

稻熱病菌의 核學的 研究

李 始 鍾* · 沈 在 燮* · 李 銀 鍾*

Studies on the nuclear cytology of *Pyricularia oryzae* CAV.

S. C. Lee · J. S. Shim · E. J. Lee

SUMMARY

Results obtained from the observation of 1,000 matured resting conidia of *Pyricularia oryzae* CAV. were as follows.

The percentage of a conidium containing mononucleus was 95.5, while that of a multinucleate conidium was 4.5. Formation of the three-celled mature conidium containing a nucleus in each cell, which was derived from the immatured conidium, could be recognized.

Chromosomes could be observed in the conidium when the nuclear division took place. The number of chromosomes was $n=3, 4, 5$ or 6 but the majority was 5.

The nucleus was moved into the germ-tube from the conidium by following ways:

(a) a resting nucleus divided into two nuclei in the conidium and one of them was moved into the germ-tube.

The other nucleus remained in the conidium (43 per cent);

(b) a nucleus was moved into the germ-tube from the conidium without nuclear division (57 per cent).

The appressorium without a nucleus was abundantly observed when stain was made. However, the number of a mononucleate appressorium was 476 out of 500 appressoria which had nuclear sap.

On the ground of this experiment, we could support the conidium of blast fungus contained mononucleus and also homokaryon seemed to be appeared on the conidia even though those were multilocular. As the results, it could be concluded that use of inoculum derived from single spore isolate was reasonable for any experiments in the rice blast fungus.

I. 緒 論

稻熱病菌은 自然狀態下에서나 培養 中에 많은 變異를 일으키며, 單孢子分離菌을 培養할 때에도 生理的 또는 形態的인 性質 그리고 病原性的 變異體가 생긴다는 것은 이미 알려진 사실이다.

稻熱病菌의 分生子孢子는 普通 3細胞로 構成되어 있으며, 各細胞가 全部 發芽能力을 가지며, 附着器를 形成하고 侵入菌絲를 낼 수 있다. 그러므로 各細胞가 含有한 核들이 遺傳的으로 同質인지 아닌지를 밝히는 것은 單孢子分離菌의 變異性을 追究하는 데 重要한 問題點이 될 것이다.

이에 關한 研究로는 1953年 以來 山崎^(13,14,15,16,17)

와 鈴木^(8,9,10,11,12)의 單核說과 多核說이 各各 論議되어 오다가 1964年 新關⁽⁶⁾에 依하여 單核을 含有한다는 것이 거의 確고하여진 듯하지만 本人等은 韓國產 稻熱病菌을 供試하여 核의 行動을 觀察해서 單核인지 多核인지를 確認하고 稻熱病菌의 生理型에 關한 研究 및 稻熱病에 對한 水稻品種의 抵抗性에 關한 研究等 諸般 試驗에 應하고자 한다.

II. 研 究 史

稻熱病菌의 核에 關한 研究로는 먼저 山崎와 鈴木의 報告를 들 수 있다. 鈴木^(8,9,10,11,12)는 稻熱病菌은 分生子孢子·菌絲·分生子梗·附着器等의 各細胞에 多數의 核을 含有하고 있어서 Heterokaryosis를 보여 주며,

*農村振興廳 植物環境研究所: Institute of Plant Environment, O. R. D.

單孢子分離菌일지라도 Heterokaryon 이 있다고 하였다.

이에 反하여 山崎^(13,14)는 稻熱病菌은 全生活環을 통하여 1細胞에 1核을 가지는 것을 原則으로 한다고 말하였다.

그 후 水澤⁽⁵⁾는 電子顯微鏡으로 1細胞중에 1核이 存在함을 밝혔다.

