

## 培養條件에 따른 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*) 菌絲體의 Esterase 同位酵素

朴相鎬 · 朴元穆 · 金晟會 · 李銀鍾 \*

高麗大學校 農科大學 植物保護學科  
\* 農村振興廳 農業技術研究所 病理科

### Esterase Isozyme of Mycelium of *Pyricularia oryzae* under Various Cultural Conditions

Sang Ho Park, Won Mok Park, Seong Hoe Kim and Eun Jong Lee\*

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea

\* Department of Plant Pathology, Agricultural sciences Institute, Rural Development Administration, Suwon 170, Korea

#### 要 約

稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*) 菌絲體의 esterase 同位酵素 pattern 이 培養條件에 의하여 變化되는가 를 10~25% polyacrylamide gradient slab gel 을 使用하여 알아보았다. 培養期間에 따라 培養 24 日 까지 同位酵素 pattern 은 변하지 않았지만 특정 band 의 酵素量에는 차이가 있었다. 炭素源(glucose, fructose, maltose, sucrose, starch), 單孢子分離菌株間, 繼代培養 및 細胞壁再生菌株間의 同位酵素 pattern 은 변함이 없었다.

#### ABSTRACT

The constancy of the patterns of esterase isozymes in the mycelium of *Pyricularia oryzae* grown under various cultural conditions was observed by 10-25% polyacrylamide gradient slab gel. The position of the isozyme was not affected by cultural age for 24 days. However the intensity of the band was affected. The band patterns were not affected by the carbon sources (glucose, maltose, fructose, sucrose or starch), single spore isolates, successive transfer culture and regenerated isolates from protoplast cultures.

Key words: *Pyricularia oryzae*, isozyme.

#### 緒 論

電氣泳動法은 1962年 Chang 等(4)이 *Neuros-*

*pora* 菌의 protein 을 比較하여 真菌의 遺傳과 分類에 利用可能性을 시사한 이래 많은 植物病原菌의 分類에 利用되어 왔다(1, 3, 14).

하지만 同位酵素는 生體의 部位와 生長·發育단계

및 환경의 영향을 많이 받는다는 報告가 있고 (7, 12), 菌의 種類에 따라서도 배양환경요인이 酵素의 pattern에 영향을 미친다는 報告가 있다. 즉 양송이(*Agaricus bisporus*)의 peroxidase 同位酵素는 갓, 줄기, 초발이시기 및 菌絲에서 각각 다른 형태를 하고 있으며(16), Chapman과 Ostrovsky(5)는 *Papulaspora thermophila*의 protein pattern은 溫度에 의하여 變化된다고 하였다. Whitney等(21)은 *Verticillium* spp.에서, Hall(10)은 *Fusarium solani*에서 단백질 조성은 培養期間에 따라 變化되며 또한 배양조건에 의해서도 變化된다고 하였으며 Meyer等(13)은 培養期間과 炭素源인 glucose와 pectin에 의하여 *Fusarium oxysporum*의 exo-esterase 同位酵素 pattern이 變化된다고 하였다.

따라서 稻熱病菌의 菌絲體內的 同位酵素 pattern이 培養의 조건에 의하여 영향받는가를 밝히는 것은 稻熱病菌의 遺傳 및 分類研究에 重要하다.

本 實驗은 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*)이 배양 조건에 의하여 同位酵素 pattern에 차이가 있는가를 밝히고자 실시하였다.

## 材料 및 方法

**菌株.** 農村振興廳 農業技術研究所 病理科에서 분양받은 稻熱病菌(*Pyricularia oryzae*) KJ-101, KI-307, KI-315 및 KI-413 race를 使用하였다.

培養期間의 영향은 KJ-101 race를 使用하였고, 炭素源의 實驗은 KJ-101 및 KI-413 race를 使用하였다. 單胞子分離菌株는 한강찰벼에서 單胞子分離된 KI-315 race를 Oatmeal 한천배지가 담긴 petri dish에서 7日間 培養後 기준균사를 제거한 다음 27°C에서 螢光등은 48時間 조사하여 胞子를 形成시켰다. 이 중에서 10個의 單胞子를 分離하였다. 繼代培養菌株는 KJ-101과 KI-413 race를 PSA(potato sucrose agar 1.5%)培地에서 27°C로 15日間 培養하여 5回繼代培養하였다. 細胞壁再生菌株는 農業技術研究所 病理科에서 KJ-307 race에서 原形質體를 나출시켜 다시 細胞壁을 再生시킨 16個 菌株를 使用하였다.

