

稻熱病菌의 原形質體 裸出 및 細胞壁 再生

韓聖淑 · 李永熙 · 柳在塘 · 李銀鍾

農村振興廳 農業技術研究所 病理科

Purification and Cell Wall Regeneration of Protoplasts from *Pyricularia oryzae* Cav.

S.S. Han, Y.H. Lee, J.D. Yoo and E.J. Lee

Department of Plant Pathology, Agricultural Sciences
Institute, Suwon 170, Korea

要 約

水稻 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)의 菌絲體로부터 多量의 原形質體의 分離 및 세포벽 再生을 하기 위하여 必要한 몇 가지 條件을 選拔하였다.

裸出을 위하여 基本溶液으로 0.02 M potassium phosphate buffer 와 pH 5.2, 0.6 M KCl 로 滲透壓을 調節하였고 分解酵素는 ml 당 각각 20 mg Cellulase R-10, 5 mg Macerozyme R-10, 10 mg Driselase 를 使用하였는데 각각의 單獨處理區보다 3 가지 酵素의 複合處理區에서 原形質體 裸出 程度가 優秀하였다. 또한 選拔된 複合酵素液에 2日間 液體培養된 어린 菌絲體를 3時間, 30°C 恒溫器에서 진탕했을 때 가장 많은 原形質體가 分離되었다. 原形質體로부터 세포벽의 再生은 純粹 精製한 原形質體를 0.02 M potassium phosphate 와 0.6 M KCl 을 添加시켜 滲透壓을 調節한 감자한천배지에 接種시켜 가장 높은 再生率을 얻을 수 있었다.

ABSTRACT

The optimum conditions for protoplast formation and regeneration from *Pyricularia oryzae* Cav. were selected as follows. As a basic solution, 0.02M potassium phosphate buffer solution plus 0.6M KCl adjusted to pH 5.2 with 1N HCl was used. A mixture of enzyme combinations with 20mg Cellulase R-10/ml, 5mg Macerozyme R-10/ml and 10mg Driselase/ml used as a lytic enzyme showed better lytic effect than any single enzyme treatment for protoplast formation. Two-day-old mycelia of *P. oryzae* grown in the mixture of three lytic enzyme solution at 30°C for 3 hr showed best condition for protoplasts formation. For regeneration from the protoplasts of *P. oryzae*, potato dextrose agar containing 0.02M potassium phosphate plus 0.6M KCl used as a stabilizer was best for regeneration medium.

Key words: *Pyricularia oryzae*, protoplast formation and regeneration.

緒 論

材料 및 方法

水稻 稻熱病(*Pyricularia oryzae*, Cav.)의 病原性 變異機構에 關한 研究는 孢子나 菌絲 狀態에서 또는 菌絲 癒合에 의한 核의 이동 등에 의해 거의 推定되어 왔으나(3, 4, 15, 16, 22) 病原性 관련 遺傳物質이 무엇인가에 대하여는 아직 밝혀진 바가 없다. 近來에 이르러 이 變異機構를 좀더 安定的인 分子生物學이나 分子遺傳學 側面에서 밝혀보고자 基礎的 技法인 稻熱病菌의 原形質體를 分離하여 再生 및 融合하는 研究가 이루어지고 있다. 이러한 研究에 對하여 稻熱病菌만 아니라 病原真菌이 다른 微生物에 비하여 늦게 시작된 것은 菌絲의 細胞壁이 큰 障礙物이 되었기 때문이다. 그러나 絲狀菌에 있어서는 처음으로 달팽이의 胃로부터 推出한 消化液으로 *Neurospora crassa* 에서 原形質體를 裸出하였으며(1, 2) 最近에 와서는 *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus* 등으로부터 推出, 精製하여 市販되고 있는 酵素를 單獨 혹은 複合處理하여 絲狀菌의 細胞壁 分解로 原形質體를 分離하고 있다(17, 18, 19). 이와같이 分離된 原形質體는 滲透壓 調節劑의 條件에 따라 裸出量이 달라지며 다시 정상적 菌絲狀態로 再生될 때에도 培地條件이나 營養原, 菌絲狀態 등에 따라 그 再生程度가 달라진다(19).

