

## 잔나비 걸상버섯과 靈芝의 種間原形質體 融合과 子實體形成에 관한 研究

朴榮道\*·劉英福·申平均·柳昌鉉  
車東烈·朴容煥·李在成\*

\*嶺南大學校 食品加工學科·農村振興庁 農業技術研究所 菌相科

## Interspecific Protoplast Fusion of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma lucidum* and Fruit Body Formation of the Fusants

Young-Do Park\*, Young-Bok Yoo, Pyung-Gyun Shin, Chang-Hyun You,  
Dong-yeul Cha, Yong-Hwan Park and Jae-Sung Lee\*

\*Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 713-800 and Applied  
Mycology and Mushroom Division, Agricultural Science Institute, R.D.A. Suweon 440-707, Korea

**ABSTRACT:** Interspecific fusion products were obtained from fusion of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma lucidum*. Frequency of fusion was 0.77-1.38%. Fusion products were selected by the comparison of morphology and color of colony. Fusion products had characteristics of two parental strains and generally grew faster than the parents. Some fusants were segregated on GCM. Fusion products were confirmed by mycelial morphology and electrophoretics pattern of esterase isozyme from mycelium. Most of fusion products were lack in clamp connection but those fusion products, that were segregated, produced mycelium with and without clamp connection. Some of the fusion products produced fruit body on sawdust medium.

**KEYWORDS:** Interspecific protoplast fusion, segregation, esterase, fruit bodys, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, basidiomycetes.

1925년 Bacteria에서 처음 시작된 原形質體의 融合은 곰팡이에 있어서도 두터운 細胞壁을 지닌 菌絲間 단순한 菌絲融合(hyphal anastomosis)의 한계를 극복한 새로운 한 技法으로 시도되어 왔다.

이러한 노력의 결과로 1966년 Lopez 등의 *Fusarium culmorum*에서 시작된 이래 Ferenczy 등(1974)이 *Geotricum candidium*에서 同種間 原形質體融合을 시도하였으며 최근에 와서는 種內, 種間 原形質體融合 뿐만 아니라 細胞內 核이나 미토콘드리아 등의 小器官들을 다른 原形質體 안으로 轉移시키는 등의 발전을 가져왔다(Ferenczy 등, 1974; Peberdy 1980; Hynes, 1986; Mulder and Wes-

sels, 1986; Stahl 등, 1987).

高等菌類中에서擔子菌類에 속하는 버섯에 대해서도 品種改良과 生産性 增大 및 産業物質을 개발코저 하는 노력의 일환으로 原形質體融合을 이용한 여러 가지 노력이 경주되어 Abe 등(1982)은 *Tricholoma matsutake*에서, Gold 등(1983)은 *Phanerochaete chrysosporium*에서 種內 原形質體融合을 실시하였으며, Yoo 등(1984)은 *Pleurotus ostreatus*와 *P. florida*에서, Toyomasu와 Mori(1987 a, b)는 *Pleurotus* species간에서 種間 原形質體融合을 실시하여 새로운 子實體의 形成을 보게되었으며, Alfredo 등(1986)은 *Schizophyllum commune*에서 原形質體 안으로

DNA를 주입시키는 Transformation을, Yoo 등 (1987)은 *Pleurotus ostreatus* 原形質體內에 *P. florida*의 핵을轉移시키는데 성공하여 보다 더 진보된 育種의 方法을 제시해 주었다.

구멍장이버섯科 靈芝버섯屬에 속하는 잔나비겉상버섯인 *Ganoderma applanatum* (Pers. ex S.F. Gray) Karst.와 靈芝버섯인 *Ganoderma lucidum* (Curt. ex Fr.) Karst.은 藥用버섯으로 그 藥理效果가 널리 알려져 있는데 (Ikekawa 등, 1968 有地滋, 1979; Kim 등, 1980) 근년에 와서 靈地버섯은 農家에서 대량 재배되고 있다. 그런데 靈地버섯은 잔나비겉상버섯에 비해 子實體가 작을 뿐 아니라 針葉樹木에서는 栽培가 불가능하여 原木栽培時 樹木의 선택성을 가지게 되어 이를 改良함과 동시에 藥效成分이 다양한 菌株를 개발코저 두 버섯간의 種間 原形質體融合을 실시하여 融合을 확인하고 子實體를 形成하였기에 그 結果를 보고하고자 한다.

