

프로테옴 분석기술을 이용한 잿빛곰팡이  
병원균의 발아 특이 단백질 규명 및 발아  
억제제 개발

국립경상대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “프로티움 분석기술을 이용한 잣빛곰팡이 병원균의 발아 특이 단백질 규명 및 발아 억제제 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 26 일

주관연구기관명 : 경상대학교  
총괄연구책임자 : 김 재 원  
연 구 원 : 이 창 원

# 요 약 문

## I. 제 목

프로티움 분석기술을 이용한 잣빛곰팡이 병원균의 발아 특이 단백질 규명 및 발아억제제 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

잣빛 곰팡이 병원균은 광범위한 경제성 작물에 피해를 입혀 막대한 경제적 손실을 입히는 중요 식물병원균이다. 이 병원균의 연구는 여러 선진 농업국가에서 많이 진행되고 있으나 균의 다양성 및 연구방법의 한계로 방제 및 퇴치에 관한 연구 성과가 저조한 실정이다. 이 병원균의 방제를 위해서 병원균의 생리적 특성에 대한 심도있는 연구가 병행되어야 함에도 불구하고 이 분야의 연구는 활발하지 않으며, 분자생물학적 기술의 도입도 기술적 한계로 저조한 실정이다. 따라서 이 병원균의 생리적 특성 연구는 새로운 방향에서 시도되는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 프로테오믹 분석 기술을 이용하여 잣빛 곰팡이 병원균의 발현 단백질 중 포자 발아시에 특이적인 단백질을 규명하여 이를 토대로 발아 억제제를 개발하는 데 밑거름이 되고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 이차원 전기영동 기술을 이용한 protein display 기술로 포자 단백질 및 균사 단백질을 분리하고 포자 발아 시에 특이적으로 발현양이 변하는 단백질의 목록을 작성하고자 하였다. 단백질을 이차원 전기영동으로 분리하였으며, 이미지 분석을 통하여 포자가 발아하는 동안 변화하는 단백질을 추적하였다. 단백질 발현양의 변화를 통계적 방법으로 처리하여 유의성 있게 변화하는 단백질의 목록을 구축하고, 대표적인 단백질을 동정하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

*Botrytis cinerea* 포자 발아 특이 단백질 21종을 선별하였다. 선별된 단백질을 Q-TOF를 이용하여 아미노산 서열을 결정하여 동정을 시도하여 6종류의 단백질을 동정하였다. 선별된 21개의 단백질 외에도 14개의 단백질의 동정을 시도하여 12종류의 단백질을 동정하였다. 도출된 단백질의 생리적 의미는 분자생물학적 방법으로 검증하여야 할 것이며, 또한 아직 학문적으로 밝혀지지 않은 포자의 메커니즘을 밝히는 중요 단서가 될 것이다.

## SUMMARY

(영문요약문)

*Botrytis cinerea* is a well-known plant pathogenic fungus causing gray mold disease in important crops. Effective protection of the disease could be achieved by the inhibition of conidia formation and germination. Proteins, which are involved in germination, would be the candidates for the development of method to control the disease. To study the expression of proteins during spore germination, proteome analysis of conidia of *B. cinerea* was performed. Protein patterns of germination conidia were determined up to eight hours of incubation by two-dimensional electrophoresis. By silver nitrate staining approximately 2000 spots were visualized. Image analysis showed twenty three proteins were differentially expressed during germination. Of those protein spots, it was confirmed ten protein spots were up-regulated and five protein spots were down regulated by statistical analysis. The proteins expressed differentially during germination were identified comparing. Peptide sequence obtained by Q-TOF mass with databases including FASTA programe and NCBI BLAST online search service.

# CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. State of Art

Chapter 3. Specific Aims and Results

Chapter 4. Achievements and Contribution

Chapter 5. Further Research Plan

Chapter 6. Research Information Obtained from Abroad

Chapter 7. References

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
1절.	연구개발의 필요성 .....	7
2절.	연구개발의 목적 .....	8
3절.	연구개발의 범위 .....	9
제 2 장	국내외 관련기술의 현황	
1절.	국외의 연구개발 동향 .....	10
2절.	국내의 연구 동향 .....	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
1절.	실험 방법 .....	13
2절.	연구 내용 및 결과 .....	17
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	
1절.	연구개발 목표의 달성도 .....	34
2절.	관련분야의 기술 발전의 기여도 .....	38
제 5 장	연구 개발 결과의 활용계획	
1절.	추가 연구의 필요성 .....	39
제 6 장	연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	41
제 7 장	참고문헌 .....	43

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1절 연구개발의 필요성

*Botrytis cinerea*는 과일, 화훼, 콩과식물 등 200종 이상의 작물에 잿빛 곰팡이병을 일으키는 병원성 진균으로 작물이 생육할 때 뿐 아니라 수확한 뒤 장기간 저장하거나 운송과정에서도 병을 일으켜 경제적으로 많은 손실을 가져온다(1,2). 이 곰팡이는 균사, 분생포자와 균핵의 형태로 병든 식물체와 토양에서 월동하며, 온도가 20℃ 정도이고 습도가 높아지면 균핵이 발아하여 분생포자를 형성해 공기 전염된다. 무성포자들은 발아한 후 appressorium과 같은 침입기관을 형성하기도 하지만 주로 균사가 식물체의 약한 부분을 뚫고 들어가 잿빛곰팡이 병을 일으킨다. 이 균의 방제는 화학적 살균제인 benzimidazol, dicarboximides, anilinopyrimidines, phenylpyrroles과 같은 화학적 살균제에 의해 어느 정도 달성되고 있으나 이들 약제에 대한 저항성 균의 증가로 전반적으로 크게 도움이 되지 않고 있다(3, 4). 이러한 살균제들은 methionine 생합성을 저해하거나 세포벽을 분해하는 곰팡이 효소 생성 또는 protein kinase 작용을 억제하여 포자의 발아나 균사 성장을 억제한다. 그러나 이러한 살균제의 장기 사용으로 인해 살균제에 대한 저항성 균주의 발생(7)과 발아관이나 균사끼리의 융합 등으로 유전적 성질이 전이(5, 6)되어 방제효과가 급격하게 저하되어 실제적인 방제 수단이 되고 있지 못하다 따라서 좀더 효과적이고 장기적인 잿빛 곰팡이병의 새로운 방제 약제의 개발이 필요하여 새로운 방제제 개발에 대한 연구가 필요하다.

병의 방제를 위해서는 무성포자의 생성 또는 발아 과정을 분자 수준에서 이해하고 이를 토대로 방제법을 개발하여야 할 것이다. 그러나 포자의 발아에 관한 연구를 비롯하여 분자 수준에서의 연구가 부진한 것이 이 병원균의 방제 대책에 걸림돌이 되고 있다. *B. cinerea* 뿐만 아니라 곰팡이 포자 발아에 대한 연구는 미진한 형편이다 (8, 9, 10). 주로 *Neurospora crassa*와 *Aspergillus nidulans* 등의 곰팡이에서 포자 발아에 대한 molecular mechanism이 연구되어왔지만, trehalose mechanism, 포자 발아 동안 발현되는 유전자 연구, ras signaling, mitoen-activated protein kinase (MPKA)



pathway 등에 국한되어 있다. 특히 *B. cinerea*는 병원성과 관련한 세포벽 분해 효소인 protease(11), cellulase(12), pectinase(13), cutinase(14) 등의 연구만이 이루어지고 있어 활발한 연구 활동이 요구되고 있다. 이러한 연구 동향은 잣빛곰팡이 병이 중요하지 않아서가 아니라 균의 특성상 연구 진행이 어려운 데 기인한다. 현재까지 개발된 기술들은 일반적으로 *E. coli*와 같은 세균 또는 yeast와 같은 곰팡이를 대상으로 개발되어 왔다. *B. cinerea*와 같은 filamentous fungi (균사성 진균)에는 이와 같은 기술이 적용되기 어려운 것도 장애 요인으로 지목되어 왔다. 따라서 이 병원균의 근본적인 생리연구가 필요하며, 이러한 연구는 현재까지 사용되어 온 기술로는 한계가 있어 새로운 분석 기술이 요구된다.

본 연구에서는 *B. cinerea* 포자 발아에 관련된 단백질 연구를 위해 이차원 전기영동법을 이용한 프로티옴 분석을 하였다. 최근 단백질의 총체적 분석 기술로 프로티옴 분석 기술이 주목받고 있다. 이 기술은 세포나 조직에서 발현되는 단백질을 한 평면에서 분석할 수 있는 장점이 있어 단백질 발현 패턴을 전체적으로 파악하여 목표 단백질을 찾는 데 유용한 수단일 것이다

## 제 2절 연구개발의 목적

본 연구에서는 최근 유전자 기능 분석의 기술로 주목받고 있는 프로티옴 분석 기술을 이용하여 이 병원균의 발아과정에 특이적으로 발현되는 단백질을 구명하여 향후 이를 토대로 발아과정을 억제하는 억제제의 개발에 응용하고자 한다. 이 프로티옴 기술은 단백질의 총체적 분석 기술로 세포나 조직에서 발현되는 단백질을 한 평면에서 분석할 수 있는 장점을 가지고 있어 현재 새로운 의약품이 개발이나 암과 같은 난치병의 치료 및 진단 기술 개발에 응용되어지는 21세기 최신 기술이다. 이 기술을 농학 분야에 접목시켜 빠른 시일 내에 국제 경쟁력을 갖출 수 있다. 본 연구에서는 프로티옴 분석 기술을 이용하여 잣빛곰팡이병을 일으키는 *Botrytis cinerea* 포자의 발아 특이 단백질을 규명한다. 잣빛 곰팡이병의 진균에서 포자를 수집하여 발아 전과 후의 단백질을 한 평면에 펼쳐 발현의 양을 비교 분석하는 기술을 확립해 발아 특이 단백질을 선별하여 그 단백질을 구명하여 발아 특이 단백질을 타겟으로 하는 억제 후보 물

질을 도출하는 데 활용하고자 한다. 또한 포자 발아시에 발현양이 변하는 단백질들의 목록을 작성하여 이들 단백질들의 발아 단계에서의 생리적 역할에 대한 연구가 활성화 되도록 한다. *B. cinerea*의 포자를 대상으로 이와 같은 연구 방법을 적용한 경우는 아직 없으며, 최초의 시도이다. 또한 *B. cinerea*의 경우에는 genome sequence가 알려지지 않아 단백질 동정에 MALDI-TOF mass spectrometry를 이용한 peptide mass fingerprinting (PMF) 방법을 적용할 수 없어 Q-TOF mass spectrometry를 이용한 아미노산 결정 기술을 적용하여야 하는 어려움이 있어, 본 연구과제에서 확립한 기술은 유전자의 염기 서열이 알려져 있지 않은 생물체의 프로티옴 연구의 모델이 될 수 있다.

### 제 3절 연구 개발의 범위

본 연구는 잣빛 곰팡이 병원균인 *B. cinerea*의 포자 발아시에 발현양이 변하는 단백질을 도출하여, 동정하여 향후 억제제 개발에 응용하려는 목표를 가지고 있다. 이러한 목표 달성을 위하여 다음과 같은 연구 범위를 설정하여 진행하였다.

