

양송이 원형질체 분리와 PEG 형질전환법의 최적화

김민식 · 장갑열 · 이윤상 · 오민지 · 임지훈 · 오연이*

농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Optimization of protoplast isolation and PEG-mediated transformation in *Agaricus bisporus*

Minseek Kim, Kab-yeul Jang, Yun-Sang Lee, Min Ji Oh, Ji-Hoon Im, and Youn-Lee Oh*

Mushroom Science Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, Eumseong 27709, Korea

ABSTRACT: Currently, button mushroom, *Agaricus bisporus* is one of the most consumed mushroom in the world. However, despite of its importance in food market, molecular genetic modification method for breeding of *A. bisporus* is not well established. In this study, we optimized yield of *A. bisporus* protoplast with Lysing enzyme, Chimax-N and cellulase. With this composition, 1.0×10^8 /mL of protoplasts were obtained reliably. PEG-mediated transformation with spermidine showed almost 100-fold higher yield than non-spermidine method.

KEYWORDS: *Agaricus bisporus*, protoplast isolation, PEG transformation

양송이는 세계 버섯 생산에서 네번째에 해당하는 15%를 차지하고 있는 버섯이다(Royse *et al.*, 2017). 국내에서도 21,913톤이 생산되고 있고, 국내 총 버섯 생산량 178,346톤('19) 중 12.3%를 차지하지만 높은 판매 단가로 생산액은 20.8%에 해당된다(MAFRA, 2020).

서로 다른 양송이 품종에서 유래한 단핵체를 교배하여 만들어진 하이브리드 품종이 1980년에 시장에 처음으로 소개된 이후, 대부분의 새로운 양송이 품종들은 같은 방법으로 육종되었다(Fritsche, 1981). 그 후, 다양한 품종의

수집과 특성 분석, 분자 마커의 개발, 양적 형질 위치(Quantitative trait Loci, QTL)의 발견과 연관성 매핑과 같은 품종 개발에 있어 필수적인 다양한 분야에서 중요한 진전들이 있었지만 이러한 연구 결과들이 새로운 품종 개발로 이어지기는 어려웠다(Sonnenberg *et al.*, 2017). 주된 이유는 양송이의 생활사의 특징 때문인데, 이차자웅동주성으로 인해 이핵균사의 교잡없이 자실체를 이룰 수 있어 변이를 위한 모본이 되는 단핵균주의 생성이 5%밖에 되지 않아 모본 확보가 어렵다. 또한 격쇄연결체가 없어 모본간의 교배 후에도 교잡 여부를 확인하기 힘든 문제도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 분자 유전학적인 방법을 이용하여 새로운 품종을 개발하려는 노력이 계속 해서 있었다. 대표적으로 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation(ATMT)를 이용하여 특정 유전자를 도입하는데 성공한 연구가 있었지만 ATMT가 가지는 한계 때문에 상용화 단계에 이른 연구는 없었다(Chen *et al.*, 2000). ATMT를 통해 유전자를 도입할 경우, 형질전환체의 선별을 위해 항생제 저항성 유전자가 삽입되어야 하고, 삽입되는 유전자 또한 특정 위치가 아닌 무작위 위치에 삽입되기 때문에 목적하는 육종형질을 변형하기 힘들어 상용 품종 개발을 위한 기술로는 적절치 않다. 또한, 유전자의 삽입만 가능할 뿐 특정 유전자의 결실이나 대체를 유도하는 것은 어려워 개발 가능한 품종의 폭 또한 좁다. 기존에 보편적으로 사용되는 방법인 상동 재조합

J. Mushrooms 2021 September, 19(3):256-259
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.3.256>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Minseek Kim(Postdoctoral researcher), Kab-yeul Jang(Division manager), Lee Yun-Sang(Senior researcher), Min Ji Oh(Researcher), Ji-Hoon Im(Researcher), Youn-Lee Oh(Researcher)

*Corresponding author
 E-mail : o5ne2@korea.kr
 Tel : +43-871-5703

Received September 1, 2021
 Revised September 15, 2021
 Accepted September 25, 2021

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(Homologous recombination, HR)을 이용한 PEG 형질전환(Polyethylene glycol-mediated transformation, PEG)의 경우 균류에서는 DNA의 이중가닥 수선 매커니즘이 상동 재조합에 비해 비상동말단연결(Non-homologous end joining, NHEJ)에 극단적으로 치우쳐져 있기 때문에 다른 종에 비해 그 효율이 매우 떨어진다. 이러한 문제들로 인해 최근까지 버섯에서 형질전환방법에 의한 품종개발은 거의 이뤄지지 못하고 있었다.

