

옥수수 이삭썩음병에 관여하는 *Fusarium*속군의 동정

최효원* · 김정미 · 김진희 · 홍성기 · 김완규 · 천세철¹

농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과, ¹ 건국대학교 생명환경과학대학 분자생명공학과

Identification of *Fusarium* Species Associated with Corn Ear Rot

Hyo-Won Choi*, Jung-Mi Kim, Jin Hee Kim, Sung Kee Hong, Wan Gyu Kim, and Se-Chul Chun¹

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

¹Department of Molecular Biotechnology, College of Life and Environmental Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

(Received June 16, 2009. Accepted September 8, 2009)

ABSTRACT: In 2007, a total of 77 isolates of *Fusarium* spp. were obtained from ear rot symptoms of corns collected from 5 locations in Gangwon Province, Korea. The fungal isolates were identified based on their morphological features. Out of the isolates, fifteen isolates were identified as *Fusarium verticillioides* which formed microconidia in long chains on monophialides. Four isolates were identified as *F. subglutinans* which formed microconidia only on false heads. Six isolates were identified as *F. graminearum* which produced red pigment in PDA culture. Besides these *Fusarium* species, *F. napiform*, *F. nygamai*, and *F. oxysporum* were identified from the rest isolates. To assess for genetic diversity of the isolates, a random amplified polymorphic DNA(RAPD) technique was carried out using URP primers. The results from the RAPD analysis showed that the isolates from corn were divided into 6 groups. These RAPD groups of the *Fusarium* species corresponded to morphological characters of the *Fusarium* species. The phylogenetic analysis of most isolates by DNA sequencing of EF-1 α gene corresponded to morphological characters of the *Fusarium* species. The results of pathogenicity tests by two inoculation methods revealed that *F. verticillioides*, *F. graminearum* and *F. subglutinans* are strongly pathogenic to corn stalks.

KEYWORDS: Corn ear rot, *Fusarium graminearum*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium verticillioides*, Pathogenicity

옥수수(*Zea mays* L.)는 밀(*Triticum aestivum* L.), 벼(*Oryza sativa* L.)와 더불어 세계 3대 작물로서 식량, 사료, 공업원료로 사용되며, 재배면적이 넓고, 단위면적당 수량성이 뛰어난 작물이다(농업생명공학연구원, 2006).

옥수수에는 많은 종류의 병이 발생하고 있으며, 우리나라에서 옥수수에 발생하는 진균병으로는 둥근무늬병, 점무늬병, 잎마름병을 비롯하여 13가지의 병이 알려져 있는데, 이 중 *Fusarium*군에 의한 병해로는 *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw.에 의한 이삭썩음병, *Gibberella zeae* Schwein (Petch.)에 의한 붉은곰팡이병, *Fusarium moniliforme* I. Sheld.에 의한 밀등썩음병 등이 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004). 반면 외국의 경우, *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg를 비롯하여 *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Tousson & Marasas와 *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg이 관여하는 *Fusarium* ear rot와 *Fusarium graminearum* Schwabe가 주로 관여하는 *Gibberella* ear rot로 구분하고 있다(Munkvold, 2003). 이들 병원균의 감염은 옥수수의 수량을 감소시키고, 품질을

저하시킬 뿐만 아니라 진균독소를 생산하여 인축에도 해를 주는 것으로 알려져 있다(Sutton, 1982).

과거에 옥수수 이삭썩음병균으로 보고된 *F. moniliforme*는 여러 가지 종이 혼재하는 종복합체(species complex)로 밝혀졌고, 최근 분자생물학적 실험법의 발전으로 인하여 본 종복합체에 대한 새로운 연구 결과가 계속해서 보고되고 있으며, 분류학적으로 현재까지도 논쟁의 여지가 있는 균이다(Seifert *et al.*, 2003). 현재 옥수수 이삭썩음병균은 *F. verticillioides*로 알려져 있으며, 과거에 보고된 *F. moniliforme*에는 *F. subglutinans*나 *F. proliferatum* 등이 포함되어 있다(Munkvold, 2003).

이러한 옥수수 이삭썩음병에 대한 외국의 연구는 식량과 사료로 이용되는 경우 심각한 문제가 될 수 있는 진균독소에 관한 연구(Fandohan *et al.*, 2003; Presello *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2007)와 분리한 병원균의 유전적 다양성 분석에 관한 연구(Danielsen *et al.*, 1998; Kini *et al.*, 2002) 등이 수행되었다. 또한, 국내에서는 80년대 초반까지 옥수수 이삭썩음병 발생이 단편적으로 보고되었고, 옥수수에서 분리된 *F. moniliforme*의 증자감염 양식과 병원성 등에 대한 연구가 있었다(김 등, 1984). 그리고 옥수수에서 분리한

*Corresponding author <E-mail: hyon338@rda.go.kr>

Fusarium sporotrichioides Sherbakoff의 T-2 독소에 관한 연구 (Lee *et al.*, 1990), 중국산 옥수수 시료에서 분리한 *Fusarium* 종의 독성연구(이 등, 1994), 옥수수과 보리에서 분리한 *F. graminearum*이 생산하는 독소에 관한 연구(서 등, 1998) 등 주로 병원균이 생산하는 독소에 관한 연구가 수행되었으나 본 병에 관여하는 병원균에 대한 분류 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 이삭썩음증상이 있는 옥수수를 채집하고, *Fusarium*속균을 분리하여 균학적 특성을 조사하였고, 분리된 균주의 유전적 다양성과 염기서열 등을 분석하여 국내의 옥수수 이삭썩음병에 관여하는 *Fusarium*균을 동정하였으며, 이들의 병원성을 확인하였다.

