

原形質體還元에 의한 몇가지 食用버섯류의 Neohaplont 의 選拔

劉英福 · 李娟姬 · 呂運炯* · 嚴承德** · 車東烈 · 朴容煥
農村振興廳 農業技術研究所 菌科 · 忠南大學校 農生物學科 · 서울大學校 農學科

Selection of Neohaplont in Some Edible Fungi by Protoplast Reversion

Young-Bok Yoo, Yeon-Hee Lee, Un-Hyung Yeo *, Seung-Duk Um ,
Dong-Yeul Cha and Yong-Hwan Park

Applied Mycology and Mushroom Division, Institute of Agricultural Sciences,
R.D.A. Suweon 170, Department of Agricultural Biology, Chungnam National
University *, Daejeon 300-01, and Department of Agronomy, Seoul National
University **, Seoul 151, Korea

ABSTRACT: Neohaplonts were obtained to improve mushroom strain from dikaryon strains of *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Lyophyllum ulmarium*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus spodoleucus* by protoplast reversion. The neohaplont frequency from reversion colonies of protoplasts was 4.47-47.7%. Four more types of morphological characteristics were detected from neohaplonts of protoplast reversion in *L. ulmarium*, *P. cornucopiae* and *P. spodoleucus*, but one or two types were neohaplonts in *F. velutipes* and *G. lucidum*. Growth rate of neohaplonts was slow compared with dikaryon strains.

KEYWORDS: Neohaplonts, protoplast reversion, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus spodoleucus*, Basidiomycetes.

Monokaryotization은 1926년 Harder에 의해 처음으로 인위적으로 이루어졌다. dikaryon mycelia에서 surgical method에 의해 clamp connection을 가지지 않는 균사체를 선발하여 monokaryon화 하였으며 이러한 균주를 neohaplont라고 한다(Fries 등, 1952). Miles 및 Raper(1956)가 독성을 지닌 화학물질을 사용하여 neohaplont를 얻은 후 많은 균류에서 여러가지 화학물질에 의해 얻어왔다(Parag, 1961, Kerruish 등, 1963; Takemaru, 1964a,b; Amburgey, 1967; McC laren, 1970; Raudaskoski, 1977). Ginterova(1973)는 *Pleurotus ostreatus*를 malt extract 배지에 진탕 배양하여 neohaplont를 얻었으며 Leal-Lara와 Eger-Hummel(1982)는 glycine을 이용하여 짧은 기간내에 5종의 14균주에서 neohaplonts를 분리했다. Wessels 등(1976)은 *Schizophyllum commune*에서 원형질체 환원에 의해 neohaplont를 얻었다고 보고하였다.

이러한 neohaplonts는 고등균류의 유전육종 연구에 크게 기여하게 될 것이며, 특별한 균주에 있어서 종래의 방법에 의해 유전 mechanism을 정확히 알 수 없을 때 이용될 수 있을 것이다(Eger, 1978; Leal-Lara 등, 1982).

본 연구는 종래의 방법으로는 포자발아가 불가능한 *Ganoderma lucidum*의 유전 및 육종연구에 크게 기여할 것으로 보며, 그외의 *Flammulina velutipes*, *Lyophyllum ulmarium*, *pleurotus cornucopiae* 그리고 *pleurotus spodoleucus*의 유전육종의 기초 자료로서 neohaplonts를 원형질체 환원에 의하여 선발할 수 있었는데 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

균 주

본 실험에 사용한 균주는 농촌진흥청 농업기술원

Table I. Constitution of culture media

Medium ingredients	MCM	GCM (g l ⁻¹)	PD	YG
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.50	0.50		
KH ₂ PO ₄	0.46	0.46		
K ₂ HPO ₄	1.00	1.00		
Peptone (sigma)	2.00	4.00		
Yeast extract (sigma)	2.00	10.00		5.00
Casamino acid		5.00		
Dextrose	20.00	30.00	20.00	10.00
Sucrose		20.00		
Potato			20.00	
Agar (sigma)	20.00	20.00	20.00	20.00

MCM: Mushroom Complete Medium

GCM: Ganoderma Complete Medium

PD: Potato Dextrose

YG: Yeast Glucose

구소의 보존균주인 팽이 *Flammulina velutipes* ASI 4005, 영지 *Ganoderma lucidum* ASI 07009, 만가닥 *Lyophyllum ulmarium* ASI 8007, 노랑느타리 *Pleurotus cornucopiae* ASI 2011, 참느타리 *Pleurotus spodoleucus* ASI 2010으로서 모두 clamp connection을 가진 dikaryon 균주이다.

