹여 각각의 DNA를 얻었다. RAPD를 진행하기 위하여 OPC-2 프라이머(5'-GAG AGG CGT C-3')를 사용하여 진행하였다. PCR 조건은 pre-denaturation을 94 $^{\circ}$ C에서 5분동안 진행한 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 38반복을 진행한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 final extension을 진행하였다(표 2-3).

표 2-3. RAPD의 수행 조건

	Step	TM ($^{\circ}$ C)	Time (min)
38 cycles	Pre-denaturation	94	5
	denaturation	94	0.5
	annealing	55	1
	extension	72	2
	final-extension	72	7

그 결과, 모양이 각각 특이적인 균주 중에 6, 21, 52, 59번 균주의 밴드 패턴 양상이 다른 것으로 나타났다. 분홍색으로 가장 많은 모양과 색을 보인 균주 중에는 황성 지역의 51, 53번 균주가 밴드 패턴에 차이를 나타내었다(그림 2-24). 이 결과로 모양과 색깔에 따른 유전적인 다양성이 존재하며 유사한 모양과 색을 갖더라도 지역에 따라 유전적인 차이를 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있었다. 추

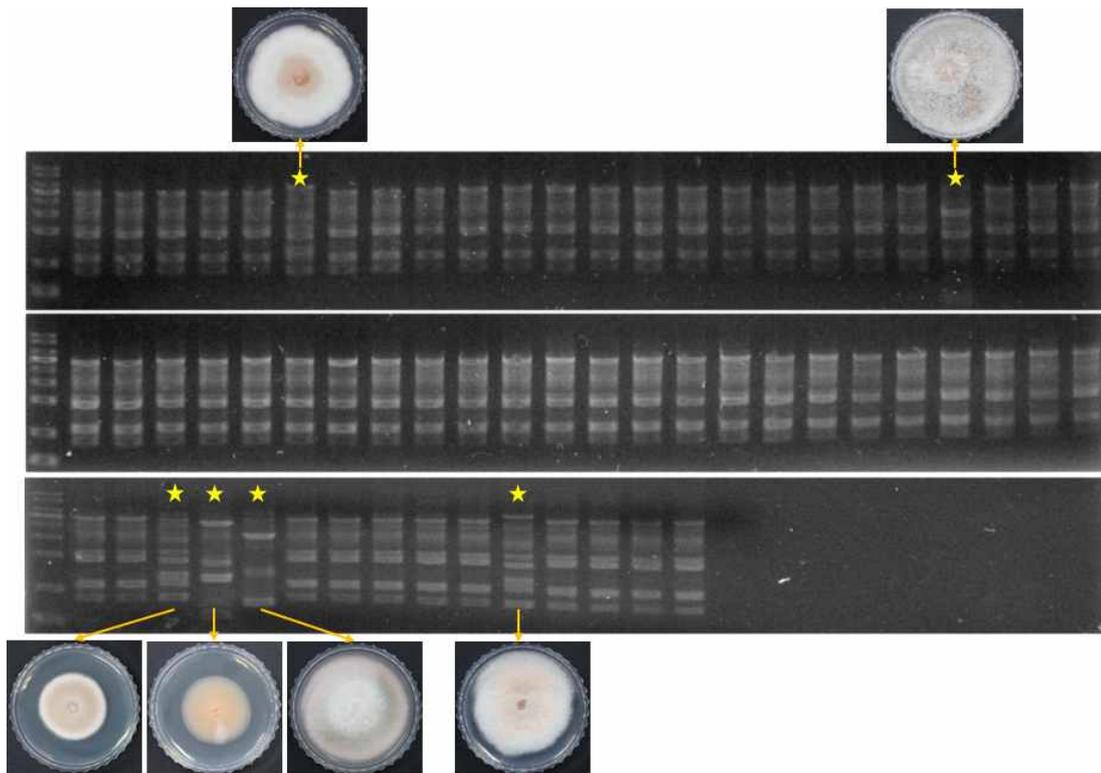


그림 2-24. 고추탄저병원균에 대한 OPC-2 프라이머 사용한 RAPD 결과.

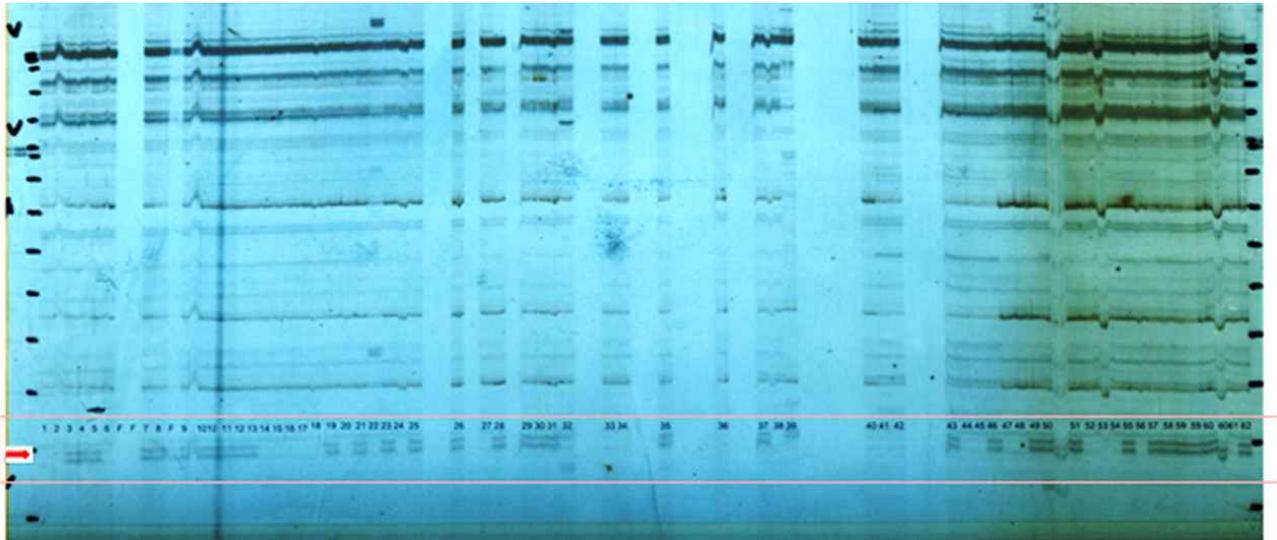


그림 2-25. 고추탄저병원균의 AFLP 분석 결과 (EcoRI - ACG, MseI - CTG).

가적으로 정확한 유전적 특성 분석을 위하여 OPC-2 프라이머 이 외에 더 다양한 프라이머로 조합하여 RAPD를 해보야 할 것으로 사료된다.

AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)는 유전체내 제한효소 부위의 변이를 탐지하여 고감도로 유전적 특성 분석이 가능한 장점이 있다. 따라서 본 연구 과제를 통해 수집된 탄저병원균들의 유전적 특성을 분석하기 위하여 AFLP 방법을 적용하여 분석하였다. AFLP를 수행하기 위하여 64개의 병원균들의 genomic DNA를 추출하였다. PDA에서 자란 균의 균사를 멸균 이쑤시개를 이용하여 긁어내어 튜브에 넣었고, phenol-chloroform extraction 방법을 통해 DNA를 추출하였다. 추출한 gDNA에서 EcoRI부위와 MseI부위로 AFLP 실험을 수행하기 위하여 프라이머 및 adaptor 프라이머를 제작하였다. Adaptor를 제작하기 위하여 EcoRI-A1과 EcoRI-A2를 pcr tube(5pmol/ul)에 넣고 MseI-A1과 MseI-A2를 또 다른 pcr tube에 넣는다. 피펫팅을 통해 잘 섞어준 후 PCR 기계를 이용하여 95℃ 2min, 95℃-25℃ (-1℃, each for 1 min) 조건을 맞춰주어 adaptor를 제작하였다. EcoRI - ACG, MseI - CTG 조합으로 AFLP를 실시하였다. 실험 결과 두 개로 이루어진 밴드 부분에서 밴드가 없는 균주들이 보였다(그림 2-25). 이들 균주들은 충청북도 지역에서 9개, 경상북도 지역에서 17개로 유전적인 다형성(polymorphism)을 나타내었다. 이러한 결과는 국내에 존재하는 고추탄저병원균에는 유전적인 다양성이 존재하는 것으로 보여진다. 그리고 모든 균주에서 공통적으로 지닌 밴드의 시퀀싱 분석을 통해 국내 고추탄저병원균의 분자마커로 이용 가능할 것으로 사료되어진다.

8. 고추탄저병균 (*C. acutatum*)의 신규(de novo) 유전체 NGS data 생성

지놈을 shotgun 방식으로 지놈 DNA를 절단하여 de novo assembly 로 작성하는 genome DNA *de novo* assembly 전략으로 수행하였다(그림 2-26). 선발된 *C. acutatum*의 유전체를 해독하기 위하여 PAC Bio RS II system (Pacific Biosciences, San Diego, CA)과 MiSeq system (Illumina, San Diego, CA)에 의한 genome sequencing을 수행하고 SSPACE V3.0으로 분석한 결과 최종 scaffolds 는 27개의 52,190,760bp로 이루어 졌으며, 가장 작은 길이가 14,215bp 그리고 가장 큰 길이는 6,776,476bp였으며, 평균 11,932,991bp로 이루어졌다 (표 2-4).



그림 2-26. Shotgun sequencing & assembly 분석과정.

표 2-4. SSPACE V3.0분석을 통한 *C. acutatum*의 genome 정보

Genome information	Contigs		Scaffolds	
	No.	Length (bp)	No.	Length (bp)
Total	39	52,181,250	27	52,190,760
N50	6	3,673,828	5	4,416,304
Shortest Length (bp)		12,548		14,215
Largest Length (bp)		6,290,098		6,776,476
Average Length (bp)		1,337,981		1,932,991

Annotation은 다양한 분석 프로그램(Trinity V2.0.6, GeneMark-ES V4.21, PASA V2.0.1, EVIDENCEModeler V1.1.1)을 이용하여 수행하였다. 그 결과 13,559개의 유전자에 20,550,771bp의 유전자 길이를 가지고 있었다. 가장 짧은 유전자 길이는 281bp, 가장 긴 유전자는 27,642bp였다. 그리고 평균 1,516bp 유전자 길이를 가지고 있었다. 그리고 유전자의 밀도는 3,849bp로 분석되었다. 이 중 13,376개의 유전자가 annotation이 되었다(표 2-5).

표 2-5. *C. acutatum*의 annotation 정보

Predicted Gene Information	Total
Gene No	13,559
Gene Length (bp)	20,550,771
Shortest Gene Length (bp)	281
Largest Gene Length (bp)	27,642
Average Gene Length (bp)	1,516
Gene Density (bp)	3,849

RNA-seq은 NGS 기술로 전사체(Transcriptom)를 분석 할 수 있는 방법이다. 발현되는 RNA 서열을 시퀀싱하여 전사체(Transcriptome)에 대한 다양한 정보를 한 번에 알아낼 수 있다. 일반적으로 RNA-seq으로 유전자 발현 및 차이 분석, 선택 발현 분석, 전사체 발견 및 주석 달기, 변이 발견, 융합 검출, RNA 편집 등이 가능하다. 이렇게 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석을 위하여 고추탄저병균의 균사생장(M;Mycelia), 포자생성(C;Conidia), 부착기생성(A;Appressorium), 식물체 감염(B;Biotroph stage, N;Necrotroph stage) 5단계로 RNA-Seq을 수행하고 있다. 현재 1차적으로 균사생장(M), 포자생성(C), 식물체 감염 두 단계(B, N)의 RNA-seq으로 DEG(Differential expression gene)분석을 수행하였다 (표 2-6). 그 결과 각 단계별로 발현에 차이가 나는 유전자가 1269개에서 6653개로 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 각각의 발현에 차이가 나타난 유전자들에 대한 분석을 수행 중에 있다. 그리고 추가적으로 정확한 data를 얻기 위하여 부착기생성(A;Appressorium), 식물체 감염(B;Biotroph stage, N;Necrotroph stage)단계에 대한 연구가 수행 중이다.

표 2-6. *C. acutatum*의 생활사별 DEG(Differential Expression Gene) 분석결과

DEG analysis	M vs C	C vs B	B vs N
DEG number	6653	3673	1269
UP DEG	2087	944	361
UP_only	303	156	190
percentage	14.52	16.53	52.63
DOWN DEG	4566	2729	908
DOWN_only	1022	2304	772
percentage	22.38	84.43	85.02

DEG selection : P-value < 0.01, FDR < 0.05 (DESeq)

Mycelia (M) 균사, Conidia (C) 포자, Biotrophic infection (B) 고추과실 접종 후 78hr, Necrotrophic infection (N) 고추과실 접종 후 120hr

9. *C. acutatum* genome assembly 및 유전자 예측

고추탄저병균의 유전체 해독을 위한 library 제작을 통해 PAC Bio sequencing 방법으로 수행하였으며, assembly을 위해서 Illumina sequencing에 의한 data를 보완하는 방식으로 진행하였다. 그리고 sequencing된 단편들을 이용하여 contig를 제작하고 scaffold를 작성하였다. 이렇게 염기서열이 분석된 data와 RNA-seq data를 이용하여 다른 유전체 정보와 비교를 통한 유전자를 예측하고 annotation을 수행하였다(그림 2-27). genome annotation은 세 가지 과정으로 구분할 수 있다. 유전체 내의 유전자에 대한 구조적 정보를 분석하는 structural annotation, 유전자의 기능을 규명하는 functional annotation, 그리고 마지막으로 수학적 알고리즘으로 밝혀지지 않는 부분을 면밀히 분석하는 manual curation 과정으로 구성되어 있다. structural annotation은 유전체 서열 내에서 유전자의 위치와 구조 정보를 밝혀내는 것을 목적으로 하여 유전체 서열 전체의 유전자 지도를 완성한다. 유전체 서열에는 실제 단백질을 코딩하는 유전자 영역과 그 외 나머지 영역으로 크게 나뉜다. 그 중 유전자는 exon과 intron으로 나뉘고 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 영역이 일반적으로 유전자의 앞단에 위치하고 있다. 또한 유전체 서열의 상당 부분을 차지하고 있는 반복 서열과 transposon elements 들도 유전체의 다양한 영역에 존재하고 있다. 진핵생물에서 대부분의 서열은 non-coding RNA, intron, repeat, regulation 영역이 대부분 차지하고 있다. 따라서 유전체에서 여러 가지 형태의 서열들에 대한 위치 정보를 다양한 데이터베이스와 알고리즘을 이용하여 분석하였다. 그 결과 이미 분석된 다른 종들과 비교하여 *C. acutatum* 13,559개의 유전자들에 대한 functional annotation이 완성되었다. 각각의 scaffold로 이루어진 유전자 목록에 locus 번호를 부여하고 정렬하는 structural annotation 연구가 진행 중에 있다.

#	A	B	C	D	E	F	G	
1	Name	Length	Start	End	AC	GI	Description	Species
2	evm.model.KC05_01.1	1453	812	1453	AAG24792	10946132	AF264028.2 pol protein	[Colletotrichum gloeosporioides]
3	evm.model.KC05_01.10	104	1	82	AAG24792	10946132	AF264028.2 pol protein	[Colletotrichum gloeosporioides]
4	evm.model.KC05_01.100	582	94	394	EKG20484	407927595	Aminoglycoside phosphotransferase	[Macrophomina phaseolina MS6]
5	evm.model.KC05_01.1000	1093	1	1093	XP_007597	615460532	ribosomal protein L19	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
6	evm.model.KC05_01.1001	967	1	960	CCT68426	517317195	uncharacterized protein FFJU_07206	[Fusarium fujikuroi IMI 58289]
7	evm.model.KC05_01.1002	575	1	575	CCT68425	517317194	uncharacterized protein FFJU_07205	[Fusarium fujikuroi IMI 58289]
8	evm.model.KC05_01.1003	221	1	221	XP_007597	615460541	ribosomal protein L10.e	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
9	evm.model.KC05_01.1004	110	1	110	XP_007597	615460544	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
10	evm.model.KC05_01.1005	625	1	625	ENH81911	477530169	m serotype	[Colletotrichum orbiculare MAFF 240422]
11	evm.model.KC05_01.1006	128	1	128	ENH81912	477530170	thioredoxin-like protein 5	[Colletotrichum orbiculare MAFF 240422]
12	evm.model.KC05_01.1007	862	1	862	XP_007597	615460554	phospholipid metabolism enzyme regulator	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
13	evm.model.KC05_01.1008	379	17	379	EFO29105	310793644	dimethyladenosine transferase	[Colletotrichum graminicola M1.001]
14	evm.model.KC05_01.1009	925	1	925	XP_007597	615460564	PRP1 splicing factor	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
15	evm.model.KC05_01.101	867	4	850	CCT69266	517317815	uncharacterized protein FFJU_07825	[Fusarium fujikuroi IMI 58289]
16	evm.model.KC05_01.1010	126	2	126	XP_001557	154316454	predicted protein	[Botrytis cinerea B05.10]
17	evm.model.KC05_01.1011	469	1	469	XP_007597	615460571	meiotically up-regulated 65 protein	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
18	evm.model.KC05_01.1012	894	29	793	KDN61146	640916336	putative pentatricopeptide repeat domain-containing protein	[Colletotrichum sublineola]
19	evm.model.KC05_01.1013	444	1	444	XP_007597	615460578	protein phosphatase 2C	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
20	evm.model.KC05_01.1014	934	1	934	XP_007597	615460582	polarity establishment/cellular polarization	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
21	evm.model.KC05_01.1015	255	17	255	XP_00859E	667652787	Nicotinamide N-methyltransferase, putative	[Beauveria bassiana ARSEF 2860]
22	evm.model.KC05_01.1016	290	1	290	XP_007597	615460589	allergen Asp F7	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
23	evm.model.KC05_01.1017	508	1	508	XP_007597	615460592	FAD dependent oxidoreductase	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
24	evm.model.KC05_01.1018	340	1	340	XP_007597	615460596	domain found in IF2B/IF5	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
25	evm.model.KC05_01.1019	155	87	139	XP_00305C	302912862	predicted protein	[Nectria haematococca mpv1 77-13-4]
26	evm.model.KC05_01.102	281	1	225	XP_00759E	615448382	baiclysin biosynthesis oxidoreductase bacC	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
27	evm.model.KC05_01.1020	173	1	154	XP_00728E	596707878	non-classical export protein	[Colletotrichum gloeosporioides Nara gc5]
28	evm.model.KC05_01.1021	847	2	845	KGQ07394	701772890	Vacuolar fusion protein CCZ1	[Beauveria bassiana D1-5]
29	evm.model.KC05_01.1022	797	1	797	XP_007597	615460609	DNA polymerase alpha/epsilon subunit B	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
30	evm.model.KC05_01.1023	233	20	233	CCT68750	517317553	uncharacterized protein FFJU_07563	[Fusarium fujikuroi IMI 58289]
31	evm.model.KC05_01.1024	726	1	726	ENH81932	477530190	carbon catabolite derepressing protein kinase	[Colletotrichum orbiculare MAFF 240422]
32	evm.model.KC05_01.1025	664	1	650	ENH81933	477530191	peptide-n4-(n-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase a	[Colletotrichum orbiculare MAFF 240422]
33	evm.model.KC05_01.1026	142	52	142	KID76373	743645215	peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A, partial	[Metarhizium brunneum ARSEF 3297]
34	evm.model.KC05_01.1027	259	1	259	CCF38089	380487365	peptide alpha-N-acetyltransferase Nat2	[Colletotrichum higginsianum]
35	evm.model.KC05_01.1028	740	1	740	XP_007592	615442980	neutral trehalase	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
36	evm.model.KC05_01.1029	546	1	546	XP_007592	615442977	isocitrate lyase	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
37	evm.model.KC05_01.103	156	49	156	ENH86355	477534827	FAD binding domain protein	[Colletotrichum orbiculare MAFF 240422]
38	evm.model.KC05_01.1030	441	1	437	XP_007592	615442974	FAD dependent oxidoreductase	[Colletotrichum fioriniae PJ7]
39	evm.model.KC05_01.1031	310	20	286	EQB58157	530478869	hypothetical protein CGLO_01617	[Colletotrichum gloeosporioides Cg-14]

그림 2-27. Annotation 된 *C. acutatum*의 13,559개의 유전자.

10. 다른 *Colletotrichum* species 간의 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해

C. acutatum 유전체를 기존에 해독된 다른 *Colletotrichum* species 및 다른 out-group의 병원성 곰팡이 유전체와 비교하여 중간 특성을 분석하였다(표 2-7). 전체적인 *Colletotrichum* species의 지놈 크기가 outgroup의 다른 속들보다 큰 것을 알 수 있었다. 그리고 *C. orbiculare*를 제외하고 GC content가 outgroup에 비해 높은 것을 알 수 있었다. *Colletotrichum* species에서는 *C. orbiculare*가 88.3 Mb로 가장 큰 지놈 크기를 갖고 있었으며, *C. higginsianum*은 16,150개로 가장 많은 유전자를 갖고 있었다. 이번 *C. acutatum* 시퀀싱 분석에 사용된 NGS분석으로 인해 scaffolds 수를 27개로 줄일 수 있었다. 따라서 기존 분석된 *Colletotrichum* species 보다 더 정확하고 세밀한 분석이 이루어졌다고 사료된다.

표 2-7. 분석된 *Colletotrichum* species와 다른 병원성 곰팡이와 유전체 비교

Species	Number of scaffolds	Genome size (Mb)	N50 scaffold size (bp)	GC content (%)	Protein coding genes
Published genomes					
<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001	654	51.64	579,194	49.11	12,022
<i>Colletotrichum higginsianum</i> INI349063	10,235	49.08	6,147	55.10	16,150
<i>Colletotrichum orbiculare</i> MAFF240422	525	88.30	428,890	37.52	13,479
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1241	55.60	112,810	53.58	15,469
<i>Colletotrichum sublineola</i> TX430BB	1625	46.75	-	52.70	12,699
<i>Colletotrichum fioriniae</i> PJ7	1,096	49.00	34,930	52.5	13,759
<i>Colletotrichum acutatum</i> KC05	27	52.19	4,416,304	51.73	13,559
Outgroups					
<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	8	41.03	4,490,059	51.61	12,991
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	33	36.55	3,260,130	48.28	13,321
<i>Botrytis cinerea</i> B05.10	588	42.66	257,700	43.07	16,448
<i>Calopluca flavorubescens</i> KoLRI002931	36	34.47	1,693,300	41.89	9,695
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	20	41.04	78,551	48.30	10,785

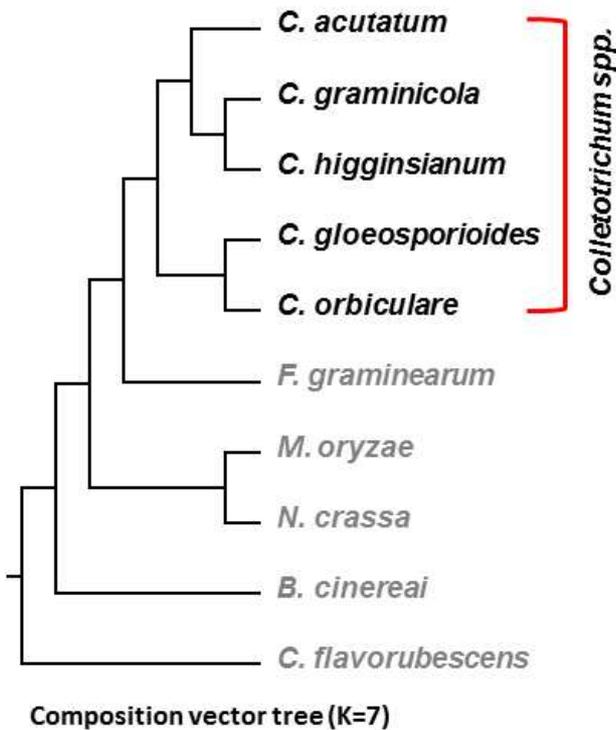


그림 2-28. *Colletotrichum* species와 다른 병원성 곰팡이의 전체 지놈에 기반한 phylogenetic tree.

