

표고버섯의 영양요구성 및 약물내성주의 분리

김채균* · 심미자¹ · 최응철 · 김병각
서울대학교 약학대학, ¹서울시립대학교

Isolation of auxotrophs and drug resistant mutants of *Lentinus edodes*

Chaekyun Kim*, Mi Ja Shim¹, Eung Chil Choi and Byong Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742,
and ¹Seoul City University 130-704, Korea

ABSTRACT: Auxotrophs and drug resistant mutants from the mycelia of *Lentinus edodes* were obtained by UV irradiation at survival rates of 0.024~2.45% and ethidium bromide (EtBr) enrichment after UV irradiation. The mutation rate was 0.40%, and back mutation rate was 4.81×10^{-4} ~ 8.46×10^{-4} . Various amino acid-, nucleic acid-, and vitamin-requiring auxotrophs were isolated. The concentrations of several fungicides, antibiotics and amino acid analogues inhibiting the growth of *L. edodes* were determined. The MIC values for cycloheximide, benomyl, and *p*-fluorophenylalanine were 2, 2000, and 1000 ug/ml respectively. Five *p*-fluorophenylalanine-resistant mutants and eight benomyl-resistant mutants were selected by UV irradiation.

Key Words: *Lentinus edodes*, auxotrophs, drug-resistance, Basidiomycotina

표고버섯 *Lentinus edodes* (Berk.) Singer.은 주름버섯목에 속하며, 독특한 향과 맛을 지닌 버섯으로 식품으로 널리 애용되어 왔고 국내 생산 버섯류중 가장 생산량이 많으며, 예로부터 건강증진 및 질병에 대한 저항성을 높여 준다고 믿어왔다. 균사체 및 자실체의 단백질당 성분의 함양효과가 보고되었으며(Chihara 등, 1970; Chung 등, 1984; Fujii *et al.*, 1978), 자실체 및 포자에서 추출된 double-strand RNA가 강력한 interferons 유발제로서 작용함이 보고되었다(Ushiyama, 1977). 또한 immuno accelerator로의 작용과 T-cell immune adjuvant로의 작용도 보고되었다(Maeda *et al.*, 1971; Hamuro, 1980). 일본과 미국 등지에서 시판되는 표고 균사체 추출물인 LEM은 rat의 ascites hepatoma AH414의 증식 억제, hepatocarcinogenesis의 억제, 항체 결핍성 간세포 손상 보호 효과, IL-1의 생산, murine macrophages 기능의 활성화 및 murine bone marrow 세포의 증식 촉진은 물론 임상적으로 B형 간염 환자의 치료에 효과가 있음이 보고되었다. 또한

HIV에 대해 감염과 세포 병리학적 증상을 억제하는 작용이 보고되었다(Mizoguchi 등, 1984; Suzuki 등, 1989).

진균류의 유전적 연구는 일정한 염색체 유전자에서의 돌연변이에 근거를 두며 돌연변이 없이 그 loci가 검정되거나 그 기능이 밝혀질 수 없으므로 이러한 돌연변이 유전자가 marker가 되며, 유전 표지를 통하여 유전자 지도가 작성되므로 야생형의 형태 구별에 중요하다(Burnett, 1975; Fincham 등, 1979). 진균류의 경우 *Phycomyces blakesleeanus*에서 자연적인 형태상 돌연변이가 이용된 이후 *Neurospora*의 돌연변이 유발에 관한 연구가 시작되었다(Beadle and Tatum, 1941, 1945). 담자균류에는 *Agaricus bisporus* (Raper 등, 1972)를 비롯한 수종의 균주에서 영양요구주가 보고되었다. 최근 glycerol과 같은 비발효성 탄소원에서는 자라지 못하는 미토콘드리아 기능이 결핍된 petite mutants가 효과적인 돌연변이주로 흥미를 끌고 있으며, 항진균제에 저항성인 약제 내성주가 보고되었다.

