

紫外線照射에 의한 느타리버섯과 사철느타리버섯 原形質體의 營養要求性 菌株 選拔에 관한 研究

劉英福 · 존 페버디* · 朴容煥

農村振興廳 農業技術研究所 · 英國 노팅검大學 植物學科*

Isolation of Auxotrophic Mutants from Protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*

Young-Bok Yoo, John F. Peberdy* and Yong-Hwan Park

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

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

Abstract: Mutagenesis of protoplast could serve a great potential tool for improvement of strains and genetics in higher fungi. For the isolation of auxotrophic mutants from protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*, viability levels of ultraviolet lights were determined. Seven auxotrophs were obtained from protoplasts irradiating UV to give 0.83~15 % survival. The mutants showed a single requirement for each of Arg, Ribo-1, Ribo-2 or Phen for growth. Some of them showed two or three kinds of requirements, Gly Ser, Ade Hypo or Ala Orn Tryp for growth.

Keywords: Mutagenesis of protoplasts, Auxotrophic mutant, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, Basidiomycetes.

生物에 있어서 交雜과 아무런 관계없이 어떤 원인에 의하여 兩親과 다른 形質을 가지는 새로운 個體가 갑자기 나타나는 경우가 있는데 이러한 현상을 突然變異라 한다. 自然突然變異의 誘發은 生物의 種類, 遺傳子의 種類, 環境등 여러가지 조건에 따라서 다르나 그 誘發頻度는 대체로 10^{-5} ~ 10^{-6} 정도로 낮으며, 그 원인에 대해서도 아직 충분히 알려져 있지 못하고 있다.

眞菌類에 있어서의 菌株開發 및 遺傳研究는 突然變異體의 選拔과 그 특성을 밝힌 후에 이루어 질수 있다. 따라서 人爲的으로 돌연변이의 빈도를 높게 하는데, 여기에 사용되어지는 것을 돌연변이의 誘發源이라고 하는 바, 이에 ultraviolet lights(Bonner, 1946; Pontecorvo등, 1953), x-rays (Beadle and Tatum, 1941) 그리고 여러가지 화학물질(Westergaard, 1957; Loveless and Howarth, 1959; Prakash등, 1972; Lemontt, 1977) 등이 있다. 돌연변이체 및 wild type에 있어서 이용할 수 있는 遺傳 marker로서 그 균총의 形態와 色, 胞子 色등은 wild type의 우수한 形質을 그대로 이용할 수 있으며, 抵抗性 變異를 포함한 營養要求性 菌株는 原

形質體 融合 및 vector의 形質轉換에 사용되고 있다.

生化學的 突然變異는 주로 영양요구성을 말하는데 絲狀菌類에 있어서는 *Neurospora*(Beadle and Tatum, 1945)에서 먼저 연구 되었다. 영양요구성 균주는 wild type이 생육할 수 있는 最少培地에서 생육하지 못하며 생육에 필요한 어떤 하나의 물질 또는 몇가지의 필요 성분, 즉 amino acid, vitamin 또는 nucleic acid 등을 최소배지에 공급하면 성장하게 된다. 다른 형태의 영양요구성으로는 carbohydrate (Robert, 1963), nitrite and nitrates(Cove, 1966), sulphate (Arst, 1968), acetate(Armitt등, 1970) 또는 ethanol (Page and Cove, 1972)등의 성분을 이용할 수 없는 것도 있는데 이들도 포함된다.

高等菌類에 있어서의 영양요구성 균주는 *Agaricus bisporus*(Pelham, 1967; Raper등, 1972; Wang, 1972; Elliott, 1979), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold등, 1982), *Volvariella volvacea* (Santiago, 1981)에서 보고 되었다. 돌연변이체로는 사상균류에서는 주로 菌絲와 胞子が 이용되어 왔는데 최근에 원형질체를 사용한

것이 *Podospora*에서 보고 되었다(Belcour, 1975). 이러한 영양요구성 균주는 遺傳標識으로서 原形質體融合과 vector의 형질전환을 통하여 後代의 遺傳分析을 하여 새로운 交雜種의 選拔과 genetic map을 작성하는데 필요하다.

