붉은곰팡이 감염 벼와 건전 벼의 독성 곰팡이와 제랄레논 발생

Occurrence of Toxigenic *Fusarium* spp. and Zearalenone in Scabby Rice Grains and Healthy Ones

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-3202

Fax: +82-63-238-3836

E-mail: tessyl1@korea.kr

장자영¹ · 김소수¹ · 진현숙¹ · 백슬기¹ · 오수진² · 김규태² · 김점순¹ · 이데레사^{1*}¹국립농업과학원 유해생물팀, ²거창군농업기술센터 향노화산업과Ja Yeong Jang¹, Sosoo Kim¹, Hyun Suk Jin¹, Seul Gi Baek¹, Sujin O², Kyutae Kim², Jeomsoon Kim¹, and Theresa Lee^{1*}¹Microbial Safety Team, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea²Department of Anti-aging, Geochang-gun Agricultural Technology Center, Geochang 50147, Korea

We analyzed rice sample with scab (collected in 2017) for fungal occurrence and found that frequency of *Fusarium* spp. was the highest among fungal genera. Within *Fusarium*, *Fusarium asiaticum*-nivalenol type dominated as 79%. Among mycotoxins, zearalenone was the highest toxin detected (1117 ng/g), followed by deoxynivalenol (163 ng/g), 15-acetyl deoxynivalenol (155 ng/g), nivalenol (110 ng/g). Analysis of mycotoxin levels in scabby and healthy grains (collected in 2015) revealed that both grain samples were contaminated with zearalenone. However, level difference of zearalenone between the samples was over 5 times as the scabby samples were 1400–2370 ng/g, while healthy ones were 240–430 ng/g. This result indicates that scabby grains should be removed when harvest to reduce zearalenone contamination in rice.

Keywords: *Fusarium asiaticum*, Rice, Scab, Zearalenone

Received September 27, 2018

Revised October 18, 2018

Accepted October 19, 2018

붉은곰팡이병(*Fusarium* head blight)은 곡류에 발생하는 주요 곰팡이 병의 하나로 개화기에 잦은 강우 등 습한 환경이 지속될 때 많이 발생한다. 이 병은 작물에 병해를 일으켜 수량감소와 품질을 저하시킬 뿐 아니라 곰팡이독소를 분비하여 감염된 종자를 섭취하는 인축에 2차 피해를 야기할 수 있다. 대표적인 붉은곰팡이 독소는 데옥시니발레놀(deoxynivalenol, DON), 니발레놀(nivalenol, NIV), 제랄레논(zearalenone, ZEA), T-2독소로 이들은 소화기 장애, 생식기질환, 피부병을 일으키거나 면역저하를 초래한다(Desjardins, 2006; Placinta 등, 1999). 병원균인 붉은곰팡이는 다수의 종으로 구성된다. 전 세계적으로 빈번하게 발생하는 종으로는 *Fusarium graminearum* 종복

합체(species complex, FGSC)에 속하는 *F. graminearum*, *F. asiaticum*, *F. boothii* 등과 *F. culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* 등이 보고되었다(Bacon 등, 1996). 붉은곰팡이는 식물의 화기를 통해 감염하며 맥류에 주로 발병하는 것으로 알려져 있지만 벼에도 빈번하게 발생한다. 우리나라의 곡류 중에는 보리와 밀 뿐 아니라 벼와 옥수수에도 발생이 지속적으로 보고되었다(Chung, 1975; Lee 등, 1986; Lee 등, 2010a; Park 등, 1992). 이 연구에서는 붉은곰팡이에 감염된 벼 시료에서 병원균을 분리, 동정하고 시료의 곰팡이독소 오염수준을 분석하는 한편, 시료 중 육안상 감염 낱알과 건전한 낱알을 구분하여 감염 정도, 곰팡이 발생과 곰팡이독소 오염수준의 연관성을 구명하고자 하였다.

붉은곰팡이 감염 벼 시료는 2017년 8월 경남 거창군의 예찰 포장에서 채취한 것(#1)과 2015년 10월 전남 해남군에서 수집

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

한 것(#2, #3)을 사용하였다. 각 시료는 원시료와 원시료를 육안 상 건전한 낱알과 감염 낱알로 각각 분리한 것으로 구분하여 분석에 사용하였다. 곰팡이 발생조사를 위해 낱알을 표면살균한(1% NaOCl, 2분) 후 감자한천배지(PDA)에 무작위로 치상하고 25°C에서 5일간 배양한 후 자라나는 균총을 계수하였다. 곰팡이 발생조사, 붉은곰팡이 분리과 DNA 추출, 종과 독소화학형 동정은 Lee 등(2016)의 방법에 따라 실시하였으며 종 동정은 *TEF* (translation elongation factor) 유전자, 독소형(trichothecene chemotype) 동정은 *TRI12* 유전자를 이용하였다.