그러나 최근 들어 유전자 가위로 잘 알려진 CRISPR/Cas9 시스템을 이용한 유전자 교정 기법이 개발됨에 따라 버섯에서도 유전자교정 품종을 개발하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. CRISPR/Cas9 시스템은 특정 유전자에 계속해서 절단을 일으켜 유전자 결손을 유도하는데, ATMT와 달리 구성요소들이 벡터 혹은 RNPs(Ribonucleoprotein particles)의 형태로 삽입되기 때문에 원본 유전체에 삽입되지 않고 일시적으로만 영향을 끼치고 일정 시간 뒤에는 자연스럽게 분해되어 사라지게 되므로 흔적이 남지 않는 장점이 있다. 다만 이 시스템을 사용하기 위해서는 호스트 균주의 원형질체 분리와 PEG 형질전환 기술이 필수적이다. 본 연구에서는 새로운 양송이 품종의 개발을 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 적극 활용하기 위해 필수적인 양송이의 원형질체 분리와 PEG 형질전환 기술의 최적화를 시도하였다.

본 연구에서는 모본으로 농촌진흥청 버섯과에서 보유하고 있는 양송이 KMCC00591 균주를 사용하였고, CDA(Compost dextrose agar, Compost extract 40 g/L, Dextrose 10 g/L, malt extract 7 g/L, Agar 16 g/L) 배지로 암조건 하에 24°C에서 2주간 배양하였다(Oh *et al.*, 2021). 배양된 균주는 다시 DT80(Glucose 30 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.02 g/L, FeCl₃·6H₂O 0.01 g/L, MnCl₂·4H₂O 0.0072 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.0088 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.00126 g/L, Thiamine-HCl 0.0004 g/L, Tween80 0.5 mL/L, K₂HPO₄·3H₂O 0.8559 g/L, NaH₂PO₄·H₂O 0.345 g/L, L-asparagine 3.23 g/L, L-phenylalanine 0.62 g/L, L-histidine 0.13 g/L, L-valine

0.44 g/L, DL-methionine 0.15 g/L, pH6.8) 200 mL로 옮기고 암조건 하에 24°C에서 2주간 정지 배양하였다.

배양된 균사 배양액은 Miracloth(Merk, Germany)로 배지를 제거하고 0.6 M sorbitol로 세척하였다. 얻어진 양송이 균사로부터 원형질체 분리를 위해 Lysing enzyme(Sigma-Aldrich, USA)을 기본으로 하여 Cellulase(Sigma-Aldrich, USA), Chimax-N(Amicogen, Korea), Yatalase(Takara, Japan) 효소를 다양한 조합으로 처리하여 원형질체 생산량을 조사하였으며, 각 효소의 조성은 Table 1과 같다. 분리된 균사는 20 ml의 0.6 M Sorbitol에 Table 1에서 제시된 농도의 효소와 1.5 mg/mL의 BSA를 첨가하여 혼합한 후 암조건 하에 24°C에서 4시간 30분 동안 반응하였다.

그 후 다시 Miracloth로 균사를 거르고 0.6 M sorbitol 용액 20 mL로 세척한 후, 걸러진 용액을 ×1000 g, 4°C에서 15분간 원심분리하고 상층액을 조심스럽게 제거했다. 다시 0.6 M sorbitol 용액 50 mL을 첨가하여 현탁한 후에 동일 조건으로 다시 원심분리하고 상층액을 제거한 후 0.6 M sorbitol을 1 mL 첨가하여 현탁하였다. 현탁액은 Hemocytometer(Mariefeld Superior, Germany)를 이용하여 현미경으로 각 효소 조성별로 원형질체 수를 확인하였다. 그 결과 Lysing enzyme, Yatalase, cellulase, Chimax-N을 모두 첨가했을 때 가장 높은 원형질체 수를 확인할 수 있었다(Table 1). 또한 Lysing enzyme을 제외하고 Chimax-N이 원형질체 분리 효율에 가장 큰 영향을 미쳤고, Yatalase만 처리했을 때에 비하여 약 10배 높은 효율을 보였다. Cellulase의 경우 단독으로 처리했을 때는 영향이 미미한 것으로 확인되었지만, 다른 효소와 함께 처리하였을 때 균사 찌꺼기가 확연히 줄어드는 효과가 있었다(Fig. 1). 이를 토대로 이후의 원형질체 분리 실험은 Table 1의 3번 조합인 Yatalase를 제외한 Lysing enzyme, Chimax-N, Cellulase의 조합으로 진행하였다.