본 연구에서는 원형질체 조작에 의한 영양요구성 균주를 선별 하였기에 그 결과를 보고 하고자 한다.

材料 및 方法

菌 株

한국 농촌진흥청 농업기술 연구소의 보존 균주인 *Pleurotus ostreatus* ASI 2018에서 單孢子 分離하여 얻은 ASI 106-6과 *Pleurotus florida* ASI 2016에서 단포자 분리하여 얻은 ASI 124-30 두 균주를 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 사용하였으며 成分 造成을 보면 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) 20.0)이며, 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) 20.0 이다.

突然變異 誘發

原形質體 分離는 이미 보고된 방법(Yoo 등, 1984)에

따라 하였으며, 滲透壓 調節劑에 두번 세척하여 알맞은 농도로 원형질체를 현탁하여, 멸균된 petri dish에 10 ml씩 넣고 사용전 30분에 미리 가동시켜 둔 U.V lamp (emission=39 ergs sec⁻¹ cm⁻²)를 약 30 cm 거리에서 원형질체 현탁액을 magnetic stirrer로 저으면서 시간별로 照射하였다. 이 때에 자외선을 조사할 때는 빛을 완전히 차단한 암실에서 하였으며, 원형질체를 자외선에 조사한 후에도 약 10분 이상을 암흑상태로 두었다가 삼투압 조절제가 첨가된 완전배지에 再生하였다.

營養要求性 菌株 選拔

재생한 원형질체를 25°C에 10~15일 배양후 환원된 菌叢을 이쑤시개로 완전배지에 1개의 petri dish에 16 균주씩 옮겼다. 옮긴후 5~7일에 다시 최소배지에 동일한 방법으로 접종한 후 5~7일에 생장이 느린 균주만을 선별하여 다시 최소배지에 옮겨서 동일한 방법으로 전혀 생육하지 않는 균주만을 선별하였다.

營養要求性 菌株의 遺傳 標識 確認

최소배지에서 성장하지 않는 균주를 선별하여 1개의 petri dish에 12균주씩 최소배지에 필요성분을 혼합하여 검정하였다. 기본적인 방법은 Holliday(1956)에 준하였으며 보다 정밀하고 편리한 방법이 眞菌類의 遺傳 標識 확인에 필요하여 Holliday방법을 수정하여 만들어 사용하였다. 먼저 yeast extract 1mg, casamino acid 5 mg, 그리고 nucleic acid 50 µg/ml로 각각 검정한 후에 Table I의 용액 9가지를 검정하여 선별하였다.

Table I. List of solutions used for the screening of auxotrophic mutants.

1	2	3	4	5	6	7	8
1. Choline							
2. Cystine	Biotine						
3. Citrulline	Glutamate	Adenine					
4. Cytosine	Histidine	Nicotinic acid	Aneurine				
*5. Folic acid	Isoleucine	Methionine	Pyridoxine	Arginine			
6. Guanine	Inositol	Ornithine	Pantothenic acid	Serine	Alanine		
7. Glycine	Leucine	Proline	PABA	Thymine	Tryptophan	Asparatate	
8. Glutamine	Lysine	Phenylalanine	Riboflavin	Tyrosine	Threonine	Valine	Asparagine
*9. (NH ₄) ₂ SO ₄	Na ₂ S ₂ O ₃						

* Amino acid: 0.5 mg/ml

Vitamin, Nucleic acid: 0.1 mg/ml

*5: Folic acid, Isoleucine, Methionine, Pyridoxine, Arginine, Serine, Thymine, Tyrosine

