

*Ustilago maydis*의 Mating 과정에 따른 Virus 유전자의 변이에 관한 연구

강인식 · 이세원*

강원대학교 생명과학부 미생물전공

한국에서 분리한 *U. maydis*에서 바이러스 혹은 dsRNA를 가지고 있는 A series와 SH series를 조합하여 옥수수에서 인위적으로 mating시켜 A45, A23, A211, A310, SH614, SH24의 6개 교배형 균주를 분리하였다. 새로운 교배형 균주에서 바이러스 dsRNA를 비교 분석하여 본 결과, mating전 양친형 균주에서 보이고 있는 H, M, L strand의 dsRNA 양상을 모두 가지고 있고 균주간 특별한 molecular exclusion 현상은 보이지 않았다. 교배형 6개의 균주에서 바이러스를 분리하였다. 분리된 바이러스로부터 dsRNA를 분석한 결과 균주간 mating시 dsRNA 재조합을 통한 새로운 encapsidation은 발생하지 않는다는 것을 확인하였다. Toxin test 결과, SH614는 SH9, SH10, SH11 균주에 대해서, A310과 SH24의 2종은 SH11 균주에 대해 특이적 성장억제 현상을 보였다. 이는 mating에 따른 dsRNA의 재조합이 toxin gene의 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다.

KEY WORDS □ *Ustilago maydis* virus, mating, dsRNA, toxin protein

*Ustilago maydis*는 basidiomycetes에 속하는 균류로써 smut fungi에 속하고 corn smut(neoplastic tumor)를 유발한다. 이러한 질병은 chlorosis, stunting, tumor의 형태로 옥수수의 열매, 줄기, 잎, 그리고 수염에서 주로 발생한다(5). *U. maydis*에서 바이러스의 존재는 각 분리균들의 mating 현상을 연구하는 도중 몇몇 균주간의 성장억제 현상이 관찰되면서 확인되었다(19). *U. maydis*가 세포질내에서 segmented dsRNA를 genome으로 가지고 있고(14, 25) strain간의 성장억제 현상을 나타낸다는 것은 이미 밝혀졌으며(9, 15) 이러한 killing 현상이 세포질내의 cytoplasmic virus의 존재와 관련 있음이 전자현미경적 관찰에 의해서 밝혀졌다(25). *U. maydis* 바이러스의 dsRNA는 크기에 따라 heavy(H) strand, medium(M) strand, light(L) strand로 구분되며 그 크기는 6.2-4.2 Kb(H), 1.4-0.92 Kb(M), 0.34-0.36 Kb(L)이다(4, 8). 이들 dsRNA 중 H strand는 바이러스의 capsid protein과 RNA-polymerase를, M strand는 killer toxin을, L strand는 지금까지 잘 알려져 있지 않지만 아마도 immunity protein을 coding 한다고 추측되고 있다(6, 16, 17, 18). 자연계에 존재하는 *U. maydis* 중 약 5% 정도가 바이러스를 가지고 있으며 이들 중 약 10% 정도가 toxin protein을 분비하고 이러한 종을 killer strain이라고 하며 toxin protein에 대하여 성장억제 현상이 나타나는 균주를 sensitive strain이라고 한다(7). 현재 연구되고 있는 killer strain으로는 P1, P4, P6의 3종으로 이들은 각기 특이한 toxin 단백질을 분비하며 다른 종의 성장을 억제하고 자신은 자신의 toxin 단백질에 대해 저항성이 있음이 밝혀졌다(12).

