

***Botrytis cinerea* 균주들이 생산하는 Polygalacturonase, Laccase, β -glucosidase의 균주 간 활성 및 병원성과의 상관관계**

김종진 · 김재원 · 이창원 · 정영훈*
경상대학교 자연과학부 미생물학과, 기초과학연구소

Relationships Between Pathogenicity and Activities of Polygalacturonase, Laccase, and β -Glucosidase Produced by *Botrytis cinerea*

Jong Jin Kim, Jae Won Kim, Chang Won Lee and Young Ryun Chung*
Department of Microbiology & Research Institute of Natural Science,
Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

ABSTRACT: Activities of polygalacturonase, laccase, and intra- and extra-cellular β -glucosidase produced by 20 *Botrytis cinerea* isolates in liquid culture media containing cucumber cell wall as a carbon source were measured and their relationships to the pathogenicity were analyzed. No significant correlations between these enzyme activities and the pathogenicity of *B. cinerea* were found. Mycelial growth rate on Bavendamm media, however, was highly correlated with the pathogenicity ($r=0.522$) among these isolates. Immuno-blot analysis of the culture filtrate using antibody against exo-polygalacturonase revealed that only one band with molecular weight of 66 kDa was detected among 34 tested isolates. It appears that these enzymes may not be primary factors in determining the pathogenicity of *B. cinerea*.

Key words: Gray mold rot, pathogenicity, exo-polygalacturonase, laccase, β -glucosidase

*Botrytis cinerea*는 150여 종의 작물을 기주로 가지는 중요한 식물병원성 진균으로 완전세대는 자낭균류인 *Botryotinia fuckeliana*로 밝혀져 있다(8). 이 병원균에 의한 잣빛곰팡이병은 18~20°C 내외의 서늘하고 다습한 기후에서 가장 잘 발생되며, 특히 온실에서 재배되는 토마토, 딸기 등에 심하게 발병되어 경제적으로 큰 손실을 주고 있다(1, 9, 10). *B. cinerea*가 식물체를 침입하여 병을 유발하는 과정 중에는 몇가지 효소가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있으나 아직까지 이 효소들이 병원성과 직접적인 관련이 있는지 명확하게 밝혀지지 않았다(7). 최근 병원성과 관련이 깊은 것으로 알려진 polygalacturonases(PG)와 laccase의 분리정제 및 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있는데, citrus pectin을 탄소원으로 배양한 균주배양액의 polygalacturonase의 총활성과 각 균주간의 병원성은 직접 관련이 없는 것으로 보고 되었다(3, 4, 11, 19, 22). *B. cinerea*를 pectin을 탄소원으로 하여 액체 배양

하면 10여 종의 polygalacturonase가 생성되며, 이들 효소들의 분해작용에 따라 exo- 및 endo-polygalacturonase로 나누어 진다(12, 14, 20, 21). 따라서, polygalacturonase의 총 활성보다는 각 동위효소와 병원성과의 연관성을 규명 할 필요가 있다.

발병과 관련되어 있는 것으로 추측되는 또 다른 효소인 laccase는 polyphenol oxidase 종류로서 세포벽 구성성분인 lignin을 분해시킬 수 있는데, 이 효소는 *B. cinerea*가 기주침입시 기주가 생성한 antifungal 물질인 cucurbitacin에 의해 그 생성이 억제되는 것으로 알려져 있다(15, 16, 25, 26). 이 외에 Sasaki 등(18)은 병원성이 다른 11개 *B. cinerea* 균주의 병원성 정도와 β -glucosidase(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21) 활성 간의 상관관계를 조사 하였는데, 균사세포 내(intracellular)의 β -glucosidase 활성과 병원성은 직접적인 상관관계가 있었으나 균사세포 외(extracellular)의 β -glucosidase활성은 병원성과 상관관계가 없다고 보고하였다. 뿐만아니라 최근 active oxygen species가 *B. cinerea* 균주들의 병원성과 연관성이 있을 것으로

*Corresponding author.

