

## Aspergilli에 寄生하는 *Penicillium rugulosum*에 對하여

李培咸·蔡熙秉·李馥權·沈聖輔

建國大學校 生物學科

### *Penicillium rugulosum* Parasite on Aspergilli.

Bae-Ham Lee, Hee-Byung Chai, Bok-Kwon

Lee and Sung-Bo Sim.

Dept. of Biology, Kon Kuk Univ. Seoul, Korea.

**Abstract:** In the studying of Mycoparasitism both the Host and Parasite were identified and the course of growth were investigated.

Its pathological histology and anatomical structure under the optic and electron microscope are reported in this paper.

The reciprocal relationships between these organisms are summarized as follows;

1. Strains of Host and Parasite were identical with *Aspergillus niger* and *Penicillium rugulosum* respectively.
2. The Parasite was proved to parasitize on the sterigmata of host.
3. In the process of parasitism, cytological contents of host were getting lost.
4. Growing on Synthetic medium, the parasite proved to the nonobligate.

### 緒論

植物病學의 開祖 de Bary(1865, 1870)는 *Mucor*에  
불는 *Piptocephalis freseniana*와 흰가루병균에 불는  
*Cicinobolus cesatii*를 真菌寄生으로 記載한 후  
Brefeld (1872)에 의해 *Piptocephalis freseniana*의  
生活史와 haustorium의 觀察結果를 報告하였다.

寄生 Mucorales는 Tieghem (1875)에 의해 研究되었으며 *Trichothecium roseum*는 whetzel (1909)에  
의해 편성기생으로 처음 報告되었다. 이것은 Mycoparasite의 初期文獻에 지나지 않으며, 그후 真菌에  
真菌이 寄生하는 것이 認識되어 많은 研究者들이 宿主-寄生菌 關係의 病理解剖學的 樣相과 宿主와 寄生  
菌의 同定結果가 報告되어 왔다.

Emmons (1930)의 *Cicinobolus cesatic*의 細胞學的研究와 Ayer (1933, 1935)의 *Dispira cornuta*의 營養學的研究는 最近 生理的 研究의 基礎가 되었으나  
이것은 再檢討의 必要性이 있다고 생각된다.

真菌에 真菌이 寄生하는 것에 대한 研究結果를 보

면 Barnett (1964)는 Mycoparasitism에 對하여, Berry (1959)는 *Mucor* spp.에 寄生하는 *Piptocephalis virginiana*, Armentrout와 Wilson (1956)은 *Mycotypha microspora*에 寄生하는 *Piptocephalis virginiana*에 對하여 觀察 報告한 바 있으며, 그 외에도 Berry 와 Barnett (1957), Manocha 와 Lee (1971), 橋岡 (1974)에 의하여 研究 報告된 바 있다.

Raper와 Thom (1949)는 *Penicillium rugulosum*, *Penicillium purpurogenum*이 *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavus*에 寄生하여 宿主를 破壊할 수 있음을 記載하였으며, Romankova (1936)는 *Aspergillus niger*에 *Penicillium rugulosum*이 寄生하는 것을 報告하였다.

Smith (1954)도 *Aspergillus niger*에 *Penicillium rugulosum*이 寄生하는 것을 記載하고 있으며, Tatarenko (1959)는 *Aspergillus niger*에 *Penicillium* sp.가 寄生하는 것을 報告하였다.

이에 筆者는 *Aspergillus* sp.와 이에 寄生하는 *Penicillium* sp.를 實驗材料로 하여 宿主와 寄生菌을 分類 同定하고 成長過程을 觀察, 病理組織學의 및 解

剖學的構造를 光學 및 電子顯微鏡을 통하여 宿主一寄生菌의 相互關係를 究明한 結果를 報告한다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### (1) 實驗에 使用된 菌株

本 實驗에 使用된 菌株로는 식빵에서 分離 保管 중인 *Aspergillus* sp.에 *Penicillium* sp.가 寄生하고 있는 菌株를 使用하여 本 實驗을 實施하였다.

