

상황버섯, *Phellinus linteus* 계통과 *Phellinus baumii* 의 항혈소판 응집 효과

강희완^{1,2*} · 이만희³ · 여운형⁴

¹한경대학교원에생명과학과

²한경대학교유전공학연구소

³경북대학교 수의과대학

⁴케이티엔지 R&D 본부

Inhibitory effects of Sanghwang mushrooms, *Phellinus linteus* strains and *Phellinus baumii*, on platelet aggregation

Hee-Wan Kang,^{1,2,*} Man-Hee Rhee³, and Woon-Hyung Yeo⁴

¹Department of Horticultural Life Science, Hankyong National University, Ansong 17579, Korea

²Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea

³College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁴KT&G Central Research Institute, Daejeon 34128, Korea

ABSTRACT: The fruiting bodies of Sanghwang mushrooms, *Phellinus linteus* HN1009K (PLH) and *Phellinus linteus* (Korea Sanghwang, PLK), and *Phellinus baumii* (Jangsu Sangwhang, PB), were extracted with 70% methanol. The methanolic extracts of different concentrations (5–200 µg/ml) showed inhibitory effects of 20–95% on plated aggregation induced by collagen (2.5 µg/ml), ADP (10 µM), and thrombin (0.1 U/ml). The PLH, PLK, and PB extracts (200 µg/ml) reduced ATP release from ADP-activated platelets by 50–60%. These results suggest that the methanolic extracts from Sanghwang mushrooms inhibit platelet aggregation.

KEYWORDS: Anti-platelet Aggregation, ATP release, Methanolic extracts, Sanghwang mushrooms.

서론

진흙버섯 (*Phellinus*) 속에 속하며 국내에서 재배되고 있는 대표적인 종으로 *Phellinus baumii*, *Phellinus linteus* 를 들 수 있다. 진흙버섯은 세계적으로 약 48여종이 알려

져 있으며 한국에는 8종이 분포하고 있는 것으로 보고 되었다 (Choi *et al.*, 1996). 진흙버섯 중에서 목질진흙버섯 (*P. linteus*)은 뽕나무를 기주식물체로 하여 자실체형태가 누런색을 띠다하여 “상황버섯으로 부르게 되었으며, 학술 명으로는 목질진흙버섯이다. Wu 등 (2012)은 ITS-rDNA 염기서열 비교분석에서 아시아에 분포하는 *Inonotus baumii*-*I. linteus* 집단은 6종이 관련되어 있으며 형태적으로 매우 유사하여 채집 기주식물체에 따라 종명을 결정할 것을 제안 하였다. 즉 각 기주체에 따라 *I. baumii* (개화나무, *Syringa*), *I. lonicericola* (인동나무, *Lonicera*), *I. lonicerinus comb. nov.* (인동나무, *Lonicera*), *I. sanghuang* (뽕나무, *Morus*), *I. vaninii* (포플러, *Populus*), *I. weigela* sp. nov. (병꽃나무, *Weigela*)로 하여 분류 하였으며 이들을 *I. linteus complex*라 하였다(Tian *et al.*, 2013). 일본에서 목질진흙버섯 자실체 추출물에서 96.7% 고형암세포 저지율을 나타내는 가장 강력한 항암버섯으로 알려지게 되면서 (Ikekawa *et al.*, 1968) 항암뿐만아니라, 면역활성, 항염, 항산화, 항알러지, 혈과형성억제제 등의

J. Mushrooms 2017 September, 15(3):124-128
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2017.15.3.124>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author

E-mail : kanghw2@hknu.ac.kr

Tel : +82-31-670-5420, Fax : +82-31-676-2602

Received August 15, 2017

Revised September 15, 2017

Accepted September 19, 2017

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다양한 약리효과가 보고 되었다(Daniel, 2010; Kang *et al.*, 2013).

상황버섯의 유효 약리활성으로 야생버섯을 채집하여 약리효과를 탐색 하여 왔으나 실험재료의 제한적으로 실효를 거두지 못하고 균사배양체로 연구를 수행 하여왔다. 그러나 균사체와 자실체는 항산화 물질 등 약리활성물질과 다양한 대사체성분이 현저하게 차이가 난다 (Kang *et al.*, 2013). 인공재배에 의한 지속적이며 안정적 자실체 생산이 상황버섯의 약리활성의 다양성 확보측면에서 매우 중요하다고 할 수 있다. 현재, 국내에서 재배되고 있는 상황버섯은 *P. linteus* (PLK고려상황)과 *P. baumii* (PB, 장수상황)이 종자관리소에 품종 등록 되어 있다. 그러나 PLK의 경우는 인공재배가 매우 까다롭고 안정적 생산이 어려워 대부분 농가에서는 생산량이 많고 재배가 비교적 쉬운 PB를 주로 재배하고 있다. 최근 국내에서 균사성장이 빠르고 자실체형성이 잘 되는 *P. linteus* HN00k9 (PLH)가 보고되어 *P. linteus*의 안정적 생산이 가능하게 되었으며 (Min *et al.*, 2016) KACC93057P균주명으로 특허기탁 된 바 있다.

