식물병연구
Res. Plant Dis. 19(4) : 254–258 (2013)
http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2013.19.4.254

Research Article | Open Access

Research in Plant Disease
©The Korean Society of Plant Pathology

Restriction Enzyme-Mediated Integration 방법으로 확보한 *Fusarium oxysporum* 형질전환체의 후자리산 생성능 분석

이데레사* · 신진영 · 손승완 · 이수형 · 류재기
국립농업과학원 유해생물팀

Fusaric Acid Production in *Fusarium oxysporum* Transformants Generated by Restriction Enzyme-Mediated Integration Procedure

Theresa Lee*, Jean Young Shin, Seung Wan Son, Soohyung Lee and Jae-Gee Ryu
Microbial Safety Team, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea
(Received on October 31, 2013; Revised on November 20, 2013; Accepted on November 22, 2013)

Fusaric acid (FA) is a mycotoxin produced by *Fusarium* species. Its toxicity is relatively low but often associated with other mycotoxins, thus enhancing total toxicity. To date, biosynthetic genes or enzymes for FA have not been identified in *F. oxysporum*. In order to explore the genetic element(s) for FA biosynthesis, restriction enzyme mediated integration (REMI) procedure as an insertional mutagenesis was employed using FA producing-*F. oxysporum* strains. Genetic transformation of two *F. oxysporum* strains by REMI yielded more than 7,100 transformants with efficiency of average 3.2 transformants/μg DNA. To develop a screening system using phytotoxicity of FA, eleven various grains and vegetable seeds were tested for germination in cultures containing FA: Kimchi cabbage seed was selected as the most sensitive host. Screening for FA non-producer of *F. oxysporum* was done by growing each fungal REMI transformant in Czapek-Dox broth for 3 weeks at 25°C then observing if the Kimchi cabbage seeds germinated in the culture filtrate. Of more than 5,000 REMI transformants screened, fifty-three made the seeds germinated, indicating that they produced little or fewer FA. Among them, twenty-six were analyzed for FA production by HPLC and two turned out to produce less than 1% of FA produced by a wild type strain. Sequencing of genomic DNA regions (252 bp) flanking the vector insertion site revealed an uncharacterized genomic region homologous (93%) to the *F. fujikuroi* genome. Further study is necessary to determine if the vector insertion sites in FA-deficient mutants are associated with FA production.

Keywords **: Fusaric acid, *Fusarium oxysporum*, REMI, Transformation**

서 론

후자린산(fusaric acid, FA)은 1937년 *Fusarium heterosporum*에서 처음 생성이 확인된 화합물이다(Yabuta 등, 1937). FA는 5-butylpicolinic acid로서 화학 구조가 간단하며(Fig. 1) 동물 뿐 아니라 식물에 약독성을 나타내고 식물의 시들음병에 관여하는 것으로 알려졌으나(Gaumann, 1957) 식물병원성에 어떤 역할을 하는지 확실한 증거는 아직 보고된 바 없다. FA를 생산하는 *Fusarium*종으로 *F. verticillioides, F. crookwellense, F. subglutinans, F. sambucinum, F. napiforme, F. oxysporum, F. solani, F. proliferatum* 등이 알려졌다(Bacon 등, 1996).

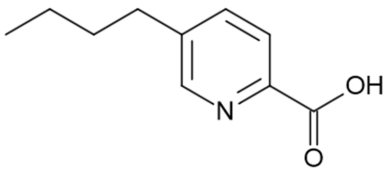

Fig. 1. Chemical structure of fusaric acid (FA).

*Corresponding author
Phone) +82-31-290-0451, Fax) +82-31-290-0407
Email) tessyl1@korea.kr

FA는 다른 *Fusarium* 독소에 비해 독성이 낮으나 다른 *Fusarium* 독소와 중복오염시 독성증진효과를 보이는 물질로 주목받고 있다(Desjardins, 2006). Smith 등(1993)은 캐나다에서 돼지 사료의 오염을 조사한 결과 상당한 양의 FA가 검출됨에 따라 돼지 사료의 *Fusarium* 독소의 오염 분석시 FA를 포함해야 한다고 주장한 바 있다. 옥수수의 경우 종자감염된 *Fusarium* 외 다른 *Fusarium* 균이 추가로 감염될 수 있으며 푸모니신(fumonisin) 독소가 자주 발생하는 작물이기 때문에 FA에 의해 푸모니신 독성이 증가할 수 있다(Bacon 등, 1996).

