

영지버섯과 표고버섯 원형질 융합체의 미토콘드리아 DNA 검색

최은주¹ · 정영자² · 이영재³ · 김병각¹ · 현진원^{4*}

¹서울대학교 약학대학, ²식품의약품 안전청 생약규격과,

³제주대학교 농업생명과학 대학, ⁴제주대학교 의과대학

Mitochondrial DNA Analysis in Fusants of *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes*

Eun Joo Choi¹, Young Ja Jung², Young Jae Lee³, Byung Kak Kim¹ and Jin Won Hyun^{4*}

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,

²Devison of Herbal Medicine, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704,

³Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Life Science, Cheju National University,

⁴Department of Biochemistry, Cheju National University College of Medicine, 1 Ara-1 dong, Jeju, 690-756, Korea

(Received September 6, 2002 / Accepted September 23, 2002)

ABSTRACT : It has been known that *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes* have anticancer activity and immune enhancing activity. These two mushrooms were grown in liquid culture and harvested. From these mycelia, DNA was isolated and EtBr-CsCl density gradient ultracentrifugation was performed to purify it further. Then mitochondrial DNA was isolated by bisbenzimidazole-CsCl density ultracentrifugation. Mitochondrial DNA of *Ganoderma lucidum* was digested by restriction enzymes, EcoR I, Hind III, and Pst I, then electrophoresed. It showed 12, 22, 4 fragments. Mitochondrial DNA of *Lentinus edodes* was digested by EcoR I. Electric pattern showed 6 fragments. 4 fragments had appeared by Pst I digested mitochondrial DNA. Hind III couldn't digest mitochondrial DNA of *Lentinus edodes*. Mitochondrial DNA of fusants was isolated to compare to those of parents. The results showed that fusant P₂S₄ has new, recombined mitochondrial DNA. But P₂S₄ had the same DNA that *Ganoderma lucidum* had.

Keywords : *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, Fusants, Restriction enzyme, Mitochondrial DNA

서 론

최근 박테리아에서 개발된 유전자 조작기술을 이용하여 진균류의 일종인 버섯에 도입하려는 시도가 계속 되고 있다 (S:van *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1987; Contolini *et al.*, 1992). 유전자 조작기술을 응용하기 위해서는 버섯에서 DNA가 순수하게 분리되어야 한다. 그러나 버섯의 DNA 분리는 용이하지가 않다. 왜냐하면 첫째, 버섯은 한 세포 내에 함유된 DNA의 양이 많지 않다. 둘째, 버섯의 세포벽은 다당체인 chitin, cellulose, β-glucan과 지질, 단백질로 이루어져 있어 매우 질기다. 이렇게 질기고 튼튼한 세포벽을 파괴하고 세포 내용물을 얻는 과정에서 상당량의 DNA 손실을 가져올 뿐만 아니라, DNA가 분리되더라도 잘려진 상태로 분리가 된다. 셋째, nuclease의 공격을 받기가 쉽다. 따라서 이러한 현상을

극복하기 위해 DNA 분리과정은 가능한 온도를 낮추고 즉시 phenol로 단백질을 변성 시켜야 한다. 넷째, DNA가 histone 같은 단백질과 단단히 결합되어 있으므로 이들을 제거해 내야 하는 어려움이 뒤따른다. 그러므로 DNA가 제대로 분리되어 분자량, 염기의 개수가 분석되어 있는 버섯은 몇몇 종류에 불과하다(Belliard *et al.*, 1979; Grossman *et al.*, 1986; Hintz *et al.*, 1985; Ovenden *et al.*, 1990). 지금까지 알려진 바에 의하면 곰팡이 DNA의 크기는 평균 2.4×10⁷ bp로 Yeast *Saccaromycetes cerevisiae*는 1.35×10⁷ bp, *Aspergillus nidulans*는 2.6×10⁷ bp, *Neurospora crassa*는 2.7×10⁷ bp, 치마버섯 (*Schizophyllum commune*)은 3.8×10⁷ bp 등이다 (Avisé *et al.*, 1979; Maraz *et al.*, 1981; Boeshore *et al.*, 1983; Mellon *et al.*, 1983). 그런데 이들 총 DNA 양의 10~20%는 미토콘드리아 DNA이다. 미토콘드리아는 세포 내 소 기관으로 그들만의 독자적인 DNA를 가지고 복제를 한다. 이 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA와는 성격이 약간 다르다.

