

## 느타리버섯屬의 原形質體 融合率에 影響을 미치는 要因

劉英福 · 金永兌 · 卞明玉 · 柳昌鉉 · 車東烈 · 朴容煥

農村振興庁 農業技術研究所 菌類科

### Factors Affecting Fusion Frequency of *Pleurotus* Protoplasts

Young-Bok Yoo, Yeong-Tae Kim, Myung-Ok Byun, Chang-Hyun You,  
Dong-Yeul Cha and Yong-Hwan Park

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute,  
R.D.A., Suweon 440-707, Korea

**ABSTRACT:** Factors influencing the fusion frequency of protoplasts were investigated with auxotrophic mutants of *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Immediately after the polyethylene glycol (PEG) solution was added, the protoplasts adhered firmly and shrank. During the subsequent dilution with 0.6 M sucrose, the protoplasts regained their normal size and larger bodies were observed. Interspecific heterokaryons were obtained by fusion of the nutritionally complementing protoplasts. Hyphae of the heterokaryotic fusants formed true clamp connections. The optimum conditions were a total of 1 to 15 million protoplasts per ml, 30% polyethylene glycol 8000 solution with adjustment to pH 8.0 and 0.6 M sucrose stabilized regeneration medium. Other parameters such as  $Ca^{++}$ , glycine, exposure time and temperature influenced mainly the viability of the protoplasts.

**KEYWORD:** Polyethylene glycol, High-frequency protoplast fusion, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, Basidiomycotina.

原形質體 融合은 Mellon (1925)에 의해 박테리아의 自發的 原形質體 融合을 보고하면서부터 시작되었으며 그후 박테리아와 眞菌類에서 재확인되었다 (Smith, 1944; Müller, 1966). 진균류에 있어서의 원형질체 융합은 여러 가지 방법으로 이루어졌으나 융합율이 극히 낮았는데 (Ferency 등, 1972; Binding and Weber, 1974), 高等 植物의 융합제로 polyethylene glycol (Kao and Michyluk, 1974)을 발견한 이후 絲狀菌類에서도 융합을 증진에 관하여 보고되었다 (Anne and Peberdy, 1975 및 1976; Ferency 등, 1975 및 1976). Polyethylene glycol을 이용하여 원형질체 융합시에 種內, 近綠種間에는 融合株를 얻을 수 있으나 遠綠種間 또는 屬間에서는 융합주를 획득하기가 극히 어렵거나 전혀 불가능하다 (Anne and Peberdy, 1985; Ferency, 1985; Kevai and Peberdy, 1985).

본 연구에서는 원형질체 융합을 증진을 위하여 이에 관여하는 polyethylene glycol 分子量, pH, 溫度, 處理時間, 細胞 活性物質 混用 등에 대하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

### 材料 및 方法

#### 菌株 및 培養

사철느타리버섯 *Pleurotus florida* ASI 2016에서 單孢子 分離하여 얻은 ASI 124-30과 느타리버섯 *Pleurotus ostreatus* ASI 2018로부터 얻은 ASI 106-6의 균사체로부터 원형질체를 분리하여 紫外線 照射로 각각 유기한 營養要求株 ASI 2-3-f 2016-29 (rib-1)와 ASI 2-1-0 2018-83 (arg)을 사용하였다 (Yoo 등, 1985). 균주 배양은 버섯 완전배지 (mushroom complete medium=MCM)와 버섯 최소배지 (mush-

room minimal medium = MMM)를 121°C에서 20분 멸균하여 사용하였으며 (Raper 등, 1972), 원형질체 배양은 여기에서 삼투압조정제를 첨가하였다.

#### 原形質體分離, 融合 및 融合株의 選拔

Yoo 등 (1984)의 방법에 따라 *P. florida*는 Novozym 234 (Novo), Cellulase onozuka R-10 (Yakult),  $\beta$ -Glucuronidase (Sigma), *P. ostreatus*는 Novozym 234,  $\beta$ -Glucanase (BDH),  $\beta$ -Glucuronidase를 각각 5 mg ml<sup>-1</sup>로 0.6 M sucrose와 혼합하여 원형질체를 분리하였다. 원형질체 융합율은 분해효소와 혼합된 원형질체를 0.6 M sucrose에 2번 세척 후 polyethylene glycol (PEG, Sigma)을 사용하여 Anne and Peberdy (1976)와 Ferenczy 등 (1975)의 방법에 따라 융합하여 원형질체 배양 배지 (버섯 최소배지 + 삼투압조정제)에서 배양 후 육안으로 菌叢을 관찰할 수 있을 때 그 수를 셈하여 다음과 같이 구하였다.

$$\text{융합율} = \frac{\text{최소배지에 환원된 균총수}}{\text{최소배지에 배양한 원형질체 수}} \times 100$$

으로 하였고, 융합주의 선발은 양친균주의 원형질체가 back mutation이 되지 않는 원형질체 농도로 융합하여 재생된 균사를 현미경으로 관찰하여 클렘프 연결체의 형성 균총을 융합주로 하였다.