시료의 *Fusarium* 곰팡이독소(3-ADON, 15-ADON, ZEA)는 퀘처스(QuEChERS) 법으로 다음과 같이 분석하였다(Lee 등, 2013). 시료를 마쇄하여 2 g을 취한 후 시료에 0.1% formic acid가 들어있는 물 3.75 ml과 acetonitrile 5 ml을 넣어 1시간 동안 300 rpm에서 진탕 추출하였다. 이 추출액에 NaCl 1 g과 MgSO₄ 4 g을 넣고 1분간 vortex 후 원심분리하였다. 상등액 2 ml을 취해 primary secondary amine 50 mg 과 MgSO₄ 150 mg을 넣고 1분간 vortex 후 원심분리 한 다음 상등액 1 ml을 test tube에 넣고 질소 건조하였다. 건조시료는 1 ml의 15% 메탄올 용액으로 재 용해 후 0.2 µm 실린지 필터로 filtering 하여 시료를 조제하였다. DON과 NIV는 Ham 등(2017)의 방법에 시료수를 2 g으로 변형한 후 동일한 방법으로 전처리 하였으며, 모든 시료는 액체크로마토그래프 질량분석기(LC-MS) 분석을 실시하였다. LC-MS 분석은 Waters e2695 separation module과 정량을 위해 Water 3100 MS detector를 이용하여 다음의 조건으로 분석을 실시하였다. 컬럼은 Zorbax SB Aq C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm, Agilent, USA)를 사용하였고, 이동상 용매는 0.2% formic acid와 5 mM ammonium formate가 첨가된 물(A)과 100% 메탄올(B)을 구배(gradient) 조건으로 사용하였다. 유속은 0.5 ml/min이었고 컬럼온도는 40°C, 주입량은 5 µl이었다. MS 검출조건은 ESI negative 또는 positive 모드를 이용하였으며, Capillary는 2000 V, Cone은 22 V였으며, Ion Source 온도는 150°C, Desolvation 온도는 400°C였고, Cone gas 유량은 50 l/h, Desolvation gas 유량은 800 l/h로 분석하였다. 정량분석은 SIM (selective ion monitoring) 모드를 이용하여 NIV: 357.26, DON: 341.32, 3-ADON: 383.11, 15-ADON: 356.21, ZEA: 317.32 질량값을 선택적으로 검출하였다. 통계분석은 SPSS 프로그램(SPSS, version 21.0 Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리 평균간 비교를 위해 t-test ($p < 0.05$)를 실시하여 유의성 검증을 수행하였다.

벼 시료(#1, 2017년 산)에서 가장 빈번하게 관찰된 곰팡이는 *Fusarium* 속 (34.2%) 이었으며 *Bipolaris* 속(29.1%)가 그 다음이었다(Table 1). *Fusarium* 속은 붉은곰팡이(FGSC, 20.3%)와 *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex (FIESC, 8.9%)

Table 1. Frequency (%) of fungal genus observed from the rice sample #1

Fungal genus	Sample		
	Mixed	Healthy	Scabby
<i>Fusarium</i> (total)	34.2	22.2	54.8
(FGSC) ^a	(20.3)	(5.6)	(28.6)
(FIESC) ^b	(8.9)	(6.9)	(21.4)
<i>Bipolaris</i>	29.1	26.4	3.6
<i>Nigrospora</i>	5.1	15.3	9.5
<i>Clonostachys</i>	3.8	0.0	14.3
Others ^c	1.3	5.6	3.6
Unknown ^d	26.6	30.6	14.3
Total	100.0	100.0	100.0

^a*Fusarium graminearum* species complex.

^b*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex.

^cOthers include genera occurred less than 10% each.

^dNot identified.

