

느타리버섯 原形質體內에 맛느타리버섯 核의 轉移에 관한 研究

柳昌鉉·劉英福·卞明玉·朴淵姬*

農村振興庁 農業技術研究所 菌相科

*亞州大學校 生物工學科

Studies on the Transfer of Isolated Nuclei from *Pleurotus sapidus* into Protoplasts of *Pleurotus ostreatus*

Chang-Hyun You, Young-Bok Yoo, Myung-Ok Byun and Yun-Hee Park*

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute,

R.D.A. Suweon 440-707 and *Department of Bioengineering,

Ajou University, Suweon 440-749, Korea

ABSTRACT: Several reversion colonies were obtained after induced transfer of the isolated nuclei from *P. sapidus* into protoplast of *P. ostreatus*(Arg⁻). These colonies showed three distinct cultural characteristics, type 1 produced spontaneous segregants of both parental types, type 2 showed segregants of non parental types, and type 3 gave rise to homogeneous colonies.

Isozyme patterns of esterase, malate dehydrogenase and superoxide dismutase showed substantial differences between parents and nuclei transferred strains. This observation supported that the isolated nuclei of *P. sapidus* were transferred into protoplast of *P. ostreatus* and expressed in recipient cell.

KEYWORDS: *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus ostreatus*, Nuclear transfer, Isozyme pattern.

버섯류의 우량품종 육성은 여러가지 방법이 이용되고 있으며, 현재까지 주로 사용하는 단포자분리나 균사융합은 혈연적으로 유연성이 가까워야 하므로 유전자원의 활용에 많은 제한을 받고 있다. 또한 돌연변이 육종은 효율이 매우 낮기 때문에 최근에는 원형질체의 융합, 형질전환, 핵의 전이에 의한 신품종 육성에 관심을 갖게 되었다.

핵의 전이에 관한 연구는 동물에서 먼저 시작되어 Briggs 등(1952)은 개구리알의 생화학적 특성에 관한 유전적 전이를 보고하였다. 식물에서는 Potrykus 등(1973)이 *Petunia hybrida*의 핵을 다른 식물의 세포에 삽입시킨 이래 Lörz 등(1978)은 *Nicotiana tabacum*의 변이체에 Ca-PEG를 처리하므로써 핵의 전이율을 5%까지 높였고, Saxena 등(1986)은 *Datura innoxia* 세포에 *Vicia harastana* 핵을 삽입하여 엽초까지 발생시켰다. 미생물중에서는 Ferenczy 등(1982)이 *Saccharomyces cerevisiae*의 영양요구성 균주로 핵을 전이하여 Heterozygous diploid

cell을 얻은 바 있으며, 버섯에서는 Yoo 등(1987)이 *Pleurotus ostreatus*의 원형질체내에 *P. florida*의 핵을 전이시켰다.

본 시험에서는 단핵균사에 의해 교배가 되지 않는 느타리버섯(*P. ostreatus*)에 맛느타리버섯(*P. sapidus*)의 핵을 전이시키는 새로운 품종육성 방법의 가능성을 검토하고자 하였다.

材料 및 方法

핵의 전이

핵의 전이에 사용된 맛느타리버섯 핵의 분리는 균사체(dikaryon)를 액체배양한 후 100 ml의 핵분리 배지에 넣어 균질기로 1000 rpm에서 10분간 균질화하였다. 핵분리 배지의 조성은 Sucrose 0.3M, Ficoll 400 7%, Glycerol 20%, Magnesium chloride 50 mM, Calcium chloride 10 mM, Triton X-100 0.5%의 농도가 되도록 제조하였다.

균질화된 시료는 Millipore filter (pore size 0.8 μ m)로 여과하여 1000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 0.6 M Sucrose에 희석하여 사용하였다. 숙주인 느타리버섯 원형질체의 분리는 U.V照射로 Arginine 영양요구성 균주를 유기한 후 Yoo 등(1985)의 방법을 사용하였으며, 핵의 섭입은 원형질체와 핵을 융합용 튜브에 혼합하여 넣고 700 \times g에서 30분간 원심분리한 후 PEG 용액(30% polyethylen glycol 4000, 10 mM CaCl₂, 50 mM glycine, 1 mM NaOH로 pH 8.0 조정) 1 ml와 섞어 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양하였다. 이것을 0.6 M Sucrose에 섞어 버섯 최소배지에서 15일간 배양하였으며, 성장한 균총은 다시 버섯 최소배지에 옮겨 확인한 다음 버섯 완전배지에서 모균주와 균총형태를 비교하였다.