#### (2) 實驗에 使用된 培地

本 實驗에 使用된 培地는

##### 1) Czapek's Dox Agar

Saccharose.....	30gm
Sodium Nitrate .....	3gm
Dipotassium Phosphate .....	1gm
Magnesium Sulfate .....	0.5gm
Potassium Chloride .....	0.5gm
Ferrous Sulfate .....	0.01gm
Agar .....	15gm
Distilled Water .....	1,000ml

##### 2) Malt Extract Agar

Malt extract.....	25gm
Agar .....	15gm
Distilled water .....	1,000ml

를 使用하였다.

### 2. 實驗方法

#### (1) 供試菌株의 培養

Czapek's Dox Agar와 Malt Extract Agar Plate中央에 “ㄱ”字 백금구로 *Penicillium* sp.가 寄生하고 있는 *Aspergillus* sp.의 胞子를 接種, 24~26°C에 培養하여 成長과 形態 및宿主-寄生菌과의 相互關係를 觀察하였으나, 解剖顯微鏡( $\times 40$ ) 하에서 *Aspergillus* sp.에 寄生하고 있는 寄生菌의 胞子를 白金線 끝에 Agar를 둘러 떼어내는 Berry와 Barnett (1957)의 方法에 의해 分離하였으며, Plate상에서 아직 寄生되지 않은 *Aspergillus* sp.의 胞子를 떼어내어 保管하였다(附圖 1).

#### (2) 試料의 採取 및 電子顯微鏡的 方法

使用한 菌株은 Czapek's Dox Agar와 Malt Extract

Aagr Plate에 接種 24~26°C에서 7~10日 동안 培養하여 그 菌體를 採取하였다.

上記 採取한 試料를 0.1M Phosphate buffer로 緩衝된 4%에 glutaraldehyde에 0~4°C에서 4時間 以上 固定한 후 上記 緩衝液으로 洗滌하여 다시 上記 緩衝液으로 緩衝된 1% Osmium tetroxide에서 2時間 固定을 行한 후 Ethanol濃度 上昇 順으로 脱水를 行하고 Epon 812에 포xae하였다.

Sorvall MT-2B型 Ultramicrotome으로 Glass knife를 使用하여 초박절편을 만든 후 Uranyl acetate와 Lead citrate로 2중 染色하여 Hitachi HV-11E型 電子顯微鏡으로 75Kv에서 觀察하였다.

#### (3) 分離菌株의 分類 同定

##### 1)宿主菌의 同定

保管中인 *Aspergillus* sp.의 胞子를 Czapek's Dox Agar와 Malt Extract Agar Plate에 接種하여 24~26°C에서 培養함과 동시에 Slide culture를 實施하여 菌의 形態를 觀察하였다.

Colony의 形態 및 發育速度, Conidial head의 크기 및 形態, Vesicle의 크기 및 形態 등을 觀察하여 Raper와 Fennell (1965)의 分類 方法에 따라 分類同定하였다.

##### 2) 寄生菌의 同定

*Penicillium* sp.의 胞子를 上記 方法에 의해 培養, Slide culture를 實施하여 菌의 形態를 觀察하였으며 Colony의 形態 및 發育速度, Conidiophore의 크기 및 形態 Metulae의 數와 크기, Conidium의 形態 및 크기 등을 觀察하여 Raper와 Thom (1949)의 分類方法에 따라 分類同定하였다.

## 結 果

### 1.宿主와 寄生菌과의 相互關係 및 成長과 形態 觀察

Czapek's Dox Agar Plate에 *Penicillium* sp.가 寄生하고 있는宿主의 胞子를 接種하여 24~26°C에 培養한 후 5~6日 후,宿主 colony의 直徑은 約 3.2cm程度 繁殖될 때 中心部分에서 light green 색깔의 寄生菌胞子가 나타나는 것을 肉眼으로 觀察하였으며, 절차寄生되어 나가기始作하여 寄生菌이 나타나기始作한 7일 후의 colony의 直徑은 約 1.3cm였으며,宿主의 colony直徑은 約 4.3cm였다(附圖 2).

寄生菌이 寄生되어 가는 speed는 寄生菌이 나타나기始作한 후부터 1~4일간은 1일에 0.2mm의 speed로寄生되어 가다가 時間이 지남에 따라 寄生 speed가 늦어지는 것을 觀察하였다.