植物 病原真菌 中 *Rhizoctonia solani* 에서는 裸出된 原形質體를 人爲的으로 融合시켜 再生된 菌株가 病原력이 低下되었다는 것을 確인하여 生物學的 防除의 可能性을 示唆하기도 하였으며(6, 7, 8) *Fusarium culmorum*(12), *Pythium*(20), *Gibberella fujikuroi*(5) 등에서 原形質體가 각각 分離된 바 있다.

Pyricularia oryzae 에서는 1981年 Tanaka 등(21)이 遊離시킨 한 細胞內的 核數 및 細胞質內 物質에 對한 研究를 하기 위해 裸出과 再生을 한 것이 처음이며 그 以後로는 殺菌劑가 原形質體 再生 菌叢의 生育阻止에 미치는 영향 등에 對한 報告(10)가 있다. 韓國에서는 1984年 韓等(9), 1985年 李等(13)의 原形質體 裸出에 關한 報告가 있지만 아직도 裸出에 따르는 再生條件에 對한 體系的인 研究가 未備한 바 본 實驗에서는 稻熱病菌의 菌絲에서 多量의 原形質體 分離 및 細胞壁 再生을 위한 몇가지 조건을 究明하기 위해 그 結果를 報告하고자 한다.

供試菌은 農業技術研究所 病理科에 保存된 1983年에 分離한 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae* CAV.) 레이스 KJ-101(KA 83-732)을 使用하였으며 原形質體 裸出 및 細胞壁 再生은 Hashiba法(6)을 修正하여 實驗을 實施하였다.

基本溶液으로는 0.02 M potassium phosphate buffer를 使用하였으며 이 溶液에 滲透壓을 調節하기 爲해 KCl, Mannitol, NaCl을 0.6 M 濃度로 녹여 pH 5.2, 5.8, 6.5로 차이를 두었다.

原形質體 裸出을 爲해 使用한 細胞壁 分解 酵素는 *Trichoderma*, *Rhizopus* 또는 擔子菌으로부터 推出되어 市販되는 각각의 2% Cellulase R-10 Onozuka(20 mg/1 ml), 0.5% Macerzyme R-10 Onozuka(5 mg/1 ml), 1%의 Driselase Sigma(10 mg/1 ml)인데 이들을 單獨處理하거나 2~3種의 複合組合으로 3 ml의 0.6 M 滲透壓 調節劑에 녹여 4°C, 10,000 rpm으로 50分間 遠心分離 精製後 membrane filter(porosity 0.2 μm)로 濾過 殺菌하여 使用하였다.

PDA 사면시험관에 보관중인 供試菌株의 菌絲節片을 2 ml 殺菌수에 磨碎하여 그 懸濁液을 잠자液體培地 50 ml당 2 ml씩 接種, 28°C 恒溫器에 1~6日까지 培養하였다.

酵素는 殺菌 증류수로 2回 洗滌한 菌絲體에 1/2, 1, 2, 3, 5, 7, 9時間別로 處理하여 30°C, 往復 120回/分 恒溫盪湯培養器에서 培養하였다. 다음에 sintered glass filter(porosity 1)를 使用하여 濾過한 후 裸出數는 400배 顯微鏡下의 Thoma's 血球計로 調査하였고 菌絲 生體重 1 g당 原形質體의 갯수로 表示하였다. 菌絲의 生體重은 液體培養된 菌絲體를 6,000 rpm, 30分 遠心分離하여 배양액을 제거한 후 여과지에 1時間 吸濕시킨 다음 무게를 달았다. 또한 濾過된 原形質體는 酵素液을 洗滌하기 위해 0.6 M KCl 溶液으로 2回 遠心分離(3,500 rpm, 5分)시켜 純粹 精製하였다.

原形質體로부터 細胞壁의 再生을 위해 앞에서 얻은 原形質體의 갯수를 0.6 M KCl 용액을 加하여 10³ 개/ml로 稀釋시켰다. 再生用 培地는 물 한천 배지(WA), Potato Dextrose Agar(PDA), Soluble Starch Agar(SSA)를 0.6 M Mannitol, 0.6 M Sucrose, 0.6 M KCl 등으로 滲透壓을 調整하고

稀釋된 原形質體 현탁액 0.5 ml을 분주하여 28 °C에서 3日間 培養한 後 colony counter로 菌叢數를 調査하여 再生率을 算出하였다. 또한 한천 濃度別 細胞壁 再生力을 보기 위해 0.6 M KCl로 滲透壓을 調整한 PDA培地에 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10%의 한천 濃度別로 1~3日 後의 再生菌絲 狀態를 調査하였다.

