

Note | Open Access

종 특이 primer를 이용한 옥수수 오염 *Fusarium verticillioides*의 PCR 검출

강미란 · 김지혜 · 이승호¹ · 류재기¹ · 이데레사¹ · 윤성환*

순천향대학교 의료생명공학과, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물과

Detection of *Fusarium verticillioides* Contaminated in Corn Using a New Species-specific Primer

Mi Ran Kang, Ji-Hye Kim, Seung-Ho Lee¹, Jae-Gee Ryu¹, Theresa Lee¹ and Sung-Hwan Yun*

Department of Medical Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

¹Microbial Safety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received on October 27, 2011; Revised on November 21, 2011; Accepted on November 22, 2011)

Fusarium verticillioides (teleomorph: *Gibberella moniliformis*), a member of the *Gibberella fujikuroi* species complex, causes rots of corn stalks and ears, and produces a group of mycotoxins known as fumonisins that are harmful to animals and humans. Here, we focus on the development of a species-specific PCR primer set for differentiating *F. verticillioides* from other fumonisin-producing *Fusarium* species belonging to the species complex, such as *F. proliferatum*, *F. fujikuroi*, and *F. subglutinans* that are frequently associated with corn. The specific primers (RVERT1 and RVERT2) derived from the nucleotide sequences of RNA polymerase II beta subunit (*RPB2*) gene amplified a 208 bp-DNA fragment from only *F. verticillioides* isolates among the potential fumonisin-producing species examined; all of these isolates were shown to carry *FUM1* required for fumonisin biosynthesis. The PCR detection limit using this specific primer set was approximately 0.125 pg/μl genomic DNA of *F. verticillioides*. In addition, the *F. verticillioides*-specific fragment was successfully amplified from genomic DNAs of corn samples contaminated with *Fusarium* spp. This primer set would provide a useful tool for the detection and differentiation of potential fumonisin-producing *F. verticillioides* strains in cereal samples.

Keywords : Corn ear and stalk rot, *Gibberella*, Fumonisin, RNA polymerase II subunit

Gibberella fujikuroi 종 복합체(species complex)는 *Fusarium*을 불완전세대로 갖는 사상성 자낭균 곰팡이집단으로서 벼, 옥수수, 수수, 기장 등을 비롯한 각종 곡물에 광범위하게 오염되어 주요 병해를 일으키는 식물병원균이다(Leslie 등, 1990; Leslie와 Summerell, 2006). 이 집단에 속한 종들은 형태학적 특징만으로 정확히 구분되기 어렵기 때문에 균주 사이의 교배 여부에 따른 mating population (MP)으로 나뉘기도 하였으나(Leslie 등, 2007; Leslie와 Summerell, 2006) 무성세대로만 존재하는 종들의 구분은 여전히 명확하지 않았다. 이를 극복하기 위하여 DNA 염기서열의 비교분석을 통해 지금까지 집단 내 최소 40여

종 이상의 계통발생학적 종(phylogenetic species)이 동정되었다(O'Donnell 등, 1998). 이들 중 일부 종은 식물병 뿐 아니라 이병 또는 오염식물 내 fumonisins이라는 polyketide 계통의 곰팡이독소(mycotoxin)를 생성하여 사람과 가축에 심각한 중독증을 일으키기도 한다(Marasas, 2001; Marasas 등, 1988; Munkvold와 Desjardins, 1997; Nelson 등, 1993). 특히 사람의 경우, fumonisin 오염곡물의 섭취와 식도암 발생 사이의 병역학적 연관관계가 대두되면서 발암물질 후보로서 더욱 많은 관심을 얻게 되었다(Marasas, 2001; Yoshizawa 등, 1994).