*U. maydis*가 가지고 있는 바이러스는 다른 곰팡이 바이러스와 마찬가지로 스스로 감염성이 없어 인위적으로 감염시

킬 수가 없다. 그러나 자연환경에서는 두 가지 다른 mating type을 가진 포자가 옥수수에서 mating될 때 일어나는 cytoplasmic fusion에 의하여 감염될 수 있다. 그러므로 각기 다른 두 종류의 바이러스를 가진 포자가 mating하여 smut을 형성할 때 바이러스의 dsRNA가 같은 세포내에서 재조합될 수 있게 된다. 이때 dsRNA간의 선택적 배척현상(molecular exclusion)이 일어나는 것으로 보고되었다(13, 24). *U. maydis*의 dsRNA간의 exclusion 기작에 대해서는 실험실 type killer strain인 P1, P4, P6에 대해서 부분적으로 알려져 있다. 실험실 균주인 P1, P4 그리고 P6 균주를 인위적으로 cell fusion시켰을 때 P1×P4 조합균주는 안정된 형태로 성장하여 P1과 P4의 형질을 나타내는데 비해 P1×P6 조합균주와 P4×P6에서는 P6의 형질만으로 나타나므로 P6 dsRNA가 P1과 P4의 dsRNA를 exclusion시키는 것으로 보고되었다(24). 이전의 연구에 의하면 P1과 P6는 다른 strain에 대해 공동적으로 exclusion 한다고 알려졌으나(14) 현재 알려져 있는 killer strain에서는 P6의 dsRNA가 항상 exclusion되는 unilateral exclusion 현상을 보여주고 있다.

본 실험실에서는 한국에서 분리한 *U. maydis*에서 바이러스 dsRNA의 분포를 조사하고 각 균주에서 분비되는 toxin protein의 특이성을 연구하였다. 현재까지의 결과를 종합하면 대부분의 분리균들은 1-2개의 H dsRNA와 1-2개의 M dsRNA를 가지고 있는 전형적인 P type 균주들로서 이들을 A series(26)와 SH series(10)로 구분하여 이들의 분자생물학적인 특성을 보고하였다. 이들은 전자현미경 관찰에 의해 45 nm의 크기를 가진 전형적인 *U. maydis* 바이러스로 확인되었다(11).

본 실험에서는 한국에서 분리된 A series 균주와 SH series 균주를 서로 조합하여 혼합한 후, 옥수수에서 인위적으로 mating시켜 획득한 새로운 교배형 균주의 dsRNA 유전

*To whom correspondence should be addressed

자 분포와 바이러스의 재조합 유형 여부를 확인하여 strain 간의 molecular exclusion 현상을 관찰하고 toxin 단백질의 민감도를 조사하여 자연상태에서 일어날 수 있는 *U. maydis* viral dsRNA의 재조합 과정을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

U. maydis A series 11개 strain과 SH series 14개 strain을 사용하여 가능한 재조합의 형태로 만들어 옥수수에 감염을 실시하였다. 각각의 *U. maydis* strain의 배양은 *Ustilago maydis* complete(UMC) 배지(23)에 접종하여 25°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 48시간 배양하였다. 바이러스의 분리를 위해 새롭게 획득한 교배형 균주를 5 L fermentor에 접종하여 25°C에서 agitation rate 150 rpm, aeration rate 3 L/min 조건으로 72시간 배양하였다.

식물체 감염

농가에서 분양받은 옥수수 씨앗(sweet corn)을 4°C에서 24시간 저온처리한 후 파종하여 온실에서 재배하였다. 배양된 두 균주에서 각각 500 µl를 취하여 잘 혼합 후 5 ml 주사기에 넣어 10일간 재배한 옥수수의 줄기에 멸균된 23-gauge의 주사기 바늘을 이용하여 인위적인 mating을 실시하였다(22). Mating의 결과로 발생한 neoplastic tumor에서 spore를 무균 상태로 취해 UMC 배지에 접종하여 단일 colony를 획득하였다.

