Journal of Mushroom Science and Production
Vol. 2, No 1, p33-37 March 2004
Copyright ⓒ 2004 by The Korean Society of Mushroom Science
Printed in S. KOREA

원형질체 분리에 의한 영지버섯균주의 육종소재 개발

김경수[1] · 공원식[2]* · 최선규[2] · 유창현[2] · 고미석[3] · 서건식[4]
[1]농민버섯연구소, [2]농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과, [3]경상대학교 농학과, [4]한국농업전문학교

Development of breeding materials based on protoplast isolation in *Ganoderma strains*

Kyung-Soo Kim[1], Won-Sik Kong[2]*, Sun-Gyu Choi[2], Chang-Hyun You[2], Mi-Suk Ko[3], and Geon-Sik Seo[4]
[1]*Nongmin Mushroom Institute, Anseong 456-810*
[2]*Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707*
[3]*Dep. of Agronomy, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*
[4]*Korea National Agriculture College, Hwasung, Kyonggi, 445-893, Korea*

ABSTRACT : To develop neohaplonts for *Ganoderma* breeding, protoplasts were isolated from dikaryotic mycelium and regenerated. Selection rate of neohaplonts varied between ASI7074, ASI7091, ASI7094, ASI7100 and ASI7115, showing 5.24% on the average. Auxotropic mutants from *Ganoderma* monokarions were recovered by UV irradiation on protoplasts. Protoplast survival rates were 1.9% ASI 7074, 0.17% ASI 7091, and zero percent ASI 7100 using 300 second irradiation. Four auxotrophic strains were recovered from 1,536 colonies screened that will be further utilized for protoplast fusion and transformation.

KEYWORDS : neohaplont, auxotrophic mutant, *Ganoderma*, protoplasts

우리 나라에서 재배되고 있는 품종은 영지 1호와 2호로서 모두 산야에서 수집된 균주 중 선발된 우수계통을 농가에 보급한 것이다. 그러나 이러한 품종보다 수량과 품질이 우수한 새로운 품종을 육성하기 위해서는 세계각지에서 수집된 다양한 형질을 가진 균주를 이용하여 교잡 육종을 하는 것이 가장 효율적이라고 할 수 있다. 버섯에 있어서 효율적인 교잡 육종은 단핵균주의 획득이 가장 필수적이라 할 수 있는데 영지에서는 포자발아가 힘들고 효율이 낮아 단핵균주의 획득이 쉽지 않은 상태이다 (김 등, 1998). 따라서 포자 발아 이외의 단핵균주의 획득방법이 육종에 있어서는 필수적이다. 버섯 2핵 균주의 원형질체를 분리한 후 재생된 균총 중에서 단핵균주 (neohaplont)를 분리하는 경우도 있는데, 시간상 자실체를 형성시킬만한 여유가 없거나 포자발아가 안될 때 이러한 방법이 사용되기도 한다 (Fox *et al*.. 1994, Yoo *et al*., 1987. Zhao and Chang. 1993). 더불어 버섯은 일반 작물과 달리 같은 종이라도 교배형이 같으면 불화합성을 보이기 때문에 이러한 것을 극복하기 위해서는 원형질체 융합이나 형질전환 등이 육종에 이용되기도 한다. 이와 같은 원형질체 융합이나 형질전환을 하기 위해서는 다양한 영양요구주의 선발이 이루어져야 육종목표에 쉽게 접근할 수 있을 것이다. *G. lucidum*의 경우 2핵 균사체를 균질화한 후 U. V.를 조사해서 영양요구주를 선발한 다수의 보고가 있으며(Um *et al*., 1988; 박, 1991), *G. applanatum*의 영양요구주를 선발한 보고 (Park *et al*., 1988)도 있다.