*9: (NH₄)₂SO₄, Na₂S₂O₃

結果 및 考察

紫外線이 原形質體에 미치는 影響

돌연변이 유발에 먼저 수반되는 자외선 조사에 대한 느타리버섯과 사철느타리버섯 원형질체의 生存率을 보던 Fig. 1과 같다. 2~120초 범위로 자외선을 조사해 본 결과 10초 이내에서 원형질체의 50%이상이 再生能力을 잃었으며 35초 부근에서 약 1%의 생존율을 나타내었고 느타리버섯은 40초, 사철느타리버섯은 60초 이상에서 100% 致死함을 보였다. 따라서 원형질체의 생존율은 種에 따라 차이가 있었는데 사철느타리버섯이 느타리버섯 원형질체에 비하여 생존율이 높았다.

營養要求性 菌株 選拔

느타리버섯과 사철느타리버섯의 원형질체에서 선발한 영양요구성 균주는 각각 3균주와 4균주이었다. 느타리버섯의 유전표식은 Arg, Gly Ser과 Ala Orn Tyr이었으며, 사철느타리에 있어서는 Ribo가 2균주, Phen 그리고 Ade Hyp이었는데 느타리버섯은 자외선 조사시간이 12.5~15.0초로서 원형질체 생존율은 11.8~15%였으며 사철느타리버섯은 자외선 조사시간이 20~40초로서 원형질체 생존율은 0.83~7.8%이었다(Table II).

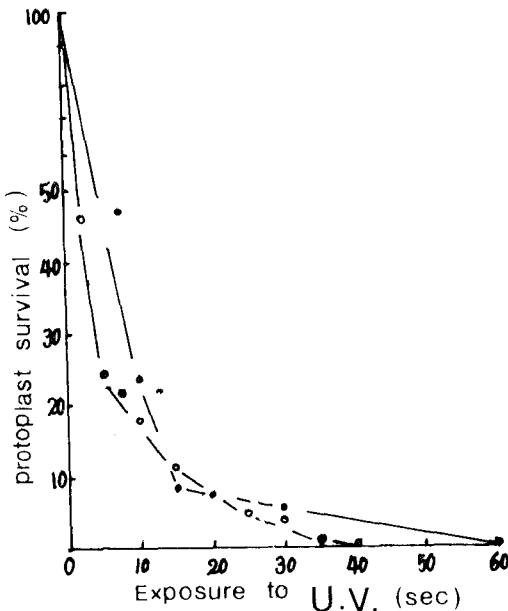


Fig. 1. Effect of ultraviolet light on the survival of *Pleurotus ostreatus* (o-) and *Pleurotus florida* (•-) protoplast.

Table II. Auxotrophic mutants of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*.

Strain	Genetic marker	Exposure time (Sec.)	Viability (%)
<i>P. ostreatus</i>	Arg	12.5	15.0
	Gly Ser	12.5	15.0
	Ala Orn Tyr	15.0	11.88
<i>P. florida</i>	Ribo-1	20.0	7.86
	Ribo-2	40.0	0.83
	Phen	40.0	0.83
	Ade Hyp	40.0	0.83

Table III. The reversion of auxotrophic strains on MCM and MMM.

Strains		Reversion frequency(%)	
		MCM	MMM
<i>P. ostreatus</i>	Arg	0.24	0
	Gly Ser	0.41	0
<i>P. florida</i>	Ribo-1	1.63	0
	Ribo-2	3.19	0
	Phen	1.22	0.87*

* back mutation

일반적으로 포자에서 영양요구성 균주를 선발할 때는 5~15%의 생존율에서 선발한다(Hamlyn, 1982). 그러나 원형질체에서는 보고된 바 없어서 정확한 생존율을 알 수 없는데, 이 실험에서는 0.83~15%로 나타났다. 생존율이 낮을수록 변이체는 많이 얻지만, 변이가 심화되면 균주의 생장이 느려지는 경향이 있었다.

