

미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 진흙버섯류의 계통분류

정원진 · 정학성*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 분자미생물학연구센터

진흙버섯속 (*Phellinus*)에 속하는 6종 10균주에 대하여 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 제한효소 분석법에 의한 계통분류를 수행하였다. 도합 6가지의 제한효소를 이용하여 전체 절편중 공통된 절편의 양상을 비교하고 이로부터 염기치환율을 구하였으며 이 치환율을 균주간의 진화거리로 계산하여 PHYLIP package의 UPGMA 방법에 의한 계통도를 얻었다. 그 결과 *P. laevigatus*의 두 균주는 기존의 형태학적 분류결과와 잘 일치하였다. *P. igniarius*는 다른 어느 균주보다 *P. laevigatus*의 두 균주와 가까운 유연관계를 보여주었다. *P. chrysoloma*의 두 균주는 서로 먼 거리를 유지하고 있으나 같은 유연관계를 보여 주었다. *P. linteus* Hansin은 다른 종 뿐만 아니라 동일종의 균주와도 먼 거리에 위치하였으며 본 실험에서는 동일종의 균류인 L13202 균주와 가깝게 나타났다. 또한 본 연구에서 분석된 종들은 미토콘드리아 DNA의 크기가 80~100 kb로 추정되었으나 *P. linteus* Hansin은 그 크기가 40 kb로 추정되어 이 균주가 일찍이 분화되어 왔음을 시사하였다. *Phellinus*의 종들은 서로 일정한 진화거리를 유지하고 이들이 하나의 속으로 묶여지기에는 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며 종간의 변이 뿐만 아니라 종내의 변이도 심한 것으로 나타났다. 그러나 mtDNA를 이용한 제한효소 분석법은 속이하의 분류군에서도 유연관계를 잘 분석할 수 있다는 점에서 진흙버섯류에 대한 새로운 분류방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

KEY WORDS □ *Phellinus*, mtDNA, restriction enzyme analysis, RFLP, phylogeny

진흙 버섯류는 고등균류의 담자균아문, 균심강, 민주름버섯목, 소나무늪버섯과의 진흙버섯속 (*Phellinus*)으로 분류되는 종류로서 참나무, 상수리나무, 밤나무, 자작나무, 단풍나무, 아카시아, 버드나무, 벚나무, 오리나무 및 너도밤나무와 같은 활엽수와 소나무, 가문비나무 및 전나무와 같은 침엽수에 서식하며 살아 있는 나무나 생활력이 약해진 나무의 줄기나 뿌리, 죽은 나무의 기부, 또는 고목의 그루터기에 발생하여 수재부후 (sap rot)와 심재부후 (heart rot)를 일으키며 목재의 주성분인 섬유소와 리그닌을 분해하여 영양을 얻는 전형적인 백색부후균류 (white rot fungi)에 속하며 (1, 7) 중에 따라서는 산림에 막대한 피해를 주기도 한다 (6, 11). 이들 균류는 자연계에 가장 풍부하게 존재하는 유기물 탄소자원의 하나인 섬유소와 리그닌을 분해하는 능력이 크므로 산업적으로 이용 가치가 큰 종류이다.

진흙버섯류는 형태적으로나 현미경적으로나 모두 변이가 심하고 다양하여 종류가 많으며 자실체는 목재의 표면에 부착하여 평면상으로 자라거나 (resupinate) 종에 따라서는 갓을 이루어 (pileate) 입체상으로 자란다. 또한 자실체의 균사가 갈색 색소를 지니고 있어 갈색균류 (brown fungi)로 불리우며 소나무늪버섯과의 균류들이 지니는 독특한 화학적 성질의 하나로서 KOH 용액에 닿으면 영구적으로 검게 변하는 특성을 지니고 있어 손쉽게 확인할 수 있으나

형태의 다양성과 유사성으로 인하여 동정이 어려운 분류군이다. 형태분류학적으로는 전세계적으로 도합 154종 67변종 또는 품종이 보고되어 있으나 (10), 국내에서는 마른진흙버섯 (*P. gilvus*), 말뚝진흙버섯 (*P. igniarius*), 목질진흙버섯 (*P. linteus*) 및 찰진흙버섯 (*P. robustus*)의 4종이 보고되어 있다. 진흙버섯류는 형태와 색깔과 크기가 다양하고 변이가 심하여 학명정리와 형태분류상의 큰 문제점으로 지적되어 왔으며 (10) 전세계적으로는 통일된 분류 체계가 없어서 분화학적 특징을 이용한 배양분류나 분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류에 의거한 제 3의 분류방법이 요청되어 왔다.