*Corresponding author : <E-mail: wskong@rda.go.kr>

본 연구에서는 교잡 육종에 가장 필수적이라고 할 수 있는 단핵균주를 영지버섯의 2핵 균사체로부터 원형질체를 분리하여 neohaplonts 선발에 의하여 획득하고자 하였으며, 단핵의 균사체로 부터는 원형질체를 분리한 후 원형질체에 자외선을 처리하여 영양요구성 균주를 선발하였다. 이렇게 선발된 단핵균주로 균주간의 교잡을 실시하여 새로운 균주을 육성하고자 하였으며, 추후 계속될 원형질체 융합이나 형질전환 등에 필수적인 영양요구주를 육성하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

영지의 neohaplont 및 영양요구주 선발에 이용된 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에 보존중인 쓴맛이 강하면서 자실체가 편각형인 ASI 7091과 녹각형인 ASI 7074, 7094, 7100, 7115 (Kim *et al*., 1994)을 이용하였다. Neohaplont 및 영양요구주 선발에 사용된 배지는 버섯완전배지 (MCM ; 20 g dextrose, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.46 g KH_2PO_4, 1 g K_2HPO_4, 2 g yeast ex., 2 g peptone, 20 g agar/1,000 ml)와 버섯최소배지 (MMM ; 20 g dextrose, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.46 g KH_2PO_4, 1 g K_2HPO_4, 20 g bacto-agar/1,000 ml)를 사용하였다.

Neohaplonts 선발

영지 2핵 균주를 cellophane membrane이 깔린 MCM에

접종하여 30℃에서 3~4일간 배양시켰다. 생장이 이루어진 균사체는 따로 수집하여 0.6 M sucrose에 세포벽 분해효소 (Novozym 234 5 mg/㎖ + β-glucuronidase 5 ㎕/㎖) 용액을 처리하여 30℃에서 120 rpm으로 3~4시간 진탕 반응시켰다. 반응 후 생성된 원형질체는 sintered glass filter (porosity No. 1)를 사용하여 균사체 잔유물로부터 순수 분리하고 삼투압 조절제로 두번 세척한 다음 현탁시켜 0.6 M의 sucrose가 첨가된 MCM배지에 배양하는 방법으로 재생시켰다. 재생된 균총은 GCM에 계대배양하며 현미경으로 관찰하여 clamp connection이 없는 단핵균주를 선발하였다.

돌연변이유발

공시균주의 단핵 균사체에서 원형질체를 분리한 후 자외선 처리를 하였다. 처리방법은 253.7 nm의 자외선등으로부터 10 cm 거리에 원형질체를 포함한 petri dish를 위치시켜 처리시간별로 조사하였다. 자외선 처리는 빛이 완전히 차단된 암실에서 수행하였으며 처리 후 약 30분간 암상태로 두었다가 0.6 M sucrose가 첨가된 MCM에서 재생하였다. 처리시간별 생존율은 자외선을 처리한 원형질체에서 재생된 균총수를 자외선을 처리하지 않은 원형질체에서 재생된 균총수로 나누어 백분율로 나타내었다.

영양요구주의 선발 및 유전표지 확인

원형질체로부터 재생된 균주를 MCM을 분주한 petri-dish에 16개씩 옮겼으며, 이들 균총중 MMM에서 생육이 되지 않은 균주만 선발하였다. 선발된 균주는 MCM을 이용 배양한 후 다시 MMM에 배양하고는 petri dish 1개당 12개씩 옮겨 검정을 통하여 유전표지 확인에 이용하였다. 사용한 배지의 조성은 yeast extract 1 ㎎/㎖, casamino acid 5 ㎎/㎖, purine과 pyrimidine은 각각 50 ㎍/㎖이었다 (그림 1). 유전표지 확인은 Yoo 등 (1985)의 방법과 같이 MMM에 amino acid 0.5 ㎎, vitamin과 nucleic acid base는 0.1 ㎎/㎖을 각각 첨가하여 사용하였다 (표 1).

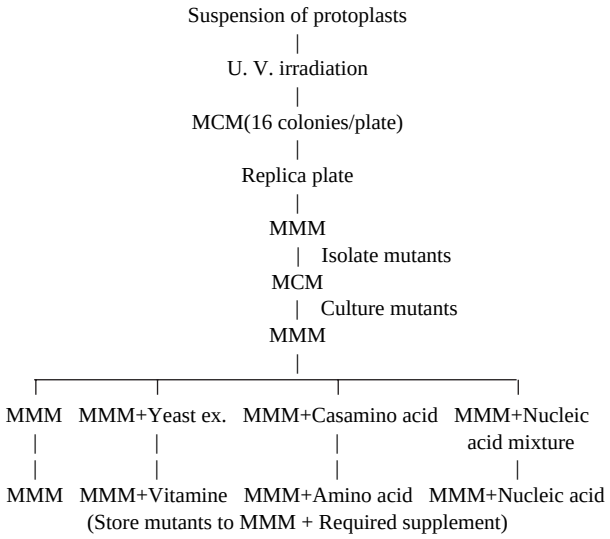

Fig. 1. Procedure for auxotrophic mutant isolation of *Ganoderma* strains.