본 실험에서는 표고버섯의 유전적 연구 및 원형질체 융합과 핵 전이 연구의 표지로 사용하기 위해

*Corresponding author

Table 1. Media used for mycelial growth of *L. edodes*

Medium ingredient (g/l)	Medium								
	MCM	CCM	SCM	GCM	PDA	YG	PDY	MMM	LCM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5			0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	0.46	0.46	0.46	0.46			0.46	0.46	0.46
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0			1.0	1.0	1.0
Peptone	2.0	5.0	2.0	4.0			1.0	1.0	4.0
Yeast extract	2.0	5.0	15	10		5.0	5.0		4.0
Glucose	20	20	50	30		10	30	20	50
Sucrose				20					
PDA(Bacto)					39		39		
Casamino acid				5.0					
Agar	15	15	15	15		15		15	15

영양요구주와 항진균제 및 아미노산 유사체 등의 약물에 내성인 돌연변이주를 선발하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. DMC-1이다. 실험에 사용한 배지의 종류 및 각 성분은 Table 1에 요약하였으며, 배지의 pH에 따른 성장 정도를 측정, 비교하였다.

약제내성 (MIC)의 결정

멸균수를 가한 *L. edodes* 균사를 homogenizer로 3분간 균질화 시킨 후, 10¹, 10², 10³ 농도로 희석하였다. 희석된 균액을 각 농도의 cycloheximide, *p*-fluoro-DL-phenylalanine, *p*-fluoro-DL-tryptophane, benomyl 등의 약제가 함유된 완전 평판배지(MCM)에 도말, 25°C에서 배양하여 생성되는 집락의 수를 대조군과 비교하였다. 또한 일정한 크기(0.5 cm)의 균사를 약제가 함유된 MCM에 옮겨 배양 후 자라난 직경을 대조군과 비교하였다.

돌연변이의 유발

L. edodes 균사 균질액 10 ml을 멸균된 Petri dish에 분주하여 10 cm 거리에서 교반기로 부드럽게 진탕하면서 각 시간별로 자외선(lamp: emission=39 erg/sec cm²)을 조사하였다. 자외선 처리 후 빛에 의한 photoreactivation을 방지하기 위해

암소에서 10분 방치후 단계 희석하여 MCM에 도말하고 25°C에서 7~15일간 배양하였다.

EtBr에 의한 농화 배양은 McCusker와 Haber (1988)의 방법을 개량하여 시행하였다. 자외선을 처리한 균사의 균질액을 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거시켰다. 그 다음 EtBr이 50 ug/ml의 농도로 첨가된 최소액체배지에서 25°C에서 180 rpm으로 2일간 진탕배양 시킨 후 원심분리하여 EtBr을 제거하고, 세척한 다음 최소액체배지로 균사 현탁액을 만들어 탄소원으로 glucose대신 glycerol이 첨가된 MCM에 도말하여 자외선 조사 균사와 같은 방법으로 배양하였다. 약제내성 균주의 경우 자외선 조사 후 약물 함유 배지에 도말하여 배양하였다.

영양요구성 균주의 유전자형 확인

MCM에 자라난 균사를 MCM와 MMM에 옮겨 배양하였다. 7~10일간 배양 후 MCM에서는 자라지만 MMM에서는 자라지 않는 균사를 영양요구주로 정하였으며, 원래의 독립영양형으로 back mutation 된 것을 제거하기 위해 위의 과정을 수차례 반복하여 MCM에서만 자라는 균사를 최종적으로 선발하였다.

선발한 균주의 영양요구성 확인을 위하여 yeast extract 0.1~0.3 mg/ml, casamino acid 0.5~1.5 mg/ml과 nucleic acid mixture 0.05~0.15 mg/ml이 첨가된 MMM에서의 성장도에 따라 영양요구성을 대략 결정한 후, Holliday 방법(1956)을 개량하여 각 균주의 영양요구성을 확인하였다.

결 과

균사 배양

L. edodes DMC-1 (이하 LE로 약함)의 각종 배지에서의 성장 결과를 Table 2에 정리하였다. MCM에서 가장 잘 자랐으며, MCM에 glucose 30 g을 더 첨가한 LCM에서의 성장속도는 MCM에 비해 느렸다. YG와 PDA를 제외한 모든 배지에서 호기성 균사의 성장이 왕성하였다. 보통 버섯의 계대 배양에 사용되는 PDA배지에서는 잘 자라지 않았고 호기성 균사도 부족하였다. pH 변화에 따른

