慶北大農學誌(Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.) 5 : 127～133 (1987)

# *Sclerotinia trifoliorum*의 Spermatization에 관여하는 要因의 檢索*

## Ⅰ. 菌의 受精過程

嚴在烈 · 金永兌

慶北大學校 農科大學 農生物學科

# Detection of the Factors Related to spermatization in *Sclerotinia trifoliorum*

## Ⅰ. Course of Fertilization

Uhm, Jae Youl · Kim, Young Tae

Dept. of Agric., Biology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

**Summary**

The process of fertilization and changes in anatomical structure of sclerotia during the apothecial formation in *Sclerotinia trifoliorum*, the causal fungus of sclerotial rot of forage legumes, were investigated.

The time of fertilization could be estimated with fair accuracy by the sequencial spermatization of the sclerotia which kept at 15C in saturated moisture. In the case of one strain used in this experiment, fertilization between the sclerotia and spermatia were estimated to take place at around 18days after the sclerotia were placed under the conditions for apothecial induction (15C, saturated moisture). The fertilizable state was maintained for about 45 days and the spermatization thereafter did not induce the apothecial formation.

When the sclerotia reached fertilizable state, a number of interwoven hyphal nests were developed within the medulla of sclerotia, regardless of the sexuality of the cultures. Comparing the process of multiplication and growth of the hyphal nests in homothallic and heterothallic culture, they were identified as ascogonium. These ascogonia were persisted for about 45 days. This observation was wellcoincided with the duration of fertilizable state elucidated by the sequencial spermatization experiment.

### 緖 論

*Sclerotinia trifoliorum* Eriksson는 주로 콩科牧草에 寄生하는 植物病原菌이며 世界 各地에 널리 分布하는 것으로 알려져 있다.[5,13] 우리나라에서는 자운영에 있어서 本 菌에 의한 病害가 記載[9]되어 있다.

本 菌은 Henson[6]과 Keay[7]에 의해 homothallism으로 分類되었고 그 知見은 그후 다수의 硏究者[1,3,4,10,11]에 의해 지지되어져 왔다. 그러나 最近에 本 菌은 基本的으로 2極性 heterothallism이며 個個의 子囊內에서 交配型 突然變異에 의해 2次的 homothallism을 나타내는 胞子와 완전한 heterothallism을 나타내는 胞子가 항상 4 : 4로 分離된다는 사실이 밝혀져 前者의 交配型은 "L", 後者의 交配型은 "S"로 각각 designate 되었다.[16,17,18]

* 이 硏究는 1984年度 文敎部 學術硏究 助成費에 依해 遂行되었음.

本 菌의 sexual mechanism에 있어서 이러한 發見은 本 菌의 植物病理學的 또 菌學的 연구에 있어서 새로운 場이 열리게 되었다. 특히 heterothallism을 나타내는 系統의 존재로 종래에 알려져 온 것과는 다른 새로운 生活環이 실험적으로 증명되었고[9] 本 菌의 一次傳染源인 子囊 胞子의 형성과정에 대해 보다 정밀한 연구가 가능하게 되었다.

本 研究에서는 heterothallic 系統의 菌核에 있어서의 受精時間와 受精可能期間 및 이에 따르는 菌核내부의 解部學的 構造變化를 추적하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 供試菌株 및 菌의 培養

sclerotial parent 로는 비교적 단기간에 子囊盤을 형성하고 또 菌核의 형성수가 많은 1-2L 과 1-4S를 선정하였다. 이들 두 菌株는 동일 子囊에서 분리된 서로 다른 交配型이며 母菌株는 알팔파에서 분리된 것이다. microconidial parent 로는 자운영에서 분리된 單子囊胞子 系統으로 다량의 microconida를 형성하는 14-4L을 供試하였다. 실험에 사용한 菌核는 sclerotial parrent 를 1% 可溶性 澱粉加用 감자煎汁寒天上[6], 22C에서 30일간 배양하여 형성된 것을 각종 실험에 供試하였다. 또한 실험 결과의 균질화를 위하여 本 實驗 전체에 필요한 菌核을 單一培養에서 얻었다.