結 果

稻熱病菌 原形質體 裸出 및 安定을 위한 滲透壓 調節劑로는 potassium phosphate buffer에 無機鹽類인 KCl을 첨가한 것이 다른 處理에 比하여 裸出量이 많았다. 이에 따른 pH는 弱酸性에서는 크게 差異가 없었으나 pH 5.2에서 原形質體 狀態가 매우 鮮明하고 新鮮하게 檢鏡되었다(表 1).

앞서 選拔된 滲透壓 調節劑에 細胞壁 分解酵素를 녹여 處理한 바 Cellulase R-10, Driselase 單獨處理區에서는 比較의 裸出數가 많았으나 Mace-rozyme R-10은 細胞壁 自體를 끊어주지 못하고 있었다. 表 2에서와 같이 세가지 酵素의 複合處理

Table 1. Effect of pH and osmotic stabilizers on protoplast yields (No. protoplast x 10⁸/g of fresh mycelia) from *Pyricularia oryzae* in lytic enzyme solution consisting of 2% Cellulase R-10, 0.5% Macerozyme R-10, 1% Driselase and 0.6M osmotic stabilizer

pH	Osmotic Stabilizer		
	NaCl	Mannitol	KCl
5.2	7.1±1.83	3.1±0.73	7.6±2.18
5.8	4.5±1.12	0.7±0.58	5.7±1.08
6.5	5.0±1.26	0.7±0.56	4.3±0.82

Table 2. Effects of enzyme treatments on protoplasts release from *Pyricularia oryzae* mycelia

Enzyme used	No. of protoplasts obtained from 1g fresh mycelia
Cellulase R-10 (A)	3.7 x 10 ⁷
Macerozyme R-10 (B)	0
Driselase (C)	1.8 x 10 ⁸
A + B	1.5 x 10 ⁷
B + C	2.2 x 10 ⁸
A + C	3.7 x 10 ⁸
A + B + C	4.4 x 10 ⁸

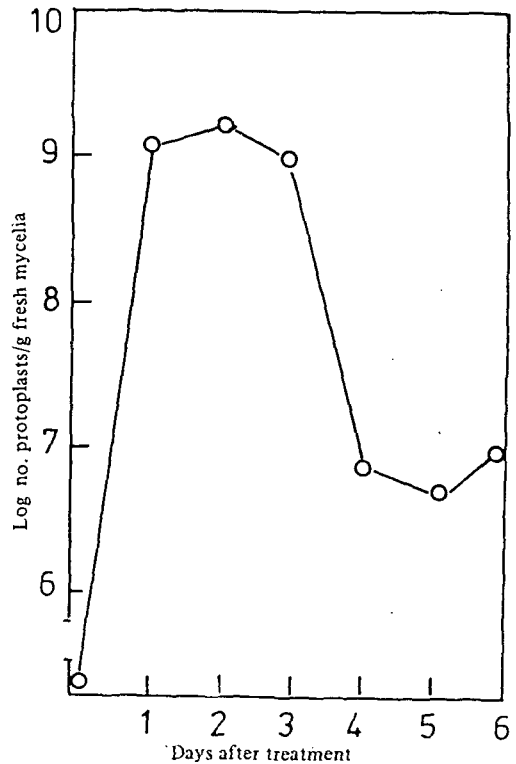


Fig. 1. Yields of protoplasts from mycelia of *Pyricularia oryzae* at the different days after treatment.

에서 최고 4.41 x 10⁸ 개 / g의 原形質體를 얻을 수 있어 稻熱病菌 原形質體 裸出에 效果的인 結果를 얻었다.

菌絲 培養日數에 따른 原形質體 裸出程度를 보면 2日 培養한 菌絲體에서 生體重 1g當 多量의 原形質體를 얻을 수 있었다(그림 1). 그러나 2日 培養한 菌絲體는 9當 裸出數는 많았으나 菌絲 영양성이 적어 다루기가 용이하지 않았으며 3日 培養된 菌絲體를 使用하는 것이 편리하고 全體 裸出量도 많았다.

