

노랑느타리버섯의 原形質體 分離에 관한 研究

李娟姬 · 朴容煥* · 劉英福* · 閔庚喜

淑明女子大學校 理科大學 生物學科 · 農村振興廳 農業技術研究所 菌柄科*

Studies on Protoplast Isolation of *Pleurotus cornucopiae*

Yeon-Hee Lee, Yong-Hwan Park*, Young-Bok Yoo* and Kyung-Hee Min

Department of Biology, College of Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140 and
Department of Applied Mycology and Mushroom, Institute of Agricultural Sciences*, Suweon 170, Korea

Abstract: The optimal conditions for high yields of mycelial protoplasts from *P. cornucopiae* were established. The concentration of enzyme system containing Novozym 234, β -D-glucanase and β -glucuronidase was 5mg ml⁻¹ each. The osmotic stabilizer most effective for protoplast isolation was 0.6 M sucrose. The optimal reaction time of mycelium with the lytic mixture was 90 min in a shaking condition at 120 strokes min⁻¹. When the mycelium of *P. cornucopiae* was cultured for 4 days on mushroom complete medium at 28°C, the formation of protoplast was effective. When the pH of the digestion mixture with 0.6 M sucrose as stabilizer varied between pH 4.0 and 7.0, the production of protoplasts was effective in phosphate buffer (pH 6.2) and Na-maleate buffer (pH 5.0). Generally, phosphate buffer was more effective for protoplast isolation than Na-maleate buffer, but 0.6 M sucrose osmotic stabilizer without adjusting pH was most effective. Using these conditions, protoplasts from *P. cornucopiae* were obtained at a ratio 1×10⁷ ml⁻¹.

Keywords: Protoplast isolation, *Pleurotus cornucopiae*, Basidiomycetes.

原形質體는 Weibull(1953)이 lysozyme 처리로 *Bacillus megaterium*에서 처음으로 분리한 이후 많은 酵母와 絲狀菌類에서 분리되었다(Eddy and Williamson, 1957; Foury and Goffeau, 1973; Emerson and Emerson, 1958; Bachmann and Bonner, 1959; Gabriel, 1968; Ann 등, 1974; Gibson and Peberdy, 1972; Moore and Peberdy, 1976).

高等菌類인 Basidiomycetes에서는 Strunk(1965)가 *Polystictus versicolor*에서 처음 原形質體를 분리한 이후 *Schizophyllum commune* (De Vries and Wessels, 1972, 1973), *Coprinus cinereus* (Moore, 1975), *Lentinus edodes* (Ushiyama and Nakai, 1977), *Tricholoma matsutake* (Abe 등, 1982), *Phanerochaete chrysosporium* (Gold 등, 1983), *Flammulina velutipes* (Yamada 등, 1983), *Coprinus macrophizus* (Yanagi and Takebe, 1983), *Pleurotus ostreatus* (Yamad 등, 1983; 秦와

Byun, 1984; Go, 1985), *Pleurotus sajor-caju* (Go, 1985)에서 분리되었고 특히 Yoo 등(1985)은 食用버섯의 原形質體 분리에 관한 諸條件을 밝힘으로써 原形質體를 이용한 育種 方法의 기초연구를 하였다.

분리된 原形質體는 原形質體 融合(Kevei 등, 1977; Peberdy, 1980; Yoo 등, 1984), 細胞內 器官 및 DNA 분리(Morris, 1978; Peberdy, 1979), 形質轉換(Case 등, 1979; Tilburn 등, 1983; Ballance 등, 1983)에 유용하게 사용되고 있고 分類學的인 연구에서도 이용되어지고 있다(Sipiczki 등, 1982).

本 研究는 食用버섯의 一種인 노랑 느타리버섯의 遺傳研究 및 다른 느타리 種과의 融合을 하기 위한 基礎的인 研究로서 노랑 느타리버섯의 原形質體 분리에 영향을 미치는 酵素의 種類와 濃度, 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 등에 대해서 조사하였다.