Fusarium verticillioides(완전세대: *G. moniliformis*, MP A)는 *G. fujikuroi* 종 복합체에 속하는 종으로서 전세계적으로 옥수수에 자주 발생하여 즐기나 이삭에 뿌리썩음병을 일으킬 뿐 아니라 다량의 fumonisins을 생산하는 것으

*Corresponding author

Phone) +82-41-530-1288, Fax) +82-41-530-3085

Email) sy14@sch.ac.kr

로 알려졌다(Jurjevic 등, 2005). 하지만 옥수수에 빈번히 오염되는 *G. fujikuroi* 종 복합체 중에는 *F. verticillioides* 뿐 아니라 *F. proliferatum*(*G. intermedia*, MP D), *F. subglutinans*(*G. subglutinans*, MP E), *F. fujikuroi*(*G. fiji kuroi*, MP C) 등의 다른 종들도 fumonisin을 생성한다(Jurjevic 등, 2005). 곡물 시료 내 이들 fumonisin 생성 균주들의 검출과 동정은 fumonisin 생합성에 필수적인 polyketide synthase 유전자인 *FUMI*(Proctor 등, 1999)의 PCR 증폭 여부로 쉽게 가능하나(Baird 등, 2008; Bezuiden hout 등, 2006), fumonisin 생성 균주 내 정확한 종 동정은 여전히 계통발생학적 분석으로만 가능하다. 이를 극복하기 위해 rDNA의 intergenic spacer(IGS), internal spacer(ITS) 부위, 또는 calmodulin 유전자의 염기서열을 이용하여 *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*의 특이적인 검출을 위한 primer 조합의 개발이 시도되었다(Mulè 등, 2004; Patiño 등, 2004; Sreenivasa 등, 2008; Yazeed 등, 2011). 한편 국내 친환경 농법의 확산과 농산물의 안전성에 대한 관심이 커지면서 옥수수를 비롯한 곡물시료 내 이들 fumonisin 생성 균주들의 오염 여부를 신속하게 검정할 수 있는 기술의 필요성은 더욱 부각되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 우리나라 옥수수에서 발생하는 *F. verticillioides* 균주를 다른 fumonisin 생성 추정 *G. fujikuroi* 종 복합체 소속 균주들과 구별할 수 있는 신규 특이 primer 조합을 개발하고, 이들 primer의 특이성과 검출한계 등을 분석하며, 곡물시료로부터 *F. verticillioides* 검출 여부를 검정하는 것

이다.

균주 수집. 본 연구에서 사용된 *G. fujikuroi* 종 복합체들은 2009-2010년 동안 우리나라 옥수수와 벼로부터 분리한 균주로서 농촌진흥청 국립농업과학원 유해생물과로부터 분양받아 eukaryotic translation elongation factor 1-alpha(*EF1A*) 유전자 염기서열을 이용한 계통발생학 분석으로 동정된 균주들(Kim 등, unpublished data, 2011년 추계 한국식물병리학회발표)과 농업유전자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)로부터 분양받은 균주들이다(Table 1). 이외 다른 종의 *Fusarium* 속 곰팡이는 *Fusarium* Research Center(USA) 와 KACC로부터 분양받았다(Table 1).

RPB2 유전자의 증폭 및 염기서열 정렬 수집된 균주들의 게놈 DNA 추출을 위하여 감자한천배지(PDA)에서 3일간 배양한 각 균주의 agar block을 감자한천 액체배지(Potato Dextrose Broth, Difco, USA)에 접종하여 3일 동안 24°C에서 진탕 배양하였다. 균체로부터 Chi 등(2009)이 보고한 방법에 따라 게놈 DNA를 추출한 후 *F. verticillioides* 14주, *F. proliferatum* 8주, *F. fujikuroi* 5주, *F. subglutinans* 4주의 게놈 DNA로부터 fRPB2-7cF과 fRPB2-11aR의 primer(Table 2)를 이용하여 RNA polymerase II beta subunit(*RPB2*) 유전자를 증폭하였다. 본 연구에서 사용한 모든 PCR 증폭용 primer는 Bioneer사(Korea)에서 제작하였으며, PCR 반응을 위해 총량 50 µl 반응액에 50 ng의 주형 DNA, 1 × PCR buffer, 각각의 dNTP 0.2 mM, 각

Table 1. *Fusarium* spp. used in this study and PCR amplification using species-specific primers

