

## 노랑느타리버섯의 原形質體 再生 및 還元에 관한 研究

李娟姬 · 柳昌鉉\* · 車東烈\* · 劉英福\* · 閔庚喜

淑明女子大學校 理科大學 生物學科 · 農村振興廳 農業技術研究所 菌科\*

## Protoplast Regeneration and Reversion in *Pleurotus cornucopiae*

Yeon-Hee Lee, Chang-Hyun You,\* Dong-Yeul Cha,\*

Young-Bok Yoo\* and Kyung-Hee Min

Department of Biology, College of Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140 and  
Department of Applied Mycology and Mushroom, Institute of Agricultural Sciences\*, Suwon 170, Korea

**Abstract:** Protoplasts of *P. cornucopiae* were reverted to normal hyphal growth and reversion frequency was 0.04~19%. The complete medium stabilized with 0.6M sucrose was most effective for regeneration of protoplasts. When hypertonic mushroom complete medium not containing agar was overlaid, regeneration frequency of protoplasts was the highest rate among the others of top-agar. The protoplast reversion frequency and mycelial growth of *P. cornucopiae* were increased when various amino acids, nucleic acid components and vitamin compound were added to the hypertonic minimal medium. The relation between sources increasing reversion frequency and sources accelerating mycelial growth was similar in amino acids and nucleic acid components but it was different in vitamins. The protoplast reversion frequency showed the highest rate when all sources were added to the regeneration minimal medium. Microscopically, regeneration patterns of protoplasts showed formation of a bud-like structure, direct germination, yeast-like cell chain of the protoplast, and the production of both direct germ tube and yeast-like cell chain from a protoplast.

**Keywords:** Protoplast regeneration and reversion, *Pleurotus cornucopiae*, Basidiomycetes.

분리된 原形質體가 완전한 菌絲體로 再生·還元되어야 실제 응용이 가능한데 原形質體는 정상세포와 같은 핵이 있으므로 새로운 細胞壁을 合成(regeneration) 하며 완전한 정상적인 菌絲體로 환원될 수 있다(reversion). 絲狀菌類에서 原形質體 再生 및 還元은 주로 形態的인 變移를 관찰함으로써 研究되어졌는데 (Peberdy and Gibson, 1971; Dooijenaar-Kloosterziel 등, 1973; Sietsma and De Boer, 1973; Moore and Peberdy, 1976; Anne, 1977; Peberdy, 1979), 高等菌類에서도 Strunk(1965)가 *Polystictus versicolor*에서 再生 形態를 보고한 이후 *S. commune* (De Vries and Wessels, 1975), *T. matsutake* (Abe 등, 1982), *F. velutipes* (Yamada 등, 1983), *P. ostreatus* (Yamada 등, 1983; 秦, 1984)에서 관찰되어 졌다. 이러한 原形質體에 의한 細胞壁의 發達 形態는 菌類의 細胞壁 合成 또는 再

生 菌株의 形態를 연구할 수 있는 자료가 되어왔다 (Peberdy, 1979).

本 研究는 노랑 느타리버섯의 原形質體 再生率에 영향을 주는 要因인 再生培地의 構成 成分, 再生培地에 첨가되는 滲透壓 調節劑와 濃度, overlaying하는 培地의 agar濃도에 대해서 조사하였고 특히 아미노산, 핵산 구성 성분, 비타민이 노랑 느타리 菌絲生長과 細胞壁이 제거된 原形質體 再生에 미치는 영향에 관해서 조사하였다. 또한 固體培地에서 노랑 느타리 原形質體가 再生되는 形態를 관찰하며 再生 形態를 분류하였다.

### 材料 및 方法

#### 菌株 및 培養

本 實驗에 사용한 菌株는 農村振興廳 農業技術研究

**Table I.** Media used for the culture of *P. cornucopiae* mycelium.

Media	Component	Content
Mushroom complete medium(MCM)	Yeast extract	2.00 g
	Peptone	2.00 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.46 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
	Glucose	20.00 g
	Agar	20.00 g
	Distilled water	1.00 l
Mushroom minimal medium(MMM)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.46 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
	DL-Asparagine	2.00 g
	Thiamine-HCl	120μg
	Glucose	20.00 g
	Agar	20.00 g
	Distilled water	1.00 l

所 保存菌株인 *Pleurotus cornucopiae* (Paul ex Pers) Roll ASI 2011 (dikaryon), 즉 노랑 느타리버섯으로서 28°C에서 3~4 일 培養하여 사용하였다.

**培 地**

菌 培養을 위한 버섯 完全培地(mushroom complete medium, MCM; Raper 등, 1972)와 버섯 最小培地(mushroom minimal medium, MMM; Raper 등, 1972)의 구성 성분은 Table I과 같으며 120°C에서 30분간 멸균하여 사용하였다.