결과 및 고찰

Neohaplonts 선발

영지버섯의 우량균주를 육성에 필수적인 균주간 교배를 하기 위하여는 단핵균주의 분리가 필요하다. 영지중 자실체 형태가 녹각이면서 쓴맛이 강한 ASI 7074, 7094, 7100, 7115 균주와 편각형 중 고미도가 가장 높은 ASI 7091 균주(김 등, 1994)의 neohaplonts를 선발 하고자 하였다. 이들 균주의 2핵 균사체에 Novozym 234 등 세포벽 분해효소를 처리하여 원형질체를 분리하고 (그림 2) MCM 배지에 0.6 M 삼투압 조절제가 첨가된 배지에서 재생시킨 균총으로부터 표 2와 같은 단핵의 neohaplonts를 선발하였다. 각 균주마다 선발율에 차이가 있으며, 특히 ASI 7091 균주는 단핵균주 선발 비율이 11.9%로 가장 높았으며, ASI 7094는 단핵균주를 전혀 선발이 이루어지지 못하였다.

Table 1. 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	Usoleucine	Methionine	Pyridoxine	Argineine			
6	Guanine	Inositol	Ornithine	Pantothenic acid	Serine	Aianine		
7	Glycine	Leucine	Prolin	PABA	Thymine	Tryptophan	Asparatate	
8	Glutamine	Lysine	Phenylalanine	Riboflavin	Tyrosine	Threonine	Valine	Asparagine
9	$(NH_4)_2SO_4$		$Na_2S_2O_3$					

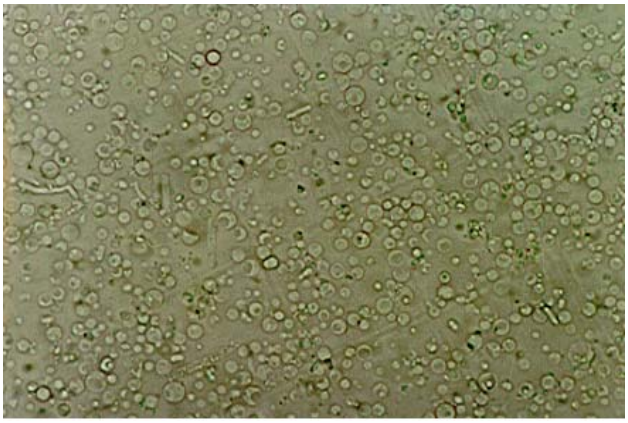

Fig. 2. Protoplasts of *Ganoderma* strain.

Table 2. Neohaplonts recovered from *Ganoderma lucidum* dikaryons after protoplast reversion

Strains (ASI)	No. of colonies examined	No. of monokaryon	Percentage of monokaryon (%)
7074	320	4	1.3
7091	303	36	11.9
7094	960	0	0
7100	364	19	5.2
7115	128	10	7.8

