

*Candida pseudotropicalis*의 원형질체 융합 : 원형질체 형성 및 재생과 융합 조건

전순배 · 정기철* · 배 석

전남대학교 생물학과 *전남대학교 낙농학과

Protoplast fusion of *Candia Pseudotropicalis*: The conditions for protoplast formation, regeneration and fusion

Chun, Soon-Bai, Ki-Chul Chung* and Suk Bai

Department of Biology, Chonnam National University

*Department of Dairy Science, Chonnam National University

Abstract: Protoplast formation and regeneration from wild-type and auxotrophic mutants of *Candida pseudotropicalis* CBS 607 as well as fusion between complementary mutants were carried out. Frequencies of protoplast formation from wild-type and histidine or adenine requiring mutants ranged from 96 to 100% whereas those from methionine or tryptophan auxotrophs were 52 and 72%, respectively. When bovine serum albumin(4mg/ml, BSA) was added to protoplasting buffer for cells of methionine or tryptophan auxotrophs grown in a medium supplemented with myoinositol(0.5mg/ml), 96-99% of cells were converted to protoplasts. Protoplasts were regenerated at the frequencies ranging from 18 to 20%. However, the addition of BSA to protoplasting buffer and the supplement of myoinositol to a medium of cell growth doubled the regeneration rate except adenine auxotroph in which such an improvement was not observed. It was found that optimal concentrations of polyethylene glycol and CaCl₂ are 20% and 100mM while optimal pH and exposure time are 6.0 and 30min. The fusion frequencies between complementary mutants ranged from 1.5×10^{-3} to 8.8×10^{-3} and were enhanced by the improvement in the rate of protoplast regeneration. When histidine auxotroph was fused with tryptophan mutant, several fusion products were obtained which were found to be in the state of aneuploid or diploid, judging from DNA content and the presence of a large nucleus in the products.

Key words: protoplast fusion, *Candida pseudotropicalis*

*Candida pseudotropicalis*는 무성생식 효모 이면서 β -D-galactosidase 생산능이 좋은 출아 효모이고 자연상태에서는 diploid를 형성할 수 없는 것으로 알려져 있다(Lodder, 1970). 최근 유전적 목적이나 산업적 이용으로 유성생식 효모에 관한 원형질체 융합 보고가 많아지고 있으며 무성생식 효모에 관해서도 이와같은 연구

사례가 있으나(Fink 등, 1977; Olaiya and Sogin, 1979; Poulter 등, 1981, 1983; Sarachek 등, 1981) 원형질체 융합세포가 유전적으로 불안정할 뿐아니라, 이종이나 속간에서는 불안정성이 현저하다고 알려져 있다(Fink 등, 1977; Sarachek 등, 1981). 무성생식 효모인 *C. pseudotropicalis*에 대한 원형질체 융합은 아직까

지 연구된 바 없으므로 본 연구에서는 *Trichoderma harzianum* (Budz-Jørgensen and Kelstrup, 1977) 으로부터 분리한 복합효소제제인 Novozym 234 를 사용하여 *C. pseudotropicalis* 의 야생형 균주와 영양요구성 돌연변이 균주로부터 원형질체 형성 및 재생조건과 bovine serum albumin (BSA) 및 myoinositol 이 원형질체 형성 및 재생에 미치는 영향을 조사하였고, 상보적인 영양요구성 돌연변이 균주간의 원형질체 융합조건과 융합세포의 핵융합 유무를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 보존

사용균주는 본 실험실에서 보관중인 *C. pseudotropicalis* CBS 607 이었고, YM (0.3% Yeast extract, Difco; 0.3% Malt extract, Difco; 0.5% Bacto-peptone, Difco; 1% Glucose; 2% Bacto-agar; Difco) 평판배지에서 colony 가 형성될 때까지 30°C 에서 3~4 일간 배양한 후 YM 한천 사면배지에 옮겨 4°C 로 유지 보관하고 4 주마다 계대 배양하였다.