原形質體 再生培地는 MCM, MMM에 滲透壓 調節劑 mannitol, KCl, sorbitol을 0.6 M되게 첨가한 후 멸균하였으며, sucrose는 별도로 살균하여 MCM, MMM에 0.6 M되게 첨가하여 사용하였다. 營養源 試驗用 培地는 thiamine-HCl과 DL-asparagine이 없는 MMM에 아미노산 1 mg ml<sup>-1</sup>, 핵산 구성 성분 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, 비타민 0.5 mg ml<sup>-1</sup>되게 첨가하여 사용하였다.

**原形質體 分離**

MCM 固體培地上的 cellophane membrane에서 4일동안 培養한 노랑 느타리 菌株를 Novozym 234+β-D-glucanase+β-glucuronidase 混合酵素液과 혼합하여 28°C에서 90 분간 120 strokes min<sup>-1</sup>로 흔들었다.

採出된 原形質體가 있는 酵素液을 sintered glass filter

(porosity 1)에 여과하여 菌絲體를 제거한 후 1,000 rpm에서 15 분동안 遠心分離하였다. 상등액을 제거하고 남은 原形質體에 滲透壓 調節劑 0.6M sucrose를 첨가하여 흔들은 다음 遠心分離하였다(1,000 rpm, 15min). 다시 이 과정을 반복하여 滲透壓 調節劑로 2 번 세척하여 酵素液을 완전히 제거시켰다.

**原形質體 再生**

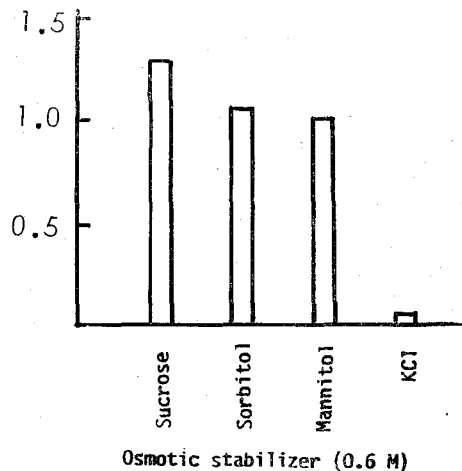
酵素液을 제거시킨 原形質體를 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup>으로 되게한 후 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup> ml<sup>-1</sup> 濃度로 희석하여 滲透壓 調節劑와 agar 2.0%가 첨가된 MCM과 MMM 0.5 ml씩 분주한 다음 40~45°C로 유지시켜 놓은 agar濃度가 0.75%인 동일한 培地를 5ml씩 overlaying하여 原形質體가 培地全면에 흩어지도록 흔들어 준 다음 완전히 굳혀 28°C에서 5~17 일동안 培養하였다.

原形質體 再生率은 再生培地에서 자란 colony 數를 분주된 原形質體 數로 나누어 百分率로 계산하였으며, 原形質體의 再生形態를 광학 현미경하에서 관찰하였다.

**結 果**

**滲透壓 調節劑와 培地의 影響**

原形質體가 파괴되지 않고 정상적인 菌體絲로 再生·還元되는데 적당한 滲透壓 調節劑를 찾기 위하여 mannitol, KCl, sorbitol, sucrose를 0.6 M되게 培地에 첨가하여 再生率을 본 결과 KCl 0.04%, mannitol, sorbitol에서 1.0% 정도로 나타났으며 sucrose가 첨가된 培地에서 1.29%로 再生率이 가장 높게 나타났다



**Fig. 1.** Effect of different osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts.

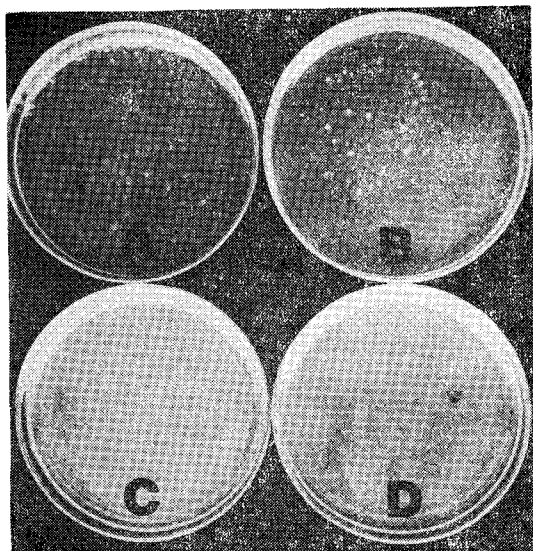


Fig. 2. Reversion of protoplasts of *Pleurotus cornucopiae*. Protoplasts were incubated at 28°C for 7 days on 0.6 M sucrose, KCl stabilized MCM (A,B) and on 0.6 M sucrose, KCl stabilized MMM (C,D).

Table II. Effect of media and osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts.

Media	Osmotic stabilizers (0.6M)	Reversion frequency (%)
MCM	Sucrose	5.21
MMM	—	2.17
MCM	KCl	0.08
MMM	—	0.19

\* MCM: Mushroom complete medium.  
MMM: Mushroom minimal medium.

(Fig. 1). 再生菌株는 0.6 M mannitol, sorbitol, sucrose에서는 5~6 일째 육안으로 볼 수 있었으나 0.6 M KCl에서는 7~10 일이 되어야 확인할 수 있었다.