제시되었다(7, 23). 현재 병원균의 침입 및 감염에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 효소에 관한 연구가 여러 곳에서 활발히 진행되고는 있으나 실험 결과가 서로 상반되는 경우가 많아 병원성과 관련된 직접적인 인자 규명에 어려움이 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 여러 균주들을 대상으로 병원성과 관련이 있는 효소로 알려진 polygalacturonase, laccase 및 β -glucosidase의 활성을 측정하고, 기주 식물의 하나인 오이에서 추출한 세포벽을 탄소원으로 사용하였을 경우 효소 활성과 병원성과의 관련성을 밝히고자 하였다. 특히 66 kDa exo-polygalacturonase의 항체를 이용하여 병원성과 이 효소 생산과의 관계도 추적하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 병원성 조사. 본 실험실에서 지난 3년간 확보한 기주, 분리 연도가 다른 *B. cinerea* 균주를 이용하였으며, 균주에 대한 구체적인 내용은 이미 보고된 바 있다(5). 병원성 검정은 감자포도당하천 배지(PDA)에서 3일간 배양한 *B. cinerea* BC5 균주의 균사 disc를 식물 생육상 내의 소형 pot(직경 5 cm)에서 재배한 2엽기의 오이유묘에 접종한 뒤, 습실상에서 20°C로 3일간 발병시킨 후 피사부위의 직경을 측정하여 조사하였다. 발병을 촉진시키기 위하여 병균점종 5일전에 1.5% 요소액 5 ml씩을 pot에 시비하였고 실험은 3반복으로 실시하였다.

기주식물 세포벽 분리 및 조제. *B. cinerea*의 기주식물인 오이, 토마토 잎과 딸기 과일 일정량을 흐르는 수도물에 씻어내고 칼로 작은 조각으로 만든 후 Waring blender로 마쇄하였으며, 마쇄한 조직에 첫 부피의 3배가 되는 acetone을 첨가하여 5분 동안 침지시켰다. 색소를 뺀 후 다시 nylon 천으로 거르고 남은 고형물에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 10배 양(v/w) 첨가하여 acetone을 깨끗히 씻어내었다. 다시 고형물에 chloroform과 methanol을 1:1(v/v)로 섞은 용액을 처리한 다음 acetone으로 씻었고, 60°C에서 24시간 건조시킨 후 막자사발로 뺀 식물 세포벽 분말을 탄소원으로 배지에 첨가하여 실험에 사용하였다(6).

Polygalacturonase 활성 및 pattern 조사. 효소 생산용 종균배양은 PDA 배지를 이용하여 20°C에서 3일간 배양 후 사용하였다. 효소 생산을 위한 배지는 탄소원으로 0.5%(w/v) 기주식물의 세포벽 및 1% NaNO₃, 0.5% KH₂PO₄, 0.25% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1%

CaCl₂, 0.05% yeast extract를 첨가하여 조제하였으며, 250 ml Erlenmeyer flask에 100 ml씩 넣어 멸균하고 직경 5 mm 균사 절편 10개를 접종하여 20°C에서 10일간 135 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양된 액을 두겹의 cheese cloth로 걸러 균사를 제거한 후 배양여액의 효소활성 측정에 이용하였다.

효소 활성을 측정하기 위한 반응 혼합액으로 2 mM EDTA, 100 mM sodium acetate(NaOAc) buffer(pH 5.0)와 기질로서 0.5%(w/v) sodium polygalacturonic acid를 사용하였다. 반응은 반응혼합액 1 ml를 40°C에서 미리 10분간 방치한 후 앞에서 만든 조효소액을 가하고 20분간 반응시켰다. 이 반응액에 DNS 용액(7.5 g 3, 5-dinitrosalicylic acid, 14 g NaOH, 216.1 g sodium potassium ttrate, 5.9 g Na₂S₂O₅, 5.4 ml phenol/L) 3 ml을 가하고 끓는 물에서 10분간 처리 한 다음 상온에서 식혔다. 이를 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소반응의 생성물은 D-galacturonic acid(50, 100, 150, 200, 250, 300 µg)를 표준물질로 하여 얻은 곡선으로 결정하였고, 모든 단백질량은 Bradford 방법(2)에 따라 수행하였으며, 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. 효소 unit의 정의는 위 반응 조건에서 1분 동안 1 µg의 galacturonic acid를 생성하는 효소량을 1 unit(U)로 하였다.