光學顯微鏡(>60)으로 *Penicillium* sp.가宿主에寄生되어 있는 것이 觀察되었으며, 寄生되는過程은寄生菌의 胞子에서 germ tube가 나와 아직寄生되지 않은宿主의 conidial head쪽으로伸長하여接着한 후細胞內로侵入하는 것으로 생각되어, 約 24時間 후에 germination되는 것을 观察하였다(附圖 3).

分離한二菌의二點培養에 의해二菌이 서로接한 후, 寄生菌이宿主로寄生되어 가는 것을 观察하였다.

時間이經過할수록宿主는寄生菌에 의해 뒤덮혀지며, 肉眼으로나光學顯微鏡으로宿主를觀察하기 힘들었으며, 約 6個月 후에宿主는 거의 볼 수 없는狀態로된다.

Plate上에서 아직寄生되지 않은部分에서宿主의胞子를 떠내어反復培養하였지만寄生菌은 나타나지 않았으며, 이런方法에 의해純粹하게宿主를分離해낼 수 있었다.

Malt Extract Agar Plate에서는宿主나寄生菌이 Czapek's Dox Agar에서 보다 colony의形成이叢生하는 것以外에는별다른差異點을 찾아볼 수 없었다.

## 2. 電子顯微鏡에 의한 觀察

### (1)宿主細胞의 微細構造

核內의形質은比較的밝고,核小體는 한쪽으로치우쳐 있으며,核은二重膜으로된核膜으로둘러쌓여있어細胞質과區分되어있음이觀察되었다.

Mitochondria는細胞質全體에散在해 있고,高等動・植物에서와같이 Cristal를 볼 수 있다.

原形質膜이外部에存在하는透明한細胞壁을觀察할 수 있으며,直徑은0.1~0.17μ이었으며細胞壁外部에는filament樣構造가둘러쌓여있으며,直徑은0.6~0.62μ이었다.

細胞質外緣部에서Lomasome을 볼 수 있었다(附圖4).

### (2)宿主와寄生菌의相互關係

培養7~10日中選澤한宿主에서 다음과같이寄生菌과의相互關係를 나타내었다.

寄生菌의 Haustorium이宿主의細胞內로侵入하자宿主의細胞內液胞가크게나타났으며,細胞壁이瓦解된것이觀察되었다(附圖5,6).

Haustorium의尖端部分은 다른部分에比해濃度가濃厚하게나타나며,Septum을形成,宿主의細胞營養物을寄生菌에옮겨주는中間役割을하는Sheath構造와Sheath membrane을볼수있다(附圖7).

侵入후時間이많이經過한狀態로宿主의細胞內容物이없어져透明하게보이며,外緣部에서엷은filament樣構造를볼수있다(附圖8,9).

宿主의細胞內로侵入하기前의狀態로細胞壁에寄生菌의hyphae가接着되어있으며細胞壁이나內容物이健全한狀態로있다(附圖10).

## 3. 分類同定

### (1)宿主菌의同定

Czapek's Dox Agar Plate에서24~26°C, 12~14日間培養한 colony의直徑은3.2cm였으며흰basamycelium이 많았고Zone을形成,前面의색깔은黑色이고,後面은흰색이며주름은없었다.

Table 1. Morphology of *Aspergillus* sp.

Conidial head	Color	Black
	Shape	Globese
	Size	500~600μ
Conidiophores	Color	Colorless or brownish
	Marking	Smooth
	Length	2~2.5mm
	Width	10~15μ
Vesicle	Color	Yellowish brown
	Shape	Globose
	Size	50~60μ
	Origine	Substratum
Sterigmata		Two
Primary sterigmata	Color	Brownish
	Length	40~45μ
	Width	6.0~7.0μ
Secondary sterigmata	Length	7.0~9.0μ
	Width	4μ
Conidia	Color	Coffee
	Form	Globose
	Size	3.5~4.5μ

Malt Extract Agar Plate에서 24~26°C, 12~14日間培養한 colony는 直徑이 6.3cm이고, carbon black이며 後面은 無色에서 黃色으로 變하였다.