再生率에 미치는 培地의 영향을 보면 Table II에서와 같이 滲透壓 調節劑로 0.6 M sucrose 사용시는 MCM에서 5.21 %의 높은 再生率을 보인 반면 MMM에서는 2.17 %의 다소 낮은 再生率을 보였으며, 0.6 M KCl 사용시는 MCM에서 0.08 %, MMM에서는 0.19 %로 KCl에서는 sucrose와는 달리 MMM에서 再生率이 약간 높은 경향을 나타내었다. Fig. 2는 MCM, MMM배지에 0.6 M KCl, 0.6 M sucrose가 첨가된 배지에서 再生된 菌株로 sucrose보다 KCl에서 더 단단하고 선명한 colony 형태를 나타내었다.

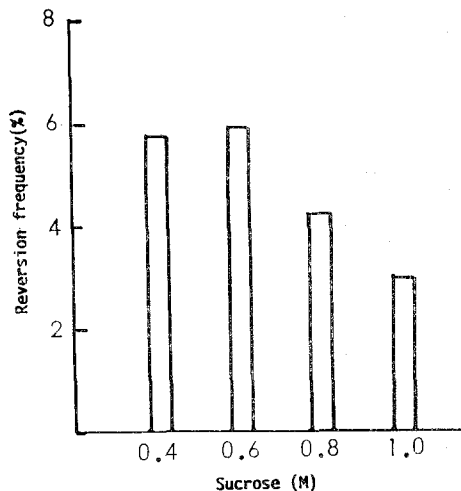


Fig. 3. Effect of the concentration of osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts.

滲透壓 調節劑 濃度の 影響

滲透壓 調節劑 sucrose 濃도를 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 M로 調節하여 再生率을 본 결과 1.0 M에서 3.05 %, 0.4 M에서 5.78 %로 나타났으며 0.6 M에서 5.98 % 가장 높은 再生率을 보여 노랑 느타리 原形質體 再生에 적합한 滲透壓 調節劑 sucrose 濃도는 0.6 M이었다(Fig. 3).

Top agar 濃度の 影響

原形質體를 安定하게 再生시키기 위해서 overlaying 하는 培地에 첨가되는 top agar 濃도에 따른 再生率을 MMM(Exp. I), MCM(Exp. II)에서 조사한 결과 Table III과 같이 MMM에서는 agar가 전혀 포함되지 않은 0.6 M sucrose+MMM 液體培地를 overlaying한

Table II. Influence of top agar concentration on the reversion of protoplasts.

Agar concentration(%)	Protoplast reversion(%)	
	Exp I. on MMM	Exp II. on MCM
0 (Only protoplasts)	—	0.80
0 (Only osmotic stabilizer. 0.6M sucrose)	5.34	2.26
0 (Only minimal medium)	6.49	—
0.50	5.87	1.75
0.75	4.05	1.64
1.00	3.13	1.35
2.00	3.11	1.56

경우에 6.49%의 높은 再生率을 나타냈고, 다음이 agar 濃度가 0.5% 일때였으며 2.0% 일때 3.11%로 가장 낮은 再生率을 보였다(Exp. I). MCM에서는 agar가 포함되어 있지 않은 滲透壓 調節劑 0.6M sucrose을 overlaying했을 때 再生率 2.26%로 가장 높게 나타났고 overlaying없이 原形質體만을 再生시켰을 경우에는 0.8%로 가장 낮았다(Exp. II). 이러한 결과로 볼 때 overlaying하는 培地에 agar를 첨가하지 않은 것이 原形質體 再生에 더 效果의인 것으로 나타났으며 top agar 濃度가 높아질수록 再生率은 감소하였고 overlaying하지 않았을 때는 再生率이 급격히 떨어진다는 것을 알 수 있었다.

여러가지 營養源의 影響

原形質體 再生 最小培地 (0.6M sucrose+MMM)에 여러 종류의 아미노산, 핵산 구성 성분, 비타민을 첨가하여 再生率에 미치는 영향을 본 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 23 종류의 아미노산 중에서는 DL-leucine, L-asparagine, L-glutamine, L-ornithine, DL-valine, L-citrulline, DL-tyrosine, DL-serine, L-alanine, L-arginine의 順으로 무첨가 培地인 control에 비해 0.49~8.45%정도 높아졌고, 8 종류의 핵산 구성 성분에서는 thymidine, cytosine, hypoxanthine, thymine, uracil의 順으로 0.2~0.66% 증가했으며(Fig. 5), 12 종류의 비타민에서는 L-ascorbic acid, myo-inositol, D-biotin, folic acid, cholin chl-

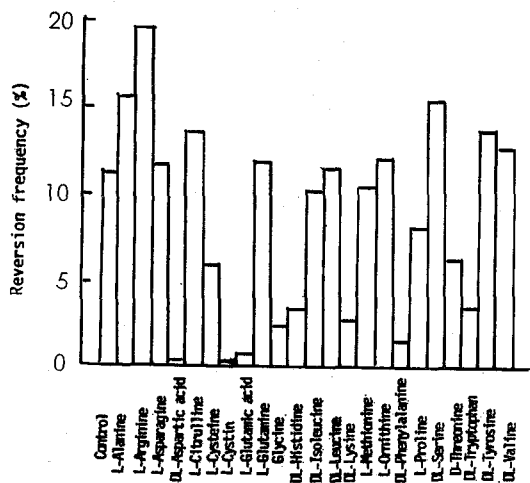


Fig. 4. Effects of various amino acids on the reversion of protoplasts. The final concentration of acids was 1 mg per ml. Control: Regeneration minimal medium without amino acids.