혈전은 동맥, 정맥, 모세혈관 또는 심장 등 순환기계 어느 곳에서도 발생 할 수 있으며, 대표적인 심혈관계 질환인 동맥경화증은 심근경색이나 뇌경색을 일으키는 매우 위험한 질환이다(Mustard and Packham, 1970). 혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 형성된 혈전을 치료하기 위한 혈전용해제 등이 사용되고 있다. 그러나 대표적인 항혈소판 제제인 아스피린은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성 궤양 등의 부작용을 일으킨다(Kim *et al.*, 2013), 혈소판의 부착과 응집은 혈전 형성 초기에 중요한 역할을 한다(Couch and Hassanein, 1976). 혈소판은 혈관 손상 시 출혈을 멈추는 작용을 하나, 죽상동맥경화증이나 혈관벽 손상과 같은 병적상태에서의 혈관에서는 혈소판이 콜라겐에 노출 되거나, 여러 가지 인자로 자극 받아 혈소판에서 분비된 ADP, thromboxane A2 (TXA2) 등에 의해 혈소판과 응집이 일어나게 된다 (Nieswandt *et al.*, 2005).

본 연구는 국내에서 주로 재배되고 있는 *P. baumii* 와 *P. linteus* 자실체의 혈소판 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 상대적으로 알려진 바가 적으며, 따라서 본 연구에서 국내 재배종인 간의 혈소판 응집 반응과 혈소판의 활성화에 미치는 영향에 대해 수행한 연구결과를 보고 하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

국내재배 종 상황버섯 *P. linteus* HN1009K (PLH)와 *P. linteus* (Korea Sanghwang, PLK), *P. baumii* (Jangsu Sangwhang, PB)로부터 생산된 2년산 자실체를 사용 하였

다. 건조 자실체를 파쇄기로 100 mesh로 분말 화 하였다. 상황버섯분말 10 g을 70% 메탄올 500 ml에 혼합하고 16 시간동안 실온에서 150 rpm으로 진탕하면서 추출 하였다. 메탄올 추출액을 회전증발농축기에서 증발시키고 잔존하는 건조물을 회수 하여 0-200 µg/ml의 다양한 농도가 되도록 10% (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 제조하였다.

혈소판의 준비

랫드의 복대동맥으로부터 venipuncture를 통해 뽑은 전혈 8 ml를 1 ml citrate phosphate dextrose solution (CPD: 90 mM Na₃C₆H₅O₇·2H₂O, 14 mM C₆H₈O₇·H₂O, 100 mM NaH₂PO₄·H₂O, and dextrose 2.55 g/100 ml)와 혼합 하였다. 혈액 샘플을 170×g에서 7분간 원심분리 하여 상등액의 혈소판 부유혈장 (platelet-rich plasma, PRP)를 취하여 120×g에서 7분간 원심 분리하여 적혈구 성분을 제거하였다. CPD solution성분을 제거하고 혈소판을 분리하기 위하여, PRP를 350×g에서 10분간 원심분리하여 침전된 혈소판은 Tyrode buffer (137mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 5.5mM glucose, 2mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.3mM NaHPO₄, pH 7.4)에서 10⁸/ml의 농도로 조정 하여 사용 하였다.