*To whom correspondence should be addressed

그 중 하나는 크기가 작다는 점이다(Hudspeth *et al.*, 1980). 버섯의 미토콘드리아 DNA는 식물보다는 작지만 동물보다는 커서 대략 19-26 μm 이고 염기의 개수로는 양송이(*Agaricus brunnescens*)가 98 kb, 여름 양송이(*Agaricus bitoquis*)가 176 kb, Polyporus cillitus가 88.2 kb, 먹물버섯 속의 *Copronus cinereus*는 43.3 kb, *Copronus stercorarius*는 91.1 kb이다(Mintz *et al.*, 1985; Mirfakhrai *et al.*, 1990; Chetrit *et al.*, 1985). 그러므로 크기가 핵 DNA보다 매우 작다. 그리고 closed circle complex 형태로 supercoiling 되어 작게 뭉쳐진 상태로 미토콘드리아 내에 존재하며, 핵 DNA와 염기의 구성도 다르다. 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA에 비해(% G+C)가 낮다. 핵 DNA가 (% G+C)가 45-50%인데 반하여 미토콘드리아 DNA는 (% G+C)가 30-35%에 불과하다. 이러한 차이점을 이용하여 미토콘드리아 DNA를 핵 DNA에서 분리할 수 있다. A+T 염기에 더 잘 부착되는 성질을 가지는 bisbenzimidazole을 사용하여 밀도 구배 초 원심분리를 하면 부력도가 높아 위로 떠서 윗 밴드를 형성하기 때문이다. 이와 같이 분리된 미토콘드리아 DNA는 크기가 핵 DNA보다 작기 때문에 다루기가 쉽다는 잇점을 가지고 있다(Tripputi *et al.*, 1988; Fluhr *et al.*, 1984; He *et al.*, 1992). 또 버섯 DNA를 핵 DNA와 미토콘드리아 DNA를 구별하여 분리하면 핵 DNA와 미토콘드리아 DNA를 필요에 따라 구별해 cloning 할 수 있을 뿐만 아니라 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)에 의한 균주 간의 유사성 확인, 미토콘드리아 DNA의 유전자 homology에 의한 분류학적 연구에도 이용할 수 있다(Shumard *et al.*, 1986; Specht *et al.*, 1981).

본 실험에서는 위와 같이 미토콘드리아 DNA를 분리하여 융합체의 검정에 사용하고자 하였다. 항암 작용, 면역 증진 작용이 확인된 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 표고버섯(*Lentinus edodes*)을 원형질체로 만들어 이 둘을 polyethylene glycol을 사용하여 융합 시켰다. 이와 같이 만들어진 융합체는 두 버섯의 유효 성분이 극대화된 새로운 품종 개발이 목적이다. 그러나 융합체들이 제대로 융합이 되었는지 확인하는 방법은 지금까지는 그 균사체의 성장, 성장 속도, 새로운 색소를 내는지의 여부로 판별하였고 좀 더 객관적인 증거를 갖추기 위해 시도된 방법이 동위효소 분리에 의한 방법이었다. 그러나 모균주와 융합체의 DNA를 분리하여 그 차이점을 직접 비교하여 융합체가 모균주 DNA들의 재조합된 형태인 DNA를 가지고 있다면 이것은 제대로 융합이 되었다는 가장 직접적인 증거가 될 것이다. 그러나 핵 DNA는 크기가 너무 크고 분리하는 과정에서 완전한 형태로 분리되지 못하고 절단되어지므로 핵 DNA를 사용하기는 현실적으로 어렵다. 이에 미토콘드리아 DNA를 분리하여 비교를 하면 미토콘드리아 DNA 크기가 작아 제한 효소 처리를 한 후

전기 영동 시에 밴드를 나타내므로 실험하기에 편리하다. 따라서 본 실험에서는 모균주인 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 표고버섯(*Lentinus edodes*) 각각에서 미토콘드리아 DNA를 분리하였고 이 두 균주를 융합시킨 융합체에서도 미토콘드리아 DNA를 분리하였다. 이들 미토콘드리아 DNA에 제한 효소 처리를 한 후 agarose gel에서 전기영동을 시킬 때 band의 형태로써 융합체의 DNA가 재조합된 것인지, 재조합되지 않은 것인지를 판별하여 융합의 증거로 삼을 수 있도록 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 UV를 조사하여 돌연변이 시킨 hypoxanthin 영양 요구주 GL1을 사용하였고 표고버섯(*Lentinus edodes*)도 역시 UV를 조사시켜 돌연변이 시킨 PABA 영양 요구주 LE4를 사용하였다. 원형질체 융합체는 위 두균주를 polyethylene glycol(PEG)을 사용해 융합 시켜 선별한 P2S2, P2S4를 사용하였다.

