

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)의 原形質體 裸出

呂運炯*·劉英福·朴容煥·申寬澈*

*忠南大學校 農生物學科·農材振興廳 農業技術研究所菌茸科

Isolation of Protoplasts from *Flammulina velutipes*

Un-Hyung Yea*, Young-Bok Yoo, Yong-Hwan Park and Gwan-Chull Shin*

*Dept. of Agricultural Biol., Coll. of Agriculture., Chung-Nam National University.,
Daejeon 301-764 and Applied Mycol. and Mushroom Division,
Agricultural Sciences Inst., R.D.A. Suweon 440-707, Korea.

ABSTRACT: To obtain basic information for the genetic analysis and breeding of *Flammulina velutipes*, some factors affecting the release of protoplasts from the fungus were studied. Potato Dextrose peptone Agar medium was suitable for the growth of the mycelium and the protoplast formation of *F. velutipes*. The culture age for the high yields of protoplast was 5 days on PDPA. Few protoplasts were formed from the mycelium cultured on Mushroom minimum Media. The highest yield of protoplasts was obtained in enzyme solution containing Novozyme 234 plus cellulase CP at 10 mg ml⁻¹ concentration, while a half amount of protoplasts was obtained in enzyme solution containing Novozyme 234 only. The optimal reaction time of the mycelium in the lytic enzyme mixtures was 3 hours. The best osmotic stabilizer for the protoplast formation of the mycelium was 0.6M sucrose without buffer at pH 6.2.

KEYWORDS: *Flammulina velutipes*, Protoplast formation, Enzyme solution

팽이버섯(*Flammulina velutipes*)은 Tricholomataceae科에 속하는 食用버섯으로서 營養價가 높고 맛이 좋아 人工培養의 필요성이 요구되는 한 種에 하나이다. 이 菌은 주로 廣葉樹에 自生하는 것으로 氣溫이 낮은 時期에 子實體가 形成된다(Tonomura; 1978). 따라서, 버섯의 周年生産 體系中的 한 品目으로서도 重要視될 것으로 생각된다.

팽이버섯은 生活史에 있어서 單核狀態에서 직접 子實體를 形成한다는 점이 다른 擔子菌類와 다르고 單核의 分生子가 形成되어 Dedikaryotization 現象을 나타낸다(Takemura; 1961). 팽이버섯은 4極性的 交配系를 갖고 있으며 4種類의 Mating type을 갖고 있다(Takemura; 1961). 現在 우리나라에서 栽培되고 있는 食用버섯들의 品質과 收量에 있어서 보다 優秀한 品質의 開發과 遺傳研究을 위해서는 새로운 育種方法이 必要하나 活發한 研究이 이루어지지 않고 있다. 그러나 Ferenzy 等(1974)이 *Geotrichum candidum*의 原形質體를 利用한 種內

融合에 成功하여 原形質體 融合에 의한 絲狀菌과 屬을 超越한 交配의 可能性을 보여 줌으로써 担子菌류의 育種과 遺傳研究에 새로운 方法을 提示하였다. 즉 菌絲의 細胞壁을 酵素로 처리하여 除去하고 裸出된 原形質體를 PEG-Ca⁺⁺으로 處理하여 原形質體 融合을 誘導하는 것인데(Anne; 1976), 실제로 Yoo 等(1984)은 *pleurotus ostreatus*와 *pleurotus florida*의 種間 融合을 試圖하여 成功하였고 Go 等(1985)은 *pleurotus ostreatus*와 *pleurotus sajor-caju*의 種間 融合에 成功함으로써 原形質體 融合에 의한 食用버섯의 品種改良 可能性을 보여주었다. Eddy와 Williamson(1957)은 달팽이(*Helix pomatia*)의 消化管에서 抽出한 消化液으로 酵母에서 原形質體를 얻었으며 Emerson 等(1958)은 *Nurospora crassa*에서 絲狀菌으로는 처음으로 原形質體 裸出에 成功하였다. 擔子菌類에서는 Strunk(1965)가 *polystictus versicolor*에서 처음으로 原形質體를 裸出시킨 이후 *Schizophyllum commune*(De

Vries; 1972), *Coprinus cinereus* (Moore; 1975), *Lentinus edodes* (Ushiyama; 1977), *Tricholoma matsutake* (Abe; 1982), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold; 1983), *Pleurotus ostreatus* (Byun; 1984, Go; 1985, Yamada; 1983, 秦 京熙; 1984), *P. sajor-caju* (Go; 1985), *Ganoderma lucidium* (Park; 1985), *Pleurotus cornucopiae* (Lee; 1986) 등에서 報告되었다. 原形質體를 이용한 研究에 있어서의 課題는 많은 量의 原形質體를 얻는 것으로 原形質體 裸出量은 酵素의 種類와 濃度, 酵素液의 pH, 滲透壓調節劑의 種類와 濃度, 菌絲體의 培養時間, 酵素液과의 反應時間 等に 큰 影響을 받음이 報告 (Peberdy; 1976) 되어 있다.

