韓 國 菌 學 會 誌 第19卷 第2號
Kor. J. Mycol. Vol. 19, No. 2, 101~108, 1991

Isozyme patterns 차이에 의한 영지, 치마버섯 및 동충하초의 계통분류

이준우 · 이권행
일양약품(주)중앙연구소

Classification of Isolates of *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune and Cordyceps* spp. by Electrophoretic Patterns of Isozymes

June-Woo Lee and Kweon-Haeng Lee
Central Institute of Research, Il Yang Pharmaceutical Co., Ltd. Yong-in 449-900, Republic of Korea

ABSTRACT: To classify fungal species employed for pharmacological effects, mycelial proteins of six isolates of *Ganoderma lucidum*, five isolates of *Schizophyllum commune* and five isolates of *Cordyceps* spp. were separated on polyacrylamide gel to compare them by esterase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase and peroxidase patterns. Similarity of isozyme patterns among the isolates of *G. lucidum* IY003, IY004, IY005 and IY008 was indicated over 70%, but that among the isolates of *G. lucidum* IY009, IY010 and others was indicated from 48% to 9%. Highest similarity of isozymes of *S. commune* was observed to be between IY803 and IY805, and similarity between these two isolates was 57%. Similarity among other isolates was shown to be from 40% to 56%. Isozyme patterns of *Cordyceps* spp. were comparatively different, even though they were originated from the same kind of insect as their isolate. Similarity between *Cordyceps* spp. IY901 and IY904, which was isolated from moths, was 67% and that of IY905 and IY909, which was originated from the larvae, was 42%. Similarity among other isolates was shown to be from 12% to 67%.

KEYWORDS: Isozyme, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps* spp., *Schizophyllum commune*

고등균류에 속하는 일부 담자균류가 항암활성 이외에 많은 약리작용을 가지고 있다고 알려지고 있기 때문에, 이들의 약효성분에 대한 과학적인 연구가 활발히 진행되고 있다(Chihara등, 1970 ; Tsukagoshi등, 1974 ; Yoshioka등, 1973 ; Kim등, 1980 ; Matsuo등, 1982 ; Iino등, 1985 ; Mizuno등, 1984 ; Lee등, 1990). 최근에는 자낭균류에 속하는 동충하초(*Cordyceps* spp.)에서 추출된 polysaccharide도 sarcoma 180에 항암활성을 나타내는 것으로 알려졌다 (Ohmori 등, 1989).

담자균류의 약리효과에 관한 연구에 이용되었던 대부분의 균종들은 정확한 분류를 거치지 않고 연구가 행해졌다. 따라서 특정 균종의 포괄적인 약리효과를 언급하는 것은 가능하였으나, 동일 균종중 각각의 균주에 대한 특성이나 약효를 말한다고 보기는 어렵다. 이는 동일균이라 하더라도 채집시기나 장소에 따라 자실체의 형태, 색택, 포자문의 색 등 형태적인 차이는 물론 이에 따른 유전적인 차이도 예상되나, 형태적인 차이를 근거로 하여 계통을 분류하는 종래의 방법으로는 정확한 분류 체계가 이루어 지지 않았기 때문이다.

Chang 등(1962)이 *Neurospora*속의 효소 pattern이 이종 간이나 동종 간에도 차이가 있다고 보고한 이래, 많은 연구자들이 여러 균종의 효소 pattern의 차이를 연구하여 이를 분류의 기준으로서 이용할 것을 제안하였다(Durbin, 1966 ; Clare and Zentmeyer, 1966 ; Gill and powell, 1968). 최근 국내에서 자생하는 몇몇 담자균류의 동위효소 pattern을

Table I. Collected areas of *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

Species	Isolates	Collected areas	Origin
Ganoderma lucidum	IY 003	Yongin, Gyeonggi	
	IY 004	Yongin, Gyeonggi	
	IY 005	Kwangneung, Gyeonggi	
	IY 008	Mt. Duryun, Chonnam	
	IY 009	Mt. Duryun, Chonnam	
	IY 010	Mt. Chiak, Gangweon	
Schizophyllum commune	IY 801	Sangju, Kyeongbuk	
	IY 803	Sangju, Kyeongbuk	
	IY 805	Mt. Kyeryong, Chungnam	
	IY 806	Kwangneung, Gyeonggi	
	IY 818	Mt. Duryun, Chonnam	
Cordyceps spp.	IY 901	Mt.Chiak, Gangweon	Moth
	IY 903	Mt. Chiak, Gangweon	May beetle
	IY 904	Mt. Kyeryong, Chungnam	Moth
	IY 905	Kwangneung, Gyeonggi	Larva
	IY 909	Mt. Duryun, Chonnam	Larva

