

*Fusarium poae*와 *Fusarium sporotrichioides*간의 원형질체 융합

하경란 · 장성렬\* · 민병례

상명여자대학교 생물학과, \*한양대학병원 임상교수연구실

Interspecific Protoplast Fusion between *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*

Ha, Kyung-Ran, Sung-Yeoul Chang\* and Byung-Re Min

Department of Biology, College of Natural Sciences, Sang Myung Women's University

\*Central Research Lab. for Clinical Professor, Hanyang University Hospital

**ABSTRACT:** In order to develop the protoplast fusion method of the strains of *Fusarium*, the interspecific protoplast fusion was attempted between *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides*. Various auxotrophic mutants were isolated by the treatment of N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. The optimal conditions for the formation and regeneration of protoplasts were examined and the characteristics of a fusant were studied. As a results, protoplasts were readily obtained from 18 hours cultured mycelia by the treatment of driselase for 3 hours and 0.6 M KCl as a best osmotic stabilizer at pH 6.0 for the formation of protoplast. Sucrose was the most suitable for the regeneration. Polyethylene glycol (M.W. 8,000) in CaCl<sub>2</sub>-glycine solution was used to induce the protoplast fusion. The interspecific fusion frequency between protoplasts among the auxotrophic mutants of the two strains ranged from  $2.7 \times 10^{-2}$  to  $5.7 \times 10^{-3}$ . DNA content and cellulase activity were rather increased in the interspecific fusant. The lag phase of growth curve was slightly elongated in the fusant.

**KEY WORDS** □ *Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides*, interspecific fusion.

Polyethylene glycol (PEG)과 CaCl<sub>2</sub>에 의하여 원형질체 융합이 촉진된다는 사실이 알려진 후로 (Kao와 Michayluk, 1974) 이 방법을 이용하여 여러종류의 미생물들에서 원형질체의 융합에 관한 연구가 활발하게 이루어졌다 (Hoopwood와 Wright, 1978; Dhawle와 Ingledew, 1983; Peberdy, 1980). 균류에서도 종간 원형질체 융합에 관한 연구는 *Aspergillus*속 (Kevei와 Peberdy, 1979, 1984)과 *Penicillium*속 (Anne, 1982; Anne와 Eyssen, 1978)에서 광범위하게 연구되어 왔다. 그러나 식물병원균으로 가장 중요한 균종의 하나인 *Fusarium*속에 대하여는 원형질체 융합에 관한 연구보고가 많지 않았다. *Fusarium*속은 경제적, 산업적으로 중요하고 응용도가 높은 균류로써 균주개발을 위한 시도의 하나로 원형질체 형성 및 융합에 관한 연구를 계획하였다.

본 연구에서는 분류학적으로 동일한 Section에 속하는 *F. poae*와 *F. sporotrichioides*를 재료로 원형질체 형성 및 재생의 최적조건을 찾고 이들의 종간융합체를 형성하여 융합체의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

## 균주 및 배지

균주로는 *F. poae* NRRL 3287과 *F. sporotrichioides* NRRL 3510을 사용하였으며 PDA (Potato Dextrose Agar) 사면배지에 배양하여 4°C에서 보관하였다.

돌연변이 유도용 최소배지는 Czapeck Dox배지를 사용하였으며 완전 배지로는 PDA배지를 사용하였다.

원형질체 형성용배지는 PDB (Potato Dextrose Broth) 배지를 사용하였다.

원형질체 재생용 완전, 최소배지는 돌연변이 유도용 완전, 최소배지에 각각 0.6 M이 되도록 KCl을 첨가하여 사용하였다.

균체의 효율적 분리를 위해 완전, 최소배지에 각각 0.1% 농도로 Triton X-100을 첨가하여 사용하였다.

효소유도용 배지는 Lee (1987)의 방법에 따른 배지를 사용하였다.

## 삼투안정제 및 세포벽 분해효소의 제조

삼투안정제는 0.1 M 인산완충용액 (pH 6.0)에 각

삼투안정제를 0.6 M이 되도록 첨가하여 사용하였고 세포벽 분해효소는 driselase (10 mg/ml, Sigma)를 삼투안정제에 용해하여 4°C에서 24시간 방치한 후 6500g에서 15분간 원심분리 (Beckman JA-20)한 뒤 그 상등액을 여과(Millipore filter, pore size 0.45  $\mu$ m)하여 사용하였다.