完全培地 및 最少培地에서 營養要求性 菌株의 原形質體 再生

원형질체 용합을 위하여 분리한 원형질체를 0.6 M KCl 이 첨가된 배지에 재생해본 결과 Phen을 제외하고 모든 균주는 완전배지에서는 환원이 되고, 최소배지에서는 원형질체 환원이 이루어 지지 않았다. Phen균주는 최소배지에서도 버섯완전배지에서와 동일하게 원형질체가 환원되는 back mutation 현상이 나타났다(Table III). 따라서, 이 균주는 원형질체 融合에 부적당하지만, 아주 낮은 농도에서 용합을 시도할 필요는 있다고 사료되었다.

摘 要

진균류의 균주개발과 유전연구에 필수적인 영양요구성 균주 선발을 위하여 느타리버섯과 사철느타리버섯

의 원형질체에 자의선을 조사하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 원형질체에 자의선을 조사하여 그 생존율이 0.83~15%일때 가장 많은 영양 요구성 균주를 선발하였다
2. 느타리에서 Arg, Gly Ser 그리고 Ala Orn Tyr 3균주와 사철느타리버섯에서 Ribo-1, Ribo-2, Phen, 그리고, Ade Hyp 4균주를 선발하였으며 이들중에서 Phen 균주는 back mutation 현상이 나타났다.

文 獻

- Armitt, S., Roberts, C.F. and Kornberg, H.L. (1970): The role of isocitrate in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Letters* 7:231-234.
- Arst, H.N. Jr. (1968): Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 219:268-270.
- Beadle, G.W. and Tatum, E.L. (1941): Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 27:499-506.
- Beadle, G.W. and Tatum, E.L. (1945): *Neurospora* II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Am. J. Botany* 32:678-686.
- Belcour, L. (1975): Cytoplasmic mutation isolated from protoplasts of *podospora anserina* *Gen. Res. Camb.* 25:155-161.
- Bonner, D. (1946): Further studies of mutant strains of *Neurospora* requiring isoleucine and valine. *J. Biol. Chem.* 166:545-554.
- Cove, D.J. (1966): The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochemica et Biophysica Acta* 113:51-56.
- Elliott, T.J. (1979): Spontaneous auxotrophs in *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 115:505-508.
- Gold, M.H., Cheng, T.M. and Alic, A. (1983): Formation, fusion and regeneration of protoplasts from wild type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *phanerochate chryso spor.* *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1):260-263.
- Hamlyn, P.F. (1982): Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium acremenium*, Ph. D. *Theis.* Univ. of Nottingham.
- Lemontt, J.F. (1977): Mutagenesis of yeast by hydrazine: Dependence upon post treatment cell division. *Mutation Research* 43:165-178.
- Loveless, A. and Howarth, S. (1959): Mutation of bacteria at high levels of survival by ethyl methane sulphonate. *Nature*, 184:1780-1782.
- Page, M.M. and Cove, D.J. (1972): Alcohol and amine catabolism in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 127:17.
- Pelhan, J. (1967): Techniques for mushroom genetics. *Mushroom Science* 6:49-64.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M. Macdonald, K.D. and Bufton, A.W. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5:141-238.
- Prakash, S., Masurekar, M., Kahgan, P. and Demain, A.L. (1972): Mutagenesis and enrichment of auxotrophs in *penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology* 23:995-996.
- Raper, J.R. and Raper, C.A. (1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 8:1-9.
- Raper, C.A., Raper, J.R. and Miller, R.E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64:1088-1117.
- Roberts, C.F. (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilisation in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31:226-227.
- Santiago, C.M. Jr. (1981): Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) SINGER. Ph. D. Thesis Univ. of Nottingham.
- Wang, H.H. (1972): Existence of auxotrophic nuclei in non-irradiated mycelial fragments of the commercial cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 9:453-459.
- Westergaard, M. (1957): Chemical mutagenesis in relation to the concept of the gene. *Experientia* 13:224-234.
- Yoo, Y.B., Byun, M.O., 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(4):164-169.

<Received January 11, 1985; Accepted March 21, 1985>