材料 및 方法

菌株 및 培養

本實驗에 사용한 菌株는 農村振興廳 農業技術研究所 保存菌株인 *Pleurotus cornucopiae*(Palu ex Pers) Roll ASI 2011(dikaryon), 즉 노랑 느타리버섯을 28°C에서 3~4 일 배양하여 사용하였다.

培地

菌 培養을 위한 버섯 完全培地(mushroom complete medium, MCM; Raper 등, 1972)의 성분은 다음과 같다. Bacto-yeast extract 2.0 g, Bacto-peptone 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.46 g, K₂HPO₄ 1.0 g, glucose 20.0 g, Bacto-agar 20.0 g을 증류수 1 l에 녹여 120°C에서 30 분간 멸균하여 사용하였다.

滲透壓 調節劑

magnesium sulfate(MgSO₄·7H₂O), mannitol, potassium chloride(KCl), sorbitol, sucrose를 0.4, 0.6, 0.8 M로 조절하여 사용하였다.

酵 素

Novozym 234(Novo Industri, Denmark), β-D-glucanase(BDH Chemicals Ltd, U.K.), β-glucuronidase(Sigma Chem. Co., U.S.A.)를 5 mg ml⁻¹으로 滲透壓 調節劑에 첨가하여 4°C 냉장고에 두면서 부드럽게 흔들여 완전히 녹인 후 membrane filter(Gelman Sc., 0.2 μm)로 여과하여 사용하였다.

原形質體 分離

노랑 느타리는 MCM Petri dish에 3일 동안 培養시켜 놓았다. 먼저 멸균된 cellophane membrane(dialysis membrane, Fisher Scientific Co.)을 MCM위에 놓고 멸균수를 2-3방울 떨어뜨린 후 살균한 spreader로 cellophane membrane을 끌고루 편다음 미리 培養시켜 놓은 菌株의 가장자리를 직경이 5 mm 되는 cork borer로 절단하여 cellophane membrane위의 4 군데에 접종하여 28°C에서 4 일 동안 培養하였다. cellophane membrane 상에서 菌株가 자라면 cellophane membrane을 잘라서 지름 5 cm되는 작은 Petri dish에 2 colonies를 넣고 酵素液 2 ml과 혼합하여 23~30°C에서 120 strokes min⁻¹로 90 분 동안 흔들었다. 原形質體分離量은 분리된 原形質體를 광학 현미경하에서 haemocytometer를 이용하여 數를 계산하였다.

結 果

酵素 濃度の 影響

菌絲의 細胞壁을 완전히 분해하면서 裸出된 原形質體를 파괴시키지 않을 정도의 酵素濃度가 중요한데 Novozym 234 濃度를 ml당 2, 3, 4, 5, 7, 10 mg으로 하여 90 분 동안 반응시켜 본 결과 Table I에서와 같이 5 mg 일때 分離量이 가장 많았으며 濃度가 높아지거나 낮아지면 적어졌다. 특히 10 mg에서는 처리 30 분에 극히 적은 數의 原形質體가 보였고 90 분 이상에서는 거의 관찰할 수 없었으며 파괴되어 가는 原形質體를 볼 수 있었다.

酵素系의 影響

細胞壁 分解 酵素를 단독으로 사용하는 것보다는 혼합사용하는 것이 原形質體 分離에 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있는데(Hamlyn 등, 1981; Yoo 등, 1985) 본 실험에서도 Novozym 234, β-D-glucanase, β-glucuronidase를 5 mg·ml⁻¹으로 하여 단독사용한 것보다 Novozym 234+β-glucuronidase, Novozym 234+β-D-glucanase+β-glucuronidase의 혼합효소에서 原形質體 分離量이 월등히 높았고 단독사용에서는 Novozym 234가 7.68×10⁶ml⁻¹으로 가장 효과적이었으며 β-D-glu-

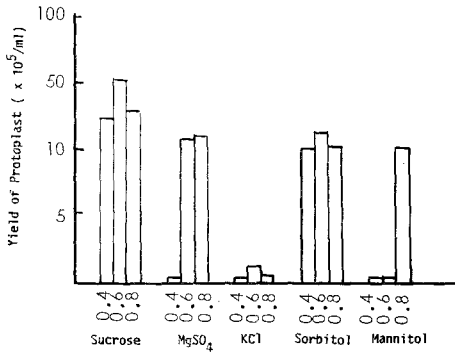
Table I. Effect of enzyme concentration on protoplast release. Novozym 234 was used for lytic enzyme incubation for 90 mins.