본 研究은 原形質體 融合에 의한 팽이버섯의 品種 育成에 必要한 基礎資料를 얻기 위하여 原形質體의 裸出에 미치는 諸 條件을 밝히기 위하여 실시하였다.

材料 및 方法

供試 菌株

本 研究에 使用한 菌株은 農業技術研究所에서 分讓받은 *Flammulina velutipes* ASI 4003 및 4005로서 25°C에서 5~6日 培養 後 使用하였다.

培 地

버섯 完全培地 (Mushroom Complete Medium, MCM), 버섯 最小培地 (Mushroom Minimal Medium, MMM) 等 9種類의 培地를 供試하여

(Table I) 팽이버섯 菌絲體의 生育이 빠르고 氣菌絲가 豊富하게 形成되는 培地를 選拔하여 繼代培養과 原形質體 裸出에 利用하였다.

細胞壁 分解酵素 및 滲透壓調節劑

細胞壁 分解酵素로는 Novozym 234 (Novo Industri, Denmark), β-D-Glucanase (BDH Chem Ltd, U.K.), β-Glucuronidase (Sigma Chem Co, U.S.A), Cellulase CP (John and Sturge Ltd, U.K.), Cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha, Japan), Chitinase (Sigma Chem Co, U.S.A)를 滲透壓調節劑 1ml當 5~20mg 濃度로 單獨 또는 混合하여 溶解시킨 다음, Membrane filter (Gelman Sc, 0.2μm)로 濾過한 후 使用하였다. 滲透壓調節劑로는 Sucrose, Mannitol, Sorbitol, KCl, MgSO₄·7H₂O를 0.6M로 調節하여 使用하였다.

原形質體 裸出

原形質體 裸出에 使用할 팽이버섯의 菌絲體는 25°C에서 Potato dextrose peptone (PDP)培地에 繼代培養하였다. 滅菌된 Cellopane membrane (Dialysis membrane, Fisher Scientific Co.)을 spreader로 PDP 培地 위에 고르게 편 다음 미리 培養된 菌絲體의 가장자리를 直徑 5mm의 滅菌된 Cork borer로 떼어 Cellopane membrane 위에 4개씩 接種하여 25°C에서 5日間 培養하였다. 培養된 菌絲體를 Cellopane membrane과 함께 칼이나 가위를 이용하여 切取한 後 直徑 5cm의 滅菌된 Petri-dish에 4菌叢씩 옮겨 1菌叢當 1ml의 酵素液을 添加한 다음 28~30°C의 Reciprocal shaker를 이용

Table I. Ingredients of the media used for culture of *Flammulina velutipes*(gl⁻¹).

Medium ingredients	PDP	PDA	PSA	PDY	Y G	MMM	MCM	CCM	SCM
Yeast extract				5.0	5.0		2.0	5.0	15.0
Peptone	5			5			2.0	5.0	2.0
Glucose				30	10	20	20	50	20
KH ₂ PO ₄				0.46		0.46	0.46	0.46	0.46
K ₂ HPO ₄				1.0		1.0	1.0	1.0	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O						0.5	0.5	0.5	0.5
PDA (Bacto)	39	39		39					
Sucrose			20						
Potato			200						
Agar			20	20	20	20	20	20	20

MMM: Mushroom Minimal Medium.
MCM: Mushroom Complete Medium.

하여 120 strokes min^{-1} 로 1~24時間 흔들어 주었다. 裸出된 原形質體數는 Haemocytometer를 이용하여 光學顯微鏡하에서 計測하였다.

結果 및 考察

팽이버섯 菌絲生長 最適培地

팽이버섯의 原形質體 裸出 및 繼代培養에 適合한 培地를 選拔하기 위하여 Mushroom complete media(MCM), Mushroom minimal media(MMM) 등 9種類의 培地를 供試하여 菌絲의 生長을 比較한 結果는 Table II와 같다.

菌絲의 生長은 Potato dextrose agar(PDA), Potato sucrose agar(PSA), MMM, MCM, PDP 등에서 빨랐으며 氣菌絲는 PSA, PDP 등에서 잘 發達하였다. PSA의 경우 菌絲의 生長은 供試된 9種類의 培地中 가장 빨랐으나 培地의 組成을 菌一하게 維持할 수 없는 難點 때문에 連續的인 實驗材料로 사용하기에 適合하지 못하였다. PDP는 菌絲의 生長이 빠르고 氣菌絲의 發達도 良好하였으므로 팽이버섯 菌絲의 繼代培養 및 原形質體 裸出用 培地로 選拔하였다.

