

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
포스트게놈다부처유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004051-01

기능유전체 기반 다중 공기전염 식물병원균의 병 발생 기작 규명 및 제어 전략 개발

2022.04.05

주관연구기관 / 순천향대학교 산학협력단
협동연구기관 / 강원대학교 산학협력단
부산대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "기능유전체 기반 다중 공기전염 식물병원균의 병 발생 기작 규명 및 제어 전략 개발"(개발기간: 2018. 04. 25. ~ 2021. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.04.05

주관연구기관명 : 순천향대학교 산학협력단
협동연구기관명 : 강원대학교 산학협력단
부산대학교 산학협력단

전창환

(인)

장철성

(인)

최경민

(인)

주관연구책임자 : 순천향대학교 윤성환
협동연구책임자 : 강원대학교 김경수
부산대학교 서영수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

| | | | | | | | |
|------------------------|----------------|--|----|--------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| 사업명 | | 포스트게놈다부처유전체사업 | | | 총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | |
| 내역사업명 (해당 시 작성) | | | | | 연구개발과제번호 | | 918019-4 |
| 기술 분류 | 국가과학기술 표준분류 | LB0304 | 60 | LB0303 | 20 | LA0204 | 20 |
| | 농림식품 과학기술분류 | RA0304 | 70 | RA0302 | 20 | RA0301 | 10 |
| 총괄연구개발명 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | | 기능유전체 기반 다중 공기전염 식물병원균의 병 발생 기작 규명 및 제어 전략 개발 | | | | | |
| 전체 연구개발기간 | | 2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (45개월) | | | | | |
| 총 연구개발비 | | 총 750,000천원 (정부지원연구개발비: 750,000천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원) | | | | | |
| 연구개발단계 | | 기초[] 응용[√] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[] | | 기술성숙도 (해당 시 기재) | | 착수시점 기준() 종료시점 목표() | |
| 연구개발과제 유형 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발과제 특성 (해당 시 작성) | | | | | | | |
| 연구개발 목표 및 내용 | 최종 목표 | <p>▶ 기주-병원균 상호작용 관련 기능유전체 연구를 통한 다중 공기전염 벼, 고추 병원균의 병 발생 기작 규명과 이를 활용한 병 발생 제어 전략 기반 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이의 병원성과 공기전반 기작의 규명 및 병 발생 제어 기술 개발 ○ 고추 병원성 <i>Colletotrichum</i> 곰팡이의 공기전반과 병 발생 기작의 규명 및 제어 기술 개발 ○ 벼, 고추 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균의 병 발생 및 <i>Fusarium</i> 곰팡이와 상호작용, 복합감염 관련 기작의 규명 | | | | | |
| | 전체 내용 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 벼 키다리병원균(<i>Fusarium fujikuroi</i>)의 키다리 병원형과 줄기마름 병원형별 발병 특이 유전자 집단의 기능과 조절 체계 규명 ○ 벼 이삭마름병원균(붉은곰팡이) <i>F. graminearum</i>의 공기전반 관련 유전자 집단의 기능 분석 및 조절 체계 규명 ○ <i>Fusarium</i> 병원균의 발병 기작과 생태의 종합적 이해 ○ <i>Fusarium</i> 병원균의 발병 기작과 생태 활용 병 발생 제어 전략의 개발 ○ 고추 탄저병원균 <i>Colletotrichum scovillei</i>의 포자 생성 전사체 연구 ○ 고추 탄저병원균 <i>C. scovillei</i>의 포자 생성 및 발병 기작 연구 ○ 고추 탄저병원균 <i>C. scovillei</i>의 포자 및 발병 특이 유전자의 기능 연구 ○ 고추 탄저병원균 <i>C. scovillei</i>의 공기전반 및 발병 억제 제어 전략의 개발 ○ 다양한 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균 사이 상호작용 연구 및 유전체 분석 ○ 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균과 <i>Fusarium</i> 곰팡이 사이 상호작용 및 전사체 연구 ○ 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균과 <i>Colletotrichum</i> 곰팡이 사이 상호작용 및 전사체 연구 ○ 병원균 사이 상호작용 관련 주요 유전자의 발굴 및 기능 연구 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|---|----------|---------------------------|----------|------------------------|-----------|--------------------|-----------|---------------------|-----|-----|----|
| 연구개발성과 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 벼, 고추 식물병원균의 발병과 공기전반, 복합감염 관련 기작의 규명 (10건) ○ 벼, 고추 식물병원균의 다양한 유전체 정보(4건)와 유용 유전자(3건)의 발굴 ○ 벼, 고추 식물병해의 예방과 방제를 위한 진단 마커의 개발 (4건) 및 특허출원 (4건) ○ 벼, 고추 식물병해의 제어를 위한 기술 개발 기반 구축 ○ 연구 성과의 국내외 학술대회 발표 (25건) 및 해외 저명 SCI급 학술지 (관련 분야 상위 10% 저널 포함) 논문 게재 (9건) | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과 활용계획 및 기대 효과 | <ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 식물병원균의 발병 기작 관련 국내 연구기반 확립에 활용 가능 ○ 식물병원균 발병 유전자를 활용한 난방제 식물병의 신개념 방제 전략 개발 ○ 과제 성과를 바탕으로 후속 실용화 연구 추진 필요 ○ 식물병원균의 복합감염 기작 규명을 통한 주요 작물 병해의 친환경 방제 체계 제시 ○ 연구 결과의 해외 우수 논문 발표를 통한 국내 식물병원균 유전체학 연구 경쟁력 제고 ○ 국내 유해/유용 진핵 미생물의 유전체 연구와 활용 기술력 향상 ○ 주요 식물병해의 효율적 방제를 통한 국내 농산물의 안정적 생산과 안전성 확보에 기여 가능 | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 비공개여부 및 사유 | | | | | | | | | | | | |
| 연구개발성과의 등록·기탁 건수 | 논문 | 특허 | 보고서 원문 | 연구 시설·장비 | 기술 요약 정보 | 소프트웨어 | 표준 | 생명자원 | | 화학물 | 신품종 | |
| | 9 | 4 | | | | | | 생명 정보 | 생물 자원 | | 정보 | 실물 |
| 연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황 | 구입 기관 | 연구시설·장비명 | 규격 (모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입가격 (천원) | 구입처 (전화) | 비고 (설치장소) | ZEUS 등록번호 | | | |
| 국문핵심어 (5개 이내) | 식물병원성 곰팡이 | | 식물병원성 세균 | | 병 발생 기작 | | 복합감염 | | 기능유전체학 | | | |
| 영문핵심어 (5개 이내) | Plant pathogenic fungi | | Plant pathogenic bacteria | | Pathogenesis mechanism | | Multiple infection | | Functional genomics | | | |

| 최종보고서 | | | | | | 모양틀금 | | | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|--|-------------------|-----------------------------|------------|------------|---------|--------------------|
| | | | | | | 일인 | 모던 | | |
| 중앙행정기관명 | | | | | 사업명 | | | | |
| 전문기관명 (해당 시 작성) | | | | | 내역사업명 (해당 시 작성) | | | | |
| 광고번호 | | | | | 공동연구개발 식별번호 (해당 시 작성) | | | | |
| | | | | | | 연구개발과제번호 | | | |
| 기술분류 | 국가과학기술보존분류 | LB0304 | 60 | LB0303 | 20 | LA0304 | 20 | | |
| | 농림식품과학기술분류 | FA0304 | 70 | FA0302 | 20 | FA0301 | 10 | | |
| 공동연구개발명 (해당 시 작성) | 국문 | | | | | | | | |
| | | 영문 | | | | | | | |
| 연구개발과제명 | 기능유전체 기반 다중 공격인형 식물병원균에 대항해 기작 규명 및 내외 전사 저방 | | | | | | | | |
| | 영문 | | Functional genomics approaches to elucidate the pathogenesis mechanisms of multiple airborne plant pathogens, and their applications for the development of disease control strategies | | | | | | |
| 주관연구개발기관 | 기관명 | 순천향대학교 신학림병원 | | 사업자등록번호 | 312-82-10071 | | | | |
| | 주소 | (주) 31530 충청남도 아산시 신성면 순천향로22 | | 법인등록번호 | 184671-0004456 | | | | |
| 연구책임자 | 성명 | | 윤성현 | | 직위 | | 교수 | | |
| | 연락처 | 직상전화 | [REDACTED] | | 휴대전화 | | [REDACTED] | | |
| 전자우편 | | [REDACTED] | | 국기연구자번호 | | [REDACTED] | | | |
| 연구개발기간 | 연세 | | 2018. 04. 25 - 2021. 12. 31 (45개월) | | | | | | |
| 연구개발비 (단위: 원형) | 정부지원 연구개발비 | 기관부담 연구개발비 | | 그 외 기금 등의 지 원금 | | 합계 | | | 연구개발 비의 지원 금 |
| | | 현금 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | 현금 | 현물 | |
| 총계 | 780,000 | | | | | | | 780,000 | |
| 1년차 | 150,000 | | | | | | | 150,000 | |
| 2년차 | 200,000 | | | | | | | 200,000 | |
| 3년차 | 200,000 | | | | | | | 200,000 | |
| 4년차 | 200,000 | | | | | | | 200,000 | |
| 공동연구개발기관 명 (해당 시 작성) | 기관명 | 책임자 | 직위 | 휴대전화 | 전자우편 | 비고 | | | |
| | 강원대학교 | 김경수 | 교수 | [REDACTED] | [REDACTED] | 역할 | 기관유형 | | |
| 공동연구개발기관 | 부산대학교 | 서영수 | 교수 | [REDACTED] | [REDACTED] | 교수 | 대학 | | |
| 연구개발담당자 실무담당자 | 성명 | | 이상현 | | 직위 | | 대학원생 | | |
| | 연락처 | 직상전화 | [REDACTED] | | 휴대전화 | | [REDACTED] | | |
| 전자우편 | | [REDACTED] | | 국기연구자번호 | | [REDACTED] | | | |

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하여, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라
제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 02월 10일

연구책임자: 윤성현 (인)

주관연구개발기관장: 순천향대학교 신학림병원 (직인)

공동연구개발기관장: 강원대학교 신학림병원 (직인)

부산대학교 신학림병원 (직인)

농림축산식품부장관-농림식품기술기획평가원장 귀하

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요

- 1-1. 연구개발의 개요
- 1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황
 - 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황
 - 나. 국외 기술 수준 및 시장
- 1-3. 연구개발의 중요성

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 개요

- 우리나라 최대 경제작물인 벼와 고추의 주요 식물병해 원인 병원균(곰팡이, 세균)을 대상으로 기주 식물과 병원균 사이 상호작용 관련 기능유전체학 연구를 수행함.
- 벼 키다리병과 이삭마름병의 원인균인 *Fusarium* 곰팡이, 고추 탄저병 원인균인 *Colletotrichum* 곰팡이와 벼 알마름병 및 고추 시들음병 원인균인 *Burkholderia* 세균의 병원성, 공기전반, 복합감염 관련 기작을 규명하고, 이를 활용한 식물병 제어 전략을 개발하고자 함.

1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 식물병원성 곰팡이의 Pathogenomics (유전체/전사체 분석을 통한 병원성 인자의 대량 발굴) 분야

- 서울대 연구진에 의해 벼 도열병균 (*Magnaporthe oryzae*) 연구를 위주로 진행되고 있음. *Agrobacterium*-mediated transformation 방법을 활용하여 유전체 내 모든 유전자별 삭제 돌연변이체 라이브러리를 확보하고 이들의 유전형과 표현형에 대한 데이터베이스가 구축됨.
- 서울대와 순천향대 (본 과제 단위책임자) 연구진에 의해 붉은곰팡이 (*Fusarium graminearum*) 유전체 내 전사조절인자 추정 유전자(약 650여개)의 삭제 돌연변이체 집단 육성을 포함한 대량 기능유전체학적 분석이 이루어 짐. 또한 우리나라 토종 붉은곰팡이 집단의 유전체 해독 및 토착 형질의 분자유전학적 분석, 유성생식 조절 체계의 유전체 수준 이해 등이 진행됨.

○ 식물병원성 곰팡이 진단 시스템 개발

- 농식품부 검역검사본부 주도로 검역 대상 식물병원성 곰팡이(*Fusarium* 곰팡이 포함)의 신속진단을 위한 PCR 증폭용 프라이머가 개발 중에 있으며, 기업체에서 현장 활용 ELISA 진단 키트를 포함하여 농작물 내 곰팡이독소 오염 진단을 위한 바이오센서를 개발함.
- 병원균 정보, 분자 표지 정보, 계통분류학적 정보 관리 시스템 구축을 위한 산·학·연 협력 연구가 활발히 진행됨.

○ 식물병원성 곰팡이 제어를 위한 항균제 개발

- 지금까지 아졸계 항균제의 개발은 화학연구원, 생명공학연구원, 유한양행, 한화 등에서 수행되고 있으나 거의 대부분 의료용 항균제이며, 식물병원균용 항균제 개발 연구는 매우 미미함. 의료용 항균제의 경우도 국내 제약업체의 연구개발비와 연구개발 인력의 부족 등으로 신규 항균제 개발 연구는 극소수의 회사에서만 진행됨. 대부분 연구는 현재 매출액이 큰 해외 항균제의 국산화 및 신규 합성 방법의 개발 연구에 국한되어 있음.

○ 식물병원성 곰팡이 제어를 위한 생물제제 개발

- *Bacillus*를 비롯한 몇몇 속의 세균에 집중되어 있으며 이들로부터 항진균 활성을 보이는 물질을 분리/동정함.
- 산·학·연 협력연구를 통해 식물 및 미생물추출물을 활용한 작물 곰팡이병 방제 친환경농자재의 개발이 활발히 수행되고 있음.

○ 식물병원성 곰팡이 관련 국내 연구의 한계와 문제점

- 식물병원성 곰팡이의 유전체학/오믹스 연구는 벼 도열병균 연구진(서울대)을 제외하면 여전히 소규모로 진행될 뿐 아니라 단순 유전체/전사체의 해독과 생물정보 분석 수준을 벗어나 기주-병원균 상호작용 수준의 유전체학 연구를 기반으로 식물병 발생 과정을 종합적으로 이해하기 위한 연구는 매우 부족함.
- 기주 식물체 내 병원균의 감염 진단을 위한 마커 개발 외 병원균 유전체를 활용한 병 방제 전략 개발은 거의 이루어지지 않고 있음.
- 새로운 식물병 제어 기술 개발을 위한 신규 항균제의 개발, 항균제 작용점 탐색이나 유전체 기반 연구는 거의 이루어지지 않고 있음.

○ 식물병원성 *Burkholderia* 연구

- 서울대 연구진과 부산대 (본 과제 제2협동) 연구진에 의해 *B. glumae*는 벼 이외 다양한 가지과 작물의 줄기에도 병을 일으킬 수 있음이 확인되었음. 또한 *B. glumae*와 *B. gladiolii*의 유전체 해독 완료 및 비교 유전체학, 전사체학 연구가 활발히 진행 중임.
- 서울대 연구진에 의해 *B. glumae*의 밀도 조절인자 기작(Quorum sensing)이 병원성의 주요한 요인인 독소 생합성과 분비 기작을 조절함으로써 벼 알마름병 발생을 유도함이 밝혀짐. *B. glumae*의 type III secretion과 effectors에 관련된 *hrp* 유전자의 발현과 기능은 기존에 알려진 다양한 병원성 세균들과 차이를 보임이 밝혀짐.
- 부산대 (본 과제 제 2협동) 연구진은 *in planta* 전사체 수행을 통해 벼줄기 감염시 *B. glumae*의 다양한 대사체 합성 및 유입에 관여하는 유전자군과 signaling pathways의 기작을 밝힘으로써 벼 조직 내 세균 감염기작에 대한 기반을 본 과제의 선행 연구 결과로 제시하였음.
- 서울대 연구진은 toxoflavin 독소의 생성과 편모가 *B. glumae*의 주요 병원성인자이며, 이들 모두 AHL 계열 신호물질인 octanoyl-homoserine lactone(C8-HSL)에 의한 정족수 인식체계에 의하여 조절됨을 제시하였음.

○ 서로 다른 식물병원균의 복합감염 연구

- 서울여대 연구진은 가지과 작물에서 같은 종 바이러스의 복합감염 뿐 만 아니라, 서로 다른 종 바이러스의 감염에 의해 병원성이 증가하거나 특정 바이러스의 병원성이 약화되는 사례를 보고하였음.
- 하지만 실제 포장에서 발생하는 서로 다른 세균과 곰팡이에 의한 복합감염 관련 연구는 거의 전무한 실정임. 최근 부산대(본 과제 제 2협동)와 동아대 연구진은 벼 이삭 내 *B. glumae*와 *F. graminearum*에 의한 복합감염의 기작을 세계 최초로 보고하였음.

나. 국외 기술 수준 및 시장

○ 식물병원성 곰팡이의 유전체 연구

- 최근까지 170여 종 이상의 곰팡이 유전체가 해독되었음. 식물병원성 *Fusarium* 곰팡이의 경우, 미네소타 주립대 Corby Kistler, 미국 농무성 ARS 연구소 K. O'Donnell, Robert Proctor, 미시간 주립대 Francis Trail 교수 연구진 등에서 연구가 활발히 이루어짐.
- 단순한 곰팡이의 유전체 해독에서 벗어나 식물병원성 곰팡이의 진화와 병원성 메커니즘을 시스템 수준에서 이해하기 위한 목적으로 유전체와 오믹스 정보를 이용한 병원성 인자의 발굴과 기능 연구가 수행 중임.
- 기주 식물체 내 생성된 small RNA에 의한 동일 식물체 내 감염 병해충의 유전자 발현을 억제하는 HIGS (host-induced gene silencing) 현상을 이용하여 기주 식물 내 주요 식물병원성 곰팡이(노균병, 흰가루병균, 붉은곰팡이 등)의 생장 억제 가능성을 검정하였음. 곰팡이 유전체 유래 small RNA를 이용한 HIGS는 기존 여러 식물병 방제 전략의 단점을 보완할 수 있는 새로운 개념의 병 방제 수단으로서의 가능성을 인정받고 있음.
- 고추 탄저병균의 유전체와 전사체 연구는 본 과제외 제 1협동 연구진이 최초로 수행하였으며 이를 통한 기능유전체학 연구 기반을 마련했음.

○ 항균제 시장 현황

- 전 세계 항균제 시장은 2010년 기준 94억불이며, 2010 ~ 2016년 동안 연평균 성장률은 1.9%로 2017년에는 약 100억불 정도로 추산됨. 이 중 농업용 살균제 시장규모는 2016 ~ 2021년 연평균 성장률이 4.3%로 확대되어 2021년까지 21억불 정도로 추산됨.
- 현재까지 항균제 연구는 주로 합성 화합물을 대상으로 시도되고 있음. 하지만 아즐계 항균제의 장기간 광범위 사용에 의해 내성균 출현이 급격히 증가하여 새로운 항균제의 연구 개발을 시도하고 있음. 특히 내성균에 대응하기 위하여 천연물을 활용한 항균제 연구 개발이 시도됨.

○ 식물병원성 *Burkholderia* 연구

- 이탈리아 International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology의 Vittorio Venturi 연구진은 toxoflavin 독소와 lipase가 이 세균의 주요 병원성인자이며, 이들은 신호물질인 octanoyl-homoserine lactone(C8-HSL)에 의한 정족수 인식체계에 의하여 조절됨을 규명함.
- 콜롬비아 International Centre for Tropical Agriculture(CIAT)의 G. M. Mosquera 연구진에 의해 *B. glumae*는 *Burkholderia gladioli*와 더불어 세균성 벼 알마름병을 일으키지만 *B. gladioli*에 비해 대체적으로 병 발생에 더 중요한 역할을 함이 밝혀짐.
- 미국 루지아나 주립대의 함종현 교수 연구진은 *B. glumae* 한국 균주인 BGR1과 미국 균주인 336gr-1의 유전체를 분석하여 두 균주사이 서로 다른 genome islands로 인한 상당한 수준의 유전체 구조의 변이를 발견하였음. 하지만 genome islands 이외의 부위에서 염기서열의 변화가 거의 없음을 확인하였음.

○ 서로 다른 병원균의 복합감염 연구

- 미국 캘리포니아 주립대 Robert Gilbertson 연구진과 Bryce Falk 연구진은 DNA 바이러스인 Geminivirus와 RNA 바이러스인 potyvirus에서 매우 다양한 복합감염에 대한 연구 논문을 발표하였음.
- 하지만 바이러스를 제외한 식물병원균의 복합감염 기작 관련 연구는 거의 전무한 실정임.

1-3. 연구개발의 중요성

○ 작물 병해 발생 증가의 심각성

- 최근 기후 변화와 친환경 (유기농) 농법 등의 확산으로 식물 재배지역 내 기존 병원성 곰팡이 뿐 아니라 새로운 곰팡이의 발생이 급격히 증가하고 있음. 전 세계적으로 붉은곰팡이병, 키다리병, 균핵병, 잿빛곰팡이병의 발생이 계속 증가하고 있을 뿐 아니라 바나나 파나마병, 밀 도열병 등이 최근 새롭게 발생하여 작물의 심각한 수량 손실을 야기함으로써 식량의 안정적인 공급을 위협하고 있음(그림 1).

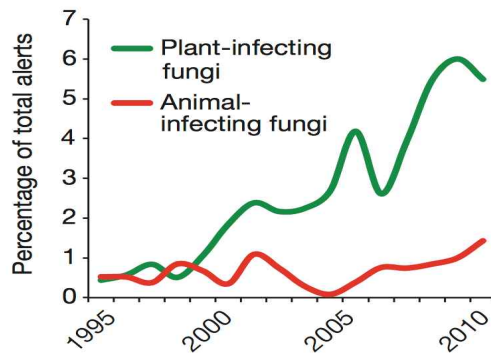


그림 1. 전 세계적인 식물곰팡이병 발생 증가 추세 (Fisher et al. 2012. Nature)

- 우리나라의 경우 오랫동안 벼의 가장 중요한 병해였던 도열병은 최근 질소 비료 사용이 급격히 줄어들면서 거의 발생하지 않는 반면, 본 과제의 연구 대상인 키다리병과 이삭마름병의 발생이 증가하는 추세임.
- 우리나라의 우 벼 키다리병 발생이 2000년 대 이후 급격히 증가하는 추세임. 못자리에서는 2007년 28.1% 발생한 이후 2012년 4.1% 로 발생률이 감소하였으나 2013년, 2014년 13% 이상 크게 증가하였음. 경또한 본답에서 발병률은 2006년 29% 이후 2012년 20%로 소폭 감소하였으나 2013년 31%로 다시 증가하면서 많은 피해가 발생하고 있음(농진청 국립식량과학원).
- 벼 이삭마름병(붉은곰팡이병)의 경우, 지난 2005년부터 본격적인 피해조사가 이루어진 이후 전국적으로 벼 이삭으로부터 붉은곰팡이의 검출빈도가 급격히 증가하여 이에 따른 식물 병해의 꾸준한 증가 뿐 아니라 이병식물 내 곰팡이독소 오염에 따른 농작물 안전성 관련 피해 가능성이 증대함.
- 최근 논에 설치한 시설재배지의 경우 *Fusarium* 곰팡이가 시설 내 집적되어 작물 재배의 위해 요인으로 심각하게 대두됨.
- 고추는 조미 채소류 중 가장 중요한 비중을 차지하고 있으며, 세계 고추 생산량은 3,614만 톤(재배면적 362만ha)에 달함. 고추 탄저병은 역병과 함께 고추의 최대 병해 중 하나로서 고추 탄저병으로 인한 국내 연간 총 고추 생산액의 약 20%(1,000억원)가 손실되고 있으며, 연간 10~25회의 살균제 처리로 인해 많은 노동과 비용이 초래되고 있음(통계청 2016).

- 최근 고추 탄저병 저항성 품종이 보고되고 있으나, 환경에 따른 저항성 정도가 미약하고 고추 탄저병균 집단의 다양한 병원성으로 여전히 문제시되고 있는 실정임.
- 고추 탄저병균은 고추뿐 만 아니라 다양한 작물(딸기, 사과, 구기자 등)에 막대한 피해를 입히기 때문에 해당 병원균에 대한 이해와 지식이 새로운 식물병 방제 전략 개발에 필요함 (Plant Disease 2005).
- 세균성 벼 알마름병은 한국에서 1986년 처음으로 전국적인 발생이 보고된 후, 1990년 전남 서해안 지대의 벼 재배지역에서 점진적으로 피해 발생이 증가하고 있으며, 1999 ~ 2000년 동안 전국적인 조사를 통해 약 20% 내외의 발병률이 보고됨(농진청 국립농업과학원).
- 우리나라 외 *Burkholderia*의 병원균이 발생한 지역은 특정 조건의 경우(아열대성기후나 곤충과 함께), 일본의 구주지역(1975년~1989년; 30~40% 발병률), 미국의 남부 벼 농사지역(1995년~ 1998년; 40% 수확량감소), 코스타리카를 포함한 중남미 지역(1997년, 30~90% 수확량감소)에서 보고되었음.
- 우리나라에서는 *B. glumae*에 대한 벼 저항성 품종이 아직 보고되지 않아 기후 온난화로 인한 병 발생시 심각한 피해를 야기할 수 있을 것으로 예상함(농진청 국립농업과학원).

○ 기존 식물 병해 방제 전략의 한계에 따른 새로운 페리다임의 식물병 방제 전략 수립의 필요성

- 지금까지 *Fusarium*, *Colletotrichum* 곰팡이에 의한 식물병해의 방제는 거의 대부분 농약 살포 등 화학적 방제 방법에 의존하였음. 하지만 대표적 약제인 아졸계통 항균제의 광범위한 사용으로 약제 내성 균주의 출현이 전 세계적으로 보고되고 있음. 이로 인해 농약 살포를 통한 식물 병해 방제의 효율이 급격히 떨어지고 있음.
- 식물병 방제를 위한 전통적인 방법으로 앞서 언급한 유기합성 농약의 개발 뿐 아니라 병 저항성 품종의 육종이나 경종적, 생물학적 방제 방법이 시도되고 있음. 하지만 병 저항성 품종 조차 잦은 breakdown을 보일 뿐 아니라 *Fusarium* 곰팡이에 의한 식물 병해, 특히 붉은곰팡이병의 경우 병 저항성 작물의 육종이 최근 예외적인 성과 외 거의 100년 동안 성공하지 못하였음.
- 이와 같은 전통적 병 방제 전략은 주로 기주 식물에 감염된 병원균의 생육 억제를 목표로하였기 때문에 병원균 측면에서 이러한 선택압(selection pressure)을 극복하기 위한 돌연변이체의 출현이 빈번히 발생하였음.
- 최근 이러한 문제점을 극복하고 새로운 방제 전략 수립의 기반 구축을 위해 다양한 유전체학과 오믹스 분석 방법을 통한 식물 병 발생의 원리와 식물 병원균 집단의 진화, 유전적 다양성 등의 규명이 시도되고 있음.
- NGS 기술의 발달로 유전체 정보가 밝혀진 식물 병원성 곰팡이의 숫자가 빠르게 증가하고 있음. 해독 유전체 중 병원균의 병원성이나 독성물질의 생산 등에 관련이 되어 있는 유전자의 발굴과 기능 분석의 중요성이 증가함.
- 작물병의 80%는 곰팡이에 의해 발생하고 있으며 곰팡이의 전염 및 발병에 대한 연구는 농산물 안전성 및 친환경 등의 시대의 요구에 부응하는 새로운 방제전략 개발에 있어 반드시 전제되어야 하는 분야임.

○ 세균-곰팡이 복합감염에 의한 식물병 연구 필요성

- 식물병원성 바이러스의 경우 복합감염에 의한 병 발생 연구가 활발히 진행되어 왔음. 하지만 이중 생물계 사이 (inter-kingdom) 복합감염에 의한 식물병 발생 연구는 매우 미흡한 실정임. 본 연구진의 선행 연구 결과를 통해 벼 알마름병 원인 세균인 *B. glumae*와 벼 이삭마름병 원인 곰팡이인 *F. graminearum*에 의한 복합감염이 증가함을 확인하였음. 이를 통해 세균-식물 또는 곰팡이-식물 사이상호작용 연구 뿐 아니라 세균-곰팡이-식물 사이 상호작용 연구의 필요성이 강조될 수 있음. 따라서 오믹스 기반 상호작용 연구는 농업 생태계에서 생물 상호 간 의사소통과 발병 메커니즘에 대한 중요한 단서를 제시할 수 있음.

○ 우수한 선행 연구 결과 확보에 따른 연구 개발의 성공 가능성

- 본 과제의 연구진은 미생물유전체전략연구사업단의 1단계 사업에 참여하여 우수한 선행 연구 결과를 도출하였음.
- 1단계 연구를 통해 확보한 주요 결과는 본 과제의 창의적이고 혁신적인 아이디어의 도출 뿐 아니라 과제의 성공적인 수행을 위한 연구대상의 선정, 연구 방법론, 협력체계 등에 크게 기여할 것으로 기대함.
- 특히 국내외적으로 고추 탄저병균에 대한 연구는 전무한 상황에서 본 연구진은 1단계 사업을 통해 고추 탄저병균의 유전체와 전사체 해독과 분석을 최초로 수행하였으며, 고추 탄저병균의 발달 및 발병을 이해하기 위한 생물정보학 및 기능유전체학 연구기반을 확립함.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[단위과제(순천향대, 동아대)]

○ *F. fujikuroi*의 키다리 병원형과 줄기마름 병원형별 특이 유전자 집단의 기능 규명

1) 병원형 대표균주의 발병 단계 특이 유전자 집단의 동정 및 발현 양상 분석

- 키다리 병원형 대표균주인 *F. fujikuroi* B14와 줄기마름 병원형 대표균주인 B20의 전사체를 비교 분석하여 벼 발병 단계에서 특이적으로 발현이 증가한 유전자 집단을 확보함. 각 병원형 대표균주인 B14와 B20 균주는 벼 유묘에 대한 병징 뿐 아니라, 이차대사산물의 profiling, 게놈해독과 계통발생학적 분석 등을 통해 선정하였음 (본 연구진의 논문 PLoS Pathogens 13(10): e1006670 참조)

- 벼 유묘(5일 생장)의 뿌리를 대표균주의 분생포자가 포함된 영양액에 담근 다음 1일, 3일, 5일, 7일 후 식물체로부터 total RNA를 추출함. 이를 template로 사용하여 병원형 발병 특이 유전자의 발병 단계별 발현양을 측정함.

2) 병원형별 발병 특이 유전자 집단의 대량 기능 분석

- 발병 특이 유전자를 대상으로 targeted gene deletion 또는 gene overexpression 방법을 활용하여 유전자 삭제 또는 과발현 돌연변이체를 제작함. 이를 위해 필요한 고품질이 원형질체 제조, split marker 형질전환용 DNA construct의 제작, 유전자 삭제 돌연변이체 검증 등의 분자생물학적 기법은 본 연구진에 의해 이미 개발되어 높은 효율로 수행되고 있음.

- 돌연변이체를 벼 유묘에 접종하여 키다리 또는 줄기마름 증상의 발생 여부를 검정함.

- 발병 관련 필수 기능이 검정된 유전자를 대상으로 정량적 실시간 PCR 방법으로 다양한 생육 조건(균사생장, 포자생성, 독소생성, 벼 발병 등)에서 유전자의 발현 양상을 정량적으로 분석함.

- 이러한 발병 유전자의 발현 양상을 B14와 B20 균주 사이에서 비교 분석함으로써 병원형에 따른 해당 발병 유전자의 기능 변이를 분석함.

- 발병 특이 유전자 집단 중 기주 식물체 내 유전자 발현의 특이성과 발현 수준을 기준으로 진단 마커 용 후보 유전자를 선별하여 정량적 실시간 PCR 기법 등을 활용한 진단 시스템을 개발함.

3) 병원형별 발병 특이 유전자 집단의 조절 체계 분석

- 발병 특이 유전자 집단 중 전사인자(transcription factor)를 포함한 유전자 발현 조절 체계(신호전달, chromatin remodeling, RNA 간섭 등)에 관여하는 유전자를 선별하여 해당 유전자에 의한 유전자 조절 체계의 규명과 target 후보 유전자 집단을 동정함.

- 이를 위해 주요 발병 관련 조절 유전자가 삭제된 돌연변이체 내 다른 발병 유전자의 발현 양상을 정량적 실시간 PCR 방법으로 비교 분석하여 조절 유전자에 의한 발병 유전자의 조절 체계를 규명함(부산대 연구진과 협의).

- 주요 발병 조절 유전자 삭제 돌연변이체의 전사체와 표준 균주의 전사체를 비교 분석하여 조절 유전자의 target 후보 유전자 집단을 동정함. 이 중 일부 후보 유전자의 삭제 돌연변이체를 제작하여 후보 유전자의 발병 관련 기능을 검정함.

- 주요 발병 조절 유전자의 기능과 발현 양상을 병원형 균주별로 비교 분석함.

○ *Fusarium* 병원균의 공기전반 관련 유전자 집단의 기능 분석

1) *F. fujikuroi*의 병원형별 포자 형성 특이 유전자 집단의 기능 규명

- 두 병원형에 속하는 대표균주와 야생형 균주(최소 5 주 이상)를 V8 배지 등의 조건에서 배양하여 대형분생포자와 소형분생포자의 생성 여부, 생성능 등을 비교 분석함.
- 최적의 포자 형성 조건에서 병원형 대표균주의 전사체 해독을 수행하여 병원형별 포자 형성 단계 특이 유전자 집단을 동정함.

2) *F. fujikuroi* 병원형 대표균주의 포자 형성 단계 특이 유전자 집단의 기능 분석

- 전사체 해독을 통해 확보 예정인 *F. fujikuroi*의 병원형별 포자 형성 특이 유전자 집단을 대상으로 앞서 기술한 targeted gene deletion, gene overexpression, qPCR 등의 방법을 사용하여 포자 형성 관련 유전자의 기능을 검정함.
- 포자의 모양과 무게를 기준으로 액체 상태에서 포자 확산 속도를 계산하고 이를 기반으로 공기 중에서 포자 확산 모델을 구축하여 공기에서 포자유형별 분산을 예측함.
- 위에서 제작한 돌연변이체를 대상으로 포자 유형별 생성 양상을 비교 분석하고 각 유전자의 진화적 기원을 추적함으로써 *Fusarium* 속 곰팡이의 포자 모양에 대한 생태적 이유를 설명함.

3) *F. fujikuroi* 병원형 대표균주의 포자 형성 관련 유전자 집단의 조절 체계 분석

- 포자 형성 특이 유전자 집단 중 앞서 기술한 방법과 같이 유전자 조절 체계 관련 유전자를 선별하여 해당 유전자에 의한 포자 특이 유전자의 조절 체계, target 후보 유전자 집단의 동정, target 후보 유전자의 기능 등을 분석함.

4) *F. graminearum* 중복합체 집단 내 무성포자 형성 관련 유전자의 기능 변이 분석

- 우리나라 토종 *F. graminearum* 중복합체 소속 대표 종인 *F. asiaticum* SCKO4 균주와 북미산 *F. graminearum* Z3643 균주의 무성포자 형성 단계 전사체를 비교 분석하여 종별 무성포자 특이 유전자 집단을 확보함.
- 무성포자 특이 유전자의 일부를 대상으로 앞서 기술한 방법을 사용하여 포자 형성 관련 유전자의 기능을 검정함.
- 무성포자 형성 특이 유전자 집단 중 조절 유전자를 선별하여 앞서 기술한 방법처럼 해당 조절 유전자에 의한 포자 특이 유전자의 조절 체계와 target 후보 유전자 집단을 동정함.
- 주요 무성포자 특이 조절 유전자의 발현 양상과 기능을 *F. asiaticum* SCKO4와 *F. graminearum* Z3643 균주 사이에서 분석하여 종별 포자 형성 기작의 변이를 분석함.

5) 벼 병원성 *Burkholderia* 세균에 의해 유도되는 *F. graminearum* 포자 형성 관련 유전자의 기능과 조절 체계 분석

- 토크소플라빈에 의해 발현이 유도되는 포자 형성 관련 유전자를 대상으로 돌연변이체를 제작하여 각 유전자의 기능을 분석함.
- 분생포자경과 경자에 생성되는 활성산소의 양을 측정함.
- 선행연구에서 제작된 불완전 경자 생성을 보이는 돌연변이체에서 활성산소 양을 측정하여 세포내 축적되는 활성산소의 양과 포자 형성과의 관계를 분석함.

○ *Fusarium* 병원균의 발생 생태 활용 병 발생 제어 기술의 탐색

1) 비병원성 *Fusarium* 종을 활용한 벼 키다리병과 이삭마름병의 발생 제어

- 벼 재배 지역 공기 중 우점으로 분포하는 *Fusarium* 종 (예: *F. incarnatum-equiseti*) 균주 집단의 병원성과 곰팡이독소 생성능 등을 검정하여 비병원성 균주를 선발함. 선발된 *F. incarnatum-equiseti* 균주는 *Fusarium* 종 집단 중 벼 재배지역 공기과 벼 식물체, 기타 주변 식물 잔재물 등에서 가장 높은 빈도로 존재할 뿐 아니라 주요 독성 *Fusarium* 곰팡이독소를 생성하지 않음
- 비병원성 균주의 분생포자를 출수기 벼 식물체에 분무 살포함. 1 ~ 2일 경과 후 같은 식물체에 병원성 *Fusarium* 곰팡이(*F. fujikuroi*, *F. graminearum* 등)의 분생포자를 분무 살포한 후 병징 발달 양상을 검정함. 벼 붉은곰팡이병(이삭마름병)의 경우, 병원균 살포 후 일주일 이후부터 병 발생 여부와 발생양 등을 검정함. 한편, 줄기마름 병원형 *F. fujikuroi* 균주를 접종할 경우 벼 성체 줄기의 마름 증상 여부를 1 ~ 2주 안에 확인할 있으나, 키다리 병원형 균주 접종 시 벼 성체의 옷자람 (키다리 증상) 여부를 단시간에 확인하기 어려울 수 있음.
- 키다리 병원형 균주 접종의 경우, 접종 벼 식물체로부터 난알을 수확하여 다음 해 심어 유묘 상태에서 키다리 증상 발현 여부를 검정할 예정임.
- 곰팡이 접종 후 벼 이삭 내 곰팡이독소(fumonisin, fusaric acid, trichothecenes 등)의 생성량을 측정할 예정임.

2) 벼 재배 포장 내 토종 *F. graminearum* 중복합체 균주의 월동 억제 전략 탐색

- 벼 그루터기를 포함한 식물 잔재물에서 균사 상태로 월동할 것으로 예상되는 토종 *F. graminearum* 중복합체 균주의 전염원을 제거 또는 억제하기 위하여 겨울철 벼 그루터기에 다양한 항균 물질(농약 포함)을 정기적으로 살포한 후 그루터기로부터 *F. graminearum* 종의 오염 빈도를 조사함.
- 이듬해 같은 논에서 정기적으로 식물 잔재물, 토양, 관개수 등으로부터 *Fusarium* 곰팡이 오염 수준을 조사함.
- 항균 물질 살포 후 벼 재배 포장 자체 뿐 아니라 포장 내 비닐하우스를 설치하여 밀폐된 공간 내 식물 잔재물로부터 *Fusarium* 곰팡이의 오염 수준을 조사할 수 있음.

○ *F. fujikuroi*의 병원형 특이 발병 유전자 활용 식물병 발생 제어 전략 개발

1) 병원형 특이 이차대사 생합성 또는 포자 형성 유전자의 발현 억제 천연물의 탐색

- 반딧불이 luciferase 유전자 염기서열을 병원형 특이 발병 관련 이차대사 산물 (키다리 병원형의 gibberellin, 줄기마름 병원형의 fumonisin 등) 생합성 조절 유전자 또는 포자 형성 조절 유전자의 프로모터와 융합시킨 후 *F. fujikuroi* 병원형 대표 균주(B14, B20)의 유전체에 도입함. 이를 통해 제작한 형질전환체에서 luciferase의 활성도는 발병 특이 유전자의 발현에 의해 조절되기 때문에 이를 이용하여 발병 유전자의 발현을 정량적, 정성적으로 쉽게 검정할 수 있음.
- 이와 같은 reporter 균주를 천연물 유래 생물소재 (식물 또는 미생물 추출물) 또는 길항미생물과 함께 배양하여 해당 물질이나 미생물에 의한 *F. fujikuroi* 발병 특이 유전자의 발현 억제 효과를 검정할 수 있음(그림 2).

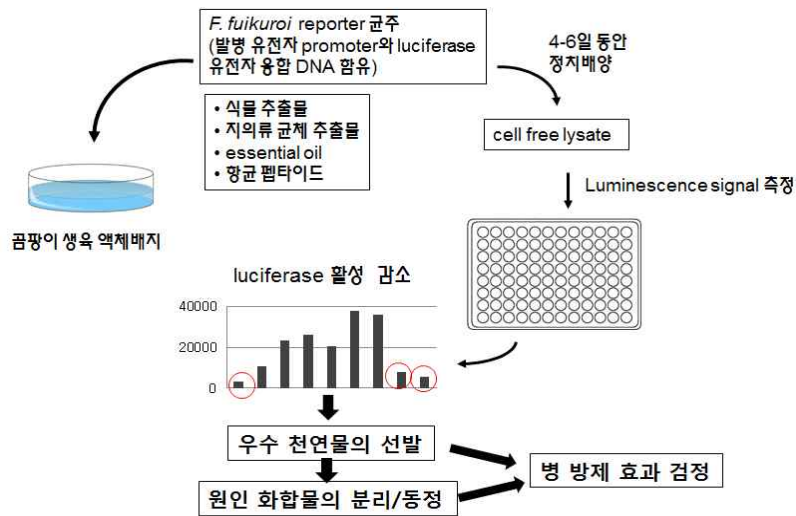


그림 2. Luciferase reporter 균주를 활용한 발병 유전자 억제 천연물 탐색 과정의 모식도

- 이를 통해 곰팡이 병원균의 생육 자체를 억제하는 항균 물질/길항균의 탐색 뿐 아니라 병원균의 생장은 허용하되 발병 특이 유전자의 발현만 억제할 수 있는 생물 소재의 탐색도 가능함.
- 효과가 검증된 천연물 유래 추출물의 경우, 추출물의 분획 및 순수 분리 과정을 통해 원인 화합물의 동정이 가능함(천연 화합물의 화학적 분석, 분리, 구조 동정 전문 연구진과 협의 필요).

2) small RNA 활용 병원형 특이 발병 유전자의 발현 억제 전략 탐색

- 병원형 대표균주별 주요 발병 유전자의 염기서열을 대상으로 RNA 간섭 경로를 통해 해당 유전자의 전사체 분해를 유도할 수 있는 small RNA 염기서열을 선발함.
- 선발한 small RNA를 다량으로 제작하여 *F. fujikuroi* 병원균에 직접 살포한 후 병원균 내 발병 유전자의 발현 수준을 검정함.
- 한편, 선발한 small RNA 염기서열을 활용하여 hairpin 구조 생성이 가능하게 곰팡이 형질 전환용 벡터 DNA(본 연구진이 이미 확보)에 삽입하여 새로운 plasmid DNA를 제작함. 이를 병원균 곰팡이의 유전체 삽입한 후 발병 유전자의 발현 수준을 검정함.

[협동1과제(강원대)]

○ 고추 탄저병균 *Colletotrichum scovillei*의 포자 생성 양상 규명

1) *C. scovillei*의 포자 생성 양상 비교

- 주요 환경요소인 질소, 탄소 pH, 산소, 등이 포자 생성, 모양, 생존력에 미치는 영향을 정량적, 정성적으로 분석함.

2) 고추 품종별 *C. scovillei*의 포자 생성 양상 연구

- 저항성 및 감수성을 포함한 고추 품종별로 포자 생성의 변화를 측정하고, 광조건이 서로 다른 품종에서 포자 생성 영향에 미치는 영향을 측정함.

○ 고추 탄저병균 *Colletotrichum scovillei*의 포자 생성 전사체 및 발병 유전자 연구

- 1) *C. scovillei*의 포자 생성 단계별 전사체의 생물정보학적 비교 분석
 - 1차년도 연구 결과를 토대로 포자 생성 전 단계 조직(비교군), 포자 생성 단계별 조직, 그리고 포자 생성 억제 및 촉진 조직으로부터 total RNA를 추출하고 이를 RNA-seq 분석에 사용함.
 - RNA-seq 데이터를 비교 분석하여 포자 생성 특이 유전자 집단을 선별하고, 이 중에서 선별된 중요 유전자에 대한 고추 탄저병균의 발달 및 발병 단계를 발현 양상을 qRT-PCR 또는 promoter 분석을 통해서 연구함.
- 2) *C. scovillei*의 발병 관련 유전자 선별
 - 위의 단계별 양상 연구 및 1단계 연구 결과를 비교 분석하여 포자에서 발현되는 발병 관련 유전자를 선별하고 형광단백질을 이용한 발병 단계별 발현 양상을 연구함.

○ 고추 탄저병균 *Colletotrichum scovillei*의 포자 생성 및 발병 기작 연구

- 1) 고추 탄저병균의 포자 생성 특이 유전자의 기능 연구
 - 포자 생성 특이 유전자 집단 중에서 주요 조절인자를 코딩하는 유전자를 대상으로 결실돌연변이체, 복원형질전환체를 제작함. 고추 탄저병균 형질전환 기법은 본 사업의 1단계에서 확립하였음.
 - 이들 형질전환체를 이용하여 포자 생성 단계별 유전자의 기능을 세포학적 분자생물학적 분석하고 관련 기작을 연구함.
 - 환경요소가 포자 생성 특이 유전자의 발현 양상을 조사하고 형광단백질을 이용한 해당 단백질의 세포학적 위치에 대한 연구를 수행함.
- 2) 고추 탄저병균의 발병 특이 유전자의 기능 연구
 - 해당 유전자를 대상으로 결실돌연변이체, 복원형질전환체를 제작함.
 - 감수성 고추 품종에서 고추 탄저병균 야생형 및 형질전환체간의 발병 단계별 양상을 비교 분석하여 해당 유전자의 기능 연구함.

○ 고추 탄저병균 *C. scovillei*의 공기전반 및 발병 종합적 이해 및 제어 전략 연구

- 1) 고추 탄저병균의 공기전반 및 발병 종합적 이해
 - 포자 생성 및 발병 특이 유전자의 기능 분석 연구와 RNA-seq 발현양상 연구를 기반으로 환경요소 및 기주 식물요소가 포자 생성 및 발병에 미치는 영향을 종합적으로 분석함.
- 2) 고추 탄저병균의 공기전반 및 발병 억제 제어 전략 개발
 - 고추 탄저병균 포자 생성 및 발병 관련 마커유전자의 발현을 억제하는 길항균 및 식물추출물을 탐색하고 연구함.
 - 후보 천연물의 환경조건별, 처리조건별, 고추품종별 억제력을 정량적 정성적으로 검증함.
 - 효과가 검증된 천연물로부터 필요시 억제효능을 갖는 화합물을 동정(관련 전문 연구진과의 협력이 요구됨)함.

[협동2과제(부산대)]

○ 식물병원성 *Burkholderia glumae*와 *B. gladioli* 사이 상호작용 및 병원성 연구

1) *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 서로 다른 정도의 병원성을 가진 *B. glumae*와 *B. gladioli* 균주들을 확보함.
- 벼 또는 다른 식물에서 분리한 *B. glumae*와 *B. gladioli* 균주 사이 대치 배양을 통해서 길항적인 또는 배타적 상호 관계 여부를 검정함.

2) 기주 조건과 유사한 배지 조건에서 상호작용 관계 연구

- 영양최소 배지에 특이적 대사 물질을 첨가하여 상호작용을 확인하고자 함.
- 벼 또는 식물과 가장 유사한 조건인 MS 배지나 벼 조직을 마쇄한 후에 멸균을 하여 배지를 만들어 상호작용을 관찰함.

○ *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이 *in vivo* 조건에서 상호작용 및 병원성 연구

1) 벼 유모 상태에서 *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이 상호작용

- *B. glumae*와 *B. gladioli* 균주가 GFP 또는 RFP을 발현할 수 있도록 *Burkholderia*에서 발현이 높은 유전자의 프로모터 부분을 사용한 형광 발현 균주를 제작함.
- 10일 전·후의 벼 유모나 60일 전·후의 벼 줄기에 형광 발현 *B. glumae*와 *B. gladioli*를 각각 접종한 후 벼 조직 내 군집화 및 전이를 관찰하고, 이와 동시에 병원성 정도를 측정하여 복합감염의 양상이 어떻게 나타나는지 조사하고자 함.

○ 병원성 *Burkholderia* 세균과 *Fusarium* 곰팡이 사이 상호작용 연구

1) 병원성 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 확보된 다양한 병원성 *Burkholderia* 균주(*B. glumae* BGR1 또는 *B. gladioli* 11882, *B. gladioli* BRS3)와 병원성 *Fusarium* 균주(*F. fujikuroi* 또는 *F. graminearum*)를 함께 배양을 하거나 대치 배양하여 어떠한 *Burkholderia* 균주가 *Fusarium* 균주에 도움을 주는지 또는 서로 배타적인지 여부를 검정함.
- 1차년도에 확보된 형광 발현 *Burkholderia* 균주를 활용하여 *Fusarium* 균주에 부착여부를 형광현미경으로 자세히 관찰함.

2) 다양한 배지에서 *Burkholderia* 세균과 *Fusarium* 곰팡이 사이 상호작용 연구

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 *in vitro* 상호작용을 세균 배양용 LB 배지나 곰팡이 배양용 PDA 배지에서 관찰하고자 함.

○ *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 *in vivo* 상호작용 및 병원성 연구

1) 벼 유모에서 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호작용

- 형광 발현이 되는 *Fusarium* 균주를 먼저 확보 또는 제작함.

- 1차년도에 확보된 형광 발현 *Burkholderia* 균주를 이용하여 두 병원균이 서로 다른 형광을 하는 조합으로 벼 종자나 벼 유모에 접종을 하여 벼 조직 내에서의 colonization과 전이를 관찰하고자 함.
- 형광 현미경으로 전반적인 분포를 관찰하고 이를 바탕으로 confocal 현미경으로 자세한 분포를 관찰하고자 함.

2) 벼 조직에 접종 후 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호작용

- 두 병원균을 벼 줄기 또는 벼 이삭에 두 균주를 각각 그리고 복합접종한 후 병원성 발병 정도 및 기작을 두 병원균 특이적인 qPCR을 통해 양적인 정량화를 측정하고 두 병원균에 의한 병 발생 정도를 측정하여 상호 기작을 연구하고자 함.

○ 상호작용하는 병원성 *Burkholderia* 세균과 *Fusarium* 곰팡이 사이 전사체 분석

1) *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주의 대치 배양 *in vitro* 전사체 분석

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 대치 배양에서 특이적인 상호작용이 관찰이 되면 두 균주에 대한 RNAseq을 수행하여 기작을 연구하고자 함.
- 접종 후 1 ~ 2일의 초기 단계 상호 작용이 7일 후 후기 단계 상호 작용과 차이가 나 경우 이에 대한 전사체 분석도 수행하고자 함.

2) 벼 접종 후 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주의 *in vivo* 전사체 분석

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 벼 줄기나 벼 이삭에서 *in vivo* 상호작용 결과 병원성이 차이가 나는 경우, *in vivo* 전사체 해독을 수행함.
- *Burkholderia* 균주의 경우 부산대 (본 과제 제2협동) 연구진에 의해 이미 확보된 *in host* 전사체로 수행을 하고자 함. 또한 *Fusarium* 균주의 경우 순천향대 (본 과제 단위책임) 연구진에 의해 확보된 *in vivo* 전사체를 함께 분석하고자 함.

○ 다양한 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Colletotrichum* 사이 상호작용 연구

1) 병원성 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 병원성 *B. glumae*와 병원성 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양을 통해서 상호작용을 관찰하고자함.

2) 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- *Burkholderia* 균주 중 이미 확보된 작물에 유익한 균주와 식물 내생인 *Burkholderia*와 고추 탄저병을 유발하는 *Colletotrichum* 균주와의 상호작용을 조사하여 *Colletotrichum* 균주 제어 가능 여부를 검정함.

○ *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이 사이 전사체 분석

1) 상호작용하는 *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이 사이 전사체 분석

- 병원균 또는 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 *in vitro* 상호작용에서 차이가 나는 조합을 대상으로 배지 상 대치 배양 중 균주를 수집하여 RNAseq을 통해 차별적으로 발현되는 유전자들을 탐색하고자 함.

○ *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이의 기주 감염 연구

1) 병원균 또는 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 감염 연구

- 고추 유묘 또는 성체를 대상으로 단일 또는 복합감염 후 병 발생 정도 및 특이적 프라이머 qPCR로 정량화를 수행함.

○ 비교 전사체 분석을 통한 병원균 상호 용 기작 연구

1) *In vitro* 전사체 비교 분석

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호작용, *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 간 사이 상호작용 관련 비교 전사체 분석을 위해서 먼저 다른 species(종)의 경우 비교 유전체 분석을 통해 공통적 그리고 특이적 유전자들을 선별함.
- 비교 유전체 분석 결과를 바탕으로 확보된 특이 유전자들의 그룹을 만들고 생물정보학적 분석 또는 네트워크 분석을 수행함.

2) *In vivo* 전사체 비교 분석

- 위의 *in vitro*와 같은 방법으로 수행하고 함.
- 만들어진 *in vivo* 결과를 *in vitro*와 비교 분석하여 더 확실한 pathways 또는 유전자들을 발굴하고자 함.

○ 상호작용 주요 유전자에 대한 기능 연구

1) 상호작용에서 중요한 기능을 하는 유전자의 삭제 돌연변이체 확보

- 비교 전사체 분석 결과 최종 선별된 유전자를 대상으로 *Burkholderia* 균주의 deletion 돌연변이를 만들고자 함.
- 비교 전사체 분석 결과 최종 선별된 유전자를 대상으로 병원성 곰팡이 균주의 유전자 삭제 돌연변이체를 확보하고자 함(단위과제와 협동 1과제 연구진과 협의).

2) 돌연변이체의 표현형 연구

- 확보된 돌연변이체를 활용하여 병원균 상호 작용 결과와 일치하는지 여부를 검정함.
- 돌연변이체의 형질변화를 통해 유전자 특이적 표현형을 분석함.
- 이동성, 독소생성, 효소 분비 등과 감염 및 병원성 관련 표현형 분석을 수행하고자 함.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

- 주관연구기관(순천향대): 벼 *Fusarium* 곰팡이 병원균의 발병과 병원형 변이 조절 체계의 규명 및 병 발생 제어 전략의 탐색

○ *F. fujikuroi*의 줄기마름 병원형 발병 특이 유전자 집단 기능 규명

1) 줄기마름 병원형 발병 특이 유전자 삭제 돌연변이체의 제작

- 줄기마름 병원형 대표균주 B14의 발병전사체(벼 접종 후 3일차 & 6일차), 영양생장 단계(PDA 배양 후 4일차)의 전사체, 키다리 병원형 대표균주 B20의 발병전사체를 종합적으로 비교·분석하여 줄기마름 병원형 특이적 발현 유전자(총 35종)를 선별하였음(표 1-1). 일부 유전자는 식물 세포벽 분해(7종)나 물질 수송(5종)과 관련되어 있으며, 대부분은 그 기능이 밝혀져 있지 않음(14종).

- 35종 유전자를 targeted gene deletion 방법으로 각각 삭제한 돌연변이체를 제작하였고, 이를 검정하기 위하여 split marker의 homologous recombination 여부를 판별하였음. 하나의 예로 FFB14_01372 유전자 삭제 돌연변이체 후보 균주의 genomic DNA를 추출하여 confirmation PCR(polymerase chain reaction)로 3개 region(① 5' flank & 3' flank ② 유전자 내부)을 증폭할 경우, 해당 유전자가 실제로 삭제되었다면 5' flank와 3' flank에서는 band가 나타나야 하고 유전자 내부에서는 band가 나타나지 않아야 함(그림 1-1). 나머지 34종 유전자 single deletion 돌연변이체도 동일하게 검정하였음.

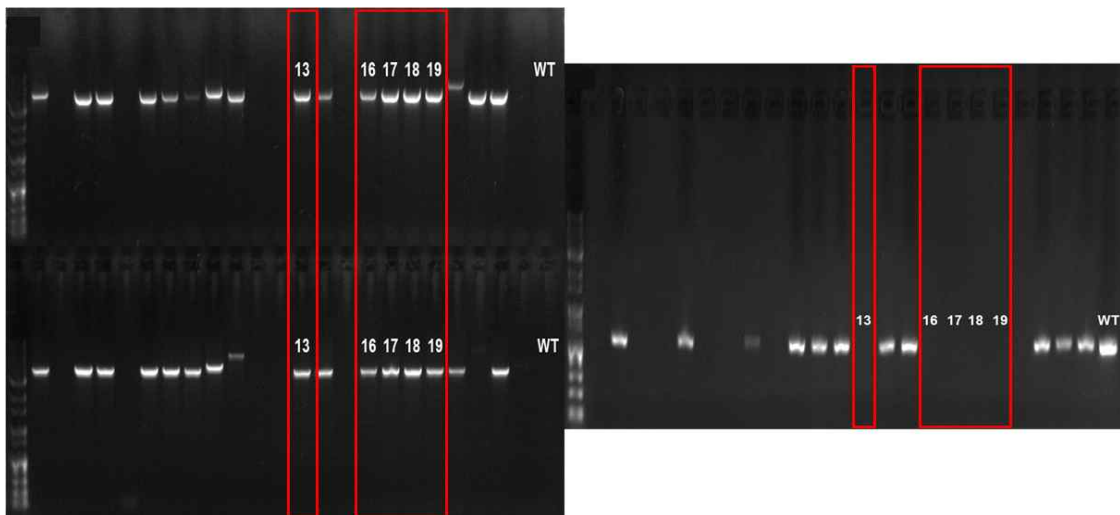


그림 1-1. *F. fujikuroi* B14 유래 FFB14_01372 유전자 삭제 돌연변이체의 confirmation PCR

표 1-1. *F. fujikuroi* B14의 발병 특이 후보 유전자 집단

| B14 gene | PDA_4 | P_3 | P_6 | Description |
|-------------|-------|--------|--------|--|
| FFB14_00027 | 3.2 | 61.6 | 106.9 | Related to dienelactone hydrolase |
| FFB14_00028 | 1.5 | 65.7 | 95.3 | Related to D-arabinitol-2-dehydrogenase |
| FFB14_00035 | 0.0 | 41.3 | 98.2 | Related to 6-hydroxy-D-nicotine oxidase |
| FFB14_00038 | 0.3 | 47.8 | 201.9 | Related to salicylate-1-monooxygenase |
| FFB14_00167 | 3.5 | 224.3 | 450.8 | Uncharacterized protein |
| FFB14_00240 | 7.7 | 32.3 | 114.2 | Uncharacterized protein |
| FFB14_00241 | 74.5 | 665.4 | 926.3 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01372 | 2.6 | 8.9 | 51.9 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01383 | 2.2 | 39.4 | 97.2 | Related to sugar transport protein STP1 |
| FFB14_01385 | 1.9 | 40.5 | 115.4 | Related to alpha-L-arabinofuranosidase 1 |
| FFB14_01483 | 0.1 | 260.6 | 430.4 | Probable alpha-L-arabinofuranosidase precursor |
| FFB14_01498 | 11.2 | 93.3 | 210.4 | Related to H ⁺ antiporter HOL1 |
| FFB14_01546 | 22.8 | 209.9 | 0.8 | Probable catalase isozyme P |
| FFB14_01559 | 10.6 | 261.3 | 420.7 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01562 | 0.0 | 3804.0 | 420.2 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01579 | 3.5 | 47.6 | 195.0 | Related to ceramidase |
| FFB14_01609 | 17.5 | 31.7 | 192.0 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01620 | 0.1 | 1.5 | 96.7 | Related to glucose/galactose transporter |
| FFB14_01764 | 58.0 | 1026.0 | 148.3 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01767 | 0.5 | 83.2 | 385.1 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01838 | 9.6 | 27.6 | 207.6 | Probable maltose permease MalP |
| FFB14_01862 | 9.5 | 317.8 | 1118.4 | Uncharacterized protein |
| FFB14_01959 | 11.9 | 112.6 | 141.1 | Related to NADH oxidase |
| FFB14_08408 | 0.3 | 0.9 | 162.1 | Related to aldehyde reductase II |
| FFB14_10038 | 46.2 | 100.0 | 40.8 | Uncharacterized protein |
| FFB14_10570 | 0.2 | 15.8 | 199.4 | Uncharacterized protein |
| FFB14_11414 | 0.1 | 4.2 | 22.5 | Probable multidrug-resistance transporter |
| FFB14_11620 | 5.7 | 70.8 | 10.0 | Uncharacterized protein |
| FFB14_12086 | 0.6 | 70.5 | 122.2 | Endo-1,4-beta-xylanase A |
| FFB14_12102 | 6.1 | 68.6 | 48.6 | Related to L-sorbose dehydrogenase |
| FFB14_12133 | 4.1 | 88.0 | 19.0 | Uncharacterized protein |
| FFB14_12264 | 0.0 | 70.2 | 193.8 | Probable xyloglucanase |
| FFB14_12527 | 14.0 | 115.9 | 215.6 | Related to acetyltransferase |
| FFB14_15010 | 0.4 | 12.0 | 54.6 | Probable arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase |
| FFB14_15592 | 3.7 | 70.0 | 190.6 | Related to enoyl-CoA hydratase/isomerase |

■ : 식물 세포벽 분해 // ■ : 물질 수송 // ■ : 기능이 밝혀져 있지 않음

PDA_4: PDA 배양 후 4일차 // P_3: 벼 접종 후 3일차 // P_6: 벼 접종 후 6일차

2) 줄기마름 병원형 발병 특이 유전자 삭제 돌연변이체의 병원성 검정

- 35종 유전자 single deletion 돌연변이체의 병원성 검정을 위하여 분생포자를 벼 유묘 뿌리에 $1 \times 10^5/ml$ 농도로 접종하였음(그림 1-2). 그러나 모든 돌연변이체에서 야생형 B14를 접종했을 때와 비슷한 수준의 병징이 나타남.

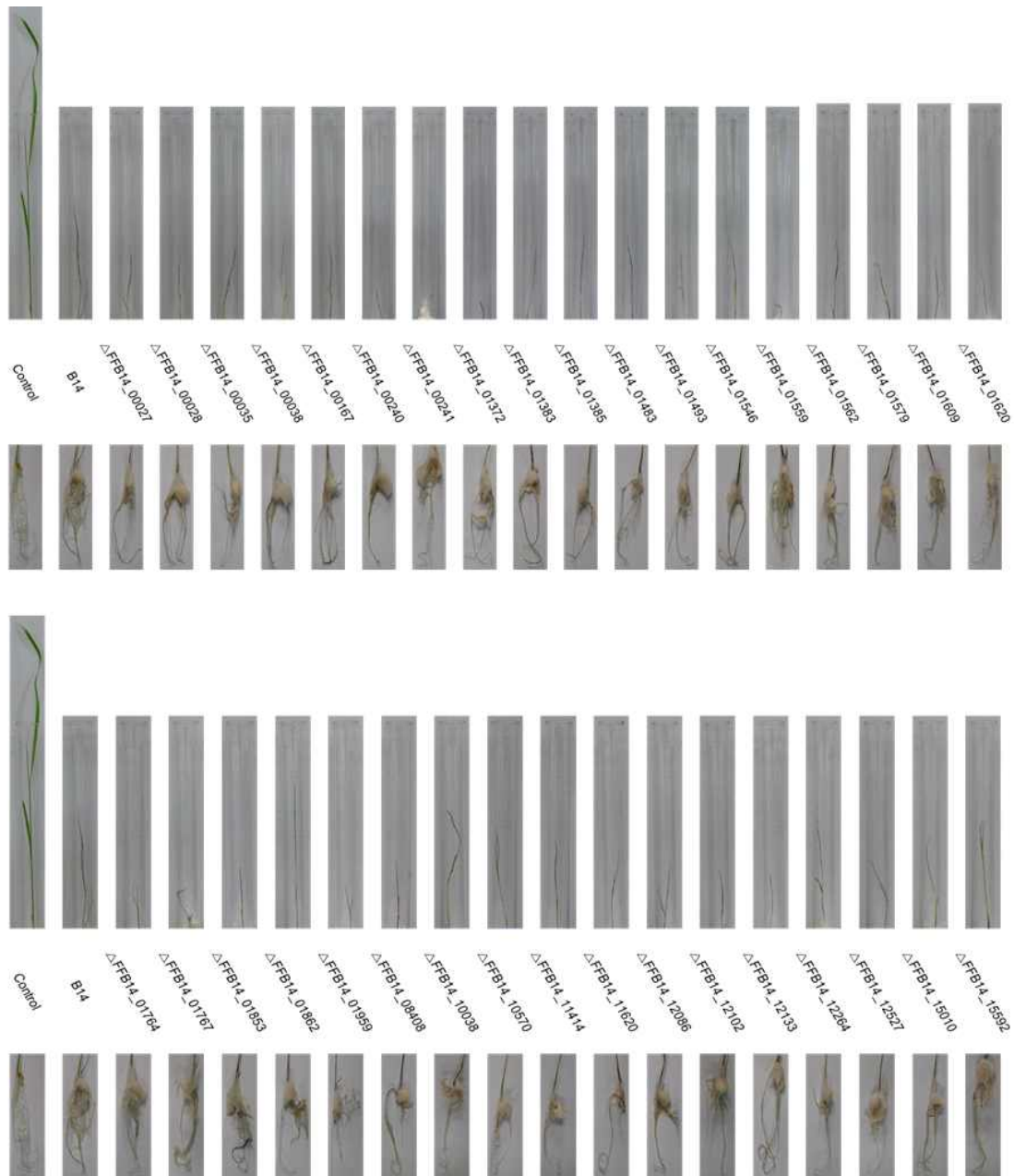


그림 1-2. *F. fujikuroi* B14 유래 발병 특이 후보 유전자 삭제 돌연변이체의 병원성 검증

- 각각의 후보 유전자 삭제에도 불구하고 기주 식물에 대한 발병 능력에는 유의미한 변화가 없음.
- 특정 유전자의 기능은 여러 다른 homologue 유전자에 의해 대체될 수 있음. 따라서 줄기마름 병원형 특이적 발현 유전자일지라도 발병 과정 중 독립적·필수적으로 작용하지 않을 수 있다는 식의 추정이 가능함.

3) Gene silencing 활용 줄기마름 병원형 발병 특이 유전자의 기능 분석

- 최근 사상성 곰팡이에서도 RNA 간섭(RNAi, RNA interference)에 따른 유전자 발현 억제 기전이 밝혀지고 있음. 특정 유전자 염기서열과 상보적인 small RNA 또는 hairpin RNA의 도입에 의한 해당 유전자 발현 억제가 시도되고 있으며, 모델 사상성 곰팡이의 경우 small RNA보다는 200bp 이상의 DNA 염기서열을 sense & antisense 방식으로 배열하여 만든 hairpin RNA가 더 우수한 유전자 발현 억제 효과를 나타낸다고 알려져 있음.

- 주목받는 분자생물학적 연구 방법인 gene silencing을 활용하여 단일 유전자 삭제에서 드러난 유전자 기능의 redundancy를 규명하고자 B14 발병 과정 중 비슷하게 작용할 것으로 여겨지는 유전자(functional orthologue)를 총 12종 선발하였음(표 1-2). 주로 식물 세포벽 분해 효소이거나 그 전구물질을 암호화하고 있음.
- 적어도 2종 이상의 유전자 발현이 동시에 억제되도록 각각의 유전자를 다시 개별적인 4개 조합으로 구성하였음.

