

## Trichoderma koningii의 conidiospore로부터의 원형질체 생성에 관한 전자현미경적 연구

박희문 · 임현만\* · 홍순우 · 하영칠

### Electron Microscopic Study of Protoplast Formation from the Conidiospore of *Trichoderma koningii*

Park, H.M., H.M. Lim,\* S.W. Hong, and Y.C. Hah

(Received Oct. 8, 1984)

#### Abstract

Fine structure of dormant and swollen conidiospore from *Trichoderma koningii* and the mechanism of protoplasting from the conidiospore were studied by scanning and transmission electron microscopy.

The cell wall of dormant conidiospore was two-layered structure which consisted of electron dense outer layer and electron transparent inner layer. After 8.5 hrs incubation, the conidiospore was swollen and the outer layer of cell wall shown unequal thickness and partial breakage.

Protoplast was released through the pore which has been formed by the breakage of outer layer and dissolution of newly synthesized cell wall for germ-tube formation.

Swollen conidiospore and protoplast in releasing process contained various cell organelles and vacuoles with electron dense materials. The protoplast contained looser cytoplasm and had no cell wall materials outside of plasmamembrane.

#### 서 론

사상균류의 균사체로부터 원형질체를 분리하여 정상균사체로의 환원과정을 관찰하고 융합을 유도, 성공한 예는 많으나(Anne들 1976; Croft들 1979; Ferenczy들, 1975) conidiospore로부터 원형질체의 생성을 유도하여 분리한 예는 *Aspergil-*

*lus flavus* (Moore와 Peberdy, 1976), *Aspergillus nidulans* (Bos들, 1981), *Trichoderma reesei* (Toyama들, 1983) 외에는 없는 실정이다.

본인들은 이미 *Trichoderma koningii*의 균사체로부터 원형질체의 생성을 유도하여, 그 생성과정 및 환원과정을 조사, 보고한 바 있으며(Cho 들, 1981a,b; Lim들, 1983) 원형질체융합에 의한

\*서울대학교 자연대 미생물학과

\*\*연세대학교 의과대학 전자현미경실

Dept. of Microbiol. Seoul National University

\*E.M. Lab., College of Med., Yon Sei University

본 논문은 1983년도 문교부 학술연구조성비에 의한 연구의 일부임.

종내·종간접종의 생성을 유도 분리한 바 있다(Hong들, 1984a,b; Park들, 1984). 또한 *T. koningii*의 conidiospore로부터 원형질체 생성을 유도하기 위한 조건 등을 조사 보고한 바 있으나(Park들, 1983) 지금까지 사상균류의 포자로부터 원형질체의 생성과정에 관한 연구는 광학현미경을 사용하여 조사하였을 뿐 전자현미경을 사용하여 그 미세구조의 변화를 조사한 경우는 없다.

따라서 본인들은 *T. koningii*의 conidiospore로부터 원형질체가 생성되는 과정과 conidiospore의 세포벽미세구조변화 및 원형질체의 특성을 자세히 규명하기 위하여 주사전자현미경과 투과전자현미경을 사용하여 관찰하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 배양조건

균주로는 *Trichoderma koningii* ATCC 26113을 사용하였으며, 균주보관용 완전사면배지로는 potato dextrose agar 배지(Difco)를 사용하였고 conidia를 swelling 시키기 위한 최소액체배지는 Mandel salt에 dextrose를 탄소원으로 첨가하여 (dextrose 10g, urea 0.3g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4g,  $\text{CaCl}_2$  0.06g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.456mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.28mg,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.85mg per liter) 28°C에서 배양하였다.

### 2. Protoplast의 생성

*T. koningii*의 사면배지에 0.02%(v/v) tween 80 용액을 넣고 conidia 혼탁액을 만든 다음 haemocytometer로 conidia 수를 세어, 2-Deoxy-D-Glucose(2-DG)가 첨가되거나 ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 첨가되지 아니한 최소액체배지에 접종한 후 ( $1.0 \times 10^6$  conidia/ml) 28°C에서 8.5시간 진탕배양하여 conidia를 swelling시켜 원심분리 ( $750 \times g$ , 10분)하여 수득하였다. 이를 osmotic stabilizer로 세척한 후 2% Driselase (dissolved in osmotic stabilizer, Koywa Hakko Co. Ltd, Japan)를 효소용액 1ml 당  $1.0 \times 10^7$  conidia가 되도록 처리하여 28°C에서 진탕배양하면서 3시간 동안 반응시켜 protoplast

의 생성을 유도하였다.

### 3. 투과전자현미경(TEM) 시료처리 방법

사면배지에서 수득한 conidia, 최소액체배지에서 8.5시간 swelling시킨 conidia 및 swelling시킨 후 3시간 동안 세포벽분해효소 (2% Driselase)를 처리한 conidia 반응 혼합물을 등에 각기 3%(v/v) glutaraldehyde (in osmotic stabilizer)를 가하여 glutaraldehyde가 약 1%되도록 하였다. 이를 다시 원심분리하여 3% glutaraldehyde 용액을 가하여 4°C에서 전고정하였다.

전고정은 4~6시간 동안 행하였으며 전고정이 끝난 시료는 osmotic stabilizer로 몇 차례 세척한 후 1%(w/v) osmium tetroxide (in stabilizer)로 실온에서 두 시간 후고정하였다.

후고정 후 각 시료를 2%(w/v) agar(in 0.01M phosphate buffer, pH 5.8)에 포매하여 굳힌 다음 1mm<sup>3</sup>으로 잘라서 0.5%(w/v) uranyl acetate(in 0.01M phosphate buffer, pH 5.8)에서 두 시간 동안 세척결 염색하였다.

각 시료의 탈수는 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95%의 알코올로 20분 간격으로 행하였으며 absolute ethanol에서 두 번 행하였다. 탈수가 끝난 후 propylene oxide에 20분간 방치하였고 Epon과 propylene oxide의 비가 1:2, 1:1, 2:1의 용액에 각각 1시간씩 방치하여 Epon이 시료속으로 잘 스며들게 한 후 Epon에 포매하여 24시간동안 방치한 후 65°C에서 3일간 polymerization시켰다.

Thin section은 Sorvall MT-2형 ultramicrotome으로 유리칼을 사용하여 만들었으며, silver section은 모아 collodion membrane의 coating된 400 mesh grid에 올려 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색한 후 Hitachi H-500형 투과전자현미경으로 75KV에서 관찰하였다.

### 4. 주사전자현미경(SEM) 시료처리 방법

정상 conidia와 최소액체배지에서 swelling시킨 후 3시간 동안 효소처리한 반응 혼합물을 TEM과 같은 방법으로 전고정하였다.

전고정이 끝난 시료는 membrane filter (millipore, 0.45μm)에 올려 TEM과 같은 방법으로 후고정하고 탈수시켰다.