原形質體 裸出에 影響을 미치는 要因

가. 培 地

Peberdy(1976)는 菌絲體를 培養한 培地의 成分은 原形質體 裸出에 큰 影響을 미친다고 報告하였던 바

Table II. The mycelial growth of *F. velutipes* on the different media.

Growth medium	Colony diameter (mm) after			Degree of aerial mycelium*
	2days	4days	6days	
PDA	14.5	32.8	54.1	++
PDY	12.1	22.2	36.2	++
Y G	9.8	24.8	38.0	+
MMM	8.1	31.5	53.0	+
MCM	10.2	29.0	50.0	++
CCM	13.1	26.8	39.8	+++
SCM	11.8	19.8	29.5	+
PSA	11.4	45.3	74.8	+++
PDP	13.8	34.7	59.2	+++

Cultured at 25°C

* + + + : Indicates high degree of aerial mycelium.

Table III. Formation of protoplasts from mycelia of *F. velutipes* grown on different media.

Growth medium	Protoplast yields ($\times 10^5 \text{ml}^{-1}$)
PSA	7.6
PDA	10.7
PDP	12.1
MCM	1.3
MMM	0.0

Novozym 234(5mg ml^{-1}) was used for lytic enzyme. Sucrose(0.6M) was used for osmotic stabilizer.

이 研究에서도 培地의 種類에 따른 팽이버섯菌의 原形質體 裸出量의 變化를 알아보기 위해 PDA, MMM, MCM, PSA, PDP 등 비교적 菌絲 生育에 効果的이었던 培地에 菌絲體를 培養시켜 原形質體를 裸出시킨 結果 培地上에서의 菌絲의 生育程度와 같이 PDP培地에서 $12 \times 10^5 \text{ml}^{-1}$ 로 原形質體 裸出量이 가장 많았다. 그러나, MMM에서는 전혀 裸出되지 않았다. 이러한 結果는 Hamlyn(1981)이 天然培地가 合成培地보다 原形質體 裸出에 더 効果的이었다고 報告한 것과 Yoo 등(1985)이 菌絲의 生長이 빠르고 氣菌絲의 形成이 良好한 培地에서 原形質體 裸出量이 높다고 報告한 것과 一致하는 것이었다 (Table III).

나. 菌絲體 培養日數

팽이버섯의 菌絲體 培養日數가 原形質體 裸出에 미치는 影響을 究明하기 위해 培養日數別로 裸出된 原形質體의 量을 調査한 結果는 Table IV와 같다. 일반적으로 原形質體는 菌의 指數的 生長期의 末期에 있는 菌絲體로 부터 많이 裸出된다고 報告되어 있으며 (Peberdy; 1976) De Vries와 Wessels

Table IV. Influence of the physiological age of mycelia on the protoplast release.

Culture days	Colony area (cm^2)	Total protoplast yields ($\times 10^5 \text{ml}^{-1}$)	Protoplast yields/colony area ($\times 10^5 \text{ml}^{-1}$)
3	2.83	18.3	6.5
4	4.52	28.3	6.3
5	7.19	64.0	8.9
6	10.32	14.3	1.4

Novozym 234 + Cellulase CP(10mg ml^{-1}) was used for lytic enzyme.

0.6M Sucrose was used for osmotic stabilizer.

(1972)는 늙은 菌絲體보다는 어린 菌絲體에서 많이 原形質體를 얻을 수 있다고 報告한 바 있다. 또한, Charoensiri 等(1983)은 *Cephalosporium eichhorniae*의 指數的 生長期에서 많은 原形質體를 얻었다고 報告하였으며 Yamada 等(1983)은 *Collybia velutipes*, *P. ostreatus*를 2~3일 液體培養하였을 때 原形質體 裸出量이 높다고 하였고 Yoo 等(1985)은 *P. ostreatus*에서 4日, *P. florida*는 5日, *P. sajor-caju*는 3日 培養했을 때 原形質體 裸出量이 많았다고 報告함으로써 指數的 生長期에 原形質體 裸出量이 높음을 알 수 있었는데 팽이버섯의 경우도 指數的 生長期에 해당하는 5日째 原形質體 裸出量이 가장 많았다(Fig. 1). 培養日數에 따라 原形質體 裸出量이 變化하는 원인으로서 Peberdy 等(1976)과 Santiago 等(1982)은 細胞壁의 成分이 培養日數에 따라 變化하기 때문이라고 하였으며 De Vries 等(1973)은 *S. commune*에서 細胞壁 構成 成分中 S-glucan, R-glucan chitin의 變化에 대해 報告한 바 있다. 이상의 結果를 볼 때 菌의 種類에 따라 生長曲線이 다르고 이는 培地의 種類 等 培養條件에 큰 影響을 받으므로 培養日數는 生理的 觀點에서 考慮되어야 할 것으로 생각된다.