이렇게 분리된 원형질체는 HygromycinB 저항성 유전자인 *hph* 유전자가 포함된 pHA₁C 벡터에서 프로모터 서열을 *A. bisporus*의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*gpd*) 유전자의 프로모터로 교체하여 PEG 형질전환을 시도했

Table 1. Yield of protoplasts according to enzyme composition.

| No. | Enzyme composition(mg/mL) | | | | Number of Protoplast(×10 ⁷ /mL) |
|-----|---------------------------|----------|----------|-----------|--|
| | Lysing enzyme | Chimax-N | Yatalase | Cellulase | |
| 1 | 10 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 15.1 |
| 2 | 10 | 2.5 | 2.5 | | 9.3 |
| 3 | 10 | 2.5 | | 2.5 | 13.7 |
| 4 | 10 | 2.5 | | | 11.7 |
| 5 | 10 | | 2.5 | 2.5 | 1.6 |
| 6 | 10 | | 2.5 | | 1.3 |
| 7 | 10 | | | 2.5 | 0.19 |
| 8 | 10 | | | | 0.24 |

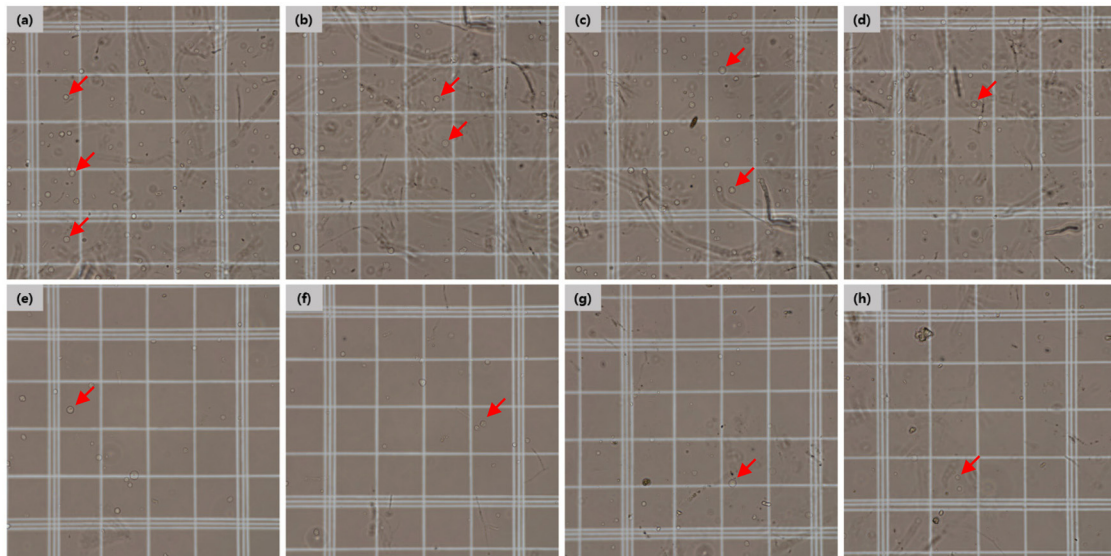


Fig. 1. Protoplast of *Agaricus bisporus*. (a) Lysing enzyme, Chimax-N, Yatalase and cellulase; (b) Lysing enzyme, Chimax-N and yatalase; (c) lysing enzyme, Chimax-N and cellulase; (d) lysing enzyme and Chimax-N; (e) lysing enzyme, yatalase and cellulase; (f) lysing enzyme and yatalase; (g) lysing enzyme and cellulase; (g) lysing enzyme. Red arrows indicate protoplasts.