### 材料 및 方法

#### 菌 株

본 실험에 사용한 菌株는 Table I과 같으며 農村振興廳 農業技術研究所에 보관중인 잔나비겉상버섯 (*Ganoderma applanatum* ASI 07031)과 靈芝버섯 菌株 (*Ganoderma lucidum* ASI 07009)를 紫外線 처리하여 얻은 營養要求性 菌株이다.

#### 培 地

사용한 培地는 *Ganoderma* Complete Medium (GCM)과 最小培地인 Mushroom Minimal Medium (MMM)로 121°C에서 20分間 滅菌하여 사용하였으며 成分造成은 다음과 같다 ( $g \cdot l^{-1}$ ) 즉,

GCM은 yeast extract 10.0, dextrose 30.0,  $KH_2PO_4$  0.46,  $K_2HPO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5, peptone 4.0, sucrose 20.0, casamino acid 5.0 및 agar 20.0이며, MMM은 dextrose 20,  $KH_2PO_4$  0.46,  $K_2HPO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 및 Bacto-agar 20.0이다. 融合時 overlay用 培地는 각각 同一한 成分에 agar만 7.5g으로 하여 사용하였다.

#### 原形質體融合

原形質體融合은 Anne 등 (1976)과 Anne와 Peberdy (1976)가 실시한 融合方法을 응용하였다. 즉, 두 개의 菌株에서 각각 原形質體를 分離하여 滲透壓調節劑로 2회 洗滌한 다음, 두 菌株의 原形質體 數를 동일하게 조절하여 ( $10^6 \sim 10^8$  cells  $\cdot$  ml $^{-1}$ ) 融合用 tube에 넣고 500×g에서 10分間 遠心分離하여 上等液을 제거하였다. 여기에 PEG 溶液 (30% PEG MW 4000+0.1 M  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ +0.05 M glycine; pH 8.0) 1 ml을 添加하여 30°C에서 10分間 靜置한 후, 5 ml의 滲透壓調節劑를 사용하여 1회 洗滌하고 適當한 濃度로 稀釋한 다음 培地에 分注하고 0.75% agar 培地를 overlay하여 30°C에서 4~15日間 培養하였다.

#### 融合株의 選拔과 確認

融合後 還元된 菌叢中에서 母菌株와 비교하여 生長速度, 菌叢의 形態, 색깔 등에서 차이를 보이는 것을 選拔하였으며 選拔된 融合菌株는 培養하면서 배지상에서 형태를 비교하였다.

또 菌絲體로 부터 esterase isozyme pattern 分析을 실시하여 融合 여부를 확인하였는데, 電氣泳動은 菌絲體를 磨碎한 다음 Davis (1964) 方法을 다소 變形하여 실시하였으며, 分離 gel은 10% polyacryl

Table I. List of strains used

Species	Strains NO.	Maker		origin
		geno	type	
<i>Ganoderma applanatum</i>	ASI 7-15-a07031-1124	Hyp	Thy	<i>G. applanatum</i> ASI 07031 (dikaryon)
	ASI 7-16-a07031-1137	Hyp	Ura	
	ASI 7-18-a07031-880	Cys	Met	
<i>Ganoderma lucidum</i>	ASI 7-5-107009-13	Asc		<i>G. lucidum</i> SI 07009 (dikaryon)
	ASI 7-12-107009-48	Asc	PABA	

Mutant Symbols: Hyp(Hypoxanthine), Thy(Thymidine), Ura(Uracil), Cys(Cystine), Met(Methionine), Asc(Ascorbic acid) and PABA(P-amino benzoic acid).

Mutants of strains were induced by U.V. light.