다. 細胞壁 分解酵素의 種類

팽이버섯의 細胞壁 構成成分이 明確히 究明되어

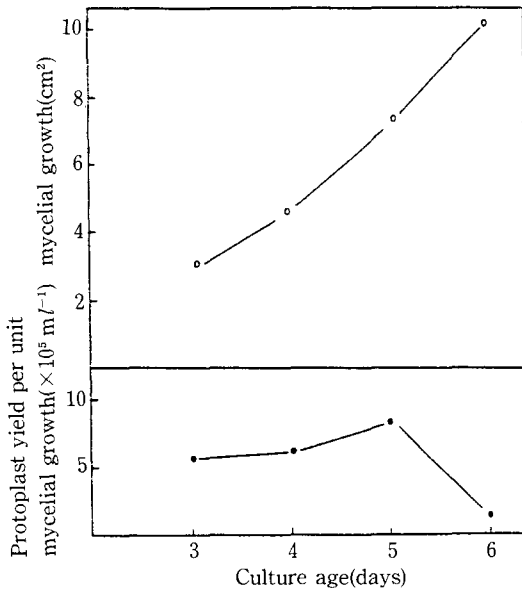


Fig. 1. Changes of mycelial growth of *F. velutipes* and influence of culture age on the protoplast release.

Table V. Effect of commercial enzymes on the protoplast release from mycelia of *F. velutipes*.

Enzyme preparation	Protoplast yields (x10 ⁵ ml ⁻¹)
1. Novozym 234	29.0
2. β-D- Glucanase	2.8
3. β- Glucuronidase	5.5
4. Novozym 234 + Cellulase Cp	52.0
5. Novozym 234 + Cellulase Onozuka R-10	14.0
6. Novozym 234 + β- Glucuronidase + Cellulase Cp	12.6
7. Novozym 234 + β- Glucuronidase + β- D- Glucanase	14.5
8. Novozym 234 + β- Glucuronidase + β- D- Glucanase + Cellulase Cp	18.5
9. Novozym 234 + Cellulase Onozuka R-10 + β- Glucuronidase	24.0
10. Novozym 234 + Cellulase Cp + Chitinase	40.0

Concentration of lytic enzymes was 10 mg ml⁻¹. Sucrose(0.6M) was used for osmotic stabilizer.

있지 못하여 擔子菌類에서 效果가 있음이 報告된 몇 가지 酵素를 單獨으로 또는 混合하여 原形質體 裸出量을 比較하였다. Giaja(1914)가 달팽이(*Helix pomatia*)의 消化液이 酵母의 細胞壁을 分解시킨다는 것을 발견한 이후 *Streptomyces*와 *Trichoderma*와 같은 微生物에서 만들어진 酵素를 利用하여 많은 菌類에서 原形質體를 얻었으며(De Vries ; 1973, 1972, Peberdy ; 1976) 오늘날 이러한 酵素들은 商品化되어 사용되고 있다(Hamlyn ; 1981). 이 研究에서 供試된 酵素들을 單獨으로 處理하였을 때 Novozyme 234가 29.0 x 10⁵ ml⁻¹로 가장 效果의 이었으며 2種類 이상의 酵素를 混合하여 사용하였을 때는 Novozyme 234 + Cellulase CP에서 52.0 x 10⁵ ml⁻¹로 가장 優秀하였다(Table V). Novozyme 234는 *Trichoderma harzianum*에서 分離精製된 酵素로서 많은 研究者들에 의해서 그 效果가 뛰어난 것으로 報告되어 있으며(Byun ; 1984, Cold ; 1983, Hamlyn ; 1981, Karasawa ; 1986) 이 研究에서도 單獨 使用時나 複合 使用時 가장 優秀한 細胞壁 分解能力을 나타내었다. 酵素를 單獨으로 使用

하는 것보다는 몇가지 酵素를 混合하여 使用하는 것이 原形質體 裸出에 더 効果的인 것으로 報告되어 있는데 (Hamlyn ; 1981, Yanagi ; 1983) 팽이버섯의 경우는 Novozyme 234+Cellulase CP, Novozyme 234+Cellulase CP+Chitinase에서만 Novozyme 234 單獨 處理에 비해 効果적이었을 뿐 다른 酵素의 組合에 있어서는 오히려 Novozyme 234의 酵素 活力이 抑制되어 單獨 處理보다도 效果가 낮을 것을 보여 주었다.