### 2. 菌核의 發芽

직경 6cm 및 9cm의 Petri dish에 두께 약 3mm정도의 폴리에스텔 솜을 깔고 滅菌蒸溜水로 飽和吸濕시킨 뒤 그 위에 菌核을 置床하여 發芽시켰다.

### 3. Spermatization

microconidial parent 로 사용한 14-4L을 두께 7~10mm의 高壓殺菌한 감자 slice에 20일 이상 배양하여 형성된 microconidia 를 滅菌水로 懸濁(~$10^6$/mℓ)[8], 이를 毛細管으로 菌核上에 1滴씩 滴下하였다.

### 4. 交配型 S菌核의 受精時期 및 受精可能期間

heterothallic 系統인 1-4S의 菌核을 發芽床 1枚當 100개씩 置床하여 15C의 定溫器에 보존하고 置床 당일을 기점으로 하여 30일까지는 3일 간격으로, 30일 이후 75일까지는 15일 간격으로, 매회 1枚의 發芽床에 置床한 菌核을 spermatization 하였다. spermatization한 菌核을 15C의 정온기에 계속 보존하면서 菌核의 發芽所要日數를 조사하여 S型 菌核과 L型의 microconidial間의 受精時期를 추정하였으며 15C의 정온하에서의 S型 菌核의 受精可能期間을 조사하였다.

### 5. 菌核 內部의 解部學的 構造變化

1-2L의 菌核과 1-4S 의 菌核, 그리고 1-4S의 菌核에 14-4L의 microconidia로 spermatization한 것을 각각 發芽床에 置床하여 15C에 보존하고 매 3일 간격으로 10개씩의 균핵을FAA에 固定하였는데 1-2L 및 spermatization한 1-4S 菌核은 菌核이 발아할 때까지 고정을 계속하였고 또한 spermatization하지 않은 1-4S 균핵은 치상 후 90일까지 고정을 계속하였다. 고정한 試料는 n-butanol series 를 거쳐 脫水하고[10] paraplast로 封入, rotary 式 microtome을 사용하여 8 $\mu$m 두께로 切片, xylene-alcohol process 를 거쳐 脫 paraffin한 후 iron-heamatoxyline法[13]으로 염색하여 균핵내부의 해부학적 구조 변화를 추적하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 交配型 S菌核의 受精時期 및 受精可能期間

最適發芽條件(飽和濕度, 15C)下에 둔 菌核을 3일 간격으로 spermatization하여 菌核의 發芽所要日數를 조사한 결과, 菌核의 發芽에는 一定한 규칙성이 있음이 밝혀졌다(Table 1). 즉, 置床 직후부터 18일까지 spermatize한 全區에서의 菌核發芽는 置床 33일의 같은 날에 시작되었다. 한편, 置床 21일째와 그 이후에 spermatize 한 各 區에 있어서는 spermatization이 3일 늦어지면 菌核의 發芽開始도 3일 늦어져 spermatization 에서

Table 1. Sclerotial germination by a sequencial spermatization to the sclerotia kept in saturated humidity at 15C

| Days spermatized | No. of sclerotia germinated at ; | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 33 | 36 | 39 | 42 | 45 | 48 | 51 | 54 | 57 | 60 | 63 | 66 | 69 | 72 |
| 0 | 3 | 24 | 36 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 2 | 24 | 28 | 9 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 3 | 27 | 34 | 11 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 31 | 37 | 8 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 4 | 30 | 33 | 10 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 4 | 25 | 38 | 7 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 5 | 29 | 35 | 3 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | | 2 | 38 | 27 | 13 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | | | 18 | 29 | 29 | 8 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | | | 3 | 33 | 37 | 6 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | | | | | 12 | 39 | 20 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | | | | | | | | | | | | 6 | 5 | 0 |
| | | | | | | | | | | | | | | 3 |

발아까지의 所要日數는 15일로 거의 일정했다. 또한 置床 60일과 75일에 spermatize한 菌核은 전혀 發芽하지 않았다.