비교한 연구가 보고되었으나(Park 등, 1986 ; Park 등, 1988 ; Park 등, 1989), 이러한 분류체계에 따라 특정균주를 선정하여 실험에응용한 경우는 많지않다. 따라서 본 연구에서는 균주 간의 체계적인 약리실험 등을 위해, 본 실험실에서 보유하고 있는 국내자생 영지(*Ganoderma lucidum*) 및 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 동위효소 pattern 차이를 분석하여, 계통간 분류를 시도하였으며, 동위효소 pattern에 의한 계통분류방법을 자낭균류에 속하는 동충하초에 응용하였다.

材料 및 方法

시약

전기영동을 위한 acrylamide, N,N′-methylene bis-acrylamide, ammonium persulfate 및 N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine(TEMED) 등은 Bio-Rad사의 제품을 사용하였으며, esterase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase 및 peroxidase 등의 효소와 기타시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 국내에서 자생하는 영지 6균주, 치마버섯 5균주 및 동충하초 5균주로, 각 균주의 수집원은 Table I과 같다. 보관용배지는 potato dextrose agar(PDA) 사면배지를 사용하였다.

배양용 배지는 glucose 50g, peptone 20g, KH_2PO_4 0.87g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g 과 basal medium 20 ml를 가해 1l로 하여 pH를 5.5로 조정한 후 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. Basal medium은 0.1% $FeCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.072% $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.04% $ZnCl_2$및 0.01% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$로 조성되었다.

단백질의 조제

액내배양한 배양물을 원심분리 하여 얻어진 균사체를 phosphate buffered saline(pH 7.5)에 3회 세척한 후, 세척한 균사체를 빙냉하에서 30초간 초음파 처리하였다. 이것을 12,000×g에서 원심분리한 후, 상등액을 전기영동 시료로 사용하였다. 시료중의 단백질은 BSA를 표준물질로 사용하여 BCA protein assay reagent(Pierce Co.)를 사용하여 정량하였다(Smith 등, 1985).

전기영동

전기영동은 Davis의 방법(1964)을 변형한 discontinuous buffer system을 이용하였다. Separating

Table II. Data matrix of *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp. respectively and their characteristics of isozyme, esterase (E_x), acid phosphatase (A_x), leucine aminopeptidase (L_x) and peroxidase (P_x) patterns.

Species	Isolates	Characteristics																							
		E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	E_{10}	E_{11}	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	A_8	A_9	L_1	L_2	L_3	P_1	P_2
Ganoderma	IY003	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
lucidum	IY004	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	IY005	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1
	IY008	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0
	IY009	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	IY010	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
		E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	A_1	A_2	A_3	L_1	L_2	L3	L_4	P_1	P_2	P_3								
Schizophyllum	IY801	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0								
commune	IY803	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1								
	IY805	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0								
	IY806	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0								
	IY818	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0								
		E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	L_1	L_2	L_3	L_4	L_5	P_1	P_2	P_3	P_4
Cordyceps	IY901	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1
spp.	IY903	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Y904	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	IY905	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
	IY909	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Isolates with isozyme band at each characteristic indicated '1', without one indicated '0'.

gel은 0.24 M Tris-Cl buffer(pH 8.48)에 10% polyacrylamide을 사용하였으며, stacking gel은 Tris buffer(0.04 M Tris, 0.064 N H_3PO_4, pH 6.9)에 4% polyacrylamide를 사용하여 gel을 조제하였다. Gel을 굳히기 위해 TEMED와 ammonium persulfate를 사용하였다. Running buffer로 양극에는 0.04 M Tris-glycine buffer(pH 8.8)를,음극에는 0.06 M Tris-Cl buffer (pH 7.47)을 사용하였으며, 70 μg의 단백질을 sucrose dye 용액과 혼합하여 gel에 load한 후, stacking gel에서는 60 volts로 separating gel 에서는 100 volts로 조정하여 4℃에서 전개하였다.