등전점 전기영동

핵이 전이되어 성장한 균주의 Isozyme pattern (Esterase, Malate dehydrogenase, Superoxide dismutase)을 확인하기 위하여 등전점 전기영동 (Osterman 등, 1984)을 하였으며, 시료의 조제는 균주별로 액체배양을 하여 균사체 10g당 0.1 M Tris HCl Buffer (pH 7.5)를 10 ml씩 첨가하고 액체질소를 넣어 마쇄하였다. 이것을 고속냉동원심분리기로 12000 \times g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다.

전기영동은 LKB multiphor 2 수평형을 사용하였고, gel은 PAG film에 7 \times 25 \times 0.07 cm polyacrylamide slab gel을 이용하였다. Gel의 조성은 Acrylamide 5.84%, Bisacrylamide 0.16%의 농도로 하고, gel 30 ml당 2.3% Ammonium persulfate 0.4 ml, 1% Tetra methylethylene diamine 2 ml와 Ampholyte 1 ml를 첨가하여 gel의 pH를 3-10과 4-6.5가 되도록하였다. 시료는 20 ml씩 처리하고 200 V 9.5 mA로 1시간, 300 V, 3.0 mA로 2시간 동안 전기영동 후 Tanksley 등(1983)의 효소별 염색법에 따라 발색시켰다.

Esterase의 발색은 α -naphthyl acetate 20 mg, Ethylene glycol monomethyl ether 2 ml, Fast blue RR salt 30 mg을 pH 6.5로 조절한 0.2 M phosphate buffer 100 ml와 혼합한 후 gel을 침적하여 암 상태에서 밴드가 선명할 때까지 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 발색시켰다.

Malate dehydrogenase의 염색액은 L-malic acid 350 mg, Nicotinamide adenine dinucleotide 10 mg, Methyl thiazolyl blue 5 mg, phenazine

methosulfate 5 mg을 혼합한 후 증류수로 50 ml를 만들었으며, 발색은 gel을 침적하여 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 하였다.

Superoxide dismutase의 발색은 gel을 A용액(0.05 M Tris HCl buffer 100 ml, 0.1 M KCN 4 ml, Methyl thiazolyl blue 10 mg, Phenazine methosulfate 10 mg)에 넣어 37 $^{\circ}$ C의 암 상태에서 30분 처리후 B용액(0.05 M Tris HCl 100 ml, Riboflavin 1 mg, Tetramethylethylene diamine 0.4 ml)에서 30분간 광을 조사하여 밴드가 나타나도록 하였다.

結果 및 考察

핵의 전이

맛느타리버섯의 핵이 느타리버섯의 원형질체에 전이되도록 한 후 Arginine이 들어있지 않은 버섯 최소배지에서 배양한 결과 15일후에 균총이 육안으로 관찰되었다. 이 균주들은 핵의 전이가 일어나므로서 생장이 가능한 것이며, 버섯 최소배지를 거쳐 버섯 완전배지에서 균총형태를 관찰한 결과 모균주와 다른 3가지 형으로 나눌 수 있었다(Fig. 1).

형태 1은 두 모균주의 균총형태로 분리되는 것, 형태 2는 모균주와 다른 형태이며 균총이 분리되는 것, 형태 3은 균총이 분리되지 않고 안정한 상태로

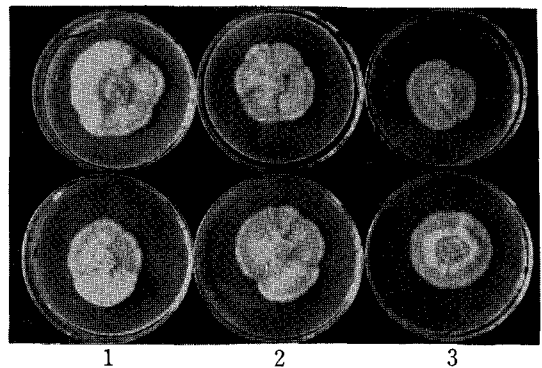


Fig.1. Three types of regenerated colonies of nuclei transferred protoplasts cultured for 15 days on MCM. The isolated nuclei from *P. sapidus* were transferred into *P. ostreatus*. Type 1(p 613, p 622) showed segregation of fluffy type and strandy type colonies according to characteristics of parents. Colonies of Type 2(p 613, p 617) showed also segregation but different from parents. Type 3(p 611, p 610) formed stable colonies without segregation.