재료 및 방법

병원균 분리

강원도 지역의 옥수수 재배포장에서 이삭썩음증상이 있는 옥수수 시료를 채집하여 병원균을 분리하였다. 병든 이삭을 1% 차아염소산나트륨을 사용하여 표면소독한 후, 살균수로 3회 세척하여 WA(water agar)배지에 치상하였다. 치상 5~7일 후, 자라난 균총으로부터 *Fusarium*균을 단포자 분리하여 PDA(potato dextrose agar)와 SNA(synthetic low nutrient agar) 사면배지에 옮겨 배양하였고, 이들 균주를 10°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

균학적 특성조사

분리된 *Fusarium*균의 균학적 특성은 PDA배지와 CLA(carnation leaf agar)배지 및 SNA배지에 균을 배양하여 조사하였다. 조사방법은 다른 연구자들(Gerlach and Nirenberg, 1982; Leslie and Summerell, 2006; Nelson *et al.*, 1983)의 기준에 따라 실시하였다. 배양적 특성을 조사하기 위하여 균주를 직경 5 mm의 cork borer로 잘라 PDA배지 중앙에 접종한 후, 5~7일간 25°C에서 배양한 후 생장율, 균총의 모양과 색, 배지로 확산된 색소 형성의 유무 등을 조사하였다. CLA배지는 Fisher 등(1982)의 방법으로 조제하였고, SNA배지의 구성성분은 KH₂PO₄ 1.0 g, KNO₃ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, glucose 0.2 g, sucrose 0.2 g, agar 23 g, 1N NaOH 0.6 mL, DW 1000 mL이며, pH를 8~10으로 조정하고 멸균하여 조제하였다. 준비된 배지에 5 mm cork borer로 자른 균총을 치상하여 20°C의 NUV(near ultra violet) 아래에 12시간/1일의 조건으로 배양한 후, 2주후부터 대형분생포자의 모양과 크기, 소형분생포자의 형성 유무, 모양 및 크기, 경자(phialide)의 형태, 후막포자의 형성 유무 등의 형태적 특성을 조사하였다.

분리균주의 DNA 추출 및 RAPD 분석

RAPD 분석을 위한 대조균주로 *F. proliferatum* NRRL22003, *F. subglutinans* NRRL13588, *F. verticillioides*

NRRL20956을 미국 ARS Culture Collection에서 분양받아 사용하였다. 분리균주 및 대조균주의 genomic DNA를 추출하기 위해서 균주를 PDB(potato dextrose broth)배지에 접종하고, 25°C에서 5~7일간 정치배양 하였다. 배양된 균 사체를 miracloth로 수거하여 동결건조하여 곱게 마쇄한 후 김 등(2007)의 방법을 변형한 CTAB-phenol/chloroform 추출법으로 genomic DNA를 추출하고, -20°C에 보존하면서 실험에 사용하였다. RAPD(random amplified polymorphic DNA)분석을 위해서 12종류의 URP(universal rice primer) (Kang *et al.*, 2002) 중에서 다형성 밴드를 뚜렷하게 나타내는 2R(5'-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3')과 17R(5'-AATGTGGGCA AGCTGGTGGT-3') primer를 사용하였다. PCR 반응액은 100 ng/ μ l의 template DNA를 포함하여 10 \times Taq buffer, 2 mM dNTPs, 10 pmole/ μ l primer, 0.5 unit의 Taq DNA polymerase(G&P Co.)를 총량 30 μ l로 제조하였다. 반응조건은 95°C 1분, 55°C 2분, 72°C 1분을 35회 반복하였으며, 최종적으로 72°C에서 7분간 post extension으로 하였으며, Tetrad 2 Peltier thermal cycler(Bio-RAD)를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였다. 이후 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 관찰하였다. 유사도 분석은 pc-NTSYS software(numerical taxonomy system; Rohlf, 2000)를 사용하여 RAPD 실험 결과 특정위치에 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 구분하여 SIMQUAL의 계수를 계산하였다. 이 계수를 이용하여 유사성 혹은 비유사성의 계수를 구하고, UPGMA(unweighted pair-group method)를 사용하여 cluster분석하고, dendrogram을 작성하였다.

염기서열 및 계통 분석

Translation elongation factor 1- α (EF-1 α) 유전자의 염기서열 분석을 위하여 O'Donnell 등 (1998b)의 방법을 참고하여, EF-1(5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3')과 EF-2(5'-GGAAGTACCAGTGCATGTT-3') 프라이머를 사용하였다. PCR 반응액은 100 ng/ μ l의 template DNA를 포함하여 10 \times Taq buffer, 2 mM dNTPs, 10 pmole/ μ l의 양방향 primer쌍, 0.5 unit의 Taq DNA polymerase를 총량 50 μ l로 제조하였다. PCR 증폭은 94°C 30초, 50°C 30초, 70°C 90초를 35회 반복하였고, 최종적으로 70°C에서 7분간 충분히 post extension을 실시하였다. 1.0% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 확인하였다. 증폭된 band를 Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System(Promega) kit를 사용하여 정제한 후 pGEM-T easy vector와 ligation하고, heat shock방법으로 형질전환시켜 blue-white screening법으로 형질전환체 선별하였다. Wizard Plus SV Minipreps (Promega)를 이용하여 선별된 형질전환체에서 plasmid를 추출하였고, ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems)로 sequencing을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Clustal W 소프트웨어(Thompson *et al.*, 1994)를

이용하여 정렬하였고, 여기서 nucleotide의 유사도를 계산하였다. 계통수는 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 neighbor-joining법에 의해 작성하였다.