Matsumoto 등(1995)은 느타리버섯 등 13개 균주에 대하여 원형질체를 재생하여 단핵 균주를 확인 한 결과 단핵균주의 비율이 44~97%라고 한 바 있고, Yoo 등(1987)은 *Pleurotus spodoleucus*에서 48.76%의 많은 단핵주를 분리한 바 있으나, *Lyophyllum ulmarium*에서는 4.47%로 단핵주의 분리 비율이 낮다고 하였다. 그리고 Zhao 등(1993)은 *Coprinus cinereus*등 6종 8균주에서 46.0~70.1%의 단핵균주를 선발하였다고 하였다. 그러나 Fox 등(1994)은 *L. edodes*에서 단핵균주의 재생율이 매우 낮다고 하였으며, Salvado 등(1991)은 *Agrocybe aegerita*.의 2핵 균주의 교배형이 A_3B_3/A_4B_4인 것으로부터 원형질체를 분리한 후 재생시켜 단핵균주를 선발 한 후 교배형을 확인한 결과 총 100균주 중 A_3B_3가 96균주, A_4B_4가 4균주였다고 보고하였다. 따라서 버섯 종별로 neohaplonts의 선발율은 상당히 차이가 있음을 알 수 있었다. 이와 같이 원형질체 재생에 의해서 neohaplonts를 선발하는 것은 포자발아율이 낮은 종이나 자실체 형성이 곤란한 버섯에서는 상당히 편리한 방법이 될 수 있을 것이다. 그리고 2핵 균주의 원형질체 재생에 의해 neohaplonts를 효과적으로 선발하기 위해서는 균사 생장속도를 이용하여 먼저 재생된 균사중 균총이 큰 것은 제거하고 나중에 재생되면서 균총이 적은 것을 선발하면 효과적인데 그 이유는 2핵인 경우 균사 생장이 단핵에 비하여 빠르기 때문인 것으로 추정된다. Zhao 등(1993)이 보고한 결과를 보면 *L. edodes*는 처음 1주일 동안 재생된 76 colony 중 단핵균주는 3 colony 였으나 그 다음날부터 새로이 재생되는 colony는 모두 단핵균주였다고 하였다. 한편 그들은 2핵 균주에서 재생되는 원형질체 내의 핵 분포는 2핵이 30%, 1핵이 10%, 무핵이 60%라고 하였다.

이처럼 본 시험과 상기 보고들로부터 이용된 원형질체 분리 재생에 의한 단핵균주의 선발은 자실체를 발생시키지 않고 균사체로부터 직접 단핵균주를 선발할 수 있기 때문에 시간을 절약할 수 있는 새로운 방법이라고 볼 수 있다.

돌연변이유기

영지의 원형질체 융합 등에 이용하기 위한 영양요구성 균주를 분리하고자 영지 균주별 단핵 균사체를 배양한 후 세포벽 분해효소를 처리하여 원형질체를 분리하였다. 분리된 원형질체에 일정한 시간별로 자외선을 조사하고 자외선을 조사하지 않은 대조구의 재생율과 비교하여 생존율을 나타낸 것은 그림 3과 같다. 균주간의 생존율을 보면 ASI 7074는 90초 동안 자외선을 조사하여도 약 50% 정도로 ASI 7091과 7100 균주보다 높았다. 그러나 180초간의 자외선 조사에서는 3개 균주 모두 거의 비슷하였으며, 300초에서는 ASI 7074는 1.9%, ASI 7091은 0.17%을 나타내었고 ASI 7100은 완전히 상실하였다. 식용버섯인 느타리버섯의 원형질체를 분리하여 자외선을 조사한 경우에 치사되는 시간은 종에 따라 20-90초 정도로 차이는 있으나(Yoo 등, 1985; Takashi 등, 1993; Lee 등, 1986; 조, 1994), 이러한 처리시간별 영지의 원형질체 생존력은 다른 버섯에 비하여 월등히 높은 것을 알 수 있었다. 원형질체 이외에도 2핵 균사체를 GCM 액체배지에 배양한 후 균질화하여 자외선을 조사한 결과 박 (1991)은 G. lucidum에서 90분 Coriolus versicolor은 60분에서 생존력을 상실하였다고 하였고, Park 등 (1988)은 G. applanatum에서 120분의 처리에서는 완전히 생존력을 상실하였다고 하였다. 한편 표고버섯의 균사체에서는 자외선을 처리한 결과 30분 조사시 생존력이 상실된다고 하였으며(김, 1993), 표고버섯의 담자포자에 자외선을 조사한

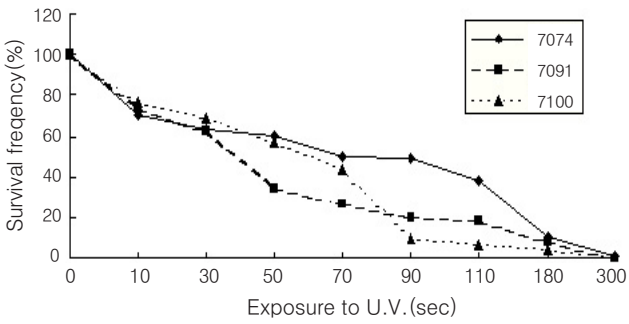

Fig. 3. Effects of ultraviolet light irradiation on the protoplasts survival of *Ganoderma* strains.