영양요구성 돌연변이 균주의 조제

돌연변이 균주의 유도는 Poulter (1981, 1983) 등의 방법을 약간 수정하였다. 돌연변이원인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG, Sigma) 를 0.5~1mg/ml 의 농도로 정지기 세포 현탁액 (10^8 cells/ml) 에 첨가하여 30°C 에서 90분간 처리한 후 직접 또는 nystatin 으로 집적한 후 증류수 1 l 당 KH_2PO_4 , 1.5g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5g; MgSO_4 , 1.0g; Yeast extract, 1.5g; Bactopeptone, 1.5g; Glucose, 20g; Agar, 20g; Phloxine B, 10mg 으로 조성된 배지 (Fink, 1970) 상에 도말하여 7 일간 배양한 다음 필요한 영양 돌연변이 균주를 분리하였다.

원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성 및 재생은 배와 전 (Bai and Chun, 1984) 의 방법에 따랐다. 세포벽 제거 효소인 Novozym 234 (Novo industrias, Denmark) 의 농도는 3 mg/ml 이었고 myoinositol (Difco) 을 0.1~1 mg/ml 로 첨가한 YEPD (1%

Yeast extract, Difco; 2% Bacto peptone, Difco; 2% Glucose) 액체 배지상에서의 전 배양이나 원형질체 형성 완충용액에 1~10mg/ml 의 농도로 첨가한 BSA (Sigma) 가 원형질체 형성 및 재생에 미치는 영향을 조사하였다.

원형질체 융합

영양요구성 돌연변이 균주의 원형질체를 0.3 M CaCl_2 가 들어있는 Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5) 으로 세척한 후 원형질체의 수를 각각 $1 \sim 5 \times 10^7$ /ml 로 상보적 조합을 만들어 1:1 로 혼합하였다. $1,000 \times g$ 로 원심분리한 후 상등액을 버리고 0~40% polyethylene glycol (PEG, M. W. 4,000, Sigma) 과 0~500 mM CaCl_2 가 들어있는 완충용액 (pH 4.0~9.5) 에 재현탁한 뒤 30°C 에서 0~100분간 유지시켜 융합에 대한 최적조건을 조사하였다. 반응시간이 지나면 $1,000 \times g$ 로 원심분리 후 0.6 M KCl 과 0.1 M CaCl_2 가 들어있는 완충용액에 재현탁한 뒤 최소배지와 완전배지에 각각 plate 하였다. 융합 빈도는 최소배지상에서 자란 colony 수를 완전배지상에서 자란 colony 수로 나누어 백분율로 표시하였다.

DNA 정량

정지기 세포 ($1 \sim 5 \times 10^9$ /ml) 를 Stewart (1975) 방법에 의해 perchloric acid 로 DNA 를 추출하고 diphenylamine 방법 (Burton, 1968) 에 의해 600nm 에서 측정하여 세포당 DNA 양을 측정하였다. 표준 DNA 는 herring sperm DNA (Sigma) 를 사용하였다.

핵염색

YEPD 한천배지에서 30°C 로 5~6 시간 배양 후 대수기에 들어간 세포를 취해 Fournier 등 (1977) 방법에 의해 Giemsa (Merck) 염색한 뒤 $1,000 \sim 1,500 \times$ 에서 관찰하였다.

세포체적 측정

출아 세포를 없애기 위해 세포를 정지기까지 배양 후 동일한 생리적 연령에 도달하게 하여 50 개 이상 세포의 장축과 단축을 측정하여 $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot a \cdot b^2$ ($a = \frac{1}{2}$ 장축, $b = \frac{1}{2}$ 단축) 의 공식에 의하여 세포체적을 계산하였다.

β -D-galactosidase 활성 측정

Lactose를 에너지 및 탄소원으로 하는 YNB (Yeast nitrogen base, Difco) 배지를 사용하여 세포를 배양하였고, 효소 추출은 Dickson 과 Markin (1980)의 방법에 의해 실시하였다. 효소 활성은 O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (Sigma, Co.)의 가수분해 산물인 O-nitrophenol 양을 420nm에서 측정하여 분당, 세포당, pico mole (pM)로 표시하였다.

