

한국산 느타리버섯(*Pleurotus* spp.)의 전기영동 Isozyme Band Pattern 비교 - I. Homogeneous Gel -

박용환·변명옥·藤井溥*

농촌진흥청 농업기술연구소·*일본 동경농업대학 농학과

Comparison of Electrophoretic Isozyme Band Pattern of *Pleurotus* spp. in Korea

- I. Homogeneous Gel -

Yong-Hwan Park, Myung-Ok Byun and Fujii Hiroshi*

Applied Mycology and Mushroom Division, Agricultural Sciences Institute, R.D.A. Suweon 440-707, Korea and *Department of Agronomy, Tokyo University of Agriculture, Japan

ABSTRACT: Electrophoretic isozyme patterns from mycelia, primordia, cap and stem of *Pleurotus* spp. collected in Korea were compared. Primordia, cap and stem of fruitbody showed very similar isozyme patterns but mycelial isozyme patterns were different from those of fruitbody. Isozyme patterns of malate dehydrogenase, acid phosphatase in *Pleurotus ostreatus* collected from different regions in Korea were similar but those of esterase, peroxidase, leucine amino peptidase and superoxide dismutase were different. Interspecific comparison of esterase isozyme patterns among *Pleurotus ostreatus*, *P. cornucopiae* and *P. florida* was very different and may be valuable subsidiary tool to conventional taxonomic techniques for identifying species of *Pleurotus*. A dendrogram by similarities of isozyme band pattern was presented.

KEYWORDS: *Pleurotus* spp. Isozyme pattern, dendrogram.

느타리버섯(*Pleurotus* spp)은 맛과 향기가 좋고 lignocellulose 기질에서 생육이 가능하여 원목, 톱밥, 벗짚 등 농림부산물물을 이용한 재배법이 개발되어 한국에서는 가장 많이 재배되고 있는 버섯이다.

느타리버섯의 유전 및 육종 연구도 활발하여 이들 계통간의 교배, 세포융합 등 방법이 수행되고 있으나 최근 유전자 조작연구 등의 방법적용을 위해서는 좀 더 유전학적 생화학적 연구가 진척되어야 한다.

느타리버섯의 분류는 자실체 형태, 색깔, 기주 친화력, 포자문의 색, 생육온도 등 그 기준이 다양하므로 이들 종의 분류에 관해서는 논쟁이 빈번하다(Eger; 1978). 따라서 느타리버섯 분류에는 형태적 특성, 생리적 특성 외에 생화학적 특성이 조사되면 도움이 될 것이라 본다.

버섯류에서 전기영동 연구로는 Wang과 Raper

(1969)가 치마버섯의 1핵과 2핵 균사에서 단백질 패턴을 조사하고, Royse(1982), May(1982) 등은 양송이와 들버섯에서 유전적 유연관계나 Cell line 확증을 결정하기 위해 동위효소 패턴을 조사하였다. Shannon(1969) 등은 *Polyporus*의 종의 분류에, Park(1986) 등은 영지버섯의 균주간 비교를 위해 동위효소 패턴을 이용하였다.

본 시험은 한국에 자생하고 있는 느타리버섯을 지역별로 수집하여 전기영동 패턴을 비교하고 유전 및 종의 분화 연구에 기초자료를 얻고자 실시하였다.

材料 및 方法

균주

균주는 국내 자생 *P. ostreatus* 8, *P. cornucopiae* 1 균주와 독일에서 입수된 *P. florida* 1 균주이며 균주

Table I. Speices and isolates of *Pleurotus* spp. used in the experiment.

Species with isolates No.	Collection area	Habitat	Cap		Spore print color
			color	shape	
<i>P. ostreatus</i>					
K-101	Injai, Gangweon Prov.	<i>Populus tremuloides</i>	pale yellow	kidney	white-ivory
K-104	Mooju, Chungbuk Prov.	<i>Fraxinus rhynche phylla</i>	light grey	kidney	"
K-105	Weonju, Gangweon Prov.	<i>Morus alba</i>	"	"	white
K-106	Seoul City	<i>Populus deltoide</i>	"	funnel	"
K-107	Suweon, Gyeonggi Prov.	"	grey	umbilicate	"
K-110	Goaisan, Chungbuk Prov.	"	light grey	kidney	pink to ivory
K-112	Gongju, Chungnam Prov.	" "	"	funnel	light pink
K-118	Pusan City	"	"	button	white
<i>P. cornucopiae</i>					
C-201	Chuncheon, Gangweon Prov.	<i>Morus alba</i>	pale yellow	funnel	ivory
<i>P. florida</i>					
F-301	Institute fur Bodenbiogie		white	kidney	"

별 특성은 Table I 과 같다.

