

電氣泳動法에 의한 靈芝버섯 系統의 特性

朴元穆 · 李鎔世 · 金晟會 · 朴容煥*

高麗大學校 農科大學 植物保護學科 · 農村振興廳 農業技術研究所*

Characterization of Isolates of *Ganoderma lucidum* by Electrophoretic Patterns of Enzymes

Won Mok Park, Yong Se Lee, Seong Hoe Kim and Yong Hwan Park*

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Korea University, Seoul 140, and
Institute of Agricultural Sciences,* Suweon 170, Korea

Abstract: Isozyme patterns of leucine aminopeptidase, esterase and protein from 16 isolates of *Ganoderma lucidum* were observed by electrophoresis for characterization of the isolates. Even in the same isolate, the patterns of the isozymes from mycelium and cap were different. The esterase patterns from the mycelium could differentiate the isolates. Of 16 isolates, four isolates showed identical patterns. It was assumed that these had the same genetic background.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Isozyme pattern, Esterase, Leucine aminopeptidase.

靈芝버섯 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.은 옛부터 靈藥이라 하여 漢方에 利用되어 왔으며 不老草 혹은 萬年버섯 등으로 불려왔다.

최근 靈芝는 健康食品으로 관심이 증대됨에 따라 化學成分 및 藥效 등에 관한 研究가 행해지고 있으며 이에 따른 人工栽培가 확산되고 있다(Woo, 1984).

人工栽培時 靈芝의 形態는 扁角과 鹿角 등 다양하지만 遺傳 및 分類에 관한 研究는 미진하여 系統의 分化 조차 명확히 밝혀지지 않은채 栽培되고 있는 실정이다 一般的으로 버섯의 分類는 外的인 形態와 色等に 의하여 可能하나 靈芝는 同一 菌株內에서도 形態가 다른 扁角, 鹿角 그리고 中間 形態가 同時에 形成되는 性質이 있기 때문에 形態에 의한 分類는 어려움이 있다. 따라서 形態와 生化學的 分類法의 병행이 요구된다.

生物體의 酵素가 몇개의 서로다른 分子型 즉 同位酵素로 存在하고 있음이 밝혀진 以來 電氣泳動法은 遺傳 因子의 1次 產物인 酵素蛋白質을 分析함으로써 동물(Hubby 등, 1966), 식물(Green 등, 1981), 미생물(Baptist 등, 1969; Gill 등, 1978; Glynn 등, 1969; Kulik 등, 1970)의 分類 및 集團遺傳(Kim 등, 1982; Nakagahra 등, 1975)에 利用되어 왔다.

本 實驗은 電氣泳動法을 利用하여 靈芝버섯 菌株間

의 蛋白質과 同位酵素의 pattern을 比較하여 分類 및 遺傳研究의 기초자료를 얻고자 실시하였다.

材料 및 方法

菌株

菌株는 韓國과 日本에서 수집한 16 菌株를 農業技術 研究所 菌茸科에서 분양받아 使用하였다.

各 菌株의 수집원은 Table I과 같다.

菌絲의 培養

modified Czapek dox medium 50 ml를 250 ml elenmyer flask에 담은 後 菌絲결편을 接種하여 28°C incubator에서 14日間 액체배양 하였다. modified Czapek dox medium의 조성은 NaNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, peptone 5.0 g yeast extract 1.5 g, malt extract 10.0 g, CuSO₄·5H₂O 0.005 g, FeSO₄ 0.01 g, ZnSO₄·7H₂O 0.01 g, distilled water 1,000 ml 이다.

子實體 形成

툼밥배지에 자란 靈芝버섯의 종균을 7月末에 모래에 심어 진흙형 栽培方式에 의하여 子實體로 形成시켰다.

酵素 抽出

Table I. Collected area of *Ganoderma lucidum*.