혈소판응집억제효과 검정

상황버섯 메탄올추출물을 농도별로 혈장(10⁸/ml)에 2분간 37°C에서 전처리 하고 혈소판 응집촉진물질 (collagen 2.5 µg/ml, thrombin 0.1 U/ml, ADP (10 µM)를 가하여 250 g로 stirring하면서 5분간 반응시켜 혈소판 응집억제능을 측정 하였다. 혈소판응집은 Aggregometer (Chrono Log, Havertown, PA, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈소판 응집억제 활성은 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로, 상황버섯 메탄올 추출물 처리 후 유도된 aggregation (%)을 실험군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 저해율 (%)로 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

ATP release 분석

Luciferin-luciferase와 Adenosine triphosphate (ATP)가 반응할 때 발생하는 luminescence로 ATP release를 측정 하였다. 혈소판을 37°C에서 3분간 200 µg/ml 농도의 PLK, PLH, PB 메탄올 추출물을 전 처리 하고 10 µM Adenosine diphosphate (ADP))를 가하여 5분간 반응을 유도한 후 원심분리로 상층액을 취하여 분석에 사용하였다. ATP release는 ATP assay kit (Biomedical Research Service Center, Buffalo, USA)를 사용하여 luminometer (GloMax 20/20, Promega, Madison, USA)로 측정하였

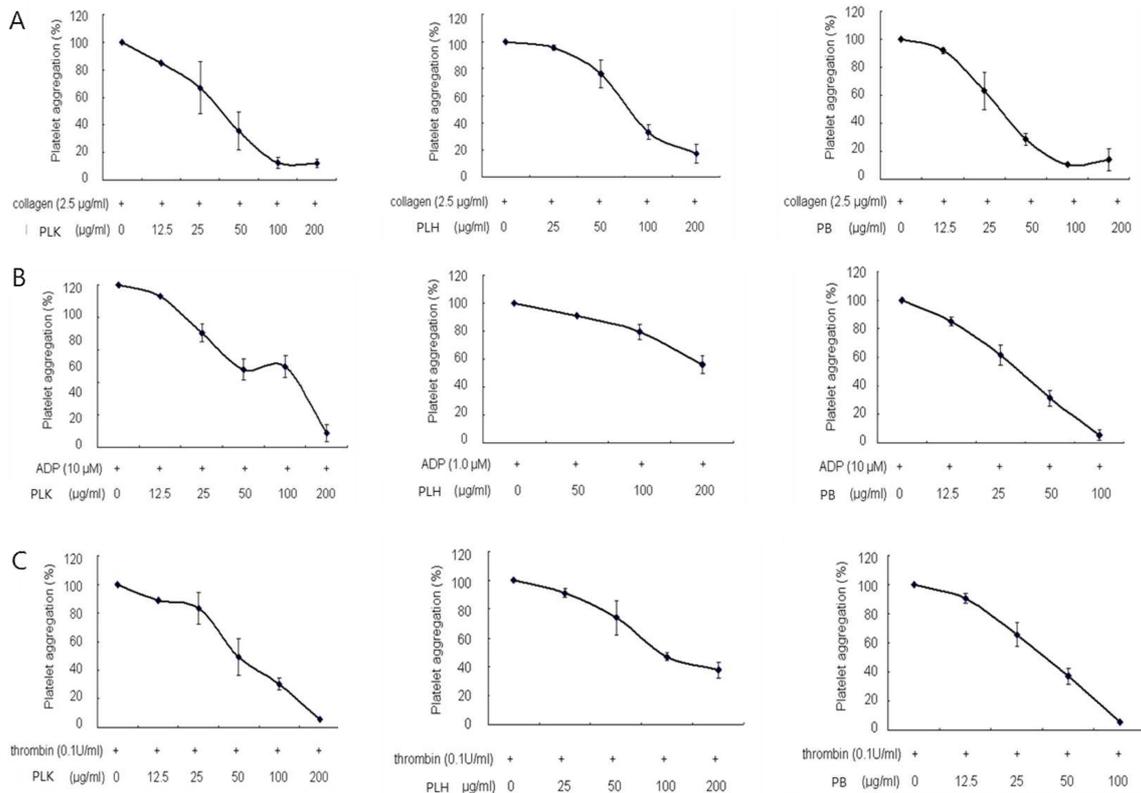


Fig. 1. Inhibitory effect of methanolic extracts from Sanghwang mushrooms on collagen (A), ADP (B) and thrombin (C) induced platelet aggregation. Platelets (10^8 /ml) were preincubated with or without a the extract in the presence of 1 mM $CaCl_2$ for 2 min at $37^\circ C$. The platelets were activated with the indicated concentration of collagen (25 $\mu g/ml$), ADP (10 $\mu M/ml$) and thrombin (0.1 U/ml). Light transmission was recorded on a Chronolog 2 channel aggregometer. The aggregation reaction was terminated at 5 min and the percent aggregation rate was determined. Each graphs show mean \pm SEM of at least 3 independent experiments performed. PLK: *Phellinus linteus* (Korea Sanghwang), PLH: *Phellinus linteus* (HN00K9), PB: *Phellinus baumii* (Jangsu Sanghwang)

다. 대조구로서 ATP release 억제 효과가 알려진 Phospholipase C의 inhibitor인 U73122 (4 μM)와 calcium chelator인 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)를 1 mM 사용하였다.