또 山崎·新關^(15,16,17)의 單核說에 反論하여 鈴木는 單일 各細胞가 單核이라면 單孢子分離菌은 Homokaryon 이라야 하며 生理的 特性이나 病原性에 關한 變異는 性過程에 依한 交雜을 除外하고는 發生하지 않을 것이라고 하였으나 新關는 鈴木가 Hetero型이라고 하는 稻熱病菌 3系統을 분양받아 菌絲細胞의 核數를 調査하여 본 結果 單核이었다고 하며, 이러한 理由는 核染色 技術의 差異라고 주장하였으며 분양받은 3系統은 多核細胞가 많은 特殊系統으로서 그 比率는 最高 17%(多核率)이었다고 한다.

Ⅲ. 材料 및 方法

供試菌株는 wh 65-421 로서 감자·寒天培地에서 10日間 暗培養한 後 全體를 벗길煎汁培地에 移植하여 螢光箱에서 3~4日間 光培養하여 많은 胞子를 얻을 수 있었다.

染色方法은 예비시험에서 ① Giemsa's Solution 法 ② Aceto-Orcein 法 ③ Aceto-Carmin 法 ④ Basic Fuchsin 法(1,2) ⑤ Feulgen's reaction 에 依한 Basic Fuchsin 法 ⑥ Hematoxylin 法 등 여러가지 方法을 使用했

으나 Aceto-Orcein 과 Giemsa's Solution 에서만 核을 染色할 수 있었다. 本試驗에서는 染色이 잘 되는 Aceto-Orcein 法을 使用하였는데, 前培養과 後培養을 거친 Petri-dish 의 菌叢으로부터 卵白알부민을 얇게 바른 25 mm×25 mm 의 Cover-glass 로서 가볍게 눌러 胞子를 찍어서 Farmer's Solution(純알코올 3 : 水酢酸 1)에서 固定시킨 後 1 N 의 HCl 에 加水分解시키고 酢酸 Orcein 으로 染色시켜 觀察하였으며, 菌絲·未熟胞子·成熟胞子 등의 休止狀態의 核과 發芽管 및 附着器를 形成시켜 分裂 중인 核을 觀察하였다.

酢酸 Orcein 染色方法

- (1) 純알코올 3+水酢酸 1 에 固定 1~3時間
- (2) 95% 알코올 5~10分
- (3) 殺菌증류수로 3~4 회 水洗
- (4) 1 N HCl 20°C 에서 5分
- (5) 1 N HCl 60°C 에서 7~8分
- (6) 殺菌증류수로 3~4 회 水洗
- (7) 加溫하면서 酢酸 Orcein 에 染色하여 봉합제로 封한다.

Ⅳ. 結 果

1. 休止狀態의 核

菌絲·分生胞子·分生子梗·發芽管·附着器等에서 多數의 細胞가 1核을 가지는 것을 觀察할 수 있었다.

表 1 은 分生胞子內의 核을 觀察한 成績인데, 休止狀態에서는 單核이 95.5% 로서 單核說을 認定할 수 있었다.

Table 1. Number of nucleus in each cell at matured conidium in *Pyricularia oryzae*.

	Number of nucleus			No. of conidia observed	Total	Percentage
	Apical cell	Central cell	Basal cell			
Type of uni-nucleus	1 —	1 —	1	108	955	95.5
	1 —	1 —	0	77		
	1 —	0 —	1	42		
	0 —	1 —	1	72		
	1 —	0 —	0	176		
	0 —	1 —	0	286		
	0 —	0 —	1	191		
	0 —	0 —	0-1	1		
	1 —	0 —	0-0	1		
	0 —	1 —	0-1	1		
	1 —	0 —	2	1		
	0 —	0 —	2	5		
	1 —	2 —	1	3		
	2 —	0 —	0	11		

Type of multi-nuclei	1 —	1 —	2	5	45	4.5
	1 —	2 —	0	1		
	0 —	2 —	1	3		
	1 —	2 —	2	1		
	2 —	1 —	0	2		
	2 —	0 —	1	3		
	1 —	0 —	2	1		
	2 —	1 —	1	1		
	0 —	2 —	0	1		
	0 —	1 —	3	2		
	1 —	3 —	1	2		
	3 —	0 —	0	1		
	2 —	2 —	3	1		
	2 —	0 —	3	1		
	Total	28 types		1,000		

Note: 2 out of 5 conidia was observed had chromosomes in central cell ($n=5$).