또한 酵素處理 時間이 裸出에 미치는 영향을 보면 3時間에서 가장 많았지만 原形質體가 2時間 處理보다는 新鮮하지 못하고 液胞가 커지며 原形質이 희미해져 時間이 갈수록 減少하는 경향을 볼 수 있었다(그림 2). 따라서 酵素處理 後 2時間동안 盡湯培養하는 것이 原形質體 狀態와 裸出數에 있어서도 良好한 結果를 얻을 수 있었다.

原形質體로부터 細胞壁의 再生에 있어서 WA, S-SA培地에서는 再生이 되지 않았으며 0.6 M KCl로 滲透壓을 調整한 PDA培地에서 19.1%의 再生

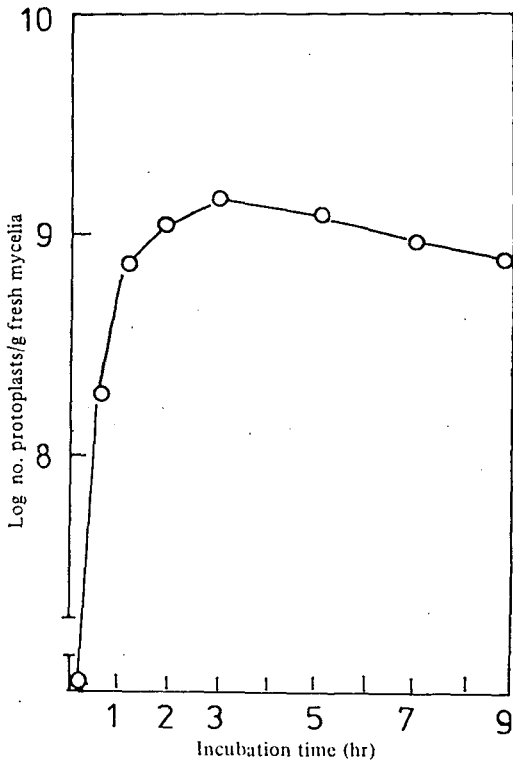


Fig. 2. Changes in yield of protoplasts as influenced by incubation time from two-day-old mycelia of *Pyricularia oryzae*.

Table 3. Effects of media and osmotic stabilizers on regeneration from protoplasts of *Pyricularia oryzae*

Media	Regeneration rate (%)		
	Mannitol ^a	Sucrose	KCl
W.A.	0.0	0.0	0.0
P.D.A.	6.1	16.1	19.1
S.S.A. ^b	0.0	0.0	0.0

^aConcentration of each osmotic stabilizer used was 0.6M.

^bSoluble Starch Agar (Starch 20g, Agar 20g, Water 1l).

를 얻었다(表 3).

또한 한천 濃度別 細胞壁 形成能力이 다르다는 報告(11)가 있는데 表 4의 結果를 보면 한천 濃度 0.1, 0.5%에서는 培養液이 굳지 않아서 再生 菌絲 體를 얻을 수 없었고 다루기도 불편했다. 1% 한천 배지의 固定된 狀態에서는 다른 培養液보다는 비교적 높은 40%의 再生率을 얻을 수 있었다. 再生用 培地에 置床한지 12時間 後 大部分의 再生 原形質 體는 細胞壁으로 생각되는 組織體로 둘러싸여 表面

Table 4. Effect of agar concentration on regeneration from protoplasts of *Pyricularia oryzae* on potato dextrose agar amended with 0.6M KCl

Agar concentration (%)	Regeneration rate ^a (%)
0.1	33.3±3.6
0.5	33.4±3.0
1	40.2±3.8
2	33.6±2.2
5	32.9±4.2
10	2.6±0.7

^aValues are averages of 5 replications.

의 色이 거므스름하게 着色되면서 側近에 子細胞가 생기기 시작하고 24時間 後에는 菌絲가 굵고 울퉁불퉁한 나무가지 처럼 뻗어 나가거나 念珠狀으로 連鎖的으로 形成되면서 3日 後에는 既存 菌絲와 다른 菌叢을 확인할 수 있었다(그림 4).

考 察

稻熱病菌의 變異機構라든가 病原性 關聯 遺傳物質을 밝혀내는 研究, 防除의 차원에서 尖端技法을 利用하려는 實驗을 하기 위하여 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)에서 多量의 原形質體의 分離를 필요로 하는데 원형질체의 나출량은 滲透壓 調節劑, 酵素組合, 菌絲培養 條件, 酵素處理時間 等に 의해 큰 영향을 받는다. 本 試驗에서는 滲透壓 調節劑에 있어서 potassium phosphate buffer에 pH 5.2의 KCl로 滲透壓을 調節한 것이 Mannitol이나 NaCl을 사용한 것 보다 裸出狀態가 좋았는데 이는 Tanaka 等(21), 李 等(13)의 報告와 一致하였다.