## 結果 및 考察

#### 原形質體 融合過程의 觀察

원형질체에 PEG 용액을 처리하였을 때는 처리 전보다 원형질체가 표면이 쭈그러지면서 원형질체 상호간의 공극이 줄어들 한 곳에 많은 원형질체가 응집되었다. 그러나 융합은 일어나지 않았으며 삼투압조정제로 PEG를 제거한 후에 두 개 또는 다수 개의 원형질체가 융합되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig.1).

원형질체는 PEG 존재하에서 원형질막이 서로 밀착되어 융합되며, 세포간의 Ca, lipid의 유출과 침투로 서로 교환이 일어나다가 PEG가 제거되면 응축된 원형질체가 부풀어 지면서 완전한 하나의 원형질체로 융합된다 (Ferenczy 등, 1976; Knutton and Pasternak, 1979; Boni and Hui, 1987).

#### 原形質體 融合에 關여하는 要因

융합율에 영향을 주는 PEG의 농도를 PEG 3350으로 처리하였을 때 Fig.2와 같이 30%에서 가장 효

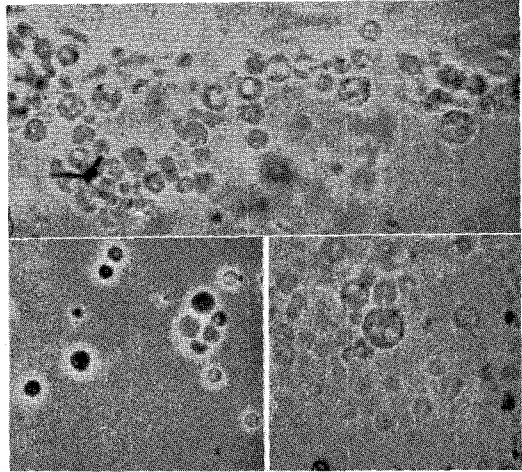


Fig. 1. Micrographs of the fusion products of protoplasts of *Pleurotus florida* and *pleurotus ostreatus*. Suspension of fused protoplast after the removal of PEG. Note the larger body probably a consequence of fusion between two or more protoplasts.

과적이었으며 10%에서는 극히 낮았다.

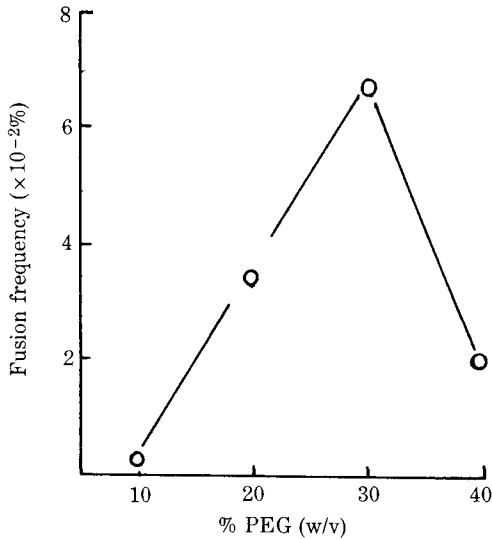
PEG는 융합촉진과 삼투압조정 역할을 하는데 30%에서의 높은 효과는 다른 연구결과와 유사한 경향이였다 (Anne and Peberdy, 1975; Ferenczy 등, 1975). PEG 농도가 낮거나 높으면 삼투압의 불안정으로 원형질체가 파열되며 40% 이상의 높은 농도에서는 원형질체내의 수분과 세포물질이 유출되어 세포생존에 해가되어 융합율이 낮아지는 것으로 사료된다.

Ca 이온이 없는 상태에서 30% PEG 3350으로 pH의 효과를 비교한 것은 Fig.3과 같은데 pH 8에서 융합율이 가장 높았다.