시료 추출

균사는 Mushroom Complete Medium (MCM) 배지 (Dextrose 20g, Peptone 2g, Yeast extract 2g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1.0g, 증류수 1000 ml) 50 ml에 15일간 배양한 시료를 1차 buchner funnel (Whatmann No. 2)에 걸른 후 증류수로 세척하였다. 자실체 발생은 포플러 톱밥 80%, 미강 20%을 혼합하여 수분을 65%로 조절 후 1l 광구병에 담아 배지의 가운데에 직경 10 mm 구멍을 뚫고 뚜껑을 막은 후 1.2kg/cm² 압력으로 90분간 고압살균을 하였으며, 공시 균주를 접종하여 25°C에서 25일간 배양하였다. 균사가 완전히 자란 다음 뚜껑을 열어 접종원을 제거하고, *Pleurotus ostreatus*와 *P. florida*의 경우는 온도 17°C, 상대습도 95%, *P. cornucopiae*는 23°C, 95% 상대습도로 조절한 발이 유기질에서 버섯발생을 유도하였다. 발이된 버섯의 갓 직경이 3 mm 정도 크기를 Primordia로 정하여 채취하고, 성숙한 자실체는 갓 직경 40 mm-60 mm 크기 버섯을 채취하여 줄기 부분과 갓 부분으로 분리한 후 시료로 사용하였다. 시료는 10g을 평량하여 0.1 M Tris-HCl Buffer (pH 7.5)를 10 ml 첨가하고 0°C의 유발에서 곱게 마쇄한 후 고속냉동 원심분리기 (12000g)에서 4°C로 30분간 원심분리 후 상등액을 전기영동의 시료로 사용하였다.

단백질 정량

Alkali soluble protein은 Lowry법 (1951)에 의하여 정량하였다.

전기영동

전기영동은 수직형 전기영동 (한국맨허턴) 장치를 이용해서 acrylamide vertical slab gel로 Hoefer 방법에 따라 수행하였다. Separating gel은 Tris Buffer (237 mM Tris), 0.072 N HCl, pH 8.48)에 10% T, 5% C 농도로 acrylamide와 bisacrylamide를 첨가하고 Ammonium Persulfate, TEMED를 적당량 첨가하여 사용하였다. Stacking gel은 Tris buffer (39.5 mM Tris, 0.064 N H₃PO₄, pH 6.9)에 3.125% T, 20% C 농도로 acrylamide gel을 제조하고 riboflavin, TEMED를 넣어 광을 조사하여 gel을 만들었다. Buffer는 discontinuous 시스템으로 하부탱크는 63 mM Tris, 50 mM HCl pH 7.47 Buffer, 상부탱크는 37.6 mM Tris, 40 mM glycine pH 8.89 Buffer를 사용하였으며, 추출 시료 50 µl를 20 µl sucrose dye 용액 (0.1% bromophenol, 5% sucrose)과 혼합하여 전기영동하였다. 전기영동은 5°C에서 실시하였으며 tracking dye가 stacking gel을 통과할 때까지 일정 전류로 80V (20 mA/13 cm gel)로 조절하고 separating gel에서는 120V (50 mA/13 cm gel)로 조절하였으며, tracking dye가 gel 하부에서 1cm 부분에 도달하였

을 때 종료한 후 gel을 꺼내 염색하여 밴드를 조사하였다.

염색법

gel 염색에 사용된 시약중 특별히 언급되지 않은 것은 Sigma 제품을 사용하였고 염색후에는 5% acetic acid에 보관하여 고정시켰다.

(1) Esterase(E. C. 3, 1, 1, 1)

전기영동 후 gel을 0.2 M Phosphate buffer(pH 6.5)에 3회 교환하여 gel의 산도를 조정하였다. 35°C의 발색액(α -naphthylacetate 20 mg, Ethylene glycol monomethyl Ether 2 ml, Fast blue RR salt 20 mg, 0.2 M Phosphate buffer(pH 6.5) 120 ml)에 침적하여 암상태에서 50 rpm으로 흔들어 밴드가 선명할 때까지 약 30분간 발색시켰다(Kahler; 1970).

