

靈芝의 營養要求性菌株의 誘起와 靈芝와 잔나비겉상버섯의 種間原形質體融合에 關한 研究

嚴承德·蔡永岩·朴容煥*·劉英福*

서울대학교 農科大學 農學科·農村振興庁 農業技術研究所 菌根科*

Studies on Auxotroph Induction of *Ganoderma lucidum* and Interspecific Protoplast Fusion between *G. lucidum* and *G. applanatum*

Seung-Duk Um, Young-Am Chae, Yong-Hwan Park* and Young-Bok Yoo*

Department of Agronomy, College of Agriculture, Seoul National University,

Suwon 440-744 and Applied Mycology and Mushroom Division,

Agricultural Sciences Institute, R.D.A.* Suwon 440-707, Korea

ABSTRACT: Auxotrophic mutants were obtained by UV-irradiation to mycelium of *Ganoderma lucidum*. Induction rate of auxotrophs was 5.78%. Interspecific fusion products of protoplasts were obtained by polyethylene glycol induced fusion of protoplasts from auxotrophic mutants of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma applanatum*. Fusion products were selected by means of the comparison with the mycelial growth rate and colony morphology. Fusion products were confirmed by mycelial morphology and esterase isozyme pattern. Some segregants were observed and fusion product produced fruit bodies.

KEYWORDS: Auxotrophic mutants, Interspecific fusion products, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, Segregants, Fruit bodies.

버섯에 對한 品質向上과 生産性 增大를 爲하여 品質改良과 新品種의 育種에 對한 研究가 오랫동안 수행되었으나, 실제로 高等菌類의 複雜한 遺傳樣式과 種間 뿐 아니라 같은 種內의 系統間에도 있는 不和合性으로 因하여 屬間은 물론 種間의 菌絲融合에 의 한 育種이 어려운 形편이다.

Ferenczy 등(1974)이 *Geotricum candidum*에서 種內原形質體融合을 성공시킨 이래로 異種菌絲에서 얻은 原形質體間의 融合에 의 한 體細胞雜種菌株의 획득은 産業微生物 및 食用버섯의 育種面에서 큰 관심을 갖게 되었다(Peberdy, 1980a, 1980b; Yoo *et al.*, 1984, 1987).

原形質體融合의 頻度는 처음 方法上의 문제로 매우 낮았다. 즉, 遠心分離에 의해 원형질체를 응집시키는 方法이 사용되었는데(Ferenczy *et al.*, 1974), 遠心分離溶液에 KCl, NaCl 등 滲透壓調節劑를 添加함으로 해서 融合率이 向上되었다고 보고

되었으며(Ferenczy *et al.*, 1975a), 특히 polyethylene glycol(PEG)와 CaCl₂의 使用으로 融合率이 과거보다 1000배 이상 向上되었다고 하였다(Ferenczy *et al.*, 1975b). PEG의 效率에 영향을 미치는 條件들에 대한 研究가 보고되었는데(Ferenczy *et al.*, 1976), PEG 4000과 PEG 6000이 똑같이 效果的이었고 PEG 濃度를 25~30%로 하여 使用하고, 여기에 calcium ion을 100 mM 添加하고 pH를 8.0~9.0으로 조정하는 것이 融合率을 效果的으로 向上시켰다고 하였다. 融合菌株의 選拔 및 特性化는 菌叢의 形態와 分生孢子의 색깔(Anne *et al.*, 1976; Ferenczy *et al.*, 1974), 營養要求性에 對한 相補性(Ferenczy *et al.*, 1975b; Ferenczy *et al.*, 1976)과 Isozyme의 band pattern(Anne & Peberdy, 1981; Kevei, 1985) 등이 利用되고 있다.

靈芝의 抗癌物質의 大量生産을 爲한 育種은 抗癌物質이 protein-bound polysaccharide이므로(Kim

et al., 1980; 姜 等, 1981) gene-cloning 方法보다는 原形質體融合에 의해서 갓이 크고 두꺼운 多産性的 片角芝 菌株를 개발하는 것이 効率的이라고 판단되며, 이와같은 靈芝 育種의 기초자료를 얻고자 靈芝菌絲體에서 營養要求性 突然變異菌株를 誘起하였고, 靈芝와 잔나비결상버섯간의 種間原形質體融合과 融合菌株의 確認分析을 實驗하였는 바 그 結果를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

菌 株

營養要求性菌株의 選拔實驗에서는 農村振興廳 農業技術研究所의 保存菌株인 韓國產 靈芝 *Ganoderma lucidum* ASI 07009를 使用하였으며, 種間原形質體融合 實驗에서는 위에서 얻은 *G. lucidum* ASI 7-7-1 07009-17과 農業技術研究所 保存菌株인 잔나비결상버섯 *G. applanatum* ASI 7-15-a 07031-1124(Hypoxanthine/Thymine-requiring)을 使用하였다.