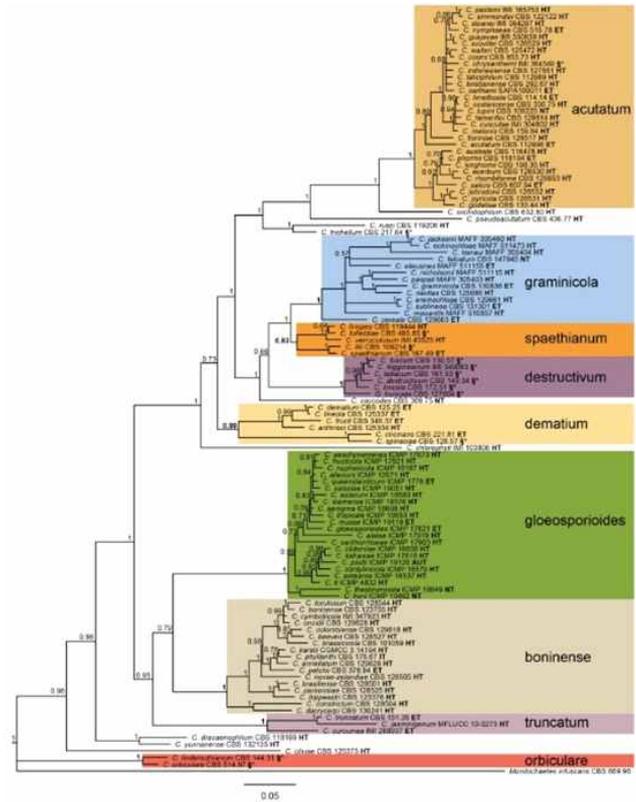


그림 2-29. *Colletotrichum* species의 Multilocus phylogenetic analysis (ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3)에 기반한 phylogenetic tree (Cannon et al., 2012).

새로 분석한 *C. acutatum*의 분류학적 위치를 알아보기 위하여 CV Tree program을 이용하여 전체 지놈 서열에 기반한 phylogenetic tree를 분석하였다 (그림 2-28). 이 결과는 이전 Cannon 등의 연구 Multilocus phylogenetic analysis (ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3)를 수행한 결과와 유사하였다 (그림 2-29). *C. acutatum*은 *C. graminicola*와 *C. higginsianum* 그리고 *C. gloeosporioides*와 *C. orbiculare*와 다른 클레이드(clade)로 나타났다.

11. 고추탄저병균의 발달 및 발병연구

고추탄저병이 기주식물인 고추를 침입하는 과정을 시간대 별로 관찰하여 발병 연구를 위한 기초연구를 수행하였다. 사용된 고추과실은 고추탄저병에 감수성인 빅스터 1종, 저항성인 타네강, 지존, 레전드, 에코스타 4종이었다. 먼저 증류수로 고추과실 표면을 여러 번 세척한 뒤 습실 처리 한 박스에 넣었다. 그리고 PDA배지에서 7일 동안 배양된 *C. acutatum* KC05의 포자현탁액을 1×10^6 conidia/ml 농도로 맞춘 후에 5품종의 녹색 및 적색 고추에 $20 \mu\text{l}$ 씩 포자현탁액을 떨어뜨려 접종하였다(그림 2-30). 그리고 한 쪽은 전착제인 Tween 20을 첨가하였다. 그 결과, 접종 24시간 후에는 부착기를 만들고, 접종 72시간 후에는 과실표피에 dendroid structure를 형성하고 hypha를 형성하였다. 접종 120시간 후에는 과실의 식물 세포가 죽어가는 necrotrophic 단계가 관찰되었다 (그림 2-31).

고추탄저병균의 분자생물학적 유전자 특성 및 기능분석을 위한 원형질체 제작을 위한 enzyme 선발 및 최적 조건을 규명하고자 하였다. PDA plate에 탄저병균을 접종하여 배양하였다. 포자가 자라면 멸균수를 첨가하여 포자를 끊어 포자 현탁액을 만들고 거르로 걸러 주었다. 거른 포자현탁액은 ampicillin 이 첨가된 PDB 배지에서 암 조건으로 25C, 200 rpm에서 2~3일간 배양하였다. 2~3일간 자

란 균사 현탁액을 새로 만든 PDB 배지에 잘게 갈아 재접종하여 주고 25C, 200 rpm, 암조건에서 1-2일 배양하였다. 배양된 균사 현탁액에서 mesh에 걸러 균사를 얻고 20% sucrose로 2~3차례 washing하여 주었다. 20% sucrose 10ml에 Lysing enzyme (from *Trichoderma harzianum*, Sigma,

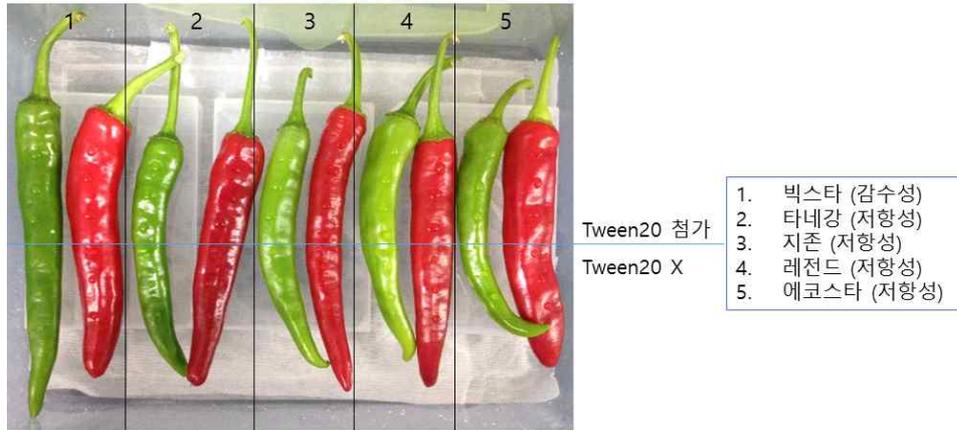


그림 2-30. 고추탄저병원균의 발병 연구를 위한 포자현탁액 접종.

USA) 1g을 미리 녹여놓고 washing된 균사체에 넣고 2~4시간동안 천천히 shaking incubation하였다. 배양 2시간째부터 현미경 관찰을 통하여 protoplasting상태를 관찰하였으며, 80% 이상이 진행되었을 때 원심분리를 통해 protoplast를 얻고 1×STC buffer (sucrose 20%, 1M Tris-HCl 100 ml, 1M CaCl₂ 100 ml, 증류수 1L) 10 ml에 녹여주었다. 그리고 다시 한 번 거즈로 걸러 깔끔하게 진행된 protoplast만 얻을 수 있었다. 이 후에 hemocytometer를 이용하여 5 x 10⁷ protoplast/ml 농도(그림 32)로 맞추고 -80℃ deep freezer에 보관하였다. 추가적으로 driselase enzyme이나 최적 시간 및 농도를 찾아야 할 것으로 보인다.

제작된 원형질체를 이용하여 형질전환을 하기 위하여 항생제의 최적 농도를 선정하는 실험을 진행하였다. 진균의 형질전환에 많이 이용되는 Hygromycin을 이용하여 각 ppm 별로 test를 진행하였다. 그 결과, Hygromycin 200ppm에서 원형질체가 자라지 못하는 것을 확인하고 항생제 마커 및 농도로 사용가능 할 것으로 보였다 (그림 2-32).

○ 고추작물 탄저병원균 간의 교차 병원성 조사

- 고추 품종에 따른 병원성 차이 관찰

고추영양시험장에서 분양받은 종자 3종(대장정, 금빛, 남자의 자격)과 감수성 품종 1종(녹광)을 식물생장상에서 재배하여 고추과실로 병원성차이를 알아보는 시험을 진행하였다. 품종의 특징으로 대장정과 금빛은 바이러스 내병계, 금빛시험방법은 각각 배양하여 얻은 고추과실에 KC05 균주 포자현탁액을 1×10⁴ conidia/ml의 농도로 하여 접종하고 24hr 마다 현미경으로 관찰하고 그 특징을 알아보았다 (2-33).

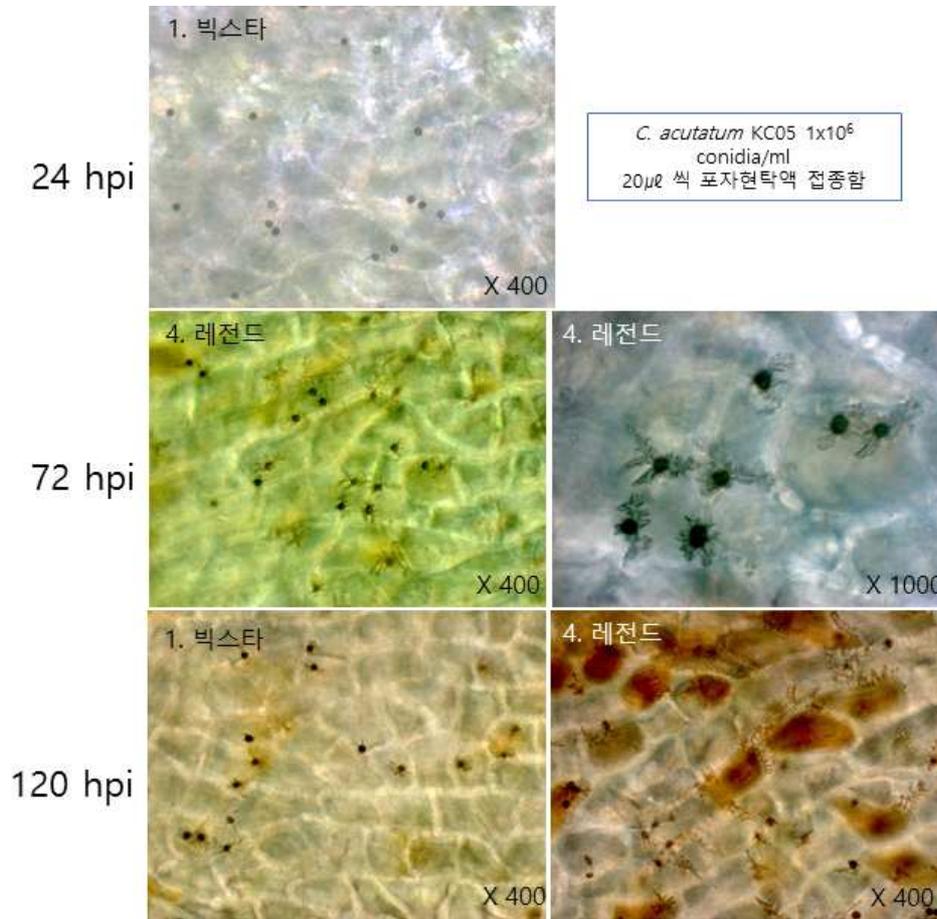


그림 2-31. 고추탄저병원균의 시간대별 침입 및 발병과정.

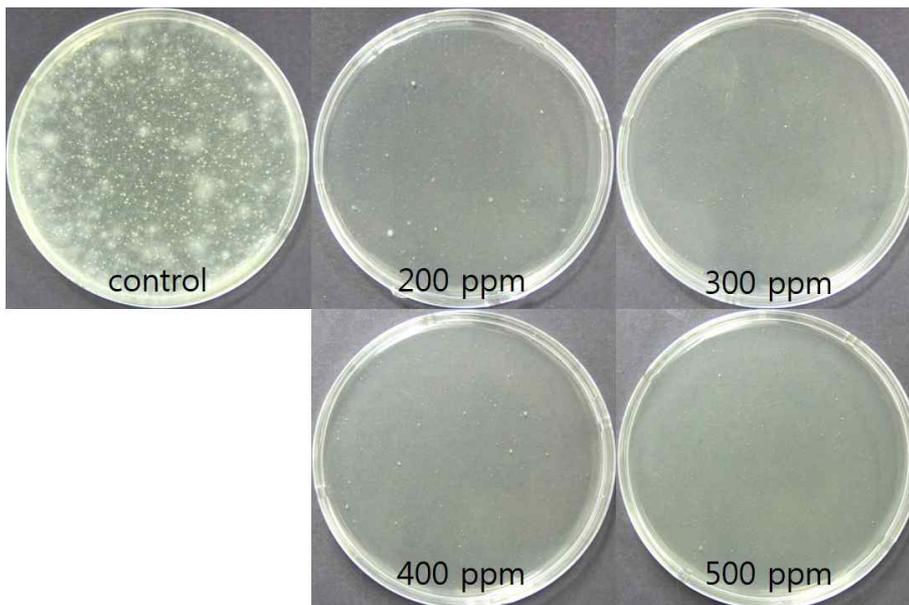


그림 2-32. 고추탄저병원균 형질전환을 위한 항생제 마커 hygromycin B 농도 선정.

접종 후 24시간 후 4가지 품종에서 모두 부착기를 생성하였다. 그리고 48시간에는 dendroid structure를 형성하였다. 형성된 Dendroid structure의 크기는 남자의 자격 > 금빛 > 녹광 > 대장 정 순서로 크기 차이가 있었고, 이는 형성된 시간에 따른 차이와 유사하였다. 72시간째에는 고



그림2-33. 병원성 차이 관찰을 위해 사용된 4가지 고추품종

추과실의 dead cell이 공통적으로 나타났다. 96시간째에는 dead cell들과 second conidia가 많아지고 dendroid structure들이 커지는 특징을 보였다. 집중 120시간째에는 식물세포내에 감염균사들이 많이 뻗어있는 것들이 관찰되었으며, 여기에도 금빛=남자의 자격>대장정>녹광 순서로 감염균사들이 관찰되었다. 본 연구결과로 고추품종에 따른 dendroid structure 및 감염균사형성의 시간적 차이는 존재하지만 감염 경로 및 식물과의 반응은 유사한 것으로 나타났다 (그림 2-34).

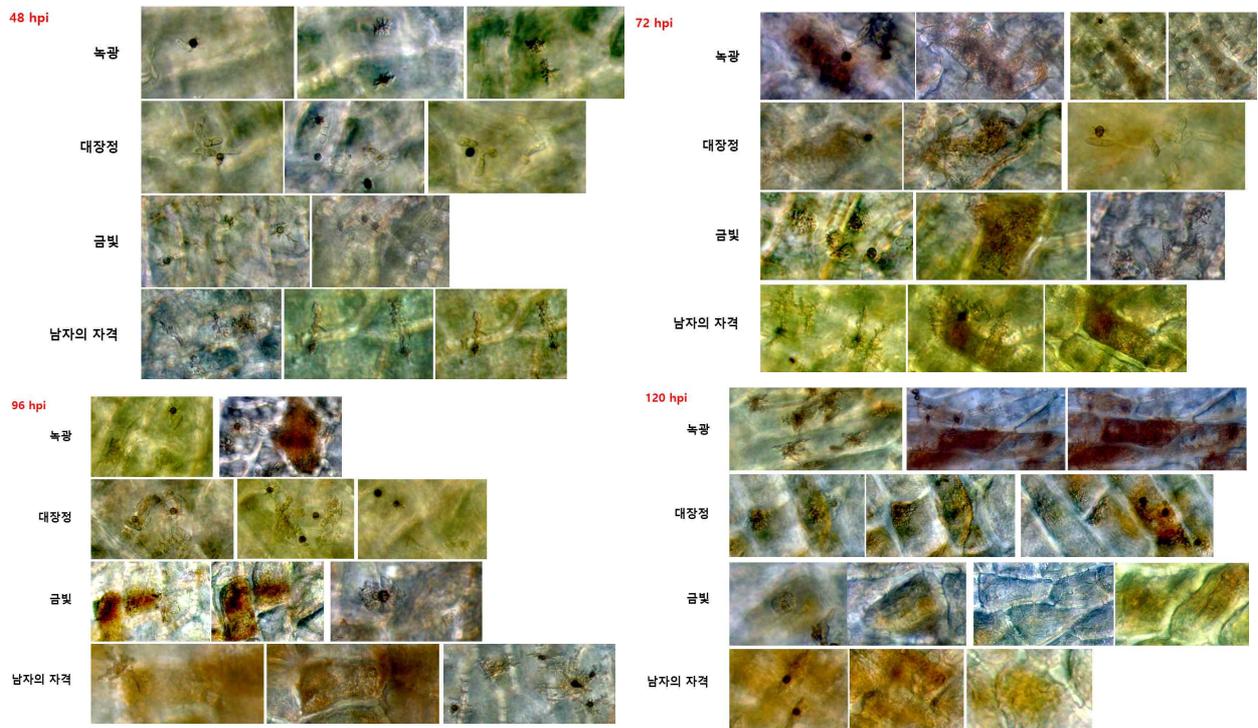


그림2-34. 고추 품종에 따른 병원성 차이 현미경적 관찰. 24시간 단위로 관찰.

- 담배 및 단고추류에 대한 고추탄저병원균 병원성 시험

담배는 연구를 위한 최적화된 모델식물로 세균부터 바이러스 연구까지 식물과 식물병원균의 상호작용을 연구하는데 많이 사용되고 있다. 따라서 고추탄저병원균 KC05을 가장 많이 사용하는 담배 2종 *Nicotiana tabacum* cv. xanti, *Nicotiana benthamiana*에 집중시험을 수행하였다. 집중방법은 포자현탁액을 2×10^6 conidia/ml 농도로 하여 포자접종을 하였고, 포자를 생성하지 않는 균사 배지인 CM(Complete Medium) agar 배지에 키운 균사 plug로 균사 접종하였다. 그리고 상처를 내주어 감염여부도 관찰하였다 (그림

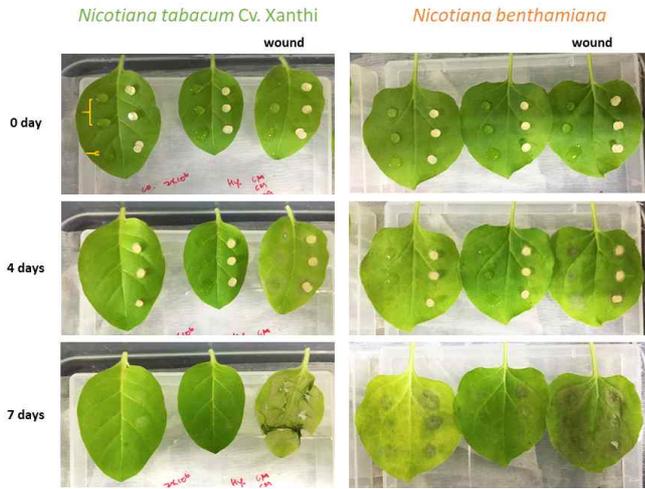


그림2-35. 고추탄저병원균의 담배접종결과 2-35).

접종 4일차에 비상처 처리구에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 상처 처리구에는 감염된 것처럼 식물세포벽이 녹아 병이 발생한 것같은 병징이 관찰되었다. 접종 7일차에는 더 뚜렷이 상처 접종 처리구에서 포자, 균사접종 처리구 모두 담배잎이 손상되었다. 그리고 *N. tabacum* 보다 *N. benthamiana*에서 비상처 처리구에서도 손상된 것 같은 모습이 관찰되었다. 이를 현미경으로 관찰해본 결과 비상처 처리구에서 *N. tabacum*은 어떠한 반응도 없이 접종한 포자가 온전

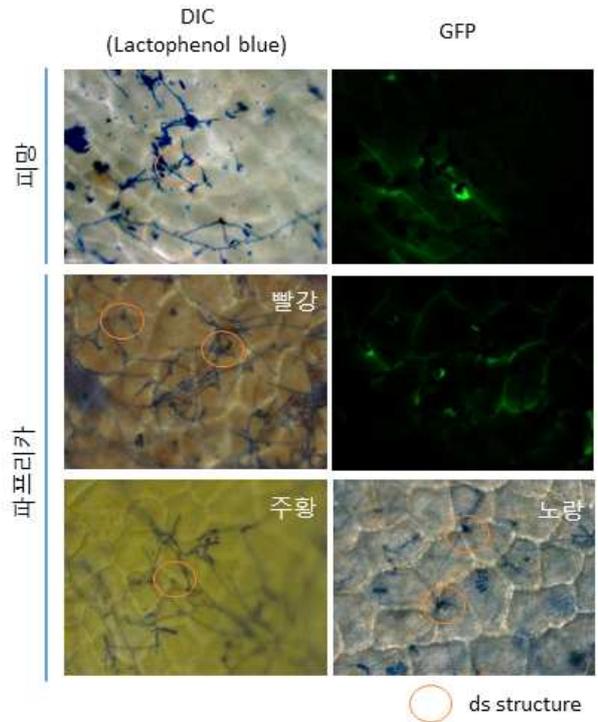


그림2-37. 단고추(피망, 파프리카)에 고추탄저병원균 KC05의 접종관찰

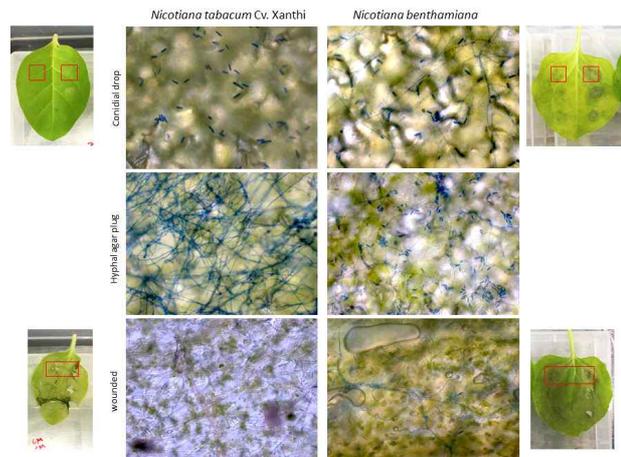


그림2-36. 고추탄저병원균의 담배접종 현미경적 관찰

히 존재하였다. 이와 반면에 *N. benthamiana*는 접종된 포자에서 길게 발아하여 균사를 많이 만드는 것이 관찰되었다. 그러나 고추과실과는 다르게 부착기를 형성하지 못하였다. 균사를 접종한 처리구에서 *N. tabacum*은 균사형태로 온전히 존재하는 것으로 보여졌다. 반면에 *N. benthamiana*는 접종한 균사에서 포자가 생성되었으나 부착기를 형성하여 침입하지는 못하였다. 상처 접종은 식물조직이 많이 손상이 되었고 식물체를 뚫고 들어가 병을 일으키는 것은 관찰되지 않았으나, 식물세포벽이 녹아 영향을 받은 것은 볼 수 있었다. 따라서 담배는 고추탄저병원균의 침입 및 발달과정을 연구하기에는 적합하지 않았다 (그림 2-36).

