

느타리버섯과 사철느타리버섯의 原形質體 再生 및 還元에 관한 研究

劉英福 · 존 페버디* · 車東烈

農村振興廳 農業技術研究所 · 英國 노팅엄大學 植物學科*

Studies on Protoplast Regeneration and Reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*

Young-Bok Yoo, John F. Peberdy* and Dong-Yeul Cha

Institute of Agricultural Sciences, Office of Rural Development, Suweon 170, Korea and

*Department of Botany, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, England

Abstract: The experiment of protoplast regeneration and reversion were undertaken to provide a basic techniques for protoplast manipulation. Protoplasts of *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus* were reverted to normal hyphal growth and the reversion frequency of both fungal protoplasts were 0.24~3.19 %. Reversion medium stabilized with 0.6 M potassium chloride and sucrose was better than the other stabilized one. The protoplast reversion frequency was increased when various amino acid and vitamin compounds were added to the hypertonic mushroom complete agar medium.

Keywords: Protoplast regeneration and reversion, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, Basidiomycetes.

原形質體는 細胞壁의 成分 分析, 菌株間의 分類學的 究明, 菌株開發 및 遺傳研究에 크게 공헌하고 있다. 이러한 연구에 있어서 원형질체 재생 및 환원은 필수적인 과정인데 分離된 원형질체는 새로운 세포벽으로 合成되어야 하고, 결국 정상적인 菌絲 상태로 환원되어야 한다.

液體 및 固體培地에서 원형질체의 재생이 결코 100%가 되지 못했으며(Peberdy, 1979) 많은 眞菌類에서 원형질체가 재생되는 形態에 대하여 보고되었다(Peberdy and Gibson, 1971; Sietsma and De Boer, 1973; Anne 등, 1974; Gabriel, 1968). 또한 培地造成이 원형질체 재생에 영향을 미칠 수 있는데 탄소源의 종류가 *Fusarium culmorum* 원형질체 재생율을 5~82 %까지 변화시킬 수 있음을 보고하였다(Garcia Acha 등, 1966).

高等菌類에 있어서는 1965년 Strunk가 *Polystictus versicolor*에서 처음으로 원형질체 재생을 관찰한 이후 *Flammulina volutipes*에서 Yamada 등(1983)이 *Phaner-*

*ochaet chrysosporium*에서 Gold 등(1983)이, *Pleurotus ostreatus*에서 Byun(1984) 및 秦(1984)이, *Schizophyllum commune*에서 De Vries and Wessels(1975)이, *Tricholoma matsutake*에서 Abe 등(1982)이, *Volvariella volvacea*에서 Santiago(1981)가 보고 하였다.

본 연구는 고등균류의 원형질체 재생 및 환원율이 다른 균류에 비하여 아주 낮으며, 점차 재배면적이 증가하고 있는 버섯류의 유전연구와 균주개발을 위한 기초연구로서 느타리버섯과 사철느타리버섯의 원형질체 환원율의 증가를 위하여 다소의 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

材料 및 方法

菌 株

한국 농촌진흥청 농업기술 연구소의 보존 균주인 wild type의 *Pleurotus ostreatus* ASI 106-6, *Pleurotus florida* ASI 124-30 그리고 auxotrophic mutant인 *P.*

ostreatus ASI 2-1 (Arg), *P. ostreatus* ASI 2-2 (Gly Ser), *P. florida* ASI 2-3 (Ribo-1), *P. florida* 2-4 (Ribo-2) 및 *P. florida* ASI 2-5 (phen)을 사용하였다.

培地

버섯完全培地(MCM; Raper 등, 1972)와 버섯最少培地(MMM; Raper 등, 1972)를 121°C에 20분 멸균하여 사용 하였는데, 培地成分은 다음과 같다(g/l). 즉, 버섯완전배지는 Bacto-yeast extract (Difco) 2.0, Bacto-peptone (Difco) 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 20.0, Bacto-agar (Difco) 20.0이며, 버섯최소배지는 MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, DL-asparagine 2.0, thiamin-HCl 120 µg, glucose 20.0, Bacto-agar (Difco) 20.0이다.