Gel의 염색

Esterase(E.C.3,1,1,1)의 발색은 Nakagahra 등(1975)의 방법에 따라 행하였다. 전개된 gel을 0.2 M phosphate buffer(pH 6.5)에 30분간 침지하였다. 침지되는 동안 새 buffer로 3회 교환하여 주었다. 발색액(1% α-naphthylacetate 2 m*l*, etyleneglycol monomethyl ether 2m*l*, 0.2M phosphate buffer 20m*l*, fast blue RR salt 20 mg, 증류수 76 m*l*)을 가하여 실온에서 30분간 서서히 흔들어 주면서 발색시켰다.

Acid phosphatase(E.C.3,1,3,2)와 Leucine aminopeptidase (E.C.3,4,11,1)의 발색은 Gomori 등의 방법(Colowick 등, 1957)에따라 행하였다. Acid phosphatase의 발색을 위해, gel을 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)에 침지하여 gel내의 산도를 조정한 후, 발색액(0.06 M $MgCl_2$, fast garnet GBC salt 70 mg, α-naphthylphosphate 80 mg, β-naphthylphosphate 40mg, 0.05 M acetate buffer 100 m*l*)을 가해 37℃에서 30분간 발색 시켰다.

Leucine aminopeptidase(E.C.3,4,11,1)의 발색은 gel에 발색액 {L-leucyl-β-naphthylamide HCl 20 mg, fast black K salt 20 mg, 증류수 40 m*l*, 0.2 M Tris-malate buffer(pH 5.4)50 m*l*}을 가해 어두운 곳

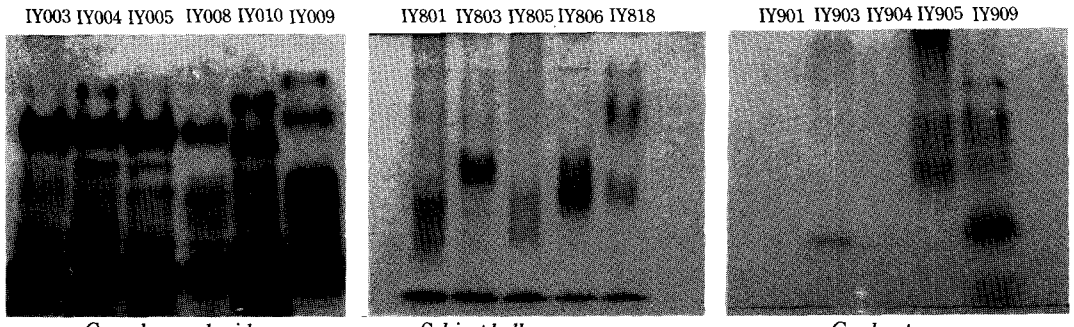

Fig. 1. Isozyme patterns of esterase of the several *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

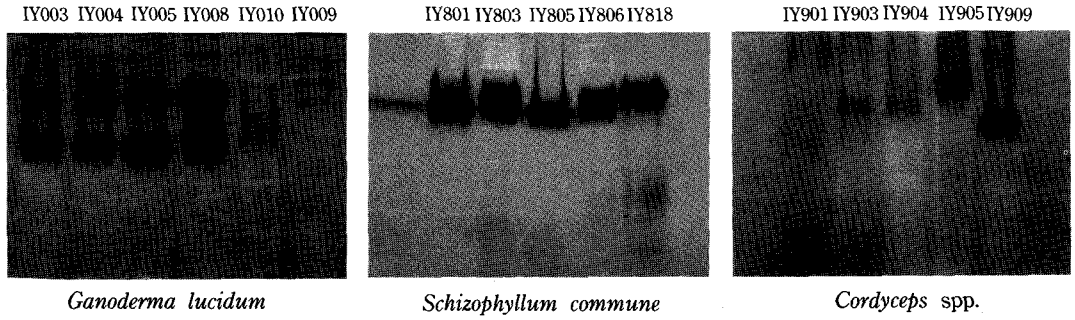

Fig. 2. Isozyme patterns of acid phosphatase of the several *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

에서 30분간 발색 시켰다.

