

紫外線 照射에 의한 표고버섯擔子胞子の營養要求性 菌株 選拔에 관한 研究

劉英福 · 柳昌鉉 · 朴容煥
農村振興廳 農業技術研究所 菌科

Isolation of Auxotrophic Mutants from Basidiospores of *Lentinus edodes*

Young Bok Yoo, Chang Hyun You and Yong Hwan Park

Dept. of Applied Mycology and Mushroom, Institute of Agricultural Sciences, Suweon 170, Korea

Abstract: This experiment was undertaken to investigate considerable economy of labor for selection of auxotrophs from strains of *Lentinus edodes*. Various types of auxotrophs of this strain were isolated after treatment of basidiospores with ultraviolet light, and the highest proportion of putative mutants was also obtained from isolates irradiated to give 1.30 % survival.

Keywords: UV mutagenesis of basidiospores, Auxotrophs, *Lentinus edodes*, Basidiomycetes.

이전부터 표고버섯은 능이 *Sarcodon aspratus* 및 송이 *Tricholoma matsutake*와 함께 독특한 향기와 맛을 가진 으뜸가는 버섯으로 널리 식품으로 애용되어 왔으며, 또한 항암효과(Ikekawa 등, 1969; Chihara 등, 1970; Chung 등, 1984)에 관한 보고로 경제적인 가치가 더욱 높아졌다.

표고버섯은 하나의 담자기에 4개의 포자를 지니며 감수분열 이후에는 포자내에는 한개의 핵을 가져 self-sterile이다. 이러한 monokaryon 상태가 crossing이 되어 heterokaryon (or dikaryon)이 되고, 균사에 clamp connection이 생기면 fertile로 된다. Incompatibility factors는 A, B로서 4개의 mating type으로 되어있는 bifactorial heterothallism에 속한다(Chang and Hayes, 1978).

어떠한 균주에 대한 체계적이고 과학적인 육종을 위해서는 그 종에 대한 life cycle을 통하여 유전적 순도를 지닌 많은 야생균주와 유전적 mechanism이 충분히 밝혀져서 쉽게 응용될 수 있어야 한다. 진균류에 있어서의 유전연구는 소수의 제한된 종에만 국한되어 있는데 이들은 대부분이 실험실 내에서의 조작이 편리하기 때문이다. 식용버섯은 경제적인 가치는 크지만 실험실 내에서의 버섯 자실체의 형성이 어려울 뿐만 아니라 시간이 많이 소요되고, 너무많은 담자포자를 지녔으며

균주간의 incompatibility로 유전연구가 발전하지 못하였다.

진균류의 유전연구는 일정한 chromosomal loci에서의 mutant 연구에 근거를 두며 mutation 없이 그 loci가 결정되거나 그 기능이 밝혀질 수 없는데 이와같은 mutant gene이 marker이다. genetic marker를 통하여 유전자의 조사나 genetic map이 작성되어지며, 따라서 이러한 genetic marker는 wild type의 표준적인 형태를 구별하는데 아주 중요하다(Burnett, 1975; Fincham 등, 1979). Auxotrophic mutant는 chromosomal marker에 속하는 biochemical mutants를 말하는데, 진균류에 있어서 *Phycomyces blakesleeanus*에서 자연적인 morphological mutant가 이용(Bergeff, 1912; 1914)된 이후 *Neurospora*의 biochemical mutant 유발에 관한 연구가 시작되었다(Beadle and Tatum, 1941; 1945). 담자균류에 있어서도 mutant 유발에 관한 것이 *Agaricus bisporus* (Raper 등, 1972), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold 등, 1982), *Pleurotus florida*와 *Pleurotus ostreatus* (Yoo 등, 1985), 그리고 *Volvariella volvacea* (Santiago, 1981)에서 보고 되었다.

본 실험은 식용버섯의 유전연구와 새로운 품종 육성을 위하여 표고버섯의 자실체에서 얻은 담자포자를 자외선에 조사하여 auxotrophs를 선별하는데 있어서 가장

효과적인 방법에 대한 기초 이론을 밝히고자 수행하였으며 그 결과를 보고 하고자 한다.

材料 및 方法

균주 및 담자포자 채취

농촌진흥청 농업기술연구소의 보존균주인 *Lentinus edodes* ASI 3046을 참나무 원목재배로 버섯 자실체를 수확하여 멸균된 petri dish 위에 멸균된 가느다란 철사를 걸쳐서 자실체가 petri dish 내부에 닿지않게 철사위에 얹은후 공기가 통하는 상자를 씌운후 다시 신문지를 덮어서 상온에서 약 10~20시간 동안 포자를 채취하여 4°C의 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

배 지

버섯완전배지(MCM; Raper등 1972)와 버섯 최소배지(MMM; Raper등 1972)를 121°C에 20분 멸균하여 사용하였는데 여기서 MMM은 DL-asparagin과 thiamin-HCl을 제외하였다. 즉, 그 성분을 보면(g/l), 완전배지는 yeast extract 2.0, peptone 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 20.0, bacto-agar 20.0이며, 최소배지는 MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 20.0, bacto-agar 20.0

이다.