Table 2. Mycelial growth of *L. edodes* on various media

Media	Colony diameter (cm)		Degree of aerial mycelia*
	2 day	5 day	
MCM	1.73±0.04	4.15±0.11	+++++
SCM	1.45±0.05	3.18±0.04	+++++
GCM	1.65±0.05	3.30±0.07	+++++
PDY	1.53±0.04	2.95±0.05	+++++
YG	1.75±0.05	3.88±0.04	+++
CCM	1.83±0.04	3.90±0.07	+++++
PDA	1.33±0.23	2.00±0.16	++
MMM	1.65±0.05	3.75±0.05	+++++
LCM	1.70±0.09	3.33±0.18	+++++

* +++++: 100%, +++: 60%, ++: 40%

Table 3. Inhibitory effects of several drugs on the growth of *L. edodes*

Drug	Concentration (µg/ml)	Percentage inhibition
Cycloheximide	0.5	0
	1.0	0
	2.0	100
<i>p</i> -Fluorophenylalanine	250	59
	500	92
	1000	100
<i>p</i> -Fluorotryptophane	50	0
	100	0
	200	0
Benomyl	500	44
	1000	54
	2000	100

성장은 pH 6.2 (LCM의 pH)에서 균사의 성장이 가장 왕성하였다(자료 생략).

약제내성 균주

각 항진균성 약제에 대한 성장억제 정도를 Table 3에 정리하였다. 단백질 생합성을 억제하는 cycloheximide는 2 µg/ml에서 100% 억제하였고, *p*-fluorophenylalanine은 500 µg/ml에서 92%, 1000 µg/ml에서 100% 억제하였지만, *p*-fluorotryptophane은 200 µg/ml에서 성장억제가 관찰되지 않았다. 염색체의 disjunction에 기여 들어가 염색체 이상을 일으키는 benomyl은 1000 µg/ml에서 54%, 2000 µg/ml에서는 완전히 억제하였다.

돌연변이주의 분리 및 특성 조사

LE의 균사에 자외선을 조사하면 3분 조사에 2.45%, 20분 조사에 0.0014% 생존율을 보였으며, 30분 조사시 생존한 균주는 없었다(Fig. 1). 자외선을 조사하여 살아난 균주중 총 4028 균주의 돌연변이 여부를 조사하였고 이중 174종의 영양요구성을 검정하였다. 또한 EtBr에 의해 미토콘드리아 유전자 손상을 이유로 추정되는, glycerol 함유 배지

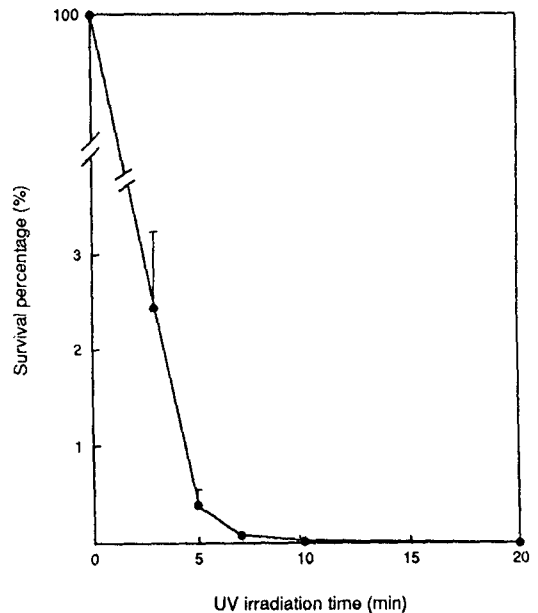


Fig. 1. Survival curve of the mycelia of *L. edodes* after UV irradiation.

Table 4. List of mutants of *L. edodes*

Mutant No.	Mutagen	UV exposure time (min)
LE 1-43	UV	5
LE 101-140	UV	7
LE 201-248	UV	10
LE 301	UV	20
LE(eb) 1-34	UV-EtBr	5
BEN 1-8	UV-Benomyl	5
FPA 1-5	UV-p-Fluoro-phenylalanine	5

에서 자라지 않는 34종의 균주를 선발하였다.

또한 benomyl, cycloheximide, p-fluorophenylalanine을 MIC 농도 이상 첨가하여 약제내성 돌연변이를 유발한 결과 benomyl 저항성 균주 8종과 p-fluorophenylalanine 저항성 균주 5종을 선발하였다. Cycloheximide 저항성 균주는 선발하지 못하였다(Table 4, Table 5).