핵과 독립적으로 존재하는 미토콘드리아 게놈은 rRNA, tRNA, cytochrome oxidase subunit, cytochrome b, ATPase subunit, NADH dehydrogenase complex subunit 등의 아주 제한된 유전자를 가지고 있으며 그 크기는 핵 DNA에 비해 매우 작고 많은 개수를 가지고 있어 실험실 분석에 좋은 재료로 평가되고 있다 (3). 미토콘드리아 DNA는 진화속도가 빠르고 간단한 분석방법 때문에 균류의 경우 속주에 따른 진화의 경로를 추적하거나 가까운 유연관계를 가지고 있는 종간의 계통관계를 추적하는데 널리 사용되고 있다 (4, 5). 특히 미토콘드리아의 DNA는 특정 염기를 인식하는 제한효소로 잘랐을 때 종 또는 균주마다 분별가능한 restriction fragment length poly-

morphism (RFLP)을 나타내는데 제한효소 분절양상의 유사성을 분석함으로써 진화과정에서 발생한 DNA 염기서열의 변화에 대한 계통학적인 정보를 얻을 수 있다(2, 14). 이에 본 연구에서는 진흙버섯류의 형태분류학상의 한계를 극복하고 미토콘드리아 게놈을 이용하여 제한효소 분절양상을 분류의 특성으로 하는 분자생물학적인 계통분류를 시도하였다.

재료 및 방법

균 주

본 연구를 위하여 계통분류에 사용할 기준종으로서 미국 Madison의 Center for Forest Mycology Research(CFMR)의 Nakasone 박사로부터 *P. laevigatus* FP-56498-T와 FP-125082-T, *P. igniarius* FP-125027-T 그리고 *P. chrysoloma* HHB-3585-Sp와 HHB-12766-T의 3종 5균주의 진흙버섯 균주를 분양받았다. 또한 경기도 소재 광릉 수목원에서 채집한 *P. ribis* SNU-930719-5와 *P. punctatus* SNU-930719-6의 2종 2균주와 대전 유전공학 연구소의 유익동 박사로 부터 분양받은 *P. linteus* L13202와 WD1222 및 Hansin의 1종 3균주를 실험 균주로 사용하였다(Table 1).

배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 조성의 일부를 바꾼 malt extract agar(2% malt extract, 0.5% peptone, 0.5% glucose, 2% agar)의 고체배지에 접종하여 24°C에서 배양하고 한 달 간격으로 계대배양을 하였다. 균주마다 성장속도에 차이가 있었으나 일일 평균 0.2~0.4 cm씩 자랐고 2주에서 4주간 배양한 배지의 균사체를 굵어 200 ml의 malt extract broth에 접종하여 culture seed로 사용하였다. 2주간 배양한 후 1 l의 액체배지에 재접종하여 다시 한 달간 배양한 균사체를 시료로 사용하였다.

전체 핵산의 분리

DNA 분리의 방법은 Raeder와 Broda의 방법을 변형하여 사용하였다(13). 배양한 균사체는 거즈로 거르고 20 mM EDTA 용액으로 세척하여 회수한 뒤

냉동건조를 하였다. 균사체 파쇄를 위하여 2g의 건조 균사체를 막자 사발에 넣어 유봉으로 갈고 20 ml의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]에 푼 뒤 phenol 14 ml/과 chloroform 6 ml/을 넣어 교반시키고 1시간 동안 원심분리한 뒤 (10,000×g) 상층을 회수하였다. 여기에 RNAase A (10 mg/ml) 500 µl를 첨가하여 RNA를 제거하고 다시 20 ml의 chloroform으로 추출한 뒤 0.54배의 isopropanol을 넣고 상온에서 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 씻어 전체 핵산을 분리하였다.