탈수가 끝난 각 시료는 isoamylacetate에 30분 냉치한 후 액체 CO<sub>2</sub>를 이용하여 critical point drier (Hitachi HCP-2)로 건조하였다. 건조 후 각 시료를 aluminium stub에 올려 40nm 두께로 gold coating하여 (Eiko IB-3) Hitachi S-450형 주사전자현미경으로 20KV에서 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 정상 conidiospore의 구조

SEM으로 관찰된 *T. koningii*의 휴지상태 (dormant stage)의 conidiospore는 그 표면이 비교적 배끄러운 타원형 구조를 갖고 있으며, conidiospore의 장축의 길이는 약 3.0μm 내외였다 (Fig. 1).

TEM으로 관찰한 휴지기의 conidiospore 세포벽 구조는 전자밀도가 높은 외부층(outer layer : O)과 전자밀도가 낮은 내부층(inner layer : I)으로 이루어진 두 층(two-layer) 구조를 갖고 있다 (Fig. 5, 6). 그 내부에는 원형질막(plasmamembrane) 가까이에 위치하며 단일막구조를 둘러싸여 있는 액포(vacuole)와 특별한 막구조가 없이 비교적 투명한 지질입자(lipid granule) 및 전자밀도가 높은 물질(electron dense material)을 함유하는 액포 등을 볼 수 있다. 또한 미토콘드리아(mitochondria)와 리보솜(ribosome)이 다양 존재하며 휴지기 conidiospore 원형질막의 특징인 원형질막의 함입(invagination) 또는 굴곡현상(grooving)을 볼 수 있다 (Fig. 5). 휴지상태의 conidiospore의 세포벽 디세구조를 살펴 본 경우 두 층으로 이루어져 있으며 원형질막의 형태가 상당히 불균일하며 굴곡이 심하게 이루어져 있음을 알 수 있다.

### 2. Swollen conidiospore의 구조

2-DG가 첨가된 최소액체배지에서 8.5 시간 전 배양한 conidiospore의 구조를 TEM으로 살펴본 경우, 그 크기가 전체적으로 커져 장축의 길이가 5μm 내외로 다소 원형에 가까운 형태로 나타나며 휴지기 conidiospore 세포벽 구조와는 달리 외부층의 두께가 전반적으로 얇아지고 불균일해지며, 중간중간이 끊어진 단속현상을 나타낸다. 반면 내부층은 외부층에 비해 볼 때 상대적으로 두꺼워진 양상을 볼 수 있다 (Fig. 7, 11).

Swollen conidiospore의 원형질막은 휴지기 때와 마찬가지로 원형질막의 함입과 굴곡을 보이며 swelling 중인 conidiospore나 생장중인 균사체의 특정적인 원형질막 구조체인 lomasome을 관찰할 수 있다. 또한 원형질막에 인접해 있는 소포체와 지질체, 미토콘드리아, 핵, 다양한 리보솜 등도 관찰되었다.

2-DG를 첨가하지 아니한 최소액체배지에서 전 배양하여 swelling시킨 conidiospore의 세포벽구조도 세포벽의 외부층이 단속적이고 다소 얇아지는 양상을 보여주어 (Fig. 8) 2-DG가 첨가된 최소배지에서 swelling시킨 경우와 비교하여 별다른 차이점을 발견할 수 없었다.

최소액체배지에서 conidiospore를 전배양시킬 때, 배양 8시간 이후부터 발아관(germ-tube)의 형성이 시작됨이 밝혀진 바 있다 (Park들, 1983). 따라서, 2-DG가 첨가된 액체배지에서 8.5 시간 전 배양하여 swelling 시킨 conidiospore의 발아관 형성부위로 예상되는 곳의 세포벽구조를 살펴보았다. 그 결과 Fig. 9에서 볼 수 있듯이, 발아관이 형성되려는 부위의 세포벽은 기존의 세포벽 성분과 동일한 세포벽 성분이 연속적으로 발달된 것이 아니라, 기존의 세포벽 내부층과 원형질막 사이에서 새로운 세포벽층이 형성되어 발아관으로 둘출되려는 부위의 원형질외부를 둘러싸고 있음을 알 수 있었다.

### 3. Protoplast의 생성과정

SEM으로 살펴본 원형질체의 생성과정은 Fig. 2, 3, 4에서 보듯이, swelling된 conidiospore의 세포벽이 부분적으로 파괴되면서 원형질체가 세포벽 외부로 밀려나오기 시작하여 (Fig. 2), 세포벽의 파괴가 더욱 진행되면서 원형질체의 생성이 진행되며 (Fig. 3), 원형질체가 완전히 빠져나간 후 분해되지 아니한 conidiospore 세포벽의 대부분은 ghost 세포로 남게 됨을 알 수 있다 (Fig. 4). 또한 swelling된 이들 conidiospore의 세포벽 표면은 휴지기 상태의 conidiospore 세포벽의 외부양상과는 달리, 그 표면이 상당히 거칠게 나타남을 알 수 있다.

원형질체의 생성과정을 TEM으로 살펴본 경우,

SEM의 경우와 마찬가지로 conidiospore 세포벽의 한쪽 부분이 파괴되면서 원형질체가 빠져 나오는 과정을 볼 수 있는데 (Fig. 10), 원형질체 생성 초기에는, 원형질체가 분리되기 시작하는 conidiospore의 세포벽은 전자밀도가 높은 바깥층과 전자밀도가 낮은 내부층이 모두 존재하고 있는 형태 (Fig. 10 A)와 세포벽 내부층이 다소 분해된 상태 (Fig. 10 B) 및 세포벽 내부층은 거의 분해되고 외부층만 남아있는 형태 (Fig. 10 C)를 볼 수 있다. 또한 conidiospore 세포벽으로부터 원형질이 완전히 분리되어 원형질막으로만 둘러싸인 원형질체를 볼 수 있다.

그 형성이 진행되고 있는 원형질체의 원형질막쪽으로 전자밀도가 높은 물질 (electron dense material)을 함유하는 액포 (vacuole)들이 위치하며, 액포가 원형질막에 융합되고 있는 상태 및 원형질체 외부로 돌출되어 다소 변형된 형태를 갖는 액포 등을 관찰할 수 있다. 뿐만 아니라, 작은 소포체나 액포가 원형질외부로 방출되어 독립적으로 존재하는 형태와 세포벽 전유물 등을 볼 수 있다,

#### 4. Protoplast의 미세구조

최소액체배지에서 8.5시간 동안 전배양하여 swelling시킨 conidiospore의 세포벽은 단속적인 외부층과 그 안쪽에 전자밀도가 낮은 내부층의 두 층이 존재하는 반면 (Fig. 11), 원형질체의 외부는 원형질막에 특정한 세포벽 성분이 존재하지 아니하며, 원형질막 외부의 물리적인 장벽이 제거됨으로써, 세포벽이 존재할 때 보다 원형질의 밀도가 훨씬 느슨하게 나타남을 알 수 있다. 또한 원형질체의 원형질막에는 lomasome이나 원형질막의 줄곡현상이 없이 비교적 평평한 막 구조를 보여주고 있다 (Fig. 12).

conidiospore의 세포벽으로부터 완전히 분리된 원형질체의 경우 (Fig. 12) 원형질막으로만 둘러싸여 있고, 내부에 많은 수의 미토콘드리아, 소포체 및 핵을 볼 수 있다.