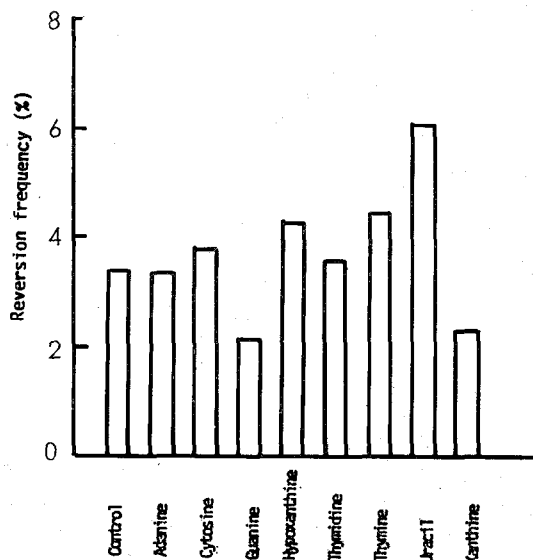


Fig. 5. Effects of nucleic acid bases and nucleosides on the reversion of protoplasts. The final concentration of nucleic acid bases and nucleosides was 0.5 mg per ml. Control: Regeneration minimal medium without nucleic acid bases and nucleosides.

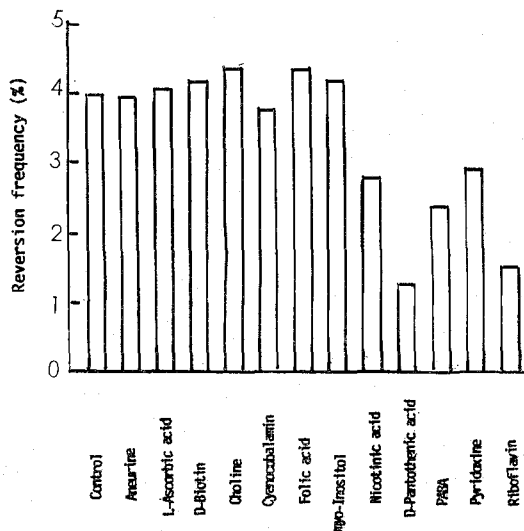


Fig. 6. Influence of various vitamins on the reversion of protoplasts. The final concentration of vitamins was 0.5 mg per ml. Control: Regeneration minimal medium without vitamins.

oride 順으로 再生率이 0.09~0.38 % 높아졌다(Fig. 6). 대체적으로 再生率이 높게 나타난 營養源이 첨가된 培地에서는 6~10 일 사이에 再生菌株를 육안으로 확인할 수 있었으나 낮은 再生率을 보인 培地에서는 14~17 일 정도에서 再生菌株를 볼 수 있었다. 또한 이러한 營養

**Table IV.** Effects of various amino acids on the mycelial growth of *P. cornucopiae*. Incubation for 7 days at 28 °C. The final concentration of amino acids was 1 mg per ml.

Source	Colony diameter(cm)
L-Alanine	6.86
L-Arginine	7.55
L-Asparagine	3.54
L-Aspartic acid	2.97
L-Citrulline	7.31
L-Cysteine	6.69
L-Cystin	6.06
L-Glutamic acid	2.66
L-Glutamine	7.10
Glycine	5.07
DL-Histidine	5.43
DL-Isoleucine	6.32
DL-Leucine	4.72
DL-Lysine	3.04
L-Methionine	4.48
L-Ornithine	6.77
DL-Phenylalanine	4.75
L-Proline	7.05
DL-Serine	6.79
D-Threonine	2.90
DL-Tryptophan	2.15
DL-Tyrosine	5.17
DL-Valine	5.81
Control(MMM)	6.11

**Table V.** Effects of different nucleic acid bases and nucleosides on the mycelial growth of *P. cornucopiae*. Incubation for 7 days at 28 °C. The final concentration of nucleic acid bases and nucleosides was 0.5 mg per ml.

Source	Colony diameter(cm)
Adenine	5.47
Cytosine	6.15
Guanine	7.25
Hypoxanthine	6.17
Thymidine	7.22
Thymine	7.70
Uracil	7.45
Xanthine	6.95
Control (MMM)	7.16

**Table VI.** Effects of various vitamins on the mycelial growth of *P. cornucopiae*. Incubation for 7 days at 28 °C. The final concentration of vitamins was 0.5 mg per ml.

