

사철느타리버섯 形質轉換株의 特性

卞明玉 · 金庚守 · 車東烈
農村振興廳 農業技術研究所 菌茸科

Characteristics of Transformants in *Pleurotus florida*

Myung-Ok Byun, Kyung-Soo Kim and Dong-Yeul Cha
Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute
R. D. A. Suweon 441-707

ABSTRACT: *Pleurotus florida* was transformed by complementation of auxotrophic mutant using chimeric plasmid containing *Flammulina velutipes* leu 2 gene and pBR 322 replicon. Mycelial morphology of transformants was grown and compared on mushroom complete and minimal medium. Transformants were mated with monokaryon and their genetic recombination was investigated for the morphology of fruitbody and spore analysis. Leu⁺ transformant showed same mating type of A₁B₁ as to the untransformed mutant. The transformant and the untransformed mutant were mated with monokaryon of which mating type is A₂B₁, respectively. Although fruitbody of the untransformed mutant was not produced, leu⁺ transformant produced fruitbody. Spore analysis showed that leucine requiring spores from fruitbody of leu⁺ transformant were diminished when compared with those of untransformed mutant.

KEY WORDS: *Pleurotus florida*, transformation, fruitbody type, spore analysis.

느타리버섯(*Pleurotus sp.*)은 하나의 子實體 내에 서는 4 극성의 불화합성을 나타내고 있다. Clamp 形成에 關與하는 A 遺傳子와 核 移動에 關與하는 B 遺傳子が 和合性인 있는 유전성을 띠는 性으로, 두개의 和合들이 결합되어야 子實體를 形成한다. 자연계에는 느타리버섯에 663 A와 190 B 要因이 있어 交配 확율이 훨씬 높다. 느타리버섯종의 分類에서 *Pleurotus florida*는 *P. ostreatus*의 모든 種과 交配가 되기 때문에 *P. ostreatus*의 고온성 系統으로 간주되고있다(Eger, 1978).

진균류의 形質轉換은 *Neurospora*, *Aspergillus* 등에서 많이 이루어지고 있으며, 버섯류에는 營養要求性 유전자를 利用하여 치마버섯(*Schizophyllum commune*, Munoz-Rivas 등 1986), 먹물버섯(*Coprinus cinereus*, Binninger 등, 1987), *Phanerochaete chrysosporium*(Alic 등, 1989), 느타리버섯(Byun 등, 1989a) 등에서 이루어지고 있다. 形質轉換株의 特性은 營養要求性 보완, southern hybridization, 形

質轉換株로부터 벡터 DNA의 재분리 등으로 확인할 수 있으나, 形質轉換株의 子實體로부터 포자分析도 形質轉換의 特性을 나타내었다.

사철느타리버섯(*P. florida*) 營養要求性 菌株를 形質轉換 시킨후 子實體模樣, 포자形成, 포자分析을 實施하였다.

材料 및 方法

菌株 및 벡터: 使用한 菌株는 Table 1과 같이 營養要求性 菌株와 1 核 菌株로서 P 101은 形質轉換을 위한 숙주로 使用 하였으며 2016-Rib⁻, 2016-1, 2016-4, 2018-Arg⁻는 形質轉換株 特性調査를 위한 交配 菌株로 使用하였다. 形質轉換 벡터는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*) total DNA를 Sau 3 A로 切斷後 pBR 322의 Bam HI site에 크로닝한 벡터 pM 301(Byun 등, 1989b)을 使用하였다(Table 1).

Table 1. Fungal strains used in this experiment

Strains	Phenotype	Scientific name
P 101	Leu ⁻ , Ura ⁻ , Cyt ⁻ , A ₁ B ₁	<i>Pleurotus florida</i>
2016-Rib	Rib ⁻ , A ₂ B ₁	〃
2018-Arg	Arg ⁻	<i>Pleurotus ostreatus</i>
2016-1	Monokaryon, Wild	<i>Pleurotus florida</i>
2016-4	〃	〃