#### 고 찰

휴지기 상태의 conidiospore의 세포벽은 *Aspergillus niger* (Deans들, 1980), *Trichoderma vi-*

*ride* (Rosen들, 1974), *Botrytis cinerea* (Gull과 Trinci, 1971) 등과 마찬가지로 전자밀도가 높은 외부층과 전자밀도가 낮은 내부층의 두 층으로 이루어져 있다 (Fig. 5, 6).

최소액체배지에서 8.5시간 전배양하여 swelling시킨 conidiospore의 세포벽 외부층은 부분적으로 끊어지고 두께가 불균일한 양상을 보여준다 (Fig. 7, 8), 이는 외부층이 계속 존재하기는 하나 그 양이 더 이상 늘어나지 않고 conidiospore가 swelling되어 부피가 증가함에 따라, conidiospore 표면에 확장되어 불균일하게 분포하거나 부분적으로 끊어지고 결국 외부층이 잃어진 어느 한 쪽이 파괴되면서 발아관이 형성되는 것으로 사료된다. 이러한 양상은 *Hypocrea pulvinata* (Dixon과 Speller, 1983), *T. viride* (Rosen들, 1974) 및 *Ceratocystis adiposa* (Hawes, 1980) 등에서 관찰된다.

휴지기와 swelling된 conidiospore의 내부에는 전자밀도가 높은 물질 (electron dense material)이 포함된 액포를 볼 수 있는데, *T. viride*의 conidiospore와 *Schizophyllum commune*의 담자낭포자 (basidiospore)에서도 발견되는 이러한 구조체는 발아관 형성이 진행될수록 커지고 많아진다고 하였으며 아마도 발아관 형성 시 필요한 막성 구조체의 조립에 필요한 물질로 인단백질 (phosphoprotein)일 것이라 하였다 (Aitken과 Niederpruem, 1970).

발아관이 형성되기 직전 약간의 돌출이 일어나는 부위의 세포벽구조는 (Fig. 9) 기존의 세포벽 층외에 새로운 두 층의 세포벽이 형성되어 발아관이 형성된 부위의 원형질을 둘러싸고 있음을 알 수 있다. 그런데 균류의 포자 (spore)는 발아관의 세포벽과 부분적 또는 전체적으로 연결되어 있는 종류와 발아관의 세포벽이 휴지기 포자의 세포벽으로부터 새로이 합성되는 두 가지 형태로 분류되는데 (Gull과 Trinci, 1971) *T. koningii*의 경우 후자의 경우에 속하는 것임을 추정할 수 있다.

휴지기의 conidiospore는 세포벽분해효소에 대하여 내성을 갖고 있으며 최소액체배지에서 7시간 이상 배양한 경우에만 원형질체가 만들어지며

배양 9시간 경부터 본격적인 발아관의 형성이 이루어진다(Park들, 1983), 그런데 휴지기 conidiospore의 각종 세포벽 분해효소에 대한 내성은 아마도 세포벽 외부층에 존재하는 melanin 성분에 기인할 것으로 보여진다. 2차대사산물인 melanin은 균사체의 활발한 생장이 정지되고 난 후에 대량 생성되기 시작하여 오래된 균사체의 세포벽 바깥부위에 축적되고 (Rowley와 Pirt, 1972) 특히 포자의 세포벽에 가장 많이 축적되며 (Novaes-Ledieu와 Mendoza, 1981) 이 melanin 성분이 각종 세포벽 가수분해효소의 작용을 억제하여 포자가 내성을 갖도록 한다(Moore와 Peberdy, 1976; Rosenberg, 1976). 따라서, *T. koningii*의 conidiospore의 melanin이 포함된 세포벽 외부층은 본 실험에서 세포벽 분해효소로 사용한 Driselase에 의하여 분해되지 않는 반면, conidiospore가 swelling되면서 표면적이 증가하므로 외부층이 점차 얇아지거나 단절이 일어나 내부층이 외부로 나출되며, swelling이 최대로 진행되어 발아관 형성이 진행되는 부위도 새로운 세포벽 층이 형성되어 나출되게 된다. 그 결과 나출된 세포벽 내부층이나 새로 형성된 세포벽이 각종 세포벽 분해효소에 의하여 분해되기 시작할 것으로 예상된다.

일반적으로, 균류의 세포벽 구성성분 중 chitin은 거의 모든 균류의 세포벽에 있으며, 포자낭균(Ascomycetes) 및 담자낭균(Basidiomycetes)과 불완전균류(Deuteromycetes)의 경우 주로 포도당이  $\beta(1 \rightarrow 3)$ ,  $\beta(1 \rightarrow 6)$ ,  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ 로 결합한 glucan들이 주된 세포벽성분으로 알려져 있다. chitin의 glucosamine중 상당부분이 아미노산을 매개로하여  $\beta$ -glucan과 결합되어 있으며 (Sietsma와 Wessels, 1979, 1981; Gow와 Gooday, 1983) *Schizophyllum commune*의 균사체는 가장 외부에  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucan 층이 있고 그 아래쪽에 chitin과  $\beta(1 \rightarrow 3)/\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucan이 상호결합된 층이 존재하는 것으로 알려져 있다(Wessels들, 1983). Jeenah들(1982)에 의하면 *Trichoderma pseudokoningii*의 균사체 세포벽은 제일 바깥층에  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -와  $\beta(1 \rightarrow 6)$ -linkage를 갖는 glucan이 있고 그 내부에 단백질 또는 당단백질(glycoprotein)층이 있으며 제일

안쪽에 chitin층이 존재하고 있을 것이라 하였다. 또한 *S. commune*의 원형질체가 정상세포로 환원될 때  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucan의 전구물질이  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucan이나 chitin의 전구물질보다 훨씬 많으며, 초기의  $\beta$ -glucan은  $\beta(1 \rightarrow 6)$ -linkage가 거의 없는  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucan의 순수증합체(homopolymer)이며, 이것이 후에 chitin과 결합하여 단단한 구조체로 된다고 하였다(Sonnenberg들, 1982).