이러한 FA의 특성 때문에 FA의 생합성 기작 및 생합성 유전자를 규명하기 위한 연구가 진행 중이며 최근 *Fusarium verticillioides* 균주에서 FA 생합성에 필수적인 polyketide synthase(PKS) 유전자와 주변 유전자군이 보고되었다(Brown 등, 2012). 따라서 본 연구에서는 FA 생합성 유전자의 규명을 위해 FA 생성 *Fusarium oxysporum* 균주를 대상으로 생합성유전자의 결손 형질전환체를 육성하고자 유전체 삽입 돌연변이방법 중 하나인 Restriction Enzyme-Mediated Integration(REMI) 방법을 이용하여 곰팡이 형질전환을 실시하였고, 이들 REMI 형질전환체의 FA 생성여부를 검정하는 방법을 확립하였으며, 선발한 형질전환체의 FA 생성능을 분석하였다.

재료 및 방법

FA 생산 *Fusarium* 균주의 확보와 형질전환용 균주 선발. FA 생산 *F. oxysporum*균주는 자체 보유 1주, 경기도농업기술원 보유 3주, 서울대학교 보유 1주를 분양받아 사용하였다(Table 1). 각 균주는 Notz 등(2002)의 방법에 따라 Czapek-Dox broth(CDB, MBCell, Korea)에서 3주간 진탕 배양 후 배양액 내 FA 생성량을 HPLC(Agilent 1100, USA)로 분석하였다. 이 중 가장 높은 FA 생성능을 보인 Foxy20 균주와 V3균주 2점을 선발하여 형질전환에 사용하였다.

Table 1. Effect of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* strains on germination of Kimchi cabbage seeds

Strain	Host	No. of germinated seeds (per 20 seeds)		FA level in culture (μg/ml)
		24 hr	48 hr	
CDB only		17	17	<15
V3	Rice	0	0	47
F.oxy20	Cactus	0	0	2,209
I	Lettuce	0	0	166
Y	Lettuce	0	0	97
A	Unknown	0	0	117

REMI를 이용한 형질전환. 형질전환에 사용할 벡터로 pII99(Namiki 등, 2001)를 선정하였고 제한효소는 *Hind*III를 사용하였다. 원형질체 제작을 위해 driselase(Sigma, USA)를 사용하였고 *Hind*III로 절단된 pII99 DNA와 *Hind*III를 원형질체에 혼합하여 형질전환을 실시하였으며 구체적인 방법은 Han 등(2004)의 방법을 참고하였다. 생산된 형질전환체는 항생제 geneticin이 100 μg/ml 농도로 첨가된 배지에서 3회 이상의 계대 배양을 거쳐 항생제 저항성의 유지를 확인한 후 −80°C에 장기 저장하였다.