培 地

버섯最小培地(MMM; Raper *et al.*, 1972)와 SCM을 使用하였는데 培地造成은 다음과 같다($g \cdot l^{-1}$). 즉, MMM은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.46, K_2HPO_4 1.0, Thiamin-HCl 120 μg , glucose 20.0, Bacto-agar 20.0이며, SCM은 yeast extract 15.0, peptone 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.46, K_2HPO_4 1.0, glucose 50.0, Bacto-agar 20.0이다.

營養要求性菌株의 選拔

營養要求性菌株를 얻는데는 이미 보고된 方法(Yoo *et al.*, 1985)에 따랐으며, 6W·253.7 nm의 UV-lamp를 使用하였다.

原形質體의 融合

Kevei & Peberdy(1977)가 실시한 方法을 應用하였다.

두 菌株의 原形質體를 同一한 濃度로 하여 融合 tube에 넣고 500×g에서 10分間 遠心分離하여 上等液을 제거한 다음, 30%의 PEG溶液(30% PEG 4000+100 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ +50 mM glycine; pH 8.0) 1ml를 添加하여 30°C에서 10分間 處理하였다. 다시 5ml의 滲透壓調節劑를 添加하여 1回 洗滌한 후에 適當하게 희석하여, 還元用 培地에 分注하고

0.7% agar 培地를 overlaying하여 30°C에서 10~15日間 培養하였다.

融合菌株의 選拔·確認

Back mutation 검정에서 母菌株들이 다소 還元되었으므로, 融合後에 還元된 菌株들과 母菌株를 生長速度, 菌叢의 形態 등을 比較하여 融合菌株를 選拔하였다.

選拔된 融合菌株는 繼代培養하여 形態의 母菌株와 比較하고, esterase isozyme pattern 分析을 하여 融合여부를 確認하였다. 電氣泳動은 Poulik(1957)의 方法을 應用한 pantaphor system으로 分離 gel은 10% polyacrylamide porosity slab gel을 使用하였으며, discontinuous buffer system으로 pH 6.9~8.89의 buffer를 使用하였다.

確認된 融合菌株는 참나무톱밥 培地에서 子實體形成을 爲하여 栽培實驗을 하였다.

結果 및 考察

營養要求性菌株의 選拔

靈芝는 일반적인 條件에서 孢子發芽가 되지 않으므로 菌絲體를 利用하여 mutagen을 處理하였는데, UV를 5, 10, 20分을 照射하였을 때 5, 10分에서 各 各 5.86%, 6.25%의 突然變異株를 얻었으나 20分에서는 營養要求性菌株를 얻지 못하였다. 돌연변이를 誘起하는데는 mutagen의 臨界點이 있는 것으로 생각된다.

靈芝에서 總 1392 colony를 검정하여 80개의 營養要求性菌株를 얻었고 이들 中에서 13개의 菌株를 供試하여 遺傳 marker를 確認하였다(Table I).

原形質體融合

Fig. 1에서 볼 수 있듯이 서로 不和合性을 나타내는 *G. lucidum* ASI 7-7-1 07009-17과 *G. applanatum* ASI 7-15-a 07031-1124를 使用하여 種間原形質體融合을 한 結果 2.03%의 融合率을 얻었다.

融合菌株의 選拔·確認

還元菌叢의 比較: 靈芝는 菌絲生長이 빠르고 매우 성글게 자라고, 잔나비결상버섯은 菌絲生長이 느리고 密하게 자라는데, 融合菌株는 生長速度와 菌絲의 密한 정도가 두 母菌株의 中間 정도이고 菌叢의 中央部에는 연한 노랑색을 띄었다(Fig. 2, 3).