각 균주별로 형성된 polygalacturonase 동위효소의 pattern을 비교하기 위하여 immuno-blot 분석방법을 이용하였는데, 항체는 경상대학교 미생물생화학 실험실에서 조제한 것을 사용하였다(12). *B. cinerea* 균주들을 배양하여 얻은 배양액을 동결건조하여 농축하였으며, 농축된 각 효소원을 투석하고 SDS-PAGE로 전개한 다음 면역혈청 blotting을 실시하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 전개한 후 nitrocellulose paper(Schleicher and Schuell)에 electrotransfer하였다. Nitrocellulose paper를 5%(w/v)의 skim milk 용액에 담근 15분간 blocking한 후, 혈청을 TTBS[50 mM Tris(pH 7.5), 0.05%(v/v) Tween 20]에 10,000배 희석하여 12시간 동안 처리하였다. 이를 TTBS로 10분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase가 달린 goat anti-rabbit IgG(KPI)를 5,000배 희석하여 2시간 동안 처리 후 다시 TTBS로 10분간 3회 세척한 후 BCIP(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)와 NBT(Nitroblue tetrazolium)를 alkaline phosphatase buffer[0.1 M Tris-HCl(pH 9.5), 0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂]에 녹여 처리 후 발색시켰다.

Laccase 활성 조사. Bavendamm agar plate(0.5% tannic acid, 1.5% malt extract, 2% Bacto agar)에 PDA

에서 배양된 직경 5 mm 균사절편을 접종하여 암실상태로 20°C에서 3일 동안 배양한 다음 균사를 긁어서 제거하고, 균총생장 부분이 갈색으로 변한 부위의 가장자리를 칼로 잘라 작은 조각(2×5×5 mm³)으로 만들었다. 이 작은 조각 5 g을 멸균중류수 5.3 ml에 넣어 4°C에서 30분간 방치한 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 이 상등액을 효소활성 측정을 위한 조효소 액으로 사용하였다(17).

Laccase 활성을 측정하기 위한 기질로는 2.5 mM 2, 6-dimethoxyphenol을 80 mM sodium tartrate buffer (pH 3.0)에 녹여서 사용하였고, 반응은 상온에서 실시하였다. 반응액은 위에서 분리한 상등액 200 μl와 기질용액 800 μl을 섞어서 만들었으며 효소활성은 468 nm에서 1분 동안 증가하는 흡광도로 결정하였다.

β-Glucosidase의 효소 활성 조사. 효소생산을 위하여 1% peptone, 1% yeast extract, 1% avicel, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O를 혼합하여 pH 4.5로 조절한 배양액 100 ml에 직경 5 mm 균사 disc 10개를 접종하여 20°C에서 4일간 160 rpm으로 진탕배양하였다. 배양된 액을 두점의 cheese cloth로 걸러 균사를 제거한 후 남은 배양여액을 세포의 효소활성 측정에 이용하였다. 세포내 효소활성은 cheese cloth로 거른 세포를 3차 중류수로 충분히 씻은 후 0.1 M acetate buffer(pH 5.0) 소량과 sea sand를 적당량 넣고 막자사발로 마쇄한 후, 마쇄된 균사체를 12,000 rpm으로 30분간 0°C에서 원심분리하여 얻어진 상등액에서의 활성을 측정하여 결정하였다(18).