영양요구주는 불안정하여 균주를 보관 또는 계대를 하는 동안 지속적인 복귀돌연변이가 일어나 초기에는 영양요구주였으나 시간이 경과됨에 따라 독립영양주가 되는 비율이 증가하였다. 독립영양형으로 되돌아가는 비율은 serine 요구주인 LE207은 8.46×10^{-4} , isoleucine, arginine, thymine의 복합 요구주인 LE(eb)26은 4.81×10^{-4} 이었다. EtBr 농화법은 생존율은 낮았지만 돌연변이주를 얻은 확률은 자외선 조사만을 단독으로 행한 경우보다 높았다(자료 생략).

고 찰

표고의 균사체에 자외선 조사시 생존율은 3분 조사에 2.45%, 20분 조사에 0.0014%, 30분 이상 조사시 생존한 균주는 없었다. 일반적으로 담자균류에서 자외선 조사시 생존율은 0~25%로 보고되어 있으며, 동일 균주에서도 균사의 생리적 상태에 따라 달라질 것으로 예측된다. 또한 포자에서는 생존율이 5~15%일 때 돌연변이주의 수득율이 가장 높다고 보고되었다(Hamlyn, 1982). 균사체 및 담자포자에서 5~10%의 생존율 범위에서 돌연변이주를 분리하였다(Yoo 등, 1985; Lee 등, 1986; Park 등, 1987; Um 등, 1988). 또한 Yoon (1985)은 *L. edodes*의 담자포자에 자외선을 조사하면 40초

Table 5. List of auxotrophic mutants of *L. edodes*

Mutant No.	Phenotype*	Mutagen	Exposure time(min)
Nucleic acid base - requiring			
LE17	Gua	UV	5
LE21	Thy	UV	5
LE240	Gua	UV	10
Amino acid - requiring			
LE1	Ile, Met	UV	5
LE41	Ile	UV	5
LE114	Cit	UV	7
LE207	Ser	UV	10
LE244	Arg	UV	10
LE246	Met	UV	10
LE(eb)16	His	UV-EtBr	5
LE(eb)25	Arg	UV-EtBr	5
LE(eb)28	Ile	UV-EtBr	5
Vitamin - requiring			
LE18	Ino	UV	5
LE19	Pyr	UV	5
LE234	Cho	UV	10
LE241	Fol	UV	10
LE243	Rib	UV	10
LE(eb)8	Pyr	UV-EtBr	5
Mixed source - requiring			
LE125	Met, Thy	UV	7
LE208	Ile, Arg, Fol	UV	10
LE236	Ile, Gua	UV	10
LE(eb)20	Ile, Pyr, Thy	UV-EtBr	10
LE(eb)26	Ile, Arg, Thy	UV-EtBr	5

*Arg:arginine, Cit:citrulline, Cho:choline, Fol:follic acid. Gua:guanine, His:histidine, Ile:isoleucine, Met:methionine, Pyr:pyridoxine, Rib:riboflavin, Ser:serine, Thy:thymine, Ino:inositol

조사시 5%가 살아남고, 120초에서 완전히 발아 능력이 상실되며, 60초 조사시 생존율 1.3%에서 1.35%의 빈도로 돌연변이를 유도하였다고 보고하였다.

담자균류는 한 세포 내에 2개의 핵이 존재하는 이형핵체이므로 영양요구성 돌연변이가 일어나더라도 recessive한 표현형이면 표현되지 않는 경우가 있으며, 배양시 체세포 분열 과정에서 alleism에 의해 영양요구성이 상보될 수가 있으므로 안정한 영양요구주를 얻는 데 매우 많은 시간과 노력이 필요하다. 담자균류의 돌연변이 선발율은 *L.*

edodes 1% (Yoo 등, 1985), *Ganoderma lucidum* 5.7% (Um 등, 1988), *G. applanatum* 0.44% (Park 등, 1987), *Pleurotus cornucopiae* 1.79% (Lee 등, 1986)이었다. 담자균류에서는 아직 효율적인 농화법에 의한 돌연변이주 선발에 대한 연구가 거의 없고 주로 효모에서 돌연변이 유도 시 농화법을 적용하고 있다. 사상균류에서는 *Trichoderma*에서 Park 등(1989)이 여과법을 사용하여 18.8배의 수득율을 높였으며, *Penicillium chrysogenum*에서 Prakashi 등(1972)이 sodium pentachlorophenate를 사용하여 10.2배의 수득율을 높인 바 있다. 본 실험에서 자외선을 조사하여 얻은 총 4023개의 돌연변이중 많은 균주가 독립영양형으로 되돌아가는 돌연변이로써, 이를 보완하기 위해 EtBr를 사용한 농화법을 적용하여 균주를 선발하였다.

