

## 느타리버섯 形質轉換株에서 Filamentous Crystal 形成

卞明玉 · 車東烈

農村振興廳 農業技術研究所 菌茸科

### Formation of Filamentous Crystal in Transformants of *Pleurotus* species

Myung-Ok Byun and Dong-Yeul Cha

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute

R. D. A. Suweon 441-707

**ABSTRACT:** Aerial crystalline filaments emerged from dense type of mycelia on some monokaryotic transformants of *Pleurotus florida*, *P. ostreatus* and *P. sajorcaju*. Crystals were not dissolved in water but soluble in ethanol or at the temperature of higher than 80°C. Crystals were detected in the mycelia grown on the mushroom minimal medium as well as the mushroom complete medium. They were produced on both liquid media and agar plate. Although the mycelia incubated at 15-25°C, produced crystals, the mycelia incubated at 30-35°C did not. Furthermore, crystal forming mycelia were obtained from monokaryotic basidiospore of *P. ostreatus* and *P. sajorcaju* by mutations (UV irradiation).

**KEYWORDS:** Crystal growth, Transformant, *Pleurotus*, UV irradiation.

사철느타리버섯(*Pleurotus florida*)은 느타리버섯과  
交配나 원형질체 融合에 의하여 새로운 品種을 育  
成하고 있다. 버섯류에서 形質轉換은 營養要求性的  
補完이나 hygromycin B와 같은 약제내성(Mooib-  
roek, 1990)을 利用하여 形質轉換하고 있으나 아직  
基礎的인 段階에 있다. 形質轉換에 대한 研究가  
진전되면 버섯유전자 分離와 유전자 발현기작이 밝  
혀져 버섯 육종의 기초자료로 활용될 것이다.

버섯 균사체에서 crystal이 形成된 報告는 *Ste-  
reum*에서 원연간 교배시 crystal이 形成되는 것이  
보고 되었으며(Ainsworth 등, 1989) *Clitocybe illu-  
dens*는 1核 菌絲에서 sesquiterpene의 한종류인 il-  
ludens 라는 항생物質이 crystal로서 形成(Carey,  
1974) 되었다고 하였다. 느타리 버섯속 菌絲의 1核  
菌絲나 2核 菌絲에서 일반적으로 crystal이 形成되지  
않으나 1核 菌絲의 突然變異株나 形質轉換株에서  
crystal 形成 菌株가 發見 되었다.

本 實驗은 營養要求性인 느타리 버섯을 補完 시  
킬수 있는 細菌을 使用하여 形質轉換 하였을때 얻

어진 形質轉換株의 菌絲生長, 菌絲에서 crystal形成  
및 子實體 發生을 調査 하였고 느타리버섯 속 균사의  
UV 처리에 의한 crystal 形成을 보고 하고자 한다.

### 材料 및 方法

**菌株 및 細菌:** 使用한 菌株는 營養要求性 菌株  
사철느타리 *Pleurotus florida* P101(leu, ura, cyt),  
느타리버섯 *P. ostreatus* 2018-4(trp), 여름 느타리버  
섯 *P. sajorcaju* 2070 -3 -56(ade)을 形質轉換을 위한  
母菌株로 使用 하였다. 2016-1은 形質轉換株 特性  
調査를 위한 交配菌株로 使用 하였다. Leucine 요  
구성인 P101을 形質轉換 하기위한 細菌은 2 종류의  
細菌을 使用 하였는데 하나는 팽이버섯(*Flammulina  
velutipes*) total DNA를 Sau3A 로 절단후 pBR 322의  
Bam H1 site에 크로닝한 細菌 pM 301(Byun 1989)  
이며, 다른 하나는 pyr 4 gene과 *Aspergillus nidu-  
lans*의 ans 1 부위를 pBR 325에 지니고 있는 pDJB  
3(Ballance and Turner, 1985)이었다. Tryptophan

요구성을 補完시키기 위해서는 PAK 3(Burrows 등, 1990) adenine 요구성을 補完시키기 위해서는 crs 1 벡터(ade 8 유전자를 지닌 cosmid)를 사용하여 形質轉換 하였다.