繼代培養後 形態比較: 選拔된 融合菌株를 繼代培養을 한 結果, 많은 菌株가 Fig. 4에서 보듯이 菌絲

Table I. Auxotrophic mutants of *G. lucidum*

Mutant number	Genetic marker	Exposure time (min)
Vitamin-requiring		
ASI 7-1-107009-7	PABA Cya Asc	10
ASI 7-2-107009-8	Rib PABA Asc	10
ASI 7-3-107009-10	PN Asc	10
ASI 7-4-107009-12	PABA Asc	10
ASI 7-5-107009-13	Asc	10
ASI 7-6-107009-15	Cya Nia	10
ASI 7-7-107009-17	Nia	10
ASI 7-8-107009-18	Nia	10
ASI 7-9-107009-22	Asc	10
ASI 7-10-107009-25	PABA Rib Nia	10
ASI 7-11-107009-46	Nia PABA	10
ASI 7-12-107009-48	Asc PABA	10
Nucleic acid components-requiring		
ASI 7-13-107009-29	Gua Thd Hyp Ura	10

의 形態는 잔나비결상버섯을 닮았지만 融合菌株의 특징인 環이 觀察되었고 生長速度는 母菌株의 中間 정도이었다. 하지만 몇 菌株에서는 菌叢分離(segregation)를 관찰할 수 있었는데 (Fig. 5) 이는 細胞內 小器官의 不均等한 分配나 genome의 不安定한 배열 등에 의해서 일어나는 것으로 생각된다.

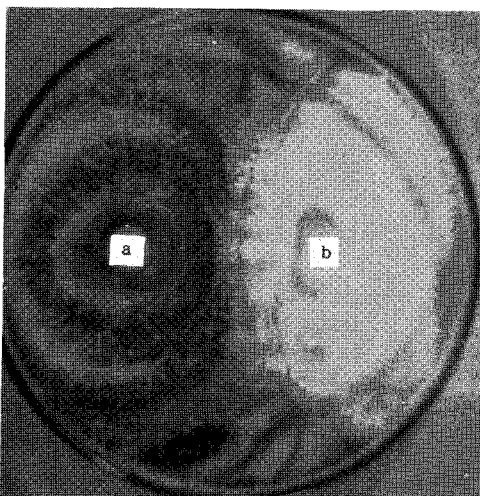


Fig.1. Morphology of anastomosis between *G. lucidum*(a) and *G. applanatum*(b).

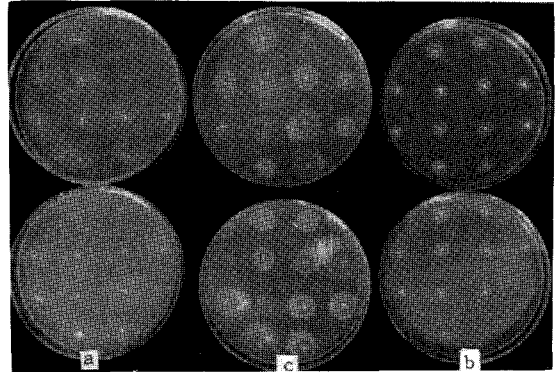


Fig.2. Morphology of colonies regenerated after protoplast fusion. (a) *G. lucidum* (b) *G. applanatum* (c) fusion products

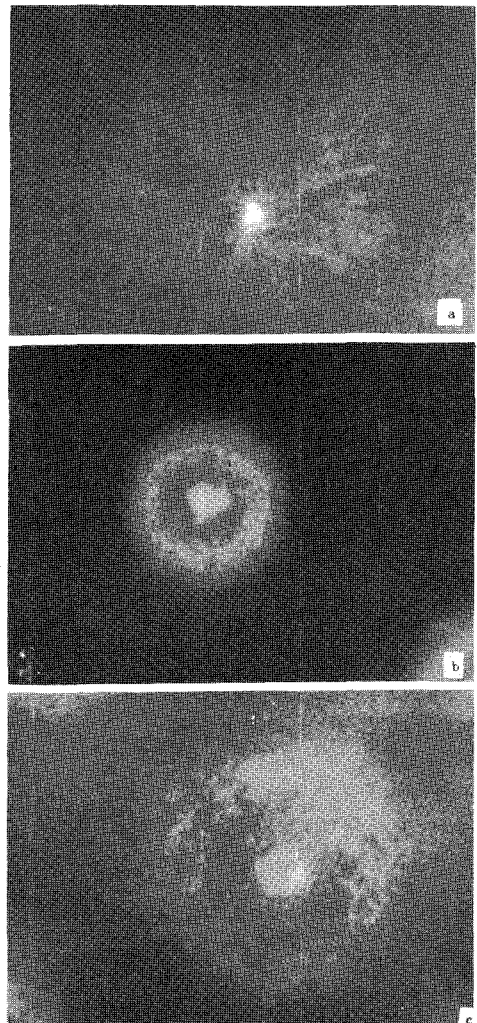


Fig.3. Morphology of amplified colonies in Fig.2. (a) *G. lucidum* (b) *G. applanatum* (c) fusion products