다(Kim *et al.*, 2016). 특히, DNA와 원형질체의 세포막과 결합하여 원형질체 내부로의 DNA 이동에 영향을 주는 것으로 알려진 Spermidine을 실험 과정에 추가하여 PEG형질전환의 효율을 끌어올렸다(Li *et al.*, 2006). 먼저 160 μ L의 양송이 원형질체 현탁액(10^8 /mL)과 pHAtC 벡터 10 μ g, 50 mM spermidine 5 μ L, PTC 용액(40% PEG3350, 100 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 50 μ L을 천천히 섞고, 얼음에서 45분간 반응시켰다. 그 후 1 mL의 STC 용액(0.6 M sorbitol, 100 mM CaCl_2 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 첨가하고 실온에서 25분간 반응시킨 후 $\times 4150$ g, 4°C에서 5분간 원심분리 하였다. 침전물이 다시 뜨지 않도록 주의하여 상층액을 제거하고, 500 μ L의 STC 용액으로 다시 현탁하고 $\times 1620$ g, 4°C에서 5분간 원

심분리하고 상층액을 제거하는 과정을 반복하였다. 그 후 0.6 M sorbitol이 첨가된 CDB 배지 1 mL에 현탁하고 24°C에서 암조건 하에 24시간 동안 배양했다. 배양된 원형질체들은 0.6 M sorbitol이 첨가된 CDB 배지 5 mL에 low-melting point agarose를 50 mg 첨가하고 전자레인지로 가열하여 녹인 후, 37°C로 식히고 30 mg/L hygromycin B를 첨가한 용액과 섞은 후 1차 선별 배지(Compost extract 40 g/L, Dextrose 10 g/L, malt extract 7 g/L, D-Sorbitol 109.3 g/L, Agar 16 g/L, hygromycinB 30 mg/L) 위에 부어서 얇게 도포했다. 원형질체들을 도포한 배지는 24°C에서 암조건 하에 일주일간 배양했고, 자라나오는 균사들의 숫자를 확인하였다(Fig. 2).

그 결과, 벡터가 첨가되지 않은 대조군에서는 콜로니가

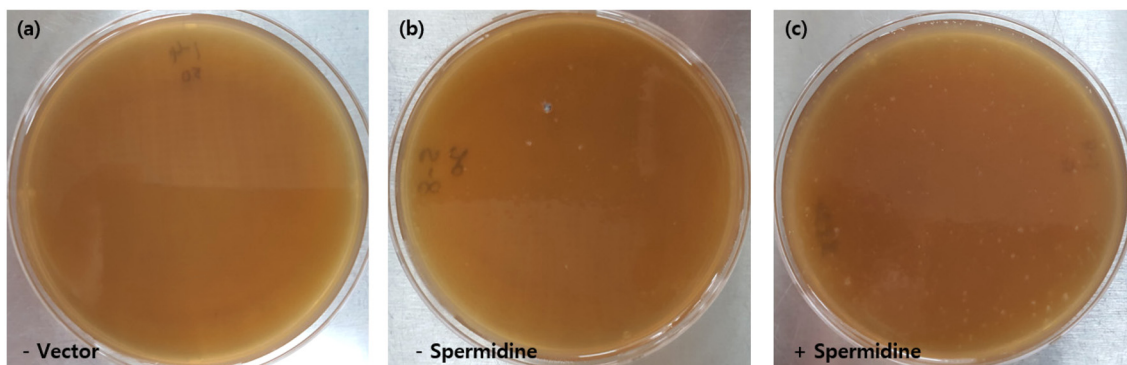


Fig. 2. Regeneration of transformants on 1st selection media. (a) Protoplast that did not treated vector(control). No colony was observed;(b) vector treated protoplast without spermidine. 1.3×10^1 of colonies were observed;(c) vector treated protoplast with spermidine. 1.27×10^3 of colonies were observed.