병원성 검정

옥수수 분리균의 병원성 검정은 약 7주간 키운 옥수수(품종 : 찰옥1호) 줄기를 대상으로 이쭉시개를 이용한 접종법(Jardine and Leslie, 1999)과 포자형성이 용이한 CLA배지의 agar block을 이용한 접종법으로 수행하였다. 이쭉시개는 3회 멸균하여 불순물을 제거하여 준비하고, PDB배지(5 ml)가 들어 있는 test tube에 4~5개씩 넣어 멸균하였다. 여기에 분리균주를 접종하고 7일간 25°C의 조건으로 배양하여 이쭉시개 접종원을 준비하였고, 대조구는 멸균된 이쭉시개를 PDB배지에 7일간 넣어 준비하였다. 또한, agar block의 접종원을 제조하기 위하여 동일한 균주를 CLA배지에 접종하고, 20°C의 항온기에서 NUV(near ultra violet)가 비추는 조건(12시간/1일)으로 배양하였고, 대조구는 균주를 배양하지 않은 CLA 배지를 대상으로하여, 1 × 1 cm 크기로 잘라 준비하였다. 7주간 온실에서 키운 옥수수 줄기에 송곳으로 구멍을 뚫고, 준비된 이쭉시개 접종원을 꽂은 후

튀어나온 부분을 잘라내고 파라필름으로 밀봉하여 주었다. Agar block도 구멍 뚫린 줄기에 붙인 후, 파라필름으로 감싸 주었다. 접종 2주 후, 옥수수 줄기를 세로로 잘라 변색된 병반 길이를 측정하였다.

결과 및 고찰

*Fusarium*속균의 분리 및 균학적 특성 조사

2007년도에 강원도의 옥수수 재배 지역에서 이삭썩음 증상이 있는 옥수수 이삭에서(Fig. 1) *Fusarium*균을 분리하였는데, 지역별로 62.5-100%의 균검출율을 나타내었다. 총 77개의 *Fusarium*속균 중 38개 균주에 대해 CLA, SNA, PDA 배지에서의 균학적 특성을 조사하여 동정한 결과, 15개 균주가 *F. verticillioides*로 동정되었고, *F. subglutinans*가 4개, *F. graminearum*과 *F. proliferatum*이 각각 6개 동정되었으며, 그 밖에 *Fusarium napiforme* Marasas, Nelson & Rabie, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Fusarium nygamai* Burgess. & Trimboli 등이 동정되었다(Table 1-5). *F. verticillioides*는 옥수수의 이삭이나 줄기에 썩음병을 일으키는 것으로 알려져 있는데, 대표적인 형태적 특징으로는 단일의 경자(monophialides)

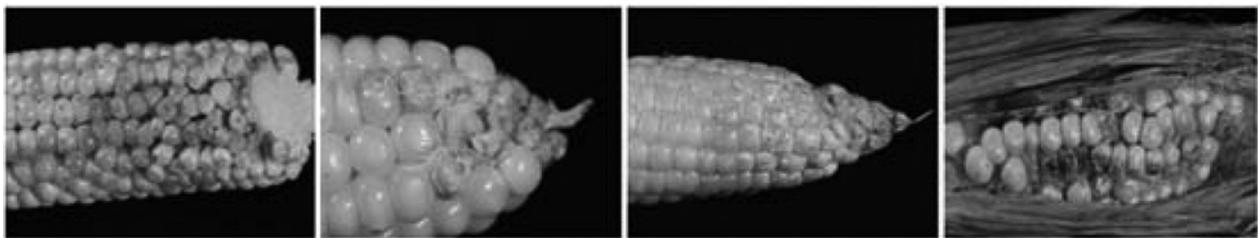


Fig. 1. Various symptoms of corn ear rot caused by *Fusarium* spp. collected from the field.

Table 1. Morphological characteristics of *Fusarium verticillioides* isolated from corn ears

Structure ^a	Characteristics	
	Present isolates	Gerlach <i>et al.</i> (1982)
Growth rate (mm/day)	10.7	12.5-13.3
Aerial mycelium	Abundant, white to cream	Generally abundant, white to buff
Microconidia	Shape	Clavate with a flattened base, oval
	Size(μm)	6.6-14.9 × 2.5-4.2
Macroconidia	Shape	Scarce
	Size(μm)	-
Phialides	Shape	Slender, Slightly falcate or straight May be difficult to find
	Size(μm)	18-73°ø2-4.3
Phialides	Shape	Always monophialides, slender
	Size(μm)	18.7-29.1 × 2.5-3.0
Chlamydospores	Absent	Absent

^aGrowth rate and aerial mycelium were investigated on PDA plates incubated in darkness at 25°C for a week. Other structures were investigated on CLA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 22°C for 2 weeks.