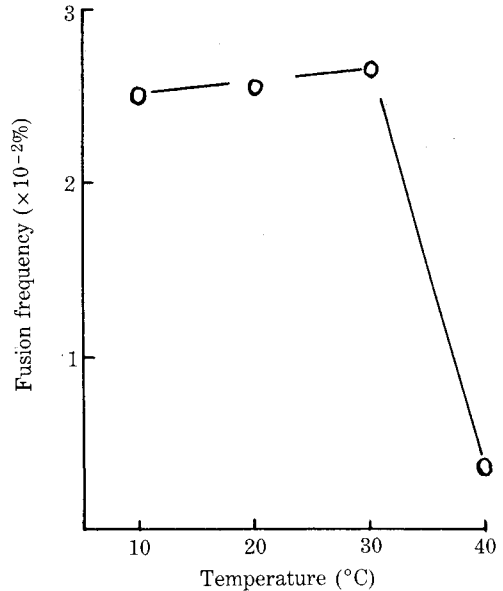
높은 pH 농도에서 융합율이 높아지는 것으로 알려져 있는데 Anne and Peberdy (1975)는 *Penicillium chrysogenum*의 융합에서 pH 9.0에서 가장 효과적이라 하였는데 이러한 차이는 상이한 종이나 Ca 이온의 존재여부 등에서 기인되는 것으로 사료된다.

양친 원형질체를 30% PEG 3350에 처리하여 10분간 배양할 때 여러 가지 온도에서 융합율을 조사한 것은 Fig.4와 같이 10, 20, 30°C에서는 차이가 없었으나 40°C에서는 아주 저조한 융합율을 보였다.

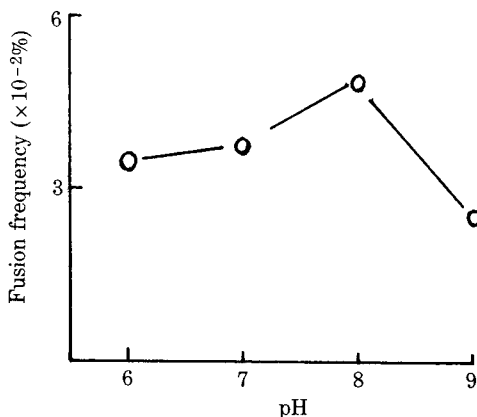
고온에서 융합율이 증가하는 것으로 알려져 있는데 Anne and Peberdy (1975)는 20-30°C에서 융합주를



**Fig. 2.** Effects of concentrations of PEG on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with different concentration of PEG 3350 at 30°C for 10 min. Protoplasts were washed once with 0.6 M sucrose and plated on hypertonic MM.



**Fig. 4.** Influence of temperatures on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were incubated in one ml of 30% PEG 3350 solution for 10 min at different temperatures. Protoplasts were washed with 0.6 M sucrose and plated on hypertonic MM.



**Fig. 3.** Influence of pH on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution at 30°C for 10 min. pH was adjusted with 10mM NaOH. Protoplasts were washed once with 0.6 M sucrose and plated on hypertonic MM.

가장 많이 형성하였으며, 40°C에서는 완전배지에서 재생율이 극히 낮았다고 하였다. Fig.4에서의 40°C에서 10분간 처리되는 동안 염색체내의 유전자의 손상으로 핵의 기능을 상실하여 재생될 수 없어 융합

율이 극히 낮아지는 것으로 생각된다.

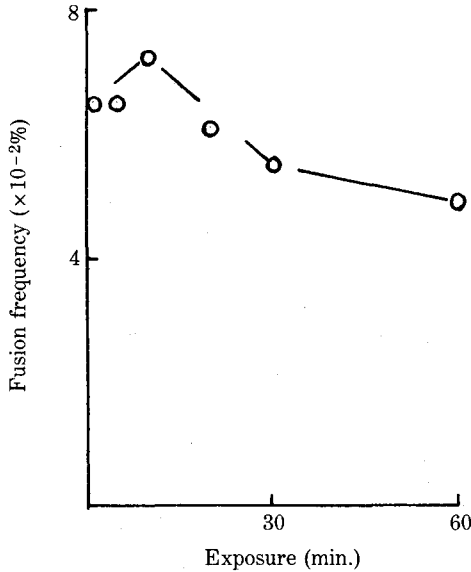
원형질체에 융합제 PEG를 혼합하면 원형질체가 서로 응집되어지는데 이 때 온도를 높게하면 원형질체와 접촉하는 PEG의 점성이 감소하고 세포질막의 유동성이 증가하여 원형질체막의 접촉과 융합이 보다 용이하여 진다 (Ankong 등, 1973).