총핵산의 분리

새롭게 획득한 교배형 *U. maydis* 균주에서 총핵산의 분리는 Seroussi의 방법(21)을 사용하였다. 20 ml의 액체 배지에서 25°C, 72시간 진탕배양한 세포를 13,000 rpm에서 20초간 원심 분리하여 수확한 세포를 2×SSC에 잘 현탁한 후, 8분간 끓는물에 방치한 뒤 13,000 rpm에서 20초간 원심분리하여 세포를 수확하였다. 동량의 0.5 mm glass bead와 50 µl phenol/50 µl choroform, 20 µl의 멸균 증류수를 처리하여 1분간 bead beater로 처리한 후 13,000 rpm에서 4분간 원심분리하여 총 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산은 cold ethanol로 침전시킨 후 TE 완충용액으로 현탁하였다. 순수분리를 위해 1 mg/ml 농도의 DNase와 40 mM MgSO₄를 처리하여 37°C에서 20분간 반응시키고 phenol/choroform을 처리한 뒤 cold ethanol로 침전시켰다.

바이러스 분리

20 ml의 액체배지에 25°C에서 48시간 진탕배양한 교배형 균주를 UMC 배지 3 L가 들어있는 fermentor에 접종을 하여 25°C에서 72시간 배양하였다. 배양한 세포를 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수확하였다. 수확된 세포를 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 잘 현탁하였다. Bead-beater에 0.5 mm glass bead를 2/3 채우고 현탁시킨 균주를 넣어 4°C cold chamber에서 25분 동안 균주를 갈아 세포를 완전히 깨뜨렸다. 현탁액을 상온에서 1시간 이상 교반하여 바이러스 입자를 세포 잔존물과 완전히 분리한 후 5,000

rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 모았다. 이 상등액에 0.15 M NaCl과 6% polyethyleneglycol(PEG)를 이용하여 4°C에서 2시간 이상 침전시킨 후, 침전물을 모아 다시 동일한 완충용액에 잘 현탁시키고 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 세포 파쇄물을 침강시키고 바이러스 입자가 들어있는 상등액을 모았다. 바이러스 입자는 40,000 rpm에서 2시간 동안 초고속 원심분리한 후, 상등액은 버리고 침전물을 0.1 M sodium phosphate buffer로 현탁하고 바이러스의 존재 여부 및 농도를 알아보기 위해서 U.V-spectrophotometer로 측정하였다.

바이러스 입자를 더욱 순수분리하기 위해 sucrose density gradient(10-50%)에 적용하고 이를 SW-55 rotor(Beckman, USA)를 이용하여 40,000 rpm에서 2시간 초고속 원심분리하였다. 초고속 원심분리 후 density gradient fractionator(ISCO, Inc., USA)를 이용하여 바이러스 분획을 모았고, 동량의 sodium phosphate buffer를 바이러스 분획과 혼합 후 40,000 rpm에서 2시간 초고속 원심분리하여 바이러스를 침강시켜 분리하였다.

Double-stranded RNA 분리 및 분석

Sucrose density gradient를 통해 순수분리된 바이러스 20 µl를 취해 동량의 phenol과 choroform을 처리하여 30초간 선회교반하였다. 선회교반 뒤 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 dsRNA를 추출하였다. 추출한 dsRNA는 cold ethanol로 침전을 시킨 후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻은 뒤 TE 완충용액(pH 7.0)에 현탁하여 -20°C에 보관하였다.

Total dsRNA 및 바이러스에서 분리한 dsRNA 시료를 5% polyacrylamide gel에 TBE 완충용액(1×: 10.8 g/L Tris base, 5.5 g/L boric acid, 4 ml/L 0.5 M EDTA, pH 8.0)을 사용하여 80 volt로 9시간 전개하였다. DsRNA의 분자량 측정을 위한 size marker로는 1 kb DNA ladder(BioRad Co., USA)를 사용하였다. 전개 후 ethidium-bromide 10 µl와 함께 3차 증류수에 넣고 20분간 염색하고 3차 증류수로 1시간 동안 탈색시켜 dsRNA band를 확인하였다.