本 菌은 PSA培地에서 27°C로 10日間 培養後 菌絲전편(직경 8 mm)을 接種源으로 使用하였다.

**培養基 및 菌株培養.** 菌株는 Modified Czapeck培地를 50 ml 남은 삼각 flask에 接種後 27°C 항

온기에서 진탕배양하였다. Czapeck dox培地는  $\text{NaNO}_3$  1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 0.5 g, yeast-extract 1.5 g, pepton 5.0 g, sucrose 15.0 g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.01 g 증류수 1000 ml이었다.

培養期間의 영향은 KJ-101 race를 24日間 27°C로 培養하였고 炭素源의 實驗은 基本培地에 glucose, fructose, maltose, sucrose, starch를 各 各 달리하여 15 g씩 同量시용하여 KJ-101 및 KJ-413 race를 16日間 27°C로 培養하였다. 單胞子分離菌株, 繼代培養菌株 및 細胞 生菌株菌株는 27°C에서 16日間 培養하였다.

**蛋白質抽出.** 모든 實驗은 培養後 16일에, 培養期間에 따른 菌株間 比較는 培養後 6일부터 24일까지 2日 간격으로 蛋白質을 抽出하였다.

蛋白質抽出方法은 培養後 菌絲體를 buchnerfunnel을 이용하여 filter paper(whatman No. 3)로 거른後 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 세척하여 수집하였다. 本 菌絲體에 生體重 2배의 同一 buffer를 첨가하여 4°C에서 유발을 사용하여 마쇄하였다. 이것을 4°C에서 12,000 g로 30分間 고속냉동원심분리後 상등액을 취하여 전기영동재료로 使用하였다.

蛋白質含量은 Lowry等(11)의 方法을 利用하여 測定하였다.

**電氣泳動 및 發色.** Panta phor system(18)을 使用하였다. 10~25% polyacrylamide gradient slab gel을 使用하였고 continuous buffer system으로 gel buffer와 tray buffer는 0.125 M tris-borate buffer(pH 8.9)를 使用하였다. slot當 시료는 100  $\mu\text{l}$ 를 넣었고 電氣泳動은 10°C에서 400 Volt로 20時間 하였다.

Esterase 同位酵素發色은 泳動이 끝난 gel을 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 30分間 buffer를 2回 갈아주면서 침적하여 gel의 酸度를 조절後 발색액( $\alpha$ -naphthylacetate 60 mg, Fast blue RR salt 70 mg, 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 120 ml)에 35°C에서 發色하였다(8).

## 結果 및 考察

**培養期間의 영향.** KJ-101 race의 同位酵素 pattern이 培養期間에 의하여 變化되는가를 관찰하기

위하여 培養 6日부터 2日 간격으로 24日까지 蛋白質 含量의 測定 및 同位酵素 pattern을 조사하였다.

KJ-101 race는 初期에는 엷은 노란색이었으나 培養期間이 길어짐에 따라 짙은 회색 혹은 밤색으로 變했고 蛋白質含量은 培養 後 培養日數가 길어짐에 따라 점점 낮아지는 경향을 보여 6日에는 菌絲生體重의 mg當 72  $\mu$ g, 14日에는 45  $\mu$ g, 24日에는 33

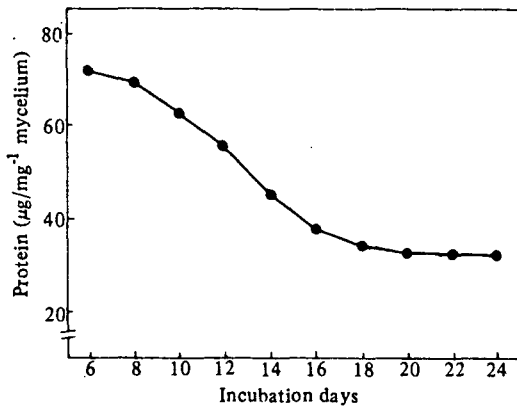


Fig. 1. The effect of cultural age on the crude protein content of mycelium of *Pyricularia oryzae* race KJ-101.