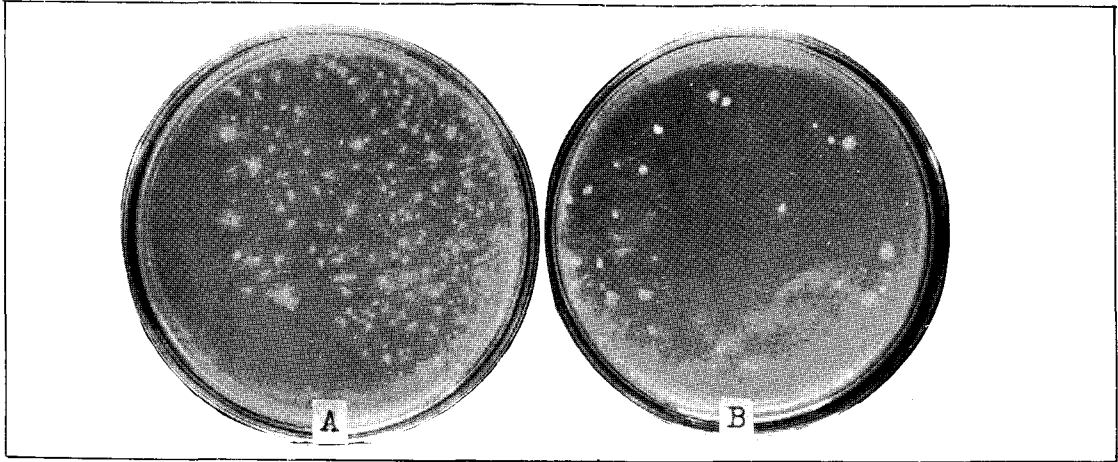


Fig.1. Morphologies of regenerated(A) and fusion colonies(B) on MMM.

porosity slab gel을 사용하여 discontinuous buffer system으로 pH 6.9~8.9의 buffer를 사용하였다.

**子實體 形成**

참나무톱밥(60%), 버드나무톱밥(20%) 및 미강(20%)이 혼합된 톱밥배지상에 培養하여 子實體의 形成有無를 확인하였다.

**結果 및 考察**

**原形實體融合**

菌絲融合이 불가능한 각 菌株間의 原形實體融合을 실시한 결과 Fig.1과 같이 배양 4~15日 後에 融合된 菌叢을 얻었으며, 각 菌株間의 融合率은 Table II에서와 같이 0.77~1.38%의 融合率을 얻었다. 이는 다른 擔子菌類에서 보고한 바와 비교해 볼 때 Yoo 등(1984)의 *Pleurotus ostreatus*와 *P. florida*

의 種間融合에서 0.18~3.80%, Gold 등(1983)의 *Phanerochaete chrysosporium*의 種內融合에서의 0.12~0.14%, Abe 등(1982)의 *Tricholoma matsutake*에서의 1~10%와 거의 유사함을 보였다.

**融合菌株의 選拔**

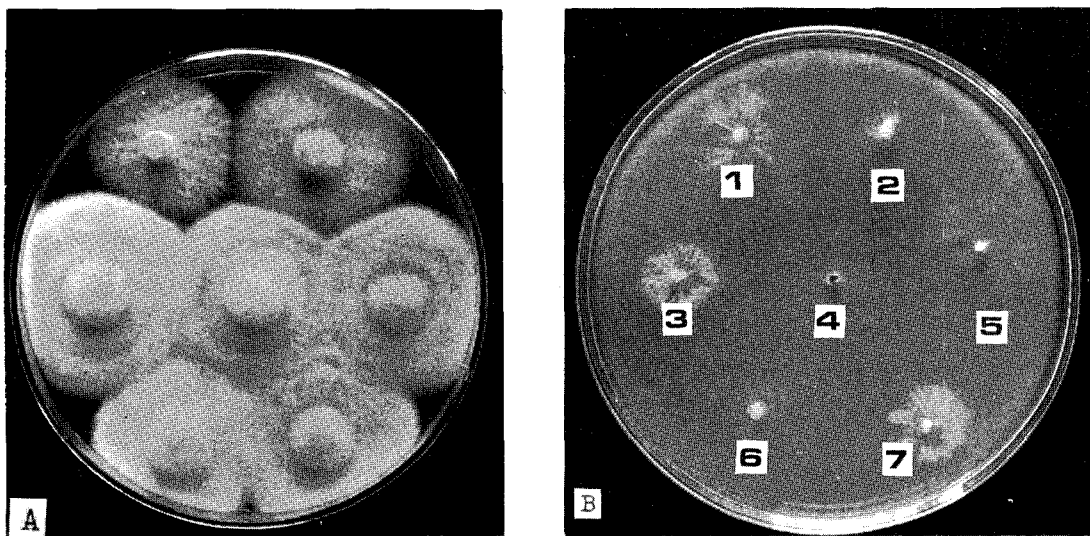
融合된 菌株의 選拔은 母菌株로 사용된 營養要求性 菌株中에서 MMM 배지상에서 還元이 다소간 일어나기 때문에 母菌株의 back mutation 檢定과 비교하여 菌叢의 形態가 다르거나 菌叢의 中央部位에 엷은 黃褐色의 색갈을 띄는 것을 1차 選拔하여 MMM 배지상에서 성장하는 것을 다시 選拔하였다. 融合株를 選拔 배양하는 과정에서 母菌株과 비교해 볼 때 두 菌株의 장점을 고루 지니고 있음이 확인되었다. 즉, *G. applanatum*은 균사의 길이가 짧고 密하게 자르는데 비해 *G. lucidum*은 균사의 길이는 다소 긴편이나 密度가 낮게 자랐으며, 融合株에서는 菌絲의 길이도 길면서 密하게 자라는 양쪽의 장점을 고루 지니고 있었다(Fig. 2).