Source	Colony diameter(cm)
Aneurin	8.20
L-Ascorbic acid	7.95
D-Biotin	7.47
Choline	7.72
Cyanocobalamin	7.85
Folic acid	8.12
Myo-Inositol	7.95
Nicotinic acid	8.00
D-Pantothenic acid	7.77
para-Aminobenzoic acid(PABA)	8.32
Pyridoxine	8.15
Riboflavin	7.95
Control (MMM)	7.60

**Table VII.** Effects of various amino acids, nucleic acid bases, nucleosides and vitamins on the reversion of protoplasts of *P. cornucopiae*.

Culture media	Reversion frequency(%)
MMM+Amino acids(A.A.)*	5.09
MMM+Nucleic acid bases and nucleosides (N.A.)*	5.16
MMM+Vitamins(Vit.)*	3.20
MM+All(A.A.+N.A.+Vit.)*	5.21
Control (MMM)	3.38

\* Amino acids: L-Alanine, L-Arginine, L-Asparagine, L-Citrulline, L-Glutamine, DL-Leucine, L-Ornithine, DL-Serine, DL-Tyrosine and DL-Valine 1mg ml<sup>-1</sup> each.

Nucleic acid bases and nucleosides: Cytosine, Hypoxanthine, Thymidine, Thymine and Uracil 0.5 mg ml<sup>-1</sup> each.

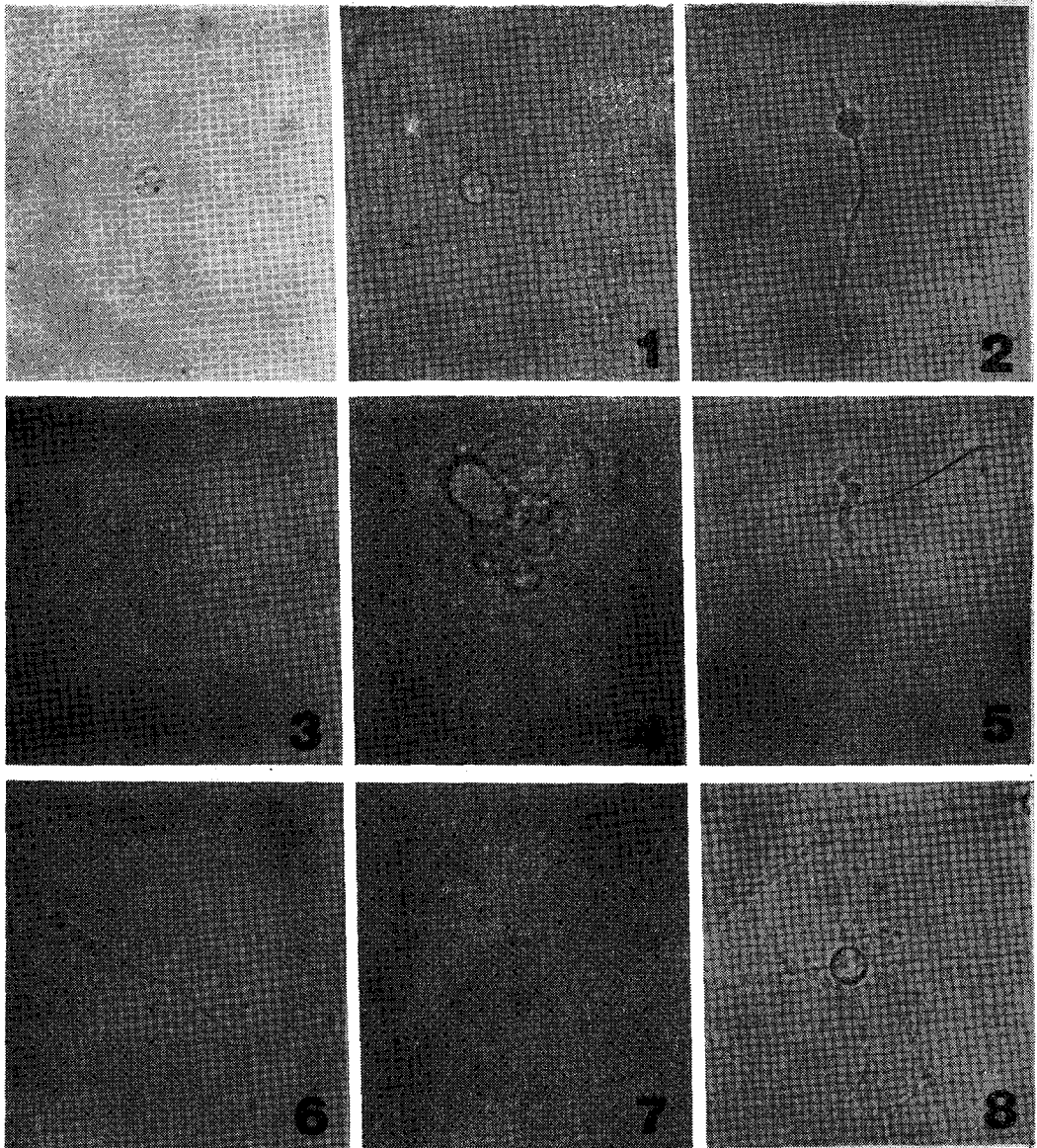
Vitamins: L-Ascorbic acid, D-Biotin, Choline, Folic acid and myo-Inositol 0.5 mg ml<sup>-1</sup> each.