#### 원형질체의 형성 및 재생

25 ml의 완전액배지에  $1.0 \times 10^6$  spores/ml 농도의 포자를 접종하여 28°C에서 18시간동안 진탕배양한 후 균사체만을 수확하였다. 이를 삼투안정제로 2회 세척한 후 1 ml의 세포벽분해효소를 가하여 28°C에서 3 시간동안 반응시켰다. 형성된 원형질체는 sintered glass filter (pore size 40-60  $\mu$ m)로 여과하여 균사체를 제거한 뒤 삼투안정제로 2회 세척하여 원형질체만을 분리해내었다.

원형질체 형성을 위한 최적조건을 조사하기 위하여 균사체 배양시간, 세포벽 분해효소의 농도 및 처리시간, 삼투안정제와 pH, 전처리의 효과등을 비교하였다.

분리된 원형질체를 삼투안정제로 희석하여 재생용 배지에 접종한 후 28°C에서 4-5일간 배양하여 형성되는 군체의 수를 접종한 원형질체의 수와 대비하여 재생률을 구하였다.

삼투안정제의 종류에 따른 원형질체의 재생률을 조사하기 위하여 완전배지에 각 삼투안정제를 0.6 M 농도로 첨가하여 사용하였다.

#### 돌연변이주의 분리

$1.0 \times 10^6$  spores/ml 농도의 포자현탁액 20 ml에 MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine)을 200  $\mu$ g/ml 되게 가하여 28°C에서 90분간 처리하였다. 이를 돌연변이 유발용 최소 액배지에 접종하여 28°C에서 24시간 동안 진탕배양 후 sintered glass filter로 여과하여 최소배지에서 발아하지 못한 포자를 수확하였으며 이를 완전배지에 평판도말하여 4-5일간 28°C에서 배양한 뒤 각각 완전, 최소배지에 옮겨 영양요구성 돌연변이주를 분리해내었다. 이때 영양요구물질의 결정은 Kim (1986)에 의해 변형된 Holliday방법 (Clowes와 Hayes, 1968)을 사용하였다.

#### 원형질체의 융합

영양요구성 돌연변이주로 부터 추출한 원형질체를 각각  $1.5 \times 10^6$  pts/ml 농도로 섞은 다음 30°C로 전처리한 PEG(30%, M.W. 8,000), 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.05 M Glycine 용액을 가하여 28°C 10분간 반응시켜 원형질체의 융합을 유도하였다. 융합율은 재생용 완전배지와 재생용 최소배지상에 생성된 군체의 비로써 측정하였다.

#### DNA 함량

양친주 및 융합주의 DNA함량은 Park(1985)의 방법에 의해 DNA를 추출한 다음 diphenylamine법

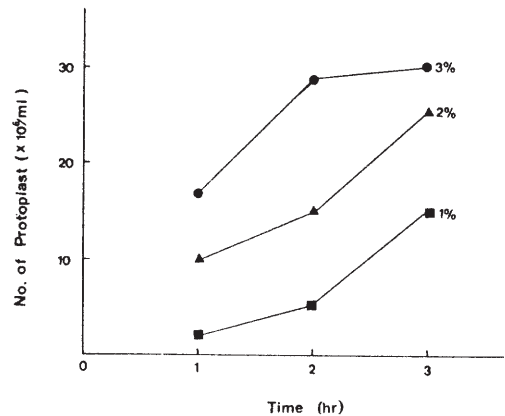


Fig. 1. Effect of concentration of driselase on the yield of protoplast from *F. poae*.

(Glies와 Myers, 1965)으로 calf-thymus DNA를 표준 DNA로 정량하였다.