- 1) *B. cinerea*의 포자 발아 조건의 확립
- 2) 이차원 전기 영동을 이용한 포자 단백질의 분리
- 3) 이미지 분석을 통한 포자 발아 시 발현양이 변하는 단백질의 추적
- 4) 통계적 분석을 통한 변화 단백질의 유의성 검증
- 5) 변화 단백질의 동정 및 목록 작성
- 6) *B. cinerea* 포자 단백질의 표준지도 작성

이상 열거한 연구는 주로 pH 4-7 범위에서 수행하였으며, 이차원 전기 영동법이 가진 취약점을 보완하기 위하여 이차원 전기영동을 같은 시료에 대해 3회 이상 반복하였으며, 이를 근거로 통계분석에 활용하였다.

## 제 2 장 국내·외 관련기술의 현황

### 제 1절 국외의 연구개발 동향

전 세계의 과학자를 대상으로 매 3년마다 국제 **Botrytis 심포지엄**이 개최되고 있다. 잣빛 곰팡이 병원균 하나를 대상으로 약 200명의 과학자가 그동안의 연구결과를 발표하는 학술회의를 가진다. 이 학술회의에서는 Genetics, New Botryticides/Resistance Management, Epidemiology, Biological control, Integrated Pest management, Pathogenecity factor와 Plant defence Responses/Host Resistanse를 포함한 다양한 주제에 대하여 토론하고 이를 바탕으로 앞으로의 연구 방향을 설정한다. 최근 제 13차 회의를 열었으므로 약 40여 년 간 많은 연구결과가 발표되었으나 아직까지 이렇다할 방제 대책이 없다. 이처럼 북구를 비롯하여 전 세계적으로 중요한 병원균임에도 불구하고 연구에 진전이 없음은 이 병원균이 유전적으로 매우 다양하고 현재까지 개발된 생화학적, 분자생물학적 기술로는 연구하기가 매우 어려웠기 때문이다.

식물 병원성 곰팡이들은 식물체의 세포벽을 뚫기 위하여 appressorium이나 penetration peg를 형성하여 mechanical force로 침입하거나, microbial toxin 또는 cell wall degrading enzyme등의 chemical force를 이용하는 것으로 알려져 있다(15, 16, 31). *B. cinerea*는 mechanical force를 이용하기보다는 식물체의 손상된 부위나 피사 부위를 통해 식물체 내로 침투한다. 따라서 이 곰팡이의 병원성과 관련하여 cell wall degrading enzyme에 대한 연구가 가장 활발하게 진행되어 왔다(17, 26, 27). 최근 이 곰팡이를 대상으로 분자생물학적 기술을 이용하여 유전자를 knock-out 시킬 수 있는 기술이 발표되면서 cell wall degrading enzyme에 대한 유전자를 걸손 시켜 병원성과의 관계를 알아내는 연구 결과가 발표되고 있다(18, 19, 20). 그러나, 현재까지 knock-out된 유전자, 예를 들어 cutinase, polygalacturonase(28, 29, 30)등에 대한 유전자는 병원성과 관련이 적은 것으로 나타났으며, cell wall degrading enzyme들이 매우 다양하고 동위 효소들이 너무 많으며, 대개의 효소가 유도되기 때문에 이 분야의 연구 결과가 병원균의 방제에 크게 기여하지 못 하였다. 병원균의 효율적 방제를 위해서는 병원균의 생리적 연구가 바탕이 되어야 한다. 따라서 병원균의 생

리적 역할을 수행하는 구성 단백질을 하나하나 밝혀내어 그 역할을 구명하고 더 나아가서 병리적 현상에서의 역할을 담당하는 단백질을 목표로 농약을 개발하여야 해결될 문제일 것으로 생각된다. 특히 *B. cinerea*의 전파는 포장에 기인한다. 따라서 포자가 발아하지 못하는 조건에서는 병이 발생하지 않으며, 이러한 포자 발아의 억제제가 효과적 방제 수단일 것으로 판단된다. 따라서 포자 발아에 관여하는 단백질을 도출한다면 이를 대상으로 발아 억제제가 개발될 여지가 충분한 것이다. 이러한 연구를 위해서는 포자 단백질을 모두 분리하고 이를 동정해야만 하지만 종래의 기술로는 달성하기 어려운 과제 였다.

최근에 개발된 분석법인 프로티옴 연구는 이러한 측면에서 강력한 기술로 평가받고 있다. 프로티옴 연구 분석법은 1994년에 호주 Macquarie University (Center for Analytical Biotechnology)의 Marc Wilkins and Keith Williams가 Protein과 Genome을 합성하여 프로티옴(proteome)이라는 용어를 어떤 조직이나 세포에서 발현되는 단백질의 총체를 의미하는 것으로 처음 제안한 이래 세계적으로 주목받는 연구 방법이 되었다. 호주의 APFA에서도 식물 병원 진균을 대상으로 프로티옴 분석을 시도하고 있으며 병원성이 강한 균주와 그렇지 않은 균주에서 발현 단백질의 양상을 조사하고 있다. 따라서 신기술을 재빨리 접목하여 이 병원균의 방제를 위한 연구를 수행하는 것이 바람직하다.

## 제 2절 국내의 연구 동향

국내에서는 몇몇 기관을 중심으로 빛 곰팡이병의 연구가 이루어져 왔다. 한국 화학 연구소를 중심으로 가장 많은 연구가 이루어져 왔고, 한국에서의 균주 분리 및 역학 조사, biocontrol에 관한 연구도 이루어져 왔다. 1997-1998년에는 한국과학재단에서 지정한 살균제 저항성 연구회를 중심으로 잣빛 곰팡이병에 대한 논의가 있었다. 국내에서 이루어진 연구는 주로 본 연구진을 주축으로 이루어져 왔다. 국내 분리균의 RAPD 분석을 수행하였으며 virulent factor로 주목받고 있는 endo-polygalacturonase의 정제 분리 및 exo-polygalacturonase의 정제 분리를 하여 병원성과의 관계 연구에 재료로 사용되었다(21, 22, 23, 24). 분자생물학적 연구에서는 phospholipase C의

cloning 및 sequencing(25), Ras 유전자의 cloning 및 sequencing, tubulin 유전자의 cloning 및 sequencing, exo-polygalacturonase 유전자의 cloning 및 sequencing 및 결손 돌연변이주의 제작, 잿빛 곰팡이병의 길항 미생물 분리 등의 연구결과를 발표하였다. 이러한 연구성과에도 불구하고 근본적인 방제에 접근하기는 당분간 어려울 것으로 판단된다. 이 진균에 대한 중요성에도 불구하고 외국의 경우에서처럼 문제점은 공감하나 대책 마련에는 성과를 얻을 수 없었다. 따라서 새로운 분석기술을 도입하고자 프로티움 분석법을 적용하였다. 세계적으로 프로티움 분석법은 새로운 개념의 학문이기 때문에 체계적인 프로티움 연구가 시도된 적이 없다. 따라서 잿빛 곰팡이 포자에 대한 연구는 이 병원균의 방제 대책 수립에 도움이 될 것이며, 본 연구 결과를 활용하여 앞으로의 연구를 진행한다면 새로운 농약 개발을 비롯한 방제 대책 마련에 활용될 것으로 보인다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 실험 방법

#### 1. 시약

IPGgel strip과 carrier ampholyte는 Amersham Pharmacia사의 Immobiline DryStrip과 IPG buffer를 사용하였다. Urea, CHAPS, DTT, iodoacetamide는 Bio-Rad사와 USB사에서 구입하였고, 단백질 정량시약과 전기영동에 필요한 acrylamide, SDS, tris, glycine, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide등의 시약은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다. 또한 sodium thiosulfate, silver nitrate, sodium carbonate등 silver staining용 시약은 Sigma사와 Fluka사에서 구입하였고, 균 배양 시약들은 DIFCO 제품을 사용하였다. Acetonitrile과 ammonium bicarbonate, calcium chloride,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, acetone, nitrocellulose, trifluoroacetic acid, formic acid, isopropanol등의 mass 측정용 시약들은 Sigma사와 Merck사에서 구입하였고, internal calibration을 위한 standard solution에 사용된 Bradykinin, Angiotensin I, (Glu<sup>1</sup>)-Fibrinopeptide B, Neurotensin, Adrenocorticotropic Fragment는 Sigma사에서 구입하였다. Digestion에 사용한 trypsin은 Promega사에서 구입하였다. 그 외 시약들은 특급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

#### 2. 사용균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 곰팡이 균주인 *Botrytis cinerea*는 국내에서 분리된 균주인 *B. cinerea* T91-1, *B. cinerea* BC5와 독일의 Tuzinsky group으로부터 분양받은 *B. cinerea* B05.10을 사용하였다. 균주는 Potato dextrose broth (PDB) 배지에 배양하였다.

#### 3. 실험 방법

##### 가. 포자의 발아

무성포자는 *B. cinerea* BC5 균주를 PDA배지에 접종하여 37°C에서 5~6일간 배양하여 얻었다. 발아한 포자를 얻기 위해서는  $1 \times 10^7$  conidia/ml인 포자현탁액을 배지부피의 20% 가 되게 PDB배지에 접종하여 포자의 최종 농도가  $2 \times 10^6$  conidia/ml이 되도록 한 후 37°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하여 포자를 발아 시켰다.

이때 포자의 발아는 발아관의 길이가 포자 지름의 2~3배가 될 때까지 배양하였다.

#### 나. 단백질 시료 준비

포자 준비는 포자가 형성된 배지에 멸균 증류수를 10~15 ml 붓고 spreader로 긁어모은 포자액을 멸균한 가제로 2회 걸렀다. Haemocytometer로 포자수를 측정하여 포자액에 들어 있는 총 포자수를 계산하였다. 발아하지 않은 포자와 진탕하여 발아시킨 포자를 12,000 rpm, 4°C에서 10~20분간 원심 분리해 포자와 발아 포자를 얻었다. 여기에 차가운 washing buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4)를 가하여 현탁 시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 10~20분간 원심 분리하는 과정을 3회 반복하여 세척하였다. 포자와 발아 포자는 homogenization buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 현탁 시켜 그 부피의 2배 부피의 glass beads (직경 0.5 mm)를 넣고, bead beater로 시료를 켜었다. 이때 포자 시료가 500  $\mu$ l~700  $\mu$ l일 때는 1 ml의 homogenization buffer를, 500  $\mu$ l 이하일 때는 500  $\mu$ l를 넣어서 bead-beater를 이용해 5,000 rpm으로 20초씩 15회 실시하였다. 이때 매회 깨고 난 후 얼음에 1분간 두었다. 시료의 깨진 정도는 광학 현미경으로 확인하였다. Lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 40 mM tris, 100 mM DTT, 0.2% (w/v) ampholyte)와 urea를 homogenization buffer와 동일 volume 넣고 urea가 녹을 때까지 vortexing하였다. Urea가 다 녹으면 12,000 rpm, 15°C에서 15분간 원심 분리해 상등액을 취하여 포자와 발아 포자의 2DE용 단백질 시료로 각각 사용하였다.

#### 다. 단백질 정량

단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량 하였다. Bio-Rad사의 protein assay kit를 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 (UV-VIS spectrophotometer), Bovine serum albumin (Sigma cat No. B-4287)을 표준시

료로 사용하였다.

라. Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

Focusing은 IPGphor (Amersham Pharmacia)를 사용해 수행하였다. 단백질 시료 (50  $\mu\text{g}/\text{strip}$ )와 rehydration buffer (8 M Urea, 2% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer, Bromophenol blue trace)을 섞은 후, IPG holder에 sample을 loading하고 13 cm linear gradient pH 4~7 strip를 사용해 focusing을 실시하였다. 이때, rehydration을 12시간 실시하고 Step1은 500 V에서 1시간, Step2에서는 1000 V로 1시간, Step3에서는 8000 V로 45000 Vhr까지 실시하였다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Hoefer SE 600을 이용해 실시하였다. First dimension이 끝난 strip은 equilibration buffer I (6 M Urea, 30% (w/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0.05 M Tris-HCl buffer, Bromophenol blue trace, 1% DTT)과 equilibration buffer II (Equilibration buffer I + 2.5% Iodoacetamide)을 이용해 equilibration하였다.

그 후, 8~16 % gradient polyacrylamide gel을 사용해 second dimension을 실시하였다. 전기영동은 처음 1시간은 5 mA로 시작해 15 mA로 dye가 gel의 바닥에 갈 때까지 수행하였다.

마. 염색 (Silver staining)

전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 fix solution (12% Acetic acid, 50% Methanol)에 담가 1시간 30분 이상 fixing 시킨 다음, 50% ethanol로 30분씩 2번 washing 해주었다. Sensitivity-enhancing solution (0.02% sodium thiosulfate)에 1분간 담가 흔들어 주고 3차 증류수로 1분간 3번 씻어 주고 silver stain solution (0.2% Silver nitrate, 0.75 ml/l 37% formaldehyde)에 담가 20분간 흔들어 주었다. 이를 3차 증류수로 1분간씩 2번 씻은 후, development solution (2% sodium carbonate, 0.0004% sodium thiosulfate, 0.5 ml/l 37% formaldehyde)에 담가 단백질 spot이 나타나면 stop solution (1% acetic acid)을 가하여 발색을 정지시켰다.

바. Image analysis

Staining이 끝난 각 polyacrylamide gel들은 Densitometer(Bio-Rad,



GS-710)로 scanning하여 PDQuest 6.2 (Bio-Rad사)로 분석하였다.

#### 사. In-gel digestion

분석하고자 하는 spot을 yellow tip을 사용해 잘라낸 후 1 mm<sup>3</sup>로 조각을 내어 물과 acetonitrile로 2회 washing한 후 vacuum dry하였다. 그런 후 gel 조각을 10 mM DTT/0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>로 45분간 56°C에서 reduction하고 55 mM iodoacetamide/0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>에서 30분간 alkylation하여 vacuum dry하였다.

마른 gel 조각에 digestion buffer (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>)와 12.5 ng/ $\mu$ l trypsin을 처리한 후 45분간 trypsin이 gel속으로 들어가도록 얼음에 박아 두었다. trypsin을 제거하고 gel 조각이 마르지 않도록 digestion buffer를 10  $\mu$ l정도 넣고 37°C에서 overnight (16시간정도)으로 digestion하였다. Peptide extraction은 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>와 acetonitrile로 한 번, 5% formic acid와 acetonitrile로 2번, 총 3번 실시하였다. Extract한 peptide solution을 vacuum dry한 후 물 : acetonitrile : trifluoroacetic acid를 93 : 5 : 2로 섞은 solution에 peptide를 녹여 solution phase nitrocellulose 방법으로 질량을 측정하였다(18).

#### 아. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

MALDI-TOF방식인 Voyager<sup>TM</sup>-DE STR Biospectrometry<sup>TM</sup> Workstation을 사용해 분석하였다.

Matrix solution (40 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetone)과 nitrocellulose solution (20 mg/ml Nitrocellulose in acetone) 그리고 2-propanol을 2 : 1 : 1로 섞어 사용하였다.

Internal calibration을 위하여 standard solution을 sample과 함께 loading하였다. Standard solution에 사용된 peptide는 Bradykinin, Angiotensin I, (Glu<sup>1</sup>)-Fibrinopeptide B, Neurotensin, Adrenocorticotrophic Fragment였다.

Sample loading시 sample : standard solution : matrix solution을 2 : 1 : 2로 섞은 후 sample loading plate에 loading하였다. Sample이 마르면 5% formic acid와 물로 번갈아 10초씩 washing해 주었다(18).

자. 단백질의 동정

N-terminal amino acid sequence와 Q-TOF를 이용한 아미노산 서열 결정은 기초과학 지원연구원에 의뢰하여 실시하였다.

## 제 2절 연구 내용 및 결과

### 1. *B. cinerea*의 포자 발아 동안 형태적 변화 관찰

젯빛 곰팡이 병원균은 특이한 점을 가지고 있다. 실험실에서 식물체에 젯빛 곰팡이 병원균의 포자를 감염시키는 경우, 포자만을 감염 시켰을 때에는 병 발생이 저조하다. 성공적인 감염을 위해서는 glucose와 같은 당을 가하여 주어야 한다. 이러한 점은 젯빛 곰팡이 병원균을 제외한 다른 곰팡이에서는 그 예가 드문 특징적인 성질이다. 이러한 병원성과 당과의 관계는 포자의 발아와 관계된 것으로 추측되었다. 이러한 가정을 증명하기 위하여 발아에 미치는 당 및 영양분의 영향을 실험하였다. 그 결과 glucose와 같은 당류는 곰팡이 포자의 발아에 중요한 역할을 하는 것으로 판명되었으며, inositol과 같은 경우는 포자를 발아시키지 못하였고 따라서 식물체에 감염도 저조함을 관찰하였다. 이를 토대로 몇 가지 stereo-isomer를 이용한 실험에서도 각 isomer에 따라 발아 정도가 다르게 나타났으며 이러한 결과로 포자의 발아율과 식물체 감염에는 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 흥미로운 사실은 glucose의 artificial derivative인 2-deoxyglucos가 존재할 경우에는 *B. cinerea*의 포자가 발아하지 못하였으며, 이때 glucose를 가하여 주어도 농도비가 1:4 이상에서만 발아가 정상적으로 일어났다. 이러한 결과로 발아 특이적 단백질을 구명하면, 새로운 발아 억제제의 개발이 가능하며, 따라서 신 개념의 농약을 개발할 수 있을 것으로 전망된다. 본 연구에서는 발아 조건을 조절하기 위하여 potato dextrose broth (PDB)를 사용하여 *B. cinerea* 무성 포자를 발아시키면서 시간별로 형태적 변화를 관찰하였다. 발아 시작 후 2시간째는 Fig. 1에서와 같이 포자의 크기가 커지는 것을 관찰하였고 이 시간동안 swelling이 일어나는 것을 확인하였다.

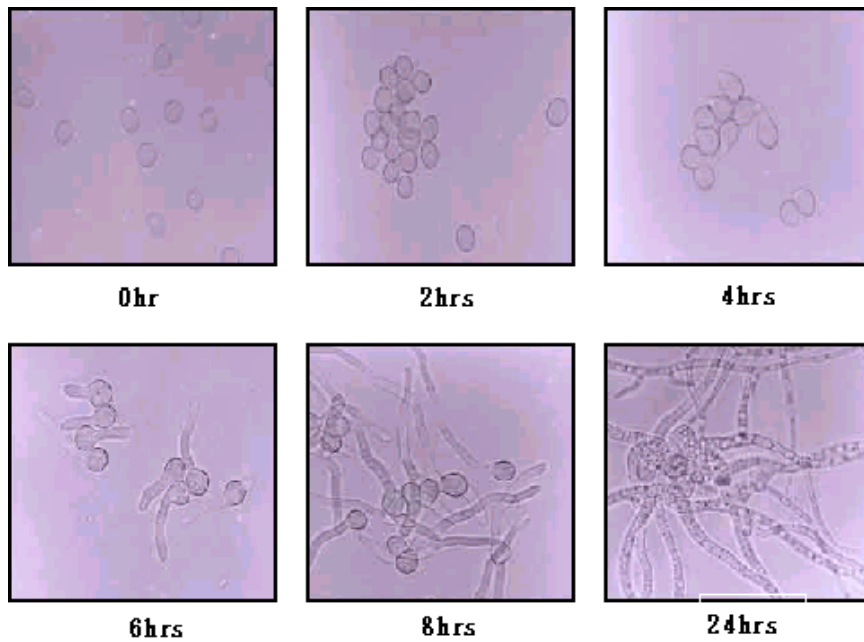


Fig. 1. Morphological changes of *B. cinerea* conidia during germination.

The conidia were inoculated in potato dextrose broth and incubated at 20°C with shaking for indicated time.

*B. cinerea* 포자는 발아 4시간 후부터 발아관이 생성되어 발아 6시간 후에는 발아관의 길이가 포자 직경의 2-3배로 성장된 것을 확인하였다. 8시간 후에는 7-8배 정도까지 길어졌으며 그 이후에는 균사 성장 단계로 진입함을 형태적으로 판단할 수 있었다 (Fig. 1). 본 연구에서는 포자를 8시간 동안 2시간 간격으로 회수하고 단백질을 추출하여 프로티옴 분석을 수행하였다.

## 2. *Botrytis cinerea*의 무성 포자와 발아 된 포자의 이차 전기영동 젤 패턴

*B. cinerea* 포자를 발아시키면서 시간별로 단백질의 발현 양상을 이차원

전기 영동으로 분석하였다 (Fig. 2). 발아하기 전 포자를 분석한 결과 총 2000개의 단백질 스팟을 확인할 수 있었고 이들 단백질은 분자량이 12,000에서 90,000사이의 고루 분포하였다. 발아 과정 중의 포자 단백질 발현 양상을 Fig. 2에서 보듯이 육안으로 판단하였을 때 발아 전과 큰 변화를 알 수 없었지만 PDQuest를 이용하여 분석한 결과 100종 이상의 단백질의 발현이 변화함을 알 수 있었다.

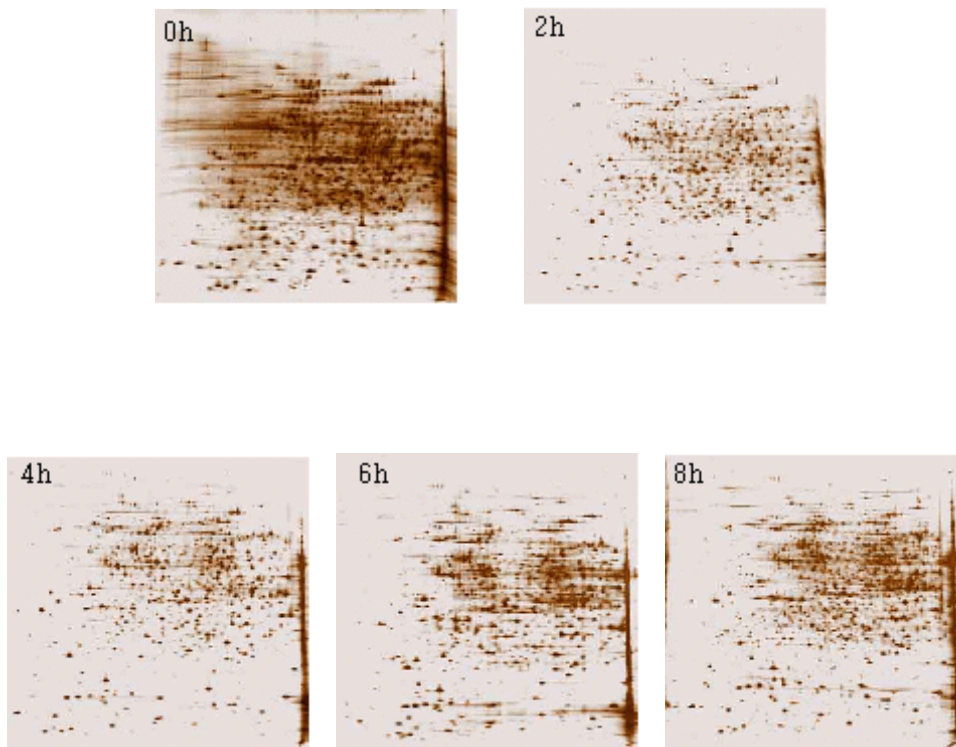


Fig. 2. The protein profiles of germinating conidia of *B. cinerea*. Proteins ( $60 \mu\text{g}$ ) were analyzed using pH 4-7L IPG gel strip ( $170 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}$ ) and 7.5-17.5% SDS-PAGE gel ( $180 \times 200 \times 1 \text{ mm}$ ).