**形質轉換 및 子實體 形成**: 形質轉換은 Byun(1992)의 方法과 同一하게 遂行하였으며 形質轉換株는 버섯 完全培地와 버섯 最小培地에 培養하여 crystal 形成을 調査 하였다. 形質轉換株의 子實體 發生은 사철느타리 1核 菌絲인 2016-1과 교배후 톱밥배지에서 子實體 發生을 위하여 발이를 誘導하였다(Byun 1992).

## 結果 및 考察

**形質轉換株의 crystal 形成**: 사철느타리(*Pleurotus florida*) P101 營養要求株를 pM 301 벡터를 利用하여 形質轉換하였다. 形質轉換率은 매우 저조하나 10개의 形質轉換株를 얻었으며 菌絲生長 特性이 버섯 完全培地에서 母菌株보다 빠른것, 母菌株와 비슷한것, 느린것 등으로 區分되며 버섯 最小培地에서는 母菌株와 비슷한것, 母菌株보다 아주 빠른것이 있었다. 形質轉換株중 菌絲生長이 미약한 균총에서 均사체와 다른 바늘침 모양의 crystal이 形成되었다. 子實體 形成은 1核 菌絲인 사철느타리버섯 2016-1과 交配하여 발이시킨 結果 子實體 模樣이 母菌株가 톱니형인데 비하여 形質轉換株는 톱니형, 갈데기형

의 두가지가 形成되었으며 crystal 形成과 子實體 모양간에 상관을 찾을수 없었다(Table 1).

P101 營養要求株를 pDJB 3 벡터를 使用하여 形質轉換 하였을때 9개 균총을 얻었다. 버섯 完全培地와 버섯 最小培地에서 菌絲 生長은 pM 301 벡터의 形質轉換株와 유사하였으며 crystal 形成 菌株를 4개 發見 하였다. pDJB 3 벡터 形質轉換株의 子實體도 갈데기형과 톱니형이 나타났으며 crystal 形成과 子實體 모양간에 상관을 찾을수 없었다(Table 2)

사철느타리 버섯 形質轉換株 뿐 아니라 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) tryptophan 營養要求株, 여름느타리버섯(*Pleurotus sajorcaju*) adenine 營養要求株를 形質轉換 하였을때도 몇개의 形質 轉換株중 crystal을 形成하는 菌株를 얻었다.

Crystal을 形成하는 形質轉換株는 母菌株나 crystal을 形成하지 않는 다른 形質轉換株에 비해 버섯 完全培地에서 菌絲生長이 극히 부진하였다. 그러나 버섯 最小培地에서 菌絲生長을 다른 形質 轉換株와 별 差異가 없이 잘 자랐다(Table 3). 버섯균사체에 crystal을 形成하는 菌株는 形質轉換株에서 發見되었고 그 외에는 느타리버섯, 여름 느타리버섯의 담자 포자에 UV를 調査하여 얻은 1核 菌株에서도 5개 菌株에서 發見 되었다(Table 4).

**培地造成과 培養 溫度에 따른 crystal 형성**: *P. florida* 營養要求株 P101을 pM 301 vector로 形質

**Table 1.** Mycelial growth and fruitbody in transformants of P101 auxotrophic mutant with pM 301 vector.

Transformants	Vector	Mycelial growth*		Crystal formation	Fruitbody type (X 2016-1)
		MCM	MMM		
T 101	pM 301	++	+		Eroded
T 102	〃	+	+	Crystal	Eroded, Funnel
T 103	〃	+	+	Crystal	Funnel
T 104	〃	+++	+++		Eroded, Funnel
T 105	〃	+	+	Crystal	Funnel
T 106	〃	+++	+++		Funnel
T 107	〃	+	+	Crystal	Eroded
T 108	〃	+++	+++		Funnel
T 109	〃	+++	+		Eroded, Funnel
T 110	〃	+	+		Funnel
P101	control	++	+		Eroded