Enzyme concentration (mg/ml)	Degree of protoplast production
2	+
3	++
4	+++
5	####
7	++
10	-

* ####: indicates best protoplast yield.

Table II. Comparison of different commercial enzyme preparations for the release of protoplasts. Incubation for 90 mins.

Enzyme	Protoplast yield(×10 ⁶ /ml)
Novozym 234	7.68
β-D-Glucanase	0.00
β-Glucuronidase	0.05
Novozym 234+β-Glucuronidase	9.45
Novozym 234+β-Glucuronidase +β-D-Glucanase	10.55



Concentration of osmotic stabilizers (M)

Fig. 1. Effect of different osmotic stabilizers on the release of protoplasts.

canase에서는 原形質體를 볼 수 없었다. 혼합 효소중에서는 3가지 酵素를 모두 혼합한 것이 $10.55 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 으로 分離量이 가장 많았다(Table II).

滲透壓 調節劑와 濃度の 影響

原形質體가 裸出되면서 安定性を 잃지 않도록 하는 滲透壓 調節劑와 濃도가 중요하므로 본 실험에서는 MgSO₄, mannitol, KCl, sorbitol, sucrose를 각각 0.4, 0.6, 0.8 M로 조절하여 처리한 결과 Fig. 1에서와 같이 MgSO₄, sorbitol에서도 비교적 분리가 잘 되었으나 특히 sucrose에서 다른 滲透壓 調節劑보다 현격한 차이로 분리량이 높았으며 KCl에서 가장 낮았다. 또 滲透壓 調節劑 濃도는 mannitol, MgSO₄에서 0.8 M이 효과적인 것을 제외하고는 0.6 M에서 原形質體 分離量이

높았다. 결과적으로 노랑 느타리 原形質體 分離에 가장적합한 滲透壓 調節劑와 濃도는 0.6 M sucrose로 나타났다.

酵素液과의 反應時間의 影響

菌絲體를 酵素液과 혼합하여 혼드는 반응시간에 따른 原形質體 分離量을 본 결과 노랑 느타리의 原形質體는 裸出되기 시작하는 시간이 매우 짧아 반응 30분 후에 이미 $1.3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 정도가 분리되었으며 90분에 $2.2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 가장 많이 裸出되었다. 그 후 부터

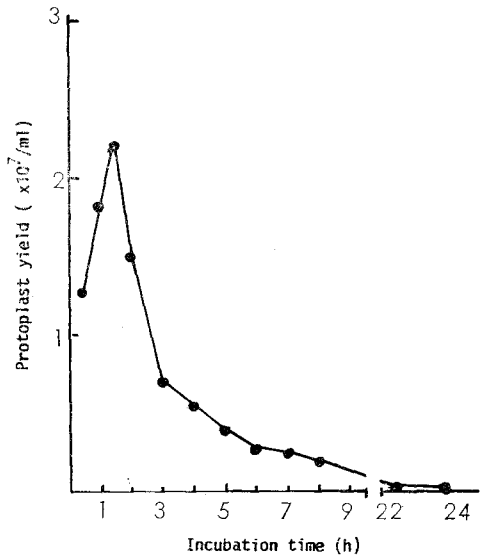


Fig. 2. Influence of incubation time on the release of protoplasts.