Species	Isolate	Host	Source ^a (origin)	Primer pairs ^b			
				PRO1/2	VER1/2	rp32/ 33	RVER1/2
<i>F. fujikuroi</i>	K44021	rice	KACC	+	- ^d	+	-
	K44019	rice	KACC	+	-	+	-
	K44017	rice	KACC	+	-	+	-
	K44015	rice	KACC	+	-	+	-
	K44010	rice	KACC	+	-	+	-
	K44009	rice	KACC	+	-	+	-
	K44004	rice	KACC	+	-	+	-
	K42687	rice	KACC	+	-	+	-
	K42686	rice	KACC	+	-	+	-
	OS5	corn	Kim et al. ^e	-	-	+	-
	OS6	corn	Kim et al.	+	-	+	-
	OS8	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS11	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS25	corn	Kim et al.	+	-	+	-

Table 1. Continued-2

Species	Isolate	Host	Source ^a (origin)	Primer pairs ^b			
				PRO1/2	VER1/2	rp32/ 33	RVER1/2
<i>F. proliferatum</i>	K44025	rice	KACC	+	-	+	-
	K44024	rice	KACC	+	-	+	-
	K42694	-	KACC	+	-	+	-
	K42693	-	KACC	+	-	+	-
	K42692	-	KACC (China)	+	-	+	-
	OS17	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS18	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS30	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS32	corn	Kim et al.	+	-	+	-
	OS46	corn	Kim et al.	+	-	+	-
	OS58	corn	Kim et al.	+	-	+	-
	OS65	corn	Kim et al.	+	-	+	-
	OS66	corn	Kim et al.	+	-	+	-
<i>F. verticillioides</i>	K42699	-	KACC	-	+	+	+
	K42698	-	KACC (China)	-	+	+	+
	K41321	-	KACC	-	+	+	+
	OS9	corn	Kim et al.	+	+	+	+
	OS14	corn	Kim et al.	+	+	+	+
	OS20	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS21	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS24	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS26	corn	Kim et al.	+	+	+	+
	OS34	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS35	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS40	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS44	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS45	corn	Kim et al.	-	+	+	+
	OS48	corn	Kim et al.	-	+	+	+
<i>F. subglutinans</i>	OS12	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS13	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS23	corn	Kim et al.	-	-	+	-
	OS47	corn	Kim et al.	-	+	+	-
<i>F. oxysporum</i>	K41087	cymbidium	KACC	-	-	-	-
	K40236	carnation	KACC	-	-	-	-
	O1565	banana	FRC (Taiwan)	-	-	-	-
	O1566	banana	FRC (Honduras)	-	-	-	-
	O1567	banana	FRC (Australia)	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	O1090	tomato	FRC (Canada)	-	-	-	-
	O1092	tomato	FRC (Canada)	-	-	-	-
	O1097	tomato	FRC (Canada)	-	-	-	-

Table 1. Continued-3

Species	Isolate	Host	Source ^a (origin)	Primer pairs ^b			
				PRO1/2	VER1/2	rp32/ 33	RVER1/2
<i>F. graminearum</i>	PH-1	wheat	FRC (USA)	-	-	-	-
	Z03643	wheat	FRC (USA)	-	-	-	-
	GZ3639	wheat	FRC (USA)	-	-	-	-
	SCK04	barley	KACC	-	-	-	-

^aKACC: Korean Agricultural Culture Collection, Suwon, Korea. KACC without parenthesis indicates the fungal isolates from Korea. FRC: *Fusarium* Research Center, University Park, PA, USA.

^bPrimer pairs used in PCR amplification. Refer to Table 2.