결과 및 고찰

상황버섯 메탄올 추출물의 혈소판 응집억제 효과

혈소판 응집반응 기전은 thromboxane A2와 같은 지질이 Phospholipase C를 활성화시켜, diacylglycerol과 inositol triphosphate를 생성하게 하며, 이는 protein kinase C의 활성화와 세포내 칼슘의 증가를 각각 가져오며. 콜라겐이 혈소판 막에 부착하게 되면, 세포내부의 칼슘이 증가하고, 세포모양이 변하며, ADP와 TXA2 등의 유리가 초래된다(Jennings, 2009). 유리된 ADP는 활성화된 혈소판의 dense granule에서 분비되어 혈소판 세포막에 있는 integrin α 2b β 3를 활성화시켜 혈소판을 응집시킨다(Davi and Patrono, 2007) 또한 유리된 TXA2는 혈소판 세포막에 있는 thromboxane 수용체에 결합하여 혈소

판을 활성화 시키고, fibrinogen과 vWF가 활성화된 혈소판의 glycoprotein IIb/IIIa 수용체에 결합하여 혈관 손상 부위에 platelet mass가 형성됨으로써 혈소판을 응집시킨다. 이와 같이, 혈소판은 콜라겐, ADP, TXA2 등 다양한 생리물질을 통하여 활성화되고, 특이적인 수용체와의 결합과 신호전달기전을 통하여 응집반응을 일으킨다(Lefkovits *et al*, 1995)

본 연구는 국내 상황버섯 재배 종인 *P. baumii* (PB, Jangsu sanghwang), *P. linteus* (PLK, Korea Sanghwang), 그리고 *P. linteus* HN00k9 (PLH) 자실체의 methanol 추출물의 혈소판 응집 억제효과를 위하여 사용 하였다. PB, PLK, PLH methanol 추출물을 전 처리하고 혈소판 응집 촉진물인 collagen (2.5 $\mu g/ml$), ADP (10 μM), thrombin (0.1 U/ml)의 처리에 따른 혈소판 응집억제 효과를 조사 하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 PB는 collagen, ADP와 thrombin에 의해 유도된 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 억제시켰으며 50 $\mu g/ml$ 의 농도에서 무처리구에 비하여 50% 이상, 100 $\mu g/ml$ 농도에서는 95% 이상의 혈소판응집억제 효과를 보였으며 그 효과는 ADP처리 혈소

