

참느타리버섯의 原形質體 分離 및 還元

劉英福 · 卞明玉 · 高昇柱 · 柳昌鉉 · 張權烈*

農村振興廳 農業技術研究所 菌相科 慶尙大學校 農科大學 農學科*

Protoplast Isolation and reversion from *Pleurotus spodoleucus*

Young-Bok Yoo, Myung-Ok Byun, Seung-Joo Go,
Chang-Hyun You and Kwon Yawl Chang *

Applied Mycology and Mushroom Division, Institute of Agricultural Sciences,
R.D.A. Suweon 170, and Department of Agronomy, College of Agriculture,
Gyeongsang National University *, Chinju 620, Korea

ABSTRACT: This experiment was undertaken to investigate proper conditions for protoplast formation from *Pleurotus spodoleucus*. Novozym 234 was the most effective enzyme and a high yield of protoplasts was obtained. Combination of enzymes did not improve this result. Sucrose gave the best result to support the release and maintain the stability of protoplasts. The optimal reaction time of mycelium with the lytic mixture was 3 hrs. in shaking condition at 120 strokes min⁻¹. When the mycelium of *P. spodoleucus* was cultured for 3 days on mushroom complete agar medium at 27°C, the formation of protoplasts was effective. The mushroom complete agar medium stabilized with 0.6 M sucrose was the most effective for reversion of protoplasts.

KEYWORDS: Protoplasts formation and reversion. *Pleurotus spodoleucus*. Basidiomycetes.

느타리버섯류는 배지 적응력이 높고 맛이 좋아 세계적으로 재배면적이 매년 증가하며, 버섯 생산량이 세계 총 생산의 2.8%를 증가한다(Yoo 등, 1985). 우리나라에서는 국민소득의 증가와 비례하여 소비량이 늘어나고 있다.

1973년 Devries and Wessels은 33종의 담자균류에 대해 Spheroplasts의 생성을 보고한 이후 많은 식용버섯에서 원형질체 분리에 대한 연구가 이루어졌다(Anderson, 1984; Ushiyama 등, 1977; Lee 등, 1986; Yoo 등, 1985; Santiago, 1981; Yamada 등, 1983). 또한 Yoo 등(1984, 1986)은 *P. ostreatus*와 *P. florida*의 중간 원형질체 융합에 의해 무포자 또는 극히 적은량을 가진 소포자느타리균주, 자실체의 여러가지 형태변화와 자실체의 생산력이 증가된 체세포잡종을 선발하였으며, 이들 융합균주의 유전분석에 의해 두 종의 유전자 재조합균주 선발과 단포자 분리 균사체에서 clamp connection을 확인함으로써 생활환의 변화를 보고하였다.

따라서 원형질체 조작에 의한 식용버섯의 유전육종은 크게 기대되며, 이러한 느타리버섯류의 균주개발을 위하여 참느타리의 원형질체 분리 및 환원에 대한 몇가지 요인을 조사하여 보고하고자 한다.

材料 및 方法

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 농촌진흥청 농업기술연구소의 보존 균주인 *Pleurotus spodoleucus* ASI 2010으로서 clamp connection을 가진 dikaryon 균주이다. 배양을 위하여 버섯완전배지(MCM; Raper 등, 1972)를 121°C에 20분 멸균하여 사용하였다.

분해효소 및 삼투압 조절제

Novozym 234(Novo Industri, Denmark), β -D-glucanase(BDH Chemical Ltd., U.K.), β -glucuronidase(Sigma Chem. Co. USA)를 구입하여 사용하였으며, 0.6 M 삼투압 조절제에 혼합하여

Table I. Comparison of commercial enzymes for their ability to induce protoplast release

Enzyme	Protoplast yield ($\times 10^6/ml$)
Novozym 234 ^a	3.35
Novozym 234 ^b	1.78
Novozym 234 + β -Glucuronidase ^b	2.58
Novozym 234 + β -Glucuronidase + β -D-Glucanase ^a	2.68

a: 5 mg/ml each

b: 10 mg/ml each

4°C의 냉장고에 두면서 부드럽게 흔들어 완전히 녹인 후에 membrane filter(Gelman Sci. 0.2 μ m)로 여과하여 사용하였다.