돌연변이 유발

멸균된 petri dish에 담자포자를 알맞는 농도(2.5~7.5×10⁶)로 멸균수에 현탁하여 10 ml씩 넣고 사용전 30분에 미리 가동시켜 둔 ultraviolet lamp(100 V-6 W)를 약 10 cm 거리에서 포자현탁액을 magnetic stirrer로 저으면서 시간별로 조사하였다. 이때 자외선을 조사할 때는 빛을 완전히 차단한 암실에서 하였으며, 포자현탁액을 자외선에 조사한 후에도 약 10분 이상을 암상태로 두었다가 알맞는 농도로 다시 현탁하여 버섯완전 배지에 petri dish당 0.2 ml씩 분주하여 spreader로 고무배지위에 문질러서 25°C에 5~10일 정도 배양하였다.

Mutant 선발 및 Genetic markers의 확인

자외선 처리후 MCM에서 배양되어 발아된 colony들을 MCM에 cocktail-stick(이쑤시개)으로 16균주씩 petri dish에 옮기고, 다시 반복하여 MMM에 cocktail-stick으로 16균주씩 petri dish에 옮겨 10~15일간 배양하여, MMM에서는 전혀 성장하지 않으면서 MCM에서는 생장이 양호한 균주만을 선발하였다. 선발한 균주는 MCM에 배양하여 MCM agar와 함께 이 균주를 MMM에 옮겨 접종한 후 10~20일 정도 배양하여, MMM에서 성장한 균사를 잘라 다시 MMM에 12균주씩 petri dish

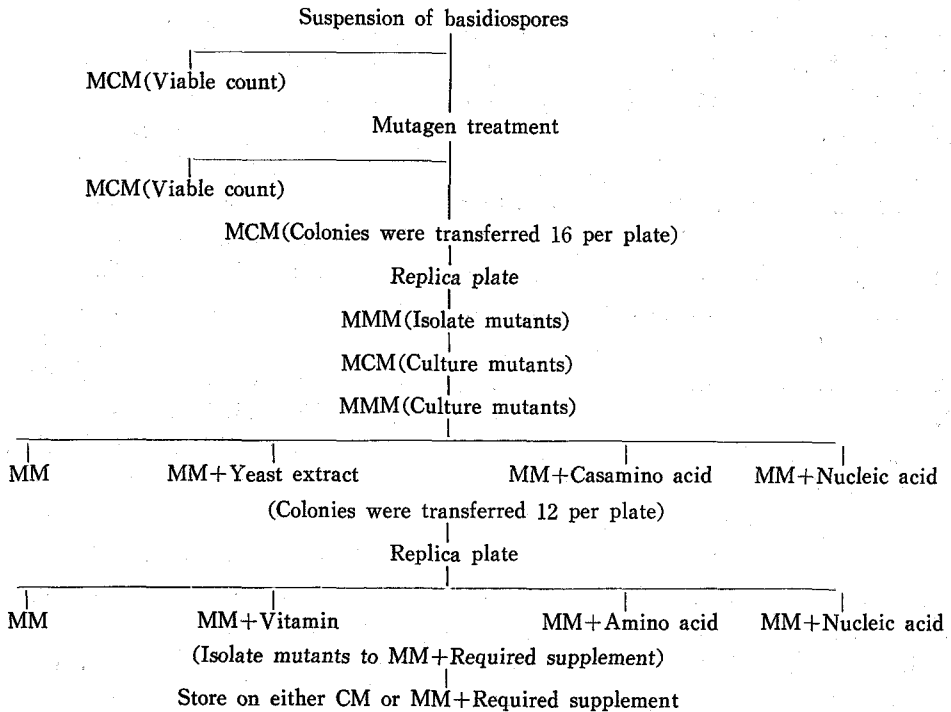


Fig. 1. Diagram to illustrate procedure for mutant isolation and identification.

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	Aspartate	
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

에 옮겨 전혀 성장하지 않는 균주를 재선발 하였다. 선발한 mutants의 genetic markers의 검정을 위하여 yeast extract 1 mg, casamino acid 5 mg 그리고 nucleic acid 50 µg 1 ml로 각각 MMM에 혼합하여 1 petri dish에 12균주씩 옮겨 검정한 후, 다시 Table I의 9가지 용액을 MMM에 혼합하여 반복 검정 하였다(Fig. 1).