고추(*Capsicum annuum*)와 같은 종에 속하는 피망과 파프리카에 고추 탄저병원균 KC05를 포자접종하고 lactophenol blue 및 GFP를 이용하여 관찰하였다 (그림 2-37). 그 결과 피망과 파프리카 모두 풋고추와

마찬가지로 부착기와 dendroid structure를 형성하여 병을 일으키는 것이 관찰되었다. 특히 파프리카는 빨강, 주황, 노랑 파프리카 색에 관계없이 모두 병을 일으키는 것으로 나타났다. 따라서, 고추에서 분리한 고추탄저병원균 KC05는 고추 중에 특이적으로 병을 일으키는 탄저병원균임을 알 수 있었다.

○ *C. acutatum* genome assembly 및 유전자 예측

2년차에서 분석된 다른 종들과 비교하여 *C. acutatum* 13,559개의 유전자들에 대한 functional annotation이 완성되었다. 3년차에서는 annotation을 더 다듬어 각각의 scaffold로 이루어진 유전자 목록에 locus 번호를 부여하고 정렬하는 structural annotation을 수행하였다. 각각의 유전자들에 고유 번호가 부여되어 앞으로 유전자 기능 연구 등에 있어서 수월하게 수행할 수 있을 것으로 사료된다(그림2-39).

이렇게 분석된 Genome sequence와 annotation은 IGB(Integrated Genome Browser) 포맷으로 변환하여 각 locus 번호 별로 시퀀스를 열어볼 수 있도록 하였다. IGB는 큰 지놈 데이터를 한 눈에 볼 수 있게 해주는 프로그램으로 로컬데이터 혹은 온라인상의 데이터를 열어볼 수 있다(그림2-38).

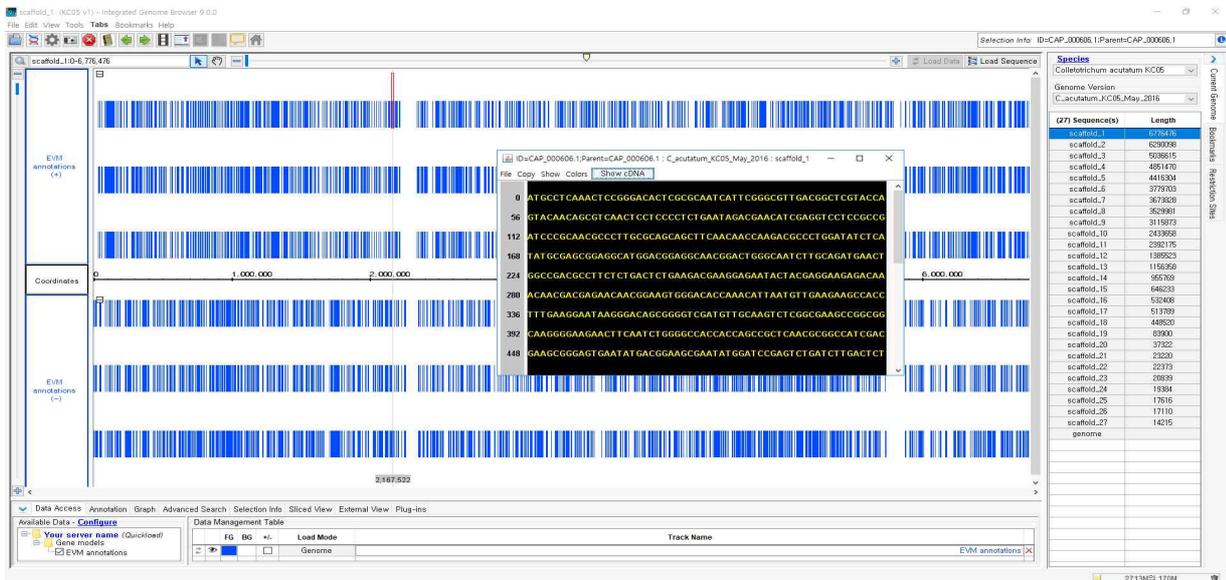


그림2-38. *C. acutaum* KC05 genome data와 locus 번호가 입력되어 있는 IGB 프로그램

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Name	New_ID	Gene	Length	Start	End	AC	GI	Description	Species	Gene
2	evm.model.KC05_01.1	CAP_000001.1	EVM%20prediction%20KC05_01.1	1453	812	1453	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
3	evm.model.KC05_01.2	CAP_000002.1	EVM%20prediction%20KC05_01.2	1934	824	1911	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
4	evm.model.KC05_01.3	CAP_000003.1	EVM%20prediction%20KC05_01.3	2022	786	1814	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
5	evm.model.KC05_01.4	CAP_000004.1	EVM%20prediction%20KC05_01.4	1533	786	1531	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
6	evm.model.KC05_01.5	CAP_000005.1	EVM%20prediction%20KC05_01.5	112	44	112	XP_007591	6.15E+08	hypothetic	[Colletotric	hypothetic
7	evm.model.KC05_01.6	CAP_000006.1	EVM%20prediction%20KC05_01.6	264	1	239	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
8	evm.model.KC05_01.7	CAP_000007.1	EVM%20prediction%20KC05_01.7	937	303	922	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
9	evm.model.KC05_01.8	CAP_000008.1	EVM%20prediction%20KC05_01.8	458	51	451	AAG24791	10946131	AF264028.	[Colletotric	AF264028
10	evm.model.KC05_01.9	CAP_000009.1	EVM%20prediction%20KC05_01.9	382	1	369	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
11	evm.model.KC05_01.10	CAP_000010.1	EVM%20prediction%20KC05_01.10	104	1	82	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
12	evm.model.KC05_01.11	CAP_000011.1	EVM%20prediction%20KC05_01.11	379	145	323	KHO11016	7.35E+08	natch and	[Metarhizii	natch and
13	evm.model.KC05_01.12	CAP_000012.1	EVM%20prediction%20KC05_01.12	503	32	127	AAG24791	10946131	AF264028.	[Colletotric	AF264028
14	evm.model.KC05_01.13	CAP_000013.1	EVM%20prediction%20KC05_01.13	1752	595	1730	AAG24792	10946132	AF264028.	[Colletotric	AF264028
15	evm.model.KC05_01.14	CAP_000014.1	EVM%20prediction%20KC05_01.14	932	8	751	CCT75903.	5.17E+08	uncharact	[Fusarium	uncharact
16	evm.model.KC05_01.15	CAP_000015.1	EVM%20prediction%20KC05_01.15	261	1	261	XP_007287	5.97E+08	glucurona	[Colletotric	glucurona
17	evm.model.KC05_01.16	CAP_000016.1	EVM%20prediction%20KC05_01.16	816	1	816	XP_007600	6.15E+08	microtubu	[Colletotric	microtubu
18	evm.model.KC05_01.17	CAP_000017.1	EVM%20prediction%20KC05_01.17	752	47	752	XP_007600	6.15E+08	increased	[Colletotric	increased
19	evm.model.KC05_01.18	CAP_000018.1	EVM%20prediction%20KC05_01.18	193	1	193	XP_007600	6.15E+08	acetyltrans	[Colletotric	acetyltrans
20	evm.model.KC05_01.19	CAP_000019.1	EVM%20prediction%20KC05_01.19	895	13	894	XP_007793	6.3E+08	putative g	[Eutypa	lal putative g
21	evm.model.KC05_01.20	CAP_000020.1	EVM%20prediction%20KC05_01.20	516	1	516	XP_007600	6.15E+08	glycosyl h	[Colletotric	glycosyl h
22	evm.model.KC05_01.21	CAP_000021.1	EVM%20prediction%20KC05_01.21	794	1	794	XP_007600	6.15E+08	FAD bindi	[Colletotric	FAD bindi
23	evm.model.KC05_01.22	CAP_000022.1	EVM%20prediction%20KC05_01.22	306	18	306	XP_007600	6.15E+08	metalloprc	[Colletotric	metalloprc
24	evm.model.KC05_01.23	CAP_000023.1	EVM%20prediction%20KC05_01.23	643	1	540	CCF41338.	3.8E+08	transposa	[Colletotric	transposa
25	evm.model.KC05_01.24	CAP_000024.1	EVM%20prediction%20KC05_01.24	514	17	514	EQB47720	5.3E+08	FAD bindi	[Colletotric	FAD bindi
26	evm.model.KC05_01.25	CAP_000025.1	EVM%20prediction%20KC05_01.25	371	56	351	XP_007915	6.31E+08	putative ir	[Togninia	putative ir
27	evm.model.KC05_01.26	CAP_000026.1	EVM%20prediction%20KC05_01.26	498	1	498	XP_007600	6.15E+08	C-x8-C-x5	[Colletotric	C-x8-C-x5
28	evm.model.KC05_01.27	CAP_000027.1	EVM%20prediction%20KC05_01.27	355	1	355	XP_007600	6.15E+08	2,3-dihydr	[Colletotric	2,3-dihydr
29	evm.model.KC05_01.28	CAP_000028.1	EVM%20prediction%20KC05_01.28	591	212	591	XP_007282	5.97E+08	transcripti	[Colletotric	transcripti
30	evm.model.KC05_01.29	CAP_000029.1	EVM%20prediction%20KC05_01.29	441	1	417	XP_007600	6.15E+08	hypothetic	[Colletotric	hypothetic

그림2-39. Annotation 된 *C. acutatum*의 13,559개의 유전자의 locus 번호

○ 고추탄저병원균의 발달 및 발병연구

- 병원균 발달 및 발병 연구를 위한 기주식물체 배양

기내에서 동일한 조건으로 병원성 실험을 수행하기 위하여 기주식물의 품종과 기내에서의 배양이 중요하다. 따라서 병원균의 발달 및 발병을 보기위한 기초연구로 위한 고추탄저병원균의 기주식물인 고추의 기내배양을 수행하였다. 품종은 일반적으로 국내의 풋고추 시장에 대부분 차지하고 있는 녹광(동부팜농)을 사용하였다. 녹광은 최근 출시되고 있는 탄저병, 역병, 바이러스 등에 대하여 저항성을 갖고 있지 않은 감수성 품종으로 국내 고추탄저병 및 역병 연구에서도 이용되고 있다. 본 실험을 위한 녹광의 종자는 춘천 소재 종묘사에서 구입하였다. 실험방법으로 종자발아를 위하여 9cm petri-dish에 적셔놓은 멸균여과지 위에 종자를 올려놓고 25℃ 배양기에서 종자발아를 유도하였다. 약 3~5일 후 종자가 발아하여 16 tray pot에 배양토에 파종하였다. 파종 후에 식물체는 Light(16hr, 25℃)/Dark(8hr, 23℃) 주기로 배양기에서 재배하였다. 약 3주가 지나면 높이 10cm 정도에 5엽기까지 자라는 것을 확인할 수 있었다 그림 (2-40). 파종 후 2개월 정도가 되면 꽃이 생성되고 과실을 만들 준비가 되었다. 기내배양의 특성상 화분수정을 위하여 붓으로 꽃술부분을 조금씩 건드려 인공수정을 유도하였다. 그리고 약 3개월 정도가 되면 고추과실이 생성되어 병원성 연구를 수행할 수 있었다 (그림 2-41).



그림2-40 고추 식물성장상 재배. 파종 후 1주(위), 3주(아래).

그림2-41. 고추 식물성장상 재배. 파종 3달 후 과실생성.

- 병원균 발달 및 발병 기초연구를 위한 과실크기에 따른 병원성 집중관찰

병원성 연구를 위한 기주식물의 적절한 생육 및 상태 등은 식물과 상호작용을 하는 병원균의 발달 및 발병 연구를 수행하기 위하여 매우 중요하다. 따라서 위에서 기내 배양된 고추 과실의 4가지 길이에 따른 고추탄저병원균 KC-05를 접종하고 그 특징을 확인하였다. 기내배양된 고추과실 중 2, 6, 9, 11cm의 과실을 선발하고 각각에 1×10^4 conidia/ml의 농도로 포자현탁액을 접종하였다. 25℃에서 습실처리된 박스에서 48hr동안 발병을 유도하였다 (그림 2-42). 그 결과 각각 다른 크기의 고추과실은 식물세포의 크기가 다른 것을 확인할 수 있었다. 그리고 2cm미만의 고추과실은 조직이 약하여 같은 시간에 다른 크기의 과실에 비해 병발생이 너무 빠르게 많은 세포에 퍼져서 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 6cm 정도 크기를 갖는 과실은 비교적 11cm에 비하여 식물세포의 크기는 작지만 조직이 연하여 세포 관찰이 용이하였다. 그리고 9cm 크기의 식물세포 크기는 11cm와 큰 차이를 보이지 않았지만 과실의 크기가 커질수록 식물의 세포벽과 조직 등이 더 강한 것으로 보였다. 결론적으로 기내배양을 통한 고추탄저병원균의 병원성 연구수행은 6cm이상의 과실에서 수행해야하며, 크기가 너무 큰 경우 현미경적 세포관찰이 어려울 수 있다는 것이다. 그리고 GFP가 tagged된 *C. acutatum*을 현미경적으

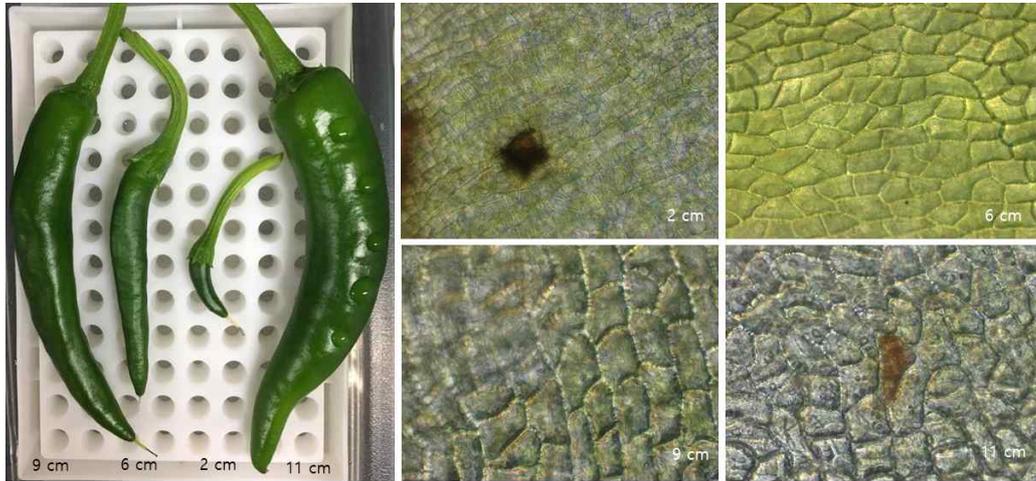


그림2-42. 병원균 발달 및 발병 기초연구를 위한 과실크기에 따른 병원성 집중관찰.

로 관찰한 결과 48시간에 정상적으로 부착기, DS(Dendroid Structure), IH(Infection Hyphae)를 만들어 병원성 연구수행에 있어서 적합한 것으로 사료되어진다 (그림 2-43).

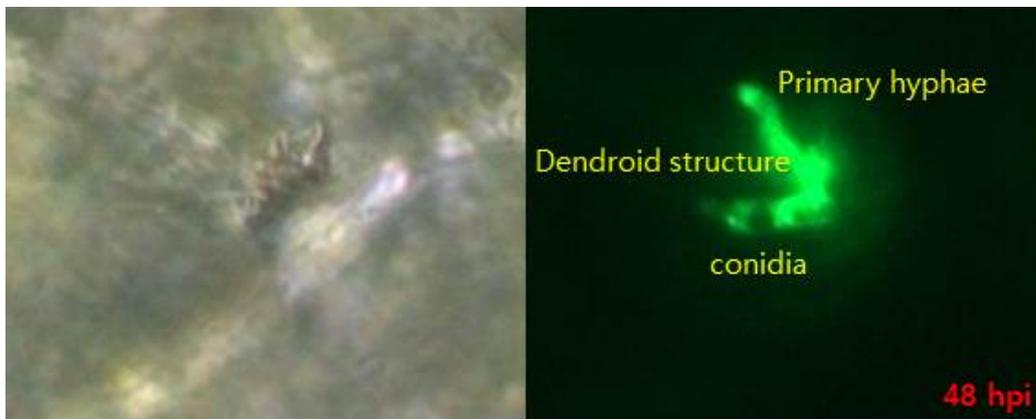


그림2-43. 식물생장상 재배된 고추과실에 접종한 GFP tagged *C. acutatum*.

○ 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석

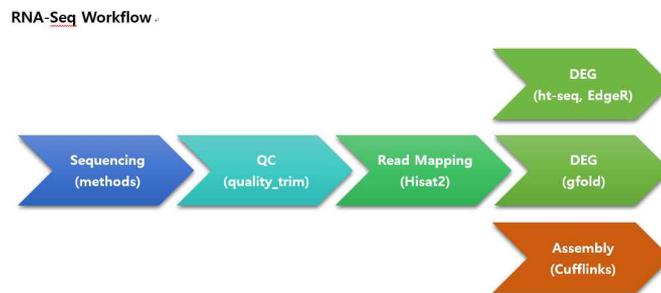


그림2-44. RNA-seq workflow

고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-seq 분석을 위하여 균사, 포자, 부착기, 접종 2단계 (Biotroph, Necrotroph)에서 각각의 RNA를 추출하고 sequencing을 수행하였다. 이 후에 QC를 통해 RNA를 확인하고 Hisat2를 이용하여 Read mapping을 수행하였다. 그리고 ht-seq,

EdgeR, gfold, cufflinks 등의 프로그램을 이용하여 DEG 분석 및 Assembly를 수행하였다 (그림 2-44).

표2-8. Hisat2 Read Mapping 결과

ID	Condition	Name	Replicate	# Reads 1	# Reads 2	% aligned 1	% aligned 2
M	Mycelia	KC05-M	1	11934896	-	97.35%	-
C	Conidia	KC05-C	1	14979020	-	97.36%	-
A	Appressorium	A1_S1	2	23364424	23535006	97.37%	97.41%
B	Infection 40 phi Biotroph	40h_S4	2	24947753	25234148	0.54%	0.54%
N	Infection 65 phi Necrotroph	Necro80_S2	2	21899257	22132893	0.71%	0.71%
Control	Pepper plant	CTT266_S3	2	22500349	22741493	0.05%	0.05%

M, C, A에서는 reads가 >97% 이상 reference genome에 붙는 것을 볼 수 있었다. 반면 B와 N에서는 <1%만 붙는 것을 알 수 있었다. 당연히 Control로 사용한 고추 RNA reads들은 곰팡이에 붙지 않았다 (0.05%) (표 2-8).

각 replicates끼리 묶여있는 것을 보아 replicate간 차이는 없다고 볼 수 있다. 여기서 Dimension 1은 곰팡이 샘플과 식물 샘플을 나눈다. Dimension 2는 M을 기준으로 다른 조건과 매우 다르다고 볼 수 있다. A1/A2는 식물체 없이 appressorium을 만든 것으로 곰팡이 샘플에 가까운 이유로 볼 수 있다. EdgeR로는 replicate수가 적어서 여기까지 밖에 분석할 수 없었다. EdgeR DEG 분석을 하기 위해서는 적어도 3개의 replicate가 필요한 것으로 보인다 (그림 2-45).

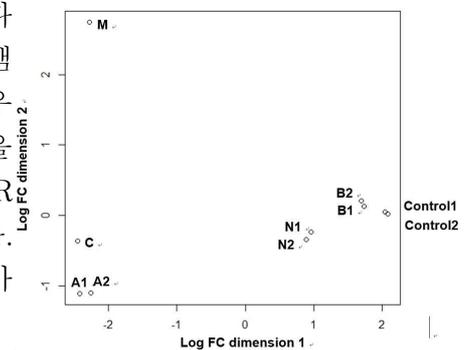


그림2-45. Ht-seq, EdgeR DEG 결과

Gfold는 replicate가 없을 때 RNA-Seq data에서 DEG를 찾는 소프트웨어이다. 우선 read mapping (sam) 파일에서 read count를 수행하고 각 유전자 마다 read count 개수와 RPKM값을 계산하여 준다. 그 결과 M/C/A 곰팡이 샘플에서는 대부분이 발현되는 것을 알 수 있지만, B/N 식물/곰팡이 샘플에서는 반 정도밖에 발현이 되지 않았다. 반면 read가 붙지 않아야 정상인 Control 식물 샘플에서 곰팡이 유전자는 약간 발현되는 것으로 보아, 이것들은 모든 생물에 보존된 유전자이거나 에러로 보여진다 (표 2-9).

표2-9. 발현된 유전자와 발현되지 않은 유전자 개수

	M	C	A (average)	B (average)	N (average)	Contol (average)
TOTAL	13559	13559	13559	13559	13559	13559
Expressed	11788	10834	12562	6088	7806	1144
Not expressed	1771	2725	997	7471	5753	12415

RPKM값으로 각 단계별 유전자들의 heatmap을 수행하였다. 유전자는 hierarchical clustering을 통하여 비슷한 발현 패턴을 갖는 것끼리 묶어주었다. 이를 통해 각 단계에서 특이적으로 발현이 되는 Stage-specifically expressed gene을 찾을 수 있을 것으로 생각한다 (그림 2-46).

이러한 결과를 종합적으로 볼 때 M, C 샘플의 반복적 시퀀싱이 필요할 것으로 사료되며, B와 N 샘플은 <1%만 genome에 붙는 것으로 볼 때 과실에 접종농도를 높여 곰팡이 조직의 샘플비율을 늘려

유효 분석 유전자의 수를 늘리는 것이 필요한 것으로 보여진다. 따라서 추가적으로 시퀀싱을 수행하고 있으며, 이에 따른 보다 정확한 고추탄저병원균의 생활사별 DEG(Differential Expresson Gene)분석이 수행될 예정이다.