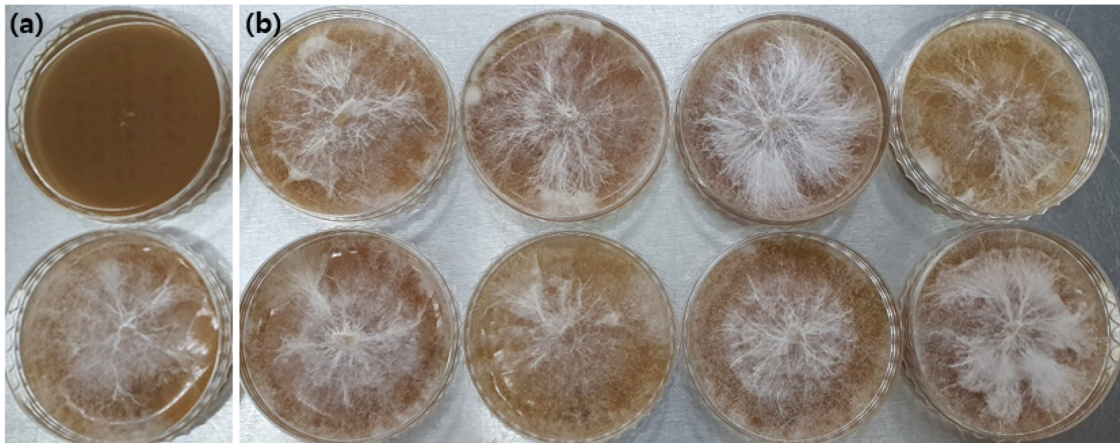


Fig. 3. Isolated transformants on 2nd selection media. (a) Original strain(KMCC00591) on 2nd selection media(up) and CDA without hygromycinB(down). No growth was observed on 2nd selection media;(b) isolated transformants on 2nd selection media.

확인되지 않았지만 벡터를 첨가한 각 샘플들에서는 균사체 콜로니들을 확인할 수 있었다. 특히 실험 과정에 spermidine을 추가한 샘플의 경우 그렇지 않은 샘플에 비해 약 100배 가량 높은 콜로니 숫자를 확인할 수 있었다. 또한 1차 선별 배지에서 균사 생장이 확인된 각 균사 콜로니들은 2차 선별 배지(Compost extract 40 g/L, Dextrose 10 g/L, malt extract 7 g/L, Agar 16 g/L, hygromycinB 50 mg/L)로 계대하여 2주간 배양하였고, 원본 균주와 달리 HygromycinB에 저항성을 가지고 있어 정상적으로 균사 생장을 하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

적 요

현재 양송이 품종의 개발은 1980년대에 개발된 방법에 의존하여 진행되고 있다. 유전자가위를 이용한 유전자 교정 기술이 다양한 분야에서 각광받고 있고, 이 기술을 버섯 육종에도 적용하기 위하여 진행된 이 연구에서는, CRISPR/Cas9 활용에 필수적인 원형질체 분리 효율을 1.0×10^8 /mL까지 안정적으로 끌어올렸고, spermidine을 이용하여 PEG 형질전환의 효율 또한 기존 방법에 비해 100배가량 끌어올렸음을 보고한다.

감사의 글

본 결과물은 농촌진흥청 신유종기술실용화사업단 ‘미래

시장 대응 유전자 교정기술 활용 양송이 육종 소재 개발 (PJ01516501)’ 주관과제의 예산을 지원받았습니다.

REFERENCES

Royse DJ, Baars J, Tan Q. 2017. Current Overview of Mushroom Production in the World. *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications* 5-13.

MAFRA. 2020. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs 2019. 64-67.

Sonnenberg AS, Baars JJ, Gao W, Visser RG. 2017. Developments in breeding of *Agaricus bisporus* var. *bisporus*: progress made and technical and legal hurdles to take. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(5): 1819-1829.

Oh YL, Jang KY, Oh MJ, Im JH. 2021. Development of a spawning method using liquid inoculum of *Agaricus bisporus*. *J mushroom* 19(2): 109-113

Kim H, Kim ST, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang BC, Ahn HM, Bae S, Kim JS, Kim SG. 2016 A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol* 58(8): 705-712

Gang Li, Ruixue Li, Qiuyun Liu, Qiang Wang, Min Chen, Baojian Li. 2006. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms. *FEMS Microbiol Lett* 256(2): 203-208

Chen X, Stone M, Schlaghauser C, Romaine CP. 2000. A Fruiting Body Tissue Method for Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4510-4513.