결 과

원형질체 형성과 재생

*C. pseudotropicalis*의 야생형 균주와 이것의 영양요구성 돌연변이 균주의 protoplast yield가 거의 100%에 도달하였다. 그리고 반응 시간 후 총 세포수에서 lysis율을 보면 야생형 균주와 histidine (His) 및 adenine (Ade) 요구성 돌연변이 균주는 2.3~3.5%로 매우 낮았으나 methionine (Met) 과 tryptophan (Trp) 요구성 돌연변이 균주는 각각 48%와 28%로 높았다. 그러나 BSA (4mg/ml)와 myoinositol (0.5mg/ml)을 처리했을때 Met영양요구성 돌연변이 균주에서는 48%에서 4.5%, Trp 영양요구성 돌연변이 균주에서는 28%에서 0.5%로 lysis율이 현저하게 감소되었고, 이와는 달리 His과 Ade영양요구성 균주에서는 별 차이가 없었다(Table 1).

한편, 원형질체 재생율은 야생형 균주에서 BSA을 원형질체 형성 완충용액에 첨가시 20.5%에서 32.8%로 증가했으며, 그 이상 첨가시에는 약간 감소하는 경향을 보였고, myoinositol

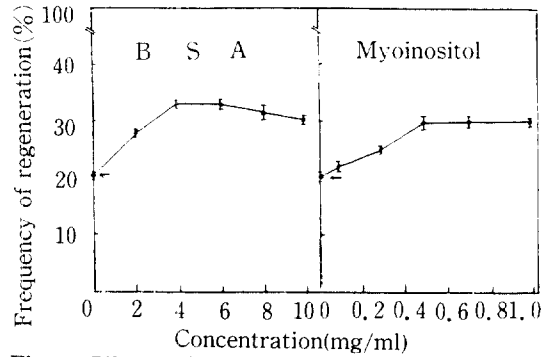


Fig. 1. Effect of concentration of BSA and myoinositol on the regeneration of protoplast. Arrows (←) indicate the frequency of protoplast regeneration in the absence of additives.

을 0.5mg/ml로 전배양시 첨가하였을때는 29.6%로 증가하였다(Fig. 1). 그리고 myoinositol (0.5mg/ml)과 BSA (4mg/ml)를 동시에 처리했을 때 야생균주나 His, Trp, Met요구성 돌연변이 균주에서는 비처리구에 비해 2배 이상의 원형질체 재생 증진효과를 보여주었으나 Ade요구성 돌연변이 균주의 경우에는 거의 변화가 없었다(Fig. 2).

원형질체 융합

원형질체의 융합 유도물질에는 PEG와 융합시 필수이온으로서 Ca²⁺이온이 널리 사용되고 있다(Fournier등, 1977; Sarachek등, 1981; Sipiczki and Ferenczy, 1977a, b; Stahl, 1978; Van Solingen and Van der Platt, 1977; Wilson등, 1982; Yamamoto and Fukui, 1977). 먼저 His와 Trp인 영양요구성 돌연변이 균주를 이용, 이들간의 원형질체 융합율에 미치는 PEG (M. W. 4, 000)와 CaCl₂의 농도별 영향을

Table 1. Frequencies of protoplast formation and its reversion from wild-type and auxotrophs of *C. pseudotropicalis*.

Frequency (%)	Phenotype				
	Prototroph	Ade	His	Met	Trp
Reversion	-	1.2 × 10 ⁻⁷	3.9 × 10 ⁻⁷	2.4 × 10 ⁻⁵	4.4 × 10 ⁻⁶
Protoplast formation	97.6 (99.7) ^a	96.7 (100)	96.5 (99.6)	52.0 (95.5)	72.0 (99.5)

^aIndicates the frequency of protoplast formation from cells treated with BSA (4mg/ml) and myoinositol (0.5mg/ml). Values are average from three experiments.

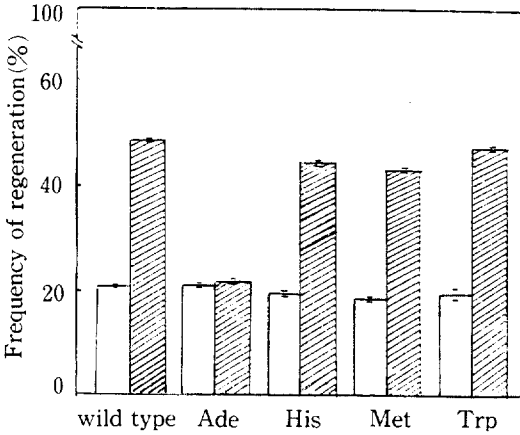


Fig. 2. Effect of BSA and myoinositol on the regeneration of protoplasts from wild type cells and auxotrophic mutants.