Table 2. Morphological characteristics of *Fusarium subglutinans* isolated from corn ears

Structure ^a	Characteristics	
	Present isolates	Nelson <i>et al.</i> (1983)
Growth rate (mm/day)	9.8	Rapidly
Aerial mycelium	Abundant, white to purple	White but becomes violet
Microconidia	Shape	Oval, produced only in false heads
	Size(μm)	7.5-13.7 \times 2.1-3.5
Macroconidia	Shape	Abundant Sickle-shaped to straight
	Size(μm)	31.2-56.2 \times 3.7-4.2
Phialides	Shape	Poly- and monophialides
Chlamydospores	Absent	Absent

^aGrowth rate and aerial mycelium were investigated on PDA plates incubated in darkness at 25°C for a week. Other structures were investigated on CLA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 22°C for 2 weeks.

Table 3. Morphological characteristics of *Fusarium graminearum* isolated from corn ears

Structure ^a	Characteristics	
	Present isolates	Gerlach <i>et al.</i> (1982)
Growth rate (mm/day)	11.5	Very fast, 15-16
Aerial mycelium	Abundant, white	Abundant, whitish with yellow tips
Pigmentation	Red	Rrather variable, whitish, pinkish, golden yellow, crimson
Microconidia	Shape	Absent
Macroconidia	Septate	Mostly 5-septate
	Size(μm)	60 \times 5.1 (50-72.5 \times 4.8-5.5)
	Shape	Falcate, long and slender
Phialides	Shape	Monophialides
Chlamydospores	Absent	Usually rather scarce

^aGrowth rate, aerial mycelium and pigmentation were investigated on PDA plates incubated in darkness at 25°C for a week. Other structures were investigated on CLA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 22°C for 2 weeks.

Table 4. Morphological characteristics of *Fusarium proliferatum* isolated from corn ears

Structure ^a	Characteristics	
	Present isolates	Gerlach <i>et al.</i> (1982)
Growth rate (mm/day)	9.5	9.4-10
Aerial mycelium	Abundant, white to purple	Abundant, white to pinkish buff
Microconidia	Shape	Oval, clavate with a flattened base
	Size(μm)	6.3-12.5 \times 2.5-3.2
Macroconidia	Shape	Slender, straight
	Size(μm)	-
Phialides	Shape	Polyphialides
	Size(μm)	17-27 \times 2.5-2.7
Chlamydospores	Absent	Absent

^aGrowth rate and aerial mycelium were investigated on PDA plates incubated in darkness at 25°C for a week. Other structures were investigated on CLA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 22°C for 2 weeks.

Table 5. Morphological characteristics of *Fusarium napiforme* isolated from corn ears

Structure ^a		Characteristics	
		Present isolates	Marasas <i>et al.</i> (1987)
Growth rate (mm/day)		7.8	6.7-10.7
Aerial mycelium		White to purple	White
Microconidia	Shape	In short chains and in false heads	In short chains and in false heads
		Obovoid with truncate base, Napiform to lemon-shaped	Variable in size and shape
			Obovoid with truncate base to fusiform, napiform to lemon-shaped
	Size(μ m)	Obovoid : 7.5-10 \times 1.7-3.3 Napiform : 8.3-10 \times 5.8-7.5	Obovoid : 6-20 \times 1.5-4.5 Napiform : 9-15 \times 6.5-10.5
Macroconidia	Shape	Falcate, slightly curved	Falcate, slightly curved
	Size(μ m)	56.2-66.6 \times 2.5-3.7	29-90 \times 3.5-5.0
Phialides	Shape	Monophialides	Monophialides
	Size(μ m)	30 \times 2.5	14-31 \times 1.5-3.0
Chlamydospores		Formed slowly	Formed slowly

^aGrowth rate and aerial mycelium were investigated on PDA plates incubated in darkness at 25°C for a week. Other structures were investigated on CLA plates incubated in alternating cycles of 12 h NUV light and 12 h darkness at 22°C for 2 weeks.

에 긴 사슬형의 소형분생포자를 형성하는 것이다. 이 균은 fumonisin을 생산하는 균으로 외국의 옥수수 주재배지역에서는 심각한 문제가 되고 있다(Gelderblom *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1995). *F. subglutinans*는 소형분생포자가 false head형태만으로 형성되는 특징을 가지고 있어 연쇄로 형성되는 *F. verticillioides*와 구분된다. *F. graminearum*은 붉은 색소를 형성하는 특징이 있으며, *F. pseudograminearum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*과 형태적으로 비슷하여 혼동하기 쉽지만, 대형포자의 형태 등으로 구분하며, *F. verticillioides*와 더불어 이삭과 줄기의 썩음병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Leslie and Summerell, 2006).

Munkvold(2003)에 의하면 *F. graminearum*에 의한 이삭썩음병은 이삭의 끝부분부터 발생하여 전체적으로 진전되는 반면, *F. verticillioides*에 의한 이삭썩음병은 상처가 있는 이삭에 무작위적으로 발생한다고 하였다. 또한 *F. graminearum*에 의한 이삭썩음병은 서늘한 기상조건으로, 생육기에 강우량이 많은 경우에 발생이 심하다고 하였다. 본 균은 맥류를 비롯한 작은 곡실의 이삭에 병을 일으키는 것으로 알려져 있다.

