

*Ganoderma lucidum*과 *Ganoderma* sp.의 原形質體 裸出 및 還元

嚴承德·蔡永岩·劉英福*·柳昌鉉*·車東烈*

서울대학교 農科大学 農学科·農村振興庁 農業技術研究所 菌相科

Protoplast Isolation and Reversion from *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma* sp.

Seung-Duk Um, Young-Am Chae, Young-Bok Yoo*,
Chang-Hyun You* and Dong-Yeul Cha *

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: This experiment was carried out to investigate proper conditions for protoplast isolation and reversion from *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma* sp.. In *G. lucidum*, 10 mg. ml⁻¹ Novozyme 234 with 0.6 M sucrose was proper for protoplast isolation. The optimal reaction time of mycelium with lytic enzyme was five hrs. Protoplast isolation from four-day-old mycelium was the most effective. Protoplast isolation from four-day-old mycelium in *G. sp.* was optimum in the combination of Novozyme 234 and β -glucuronidase with 0.6 M sucrose. MCM was suitable for reversion in *G. lucidum* while SCM was good for *G. sp.*. The most effective osmoticum stabilizer for protoplast reversion in *G. lucidum* and *G. sp.* was 0.6 M sucrose.

KEYWORDS: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma* sp., Protoplast isolation and Reversion

原形質體는 還元이나 融合을 利用한 育種이나 二次産物의 生産, 形質轉換, 細胞內 小器宮 및 DNA 分離 等に 利用되고 있으며, 高等菌類의 遺傳研究와 分類學에 크게 공헌하고 있다.

高等菌類에 있어서는 Strunk(1965)가 *Polystictus versicolor*에서 처음으로 原形質體를 裸出·還元시킨 以後에 여러 菌類에서 보고되고 있다.

本 研究는 최근 항암작용, 혈압강하제 等の 效果로 널리 알려져 있는 靈芝와 *G. sp.*(黃芝)의 育種에 필요한 기초자료를 제공하고자 原形質體 裸出과 再生에 관한 몇가지 結果를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

菌 株

農村振興廳 農業技術研究所의 보관 균주인 *Ganoderma lucidum* ASI 07009(靈芝)와 *G. sp.*

ASI 07047을 使用하였다.

培 地

버섯完全培地(MCM; Raper *et al.*, 1972)와 버섯最小培地(MMM, Raper *et al.*, 1972), SCM, GCM(Yoo *et al.*, 1987) 등을 121°C에 20分 멸균하여 使用하였는데 培地成分은 다음과 같다(g. l⁻¹). 즉, MCM은 yeast extract 2.0, peptone 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 20.0, agar 20.0이며, MMM은 MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 20.0, agar 20.0이며, SCM은 yeast extract 15.0, peptone 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 50.0, Bacto-agar 20.0이며, GCM은 Yeast extract 10.0, Bacto-peptone 4.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.46, K₂HPO₄ 1.0, glucose 30.0, sucrose 20.0, Casamino acid 5.0, Bacto-agar 20.0이다.

Table I. Comparison of different commercial enzyme preparations for the release of protoplasts

Enzyme	Protoplast yield ($\times 10^6$)	
	<i>G. lucidum</i>	<i>G. sp.</i>
1. Novozym 234 ^b	6.12	0.88
2. Novozym 234 ^a	3.04	
3. β -glucuronidase ^b	2.72	
4. β -glucuronidase ^a	0.01	
5. Novozym 234 + β -glucuronidase ^b		4.4
6. Novozym 234 + β -glucuronidase ^a	1.73	
7. Novozym 234 + β -D-glucanase ^b		2.35
8. Novozym 234 + β -glucuronidase ^b + β -D-glucanase ^b	2.08	0.96
9. Novozyme 234 + β -glucuronidase + β -D-glucanase ^a	1.83	

a: 5 mg/ml each
b: 10 mg/ml each

滲透壓調節劑

Sucrose, Mannitol, Sorbitol, NaCl을 各各 0.6 M로 하여 pH 조절없이 사용하였다.

細胞壁分解酵素

Novozym 234(Novo Industries, Denmark), β -glucuronidase(Sigma Chem. Co., USA), β -D-glucanase(BDH Chemicals Ltd., U.K.)를 삼투압조절제 1 ml당 5~10 mg 濃度로 하여 單用 또는 混用하였다.