미토콘드리아 DNA의 분리

분리된 전체 핵산을 10 ml의 TE [Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM]에 녹이고 CsCl-bisbenzimidazole gradient를 실시하여 100,000×g에서 40시간 동안 초원심분리하였다. 상층에 형성된 미토콘드리아 DNA band를 주사기로 회수하여 분리하고 ethanol로 침전시킨 후 50 µl의 TE에 녹여 제한효소 반응과 분석에 사용하였다.

제한효소 및 전기영동

본 실험에 시험적으로 사용한 12가지의 제한효소들 중에서 적당한 수의 DNA 절편을 생산하는 *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Nsi*I, 및 *Pvu*II의 6가지 제한효소를 실험에 사용하였다. 이들 효소는 Boehringer Mannheim, KOSCO, 및 Amersham에서 구입하였으며 효소의 반응조건은 공급자의 조건에 따랐다. 전기영동은 TAE 완충용액 (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 0.6% agarose 겔에서 실시하였다. 전기영동 후 0.5 µg/ml의 EtBr 용액에서 염색하여 관찰한 후 사진촬영을 하였다.

제한효소 분절양상 분석

한 종류의 제한효소에 의해 형성된 제한효소 분절양상을 쌍으로 비교하여 크기가 같은 절편의 수와 크기가 다른 절편의 수를 계산하고 아래의 수식에 의거하여 균주들간의 제한효소 분절 유사도를 계산하였다(12).

$$\text{유사도 } F = \frac{2n_{xy}}{(n_x + n_y)}$$

Table 1. *Phellinus* strains used in the study.

종 명	균주 번호	숙 주	채집 지역	
<i>P. laevigatus</i>	FP-56498-T	<i>Betula lenta</i>	Pennsylvania,	U. S. A.
<i>P. laevigatus</i>	FP-125082-T	<i>Betula</i> sp.	New Hampshire,	U. S. A.
<i>P. igniarius</i>	FP-125027-T	<i>Betula</i> sp.	New Hampshire,	U. S. A.
<i>P. chrysoloma</i>	HHB-3585-Sp	<i>Pinus</i> sp.	Michigan,	U. S. A.
<i>P. chrysoloma</i>	HHB-12766-T	<i>Picea mariana</i>	Alaska,	U. S. A.
<i>P. punctatus</i>	SNU-930719-6	<i>Quercus × grosseserrata</i>	Kwangneung,	Korea
<i>P. ribis</i>	SNU-930719-5	<i>Symplocos chinensis</i>	Kwangneung,	Korea
<i>P. linteus</i>	L13202	—	—	U. S. A.
<i>P. linteus</i>	WD1222	—	—	Japan
<i>P. linteus</i>	Hansin	—	—	Korea