표 1-2. *F. fujikuroi* B14의 gene silencing 후보 유전자 집단

| B14 gene | PDA_4 | P_3 | P_6 | Description |
|-------------|-------|-------|-------|--|
| FFB14_07329 | 0.0 | 2.6 | 17.7 | Probable endoglucanase IV precursor |
| FFB14_12098 | 0.0 | 43.1 | 221.9 | Probable endoglucanase I precursor |
| FFB14_12518 | 0.0 | 73.4 | 302.4 | Probable endoglucanase type F |
| FFB14_15114 | 1.5 | 311.8 | 632.6 | Probable endopolygalacturonase |
| FFB14_08613 | 0.0 | 24.7 | 5.7 | Probable pectate lyase |
| FFB14_10417 | 0.0 | 42.7 | 67.2 | Probable endo-1,4-beta-xylanase |
| FFB14_10885 | 0.0 | 19.2 | 63.6 | Probable pectate lyase |
| FFB14_10648 | 0.0 | 16.8 | 31.1 | Related to alpha-N-arabinofuranosidase/ alpha-L-arabinofuranosidase |
| FFB14_10649 | 6.2 | 52.2 | 147.6 | Related to arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase A precursor |
| FFB14_15010 | 0.4 | 12.0 | 54.6 | Probable arabinogalactan endo-1,4-beta-galactosidase |
| FFB14_04559 | 0.0 | 5.0 | 13.9 | Related to rhamnogalacturonan acetyltransferase |
| FFB14_12237 | 0.0 | 2.8 | 11.3 | Probable rhamnogalacturonate lyase C |

Set 01 // Set 02 // Set 03 // Set 04

PDA_4: PDA 배양 후 4일차 // P_3: 비 접종 후 3일차 // P_6: 비 접종 후 6일차

- 선발 유전자 내부에서 small RNA와의 결합 가능성이 있는 ORF(open reading frame)가 포함된 region(약 200 ~ 400bp)을 탐색하였음. 해당 염기서열을 각 조합의 유전자별로 연속되게 이어 붙인 insert를 제작하였고, 이를 double-strand RNA의 형성이 가능하게끔 진행 방향이 서로 반대인 promoter를 구조 내에 배치하여 설계한 plasmid(pSD1, pSilent-Dual 1)와 연결시킴으로써 gene silencing 유도 vector를 완성하였음(그림 1-3).

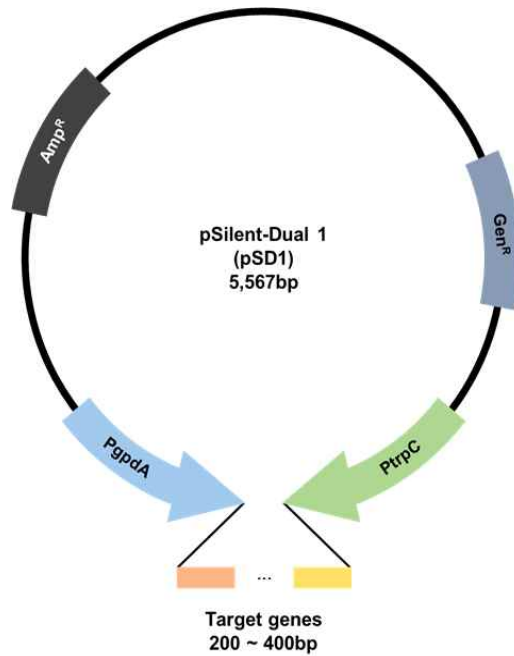


그림 1-3. Gene silencing을 위한 pSD1 유래 vector의 모식도

- 형질전환으로 B14 유전체 내 gene silencing vector가 삽입된 RNAi 돌연변이체의 병원성을 검정하였음(그림 1-4). 야생형 B14 접종과 비교하여 Set 04 돌연변이체에서의 병징이 무처리구와 비슷한 수준으로 유의미한 감소를 보였기 때문에, 후보 유전자 중 최소 2종(FFB14_04559 & FFB14_12237)은 B14의 발병에 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수 있음.

○ *F. fujikuroi*의 병원형별 포자 형성 특이 유전자 집단 기능 규명

1) 병원형별 분생포자의 형성 양상 비교

- B14(줄기마름 병원형)와 B20(키다리 병원형)을 분생포자 형성 유도 배지(CMC & YMA)에 배양하여 소형분생포자(microconidia), 대형분생포자(macroconidia)의 형성 양상을 비교하였음(그림 1-5).

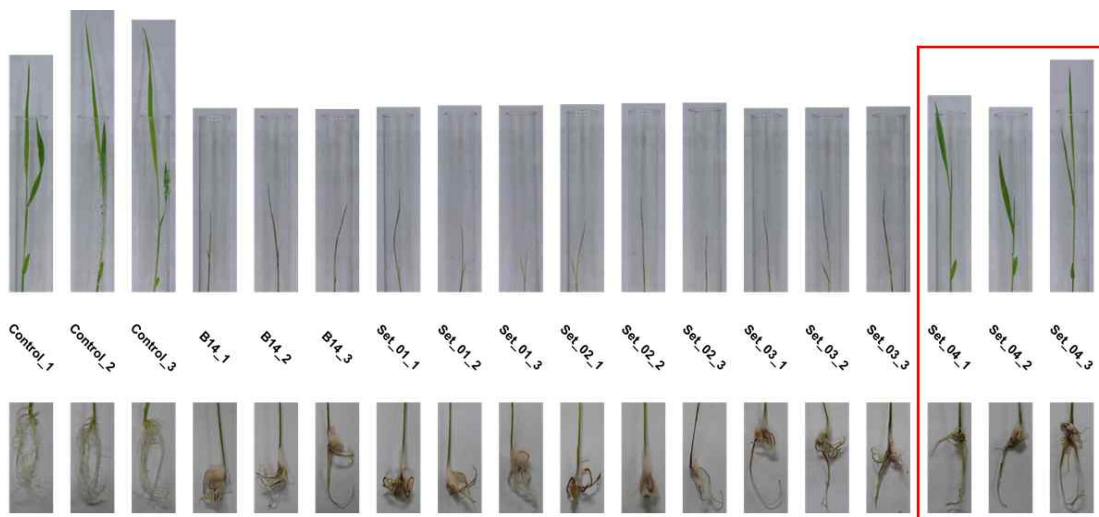


그림 1-4. *F. fujikuroi* B14 유래 RNAi 돌연변이체의 병원성 검정

- CMC의 경우, 두 병원형 균주 모두 소형분생포자만을 형성하며 B14의 양이 B20보다 두 배 가량 많음.
- YMA의 경우, 두 병원형 균주 모두 소형분생포자와 대형분생포자를 함께 형성함. 그러나 B14의 대형분생포자 양이 B20보다 두 배 가량 많을 뿐 아니라 형성 시기도 하루 이상 빠름.

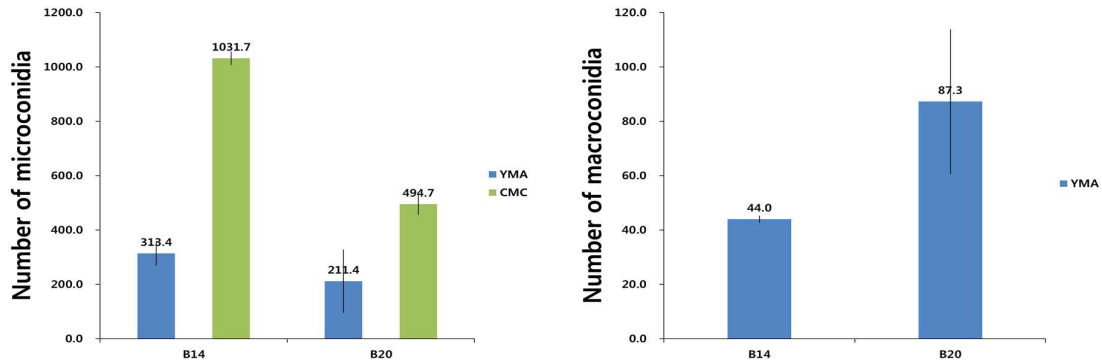


그림 1-5. *F. fujikuroi*의 병원형별 분생포자 형성 양상

- CMC는 소형분생포자 형성 특이 조건, YMA는 대형분생포자 형성 특이 조건으로 간주할 수 있음.

2) 병원형별 분생포자 형성 단계의 전사체 해독

- 두 병원형 균주를 CMC와 YMA에 각각 배양한 후 total RNA를 추출하여 전사체 해독을 수행하였음. 이를 군사성장 배지인 PDA에서의 배양체 추출 total RNA 전사체 해독 결과와 함께 종합적으로 분석함으로써 발현 양상이 달라진 유전자(DEG, differentially expressed gene)를 동정하였음(그림 1-6).
- B14 특이 유전자: CMC에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(CMC>PDA)는 총 432종, YMA에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(YMA>PDA)는 총 471종임. 두 그룹에 공통으로 존재하는 DEG는 총 141종이며, 이 중 76%는 통계적으로 유의하지 않음(CMC≈YMA).
- B20 특이 유전자: CMC에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(CMC>PDA)는 총 691종, YMA에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(YMA>PDA)는 총 424종임. 두 그룹에 공통으로 존재하는 DEG는 총 109종이며, 이 중 63%는 통계적으로 유의하지 않음(CMC≈YMA).
- CMC 특이 유전자: CMC에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(CMC>YMA)는 B14 총 379종, B20 총 870종임. 두 그룹에 공통으로 존재하는 DEG는 총 189종이며, 이 중 58%(B14)와 70%(B20)는 분생포자 형성 단계 특이적이라고 추정할 수 있음.
- YMA 특이 유전자: YMA에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG(YMA>CMC)는 B14 총 1,089종, B20 총 707종임. 두 그룹에 공통으로 존재하는 DEG는 총 317종이며, 이 중 52%(B14)와 43%(B20)는 분생포자 형성 단계 특이적이라고 추정할 수 있음.

- CMC>PDA에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG 중 두 균주에 공통으로 존재하는 것(소형분생포자 형성에 특이적인 유전자)은 총 130종임.
- YMA>PDA에서 2배 이상 up-regulation 된 DEG 중 두 균주에 공통으로 존재하는 것(소형분생포자 및 대형분생포자 형성에 특이적인 유전자)은 총 195종임.
- B14에서 CMC>PDA, B20에서 YMA>PDA인 DEG(두 균주 공통으로 소형분생포자 및 대형분생포자 형성에 관여하는 유전자)는 총 86종임.
- B14에서 YMA>PDA, B20에서 CMC>PDA인 DEG(두 균주 공통으로 소형분생포자 형성에 관여하는 유전자)는 총 54종임.

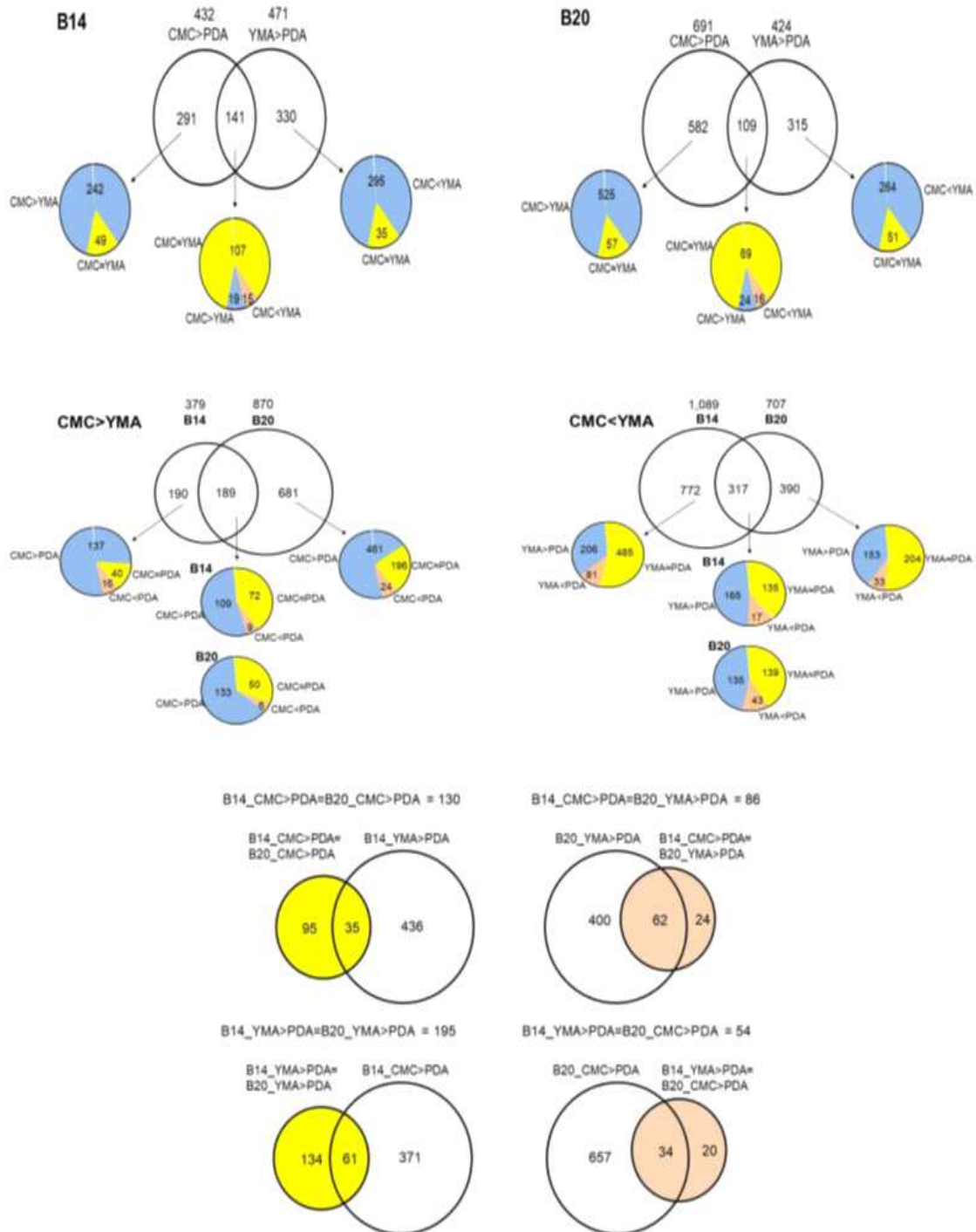


그림 1-6. *F. fujikuroi*의 병원형별 분생포자 형성 관여 DEG 집단

3) 병원형별 분생포자 형성 특이 유전자의 기능 분류

- KEGG pathway 탐색으로 분생포자 형성 특이적 관여 유전자 집단 중 일부(B14에서 30% & B20에서 35%)의 기능을 분류하였음(표 1-3).

표 1-3. *F. fujikuroi*의 병원형별 분생포자 형성 특이 후보 유전자 집단 기능 분류

| KEGG pathway | B14 | | | B20 | | |
|-----------------------|---|----------------------------|-----------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------|
| | CMC>PD A | CMC>PD A YMA>PD A | YMA>PD A | CMC>PD A | CMC>PD A YMA>PD A | YMA>PD A |
| Various metabolism | 32 | 12 | 29 steroid 7 | 67 | 16 | 36 steroid 5 |
| Amino acid metabolism | 46 G,S,T 4 V,L,I 8 Y 5 C,M 8 W 8 | 7 | 10 | 50 G,S,T 9 Y 5 C,M 4 W 3 | 5 | 9 |
| Protein degradation | 15 | 5 | 7 | 29 | 2 | 4 |
| Transporter | 4 ABC 4 | 14 ABC 10 | 6 ABC 2 | 47 | 9 | 21 |
| Secondary metabolism | 2 | 4 | 4 | 15 aflatoxin 6 | 0 | 5 |
| Regulation | 3 | 2 | 8 | 5 | 1 | 3 |
| Signal transduction | 1 | 0 | 6 | 18 | 0 | 6 |
| Transcription factor | 3 cutinase 2 | 2 | 4 | 32 cutinase 9 | 3 | 1 |
| Subtotal | 106 | 46 | 74 | 263 | 36 | 85 |

steroid: steroid biosynthesis // G,S,T,V,L,I,Y,C,M,W: 아미노산 약자 // ABC: ABC transporter
aflatoxin: aflatoxin biosynthesis // cutinase: cutinase transcription factor α or β

- B14의 CMC>PDA에서는 아미노산 대사 유전자(43%), YMA>PDA에서는 기타 대사 유전자(39%), CMC>PDA=YMA>PDA에서는 transporter 유전자(30%)가 가장 높은 빈도로 존재함. B20의 CMC>PDA는 B14와 뚜렷한 차이를 보이는데, 예를 들어 세 번째로 높은 빈도(18%)인 transporter 유전자는 B14에서 4%의 빈도로 존재하며 12% 빈도의 전사조절인자 유전자도 B14에서는 매우 낮은 3%의 빈도로 존재함. 두 병원형 균주 모두 기타 대사 유전자 중 steroid 생합성 유전자(14 ~ 24%)가 높은 빈도로 존재하고, B14의 transporter 유전자 중 대부분(71 ~ 100%)은 ABC transporter에 속함. 이를 통해 아미노산 대사, steroid 생합성, transporter 관련 유전자가 B14 분생포자 형성에 중요한 역할을 할 것이라고 추정할 수 있음.

4) 줄기마름 병원형 분생포자 형성 특이 유전자의 기능 분석

- B14에서 분생포자 형성 단계 특이적 발현 유전자(총 3종; steroid 생합성 2종 & tryptophan 생합성 1종)를 선발하였음(표 1-4). 해당 유전자의 기능 분석을 위하여 single deletion 돌연변이체를 제작한 후 여러 가지 표현형을 확인하였음.

표 1-4. *F. fujikuroi* B14의 분생포자 형성 특이 후보 유전자 집단 1

| B14 gene | PDA | CMC | YMA | Description |
|-------------|------|--------|-------|---|
| FFB14_02897 | 15.6 | 18.7 | 290.5 | Probable C-5 sterol desaturase |
| FFB14_13495 | 14.1 | 3356.4 | 1.8 | Indoleamine 2,3-dioxygenase |
| FFB14_14943 | 8.6 | 69.1 | 597.1 | 3-beta-hydroxysteroid-delta(8),delta(7)-isomerase |

○ : steroid 생합성 // □ : tryptophan 생합성

- 각 돌연변이체를 CMC에 배양하여 분생포자 양을 측정하였음(그림 1-7). 야생형 B14 대비 68% 수준으로 약간 감소한 FFB14_02897 삭제 돌연변이체를 포함해 모두 큰 변화가 없었기 때문에, 3종 유전자는 B14의 분생포자 형성에 필수적이지 않을 것이라고 추정할 수 있음.

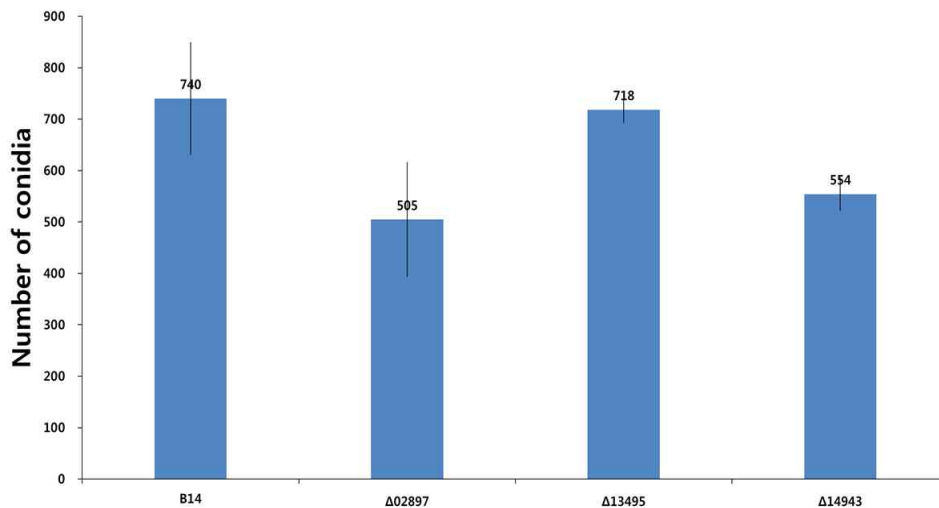


그림 1-7. *F. fujikuroi* B14 유래 유전자 삭제 돌연변이체의 분생포자 양

- 각 돌연변이체의 분생포자를 벼 유묘에 접종하여 병원성을 검정하였음(그림 1-8). FFB14_02897 삭제 돌연변이체의 경우 야생형 B14보다 뿌리 근처에 형성된 균사체 양이 다소 줄어드는 것처럼 보임.
- 서로 중복되지 않도록 B14에서 분생포자 형성 단계 특이적 발현 유전자(총 8종; ABC transporter 4종 & tryptophan 생합성 4종)를 새롭게 선택하였음(표 1-5).



그림 1-8. *F. fujikuroi*
B14 유래 유전자
삭제 돌연변이체의
병원성 검정

- 각 유전자의 발현을 CMC 조건에서 qPCR(quantitative PCR)로 정량분석하였음(그림 1-9). FFB14_04553을 제외한 7종 유전자는 균사생장 조건(PDB)과 비교했을 때 그 발현이 증가함. 이는 B14의 분생포자 형성 과정 중 tryptophan을 비롯한 아미노산 생합성 유전자와 특정 transporter 유전자가 발현되어야 한다는 것을 의미함.

표 1-5. *F. fujikuroi* B14의 분생포자 형성 특이 후보 유전자 집단 2

| B14 gene | PDA | CMC | YMA | Description |
|-------------|-----|-------|------|--|
| FFB14_00253 | 1.4 | 86.4 | 56.8 | N amino acid transport system protein |
| FFB14_04542 | 7.6 | 263.6 | 40.0 | N amino acid transport system protein |
| FFB14_04553 | 2.4 | 32.1 | 93.5 | N amino acid transport system protein |
| FFB14_09731 | 3.1 | 28.3 | 0.0 | N amino acid transport system protein |
| FFB14_01596 | 0.2 | 43.0 | 0.0 | 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase |
| FFB14_01598 | 0.4 | 201.5 | 0.8 | 2-aminomuconate deaminase |
| FFB14_08605 | 2.7 | 476.9 | 1.2 | Indoleamine 2,3-dioxygenase |
| FFB14_09921 | 2.9 | 164.1 | 3.5 | Salicylate hydroxylase |

■: ABC transporter // ■: tryptophan 생합성

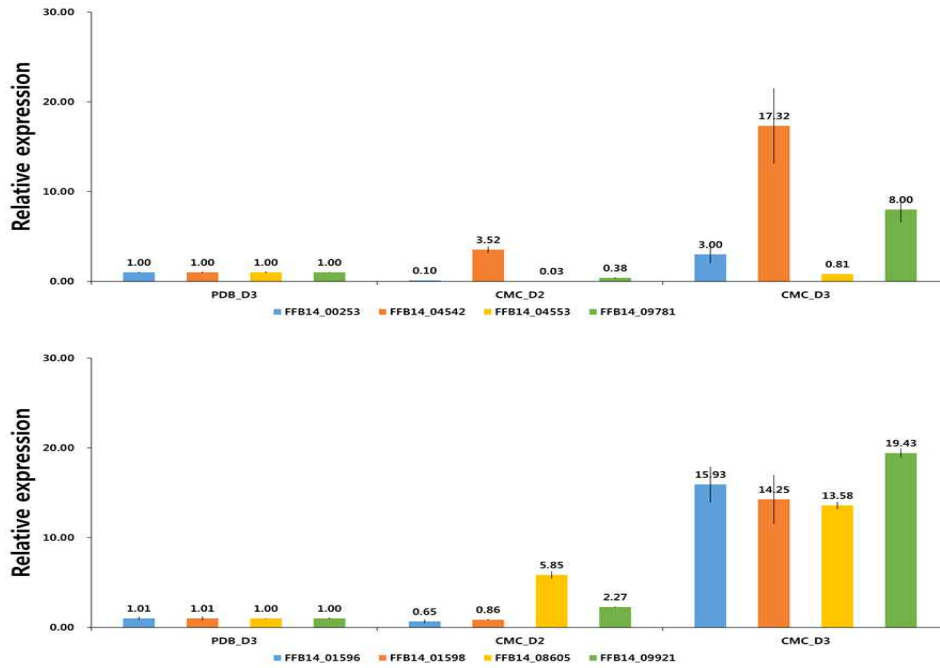


그림 1-9. *F. fujikuroi* B14의 분생포자 형성 특이 후보 유전자 발현 양상

○ *F. fujikuroi*의 병원형별 무성포자 형성 조절 유전자 집단 기능 규명

1) 병원형별 무성포자 형성 유전자 집단 내 발현 조절체계의 재검증

- 기존 모델 사상성 곰팡이에서 무성포자 형성 조절 경로에 관여하는 것으로 알려진 총 14종 유전자를 대상으로 두 병원형 균주에서의 기능과 그 조절체계를 분석하였음(실제 이 실험은 1단계 연구에서 수행되었으나 당시 해당 유전자 삭제 돌연변이체의 검증 여부, qPCR, 병원성 검정 결과의 미완성 내지 부정확함 등으로 2단계 연구에서 재검증하였음).

- B14 유래 14종 조절 유전자 삭제 돌연변이체를 CM(complete media)에 배양하여 군사생장을 관찰하였음(그림 1-10). *VeA*와 *VelB* 삭제 균주의 경우 야생형 B14와 비교했을 때 성장 속도는 느린 반면 공중균사량과 색소 생성은 증가함.

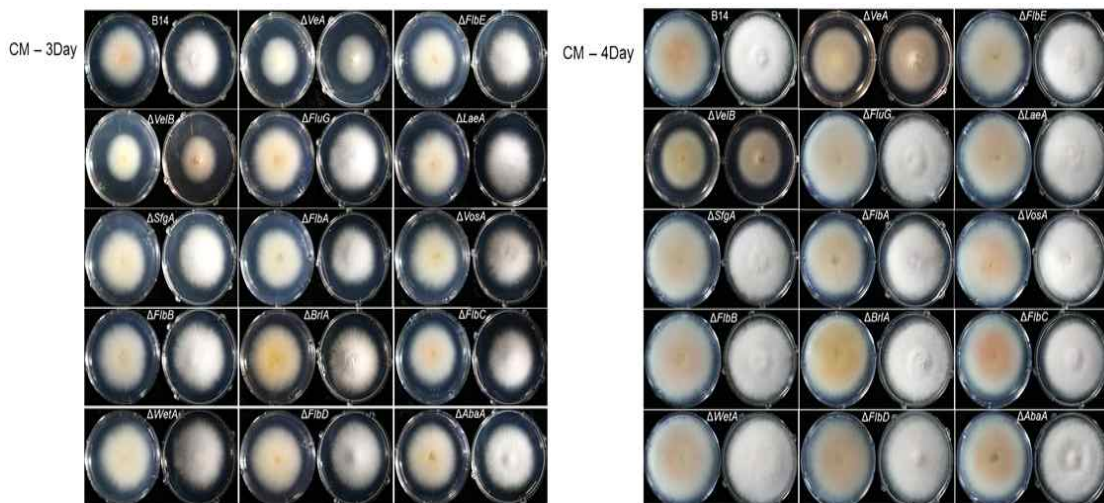


그림 1-10. *F. fujikuroi* B14 유래 포자 형성 조절 유전자 삭제 돌연변이체의 군사생장

- 두 병원형 균주 유래의 모든 무성포자 형성 조절 유전자 삭제 돌연변이체($\Delta FlbA$, $\Delta FlbB$, $\Delta FlbC$, $\Delta FlbD$, $\Delta FlbE$, $\Delta FluG$, $\Delta AbaA$, $\Delta BrlA$, $\Delta LaeA$, ΔVeA , $\Delta VelB$, $\Delta VosA$, $\Delta SfgA$, $\Delta WetA$)를 대상으로 각 유전자 발현 수준을 정량분석하였음(표 1-6). 야생형 균주(B14 또는 B20)의 *AbaA* 유전자 발현을 1로 놓았음(빨간색 표시 수치는 유전자 발현이 1/2배 이하로 감소한 것 & 파란색 표시 수치는 유전자 발현이 2배 이상으로 증가한 것).

표 1-6. *F. fujikuroi* 유래 돌연변이체의 무성포자 형성 조절 유전자 발현 수준

| DW | B14 | DFibA | DFibB | DFibC | DFibD | DFibE | DFluG | DabaA | DbriA | DlaeA | DveA | DvelB | DvosA | DsfgA | DwetA |
|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| FibA | 2.39 | 0.00 | 1.39 | 1.40 | 1.80 | 1.18 | 2.87 | 1.31 | 1.61 | 0.19 | 0.02 | 0.06 | 1.30 | 1.77 | 1.18 |
| FibB | 0.67 | 1.13 | 0.00 | 1.42 | 0.47 | 0.88 | 0.62 | 0.96 | 1.46 | 0.16 | 0.62 | 0.06 | 1.01 | 1.64 | 1.02 |
| FibC | 0.81 | 0.89 | 1.36 | 0.00 | 0.58 | 1.14 | 0.70 | 1.37 | 1.10 | 0.17 | 0.49 | 0.03 | 1.26 | 1.02 | 0.95 |
| FibD | 0.99 | 1.48 | 2.40 | 1.65 | 0.00 | 2.17 | 1.13 | 2.09 | 1.63 | 0.35 | 0.84 | 0.07 | 2.04 | 1.58 | 1.85 |
| FibE | 0.75 | 1.11 | 0.88 | 1.07 | 0.39 | 0.00 | 0.66 | 0.87 | 1.26 | 0.14 | 0.46 | 0.03 | 1.01 | 1.33 | 0.86 |
| FluG | 0.81 | 0.94 | 0.99 | 1.16 | 0.51 | 1.06 | 0.00 | 0.74 | 1.44 | 0.15 | 0.78 | 0.04 | 1.07 | 1.88 | 1.15 |
| abaA | 1.00 | 0.82 | 0.78 | 0.97 | 0.81 | 0.86 | 1.48 | 0.00 | 1.28 | 0.10 | 0.55 | 0.03 | 0.92 | 1.34 | 0.80 |
| brlA | 1.14 | 0.70 | 0.82 | 0.85 | 0.73 | 0.81 | 2.36 | 0.84 | 0.00 | 0.15 | 0.40 | 0.04 | 1.09 | 1.26 | 0.86 |
| laeA | 0.11 | 0.56 | 0.30 | 0.65 | 0.07 | 0.55 | 0.07 | 0.34 | 0.84 | 0.00 | 0.22 | 0.02 | 0.41 | 0.95 | 0.57 |
| veA | 1.34 | 0.88 | 1.34 | 1.00 | 0.86 | 0.99 | 1.40 | 1.17 | 1.09 | 0.13 | 0.00 | 0.05 | 1.21 | 1.15 | 0.86 |
| velB | 3.82 | 0.84 | 1.85 | 0.84 | 1.23 | 1.39 | 2.23 | 1.73 | 1.29 | 0.19 | 1.38 | 0.00 | 1.63 | 1.53 | 1.22 |
| vosA | 0.69 | 0.60 | 0.59 | 0.62 | 0.42 | 0.54 | 0.61 | 0.67 | 0.92 | 0.08 | 0.32 | 0.02 | 0.00 | 0.99 | 0.54 |
| sfgA | 1.13 | 0.50 | 0.62 | 0.53 | 0.36 | 0.41 | 0.56 | 0.53 | 0.68 | 0.06 | 0.31 | 0.02 | 0.58 | 0.00 | 0.53 |
| wetA | 1.48 | 0.54 | 0.83 | 0.60 | 0.78 | 1.01 | 1.77 | 0.86 | 1.15 | 0.16 | 0.95 | 0.06 | 1.05 | 1.32 | 0.00 |

| YK | B20 | DFibA | DFibB | DFibC | DFibE | DFluG | DabaA | DlaeA | DveA | DvelB | DvosA | DwetA |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| FibA | 1.27 | 0.00 | 1.74 | 7.61 | 2.59 | 3.11 | 0.30 | 5.81 | 7.68 | 6.45 | 2.01 | 0.53 |
| FibB | 8.86 | 6.50 | 0.00 | 11.90 | 10.25 | 9.67 | 2.40 | 9.92 | 7.84 | 10.12 | 5.71 | 3.99 |
| FibC | 3.66 | 0.62 | 3.70 | 0.00 | 2.31 | 0.97 | 0.06 | 0.47 | 0.98 | 0.76 | 0.28 | 0.13 |
| FibD | 29.12 | 7.58 | 14.38 | 49.02 | 5.61 | 37.93 | 2.08 | 23.09 | 5.44 | 12.86 | 12.98 | 1.88 |
| FibE | 0.88 | 0.16 | 0.38 | 2.77 | 0.00 | 0.14 | 0.08 | 0.25 | 0.66 | 0.28 | 0.19 | 0.07 |
| FluG | 0.30 | 0.07 | 0.18 | 0.57 | 0.49 | 0.00 | 0.13 | 0.08 | 0.54 | 0.05 | 0.03 | 0.01 |
| abaA | 1.00 | 0.93 | 2.51 | 2.26 | 1.30 | 0.36 | 0.00 | 0.25 | 1.40 | 0.25 | 0.08 | 0.23 |
| brlA | 5.76 | 0.17 | 0.64 | 14.18 | 0.64 | 1.63 | 0.17 | 0.23 | 0.79 | 0.57 | 0.17 | 0.03 |
| laeA | 0.28 | 0.01 | 0.08 | 1.01 | 0.50 | 0.92 | 0.14 | 0.00 | 0.26 | 0.03 | 0.01 | 0.01 |
| veA | 5.39 | 2.38 | 3.65 | 82.32 | 1.08 | 1.96 | 1.39 | 2.85 | 0.00 | 4.00 | 1.54 | 0.58 |
| velB | 0.87 | 0.10 | 0.58 | 4.91 | 0.71 | 0.34 | 0.14 | 0.23 | 0.67 | 0.00 | 0.10 | 0.18 |
| vosA | 5.06 | 0.41 | 0.68 | 7.81 | 0.56 | 0.58 | 0.04 | 0.42 | 0.43 | 0.64 | 0.00 | 0.02 |
| sfgA | 0.08 | 0.13 | 0.04 | 0.54 | 0.65 | 0.08 | 0.19 | 0.05 | 0.49 | 0.05 | 0.01 | 0.02 |
| wetA | 1.71 | 0.38 | 2.40 | 2.52 | 1.73 | 1.13 | 0.04 | 0.28 | 0.92 | 1.72 | 0.15 | 0.00 |

- B14 유래 돌연변이체의 유전자 발현 양상 비교를 위한 heatmap을 작성하였음(그림 1-11). *VosA*, *AbaA*, *BrlA*, *VeA*, *WetA*, *FlbA*, *SfgA*는 하나의 그룹으로 묶일 수 있으며, *FluG*, *FibE*, *FibC*, *FibB*, *FibD* 그룹, *VelB*와 *LaeA* 그룹 등 총 3개 그룹으로 나뉨.

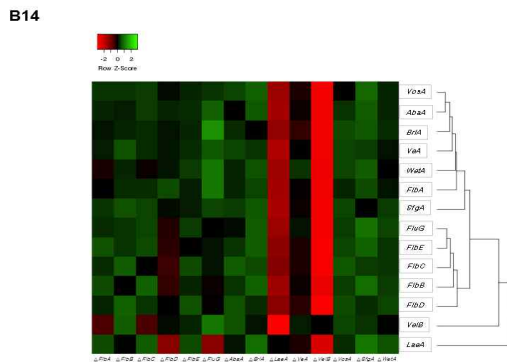


그림 1-11. *F. fujikuroi* B14 유래 돌연변이체의 무성포자 형성 조절 유전자 발현 기반 heatmap

- B20 유래 돌연변이체의 유전자 발현 양상 비교를 위한 heatmap을 작성하였음(그림 1-12). *LaeA*와 *FluG*는 하나의 그룹으로 묶일 수 있으며, *VelB*, *FlbE*, *VosA*, *WetA*, *FlbC*, *AbaA* 그룹, *VeA*, *FlbA*, *FlbB* 그룹 등 총 3개 그룹으로 나뉨.

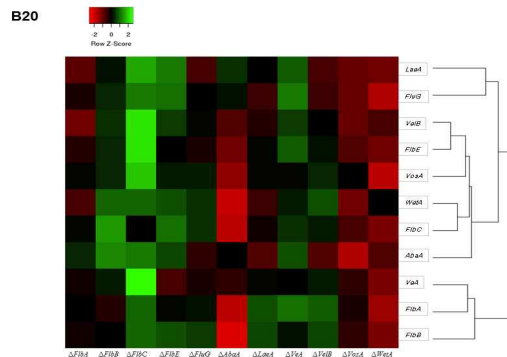


그림 1-12. *F. fujikuroi* B20 유래 돌연변이체의 무성포자 형성 조절 유전자 발현 기반 heatmap

- B14의 무성포자 형성 관련 유전자 발현 조절 체계를 qPCR, heatmap 분석 결과를 바탕으로 작성하였음(그림 1-13). 유전자삭제 돌연변이체의 무성포자 생성 표현형 변화를 바탕으로 B14의 무성포자 생성에 직접 관여하는 *AbaA*와 *WetA* 유전자는 무성포자 생성 조절체계 중 “Central regulatory pathway”에 속한다고 할 수 있으며, 이들 유전자의 발현도 비슷한 양상을 보였음. 그리고 *FlbA*, *FlbB*, *FlbC*, *FlbD*, *FlbE*, *FluG*, *SfgA* 유전자는 서로 비슷한 발현 양상을 보이며 *WetA* 유전자의 발현을 조절하였기 때문에 “Upstream regulatory pathway”에 속하는 조절인자로 묶을 수 있음. 한편, 이미 다른 곰팡이에서 “Global regulator”로 알려진 *LaeA*, *VeA*, *VelB* 유전자도 발현 양상에 의해 한 그룹으로 묶일 뿐 아니라 upstream regulatory pathway 유전자의 발현을 조절하기 때문에 가장 상위에서 포자 형성을 조절하는 유전인자임을 확인할 수 있었음.

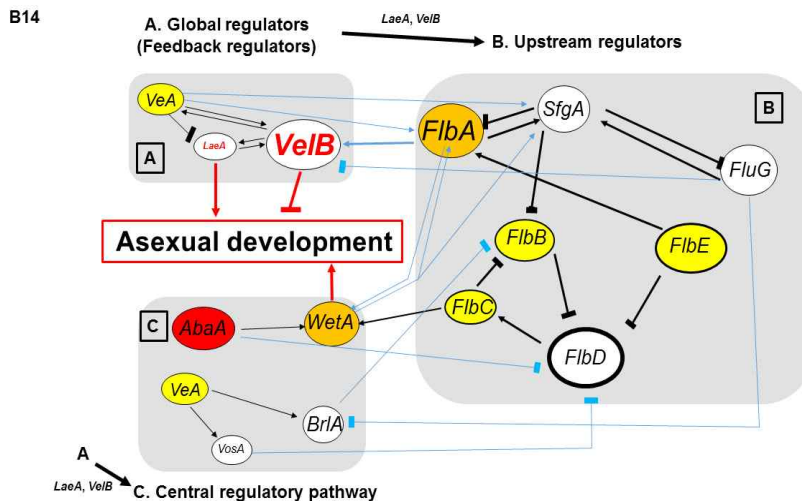


그림 1-13. *F. fujikuroi* B14 유래 무성포자 형성 유전자의 발현 조절체계

2) 병원형별 무성포자 형성 조절 유전자 집단의 병원성 관련 기능 분석

- B14와 B20에서 무성포자 형성 조절에 관여하는 총 14종의 *fluffy* 계열 전사조절인자, central regulator, global regulator 유전자들의 병 발생 과정 조절 여부 검정을 위하여 해당 유전자의 삭제돌연변이체(1단계와 2단계 1년차 연구 참조)를 2회에 걸쳐 벼 유묘에 접종한 후 병징의 변화를 분석하고 벼에서 RNA를 추출하여 fumonisin 또는 gibberellin 생합성 관련 유전자의 발현을 qPCR로 정량분석하였음(그림 1-14, 1-15, 1-17, 1-18).

- B14 유래 돌연변이체 중, 2회의 병원성 검정에서 모두 야생형과 달리 줄기마름 증상을 일으키지 못하는 것은 *FlbA*, *AbaA*, *WetA*, *VeA*, *VelB* 삭제 돌연변이체이며, 1회 검정에서만 병징을 일으킨 것은 *BrlA*와 *VosA* 삭제 돌연변이체였음(표 1-7). 이러한 결과 중 1단계의 병원성 검정과 비교하여 일치하는 것은 *AbaA*, *BrlA*, *VeA*, *VelB* 삭제 돌연변이체임. 이를 바탕으로 *FlbA*, *AbaA*, *BrlA*, *WetA*, *VeA*, *VelB*, *VosA* 유전자는 B14에 의한 벼의 줄기마름 증상 발생에 관여한다고 추정할 수 있음.

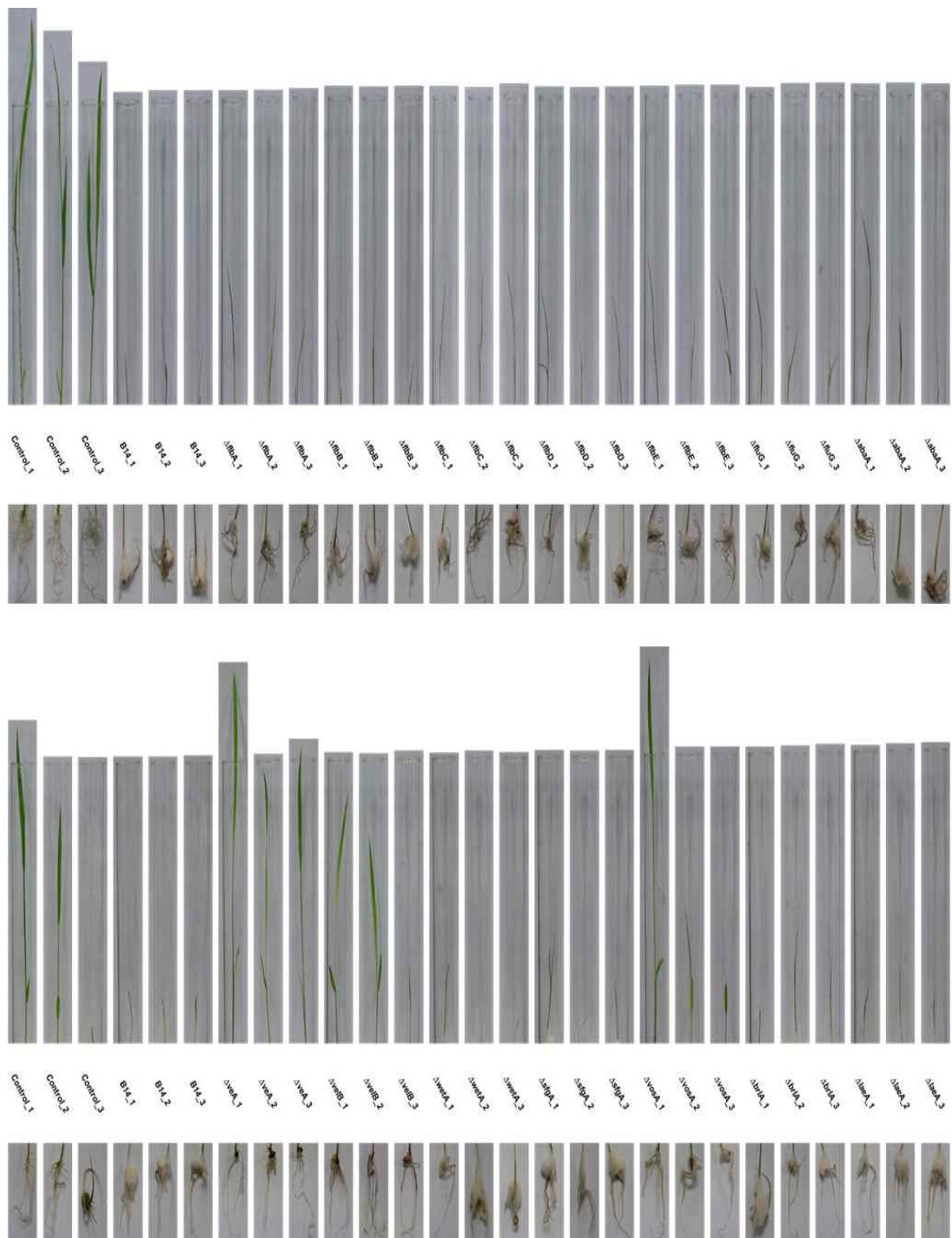


그림 1-14. *F. fujikuroi* B14 유래 돌연변이체의 병원성 검정

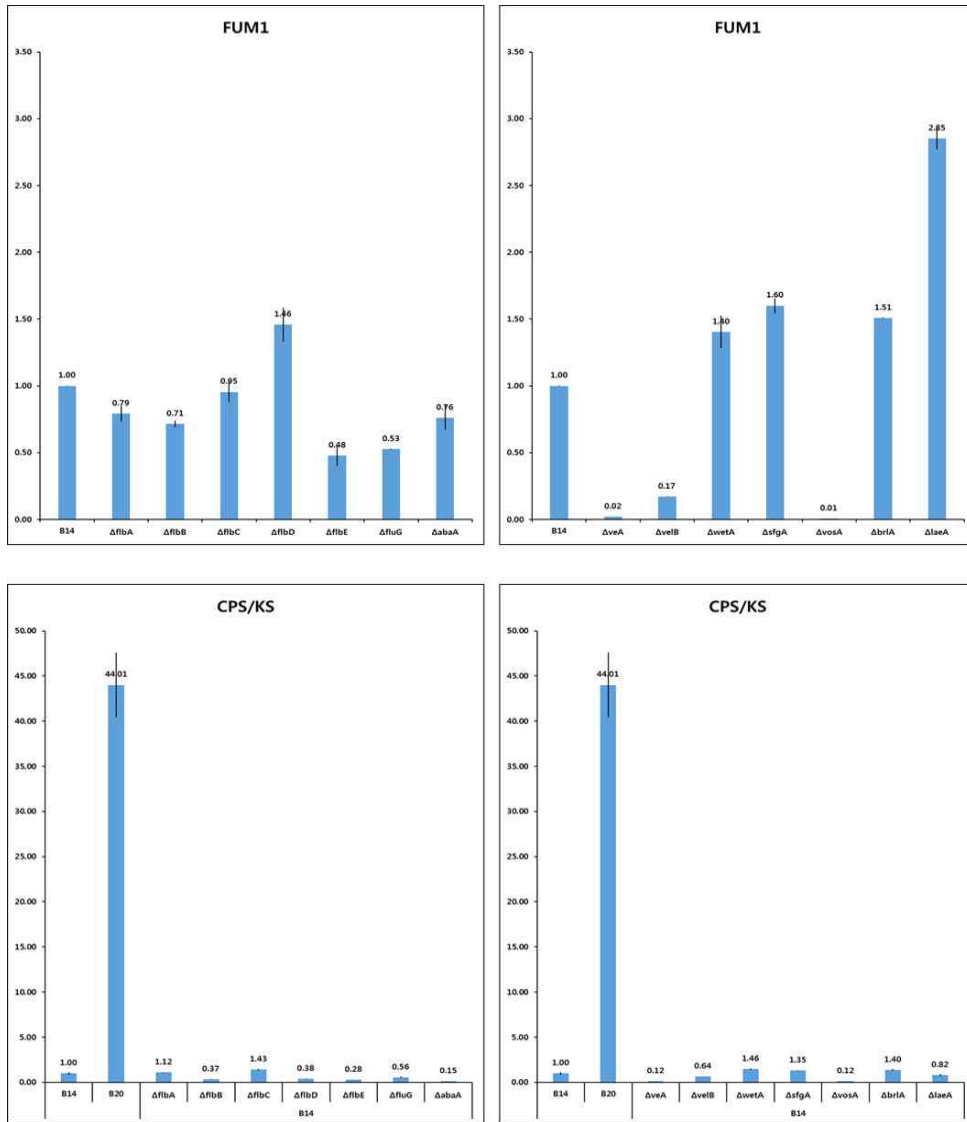


그림 1-15. *F. fujikuroi* B14 유래 돌연변이체의 유전자 발현 양상

표 1-7. *F. fujikuroi* 무성포자 조절 유전자 삭제 돌연변이체의 병원성

| 접종원 | 8 days | | 17 days | | 접종원 | 8 days | |
|--|--------|-------|---------|-------|---------------|--------|------|
| | 1 차 | 2 차 | 1 차 | 2 차 | | 1 차 | 2 차 |
| water | - | - | - | - | water | - | - |
| B14 | +++++ | - | +++++ | +++++ | B20 | xx | xxx |
| Upstream regulatory pathway 소속 유전자 (<i>fuffy</i> 유전자) | | | | | | | |
| $\Delta FtbA$ | - | - | - | - | $\Delta FtbA$ | - | xx |
| $\Delta FtbB$ | ++ | ++++ | +++++ | +++++ | $\Delta FtbB$ | - | xx |
| $\Delta FtbC$ | ++++ | - | +++++ | +++++ | $\Delta FtbC$ | - | +++ |
| $\Delta FtbD$ | +++ | - | +++++ | +++++ | $\Delta FtbD$ | x | ++ |
| $\Delta FtbE$ | ++++ | - | +++++ | +++++ | $\Delta FtbE$ | - | xxx |
| $\Delta FluG$ | +++ | ++ | +++++ | +++++ | $\Delta FluG$ | - | +++ |
| $\Delta SfgA$ | +++++ | +++++ | +++++ | +++++ | $\Delta SfgA$ | - | +++ |
| Central regulatory pathway 소속 유전자 | | | | | | | |
| $\Delta AbaA$ | - | - | - | - | $\Delta AbaA$ | x | xxxx |
| $\Delta WetA$ | - | - | - | - | $\Delta WetA$ | ++ | +++ |
| $\Delta BriA$ | + | - | +++ | - | $\Delta BriA$ | ++ | xxx |
| Global regulator 유전자 | | | | | | | |
| ΔVeA | - | - | - | - | ΔVeA | x | xxx |
| $\Delta VelB$ | - | - | - | - | $\Delta VelB$ | +++ | xxx |
| $\Delta VosA$ | ++ | - | +++++ | - | $\Delta VosA$ | xx | +++ |
| $\Delta LaeA$ | ++ | ++++ | +++++ | +++++ | $\Delta LaeA$ | ++ | +++ |

+ : 줄기마름 증상 // x : 키다리 증상 // - : 병징 없음

- 한편, B14의 주요 병원성 인자로 알려진 fumonisin 독소의 생합성을 조절하는 전사조절인자인 *FUM21* 유전자의 발현이 각 유전자 삭제돌연변이체에서 억제되는지를 검정하기 위하여 YES 배지에서 5일간 배양한 돌연변이체의 균체로부터 total RNA를 추출하여 qPCR을 수행하였음 (그림 1-16).

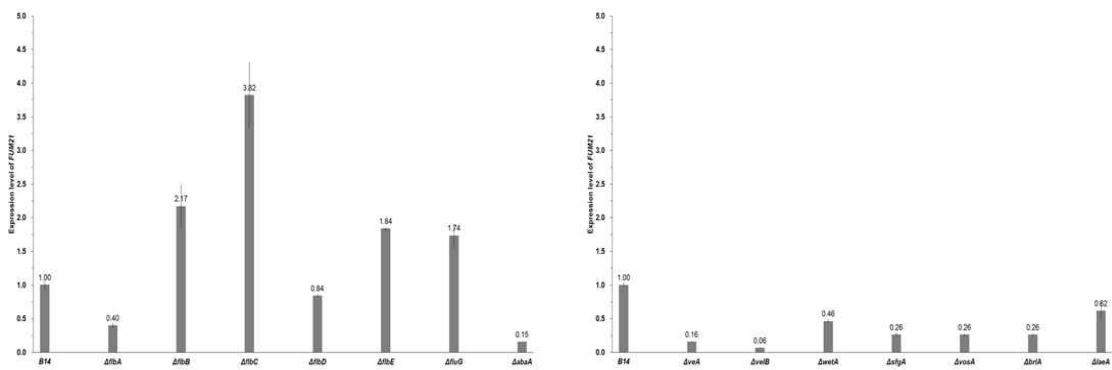


그림 1-16. *F. fujikuroi* B14 유래 유전자삭제 돌연변이체 내 *FUM21*의 발현 비교

- *AbaA*, *VeA*, *VelB* 삭제 돌연변이체의 경우, *FUM21* 유전자의 발현 수준은 B14 모균주와 비교하여 6~16% 수준으로 매우 감소하였음. 또한, *VosA*, *BrlA* 삭제 돌연변이체의 경우, 26% 수준, *FibA*, *WetA* 삭제 돌연변이체의 경우 40~46% 수준으로 감소하였음. 이러한 유전자 삭제 돌연변이체의 경우, 벼 유묘에 대한 병원성이 대폭 감소하였기 때문에 이들 유전자는 B14 균주에서 무성 포자의 생성 조절뿐 아니라 fumonisin 생합성을 조절함으로써 병원성에 깊이 관여함을 알 수 있었음. 이에 반해 다른 *fluffy* 유전자(*FibB*, *FibC*, *FibD*, *FibE*, *FluG*)와 *LaeA* 유전자 삭제 돌연변이체 내 *FUM21*의 발현 수준은 B14와 비교하여 2배 이하로 증감하였기 때문에 이들 유전자는 fumonisin 생합성 조절에 크게 관여하지 않는 것으로 판단됨. 또한, 이들 유전자의 삭제 돌연변이체들은 모두 B14와 비슷한 수준의 줄기마름증상을 나타냈기 때문에 병원성에 관여하지 않는 것으로 추정할 수 있음. 이를 통해 *F. fujikuroi*의 줄기마름 병원형 균주인 B14에서 fumonisin은 주요 병원성 인자임이 다시 한번 확인되었음. 하지만 병원성 검정과 *FUM21* 유전자 발현 사이 차이를 보인 예외적인 유전자는 *SfgA*로서, *SfgA* 삭제 돌연변이체는 벼 유묘에 B14 수준 또는 그보다 더 심한 줄기마름 증상을 일으켰으나, *FUM21*의 발현은 B14의 26% 수준에 그쳤음.

- 한편, B20 유래 유전자 삭제돌연변이체의 병원성 검정 결과는 1차와 2차시기 사이에 차이가 커 신뢰할 만한 결론을 얻기 어려웠음(표 1-7, 그림 1-17). 1차 검정의 경우, 여러 돌연변이체가 전형적인 키다리 증상을 일으키지 않았으나, 2차 검정에서 같은 결과를 얻지 못하였음. 하지만 흥미롭게도 1차 검정 시 비병원성을 보인 돌연변이체 중 일부는 2차 검정 시 키다리 증상을 일으키지 않았으나 오히려 B14와 같은 줄기마름 증상을 일으켰음. 추가적인 병원성 검정으로 확인이 필요하지만 줄기마름 증상을 키다리 증상이 아닌 비병원성 증상으로 간주할 경우, *FibC*, *FibD*, *FluG*, *SfgA*, *WetA*, *VosA*, *LaeA* 유전자는 B20 균주의 키다리 증상 발생을 조절하는 것으로 추정할 수 있음. 또한, B14 균주에서 줄기마름증상 발생에 관여한 *FibA*, *AbaA*, *VeA*, *VelB* 유전자는 B20에서 키다리증상 발생에 관여하지 않은 것으로 추정할 수 있음. 이들 유전자에 의한 B20 균주의 병원성 인자인 gibberellin 생합성 유전자의 조절 여부는 추후 분석할 필요가 있음.

- 흥미롭게도 B20 유래 *LaeA* 삭제 돌연변이체의 경우 오히려 fumonisin 생합성 유전자의 발현이 야생형 B14와 비슷한 수준으로 증가하였음(그림 1-18). 이를 통하여 *LaeA* 유전자가 두 가지 병원형 중 하나를 결정하는 데 주요 인자로 작용할 것으로 추정할 수 있음. 추후 B20 균주 내 *LaeA* 유전자 삭제가 아닌 *FUM21* 전사조절인자의 과발현을 통해 fumonisin 생합성 유전자군의 활성과 fumonisin 생성량 증가를 유도한 후 해당 B20 균주의 병원형 변화 (키다리형 → 줄기마름형) 여부를 분석할 필요가 있음. 한편 B14 또는 B20 균주 내 fumonisin 과 gibberellin 동시 과생성을 유도한 후 균주의 병원형 변화 여부 분석도 필요함.

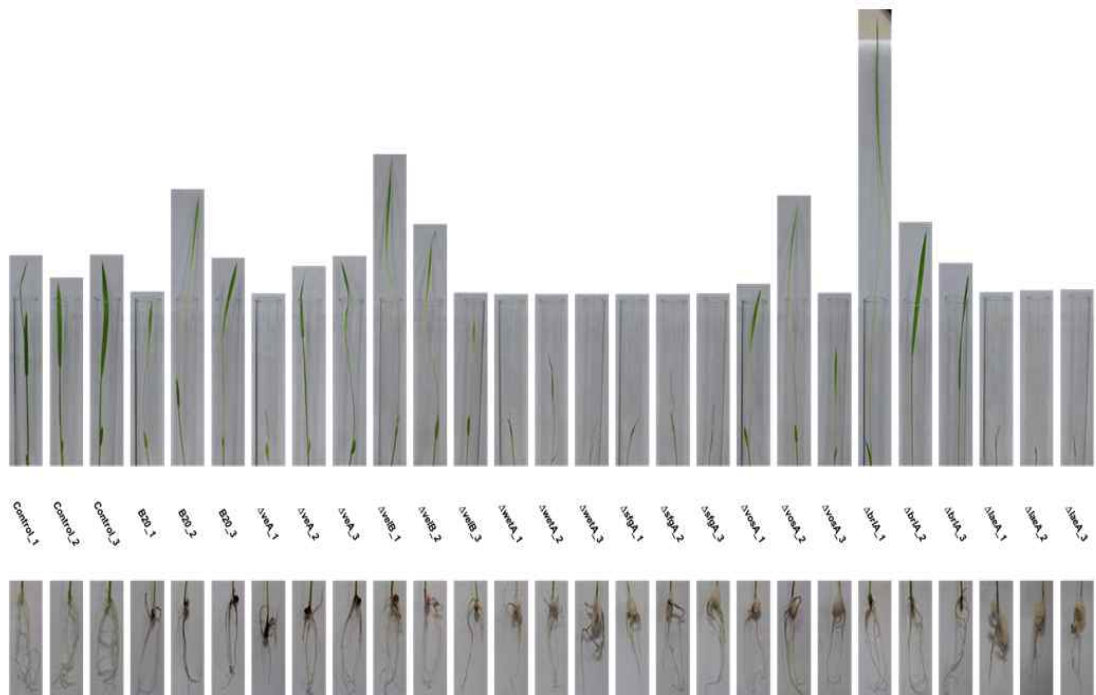
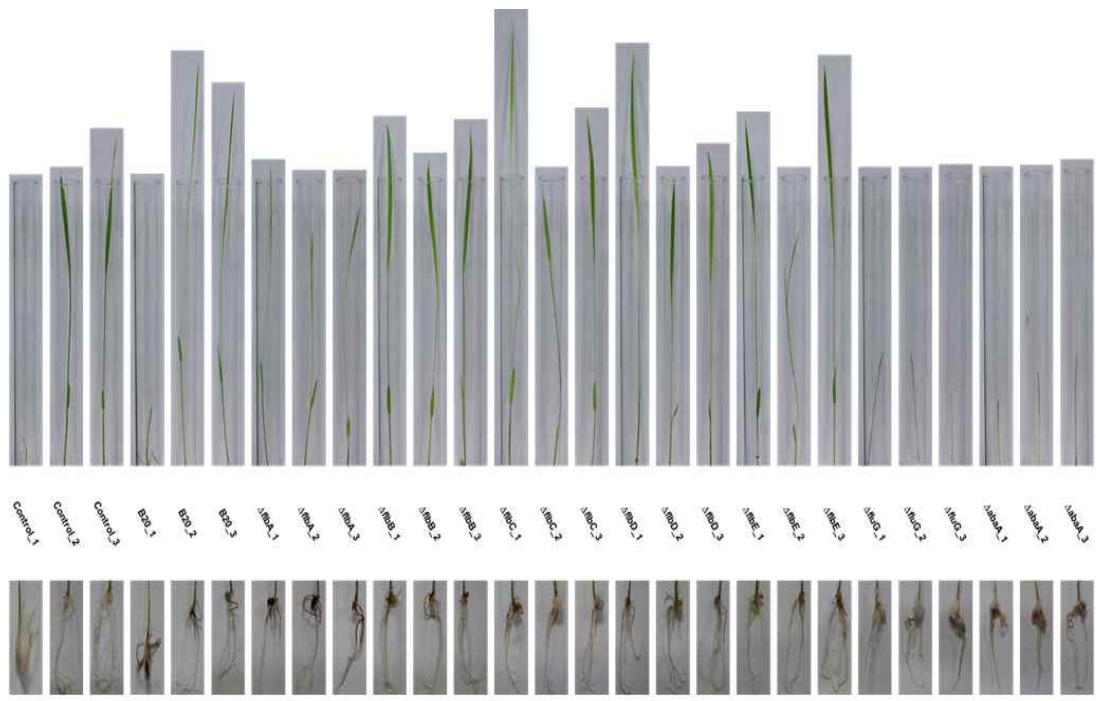


그림 1-17. *F. fujikuroi* B20 유래 돌연변이체의 병원성 검정

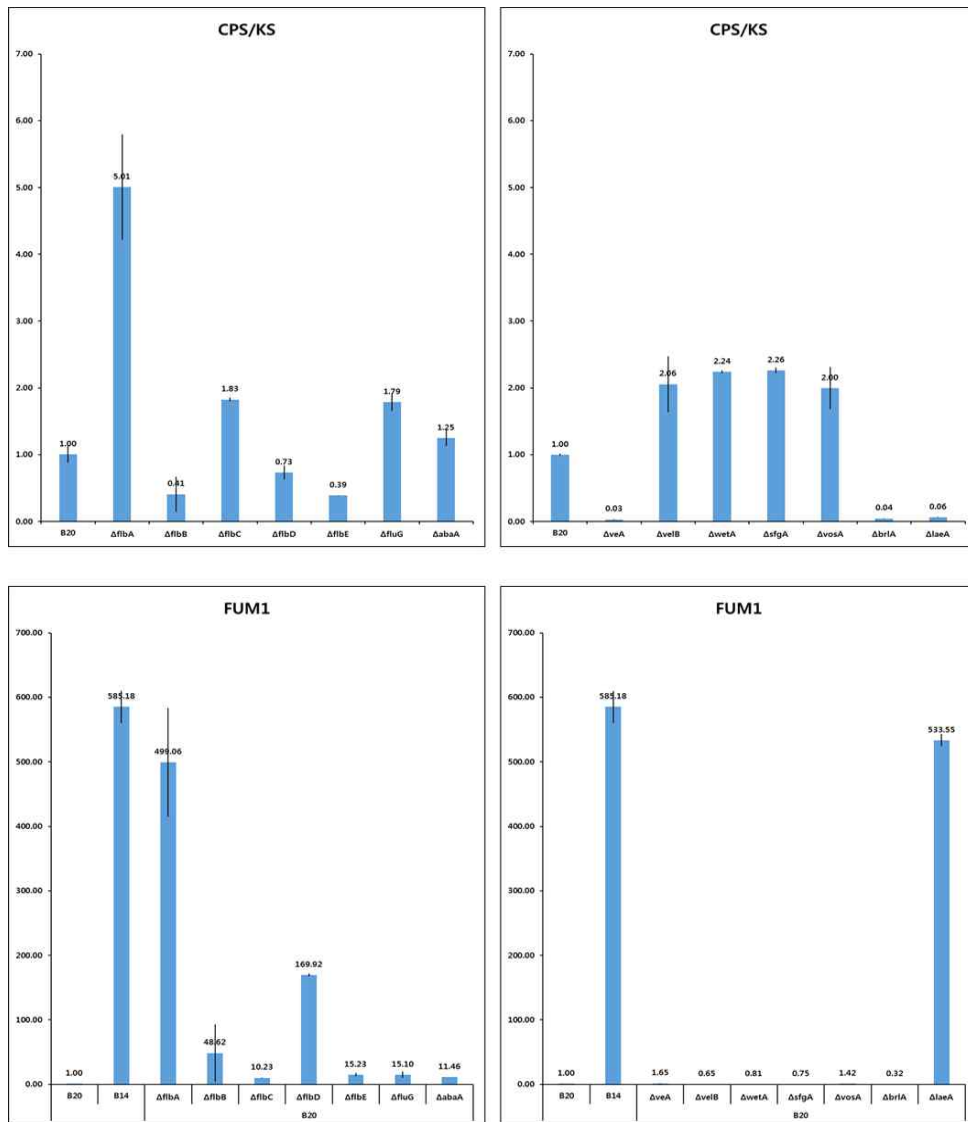


그림 1-18. *F. fujikuroi* B20 유래 돌연변이체의 유전자 발현 양상

○ *F. fujikuroi*의 병원형별 초파리(*Drosophila melanogaster*)에 대한 병원성 검정

- 순천향대 김기영 교수 연구진과 협력 연구를 통하여 *F. fujikuroi*를 포함한 *Fusarium* 속 주요 종 곰팡이의 초파리에 대한 병원성 검정을 수행하였음.

- *F. fujikuroi* B14와 B20 균주 뿐 아니라 토종 붉은곰팡이 종(*F. bothii*)과 북미산 붉은곰팡이 종(*F. graminearum*), 사람에게 피부나 안과 질환을 일으킨다고 알려진 *F. oxysporum*, *F. solani*의 분생 포자 현탁액을 초파리의 가슴 또는 복부에 그림 1-19와 같이 주사한 후 25일차까지 생존율을 조사하였음.

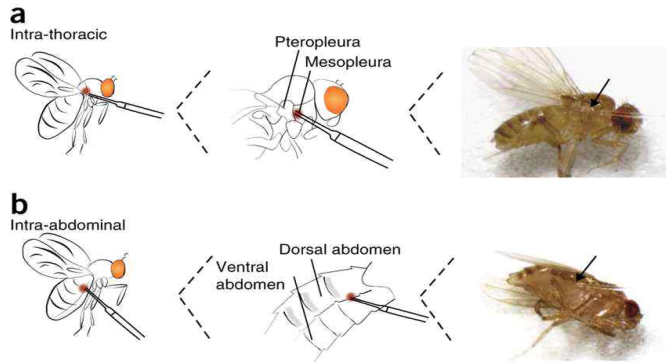


그림 1-19. *Fusarium* 곰팡이 분생포자 현탁액을 이용한 초파리 접종 방법

- 홍미롭게도 실험 대상 *Fusarium* 곰팡이 중 *F. fujikuroi* B14가 가장 심한 병원성을 보였음. B14 균주 접종 초파리 집단인 경우, 접종 1일 이후부터 접종 부위의 괴사와 함께 급격한 생존 감소율(약 50% 치사)을 보였으며, 22일 이후 모든 초파리가 죽었음(그림 1-20). 한편, *F. oxysporum*과 *F. solani* 접종 초파리 집단의 경우, 접종 1일 이후 약 30 ~ 40%의 치사율을 보였음. 하지만 *F. fujikuroi* B20과 붉은곰팡이의 경우, 접종 부위에 특별한 변화가 없었으며 25일까지 뚜렷한 생존 감소율도 보이지 않았음(그림 1-20).

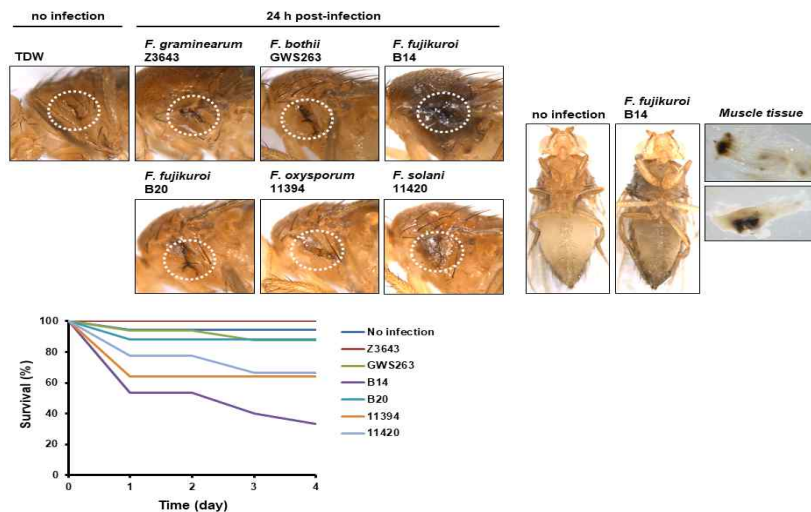


그림 1-20. *Fusarium* 곰팡이의 접종에 의한 초파리의 감염과 치사율

- 벼에 대한 *F. fujikuroi* B14 균주의 주요 병원성 인자인 fumonisin 독소가 초파리에서도 비슷한 병원성 인자로 작용하는지 검정하기 위하여 fumonisin만 초파리에 접종하였음(그림 1-21). Fumonisin 표준시약(100ppm)을 1/10, 1/100로 희석하여 접종하였을 경우, B14 곰팡이 접종의 경우와 비슷하게 초기 급속한 생존을 감소를 보였음. 이를 통해 fumonisin 독소가 초파리에서 급성독성(심장마비 등)을 야기하는 것으로 추정됨. 향후 B14 감염 초파리 체내 fumonisin 생합성 유전자의 발현 여부 검정이 필요함.