균사체 핵 염색

버섯 균사체를 petri dish에 만든 고체 배지에 접종을 하고 무균 처리된 slide glass를 배지 위에 넣어 두어 slide glass 위로 균사가 자랄 수 있도록 하여 28°C에서 배양하였다. 균사가 자란 slide glass를 petri dish에서 꺼내어 DAPI (4'6'-diamine-2-phenylindol dihydrochloride : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)용액을 1~2방울 놓고 cover glass를 씌운 후 20~30분 후 형광 현미경 하에서 UV를 이용하여 검경 후 사진 촬영을 하였다.

버섯의 액내 배양

각 버섯을 평판 배지에서 배양한 후 그 균사를 무균적으로 100 ml의 액내 배지에서 homogenize하고 27±1°C에서 180 rpm으로 10 일간 진탕 배양하였다. 여기에서 얻은 균사를 homogenize 후 1000 ml 배지에 접종하고 다시 같은 조건에서 배양균사가 성숙하여 exponential phase에 이를 때까지 진탕 배양을 한다.

버섯 DNA 분리

액내 배양한 버섯 균사체를 증류수로 세척한 후 -70°C에서 하룻밤 동안 얼린 후 유발에서 곱게 마쇄시킨 후 마쇄된 균사체가 적셔질 정도로 DNA isolation buffer [100 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl]를 가하고 최종 농도가 1%가 되도록 SDS를 가한 다음 60°C에서 2시간을 진탕 배양하였다. 여기에 최종 농도가 1 M이 되도록

록 NaCl을 첨가하고 0°C에서 2시간 방치하였다. 250 ml Beckmann centrifuge cell에 옮기고 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 상등액에 polyethylene glycol 8,000을 최종 농도 10%로 조정하여 첨가하고 4°C에서 방치하여 서서히 녹였다. 녹인 침전물을 RNase 10 µg/ml 농도로 36°C에서 1시간 반응시키고 pronase 1 mg/ml 농도로 36°C에서 1시간 반응시켰다. 이것을 phenol로 1회, phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)로 2회, chloroform:isoamylalcohol(24:1)로 2회 추출하였다. DNA에서 유기용매를 제거하기 위해 dialysis를 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA에 대해 3회 행하고, 10 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA에 대하여 3회 실시하였다. 이것을 다음 실험에 사용할 때까지 냉동 보관하였다.

Mitochondria DNA의 분리

DNA 용액에 CsCl(1.1 g/ml)을 넣어 녹이고 EtBr(10 mg/ml)을 10 ml당 0.8 ml씩 가하고 60,000 rpm에서 24시간동안 초 원심분리 하였다. 여기에서 DNA층만 분리하여 isoamylalcohol로 EtBr을 추출하고 dialysis를 하여 CsCl을 제거한다. 이 DNA를 다시 CsCl (1.1 g/ml)을 넣어 녹이고 b.sbenzimidazole를 최종 농도가 100~150 µg/ml이 되도록 하고 45,000 rpm에서 48시간 초 원심분리를 하여 mitochondria와 chromosome DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 제한 효소 처리를 한 후 0.7% agarose gel에서 전기영동을 하였다.

원형질체로부터의 DNA 분리

균사체를 셀로판을 깐 고체 평판 배지에 접종하여 자라난 크기가 직경 1cm이 될 때 까지 배양하였다. 균사체에 cellulose-Onozuka R-10과 Novozyme 234를 사용하여 원형질체를 나출하였다. 5000 rpm에서 5분간 원심분리를 하고 상등액을 제거한 후 여기에 50 mM Tris-Cl, 50 mM EDTA를 800 µl를 가하고 10% SDS를 200 µl 가하였다. 65°C에서 20분간 배양한 후 얼음에서 10분간 방치하였다. 5000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 세포 잔유물을 제거한 후 RNase와 Pronase를 처리하고 phenol과 chloroform을 사용하여 단백질을 제거하였다. 유기용매를 제거하기 위해 dialysis를 실시하였다. 얻어진 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기 영동을 하였다.