結果 및 考察

자외선이 담자포자에 미치는 영향

mutants 유발에 수반되는 자외선 조사에 대한 담자포자의 생존율을 보면 Fig. 2와 같다. 5~120초 범위로 자외선을 조사해 본 결과 10초 조사에서 약 28.5 %의

생존율을 나타내었으며, 120초 이상에서는 완전히 발아 능력을 상실하였다. 가장 많이 이용되는 5 %의 생존율은 40초의 범위에서 나타났다.

자외선 조사 시간이 auxotrophs 유발율에 미치는 영향

30초에서 100초까지 10초 간격으로 자외선을 조사하여 총 7,088 colonies를 검정한 결과 71개의 auxotrophic mutant를 선발하여 약 1.0 %의 유발율을 얻었다. 60초에서 약 1.35 %의 auxotrophs 유발율을 얻어 가장 높은 빈도를 나타내었는데 이때의 포자 생존율은 약 1.3 %였으며 30초와 90초 이하에서는 극히 낮은 유발율을 보였다. 자외선 조사 시간이 높으면 높을수록 많은 변이균주는 선발되지만 CM에서의 균사 생장이 극히 떨어

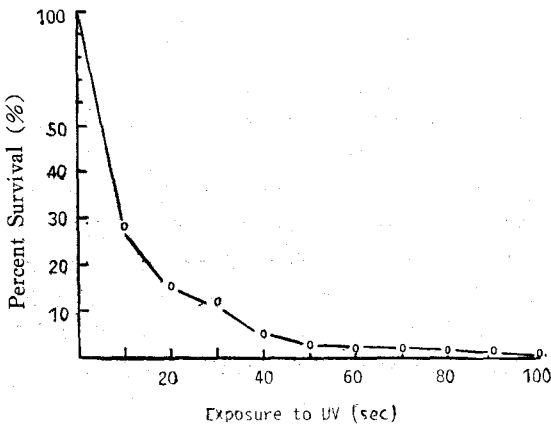


Fig. 2. Effect of ultraviolet light on the survival of basidiospores of *Lentinus edodes*.

Table II. Effect of exposure time of ultraviolet light on the proportions of auxotrophs.

Exposure time (sec)	Isolates (No.)	Putative auxotrophs (No.)	Among isolates (%)
30	272	0	0
40	416	5	1.20
50	1712	17	0.99
60	2144	29	1.35
70	1584	14	0.88
80	800	6	0.75
90	32	0	0
100	128	0	0
Total U.V.	7,088	71	1.00

Table III. Comparison of the types of *Lentinus edodes* auxotrophs.

Mutant number	Genetic marker	Exposure time(Sec)
Nucleic acid-requiring strains		
ASI 3- 1-1957	Ade	60
ASI 3- 2-1900	Cyt	60
ASI 3- 3-1965	Cyt	60
Nucleic acid/Vitamin-requiring strains		
ASI 3- 4-1937	Ade/Nic	80
ASI 3- 5-1960	Ade/Nic	60
ASI 3- 6-1743	Ade/Nic	70
ASI 3- 7- 729	Ade/Nic	70
ASI 3- 8-1848	Ade/Nic	50
ASI 3- 9- 37	Ade/pan	50
ASI 3-10-1956	Ade/pan	60
ASI 3-11-1710	Cyt/Asc	50
ASI 3-12-1806	Cyt/Asp	50
ASI 3-13-1707	Cyt/Ino	50
ASI 3-14-1819	Cyt/pan	50
ASI 3-15-1714	Cyt/Rib	70
ASI 3-16-1827	Ade/Ane/Cya/Nic	60
Nucleic acid/Amino acid-requiring strains		
ASI 3-17-1828	Cyt/Asp/Cit	60
Vitamin-requiring strains		
ASI 3-18- 420	Cho	30
ASI 3-19-1757	Cya	60
ASI 3-20-1816	Cya	70
ASI 3-21- 682	Nic	70
ASI 3-22-1769	Cho/pan	60
ASI 3-23-1967	Nic/Paba	60
ASI 3-24-1805	Nic/Asc	50
Amino acid-requiring strains		
ASI 3-25-1749	Asp	60
ASI 3-26-1746	Asp	70
ASI 3-27-1898	Cit/Pro	60
ASI 3-28-1849	Cit/Pro	50
ASI 3-29- 15	Cit/Pro/Ala	60
Total	29	
Not fully tested	42	

Mutant symbols : Ade (Adenine), Ala (Alanine), Ane (Aneurine), Asc (Ascorbic acid), Cit (Citrulline), Cya (Cyanocobalamin), Cyt (Cytosine), Ino (Inositol), Nic (Nicotinic acid), Paba (p-Aminobenzoic acid), Pro (Proline), Rib (Riboflavin).