- GFP로 labeling 된 B20과 B14 균주를 초파리에 접종한 후 20일 뒤 관찰 결과, 그림 1-21과 같이 B20과 B14 접종 초파리에서 모두 형광을 관찰할 수 있었음. 이를 통해 B20 균주의 경우 초파리의 생존에 큰 영향을 주지 않으면서 초파리 생체 내 생장이 가능한 것으로 추정됨. 또한 fumonisin을 생성하지 않는 B20 균주가 초파리의 면역계를 회피할 수 있는지에 대한 추정도 가능함.

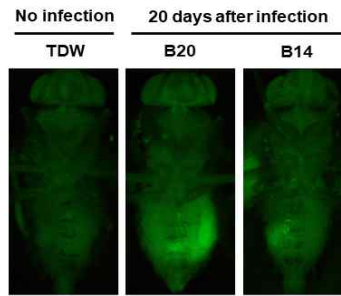
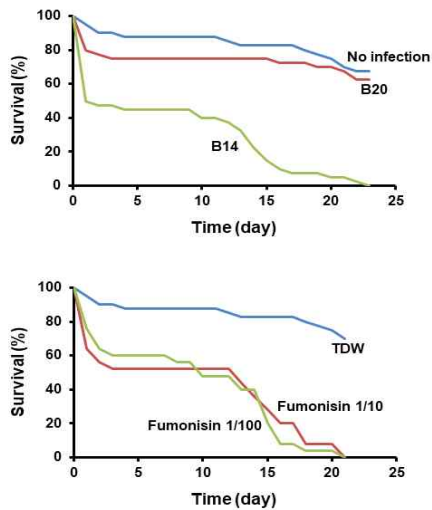


그림 1-21. B14와 B20 균주 접종 후 치사율(왼쪽 위 그래프)과 fumonisin 단독 접종 후 치사율(왼쪽 아래 그래프), GFP labeling B14와 B20 균주의 접종 후 20일 뒤 초과리 내 형광 관찰(오른쪽 그림)

○ 벼 재배 지역 내 *Fusarium* 곰팡이 집단의 분포 규명

- 총 3차례(2018. 08. 14, 09. 05, 09. 28)에 걸쳐 충남 아산시 소재 벼 재배지역의 공기 중(Air), 벼 이삭(G), 흙(S), 논물(W)등으로부터 *Fusarium* 곰팡이를 채집하였음(그림 1-22). *Fusarium* 균주의 genomic DNA를 추출하여 TEF 유전자 증폭 및 염기서열 비교·분석을 바탕으로 종을 동정하였음.
- 토양에서는 일정수의 *Fusarium*이 발견되지만, 공기 중에서는 9월 5일 채집 당시 25개의 *Fusarium*이 포집되어 다른 시기보다 공기 중에 많이 분포함을 알 수 있었음.

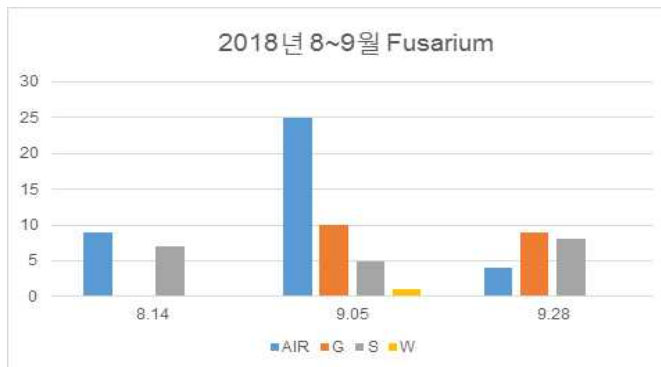


그림 1-22. 2018년 8~9월 동안 채집한 *Fusarium* 곰팡이의 수

- 채집 시기별, 부위별로 나눠 종 동정을 실시하였음(그림 1-23). 공기 중에서는 항상 *F. incarnatum-equiseti* complex가 많이 나오며 *F. fujikuroi* 균주도 꾸준히 채집되었음. 벼 이삭에서도 *F. incarnatum-equiseti* complex가 많이 나오며 *F. fujikuroi*, *F. graminearum* complex 균주들이 주로 발견되었음. 토양에는 *F. oxysporum* complex 균주가 많이 분포하였음.

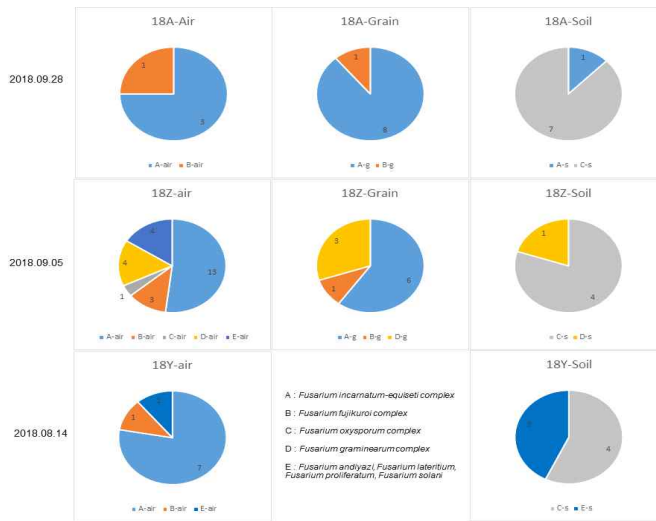


그림 1-23. 2018년 8~9월 동안 채집한 *Fusarium* 곰팡이의 종 분포

○ *Fusarium* 병원균의 공기전반 관련 유전자 집단의 기능 및 조절체계 분석

1) 붉은곰팡이 (*F. graminearum* 중복합체) 집단 내 무성포자 형성 관련 유전자의 기능 변이 분석
 - 토종 *F. graminearum* 중복합체 소속 균주와 북미산 균주 사이 가장 큰 변이를 보인 균학적 형질은 유성생식, 공중균사 성장, 무성포자 형성이었음.

- 균사생장 및 무성포자 생성 조건에서 배양한 북미산 *F. graminearum* Z3643 과 토종 *F. asiaticum* SCKO4 균주로부터 추출한 전사체의 비교 분석 결과, 사상성 곰팡이와 방선균 등에서 공중균사와 포자 생성에 관여하는 단백질 중 하나인 hydrophobin 유전자의 발현 양상에 차이가 있음을 확인하였음.

2) *F. graminearum*에서 hydrophobin 유전자의 기능 규명

- Hydrophobins은 자낭균이 생성하는 양친매성(amphiphilic)의 단백질로서 물-공기와 같은 친수성-소수성 표면에서 포자나 균사가 물로부터 공기 중으로 자랄 때 보호하는 역할을 함. 현재 *F. graminearum* 유전체에서 총 5종의 hydrophobin 유전자가 동정되었으며, 모두 N-terminal signal peptide와 약 8개의 보존된 시스테인을 가지고 있는 것이 특징임. 이러한 hydrophobin은 소수성 패턴과 여러 생물학적 특징에 의해 Class-I 과 Class-II로 나뉨(그림 1-24).



그림 1-24.
Hydrophobin
단백질의 특징 (A)
염기서열 정렬; (B)
시스테인 모티프의
반복 구조

B

| Name | Cysteine motif | Class |
|--------------------|--|-----------|
| FgHyd1(FGSG_01763) | X ₁₇ CX ₇ CCX ₉ CX ₁₁ CX ₅ CCX ₈ | Class- I |
| FgHyd2(FGSG_01764) | X ₆₉ CX ₁₂ CX ₆ CCX ₉ CX ₅ CX ₅ CCX ₈ C | Class- I |
| FgHyd3(FGSG_09066) | X ₂₉ CX ₇ CCX ₅ CX ₈ CX ₅ CCX ₁₆ C | Class- I |
| FgHyd4(FGSG_03960) | X ₁₉ CX ₇₃ CX ₇ CCX ₃₂ CX ₈ CX ₇ CCX ₁₂ C | Class- I |
| FgHyd5(FGSG_01831) | X ₂₉ CX ₈ CCX ₁₁ CX ₁₆ CX ₈ CCX ₁₀ C | Class- II |

3) *F. graminearum* 야생형 (WT) Z3643 균주에서 hydrophobin 유전자의 발현 양상
- 영양생장과 유성생식 단계에서 hydrophobin 유전자의 발현 양상을 알아보기 위하여 Z3643 균주를 각각 CM과 당근 고체배지에서 3, 5, 7일 동안 배양한 후 균체와 자낭각으로부터 total RNA를 추출하여 cDNA로 합성한 후, 각 hydrophobin 유전자의 상대적인 발현량을 qRT-PCR을 이용하여 분석함(그림 1-25).

- CM 고체배지의 영양생장 단계와 당근배지의 유성생식 단계에서 *FgHyd1*, *FgHyd2*, *FgHyd3*이 상대적으로 높게 발현되었으며, 당근배지의 영양생장 단계에서는 *FgHyd2*, *FgHyd3*의 발현이 상대적으로 높았음. CM 액체배지, CMC 액체배지, YMA 고체배지 내 균사에서는 *FgHyd3*를 제외한 4개의 *FgHyd* 유전자가 발현되는 것을 볼 수 있었고, CM 액체배지, CMC 액체배지 내 포자에서는 hydrophobin 유전자의 발현이 거의 없음을 알 수 있음. 반면에 YMA 고체배지에서 생성되는 공중균사에서는 시간이 지남에 따라 모든 유전자가 발현됨을 알 수 있었음. 이러한 결과를 통해 hydrophobin 유전자가 공중균사를 생성하는 데에도 관여한다고 추정할 수 있음.

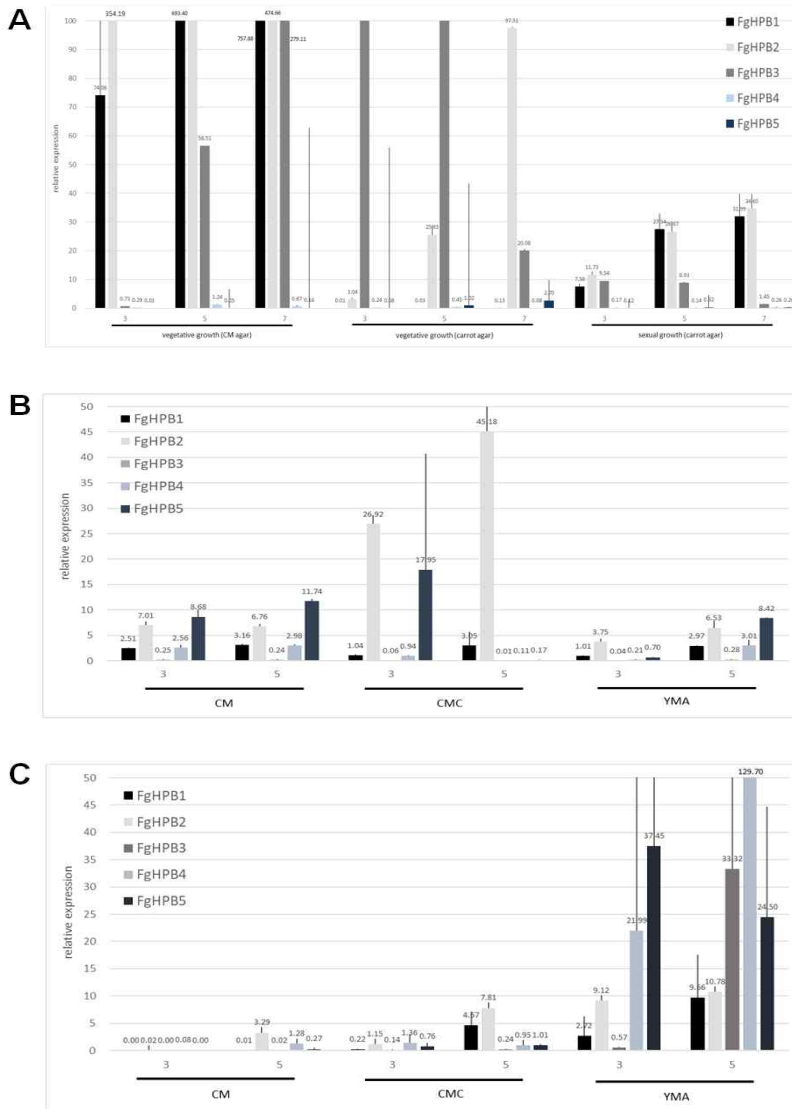


그림 1-25. WT(Z3643)에서 *FgHyds* 유전자의 발현 패턴 (A) 영양생장(CM), 유성생식(당근배지) 단계에서 *FgHyds*의 발현 패턴; (B) CM 액체, CMC 액체배지, YMA 고체배지에서 키운 WT의 균사에서 *FgHyds*의 발현 패턴; (C) CM 액체, CMC 액체배지, YMA 고체배지에서 키운 WT의 포자에서 *FgHyds*의 발현 패턴

4) Hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체($\Delta FgHyd$)의 제작

- 5종 hydrophobin 유전자의 기능을 규명하기 위하여 targeted gene deletion과 유성 교배 등을 통해 총 12종(single부터 quintuple gene deletions까지)의 *FgHyd* 유전자삭제 돌연변이체를 제작함(표 1-8).

표 1-8. *FgHyd* 유전자 삭제 돌연변이체의 목록

| Number | Strains | Selectable markers |
|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 1 | WT(Z3643) | |
| single deletion | | |
| 2 | $\Delta FgHyd1$ (FGSG_01763) | <i>gen</i> |
| 3 | $\Delta FgHyd2$ (FGSG_01764) | <i>gen</i> |
| 4 | $\Delta FgHyd3$ (FGSG_09066) | <i>gen</i> |
| 5 | $\Delta FgHyd4$ (FGSG_03960) | <i>gen</i> |
| 6 | $\Delta FgHyd5$ (FGSG_01831) | <i>gen</i> |
| double deletion | | |
| 7 | $\Delta FgHyd12$ | <i>gen</i> |
| 8 | $\Delta FgHyd45$ | <i>hygB:gen</i> |
| triple deletion | | |
| 9 | $\Delta FgHyd123$ | <i>hygB:gen</i> |
| 10 | $\Delta FgHyd125$ | <i>gen;hygB</i> |
| quadruple deletion | | |
| 11 | $\Delta FgHyd1234$ | <i>gen;hygB</i> |
| 12 | $\Delta FgHyd1245$ | <i>gen;hygB</i> |
| quintuple deletion | | |
| 13 | $\Delta FgHyd12345$ | <i>gen;hygB</i> |

5) Hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체의 균사생장 변화

- $\Delta FgHyds$ 돌연변이체를 다양한 배지에 접종하여 영양생장 단계와 유성생식 단계에서 표현형 변화를 관찰하였음. CM 고체배지에서는 colony의 형태를 포함한 균사 생장에 큰 변화가 없었음. $\Delta FgHyds$ 돌연변이체를 CMC 액체배지에서 3일간 배양한 후 $2 \times 10^4/ml$ 농도로 minimal 액체배지 400 μ l가 들어있는 vial에 접종하여 배양 7일 후 vial의 유리벽을 타고 올라간 균사의 성장 정도를 비교한 결과, 대부분 야생형과 비슷하거나 조금 덜 자라는 것을 확인하였음. 하지만 $\Delta FgHyd1245$ 돌연변이체의 경우 벽을 타고 올라가는 균사가 거의 없음이 관찰되었음(그림 1-26).

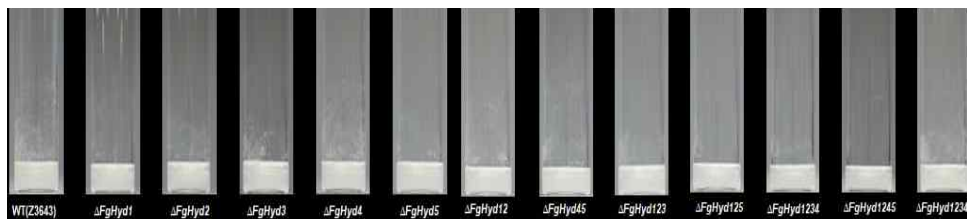


그림 1-26. Minimal 액체배지에서의 균사 성장

- 한편, 당근배지에 접종 후 2일 차에 *FgHyd* 삭제 돌연변이체와 야생형 균주를 비교하였을 때 $\Delta FgHyd1$ 돌연변이체의 균사는 상대적으로 좀 더 조밀하고 풍성하게 자란 반면, $\Delta FgHyd3$ 과 $\Delta FgHyd5$ 돌연변이체는 균사의 양이 상대적으로 적고 성글어 보임. $\Delta FgHyd4$, $\Delta FgHyd123$, $\Delta FgHyd1245$ 돌연변이체의 경우, colony의 바깥 부분이 바닥에 깔려 자라는 형태를 보였음(그림 1-27).

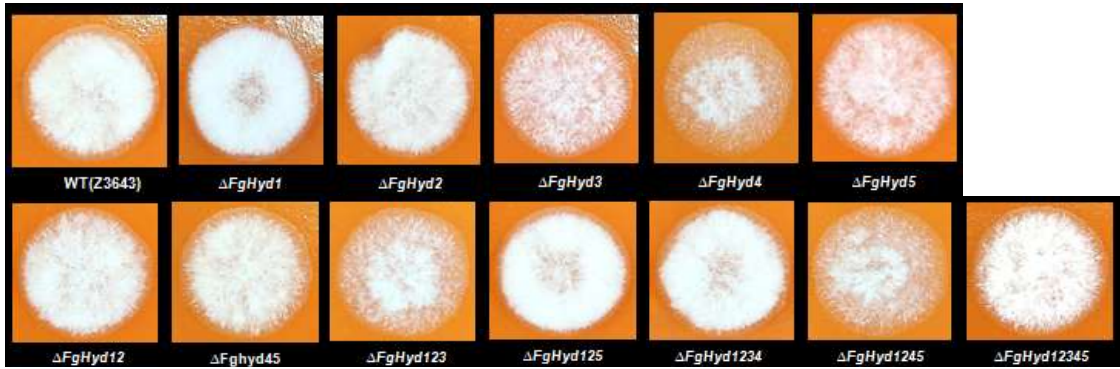


그림 1-27. 당근배지에서 *FgHyd* 삭제 돌연변이체의 균사 성장

6) *FgHyds* 유전자 삭제 돌연변이체 균사의 hydrophobicity 변화

- 각 돌연변이체가 생성하는 균사 표면의 소수성을 확인하기 위하여 CM 배지에서 돌연변이체를 3일 동안 배양한 후 $10\mu\text{l}$ 의 멸균수를 균사 colony의 8군데 떨어뜨려 관찰하였음(그림 1-28). 2시간 후 야생형 균주의 균체에서만 물방울이 모두 유지되었으며, *FgHyd* 삭제 돌연변이체 균주에서는 4 ~ 7개의 물방울이 배지로 흡수되었음. 이러한 결과를 통하여 $\Delta FgHyds$ 균주가 생성하는 공중균사의 소수성이 야생형에 비해 상대적으로 낮음을 확인하였음.

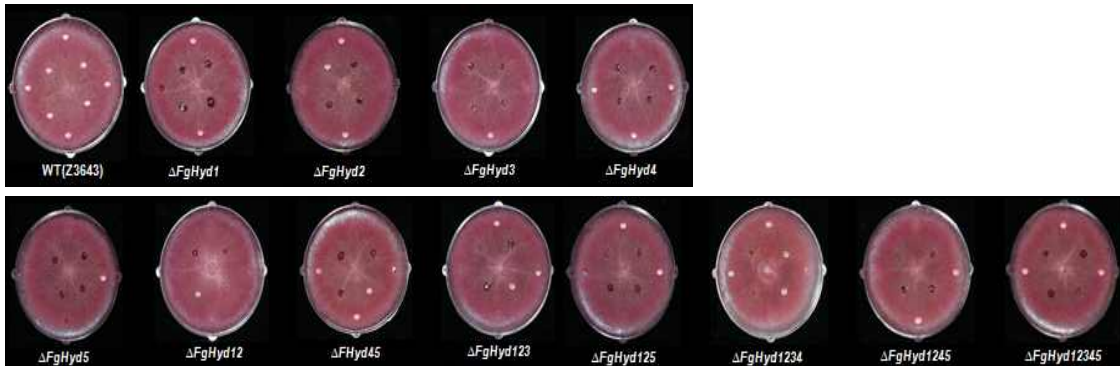


그림 1-28. *FgHyd* 유전자삭제 돌연변이체 균주가 생성하는 공중균사의 hydrophobicity 검정

7) *FgHyd* 삭제 돌연변이체의 유성생식능 변화

- $\Delta FgHyds$ 돌연변이체의 유성생식 (자낭각 형성) 능력을 알아보기 위해 당근배지 접종 7일 후 균사를 인위적으로 제거하여 유성생식을 유도하였음. $\Delta FgHyds$ 돌연변이체 모두 WT과 비슷한 개수와 크기의 자낭각을 형성하였음(그림 1-29). 인위적 공중균사 제거 5일 후 WT에 비해 *FgHyd* 돌연변이체들의 자낭과 자낭포자 생성이 조금 늦지만 7일 차에는 WT과 같은 수준의 자낭포자가 생성됨을 확인함. 단지 $\Delta FgHyd123$ 과 $\Delta FgHyd45$ 돌연변이체의 경우, 자낭포자의 성숙이 WT보다 덜 되는 것처럼 관찰되었으나 추가 반복 실험이 필요함.

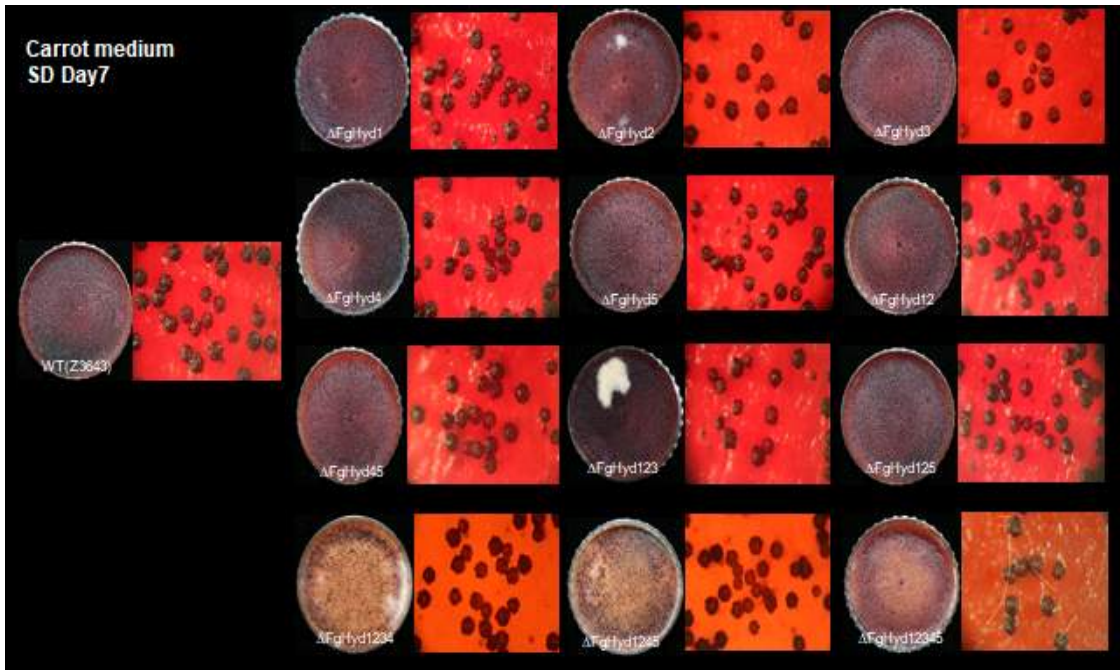


그림 1-29. 당근배지에서 *FgHyd* 삭제 돌연변이체의 자낭각 형성

8) *F. graminearum*의 hydrophobin 유전자 기능 분석

- Hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체 12종의 병원성을 확인하기 위해 각 균주의 분생포자를 1×10^5 /ml의 농도로 밀 head 두 군데에 접종하였음. 4일간 습실 처리 후 3주간 온실에서 키웠음.

- Single deletion 균주의 경우 야생형 모균주와 거의 비슷한 병 발생 정도를 보였으며, double deletion 균주 접종 밀의 경우, 병 발생이 조금씩 줄어드는 것을 확인하였음. 특히 quadruple, quintuple deletion 균주를 접종하였을 때는 밀 head에서 병 발생이 거의 일어나지 않음을 확인하였음(그림 1-30).

- 이를 통해 hydrophobin 유전자가 병원성과 밀접한 관련이 있으며, 4개 이상의 hydrophobin 유전자가 기능을 하지 못할 경우 병 발생이 확실히 억제됨을 확인하였음.

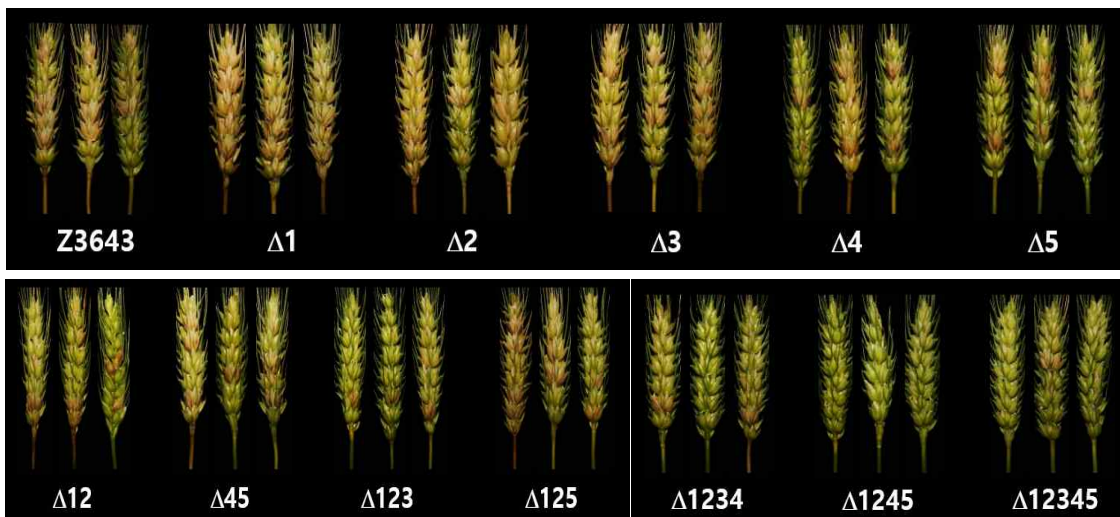


그림 1-30. Hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체 병원성 확인

- 5종 hydrophobin 유전자가 모두 삭제된 돌연변이체($\Delta FgHyd12345$)의 전사체 분석 결과, 야생형 모균주에 비해 trichothecene (DON) 생합성에 필수적인 *Tri* 유전자 cluster 내 유전자의 발현이 높았음.
- 이를 바탕으로 hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체 12종을 대상으로 DON 독소생성 유전자의 발현 양상을 정량분석하기 위하여 돌연변이체를 agmatine 액체배지에 접종하여 일주일간 배양한 후 total RNA를 추출하여 qPCR을 수행하였음(그림 1-31).
- 야생형 모균주와 비교하여 대부분의 hydrophobin 유전자 삭제 돌연변이체에서 *Tri5* 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 $\Delta Fghyd5$ 균주에서 32배 정도 큰 폭으로 증가한 것을 확인하였음.

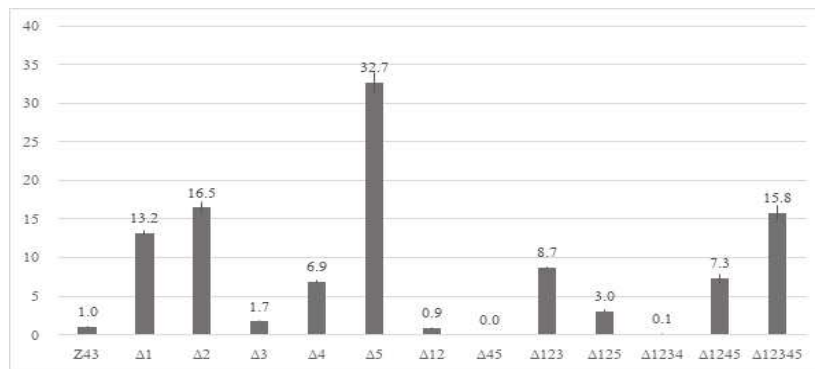


그림 1-31. $\Delta FgHyd5$ 돌연변이체에서 *Tri5* 유전자 발현 수준

9) *F. graminearum* 유성포자 형성 필수 *PKS7* 유전자의 기능 분석

- *PKS7* 유전자(FGSG_08795)는 *F. graminearum*을 비롯한 다양한 *Fusarium* 속 곰팡이 종(*F. fujikuroi* 포함)의 유전체에 존재하는 polyketide 생합성 유전자로서 *F. graminearum*의 유성생식 과정 중 교배형 유전자좌(*MAT* loci)에 의해 전사수준에서 조절되며, 유전자 삭제 시 돌연변이체는 유성포자를 형성하지 못함. 하지만 *PKS7*에 의해 생합성되는 polyketide 최종 산물은 아직 화학적으로 밝혀져 있지 않음[본 연구진의 선행연구결과 참조, Kime et al. 2015. PLoS Genet., 2017년 차세대바이오그린21 농생물게놈활용연구사업과제 (PJ011180) 최종보고서]
- *F. graminearum*에 의한 벼 이삭마름병의 발생은 공기 중 분포하는 병원균의 유성포자에 의한 화기감염으로부터 시작되기 때문에 *PKS7*은 *F. graminearum*의 공기전염에 필수적인 유전적 요인이라 할 수 있음. 현재까지 *Fusarium* 속 곰팡이의 유성포자 형성에 관여하는 이차대사관련 유전자, 특히 *PKS* 유전자로는 곰팡이의 자실체 색소 생합성에 필수적인 *PKS3* 외 *PKS7*이 유일함. 본 과제에서는 아래와 같이 *F. graminearum* 중복합체 소속 중 중 복미산 우점종인 *F. graminearum* Z03643과 우리나라 토착종인 *F. asiaticum* SCKO4 균주를 대상으로 *PKS7*의 기능을 종합적으로 분석하였음.

① *Fusarium* 속 내 *PKS7* 유전자군(gene cluster)의 보존

- *F. graminearum*의 *PKS7* 유전자(*FgPKS7*으로 명명)는 type I fungal reducing PKS 단백질을 암호화하고 있으며, KS-AT-DH-ER-ACP 구조의 6개 enzymatic domain을 가지고 있음. 총 43kb의 길이에 걸쳐 *FgPKS7*을 비롯한 총 13종의 유전자가 cluster로 존재함(그림 1-32의 A).
- *F. graminearum* *FgPKS7*의 orthologue가 다양한 *Fusarium* 종에서 발견됨. 특히 *F. asiaticum* SCKO4와 *F. fujikuroi* B14 균주의 orthologue(각각 *FaPKS7*과 *FjPKS7*으로 명명)를 비교할 경우, 대부분의 gene cluster member들도 보존되어 있음(그림 1-32의 B).

② *PKS7* 유전자의 삭제와 과발현을 통한 유전자의 기능 분석

- *F. graminearum* Z3643 균주와 *F. asiaticum* SCKO4 균주로부터 각각 *FgPKS7*과 *FaPKS7* 유전자를 삭제시킨 후, 각 돌연변이체의 균학적, 병리학적 형질 변화를 검정하였음.

- *FgPKS7* 삭제돌연변이체($\Delta FgPKS7$)의 경우, 선행연구결과처럼 야생형 균주에 비해 크기가 작은 자낭각을 형성하였지만 자낭각안에 자낭포자를 형성하지 못하였음. 하지만 무성포자(conidia)의 생성량은 야생형에 비해 5배 정도 높았음. 또한 공중균사의 색깔이 좀 더 붉어졌으며, agar 배지 위에서 배양된 균사체의 건물량은 야생형보다 2배 정도 높았음(그림 1-33의 A-E).

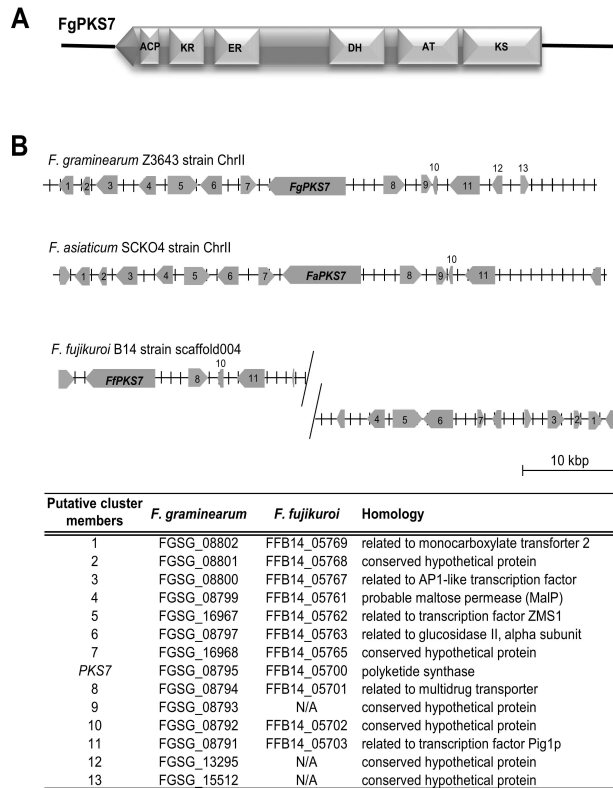


그림 1-32. (A) *FgPKS7* 단백질 서열의 구조; (B) *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. fujikuroi* *PKS7* 유전자군의 구조 비교

- *FaPKS7* 삭제돌연변이체($\Delta FaPKS7$)의 경우, 자낭각과 자낭포자를 모두 형성하지 못하였음. 하지만 유성생식능이 매우 낮은 야생형 모균주(SCKO4)와 큰 차이를 보이지 않았음. 반면 CM agar 배지 위에 형성된 균사체의 면적은 야생형 균주에 비해 50% 가량 작았음. 하지만 흥미롭게도 균사체의 건물량은 야생형에 비해 30% 가량 증가하였음(그림 1-33의 A-E).

- $\Delta FgPKS7$ 와 $\Delta FaPKS7$ 돌연변이체 모두 보리와 옥수수에 접종 시 야생형과 비슷한 수준의 이삭마름 또는 줄기썩음 증상을 일으켰음(그림 1-33의 F).

- 유전자삭제 돌연변이체에 정상적인 *FgPKS7* 또는 *FaPKS7* 유전자 copy를 다시 넣어 준 균주에서는 균사생장, 색소형성, 유성생식 등의 형질변화가 야생형 수준으로 회복되었음. 또한 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체에 *FaPKS7*을 넣었을 때에도 형질변화, 특히 유성포자 생성능이 회복되었음. 하지만 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체에 *F. fujikuroi* *FjPKS7*이나 *F. necosmosporiellum* *FnPKS7* 유전자 copy를 넣었을 경우, $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체의 형질변화는 회복되지 않았음(그림 1-33의 A).

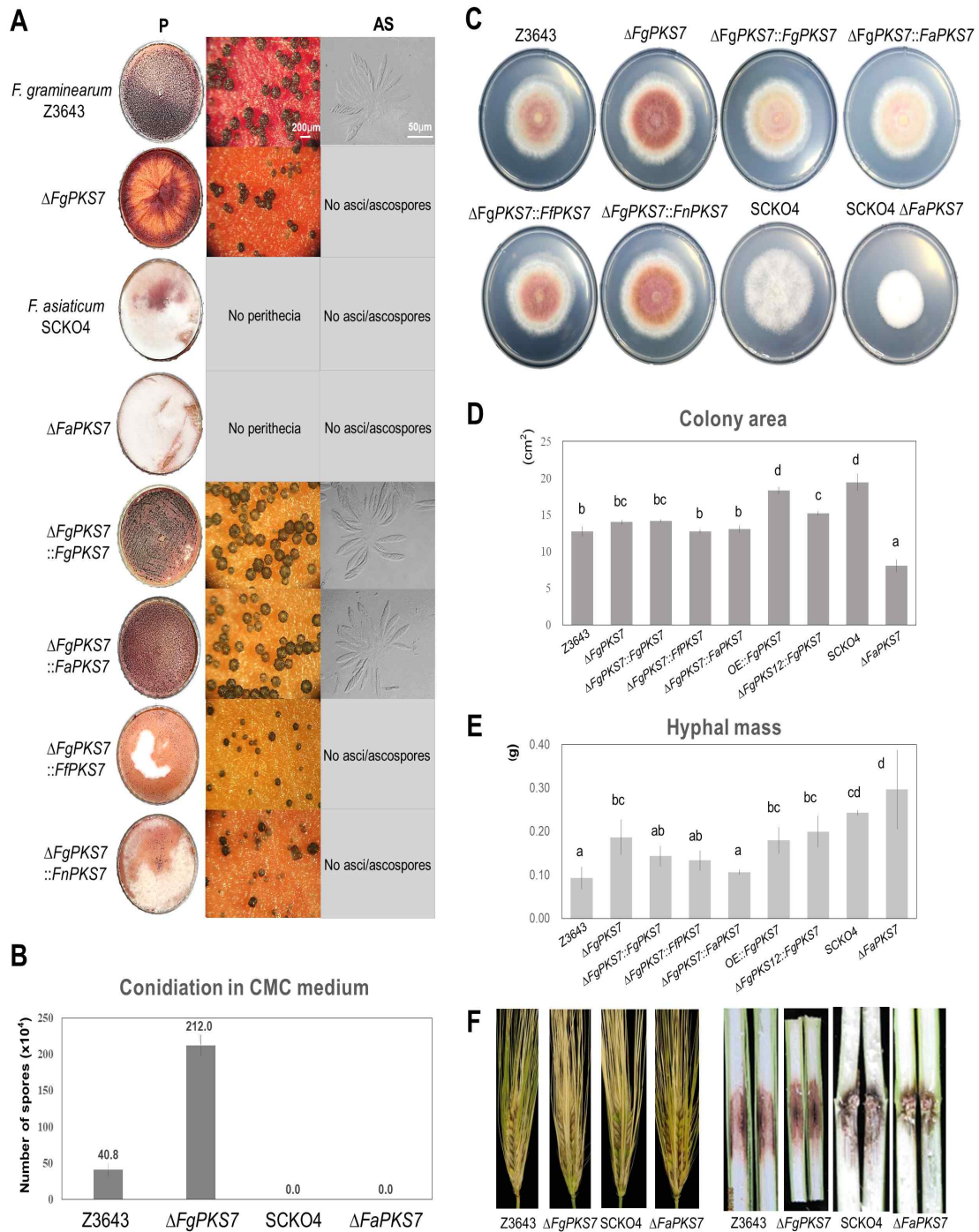


그림 1-33. *PKS7* 유전자 삭제돌연변이체의 형질변화 (A) 당근배지 위 자낭각과 자낭포자 형성; (B) 무성포자 생성량; (C) CM agar 배지 위 균사생장 및 공중균사의 색소 생성; (D) 균사생장(colony 면적 기준); (E) 균사의 건물량 (F) 기주식물 내 병원성(왼쪽: 보리, 오른쪽: 옥수수)

- 위와 같은 형질뿐 아니라 $\Delta FgPKS7$ 와 $\Delta FaPKS7$ 돌연변이체는 azole 계통의 살균제에 대한 저항성이 야생형 균주에 비해 증가하였음. 특히 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체는 prochlorz 1ppm과 10ppm 농도에서 야생형 균주에 비해 균사생장이 증가하였을 뿐 아니라 difenoconazole 10ppm, ipconazole 100ppm 농도에서도 공중균사의 생장이 뚜렷하였음. 또한 $\Delta FaPKS7$ 균주도 difenoconazole 첨가 배지에서 균사생장 저해율이 야생형 균주에 비해 감소하였음(그림 1-34).

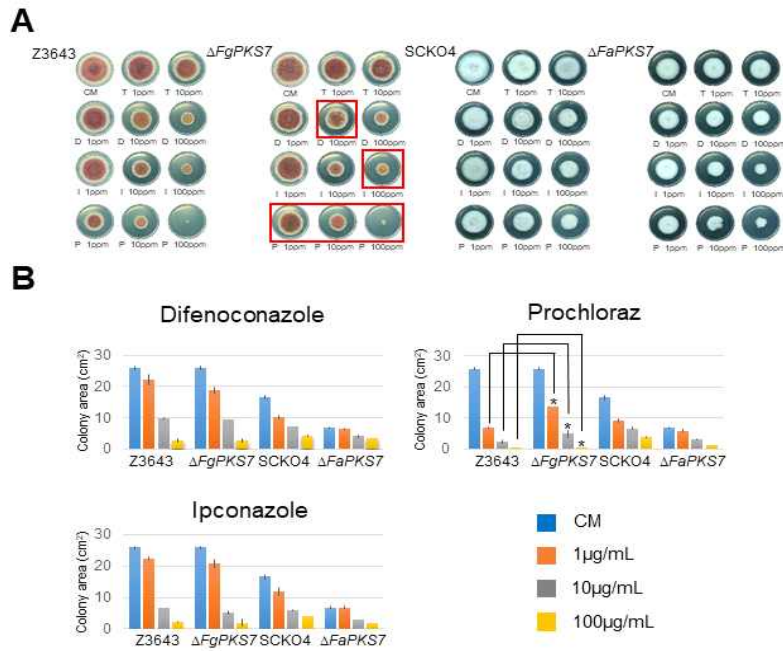


그림 1-34. Azole 살균제 첨가 배지에서 $\Delta FgPKS7$ 과 $\Delta FaPKS7$ 돌연변이체의 균사생장

- 한편, $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체에 과발현 promoter로 조절되는 *FgPKS7*을 넣어 주거나, small RNA 삽입에 의해 야생형 균주에서 *FgPKS7*을 과발현시켰을 경우, 유성포자의 생성 또는 성숙이 지연되거나 유성포자의 형태가 달라지는 등의 형질변화가 관찰되었음(그림 1-35).

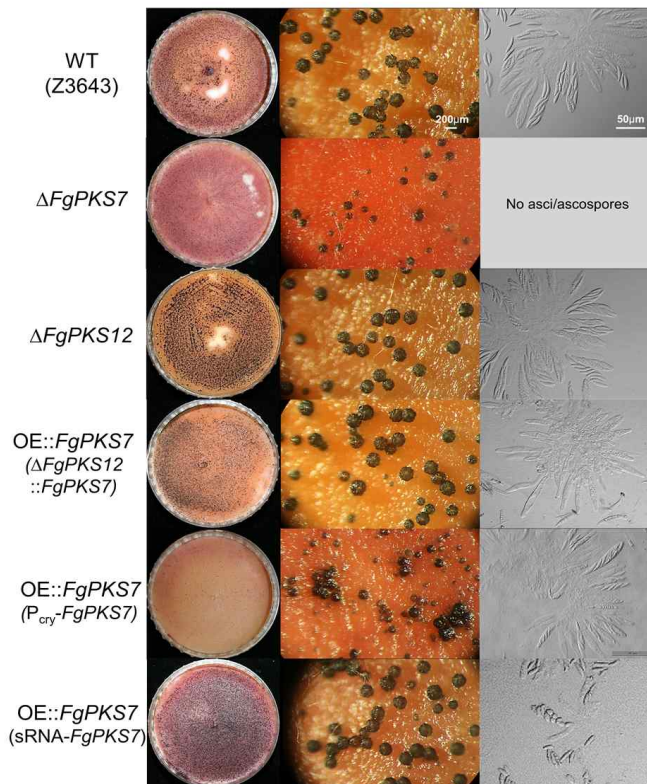


그림 1-35. *FgPKS7* 과발현 균주의 유성포자 생성

- 위와 같은 유전자 조작을 통한 *PKS7*의 기능 분석 결과, *PKS7* 유전자 서열은 다양한 *Fusarium* 속 곰팡이에 보존되어 있으나, 유전자의 기능은 곰팡이 종에 따라 특화되었을 가능성이 있음. *FgPKS7*는 유성생식능이 뛰어난 *F. graminearum*에서 유성포자 형성에 필수적으로 관여하며, 그 밖에 무성포자 생성, 균사의 색소 생성, 살균제 저항성에도 관여하는 것으로 추정됨. 이에 반해 유성생식과 무성포자생성능이 매우 떨어지는 *F. asiaticum*에서는 *FaPKS7*이 유성생식보다 오히려 균사생장에 관여함. 이는 우리나라 토착종인 *F. asiaticum*의 종 분화 또는 적응 과정에 따라 *PKS7*의 기능도 그에 맞게 분화했다고 추정할 수 있음. 하지만 genetic complementation 결과를 바탕으로 *F. graminearum*과 *F. asiaticum*은 계통발생학적으로 같은 종복합체(species complex)에 속할 정도로 가깝기 때문에 두 종 사이의 *PKS7* 기능은 여전히 보존되어 있다고 추정할 수 있음. 한편 다른 *Fusarium* 종의 *PKS7*(*FjPKS7* 또는 *FnPKS7*)은 비록 아미노산 서열 수준에서 *FgPKS7*과 60% 정도 유사하지만 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체의 형질변화를 회복시키지 못하였음. 이를 통해 *PKS7*의 기능은 유전자 보유 *Fusarium* 종의 근연관계에 따라 분화되었음을 추정할 수 있음.

③ *FgPKS7* 내 존재하는 enzymatic domain의 기능 분석

- *FgPKS7*이 전형적인 non-reducing fungal PKS로서 특정 화학반응을 촉매 하는지 검정하기 위하여 *FgPKS7* 단백질 서열 내 존재하는 4개의 enzymatic domain (ACP, AT, DH, ER)을 각각 삭제한 후 돌연변이체의 형질변화를 검정하였음. 모든 domain 삭제 돌연변이체는 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체와 마찬가지로 유성포자를 형성하지 못하였음. 이를 통해 *FgPKS7*의 각 enzymatic domain은 PKS로서 *FgPKS7*의 기능에 필수적임이 확인되었음.

④ *PKS7* 유전자의 발현 양상

- *F. graminearum*의 유성생식 단계에서 *FgPKS7*의 발현 수준은 영양생장 단계에 비해 최소 2배 이상 증가함(그림 1-36의 A).
 - 반면에 *F. asiaticum* *FaPKS7*의 발현은 오히려 균사생장 단계 특이적임. 즉, 균사생장 단계에서 발현양이 유성생식 단계보다 최소 16배 이상 높을 뿐 아니라 *F. graminearum* *FgPKS7*의 유성생식 단계 발현에 비해서도 6배 정도 높음(그림 1-36의 A).
 - 이를 통해 *F. asiaticum*에서 *FaPKS7*은 *FgPKS7*과 달리 균사생장의 조절에 더 많이 관여함이 검증됨.

⑤ *FgPKS7*에 의해 전사수준에서 조절되는 target 유전자의 동정과 기능 분석

- 유성생식 단계 *FgPKS7* 돌연변이체의 전사체 분석을 통하여 총 754종의 DEG(428 down-regulated, 326 up-regulated)를 동정하였음.
 - 이들 DEG를 유성생식능이 제거된 *MAT* 유전자삭제 돌연변이체로부터 확보한 DEG와 비교·분석한 결과, 총 129종 유전자가 겹쳤음. 84종은 down-regulated 유전자이며, 이 중 9종 유전자는 발현이 유성생식 단계에 특이적일 뿐 아니라 기능적으로 필수적임. 이들 유전자는 FGSG_13708, 00348, 01862, 02052, 04480, 07869, 08320으로서 RNA 간섭 경로 참여, 전사조절, 이차대사 등에 관여함(그림 1-37의 A). 또한 45종의 up-regulated 유전자 중 *Aspergillus nidulans* 곰팡이에서 균사생장과 무성포자 형성을 조절하는 G-protein signaling protein 유전자의 orthologue (FGSG_03597)도 포함됨(그림 1-37의 B).

- 한편, up-regulated 유전자 중 azole 계열 살균제에 대한 저항성에 관여하는 5종의 유전자가 동정됨. 이 중 3종은 이미 azole 살균제 내성에 필수적으로 알려진 group G ABC transporter 유전자(FGSG_04580, 11240, 03882)이며, 나머지는 cytochrome P450(FGSG_01583)과 전사조절인자(FGSG_17584)임.

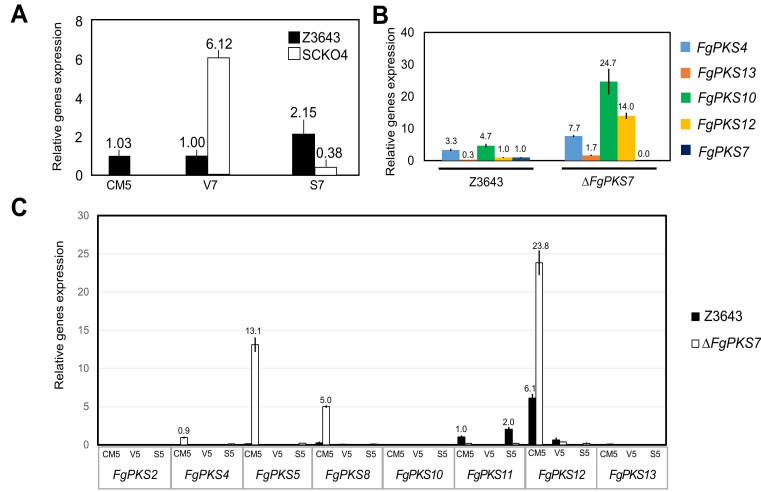


그림 1-36. *FgPKS7*과 *FaPKS7*의 발현양상 (A) $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체에서 다른 *PKS* 유전자의 발현 양상 [(B) YES 액체배지; (C) CM 배지]

⑥ *FgPKS7*에 의해 조절되는 다른 *PKS* 유전자의 기능 분석

- *FgPKS7*의 삭제에 의한 다른 *PKS* 유전자의 발현 변화를 검정하였음.
- $\Delta FgPKS7$ 균주를 이차대사 유도 환경인 YES 액체배지에서 배양하였을 때 총 4종의 *PKS* (*FgPKS4*, *FgPKS13*, *FgPKS12*, *FgPKS10*) 유전자 발현양이 야생형 모균주에 비해 뚜렷하게 증가하였음. 이러한 추세는 CM 배지 환경에서 관찰됨(그림 1-36의 B-C).

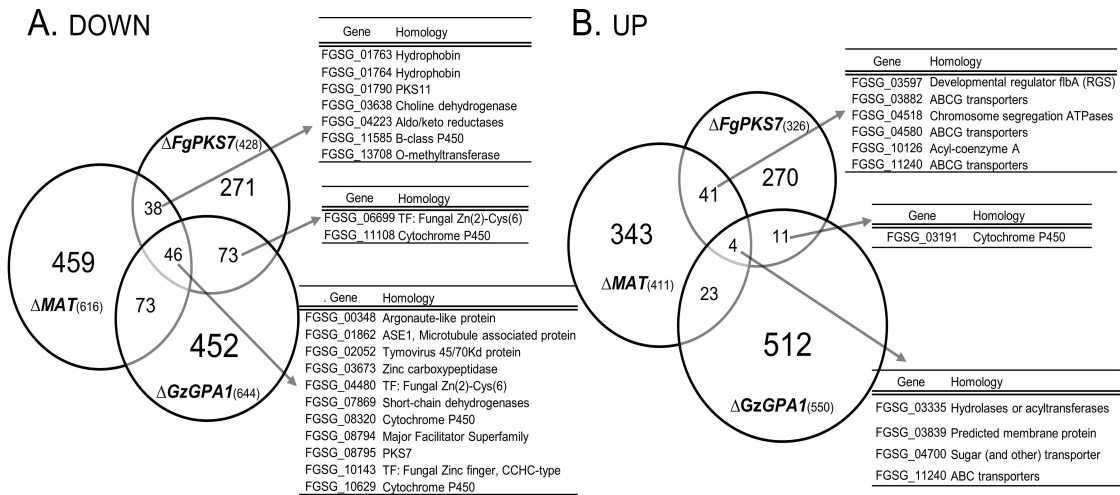


그림 1-37. 유성생식 단계에서 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체의 전사체 분석을 통해 동정된 DEG와 *MAT* 삭제 돌연변이체 유래 DEG의 비교 분석

- $\Delta FgPKS7$ 균주에서 이러한 polyketide(*FgPKS4*와 *FgPKS13*에 의한 zearalenone 생성, *FgPKS12*에 의한 aurofusarin, *FgPKS10*에 의한 fusarin C)의 과생성이 $\Delta FgPKS7$ 균주의 유성포자 미생성에 대한 직접적인 원인인지 검정하기 위하여 해당 *FgPKS* 유전자와 *FgPKS7*이 동시 삭제된 돌연변이체를 제작하였음. 만약 여러 polyketide의 과생성이 유성포자 형성에 영향을 주었다면 *FgPKS* 동시 삭제 돌연변이체에서는 유성포자 생성능이 회복될 것으로 기대함. 하지만 제작한 모든 유전자 삭제 돌연변이체는 $\Delta FgPKS7$ 돌연변이체와 마찬가지로 유성포자를 형성하지 못함(그림 1-38). 이를 통해 $\Delta FgPKS7$ 에 의한 이차대사산물의 과생성은 유성생식과 직접적인 연관이 없다고 추정할 수 있음.

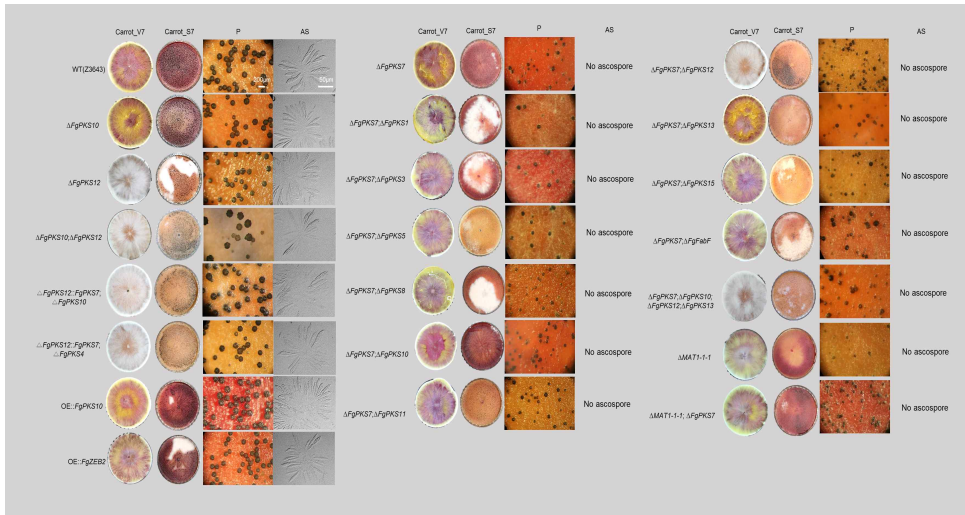


그림 1-38. 다양한 *FgPKS* 유전자 조합의 삭제에 의한 유성생식능의 변화 검정

10) *F. graminearum* *NoxD* 유전자의 기능 분석

- 세포 내 활성산소(ROS, reactive oxygen species)의 생성에 관여하는 NADPH oxidases(*Nox*)는 동·식물의 세포 방어와 분화에 중요한 역할을 함. 또한 식물병원성 곰팡이에서도 특정 isoform의 *Nox*는 유성생식 뿐 아니라 균사생장 과정에 필수적임이 밝혀짐.

- *F. graminearum*에서 *NoxA*와 *NoxB*는 병 발생 단계에서 중요한 역할을 한다고 보고되었으나 *NoxD*의 기능에 대한 연구는 아직 미진함. 따라서 본 연구진은 *F. graminearum* *NoxD*(FGSG_01268)의 기능을 상세히 분석하였음.

- *F. graminearum* Z3639 균주를 야생형 모균주로 삼아 그로부터 *NoxD* 유전자 삭제돌연변이체를 제작하였음. 또한 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체에 정상적인 *NoxD* 유전자를 넣어 준 complement 형질전환체인 *FgNoxD-C*를 제작하였음.

- PDA, CM, MM, YMA 배지에서 25°C, 3일간 배양한 결과 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 균사생장 속도가 야생형 모균주나 *FgNoxD-C* 균주에 비해 느려지며(그림 1-39의 A), 공중균사의 생성양도 감소함(그림 1-39의 B). 또한 무성포자의 생성양도 야생형 균주에 비해 20배 이상 감소함(그림 1-39의 C).

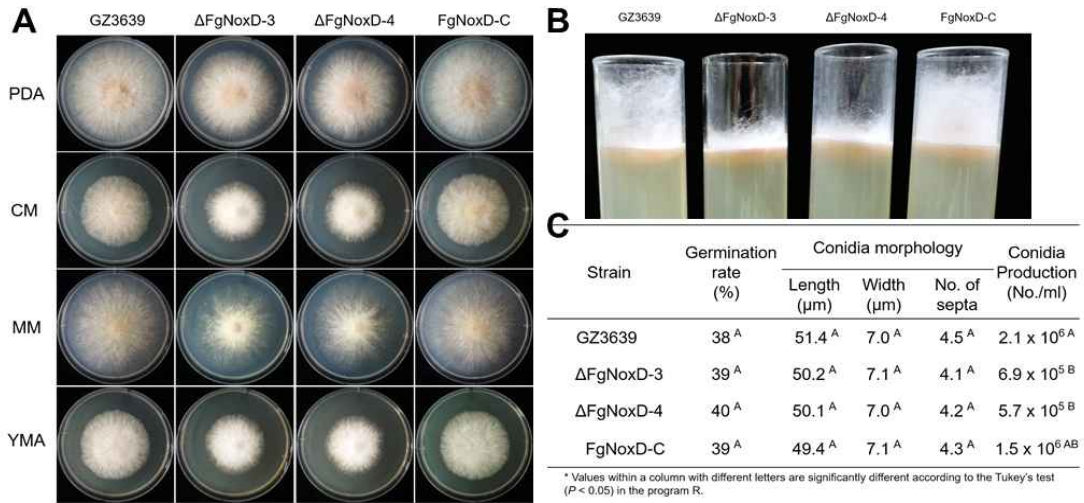


그림 1-39. *FgNoxD* 삭제 돌연변이체의 (A) 균사생장; (B) 공중균사형성; (C) 무성포자 생성

- $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체는 유성생식 유도 조건에서 야생형균주나 *FgNoxD-C* 균주와 달리 자낭각과 자낭포자를 전혀 형성하지 못함(그림 1-40).

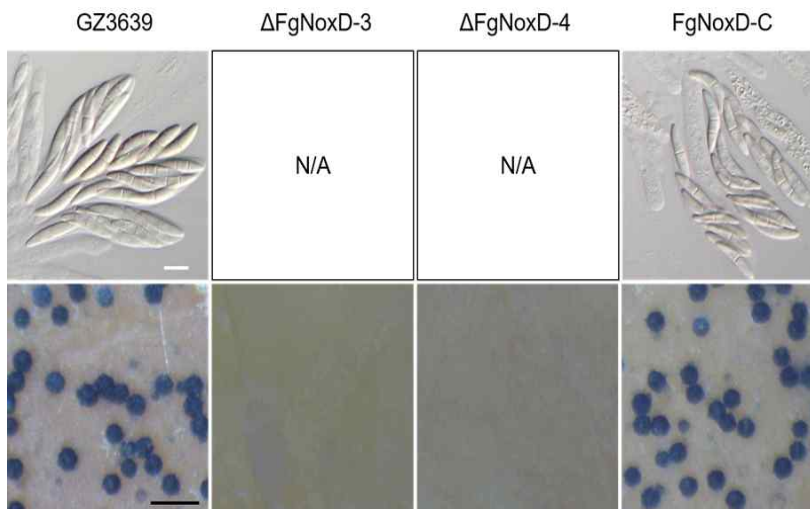


그림 1-40. 당근배지 위에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 자낭각과 자낭포자 형성

- 한편, 다양한 stress 조건에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 성장 변화를 검정하였음. oxidative stress 유발을 위한 menadione 첨가배지에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체는 야생형 균주나 *FgNoxD-C* 균주와 마찬가지로 생장이 저해되었음(그림 1-41의 A). 하지만 3mM H₂O₂에 의한 oxidative stress 조건에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 균사생장은 야생형 균주와 달리 회복되지 못하였음(그림 1-41의 B).

- KCl과 NaCl에 의해 유발된 osmotic stress 조건에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 균사생장은 야생형 모균주, *FgNoxD-C* 균주와 비교하여 크게 다르지 않았음(그림 1-41의 C). 하지만 세포막과 세포벽 stress 조건에서는 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 균사생장이 야생형 모균주, *FgNoxD-C* 균주에 비해 훨씬 저해 받았음(그림 1-41의 D). 마지막으로 prochloraz 살균제 첨가 배지에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체는 야생형 모균주, *FgNoxD-C* 균주에 비해 균사생장이 감소하였음(그림 1-41의 E).

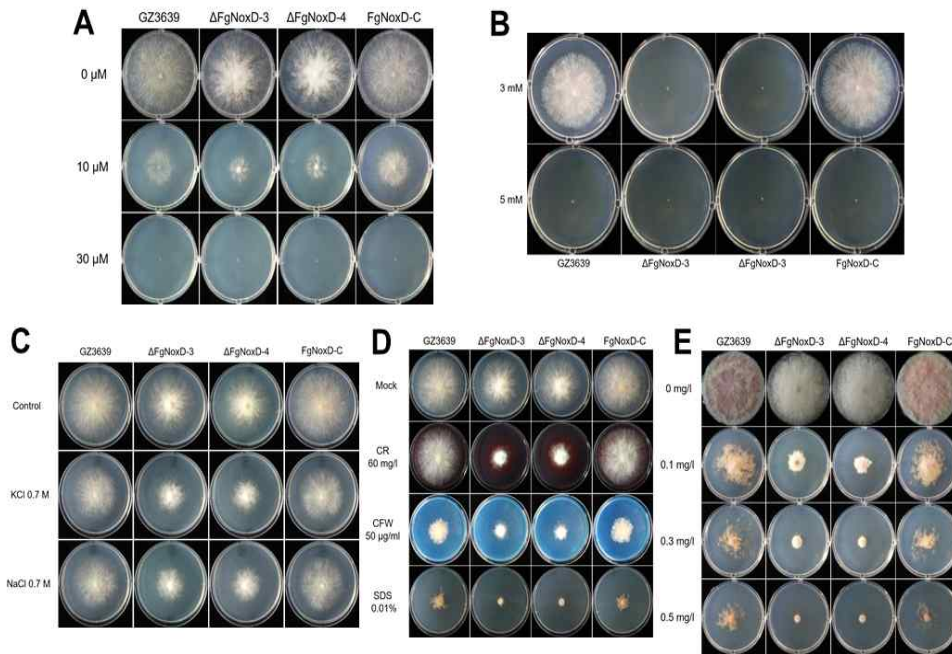


그림 1-41. 다양한 stress 조건에서 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 성장 (A) oxidative stress 검정을 위한 menadione test; (B) H_2O_2 test; (C) osmotic stress; (D) 세포막, 세포벽 stress; (E) prochloraz test

- $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 기주 식물에 대한 병원성을 검정하기 위하여 분생포자를 밀 자엽 (coleoptile), 밀 head, 벼 head에 접종하여 병 발생 정도를 관찰하였음. 모든 기주 식물에 대해 $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체는 야생형 모균주, FgNoxD-C보다 뚜렷한 병원성 감소를 보였음(그림 1-42).

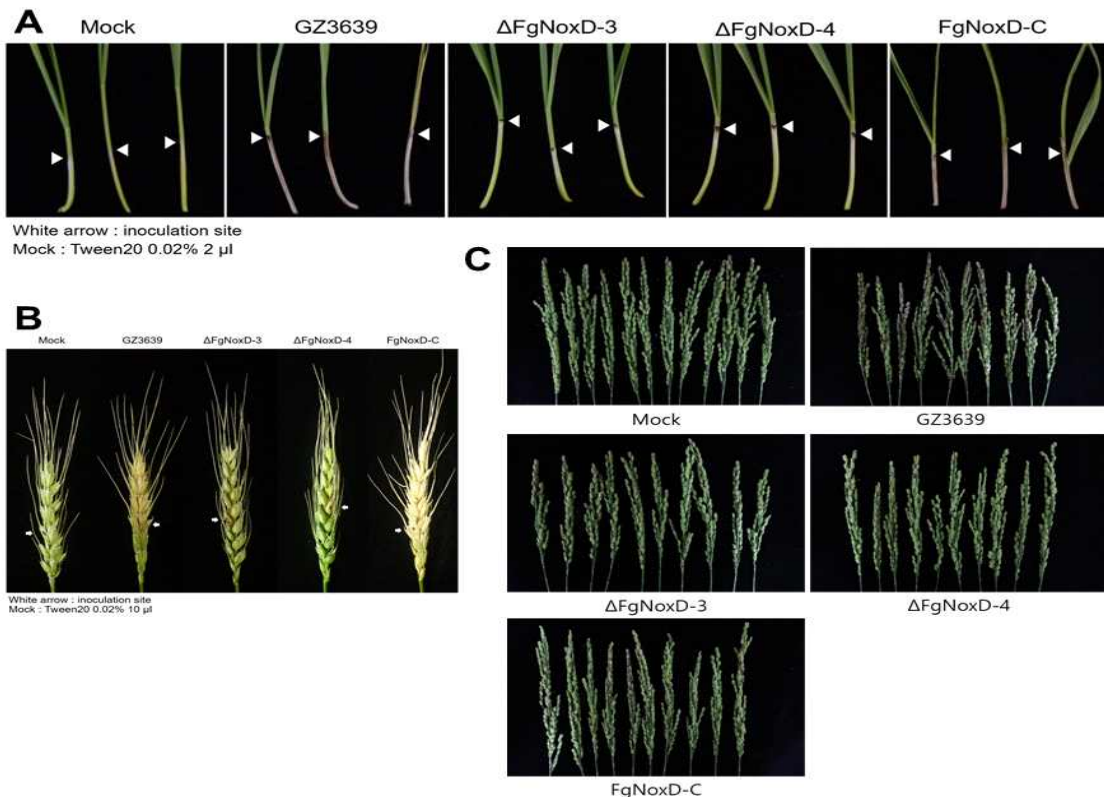


그림 1-42. 병원성 검정 (A) 밀의 coleoptile; (B) 밀의 head; (C) 벼의 head

- $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 곰팡이독소 (DON) 생성능을 검정하기 위하여 H_2O_2 를 첨가한 GYEP 배지에서 배양한 후 DON 생성 농도와 DON 생합성 유전자인 *Tri5*와 *Tri6*의 발현양을 정량적으로 분석하였음. $\Delta FgNoxD$ 돌연변이체의 DON 생성농도와 *Tri* 유전자의 발현양은 야생형 모균주, *FgNoxD-C* 균주에 비해 현저히 감소하였음(그림 1-43).