결 과

사용 균주

그림 1에서 본 바와 같이 실험에 사용한 영지버섯 hypoxanthin 영양 요구주 GL1은 성장 속도가 빠르며 질긴

균사체를 가지고 aerial mycelia가 적었다. 반면, 표고버섯 PABA 영양 요구주 LE4는 성장 속도가 느리고 연한 균사체를 가지며 aerial mycelia가 많았다. 이 두 균주 모두 색소는 형성하지 않았다. 융합체 P2S2와 P2S4의 성장 속도는 영지버섯과 표고버섯의 중간쯤 되며 모균주에는 없는 갈색 색소를 내었다. 그러나 액내 배양 시에는 융합체 둘 다 표고버섯보다는 영지버섯을 더 닮은 형태를 가지고 있었다.

균사체 핵 염색

균사를 DAPI(4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)로 염색하여 형광 현미경으로 관찰할 때 균사체는 핵 뿐만 아니라 자체의 DNA를 가지는 세포 내 소 기관인 미토콘드리아도 염색이 되었다. 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 융합체(P2S4) 모두 한 세포 내에 2~3개의 핵을 가지고 있었다. 따라서 원형질체 융합이 되었다고 융합체내 핵 숫자는 변하지 않음을 알 수 있었다(그림 2).

버섯 DNA 분리

균사체에서 버섯을 분리할 때 polyethylene glycol 8000 (PEG 8000)을 사용하여 침전시켜 TE buffer에 녹여서 단백질 제거를 하였다. 이와 같이 PEG 8000을 사용하면 phenol로 단백질 추출 시 PEG 8000을 처리하지 않았을 때보다 훨씬 더 많은 양의 단백질이 제거가 되었다. 이 현상의 기전은 확실치 않으나 PEG 8000의 탈수작용 또는 알지 못하는 어떤 작용에 의해 DNA에 결합되어 있는 단백질이 잘 떨어져 나갈 수 있도록 DNA의 구조가 변하는 것이 아

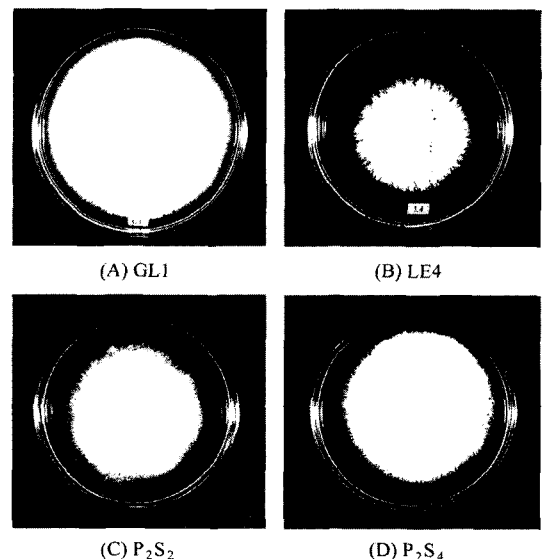


Fig. 1. Characteristics of *Ganoderma lucidum* (GL1), *Lentinus edodes* (LE4) and their fusants, P₂S₂ and P₂S₄.

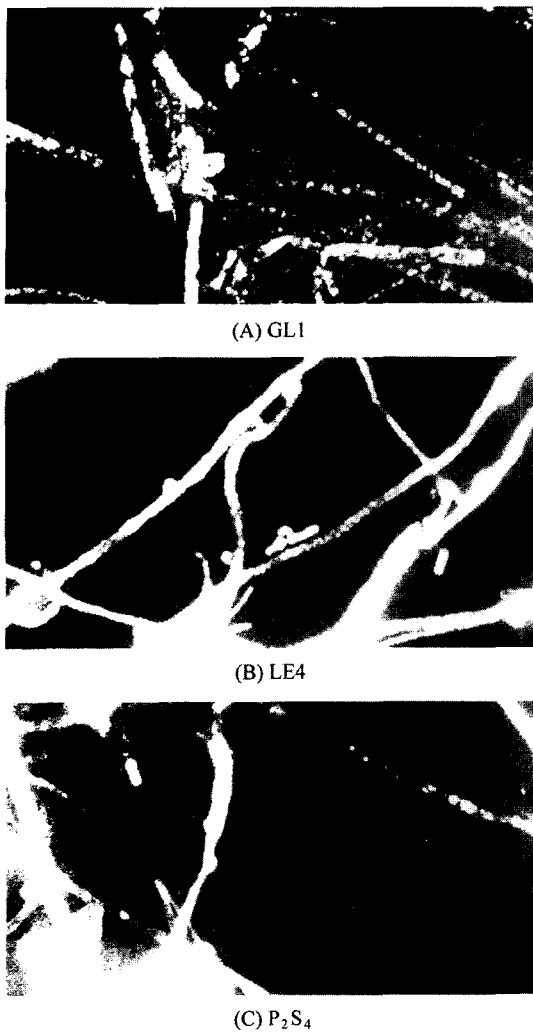


Fig. 2. Micrographs of *Ganoderma lucidum* (GL1), *Lentinus edodes* (LE4) and their fusant, P₂S₄.