形質轉換 : 營養要求性 變異 菌株을 버섯 完全培地(Mushroom Complete Medium)에 25-27°C 로 3-4日間 培養한 다음 生育이 왕성한 部分을 다시 버섯 完全培地에 셀로판지를 깔고 직경 5 mm 크기의 菌絲體를 接種 하였다. 原形質體 分離를 위한 sucrose(0.6M)를 添加한 滲透壓 調整劑에 Novozym 234(0.5 mg/ml, Novo industrie Denmark)와 Cellulase(Onozuka R-10, 0.5 mg/ml, Yakult, Japan)을 添加하여 녹인후 18,000 rpm에서 60분간 遠心分離후 上등액을 취하여 使用 하였다. 原形質體는 셀로판지에 培養한 菌絲體에 酵素液을 處理하여 30°C 에서 3시간 세포벽을 分解시킨 후 Sintered glass filter (porosity 1)로 原形質體만 收集하여 0.6 M sorbitol을 포함한 MOPS(4-Morpholino propane sulfonic acid) pH 7.2 緩衝溶液 (SM)으로 2회 洗滌 하였다. 原形質體를 다시 0.6 M sorbitol과 0.1 M CaCl₂를 포함한 MOPS pH 7.2 緩衝溶液(SMC)으로 洗滌後 SMC 溶液 1 ml에 懸濁한 다음 0.5 ml씩 2개의 試驗管에 나누었다. 하나의 試驗管에는 TE(10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0)에 녹인 DNA를 50 μ를 넣고, 또다른 試驗管에는 TE 50 μ를 混合 하였다. 44% PEG(Polyethylene glycol 分子量 8,000) 溶液을 0.3 ml씩 添加後 얼음위에 20분 培養시킨다음 35°C 에 5분 處理하였다. SM 으로 2회 洗滌하여 PEG 溶液을 除去하였다. 1 ml SM에 10⁶의 原形質體를 懸濁하여 0.6 M sorbitol을 含有한 버섯 完全再生培地와 버섯 最小再生培地에 接種後 0.75% 저농도 한천 再生培地를 overlay 하였다. 25-27°C 에서 10-14일 培養後 形質轉換된 菌叢을 調査 하였다.

Mating type 決定 : ASI 2016 子實體를 채취하여 無菌的으로 孢子를 收集한후 포자현탁액을 10³포자를 버섯 完全培地에 接種후 25-27°C 에 5-7일간 培養하여 독립적으로 發生한 菌叢을 각각 分離하여

이들 菌絲體를 현미경으로 검경하여 clamp가 없는 25-30 개의 1核菌絲(Monokaryon)를 選拔하였다. 이들 각 1核菌絲를 full combination 으로 버섯 完全培地에 10mm 간격을 두고 두개의 菌株를 接種후 10-15日間 培養 하였다. 培養이 完了되면 두 菌株의 접촉 부위와 양 끝의 菌絲를 채취하여 clamp 유무를 확인후 Eger(1978)의 方法으로 mating type을 定하였다. A1B1, A1B2, A2B1, A2B2와 같이 4개 交配型으로 定해진 菌株와 形質轉換株를 대치 培養하여 부위 별로 clamp 形成을 調査 하므로써 形質轉換株의 交配型을 定하였다.

核染色 : 버섯 完全培地사이에 菌株를 接種하고 無菌處理된 slide glass를 培地위에 넣어주어 slide glass위에 菌絲가 生育하도록 하였다. 菌絲가 자란 slide glass를 사레에서 꺼내 DAPI(4'6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)로 버섯 菌絲의 核을 염색하여 檢경 하였다. 증류수에 10 μg/ml로 녹인 DAPI 용액을 培養한 菌絲體에 1-2방울 넣고 cover glass를 씌워 20-30분후 형광 현미경하에서 UV를 利用하여 檢경후 寫眞을 촬영하였다.

Southern hybridization : 形質轉換된 菌株의 total DNA를 分離하여 agarose gel에서 전기영동한 후 gene screen plus membrane(Dupont)에 옮겼다. Probe DNA(0.5-1.0 μg)는 방사성 동위원소인 ³²P로 labelling한 pM 301 plasmid와 65°C 에서 24시간 hybridization 하였다(Byun 등, 1989b).

子實體 形成 : 버드나무뚝밥 80%와 미강 20%를 混合하여 물을 뿌리며 수차례 뒤집어 水分이 63-65%로 조절한 다음 링겔병에 550-650g 정도 넣고 표면을 약간 다진후 직경 1.5-2.0 cm 막대기로 培地상부에서 중심부에 구멍을 뚫어준 후 솜마개를 하고 90분간 高壓 殺菌하였다. 톱밥 培地가 식은 후 菌株別로 培養된 接種원을 接種하여 28°C 에서 30일간 培養하였다. 느타리버섯균이 완전히 자라면 병을 깨고 보습을 위해 신문을 덮고 溫度는 15°C 濕度는 90% 정도의 버섯 발이 유기실에서 낮에만 光을 調査하면서 버섯 發生을 유도하였다.