Czapek's Dox Agar에서 보다 mycelium의 發育이 적고 Sporulation이 많고 conidial head가 밀집하였다 (Table. 1).

以上과 같이 調査한 結果를 Raper와 Fennell(1965)의 分類 Key와 對照해 본 結果 Aspergillus niger로 同定되었다.

## (2) 寄生菌의 同定

Czapek's Dox Agar Plate에서 24~26°C, 12~14日間培養한 colony의 直徑은 1.2cm였으며 成長은 限정의이고, Margin은 abrupt, 前面의 색 같은 light green이며, 後面은 colorless에서 orange red로 變하였다.

Malt Extract Agar에서의 成長은 빠르고 colony의 直徑은 3.2cm이며 中心部分은 raise하고 넓고 깊은 주름을 形成, 胞子形成은 疣生하여 前面의 색 같은 lilly green이며 後面은 colorless에서 brown shade로

Table 2. Morphology of *Penicillium* sp.

Conidial stage	Penicilli Manner	Symmetrical Substrata
	Color	Yellowish-green
Conidiophore	Origin Marking Length Width	Basal felt Smooth 50~60μ 2.0~3.0μ
Branches	Number	2
Metulae	Number Length Width	6 8.0~10μ 2.0μ
Sterigmata	Number Length Width	7~8 9.0~11μ 2.0μ
Conidia	Marking Length Width Chain Length	rough 2.8~3.3μ 2.2~2.8μ tangle 60μ

變한다 (Table 2).

以上 調査한 結果를 Raper와 Thom (1949)의 分類 Key에 對照해 본 結果 *Penicillium rugulosum*으로 同定되었다.

## 考 察

*Aspergillus* sp.와 *Penicillium* sp.가 寄生되어 있는 것은 Raper와 Thom (1949), Romankova (1936), Smith (1954), Tataranko (1959)의 報告와 一致하여 寄生菌의 胞子에서 germ tube가 나와 宿主와 接着寄生하는 것은 Barnett (1964), Berry와 Barnett (1957)의 結果 報告와 同一하며 *Piptocephalis virginiana*는 Obligate parasite인 反面, *Penicillium* sp.는 Synthetic media 上에서 繁殖하는 것으로 보아 活物寄生이 아닌 것이다.

本 實驗에서는 宿主에서 寄生菌을 分離시키는 方法으로 Berry와 Barnett (1957)의 方法을 指하였으나 暗處에서 宿主의 成長을 抑制시킨 후 寄生菌을 分離시키는 Manocha와 Lee (1971)의 方法도 應用해 볼만한 것이라 생각된다.

宿主의 發育初期와 發育後期에 따른 寄生菌의 寄生速度의 差異는宿主의 營養關係와 密接한 關係가 있으리라 생각되며 內部 生理的 營養關係등도 앞으로 나누어져야 할 것으로 생각된다.

宿主의 核은 二重膜으로 된 核膜으로 細胞質과 境界를 이루고, 核小體의 部位를 볼 수 있으며, 이는 Moore와 McAlear (1963)의 報告와 符合되며 Mitochondria는 形態의 으로 볼 때 植物과 動物에서 볼 수 있는 것으로 觀察된 mitochondria는 Campbell (1970)의 報告와 同一하다.

Lomasome에 대한 Bracker (1967)의 報告를 보면 原形質膜과 細胞膜 사이에 있는 膜性構造의 集合으로 그 位置가 細胞의 외변이기에 Moore와 McAlear (1963)에 의해 lomasome으로 불리워졌으며 그 構造를 觀察할 수 있었다.

寄生菌의 haustorium이宿主의 hyphae나 conidia에 나타나지 않고, sterigmata에 나타난 것은 Armentrout와 Wilson (1956)의 *Mycotyphacephalis microspora*에 寄生하는 *Piptocephalis virginiana*와 Manocha와 Lee (1971)가 *Choephora cucurbitarum*에 寄生하는 *Piptocephalis virginiana*宿主 hyphae에 寄生하는 것과는 다른 現象으로 이는 conidia는 haustorium

보다 적고, vesicle은 細胞膜이 두텁기 때문에 侵入하기 어려운 때문이다.