REMI 형질전환체의 FA 생성능 스크리닝: 배추종자를 이용한 발아검정법 확립. FA 생산 균주들(Table 1)의 배양여액을 이용하여 11종(벼, 보리, 옥수수, 목화, 오이, 배추, 상추, 들깨, 토마토, 양상추, 애기장대)의 작물과 식물종자의 발아 저해 여부를 검정하였다. 실험에 사용한 종자들은 다음과 같다: 벼(실험실 보유, '일미'), 보리(아시아종묘, '보리싹'), 애기장대(실험실 보유, 'Col-0'), 옥수수(실험실 보유, 품종 미확인), 오이(농우바이오, '백춘다다기'), 들깨(동원농산종묘, '잎들깨'), 양상추(제일종묘농산, '여름그린볼결구양상추'), 목화(아시아종묘, 'ACT01'), 토마토(동부하이텍, '다다기 토마토'), 배추(신젠타, '삼보엇갈이'), 상추(농우바이오, '청치마'; 권농종묘, '선풍포찹적축면상추'; 동부하이텍, '뚝섬적축면'). 배양여액은 각 균주를 CDB에서 3주간 진탕 배양(25°C, 180 rpm)한 후 6겹의 거즈를 통해 배양액을 여과하여 준비하였다. 각 종자 별로 페트리디쉬(90 mm)에 여과지를 2장 깔고 배양여액 8 ml을 분주한 후 종자를 20립씩 치상하였다. 이후 상온, 형광 조명 아래 배양하며 24시간과 48시간 경과 시 종자의 발아여부를 관찰하였다. 실험 결과 배양여액에서 유일하게 발아하지 않은 배추(삼보 엇갈이 품종) 종자를 선발할 수 있었다(Table 1, Fig. 2). 배추종자를 이용한 발아검정은 페트리 디쉬(60 mm) 내부에 2겹의 여과지를 깔고 배양여액 3.5 ml을 분주한 후 배추종자 20립을 치상하고 위와 같은 방법으로 배양한 후 배추종자의 발아유무를 대조구와 비교하였다. 이를 통해 배추종자가 미 발아한 배양여액의 형질전환체를 선발하여 재 검정을 통해 확인한 후 FA 정량을 위한 기기 분석에 사용하였다.

HPLC를 이용한 배양여액 내 FA 농도의 정량. FA 정량분석을 위해 선발된 REMI 형질전환체는 각 배양여액을 6겹의 거즈로 여과하여 균체를 제거한 후 상등액 1 ml을 다시 멸균여과필터(0.45 μm)로 여과하였다. 상등 여과액 0.5 ml과 동량의 acetonitrile 0.5 ml를 혼합하여 HPLC에 주입하였다. HPLC(Agilent 1100, USA)는 DAD 254 nm와 Zobax C18 column(4.6 × 150 mm, 40°C)을 사용하였고

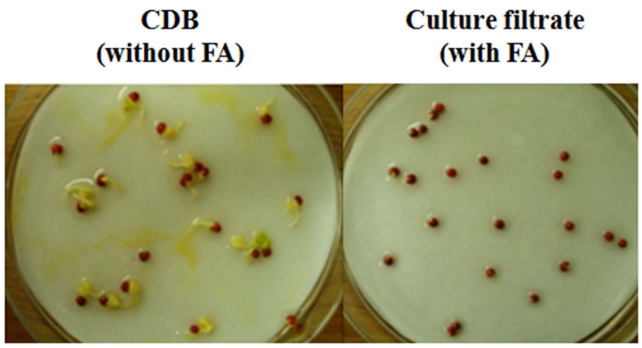

Fig. 2. Screening of fusaric acid (FA) production based on germination of Kimchi cabbage seeds.

이동상은 0.5%의 trifluoroacetic acid가 포함된 acetonitrile과 0.5%의 trifluoroacetic acid가 포함된 water를 이용하여 gradient를 주어 분석하였으며 이때 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 25 μl이었다. 표준물질로 fusaric acid(Sigma, USA)를 acetonitrile에 희석하여 사용하였다. 모든 시료는 3반복 분석하여 평균농도를 구하였다.

REMI 형질전환체 내 벡터 삽입 인근 부위의 DNA 염기서열 분석. REMI 형질전환체 중 FA 생성량이 현저히 감소한 형질전환체 2주를 선발하여 게놈 내 벡터가 삽입된 부위를 확보한 후 DNA 염기서열을 분석하였다. 형질전환체의 게놈 DNA를 벡터를 절단하지 않는 *Hae*III, *Hinc*II, *Msp*I, *Xce*I, *Rsa*I 제한효소로 절단한 후 어댑터(GreenGene Biotech Inc., Korea)를 양 말단에 접합시키고 벡터의 유일한 *Hind*III 절단부위 좌우에 특이적인 프라이머(pII99 LB1: 5'-GGTCGTCAAGAGACCTACGAGACTGAG-3', pII99 RB1: 5'-ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCC-3')와 어댑터 특이적인 프라이머(GreenGene Biotech Inc.)의 PCR을 통해 벡터 삽입 주변의 게놈을 증폭하였다. 증폭된 DNA는 분리, 정제한 후 어댑터 프라이머보다 안쪽의 프라이머를 사용하여 염기서열을 결정하고 유사도를 NCBI BLAST를 통해 검색하였다(GreenGene Biotech Inc.).