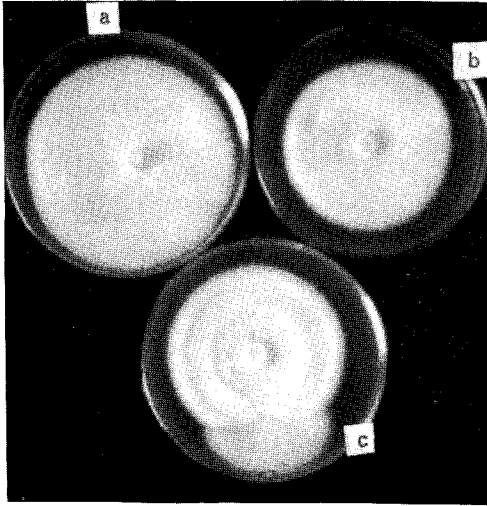


Fig.4. Comparison of mycelium between parents and fusion product.

(a) *G. lucidum* (b) *G. applanatum* (c) fusion product

Esterase isozyme pattern : 두 母菌株를 함께 培養한 것(a)과 靈芝(b)는 서로 구별할 수 없었고, 融合菌株中에는 잔나비결상버섯의 band pattern(c)과 같은 것(d)과 새로운 band가 생긴 것(e, f)을 觀察할 수 있었다(Fig. 6).

Isozyme pattern을 보면, 混合培養된 것(a)과 融合菌株는 서로 확실히 구별되며, 融合菌株中에는 不安定하여 잔나비결상버섯으로 分離가 된 것(d)과 完全히 雜種化된 것(e, f)를 確認할 수 있었다.

融合菌株의 Isozyme pattern중에는 母菌株와 같은

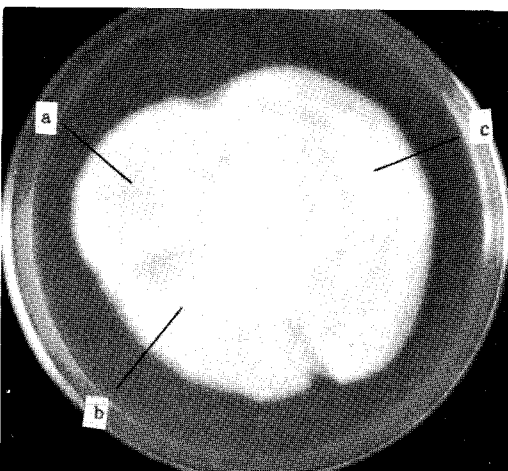


Fig.5. Segregation of fusion products.

(a) *G. lucidum* type (b) *G. applanatum* type (c) fusion product type

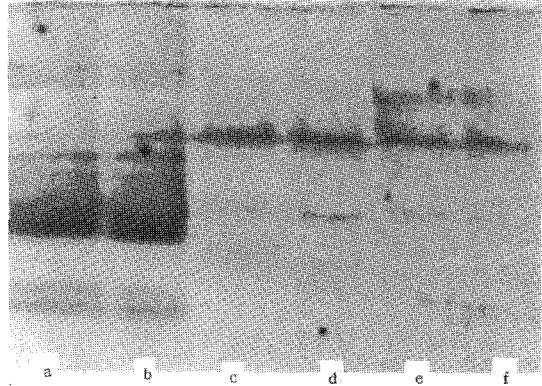


Fig.6. Isozyme pattern of esterase.

(a) *G. lucidum* with *G. applanatum* (b) *G. lucidum* (c) *G. applanatum* (d:P513) (e:P517) (f:P528) fusion products

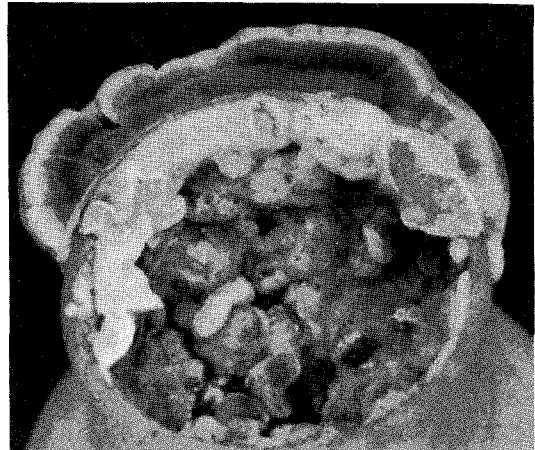


Fig.7. Morphology of fruiting body of fusion product(P513).

pattern을 보이는 것도 있다는 보고가 있다 (Anne & Peberdy, 1981).