(2) Peroxidase(E. C. 1, 11, 1, 7)

Peroxidase의 발색시약은 Benzidine 1g, 초산 9 ml, 증류수 40 ml를 혼합하여 Benzidine 용액을 혼합제조하고 Benzidine 용액, 0.03% H₂O₂, 증류수를 1:1:4의 비율로 혼합 조절하였다. 밴드의 발생은 암흑 상태로 용액의 밴드가 나타날 때까지 침적하였다.

(3) Acid Phosphatase(ACP): Orthophosphoric monoester Phosphohydrolase(E. C. 3, 1, 3, 2)

Acid Phosphatase의 발색은 전기영동한 gel을 0.1 M Acetate Buffer(pH 5.2)에 약 30분간 침적하여 gel내의 산도를 조절한 후 발색용액에 gel을 넣어 약 30분간 37°C로 발색시켰다. 발색시약은 α -naphthyl Phosphate 80 mg, β -naphthyl Phosphate 40 mg, Fast garmet GBC-salt 70 mg, 10% MgCl₂ 용액 6 ml를 0.1 M Acetate Buffer(pH 5.2) 100 ml에 용해시켰다.

(4) Leucine Amino Peptidase(L. A. P)(E. C. 3, 4, 11, 1)

Gel을 발색액(120 ml Tris-malate Buffer(pH 5.4), 50 ml 증류수, 15 mg fast Black K salt, 20 mg L-leucyl- β -naphthyl amide HCl)에 침적하여 30분간 어두운 곳에서 발색하였다(Second; 1980).

(5) Superoxide Dismutase(SOD)(E. C. 1, 15, 1, 1)

Superoxide Dismutase(SOD) 발색법은 Tanksley 방법을 변형하여 사용하였다. gel은 A용액(0.05 M Tris HCl Buffer(pH 7.5) 100 ml, 0.1 M KCN 0.4 ml, MTT 10 mg, PMS 10 mg)에 넣어 37°C에서

암상태로 30분간 처리한 후 A용액을 버리고 B용액(0.05 M Tris HCl pH 7.5 100 ml, Riboflavin 1 mg, TEMED 0.4 ml)을 가하여 30분간 광을 조사하여 밴드가 나타나도록 하였다(Tanksley; 1983).

(6) Malate Dehydrogenase(MDH)(E. C. 1, 1, 1, 37)

Malate Dehydrogenase는 Harris와 Hopkinson(1976) 등의 방법을 변형하여 전기영동한 gel을 0.1 M Tris HCl(pH 8.0) Buffer에 D. L-maleic acid 0.7g, 0.1 M KCN 0.4 ml, 0.01 M NAD 1 ml, PMS 1.6 mg, MTT 50 mg을 가한 발색액에 30분간 암상태로 침적하여 발색시켰다.

유사도 지수

동위효소 band patterns에 의해 Stout(1974)의 방식으로 동일농도 전기영동에 의하여 조사된 모든 효소 밴드수를 총집계하여 계산하였으며 동일밴드 수/총밴드수×100(%)으로 유연관계를 구하였다. Dendrogram은 단일연관법(single linkage method)에 의한 clustering에 의하여 작성하였다.

結果 및 考察

느타리버섯의 균사체와 자실체 부위별로 Protein 양을 비교해 본 결과 *P. ostreatus* 균주간 다소의 차이는 있었으나 대체로 *P. cornucopiae*가 많았으며 균사체와 자실체를 비교할 때 균사체보다 자실체의 단백질 함량이 높았고, 자실체의 경우는 K 101, K 104, K 106은 갓 부분에서 단백질 함량이 가장 높았으며, K 105, K 107, K 110, K 112, K 118, C 201, F 301 등 대부분의 균주에서는 primordia에서 단백질 함량이 높았다(Table II).

(1) Esterase

Esterase의 Isozyme은 느타리버섯에서 총 14개의 밴드가 나타났고 밴드별로 비교해 보면 *P. ostreatus*에서는 E1,2,4,5,7,9 밴드가 모두 형성되었고 E13과 E14는 밴드 이동속도가 약간의 차이가 있었으며 K101, K107, K110, K118 균주는 그 밴드중 각 1개씩만 형성하여 *P. ostreatus* 내에서도 많은 차이가 있었다. *P. cornucopiae*(균주 C 201)는 *P. ostreatus*와 달리 E3, E6, E8, E11, E12 밴드가 형성되고 *P. florida*(균주 F 301)는 E3, E10, E11 밴드를 추가로 형성하여 중간에 Esterase 밴드에는 뚜렷한 차이가 있었다(Fig. 1).