\*+: slow, ++: moderate, +++: fast

**Table 2.** Mycelial growth and fruitbody in transformants of P101 auxotrophic mutant with pDJB 3 vector.

Transformants	Vector	Mycelial growth*		Crystal formation	Fruitbody type (X 2016-1)
		MCM	MMM		
TD 1	pDJB 3	+	+++	Crystal	Eroded
TD 2	∕	+++	+	Crystal	No primordia
TD 3	∕	+++	+		∕
TD 4	∕	+	+	Crystal	-
TD 5	∕	+	++		Funnel
TD 6	∕	+++	++		∕
TD 7	∕	+	+		∕
TD 8	∕	+	+		∕
TD 9	∕	+++	+++	Crystal	Eroded
P 101	control	++	+		Eroded

\*+: slow, ++: moderate, +++: fast

**Table 3.** Crystal formation on transformants of *Pleurotus* with pAK 3 or CRS 1 vector.

Host	Vector	Mycelial growth*		Crystal formation
		MCM	MMM	
<i>P. ostreatus</i>				
2018-4-trp	PAK 3	+	+	+
∕	∕	++	+	+
2018-4 trp	control	+++	-	+
<i>P. sajor-caju</i>				
2070-3-56 ade	CRS 1	++	++	+
2070-3-56 ade	control	+++	+	-

\*Mycelial growth, +++: Fast, ++; Moderate, +; Slow, -; No growth

**Table 4.** Crystal formation of some monokaryotic strain obtained from basidiospore irradiated with U.V. rays.

Strain	Mycelial* growth on MCM	Crystal formation
<i>P. ostreatus</i>		
2066-3-3	+	+
2066-7-3	+	+
<i>P. sajor-caju</i>		
2070-101	+	+
2070-102	+	+
2070-103	+	+

\*Mycelial growth; +: very slow

\*\*Crystal formation; +

轉換한 菌株 #23을 溫度 및 培地가 crystal 形成에 미치는 影響을 調査하고 crystal의 溫度, 물, ethanol에서의 용해성을 調査하였다.

Crystal 形成을 菌絲 培養溫度 별로 比較한 結果 15-25°C 에서는 crystal이 形成되나 30-35°C 에서는 crystal이 發見되지 않았다. 특히 20°C 에서 가장 빨리 crystal이 形成되며 버섯 完全培地 뿐 아니라 버섯 最小培地에서도 crystal이 形成되었고 培養 初期에는 없으나 培養期間이 길어지면 crystal이 形成되었다.

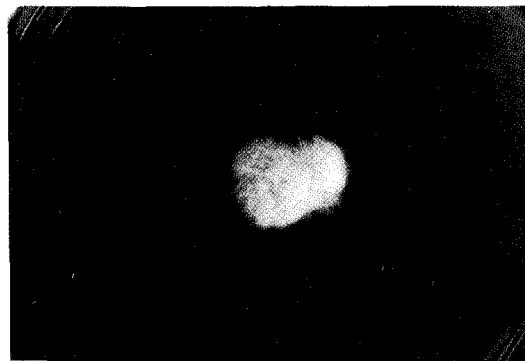
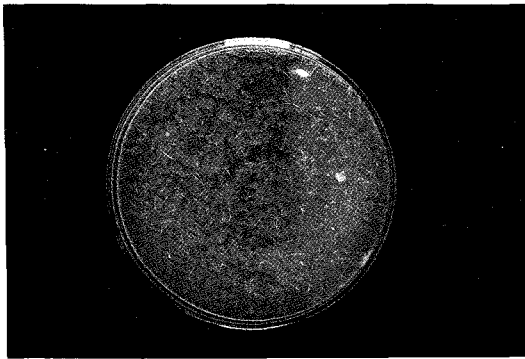
Crystal을 形成하며 菌絲生長이 저조하고 조밀한 菌株와 crystal을 形成하지 않는 菌株를 交配하였을 때 crystal은 形成되지 않았으며 균총이 정상적으로 활력있게 빨리 자랐다. 버섯 完全培地에서는 한천을

**Table 5.** Mycelial growth and crystal formation of transformant of P101, #23 grown at different temperature for 3 months.