Toxin 단백질 준비

액체배지 30 ml에 균을 접종하여 25°C에서 48시간 진탕배양하고 배양액을 멸균된 Sorval SS34 tube에 넣고 8,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 다시 멸균된 tube에 16 ml의 상등액을 넣고 cold acetone 24 ml을 넣어 잘 섞었다(최종 acetone 농도 60%). 혼합된 시료는 4°C에서 24시간 보관 후, 침전이 생기는 것을 확인하고 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물은 1 ml의 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 현탁시킨 뒤 -20°C에 보관하였다.

Filter disk 분석

UMC 배지에 사용할 3개의 균주를 25°C에서 48시간 각기 배양한 뒤 100 µl를 무균상태로 취해 4 ml soft agar(UMC+ 0.7% agar)에 넣고 잘 섞어 한천평판배지에 부어 골고루 퍼지게 하여 soft agar lawn을 만들었다. 각 균주의 준비된

lawn 위에 6개의 재조합 균주의 toxin protein 시료를 적신 filter disk를 얹고 25 °C에서 36시간 배양하여 성장억제 부위의 생성여부를 확인하였다. 이때 UMC 배지에 사용한 균주는 toxin을 분비한다고 알려져 있는 mating 이전의 균주에 대해 모두 성장저해를 일으키는 균주로 결정하였다(10).

결 과

조합형 균주의 분리

옥수수씨를 파종한지 4일 정도 후에 발아가 시작되었고 발아후 1주일 정도가 지나서 mating시킬 두 균주를 섞어 주사기를 이용하여 감염시킬 수 있을 정도의 상태로 성장하였다(Fig. 1A). 감염시킨지 10일 정도가 지나서 neoplastic tumor가 형성되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). Mating이 일어난 균주만이 smut fungi의 전형적인 tumor를 형성하므로 확인된 neoplastic tumor로부터 포자를 분리하여 교배형의 새로운 균주를 순수 분리하였다. 실제로 tumor를 형성한 전체 교배형 균주의 수는 9개였으며 이는 전체 접종 수 300개의 3%에 해당하였다. 이들 중 6개 균주에서 교배형 균주를 순수분리하여 다음과 같이 명명하였다. A4×A5의 교배형 균주를 A45, A2×A3은 A23, A2×A11은 A211, SH6×SH14은 SH614, SH2×SH4은 SH24 그리고 A3×A10은 A310.

Double-stranded RNA 분석

분리한 교배형의 *U. maydis* 균주들이 가지고 있는 dsRNA를 분석하기 위해서 Seroussi의 방법(21)을 이용하였다. 분리한 dsRNA의 분포 양상을 조사하기 위해서 총 핵산을 분리하여 5% PAGE를 시행하였다. 모든 교배형 균주에서 mating 전 양친형 균주에서 확인되는 H, M 그리고 S dsRNA를 모두 포함하고 있으며 특정 dsRNA의 생성이나 소멸은 확인되지 않았다(Fig. 2). 또한 이들 band들은 2×SSC의 존재 하에서 RNaseA나 DNase를 처리하여도 영향을 받지 않는 것으로 보아 *U. maydis* virus의 전형적인 dsRNA임을 확인하였다.

바이러스 분리

두 종류의 바이러스가 한 세포내에서 존재하는 교배형 균주에서 dsRNA들이 mixed encapsidation이 일어나는가를 조사하기 위하여 순수 분리된 6개의 균주에서 sucrose density gradient(10-50%)를 이용하여 바이러스를 순수 분리하였다.

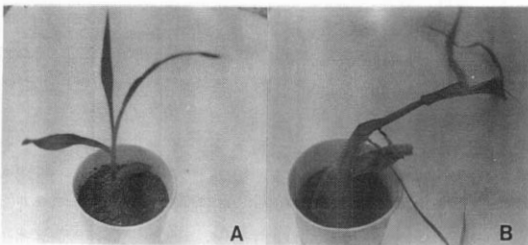


Fig. 1. Healthy corn seedling, 7 days after germination(A) and smut bearing plant, 10 days after infection of *U. maydis*(B).