이상의 결과로써 菌核의 受精時期를 상당히 정확하게 추정할 수 있었다. 우선, 置床 18일 이후에 spermatize한 菌核에 있어서 spermatization으로부터 균핵의 발아까지 소요일수가 15일로 거의 일정하였던 점으로 보아서 그들 菌核은 이미 受精可能狀態가 되어 있어서 spermatize하면 곧 受精이 일어났을 것으로 판단되었다. 한편, 置床 18일까지 spermatize한 菌核의 發芽開始가 置狀後 33일째로 거의 일정했다는 사실은 그들 菌核에서는 거의 같은 시기에 수정이 일어난 것으로 판단되며 그 시기에 菌核이 처음으로 수정가능상태에 도달한 것으로 판단되었다. 즉, 수정에서 菌核의 발아까지 소요일수가 15일이었고 置床 직후부터 18일까지의 사이에 spermatize한 菌核의 發芽가 처음으로 置床 後 33일에 인정되었으므로 33일에서 15일을 逆算하면 수정이 일어난 시기는 置床 後 18일이 된다. 따라서 치상 직후부터 15일까지의 사이에 spermatize한 菌核에서는 microconidia가 菌核이 수정가능상태에 도달하기까지 菌核의 표면에 머물고 있었던 것으로 판단되었다.

한편, 치상 60일 또는 그 이후에 spermatize한 菌核은 전혀 발아하지 않았으므로 그 시기에는 이미 菌核의 受精能力이 상실된 것으로 판단되었다. 이와 같이 일정조건하에서 S型 菌核의 수정시기를 비교적 정확하게 추정할 수 있었으나 이 시기는 菌의 系統, 培養條件 등에 따라서 상당히 달라질 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 실험의 일반적 原理는 어떤 狀況에서 든지 적용 가능할 것으로 판단된다.

### 2. 菌核 內部의 解部學的 構造變化

菌核의 受精可能狀態에의 도달, 수정 및 그 이후의 發芽에 이르기까지 菌核內部에 상당한 해부학적 構造變化가 예상되었고 또 그 변화양상은 homothallic 系統(L), heterothallic 系統(NS) 및 spermatize한 heterothallic系統(SS)間에 차이가 있을 것으로 생각되어 經時的으로 試料를 채취하여 paraffin section한 결과, 菌核의 내부에는 일련의 구조변화가 검출되었는데 그 변화의 시간적 경과에 있어서 3者間에 차이가 있었다.

菌核內部에서의 최초의 변화는 菌核의 cortex 층 直下의 髓組織(medulla)에 染色性이 강한 少數의 菌糸細胞가 출현되었고(Fig. 1. A)이를 stage Ⅰ으로 칭하였다. 시간이 경과함에 따라 그 세포의 수가 증가하였고 菌糸細胞는 복잡하게 얽혀서 마치 새둥우리와 같은 형상을 나타내었는데(Fig. 1. B), 이 시기를 stage Ⅱ로 칭하였으며, 이 시기의 균사집단의 크기는 최고 200$\mu$m 정도였으며 그 이상 더 커지지는 않았다. 더욱 시간이 경과하면 stage Ⅱ의 菌糸集團에서 表皮쪽을 향해서 새로운 一團의 菌糸組織이 출현했는데(Fig. 1. C) 이 시기

