

## 紫外線照射에 의한 노랑느타리버섯擔子胞子の 營養要求性 菌株 選拔에 관한 研究

李娟姬 · 朴容煥\* · 劉英福\* · 閔庚喜

淑明女子大學校 理科學科 · 農村振興廳 農業技術研究所 菌科科\*

### Isolation of Auxotrophic Mutants from Basidiospores of *Pleurotus cornucopiae*

Yeon-Hee Lee, Yong-Hwan Park\*, Young-Bok Yoo\* and Kyung-Hee Min

Department of Biology, College of Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140 and

Department of Applied Mycology and Mushroom, Institute of Agricultural Sciences\*, Suweon 170, Korea

**Abstract:** After treatment of basidiospores of *P. cornucopiae* with ultraviolet light, 84 putative mutants from 4671 isolates were obtained. The highest proportion of auxotrophic mutants was obtained from the isolates irradiated to give 0.4~1.0% survival. Fourteen auxotrophs were selected for protoplast fusion and each genetic marker was identified.

**Keywords:** UV mutagenesis of basidiospores, Auxotrophs, *Pleurotus cornucopiae*, Basidiomycetes.

高等菌類인 basidiomycetes는 basidiocarp라는 子實體를 갖고 있는데 이를 버섯이라 하며 버섯은 食用 및 藥用으로 사용되어지고 있고 특히 최근 연구결과에 抗癌效果가 있는 것이 알려져 (Gregory 등, 1966; Chihara 등, 1970; Shim, 1981; Kim 등, 1983) 세계적으로 소비가 증가하고 있다. 이 결과 버섯의 品種開發 및 遺傳研究의 重要性이 높아져 가고 있는데 이 연구의 기본단계로 mutation으로 유발된 營養要求性 菌株를 선 발하는 것이 필요하다. 담자균류에서 이러한 mutant 선 발은 *Agaricus bisporus* (Raper 등 1972), *Phanerochate chrysosporium* (Gold 등, 1982), *Pleurotus ostreatus*와 *Pleurotus florida* (Yoo 등, 1985a), *Pleurotus sajor-caju* (Go, 1985), *Lentinus edodes* (Yoo 등, 1985 b)에서 보고되어졌다.

버섯의 品種開發 方法 중의 하나인 原形質體 融合 에서는 融合菌株 선 발을 위해서 最小培地에서 자라지 않는 營養要求性 菌株를 선 발하는 것이 필수적이라고 할 수 있는데 Yoo 등 (1984)은 *P. ostreatus*와 *P. florida*의 영양요구성 균주의 原形質體를 PEG-Ca<sup>++</sup> 처리로 융합하여 母菌株의 중간특성을 갖는 버섯을 만들었다.

본 실험은 노랑 느타리 버섯의 遺傳 研究 및 다른 느타리種과의 융합을 위해서 노랑 느타리의 자실체에 서 얻은 담자포자를 자의선에 조사하여 영양요구성 균주를 선 발하였다.

#### 재료 및 방법

##### 균주 및 담자포자 채취

본 실험에 사용한 균주는 농촌진흥청 농업기술연구소 보존균주인 *Pleurotus cornucopiae* (Paul ex Pers) Roll ASI 2011 즉 노랑 느타리이고, 담자포자 채취는 다음과 같이 하였다.

멸균된 Petri dish위에 살균한 가느다란 철사를 놓고 그 위에 노랑 느타리의 성숙된 자실체를 Petri dish에 닿지 않게 놓아 공기를 차단하여 20~24 시간 두어 포자를 낙하시킨 다음 4°C 냉장고에 보관하여 사용하였다. 또한 노랑 느타리의 원형질체를 Yoo 등 (1984)의 방법에 의해 분리하여 본 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 배지는 버섯 완전배지 (mushroom complete medium, MCM; Raper 등, 1972)와 버섯 최소배지 (mushroom minimal medium, MMM; Raper

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 <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |            | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |                  |          |            |           |            |

\* Amino acid 0.5 mg/ml.

Vitamin and nucleic acid components 0.1 mg/ml.

\*5: Folic acid, isoleucine, methionine, pyridoxine, arginine, serine, thymine, tyrosine.

\*9: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

등, 1972)로 버섯 완전배지의 성분은 yeast extract 2.0 g, peptone 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, glucose 20.0 g, bacto-agar 20.0 g이고 버섯 최소배지의 성분은 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.46 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, glucose 20.0 g, bacto-agar 20.0 g이며 증류수 1 l에 녹여 120 °C에서 20~30 분 멸균하여 사용하였다.