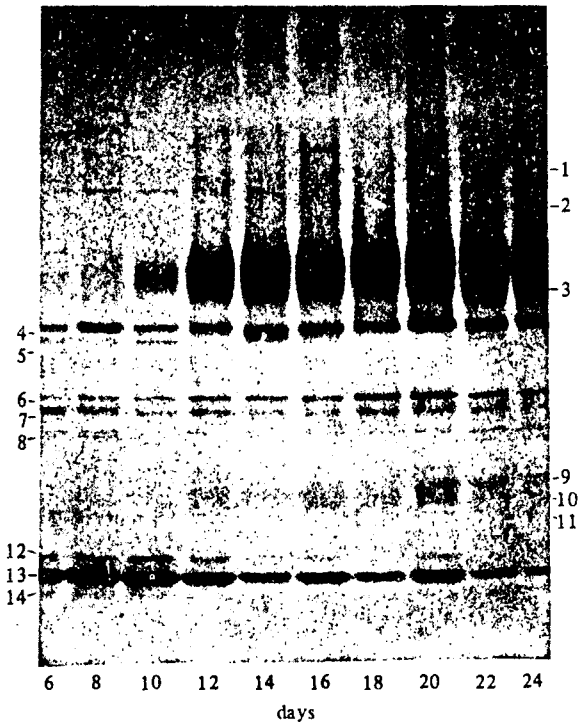


Fig. 2. Esterase isozyme pattern of mycelium in *Pyricularia oryzae* race KJ-101 with cultural age for 24 days.

$\mu$ g의 含量變化를 보였다(그림 1). Esterase 同位酵素 band pattern은 1~14個의 band를 보였다. 이 중에서 3, 4, 5번 band는 培養期間이 길어질수록 酵素量이 높아진 반면 12, 13, 14번 band는 점점 그 量이 낮아졌지만 同位酵素 pattern은 一定하였고 培養 16日이 가장 좋은 同位酵素 pattern을 보였다(그림 2).

達山和紀(20)에 의하면 *Pyricularia oryzae* 두 race의 paper electrogram에서 菌이 生長함에 따라 菌體의 蛋白質 band pattern은 명확하지 않으며 培養 6週 後에는 band가 나타나지 않았고 生體重의 變化는 培養 2~5週에서 점점 감소한다고 하였다. 이와같은 견해는 여러 學者(1, 14)들에 의해서도 나타났는데 培養期間에 따른 生體重의 減少와 菌의 色變化는 酵素 pattern에는 變化를 주지 않는다고 하여 本實驗과 一致한다. 이와 反面 Glynn과 Reid(9), Whitney等(21)은 培養期間에 따른 band pattern의 變化를 주장하였는데 本實驗과 비추어 볼 때 이들은 대부분 낮은 gel 조성과 homogenous system을 사용했으므로 蛋白質分子의 무게나 크기가 작은 band를 gel에서 볼 수가 없었을 것으로 추정된다. Gradient gel이 minor band를 잘 관찰할 수 있는 system임을 고려해 볼 때 培養에 따른 菌體内の 含量이 줄어들더라도 同位酵素를 利用한 菌의 分類에 있어서 오류를 최소화할 수 있으리라 생각된다.

**炭素源의 영향.** KJ-101과 KI-413 race의 esterase 同位酵素 pattern이 Modified Czapek培地に glucose, fructose, maltose, sucrose 및 starch의 炭素源을 달리하였을 때 變化되는가를 관찰하였다.

Esterase 同位酵素는 1~13의 위치에 band가 있었으며 炭素源을 달리 하였을 때도 band pattern에는 차이가 없었고 단지 2번 band의 酵素量에만 약간의 차이가 있었다(그림 3).

Meyer等(13)은 *Fusarium oxysporum*의 esterase 同位酵素量은 pectin과 sucrose를 培地에서 달리 하였을 때 變化된다고 하였으나 Alfens等(1)은 培地の 種類가 酵素의 量에는 영향을 미치나 菌體内の 酵素 pattern은 차이가 없다고 하였고 Durbin(6)은 *Septoria avenae*에서 單孢子 分離한 菌의 蛋白質 pattern은 Czapek, Fries 및 Richard培地에서 培養하더라도 그 pattern은 一定하다고 하였다. 本 KJ-101과 KI-413 race는 菌體의 es-