결과 및 고찰

REMI를 사용한 *Fusarium oxysporum*의 형질전환 방법으로 1 μg DNA 당 약 3.2주의 형질전환체를 얻을 수 있었으며, 조사한 두 모균주 사이에 형질전환 효율의 차이는 없었다(Table 2). 하지만 REMI를 통해 확보한 전체 형질전환체의 약 70%인 5,000여 주만 3회 이상의 계대배양 후에도 항생제 저항성을 유지하였다. REMI는 *Fusarium* spp. 중에서 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*(Namiki 등, 2001), *Gibberella fujikuroi*(Linnemannstons 등, 1999)와 *Gibberella zeae*(Han 등, 2004) 등뿐 아니라 그 외 다양한 *Fusarium* 속 곰팡이에서 유전체 삽입 돌연변이 방법(insertional mutagenesis)으로 활용되었기 때문에 본 연구에서 사용한 *F. oxysporum* 형질전환 및 돌연변이체의 육성에도 적합할 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서 REMI 형질전환체 중 돌연변이체(FA 미생성 또는 FA 미량생성 형질전환체)의 선발 효율[5,000주 중 2주(0.04%)와 19주(0.38%)]는 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*(Namiki 등, 2001)의 경우[1,120여 주 중 13주(1.15%)]와, *G. fujikuroi*(Linnemannstons 등, 1999)의 경우[1,600주 중 2주(0.13%)] 보다 다소 낮았다.

Table 2. Transformation efficiency of *Fusarium oxysporum* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)

Strain	No. of REMI performed	No. of transformants	Efficiency[a]
F.oxy20	32	5,371	3.3
V3	11	1,762	3.2
Total	43	7,133	

[a]No. of transformant/1 μg DNA used in REMI.

REMI 형질전환체의 FA 생성여부를 스크리닝하기 위한 배추종자의 발아검정법은 수 천 주의 형질전환체를 빠른 시일 내 간단히 검정하는데 매우 유용하였다. FA의 생성 최적배지로는 PDB(Difco, USA)와 CDB의 비교 후 CDB를 선발하였으며(미보고 결과), 검정에 사용한 20립의 배추종자는 대부분 일정하게 발아하였으므로 발아 또는 미발아의 판단이 용이하였다. 그러나 이 검정법을 통해 선발한 FA 미생성 추정 REMI 형질전환체 중 26주의 FA 생성량을 분석했을 때 5주는 모균주인 Foxy20 보다 오히려 FA 생성량이 높게 나타났다. 따라서 종자 스크리닝 후 정밀 기기분석을 통한 FA 생성여부의 최종판단이 필요하다(Table 3).

총 11종의 식물 종자 중 유일하게 배추종자가 FA에 감수성 반응을 나타낸 것은 FA의 식물독성이 작물에 따라 다를 수 있음을 시사한다. 배추종자에서 식물독성을 나타내는 FA의 농도는 조사한 *F. oxysporum* 균주 중 최저량을 생산한 V3균주의 경우 47 μg/ml이었으며 이 농도에서 배추종자는 전혀 발아하지 않았다(Table 1). FA에 민감한 반응을 보인 식물로는 토마토(Gaumann, 1957), 상추, 선인장 등(미보고 결과)이 있다. FA 생성 *Fusarium* 종인 *F. proliferatum*과 *F. oxysporum*의 경우, 기주 특이성이 높지만 작물의 범위도 매우 넓기 때문에 다양한 작물에서 FA가 생성되어 독성을 나타낼 것으로 추정할 수 있다(Desjardins, 2006).

