최 종 연구보고서

> 옥수수와 보리에서 발생하는 붉은 곰팡이 독소오염에 관한 안전성 향상 기술개발

Development of molecular technology for improving safety of corn and barley contaminated with *Fusarium* mycotoxins

연구기관

서울대학교 농업생명과학대학

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "옥수수와 보리에서 발생하는 붉은 곰팡이 독소오염에 관한 안전성 향상 기술개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 7월 26일

주관연구기관명: 서울대학교

총괄연구책임자: 이 인 원

세부연구책임자: 김 국 형

연 구 원: 이 데레사

연 구 원:임선회

협동연구기관명: 순천향대학교

협동연구책임자: 윤 성 환

요 약 문

I. 제 목

옥수수와 보리에서 발생하는 붉은 곰팡이 독소오염에 관한 안전성 향상 기술개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

남부지방에서 맥류의 붉은곰팡이병이 1963년, 1974년, 1987년, 1998년에 대발생하였으며 이중 1963년에는 40-90%의 수확이 감소되었고 이병된 맥류가 인축에 심한 중독증을 가져와 그 당시 큰 사회적 문제가 되었다. 1998년에도 보리의 붉은곰팡이병이 대 발생하여 독소에 대한 중독증 우려가 대두되었으나 1963년과 비교하여 보리의 식이양상이 달라졌기 때문에 사람에서 중독증 발생가능성은 낮지만 이병된 보리를 사료로 사용할 경우 가축에 질병을 가져올 가능성은 상존한다. 또한 강원도 지방을 중심으로 옥수수를 재배하고 있는바 곰팡이독소의 오염이 해마다 계속되고 있다. 따라서 국내산 옥수수와 보리의독소에 대한 안전성을 증진하는 연구개발이 절실히 요청되고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 국내산 옥수수와 보리로부터 Fusarium균을 분리하고 이들 균주가 생성하는 Fumonisin과 Trichothecene의 생합성 유전자변이를 분석하여 이를 토대로 생물공학 기법을 이용한 독소검출법개발, 붉은곰팡이바이러스의 특성 규명과 바이러스를 이용한 벡터 개발, 그리고 개발된 검출법을 통하여 독소오염조사를 수행함으로써 옥수수와 보리의 붉은곰팡이병으로 인한 곰팡이독소 대한 안전성을 확보하고자 한다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국내산 옥수수와 보리로부터 각각 152균주와 160균주의 F. graminarum를 분리하여 각각의 독소생성능을 측정한 결과 옥수수균주 대부분은 DON생성균주인 반면보리균주들은 NIV생성균주이었다. 이들 독소생성형의 대표균주로부터 각각 23 kb의 Trichothecene 생합성 유전자군을 증폭하여 DNA 염기서열을 비교·분석한 결과 두 독소생성형 균주 사이에 Tri7 과 Tri13유전자의 구조 변이가 가장 뚜렷하였다. 이를 바탕으로 PCR 반응을 통해 독소생성형을 특이적으로 검출할 수 있는 primer 조합을 제작하였다. 또한 Tri7 과 Tri13 특이 primer를 이용한 PCR 증폭과 독소생성형과 관계없는 Tri5 유전자를 이용한 DNA gel blot 분석을 통해 국내산야생형 F. graminearum 균주들을 비롯한 표준균주, 곰팡이바이러스 함유 균주의독소생성능 변이를 분석하였다. 그리고 서로 다른 항생제 저항성 형질전환체의 제작을 통해 지금까지 자가화합성으로 인해 거의 불가능하였던 F. graminearum DON생성균주와 NIV생성균주간의 교배를 성공적으로 수행하여 총 136 주의 자손균주를 확보하였다. 이들 균주의 독소생성형을 PCR 검출법을 이용해 조사한 결과,부모의 독소생성형 형질이 자손균주에서 1:1로 분리됨으로써 독소생성형은 단일유전자에 의해 결정됨을 유전적으로 증명할 수 있었다.

한편 옥수수에서 분리한 118균주의 *G. fujikuroi* 중에서 Fumonisin을 생성하는 mating population A (MP-A) 균주가 우점을 차지하였다. PCR 증폭실험을 통해 Fumonisin 생성균주는 mating population에 관계없이 모두 Fumonisin 생합성 유전자 *Fum5*와 *Fum6* 유전자를 함유하고 있는 반면 Fumonisin 미생성 균주집단 (MP-F) 에는 두 유전자가 존재하지 않음이 밝혀졌다. 하지만 *Fum5* 와 *Fum6* 유전자의 염기서열비교와 DNA gel blot 분석을 통해 비록 Fumonisin 생성 균주일지라도 mating population에 따라 상당한 유전변이가 있음이 확인되었다. 또한 MP-F 균주의 게놈에서도 Fumonisin 생성균주의 *Fum5* 와 *Fum6* 인근 부위에 존재하는 유전자들과 매우 비슷한 유전자군이 발견되었으며 그 구조는 MP-F 균주집단내에 잘 보존되었다. 그리고 이와 같은 Fumonisin 생합성 유전자군의 변이 분석을 통해 각 mating population 에 특이적인 primer 조합을 제작하였다.

붉은곰팡이의 유전변이 분석을 통해 제작된 primer의 특이성과 유용성을 확인하기 위해 곡물시료의 게놈 DNA로부터 직접 독소생합성 유전자를 증폭하였다. 그

리고 PCR 증폭 여부, 증폭 양상에 따라 곡물시료에 오염된 붉은곰팡이의 종류, 독소생성형, 자연발생가능한 독소 등을 예측할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 확립된 PCR 검출법은 이전의 화학분석에 비해 매우 신속하고 정확하게 곡물의 붉은곰팡이 오염여부를 결정하는 데 사용할 수 있으며, 특히 국내 곡물뿐 아니라 해외농산물의 검역에도 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

곰팡이 바이러스는 곰팡이에 기생하여 기주의 게놈보다 상당히 높은 수준으로 복제를 진행하고 기주의 정상적인 생리현상을 방해하는 경우가 빈번하다. 따라서 이러한 곰팡이 바이러스의 특성을 이용하여 외래 유전자의 발현을 위한 벡터나 곰 팡이에 의한 피해를 줄이기 위한 생물학적 조절인자로서 이용이 가능하다. 본 연구 에서는 우리나라 옥수수 및 보리에 붉은 곰팡이 병을 유발하는 F. graminearum에 서 분리한 곰팡이 바이러스의 감염빈도와 이용 가능성을 모색하였다. 남부 지방의 경우 같은 종류의 곰팡이 바이러스가 그 발견 빈도는 낮았고 게놈의 크기가 2-4 kb인 서로 다른 세 종류의 dsRNA 게놈을 발견하였고 이중 F. graminearum strain 98-8-60에서 준리한 dsRNA의 게놈 및 defective dsRNA의 게놈 분석을 실 시하여 Partitiviridae에 속한 dsRNA 바이러스라는 것을 확인하였다. 593 bp 크기 의 defective dsRNA는 곰팡이 벡터로 이용하기 위한 DNA 클론 제작에 이용하였 다. 강원도 옥수수에서 분리한 붉은 곰팡이는 남부 지방에서 발견되는 바이러스와 는 다른 곰팡이 바이러스가 발견되었고 모두 영월 지방의 시료에서 상당히 빈번하 게 발견되었다. 이상의 연구 결과는 지역별 또는 작물에 따라 서로 다른 종류의 곰 팡이 바이러스가 존재하고 있다는 것을 나타내고 있으며 기주 곰팡이의 생장에 서 로 다른 영향을 줄 수 있고 이러한 dsRNA의 이용 가능성이 높다는 것을 암시한 다.

SUMMARY

Fusarium graminearum causes diseases in many cereal crops including corn, wheat, and barley. Historically, epidemics of cereal scab occurred in southern provinces of Korea in 1963, 1974, 1987, and 1998. In 1963, yield losses ranged 40-90% due to the disease and serious mycotoxicoses occurred in humans and animals. Recently another epidemic of barley scab occurred in 1998 and barley harvested in 1998 was highly suspected to be contaminated with Fusarium mycotoxins. Also, corn cultivated in Gangwon province had been contaminated with mycotoxins. In this regard, the development of technology for improving the safety is urgent in domestic cereals against the mycotoxins. For this purpose, the objectives of this project were i) to isolate Fusarium species from corn and barley samples and to screen the toxin production by those isolates. ii) to analyze the genes involved in biosynthesis of trichothecenes and fumonisins, iii) to develop the molecular assay methods for detecting the toxins and to apply the methods in cereal samples, and iv) to characterize mycoviruses in F. graminearum and to develop the vector system by using the mycoviruses. A total 312 isolates of F. graminearum were obtained from corn and barley samples and tested for trichothecene production. Most of corn isolates were DON-chemotypes whereas barley isolates were of When kb DNA region mostly NIV-chemotypes. а trichothecene-biosynthesis gene cluster was analyzed between DON-NIV-chemotypes, both Tri7 and Tri13 genes were strikingly different between the two chemotypes. Several PCR primer combinations for use to distinguish the two chemotypes were designed based on variations of nucleotide sequences from these regions. Also, PCR amplification using Tri7- and Tri13-specific primers and DNA gel blot analysis using Tri5 gene revealed genetic diversity in standard strains, mycovirus-infected isolates as well as Korean field isolates. Outcross between the two chemotype strains was successful by using drug resistant transformants and the progeny were segregated as a 1:1 ratio for DON/NIV production, demonstrating that the chemotype of *F. graminearum* was controlled by a single genetic element.

A total of 118 isolates of *G. fujikuroi* from corn produced fumonisin except one and most fumonisin-producing isolates belonged to mating population A (MP-A). PCR amplification using primers specific *Fum5* or *Fum6* required for fumonisin bisosynthesis showed that all of the fumonisin-producing isolates (regardless to mating population) carried both *Fum5* and *Fum6*, whereas MP-F isolates (no fumonisin producer) did not. However, comparison of nucleotide sequences and DNA gel blot analysis revealed genetic diversity between mating populations of fumonisin-producing isolates (MP-A and MP-D). In addition, several genes homologous to those closely linked to *Fum5* and *Fum6* in MP-A and MP-D isolates were found in MP-F isolates. Specific primer sets were designed based on these genetic variation for detection or identification of *G. fujikuroi*.

These specific primer sets derived from varied regions in toxin biosynthesis genes were used to detect toxin-producing *Fusarium* species on cereal samples. The PCR detection method developed in this study should be very useful to improve safety of agro-products because it is more sensitive and faster than chemical detection of mycotoxin.

Double-stranded RNA mycoviruses are usually replicate very efficiently in their infected host and affect host's normal physiological functions. Using these characteristics, researches have been done to use mycoviruses as a vector for the expression of foreign gene(s) in a fungal cell and as a biological agent to control diseases caused by their host fungi. In this research, we screened *F. graminearum* isolates from barley and corn for presence of dsRNA mycovirus. dsRNAs of 2-4 kbp in length were isolated from *F. graminearum* from barley. Nucleotide sequence analysis of a dsRNA and a defective dsRNA obtained from strain 98-8-60 revealed that this dsRNA mycovirus is a member of the *Partitiviridae*. The defective small-size dsRNA of 593 bp was used for vector construction. In contrast, relatively large-size dsRNA mycoviruses were isolated

from F. graminearum infecting corn, suggesting that there are differences in infection rate and class of mycoviruses based on the host plant of fungus (corn and barley) and on regions. Therefore, these dsRNA mycoviruses could be used as useful fungus expression vector system or biological control dsRNAs of 2-4 kbp in length were isolated from F. graminearum from barley. Nucleotide sequence analysis of a dsRNA and a defective dsRNA obtained from strain 98-8-60 revealed that this dsRNA mycovirus is a member of the Partitiviridae. The defective small-size dsRNA of 593 bp was used for vector construction. In contrast, relatively large-size dsRNA mycoviruses were isolated from F. graminearum infecting corn, suggesting that there are differences in infection rate and class of mycoviruses based on the host plant of fungus (corn and barley) and on regions. Therefore, these dsRNA mycoviruses could be used as useful fungus expression vector system or biological control

CONTENTS

Chapter 1. In	ntroduction	10
(Objectives of research	10
S	Scope of research	13
Chapter 2. S	Status of Art	16
Chapter 3. R	Results and Discussion	18
I	Materials and Methods	18
	Analysis of genetic variation of toxin-producing fungi	18
	Development of vectors by using mycoviruses	19
	Development of toxins by molecular assay methods	20
]	Results and Discussion	23
	Analysis of genetic variation of toxin-producing fungi	23
	Development of vectors by using mycoviruses	39
	Development of toxins by molecular assay methods	51
Chapter 4. C	Conclusion and Contribution to Related Fields	76
Chapter 5. F	Further Research and Plan	78
Chapter 6. In	nformations from Other Institutes	80
Chapter 7. R	References	82

목 차

제	1 장	연구개발과제의 개요	10
	제 1	절. 연구개발 목적 및 범위	10
	제 2	절. 연구개발의 필요성	10
	제 3	절. 연구개발내용 및 범위	13
제	2 장	국내외 기술개발 현황	16
	제 1	절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	16
	제 2	절. 앞으로 전망	16
제	3 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
	제 1	절. 연구의 이론적, 실험적 수행 방법	18
	1.	붉은 곰팡이 독소 생성능의 유전적 변이분석	18
	2.	곰팡이바이러스를 이용한 벡터개발	19
	3.	생명공학 기법을 이용한 붉은 금팡이 독소 검출기법 개발	20
	제 2	절. 연구 수행내용 및 결과	23
	1.	붉은 곰팡이 독소 생성능의 유전적 변이분석	23
	2.	곰팡이바이러스를 이용한 벡터개발	39
	3.	생명공학 기법을 이용한 붉은 금팡이 독소 검출기법 개발	51
제	4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
•	제]	[절. 연구개발 목표와 내용 및 평가 착안점	76
	제 2	2절. 연구개발 목표의 달성도	77
	제 3	3절. 관련분야에의 기술발전 기여도	77
제	5 장	연구개발결과의 활용계획	78
	제]	[절. 추가연구의 필요성	78
	제 2	2절. 타 연구에의 응용	78
	제 3	3절. 연구결과의 활용계획	79
제	6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	80
궯	7 장	찬고무허	82

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적 및 범위

본 연구는 국내산 옥수수와 보리로부터 Fusarium 균을 분리하고 이들 균주가 생성하는 Fumonisin과 Trichothecene의 생합성 유전자변이를 분석하여 곰팡이 독소 검출법과 생물학적 방제를 위한 곰팡이 바이러스 벡터를 개발함으로써 옥수수와 보리의 이삭썩음병과 붉은곰팡이병으로 인한 곰팡이독소 대하여 공중위생과 농축산물의 안전성 향상에 기여하는데 있다. 구채적 연구 개발목표는 다음과 같다.

- 1. 국내산 옥수수와 보리로부터 Fusarium균을 분리하여 독성학적, 유전학적인 변이를 규명
- 2. 붉은 곰팡이 바이러스의 특성 규명과 바이러스를 이용한 벡터 개발 및 곰팡이 바이러스 벡터 개발
- 3. 생물공학 기법을 이용한 Fusarium 독소의 검출법 확립
- 4. 개발된 검출법을 통하여 곡물내 독소의 오염 가능성 조사

제 2 절. 연구개발의 필요성

Fusarium속 곰팡이는 많은 작물에 병을 일으켜 작물의 수량감소와 품질의 저하를 가져올 뿐 만 아니라 수확 후 Fusarium에 감염 또는 오염된 곡물이 식품이나 사료로 사용될 경우 인축에 치명적인 중독증을 초래할 위험이 있다. 곰팡이독소의 발생은 전 세계적으로 Aflatoxin과 Fusarium곰팡이독소가 주종을 이루고 있는데 이들 두 독소의 발생지역은 서로 다르다. Aflatoxin의 발생은 대부분 고온 다습한 열대나 아열대 지방에서 생산된 곡물에서 보고 되고 있으며 Fusarium독소는 사계절이 뚜렷한 온대지방에서 생산된 곡물에서 흔히 발생한다고 보고 되고 있다. 따라서 국내산 곡물은 Fusarium독소의 발생위험이 높으며 국내산 곡물이 Fusarium독

소에 심하게 오염되어 있다는 보고들이 이러한 사실을 뒷받침 하고 있다. 현재 우 리나라에서는 강원도와 남부지방을 중심으로 각각 옥수수와 보리가 재배되고 있으 나 이들 곡물에서의 곰팡이독소 관한 안전성 평가에 관한 연구가 미흡한 실정이다. 이 두 작물에서 Fusarium속 곰팡이독소 연구는 독소가 병원성과 관련이 있으므로 옥수수의 이삭썩음병과 보리 붉은곰팡이병을 방제할 수 있는 수단이 강구 될 뿐만 아니라 곰팡이에 오염된 곡물이 식품이나 사료로 사용될 경우 중독증을 초래할 가 능성이 있기 때문에 공중보건위생과 가축의 생산성 향상을 위하여 중요하다. Fusarium독소로는 Fumonisin과 Trichothecene계의 독소가 주종을 이루고 있다. 현재까지 본 연구진에 의해서 수행된 결과에 국내에 분포하고 있는 *Fusarium* 균 주들의 독소 생성능이 지역적으로 분포를 달리하며 이에 따라 곡물에 오염되는 독 소의 종류도 다양함을 알 수 있었다. 남부지방에서 생산되는 보리는 Trichothecene 계 독소 중 Deoxynivalenol (DON)과 Nivalenol (NIV)이 동시에 검출이 되고 있으 며 NIV의 검출농도가 항상 높게 검출된다. 독성학적으로 NIV가 DON보다 10배 정도 독성이 높기 때문에 보리에서의 NIV발생은 심각한 안전성 문제를 제기 할 수 있다. NIV 생성균주들은 남부지방에 널리 분포하고 있으며 미국을 포함한 북미 국가들에서는 NIV생성균주가 분포하지 않는다. 한편 강원도지방에서 생산되는 옥 수수는 DON과 NIV가 모두 검출되나 DON이 주요독소로 검출되며 Fumonisin오염 이 매우 혼하다. Fumonisin 오염에서는 C-series Fumonisin이 10%에 달하고 있음 이 외국에서의 발생양상과 다른 점이다. 이러한 차이는 국내에 분포하는 독성균주 들의 독소 생성능이 외국과 다르며 독소생합성 유전자가 다름을 시사한다. 따라서 국내산 독성균주의 유전변이분석과 이를 토대로 효과적인 독소 분석법의 개발, 독 소를 제어 할 수 있는 대책이 시급하다.옥수수와 보리에서 Trichothecene과 Fumonisin의 오염은 식품안전도의 관점에서 볼 때 잠재적이며 커다란 위험요소로 서 작용할 것이며 국가 정책적 차원에서 그 비중을 두어야 할 분야이다. 그 이유는 Fusarium에 의한 붉은곰팡이병의 발생은 수확의 감소로 경제적인 손실을 가져옴 은 물론 식품 및 사료의 독소는 인축에 중독증을 초래 할 수 있다. Trichothecene 의 중독증으로는 피부독성, 소화기관 및 순환기관에서의 출혈, 설사, 구토, 신경장 애, 그밖에 동물이 사료섭취를 꺼려한다. Fumonisin은 동물과 사람에게 심각한 질 병을 야기하는데 동물 의존적인 장기특이성을 나타내고 있다. 대표적으로 말, 노새, 당나귀 등에서 뇌 백질연화증, 돼지에서 pulmonary edema 증후군, 및 실험동물인

흰취에서 간암, 간 독성 및 신장독성을 들 수 있다. 또한 사람에서는 식도암 발생과 깊은 관계가 있는 것으로 추정하고 있다. 이와 같이 옥수수와 맥류를 기제로 한식품과 사료에서 Trichothecene과 Furnonisin의 오염의 심각성은 곡물시장에 타격을 안겨줄 것이다. 미국 미네소타주의 경우 95년도 밀의 붉은곰팡이병의 대 발생으로 인한 경제적 손실은 10억 달러이상에 달한다. 역사적으로 우리나라에서는 남부지방에서 맥류의 붉은 곰팡이병이 1963년, 1974년, 1987년, 1998년에 대발생하였으며 이중 1963년에는 40-90%의 수확이 감소되었고 이병된 맥류가 인축에 심한중독증을 가져와 그 당시 큰 사회적 문제가 되었다. 1998년에도 보리의 붉은 곰팡이병이 대 발생하여 독소에 대한 중독증 우려가 대두되었으나 1963년과 비교하여보리의 식이양상이 달라졌기 때문에 사람에서 중독증 발생가능성은 낮지만 이병된보리를 사료로 사용할 경우 가축에 질병을 가져올 가능성은 상존한다. 따라서 농산물의 안전성에 대한 국민의식이 점점 높아지고 있는 실정이므로 곰팡이독소에 대한 곡물의 안전성을 증진하는 연구개발이 절실히 요청되고 있다.