□ ; Control ▨ ; Treatment
 a Indicates the addition of BSA (4mg/ml) to protoplasting buffer for cells grown in YEPD medium supplemented with myoinositol (0, 5mg/ml).

조사하였다. Fig. 3에서 보여준 바와같이 PEG 20%와 CaCl₂ 100mM에서 융합율이 가장 높았고 이때 PEG에 노출시간은 30분임을 알 수 있었다 (Fig. 3, Fig. 4). 또, pH도 융합율에 영향을 미칠수 있기 때문에 몇가지 완충용액을 사용, pH별 융합율을 조사하였다. Table 2에서 표시된 바와같이 pH 6.0에서 융합빈도가 현저하게 증가하였다.

따라서 His와 Trp간의 원형질체 융합 최적

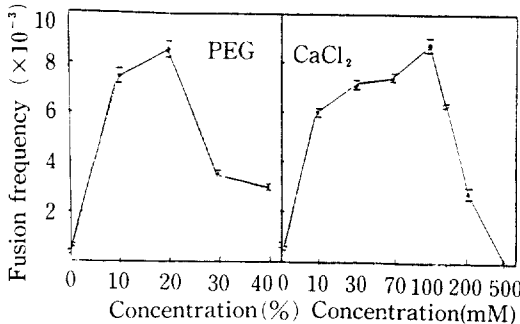


Fig. 3. Effect of PEG and CaCl₂ on the fusion frequencies between His and Trp mutants. Citrate phosphate (pH 6.0) buffer was used for this experiment.

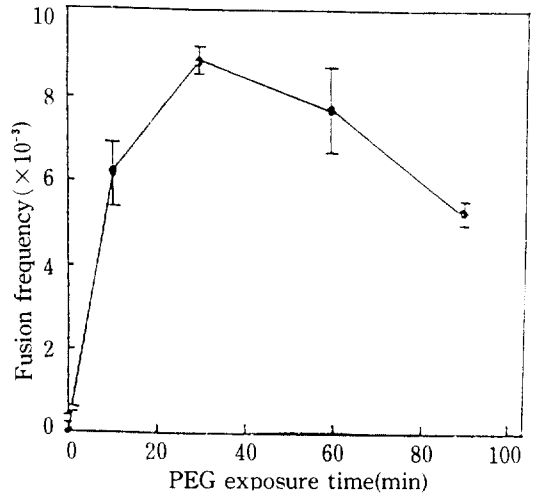


Fig. 4. Effect of exposure time to PEG on the fusion frequency between His and Trp mutants. Citrate phosphate buffer (pH 6.0) was used for this experiment.

조건은 PEG 20%, CaCl₂ 100mM, 노출시간은 30분 그리고 pH는 6.0임을 알 수 있었다. 상기 조건하에서 몇가지 상보적인 영양 돌연변이주간 융합율을 조사하였는데 Table 3에서 보여준 바와같이 BSA와 myoinositol 처리구가 비처리구에 비해 His+Ade과 Trp+Ade에서는 2배, His+Trp에서는 3.5배 이상의 융합율 증가가 있었는데 이는 원형질체 재생증가 (Fig. 2)가 융합빈도를 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

Table 2. Effect of pH on the frequency of protoplast fusion between His and Trp mutants.

pH	Fusion frequency	Relative frequency (%)
pH 4.0 (acetate buffer) ^a	0	0
pH 6.0 (citrate-phosphate buffer)	8.8 × 10 ⁻³	100
pH 7.5 (Tris-HCl buffer)	1.4 × 10 ⁻³	15.9
pH 9.5 (glycine-NaOH buffer)	1.4 × 10 ⁻⁴	1.6

^aThe concentration of buffer used was 50mM except glycine-NaOH which was 200mM. Values are average from three experiments.