*F. proliferatum*은 *F. verticillioides*와 더불어 *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. 종복합체에 속하는 균으로 polyphialides형태의 경자를 형성하므로 *F. verticillioides*와 구분이 가능하다. *F. napiforme*는 소형분생포자가 단일의 경자를 사슬로 형성되며, 순무형의 소형포자를 형성하기도 하며, 후막포자가 매우 느리게 형성되는 것이 특징인데, 남아프리카에서 수수, 조와 같은 화곡류에서 분리된 바 있으나 그 병원성이나 생태 등에 대해서는 아직 보고된 바 없다(Leslie and Summerell, 2006).

RAPD 분석

URP primer 17R과 2R을 이용하여 62개 균주에 대해 RAPD-PCR 분석을 실시한 결과, 크게 6개의 그룹으로 나누어졌다. 각 그룹별로 그 특성을 조사한 결과, 형태적 특징에 의한 분류와 URP primer를 이용한 RAPD 분석 결과가 거의 일치하여 그룹 I, 그룹 III, 그룹 IV는 각각 대조균주로 사용한 *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*와 동일한 그룹을 이루었으며, 그룹 V는 *F. graminearum*으로 나타났다(Fig. 2). 반면, 그룹 II과 그룹 VI는 *G. fujikuroi* 종 복합체에 속하는 균주들이었으므로 나타났으나, 그룹의 특성을 분석하기 위해서는 정확한 동정이 필요할 것으로 생각된다. 민 등(1999)에 의하면 여러 가지 분자생물학적 방법에 의한 유연관계 연구 가운데 RAPD 분석 방법은 DNA수준에서의 유전적 다양성을 연구하는 하나의 방법으로 광범위하게 이용되고 있다고 하였다. 또한, 종 수준에서 유전적 다양성을 분석하는데 간단하고 빠른 기술 중의 하나로 알려져 있는데, *Fusarium*속균의 6개 section에 속하는 16종 21균주를 대상으로 여러 가지 primer를 이용하여 RAPD pattern을 분석한 결과, 대체로 형태적 특징에 의한 분류와 일치한다고 하였다(민 등, 1999). 특히, 기주 범위가 넓고, 병징이 복잡한 균인 *Fusarium*균의 분류에 대하여 이러한 방법을 이용한 여러 가지 접근이 시도되었다.

밀을 비롯한 곡류에 붉은곰팡이병을 일으키는 주요 병원균인 *F. graminearum*과 *F. culmorum*의 유전적 다양성을 조사하기 위해 PCR-fingerprinting방법이 이용되었고(Miedaner *et al.*, 2001), 기주별 종자에서 분리한 *F. moniliforme*의 RAPD 분석(Kini *et al.*, 2002)이나 옥수수에서 분리한 *F. verticillioides*의 RAPD 분석(Pamphile and Azebedo, 2002),

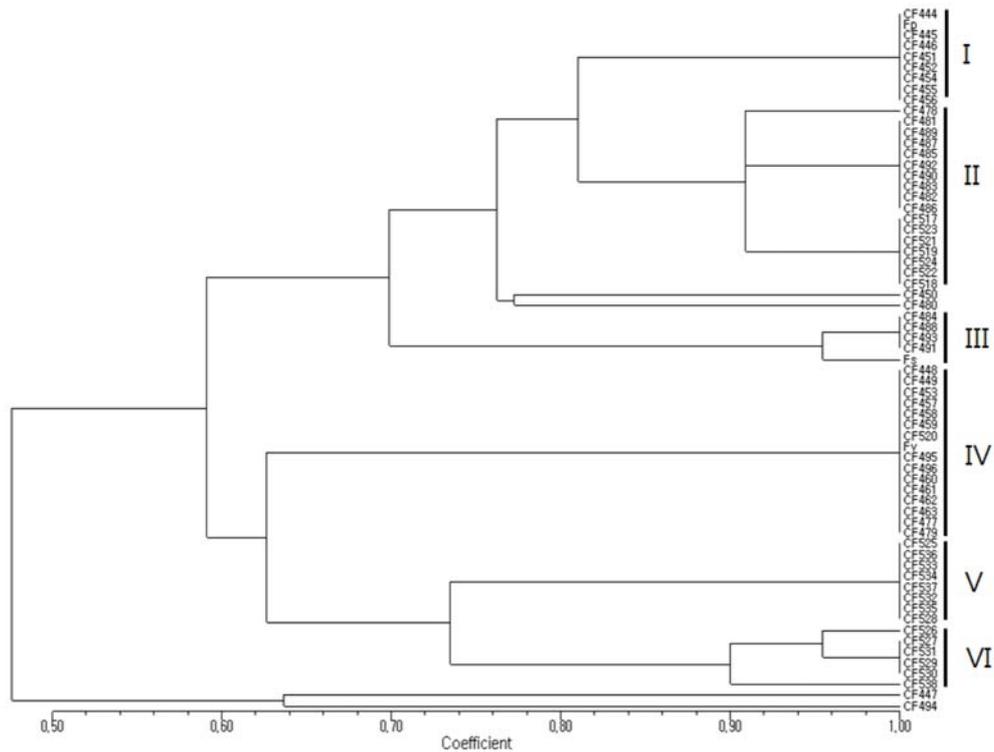


Fig. 2. Dendrogram of *Fusarium* spp. isolates from corn based on UPGMA cluster analysis in the program pc-NTSYS using genetic similarities calculated from RAPD-PCR analysis with URP-17R and 2R primers. Fp, *Fusarium proliferatum* NRRL22003; Fs, *F. subglutinans* NRRL13588; Fv, *F. verticillioides* NRRL20956.