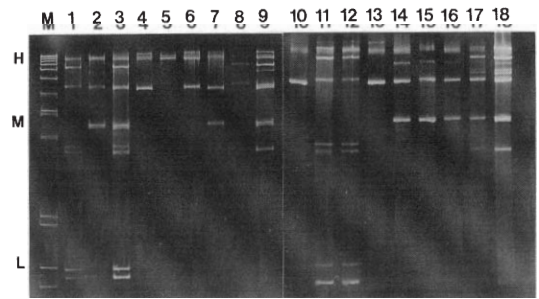


Fig. 2. Double-stranded RNA patterns of *U. maydis* virus from parental strains and progeny strains analyzed on 5% PAGE. M: Molecular weight marker, 1: A4, 2: A5, 3: A45, 4: A2, 5: A11, 6: A211, 7: SH2, 8: SH4, 9: SH24, 10: SH6, 11: SH14, 12: SH614, 13: A2, 14: A3, 15: A23, 16: A3, 17: A10, 18: A310.

이들 6개의 조합형 균주는 모두 sucrose density fractionator에서 전형적인 *U. maydis* 바이러스의 peak가 나타남을 확인하였다(11). Sucrose density gradient에 의해 분리된 바이러스 입자들은 U.V scanning에서 전형적인 바이러스 profile을 보였다.

분리된 바이러스로부터 dsRNA 분석

6개의 교배형 균주에서 순수 분리한 바이러스를 phenol/chloroform으로 처리하여 추출한 dsRNA를 5% PAGE에 의해 분석하여 본 결과 세포에서 분석한 총 dsRNA의 형태와 매우 유사한 전형적인 P-type 분포양상을 보였다.

A45 조합형 균주에서 분리한 바이러스로부터 dsRNA를 분석한 결과 A4 균주에서 보여주고 있는 dsRNA 형태와 동일한 것을 확인하였다. 또한, SH24 조합형 균주에서는 SH4

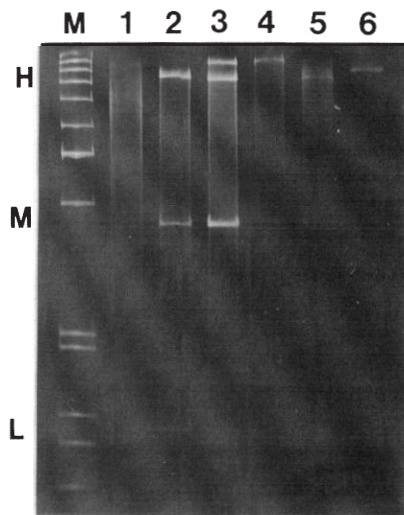


Fig. 3. Double-stranded RNA patterns of progeny strains of *U. maydis* virus particles analyzed on 5% PAGE. 1: A310, 2: A45, 3: SH24, 4: A211, 5: SH614, 6: A23.

Table 1. Toxin sensitivity of three progeny strains and their parental strains on the three sensitive strains. Fiter disk soaked with toxin sample were placed on the lawn of test organism. The presence of clear zone after 2 days of incubation was killer(k) and no sign of growth inhibition was resistant strain(R)

Killer Test strains	A3	A10	A310	SH2	SH4	SH24	SH6	SH14	SH614
SH9	R	R	R	R	R	R	R	(k)	(k)
SH10	R	R	R	R	(k)	(k)	R	(k)	(k)
SH11	R	R	(k)	R	(k)	(k)	R	(k)	(k)

의 dsRNA 형태만이, SH614 조합형 균주에서는 SH14 dsRNA 형태만이 나타나는 것을 확인하였다. A211, A310 조합형 균주에서는 A2×A11 총핵산과 A3×A10 총핵산에서 분석되어진 결과와 동일함을 확인하였다(Fig. 3). 이 결과로 두 종류의 바이러스가 한 세포에서 존재하여도 본래 plasmid-like한 상태로 존재하던 dsRNA는 encapsidation이 일어나지 않는 것으로 확인되었다.