Table II. Alkali soluble protein content in different organs of *Pleurotus* spp..

Strain Nb.	Mycelia	Primordia	Cap	Stem
K101	10.8*	10.2	15.0	14.0
K104	4.8	4.8	16.2	16.0
K105	6.6	21.0	13.8	12.6
K106	6.6	7.8	16.2	15.0
K107	1.2	19.2	15.0	14.0
K110	0.6	22.2	15.0	13.8
K112	12.6	23.4	12.6	12.6
K118	1.8	18.6	16.2	13.2
C201	11.4	23.4	21.0	27.0
F301	6.6	21.0	19.8	13.2
Mean	6.3	17.2	16.1	15.1

*mg/g

(2) Peroxidase

Peroxidase에서는 7개의 band가 형성되었다. 그 중 *P. cornucopiae*는 Pe5 밴드만, *P. florida*는 Pe1과 Pe6 밴드를 형성하였고 *P. ostreatus*는 Pe1, Pe3, Pe7은 모두 형성하였으나 Pe4는 K105를 제외한 모든 균주가, Pe2는 K107, K110, K112, K118 균주만 형성하였다(Fig. 1).

(3) Acid Phosphatase

Acid phosphatase에서는 총 3개의 밴드가 형성되었는데 *P. ostreatus*는 Ph1 밴드를 모두 나타냈고, *P. cornucopiae*는 Ph2 밴드를, *P. florida*는 Ph1, Ph3, 밴드를 나타내 종간의 차이는 있었으나 *P. ostreatus* 종내는 모두 유사한 밴드 패턴을 나타냈다(Fig. 1).

(4) Leucine Amino Peptidase

자실체의 Leucine amino peptidase는 5개 밴드를 형성하였으며, 모든 균주가 L1, L4, 밴드를 형성하였다. 균주별에서는 2개 밴드 외에 *P. cornucopiae* (C201)는 L2, L3, L5 밴드를 형성하고 *P. florida* (F301)은 L2, L3 밴드를 더 형성하였다. *P. ostreatus*중 K105를 제외한 모든 균주가 L5 밴드를 형성하였고 K105, K106, K110은 L3 밴드를 추가로 형성하여 Leucine amino peptidase는 종간 뿐 아니라 종내에서도 차이가 큼을 알 수 있었다(Fig. 1).

(5) Superoxide Dismutase

Superoxide Dismutase는 Negative staining으로

SOD activity가 있는 부분을 제외하고 gel이 푸르게 변한다. *P. ostreatus*는 main band가 *P. florida*와 동일 위치에 모두 형성되었으나 *P. cornucopiae*는 다른 위치에 형성하였으며, *P. ostreatus* 내에서도 K106, K107은 특히 S3 밴드를 형성하였다(Fig. 1).

(6) Malate Dehydrogenase

Malate Dehydrogenase에서는 자실체에서만 분자량이 큰 1개의 밴드 M1만 형성하였다(Fig. 1).

(7) 생육 부위별 Esterase 비교

균사체와 자실체의 primordia, 갓, 줄기 부위를 동시에 밴드를 비교한 결과 균사 밴드는 같은 크기의 Well에 같은 양의 시료를 loading 하였으나 separation시 자실체의 밴드에 비해 주 밴드만 좁게 밴드를 형성하였으며, 자실체 부위별로 볼 때 primordia, 갓, 줄기는 모두 동일하게 밴드를 형성하여 자실체 부위별 비교는 할 수 없었으나 균사와 자실체는 차이가 있었다(Fig. 2, 3, 4, 5).