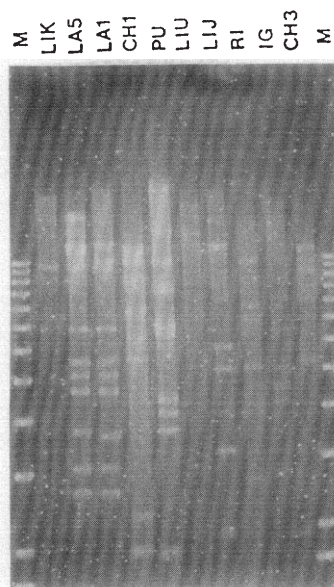
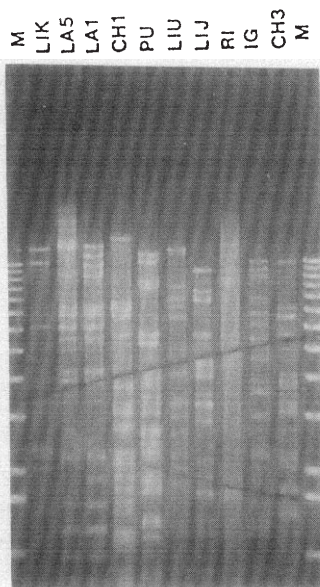
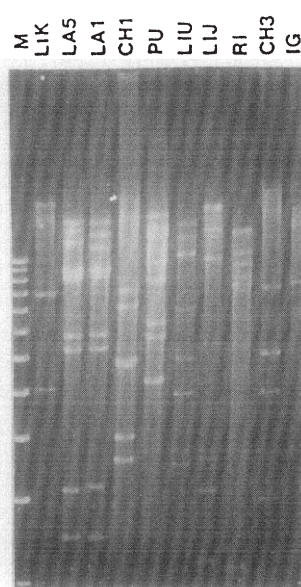
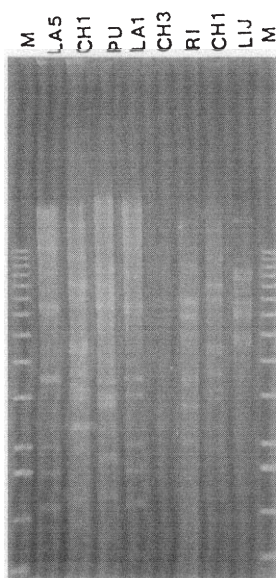
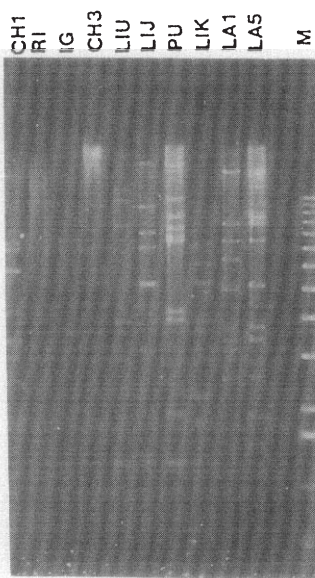
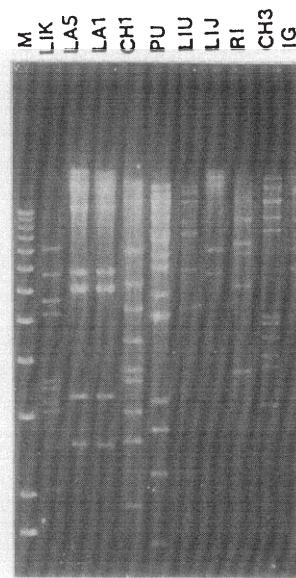
Fig. 1. *Bam*HI.Fig. 2. *Bgl*II.Fig. 3. *Cla*I.Fig. 4. *Eco*RI.Fig. 5. *Nsi*I.Fig. 6. *Pvu*II.

Plate 1. RFLP profiles of *Phellinus* mtDNAs digested by *Bam*HI (Fig. 1), *Bgl*II (Fig. 2), *Cla*I (Fig. 3), *Eco*RI (Fig. 4), *Nsi*I (Fig. 5), and *Pvu*II (Fig. 6).

Due to uncertain positions and sizes of large bands, DNA bands only smaller than 10.0 kb were counted.

LA1, *P. laevigatus* FP-125082-T; LA5, *P. laevigatus* FP-56498-T; IG, *P. igniarius* FP-125027-T; CH1, *P. chrysoloma* HHB-12766-T; CH3, *P. chrysoloma* HHB-3585-Sp; PU, *P. punctatus* SNU-930719-6; RI, *P. ribis* SNU-930719-5; LIU, *P. linteus* L13202; LIJ, *P. linteus* WD1222; LIK, *P. linteus* Hansin.

Table 2. *Bam*HI.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.0419	0.2203	0.2597	0.3567	0.2682	0.1736	ND		0.2682
LA5	0.7778	-	0.2203	0.3752	0.3567	0.2682	0.2411	ND		0.2682
IG	0.2667	0.2667	-		0.3243	0.3567	0.3243	ND		
CHI	0.2105	0.1053	NC	-	0.3662	0.2764	0.3662	ND		
CH3	0.1176	0.1176	0.1429	0.1111	-	0.3752	0.4275	ND	0.2986	0.2507
PU	0.2000	0.2000	0.1176	0.1905	0.1053	-	0.2597	ND		
RI	0.3529	0.2353	0.1429	0.1111	0.0769	0.2105	-	ND	0.2986	
LIU	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
LIJ	NC	NC	NC	NC	0.1667	NC	0.1667	ND	-	
LIK	0.2000	0.2000	NC	NC	0.2222	NC	NC	ND	NC	-