Toxin test

Toxin의 상호작용을 조사한 결과 6종의 조합형 균주 중에 3종의 균주가 toxin을 분비하여 SH9, SH10, SH11 균주에 대해 toxin 활성을 나타내었다. 이중 SH614 조합형 균주는 SH9, SH10, SH11에 대해 모두 활성을 보였고, A310, SH24는 SH11 균주에 대해서만 특이적 활성을 보였다(Table 1).

SH4, SH14, 균주는 toxin 활성이 있는 균주로 재조합 균주인 SH24, SH614와의 toxin 상호관계를 조사한 결과 재조합 균주의 toxin의 활성이 더 크다는 것을 확인하였으며 SH24의 활성은 SH4에서 SH614 균주의 toxin 활성은 SH14에서 유래되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 두 종류의 바이러스가 mating에 의하여 같은 세포내에 존재하여도 toxin gene의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

고 찰

한국에서 분리한 *U. maydis*균 중에서 바이러스 혹은 viral dsRNA를 가지고 있는 11개 strain의 *U. maydis* A series(26)와 14개 strain의 *U. maydis* SH series(10)를 혼합하여 옥수수에 직접 감염시켜 6개의 교배형 균주를 분리하였다. 자연계 내에서의 mating이 일어날 확률은 약 6% 정도로 알려져 있는데(3) 9개의 재조합형 tumor의 형성은 총 300개의 조합 실험 균주의 3%에 해당하는 것으로 이러한 현상은 각 균주간 mating type 유전자가 서로 호환적으로 작용할 경우에만 일어나기 때문이다(1, 2). 이들 중 6개 균주만이 분리되었고, 분리된 균주로부터 *U. maydis* 바이러스의 dsRNA 분포와 바이러스 입자의 존재 여부, toxin의 특이성을 조사하였다.

새롭게 분리된 교배형 균주에서 특이한 바이러스 dsRNA 형태를 알아보기 위해서 총핵산을 분리하여 전기영동을 실시하였다. 그 결과 전형적인 P-type의 dsRNA 형태를 가지고 있음이 확인되었으며 dsRNA의 분포양상은 *U. maydis*의 mating에 의해 생긴 교배형 균주에 있어서 새롭게 형성되기

나 소멸되는 현상은 보이지 않았다. 이 결과로서 *U. maydis* 바이러스의 dsRNA는 *U. maydis*의 mating이 일어나는 현상에서도 변하지 않는 매우 안정성 있는 dsRNA로 추정되며 P-type 균주간의 molecular exclusion 현상과 같은 결과는 나타나지 않음을 확인하였다. 분리된 균주로부터 sucrose density gradient를 이용해 바이러스를 분리하였다. 6개의 균주에서 모두 전형적인 바이러스 fractionation peak를 확인하였으며 U.V scanning profile에서도 전형적인 형태를 보여주었다. 분리된 바이러스의 dsRNA를 PAGE를 이용해 분석해본 결과 A45 균주에서는 A4가 가지고 있는 dsRNA만 나타났고, SH24 균주에서는 SH4 dsRNA만이, SH614 균주에서는 SH14 dsRNA만 나타났다. A45 균주에서 A4 균주, SH24에서는 SH4 균주, SH614에서는 SH14 균주가 encapsidation 되어 있고 반면에 A5, SH2, SH6 균주는 plasmid 상태의 dsRNA만을 포함하는 균주로서 조합형 균주에서의 바이러스 분리 과정속에 encapsidation되어 있는 균주의 dsRNA만이 분리되었다고 생각을 할 수 있다. 그 반면에 두 균주 모두 encapsidation되어 있는 A310, A211에서는 총 핵산에서 보여준 dsRNA 분포양상과 동일한 모습을 보였다. 이것은 아마도 *U. maydis*의 mating이 일어날 때 바이러스간의 dsRNA 재조합을 통한 새로운 encapsidation은 발생하지 않고 조합전 균주에 있는 원래 바이러스의 형태로 존재한다고 하는 것을 시사한다.