Sample No.	Isolate No.	Area
1	7118	Japan
2	7101	Japan
3	7006	Japan
4	7117	Japan
5	7096	Japan
6	7061	Japan
7	7109	Japan
8	7060	Korea, Gyeonggi
9	7112	Korea, Seoul
10	7029	Korea, Gyeonggi
11	7079	Japan
12	7095	Japan
13	7066	Japan
14	7119	Japan
15	7113	Japan
16	7110	Japan

子實體의 蛋白質 抽出은 子實體를 잘게 잘라 2g을 취한 후 8ml의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 첨가하여 Ultra-Turrax(Janke & Kunkel IkaWerk)를 사용 4°C에서 20,000 rpm으로 1분간 마쇄하였다. 이것을 고속 냉동 원심 분리기에서 4°C, 12,000 g로 30분간 회전시킨 후 상등액을 電氣泳動試料로 사용하였다.

菌絲의 蛋白質 抽出은 액체배양된 菌絲를 büchner funnel(Wattmann No.3)에서 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 씻어내면서 거른 후 菌絲 生體重의 1배(w/v)의 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 첨가하여 유발을 사용 4°C에서 마쇄하였다. 이것을 고속냉동원심분리기에서 4°C, 12,000 g로 30분간 회전시킨 후 상등액을 試料로 취하였다.

電氣泳動法

panta-phor system으로 분리 gel은 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel을 사용하였다. continuous buffer system으로 gel buffer와 tray buffer는 0.125 M Tris-borate (pH 8.9)를 사용하였다. slot 당 試料는 100 μl (μl/μg protein)을 넣었다. 電氣泳動은 10°C에서 400 V로 20시간 실시하였다.

發色法

蛋白質 : 電氣泳動 후 gel을 발색액에 (800 ml H₂O, 200 ml methanol, 70 ml acetic acid, 60 g trichloroacetic acid, 25 ml 1% Coomassie brilliant blue R 250)에 침적하여 1시간 경과 후 탈색액(H₂O : methanol : acetic acid=3 : 7 : 1)에 12시간 침적하였다(Glynn 등, 1969).

esterase 同位酵素 : gel을 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2)에 30분간 침적하였다. 이때 10분 간격으로 buffer를 3회 갈아주며 gel의 산도를 조정하였다. 35°C의 발색액(α-naphthylacetate 60 mg, fast blue RR salt 70 mg, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) 120ml)에 침적하여 band가 명확하여질 때까지 발색하였다(Kahler 등, 1970).

leucine amino peptidase(LAP) : gel을 발색액(120 ml Tris-malate buffer (pH 5.4), 50 ml distilled water, 15 mg fast black K salt, 20mg L-leucyl-B-naphthylamide HCl)에 30분간 침적하여 어두운 곳에서 발색하였다(Green 등, 1981).

유사도 지수 : 同位酵素 band pattern에 의해 Stout (Stout 등, 1974)의 方式으로 $\frac{\text{동일 band 수}}{\text{총 band 수}} \times 100$ (%)의 유연관계를 구하였다.

結 果

子實體 形態 比較

子實體 形態는 菌株 1번, 13~16번은 鹿角 形態이고, 2~12번은 扁角 形態이었다. 扁角에서는 Table II와 같이 균침과 줄기의 경계, 갓의 모양, 표면상태, 두께 등이 다양하였다.

子實體 蛋白質 패턴

子實體의 蛋白質 pattern은 major band 1,2는 유사한 위치에서 보였다. 그러나 각 菌株間에는 6,7,8 菌株에서 band 3과 5, 13~16菌株는 band 4와 7, 3,4,5 菌株는 band 6, 3~8 菌株間에는 band 8에서 구별할 수 있었다(Fig. 2).