**融合株의 特徵**

각 菌株間의 融合에서 選拔한 30개 融合株의 특징을 비교해 본 결과 MMM 培地上에서 母菌株보다 대체로 빠른 成長을 보였으며(Fig. 2), 또 中央部位에 엷은 黃褐色을 나타내던 菌叢中에서는 菌絲가 成長함에 따라 색갈이 대부분 消失되었으며, 母菌株인 *G. applanatum* a 07031-880과 *G. lucidum* 107009-13간의 選拔融合株에서는 MMM 培地上에서는 변화가 없던 것이 GCM 培地上에서 培養했을 때는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 여러 갈래의 菌叢形態로 分離되는 菌叢分離現象(segregation)이 나타났다. 이와

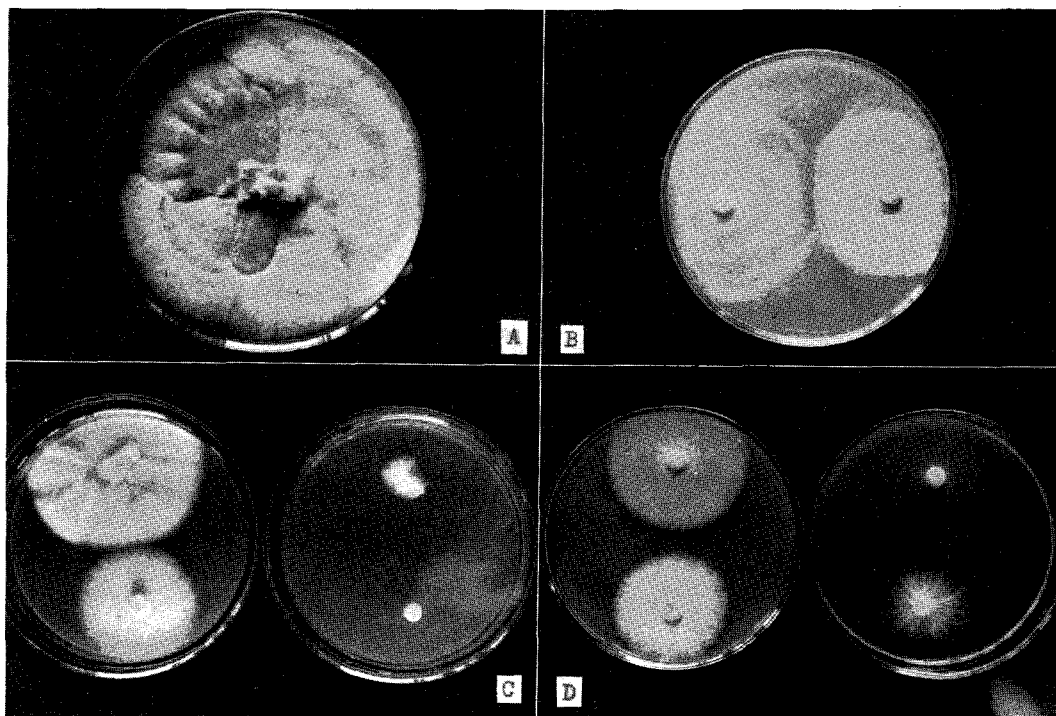
Table II. The fusion frequency of protoplast between *G. applanatum* and *G. lucidum* auxotroph mutants

Fusion strain			Fusion frequency
<i>G. applanatum</i>	<i>G.</i>	<i>lucidum</i>	
ASI 7-16-a 07031-1137	ASI 7-12-1	07009-48	1.38
Hyp, Ura	Asc, PABA		
ASI 7-15-a 07031-1124	ASI 7-12-1	07009-48	1.24
Hyp, Thy	Asc, PABA		
ASI 7-18-a 07031-880	ASI 7-5-1	07009-13	0.77
Cys, Met	Asc		



**Fig.2.** Morphologies of the fusion products between *Ganoderma applanatum* a07031-1137 and *Ganoderma lucidum* 107009-48 on GCM(A) and MMM(B).