Liseola section에 포함된 *Fusarium*균의 교배형 동정을 위한 RAPD 분석(Amoah, 1996) 등 *Fusarium*균과 관련된 RAPD 분석은 다양하게 연구되었다.

염기서열분석

2000년대 초반 *F. moniliforme*는 여러 종이 혼재하는 중복합체임이 밝혀진 이후로 균의 형태적 특성과 더불어 분자계통학적 특성을 접목시켜 *Fusarium*균의 분류에 대한 재해석이 시도되었다(Aoki and O'Donnell, 1999; Aoki *et al.*, 2001; Nirenberg and O'Donnell, 1998; O'Donnell *et al.*, 1998a). 특히 최근 들어 여러 가지 유전적 마커 중에서 translation elongation factor 1- α (TEF) 유전자가 *Fusarium*균의 종간 구별에 적합하다고 평가되고 있다(Geiser *et al.*, 2004). 균학적 특성이 다른 10개의 분리균주에 대하여 TEF 유전자의 염기서열분석에 의한 계통수를 작성한 결과(Fig. 3), *F. verticillioides*로 동정된 CF495와 CF449 균주는 NCBI에 등록되어 있는 *F. verticillioides* (완전세대 : *Gibberella moniliformis* Sheldon)와 같은 종임이 확인되었고, *F. graminearum*으로 동정된 CF535 역시 등록된 *F. graminearum* (완전세대 : *G. zae* (Schwein.) Petch)과 같은 종으로 확인되었다. 또한 CF493은 *F. subglutinans*로, CF519는 *F. proliferatum*으로 확인되어 형태적 특성에 의해 동정된 결과와 일치하였다. 그러나 *F. napiforme*로 동정되었던 CF490은 *G. fujikuroi*와 동일한

그룹에 속하였고, *Fusarium* sp.로 미동정된 CF527, CF446, CF452는 *F. proliferatum* 그룹에 속하는 것으로 나타났다. 이와 같이 균주의 형태적 특성에 의한 동정결과와 유전자의 염기서열분석 결과가 대부분 일치하는 것으로 나타났으며, 앞으로 다양한 균주를 대상으로 조사해야 할 것으로 판단된다.

병원성 검정

F. verticillioides 등으로 동정된 9개 균주에 대해 두 가지 방법을 이용하여 병원성 검정을 수행하였는데, 그 결과 *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. graminearum* 이 병원성이 강한 것으로 나타났다(Table 6). CF519와 CF527은 접종방법에 따라 발병정도에 큰 차이가 있었으며, 일반적으로 이쭉시개 접종방법 사용시 병원성이 강하게 나타났다. 또한, 대조구의 경우 3.3-6.0 mm의 병반길이를 나타냈는데, 이는 송곳으로 구멍을 뚫어 상처 접종을 하는 과정에서 발생한 것으로 생각된다. Silva 등(2007)에 의하면 에콰도르의 옥수수에서 분리한 *F. verticillioides*와 *F. subglutinans*의 병원성 정도는 비슷하였고, 접종방법에 의해서도 비슷한 경향을 나타냈으며, 접종시 포자농도 역시 관련이 없는 것으로 조사되었으나 옥수수 품종에 따라 병원성이 크게 차이가 난다고 하였다. 따라서 앞으로 옥수수의 품종별로 병원성 검정을 수행하여 비교할 필요가 있을 것으로 생각된다. 한편, Jardine과 Leslie(1999)는 *F. verticillioides*와 *F. thapsinum*의