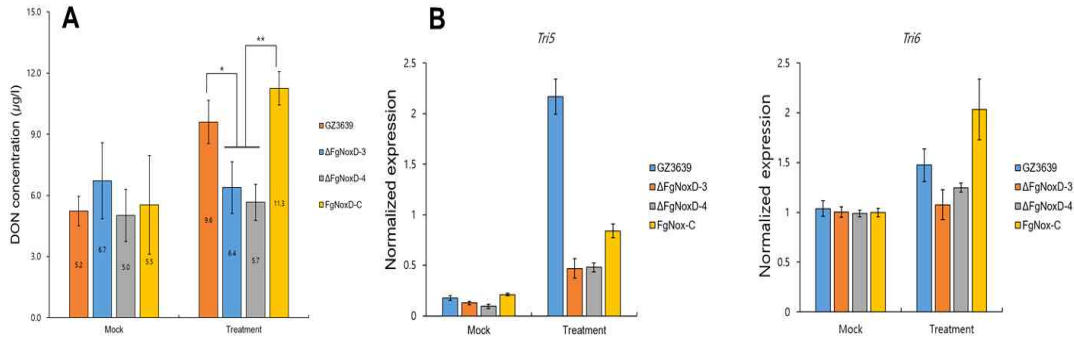


그림 1-43. DON 생성 (A) DON 생성양; (B) *Tri5*, *Tri6* 유전자의 발현양

- 위와 같은 실험 결과, *F. graminearum*에서 *FgNoxD* 유전자는 영양생장과 공중균사 형성, 무성 포자 생성, 유성생식과 같은 균학적 형질에 필수적으로 관여할 뿐 아니라 oxidative stress에 대한 저항성, 세포막/벽의 integrity 유지에도 직접적으로 관여함이 밝혀짐. 또한 기주 식물에 대한 병원성과 곰팡이독소 생합성에도 필수적인 역할을 함.

○ *Fusarium* 병원균의 발생 생태 활용 병 발생 제어 기술의 탐색

- 1) 벼 재배지역 공기 중 분포 비병원성 *Fusarium* 종을 활용한 벼 키다리병 발생 제어 시도
 - 벼 재배지역 공기 중 우점으로 분포하는 *F. incarnatum-equiseti* 중복합체 소속 균주 2종(*F. equiseti* DG1, *F. incarnatum* DG6)을 선발하여 분생포자 생산 후 각각 $1 \times 10^5/ml$ 의 농도로 출수기 벼의 head에 분무 살포하였음. 하루 뒤 같은 벼 head에 B14와 B20의 소형분생포자를 같은 농도로 각각 분무 살포한 후 2일 동안 습실 처리하였음. 이후 24일 동안 온실에서 키웠음.
 - 각 조합의 균주 살포 후 벼의 일부 head가 검은색으로 변함(그림 1-44).
 - 각 조합의 포자 살포 난알을 총 24개 회수하여 표면 살균 후 CM 배지 위에 치상하여 3일 동안 배양하였음(그림 1-44). 각 조합의 난알로부터 자란 곰팡이 colony 5개를 선발하여 순수 배양한 후 genomic DNA를 추출하였음. B14와 B20 특이 검출 primer를 활용한 PCR을 통해 각 곰팡이 colony를 동정하였음.

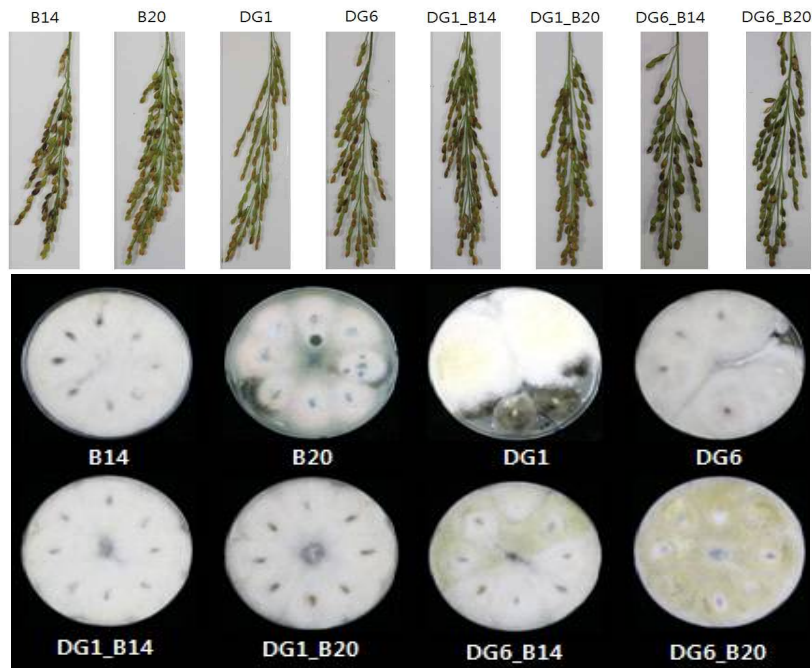


그림 1-44. 벼에서의 병징 발현 및 낱알을 치상한 CM 배지

- PCR 결과, B14와 B20의 포자만 단독으로 처리한 낱알로부터는 100% B14 또는 B20 균주가 검출되었음. 또한 *F. equiseti* DG1과 *F. incarnatum* DG6의 포자만 단독 처리한 낱알에서는 B14 또는 B20 균주가 전혀 검출되지 않았음.
- 한편, DG1 또는 DG6 균주 처리 후 B14를 접종한 벼의 낱알로부터 회수한 곰팡이 균주 중 각각 40%(2/5)와 60%(3/5)는 B14로 동정되었음. 이에 반해 DG1이나 DG6를 처리한 후 B20을 접종한 벼의 낱알로부터는 B20이 전혀 검출되지 않았음(표 1-9).
- 이를 통해 *F. equiseti-incarnatum* 균주의 포자를 벼 head에 미리 살포할 경우, 추후 *F. fujikuroi* B20 균주의 감염을 억제할 수 있는 가능성을 확인함. 또한, B14 균주의 감염도 어느 정도(약 50%)는 막을 수 있을 것으로 판단됨. 하지만 이는 예비 실험 수준이기 때문에 대단위의 반복 실험이 필요함.

표 1-9. *F. incarnatum-equisetii* 포자 살포 후 *F. fujikuroi* 포자를 접종한 벼 낱알로부터 회수한 *F. fujikuroi* 균주의 검출 빈도 (colony 수)

| | B14 | B20 | DG1 | DG6 | DG1_B14 | DG1_B20 | DG6_B14 | DG6_B20 |
|-----|-----|-----|-----|-----|---------|---------|---------|---------|
| B14 | 5 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 |
| B20 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

B14, B20: B14 또는 B20의 포자만 살포 // DG1, DG6: DG1 또는 DG6의 포자만 살포
 DG1_B14: DG1 살포 후 B14 살포 // DG1_B20: DG1 살포 후 B20 살포
 DG6_B14: DG6 살포 후 B14 살포 // DG6_B20: DG6 살포 후 B20 살포

- 또 다른 *F. incarnatum-equisetii* 중복합체 소속 균주 2종(*F. equiseti* Fe1, *F. incarnatum* Fe6)을 선발하여 분생포자 생산 후 각각 1×10^5 /ml의 농도로 밀의 같은 위치에 동일하게 접종하였음(그림 1-45). 4일 뒤 Z3643 균주의 분생포자를 같은 농도로 각각 접종한 후 3일간 습실 처리하였음. 이후 2주간 온실에서 키웠음.

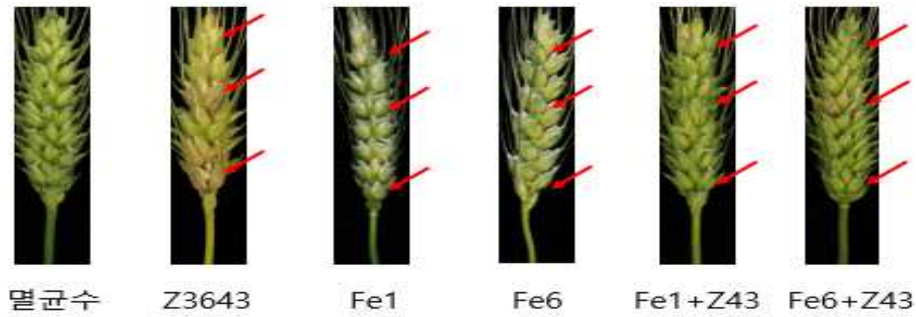


그림 1-45. 밀에서의 병징 발현

- Fe1, Fe6 균주 모두 밀에서 병원성을 나타내지 않았음(그림 1-45).
- Fe1, Fe6 균주의 분생포자 접종 후 Z3643 분생포자를 접종한 결과, Z3643 분생포자만 접종한 밀 head와 비교했을 때 병이 거의 발생하지 않은 것을 확인하였음(그림 1-45).
- 이를 통해 *F. equiseti-incarnatum* 균주의 포자를 밀의 head에 미리 살포할 경우, 추후 *F. graminearum* 균주의 감염을 억제할 수 있는 가능성을 확인하였음.
- 한편, 같은 방식으로 벼의 head에 Fe1 또는 Fe2 균주를 미리 접종한 후 *F. graminearum* Z3643 균주 뿐 아니라 *F. fujikuroi* B14, *F. fujikuroi* B20 균주를 접종하여 병원성을 검정하였음(그림 1-46). 벼의 경우, 접종 균주별 병원성의 차이가 뚜렷하지 않았음. 하지만 균주 접종 후 회수한 벼 낱알을 PDA에 치상하여 낱알 내 곰팡이 감염 정도를 검정한 결과, *F. equiseti-incarnatum* 균주를 먼저 접종한 낱알로부터의 *F. graminearum*과 *F. asiaticum* 균주 회수율이 급격히 떨어졌음(표 1-10).

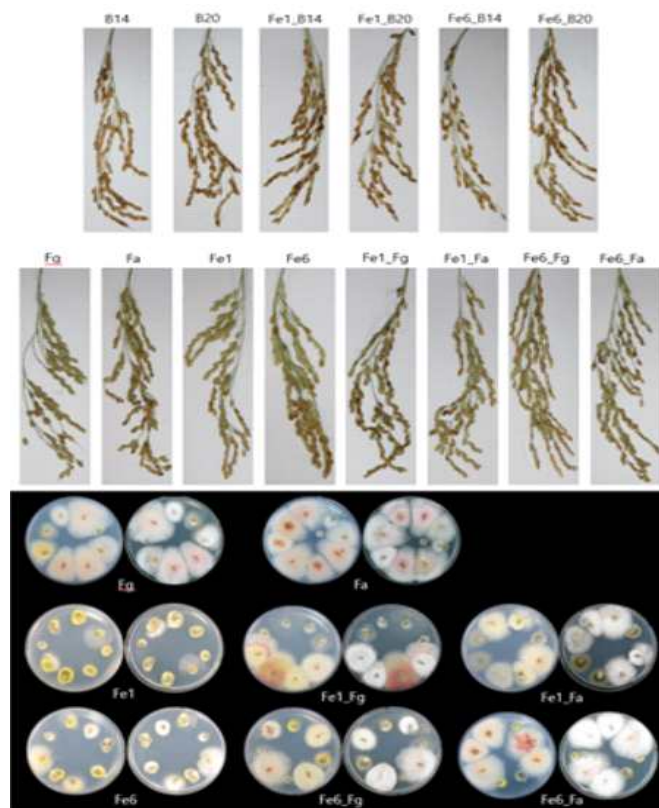


그림 1-46. 벼에서의 병징 발현 및 낱알 내 곰팡이 감염 정도 검정

표 1-10. *F. incarnatum-equisetii* 포자 살포 후 *F. graminearum* 또는 *F. asiaticum* 포자를 접종한 벼 낱알로부터 회수한 *F. graminearum* 또는 *F. asiaticum* 균주의 검출 빈도 (colony 수)

| | Fg | Fa | Fe1 | Fe6 | Fe1_Fg | Fe1_Fa | Fe6_Fg | Fe6_Fa |
|-----------------------|----|----|-----|-----|--------|--------|--------|--------|
| <i>F. graminearum</i> | 5 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>F. asiaticum</i> | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |

Fg, Fa: Fg 또는 Fa의 포자만 살포 // Fe1, Fe6: Fe1 또는 Fe6의 포자만 살포

Fe1_Fg: Fe1 살포 후 Fg 살포 // Fe1_Fa: Fe1 살포 후 Fa 살포

Fe6_Fg: Fe6 살포 후 Fg 살포 // Fe6_Fa: Fe6 살포 후 Fa 살포

2) *F. fujikuroi* B14의 fumonisin 생합성 유전자 발현 검정용 reporter 균주 제작

- Fumonisin은 *F. proliferatum*, *F. verticilloides*, *F. fujikuroi* 등에 의해 생산되는 곰팡이독소로, 지금까지 최소 28종이 보고됨. 대부분 A-series, B-series, C-series, P-series으로 구분되며, B1, B2, B3가 가장 독성이 강함.
- 옥수수에서 가장 흔하게 검출되는 곰팡이독소라고 알려져 있지만, 다른 작물에서도 발견될 수 있음.
- 위장기관에 흡수되지 않고, 장 세포에 노출되어 손상을 줌. 발암물질(2B군)으로써 간 독성과 신경 독성, 면역 억제, 호흡 곤란, 청색증 및 신경관 결손을 야기하며 다른 곰팡이 독소(DON)와 같이 시너지 효과를 내어 가축의 장벽 파괴, 다른 독성 물질과 병원균의 전이를 도움.
- 본 연구진에 의해 fumonisin은 벼 키다리병균 *F. fujikuroi* 줄기마름형 균주의 주요 병원성 인자로 새롭게 동정되었음.
- 기주 식물 내 fumonisin 생성의 활성도를 정량적으로 평가하기 위해 보통 LC/GC 등 화학적 기기분석 방법을 사용함. 하지만 본 연구진에 의해 개발된 Luciferase 유전자 이용 reporter system은 독소 생합성 유전자의 발현과 그에 따른 독소 생성을 좀 더 효율적으로 측정할 수 있음.
- Luciferase reporter assay는 유전자의 전사수준에서 연구에 사용됨. 반딧불이 루시페린(firefly luciferin)이 Luciferase에 의해 옥시루시페린(oxy-luciferin)으로 전환되는 화학반응을 통해 빛이 방출됨. 이때 방출되는 빛 에너지를 luminometer로 정량화하여 분석할 수 있음.
- *F. fujikuroi* B14 균주의 fumonisin gene cluster 내 모든 유전자의 발현을 조절하는 전사조절인자(transcription factor)인 *FUM21*이 존재함. 이 유전자의 promoter 부위(1,327bp)와 firefly Luciferase 유전자의 ORF(1,879bp)를 PCR 증폭으로 융합한 후, B14에 도입하여 homologous recombination 방식으로 유전체에 삽입시킴(그림 1-47의 A). 이렇게 확보한 형질전환체(FLFUM21로 명명)를 fumonisin 생성 유도 배지인 Fructose 액체배지와 10% IMI 액체배지에서 각각 배양한 후, 균체로부터 Luciferase를 측정된 결과 두 배지에서 모두 높은 활성도를 보임(그림 1-47의 B).

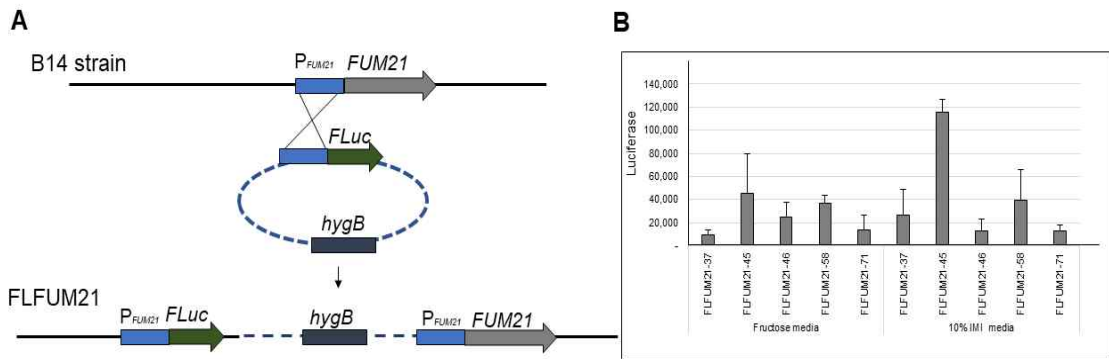


그림 1-47. (A) FLFUM21 형질전환체의 제작 모식도; (B) FLUM21 형질전환체의 Luciferase 활성도

3) Fumonisin 생합성 유전자 발현 억제 미생물추출물의 탐색

- *F. fujikuroi* B14 균주 유래 reporter 균주(FLFUM21)를 YES 액체배지 20ml에 접종한 후, 다양한 미생물추출물을 50% MeOH에 10분 동안 녹인 후 1 μ l씩 처리하였음. 이를 6일간 배양하여 *FUM21*의 발현이 억제되었는지를 Luciferase assay로 검정하였음.
- 미생물추출물은 명지대 희귀 유용 미생물추출물은행(ECUM, Extract Collection of Useful Microorganism)으로부터 분양받았으며, 하나의 추출물에 배양 배지 3종류(BN, GSS, DYC)와 3가지 추출방법(water층, MeOH층, EtOAc층)의 총 9가지 sample을 얻을 수 있음.
- 1차 실험: BN 배지 배양 & MeOH층 분리 미생물추출물 총 88종을 검정한 결과, 무처리구에 비해 Luciferase 활성도를 약 50% 이하로 감소시킨 추출물은 9종(#04302, 09047, 09050, 09061, 11546, 12177, 12210, 12234, 12251)이었음(그림 1-48).

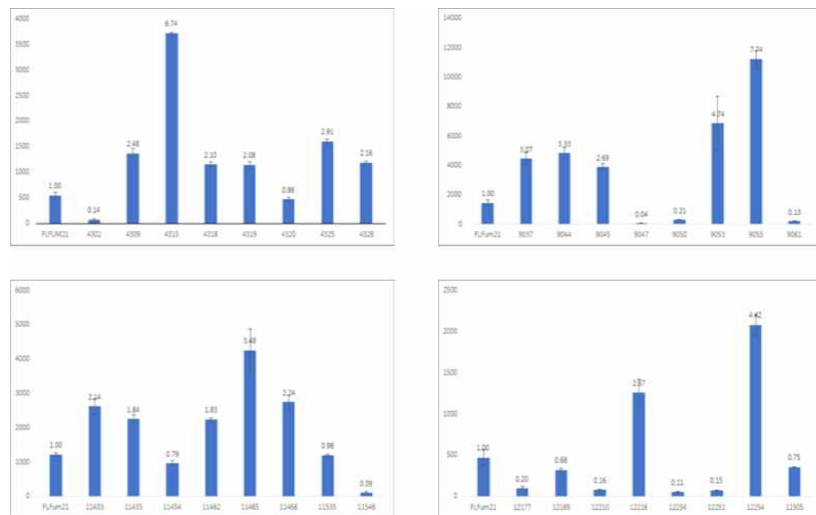


그림 1-48. 1차 미생물추출물 처리 후 Luciferase assay 결과

- 2차 실험: YES 액체배지를 Czapek-Dox broth(CB)로 변경하였음. 총 62종의 미생물추출물을 검정한 결과, 무처리구에 비해 Luciferase 활성도를 약 30% 이하로 감소시킨 추출물은 11종(#01586, 01599, 09082, 09121, 09276, 09083, 09859, 10093, 10095, 10096, 10097)이었음(그림 1-49).

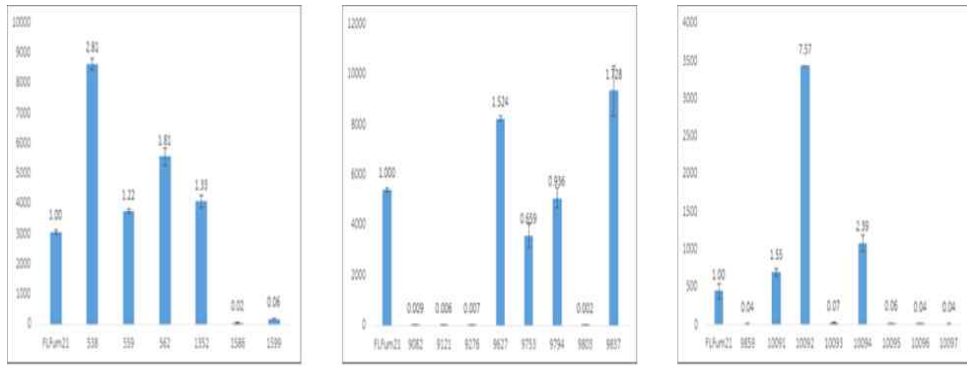


그림 1-49. 2차 미생물추출물 처리 후 Luciferase assay 결과

- 3차 실험: 2차 실험과 동일한 조건으로 총 56종의 미생물추출물을 검정한 결과, 무처리구에 비해 Luciferase 활성도를 약 30% 이하로 감소시킨 추출물은 11종(#12043, 12669, 13234, 13238, 13240, 13374, 14298, 14300, 14302, 14305, 14310)이었음(그림 1-50).

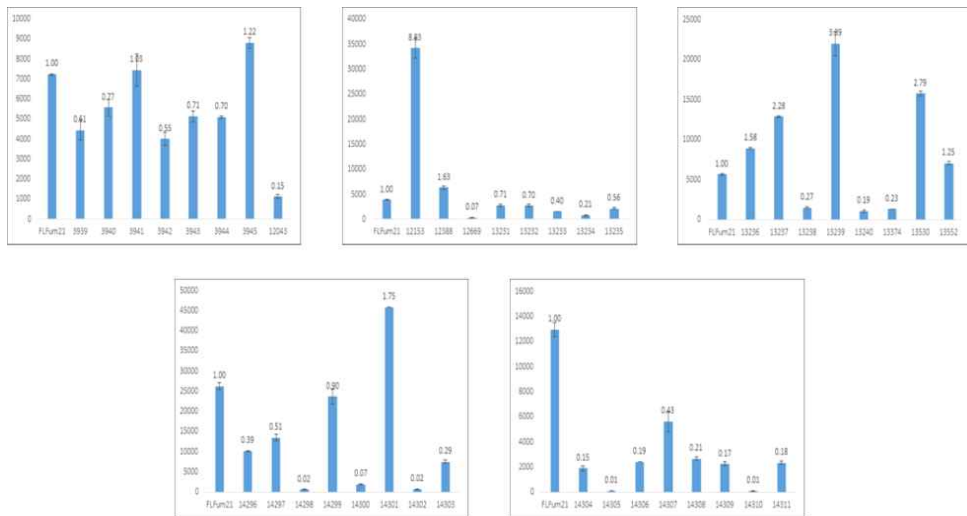


그림 1-50. 3차 미생물추출물 처리 후 Luciferase assay 결과

4) *F. graminearum* Z43 유래 β -tubulin 생합성 유전자의 발현 검정용 reporter 균주 제작과 해당 유전자의 발현 억제 미생물추출물 탐색
 - *F. graminearum* Z43 β -tubulin 유전자 promoter(1,854bp)와 firefly Luciferase 유전자의 ORF(2,617bp)를 이용하여 *F. fujikurii* B14 FLFUM21 균주 제작 방법(vector 융합 및 유전체 도입을 위한 형질전환)과 유사하게 reporter 균주(p β -tub + Luc로 명명)를 제작하였음(그림 1-51). 해당 형질전환체가 reporter 균주로서 작동하는지 확인하기 위하여 PDB에서 3일간 배양한 후 luciferase 활성을 측정하였음(그림 1-51). 실험 결과, reporter 균주에서 야생형 Z3643 균주 대비 Luciferase activity가 크게 증가하는 것을 확인하였음.

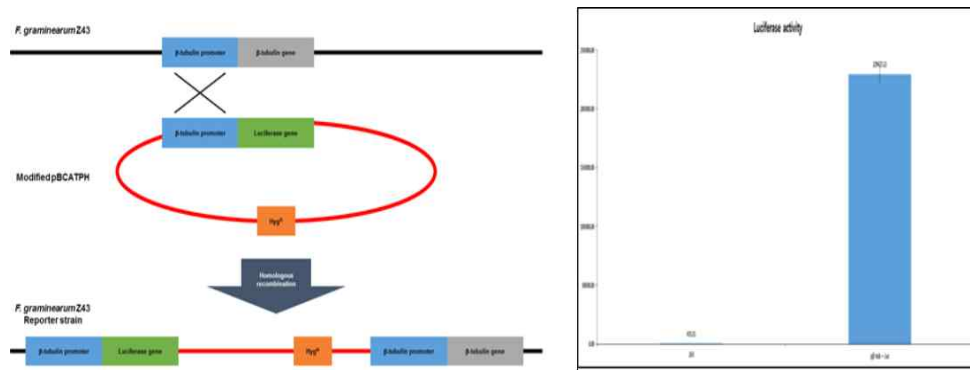


그림 1-51. p β -tub + Luc 형질전환체의 제작 모식도와 Luciferase activity

- Reporter 균주를 PDB 액체배지 20ml에 접종한 후, 다양한 미생물추출물(BN 배지 유래)을 50% MeOH에 10분 동안 녹인 후 1 μ l씩 처리하였음. 이를 3일간 배양하여 β -tubulin 유전자의 발현이 억제되었는지를 Luciferase assay로 검정하였음.
- EtOAc층의 경우, 2회 반복에서 모두 무처리구 대비 활성이 약 50% 이하로 감소한 추출물은 총 10종(#03413, 03422, 03429, 04302, 04309, 04315, 04340, 04697, 04719, 05095)이었음(그림 1-51).
- 반면, 2회 반복에서 모두 무처리구 대비 활성이 대략 2배 이상으로 증가한 추출물은 총 33종(#02046, 03063, 03076, 03094, 03115, 03118, 03127, 03201, 03203, 03204, 03337, 03342, 03345, 03348, 03349, 03350, 03368, 03389, 03402, 04591, 04636, 04643, 05085, 06083, 09045, 09050, 09055, 09061, 12251, 12254, 13614, 13634, 13706)이었음(그림 1-51).

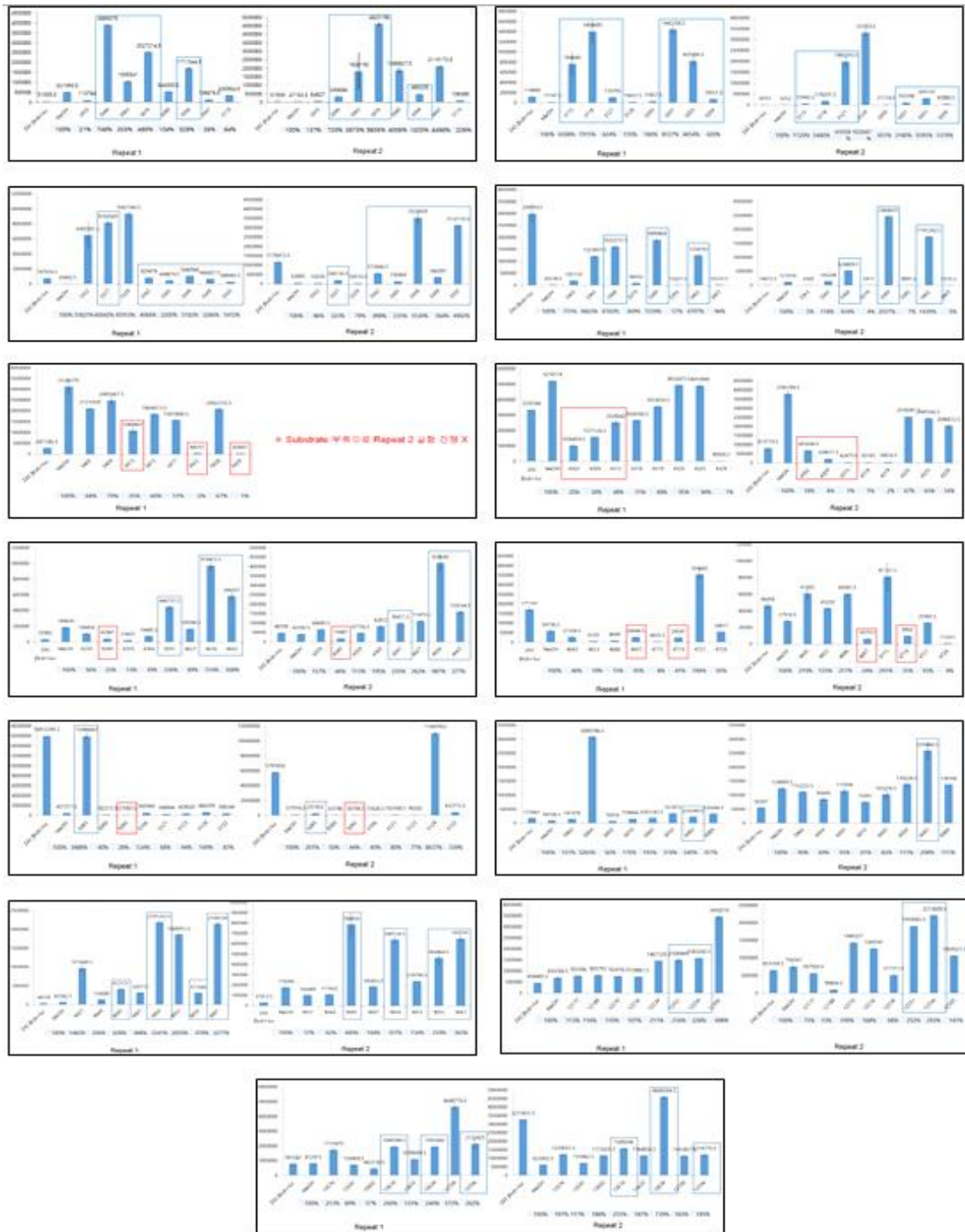


그림 1-51. EtOAc층 미생물추출물 처리 후 Luciferase assay 결과

- MeOH층의 경우, 2회 반복에서 모두 무처리구 대비 활성이 약 50% 이하로 감소한 추출물은 총 6종(#01983, 01988, 02028, 03332, 03349, 04339)이었음(그림 1-52).
- 반면, 2회 반복에서 모두 무처리구 대비 활성이 대략 2배 이상으로 증가한 추출물은 총 26종(#02014, 02035, 03080, 03348, 03363, 03365, 03409, 03415, 03428, 04302, 04309, 04315, 04319, 04320, 04359, 04627, 04636, 04643, 04653, 04715, 04719, 04726, 05106, 13634, 13700, 13706)이었음(그림 1-52).



그림 1-52. MeOH층 미생물추출물 처리 후 Luciferase assay 결과

- 제1협동연구기관(강원대): 고추탄저병균(*C. scovillei*)의 포자 및 발병 특이 유전자의 기능 연구

○ 고추탄저병균 *C. scovillei*의 포자생성 양상 규명

1) 광조건 및 공기 공급에 따른 포자생성 비교

- 본 연구를 수행하기 위하여 1단계 유전체 연구에서 사용한 wild-type 균주인 *C. scovillei* KC05를 사용하였음. 배양 배지는 곰팡이 영양 배지인 V8 agar를 사용하였음.
- 광조건은 25℃ 배양기 내에 형광등(white light)이 사용되었으며, 암조건은 같은 배양기 내에 빛이 차단되는 박스에 넣고 배양하였음. 공기 공급(aeration) 방법은 빛 조건에서 5일 동안 키운 sealing 된 plate를 이후에 unsealing 하여 통기하는 방법으로 적용하였음.
- 그 결과 빛을 주지 않았을 때 9일 차에서 약 38%의 포자 생성률이 떨어지는 것을 확인할 수 있었음. 5일 차에 공기 공급을 진행한 unsealing 처리구에서 포자생성이 증가하기 시작하였고, 9일 차에 공기 공급이 안 된 처리구는 약 77%의 포자만 생성되었음.
- 이 결과는 광조건과 공기 공급이 포자 생성에 영향을 미치며, 특히 광조건이 공기공급과 비교하여 더 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있었음.

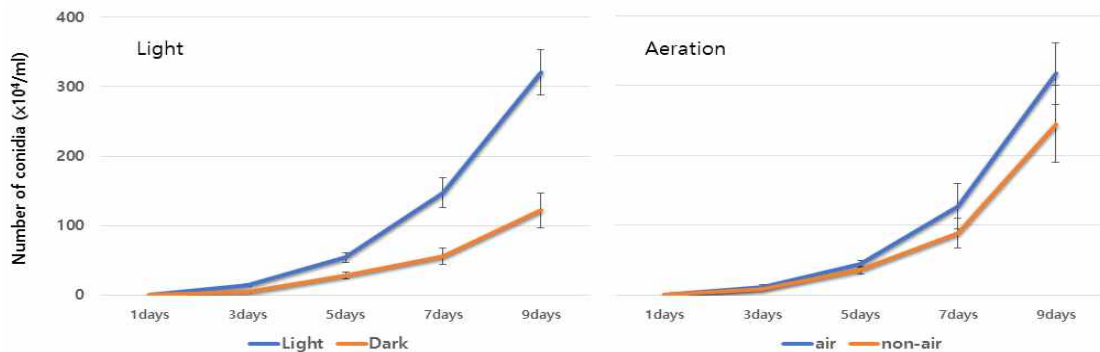


그림 2-1. 광조건과 공기 공급에 따른 *C. scovillei*의 포자생성률 조사

2) pH에 따른 포자생성 비교

- 위 실험에서 얻은 광조건과 공기 공급 조건으로 하여 7일 동안 pH가 서로 다른 V8배지에서 배양하여 생성된 포자 수를 측정하였음.
- 그 결과 pH7에서 가장 많은 포자가 생성되었으며, pH3과 pH9에서도 포자는 생성되었지만, pH7과 비교하여 각각 51%와 59% 정도로 줄어든 포자를 생성하였음.
- 따라서 pH도 포자를 생성하는 데 있어서 영향을 미치는 조건임이 확인되었음.

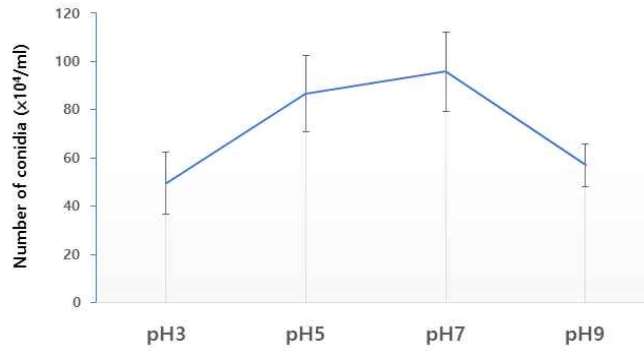


그림 2-2. pH에 따른 *C. scovillei*의 포자생성률 조사

3) 탄소원 및 질소원에 따른 포자생성 비교

- 위와 같은 조건으로 하여 포자를 거의 생성하지 않는 MMA(Minimal Media Agar) 배지에 각각의 탄소원 (Glucose, Cellulose, Sucrose, Mannitol, Sorbitol) 및 질소원 (Ammonium sulfate, Ammonium nitrate, Glycine, Potassium nitrate, Sodium nitrate)을 첨가하여 포자생성을 유도하고 포자수를 측정하였음.
- 우선 탄소원이 첨가된 배지들에서 붉은색 혹은 어두운색으로 pigmentation 되는 현상이 발생하였고, 질소원 첨가 배지들과 비교하면 공중균사가 적은 것이 특징이었음. control로 사용된 MMA배지보다 질소원 처리구에서는 공중균사가 뿌옇게 많이 올라온 것이 보임.

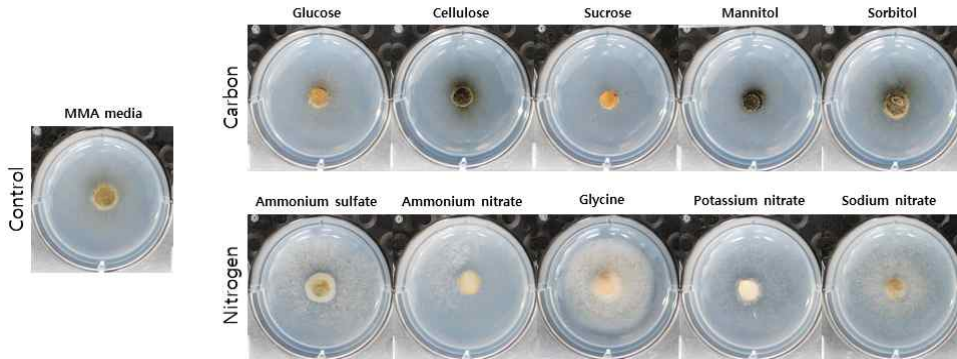


그림 2-3. *C. scovillei*의 탄소원 및 질소원에 따른 콜로니 모양 및 색깔 비교

- 그 결과, 탄소원에 비해 질소원 처리구에서 더 많은 포자를 생성하였음. 질소원을 첨가한 배지에서 4.4배~12.3배 이상 포자를 더 많이 만들었으며, Glycine에서 가장 많은 포자를 생성하였음.
- 탄소원 처리구에서는 0.1배~3.1배 더 많이 만들었으며, Cellulose에서 0.1배로 오히려 줄어드는 포자수가 측정되었음.

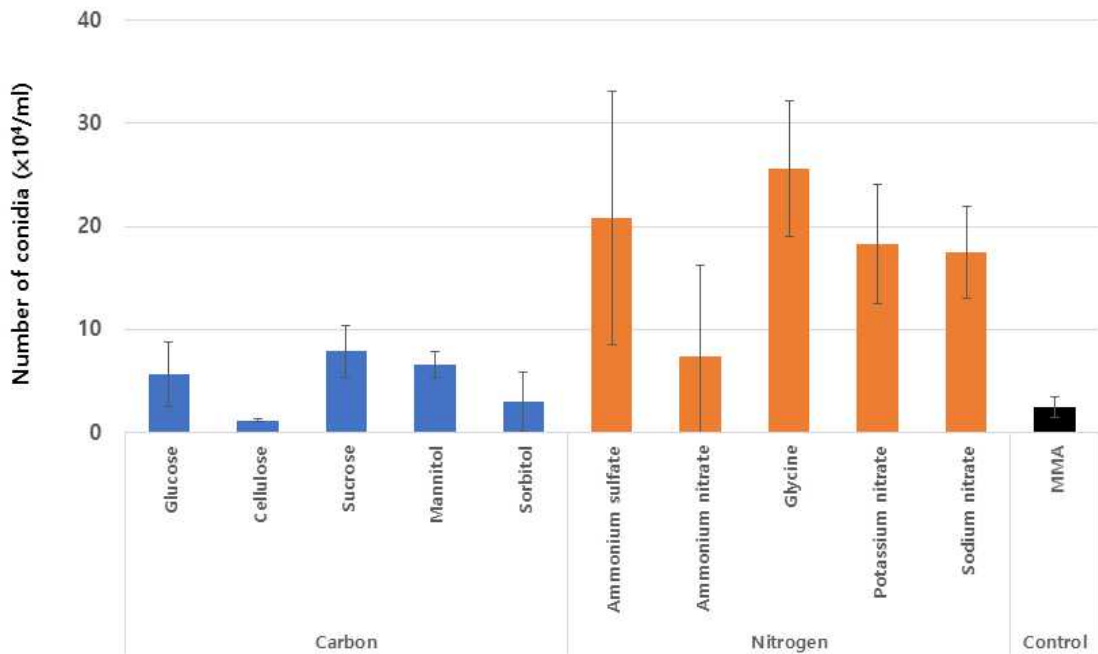


그림 2-4. *C. scovillei*의 탄소원 및 질소원에 따른 포자생성 비교

4) 시간별 분생포자 형성 과정

- 분생포자 생성 단계를 확인하기 위해 OMA에서 배양한 고추 탄저병 *C. scovillei* wild-type의 균사 조각을 slide glass에 올려놓고 습식처리하여 시간대별로 분생포자 생성 과정을 현미경으로 관찰하였음.
- 우선 접종 후 0~1시간까지 stalk elongation을 관찰할 수 있었음. 그 뒤 접종 후 1~3시간까지 conidiophore가 생성되는 것을 관찰할 수 있었고, 접종 후 3~6시간 까지 phialide 끝에서 분생포자가 생성되는 것을 관찰 할 수 있었음. 최초의 분생포자 형성까지 약 6시간이 걸린다는 것을 확인하였음.
- 최초의 분생포자가 형성된 이후 6~12시간 까지 secondary conidia가 분생포자 옆에 붙어 생성 되었음.
- 이러한 실험을 통해 고추탄저병의 분생포자 생성 과정을 확인할 수 있었음.

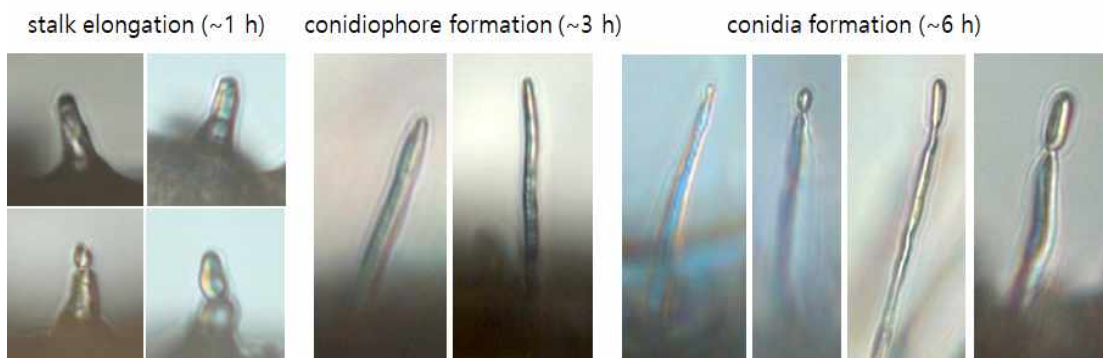


그림 2-5. 고추탄저병(*C. scovillei*)의 conidiophore 및 conidia 생성

Secondary conidia (~12 h)

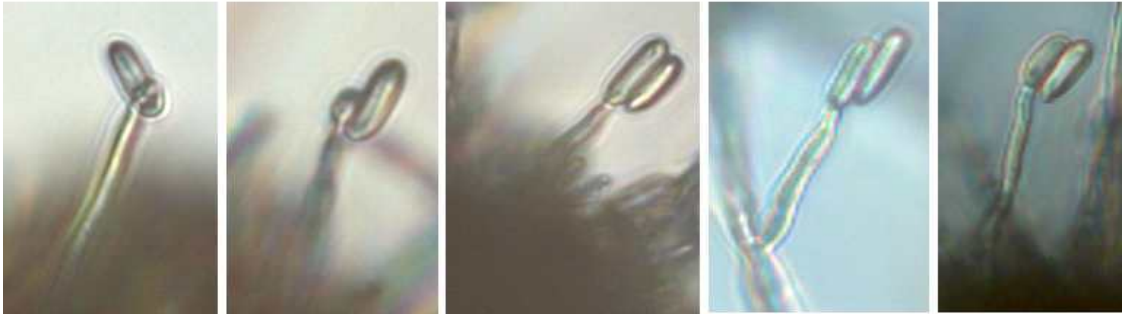


그림 2-6. 고추탄저병(*C. scovillei*)의 secondary conidia 생성

5) 고추 품종별 *C. scovillei*의 포자생성 양상 연구

- 고추 과실에서 포자가 생성되어 병을 퍼뜨리는 데 중요한 역할을 함. 따라서 고추 품종에 따른 과실에서의 *C. scovillei* 포자 생성에 대한 차이를 알아보고자 하였음.
- 포자 농도를 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 10×10^5 conidia/ml로 조정 한 후 1% NaOCl로 소독된 각 고추 과실에 20ul씩 포자현탁액을 접종하였음. 이후 습실처리하여 25℃ 배양기에서 10일 동안 배양하였음. 배양 후 접종부위에 생성된 포자를 긁어내고 그 수를 세어 확인하였음.
- 사용된 품종은 국내에서 많이 재배하는 품종인 녹광, 마니따, 남자의자격, 대장정, 금빛을 1차 선발하였음.



그림 2-7. 고추품종에 따른 포자생성 양상시험

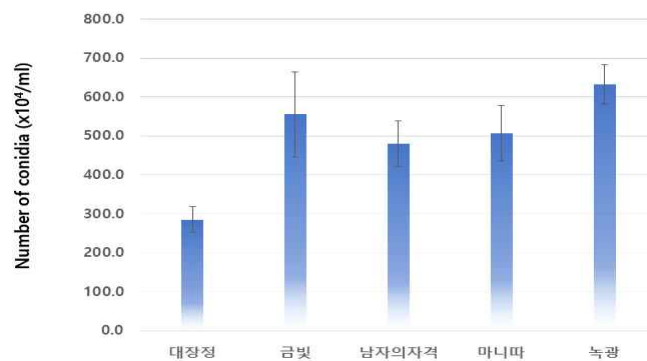


그림 2-8. 고추품종에 따른 포자생성 수치 결과

- 그 결과 대장정 품종의 포자 수가 다른 나머지 품종에 비해 약 45~59% 적은 수의 포자를 생성하였음. 이 결과는 고추 품종에 따라 고추 탄저병원균의 포자 생성에 차이를 나타낼 수 있다는 것을 의미함.

○ 고추탄저병원균 *C. scovillei*의 포자 접종에 따른 고추 품종별 감염 및 발병 특성 연구

- 식물병원성 진균은 일반적으로 기주 식물 표피 위에 발아한 후 균사가 내부의 조직에 침입하기 전에 균사 또는 발아관의 선단이 크게 되어 흡반과 같은 특수한 형태인 부착기를 생성함.
- *C. scovillei*의 발병 특성을 알아보기 위하여 식물표면과 같은 소수성 특성의 cover glass 위에 포자현탁액을 올려놓고 습실처리하여 발아를 유도하였음.
- 그 결과 접종 3시간 후에 포자에서 발아관이 나오고 4시간째 발아관 끝이 부풀어 오르며 5시간째 부착기가 만들어짐. 그리고 24시간 후에는 부착기가 성숙하여 melanization되는 현상을 보였음.



그림 2-9. *C. scovillei*의 발아 및 부착기 생성

- *C. scovillei*는 부착기를 이용해 고추 과실을 침투하여 병을 발생시킬 수 있다는 것을 확인하였음.
- 감염 특성을 연구하기 위하여 탄저병 감수성인 녹광 고추 과실에 균사 또는 포자현탁액을 접종하여 7일 후 그 차이를 비교해 보았음.
- 균사 접종은 PDA배지에서 암조건에서 배양한 균사를 4 mm agar plug로 잘라낸 조각을 고추 과실 위에 올려놓고 발병을 유도하였음. 상처 조건은 sterile 된 needle을 이용하여 10군데 정도 무작위로 찔러 상처를 내었음.
- 포자 접종은 포자 농도를 혈구계산판(hemocytometer)을 이용하여 10×10^5 conidia/ml로 조정 후 1% NaOCl로 소독된 각 고추 과실에 20ul씩 포자현탁액을 접종하였음. 상처 조건은 균사 접종과 동일함.
- 두 접종 방법 모두에서 상처를 내었을 때 뚜렷한 병징이 드러났으며, 균사보다 포자 접종에서 병의 전진이 뚜렷이 빠르게 나타나는 것이 확인되었음. 그리고 포자를 상처내어 접종한 처리구에서 특히 오렌지색의 많은 양의 포자 덩어리가 만들어지는 것이 확인되었음. 따라서 고추탄저병원균의 발병의 주요 원인은 포자와 상처에 의한 것임을 알 수 있었음.
- 식물세포에서의 침입 후 감염단계에 관한 특성 연구를 위하여 양과 표피 세포에 포자를 접종하여 Lactophenol blue로 염색하여 관찰하였음. 접종 48시간 이후에 부착기로부터의 침입균사가 관찰되었으며, 균사에서 만드는 hyphal appressorium도 관찰되었음.
- 부착기에서 생성된 침입균사는 식물세포 안에 들어가 있어서 염색 시약으로 염색되지 않았으며, 균사보다 더 굵어 일반적인 감염균사의 특징을 보였음.

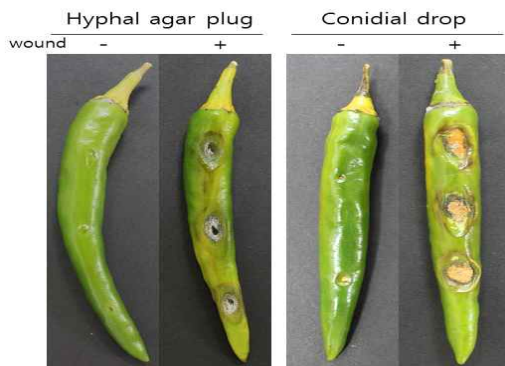


그림 2-10. *C. scovillei*의 균사 및 포자 접종에 따른 발병 특성 비교

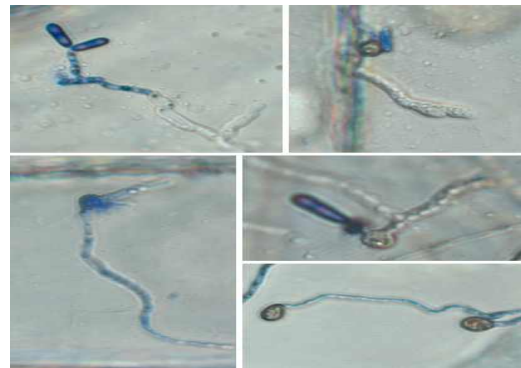


그림 2-11. *C. scovillei*의 양과 세포에서의 발병 특성 관찰

- 좀 더 자세히 관찰하기 위하여 GFP 형광단백질을 발현하는 *C. scovillei*를 고추과실에 접종하여 형광현미경을 통해 관찰하였음.
- 고추탄저병균의 분생포자를 4×10^4 conidia/mL의 농도로 포자현탁액을 만들고 고추 과실에 20 μ L씩 포자를 접종하고 습실처리 하였음.
- 광학현미경 및 형광현미경 상에서 관찰한 결과 접종 후 약 24시간 까지 dendroid structure가 고추 과실 cuticle 층에 형성되는 것을 관찰할 수 있었고, dendroid structure를 따라 cuticle 내부에서 균사가 성장하다가, 접종 후 48~72시간이 지나 일정 단계에 도달하면 cuticle 층에서 epidermal cell로 invasive hypha가 생성되는 것을 관찰할 수 있었음. 생성된 invasive hypha는 고추의 epidermal cell의 가장자리를 따라 자라다가 plasmodesmata를 통해 옆 세포로 이동하며 과실을 감염시켰음.

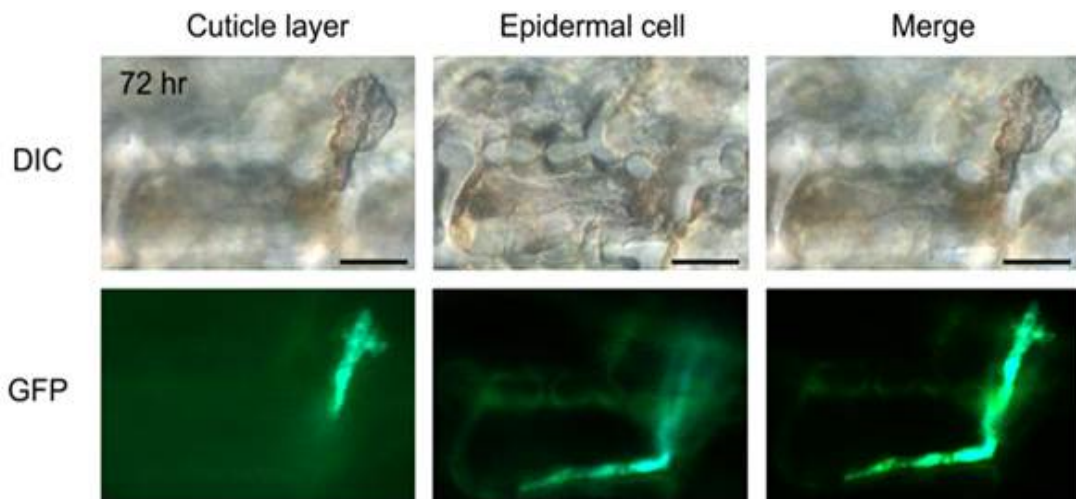


그림 2-12. 형광단백질로 태깅된 고추탄저병균(*C. scovillei*)의 고추 감염

○ 고추탄저병균 *C. scovillei*의 포자생성 전사체 및 발병 유전자 연구

1) 고추탄저병균 *C. scovillei*의 포자생성과 발병 단계별 전사체의 생물정보학적 분석 및 관련 유전자 선별

- 포자 생성 전 단계 조직(비교군), 포자생성 단계별 조직, 그리고 포자생성 억제 및 촉진 조직으로부터 total RNA를 추출하여 RNA-seq 분석을 하였음. 각 단계별 전사체 분석은 log2(FC)로 변환하여 표현하였음.



그림 2-13. RNA-seq 분석에 사용된 포자 생성 전 단계 조직, 포자 생성 조직, 포자 샘플

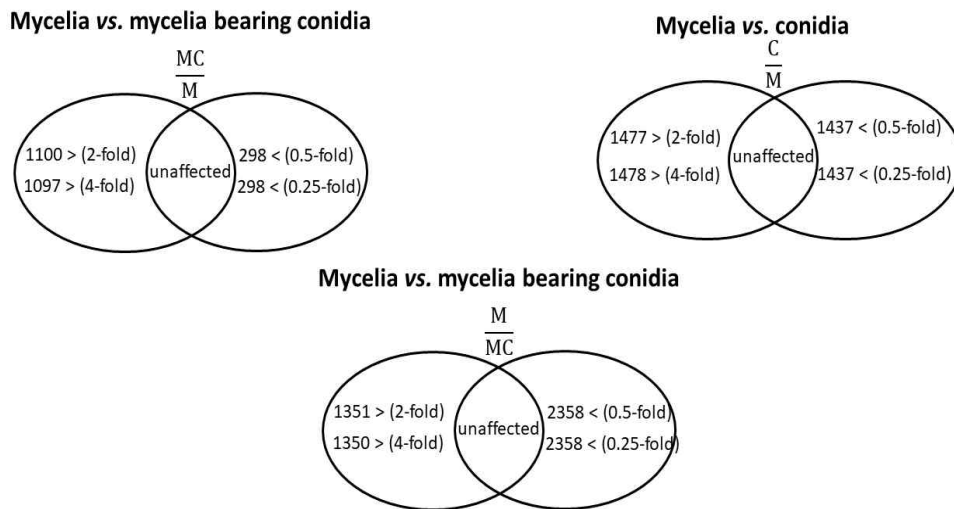


그림 2-14. 포자 생성 전 단계 조직, 포자생성 조직, 포자 조직간 DEGs(different expressed genes) 분석 결과

- 포자 생성 전 단계 조직과 포자 생성 단계 조직간 비교 결과 1,100개의 포자생성 촉진 (up-regulation) 유전자의 발현이 확인되었고, 억제(down-regulation)된 유전자는 298개로 확인 되었음.

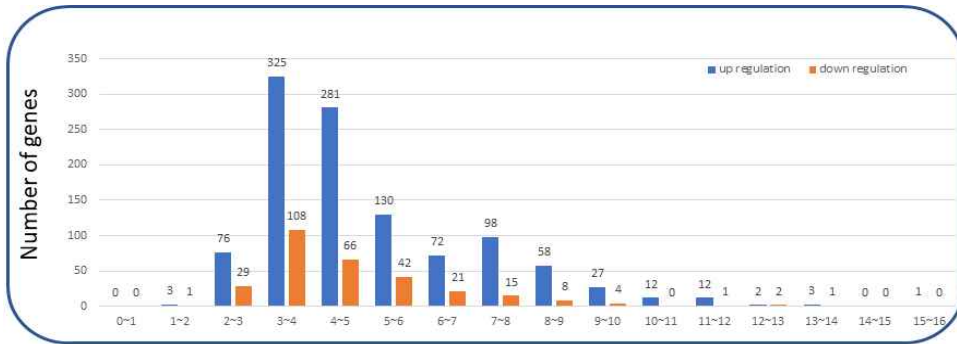


그림 2-15. 포자 생성 전 단계 균사 조직과 포자가 형성된 균사 조직간의 포자생성 촉진 또는 억제된 유전자 수의 그래프

- 포자 생성 단계 조직과 포자 조직간 비교는 1,351개의 포자생성 촉진된 유전자와 2,368개의 하향 조절된 유전자 발현이 확인되었음.

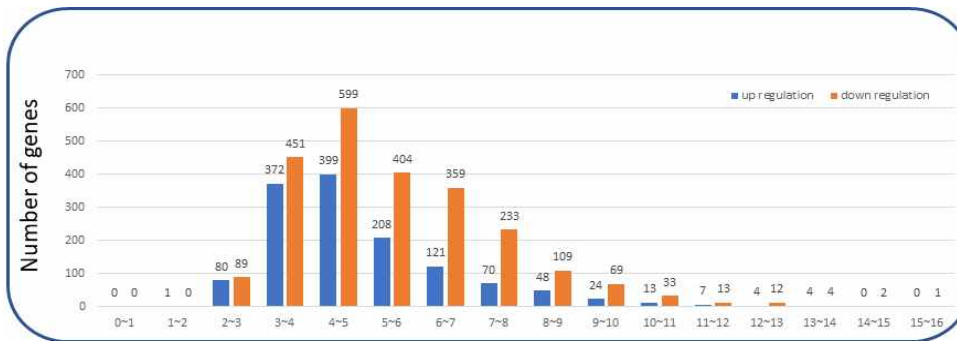


그림 2-16. 포자가 형성된 균사 조직과 포자 조직간의 포자생성 촉진 또는 억제 유전자 수의 그래프

- 포자 생성 전 단계 조직과 포자 조직간 비교결과 1,478개의 포자생성 촉진된 유전자의 발현이 확인되었고 1,437개의 억제된 유전자의 발현이 확인되었음.

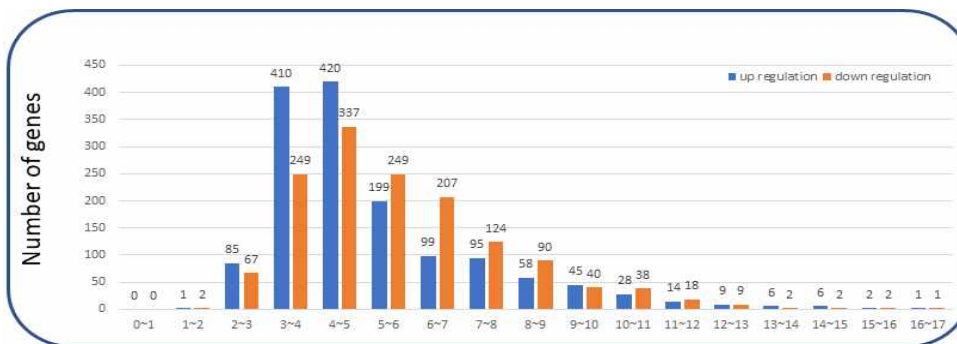


그림 2-17. 포자 생성 전 단계 균사 조직과 포자 조직간의 포자생성 촉진 또는 억제 유전자 수의 그래프

- 또한, 각 단계별(균사단계, 부착기형성단계, 포자단계, 활물기생단계, 사물기생단계) RNA-seq 데이터 분석을 통해 heat map을 제작하고 포자생성 관련 유전자들의 발현량 확인을 통해 포자생성 및 발병 관련 유전자 선별하였음.
- 전사체 분석을 통해 *Colletotrichum scovillei* KC05 균주의 HOX2, HOX7, CAP1, PMK1 등의 유전자를 선별하였음.
- RNA-seq 분석을 통해 infection 후 40 h 단계와 infection 후 60 h 단계에서 발현량이 높은 2개의 유전자 CUT2와 MEL1 (SCD1)을 선별하였음.

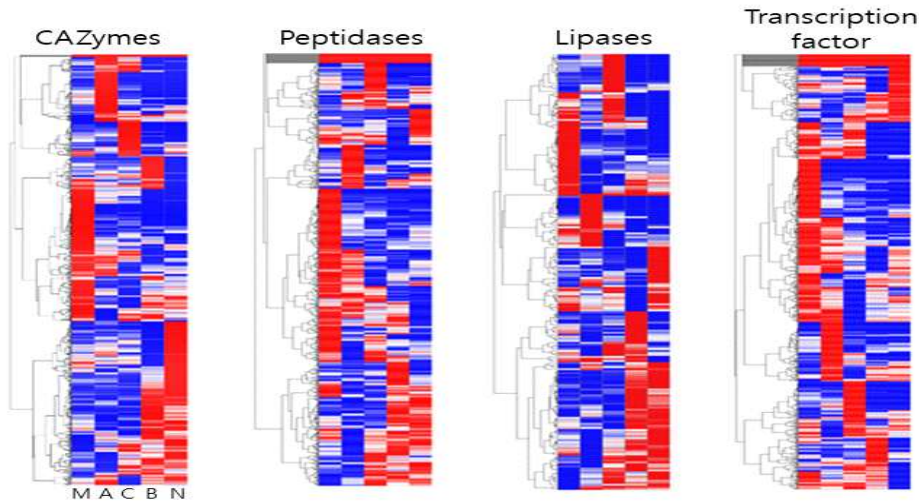


그림 2-18. RNA-seq 데이터 분석을 통한 해당 기능 관련 각 단계별 유전자들의 발현량을 표현한 heat map, M : 균사단계, A : 부착기형성단계, C : 포자단계, B : 활물기생단계, N : 사물기생단계 (붉은색일수록 발현량이 높음)

- CUT2는 conidia, appressorium, infection 40 h, infection 72 h 모두 mycelia stage에 비해 발현량이 높았으며 특히 infection 단계에서 발현량이 높았음.
- MEL1 (SCD1)은 conidia, appressorium, infection 40h, infection 72 h 모두 mycelial stage에 비해 발현량이 높았으며 appressorium 단계부터 infection 72 h 단계까지 발현량이 특히 높았음.

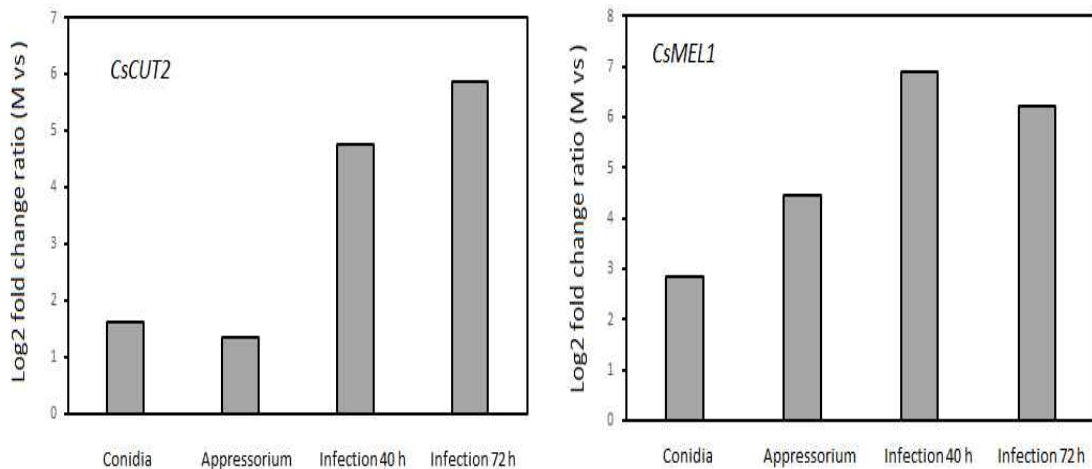


그림 2-19. *CsCUT2*와 *CsMEL1* 유전자의 각 단계별 RNA-seq

○ 고추탄저병균 *C. scovillei*의 포자생성 및 발병 기작 연구

- 1) 고추탄저병균 *C. scovillei*의 포자생성 특이 유전자의 기능 연구 및 공기전반 종합적 이해
- RNA-seq 데이터 분석을 기반으로 포자 생성 관련 유전자 결실돌연변이체 제작을 위해 유전자 구조도를 설계하고 본 사업의 1단계에서 확립한 고추탄저병균 형질전환 기법을 이용하여 결실돌연변이체를 제작한 후, 서던 블롯과 RT-PCR을 수행하여 결실돌연변이체의 유전자 결실을 확인하였음.
 - 포자생성 특이 유전자의 기능 연구를 위해 고추탄저병균의 homeobox transcription factor를 선발하여 유전자결실돌연변이체를 생성하였음(CsHOX1에서 CsHOX10까지).

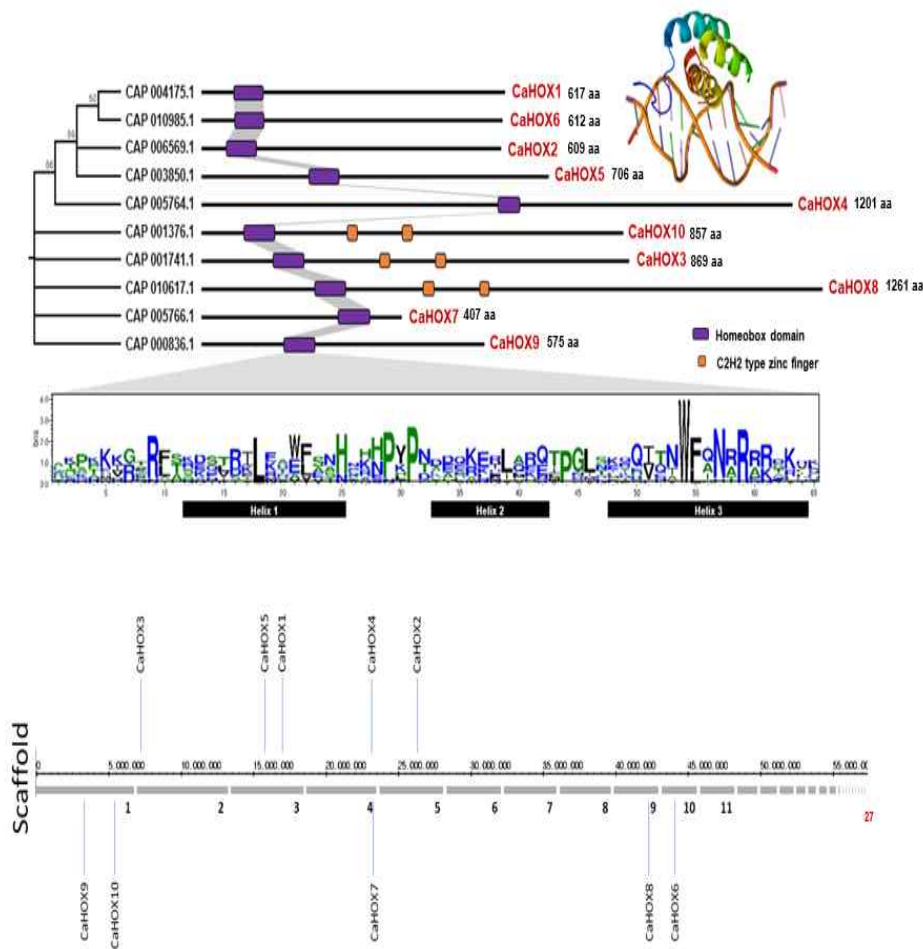


그림 2-20. 선발한 homeobox transcription factor의 domain 분석

- RNA-seq 데이터 분석을 기반으로 포자 생성 관련 유전자 결실돌연변이체 제작을 위해 유전자 구조도를 설계하고 본 사업의 1단계에서 확립한 고추탄저병균 형질전환 기법을 이용하여 결실돌연변이체를 제작한 후, 서던 블롯과 RT-PCR을 수행하여 결실돌연변이체의 유전자 결실을 확인하였음.
- 포자생성 특이 유전자의 기능 연구를 위해 고추탄저병균의 homeobox transcription factor를 선발하여 유전자결실돌연변이체를 생성하였음(CsHOX1에서 CsHOX10까지). 또한 mitogen-activated protein kinase 1 유전자(CsPMK1) 결실돌연변이체와 adenylate cyclase-associated protein 1 유전자(CsCAP1) 결실돌연변이체를 생성하였음.