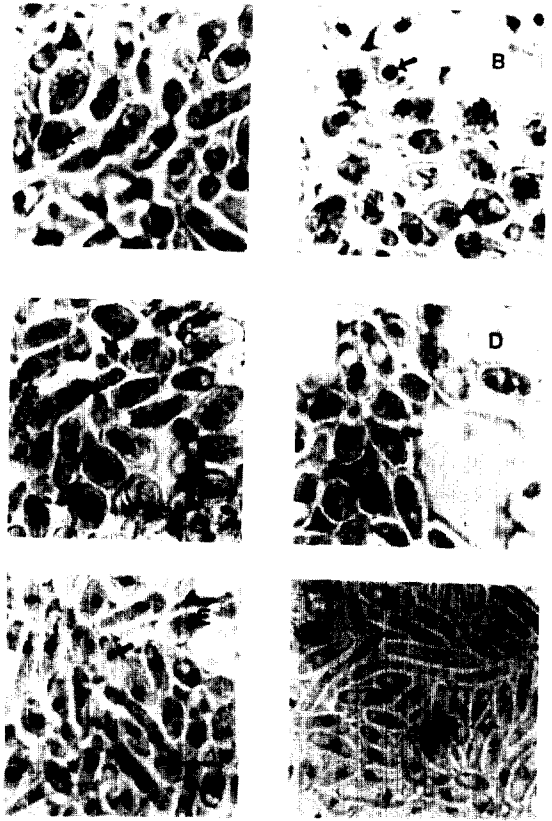
Table 3. Fusion frequency between complementary auxotrophs.

Phenotype	Fusion frequency
His + Ade	1.5×10^{-3} (7.5×10^{-4}) ^a
His + Trp	8.8×10^{-3} (2.3×10^{-3})
Trp + Ade	3.9×10^{-3} (1.2×10^{-3})

^aIndicates the fusion frequencies of protoplasts formed from cells not treated with BSA and myoinositol. Values are average from three experiments.

융합세포의 특성

융합율이 양호한 His+Trp으로부터 100 개의 융합체를 분리하였는데 이들중 성장속도가 빠른 4 개의 융합체들에 대한 융합상태를 알아보기 위하여 세포크기, 체적, DNA 함량 그리고 핵염색등을 실시하였다. 그 결과는 Table 4 와 Plate 1 에 나타나 있다. Table 4 에서 본 바와같이 융합균주 F₂와 F₃₀의 세포당 DNA 함량을 양친인 His와 Trp의 평균 DNA 함량인 22 fg/cell와 견주어보면 2 배나 2 배에 아주 가까운 수치인 44.0 ± 2.9 fg/cell과 43.5 ± 2.0 fg/cell이었으며 반수체인 *Saccharomyces cerevisiae* (Maraz 등, 1978)의 21~25 fg/cell 의

**Plate 1.** Photomicrography of nuclei of fusion hybrids and parents.

A:F₂, B:F₃₀, C:F₄, D:F₅, E:His, F:Trp. Arrows indicates nucleus. Bar equals 10 μ m.

Table 4. Cell size, volume and DNA content of *C. pseudotropicalis* parental strains and fusion hybrids

Strain	Mean length (μ m)	Mean width (μ m)	Mean volume (μ m ³)	DNA/cell (fg)	Ploidy (n) ^a	β -D-galactosidase activity (pM/cell/min)
Parental:						
Wild type	7.5 ± 0.4	4.3 ± 0.4	72.6 ± 17.4	21.3 ± 0.3	1	0.73
His	8.0 ± 0.3	4.1 ± 0.3	70.4 ± 13.0	22.6 ± 1.6	1	0.67
Trp	8.8 ± 0.3	3.7 ± 0.4	63.1 ± 16.3	21.4 ± 1.4	1	0.67
Fusants:						
F 2	9.5 ± 0.8	6.2 ± 0.6	191.3 ± 53.3	44.0 ± 2.9	2	0.55
F 4	9.3 ± 0.6	6.1 ± 0.5	181.2 ± 38.9	35.6 ± 1.4	1.62	ND
F 5	9.2 ± 0.8	5.8 ± 0.5	162.1 ± 42.2	36.6 ± 1.4	1.66	ND
F 30	9.5 ± 0.7	6.0 ± 0.5	179.1 ± 43.1	43.5 ± 2.0	1.97	0.54