β-glucosidase 활성을 측정하기 위한 기질로는 0.25 M β-phenyl-D-glucoside를 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)에 녹여 사용하였다. 앞에서 만든 배양 조효소액 250 μl과 기질용액 250 μl를 30°C에서 30분간 반응시킨 후 copper reagent(28 g Na₂HPO₄, 24 g rochell salt, 1 N NaOH 100 ml, 10% CuSO₄ 80 ml, 180 g Na₂SO₄/L) 500 μl를 첨가하여 반응을 정지 시키고, 다시 100°C에서 10분간 끓여서 상온으로 식힌 후 arsenomolybdate solution[arsenomolybdate reagent(50 g ammonium molybdate, 원액 H₂SO₄ 42 ml, 6 g Na₂HAsO₄·H₂O/L): H₂SO₄ = 1 : 2] 500 μl를 첨가하였다(21). 색깔에 따라 멸균수로 적당량 희석하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 반응의 생성물은 D-glucose를 표준물질로 하여 얻은 곡선으로 결정하였으며, unit은 위의 반응조건에서 1분동안 1 μmol의 glucose를 생성하는 효소량으로 정의하였다. 단백질량은 Bradford 방법(2)에 따라 행하였고 이때 표준 단백질은 BSA를 사용하였다.

통계분석. 얻어진 자료의 통계분석은 경상대학교 통계분석센터의 Minitab 분석프로그램을 이용하였다.

결 과

균주의 병원성. 국내에서 확보된 20개 균주의 병원성을 오이 유포에서 검정한 결과 병원성이 아주 약한 균주와 괴저병반 지름이 최대 4.75 cm인 균주 등 다양한 병원성을 나타내었는데, 그 중에서 KC6, JM 43, T91-1 등은 병반지름이 4.3 cm 이상으로 병원성이 강하였고 FC122, NS1 균주는 병원성이 매우 약하였다(Table 1).

Polygalacturonase의 균주별 및 탄소원별 활성.

오이 세포벽을 유일한 탄소원으로 첨가하여 배양한 20개 균주의 배양여액에서의 PG 활성은 JM4 균주에서 효소의 specific activity가 14.86 unit로 가장 낮았고 BT300에서는 124.37 unit로 가장 높았다. 30 unit 이하인 균주가 3개, 30~50 unit인 균주가 14개, 50 unit 이상인 균주가 3개 이었다(Table 1). 오이, 토마토, 딸기에서 분리된 병원성이 강한 균주와 약한 균주를 3개씩 선별하여 탄소원으로 오이, 토마토, 딸기의 세포벽을 첨가, 배양한 후 배양여액의 polygalacturonase의 활성을 측정하였다. 선별된 6균주 중 병원성이 강한 KC6, JM43, CS107 균주와 약한 FC122, BC5, NS1 균주간에는 탄소원으로 첨가된 각 기주의 세포벽 종류에 따른 PG의 활성과 병원성 간에는 유의성 있는 차이가 없었다(Table 2). 그러나, KC6, FC122 균주와 JM43, BC5 균주들의 경우 오이세포벽을 탄소원으로 첨가 하였을 때 병원성이 높은 균주가 더 강한 polygalacturonase 활성을 보였으나 CS107, NS1 균주의 경우는 이러한 경향이 없었으며, 다른 기주세포벽을 첨가하였을 때 뚜렷한 경향을 발견할 수 없었다.

균주별 laccase 활성. 각 균주별로 병원성이 다른 균주들의 laccase의 활성을 측정한 결과 측정 균주 중 BY33 균주가 0.253으로 가장 높았고 BT300 균주는 0.008로 가장 낮았다(Table 1). 균주들 중 활성이 0.1 이하인 것이 10개, 0.1~0.2인 균주가 8개, 0.2 이상인 균주는 2개 이었다.

균주별 β-glucosidase 활성. 각 균주의 β-glucosidase의 활성을 측정한 결과 extra-cellular 효소의 경우 FC122 균주는 활성이 없었고 KT433 균주는 0.03으로 가장 높았다. Intracellular 효소의 경우 역시 FC122 균주가 0.09로 가장 낮았으며 JT104 균주는 0.325로 가장 높았다(Table 1).