배 지

*F. velutipes*는 PD, *G. lucidum*은 GCM, *L. ulmarium*은 YG, *P. cornucopiae*와 *P. spodoleucus*는 MCM을 121°C에서 20분 멸균하여 사용하였으며 그 구성 성분은 Table I과 같다.

분해효소 및 삼투압 조절제

Novozym 234(Novo Industri, Denmark), β-D-Glucanase(BDH Chem. Ltd., UK), β-Glucuronidase(Sigma Chem. Co. USA), Cellulase

Table II. Commercial enzyme preparations for protoplast release

Enzyme (mg/ml)	Species			
	<i>P. cornucopiae</i>	<i>F. velutipes</i>	<i>L. ulmarium</i>	<i>G. lucidum</i>
Novozym 234	5	10	5	10
β-D-Glucanase	5		5	
β-Glucuronidase	5		5	
Cellulase CP.		10		

CP(John and Sturge Ltd., UK)를 구입하여 균주에 따라 Table II와 같이 효소의 종류와 농도를 달리하여 0.6 M Sucrose에 녹여 pH를 조절하지 않고 사용하였다.

원형질체의 생성·환원 및 clamp connection 확인

원형질체 분리 및 환원은 Yoo 등(1984, 1985)의 방법에 의하여 하였다. 원형질체 분리를 위하여 *F. velutipes*와 *L. ulmarium*은 5일, *G. lucidum*과 *P. cornucopiae*는 4일, *P. spodoleucus*는 3일간 각각 배양하였으며, 원형질체 환원을 위하여 0.6 M의 Sucrose, Mannitol, Sorbitol, KCl, MgSO₄를 삼투압 조절제로 첨가하여 배지를 사용하였다.

원형질체 환원 후 5-15일에 환원된 colony를 삼투압 조절제가 첨가되지 않은 배지에 옮겨 5-10일 배양하여 광학 현미경으로 clamp connection을 확인하였다.

結果 및 考察

Neohaplonts를 모든 균주에서 선발할 수 있었으며, 균주에 따라 상당한 차이가 있었다. Table III에서 보면 *F. velutipes*는 neohaplonts 선발율이 15,

Table III. Neohaplonts recovered from various strains of edible mushrooms after protoplast reversion

Strain	No. of colonies examined	No. of monokaryon	Percentage of monokaryon (%)	reversion frequency of protoplasts (%)
<i>F. velutipes</i>	500	76	15.20	0.47-1.32
<i>G. lucidum</i>	742	85	11.46	0.47-1.47
<i>L. ulmarium</i>	313	14	4.47	0.0002-0.23
<i>P. cornucopiae</i>	100	18	18.00	0.01-1.29
<i>P. spodoleucus</i>	402	196	48.76	0.01-0.28

韓國菌學會誌 第15卷 第1號
Kor. J. Mycol. Vol. 15, No. 1, 42-47, 1987

표고버섯 톱밥 人工栽培에 關한 研究

金漢慶 · 朴容煥 · 車東烈 · 鄭煥彩
農村振興廳 農業技術研究所

Studies on the Artificial Cultivation of *Lentinus edodes* on sawdust media

Han Kyung Kim, Yong Hwan Park, Dong Yule Cha and Hwan Chae Chung
Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration
Suweon 170, Korea

ABSTRACT: 4 strains of the oak mushroom *Lentinus edodes* including the strain ASI 3046 were collected home and abroad to investigate the characteristics of mycelial growth on synthetic media and sawdust media. The possibility of artificial culture of *Lentinus edodes* on media composed of different sawdusts and adding materials was investigated.

Results were as follows: The optimum temperature for growth ranged from 22°C to 26°C among the lineages of *Lentinus edodes*. The optimal growth temperature for ASI 3046 strain and ASI 3047 strain was 26°C and 22°C, respectively. The optimal carbon source for ASI 3046 strain was glucose, and peptone and ammonium tartrate were proved excellent as nitrogen sources. When *Lentinus edodes* was cultured on sawdust media by varying the mixing ratio of different sawdusts and adding materials, mixed sawdust media composed of oak sawdust(50%, v/v), poplar sawdust(50%, v/v), acorn powder(5%, v/v) and rice bran(10%, v/v) showed higher yields of fruit bodies. Results showed that the ideal strain of *Lentinus edodes* for artificial culture on sawdust media was strain ASI 3046.

KEYWORDS: *Lentinus edodes*, Synthetic media, Sawdust media.