전기영동에 의한 균주의 분류는 형태적이나 배양적 특성에 의한 분류외에 생화학적으로 비교하기 위해 여러 분야에서 실시되었으며(Gill; 1978), 버섯류에서는 최근 균주간의 근연관계를 찾기 위해 전기영동을 이용한 방법이 연구되고 있다(May; 1981). 국내에서 자생하는 느타리버섯을 자생지별로 종의 분화를 연구하고 *P. ostreatus*와 *P. cornucopiae*, *P. florida*의 전기영동에 의한 isozyme band pattern을 비교하고자 esterase, peroxidase, acid phosphatase, leucine amino peptidase, malate dehydrogenase, superoxide dismutase를 비교하고 균사체, 자실체, 부위별로 isozyme band pattern의 차이를 보기 위해 esterase 밴드를 부위별로 비교하였다. 느타리버섯의 균사와 자실체의 부위별로 단백질 함량을 비교해본 결과 대체로 균사체에 비해 자실체가 높았고 자실체 중에서도 K101, K104, K106은 갓 부분이 높았으나 그의 대부분의 균주가 primordia에서 가장 높아 primordia 형성시 빠른 단백질 합성이 이루어진다는 보고와 일치하였다(Wang 등; 1969). 자실체 부위별로 볼 때 성숙된 자실체중 갓이 줄기보다 *P. cornucopiae*(201)를 제외한 모든 균주가 단백질 함량이 높아 양송이에서 갓이 줄기보다 단백질 함량이 높았다고 한 보고와 유사하였다(Paranjpe; 1979). 생육 stage별로 Esterase isozyme을 비교한 결과 자실체의 주요 밴드는 primordia나 줄기, 갓 부분에서 모두 유사한 pattern을 나타내고 균사의