#### 섬유소 분해효소의 합성

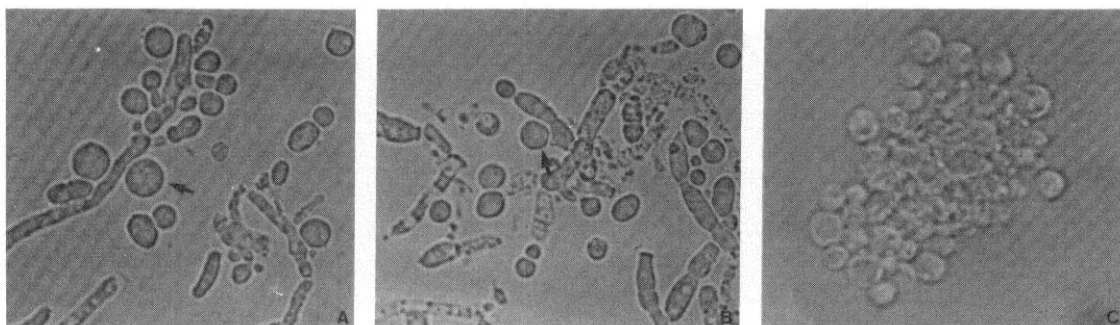
각 균주들을 효소유도용배지에  $1.0 \times 10^6$  spores/ml 되게 접종한 후 28°C에서 5일간 배양하여 여과한 액을 조효소원으로 사용하였으며 효소의 활성도는 0.2 ml의 0.2 M 초산완충용액 (pH 5.4)에 용해한 1%의 carboxymethylcellulose용액 0.8 ml에 효소용액 0.2 ml를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 Somogi-Nelson 방법 (Somogi, 1952)으로 파장 660 nm에서 유리된 환원당의 양을 측정하였다. 이때 효소의 단위는 1시간동안 반응 혼합액 1 ml당 1 $\mu$ g의 환원당을 유리시킨 경우를 1 unit로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

#### 원형질체의 형성 및 재생

*Fusarium*속의 세포벽은 chitin과  $\beta$ -(1-3)glucan이 주요한 성분으로 알려져 있으므로 (Skujins등, 1965) *Fusarium*속 균의 원형질체 형성을 위한 세포벽 분해 효소로서 본 연구에서는  $\beta$ -(1-3)glucanase 활성을 지니고 있는 driselase를 사용하였다.

Driselase의 농도 및 처리시간에 따른 원형질체의 형성량을 조사해 본 결과 (Fig. 1), 최대치를 나타낸 농도 및 반응시간은 두종 모두 3% 농도로 3시간 반응시켰을 때였으며, 원형질체는 효소반응 시작 후 약 30분경 부터 생성되기 시작하여 반응시간이 경과함에 따라 생성량이 급격하게 증가하였고 원형질체의 크기가 커짐을 볼 수 있었는데 (Plate A, B) 그것은 액포의 함유량에 따른 것으로 사료되며 액포 형성의 차이는 생성부위에 따른 것으로 보고되어 있다(Peberdy와 Gibson, 1971; Issac등, 1978). 또한 이때의 *F. poae*와 *F. sporotrichioides*의 원형질체 형성량 각  $3.0 \times 10^7$



### Plate

- A: Protoplast formation of *F. sporotrichioides*, with the enzyme driselase for 3 hours.  
 B: Protoplast formation of *F. Poae*, with the enzyme driselase for 3 hours.  
 C: Aggregation of protoplast after PEG treatment for 10 min .

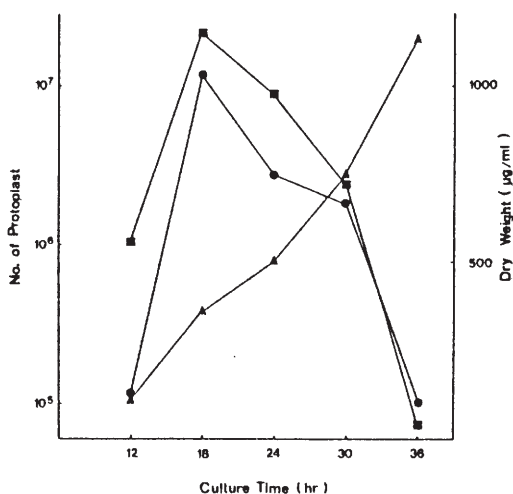


Fig. 2. Effect of mycelial age on the formation of protoplast from the mycelium of *F. poae*.

- — ■: number of protoplasts per mg of dried mycelium  
 ▲ — ▲: dry weight  
 ● — ●: total number of protoplasts.

pts/ml와  $1.8 \times 10^7$  pts/ml로 나타나 *F. culmorum*에  $10^6$ pts/ml (Kitamoto 등, 1988)이나 *F. moniliforme*에  $\beta$ -Glucuronidase를 처리하여 얻은  $1.3 \times 10^7$  pts/ml (Harris, 1982) 보다 더 우수한 수준이었다.