結果 및 考察

팽이버섯 DNA를 Sau 3A로 部分 切斷後 pBR 322 의 Bam HI site에 크로닝한 백터 pM 301은 팽이

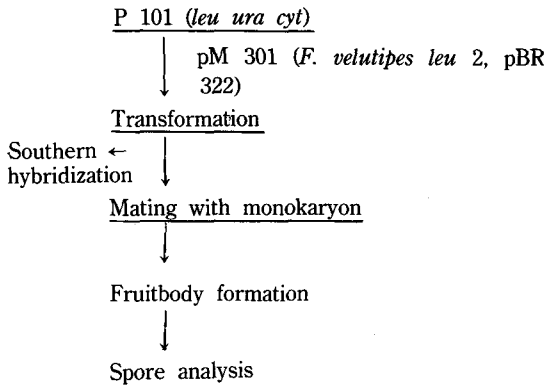


Fig. 1. Scheme of transformant analysis.

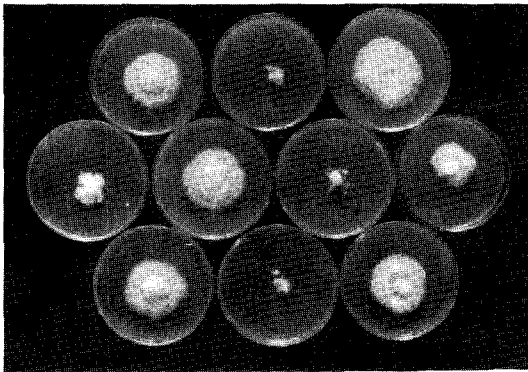


Fig. 2. Mycelial growth of transformants on mushroom complete medium. Upper left colony-auxotroph of *P. florida* (P 101), the other colonies-transformants.

버섯의 DNA 部分에 leu 2 gene을 지니고 있는것으로 추정 되었다(Byun 등, 1989b). 사철느타리버섯 영양要求性菌株 P101(leu, ura, cyt)을 pM 301백터를 이용하여 形質轉換 하였다. 形質轉換株는 母菌株의 영양要求性이 보완됨으로써 버섯 最小培地에서 생육하고 southern hybridization 으로 DNA 염기유사성을 確因하였다. 形質轉換株의 子實體 特性을 보기 위하여 1核 菌絲와 交配하여 2核 菌絲로變化시킨후 톱밥 培地에서 子實體 發生을 誘導하였고, 形成된 子實體의 포자를 分析하였다(Fig. 1).

P101은 營養要求性 菌株로서 버섯 最小培地에서 생육하지 못하고 버섯 完全培地에서 생육이 良好하나 形質轉換株는 버섯 最小培地에서 생육이 어느정도 이루어지고 버섯 完全培地에서 菌絲생육이 母菌株와 비슷한 균種, 母菌株보다 느린것, 菌絲生長이

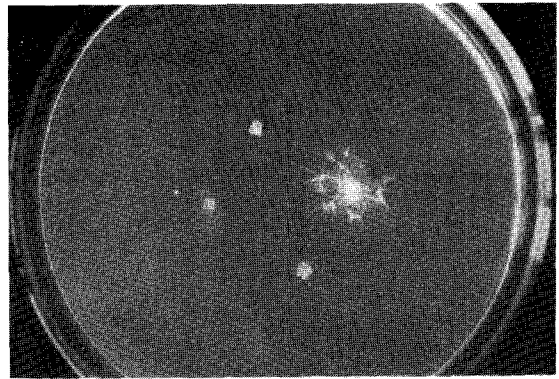


Fig. 3. Mycelial growth of transformants on mushroom minimal medium. Top: auxotroph of *P. florida* (P 101), the other colonies : transformants.

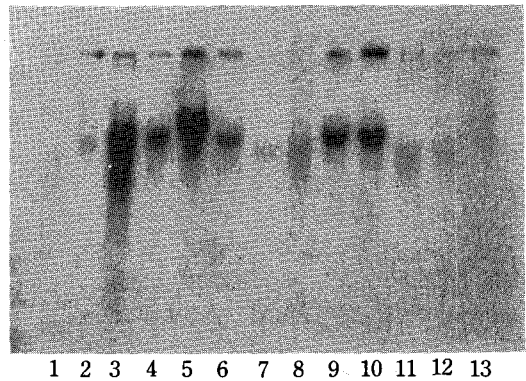


Fig. 4. Southern hybridization of transformants with ³²P-labelled pM 301 vector. 1 : auxotroph (P101), 2-13 : transformants.