^aFor fusion hybrids, haploid(n) value based on average of parents, His+Trp. ND:Not determined

DNA량과 비교해 보았을때 반수체(1n)에서 배수체(2n)로 ploidy가 증가 되었음을 알 수 있었고 Plate 1에 나타난 바와같이 융합균주의 핵의 크기가 양친의 그것에 비해 크고, 세포체적도 2배 이상이된 것 등으로 미루어보아 핵 융합이 일어난 것 같다. 한편, F₄와 F₅의 DNA 함량은 반수체와 배수체의 중간 수준으로 보아 이수체인 것 같으나 앞으로 더 확인해야 할 것으로 본다. 융합균주중 F₂와 F₃₀에 대해서 β -D-galactosidase 활성을 측정해본 결과 효소활성이 양친의 그것에 미치지 못하고 있음을 볼 수 있다. 이에 관해서는 앞으로 안정된 융합균주를 screening하여 보다 정확한 조사를 할 계획이다.

고 찰

Novozym 234를 사용하여 원형질체를 형성시켜보면 *C. pseudotropicalis*에서는 야생형 및 영양요구성 돌연변이 균주가 BSA(4mg/ml)와 myoinositol(0.5mg/ml)을 첨가시켰을 때 95~100%의 원형질체 형성율을 나타내 *Schizosaccharomyces pombe* 등 5가지 균주를 Novozym 234로 처리한 Stephen과 Nasim(1981)의 결과인 80~90%보다 높고 *Saccharomycopsis lipolytica* (Stahl, 1978)의 93~99%와 유사함을 나타냈다. 한편, 원형질체 재생율에서도 18~20%로 Novozym 234를 이용한 Stephen과 Nasim(1981)의 결과(10~18%)나 Stahl(1978)의 결과(9~10%)보다 약간 높은 경향을 보였으나 BSA와 myoinositol을 첨가했을때는 44~46%로 현저히 재생율이 증진됨을 알 수 있었다. Lai와 Lui(1982) 및 Teasdale과 Rugini(1983) 등은 식물세포의 원형질체 형성에 BSA를 사용하여 원형질체 viability를 증진시켰다고 보고한 바 있으며 Ulaszewski(1978) 등과 Hanson과 Lester(1980)는 myoinositol이 세포막의 확장 및 세포벽 합성에 중요하다고 보고한 바 있는데 이런 증거들은 BSA와 myoinositol이 원형질체 형성 및 재생에 효과가 있음을 입증해 주고 있다.

원형질체 융합율에 미치는 PEG의 최적농도

가 20%이었는데 이는 *C. tropicalis* (Fournier 등, 1977)의 결과와 일치하고 있으나 *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *S. lipolytica* 그리고 *S. pombe* (Maraz 등, 1978; Pesti 등, 1979; Sarachek 등, 1981; Sipiczki and Ferenczy, 1977; Stahl, 1978)와는 5~20%의 차이가 있었다. 한편, CaCl₂의 최적농도는 100mM 이었는데 이는 *C. tropicalis* (Fournier 등, 1977)와 *S. cerevisiae* (Maraz 등, 1978)의 경우와는 일치하고 있으나 *C. albicans*와 strain이 다른 *S. cerevisiae* (Pesti and Ferenczy, 1982; Sarachek 등, 1981; Van Solingen and Van der Platt, 1977)에서의 10mM에 비해서는 10배나 차이가 있었다. 이와같은 차이는 균종이나 돌연변이형의 차이에서 기인된 것으로 사료된다. 그러나 융합율에 미치는 pH의 영향을 보면 *C. albicans* (Sarachek 등, 1981), *S. cerevisiae* (Skatrud 등, 1980), *S. lipolytica* (Stahl, 1978)의 결과와 거의 일치하고 있다.