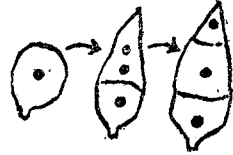


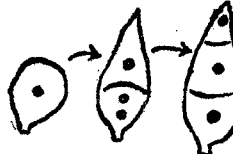



2. 分裂 중인 핵

(1) 핵 분열과 隔膜의 形成

分裂 중인 핵의 觀察은 未熟孢子인 1 隔膜 2 細胞의

것을 觀察調査하였다. 分裂 중인 染色體는 後에 2 核을 이루게 되며 이들 2 核은 隔膜을 만들어 各各 1 核으로 分離되는 것을 意味하므로 各 細胞의 形成順位를 決定지을 수 있다. 表 2 에서 보는 바와 같이 細胞의 形成過程이 下端細胞→中央細胞→上端細胞로 되는 것이

Table 2. Nuclear division and formation of septum.

Forms of division		Number of conidia observed	Total	Remarks
Nuclear division in an apical cell		4	27	
		23		
Nuclear division in a basal cell		3	3	
		0		
Nuclear division in both cells		4	4	
Total		34	34	

(사진 I~e) 27 개인데 비하여 上端細胞→中央細胞→下端細胞의 순서로 形成되는 것은(사진 I~f) 3 개를 觀察하였다.

그리고 1 個의 隔膜을 中心으로 兩方間으로 各各 進行하는 4 細胞의 경우도 觀察할 수 있었다. 그러나 大部分의 孢子가 下端細胞에서 上端細胞로 形成됨을 알






수 있다. 핵 분열하여 나타난 染色體數는 경우에 따라서 3, 4, 5, 6 個로 觀察되었으나 $n=5$ 개가 가장 많이 볼 수 있었다(사진 I~d).

(2) 發芽管으로의 핵移動

成熟孢子가 發芽管을 形成할 때 핵은 一般적으로 孢子의 細胞壁 가까이에서 머물러 있다가 發芽管이 뻗으면

Table 3.

Ways of nuclear movement into germ tube.

Form	Number of conidia observed	Percentage	Remarks
A 	123	57.2	Moved into germtube without nuclear division
B 	79	36.7	Resting nucleus divided and one of them moved into germ-tube
C 	11	5.1	Nucleus divided and one moved into germ-tube, the other divided
D 	1	0.5	Resting nucleus divided two times and one of them moved into germ-tube
E 	1	0.5	Resting nucleus divided and two nuclei moved into two germ-tubes
Total	215	100	

서 핵이 이동하는 것을 볼 수 있고 大部分의 이동핵은 發芽管의 最頂端에 位置해 있음을 사진 II~a, II~b 에서 보여 주고 있다.

表3에서 보는 바와 같이 핵이 發芽管으로 이동하는 경우는 大別하여 2가지 방법으로 나누어진다. 첫째는 休止狀態에 있던 핵이 分裂하지 않고 바로 발아관으로 이동하는 것이 있고(A型 57%)(사진 II~a), 둘째로는 핵이 일단 分裂한 後 發芽管을 내고 이동하는 것이 있다(B, C, D, E型 43%)(사진 II~b). 一般적으로 1細胞는 1個의 發芽管을 내는 것이 많고 生長途中에 여러 개의 分枝를 形成하기도 하지만 最初 2個 以上の 發芽管을 形成하는 경우도 있다. 이 경우 핵은 兩쪽 發芽管으로 各各 移動한다.

(3) 附着器內의 핵

Table 4. Number of nucleus in an appressorium in *Pyricularia oryzae*.