All: Amino acids+Nucleic acid bases and nucleosides+Vitamins.

源들이 노랑 느타리의 菌絲 生長에 미치는 영향을 보면 아미노산에서는 DL-isoleucine, L-ornithine, DL-serine, L-alanine, L-proline, L-glutamine, L-citrulline, L-arginine 順으로 colony diameter가 무첨가 培地

MMM에 비해 0.21~1.44 cm정도 증가했고(Table IV), 핵산 구성 성분에서는 thymidine, guanine, uracil, thymine의 順으로 0.06~0.54 cm 커졌으며(Table V),

비타민에서는 D-biotin 을 제외하고 choline chloride, D-pantothenic acid, cyanocobalamine, L-ascorbic acid, myo-inositol, riboflavin, nicotinic acid, folic



**Fig. 7.** Patterns of regeneration and reversion of *Pleurotus cornucopiae* on solid medium after 1~2 days of incubation.

- 1 and 2: Direct development of one or two germ tubes from a spherical protoplast.
- 3 and 4: Formation of various bud-like structure from spherical protoplasts.
- 5 and 6: Formation of yeast-like cell chain from a spherical protoplast and development of hyphae from yeast-like cell chain.
- 7: Production of both direct germ tube and yeast-like cell chain from a spherical protoplast.
- 8: Development of hyphae and formation of hyphal branch after 4 days.

acid, pyridoxine, aneurin, PABA 順으로 0.12~0.72 cm 정도로 菌絲 生長이 촉진되었다(Table V). 이러한 결과로 볼 때 아미노산, 핵산 구성 성분에서는 原形質體 再生率을 증가시킨 營養源과 菌絲 生長을 촉진시킨 營養源의 種類 사이에 큰 차이없이 비슷한 경향을 보였으나, 비타민에서는 대부분의 종류가 菌絲 生長을 증가시키나 再生率은 5 종류에서만 높아져서 다소 다른 경향을 나타내었다.

Table VII은 原形質體 再生率을 증가시킨 營養源들을 種類別로 혼합한 것과 모두 혼합한 것이 再生率에 미치는 영향을 본 것으로 아미노산에서는 5.09%의 再生率으로 무첨가 培地에 비해 1.71% 증가했고, 핵산 구성 성분에서는 再生率이 5.16%로 1.78% 높아졌으나 비타민에서는 3.20%의 再生率을 나타내 control에 비해 낮아졌다. 아미노산, 핵산 구성 성분, 비타민이 모두 첨가된 培地에서 再生率은 5.21%로 되어 무첨가 培地에 비해 1.83%정도 증가하여 높은 再生率을 나타냈다.

#### 再生 및 還元過程의 形態的인 變移 觀察

原形質體가 再生되는 形態를 광학 현미경하에서 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 再生形態의 pattern을 보면 첫째, one or two direct germ tube가 原形質體에서 나와서 菌絲로 발달해 가는 것, 둘째, 原形質體에서 bud-like cell이 형성되는 것, 셋째, 原

形質體에서 3~6個의 cells이 yeast-like cell chain이 되어 germ tube가 형성되어서 菌絲로 발달해 가는 것을 볼 수 있었고 네째는 아주 드문 형태로 한 原形質體에서 yeast-like cell chain과 direct germ tube가 나와서 菌絲로 발달하는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 다양한 再生形態는 原形質體를 固體培地에서 1~2일 培養했을 때 관찰할 수 있었는데 첫번째 形態가 가장 많이 나타났다. 培養 3~4일 때에는 原形質體를 중심으로 菌絲가 成長해 가면서 branch를 형성하였다. 再生되는 原形質體를 MCM Petri dish 중앙에 집중하여 20~25°C 상온에서 28~30일 동안 培養하여 본 결과 완전한 菌絲體로 還元되어 子實體의 발달 초기단계인 primordium을 형성해 노랑 느타리의 완전한 子實體로 발달하였다(Fig. 8).

#### 考 察

분리된 原形質體가 새로운 細胞壁을 合成하여 정상적인 菌絲體로 還元되어 子實體를 형성하는 것은 필수적이라고 할 수 있다. 노랑 느타리 原形質體 再生에 적합한 滲透壓 調節劑와 濃度는 0.6 M sucrose가 가장 효과적인 것으로 나타났는데 이러한 결과는 Yoo등(1985)이 느타리버섯에서 0.6 M sucrose, 0.6 M KCl이 再生에 적합하다고 한 것과 일치하나 0.6 M KCl에서 再生率이 더 높았다는 것과는 相異한 결과였다.