原形質體標出

固型培地에 cellophane membrane을 고르게 편 다음, 培養된 菌絲體를 直徑 5mm의 cork borer로 節斷하여 cellophane membrane 위에 4個씩 接種하여 2~5日씩 必要에 따라 30°C에서 培養하였다. 培養된 colony를 cellophane membrane과 함께 petri-dish에 넣은 다음 酵素液을 4 ml 添加한 다음 reciprocal shaker에 넣고 30°C에서 120 strokes·min⁻¹로 흔들어서 原形質體를 나출하였다.

原形質體還元

標出된 原形質體가 들어있는 酵素液을 sintered glass filter(porosity 1)에 濾過하여 菌絲體를 제거한 후, 500×g에서 15分間 遠心分離하였다. 上等液을 제거하고 남은 原形質體에 滲透壓調節劑를 첨가하여 2回 酵素液을 洗滌하고 原形質體를 적당한 濃度로 稀釋하여 還元用 培地에 分注한 다음 30°C에서

10~15日間 培養하였다.

結果 및 考察

原形質體標出

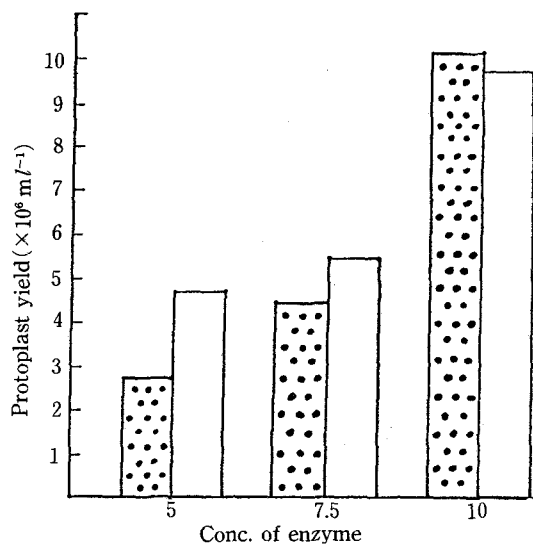


Fig.1. Effect of enzyme concentration on protoplast release from *G. lucidum*. Novozym 234 was used as lytic enzyme at a concentration of 5 mg, 7.5 mg and 10 mg ml⁻¹. The digestions were carried out for 3h(▨) and 4h(□).

細胞壁分解酵素의 濃度 및 種類: 原形質體의 裸出은 *G. lucidum*에서 Novozym 234 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 를 單用하는 것이 混用하는 것보다 效果的이었고, *G. sp.*에서 Novozym 234와 β -glucuronidase를 각각 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 로 混用한 것이 效果가 컸다(Table I).

*G. lucidum*에서 Novozym 234의 濃度を 달리 하여 實驗한 結果 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 에서 效果的으로 原形質體가 裸出되었다(Fig. 1).

Novozyym 234는 *Pleurotus ostreatus* (Byun et al., 1984; Yoo et al., 1985)와 *Volvariella volacea* (Hamlyn et al., 1981)에서 가장 效果적이었으며, 일반적으로 絲狀菌類의 原形質體裸出에는 酵素를 混用하는 것이 좋다고 하였다(Hamlyn et al., 1981; Yoo et al., 1985).

滲透壓調節劑: 무기염류, 糖 및 糖알콜을 使用하여 原形質體裸出에 미치는 影響을 조사하였다(Table II). *G. lucidum*과 *G. sp.*에서 모두 0.6 M sucrose를 사용하는 것이 效果的이었다.

高等菌類에서 0.6 M sucrose가 效果的이라는 보고가 *Pleurotus ostreatus* (Flint, 1982), *Lyophyllum ulmarium* (Yoo et al., 1987) 등 많은 種에서 있었다.

酵素處理時間: *G. lucidum*의 菌絲體와 分解酵素液의 反應時間에 따른 原形質體 裸出量을 조사한 結果(Fig. 2), Novozyme 234를 單用하였을 때 5時間 정도에서 10^7 個로 가장 良好한 結果를 보였다.

菌絲培養日數: *G. lucidum*과 *G. sp.*에서 모두 SCM에서 4日間 培養한 것이 가장 效果가 좋았으며,

Table II. Effect of different stabilizers on the release of protoplasts from *G. lucidum* and *G. sp.*

0. stabilizer (0.6M)	Protoplast yield (10^6 /ml)	
	<i>G. lucidum</i>	<i>G. sp.</i>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.800	39.12
Sucrose	3.88	42.5
Mannitol	0.100	20.0
Sorbitol	0.125	1.550
KCl	0.075	1.125
NaCl	0.500	

* *G. lucidum*: Novozym 234 10 mg/ml
G. sp.: Novozym 234 + β -glucuronidase 10 ul/ml each.