Number of nucleus	No. of appressoria observed	Percentage
1	480	96.0
2	0	0.0
3	9	1.8
4	4	0.8
5	7	1.4
Total	500	100

Note: 4 out of 480 appressoria observed had chromosomes ($n=5$).

附着器內의 핵을 觀察하기 위하여 25 mm×25 mm Cover-glass 에 附着시킨 胞子를 28°C 에 24時間 水中에 넣어 附着器를 形成시켰다. 附着器 形成率은 100% 였으며, 表4에서 보는 바와 같이 附着器內의 핵數는 單核이 95.2% 였고(사진 II~d) 나머지 多核으로 나타난 것과 染色體를 가진 것이 4.8% 였다(사진 II~e).

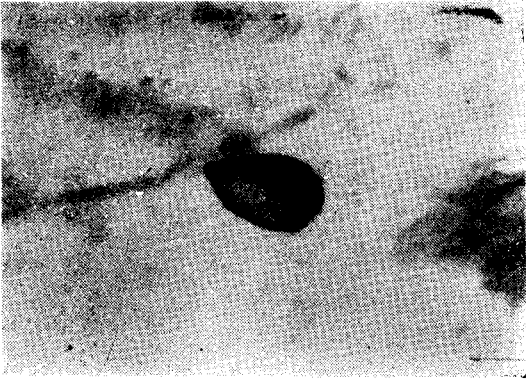
以上の 結果로 보아 稻熱病菌의 핵은 多少 多核을 發見할 수 있었으나 菌絲와(사진 II~e)·分生胞子·發芽管·附着器內에서 單核을 認定할 수 있으며, 全生活環을 通하여 單核을 갖는다고 主唱한 山崎·新關의 研究報告를 再確認한 셈이다.

V. 考 察

多細胞로 이루어진 稻熱病菌을 그의 生活環을 通하여 핵의 行動을 觀察하여 單核인지 多核인지를 밝힌다는 것은 單細胞分離菌이 遺傳적으로 純系로서 모든 實驗에 通用될 것인지 또 나아가서는 變異現象의 機構를 解明할 수 있는 重要한 問題點이 되는 것이다. 單細胞分離菌의 原意는 單細胞分離菌에서 출발한 것이다. 單核을 가진 單胞子가 遺傳적으로 同一하다는 것을 確認하지 않고는 單胞子分離菌을 遺傳研究의 材料로서 供試할 수 없는 것이다.

多核을 含有한다는 것은 異種의 핵이 混合되어 있으므로 이의 單胞子分離菌도 容易하게 變異를 일으킬 수

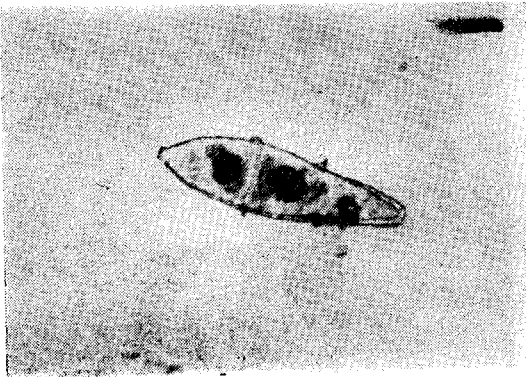
Plate I.



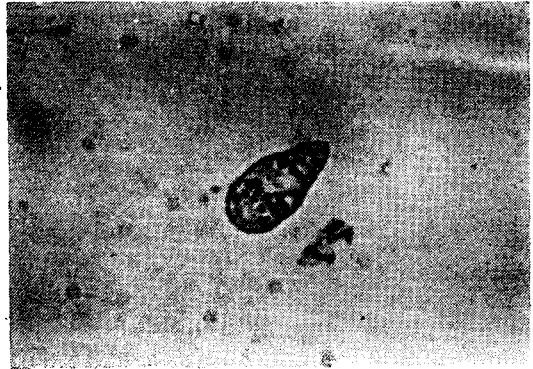
a. The conidium consists of one cell with mononucleus.



b. The conidium consists of two cells with mononucleus.



c. The conidium consists of three cells with mononucleus.



d. The conidium under nuclear division showing chromosomes.