극히 부진한것 등 形質轉換株 간에 여러가지 特性이 나타났었다(Fig. 2, Fig. 3).

形質轉換株의 DNA를 pM 301 백터를 ³²P로 labelling한 후 southern hybridization한 結果 形質轉換하지않은 營養要求株는 hybridization이 이루어지지 않았으나 形質轉換株들은 hybridization이 되었으며 특히 形質轉換株 # 3, 4, 5, 6, 9, 10 번 菌株는 강하게 hybridization이 되어 plasmid vector 염기서열이 存在하고 있었다(Fig. 4).

形質轉換株는 母菌株가 1核 菌絲이므로 모두 1核 菌絲이었다. 따라서 子實體 形成을 위하여 다른 1核 菌絲와 交配 하였다.

사철 느타리 ASI 2016의 단포자를 分離하여 1核 菌株를 選抜한후 1核 菌株간 상호交配하여 clamp

Table 2. Mating the transformants obtained from auxotrophic mutant of *P. florida* with monokaryon showing four different mating type

Transformants	Mating Type			
	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
P 101	-	-	(+)*	+**
P 101-#3	-	-	(+)	+
P 101-#23	-	-	(+)	+

*(+): False clamp
 **+: Clamp formation

形成, 核移動을 調査하여 A₁B₁, A₁B₂, A₂B₁, A₂B₂ 交配型을 定하였다. 이들 4가지 交配型和 營養要求性인 母菌株 P101을 交配한 結果 母菌株는 A₁B₁을 나타내어 A₂B₂ 交配型和 交配함으로써 2核 菌絲가 形成되었다. 또한 A₂B₁ 交配型和 交配 하였을때 clamp가 菌絲 접촉 부위에만 形成되고 核이 移動되지 못하므로 菌絲接合部位에서 먼 부분에는 클램프가 形成되지 않아 완전한 2核 菌絲가 이루어지지 않았다(Table 2).

Clamp를 形成한 2核 菌株와 clamp를 形成하지 않는 1核 菌株의 핵을 調査한 結果 clamp를 形成하지 않은 菌絲는 1核이며 clamp를 形成한 菌株는 2核 이었다(Fig. 5).

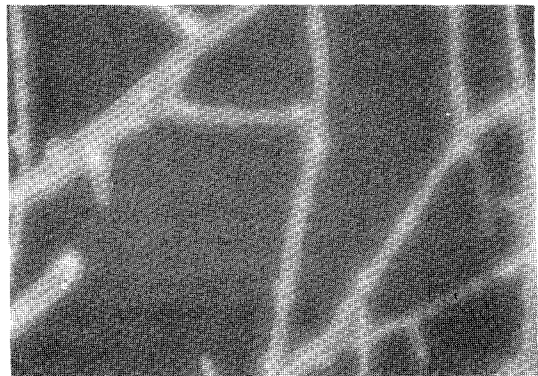
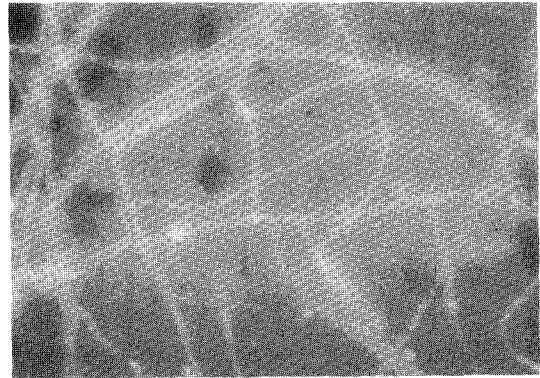


Fig. 5. Nuclear staining of *P. florida* mycelia. Upper: mononucleate without clamp connection, lower: binucleate with clamp connection.