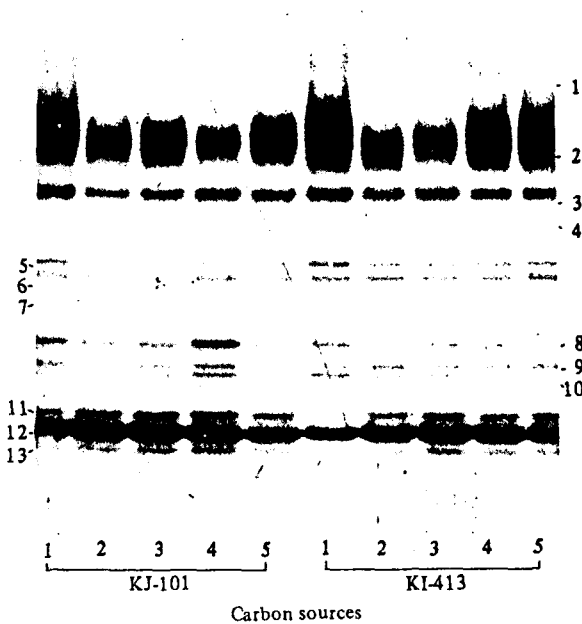


Fig. 3. Esterase isozyme pattern of mycelium in *Pyricularia oryzae* race KJ-101 and KI-413 cultured with the different carbon sources. 1: glucose, 2: maltose, 3: fructose, 4: sucrose 5: starch.

terase 同位酵素로서 대부분 同位酵소를 利用한 菌의 分類는 體內 蛋白質을 比較함으로써 炭素源은 同位酵素 pattern 에는 變化를 주지 않는 것으로 思料된다. 本 實驗에서 炭素源의 영향은 starch 첨가구가 生體重도 제일 높았고 band 에 있어서 酵素 量도 좋게 나타났다.

單胞子分離菌株의 比較. KI-315 race 에서 單胞子分離한 10 個의 菌株間 同位酵素 pattern 을 알아 보았다.

Esterase 同位酵素 pattern 은 1~11 的 위치에 band 가 있었으며 同位酵素 pattern 은 一定하였다 (그림 4).

Spith(17)는 *Neurospora intermedia* 에서 單胞子分離한 菌株間에는 同位酵素 pattern 에 차이가 없다고 하였고 Durbin(6)도 같은 견해를 나타내었다. 하지만 嗜熱病菌에 있어서 Ou 等(15)이 1 個 race 에서 單胞子分離한 菌株間에는 病原力を 달리한다는 보고도 있어 病原성과 관련지어진 菌의 分類에는 더 많은 研究가 必要하겠다.

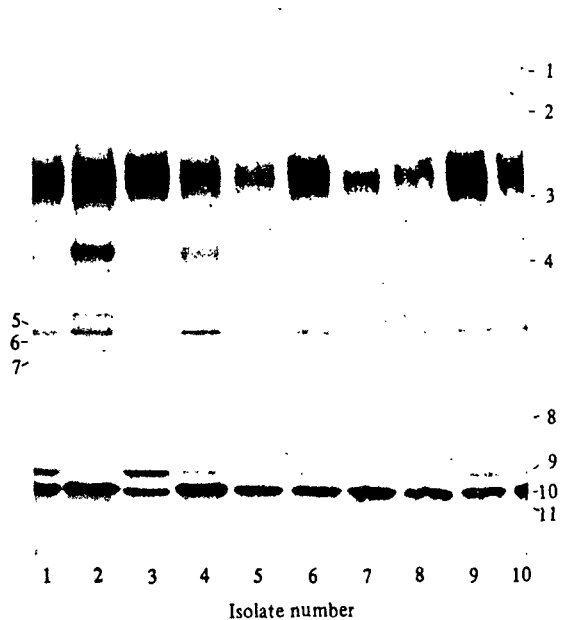


Fig. 4. Esterase isozyme pattern of mycelium in single spore isolates from *Pyricularia oryzae* race KI-315.

繼代培養의 영향. KJ-101 과 KI-413 race 를 15 日 간격으로 感染한 葉에서 5 回 繼代培養하여 酵素 pattern 을 알아 보았다.

두 race 모두 1~13 的 band 가 있었으며 各 菌株間에 3 個 band 的 酵素 量에 차이가 있었으나 同位酵素 pattern 은 一定하였다(그림 5).

Stipes 等(19)은 *Endothia gyrosa* 와 *E. parasitica* 的 isolates 는 繼代培養하더라도 그 同位酵素 pattern 은 同一하다고 하였으며 *E. gyrosa* 的 isolates 間에는 약간의 차이는 있었으나 band pattern 은 變함이 없다고 하여 一致된 傾向을 나타낸다.