균사체 배양시간에 따른 원형질체의 생성량을 조사해본 결과 (Fig. 2), 대수기 초반에 해당하는 18시간 동안 진탕배양한 균사체로 부터 전체 원형질체 형성량과 균사체 건조중량당 형성량이 최대치를 나타내었다. 이는 일반적으로 원형질체 형성률이 대수기에서 가장 높다는 보고들 (Benitez 등, 1975; Peberdy 등, 1976)과 일치하며, 이유는 아직 밝혀지지 않았으나 이 시기에는 세포내의 wall-bound lytic enzyme의 활성

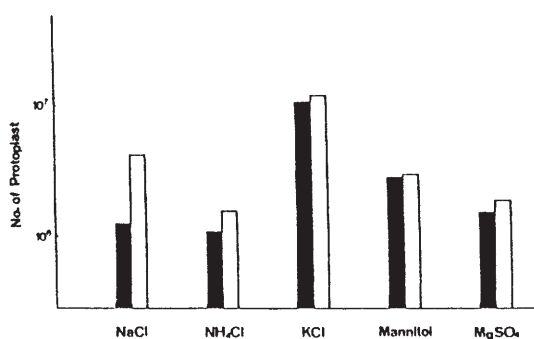


Fig. 3. Effect of osmotic stabilizer on the formation of protoplast from the 18 hour-old mycelium of *F. poae* and *F. sporotrichioides*: The concentration of the salt was 0.6 M in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0

■ : *F. sporotrichioides*  
 □ : *F. poae*.

Table 1. Effect of osmotic stabilizers on the regeneration of protoplast of *F. poae* and *F. sporotrichioides*.

Stabilizer	Regeneration frequency (%)	
	<i>F. poae</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
KCl	7.0	10.9
sucrose	14.2	13.4
NaCl	11.6	6.5
NH <sub>4</sub> Cl	1.9	3.2
MgSO <sub>4</sub>	5.8	5.8

이 높고 (Bartnicki-Garcia와 Lippman, 1972) melanin이 없거나 적은 농도로 존재하고 있기때문에 (Bull, 1970) 세포벽의 물리, 화학적 성질변화에 의한 것으로 사료되었다.

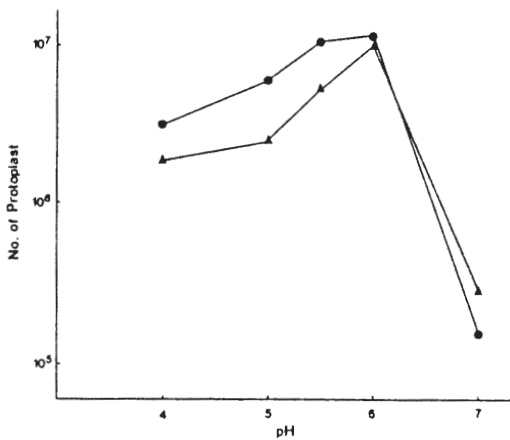


Fig. 4. Effect of pH of osmotic stabilizer on the formation of protoplast from 18 hour-old mycelium of *F. poae* and *F. sporotrichioides*  
 ●—●: *F. poae*  
 ▲—▲: *F. sporotrichioides*

Table 2. Effects of pretreatment on the protoplast formation from *F. poae* and *F. sporotrichioides*.

Chemicals	<i>F. poae</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
Control	$1.5 \times 10^7$	$5.5 \times 10^6$
100 mM $\beta$ -mercaptoethanol	$2.1 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$
200 mM Ethyl alcohol	$1.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
50 mM EDTA+	$5.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
25 mM $\beta$ -mercaptoethanol		

삼투안정제는 세포벽이 제거된 원형질체를 삼투적으로 지지해 주는 기본이 되는 것으로 알려져 있으며 (Peberdy, 1979), 모든 균류에 공통적으로 적용 가능한 삼투안정제는 없다고 보고되어 있다 (Peberdy와 Ferency, 1985). 따라서 여러종류의 삼투안정제를 비교해 본 결과 두종 모두 KCl이 가장 효과적이었고  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 이 가장 효율이 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 3). 또한 삼투안정제의 종류에 따른 원형질체가 재생물은 sucrose를 첨가한 배지에서 가장 높게 나타났다 (Table 1).