원형질체의 분리 및 환원

Yoo 등(1984, 1985) 및 Lee 등(1986 a,b)의 방법에 따라 하였다. cellophane membrane 위에 배양한 균사체에 효소를 처리하여 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체를 sintered glass filter(prosityl)에 여과하여 균사체를 제거 후 삼투압 조절제에 2 번 세척하여 알맞게 현탁한 후 2% agar 배지상에 0.75% agar 배지로 overlay 하였다.

結果 및 考察

분해효소의 영향

원형질체 생성은 분해효소의 종류와 농도에 따라 상당한 차이가 있는데, Table I에서와 같이 Novozym 234의 농도가 높아짐에 따라 원형질체 분리는 시간적으로 빨리되나 생성량은 낮았다. Novozym 234의 효과가 가장 높았으며, Novozym 234 + β -glucuronidase, Novozyme 234 + β -glucur-

Table II. Comparison of the osmotic stabilizers on the release of protoplast from *Pleurotus spodoleucus*

Osmotic stabilizer (0.6 M)	Protoplast yield ($\times 10^5/ml$)
Glucose	1.00
Mannitol	0.25
Sucrose	34.25
KCl	1.25
MgSO ₄	0.25

Table III. Effect of incubation time on protoplast release. Lytic mixture stabilized with 0.6 M sucrose stabilizer

Incubation time (h)	Protoplast yield ($\times 10^6/ml$)
1	1.48
2	2.75
3	3.35
4	2.56
5	2.30

onidase + β -D-glucanase의 혼용으로도 원형질체의 생성량을 증가시키지 못하였다.

Yoo 등(1985)의 *P. ostreatus*와 Lee 등(1986)의 *P. cornucopiae*에서 Novozym 234 + β -glucuronidase + β -D-glucanase에서 가장 효과적인 경우와 차이가 있었는데 이러한 결과는 종간에 따르는 세포벽 구성성분의 차이에서 오는 결과로 사료된다.

삼투압 조절제의 영향

일반적으로 가장 효과적인 0.6 M의 농도를 이용하여 몇가지 삼투압 조절제의 효과를 보면 Table II와 같다. Sucrose에서 가장 효과가 좋았으며 Mannitol과 MgSO₄에서 낮았다. Sucrose에서 높은 결과는 Flint(1982)의 *P. ostreatus*, Yoo 등(1985)의 *P. ostreatus*, Go 등(1985)의 *P. sajor-caju*, Lee 등(1986)의 *P. cornucopiae* 그리고 Yoo 등(1987)의 *L. ulmarium*에서의 결과와 일치하였다.

효소처리 시간의 영향

균사체를 효소액과 혼합하여 배양하는 시간에 따른 원형질체 분리량을 보면 배양후 3시간에 가장 많은 분리량을 나타내었다(Table III). 이러한 결과는 Santiago(1981)의 *V. volvacea*, Yamada 등

Table IV. Production of protoplasts from mycelial colonies of different ages in *Pleurotus spodoleucus*

Culture age (day)	Colony area (cm ²)	Protoplast yield ($\times 10^6/ml$)	Protoplast yield per unit area ($\times 10^5/ml$)
3	5.93	2.38	3.43
4	12.74	1.63	1.27
5	18.47	1.19	0.64

Table V. Effect of different osmotic stabilizers on the reversion of *Pleurotus spodoleucus*

Osmotic stabilizer (0.6M)	Percentage of protoplast reverted on MCM
KCl	0.01
Mannitol	0.08
Sorbitol	0.05
Sucrose	0.28

(1983)의 *C. velutipes*, Yoo 등(1987)의 *L. ulmarium* 에서와 동일한 것이었다.

균사체 배양 시간의 영향

균사체의 배양시간은 원형질체 분리에 중요한 요인으로 작용하는데 Table IV에서 보면 배양 3 일이가장 효과적이었다. 3 일 이전은 cellophan membrane 상의 집락이 너무 적었으며, 4 일 이후부터는 점차 원형질체 나출량이 감소하였다. 3 일되는 집락의 cm²당 원형질체 분리수는 3.43×10⁵ ml⁻¹ 이었다. 균사생장과 연관지어 살펴보면 3 일은 지수기에 속하는 바, 이러한 결과는 대부분의 사상균류에 있어서의 결과와 일치하였다(Peberdy, 1976 ; Peberdy 등 1976 ; Yoo 등, 1987).