그런데, chitinase와  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucanase의 활성이 거의 없고  $\beta(1 \rightarrow 3)$ -와  $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucanase 등의 활성이 높은 것으로 알려진 Driselase (Picataggio들, 1983)에 의하여 생장초기의 *T. koningii* (Cho들, 1981; Hong들, 1984; Park들, 1984)와 *T. reesei* (Picataggio들, 1983; Hong들, 1984)의 균사체로부터 원형질체가 용이하게 만들어졌으며, swelling된 conidiospore에 chitinase를 처리한 경우 원형질체가 생성되지 아니하였고  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucanase가 주성분이며 소량의 laminarinase 및 chitinase 활성을 갖는 효소인 novozyme에 의해서는 Driselase의 경우보다 원형질체 생성이 약 1/3 정도 감소한 사설(Park들, 1983)로 미루어보아 *T. koningii*의 세포벽 역시 chitin과  $\beta(1 \rightarrow 3)$ - $\beta(1 \rightarrow 6)$ -, 또는  $\beta(1 \rightarrow 3)/\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucan 그리고  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucan으로 구성되어 있을 것으로 추정되며 특히 swelling된 conidiospore의 발아관 생성부위의 새로운 세포벽에는 chitin과  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glucan이 비교적 소량 존재하는 것으로 추정된다.

chitin과  $\beta$ -glucan 사이의 결합에 의하여 단단한 세포벽구조를 형성하지만 세포벽 합성초기에는 chitin과  $\beta$ -glucan이 각기 독립적으로 세포벽 생장부위(균사체의 경우 균사체 말단부이며, conidiospore의 경우는 발아관이 형성될 새로운 세포벽 층)에 따로 존재하는 비교적 약한 구조체를 형성하고 있기 때문에 (Vermeulen과 Wessels, 1984), 이미 chitin과  $\beta$ -glucan의 결합이 완결되어 단단한 구조를 갖는 conidiospore의 나출된 내부층보다 아직 chitin과  $\beta$ -glucan간의 결합이 제대로 이루어지지 아니한 발아관 생성부위의 새로운 세포벽층이 세포벽분해효소(Driselase)에 의하여 쉽게 분해될 것이다. 이와 함께 2-DG를 첨가한 경우(Fig. 7)와

첨가하지 아니한 경우(Fig. 8), swelling된 conidiospore의 세포벽구조에서 별다른 차이점이 관찰되지 않으나,  $\beta$ -glucan의 합성은 균사체 말단에서 직접 이루어지고 (Wessels들, 1983) dictyosome이나 apical vesicles에는  $\beta$ -glucanase와 cellulase는 많이 있으나 (Fèvre, 1977) 다당류는 많지 않고 포도당이 세포벽으로 직접 흡수되어 균사체 말단의 세포표면에서 glucan의 합성이 이루어진다 (Fèvre와 Rougier, 1982). 따라서 포도당의 이성질체(isomer)로 다당류의 합성을 저해하여 세포벽을 약화시키는 물질로 알려져 있는 2-DG (Biely들, 1971)가 새로이 합성되는 세포벽층에 영향을 미칠 것이므로 가수분해효소에 의하여 새로이 합성되는 발아관 형성부위의 세포벽분해가 더욱 촉진되는 것으로 사료된다.

이상의 관찰사실과 추론들을 근거로하여 *T. koningii*의 conidiospore로부터 원형질체가 생성되는 과정을 Fig. 14와 같이 추정할 수 있겠다. 즉, melanin이 함유된 두꺼운 외부층을 갖는 conidiospore를 (Fig. 1, 5, 14 A) 2-DG가 첨가된 최소액체배지에서 배양하면 swelling되고 swelling이 진행됨에 따라 바깥층이 얇아지거나 부분적인 단절현상이 나타나며, 발아관이 형성된 부위에서 새로운 세포벽의 합성이 일어나고 이곳에 2-DG가 함께 끼어들어 약한 세포벽이 형성되기 시작한다 (Fig. 7, 8, 9, 11, 14B). 이를 Driselase로 처리하면 conidiospore의 나출된 내부층과 새로이 합성된 세포벽의 분해가 일어난다 (Fig. 10, 14C). 이렇게 형성된 pore를 통하여 원형질체가 빠져 나오기 시작하면서 conidiospore의 세포벽과 원형질이 분리되기 시작하고 전체 원형질이 외부로 빠져나와 원형질체를 형성하게 된다 (Fig. 2, 3, 10, 14의 D와 E). 이 과정이 더욱 진행되어 완전한 원형질의 형성이 완결되고, 세포벽 분해효소의 작용에 내성을 갖는 외부층은 ghost로 남게된다 (Fig. 4, 10, 13, 14의 E).

## 결 론

*Trichoderma koningii*의 휴지기, swelling된 conidiospore의 미세구조와 conidiospore로부터 원

형질체가 생성되는 과정 및 원형질체의 특성을 주사전자현미경과 투과전자현미경을 사용하여 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

휴지기 상태의 conidiospore 세포벽은 전자밀도가 높은 외부층과 전자밀도가 낮은 내부층의 두층으로 이루어져 있으며, 2-DG가 든 최소액체배지에서 8.5 시간 전배양한 swollen conidiospore의 세포벽은 외부층이 다소 얇아지고 불균일하게 존재하여 부분적인 단절부위가 생성되어 내부층이 나출된 양상을 보여주었다.

원형질체가 생성되는 기작은 swelling된 conidiospore의 세포벽 중 발아관이 생성될 부위의 새로이 합성된 세포벽층이 분해되어, conidiospore의 세포벽에 구멍이 생기고, 이 구멍을 통하여 전체 원형질이 빠져나오는 방식에 의하여 원형질체가 생성되는 것임을 알 수 있었다.

Swelling된 conidiospore 및 생성중에 있는 원형질체의 내부에는 여러가지 소기관들과 함께 전자밀도가 높은 물질을 갖는 액포를 다수 발견할 수 있었으며, 생성된 원형질체는 conidiospore에 비하여 보다 느슨한 원형질을 가지며, 세포벽 성분이 원형질체 외부에 남아있는 sphaeroplast가 아닌 완전한 원형질체(protoplast)였다.

## 참고문헌

- Anné, J. and J.F. Peberdy. 1976. Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene-glycol. *J. Gen. Microbiol.* 92, 413~417.
- Aitken, W.B. and D.J. Niederpruem. 1970. Ultrastructural changes and biochemical events in basidiospore germination of *Schizophyllum commune*. *J. Bacteriol.* 104, 981~988.
- Biely, P., Z. Krátký, J. Kovárik and S. Bauer. 1971. Effect of 2-Deoxy-glucose on cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae* and its relation to cell growth inhibition. *J. Bacteriol.* 107, 121~129.
- Bos, C.J. and S.M. Stakhorst. 1981. Isolation of protoplast from *Aspergillus nidulans* co-