제 3 절. 연구개발내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2000)	Fusarium 독성균주의 선발 및 독소 생합성 유전자의 특성규명	1. 옥수수와 보리에서 Fusarium균 분리 및 동정 - 옥수수로부터 Fusarium균의 분리 및 동정 - 보리로부터 붉은 곰팡이 분리 및 동정 2. Fumonisin과 Trichothecene (DON, NIV)의생성능 측정 - Fumonisin생성균주의 선발 - Fumonisin생성균주의 전발 - Trichothecene생성균주 중 DON 생성형과 NIV 생성형 균주의 선발 및 확보 3. 붉은곰팡이로부터 곰팡이바이러스 분리 - 맥류와 옥수수에서 분리된 붉은 곰팡이 병원균을 서로 다른 배양환경에서 배양 - 배양된 병원균에서 켈럼을 이용하여 dsRNA를 분리 4. 곰팡이바이러스의 지역적 분포와 기주와의상관관계 조사 - dsRNA가 존재하는 균주들을 분리, 정리 - dsRNA의 존재가 붉은 곰팡이의 지역이나 기주 또는 독소 생성능이나 병원성과의 관계분석 5. Fumonisin생합성 유전자의 특성 규명 - 각 균주로부터 Fumonisin생합성유전자들의 homolog 증폭 및 분리 - 증폭된 homolog들의 DNA염기서열 비교분석 6. Trichothecene 생성균주로부터 독소생성 유전자의 homolog증폭 및 분리 - 증폭된 homolog들의 DNA염기서열 비교분석

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
구 분 (2001)	연구개발목표 생합성 유전자의 검출법 개발	연구개발 내용 및 범위 1. Fumonisin독소 생성곰팡이의 유전변이분석 - 독소생합성유전자를 이용한 genomic DNA blot 분석 2. Trichothecene생합성 유전자 비교분석 - DON과 NIV생합성 유전자군의 구조 비교분석 3. 곰팡이바이러스의 유전자 분리 - 얻어진 dsRNA 들을 크기별로 분리하여 순화 - 각각의 순화된 dsRNA 바이러스의 특성조사 4. 곰팡이바이러스의 게놈분석 - 각 dsRNA를 5'과 3' RACE를 이용하여 끝부분의 염기서열 확인 - 확인된 염기서열을 이용하여 전체 게놈을 cloning 하고 각각의 cloning된 DNA 의 염기서열 확인 5. PCR을 이용한 Fumonisin 생합성 유전자의 검출법 확립 - DNA염기서열이 비교분석된 Fumonisin생합성 유전자들로부터 degenerate primer제작 - 제작된 primer와 여러조건의 PCR를 이용하여 각 분류군의 균주로부터 Fumonisin생합성유전자의 증폭시도 6. PCR을 이용한 Trichothecene 생합성 유전자의 검출법 확립 - DON과 NIV 생성유전자들 사이의 특이적인 DNA 염기서열 선발 및 degenerate primer제작 - 여러조합의 primer pair와 다양한 PCR조건을 이용하여 각 Trichothecene에 특이적인 DNA band

1. Trichothecene 생합성 유전분석을 위한 항생제 내성 형질전환 균주 개발 - DON과 NIV생성균주의 Hygromycin B와 Geneticin에 대한 내성 형질전환체 선발 2. 내성균주간의 교배를 통한 Trichothecene 생성 능에 관한 유전분석 - DON과NIV 생성균주 교배 및 자손균주 독소분석 3. 유전자 조작을 통한 곰팡이벡터 개발 - Cloning된 곰팡이 바이러스의 복제에 필요한 최소 sequence 확인 4. PCR을 이용한 붉은곰팡이균주의 독소 생성능 측정 및 분석	구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
- 개발된 PCR검출법을 이용하여 유전변이분석을 마친 균주들로부터 독소 생합성 유전자의 증폭 - DNA증폭여부 및 증폭양상과 독소 생성능과의 상관관계분석 5 PCR을 이용한 곡물에서 독소생성균 오염조사 - 보리와 옥수수시료의 genomic DNA로부터 개발된 PCR 방법을 이용하여 곰팡이의 독소 생합성 유전자검출 - 곡물시료로부터 붉은 곰팡이독소의 자연발생분석		생합성 억제	내성 형질전환 균주 개발 - DON과 NIV생성균주의 Hygromycin B와 Geneticin에 대한 내성 형질전환체 선발 2. 내성균주간의 교배를 통한 Trichothecene 생성 능에 관한 유전분석 - DON과NIV 생성균주 교배 및 자손균주 독소분석 3. 유전자 조작을 통한 곰팡이벡터 개발 - Cloning된 곰팡이 바이러스의 복제에 필요한 최소 sequence 확인 4. PCR을 이용한 붉은곰팡이균주의 독소 생성능 측정 및 분석 - 개발된 PCR검출법을 이용하여 유전변이분석을 마친 균주들로부터 독소 생합성 유전자의 증폭 - DNA증폭여부 및 증폭양상과 독소 생성능과의 상관관계분석 5 PCR을 이용한 곡물에서 독소생성균 오염조사 - 보리와 옥수수시료의 genomic DNA로부터 개발된 PCR 방법을 이용하여 곰팡이의 독소 생합성 유전자검출

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 국내 · 외 관련기술의 현황과 문제점

Fusarium곰팡이독소에 대한 연구는 국제적으로 활발하게 진행됨에도 불구하고 국내에서는 그 중요성과 심각성을 크게 인식하고 있지 않은 실정이다. 국내에서는 새로운 Fusarium독소의 분리와 구조의 동정, 세포 및 분자수준에서 독성기준과 중독증과의 관련성에 대한연구가 진행되어 왔으나 무엇보다도 표준독소의 미비, 독 소의 정제 및 정량의 어려움. 분석기기의 미비, 안정성, 전문인력의 부족 등으로 연 구에 큰 진전이 없었다. 특히 국내의 곰팡이독소 오염 측정기술은 선진외국과 비교 하여 낙후되어있으며 그중 독성곰팡이의 검색과 독소의 자연발생을 연관하여 연구 하는 전문인력이 부족하여 곡물의 종류나 산지에 따라 어느 종류의 독소를 측정할 것인지의 기초 자료가 축적되어 있지 않은 실정이다. Fusarium독소의 연구는 미국 과 일본을 중심으로 전 세계 많은 국가들이 관심을 갖고 활발하게 연구를 진행하 고 있다. 미국의 경우에 USDA, FDA, 및 대학 등이 관련되어 집중적이며 심도있 는 연구를 하고 있다. 이들의 주요연구를 종합하면 크게 세 개의 분야로 나눌 수 있다. 첫째는 *Fusarium*병 저항성작물의 육종이 어렵기 때문에 독소생성과 병원성 과의 상관관계를 이용하는 분자육종과 병 방제에 생물적 방제를 시도하고 있는 연 구 분야이다. 둘째는 Trichothecene과 Fumonisin의 독성에 관한 연구이다. 아직 알려지지 않았지만 Fumonisin의 Fumonisin의 독성기전의 규명은 shingolipids와의 구조유사성에 착안한 shingolipids대사억제가 가장 설득력있는 독 성작용의 기전일 것으로 추정된다. 셋째 연구의 관심은 효율적인 독소 검출 및 제 독 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 독소를 손쉽고, 신속, 정확하게 검출하는 방법을 개발하는 것이다. 본 연구개발과 직접 관련하여 본 연구진은 우 리나라에서 생산되는 곡물에서 발생하는 *Fusarium*속의 균학적 분류체계를 정립하 여 왔으며 독성균주가 생성하는 독소의 분리와 동정에 관한 연구를 수행하여 오고 있다.

제 2 절. 앞으로 전망

우리나라에서 생산되는 옥수수나 보리의 생산량은 소비량에 훨씬 못 미치고 있

으나 이 두 작물은 쌀과 더불어 중요한 식량자원 작물임을 부인할 수 없다. 현재 농가에서는 수확 후 정선과정 중 곰팡이에 오염된 곡물이 일부 선별하고 있으나 오염된 곡물을 폐기하지 않으며 가축의 사료로 사용하고 있다. 곰팡이독소에 대한 지도행정은 농가의 가축생산성과 직결되어 있는 과제로 생각된다. 국제적으로는 미국의 FDA나 USDA등이 우선적으로 서두르면서 매우 신중하게 접근하고 있는 과제는 Fumonisin의 허용기준치 설정으로 보여 진다. 이 허용기준치에 따라서 국 제곡물시장에서 폐기되어야 할 독소에 오염된 옥수수 및 옥수수관련 식품과 가축 사료의 물량이 미치는 과장은 심각할 것으로 예상된다. 이에 따른 우리나라와 같이 곡물수입국으로서는 양질의 곡물수입대책이 주요 관건이 될 수 있다. 또한 Trichothecene 중 DON의 경우 미국 캐나다 등에서는 식품원료로 쓰이는 밀에서 1-1.1 ppm의 가이드라인기준을 설정하여 운용하고 있다. NIV의 오염이 더 문제가되고 있는 우리나라에서는 농산물의 NIV와 DON 오염에 대한 가이드라인 설정을 재고할 때이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구의 이론적, 실험적 수행 방법

1. 붉은 곰팡이 독소 생성능의 유전적 변이분석

가. 균분리 및 독소 분석 (제 1세부과제)

Fusarium속 균이 생성하는 곰팡이독소는 옥수수에서는 Fumonisin과 Trichothecene이 주종을 이루고 있으며 보리에서는 Trichothecene이 자연발생 되고 있다. Fumonisin은 Fusarium moniliforme에 의해서 생성되고 Trichothecene은 Fusarium graminearum에 의해서 생성된다. 제1 세부과제에서는 1998년도 남부지방에서 생산된 보리와 강원도산 옥수수로부터 Fusarium균을 분리하여 곰팡이독소의 생성능을 측정하며 이를 토대로 국내산 독성 균주들의 유전변이분석을 수행하고자 한다. 우선 옥수수와 보리로부터 Fusarium균을 분리하여 Nelson 등(1983)의방법에 따라 종까지 동정한다. Fusarium moniliforme 균주의 Fumonisin 생성능을 Sydenham 등(1990)의 방법에 따라 측정하며 Fumonisin 생성균주들의 mating population을 결정하여 균학적인 특성을 규명한다. Fusarium graminearum 균주들의 Trichothecene 생성능을 Tanaka 등(1985)의 방법에 따라 측정하여 DON 생성형과 NIV 생성균주를 선발 및 확보한다.

나. 독소생성능의 유전적 변이분석

1) Fumonisin

Fumonisin생합성유전자로 알려진 여러 Fum유전자를 probe로 이용하여 각 mating population에 속한 G. fujikuroi 균주의 게놈 DNA를 탐색함으로써 균주들의 유전 변이를 분석한다. 이때 probe와 게놈 DNA간의 염기서열 유사도 차이로 hybridization band가 뚜렷이 나타나지 않을 경우 각 mating population에서 유래한 Fum 유전자조각으로 같은 DNA blot을 여러 번 탐색한다. 한편 독소 생합성

유전자군을 포함하고 있는 cosmid clone을 probe로 하여 여러 mating population 균주들의 게놈을 분석함으로써 Fumonisin 생합성 관련 유전자군의 보존 양상과 mating population 및 균주간 변이를 분석한다.

G. fujikuroi 집단의 변이는 개별 Fum 유전자 및 전체 유전자군을 probe로 사용하는 DNA blot 방법으로, F. graminearum 집단의 변이는 Tri 유전자에서 유래한 primer를 이용하여 분석한다.

2) Trichothecenes

협동연구에서 얻어진 Trichothecene 생합성 유전자의 특성을 토대로 DON과 NIV 생합성 유전자군의 구조를 비교 분석한다. F. graminearum군의 Trichothecene 생합성 유전자군에 속하는 유전자 중 Tri7의 염기서열이 두 독소 생성형 대표균주 사이에서 가장 뚜렷한 차이를 보였다. 또한 최근 Trichothecene 생합성 유전자 중 Tril3 이라는 새로운 Tri 유전자의 DNA 염기서열이 T-2 독소 생성 F. sporotrichioides 와 DON 생성 F. graminearum 사이에서 크게 차이가 나는 것이 밝혀졌다. 따라서 Tri7 유전자와 더불어 Tri13 유전자도 DON과 NIV 생성형 균주 사이에서 차이가 나는 지를 두 독소 생성형의 대표균주를 이용하여 결정한다. 이를 기초로 하여 DON과 NIV 생성형 F. graminearum 균주 집단사이 에서 *Tri7*과 *Tri13* 유전자의 차이를 PCR 방법으로 분석한다. 그리고 이러한 두 독 소 생성형간의 Tri 유전자변이가 균주 집단에 공통적으로 보존되어 있는지를 조사 한다. 이를 토대로 최소한 각 독소 생성형에 속하는 균주들의 게놈으로부터 *Tri7*과 Tril3 유전자 조각을 증폭하여 그 증폭양상을 분석하고 필요할 경우 증폭된 DNA 조각을 분리하여 염기서열을 밝혀 독소 생성형간 또는 균주간의 변이를 분석한다. 주 집단과 F. graminearum의 DON 및 NIV 생성형에 속하는 균주 집단의 유전변 이를 분석한다.

2. 곰팡이 바이러스를 이용한 독소 생성억제 벡터개발 (제 2 세부과제)

가. 바이러스 게놈의 cloning

바이러스를 함유하고있는 F. graminearum을 액체배지에서 대량으로 배양한다. 배양된 균사체에서 전체 RNA를 분리하고 분리된 RNA를 agarose gel에서 게놈의 크기별로 분리시킨다. 분리된 각 dsRNA를 순화하여 게놈 분석에 이용한다. 순화된 각각의 dsRNA를 oligo dT 또는 ramdom nucleotide primer를 이용하여 클로닝하고 이를 E. coli에 형질전환하여 DNA를 대량으로 추출하여 염기분석에 이용한다. dsRNA의 말단 부분은 poly A polymerase와 terminal transferase를 이용하여특정 primer가 결합하게 전환하여 (RACE 방법) 클로닝하고 상기 명시된 방법과동일하게 염기분석에 이용한다.

나. 바이러스 계놈의 분석

성공적으로 cloning이 진행된 각각의 clone을 제한효소를 이용한 mapping과 sequencing등을 이용하여 분석한다. 기존에 보고된 다른 곰팡이 바이러스들과의 염기서열과 아미노산서열 등을 DNA STAR program을 이용하여 비교분석하고 이들의 분류학적 위치나 연관관계 등을 파악한다. 또한 염기서열 분석에 의해 곰팡이바이러스 게놈에 위치한 유전자들의 분자 생물학적인 특성도 조사한다.

다. 곰팡이 바이러스의 유전자 분리 및 게놈 분석

얻어진 곰팡이 바이러스 clone에 곰팡이에서 발현될 수 있는 promoter를 연결하여 바이러스를 함유하고있지 않는 곰팡이 균주에 형질 전환하여 바이러스가 발현되고 중식하는지를 확인한다. 중식형 바이러스 clone을 이용하여 이에 첨가할 수 있는 외래 유전자의 제한요인 (첨가할 수 있는 유전자의 크기, 사용될 marker 등)을 확인한다.

3. 생명공학기법을 이용한 붉은 곰팡이 독소 검출기법개발 (협동과제)

가. 독소 생합성 유전자 특성규명

협동과제는 Fumonisin과 Trichothecene의 생합성 유전자특성에 관한 연구를 수행한다. Fumonisin의 생합성에 중요한 역할을 하는 유전자로는 Proctor (1999) 등에 의해 G. fujikuroi mating population A 균주로부터 polyketide synthase (PKS) 유전자 (Fum5)가 분리되었다. 한편 Fum5 유전자는 Fumonisin 생합성에 필요한다른 여러 유전자와 가깝게 위치하여 하나의 유전자군(Gene cluster)을 이루고 있는 것으로 추측된다. 따라서 Fumonisin을 생성하는 Gibberella/Fusarium 속 곰팡이는 모두 이 유전자군을 가지고 있을 것으로 예상된다. 하지만 Fum5 유전자의일부를 probe로 이용한 최근의 예비실험결과 곰팡이내 Fumonisn 생성 PKS 유전자의 존재유무는 Fumonisin 생성여부와 직접적인 관련이 있었으나 균주들의 분류학적 변이에 따라 유전자의 DNA염기서열과 유전자군의 구조에도 변이가 있을 수있음이 간접적으로 증명되었다. 따라서 본 연구에서는 이미 밝혀진 Fum5 유전자의 특성을 토대로 Fumonisin 생성 여부 및 생성량에 차이가 있는 여러 분류군 (mating population)의 G. fujikuroi의 Fum5 유사유전자 (homolog)를 분리하고 그들간의 DNA염기서열 변이를 밝히고자 한다.

- 1) 제 1세부과제에서 분양받은 붉은곰팡이균주를 GYEP 액체배지에서 배양한 후 Wirsel 등의 방법으로 균체에서 genomic DNA를 추출한다.
- 2) Fum5의-ketoacyl synthase (KS) 부분으로부터 degenerate primer를 만들어 추출된 각 균주의 genomic DNA로부터 Fum5 의 homolg를 Arie 등이 사용한 PCR 방법으로 증폭한다.
- 3) 중폭된 DNA 절편들은 pCR2.1 vector (Invitrogen 사)에 삽입, 분리 (cloning) 한다.
- 4) 분리된 DNA 절편의 염기서열은 결정한다. 또한 *Fum5* 유전자외에 Fumonisin 생합성 유전자군에 있는 다른 유전자들 (예: *Fum6*)의 특성이 점차 규명되는대로 각각의 homolog도 분리. 비교 분석한다.

Trichothecene 생합성 유전자의 특성규명연구에서는 *F. sporotrichioides* 와 *F. graminearum* 에서 이미 분리된 trichodiene synthase 유전자 (*Tri5*)의 DNA 염기서열을 비교하여 degenerate primer를 만들어 이 primer를 이용하여 제 1 세부과 제에서 분양 받을 NIV 독소 생성 *G. zeae* 균주의 genomic DNA로부터 *Tri5* homolog 를 분리하고 DNA 염기서열을 분석한다. *Tri5*외에 독소 생성 유전자군에 있는 다른 유전자들의 homolog도 분리하여 그들의 DNA 염기서열을 포함한 여러

특성을 기존의 유전자들과 비교 분석한다.

나, 독소검출법 개발

1) PCR를 이용한 Fumonisin 생합성 유전자의 검출방법 확립

G. fuiikuroi mating population A 와 D 균주로부터 분리한 Fum5 유전자 조각 의 DNA 염기서열을 DNASTAR사의 MegAlign program을 이용하여 비교한 다음 두 mating population에 특이적인 DNA 염기서열을 찾는다. 한편 1년차 결과에 의 해 G. fujikuroi의 다른 mating population (B, C, E, F)은 Fum5의 homolog를 가 지고 있지 않거나 DNA염기서열 유사도가 매우 낮은 homolog를 가지고 있는 것으 로 예상되기 때문에 본 연구에서 제작될 primer로는 이들 mating population에 속 하는 균주들이 검출되지 않을 것이다. 따라서 이들 균주들의 검출을 위해 Fumonisin 생합성 유전자군의 다른 유전자나 이웃 유전자의 염기서열을 분석한다. 1년차 결과에 의하면 MP-F의 균주들은 mating population A나 D 균주들과 달리 Fum5 유전자를 가지고 있지 않으나 Fumonisin 생합성 유전자군의 다른 유전자 (Fum7부터 Fum11까지) 들의 homolog는 가지고 있다. 이들 유전자의 게놈 내 존 재가 MP-F 균주뿐 아니라 다른 mating population 균주에서도 보존되어 있다면 그들 유전자 중 하나를 각 균주에서 증폭하여 염기서열을 비교한 후 각 mating population에 특이적인 primer를 제작한다. 한편 Fum6 유전자 homolog도 MP-D 균주의 게놈으로부터 증폭 내지 분리를 계속 시도하여 특이적인 primer를 제작한 다.

2) PCR를 이용한 Trichothecene 생합성 유전자의 검출방법 확립

Fumonisin의 경우와 마찬가지로 1년차에서 얻어진 Trichothecene 생합성 유전 자군의 *Tri* 유전자의 DNA염기서열을 이용하여 DON과 NIV에 특이적인 PCR용 primer 조합을 선발하여 PCR을 시도한다.

3) 곡물시료에서 PCR를 이용한 독소 생합성 유전자의 검출방법 확립

1년차 연구에서 얻어진 독소 생합성 유전자의 DNA염기서열을 비교 분석하여 G. fujikuroi의 각 mating population에 속하는 균주와 F. graminearum의 DON 및 NIV 생성형 균주를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR용 primer와 PCR 조건을 확립한다. Fumonisin 생합성 균주의 특이적인 검출을 위해 Fum5와 Fum6 유전자를, Trichothecene 생합성 균주의 검출은 주로 Tri7과 Tri13 유전자의 염기서열을 이용한다. 확립된 PCR 검출법을 이용하여 보리와 옥수수 시료의 게놈 DNA로부터 붉은곰팡이 독소에 특이적인 DNA 조각을 증폭한다. PCR 결과 증폭양상에 따라 곡물내 오염가능성이 있는 붉은곰팡이의 종류와 자연발생가능한 독소를 예측한다.