원형질체 환원

몇가지 삼투압 조절제가 원형질체 환원에 미치는 영향을 보면 Table V와 같다. sucrose에서 가장 효과적이었으며, 환원율은 0.01-0.28%였다. 원형질체의 환원에 있어서 sucrose의 효과는 Hamlyn (1982)의 *C. acremonium*, Lee 등(1986)의 *P. cornucopiae*, Yoo 등(1987)의 *L. ulmarium* 에서의 결과와 동일하였다.

摘 要

식용버섯의 일종인 참느타리버섯 *P. spodoleucus*의 유전육종을 위하여 균사체로부터의 원형질체 분리와 분리된 원형질체의 환원에 영향을 미치는 몇가지 요인을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 원형질체 분리에 알맞는 효소로는 Novozym 234이며, 삼투압 조절제로는 0.6 M sucrose, 효소처리 시간은 3 시간이었다. 그리고 균사체 배양일수는 exponential phase인 3 일이었으며, colony의 cm²당 원형질체 생성수는 3.43×10⁵ ml⁻¹이었다.

2. 원형질체 환원에 알맞는 삼투압 조절제는 0.6 M sucrose이며, 환원율은 0.01-0.28%였다.

參考文獻

Anderson, J.B., Petsche, D.M., Herr, F.B. and Horgen, P.A.(1984) : Breeding relationships among several species of *Agaricus*. *can J. Bot.* **62** : 1884-1889.

De Vries, O.M.H. and Wessles, J.G.H.(1973) : Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* in releasing spheroplasts from fungi, particularly basidiomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek* **39** : 397-400.

Flint, J.E.(1982) : An appraisal of the problems of strain improvement in *Agaricus bisporus*. M. Sc. Thesis, Univ. of Nottingham.

Go, S.J., Shin, G.C. and Yoo, Y.B.(1985) : Protoplast formation, regeneration and reversion in *Pleurotus ostreatus* and *P. sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* **13**(3) : 169-177.

Hamlyn, P.F.(1982) : Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. Ph. D. Thesis. Univ. of Nottingham.

Lee, Y.H., Park, Y.H., Yoo, Y.B. and Min, K.H. (1986a): Studies on Protoplast isolation of *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* **14**(2) : 141-148.

Lee, Y.H., You, C.H., Cha, D.Y., Yoo, Y.B. and Min, K.H.(1986b): Protoplast regeneration and reversion in *Pleurotus cornucopiae* *Kor. J. Mycol.* **14**(3) : 215-223.

Peberdy, J.F.(1976a): Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In: Microbial and plant protoplasts. ed. J.F. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers, E.C. Cocking. pp. 39-50. London: Academic.

Peberdy, J.F., Buckley, C.E., Daltrey, D.C. and Moore, P.M.(1976b): Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi, *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**(1) : 23-26.

Raper, J.R. and Raper, C.A.(1972) : Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mush. Sci.* **8** : 1-9.

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

- Nottingham.
- Ushiyama, R. and Nakai, Y.(1977) : Protoplasts of shiitake, *Lentinus edodes*(Berk) Sing. *Rep. Tottori. Myco. Inst.*(Japan) **15**: 1-5.
- Yamada, O., Magea, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. and Sasaki, T.(1983) : Preparation and regeneration of mycelia protoplasts of *Collybia velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol* **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**(4) : 164-169.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. Cha, D.Y.(1985) : Studies on protoplast regeneration and reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **13**(2) : 79-82.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. and You, C.H.(1985) : Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* **13**(1) : 1-10.
- Yoo, Y.B., You, C.H. Park, Y.H. and Chang K. Y.(1987) : Protoplast isolation and reversion from *Lyophyllum ulmarium*. *Kor. J. Mycol.* in press.
- Yoo, Y.B., C.H. Park, Y.H. and Peberdy, J.F. (1986) : Genetic analysis of the life cycle in interspecific hybrids of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following protoplasts fusion. *Kor. J. Mycol.* **14**(1) : 9-15.

Accepted for Publication 19 February 1987