Table 3. *Bgl*III.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.2864	0.2986	0.4142	0.2088	0.3183	NC	0.3752	0.4142	0.2841
LA5	0.8421	-	0.4070	0.4070	0.2007	0.3120	NC	0.3662	0.4070	0.2682
IG	0.1667	0.0870	-	0.2089	0.2379	0.2737	0.3920	0.2245	0.2088	
CHI	0.0833	0.0870	0.2857	-	0.1368	0.1582	0.2088	0.2924	0.2088	
CH3	0.2857	0.3000	0.2400	0.4400	-	0.0933	0.3662	0.2007	0.1527	
PU	0.1481	0.1538	0.1935	0.3871	0.5714	-	0.2915	0.2444	0.1886	
RI	NC	NC	0.0952	0.2857	0.1111	0.1739	-	NC	0.1527	
LIU	0.1053	0.1111	0.2609	0.1739	0.3000	0.2308	NC	-	0.2915	
LIJ	0.0833	0.0870	0.2857	0.2857	0.4000	0.3225	0.4000	0.1739	-	
LIK	0.1818	0.2000	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	-

Table 4. *Cla*I.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.0324				0.3243	0.3359			
LA5	0.8235	-				0.3243	0.3466		0.3120	
IG	NC	NC	-							
CHI	NC	NC	NC	-	0.2986		0.1527	0.1964	0.2986	0.2682
CH3	NC	NC	NC	0.1667	-			0.1352		
PU	0.1429	0.1333	NC	NC	NC	-			0.2682	
RI	0.1333	0.1250	NC	NC	NC	NC	-			0.2507
LIU	NC	NC	NC	0.3077	0.4444	NC	NC	-		
LIJ	NC	0.1538	NC	0.1667	NC	0.2000	NC	NC	-	
LIK	NC	NC	NC	0.2000	NC	NC	0.2222	NC	NC	-

Table 5. *Eco*RI.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.0223	0.3567		0.3920	0.2986	0.4013			
LA5	0.8750	-				0.4142	0.3838			
IG	0.1176	NC	-	0.4070	0.3120	0.2379	0.4142	0.3662	0.2841	
CHI	NC	NC	0.0870	-	0.3183	0.4456	0.3183	0.3120	0.4210	
CH3	0.0952	NC	0.1538	0.1481	-	0.2202	0.2146	0.2310	0.2507	0.3662
PU	0.1667	0.0833	0.2400	0.0690	0.2667	-	0.2633	0.4070	0.2089	
RI	0.0909	0.1000	0.0833	0.1481	0.2759	0.2069	-	0.3997	0.1593	0.3466
LIU	NC	NC	0.1111	0.0952	0.2500	0.0870	0.0909	-	0.3838	0.1527
LIJ	NC	NC	0.1818	0.0800	0.2222	0.2857	0.3846	0.1000	-	0.3243
LIK	NC	NC	NC	NC	0.1111	NC	0.1250	0.4000	0.1429	-

Table 6. *Nsi*I.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.0980	0.0884	0.1441	ND	0.3662	ND	0.3120	0.3466	0.2507
LA5	0.5556	-	0.1736	0.1441	ND	0.3662	ND	0.3120		0.2507
IG	0.5882	0.3529	-	0.2411	ND	0.3466	ND			0.3359
CHI	0.4211	0.4211	0.2353	-	ND	0.3752	ND		0.2411	0.3752
CH3	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
PU	0.1111	0.1111	0.1250	0.1053	ND	-	ND	0.1289	0.3466	0.2507
RI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
LIU	0.1538	0.1538	NC	NC	ND	0.4615	ND	-		0.1964
LIJ	0.1250	NC	NC	0.2353	ND	0.1250	ND	NC	-	0.3466
LIK	0.2222	0.2222	0.1333	0.1053	ND	0.2222	ND	0.3077	0.1250	-

Table 7. *Pvu*II.