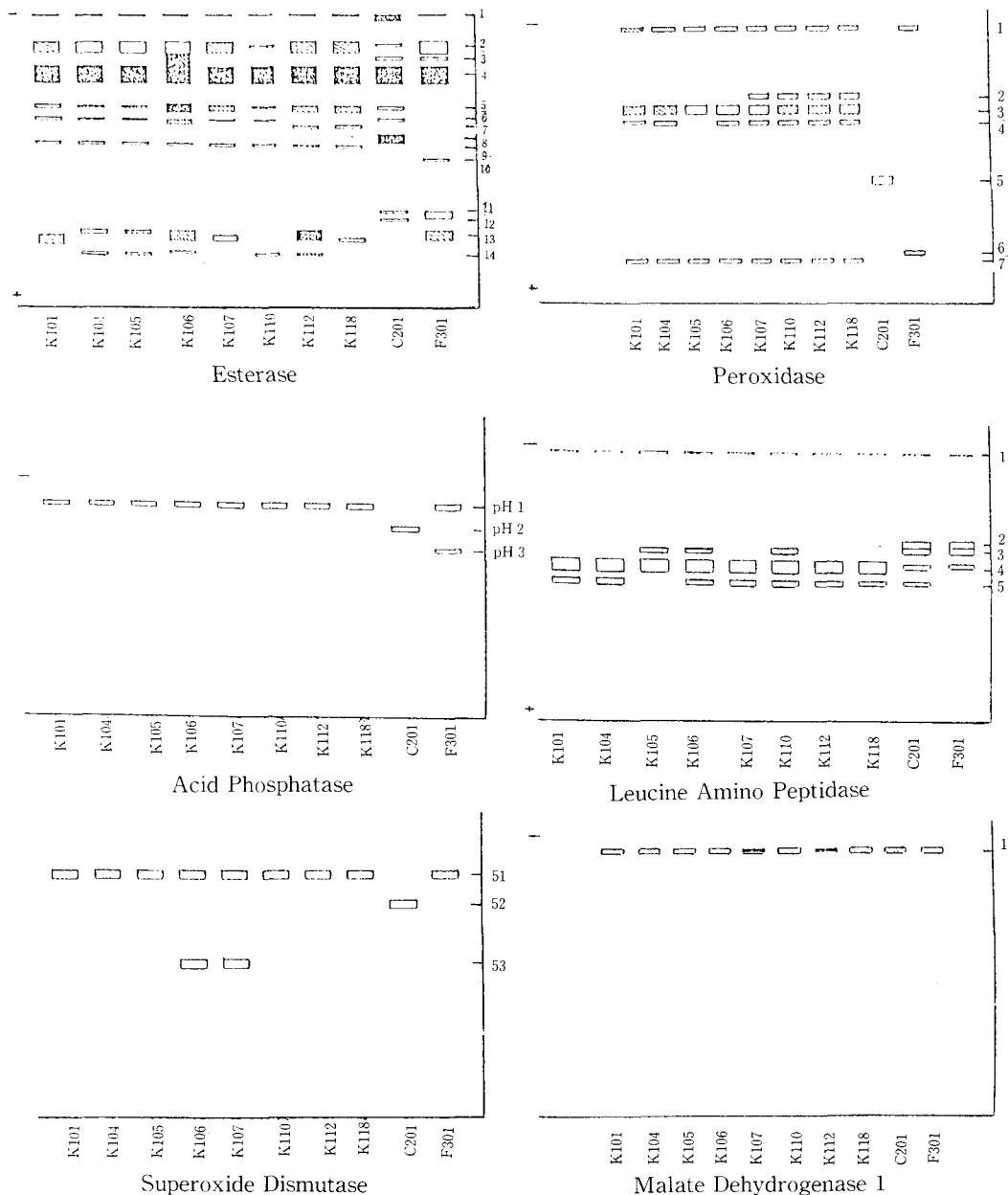


Fig.1. Isozyme patterns of *Pleurotus* spp.

isozyme 밴드와는 차이가 있었는데 이 결과는 Paranje(1979)의 양송이 생육시기별로 polyacrylamide gel을 이용한 전기영동 결과 값, 줄기 primordia의 cytochrome oxidase의 isozyme band pattern이 유사하나 균사체에서는 자실체에 비해 2개의 band가 없었다는 보고와 일치하였다. 사용한 모든 효소의 밴드 패턴을 쉽게 비교하기 위하여 동

일 농도 전기영동 방법을 이용한 Esterase, Peroxidase, Acid Phosphatase, Leucine amino peptidase, Malate Dehydrogenase, Superoxide dismatase 유사도로서 비교하였다. *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. florida* 간에서 종이 같은 균주가 종이 다른 균주에 비해 밴드 패턴에서 더 유사도가 높은 것으로 나타나 느타리버섯의 일반적인 분류와 일치하였으며, 이

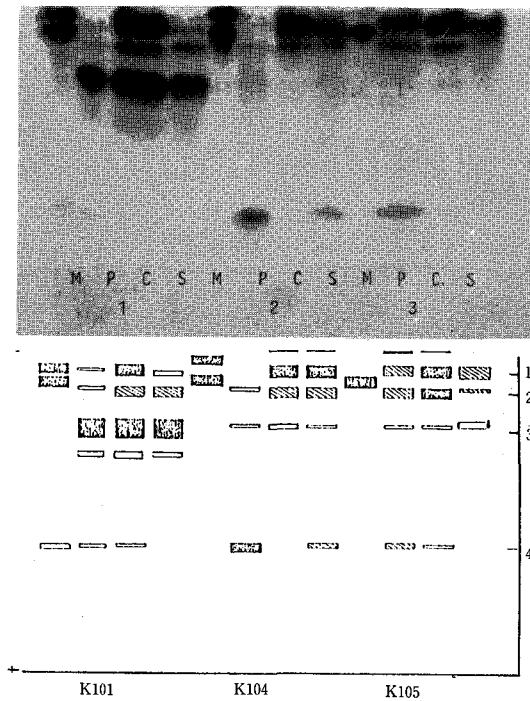


Fig. 2. Isozyme patterns of Esterase in mycelium, primordia, cap and stem of *Pleurotus* spp. M: Mycelia, P:Primordia, C:Cap and S:Stem.

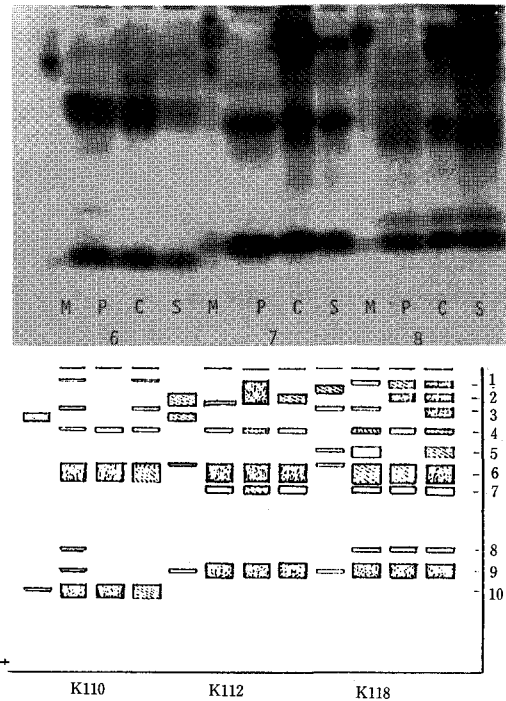


Fig. 4. Isozyme patterns of Esterase in mycelium, primordia, cap and stem of *Pleurotus* spp.