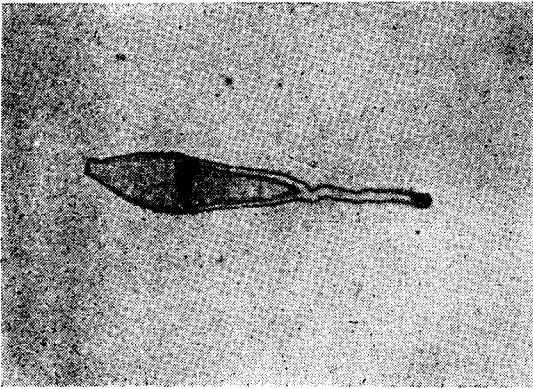


e. Nuclear division in an apical cell.

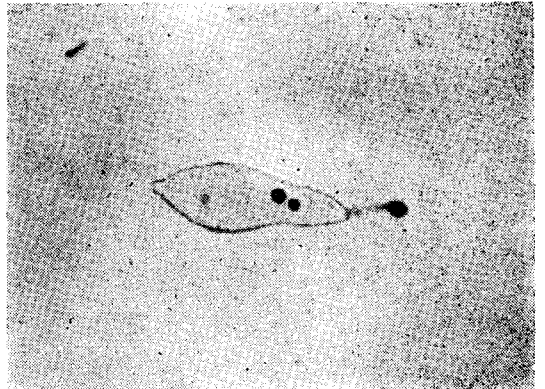


f. Nuclear division in a basal cell.

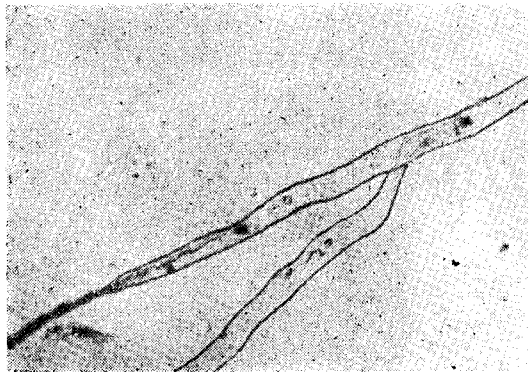
Plate II.



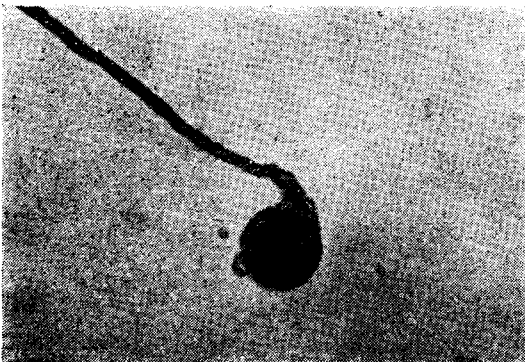
a. Movement of a nucleus into the germ-tube without nuclear division.



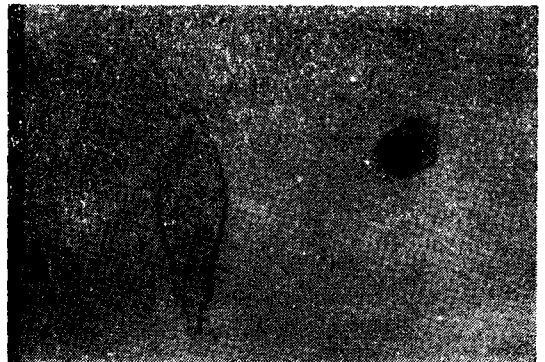
b. Movement of a nucleus into the germ-tube after nuclear division.



c. Mycelium showing a nucleus in each cell.



d. An appressorium contained a nucleus.



e. An appressorium contained five nuclei.