지는 경향을 나타내었다. 따라서 40초에서 70초 범위가 알맞는 것으로 나타났는데, 이때의 포자 생존율은 0.6 ~ 5 % 정도였다(Table II). 이러한 경향은 포자를 이용하여 mutagenesis를 할때 많이 사용되는 5~25 %의 생존율보다 다소 낮은 생존율에서 알맞는 것으로 나타났다(Pontecorvo등, 1953; Gold등, 1982).

영양요구성 균주의 genetic markers의 검정

71개의 mutant 중에서 29개 균주의 영양요구성을 조사하여 본 결과는 Table III과 같다. 이들을 영양요구성의 종류에 따라 분류하여 보면 nucleic acid-requiring strain으로는 adenine 1, 그리고 cytosine 2균주, nucleic acid/vitamin-requiring strain으로는 adenine·nicotinic acid 5, adenine·panthothenic acid 2, cytosine·ascorbic acid 1, cytosine·aspartate 1, cytosine·inositol 1, cytosine·panthothenic acid 1, cytosine·riboflavin 1, 그리고 adenine·aneurine·cyanocobalamin·nicotinic acid 1균주, nucleic acid/amino acid-requiring strain으로는 cytosine·aspartate·citrulline 1균주, vitamin-requiring strain으로는 choline 1, cyanocobalamin 2, nicotinic acid 1, choline·panthothenic acid 1, nicotinic acid·p-aminobenzoic acid 1, 그리고 nicotinic acid·ascorbic acid 1균주 amino acid-requiring strain으로는 aspartate 2, citrulline·proline 2, 그리고 citrulline·proline·alanine 1균주 이었다.

摘 要

식용버섯의 유전 연구와 균주 개발을 위하여 포고버섯의 담자포자에 자외선을 조사하여 영양요구성 균주를 유발하였는 바, 자외선을 담자포자에 40초 조사했을때 약 5 %의 포자 생존율을 보였으며 120초 조사에서 완전히 발아력을 상실하였다. 30초에서 100초까지 10초 간격으로 자외선을 조사하여 7088 colonies를 검정한 결과 71개의 auxotrophs를 선발하여 1.0 %의 유발율을 얻었으며, 60초 조사에서 1.35 %의 가장 높은 유발 빈도를 나타내었는데 이때의 포자 생존율은 1.3 % 이었다. 71개의 auxotrophs 중에서 29개 균주의 영양요구성을 검정한 결과 nucleic acid-requiring strain이 3, nucleic acid/vitamin-requiring strain이 13, nucleic acid/amino acid-requiring strain이 1, vitamin-requiring strain이 7, 그리고 amino acid-requiring strain이 5이었다.

文 獻

- Beadle, G.W. and Tatum, E.L. (1941): Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci., 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.
- Bergeff, H. (1912): *Ber. Deut. Bot. Ges.* 30: 679~685.
- Bergeff, H. (1914): *Flora. N. F.* 107: 259~316.
- Burnett, J.H. (1975): *Mycogenetics: An Introduction to the General Genetics of Fungi*, John Wiley & Sons, N.Y.
- Chang, S.T. and Hayes, W.A. (1978): *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, Academic Press, N.Y.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fraction and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer. Res.* 30: 2776~2781.
- Chung, K. S., Choi, E.C. and Kim, B.K. (1984): Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XLI). An antitumor fraction from the culture filtrate of *Lentinus edodes* DMC-7. *Kor. J. Mycol.* 12: 129~132.
- Fincham, J.R.S., Day, P.R. and Radford, A. (1979): *Fungal Genetics*, Blackwell Scientific Publications, London.
- Gold, M.M., Cheng, T.M. and Mayfield, M.B. (1982): Isolation and complementation studies of auxotrophic mutants of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 996~1000.
- Ikekawa, T., Uehara, N., Nakamishi, M. and Fukuoka, F. (1969): Antitumor activity of aqueous extracts of some edible mushrooms. *Cancer Res.* 29: 734~735.
- 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.
- Raper, C.A., Raper, J.R. and Miller, R.E. (1972): Genetic analysis of the life cycles of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64: 1088~1117.
- Santiago C. M. Jr. (1981): Studies on the physiology and genetics of *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Singer. Ph. D. Thesis, University of Nottingham.
- Yoo, Y. B., Peberdy, J.F. and Park, Y.H. (1985): Isolation studies of auxotrophic mutants from protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* 13: 75~78.

<Received June 16, 1985; Accepted July 19, 1985>