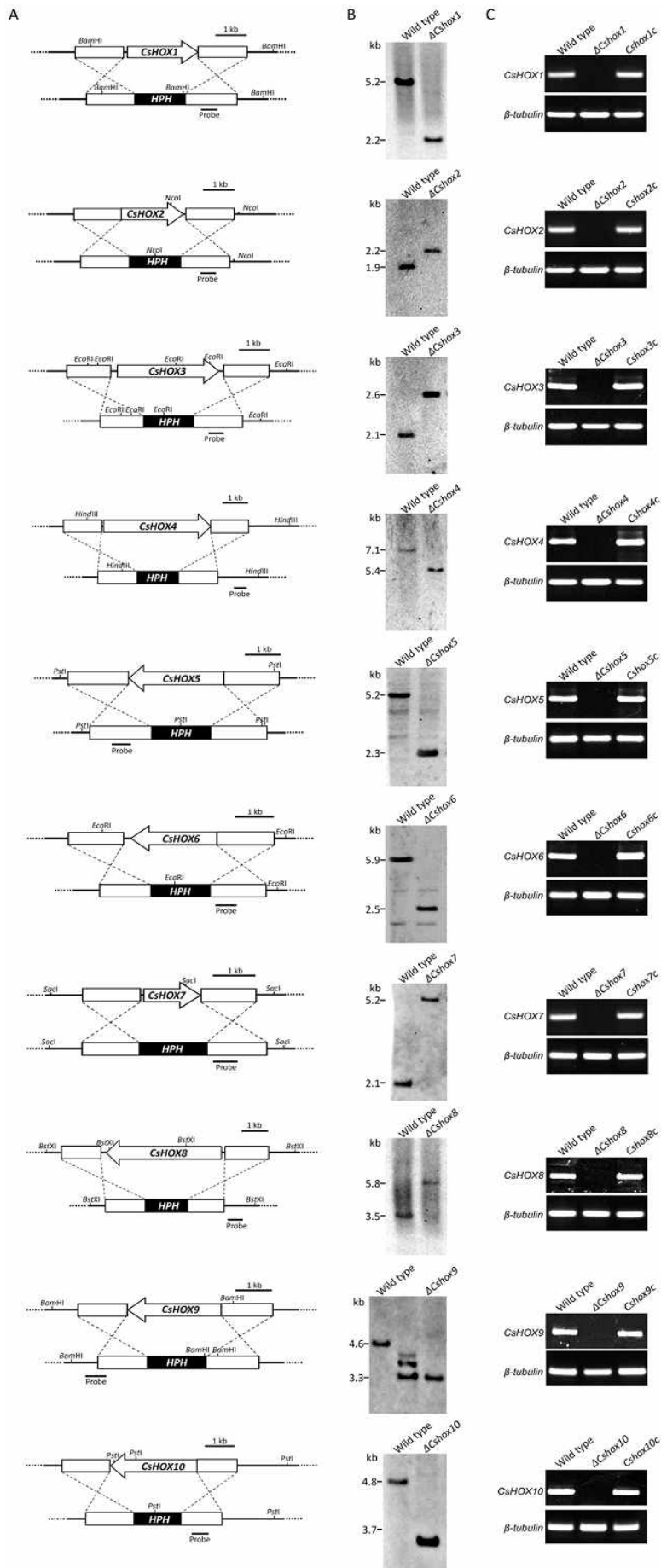


그림 2-21.
 결실돌연변이체
 제작을 위한 유전자
 구조도 및 서던
 블롯과 RT-PCR을
 통한
 결실돌연변이체의
 유전자 결실 확인

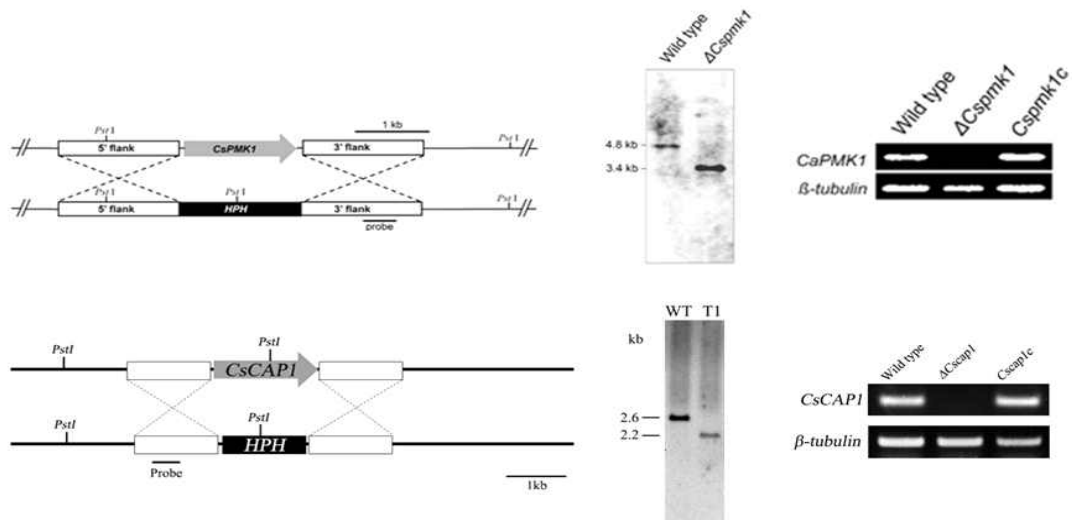


그림 2-22. 결실돌연변이체 제작을 위한 유전자 구조도 및 서던 블롯과 RT-PCR을 통한 결실돌연변이체의 유전자 결실 확인

- 그 결과 $\Delta Cshox2$ 는 분생포자를 전혀 생성하지 못하는 표현형을 나타내었고, $\Delta Cshox3$ 과 $\Delta Cshox6$ 는 분생포자 형성이 wild-type에 비해 떨어지는 표현형을 나타내었음. 이러한 결과를 통해 HOX2, HOX3, HOX6가 고추탄저병균의 분생포자의 형성을 조절하는 유전자라는 것을 확인하였음.

표 2-1. $\Delta Cshox$ mutant들의 표현형 확인

| Strain | Growth (mm) ^a | | Conidiation (10 ⁴ /ml) ^c | Conidial size (μm) ^d | | Conidial germination (%) ^e | Appressorium formation (%) ^f |
|------------------|--------------------------|----------------------------|--|---------------------------------|------------------------|---------------------------------------|---|
| | CMA | MMA | | Length | Width | | |
| Wild-type | 49.3 ± 0.3 ^A | 44.3 ± 0.5 ^{ABC} | 155.0 ± 9.1 ^A | 10.9 ± 1.3 ^D | 3.7 ± 0.5 ^B | 97.5 ± 1.3 ^A | 90.0 ± 3.2 ^A |
| $\Delta Cshox1$ | 31.8 ± 0.5 ^E | 24.5 ± 0.9 ^H | 158.8 ± 12.9 ^A | 19.9 ± 2.4 ^A | 3.4 ± 0.3 ^C | 81.0 ± 4.4 ^D | 31.0 ± 6.7 ^H |
| $Cshox1c$ | 48.5 ± 0.6 ^A | 44.0 ± 0.8 ^{ABC} | 148.5 ± 9.8 ^A | 10.6 ± 1.1 ^D | 3.8 ± 0.5 ^B | 97 ± 1.8 ^{AB} | 90.5 ± 4.5 ^A |
| $\Delta Cshox2$ | 42.3 ± 0.5 ^D | 32.8 ± 0.9 ^G | 0 ^D | ND | ND | ND | ND |
| $Cshox2c$ | 49.0 ± 0.8 ^A | 44.3 ± 1.3 ^{ABC} | 150.8 ± 6.4 ^A | 11.0 ± 1.2 ^D | 3.6 ± 0.3 ^B | 94.8 ± 2.2 ^{ABC} | 89.8 ± 5.1 ^A |
| $\Delta Cshox3$ | 48.3 ± 0.3 ^A | 44.0 ± 0.8 ^{ABC} | 87.5 ± 6.5 ^C | 15.1 ± 2.3 ^B | 4.2 ± 0.3 ^A | 92.0 ± 3.2 ^{BC} | 88.8 ± 3.9 ^A |
| $Cshox3c$ | 48.8 ± 0.9 ^A | 43.8 ± 0.5 ^{ABCD} | 153.0 ± 13.5 ^A | 10.9 ± 1.1 ^D | 3.7 ± 0.4 ^B | 96.8 ± 1.7 ^{AB} | 89.3 ± 5.5 ^A |
| $\Delta Cshox4$ | 44.5 ± 0.6 ^C | 38.0 ± 0.8 ^F | 150.5 ± 8.8 ^A | 14.2 ± 1.2 ^C | 4.4 ± 0.4 ^A | 92.8 ± 2.2 ^{ABC} | 89.5 ± 4.4 ^A |
| $Cshox4c$ | 48.8 ± 0.9 ^A | 44.8 ± 0.5 ^{AB} | 157.5 ± 13.0 ^A | 11.0 ± 1.6 ^D | 3.9 ± 0.4 ^B | 95.8 ± 2.1 ^{ABC} | 89.0 ± 4.0 ^A |
| $\Delta Cshox5$ | 48.5 ± 0.6 ^A | 41.5 ± 0.6 ^E | 151.3 ± 7.0 ^A | 15.7 ± 1.0 ^B | 4.4 ± 0.3 ^A | 90.5 ± 2.6 ^C | 89.0 ± 5.0 ^A |
| $Cshox5c$ | 48.5 ± 0.6 ^A | 44.5 ± 0.6 ^{ABC} | 146.8 ± 4.7 ^A | 10.9 ± 1.1 ^D | 3.6 ± 0.4 ^B | 95.3 ± 2.2 ^{ABC} | 88.8 ± 5.9 ^A |
| $\Delta Cshox6$ | 47.3 ± 0.5 ^B | 43.3 ± 0.5 ^{CD} | 123.0 ± 6.3 ^B | 10.6 ± 1.2 ^D | 3.7 ± 0.4 ^B | 95.5 ± 3.4 ^{ABC} | 89.0 ± 5.4 ^A |
| $Cshox6c$ | 48.8 ± 0.9 ^A | 44.3 ± 0.5 ^{ABC} | 148.5 ± 6.0 ^A | 10.9 ± 1.4 ^D | 3.7 ± 0.4 ^B | 94.8 ± 2.5 ^{ABC} | 90.0 ± 5.4 ^A |
| $\Delta Cshox7$ | 48.5 ± 0.6 ^A | 42.5 ± 0.6 ^{DE} | 156.8 ± 15.9 ^A | 10.8 ± 1.3 ^D | 3.8 ± 0.3 ^B | 95.0 ± 2.2 ^{ABC} | 0 ^F |
| $Cshox7c$ | 48.8 ± 0.7 ^A | 43.8 ± 0.9 ^{ABCD} | 150.0 ± 4.4 ^A | 10.9 ± 1.6 ^D | 3.8 ± 0.4 ^B | 94.5 ± 3.4 ^{ABC} | 89.3 ± 5.1 ^A |
| $\Delta Cshox8$ | 48.0 ± 0.8 ^{AB} | 42.3 ± 1.3 ^{BCD} | 158.1 ± 9.8 ^A | 11.0 ± 1.3 ^D | 3.8 ± 0.3 ^B | 95.8 ± 2.2 ^{ABC} | 85.3 ± 4.3 ^{AD} |
| $Cshox8c$ | 48.8 ± 0.9 ^A | 44.3 ± 0.9 ^{ABC} | 154.3 ± 19.6 ^A | 11.0 ± 1.2 ^D | 3.6 ± 0.4 ^B | 95.5 ± 2.1 ^{ABC} | 90.3 ± 3.5 ^A |
| $\Delta Cshox9$ | 48.0 ± 0.8 ^{AB} | 43.3 ± 0.5 ^{CD} | 150.0 ± 7.7 ^A | 11.0 ± 1.4 ^D | 3.8 ± 0.3 ^B | 95.3 ± 2.5 ^{ABC} | 86.0 ± 3.7 ^{AD} |
| $Cshox9c$ | 48.8 ± 0.8 ^{AB} | 45.0 ± 1.4 ^A | 155.5 ± 14.8 ^A | 11.0 ± 1.4 ^D | 3.7 ± 0.4 ^B | 94.5 ± 2.4 ^{ABC} | 88.8 ± 6.2 ^A |
| $\Delta Cshox10$ | 48.8 ± 0.9 ^A | 43.8 ± 0.9 ^{ABCD} | 141.8 ± 12.6 ^A | 10.8 ± 1.3 ^D | 3.7 ± 0.3 ^B | 95.0 ± 2.2 ^{ABC} | 89.8 ± 4.6 ^A |
| $Cshox10c$ | 49.0 ± 0.8 ^A | 43.8 ± 0.9 ^{ABCD} | 148.8 ± 9.4 ^A | 11.1 ± 1.3 ^D | 3.7 ± 0.3 ^B | 94.5 ± 2.9 ^{ABC} | 89.8 ± 5.0 ^A |

- 포자의 길이에서는 $\Delta Cshox1$, $\Delta Cshox3$, $\Delta Cshox4$, $\Delta Cshox5$ 에서 wild-type에 비해 비정상적으로 긴 형태의 분생포자를 형성하였음. 이 결과는 HOX1, HOX3, HOX4, HOX5가 고추탄저병균의 분생포자의 길이를 조절하는 유전자라는 것을 의미함.

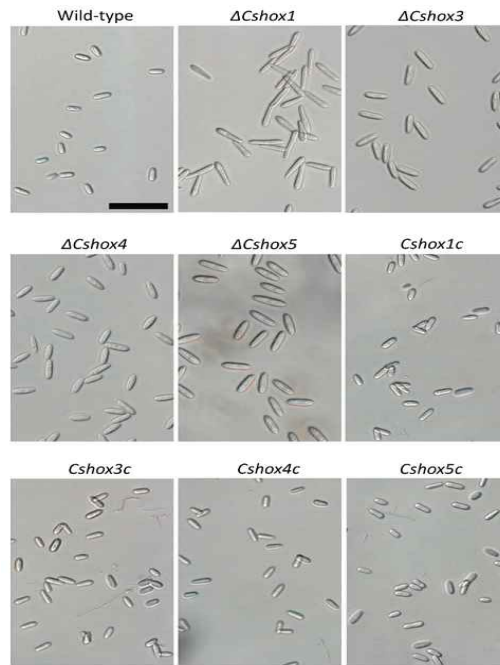


그림 2-23. $\Delta Cshox$ 뮤탄트들의 포자형태

- $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 에서도 포자생성 관련 표현형이 확인되었음. $\Delta Cspmk1$ 은 길이가 긴 분생포자를 생성하였으며 반면 $\Delta Cscap1$ 은 길이가 짧은 분생포자를 형성하였음. 이러한 결과는 고추탄저병균의 mitogen-activated protein kinase 1과 adenylate cyclase-associated protein 1이 분생포자의 길이를 조절하는데 있어 중요한 기능을 한다는 것을 의미함.

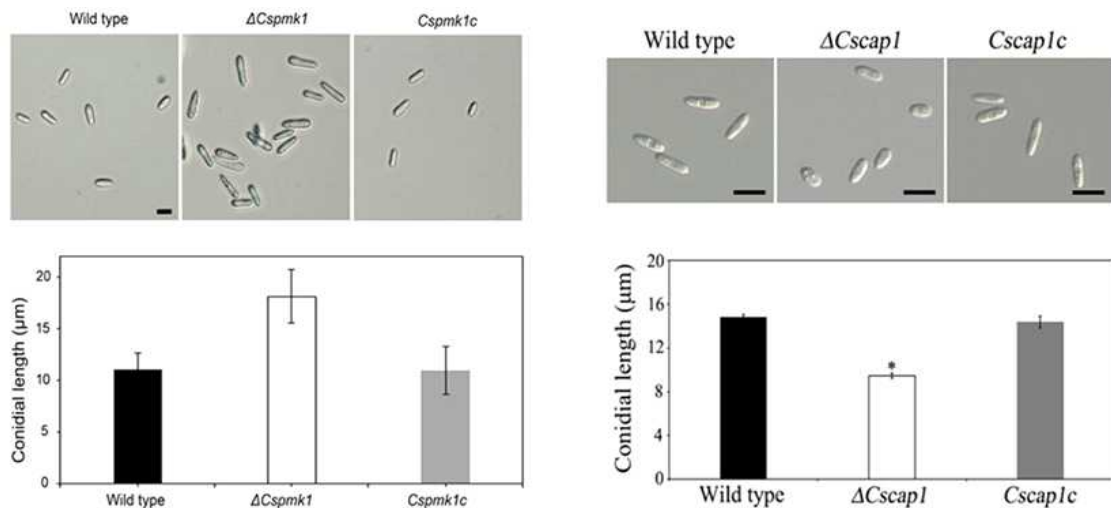


그림 2-24. $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 뮤탄트들의 포자형태

2) 고추탄저병균 *C. scovillei*의 발병 특이 유전자의 기능 연구 및 발병 종합적 이해

- 발병 특이 유전자의 기능을 연구하기 위하여 생성한 유전자결실돌연변이체들의 부착기 형성을 관찰하였음. 부착기 형성을 관찰하기 위하여 분생포자를 소수성 표면인 커버 글라스위에 접종하였으며 습실처리 후 분생포자 형성을 확인하였음.

- Homeobox transcription factor 유전자가 제거된 돌연변이체들 중에서 $\Delta Cshox7$ 가 부착기를 형성하지 못하는 표현형을 나타내었음. cAMP나 $CaCl_2$ 를 처리하였을 때 분생포자 형성율이 약 20%, 40%로 회복되었으며, cAMP와 $CaCl_2$ 를 동시에 처리하였을 때는 분생포자 형성율이 약 80% 까지 회복되었음. 이러한 결과는 HOX7이 고추탄저병균의 부착기 형성에 중요한 기능을 하며 cAMP 및 $CaCl_2$ 과 관련된 신호전달에 연관된다는 것을 의미함.

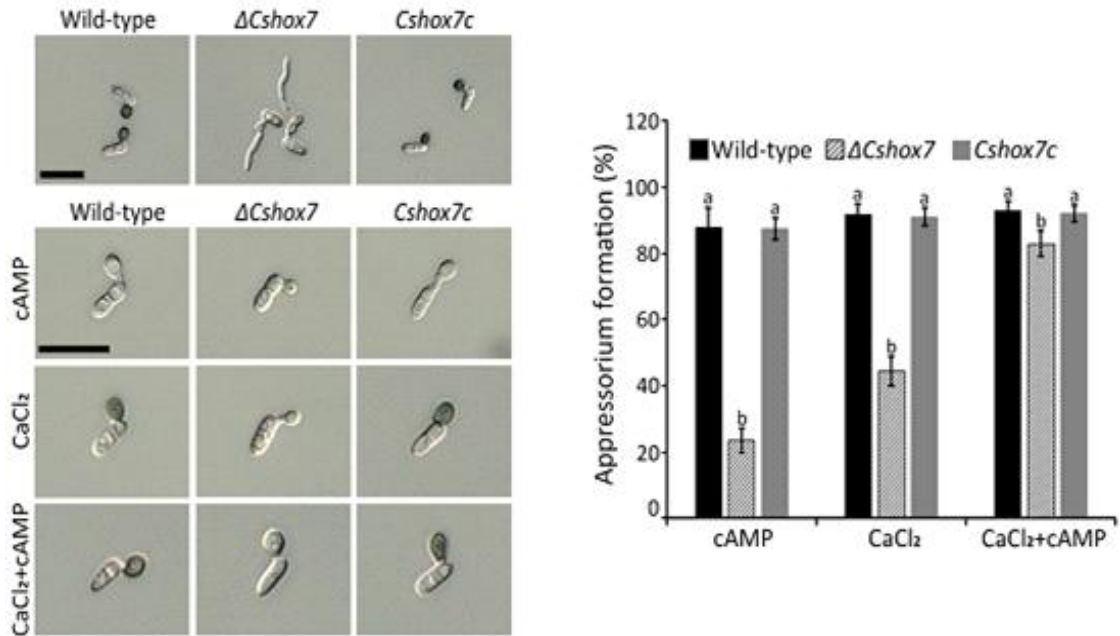


그림 2-25. $\Delta Cshox7$ 의 부착기 형성

- CUT2 유전자에 대한 $\Delta Cscut2$ 뮤탄트와 MEL1(SCD1) 유전자에 대한 $\Delta Cssc1$ 뮤탄트의 경우 부착기 생성율에서 wild-type과 거의 차이가 없었음. 하지만 $\Delta Cssc1$ 의 경우 부착기의 멜라닌이 형성되지 않는 것이 관찰되었는데, 멜라닌이 부착기의 팽압 형성과 관련이 있으므로 추후 고추 과실에서의 병원성에 대한 연구를 진행할 필요가 있다고 판단됨.

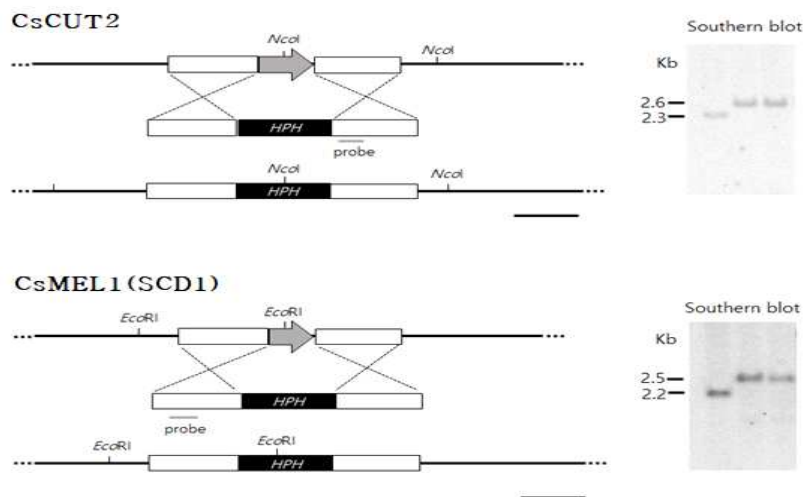


그림 2-26. CUT2와 SCD1에 대한 유전자결실돌연변이체 생성

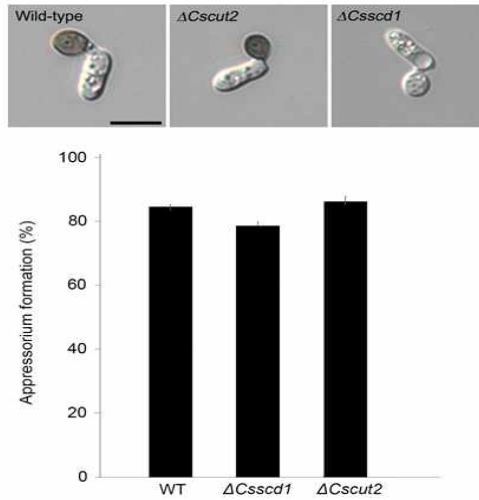


그림 2-27. $\Delta Cscut2$ 와 $\Delta Cssc1$ 의 부착기 형성

- $\Delta Cspm1$ 은 커버 글라스 위에서 부착기를 전혀 생성하지 못하였고 $\Delta Cspm1$ 은 형성율이 크게 줄었음. 이러한 결과는 mitogen-activated protein kinase 1과 adenylate cyclase-associated protein 1이 고추탄저병균의 소수성 표면 인식을 통한 부착기 형성에 중요한 기능을 한다는 것을 의미함.

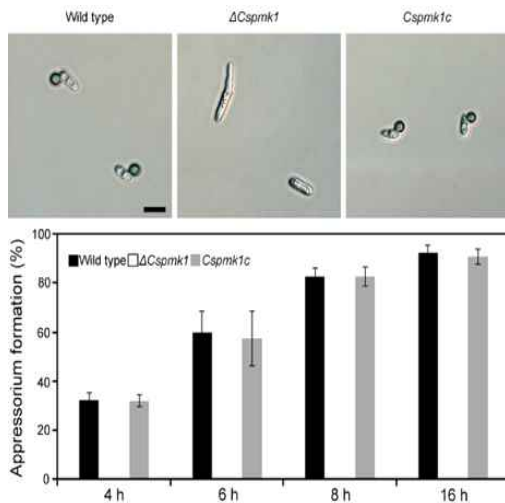


그림 2-28. $\Delta Cspm1$ 의 부착기 형성

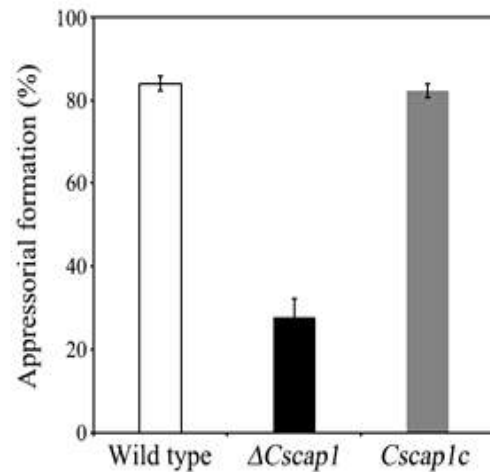


그림 2-29. $\Delta Cscap1$ 의 부착기 형성

- 다음으로 고추 과실에 유전자결실돌연변이체들을 접종하여 병원성을 확인하였음. 그 결과 $\Delta Cshox1$ 유전자결실돌연변이체는 고추 과실의 cuticle 층은 뚫고 들어갈 수 있어 dendroid structure는 형성 되었지만 그 이후의 단계인 epidermal cell로의 감염이 이루어지지 않는다는 것을 현미경으로 관찰 할 수 있었음.

- 어떠한 원인으로 병원성에 관여하는지 확인하기 위해 3, 3 - diaminobenzidine와 perls prussian blue를 이용하여 식물체의 hypersensitive response 저항성 기작과 관련된 Reactive Oxygen Species(ROS)를 염색하여 확인해 보았음. 확인결과 wild-type에 비하여 $\Delta Cshox1$ 유전자결손돌연변이체를 접종한 고추에 눈에 띄게 ROS가 형성되어 갈색 (3, 3 - diaminobenzidine) 및 하늘색(perls prussian blue)으로 염색되는 것을 확인할 수 있었음. 고추탄저병 wild-type은 식물체의 저항성 기작을 효과적으로 억제하여 ROS 반응이 적는데 반면, $\Delta Cshox1$ 유전자결손돌연변이체는 식물체의 저항성 기작을 효율적으로 억제하지 못하기 때문에 많은 양의 ROS가 형성되고 이로 인해 감염을 못하는 것으로 판단됨.

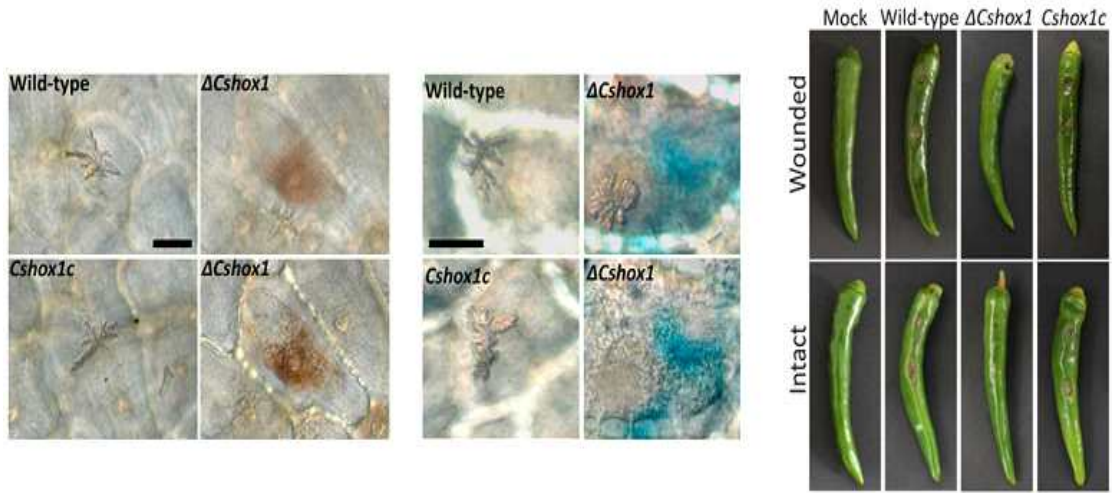


그림 2-30. $\Delta Cshox1$ 의 병원성

- $\Delta Cshox7$ 유전자결손돌연변이체도 고추 과실에서 병을 내지 못하였음. 하지만 $\Delta Cshox1$ 과는 다르게 상처를 냈을 때는 wild-type과 비슷하게 병을 내는 것을 확인하였음. 이는 $\Delta Cshox7$ 은 부착기를 형성하지 못하므로 고추 과실 표면을 뚫고 들어가지 못하지만 상처를 냈을 시에는 wild-type과 비슷하게 병을 낼 수 있다는 것을 의미함. $CaCl_2$ 및 $CaCl_2$ 와 cAMP를 동시에 처리하였을 때는 부착기 형성이 회복되어 상처를 내지 않았을 때에도 병반이 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

- $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 유전자결손돌연변이체도 고추에서 병을 내지 못하였음. $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 은 소수성 표면 위에서 부착기 형성을 못하거나 형성율이 크게 줄었으므로, 고추과실에서 부착기를 통한 침입을 못하여 병을 내지 못하는 것으로 판단됨.

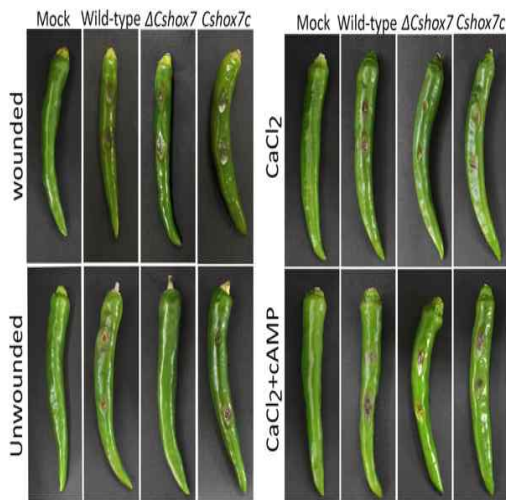


그림 2-31. $\Delta Cshox7$ 의 병원성

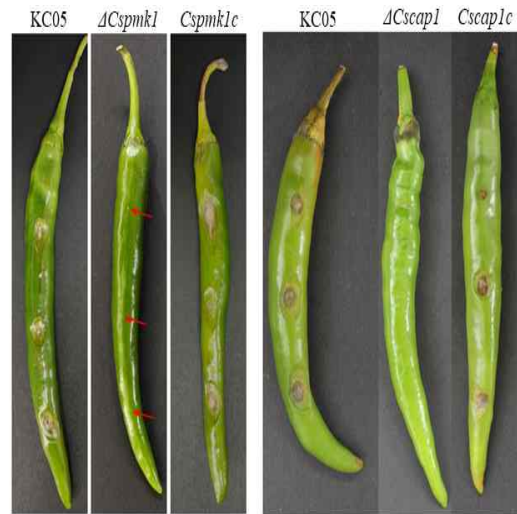


그림 2-32. $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 의 병원성

- HOX1이 고추과실에서의 병 발생에 중요한 기능을 하는 것이 밝혀졌기 때문에 wild-type과 $\Delta Cshox1$ 을 고추과실에 접종하여 RNA를 추출하였고, RNA-seq을 통하여 유전자 발현을 분석하였음. 그 결과 $\Delta Cscap1$ 를 접종한 고추조직에서 wild-type을 접종한 고추조직에 비하여 121개의 유전자 발현이 증가하였고 52개의 유전자 발현이 감소하였음.

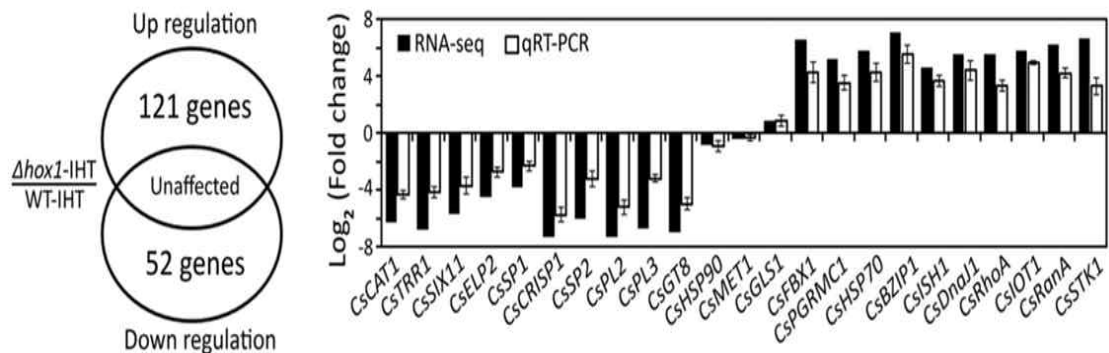


그림 2-33. wild-type과 $\Delta Cshox1$ 을 접종한 고추조직에서 추출한 RNA를 이용한 유전자 발현 분석

- 증가한 유전자에는 병원성 관련 유전자, 활성산소종 소거 유전자, 식물 세포벽 분해효소 등이 있었으며, 감소한 유전자에는 스트레스 반응과 신호 전달 관련 유전자 등이 있었음.
- 종합적으로 HOX1에 의해 조절되는 유전자는 활성산소종 소거 기능을 하는 CsTRR1과 CsCAT1, 분비단백질인 CsELP2, CsSP1, CsSP2, CsSIX11, CsCRISP1, 그리고 식물 세포벽 분해효소인 CsPL1, CsPL2, CsPL3, CsPG1, CsGT8, CsGH31로 확인되었음.
- 활성산소종 소거 기능은 고추에서 생성되는 활성산소종을 제거하는 기능을 하고, 분비단백질은 고추의 방어시스템을 무력화시키는 기능을 하며, 식물 세포벽 분해효소는 고추 과실에 감염할 때 세포벽을 분해하는 기능을 함.
- 이러한 유전자들이 발현이 HOX1에 의하여 조절되어 *C. scovillei*의 고추과실 감염이 이루어진다는 것을 최종적으로 밝혀내었음.

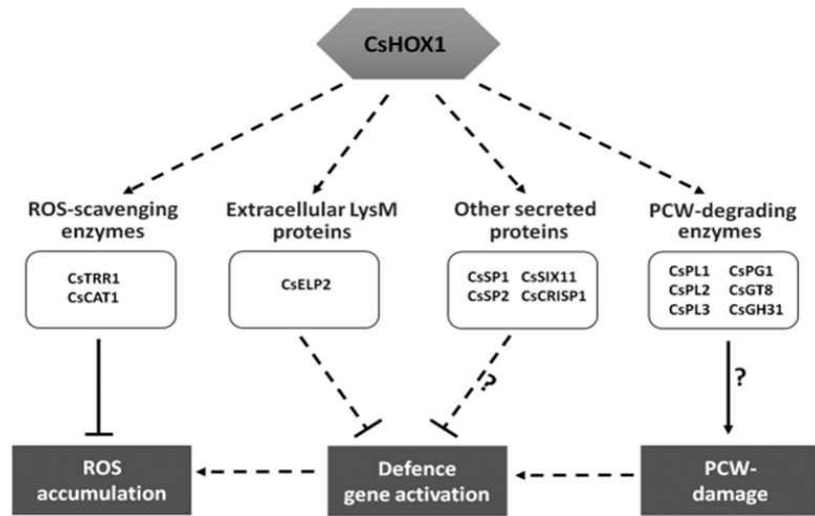


그림 2-34. CsHOX1에 의해 조절되는 유전자 및 기능 모식도

○ 고추탄저병균 *C. scovillei*의 제어 전략 연구

1) 고추탄저병균의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물 선발

- 길항 미생물을 이용한 고추탄저병균 방제 제어를 위하여 살균제를 사용하지 않은 토양에서 세균을 분리하여 *C. scovillei* 균사 억제에 효과가 있는 균주들을 선발하였음. 선발된 세균을 이용하여 고추 탄저병균에 대한 균사 성장 억제 및 포자 발아 억제를 확인하였고 더 나아가 항균 활성 범위 및 길항 미생물의 효소 활성을 검정하여 고추 탄저병의 생물학적 방제를 위한 길항 미생물의 활성을 검정하였음.

- 선발된 세균은 16S rRNA, recA, gyrA 유전자 지역 분석을 통해 동정하였으며 *Burkholderia cepacia* KF1과 *Bacillus velezensis* BS1이 가장 효과가 좋았음.

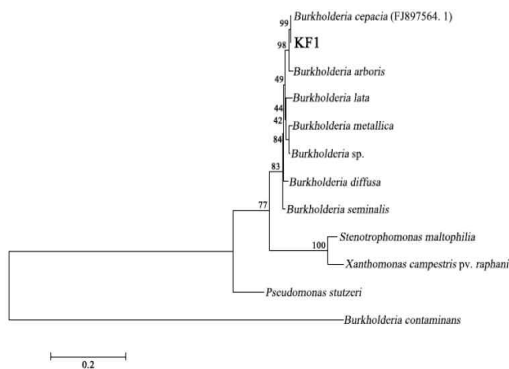


그림 2-35. 16S rRNA 및 recA 유전자 지역 분석을 통한 분리된 길항미생물 KF1 균주의 계통학적 분석도

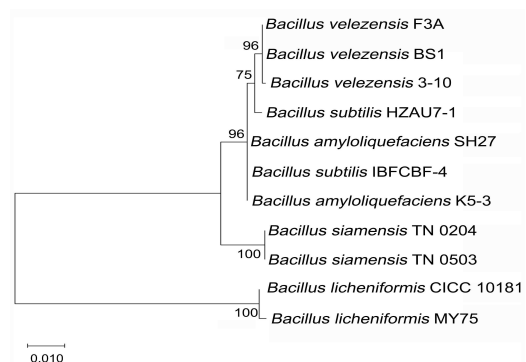


그림 2-36. 16S rRNA 및 recA 유전자 지역 분석을 통한 분리된 길항미생물 KF1 균주의 계통학적 분석도

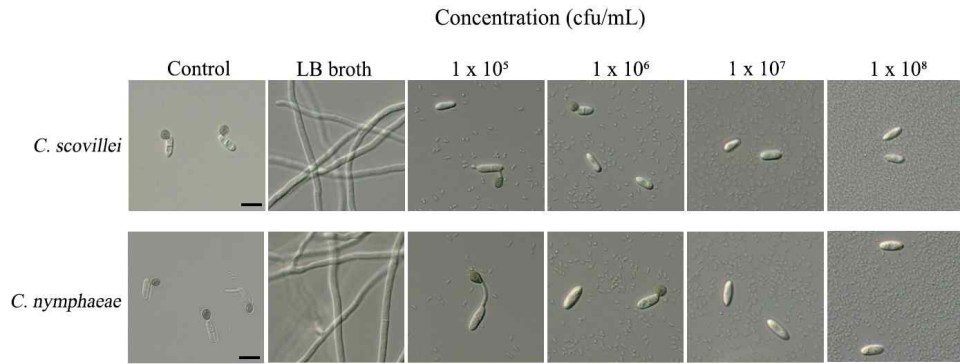


그림 2-37. 길항미생물 KF1의 현탁액 농도별 처리에 따른 소수성 유리표면에서의 고추탄저병균 *C. scovillei*와 *C. nymphaeae*의 포자 발아 억제력 확인 (고추탄저병균 현탁액 농도는 1×10^5 포자수/mL로 조정하여 집중)

- 고추 탄저병균 *C. scovillei*와 *C. nymphaeae*에 대해 $1 \times 10^5 \sim 10^8$ cfu/mL 농도의 *B. cepacia* KF1 처리 시 고추탄저병균의 포자 발아에 대하여 90% 이상의 억제율을 나타내었음.
- *B. cepacia* KF1은 고추 탄저병균 *C. scovillei*, *C. nymphaeae*, *C. acutatum*의 균사생장 억제에서도 큰 효과가 있었고, 추가적으로 *Fusarium verticillioides*의 균사생장 억제에도 어느정도 효과가 있었음.

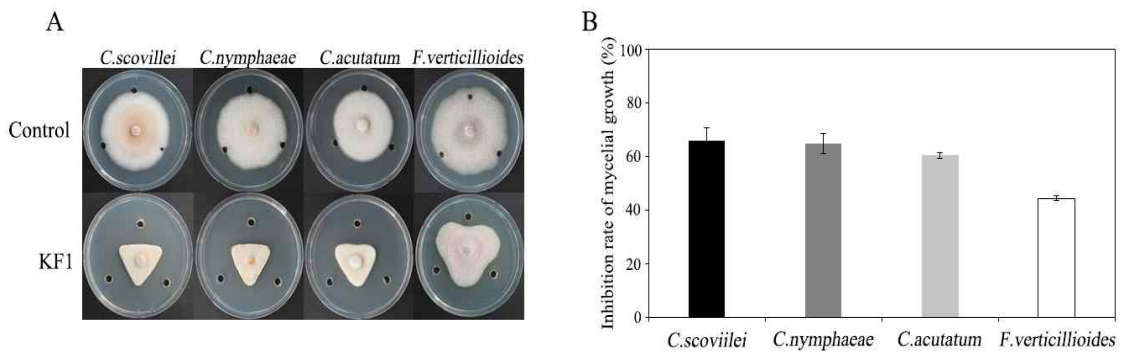


그림 2-38. 대치배양을 통한 길항미생물 KF1의 균사 성장 억제력 및 항균 활성 범위 확인 (A) : 길항미생물 KF1과 고추탄저병균 및 옥수수 밀둥썩음병균의 대치배양 모습 (B) : 길항미생물 KF1에 의한 균사 성장 억제율

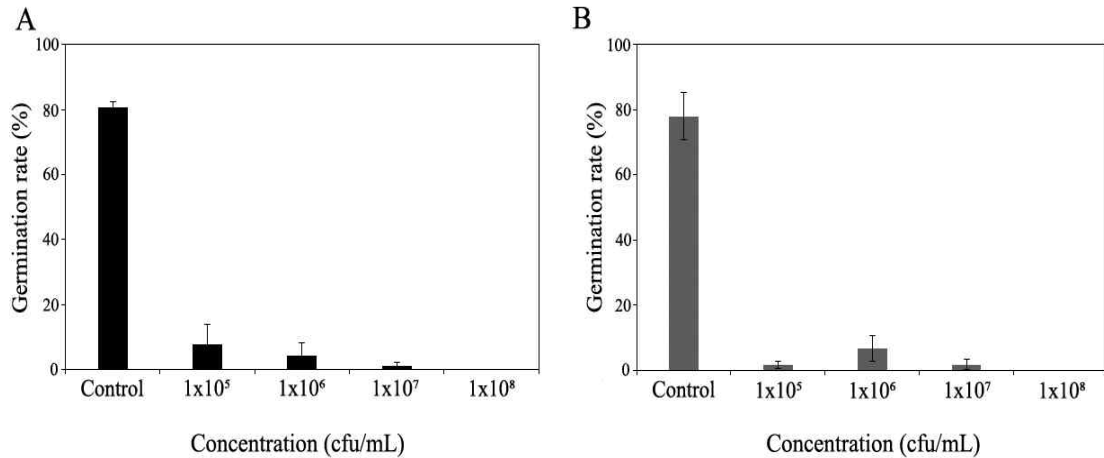


그림 2-39 길항미생물 KF1의 현탁액 농도별 처리에 따른 고추탄저병균의 포자 발아율 (A) : 길항미생물 KF1의 농도별 처리에 따른 *C. scovillei*의 발아율, (B) 길항미생물 KF1의 농도별 처리에 따른 *C. nymphaeae*의 발아율. 대조군은 멸균 증류수가 처리됨

- *B. cepacia* KF1 효소 활성 검정을 위해 단백질 분해효소, 세포벽 분해효소, 난용성 인산염 분해효소, 난용성 철 분해효소 활성을 확인할 수 있는 배지를 이용하여 검정하였고, 그 중 프로테아제, 셀룰라아제, 난용성 철 분해효소의 활성을 확인하였음. 위의 결과로, *B. cepacia* KF1 균주는 고추탄저병 방제를 위한 유용 미생물로서의 활용이 가능할 것으로 판단됨.

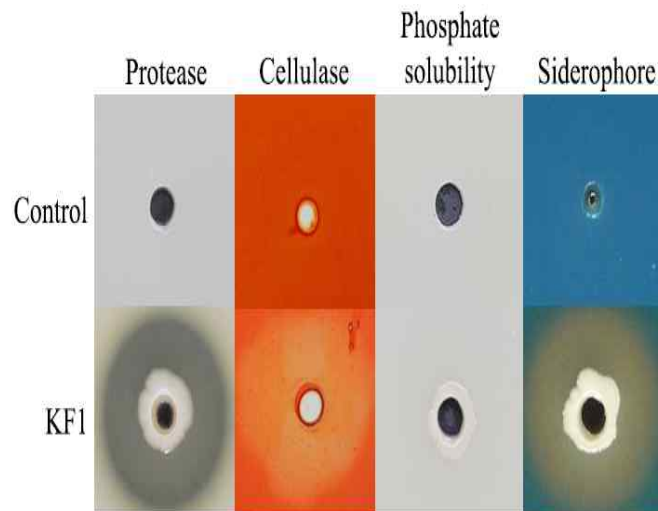


그림 2-40. 길항미생물 KF1의 효소활성 확인 검정 배지를 이용한 단백질분해효소, 세포벽분해효소, 난용성 인산염 분해효소, 난용성 철 분해효소 활성 확인

- *B. velezensis* BS1은 고추 탄저병균 *C. scovillei*의 부착기 생성을 효과적으로 억제하였는데 1×10^6 cfu/mL 농도에서 고추탄저병균의 부착기 형성을 80% 이상 억제하였고, 1×10^5 cfu/mL의 농도에서 병 발생을 효과적으로 억제하였음.

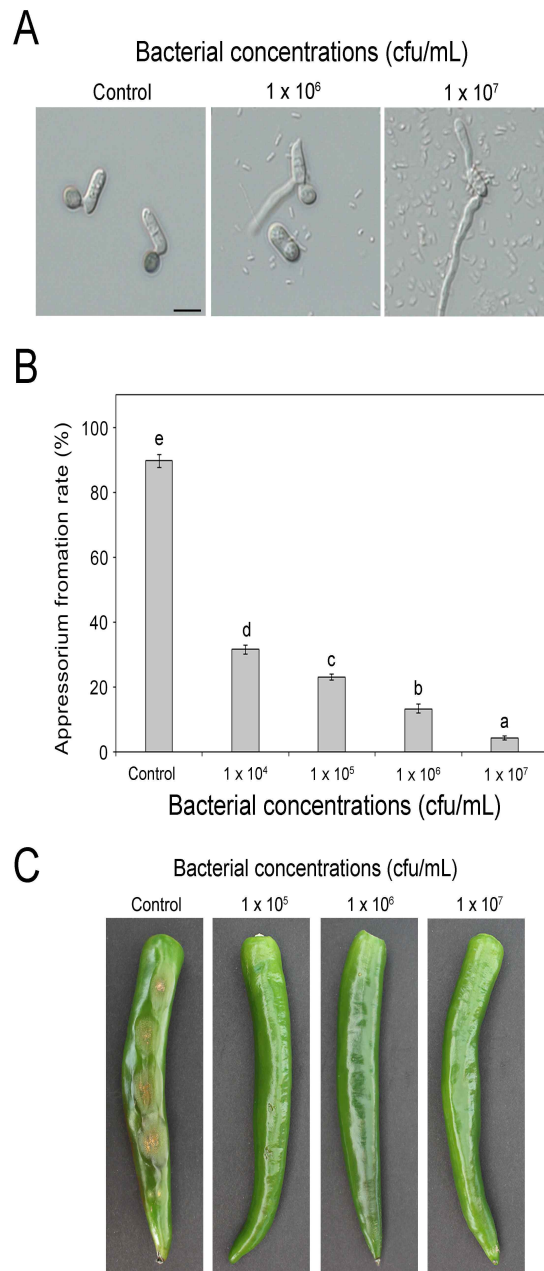


그림 2-41. 길항미생물 BS1의 현탁액 농도에 따른 *C. scovillei*의 부착기 생성 억제와 고추 과실에서의 병 발생 억제

- *B. velezensis* BS1 효소 활성 검정을 위해 셀룰로스 분해, 단백질 분해, 시데로포어 생성 능력 검정 활성을 확인할 수 있는 배지를 이용하여 검정하였고, 그 중 셀룰로스 분해효소, 단백질 분해효소, 시데로포어 생성의 활성을 확인하였음. 또한 고추과실에 *B. velezensis* BS1을 처리하였을 때 고추 성장 촉진 능력이 있다는 것도 확인하였음.

- 위의 결과로, *B. velezensis* BS1 균주는 고추탄저병 방제 및 고추 성장 촉진을 위한 유용 미생물로서의 활용이 가능할 것으로 판단됨.

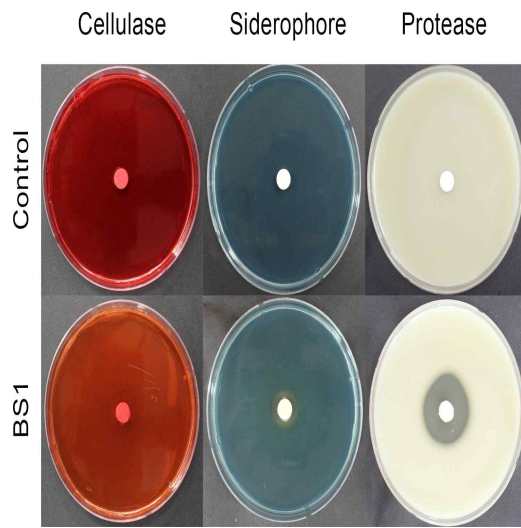


그림 2-42. 길항미생물 BS1의 효소활성 확인
검정 배지를 이용한 셀룰로스 분해효소, 단백질
분해효소, 시테로포어 생성 능력 검정



그림 2-43. 길항미생물 BS1의 고추 성장
촉진 능력

표 2-2. 길항미생물 BS1의 고추 성장 촉진 능력

| Treatment | Plant height (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Root length (cm) | Root fresh weight (mg) |
|-----------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------------|
| BS1 | 107.8 ± 7.35* | 66.7 ± 8.41* | 37.1 ± 5.32* | 190.8 ± 36.39* | 114.3 ± 39.11* |
| Control | 76.3 ± 5.2 | 46.5 ± 7.9 | 25.5 ± 4.0 | 115.6 ± 28.3 | 30.1 ± 8.12 |

- 제2협동연구기관(부산대): 기능유전체학적 접근을 통한 다양한 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이 사이 상호작용 연구

○ 식물 병원성 *Burkholderia glumae*와 *B. gladioli* 간의 상호작용 및 병원성 연구

1) *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이의 대치 배양 *in vitro* assay

- 식물병원성 *Burkholderia* species(*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3, *B. gladioli* KACC11889 *B. gladioli* KACC18962, *B. plantarii* KACC18965)와 식물내생균 (*Burkholderia* sp. KJ006) 사이의 대치배양을 통한 *in vitro* assay를 수행하여, 길항적 또는 배타적인 상호작용을 28°C와 37°C에서 각각 스크리닝(그림 3-1,그림 3-2)하여, 식물병원성 *B. gladioli* KACC18962가 여러 식물에 강한 병원성 가지고 있는 *B. glumae* BGR1를 억제함을 1차적으로 확보하였음. 또한, 식물병원성 *B. gladioli* KACC18962가 *B. plantarii* KACC18965를 억제함을 확인하였음(그림 3-1).

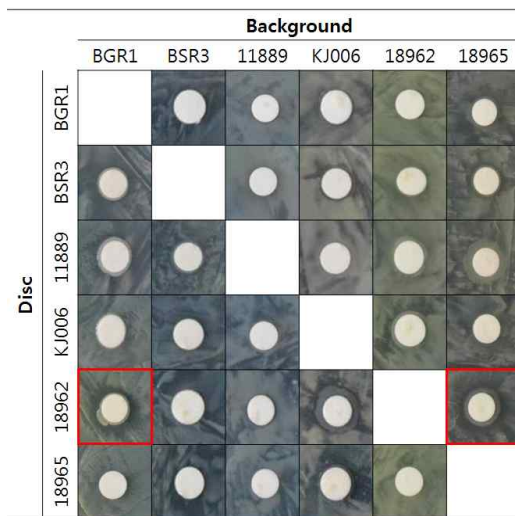


그림 3-1. *in vitro* assay between bacteria and another bacteria at 28°C

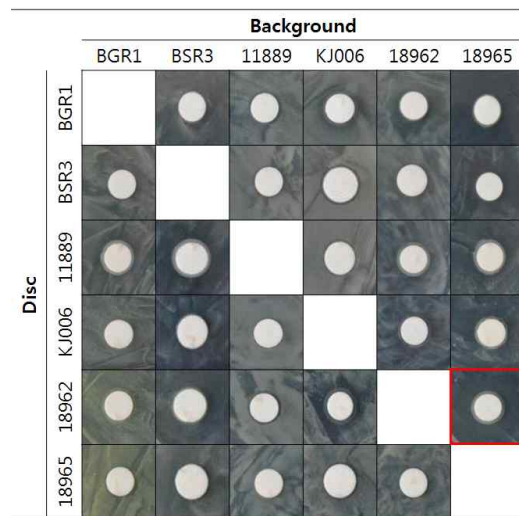


그림 3-2 *in vitro* assay between bacteria and another bacteria at 37°C

- 식물병원성 *Burkholderia* species(*B. glumae* BGR1, *B. gladioli* BSR3, *B. gladioli* KACC11889 *B. gladioli* KACC18962, *B. plantarii* KACC18965)와 식물내생균 (*Burkholderia* sp. KJ006) 사이의 상호작용의 원인을 확인하기 위해 배양된 bacteria을 수거하여 *in vitro* assay를 수행한 결과, *B. gladioli* KACC18962가 동일하게 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* KACC18965를 억제함을 확인하였음.

- 또한, bacteria가 제거된 상등액과, 열처리된 bacteria 상등액을 *Burkholderia* species와 28°C에서 *in vitro* assay를 수행한 결과 *B. gladioli* KACC18962의 상등액에 의해서 *B. glumae* BGR1만 저해 받는 것을 확인하였고, *B. gladioli* KACC18962의 열처리한 상등액에서 *B. glumae* BGR1의 저해현상이 현저히 줄어든 것을 확인하였음(그림 3-3, 그림 3-4).

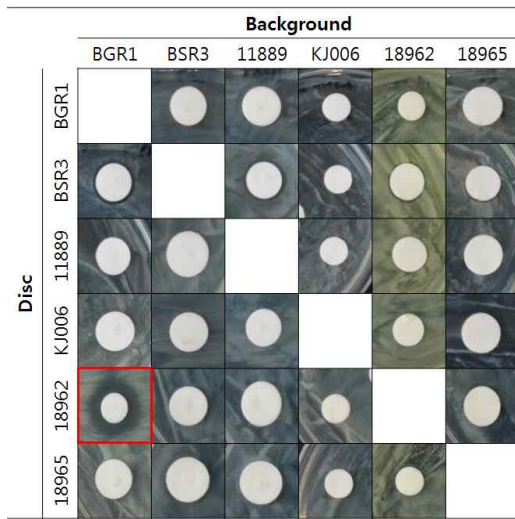


그림 3-3. *in vitro* assay between bacteria and bacterial supernatant at 28°C

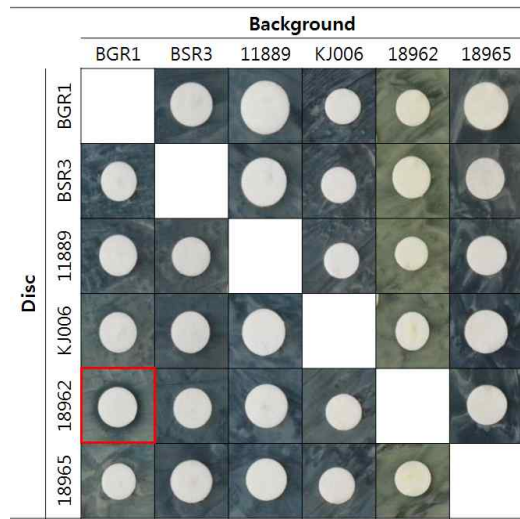


그림 3-4. *in vitro* assay between bacteria and heat-treated bacterial supernatant at 28°C

- *in vitro* assay를 대치배양을 이용해 *B. gladioli* KACC18962가 실제로 28°C에서 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* KACC18965를 억제함(그림 3-5)을 밝혀냄.

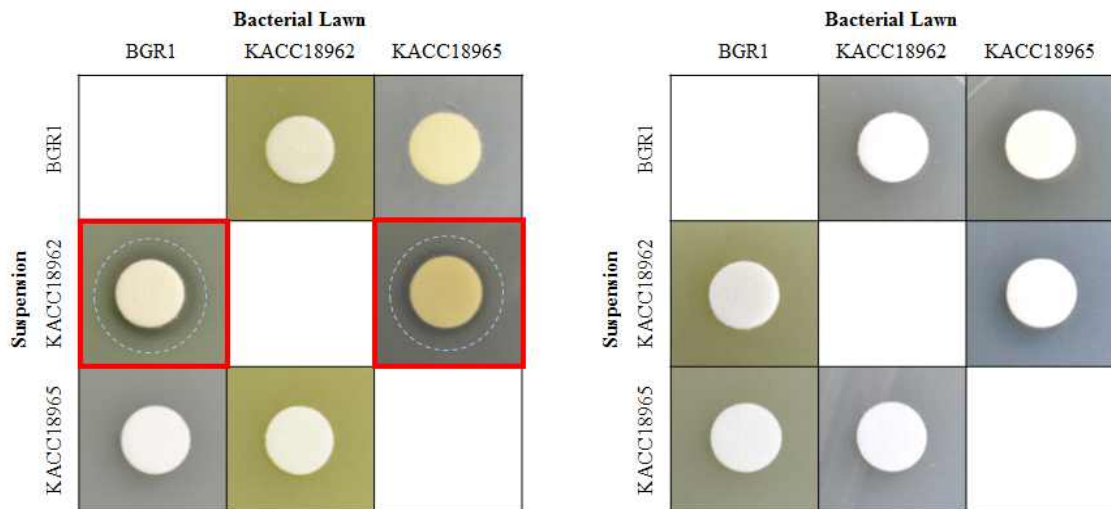


그림 3-5. Selection of *in vitro* bacteria-bacteria interactions among *Burkholderia* species at 28°C and 37°C

- GFP(Green Fluorescence Protein)을 암호화하며, 특정 항생제의 저항성을 가지는 플라스미드를 도입하여, BGR1/KACC18962와 KACC18965/KACC18962 혼합배양액으로부터 도입된 플라스미드의 항생제마커를 이용해 생균수를 측정하여 KACC18962가 BGR1과 KACC18965를 억제함을 정량적 수치로 확인하였으며, GFP를 암호화하는 플라스미드가 세포내에서 발현되어 GFP의 세기를 측정해 상대적인 fluorescence intensity를 KACC18962의 단일 배양한 경우와 BGR1/KACC18962와 KACC18965/KACC18962 혼합배양한 경우를 비교하여 정량화함으로써, *B. gladioli* KACC18962가 실제로 28°C에서 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* KACC18965를 억제함(그림 3-6, 그림 3-7)을 확인하였음.

- *B. gladioli* KACC18962의 열에 약한 외부분비물질을 비롯한 인접한 세포와의 상호작용에 의해 *B. glumae* BGR1가 저해되며, 인접한 세포와의 상호작용을 통해 *B. plantarii* KACC18965가 저해된다고 예상할 수 있었음.

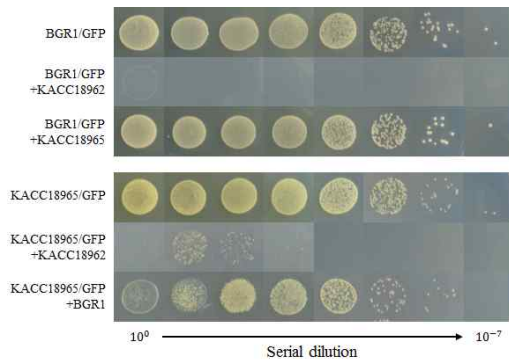


그림 3-6.
Quantification of
bacteria-bacteria
interaction by spot
assay

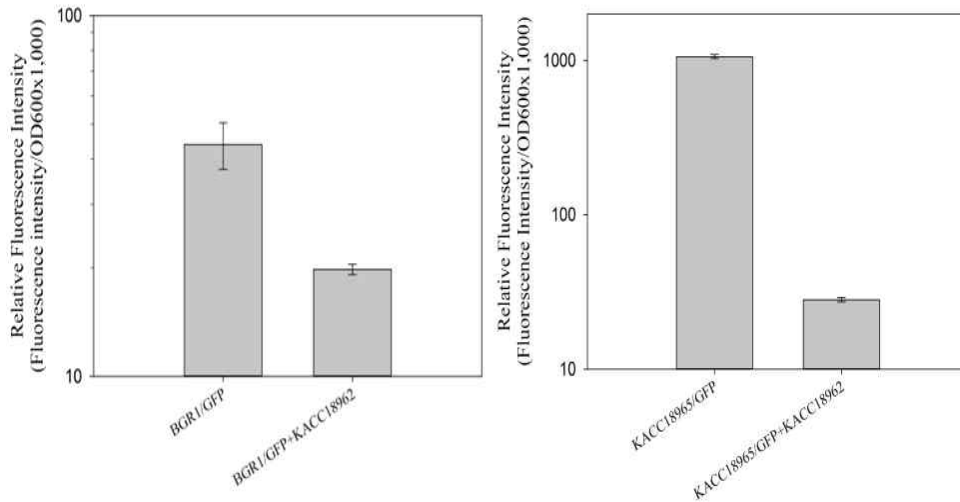


그림 3-7.
Quantification of
bacteria-bacteria
interaction by
relative fluorescence
intensity

○ *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이 *in vivo* 조건에서 상호작용 및 병원성 연구

1) 벼 줄기에서 *B. glumae*와 *B. gladioli* 사이 상호작용

- *in vitro* assay를 통해서 확보한 상호작용이 존재하는 *B. glumae* BGR1과 *B. gladioli* KACC18962의 상호작용을 *in vivo* 조건에서 확인하기 위해서, 벼의 flowering dipping을 통해 벼알마름병을 낼 수 있으나, 기주인 벼의 줄기에서는 국소적으로 병징을 나타내는 KACC18962와 벼알마름병을 일으키며, 벼의 줄기에서도 강한 병원성을 가지고 있는 BGR1의 특징을 이용하였고, 그 결과로 BGR1/KACC1892의 동시 감염(co-infection)시 BGR1의 병원성을 벼 줄기에서 확인할 수 없었음(그림 3-8).

- 이는 KACC18962가 *in vivo* 조건에서도 동일하게 BGR1을 억제함으로써 *B. glumae* BGR1에 의한 병징이 감소하는 것을 확인할 수 있었음.

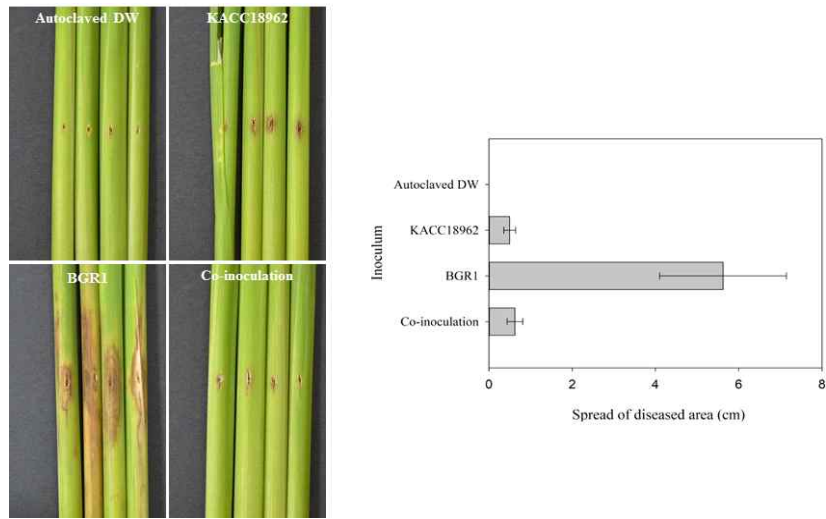


그림 3-8. *in vivo* pathogenicity test to confirm bacteria-bacteria interaction at vegetative stage of rice

2) 벼 유모 상태에서 *B. gladioli*와 *B. plantarii* 사이 상호작용

- *B. plantarii* KACC18965가 벼의 유모상태에서 어린 잎의 tumbling 현상과 뿌리의 성장을 억제하는 반면, *B. gladioli* KACC18962는 약한 병원성만을 보이는 특징을 가지기 때문에 *in vivo* 조건에서 *B. gladioli* KACC18962과 *B. plantarii* KACC18965의 상호작용이 *in vitro* assay의 결과와 동일함을 확인하기 위하여 벼 유모상태에서 병원성을 확인하였음.
- *in vivo* 조건에서 KACC18965/KACC18962 동시감염(co-infection)시 KACC18965는 KACC18962의 의해 억제되므로, KACC18965의 단일 감염 시 나타나는 tumbling 현상과 뿌리의 성장 억제 현상이 나타나지 않았음.
- 이는 KACC18962가 *in vivo* 조건에서도 동일하게 KACC18965를 억제함으로써, *B. plantarii* KACC18965에 의한 병징이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었음.

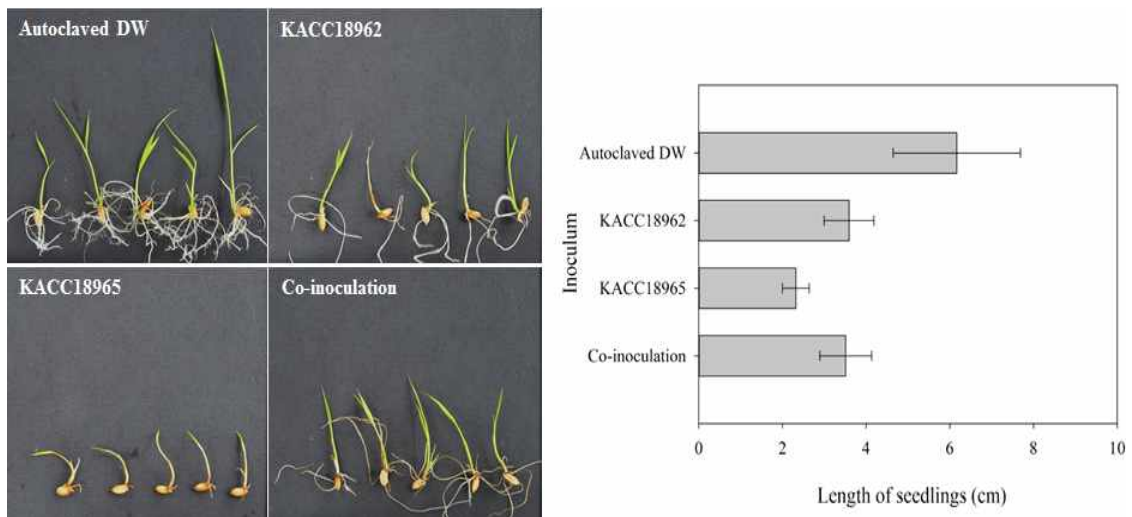


그림 3-9. *in vivo* pathogenicity test to confirm bacteria-bacteria interaction at seedling stage of rice

○ 병원성 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Fusarium* 곰팡이와의 상호작용 연구

1) 병원성 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 예비 실험 결과를 통해서, *B. glumae* 균주가 *F. fujikuroi* 균주에 대해 배지 특이적으로 제어함을 확인하여 이를 바탕으로 다양한 배지 조합의 *Burkholderia* 균주 (*B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii*) 및 다른 식물병원성 세균 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Pseudomonas syringae* pst DC3000) 과 *Fusarium* 균주 (*F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*) 사이 대치 배양 실험을 수행하고자함. *Burkholderia* sp. KJ006은 식물유용균으로서 대치배양 *in vitro* assay에 수행함(그림 3-10).

- 대치 배양 *in vitro* assay 결과, Luria-Bertani (LB) agar plate보다 Potato Dextrose Agar (PDA) plate에서 세균과 곰팡이 상호작용의 효과적인 관찰이 가능했고, *F. fujikuroi*와 *F. oxysporum*에서 식물 병원성 *Burkholderia* speice (*B. glumae*, *B. gladioli*, *B. plantarii*)와 경쟁적 상호작용이 공통적으로 나타나는 것을 확인하였음.