제 2 절. 연구수행 내용 및 결과

1. 붉은 곰팡이 독소 생성능의 유전적 변이분석 (제 1 세부과제)

가. 시료 수집

1999년도 및 2000년도 10월 하순에 옥수수 재배지역인 강원도를 중심으로 시료를 수집하여 Fusarium균을 분리하였다. 또한 남부 지방에 1998년도 붉은 곰팡이병에 이병된 보리시료를 공시하여 Fusarium균주를 분리 하였다. 각 시료는 약 500g씩 채집하여 비닐백에 넣어 채집하였다.

나. Fusarium균위 분리 및 보관

옥수수나 보리의 낟알을 멸균된 핀셋을 이용하여 삼각플라스크에 담은 후 1% sodium hypochlorite용액에 3분간 침지하여 표면 살균하였다. 표면소독된 낟알들은 감자한천배지 (PDA)에 5-7개씩 치상하여 25℃에서 배양하였다. 2-3일 후 낟알로부터 균사가 자라기 시작하면 다시 complete medium (CM)에 옮긴 후 25℃에서 배양하여 단포자 분리를 수행하였다. 이들 균주를 CM사면배지에 배양한 후 1 ml의 15% 글리세롤을 첨가하여 포자현탁액을 조제한 후 살균된 vial에 넣고 -80℃에

보관하였다. 분리 균주 수는 옥수수에서 298균주, 보리에서 172균주를 분리하여 총 470균주를 분리하였다(표 1).

표1. 옥수수와 보리에서 Fusarium균주의 분리

곡류	총분리균주수	F.graminearum	F. sporochioides	F. moniliforme	Others
옥수수	298	152	21	118	7
보리	172	160	5	0	7
합 계	470	312	26	118	14

다. 분리 균주의 동정

각 균주의 종을 동정하기 위하여 PDA와 당근배지에 접종하여 균총의 색깔과 포 자 모양을 관찰하여 Nelson등의 방법에 따라 분류하였다.

F. graminearum (Gibberella zeae)은 PDA상에서 빠르게 생장하고 공중균사를 형성하며 carmine-red색을 띄었다. 당근배지에서 자낭각과 자낭포자를 형성하였다. 또한 소형분생포자를 형성하지 않았으며 대형분생포자는 2-6개의 격막을 갖고 낫모양을 하고 있었다.

F. sporotrichioides는 PDA상에서 생장이 빠르고 오랜지색의 균총을 띄었다. 당근 배지에서는 자낭각을 형성하지 않았으며 대형분생포자와 소형 분생포자를 모두 형성하였다. 특히 소형분생포자는 격막이 0-1개를 갖고 난형 또는 서양배 모양을 하고 있었다.

F. moniliforme는 PDA상에서 생장이 빠르고 가끔 자주색을 띄고 있었으며 균총은 오랜지색을 띄었다. 당근배지에서 소형 및 대형분생포자를 형성하였으며 소형분생포자는 난형이고 사슬을 이루고 있었다.

라. F. moniliforme 균주의 Fumonisin생성능 측정 및 mating population 결정

Mating population을 결정하기 위하여 각 균주를 당근배지에 접종하여 2주간 배양한 후 미국 캔사스 주립대학에서 분양받은 테스터 균주들의 소형분생포자와 균사현탁액을 옥수수로부터 분리한 균주들이 자라고 있는 당근배지에 부었다. 이후 2-3주간 배양하면서 자낭각과 자낭포자의 형성유무에 따라 mating population을 결정 하였다. 118균주 중 104균주가 MP-A균주이었고 13균주가 MP-D, 그리고 1 균주가 MP-F로 나타나 우리나라 옥수수산지에 분포하고 있는 F. moniliforme균주들은 주종이 MP-A임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 북미의 옥수수산지에 분포하는 F. moniliforme균주의 mating population양상과 아주 비슷하다.

F. moniliforme균주를 각각 쌀 배지에 25℃에서 3주간 배양한 후 Sydenham 등의 방법에 따라 Fumonisin을 추출 하였으며 분석은 추출물에 OPA를 반응 시킨후 HPLC에 주입하여 분석하였다. 분석한 118 균주 중 113균주가 Fumonisin을 생성하였으며 5균주는 생성하지 않았다. Fumonisin Bi, B2, B3의 유도체 중 B1의 생성량이 가장 높았으며 0.2-1130 ppm 수준으로 생성되었다. MP-A 104균 중 100 균주가 Fumonisin을 생성하였고 MP-D에 속하는 13균주는 모두 Fumonisin생성능을 갖고 있었다 (표 2).

표2. F. moniliforme의 Fumonisin독소 생성과 mating population

Mating type	Positive	Fumonisin(μ g/g)		
Mating type	/Total	FB1	FB2	FB3
ă.	100/104	263	92	47
A		(0.2-948)	(0.1-374)	(0.1-556)
D	13/13	499	147 ·	28
D		(11-1130)	(11-304)	(0.1-8.3)
F	0/1	ND	ND	ND

이상의 결과를 종합하면 옥수수에서 분리한 *F. moniliforme*균주들은 대부분이 Fumonisin의 생성능이 있는 균주들이어서 이들이 포장에서 옥수수에 병을 일으키게 되면 옥수수에 독소의 오염 가능성이 높음을 시사한다. Fumonisin은 현재 미국

FDA에서 발암물질로 지정되었기 때문에 향후 농산물에서 이 독소의 오염은 곡물의 안전성에 크게 영향을 미칠 것으로 생각된다.

마. F. graminearum균주의 Trichothecene생성능 측정

F. garminearum균주를 각각 쌀배지에 25℃에서 3주간 배양한 후 Tanaka (1985) 등의 방법에 따라 Trichothecene을 추출하였으며 TMS를 반응시켜 GC-MS를 사용하여 분석하였다. 보리로부터 분리한 160균주의 독소 분석 결과 153균주가 nivalenol (NIV)과 4-acetylnivalenol을 생성하였고 7균주는 deoxynivalenol (DON)과 acetyldeoxynivalenol을 생성하여 우리나라 남부지방에서 생산되는 보리기원 균주들은 nivalenol 생성형임을 알 수 있었다. 또한 옥수수에서 분리한 152균주의 독소 생성능은 144균주가 DON생성균주 이었고 NIV생성균주가 8균주이었다. 그림 1과 2는 각각 DON과 NIV 생성균주의 SIM크로마토그램이다. 이상의 결과는 우리나라에서 분포하는 F. graminearum균주들의 독소생성양상이 지역별로 서로 다르게 분포하고 있다는 것을 나타낸다. 이러한 현상은 미국을 비롯한 북미 지역에 분포하는 F. graminearum균주와는 커다란 차이를 나타내고 있다.

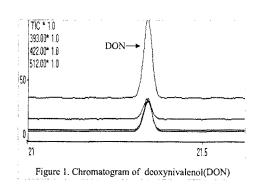
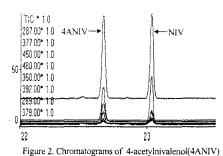


그림1.DON생성균주의 SIM 크로마토그램



and nivalenol(NIV)

그림2. NIV생성군주의 SIM 크로마토그램

바. Trichothecene 생합성 F. graminearum 균주의 유전변이

1) F. graminearum 균주집단내 Tri13 유전자의 변이

Trichothecene 독소 중 DON과 NIV를 생성하는 균주의 두 집단이 우리나라에 분포하기 때문에 이들 각각의 생합성 유전자를 비교분석할 경우 독소 생성능의 결정요인을 알 수 있을 것으로 기대 되어 *Tril3* 유전자의 변이를 조사하였다.

2) Tri13 유전자의 변이 분석

최근 본 연구진에 의해 Trichothecene 생합성 유전자 군에 존재하는 *Tri13* 유 전자가 DON과 NIV 생합성의 차이를 결정하는 유전요인으로 밝혀졌다. 이에 따라 DON과 NIV를 생성하는 대표균주로부터 Tril3의 염기서열을 분석하였다 우선 T-2 toxin의 Trichothecene을 생성하는 F. sporotrichioides 균주의 Tril3 유전자 염기서열에서 유래한 degenerate primer를 이용하여 88-1 균주와 DON 생성 H-11 균주, F. sporotrichioides 게놈 DNA으로부터 Tril3유전자의 homolog 들을 각각 증폭하여 DNA 염기서열 및 유전자군 내 구조를 규명하였다. 실험 결과, Tri13 ORF는 Trichothecene유전자군 중 Tri12의 upstream에 위치하고 있었으며 88-1과 F. sporotrichioides사이의 Tril3 유전자 DNA 염기서열과 아미노산 서열 유사도는 각각 78%와 80%이었다. 한편 DNA 염기서열 유사도는 H-11의 경우 88-1과 F. sporotrichioides와 비교하였을 때 각각 65%와 61%이었다. 특히 이들 3 균주, 즉 F. sporotrichioides, 88-1, H-11 균주의 Tril3 유전자 DNA 염기서열을 비교한 결 과 그림 3과 같이 DON 생성 H-11 균주의 Tril3 유전자에서 여러 돌연변이 (nucleotide substitutions and deletions) 가 발견되었으며 이들로 인해 Tri13 단백 질의 amino acid 서열에 큰 변화 (frameshifts)가 생겨 더 이상 88-1과 F. sporotrichioides Tri13 단백질의 amino acid 서열과는 유사도가 없었다. 이러한 현 상은 다른 균주들로 부터 *Tri13* 유전자의 DNA염기서열을 분석하였을 때도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 DON을 생성하는 H-11에서는 *Tri13* 유전자의 기 능이 없다고 결론을 내릴 수 있다. Trichothcene을 생합성에 관여하는 유전자군 중 Tri13과 Tri7 유전자가 DON 생성균주에서는 기능을 잃었다고 추측된다. 따라서 이들 두 Tri 유전자를 이용하면 두 독소의 생성형을 PCR 반응으로 쉽게 검출할 것으로 기대된다. 이를 위해 기기분석을 통해 독소생성형이 결정된 300여 주의 F. graminearum 균주들을 PCR 반응으로 분석하였다 (협동연구 결과 참조).

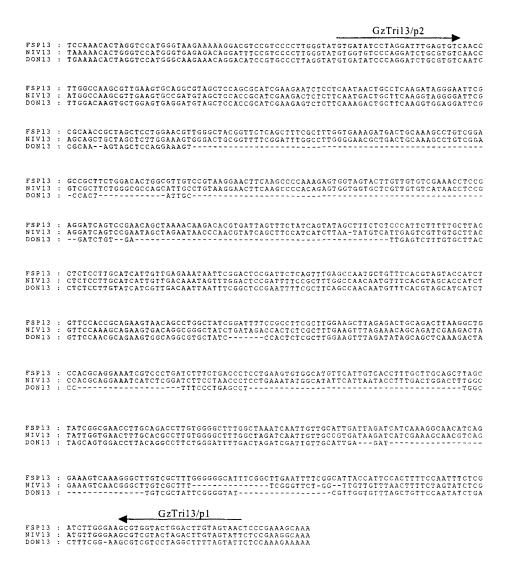


그림 3. DNASTAR 프로그램의 Clustal방법을 이용한 *Tri13* 유전자 염기서열의 정렬분석. 전체 Tri13 ORF중 5' 과 3' 일부가 빠졌으며 염기서열의 방향은 5' 에서 3' 이다. FSP13, Fusarium sporotrichioides Tri13; NIV13, NIV 생성 G. zeae 균주 88-1의 Tri13; DON13, DON 생성 F. graminearum 균주 H-11의 Tri13. GzTri13/p1 과 GzTri13/p2는 DON과 NIV 간의 염기서열차이를 이용하여 이 둘을 구분하기 위한 PCR 분석용으로 제작된 프라이머의 위치와 방향을 나타낸다 (협동연구결과 참조).

3) F. graminearum 균주 집단내 Tri 유전자군의 polymorphism

우리나라 F. graminearum 균주 집단내 Tri 유전자군의 변이를 조사하기 위하여 Tri5 유전자를 이용한 게놈 DNA blot 분석과 협동연구에서 얻어진 Tri7 및 Tri13 유전자의 증폭양상을 비교하였다. Tri5 는 DON과 NIV생성형 균주 모두에서 초기 Trichothecene생합성 과정에 필수적인 유전자이다. 따라서 Tri5를 이용하여 균주 집단내 독소생성형에 따른 독소생합성 유전자군의 변이 여부를 조사할 수 있었다. H-11 균주의 Tri5 유전자 일부 (0.6kb) 를 PCR로 증폭한 후 probe로 사용하여 협동연구에서 사용된 총 167균주의 게놈 DNA를 탐침하였다. 실험 결과 Tri5 probe와의 hybridization 양상이 독소생성형과 거의 일치하였다. 그림 4와 같이 MseI으로 절단된 균주의 게놈 DNA 중 NIV생성균주는 2.2kb의 절편이 probe와 반응을 하였으나 DON 생성균주는 1.8 kb의 band를 나타내었다.

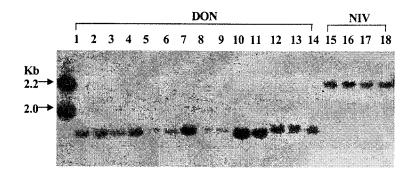


그림4. 계놈 DNA gel blot 분석에 의한 *F. graminearum Tri5* 유전자 부위의 변이. lane 1-9: 미국 DON 균주, lanes 10-14: 우리나라 DON 균주, lanes 15-18: 우리나라 NIV 균주

사. Fumonisin 독소 생성 곰팡이의 유전변이 분석

1) Fum5 유전자를 이용한 DNA gel blot 분석

대표적인 Fumonisin 생성 *G. fujikuroi* 균주 집단의 유전변이 분석을 위하여 협동 연구에서 시도한 DNA gel blot 분석을 150여 균주를 대상으로 수행하였다. hybridization을 위해 전년도 연구에서 사용한 650 bp 크기의 MP-A 균주의 *Fum5* 유전자 절편 (FA5)과 2.6 kb 크기의 MP-D 균주의 *Fum5* 절편 (FD5)을 probe로 사용하였다. 조사 균주의 게놈 DNA를 *Eco*R I 또는 *HindIII* 로 절단한 후 ³²P로 표지된 FA5 또는 FD5로 탐침을 하였다. 그림 5A와 같이 MP-A 균주들의 게놈

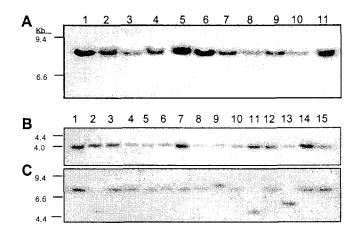


그림 5. *G. fujikuroi* MP-A와 MP-D 균주에서 *Fum5* 유전자 부위의 변이. probe: FA5, A) *Eco*RI 절단 MP-A 균주 게놈 DNA, B) *Eco*RI 절단 MP-D 균주 게놈 DNA, C) *Hind*III 절단 MP-D 균주 게놈 DNA

DNA는 EcoRI으로 절단되었을 때 모두 FA-5 probe와 hybridization 하여 8.5 kb 크기의 단일 band를 나타내었다. 하지만 EcoRI 으로 절단된 MP-D 균주들의 게놈 DNA에서는 4.0 kb 크기의 단일 hybridization band가 나타났지만 균주 간의 band 크기에 약간의 차이가 발견되었다(그림 5B). 이러한 변이를 좀 더 조사하기 위해 같은 게놈 DNA를 HindIII로 자른 후 FA5 probe로 탐침한 결과 균주간의 hybridization 변이를 관찰할 수 있었다. 한편 FA5 probe가 MP-D 균주들의 게놈 DNA와 hybridization 할 때는 MP-A 균주들과의 hybridization에 비해 band의 intensity가 낮았다(그림 5C). 이는 MP-A 와 MP-D 균주 사이 hybridizationn band의 크기 차와 더불어 두 mating population 균주간의 Fum5 유전자 염기서열 차이를 나타내는 것이라 할 수 있다. 또한 FA5 또는 FD5의 probe는 MP-A 또는 MP-D 균주들의 게놈 DNA와만 반응하며 Fumonisin을 생성하지 않거나 소량만을 생성하는 다른 mating population 균주와는 hybridization을 하지 않는다는 것이 다

시 한 번 확인되었다. 이를 통해 서로 다른 mating population 간에는 Fum5 유전자의 존재 여부 혹은 변이에 많은 차이가 있는 것으로 추측된다.

2) Fum 유전자 군을 이용한 G. fujikuroi 균주 집단의 변이 분석

G. fujikuroi 균주 집단 내에서 Fum5와 Fum6를 포함한 다른 Fum 유전자의 변이를 분석하기 위해 MP-A, MP-D, MP-F 균주들의 게놈 DNA를 7 개의 Fum 유전자 (Fum7, Fum8, Fum11, Fum9, Fum10, Fum5, Fum6)가 포함된 cosmid clone인 16-1을 probe로 탐침하였다. 실험 결과 mating population 간 Fum 유전자

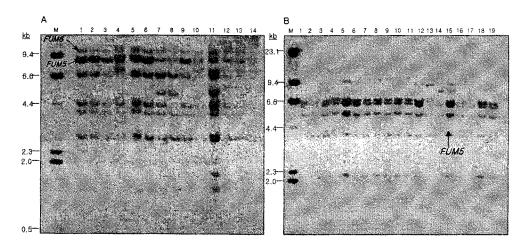


그림 6. EcoRI 절단 MP-A (A)와 MP-D (B) 균주 계놈 DNA의 gel blot. probe: cosmid clone 16-1.

염기서열의 상동성 차이에도 불구하고 각 mating population 균주들 마다 6-8 개의 여러 hybridization band들이 나타났다. 그림 6, 그림 7 과 같이 mating population 내에는 Fum 유전자군의 변이가 크게 나타나지 않았으나 mating population 사이의 hybridization pattern에는 뚜렷한 차이를 관찰할 수 있었다. 또한 1년차 연구에서 제시되었던 MP-F 에서 Fum5와 Fum6 유전자외 다른 Fum 유전자의 보존이 확인되었다. 결국 Fum5 인근 유전자들은 3 개의 mating population내에서 잘 보존 되어있으나 G. fujikuroi가 각 mating population으로 분화되면서 mating population에 특이한 변이 구조를 갖게 되었다고 추측할 수 있다.

또한 Fumonisin 생합성에 필수적인 Fum5와 Fum6 유전자의 존재 유무에 의해 Fumonisin 생합성 여부가 결정됨을 다시 한번 확인할 수 있었다.

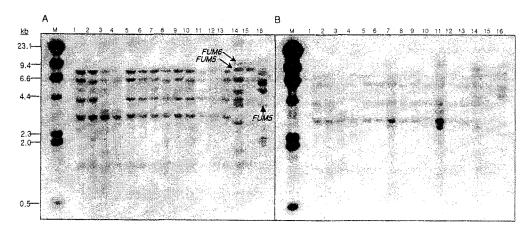


그림 7. *Eco*RI 절단 MP-F 균주 게놈 DNA의 gel blot. (A) probe: cosmid clone 16-1, (B) cosmid clone 6B, lanes 1-13, MP-F 균주, lanes 14-15: MP-A, lane 16: MP-D

아. F. graminearum 의 교배에 의한 자손균주의 독소생성능 변이분석

불은곰팡이 F. graminearum 의 Trichothecene 독소 생성 변이를 유전적으로 분석하기 위해 DON 생성형 균주와 NIV 생성형 균주사이의 교배를 시도하였다. 실제로 F. graminearum 은 자가화합성으로 인해 부모균주간 유성교배의 결과인 유전자제조합 자손 (recombinant progeny)을 얻기 매우 어려웠다. 따라서 이를 극복하기 위하여 분자 표지인자를 이용한 교배를 시도하였다. 즉, 각 부모 균주의 게놈에 서로 다른 항생제 저항성 표지인자를 도입한 후 부모균주 사이의 교배를 통해생산되는 재조합 자손을 표현형의 변화를 통해쉽게 선발하고자 하였다. 이를 위해형질전환 방법을 이용하여 DON 생성 표준균주에는 hygromycin B 저항성 유전자, NIV 생성 표준균주에는 geneticin 저항성 유전자를 도입하였다. 그리고 각 형질전환체를 부모로 하는 교배를 여러 방법으로 시도하여 교배의 결과인 자낭각으로부터 두 가지 항생제에 모두 저항성인 자손을 선발한 후 자손 균주의 독소 생성형을결정하였다. 이를 토대로 독소 생성 변이에 관여하는 인자의 유전 변이를 분석하였다.

1). F. graminearum 의 형질전환

가) 형질전환용 벡터

붉은곰팡이의 형질전환에는 두 가지의 벡터 (pUCH1 과 pII99) 가 사용되었다. pUCH1은 미국 코넬대학교의 B. Gillian Turgeon 박사로부터 분양 받았으며, 곰팡이의 형질전환용 표지인자로 hygromycin B에 대한 저항성 인자 (hygB) 를 포함하고 있다. 그리고 hygB 유전자는 Cochliobolus heterostrophus 의 promoter 1에 의해 발현이 조절된다. pII99 는 일본 나고야 대학교의 Tsuge 박사로부터 분양 받았으며, 표지인자로 geneticin 에 대한 저항성 인자 (gen) 을 포함하고 있다. gen 유전자의 발현은 Aspergillus nidulans의 Trp 유전자 promoter에 의해 조절된다. 형질전환에 필요한 양의 벡터 DNA 를 얻기 위해 해당 벡터를 함유하고 있는 대장균을 대량 배양한 후 독일 Qiagen 사의 plasmid midi kit로 벡터를 추출・분리하였다.