곰팡이가 대부분이었다. *Bipolaris* 속의 높은 발생빈도(29.1%)은 이 시료가 벼 깨씨무늬병(병원균 *Bipolaris oryzae*)에도 감염되었을 가능성을 나타내며 실제 동일한 포장에서 깨씨무늬병이 6–25% 발생한 것으로 추산되었다. 흥미롭게도 곰팡이 발생빈도는 건전한 낱알 시료와 감염 낱알 시료에서 다르게 나타났다. 건전한 낱알의 붉은곰팡이(FGSC) 발생빈도는 원시료(20.3%)보다 낮은 5.6%였으나 감염 낱알은 28.6%로 건전한 낱알보다 약 5배 높았다. 이 차이는 다른 시료(Fig. 1)에서 보이는 것과 유사한 육안 상 병징의 차이를 뒷받침하는 결과로 보인다. FIESC의 발생빈도도 FGSC의 빈도와 유사한 양상을 보였다. *Bipolaris* 속은 원시료와 건전시료에서 유사하게 관찰되었으나 감염시료에서는 3.6%로 현저히 낮았다. *Clonostachys* spp.는 건전 낱알에서는 전혀 발생하지 않았으나 감염 시료에서는 *Fusarium* 속 다음으로 발생빈도(14.3%)가 높았다. 이것은 *Clonostachys* spp.가 *F. graminearum*의 길항균으로 저장 중 *Fusarium* 균에 대한 생물방제효과와 제랄레논 분해에 관여한다는 것이 밝혀진 바 있어(Jensen 등, 2000; Kosawang 등, 2014) 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

붉은곰팡이의 종 구성은 Table 2와 같다. 감염시료에서 분리한 붉은곰팡이의 우점종은 *F. asiaticum*-NIV 생성형으로 붉은곰팡이 중 79%를 차지하였으며 *F. graminearum*-15-ADON (17%), *F. graminearum*-3-ADON (4%)의 순으로 우점하였다. 이는 원시료와 유사한 결과이며(Table 2), 우리나라의 벼에 발생하는 붉은곰팡이 우점종이 *F. asiaticum*-NIV 생성형이라는 기존의 보고와 일치하는 결과이다(Lee 등, 2009). 건전시료에서

Fig. 1. Rice grains with healthy or scab appearance. (A) sample #2, (B) sample #3.

Table 2. Species composition (%) of FGSC isolates in the rice sample #1

Species (Chemotype) ^a	Sample		
	Mixed	Healthy	Scabby
<i>F. asiaticum</i> (NIV)	81.3 (13) ^b	0.0	79.2 (19)
<i>F. graminearum</i> (3-ADON)	0.0	0.0	4.1 (1)
<i>F. graminearum</i> (15-ADON)	18.7 (3)	100.0 (4)	16.7 (4)
Total	100.0 (16)	100.0 (4)	100.0 (24)

^aNIV, nivalenol; 3-ADON, 3-acetyl deoxynivalenol; 15-ADON, 15-acetyl deoxynivalenol.

^bNumber of isolates in parentheses.

우점형인 *F. asiaticum*-NIV 이 아닌 *F. graminearum*-15-ADON 만 분리된 것은 분리균주의 수(16점)가 적기 때문에 발생한 오류로 추정된다. 2015년산 벼 시료(#2, #3)의 경우 #1 시료와 달리 붉은곰팡이가 거의 관찰되지 않아 곰팡이독소의 오염수준만 측정하였다.

벼 시료의 붉은곰팡이 독소 5종의 오염을 분석한 결과, 2017년산 혼합시료(#1)는 ZEA의 오염수준이 가장 높았으며(1117 ng/g), DON > 15-ADON > NIV > 3-ADON의 순으로 오염이 높았다