병원성과 효소활성 간의 상관관계. 오이와 토마

Table 1. Pathogenicity and mycelial growth related with polygalacturonase, laccase and β -glucosidase activity of *Botrytis cinerea*

Isolates	Pathogenicity ^a (Lesion diameter, cm)	Mycelial growth ^b (cm)	Polygalacturonase activity ^c (U/mg prot.)	Laccase activity (Δ A486/min)	β -Glucosidase activity (U/mg prot.)	
					extra	intra
KC6	4.73	4.4	35.99	0.043	0.021	0.131
S1	3.48	2.9	49.00	0.067	0.002	0.232
BY6	3.25	4.5	45.84	0.104	0.014	0.211
BY2	3.10	4.0	46.39	0.067	0.015	0.067
BY33	2.83	4.5	43.25	0.253	0.019	0.146
BY3	2.40	4.5	31.86	0.069	0.016	0.090
FC122	0.25	1.8	46.80	0.006	0.000	0.033
JM43	4.68	4.0	49.34	0.143	0.010	0.062
T91-1	4.30	4.2	33.37	0.205	0.019	0.073
BT300	4.18	4.4	124.37	0.008	0.024	0.194
JM1	4.05	3.1	57.63	0.075	0.014	0.194
IT106	3.85	4.0	36.08	0.125	0.013	0.166
JT101	3.70	4.4	33.39	0.120	0.025	0.092
JM3	3.65	3.9	39.56	0.129	0.016	0.288
JM4	3.58	4.7	14.86	0.172	0.010	0.122
JM2	3.48	3.0	51.91	0.086	0.021	0.125
JT104	3.30	4.5	28.79	0.101	0.018	0.325
KT433	2.85	4.6	20.51	0.121	0.030	0.120
JM42	2.23	2.4	38.41	0.025	0.025	0.153
BC5	1.70	3.5	30.17	0.022	0.009	0.082

^a Diameter of necrotic lesions of cucumber leaves inoculated with agar discs (ϕ = 5 mm) of the pathogen was measured 3 days after inoculation at 20 C.

^b Mycelial growth on Bavendamm media for 5 days after inoculation.

^c Polygalacturonase activity was determined 10 days after inoculation of *Botrytis cinerea* isolates in minimal media containing cucumber cell wall (5 g/L) as a carbon source.

토에서 분리된 20개 균주의 오이유묘에 대한 병원성과 polygalacturonase, laccase, β -glucosidase 활성 간에 상관관계를 Table 1 결과를 이용하여 분석하였는데 결과는 Table 3과 같다. 측정된 효소활성과 병원성 사이에는 상관계수가 모두 0.5 이하로 유의성이 없었으나, 특이하게도 laccase 활성을 측정하는 과정에서 사용된 Bavendamm 배지에서의 병원균 균사생장 정도는 $r = 0.522$ 로 높은 정의 상관관계($p = 0.05$)가 성립하였다.

Polygalacturonase의 균주별 pattern. 34개 균주의 exo-PG 동위효소 pattern을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 균주 간 뚜렷한 차이는 없었고, 다만 66 kDa 정도 크기의 1 band만 검출되었다.

고 찰

여러 기주에서 분리된 *B. cinerea*의 병원성이 균주별로 다양하였으며, citrus pectin 대신 기주식물 중의

하나인 오이세포벽을 탄소원으로 첨가하더라도 polygalacturonase 활성이 분리기주와는 상관없이 균주별로 다양하였다. 이 결과는 최 등(5)의 보고와 같았으며 잣빛곰팡이 병원균의 다범성과 부생성을 간접적으로 뒷받침 한다고 볼 수 있다(7). 균주별로 분리 기주의 세포벽을 첨가하여 polygalacturonase 생성 정도와 병원성과의 관련성을 알고자 하였는데, 기주 세포벽 또는 병원성의 강약과 관계없이 polygalacturonase 활성에 있어서 뚜렷한 경향을 찾을 수 없었다. 이러한 결과는 이 효소의 활성이 병원성 발현에 주 역할을 하지 못하거나 또는 병원성 요인으로 여러 factor가 복합적으로 관여하기 때문으로 생각된다(7, 13). 또한 균주별 exo-polygalacturonase 동위효소의 pattern을 면역형질 blotting 방법으로 비교한 결과, 역시 병원성 강약과 관계 없이 모든 균주에서 거의 유사한 양상을 보였다.