각 젤에서 변화하는 단백질 스팟이 포자가 발아하는 동안 발현양이 변하는 것인지 아니면 이차원 전기 영동 기술의 한계에 의해 나타나는 실험적 오차인지를 확인하였다 이를 위해서 본 연구에서는 한 시료에 대해 독립적으로 3회 이상의 실험을 수행하여 실험 과정 중에 발생 할 수 있는 오류를 최소화하여, 각 젤에서 공통적으로 변화를 보이는 단백질만을 도출할 수 있도록 하였다. 이를 위하여 포자 발아하는 동안 나타나는 모든 단백질 스팟을 대상으로 독립적으로 실험하였을 때 나타나는 모든 단백질 스팟을 하나의 이미지로 통합하여 표준 지도를 작성하였다.

### 3. *Botrytis cinerea* 발아 특이 단백질 분석

포자가 발아 특이 단백질을 도출하기 위해 총 20장의 이차 전기영동 젤 이미지를 PDQuest로 분석하였다. 모든 젤 이미지를 하나로 통합하고 각 단백질에 고유 번호를 부여하여 표준지도를 작성하였다 (Fig. 3). PDQuest로 분석된 각 젤에 있는 단백질들의 발현양은 normalization 한 후 통계 분석법을 이용하여 유의성을 검증하였다. 본 연구에서는 분석 시료의 수가 비교적 적기 때문에 정규화 분산을 하는지의 여부를 알 수 없었다. 따라서 모수적 방법과 비모수적 방법을 모두 동원하여 분석한 후, 두 방법의 결과를 비교하였다. 이때, 유의 확률이 0.1 미만인 단백질을 선별하여 Duncan의 다중비교를 실시하였다. 그 결과 유의성을 보이는 단백질 21개를 얻었다(Table 1).

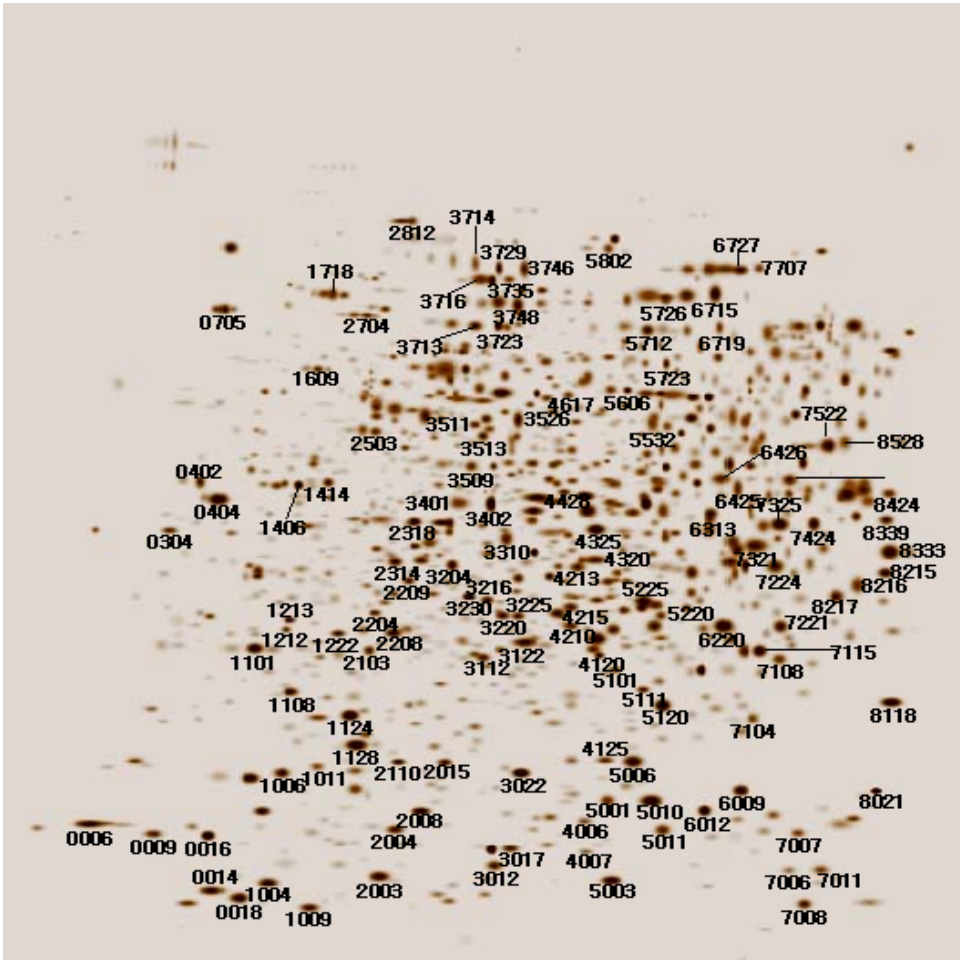


Fig. 3. Standard proteome map of spore of *B. cinerea*

Table 1. Statistical analysis of expressed protein for germination of *B. cinerea*.

Spot no.	Mean value					Parametric method	Nonparametric method
	0h	2h	4h	6h	8h	P <0.1	P <0.1
14	2960 <sup>a</sup>	2165 <sup>a,b</sup>	1934 <sup>a,b</sup>	1128 <sup>a,b</sup>	510 <sup>b</sup>	0.073	0.042
18	6870 <sup>a</sup>	5244 <sup>a,b</sup>	2609 <sup>a,b</sup>	2880 <sup>a,b</sup>	1685 <sup>b</sup>	0.022	0.025
1004	6243 <sup>a</sup>	1817 <sup>a,b</sup>	1318 <sup>b</sup>	1914 <sup>a,b</sup>	2476 <sup>a,b</sup>	0.028	0.033
1006	4167 <sup>b</sup>	2870 <sup>b</sup>	5707 <sup>a,b</sup>	8032 <sup>b</sup>	8897 <sup>b</sup>	0.009	0.020
1011	1673 <sup>d</sup>	2531 <sup>c,d</sup>	4018 <sup>b,c</sup>	5881 <sup>a,b</sup>	6868 <sup>a</sup>	<.0001	0.006
1124	4775 <sup>b</sup>	7741 <sup>a,b</sup>	8850 <sup>a,b</sup>	11550 <sup>a</sup>	10421 <sup>a,b</sup>	0.035	0.029
1212	781 <sup>b</sup>	2598 <sup>a,b</sup>	5235 <sup>a</sup>	4785 <sup>a</sup>	1841 <sup>a,b</sup>	0.043	0.080
1220	261 <sup>b</sup>	420 <sup>a,b</sup>	196 <sup>b</sup>	915 <sup>a</sup>	553 <sup>a,b</sup>	0.070	0.1307
1226	19 <sup>c</sup>	21 <sup>c</sup>	193 <sup>b</sup>	293 <sup>a,b</sup>	362 <sup>a</sup>	<.0001	0.007
2103	2509 <sup>a</sup>	1473 <sup>b</sup>	1196 <sup>b</sup>	1867 <sup>a,b</sup>	1406 <sup>b</sup>	0.004	0.024
2109	397 <sup>a,b</sup>	90 <sup>b</sup>	142 <sup>b</sup>	816 <sup>a</sup>	661 <sup>a</sup>	0.009	0.024
2204	1076 <sup>c</sup>	5072 <sup>a</sup>	2849 <sup>b,c</sup>	4193 <sup>a,b</sup>	2043 <sup>b,c</sup>	0.002	0.026
3012	2895 <sup>a</sup>	2521 <sup>a,b</sup>	1834 <sup>a,b</sup>	2183 <sup>a,b</sup>	1241 <sup>b</sup>	0.035	0.039
3017	2882 <sup>b</sup>	4284 <sup>a,b</sup>	5150 <sup>a,b</sup>	6327 <sup>a</sup>	4620 <sup>a,b</sup>	0.056	0.090
3220	1345 <sup>c</sup>	2607 <sup>a,b,c</sup>	4867 <sup>a</sup>	3939 <sup>a,b</sup>	2177 <sup>b,c</sup>	0.025	0.064
3737	116 <sup>b</sup>	104 <sup>b</sup>	696 <sup>a,b</sup>	1094 <sup>a</sup>	314 <sup>a,b</sup>	0.074	0.370
4315	1794 <sup>a</sup>	610 <sup>a,b</sup>	1230 <sup>a,b</sup>	68 <sup>b</sup>	247 <sup>b</sup>	0.025	0.086
5010	8593 <sup>a</sup>	5865 <sup>a,b</sup>	3365 <sup>b</sup>	4148 <sup>a,b</sup>	2770 <sup>b</sup>	0.016	0.030
5120	6274 <sup>a</sup>	4889 <sup>a,b</sup>	4302 <sup>a,b</sup>	3514 <sup>a,b</sup>	2788 <sup>b</sup>	0.040	0.040
6012	5015 <sup>a,b</sup>	2849 <sup>b</sup>	3307 <sup>b</sup>	7373 <sup>a</sup>	2778 <sup>b</sup>	0.068	0.090
7007	1453 <sup>c</sup>	1949 <sup>b,c</sup>	3101 <sup>a,b</sup>	3867 <sup>a</sup>	3896 <sup>a</sup>	0.001	0.008

\* a>b>c>d ; Duncan's multiple range test

도출한 단백질들 중 SSP no. 1220과 3737 두 개의 단백질을 제외하고는 모두 두 가지 통계 분석 방법에서 유의성을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 통계 분석법의 선택이 유호한 단백질의 도출에 중요하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 보수적 방법에서 도출된 21개 단백질을 모두 유호 후보로 인정하였다. 이들 단백질 중 발아 8시간 동안 꾸준히 증가하는 단백질은 10개 (SSP no. 1006, 1011, 1124, 1220, 1226, 2109, 3017, 3220, 3737, 7007)였으며, 특히 1006, 1011, 7007은 발아 동안 단백질 발현의 뚜렷한 증가를 보였다(Fig. 4, 5). 또한 발아 8시간 동안 꾸준히 감소하는 단백질은 5개 (SSP no. 14, 18, 3012, 5010, 5120)이며, 이중 14, 18, 5120 단백질이 발아 동안 발현의 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 6, 7).