Lentinus edodes(Berk) Sing 은 分類學上 Tricholomataceae 에 속하는 木材腐生菌으로 참나무류 (*Quercus* sp.)의 枯死木에 自然棲息하며 分布地域은 東南亞地域의 闊葉樹 枯死木에 自然棲息 한다고 報告되어 있다. 우리나라에서도 李朝時代 丁若鏞 (1790)의 산림경제에 송이, 표고, 복령에 대한 記錄이 있는것으로 보아서 버섯은 藥用이나 食用으로 널리 利用되어 왔음을 알 수 있다. 특히 臺灣과 日本에서는 표고버섯이 代表的인 重要한 食用버섯이며 표고버섯에는 人體에 重要한 營養素가 多量含有되어 있다(岩出, 1966). 표고버섯에는 lentinan 成分에 의해서 독특한 香氣를 내고(Morito & Kabayashi 1966), 多糖類가 含有되어 있어 抗癌에도 効果가 있는 것으로(Hamuro 1974, Maeda & Chihara 1971) 報告하였다.

그러나 우리나라에서는 표고버섯에 대한 人工栽培은 1905年 제주도에서 산도식 栽培가 最初라고 볼 수 있으며(李, 1973) 톱밥을 利用한 箱子栽培가 森林(1928)에 의하여 처음 試圖하였고, 톱밥栽培時 營養物로서 첨가제가 必要하다는 事實을 報告하였다(浜田, 1962).

最初에는 버섯栽培에 대한 溫度 및 濕度를 인위적으로 조절하여 集約的인 栽培方法이 報告된 바 있으며(中村, 1971), 人工栽培時 첨가제 농도에 관하여(Ishikawa, 1967) 등이 報告한 바 있다. Ho 등(1978)은 *Auricularia polytricha*의 톱밥培地를 利用한 plastic bag 栽培에 관하여, Toth(1970)은 *Pleurotus ostreatus*의 plastic sacks 을 利用한 菌糸 활착에 대하여, 張(1976)은 *Flammulina Velutipes*의 톱밥병栽培, 朴(1978), 車 등(1981)은 느타리 및

- protection for practical mushroom cultivation. *Mush. Sci.* **10**(2) : 415-420.
- Fries, N. and Aschan, K.(1952) : The physiological heterogeneity of the dikaryotic mycelium of *Polyporus abietinus* investigated with the aid of the microsurgical technique. *Sven. Bot. Tidskr* **46** : 429-4465.
- Ginteroba, A.(1973) : Dedikaryotization of higher fungi in submerged culture. *Folia Microbiol.* **18** : 277-280.
- Harder, R.(1927) : Zur Frage der Rolle von kern und Protoplasma in Zellgeschnen und beider ubertagung von Eigenschaften. *Z. Bot.* **19** : 337-407.
- Kerruish, R.M. and Da Costa, E.W.B.(1963) : Monokaryotization of cultures of *Lenzites trabea*(Pers.) Fr. and other wood-destroying basidiomycetes by chemical agents. *Annals of Botany.* N.S. **27**(108) : 653-669.
- Leal-Lara, H. and Eger-Hummel. G.(1982) : A monokaryotization method and its use for genetic studies in wood-rotting basidiomycetes. *Theor. Appl. Genet.* **61** : 65-68.
- McClaren, M.(1970) : Chemical dedikaryotization of *Coprinus myceliocephalus* (Agaricales). *Can. J. Bot.* **48** : 787-790.
- Miles, P.G. and Raper, J.R.(1956) : Recovery of the component strains from dikaryotic mycelia. *Mycologia* **48** : 484-494.
- Parag, Y.(1961) : Sensitivity of *Schizophyllum commune* to chemical toxicats. *Can. J. Microbiol.* **7** : 838-841.
- Raudaskosky, M.(1977) : The effect of griseofulvin on nuclear distribution in a dikaryon of *Schizophyllum commune*. Abstr. 2nd Int. Mycol. Cong. Tampa. 557.
- Takemaru, T.(1964a): Monokaryotization studies in the basidiomycetes. I. Chemical induction. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* (Japan) **4** : 35-38.
- Takemaru, T.(1964b): Monokaryotization studies in the basidiomycetes. II. Neohaplonts induced by oxgall treatment. *Rep. Tottori Myco. Inst.* (Japan) **4** : 41-43.
- Wessels, J.G.H., Hoeksema. H.L. and Stemerding. D.(1975) : Reversion of protoplasts from dikaryotic mycelium of *Schizophyllum commune*. *Protoplasma* **89** : 317-321.
- Yoo, Y.B., Byun, M.J. Go. S.J., You, C.H., Park, Y.H. and Peverdy, 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. and Cha, D.Y.(1985) : Studies on protoplast regeneration and reversion of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **13**(2) : 79-82.

Accepted for Publication 19 February 1987