Peroxidase(E.C.1,11,1,7)의 발색은 Washburn의 방법(Colowick 등, 1957)에 따라 행하였다. Gel을 수세한 후, 발색액(20% acetic acid 9m*l*에 녹인 benzidine 1 m*l*, 0.03% H_2O_2 1 m*l*, 증류수 3 m*l*)을 가해 어두운 곳에서 수분 동안 발색 시켰다.

유사도 지수의 계산

분리된 isolate들의 유연관계를 알아보기 위해, 각 isolate에서 얻어진 동위효소 pattern간의 data matrix를 작성하여(Table II), percent dissimilarity로서 distance index를 구하였으며, 이때 사용된 clustering strategy는 centroid (unweighted) pair-group method (Ludwig, J.A and Reynolds, J.G, 1988)를 이용하였다. 각 isolate간의 유사도는 1-distance index(%) 로서 표기하였다(Table III).

結 果

Esterase의 동위효소 pattern

영지의 esterase band는 Fig. 1에서와 같이 모두 17개가 나타났는데, 5와 15번째 band는 모든 균주에서 거의 공통적으로 보였다. IY003,IY004 및 IY005 균주의 esterase pattern은 매우 유사하였으나, IY009와 IY010균주의 esterase pattern은 다른 균주와 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한 치마버섯의 esterase band는 모두 11개로, 2번째 및 8번째 band가 공통적으로 나타났음을 알 수 있었다. 동충하초의 경우는 모두 10개의 band를 형성 하였는데, 모든 균주가 8번째 band를 공통적으로 나타냈으나, esterase의 band pattern은 종에 따라 많은 차이를 나타 내었다(Fig.1).

Acid phosphatase의 동위효소 pattern

영지 IY003, IY004 및 IY005 균주의 acid phosphatase pattern간에는 매우 유사한 양상을 나타내었으나, IY009와 IY010의 경우는 다른 균주와는 상이한 band pattern을 보였다. 치마버섯에서는 총 2개의 band중 1번째 band가 공통적으로 나타나 높은 유사성을 보였으며, 동충하초의 경우는 종간에 acid

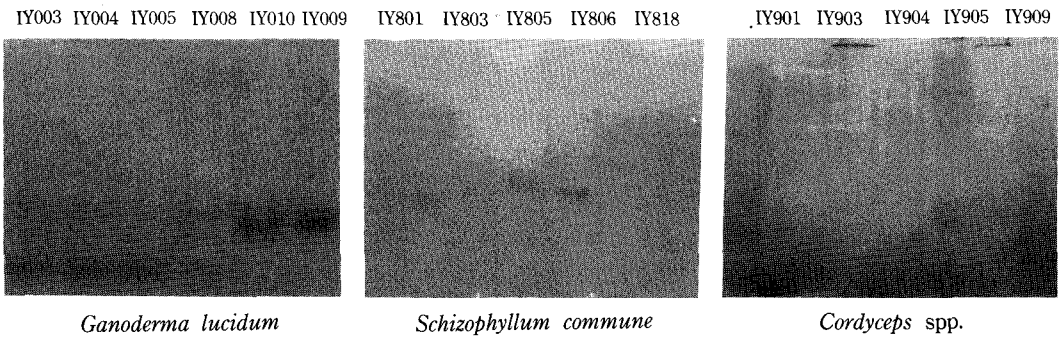

Fig. 3. Isozyme patterns of leucine aminopeptidase of the several *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