Table 3. Fruitbody formation of transformants obtained from auxotrophic mutant P101 of *P. florida* mated with monokaryon 2016-1

Vector	Transformants	Fruitbody Type	Spore formation*
pM 301	M 2	Plane type	+++
∕	M 3	Eroded type	++
∕	M 5	Funnel type	-
∕	M 6	∕	-
∕	M 21	Eroded type	++
∕	M 22	Funnel type	-
∕	M 23	∕	-
∕	M 24	∕	-
∕	M 25	∕	-
∕	M 26	∕	-
∕	M 27	∕	-
Control	P 101	Eroded type	++

*+++ : many, ++ : a few, - : few

Table 4. Fruitbody formation of mated transformants with several monokaryon

Monokaryon (mating type)	Transformants (vector)	Clamp* connection	Fruitbody type	Spore** formation
2016-1 (A ₃ B ₃)	P 101(control)	+	Eroded	+
	# 21(pM 301)	+	〃	+
2016-4 (A ₂ B ₂)	P 101(control)	+	Bell	+++
	# 21(pM 301)	+	Eroded	+
2016 Rib-(A ₂ B ₁)	P 101(control)	(+)	No	-
	# 21(pM 301)	(+)	Plane	+
2018 Arg ⁻ (-)	P 101(control)	+	Plane	++
	# 21(pM 301)	+	〃	++

*+; clamp formation, (+); false clamp

**+++; many, ++; moderate, +; a few, -; not tested

交配한 2核 菌株를 톱밥培地에 접종하여 培養이 完了되면 溫度, 濕度, 光 등 條件을 調節하여 발이를 誘導하였다. 母菌株를 톱니형 子實體를 形成한데 비해 形質轉換株는 우산형, 톱니형, 깔데기형의 子實體가 形成되었다. 포자形成은 깔데기형은 포자가 매우 적거나 거의 없으며 우산형은 포자가 많고 톱니형은 중간 정도를 나타냈다(Table 3).

形質轉換株를 여러가지 다른 交配型和 交配후 子實體 形成을 본 結果 交配型에 따라 子實體가 母菌株와 形質轉換株에서 同一하게 形成되었다. 그러나 2016-4, 2016 Rib⁻ 菌株와 交配할때는 母菌株와 形質轉換株 子實體 形成이 差異를 나타내어 2016-4와 交配시 母菌株는 중형, 形質轉換株는 톱니형 子實體를 形成하였다. 또한 2016-Rib와 交配하였을때는 核 이동이 안되고 clamp 형성 유전자만 다르므로 菌絲접합 부위만 clamp가 형성되었으며 자실체는 母菌株는 형성하지 못하나 形質轉換株는 우산형 자실체가 형성되었다. 포자형성은 중형 자실체에서 많이 형성 되었고 톱니형은 적게 형성 되며 우산형은 약간 많이 형성되었다(Table 4, Fig. 6).

形質轉換株의 포자 分析 結果 발아율이 母菌株에 비해 形質轉換株가 약간 높았으나 우산형이 특이하게 높았다. 母菌株의 營養要求性 補完은 우산형과 톱니형 모두 母菌株에 비하여 월등히 높았다(Table 5).

母菌株의 交配型이 A₁B₁이었을때 벡터를 使用하여 形質轉換시킨 形質轉換株의 交配型도 母菌株와 同一하게 A₁B₁이었다.

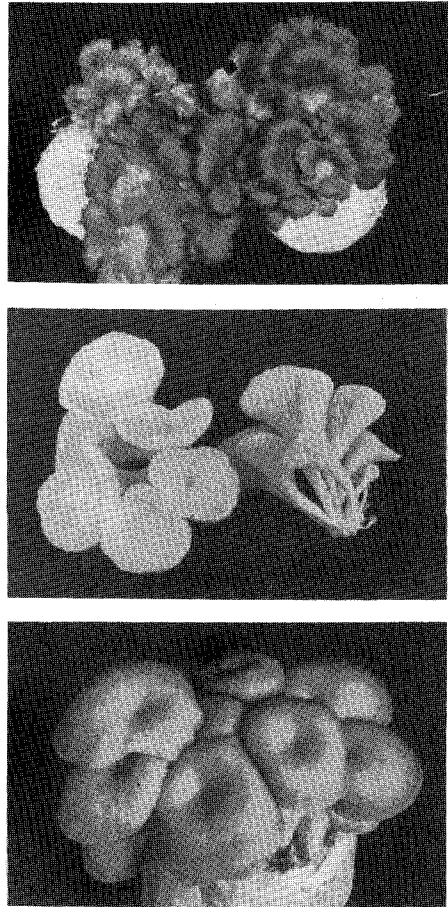


Fig. 6. Fruitbody type of transformants obtained from auxotrophic mutant P101 of *P. florida* mated with monokaryon. Upper; Eroded type, Middle; Funnel type, Lower; Bell type.