이렇게 얻어진 단백질들은 *B. cinerea* 포자 발아와 밀접한 관련이 있을 것으로 판단되며, 이를 mass spectrometry 방법으로 단백질 동정을 시도하였다.



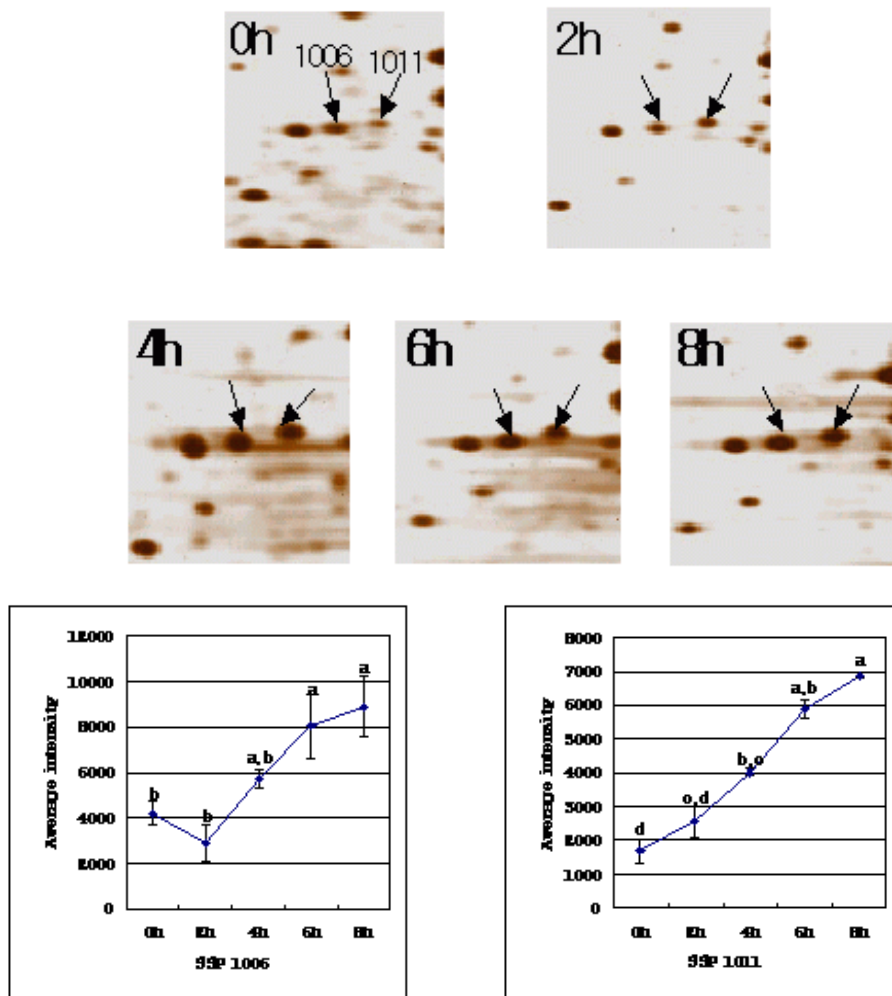


Fig. 4. Increased protein spots during conidia germination of *B. cinerea*. SSP no. 1006 and 1011 were identified to 40S ribosomal protein S12.

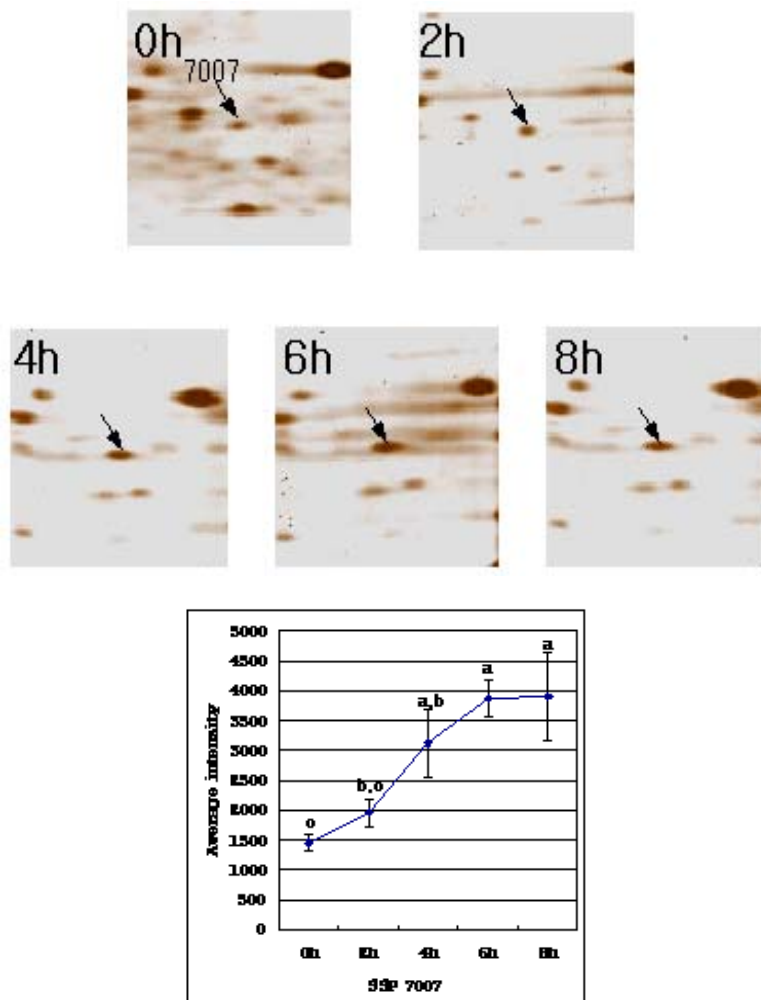


Fig. 5. SSP no. 7007 was identified to ubiquitin-conjugating enzyme E2.

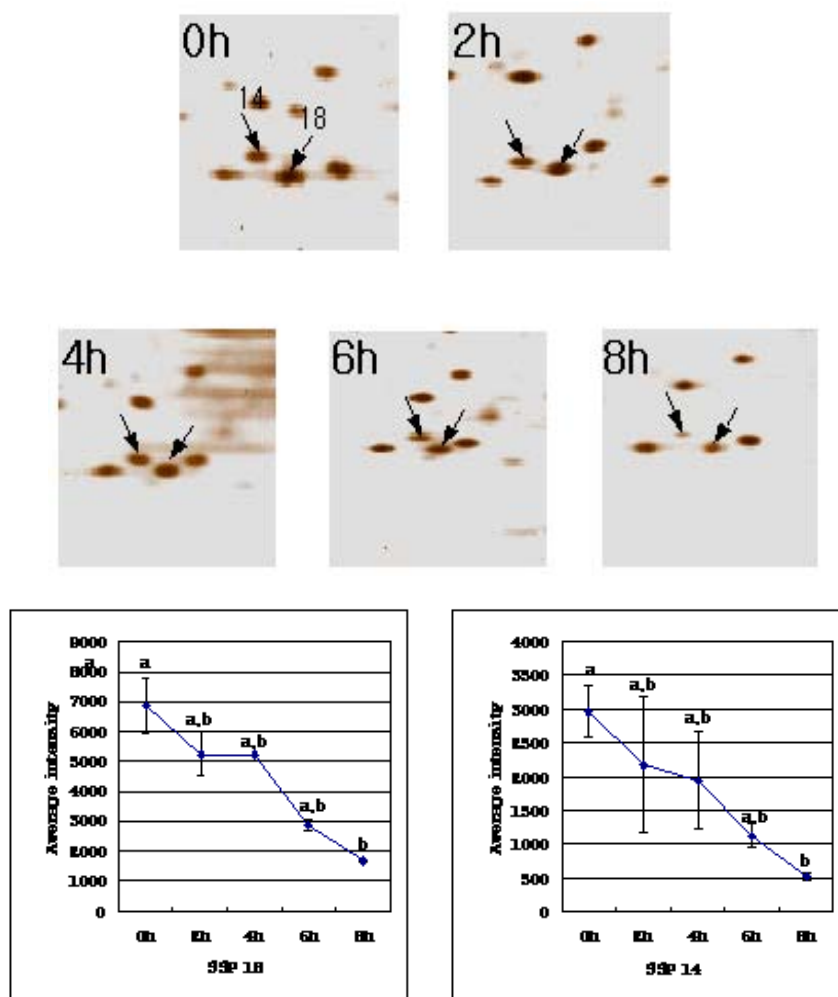


Fig. 6. Decreased protein spots during conidia germination of *B. cinerea*. SSP no. 14 and 18 are unknown proteins.

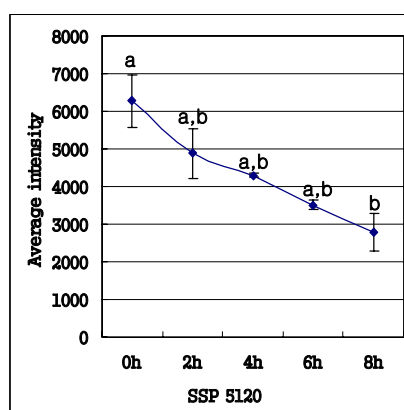
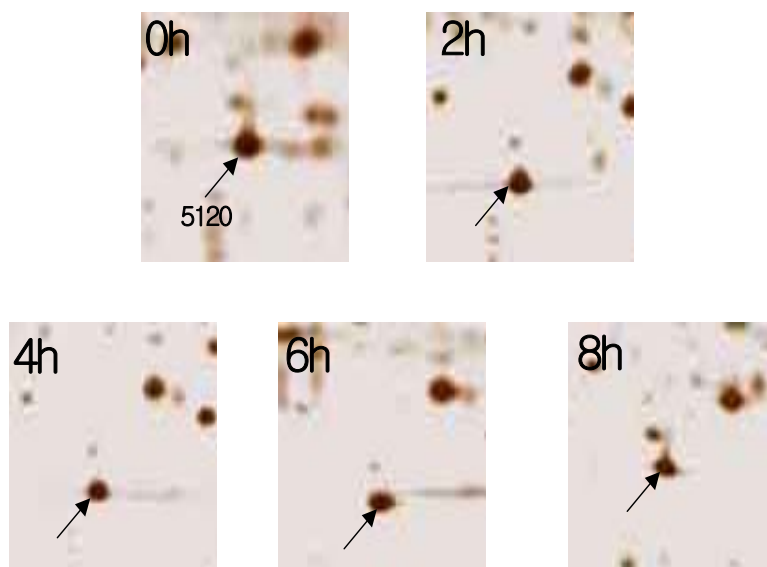


Fig. 7. SSP no. 5120 was identified to 1,4-benzoquinon reductase.

#### 4. 발아 특이 단백질의 동정

*B. cinerea* 발아 특이 단백질을 동정하기 위해 MALDI-TOF를 이용한 peptide mass finger printing 방법을 시도하였으나 동정에 실패하였다. 이는 *B. cinerea*의 유전자 정보가 완전히 구축되어 있지 않기 때문인 것으로 판단되었다. 다만 SSP no. 1009 단백질이 esterase로 동정되었으며, 이것으로 보아 앞으로 유전자 정보가 구축되면 이 기술을 사용할 수 있을 것으로 생각되어진다. 또 다른 방법으로는 N-terminal 아미노산 소열 분석을 시도하였다(Table 2). 포자 발아 동안 발현이 변하는 단백질 SSP no. 1006, 1011, 1101, 3220에 대해 N-terminal 아미노산 서열을 분석한 결과 1011은 N-terminal blocking 되어 아미노산 서열 분석을 할 수 없었고, 나머지 3개의 단백질의 아미노산 서열은 FASTA와 BLAST에서 단백질 상동성을 조사한 결과 어떠한 단백질과도 상동성이 없었으므로 상동성 조사에 의한 단백질 동정은 불가능하였다.