**돌연변이 유발**

노랑 느타리의 담자포자 수를 3.0×10<sup>5</sup>~5.0×10<sup>5</sup> ml<sup>-1</sup>정도로 하여 Petri dish당 10 ml씩 넣고 30분전에 미리 가동시켜 놓은 ultra violet lamp (6 W)에서 10 cm 떨어진 곳에 놓은 후 magnetic stirrer로 저으면서 암상 상태에서 정해진 시간 별로 (10~120 초) UV light를 照射하였다. UV를 쬐인 후 back mutation을 막기 위해 10 분이상 암상태를 유지시킨 다음에 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> ml<sup>-1</sup> 농도로 희석하여 0.2 ml씩 MCM Petri dish에 분주하여 28 °C에서 5~7일동안 배양하였다. 또한 노랑 느타리 원형질체수를 10<sup>6</sup> ml<sup>-1</sup>정도로 하여 위와 같은 방법으로 UV처리를 하여 osmotic stabilizer (0.6M sucrose)가 첨가된 MCM에 0.5 ml씩 분주한 후 agar 농도 0.75 %인 동일한 soft agar 배지로 overlaying한 다음 완전히 굳혀 28 °C에서 6~8일 동안 배양하여 생존율을 조사하였다.

**영양요구성 균주선발**

본 실험에서는 노랑 느타리의 담자포자를 이용해 영양요구성 균주를 선발하였다. UV 처리후 MCM에서 배양되어 발아된 colony들을 thiamine-HCl과 DL-aspa-

ragine이 첨가되지 않은 MMM에 16 균주씩 멸균된 toothpick으로 가능하면 MCM을 적게하여 옮겨서 28 °C에서 7~10 일동안 배양시켰다. MMM에서 자라지 않은 균주를 다시 MMM에 12 균주씩 옮겨서 7~10일동안 배양시킨 다음 MMM에서 자라지 않은 균주를 MMM과 MCM에 옮겨 MCM에서는 잘 자라고 MMM에서는 자라지 않는 균주를 선발하였다. 이러한 돌연변이 균주들의 유전 marker를 확인하기 위해서 먼저 MMM에 yeast extract 1 mgml<sup>-1</sup>, casamino acid 5 mg ml<sup>-1</sup>, nucleic acid components 50 µgml<sup>-1</sup>을 첨가하여 각각의 배지를 만든 후 점종하여 검정한 후 Holliday 방법 (1956)을 수정하여 만든 Table I의 용액으로 최종유전 marker를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

자의선이 노랑 느타리 포자와 원형질체 생존율에 미치는 영향은 Fig. 1과 같다. 노랑 느타리 원형질체에 자의선을 5, 7.5, 10, 20 초로 조사한 결과 5 초일 때 생존율이 6.5 %로 대부분의 원형질체가 재생능력을 잃었고, 10 초에서는 3.5 %의 생존율을 나타내었으며 20 초일때는 거의 재생 능력을 상실하였다. 또한 노랑 느타리 포자에 자의선을 5~120 초까지 조사한 결과 5 초에서 50 %정도가 발아하였고 120 초에서는 0.005 %의 생존율을 나타냈다. 이러한 결과로 볼 때 원형질체가 자의선에 훨씬 더 민감하다는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서는 담자포자를 이용하여 영양요구성 균주를

선발하였는데 자외선을 5~120초까지 조사하여 얻은 총 4,671 colonies 중 mutant로 생각되는 84균주를 얻어 1.79%의 유발율을 나타내었으며 특히 포자생존율이 0.4~1.0%인 60, 70 초일때 높은 유발율을 얻었다 (Table II). 일반적으로 mutants는 포자생존율이 5~15%일때 선발되나 노랑 느타리에서는 다소 낮은 0.4~1.4%에서 선발되었다(Pontecorvo 등, 1953). 선발된 84 균주중 실제 원형질체 융합에 이용할 수 있는 14 균주의 유전 marker를 결정하였는데, 14 auxotrophic

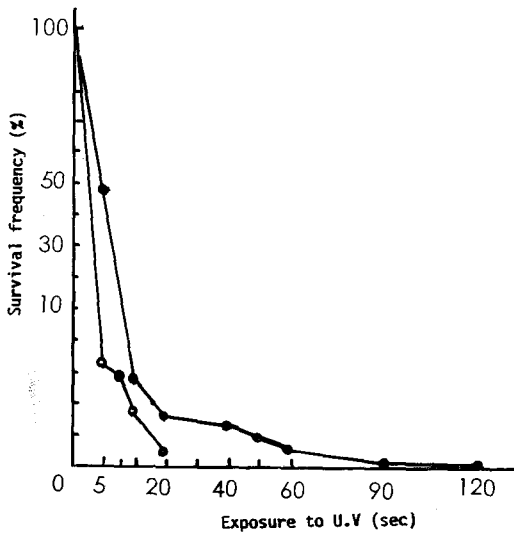


Fig. 1. Effects of ultraviolet light on the survival of *P. cornucopiae* spores (●) and protoplasts (○).