1; mutant 1137, 2; mutant 48, 3; p 470, 4; p 461, 5; p 458, 6; p 478, 7; p 475.



**Fig.3.** Morphology of segregation colony obtained the fusant(p 485) of protoplast fusion from *Ganoderma applanatum* a 07031-880 and *Ganoderma lucidum* 107009-13.

A ; GCM, B; the first subcultured on GCM, C; the second subcultured on GCM and MMM, D; the third subcultured on GCM and MMM.

**Table III.** Characteristics of the fusion products

Fusion strains	No. of fusion products	Mycelial growth on MMM	Clamp	Fruit body primordia
ASI 7-16-a 07031-1137	P458	f	-	
	P459	f	-	
+ ASI 7-12-1 07009-48	P460	.	-	*
	P461	f	-	
	P462	m	+	
	p463	f	-	
	P464	.	-	
	P465	m	-	
	P466	m	-	
	P467	f	-	
	P468	f	+	
	P469	f	-	
	P470	f	-	
	P471	m	-	*
	P472	f	-	
	P473	s	-	
	P474	f	-	*
	P475	f	-	
	P476	m	-	
	P477	.	-	
	P478	m	-	
	P479	.	-	
	P480	f	-	
	P481	.	-	
ASI7-15-a07031-1124	P482	s	-	
	P483	m	-	
+ ASI7-12-1 07009-48	P484	m	-	
	P485	s	±	
+ ASI7-18-a07031-880	P486	.	±	
	P487	.	±	

- 1) f : fast growing type.  
m ; Moderate growing type.  
S ; Slow growing type.
- 2) + ; Present pseudoclamp connection.  
- ; Absent clamp connection.
- 3) \* ; Induced fruit body primordia.

같은 현상은 *Penicillium roquefortii*와 *P. cyaneofulvum*간의 種間 融合에서 (Anne 등, 1976), *Aspergillus nidulans*와 *A. rugulosus*의 種間 融合에서

(Kevei와 Peberdy, 1976) 그리고 *P. chrysogenum*과 *P. cyaneofulvum*간의 種間 融合 (Peberdy 등, 1977) 등에서 보고된 바 있는데, 이는 細胞內 小器官들의 불균등한 分配나 genome의 불안정한 排列 등에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 染色體가 n와 n인 haploid(半數體)가 融合을 하여 diploid(二數體)가 된 후 segregation이 일어나는 경우에는 haploid와 diploid 또는 aneuploids(非整倍體, 異數體)가 되는 것으로 알려져 있다 (Christopher, 1984). 따라서 segregation이 일어나는 菌株를 계속해서 分離하여 繼代培養을 해본 결과 繼代가 반복됨에 따라 각각의 母菌株와 비슷한 形態로 변해가는 것을 확인 할 수 있었다.

한편, *G. applanatum*에서는 clamp connection을 볼 수 없었으나 *G. lucidum*은 隔膜이 있는 부분에서는 거의 clamp connection을 가지고 있었는데, 融合株에서는 대부분 clamp connection의 확인이 어려웠다. P 462와 P 468에서는 불완전한 pseudo-clamp connection이 관찰되었으며, segregation이 일어난 菌絲에서는 clamp가 있는 菌絲와 없는 菌絲가 混在해 있는 것을 볼 수 있었다(Fig. 4).

**Esterase isozyme pattern**

融合을 확인하기 위하여 선발된 融合 菌株와 母菌株를 液體培養한 後 菌絲體를 電氣泳動하여 esterase의 isozyme band를 비교해 본 결과 母菌株와는 전혀 다른 pattern을 보였다(Fig. 5). 靈芝인 營養要求株 107009-48과 잔나비결상버섯인 營養要求株 a 07031-1137간의 融合株인 p 462, p 467, p 475 그리고 p 474에서는 細菌株와는 많은 차이점을 보였는데, 양 細菌株의 同一한 部位에서 나타난 band가 融合株에서는 더욱 강하게 형성되었으며 특히, 두 細菌株에서 없었던 새로운 band가 형성되는 특징을 보였고, 靈芝의 細菌株에서의 복잡한 band 중에서 일부는 融合株에서도 형성되어 전체적으로 靈芝에 더 가까운 모습을 보였다. 또 靈芝인 107009-48과 잔나비결상버섯인 a 07031-1124간의 融合에서는 共通된 部位에서만 강한 band를 보여 오히려 잔나비결상버섯에 가깝게 나타났다. 한편, 菌叢分離現象이 일어났던 靈芝인 107009-13과 잔나비결상버섯인 a 07031-880간의 融合株에서는 共通된 部分의 band는 없어진데 비해 靈芝의 일부 band만을 지니고 있었다.