最近에는 단순한 菌의 分類외에 病原성과 관련지어진 菌의 分類 및 集團遺傳에 관하여 보고된 바 있다(1, 3). 하지만 菌의 種類에 따라서 *Alternaria* 와 같은 菌은 繼代培養하였을 때 病原력이 약해지므로(2) 이 또한 酵素 pattern 에 의한 菌의 분류는 더 많은 노력에 있어야겠다.

細胞壁再生菌株의 比較. 原形質을 取出後 다시 세포벽을 재형성시킨 KI-307 race 的 16 個 菌株 esterase 同位酵素 pattern 을 알아 보았다.

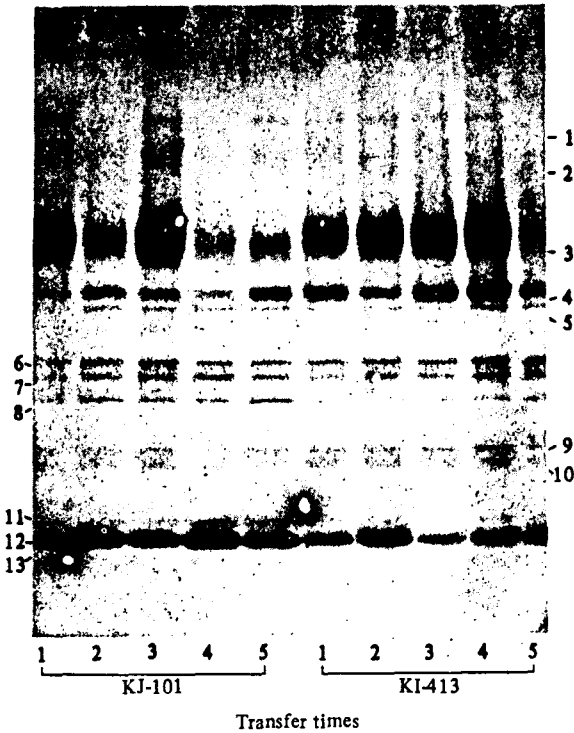


Fig. 5. Esterase isozyme pattern of mycelium in the five successive transfer culture of *Pyricularia oryzae* race KJ-101 and KI-413.

Esterase 同位酵素 pattern 은 1~13의 band 위치를 보였으며 세포벽 재생균주(2-8, 10-16)는 原菌(1, 9)과 같은 同位酵素 pattern 을 보여 차이가 없었고 菌株間 band에 있어서 酵素 量에만 차이가 났다(그림 6).

眞菌에 있어서 生理·生化學的 遺傳研究에서는 세포벽을 제거시킨 것과 이를 利用하여 DNA 유출, 原形質體의 분리, 융합을 研究하는데 이에는 agarose gel 및 polyacrylamide gel의 電氣泳動法이 利用되며 이에 따르는 酵素 pattern의 安定性 또한 필요하리라 생각된다.

電氣泳動法에 의한 同位酵素 pattern 은 gel의 농도와 조성(Homogenous, Gradient, SDS, IEF)에 따라 혹은 gel의 pH 및 seperating buffer 등 여러 要因에 의해 變化될 수 있으므로 酵素形態를 가장 명확히 나타낼 수 있는 체계를 확립하는 것이 菌의 分類에 있어서 重要하다.

參 考 文 獻

1. ALFENAS, A. C., JENG, R. & HUBBES, M.

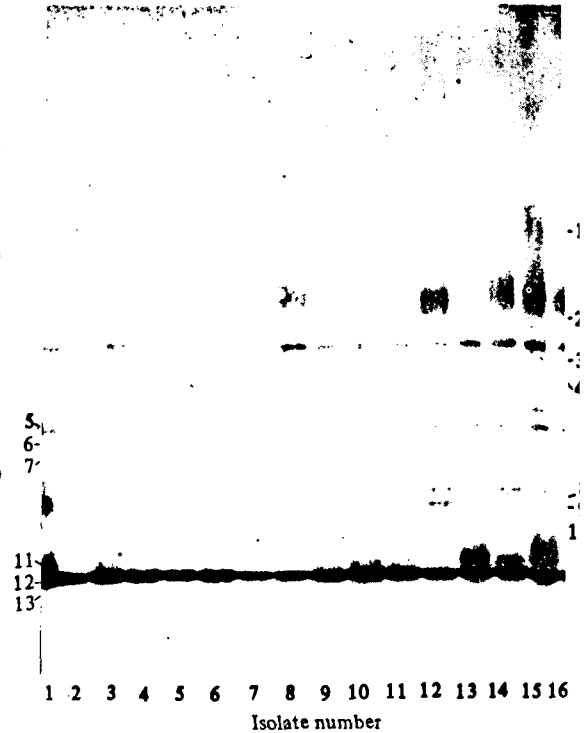


Fig. 6. Esterase isozyme pattern of mycelium in *Pyricularia oryzae* race KI-307 (1, 9) and cell wall regenerated isolates (2-8, 10-16). 1: parent, 2-8: isolates derived from # 1, 9: parent, 10-16: isolates derived from # 9.