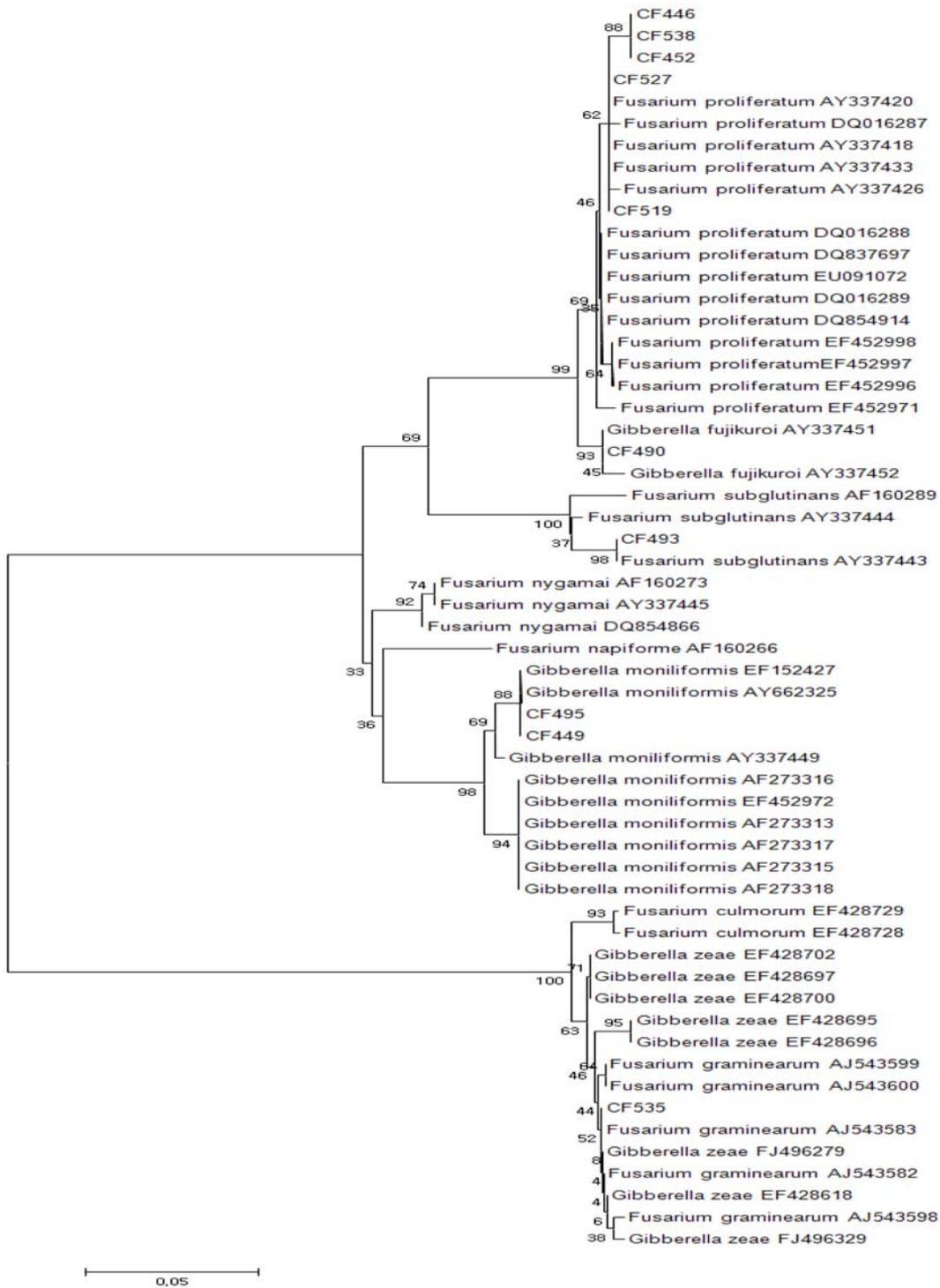


Fig. 3. Phylogenetic tree of *Fusarium* spp. isolates from corn ears based on the sequence of the translation elongation factor. The tree was generated using Neighbour-Joining analysis. The number in each branch indicates bootstrap values obtained after a bootstrap test with 1000 replications. Marks AY, DQ, EU, EF, AF, AJ and FJ are DNA sequence accession numbers from NCBI GenBank.

옥수수에 대한 병원성과 fumonisin의 생산성을 비교하였는데, 병원성과 fumonisin의 생산 능력 간에는 상관관계가 없는 것으로 조사되었다. 그러나 현재까지 독소생산과 병원성에 대한 관계는 명확하지 않은 것으로 알려져 있다(Leslie

and Summerell, 2006).

적요

2007년 강원도의 5개 옥수수 재배지역에서 이삭썩음 증

Table 6. Result of pathogenicity tests of *Fusarium* spp. isolates from corn by two inoculation methods

Isolate	<i>Fusarium</i> species	Mean lesion length (mm) ^a							
		Experiment 1				Experiment 2			
		Agar block method		Tooth pick method		Agar block method		Tooth pick method	
CF449	<i>F. verticillioides</i>	15.3	ab	21.7	ab	23.0	ab	28.0	abc
CF495	<i>F. verticillioides</i>	15.7	a	16.0	bc	28.3	a	30.0	ab
CF493	<i>F. subglutinans</i>	14.0	ab	29.0	ab	19.3	abc	30.0	ab
CF535	<i>F. graminearum</i>	12.7	ab	21.7	ab	22.7	ab	23.5	abc
CF490	<i>F. napiforme</i>	13.0	ab	18.3	abc	24.3	ab	18.3	bc
CF483	<i>F. napiforme</i>	10.7	abc	19.3	ab	15.0	bc	27.3	abc
CF519	<i>F. proliferatum</i>	0.0	c	25.0	ab	12.0	c	28.7	ab
CF527	<i>Fusarium</i> sp.	9.0	abc	30.3	a	16.3	bc	35.7	a
CF538	<i>Fusarium</i> sp.	15.3	ab	17.7	abc	20.5	abc	15.7	cd
Control		3.3	bc	5.7	c	0.0	d	6.0	d

^a Means followed by the same letters in the columns were not significantly different by DMRT at $P = 0.05$

상이 있는 옥수수를 채집하여 77개의 *Fusarium* 균을 분리하였다. 이 중 38개 균주의 형태적 특성 조사 결과, 단일의 경자에 긴 사슬형의 소형분생포자를 형성하는 *F. verticillioides*가 15균주 동정되었다. 또한, 소형분생포자를 false head 형태로 형성하는 *F. subglutinans*가 4균주, 붉은 색소를 형성하는 특징이 있는 *F. graminearum*이 6균주 동정되었다. 그 밖에 *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. oxysporum* 등이 동정되었다. 분리균주의 유전적 다양성을 분석하기 위해 URP primer를 이용한 RAPD 분석을 수행한 결과, 크게 6개의 그룹으로 분류되었으며, 이는 형태적 특성에 의한 분류와 거의 일치하는 결과를 나타내었다. EF-1 α 유전자의 염기서열을 조사하여 계통분석을 수행한 결과, 분리균주 대부분이 형태적 특성에 의한 동정결과와 일치하는 것으로 나타났다. 두 가지 접종방법에 의한 병원성 검정 결과, *F. verticillioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*의 병원성이 강한 것으로 나타났다.