原形質體의 生成

原形質體 分離는 이미 보고된 방법(Yoo 등, 1984)에 따라 하였으며, 菌絲體를 제거하기 위하여 Sintered glass filter (Porosity 1)로 여과한 후에 0.6M의 滲透

壓 調節劑에 2번 세척하여 사용 하였다.

原形質體 再生 및 還元

원형질체를 분리하여 0.6 M 삼투압 조절제에 2번 세척한 후 알맞는 농도로 현탁액을 만들어 미리 준비한 petri dish에 0.6 M 삼투압 조절제가 첨가된 완전배지 및 최소배지(2 % agar)에 원형질체와 0.75 % agar로 된 완전배지 및 최소배지를 혼합하여 1개 petri dish에 0.5 ml씩 분주하여 배지 표면에 고무 퍼지개 천천히 흔들어서 완전히 균현 후에 25°C에서 7~10일간 배양하여 환원된 菌叢을 조사하였다. 환원율을 측정하기 위하여 원형질체를 알맞는 농도로 현탁하여 1개의 petri dish에 100~200개의 환원된 균총이 되게하여 사용하였다.

원형질체 환원율의 증가를 위하여 營養源으로 amino acid와 vitamin을 느타리버섯에 검정하여 군사생장을 촉진하는 증류만을 선별하여 amino acid는 1 mg, vitamin은 0.5 mg/ml로 각각 완전배지 및 최소배지에 모두 혼합하여 원형질체 재생을 하였다(Table I).

Table I. Effects of various amino acids and vitamins on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus*.

Source	Mycelial growth
Amino acid Alanine	+
Arginine	-
Cysteine	+
Cystine	-
Glutamic acid	-
Histidine	-
Isoleucine	-
Leucine	+
Lysine	-
Methionine	-
Phenylalanine	-
Proline	-
Tryptophan	-
Tyrosine	+
Vitamin Aneurine	+
Ascorbic acid	+
Choline	+
Cyanocobalamin	-
Folic acid	+
Inositol	+
Nicotinic acid	-
Pantothenic acid	+
P-Amino benzoic acid	+
Pyridoxine	+
Riboflavin	+

+: better than control (MCM)

-: worse than control

結果 및 考察

滲透壓 調節劑의 影響

느타리버섯의 원형질체 재생에 알맞는 삼투압 조절제로는 0.6 M KCl과 0.6 M sucrose가 가장 알맞았다 (Table II). 0.6 M sucrose, mannitol 그리고 sorbitol은 원형질체 재생을 촉진하여 재생후 5일 경에 원형질체가 환원된 균총을 肉眼으로 관찰할 수 있었으며 균총의 성장도 빠른 경향이였다. 이에 비하여 KCl과 NaCl은 재생되는 시간이 느려 재생후 7~10일에 환원된 균총을 확인할 수 있었다. 그러나 환원율은 KCl에서 2~3 %로 오히려 높았으며, NaCl에서는 0.07 %로

Table II. Effects of different osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts of *Pleurotus ostreatus*.

Osmotic stabilizer(0.6M)	Percentage of protoplast reversion on MCM(%)
KCl	2.39
MgSO ₄	—*
NaCl	0.07
Mannitol	0.39
Sorbitol	0.80
Sucrose	1.69

* Not estimated because of precipitation.

Table III. Effects of various amino acids and vitamins on the reversion of protoplast of *Pleurotus ostreatus*.

Culture media	Reversion frequency(%)
MCM	1.32
MCM+Amino acid+Vitamin*	6.37
MMM	1.97
MMM+Amino acid+Vitamin*	0.54

* Amino acid: Alanine, Leucine, Cysteine and Tyrosine 1mg/ml each

Vitamin : Aneurine, Ascorbic acid, Coline, Folic acid, Inositol, Pantothenic acid, PABA, Pyridoxine and Riboflavin 0.5 mg/ml each.