^c+: amplification of a specific DNA fragment

^d -: no amplification

^eunpublished data

Table 2. PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
fRPB2-7cF	ATGGG(C/T)AA(A/G)CAAGC(C/T)ATGGG	Liu et al., 1999
fRPB2-11aR	GC(A/G)TGATCTT(A/G)TC(A/G)TC(C/G)ACC	
PRO1	CTTCCGCCAAGTTTCTTC	Mulé et al., 2004
PRO2	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	
VER1	CTCCTGCGATGTTTCTCC	Mulé et al., 2004
VER2	AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	
rp32	ACAAGTGTCTTGGGGTCCAGG	Proctor et al., 2004
rp33	GATGCTCTTGAAGTGGCCTACG	
RVER1	CCTTAACTACACTGAAATCTTTG	This study
RVER2	TATCACGACGTTGATGCGAC	

primer 10 mM, 1.25 U ExTaq polymerase(Takara Bio-medicals, Japan)을 첨가하였다. *RPB2* 유래 primer 조합 (fRPB2-7cF과 fRPB2-11aR) (Table 2)을 이용한 PCR 증폭은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 94°C 2분의 변성 이후 94°C, 30초, 58°C, 30초, 72°C, 1분 반응의 조건으로 30 cycle의 증폭을 수행한 후 72°C에서 10분 동안 extension 반응을 수행하여 완료하였다. 전기영동을 통하여 단일한 크기(~970 bp)의 PCR 증폭을 확인한 후 PCR purification kit(NucleoGen, Korea)를 이용하여 해당 증폭 DNA를 정제하였다. 증폭 DNA의 염기서열을 결정하기 위하여 증폭 DNA를 주형으로, PCR 증폭용 primer 조합을 염기서열 결정용 primer로 사용하는 direct sequencing 방법을 사용하였다. 하지만 염기서열의 결과가 명확하지 않을 경우, 해당 증폭 DNA를 이미 보고된 방법(Hong 등, 2010)에 따라 pGEMT- Easy Vector System (Promega, USA)에 cloning한 후 T7과 SP6 primer 조합으로 염기서열을 결정하였다. 증폭 유전자의 최종 염기서열을 확정하

기 위하여 양 방향 primer에 의해 결정된 염기서열을 DNASTAR사(USA)의 SEQMAN 프로그램으로 비교하였으며, 이후 증폭 유전자 염기서열들을 DNASTAR MEGALIGN 프로그램 내 Clustal W 방법(Thompson 등, 1994)을 사용하여 정렬하였다. 증폭된 *RPB2* 유전자들의 염기서열은 NCBI(The National Center for Biotechnology Information, USA)에 이미 기탁되어 있는 해당 *Fusarium* 종의 *RPB2* 유전자와 99-100% 수준에서 상동성을 보였다. 본 연구에서 얻은 서열 중 일부는 NCBI의 GenBank에 기탁하였다(GenBank accession numbers: JN968201-JN968212).

종 특이 primer의 제작. *F. verticillioies*의 종 특이 primer를 제작하기 위하여 수집 균주의 *EF1A* 유전자(Kim 등, unpublished data)와 본 연구에서 증폭한 *RPB2* 유전자 염기서열을 사용하였다. 약 680 bp 크기의 *EF1* 유전자 염기서열을 균주별로 정렬하였을 경우, 3종의 *G. fujikuroi* species complex 균주 내에서 총 68 bp의 염기서

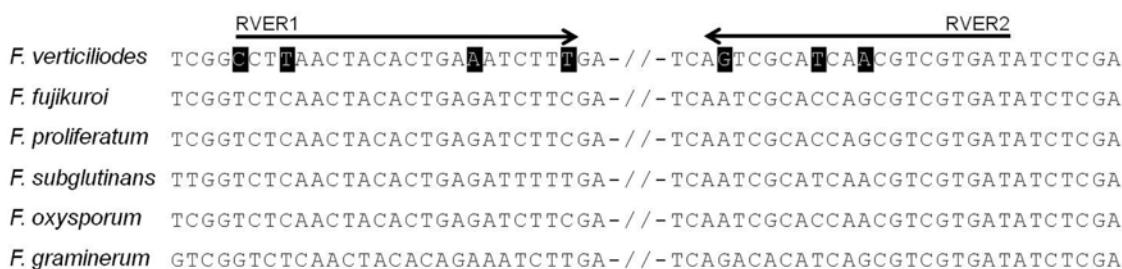


Fig. 1. Alignment of partial nucleotide sequences of *RPB2* from the representative isolates of *Fusarium* spp. used in this study. The location of primers RVER1 and RVER2 are indicated by black arrows, and variable nucleotides within the primer sequences among the species are filled with black rectangles. // represents discontinuity of the nucleotide sequences. *F. verticillioides*: *RPB2* from isolate OS9, *F. fujikuroi*: OS5, *F. proliferatum*: OS17, *F. subglutinans*: OS12, *F. oxysporum*: K41087, *F. graminearum*: PH-1.