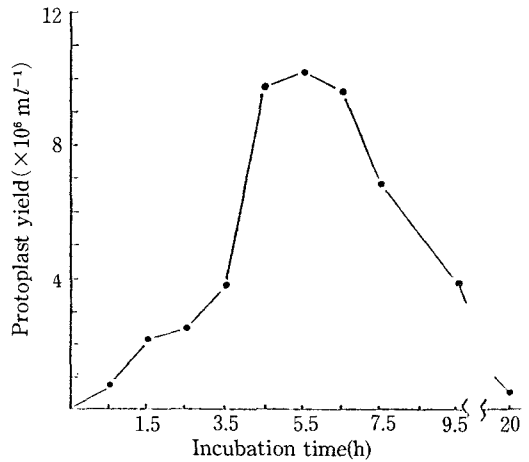


Fig. 2. Effect of incubation time of protoplast release from mycelia of *G. lucidum*.

5日 以後에는 菌絲量이 增加함에도 불구하고 裸出되는 原形質體는 급격히 감소하였다(Fig. 3).

일반적으로 菌絲生長이 指數期에 있는 菌絲體로부터 原形質體裸出이 많다고 하는데 (Peberdy, 1976; Peberdy et al., 1976), *G. lucidum*과 *G. sp.*에서 5日 以後 裸出量이 급격히 감소한 것은 老化된 菌絲가 많기 때문인 것으로 생각된다.

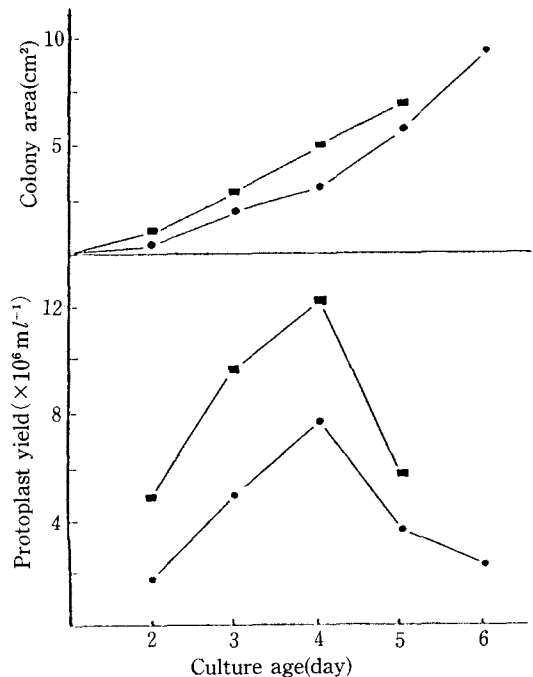


Fig. 3. Protoplast formation at different stages of growth in *G. lucidum* (●), and *G. spp.* (■).

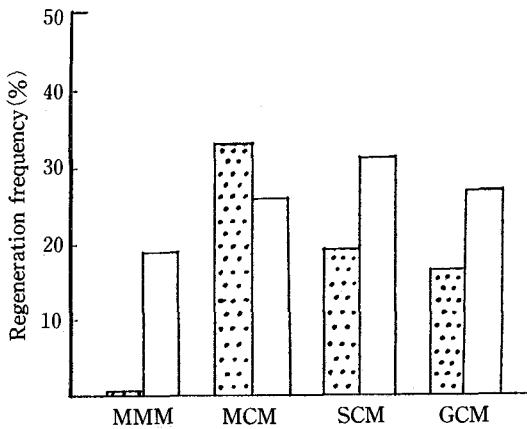


Fig.4. Effects of different media on the reversion of protoplasts in *Ganoderma lucidum* (▨) and *G. sp.* (□).

原形質體還元

還元用培地 : Fig.4에서 보는 바와 같이 *G. lucidum*은 MCM에서 34%還元되었으며 SCM·GCM에서도 높은還元率을 보였으나, MMM에서는 0.49%로 낮았다. *G. sp.*에서는 SCM에서 31%로 제일 높았지만 다른培地에서도 높은還元率을 보였다.