(1984). Isozyme and protein patterns of isolates of *Cryphonectria cubensis* differing in virulence. *Can. J. Botany* 62: 1756-1762.  
 2. ASADA, Y., BUSHNELL, W. R., OUCH, S. & VALANCE, C. P. (1982). *Plant Infection. The Physiological and Biochemical Basis*. Page 201-202. Japan Scientific Societies Press and Springer-Verlag.  
 3. BONDE, M. R., PETERSON, G. L., DOWLER, W. M. & MAY, B. (1984). Isozyme analysis to differentiate species of *Peronosclerospora* causing downy mildews of maize. *Phytopathology* 74: 1278-1283.  
 4. CHANG, L. O., SRB, A. M. & STEWARD, F. C. (1962). Electrophoretic separation of the soluble proteins of *Neurospora*. *Nature* 193: 756.  
 5. CHAPMAN, E. S. & OSTROVSKY, D. S. (1976). Protein changes in response to temperature stress in *Papulaspora thermophila*. *Mycolo-*

- gia 68: 678-681.
6. DUBBIN, R. D. (1966). Comparative gel-electrophoretic investigation of the protein patterns of *Septoria* species. *Nature* 210: 1186-1187.
  7. EFRON, Y. (1970). Tissue specific variation in the isozyme pattern of the Apl acid phosphatase in maize. *Genetics* 65: 575-583.
  8. GEBBIEL, O. (1971). Locating enzymes on gels. *Methods in Enzymology* 22: 578-604. Academic Press New York and London
  9. GLYNN, A. N. & REID, J. (1969). Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in the genus *Fusarium*. *Can. J. Botany* 47: 1823-1831.
  10. HALL, R. (1967). Proteins and catalase isozymes from *Fusarium solani* and their taxonomic significance. *Aust. J. Biol. Sci.* 20: 419-428.
  11. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & PADALL, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
  12. McCOWN, B. H., HALL, T. C. & BECK, G. E. (1969). Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental change. *Plant Physiol.* 44: 210-216.
  13. MEYER, J. A., GARBER, E. D., & SHAEFFER, SU SAN G. (1964). Genetics of phytopathogenic fungi. XII. Detection of esterase and phosphatases in cultural filtrates of *Fusarium oxysporum* and *F. xylarioides* by starch gel zone electrophoresis. *Botan. Gaz.* 125: 298-300.
  14. MEYER, J. A. & BENARD, J. L. (1969). Protein and esterase patterns of two formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 59: 1409-1411.
  15. OU, S. H. & AYAD, M. R. (1968). Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesion and monoconidial cultures *Phytopathology* 58: 179-182.
  16. PARANJPR, M. S., CEEN, P. K. & JONG, S. C. (1979). Morphogenesis of *Agaricus bisporus*: Changes in protein and enzyme activity. *Mycologia* 71: 469-478.
  17. SPITH, P. T. (1975). Population genetics of allozyme variation in *Neurospora intermedia*. *Genetics* 80: 785-805.
  18. STEGEMANN, H., BERGEMEISTER, W., GRANCKSEN, H. & KROGERRECKLENFORD, E. (1985). Gel electrophoresis and isoelectric focusing, Chapter 3. Standard Electrophoresis (PAGE), Institut für Biochemie, Biologische Bundesanstalt, Messeweg 11 D-3300 Braunschweig (west germany).
  19. STIPES, R. T., EMERT, G. H. & ROSS, D. B. (1982). Differentiation of *Endothia gyrosa* and *Endothia parasitica* by disc electrophoresis of intramycelial enzymes and proteins. *Mycologia* 74: 138-141.
  20. 達山和記. (1961). 伊紙電気泳動法にはる植物病原菌 菌糸たんぱり検索. 日植病報 24: 1-6.
  21. WHITNY, J. P., VAUGHAN, J. G., & HEALE, J. B. (1968). A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.* 19: 415-427.