생장하였다. 특히 형태 1은 균총의 모양이 핵을 공여한 맛느타리버섯에 유사한 fluffy type과, 핵의 수용체인 Arginine 영양요구성 느타리버섯균주의 strandy type의 두가지로 확실히 분리되었다.

핵 전이균주들을 다시 버섯 완전배지에서 계대배양한 결과 느타리버섯의 특징인 붉은 점액물질이 균사체에서 형성되었으며, Yoo 등(1987)이 보고한 균총형태 2의 Heterokaryon과 매우 유사하였으나 clamp connection은 형성되지 않았고 균사생장이 느렸다.

이와같은 핵 전이균주의 다양한 특성은 불화합성에 기인된 것으로 추정되나 이에 관한 연구보고가 거의 없으므로 앞으로 유전분석 등 그 원인을 연구

해야 할 것으로 생각한다.

등전점 전기영동

등전점 전기영동에 의하여 핵 전이균주와 모균주의 Esterase를 비교한 결과 Fig. 2-a에서와 같이 pH 3-10에서는 p 613과 p 617의 중간부분에 모균주에 없는 새로운 band가 형성되었고 균총형태 3의 p 611과 p 610은 다른 균주와 달리 첫번째의 band가 없었다. 또한 pH 4-6.5에서도 (Fig. 2-b) 맛느타리버섯은 pH 6 부근에 뚜렷한 band가 있었으나 핵 전이균주에서는 발견할 수 없었으며, p 613과 p 622, p 623, p 610은 pH 6.5 부근에 새로운 band가 형성되었다.

한편 Fig. 3에서와 같이 Malate dehydrogenase에 서는 모균주에 없는 band가 p 623에서 1개, 균총형

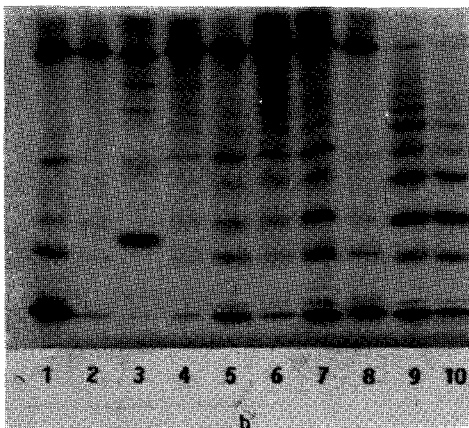
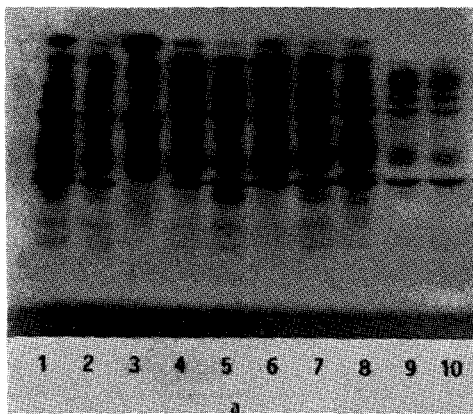


Fig.2. Isozyme pattern of esterase in products of nuclei transfer on isoelectric focusing. a: pH 3-10, b: pH 4-6.5.

Recipient; 2: Arginine, Nuclei donor; 3: ASI 2057, Products of nuclei transfer; 1: p 613(fluffy type). 4: p 613(strandy type), 5: p 613, 6: p 622, 7: p 623, 8: p 617, 9: p 611, 10: p 610.

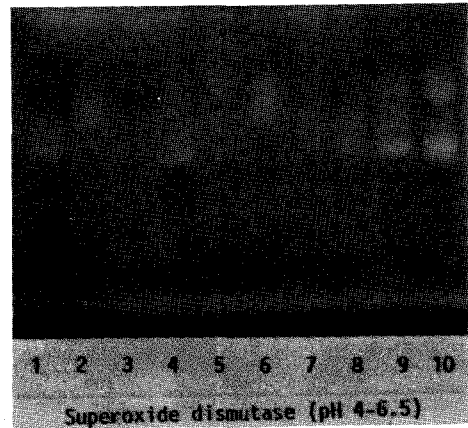
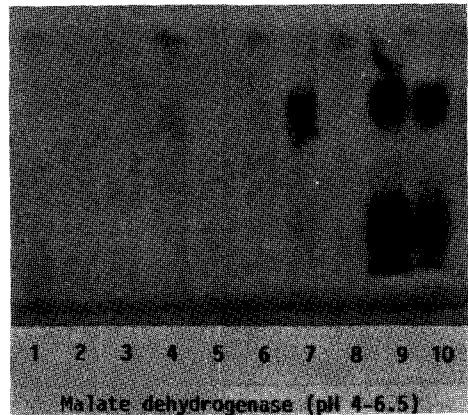


Fig.3. Isozyme pattern of malate dehydrogenase and superoxide dismutase in products of nuclei transfer on isoelectric focusing.