원형질체를 융합할 때 양친의 원형질체를 PEG 3350으로 30°C에서 1-60분 동안 배양하여 그 효과를 나타낸 것은 Fig.5와 같이 큰 차이가 없는 것으로 미루어 짧은 시간동안의 처리로도 융합될 수 있음은 다른 연구결과와 유사하였다 (Anne and Peberdy, 1976 ; Boni and Hui, 1987).

중간 원형질체 융합시 원형질체 수를 1 : 1, 5 : 1, 10 : 1로 한 결과 혼합비가 융합율에 영향을 주지는 않았다 (Table I).

양친 원형질체를 동일한 수로 하여 융합하면 그 율이 다소 높지만 (Hamlyn, 1982 ; Bradshaw, 1983), 양친 균주의 특성에 따라 크게 영향을 주지 않는 경우도 있는 것으로 생각된다.

양친 원형질체에 PEG에 10분간 처리하고 PEG를



**Fig. 5.** Influence of time on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution for different exposure time at 30°C. Protoplasts were washed and plated on 0.6 M sucrose stabilized MM.

제거하기 위하여 0.6 M sucrose로 혼합하여 2회 세척하여 최소배지에 배양할 때 까지의 30분 동안의 과정중에 원심분리하여 원형질체와 삼투압조정제를 분리하는데 이 원심분리의 온도를 5, 15, 25°C로 조정하여 융합율을 조사한 결과 Table II에서와 같이 25°C에서 가장 양호하였으며 온도가 낮을수록 융합율도 낮았다.

고온에서 배양할 때가 융합율이 높은 이러한 결과는 원형질체의 팽창이 보다 고온에서 크게 이루어져 융합에 도움을 주었을 것으로 사료되며, PEG가 제거되어져 세포가 배양되어져야 융합이 이루어진다는 보고 (Knutton and Pasternak, 1979; Robinson 등, 1979; Wojcieszyn 등, 1983)를 뒷받침한다.

삼투압조정제의 종류가 원형질체 융합율에 영향을 주는 것을 나타낸 것은 Table III에서와 같이 KCl 보다는 sucrose에서 효과적이었으며 0.4 M 보다는 0.6 M이었다.

Sucrose는 PEG 없이는 융합에 효과를 나타내지 못하지만 (Bony 등, 1984), 탈수제 역할을 하며 원형질막을 보호하고 원형질체 재생에 효과적인 탄소원

**Table I.** Influence of protoplast input ratios on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution at 30°C for 10 min. Protoplasts were washed with 0.6 M sucrose and plated on hypertonic MM

Protoplast input ratio (rib: arg)	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}\%$ )
1:1	1.38 $\pm$ 0.26
5:1	1.70 $\pm$ 0.12
10:1	1.55 $\pm$ 0.25

**Table II.** Influence of osmotic swelling temperatures on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution at 30°C for 10 min. Protoplasts were washed and diluted with 0.6 M sucrose for 30 min at different temperatures

Temperature (°C)	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}\%$ )
5	0.25 $\pm$ 0.06
15	0.54 $\pm$ 0.02
25	0.64 $\pm$ 0.07

으로 작용하는데 기인되어 융합율이 높은 것으로 사료된다. Sucrose는 원형질체 융합에 있어 cross feeding의 원인이 될 수도 있다고 *Cephalosporium acremonium*에서 보고하였으므로 (Hamlyn, 1982) 융합시 삼투압조정제로서의 사용은 세심한 관찰이 요구된다고 생각한다.

원형질체 융합시의 원형질체 농도를 조사한 것은 Table IV와 같이 농도가 높을수록 융합율은 증가하였으며,  $10^5$  이하에서는 융합이 전혀 이루어지지 않았다.

이러한 결과는 많은 수의 원형질체가 융합시에 요구됨을 의미하며, 원형질체의 재생율과도 상관이 있음을 나타낸다.

PEG의 분자량이 원형질체 융합에 미치는 효과를 Table V에서와 같이 분자량 1250을 제외하고는 유사한 결과를 나타내었다.