널까 추정된다. 얻어지는 DNA의 양은 영지버섯이 표고버섯보다 월등히 많았고 융합체는 영지버섯의 양과 비슷하였다.

미토콘드리아 DNA의 분리

영지버섯의 핵 DNA와 미토콘드리아 DNA를 분리하여 0.7% agarose gel에서 전기 영동을 했을 때 핵 DNA, 미토콘드리아 DNA 모두 λ-Hind III 23 kb band 위치까지 이동을 하였다. 그러나 제한 효소로 처리하여 전기영동을 했을 때는 핵 DNA는 길게 끌리었지만 미토콘드리아 DNA는 절단되어 일정한 모양의 band를 형성하였다. EcoR I에 의해 절단된 미토콘드리아 DNA의 절편은 12개, Hind III에 의해 절단된 절편은 22개, Pst I에 의해 절단된 절편은 4개 가량이었다(그림 3). 표고버섯의 경우 제한 효소로 처리하여

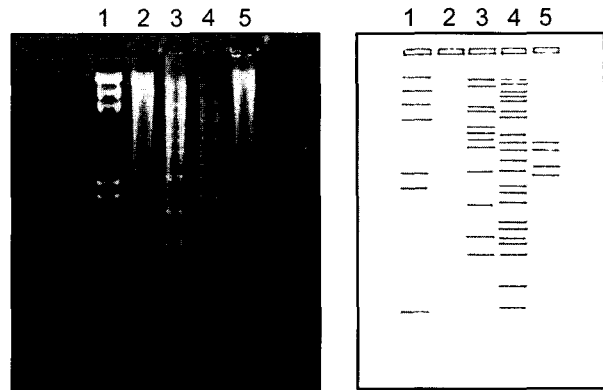


Fig. 3. Mitochondrial DNA from *Ganoderma lucidum* (GL1). lane 1: λ-Hind III marker, lane 2: Mitochondrial DNA from GL1, lane 3: Mitochondrial DNA of GL1 digested with EcoRI, lane 4: Mitochondrial DNA of GL1 digested with Hind III, lane 5: Mitochondrial DNA of GL1 digested with PstI.

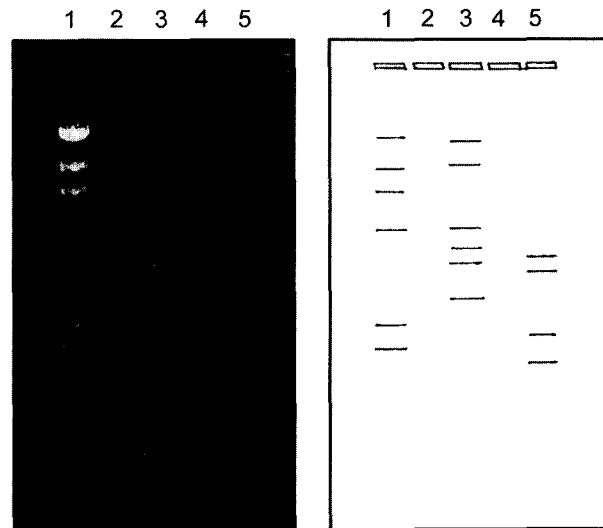
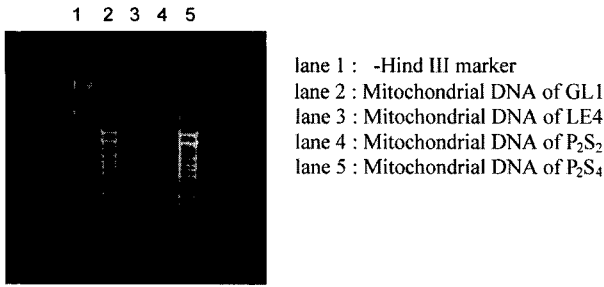