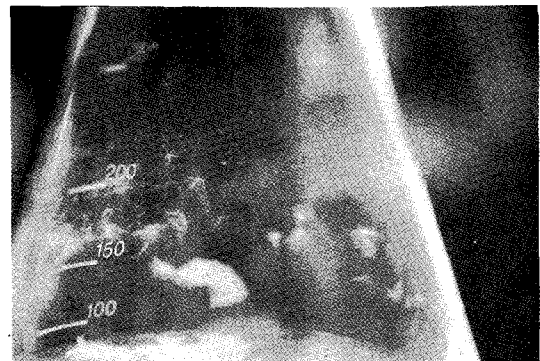
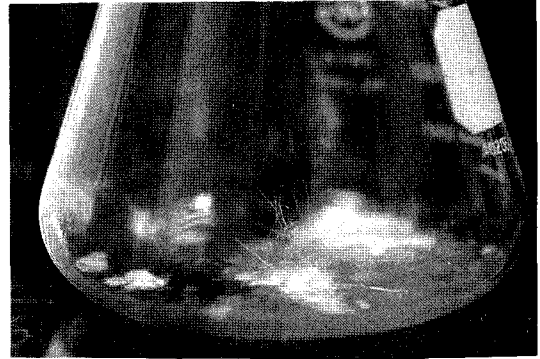
Media	Mycelial growth <sup>1)</sup> and crystal formation <sup>2)</sup>					
	15	20	25	30	35	40(°C)
MCM Submerged culture	+(C)	++(C)	+++ (C)	+	+	-
MMM	-	+	++	-	-	-
MCM Agar plate	+	+++ (C)	+++ (C)	+	+	-
MMM	+	++(C)	++	+	+	-

<sup>1)</sup>Visual rating of mycelial growth as -: No, +: poor, ++: moderate, +++: good

<sup>2)</sup>(C) crystal formation



**Fig. 1.** Filamentous crystals of transformant #23 from P101.



**Fig. 2.** Crystal formation in submerged culture of a transformant in *P. florida*.

添加한 固體 培地에서 뿐 아니라 液體培地에서도 形成되어 液體위에 crystal이 떠 있으며 삼각 flask 유리벽에도 붙어 있었다(Table 5, Fig. 1, 2). 완전 培地 紗레상에서 菌絲生長이 부진하고 crystal을 형성하는 균주를 液體培養을 할때는 固體 培養에 비해 菌絲生長이 약간 빠르며 진탕培養을 하면 더욱 菌絲生長이 빠르고 crystal 形成이 안되나 진탕을 중지하면 crystal이 많이 形成 되었다. Crystal은 물

에는 녹지않고 80°C 이상 高溫이나 95% ethanol에 溶解되며 ethanol이 휘발되면 다시 재결정이 이루어 졌다(Fig. 3).

이같은 crystal 形成은 Ainsworth 등(1990)이 담자균 *Stereum*에서 liquid media에서는 形成되지 않았다고 하였으나 사철느타리 形質轉換株는 liquid media에서도 crystal이 形成 되었다.

Crystal 形成은 *Lentinus*, *Clitocybe*, *Stereum* 등

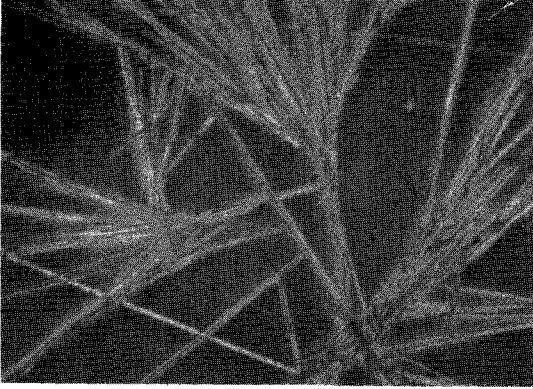


Fig. 3. Re-crystallization after evaporation from solutions of filamentous crystals in ethanol.

에서 確認 되었으며 종간이나 원연간 교잡시 한쪽 균종의 생장이 저해되고 퇴화 할때 퇴화되는 균종에서 crystal이 形成된다고 Ainsworth 등(1989)이 報告하였으며 또한 crystal 의 본성은 sesquiterpene (+)-torreyol 이라고 하였다(Ainsworth 1990).