原形質體 裸出의 용이성은 細胞壁 構成成分에 따라 다르지만 細胞壁 主成分이 α-Hetero-polysaccharide, β-1, 3-Glucan, Chitin 物質로 構成된 稻熱病菌(14)에 있어서 Tanaka 等은 Cellulase, Macerozyme, Zymolase의 混合處理 酵素에 의해 裸出을 하였는데 本 實驗에서는 Cellulase, Macerozyme 과 Zymolase 보다는 값이싼 Driselase의 혼합처리 酵素液으로도 多量을 얻을 수 있었다. 李 等(13)도 위 세가지 酵素와 β-glucuronidase를 添加하여 使用하였다.

또한 균사 배양조건에 따른 原形質體 裸出程度는 감자液體培地에서 2日間 定置培養한 어린 菌絲에서

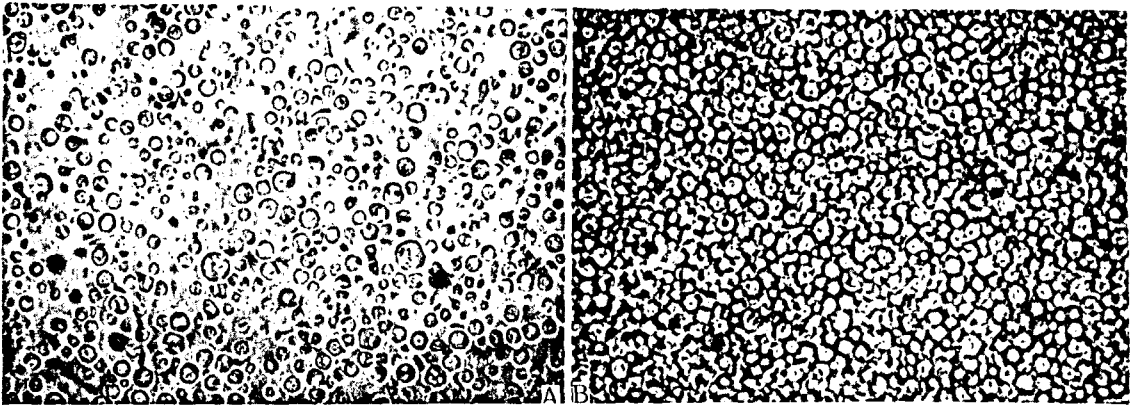


Fig. 3. Photographs of non purified protoplasts obtained from mycelia of *Pyricularia oryzae* at 400x magnification under a light microscope (A) and those after purification with sinta glass of porosity 1 (B).