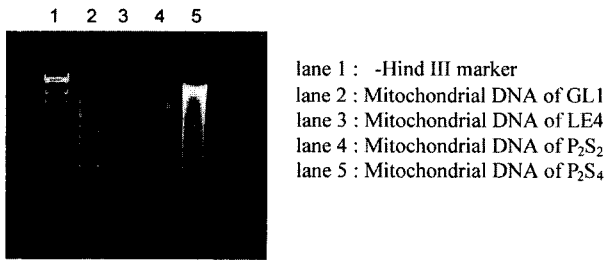
Fig. 4. Mitochondrial DNA from *Lentinus edodes* (LE4). lane 1: λ-Hind III marker, lane 2: Mitochondrial DNA from LE4, lane 3: Mitochondrial DNA of LE4 digested with EcoRI, lane 4: Mitochondrial DNA of LE4 digested with Hind III, lane 5: Mitochondrial DNA of LE4 digested with PstI.

전기영동을 했을 때는 핵 DNA는 영지버섯의 경우와 마찬가지로 길게 끌리었지만 미토콘드리아 DNA는 EcoR I에 의해 6개, Pst I에 의해 4개의 절편이 생기며 Hind III에 의해서는 절단되지 않았다(그림 4). 융합체의 경우 P₂S₂는 λ-Hind III marker의 첫째 band와 둘째 band 사이에 한 개의 특이한 band를 형성하였고(그림 5), EcoR I(그림 5A), Hind III(그림 5B) 그리고 Pst I(그림 5C)에 의해서도 절단되지 않았다. 이것은 영지버섯과 표고버섯의 미토콘드리아 DNA가 재조합 되어 새로운 미토콘드리아가 생성 되었

(A) Mitochondrial DNA digested with EcoR I



(3) Mitochondrial DNA digested with Hind III



(C) Mitochondrial DNA digested with Pst I

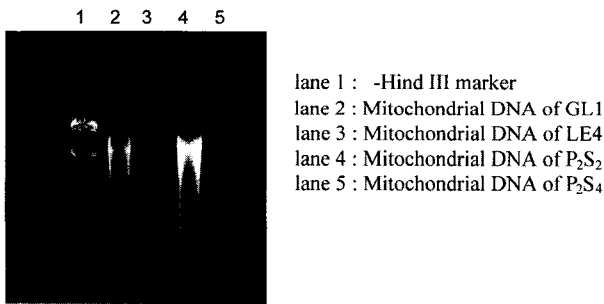


Fig. 5. Mitochondrial DNA of P₂S₂ and P₂S₄.

음을 알 수 있었다. 그러나 융합체 P₂S₄는 EcoR I, Hind III, 그리고 Pst I 처리를 하여 전기영동을 하였을 때 절편의 크기나 모양이 영지버섯의 것과 동일하였다(그림 5A, B, C). 그러므로 융합체 P₂S₄는 영지버섯의 미토콘드리아가 우시하여 표고버섯의 미토콘드리아는 사라졌음을 알 수 있다.

원형질체로부터 DNA 분리

버섯의 DNA 크기가 대략 2-4×10⁷ bp임을 감안할 때 영지버섯, 표고버섯, 융합체의 DNA가 절단되지 않은 채로 완전하게 얻어진다면 1% agarose gel상에서 전기영동 하였을 때 well에서 이동되지 않거나 그 중 작은 크기를 지닌 미토콘드리아 DNA만이 일부 이동하고 대부분은 well에 남아있는 모습을 보여야 한다. 그러나 실제 실험에서는 거의 모든 DNA가 λ-Hind III marker의 첫번째 band인 23 kb 부근으로 이동하였다(그림 6). 이로써 절단되지 않은 완전한 DNA를 얻기 위하여 원형질체를 만들어 총 DNA를 얻으려

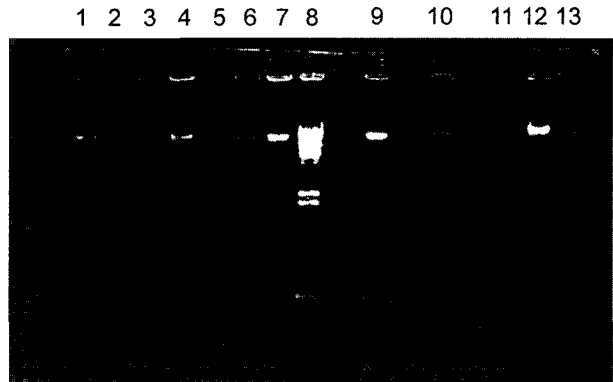


Fig. 6. Total DNA of protoplast. lane 1: LE4, lane 2-3: Fusant P65, lane 4: Fusant P45, lane 5-7: Fusant P₂S₄, lane 8: λ-Hind III marker, lane 9: Fusant P₂S₂, lane 10-11: Fusant P₂S₁, lane 12-13: GL1.