(Table 3). ZEA의 농도는 DON의 6배 이상, NIV의 10배 가량 높았다. 기존의 보고에 따르면 국내 벼 시료의 ZEA 평균 수준은 11.8 ng/g (Lee 등, 1991), 38.5 ng/g (백미; Park 등, 2005), 7.9–172.9 ng/g (Lee 등, 2010b), 102 ng/g (Lee 등, 2013)으로 나타났다. 또한 DON과 NIV는 일반적으로 ZEA보다 오염수준이 높았으므로 위의 결과는 이전 해에 비해 벼 시료의 ZEA 오염수준이 예외적으로 높음을 보여준다. ZEA의 오염수준이 높아진 배경에는 병원균의 독소 생성능 변화, 우점 병원균 집단의 변화, 독소 생성 환경 변화 등이 있을 수 있으므로 ZEA의 오염수준이 낮은 시료 또는 전년 시료와 비교 분석이 필요하다. 외국의 경우 나이지리아의 벼에서 1169 ng/g의 오염이 보고된 적이 있으나 이외의 국가에서 보고된 오염수준은 300 ng/g 이하였다 (Ferre, 2016). 국내산 청치미와 변색미에서는 3000 ng/g 이상의 ZEA 오염수준이 보고되었다(Lee 등, 2011). 국내산 벼의 ZEA 오염실태를 확인하기 위하여 2015년산 벼 시료(#2, #3)를 추가로 분석하였는데 이들도 건전시료와 감염시료로 구분하여 위의 독소를 분석하였다. 그 결과 2015년 시료에서도 ZEA의 발생수준이 다른 독소에 비해 건전과 감염시료에서 모두 월등히 높음을 확인하였다(Table 4). 이때 건전시료와 감염시료 간 ZEA 농도의 차이는 5배 이상으로 나타났다. 이 결과는 벼의 제랄레논 오염 저감을 위해서는 벼 수확 시 붉은곰팡이 감염종자를 최대한 제거해야 함을 시사한다. 또한 감염종자를 제거할 수 있는 장치 개발을 위한 실용화 연구가 필요함을 보여준다. 밀의 경우 감염 종자의 제거를 통해 붉은곰팡이독소의 26–80%가 저감되는 것으로 보고되었다(Schaarschmidt와 Fauhl-Hassek, 2018). 곡류는 도정과정을 거치면 곰팡이독소가 많이 집적된 껍질부분을 제거할 수 있지만(Kaushik, 2015), 사료용은 도정을 하지 않기 때문에 ZEA이 오염된 벼를 사료로 사용시 가축이 곰팡이독소의 오염에 더 취약하게 된다. ZEA에 가장 민감한 돼지의 경우 더욱 주의가 필요하다. 또한 붉은곰팡이독소의 오염은 이와 같이 환경의 영향을 크게 받으므로 오염 취약작물의 지속적인 실태조사가 필요하다.

한편, 2017년산 벼 시료(#1)의 경우 조사 대상인 5종의 곰팡이독소에 모두 오염되었고 2015년산 시료도 최소 2종의 독소에 오염된 것으로 확인되었다. #1 시료는 우점종인 *F. asiaticum* 외에도 *F. graminearum*에 의해 복합 감염되었으며 한 종의 균

Table 3. Level of Fusarium toxins in the mixed rice sample #1

Toxin ^a	NIV	DON	3-ADON	15-ADON	ZEA
Avg±SD ^b (ng/g)	110.3±0.6	163.3±5.8	91.3±1.5	155.0	1117.0±221.0

^aNIV, nivalenol; DON, deoxynivalenol; 3-ADON, 3-acetyl DON; 15-ADON, 15-acetyl DON; ZEA, zearalenone.

^bAverage of three replicates±standard deviation. Level of quantification = 30 ng/g for NIV, DON, 3- & 15-ADON; 3 ng/g for ZEA.

Table 4. Comparison of toxin levels (ng/g) between healthy and scabby rice samples

Toxin ^a	Sample #2		Sample #3	
	Healthy	Scabby	Healthy	Scabby
NIV	0	0	0	0
DON	62.0±107.0	0	44.0±76.0	0
3-ADON	15.3±17.5	12.7±8.5	4.8±1.5	7.4±5.8
15-ADON	0	0	0	0
ZEA ^b	235.8±40.7	1402.8±204.0	428.7±46.1	2365.0±465.7

^aNIV, nivalenol; DON, deoxynivalenol; 3-ADON, 3-acetyl DON; 15-ADON, 15-acetyl DON; ZEA, zearalenone.

^bWithin a sample, different letter meant significant difference ($p < 0.05$).

추가 두 가지 이상의 독소를 동시에 생성하는 것은 *Fusarium* 에서 빈번하게 발생한다. 붉은곰팡이감염의 주 병원균인 *F. graminearum*이나 *F. asiaticum*은 트리코세신인 데옥시니발레놀이나 니발레놀을 생성할 때 이들의 유도체뿐 아니라 제랄레논을 동시에 생성하므로(Desjardins, 2006) 붉은곰팡이 오염 시료의 경우 복합감염에 따른 다중 독소 중복 오염을 예상하고 대처할 필요가 있다.