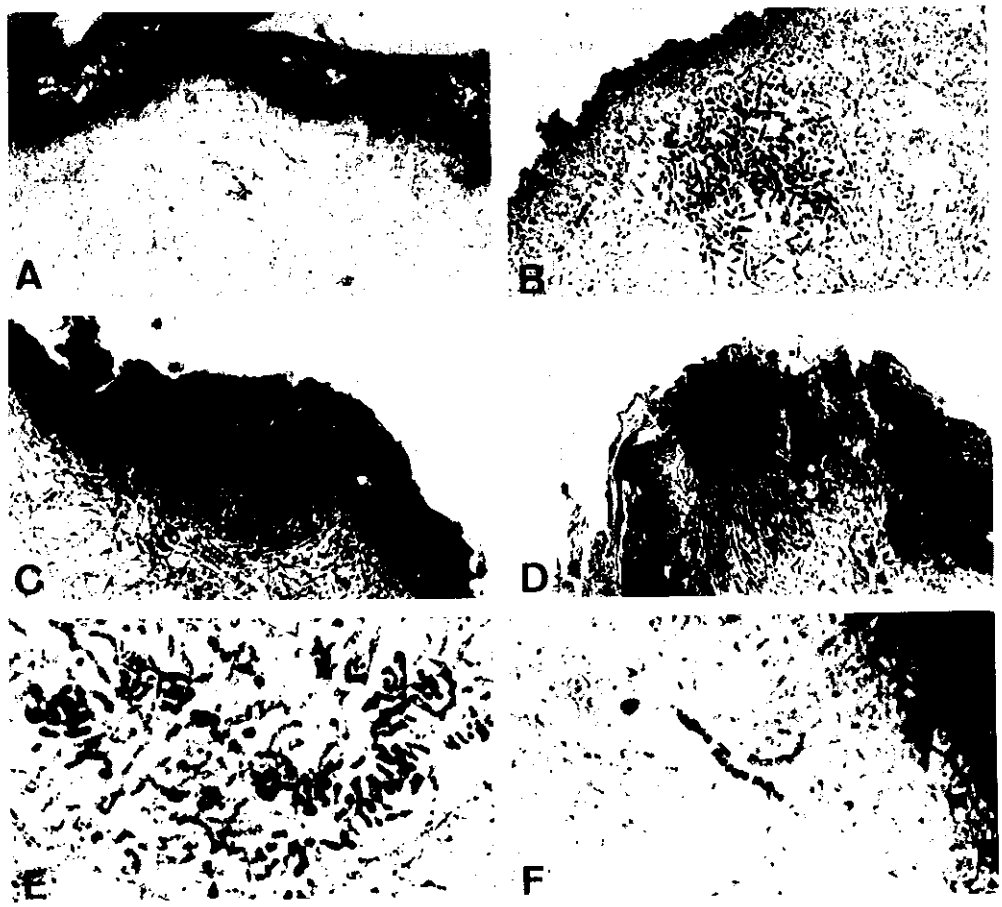


**Fig. 1. Process of ascogonial development and sclerotium germination A, Earliest stage of ascogonial formation (stage Ⅰ) ; B, Fully developed ascogonium (stage Ⅱ) ; C, Apothecial stipes primordium develpoed at ascogonium (stage Ⅲ) ; D, Sclerotial germination (stage Ⅳ)**

를 stage Ⅲ로 분류하였다. stage Ⅲ는 L과 SS에서만 나타나며 NS에서는 전혀 관찰되지 않았다. 시간의 경과함과 함께 stage Ⅲ에서 출현한 새로운 菌糸集團은 菌核의 表皮를 뚫고 밖으로 나오는 것이 관찰되었으며 이 시기를 stage Ⅳ (Fig. 1. D)로 하였는데 그후 1～2일이 경과하면 菌核의 發芽를 肉眼으로 확인할 수 있었다.

homothallism을 나타내는 1-2L(L)과 heterothallism을 나타내는 1-4S(NS) 및 14-4L의 microconidia로 spermatize한 1-4S(SS)의 菌核을 置床 당일부터 菌核의 발아까지 매 3일 간격으로 채취, paraffin section하여 각 stage의 출현시기를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

L의 경우 置床 3일 후 이미 stage Ⅰ이 나타났으나 NS 및 SS에서는 置床 6일째에 stage Ⅰ이 출현하였다. stage Ⅰ은 최초의 출현으로부터 12일간 지속적으로 나타났는데 이들이 출현한 뒤 6일 후부터는 stage Ⅱ가 출현하기 시작하였다.