감사의 글

본 실험에 사용된 미국 ARS Culture Collection(NRRL Collection) 균주의 분양에 도움을 주신 농촌진흥청 농업유전자원센터의 홍승범 박사님께 감사를 드립니다.

참고문헌

- 김완규, 오인석, 유승현, 박종성. 1984. 옥수수 종자에서 검출된 *Fusarium moniliforme*와 그 병리학적 중요성. 한국균학회지 12(3):105-110.
- 김종균, 최재을, 강희완. 2007. 국내 포도나무 흑병(*Agrobacterium vitis*) 균주의 유전적 다양성. 식물병연구 13(3):137-144.
- 농업생명공학연구원. 2006. 유전자원 특성조사 및 관리요령. 농촌진흥청. 3-8.
- 민병래, 양연주, 최영길. 1999. *Fusarium* 종에서의 RAPD-PCR 분석. The Korean Journal of Microbiology 35(2):107-114.
- 서영수, 서정아, 손황배, 이인원. 1998. 옥수수와 보리에서 *Fusarium graminearum*의 8-ketotrichothecenes 생성. 한국식물병리학회지 14(5): 418-424.
- 이인원, 강효중. 1994. 중국산 옥수수로부터 분리한 *Fusarium* 균주의 독성 및 Fumonisin B₁의 생성. 한국식물병리학회지 10(2): 129-135.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록 제4판 45-47.
- Amoah, B. K., Macdonald, M. V., Rezanoor, N. and Nicholson, P. 1996. The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseola*. Plant Pathology 45:115-125.
- Aoki, T. and O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia 91:597-609.
- Aoki, T., O'Donnell, K. and Ichikawa, K. 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. Mycoscience 42:461-478.
- Danielsen, S., Meyer, U. M. and Jensen D. F. 1998. Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. Plant Pathology 47:615-622.
- Fandohan, P., Hell, K., Marasas, W. F. O. and Wingfield, M. J. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in africa. African Journal of biotechnology 2(12):570-579.
- Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A. and Nelson, P. E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72(1):151-153.
- Geiser, D. M., Jimnez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veerarahavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. and O'Donnell, K. 2004. Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110:473-479.
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Horak, R. M. and Kriek, N. P. J. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium*

- moniliforme*. Applied and Environmental Microbiology 54: 1806-1811.
- Gerlach, W. and Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium* - A pictorial atlas. (*Mitteilungen aus der biologischen Bundesanstalt Fr Land - und Forstwirtschaft (Berling-Dahlem)* 209:1-405.
- Jardine, D. J. and Leslie, J. F. 1999. Aggressiveness to mature maize plants of *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. Plant Disease 83(7):690-693.
- Kang, H. W., Park, D.S., Go, S.J. and Eun, M.Y. 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. Mol. Cells 13:281-287.
- Kini, K. R., Leth, V. and Mathur, S. B. 2002. Genetic variation in *Fusarium moniliforme* isolated from seeds of different host species from Burkina Faso based on random amplified polymorphic DNA analysis. J. Phytopathology 150:209-212.
- Lee, Y. W., Kim, K. H. and Chung, H. S. 1990. Production of T-2 toxin and metabolites by *Fusarium sporotrichioides* isolates from the corn producing area in Korea. Kor. J. Mycol. 18(1): 13-19.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing. 1-388.
- Miedaner, T. Schilling, A. G. and Geiger, H. H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. J. Phytopathology 149:641-648.
- Miller, J. D., Savard, M. E., Schaafsma, A. W., Seifert, K. A. and Reid, L. M. 1995. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. Canadian Journal of Plant Pathology 17:233-239.
- Munkvold, G. P. 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109:705-713.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Nirenberg, H. and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:434-458.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H. 1998a. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia 90:465-493.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. and Ploetz, R. C. 1998b. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2044-2049.
- Pamphile, J. A. and Azevedo, J., L. 2002. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides*(= *Fusarium moniliforme*) from maize(*Zea mays*. L). World Journal of Microbiology & Biotechnology 18:391-396.
- Presello, D. A., Iglesias, J., Botta, G. and Eyhrabide, G. H. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisin in grain of Argentinian maize hybrids. Crop Protection 26: 852-855.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Publishing, Ltd., Setauket, N.Y.
- Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., Gruyter, j., Leslie, J. F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., Rheeder, J., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U. and Waalwijk, C. 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. Mycological Research 107(6):643-644.
- Silva, E., Mora, E. A., Medina, A., Vasquez, J., Valdez, D., Danial, D. L. and Parlevliet, J. E. 2007. *Fusarium* ear rot and how to screen for resistance in open pollinated maize in the Andean regions. Euphytica 153:329-337.
- Sutton, J. C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology 4:195-209.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequences weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids Res. 22: 4673-4680.
- Torres, O. A., Palencia, E., Pratdesaba, L. L., Grajeda, R., Fuentes, M., Speer, M. C., Merrill Jr., A. H., O'Donnell, K., Bacon, C. W., Glenn, A. E. and Riley, R. T. 2007. Estimated fumonisin exposure in Guatemala is greatest in consumers of lowland maize. The Journal of Nutrition 137:2723-2729.