요 약

2017년산 붉은곰팡이 감염 벼시료의 곰팡이 발생을 분석한 결과 *Fusarium* 속의 발생빈도가 가장 높았다. *Fusarium* 속 중에서는 *Fusarium asiaticum*-니발레놀 형이 79%로 우점하였다. 곰팡이독소 중에서는 제랄레논이 1117 ng/g으로 가장 많이 검출되었으며 데옥시니발레놀(163 ng/g), 15-아세틸 데옥시니발레놀(155 ng/g), 니발레놀(110 ng/g)의 순으로 높았다. 2015년산 벼시료를 붉은곰팡이 감염벼와 건전벼로 구분한 후 곰팡이독소 수준을 분석한 결과 두 시료는 모두 제랄레논으로 오염되었다. 그러나 이들 시료 간 제랄레논의 수준차이는 5배 이상이었으며 감염벼는 1400–2370 ng/g, 건전벼는 240–430 ng/g이었다. 이 결과는 벼의 제랄레논 독소 저감화를 위해 벼 수확 시 붉은곰팡이 감염종자의 제거가 필요함을 시사한다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgement

This study was carried out with the support of “Research Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No. PJ012485), National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Bacon, C., Porter, J., Norred, W. and Leslie, J. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4039–4043.
- Chung, H. S. 1975. Cereal scab causing mycotoxins in Korea and present status of mycotoxin researches. *Korean J. Mycol.* 3: 31–36.
- Desjardins, A. E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, MN, USA. 260 pp.
- Ferre, F. S. 2016. Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control* 62: 291–298.
- Ham, H., Baek, J., Lee, M., Lee, T., Hong, S.-K. and Lee, S. 2017. Change of fungi and mycotoxin in hulled barley under different conditions and period. *Korean J. Food Preserv.* 24: 857–864.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B. and Jensen, D. F. 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 233–242.
- Kaushik, G. 2015. Effect of processing on mycotoxin content in grains. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55: 1672–1683.
- Kosawang, C., Karlsson, M., Véléz, H., Rasmussen, P. H., Collinge, D. B., Jensen, B. et al. 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. *Fungal Biol.* 118: 364–373.
- Lee, J., Chang, I. Y., Kim, H., Yun, S. H., Leslie, J. F. and Lee, Y. W. 2009. Genetic diversity and fitness of *Fusarium graminearum* populations from rice in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3289–3295.
- Lee, S., Lee, T., Kim, M., Yu, O., Im, H. and Ryu, J.-G. 2013. Survey on contamination of *Fusarium* mycotoxins in 2011-harvested rice and its by-products from rice processing complexes in Korea. *Res. Plant Dis.* 19: 259–264.
- Lee, S.-H., Lee, J., Nam, Y. J., Lee, S., Ryu, J.-G. and Lee, T. 2010a. Population structure of *Fusarium graminearum* from maize and rice in 2009 in Korea. *Plant Pathol. J.* 26: 321–327.
- Lee, S.-H., Son, S. W., Nam, Y. J., Shin, J. Y., Lee, S., Kim, M. et al. 2010b. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in field-collected maize and rice in Korea in 2009. *Res. Plant. Dis.* 16: 306–311. (In Korean)
- Lee, T., Lee, S.-H., Lee, S.-H., Shin, J. Y., Yun, J.-C., Lee, Y.-W. et al. 2011.

- Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in rice and its milling by-products in Korea. *J. Food Prot.* 74: 1169-1174.
- Lee, T., Paek, J.-S., Lee, K. A., Lee, S., Choi, J.-H., Ham, H. et al. 2016. Occurrence of toxigenic *Fusarium vorosii* among small grain cereals in Korea. *Plant Pathol. J.* 32: 407-413.
- Lee, U.-S., Jang, H.-S., Tanaka, T., Hasegawa, A., Oh, Y.-J., Cho, C.-M. et al. 1986. Further survey on the *Fusarium* mycotoxins in Korea cereals. *Food Addit. Contam.* 3: 253-261.
- Lee, Y.-W., Kim, J. G., Chung, D. H., Roh, P. U. and Pestka, J. J. 1991. Natural occurrence of zearalenone in rice and soybean produced in Korea. *Mycotoxin Res.* 7: 69-72.
- Park, J. W., Choi, S.-Y., Hwang, H.-J. and Kum, Y.-B. 2005. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 305-314.
- Park, K.-J., Park, A.-R. and Lee, Y.-W. 1992. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins of the 1990 barley crop in Korea. *Food Addit. Contam.* 9: 639-645.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78: 21-37.
- Schaarschmidt, S. and Fahl-Hassek, C. 2018. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17: 556-593.