이상에서 본 바와 같이 融合된 菌株들은 母菌株와는 판이한 esterase isozyme pattern을 보임으로써 融合株는 母菌株와는 다른 새로운 菌株임이 確認되

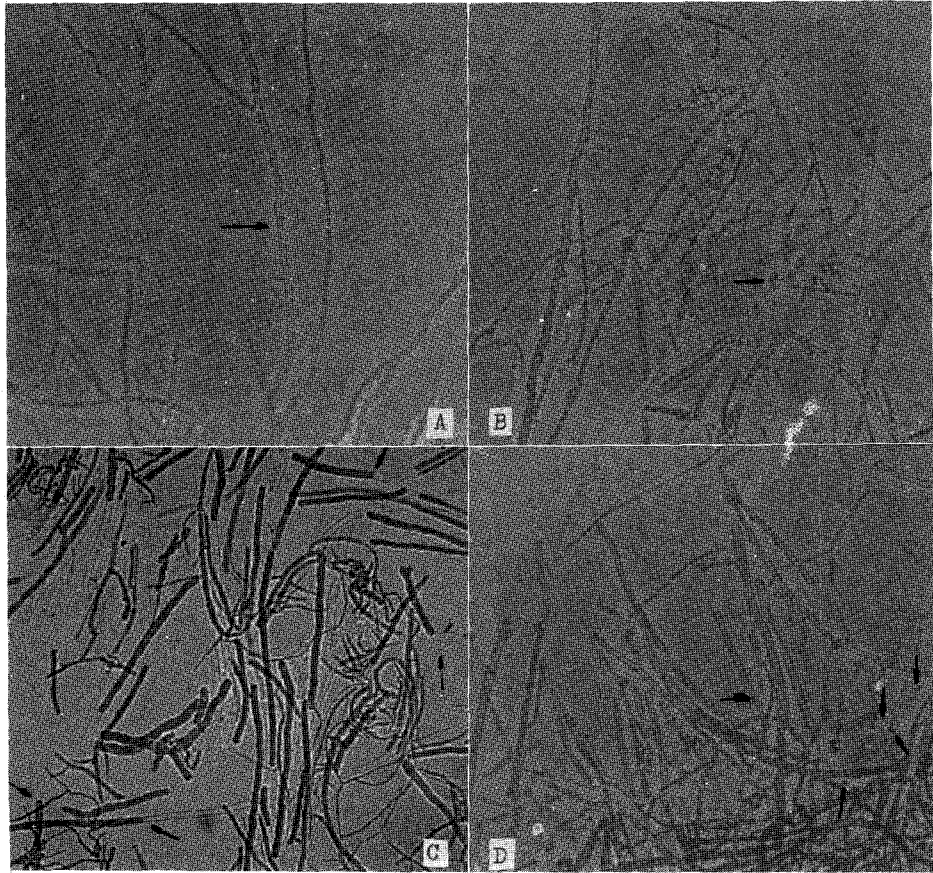


Fig.4. Microscopic observation of mycelium.  
 A; *Ganoderma applanatum*(absent clamp), B; *Ganoderma lucidum*(present clamp), C; p 462 (absent clamp) and D; p 485(mixture with clamp and non-clamp mycelium).

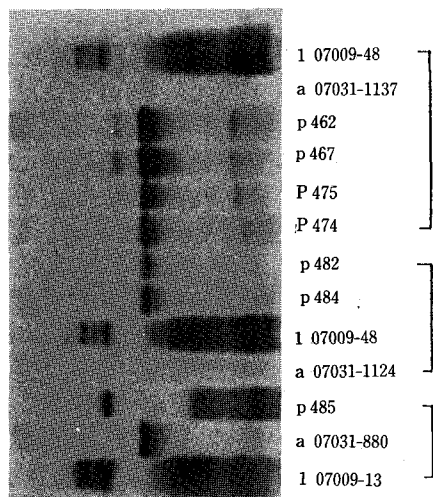


Fig.5. Isozyme pattern of esterase in products of protoplast fusion on polyacrylamide gel.