- nidiospores. Can J. Microbiol. 27, 400~407.
- Cho, N.J., Y.H. Rhee and S.W. Hong. 1981a. Formation of protoplast from *Trichoderma koningii*. Kor J. Microbiol. 19, 186~191.
- Cho, N.J., H.M. Park and Y.H. Rhee. 1981b. Protoplast reversion of *Trichoderma koningii*. Kor. J. Microbiol. 19, 192~198.
- Croft, J.H. and R.B.G. Pales. 1979. Protoplast fusion and vegetative incompatibility in *Aspergillus nidulans*. In "Protoplast-Applications in Microbial Genetics," ed. J.F. Peberdy, pp. 27~34, Univ. Nottingham, England.
- Deans, S.G., K. Gull and J.E. Smith. 1980. Ultrastructural changes during microcycle conidiation of *Aspergillus niger*. Trans. Br. Mycol. Soc. 74, 493~499.
- Dixon, P.A. and F.M. Speller. 1983. Spore germination in *Hypocrea pulvinata* Fuckel. Microbios 38, 113~129.
- Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szegedi. 1975. High frequency fusion of fungal protoplasts. Experientia 31, 1028~1029.
- Févre, M. 1977. Subcellular localization of glucanase and cellulase in *Saprolegnia monoica*. J. Gen. Microbiol. 103, 287~295.
- Févre, M. and M. Rougier. 1983. Autoradiographic study of hyphal cell wall synthesis of *Saprolegnia*. Arch. Microbiol. 131, 212~215.
- Gow, N.A.R. and G.W. Gooday. 1983. Ultrastructure of chitin in hyphae of *Candida albicans* and other dimorphic and mycelial fungi. Protoplasma 115, 52~58.
- Gull, K. and A.P.J. Trinci. 1971. Fine structure of spore germination in *Botrytis cinerea*. J. Gen Microbiol. 68, 207~220.
- Hawes, C.R. 1980. Conidium germination in the chalara state of *Ceratocystis adiposa*: A light and electron microscopic study. Trans. Br. Mycol. Soc. 74, 321~328.
- Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park and J.M. Jeong. 1984. Intra-and interspecific protoplast fusion between *Trichoderma koningii* and *T. reesei*. Can. J. Microbiol. Submitted for publication.
- Hong, S.W., Y.C. Hah, H.M. Park and N.J. Cho. 1984. Intraspecific protoplast fusion in *Trichoderma koningii*. Kor. J. Microbiol. 22, 103~110.
- Jeenah, M.S., B.E. Davision and D. Boothly. 1982. Layered structure of *Trichoderma* cell walls. Arch. Microbiol. 133, 330~331.
- Lim, H.M., H.M. Park, Y.C. Hah and S.W. Hong. 1983. Electron microscopic study of protoplasts released from mycelium of *Trichoderma koningii*. Kor. J. Electron. Microscopy 13, 49~61.
- Moore, P.M. and J.F. Peberdy. 1976. Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. Trans. Br. Mycol. Soc. 66, 421~425.
- Novaes-Ledieu, M. and C.G. Mendoza, 1981. The cell walls of *Agaricus bisporus* and *A. campestris* fruiting body hyphae. Can. J. Microbiol. 27, 779~787.
- Park, H.M., S.W. Hong and Y.C. Hah. 1984. Isolation of protoplast from conidiospore of *Trichoderma koningii*. Kor. J. Microbiol. 21, 213~220.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1984. Complementing heterokaryon formation in *Trichoderma koningii* through protoplast fusion. Can. J. Microbiol. Submitted for publication.
- Picataggio, S.K., D.H.J. Schamhart, B.S. Monetencourt and D.E. Eveleigh. 1983. Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 121~128.
- Rosen, D., M. Edelman, E. Galun and D. Danon. 1974. Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*: Structural changes in mitochondria.

- dria and other spore constituents during conidium maturation and germination. J. Gen. Microbiol. 83, 31~49.
- Rosenberg, R.F. 1976. The cell wall. In "Filamentous Fungi Vol. 2", ed. Smith, J.E. and D.R. Berry, pp. 328~344. Edward Arnold. London.
- Rowley, B.I. and S.J. Pirt. 1972. Melanin production by *Aspergillus nidulans* in batch and chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 72, 553~563.
- Sietsma, J.H. and J.G.H. Wessels. 1979. Evidence for covalent linkages between chitin and  $\beta$ -glucan in a fungal wall. J. Gen. Microbiol. 114, 99~108.
- \_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1981. Solubility of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D/(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan in fungal walls: Importance of presumed linkage between glucan and chitin. J. Gen. Microbiol. 125, 209~212.
- Sonnenberg, A.S.M., J.H. Sietsma and J.G.H. Wessels. 1982. Biosynthesis of alkali-insoluble cell wall glucan in *Schizophyllum commune* protoplast. J. Gen. Microbiol. 128, 2667~2674.
- Toyama, H., A. Shinmyo and H. Okada. 1983. Protoplast formation from conidia of *Trichoderma reesei* by cell wall-lytic enzymes of a strain of *T. viride*, J. Ferment. Technol. 61, 409~411.
- Vermeulen, C.A. and J.G.H. Wessels. 1984. Ultrastructural differences between wall apices of growing and non-growing hyphae of *Schizophyllum commune*. Protoplasma 120, 123~131.
- Wessels, J.G.H., J.H. Sietsma and A.S.M. Sonnenberg. 1983. Wall synthesis and assembly during hyphal morphogenesis in *Schizophyllum commune*. J. Gen. Microbiol. 129, 1007~1016.

### Figure Legends

- Fig. 1.** SEM photograph of dormant conidiospore. Note that the surface of elliptical conidiospore is smooth.
- Fig. 2.** SEM photograph of protoplasting from conidiospore. Protoplast is protruding from the pore of the conidiospore. Note that the size of conidiospore is larger than that of dormant conidiospore and surface of the conidiospore is rough incomparison to that of dormant conidiospore. (W) cell wall, (P) protoplast.
- Fig. 3.** Protoplasting is proceeded. The inclusions (arrow) after protrusion of peripheral vacuoles can be seen on the surface of protoplast.
- Fig. 4.** The ghost of conidiospore cell wall after releasing of protoplast.
- Fig. 5.** Sectioned dormant conidiospore. Two-layer structure of the cell wall consist of electron dense outer layer(O) and electron transparent inner layer(I) can be seen. Vacuole(Va), lipid granule(L), mitochondria(M), and electron dense material(EDM) also can be seen. Notice the invagination of plasmamembrane(arrow). (X 12,000)
- Fig. 6.** Ultrastructure of the dormant conidiospore showing two-layer cell wall, lipid granule, plasmamembrane(Pm), endoplasmic reticulum(ER), mitochondria, and electron dense material. Notice the grooving of plasmamembrane. (X 25,000)
- Fig. 7.** Swollen conidiospore after 8.5 hrs incubation in liquid minimal medium supplemented with 2-DG. showing nucleus(N), vesicle(V), lipid granule, lomasome(Lo), plasmamembrane,

mitochondria, and invesignation of plasmamembrane(arrow). Notice the uneven thickness and discontinuity of electron dense outer layer. (X 15,000)

**Fig. 8.** Swollen conidiospore after 8.5 hrs incubation in liquid minimal medium without 2-DG showing electron dense material, nucleus, mitochondria, and endoplasmic reticulum. Notice that the uneven thickness and discontinuity of outer layer wall also can be seen. (X 12,000)

**Fig. 9.** Cell wall structure of the swollen conidiospore. Notice the formation of new cell wall (arrow) between the inner layer of conidiospore and plasmamembrane. New cell wall is also composed of two-layered wall structure (No. 1, No. 2). (X 20,000)