경우는 120초에서 생존력을 상실한다고 하여(Yoo 등, 1985) 버섯 종류간 또는 같은 영지속이라고 하여도 자외선을 처리하는 부위와 자외선 조사시간에 대한 원형질체의 치사율은 많은 차이가 있는 것으로 사료되었다.

한편 돌연변이주를 얻기 위하여 Um 등 (1988)은 *G. lucidum*의 2핵 균사체에 자외선을 5~20분을 조사하여 5분과 10분 조사시 돌연변이주를 얻었다고 하였으나 자외선 외에도 Takeshi 등 (1988)은 *Pholiota nameko*와 *Pleurotus cornucopiae* 등에 화학적 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro- N-notrosoguanidine (MNNG)를 균사체와 원형질체에 처리하여 영양요구주를 선발하기 위한 시도에서 MNNG의 처리량은 균사체에는 40 ㎍/㎖을 20에서 40분, 원형질체에는 10 ㎍/㎖을 80분간 처리할 때 영양요구주의 수득율이 가장 많다고 하였다. 이처럼 돌연변이 유발원에는 자외선, EtBr, MNMG 등 여러 가지가 있으나 화학적 돌연변이원은 인체에도 매우 유해하기 때문에 처리가 쉬운 자외선의 이용이 간편한 방법이라 할 수 있기에 영지에서도 자외선 처리로 안전하게 돌연변이 균주를 육성할 수 있을 것으로 기대된다.

영양요구주 확인

영지의 원형질체에 자외선을 처리하여 얻은 영양요구주는 표 3과 같다. ASI 7091과 7100 균주는 원형질체에 60초와 100초의 자외선 처리에서 각각 2개 균주씩 선발하였으나 ASI 7074 균주에서는 영양요구주를 선발하지 못하였다. 처음에 영양요구주를 육성하고자 선발된 colony는 ASI 7074는 604개, ASI 7091은 704개, ASI 7100은 192개로 총 1,536 colony 중에서 4개 균주의 영양요구주를 선발하였다. 따라서 ASI 7091은 0.28%, ASI 7100은 1.04%의 선발율을 보여 ASI 7100의 선발율이 훨씬 높아 균주간에도 선발비율에는 많은 차이를 나타내었다.

Table 3. Auxotrophic mutants obtained from UV irradiation of *Ganoderma* strains

Strain	Genetic marker	UV. exposure time (sec)
7091-M1	Nicotinic acid, PABA	100
7091-M2	Riboflavin	100
7100-M1	Unknown	60
7100-M2	Unknown	60

한편 3개 균주 모두 처음에는 많은 돌연변이주를 선발하였으나 영양요구성 확인 과정 중에 back mutation이 되는 비율이 높아서 영양요구주의 분리에 많은 어려움이 있었다 (data not shown here). 이러한 back mutation의 비율을 줄이기 위해 박 (1991) 및 김 (1993)은 EtBr을 처리하여 돌연변이주의 안정성을 기했다고 보고한 바 있다.

일반적으로 담자균류의 경우 자외선 조사시 포자 생존율이 5~15%일 때 돌연변이주 선발율이 가장 높고 (Hamlyn, 1982), 균사체의 경우 5~10% 생존율 범위에서 돌연변이주가 많이 분리되었다고 하였다 (Park *et al.*, 1988; Um *et al.*, 1988). 그러나 영지의 원형질체인 경우 ASI 7091은 20%, ASI 7100은 약 50%의 생존 범위에서 영양요구주가 분리되어 버섯 종간이나 균주간에도 약간의 차이가 있는 것으로 사료되었다. 이처럼 선발된 영양요구주는 앞으로 영지의 후대에서 발현되는 표지 인자로 이용되거나 아니면 원형질체 융합 또는 형질전환 등에 아주 유용하게 이용 할 수 있을 것이다.