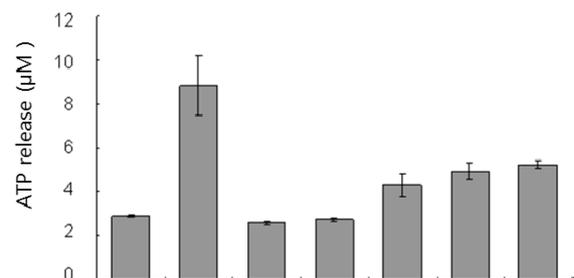
판에서 가장 강하게 나타났다. PLK 추출물 또한 PB의 혈소판 응집 억제 결과와 같이, collagen, ADP, 그리고 thrombin에 의해 유도된 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 억제시켰으며 혈소판 응집 억제 효과는 collagen처리 혈소판에서 억제 효과가 가장 높았으나 ADP처리구에서는 다소 약하게 나타났다. 한편, PLH추출물 200 µg/ml 농도에서 collagen처리 혈소판응집을 95% 이상 억제시켰으나, ADP와 thrombin에 의한 응집의 억제 효과는 38%, 56%로 다른 상황버섯 균주보다 혈소판 응집 억제 효과가 다소 약하게 나타났다(Fig. 1). Kim 등 (2013)은 표고버섯 자실체 80% 에탄올추출물은 collagen 혈소판 응집촉진제처리에 대한 억제효과를 조사한 바 있는데 추출물 5, 10, 25 mg/ml의 농도에서 10%, 35%, 50%의 혈소판응집억제 효과가 있었다고 하였다. 이는 본 연구의 처리농도보다 100배 이상의 고 농도 처리로 본 연구의 상황버섯 메탄올 추출물이 보다 높은 혈소판응집억제 효과가 있는 것으로 사료 되었다. 전 연구에서 52종의 버섯류의 균사체들의 물 추출물과 에탄올 추출물에 대한 혈소판 억제활성을 조사 한 바 있는데 에탄올 추출물이 2배에서 3배 이상 높았으며 특히 차가버섯 (*Inonotus obliquus* ASI 74006)에탄올 추출물 처리구에서 81 %이상의 혈소판 억제활성을 나타낸다고 하였고 비늘버섯류와 잎새버섯 자실체에서 51%와 37%로 다른 버섯류에 비교적 혈소판 응집억제효과가 높았다고 하였다 (Park *et al.*, 2003). 그러나, 버섯 추출물의 정량적 처리가 기술되지않아 본 연구의 상황버섯 추출물과의 활성 비교가 불가능 하였다. *P. gilvus*에 관하여 보고 된 바 있는데 메탄올 추출물에서 높은 항 혈소판응집 활성을 보였다고 하였으며 특히 Chloroform 추출물 100 µg/ml에서 90% 이상의 혈소판응집을 억제 하였다고 하여 (Chang *et al.*, 2006), 본 연구의 상황버섯 메탄올 추출물처리 결과와 유사한 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때에 상황버섯 균주 PLK, PLH, PB의 메탄올 추출물 모두 다 각자 다른 기전으로 혈액을 응집시키는 collagen, ADP, 그리고 thrombin에 의해 유도된 응집을 유의성 있게 농도 의존적으로 억제시켰다. Thrombin과 ADP와 같은 soluble agonist는 G protein과 연결된 수용체와 각각 결합하여 phospholipase C β 를 활성화 시키는 반면, collagen은 glycoprotein 수용체와 결합하여 phospholipase C γ 를 활성화시키는 것을 고려해 볼 때, 여기에서 사용한 세 가지의 추출물은 항 혈소판 효과가 광범위함을 시사 하고 있다. 본 연구의 상황버섯의 높은 혈소판 응집효과구명을 기반으로 하여 항 후 추출물 내에 잔존 하는 유효물질을 구명하여 새로운 약리 활성 물질 개발을 위한 유용한 기반재료로 활용 할 수 있을 것이다.

상황버섯 메탄올 추출물의 ATP release 감소효과

혈소판의 특징 중의 하나는 dense granule를 보유하고

있다가 활성화 되면 이들을 분비하는데 분비내용물에는 ATP, ADP, serotonin 등이 알려져 있어(Mustard and Packham, 1970; Davi and Patrono, 2007) 혈소판이 활성화될 때 나타나는 granule 분비는 ATP release양으로 측정 가능하다. granule 분비감소는 혈소판 응집 억제 능과 같은 경향치를 나타나는 것이 일반적인 현상으로 받아들여지고 있다. 따라서 본 실험은 상황버섯 메탄올 추출물의 혈소판의 ATP release를 억제효과를 조사 하였다. 혈소판 응집 억제 실험에서 쓰였던 가장 높은 농도의 PLK, PLH, PB 메탄올 추출물 200 µg/ml를 전 처리하고 혈소판응집 유도물질인 ADP (10 µM)를 처리한 후 ATP release를 측정 하였다. ADP를 단독으로 처리 시에는 ATP release가 9 µM까지 상승 하였으나 PLK과 PB 추출물은 ATP release를 2.5 µM로 감소 시켜 ADP 무 처리구와 필적하는 효과를 보였으며 PLH 추출물도 ADP로 유도된 혈소판의 ATP release를 절반 이상 감소시켰다 (Fig. 2). 이들 세 가지 추출물의 ATP release 억제 효과는 양성 대조구로 사용된 Phospholipase C의 inhibitor인 U73122 (4 µM)나 calcium chelator 인 EDTA (1 mM)보다 더 뛰어난 것으로 나타났다. 결과적으로 상황버섯 메탄올 추출물이 혈소판의 ATP release를 억제 시키는 것을 감안할



ADP (10 µM)	-	+	+	+	+	+	+
PB (200µg/ml)	-	-	+	-	-	-	-
PLK (200µg/ml)	-	-	-	+	-	-	-
PLH(200µg/ml)	-	-	-	-	+	-	-
U73122 (4µM)	-	-	-	-	-	+	-
EDTA (1 mM)	-	-	-	-	-	-	+