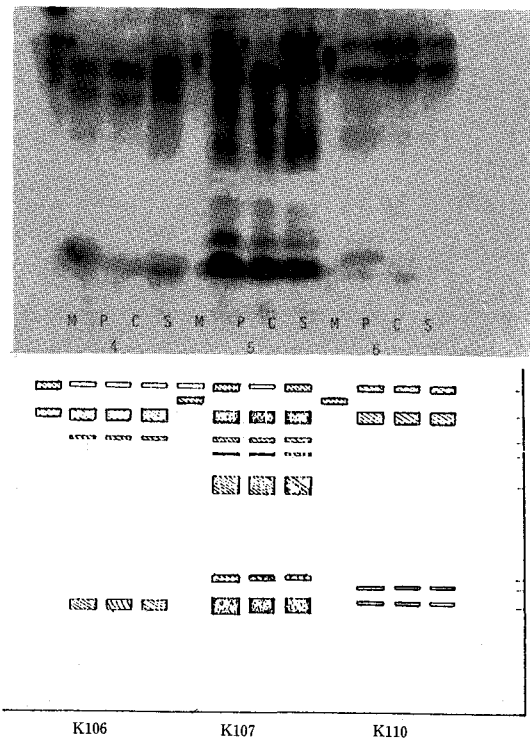


Fig. 3. Isozyme patterns of Esterase in mycelium, primordia, cap and stem of *Pleurotus* spp.

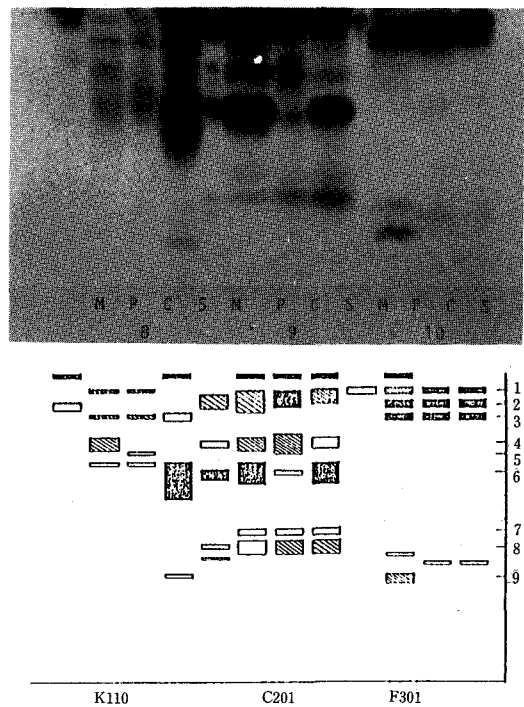


Fig. 5. Isozyme patterns of Esterase in mycelium, primordia, cap and stem of *Pleurotus* spp.

Table III. Similarity among isolates of *Pleurotus* spp.

Isolates No.	K101	K104	K105	K106	K107	K110	K112	K118	C201	F301
K101		94.4	78.9	85.0	89.5	80.0	89.5	94.4	25.0	41.7
K104			84.2	90.0	85.0	85.0	94.7	89.5	25.0	40.0
K105				85.0	71.4	80.0	80.0	75.0	25.9	47.8
K106					85.7	85.7	85.7	81.0	27.6	42.3
K107						81.0	90.0	94.7	24.1	38.5
K110							90.0	85.0	28.6	38.5
K112								94.7	24.1	38.5
K118									25.0	40.0
C201										36.0
F301										

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

* Used isozyme: Esterase, Peroxidase, Acid Phosphatase, Leucine Amino Peptidase, Malate Dehydrogenase, Superoxide Dismutase.

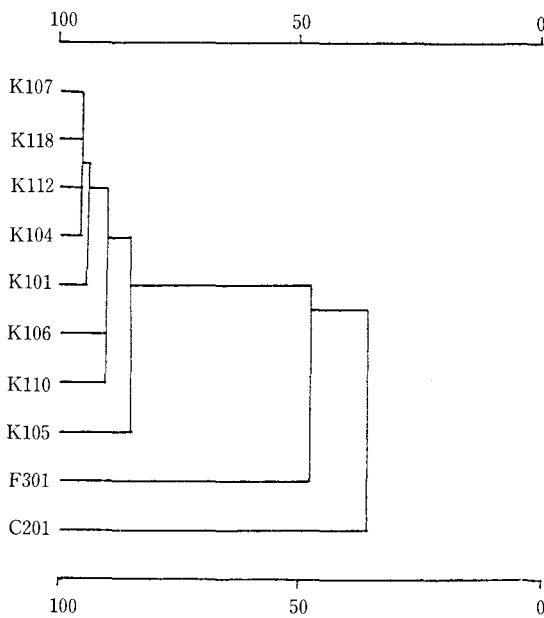


Fig.6. Genetic similarity dendrogram based on isozyme variation at 6 isozymes for 10 *Pleurotus* spp.