Toxin test 결과 SH614 균주는 SH9, SH10, SH11 균주에 대해 toxin을 분비하여 성장을 저해시켰다. A310, SH24 균주는 SH11 균주에 대해서만 성장저해 현상을 보였다(Table 1). 이것은 조합전 toxin 단백질을 분비하는 균주인 SH14, SH4의 특성과 동일한 것이다. A310 균주는 A3와 A10 균주가 toxin 활성이 없는 것으로 알려져 있는데(26) A3×A10 조합형 균주에서는 toxin 활성이 나타났다. 또한, A4 균주는 SH9, SH10, SH11 균주에 대해서 toxin 활성을 띠고 있다고 보고되었는데(10) A4×A5 균주의 toxin 활성 여부에서 어떠한 균주에 대해서도 활성을 보이지 않았다. Toxin 활성을 보이고 있는 3개의 균주는 공히 M strand를 가지고 있었다. 그러나, toxin 활성을 보이지 않는 3개의 균주에서도 M strand가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 결국, 조합형 균주에서도 toxin 활성과 M strand와는 밀접한 관계가 있다고 볼 수 있다. 그러나 toxin 민감도 혹은 활성과 dsRNA의 분포는 절대적인 상관관계를 보이는 것으로 생각되지 않는다. 또한 조합형 균주에 대해서 새롭게 형성되는 toxin 활성 (A3×A10) 및 소멸되는 toxin 활성 (A4×A5) 현상과 SH9, SH10, SH11 균주의 조합형 균주에 대한 민감도 변화는 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

*U. maydis*의 mating에 대한 연구는 현재까지 많이 연구가 되고 있으며 mating gene에 대한 연구도 활발하지만 바이러스를 포함하고 있는 균주들간에 mating의 결과로 생성된 교배형 균주에서 바이러스 유전자의 변이에 대해서는 전혀 연구되어 있지 않다. 본 실험의 결과로 *U. maydis*는 세대를 거듭함에 따라 바이러스나 viral dsRNA를 포함하는 개체의 수가 계속 증가할 것으로 생각된다. 다양하고 많은 형태의 조합형 균주를 분리하여 dsRNA 분포양상을 조사하고, toxin 활성도의 연구 및 조합형 균주에 대한 혈청학적 연구 등