- 특히, 식물병원성 *Burkholderia* species와 공통된 기주(벼)를 가지는 *F. fujikuroi*와의 경쟁적 상호작용에 중점을 두고 *F. fujikuroi* B14, *F. fujikuroi* B20과 *Burkholderia* species 사이의 경쟁적 상호작용 연구를 위하여 PDA plate내 대치배양 *in vitro* assay를 수행하였음.

| | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---|--|--|
| On Luria-Bertani (LB) agar plate | Control | <i>Burkholderia glumae</i> BGR1 | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | <i>Pseudomonas syringae</i> pst DC3000 | <i>Burkholderia</i> sp. KJ006 |
| | <i>Burkholderia gladioli</i> IS93 | <i>Burkholderia gladioli</i> 18962 | <i>Burkholderia plantarii</i> 18963 | <i>Burkholderia plantarii</i> 19137 | <i>Burkholderia gladioli</i> KACC11889 |
| On Potato Dextrose Agar (PDA) plate | Control | <i>Burkholderia glumae</i> BGR1 | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | <i>Pseudomonas syringae</i> pst DC3000 | <i>Burkholderia</i> sp. KJ006 |
| | <i>Burkholderia gladioli</i> IS93 | <i>Burkholderia gladioli</i> 18962 | <i>Burkholderia plantarii</i> 18963 | <i>Burkholderia plantarii</i> 19137 | <i>Burkholderia gladioli</i> KACC11889 |

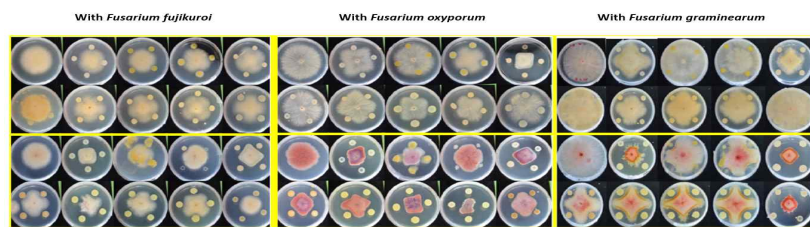


그림 3-10. *in vitro* Bacteria-Fungi interaction screening on LB agar and PDA media

- 병원성 *Burkholderia* 세균과 *Fusarium* 곰팡이 사이 대치배양 시 세균과 곰팡이 상호작용 양상 및 정도에 차이가 나는 것이 배지 성상에 따른 *Burkholderia* speices의 독소 분비의 영향인지확인 하기 위하여 표현형 분석을 수행하였음(그림 3-11).

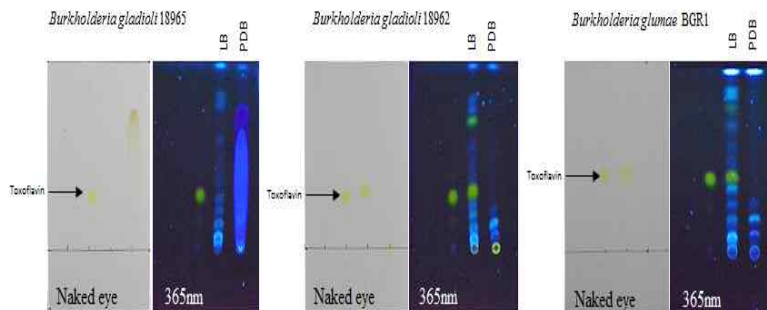


그림 3-11. Thin Layer Chromatography(TLC) analysis of *Burkholderia* species on LB and PDB media

- 일반적으로 세균배양에 사용되는 Luria-Bertani (LB) media와 곰팡이배양에 사용되는 Potato Dextrose Broth (PDA) media를 사용하여 *Burkholderia* species (*B. gladioli* 18962, *B. plantarii* 18965, *B. glumae* BGR1)의 물질 분석을 Thin Layer Chromatography (TLC)로 수행하여, 세포 밖으로 분비되는 물질이 배지성상에 따라 다른 것임을 확인하였음. 특히, 가장 강력한 독소로 불리는 toxoflavin의 생성이 확인되지 않음을 확인하였음.

- 이를 통해 *Burkholderia* species와 *Fusarium* 사이 상호작용이 세균독소에 의한 곰팡이의 생육억제가 아닌 다른 메카니즘에 의해 발현됨을 확인하였음.

2) 식물 병원성 *F. fujikuroi* B14, B20과 식물 병원성 *Burkholderia* species 사이 상호작용 연구
 - 식물병원성 *Burkholderia* species와 공통 기주(벼)를 가지는 *F. fujikuroi*와의 경쟁적 상호작용에 중점을 두고 *F. fujikuroi* B14, *F. fujikuroi* B20과 *Burkholderia* species의 경쟁적 상호작용 연구를 위해서 PDA plate내에서 대치배양 *in vitro* assay를 수행하였음(그림 3-12, 그림 3-13).

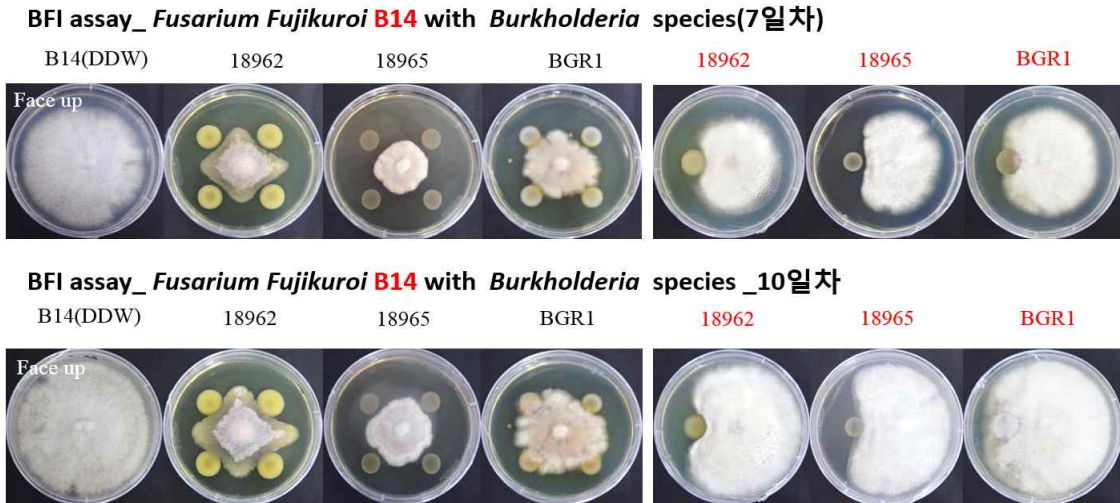


그림 3-12. Bacteria-Fungi Interaction assay by *F. fujikuroi* B14

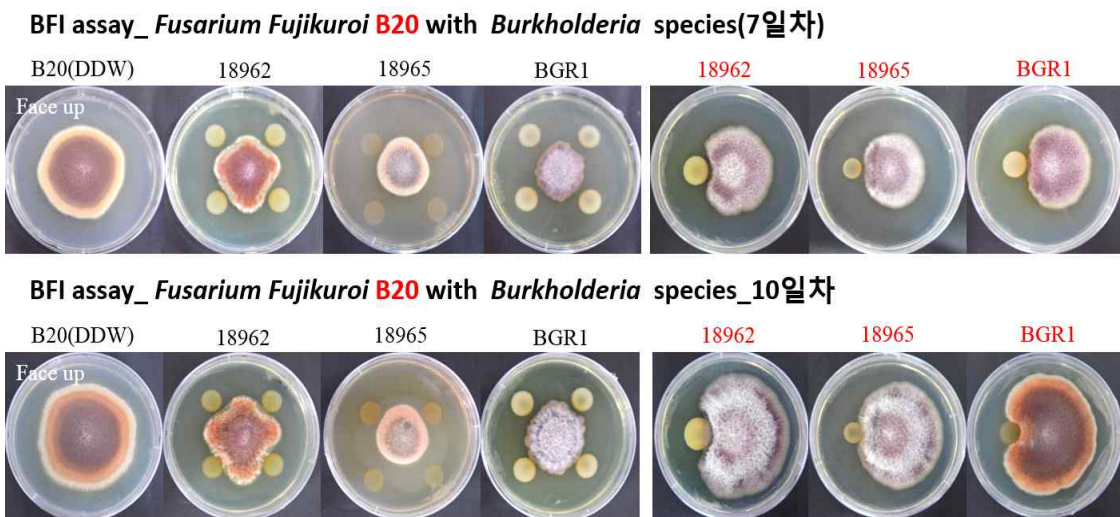


그림 3-13. Bacteria-Fungi Interaction assay by *F. fujikuroi* B20

- *Burkholderia* species (*B. gladioli* 18962, *B. plantarii* 18965, *B. glumae* BGR1)에 의해 *F. fujikuroi* B14와 *F. fujikuroi* B20의 균사생장이 억제됨을 확인하였음.

- *F. fujikuroi* B20의 균사생장을 억제하는 *Burkholderia* species의 존재를 1차년도 결과를 통해 확인하였고, 이후 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* 18965를 저해하는 *B. gladioli* 18962를 중심으로 복합감염 기작 규명을 위한 네트워크 구축을 목적으로 연구를 수행함.

○ 병원성 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 전사체 분석 및 상호작용 네트워크 구축

1) *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주의 대치배양 *in vitro* 전사체 분석 수행

- 1차 년도에서 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* 18965를 저해하는 *B. gladioli* 18962를 중심으로 복합감염 기작 규명을 하였고, 2차 년도에서 식물 병원성 *Fusarium* 균주에 가장 강한 길항작용을 나타낸 *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20 사이 상호 작용 단계 전사체 분석을 수행하였음.

- PDA 배지에서 *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20의 대치 배양과 단일 배양을 반응 7일까지 수행하여 상호작용하는 *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20를 물리적으로 분리하였음(그림 3-14).

- *F. fujikuroi* B20의 상호작용 분석을 위해서 *F. fujikuroi* B20 sole culture 시료와 대치배양 시 *B. gladioli* 18962와 상호작용하는 *F. fujikuroi* B20 culture 시료로부터 total RNA를 추출함. *B. gladioli* 18962의 상호작용 분석을 위해서 위와 같은 방식으로 *B. gladioli* 18962 sole culture 시료와 대치배양 시 *F. fujikuroi* B20과 상호작용하는 *B. gladioli* 18962 culture 시료로부터 total RNA를 추출하였음.

- 추출된 total RNA로부터 RNAseq 라이브러리(transcriptome raw data)를 생성하고, Trimmomatic 프로그램을 통하여 adapter sequence를 제거함. 이후 trimmed data를 생성하여 read data의 quality를 확인하고 read data를 genomic DNA reference에 맵핑하였음(그림 3-14).

- 해당 비교 조합 간 발현 값의 log2 fold change와 두 그룹 간 평균 비교를 통해 도출된 p-value를 volcano plot(그림 3-15)으로 나타냄(X축: log2 Fold change, Y축: -log10 p-value).

- Differentially expressed genes (DEGs, 차별유전자) 분석 (그림 3-15)을 위해 original raw data는 HTseq를 통해 얻은 기존의 알려진 유전자에 대한 RPKM값을 대상으로 하였으며, 데이터 전처리 및 QC과정에서 low quality를 가지는 유전자를 filtering 후, quantile normalization을 수행함.

- 통계 분석은 비교조합 별 fold change, independent T-test를 이용하여, 유의한 결과로 IFCI ≥ 2 , independent T-test raw p-value < 0.05 조건으로 선별함.

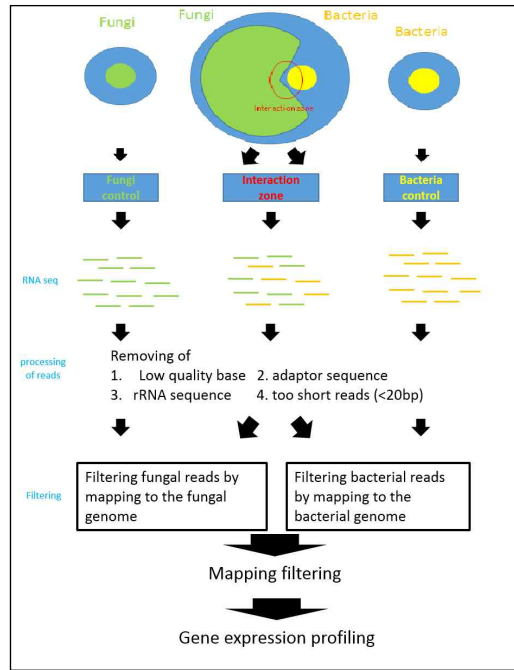


그림 3-14. Gene expression profiling

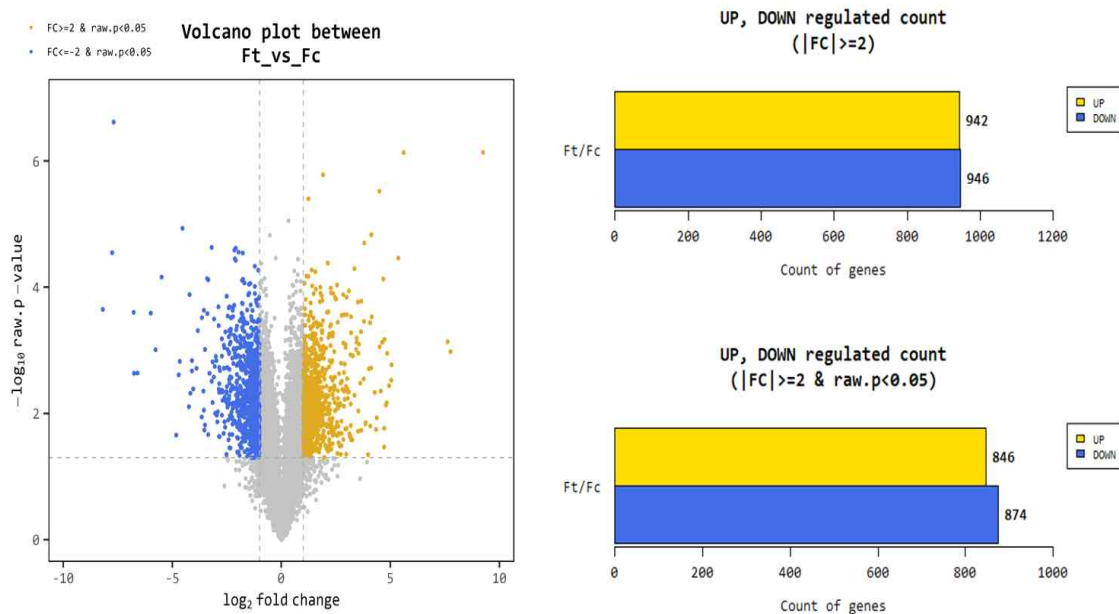


그림 3-15. Volcano plot and analysis of DEGs in *F. fujikuroi* B20 (Fc; *F.fujikuroi* sole culture, Ft; *F.fujikuroi* co-culture with *B. gladioli*)

- *F. fujikuroi* B20으로부터 *B. gladioli* 18962 상호작용 조건하 비교전사체 분석을 통해 $|FC| \geq 2$, $p < 0.05$ 의 총 1,720개 DEGs를 획득하였고, 이 중 up-regulated DEGs 846개, down-regulated DEGs 874개를 동정하였음(그림 3-15). 이를 통해 *F. fujikuroi* B20가 *B. gladioli* 18962와 상호작용 조건 하에서 서로 다른 유전자 발현을 통해 반응하고 있음을 확인하였음.

- 유의한 DEGs 리스트(982 genes)에 대하여 각 시료의 유전자별 발현 값(normalized value)을 이용하여 발현 정도가 유사한 시료와 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage)를 통하여 그룹화하여 나타내었음(그림 3-16).

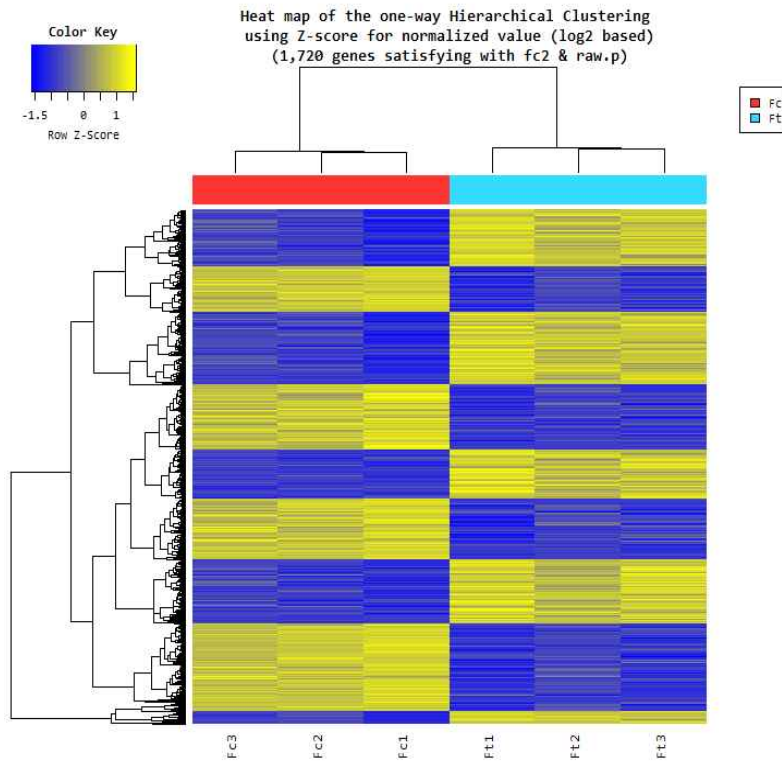


그림 3-16. Heat map of one-way Hierarchical Clustering in *F. fujikuroi* B20 (Fc; *F. fujikuroi* sole culture, Ft; *F. fujikuroi* co-culture with *B. gladioli*)

- DEGs data를 기반으로 전체 982 DEGs를 중심으로 Gene Ontology (GO) 분석을 통해 Biological process, Cellular Component, Molecular Function에 대한 결과를 얻었음(그림 3-17).

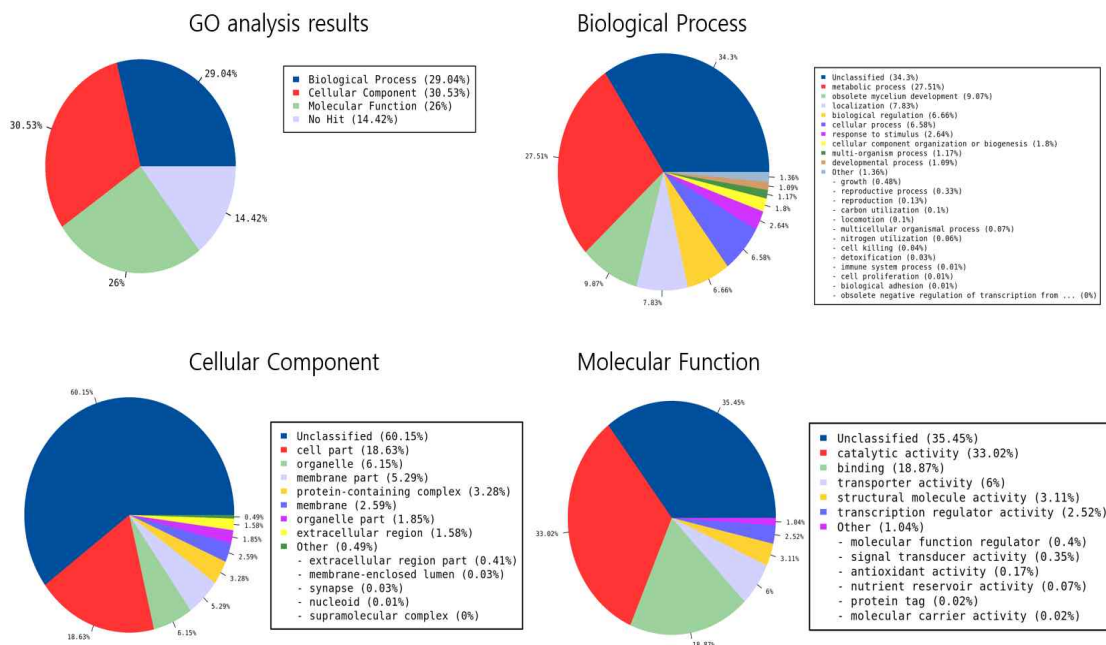


그림 3-17. Gene Ontology analysis of *F. fujikuroi* B20

- *B. gladioli* 18962와 상호작용하고 *F. fujikuroi* B20와 상호작용이 있지 않은 *F. fujikuroi* B20의 GO 분석 결과, 982 DEG 중 29.0%가 Biological process에 속하고 30.5%, 26.0%가 각각 Cellular component와 Molecular Function에 해당하고 있음을 확인하였음.
- 또한, total DEGs 중 Biological process의 개별 category로서 metabolic process, response to stimulus, biological regulation, development process, growth, reproduction, detoxification, immune system process 등이 해당됨을 확인하였음.
- Cellular component의 경우, cell part와 organelle에 해당하는 부분이 가장 차지하고 있었음.
- 특히, Molecular Function GO 분석 결과, total DEGs에서 catalytic activity에 포함되는 DEGs가 가장 많았으며, 그밖에 transport activity, signal transducer activity, antioxidant activity, nutrient reservoir activity 등의 category가 확인되었음.
- 해당 비교 조합 간 발현 값의 log2 fold change와 두 그룹 간 평균 비교를 통해 도출된 p-value를 volcano plot (그림 3-18)으로 나타냄(X축: log2 Fold change, Y축: $-\log_{10}$ p-value).
- *B. gladioli* 18962의 *F. fujikuroi* B20 상호작용 조건하 비교전사체 분석을 통해서 $|FC| \geq 2$, $p < 0.05$ 의 총 982개의 DEGs를 획득하였고, 이 중 up-regulated DEGs 579개, down-regulated DEGs 403개를 획득하였음(그림 3-18).

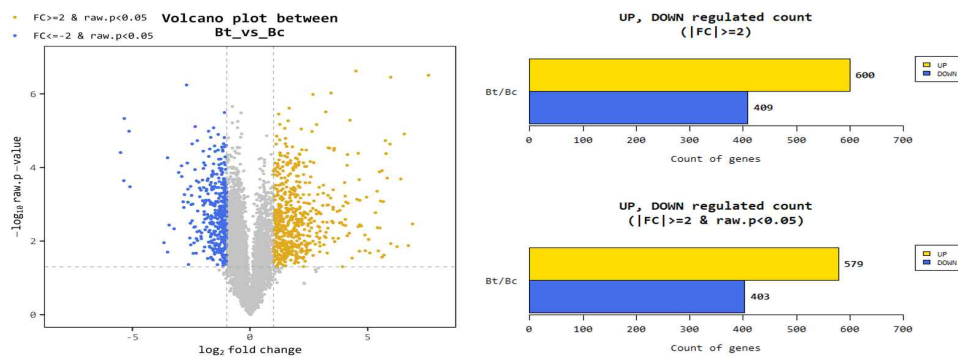


그림 3-18. Volcano plot and analysis of DEGs in *B. gladioli* 18962 (Bc; *B. gladioli* sole culture, Bt; *B. gladioli* co-culture with *F.fujikuroi*)

- 유의한 DEG 리스트 (579 genes)에 대하여 각 시료의 유전자별 발현 값 (normalized value)을 이용하여 발현 정도가 유사한 시료와 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage)를 통하여 그룹화하여 나타내었음(그림 3-19).

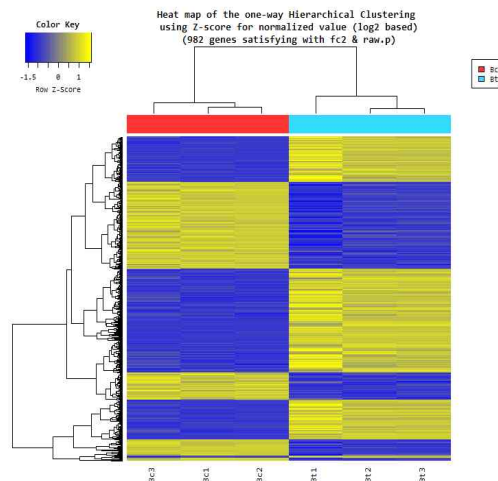


그림 3-19. Heat map of one-way Hierarchical Clustering in *B. gladioli* 18962 (Bc; *B. gladioli* sole culture, Bt; *B. gladioli* co-culture with *F.fujikuroi*)

- 앞서와 마찬가지로 DEGs data를 기반으로 전체 579 DEGs를 중심으로 Gene Ontology (GO) 분석을 수행하였음(그림 3-20).

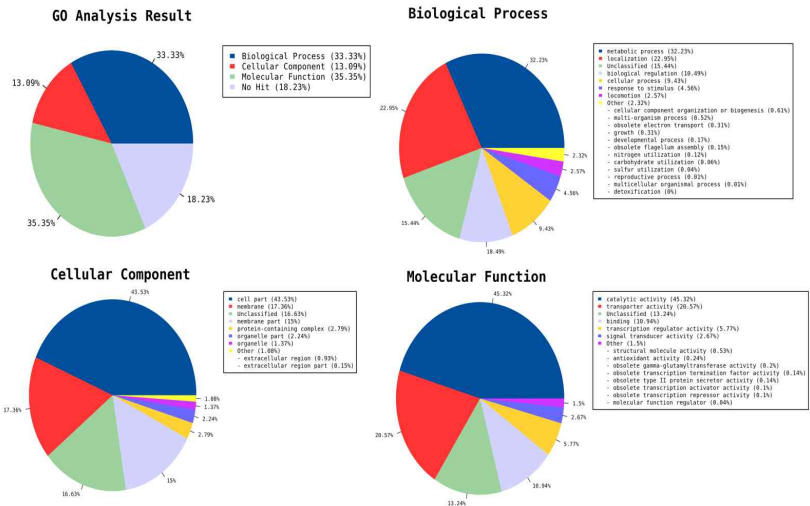


그림 3-20. Gene Ontology analysis of *B. gladioli* 18962

- *F. fujikuroi* B20와 상호작용하고 *B. gladioli* 18962와 상호작용하지 않은 *B. gladioli* 18962의 GO 분석 결과, 982 DEG 중 33.3%가 Biological process에 속하고 13.1%, 35.4%가 각 Cellular component와 Molecular Function에 해당하였음.
- Total DEGs 중 Biological process 의 category 로서 metabolic process, biological regulation, response to stimulus, development process, growth, nitrogen utilization, flagellum assembly, detoxification 등이 존재함.
- Cellular component의 경우, cell part와 membrane에 해당하는 부분이 가장 높은 빈도로 차지하고 있음.
- Molecular Function GO 분석 결과, total DEGs에서 catalytic activity에 포함되는 DEGs가 가장 많고 그밖에 transport activity와 signal transducer activity, structural molecule activity, antioxidant activity 등이 포함됨.

2) 전사체 분석 결과를 통한 네트워크 구축

- Total DEGs를 중심으로 KEGG pathway 분석을 수행하여, 가장 신뢰성 있는 20개의 pathway를 확보하였음(그림 3-21).

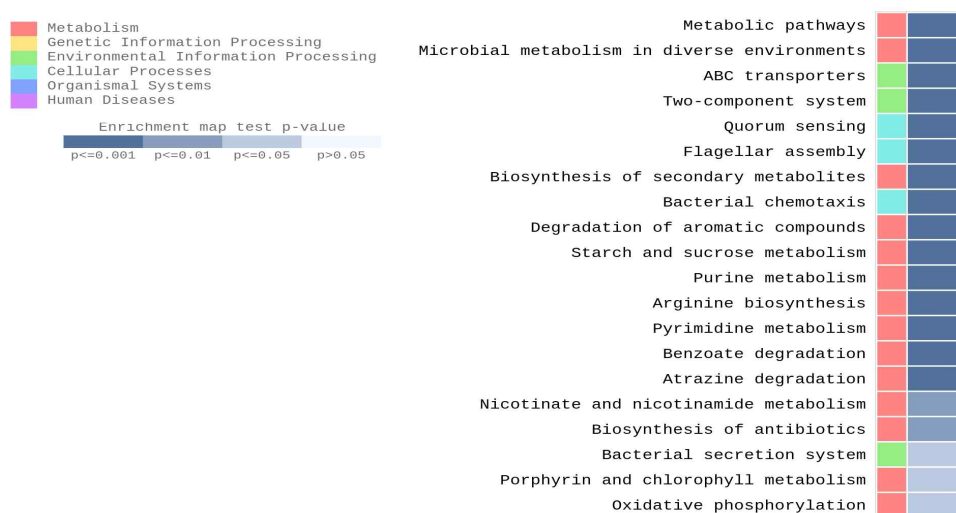


그림 3-21. Gene-set KEGG enrichment analysis in *B. gladioli* 18962 (p-value top 20)

- Top 20의 pathway로는 Metabolic pathway, Microbial metabolism in diverse environments, ABC transporters, Two-component system, Quorum sensing, Flagellar assembly, Biosynthesis of secondary metabolites, bacterial chemotaxis, Degradation of aromatic compounds, Starch and sucrose metabolism, Purine metabolism, Arginine biosynthesis, Pyrimidine metabolism, Benzoate degradation, Atrazine degradation, Nicotinate and nicotinamide metabolism, Biosynthesis of antibiotics, Bacterial secretion system, Porphyrin and chlorophyll metabolism, Oxidative phosphorylation이 동정됨.

- *F. fujikuroi* B20와 상호작용하는 *B. gladioli* 18962의 비교전사체 분석 결과, 유의하게 차이나는 pathway 중 ABC transports, Two-componet system, Quorum sensing의 존재를 통해 *B. gladioli* 18962가 *F. fujikuroi* B20와 상호작용을 하고 있다는 예상가능하며, 동시에 Flagellar assembly 및 Bacterial chemotaxis 의 존재를 통해 *B. gladioli* 18962의 운동성도 상호작용 하에 조절되는 것으로 예상 가능함.

- 또한 *B. gladioli* 18962의 secretion system도 상호작용에 연관되어 있을 가능성이 있음.

- *B. gladioli* 18962의 비교 전사체 분석결과, Degardation of aromatic compounds pathway는 Benzoate, 3-Fluorobenzoate, 4-Fluorobenzoate, p-methylbenzoate, o-Methylbenzoate, m-Methylbenzoate를 포함하는 aromatic compounds들이 *B. gladioli* 18962 내에서 분해경로를 통해 Catechol, 4-Fluorocatechol, 4-Methylcatechol, 3-Methylcatechol로 분해되고 이후 분해경로는 따르지 않는 것이 확인됨.

- 이는 *F. fujikuroi* B20과 상호작용 하는 *B. gladioli* 18962에서는 세포 내 catechol 및 catechol 유사체가 축적되는 특이점을 확인할 수 있음(그림 3-22).

- *B. gladioli* 18962의 비교전사체 분석결과, Bacteria motility에 관여하는 각각의 flagellar assembly component 와 flagellar assembly activator 유전자들이 up-regulated DEGs에 포함됨.

- 상호작용 상태의 *B. gladioli* 18962가 상호작용이 없는 *B. gladioli* 18962보다 훨씬 높은 운동성을 가지고 있음.

- *B. gladioli* 18962의 up-regulated bacteria motility DEGs는 *B. gladioli* 18962가 *F. fujikuroi* B20에 부착(adhesion 및 attachment)하는 것과 연관성이 있음.

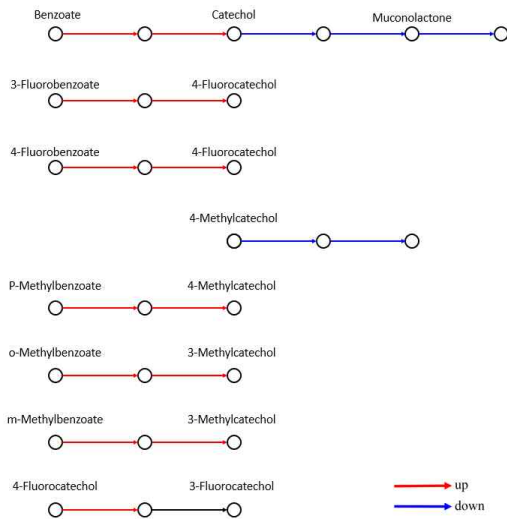


그림 3-22. Degradation of aromatic compounds pathway in *B. gladioli* 18962

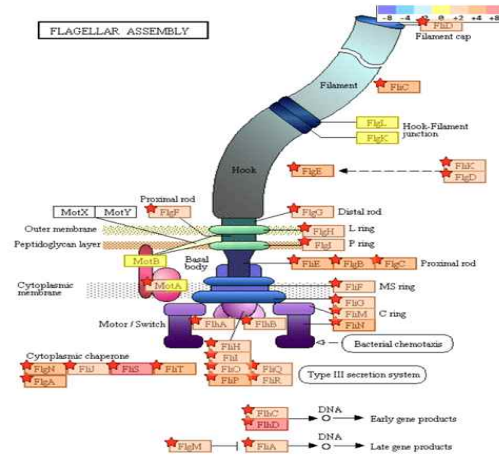


그림 3-23. Up-regulated DEGs related to flagellar assembly in *B. gladioli* 18962

- *B. gladioli* 18962 secretion system의 경우, 대체적으로 차이가 없었음(그림 3-24).
 - 상호작용 중에 있는 *F. fujikuroi* B20은 *B. gladioli* 18962의 secretion system에 영향을 받지 않음을 예상할 수 있음. 이를 통해 *F. fujikuroi* B20가 *B. gladioli* 18962와 경쟁적 상호작용 하는 데 bacterial secretion system이 영향을 주지 않음을 유추할 수 있음.

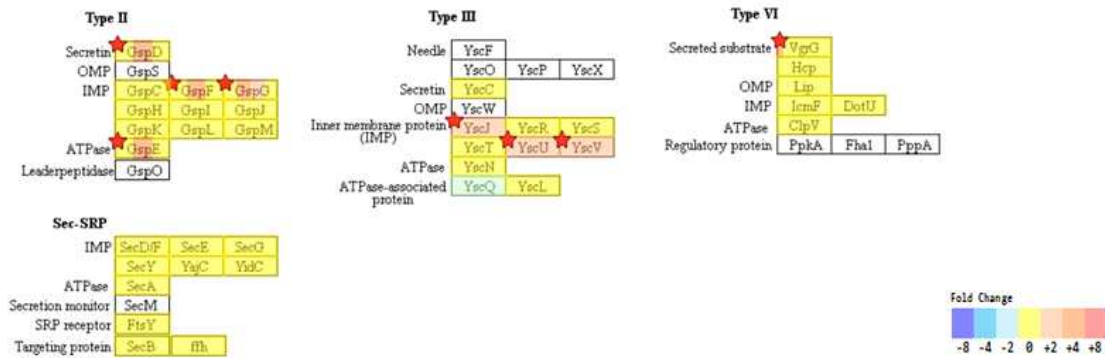
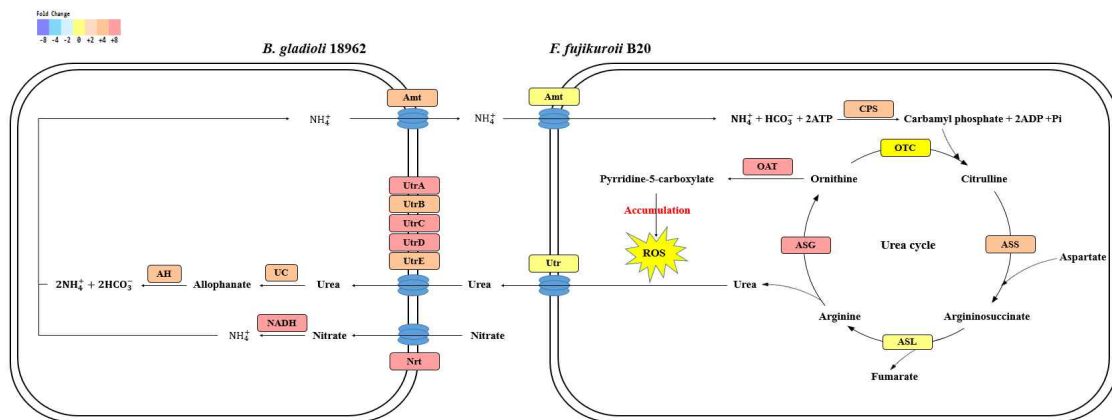


그림 3-24. Bacterial secretion system pathway in *B. gladioli* 18962

- *F. fujikuroi* B20와 상호작용 하는 *B. gladioli* 18962의 DEG 중 세균 독소인 toxoflavin와 extracellular antibiotic compound, lipase 등의 합성 관련 유전자가 확인되지 않았으며, 여러 secretion system pathway에 해당하는 up-regulated DEGs에서도 차이가 나타나지 않음.
 - 이를 통해 *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20 사이 경쟁적 상호작용에 영향을 주지 않으며, 다만 catechol의 축적 양상과 bacteria 운동성에 대한 특이점을 확인함.
 - *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20의 상호작용시 공통된 N source를 공유하는 metabolism pathway를 이루고 있음 (그림 3-25).

- *B. gladioli* 18962는 nitrate transport 및 urea transport를 이용해 세포 밖 urea와 nitrate를 세포 내부로 끌어들이고 NH⁺를 최종산물로 만들어 세포 밖으로 분비하고 분비된 NH⁺는 다시 *F. fujikuroi* B20의 amonium transport (Amt)에 의해 세포 내부로 들어와 urea cycle을 따르고 이때 생성된 urea는 세포 밖으로 다시 분비하여 이를 *B. gladioli* 18962가 이용하는 것으로 예상된다.
- 특히, *F.fujikuroi* B20의 urea cycle 과정에서 생성된 orinithine은 OAT (ornithine aminotranferase)에 의해 pyrridine-5-carboxylate (P5C)로 전환된 후, 더 이상 다른 대사산물로 전환되지 않고 *F. fujikuroi* B20의 세포 내부에 축적되는 것으로 예상된다.
- 과도한 P5C의 세포 내 축적은 세포 내 oxidase에 의해 생성된 Reactive Oxygene Species (ROS)의 세포 내 축적과 programmed cell death를 유도하기 때문에 매우 독성이 높은 물질로 알려져 있음. 특히, 밤나무줄기마름병 원인 곰팡이인 *Cryphonectria parasitica*에서 세포 내 P5C 축적에 의한 독성 가능성이 확인되었음.
- 이러한 P5C의 세포 내 축적으로 인한 독성은 그림 3-25 와 같이 *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20 사이 상호작용에서도 같은 역할로서 작용할 것으로 예상함.



NADH; nitrite reductase, UC; urea carboxylase, AH; Allophanate hydrolase, ASG; arginase, ASL; Argininosuccinate, ASS; Argininosuccinate Synthetase, OTC; Ornithine Transcarbamoylase, CPS, Carbamoyl phosphate synthetase, OAT; ornithine aminotransferase

그림 3-25. The network of predicted interaction between *B. gladioli* 18962 and *F.fujikuroi* B20 from *in vitro* comparative transcriptome analysis

○ 상호작용 주요 유전자에 대한 기능 연구

- 1) 상호작용 중요한 기능을 하는 유전자의 돌연변이체 확보
 - *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20 사이 *in vitro* 전사체 분석 결과를 기반으로 *Burkholderia* 균주의 유전자를 삭제돌연변이를 구축하고자 하였으나, 전사체 분석결과에서 *Burkholderia* 균주의 삭제 돌연변이체를 구축하는 것에 비해, *Fusarium* 균주의 과발현 균주 확보가 실험 진행에 있어 더 합리적이라 판단함.
 - *B. gladioli*의 삭제 돌연변이를 구축하는 실험을 구축하였으나, 실험적으로 확보하기가 어려움.
 - Pyridine-5-carboxylate reductase를 과발현시킨 *Fusarium* 균주 제작을 협동1과제 연구진(연구책임자, 윤성환교수)에게 의뢰 및 균주를 확보함.
- 2) 돌연변이체의 표현형 연구
 - 상호작용 주요 유전자에 관한 기능연구로 선발된 P5C 유전자를 *F. fujikuroi* B20 균주에서 과발현 시킨 곰팡이 균주에서 *B. gladioli* 18962와 대치배양을 통해 표현형 연구를 진행하였음.

- *B. gladioli* 18962와 *F. fujikuroi* B20 사이의 in vitro 전사체 결과에서, *F. fujikuroi* B20의 urea cycle 과정에서 생성된 ornithine은 OAT(ornithine aminotranferase)에 의해 pyridine-5-carboxylate(P5C)로 전환된 후, 더 이상 다른 대사산물로 전환되지 않고 *F. fujikuroi* B20의 세포 내부에 축적되어 세균이 곰팡이를 저해할 것으로 예상하였음.

- 이후 P5C 유전자를 곰팡이에서 과발현시켰을 때, KACC18962와 대치배양하여 확인하였고, *B. gladioli* 18962에 의해 성장 억제가 일어나지 않는 것을 확인하였음(그림 3-26).

- 따라서, P5C 유전자의 과발현으로 *F. fujikuroi* B20의 urea cycle에서 발생된 ROS의 해소로 세포가 정상적으로 생육 가능하게 된 것으로 판단되며, 이러한 P5CR 유전자를 유용 유전자원으로 사용할 예정임.

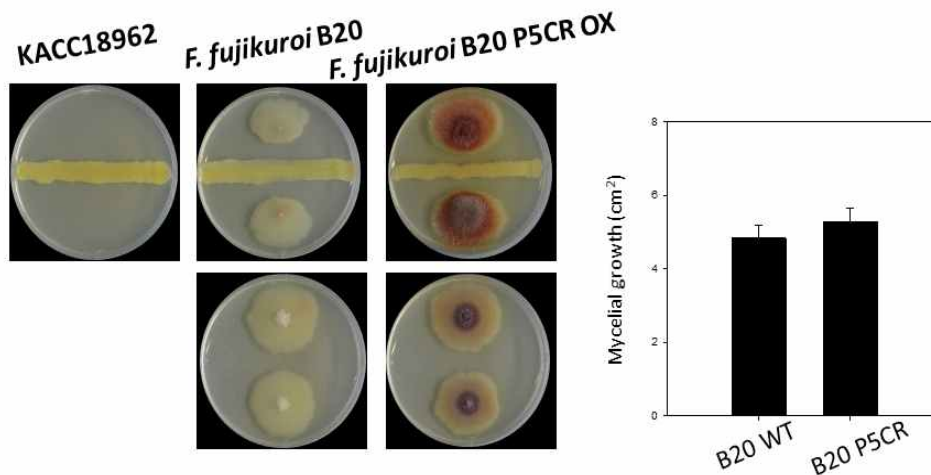


그림 3-26. Dual culture assay of *B. gladioli* 18962 with the tested *F. fujikuroi* B20 and *F. fujikuroi* B20 P5C overexpression

○ 기주 식물체 내 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 곰팡이 사이 상호작용 및 병원성 연구

1) 벼 유묘에서 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호작용

- 기주 식물인 벼에서, 세균과 곰팡이를 단일 또는 혼합 접종을 진행하여 in vitro 상호작용에 관한 병원성 발병 정도 및 기작에 관한 연구를 수행하기 위해, 벼씨에서 발아를 유도할 때, 세균 또는 곰팡이를 접종을 진행함.

- 구체적으로, *B. gladioli* 균주를 배양하여 10^7 CFU/ml 이 되도록 배양액을 준비하여 3일간 벼씨를 진탕배양하여 발아를 유도하였고, *F. fujikuroi* 균주를 10^6 conidia/ml 이 되도록 배양액을 준비하여 3일간 벼씨를 진탕배양하여 발아를 유도하였으며, 혼합접종을 위해 각 균주를 앞서 언급한 농도로 혼합 배양액을 준비하여 벼씨를 진탕배양하여 발아를 유도하였음(그림 3-27).

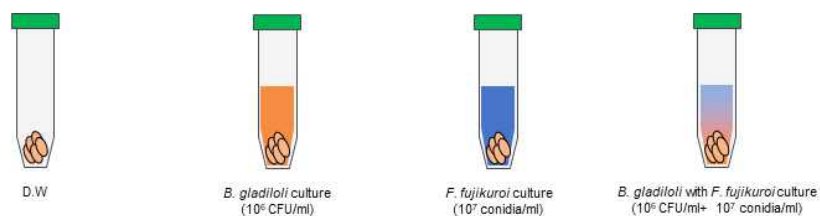


그림 3-27. Overview of induction of seed germination in this study

- D.W를 처리한 대조군과 비교하여, *B. gladioli*를 단독 접종하여 발아시켜 확인하였을 때, 식물 생육이 저해되는 현상을 확인할 수 있었지만(그림 3-28_B), 벼 키다리병을 유발하는 *F. fujikuroi*를 단독 접종하여 발아시켰을 때, 키다리병이 발병한 것을 확인할 수 있었음(그림 3-28_C).
- 반면, 세균과 곰팡이의 혼합 배양액을 통해 병씨를 발아시킨 종자에서 키다리병 증상이 사라진 것을 확인하였는데, 이는 앞서 연구한 *in vitro* 상호작용 연구와 일치하는 결과를 나타내었고, 전사체 분석결과와 일치하는 결과임을 나타냄(그림3-28_D).

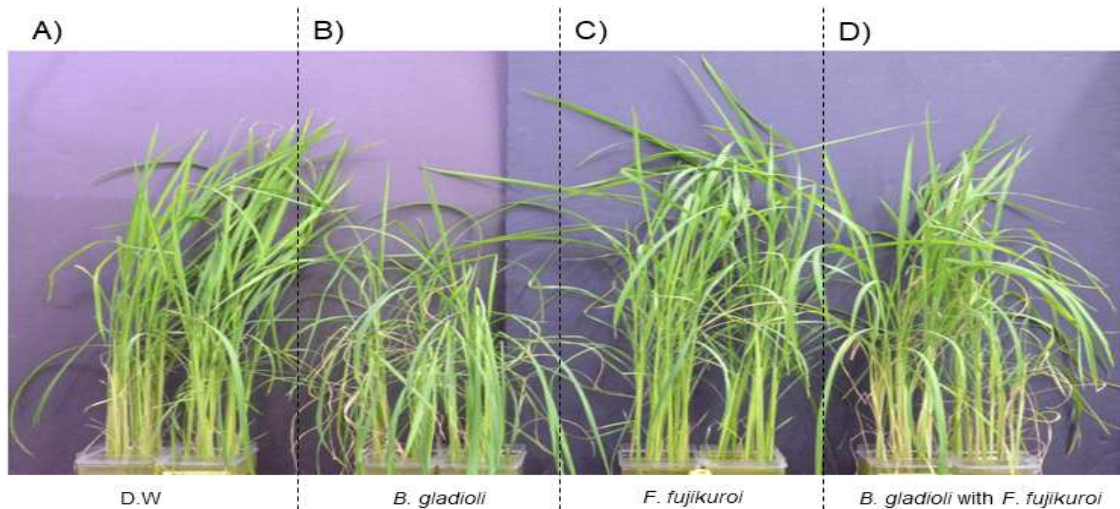


그림 3-28. Expected results in the control of bakanae diseases caused by *F. fujikuroi* through phenotypic responses

2) 벼 조직에 접종 후, *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주사이의 상호작용

- 두 병원균을 벼 줄기 조직에 복합 접종한 후 병원성 발병 정도를 확인 한 뒤, 상호기작 연구를 수행하기 위해, semi *in vivo* RNA-seq 분석을 수행하였음(그림 3-29).
- 접종 실험을 진행하기 위해 벼 줄기를 일정 크기로 자르고, *B. gladioli* 18962 균주와 *F. fujikuroi* B20 균주를 1ml 주사기를 이용하여 벼 줄기에 인위적으로 접종하였고(그림 3-29_A), 이들은 4가지 그룹으로 적절히 나누었음.
- 이후, 7일간 시간이 경과되면서 병증이 나타나는 것을 확인하고, 원심분리기를 이용하여 물리적으로 bacteria 세포만을 획득하여 total RNA를 추출하였음(그림 3-29_B, C).
- 추출된 total RNA로부터 RNAseq 라이브러리(transcriptome raw data)를 생성하고, Trimmomatic 프로그램을 통하여 adapter sequence를 제거함. 이후 trimmed data를 생성하여 read data의 quality를 확인하고 read data를 genomic DNA reference에 맵핑하였음.

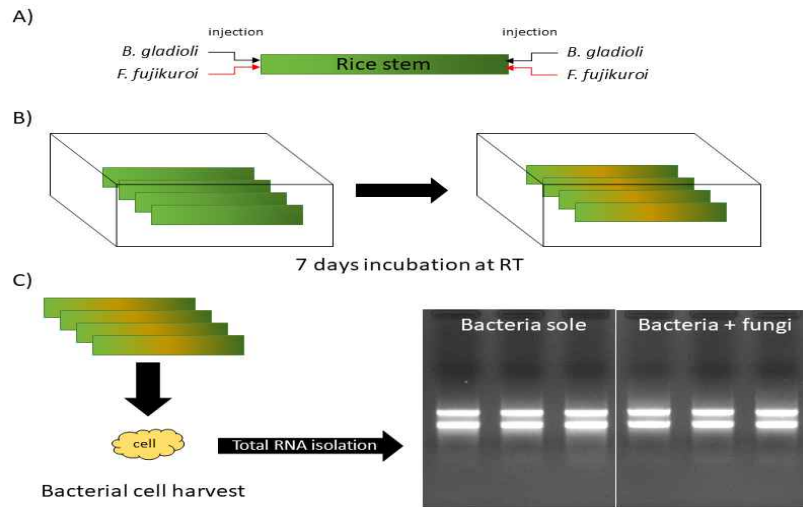


그림 3-29. Overview of semi *in vivo* assay in this study

- 해당 비교 조합 간 발현 값의 log2 fold change와 두 그룹 간 평균 비교를 통해 도출된 p-value를 volcano plot(그림 3-30)으로 나타냄(X축: log2 Fold change, Y축: -log10 p-value).
- Differentially expressed genes (DEGs, 차별유전자) 분석(그림 3-30)을 위해 original raw data는 HTseq을 통해 얻은 기존의 알려진 유전자에 대한 RPKM값을 대상으로 하였으며, 데이터 전처리 및 QC과정에서 low quality를 가지는 유전자를 filtering 후, quantile normalization을 수행함.
- 통계 분석은 비교조합 별 fold change, independent T-test를 이용하여, 유의한 결과로 IFCI ≥ 2 , independent T-test raw p-value < 0.05 조건으로 선별함.

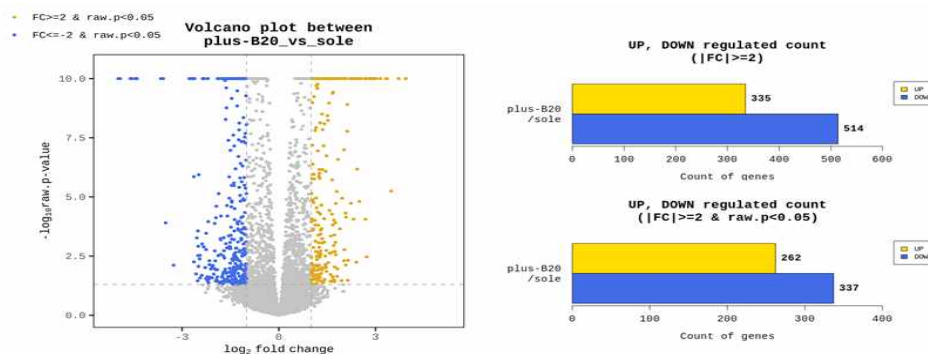


그림 3-30. Volcano plot and analysis of DEGs in *B. gladioli* B20 (sole; *B. gladioli* 18962 sole culture, plus-B20; *B. gladioli* 18962 co-infection with *F. fujikuroi* B20)

- 유의한 DEGs 리스트(599 genes)에 대하여 각 시료의 유전자별 발현 값(normalized value)을 이용하여 발현 정도가 유사한 시료와 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage)를 통하여 그룹화하여 나타내었음(그림 3-31).

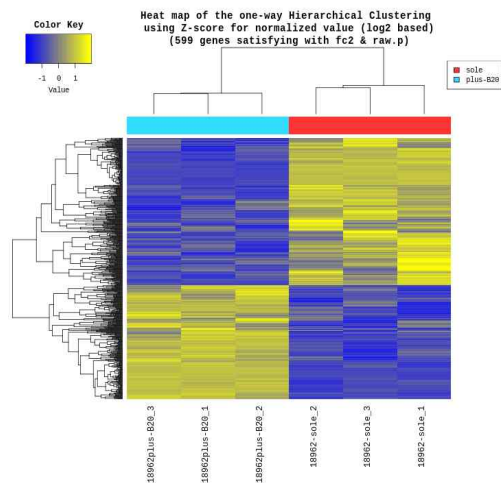


그림 3-31. Heat map of one-way Hierarchical Clustering in *B. gladioli* B20 (18962_sole; *B. gladioli* 18962 sole culture, 18962plus-B20; *B. gladioli* 18962 co-infection with *F. fujikuroi* B20)

- DEGs data를 기반으로 전체 599 DEGs를 중심으로 Gene Ontology (GO) 분석을 통해 Biological process, Cellular Component, Molecular Function에 대한 결과를 얻었음(그림 3-32).

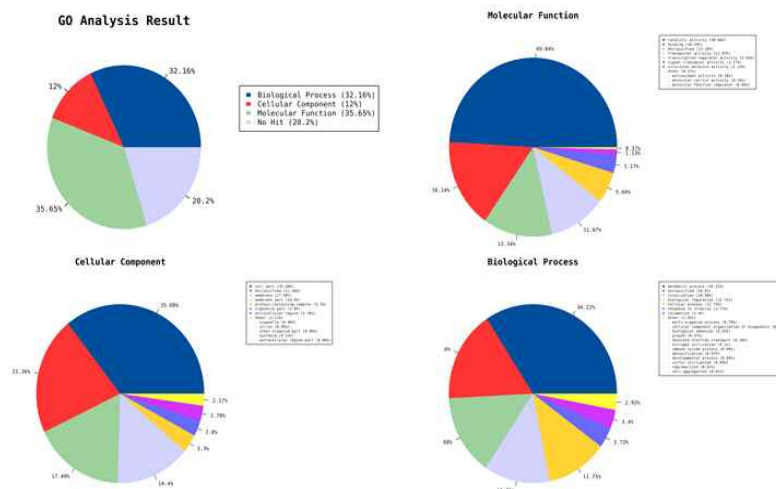


그림 3-32. Gene Ontology analysis of *B. gladioli* 18962

- 기주 식물인 벼에 감염하여, *F. fujikuroi* B20와 상호작용하지 않는 것에 비해 *F. fujikuroi* B20과 상호작용하는 *B. gladioli* 18962의 GO분석 결과, 599 DEGs 중 32.16%가 Biological process에 속하고 12%, 35.65%가 Cellular component와 Molecular Function에 속함.
- Total DEGs 중 Biological process 의 category로서 metabolic process, localization, biological regulation, cellular process, response to stimulus, locomotion 등이 존재함.
- Cellular component의 경우, cell part와 membrane에 해당하는 부분이 가장 높은 빈도로 차지하고 있음.
- Molecular Function GO 분석 결과, total DEGs에서 catalytic activity에 포함되는 DEGs가 가장 많고 그밖에 transporter activity와 transcription regulator activity, signal transducer activity, structural molecule activity 등이 포함됨.

3) 전사체 분석 결과를 통한 네트워크 구축

- Total DEGs를 중심으로 KEGG pathway 분석을 수행하여, 가장 신뢰성 있는 20개의 pathway를 확보하였음(그림 3-33).

- Top 20 pathway로는 metabolic pathways, Flagella assembly, microbial metabolism in diverse environments, ABC transporters, Two-component system, Nicotinate and nicotinamide metabolism, phenylalanine metabolism, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, Biosynthesis of secondary metabolites, Sulfur metabolism, Bacterial chemotaxis, Pentose and glucuronate interconversions, Biotin metabolism, Biosynthesis of cofactors, Starch and sucrose metabolism, Fructose and mannose metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Inositol phosphate metabolism, Galactose metabolism, Carbon metabolism이 동정됨.

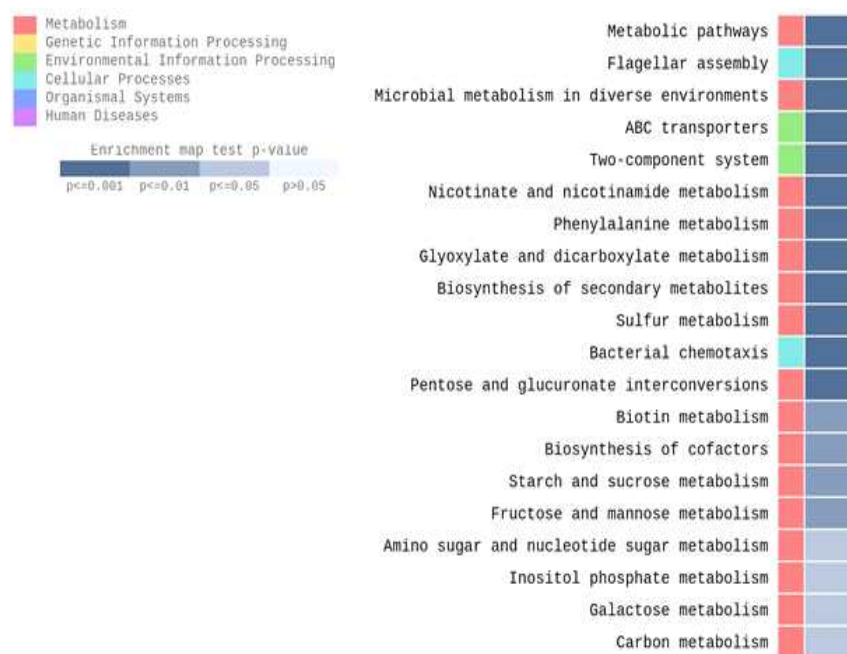


그림 3-33. Gene-set KEGG enrichment analysis in *B. gladioli* 18962 (p-value top 20)

- 기주 식물체 내에서, *F. fujikuroi* B20과 상호작용하지 않은 것에 비해 *F. fujikuroi* B20과 상호작용하는 *B. gladioli* 18962의 비교전사체 분석결과, 유의하게 차이나는 KEGG pathway 중 ABC transporters, Two-component system의 존재를 통해 *B. gladioli*가 *F. fujikuroi*와 상호작용을 하고 있다고 예상가능하며, 또한 Flagellar assembly, bacterial chemotaxis의 존재를 통해 *B. gladioli* 18962의 운동성도 상호작용하는 것으로 예상 가능함.

- 식물체 내에서 곰팡이와 상호작용하지 않는 *B. galdlioli*에 비해 상호작용하는 *B. gladioli*의 비교전사체 분석결과, Nicotinate, Nicotinurate, 6-Hydroxy-nicotinate, 2,5-Dihydroxy-pyridine, N-formylmaleamate, Maleamate, Malate, Fumarate와 같은 Nicotinate 대사경로를 통해, fumarate가 축적되는 특이점을 확인하였음(그림 3-34_A).

- Nicotinate and nicotiamide metabolism 경로에 따르면, nicotinate의 대사경로가 활성화를 이루고 있으며, 이는 *B. gladioli*가 식물체 내에서 영양이 부족한 현상을 극복하기 위함으로 보임.
- 또한, Biotin 대사 경로에 따르면, biotin 생합성에 관한 유전자 발현이 크게 증가하는 것으로 나타나며, 이는 *B. gladioli*가 식물체 내에서 영양 결핍상태를 극복하기 위한 것으로 예측함(그림 3-34_B).
- Sullivan, John T.(2001) 연구에 따르면, vitamin 생합성관련 유전자의 존재는 식물-세균 상호작용에 성공적인 정착에 기여하는 것으로 알려져있으며, vitamin의 결핍은 스트레스 상황에서 세균이 잘 정착을 할 수 있다고 언급됨.
- 따라서, 식물체 내에서 곰팡이와 상호작용하는 세균은 스트레스 상황을 극복하기 위해 biotin과 같은 대사 활동의 유전자 발현을 유도하여 식물체 내에 잘 정착하기 위한 것으로 해석됨.
- 추가적으로, bacterial motility에 관여한다고 알려진 flagellar assembly component와 flagellar assembly activator 유전자들이 상향 조절된 DEGs에 포함되며, 상호작용이 없는 것에 비해 상호작용을 하는 *B. gladioli* 18962가 상향 조절된 운동성을 가지는 것으로 나타남. 즉, *B. gladioli*가 식물 세포에서 활발한 운동성을 나타내는 것으로 보아 식물, 곰팡이 복합 상호작용체에 부착하는 것으로 연관성이 있음(그림 3-35).

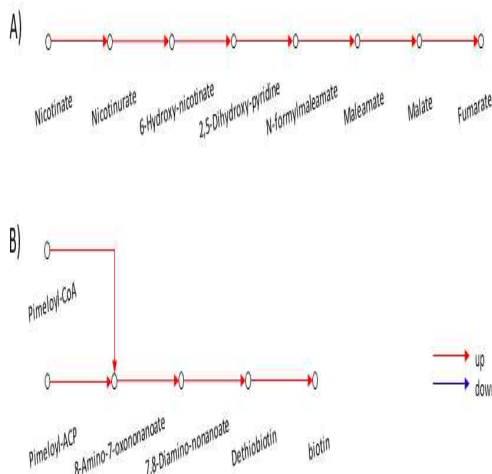


그림 3-34. Nicotinate metabolism and biotin metabolism pathway in *B. gladioli* 18962

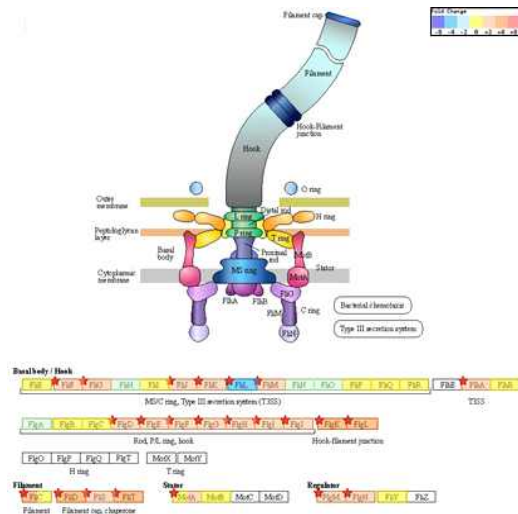


그림 3-35. Up-regulated DEGs related to flagellar assembly in *B. gladioli* 18962

- 반면에, bacterial secretion system에는 어떠한 영향이 없는 것으로 나타남. 식물체 내에서 *B. gladioli*가 곰팡이와 경쟁적 상호작용을 진행하면서 bacterial secretion system이 영향을 주지 않는 것으로 여겨짐(그림 3-36).

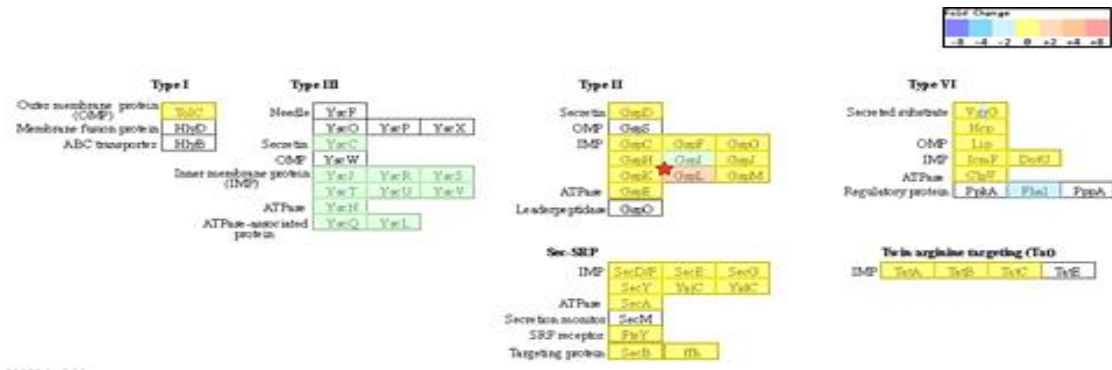


그림 3-36. Bacterial secretion system pathway in *B. gladioli* 18962

- 이러한 현상들을 종합하였을 때, 식물체 내에서 곰팡이와 상호작용을 하지 않는 *B. gladioli*에 비해 상호작용하는 *B. gladioli*의 경우, 영양 결핍이 유도되어 탄소 대사 활동을 유도하게 되며 특히 Nicotinate 대사 활동을 통해 C4 compound인 fumarate를 세포 내로 축적 및 세균의 운동성이 상향 조절되는 양상을 확인하였음.

○ 다양한 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Colletotrichum* 사이 상호작용 연구

1) 병원성 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 1차년도에서 *B. glumae* BGR1과 *B. plantarii* 18965를 저해하는 식물 병원성 *B. gladioli* 18962를 중심으로 복합감염 기작 규명을 하였고, 이를 바탕으로 *Burkholderia* 균주(*B. glumae*와 *B. gladioli*)와 고추 작물에 치명적인 탄저병을 일으키는 곰팡이 *Colletotrichum scovillei* KC05 균주 사이에 상호작용을 확인하여 병 발생 정도 및 감염기작에 관한 연구 진행.

- 병원성 *Burkholderia* 균주(*B. glumae*와 *B. gladioli*)와 *Colletotrichum* 곰팡이 *C. scovillei* KC05 사이 *in vitro* 대치 배양 실험을 기획하여 실험을 진행함(그림 3-37).

- 곰팡이 배양에 사용되는 potato dextrose agar(PDA)에서, 서로 다른 *Burkholderia* 균주(*B. glumae*와 *B. gladioli*)를 대치 배양하여 25°C에서 5일간 대치배양을 수행함.

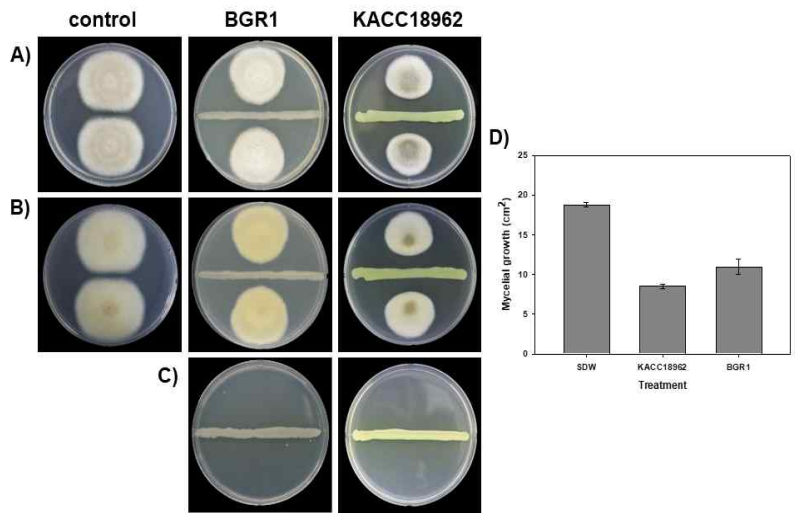


그림 3-37. Dual culture assay of *Colletotrichum scovillei* KC05 with the tested *Burkholderia glumae* BGR1, *B. gladioli* KACC 18962, or sterile distilled water (SDW) control on PDA plates 5 days after incubation at 25°C

- 그림-3-37_A는 배지의 앞면, 3-37_B는 뒷면, 3-37_C는 세균만 접종한 것을 나타내며 III-35_D는 이를 정량적으로 확인하였음.
- 대치 배양 결과, *B. glumae*의 경우, 무처리구에 비해 *C. scovillei*의 성장이 줄어들었음. 하지만, *B. gladioli*의 경우, 무처리구에 비해 *C. scovillei*의 성장이 크게 줄어들었으며, *B. glumae* 보다 훨씬 줄어들었음을 확인하였고, 이는 병원성 *Burkholderia*균주와 *Colletotrichum* 곰팡이의 상호작용이 존재함을 확인함.
- 병원성 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 곰팡이 사이의 상호작용은 확인되었지만, 직접 혹은 간접적으로 영향을 주는지를 확인하기 위해, 물리적으로 분리된 bi-plate에서 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 곰팡이간의 상호작용을 확인하고자 antifungal activity in vitro assay를 수행함(그림 3-38).