결과는 polyporus의 전기영동 밴드 패턴이 종내 비교가 종간 비교보다 더 유사성이 높았던 결과 (Shannon ; 1973)와도 일치하여 전기영동에 의한 isozyme band 패턴 비교는 기존 분류 방법에 유용한 보조 수단으로 이용될 수 있다고 본다. P.

ostreatus 종내에서 밴드 패턴은 *Malate Dehydrogenase*, *Acid Phosphatase* 등에서는 매우 유사하게 나타났으며 *Esterase*, *Peroxidase*, *Leucine amino peptidase*, *Superoxide Dismutase*의 주요 밴드는 동일하게 나타났으나 일부 밴드가 첨가되거나 소실되는 등 변화가 있었다. 유사도 비교에서 K 101과 K 104, K 107, K 112, K 118은 매우 유사성이 높았고 K 106, K 110은 유사성이 약간 낮았으며 특히 기주가 특이했던 K 105가 가장 낮았다(Fig. 6).

이와 같이 수집한 균주의 종내의 차이는 지리적인 환경변이와 유전적 변이에 의해 형태적 생리적 특성 변화를 초래하여 결국 isozyme 패턴에 차이가 있었던 것으로 보여진다.

摘 要

한국산 느타리버섯 균주의 균사, Primordia, 갓, 줄기의 전기영동 isozyme 패턴을 비교한 결과 자실체중 Primordia, 갓, 줄기의 패턴은 모두 아주 유사하였으나 균사의 패턴은 자실체의 것과 많은 차이가 있었다.

자생지역이 다른 한국산 *Pleurotus ostreatus*의 전기영동 isozyme 패턴중 *Malate Dehydrogenase*, *Acid phosphatase*는 유사하였으나 *Esterase*, *Peroxidase*, *Leucine amino peptidase*, *Superoxide Dismutase*의 패턴은 차이가 있었다. *Pleurotus*

ostreatus, *P. cornucopiae*, *P. florida*의 중간 Esterase 밴드 패턴은 많은 차이가 있어 전기영동에 의한 느타리버섯 종의 구별이 가능하였다.

參考文獻

- Eger, G.(1978):Biology and breeding of *Pleurotus*. The biology and cultivation of edible mushrooms edited by S.T. Chang and W.A. Hayes: 497-519.
- Gill, H.S. and Zentymen, G.A.(1978): Identifications of *phytophthora* species by disc electrophoresis. *Phytopathology* **60**: 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.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A.(1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics, published by north holland publishing company.
- Kabler, A.I., and Allard, R.W.(1970): Genetics of isozyme variant in barley. I. Esterase. *Crop Science* **10**: 444-448.
- May, B. and Royse, D.J.(1981): Application of the electrophoretic methodology to the elucidation of genetic life histories of edible mushrooms. *Mushroom Science* **11**: 799-817.
- Paranjpe, M.S., Chen, P.K. and Jong, S.C.(1979): Morphogenesis of *Agaricus bisporus*, Changes in proteins and enzyme activity. *Mycologia* **71**: 469-478.
- 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. *Korean Journal of Mycology* **14**(2): 93-99.
- Royse, D.J. and May, B.(1982): Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* **74**(1): 93-102.
- Second, G. and Trouslot, P.(1980):Electrophorese d' enzymes de riz(*oryza* Sp).
- Shannon, M.C., Ballal, S.K. and Harris, J.W.(1973): Starch gel electrophoresis of enzyme from nine species of Polyporus. *Amer., J. Bot.* **60**(1): 96-100.
- Tanksley, D.S. and Orton, T.J.(1983): Isozymes in plant genetics and breeding part A. : 493.
- Wang, C.S. and Raper, J.R.(1969): Protein specificity and sexual morphogenesis in *Schizophyllum commune*. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **66**: 882-889.

Accepted for Publication 20 June