滲透壓調節劑 : *G. lucidum*과 *G. sp.* 모두 0.6 M sucrose를 사용하였을 때 原形質體還元이 가장良好하였다(Table III). 또한還元菌叢을 살펴보면 Mannitol에서 가장生長이 빠르며, KCl에서는 아주 느린 것으로 나타났다(Fig. 5).

*G. lucidum*과 *G. sp.*는 *P. ostreatus*(Byun, 1984)의 0.01~2%, *T. matsutake*(Abe et al., 1982)의 1~10%와 *L. ulmarium*(Yoo et al., 1987)의 0.0002~0.23% 보다 훨씬 높은還元率을

Table III. Effect of different osmotic stabilizers on the reversion of protoplasts in *G. lucidum* and *G. sp.*

Osmotic stabilizer (0.6M)	Regeneration frequency (%)	
	<i>G. lucidum</i>	<i>G. sp.</i>
Mannitol	1.42	47.01
Sorbitol	1.19	47.86
Sucrose	1.47	51.87
KCl	0.47	0.0059
NaCl	0	

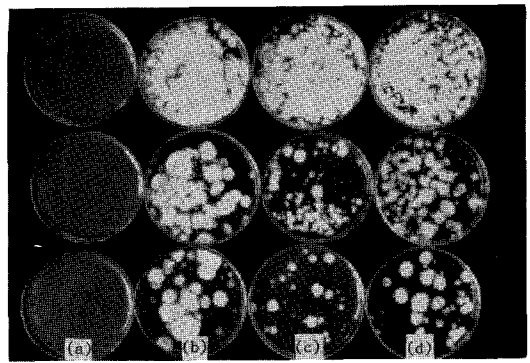


Fig.5. Reversion of protoplasts of *G. lucidum* on SCM with various stabilizers. (a) KCl, (b) Mannitol, (c) Sorbitol, (d) Sucrose.

보였다.

摘 要

原形質體融合에 의한靈芝의育種을爲하여 기초 자료를 얻고자 原形質體의裸出 및還元에 관한實驗結果는 다음과 같다.

1. 原形質體裸出은靈芝에서는 0.6 M sucrose에 Novozym 234 10 mg·ml⁻¹를單用하여 5時間정도處理하고 4日間培養한菌絲體를使用하는 것이 좋았으며, *G. sp.*는 4日間培養한菌絲體를使用하고 0.6 M sucrose에 Novozym 234와 β-glucuronidase를 각각 10 mg·ml⁻¹로混用하는 것이 좋았다.

2. 原形質體還元은 *G. lucidum*에서 0.6 M sucrose를添加한 MCM에서 가장良好하였으며, *G. sp.*에서는 0.6 M sucrose를添加한 SCM에서 가장效果的이었다.靈芝와黃芝는 20% 이상의 무척 높은還元率을 보였다.

參考文獻

Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and sasage, D. (1982): Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1955-1957.
 Byun, M.O.(1984): Isolation and reversion of protoplasts from mycelium of *Pleurotus ostreatus*. M. Sc. Thesis. Chungnam National University.
 Byun, M.O., Go, S.J., Park, Y.H. and Shin, G.C. (1984): Some factors affecting the protoplast

- release from *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **12**(1): 9-14.
- Flint, J.E.(1982): An appraisal of the problems of strain improvement in *Agaricus bisporus*. M.Sc. Thesis. Univ. of Nottingham.
- Hamlyn, P.F., Bradshaw, R.E., Mellon, F.M., Santiago, C.M., Wilson, J.M. and Peberdy, J.F. (1981): Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 321-325.
- Peberdy, J.F.(1976): Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In: Microbial and plant protoplasts. ed. J.F. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers, E.C. Cocking. pp39-50. London: Academic.
- Peberdy, J.F., Buckley, C.E., Daltrey, D.C. and Moore, P.M.(1976): Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **67**(1): 23-26.
- Raper, J.R. and Raper, C.A.(1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Science* **8**: 1-9.
- Strunk, C.(1965): Über Entstehung und Reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch* **3**: 242-244.
- 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., Peberdy, J.F. and You, C.H.(1985): Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* **13**(1): 1-10.
- Yoo, Y.B., You, C.H., Park, Y.H. and Chang, K.Y. (1987): Protoplast isolation and reversion from *L. ulmarium*. *Kor.J. Mycol.* **15**(1): 14-18.

Accepted for Publication 19 February