나) 원형질체의 확보

곰팡이 형질전환에 필수적인 붉은곰팡이의 원형질체를 다음과 같은 방법으로 확보하였다. 우선 *F. graminearum* 의 분생포자 생성을 유도하기 위해 CMC 액체배지 (1.5% of carboxylmethyl cellulose, 0.1% of yeast extract, 0.05% of MgSO₄, 0.1% of NH₄NO₃, 0.1% of KH₂PO₄) 에 *F. graminearum* 의 균사가 포함된 agar block을 접종한 후 25℃에서 5 일간 진탕배양하였다. 생성된 분생포자는 CMC 배양액을 cheese cloth 에 걸러 회수하였다. 이때 분생포자의 농도는 10⁸/㎡ 정도이었다. 그 다음 분생포자로부터 어린 균사체를 얻기 위해 분생포자를 YPG 액체배지 (0.3% of yeast extract, 1% of peptone, 2% of glucose) 에 접종한 후 25℃ 에서 18 시간동안 진탕배양한 후 배양액을 8,000 X g 의 속도로 15분간 원심분리하여 어린 균사체를 회수하였다. 균사체로부터 원형질체의 형성을 유도하기 위한 적정 삼투압 안정제와 세포벽분해효소로는 여러 차례 걸친 예비실험 결과 각각 1M NH₄Cl 과 Driselase (Interspex 사)를 선발하였다. 회수된 어린 균사체를 10㎡ 의

1M NH4Cl 용액으로 washing을 한 후 80 ml 의 Driselase 용액 (10mg/ml) 에 옮겨 30℃ 에서 2 - 3 시간동안 배양하여 원형질체 형성을 유도하였다. 배양 후 현미경을 통해 원형질체 형성이 확인되면 배양액을 3000 X g 의 속도로 5 분간 원심분리하여 원형질체를 회수하였다. 원심분리후 얻은 원형질체 침전물을 삼투압 안정제로 2 번, STC 용액 (1.2M sorbitol, 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM CaCl₂) 으로 2번 washing 한 후 적당량의 STC 용액으로 녹여 최종 원형질체 농도를 1.0 X 10⁸/ ml 로 맞추었다.

다) 형질전환

위의 방법으로 얻어진 원형질체 $150\mu\ell$ 용액에 $20\mu g$ 의 원형 벡터를 첨가한 후 얼음에 10 분간 보관하였다. 그 다음 총 $1,200\mu\ell$ 의 PEG 용액 (60% polyethylene glycol: M.W. 3350, pH 7.5 of 10 mM Tris, 10 mM CaCl₂) 을 3 번에 걸쳐 (처음 두 번은 $200\mu\ell$ 씩, 세 번째는 $800\mu\ell$) 원형질체 용액에 천천히 첨가한 후 얼음에 15분간 보관하였다. 이와 같이 만들어진 원형질체 용액 $500\mu\ell$ 을 굳기 전 상태의 $10 \text{m}\ell$ 재생 agar 배지 plate (0.5% yeast extract, 0.5% casein enzymatic hydrolate, 1 M sucrose, 0.8% agar) 에 첨가하여 골고루 섞은 후 25% 에서 overnight 배양하였다. 다음날 $150\mu g$ 의 hygromycin B 또는 geneticin 이 포함되어 있는 $10 \text{m}\ell$ 의 1.0% agar 용액을 재생배지 plate 에 부어 굳힌 다음 형질전환체가 형성될 때까지 30%에서 배양하였다. 대부분의 경우 형질전환체는 배양 3-4 일째부터 형성되었다.

2) F. graminearum의 유성교배 (outcross)

가) 교배

위의 방법으로 DON 생성형인 Z03643 균주와 98-80-14 균주로부터 hygromycin B 저항성 형질전환체를, NIV 생성형인 88-1 균주로부터 geneticin 저항성 형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체는 1 번의 자가교배를 통한 유성생식과 5 번의 연속 배양을 통한 무성생식과정 동안 표지인자를 게놈 DNA에 안

정적으로 함유하고 있어 이 후 교배 실험에 사용하였다. 위의 두 형질전환체를 부모로 하는 교배는 다음의 두 방법으로 수행하였다. 먼저 부모 균주 중 하나를 당근 agar 배지에 일주일 동안 배양하였다. 그 다음 다른 한 균주의 분생포자를 회수하여 Tween 60 용액으로 10⁵/mℓ 의 농도로 맞춘 후 일주일 동안 당근 배지에서 배양된 균사체위에 떨어뜨린 후 유리막대를 이용하여 plate에 골고루 퍼지게 하였다. 그 다음 배지를 25℃에서 2 - 3 주 간 배양하여 자낭각의 형성을 유도하였다. 이경우 부모 균주 모두 자가화합성이기 때문에 당근배지 위에 무수히 많은 자낭각이

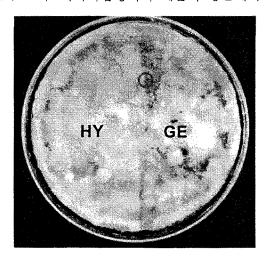


그림 8. DON 생성형 (hygB 저항성, HY) 과 NIV 생성형 (gen 저항성, GE) 균주사이의 유성교배 (outcross). 두 균주의 균사체가 접촉한 부위에서 형성된 자낭각을 화살표로 표시.

형성되지만 부모 균주간 유전적 재조합에 의해 형성된 자낭각을 선발하는 것은 불가능하였다. 또 다른 방법으로는 두 부모 균주를 당근 배지 plate의 양쪽 끝에 접종한 후 위와 같은 조건으로 일주일 동안 배양하였다. 그 동안 부모 균주의 균사체는 생장을 하여 당근 배지의 가운데 면에서 서로 접촉하게 되었다. 그 후 살균된 Tween 60 용액을 떨어뜨리고 도말하여 자낭각 형성을 유도한 후 같은 조건에서 2 - 3 주간 배양하였다. 이 경우도 첫 번째와 마찬가지로 자낭각이 당근배지 plate에골고루 형성되었지만 부모 균주가 접촉한 면에 형성된 자낭각 중 일부가 유성교배

에 의한 것임을 예상할 수 있었다 (그림 8).

나) 자손 균주의 선발

부모 균주 사이의 교배과정에서 유전적 재조합 (sexual recombination) 을 통해 생산된 자손균주를 hygromycin B 와 geneticin 이 모두 함유된 감자한천 배지 (PDA) 위에서 선발하였다. 먼저 교배를 통해 확보한 자낭각 10 여개를 Eppendorf tube로 옮긴 후 살균수로 washing하여 자낭각 주위에 있는 분생포자와 균사를 씻 어 제거하였다. 그 다음 pipette tip을 이용하여 자낭각을 부수어 자낭포자가 배출 되도록 한 후 두 항생제가 모두 함유된 PDA 배지 위에 도말하였다. 자낭포자가 골고루 퍼진 PDA 배지는 25℃에서 일주일 이상 배양하였다. 실제로 3일부터 PDA 배지 위에 균총이 형성되었다. 이들은 부모 균주 사이의 교배를 통해 부모 균주의 표지인자를 모두 함유한 재조합 자손 (recombinant progeny) 일 것으로 추측되었 다 (그림 9A). 이와 같은 방법으로 선발된 자손들의 항생제 저항성을 다시 한 번 확인하기 위해 이들 균사를 hygromycin B 함유 PDA 와 geneticin 함유 PDA 배 지에 동시에 접종하였다. 그림 9의 B, C와 같이 선발된 자손들은 모든 배지에서 정상적으로 생장하였다. 반면에 부모 균주는 함유하고 있는 표지인자에 따라 두 배 지 중 하나에서만 생장하였다. 이와 같은 방법으로 DON 과 NIV 생성형 균주간 교배를 통해 총 136 주의 자손균주를 확보하였다 (표 3 참조). 한편 이들 자손 균 주의 항생제 저항성을 게놈 수준에서 확인하기 위해 자손균주의 게놈 DNA를 Sall 제한효소로 자른 후 DNA gel blot을 만들어 각각 hygB 와 gen 유전자로 탐침하 였다. 그림 10과 같이 부모 균주 (lane 1 과 lane 2) 는 게놈에 합유하고 있는 표지 인자에 따라 gen 또는 hygB 중 한 유전자와 hybridization을 하였다. 반면에 자손균주들은 모두 두 탐침과 hybridization을 하여 자손균주들은 게놈에 두 표지인자 를 함께 함유하고 있음이 증명되었다. 더욱이 *hygB* 저항성 모균주 (lane 2)의 게놈 DNA에 존재하는 두 copy의 표지인자 중 한 copy가 특정 자손균주 (lane 3 과 lane 5) 에서는 발견되지 않아 표지인자가 유전적 재조합에 의해 자손균주에서 분 리가 되었음이 증명되었다. 이는 이들 자손균주가 부모균주 사이의 유전적 재조합 에 의해 생산되었음을 다시 한 번 입증하는 결과이다.

본 실험을 통해 서로 다른 유전인자를 형질전환방법으로 게놈 내 도입하여 유

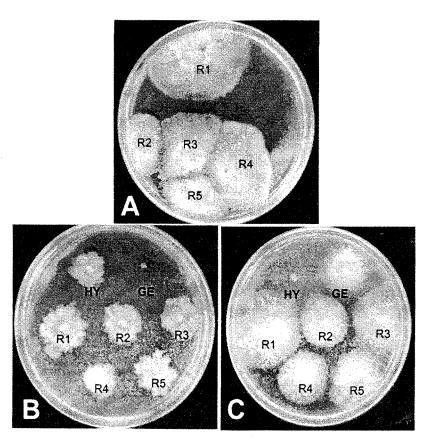


그림 9. 자손균주의 선발. (A) PDA 배지 + hygromycin B + geneticin (B) PDA 배지 + hygromycin B (C) PDA 배지 + geneticin. HY: hygB 저항성 균주, GE: gen 저항성 균주

전형과 표현형이 다른 부모균주를 확보하고 이들 사이의 교배를 통해 유전인자가 재조합된 자손균주를 손쉽고 효율적으로 선발할 수 있었다. 따라서 이와 같은 방법은 지금까지 자가화합성으로 인해 F. graminearum의 유용형질에 대한 유전연구가 거의 전무한 상태에서 효율적인 유전연구에 유용한 기술로 널리 사용될 수 있을 것이다. 한편 이와 같은 교배의 시도는 미국 캔자스 주립대 연구진에 의해서도 수행되었다 (Bowden & Leslie, 1999). 이들은 부모균주의 확보를 위해 서로 다른 종류의 질소영양돌연변이 균주 (nit1 과 NitM) 를 선발한 후 교배를 통해 야생형의 표현형으로 회복되는 자손균주를 선발하였다. 하지만 질소영양돌연변이의 선발은 모균주에 따라 성공가능성에 차이가 많이 나며 특히 우리나라의 NIV 생성형균주로부터는 특정 질소영양돌연변이의 선발이 불가능의 하였기 때문에 이 방법으

로는 DON 과 NV 생성형의 교배를 시도할 수 없었다. 결국 본 실험에서 사용한 항생제 저항성 인자는 모균주의 종류에 관계없이 형질전환을 통해 게놈에 도입이 가능하기 때문에 미국 연구진의 방법보다 훨씬 광범위하게 사용될 수 있을 것이다.

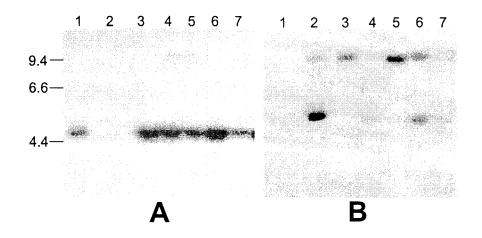


그림 10. 자손균주들의 DNA gel blot. (A) gen 유전자로 탐침한 경우 (B) 같은 blot을 hygB 유전자로 탐침한 경우. lane 1: 88-1 유래 gen 저항성 모균주, lane: Z3643 균주유래 hygB 저항성 모균주; lanes 3 - lanes 7: 그림 2 의 R1 - R5 자손균주.

자. 자손균주의 독소생성형 결정

위의 실험결과 확보된 자손균주의 독소생성형을 결정하기 위해 Trichothecene 생합성 관련 Tri7 과 Tri13 유전자를 이용한 PCR 검출법을 사용하였다 (제 3 세부과제 결과 참조). PCR 증폭결과 NIV 생성형 88-1 균주와 DON 생성형 Z3643 균주 사이에서 생산된 70 주의 자손균주 중 41주는 DON 생성형, 29주는 NIV 생성형으로 동정되었다. 또한 NIV 생성형 88-1 균주와 DON 생성형 98-80-14 균주사이의 자손균주 66 주 중 35주는 DON 생성형으로 31 주는 NIV 생성형으로 동정되었다 (표 3). 이를 통해 두 가지 독소생성형은 자손균주내에서 1 : 1의 비율로분리되었기 때문에 F. graminearum 의 독소생성형은 단일 유전인자에 의해 결정됨이 증명되었다. 이는 우리나라에 분포하는 모든 F. graminearum 야생형 균주들이 DON 과 NIV 중 하나의 Trichothecene 만을 생성하며, DON 과 NIV 를 함께

생성하는 균주는 발견되지 않았다는 기존의 연구결과를 유전학적으로 뒷받침한다고 할 수 있다.

표 3. 유성교배에 의한 자손의 수와 자손의 독소생성형

교배	자손의 수	DON 생성형	NIV생성형
$88-1 \ (hygB^R) \ X \ Z3643 \ (hygB^R)$	70	41	29
$88-1 \ (hygB^R) \ X \ 98-80-14 \ (hygB^R)$	66	35	31
Total	136	76	60

2. 곰팡이 바이러스를 이용한 독소 생성억제 벡터개발 (제 2 세부과제)

가. 붉은 곰팡이로부터 곰팡이 바이러스의 분리

dsRNA는 Valverde 등 (1990)의 방법에 의해 dsRNA와 강한 결합을 하는 cellulose CF-11을 이용한 컬럼을 통해 dsRNA를 선별적으로 분리하여 1% agarose gel을 이용한 전기영동에 의해 존재 유무를 확인하였다 (그림 1). 이용된 액상배지 중 F. graminearum 균주는 CM배지에서 dsRNA 곰팡이 바이러스의 중식에 적합한 것으로 나타났다. 그림에 나타난 바와 같이 서로 다른 크기의 게놈을 함유한 곰팡이 바이러스가 F. graminearum 균주를 기주로 이용하여 중식하는 것으로 나타나고 있다.

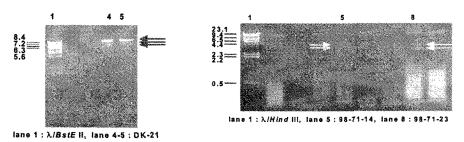


그림 1. 보리와 옥수수에서 분리된 *F. graminearum* 균주에 증식하는 곰팡이 바이러스의 RNA 게놈 각 지역의 보리와 옥수수에서 분리된 *F. graminearum* 균주에 기생하는 곰팡이

바이러스의 RNA 게놈을 순화하기 위하여 각각의 dsRNA 게놈을 agarose gel 상에서 순화하였다. 순화된 각 dsRNA 게놈을 젤에서 확인한 결과 서로 다른 크기의 dsRNA가 순화되어 있음을 알 수 있었고 (그림 2) 이들은 향후 2년차 연구에서 게놈 염기 서열 분석에 이용될 것이다.

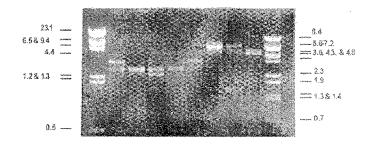


그림 2. Agarose gel을 이용하여 분리 순화된 dsRNA. 남부 지방과 강원도 지방에서 분리된 dsRNA를 게놈으로 함유하고 있는 곰팡이 바이러스를 1% agarose gel에서 분리하였다.

dsRNA와 강한 결합을 하는 cellulose CF-11을 이용한 컬럼을 이용하여 dsRNA를 선별적으로 분리하였지만 분리된 RNA가 ds 상태인 것을 확인하기 위하여 분리, 순화된 RNA를 DNAse와 RNAse A로 처리하였는데 그 결과중의 일부가 그림 3에 나타나 있다. DK 3과 DK 21은 그 크기가 8 kb 이상되는 RNA를 함유하였고 DNase와 RNase A의 처리에서 모두 분해되지 않았다. 이러한 결과는 분리된 RNA가 ds 상태임을 나타낸다.

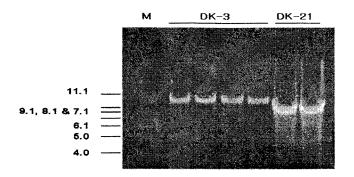


그림 3. 곰팡이 바이러스 게놈의 DNase와 RNase A의 처리 결과. 각 dsRNA를 DNase 또는 DNase와 RNase A를 30분간 처리하여 agarose gel에서 확인하였다. DNase와 RNase A의 처리에 의해서 게놈이 영향을 받지 않고 있음을 나타내고 있다.

나. 곰팡이 바이러스의 지역적 분포와 기주와의 상관관계 조사

남부 지방의 경우 같은 종류의 곰팡이 바이러스가 그 발견 빈도는 낮았지만 전북, 전남, 그리고 경남 지방의 보리 시료에서 분리한 붉은 곰팡이에 바이러스가 감염되어 있었고 강원도 옥수수에서 분리한 붉은 곰팡이는 남부 지방에서 발견되는 바이러스와는 다른 곰팡이 바이러스가 발견되었고 모두 영월 지방의 시료에서 상당히 빈번하게 발견되었다. 남부 지방의 보리에서 분리된 붉은 곰팡이는 2-4 kb 크기의 서로 다른 세 종류의 dsRNA 게놈을 함유하고 있었고 (그림 1 의 98-71-23) 이와는 다르게 강원도 지방의 옥수수에서 분리된 붉은 곰팡이는 4-12 kb 크기의 한 개 또는 여러 개의 서로 크기가 다른 게놈을 함유하고 (그림 1 의 DK 21 시료) 있었다. 이상의 연구 결과는 지역별 또는 작물에 따라 서로 다른 종류의 곰팡이 바이러스가 존재하고 있다는 것을 나타내고 있으며 기주 곰팡이의 생장에 서로 다른 영향을 줄 수 있음을 암시한다.

표 1. 지역과 기주에 따른 곰팡이 바이러스를 함유한 F. graminearum 균주의 분포

보기 기어	72 12	곰팡이 바이러스의	곰팡이 바이러스의	분리
분리 지역	균주 이름	게놈 수	게놈의 크기	기주
전남 보성	98-8-60	3	2-4 kbp	보리
전남 보성	98-56-12	2	2-4 kbp	보리
경남 밀양	98-71-14 98-71-23	2	2-4 kbp	보리
경남 밀양	98-83-28	2	2-4 kbp	보리
전북 익산	YWD-3, 5, 6, 7, 9,	2	2-4 kbp	보리
강원 영월	10	3	4-9 kbp	옥수수
강원 영월	DK-3	3	2-12 kbp	옥수수
강원 영월	DK-3 DK-21	3	8-9 kbp	옥수수

다. 바이러스 게놈의 cloning

곰팡이바이러스를 함유하고있는 F. graminearum 중 보리에서 분리된 98-8-60 균주와 강원도 옥수수에서 분리한 YWD-6 균주를 액체배지에 대량으로 배양하였다. 배양한 균사체로부터 전체 RNA를 분리하고 이를 agarose gel에서 게놈의 크기별로 분리하여 각 dsRNA를 순화하고 게놈분석에 이용하였다. F. graminearum 98-8-60은 약 4-6 kbp의 dsRNA를 3개 함유하고 있고(그림 3, panel A lane 4) F. graminearum YWD-9는 7-8 kbp크기의 단일 dsRNA를 함유하거나 간혹 그보다작은 크기의 defective interfering RNA로 여겨지는 dsRNA들을 함유하고 있었다(그림 3, panel A lane 2와 panel B lane 4와 6). 순화된 각각의 dsRNA를 single-strand 상태로 denature시키기 위하여 dsRNA를 methyl mercury hydroxide로 처리하거나 dimethyl sulfoxide로 처리하였다. 이를 99℃에서 5-10분간 처리하여 dsRNA를 denature 시킨 후 oligo dT 또는 ramdom nucleotide primer를 이용하여 dsRNA의 게놈 부분을 증폭하고(그림 4) 클로닝하였다. 클로닝된 plasmid DNA들은 E. coli에 형질전환하여 DNA를 대량으로 합성하여 순화하였고 각 순화

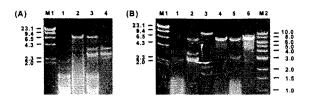


그림 3. 남부지방 보리와 강원도 지방의 옥수수에서 분리된 Fusarium graminearum에 감염되어 있는 dsRNA 곰팡이바이러스의 다양성 및 각 바이러스의 게놈의 크기.

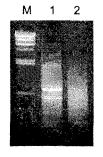


그림 4. dsRNA 바이러스의 게놈 cloning.