열의 변이를 확인할 수 있었다. 하지만 이들 변이 부위는 증폭된 *EF1A* 유전자에 골고루 분포하고 있었기 때문에 *F. verticillioides* 균주에 특이적인 primer를 제작할 정도의 연속적인 변이 부위를 찾기 어려웠다. 실제로 변이 부위로부터 제작한 primer 조합을 사용하여 PCR 증폭을 한 결과, *F. verticillioides* 균주 특이적 증폭양상을 관찰할 수 없었다(data not shown). 반면, ~970 bp 크기의 *RPB2* 유전자 염기서열의 정렬을 통해 약 50 bp의 변이 서열을 확인하였으며, 이들 부위로부터 RVER1과 RVER2를 특이 primer 후보 조합으로 제작할 수 있었다(Fig. 1). 이들 primer 는 모두 *RPB2* 유전자의 coding region에 위치하였다.

***F. verticillioides* 특이 primer를 이용한 PCR 증폭.** RVER1과 RVER2 조합을 이용한 PCR 증폭(조건은 위의 *RPB2* 증폭조건과 같으며, annealing 온도로 55°C 사용) 결과, 3종의 fumonisin 생성 *G. fujikuroi* species complex 수집 균주들 중 오직 *F. verticillioides*의 게놈 DNA로부터 208 bp의 DNA 절편이 특이적으로 증폭되었다(Table 1, Fig. 2). 이들 primer의 특이성을 좀 더 검정하기 위하여 이들 3종 외 다른 *Fusarium* 속 곰팡이(*F. oxysporum*, *F. graminearum* 등) (Fig. 2)와 옥수수에서 자주 발생하는 *Fusarium* 속 외 다른 곰팡이(*Cochliobolus heterostrophus*, *C. carbonum*, 등) (data not shown)의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행한 결과, 특이적 DNA 절편이 전혀 검출되지 않았다. 이를 통해 RVER1과 RVER2 primer의 종 특이성이 확인되었다. 한편 fumonisin 생합성에 필수적인 polyketide 유전자인 *FUM1* 유전자로부터 유래한 rp32와 rp33 primer로 PCR을 수행한 결과, 모든 *F. verticillioides* 균주의 게놈 DNA로부터 약 680 bp의 DNA 절편이 증폭되었다(Table 1, Fig. 2). *FUM1* 특이 절편이 증폭된 *F. verticillioides* 균주 모두가 실제 쌀배지에서 fumonisin을 생성하였다는 보고(Baird 등, 2008)의 결과를 참조할 경우, 본 연구에서 조사한 모든 균주는 fumonisin을 생성할 가능성이 높다고 판단된다. 하지만 *FUM1* 증폭용 primer

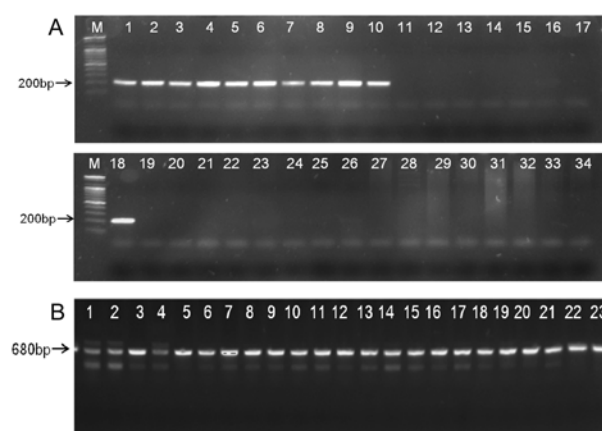


Fig. 2. PCR amplification from the *Fusarium* spp. used in this study using the primers RVER1 and RVER2 (A), and rp32 and rp33 (B), respectively. (A) Lanes 1-10 and 18: *F. verticillioides* isolates; 11-15: *F. fujikuroi*, 16-17: *F. subglutinans*, 19-27: *F. proliferatum*, 28-34: other *Fusarium* spp. M: a 100-bp ladder. (B) Lanes 1-8: *F. verticillioides*, 9-15: *F. proliferatum*, 16-21: *F. fujikuroi*, 22-23: *F. subglutinans*.