아주 낮았다. 또한 0.6 M MgSO₄에서는 배지가 잘 굳지 않았고 침전이 되어 균종을 확인하여 환원율을 측정하기는 어려웠다.

培地 組成의 影響

균사의 생장을 촉진하는 amino acid와 vitamin을 선 발하여 완전배지 및 최소배지에 혼합하여 재생해 본 결과 완전배지에서 6.37 %의 높은 환원율로서 무첨가배지에 비하여 약 5배이상 증가하였다. 그리고 완전배지와 최소배지에서는 거의 비슷한 재생을 보였으며 완전 배지에서 최소배지보다 재생이 다소 빠른 경향이였다. (Table III)

原形質體 再生 및 還元

느타리버섯 및 사철느타리버섯의 원형질체를 재생한 후 2일경부터 재생되기 시작하여 5~10일경에 육안으로 환원된균종을 관찰할 수 있었는데 다소 압축되고 단단하게 생육하는 것 같았다. 이러한 현상은 재생배지에 첨가된 삼투압 조절제의 영향으로 간주되었다(Fig. 1). 원형질체 환원율이 0.24~3.19 %로 다른 眞菌類에 비하여 낮았으며, 느타리버섯보다는 사철느타리버섯이 다소 높았고, 또한 영양요구성 균주보다는 wild type의 균주가 환원율이 높았다. 그러나 사철느타리버섯의 Ribo-2에서와 같이 영양요구성 균주 중에서도 높은 환원율을 나타내는 것도 있었다(Table IV). 사철느타리버섯은 느타리버섯에 비하여 균사생장이 빠르고 원형질체 생성량이 높으며 원형질체의 크기도 크다. 이러한 결과로 보아 원형질체의 크기와 생성량이 원형질체 환원율에 영향을 미친다고 추정할 수 있었다.

高等菌類의 원형질체 재생에 있어서 Moore(1975)는 *Coprinus cinereus*에서 원형질체를 재생배지에 옮긴후

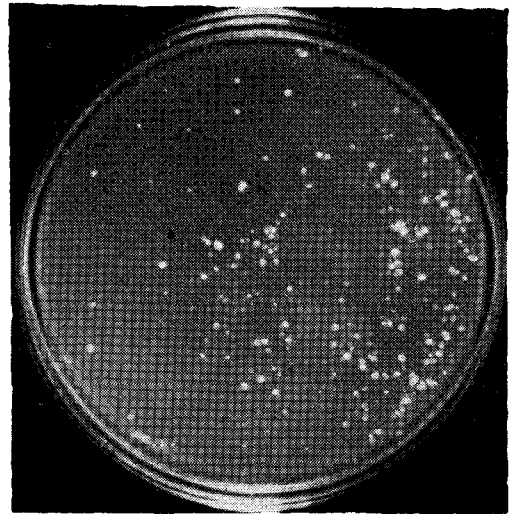


Fig. 1. Reversion of protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were incubated at 25°C for 7 days on 0.6 M KCl stabilized MCM.

Table IV. The reversion of protoplasts of wild type and auxotrophic strains on MCM.

Strain	Protoplast reversion(%)
<i>P. ostreatus</i> ASI 106-6 (wild type)	1.32
Arg	0.24
Gly Ser	0.41
<i>P. florida</i> ASI 124-30 (wild type)	2.06
Ribo-1	1.63
Ribo-2	3.19
Phen	1.22

24시간 후에, Yamada등 (1983)은 *Collybia velutipes* 및 *Pleurotus ostreatus*에서 고체배지에서는 2일, 액체 배지에서는 5~10일후에, Abe등 (1982)은 *Tricholoma matsutake*에서 3~4일 후에, Santiago (1981)는 *Volvarelliella volvacea*에서 8시간 이후에 원형질체가 재생되기 시작 했다고 보고 하였다. 이러한 결과는 본 실험과 동일한 경향이였다.