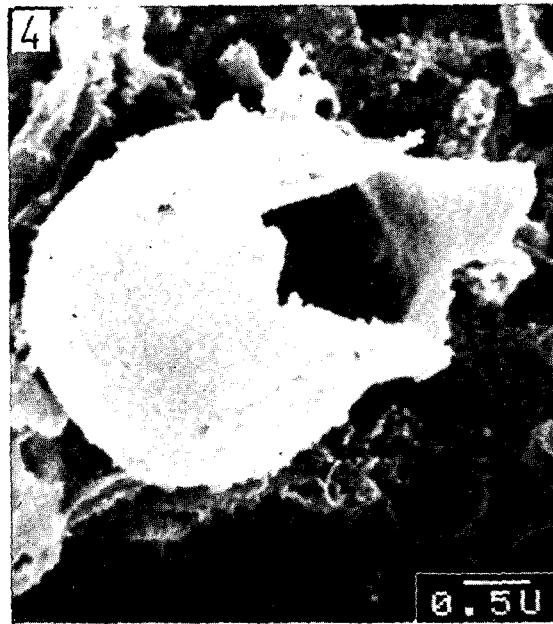
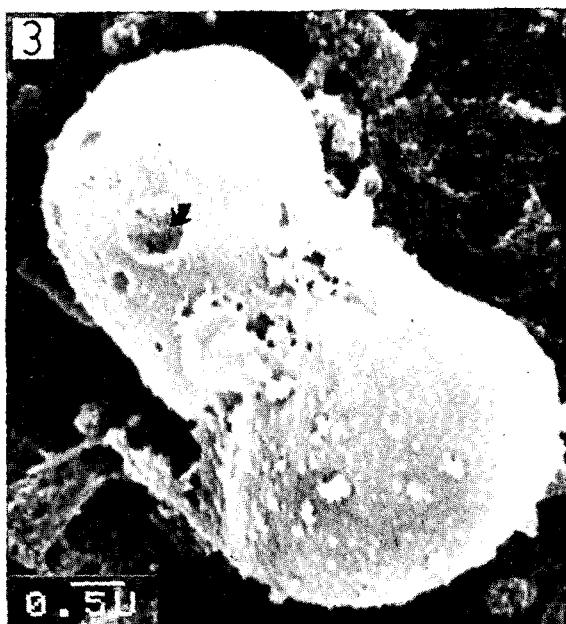
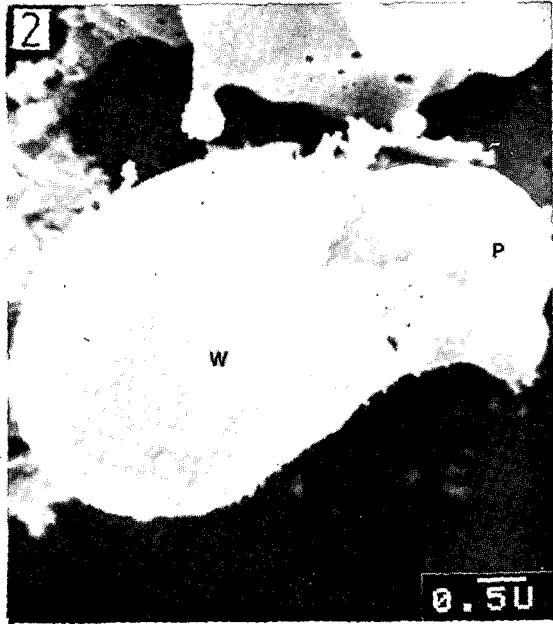
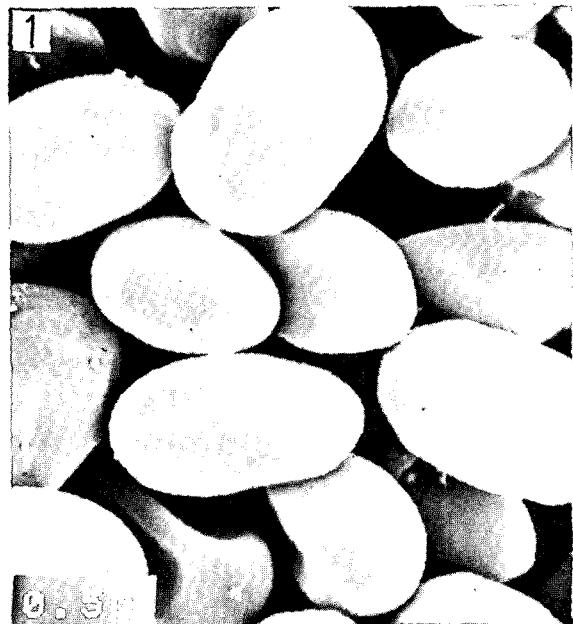
**Fig. 10.** TEM photogragh of protoplast releasing. In early stage of protoplasting(A), cytoplasm is separated from the cell wall of conidiospore and inner layer of the cell wall is still remain. In the middle stage of protoplasting(B), inclusion of pheipheral vesicles can be seen and notice that inner layer of the cell wall is dissolved more than that of the early stage. In the late stage of protoplasting(C), protoplast is almost protruded from the cell wall of conidiospore and pheipheral vacuole with electron dense material can be seen. Notice that the inner layer is almost dissolved. Protoplast(P) without any cell wall material showing pheipheral vacuole with electron dense material and somewhat deformed large vacuole (arrow) protruded out side of the cytoplasm. (X 4,000),