조합은 *F. verticillioides* 뿐 아니라 fumonisin 고생산 균주로 알려진 *F. proliferatum*과 심지어 저생산 또는 미생산 균주로 알려진 *F. fujikuroi*와 *F. subglutinans* 균주로부터도 같은 크기의 DNA를 증폭하였다(Table 1, Fig. 2). 한편, *F. verticillioides* 증폭용 primer 조합(VER1과 VER2, Table 2)을 사용하였을 경우에도, 분석대상 곰팡이 균주 중 오직 *F. verticillioides* 균주의 DNA로부터만 특이 절편이 증폭되어(Table 1), 본 연구에서 개발된 primer들의 특이성이 최소한 기존 개발 primer와 비슷함을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서 개발된 특이 primer는 지금까지 시도되지 않았던 *RPB2* 유전자로부터 제작되었기 때문에 calmodulin 유전자(Mulé 등, 2004), *EF-1* 유전자(Bezuidenhout 등, 2006), intergenic spacer sequence(IGS) 부위(Patiño 등, 2004; Sreenivasa 등, 2008), RAPD 표지인자(Yazeed 등, 2011) 등으로부터 유래된 기존 특이 primer 조합들과 달리 신규성을 갖는다고 할 수 있다. 한편 기존

에 발표된 *F. proliferatum* 특이 primer 조합(Mulé 등, 2004)을 본 연구에서 수집한 *G. fujikuroi* 종 복합체 균주 집단에 적용한 결과, 종 특이적 양상의 PCR 검출이 관찰되지 않았다(Table 1). 따라서 이들 *F. proliferatum* 특이 primer로는 옥수수 발생 fumonisin 고생산 균주인 *F. proliferatum*과 *F. verticillioides*를 구분할 수 없었다. 오히려 본 연구에서 개발한 *F. verticillioides* primer 조합(혹은 기존 primer 조합 추가)을 rp32와 rp33조합과 함께 사용할 경우, fumonisin 생성 가능 *F. verticillioides* 균주의 신속하고 보다 정확한 종 동정이 가능할 것으로 예상된다. 그리고 RVER1과 RVER2 primer의 검출 한계를 검정하기 위하여 *F. verticillioides* 균주 게놈 DNA를 125 ng/μl의 농도로부터 10배씩 희석하여 PCR을 수행한 결과, 0.125 pg/μl 수준의 곰팡이 DNA로부터도 특이 primer를 증폭할 수 있었다(Fig. 3). 한편, 여러 곡물 시료로부터 *F. verticillioides*의 PCR 검출 여부를 검정하기 위하여, 200 mg의 벼와 옥수수 시료로부터 Food Kit(NucleoSpin® Food, Germany)를 이용하여 게놈 DNA를 추출한 후, 위에서 언급한 조건으로 PCR을 수행하였다. 실험 결과, 총 5종의 옥수수 시료 중 3종에서 특이 절편이 검출되었으며(Fig. 4), 총 10종의 벼 시료로부터는 특이 절편이 증폭되지 않았다. 이와 같은 결과는 우리나라의 경우, *F. verticillioides*가 옥수수와 달리 벼에서는 거의 발생하지 않는다는 결과 (Kim 등, unpublished data)를 뒷받침한다. 따라서 우리나라 벼씨와 각종 도정미 시료에서 자연발생하는 미량의 fumonisin (Lee 등, unpublished data)은 *F. verticillioides*가 아니라 대부분 *F. proliferatum*에 의한 것으로 추정할 수 있다. 하지만 우리나라 외 다른 아시아나 아프리카 지역에서는 벼에서도 *F. verticillioides*가 발생한다는 보고가 있기 때문에(Amoah 등, 1995; Desjardin 등, 2000), 우리나라의 경우도 *F. verticillioides*에 의한 벼의 fumonisin 오염가능성에 주의하여야 할 것이다. 한편, 곡물 내 *F. verticillioides*의 오염 여부 뿐 아니라 정량적인 오염량 분석은 quantitative real-time PCR(qRT-PCR)을 통해 가능할 것이다. 본 연구에서 개발된 RVER1과 RVER2 primer 조합은 이들에 의해 증폭된 DNA 절편의 크기(208 bp)를 고려할 때 qRT-PCR에 직접 사용되기 적당할 것으로 예상된다. 또한 이들 primer는 옥수수나 벼 뿐 아니라 다른 곡물에서도 *F. verticillioides*의 오염과 이에 따른 fumonisin 발생위험 정도를 예측하는 데에도 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 특히 화학농약 사용을 최소화하는 친환경농법으로 재배된 농산물 내 곰팡이 오염분석에 중요하게 활용될 수 있을 것이다. 이를 위해서는 곡물 내 *F. verticillioides* 오염률과 fumonisin 발생량 사이의 보다 정밀한 상관관계 규