원형질체 형성에 미치는 pH의 영향을 조사해 본 결과 (Fig. 4), pH 6.0에서 가장 효과적으로 나타났으며, 환원제나 계면활성제등 화학물질의 전처리가 원형질체 생성에 영향을 미친다는 보고등 (Housset등, 1975; Baguley등, 1979; Ven den Broek등, 1979; Maraz와 Subik, 1981; Harris, 1982; Bu'Lock등, 1986)에 따라 몇가지 화학물질을 전처리해 본 결과 (Table 2), 두종 모두 효과가 없었으며 오히려 원형질체의 생성률이 저하되어 Van den Broek등 (1979)

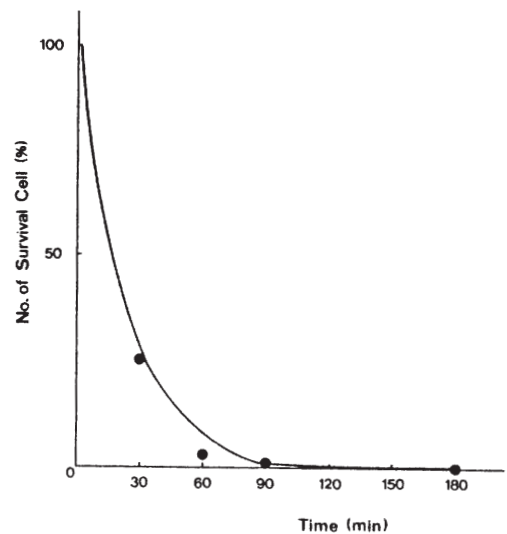


Fig. 5. Survival curve of *F. sporotrichioides* spores treated with MNNG: The final concentration of MNNG solution is 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Table 3. Nutritional requirement of *F. poae* and *F. sporotrichioides* auxotrophic mutants.

PN-1	ser <sup>-</sup> , trp <sup>-</sup> , asp <sup>-</sup>
PN-2	ribo <sup>-</sup>
PN-3	leu <sup>-</sup> , lys <sup>-</sup> , ribo <sup>-</sup> , ino <sup>-</sup> , gly <sup>-</sup>
SN-1	arg <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup>
SN-2	arg <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup>
SN-3	pro <sup>-</sup>
SN-4	pro <sup>-</sup>
SN-5	pro <sup>-</sup>

PN: Nutritional requirement of *F. poae*

SN: Nutritional requirement of *F. sporotrichioides*

Table 4. Interspecific fusion frequency crossed between protoplast from the various auxotrophic mutants of *F. poae* and *F. sporotrichioides*

Cross	No. of colonies on MRM ( $\times 10^2$ )	No. of colonies on CRM ( $\times 10^3$ )	Fusion frequency
PN-1 $\times$ SN-1 (FUPS-1)	6	22	$2.7 \times 10^{-2}$
PN-1 $\times$ SN-2 (FUPS-2)	3	150	$2.0 \times 10^{-3}$
PN-1 $\times$ SN-5 (FUPS-3)	4	70	$5.7 \times 10^{-3}$

과 Bu'Lock등 (1986)의 결과와 유사하였다.