적 요

약용버섯인 영지버섯의 단핵균주 육성 및 원형질체 융합을 위한 육종소재를 개발하기 위하여 원형질체를 분리하여 neohaplont를 육성하였으며, 원형질체에 자외선을 조사하여 영양요구성 균주를 유발하였다. 영지의 2핵 균주로부터 원형질체를 분리, 재생하여 선발된 neohaplont의 선발율은 ASI 7091이 11.9%, ASI 7094는 전혀 선발을 하지 못하였으며 균주간 평균 선발율은 5.24%였다. 영지 단핵균주의 균사체로부터 분리한 원형질체에 자외선을 조사하였을 때 300초에서는 ASI 7074는 1.9%, ASI 7091은 0.17%의 생존율을 나타내었고 ASI 7100의 경우 모두 사멸하였다. 자외선을 10초에서 300초까지 자외선을 조사하여 총 1,536 colony를 얻어 영양요구주를 선발한 결과 ASI 7091 균주는 원형질체에 100초 처리한 colony에서 Nicotinic acid, PABA 요구주와 Riboflavin 요구주를 선발하였으며, 7100 균주에서는 60초의 자외선 처리에서 특성이 확인되지 않은 2개 균주를 선발하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업비의 지원에 의해 수행된 결과의 일부로 이를 수행 할 수 있도록 지원해 주신것에 감사드립니다.

참고문헌

Fox, H. M., Burden, J., Chang, S. T. and Peberdy, J. F. 1994. Mating-type incompatibility between commercial strains of *Lentinus edodes*. Experiment Mycology 18 : 95-102.

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

Lee, Y. H., Park, Y. H., Yoo, Y. B. and Min, K. H. 1986. Isolation of auxotrophic mutants from basidiospores of *Pleurotus cornucopiae*. Kor. J. Mycol. 14(2) : 185-188.

Matsumoto, T., Fukumasa-Nakai, Y. and Komatsu, M. 1995.

Efficient dedikaryotization of higher basidiomycetes by the protoplast regeneration method. Rep. Tottori Mycol. Inst. 33 : 29-33

Park, Y. D., Yoo, Y. B., Cha, D. Y., Chang, M. W. and Lee, J. S. 1988. Isolation of auxotrophic mutants in *Ganoderma applanatum*. Kor. J. Appl. Microbiol, Bioeng. 15(4) : 230-233.

Salvado, J. C., Noël, T. and Labarère, J. 1991. Glycoprotein expression and protoplast regeneration of haploid nuclei from dikaryotic strains of the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. Sci. and Culti. of Edible Fungi XIII(1) : 65-69

Takashi, T., Kumata, A. and Aono, S. 1993. Selection of high-yield strains among regenerants from mutagenic protoplast of *Pleurotus ostreatus*. Mokuzai Gakkaishi 39(8) : 967-971.

Um, S. D., Chae, Y. A., Park, Y. H. and Yoo, Y. B. 1988. Studies on auxotroph induction of Ganoderma lucidum and interspecific protoplast fusion between *G. lucidum* and *G. applanatum*. Kor. J. Mycol. 16(1) : 16-20.

Yoo Y. B., Lee, Y. H., Yeo, U. H., Um, S. D., Cha, D. Y. and Park, Y. H. 1987. Selection of neohaplont in some edible fungi by protoplast reversion. Kor. J. Mycol. 15(1) : 38-41.

Yoo, Y. B., You, C. H. and Park, Y. H. 1985. Isolation of auxotrophic mutants from basidiospores of *Lentinus edodes*. Kor. J. Mycol. 13(3) : 185-189.

Yoo, Y. B., Perberdy, J. F. and Park, Y. H. 1985. Isolation of auxotrophic mutants from protoplasts of Pleurotus *ostreatus* and *Pleurotus florida*. Kor. J. Mycol. 13(2) : 75-78.

Zhao, J. and Chang, S. T. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. World Journal of Microbiology and Biotechnology 9 : 538-543.

김경수, 변명옥, 유창현, 차동열정훈, 고미석. 1994. 영지버섯 고미성 균주선발에 관한 연구. 한국균학회지 22(4) : 350-354.

김경수, 유창현, 차동열, 고미석. 1998. 영지(Ganoderma)의 포자발아 및 sexuality. 한국균학회지 26(1) : 16-19.

김채균. 1993. 표고버섯과 구름버섯 이목간의 원형질체 융합 및 핵 전이에 관한 연구. 박사 학위 논문. 서울대학교.

박설희. 1991. 영지와 구름버섯 이속간의 원형질체 융합 및 핵 전이에 관한 연구. 박사학위 논문. 서울대학교.

조인선. 1994. 느타리버섯속의 polyethylene glycol과 전기를 이용한 원형질체 융합에 관한 연구. 석사학위논문. 건국대학교.