	LA1	LA5	IG	CHI	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	-	0.0000	0.2682				0.2682	0.2682		0.3359
LA5	1.0000	-	0.2682				0.2682	0.2682		0.3359
IG	0.2000	0.2000	-			0.2597	0.2682			0.3359
CHI	NC	NC	NC	-	0.2007				0.2841	0.2597
CH3	NC	NC	NC	0.3000	-	0.2379		0.3466		
PU	NC	NC	0.2105	NC	0.2400	-	0.3752	0.2597		0.2986
RI	0.2000	0.2000	0.2000	NC	NC	0.1053	-	0.2682		0.3359
LIU	0.2000	0.2000	0.6000	NC	0.1250	0.2105	0.2000	-		0.2202
LIJ	NC	NC	NC	0.1818	NC	NC	NC	NC	-	
LIK	0.1333	0.1333	0.1333	0.2105	NC	0.1667	0.1333	0.2667	NC	-

Plate 2. *F* values (below diagonals of Tables) and their corresponding *p* values (above diagonals of Tables) calculated from mtDNA RFLP profiles produced by *Bam*HI (Table 2), *Bgl*III (Table 3), *Cla*I (Table 4), *Eco*RI (Table 5), *Nsi*I (Table 6), and *Pvu*II (Table 7) digestions.

In Table 5, *F* values and their corresponding *p* values for strains IG, LIU, and LIK were calculated from another picture which was not shown in the Fig. 4 of Plate 1.

Symbols for species and strain names are same as in the legend of Figs. 1~6.

NC, no common bands; ND, not determined.

Table 8. Distance matrix table of arithmetic averages of corresponding *p* values above diagonals of Tables 2~7.

	LA1	LA5	IG	CH1	CH3	PU	RI	LIU	LIJ	LIK
LA1	—	0.0802	0.2464	0.2703	0.3192	0.3151	0.3185	0.3185	0.3804	0.2847
LA5	0.0802	—	0.2673	0.3088	0.2787	0.3370	0.3100	0.3155	0.3595	0.2808
IG	0.2464	0.2673	—	0.2857	0.2935	0.2949	0.3497	0.2954	0.2465	0.3359
CH1	0.2703	0.3088	0.2857	—	0.2641	0.3139	0.2615	0.2669	0.2907	0.3010
CH3	0.3192	0.2787	0.2935	0.2641	—	0.2778	0.3361	0.2284	0.2340	0.3085
PU	0.3151	0.3370	0.2949	0.3139	0.2778	—	0.2974	0.2621	0.2526	0.2747
RI	0.3185	0.3100	0.3497	0.2615	0.3361	0.2974	—	0.3340	0.2290	0.3111
LIU	0.3185	0.3155	0.2954	0.2669	0.2284	0.2621	0.3340	—	0.3377	0.1896
LIJ	0.3804	0.3595	0.2465	0.2907	0.2340	0.2526	0.2290	0.3377	—	0.3355
LIK	0.2847	0.2808	0.3359	0.3010	0.3085	0.2747	0.3111	0.1898	0.3355	—

n_x , n_y 는 x , y 각 균주의 DNA 절편 수, n_{xy} 는 두 균주간의 공통 DNA 절편 수)

계산된 F 값을 이용하여 다시 아래와 같이 염기위치당 염기치환도(nucleotide sequence divergence value)를 계산하였다.

$$\text{염기위치당 염기치환도 } p = -\frac{(\ln F)}{r}$$

(r 은 제한효소의 인식염기쌍 수)

계산된 p 값을 근거로 p value distance matrix를 작성하여 비교균주간의 유연관계를 도식화하기 위하여 PHYLIP package (Felsenstein, J., University of Washington)의 Neighbor program의 UPGMA 방법을 이용하여 dendrogram을 작성함으로써 균주간의 또는 종간의 계통학적인 유연관계를 분석하고 얻어진 계통도를 근거로 계통관계와 진화간계를 해석하였다.

결과 및 고찰

RFLP를 이용한 제한효소 분석에서는 비교할 DNA의 절편의 수가 너무 많으면 조성이 다른 DNA 간에도 같은 크기의 DNA 절편을 생산하는 경우가 있어 실제의 유연관계를 예측하기 어려울 때가 있고 그와 반대로 비교할 DNA의 절편의 수가 너무 적으면 균주간의 공통 절편수가 적거나 없는 경우가 있어 비교할수 있는 정보의 양이 제한을 받게 된다(9). 실제 분석에서는 생산된 절편이 충분한 정보를 지니고 있으면서 균주간의 양상을 구별할수 있는 10개 내외의 절편수를 생산하는 효소가 이상적이다. 이에 6개의 염기쌍을 인지하는 제한효소들을 사용하여 본 결과 *Bam*HI, *Bgl*II, *Cl*AI, *Eco*RI, *Nsi*I, 및 *Pvu*II가 적당한 수의 제한효소 절편을 생산하였다.