#### 영양요구성 돌연변이주의 분리

돌연변이원으로 alkylating agent로써 염기의 전이를 주로 일으키는 것으로 알려져 있는 (Caton과



**Table 5.** DNA contents in mutants and fusant.

Strains	Content of DNA ( $\mu\text{g}/\text{cell}$ )
SN-1	44
PN-1	42.5
FUPS-1	54

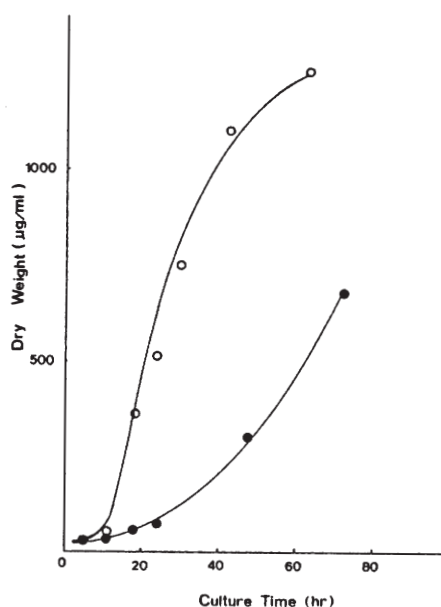
Brown, 1981) MNNG를 사용하였으며 이를 최종농도가 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가한 후 각 시간별로 처리하여 얻은 생존율 곡선은 Fig. 5와 같다. 일반적으로 생존율이 0.1-1.0%일때 돌연변이가 많이 일어난다는 연구 (Miller, 1974)와 그 돌연변이체중 영양요구주일 가능성은 0.02-0.04%정도이며 여과법에 의해 농축시켰을때 수득율이 증가한다는 보고 (Park, 1985)에 따라 0.2-1.0%의 생존율을 나타내는 시간인 90분간 MNNG를 처리하여 여과방법으로 영양요구주들을 분리 하였다(Table 3). 이때 영양요구성 돌연변이주가 얻어지는율은 0.25-0.34%로 나타났다.

#### 원형질체의 융합

원형질체 융합은 PEG의 농도가 30%일때 원형질체의 aggregation과 삼투안정제로써의 효과가 가장 좋은 것으로 알려져 있으며, PEG에 의한 융합은 다양한 양이온의 존재와 농도에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있는데 일반적으로 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 가 널리 사용되고 있다 (Anne, 1983). 따라서 30% PEG와 10 mM  $\text{CaCl}_2$  용액을 사용하여 융합을 실시한 결과  $5.7 \times 10^{-3}$  -  $2.7 \times 10^{-2}$  수준의 중간잡종 형성률을 보였으며 (Table 4), PEG 처리후 현미경하에서 aggregation되는 양상을 관찰 할 수 있었다 (Plate C). 이 결과는 Anne등 (1976)이 보고한 *Penicillium*속사이의 융합빈도  $10^{-2}$  -  $10^{-1}$  보다는 낮은 수준이었으나 *Trichoderma*속사이의  $10^{-3}$  -  $10^{-2}$  (Park, 1986)과는 유사한 수준을 보였고 *Saccharomyces*속 사이의  $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  (Sipiczki등, 1982)보다는 다소 높게 나타났는데 이는 동일한 section에 속하는 근연종을 재료로 하였기에 비교적 높은 융합율을 나타낸 것으로 사료된다.

#### DNA 함량

돌연변이주와 융합체의 DNA함량은 Giles와 Myers (1965)의 방법에 의하여 조사한 결과 양친주에 비하여 DNA함량이 다소 증가하였다 (Table 5). 그러나 Kevei와 Peberdy (1977)에 의해 보고된것 처럼 양친주에 비하여 2배 이상 증가하지는 않았는데 이는 생성 시기에 따라 원형질체내의 DNA함량에 차이가 있기 때문에 (Lim등, 1983), Yang등(1989)의 보고와 같이 DNA 함량을 측정하기 위하여 사용된 원형질체의 성장에 따라 그 차이가 날 수 있는 것으로 사료된다. 따라서 FUPS-1의 경우에는 핵형분석과 같은 다양한 분석을 위한 실험이 더 이루어져야 하겠지만 Park

**Fig. 6.** Growth curve of parents and fusant

○ — ○: parental strain  
● — ●: fusant

**Table 6.** CMCase activity of auxotrophs and fusant

Strains	Enzyme activity (Unit/ml)
Wild types	
<i>F. poae</i>	24.4
<i>F. sporotrichioides</i>	29.7
Mutants	
SN-1	35.2
PN-1	30.2
Fusant	
FUPS-1	37.9

(1985)의 결과로 미뤄 이수체 상태의 재조합체일 가능성이 높음을 추정해 볼 수 있다.

#### 성장률

융합체와 양친주의 성장률을 비교해 볼 때 일반적으로 양친주에 비하여 융합체의 유도기가 더 긴것으로 보고되어 있는데 (Kue와 Yamamoto, 1979), 본 실험에서도 두 양친주의 경우 유도기가 12시간 정도인것에 비하여 FUPS-1이 경우 18시간으로 다소 길게 나타났다 (Fig. 6).