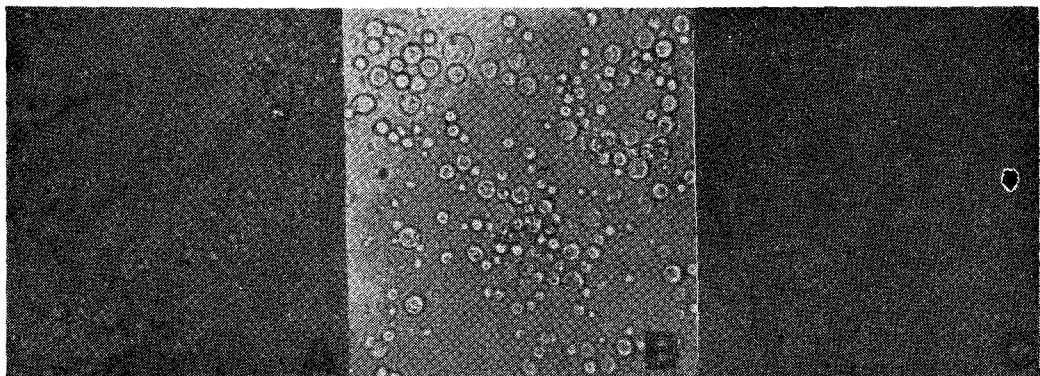


Fig. 3. Released protoplasts and empty hyphae after 90 mins incubation (A), suspensions of harvested protoplasts in 0.6 M KCl(B) and 0.6 M sucrose (C). Protoplasts were liberated from *P. cornucopiae* mycelium in 0.6 M sucrose stabilized lytic mixtures at 28°C.

는 原形質體 數가 점점 감소하였고 24시간뒤에는 $0.05 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 의 原形質體가 존재하였다(Fig. 2). Fig. 3에서 A는 반응 90분일 때 裸出된 原形質體이고 B, C는 裸出된 原形質體를 0.6 M KCl과 0.6 M sucrose로 세척한 후의 protoplast suspension으로 0.6 M KCl에서 原形質體가 더 선명하게 관찰되었다.

緩衝溶液과 pH의 影響

酵素液의 pH를 조절하는 緩衝溶液이 酵素活性에 미치는 影響을 보기 위하여 pH를 0.6 M sucrose+50 mM Na-maleate buffer (Exp. I)와 0.6 M sucrose+20 mM phosphate buffer (Exp. II)로 4.0~7.0 까지 조절하여 본 결과 Na-maleate buffer에서는 pH 5.0, phosphate buffer에서는 pH 6.2에서 原形質體 分離量이 높았다 (Fig. 4).

Table III에서와 같이 緩衝溶液으로 pH를 조절하지 않은 0.6 M sucrose (pH 6.0), 0.6 M sucrose+20 mM

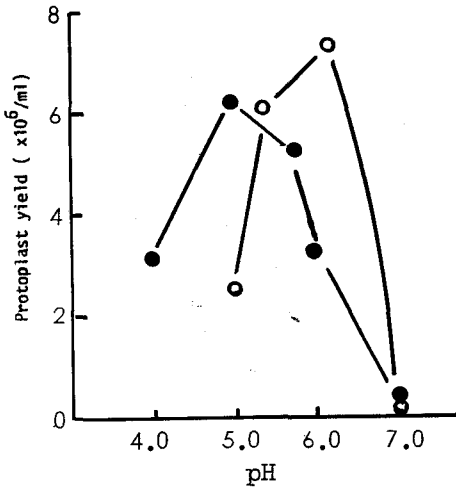


Fig. 4. Effect of pH on protoplast release. Enzymes were dissolved in 50 mM Na-maleate buffer (Exp I, -●-) and in 20 mM phosphate/buffer (Exp II, -○-). 0.6 M sucrose was used for the osmotic stabilizer.

Table III. Comparison of different buffer solutions on the release of protoplasts. 0.6 M sucrose was used for the osmotic stabilizer.

Buffer	Protoplast yield(10 ⁶ /ml)
Control(without buffer, pH 6.0)	13.63
50 mM Na-maleate (pH 5.8)	1.18
20 mM Phosphate (pH 5.8)	4.50

phosphate buffer(pH 5.8), 0.6 M sucrose+50 mM Na-maleate buffer(pH 5.8)를 비교해 본 결과 Na-maleate buffer보다 phosphate buffer가 더 효과적이었으나 pH를 조절하지 않은 0.6 M sucrose에서 분리량이 $13.63 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 으로 월등히 높았다. 이후 本實驗에서는 pH를 조절하지 않은 0.6 M sucrose를 사용하였다.