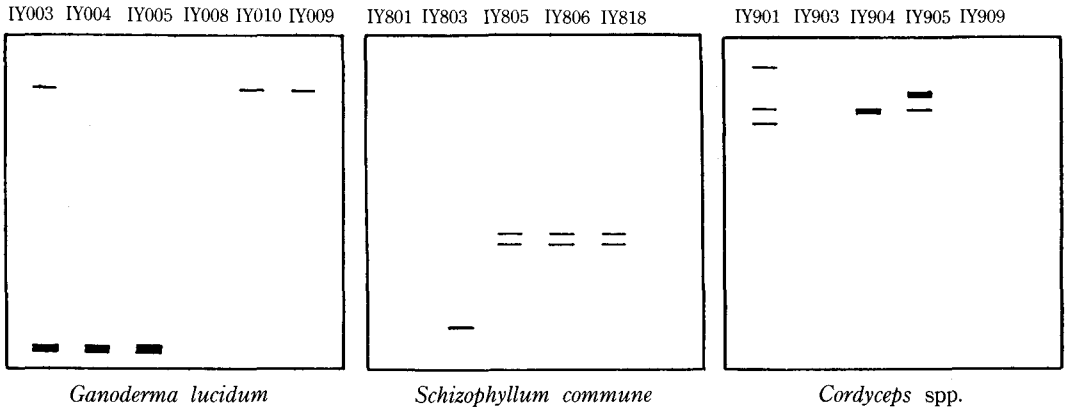

Fig. 4. Isozyme patterns of peroxidase of the several *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

phosphatase의 차이가 많음을 알 수 있었다(Fig. 2).

Leucine aminopeptidase의 동위효소 pattern

영지에서는 모두 3개의 leucine aminopeptidase band가 나타났으며, 이중 IY003, IY004 및 IY005는 대부분 동일한 양상을 나타냈으나, IY009는 이들과는 전혀 다른 양상을 나타내었다. 치마버섯에서는 모두 5개의 leucine aminopeptidase가 나타났으며, 종간에 유사한 양상을 보였다. 동충하초의 경우는 IY901과 IY904에서는 leucine aminopeptidase가 나타나지 않았으며, 나머지 균주들은 종간의 band pattern이 많은 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 3).

Peroxidase의 동위효소 pattern

영지에서는 2개의 peroxidase band가 나타났으며, IY003, IY004 및 IY005사이에는 유연관계가 많았다. 치마버섯의 경우는 모두 3개의 band가 보였으며, IY805, IY806 및 IY818간에는 서로 비슷한 양상을 나타냈다. 그러나 동충하초에서는 유연관계가 거의 없었다(Fig. 4).

고 찰

개체간의 생화학적 및 유전적인 성질을 구분하기 위해, 각 개체간의 동위효소 pattern을 비교하여 각 개체의 균종간의 유연관계를 검토하였다.

서울근교에서 채집된 영지 IY003, IY004 및 IY005 사이의 동위효소 pattern은 유사하였으나, 이들이 전남 두륜산과 강원도 치악산에서 채집된 IY009 및 IY010과는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 전체 동위효소에 대한 유사도지수는 IY004와 IY005 사이에는 100%, IY003과 IY005사이에서는 83%로 나타나, 높은 유연관계를 보이고 있으나, IY003과 IY010 및 IY003과 IY009는 각각 20%와 48%로, 비교적 낮은 유연관계를 보였다(Table III, Fig. 5). 이와같은 결과는 자생지역의 차이에 따라 동위효소 pattern이

Table III. Similarity of *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp. by isozyme, esterase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase and peroxidase patterns.

Species	Isolates	Similarity (%)					
		IY 003	IY 004	IY 005	IY 008	IY 009	IY 010
Ganoderma lucidum	IY 003	*	83	83	80	48	20
	IY 004		*	100	73	35	9
	IY 005			*	73	35	9
	IY 008				*	42	22
	IY 009					*	32
	IY 010						*
		IY 801	IY 803	IY 805	IY 806	IY 818	
Schizophyllum commune	IY 801	*	43	43	53	56	
	IY 803		*	57	40	44	
	IY 805			*	53	56	
	IY 806				*	53	
	IY 818					*	
		IY 901	IY 903	IY 904	IY 905	IY 909	
Cordyceps spp.	IY 901	*	43	67	35	19	
	IY 903		*	67	12	27	
	IY 904			*	33	12	
	IY 905				*	42	
	IY 909					*	