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

| Exposure time (sec) | Isolates (No.) | Putative auxotrophs (No.) | Among isolates (%) |
|---------------------|----------------|---------------------------|--------------------|
| 5                   | 102            | 0                         | 0                  |
| 10                  | 94             | 0                         | 0                  |
| 20                  | 98             | 1                         | 1.02               |
| 30                  | 160            | 3                         | 1.87               |
| 40                  | 1,124          | 22                        | 1.95               |
| 50                  | 1,186          | 23                        | 1.93               |
| 60                  | 857            | 20                        | 2.33               |
| 70                  | 384            | 12                        | 3.12               |
| 90                  | 206            | 3                         | 1.45               |
| 120                 | 6              | 0                         | 0                  |
| Total U.V           | 4,671          | 84                        | 1.79               |

Table III. Auxotrophic mutants of *P. cornucopiae*.

| Strain   | Genetic marker* | Exposure time(sec) |
|--|-----------------|--------------------|
| Amino acid-requiring strains                   |                 |                    |
| ASI 2-26-c 73                                  | Gln Orn         | 50                 |
| ASI 2-27-c 94                                  | Gln Cit Ala     | 40                 |
| ASI 2-28-c254                                  | Gln Cit Arg     | 70                 |
| Nucleic acid base-requiring strain             |                 |                    |
| ASI 2-29-c 47                                  | Ade             | 50                 |
| Vitamin-requiring strains                      |                 |                    |
| ASI 2-30-c 27                                  | Ino Cho Pyr     | 40                 |
| ASI 2-31-c217                                  | Ino Cya         | 70                 |
| ASI 2-32-c129                                  | PABA            | 50                 |
| Amino acid/Nucleic acid base-requiring strains |                 |                    |
| ASI 2-32-c 6                                   | Orn Thy         | 60                 |
| ASI 2-34-c 88                                  | Orn Pro Ade     | 40                 |
| Amino acid/Vitamin-requiring strains           |                 |                    |
| ASI 2-35-c 56                                  | Orn Arg PABA    | 50                 |
| ASI 2-36-c167                                  | Orn Ino         | 60                 |
| ASI 2-37-c222                                  | Orn PABA        | 70                 |
| ASI 2-38-c132                                  | Orn Pan         | 50                 |
| ASI 2-39-c 43                                  | Cit Pan         | 50                 |

\* Ade (Adenine), Ala (Alanine), Arg (Arginine), Cho (Choline), Cit (Citrulline), Cya (Cyanocobalamin), Gln (Glutamine), Ino (Inositol), Orn (Ornithine), PABA (para-Aminobenzoic acid), Pan (Pantothenic acid), Pyr (Pyridoxine), Thy (Thymine).

mutants의 유전 marker를 종류에 따라 분류해 보면 amino acid-requiring strain은 모두 3 균주로 glutamine/ornithine 1균주, glutamine/citrulline/alanine 1, glutamine/citrulline/arginine 1 균주이며, nucleic acid base-requiring strain은 adenine 요구성 1 균주이고, vitamin-requiring strain은 3 균주로 inositol/choline chloride/pyridoxine 1 균주, inositol/cyanocobalamin 1, p-aminobenzoic acid 1 균주로 되었고, amino acid/nucleic acid base-requiring strain으로는 ornithine/thymine 1 균주, ornithine/proline/adenine 1 균주이고 amino acid/vitamin-requiring strain은 5 균주로 ornithine/arginine/p-aminobenzoic acid 1 균주, ornithine/inositol 1, ornithine/p-aminobenzoic acid 1, ornithine/pantothenic acid 1, citrulline-pantothenic acid 1 균주로 분류되었다(Table III).

적 요

노랑 느타리버섯의 유전 연구 및 다른 느타리종과의 융합을 위해서 노랑 느타리의 담자포자에 자의선을 조사하여 영양요구성 균주를 선발하였다.

노랑 느타리 포자에 UV를 조사한 결과 UV조사시간이 40~70초이고 생존율 0.4~1.4% 일때 많은 mutants를 얻을 수 있었고, 선발된 14 auxotrophic mutants의 유전 marker는 amino acid-requiring strain 3 균주, nucleic acid base-requiring strain 1 균주, vitamin-requiring strain 3 균주, amino acid/nucleic acid base-requiring strain 2 균주, amino acid/vitamin-requiring strain 5 균주로 되었다.

문 헌

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fuckuoka, F. (1970): Fraction and purification of the polysaccharides with marked activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* 30:2776-2781.

Go, S.J. (1985): Studies of the mating characters of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing. and its protoplast formation and fusion with *Pleurotus ostreatus*. M. Sc. Thesis Chungnam National University.

Gold, M.H., 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.

Gregory, F.J., Healy, E.M., Agersborg, H.P.K. and Warren, G.H. (1966): Studies on antitumor subs-

tances produced by basidiomycetes. *Mycologia* 58: 80-90.

Holliday, R. (1956): A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. *Nature* 178: 987.

Kim, J.S., Choi, E.C., Kim, H.R., Lee, C.K., Lee, C.O., Chung, K.S., Shim, M.J. and Kim, B.K. (1983): Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XXXVII). *Kor. J. Mycol.* 11:151-157.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D. and Bufton, A.W.J. (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advanced in Genetics* 5:141-238.

Raper, C.A., Raper, J.R. and Miller, R.E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64:1088-1117.

Shim, M.J. (1981): Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea. *Kor. J. Mycol.* 9: 49-66.

Yoo, Y.B., Byun, M.O., Go, S.J., You, C.H., Park, Y.H. and Peberdy, J.F. (1984): Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 12:164-169.

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

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

<Received June 9, 1986; Accepted July 3, 1986>