菌絲體 培養 日數의 影響

原形質體의 裸出量에 影響을 미치는 主要한 요인중의 하나로 菌絲體의 培養日數를 들 수 있는데 Table IV에서와 같이 MCM에서 4일간 培養했을 때 原形質體 數가 $1.16 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 가장 많이 분리되었으며 5일에서도 $1.0 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 분리가 잘 되는 편이었고 2일

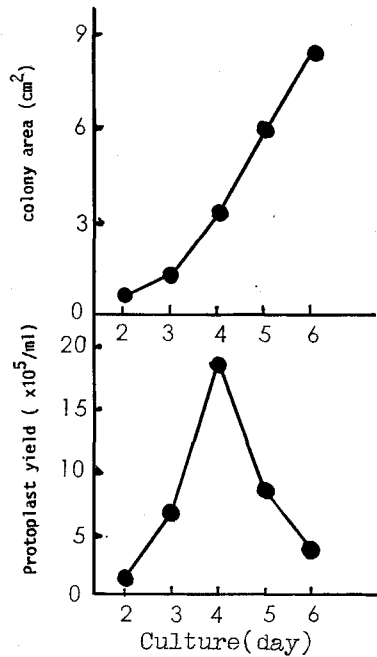


Fig. 5. The yield of protoplasts per unit area of mycelial colony.

Table IV. Influence of culture age on the release of protoplasts.

Culture age(day)	Protoplast yield(x10 ⁶ /ml)
2	0.15
3	1.65
4	11.60
5	10.00
6	6.43

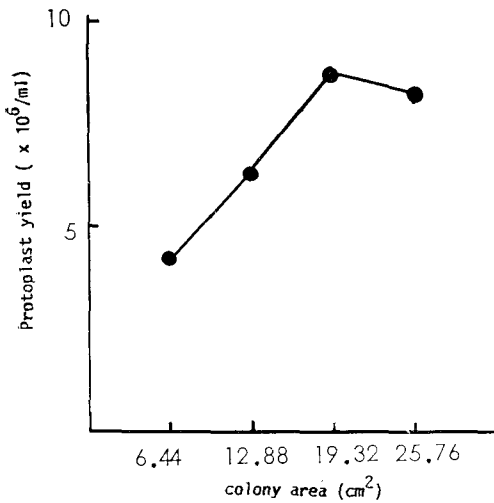


Fig. 6. Influence of mycelium concentration on the release of protoplasts. Four ml of enzyme mixture (Novozym 234, β -D-glucanase and β -glucuronidase) was used for protoplast release. Incubation for 90 mins.

일간 培養때 가장 낮았다. 실제 原形質體 分離量이 높다는 것은 mycelial colony의 單位面積 當原形質體 數가 많은 것을 뜻하는 데, Fig. 5에서 보면 2~3일 培養때 菌絲生長이 완만해지다가 培養 4일째 급격히 높아짐과 동시에 原形質體 分離量도 面積當 $1.8 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 으로 많아졌다. 이것으로 菌絲體가 급격히 成長할 때 原形質體가 많이 분리된다는 것을 알 수 있었고 노랑 느타리 原形質體 分離에 가장 적합한 培養日數는 4일인 것으로 나타났다.

菌絲體量의 影響

菌絲體量에 따른 原形質體 分離量을 본 것으로 혼합 효소 4 ml에 4 일동안 培養한 colony 2(colony area 6.44 cm²), 4(12.88 cm²), 6(19.32 cm²), 8(25.76 cm²) 個를 각각 혼합하여 본 결과 菌絲體量의 증가와 原形質體 分離量은 비례하지 않았으며 6 個를 사용했을 때 가장 효과적이었다. 즉 colony 1 個當 혼합효소 0.67 ml가 가장 적합한 것으로 나타났다(Fig. 6).