Fig. 2. Effects of methanolic extracts from Sanghwang mushrooms on Adenosine triphosphate (ATP) release from Adenosine diphosphate (ADP) activated platelet. Platelets (10^8 /ml) were pre-incubated with PLK, PLH and PB methanol extracts of 200 µg/ml for 2 min and ADP (10 µM) was added in Platelets and additionally incubated for 5 min. ATP release was assayed with ATP assay kit (Biomedical Research Service Center, Buffalo, USA) and detected on Uminometer (GloMax 20/20, Promega, Madison, USA). Bar graphs show mean \pm SEM of at least 3 independent experiments performed. PLK: *Phellinus linteus* (Korea Sanghwang), PLH: *Phellinus linteus* (HN00k9), PB: *Phellinus baumii* (Jangsu Sanghwang). U73122 (Phospholipase C inhibitor) and calcium chelator, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used for positive controls.

때, 혈소판의 dense granule 분비를 억제시키는 것과 관련이 있다고 사료 되었다.

적 요

국내 상황버섯 재배 종인 *Phellinus baumii* (PB, Jangsu sanghwang), *P. linteus* (PLK, Korea Sangwhang), 그리고 *P. linteus* HN00k9 (PLH) 자실체의 methanol 추출물의 혈소판 응집 억제와 ATP release 감소효과를 조사하였다. PB, PLK, PLH methanol 추출물을 전 처리하고 혈소판 응집촉진물인 collagen (2.5 ug/ml), ADP (10 uM), thrombin (0.1 U/ml) 처리에 50ug/ml에서 200 ug/ml 농도에서 50%에서 95%의 혈소판응집억제 효과가 나타났으며 ATP release 감소효과는 200 ug/ml 농도에서 ADP (10 uM) 처리 혈소판에서 60%에서 50%로 나타났으며 이는 Phospholipase C의 inhibitor인 U73122 (4 uM)과 calcium chelator인 EDTA (1 mM)에 비하여 20%이상 높게 나타났다. 본 결과로부터 상황버섯 PB, PLK, PLH 메탄올 추출물은 심혈관계질환을 예방 하는 유용한 소재로 활용 가능 할 것으로 사료 된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물기술평가원 (IPET) 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 116164-2)연구지원에 의해 수행된 결과입니다.

References

- Chang ZQ, Hwang MH, Rhee MH, Kim KS, Kim JC, Lee SP, Jo WS, Park SC. 2006. The in vitro anti-platelet, antioxidant and cellular immunity activity of *Phellinus gilvus* fractional extracts. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:181-187.
- Choi, JH, Ha TH, Rho YD. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor J Mycol.* 24:214-222. (in Korean).
- Couch JR, Hassanein RS. 1976. Platelet aggregation, stroke, and transient ischemic attack in middle-aged and elderly patients. *Neurology* 26:888-895.
- Daniel S. 2010. Medicinal mushroom *Phellinus linteus* as an alternative cancer therapy (Review). *Exper therap med.* 1:407-411
- Davi G, Patrono C. 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 357:2482-2494.
- Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59:155-157.
- Jennings LK. 2009. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb. Haemost.* 102: 248-257
- Kang, HW, Lee MH, Seo GS. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Phellinus linteus* HN1009K. *Kor J Mycol.* 41: 243-247. (in Korean)
- Kim GY, Jeong HW, Jeong DJ, Song HB, Lee HG 2013. Effects of Shiitake mushroom on anti-platelet aggregation and anti-thrombotic. *Korean J Oriental Physiol Pathol.* 27:239-245. (in Korean)
- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. 1995. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med.* 332:1553-1559.
- Min KJ, Kwak AM, Seok SJ, Kang HW. 2016. Morphological and cultural characteristics of a novel *Phellinus linteus* KACC93057P. *J mushrooms* 14:75-80
- Mustard JF, Packham MA. 1970. Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation. *Pharmacol Rev.* 22:97-187.
- Nieswandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJH. 2005. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost.* 3:1725-1736
- Park JS, Hyun KW, Seo SB, Cho SM, Yoo CH, Lee JS. 2003. Detection of Platelet agrigation inhibitors and fibrinolytic substances from mushrooms. *Kor J Mycol.* 31:114-116. (in Korean)
- Tian XM, Yu HY, Zhou LW, Decock C, Vlasak J, Dai YC. 2013. Phylogeny and taxonomy of *Inonotus linteus* complex. *Fungal Div.* 58:159-169.
- WU SH, Dai YC, Hattori T, Yu TW, Wang DM Parmasto E, Chan HY, Shih SY .2012. Species clarification for the medicinally valuable 'sanghuang' mushroom. *Bot Studies.* 53:135-149.