본 실험에서 사용된 *C. pseudotropicalis* C-BS 607의 경우는 몇개의 상보적 영양요구성 균주간의 융합율이 $1.5 \sim 8.8 \times 10^{-3}$ 이었다. 이는 *C. albicans*의 $1.3 \times 10^{-4} \sim 9.1 \times 10^{-3}$ (Pesti 등, 1979), *C. tropicalis*의 3×10^{-5} , *S. pombe*의 1.7×10^{-3} (Sipiczki and Ferenczy, 1977, b) 그리고 *S. lipolytica*의 $5 \times 10^{-4} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ (Stahl, 1978) 등의 수치에 비하여 융합율이 양호함을 보여주었다. 이같은 결과는 원형질체 형성시 BSA와 myoinositol을 처리함으로써 원형질체 재생능력의 향상에 기인된 것으로 본다.

융합체에 대한 핵융합 유무와 안정성 조사는 융합체의 특성을 밝히는데 필수적인 단계이다. *C. tropicalis* (Fournier 등, 1977), *C. albicans* (Sarachek 등, 1981), *Schwanniomyces alluvius* (Wilson 등, 1982) 등의 종내 융합의 경우에도 2핵상태로 존재하던가 핵융합이 되었다 하더라도 형질분리로 인해 안정성이 상실된 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 *Saccharomyces diastaticus*와 *S. cerevisiae*간으로 부터 안정성이 비교적 좋은 융합체를 얻은 바 있다 (De Figueroa 등, 1984).

본 실험에서 His와 Trp 영양요구성 요구균주

로부터 얻은 F₂와 F₃₀은 세포체적, DNA 함량, 핵염색 및 생장속도로 미루어보아 핵이 융합된 것으로 추정되나 (Maraz 등, 1978; Sipiczki and Ferenczy, 1977a, Wilson 등, 1982), 보다 확실한 핵융합 상태나 이의 안정성에 관해서는 1년 이상의 장시간 동안 mitotic segregation과 p-fluorophenylalanine 이나 benomyl 등의 처리 방법 등에 의한 핵융합 상태와 안정성을 검토함으로써 보다 정확한 결론을 얻을 수 있을 것으

로 사료된다. 이에 관한 연구는 현재 진행중에 있다.

사 사

본 연구는 1985년도 한국 유전공학 학술협회의 연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

Candida pseudotropicalis CBS 607에서의 야생형과 영양요구성 돌연변이 균주에 대한 원형질체 형성 및 재생과 상보적 영양요구성 균주간의 융합에 관해서 연구하였다. 야생형과 histidine 혹은 adenine요구성 균주에서 원형질체 형성율은 96~100%이었으나 methionine과 tryptophan요구성 균주는 각각 52%와 72%였다. Myoinositol (0.5 mg/ml)을 첨가한 배지에서 전배양한 methionine과 tryptophan요구성 균주는 원형질체 형성시 bovine serum albumin (BSA, 4 mg/ml)을 첨가하면 96~98%의 원형질체 형성율이 얻어졌다. 원형질체 재생 빈도는 18~20%였으나, BSA와 myoinositol을 첨가하면 adenine요구성 균주(약 20%)를 제외한 나머지 영양요구성 균주에서는 재생율이 2배 이상 증가했다. 원형질체 융합에 대한 PEG와 CaCl₂ 최적농도는 20%와 100 mM 이었고 최적 pH와 반응시간은 각각 6.0과 30분이었다. 상보적 영양요구성 균주의 융합빈도는 1.5~8.8 × 10⁻³였으며 원형질체의 재생 증진으로 인해 융합율이 현저히 증가했다. Histidine요구성 균주와 tryptophan요구성 균주를 융합시켰을 때 몇개의 융합세포를 얻었는데 측정된 DNA양과 핵상의 차이로 보아 aneuploid나 diploid 상태임을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Budtz-Jørgensen, E., and J. Kelstrup, 1977. Enzyme as denture cleanser. *Scand. J. Dent. Res.* **85**: 209-215.
2. Burton, K. 1968, Determination of DNA concentration with diphenylamine. In "Methods in Enzymology"(Colowick, S. P., and N.D. Kaplan, ed.), Vol.12, pp. 163-166. Academic Press Inc., New York.
3. Bai, S., and S.B. Chun, 1984. Formation and regeneration of protoplasts by Novozym 234 from *Kluyveromyces fragilis* N100 and *Candida pseudotropicalis* CBS 607. *Kon. J. Microbiol.* **22**: 45-56.
4. Dickson R.C., and J.S. Markin, 1980. Physiological studies of β -D-galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **149**: 777-785.
5. De Figueroa, L.I., M.F. de Richard, and M.R. de Van Broock, 1984. Use of the somatic fusion method to introduce the flocculation property in *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 587-592.
6. Fink, G. R., 1970. The biochemical genetics of yeast. In "Methods in Enzymology"(Tabor, H, and C.W. Tabor, ed.), Vol. 17A, pp.59-78. Academic Press, New York.
7. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguin, and H. Helslot, 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**: 143-149.
8. Hanson, B.A., and R.L. Lester, 1980. Effects of inositol starvation on phospholipid and glycogen synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**: 79-89.
9. Lai, K-W., and L-F. Lui, 1982. Correla-