子實體 Esterase 同位酵素 Pattern

3, 4, 5 菌株間에는 band 2, 3, 6, 8, 9, 10에서 유사하며,

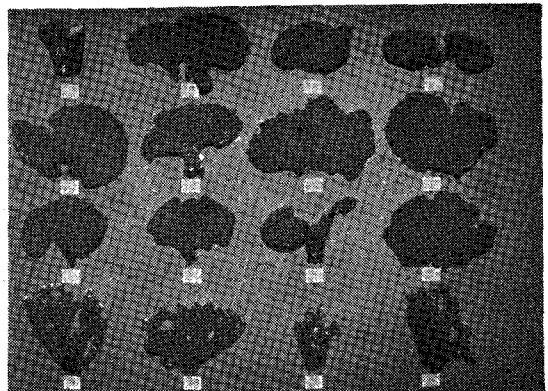


Fig. 1. Morphology of *Ganoderma lucidum* fruit bodies.

Table II. Characteristics of *Ganoderma lucidum* isolates.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Shape of pileus	Plane		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○				
	Clavaria	○													○	○	○
Attachment	Adnexed			○	○	○				○		○	○				
	Subdecurrent		○								○						
	Decurrent						○	○	○								
Shape of margin	Entire			○	○							○					
	Crisped		○			○					○	○					
	Undulating						○	○	○				○				
Texture of pileal surface	Smooth		○	○	○	○				○	○	○					
	Wrinkled						○	○	○				○				
Thickness of pileus	Thick		○	○	○	○				○	○	○					
	Thin						○	○	○				○				

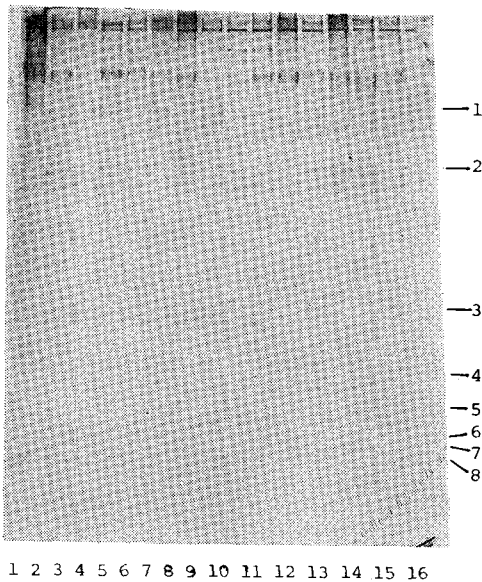


Fig. 2. Buffer soluble protein in cap of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel.
1~16: Sample number.

6, 7, 8 菌株間에서는 band, 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10에서 13~16 菌株들은 band 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11에서 유사한 것을 볼 수 있다(Fig. 3).

同一菌株에서 同時に 扁角, 鹿角 및 中間形態의 子實體가 形成된 系統 2, 6, 9번의 形態別 子實體와 菌絲에서 esterase pattern을 관찰하였던 바, 同一菌株에서는 비록 子實體모양은 달랐어도 子實體의 esterase

patten은 동일하였다. 그러나 子實體와 菌絲間에는 esterase pattern의 차이가 있었다(Fig. 4).

菌絲의 蛋白質 및 Esterase, LAP 同位酵素

Pattern

菌絲의 蛋白質 pattern은 Fig. 5와 같다. 菌株間의

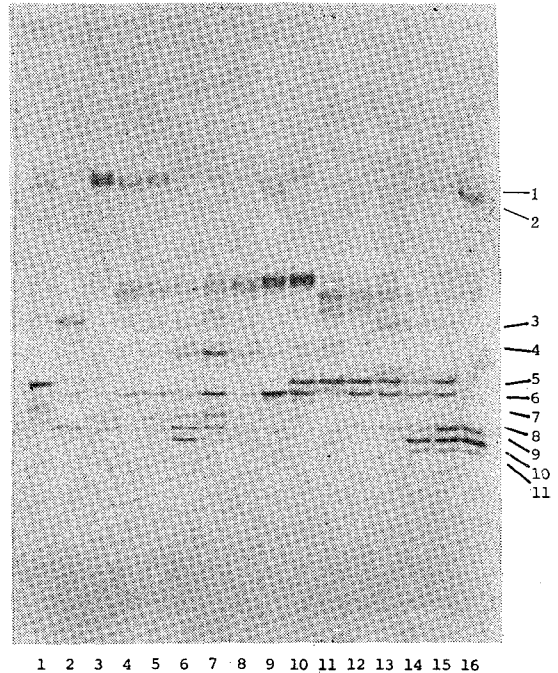


Fig. 3. Isozyme patterns of esterase in cap of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel.
1~16: Sample number.