#### 섬유소 분해효소의 활성

융합체의 섬유소 분해효소의 활성을 조사해 본 결과 (Table 6), 양친주와 돌연변이주에 비하여 다소 증가한 것으로 나타난 원형질체 융합을 통한 균주 개량의 가능성을 보여 주었으며 차후 더 많은 균주를 대상으로 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

이상의 실험결과로 미루어 앞으로 이와같은 원형질체 융합법을 통하여 안정된 융합균주를 분리, 선별하여

우량균주의 개발과 유전학적인 연구의 기초자료로 응용될 수 있을 것으로 시료된다.

## 적 요

불완전 진균인 *Fusarium*속 균류의 원형질체 융합방법을 확립하기 위하여 *F. poae*와 *F. sporotrichioides*를 재료로 하여 중간 원형질체 융합을 시도하였다. N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine을 이용하여 영양 요구성 돌연변이들을 분리해 내었으며, 원형질체의 생성 및 재생에 미치는 요인들을 조사 하였고 융합체의 특성에 대하여 연구하였다. 균사체 배양시간에 따른 원형질체의 형성량은 두종 모두 18시간 배양한 균사체에서 최대치를 나타내었다. 세포벽 분해효소인 driselase는 3% 농도로 3시간 처리하였을 때가 가장 효과적이었으며, 삼투안정제는 0.6 M KCl이 가장 좋았다. Polyethylene glycol (M.W. 8,000)-0.01 M  $\text{CaCl}_2$ -0.05 M glycine (pH 8.0) 용액을 사용하여 영양요구성 돌연변이주간의 중간 원형질체 융합을 실시 하였으며 융합률은  $2.9 \times 10^{-2}$ - $5.7 \times 10^{-3}$ 으로 나타났다. 중간 원형질체 융합을 통하여 선별한 융합체의 특성을 조사한 결과 융합체의 DNA 함량이 양친형 보다 다소 증가하였으며, 성장률을 비교할 때 양친형보다 유도기가 길게 나타났고, 섬유소 활성도 증가하였다.

## REFERENCES

1. Anne, J., 1982. Comparison of penicillins produced by interspecies hybrids from *Penicillium chrysogenum*. *Eur. J. App. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 41-46.
2. Anne, J., 1983. Protoplast of filamentous fungi in genetics and metabolite production. In: Protoplast 1983 (Lecture), ed. Potrycus I. Based., pp. 167-178.
3. Anne, J. and H. Eyssen 1978. Isolation of interspecies hybrids of *Penicillium citrinum* and *P. cyaneofulvum* following protoplast fusion. *FEMS Microbiol.* **4**, 41-46.
4. Anne, J., H. Eyssen and P. de Somer, 1976. Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion *Nature*. **262**, 719-721.
5. Baguley, B.C., G. Rommele, J. Gruner and W. Wehrli, 1979. Papulacandin B: An inhibitor of glucan synthesis in yeast spheroplast. *Eur. J. Biochem.* **97**, 345-351.
6. Barthicki-Garcia, S. and E. Lippman, 1972. The bursting tendency of hyphal tips of fungi: Presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. *J. Gen. Microbiol.* **73**, 487-500.
7. Benitez, T., S. Ramos and I. Garcia-Acha, 1975. Protoplast from *Trichoderma viride*. *Arch. Microbiol.* **103**, 199-203.
8. Bull, A.T., 1970. Inhibition of polysaccharoses by melanin: Enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **137**, 345-356.
9. Bu'lock, J.D., C.E. Wright and J.E. Mooney, 1986. Use of protoplast fusion test to establish the status of mycotoxin gene in an edible *Fusarium*. *Biotechnol. Letters.* **8**, 621-624.
10. Carton, B.C. and B.J. Brown, 1981. In: Manual of methods for general bacteriology (Gerhart, P., R. G.E. Murray, R.N. Cotilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips Eds.) 222-242. *Am. Soc. Microbiol.*, Wash.
11. Clowes, R.C. and W. Hayes, 1968. In: Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh.
12. Dhawale, M.R. and W.M. Ingledew, 1983. Interspecific protoplast fusion of *Schwanniomyces* Yeast. *Biotechnol. Letters* **5**, 825-830.
13. Giles, K.W. and A. Myers, 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**, 93.
14. Harris, G.M., 1982. Protoplast from *Gibberella fujikuroi*. *Phytopathology*. **72**, 1403-1407.
15. Hopwood, O.A. and H.M. Wright, 1978. Bacterial protoplast fusion: Recombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **162**, 307-327.
16. Housset, P., M. Nagy and J. Schwencke, 1975. Protoplast of *Schizosaccharomyces pombe*: An improved method their preparation and the study of their guanine uptake. *J. Gen. Microbiol.* **90**, 260-264.
17. Issac, S., N.S. Ryder and J.F. Peberdy, 1978. Distribution and activation of chitin synthetase in protoplast fraction relaxed during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae. *J. Gen. Microbiol.* **105**, 45-50.
18. Kao, K.N. and M.R. Michayluk, 1974. A method of high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta*. **115**, 355-367.
19. Kevei, F. and J.F. Peberdy, 1977. Interspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *A. rugulosus* by fusion of somatic protoplast. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 255-262.
20. Kevei, F. and J.F. Peberdy, 1979. Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion *Mol. Gen. Genet.* **170**, 213-218.
21. Kevei, F. and J.F. Peberdy, 1984. Further studies on protoplast fusion and interspecific dization within the *Aspergillus nidulans* group. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2229-2236.
22. Kim, J.H., 1986. Cell fusion of cellulolytic fungi. *Aspergillus* sp. HBI. Master's Thesis of the Han Yang Univ.
23. Kitamoto, Y., N. Mori, M. Yamamoto, T. Ohiwa