된 plasmid DNA에 증폭된 dsRNA의 게놈부분이 함유되어 있는지의 여부는 EcoRI 제한 효소로 절단하여 확인하였다(그림 5). dsRNA의 게놈부분을 함유하고 있는 plasmid DNA를 선발하여 염기서열 분석에 이용하였다. 현재 각 dsRNA의 말단 부분에 대한 염기서열 확인을 위하여 poly A polymerase와 terminal transferase를 이용하여 특정 primer가 결합하게 전환하여 (RACE 방법) 클로닝하였다.

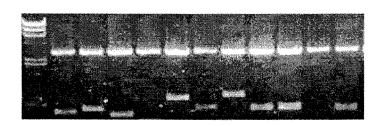


그림 5. EcoRI 제한효소 절단에 의한 증폭된 DNA의 함유여부 확인.

라. 바이러스 게놈의 분석

성공적으로 클로닝이 진행된 각각의 clone을 제한효소를 이용한 mapping과 sequencing등을 이용하여 분석하였다. 얻어진 염기서열은 DNASTAR사의 염기서열 분석 program을 이용하여 각 clone의 contig 분석과 기존 보고된 곰팡이 바이

러스의 염기서열과 비교 분석하였고 이들의 분류학적 위치의 연관관계 등을 파악 하였다. 또한 염기서열 분석에 의해 곰팡이 바이러스 게놈에 위치한 유전자들의 분 자 생물학적인 특성도 조사하였다. 현재까지 F. graminearum YWD-9의 경우 약 100여 개의 clone을 얻었으며, 이들을 contig program에 적용하여 이중 11개의 contig가 3개 이상의 DNA clone에서 얻어진 염기서열에 의해 연결되었고 약 30여 개의 contig는 현재 2개 이하의 DNA clone의 염기서열을 이용하여 얻어졌다. 이러 한 연구 결과는 아직 전체 염기서열을 해독하기에는 부족하지만 각 contig의 염기 서열의 수를 계산하면 거의 전부분에 걸쳐서 염기해독이 진행되었고 각 contig의 연결부위에 해당하는 염기서열의 정보가 얻어지는 대로 전체 염기서열의 정보에 대한 해독이 완성될 것이다. 얻어진 염기서열의 정보를 함유한 각 contig를 기존에 보고된 다른 곰팡이 바이러스들과의 염기서열과 아미노산서열 등을 BLAST 탐색 이용하여 비교, 분석하였다. 그 결과 남부지방의 보리에서 분리한 F. graminearum 98-8-60이 함유한 dsRNA의 염기서열 중 일부가 Agaricus bisporus virus 1, Trochomonas vaginalis virus, La France disease virus, Cucurbit yellows-associated virus, Helminthosporium victoriae virus 190S, Gremmeniella abietina RNA virus L1, Ustilago maydis virus H1 등의 RNA-dependent RNA 보이는 것으로 polymerase(RdRp)의 ORF 염기서열과 유사성을 ATP-dependent RNA helicase 및 non-LTR retroelement reverse transcriptase 또는 ATP-binding protein 등과 유사성을 보이는 clone 등을 얻었으나 다른 대부 분의 clone들은 별다른 유사성 및 연관관계를 보이지 않았다. 이상의 실험결과는 F. graminearum 98-8-60에서 분리된 곰팡이 바이러스가 기존에 보고된 다른 바 이러스처럼 자신의 게놈을 복제하고 합성하는데 이용하는 RdRp와 게놈의 분리에 이용되는 helicase를 함유하고 있으면서도 다른 게놈 부분은 많이 상이한 것임을 의미한다. 또한 F. graminearum strain 98-8-60에서 분리, 순화된 dsRNA에서 얻 어진 염기서열을 함유한 DNA를 probe로 이용하여 RNA blot을 수행하였는데 언 어진 DNA probe는 dsRNA에만 결합하는 것으로 나타났다(그림 6). 이러한 결과는 얻어진 DNA clone이 dsRNA에서 유래하였음을 증명한다.

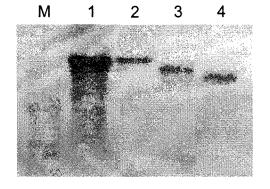


그림 6. 순화된 dsRNA를 이용하여 얻어진 염기 서열을 함유한 DNA probe를 이용한 RNA blot 의 결과.

마. *F. graminearum* 98-8-60균주에서 분리된 dsRNA 및 defective dsRNA 바이러스의 전체 게놈분석

F. graminearum strain 98-8-60에서 분리된 dsRNA 바이러스를 곰팡이 벡터로 개발하기 위하여 전체 게놈분석을 실시하였다. 특히 F. graminearum strain 98-8-60 균주는 곰팡이의 계대배양과정에서 defective dsRNA를 함유한 균주가 확보되었다 (그림 7). defective RNA나 satellite RNA 등은 게놈의 복제와 증식을 helper virus의 증식에 의존하지만 게놈의 크기가 작기 때문에 일반적인 바이러스 벡터와 비교하였을 때 보다 큰 크기의 외래유전자를 발현시킬 수 있다는 장점 때문에 외래 유전자 발현을 위한 벡터로도 최근에 많이 이용되고 있다. 따라서 F. graminearum strain 98-8-60에서 분리한 dsRNA 바이러스와 defective dsRNA 바이러스의 전체 게놈 분석이 동시에 진행되었다. 얻어진 dsRNA 바이러스와 defective dsRNA의 염기서열 및 유추된 단백질의 서열을 기존 보고된 바이러스와 의 유연관계를 파악하기 위하여 BLAST, DNASTAR를 이용한 alignment와 phylogenetic tree program 등을 이용하여 수행하였다.

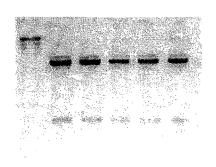


그림 7. F. graminearum strain 98-8-60에서 분리된 dsRNA 바이러스

그림 8에 나타난 것과 같이 *F. graminearum* strain 98-8-60의 dsRNA mycovirus 는 La France disease virus strain L1, *Helminthosporium victoriae* virus 145S 바이러스와 유연관계가 높게 나타나고 있다. 이상에서 언급한 바이러스외에도 *Totiviridae*에 속한 많은 다른 바이러스의 RdRp와도 유연관계가 다른 바이러스에 비해 높은 것으로 나타났다.

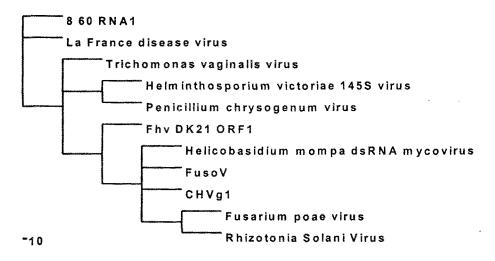


그림 8. *F. graminearum* 98-8-60 dsRNA virus RdRp의 다른 곰팡이 바이러스의 RdRp와의 유연관계를 나타내는 Phylogenetic tree.

98-8-60 균주에서 분리한 dsRNA 바이러스가 코딩하는 RNA polymerase의 conserved domain인 domain 5와 6 부분을 align한 결과 중요한 아미노산은 모두 보존되어 있는 것으로 확인되었다 (그림 9).

			Domaii	n V		J	Domain '	V I			
		*	20	*	40	*	68	*	80		
8-60	:	KHYQFMN	LWRMUSEG	WL KAYMAV	IKEQVLELSGR	VVLEHAQ	sgadevm	ALETSLSNAHI	TLNIGQA	:	73
HV1458	:	VKLDK	Y WRGHTED	VI GCYMGV	AKLCFVRLYKY	DCALFAD	gggddVD	QEFAQPEDAYR	MLAVLDRMG	:	73
PCV	:	KIWR	Y WRGITWI	VL FCYMHT	ALONVERLEGV	RVVLYVD	HGEORID	LGLSE PAVM PW	FLEVMDAMLF-	:	73
FPV	:	VREHA	P MLNIQFL	FG LFLLID	GLIEFGST-DA	EIDDILL	-FIMBOUNS	AFTTWSITHLE	QFVSFFETY	:	73
FusoV	:	KRR	P SWWIQLV	AA -MITAK	YLSLCQGV	NAKNLR	VLEDESA	fmaaethdlsv	AAEDAAAVGMD	:	68
La_France	;	RRFTHE	L WRCHAYI	HNLI IAQYEV	GRQQLMEFFGM	SSSYQFD	TGCDDGC	ADEKDLVTAYS	LLRSNTAMG	:	73
DDV2	;	PDGRMFRKYR	P SWWWQII	VV -NILID	YLADCQSV	Kīpkpe	VLUDESA	FRSNDQFDLEV.	AKDDCVPTG	:	73
RSV	;								DFISFMER		
Fhv-DK21	:								nfknigkÿ		
Baymv	:	KNV	-TQRQPSTVVD	LVLMTAFLY.	AYIHKTGDR	ELA LLNERFI	FVCN JOHNKI	FAISPOFDEEF	GHDFSPELVE-	:	74
		G	. a T	1 n			GDD				

8-60:98-8-60 isolate HV145S:Helminthosporium victoriae 145S virus PCV:Penicillium chrysogenum virus FPV:Fusarium poae virus FusoV:Mycovirus FusoV La France:La France disease virus DDV2:Discula destructiva virus 2 RSV:Rhizoctonia solani virus Fhv-DK21:Fusarium hypovirus DK21 strain BayMV:Barley yellow mosaic virus

그림 9. 98-8-60 균주에서 분리한 dsRNA 바이러스가 코딩하는 RNA polymerase의 conserved domain인 domain 5 와 6 부분을 align한 결과

F. graminearum strain 98-8-60의 dsRNA 바이러스의 기타 다른 단백질 부분도 Partitiviridae에 속한 곰팡이 바이러스와 비교하였을 때 많은 부분이 보존되어 있었다(그림 10).

F. graminearum strain들에 몇 종류의 dsRNA 바이러스가 감염되어 있는지를 확인하기 위하여 98-8-60에서 얻어진 dsRNA의 유전정보를 일부 함유하고 있는 DNA와 DK21 strain에서 얻어진 dsRNA의 유전정보를 함유한 DNA들을 프로브로 사용하여 RNA blot을 수행하였다. 발견된 dsRNA 바이러스는 최소 3종류 이상이었고 이들은 종종 복합 감염되어 있는 것으로 확인되었다(data not shown).

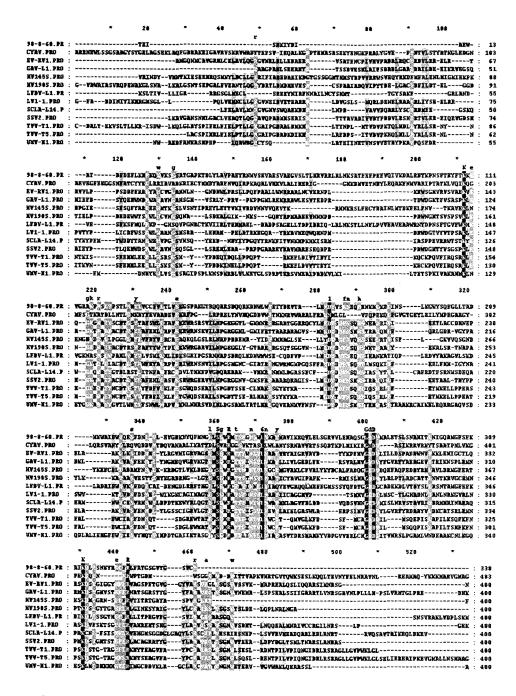


그림 10 *F. graminearum* strain 98-8-60 dsRNA와 다른 곰팡이 바이러스의 단백질의 alignment.

F. graminearum strain 98-8-60에서 분리한 작은 크기의 dsRNA는 전체 게놈의 크기가 593 bp 이었으며 아무런 유전자도 함유하고 있지 않은 defective dsRNA인 것으로 확인되었다. (그림 11) defective RNA는 dsRNA 바이러스가 감염된 곰팡이 균주에서 종종 발견되는데 F. graminearum strain 98-8-60의 경우도 다른 곰팡이의 경우와 유사하게 계대배양과정에서 일부 균주의 경우 바이러스의 게놈보다 작은 defective RNA를 함유한다는 것을 나타내고 이는 얻어진 defective RNA가 위에서 언급하였듯이 외래 유전자 발현을 위한 벡터로서 이용 가능성이 있음을 나타낸다.

그림 11. F. graminearum strain 98-8-60에서 분리한 defective dsRNA 게놈의 전체 염기서열(593 bp).

바. F. graminearum 98-8-60균주에서 분리된 defective dsRNA를 이용한 바이러스 벡터제작

F. graminearum strain 98-8-60에서 분리한 작은 크기의 defective dsRNA를 벡터로 개발하기 위하여 전체 게놈을 RT-PCR을 통하여 증폭하였다. 그림 12에 나타난 것과 같이 실험과정에 이용된 프라이머들은 염기성열 분석을 통해 확인한

defective dsRNA의 양 말단 염기서열과 5' primer에는 T7 RNA polymerase의 promoter를 첨가하였고 3' 말단에는 제한효소 sites를 함유하게 고안하여 제작하였다. 또한 defective dsRNA에 존재하는 유일한 제한효소 site를 이용하여 외래유전자로 GFP와 hygromycin 유전자를 PCR로 증폭하여 첨가하였다.

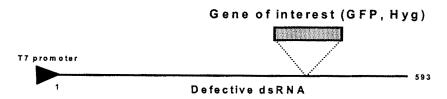


그림 12. Defective dsRNA를 벡터로 이용하기 위해 이용된 실험방법.

그림 13의 panel A에 나타난 것처럼 특이적으로 제작한 프라이머들을 이용하여 RT-PCR을 수행하였을 때 원하는 크기의 DNA가 증폭되는 것을 확인하였다. 증폭된 DNA는 pUC18 벡터에 클로닝하고 mini-prep DNA 순화과정, 제한효소를 이용한 절단 및 염기서열 분석에 의해 원하는 DNA가 삽입된 것을 확인하였다(그림 14). Insert를 함유하고 있는 클론을 확보하여 defective dsDNA의 3' 말단을 제한효소로 자르고 in vitro transcription 반응을 수행하였다(그림 13, panel B). 만들어진 RNA를 defective dsRNA를 포함하고 있지 않은 바이러스를 함유하고있지 않는 F. graminearum strain 98-8-60 곰팡이 균주에 형질 전환하여 defective dsRNA바이러스가 발현되고 증식하는지를 확인한다(그림 13, panel C). Defective dsRNA를 벡터로 제작하여 얻어지는 결과는 제 1 세부과제 및 협동연구에서 얻어진

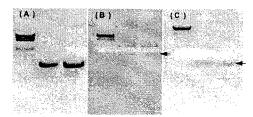


그림 13. Defective dsRNA의 벡터제작과 RNA 합성 (A) RT-PCR 결과, (B) PCR산물을 함유 한 클론을 이용하여 in vitro transcription한 결 과 (RNA는 화살표로 표시함) (C) 순화한 후 다시 확인한 RNA.

Fumonisin과 Trichothecene의 유전정보와 clone 등을 이용하여 증식형 바이러스 벡터에 첨부하여 이의 붉은곰팡이 균의 독소 생성을 억제하거나 다른 선발 유전자의 발현연구에 유익하게 이용될 것이다.

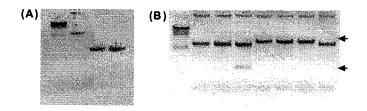


그림 14. Defective dsRNA 벡터의 제작 및 스크리닝. (A) 제한 효소로 절단한 pUC18 및 D dsRNA의 절편들 (B) pUC18에 ligation한후 얻어진 plasmid DNA들을 제한 효소로 절단하여 insert의 존재를확인함 (arrowheads; forward and reverse orientation).

3. 생명공학기법을 이용한 붉은 곰팡이 독소 검출기법개발 (협동과제)

가. Fumonisin 생합성 유전자의 증폭 및 염기서열분석

제 1 세부 과제에서 분양 받은 *G. fujikuroi* 균주와 그 밖의 표준 균주로부터 Wirsel 등의 방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 분리된 게놈 DNA로부터 Fumonisin 생합성 관련유전자의 일부를 증폭하기 위해 Proctor등이 발표한 polyketide 생합성 유전자 (*Fum5*)와 cytochrome p450 monooxygenase 유전자 (*Fum6*)의 염기서열을 이용하여 primer를 제작하였다 (표 1). *Fum5* 일부 유전자의 증폭을 위한 rp32와 rp33 primer 조합은 polyketide 생합성유전자의 염기서열 중여러 곰팡이에 가장 잘 보존되어 있는 β-ketoacyl (KS) domain 부분에서 유래되었다. 그러나 *Fum6* 유전자는 다른 유사 유전자들과의 DNA 염기서열 유사도가 낮아 알맞은 degenerate primer를 제작하기 어려웠다. 결국 rp98/rp117 조합의 primer는 *Fum6* 유전자의 5'과 3' 말단부위 근처에서 유래되었으며 그 밖의 degenerate primer 조합은 다른 곰팡이의 유사 유전자에서 비교적 보존이 되어있는 부분에서 유래되었다. 이들 primer 조합과 분리된 게놈 DNA를 이용한 PCR 증폭의 조건은 다음과 같다: 2 min. at 95℃, 30 cycles of (30 sec. at 94℃, 1

표 1. Fum5와 Fum6 유전자의 증폭을 위해 사용한 primer

Primer name	Sequences (5' to 3')		
rp 32	ACA AGT GTC CTT GGG GTC CAG G		
rp 33	GAT GCT CTT GGA AGT GGC CTA CG		
rp98	TGC CGT ATC TCG AGG CTG TCT TGC		
rp117	CCA TAA CCG AGC AAC TTC ATC TCG		
Fum6/f1	GAC CCC AAA ACT GGN GAR GGN		
Fum6/r1	GGC GTC ATC TGC NGG YTC NCC		
Fum6/f2	ATH GCN GGN CAY GAR ACN AC		
Fum6/r2	NAC RTG RTC NCC NGC YTT RTA		

R = A or G, Y = C or T, H = A or C or T

min. at 55℃, 2.0 min. at 72℃), 10 min. at 72℃. 증폭된 DNA 조각은 Qiagen사의 PCR purification kit를 이용하여 순화한 후 Invitrogen사의 pCR 2.1 TOPO vector에 삽입하여 cloning 하였다. vector에 삽입된 DNA 조각의 염기서열 결정은 M13 reverse와 M13 forward primer를 이용하여 ABI 377 automated DNA sequencer로 수행하였으며 얻어진 DNA 염기서열은 DNASTAR사의 EdSeq 와 MapDraw program을 이용하여 분석하였다. 실험 결과, rp32와 rp33 primer 조합을 이용한 PCR을 통해 G. fujikuroi 의 mating population 중 A와 D 에 속하는 균주 로부터 650 bp 크기의 단일 DNA 조각이 증폭되었으나 mating population B, C, E, F, H 소속 균주들로부터는 원하는 크기의 DNA 조각이 증폭되지 않았다. mating population A의 7개 균주로부터 증폭된 KS domain의 DNA 염기서열은 모 두 Proctor등이 발표한 미국산 G. fujikuroi 균주의 Fum5 유전자와 99% 유사하였 으며 intron의 위치와 수도 일치하였다. 또한 mating population D 균주로부터 증 폭된 KS domain 부분도 미국산 균주 및 위의 한국산 mating population A균주들 의 KS domain과 88% 가량 유사하였다. 이를 통해 mating population A와 D 균주 들은 Fum5 와 Fum6 유전자를 가지고 있어 상당량의 fumonisin을 생성하지만 그 외의 mating population 균주들은 최소한 위의 두 가지 Fumonisin 생합성 관련유 전자를 가지고 있지 않거나 유사도가 매우 떨어지는 유사 유전자(homolog)들을 가 지고 있어 Fumonisin을 생성하지 않거나 극소량만을 생성한다고 추론할 수 있다. 이는 또한 DNA gel blot 분석을 통해서도 확인되었다. 먼저 mating population A 균주의 KS domain을 probe로 이용하여 EcoRI 효소로 절단된 모든 mating population 균주들의 게놈 DNA를 탐색해 본 결과 오직 mating population A와 D 균주의 게놈 DNA만 probe와 hybridization을 하여 단일 band의 signal을 나타냈다하지만 이때 band의 크기는 서로 달랐으며 D 균주의 band signal은 A 균주에 비해 약했다. 한편 같은 게놈 DNA blot을 D 균주의 KS domain을 probe로 탐색하였을 때에는 D 균주의 band signal이 훨씬 강했으며 이와 같은 결과는 hybridization 조건을 달리 해도 똑같았다.