균주 별 laccase 활성도 분리기주, 병원성과 관련없이 다양하였다. *B. cinerea*가 생산하는 laccase는 기주식물에서 생산되는 cucurbitacin에 의해 형성이 억제되

Table 2. Effect of carbon sources on the production of polygalacturonase by *Botrytis cinerea* isolates in minimal media

Isolate	Host	Pathogenicity ^a (lesion diameter, cm)	Carbon source ^b (host cell wall)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
KC6	cucumber	4.73	T	152.25	6.63	22.96
			S	71.19	5.86	12.15
			C	111.33	2.12	52.51
FC122	cucumber	0.25	T	147.67	7.08	20.86
			S	63.60	3.77	16.87
			C	74.09	3.58	20.70
JM43	tomato	4.68	T	175.34	7.24	24.22
			S	87.17	6.43	13.57
			C	164.94	2.35	70.19
BC5	tomato	1.70	T	172.39	4.28	40.28
			S	94.37	4.22	22.36
			C	49.83	2.10	23.73
CS107	strawberry	4.18	T	164.47	6.44	25.54
			S	130.96	4.43	29.56
			C	51.40	1.38	37.24
NS1	strawberry	0.77	T	147.36	4.87	30.57
			S	86.35	4.99	17.30
			C	103.00	2.78	37.05

^a Diameter of necrotic lesions of cucumber leaves inoculated with agar discs ($\phi = 5$ mm) of the pathogen was measured 3 days after inoculation at 20 C.

^b 0.5 gram (d.w) of host cell wall preparation was added to 100 ml minimal media. T; tomato, S; strawberry, C; cucumber.

는 것으로 알려져 있으나 균주별로 이 효소활성 정도와 병원성 간의 관계에 대해서는 아직 보고된 바가 없다(16, 25, 26). 이 효소는 잭빛곰팡이 병원균이 기주 침입 후 어느 정도 생장이 시작된 후에 생성될 것으로 추정되었으므로 역시 1차적 요인은 아닐 것으로 생각된다(21). 그러나, laccase 활성 측정 과정 중 배지에서

Table 3. Correlation between pathogenicity and several enzyme activities and mycelial growth rate of 20 *Botrytis cinerea* isolates

Enzyme activity	Correlation coefficient	Significance
Polygalacturonase	0.206	ns
Laccase	0.361	ns
β -Glucosidase		
extra-	0.307	ns
intra-	0.275	ns
Mycelial growth ^a	0.522	s(p = 0.05)

^a Mycelial growth on Bavendammm media for 5 days at 20 °C.

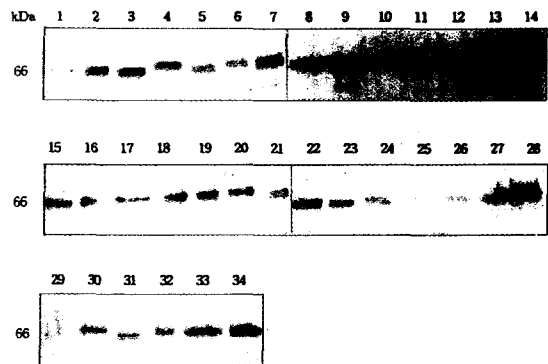


Fig. 1. Immuno-blot analysis pattern of exo-polygalacturonase produced by 33 *Botrytis cinerea* isolates and 1 *Botrytis squamosa* isolate using polyclonal antibody (PGIV). *B. cinerea* isolates (start from lane 1 to 33): KC 6, S1, BY2, BY3, FC122, JM43, T91-1, BT300, IT106, JM3, JM4, JM2, JT101, JT104, JM42, BC5, CS 107, DS522, GJ4-3, DJ49, GJ5-2, SC34, NS111, SC171, NS53, DS473, NS1, NH32, PT33, CA36, SW31, KCTC 1937. *B. squamosa* isolate: CN25 (34).

자라는 균사의 생장정도가 병원성과 높은 상관관계가 있는 것으로 밝혀진 것은 이 효소의 병진전 과정에서 중요한 역할을 시사한다고 생각된다.