라. 細胞壁 分解酵素의 濃度

細胞壁 分解酵素의 濃도가 原形質體 裸出量에 미치는 影響을 究明하고자 原形質體 裸出에 가장 效果적이었던 Novozyme 234와 Novozyme 234+Cellulase CP를 각각 0~20 mg ml⁻¹로 濃도에 差異를 두어 比較해 본 結果 Table VI에서와 같이 두 경우 모두 10 mg ml⁻¹ 濃度에서 가장 많은 原形質體가 裸出되었다. 最適濃도까지는 濃도의 增加에 따라 原形質體 裸出量이 점차 增加하였으나 最適濃度 以上에서는 反應初期에 原形質體가 裸出되었다가 짧은 時間에 消滅되어 原形質體 裸出量の 急激한 減少를 보였다. 酵素 濃도에 따른 原形質體 裸出量の 變化에 대해 Byun(1984)은 *P. ostreatus*에서 Novozyme 234를 15 mg ml⁻¹ 濃도로 處理하였을 때 가장 效果적이라고 報告하였고, Lee(1986)는 *P. corucopiae*에서 菌絲 細胞壁를 分解시키는데 알맞는 Novozyme 234의 濃도는 5 mg ml⁻¹이라고 報告한 바 있다. 菌의 種類에 따라 最適 酵素 濃도가 다른 것은 菌의 細胞壁 構成成分 反應條件 等の 차이에서 오는 것으로 생각된다.

마. 酵素液의 pH

酵素液의 pH가 原形質體 裸出에 미치는 影響을

Table VI. Effects of the concentration of lytic enzyme on the protoplast release.

Enzyme concentration (mg ml ⁻¹)	Protoplast yields (x10 ⁸ ml ⁻¹)	
	Novozym 234	Novozym 234 + Cellulase CP
0	0.0	0.0
5	11.7	30.3
10	29.3	61.4
15	7.3	17.4
20	2.3	9.3

Sucrose(0.6M) was used for osmotic stabilizer.

Table VII. Effects of pH of osmotic stabilizer on the protoplast release.

Stabilizer (0.6M)	Protoplast yields (x10 ⁸ ml ⁻¹)
Sucrose (without buffer, pH 6.2)	28.0
Sucrose (pH 5.8)	13.1
Kcl (without buffer, pH 6.2)	10.0
Kcl (pH 5.8)	18.1

Novozym 234+Cellulase CP(5 mg ml⁻¹) were used for lytic enzyme.

Lytic mixtures were controlled at pH 5.8 by 20 mM phosphate buffer.

알아보기 위해 20 mM의 Phosphate buffer를 이용하여 滲透壓調節劑의 pH를 絲狀菌의 原形質體 裸出에 有效한 5.8로 調節後 細胞壁 分解酵素를 容解시킨 다음에 pH를 조절하지 않은 경우(pH 6.2)와 비교하여 原形質體를 裸出시켜 본 結果 사용된 滲透壓調節劑의 種類에 따라 酵素液 pH의 效果가 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 즉 分解酵素로서 Novozyme 234+Cellulase CP를 사용하고 滲透壓調節劑로서 KCl을 사용하였을 때는 pH 5.8에서 pH를 調節하지 않은 경우(pH 6.2)보다 많은 原形質體가 裸出되었고 Sucrose를 滲透壓調節劑로서 사용하였을 때는 pH 5.8에서 보다는 Buffer를 사용하지 않은 pH 6.2에서 더 많은 原形質體가 裸出되었다 (Table VII). 즉 滲透壓調節劑의 種類에 따라서 酵素의 活力에 미치는 Buffer의 效果가 다르게 나타났다.

바. 酵素液과의 反應時間

팽이버섯 菌絲體와 分解酵素液과의 反應時間에 따른 原形質體 裸出量을 調査한 結果는 Fig. 2와 같다. 原形質體의 裸出量이 最大가 되는 反應時間은 酵素의 種類와 濃도에 따라 각각 달랐으며 最適 反應時間까지는 時間의 經過에 따라 原形質體 裸出量이 점차 增加하였으나 最適 反應時間 이후로는 裸出量の 急激한 減少를 보였다. 즉 Novozyme 234+Cellulase CP를 10 mg ml⁻¹로 사용시에는 反應 3時間 後에, Novozyme 234를 5 mg ml⁻¹로 사용시에는 反應 4時間 後에, Novozyme 234를 10 mg ml⁻¹로 사용하였을 때는 反應 2時間 後에 각각 原形質體 裸出量이 最大가 되었다. 秦(1984)은 *P. ostreatus*에서, Go(1985)는 *P. sajor-caju*에서 각각 反應 4時間 後에 裸出量이 最大가 되었다고 報告하였으며, Yanagi 等(1983)은 *Coprinus macrorrhizus*에서 역