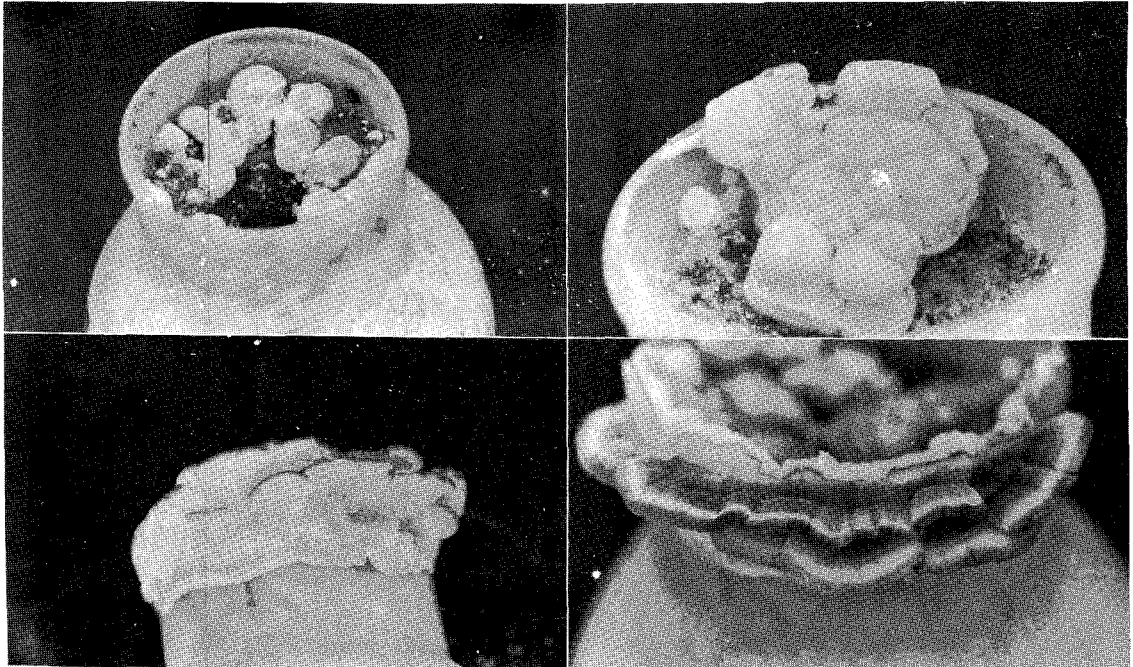


Fig.6. Fruit body Primordia of the fusion product were developed sporophores on sawdust medium from the fusant between *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma lucidum*.

었다. 한편 다른 보고된 바에 의하면 Anne와 Peberdy(1981)는 *Penicillium chrisogenum*과 *P. roquefortii*의 종간융합에서 융합체는 모균체와 같은 pattern을 나타내는 것도 있다고 보고 했으나, Toyomasu와 Mori(1987b)는 *Pleurotus* species간의 원형질체융합에서 융합체는 두 모균체의 band를 공통적으로 가진 것으로 보고했다.

#### 子實體의 形成

선발된 30菌株中 4菌株에서 子實體가 形成되었으며, 모菌株中 *G. lucidum*은 子實體가 形成되었으나 *G. applanatum*에서는 子實體가 形成되지 않았는데, 융합체에서 형성된 子實體의 모양은 모菌株와는 판이한 形態를 나타냈다(Fig. 6). 그러나 톱밥培地上에서 發芽實驗을 수행하였기 때문에 *G. applanatum*과 같은 Aphyllphorales類의 木材腐朽菌들이 子實體를 形成시키는데에는 부적당하였다고 사료되어 계속해서 原木實驗 등을 통해서 子實體의 形成과 완전한 形態의 확인이 수행되어야 하며, 胞子로부터 遺傳分析도 실시하여야 할 것이다.

#### 摘 要

잔나비결상버섯과 靈芝버섯間에 原形質體融합을 실시하여 融合된 菌株을 선발하였으며, 融合된 菌株을 培養하여 子實體의 形成하였는 바 그 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. 잔나비결상버섯과 靈芝버섯間的 種間原形質體 融合率은 0.77~1.38%였다.
2. 融合된 菌叢은 MMM培地上에서 菌叢의 形態의 차이를 보이거나 菌叢의 中央部位에 옅은 黃褐色을 띄고 있었다.
3. 融合체는 두 모菌株의 장점을 지녔고 대체로 모菌株보다 빠른 成長을 보였으며, 菌株에 따라서는 GCM培地上에서 segregation이 일어났다.
4. 融合체의 菌絲體에는 clamp connection이 없으나 segregation이 일어난 菌絲에서는 있는 것과 없는 菌絲가 混在해 있었다.
5. 菌絲體를 마쇄하여 電氣泳動에 의한 esterase isozyme pattern을 확인해 본 결과 모菌株와는 전혀



다른 band를 나타내었다.