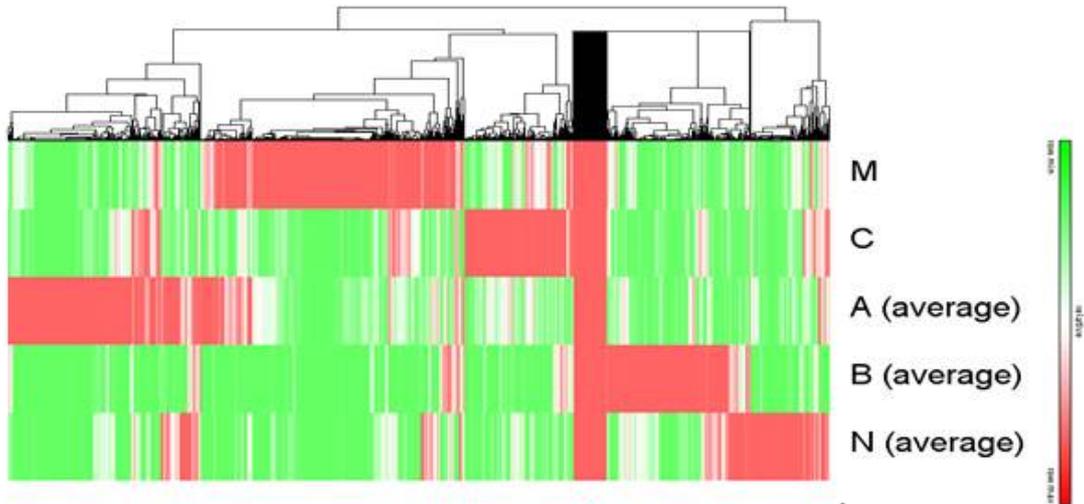


그림2-46. RPKM값으로 나타낸 각 단계별 유전자들의 heatmap

○ 다른 *Colletotrichum* 종간 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해

Genome sequencing을 수행한 *C. acutatum*과 더불어 대표적인 *Colletotrichum* 4종에 대한 Protein Clustering을 MCL(Markov Cluster Algorithm)을 이용하여 분석하였다. 5개 종에서 약 6,631개의 core cluster가 존재하였고 각각 10,000여개의 단백질을 포함하고 있었다. *C. acutatum* 특이적인 클러스터가 517개 가지고 있으며, 543개의 단백질을 포함하고 있었다. *C. higginsianum*이 1,738개의 특이적 클러스터로 가장 많이 가지고 있었으며, 1,801개의 단백질을 포함하고 있었다 (그림 2-47).

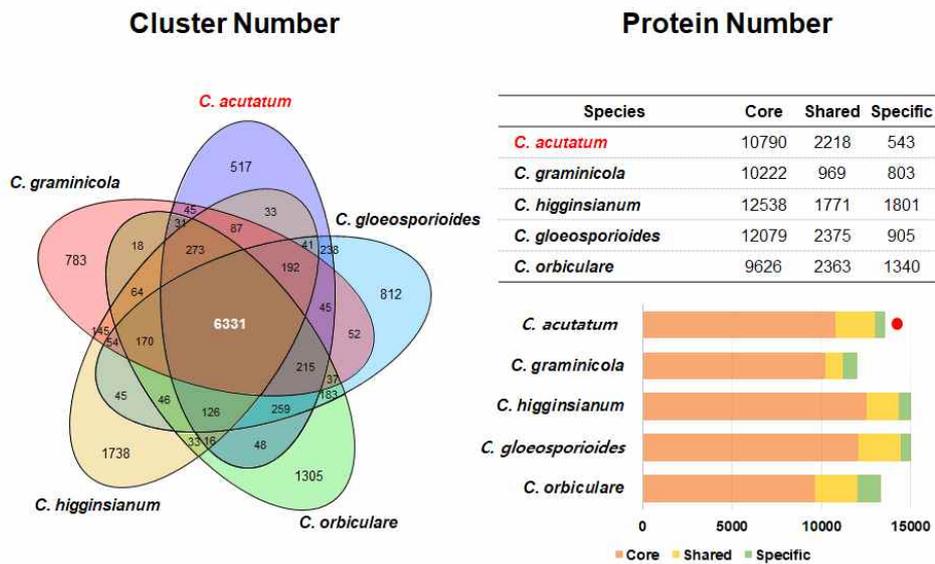


그림2-47. *Colletotrichum* 5종에 대한 Protein clustering 분석(using MCL)

Colletotrichum 5개 종의 pan genome과 core genome의 크기를 측정하였다. 그 결과 pan genome은 5개 종의 genome이 합쳐져 약 14,000개의 클러스터를 이루었으며, core-genome은 약 6,300여개의 클러스터로 이루어져 있었다 (그림 2-48).

2014년도에 분석된 *C. fioriniae*는 *C. acutatum*의 *sensu lato*로 딸기를 감염시킨다고 알려져 있다 (Baroncelli 등, 2014). 본 연구에서 분석한 *C. acutatum*은 고추에서 분리하였다. 따라서 *C. acutatum* 두 genome을 MUMmer 프로그램을 이용하여 비교 분석하고자 하였다. *C. fioriniae*는 1,000개가 넘는 scaffolds로 분석되었으나, *C. acutatum*은 단지 27개로 분석되어 더 정밀한 분석이 수행되었다고 할 수 있다. 그리고 525개의 scaffolds로 분석된 *C. orbiculare*는 종 간의 거리가 멀기 때문에 *C. acutatum*와 유사하지 않은 spot을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 분석한 *C. acutatum*이 species complex(중복합)에서 표준 genome으로 사용될 수 있음을 시사한다 (그림 2-49).

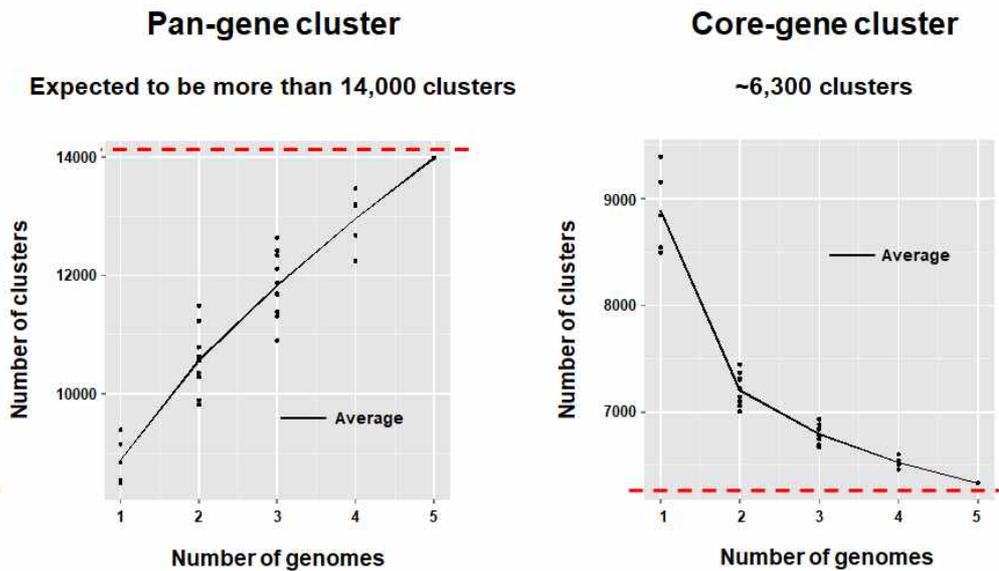


그림 2-48. Colletotrichum 5종의 Pan- & core-genome

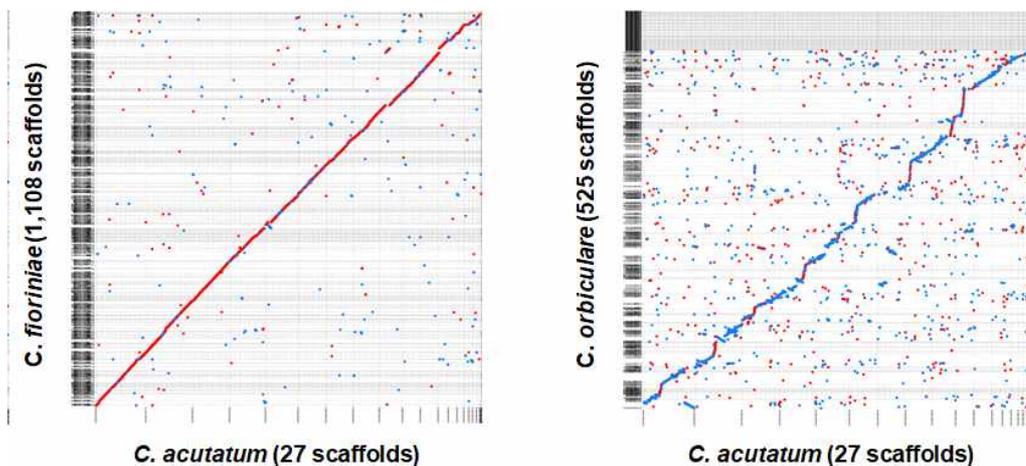


그림2-49. *C. acutatum*과 다른 2종과의 전체 genome 비교(using MUMmer)

○ REMI(restriction enzyme mediated integration)형질전환기법 적용 연구

2년차에 연구된 원형질체 제작방법을 일부 변경하여 효율을 높이고자 하였다. 원형질체 생성방법은 PDA plate에 탄저병균을 접종하여 배양하였다. 포자가 자라면 멸균수를 첨가하여 포자를 긁어 포자 현탁

액을 만들고 거즈로 걸러 주었다. 거른 포자현탁액은 ampicillin 이 첨가된 PDB 배지에서 암 조건으로 25C, 200 rpm에서 2~3일간 배양하였다. 2~3일간 자란 균사 현탁액을 새로 만든 PDB 배지에 잘게 갈아 재접종하여 주고 25C, 200 rpm, 암조건에서 1-2일 배양하였다. 배양된 균사 현탁액에서 mesh에 걸러 균사를 얻고 1mol NH₄Cl 20ml로 2~3차례 washing하여 주었다. 1mol NH₄Cl 20ml 10ml에 Lysing enzyme (from Trichoderma harzianum, Sigma, USA) 1g을 미리 녹여놓고 washing된 균사체에 넣고 2~4시간동안 천천히 shaking incubation하였다. 배양 2시간째부터 현미경 관찰을 통하여 protoplasting상태를 관찰하였으며, 80% 이상이 진행되었을 때 원심분리를 통해 protoplast를 얻고 1×STC buffer (sorbitol 20%, 1M Tris-HCl 100 ml, 1M CaCl₂ 100 ml, 증류수 1L) 10 ml에 녹여주었다. 그리고 다시 한 번 거즈로 걸러 깔끔하게 진행된 protoplast만 얻을 수 있었다. 이후에 hemocytometer를 이용하여 5 x 10⁷ protoplast/ml 농도로 맞추고 -80°C deep freezer에 보관하였다. 현재 제한효소를 이용한 형질전환을 수행중에 있으며, 4차년도 연구에서는 REMI를 이용한 Random insertional mutants를 얻어 연구를 수행할 수 있을 것으로 보인다.

○ Homologous recombination을 통한 형질전환 연구 (3~4년차)

고추탄저병균의 분자생물학적 유전자 특성 및 기능분석을 위한 homologous recombination 기법을 적용하기 위하여 REMI방법에서 얻은 원형질체를 사용하였다. 벼도열병균에서 생활사에서 중요한 특이적인 표현형을 나타낸 2개의 YPEL유전자를 선발하여 고추탄저병균에 존재하는지 여부를 알아보고 knock-out mutant를 제작하고자 하였다. 벼도열병균에는 MoYPEL1(MGG_06263)과 MoYPEL2(MGG_00255) 2개의 YPEL 유전자가 존재하고 있다. 따라서 고추탄저병균 KC-05에 존재하는 YPEL 유전자를 Genome sequencing data로 분석하여 찾아보았다. 그 결과 고추탄저병균에도 2개의 YPEL 유전자가 존재하며 MoYPEL1과 89%의 높은 상동성을 갖는 CaYPEL1(CAP_005487.1)과 MoYPEL2와 40%의 상동성을 갖는 CaYPEL2(CAP_000813.1)을 찾아내었다 (그림 2-50).



그림2-50. 벼도열병균과 고추탄저병균의 2개의 YPEL 유전자

표2-10. 고추탄저병균 YPEL 2개 유전자 결실돌연변이체 생성에 사용된 프라이머 목록

Primer	5'—3' sequence
CaYPEL1(CAP_005487.1)	
CaYPEL1_5F	AATGCAGATGCTCCTCTTG
CaYPEL1_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGGGATACTGCGTTGAGATATG
CaYPEL1_3F	GTTGGTGTGATGTCAGCTCCGGAGTGTGTCGTCGATATGCTTCTTG
CaYPEL1_3R	CTCATCAAGTACCTCACGTTT
CaYPEL1_NF	CTGCGATATTCTCGGTACAAC
CaYPEL1_NR	GCAGAGATGTTCTCCGAATC
CaYPEL1_SF	CCAAATGAAGACCGTCCTATAC
CaYPEL1_SR	CCTTCCACGTTATCCTCATTC
CaYPEL1_PF	CGGCTGTATTCTAGGCGCATG

CaYPEL1_PR	AGATATGGCGTTTGAGCTTCT
CaYPEL1_RTF	GTATAAACTTGCCCTCCTTGTA
CaYPEL1_RTR	GTTGGCGTACAACACGTA
CaYPEL2(CAP_000813.1)	
CaYPEL2_5F	GATGCTGCTGCAAGATACT
CaYPEL2_5R	CCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGGCTTGTGGAGTTGTAGAT
CaYPEL2_3F	GTTGGTGTGCGATGTCAGCTCCGGAGCTTGGATACCTGGAACATGAA
CaYPEL2_3R	CGACAAGGGCAGAATGTT
CaYPEL2_NF	CTCCAACGACATGAAGGAAG
CaYPEL2_NR	AGGGTCTTGACGACCTTATTA
CaYPEL2_SF	ATGCTCTCCTCACCTAAA
CaYPEL2_SR	TCGTCCATCGTGGTATGT
CaYPEL2_PF	GACAGTGACAGTGACATGCT
CaYPEL2_PR	GGATGGTCTTCTCTGGATGTTT
CaYPEL2_RTF	CGCAAACAACACCAAGAAC
CaYPEL2_RTR	CCAGTTTCCCGAGAACATATC

고추탄저병균의 2개의 YPEL 유전자의 결실돌연변이체를 Homology-dependent gene replacement 방법을 통한 형질전환을 위해 DNA construct을 제작하였다. targeted 유전자 부분의 5' flanking과 3' flanking, 그리고 hygromycin cassette를 각각 프라이머(표 2-10)를 이용해 pcr로 증폭한 뒤(1st PCR), 증폭한 3개의 산물을 모두 넣고 다시 overlapping pcr을 이용하여 3개의 construct을 연결시켜 5'flanking - HPH - 3'flanking construct을 제작하였다(2nd PCR). 제작한 construct은 충분한 농도를 위해 nested pcr로 대량증폭 하였다(3rd PCR) (표 2-11). 각 pcr 산물은 모두 MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON, Korea)를 통해 gel elution 하면서 사용하였고, 각 pcr의 polymerase는 Pfu Plus 5x PCR Premix (elpis, Korea)를 이용하였다.

표2-11. construct 제작에 사용된 PCR 조건

Step	Hold	PCR			
		30 cycles			
		Denature	Anneal	Extend	
1 st PCR	Temp.	95°C	95°C	55°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	1 min
	Volume	20 µl			
2 nd PCR	Temp.	95°C	95°C	52°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	20 sec
	Temp.	-	95°C	52°C	72°C
	Time	-	20 sec	20 sec	3 min
	Volume	20 µl			
3 rd PCR	Temp.	95°C	95°C	55°C	72°C
	Time	3 min	20 sec	20 sec	3 min
	Volume	50 µl			

제작한 construct을 이용한 homology-dependent gene replacement 방법으로 선정된 유전자를 knock-out 시켰다 (그림 2-51). 제작한 protoplast를 얼음에 넣고 천천히 녹인 뒤, construct 5µg과 2×STC buffer를 같은 양으로 섞어놓은 tube에 protoplast를 넣고 실온에서 10분 동안 반응 시켰다. 이후 PEG(poly ethylene glycol)를 넣고 실온에서 20분 동안 반응시켰다. 그리고 TB3 broth배지를 넣어주고 6 시간 동안 천천히 shaking incubation하였다. 이후 55~60°C까지 식은 0.8% TB3 agar 배지에 hygromycin B (CALBIOCHEM®, Germany) 400ppm과, shaking incubation 시킨 균을 넣고 잘 섞은 뒤 90 mm plate에 분주하여 굳혀주었다. 약 3~4일 뒤 자라나는 균을 1차 selection 한 뒤, selection 한 균들

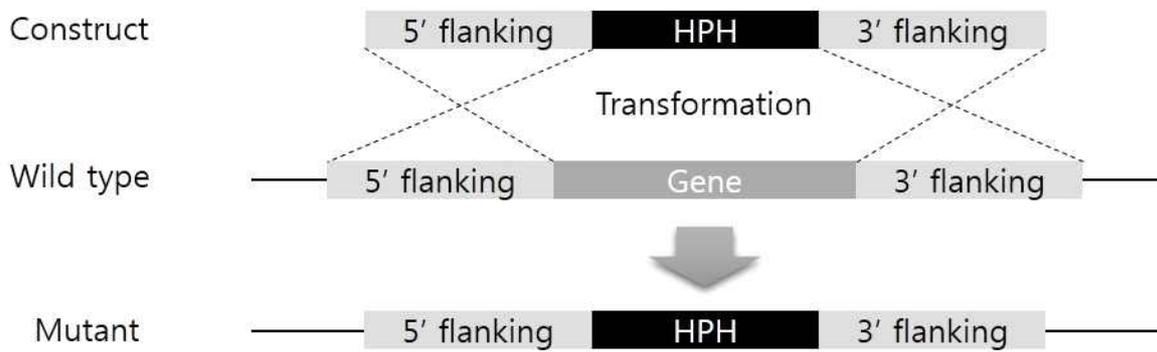


그림2-51. homology-dependent gene replacement 방법에 의한 형질전환

을 다시 hygromycin B 400ppm이 들은 TB3 agar 배지에 접종하고 3~4일 뒤 자라나는 균을 2차 selection 하였다.

2차 selection까지 마친 균들을 Multiplex PCR과 southern blot, 그리고 RT-PCR을 하여 최종 knock-out mutant를 선발하고자 하였다. 우선 균들의 DNA를 Quick DNA extraction method를 통해 추출하였다. 균사 조각을 1.5 ml tube에 넣고 그 tube에 DNA extraction buffer (1M Tris-HCl pH8.0 10%, 0.5M EDTA pH8.0 2%, KCl 74.5 g, 증류수 1 L) 500 μ l를 넣고 갈아주었다. 그리고 5,000 rpm에 10분 원심분리를 하고 상층액을 새 tube에 옮기고 isopropanol 300 μ l를 넣고 inverting한 뒤 -20°C에서 20분 이상 놓아두었다. 이후 4°C에 10,000 rpm, 10분 동안 원심분리를 진행하여 DNA pellet을 얻었고 70 % EtOH로 washing을 한 뒤 실온에서 완전히 말려주었다. 그리고 TE buffer (10 mM Tris-Hcl pH 7.5, 1 mM EDTA) 50 μ l를 넣고 65 °C에서 1시간 동안 두거나 4 °C에서 overnight하여 pellet을 녹였다. 한 유전자당 약 96 여개 이상의 형질전환체들을 얻어 각각의 DNA를 추출하였으며 Multiplex PCR screening에 이용하였다. CaYPEL1은 96개의 형질전환체를 PCR하였는데 86개가 PCR 되었으며, 그 중에 62개의 mutant candidate을 얻을 수 있었다 (그림 2-52). 72.1%에 해당하는 높은 비율로 얻을 수 있었다. 그리고 CaYPEL2는 96개의 형질전환체 중 72개가 PCR되었으며, 53개의 candidate을 얻었다 (그림 2-53). 73.6%에 해당하는 높은 비율로 mutant candidate을 얻을 수 있었으며, 벼도열병균의 약 5%의 비율의 결실돌연

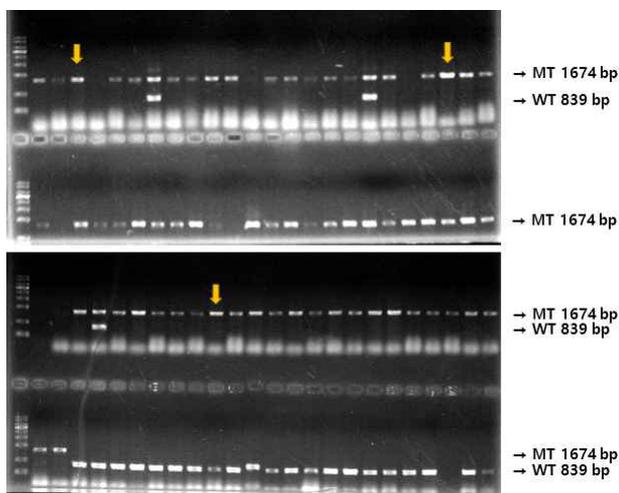


그림2-52. CaYPEL1의 multiplex PCR 결과

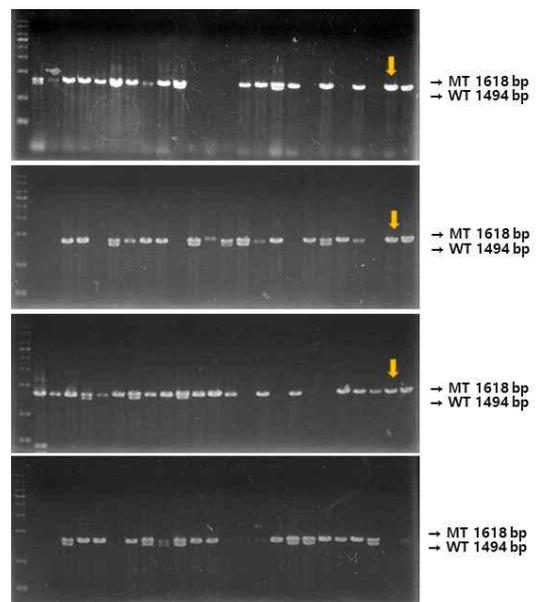


그림2-53. CaYPEL2의 multiplex PCR 결과

변이체 생성율에 비교할 때 상당히 높은 비율이란 것을 알 수 있다.

이렇게 얻어진 mutant candidate 중에서 각각 3개씩 선발하여 단포자분리를 통해 순수분리를 수행하였다. 이렇게 순수분리한 mutant candidate의 DNA를 추출하고 Multiplex PCR로 다시 확인하였다 (그림 2-54). 4차년도 연구에서 서던블롯과 RT-PCR을 이용하여 유전자 결실돌연변이체를 최종 확인하고 생활사에서 유전자 기능분석을 수행할 것이다. 그리고 유전자를 복원시킨 복원형질전환체를 생성할 것이다.

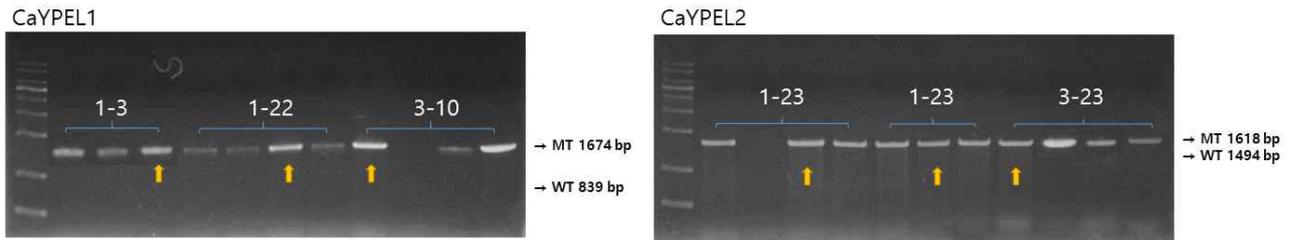


그림2-54. CaYPEL1과 CaYPEL2의 단포자 분리 후 multiplex screening PCR 확인

■ 4차년도

○ 고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석

각 생활사(M;균사, C; 포자, A; 부착기, B; Bio-trophic, N; Necro-trophic) 별 DEG 분석을 위해 빠르고 민감한 정렬 프로그램 인 HISAT2를 사용하여 RNA sequencing을 수행하였다. DEG와 전사 발현은 TopHat2 (Kim et al., 2013)와 Cufflinks를 이용하여 RNA-seq을 분석하였다. RNA-seq 데이터로부터 차별적으로 발현된 유전자의 생물학적으로 의미있는 순위를 산출하기 위해 GFOLD (일반화된 배수 변화) 알고리즘을 사용했다 (Feng et al, 2012). 얻어진 RPKM(reads per kilobase per million mapped reads) 값을 log10으로 환산하여 각 샘플의 발현 비율을 분석하였다. 그 결과, 모든 단계에서 발현이 증가하는 경향을 나타내었다 (그림 2-55). 특히, 식물체 접촉 샘플 B 및 N은 대부분 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였다. 이 결과는 균사체를 기반으로 한 두 샘플 간의 비교에서 유사하였다.