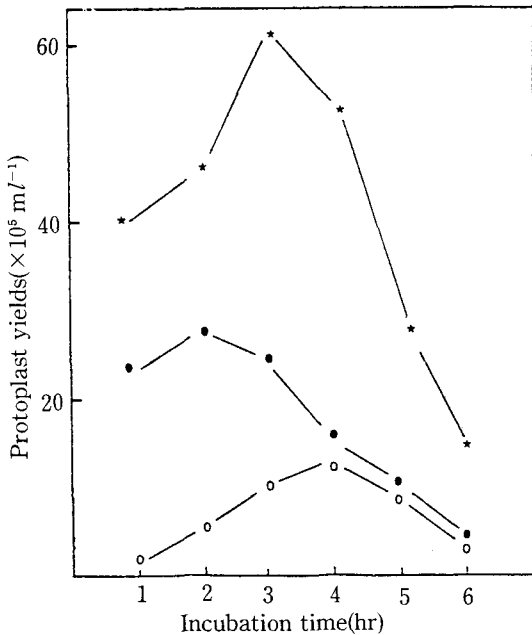


Fig.2. Effects of incubation time on the protoplast release.

○: Novozym 234(5 mg ml⁻¹)
 ●: Novozym 234(10 mg ml⁻¹)
 **: Novozym 234+Cellulase CP(10 mg ml⁻¹)

시 반응 4시간 후에 원형질체 나출량이 최대가 되었다고 보고하여 팽이버섯과 비슷한 결과를 나타내었으나 Lee(1986)는 *P. cornucopiae*에서 반응 90분 후에 裸出量이 最大가 되었다고 보고함으로써 菌의 種類와 사용된 酵素의 種類 및 濃度에 따라 最適 反應時間이 달라지는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 菌의 種類에 따라 細胞壁 成分이 다르기 때문이라고 생각된다. 한편, 反應時間이 增加할수록 原形質體의 크기가 커지는 것을 觀察할 수 있었는데 이

Table VIII. Effects of different stabilizer on the protoplast release from mycelia of *F. velutipes*.

Stabilizer (0.6M)	Protoplast yields (x10 ⁵ ml ⁻¹)
Sucrose	10.2
Dextrose	0.3
Mannitol	0.0
Sorbitol	0.8
Kcl	8.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.1

Novozym 234(5 mg ml⁻¹) was used for lytic enzyme.

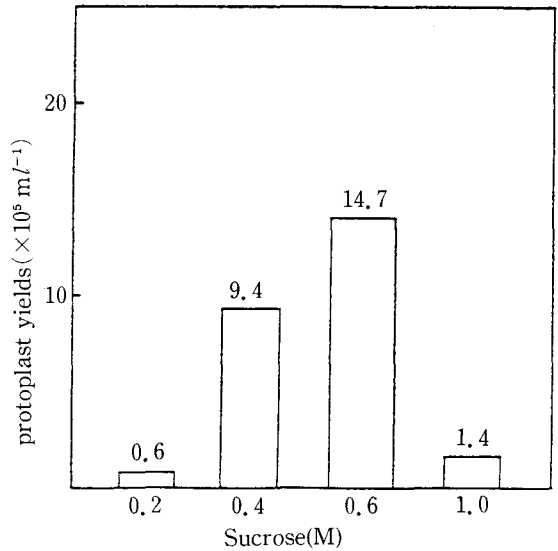


Fig.3. Effects of the mole concentration of stabilizer on the protoplast release. Novozym 234(5 mg ml⁻¹) was used for lytic enzyme.

는 原形質體內의 液胞가 커지기 때문이었다.

사. 滲透壓調節劑의 種類 및 濃度

滲透壓調節劑는 裸出된 原形質體의 安定性을 維持시켜 주는 役割을 하는 것으로서 여러 種類의 化學物質이 사용되고 있는데 그 成分 및 濃度가 原形質體 裸出에 미치는 影響은 매우 큰 것으로 報告되어 있다(Peberdy ; 1976). 이 研究에서는 Sucrose 등 6種類의 有機 및 無機 滲透壓調節劑를 材料로 實驗한 結果 Table VIII에서와 같이 Sucrose에서 原形質體 裸出量이 가장 많았고 다음은 KCl이었다. 특히 KCl의 경우 다른 滲透壓調節劑에 비해 裸出된 原形質體의 크기가 컸다. 適合한 滲透壓調節劑의 種類는 菌의 種類에 따라 달라서 *Cephalosporium* (Hamlyn ; 1981)은 NaCl 이, *S. commune* (De Vries ; 1972)과 *L. edodes* (Ushiyama ; 1977)는 MgSO₄·7H₂O가 效果의임이 報告되어 팽이버섯과는 다른 結果를 나타내었으나 Go(1985)가 *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*에서, Lee(1986)가 *P. cornucopiae*에서 sucrose가 滲透壓調節劑로서 優秀하다고 報告한 것과는 一致하는 結果이었다. 滲透壓調節劑로서 選拔된 sucrose의 濃度를 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 M로 濃度를 달리하여 原形質體를 裸出시켜 본 結果 0.6M에서 가장 많은 原形質體가 裸出되었다(Fig. 3).