考 察

최근에 들어 眞菌類의 原形質體 融合과 原形質體를 이용한 形質轉換 등에 매우 흥미가 높아져가고 있다. 이러한 研究의 기초적인 것으로 먼저 많은 量의 原形質體가 분리되어야 하는 것이 필수적인데 原形質體 分

離量은 다양한 요인에 의해 영향을 받는다.

De Vrise와 Wessels (1973)는 *Trichoderma viride*에서 얻어진 酵素가 basidiomycetes의 原形質體 分離에 효과가 있다고 하였고 Hamlyn 등 (1981)은 *Trichoderma harzianum*에서 分離, 精製된 Novozym 234가 菌類의 原形質體를 얻는데에 효과적이라고 하였다. 현재 이 Novozym 234를 이용해 많은 擔子菌類에서 原形質體가 분리되고 있다(Gold 등, 1983; Byun, 1984; Go, 1985; Yoo 등, 1985). 노랑 느타리의 菌絲 細胞壁를 분해시키는 적당한 Novozym 234 濃度는 ml 當 5 mg이 있고 10 mg에서는 原形質體를 거의 볼 수 없었던 것으로 보아 裸出된 原形質體는 사용되고 酵素量에 매우 민감한 반응을 나타내는 것으로 여겨진다.

細胞壁를 분해하는 작용이 각각 다른 酵素들의 혼합 사용이 原形質體 分離에 미치는 영향을 본 결과, 노랑 느타리의 原形質體 分離量은 Novozym 234 + β -D-glucanase + β -glucuronidase mixture에서 $1.1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 가장 많았다. 擔子菌類에서 보고된 여러가지 酵素의 혼합사용 시험결과를 보면 1982년 Abe 등이 cellulase + zymolyase + β -glucuronidase를 사용해 *T. matsutake*에서, Yamada 등 (1983)은 cellulase ONOZUKA RS + zymolyase + chitinase + β -glucuronidase mixture로 *F. velutipes*, *P. ostreatus*에서 原形質體를 분리하였다. 또 Yanagi와 Takebe(1983)는 *Coprinus macrophizus*에서 酵素를 단독 사용한 것과 chitinase + cellulase mixture로 사용한 것을 비교한 결과 혼합 사용시 1 시간내에 10⁸의 原形質體가 분리되었다고 보고하였고, Yoo 등(1985)은 Novozym 234 + β -D-glucanase + snail enzyme이 *P. ostreatus*와 *Volvariella volvacea*에서 가장 효과적이었다고 하였다. 이와같이 분해 작용이 각각 다른 酵素들의 혼합사용이 菌絲 細胞壁 分解에 훨씬 효과적이 되어 原形質體 分離量이 높은 것으로 보아 이들 酵素들을 이용해 高等菌類의 복잡한 細胞壁 構成 成分을 추정해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

原形質體 分離에 적합한 滲透壓 調節劑로는 1972년 De Vries와 Wessels이 *S. commune*에서 0.4~0.6 M MgSO₄가 효과적이었다고 했고 Ushiyama 등 (1977)은 *L. edodes*에서 0.5~0.8 M MgSO₄가 적합하다고 하였으며 Yoo 등 (1985)은 느타리와 풀 버섯에서 0.6 M MgSO₄, 0.6 M sucrose가 대체적으로 효과적이었으나 0.6 M MgSO₄에서 가장 많은 原形質體를 분리했다고 하였다. 노랑 느타리는 0.4~0.8 M MgSO₄보다 0.6 M sucrose에서 原形質體 分離量이 월등히 높아 위의 결과들과 다른 경향을 나타내었다.