- and Y. Ichikawa, 1988. A simple method for protoplast formation and improvement of protoplast regeneration from various fungi using an enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 445-450.
24. Kue, S.C. and S. Yamamoto, 1979. Preparation and growth of yeast protoplast. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 169-181.
25. Lee, H.S., 1987. Protoplast fusion of *Fusarium moniliforme*. Master's Thesis of the Ewha Women's Univ.
26. Lim, H.M., H.M. Park, Y.C. Hah and S.W. Hong, 1983. Electromicroscopic study of protoplast, released from the mycelium of *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Electron. Microscopy*, **13**, 49-55.
27. Maraz, A. and J. Subik, 1981. Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 131-133.
28. Miiler, J.H., 1974. Ultraviolet light mutagenesis In: Experiments in molecular genetics. pp.121-124.
29. Park, H.M., 1985. Intra-and interspecific protoplast fusion of cellulolytic fungi, *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. Ph. D. Thesis of the Seoul Natl. Univ.
30. Park, H.M., J.M. Jeong, S.W. Hong, Y.C. Hah and C.N. Seong, 1986. Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma reesei*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**, 91-97.
31. Peberdy, J.F., 1979. Fungal protoplast: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.*, **33**, 21-39.
32. Peberdy, J.F., 1980. Protoplast fusion-a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 23-29.
33. Peberdy, J.F. and S. Issac, 1976. An improved procedure for protoplast isolation from *Aspergillus nidulans*. *Microbios. Letter* **3**, 7-9.
34. Peberdy, J.F. and L. Ferency, 1985. Factors influencing protoplast isolation In: Fungal protoplast. ed. by P.A. Lemke p. 45-72. Marcel Dekker, Inc. New York.
35. Peberdy, J.F. and R.K. Gibson, 1971. Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplast. *J. Gen. Microbiol.*, **69**, 325-330.
36. Sipiczki, M., J. Kucsera, S. Ulaszewski and J. Zsolt, 1982. Hybridization studies by crossing and protoplast fusion within the genus *Schizosaccharomyces lindner*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1989-2000.
37. Skujins, J.J., H.J. Potgiester and M. Alexander, 1965. Dissolution of fungal cell walls by a Streptomyces chitinase and  $\beta$ -1-3 glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **11**, 358-364.
38. Somogi, M., 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
39. Van den Broek, H.W.J., H.G. Stunnenberg and M. J. Wennekes, 1979. Protoplast from *Aspergillus nidulans*. *Microbios.*, **26**, 115-128.
40. Yang, Y.K., Y. Park, Y.H. Phee and P.J. Maeng, 1989. Construction of interspecific hybrids by nuclear transfer in *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Mycol.*, **3**, 154-160.

(Received March 29, 1991)

(Accepted April 13, 1991)