PEG는 동일한 분자량이라 하더라도 융합제로서의

**Table III.** Influence of osmotic stabilizers of plating medium on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution at 30°C for 10 min. Protoplasts were diluted with osmotic stabilizer at the corresponding molar concentration and plated on hypertonic MM

Osmotic stabilizer	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}$ %)
0.4 M KCl	0.01 $\pm$ 0.003
0.6 M KCl	0.02 $\pm$ 0.007
0.4 M Sucrose	0.93 $\pm$ 0.04
0.6 M Sucrose	3.10 $\pm$ 0.09

**Table IV.** Influence of concentration of protoplasts on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG 3350 solution at 30°C for 10 min

Protoplast concentration	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}$ %)
10 <sup>4</sup>	0
10 <sup>5</sup>	0
10 <sup>6</sup>	0.0011 $\pm$ 0.0074
10 <sup>7</sup>	1.65 $\pm$ 0.13

PEG의 이질성, 순수성 등의 영향을 받아 융합율에 크게 영향을 준다고 한다. Honda 등(1981)은 순수 정제된 PEG는 융합제로서 효과가 없으며 PEG에 오염된 물질이 실제로 융합효과를 나타내는데 이것은 antioxidant 일 것이라고 하였다. 그러나 순수 정제된 PEG도 동일한 융합효과를 나타낸다고 한 보고도 있다(Boni and Hui, 1987). 따라서 PEG는 제조회사나 제조시기에 따라서 다소의 차이가 날 수도 있을 것이다.

Ca<sup>2+</sup>과 glycine의 원형질체 융합에 대한 효과는 Table VI과 같은데 Ca<sup>2+</sup>이나 glycine의 효과가 다소 나타났다.

Ca<sup>2+</sup>은 높은 pH에 주어질 때 원형질체 융합의 기능을 가지며(Binding and Weber, 1974), PEG와 함께 혼합 사용될 때는 높은 융합을 유도한다고 알려져 있는데(Constabel and Kao, 1974; Anne and

**Table V.** Comparison of molecular weights of polyethylene glycol on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG solution at 30°C for 10 min

PEG Molecular weight	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}$ %)
1250	0.37 $\pm$ 0.14
3350	4.15 $\pm$ 0.26
8000	4.21 $\pm$ 0.15
10000	4.12 $\pm$ 0.23

**Table VI.** Influence of Ca<sup>++</sup> and glycine on the fusion frequency of protoplasts between *Pleurotus florida* and *Pleurotus ostreatus*. Protoplasts were treated with 30% PEG solution at 30°C for 10 min

Fusogenic agent	Fusion frequency ( $\times 10^{-2}$ %)
PEG 8000	3.15 $\pm$ 0.26
PEG 8000, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	3.80 $\pm$ 0.20
PEG 8000, 50 mM glycine	3.78 $\pm$ 0.37
PEG 8000, 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM glycine	4.31 $\pm$ 0.17

Peberdy, 1975), Ca<sup>2+</sup>이 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>와 함께 혼합될 때는 융합 기능은 감소한다고 하였다(Anne and Peberdy, 1975).

원형질체 융합에 영향을 주는 많은 요인 중에서 PEG 농도, 높은 pH, 삼투압조정제가 크게 융합율에 영향을 주는 요인이었으며, Ca<sup>2+</sup>, glycine, 원형질체의 농도, PEG 제거 후의 원형질체 배양온도, PEG 처리시간, PEG가 혼합된 원형질체 배양온도 및 시간, PEG 분자량도 다소의 영향을 주는 요인이었다.

## 摘 要

사철느타리버섯과 느타리버섯의 영양요구주로 원형질체 융합과정을 관찰하고, 융합에 영향을 미치는 여러 가지 요인을 분석한 결과는 다음과 같다. 원형질체에 polyethylene glycol을 혼합하였을 때 원형질체는 서로 응집되어 원형질막의 접착이 이루어졌

으며, 0.6 M sucrose로 PEG를 제거한 후에 두 개 또는 다수의 원형질체가 융합되었다.

원형질체 융합율에 크게 영향을 주는 요인은 PEG 농도, pH, 삼투압조정제였으며 원형질체의 농도, PEG 혼합시간, 원형질체 배양온도 및 시간, PEG 분자량,  $Ca^{2+}$ , glycine도 영향을 주었다. 가장 알맞는 조건을 pH 8.0으로 조절된 30% PEG 8000으로 원형질체에 혼합하여 30°C에서 10분간 배양하고 0.6 M sucrose에 현탁하여 동일한 삼투압조정제가 첨가된 배지에서 배양될 때 가장 많은 융합주를 획득할 수 있었다.