균주 별로 intra-, extra- cellular β -glucosidase의 활성을 조사한 결과 기주 및 병원성 정도와 상관없이 다양하였는데, 이는 Sasaki 등이 *B. cinerea*의 intra-cellular β -glucosidase의 활성이 병원성과 직접적인 상관이 있다고 보고한 결과와는 일치하지 않았다(18). 이 저자들은 실험 중 배지에 탄소원으로 avicel을 첨가하여 이 효소활성을 측정하였으나, 본 실험에서는 오이세포벽을 탄소원으로 이용하였다. 균주 숫자와 다양성 면에서도 본 실험에서는 여러 기주에서 분리한 20개 균주를 사용하였으므로 intra-cellular β -glucosidase의 활성과 병원성과의 직접 관련성 여부는 재고해야 될 것으로 생각된다.

균주 별로 측정된 4가지 효소 활성과 병원성과의 상관관계에 있어 모두 유의성이 없었던 것은 이러한 효소들이 병원균의 발병과정에서 1차적인 역할을 하지 못하거나 또는 다른 어떤 요인이 이 병원균의 병원성 결정 요인으로 작용하는 것이 아닌가 생각된다. Bavendamm 배지에서의 균사생장 정도가 병원성과 높은 상관관계가 있었는데 이것은 균사생장에 필수적인 다른 효소가 병원성 요인으로서의 관여 가능성을 시사한다고 볼 수 있다. Edlich 등(7)도 protease, pectolytic의 다른 세포벽 분해효소와 병원성간에 직접적인 관련성이 없다고 보고하였으며, glucose 또는 xylose oxidase가 작용하여 active oxygen을 생성, 세포막을 파괴하므로써 발병의 1차적 역할을 할 것이라 제안하였다. 그러므로, 여러 균주들의 glucose 또는 xylose oxidase를 비교하므로써 병원성 결정 요인을 규명 할 수 있지 않을까 생각된다.

본 연구 결과로 볼때 현재 잭빛곰팡이병 발병에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 몇가지 효소들은 발병초기에는 직접 발병에 관여될 것으로 생각지 않으며 일단 다른 효소작용에 의해 발병이 시작되면 그때부터 병진전에 중요 역할을 할 것으로 추정된다.

요 약

기주, 분리 연도 및 장소가 다른 *Botrytis cinerea* 20개 균주를 이용하여 오이세포벽을 탄소원으로 첨가한 배지에서 배양한 뒤 병원성과 관련이 있는 것으로 알려진 polygalacturonase, laccase, β -glucosidase의 활성을 측정하고 병원성과의 상관관계를 조사하였다. 조사된 효소들의 활성과 병원성과의 상관관계는 상

관계수가 모두 0.5 이하로 직접적인 연관성을 인정할 수 없었다. 그러나, Bavendamm 배지에서의 균사생장 정도와 병원성은 $r=0.522(p=0.05)$ 로 정의 상관관계를 보였다. 또한 병원성이 강한 3균주와 약한 3균주를 선발하여 각 기주의 세포벽을 첨가하여 배양 후 polygalacturonase 활성정도를 비교하였으나 뚜렷한 경향을 찾을 수 없었다. Exo-PG 항체를 이용한 면역혈청 blotting 결과 병원성이 다른 거의 모든 균주가 66 kDa 크기의 1 band를 보이는 유사한 효소 pattern을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 측정된 이들 효소는 병원성과 관련된 일차적 요인이 아닐 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1996년도 교육부에서 시행한 기초과학연구구조 학술연구조성비(과제번호 BSRI-96-4405) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Agrios, G. N. 1987. *Plant Pathology* (3rd ed.). Academic Press, Inc., New York, 803 pp.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Buttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch S., Blaich, R., Bruckner, B. and Tudzynski, P. 1994. Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implication for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* 25: 445-450.
4. 최인실. 1995. Random amplified polymorphic DNA assay를 이용한 잭빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 유전적 변이 분석. 경상대학교 대학원 석사학위 논문. 49pp.
5. 최인실, 정영륜, 조광연. 1995. 잭빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea* 균주의 분리기주별 표현형적 특성, 병원성 및 약제저항성 변이. *한국균학회지* 23: 246-256.
6. Cooper, R. M., Wardman, P. A. and Skelton, J. E. M. 1981. The influence of cell wall from host and non-host plants on the production and activity of polygalacturonide-degrading enzymes from fungal pathogens. *Plant Pathol.* 18: 239-255.
7. Edlich, W., Lonrenz, G., Lyr, H., Nega, E. and Pommer, E. H. 1989. New aspects on the infection mechanism of *Botrytis cinerea* Pers. *Neth. J. Pl. Pathol.* 95 (suppl. 1): 53-62.
8. Faretra, F. and Antonacci, E. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fukeliana* (de Bary) Whetz,