약제내성 균주의 선발을 위한 전제조건으로 각 항진균제에 의한 성장 억제 정도를 조사하였다. 일반적으로 단세포인 세균류는 항생제에 감수성을 지니 비교적 다양하고 안정한 표지를 지닌 약제내성 돌연변이주의 선발이 용이한 데 비하여 담자균류는 대부분 항생제에 내성을 지니고 있다. 본 실험에 사용한 약제인 cycloheximide는 진균류의 단백질 합성을 억제하여 G1 phase의 기간을 연장하는 약물로 *S. cerevisiae*에 사용시 MIC는 1 µg/ml이며 돌연변이의 70%가 temperature sensitive mutant 임이 보고되었다(McCusker and Harber, 1988). Benomyl은 진균류의 염색체 이상을 유발하는 약물로 *C. albicans*의 경우 MIC는 500 µg/ml 이었고, *N. crassa*의 경우는 350 µg/ml이었다 (Gil 등, 1988; That 등, 1988). Benomyl을 처리한 경우는 형태가 변화된 돌연변이주는 발견되지만 다른 종류의 돌연변이(auxotrophs, conditional lethal)는 아직까지 발견되지 않았다.

본 실험에서 cycloheximide는 2.0 µg/ml 농도에서 성장을 100% 억제하였으며, benomyl은 1 mg/ml에서 54%, 2 mg/ml에서 성장을 100% 억제하였다. *p*-fluorophenylalanine은 500 µg/ml에서 92%, 1000 µg/ml에서 100% 억제하였으나, *p*-fluorotryptophane은 200 µg/ml 농도에서도 성장억제 효과가 전혀 없었다. 자외선 조사후 MIC 농도의 약물처리로 1000 µg/ml *p*-fluorophenylalanine 에 내성인 균주 5종과 benomyl 1000 µg/

ml 함유 배지에서 자라는 돌연변이주 8종을 선발하였다.

적 요

맛과 향이 탁월하며 항암작용을 지닌 표고버섯 *Lentinus edodes*의 균사체 균질액에 자외선을 조사하여 돌연변이주를 유도, 선발하였다. 자외선 조사시 생존율은 3분 조사시 2.45%, 10분 조사시 0.024%이었다. 자외선 조사에 의한 돌연변이주 선발율은 0.40%이며, ethidium bromide (EtBr) 농화법에 의해 glycerol 함유 배지에서 자라지 못하는 균주 34종을 선발하였다. 독립영양형으로 되돌아가는 비율은 $4.81 \times 10^{-4} \sim 8.46 \times 10^{-4}$ 이었다. 돌연변이주의 영양요구성을 검정하여 다양한 amino acid, nucleic acid, vitamin 요구성 균주를 선발하였다. 항진균성 약물의 MIC는 cycloheximide 2.0 µg/ml, *p*-fluorophenylalanine 1000 µg/ml, benomyl 2000 µg/ml이었다. *p*-fluorophenylalanine 1000 µg/ml에 내성 균주 5종과 benomyl 1000 µg/ml에 내성인 균주 8종을 선발하였다.

감사의 글

이 논문의 연구비의 일부는 서울대학교 신의약품 개발연구센터(KOSEF-RCNDD)의 연구비로 충당되었음.