G. fujikuroi mating population A

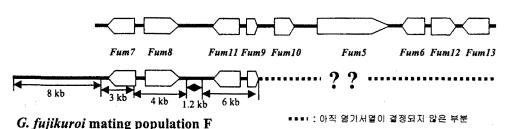


그림 1. Furnonisin 생합성 관련 유전자군 구조의 비교

한편 Fumonisin 미생성 mating population 균주들의 게놈에 Fum5와 Fum6를 제외한 기존의 Fumonisin 생합성 관련 유전자들이 존재하는 지를 알아보기 위해 mating population F 균주의 게놈을 분석하였다. 먼저 F 균주의 게놈을 EcoRI으로 절단한 후 미국산 A 균주의 Fumonisin 생합성 유전자군이 포함되어있는 27 kb의 cosmid clone (16-1)을 probe로 이용하여 탐색하였다. 흥미롭게도 위의 PCR과 DNA gel blot 방법을 통해 F 균주의 게놈에는 Fum5와 Fum6의 homolog가 존재하지 않음이 확인되었지만 전체 Fumonisin 생합성 유전자군을 포함하고 있는 probe는 F 균주의 게놈 DNA와 hybridization을 하여 강한 signal의 여러 band들을 나타내었다. 이중 4개 band (8, 6, 4, 3 kb)의 DNA염기서열을 분석하기 위해 F 균주 게놈DNA의 sugbenomic library를 제작하였다. 100μ g의 F 균주 게놈 DNA를 EcoRI으로 완전히 자른 후 sucrose gradient centrifugation에 의해 크기별로 나눈

다음 원하는 크기의 게놈 DNA fraction을 pBluscript vector에 삽입하였다. 게놈 DNA 조각이 삽입된 vector를 E. coli 세포에 형질전환 시켜 subgenomic library를 제작한 후 위의 DNA gel blot 분석에 쓰인 cosmid clone을 probe로 이용하여 library 를 탐색하였다. 이와 같은 방법을 통해 위의 DNA gel blot 분석에서 확인 된 4개의 hybridization band에 해당하는 F 균주 계놈 DNA의 조각을 모두 얻을 수 있었다. 이들 게놈 DNA 조각의 염기서열 분석을 통해 3개의 band는 8, 3, 4 kb의 순서로 이어졌으며 4 kb band와 6 kb band 는 1.2 kb의 gap을 사이로 연결 되어 총 22 kb의 contig가 완성되었다 (그림 1). 이 contig의 염기서열을 Proctor등 이 밝혀낸 A 균주의 Fumonisin 생합성 관련 유전자군과 비교하였다. 그림 1과 같 이 F 균주의 contig에서 Fumonisin 생성 A 균주의 유전자군에 존재하는 Fum7, Fum8, Fum11, Fum9 의 homolog가 발견되었지만 Fum10 이후 유전자들의 homolog는 아직 발견되지 않았다. 그런데 최근 Proctor등의 연구결과 A 균주 Fum5 의 upstream 위치에 존재하는 유전자들은 Fumonisin 생합성에 직접관여 하 지 않으며 오직 Fum5 및 downstream에 존재하는 유전자들에 의해 Fumonisin이 생합성된다고 밝혀졌다. 결국 F 균주의 게놈에서도 A 균주의 Fumonisin 생합성 관련 유전자군의 이웃 유전자들까지는 발견되었으며 Fumonisin 생합성 유전자 또 는 유전자군의 존재 여부는 F 균주로부터 FumlO homolog 이후의 DNA 염기서열 을 얻은 후에 명확히 밝혀질 것이다. 그리고 이를 통해 Fumonisin을 생성하지 않 는 다른 mating population (B. C. E. H)등의 게놈 구조도 F 균주와 비슷할 것으 로 추론 수 있지만 계속되는 연구가 필요할 것이다.

나 Trichothecene 생합성 유전자의 증폭 및 분석

제 1 세부과제로부터 분양 받은 NIV 생성형 G. zeae 균주 (88-1) 와 DON 생성 균주 (H-11) 로부터 게놈 DNA를 분리하였다. 그리고 Hohn 등이 발표한 F. sporotrichioides 의 Trichothecene (T-2 toxin) 생합성 유전자군에 속해 있는 여러 Tri 유전자의 DNA 염기서열을 이용하여 degenerate 또는 specific 한 primer 를 제작한 후 PCR 반응으로 두 게놈 DNA으로부터 Tri 유전자의 homolog 들을 증폭하였다 (그림 2). 증폭된 DNA 조각의 cloning 및 염기서열결정은 위의 방법과 같다. Tri5 homolog 의 경우 primer 1과 2의 조합으로 그 일부가 증폭되었으며 Tri6

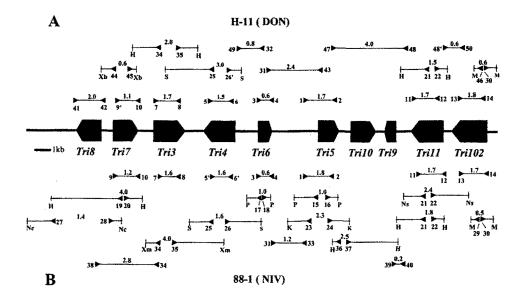


그림 2. PCR을 이용한 Trichothecene 생합성 유전자군의 증폭 및 유전자군의 구조 (A: DON 생성 G. zeae H-11 균주, B: NIV 생성 G. zeae 88-1 균주). Block arrows 는 유전자군에 존재하는 Tri ORFs의 위치와 transcription directions을 표시하며 이들을 연결하는 굵은 line들은 non-coding DNA 부분을 표시한다. 한편, inverted arrowheads를 연결하는 가느다란 line들은 PCR 용 primer 의 위치와 방향을 표시하며 그 위의 숫자는 증폭된 DNA 조각의 크기 (kb) 를 나타낸다. 그리고 영문 대문자들은 다음의 제한효소를 가르킨다: H, HindIII; K, KpnI; M, MseI; Nc, NcoI; Ns, NsiI; P, PstI; S, SpeI; Xa, XbaI; Xm, XmnI. * 참조: TriIOI 은 이 유전자군에 존재하지 않기 때문에 이 그림에 표시하지 않았음.

homolog 일부 (0.6 kb) 는 primer 3과 4를 이용하여 두 게놈 DNA에서 모두 증폭 되었다. 그러나 primer 5와 6의 조합으로는 H-11에서만 1.5 kb의 Tri4 homolog 일 부가 증폭되었으며 88-1의 Tri4 homolog는 새로 제작된 primer 인 5'과 6'에 의해 그 일부 (1.6 kb)가 증폭되었다. 한편, G. zeae의 Tri 유전자들이 F. sporotrichioides의 Tri 유전자들과 같은 순서로 유전자군에 놓여 있을 것이라는 가정 아래 서로 다른 Tri 유전자에서 유래된 primer의 조합으로 Tri 유전자 사이 의 non-coding 부분을 증폭하였다. 예를 들어 Tri6 에서 제작된 primer 31과 Tri5에서 유래된 primer 43 의 조합으로 Tri6 와 Tri5 사이의 2.4 kb가 증폭되었다. 그

러나 이러한 PCR 반응이 실패한 경우, inverse PCR 방법을 이용하였다. 예를 들 어 88-1의 게놈 DNA를 *Sal*I 으로 자른 다음 self ligation 하여 주형 DNA로 사 용하고 primer 는 이미 알고 있는 *Tri4*의 DNA 염기서열을 이용하되 방향을 그림2 의 primer 25와 26 처럼 보통의 경우와 반대로 제작하여 PCR 반응을 수행했다. 실 험 결과, 1.6 kb의 *Tri4* 주변부위를 증폭할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 H-11 에서는 23 kb, 88-1 에서는 26 kb의 Tri 유전자군을 얻었다. 한편 Trichothecene 생합성에 관여하지만 생합성 유전자군에 속하지 않는 Tri101 유전자도 88-1과 H-11에서 모두 얻었다. 각 Tri 유전자의 순서, transcription direction, intron 위치 및 수는 비교된 세 균주 (88-1, H-11, *F. sporotrichioides*) 에서 모두 동일하였다. 한편 이들 유전자간의 DNA 및 amino acid 서열 유사도는 표 2와 같다. *Tri* 유전 자의 DNA 염기서열은 H-11과 88-1의 경우 Tri7 을 제외하고는 매우 유사 (87.8 - 98.4%) 했으며 H-11 이나 88-1 과 *F. sporotrichioides*사이의 DNA 염기서열 유 사도는 H-11 과 88-1 사이보다 떨어졌다. Tri 유전자의 아미노산 서열 또한 Tri7 유전자를 제외하고는 두 균주 (H-11, 88-1) 사이에 매우 유사하였다 (81.8 -98.5%). 하편 non-coding 부분은 *Tri* 유전자보다 유사도가 (57.3-88.8%). 그런데 Tri7 유전자의 DNA 염기서열 유사도는 다른 Tri 유전자에 비해 G. zeae 와 F. sporotrichioides 사이 (63.5%) 뿐 아니라 88-1과 H-11 균주 사이에서도 매우 떨어졌다 (79.6%) (표2). 특히 이들 세 균주의 *Tri7* 유전자 DNA 염기서열을 비교한 결과 그림 3과 같이 DON 생성 H-11 균주의 Tri7 유전자에서 여러 돌연변이(nucloetide substitutions and deletions) 가 발견되었으며 이 들로 인 해 Tri7 단백질의 amino acid 서열에 큰 변화 (frameshifts)가 생겨 더 이상 88-1 과 F. sporotrichioids 의 Tri7 단백질의 amino acid 서열과는 유사도가 없었다. 더 욱이 88-1과 F. sporotrichioides Tri7 유전자의 intron에 해당되는 H-11 Tri7 부 위에는 CACAATATTAG 의 11개 염기가 10번 계속해서 반복되었다. 따라서 88-1 과 H-11 Tri7 유전자 DNA 염기서열사이의 이러한 차이를 이용한 아래의 primer 조합을 이용하면 NIV와 DON 생성형 균주의 특이적인 구분에 유용하게 사용되었 다.

GzTri7/f1: 5' GGCTTTACGACTCCTCAACAATGG 3'
GzTri7/r1: 5' G(G/A)CGC(C/T)AAAGAAAACCAATCAAC 3'

표 2. G. zeae 와 F. sporotrichioides Tri 유전자들의 유사도*.

Comparison ^b	88-1/H-11	88-1/Fsp	H-11/Fsp	88-1/Gz ^c	H-11/Gz
Region					
8	87.8 (81.8)	81.0 (76.6)	81.4 (74.9)	_	-
8-7	68.4	- ,	-	-	-
7	79.6 (- ^d)	72.8 (72.3)	63.5 (42.3)	-	-
7-3	85.9	-	-	-	-
3 .	92.9 (96.3)	82.5 (85.4)	82.4 (84.2)	-	-
3-4	57.3	-	-	-	-
4	95.9 (95.6)	83.0 (85.4)	84.4 (87.7)	-	-
4-6	88.0	-	-	-	-
6	94.2 (94.5)	86.0 (86.2)	85.1 (85.4)	95.0 (95.0)	96.3 (96.3)
6-5	82.1	-	-	-	-
5	93.5 (97.3)	83.5 (90.4)	84.5 (90.7)	93.6 (97.3)	99.7 (100.0)
5-11	88.8	-	-	-	-
11	93.5 (97.0)	83.8 (91.1)	83.5 (91.1)	90.9 (93.5)	91.9 (93.9)
11-102	81.4	-	-	-	-
102	91.5 (89.2)	79.3 (75.4)	76.0 (74.2)	89.7 (84.9)	90.2 (84.5)
101	98.4 (98.5)	80.0 (77.8)	80.1 (76.9)	99.3 (99.5)	99.3 (99.1)

^a DNA 염기유사도 (amino acid 서열의 유사도).

다. PCR을 이용한 Trichothecene 생합성 유전자의 검출법 확립

1) Tri13을 이용한 PCR 검출법

제 1 세부과제에서 분석된 *Tri13* 유전자의 염기서열을 이용하여 DON 생성균주와 NIV 생성균주를 구별하기 위해 다음과 같은 primer를 제작(제 1세부과제 그림3 참조)하여 1년차에서 *Tri7*을 이용한 PCR 반응과 같은 조건에서 증폭을 시도하였다.

b 숫자는 각각의 *Tri* 유전자를 표시하며 bar로 연결된 숫자들은 두 *Tri* 유전자 사이의 non-coding 부분을 나타낸다.

c Fsp: F. sporotrichioides, Gz: Tri 유전자가 밝혀진 G. zeae

d H-11 Tri7 유전자의 돌연변이로 인해 amino acd 서열의 비교가 무의미함

GzTri13/p1: 5' AATACTAMAAGYCTAGKACGACGA 3' GzTri13/p2: 5' GTGRTRTCCCAGGATCTGCGTGTC 3'

1.5% agarose gel에서 PCR 증폭절편을 분석하였을 때 그림 4와 같이 DON 생성 균주는 470 bp, NIV 생성균주는 760 bp의 절편을 나타내어 두 독소 생성형이 뚜렷이 구분되었다. 더욱이 우리나라와 미국 붉은곰팡이 167 균주를 대상으로 조사한 경우에도 DON과 NIV 형의 band의 다른 절편은 증폭되지 않아 붉은곰팡이의 검

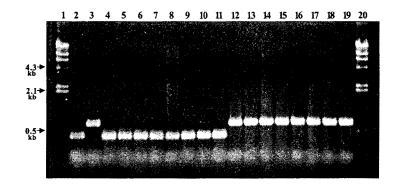


그림 4. Tril3 primers를 이용한 DON과 NIV 생성균주의 PCR 증폭.
Lane 1 and 20, ADNA/HindIII marker;lane 2, H-11 (DON 생성균주);lane
3, 88-1 (NIV 생성균주);lane 4 to 7, 강원도산 옥수수에서 분리한 DON 생성균주. Lanes 8 to 11 미국산 옥수수에서 분리한 DON 생성균주. Lane 12 to 19, 남부지방 보리로부터 분리한 NIV 생성균주

출 뿐아니라 독소 생성형 결정에도 매우 유용함이 증명되었다.

2) Tri7 과 Tri 13 유전자 이용 PCR 방법의 비교 분석

1년차 연구에서 개발된 Tri7 유전자 이용 PCR 검출법을 위의 Tri13 PCR 법과비교하였다. 같은 조사 균주를 대상으로 PCR 검출법에 의해 판명된 독소생성형과화학분석에 의해 결정된 독소생성형을 비교함으로써 PCR 검출법의 유용성을 검증하였다. 제1 세부과제에서 Tri5 유전자를 probe로 이용한 독소생성형간의 변이의결과와도 비교를 하였다. 표 3과 같이 미국산 57균주에서는 두 가지 PCR방법과DNA gel blot 방법으로 구별된 독소 생성형이 모두 실제 독소생성형과 일치하였

다. 또한 117주의 한국산 균주에서도 대부분 일치하였으나 보리균주의 경우 Tri13 PCR 분석에서는75균주 모두가, Tri7 PCR 분석에서는 72 균주가 NIV 생성균주로 분석되었고 화학분석에서는 72균주에서 NIV가 검출되었다. 한편 옥수수 분리 33 균주에서도 3 가지 검출법이 실제 독소 생성형과 차이가 나는 예외의 경우가 관찰되었다.

표 3. F. graminearum 균주들의 Tri 유전자와 독소 생성형에 관한 변이

Host	Total isolates			Tri5ª		Tril3ª			
		DON	NIV	DON	NIV	DON	NIV	DON	NIV
Barley	75 ^b	0	72	0	75	3	72	0	75
Corn	33 ^b	28	4	27	6	31	2	29	4
Wheat	2	0	2	0	2	0	2	0	2
Corn	57	57	0	57	0	57	0	57	0
(USA)									
TOTAL	167		. `						

[&]quot;Tri5 는 DNA gel blot 분석, Tri7 과 Tri13 은 PCR 분석에 의한 결과, "보리 3균주와 옥수수 1균주는 화확분석 결과 독소가 검출되지 않음.

4) 예외 균주의 변이 분석

7 주의 예외 균주는 모두 우리나라 균주 이었으며 크게 두 가지의 예외적인 변이 양상을 나타내었다. 표 4와 같이 먼저 보리에서 분리된 3 균주와 옥수수 분리 2 균주는 Tri7과 Tri13 PCR 반응에서 NIV 특이적 증폭양상을 보였으나 Tri5 probe 와는 DON 특이적인 hybridization 반응을 보였다. 그리고 이들 균주는 GC-MS 분석을 통해 실제로 NIV 독소를 생성하는 것으로 밝혀졌다. 한편 옥수수에서 분리된 또 다른 2 균주는 Tri5 DNA blot hybridization 과 Tri13 PCR을 통해서는 DON 생성형으로 판명되었지만 Tri7 PCR 반응에 의해서는 NIV 특이적 증폭을 보였다. 그리고 화학분석을 통해 최종적으로 DON생성형으로 밝혀졌다. 하지만 독소 생성형 구별에 있어 여러 검출법 사이의 불일치에도 불구하고 Tri13 PCR 방법에 의해결정된 독소 생성형과 실제 생성형은 완전히 일치하였다. 이는 본 연구진에 의해

밝혀진 대로 Tri13 유전자가 NIV 생합성에 결정적인 역할을 하고 Tri7 은 NIV 생합성 후 4-ANIV 생합성에 관여한다는 결과를 뒷받침한다. 그리고 이에 따르면 다양한 F. graminearum 균주 집단에서 NIV 생성형 중 Tri13은 NIV 특이적이지만 Tri7은 DON 특이적이거나 또는 DON 생성형 중 Tri13은 DON 특이적이지만 Tri7은 NIV 특이적인 균주들이 존재할 가능성이 있다. 결국 본 연구결과에서 밝혀진 예외적인 7 균주가 이러한 가능성에 대한 실제적인 증거가 될 수 있을 것이다.

표 4. 예외 균주들의 변이

Isolate	Host	Chemical analysis	Tri7	Tri5	Tri13
8-17	Barley	NIV	NIV	DON	NIV
8-59	Barley	NIV	NIV	DON	NIV
10-7	Barely	NIV	NIV	DON	NIV
D1	Com	NIV	NIV	DON	NIV
Н9	Corn	NIV	NIV	DON	NIV
A18	Corn	N/ D ^a	NIV	DON	DON
В9	Corn	DON	NIV	DON	DON

enot detected.

5) 예외 균주의 독소 생합성 유전자 구조 분석

이들 균주에서 나타난 예외성의 원인을 분석하기 위해 예외 균주의 두 type을 대표하는 A-18 균주와 10-7 균주로부터 3.8 kb 크기의 Tri5 유전자 부위 염기서열을 결정하고 비교하였다. 그림 5와 같이 10-7 균주의 경우 대부분의 염기서열이 NIV 생성형 88-1 균주와 일치하였으며 단지 특정 MseI 절단 부위의 염기서열에서 발견된 돌연변이로 DNA gel blot 분석에서 DON 특이적 hybridization 반응을 나타내었다. 하지만 A-18 균주의 염기서열에서는 곳곳에 DON생성형 H-11 균주와 88-1 균주 염기서열이 함께 발견되었다. 이는 A-18균주가 DON생성형과 NIV생성형 균주 사이의 유전적 재조합에 의해 생겨났을 가능성을 뒷받침한다고 할 수 있다.

6) PCR 검출법의 유용성

Tri7과 Tri13을 이용한 Trichothecene 생성 붉은곰팡이의 검출은 독성 곰팡이의 분리, 배양, 독소추출 및 검출의 단계를 거쳐야 하는 화학분석에 비해 훨씬 시간과 노력을 절약할 수 있는 방법이다. 더욱이 한 번의 반응으로 Trichothecene 오염 가능성 뿐 아니라 오염 곰팡이의 독소 생성형까지 예측할 수 있는 PCR 검출법은 Tri5 probe를 이용한 게놈 DNA blot 분석 방법에 비해서도 훨씬 간편하고 정확하다 할 수 있다. 하지만 위의 결과에서 밝혀진 예외 균주의 존재는 PCR에 의한독소 생성 곰팡이의 검출 및 독소생성형 결정의 정확성을 떨어뜨리는 요인이 될수 있다. 결론적으로 Tri7과 Tri13 primer를 동시에 이용한 PCR 검출법은 오히려예외적 균주의 검출까지 가능하게 하며 실질적으로는 Tri13 PCR만으로도 독소 생성형을 결정하는 데 충분하다 할 수 있을 것이다.

라. PCR을 이용한 Fumonisin 생합성 유전자의 검출법 확립

1) Fum5와 Fum6 primer를 이용한 Fumonisin 생성 균주의 검출

제 1세부과제의 변이 분석결과 대표적인 Fumonisin 생성 mating populaiton인 MP-A와 MP-D의 게놈에만 Fumonisin 생합성에 필수적인 Fum5와 Fum6 유전자가 존재함이 밝혀졌다. 이를 이용하여 MP-A와 MP-D 균주의 신속한 검출을 위한 PCR 검출법을 시도하였다. 1년차 연구에서 유용 가능성이 확인된 Fum5 증폭용 rp32 와 rp33 primer 조합, Fum6 증폭용 rp98 과 rp117 조합을 이용하여 제 1세부과제에서 사용한 150여 균주를 대상으로 PCR 분석을 하였다. 그림 6과 같이 모든 Fumonisin 생성 균주에서 같은 크기의 단일 절편이 증폭되었으며 Fumonisin 미생성 MP-F 균주의 게놈 DNA로부터는 PCR 조건에 따라 크기가 다른 비특이적 절편만이 증폭되거나 아무 절편도 증폭되지 않았다. 하지만 MP-A와 MP-D 균주간의 Fum5, Fum6 유전자의 비교를 통해서 염기서열의 상동성 차이만이 발견되어위에서 언급한 Trichothecene 검출 분석과 같이 한 번의 PCR에 의해 독소생성 공망이 검출과 mating populaiton의 구별을 동시에 할 수 있는 PCR primer의 제작은 불가능하였다.