Table 5. Genetic analysis of transformants obtained from auxotrophic mutant P101 of *P. florida*

Vector	Transformants x 2016-1	Fruitbody type	Germination ratio	Leu ⁺ (%)
pM 301	M2	Plane type	0.50	55.4
pM 301	M3	Eroded type	0.11	58.0
Control	P 101	〃	0.08	16.1

Table 6. Spore analysis of transformants mated with auxotroph (2016-rib)

Strain	Vector	Fruitbody by mating with 2016-rib	# of colonies	Spore characteristics				
				Leu ⁺ , Rib ⁺	Rib	Leu	Leu ⁺	Total
P 101-21	pM 301	Plane type		34	41	5	72	152
			percentage	22.4	27.0	3.3	47.4	100
P 101	Control	No fruitbody formation						

母菌株는 clamp 形成 유전자 A 유전자만이 다르고, 핵移動에 관여하는 B 유전자는 同一한境遇 A ≠ B=에서 接合 部位만 clamp가 形成되며 버섯 발이가 이루어지지 않았다. 그러나 形質轉換株는 A 유전자만 다르고 B 유전자는 同一한 A ≠ B=와 交配하였을때 母菌株와 같이 接合 部位만 clamp가 形成 되었으나 母菌株와 달리 子實體를 形成하였다. 子實體의 特性을 檢定하고자 포자 分析을 한 結果 riboflavin 要求성과 leucine 要求성의 양친 特性을 모두 지니고 있었으며 形質轉換에 의하여 leucine 要求성이 補完된 菌株가 47.4% , 交配후 leucine 要求성과 riboflavin 要求성이 모두 補完된 菌株가 22.4% 였다(Table 6).

본 試驗의 結果 사철느타리버섯 菌絲로 부터 分離한 원형질체에 DNA 벡터를 이용한 形質轉換이 可能하며 形質轉換株는 母菌株와 같이 1核 菌絲이며 同一한 交配型을 지니고 있었다. 形質轉換株를 1核 菌絲와 交配하여 子實體 發生을 본 結果 母菌株와 子實體 形成, 子實體 模樣 및 포자 形成에 차이가 있으며 形質轉換株의 포자分析 結果 營養 要求성이 補完된 것을 確인 하였다.

摘 要

사철 느타리버섯 營養要求성 菌株를 팽이버섯 leu

2 유전자를 지닌 pM 301 벡터를 利用하여 營養要求성을 補完 시킴으로써 形質轉換 하였다. 形質轉換 菌株의 菌絲生長을 버섯 完全培地나 버섯 最小培地에서 比較하였다. 形質轉換株는 1核 菌絲와 交配후 子實體 形態를 比較하고 포자 分析에 의하여 유전分析을 하였다. 子實體 發生과 子實體 모양이 形質轉換株는 모균주와 다른 特性이 나타났다. 母菌株는 交配型이 A₁B₁으로 A₂B₁ 交配型인 1核 菌株와 交配에 의하여 子實體를 形成하지 못하나 形質轉換株는 交配型이 A₁B₁이고 A₂B₁ 1核 菌株와 交配 하였을때 子實體를 形成하였다.

參考文獻

- Byun, M. O., Yoo, Y. B., Go, S. J., You, C. H., Cha, D. Y. and Park, Y. H. 1989. Transformation of the β-isopropylmalate dehydrogenase gene of *Flammulina velutipes* into *Pleurotus florida*. *Korean Mycol* 17: 27-30.
- Byun, M. O., Yoo, Y. B., Go, S. J., You, C. H., Cha, D. Y. and Park, Y. H. 1989. Cloning and expression of leu 2 gene from the basidiomycete *Flammulina velutipes* in *E. coli*. *Korean Mycol* 17: 35-38.
- Eger, G. 1978. Biology and Breeding of *Pleurotus*. in *The Biolgy and Cultivation of Edible Mushrooms*. ed. S. T. Chang and W. A. Hayes, Academic Press,

- New York, pp. 497-520.
- Munoz-Rivas, A., Specht, C. A. Drummond, B. J., Froeliger, E., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. 1986. Transformation of the basidiomycete, *Schizophyllum commune*. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 103-106.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Accepted for Publication on June 15, 1992