6. 選拔한 30菌株中 4菌株에서 子實體가 形成되었 으며 그 形態는 母菌株의 子實體와 차이를 보였다.

### 參考文獻

- Abe, M., H. Umetsu, T. Nakai and D. Sasage(1982): Regeneration and Fusion of Mycelial Protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agric. Biol. Chem.* **46**(7) 1955-1957.
- Alfredo, M.R., C.A. Specht, B.J. Drummond, E. Froeliger, C.P. Novotny, and R.C. Ullrich (1986): Transformation of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 103-106.
- Anne, J. and J.F. Peberdy(1976): Induced fusion of fungal Protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413-417.
- Anne, J. and J.F. Peberdy(1981): Characterization of interspecific hybrids between *Penicillium chrysogenum* and *P. roquefortii* by iso-enzyme analysis. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **77**(2): 401-408.
- Anne, J., H. Eyssen and P. De Somer(1976): Somatic hybridization of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature.* **262**: 719-721.
- Christopher Ball(1984): Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms. *CRC Press, Inc.*: 159-188.
- Davis, B.J.(1964): Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 407-427.
- Ferenczy, L., F. Kevei, J. Zsolt(1974): Fusion of fungal protoplast. *Nature.* **248**: 793-794.
- Gold, M.H., T.M. Cheng and M. Alic(1983): Formation, Fusion and Regeneration of Protoplasts from Wild-Type and Auxotrophic strains of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Envir. Microbiol.* **46**(1): 260-263.
- Hynes, M.J.(1986): Topical Review. Transformation of Filamentous Fungi. *Exp. Mycol.* **10**: 1-8.
- Ikekawa, J., M. Nakamishi, N. Uehara., G. Chibara and F. Fukuoka(1968): Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* **59**: 155-159.
- Kevei, F. and J.F. Peberdy(1977): Interspecies hybridization between *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 255-262.
- Kim, B.K., H.S. Chung, K.S. Chung and H.S. Yang(1980): Studies on the antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor. J. Mycol.* **8**(2): 107-113.
- Lopez-Belmonte, F., I. Garcia Acha, J.R. Villanueva(1966): Observations on the protoplasts of *Fusarium culmorum* and on their fusion. *J. Gen. Microbiol.* **45**: 127-134.
- Mulder G.H. and J.G.H. Wessels(1986): Molecular Cloning of RNAs Differentially Expressed in Monokaryons and Dikaryons of *Penicillium chrysogenum* by a vector containing a mitochondrial origin of replication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 237-241.
- Peberdy, J.F.(1980): Protoplast fusion-a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enz. Microbiol. Technol.* **8**(2): 107-113.
- Peberdy, J.F., H. Eyssen and J. Anne(1977): Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *P. cyaneofulvum* following protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **157**: 281-284.
- Stahl, U., E. Leiter and K. Esser(1987): Transformation of *Penicillium chrysogenum* by a vector containing a mitochondrial origin of replication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 237-241.
- Toyomasu, T. and K.I. Mori(1987a): Intra-and Interspecific Protoplast fusion between Some *Pleurotus* Species. *Agric. Biol. Chem.* **51**(3): 935-937.
- Toyomasu, T. and K. I. Mori(1987b): Fruit Body formation of the Fusion Products obtained on Interspecific Protoplast Fusion between *Pleurotus* Species. *Agric. Biol. Chem.* **51**(7): 2037-2040.
- Yoo, Y.B., M.O. Byun, S.J. Go, C.H. You, Y.H. Park and J.F. Peberdy(1984): Characteristics of Fusion Products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* Following Interspecific protoplast Fusion. *Kor. J. Mycol.* **12**(4): 164-169.
- Yoo, Y.B., C.H. You, P.G. Shin, Y.H. Park and K.Y. Chang(1987): Transfer of Isolated Nuclei from *Pleurotus florida* into Protoplasts of *Pleurotus ostreatus*. *Kor. J. Mycol.* **15**(4): 250-253.
- 有地滋, 鷄忠人, 久保道德, 松田秀秋, 吉村成年, 桐ヶ谷紀昌(1979): 靈芝의 研究(제1보), 만년버섯 열수추출액기스의 혈압강하작용. 基礎と臨床, **13**: 4239-4244.