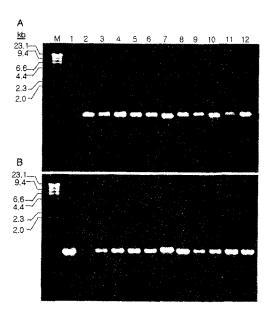


그림 6. *G. fujikuroi* MP-A 균주 계놈 DNA로부터 *Fum5* 절편 증폭

2) Fum7과 Fum8을 이용한 MP-F 균주의 검출

MP-F 균주는 Fumonisin을 생성하지 않지만 여러 작물에서 높은 비율로 검출되며 Moniliformin이라는 또 다른 곰팡이 독소를 다량 생성하기 때문에 Fumonisin 생성 MP-A와 MP-D 균주와 함께 신속한 검출법의 개발이 필요하다. 하지만 Fum5와 Fum6 유전자에 의한 PCR 검출법은 MP-A와 MP-D 균주만을 특이적으로 검출하기 때문에 새로운 primer의 이용이 필요하다. 이를 위해 MP-F 균주 게 놈의 Fum 유전자군에 존재하는 Fum7 (nicotinate phosphorybosyl transferase homolog) 과 Fum8 (WD-Repeat protein homolog) 유전자에서 다음과 같은 primer를 제작하여 PCR 증폭을 시도하였다.

Fum7For: 5' GTCGTTGGTAAGGTATGTTCC 3'

Fum7Rev: 5'CTCAAGAAGCACTGCGACTACCTC 3'

Fum8For: 5' TACGATCGCCTACCAAGAAG 3'

Fum8Rev: 5' ACGCGGTGAGAAGATTAGAGA 3'

실험 결과, 이들 primer 조합은 MP-F 뿐 아니라 MP-A, MP-D 에 속하는 균주로

부터 특이적인 DNA 절편을 증폭하였다. 모든 조사에서 MP-F 균주에서는 특이 절편이 모두 증폭된 데 반해 MP-A 와 MP-D 균주에서는 증폭여부가 균주에 따라 달랐다. 한편 소수의 다른 mating population, MP-B, MP-C, MP-E 에 속하는 균주 게놈 DNA로 부터는 비 특이적인 절편만이 약간 증폭되었다.

3) PCR 검출법의 유용성

G. fujikuroi 검출을 위해 시도된 PCR검출법은 Trichothecene 생성 곰팡이 검출 PCR 방법에 비해 특이성은 떨어졌으나 여러 primer 조합을 통해 독소 생성곰팡이를 검출할 수 있었다. Fumonisin을 생성하는 균주의 대부분은 MP-A와 MP-D 에속하며 이들의 검출은 Fumonisin 생합성 유전자인 Fum5와 Fum6를 이용하여 쉽게 증폭할 수 있었다. 즉 시료에서 특정 크기 절편의 증폭 여부로 MP-A 또는 MP-D 균주의 오염 가능성을 예측 할 수 있다. 또한 다른 primer 조합 (Fum7For + Fum7Rev, or Fum8For + Fum8Rev)을 이용하여 PCR 증폭 양상을 통해 MP-F 균주도 검출 할 수 있다. 즉 Fum5와 Fum6 PCR 과 Fum7 또는 Fum8 PCR에서 모두 특정 절편이 증폭되면 시료에 Fumonisin 생성 뿐 아니라 Moniliformin 생성 MP-F 균주의 오염 가능성을 예측할 수 있다. 한편 Fum7 또는 Fum8 PCR 에서 만 특정 절편의 증폭이 관찰될 경우 시료는 MP-F 균주에만 오염되었다고 판단할 수 있을 것이다.

마. PCR 을 이용한 붉은곰팡이균주의 독소 생성능 측정 및 분석

전년도에 확립된 검출법을 이용하여 여러 붉은곰팡이 병원균으로부터 독소생합성 유전자 절편을 증폭하여 조사 균주들의 독소 생성능을 분석·예측하였다.

1) 유성 교배로부터 얻은 F. graminearum 자손균주들의 chemotype 동정

Trichothecene 생성 균주 중 DON 생성형과 NIV 생성형 사이의 유성교배를 통해얻은 F. graminearum 자손균주의 게놈 DNA로부터 Tri7 과 Tri13 유전자 조각을 증폭하였다 (제 1세부과제 결과 참조). PCR 결과 증폭된 양상의 비교·분석을 통

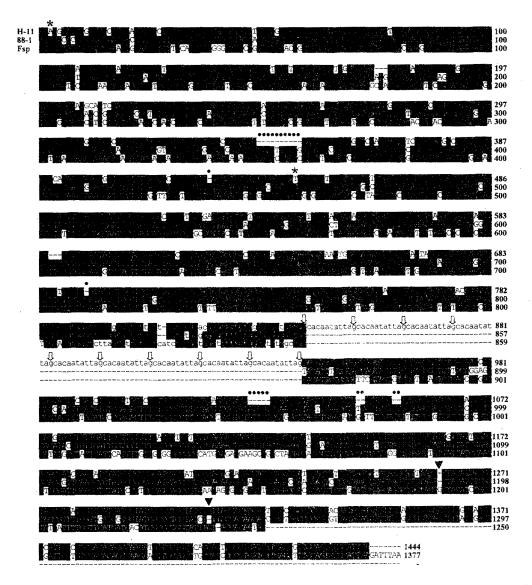


그림 5. Clustal method를 이용한 *G. zeae* 88-1, H-11, *F. sporotrichioides* (Fsp)균주의 *Tri7* 유전자 DNA 염기서열 비교, H-11에서 발견되는 돌연변이 위치는 다음과 같이 표시한다: nucleotide substitutions은 asterisks (*), frameshift를 일으키는 deletions는 굵은 전, nucleotide additions은 inverted black triangles, intron 의 염기서열은 소문자로 표시되었다. H-11에서 발견되는 10개의 tandem repeat는 화살표로 표시되었다.

해 자손균주의 Trichothecene 독소생성형을 결정하였다. 모든 자손균주로부터 부모 균주의 두 가지 독소생성형이 확인되었으며, 총 136 균주 중 76 주는 두 가지 primer 조합의 PCR 증폭을 통해 모두 DON 생성형으로, 나머지 균주 (60주)는 모두 NIV 생성형으로 동정되었다. 한편 유성교배시 Tri7 과 Tri13 유전자 사이의 재조합에 의해 발생될 수 있는 조합형 (Tri7 과 Tri13 유전자가 서로 다른 독소생성형으로 동정되는 경우)은 관찰되지 않았다. 한편 자손균주내에서 관찰된 1:1의 chemotype 분리비는 F. graminearum 균주에서 Trichothecene 독소생성형의 결정은 단일 유전인자에 의하며 그 유전인자가 Tri13 이라는 결과 (Lee et al., 2002)를 유전학적으로 뒷받침한다.

2) 표준 F. graminearum 균주들의 chemotype 동정

지금까지 *Tri7* 과 *Tri13* 유전자 특이 primer 조합으로 독소생성형이 분석된 균 주는 우리나라와 미국산 F. graminearum 이었다. 실험 결과 우리나라의 옥수수에 서 분리한 두 균주 (A18 과 B9 균주, 표 3 참조)를 제외하면 두 primer 조합을 이 용한 PCR 증폭 결과는 모두 일치하였다. 이들 primer 조합에 의한 PCR 검출법의 유용성을 좀 더 다양한 야생형 F. graminearum 균주를 이용하여 검증하였다. 본 실험에 사용된 균주는 미국을 제외한 해외 여러 지역에서 분리한 균주들로서 지금 까지 여러 연구에 사용된 표준균주이다. 총 13 주의 표준균주를 미국 캔자스 주립 대학의 Robert L. Bowden 박사와 John F. Leslie 박사, 남아프리카공화국의 Marasas 박사로부터 분양을 받아 각각의 게놈 DNA 로부터 Tri7 과 Tri13 유전자 를 증폭하였다. PCR 증폭결과 6 주의 표준균주가 *Tri7* primer에 의해서는 NIV 생 성형으로, *Tri13* primer에 의해서는 DON 생성형으로 동정되었다 (표 4). ㅇ와 같 은 독소생성형 동정의 불일치는 이들 균주가 DON 생성형과 NIV 생성형 균주사이 의 교배 (outcross)를 통한 유전적 재조합에 의해 자손균주일 가능성을 시사한다 (그림 5 참조). 한편 외국 균주집단에서 이러한 예외 균주의 출현빈도가 상대적으 로 높은 것은 우리나라 F. graminearum 과 유전적 다양성이 상당히 다른 야생형 균주가 해외에 존재함을 증명한 것이다. 따라서 *Tri7* 과 *Tri13* primer 조합의 동시 사용을 통해 국내산 F. graminearum 균주의 곡물오염 뿐 아니라 수입곡물에 오염 가능한 해외산 독소생성 *F. graminearum* 도 효율적으로 검출할 수 있을 것이다.

표 1. PCR 검출법에 의한 F. graminearum 표준균주의 독소생성형

균주	<i>Tri7</i> primer	<i>Tri13</i> primer
11785	NIV	NIV
11786	NIV	DON
11787	NIV	NIV
11788	NIV	NIV
11789	NIV	NIV
11790	NIV	DON
11791	NIV	DON
11792	NIV	DON
11793	NIV	NIV
11794	NIV	NIV
11795	NIV	NIV
11796	NIV	DON
11797	NIV	DON

3) 곰팡이 바이러스 함유 균주들로부터 PCR증폭

곰팡이 바이러스를 포함하고 있는 균주 (제 2 세부과제 표 1 참조)들의 게놈 DNA로부터 Tri7 과 Tri13 유전자를 증폭하였다 (표5). 보리로부터 분리한 균주들은 바이러스 유무와 종류에 관계없이 두 primer 조합에서 모두 NIV 생성형으로 확인되었다. 이는 바이러스를 포함하지 않는 보리 균주의 대부분이 NIV 생성형이기 때문에 곰팡이바이러스와 독소생성형과의 연관관계가 없다고 할 수 있다. 하지만 옥수수에서 분리한 세 균주는 비록 미량의 DON을 생성하는 균주로 화학적으

로 동정되었고, *Tri13* primer에 의한 PCR 을 통해서도 DON 생성형에 특이적 증폭양상을 보였다. 그러나 *Tri7* primer에 의해서는 NIV 생성형으로 동정되어 지금까지 우리나라에서 낮은 빈도로 검출된 '예외 균주'와 같은 유전형을 가진 것으로예상된다. 비록 옥수수 균추 중 바이러스 함유 균주의 검출 빈도가 매우 낮아 더많은 균주의 조사가 필수적이지만 이와 같은 결과는 곰팡이 바이러스 함유와 옥수

표 5. 곰팡이바이러스 함유 *F. graminearum* 균주를 이용한 PCR 증폭

균주	곰팡이 바이러스의 게놈의 크기	기주	<i>Tri7</i> primer	Tri13 primer
98-8-60	2-4 kb	보리	NIV	NIV
98-56-12	2-4 kb	보리	NIV	NIV
98-71-14	2-4 kb	보리	NIV	NIV
98-71-23	2-4 kb	보리	NIV	NIV
98-83-28	2-4 kb	보리	NIV	NIV
YWD-3	4-9 kb	옥수수	NIV	DON
DK-3	2-12 kb	옥수수	NIV	DON
DK-21	8-9 kb	옥수수	NIV	DON

수 균주의 특정한 유전형과의 상관관계 가능성을 시사한다고 할 수 있다.

4) 야생형 G. fujikuroi 균주의 mating population 결정

먼저 2년 차 연구에서 분석한 *G. fujikuroi* 균주 외에 25개 지역의 옥수수와 수수시료로부터 추가로 분리한 78 주의 *G. fujikuroi* 균주들의 mating population을 표준균주와의 교배를 통해 결정하였다. 그 후 1, 2년 차 연구에서 사용한 primer 조합을 이용하여 각각의 게놈 DNA로부터 Fumonisin 생합성 관련 유전자를 증폭하였다. 2년 차 연구 결과와 마찬가지로 45 주의 MP-A 와 MP-D 균주로부터는 예외 없이 *Fum5* (rp32 와 rp33 primer 조합의 경우)와 *Fum6* 유전자 (rp98 과

rp117 primer 조합의 경우) 의 일부를 증폭할 수 있었다. 하지만 Fum5와 Fum6 유전자의 인근에 위치하지만 Fumonisin 생합성에 관여하지 않는 Fum7과 Fum8 유전자는 MP-A 균주중 각각 20% (Fum7), 25% (Fum8)의 균주에서만 증폭되었다. 한편 어떠한 Fumonisin 미생성 MP-F 균주로부터도 Fum5와 Fum6 유전자를 증폭할 수 없었으나 Fum7 과 Fum8 유전자는 모든 MP-F 균주로부터 증폭되었다. 이와 같은 증폭양상은 전년도의 결과와 일치한다. 하지만 Fumonisin 생성 균주와 미생성 MP-F 균주가 곡물시료에 함께 오염되어 있을 경우 이들 primer 들의 조합만으로는 두 종류 균주의 혼합오염 여부를 결정할 수 없다. 따라서 아래와 같이 MP-F 균주만을 특이적으로 검출할 수 있는 primer 조합의 개발을 수행하였다.

5) G. fujikuroi MP-F 균주의 특이적인 검출을 위한 primer의 개발

2003년 새롭게 분석된 MP-A에 속하는 미국 표준균주의 Fumonisin 생합성 유 전자군 (총 60 kb)과 1년 차 연구에서 이미 분석된 우리나라 MP-F 균주의 해당 부위 염기서열 (총 22 kb)의 유사도를 비교하였다. 두 균주 사이 DNA 염기서열 유사도는 서로 비교가 가능한 16 kb 크기에서 예상보다 훨씬 높은 93 %이었다. 특히 각 균주의 염기서열중 한 군대를 제외하고는 10 bp 이상의 염기가 deletion 또는 insertion 된 부분을 발견할 수 없었다. 한 군데 예외적인 부위의 MP-F 균주 게놈에서는 27개의 염기가 deletion 된 것을 관찰할 수 있었다 (data not shown). 하지만 이 부위는 MP-F 균주에 특이적인 절편을 증폭시키는데 필요한 PCR용 primer를 제작하기에는 부적절하였다. 따라서 그림 7과 같이 두 균주 간 변이가 관 찰된 부위를 이용하여 PCR용 primer를 제작하였다. 한편 변이 부위가 다른 야생 형 균주에서도 보존되어있는 지 확인하기 위해 해당 변이 부위를 포함한 DNA 절 편을 5 주의 MP-A, 3 주의 MP-D, 10 주의 MP-F 균주의 게놈 DNA로부터 증폭 하여 염기서열을 결정하였다. 실험 결과 증폭된 변이부위는 각각의 mating population에서 보존이 잘 되어있음이 확인되었다. 그 다음 MP-F 균주로부터만 특 이적인 절편이 증폭되도록 제작된 4 개의 primer (그림 7 참조)를 이용한 3 가지 조합의 PCR 증폭을 통해 MP-F/fp3 와 MP-F/rp1 조합의 primer만이 MP-F 균주 로부터 특이적인 DNA 절편을 증폭함을 확인하였다. 그리고 MP-F/fp3 + MP-F/rpl 조합의 특이성을 확인하기 위해 표준균주를 포함한 모든 MP-F 균주와 Fumonisin 생성 MP-A, MP-D 균주들의 계놈 DNA를 이용한 PCR 증폭을 수행하였다. 실험 결과 오직 MP-F 균주로부터만 595 bp의 특이적인 절편이 증폭되어 이

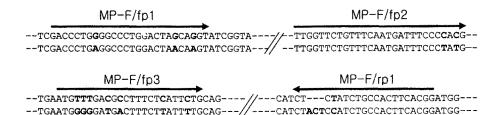


그림 7. MP-A 와 MP-F 균주 사이 Fumonisin 생합성 유전자군의 일부 DNA염기서열 비교. 윗줄이 MP-A, 아랫줄이 MP-F 균주의 염기서열을 나타냄. 두 균주간 변이를 나타내는 DNA 염기는 bold체로 표시하였으며, 변이 염기서열을 이용한 primer의 위치와 방향은 화살표로 표시됨.

primer 조합이 MP-F 균주의 검출 및 확인에 매우 유용함이 증명되었다.

바. 곡물시료로부터 PCR 검출법을 이용한 독소생성균의 오염조사

지금까지의 연구결과 확립된 PCR 검출법을 이용하여 보리와 옥수수 시료로부터 직접 붉은곰팡이의 독소생합성 유전자를 증폭하였다. 독소특이적인 절편의 증폭양상의 분석을 통해 곡물시료내 독소생성 붉은곰팡이의 오염 및 독소의 자연발생가능성을 예측하였다.

1) 곡물시료로부터 게놈 DNA의 추출 및 정량

전국각지에서 채집한 보리와 옥수수시료는 3일간 자연 건조시킨 후 마쇄기로 갈아 게놈 DNA 추출을 위한 재료로 사용하였다. 자연 건조된 0.5 g의 곡물시료로 부터 게놈 DNA 추출을 위한 적정 방법을 찾기 위하여 곡물시료를 기존의 식물 및 곰팡이 게놈 DNA 추출에 많이 사용하는 2% CTAB (cetyltrimehtylammonium bromide) buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) 용액을 이용하는 방법과 미국 MRC 사 (Molecular Research Center Inc.) 가 개발한 DNAzol 용액을 이용하는 방법을 사용하였다. CTAB buffer 용액으로

곡물시료를 lysis 시킨 후 게놈 DNA를 추출하는 경우 소수의 시료에서만 미량의 게놈 DNA을 얻었으며, 추출된 게놈 DNA도 mechanical shearing 에 의해 질이 매우 떨어졌다. 반면에 DNAzol 용액을 이용할 경우 시료에 관계없이 충분한 양의 게놈 DNA를 얻을 수 있었으며 shearing도 거의 일어나지 않아 질도 높았다. 더욱이 시료의 lysis 후 phenol 추출 및 RNA 침전 등과 같은 과정을 거쳐야하는 CTAB 방법에 비해 DNAzol 용액을 사용할 경우 그와 같은 과정을 생략할 수 있어 추출과정이 매우 빠르고 간편하였다. 이후 DNAzol을 이용하여 모든 곡물시료 로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 게놈 DNA는 0.6% agarose gel 상에서 분리한 후 gel doc system을 이용하여 gel image 상에서 50 ng의 Lambda DNA과 band brightness를 비교하여 정량하였다.

2) 곡물 게놈 DNA로부터 PCR 증폭

곡물 시료로부터 추출한 게놈 DNA 20 - 30ng을 붉은곰팡이 검출을 위한 PCR 반응의 template로 사용하였다. primer 조합으로는 Trichothecene 생성 F. graminearum 검출을 위한 GzTri7/fl 과 GzTri7/rl 조합 (Tri7 유전자 증폭용), GzTri13/pl 과 GzTri13/p2 조합 (Tri13 유전자 증폭용)을 사용하였으며, Fumonisin 생성 G. fujikuroi (MP-A 와 MP-D)검출을 위한 rp32 와 rp33 조합 (Fum5 유전자 증폭용), rp98 과 rp117 조합 (Fum6 유전자 증폭용)을 사용하였다. 또한 Fumonisin 미생성 G. fujikuori (MP-F)를 검출하기 위해서는 MP-F/fp3 와 MP-F/rp1 조합을 사용하였다. PCR 반응조건은 사용 primer의 Tm 값에 따라 annealing 온도를 55℃ 에서 65℃ 사이에서 조절하였다. PCR 검출 결과는 표 5 에 종합적으로 요약하였다.