Table 2. N-terminal sequence of four protein spots during germination.

Spot Number	Peptide sequencing	Search result
1006	XSI/LA/E/LS/ATL/G	Unknown
1011	N-terminal blocking	Unknown
1101	M/TIXF/LDVITXDEII	Unknown
3220	V/GGGEX/SVTX/QXQ/L/E/NVXXLXQEA	Unknown

따라서 단백질 서열을 결정할 수 있는 Q-TOF를 이용하여 단백질의 internal peptide 아미노산 서열 결정을 시도하였다. 특히 이 균의 단백질은 상동성이 많이 떨어지므로 가능한 한 많은 peptide의 아미노산 서열을 결정하여야 할 것으로 생각되어져 최소한 4개의 peptide에 대한 아미노산 서열을 결정하고 이를 상동성 조사에 의한 단백질 동정에 이용하였다(Table 3-1). 발아 특이 단백질로 추정되는 21개 단백질 중 8개의 단백질을 peptide 서열을 분석하여 상동성을 조사한 결과 5종류의 단백질과 상동성이 있음을 확인하였다. 결과를 종합하면 40S ribosomal protein S12, 60S ribosomal protein L38, Elongation factor- $\alpha$ , hypothetical protein, 1,4-benzoquinon reductase, ubiquitin conjugating enzyme E2이었다. 동정된 단백질 중 단백질 합성에 관련이 있는 단백질은 40S ribosomal protein S12, 60S ribosomal protein L38, Elongation factor- $\alpha$ 로 포자가 발아하는 동안 단백질 합성을 위한 도구가 준비되는 과정으로 생각되어 지고, 이와 달리 ubiquitin conjugating enzyme E2는 단백질 분해에 관련된 단백질로 포자가 발아하는 동안 단백질 분해가 동시에 일어날 것으로 예측할 수 있다. 나머지 두 단백질들은 아직 그 기능이 명백히 밝혀져 있지 않은 것으로 *B. cinerea*의 포자 발아에 어떠한 관련이 있는지 앞으로 연구가 진행되어야 할 것이다.

Table 3-1. Identification of expressed proteins during germination of *B. cinerea* by Q-TOF mass spectrometry.

SSP no.	Peptide sequencing	FASTA/BLAST search	Homologue to
14	HSAR	No match	
18	LYVFYPK	No match	
	SGGYSVQSLWFESK	No match	
1004	FSLEACVR	60S ribosomal protein L38	<i>Neurospora crassa</i>
	YLYTLVLK	60S ribosomal protein L38	
1124	LLSGWGN	Elongation factor 1- $\alpha$	<i>Candida albicans</i> , YEAST <i>Eremothecium gossypii</i>
1011	GQFSVLDALK	40S ribosomal protein S12	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>
	WDGEES	No match	
	QVVNMVN	No match	
	ETQFYNLSQK	No match	
	QLGEWAGLCGVLDLDR	40S ribosomal protein S12	<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
1006	FSVLDALK	No match	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Podospira anserine</i>
	LVVALED	No match	
	QLGEWAGLCGVLDLDR	40S ribosomal protein S12	
	DQLLDLSSDLQR	40S ribosomal protein S12	
1212	YTQVVVLGEYDR	No match	
	TMVGCANDTR		
	LYTGGPLPDK		
	SGDDDFQLLDYK		
3012	FGGMVLVK	No match	
	TPAVLM		
	EFVDRNDASK		
3017	VNLGGSK	No match	
	GNVHELVK		
	LEVPELWAEGTK		
	VAVGEVSNr		
3220	LLLVEVDDTR	Hypothetical protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> YEAST
	LDLNSLGL	No match	
	LFLALG	No match	
5120	YGNFPAGVASK	No match	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
	FSAQLANLEEVR	1,4-benzoquinone reductase	
	SNPWGAGSFAFR	No match	
	WPVFSFYGHLQK	No match	
7007	DQWSPALSK	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	<i>Magnaporthe grisea</i> <i>Candida albicans</i> , YEAST

**Table 3-2. Continue**

SSP no.	Peptide sequence	FASTA/BLAST search	Homologue to
12	AGLAPLYR	Nuclear transport factor 2	<i>Aspergillus nidulans</i>
	LGSLPFEK		<i>Alternaria alternata</i>
	LDFLNVAK		<i>Cladosporium herbarum</i>
	FYYNQFWDR		
205	QAGSEVSALLG	ATP synthase $\beta$ chain, mitochondrial precursor	<i>Neurospora crassa</i> <i>Emericella nidulans</i>
	EELLADVLGVPMFR	Eukaryotic transition inhibition factor 6	<i>S. pombe</i> , YEAST
213	YLAEFA	DAN damage checkpoint rad 24 (14-3-3 protein)	<i>S. pombe</i> , Yeast
	ASEDQELSVEER		<i>Trichoderma harzianum</i>
1101	LTGDELLSK	Transitionally controlled tumor associated protein (TCTP)	<i>Medicago sativa</i>
	GVTPYLK		<i>Oryza sativa</i>
	VNNVR		No match
1213	TQALGCDLALR	Probable proteasome subunit $\alpha$ type 5	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
	FQEGADGEESSLMSR		YEAST, <i>Oryza sativa</i>
	LFQVEYSLEALK		
2615	GLGEVAT	Phosphoglyceromutase	<i>Aspergillus oryzae</i>
	LETQGVDVDR		<i>Priomyces</i> sp. E2
	VVWQDVVR		
	DNDQVFFFNYR		
3016	VVVQLDGR	probable 13 kD U4/U6.U5 snRNP associate protein	<i>Neurospora crassa</i>
	NTPYVYVPSK		
	DEASD		
	QRLAESR		
3022	FLGDQDGSFTR	No match	
	LEFPAA		
	PTVELAEG		
3729	NSPDDYK	No match	
	LLSGLPDGR		
	LSENNVVR		
	WNPSWYHK		
7413	SLNA	No match	
	AQNLLP		Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
	VPTANVSVD		<i>Ajellomyces capsulatus</i> <i>Curvularia lunata</i>
4201	LLYGGSVSEK	Triosephosphate isomerase	<i>Aspergillus nidulans</i>
	TLEVVTAQLK		<i>A. oryzae</i>
	VLLQEEDSFVA		<i>P. brasiliensis</i>
	LVLAYEPL		
7224	VELGPD	Malate dehydrogenase	<i>S. pombe</i> , YEAST
	DK(Q)GVDFFASK		<i>Talaromyces emersonii</i>
	VTDLALYDLR		<i>Yersinia pestis</i>
	LFGVTTLDTPR		
	DDLNTNASLVR		
	TAAGSATLSFAFAQRQAGSE		
VSALLG			



또한 본 연구에서는 앞으로 포자 단백질의 연구를 위해 *B. cinerea*의 포자에 존재하는 단백질들의 동정을 수행하였다(Table 3-2). 13개의 단백질의 상동성을 비교한 결과 10종류의 단백질을 동정하였다. 동정된 단백질들은 Nuclear transport factor 2, ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor(EC 3.6.1.34), Eukaryotic translation initiation factor 6, DNA damage checkpoint rad 24(14-3-3 PROTEIN), Transitionally controlled tumor-association protein, Probable proteasome subunit  $\alpha$  type 5, Phosphoglyceromutase, probable 13 kD U4/U6.U5 snRNP associate protein, Chitin synthase 4 chitin-UDP acetyl-glucosaminyl transferase 4, Triosephosphate isomerase, malate dehydrogenase였으며, 주로 에너지 대사에 관련 있는 단백질과 DNA repair에 관련 있는 단백질들이었다.

본 연구에서는 발아에 관련된 단백질을 포함하여 총 13종류의 단백질을 동정하였고 이를 토대로 Fig. 8에서와 같이 표준 지도를 작성하였다.

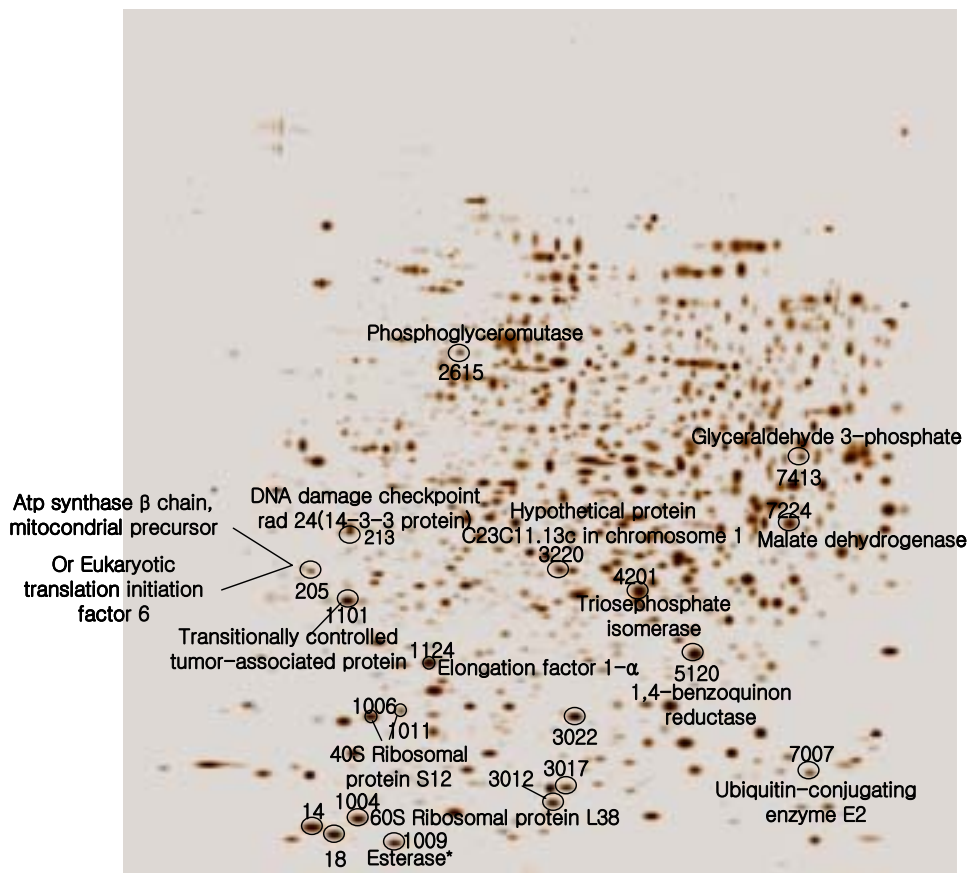


Fig. 8. Identified protein spots were shown on the gel. Proteins were identified by Q-TOF except esterase (SSP no. 1009).

## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 연구개발 목표의 달성도

#### 1. 1차년도의 연구 개발 목표 및 달성도

연구 개발 목표 : 프로티옴 분석 기술 확립

##### 가. Protein display 기술

*Botrytis cinerea*의 포자를 얻어 단백질을 추출하고, 얻은 단백질을 이차원 전기영동하여 한 평면에 단백질을 펼쳤다. 단백질을 silver staining 방법으로 염색하여 단백질의 분리정도를 확인한 후, 이미지를 저장하여 보관하였다. 이러한 protein display 기술의 재현성을 여러 가지 조건에서 조사하였고, 최적의 조건을 확립하였다. 이때 사용한 pH 구간은 pH4 - pH7이었다. 균사 상태의 프로테옴 분석에는 cinerean이란 다당류를 분비하기 때문에 전기영동상에 많은 문제점을 드러내었다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 5% Trichloroacetic acid를 전처리하는 방법과 30% ethanol을 사용하는 방법을 구사하였다. 곰팡이 포자 및 균사의 이차원 전기영동 조건이 확립되었으며, 이러한 조건하에서 앞으로의 연구를 수행하는 데 기본적인 기술을 습득하였다.

##### 나. 펩티드 분석 기술

이차원 전기영동을 수행한 후, 포자 발아시에 발현이 증가하는 단백질을 동정하기 위한 기술인 MALDI-TOF를 이용한 peptide mass fingerprinting 방법의 조건을 확립하였다. 표준 시료를 이용하여 peptide mass를 측정하여 표준 물질로 bovine serum albumin,  $\beta$ -glucosidase를 동정한 결과, 실험값에서 얻은 결과와 일치함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 목적으로한 극미량 단백질 동정기술을 확립하였다. 그러나, *B. cinerea*의 유전자 database가 부족하여 원하는 단백질의 동정에는 실패하였다. 이러한 점을 극복하기 위하여,

Q-TOF에 의한 단백질 아미노산 서열 결정법을 습득하고 있다.

#### 다. Image 분석 기술

프로티옴 연구에서 병목 지점은 바로 image analysis이다. 특히 여러 조건에서 얻은 Data의 통합 및 분석에는 많은 시간과 노력이 필요하다. 본 연구에서는 PDQuest (Bio-Rad) software를 이용하여 image 분석을 수행하였다. 본 연구에서는 standard image map, protein intensity 비교 등의 방법을 숙지하였고 이미 이 방법으로 결과를 얻었다.

## 2. 2차년도 연구 개발 목표 및 달성도

연구개발 목표 : 포자의 단백질 분리 및 구명

### 가. 발아 특이 단백질 분리

*Botrytis cinerea* 포자의 단백질을 추출하고, 이차원 전기영동법으로 단백질을 분리하였다. 단백질을 silver staining 방법으로 염색하여 단백질의 분리 정도를 확인한 후, 이미지를 저장하여 보관하였다. 이차원 전기영동의 문제점으로 지적되고 있는 재현성 부족에 대한 문제를 피하기 위해 하나의 시료에 대하여 최소한 3회 이상의 분석을 반복적으로 수행하였다. 단백질의 분리능이 가장 최적인 상태의 pH4 - pH7을 중점적으로 분석하였다. *Botrytis cinerea*의 분리 균주에 따른 포자 단백질의 pattern에 변화가 있는지의 여부를 조사하기 위하여 국내에서 분리된 균주인 *B. cinerea* T91-1 균주와 *B. cinerea* BC5의 포자 단백질과 독일의 Tuzinsky group이 분리한 *B. cinerea* B05.10 균주의 포자를 얻어 분석한 결과 silver staining으로 염색이 되는 단백질의 경우에는 이렇다할 차이를 발견할 수 없었으므로 일차년도에서 사용한 균주인 *B. cinerea* BC5균주를 표준 균주로 사용하는 것이 바람직할 것이라는 판단을 하였다. 균주변이를 조사하는 것보다는 발아과정에서 특이적으로 변화하는 단백질의 동정에 많은 시간을 투자하는 것이 본 연구 목적을 보다 효율적으로 달성할 수 있다는 일차 년도의 평가 의견을 참고로 하여 단백질의 동정에 더 많은 노력을 하였다.

### 나. Image 분석을 통한 발아 특이 단백질의 도출

이차원 전기 영동으로 단백질을 분리하는 프로테옴 기술의 문제점으로 재현성의 문제가 지적되고 있다. 이러한 문제를 해결하는 방안으로 같은 시료에 대하여 반복적으로 분석을 행하였다. 이미지 분석으로 각각의 젤을 분석하여 단백질의 변화가 실험적 오차에서 기인한 것인지, 진정한 발아 특이 단백질인지를 판단하는데 사용하였다. 본 연구에서는 PDQuest (Bio-Rad) software를 이용하여 image 분석을 수행하였다. 이러한 작업을 통하여 발아 과정 중에 지속적으로 증가하는 단백질군과 지속적으로 감소하는 단백질군 및 발아 과정 중에 발현이 증가하다가 감소하는 단백질군, 감소하다가 다시 증가하는 단백질군 등 4가지 그룹으로 분류하였다. 이렇게 도출한 단백질을 대상으로 단백질 동정 연구를 수행하였다.

#### 다. 단백질의 동정

위에서 도출한 단백질을 대상으로 단백질 동정 작업을 수행하였다. MALDI-TOF를 이용한 peptide mass fingerprinting 방법의 조건을 확립하였으나 *B. cinerea*의 분석에 적용하는 데에는 실패하였다. *B. cinerea*의 경우에는 genome data base가 매우 부족하기 때문에 펩타이드의 분자량을 정확하게 측정하였다 하더라도 단백질의 동정에 적합하지 않았다. 이 방법으로 100여개의 단백질을 분석하였으나 하나의 단백질 (esterase) 만을 동정하였다. 따라서 이 방법을 포기하고 단백질의 아미노산 서열을 분석하고자 하였다. 첫 번째로 시도한 방법은 Edman degradation법으로 N-terminal 아미노산 서열을 결정하여 homology search로 단백질을 동정하려고 하였다. 총 20여개의 단백질을 시도하였으나, 대부분의 단백질은 N-terminal이 blocking되어 있었으며, 아미노산 서열 결정에 성공한 2개의 단백질도 아미노산 서열이 너무 짧거나, homology가 없어서 단백질의 동정에 적합한 기술이 아니었다. *B. cinerea*와 같은 eukaryote system에서는 단백질의 동정이 N-terminal blocking으로 인하여 매우 어렵다는 사실을 확인한 결과에 지나지 않았으며, 아미노산 서열을 얻었다고 할 지라도 homology를 찾기란 쉽지 않음을 알았다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 C-terminal 아미노산 서열 결정이 요구되지만 많은 시료가 요구된다는 점에서 응용할 수 없었다. 이러한 점을 극복하기 위하여, Q-TOF에 의한 단백질 아미노산 서열 결정법으로 단백질의 동정을 수행하였다. *B. cinerea*의 경우 앞에서 지적했듯이, 데이터베이스의 부족,

N-terminal 아미노산의 상동성에 기인한 동정이 어렵다는 사실을 기초로 하여 internal 아미노산 서열을 결정하되 되도록 많은 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하였다. 이 방법을 통하여 16개의 단백질을 동정할 수 있었다.

### 3. 3차년도의 연구개발의 목표 및 달성도

연구개발 목표 : 발아 특이 단백질의 동정

#### 가. 포자 발아 과정에 특이적으로 발현양이 변하는 단백질의 도출

이차원 전기영동의 기술적 한계로 말미암은 재현성의 문제 때문에 도출한 단백질의 유의성을 검증하는 연구를 수행하였다. 지난 2년간의 평가에서 동정된 단백질의 검증에 분자생물학적 기술을 이용한 실험을 제안 받았다. 그러나, 이 방법을 시도하였으나, 이렇다할 성과를 거두지 못하였다. 왜냐하면, 단백질을 동정한 후, northern blot 등의 기술로 확인하려 하였으나, *B. cinerea*의 경우에는 유전자의 염기서열이 알려진 정보가 거의 없어 올바른 probe이 불가능하였기 때문이다. 따라서 다른 종, 예를 들어 yeast의 염기서열을 기초로 probe를 작성하였을 때, background가 문제가 되어 이를 쉽사리 확인할 수 없었다. 이밖에 다른 기술, 예를 들어 항체를 이용할 수 있으나, 이도 마련된 항체가 거의없기 때문에 실험을 할 수가 없었다. RT PCR의 경우도 유전자의 정보 부족에 기인한 primer 제작에 문제가 있었으므로 수행 할 수가 없었다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 극복하기 위한 수단으로 총 20자의 젤 이미지를 분석하여 발현 단백질 스팟의 이미지 부피를 대상으로 통계적 분석을 하였다. 시료의 수가 큰 편이 아니어서 데이터가 정규분포를 하는지의 여부를 알 수 없었으므로 모수 분석과 비모수 분석을 동시에 수행하고 두가지 방법 모두에서 유의성을 보이는 21개의 단백질 스팟을 도출하였다. 이 방법을 통하여 도출한 단백질의 신뢰성을 극대화하여 다음 실험을 진행하였다.

#### 나. 도출한 발아관련 단백질의 동정

3차년도에서는 평가의견에 따라 발아 과정에 특이적으로 발현양이 변하는 단백질을 도출하여, 단백질의 동정에 진념하였다. 단백질의 동정은

internal sequence를 결정하고 이를 데이터베이스의 아미노산 서열과 비교하여 동정하였다. 앞에서 언급한바와 같이 *B. cinerea*의 경우에는 유전자의 염기서열이나 단백질의 아미노산 서열에 대한 정보가 매우 부족하여, 성공적으로 아미노산 서열을 결정하였다 하더라도 이를 동정하지 못하는 경우가 많았다. 따라서 단백질의 동정이 예상만큼 수월한 것이 아니었으나, 13종의 단백질을 동정할 수 있었다.

## 제 2절 관련분야의 기술 발전의 기여도

프로티옴 분석 기술은 새로운 생물학의 연구방법으로 주목을 받고 있는 최첨단 기술이다. 본 연구를 통하여 이차원전기영동을 기본으로 한 프로티옴 연구의 기본 기술이 확립되었으며, 특히 진균류를 연구 대상으로 단백질을 분리하고 동정하는 기술을 도입하여 이 분야의 연구에 크게 기여하였다. 또한 유의성 검증을 통계적 기법으로 수행하여, 이른바 bioinformatics의 연구 분야를 도입한 것은 국내에서 유례를 찾기 힘든 일이라 생각된다. 프로티옴 데이터의 특성을 이해하고 이로부터 얻은 결과를 처리하는데 know-how를 갖게 된 것은 매우 중요한 일로 생각된다.

현재까지 진균류의 포자 발아 과정에 대한 연구정보는 그리 흔하지 않다. 포자 발아에 관하여 어느 시점에서 어느 유전자가 발현하며, 그 생리적 역할이 무엇인지 구체적으로 연구 된바가 없다. 최근에 들어서 발아과정이 일종의 signal transduction 과정의 하나로 인식되어, 동물이나 식물에서 이 경로에 관여한다고 알려진 몇 개의 유전자를 대상으로 연구한 것이 전부이다. 본 연구에서 도출한 단백질도 이러한 경로에 위치하거나 아니면 간접적으로 관여할 것으로 짐작된다. 현재까지는 연구 대상을 정하지 못하여 이 분야의 연구가 미진하였다고 사료된다. 따라서 본 연구에서 도출한 단백질을 대상으로 연구의 초점을 맞춘다면, 아직까지 알려지지 않은 발아 경로의 해석에 기여할 것이다.