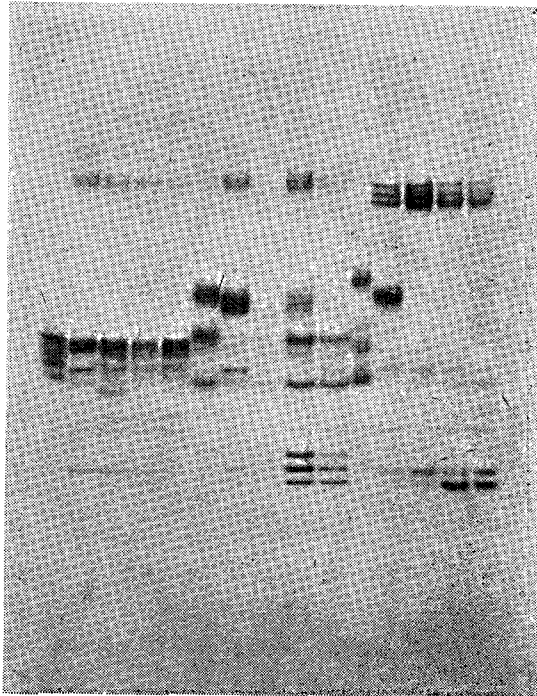


Fig. 4. Isozyme patterns of esterase in fruit body of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel.
 1~5: Isolate number 2, 6~10: Isolate number 6, 11~15: Isolate number 9.
 Mycelium: 1, 6, 11; Fresh fruit body: 2, 7, 12;
 Dried plane: 3, 8, 13; Dried middle shape between plane and clavaria: 4, 9, 14; Dried clavaria: 5, 10, 15.

major band 1, 2는 모두 유사하였으나 minor band에서 13~16번 菌株는 band 4, 5, 7 6, 7번 菌株는 band 3, 4, 6이 유사하여 菌株間의 특징을 나타낼을 볼 수 있다.

菌絲의 esterase 同位酵素 pattern은 모든 菌株들이 band 1, 3, 4를 가지고 있지만 13~16번 菌株에서 band 5, 7, 9, 11이 6, 7번 菌株는 band 2, 6, 10이 특징으로 나타남을 Fig. 6에서 菌株間 차이를 보여주었다.

菌絲 LAP 同位酵素 Pattern은 菌株 13~16번이 band 3에서, 6, 7번 菌株는 band 4에서 다른 菌株와의 차이를 보이고 있고, Fig. 7에서 菌株間 특징을 보였다.

菌絲의 esterase와 LAP 同位酵素 band pattern을 Stout(1974)의 방식에 의해 유연관계를 알아보았다. 菌株 13~16번은 100%, 6, 7번 100% 유연관계가 높았고, 5번과 13번 菌株間은 12.5%로 유연관계가

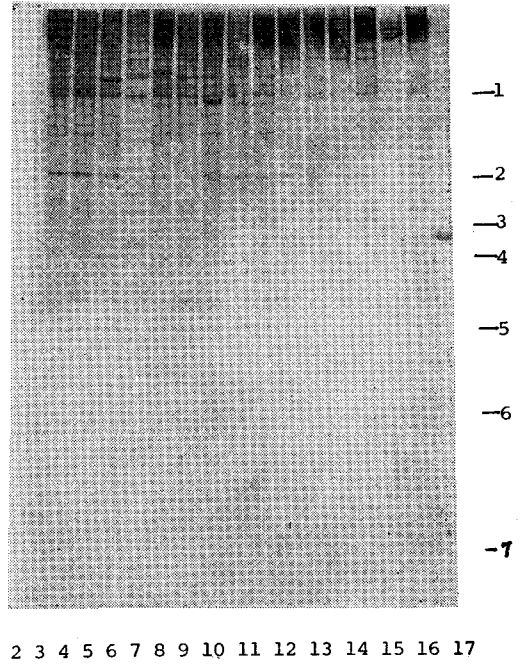


Fig. 5. Buffer soluble protein in mycelium of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel.
 2~16: Sample number, 17: Marker protein.