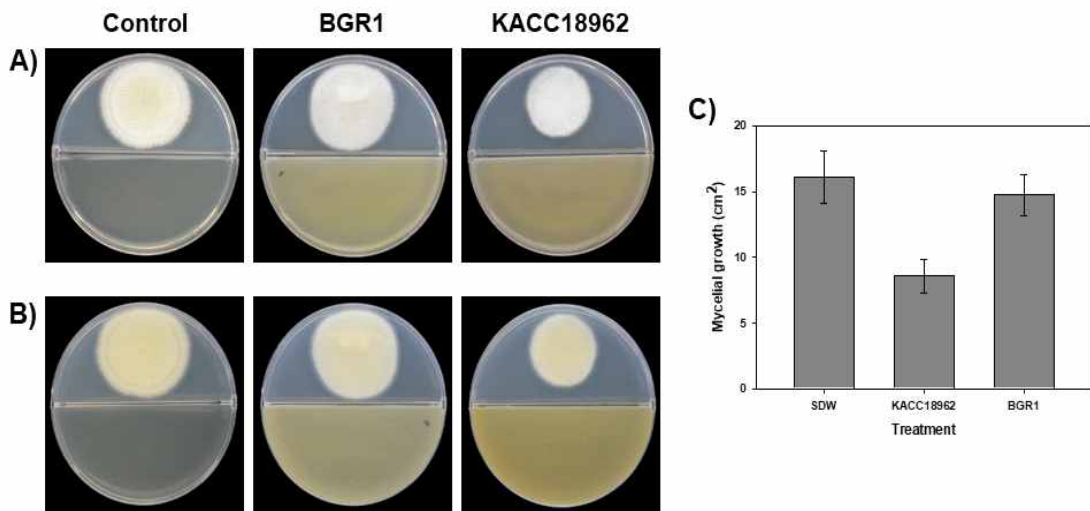


그림 3-38. Bi-plate antifungal volatiles assay against *C. scovillei* KC05 with the tested *B. glumae* BGR1, *B. gladioli* KACC18962, or sterile distilled water (SDW) control 5 days after incubation at 25°C

- 그림 3-38_A는 배지의 앞면, 3-38_B는 뒷면, 그리고, 3-38_C는 곰팡이의 성장 억제정도를 정량적으로 확인하였음.
 - Antifungal volatile *in vitro* assay 결과, *B. glumae*의 경우, 무처리구와 비교했을 때, *C.scovillei* KC05의 균사 성장 억제에 간접적인 영향이 거의 없는 것으로 확인되었으나, *B. gladioli* 18962의 경우, 무처리구와 비교했을 때, *C. scovillei* 균사 성장 억제에 간접적인 영향이 있는 것으로 파악됨.
- 2) 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay
- 토양미생물 유래의 *Paraburkholderia* sp. P39과 고추 탄저병을 일으키는 곰팡이 *C. scovillei* KC05 균주 사이에 상호작용을 확인하기 위한 *in vitro* 대치 배양 실험 진행함.
 - *Paraburkholderia* sp. P39와 *C. scovillei* KC05를 곰팡이 생육배지(PDA)배지에서 대치 배양하여 25°C에서 5일간 수행함(그림 3-39).

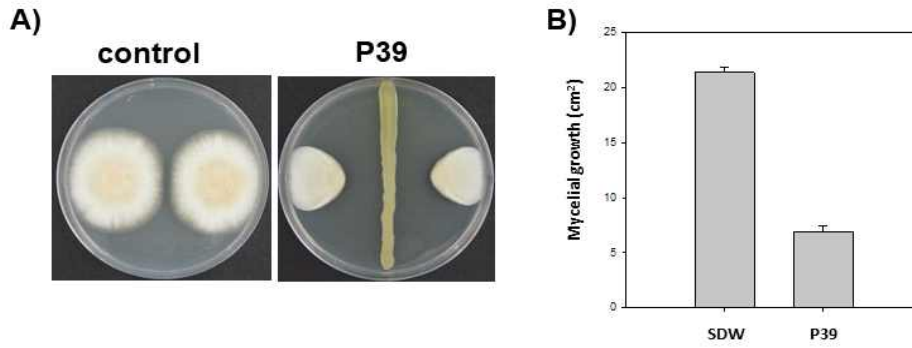


그림 3-39. Dual culture assay of *Colletotrichum scovillei* KC05 with the tested *Paraburkholderia* sp. P39 or sterile distilled water (SDW) control on PDA plates 5 days after incubation at 25°C

- 그림 3-39_A은 배지의 앞면, 3-39_B는 이를 정량적으로 확인하였음.
- 대치 배양 결과, *Paraburkholderia* sp. P39의 경우, 무처리구에 비해 *C. scovillei* KC05의 성장이 줄어들었음. 이는 *Paraburkholderia* sp. P39와 *C. scovillei* KC05 사이의 상호작용이 존재함을 확인함.
- *Paraburkholderia*와 *Colletotrichum* 균주간의 상호작용은 확인되었지만, 직접 또는 간접적으로 영향을 주는지를 확인하기 위해, 물리적으로 분리된 bi-plate에서 상호작용을 확인하고자 antifungal activity in vitro assay를 수행함(그림 3-40).

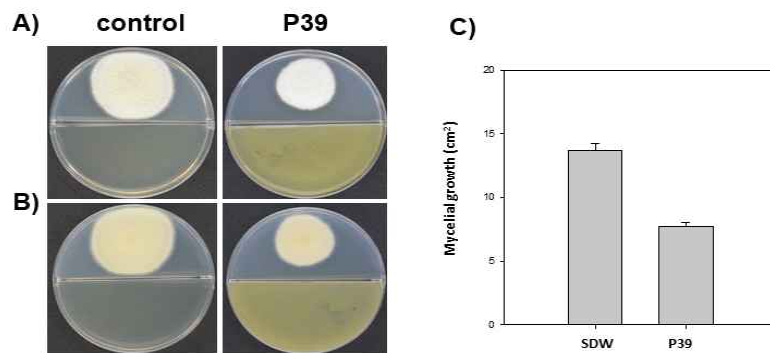


그림 3-40. Bi-plate antifungal volatiles assay against *C. scovillei* KC05 with the tested *Paraburkholderia* sp. P39, or sterile distilled water (SDW) control 5 days after incubation at 25°C

- 그림 3-40_A는 배지의 앞면, 3-40_B는 배지의 뒷면, 그리고 3-40_C는 곰팡이의 성장 억제정도를 정량적으로 확인하였음.
- Antifungal volatile in vitro assay 결과, *Paraburkholderia* sp. P39의 경우, 무처리구와 비교했을 때, *C. scovillei* KC05의 균사 성장 억제에 간접적인 영향이 있는 것으로 파악됨.
- 추가적으로, 다양한 *Burkholderia* 세균과 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이간의 상호작용을 확인하기 위해, *C. scovillei* KC05의 포자 수를 정량적으로 측정하였음(그림 3-41). 이는 일반적인 곰팡이 생육 배지(PDA)에서 *Colletotrichum*의 포자를 측정할 수 없었기 때문에, 포자 수를 측정하기 위해 V8 juice를 이용하여 배지를 제작하였고, 물리적으로 분리된 bi-plate에서 다양한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주를 배양하여 곰팡이 포자를 측정하는데 사용하였음.

- 그림 3-41_A는 배지의 앞면, 3-41_B는 균사 성장 억제율을 정량적으로 측정된 결과, 3-41_C는 광학현미경과 hemocytometer를 이용하여 포자를 측정된 정량화된 결과임.
- V8배지에서 다른 균주와 비교했을 때, 식물병원성세균 *B. gladioli* 18962균주에서 *C. scovillei* KC05의 균사 성장 억제율이 가장 높았으며 이는 세균이 곰팡이를 억제하는 물질이 간접적으로 영향을 보이고 있음(그림 3-41_A와 B).
- 곰팡이에서 포자만을 분리하였고 광학현미경을 통해 포자수를 측정된 결과, 식물 병원성 *B. gladioli* 18962균주에서 포자 수가 가장 낮았으며 이는 세균 유래의 어떤 물질에 의해 곰팡이 성장이 억제되는 것으로 추정됨.

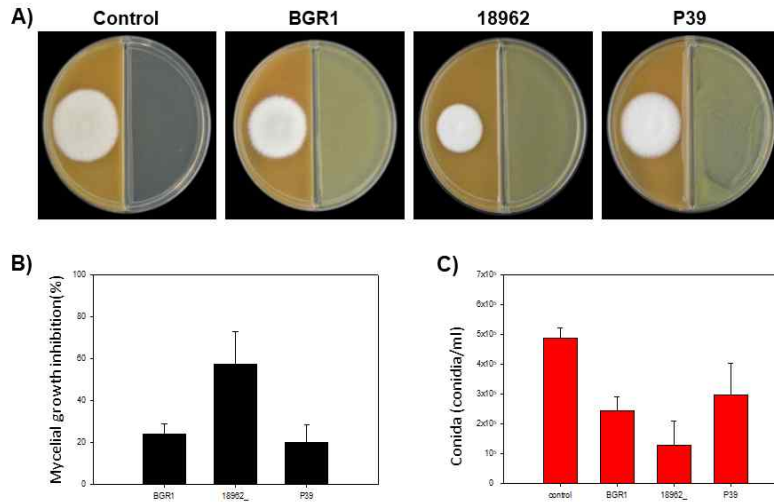


그림 3-41. Bi-plate antifungal volatiles assay against *C. scovillei* KC05 with the tested *B. glumae* BGR1, *B. gladioli* KCCM18962, and *Paraburkholderia* sp. P39 or sterile distilled water (SDW) control 5 days after incubation at 25°C. The bar graph represent the mycelial growth and sporulation

○ *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이 사이 기주 감염 연구

- 1) 병원균 또는 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 감염 연구
 - *in vitro* 상호 작용 실험에서 병원성 *Burkholderia* 균주 *B. glumae* BGR1 및 *B. gladioli* 18962와 유익한 *Burkholderia* 균주 *Paraburkholderia* sp. P39가 직접 또는 간접적으로 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이 *C. scovillei* KC05에 영향을 준다는 사실을 확인하였음.
 - 직접적인 영향을 확인하기 위해 *in vivo* dipping assay를 계획하였고, 선발된 *B. gladioli* 18962와 *Paraburkholderia* sp. P39 균주를 최소 10⁶cfu/ml 농도의 배양액을 준비하여 고추(녹광)를 2시간동안 침지하였고, 고추탄저병을 일으키는 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이 *C. scovillei* KC05를 현탁하여 5x10⁵ conidia/ml를 접종한 뒤, 25°C에서 5일간 배양 후 병징을 관찰함(그림 3-42, 43).

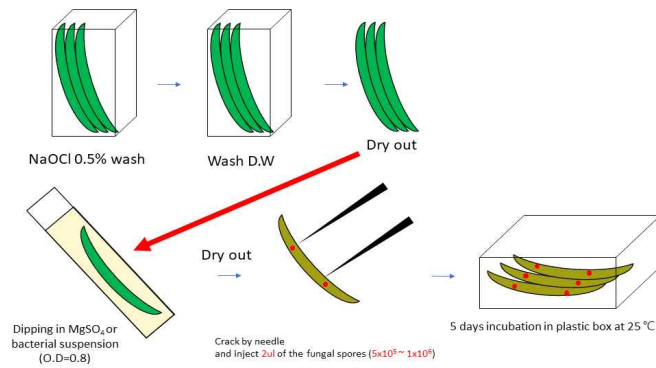


그림 3-42. scheme of *in vivo* dipping assay

- 그림 3-43_A는 *in vivo* dipping assay의 병징 결과이고, 3-43_B는 A의 결과를 정량적으로 평가한 결과임.

- *in vivo* dipping assay 수행 결과, 무처리구에 비해 병원성 *Burkholderia* 균주 *B. gladioli*와 *B. glumae*는 차이가 있는 것으로 확인됨. 특히, *B. glumae*는 토마토, 가지, 고추와 같은 가지과에도 감염한다고 알려져 있지만, 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이와 상호작용을 통해, 병증 정도를 가속화시키지 않는 것으로 판단됨. 반면, 무처리구에 비해 유익한 *Burkholderia* 균주 *Paraburkholderia* sp. P39의 경우, 차이가 나타남. 이는 *in vivo*에서 *Paraburkholderia* sp. P39와 *C. scovillei* KC05 사이의 배타적 상호작용이 일어나는 것으로 추정됨.

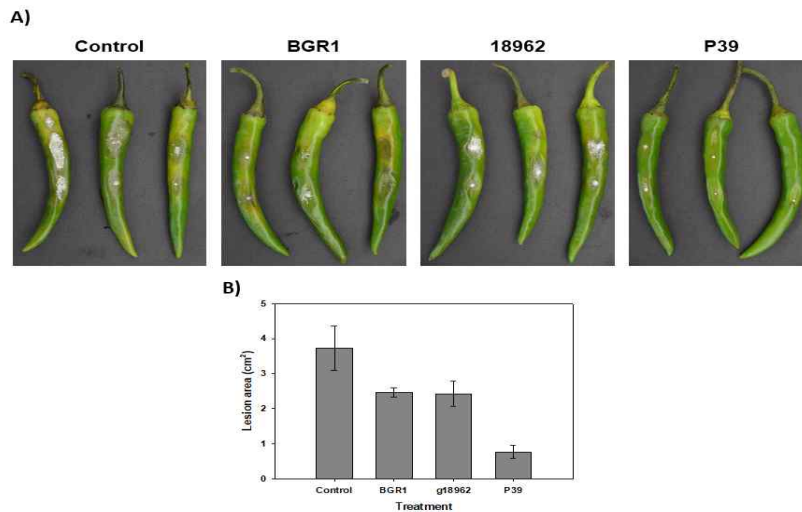


그림 3-43. Anthracnose lesion area (cm²) of green pepper (Nockwang), inoculated with 2 μl of *C. scovillei* KC05 conidial suspension (5 × 10⁵ conidia /mL) after dipping in culture suspension of *B. glumae* BGR1, *B. gladioli* 18962, and *Paraburkholderia* sp. P39. MgSO₄ served as negative control for bacterial treatment

- *in vitro* 대치 배양에서 *B. gladioli* 18962가 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났지만, 실제 *in vivo* dipping 결과에서 P39가 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이 *C. scovillei* KC05를 억제하는 길항 미생물로 판단됨.

- *in vitro* 대치 배양 결과를 통해, 간접적으로 영향을 받는지를 확인하기 위해, 다음과 같은 *in vivo* volatiles assay 구상하였고, 선발된 *B. glumae* BGR1, *B. gladioli* 18962, 그리고 *Paraburkholderia* sp. P39 균주의 액체배양액을 TSA 배지에 도말하였고, 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이 *C. scovillei* KC05를 현탁하여 5×10^5 conidia/ml를 접종한 뒤, 서로 독립적이지만 같은 계(system)에서 25°C에서 5일간 배양하여 병징을 관찰함(그림 3-44).

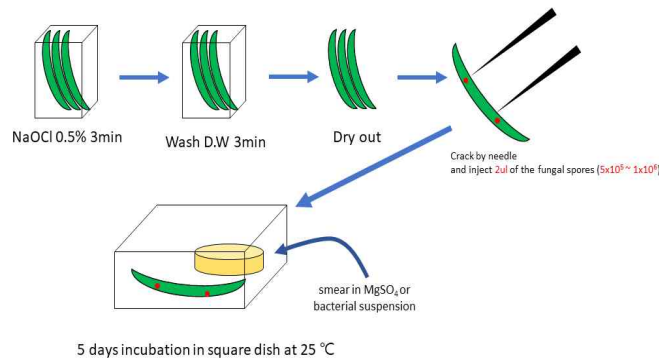


그림 3-44. Scheme of *in vivo* volatiles assay

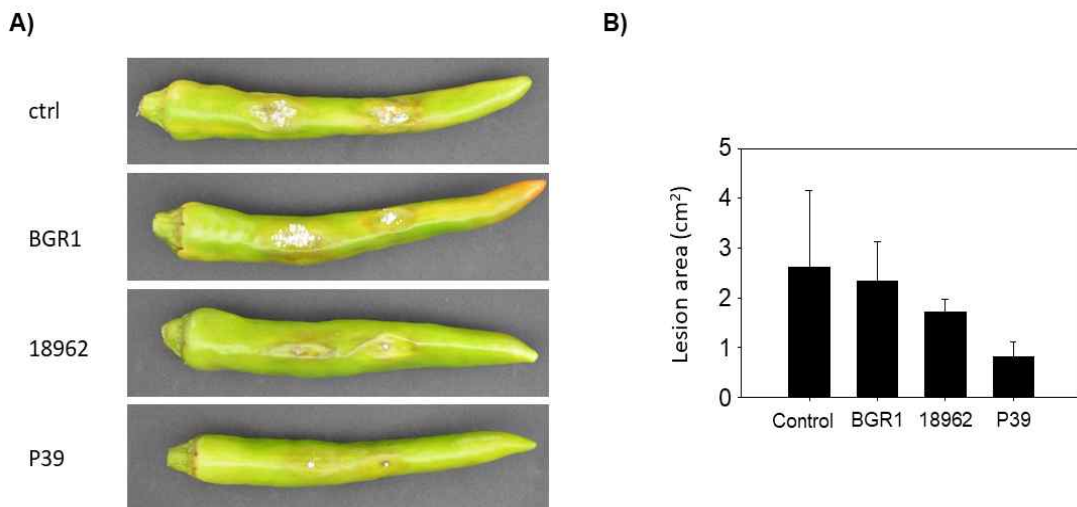


그림 3-45. Effect of volatiles produced by *B. glumae* BGR1, *B. gladioli* 18962, and *Paraburkholderia* sp. P39 in a small petri dish on green pepper (Nockwang) in a large square plastic plate. $MgSO_4$ served as negative control for bacterial treatment

- 그림 3-45_A는 고추 과실에 각각 다양한 균주를 같은 플라스틱 박스에 두고, 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이를 접종하여 간접적인 영향을 받는지 확인한 병원성 검정 사진이며, 3-161_B는 이를 정량적으로 평가한 결과임.
- 흥미롭게도, *in vitro* 대치 배양 실험결과와 비슷하게, 병원성 *Burkholderia* 균주와 다르게 유익한 *Burkholderia* 균주인 P39의 경우, 무처리구 대비 가장 효과적으로 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이를 제어하는 것으로 판단됨.
- 즉, P39 균주가 생산하는 2차 대사산물 중 휘발성 물질에 의해 고추탄저병을 일으키는 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이를 제어할 수 있다는 가능성을 보여줌.

2) 유익한 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 대치 배양 *in vitro* assay

- 세균의 성장곡선에서 지수증식기 이후 정지기에 도달하기까지, 2차 대사산물이 생성되는 시기를 생성기 (idiophase) 시기라고 하며 이를 확인하기 위해, 확보된 유익한 *Burkholderia* 균주, P39 strain의 생리학적 분석을 위해 성장 곡선을 측정하였음(그림 3-46).

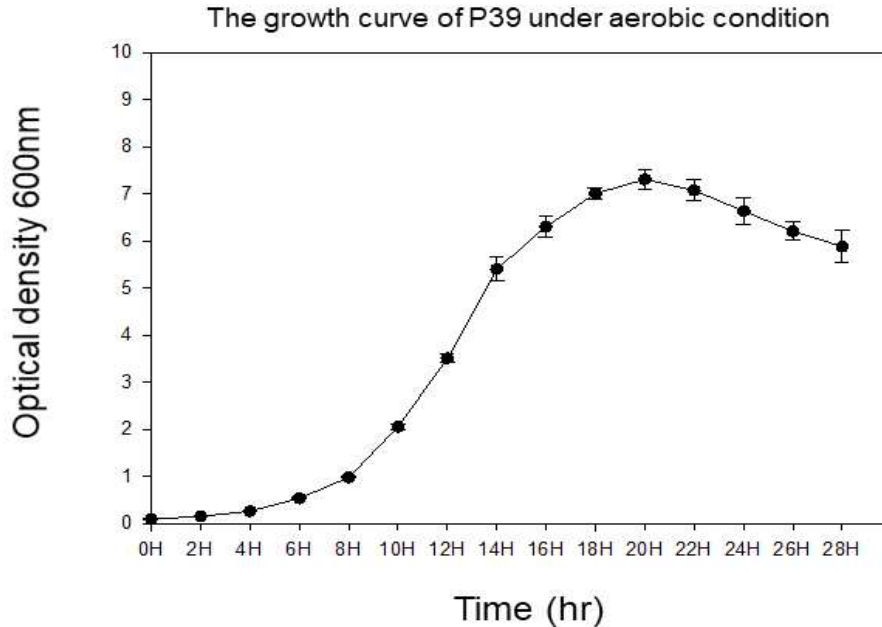


그림 3-46. The growth curves of *Paraburkholderia* sp. P39 under aerobic growth conditions. The doubling time (DT) of the bacteria was calculated from the growth curves. All values provided are the averages of the results from three independent experiments. The error bars indicate the standard deviations

- 균주가 2차 대사산물을 생산하는 생성기는 20시간 이후로 확인되었고, 차후 실험에서 생성기 기간을 고려하여 응용할 예정임.
- P39 균주의 이분법 주기는 2시간 36분으로 계산됨.
- *in vitro* 대치배양을 진행하기 위해, 적절한 실험용 포집병에 페트리디시(직경35.00 x 높이 10.00)를 이용하여 *C. scovellei* KC05 전용 V8 agar와 P39 전용 tryptic soybean agar를 미리 준비하였고, *C. scovellei* KC05와 *Paraburkholderia* sp. P39를 idiophase기간을 유도한 액체배양액을 접종하여 7일간 배양을 유도하여, GC-MS 분석을 수행하였음(그림 3-47).
- GC-MS 분석 조건에서 automated thermal deorption(ATD) 조건은 trap 온도 -30℃, desorb flow 40ml/min, desorb 온도 300℃, desorb time 8min, trap: Tenax TA으로 설정하였고, GC/MSD 조건은 column HP-5 (30m x 0.25mm x 0.25um), flow 1.0 ml/min (He), Oven: Oven35℃(5min) → 5℃/min 100℃(10min) → 10℃/min 150℃(5min) → 20℃/min 250℃(5min), MS Temperature 230℃, Transfer Temperature 280℃, Acquisition mode: Scan mode, Mass range: 30 - 550 m/z 으로 수행하였음.

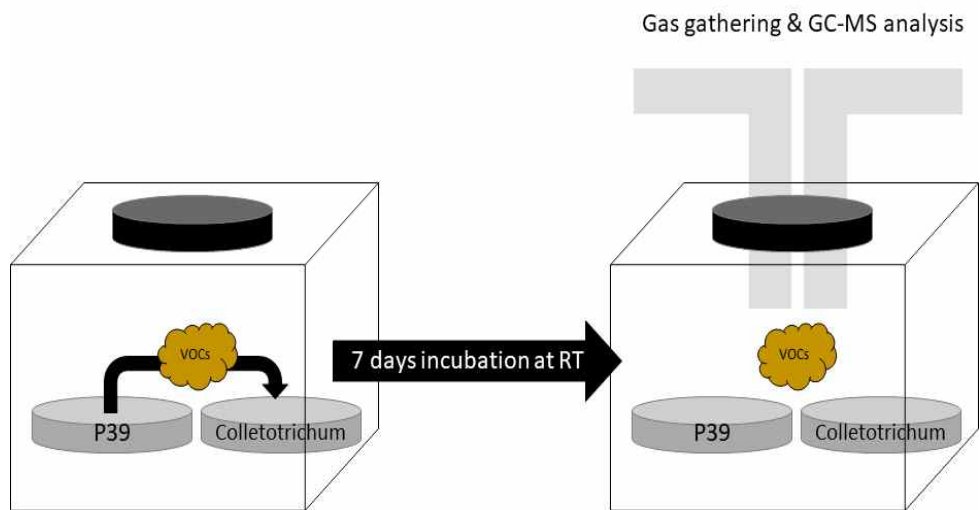


그림 3-47. Overview of the bacterial volatile compounds analysis method applied in this study

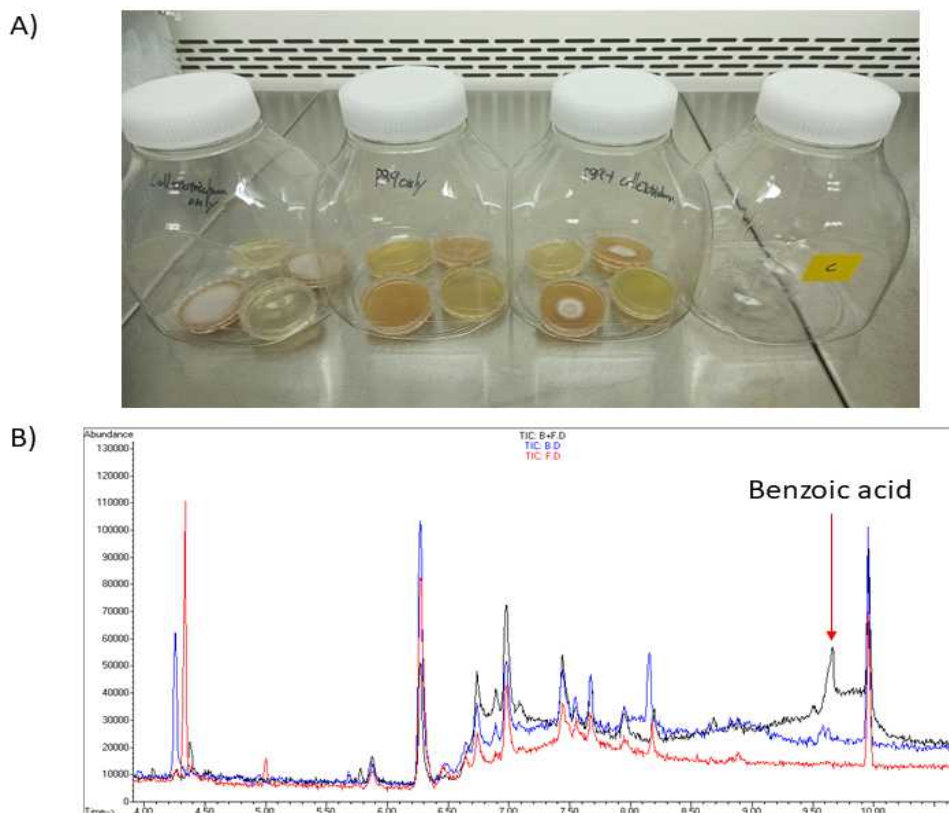


그림 3-48. GC-MS chromatogram of volatile organic compounds

- *in vitro* 대치배양 결과, 그림 3-48_A는 실험에 사용된 실험군과 대조군을 나타내었으며, *Paraburkholderia* sp. P39 균주가 *C. scovellei* KC05 균주를 효과적으로 억제하는 표현형적 특성이 잘 나타나는 것으로 확인됨.
- 대치배양을 통해 포집된 gas를 GC-MS분석 결과, *Paraburkholderia* sp. P39와 *C. scovellei* KC05 균주가 대치배양을 이룰 때, 여러 물질들이 나타나는 것이 아닌 benzoic acid가 특이적으로 나타나는 것으로 확인되었음(그림 3-48_B).

- 이를 통해, 물리적으로 분리된 배지에서 간접적으로 *Paraburkholderia* sp. P39 균주가 생산한 이차대사산물 benzoic acid의 영향으로 *C. scovillei* KC05 균주의 생장이 억제되는 현상을 확인함.
- Gao, Haiyan(2018)의 연구에 따르면, *B. subtilis* 배양액을 이용하여 *Colletotrichum gloeosporioides* 를 포함하여, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola*, and *Alternaria alternata*, *fungal pathogen*의 성장을 억제하는 것으로 확인됨.
- 또한, Yoon, Mi-Young(2012)의 연구에 따르면, *B. subtilis* GDYA-1에서 동정된 benzoic acid가 고추 역병을 일으키는 곰팡이 (*M. oryzae*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *P. capsica*) 를 대상으로 benzoic acid 가 효과적으로 성장을 억제하는 것으로 확인됨.
- 이러한 내용을 토대로, GC-MS 분석을 통해 유익한 *Burkholderia* 균주 *Paraburkholderia* sp. P39가 이차대사산물인 benzoic acid을 생산하고 기체 상태로 *C. scovillei* KC05 균주에 간접적인 영향을 끼쳐 곰팡이 성장을 억제하는 것으로 판단됨.

○ *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이 사이 전사체 분석 및 네트워크 구축

- 1) *Burkholderia* 세균과 *Colletotrichum* 곰팡이의 대치배양 *in vitro* 전사체 분석 수행
 - 2차년도에서 식물 병원성 *Fusarium* 균주와 이에 가장 강한 길항작용을 나타낸 식물 병원성 *Burkholderia* 균주 *B. gladioli* 18962간의 상호작용에 관한 전사체 분석을 수행하였음.
 - 식물 병원성 *Burkholderia* 균주와 식물 병원성 *Colletotrichum* 곰팡이의 상호작용에 관한 네트워크 구축을 위해 식물 병원성 *B. gladioli* 18962와 식물 병원성 *C. scovillei*의 *in vitro* 전사체 분석을 계획하였고, *B. gladioli* 18962와 *C. scovillei*를 PDA 배지에서 대치 배양과 단일 배양을 각각 5일 차까지 *in vitro* assay를 수행함(그림 3-49).

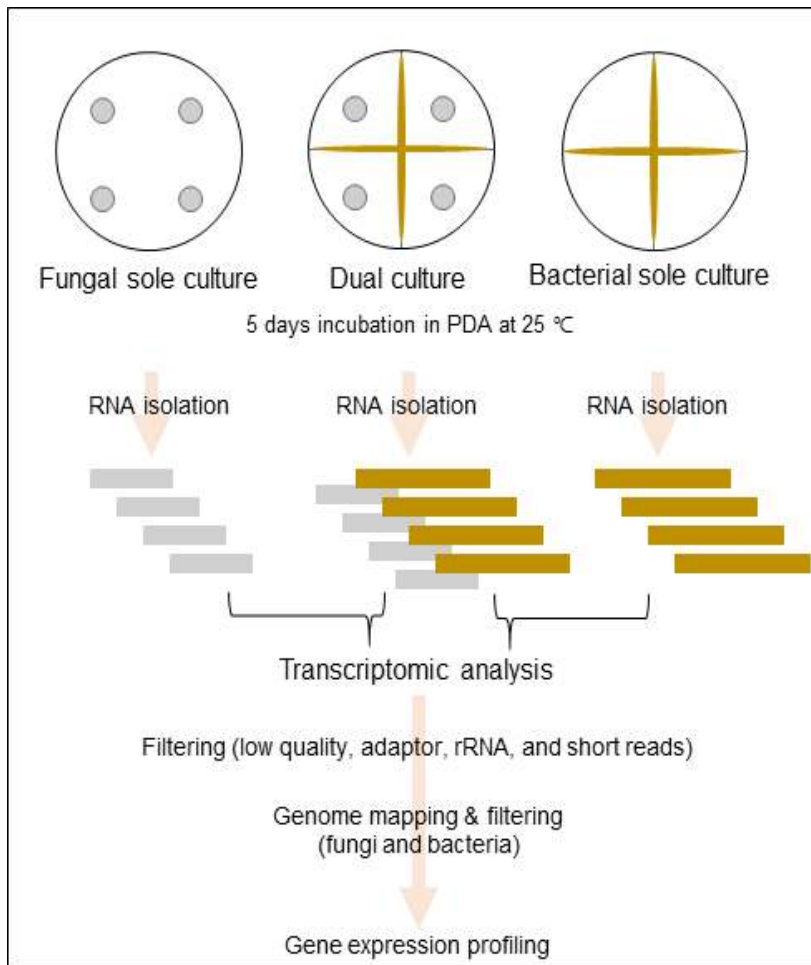


그림 3-49. scheme of RNA-seq between fungi and bacteria

- *C. scovellei* KC05의 상호작용을 분석하기 위해서 *C. scovellei* KC05 sole culture 시료와 대치배양 시 *B. gladioli* 18962와 상호작용하는 *C. scovellei* KC05 culture 시료로부터 total RNA를 추출함. *B. gladioli* 18962의 상호작용 분석을 위해서 위와 같은 방식으로 *B. gladioli* 18962 sole culture 시료와 대치배양 시 *C. scovellei* KC05와 상호작용하는 *B. gladioli* 18962 culture 시료로부터 total RNA 시료를 추출하였음.
- 추출된 total RNA로부터 RNAseq 라이브러리(transcriptome raw data)를 생성하고, Trimmomatic 프로그램을 활용하여 adaptor 서열을 제거하였고, trimmed data를 이용하여 read data의 QC확인을 진행하여 read data를 genomic DNA reference에 맵핑함.
- 해당 비교 조합간 발현 값의 log2 fold change와 두 그룹간 평균 비료를 통해 도출된 p-value를 volcano plot(그림 3-50)으로 나타냄(X-axis: log2 fold change, Y-axis: -log10 p-value).
- Differentially expressed gene (DEGs, 차별유전자) 분석을 위해 original raw data는 HTseq을 통해 얻은 기존의 알려진 유전자에 관한 RPKM값을 대상으로 하였고, 데이터 전처리 및 QC과정에서 low quality를 가지는 유전자를 filtering 후, quantile normalization을 수행하였음.
- 통계 분석은 fold change, independent T-test를 이용하여, 유의한 결과로 IFCI ≥ 2 , independent T-test raw p-value < 0.05 조건으로 선별함.
- *C. scovellei* KC05 으로부터 *B. gladioli* 18962 상호작용 조건하 비교전사체 분석을 통해 IFCI ≥ 2 , $p < 0.05$ 의 총 2,212개 DEGs를 획득하였고, 이 중 up-regulated DEGs 1,081개, down-regulated DEGs 1,131개를 동정하였음(그림 3-50). 이를 통해 *C. scovellei* KC05가 *B. gladioli* 18962와 상호작용 조건 하에서 서로 다른 유전자 발현을 통해 반응하고 있음을 확인하였음.

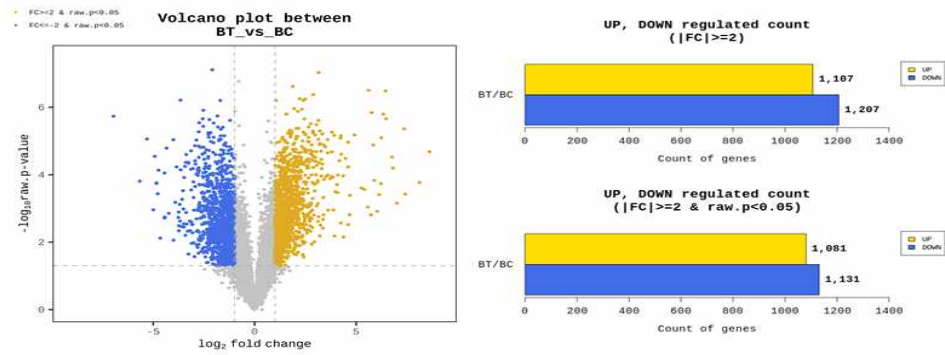


그림 3-50. Volcano plot and analysis of DEGs in *B. gladioli* 18962 (BC; *B. gladioli* sole culture, BT; *B. gladioli* co-culture with *C. scovellei*)

- 유의한 DEGs 리스트에 대하여 각 시료의 유전자별 발현 값(normalized value)을 이용하여 발현 정도가 유사한 시료와 유전자를 hierarchical clustering analysis (Euclidean Distance, Complete Linkage)를 통하여 그룹화하여 나타내었음(그림 3-51).

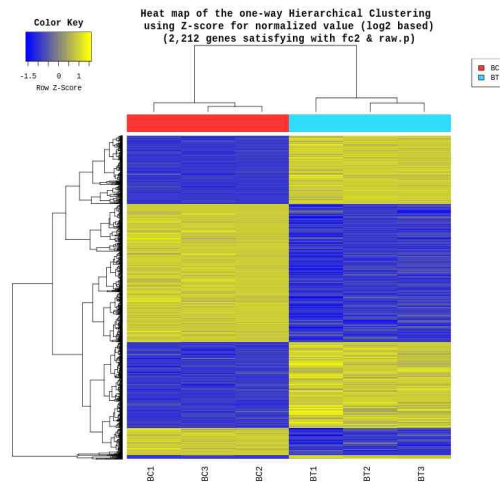


그림 3-51. Heat map of one-way Hierarchical Clustering in *B. gladioli* 18962 (BC; *B. gladioli* sole culture, BT; *B. gladioli* co-culture with *C. scovellei*)

- DEGs data를 기반으로 전체 982 DEGs를 중심으로 Gene Ontology (GO) 분석을 통해 Biological process, Cellular Component, Molecular Function에 대한 결과를 얻었음(그림 3-52).

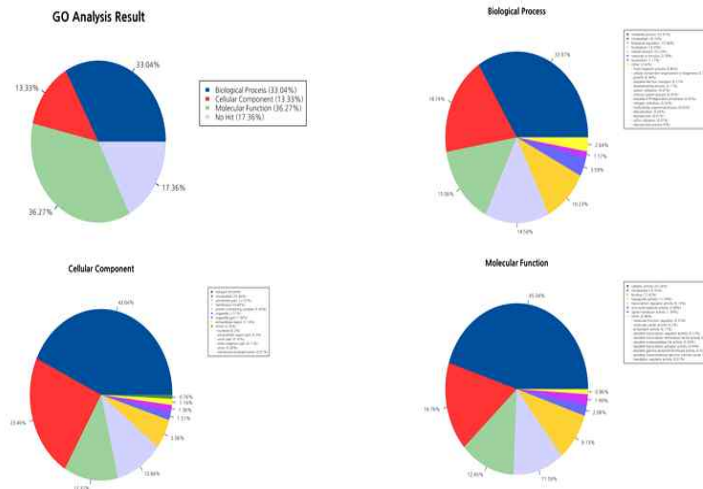


그림 3-52. Gene Ontology analysis of *B. gladioli* 18962

- *C. scovellei* KC05와 상호작용하고 *B. gladioli* 18962와 상호작용 하지 않은 *B. gladioli* 18962의 GO 분석 결과, 982 DEG 중 33.04%가 Biological process에 속하고 13.33%, 36.27%가 각 Cellular component와 Molecular Function에 해당하였음.
- Total DEGs 중 Biological process 의 category로서 metabolic process, biological regulation, localization, cellular process, response to stimulus 등이 존재함.
- Cellular component의 경우, cell part와 membrane에 해당하는 부분이 가장 높은 빈도로 차지하고 있음.
- Molecular Function GO 분석 결과, total DEGs에서 catalytic activity에 포함되는 DEGs가 가장 많고 그밖에 transporter activity와 transcription regulator activity, structural molecule activity, signal transducer activity 등이 포함됨.

2) 전사체 분석 결과를 통한 네트워크 구축

- Total DEGs를 중심으로 KEGG pathway 분석을 수행하여, 가장 신뢰성 있는 20개의 pathway를 확보하였음(그림 3-53).

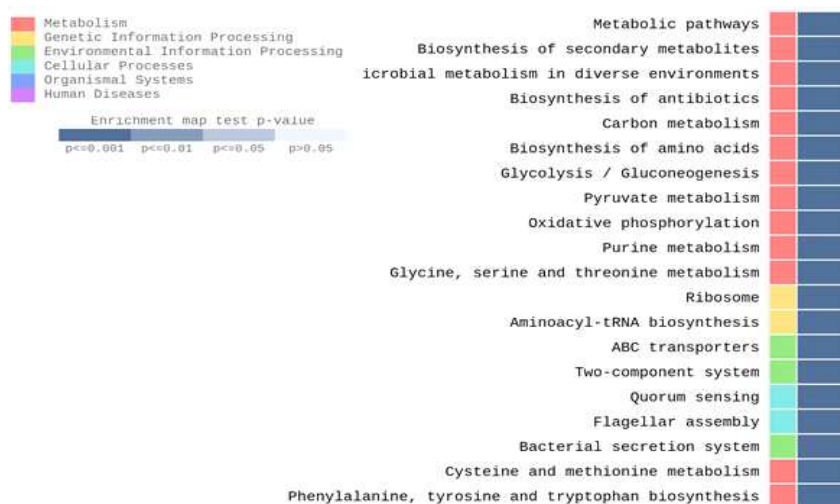


그림 3-53. Gene-set KEGG enrichment analysis in *B. gladioli* 18962 (p-value top 20)

- Top 20 pathway로, metabolic pathway, Biosynthesis of secondary metabolites, microbial metabolism in diverse environments, Biosynthesis of antibiotics, Carbon metabolism, Biosynthesis of amino acids, Glycolysis/ Gluconeogenesis, Pyruvate metabolism, Oxidative phosphorylation, Purine metabolism, Glycine, serine and threonine metabolism, Ribosome, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, ABC transporters, Two-component system, Quorum sensing, Flagella assembly, Bacterial secretion system, cysteine and methionine metabolism, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis이 동정됨.

- *C. scovellei* KC05와 상호작용하는 *B. gladioli* 18962의 비교전사체 분석 결과, 유의하게 차이나는 ABC transports, Two-component system과 같은 environmental processing의 활성화로 *B. gladioli* 18962가 *C. scovellei* KC05와 상호작용을 예상가능하며, flagellar assembly의 존재를 통해 *B. gladioli* 18962의 운동성도 상호작용에 조절되는 것으로 예상하며, bacterial secretion system의 영향이 있을 가능성이 있음(그림 3-54).

- 특히, oxidative phosphorylation과 관련되어, 전자전달계와 관련된 F-type ATPase의 하향 조절된 DEGs로 인해 전자전달에 불균형을 이루어(그림 3-54_A), 이를 해소하기 위해 two-component system 중 potassium transport 및 oxidative stress와 관련 KdpE와 그 하위 regulon의 상향 조절된 DEGs를 확인 할 수 있었으며(그림 3-54_B), glutathione 관련 대사가 상향 조절되는 양상을 확인함. 이는 *C. scovellei*와 상호작용하는 *B. gladioli*가 세포내 스트레스 상황이 유도되더라도 세포 내 산화적 스트레스가 유발되고 있지만 two-component system과 glutathione 대사 활동을 이루어 산화적 스트레스를 줄이려는 양상을 확인함(그림 3-54_C).

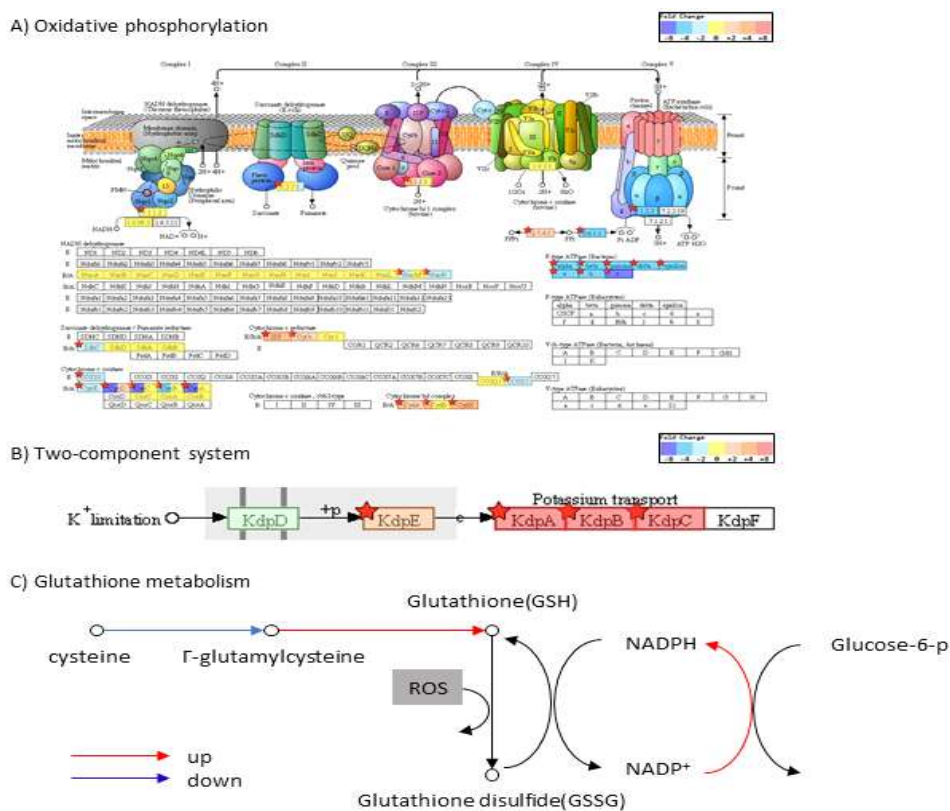


그림 3-54. Up/down-regulated DEGs related to oxidative stress in *B. gladioli* 18962

○ 비교 전사체 분석을 통한 병원균 상호작용 기작 연구

1) *In vitro* 전사체 비교 분석

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호작용, 그리고 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 상호 작용 *in vitro* 전사체 결과를 비교 분석을 통해, 확보된 특이적 유전자 그룹을 만들고 이를 기반으로 생물정보학적 네트워킹 분석을 수행함.

- 방향족 물질의 분해에 관한 대사를 비교하였을 때, *C. scovillei* KC05 균주와 상호작용하면서 *B. gladioli* 18962 내에 3,4-Dihydroxybenzoate (protocatechuate) 가 축적되는 특이점이 있는 것으로 파악됨(그림 3-55).

- 또한, *C. scovillei* KC05 균주와 상호작용하면서 down-regulated DEGs에 포함되었음. 이는 *B. gladioli* 18962는 *F. fujikuroi* B20 균주와 상호작용에서 adhesion 및 attachment에 연관성이 있지만, *C. scovillei* KC05 균주와 상호작용에서 전반적으로 낮은 운동성이 나타남(그림 3-56).

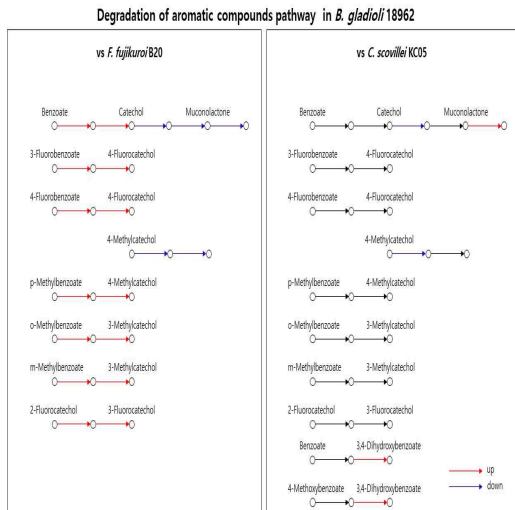


그림 3-55. Comparative transcriptomic analysis of degradation of aromatic compounds pathway in *B. gladioli* 18962

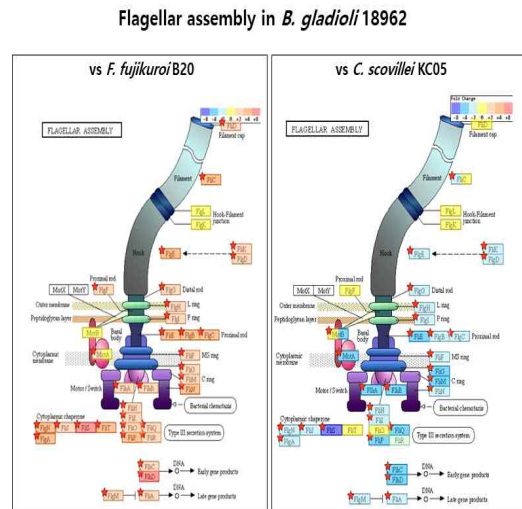


그림 3-56. Comparative transcriptomic analysis of flagellar assembly in *B. gladioli* 18962

- *B. gladioli* 18962의 비교전사체 분석결과에서, *B. gladioli* 18962의 secretion system의 경우, *F. fujikuroi* B20 균주와 상호작용하면서 대체적으로 영향을 주지 않는 것으로 유추할 수 있었지만, *C. scovillei* KC05 균주와 상호작용에 있어서 bacterial secretion system이 억제되는 경향으로 영향을 주는 것으로 추측됨(그림 3-57).

Bacterial secretion system in *B. gladioli* 18962

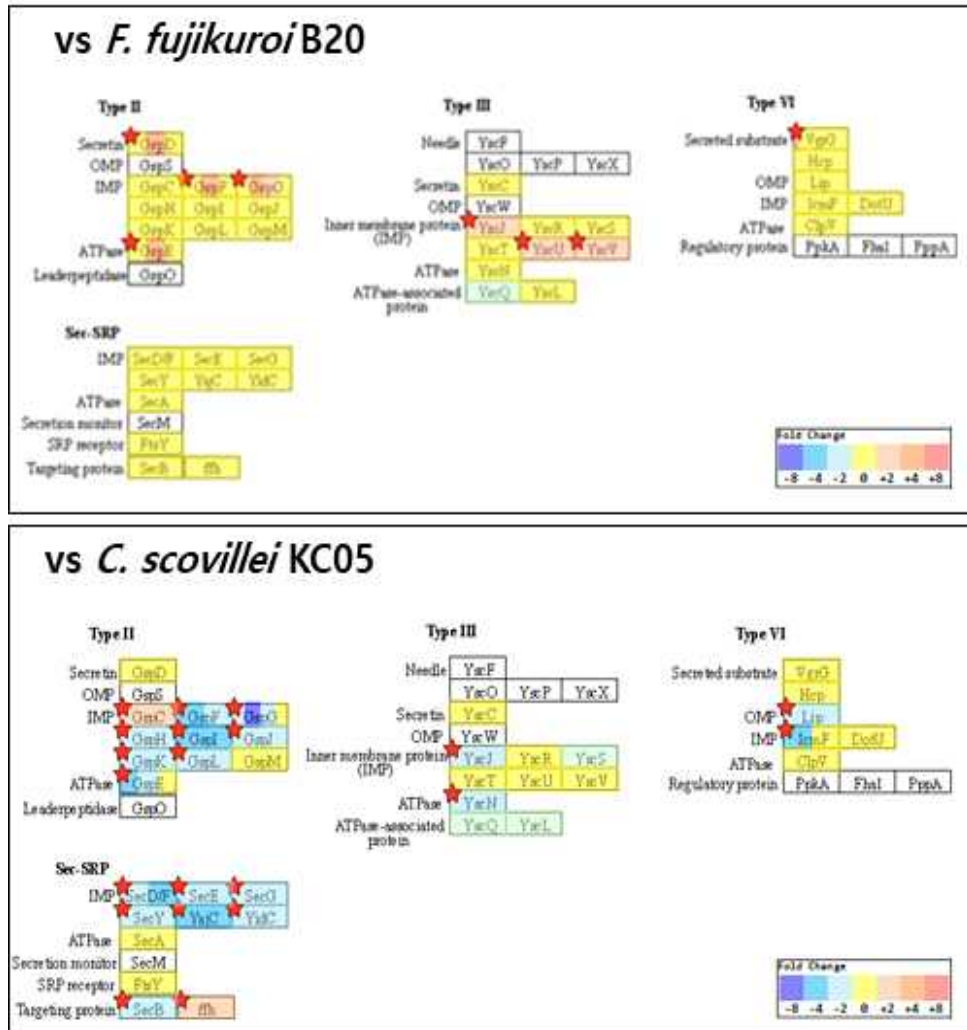


그림 3-57.
Comparative transcriptomic analysis of bacterial secretion system in *B. gladioli* 18962

- 이러한 분석 결과를 토대로, 공통적으로 *B. gladioli* 18962에서 서로 다른 kingdom에 직접적으로 영향을 주는 type 6 secretion system에 큰 영향은 없는 것으로 나타나며, 반면에 특이적으로 *F. fujikuroi* B20 균주에서는 *B. gladioli* 18962에서 세포 내에 catechol 축적 양상을 나타내고, 운동성 관련 유전자의 발현이 증가하고, bacterial secretion system에 대체적으로 영향이 없는 특이점이 파악되지만, *C. scovillei* KC05 균주에서는 *B. gladioli* 18962에서 세포 내 3,4-Dihydroxybenzoate (protocatechuate)의 축적 양상을 나타내고, 운동성이 감소하며 bacterial secretion system에 억제하는 특이점을 확인함.

2) *In vivo* 전사체 비교 분석

- *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주 사이 상호 작용, 그리고 *Burkholderia* 균주와 *Colletotrichum* 균주 사이 상호 작용을 분석하기 위해 *in vitro* 전사체 분석을 수행하였음.

- 추가적으로, 기주 식물체 내에서 *Burkholderia* 균주와 *Fusarium* 균주간 *in vivo* 전사체 분석 수행을 진행하였고, 종합적으로 *in vitro* 전사체 분석 결과와 *in vivo* 전사체 분석 결과를 비교 분석하므로써 확보된 특이적 유전자 그룹을 만들고 이를 기반으로 생물정보학적 네트워크 분석을 수행함.

- 각 전사체 data를 기반으로 확보된 DEGs를 중심으로 KEGG pathway 결과 분석을 수행을 진행하여, 결과로 얻어진 Top 20개 pathway를 비교 분석을 진행하여, 교차하는 특이적 KEGG enrichment 분석을 수행함(그림 3-58).

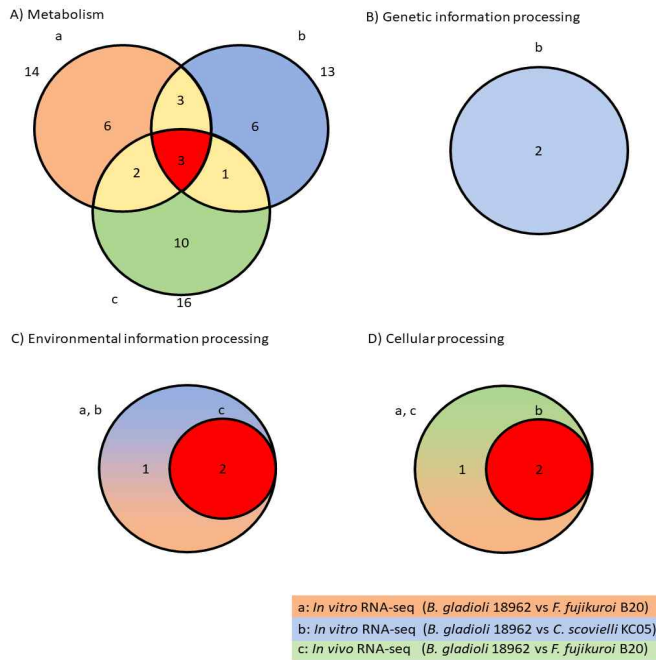


그림 3-58. The Venn diagram shows the number of common and unique gene expression profiles

- KEGG enrichment 분석을 수행하여 Metabolism, genetic information processing, environmental information processing, cellular processes, organismal systems, human disease 총 6가지 분류를 기준으로, 각 전사체 data에 해당하는 것을 분류하였고, 교차하는 것으로 metabolism, genetic information processing, environmental information processing, cellular processes 총 4가지로 분류됨을 확인함.

- 가장 많이 차지하는 metabolism 영역으로, *B. gladioli*와 *F. fujikuroi* 사이 *in vitro* 상호작용의 전사체 결과에서 metabolic pathway, microbial metabolism in diverse environments, Biosynthesis of secondary metabolites, Degradation of aromatic compounds, starch and sucrose metabolism, Purine metabolism, Arginine biosynthesis, Pyrimidine metabolism, Benzoate degradation, Atrazine degradation, Nicotinate and nicotinamide metabolism, Biosynthesis of antibiotics, Porphyrin and chlorophyll metabolism, Oxidative phosphorylation 총 14가지로 확인됨(그림 3-58_A).

- *B. gladioli*와 *C. scovellii* 사이 *in vitro* 상호작용의 전사체 결과에서 metabolic pathway, Biosynthesis of secondary metabolites, microbial metabolism in diverse environments, Biosynthesis of antibiotics, Carbon metabolism, Biosynthesis of amino acids, Glycolysis/Gluconeogenesis, Pyruvate metabolism, Oxidative phosphorylation, Purine metabolism, Glycine, serine and threonine metabolism, cysteine and methionine metabolism, Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis 총 13가지로 확인됨(그림 3-58_A).

- 기주 식물체 내에서 *B. gladioli*와 *F. fujikuroi* 사이 *in vivo* 상호작용의 전사체 결과에서 metabolic pathways, Flagella assembly, microbial metabolism in diverse environments, ABC transporters, Two-component system, Nicotinate and nicotinamide metabolism, phenylalanine metabolism, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, Biosynthesis of secondary metabolites, Sulfur metabolism, Bacterial chemotaxis, Pentose and glucuronate interconversions, Biotin metabolism, Biosynthesis of cofactors, Starch and sucrose metabolism, Fructose and mannose metabolism, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Inositol phosphate metabolism, Galactose metabolism, Carbon metabolism 총 16가지로 확인됨(그림 3-58_A).
- 공통적으로 교집합하는 것으로 metabolic pathway, Biosynthesis of secondary metabolites, microbial metabolism in diverse environments 3가지로 확인되었으며, 특히 microbial metabolism in diverse environments의 경우, 각 전사체 결과별로 서로 다른 kingdom과 상호작용을 이루는 점에서 일치하는 결과임을 나타내고 있음을 보여줌(그림 3-58_A).
- 이와 다르게, *B. gladioli*와 *C. scovellei* 사이 상호작용의 전사체 분석결과에서 genetic information processing에 관련된 특이적으로 Ribosome, Aminoacyl-tRNA biosynthesis와 관련 DEG가 enrichment 된 결과를 나타냄(그림 3-58_B).
- Environmental information processing 범주에서, 각 전사체 결과에서 공통적으로 enrichment 된 DEG는 ABC transporters, Two-component system 으로 확인되며, 이는 서로 다른 kingdom에서 상호작용을 하는데 있어 외부 신호를 인지하는 시스템과 관련된 유전자들이 조절 받는 것으로 나타나는 것으로, 실제 상호작용에 깊은 연관이 있을 것으로 예상됨(그림 3-58_C).
- 마지막으로, Cellular processes 범주에서, 각 전사체 분석 결과에서 공통적으로 flagellar assembly와 관련된 DEG가 enrichment된 것을 확인하였고, 이는 운동성을 가지는 *B. gladioli*가 서로 다른 kingdom과 상호작용을 이루고 있으면서 운동성이 가장 주요한 인자로 작용한다는 것을 보여주는 결과임(그림 3-58_D).
- 종합적으로 이러한 전사체 네트워크를 구축을 통해, 벼 알마름병을 유도하는 *B. gladioli* 균주가 서로 다른 kingdom과 상호작용에 있어, 세포 내 대사 경로가 활발히 이루어지며, 특히 세포 외부로부터 신호전달에 관여하는 two-component system에 연관이 있음을 나타내며, 무엇보다도 *B. gladioli*에 내재하고 있는 flagellar를 이용한 운동성이 상호작용에 가장 중요한 key를 나타내는 것으로 확인되며, 해당 유전자는 “bgl_1g37670” 으로 확인되며, 이는 유용 유전자원으로 사용할 예정임.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

| 성과목표 | | 전략 미생물 해독 | 유용 유전 자원 확보 | 표준 유전체 해독 | 메타 유전체 분석 | 유전체 분석 기술 개발 | NABIC 등록 | 병원성 미생물 진단마커 개발 | 병원성 미생물 정보 완성 | 미생물 병발생 기작 규명 |
|----------|----|-----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 최종목표 | | | 2 | | | | 3 | 4 | 3 | 5 |
| 1차 년도 | 목표 | | | | | | | | | |
| | 실적 | | | | | | | | | |
| 2차 년도 | 목표 | | 0 | | | | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 실적 | | 1 | | | | 6 | 1 | 2 | 4 |
| 3차 년도 | 목표 | | 1 | | | | 1 | 1 | 1 | 2 |
| | 실적 | | 2 | | | | 10 | 1 | 2 | 5 |
| 4차 년도 | 목표 | | 1 | | | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | 실적 | | 0 | | | | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 계 | 목표 | | 2 | | | | 3 | 4 | 3 | 5 |
| | 실적 | | 3 | | | | 16 | 4 | 4 | 10 |

○ 나. 기타 성과목표

| 성과목표 | 사업화지표 | | | | | | | | | | 연구기반지표 | | | | | | | | | |
|---------|--------|------|------|------------|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|------|-------|------|-------|------|------|----------|----------|---------------|
| | 지식 재산권 | | | 기술 실시 (이전) | | 사업화 | | | | | 기술인증 | 학술성과 | | | | 교육지도 | 인력양성 | 정책 활용·홍보 | | 기타 (타연구 활용 등) |
| | 특허출원 | 특허등록 | 품종등록 | 건수 | 기술료 | 제품화 | 매출액 | 수출액 | 고용창출 | 투자유치 | | 논문 | | 학술발표 | 정책 활용 | | | 홍보 전시 | | |
| | | | | | | | | | | | | SCI | 비 SCI | | | | | | 논문 평균 IF | |
| 단위 | 건 | 건 | 건 | 건 | 백만원 | 백만원 | 백만원 | 백만원 | 명 | 백만원 | 건 | 건 | 건 | 건 | 명 | 건 | 건 | | | |
| 가중치 | 25 | 15 | | | | | | | | | | | 40 | 10 | 5 | 5 | | | | |
| 최종 목표 | 4 | 2 | | | | | | | | | | 6 | 0 | 4.0 | 12 | 3 | 8 | | | |
| 1차년도 | 목표 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | |
| | 실적 | | | | | | | | | | | | | 0 | | | | | | |
| 2차년도 | 목표 | 1 | | | | | | | | | | 2 | 0 | 3.0 | 3 | 1 | 3 | | | |
| | 실적 | 2 | | | | | | | | | | 4 | 1 | 1.8 | 12 | 2 | 2 | | | |
| 3차년도 | 목표 | 1 | | | | | | | | | | 2 | | 4.5 | 4 | 1 | 3 | | | |
| | 실적 | 0 | | | | | | | | | | 1 | | 5.7 | 4 | 1 | 5 | | | |
| 4차년도 | 목표 | 2 | 1 | | | | | | | | | 2 | | 4.5 | 4 | 1 | 2 | | | |
| | 실적 | 2 | 0 | | | | | | | | | 4 | | 4.7 | 9 | 0 | 1 | | | |
| 소계 | 목표 | 4 | 1 | | | | | | | | | 6 | 0 | 4.0 | 12 | 3 | 8 | | | |
| | 실적 | 4 | 0 | | | | | | | | | 9 | 1 | 4.0 | 25 | 3 | 8 | | | |
| 종료 1차년도 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 2차년도 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 3차년도 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 종료 4차년도 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 소계 | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 합계 | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 (GB) |
|----|------------------------|------|------|------|-------------|
| | | | | | |

□ 유용 유전자원 확보

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 |
|----|---------------------------------|---|----------|------------|--------|
| 1 | <i>Burkholderia cepacia</i> KF1 | KFCC11842P | 19.10.29 | KFCC11842P | |
| 2 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05의 CsSTE50 유전자 | 20.06.17 | NS-2944 | 1.10KB |
| 3 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05의 CsYAK1 유전자 | 20.06.17 | NS-2943 | 2.23KB |

생명정보 등록 확인서

| 사항구분 | 표준번호 | 과제명 | 등록유전자원 이름 | 등록번호 | 제1저자 |
|---------|---|------------------------|---------------------|-------------------|------|
| 유전자원명 | GenBank | 국립농업과학원 유전자원 확보사업 | 국립농업과학원 유전자원 확보사업 | KT0011842P | 김영민 |
| 주요연구내용 | Functional genomic approaches to elucidate the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) patients, and their implications for the development of disease control strategies | | | | |
| 주요연구책임자 | 소유 및 유지권 | 소유권자명 | 제1권자 | 제2권자 | 제3권자 |
| | 김 영 민 | (한국) 송정희 | (영국) Song Daeun Yoo | | |
| 등록기관 | 등록일자 | 등록번호 | 제1권자 | 제2권자 | 제3권자 |
| 국립농업과학원 | 2020.06.17 | NS-2944 | (한국) 김영민 | (영국) Kyong Su Kim | |
| 연구책임자 | 연락처 | 전화 | 이메일 | | |
| 김영민 | (44) 310-3148-2276 | (81-104) kim@nrc.go.kr | | | |
| 연구비지원 | (44) 기능유전체 기반 다중 질병성질 저분해능질서 및 질병 기구 | | | | |
| 연구비지원 | 연구 및 분석 관련 | | | | |
| 생물정보원 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | | | | |
| ATCC 번호 | 생물정보원 | GenBank | GenBank | | |
| 내부번호 | GenBank | NS-2944 | | | |
| 등록번호 | NS-2944-000001 (1 권) | | | | |
| 등록일자 | GenBank | | | | |
| 등록번호 | <i>Colletotrichum scovillei</i> KT0011842P 유전자원 | | | | |
| 등록일자 | 2020.06.17 | | | | |

생명정보 등록 확인서

| 사항구분 | 표준번호 | 과제명 | 등록유전자원 이름 | 등록번호 | 제1저자 |
|---------|---|------------------------|---------------------|-------------------|------|
| 유전자원명 | GenBank | 국립농업과학원 유전자원 확보사업 | 국립농업과학원 유전자원 확보사업 | KT0011842P | 김영민 |
| 주요연구내용 | Functional genomic approaches to elucidate the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) patients, and their implications for the development of disease control strategies | | | | |
| 주요연구책임자 | 소유 및 유지권 | 소유권자명 | 제1권자 | 제2권자 | 제3권자 |
| | 김 영 민 | (한국) 송정희 | (영국) Song Daeun Yoo | | |
| 등록기관 | 등록일자 | 등록번호 | 제1권자 | 제2권자 | 제3권자 |
| 국립농업과학원 | 2020.06.17 | NS-2943 | (한국) 김영민 | (영국) Kyong Su Kim | |
| 연구책임자 | 연락처 | 전화 | 이메일 | | |
| 김영민 | (44) 310-3148-2276 | (81-104) kim@nrc.go.kr | | | |
| 연구비지원 | (44) 기능유전체 기반 다중 질병성질 저분해능질서 및 질병 기구 | | | | |
| 연구비지원 | 연구 및 분석 관련 | | | | |
| 생물정보원 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | | | | |
| ATCC 번호 | 생물정보원 | GenBank | GenBank | | |
| 내부번호 | GenBank | NS-2943 | | | |
| 등록번호 | NS-2943-000001 (1 권) | | | | |
| 등록일자 | GenBank | | | | |
| 등록번호 | <i>Colletotrichum scovillei</i> KT0011842P 유전자원 | | | | |
| 등록일자 | 2020.06.17 | | | | |

□ 표준유전체 해독

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 (GB) |
|----|------------------------|------|------|------|-------------|
| | | | | | |

□ 메타유전체 분석

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 (GB) |
|----|------------------------|------|------|------|-------------|
| | | | | | |

□ 유전체 분석기술 개발

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 (GB) |
|----|------------------------|------|------|------|-------------|
| | | | | | |

□ NABIC 등록

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 |
|----|---|---|----------|---------|--------|
| 1 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05 균주의 CaHOX2 유전자 | 18.06.08 | NS-1459 | 1.30KB |
| 2 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05 균주의 CaHOX7 유전자 | 18.06.08 | NS-1461 | 1.07KB |
| 3 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05 균주의 CsCAP 유전자 | 19.08.02 | NS-2753 | 1.23KB |
| 4 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05 균주의 CsPMK 유전자 | 19.08.02 | NS-2754 | 0.97KB |
| 5 | <i>Fusarium fujikuroi</i> B14 | 붉은곰팡이 B14 균주의 포자 형성 단계 2일차 | 19.07.20 | NN-5604 | 3.22GB |
| 6 | <i>Fusarium fujikuroi</i> B14 | 붉은곰팡이 B14 균주의 균사 형성 단계 1일차 | 19.07.19 | NN-5603 | 2.77GB |
| 7 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05의 CsSTE50 유전자 | 20.06.17 | NS-2944 | 1.10KB |
| 8 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> KC05의 CsYAK1 유전자 | 20.06.17 | NS-2943 | 2.23KB |
| 9 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 <i>F. graminearum</i> Fghyd1 유전자 | 20.11.18 | NU-1488 | 0.64KB |
| 10 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 <i>F. graminearum</i> Fghyd2 유전자 | 20.11.18 | NU-1490 | 0.75KB |
| 11 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 <i>F. graminearum</i> Fghyd3 유전자 | 20.11.18 | NU-1491 | 0.59KB |
| 12 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 <i>F. graminearum</i> Fghyd4 유전자 | 20.11.18 | NU-1492 | 0.75KB |
| 13 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 <i>F. graminearum</i> Fghyd5 유전자 | 20.11.18 | NU-1493 | 0.64KB |
| 14 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 Z3643 균주의 균사생장단계 전사체 | 20.11.17 | NN-7023 | 3.61GB |
| 15 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 Z3643 균주의 hydrophobin 유전자 5종 동시삭제 돌연변이체의 균사생장단계 전사체 | 20.11.17 | NN-7024 | 4.06GB |
| 16 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | <i>Colletotrichum scovillei</i> 유래 CsHOX 유전자 | 21.01.18 | NS-3017 | 1.29KB |

생명정보 등록 확인서

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------------------|
| 제출번호 | 202009-118 | 등록번호 | NS-1459 | 등록일자 | 2018.06.08 |
| 제출자 | 국립농업과학기술원 | 제출자명 | 국립농업과학기술원 | 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |

2020년 11월 18일
국립농업과학기술원 (국인인)

생명정보 등록 확인서

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------------------|
| 제출번호 | 202009-119 | 등록번호 | NS-1461 | 등록일자 | 2018.06.08 |
| 제출자 | 국립농업과학기술원 | 제출자명 | 국립농업과학기술원 | 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |

2020년 11월 18일
국립농업과학기술원 (국인인)

생명정보 등록 확인서

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------------------|
| 제출번호 | 202009-120 | 등록번호 | NS-2753 | 등록일자 | 2019.08.02 |
| 제출자 | 국립농업과학기술원 | 제출자명 | 국립농업과학기술원 | 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |

2020년 11월 18일
국립농업과학기술원 (국인인)

생명정보 등록 확인서

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------------------|
| 제출번호 | 202009-121 | 등록번호 | NS-2754 | 등록일자 | 2019.08.02 |
| 제출자 | 국립농업과학기술원 | 제출자명 | 국립농업과학기술원 | 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |

2020년 11월 18일
국립농업과학기술원 (국인인)

생명정보 등록 확인서

| | | | | | |
|--------|-----------------------|---------|-----------|-------|-----------------------|
| 제출번호 | 202009-122 | 등록번호 | NN-5604 | 등록일자 | 2019.07.20 |
| 제출자 | 국립농업과학기술원 | 제출자명 | 국립농업과학기술원 | 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |
| 제출자대표자 | 김정호 | 제출자직책 | 원장 | 제출자전화 | 041-570-1100 |
| 제출자주소 | 충청남도 천안시 동남구 천안대로 119 | 제출자우편번호 | 31538 | 제출자팩스 | 041-570-1101 |

2020년 11월 18일
국립농업과학기술원 (국인인)

□ 병원성미생물진단마커 개발

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 |
|----|---------------------------------|--|----------|---------|-----|
| 1 | <i>Colletotrichum scovillei</i> | Homeobox Transcription Factors Are Required for Fungal Development and the Suppression of Host Defense Mechanisms in the <i>Colletotrichum scovillei</i> -Pepper Pathosystem | 21.08.24 | 논문 | |
| 2 | <i>Fusarium graminearum</i> | Functional characterization of hydrophobin-encoding genes in <i>Fusarium graminearum</i> | 19.10.16 | 학술대회 발표 | |
| 3 | <i>Fusarium graminearum</i> | Functional roles of hydrophobin-encoding genes in <i>Fusarium graminearum</i> | 20.10.14 | 학술대회 발표 | |
| 4 | <i>Fusarium fujikuroi</i> | Functional Analyses of Genes Involved in Disease Development Caused by the Blight-pathotype of <i>Fusarium fujikuroi</i> on Rice | 21.12.10 | 학술대회 발표 | |

- *1번: 고추탄저병균의 고추 과실 침입시 특이적으로 발현하는 유전자를 활용한 진단마커
- *2번: 벼 이삭마름병균의 공중균사 및 포자 형성에 관여하는 5 종의 hydrophobin 유전자 중 식물체 내에서만 특이적으로 발현하는 *FgHyd3* 유전자를 활용한 진단마커
- *3번: 벼 이삭마름병균의 5종 hydrophobin 유전자 중 우리나라 토착종과 북미산 종을 구별할 수 있는 *FgHyd4* 와 *FgHyd5* 유전자를 활용한 진단마커
- *4번: 벼 키다리병균 집단 내 줄기마름형 병원형 균주의 주요 병원성 인자인 푸모닌신 생합성 유전자 *FUM1* 과 *FUM21* 유전자를 활용한 병발생 단계 진단마커

K-39
Functional characterization of hydrophobin-encoding genes in *Fusarium graminearum*

Yu Kyoung Shin, Da-Woon Kim, Sung-Won Lee, and Sung-Hwan Yun
Dept. of Medical Biotechnology, Soonchunhyang University, Anan 31538, Republic of Korea

Fusarium graminearum is known to cause fusarium head blight in cereal crops especially on wheat and barley. It has Hydrophobins(HPs) which are small secreted amphiphilic proteins. HPs are characterized by their eight conserved cysteine residues. *F. graminearum* contains five hydrophobin-encoding genes(FGSG_01763: *FgHyd1*, FGSG_01764: *FgHyd2*, FGSG_09066: *FgHyd3*, FGSG_03960: *FgHyd4*, FGSG_01831: *FgHyd5*). To investigate the expression levels of hydrophobin genes during vegetative growth and sexual development stage, we extracted *F. graminearum* WT mycelium grown from CM and carrot agar. *FgHyd1*, *FgHyd2* and *FgHyd3* were highly expressed in vegetative growth in CM and carrot agar(under both vegetative and perithecial-induction conditions). In contrast the expression levels of *FgHyd4* and *FgHyd5* were lower in all conditions. In this study, single, double, triple, quadruple, and quintuple *FgHyd* mutants were generated to figure out the functions of HPs. Targeted gene deletion was carried out in order to create single, double and triple deletion mutants using a split-marker recombination procedure with flanking a geneticin(Gen) or hygromycinB resistance gene cassette(Hyg). For the quadruple and quintuple deletion, Mating method was used. The morphology of colonies and growth rates of all *FgHyd* mutants on CM agar did not present significant differences compared to the WT. And also the mutants could produce fertile perithecia on carrot agar same as WT. The condition of *FgHyd* mutants was slightly reduced in YMA agar.