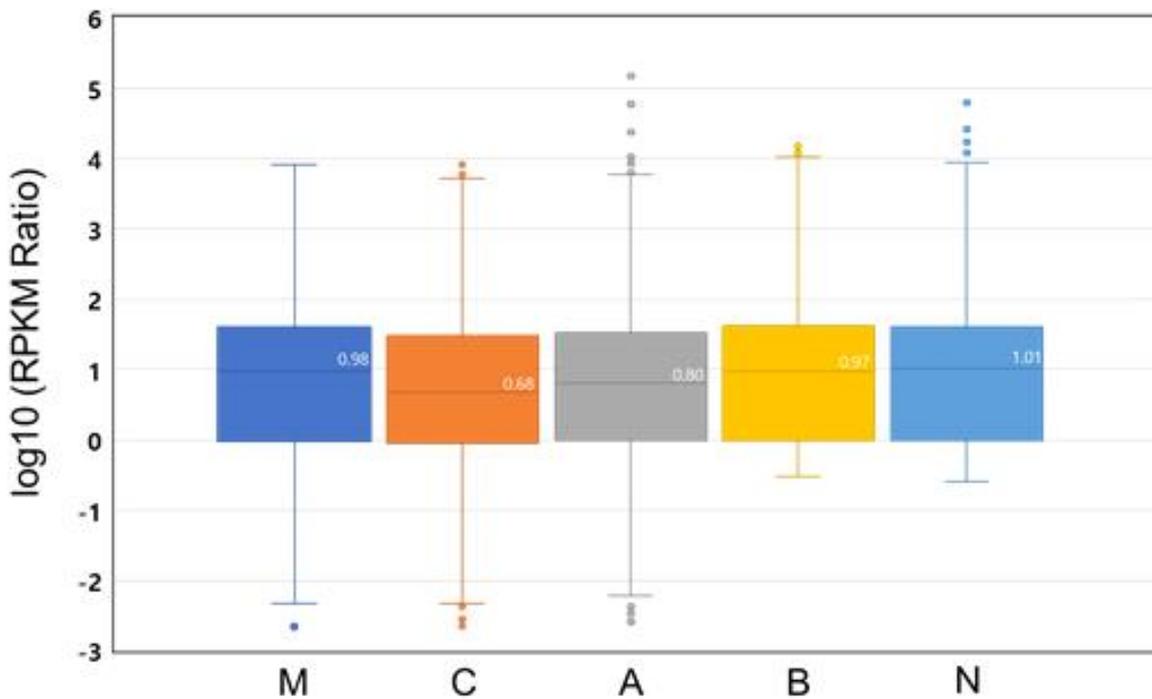


그림 2-55. RPKM 값의 로그 정규화 비율 분포. plot의 너비는 서로 다른 log10 RPKM 비율에서 유전자의 밀도를 나타냄. 상자의 바닥과 꼭대기는 각각 첫 번째 (25 %)와 세 번째 (75 %)의 사분위이고 상자 안의 실선의 회색 수평선이 중앙값 (50 %)을 표시.

M/B와 M/N 샘플의 기울기는 M/C와 M/A 샘플 사이의 RPKM 값보다 낮았다. 이 결과는 B와 N 유전자의 발현이 M에 비하여 C와 A에 비하여 전반적으로 낮다는 것을 의미한다 (그림 2-56). DEG 분석 결과로 M, C, A 샘플은 유전자는 half-duplex 였고 생체 내 곰팡이 믹스 샘플은 유의하게 높은 유전자 발현을 보였다 (표 2-12). 또한, C-B 및 C-N의 경우 모든 유전자가 상향 조절될 것으로 예측되었다. 이를 위해서는 추가 분석 및 정규화 매개 변수 값을 다시 검증해야 할 것으로 보인다.

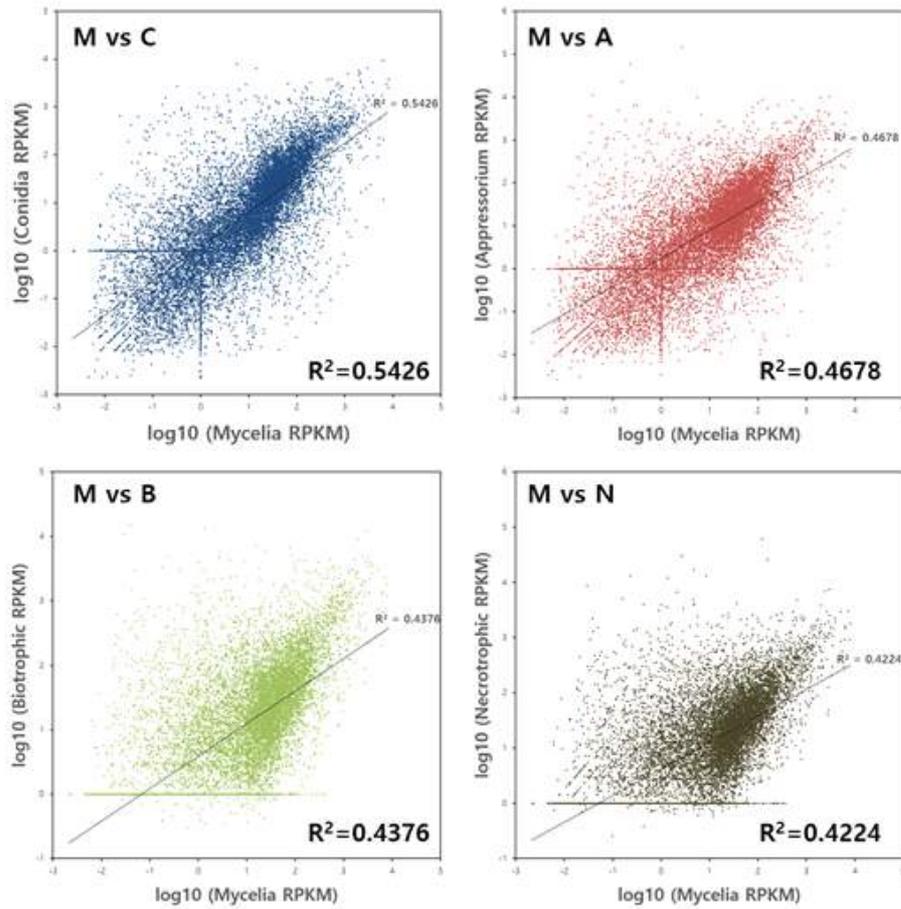


그림 2-56. M(균사)를 기준으로 생활사 별 유전자 발현 분포. log10으로 변환된 RPKM 값을 이용함. R2는 상관 계수.

표 2-12. *C. scovillei*의 유전자 발현비교

Conditions ^a			DEG ^b	
1st	2nd	Up	No	Down
M	C	160	13280	119
M	A	1114	11587	858
M	B	4097	9452	10
M	N	5027	8530	2
C	A	334	12890	335
C	B	3611	9948	0
C	N	3149	10410	0
A	B	6154	6944	461
A	N	7275	6137	147
B	N	10	13522	27

^aFive conditions: M, mycelia; C, conidia; A, appressoria; B, biotrophic stage; N, necrotrophic stage.

^bDEG (differentially expressed gene) was used RPKM from gfold value.

○ 다른 *Colletotrichum* 종간 비교유전체 연구를 통한 병원성 스펙트럼 이해
지금까지 유전체 분석이 완료된 *Colletotrichum* 종과 이외의 out-group 종들에 대한 유전자 수를 비교유전체학적으로 비교하고 분석하였다. 곰팡이의 비교 게놈 분석은 5 *Colletotrichum* spp.의 Repeat elements, Cell wall derading enzymes, secreted proteins, secondary metabolites synthase genes 등을 분석하였다. 5종류의 *Colletotrichum* spp.에서 단백질 군 검출을 위해 MCL 알고리즘 (<https://micans.org/mcl/>)을 적용했다. MUMmer 시스템 (<http://mummer.sourceforge.net/>)은 두 게놈의 다른 어셈블리를 비교하는 데 적용되었다. RepeatScout (<https://bix.ucsd.edu/repeatscout/>)을 기반으로 De novo는 반복을 식별하고 TE 클래스를 기반으로 각 반복 요소를 구별하였다. 식물세포벽 분해 효소 (PCWDEs)는 cutinase, cellulase, pectinase와 xylanase 포함하며 곰팡이 PCWDE 데이터베이스 (<http://pcwde.riceblast.snu.ac.kr/>)에서 사용된 HMM 모델에 의해 예측되었다. AntiSMASH (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)는 2 차 대사산물 유전자 클러스터를 확인하고 분석하는 데 사용되었다. Fungal secretome database (Choi 등, 2010)는 분비된 단백질을 분리하는 데 사용되었다. Transcription factors는 FTFD(Fungal Transcription Factor Database) (<http://ftfd.snu.ac.kr>)를 이용하여 분석하였다.

Repeat elements는 게놈 재배열 및 확장을 위해 알려져 있으므로, 우리는 전이 요소의 분포를 분석했다. *C. scovillei*는 27 개의 DNA 트랜스 포손과 29 개의 긴 말단 반복을 가지고 있지만, 다른 종은 더 많은 것을 갖고 있었다 (그림 2-57). *C. higginsianum*은 LINES와 SINES에 대한 유전자가 가장 많았다. 다른 주요 유형의 반복 요소, 마이크로 위성 및 미니 사이트 라이트를 포함한 직렬 반복은 분석되지 않았다. 일반적으로 *M. oryzae*와 *N. crassa*에는 더 많은 DNA 트랜스 포손과 retroelements가 있었다.

세포벽 분해효소는 특이하게도 *C. scovillei*와 *C. gloeosporioides*가 많은 수의 유전자를 갖고 있었다. 특히 Pectinase와 xylanase의 경우, *C. gloeosporioides*가 가장 많이 가지고 있었다. 전반적으로 *N.crassa*와 lichen forming fungus *C. flavorubescens*는 식물 세포벽 분해 효소에 대한 유전자를 훨씬 적게 가지고 있었다.

*C. scovillei*는 *C. graminicola* 및 *C. higginsianum* 보다 많은 분비 단백질을 가지고 있으나 *C. gloeosporioides* 및 *C. orbiculare*보다 적었다. *C. scovillei*는 464 개의 작은 분비 단백질을 가지고 있다. *Colletotrichum* 특이적 SSP(small secreted protein)는 153개 단백질을 포함하는 22 개 클러스터에 존재했다 (그림 2-59).

이것은 polyketide synthase, nonribosomal peptide synthased와 terpene synthase를 포함하는 2 차 대사 산물 유전자의 예측이다 (그림 2-60). 일반적으로 *Colletotrichum* 종은 outgroup 균류보다 2 차 대사산물 유전자가 약간 더 많다. *C. gloeosporioides*는 다른 *Colletotrichum* 종보다 더 많은 유전자를 가지고 있다. *N. crassa*는 다른 것들보다 2차 대사산물 유전자 수가 훨씬 적게 가지고 있다.

전사인자 (TF)는 유전 정보의 전사를 조절하는 단백질이다. 일반적으로 *Colletotrichum*은 다른 그룹보다 TF가 많았으며 그 중 *C. acutatum* 복합체 (그림 2-61)가 더 많았다. *C. scovillei*는

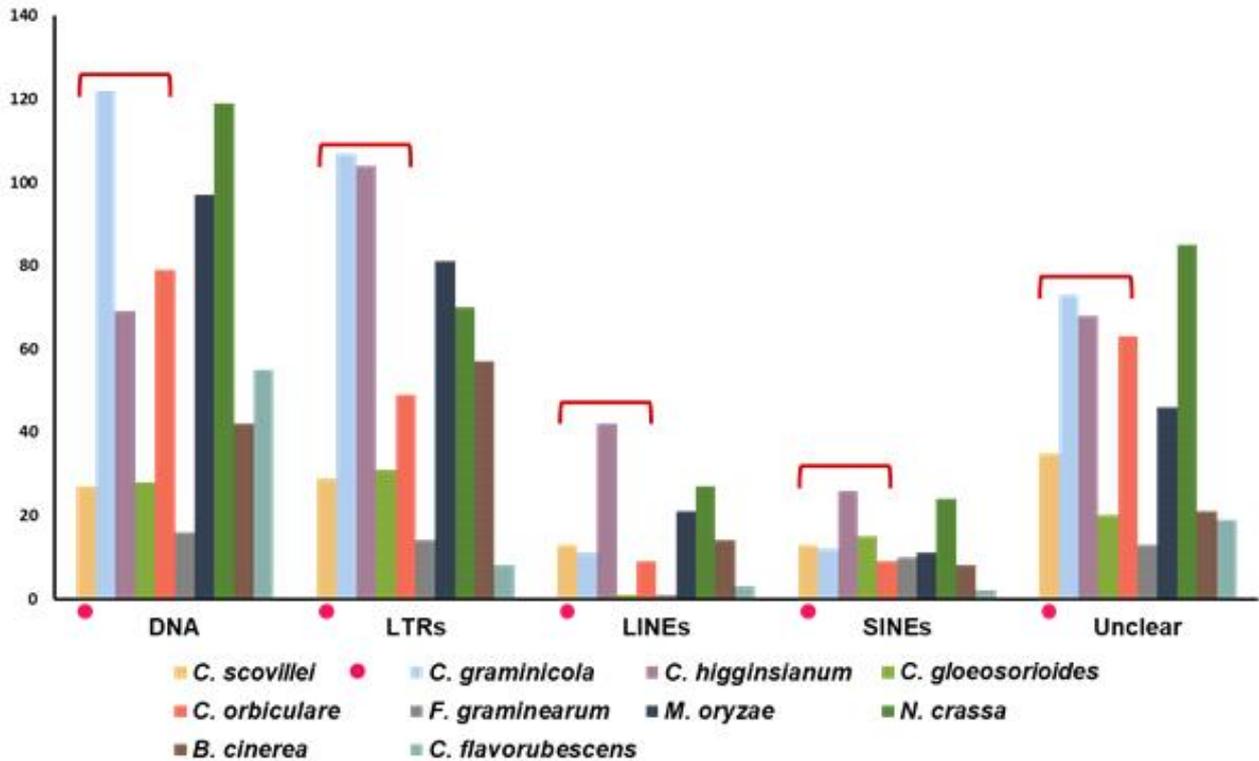


그림 2-57. *Colletotrichum*과 Outgroup 균류의 Repeat elements 분석. 막대의 빨간색 괄호는 *Colletotrichum* 그룹을 나타냄. RepeatScout (<https://bix.ucsd.edu/repeatscout/>)을 기반으로 De novo는 Repeat element 식별하고 TE 클래스를 기반으로 각 반복 요소를 구별.

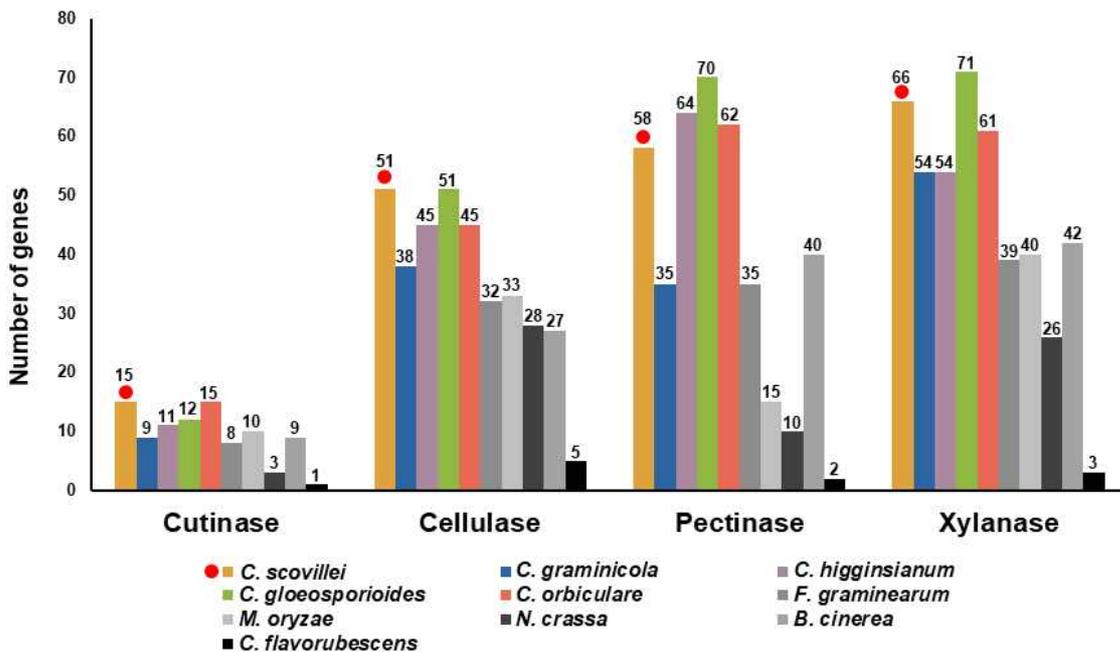


그림 2-58. *Colletotrichum* spp.와 outgroup 균류의 식물 세포벽 분해 효소 분석. 막대 위에있는 빨간색 원은 *C. scovillei*를 나타냄. PCWDE는 곰팡이 PCWDE 데이터베이스 (<http://pcwde.riceblast.snu.ac.kr/>)에서 사용된 HMM 모델에 의해 예측됨.

*C. tofieldiae*와 *C. simmondsii*에 이어 TF가 647 개이며 TF 수가 세 번째로 많았다. Outlet 그룹 중, *Colletotrichum*과 가장 유사한 *F. graminearum*과 *M. oryzae*는 각각 605와 519 TF를

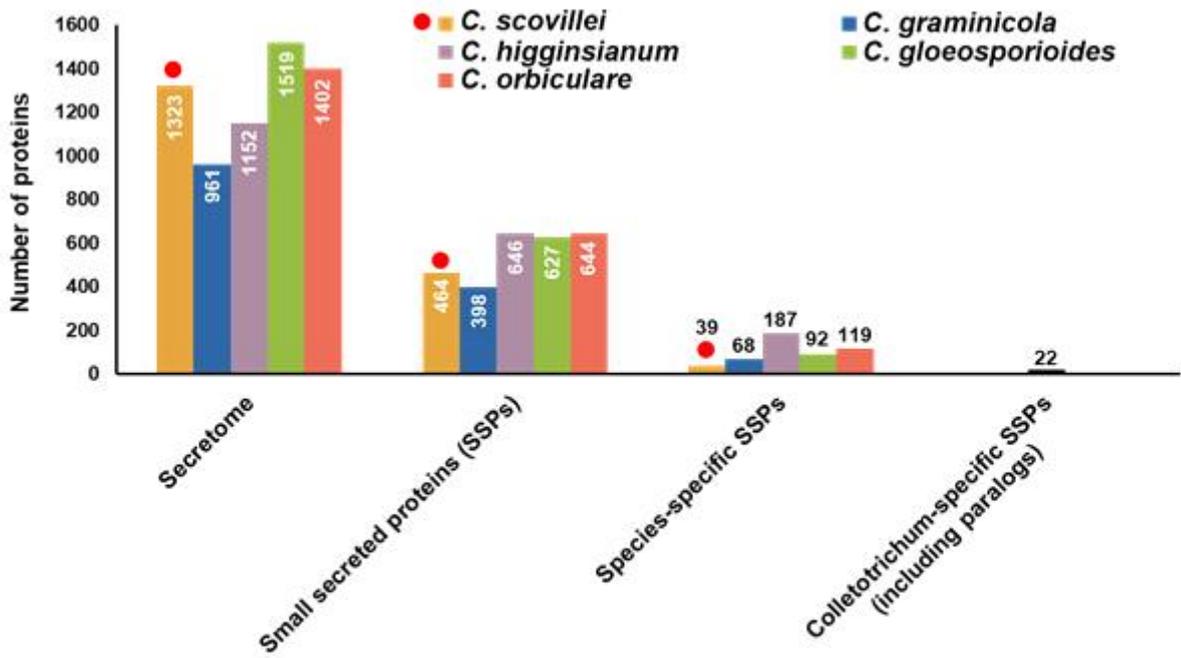


그림 2-59. 5 개의 *Colletotrichum* spp.에서 분비 단백질 분석. 막대 위에있는 빨간색 원은 *C. scovillei*를 나타냄. 곰팡이 분비 데이터베이스 (Choi et al., 2010)는 분비 단백질을 분리하는 데 사용.

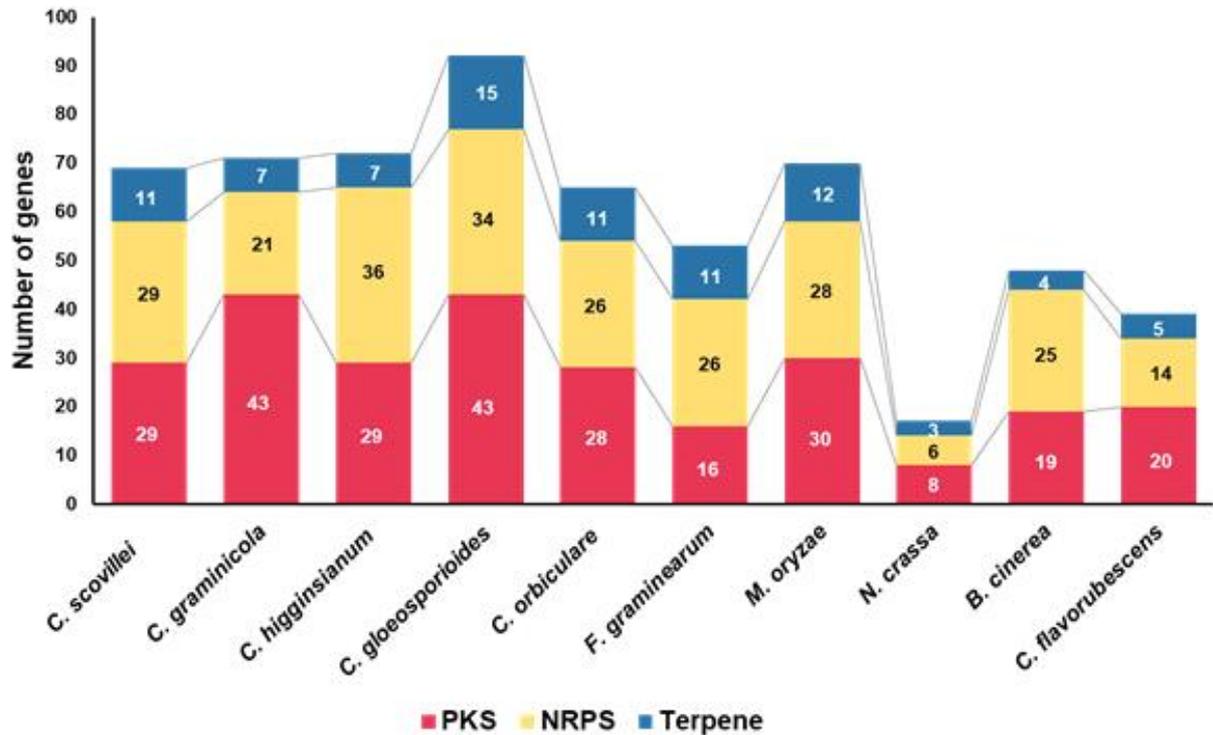


그림 2-60. *Colletotrichum* spp. 및 outgroup 균류의 2 차 대사산물 합성 유전자 분석. AntiSMASH는 2 차 대사산물 유전자 클러스터 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org>)를 확인하고 분석하는 데 사용됨. 가졌다.