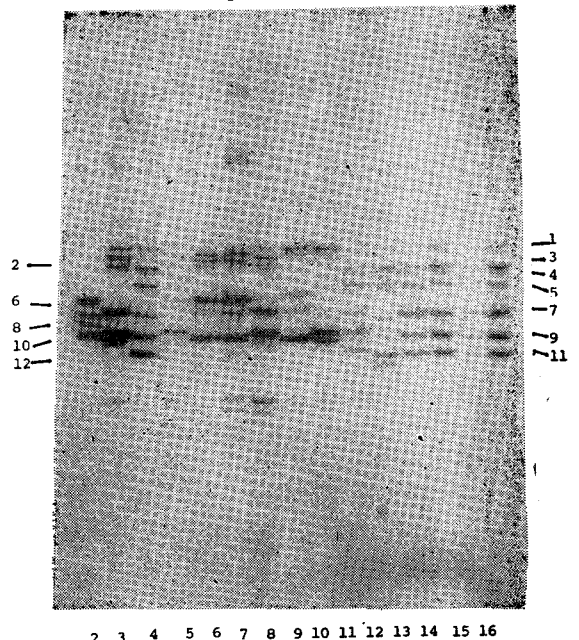


Fig. 6. Isozyme patterns of esterase in mycelium of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel.
 2~16: Sample number.

Table III. Similarity of esterase and LAP isozyme bands between isolates of *Ganoderma lucidum*.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	—	22.2	18.7	13.3	40.0	40.0	23.5	28.5	28.5	30.7	13.3	28.5	28.5	28.5	28.5*
3		—	34.7	20.0	55.5	55.5	68.7	60.0	50.0	38.8	37.5	60.0	60.0	60.0	60.0
4			—	16.6	22.7	22.7	21.7	31.5	13.6	29.4	31.2	57.1	57.1	57.1	57.1
5				—	29.4	29.4	35.2	17.6	26.6	20.0	13.3	12.5	12.5	12.5	12.5
6					—	100.0	50.0	43.7	43.7	37.5	22.2	46.6	46.6	46.6	46.6
7						—	50.0	43.7	43.7	37.5	22.2	46.6	46.6	46.6	46.6
8							—	56.2	64.2	35.3	29.4	35.3	35.3	35.3	35.3
9								—	42.8	33.3	35.7	53.8	53.8	53.8	52.8
10									—	53.8	26.6	33.3	33.3	33.3	33.3
11										—	46.1	53.8	53.8	53.8	53.8
12											—	58.3	58.3	58.3	58.3
13												—	100	100	100
14													—	100	100
15														—	100
16															—

* $\frac{\text{Same band}}{\text{Total band}} \times 100(\%)$

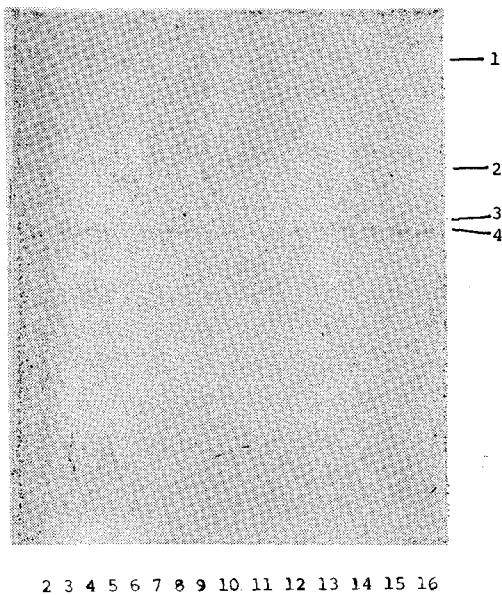


Fig. 7. Isozyme patterns of LAP in mycelium of *Ganoderma lucidum* on 10~25% polyacrylamide porosity gradient slab gel. 2~16: Sample number.