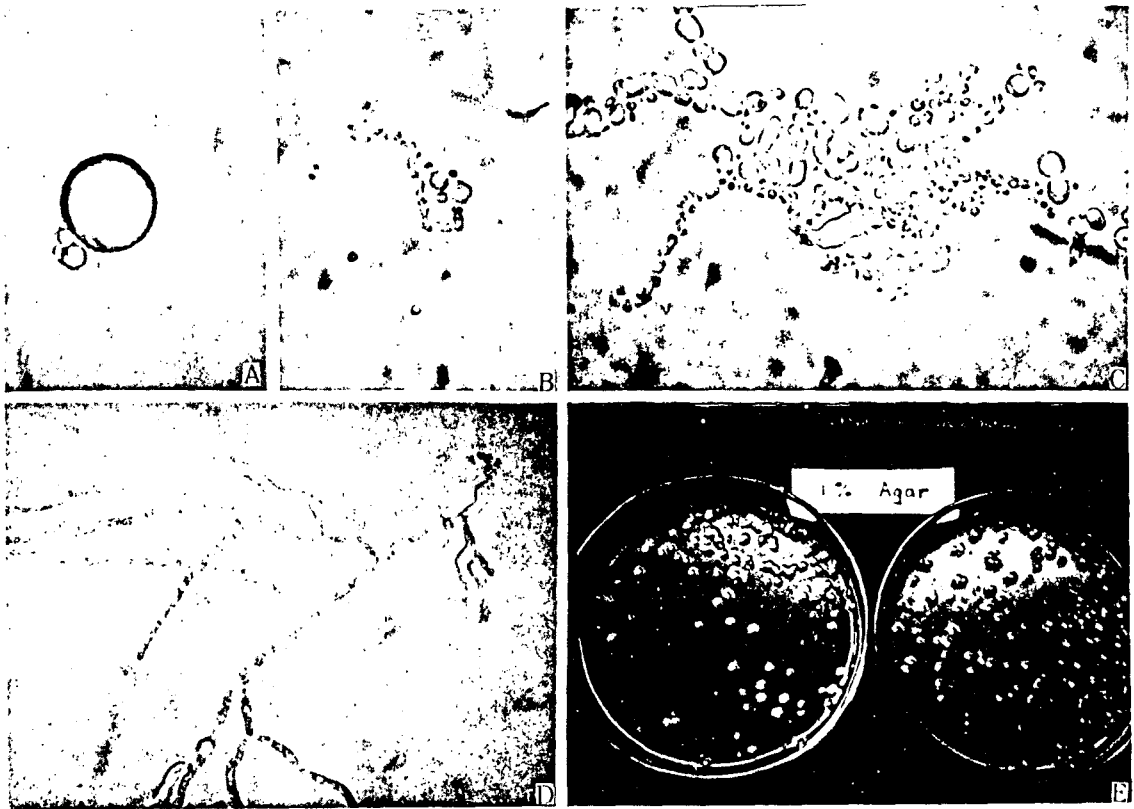


Fig. 4. Microphotographs showing regeneration of purified protoplasts of *Pyricularia oryzae* on PDA with 0.6M KCl at 400x magnification. (A: a protoplast developing daughter cells 12hr after regeneration treatment, B: a regeneration protoplast at 24hr, C and D: those at 48hr, E: protoplasts developed into small colonies 3 days after regeneration treatment.)

단위 9 당 裸出數가 最高에 달하였는데, 15~24시간 전탕배양된 菌絲狀態에서 效果的이라는 보고도 있다(13, 21). 酵素處理 時間으로 30分 경과되었을 때는 菌絲의 細胞壁과 原形質이 分離되기 시작하는 초기 단계이고 1時間에서 보다는 2時間에서 더 많은 原形質體를 얻을 수 있는데 3時間에서는 原形

質體 크기와 數가 가장 크고 많은 量을 얻을 수 있지만 液胞가 커져 新鮮度가 떨어져 문제가 있는 것으로 생각된다. 酵素液 狀態 및 處理時間 菌絲狀態에 따라 新鮮度가 다르지만 세척 정제된 原形質體도 時間이 지날수록 細胞質內 內容物이 희미해지는 現象을 볼 수 있었다. *Rhizoctonia solani*의 경우

4°C에서 4日間 保存한 결과 극소량의 原形質體만 남아 있었다는 Hashiba 등의 報告(6)는 時間이 경과할수록 液胞가 커져 原形質膜이 터진 現狀으로 思料된다.

大部分의 경우 原形質體 分離에 이어 細胞壁 再生實驗이 뒤따르는데 100%의 再生率을 얻었다는 報告는 없다. Peberdy 에 의하면 *Fusarium culmorum* 에서는 5~82%, Yeast 에서는 40%, *Aspergillus nidulans* 에서는 10~30%의 再生率을 얻었으며(19) *Rhizoctonia solani* 의 경우는 10~20%에 불과하다(6). 이들은 모두 滲透壓이 調節된 複合培地에서 細胞壁을 再生시켰으며 本實驗 結果 稻熱病菌에서 40% 以上の 再生率을 얻을 수 있었는데 이 比率은 原形質體가 滲透壓에 依한 安定性, 新鮮度, pH, 또는 細胞壁 構成成分에 따라 많이 차이된다고 생각된다.