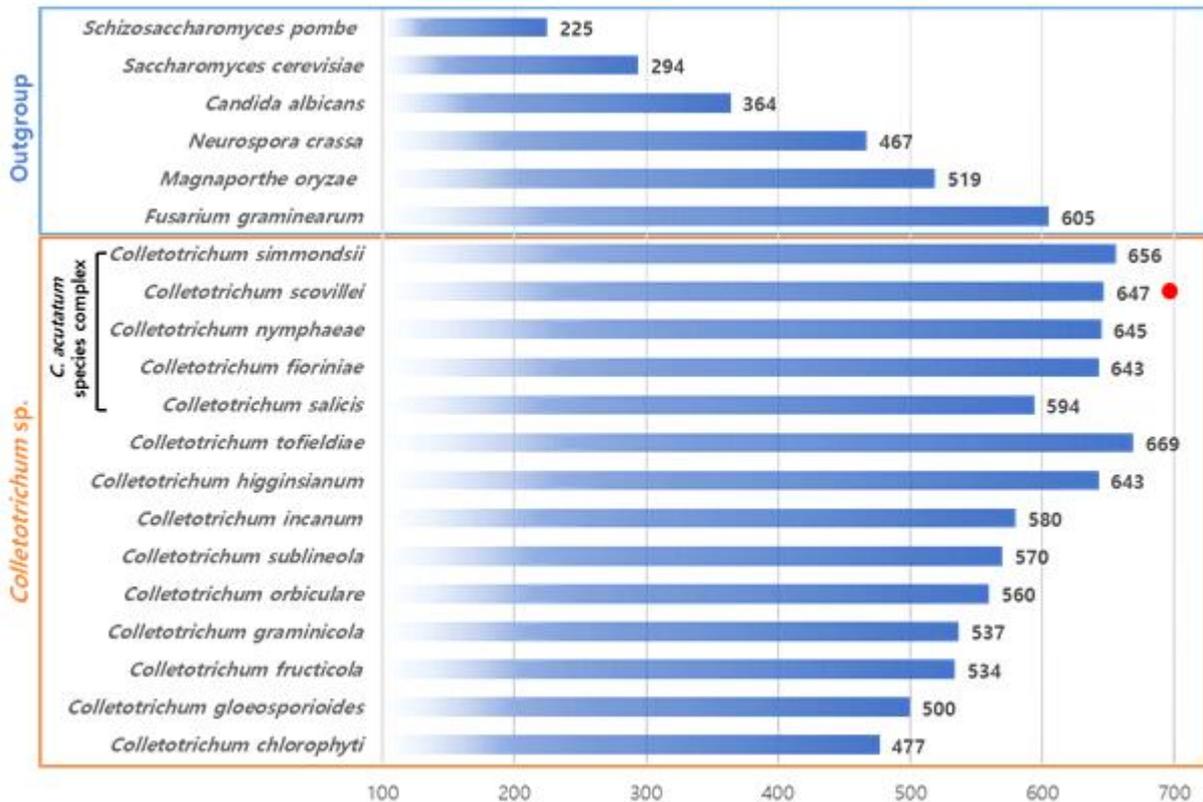


그림 2-61. *Colletotrichum* spp. 및 outgroup 균류의 전사인자 분석. 전사 인자는 FTFD (Fungal Transcription Factor Database) (<http://ftfd.snu.ac.kr>)를 이용하여 분석.

○ 고추탄저병균의 공기전반 및 병원성유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구

3차년도 연구에서 CaYPEL1과 CaYPEL2의 형질전환을 통해 mutant candidate을 선발하였다. 4차년도에서는 Multiplex PCR로 확인된 mutant candidate들의 copy 수 및 ectopic 여부를 알아보기 위하여 southern blotting을 진행하였다. 본 연구에서는 P-32 방사선 동위원소를 이용한 표지화합물의 사용을 자제하여, 비방사선 화합물인 biotin을 이용하여 핵산표지(probe labelling)을 수행하였다. 먼저 southern용 gel을 제작하여 제한효소로 처리된 wild-type과

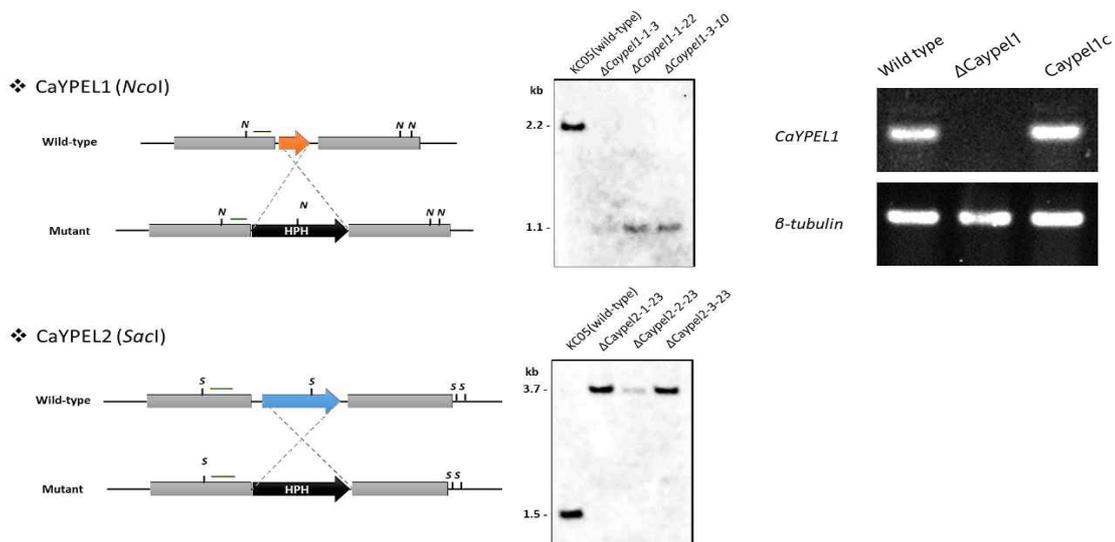


그림 2-62. CaYPEL1과 CaYPEL2의 결실돌연변이체의 서던블롯 및 RT-PCR 결과.

mutant candidate의 DNA를 전기영동하고 겔상에 존재하는 DNA를 membrane으로 옮겨주었다. 그리고 바이오틴과 probe를 결합시키고 hybridization과정을 거쳐 chemiluminescence에서 노출시켜 확인하였다 (그림 2-62).

CaYPEL1와 CaYPEL2 유전자 전체를 각각 HPH(Hygromycin resistance) 유전자로 치환하였다. 각각 3개의 candidate을 선발하여 southern blot 결과 각각 NcoI과 SacI을 처리하여 절단하였을 때 5'flanking 지역을 probe로 하여 CaYPEL1은 1.1 kb, CaYPEL2는 1.5 kb의 mutant-type의 size를 얻어 최종적으로 결실돌연변이체로 판명하였다. 추가적으로 CaYPEL1과 CaYPEL2의 predicted promoter와 ORF 부위를 다시 삽입하여 유전자복원형질체 (complemented strain)를 각각 생성하였다. 그러나 CaYPEL1의 경우 제한효소 절단 위치가 construct 안쪽에 존재하여 ectopic 여부를 서던블롯으로 확인할 수 없으므로 RT-PCR를 추가 진행하였다. wild-type, 유전자결실돌연변이체, 유전자복원형질체의 균사체를 CM broth배지에서 2~3일간 키우고 RNA sample을 준비하였다. RNA의 추출은 easy-spin™(DNA free) Total RNA Extraction Kit 을 사용하여 수행하였다. 얻어진 RNA는 농도 및 purity를 확인하고 labeling하여 -80°C deep freezer에 보관하며 연구에 사용하였다. cDNA의 합성은 SuperScript® III First-Strand Synthesis System을 이용하였으며, 최종적으로 southern blot으로 확인된 CaYPEL1 결실돌연변이체에 대하여 유전자의 발현 유무를 Reverse Transcription-PCR을 확인하였다. 만들어진 cDNA를 template으로 하여 RTF/RTR의 프라이머로 PCR을 진행하였다. 대조구로 항시 발현 유전자인 b-tubulin 유전자를 사용하여 최종확인하였다 (그림 2-62).

생성된 두 유전자의 결실돌연변이체 및 복원형질체를 이용하여 유전자의 기능을 각 생활사에서 관찰하였다. 최소영양배지인 MMA배지와 영양배지인 CM배지에서 각각의 균사생장 및 콜로니 형태를 관찰하였다. 그 결과 MMA배지에서 균사생장이 조금 느린 것이 관찰되었으며, wild-type에 비해 pigmentation되는 경향이 있었다. 그러나 CM배지에서는 wild-type과 비교하여 큰 차이가 없었다 (그림 2-63).

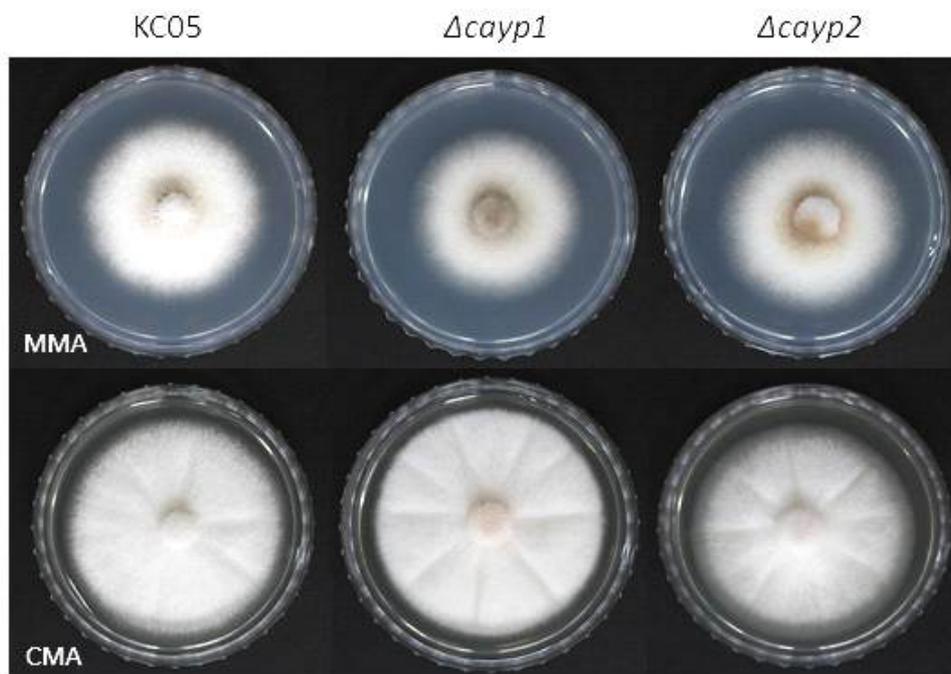


그림 2-63. Δ Cayp1와 Δ Cayp2의 균사생장 비교.

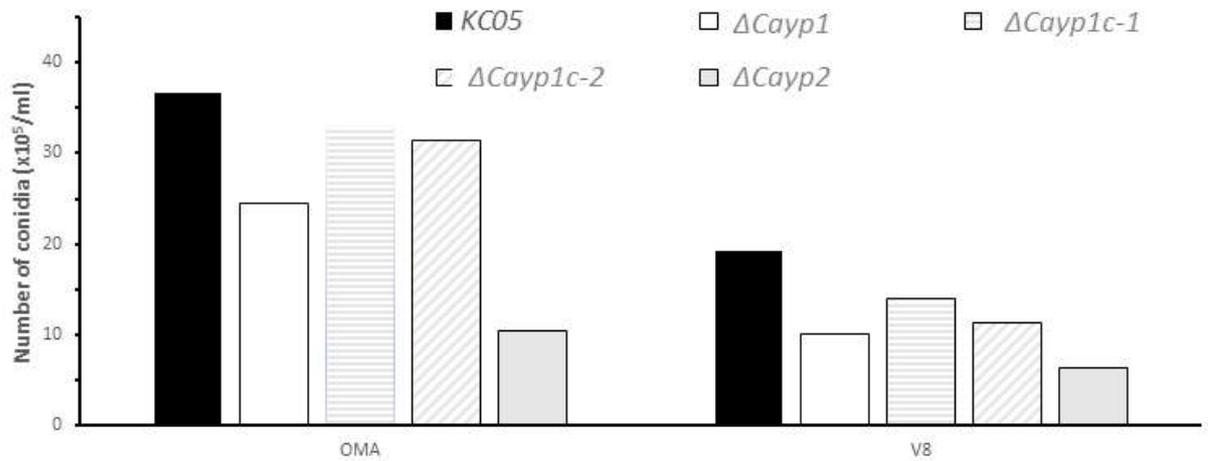


그림 2-64. $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 의 포자 수 측정.

포자를 생성하는 2종류의 OMA와 V8배지에서 $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 를 각각 배양하고 포자 수를 측정하여 포자생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 OMA배지에서 v8배지보다 약 50% 정도 더 많은 포자를 생성하였다. 그리고 $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 모두 포자 수가 줄어드는 경향을 보였으며, 특히 $\Delta Cayp2$ 는 현저하게 약 30% 정도로 줄어드는 것을 볼 수 있었다 (그림 2-64). 이 결과로 YPEL유전자가 고추탄저병균의 포자생성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

포자의 모양 및 크기를 관찰하여 conidial morphology에 미치는 영향을 알아보았다 (그림 2-65). 그 결과 $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 모두 포자의 크기가 wild-type에 비교하여 평균적으로 좀 더 긴 포자들이 만들어진 것이 관찰되었다. 그러나 너비는 큰 차이가 없었다. 길이가 길어진 포자가 만들어진 것에 관한 연구는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

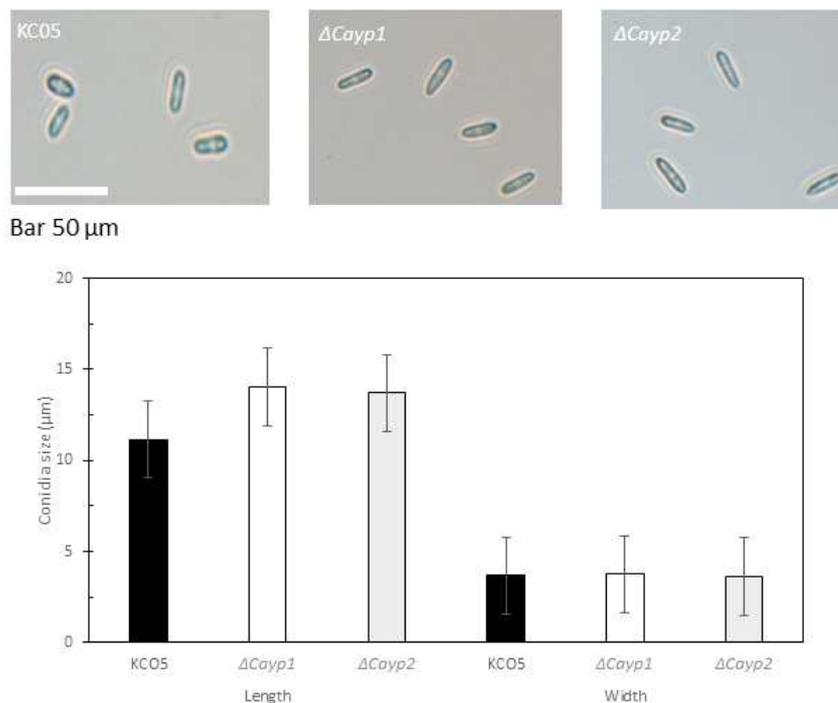


그림 2-65. $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 의 포자모양 및 크기 관찰.

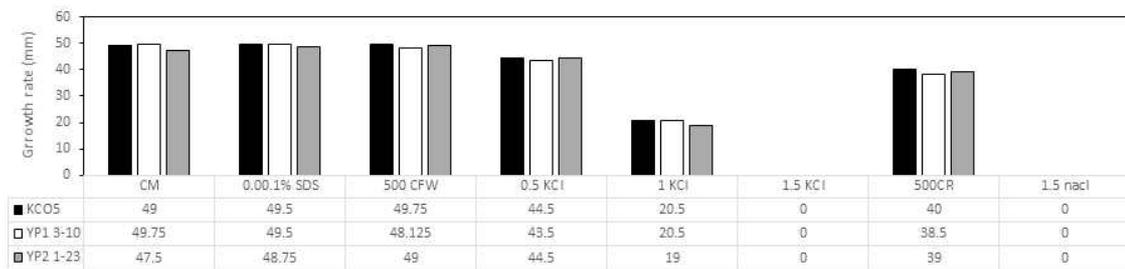
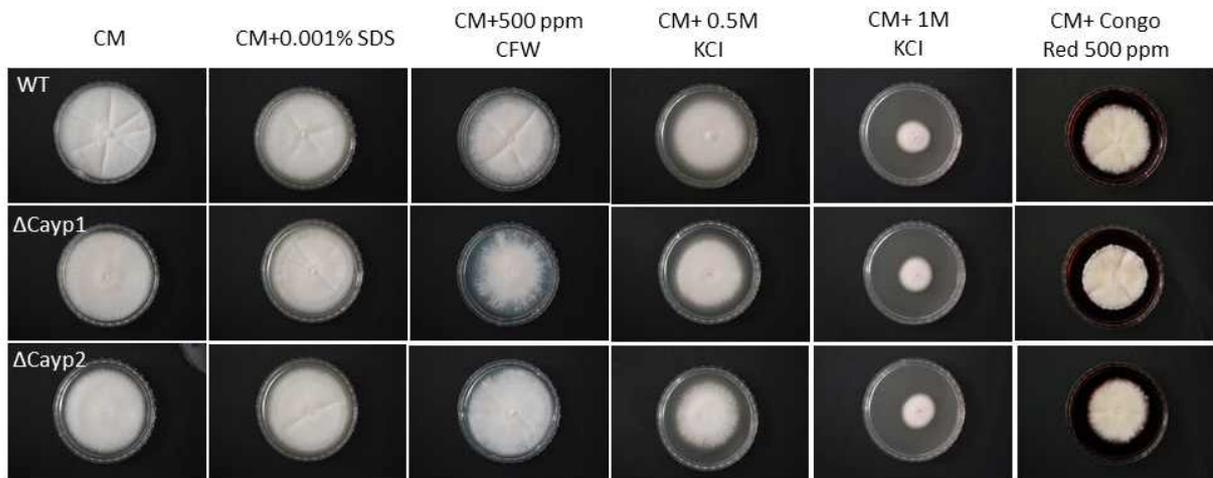


그림 2-66. $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 의 stress 조건 배지에서 균사생장 측정.

유전자가 knock-out 된 strain의 경우 외부의 stress 조건에 취약하거나 영향을 크게 받을 수 있다. 따라서, $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 의 stress 배지에서 배양하여 유전자의 특성을 알아보고자 하였다. Cell wall stress를 주는 SDS, CFW, congo red 배지와 osmotic stress를 주는 KCl 배지에서 관찰하였다 (그림 2-66). 그 결과 농도가 낮은 0.001%의 SDS에서는 크게 차이가 나지 않았으나, CFW 500ppm와 congo red 500ppm 배지에서는 $\Delta Cayp1$ 가 조금 느리게 자라는 것이 확인되었다. 특히 CFW배지에서는 공중균사 (aerial hyphae)의 양이 적어 배지가 드러나는 것이 확인되었다. KCl 0.5M과 1M 배지에서는 wild-type과 비교하여 큰 차이가 없었다.

부착기(Appressorium)는 기생성의 사상균포자가 기주식물의 표피 위에 발아한 후 균사가 내부의 조직에 침입하기 전에 균사 또는 발아관의 선단이 크게 되어 흡반과 같은 특수한 모양을 일컫는 말로 식물에 병을 일으키기 위해서 필수적인 구조이다. $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 의 부착기를 제대로 형성하는지 관찰하기 위하여 포자현탁액을 hydrophobic한 slide glass에 올려놓고 습식처리하여 8시간 후 현미경으로 관찰하였다 (그림 2-67). 그 결과 $\Delta Cayp1$ 이 wild-type에 비교하여 부착기 생성율이 떨어지는 것이 관찰되었다. $\Delta Cayp2$ 는 큰 차이를 나타내지 않았다. CaYPEL이 병원성(침입 및 발병)에 영향을 주는지 알아보기 위하여 포자 현탁액을 탄저병 감수성 품종 고추 과실에 접종하고 습식처리하여 병이 발생하는지 관찰하였다 (그림 2-68). 고추 과실은 일회용 주사기를 이용해 상처를 내준 것과 상처를 내지 않은 것을 사용하였다. 그 결과 상처를 내지 않은 처리구에서는 $\Delta Cayp1$ 은 거의 병이 발생하지 않았다. 그리고 $\Delta Cayp2$ 도 wild-type에 비해 줄어든 병반을 형성하였다. 과실에 상처를 내어 접종한 처리구에서는 비교적 병반이 크게 형성이 되었다. 이 결과는 $\Delta Cayp1$ 와 $\Delta Cayp2$ 는 부착기를 생성하지만, 식물조직 침입과정에서 CaYPEL에 의해 식물체를 잘 뚫고 들어가지 못하는 것으로 보인다.



Bar 50 μ m

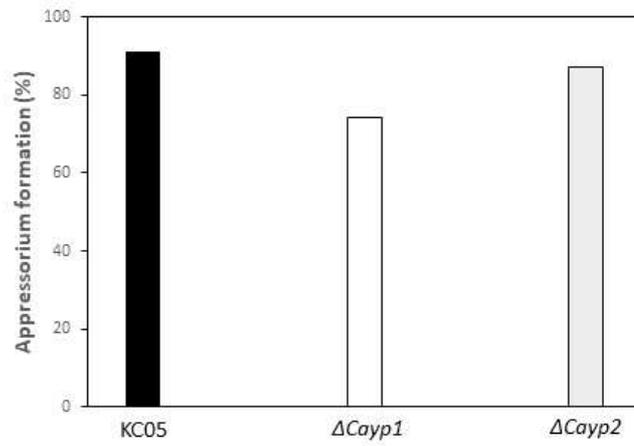


그림 2-67. Δ Cayp1와 Δ Cayp2의 부착기 생성.