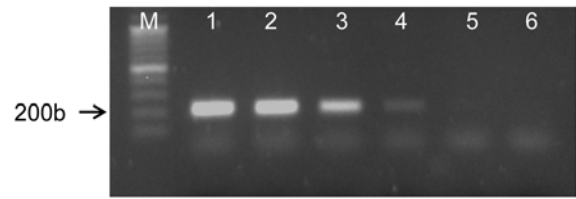


Fig. 3. Amplification of *RPB2* from *Fusarium verticillioides* genomic DNA using RVER1 and RVER2. M: a 100-bp ladder; Lane 1: fungal genomic DNA at 0.125 mg/ml; lanes 2-6: 10-fold serial dilutions of the genomic DNA in lane 1.

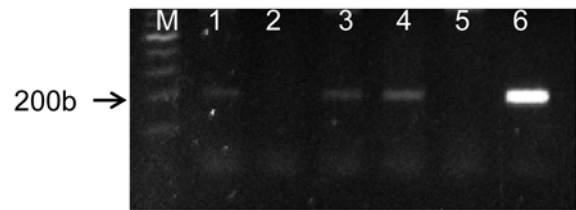


Fig. 4. Amplification of the *Fusarium verticillioides*-specific DNA fragment from genomic DNAs of corn samples using the primers RVER1 and RVER2. M: a 100-bp ladder; Lanes 1-5: corn genomic DNAs, lane 6: genomic DNA of *F. verticillioides*.

명이 필요할 것이다.

요 약

Fusarium verticillioides(완전세대: *Gibberella moniliformis*)는 *Gibberella fujikuroi* 종 복합체에 속하는 식물병원균으로서 옥수수의 줄기와 이삭에 썩음병을 일으킬 뿐 아니라 인축에 중독증을 일으키는 fumonisin 곰팡이 독소를 생산한다. 본 연구의 목적은 옥수수에 주로 발생하는 fumonisin 생성가능 *G. fujikuroi* 종 복합체 소속 *Fusarium* 곰팡이 중 *F. verticillioides*와 그 외 *F. proliferatum*, *F. fujikuroi* 등을 서로 구별할 수 있는 종 특이적 PCR primer 조합을 개발하는 것이다. RNA polymerase II beta subunit 유전자(*RPB2*)의 염기서열로부터 제작된 특이 primer 조합(RVER1과 RVER2)은 우리나라 옥수수에서 분리한 잠재적인 fumonisin 생성 *G. fujikuroi* 종 복합체 균주 중 오직 *F. verticillioides*로부터 208 bp 크기의 단일 DNA 절편을 증폭하였다. 한편 *F. verticillioides*를 포함한 모든 조사 균주는 fumonisin 생합성에 필수적인 *FUM1* 유전자를 포함하고 있었다. 개발된 특이 primer 조합의 검출한계는 분석 곰팡이 DNA 0.125 pg/μl 수준이었다. 한편, 같은 primer 조합으로 *Fusarium* spp.에 오염된 옥수수 시료의 게놈 DNA로부터 *F. verticillioides* 특이 DNA 절편이 증폭되었다. 이와 같은 결과를 종합할 때, 본 연구에서 개발된 primer 조합은 여러 곡물 시료에 오염되어 있는 *F.*

verticillioides 균주의 검출과 종 동정에 유용하게 사용될 것이다.