摘 要

팽이버섯의 遺傳研究와 新品種 育成의 基礎資料를 얻기 위하여 팽이버섯의 原形質體 裸出에 影響을 미치는 諸 要因을 究明한 結果는 다음과 같다.

팽이버섯의 菌絲生長 및 原形質體 裸出에 알맞는 培地는 Potato Dextrose peptone Agar였으며 5日間 培養된 指數的 生長期의 菌絲體에서 原形質體 裸出量이 가장 많았다. MMM 培地에서는 전혀 裸出되지 않았다.

原形質體의 裸出은 Novozyme 234+Cellulase

CP를 10 mg ml^{-1} 濃度로 使用하였을 때 $52.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 로 가장 높았으며 最適 反應時間은 3時間이었다. Novozyme 單獨處理區에서는 裸出量이 반정도였다. 酵素液 pH의 影響은 滲透壓調節劑의 種類에 따라 差異를 보였다. 酵素液의 反應時間은 Novozyme 234+Cellulase CP 10 mg ml^{-1} 의 경우 3時間後 最大 裸出量을 보였다.

滲透壓調節劑는 0.6 M의 Sucrose가 效果的이었으며 緩衝液없이 pH 6.2로 使用할 때 原形質體의 裸出量이 가장 많았다.

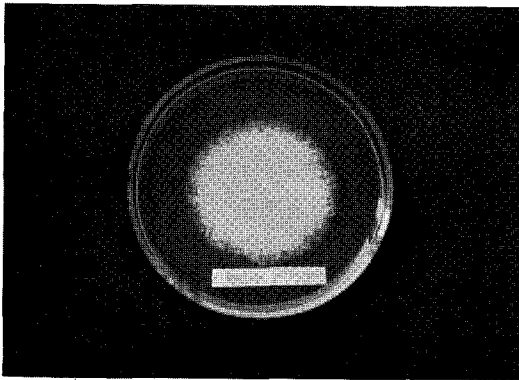


Plate.1. The colony of *Flammulina velutipes* cultured on PDP medium for 5 days at 25°C.

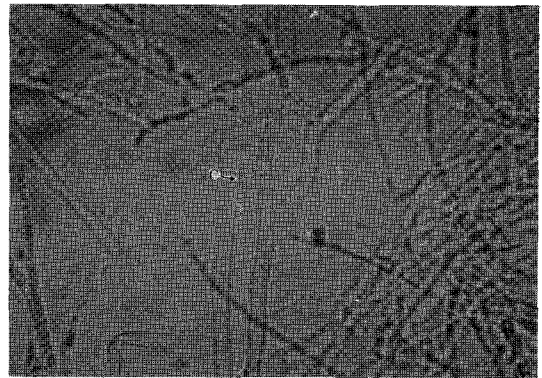


Plate.2. Mycelia and clamp connection(C) of *Flammulina velutipes*.

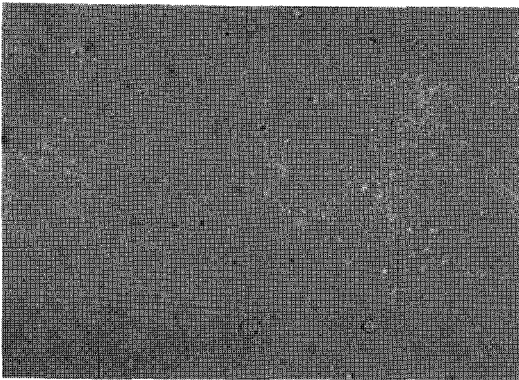


Plate.3. Released protoplasts from mycelia of *Flammulina velutipes*.

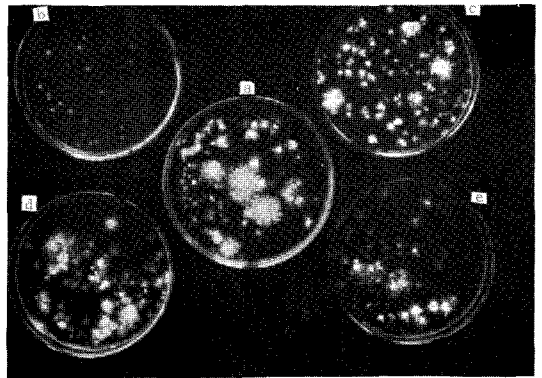


Plate.4. Reverted colonies from protoplasts of *Flammulina velutipes* on the PDP medium stabilized with various stabilizers.

a: Sucrose b: KCl c: Sorbitol d: Mannitol e: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

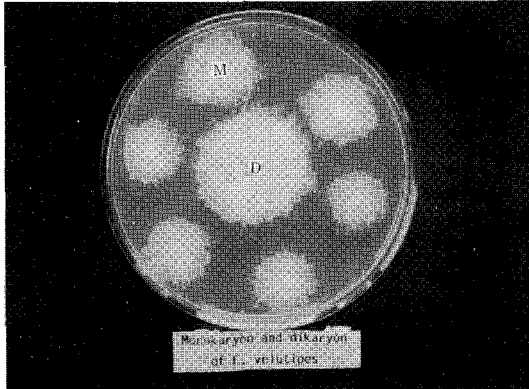


Plate.5. Dikaryotic(D) and monokaryotic(M) strains from reverted protoplasts of *Flammulina velutipes*.