FA 미생성 추정 REMI 형질전환체 26주 중 나머지

Table 3. Fusaric acid production by selected restriction enzyme-mediated integration transformants

Transformant	Day 9		Day 12		Day 15		% of wild type level
	Fusaric acid[a]	S.D.[b]	Fusaric acid	S.D.	Fusaric acid	S.D.	
F.oxy20 (wild type)	19.3	9.1	106.9	57.5	761.4	66.5	100
6-265	265.1	65.8	470.6	59.5	596.6	277.6	78.4
11-115	1.1	0.2	1.1	0.3	2.1	0.4	0.3
15-1	76.7	6.0	105.2	5.6	136.8	12.3	18
15-33	268.8	36.1	238.6	29.2	292.0	119.1	38.4
15-38	92.3	4.4	73.7	7.5	40.2	12.6	5.3
15-59	922.3	30.5	1138.7	29.5	1142.1	190.7	150
12-17	2.3	1.4	85.2	109.1	81.5	11.9	10.7
25-39	862.8	64.2	900.8	205.4	950.0	394.7	124.8
25-40	883.4	57.8	1215.1	61.3	1089.4	228.3	143.1
25-60	54.2	59.6	52.3	21.2	30.0	8.0	3.9
28-11	44.7	14.0	57.1	11.2	71.1	30.4	9.3
28-21	151.6	55.7	138.3	38.1	309.8	60.2	40.7
28-24	103.1	37.2	185.1	11.4	240.9	68.4	31.6
28-32	7.2	2.3	8.1	1.7	4.2	1.8	0.6
28-36	26.3	5.9	82.5	36.2	26.7	13.6	3.5
28-46	23.9	14.3	61.7	17.3	24.7	9.2	3.2
28-61	29.7	11.2	18.7	16.5	32.3	18.7	4.2
28-62	35.4	11.6	20.8	6.1	72.8	13.1	9.6
28-63	90.6	11.4	82.8	44.8	193.4	80.9	25.4
28-64	55.2	14.3	89.7	35.9	70.1	26.9	9.2
28-68	66.7	35.8	113.2	7.1	249.3	56.2	32.7
28-70	70.7	17.3	84.0	5.7	183.5	83.2	24.1
29-141	119.9	39.4	148.2	38.1	386.1	31.6	50.7
29-149	69.9	13.8	158.7	70.6	309.8	42.3	40.7
29-260	700.0	74.3	951.0	111.1	1025.9	213.9	134.7
29-263	1206.8	180.7	1237.3	196.5	1107.9	173.3	145.5

[a]Level of fusaric acid produced in μg/ml.
[b]Standard deviation.

19주는 모두 모균주(761.4 μg/ml)보다 낮은 농도의 FA를 생성했으며(2.1–596.6 μg/ml) 이 중 10주의 FA의 생산량은 모균주 생산량의 10% 이하였다(Tabel 3). 따라서 이들 FA 저생산 형질전환체에서는 REMI에 의해 FA 생성과 직간접적으로 관련된 유전자들이 영향을 받은 것으로 추정할 수 있다. 본 연구에서는 이 중 가장 낮은 농도의 FA를 생산한 2주의 형질전환체(11-115와 28-32)를 선발하여 벡터를 프로브로 사용하는 Southern hybridization 분석을 통한 형질전환체 내 벡터의 삽입양상 분석을 시도했으나 hybridization signal을 얻지 못하였다. 따라서 형질전환체의 벡터 삽입 부위 규명을 위한 재 분석과 확인이 필요하다. 삽입 양상은 알 수 없었으나 이들의 유전체 내 벡터 삽입 부위의 유전자 동정을 위해 삽입부위를 증폭하고 flanking DNA 염기서열을 분석한 결과, 28–32 형질전환체로부터 벡터 삽입주변 부위(252 bp)의 DNA 염기서열을 확보할 수 있었다. NCBI BLAST 검색 결과, 벡터 삽입 게놈부위 염기서열은 *F. fujikuroi* 유전체 내 미동정 부위와 93% 유사성이 있음을 확인하였다(E-value 7e-96, Accession HF679033.1). 그러나 이 부위의 FA 생성 관련 여부를 알기 위해서는 좀 더 확장된 삽입 부위의 추가 동정과 targeted gene deletion 등을 이용한 실험이 필요하다. 또한 *F. verticillioides*에서 전체 FA 생합성 유전자군의 염기서열정보가 공개되면 위의 염기서열과의 비교 및 생합성 유전자군과의 연관성 분석이 가능할 것이다. 한편 FA

생성이 저하된 다른 REMI 형질전환체의 경우도 같은 실험을 통해 FA 생성 또는 정량발현에 관여하는 유전자를 분석할 수 있을 것이다.