Bracker (1968)의 報告에서 보리의 Epidermal cell에 寄生하는 *Erysiphe graminis*의 寄生關係에서 볼 수 있는 neck나 neck周圍의 collar는 本實驗에서는 그 現象을 찾아볼 수 없었다.

Ehrlich et al. (1963). 이 *Erysiphe graminis*에서 나타낸 것처럼 確實치는 않으나宿主와 寄生菌의 haustorium關係에서 寄生菌으로의 營養物質傳達體인 Sheath構造를 볼 수 있었다.

Armentrout와 wilson(1956)은宿主곰팡이의細胞가寄生菌의侵入을 받으면散在해 있는液胞들이큰液胞를만든다고하였는데그初期現象은觀察할수없었지만侵入을받은지오래된宿主細胞는初期의健全한細胞內容物이거의없어지고液胞로가득차게되는現象은一致하여時間이經過하면寄生細胞의內容物도없어진다고報告한것과Smith(1954)의報告에서말한宿主를殺生하는것은더두고觀察해보아야할것같다.

Stavely et al. (1963), Edward와 Allen (1970)橋岡(1974)등의報告에서寄生菌이宿主에侵入하는方法에는 Papilla를통해구멍을뚫는機械的인方法과宿主細胞膜cellulose를녹이는酵素分泌方法中어느것으로明確히斷定할수없으나haustorium의尖端을보면그濃度가다른곳에比해높게나타내는것으로보아酵素分泌에의한侵透現象으로생각되어,追後Acid phosphatase activity實驗으로그確實性을試圖해볼만하다고생각된다.

本實驗에서宿主菌의形態를觀察한結果를Raper와Fennell(1965)의分類Key와對照해본結果conidia의形態나색상을除外하고는Aspergillus phoenicus와類似한點이많아同定하기어려웠으나Aspergillus phoenicus의conidia는rough하고horizontally flattened한反面宿主菌의conidia는Smooth하고globose이기에Aspergillus niger로同定하였다.

寄生菌은Raper와Thom(1949)의分類方法에의해Penicillium rugulosum으로同定되었다.

이는Smith(1954), Romankova(1936)에의해報告된것과同一한結果를얻었다. Aspergillus niger에眞菌이寄生하므로그production이크게減少하므로그純粹保管은工業上의重要問題로남게된다.

本實驗에이어宿主와寄生菌과의營養關係,宿主의範圍,溫度와營養差異에의한變化등앞으로다루어져야할點이 많다고생각된다.

## 摘要

寄生微生物에대한研究에서宿主와寄生菌을分類同定하고成長過程과그病理組織學的·解剖學的構造를光學및電子顯微鏡을통하여觀察하고,二種間의相互關係를究明한結果는다음과같다.

- 1.宿主와寄生菌은Aspergillus niger와Penicillium rugulosum으로각각同定되었다.
- 2.寄生菌은宿主의Sterigmata에寄生하고있는것을觀察하였다.
- 3.寄生狀態의進行에따라宿主의細胞內容物이消失되어간다.
- 4.寄生菌은合成培地에서도培養되므로活物寄生이아니다.

## REFERENCES

- Armentrout, V.N. and C.L. Wilson (1956): Haustorium-Host Mycoparasitism of *Mycotypha microspora* by *Piptocephalis virginiana*. Phytopathology. 59 : 897—905  
 Ayers, T.T. (1933): Growth of *Dispira cornuta* in artifical culture. mycologia. 25 : 333—341  
 Ayers, T.T. (1935): Parasitism of *Dispira cornuta*. mycologia. 27 : 235—261  
 Bary, A. de. (1865): Zur kenntnis der Mucorineen Abh. Senckeng. Naturf. Ges. 5 : 345—375  
 Bary, A. de. (1870): *Eurotium, Erysiphe, Cicinobolus*. Nebst Bemerkungen über die Geschlechtssorgane der Ascomyceten. Abhand. Senck. Nature. Ges. 7 : 361—455  
 Barnett, H.L. (1964): Mycoparasitism. Mycologia 56 : 1—19  
 Berry, C.R. and H.L. Barnett (1957): Mode of parasitism and host range of *Piptocephalis virginiana*. Mycologia 49 : 374—386  
 Berry, C.R. (1959): Factors affecting Parasitism of *Piptocephalis virginiana*. Mycologia 49 : 374—386  
 Berry, C.R. (1959): Factors affecting Parasitism of *Piptocephalis virginiana* on other Mucorales. Mycologia 51 : 824—832