融合菌株 24系統을 참나무톱밥培地에서 栽培한 결과 融合菌株 P513(Fig.6의 band(d))에서 子實體를 觀察할 수 있었다(Fig. 7). 아직 잔나비결상버섯이 發芽하지 않아 子實體의 形態의 比較는 하지 못하였다. 靈芝屬의 子實體는 菌株間의 差異와 環境에 의하여 그 形態가 크게 變한다고 알려져 있다(Part et al., 1986). 따라서 母菌株와 融合菌株間의 子實體 形態 및 分類學上의 差異는 앞으로 研究되어야 할 것으로 사료된다.

摘 要

靈芝의 抗癌物質改良과 新品種의 育成을 爲한 育

種方法으로 제시된 原形質體融合의 기초자료를 얻고자 營養要求性菌株의 選拔, 種間原形質體融合과 融合菌株의 選拔을 實驗하였다.

1. 突然變異 對相體로는 菌絲體, mutagen으로는 紫外線을 사용하였는데 營養要求性菌株의 誘起率은 5.78%이었다.

2. 靈芝와 잔나비결상버섯間 原形質體融合率은 2.03%이었다.

3. 融合菌株는 還元菌叢의 生長速度와 形態를 比較하여 選拔하였고, 繼代培養後의 形態와 esterase isozyme pattern의 分析에 의해서 確認하였으며, 참나무톱밥培地에서 栽培하여 子實體를 觀察하였다.

參考文獻

- Anne, J., Eyssen, H. and De Somer, P.(1976) : Somatic hybridization of *Penicilium roqueforti* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature, London* **262**: 719-721.
- Anne, J. and Peberdy, J.F.(1981): Characterisation of interspecific hybrids between *Penicilium chrysogenum* and *P. roqueforti* by iso-enzyme analysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**(2): 401-408.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M.(1975a): Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *Experimentia* **31**(1): 50-52.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Kjvei, F. and Szegedi, M. (1975b): High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experimentia* **31**(9): 1028-1030.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M., Franko, A. and Rojik, I.(1976): Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion. *Experimentia* **32**(9): 1156-1158.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Zsolt, J.(1974): Fusion of fungal protoplasts. *Nature, London* **248**: 793-794.
- Kevei, F.(1985): Interspecies hybridization after protoplast fusion in *Aspergillus*. In: Fungal protoplasts. ed. J.F. Peberdy, L. Ferenczy. pp.241-257. New York: Marcel Dekker.
- Kevei, F. and Peberdy, J.F.(1977): Interspecies hybridization between *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 255-262.
- Kim, B.K., Chung, H.S. and Yang, M.D.(1980): Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**(2): 107-113.
- Peberdy, J.F.(1980a): Protoplast fusion-a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 23-29.
- Peberdy, J.F.(1980b): Protoplast fusion-a new approach to interspecies manipulation and breeding in fungi. In: *Advances in protoplast research.* ed. L. Ferenczy, G.L. Farkas. pp.63-72. Oxford: Pergamon Press.
- Peulik, M.D.(1957): Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature, London* **180**: 1477-1479.
- Raper, JR. and Raper, C.A.(1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* **8**: 1-9.
- 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 *P. florida* following interspecific protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* **12**(4): 164-169.
- Yoo, Y.B., You, C.H. and Park, Y.H.(1985): Isolation of auxotrophic mutants from basidiospores of *L. edodes*. *Kor. J. Mycol.* **13**(2): 185-189.
- Yoo, Y.B., You, C.H., Park, Y.H., Lee, Y.H., Chang, K.Y. and Peberdy, J.F.(1987): Interspecific protoplast Fusion and sexuality in *Pleurotus*. *Kor. J. Mycol.* **15**(3): 135-141.
- 강창울, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각(1981) : 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구. *한국생화학회지* **14**(2) : 101-112.

Accepted for Publication 19 February