Acknowledgements

This study was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ007340)”, Rural Development Administration, Republic of Korea, and a grant from the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (No. 309015-04).

References

- Amoah, B. K., Rezanoor, H. N., Nicholson, P. and McDonald, M. V. 1995. Variation in the *Fusarium* section *Lesioloa*: pathogenicity and genetic studies of *Fusarium moniliforme* Sheldon from different hosts in Ghana. *Plant Pathol.* 44: 563–572.
- Baird, R., Abbas, H. K., Windham, G., Williams, P., Baird, S., Ma, P., Kelley, R., Hawkins, L. and Scruggs, M. 2008. Identification of select fumonisin forming *Fusarium* species using PCR applications of the polyketide synthase gene and its relationship to fumonisin production *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 554–570.
- Bezuidenhout, C. C., Prinsloo, M. and Van der Walt, A. M. 2006. Multiplex PCR-based detection of potential fumonisin-producing *Fusarium* in traditional African vegetables. *Environ. Toxicol.* 21: 360–366.
- Chi, M. H., Park, S. Y. and Lee, Y. H. 2009. A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathology J.* 25: 108–111.
- Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G. Poling, S. M. and Maragos, C. M. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1020–1025.
- Hong, S.-Y., Kang, M.-R., Cho, E.-J., Kim, H.-K. and Yun, S.-H. 2010. Specific PCR detection of four quarantine *Fusarium* species in Korea. *Plant Pathology J.* 26: 409–416.
- Jurjevic, Z., Wilson, D. M., Wilson, J. P., Geiser, D. M., Juba, J. H., Mubatanhema, W., Widstrom, N. W. and Rains, G. C. 2005. *Fusarium* species of the *Gibberella fujikuroi* complex and fumonisin contamination of pearl millet and corn in Georgia, USA. *Mycopathologia* 159: 401–406.
- Leslie, J. F., Anderson, L. L., Bowden, R. L. and Lee, Y. W. 2007. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *Int. J. Food. Microbiol.* 119: 25–32.
- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E. and Toussoun, T. A. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80: 343–350.
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* lab manual, Blackwell, Ames, Iowa, USA.
- Liu, Y. L., Whelen, S. and Hall, B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1799–1808.
- Marasas, W. F. O. 2001. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 109: 239–243.
- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C. A., Coetzer, J. A. W., Thiel, P. G. and Vanderlugt, J. J. 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin-B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Res.* 55: 197–203.
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G. and Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 495–502.
- Munkvold, G. P. and Desjardins, A. E. 1997. Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81: 556–565.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E. and Plattner, R. D. 1993. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31: 233–252.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493.
- Patiño, B., Mirete, S., González-Jaén, M., Mulé, G., Rodríguez, M. T. and Vázquez, C. 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Prot.* 67: 1278–1283.
- Proctor, R. H., Desjardins, A. E., Plattner, R. D. and Hohn, T. H. 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., Platter, R. D., Brown, D. W., Seo, J.-A. and Lee, Y.-W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol. Res.* 108: 815–822.
- Sreenivasa, M. Y., González-Jaén, M. T., Dass, R. S., Raj, A. P. C. and Janardhana, G. R. 2008. A PCR-based assay for the detection and differentiation of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolated from Indian maize kernels. *Food Biotechnol.* 22: 160–170.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Yazeed, H. A. E., Hassan, A., Moghaieb, R. E. A., Hamed, M. and Refai, M. 2011. Molecular detection of fumonisin-producing *Fusarium* species in animal feeds using polymerase chain reaction (PCR). *J. Appl. Sci. Res.* 7: 420–427.

- Yoshizawa, T., Yamashita, A. and Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1626-1629.