- Bracker, C.E. (1968): Ultrastructure of fungi. Ann Rev. of phytopathology. 5 : 343—374
- Bracker, C.E. (1968): Ultrastructure of the Haustorial Apparatus of *Erysiphe graminis* and Its Relationship to Epidermal Cell of Barley. Phytopathology. 58 : 12—30
- Brefeld, O. (1872) *Mucor, Chaetocladium, und Piptocephalis*. Bot. Unters. über Schimmelpilze. 6 : 41—45
- Campbell, C.K. (1970): Fine structure of Vegetative Hyphae of *Aspergillus fumigatus*. J. Gen. Microbiol., 64 : 373—396
- Edward, H. and P. J. Allen (1970): A fine structure study of the primary infection process during infection of Barley by *Erysiphe graminis*. f. sp. *hordei*. Phytopathology. 60 : 1504—1509
- Emmons, C.W. (1930): *Cicinnobolus cesati*, a study in host parasite relationships. Bull. Torrey Bot. Club. 57 : 421—441
- Ehrlich, H.G. and M.A. Ehrlich (1963): Electron Microscopy of the sheath Surrounding the Haustorium of *Erysiphe graminis*. Phytopathology. 53 : 1378—1380
- Manocha, M.S. and K.Y. Lee (1971): Host-Parasit-relations in a mycoparasite. I. Fine structure of host, parasite, and their interface. Canad. J. Bot. 49 : 1677—1681
- Moore, R.T. and J.H. McAlear (1963): Fine structure of mycota. J. Cell Biol., 16 : 131—142
- Raper, K.B. and D.L. Fennel (1965): The genus *Aspergillus*. William & Wilkins.
- Raper, K.B. and C. Thom (1949): A manual of the Penicillia, William & Wilkins
- Romankova, A.G. (1936): Über Parasitismus des Schimmelpilzes *Penicillium rugulosum* Thom auf *Aspergillus niger*. Acad. des Sci. U.S.S.R. compt.
- Stavely K.B., A. Pillai, and E.W. Hanson. (1963): Electron Microscopy of the Development of *Erysiphe polygoni* in Resistant and Susceptible *Trifolium pratense*. Phytopathology. 59 : 1688—1693
- Smith, G. (1954): An Introductory to Industrial Mycology. Edward Arnold Ltd. London. 295—299
- Tatarenko, E.S. (1959): Parasitism in mold fungi. Microbiologia (English translation) 28 : 828—834 Illus.
- Tieghem, P. Van. (1875): Nouvelles recherches sur les Mucorinees. Ann. Sci. Nat. (Bot) 6 : 5—175
- Whetzel, H.H. (1909): A fungus living as a parasite upon another fungus. Ontario Natural Science Bulletin No. 5.
- 橋岡良夫(1974): 菌にてく菌. 化學と生物 12 : 731—739