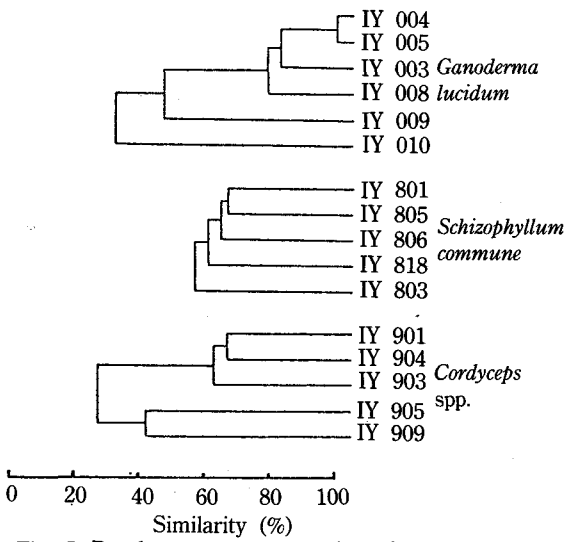

Fig. 5. Dendrogram representation of genetic similarity by isozyme bands of the different *Ganoderma lucidum, Schizophyllum commune* and *Cordyceps* spp.

상이함을 나타내는 것으로, 특히 자생지역이 원거리인 경우보다는 근거리인 경우에가 유연관계가 높게 나타났다.

치마버섯 균주간의 acid phosphatase, leucine aminopeptidase 및 peroxidase는 균주간 유사한 pattern을 나타내었으나, esterase의 경우는 균주들간에 많은 차이를 보였다. IY803과 IY805가 57%의 유사도를 나타냈으며, IY805, IY806 및 IY818사이에는 53%의 유사도를 보였다. 다른 균주간의 유연관계도 대부분 40%정도로 비교적 낮은 유연관계를 나타냈다(Table III, Fig. 5).

동충하초는 자낭균류에 속하는 고등균류로 이들의 동위효소 pattern간의 유연관계는 담자균류에 속하는 영지나 치마버섯의 경우보다 비교적 낮았다. 이중 IY901과 IY904는 나방이류에서 분리된 것들로 이들의 유연관계는 67%였으며 풍뎅이류와 나방이류에서 각각 분리된 IY903과 IY904 역시 67%의

유연관계를 보였다. IY905와 IY909는 애벌레류에서 유래된 것으로 42%의 유연관계를 나타냈으며, 기타 기생생물이 서로 다른 균주간에서는 12%에서 43%의 유연관계를 나타내었다.

이상의 결과로 부터 담자균류인 영지와 치마버섯의 esterase와 acid phosphatase 동위효소 pattern이 높은 유연관계를 보임으로서, 보다 더많은 균주를 가지고 isozyme pattern의 유연관계를 조사하면 이들 균주의 계통적 분류에 유용하게 응용될 수 있으리라 생각된다. 또한 이 방법은 실험실에서 새롭게 개량된 변이주를 구분하는데도 이용(Wang 등, 1970)될 수 있을 것이다. 이와 같은 동위효소 pattern비교 방법을 표준화 하므로서 체계적인 계통분류가 이뤄진 균주를 이용하여 생화학적인 연구나 약효연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 한편 자낭균류에 속하는 동충하초에서는, 기생하는 곤충이 유사 또는 동일하다 하더라도 균종간의 동위효소 pattern은 상당히 상이하여, 유연관계가 낮게 나타났다. 따라서 이 방법은 기생하는 곤충에 따라 균종을 분류하였던 종래의 동충하초 분류방법에 도움을 줄 것으로 생각된다. 그러나 이 방법을 단독으로 분류에 응용하기 위해서는 보다 개선된 방법에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

摘 要

약리효과를 가지고 있다고 보고된 고등균류중 영지, 치마버섯및 동충하초의 계통 분류를 위해 동위효소 pattern을 비교한 결과는 다음과 같다.

자생지역이 서로 다른 영지의 동위효소 pattern은 IY003, IY004, IY005 및 IY008 균주사이에서는 70% 이상의 유사도 지수를 보여, 높은 유연관계를 나타내었으나, IY009와 IY010의 동위효소 pattern은 많은 차이를 보여 유연관계가 낮았다.

치마버섯의 경우, 가장 높은 유연관계를 보인 균주는 IY803과 IY805로 이들의 유사도지수는 57%로 나타났다. 나머지 균주들 간의 유사도지수는 40%에서 56%정도를 나타냈다.