하였으나 단백질 추출과정 등에서 DNA의 일정한 부위가 잘라지는 듯하다. 그래서 일정한 거리로 이동하지 않는가 추정하였다.

고 찰

본 실험에서는 영지버섯과 표고버섯을 액내 배양하여 총 DNA를 분리하였고 분리된 총 DNA를 다시 밀도구배 초원심분리 방법을 써서 미토콘드리아 DNA를 얻었다. 분리된 총 DNA를 0.7% agarose에서 전기영동을 하면 영지버섯, 표고버섯 DNA 모두 λ-hind III marker의 맨 윗 band보다 조금 높은 곳으로부터 끌리는 모양을 주었다. 제한 효소를 처리한 후 전기영동을 하였을 때는 DNA가 완전히 잘라진 모습이었다. 이 결과는 버섯의 DNA가 평균 2-4×10⁷ bp라는 사실에 비추어 볼 때 전기영동의 결과로 측정된 결과가 총 DNA가 두 버섯 모두 너무 작았다. 이것은 DNA 추출 과정에서 DNA가 잘라져서 완전한 모양을 가진 채로 분리된 것을 의미하는데 특히 균사를 유봉으로 분쇄할 때 잘라진 것이 아닌가 하여 원형질체를 사용하여 DNA를 분리하였다. 세포벽을 벗겨 세포막만 남은 원형질체를 계면활성제를 사용하여 터뜨려서 그 안에 있는 DNA를 손상 없이 추출 하고자 하는 시도였다. 그러나 그 결과도 마찬가지여서 대부분이 균사를 유봉으로 갈아서 전기영동을 한 모양과 동일하였다. 이 결과로 DNA가 추출과정 중 단백질 제거단계에서 잘려지는 것이 아닐까 추측하였다. 특히 원형질체에서 얻어진 총 DNA는 일정한 크기의 band를 나타낸 것으로 보아 일정한 크기로 잘림을 알 수 있었다. 아마도 이것은 DNA의 단백질 추출과정에서 핵 DNA의 어떤 특정부위가 결합되어 있던 단백질이 빠져 나가면서 구조적으로 불안정해져 잘리기 쉽게 되는데 그 부위가 일정 간격으로 있기 때문

이 아닌가 추측된다. 미토콘드리아 DNA는 실험결과 영지버섯의 것은 약 100 kb, 표고버섯의 것은 약 60 kb가량 되는 것으로 보인다. 미토콘드리아에 제한효소를 처리하여 전기영동 할 때 고유한 band의 모양을 가진다. 이 고유한 band 모양을 사용하여 융합체가 그 모 균주의 어느 것보다 닮았는가를 알아낼 수 있다. 즉, 융합체 P_2S_2 , P_2S_4 각각에서 미토콘드리아 DNA를 분리하여 제한효소로 DNA를 절단하여 전기영동 시킬 때 절편의 모습을 모 균주의 것과 비교하여 DNA가 재조합 되었는지를 판단할 수 있다. P_2S_4 는 영지버섯의 것과 동일한 양상을 보였다. 따라서 융합체 P_2S_2 는 미토콘드리아까지 융합된 완전한 융합체이지만, P_2S_4 는 미토콘드리아는 표고버섯의 것이 사라지고 영지버섯의 미토콘드리아만 일방적으로 우세한 불완전 융합체임을 알 수 있었다. 핵 염색을 통해 융합이 되었을 때 핵의 숫자가 변하는지를 관찰하였지만 융합체에서 핵의 숫자는 모균주와 비교하였을 때와 별다른 차이가 없었다. 이것은 핵이 원형질체 융합시에 핵 자체도 융합되거나 어느 한쪽 핵이 사라지는 단계를 거쳐 모균주와 비슷한 상태인 세포 당 2~3개의 핵 수를 유지하려 하기 때문인 것으로 보인다.