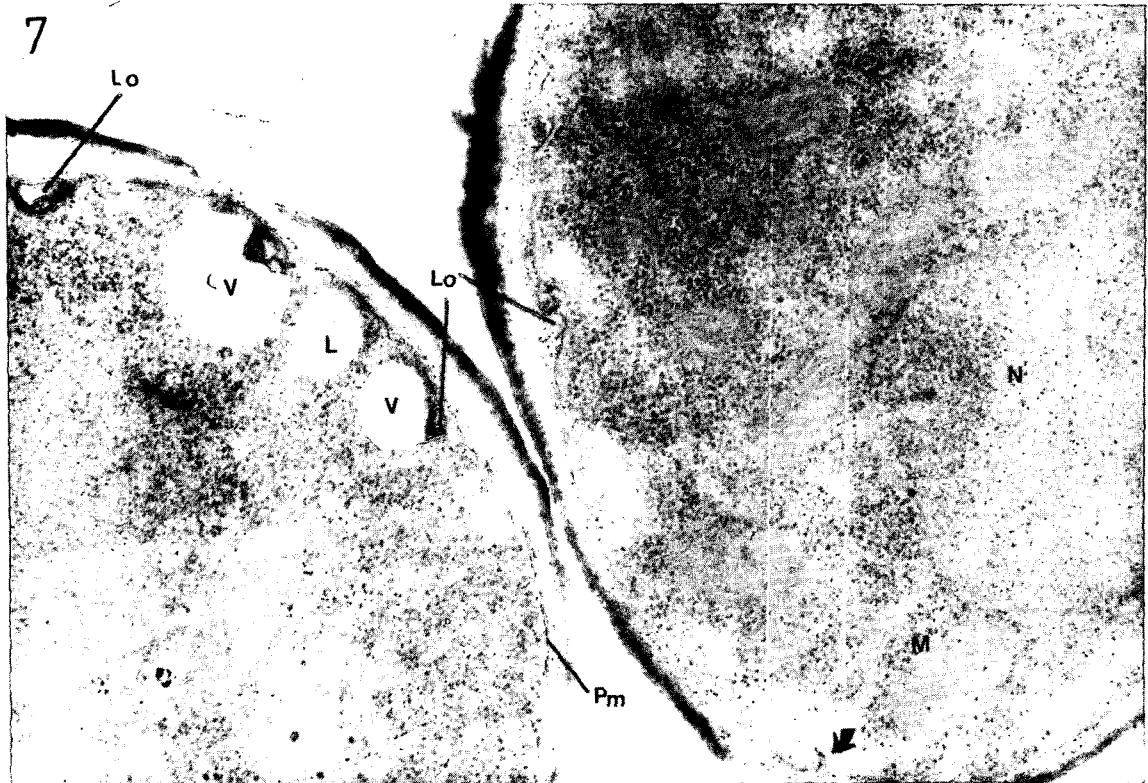
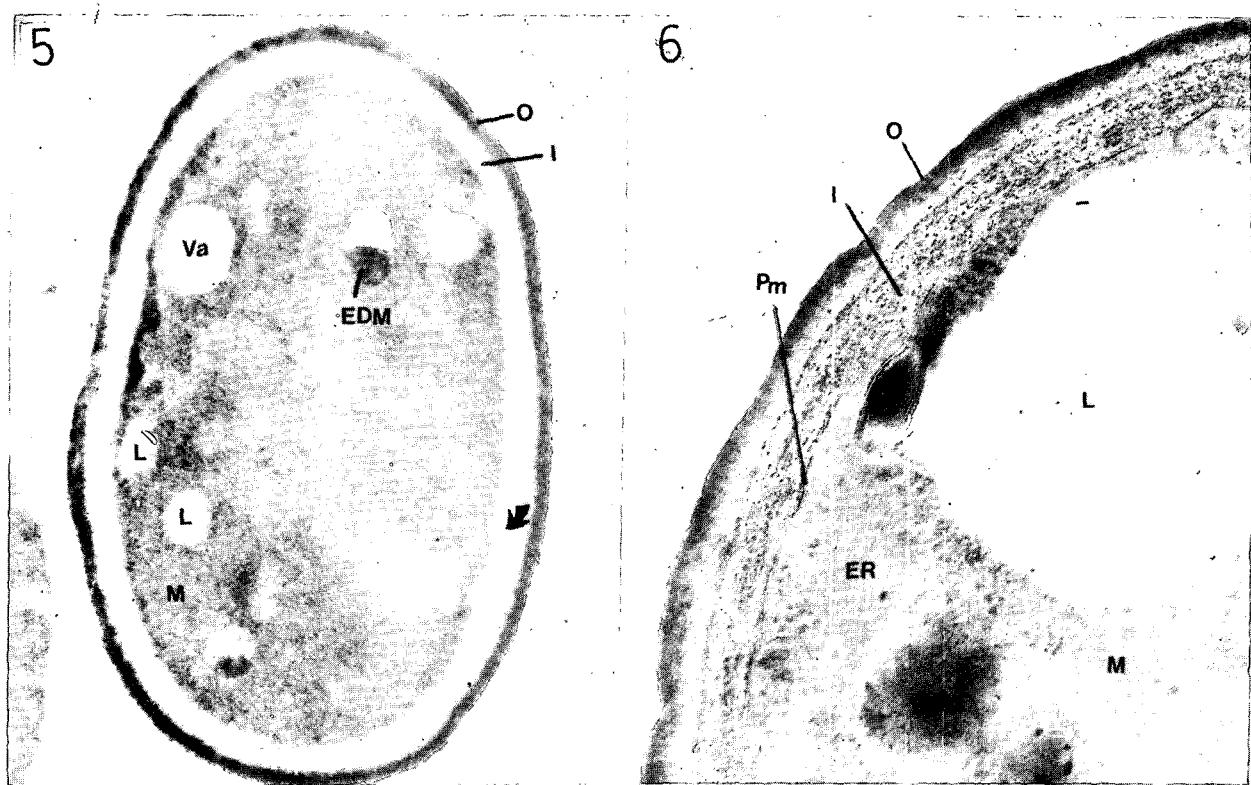
**Fig. 11.** Ultrastructure of the cell wall of swollen conidiospore showing uneven thickness and discontinuity of outer layer, lomasome.