참고문헌

- Beadle, G. W. and Tatum, E. L. 1941. Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. P.N.A.S. USA 27: 499-506.
- Beadle, G. W. and Tatum, E. L. 1945. *Neurospora* II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Am. J. Bot.* 32: 678-686.
- Burnett, J. H. 1975. *Mycogenetics: An Introduction to the General Genetics of Fungi*. John Wiley & Sons, New York.
- Chihara, G., Hamuro, T., Maeda, Y. Y., Arai,

- Y. and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.
- Chung, K. S., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1984. Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XLI): An antitumor fraction from the culture filtrate of *Lentinus edodes* DMC-7. *Kor. J. Mycol.* **12**: 129-132.
- Fincham, J. R. S., Day, P. R. and Radford, A. 1979. *Fungal Genetics*. Blackwell Scientific Publications, London. p. 636.
- Fujii, T., Maeda, H., Suzuki, F. and Ishhida, N. 1978. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from cultured mycelia of *Lentinus edodes*. *J. Antibiotics* **31**: 1080-1090.
- Gil, C., Pomes, K. and Nombela, C. 1988. A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1587-1595.
- Hamlyn, P. F. 1982. Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. Ph. D. Thesis. Nottingham Univ. England.
- Hamuro, J., Rollinghoff, M. and Wagner, H. 1980. Induction of cytotoxic peritoneal exudate cells by T-cell immune adjuvants of the (1-3) glucan-type lentinan and analogues. *Immunol.* **39**: 551.
- Hollyday, R. 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. *Nature* **178**: 987.
- Kim, B. K., Park, E. K. and Shin, M. J. 1979. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (XXIII). Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 145-151.
- Lee, Y. H., Park, Y. H., Yoo, Y. B. and Min, K. H. 1986. Isolation of auxotrophic mutants from basidiospores of *Pleurotus cornucopiae*. *Kor. J. Mycol.* **14**: 185-188.
- Maeda, Y. Y. and Chihara, G. 1971. Lentinan, a new immuno-accelerator of cell mediated responses. *Nature* **229**: 634.
- McCusker, J. H. and Haber, J. E. 1988. Cyclohexamide-resistant temperature-sensitive lethal mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **119**: 303-315.
- Mizoguchi, Y., Ikemoto, Y. and Yamamoto, S. 1984. Studies on *Lentinus edodes* mycelia (LEM) in liver disease- (1) Inhibition of immunological liver cell injury by LEM, (2) Effects on antibody production. *Presented at the 12th International Congress of Gastroenterology*. Lisbon, Portugal.
- Park, D. W., Shim, M. J. and Kim, B. K. 1979. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (XVII). Production of antineoplastic components by submerged culture of *Lentinus edodes*. *Seoul Univ. J. Pharm. Sci.* **4**: 19-30.
- Park, E. K., Choi, E. C. and Kim, B. K. 1979. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (XXIV). Chemical analysis of antineoplastic components of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edode*. *Arch. Pharm. Res.* **2**: 153-157.
- Park, H. M. and Hong, S. W. 1989. Analysis of intraspecific protoplast fusion products in *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 98-107.
- Park, Y. D., Yoo, Y. B., Cha, D. Y., Chang, M. W. and Lee, J. S. 1987. Isolation of auxotrophic mutants in *Ganoderma applanatum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 230-233.
- Prakash, S. M., Marc, P. K. and Arnold, L. D. 1972. Mutagenesis and enrichment of auxotrophs in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **24**: 995-996.
- Raper, C. A. 1979. Control of Development by the Incompatibility System in Basidiomycetes. pg 3-28 In: Schwalb, M. N. and Miles Eds. *Genetics and Mor-*

- phogenesis in the Basidiomycetes. P. G., Academic Press, New York.
- Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., Suzuki, K., Mitsuya, H. and Toda, S. 1989. Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1**: 367-373.
- That, T. C., Rossier, C., Barja, F., Turian, G. and Roos, U. P. 1988. Induction of multiple germ tubes in *Neurospora crassa* by antitubulin agents. *Eur. J. Cell. Biol.* **46**: 68-79.
- Um, S. D., Chae, Y. A., and Park, Y. H. and Yoo, Y. B. 1988. Studies on auxotroph induction of *Ganoderma lucidum* and interspecific protoplast fusion between *G. lucidum* and *G. applanatum*. *Kor. J. Mycol.* **16**: 16-20.
- Ushiyama, R., Nakai, Y. and Ikegami, M. 1977. Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes*. *Virology* **77**: 880-883.
- Yoo, Y. B., You, C. H. and Park, Y. H. 1985. Isolation of auxotrophic mutant from basidiospores of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* **13**: 185-189.
- Yoon, Y. 1985. Protoplast formation and fusion in *Lentinus edodes*. M.S. Thesis, Seoul Natl. Univ.