菌絲體와 酵素液과의 反應時間이 原形質體 分離量에 영향을 주는데 노랑 느타리는 0.6 M sucrose에서 처리 30분후에 $1.3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 분리량이 많았고 90분에서 가장 많이 나출되었으며 처리 시간이 길어짐에 따라 原形質體數는 점차 감소하였다. 이러한 결과는 Yoo 등 (1985)이 0.6 M MgSO_4 에서 酵素處理 1시간후부터 느타리 버섯의 原形質體가 분리되기 시작하여 phosphate buffer에서는 4시간, Na-maleate buffer에서는 9시간에 가장 많은 原形質體를 분리하였다고 한 것과는 다른 경향을 나타내었다. 이와같이 반응 시간에 따른 原形質體 分離量의 차이는 菌株에 따르는 菌絲體의 細胞壁 構成成分의 차이에서 오는 것으로 사료된다. 광학현미경으로 볼때 酵素液 처리 30분 후에는 原形質體 크기가 작았으나 90분경에는 原形質體가 커진 것을 알 수 있었으며, 나출된 原形質體中 대부분은 內部液胞의 數가 1個에서 4~5個 정도 있었고 드물게 내부 대부분이 液胞로 차 있는 것과 液胞가 전혀 보이지 않는 것 관찰할 수 있었는데 이러한 차이는 原形質體가 나출된 菌絲部位, 즉 정단부분 또는 오래된 부분인가에 따른 것이라고 하였다(Gibson and Peberdy, 1972; Ushiyama and Nakai, 1977).

일반적으로 酵素의 역가는 pH 5.5~6.0이 알맞는 것으로 알려져 있는데(De Vries and Wessels, 1972), 노랑 느타리 原形質體 分離에 적합한 緩衝溶液과 pH를 보면 0.6 M sucrose를 phosphate와 Na-maleate buffer로 pH 5.8에 조정하여 Novozym 234 + β -D-glucanase + β -glucuronidase의 酵素活力을 조사해 본 결과, phosphate buffer가 Na-maleate buffer보다 효과적이었으나 buffer를 사용하지 않은 상태(pH 6.0)가 더욱 알맞았다.

原形質體 分離에 영향을 미치는 주요 요인 중의 하나는 菌絲體의 培養日數이며 대체로 오래된 菌絲體보다 어린 菌絲體에서, 菌絲의 生長 속도가 대수기 상태에서 많은 原形質體를 얻을 수 있다. 노랑 느타리는 다른 느타리 종류와 비슷하게 MCM 固體培地에서 4일 배양했을 때 原形質體 分離量이 가장 많았다. Yoo 등 (1985)은 *P. ostreatus*는 4일, *P. florida*는 5일, *P. sajor-caju*는 3일 MCM 固體培地에서 배양했을 때 가장 효과적이었다고 하였고, 이러한 培養日數는 液體培養이나 固體培養과 같은 배양 조건에 따라 변할 수 있다고 하였다. 이와 같이 菌絲體의 培養日數가 原形質體 分離量에 영향을 주는 것은 細胞壁 構成成分이 培養日數에 따라 변하기 때문이라고 추정할 수 있다.

摘 要

버섯의 品種開發과 遺傳研究를 위해서 느타리 菌의 一種인 *P. cornucopiae* 노랑 느타리의 原形質體 分離에 적합한 諸條件을 조사하였다.

原形質體 分離의 最適 條件으로 Novozym 234濃度は $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 이었고 Novozym 234 + β -D-glucanase + β -glucuronidase mixture에서 原形質體數는 $10.55 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 으로 가장 높았으며, 滲透壓 調節劑와 濃度は 0.6 M sucrose에서 效果의이었고 混合酵素液과의 反應 90분일때 原形質體 分離量은 $2.2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 으로 높았다. 緩衝溶液과 pH는 0.6 M sucrose + Na-maleate buffer (pH 5.0), 0.6 M sucrose + phosphate buffer (pH 6.2)에서 原形質體 分離量이 좋았으며 대체로 phosphate buffer가 효과적인 것으로 나타났고 pH를 조절하지 않은 0.6 M sucrose 滲透壓 調節劑가 原形質體 分離에 가장 알맞았다. 그리고 培養日數 및 菌絲體量을 보면 cell-ophane MCM에서 4일 培養한 菌絲體 6 colonies와 混合酵素 4 ml과 혼합하여 28°C에서 90분간 흔들었을 때 原形質體가 가장 많이 분리되었다.