K-27
Functional roles of hydrophobin-encoding genes in *Fusarium graminearum*

Yu Kyoung Shin, Da-Woon Kim, Sung-Won Lee, and Sung-Hwan Yun
Department of Medical Biotechnology, Soonchunhyang University, Anan 31538, Korea

Here, we focused on hydrophobins that are characterized by their eight conserved cysteine residues. *F. graminearum* contains five hydrophobin-encoding genes (designated *FgHyd1*, *FgHyd2*, *FgHyd3*, *FgHyd4*, and *FgHyd5*, respectively). *FgHyd1*, *FgHyd2*, and *FgHyd3* were highly expressed under vegetative growth and perithecial-induction conditions, while the expression levels of *FgHyd4* and *FgHyd5* were lower in all the conditions examined. In addition, only the expression of *FgHyd3* was highly induced on rice substrate. For functional analysis, we generated *F. graminearum* strains carrying single, double, triple, quadruple, or even quintuple deletions of these *FgHyd* genes. The colony morphology and growth rates of all the *DfFgHyd* strains showed no significant differences compared to the WT progenitor on the CM agar. Similarly, the gene deletion strains as well as WT were able to produce fertile perithecia. The ability to produce conidia, to penetrate the water-air interface, and to maintain hydrophobicity of airtal mycelia in all of the mutants examined however, were slightly reduced compared to WT. To identify genes that were expressed differentially in the *DfFgHyd1,2,3,4,5*, RNA-sequencing was performed using total RNA extracted from mycelia of *DfFgHyd1,2,3,4,5*. Interestingly, we found four *Trx* genes belonging to the trichothecene biosynthesis gene cluster were upregulated compared to WT. In particular, an elevated gene expression pattern of *Trx5* in the *DfFgHyd1,2,3,4,5* strain grown in Agmatine liquid medium was confirmed using quantitative real-time PCR analysis.

A023
Functional Analyses of Genes Involved in Disease Development Caused by the Blight-pathotype of *Fusarium fujikuroi* on Rice

Sung-Won Lee, Da-Woon Kim, Hee-Kyoung Kim, and Sung-Hwan Yun
Department of Medical Biotechnology & Medical Science, Soonchunhyang University

Fusarium fujikuroi is known to cause rice bakanae disease by producing gibberellic acids within rice. In addition to this prominent disease symptom on rice, the other symptom showing a stem blight with a root rot on rice is known to be caused by the phylogenetically distinct pathotype (stunting- or blight-type) of *F. fujikuroi*. Molecular analyses revealed that fumonisins are the fungal secondary metabolite responsible for the development of the blight symptom on rice. To identify additional genes responsible for the symptom development in *F. fujikuroi* B14, the representative strain of the blight pathotype, we selected a total of 63 genes from the B14 genome, which were specifically expressed during pathogenesis in rice compared to the case of the other pathotype causing stem-elongation symptom (bakanae). Targeted deletions of 35 genes, however, revealed that single pathogenesis-specific genes were not essential for the blight development on rice, indicating that the roles of these genes during pathogenesis would be redundant in *F. fujikuroi* B14. Subsequently, we have performed to silence several target genes simultaneously by expression of inverted repeat DNA constructs derived from each gene, and found that the silencing of a gene combination consisting of two plant cell wall degrading enzyme genes led to a significant reduction in blight development on rice.
[Supported by Strategic Initiative for Microbiomes in Agriculture and Food.]

□ 병원성미생물 정보 완성

| 번호 | 분석대상 (유전체, 유전자원 명칭) | 분석내용 | 등록일자 | 등록번호 | 생산량 |
|----|--|--|----------|---------|--------|
| 1 | <i>Fusarium fujikuroi</i> B14 | 붉은곰팡이 B14 균주의 포자 형성 단계 2일차 | 19.07.20 | NN-5604 | 3.22GB |
| 2 | <i>Fusarium fujikuroi</i> B14 | 붉은곰팡이 B14 균주의 균사 형성 단계 1일차 | 19.07.19 | NN-5603 | 2.77GB |
| 3 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 Z3643 균주의 균사생장단계 전사체 | 20.11.17 | NN-7023 | 3.61GB |
| 4 | <i>Fusarium graminearum</i> species complex | 붉은곰팡이 Z3643 균주의 hydrophobin 유전자 5종 동시삭제 돌연변이체의 균사생장단계 전사체 | 20.11.17 | NN-7024 | 4.06GB |

생명정보 등록 확인서

| 사명구분 | 로드제출 | 제출처 | 등록유지유형 | 의심정보 | 비고 |
|--------------|---|---------------|---------|------|------------------------------|
| 사명구분 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 |
| 연구목적 | Functional genomics approaches to elucidate the pathogenesis mechanisms of multiple wheat stem pathogens, and their implications for the development of disease control strategies. | | | | |
| 연구책임자 | 소속 및 부서명 | 직위 | 소속 | 성명 | 연락처 |
| 소속 및 부서명 | 국립농업과학원 | 박희 | 국립 | 정영 | (연락처) 송정환 (영문) Song Heon Yon |
| 등록 시 의심사항 | 연락처 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| 의심사항 | (연락처) 041-520-1288 (E-mail) sy14@nrc.aks.kr | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| ATSD 비제출 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 |
| 생물정보 | Transcriptome | 생물정보 | RNA-Seq | 생물정보 | 생물정보 |
| 등록 내용 | 등록일 | 등록량 | 등록비 | 등록비 | 등록비 |
| 등록 | 2019.07.20 | 3,220,000,000 | 0 | 0 | 0 |
| 계 | | | | | |

"생명연구자원의 확보, 관리 및 활용에 관한 법률" 제10조제2항(2010.3.31)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(INABCI)에 등록되었습니다.

2019년 07월 20일
국립농업과학원장 (직인)

생명정보 등록 확인서

| 사명구분 | 로드제출 | 제출처 | 등록유지유형 | 의심정보 | 비고 |
|--------------|---|---------------|---------|------|------------------------------|
| 사명구분 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 |
| 연구목적 | Functional genomics approaches to elucidate the pathogenesis mechanisms of multiple wheat stem pathogens, and their implications for the development of disease control strategies. | | | | |
| 연구책임자 | 소속 및 부서명 | 직위 | 소속 | 성명 | 연락처 |
| 소속 및 부서명 | 국립농업과학원 | 박희 | 국립 | 정영 | (연락처) 송정환 (영문) Song Heon Yon |
| 등록 시 의심사항 | 연락처 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| 의심사항 | (연락처) 041-520-1288 (E-mail) sy14@nrc.aks.kr | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| ATSD 비제출 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 |
| 생물정보 | Transcriptome | 생물정보 | RNA-Seq | 생물정보 | 생물정보 |
| 등록 내용 | 등록일 | 등록량 | 등록비 | 등록비 | 등록비 |
| 등록 | 2019.07.19 | 2,770,000,000 | 0 | 0 | 0 |
| 계 | | | | | |

"생명연구자원의 확보, 관리 및 활용에 관한 법률" 제10조제2항(2010.3.31)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(INABCI)에 등록되었습니다.

2019년 07월 19일
국립농업과학원장 (직인)

생명정보 등록 확인서

| 사명구분 | 로드제출 | 제출처 | 등록유지유형 | 의심정보 | 비고 |
|--------------|---|---------------|---------|------|------------------------------|
| 사명구분 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 |
| 연구목적 | Functional genomics approaches to elucidate the pathogenesis mechanisms of multiple wheat stem pathogens, and their implications for the development of disease control strategies. | | | | |
| 연구책임자 | 소속 및 부서명 | 직위 | 소속 | 성명 | 연락처 |
| 소속 및 부서명 | 국립농업과학원 | 박희 | 국립 | 정영 | (연락처) 송정환 (영문) Song Heon Yon |
| 등록 시 의심사항 | 연락처 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| 의심사항 | (연락처) 041-520-1288 (E-mail) sy14@nrc.aks.kr | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| ATSD 비제출 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 |
| 생물정보 | Transcriptome | 생물정보 | RNA-Seq | 생물정보 | 생물정보 |
| 등록 내용 | 등록일 | 등록량 | 등록비 | 등록비 | 등록비 |
| 등록 | 2020년 11월 17일 | 3,610,000,000 | 0 | 0 | 0 |
| 계 | | | | | |

"생명연구자원의 확보, 관리 및 활용에 관한 법률" 제10조제2항(2010.3.31)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(INABCI)에 등록되었습니다.

2020년 11월 17일
국립농업과학원장 (직인)

생명정보 등록 확인서

| 사명구분 | 로드제출 | 제출처 | 등록유지유형 | 의심정보 | 비고 |
|--------------|---|---------------|---------|------|------------------------------|
| 사명구분 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 | 의심정보 |
| 연구목적 | Functional genomics approaches to elucidate the pathogenesis mechanisms of multiple wheat stem pathogens, and their implications for the development of disease control strategies. | | | | |
| 연구책임자 | 소속 및 부서명 | 직위 | 소속 | 성명 | 연락처 |
| 소속 및 부서명 | 국립농업과학원 | 박희 | 국립 | 정영 | (연락처) 송정환 (영문) Song Heon Yon |
| 등록 시 의심사항 | 연락처 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| 의심사항 | (연락처) 041-520-1288 (E-mail) sy14@nrc.aks.kr | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 | 의심사항 |
| ATSD 비제출 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 | 생물정보 |
| 생물정보 | Transcriptome | 생물정보 | RNA-Seq | 생물정보 | 생물정보 |
| 등록 내용 | 등록일 | 등록량 | 등록비 | 등록비 | 등록비 |
| 등록 | 2020년 11월 17일 | 4,060,000,000 | 0 | 0 | 0 |
| 계 | | | | | |

"생명연구자원의 확보, 관리 및 활용에 관한 법률" 제10조제2항(2010.3.31)에 의거하여, 위와 같이 생명정보가 농업생명공학정보센터(INABCI)에 등록되었습니다.

2020년 11월 17일
국립농업과학원장 (직인)

[과학적 성과]

□ 논문 (국내외 전문 학술지) 게재

| 번호 | 논문명 | 학술지명 | 주저자명 | 호 | 국명 | 발행기관 | SCIE 여부 (SCIE/비SCIE) | 게재일 | 등록번호 (ISSN) | 기여율 |
|----|--|---------------------------------------|----------------|-------|-------------|-------------------------------------|----------------------|----------|-------------|----------|
| 1 | Survival Factor Gene FgSv1 Is Required for Normal Growth and Stress Resistance in <i>Fusarium graminearum</i> | Plant Pathology Journal | Taiying Li | 35(5) | SOUTH KOREA | KOREAN SOC PLANT PATHOLOGY | SCIE | 19.10.07 | 1598-2254 | 50 /100 |
| 2 | Characterization of Nivalenol-Producing <i>Fusarium asiaticum</i> That Causes Cereal Head Blight in Korea | Plant Pathology Journal | Ja Yeong Jang | 35(6) | SOUTH KOREA | KOREAN SOC PLANT PATHOLOGY | SCIE | 19.12.01 | 1598-2254 | 100 /100 |
| 3 | Stress Tolerance and Virulence-Related Roles of Lipopolysaccharide in <i>Burkholderia glumae</i> | Plant Pathology Journal | Chaeyeong Lee | 35(5) | SOUTH KOREA | KOREAN SOC PLANT PATHOLOGY | SCIE | 19.10.07 | 1598-2254 | 50 /100 |
| 4 | 고추탄저병균 <i>Colletotrichum scovillei</i> 에 대한 <i>Burkholderia cepacia</i> KF1의 길항 활성 검정 | Journal of Agriculture & Life Science | 박현후 | 53(4) | SOUTH KOREA | 경상대학교 농업생명과학연구원 | 비SCIE | 19.08.10 | 2383-8272 | 50 /100 |
| 5 | Optimization of Polyethylene Glycol-Mediated Transformation of the Pepper Anthracnose Pathogen <i>Colletotrichum scovillei</i> to Develop an Applied Genomics Approach | Plant Pathology Journal | Jong-Hwan Shin | 35(6) | SOUTH KOREA | KOREAN SOC PLANT PATHOLOGY | SCIE | 19.12.01 | 1598-2254 | 50 /100 |
| 6 | Type VI secretion systems of plant-pathogenic <i>Burkholderia glumae</i> BGR1 play a functionally distinct role in interspecies | MOLECULAR PLANT PATHOLOGY | Namgyu Kim | 21(8) | ENGLAND | WILEY | SCIE | 20.07.09 | 1464-6722 | 50 /100 |
| 7 | FgPKS7 is an essential player in mating-type-mediated regulatory pathway required for completing sexual cycle in <i>Fusarium graminearum</i> | ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY | Da-Woon Kim | 23(4) | ENGLAND | WILEY | SCIE | 21.04.23 | 1462-2912 | 50 /100 |
| 8 | Antagonistic and Plant Growth-Promoting Effects of <i>Bacillus velezensis</i> BS1 Isolated from Rhizosphere Soil in a Pepper Field | Plant Pathology Journal | Jong-Hwan Shin | 37(3) | SOUTH KOREA | KOREAN SOC PLANT PATHOLOGY | SCIE | 21.04.14 | 1598-2254 | 50 /100 |
| 9 | Pex7 selectively imports PTS2 target proteins to peroxisomes and is required for anthracnose disease development in <i>Colletotrichum scovillei</i> | Fungal Genetics & Biology | Jong-Hwan Shin | 157 | USA | ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE | SCIE | 21.11.03 | 1087-1845 | 50 /100 |
| 10 | Homeobox Transcription Factors Are Required for Fungal Development and the Suppression of Host Defense Mechanisms in the <i>Colletotrichum scovillei</i> -Pepper Pathosystem | mBio | Teng Fu | 12(4) | USA | AMER SOC MICROBIOLOGY | SCIE | 21.08.24 | 2150-7511 | 50 /100 |

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

| 번호 | 회의 명칭 | 발표자 | 발표 일시 | 장소 | 국명 |
|----|--|------------|----------|----------------------------|-------------|
| 1 | 2018 INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS | 윤성환 | 18.07.21 | San Juan | Puerto Rico |
| 2 | 2018 International Joint Conference on Plant Protection 2018 | 이상원 | 18.10.25 | 전라남도 광주 컨벤션센터 | 대한민국 |
| 3 | 2018 International Joint Conference on Plant Protection 2018 | 한준희 | 18.10.26 | 전라남도 광주 컨벤션센터 | 대한민국 |
| 4 | The 2019 KSPP Spring Conference | 김다운 | 19.05.30 | The Westin Chosun Busan | 대한민국 |
| 5 | 2019년 한국균학회 춘계 학술대회 | 김경수 | 19.05.08 | 충남대학교 농업과학연구소 | 대한민국 |
| 6 | 2019년 Research Symposium in Transdisciplinary Nanoscience | 김경수 | 19.06.18 | Nankai University | 중국 |
| 7 | 2019년 한국식물병리학회 춘계 학술대회 | 김경수 | 19.04.25 | The Westin Chosun Busan | 대한민국 |
| 8 | 한국미생물생명공학회 | 김남규 | 19.06.24 | ICC JEJU | 대한민국 |
| 9 | 한국미생물생명공학회 | 서영수 | 19.06.24 | ICC JEJU | 대한민국 |
| 10 | 2019 KSM Spring International Meeting | 이정관 | 19.05.10 | 리솜오션캐슬 코즈머스홀 | 대한민국 |
| 11 | The KSPP Fall International conference | 신유경 | 19.10.16 | 전남 중흥스파골드 | 대한민국 |
| 12 | AMC2019 | Teng Fu | 19.10.02 | Mie Center for the Arts | 일본 |
| 13 | The 2020 KSPP Conference & Special Symposium | 신유경 | 20.10.14 | 온라인 | 대한민국 |
| 14 | The 2020 KSPP Conference & Special Symposium | 김다운 | 20.10.14 | 온라인 | 대한민국 |
| 15 | The 23rd Fungal Genetics and Biology Conference of the Microbiological Society of Korea 2020 | Teng Fu | 20.02.06 | 덕산 리솜리조트캐슬 | 대한민국 |
| 16 | The 2020 KSPP Conference & Special Symposium | 김경수 | 20.10.14 | 온라인 | 대한민국 |
| 17 | 2021 KSM Spring International Meeting | 윤성환 | 21.05.19 | 부산백스코 | 대한민국 |
| 18 | 2021 Korean Society of Plant Pathology Online Spring Conference | 윤성환 | 21.04.22 | 온라인 | 대한민국 |
| 19 | 2021 Korean Society of Plant Pathology Online Spring Conference | 이상원 | 21.04.22 | 온라인 | 대한민국 |
| 20 | 2021 Korean Society of Plant Pathology Online Spring Conference | Teng Fu | 21.04.22 | 온라인 | 대한민국 |
| 21 | 2021 KSM Spring International Meeting | Teng Fu | 21.05.19 | 부산백스코 | 대한민국 |
| 22 | 2021 Korean Society of Plant Pathology Online Fall International Conference | 이상원 | 21.11.10 | 온라인 | 대한민국 |
| 23 | 2021 mBiome International Conference | 윤성환 | 21.12.10 | 연세대학교 백양누리홀 | 대한민국 |
| 24 | 2021 mBiome International Conference | 이상원 | 21.12.10 | 연세대학교 백양누리홀 | 대한민국 |
| 25 | 2021 mBiome International Conference | Teng Fu | 21.12.10 | 연세대학교 백양누리홀 | 대한민국 |

Protoplast generation and transformation of pepper anthracnose pathogen *Colletotrichum scovillei* in Korea

Jong-Hwan Shin, Hee-yong Kim, and Kyoung Su Kim*
 Division of Bio-Resource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Colletotrichum strain KC05 was isolated from an infected chili pepper in Gangwon province of South Korea. By the combined sequence analysis of ITS, TUB2, ACT, CHS-1, GAPDH, and HIS3 gene, it was confirmed that *Colletotrichum* strain KC05 was *C. scovillei*, one of the *C. acutatum* species complex. In this paper, we describe a protocol for protoplast generation and genetic transformation. Enzymatic digestion with 2% lysing enzyme and 0.8% drisdatec in 1M NH4Cl for 3 hr incubation was the optimal condition to release protoplasts from *C. scovillei* KC05 mycelia. Protoplast growth was completely inhibited on regeneration media supplemented with 200 µg/ml hygromycin B. When protoplasts (1×10⁶ protoplasts/ml) were transformed with 13 different genes by PEG-mediated transformation, average 105 colonies were grown on regeneration media supplemented with 200 µg/ml of hygromycin B. Homologous integration rate was calculated by screening PCR and the average integration rate was 18.7 %. Southern blot analysis was performed with 2-5 positive transformants from each gene and it was confirmed that at least one transformant from each gene had a single copy integration. Our results provide the tool for high-throughput genetic analysis of *C. scovillei*.

Functional analysis of FgPNS1 as essential element for sexual development in *Fusarium graminearum*

De-Won Kim, Hee-Yong Shin, Sang-Won Lee, Hee-Yong Kim, and Sang-Hwan Yoo

Department of Medical Biotechnology, Seonhwhang University, Inje 71711, Korea

Fusarium graminearum is a major causal agent of the Fusarium head blight in cereal crops, and produces a variety of secondary metabolites including trichothecens within host plants. Previous studies have confirmed that FgPNS1 is a MAT1-2 regulated gene. Changes in vegetative growth, mycelial growth, and sexual development were observed

in the ΔFgPNS1 strain. However, the chemical products produced by FgPNS1 is not yet known. Functional analysis of the gene belonging to the positive FgPNS1 cluster confirmed that FgPNS1 is a stand alone PDS in ΔFgPNS1. ΔFgPNS1 strains show significant changes in mycelial growth and mycelial weight were observed. The strains in which only MAT1-2, MAT1-1, and ER domains of FgPNS1 were deleted also had the same phenotype as ΔFgPNS1. The ΔFgPNS1 strains, when complemented with FgPNS1, showed recovery of the sexual ability, but those complemented with FgPNS1 from F. solani were identical to the ΔFgPNS1 strain. Chemical analysis was attempted using various concentrations and different strains, but no metabolites essential for sexual development were identified.

Roles of Homeobox Transcription Factors in the Development and Pathogenicity of the Pepper Anthracnose Fungus *Colletotrichum scovillei*

Teng Fu* and Kyoung Su Kim*

Division of Bio-Resource Sciences and Biotech Research Institute, Kangwon National University

The Ascomycete fungus *Colletotrichum scovillei* is the most serious agent to cause anthracnose disease on chili pepper. It successfully established disease, *C. scovillei* undergoes several developmental developments, in which conidiation, appressorium formation and invasive hyphae growth play essential roles in anthracnose disease development. The functional roles of homeobox (HOX) transcription factors have been indicated to be associated with regulation of development and pathogenicity in a few fungal pathogens, but in strain unknown in *C. scovillei*. The *C. scovillei* genome has been produced to obtain 10 HOX transcription factors. To study functions of HOX transcription factors in development of *C. scovillei*, we generated 10 mutants (ΔCfHOX1 to ΔCfHOX10) by targeted gene replacement. Notably, the ΔCfHOX2 mutant completely failed to produce conidia, suggesting CfHOX2 is required for conidiation. ΔCfHOX7 was unable to form appressorium on both conical glass tube and hyphal tip, indicating CfHOX7 is indispensable for pre-infection development. Intriguingly, ΔCfHOX4 appressoria successfully penetrated host plant epidermis, but failed to establish invasive hyphae, resulting CfHOX4 is important for invasive growth inside plant cells. Moreover, the ΔCfHOX1, ΔCfHOX5, ΔCfHOX6 and ΔCfHOX8 were related to growth rate, suggesting CfHOX1, CfHOX2, CfHOX4 and CfHOX8 genes are related to mycelial growth. The ΔCfHOX1, ΔCfHOX5 and ΔCfHOX6 produced bigger conidia, indicating CfHOX1, CfHOX5 and CfHOX6 are related to conical morphology. Collectively, our results showed that homeobox transcription factors play important roles in fungal development and pathogenicity of *C. scovillei*.

Pivotal roles of mating type loci for controlling sexual development in filamentous ascomycetes

Sung-Hwan Yoo

Department of Medical Biotechnology and Medical Science, Seonhwhang University, Inje 71711, Korea
 *yoo@shu.ac.kr

Fungal capable of sexual reproduction employ one of two mating factors to sexual reproduction, self-sterile/homothallic species can mate only with a genetically distinct partner while self-fertile/heterothallic species do not require a partner. In most ascomycetes, a single mating type (MAT) locus with two alternate alleles (MAT1-1 and MAT1-2) controls mating ability. The distribution of MAT differs in heterothallic versus homothallic species, heterothallic carry these alternative forms in different nuclei, whereas most homothallic carry both forms in a single nucleus. Here, I describe mating mechanisms controlled by MAT loci in several homothallic ascomycete species. A series of MAT manipulations has revealed that the determinants of reproductive life cycle in these species reside at MAT, and that their reproductive modes can be artificially switched to each other (i.e. from homothallic to heterothallic and vice versa). By employing various functional genomic analyses we have proposed a regulatory pathway by MAT-mediated sexual development in *F. graminearum*. In addition, we have investigated the molecular mechanism underlying the unidirectional mating type switching in *C. spiroforme*. We discovered that self-fertility of this species is achieved by direct repeat sequence deletion loss of MAT1-2 from most homothallic nuclei and subsequent site-specific recombination between the existing two, normally present, nuclear types in a common complex. These investigations using five different homothallic species provide new insights into our understanding of mating mechanisms underlying homothallic and subsequent sexual developmental processes by the MAT locus in filamentous ascomycetes.

Toward a comprehensive understanding of regulatory networks controlling sexual reproduction in homothallic ascomycetes

Sung-Hwan Yoo

Department of Medical Biotechnology & Medical Science, Seonhwhang University, Inje, Korea

Fungal capable of sexual reproduction employ one of two mating factors, heterothallic self-sterile or homothallic self-fertile ones. In most ascomycetes, a single mating type (MAT) locus with two alternate alleles (MAT1-1 and MAT1-2) controls mating ability. The architecture of MAT differs in heterothallic versus homothallic species, heterothallic carry these alternative forms in different nuclei, whereas most homothallic carry both forms in a single nucleus. Here, I describe mating mechanisms controlled by MAT loci in several homothallic ascomycete species belonging to the four genera, *Colletotrichum*, *Myriophthora*, *Fusarium*, and *Onygena* (Ditherotium). The first three genera, which are general pathogens, employ a two homothallic mating strategy, while the latter exhibits both homothallic and heterothallic behaviors. A series of MAT manipulations has revealed that the determinants of reproductive life cycle in these species reside at MAT, and that their reproductive modes can be artificially switched to each other (i.e. from homothallic to heterothallic and vice versa). By employing various functional genomic analyses we have proposed a regulatory pathway by MAT-mediated sexual development in *F. graminearum*, in which the MAT1-1 and MAT1-2 loci may be activated by several environmental cues via chromatin remodeling and/or signaling pathways, and then control the expression of at least 1,000 target genes via regulatory cascades and networks. In addition, we have investigated on the molecular mechanism underlying the unidirectional mating type switching in *C. spiroforme*. Both homothallic and heterothallic strains carry an intact MAT1-1 locus, but heterothallic ones have a second version of MAT with the MAT1-2 locus closely linked to MAT1-1 in the normal MAT complex. The MAT1-1 open reading frame is split into two fragments and the truncated ends are bordered by 15bp direct repeats (DR). The MAT1-2.1 gene and additional sequences are inserted between the repeats, this demonstrated that self-fertility is achieved by DR-mediated loss of MAT1-2 from most homothallic nuclei and subsequent inter-nuclear recombination between the resulting two, normally present, nuclear types in a common complex. These investigations using five different homothallic species provide new insights into our understanding of regulation of mating mechanisms underlying homothallic and subsequent sexual developmental processes by the MAT locus in filamentous ascomycetes.

Phenotypic alterations in virulence and trichothecene production caused by the deletions of putative hydrophobin genes in *Fusarium graminearum*

Yoo-Kyoung Shin, Da-Won Kim, Sang-Won Lee, Sang-Hwan Yoo*
 Dept. of Medical Biotechnology, Seonhwhang University, Inje 71711, Republic of Korea

Hydrophobins are small secreted amphiphilic proteins that are only found in filamentous fungi. Their role has been shown to be involved in many developmental processes, including hyphal growth, conidiation, sexual development and pathogenesis. *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight in cereal crops, carries five hydrophobin-encoding genes (designated FgHyd1, FgHyd2, FgHyd3, FgHyd4, and FgHyd5, respectively). To investigate their functional roles, we generated *F. graminearum* strains carrying single, double, triple, quadruple, or even quintuple deletions of the FgHyd genes. The colony morphology, growth rates, and sexual development of all the ΔFgHyd strains showed no significant differences compared to the WT progenitor, while the ability to cause disease symptom on wheat head was dramatically reduced in the ΔFgHyd1234, ΔFgHyd1235, or ΔFgHyd12345 strains. In addition, the levels of trichothecenes (sum of DON, 15-ADON, and 3-ADON) on rice substrate were highly induced in all of the gene deletion strains examined. Those of other mycotoxins, zearalenone, was not significantly altered in the same strains. A RNA-seq analysis using total RNA extracted from mycelia of ΔFgHyd12345 revealed that four Fg genes belonging to the trichothecene biosynthesis gene cluster were upregulated compared to WT. In particular, an elevated gene expression pattern of Fg3 in the ΔFgHyd12345 strain grown in agmatine liquid medium was also confirmed using a qPCR analysis. This is the first report that hydrophobin genes may be associated with the biosynthesis of a specific secondary metabolite in fungi.

The mitogen-activated protein kinase CsPMK1 plays essential roles in conidium morphology, appressorium development, and pathogenicity in *Colletotrichum scovillei*-pepper fruit pathosystem

Fu Teng, Jong-Hwan Shin, Adiyantara Gumilang, Noh-Hyun Lee, Kyoung Su Kim*
 Division of Bio-Resource Sciences, Biotech Research Institute, and Interdisciplinary Program in Smart Agriculture, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

The filamentous ascomycete plant pathogenic fungus *Colletotrichum scovillei* was reported to cause serious anthracnose disease on several fruits, including chili pepper (*Capsicum annuum*). However, the molecular mechanisms underlying interactions of *C. scovillei*-pepper fruits remain poorly understood. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are well-known conserved regulators, essential for fungal development, pathogenicity, and tolerance to environmental stresses. In this study, we functionally characterized the CsPMK1, a FgK2/Kex1 related MAPK, via targeted gene deletion. The deletion mutant ΔCsPMK1 was normal in mycelial growth and conidiation, while it produced conidia with larger size, compared to the wild-type, indicating that CsPMK1 is involved in conidium morphology. Moreover, the ΔCsPMK1 was delayed and reduced in conidial germination on both artificial surface and pepper fruit surface, suggesting that CsPMK1 is related to conidial germination. Notably, the germinated conidia ultimately failed to differentiate appressoria on the same surfaces, suggesting that CsPMK1 is essential for appressorium formation. Pathogenicity assays showed that ΔCsPMK1 was completely defective to cause disease on both wounded and unwounded pepper fruits, indicating that CsPMK1 is required for host infection. Taken together, our results showed that CsPMK1 plays indispensable roles in fungal development and pathogenicity, which would contribute to understanding the molecular interactions of *C. scovillei*-pepper fruit pathosystem.

A *Colletotrichum scovillei* CsPMK1 gene is required for fungal differentiation and anthracnose development on pepper fruit

Teng Fu, Noh-Hyun Lee, and Kyoung Su Kim*

Division of Bio-Resource Sciences and Biotech Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Hot pepper is considered as one of the most widely grown vegetable major crop in global cuisine around the world. However, the quality and quantity of pepper production were seriously damaged by phytopathogens. Among them, the *Colletotrichum scovillei* causes serious anthracnose disease on fruits of chili pepper, in which the molecular interaction host and pathogen was still unknown. To study the molecular mechanism of *C. scovillei*-pepper fruit pathosystem, we targetedly deleted the CsPMK1, orthologous to FgK2/Kex1/MAPK. The mycelial growth and conidiation were normal, while conidium size was bigger in the deletion mutant (ΔCsPMK1) compared to that in the wild-type and complemented (CsPMK1+) strains. This result suggested that CsPMK1 is involved in conidium morphology. In addition, the conidial germination was delayed and reduced when inoculated onto hydrophobic surface of conical glass, suggesting that CsPMK1 is related to conidial germination. Notably, the appressorium formation was completely blocked in the germinated conidia on both hydrophobic surface of coverlips and host plant surface, indicating that CsPMK1 is essential for appressorium formation. Pathogenicity assays showed that ΔCsPMK1 not only failed to cause anthracnose pepper fruits, but also was completely defective in infection of wounded pepper fruits, revealing that CsPMK1 is required for fungal virulence. Taken together, our results showed that CsPMK1 plays essential roles in fungal development and pathogenicity, which would contribute to understanding the molecular interactions of *C. scovillei*-pepper fruit pathosystem.

Homeobox Transcription Factors Play Important Roles in Fungal Development and Pathogenicity in the *Colletotrichum scovillei*-Pepper Pathosystem

Teng Fu and Kyoung Su Kim*
 Division of Bio-Resource Sciences, Biotech Research Institute, and Interdisciplinary Program in Smart Agriculture, Kangwon National University

Colletotrichum scovillei causes anthracnose disease on several fruits, including peppers, resulting in huge economic losses. However, little is known regarding the underlying molecular mechanisms involved in the development of anthracnose caused by this fungus. In an initial step toward understanding the development of anthracnose on pepper fruits, we decided to investigate functional roles of homeobox (HOX) TFs, which are known master regulators in control of organism development. *C. scovillei* was found to contain 10 HOX genes (CfHOX1 to CfHOX10), which were functionally characterized using deletion mutants of each CfHOX gene. Roles of HOXs were found to be involved in mycelial growth, conidiation, conidium morphology, conidial germination, appressorium formation, and pathogenicity in *C. scovillei*. Notably, CfHOX1 was identified to suppress host defense mechanisms, which represents a new role for HOX TFs in pathogenic fungi. CfHOX2 and CfHOX7 were found to play fundamental roles in conidiation and appressorium development, respectively, in a stage specific manner in *C. scovillei*. Our study provides a molecular basis for understanding the mechanisms associated with the development of anthracnose on fruits caused by *C. scovillei*, which will aid in the development of novel approaches for disease

□ 기술 요약 정보

| 연도 | 기술명 | 요약 내용 | 기술 완성도 | 등록 번호 | 활용 여부 | 미활용사유 | 연구개발기관 외 활용여부 | 허용방식 |
|----|-----|-------|--------|-------|-------|-------|---------------|------|
| | | | | | | | | |

□ 보고서 원문

| 연도 | 보고서 구분 | 발간일 | 등록 번호 |
|----|--------|-----|-------|
| | | | |

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

| 번호 | 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명 | 등록/기탁 번호 | 등록/기탁 기관 | 발생 연도 |
|----|------------------------|----------|----------|-------|
| | | | | |

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

| 번호 | 지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재) | 국명 | 출원 | | | 등록 | | | 기여율 | 활용여부 |
|----|--|------|--------------|----------|-----------------|-----|-----|-------|---------|------|
| | | | 출원인 | 출원일 | 출원 번호 | 등록인 | 등록일 | 등록 번호 | | |
| 1 | 붉은 곰팡이 유래 진균 프로모터 및 이를 이용하여 유전자 발현 여부를 분석하는 방법 | 대한민국 | 순천향대학교 산학협력단 | 19.10.11 | 10-2019-0125834 | | | | 50 /100 | |
| 2 | 고추 탄저병균에 대한 항진균 활성을 가지는 버크홀데리아 속 균주 및 이를 포함하는 고추 탄저병 방제용 조성물 | 대한민국 | 강원대학교 산학협력단 | 19.11.07 | 10-2019-0141345 | | | | 50 /100 | |
| 3 | 붉은 곰팡이 유래 진균 프로모터 | 대한민국 | 순천향대학교 산학협력단 | 21.12.10 | 10-2021-0176338 | | | | 50 /100 | |
| 4 | 곰팡이 독소 억제용 조성물 | 대한민국 | 순천향대학교 산학협력단 | 21.12.15 | 10-2021-0179565 | | | | 70 /100 | |

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

| 번호 | 제품화 | 방어 | 전용실시 | 통상실시 | 무상실시 | 매매/양도 | 상호실시 | 담보대출 | 투자 | 기타 |
|----|-----|----|------|------|------|-------|------|------|----|----|
| 1 | | | | | | | | | | √ |
| 2 | | √ | | | | | | | | |
| 3 | | √ | | | | | | | | |
| 4 | | √ | | | | | | | | |

| 2021-09-01 | | 2021-09-01 | | 2021-12-05 | |
|---|--|---|--|---|--|
| <p>【저작사항】</p> <p>【서명명】 특허출원서</p> <p>【출원번호】 20210904</p> <p>【출원구분】 특허출원</p> <p>【출원일】</p> <p>【명칭】 순천향대학교 산학협력단</p> <p>【특허고유번호】 2-2024-02042-0</p> <p>【과제인】</p> <p>【성명】 최정민</p> <p>【과제인번호】 9-2010-00098-0</p> <p>【도출특허출원번호】 2019-012518-0</p> <p>【발명의 국문명칭】 異相 公同의 有機 靑銅 靑銅 靑銅 靑銅</p> <p>【발명의 영문명칭】 A HOMO-PROMOTER FROM FUSED HETEROCYCLE</p> <p>【발명자】</p> <p>【성명】 최정민</p> <p>【성명의 영문표기】 Sung-Hwan YOON</p> <p>【주인등록번호】</p> <p>【무관번호】</p> <p>【주소】</p> <p>【발명지】</p> <p>【성명】 김희경</p> | | <p>【성명의 영문표기】 Hye Kyung KIM</p> <p>【주인등록번호】</p> <p>【무관번호】</p> <p>【주소】</p> <p>【발명지】</p> <p>【성명】 김다은</p> <p>【성명의 영문표기】 Da Eon KIM</p> <p>【주인등록번호】</p> <p>【무관번호】</p> <p>【주소】</p> <p>【출원언어】 국어</p> <p>【심사종류】 특구</p> <p>【특안성기 서명특허 또는 영미노상 서명특허】</p> <p>【서명특허】 19</p> <p>【서명특허 권고일】 2020.09</p> <p>【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】</p> <p>【과제고유번호】 9180194</p> <p>【과제번호】 9180194</p> <p>【부차명】 농림축산식품부</p> <p>【과제관리(전반)기관명】 농림축산식품기술훈간</p> | | <p>【연구사업명】 모스핀계열 D부차 유관제사업</p> <p>【연구과제명】 기능유관제 기반 공기환경 저감발생유기물 정화 기술 개발 및 해외 선진 개발</p> <p>【기여율】 1/2</p> <p>【과제수행기관명】 순천향대학교 산학협력단</p> <p>【연구기간】 2021.01.01 ~ 2021.12.31</p> <p>【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】</p> <p>【과제고유번호】 171250079</p> <p>【과제번호】 2019K1A2A011541</p> <p>【부차명】 과학기술정보통신부</p> <p>【과제관리(전반)기관명】 한국연구재단</p> <p>【연구사업명】 기초연구사업 (중간연구)</p> <p>【연구과제명】 생물공정미(Fiber like grasshopper)의 RNA-간접 변형 규명 및 이를 통한 공정의 안정성/특성 제어 전략 개발</p> <p>【기여율】 1/2</p> <p>【과제수행기관명】 순천향대학교 산학협력단</p> <p>【연구기간】 2017.03.01 ~ 2020.02.28</p> <p>【비고】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.</p> <p>대리인 최정민 (서명 또는 인)</p> | |

| 2021-09-01 | | 2021-09-01 | | 2021-12-05 | |
|--|--|--|--|--|--|
| <p>【저작사항】</p> <p>【서명명】 특허출원서</p> <p>【출원번호】 20211006</p> <p>【출원구분】 특허출원</p> <p>【출원일】</p> <p>【명칭】 순천향대학교 산학협력단</p> <p>【특허고유번호】 2-2024-02042-0</p> <p>【과제인】</p> <p>【성명】 최정민</p> <p>【과제인번호】 9-2010-00098-0</p> <p>【도출특허출원번호】 2019-012518-0</p> <p>【발명의 국문명칭】 공중의 특소 적층물 조성물</p> <p>【발명의 영문명칭】 COMPOSITE FOR 3DPRINTING WITH ZINC</p> <p>【발명자】</p> <p>【성명】 최정민</p> <p>【성명의 영문표기】 Sung-Hwan YOON</p> <p>【주인등록번호】</p> <p>【무관번호】</p> <p>【주소】</p> <p>【발명지】</p> <p>【성명】 김희경</p> | | <p>【성명의 영문표기】 Hye Kyung KIM</p> <p>【주인등록번호】</p> <p>【무관번호】</p> <p>【주소】</p> <p>【출원언어】 국어</p> <p>【심사종류】 특구</p> <p>【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】</p> <p>【과제고유번호】 9180194</p> <p>【과제번호】 9180194</p> <p>【부차명】 농림축산식품부</p> <p>【과제관리(전반)기관명】 농림축산식품기술훈간</p> <p>【연구사업명】 모스핀계열 D부차 유관제사업</p> <p>【연구과제명】 기능유관제 기반 다용 공기환경 저감발생유기물 정화 기술 개발 및 해외 선진 개발</p> <p>【기여율】 7/10</p> <p>【과제수행기관명】 순천향대학교 산학협력단</p> <p>【연구기간】 2021.01.01 ~ 2021.12.31</p> <p>【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】</p> <p>【과제고유번호】 1649202142</p> <p>【과제번호】 2017K1A2A10010</p> <p>【부차명】 농림축산식품부</p> | | <p>【과제관리(전반)기관명】 농림축산식품기술훈간</p> <p>【연구사업명】 저용액(리소스)대형형상대형선형합성기술개발(R&D)</p> <p>【연구과제명】 배 커다라형 정체를 위한 생용소재 발굴 및 유효활성물질 규명</p> <p>【기여율】 3/10</p> <p>【과제수행기관명】 한국화학연구원</p> <p>【연구기간】 2021.04.01 ~ 2021.12.31</p> <p>【비고】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.</p> <p>대리인 최정민 (서명 또는 인)</p> | |

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

| 번호 | 저작권명 | 창작일 | 저작자명 | 등록일 | 등록 번호 | 저작권자명 | 기여율 |
|----|------|-----|------|-----|-------|-------|-----|
| | | | | | | | |

□ 신기술 지정

| 번호 | 명칭 | 출원일 | 고시일 | 보호 기간 | 지정 번호 |
|----|----|-----|-----|-------|-------|
| | | | | | |

□ 기술 및 제품 인증

| 번호 | 인증 분야 | 인증 기관 | 인증 내용 | | 인증 획득일 | 국가명 |
|----|-------|-------|-------|-------|--------|-----|
| | | | 인증명 | 인증 번호 | | |
| | | | | | | |

□ 표준화

○ 국내표준

| 번호 | 인증구분 ¹⁾ | 인증여부 ²⁾ | 표준명 | 표준인증기구명 | 제안주체 | 표준종류 ³⁾ | 제안/인증일자 |
|----|--------------------|--------------------|-----|---------|------|--------------------|---------|
| | | | | | | | |

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

| 번호 | 표준화단계구분 ¹⁾ | 표준명 | 표준기구명 ²⁾ | 표준분과명 | 의장단 활동여부 | 표준특허 추진여부 | 표준개발 방식 ³⁾ | 제안자 | 표준화 번호 | 제안일자 |
|----|-----------------------|-----|---------------------|-------|-------------|--------------|--------------------------|-----|-----------|------|
| | | | | | | | | | | |

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

| 번호 | 시제품명 | 출시/제작일 | 제작 업체명 | 설치 장소 | 이용 분야 | 사업화 소요 기간 | 인증기관 (해당 시) | 인증일 (해당 시) |
|----|------|--------|--------|-------|-------|--------------|----------------|---------------|
| | | | | | | | | |

□ 기술 실시(이전)

| 번호 | 기술 이전 유형 | 기술 실시 계약명 | 기술 실시 대상 기관 | 기술 실시 발생일 | 기술료 (해당 연도 발생액) | 누적 징수 현황 |
|----|-------------|-----------|----------------|--------------|--------------------|-------------|
| | | | | | | |

□ 사업화 투자실적

| 번호 | 추가 연구개발 투자 | 설비 투자 | 기타 투자 | 합계 | 투자 자금 성격* |
|----|------------|-------|-------|----|-----------|
| | | | | | |

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

| 번호 | 사업화 방식 ¹⁾ | 사업화 형태 ²⁾ | 지역 ³⁾ | 사업화명 | 내용 | 업체명 | 매출액 | | 매출 발생 연도 | 기술 수명 |
|----|-------------------------|----------------------|------------------|------|----|-----|------------|------------|-------------|----------|
| | | | | | | | 국내 (천원) | 국외 (달러) | | |
| | | | | | | | | | | |

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

| 사업화명 | 발생 연도 | 매출액 | | 합계 | 산정 방법 |
|------|-------|--------|--------|----|-------|
| | | 국내(천원) | 국외(달러) | | |
| | | | | | |
| 합계 | | | | | |

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

| 성과 | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------|------|------|------|
| 사업화 계획 | 사업화 소요기간(년) | | | | |
| | 소요예산(천원) | | | | |
| | 예상 매출규모(천원) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | 시장 점유율 | 단위(%) | 현재까지 | 3년 후 | 5년 후 |
| | | 국내 | | | |
| | 국외 | | | | |
| 향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획 | | | | | |
| 무역 수지 개선 효과(천원) | 수입대체(내수) | 현재 | 3년 후 | 5년 후 | |
| | 수출 | | | | |

□ 고용 창출

| 순번 | 사업화명 | 사업화 업체 | 고용창출 인원(명) | | 합계 |
|----|------|--------|------------|-------|----|
| | | | yyyy년 | yyyy년 | |
| | | | | | |
| 합계 | | | | | |

□ 고용 효과

| 구분 | | 고용 효과(명) | |
|-------|------|----------|--|
| 고용 효과 | 개발 전 | 연구인력 | |
| | | 생산인력 | |
| | 개발 후 | 연구인력 | |
| | | 생산인력 | |

□ 비용 절감(누적)

| 순번 | 사업화명 | 발생연도 | 산정 방법 | 비용 절감액(천원) |
|----|------|------|-------|------------|
| | | | | |
| 합계 | | | | |

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

| 구분 | 사업화명 | 수입 대체 | 수출 증대 | 매출 증대 | 생산성 향상 | 고용 창출 (인력 양성 수) | 기타 |
|-------|------|-------|-------|-------|--------|--------------------|----|
| 해당 연도 | | | | | | | |
| 기대 목표 | | | | | | | |

□ 산업 지원(기술지도)

| 순번 | 내용 | 기간 | 참석 대상 | 장소 | 인원 |
|----|----|----|-------|----|----|
| | | | | | |
| | | | | | |

□ 기술 무역

(단위: 천원)

| 번호 | 계약 연월 | 계약 기술명 | 계약 업체명 | 계약업체 국가 | 기 징수액 | 총 계약액 | 해당 연도 징수액 | 향후 예정액 | 수출/ 수입 |
|----|-------|--------|--------|------------|-------|-------|--------------|-----------|-----------|
| | | | | | | | | | |

[사회적 성과]

□ 법령 반영

| 번호 | 구분 (법률/시행령) | 활용 구분 (제정/개정) | 명 칭 | 해당 조항 | 시행일 | 관리 부처 | 제정/개정 내용 |
|----|----------------|------------------|-----|-------|-----|-------|-------------|
| | | | | | | | |

□ 정책활용 내용

| 번호 | 구분 (제안/채택) | 정책명 | 관련 기관 (담당 부서) | 활용 연도 | 채택 내용 |
|----|---------------|-----|------------------|-------|-------|
| | | | | | |

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

| 번호 | 구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서) | 활용 구분 (신규/개선) | 설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭 | 반영일 | 반영 내용 |
|----|--------------------------|------------------|-------------------------|-----|-------|
| | | | | | |

□ 전문 연구 인력 양성

| 번호 | 분류 | 기준 연도 | 현황 | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-------|-----|----|----|----|----|---|-----|-----|-----|-----|----|---|
| | | | 학위별 | | | | 성별 | | 지역별 | | | | | |
| | | | 박사 | 석사 | 학사 | 기타 | 남 | 여 | 수도권 | 충청권 | 영남권 | 호남권 | 기타 | |
| 1 | 박기창 | 2019 | | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 2 | 신유경 | 2020 | | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | |
| 3 | 이상원 | 2020 | | 1 | | | 1 | | | 1 | | | | |
| 4 | 박현후 | 2020 | | 1 | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 5 | 김다운 | 2020 | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | | |
| 6 | 최연주 | 2020 | | 1 | | | | 1 | | | 1 | | | |
| 7 | 이현희 | 2019 | 1 | | | | | 1 | | | 1 | | | |
| 8 | 신종환 | 2021 | 1 | | | | 1 | | | | | | | 1 |

□ 산업 기술 인력 양성

| 번호 | 프로그램명 | 프로그램 내용 | 교육 기관 | 교육 개최 횟수 | 총 교육 시간 | 총 교육 인원 |
|----|-------|---------|-------|----------|---------|---------|
| | | | | | | |

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

| 번호 | 중앙행정기관명 | 사업명 | 연구개발과제명 | 연구책임자 | 연구개발비 |
|----|---------|-----|---------|-------|-------|
| | | | | | |

□ 국제화 협력성과

| 번호 | 구분 (유치/파견) | 기간 | 국가 | 학위 | 전공 | 내용 |
|----|---------------|----|----|----|----|----|
| | | | | | | |

□ 홍보 실적

| 번호 | 홍보 유형 | 매체명 | 제목 | 홍보일 |
|----|-------|-----|----|-----|
| | | | | |

□ 포상 및 수상 실적

| 번호 | 종류 | 포상명 | 포상 내용 | 포상 대상 | 포상일 | 포상 기관 |
|----|------|-----|--------------|-------|----------|---------|
| 1 | 장관표창 | 표창장 | 중자생명산업 발전 기여 | 윤성환 | 18.12.31 | 농림축산식품부 |

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

| 구축기관 | 연구시설/ 연구장비명 | 규격 (모델명) | 개발여부 (○/×) | 연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부 | 연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호 | 구축일자 (YY.MM.DD) | 구축비용 (천원) | 비고 (설치 장소) |
|------|----------------|-------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------|---------------|
| | | | | | | | | |

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

| 추진 목표 | 달성 내용 | 달성도 (%) |
|--|---|----------------------------------|
| ○ 벼 키다리병균 <i>Fusarium fujikuroi</i> 와 벼 이삭마름병균 (붉은곰팡이병균) <i>F. graminearum</i> 의 발병과 공기전반 관련 유전자 집단의 기능 및 조절 체계 규명 | ○ <i>F. fujikuroi</i> 줄기마름 병원형 발병 특이 유전자 집단의 기능 규명 - 발병 특이 유전자삭제 돌연변이체의 제작 및 병원성 검정 - Gene silencing 활용 발병 특이 유전자 기능 분석 ○ <i>F. fujikuroi</i> 병원형별 포자형성 특이 유전자 집단의 기능 및 조절 체계 규명 - 분생포자 형성단계 전사체 해독 및 유전자 기능 분석 - 포자 형성 조절 유전자 집단의 조절 체계 및 병원성 기능 분석 ○ <i>F. fujikuroi</i> 의 병원형별 초파리(<i>Drosophila melanogaster</i>)에 대한 병원성 검정 ○ <i>F. graminearum</i> 의 공기전반 관련 유전자 집단의 기능 및 조절 체계 분석 - 붉은곰팡이 집단 내 무성포자형성 관련 유전자의 기능 변이 - 5종 hydrophobin 유전자 기능의 종합적 분석 - <i>FgPKS7</i> 유전자 기능의 종합적 분석 - <i>NoxD</i> 유전자의 기능 분석 | ○ 100 ○ 100 ○ 100 ○ 100 |
| ○ 벼 <i>Fusarium</i> 곰팡이 병원균의 발병 생태 및 발병 기작 활용 병 발생 제어 전략의 탐색 및 제어전략 구축 | ○ 벼 재배 지역 내 <i>Fusarium</i> 곰팡이 집단의 분포 규명 ○ <i>Fusarium</i> 병원균의 발생 생태 및 분자기작 활용 병 발생 제어 기술의 탐색 - 비병원성 공기 전반 <i>Fusarium</i> 종 활용 - <i>F. fujikuroi</i> fumonisin 생합성 유전자와 <i>F. graminearum</i> β -tubulin 유전자 발현 억제 미생물추출물의 탐색 | ○ 100 ○ 100 |
| ○ 고추 탄저병균 <i>Colletotrichum scovillei</i> 의 포자 생성 양상 규명 및 전사체 연구 | ○ <i>C. scovillei</i> 의 포자생성 양상 규명 - 다양한 생육조건에 따른 포자생성 비교 - 시간별, 고추 품종별 포자생성 비교 ○ <i>C. scovillei</i> 의 포자접종에 따른 고추 품종별 감염 및 발병 특성 연구 ○ <i>C. scovillei</i> 의 포자생성 전사체 및 발병 유전자 연구 - 포자 생성과 발병 단계별 전사체 분석 | ○ 100 ○ 100 ○ 100 |
| ○ 고추 탄저병균 <i>C. scovillei</i> 의 포자 생성 및 발병 기작 연구 | ○ <i>C. scovillei</i> 의 포자생성 및 발병 기작 연구 - 포자 생성과 발병 특이 유전자의 기능 분석 및 공기전반의 종합적 이해 | ○ 100 |
| ○ 고추 탄저병균 <i>C. scovillei</i> 의 공기전반 및 발병 종합적 이해 및 제어 전략 연구 | ○ <i>C. scovillei</i> 의 제어 전략 연구 - 고추탄저병의 생물학적 방제를 위한 길항미생물 선발 | ○ 100 |
| ○ 다양한 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균 사이 상호작용의 연구 | ○ 식물 병원성 <i>Burkholderia glumae</i> 와 <i>B. gladioli</i> 사이 <i>in vitro</i> 분석 조건에서 상호작용 및 병원성 연구 ○ <i>B. glumae</i> 와 <i>B. gladioli</i> 사이 상호작용 및 병원성 연구 | ○ 100 ○ 100 |
| ○ 기능유전체학적 접근을 통한 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균과 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이 사이 상호작용 연구 | ○ 병원성 <i>Burkholderia</i> 세균과 병원성 <i>Fusarium</i> 곰팡이 사이 상호작용, 전사체 분석 및 상호작용 네트워크 구축 ○ <i>Burkholderia-Fusarium</i> 상호 작용 주요 유전자의 기능 분석 ○ 기주 식물체 내 <i>Burkholderia-Fusarium</i> 사이 상호작용 및 병원성 연구 | ○ 100 ○ 100 ○ 100 |
| ○ 기능유전체학적 접근을 통한 다양한 <i>Burkholderia</i> 세균과 병원성 <i>Colletotrichum</i> 곰팡이 사이 상호작용 연구 | ○ 다양한 <i>Burkholderia</i> 세균과 병원성 <i>Colletotrichum</i> 사이 상호작용, 전사체 분석 및 네트워크 구축 ○ <i>Burkholderia-Colletotrichum</i> 곰팡이 사이 기주 감염 연구 | ○ 100 ○ 100 |
| ○ 병원균 사이 상호작용에 중요한 기능을 하는 유전자 발굴 및 기능 연구 | ○ 비교 전사체 분석을 통한 병원균 상호작용 기작 연구 | ○ 100 |

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

▶ 벼 병원성 *Fusarium* 곰팡이 연구 (순천향대)

- 벼 키다리병균의 두 병원형별 발병 및 포자형성 특이 유전자 집단의 종합적 분석을 통해 그동안 주목받지 못한 줄기마름형 키다리병균 집단의 중요성, 위험성 등을 최초로 부각함. 또한 줄기마름형 병징 발현에 필수적인 fumonisin 독소의 역할을 새롭게 규명함으로써 줄기마름형 벼 키다리병균의 방제 전략 구축에 기여할 것으로 예상됨.
- 벼 이삭마름병균(붉은곰팡이병균)의 벼 재배지역내 월동과 공기전반에 중요한 역할을 하는 무성/유성포자의 형성 관련 주요 유전자의 기능을 종합적으로 규명함으로써 병 방제전략 구축에 기여할 것으로 예상됨.
- 벼 재배지역 내 공기 중에 우점종으로 분포하는 비병원성 *Fusarium* 종의 포자 살포에 따른 벼 키다리병균과 벼이삭마름병균의 방제 효과는 새로운 친환경적 식물병 전략의 개발에 기여할 것으로 예상됨.
- 병원성 *Fusarium* 곰팡이의 주요 병 발생인자 발현 억제 미생물추출물의 탐색 및 선발은 살균제 내성균 출현 억제와 친환경 병 방제 전략 구축에 기여할 것으로 예상됨.

▶ 고추 탄저병균 *Colletotrichum* 곰팡이 연구 (강원대)

- RNA-seq 및 기능유전체학 연구 기법을 통한 고추 탄저병균의 포자 생성 및 고추 과실 감염에 대한 연구는 추후 다른 식물병원성 곰팡이를 연구하는데 기여할 것임.
- 기주 식물의 방어 메커니즘을 억제하는 병원성 인자 CsHOX1의 기능 연구는 고추의 저항성 메커니즘을 분자생물학적 수준에서 이해하는데 기여할 수 있음.
- 고추 탄저병균의 생장을 억제하는 길항미생물의 발견은 시대의 요구에 부응하는 친환경적인 방제 기술 개발에 기여할 것임.

▶ 벼 알마름병균 *Burkholderia* 세균 연구 (부산대)

- 식물-곰팡이-세균의 상호작용 연구는 종합적으로 분석하는 생물정보학의 도움이 없이는 불가능하며, 특히 어느 kingdom을 선정하느냐에 따라 해석이 달라질 수 있음.
 - 개체 선정에 관한 문제를 해결했음에도 실제로 다루기 용이한 것인지에 따라 시간에 따른 비용처리로 막대한 연구비가 사용되며, 이는 투자 대비 결과로서 좋은 효율을 얻기가 어려운 실정임.
 - 본 연구에서는 특히, 개체 선정에 있어 효율적으로 다룰 수 있는 세균을 선정하여 서로 다른 2가지의 kingdom과의 상호작용을 면밀히 확인할 수 있었고, 벼 알마름병을 유도하는 제어 기반에 가장 중요한 key 유전자를 선정한 것에 큰 성과를 이루었다고 볼 수 있음. 이를 활용하면 복합감염 기작에 대한 제어 기반을 제공할 수 있음.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 성과 관리 추진체계: 본 과제를 통해 이미 구축한 세 연구진 사이 협력체계를 바탕으로 정기적인 교류(예: 온라인 회의 등)를 통해 과제 종료 후 연구개발성과의 추가 도출 및 활용을 논의함.

○ 예상되는 연구개발성과의 활용 계획

- 과제 종료 후에도 추가적인 논문게재 예정임. *Fusarium* 연구진(순천향대)의 경우, *F. graminearum*의 균사생장 및 포자 생성 관련 hydrophobin 유전자 기능 분석 논문이 이미 투고/심사 중이며, 추후 *F. fujikuroi*의 포자 생성 조절 유전자 집단의 기능 분석 논문의 투고도 준비 중임. 또한 *Colletotrichum* 연구진(강원대)의 경우, $\Delta Cspmk1$ 과 $\Delta Cscap1$ 유전자결실돌연변이체의 병원성이 크게 감소한 내용으로 논문 게재가 가능하며, $\Delta Cspmk1$ 유전자결실돌연변이체에 대한 내용은 이미 논문 게재 심사 중임.

- 현재 출원중인 특허의 최종 등록을 위한 후속 작업을 진행할 예정임.

○ 예상되는 연구개발성과의 활용방안 및 추가연구의 필요성

- *Fusarium* 병원균의 병 발생 제어를 위하여 본 과제에서 시도한 비병원성 *Fusarium* 곰팡이포자 살포, fumonisin 생합성 유전자 발현 억제 미생물추출물의 실용화를 위한 추가적인 실험(병원성 실험, 추출물 분획 등)이 필요함.

- 비병원성 *F. incarnatum-equiseti* 균주의 포자 현탁액을 맥류 (보리 또는 밀)와 벼 출수기에 각각 살포한 후 3일 뒤 *F. fujikuroi* 또는 *F. graminearum* 대표균주를 살포함. 이후 이삭 수확기까지 맥류 붉은곰팡이병과 벼 이삭마름병의 발병 현황을 모니터링함. 이때 *F. incarnatum-equiseti*의 포자 살포시 벼와 맥류 이삭의 결실률의 영향도 검정함. 한편, 벼 키다리병의 방제 효과 검정을 위하여 수확한 벼 낱알(종자) 내 *Fusarium* 곰팡이 오염률 분석 뿐 아니라 벼 종자의 발아를 통해 벼 유묘 상태에서 벼 키다리병의 발생 여부등을 검정해야 함. 이를 위해 1차년도 온실 실험에서 비병원성 균주 현탁액의 살포양, 살포시기, 살포 후 병원균 접종 살포 간격 등을 검정하여 최적 조건을 선발한 후 실험 포장 실험을 수행할 필요가 있음.

- 또한 시제품 개발을 위하여 비병원성 *F. incarnatum-equiseti* 균주의 동식물에 대한 독성과 포자 대량생산 및 살포 방법 등에 대해 친환경 농자재 업체 등과 협력이 필수적임. 특히 *F. incarnatum-equiseti* 균주의 유전체 분석을 통해 독성 이차대산산물의 생성 가능성을 예측할 수 있음.

- 본 과제에서 선발한 유용 미생물 추출물을 활용하여 벼 이삭마름병균 또는 벼 키다리병균의 친환경적 방제법의 실용화 후속연구가 필요함. 벼 이삭마름병균과 벼 키다리병균의 주요 병원성 인자인 trichothecene과 fumonisin 독소의 생합성 유전자 발현을 억제할 수 있는 미생물(방선균) 추출물의 원인 물질에 대한 화학적 동정과 함께 미생물 추출물에 의한 실제 병 발생 억제 또는 기주 식물 내 곰팡이독소 억제 효과를 온실 실험에서 재검정할 필요 있음. 이후 우수한 미생물 추출물의 대량생산과 살포 방법 등에 대해 관련 산업체와 협력 연구를 통해 시제품 개발이 가능할 것으로 판단됨.

- 본 과제에서 선발한 *Colletotrichum* 병원균에 대한 길항미생물(*Burkholderia* 세균 포함)의 병 방제 효과 검정을 위한 추가 연구가 필요함.

< 연구개발성과 활용계획표 >

| 구분(정량 및 정성적 성과 항목) | | 연구개발 종료 후 5년 이내 | |
|---------------------|-------|-----------------|--|
| 국외논문 | SCIE | 3 | |
| | 비SCIE | | |
| | 계 | 3 | |
| 국내논문 | SCIE | 1 | |
| | 비SCIE | | |
| | 계 | 1 | |
| 특허출원 | 국내 | | |
| | 국외 | | |
| | 계 | | |
| 특허등록 | 국내 | 2 | |
| | 국외 | | |
| | 계 | 2 | |
| 인력양성 | 학사 | | |
| | 석사 | 2 | |
| | 박사 | 2 | |
| | 계 | 4 | |
| 사업화 | 상품출시 | | |
| | 기술이전 | | |
| | 공정개발 | | |
| 제품개발 | 시제품개발 | | |
| 비임상시험 실시 | | | |
| 임상시험 실시 (IND 승인) | 의약품 | 1상 | |
| | | 2상 | |
| | | 3상 | |
| | 의료기기 | | |
| 진료지침개발 | | | |
| 신의료기술개발 | | | |
| 성과홍보 | | | |
| 포상 및 수상실적 | | | |
| 정성적 성과 주요 내용 | | 위 내용 참조 | |

< 별첨 자료 >

| 중앙행정기관 요구사항 | 별첨 자료 |
|-------------|---------------|
| 1. | 1) 자체평가의견서 |
| | 2) 연구성과 활용계획서 |
| 2. | 1) |
| | 2) |

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.