그림 2-68. Δ Cayp1와 Δ Cayp2의 고추 과실에서의 병원성 assay.

추가적으로 기존 다른 병원성 곰팡이에서 알려진 포자와 부착기에 영향을 주는 Hox유전자를 *C. scovillei*에서 선발하여 동일한 방법으로 mutant를 만들어 표현형을 관찰하였다. 총 10개의 CaHOX유전자 중에 뚜렷한 표현형을 나타낼 것이 예상되는 CaHOX2와 CaHOX7 유전자를 선발하고 homologous gene replacement 방법을 이용하여 knock-out 시킨 후에 서던블롯으로 최종으로 확인하였다 (그림 2-69).

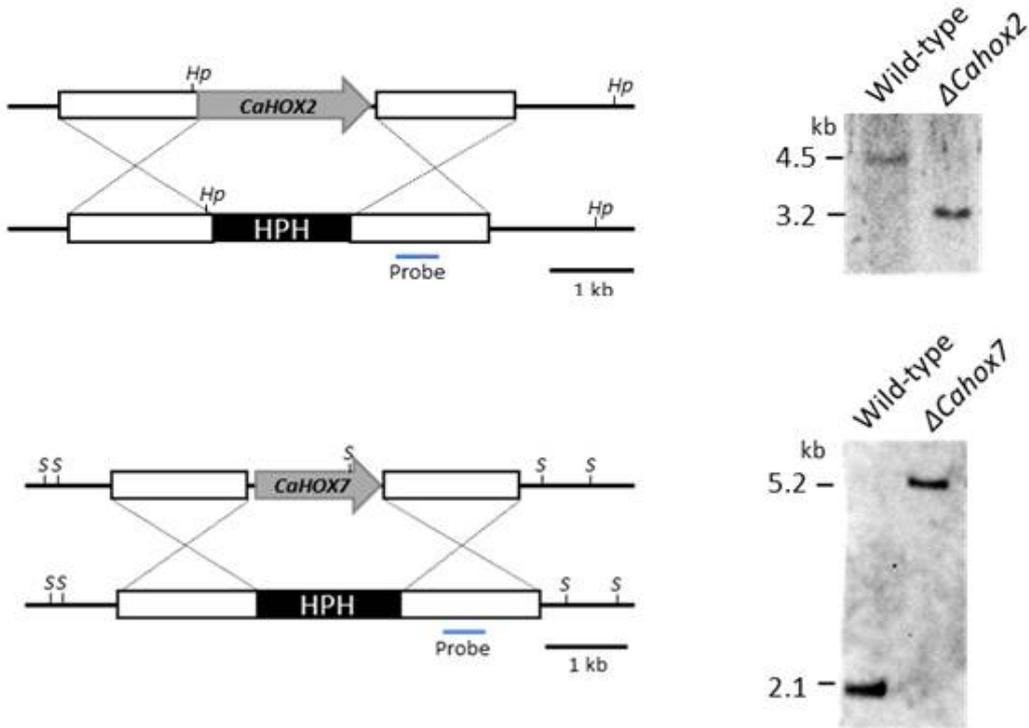


그림 2-69. CaHOX2과 CaHOX7의 결실돌연변이체의 서던블롯결과.

생성된 Δ *Cahox2*와 Δ *Cahox7*의 생활사에서의 기본적인 표현형을 관찰하였다. 우선 균사생장을 최소영양배지(MMA)와 영양배지(CM)에서 배양시켜 관찰하였다 (그림 2-70). 그 결과 Δ *Cahox2*의 균사생장이 wild-type에 비해 두 종류의 배지에서 모두 느려진 것이 관찰되었다. 그리고 Δ *Cahox2*는 포자를 만들지 못하는 표현형을 나타내었다 (그림 2-71).

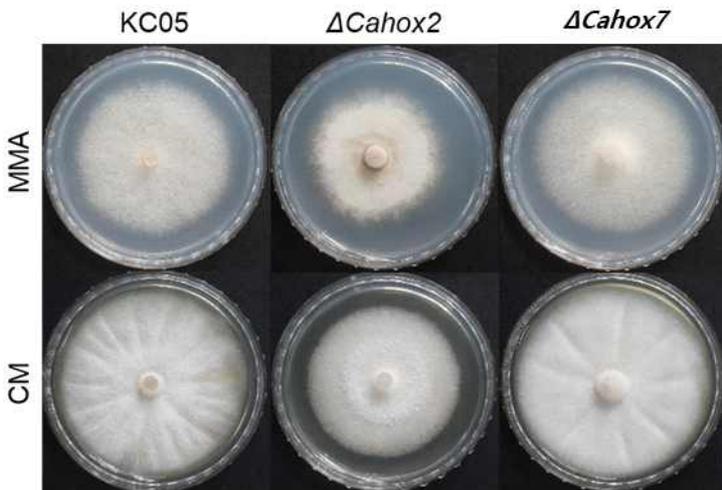


그림 2-70. Δ *Cahox2*와 Δ *Cahox7*의 균사생장 비교.

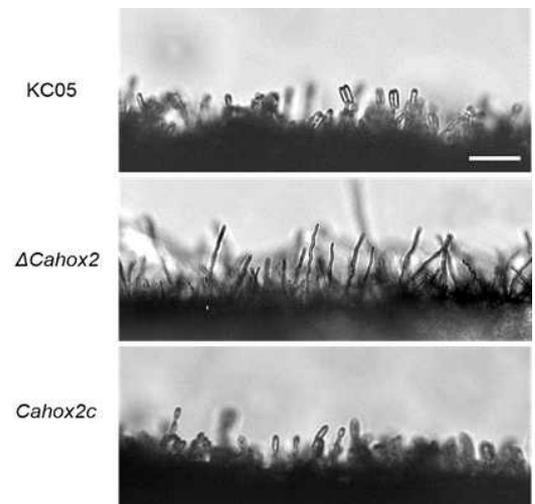


그림 2-71. Δ *Cahox2*의 포자생성

이 결과는 기존 벼도열병에서 알려진 결과와 유사한 결과(Kim 등, 2009)였으며, CaHOX2가 포자생성에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 그리고 $\Delta Cahox7$ 은 소수성 표면인 cover glass에서 식물체 침입에 필요한 구조인 부착기를 생성하지 못하였다 (그림 2-72). 또한, 균사에서 만드는 부착기인 ALS(Appressorium like structure)도 만들지 못하는 것이 관찰되었다. 기주식물인 고추 과실에 포자 현탁액을 접종시켜 부착기 형성 및 침입 여부를 관찰한 결과 $\Delta Cahox7$ 은 인공 소수성 표면에서 같이 부착기를 생성하지 못하였고, wild-type에서 기주식물 침입시 관찰되는 dendroid structure 또한 관찰되지 않았다. 따라서 $\Delta Cahox7$ 은 부착기 생성에 따른 병원성에 중요한 역할을 하는 유전자라는 것을 알아내었다.

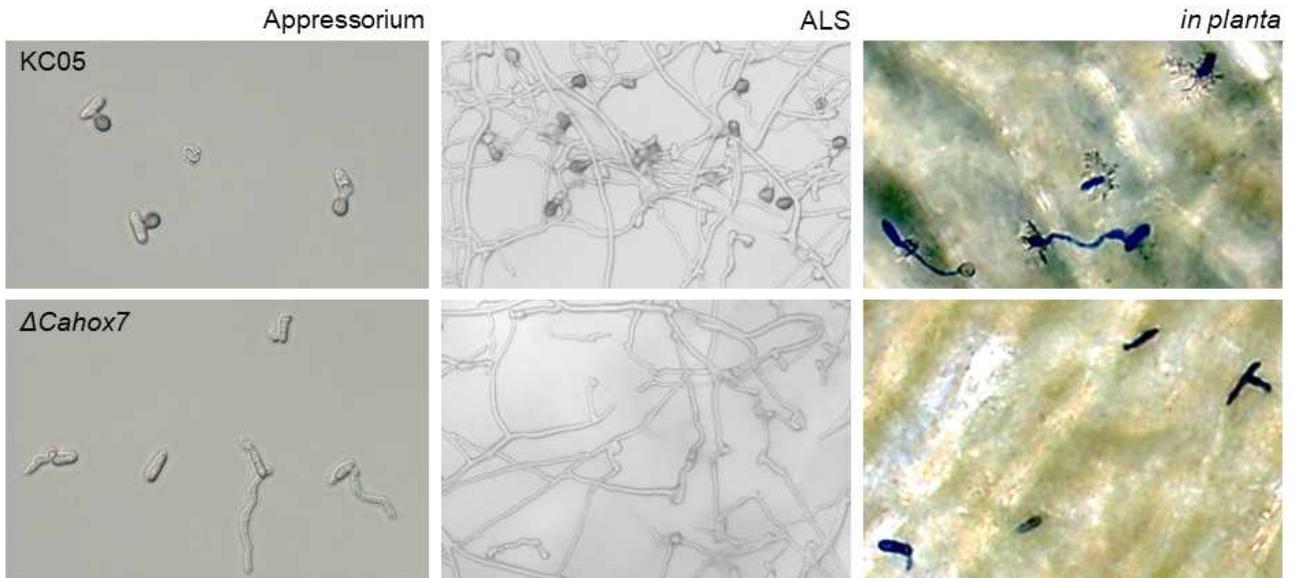


그림 2-72. $\Delta Cahox7$ 의 부착기 미생성.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 사업성과

(단위 : 건수)

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		4		4			4	2	4	
1 차 년 도	목표			1						
	실적			2			2			
2 차 년 도	목표			1			1	1	2	
	실적			2			4	2	2	
3 차 년 도	목표	2		1			2			
	실적	4		1			5	1		3
4 차 년 도	목표	2		1			1	1	2	
	실적	2		0			4	0	2	
소 계	목표	4		4			4	2	4	
	실적	6		5			15	3	4	3
종료 1차년도										
종료 2차년도										
종료 3차년도										
종료 4차년도										
소 계										
합 계		6		5			15	3	4	3

나. 기타성과

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SC I						
최종목표	3	1									5		11	6	10		1		
1차년도	목표										1		2						
	실적	1									1		5		1				
2차년도	목표	1									1		3	2					
	실적	2									4	1	8	2	2		1		
3차년도	목표	1									1		3	2	7				
	실적	1	1								1		11	2	3				
4차년도	목표	1									2		3	2	3		1		
	실적	0	2								2		7	0	2		2		
소계	목표	3	1								5		11	6	10		1		
	실적	4	3								8	1	31	4	8		3		
종료 1차년도		1																	
종료 2차년도																			
종료 3차년도																			
종료 4차년도																			
소계																			
합계	4	3									8	1	31	4	8		3		

다. 성과목표에 대한 자체평가

성과목표	자 체 평 가
- 사업성과	- 4차년도 예상 성과를 포함할 경우 표준유전체해독은 NABIC 등록 준비 중이며, 병원성미생물진단마커 개발 또한 준비 중으로 모든 항목에서 달성 할 것으로 예상됨.
- 기타성과	- 4차년도 특히 출원 중이며, 예상 성과를 포함할 경우 모든 항목에서 달성 예상됨
- 연구성과	- 연구 성과는 1, 2, 3, 4 차년도의 세부 목표 별로 무난히 달성하였음

3-2. 성과목록

가. 전략미생물 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고

나. 유용 유전자원 확보

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>PKS51</i> 유전자	벼 키다리병균의 병원형 구분 마커	NU-0962
2	<i>F. fujikuroi</i> B20 균주의 <i>NRPS31</i> 유전자	벼 키다리병균의 병원형 구분 마커	NU-0963
3	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>FUM1</i> 유전자	fumonisin 생합성 유전자로서 벼 키다리병균 마름병징형 균주의 병 발생 원인 유전자	NU-0970
4	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>FUB1</i> 유전자	fusaric acid 생합성 유전자로서 벼 키다리병균의 병 발생 기여 유전자	NU-0969
5	<i>Colletotrichum scovillei</i> KC05균주의 <i>CaHOX2</i> 유전자	고추탄저병균의 포자형성단계에 관여하는 유전자	NS-1459
6	<i>Colletotrichum scovillei</i> KC05균주의 <i>CaHOX7</i> 유전자	고추탄저병균의 식물체 침입시 부착기 형성에 관련된 유전자	NS-1461

다. 표준유전체 해독

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1 (1차년도)	<i>Fusarium fujikuroi</i> B20	<i>F. fujikuroi</i> B20 유전체를 TSLR 방법으로 해독하여 assembly 완료	NN-2471
2 (1차년도)	<i>Colletotrichum acutatum</i> KC05 Mt DNA	<i>Colletotrichum acutatum</i> KC05 Mitochondrial DNA sequencing	-NCBI GenBank (KR349346), -NG-0550
3 (2차년도)	<i>Colletotrichum acutatum</i> Genomic DNA	고추탄저병원균에 대한 전체 지놈시퀀싱 분석	NG-0552
4 (2차년도)	<i>Fusarium cullmourn</i> J1	<i>Fusarium cullmourn</i> J1 유전체를 PacBio 방법으로 해독하여 assembly 완료함.	NG-0543
5 (3차년도)	<i>Fusarium fujikuroi</i> JA19	<i>F. fujikuroi</i> JA19 유전체를 PacBio 방법으로 해독하여 assembly 완료함. <i>F. fujikuroi</i> B14와 같은 마름병징형 균주로 이차대사 유전자를 대상으로 비교분석 중.	NN-3811

라. 메타지놈 분석

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고

마. 유전체 분석기술 개발

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고

바. NABIC 등록

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1 (1차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B20 유전체	현재 <i>F. fujikuroi</i> B20 유전체의 raw data (fasta 파일)와 assembly (fasta파일) 등록	NN-2471
2 (1차년도)	<i>Colletotrichum acutatum</i> KC05 Mt DNA	<i>Colletotrichum acutatum</i> KC05 Mitochondrial DNA sequencing	NG-0550
3 (2차년도)	<i>Fusarium cullmourn</i> J1	<i>Fusarium cullmourn</i> J1 유전체를 PacBio 방법으로 해독하여 assembly 완료함.	NG-0543
4 (2차년도)	<i>Colletotrichum acutatum</i> 유전체	고추탄저병원균에 대한 전체 지놈시퀀싱 분석	NG-0552
5 (2차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주, 병발생 단계 RNA-seq	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주, 병발생 단계 RNA-seq	NN-2606
6 (2차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B20 균주, 병발생 단계 RNA-seq	<i>F. fujikuroi</i> B20 균주, 병발생 단계 RNA-seq	NN-2608
7	<i>F. fujikuroi</i> B20	<i>Fusarium fujikuroi</i> B20 Apicidin F 생합성 관련	NU-0963

(3차년도)	균주의 <i>NRPS31</i> 유전자	NRS31 유전자	
8 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>PKS51</i> 유전자	<i>Fusarium fujikuroi</i> B14 unknown PKS51 유전자	NU-0962
9 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> JA19 유전체	<i>Fusarium fujikuroi</i> JA19 유전체를 PacBio 방법으로 해독하여 assembly 완료함. <i>F. fujikuroi</i> B14와 같은 sunting type 균주로 이차대사 유전자를 대상으로 비교분석 중.	NN-3811
10 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>FUM1</i> 유전자	fumonisin 생합성 유전자로서 벼 키다리병균 마름병징형 균주의 병 발생 원인 유전자	NU-0970
11 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>FUB1</i> 유전자	fusaric acid 생합성 유전자로서 벼 키다리병균의 병 발생 기여 유전자	NU-0969
12 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05의 포자단계 RNA-seq 정보	고추탄저병균의 포자형성단계에서 전사체 정보	NN-4996
13 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05의 균사체 RNA-seq 정보	고추탄저병균의 균사형성단계에서 전사체 정보	NN-4977
14 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05균주의 <i>CaHOX2</i> 유전자	고추탄저병균의 포자형성단계에 관여하는 유전자	NS-1459
15 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05균주의 <i>CaHOX7</i> 유전자	고추탄저병균의 식물체 침입시 부착기 형성에 관련된 유전자	NS-1461

사. 병원성 미생물 진단마커 개발

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1 (2차년도)	<i>F. fujikuroi</i> 중복합체 진단 마커 (KHfuji6, KHfuji17)	<i>In silico</i> AFLP 분석을 통한 <i>F. fujikuroi</i> 중복합체 진단 마커 개발	
2 (2차년도)	벼 이삭마름병 진단용 마커 조성물 진단 마커 (FGSG_03182, FGSG_11036, FGSG_11169)	실시간 정량적 PCR 분석 방법	
(3차년도)	벼 키다리병균의 두 가지 다른 병원형 (마름병징과 키다리병징)을 구분하는 검출방법 (FFB14_06375, FFB20_12141)	PCR 방법을 통한 벼 키다리병원균의 진단과 두 가지 다른 병원형을 구분할 수 있는 방법 개발	

아. 병원성 미생물 정보 완성

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1 (2차년도)	B14 병발생 단계 RNA-seq	벼 식물체에 키다리병 B14 균주의 병발생 단계에서 발현하는 RNA-seq 데이터	NN-2606
2 (2차년도)	B20 병발생단계 RNA-seq	벼 식물체에 키다리병 B20 균주의 병발생 단계에서 발현하는 RNA-seq 데이터	NN-2608
3 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05의 포자단계 RNA-seq 정보	고추탄저병균의 포자형성단계에서 전사체 정보	NN-4996
4 (4차년도)	<i>C. scovillei</i> KC05의 균사체 RNA-seq 정보	고추탄저병균의 균사형성단계에서 전사체 정보	NN-4977

자. 미생물 병발생 기작 규명

No	유전체, 유전자원 명칭 (건별 각각 기재)	분석내용	비 고
1 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 fumonisin 생합성 유전자 (<i>FUM1</i>)	벼 발병 단계 전사체 분석 및 유전자삭제 돌연변이체의 병원성 검정 등을 통하여 벼 키다리병균의 마름병징형 (stunting type) 발현에 fumonisin 생합성이 필수적임을 밝힘	NU-0970
2 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 fusaric acid 생합성 유전자 (<i>FUB1</i>)	벼 키다리병균의 마름병징형 (stunting type) 발현에 fusaric acid 생합성이 필수적임을 밝힘	NU-0969
3 (3차년도)	<i>F. fujikuroi</i> B14 균주의 <i>PKS51</i> 유전자	<i>PKS51</i> 유전자에 의해 생성되는 이차대사 산물이 벼 키다리병균 마름병징형 (stunting type) 의 발현 억제에 관여함을 밝힘	NU-0962

- 기타성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1 (1차년도)	The white collar complex is involved in sexual development of <i>Fusarium graminearum</i>	PLoS One	H. Kim, S.H. Yun	10	미국	PLoS	SCIE	2015.3.18	
2 (2차년도)	A large-scale function analysis of putative target genes of mating-type loci provides insight into the regulation of sexual development of the cereal pathogen <i>Fusarium graminearum</i>	PLoS Genetics	H. Kim, S.H. Yun	11	미국	PLoS	SCI	2015.09.3	
3 (2차년도)	Characterization of nivalenol-producing <i>Fusarium culmorum</i> isolates obtained from the air at a rice paddy field in Korea	Plant Pathol. J.	D. Kim, S.H. Yun	32	한국	KSPPP	SCIE	2016.06.1	
4 (2차년도)	The complete mitochondrial genome sequence of the ascomycete plant pathogen <i>Colletotrichum acutatum</i>	Mitochondrial DNA	Joon-Oh Kim	Early Online: 1-2		Taylor & Francis	SCI	2015.11.01	
5 (2차년도)	Role of the MoYAK1 protein kinase gene in <i>Magnaporthe oryzae</i> development and pathogenicity	Environ. Microbiol.	Joon-Hee Han	17	미국	Soc. for Appl. Microbiol.	SCI	2015.11.01	
6 (2차년도)	Whole genome sequence and genome annotation of <i>Colletotrichum acutatum</i> , causal agent of anthracnose in pepper plants in South Korea	Genomics Data	Joon-Oh Kim	8		Elsevier	비 SCI	2016.03.28	
7 (3차년도)	Identification of genes related to fungicide resistance in <i>Fusarium fujikuroi</i>	Mycobiology	Younghae Choi	45	한국	The Korean society of Mycology	SCIE	2017.06.01	
8 (4차년도)	Self-fertility in <i>Chromocrea spinulosa</i> is a consequence of direct repeat-mediated loss of <i>MATI-2</i> , subsequent imbalance of nuclei differing in mating type, and recognition between unlike nuclei in	PLoS Genetics	S.H. Yun	13	미국	PLoS	SCI	2017.09.11	

	a common cytoplasm*								
9 (4차 년도)	Comparative genomics, transcriptomics and metabolomics of geographically distinct <i>Fusarium</i> <i>fujikuroi</i> rice isolates**	PLoS Pathogens	S.H. Yun	13	미국	PLoS	SCI	2017.10.26	

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표 자	발표일시	장소	국명
1 (1차년도)	The 3 rd Korea-Japan joint symposium & The 2014 KSPP fall meeting on plant pathology	윤기훈	2014.09.23	부경대학교	대한민국
2 (1차년도)	2015년도 한국식물병리학회 임시총회 및 춘계학술발표회	김기용	2015.04.23	충북대학교	대한민국
3 (1차년도)	The 100 th anniversary meeting of the phytopathological society of Japan	김현	2015.03.30	Meiji university	일본
4 (1차년도)	2015년도 한국식물병리학회 임시총회 및 춘계학술발표회	한준희	2015.04.23	충북대학교	대한민국
5 (1차년도)	2015년 한국균학회 춘계학술대회 및 임시총회	한준희	2015.05.14	대전컨벤션센터	대한민국
6 (2차년도)	The 2015 KSPP Fall Meeting and International conference	윤기훈	2015.10.23	거제도 대명리조트	대한민국
7 (2차년도)	The 2015 KSPP Fall Meeting and International conference	김기용	2015.10.22	거제도 대명리조트	대한민국
8 (2차년도)	The 2015 KSPP Fall Meeting and International conference	김다운	2015.10.22	거제도 대명리조트	대한민국
9 (2차년도)	The 2016 KSPP spring meeting and international conference	김희경	2016.04.21	전주 농촌진흥청	대한민국
10 (2차년도)	The 2015 KSPP Fall Meeting and International conference	한준희	2015.10.22	거제도 대명리조트	대한민국
11 (2차년도)	2015년 한국균학회 추계학술대회 및 국제공동심포지엄	한준희	2015.11.05	일산킨텍스	대한민국
12 (2차년도)	2016년 13th European Conference on Fungal Genetics	김경수	2016.04.02	La Villette, 파리	프랑스
13 (2차년도)	The 2016 KSPP spring meeting and international conference	한준희	2016.04.21	전주 농촌진흥청	대한민국
14 (3차년도)	The 25 th KOGO annual conference 2016	윤성환	2016.09.06	서울 한국과학기술센터	대한민국
15 (3차년도)	2016 농생명 빅데이터 국제 심포지움	윤성환	2016.09.20	농촌진흥청	대한민국
16 (3차년도)	The 7 th International Rice Blast Conference	한준희	2016.10.09	The Bellevue Manila	필리핀
17 (3차년도)	The 2016 KSPP Fall Meeting and International Conference	김문중	2016.10.19	서울대학교, 평창캠퍼스	대한민국
18 (3차년도)	The 2016 KSPP Fall meeting and international conference	김희경	2016.10.19	서울대학교, 평창캠퍼스	대한민국
19 (3차년도)	2016 한국미생물학회 연합 국제학술대회	윤성환	2016.11.03	kintex	대한민국
20 (3차년도)	25th International Plant & Animal Genome conference	김경수	2017.01.14	Town&Country Hotel	미국
21 (3차년도)	29 th Fungal genetics conference	김희경	2017.03.17	Asilomar,CA	미국
22 (3차년도)	The 2017 KSPP spring meeting and conference	이정관	2017.04.27	서울 과학기술회관	대한민국
23 (3차년도)	The 2017 KSPP spring meeting and conference	김희경	2017.04.27	서울 과학기술회관	대한민국
24 (3차년도)	The 2017 KSPP Spring Meeting and Conference	한준희	2017.04.27	서울 과학기술회관	대한민국
25 (4차년도)	2017 Asian conference on Plant Pathology	김희경	2017.09.15	제주 국제컨벤션센터	대한민국