가장 낮았다. 기타 菌株間에도 유년경도의 차이를 볼 수 있다(Table III).

考 察

電氣泳動法을 利用한 同位酵素 패턴 比較는 形態로써 分類가 어려운 동물, 식물, 미생물 등의 分類에 많이 利用되고 있다. 즉 초파리(Hubby 등, 1966), 보리(Kahler 등, 1970), *Phytophthora* spp.(Gill 등, 1978), *Aspergillus* spp.(Kulik 등, 1970), 세균(Baptist 등, 1969)의 分類 등에서 좋은 結果들이 보고되었다.

本 實驗은 電氣泳動法을 利用하여 靈芝버섯 各 菌株間의 蛋白質 및 同位酵素의 패턴 比較로 各 菌株別 系統과 특성을 알아보았다.

使用 菌株別 子實體의 形態는 크게 扁角과 鹿角 두가지로 分類 할 수 있었으며 扁角形態를 가진 菌株間에서도 갖의 모양과 균침과 버섯대와의 경계부분의 모양 등에 의한 形態別 차이가 있어서 子實體의 蛋白質과 esterase 同位酵素 패턴을 알아보았다.

扁角과 鹿角間에는 뚜렷한 차이가 있었으며 鹿角形態를 하였던 13, 14, 15, 16번 菌株間에는 同一한 패턴을 보였다. 扁角形態를 하였던 菌株間에는 변이가 있어 특정 band의 有·無와 位置에 의해 各 菌株의 특성을 比較 할 수 있었다. 子實體의 形態가 유사 하였던 3, 4, 5번과 6, 7, 8번 菌株들은 서로 유사한 band 패턴을

보였다.

同一菌株에서 扁角과 鹿角形態의 子實體가 同時에 形成되었던 2, 6, 9번의 形態別 子實體의 esterase 패턴은 서로 同一한 패턴을 보였으며 이것은 遺傳的인 변이라기 보다는 生理的인 現象에 의한 것으로 思料되었다. 鹿角形態의 菌株 13, 14, 15, 16번의 子實體 esterase 패턴은 菌株間 변이가 없었다. 특히 이들은 鹿角形態 菌株의 子實體 esterase 패턴과는 뚜렷이 구별이 됐다.

各 菌株別 菌絲의 蛋白質 및 esterase LAP 同位酵素 패턴을 관찰하였던 결과 esterase와 LAP에서 菌株間 分類가 可能하였다. 특히 同一菌株에서도 子實體와 菌絲에서의 esterase 및 protein의 pattern이 매우 달랐다. 이는 양송이 *Agaricus bisporus*에서도 子實體와 菌絲의 電氣泳動에 따른 蛋白質 pattern이 다르다는 보고(Paranipe 등, 1979)와 일치된다. 따라서 버섯 分類에서 菌株間의 同位酵素 比較는 菌絲끼리 혹은 子實體 끼리 比較를 하여야 한다고 思料된다.

菌絲에서도 鹿角形態의 菌株과 扁角形態의 菌株間에는 뚜렷한 차이가 있었으며 鹿角形態를 하였던 菌株間에는 변이가 없이 同一한 패턴을 보였다. 그러나 扁角形態를 하였던 菌株間에는 변이가 다양하여 子實體의 esterase 패턴이 同一하여 구별 할 수 없었던 菌株間의 구분도 가능하였다. 즉 3, 4, 5번 菌株도 各各 특징적인 形態를 보여 分類가 可能하였으며 6, 7, 8번 菌株間중에서 8번 菌株는 6, 7번 菌株와 다른 균주임을 알 수 있었다.