P. oryzae 에 있어서는 原形質體를 再生 3時間 後부터 微纖維 細胞膜이 外側에 集積되는 것을 電子顯微鏡에 依해 관찰한 報告도 있으며(10) Tanaka 는 10時間 後에 念珠形의 出芽狀 細胞를 반복하여 만들고 20時間 後에는 念珠狀 細胞에서 發芽管이 생기기 시작하여 원래의 菌絲로 점차 發達된다고 했는데(21) 이러한 現象은 本實驗 結果와 一致하는 傾向이었다. 肉眼이나 顯微鏡下에서 보아도 細胞壁 再生 處理 後 2~3日부터는 形態적으로 원래의 菌絲狀體로 돌아왔다고 생각되지만 단순한 細胞壁 再生(Cell Wall Regeneration)이 아닌 菌體의 物質代謝, 營養構成成分, 胞子形成能力, 더 나아가 病原性까지도 회복되어 있는 완전한 復歸(Reversion)이었는지에 대하여는 더 많은 實驗을 必要로 한다.

參 考 文 獻

1. BACHMANN, B.J. & BONNER, D.M.(1959). Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Jour. of Bacteriology*. 78:550-556.
2. EMERSON, S. & EMERSON, M.R. (1958). Production, reproduction & reversion of protoplast-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc. N.A.S. U.S.A.* 44: 668-671.
3. GENOVESI, A.P. & MACGILL, C.W.(1976). Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cav. *Can. J. Microbiol.* 22:531-536.
4. GIATGONG, P. & FREDERIKSEN, R.A. (1969). Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 59:1152-1157.
5. HARRIS, G.M. (1982). Protoplasts from *Gibberella fujikuroi*. *Phytopathology* 72:1403-1407.
6. HASHIBA, T. & YAMADA, M. (1982). Formation and purification of protoplasts from *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 72(2): 849-853.
7. 羽柴輝良(1982). 植物病原真菌, 特に *Rhizoctonia solani* 菌からのプロトプラストの分離と融合. *Jpn. J. Med. Mycol.* 23: 143-150.
8. 羽柴輝良(1984). 絲狀菌의 플라스미드 利用による 病原性制御의 可能性. *植物防疫* 38(4): 178-183.
9. 한성숙·이영희·유재당.(1984). 유전공학 기법에 의한 도열병균 레이스 변이에 관한 연구. *농기연보(생물부)*: 150-154.
10. ISHIZAKI, A., YAJINA, A., KOHONO, M. & KUNOH, H.(1983). Effect of isoprothiolane on *Pyricularia oryzae* Cav. (1) Cell wall regeneration of protoplasts. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49:471-480.
11. KUNOH, H.(1983). Fungal protoplasts-isolation, regeneration, reversion, fusion and application. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 24:341-356.
12. LABORDA, F., GARCIA, A.I. & VILLANUEVA, J.R.(1974). Studies on a strepzyme capable of obtaining protoplasts from *Fusarium culmorum* conidia. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 62(3): 509-518.
13. LEE, Y.H. & CHUNG, H.S.(1985). Formation of protoplasts from *Pyricularia oryzae*. *Kor. Jour. Microbiol.* 23(3):209-214.
14. NAKAJIMA, T., TAMARI, K., MATSUDA, I., TANAKA, H. & OGASAWARA, N.(1970). Studies on the cell wall of *Pyricularia oryzae* part II. The chemical constituents of the cell wall. *Agr. Biol. Chem.* 34(4):553-560.
15. OU, S. H., & AYRD, M. R. (1969). Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesion and monoconidial cultures. *Phytopathology* 58:179-182.

16. OU, S.H.(1980). Pathogenic variability and host resistance in rice blast disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18:167-187.
17. PEBERDY, J.F.(1976). Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In: *Microbial and plant protoplasts*. Ed. by J.E. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers & E.C. Cocking. Academic Press, London, pp. 39-50.
18. PEBERDY, J.F.(1977). Protoplast and their development. In: *The Filamentous Fungi*. Vol. 3, Ed. by J.E. Smith & D.R. Beery, Edward Arnold, pp.119-131.
19. PEBERDY, J.F.(1979). Fungal protoplasts isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:21-29.
20. SIETSMA, J.H. & BOER, W.R.(1973). Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. *Jour. of General Microbiology* 74:211-217.
21. TANAKA, H., OGASAWARA, N. & KAMINIYA, S.(1981). Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P2 preparation into hyphal form. *Agric. Biol. Chem.* 45(2):1541-1552.
22. YAMASAKI, Y. & NIIZEKE, H.(1965). Studies on variation of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* Cav. I. Karyological and genetical studies on variation. *Nat. Inst. Agric. Sci. Bull. Ser. D.* 13:231-273.