L에서는 stage Ⅱ의 출현 후 3일째부터 stage Ⅲ가 나타났고 다시 6일 후에는 stage Ⅳ가 나타났으며 置床 18일에는 이미 菌核의 발아가 육안으로 識別되어 실험을 終了했다. 그런데 NS에서는 stage Ⅰ 및 Ⅱ의 출현시기는 SS와 동일했으나 stage Ⅲ는 전혀 볼 수 없었다. stage Ⅱ의 숫자는 置床 30일경에 菌核 1개당 최고 40개 정도였으나 그 뒤 서서히 감소했으며, 置床 39일부터는 Fig. 1. E에서 보는 바와 같이 stage Ⅱ의 菌

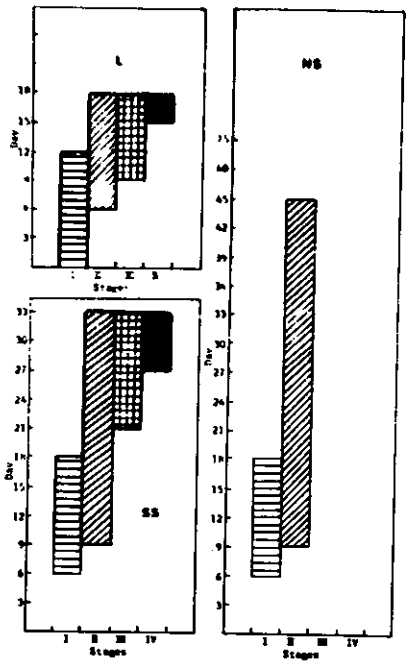


**Fig. 2. Stage of ascogonial development in the sclerotia of homothallic strain (L) spermatized heterothallic strain (SS) and non-spermatized heterothallic strain (NS)**

糸集團에서 부분적으로 退化가 일어났다. 置床 42일경부터는 한 本의 긴 菌糸細胞만 강한 染色性을 유지하고 있었고(Fig. 1. F), 置床 45일이 되면 stage Ⅱ의 菌糸集團은 거의 消滅되어 菌核 한 개당 불과 2～3개가 보일 정도였으며 置床 60일에는 菌糸集團이 전혀 보이지 않았다. 交配型 突然變異에 의하여 secondary homothallism을 나타내는 L에서는 stage Ⅱ의 길이가 heterothallism인 SS보다 훨씬 짧았던 것은 本 實驗에 供試한 1-2 L의 菌核에는 이미 mating type mutation에 의해서로 compatible 한 두 交配型의 核이 heterokaryon상태에 있었던 것으로 판단되었다. 그런데 SS에서 stage Ⅱ가 길었던 것은 菌核의 受精이 이 시기에 이루어지기 때문인 것으로 생각되었는데 受精의 시기는 前項의 經時的 spermatization실험에서 추정된 것과 거의 일치하고 있다.