26 (4차년도)	2017 한국미생물학회연합 국제학술대회	윤성환	2017.11.02	일산 킨텍스	대한민국
27 (4차년도)	2017 mBiome international conference	윤성환	2017.11.28	서울 연세대학교	대한민국
28 (4차년도)	International Plant & Animal genome XXVI	김경수	2018.01.15	San Diego, CA	미국
29 (4차년도)	The 2018 KSPP Spring meeting and conference	한준희	2018.04.26	청주 충북대학교	대한민국
30 (4차년도)	The 2018 KSPP Spring meeting and conference	김다운	2018.04.26	청주 충북대학교	대한민국
31 (4차년도)	MSJ-KSM Joint Symposium (한일 공동 균학회)	이정관	2018.05.26	나가노 신슈대학교	일본

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

라. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여 율
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록 일	등록 번호	
1	식물 병원성 진균에 대한 항균 활성을 갖는 바실러스 아트로페우스 LB14 균주	대한 민국	강원대 산학협력단	2015.04.24	10-20 15-00 58118				40%
2	벼 이삭마름병 진단용 마커 조성물 및 이를 포함하는 키트	대한 민국	순천향대 산학협력단	2016.01.19	10-2 016- 00063 76				50%
3	푸자리움 푸지쿠로이 중복합체 구분을 위한 프라이머 선별방법 및 프라이머 세트	대한 민국	동아대산학 협력단	2016.06.08	10-20 16-00 71326				100%
4	식물 병원성 진균에 대한 항균 활성을 갖는 바실러스 아트로페우스 LB14 균주	대한 민국				강원대 산학협력 단	2016. 10.24	10-16 70592	40%
5	벼 키다리병균의 두 가지 다른 병원형 (마 름병징과 키다리병징) 을 구분하는 검출방법	대한 민국	순천향대 산학협력단	2017.07.12	10-20 17-00 88562				100%
6	벼 이삭마름병 진단용 마커 조성물 및 이를 포함하는 키트	대한 민국				순천향대 산학협력 단	2018. 05.02	10-18 55955 -0000	50%
7	벼 키다리병균의 두 가지 다른 병원형 (마 름병징과 키다리병징) 을 구분하는 검출방법	대한 민국				순천향대 산학협력 단	2018. 03.02	10-18 36405 -0000	100%

마. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

바. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2015	1					1		1			
2		2016		2			2			2			
3		2017		3	1		4						4
4		2018	1				1						1

사. 산업기술 인력양성

No	프로그램 명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1						
2						

아. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황

자. 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
					1) 내부자금 2) 신용대출 3) 담보대출 4) 투자유치 5) 기타

차. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화 명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
	기술이전 자기실시	신제품개발 기존제품개 선 신공정개발 기존공정개 선 기타	국내외							

카. 표준화

No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(채택)일	국가
						yyyy.mm.dd	

타. 기술요약정보

연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호

파. 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록번호

하. 기타 - 교육지도 및 홍보

No	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	주요 공기전반 병원성 곰팡이의 이해 및 관리	자체제작 교재	공기전반에 의해 발생하는 주요 병해에 대한 설명 및 방제방법	2016.04.15
2	공기전반 병원성 곰팡이의 관찰	자체제작 교재	병원성 곰팡커니즘의 특성과 현미경을 이용한 포자관찰	2016.05.27
3	신문기사제목 (붉은곰팡이 병 발생 매커니즘 최초 규명)	농수축산신문	붉은곰팡이 유성생식 연구를 통해 월동 관련 생존 세계 최초로 규명	2015.09.23
4	주요 공기전반 병원성 곰팡이의 이해 및 관리	자체제작 교재	공기전반에 의해 발생하는 주요 병해에 대한 설명 및 방제방법	2017.05.19
5	주요 식물병원성 진균의 포자 관찰 및 방제방법	자체제작 교재	공기전반에 의해 발생하는 주요 병원균의 특성과 현미경을 이용한 포자관찰	2017.06.09
6	신문기사제목(사상곰팡이 자가교배 메커니즘 세계 최초 규명)	NEWSIS	사상성 곰팡이 유성생식에서 교배형 전환 메커니즘을 세계 최초로 규명	2017.09.21
7	신문기사제목 (벼 키다리 병 줄기마름 메커니즘 세계 최초로 규명)	NEWSIS	벼 재배에 심각한 손실 유발하는 벼 키다리병의 마름병 발생 메커니즘을 최초로 규명	2017.11.07

3-2. 목표 달성여부

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

4. 연구결과의 활용 계획 등

(1) 활용방안

- 우리나라 주요 공기전반 곰팡이의 지역 별, 기주 별, 기주 별 분포 양상에 바탕을 둔 식물 병 발생 예찰 시스템 구축
- 주요 공기전반 식물병원성 곰팡이의 유전체 데이터베이스 구축 및 특정 병 발생 관련 유전자원의 특허화
- 병 발생 관련 유전자를 이용한 식물감염진단 마커 개발 및 내병성 작물의 분자유종 소재 개발
- 국내 유용/유해 진핵 미생물의 유전체 해독 연구력과 국제 연구경쟁력 향상

(2) 기대성과

○ 기술적 측면

- 국내 주요 공기전반 식물병원성 곰팡이의 연구기반 확립
- 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전자의 확보로 식물병 방제를 위한 유전자원의 발굴 및 개발에 활용 가능
- 국내 농작물 재배 지역 내 *Fusarium* 과 *Colletotrichum* 곰팡이 분포 지도 작성에 활용 가능
- 연구결과의 해외 저명 저널 발표를 통한 곰팡이 유전체 분석 관련 연구경쟁력 확대
- 국내 진핵 미생물 유전체 해독 기술력 향상

○ 경제산업적 측면

- 주요 공기전반 병원성 곰팡이에 의한 식물병 발생과 이로 인한 경제적 손실의 최소화 기반 마련
- 기온상승, 황사 등 기후변화에 따른 국내 공기전반 식물병원성 곰팡이의 발생 생태 변화에 능동 대체 가능
- 국내 농산물의 안정적 생산 기반 확보를 통한 국내 농업경쟁력 향상에 기여

붙임. 참고문헌

- Kim, J. T., Park, S. Y., Choi, W. B., Lee, Y. H. and Kim, H. T. 2008. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 24:17-23.
- Howard, C.M., Maas, J.L., Chandler, C.K. and Albregts, E.E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Dis.*, 76: 976-981.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, Ezra. 1998. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Dis.*, 82: 596-605.
- Baroncelli, R., Sreenivasaprasad, S., Sukno, S. A., Thon, M. R. and Holub, E. 2014. Draft genome sequence of *Colletotrichum acutatum* sensu lato (*Colletotrichum fioriniae*). *Genome announcements*, 2(2), e00112-00114.
- Choi, J., Park, J., Kim, D., Jung, K., Kang, S. and Lee, Y.-H. 2010. Fungal secretome database: integrated platform for annotation of fungal secretomes. *BMC Genomics*, 11(1), 105.
- Kim, S., Park, S.-Y., Kim, K. S., Rho, H.-S., Chi, M.-H., Choi, J., et al. 2009. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000757.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구				
	(영문) Pathogenomics analysis of the airborne fungal pathogens in rice and red peppe				
주관연구기관	순천향대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 순천향대학교	
참 여 기 업				(성명) 윤성환	
총연구개발비 (840,000 천원)	계		총 연구 기간	2014.. 08.~ 2018. 08.(4년)	
	정부출연 연구개발비	840,000	총 참 연 구 원 수	총 인 원	20
	기업부담금			내부인원	20
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전체 정보 생산·분석을 통한 곰팡이 집단의 특성과 병 발생 메카니즘의 규명 및 곰팡이 진단마커 개발 - 벼 침해 공기전반 병원성 곰팡이의 종 분포양상 규명 및 주요 <i>Fusarium</i> 속 곰팡이의 발병유전체학 분석을 통한 공기전반 식물병 제어기반 구축 - 다식성 식물병균 <i>C. acutatum</i> 의 신규 유전체 해독 및 병발생 관련 전사체학 분석을 통한 식물병 제어기반 구축 - 연구결과의 산업화 지원 활용 및 우수 SCI 논문 발표 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 벼 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 집단 다양성 및 발병유전체학 분석 (1 세부) <ol style="list-style-type: none"> 1) 노지와 시설재배지역 내 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 포집, 동정 및 집단 분석 2) 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 집단의 계통발생학 분석 및 병원성 검정 3) 지역 별, 계절 별, 연차 별 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 분포 양상의 상세 분석 4) 주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 신규 유전체, 발병 관련 전사체 분석 및 유전자 기능분석 5) 종 특이 또는 발병 단계 특이유전자를 이용한 주요 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 진단마커 개발 - 고추침해 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구 (1협동) <ol style="list-style-type: none"> 1) 고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성 조사 2) 고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(<i>de novo</i>) 유전체 해독 및 분석 3) <i>C. acutatum</i> 의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석 4) <i>C. acutatum</i> 의 공기전반 및 병 발생 관련 유전자 기능연구 - 주요 곡류와 원예작물 침해 공기전반 병원성 곰팡이의 집단 분석 및 진단마커개발 (위탁과제) <ol style="list-style-type: none"> 1) 시설재배지역의 공기전반 병원성 곰팡이 분포 조사 					

2) 공기전반 병원성 곰팡이 집단의 다양성 분석

3) *In silico* AFLP-PCR 등을 활용한 병원성 곰팡이의 생물진단 마커 개발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 우리나라 주요 공기전반 곰팡이의 지역 별, 기주 별, 기주 별 분포 양상에 바탕을 둔 식물병 발생 예찰 시스템 구축 통한 공기전반 식물병원성 곰팡이의 연구기반 확립
- 주요 공기전반 식물병원성 곰팡이의 유전체 데이터베이스 구축 및 특정 병 발생 관련 유전자원의 특허화
- 병 발생 관련 유전자를 이용한 식물감염진단 마커 개발 및 내병성 작물의 분자유종 소재 개발
- 국내 진핵 미생물 유전체 해독 기술력 향상을 통한 유용/유해 진핵 미생물의 유전체 해독 연구력과 국제 연구경쟁력 향상
- 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병 관련 유전자의 확보로 식물병 방제를 위한 유전자원의 발굴 및 개발에 활용 가능
- 국산기술로 새로운 병 진단 Kit 개발 기틀 마련
- 벼 곰팡이병 방제 및 방제 시스템 구축에 기여

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

	과제번호	914009-4			
사업구분	농림축산식품미생물유전체사업				
연구분야		과제구분	단위		
사업명	포스트게놈 다부처유전체사업		주관		
총괄과제	기재하지 않음	총괄책임자	기재하지 않음		
과제명	벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구		과제유형	(기초)	
연구기관	순천향대학교		연구책임자	윤성환	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.08.23.~2015.08.22	200,000		200,000
	2차년도	2015.08.23.~2016.08.22	200,000		200,000
	3차년도	2016.08.23.~2017.08.22	220,000		220,000
	4차년도	2017.08.23.~2018.08.22	220,000		220,000
	계	2014.08.23.~2018.08.22	840,000		840,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
순천향대학교	교수	윤성환

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

공기 중 *Fusarium* 집단의 분포 양상, 벼 키다리병균의 병원형 집단의 규명, 벼 이삭마름병균의 생존 메카니즘 규명, 고추 탄저병의 유전체 해독 등의 분야에서 세계 최초 수준의 연구개발 결과를 도출함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발결과 확보한 병원균 진단마커와 신규 병원성 메카니즘 규명은 식물병원균의 기초 연구 분야 뿐 아니라 해당 식물병의 방제 관련 응용분야에도 널리 파급될 수 있을 것으로 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발결과 확보한 신규 병원성 메카니즘 규명 등은 식물병원성 곰팡이의 유전체 해독 분야 국내 연구력의 증진 뿐 아니라 식물병의 방제 전략 구축에 유용하게 활용될 것으로 기대됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구진은 매우 성실한 자세로 매 해 연구 목표 달성을 위해 최선을 다했다고 자평함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지식소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

2 편의 PLoS Genetics, 1편의 PLoS Pathogens, 1편의 Environmental Microbiology 게재 논문은 유전학, 미생물학 분야 상위 5% 이내 우수 연구 결과임. 또한 벼 키다리병의 병원형 구분마커의 특허도 신속히 등록이 완료되어 독창성을 인정받았음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체 해독	12	100	- 2014년 9월부터 현재까지 75회 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 722주 동정과 집단분석 함. - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20 곰팡이 신규유전체 분석 완료함. - <i>F. fujikuori</i> B20과 B14 균주 대상 14 종의 포자형성 관련 유전자의 기능분석 완료함.
벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체와 발병관련 전사체 해독	12	100	- 국내 미기록 종 <i>F. culmorum</i> J1 균주의 genome sequencing 과 annotation 완료함. - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20 균주의 포자형성 관련 유전자의 qRT-PCR 결과과 병원성 실험 수행. - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20 균주의 벼에서 병 발생 초기 3일과 6일의 RNA-seq 수행 - <i>F. fujikuroi</i> 균주의 포자형성 조절 유전자 삭제 돌연변이체의 벼 병원성 검증
벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병관련 전사체 분석과 진단마커 개발	26	100	-주요 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병 관련 (포자형성과 병발생 단계) 전사체 해독 완료함. -벼 키다리병균 (<i>F. fujikuroi</i>) 의 두 병원형 (pathotype) 균주의 이차대사 관련 Fusaric acid, Fumonisin, Gibberellin(GA), ApicidinF 생합성 유전자 삭제 돌연변이체의 제작과 병원성 검증 -벼 키다리병원균의 두 가지 병원형(sunting type & elongation-type)을 신속 정확하게 구분할 수 있는 진단 마커 개발함. -포자발아와 단주기 분생포자 형성 유도단계 RNA-sequencing 분석을 통하여 발아와 포자생성 조절 유전자의 동정 및 기능 분석
고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성 조사	10	100	- 2014년 국내 주요 고추 생산지 충북, 충남, 경북, 전북, 강원서 고추 노지재배시 발생하는 병을 모니터링 - 고추탄저병균의 분리 및 동정 - <i>C. acutatum</i> KC-05의 분생포자의 특징, 배양 배지선정 - <i>C. acutatum</i> 의 저장법, 분생포자 관찰, 부착기 생성
고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규(<i>de novo</i>) 유전체 NGS data 생성	10	100	- <i>C. acutatum</i> KC-05 균주의 유전체를 해독 - KC-05 Mitochondrial DNA 분석
고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석	15	100	-PAC Bio RS II system 과 MiSeq system 에 의한 genome sequencing을 수행하고 SSPACE V3.0으로 분석 -Annotation은 다양한 분석 프로그램을 이용하여 수행 -RNA-Seq을 통한 전사체 분석
고추탄저병균의 공기전반 및 병원성 유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구	15	100	- REMI 방법을 이용하여 유전체삽입 형질전환체 집단을 확보하여 돌연변이체 분석 - 특정 유전자 결손돌연변이체 제조를 위한 형질전환의 성공적 수행. 발병전사체 해독 결과를 기초로 포자 생성과 발병 유전자를 선발하여 해당 유전자의 기능 분석
합계	100점	100	- 모든 세부 연구목표를 계획대로 달성하였음

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발결과는 당초 계획한 연구 내용을 종합적으로 성실히 수행하여 도출한 것으로서 우리나라 농작물 재배 지역 내 공기 중 분포하는 주요 식물병원성 곰팡이인 벼 이삭마름병균, 벼 키다리병균, 고추 탄저병균의 집단의 분포 양상, 다양한 유전체 연구방법론을 활용한 병원성 메커니즘의 규명 등으로 구성되어 있음. 대부분의 연구 결과는 충분한 데이터를 바탕으로 현상의 규명 뿐 아니라 내재되어 있는 근본적 원인에 대한 충분한 이해와 고찰까지 가능한 수준의 완성도를 보임.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 우리나라 농작물 재배 지역 내 존재하는 식물병원성 곰팡이의 주요 서식처로서 “공기”를 선택하여 공기 중 우점으로 존재하는 *Fusarium* 과 *Colletotrichum* 속 병원균의 병 발생 메커니즘 관련 연구를 종합적으로 수행하였음. 연구개발 목표의 타당성과 독창성 뿐 아니라 연구개발결과 또는 성과물의 우수성, 활용 및 파급 가능성 등에 대한 종합적인 검토와 평가를 부탁드립니다

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 과제는 지난 4년 동안 주로 공기 중 분포 주요 식물병원성 곰팡이의 발생 생태와 병원성 메커니즘의 규명, 진단마커의 개발에 초점을 맞춰 수행하였음. 이들 연구 결과는 추후 식물병 방제 전략 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단됨. 또한 추후 연구 지원이 계속될 경우, 연구진에 의한 식물병 방제 관련 응용 기술의 개발도 가능할 것으로 판단됨

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	벼와 고추 침해 주요 공기전반 병원성 곰팡이의 발병유전체 분석 및 기능연구			
주관연구기관	순천향대학교		주관연구책임자	윤성환
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	840,000,000			840,000,000
연구개발기간	2014. 08. 23 ~ 2018. 08. 22			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
①벼 재배 지역 내 주요 공기전반 곰팡이 집단의 특성 및 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체 해독	- 총 75회 공기전반 <i>Fusarium</i> 곰팡이 722주 동정과 집단 분석 완료 - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20, JA19 균주의 유전체 분석 완료
②병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 유전체와 발병 관련 전사체 해독	- 국내 미기록 종 <i>F. culmorum</i> J1 균주의 유전체 해독 - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20 균주의 포자형성 관련 유전자의 발현 양상 분석 - <i>F. fujikuroi</i> B14, B20 균주의 벼에서 발병 전사체 해독
③병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 발병 관련 전사체 분석과 진단마커 개발	- <i>F. fujikuroi</i> 의 두 병원형 (pathotype) 균주의 이차대사 관련 Fusaric acid, Fumonisin, Gibberellin, Apicidin F 생합성 유전자 삭제 돌연변이체의 제작과 병원성 검정 -벼 키다리병원균 병원형을 신속 정확하게 구분할 수 있는 진단 마커 개발 -포자발아와 단주기 분생포자 형성 유도단계 RNA-sequencing 분석을 통하여 발아와 포자생성 조절 유전자의 동정 및 기능 분석
④고추작물 공기전반 탄저병균의 균학적 병리학적 특성 조사 및 고추탄저병균(<i>C. acutatum</i>)의 신규 (<i>de novo</i>) 유전체 NGS data 생성	- 2014년 국내 주요 고추 생산지 충북, 충남, 경북, 전북, 강원서 고추 노지재배시 발생하는 병을 모니터링 - 고추탄저병균의 분리 및 동정 - <i>C. acutatum</i> KC-05의 분생포자의 특징, 배양배지선정 - <i>C. acutatum</i> 의 저장법, 분생포자 관찰, 부착기 생성 - <i>C. acutatum</i> KC-05 균주와 Mitochondrial DNA 해독 -PAC Bio RS II system 과 MiSeq system 에 의한 genome sequencing을 수행하고 SSPACE V3.0으로 분석 -Annotation은 다양한 분석 프로그램을 이용하여 수행
⑤고추탄저병균의 발달 및 발병 단계별 RNA-Seq을 통한 전사체 분석 및 유전자 기능연구를 위한 형질전환 연구	- RNA-Seq을 통한 전사체 분석 - REMI 방법을 이용하여 유전체삽입 형질전환체 집단 확보 및 병원성 돌연변이체 선발 - 특정 유전자 결손 방법을 활용하여 포자 생성과 발병 유전자의 기능 분석

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용화	표준 유전체 해독	메타지놈 분석	유전체 분석기술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커개발	병원성 미생물 정보완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		4		4			4	2	4	
연구기간 내 달성실적		6		5			15	3	4	3
달성율(%)		150		125			375	150	100	

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
												SCI	비SCI						논문 평균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	3	1									5			11	6	10		1		
연구기간 내 달성실적	4	3									8	1		31	4	8		3		
달성율(%)	133.3	300									160	100		281.8	66.7	80		300		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	벼 재배 지역 공기 중 분포 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 분포 양상 분석
②	벼 키다리병균의 병원형 및 병원형 특이 병원성 메카니즘의 규명
③	벼 이삭마름병균의 포자 내 생존 메카니즘의 규명
④	벼 이삭마름병균의 포자 형성 메카니즘의 규명
⑤	고추 탄저병균의 유전체 최초 해독 및 병원성 유전자 기능 분석 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	✓					✓				
②의 기술	✓					✓				
③의 기술	✓					✓				
④의 기술					✓	✓				
⑤의 기술					✓	✓				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	공기 중 병원성 곰팡이의 발생 생태에 기반 한 병 발생 예방 및 방제 전략 수립
②의 기술	벼 키다리병균 병원형에 특이적으로 적용될 수 있는 방제 전략 수립
③의 기술	우리나라 벼 이삭마름병균 집단의 생존 전략에 기반을 둔 방제 전략 수립
④의 기술	우리나라 병 이삭마름병균 집단의 발생 생태 이해
⑤의 기술	우리나라 고추 탄저병균의 유전체 관련 기초 연구 기반 제공

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	전략 미생물 해독	유용 유전자 원 확보	사업화 · 실용 화	표준 유전체 해독	메타지 놈 분석	유전체 분석기 술개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보완 성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		4		4			4	2	4	
연구기간 내 달성실적		6		5			15	3	4	3
연구종료 후 성과창출 계획		0		0			0	0	0	0

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권		기술실 시 (이전)		사업화						기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문 SC I	비 SC I	논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용	

단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명			
가중치																		
최종목표	3	1									5			11	6	10		1
연구기간내 달성실적	4	3									8	1		31	4	8		3
연구 종료 후 성과창출 계획	0	0									0			0	0	0		0

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

<p>주 의</p> <p>1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림축산식품미생물유전체사업의 연구보고서입니다.</p> <p>2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처 유전체사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.</p> <p>3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.</p>
--