## 謝 辭

본 연구는 1988년도 한국과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구비로 수행된 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 參考文獻

- Ahkong, Q.F., Fisher, D., Tampion, W. and Lucy, J.A. (1975): Mechanisms of cell fusion. *Nature* **253**: 194-195.
- Anne, J. and Peberdy, J.F. (1975): Conditions for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions. *Arch. Microbiol.* **105**: 201-205.
- Anne, J. and Peberdy, J.F. (1976): Induced fusion of fungal protoplasts following treatment with polyethylene glycol. *J. Gen. Microbiol.* **92**: 413-417.
- Anne, J. and Peberdy, J.F. (1985): Protoplast fusion and interspecies hybridization in *Penicillium*. In *Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics*. ed. J.F. Peberdy & L. Ferenczy. pp.259-277. New York, U.S.A.: Macel Dekker.
- Binding, H. and Weber, H.J. (1974): The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Mol. Gen. Gene.* **135**: 273-276.
- Boni, L.T., Hah, J.S. Hui, S.W. Mukherjee, P., Ho, J.T. and Jung, C.Y. (1984): Aggregation of fusion of unilamellar vesicles by poly (ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 409-418.
- Boni, L.T. and Hui, S.W. (1987): The mechanism of polyethylene glycol-induced fusion in model membranes. In *Cell Fusion*. ed. A.E. Sowers. pp. 301-330. New York, U.S.A: Plenum.
- Bradshaw, R.E. (1983): Hybridization of *Aspergillus* species. Ph.D. Thesis. Univ. of Nottingham.
- Constabel, F. and Kao, K.N. (1974): Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. *Can. J. Bot.* **52**: 1603-1606.
- Ferenczy, L., (1985): Protoplasts fusion in yeasts. In *Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics*. ed. J.F. Peberdy & L. Ferenczy. pp.279-306. New York, U.S.A.: Marcel Dekker.
- Ferenczy, L., Kevei, F. and Szegedi, M. (1975): High-frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* **31**: 1028-1030.
- Ferenczy, L., Kevei, F., Szegedi, M., Franko, A. and Rojkk, I. (1976): Factors affecting high-frequency fungal protoplast fusion. *Experientia* **32**: 1156-1158.
- Ferency, L., Zsolt, J. and Kevei, F. (1972): Forced heterokaryon formation in auxotrophic *Geotrichum* strains by protoplast fusion. In *Third Juntenration Protoplast Symposium on Yeast Protoplasts*. p.74. October 2-5, 1972, Salamanca, Spain: Abstracts.
- Hamlyn, P.F. (1982): Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. Ph.D. Thesis. Univ. of Nottingham.
- Honda, K.Y., Magae, S., Sasakawa, H., Ohno, H. and Tsuchida, E. (1981): The components contained in polyethylene glycol of commercial grade (PEG-6000) as cell fusogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 165-171.
- Kao, K.N. and Michayluk, M.R. (1974): A method for high-frquency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* **1155**: 355-367.
- Kevei, F. and Peberdy, J.F. (1985): Interspecies hybridization after protoplast fusion in *Aspergillus*. In *Fungal Protoplast: Applications in Biochemistry and Genetics*. ed. J.F. Peberdy & I., Ferenczy. pp.241-257. New York, U.S.A.: Marcel Dekker.
- Knutton, S. and Pasternak, C.A. (1979): The mechanism of cell-cell fusion. *Trends Biochem. Sci.* **4**: 220-223.
- Mellon, R.R. (1925): Studies in microbic heredity I. Observation on a primitive from of sexuality (zygospore formation) in the colon typehoid group. *J. Bacteriol.* **10**: 481-501.

- Muller, R. (1966): Die Entstehung entwicklungs-fahiger Protoplasten aus Hefezellen und ihre Reverssion. Wissenschaftliche filme aus dem Zentralinstitut fur Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Wissenschaftn der DDR. No. T-HF 65 P.
- Raper, C.A., Raper, J.R. and Miller, R.E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*, *Mycologia* **64**: 1088-1117.
- Robinson, J.M., Roos, D.S., Davidson, R.E. (1979): Membrane alternation and other morphological features associated with polyethylene glycol-induced cell fusion. *J. Cell. Sci.* **40**: 63-75.
- Smith, W.F. (1944): Observations indicating a sexual mode of reproduction in a common bacterium (*Bacteroids funduliformis*). *J. Bacteriol.* **47**: 417-418.
- Wojcieszyn, J.W. Schlegel, R.A. Lumley-Sapan-ski, K. and Jacobson, K.A. (1983): Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J. Cell Biol.* **96**: 151-159.
- Yoo, Y.B., Byun, M.O., Go, S.J., 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**(4): 164-169.
- 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**(2): 75-78.

**Accepted for Publication 9 April 1990**