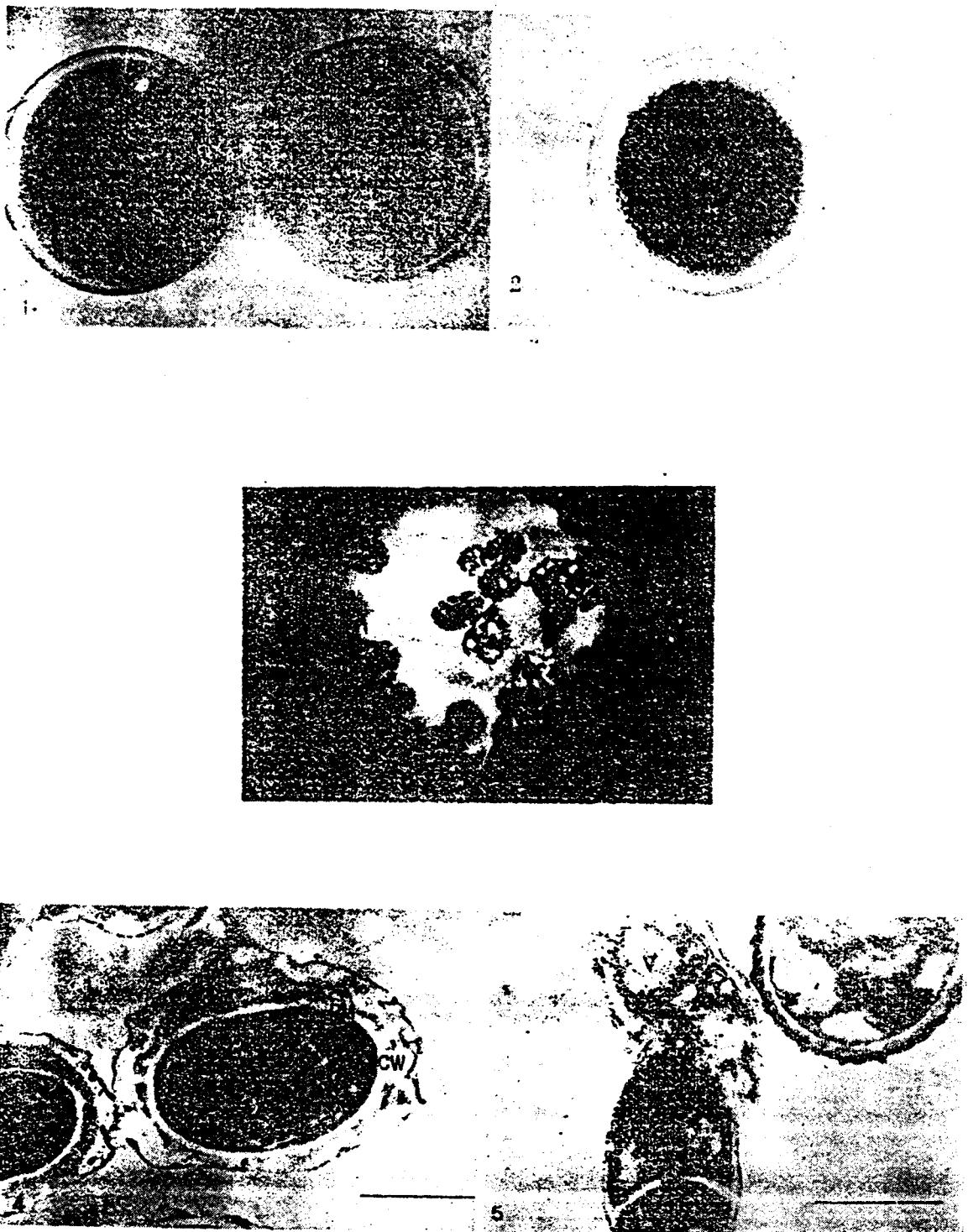
#### Plate Explaining

1. The Host (left) and Parasite (Right) was isolated
2. The Host parasited by parasite
3. Parasite parasiting to Host Fungus
4. Fine structure of the Host Fungus
5. Parasite proceeding to penetrate Host cell
6. Longitudinal section of a penetrated Host cell
7. Cross section of a penetrated Host cell
8. Longitudinal section of a penetrated Host cell
9. Cross section of a penetrated Host cell
10. At the beginning of the parasite parasiting the Host cell

#### KEY TO LABELING

Nu; Nucleus	Nuc; Nucleolus
Mi; Mitochondria	V; Vacuole
Lo; Lomasome	CW; Cell Wall
Ho; Host	Fa; Parasite
Sh; Sheath "	Hy; Hyphae
Ha; Haustorium	Sm; Sheath Membrane
Pm; Plasma Membrane	
Se; Septum	Fc; Filament "
Scale in each plate represents 1μ.	

Plate



Plate