*Clitocybe illudens*는 1核 菌絲에서 바늘침 모양의 sesquiterpene의 한가지인 torreyol이 形成되며 이것은 antitumor 항생물질인 illudin 種類라고 하였다.

사철느타리, 느타리, 여름느타리의 營養要求性 菌株를 形質轉換 하였을때 菌絲生장이 微弱하고 hyphae가 잘 자라지 못할때 crystal이 觀察되었다. 그밖에 *Pleurotus osteratus*와 *P. sajor-caju*의 포자를 UV 處理에 의하여 mutation을 誘發하였을때 버섯 完全培地에서 菌絲生장이 극히 미약한 균종에서도 crystal이 觀察되었다.

Crystal을 形成했던 菌株에서는 菌絲가 조밀하고 hyphae가 잘 形成되지 않으며 대부분의 느타리버섯속 菌絲들이 지니고 있는 conidia가 發見되지 않았다 (Byun 등 1991). Torreyol인 crystal 形成과 느타리버섯속 菌絲의 생장에는 어떤 關係가 있는지 좀더 研究되어야 할 것으로 생각된다.

## 사 사

本 研究는 科學技術處 特定研究課題 研究費로 一部 遂行된 것입니다.

## 적 요

사철느타리버섯, 느타리버섯, 여름느타리버섯 形質轉換株에서 crystal이 形成 되었으며, crystal은 물에는 녹지않고 高溫이나 ethanol에 녹으며 ethanol이 휘발되면 재결정이 이루어 졌다. crystal은 固體배지뿐 아니라 液體 培地에서도 形成되며 菌絲를 15-25℃ 에서 培養할때 形成되나 30-35℃ 에서는 形成되지 않았다. 또한 UV를 利用하여 突然變異를 誘發시켰을때도 여름느타리 버섯과 느타리버섯의 1核 菌絲에서 crystal을 形成하는 菌株를 얻었다.

## 參考文獻

- Ainsworth, A. M. and Rayner, A. D. M. 1989. Hyphal and mycelial responses associated with genetic exchange within and between species of the basidiomycete genes *Stereum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1643-1659.
- Ainsworth, A. M. Rayner, A. D. M., Broxholme, S. J., Beeching, J. R., Pryke, J. A., Scard, P. R., Berri-man, J., Powell, K. A. Floyd, A. J. and Branch, S. K. 1990. Production and properties of the sesquiterpene (+)-torreyol, in degenerative mycelial interactions between strains of *Stereum*. *Mycol. Res.* **94** (6): 799-809.
- Ballance, D. J. and Turner, G. 1985. Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* **36**: 321-331.
- Burrows, D. M., Elliott, T. J. and Casselton, L. A. 1990. DNA-mediated transformation of the secondarily homothallic basidiomycete *Corpimus bilanatus*. *Curr. Genet.* **17**: 175-177.
- Byun, M. O., Yoo, Y. B. Go, S. J., You, C. H., Cha, D. Y. and Park, Y. H. 1989. Cloning and expression of leu 2 gene from the basidiomycete *Flammulina velutipes* in *E. coli*. *Kor. J. Mycol.* **17**(1): 35-38.
- Byun, M. O., Yoo, Y. B., Go, S. J., You, C. H. and Cha, D. Y. 1991. Microscopic observation of conidia from the genus of *Pleurotus*. *Korean Mycol* **19**: 27-31.
- Carey, S. T. 1974. *Clitocybe illudens*: its cultivation, chemistry, and classification. *Mycologia* **66**: 951-968.
- Hanssen, H. P. 1985. Sesquiterpene alcohols from Le-

ntinus lepideus. *Phytochemistry* **24**: 1293-1294.  
Mooibroek, H., Kuipers, A. G. J., Sietsma, J. H., Punt, P. J. and Wessels, G. H. 1990 . Introduction of hygromycin B resistance into *Schizophyllum commune* : preferential methylation of donor DNA . *Mol.*

*Gen. Genet.* **222**: 41-48.

卡明玉, 金庚守, 車東烈 1992. 사철느타리버섯 形質轉換株의 特性. 韓國菌學會誌.

**Accepted for Publication on June 19, 1992**