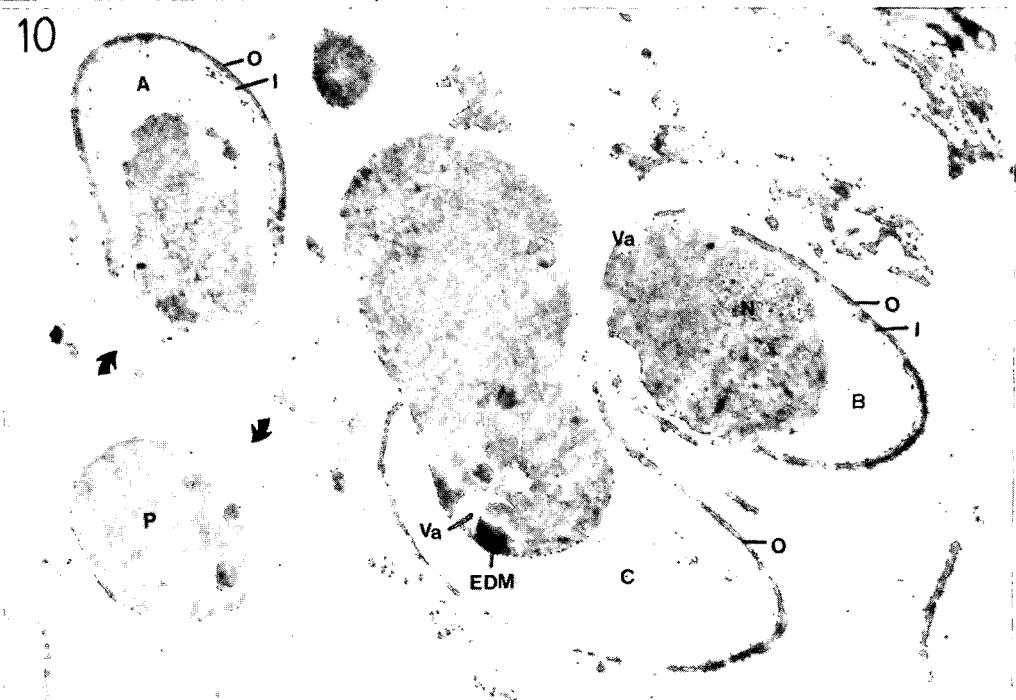
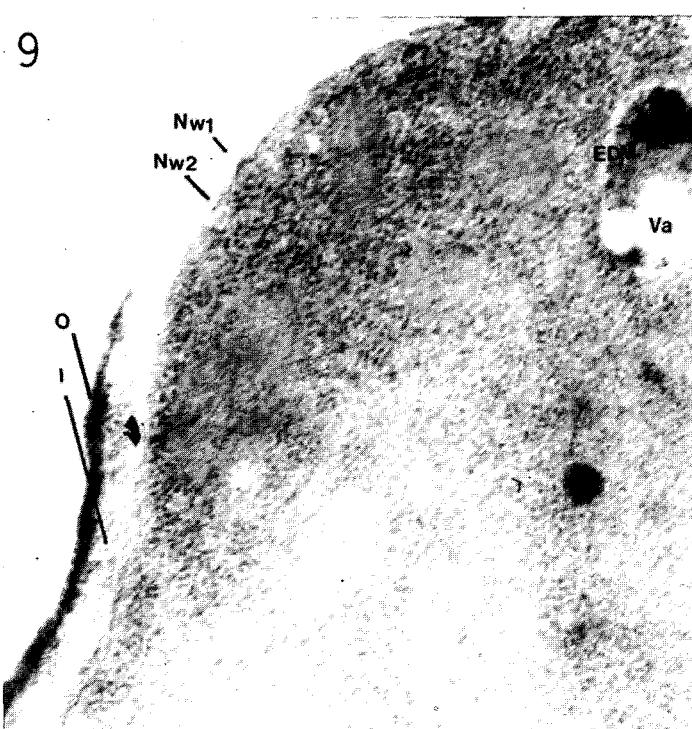
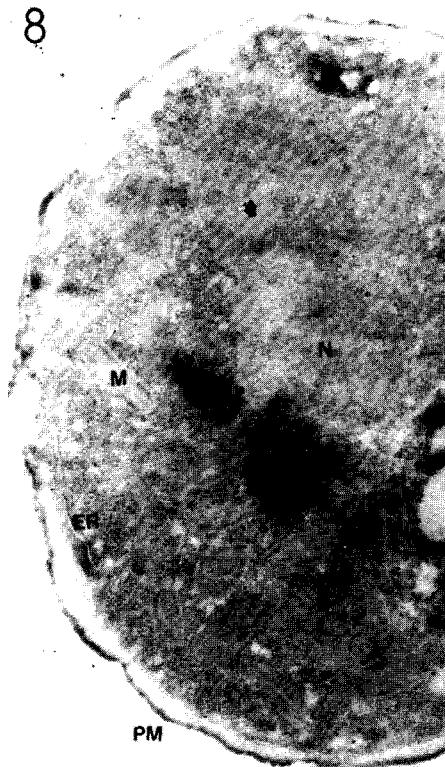
**Fig. 12.** Ultrastructure of plasmamembrane of protoplast. Cell wall is completely dissolved out and plasmamembrane is flattened. Notice the looser cytoplasm. (X 60,000)

**Fig. 13.** Sectioned protoplast showing looser cytoplasm, nucleus, mitochondria, small vesicles(ve) with or without dense material. Notice that protoplast contains two irregular nucleus. (X 8,000)

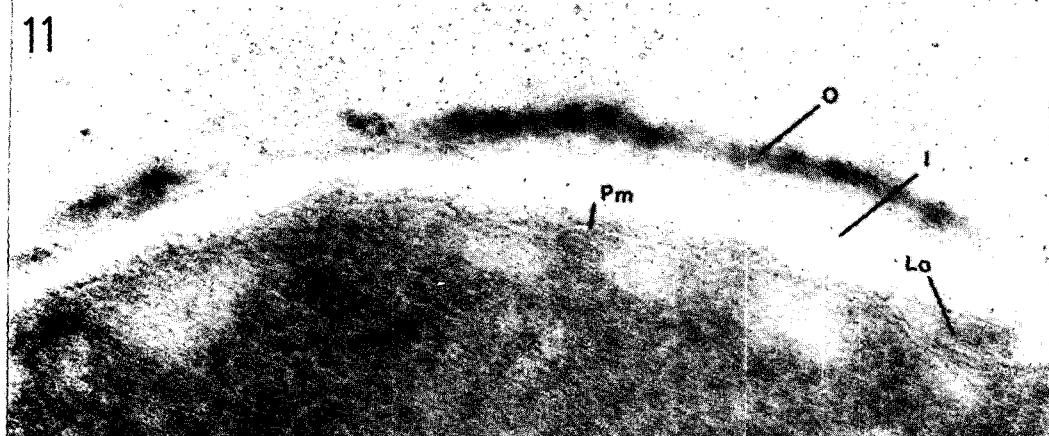
**Fig. 14.** Proposed mechanism of protoplasting from the conidiospore of *T. koningii*. The dormant conidiospore which has two-layered cell wall(A) is swollen after incubation in liquid minimal medium with 2-DG. In swollen conidiospore(B), outer layer which is electron dense and resistant to lytic action of Driselase is unevenly distributed on the surface of conidiospore. At this time new cell wall for germ-tube is synthesized and inner layer is partly unmasked to the outside. After addition of Driselase, new cell wall layer and unmasked inner layer are attacked to the lytic action of enzyme(C). New cell wall is more rapidly dissolved than inner layer of conidiospore cell wall. After the lysis of new cell wall, cytoplasm is protruded and partial separation of cytoplasm from the conidial cell wall is also proceeded(D). Protoplast is formed completely(E,F). Note that inner layer is dissolved slowly but the resistant outer layer is still remain in the reaction mixture.



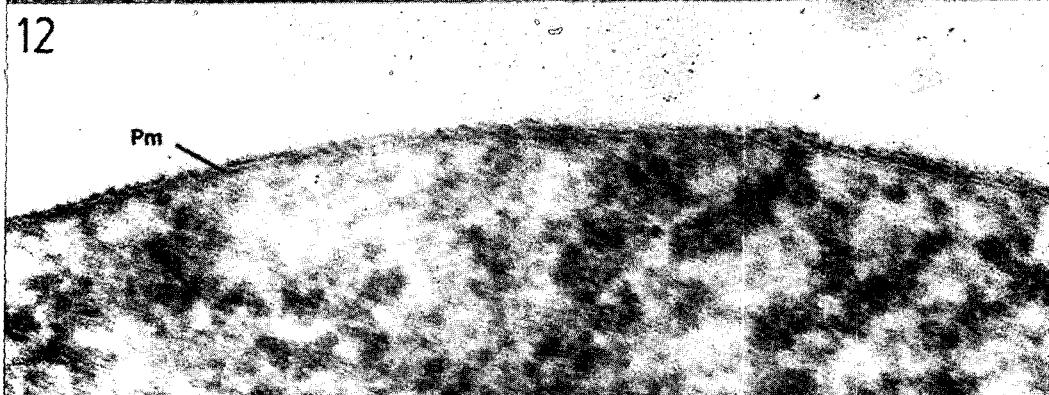




11



12



13