을 통해서 숙주 세포인 *U. maydis*의 mating에 따른 *U. maydis* 바이러스의 특성을 더욱 자세히 연구할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. **Bennett, F. and I. Herskowitz.** 1988. Smut of maize. Genetics of plant pathogenic fungi (G.S. Sidhu, ed.), *Advances in plant pathology*. 6, 427-455. Academic Press, New York.
2. **Bennett, F. and I. Herskowitz.** 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 5878-5882.
3. **Bowman, D.H.** 1946. Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J. Agric. Res.* 72, 233-243.
4. **Bozarth, R.F., Y. Koltin, M.R. Weissman, R.I. Parker and R.F. Dalton.** 1981. The molecular weight and packaging of dsRNA in the mycovirus from *Ustilago maydis* killer strain. *Virology* 113, 492-502.
5. **Christensen, J.J.** 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Monograph No 2. American phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
6. **Dalton, R.E., G.K. Podila, W.H. Flurkey and R.F. Bozarth.** 1985. *In vitro* translation of the major capsid polypeptide from *Ustilago maydis* virus strain P1. *Virus res.* 3, 153-163.
7. **Day, P.R.** 1981. Fungal virus population in corn smut from Connecticut. *Mycologia* 61, 379-384.
8. **Finkler, A., T. Peery, J. Tao, J. Bruenn and Y. Koltin.** 1992. Immunity and resistance to the KP6 toxin of *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 233, 395-403.
9. **Hankin, L. and J.E. Puhalla.** 1971. Nature of a factor causing interstrain lethality in *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 61, 50-53.
10. **Hwang, S.H. and S.W. Yie.** 1993. Genomic variation and toxin specificity of *Ustilago maydis* virus Isolated in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 31, 184-188.
11. **Hwang, S.H., C.H. Jung and S.W. Yie.** 1995. Characteristics of *Ustilago maydis* Virus of SH14 killer strain isolated in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 33, 154-159.
12. **Koltin, Y. and J.S. Kandel.** 1978. Killer phenomenon in *Ustilago maydis* the organization of the virus genome. *Genetics* 88, 267-276.
13. **Koltin, Y.** 1983. Exclusion mechanisms among the *Ustilago maydis* dsRNA virus. p. 495-501. In R.W. Compans and D.H.L. Bishop (ed.). Double stranded RNA viruses. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
14. **Koltin, Y. and P.R. Day.** 1976. Inheritance of killer phenotype and dsRNA in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 594-598.
15. **Koltin, Y. and P.R. Day.** 1975. Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Appl. Microbiol.* 30, 694-696.
16. **Koltin, Y., R. Levine and T. Peery.** 1980. Assignment of functions to segments of the dsRNA genome of the *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 178, 173-178.
17. **Peery, T., Y. Koltin and A. Tamakin.** 1982. Mapping the immunity of the *Ustilago maydis* P1 virus. *Plasmids* 7, 52-58.
18. **Podila, G.K., W.H. Flurkey and R.F. Bozarth.** 1987. Identification and comparison of viral genes coding for capsid proteins of *Ustilago maydis* virus. *J. Gen. Virol.* 68, 2741-2750.
19. **Puhalla, J.E.** 1968. Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics* 60, 461-474.
20. **Puhalla, J.E.** 1970. Genetic studies of the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* 16, 229-232.
21. **Seroussi, E., T. Peery, I. Ginzberg and Y. Koltin.** 1989. Detection of killer-independent dsRNA plasmids in *Ustilago maydis* by a simple and rapid method of extraction of dsRNA.
22. **Snetselaar, K.M.** 1993. Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and Electron Microscopy. *Phytopathol.* 83, 843-849.
23. **Stevens, R.B.** 1974. Genetic studies with *Ustilago maydis*. *Mycology Guidebook*. 506-524.
24. **Wigderson, M. and Y. Koltin.** 1982. Dual toxin specificities and the exclusion relations among the *Ustilago* dsRNA viruses. *Curr. Genet.* 5, 127-136.
25. **Wood, H.A. and R.F. Bozarth.** 1973. Heterokaryon transfer of virus-like particles associated with a cytoplasmically inherited determinant in *Ustilago maydis*. *Phytopathol.* 69, 1019-1021.
26. **Yie, S.W. and H.T. Choi.** 1992. Molecular biological characteristics of *Ustilago maydis* virus isolated in Korea. *Kor. J. Microbiol.* 30, 177-180.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Genomic Variation and Toxin Specificity of *Ustilago maydis* Viruses from Progeny Strains as a Result of Artificial Mating

In Sik Kang and Se Won Yie* (Division of Biological Sciences, Kang Won National University, Chun Cheon 200-701, Korea)

Ustilago maydis strains (A-series and SH-series) containing virus or viral dsRNAs were artificially mated in corn seedling to generate 6 progeny strains, designated A23, A45, A211, A310, SH24 and SH610. The dsRNA patterns of progeny strains were identical to those of the parental strains and there was no molecular exclusion mechanism among dsRNAs of parental strains. Virus particles were purified from 6 progeny strains and viral dsRNAs were analyzed on 5% PAGE. There was no mixed encapsidation between virus or dsRNAs of parental strains. Progeny strain SH614 produced toxin which inhibits the growth of SH9, SH10 and SH11. Likewise, toxins from A310 and SH24 inhibited growth of the SH11 strains. These results indicate that the presence of different types of dsRNA does not interfere the expression of toxin gene.