## 제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획

### 제 1절 추가연구의 필요성

본 연구에서의 궁극적 목표는 *B. cinerea*의 포자 억제제를 개발하여 농약을 개발하려는 데에 있다. 지난 3년간의 연구는 포자 발아와 관련된 단백질들의 도출 및 동정에 전념하였으며, 소정의 연구 목표를 달성하였다. 이를 토대로 다음과 같은 추가 연구가 요구된다.

#### 1. 동정된 단백질에 대한 추가 연구

본 연구에서 동정된 단백질에 대하여는 다음과 같은 추가 연구가 필수적이다.

첫째, 동정된 단백질의 유전자를 확보하여야 한다. 본 연구에서 동정된 단백질은 다른 곰팡이와의 상동성에 기초를 두고 있어 유전자를 확보하는 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다.

둘째, 확보된 유전자를 이용하여, knock-out mutant를 제작하여야 한다. 이렇게 제작된 돌연변이주를 이용하여 병원성이 있는지의 여부와 포자 발아가 정상적으로 일어나는지의 여부를 조사하여야 한다. 포자 발아에 크게 영향을 미치거나 병원성에 영향을 미치는 단백질의 도출하여 확인하여야 한다

셋째, 도출한 단백질의 3차 구조를 밝혀야 한다. 이를 위해서는 단백질을 과량으로 발현하고 결정화하는 연구가 필수적이다. 돌연변이주에서 도출한 단백질과 포자 발아의 관계를 규명하였다면, 단백질의 3차 구조를 해석하는 일은 매우 중요할 것이다.

넷째, 도출한 단백질의 3차 구조를 이용하여 억제제를 개발하여야 한다. Chemical library를 이용하여 스크리닝 방법으로 억제제를 개발할 수 있겠으나, 단백질의 구조를 통한 bioinformatics 방법이 유용한 기술이 될 것으로 전망된다.



## 2. 동정하지 못한 단백질에 대한 추가 연구

본 연구에서 도출한 21개의 단백질 중 동정하지 못한 단백질은 현재 까지 아미노산 서열에 대한 정보가 부족하기 때문이다. 따라서 이 결과는 정보의 양이 늘어남에 따라 앞으로 밝혀질 수도 있다. 그러나, 현재까지 얻은 결과를 토대로 DNA probe를 작성하여 PCR 기술을 통해 유전자를 확보할 수 있을 것이라고 생각된다. 이러한 연구가 성공적으로 진행된다면, 위에서 언급한 동정한 단백질에 대한 추가 연구가 공통적으로 요구된다.

## 3. 도출한 단백질에 대한 추가 연구

본 연구에서 도출한 단백질들이 군사 성장시에 어떠한 변화를 보이는가를 연구하는 것이 필수적이다. 현재 도출한 단백질의 세포내 기능을 살펴보면, 에너지 대사 및 단백질 합성에 필수적인 것처럼 보인다. 이러한 단백질의 변화가 포자 발아에만 국한 된 것인지, 아니면 곰팡이의 성장에 모두 필요한 것인지를 연구하여야 할 것이다.

## 제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구 수행에 가장 큰 걸림돌은 *B. cinerea*의 유전자 정보의 부족이었다. 이 곰팡이는 그 중요성에도 불구하고 분자생물학적 연구가 수행되지 않고 있다. 그 이유로는 변이가 심하고, 각 분리 균주마다 특성이 다양하기 때문이기도 하지만, DNA의 분리 조차 매우 까다로워 연구 수행이 어렵기 때문이다. 본 연구팀에서도 이러한 점 때문에 과거 7년간 많은 연구 결과를 생산하지 못하였다. 그러나, 최근에 몇몇 실험실에서 이 병원균에 대한 분자 생물학적 기술 도입이 이루어져서, 유전자 수준에서의 연구가 가능하게 되었다. 그럼에도 불구하고 현재 알려진 유전 정보는 극히 제한적인 것이 사실이다.

현재의 연구 동향은 genome sequencing을 위시해서 대량화 가속화되고 있다. 따라서 *Neurospora crassa*를 시작으로 진균류에 대한 유전자 염기서열 분석 작업이 이루어지고 있다. *B. cinerea*의 경우에도 그 중요성 때문에 몇몇 연구 그룹을 중심으로 *B. cinerea*의 genome sequencing 연구 수행을 위한 consortium이 형성되고 있다. 가장 적극적인 연구기관은 프랑스의 INRA(Versailles)이며, 올 1월에 전세계의 관련 과학자를 초청하여 회의를 가졌다 (프랑스, 파리 : *B. cinerea* Genome Project). 따라서 이 콘소시엄을 통하여 조만간에 genome sequencing이 이루어질 것으로 예측된다. 이와 같은 사업에 따라 조만간 *B. cinerea*의 유전자 정보를 이용한 여러 형태의 연구가 가속화 될 것으로 판단된다.

프로티움 분석 기술은 아직까지 많은 연구실에서 이차원전기영동법을 사용하고 있으나, 이 기술의 태생적 문제점 때문에 대체 기술이 모색되고 있다. 그렇지만, 아직까지 이렇다할 획기적 기술이 제시되고 있지는 않다. 전체적인 움직임은 단백질 분리를 젤을 사용하지 않고, 직접 질량분석기를 이용하거나, HPEC와 같은 방법을 접목시키려 하고 있다. 이러한 기술의 장점은 빠른 시간내에 세포에 존재하는 단백질의 목록을 작성하는데 아주 적합하다. 그러나, 두가지 서로 다른 환경에서의 시료, 이를 테면 발아전과 후의 비교는 불가능하다. 많은 연구자들이 두 가지 다른 환경하에서의 단백질 발현양의 비교를 원하므로, 이 부분을 만족시킬만한 새로운 기술이 요구된다. 최근 이러한 점을

감안한 기술이 DIGE 방법인데, 두가지의 형광염색약을 이용하는 방법이다. 그러나, 이 방법은 매우 고가의 방법이어서 많이 사용되고 있지 못하다.

## 제 7 장 참고 문헌

1. Williamson, B., Johnston, D.J., McNicol, R.J., Romannathan, V. and James, E.K. 1992. Quiescence and grey mold in raspberries. Annual Report Scottish Crop Research Institute. pp. 70-72
2. Jarvis, W. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. Can. Dep. Agric. Monogr. 15, Harrow, Ontario, Canada.
3. Edlich, W. and Lyr, H. 1992. Target sites of fungicides with primary effects on lipid peroxidation, in "Target sites of fungicide action" (Köller, W.Ed), pp. 53-68. CRC Press, Boca Raton FL.
4. Pommer, E.H. and Lorenz, G. 1995. Dicarboximide fungicides in "Modern selective fungicides; properties, application, and mechanism of action" (Lyr, H.Ed). pp. 99-118, Gustav Fisher Verlag, Jene.
5. Grindle, M. 1979. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology 111: 109-120
6. Grindle, M. 1981. Variation among field isolates of *Botrytis cinerea* in their sensitivity to antifungal compounds. Pesticide Science 112: 305-312
7. Vermeulen, T., Schoonbeek, H. and Manten A De Waard. 2001 The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. Pest Management Science 57: 393-402
8. Catska, V., Afifi, A.F. Vancura, V. 1975. The effect of volatile and gaseous metabolites of swelling seed on germination of fungal spore. Folia Microbiol. 20: 152-156
9. Shimoni, M., Reuveni, R. and Ravid, U. 1993. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by essential oils. Hasedot 74: 306-308
10. Wilson, C.L., Franklin, J.D. and Otto, B.E. 1987. Fruit volatiles inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Disease. 71: 316
11. Movahedi, S. and Heale, J. 1990. Purification and characterization of an

- aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers in culture and in infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 289-302.
12. Touzani, A., Mura, J. P., and Doneche, B. 1994. Effect of pool enzymatique exocellulaire de *Botrytis cinerea* sur les cellules de *Vitis vinifera*. Application a la pellicule du raisin. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 28: 19-31.
  13. Leone, G., Schoffemeer, A. 1983. Single step chromatographic purification and characterization of the endopolygalacturonases and pectinesterases of the fungus, *Botrytis cinerea* Pers. *Physiol. Plant Pathol.* 22:1-13.
  14. Salinas, J., Warnnar, F., and Verhoeff, K. 1986. Production of cutin hydrolyzing enzymes by *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 116:299-307
  15. Agrios, G. N. 1988. *Plant pathology* (3rd ed.). Academic press Inc., New York.
  16. Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
  17. Bateman, D. F. and Basham, H. G. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. *In* : *Encyclopedia of plant physiology* Vol. IV, physiological plant pathology (Heitefuss, R. and Williams, P. H. Ed.) pp.316-355. Springer-verlag, Berlin.
  18. Bonnet C., Perret, E., Dumont, X., Picard, A., Caput, D., and Lenaers, G. (2000) Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast* 16 : 23-33
  19. Choi, I.S., Kim, D.H., Lee, C.W., Kim, J.W., and Chung, Y.R. (1998) Analysis of genetic variations in *Botrytis cinerea* isolates using random amplified polymorphic DNA markers, *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 490-496
  20. Cooper, R. M. and Wood, R. K. S. 1975. Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* 5 : 135-156.
  21. Kim, B.Y., Lee, T.H., Rha, E., Chung, Y.R., Lee, C.W., and Kim, J.W. (1997) Purification and Characterization of Endo-polygalacturonase Produced by Plant Pathogenic Fungus, *Botrytis cinerea*, *Kor. J. Mycol.* 25, 340-349

22. Kim, J.J., Kim, J.W., Lee, C.W., and Chung, Y.R. (1997) Relationship Between Pathogenicity and Activities of Polygalacturonase, Laccase, and  $\beta$ -Glucosidase Produced by *Botrytis cinerea*, *Kor. J. Plant Pathol.* 13, 225-231
23. La, Y.J., Kim, J.W., Chung, Y.R., Huh, N.E., and Cho, K.Y. (1994) Partial Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Plant Pathol.* 10, 215-221
24. Lee, T.H., Kim, B.Y., Lee, S.Y., Chung, Y.R., Lee, C.W., and Kim, J.W. (1997) Purification and characterization of an Exo-polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. *J. Microbiol.* 35, 134-140
25. Jung, O.J., Lee, E.J., Kim, J.W., Chung, Y.R., and Lee, C.W. (1997) Identification of putative phosphoinositide-specific phospholipase C genes in filamentous fungi. *Mol. Cells* 7, 192-199
26. Aguilar, G. and Huitron, C. 1987. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enz. Microb. Technol.* 9 : 690-696.
27. Jones, T. M., Anderson, A. J., and Albersheim, P. 1972. Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Physiol. Plant. Pathol.* 2 : 153-166.
28. Johnston, D. J. and Williamson, B. 1992. An immunological study of the induction of polygalacturonases in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microb. Lettes* 97 : 19-24.
29. Johnston, D. J. and Williamson, B. 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 96 : 343-349.
30. Magro, P., Di Lenna, P., Marciano, P., and Pallavicini, C. 1980. Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in *Botrytis cinerea* isolates. *J. Gen. Microbiol.* 120 : 105-109
31. Hagspiel, K., Haab, D. P., and Kubicek, C. P. 1989. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 61-67