- under controlled environmental conditions. *Phytopath. Medit.* 26: 29-35.
9. Fourie, J. F. and Holz, G. 1987. Infection and decay of stone fruit by *Botrytis cinerea* and *Monilinia laxa* at different stages after anthesis. *Phytophylactica* 19: 45-46.
 10. Fourie, J. F., and Holz, G. 1994. Infection of plum and nectarine flowers by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol.* 43: 309-315.
 11. 나유진, 김재원, 정영륜, 허남응, 조광연. 1994. 잣빛 곰팡이 병균 *Botrytis cinerea*가 분비하는 polygalacturonase의 부분정제와 특성. 한국식물병리학회지 10: 215-221.
 12. 이태호. 1995. 식물 병원진균 *Botrytis cinerea*가 생산하는 polygalacturonase의 순수 분리 및 특성. 경상대학교 대학원 석사학위논문. 43pp.
 13. Leone, G. 1992. Significance of polygalacturonase production by *Botrytis cinerea* in pathogenesis. In: *Recent advances in Botrytis research* (Verhoeff, K., Malathrakis, N. E. and Williamson, B., eds), pp. 63-68. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen.
 14. Mankarios, A. T. and Friend, J. 1980. Polysaccharide-degrading enzymes of *Botrytis alli* and *Sclerotium cepivorum*. Enzyme production in culture and the effect of the enzymes on isolated onion cell walls. *Plant Pathology* 17: 93-104.
 15. Marbath, I., Harel, E. and Mayer, A. M. 1983. Inducer and culture medium dependent properties of extracellular laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 22: 1535-1538.
 16. Nurit, B. N. and Mayer, A. M. 1989. Cucurbitacins-repressors of induction of laccase formation. *Phytochemistry* 28: 1369-1371.
 17. Rigling, D., Heiniger, U., and Hohl, H. R. 1989. Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology* 79: 219-223.
 18. Sasaki, I. and Nagayama, H. 1994. β -Glucosidase from *Botrytis cinerea*: Its relation to the pathogenicity of this fungus. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 616-620.
 19. Salinas, J. and Schots, A. 1994. Monoclonal antibodies-based immunofluorescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flowers. *Phytopathology* 84: 351-356.
 20. Sharrock, K. R. and Labavitch, J. M. 1994. Polygalacturonase inhibitors of Baetlett pear fruits: differential effects on *Botrytis cinerea* polygalacturonase isozymes, and influence on products of fungal hydrolysis of pear cell walls and on ethylene induction in cell culture. *Plant Pathol.* 45: 305-319.
 21. Staples, R. C. and Mayer, A. M. 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Letters* 134: 1-7.
 22. Sung, J. M. and Chiu, C. C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Sci.* 110: 45-52.
 23. Tiedemann, A. V. and Laurence, J. A. 1996. Active oxygen species as pathogenicity factors of *Botrytis cinerea* in relation to the role of cell-wall degrading enzymes and oxalic acid. L6-2. The proceeding in the 11th International Botrytis Workshop (abstr.).
 24. Viterbo, A., Yagen B., and Mater, A. M. 1993. Cucurbitacin 'attack' enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 32: 61-65.
 25. Viterbo, A., Staples, R. C., Yagen, B., and Mayer, A. M. 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 35: 1137-1142.
 26. Yao, C., Conway, W. S., and Sams, C. E. 1995. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathology* 85: 1373-1377.

(Received June 18, 1997)