자낭균류에 속하는 동충하초는 영지나 치마버섯 등의 담자균류와는 달리 균주간에 유사도지수가 비교적 낮았다. 동충하초중 나방이류에서 분리된 IY901과 IY904사이의 유사도지수는 67%였고, 풍뎅이류와 나방이류에서 각각 분리된 IY903과 IY904 역시 67%의 유연관계를 보였으며, 애벌레류로 부터 분리된 IY905와 IY909사이의 유사도지수는 42%로 시험된 동충하초 균종 중 비교적 높은 유연관계를 나타내었으나, 나머지 균주들 간의 유사도 지수는 12%에서 43%를 나타내었다.

參考文獻

Chang, L. O., Srb, A. M. and Steward, F.C. (1962): Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora. Nature* **193**: 756-759.

Durbin, R.D. (1966): Comparative gel-electrophoretic investigations of the protein patterns of *Septoria species.Nature* **210**: 1186-1187.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970): Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes. Cancer Res.* **30**: 2776-2781.

Clare, B.G. and Zentmeyer, G.A. (1966): Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora. Phytopathology* **56**: 1334-1335.

Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (1957): Method in Enzymology 4: 384-391.

Davis, B.T. (1964); Disc electropheresis-II: Method and application to human serum proteins. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.

Gill, H.S. and Powell, D. (1968): Polyacrylamide gel disc electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae. Phytopathology* **58**: 722-723.

Iino, K., Ohno, N., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S. and Yadomae, T. (1985): Structure-function relationship of antitumor β-1,3-glucan obtained from matted mycelium of cultured *Grifora frondosa. Chem. Pharm. Bull.* **33**: 4950-4956.

Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S. and Yang, M.S. (1980): Studies on antineoplastic components of Korean basidiomycetes. *Kor.J. Mycol.* **8**: 107-113.

Lee, J.W., Chung, C.H., Jeong, H. and Lee, K.H. (1990): Effects of alkaline extract of *Ganoderma lucidum* IY007 on complement and reticuloendotherial system. *Kor. J. Mycol.* **18**: 133-144.

Ludwig, J.A. and Reynolds, J.E. (1988): Statistical Ecology, A wiley-Interscience Pub. John Wiley and Sons. Inc. N.Y. 337pp.

Matsuo,T., Arika,T., Mitani, M. and Komatsu, N.

(1982): Pharmacological and toxicological studies of a new antitumor polysaccharide, schizophyllan. *Drug Res.* **32**: 647-656.

Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, k. and Shimizu, M. (1984):Fractionation of water-soluble polysaccharide from "Reish", the fruit body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **58**: 871-880.

Nakagahra, M., Akihama, T. and Hayashi, K. (1975): Genetic variation and geographic line of esterase isozymes in native rice varieties. *Japan. J. Genetics* **50**: 373-382.

Ohmori, T., Tamura, K., Fukui, K., Kawanishi, G., Mitsuyama, M., Nomoto, K. and Miyazaki, T. (1989): Isolation of galactosaminoglycan moiety(CO-N) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and its effects against murine tumors. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1019-1022.

Park, W.M., Lee, Y.S., Kim, S.H. and Park, Y.H. (1986): Characterization of isolates of *Ganoderma lucidum* by electrophoretic patterns of enzymes. *Kor. J. Mycol.* **14**: 93-99.

Park, Y.D., Whang, W.K., Huh, J.D,. Kim, S.H.and Park, W.M. (1989): Comparison of physiological characteristics in *Coriolus versicolar* intraspecific strains. *Kor.J. Mycol.* **17**: 7-13.

Park, Y.H., Byun, M.O. and Hiroshi. F. (1988): Comparison of electrophoretic isozyme band pattern of *Pleurotus* spp. in Korea. I. Homogenous gel. *Kor J. Mycol.* **16**: 87-94.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K.,Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.

Tsukagomi, S. and Ohashi, F. (1974): Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res.* **65**: 557-560.

Wang, C.H. and Raper, J.R. (1970); Isozyme patterns and sexual morphogenesis in *Schizophyllum. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **66**: 882-889.

Yoshioka, Y., Sano, T. and Ikekawa, T. (1973): Studies on antitumor polysaccharide of *Flammulina velutipes* (Curt.ex Fr.)Sing.I. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 1772-1776.

Accepted for Publication on May 29, 1991