参考文献

- Abe, M., Umetsu, H., Nakai, T. and Sasage, D. (1982): Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. *Agaric. Biol. Chem.* **46**: 1955-1957.
- Anne, J., Eyssen, H. and De Somer, P. (1974): Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Arch. Microbiol.* **98**: 159-166.
- Byun, M.O.(1984): Isolation and reversion of protoplasts from mycelium of *Pleurotus ostreatus*(Fr.) Quel. M. Sc. Thesis. Chungnam National University.
- Charoensiri, K. and Gregory, K.F.(1983): Reproduction of *Cephalosporium eichhorniae* as spheroplasts. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1539-1544.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H.(1972): Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* **73**: 13-22.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H.(1973): Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride* in releasing spheroplasts from fungi, particularly basidiomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.* **39**: 397-400.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H.(1973): Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified α -1, 3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* **76**: 319-330.
- Eddy, A.A. and Williamson, D.H.(1957): A method of isolating protoplasts from yeast. *Nature.* **179**: 1252-1253.
- Emerson, S. and Emerson, M.R.(1958): Production, reproduction and reversion of protoplast like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **44**: 668-671.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Zsolt, J.(1974): Fusion of fungal protoplasts. *Nature.* **248**: 793-794.
- 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 Alic, M.(1983): Formation, fusion and regeneration of protoplasts from wild type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 260-263.
- 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.
- Karasawa, M., Tosaka, O., Ikeda, S. and Yoshii, H. (1986): Application of protoplast fusion to the development of L-Threonine and L-Lysine producers.
- Lee, Y.H., Park, Y.H., Yoo, Y.B. and Min, K.H. (1986): Studies on protoplast isolation of *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* **14**: 141-148.
- Moore, D.(1975): Production of *Coprinus* protoplasts by use of chitinase or helicase. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**: 134-136.
- Ohnuki, T., Etoh, Y. and Beppu, T.(1982): Intraspecific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *M. miehei* by protoplast fusion. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 451-458.
- Park, Y.D., Park, G.S. and Lee, J.S.(1985): Protoplast formation and regeneration of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Appl. Microb. Bioeng.* **13**: 311-314.
- Peberdy, J.F.(1976): Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. In "Microbial and plant protoplasts"(eds. J.F. Peberdy, A.H. Rose, H.J. Rogers. and E.C. Cocking). *Academic Press*, London. pp.39-50.
- 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**: 23-26.
- Santiago, C.M. Jr.(1982): Production of *Volvariella* protoplasts by use of *Trichoderma* enzyme. *Mushroom Newsletter for the Tropics.* **3**: 3-6.
- Strunk, C.(1965): Über Entstehung und Reversion enzymatisch erzeugter protoplasten van *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch.* **3**: 242-244.
- Takemaru, T.(1961): Genetical studies on fungi. X. The mating system in Hymenomyces and its genetical mechanism. *Biol. J. Okayama Univ.* **7**: 133-211.
- Tonomura, H.(1978): *Flammulina velutipes* In "Edible mushrooms" *Academic Press, Inc.* pp. 409-421.
- Ushiyama, R. and Nakai, Y.(1977): Protoplasts of shiitake, *Lentinus edodes*(BERK) Sing. Rept. *Tottori, Mycol. Inst.*(Japan). **15**: 1-5.
- Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Kakimoto, Y. and Sasaki, T.(1983): Preparation and regeneration of mycelial protoplasts of *Cellybia velutipes* and *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **17**: 298-300.
- Yanagi, S.O. and Takebe, I.(1983): Efficient protoplast isolation from *Coprinus macrophizus* and other basidiomycetes. In "Protoplast 1983", (eds. I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinnen, R. Hutter, P. J. King, R.D. Shillito). pp.295-296.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. and Park, Y.H.(1985): Isolation of auxotrophic mutants from protoplasts of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Kor. J. Mycol.* **13**: 75-78.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. and You, C.H.(1985): Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* **13**: 1-10.
- 秦京熙(1984) : *Pleurotus ostreatus*의 protoplast 生成과 還元에 관한 研究. 석사학위논문, 숙명여자대학교 대학원.

Accepted for Publication 9 May