Recipient; 2: Arginine, Nuclei donor; 3: ASI 2057, Products of nuclei transfer; 1: p 613(fluffy type), 4: p 613(strandy type), 5: p 613, 6: p 622, 7: p 623, 8: p 617, 9: p 611, 10: p 610.

태 3인 p611과 p610은 2개가 형성되어 다른 균주와 구별이 되었다.

Superoxide dismutase에 있어서는 p623이 맛느타리버섯과 같았으나 p613, p611, p610은 모균주와 달리 나타나므로써 균주에 따라 Isozyme band pattern이 각기 상이하였다. 특히 균총형태 3의 두 균주는 여러가지 효소의 band pattern이 매우 유사하여 다른 균주와 대조가 되었다. 이와같은 핵 전이 균주들의 새로운 band 형성은 Yoo 등(1987)이 *P. florida*의 원형질체로부터 핵을 분리하여 *P. ostreatus*의 원형질체내로 전이시킨 균주에서도 보고 되었으며, 그 기작은 유전자의 상호작용에 기인된 것으로 추정되나 앞으로 더 연구할 과제라고 생각된다.

이상에서 관찰한것과 같이 핵을 삽입시킨 Arginine 영양요구성 원형질체가 버섯 최소배지에서 성장 하고, Esterase, Malate dehydrogenase, Superoxide dismutase의 새로운 동질효소 band가 형성되거나 없어진 균주가 생긴 것으로 보아 맛느타리버섯의 핵은 느타리버섯의 원형질체에 확실히 전이되었으며, 핵 전이에 의한 버섯류의 신품종 육성이 가능할 것으로 보인다.

摘 要

맛느타리버섯(*P. sapidus*)의 균사체로부터 핵을 직접 분리하여 느타리버섯(*P. ostreatus*)의 원형질체에 전이시켜 다음과 같은 결과를 얻었다.

맛느타리버섯의 핵을 느타리버섯의 Arginine 영양요구성 균주 원형질체에 전이하여 얻은 균주의 균총 형태는 3종류로 구분되었으며, 형태 1은 균총이 두 모균주의 모양으로 명확히 분리되었고, 형태 2는 균총은 분리되나 모균주와 다른 형태, 형태 3은 균총의 분리현상이 없이 안정하고 균일하게 성장하였다.

등전점 전기영동으로 핵 전이균주와 모균주의 Esterase, Malate dehydrogenase, Superoxide

dismutase의 동질효소 pattern을 비교한 결과 핵 전이균주들은 모균주와 차이가 있었으며, 특히 형태 3의 두 균주는 모균주에서 볼 수 없는 새로운 band가 발견되었다.

參考文獻

- Briggs, R. and King, T.J.(1952): Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **38**: 455-463.
- Ferenczy, L. and Pesti, M.(1982): Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Microbiol.* **7**: 157-160.
- Lörz, H. and Potrykus, I.(1978): Investigation on the transfer of isolated nuclei into plant protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* **53**: 251-256.
- Osterman L.A.(1984): Methods of Protein and Nucleic acid research 1, Electrophoresis, Isoelectric Focusing, Ultracentrifugation Published by Springer-Verlag: 199-209.
- Potrykus, I. and Hoffmann, F.(1973): Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. *Z. Pflanzen physiol.* **69**: 287-289.
- Saxena, P.K., Mill, M., Crosby, W.L., Fowke, L.C. and King, J.(1986): Transplantation of isolated nuclei into plant protoplasts. *Planta* **68**: 29-35.
- Tanksley, S.D. and Orton, T.J.(1983): Isozyme in plant genetics and breeding. part A: 486-493.
- 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.
- Yoo, Y.B., You, C.H., Shin, P.G., Park, Y.H. and Chang, K.Y.(1978): Transfer of Isolated Nuclei from *Pleurotus florida* into Protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **15**: 250-253.

Accepted for Publication 28 September