한편, spermatize하지 않았던 heterothallic 系統의 菌核에서는 菌糸集團의 발달이 stage Ⅲ까지 진전하지 못했다는 사실은 이 stage가 spermatization에 의해 誘導되는 것으로 판단되었다. 또한 paraffin section 실험 결과는 前項의 受精可能期間의 탐색실험과도 연관지워 생각할 수 있었다. 즉, 置床 後 45일이 경과된 菌核에 spermatize한 결과 菌核의 發芽率이 매우 낮았다는 사실은 그 菌核內에 stage Ⅱ의 菌糸集團이 거의 消滅되어 있었다는 것과 연관하여 생각할 수 있었고, 나아가서 置床 60일의 菌核은 spermatize 하여도 전혀 발아하지 않았다는 사실은 그 菌核內에 stage Ⅱ의 菌糸集團이 완전히 消滅되었다는 사실과 잘 符合한다. 따라서 本 實驗의 조건하에서는 菌核 受精可能期間은 45～50일 정도인 것으로 추정되었다. 그런데 置床 後 60일 이상 경과한 菌核은 비록 受精能力은 消失되었으나 菌核은 여전히 생존해 있었다. heterothallic 系統의 菌核은 飽和濕度, 15 C에서 1년 이상 생존하는 것으로 보고되어 있는데[16] 그 기간동안 菌核의 受精能力이 다시 회복되는지 또는 수정능력의 회복을 위해서는 특수한 환경조건의 변화가 필요한지에 대해서 아직 실험이 계속되고 있다.

*Sclerotinia* 屬菌에 있어서 이와 유사한 실험은 Bjorling[1], Kosasih and Willets[9], Saito[14]에 의해 이미 수행되었는데 그들은 모두 *Sclerotinia* 屬菌이 homothallism이라는 전제하에서 실험했으므로 受精은 전혀 고려하지 않았다. Bjorling은 *S. trifoliorum*에 있어서 autogamous nuclear pairing은 未熟 子囊盤의 子實層 直下에 있는 약간 폭이 넓고 細胞質이 많은 菌糸細胞內에서 일어난다고 했으며 Gauman[4]은 *S. trifoliorum*은 homothallism이므로 ascogonium의 발달은 없다고 하였다. Saito[14]와 Kosasih and Willets[9]는 近緣種인 *S. sclerotiorum*의 菌核에서 子囊盤이 형성될 때 菌核內에 출현하는 染色性이 강한 菌糸集團을 子囊盤柄原基(apothecial stipes perimordium)라고 칭하였으며 그 菌糸集團은 ascogonium 또는 그와 관련된 기관이 아니라고 하였다.

本 實驗의 결과 子囊盤形成 과정중의 菌核內部의 菌糸集團은 homothallic 또는 heterothallic에 관계없이 출현하였으며, stage Ⅱ까지는 비슷한 경과를 거쳐서 진전되었다. 따라서 stage Ⅱ까지의 進展에는 두 mating type 間의 相互作用을 전제로 하지 않는다. 이와 같은 점은 heterothallism인 *Pyrenomycetes*에서의 ascogonium 형성 과정과[3]

동일하다. 따라서 S型의 菌核內에 발달하는 菌糸集團을 ascogonium으로 간주하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

한편, S型의 菌核은 L型의 microconidia에 의해 spermatize되지 않으면 子囊盤柄을 형성하지 못한다는 사실로 본다면 子囊盤柄의 형성에는 서로 和合하는 두 核의 상호작용을 전제로 한다. 따라서 L型의 菌核內에서도 子囊盤柄 형성을 위해서는 두 交配型의 핵의 상호작용이 전제가 되며 그 conjugation의 장소는 菌核내부의 균사집단일 것이므로 L型 菌核內에 발달하는 균사집단도 ascogonium으로 간주하는 것이 타당하다고 본다. 또 S型 菌核의 경우 spermatization 후 stage Ⅲ에서 출현하는 새로운 균사집단을 子囊盤柄原基(apothecial stipes primordia)로 보는 것이 보다 논리적일 것으로 생각된다.

## 摘　　要

콩科牧草 菌核病菌 *S. trifoliorum*의 완전세대 형성과정중 受精의 mechanism과 그 시기를 밝히고 菌核내부의 解部學的 구조변화의 樣相을 실험한 결과는 다음과 같이 요약된다.

본 실험에 供試한 S系統의 菌株에 있어서 受精可能狀態에의 도달은 菌核을 飽和濕度 15℃에 置床한 후 18일 경인 것으로 밝혀졌으며 受精可能狀態는 일부의 菌核에서 置床 後 45일 경까지 지속되는 것으로 나타났다.