- tion between fine structure and viability of rice protoplasts. Proc. 5th Intl. Cong. *Plant Tissue & Cell Culture*. pp. 603-604.
10. Lodder, J., 1979. The yeasts: a taxonomic study. pp.1025-1027, North Holland Publishing Co., Amsterdam, London.
 11. Maraz, A., Kiss, and L. Ferenczy, 1978. Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* strains of identical and opposite mating types. *FEMS Microbiol. Lett.* **3** : 319-322.
 12. Olaiya, A.F., and S.J. Sogin, 1979. Ploidy determination of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **140** : 1043-1049.
 13. Pesti, M., and L. Ferenczy, 1982. Protoplast fusion hybrids of *Candida albicans* sterol mutants differing in nystatin resistance. *J. Gen. Microbiol.* **128** : 123-128.
 14. Pesti, M., E.K. Novak, A. Svoboda, and L. Ferenczy, 1979. Protoplast fusion between polyene-resistant and sensitive mutants of *Candida albicans*. 8th Congress of the Hungarian Society of Microbiology, Budapest, P. 138(abstract).
 15. Poulter, R., and V. Hanrahan, 1983. Conservation of genetic linkage in nonisogenic isolates of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **156** : 498-506.
 16. Poulter, R., K. Jeffery, M.J. Hubbard, M.G. Shepherd, and P.A. Sullivan, 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146** : 833-840.
 17. Sarachek, A., D.D. Rhoads, and R.R. Schwarzhoff, 1981. Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplasts. *Arch. Microbiol.* **129** : 1-8.
 18. Sipiczki, M., and L. Ferenczy, L. Ferenczy, 1977a. Fusion of *Rhodospiridium (Rhodotorula)* protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2** : 203-250.
 19. Sipiczki, M., and L. Ferenczy, 1977b. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Mol. Gen. Genet.* **151** : 77-81.
 20. Skatrud, P.L., D.M. Jaeck, E.L. Kot, and J.R. Herbert, 1980. Fusion of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*: genetic manipulation and reconstruction of brewer's yeast. *J. Am. Soc. Brew., Chem.* **38** : 49-52.
 21. Stahl, U., 1978. Zygote formation and recombination between like mating types in the yeast *Saccharomycopsis lipolytica* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **160** : 111-113.
 22. Stephen, E.R., and A. Nasim, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.* **27** : 550-553.
 23. Stewart, P.R., 1975. Analytical methods for yeast. In "Methods in Cell Biology" (Prescott, D.M., ed.), Vol.12, pp. 122-123, Academic Press, New York.
 24. Teasdale, R.D., and E. Rugini, 1983. Preparation of viable protoplasts from suspension-cultured lobolly pine (*Pinus taeda*) cells and subsequent regeneration to callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* **2** : 253-261.
 25. Ulazewski, S., J.R. Woodward, and V.P. Cirillo, 1978. Membrane damage associated with inositol-less death in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **136** : 49-54.
 26. Van Solingen, P., and J.B., Van der Platt, 1977. Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.* **130** : 946-947.
 27. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians, and W. Ingledew, 1982. Protoplast fusion in the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Mol. Gen. Genet.* **186** : 95-100.
 28. Yamamoto, M., and S. Fukui, 1977. Fusion of yeast protoplast. *Agr. Biol. Chem.* **41** : 1829-1830.

(Received June 21, 1986)