결 론

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 표고버섯(*Lentinus edodes*)에서 총 DNA를 분리하였고 총 DNA 중에서 미토콘드리아 DNA를 분리하였다. 이것을 제한효소 EcoR I, Hind III, Pst I로 절단하여 전기영동 하였더니 잘라진 절편들이 보여주는 모양은 두 버섯에서 서로 달랐다. 이 두 버섯을 원형질체 융합을 시킨 융합체 P_2S_2 와 P_2S_4 에서도 미토콘드리아 DNA를 분리하여 모균주와 비교하였을 때 P_2S_4 는 영지버섯과 같은 모양을 가지고 전기영동 되었지만 P_2S_2 는 모균주의 어느 쪽도 같지 않은 새로운 형태의 재조합 미토콘드리아임을 알 수 있었다.

참고 문헌

Sivan, A., Harman, G.E. and Stasz, T.E. (1990): Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Trichoderma harianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 2404-2409.

Kumar, A. and Cocking, E.C. (1987): Protoplast fusion: A novel approach to organelle genetics in higher plants. *Amer. J. Bot.* **74**(8), 1289-1297.

Contolini, C., Hughes, K.W. and Petersen, R.H. (1992): Characterization of the mitochondrial genome of *Clavicornia pyxidata*. *Mycologia*, **84**, 517-521.

Belliard, G., Vedel, F. and Pelletier, G. (1979): Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by

protoplast fusion. *Nature*, **281**, 401-403.

Grossman, C.A., Hudspeth, S., Moore, G.P. and Grossman, L.I. (1986): Analysis of the mitochondrial and nuclear genomes of two genomes of two basidiomycetes, *Coprinus cinereus* and *Coprinus sterorarius*. *Curr. Genet.*, **10**, 515-525.

Hintz, W.E., Mohan, M., Anderson, J.B. and Horgan, P.A. (1985): The mitochondrial DNAs of *Agaricus*: heterogeneity in *A. bitoquis* and homogeneity in *A. brunnescens*. *Curr. Genet.* **9**, 127-132.

Ovenden, J.R. and White, R.W.G. (1990): Mitochondrial and allozyme genetics of incipient speciation in a landlocked population of *Galaxias trurraceus*. *Genetics*, **124**, 701-716.

Avise, J.C., Lansman, R.A., and Shade, R.O. (1979): The use of restriction endonuclease to measure mitochondrial DNA sequence relation in natural population, structure and evolution. *Genetics*, **92**, 279-295.

Maraz, A. and Subik, J. (1981): Transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae* after protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, **181**, 131-133.

Boeshore, M.L., Lifshitz, I., Hanson, M.R. and Izhar S. (1983): Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol. Gen. Genet.*, **90**, 459-467.

Mellon, F.M., Peberdy, J.F. and McDonald, K.D. (1983): Hybridization of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium baarnense* by protoplast fusion. *Experientia*, **45**, 310-311.

Hudspeth, M.E.S., Shunard, D.S., Tatti, K.M. and Grossman, L.I. (1980): Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield. *Biochimica et Biophysica Acta*, **610**, 221-228.

Mintz, W.E., Mohan, M., Anderson, J.B. and Hogen, P.A. (1985): The mitochondrial DNAs of *Agarius*: heterogeneity in *A. birtorquis* and homogeneity in *A. brunnescens*. *Curr. Genet.* **9**, 127-132.

Mirfakhrai, M., Tanaka, Y. and Yanagisawa, K. (1990): Evidence for mitochondrial DNA polymorphism and uniparental inheritance in the cellular slime mold *polysphondylium pallium*: Effect of intraspecies mating on mitochondrial DNA transmission. *Genetics*, **124**, 607-613.

Chetrit, P., Mathieu, C., Vedel, F., Pelletier, G. and Primard, C. (1985): Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in Cruciferae. *Theor. Appl. Genet.*, **69**, 361-366.

Tripputi, P., Guerin, S.L., Moore, D.D. (1988): Two mechanisms for the extinction of gene expression in hybrid cells. *Science*, **241**, 1205-1207.

Fluhr, R., Aviv, E., Galun, E. and Edelman, M. (1984): Generation of heteroplasmic *Nicotiana* cybrids by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* **67**, 491-497.

He, S., Ohm, H. and Mackenzie, S. (1992): Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 573-578.

Shumard, D.S., Grossman, L.I. and Hudspeth, M.E.S. (1986): *Achlya* mitochondrial DNA: Gene localization and analysis of inverted repeats. *Mol. Gen. Genet.*, **202**, 16-23.

Specht, C.A., Dirusso, C.C., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C. (1981): A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119**, 158-163.