이들 효소 중 4개의 G/C와 2개의 A/T를 인지하는 *Bam*HI, *Bgl*II, *Cl*AI, 및 *Pvu*II는 2개의 G/C와 4개의 A/T를 인지하는 *Eco*RI와 *Nsi*I보다 상대적으로 적은 수의 절편들을 생산하여 *Phellinus*의 미토콘드리아 DNA도 일반 균류의 경우처럼 G/C 함량이 상대적

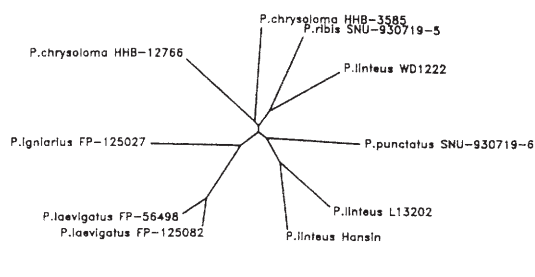


Fig. 7. Phylogenetic tree inferred by Neighbor-joining method.

The bar is 0.1 unit of p value.

으로 낮음을 보여주었다(8). 본 실험에 사용한 10균주(Table 1)의 미토콘드리아 DNA를 6가지 제한효소로 처리한 결과를 Fig. 1에서 6가지 제시하였다. 이로부터 계산된 p 값을 Table 2에서 7가지 나타내고 이들 전체를 합산하여 평균한 p 값을 Table 8에 정리하고 이를 바탕으로 계통도를 작성하여 그 결과를 Fig. 7에 제시하였다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 *P. laevigatus*의 FP-56498-T와 FP-125082-T 두 균주는 매우 가까운 유연관계를 나타내어 이들이 같은 종으로 잘 보존되어 왔음을 시사하였으며 이는 형태학적인 분류 결과와 일치하였다. 같은 종으로 동정되어 있는 *P. chrysosporium*의 HHB-3585-Sp와 HHB-12766-T 두 균주는 진화거리가 비교적 멀었으나 같은 유연관계를 유지하고 있으며 기존의 형태학적 분류결과와 일치하였다. *P. igniarius* FP-125027-T는 다른 어느 균주보다 *P. laevigatus*의 FP-56498-T와 FP-125082-T 두 균주와 가까운 유연관계를 나타내어 이들 균류의 현미경적 특징의 유사성을 반영하였다. 그리고 *P. ribis* SNU-930719-5는 *P. lintheus* WD-1222와 상대적으로 가까운 유연관계를 보여주었다.

P. lintheus Hansin은 Fig. 7에서 보는 바와 같이 다른 종 뿐만 아니라 동일종의 WD1222 균주와도 아주 먼 거리에 위치하였으며 본 실험에서는 유일하게 동일종의 균류인 L13202 균주와 제일 가깝게 나타

났다. 그러나 L13202를 포함한 본 연구에서 조사된 다른 모든 종들은 미토콘드리아 DNA의 크기가 일반 균류의 미토콘드리아 DNA의 크기와 비슷한 80~100 kb로 추정되었으나, *P. linteus* Hansin의 경우에는 그 크기가 약 40 kb로 추정되어 이 균주가 다른 종 또는 균주로부터 일찌기 분화되어 왔음을 시사하였다.