있다고 볼 수 있다. 그러나 本試驗의 結果 分生胞子の 形成過程은 分生子梗 先端에 最初 1細胞 1核의 胞子が 생겨서 그 核이 分裂하여 2細胞의 胞子が 되고 그 先端細胞의 核이 分裂하고 隔膜이 생겨 3細胞의 成熟胞子が 됨을 認定할 수 있었다.

鈴木^(8,9)는 胞子が 양쪽 方向으로 形成된다고 하였으나, 關省吾·平田幸治⁽⁷⁾ 양인과 山崎·新關^(15,16,17)는 本試驗의 結果와 같이 先端細胞 쪽으로 形成됨을 밝힌 바 있다. 이와 달리 Goto⁽³⁾는 胡麻葉枯病菌과 같이 多核인 菌絲細胞·分生胞子를 가지며, 따라서 多細胞인 稻熱病菌은 單胞子分離의 意義가 없다고 볼 수 있다. 그러나 本試驗에서는 稻熱病菌은 全生活環에 通하여 菌絲·分生子梗·分生胞子·發芽管·附着器 등의 各細胞에서 單核을 認定할 수 있었으며, 이에 對한 報告로서는 鈴木^(8,9,10,11) 및 鈴木等⁽¹²⁾은 稻熱病菌이 全生活環을 通하여 多核細胞를 갖는다고 主張하였으며, Hetero型이 있다고 보고 稻熱病菌 變異의 原因은 Heterokaryon이 主要役割을 한다고 하였다. 이에 反論하여 山崎^(8,9)·水澤⁽¹⁰⁾·新關⁽⁶⁾ 등은 多核이라 함은 核染色技術의 問題라고 指摘하고 1細胞는 1核을 가짐을 原則으로 한다고 主張하였다. 鈴木⁽¹¹⁾는 山崎·新關^(15,16,17)의 研究에 反論하여 單胞子分離菌이 Homo型이라면 有性世代가 發見되지 않은 이 菌類가 많은 變異를 性過程의 交雜에 依하여야 될 것이 아니냐고 하였으나, 新關⁽⁶⁾이 核染色技術의 잘못임을 밝혔다.

本試驗에서도 核染色으로서 單核임을 確認할 수 있었다. 新關가 使用한 核染色法에서는 Giemsa's Solution이 가장 잘 着色되었다고 하였으나 本試驗에서는 오히려 Aceto-Orcein이 染色이 잘 되어 主로 이 方法을 使用하였다.

染色하여도 核이 없는 細胞가 많이 發見되었는데, 理由는 알 수 없었다.

染色體의 배열과 數의 觀察에 對하여 山崎⁽¹²⁾는 $n=3$ 程度다 하였고 鈴木⁽¹¹⁾는 Homokaryon에서는 $n=3\sim4$ 개이고 Heterokaryon에서는 $n=2, 3, 4, 5$ 個가 含有되어 異數性이 存在한다고 하였다.

新關⁽⁶⁾는 有絲分裂에 있어서 染色體數를 결정하는 것은 困難한 일이며, 主로 $n=6$ 個로 認定되나 간혹 $n=5$ 個가 나타난다고 하였다. 本試驗에서는 $n=3, 4, 5, 6$ 個로 觀察되었으나 $n=5$ 가 가장 많이 나타났다. 染色體와 核分裂에 따른 遺傳的인 究는 繼續하여야 하겠다.

VI. 摘 要

休止狀態에 있는 成熟한 稻熱病菌 胞子 1,000 個를

觀察한 結果 各細胞에 單核을 가지는 胞子比率이 95.5%로 단연 많았고 또 未熟胞子인 1細胞 1核 胞子로부터 출발하여 3細胞 3核인 成熟胞子が 形成됨을 관찰할 수 있었다.