먼저 전국 35 개 지역에서 채집한 47 개의 보리시료와 8 개 지역에서 채집한 18개의 옥수수 시료로부터 Trichothecene 생합성 유전자를 증폭하였다. 보리의 경우 F. graminearum 의 Tri7 과 Tri13 유전자가 모두 증폭된 시료는 30개이었으며 모두 NIV 생성형의 증폭양상을 보였다. 두 Tri 유전자 중 Tri7 유전자는 증폭되었으나 Tri13 유전자는 증폭되지 않은 시료는 8개이었다. 이 경우에도 Tri7 유전자의 증폭양상은 NIV 생성형이었다. 한편 두 Tri 유전자가 모두 증폭되지 않은 시료는 9개이었다 (그림 8 참조). PCR 증폭을 통해 보리시료에 오염된 F. graminearum이

NIV 생성형이라는 결과는 보리로부터 실제 분리된 F. graminearum의 95% 이상 이 NIV 생성형이라는 화학 분석결과를 뒷받침 한다 (제1 세부과제 결과 참조). 또 한 8개 시료에서 관찰된 두 *Tri* 유전자의 증폭변이결과를 통해 *Tri7* 검출 PCR 조 건이 Tri13 검출조건보다 훨씬 민감함을 알 수 있었다. 그리고 두 Tri 유전자가 모 두 증폭되지 않았던 9개 시료에는 최소한 F. graminearum이 PCR 검출한계 이하 로만 존재하거나 또는 전혀 오염되지 않았다고 예측할 수 있다. 따라서 이러한 시 료에서는 Trichothecene의 자연발생 가능성이 매우 낮다고 할 수 있다. 실제로 이 들 시료로부터 화학적으로 Trichothecene 자연발생을 분석하였을 때 가스크로마토 그래피 검출한도 이하 또는 극소량의 발생만이 확인되었다. 한편 보리시료로부터는 G. fujikuroi 에 특이적인 DNA 절편이 전혀 증폭되지 않았다. 이 결과는 G.fujikuroi 가 실제로 보리에서 검출되지 않았다는 이전 결과를 뒷받침한다 (제 1세 부과제 결과 참조). 옥수수시료의 경우 예상 밖으로 낮은 빈도 (4/19)로 Tri7 또는 Tril3 유전자 검출되었으며, 이들의 증폭양상은 모두 DON 생성형으로 확인되었다. 반면 12개의 시료에서 *G. fujikuroi* 의 *Fum5* 와 *Fum6* 유전자가 증폭되었으며, MP-F 에 특이적인 절편은 증폭되지 않았다. PCR 검출 결과, 조사에 사용된 옥수 수 시료에는 전반적으로 *F. graminearum*의 오염이 저조하며 대신 *G. fujikuroi*가 우점종으로 오염되어있음을 추측할 수 있다. 이와 같은 결과는 보리와 달리 옥수수 에는 실제로 F. graminearum 과 G. fujikuroi (F. moniliforme) 가 모두 우점종일 수 있으며, 두 곰팡이의 오염빈도는 시료에 따라 다르고, 대부분의 F. graminearum 은 DON 생성형이며, G. fujikuroi 는 MP-A 에 속한다는 기존의 연 구결과와 일치한다 (제 1 세부과제 참조). 한편 MP-F 균주에 특이적인 MP-F/fp3 와 MP-F/rpl primer 조합은 G. fujikuroi MP-F 균주들이 우점종으로 분리되는 수 수나 해외의 곡물의 PCR 검출법에는 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 하지만 본 연구에서는 독소의 자연발생량과 독소유전자의 증폭량사이에 일정한 상관관계를 확인할 수 없었다. 따라서 보다 정량적인 독소의 자연발생을 PCR 반응으로 측정하 기 위해서는 같은 primer 조합들을 이용한 real-time PCR 또는 competitive and quantitative PCR 같은 검출법의 개발이 필요하다.

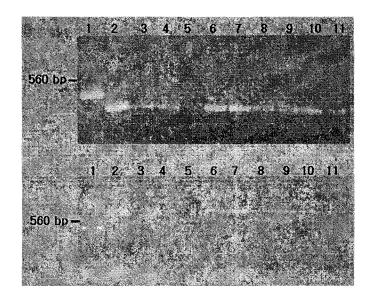


그림 8. 보리시료로부터 *Tri7* 과 *Tri13* 유전자의 증폭. 위 panel은 *Tri7* primer 조합, 아래 panel은 *Tri13* primer 조합을 이용한 PCR 증폭. lane 1: H-11 균주 (DON 생성형), lane 2: 88-1 균주 (NIV 생성형), lanes 3 - 11: 보리시료 (BS 5 - BS13, 표 4 참조)

표 4. PCR 검출법을 이용한 곡물시료 (보리: BS, 옥수수: CS)내 독소생성 붉은곰팡이의 오염 조사

곡물시료	Tri7 증폭	Tri13 증폭	Fum5 증폭	Fum6 증폭	MP-F 특이증폭
BS-1	+	+	-	***	
BS-2	+	+			N.A.
BS-3	+	+			Jama
BS-4	+	****	-	****	Vident
BS-5	+	+	~	***	
BS-6	+	+	-		
BS-7			_	spine.	-
BS-8	+	+	_	Marcon.	-
BS-9	+	+		serve.	-
BS-10	+	+	- Annual School of the Control of th		
BS-11	+	+	-		-
BS-12	+	+	water		- ·
BS-13	+	+		Alana.	min.
BS-14	***		<u>.</u>		
BS-15	+	+	_	-	
BS-16	+	+		-	
BS-17	+	+			·
BS-18		***	Name	-	dana
BS-19	+	-	_		
BS-20	+				
BS-21	+	+			, many
BS-22	+	+	-		-

표 4. 계속

곡물시료	Tri7 증폭	Tril3 증폭	Fum5 증폭	Fum6 증폭	MP-F 특이증폭
BS-23	+	_	-	~	_
BS-24		_		_	~~
BS-25	+	+	_	_	-
BS-26	+	+	_	_	
BS-27	+	+	_		-
BS-28	+	+	-	-	-
BS-29	_	-	_	_	<u></u>
BS-30	+	_		_	-
BS-31	+	+	_	_	-
BS-32	+	+		_	_
BS-33	+	+	_	-	_
BS-34	+	-	_	-	
BS-35	+		-	_	<u>-</u>
BS-36	+	+	_	_	_
BS-37	+	+		_	
BS-38	+		_	_	-
BS-39	+	+		_	-
BS-40	+	+	_	_	_
BS-41	+	+			
BS-42	+	+	_	_	

표 4. 계속

곡물시료	Tri7 증폭	Tri13 증폭	Fum5 증폭	Fum6 증폭	MP-F 특이증폭
BS-43	+	+			
BS-44	. –		_	****	
BS-45		+	_	****	-
BS-46	_	——————————————————————————————————————	_		Paren.
BS-47		—	_		,one
CS-1		—	+	+	
CS-2	—	. +	+	+	Abre
CS-3	_	—	— — — — — — — — — — — — — — — — — — —	army.	
CS-4		_	_		many .
CS-5	_	***	+	+	T
CS-6	+	+	, ma		
CS-7	-		-		
CS-8	_	-	+	+	/ 100 00
CS-9	-	+	+		
CS-10	_	_	+	+	-
CS-11	-	***		what	
CS-12	-	+	+	+	****
CS-13	_	-	+	+	parties.
CS-14	_	_	4		****
CS-15	-		+	+	
CS-16	_				
CS-17	****		+	+	
CS-18	_		+	4004	
CS-19	_	_	+		

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발 목표와 내용 및 평가의 착안점

1. 1 년차

- 가. 옥수수와 보리로부터 독소생성 Fusarium 균주의 분리, 동정 및 독소생성능 측정
- 나. 독소생성 *Fusarium* 균으로부터 곰팡이 바이러스 분리 및 지역 또는 균주특 성별 연관관계 규명
- 다. Fumonisin과 trichothecene의 생합성 유전자 분리 및 특성규명

2. 2년차

- 가. 곰팡이독소의 생합성 유전자 분리 및 특성 규명
- 나. Fusarium 균으로부터 분리한 곰팡이 바이러스의 cloning 및 염기서열 분석 에 의한 기존 보고된 바이러스와의 연관관계 규명
- 다. PCR을 이용한 독소 검출법의 검증시험을 통한 신뢰도 확인

3. 3년차

- 가. 균주간의 교배 성공 가능성 및 독소생성능의 유전분석
- 나. 곰팡이 바이러스를 이용한 벡터 제작 및 실용가능성
- 다. 농산물에서 독소검출법의 적용

제 2 절. 연구개발 목표의 달성도

본 과제를 주관하는 서울대학교 연구책임자은 지난 15년간 국내에서 옥수수와 맥류에서 발생하는 붉은 곰팡이병원균에 의한 농작물의 독소오염을 지속적으로 조사해 오고 있던 바 이 연구에서는 Fusarium균이 생성하는 독소 생성능의 측정, 곰팡이바이러스의 분리, 및 독소 생합성 유전자의 특성을 규명하여 생명공학기법을 이용한 독소 검출법 개발을 통한 곡물에서 독소에 대한 안전선 향상을 궁극의 목표로 하고 있다. 이 연구에서는 균의 분리와 독소 생성능을 측정하여 독성균주의 균학적 체계를 정립하였으며 독소 생합성 관련 유전자들에 대한 특성을 규명하여 생물공학기법을 이용한 독소검출법을 개발하였다. 또한 곰팡이바이러스를 분리하여 그 특성을 규명하였고 이를 이용한 벡터제작을 통하여 비병원성균주 개발의 토대를 마련하여 전반적으로 연구목표는 달성되었다고 사료된다. 3년 동안에 얻은 결과의 일부는 이미 국내외학술지에 4건 발표를 하였으며 국내외 학술대회에서 10건 발표를 하였다. 또한 국내록허도 1건 출원하였다. 연구가 종료 후에도 계속 논문을 발표할 예정이다.

제 3 절. 관련분야에의 기술발전 기여도

본 연구는 우리나라에서 분포하고 있는 Fusarium균이 생성하는 곰팡이독소의 종류와 이를 PCR로 검출하는 기법을 개발하였다는 점에서 이 분야의 기술발전을 도모하였다고 사료된다. 곰팡이독소의 검출은 독소의 정제 및 정량의 어려움, 고가의분석기기, 독소의 안정성 등으로 전문적인 경험을 요하며 많은 시간이 요구되어 연구에 큰 진전이 없었다. 특히 국내의 곰팡이독소 오염 측정기술은 선진외국과 비교하여 낙후되어있으며 그중 독성곰팡이의 검색과 독소의 자연발생을 연관하여 연구하는 전문인력이 부족한 실정에서 본 연구에서 개발한 검출법은 시의적절하며 비교적 용이하게 사용가능한 장점이 있다. 앞으로 곰팡이독소뿐만 아니라 농산물에서 문제가 되고 있는 다른 독성물질의 검출법 개발에도 참고가 될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 개발한 방법은 국외 학술지(Appl. Environ. Microbiol. 2001)에게재한 결과 미국, 일본 등의 외국과학자들에 의해서 다수 인용되고 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 추가연구의 필요성

국내에서 수행되는 붉은곰팡이병원균에 관한 연구는 주로 본 연구진에 의해 진행 되고 있으며 유전적으로 3 집단으로 구분될 수 있음을 밝혀졌다. 이와 같은 집단유 전학적 연구와 더불어 붉은곰팡이의 독소인 DON 과 NIV 생성의 변이에 관한 연 구를 통해 DON/NIV 생합성에 결정적인 역할을 하는 유전자는 Trichothecene 생 합성 유전자 cluster에 존재하는 *Tri13*과 *Tri7*임을 밝혔다. *Tri13* 유전자는 NIV 생 성형 균주에서 NIV 생합성 과정에서 Trichothecene 모핵의 C-4에 hydroxylation 에 관여하며, Tri7은 C-4위치에 acetyl기를 붙여서 NIV의 유도체인 4-acetyl NIV 를 만드는 데 관여한다. 한편 DON 생성형 균주들은 Tri13 과 Tri7 유전자의 기능 을 상실하였다. 지금까지 붉은곰팡이의 유전학적 연구의 가장 큰 장애였던 자가화 합성을 붉은곰팡이 교배형 결정유전자의 조작을 통해 자가불화합성으로 전환시키 는 데 성공하였다. 즉 붉은곰팡이의 게놈 내 존재하는 서로 다른 두 개의 유전자를 각각 제거하여 더 이상 자가교배를 통해서는 자낭각을 형성하지 못하고 오직 반대 되는 유전자만을 가지고 있는 형질전환체나 야생형균주와의 결합을 통해서만 자낭 각 형성을 가능하게 하였다. 이와 같이 추가연구에서는 선행연구의 경험과 유용한 결과의 확보, 참여 연구진의 전문성 및 유기적인 공동연구 체계 등을 고려할 때 성 공적인 연구를 수행할 수 있다. 우리나라 토착 붉은곰팡이 집단의 특성을 규명하려 는 노력은 차기연구과제의 목표인 붉은곰팡이병의 효과적인 방제에 필수 불가결한 기반 연구가 될 것이다. 이러한 연구는 붉은곰팡이 병원균의 병리학적, 균학적 및 유전학적 특징을 규명하게 될 것이다.

제 2 절. 타 연구에의 응용

우리나라와 미국 내 분포하는 붉은곰팡이 집단의 유전적 다양성에는 큰 차이가

존재하기 때문에 저항성 품종의 육종을 위한 연구의 대상 병원균이 차이가 있다고할 수 있다. 북미에 분포하는 붉은곰팡이 집단은 lineage 7에 속하며 특히 우리나라의 대표적 lineage 6 균주는 발견되지 않는다. 이는 향후 병 저항성 육종연구에 있어서 lineage 6에 중점을 두어 육종할 필요가 있다. 이와 함께 독소의 생성은 집단에 특이적인 독소를 생성하므로 우리나라에서는 NIV 생성균주들이 우점종을 차지한다. 특히 NIV는 DON보다 독성이 더 높은 것으로 보고 되어 있으므로 저항성품종 육종에서 독소를 경감시킬 수 있는 전략이 필요하며 본 연구의 결과가 응용될 수 있을 것이다.

제 3절. 연구 결과의 활용계획

현재까지 본 연구결과는 논문발표 4건, 학술대회 발표10건, 특허출원 1건이며 과 제종료 후에도 논문을 발표할 예정이다. 본 연구에서 개발한 독소를 검색할 수 있 는 결과는 산업체와 식물검역에서 곡물을 수입할 때 독성곰팡이의 검색에 유용하 게 사용될 수 있으리라 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구 과제를 수행하면서 수집한 관련기술 정보로서는 표준균주를 확보하였다. 이는 본 연구수행에서 뿐만 아니라 향후 연구수행에도 중요하며 국내 다른 연구자들에게도 분양이 가능하다. 미국 Kansas 주립대학의 Robert Bowden교수와 Mississippi USDA의 Dr. Abbas로부터 F. graminearum을, Kansas 주립대의 John Leslie교수와 남아프리카 Medical Research Counsel의 Marasas박사로부터 F. verticillichoides균주를 다수 분양받았다.

1990년대 이후 미국, 캐나다 등 북미지역에서 F. graminearum에 의한 붉은곰팡이병이 대발생하여 미국에서는 이 병에 대한 작물의 저항성 품종 육종이 큰 과제로 떠오르고 있다. 이를 위하여 병원성에 관련이 있는 독소생합성 유전자를 연구하여 이 병의 방제를 위한 유용 유전자를 탐색하는 연구가 진행되고 있다. 무엇보다도 F. graminearum의 유전체 연구가 활발히 진행되고 있는 점이다. 미국 정부에서는 붉은곰팡이의 경제적 중요성을 인정하여 US Wheat and Barley Scab Initiative를 발족시켜 미국 Whitehead Institute 의 유전체연구센터와 공동으로 G. zeae 의 게놈 분석을 착수하여 2003년 5월에 게놈염기서열의 초안을 공개하였다. 이에 따라 앞으로의 주요 연구 방향은 전체 게놈의 염기서열을 토대로 생물정보학기술을 이용한 유전자 구분 및 유사도 분석, 개별 유전자의 Knockout이나 유전체 삽입변이체 육성기술에 의한 기능유전체 연구가 활발히 진행 될 전망이다. 또한 DNA chip기술을 이용하여 보다 효율적이고 대규모로 EST 분석이 수행될 것이며 독소 생합성 관련 유전자의 연구도 활발히 진행될 것으로 기대한다.

O'Donnell 등(2000)은 전 세계적으로 수집한 붉은곰팡이 균주들은 특정 유전자의염기서열 비교분석을 통해서 유전적으로 상이한 집단임을 밝혔으며 현재까지 9개의 lineage로 분류하고 있는데 이러한 결과는 붉은곰팡이병원균에 대한 저항성 작물육종을 보다 더 어렵게 할 가능성이 높다. 따라서 우리나라에서도 우점 lineage를 대상으로 병 저항성 육종이 시도 되어야 할 것 이다. 이와 같이 여러 균학적・병리학적・독성학적 특성을 공유하는 집단의 존재는 붉은곰팡이의 진화 과정 중여러 집단으로의 분화 및 정착에 있어 자가화합성 유성생식방법의 역할을 예측할수 있게 되었다. 이에 따라 Bowden교수 등(2003)은 유전적 집단의 구분이후 집단

간 교잡의 가능성을 실험실 내 교배실험을 통해 증명하였으며 실험적 교배를 통해 생산된 자손의 유전분석을 통해 붉은곰팡이의 유전자 지도가 작성하였다.

제 7 장 참고문헌

Abbas, H. K. and Mirocha. C. J. 1988. Isolation and purification of a hemorrhagic factor (Wortmannin) from *Fusarium oxysporum* (N17B). *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1268-1274.

Bowden, R. L. and Leslie, J. F. 1999. Sexual Recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 89:182–188.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., and Desjardins, A. E. 2001. A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *F. graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* 32:121-133.

Brown, D. W., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Proctor, R. H., and Desjardins, A. E. 2002. Inactivation of a cytochrome P-450 is a determinant of trichothecene diversity in *Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 36:224-233.

Buck, K. W. 1986. Fungal Virology: An overview. In: Fungal Virology (K. W. Buck, Ed.), pp 1-84. CRC Press, Boca Raton, FL.

Buck, K. W. 1988. From interferon induction to fungal viruses. *Eur. J. Epidemiol.* 4: 395–399.

Darkin-Rattray, S. J., Gureett, A. M., Myers, R. W., Dulski, P. M., Crumley, T. M., and Schmatz, D. M. 1996. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:13143-13147

Desjardins, A. E. and Hohn, T. M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:147-152

Desjardins, A. E., Proctor, R. H., Bai, G., McCormick, S. P., Shaner, G., Beuchley, G., and Horn, T. H. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of Gibberella zeae in wheat field tests. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:775-781.

Doohan, F. M., Weston, G., Rezanoor, H. N., Parry, D. W., and Nicholson, P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study

expression of *Tri*5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3850-3854

Hohn, T. M., McCormick,S. P., Alexander, N. J., Desjardins, A. E., and Proctor, R. H. 1998. Function and biosynthesis of trichothecenes produced by *Fusarium* species, p. 17–24. In Kohmoto and Yoder eds. Molecular genetics of host specific toxins in plant disease. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y., and Ueno, Y. 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1364–1369.

Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T. J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., and Yamaguchi, I. 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential gene. *FEBS Lett.* 539:105–110.

Lee, T., Oh, D. W., Kim, H. S., Lee, J., Kim, Y. H., Yun, S. H., and Lee, Y. W. 2001. Identification of deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae* by using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2966-2972.

Lee, U. S., Jang, H. S., Tanaka, T., Hasegawa, A., Oh, Y. J., and Ueno, Y. 1985. The coexistence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, dexoynivalenol and zearalenone in Korean cereals harvested in 1983. *Food Addit. Contam.* 2:185–192.

Marasas, W.F.O., Nelson, P. E., and Toussoun, T. A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology. Pennsylvania State University, University Park.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated mannual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.

Nogawa, M., Kageyama, T., Nakatani, A., Taguchi, G., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1996. Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. 60: 784-788.

Nogawa, M., Shimosaka, M., Kageyama, T. and Okazaki, M. 1993. A doule-stranded RNA mycovirus from the plant pathogenic fungus, Fusarium solani f.sp. robiniae. *FEMS Microbiol. Lett.* 110:

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Tacke, B. K., and Casper, H. H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of Fusariumgraminearum, the fungus causing wheat scab. 97:7905-7910.

Panaccione, D. G., Scott-Craig, J. S., Pocard, J. A., and Walton, J. D. 1992. A cyclic peptide synthetase gene repuired for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6590-6594

Park, J. S., Lee, K. R., Kim, J. C., Lim, S. H., Seo, J. A., and Lee, Y. W. 1999. A Hemorrhagic factor (Apicidin) produced by toxic *Fusarium* Isolates from soybean seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:126–1301

Proctor, R. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D., and Hohn, T. M. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of Fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27:100-112.

Proctor, R. H, Brown, D. W, Plattner, R. D., and Desjardins, A. E. 2003.Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38:237-249

Rabie, C. J., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Lubben, A., and Vleggaar. R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from South Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 43;517–521.

Schilling, A. G., Miedaner, T., and Geiger, H. H. 1997. Molecular variation and genetic structure in field populations of Fusarium species causing head blight in wheat. *Cereal Res. Comm.* 25:549-554

Scott-Craig, J. S., Panaccione, D. G., Pocard, J. A., Walton, J. D. 1992. The cyclic peptide synthetase catalyzing HC-toxin production in the Filamentous Fungus *Cochliobolus carbonum* is encoded by a 15.7 kilobase Open Reading Frame. *J. of Biol. Chem.* 256:26044-26049

Smith, J. E., Solomons, G., Lewis, C., and Anderson, J. G. 1995. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Natural toxins* 3:187-192 Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. and Stockenstrom, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39:2014-2018.

Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Schalkwyk, D. J. and Koch. K. R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, South Africa.

J. Agric. Food Chem. 38:1900-1903.

Tanaka, T., A. Hasegawa, Y., Matsuki, K., and Ueno, Y. 1985. Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. *Food Addit. Contam.* 2:125–137.

Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Sugiura, A., and Ueno, Y. 1988. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. I. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36:979–983.

Valverde, R. A., Nameth, S. T. and Jordan, R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74: 255-258.