各 菌株間 菌絲의 esterase와 LAP의 band에 의해서 유연관계를 구해본 결과 鹿角形態間에는 100%의 유연관계를 보여 수집 장소가 다르다해도 同一한 菌株임을 알았고 6번과 7번도 서로 同一한 菌株임을 알았다.

이상의 結果에서 靈芝의 菌絲 esterase 同位酵素 패턴이 菌株間의 변이를 잘 나타내므로 이것을 靈芝의 系統 分類의 特性으로 使用 可能性이 있으리라 思料된다.

摘 要

靈芝버섯(*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.)의 16개 菌株間 特性을 電氣泳動法을 使用하여 蛋白質 pattern과 esterase, LAP의 同位酵素 pattern에 의해 比較 관찰하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 子實體의 esterase의 band pattern은 各 菌株間 특정 band의 有·無와 位置 등에 의해 分類 할 수 있었으며 子實體의 形態가 유사한 것은 band pattern에서

도 유사하였다.

2. 同一菌株에서 扁角과 鹿角形態로 形成된 子實體의 esterase band pattern은 서로 同一한 pattern을 보였다.

3. 菌株間 유연관계인 유사도 지수는 12.5%에서 100%의 변이 폭을 보였다. 특히 6과 7번의 두 菌株間과 13, 14, 15, 16번의 4菌株間은 유사도지수가 100%이므로 遺傳的으로 同一한 菌이라 思料된다.

4. 菌絲의 蛋白質과 esterase의 band pattern은 子實體의 pattern과는 달랐으며 子實體에서 同一한 pattern을 보였던 菌株間에서도 菌株間 特性을 가장 잘 보여 주었으므로 靈芝버섯 分類에는 菌絲의 esterase pattern이 가장 적합하다.

문 헌

- Baptist, J.N., Shaw, C.R., and Mandel, M. (1969): Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. *J. Bacteriol.* 99:180-188.
- Gill, H.S. and Zentymen, G.A. (1978): Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology* 68:163-167.
- Glynn, A.N. and Reid, J. (1969): Electrophoretic patterns of soluble fungal proteins and their possible use as taxonomic criteria in genus *Fusarium*. *Can. J. Botany* 47:1823-1831.
- Green, R.L., Dudeck, A.E., Hannash, L.C., and Smith, R.L. (1981): Isozyme polymorphism in *St. augustingrass*. *Crop Sci.* 21:778-782.
- Hubby, J.L. and Lewontin, R.C. (1966): A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural population. *Genetics* 54:557-594.
- Kahler, A.L., and Allard, R.W. (1970): Genetics of isozyme variant in barley. I. Esterase. *Crop Sci.* 10:444-448.
- Kim, Z.S. and Hong, Y.P. (1982): Genetic analysis of some polymorphic isozymes in *Pinus densiflora* (1). *J. Korean For. Soc.* 58:1-7.
- Kulik, K.M. and Brooks, A.G. (1970): Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* spp. *Mycologia* 62:365-376.
- Nakagahra, M., Akihama, T. and Hagashi, K.I. (1975): Genetic variation and geographic cline of esterase isozymes in native rice varieties. *Japan J.*

Genetics 50:373-382.

- Paranjpe, M.S. and Chen, P.K. (1979): Morphogenesis of *Agaricus bisporus*: Changes in proteins and enzyme activity. *Mycologia* 71:469-478.
- Stegemann, H., Burgermeister, W., Francksen, H., and Krögerrecklenfort, M. (1985): Electrophoresis and focusing in slabs using the Panta-phor apparatus for analytical and preparative separation in gels. *Institut für Biochemie, Biologische Bundesanstalt, Messeweg 11 D-3300 Braunschweig* (West Germany).
- Stout, D.L. and Shaw, C.R. (1974): Genetic distance among certain species of *Mucor*. *Mycologia* 66:967-977.
- Woo, M.S. (1984): Symposium on *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* 12:121-123.

<Received January 22, 1986;

Accepted February 26, 1986>