本 菌의 菌核이 수정가능상태에 달하게 되면 菌核의 交配型과 관계없이 그 내부에 染色性이 강한 菌糸集團이 출현하였는데 이들의 진전과정을 homothallic 系統과 heterothallic 系統에서 비교 검토한 결과, ascogonium으로 판단할 수 있었다. 이들 ascogonium은 치상 후 약 45일 경까지 지속적으로 관찰되었으나 치상 39일 경부터 퇴화되어 가는 것이 관찰되었다.

균핵내부에서의 ascogonium의 출현 지속 기간과 균핵의 수정가능기간이 서로 잘 부합되었다.

## 引 用 文 献

1. Björling, K. : 1952, Über die Entwicklungsgeschichte, variabilität und Pathogenität von *Sclerotinia trifoliorum* Erikss, Phytopathol. Z., 18 : 129-156.
2. Burnett, J. H. : Fundamentals of mycology, 2nd ed., Edward Arnold, London(1976), p. 153.
3. Carr, A. J. H. : 1954, Variation in the homothallic fungus *Sclerotinia trifoliorum*, Proc. 8th Int. Bot. Congr., Sect. 19 Paris, : 72-74.
4. Gäumann, E. A. : The Fungi, Hafner Publishing Co., New York (1952), p. 238.
5. 韓國植物保護學會 : 韓國植物病·害蟲·雜草名鑑 서울( 1972 ), p. 76.
6. Henson, L. : 1935, Apothecium production in *Sclerotinia trifoliorum and Sclerotinia sclerotiorum*, (Abstr.) Phytopathology, 25 : 19-20.
7. Keay, M. A. : 1939. A study of certain species of *Sclerotinia*, Ann. Appl. Biol., 27 : 227-246.
8. Kohn, L. M. : 1979, Delimitation of economically important pathogenic *Sclerotinia* species, Phytopathology, 69 : 881-886.
9. Kosasih, B. D. and Willets, H. J. : 1975, Ontogenetic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*, Ann. Bot., 39 : 185-191.
10. Kreitlow, K. W. : 1950, Longevity of inoculum of *Sclerotinia trifoliorum* prepared from cultures grown on grain, (Abstr.) Phytopathology, 40 : 16.
11. Loveless, A. R. : 1951, The confirmation of the variety *fabae* Keay of *Sclerotinia*

*trifoliorum* Erkiksson, Ann. Appl. Biol., 38 : 253-275.

12. Lu, B. C. and Henderson, S. A. : 1968, The use of haematoxylin for squash preparation of chromosomes, Stain Technol., 43 : 233-236.
13. Purdy, L. H. : 1969, *Sclerotinia Sclerotiorum* : histology, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact, Phytopathology, 69 : 875-880.
14. Saito, I. : 1977, Studies on the maturation and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.) De Bary, a causal fungus of bean stem rot, Rep. Hokkaido Prefec. Agric. Exp. Stn., No. 27., p. 106.
15. Sass, J. E. : Botenical microtechnique, 3rd ed., The Iowa state University Press, Iowa (1958), pp. 22-39.
16. 嚴在烈 : 1981, *Sclerotinia trifoliorum* Erikss. の sexual mechanismに 關する研究 ph D. 論文, 東京農業大學, 日本.
17. Uhm, J. Y. and Fujii, H. : 1983, Ascospore dimorphism in *Sclerotinia trifoliorum* and cultural characters of strains from different-sized spores, Phytopathology, 73 : 565-569.
18. Uhm, J. Y. and Fujii, H. : 1983b, Heterothallism and mating type mutation in *Sclerotinia trifoliorum*, Phytopathology, 73 : 569-572.
19. 嚴在烈 : 1984, 豆科牧草菌病菌 *Sclerotinia trifoliorum* Erikss 의 交配型 S 菌株의 生活環, 慶北大 農學誌, 2 : 164-171.