原形質體를 固體培地에서 再生시킬 경우 overlaying 방법이 사용되었는데 1969年 Fukui 등은 thin-layer-agar plating method를 이용해서 原形質體 再生을 分析 研究하였다. 대부분의 高等菌類에서 overlaying하는 培地가 첨가되는 top agar 濃度를 0.5~0.75%로 사용하는 것이 보고되어 있으나(Abe 등, 1982; Yamada 등, 1983; 秦, 1984; Yoo 등, 1985) 本實驗에서는 agar가 첨가되지 않은 滲透壓 調節劑나 液體培地만을 overlaying한 경우에 再生率이 높았고 agar 濃도가 높아질수록 再生率이 감소하였는데 이러한 결과는 Go(1985)가 0.75% 濃度에서 높았다는 것과 다른 경향이였다.

여러가지 營養源이 再生率에 미치는 영향을 보면 1973年 Sietsma와 Boer가 *Pythium*의 原形質體 再生培地에 glucose(Gl), asparagine(Asp), yeast extract(Ye), Gl+Asp, Gl+Ye, Gl+Asp+Ye를 첨가하여 본 결과 glucose는 再生에 필수적이거나 질소원인 Asp, Ye, peptone은 필수적인 요소는 아니나 再生過程을 상당히 촉진시킨다고 하였고 高等菌類에서는 De Vries와 Wessels(1975)가 *S. commune* 原形質體 再生·還元이 최대

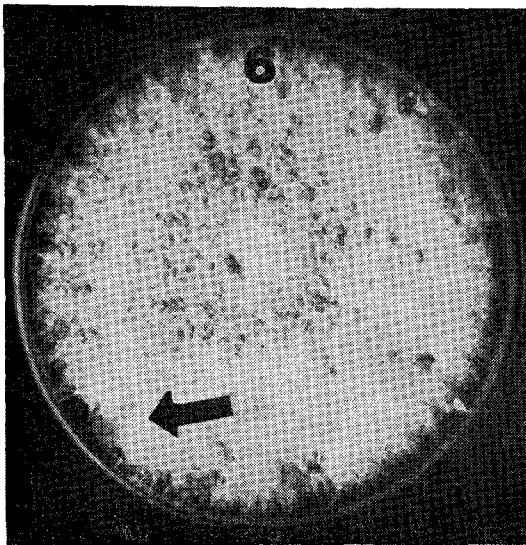


Fig. 8. Fruiting body formation of *P. cornucopiae* when a regenerating protoplast was cultured on MCM Petri dish for 30 days at 20~25°C.

가 되기 위해서는 탄소원과 질소원이 함께 있을 때라고 하였다. 또 Yoo 등 (1985)은 菌絲 生長을 촉진시키는 아미노산과 비타민을 선별하여 再生 培地에 첨가하여 본 결과 完全 培地에서 무첨가 培地에 비하여 약 5배이상 再生率이 증가하였다고 했다.

대체적으로 原形質體 再生率은 原形質體의 흡수·전달기능에 의존하는 것으로 알려져 있다(Elorza 등, 1969). 본 實驗에서는 여러 종류의 아미노산, 핵산 구성 성분, 비타민이 노랑 느타리 버섯의 菌絲 生長과 原形質體 再生率에 미치는 영향을 본 결과 아미노산, 핵산 구성 성분에서는 菌絲 生長을 촉진시킨 종류와 原形質體 再生率을 증가시킨 종류와 原形質體 再生率을 증가시킨 종류에 유사성이 있는 것으로 보아 細胞壁이 제거된 原形質體에 이들 營養源을 흡수·전달하는 기능이 있는 것으로 생각되고 12 종류의 비타민에서는 대부분이 菌絲 生長을 촉진시키나 再生率은 5 종류에서만 높아져서 다소 다른 경향을 나타내었다.

노랑 느타리버섯의 原形質體 再生率은 대체로 0.04~19%였는데 이러한 결과는 *P. ostreatus* (Byun, 1984; 秦, 1984; Go, 1985)의 0.01~2%, *T. matsutake* (Abe 등, 1982)의 10%, *P. sajor-caju* (Go, 1985)의 0.05%, Yoo 등 (1985)이 *P. ostreatus*, *P. florida*에서 0.24~3.19%라고 한 것과 비슷하거나 다소 높은 경향을 나타내었으나 De Vries와 Wessels (1975)이 *S. commune*에서 19~45%였다는 것과는 차이가 났다. 분리된 原形質體가 100% 再生될 수 없는 것은 核이 결핍되었거나(Garcia Acha, 등, 1966) 細胞質에 있는 필수적인 細胞內 小器官이 없기 때문이라고 한다(Anne, 1977; Peberdy, 1979).