문 헌

- 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.
- Anne, J., Eyssen, H. and De Somer, P. (1974): Formation and regeneration of *Penicillium chrysosporium* protoplasts. *Arch. Microbiol.* 98: 159-166.
- Bachmann, B.J. and Bonner, D.M. (1959): Protoplasts from *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 78: 550-556.
- Ballance, D.J., Buxton, F.P. and Turner, G. (1983): Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 112: 284-289.
- Byun, M.O. (1984): Isolation and reversion of protoplasts from mycelium of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. M. Sc. Thesis, Chungnam National University.
- Case, M.E., Schweizer, M., Kushner, S.R. and Giles, N.H. (1979): Efficient transformation of *Neurospora*

- crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 5259-5263.
- De Vries, O.M.H. and Wessels, J.G.H. (1979): 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.
- Eddy, A.A. and Williamson, D.H. (1957): A method of isolation 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. Sci. U.S.A.* **44**: 668-671.
- Foury, F. and Goffeau, A. (1973): Combination of 2-deoxy-glucose and snail-gut enzyme treatments for preparing spheroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Microbiol.* **75**: 227-229.
- Gabriel, M. (1968): Formation and regeneration of protoplasts in the mold *Rhizopus nigricans*. *Folia Microbiologica* **13**: 231-234.
- Gibson, R.K. and Peberdy, J.F. (1972): Fine structure of protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 529-538.
- 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. *Microb. Technol.* **3**: 321-325.
- Kevei, F. and Peberdy, J.F. (1977): Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* by fusion of somatic protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 255-262.
- Moore, D. (1975): Production of *Coprinus* protoplasts by use of chitinase or helicase. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **65**: 134-136.
- Moore, P.M. and Peberdy, J.F. (1976): Release and regeneration of protoplasts from the conidia of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **66**: 421-425.
- Morris, N.R. (1978): Preparation of large molecular weight DNA from the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **106**: 387-389.
- Peberdy, J.F. (1979): Fungal protoplasts isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 21-39.
- Peberdy, J.F. (1980): Protoplast fusion, a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 23-29.
- Raper, J.R. and Raper, C.A. (1972): Life cycle and prospects for interstrain breeding of *Agaricus bisporus*. *Mushroom Sciences* **8**: 1-9.
- Sipiczki, M., Kucsera, J., Ulaszewski, S. and Zsolt, J. (1982): Hybridization studies by crossing and protoplast fusion within genus *Schizosaccharomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1989-2000.
- Strunk, C. (1965): Uber Entstehung und reversion enzymatisch erzeugter protoplasten von *Polystictus versicolor*. *Biol. Rundsch.* **3**: 242-244.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-zissman, J.H., Lockington, R.A. and Davies, R.W. (1983): Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.
- Ushiyama, R. and Nakai, Y. (1977): Protoplasts of shiitake, *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Rep. Tottori. Mycol. Inst. (Japan)* **15**: 1-5.
- Yamada, O., Magae, Y., Kashiwagi, Y., Shiratori, T. and Sasaki, T. (1983): Formation and regeneration of *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus* protoplasts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **30**: 495-500.
- Yanagi, S.O. and Takebe, I. (1983): Efficient protoplast isolation from *Coprinus macrophizus* and other basidiomycetes. In *Protoplast 1983 Poster Proceedings* (ed. I. Potrykus, C.T. Harms, A. Hinnen, R.

- Hutter, P.J. King, R.D. Shillito). pp.295-296. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Yoo, Y.B., Byun, M.O., You, C.H., Park, Y.H. and Peberdy, J.F. (1984): Characteristics of fusion products between *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida* following interspecific protoplast fusion. *Kor. J. Mycol.* 12: 164-169.
- Yoo, Y.B., Peberdy, J.F. and You, C.H. (1985): Studies on protoplast isolation from edible fungi. *Kor. J. Mycol.* 13: 1-10.
- Weibull, C. (1953): The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bacteriol.* 66: 688-695.
- 秦京熙 (1984): *Pleurotus ostreatus*의 protoplast 生成과還元에 관한 研究. 석사학위논문, 숙명여자대학교 대학원.

<Received June 9, 1986; Accepted July 3, 1986>