본 계통도에서 보는 바와 같이 *P. laevigatus*의 두 균주를 제외하면 정도의 차이는 있으나 본 실험에 사용한 모든 종들이 서로 일정한 거리로 계통관계가 떨어져 있고 *Phellinus*의 종들이 하나의 같은 속으로 묶여지기에는 대체로 유연관계가 먼 종들로 구성되어 있으며 종간의 변이 뿐만 아니라 종내의 변이도 심한 것으로 나타났다. 따라서 *Phellinus*속 뿐만 아니라 *Phellinus*가 속해 있는 소나무비늘버섯과 (Hymenochaetaeaceae)의 *Asterodon*, *Hymenochaete*, *Inonotus* 등의 유사한 속들을 비교군으로 조사하여 함께 연구하여야 할 것으로 사료된다. 본 실험에 나타난 것처럼 미토콘드리아 DNA를 이용한 제한효소 분석법이 속 이하의 분류군에서도 그들의 유연관계를 잘 분석할 수 있다는 점에서 아직까지 객관적인 분류방법이 결여되어 있는 진흙버섯류에 대한 좋은 분류방법으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 유전공학 연구소의 G7 Project 연구비 (연구관리번호 93-06-2082)와 과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비를 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 정학성, 1989. 목재부후균류 (담자균 민주름버섯목)의 분류학적 고찰. 미생물과 산업 15, 20-23.
2. Croft, J.H., 1987. Genetic variation and evolution in *Aspergillus*, p. 311-323. In A.D.M. Rayner, C.M. Brasier, and D. Moore (eds.), Evolutionary biology of the fungi. Cambridge University Press, Cambridge.
3. Ernster, L. and G. Schatz, 1981. Mitochondria: A historical review. *J. Cell Biol.* 91, 227-255.
4. Förster, H., T.G. Kinscherf, S.A. Leong, and D.P. Maxwell, 1987. Molecular analysis of the mitochondrial genome of *Phytophthora*. *Curr. Genet.* 12, 215-218.
5. Förster, H., T.G. Kinscherf, S.A. Leong, and D.P. Maxwell, 1988. Estimation of relatedness between *Phytophthora* species by analysis of mitochondrial DNA. *Mycologia* 80, 466-478.
6. Gilbertson, R.L., 1980. Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* 72, 1-49.
7. Gilbertson, R.L. and L. Ryvarden, 1986. North American polypores, Vol. 1. Fungiflora, Oslo.
8. Hoog, G.S. de, M.Th. Smith, and A.C.M. Weijman, 1987. The expanding realm of yeast-like fungi, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
9. Kohn, L.M., 1992. Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia* 84, 139-153.
10. Larsen, M.J. and L.A. Cobb-Poulsen, 1990. *Phellinus* (Hymenochaetaeaceae): A survey of the world taxa. Fungiflora, Oslo.
11. Manion, P.D., 1981. Tree disease concepts. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs.
12. Nei, M. and W.-H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P.N.A.S. USA* 76, 5269-5273.
13. Raeder, U. and P. Broda, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Microbiol.* 1, 17-20.
14. Taylor, J.W., 1986. Topical review: Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA. *Exp. Mycol.* 10, 259-269.

(Received October 14, 1994)

(Accepted November 10, 1994)

ABSTRACT: Phylogenetic Study of *Phellinus* Based on the Restriction Enzyme Analysis of Mitochondrial DNA

Jeoung, Won-Jin and Hack Sung Jung* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs (mtDNAs) was accomplished to study phylogenetic relationships between ten strains of 6 species from the genus *Phellinus*. Six restriction enzymes were used and common bands per total bands of restriction profiles between strains were compared as analysis characters to calculate corresponding nucleotide sequence divergence values, which were then arranged in a matrix table to evaluate evolutionary distances and construct a phylogenetic tree using the Neighbor program with UPGMA option of the PHYLIP package. Two strains of *P. laevigatus* exhibited a same lineage, which agreed with the existing morphological taxonomy, but *P. igniarius* showed a close relationship with two strains of *P. laevigatus* more than any other strains. And two strains of *P. chrysoloma* developed fairly long distances each other but exhibited a same lineage. However, *P. linteus* Hansin developed long evolutionary distances between strains of other species as well as strains of the same species but, in this study, suggested a rather close relationship with the strain L13202 of the same species. And the present species were predicted to have mtDNAs of 80~100 kb sizes but only *P. linteus* Hansin seems to have a short mtDNA of 40 kb size, which suggests that this strain has separated from other ones at a fairly early stage of evolution. All the species of *Phellinus* kept almost same evolutionary distances away from one another showing too far phylogenetic relationships to be combined in a single genus and exhibited not only a great interspecific variation but also an intraspecific variation. But the present study suggests that the restriction enzyme analysis of mtDNAs apparently has a good resolution power for the groups even below the genus and it is believed that this method can be utilized as a new classification system.