原形質體가 再生되는 形態를 高等菌類에서는 Abe 등 (1982)이 *T. matsutake* 原形質體에서 하나 또는 둘 이상의 germ tube가 나오는 것과 bud-like 구조에서 germ tube를 형성하는 것을 관찰했는데 後者は 固體培地에서만 관찰할 수 있었다고 한다. 또 Yamada 등 (1983)은 *P. ostreatus*, *F. velutipes* 原形質體에서 직접 germ tube가 발달하는 형태, yeast-like cells에서 菌絲가 발달하는 것, 변형된 bud-like cells에서 germ tube가 나오는 형태를 관찰하였는데 이러한 再生 形態는 固體培地에서 2일 後에, 液體培地에서는 5~10일 後에 관찰할 수 있었다고 했다. 또 秦(1984)은 *P. ostreatus* 原形質體에서 직접 germ tube가 나오는 것, aberrant tube를 형성하는 것, 한 原形質體에서 정상적인 germ tube와 비정상적인 aberrant tube, 두 가지를 형성하는 형태를 설명하였다. *P. cornucopiae* 原形質體 再生 形態

를 광학 현미경하에서 관찰한 결과 위의 보고들과 비슷한 형태를 볼 수 있었는데 특이한 것은 한 原形質體에서 direct germ tube와 yeast-like cell chain이 형성되는 것이었다. 이렇게 다양하게 再生 形態가 나타나는 것은 再生된 菌株의 形態 및 生長속도의 차이, 核의 數와 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다.

### 摘 要

原形質體를 이용한 버섯의 育種研究를 하는데 있어서 原形質體 再生 및 還元은 필수적인 과정이라고 할 수 있다. 食用버섯의 一種인 *P. cornucopiae* 노랑 느타리버섯의 原形質體 再生에 적합한 諸條件에 대해서 조사한 바를 요약하면 다음과 같다.

原形質體 再生에 적합한 滲透壓 調節劑와 濃度는 0.6M sucrose로 MCM에서 5.21%의 높은 再生率을 보였고, agar를 포함하지 않은 0.6M sucrose 滲透壓 調節劑나 0.6M液 sucrose+MMM 體培地만을 overlaying한 경우에 再生率이 높았다. 노랑 느타리버섯의 菌絲 生長을 촉진시킨 아미노산, 핵산 구성 성분의 種類와 原形質體 再生率을 증가시킨 種類는 유사하며 큰 차이가 없었으나 비타민에서는 다소 다른 경향을 나타냈다. 再生率을 증가시킨 營養源들을 혼합했을 때 무첨가 배지 MMM에 비해 아미노산 혼합, 핵산 구성 성분 혼합에서는 再生率이 증가했으며 비타민 혼합에서는 오히려 감소하였고 아미노산, 핵산 구성 성분, 비타민 모두가 첨가된 데서 가장 높은 再生率을 나타냈다.

固體 培地에서 原形質體가 1~2일 培養되었을 때 광학 현미경하에서 再生 形態를 첫째, one or two direct germ tube, 둘째, bud like structure, 셋째, yeast-like cell chain, 네째는 한 原形質體에서 direct germ tube와 yeast-like cell chain을 형성하는 형태를 관찰할 수 있었으며 3~4일 培養때는 菌絲가 branch를 형성하며 성장하였고 결국 완전한 菌絲體로 되어 노랑 느타리 子實體를 형성하였다.

### 문 헌

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.  
Anne, J. (1977): Somatic hybridization between Pen-



- icillium* species after induced fusion of their protoplasts. *Agricultura* 25:1-118.
- 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*. *Arch. Microbiol.* 102:209-218.
- Dooijewaard-Kloosterziel, A.M.P., Sietsma, J.H. and Woutters, J.T.M. (1973): Formation and regeneration of *Geotrichum candidum* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 74:205-209.
- Elorza, M.V., Jr. Arst, H.N., Cove, D.J. and Scazzocchio, C. (1969): Permeability properties of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Bacteriol.* 99:113-115.
- Fukui, K., Sagara, Y., Yoshida, N. and Matsuoka, T. (1969): Analytical studies on regeneration of protoplasts of *Geotrichum candidum* by quantitative thin-layer-agar plating. *J. Bacteriol.* 98:256-263.
- Garcia Acha, I., Lopez Belmonte, F. and Villanueva, J.R. (1966): Regeneration of mycelial protoplasts of *Fusarium culmorum*. *J. Gen. Microbiol.* 45:515-523.
- Go, S.J. (1985): Studies of the mating characters of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.). Sing. and its protoplast formation and fusion with *Pleurotus ostreatus*. M. Sc. Thesis, Chungnam National University.
- Moore, P.M. and Peberdy, J.F. (1976): Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66:421-425.
- Peberdy, J.F. (1979): Fungal protoplasts: Isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:21-39.
- Peberdy, J.F. and Gibson, R.K. (1971): Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 69:325-330.
- Raper, J.R. and Raper, C.A. (1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* 8:1-9.
- Sietsma, J.H. and De Boer, W.R. (1973): Formation and regeneration of protoplasts from *Pythium* PRL 2142. *J. Gen. Microbiol.* 74:211-217.
- Strunk, C. (1965): Über Entstehung und reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch.* 3:242-244.
- Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Shiratori, T. and Sasaki, T. (1983): Formation and regeneration of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus* protoplasts. *Nippon Shokuhin Kogyo Kakkaiishi* 30:495-500.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. and Cha, D.Y. (1985): Studies on protoplast regeneration and reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* 13:79-82.
- 秦京熙 (1984): *Pleurotus ostreatus*의 protoplast 生成과還元에 관한 研究. 석사학위논문, 숙명여자대학교 대학원.

<Received June 9, 1986; Accepted July 3, 1986>