요 약

후자린산(FA)는 *Fusarium* 속 균이 생성하는 독소로서 다른 곰팡이독소보다 독성은 낮으나 다른 독소와 중복 오염시 전체 독성을 증진시키는 것으로 알려졌다. 현재까지 FA 생합성 관련 효소나 유전자가 *Fusarium oxysporum*에서 밝혀지지 않았기 때문에 본 연구에서는 관련 생합성 유전자의 발굴을 위해 제한효소를 통한 무작위 삽입 형질전환방법인 REMI를 이용하여 FA 생성 *F. oxysporum* 균주의 생합성유전자의 결손을 시도하였다. *F. oxysporum* 균주 2주를 대상으로 REMI를 시도한 결과, 평균 3.2주(1 μg DNA 당)의 효율로 7,100주 이상의 형질전환체를 육성하였다. FA 미생성 형질전환체를 스크리닝 하기 위해 FA가 함유된 배양액에서 다양한 식물종자의 발아여부를 조사한 결과, 11종의 종자 중 가장 감수성인 배추종자를 선발하였다. 각 형질전환체는 Czapek-Dox broth에서 3주간 배양한 후 배양여액을 배추종자의 발아여부 검정에 사용하였다. 검정결과 총 5,000여 주의 REMI 형질전환체 중 53주의 배양여액에서 종자가 발아하지 않아, 이들을 FA 미(저) 생성 추정 형질전환체로 선발하였다. 이 중 26주의 FA 생성량을 HPLC로 분석한 결과, 2주의 형질전환체에서 모균주 생성량의 1% 이하의 FA가 검출되었다. 이 중 형질전환체 1주로부터 REMI 벡터 삽입 부위 게놈 DNA의 염기서열(252 bp)을 확보하였으며, 이 부위는 *F. fujikuroi*의 미동정 게놈부위와 93% 유사성이 있음을 확인하였다. 이 부위의 FA생성 관련성 증명을 위해서는 추후 연구가 필요하다.

Acknowledgements

This study was carried out with the support of “Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ008432), National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea. We thank Dr. Jin Young Kim at Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services and Prof. Young-Ho Kim at Seoul National University for kindly providing *Fusarium oxysporum* strains used in this study.

References

Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. and Leslie, J. F. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4039–4043.

Brown, D. W., Butchko, R. A. E., Busman, M. and Proctor, R. H. 2012. Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol*. 49: 521–532.

Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 260 pp.

Gaumann, E. 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology* 47: 342–357.

Han, Y.-K., Lee, T., Han, K.-H., Yun, S.-H. and Lee, Y.-W. 2004. Functional analysis of the homoserine O-acetyltransferase gene and its identification as a selectable marker in *Gibberella zeae*. *Curr. Genet*. 46: 205–212.

Linnemannstons, P., Vob, T., Hedden, P., Gaskin, P. and Tudzynski, B. 1999. Deletions in the gibberellins biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 2558–2564.

Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y. and Tsuge, T. 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 14: 580–584.

Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H., Haas, D. and Defago, G. 2002. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 2229–2235.

Smith, T. K. and Sousadias, M. 1993. Fusaric acid content of swine feedstuffs. *J. Agric. Food Chem*. 41: 2296–2298.

Srobarova, A., Eged, S., Teixeira da Silva, J., Ritieni, A. and Santini, A. 2009. The use of *Bacillus subtilis* for screening fusaric acid production by *Fusarium* spp. *Czech J. Food Sci*. 27: 203–209.

Yabuta, T., Kambe, K. and Hayashi, T. 1937. Biochemistry of the bakanae fungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanae fungus. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn*. 10: 1059–1068.