分裂 중인 核은 배열된 染色體로서 관찰할 수 있었으며, 染色體數는 $n=3, 4, 5, 6$ 個로 나타났으나, $n=5$ 個가 가장 많았다.

核이 發芽管으로 移動하는 方法은 첫째로 休止狀態에 있던 核이 分裂하여 2核이 되고 그 중 1核이 發芽管에 移動하고 1核은 細胞內에 머무는 것과(43%), 둘째 方法은 核分裂 없이 直接 細胞內의 1核이 發芽管을 따라 移動하는 것들이(57%) 있다.

또 附着器內의 核을 染色하여 觀察한 結果 無核의 附着器가 相當히 많았으나 核質을 가진 500 個의 附着器 중에 單核이 476 個로서 95.2%였다(Chromosome으로 관찰된 4 附着器는 除外).

以上の 結果로서 稻熱病菌은 全生活環을 通하여 單核을 含有한다는 것을 認定할 수 있으며, 稻熱病菌胞子が 多細胞일지라도 Homokaryon이라고 생각되므로 單胞子分離菌을 稻熱病에 關한 모든 試驗에 供試하는 것은 合當하다고 할 수 있다.

VII. 引用文獻

- 1) de LAMATER; E. D. (1948 a) Basic Fuchsin as a nuclear stain for fungi. Mycologia 40: 423-429.
- 2) ————— (1948 b) The nuclear cytology of *Blastomyces dermatitidis*. Mycologia 40: 430-444.
- 3) GOTO, I (1954) Studies on the leaf spot of the rice plant. (6) Observation on the nuclear phenomena in the causal fungi (1). Bull. Yamagata Univ. (Agric. Sci.) 2: 23-30.
- 4) 後藤和夫 (1956) イモチ病菌に於ける系統檢定. 日本植物病理学会報 21:139-142.
- 5) 水沢芳名 (1959) いもち病菌分生胞子の超薄切片による電子顯微鏡像. 植物防疫 13:17-18.
- 6) 新關宏夫 (1964) いもち病菌の變異現象に對する核學的ならびに遺傳學的的研究. pp. 1-95.
- 7) 関省吾·平田幸治 (1960) いもち病菌分生胞子の胞の性状について. 日植病報 25:136-141.
- 8) 鈴橋雄 (1953a) 稻熱病菌の系統について. 植物防疫 7:195-199.
- 9) ————— (1953b.) 稻熱病菌の生態的分化現象に關する研究. 第6報 ヘテロカリオシス. 日植病報 17:

- 167.
- 10) ———(1953 c.) 稻熱病菌の生態的分化現象に関する研究. 第7報ヘテロカリオシス(その 2). 日植病報 18:73.
- 11) SUZUKI, H. (1963) Origin of variation in *Piricularia oryzae*. A paper to be presented at the Symposium on Rice Blast Disease at the International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines July 7-12, 1963, paper F. pp. 72.
- 12) 鈴木橋雄・田村友一・土志田武. (1955.) 稻熱病菌の生態的分化現象に関する研究. 第10報ヘテロカリオシス(その 4) 日植病報 20:37.
- 13) 山崎義人(1953 a.) 稻熱病菌の核学的研究(予) 育種雑 3:59-60.
- 14) ——— (1953 b.) イモチ病菌の遺伝学的研究 VII. 核学的研究補遺. 遺伝雑 28:192.
- 15) 山崎義人・新関宏夫(1954) イモチ病菌の遺伝学的研究 VIII. 菌糸細胞核数の系統間差異・遺伝雑 29:183
- 16) ——— (1959) 稻熱病菌の核学的研究(第1報) 日植病報 24:4.
- 17) ———. 1960 稻熱病菌の核学的研究(第2報) 日植病報 25:4.