원형질체의 재생 및 환원은 삼투압 조절제, 배지 그리고 균주의 종류등 여러가지 요인에 의하여 크게 변함을 알수 있는데 이 실험에서의 낮은 원형질체 환원율은 *P. ostreatus* (Byun, 1984; 秦 1984)의 0.01~2 %, *T. matsutake* (Abe등, 1982)에서 1~10 %, *V. volvacea* (Santiago, 1981)에서 1~4 %의 결과와 비슷한 경향이였다. 그러나 De Vries and Wessels (1975)이 *Schizophyllum commune*에서 19~45 %의 높은 환원율과는 많

은 차이가 있었다. 원형질체의 환원율이 낮은 원인은 細胞內的 核의 缺乏이나 細胞質內的 小器官의 缺乏에서 기인되는 것으로 사료된다(Garcia Acha 등, 1966; Peberdy, 1979).

摘 要

식용으로 재배면적이 증가하고 있는 느타리버섯과 사철느타리버섯의 유전연구와 균주개발을 위하여 원형질체의 재생 및 환원에 관한 실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 느타리버섯의 원형질체 재생에 알맞는 삼투압 조절체는 0.6 M KCl과 0.6 M Sucrose였으며, 균사의 생장을 촉진하는 amino acid와 vitamin을 혼합한 배지에서 원형질체 환원율이 약 5배로 증가하였다.

2. 삼투압 조절체가 첨가된 배지에서 재생후 2일부 터 원형질체가 재생하여 5~10일에 균총을 육안으로 확인하였으며, 환원율이 0.24~3.19%로 사철느타리버섯과 wild type이 느타리버섯과 영양요구성 균주보다 환원율이 다소 높았다.

文 獻

Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D. (1982): Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol. Chem.* 46:1955-1957.

Anné, J., Eyssen, H. and De Somer, P. (1974): Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Arch. Microbiol.* 98:159-166.

Byun, M.O. (1984): Isolation and reversion of protoplasts from mycelium of *Pleurotus ostreatus*(Fr.) Quel. *M. Sc. Thesis*. Chungnam National University.

De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1975): Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum commune*. *Archiv of Microbiology.* 102:209-218.

Gabriel, M. (1968): Formation and regeneration of protoplasts in the mould *Rhizopus nigricans*. *Folia Microbiologia* (Draha) 13:231-234.

Garcia Acha, I., Lopez Belmonte, F. and Villanueva, J.R. (1966): Regeneration of mycelial protoplasts

of *Fusarium culmorum*. *J. Gen. Microbiol.* 45:515-523.

Gold, M.H., Cheng, T.M. and Alic, M. (1983): Formation, fusion and regeneration of protoplasts from wild type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysospor.* *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1):260-263.

Moore, D. (1975): Production of *Coprinus* protoplasts by use of chitinase or helicase. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65:134-136.

Peberdy, J.F. (1979): *Protoplasts-Application in Microbial Genetics*. Dept. of Botany. Univ. of Nottingham.

Peberdy, J.F. and Gibson, R.K. (1971): Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 69:325-330.

Raper, JR. and Raper, C.A. (1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 8:1-9.

Santiago, C.M. Jr.(1981): Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Singer. *Ph. D. Thesis*. Univ. of Nottingham.

Sietsma, J.H. and De Boor, W.R. (1973): Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium PRL 2142*. *J. Gen. Microbiol.* 74:211-217.

Strunk, C. (1965): Uber Entstehung und Reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch* 3:242-244.

Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y. Kakimoto, Y. and Sasaki, T. (1983): Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Collybia velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *European J. Appli. Microbiol. Biotec.* 17:298-300.

Yoo, Y.B., Byun, M.O., Go.S.J., You, C.H., Park, Y.H. and Peberdy, J.F. (1984): Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 12:164-169.

秦京熙 (1984): *Pleurotus ostreatus*의 protoplast 生成과 還元에 關한 研究, 석사학위 논문, 숙명여자대학교 대학원

<Received January 1, 1985;

Accepted March 21, 1985>