

미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 *Penicillium*속 균주의 분류

윤철식 · 최정은 · 최숙정¹ · 박희문¹ · 배경숙*

유전공학연구소 유전자원센터, ¹충남대학교 자연과학대학 미생물학과

미토콘드리아 DNA의 RFLP 양상을 이용하여 monoverticillate와 terverticillate에 속한 16종의 *Penicillium*종간의 유전적 연관성을 조사하였다. Monoverticillate에 속한 5종의 균주와 terverticillate에 속한 11종의 균주에서 4종의 제한효소로 처리된 미토콘드리아 DNA 단편들을 전기영동으로 분리한 결과, 16종의 균주로부터 191개의 서로 다른 단편들이 얻어졌다. 이를 phenetic analysis 방법으로 phenogram을 만들어 본 결과, 조사대상인 16종의 균주들이 분기형태에 따라 2개의 group으로 분리되었다. 이는 미토콘드리아 DNA의 RFLP 양상이 *Penicillium*종의 분기형태와 연관성이 있다는 것을 의미하며 분기형태가 유전적으로 영향을 받는 것으로 판단된다. 그러므로 미토콘드리아 DNA의 RFLP가 형태적 특성이 유사한 다른 *Penicillium*종간의 유연관계와 진화정도를 연구하는데 유용하게 이용될 수 있으리라 기대된다.

KEY WORDS □ mitochondrial DNA, RFLP, *Penicillium*, systematics

*Penicillium*속에 속하는 곰팡이는 인류 최초, 최대의 항생제인 페니실린을 비롯하여 산업적으로 유용한 물질을 다양하게 생성하기 때문에 *Penicillium*속은 산업적으로 가장 중요한 곰팡이속 중의 하나로 여겨져 왔다(10). 그러나 이들 곰팡이의 분류체계의 미흡으로 인하여 신규 유용물질의 개발을 위한 탐색이 원활하지 못한 실정이다.

*Penicillium*의 분류체계는 teleomorphic state에 대한 정보의 부재로 인해 주로 anamorphic state의 형태적 특성에 의존해 왔다(11). 이러한 형태적 특성에 의한 분류방법은 분류학자 개개인의 의견과 선호도에 따라 영향을 많이 받아 온 관계로 *Penicillium*종의 숫자가 분류학자들간에도 일치하지 않은 실정이다. 특히 Raper와 Thom(13)은 137여종으로, Pitt(9)는 150여종으로, Ramirez(12)는 227여종으로 분류할 정도로 분류기준이 체계화되지 않았다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근에는 형태적 특성뿐만 아니라 2차 대사산물 생성양상(3, 4), 동위효소의 분포양상(5), DNA 제한효소 절단 다형질(11) 등을 이용하여 *Penicillium*을 분류한 보고가 있으나 극히 일부분의 종들에 국한되어 있다.

미토콘드리아 DNA(mtDNA)는 genomic DNA보다 크기가 훨씬 작을 뿐만 아니라 진화속도가 빠르다는 보고가 있는 후, 종들 간의 집단유전과 분자진화적 상태를 조사하기 위하여 많이 이용되어 왔다(1, 2). 특히 곰팡이 분류에 있어서도 mtDNA의 제한효소 절단 다형질(RFLP)을 이용하여 많은 연구가 되어 왔다(7, 15).

본 연구의 목적은 mtDNA의 RFLP를 이용하여

지금까지 형태적 특성에 의해 분류되었던 기존의 monoverticillate와 terverticillate에 포함되어 있는 *Penicillium*종간의 분류학적 연관성 및 유전적 연관성을 재검토하는데 있으며 분류학자들 간에 의견을 달리하는 *Penicillium*종의 계통분류에 있어서 mtDNA의 RFLP의 효율성과 적합성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)와 NRRL (ARS Culture Collection, Northern Regional Research Center, Peoria, U.S.A.)로부터 분양 받은 monoverticillate에 속한 5종의 균주와 terverticillate에 속한 11종의 균주를 사용하였다(Table 1). 균주들은 potato dextrose agar 배지에 접종, 24°C에서 3~7일간 배양하여 포자를 형성시킨 후, 멸균한 Tween 80 (0.05% in water) 용액을 넣고 포자현탁액을 만들었다. 이를 potato dextrose broth에 10⁶ spores/ml로 접종하여 24°C에서 약 30시간 동안 200 rpm으로 교반 배양하였다.

미토콘드리아 DNA의 분리

배양이 끝난 균사체는 filter paper (Whatman No. 1)를 사용하여 vacuum filtration으로 수확하였고 -70°C에서 얼린 다음 동결건조시킨 후 Hwang 등의 방법(6)에 따라 genomic DNA를 분리하였다. Genomic DNA로부터 mtDNA를 추출하기 위하여 8 ml의 DNA 용액(약 30 mg의 DNA)에 8.8 g의 cesium chloride와 6 μ l의 bisbenzimidazole 용액(10

Table 1. Isolates of *Penicillium* species used and their characteristic branching type

Strain	Source	Type
KCTC 1258 <i>Penicillium glabrum</i>	Isolate	Monoverticillate
KCTC 6052 <i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC 10106	Terverticillate
KCTC 6012 <i>Penicillium spinulosum</i>	Isolate	Monoverticillate
KCTC 6053 <i>Penicillium notatum</i>	ATCC 7813	Terverticillate
KCTC 6080 <i>Penicillium roquefortii</i>	ATCC 10110	Terverticillate
KCTC 6114 <i>Penicillium puberulum</i>	ATCC 36363	Terverticillate
KCTC 6117 <i>Penicillium viridicatum</i>	IFO 7736	Terverticillate
KCTC 6252 <i>Penicillium ag.var.aurantiogriseum</i>	NRRL2040	Terverticillate
KCTC 6253 <i>Penicillium brunneoviolaceum</i>	NRRL2137	Terverticillate
KCTC 6254 <i>Penicillium ochraceum</i>	NRRL873	Terverticillate
KCTC 6255 <i>Penicillium carneolutescens</i>	NRRL2035	Terverticillate
KCTC 6257 <i>Penicillium ag.var.neoechinulatum</i>	NRRL13486	Terverticillate
KCTC 6258 <i>Penicillium trzebinskii</i>	NRRL731	Monoverticillate
KCTC 6260 <i>Penicillium terlikowskii</i>	NRRL752	Monoverticillate
KCTC 6265 <i>Penicillium verrucosum</i>	NRRL965	Terverticillate
KCTC 6271 <i>Penicillium thomii</i>	NRRL2077	Monoverticillate

mg/ml H₂O)을 첨가하고 20°C에서 50,000×g로 24 시간 초원심분리(Beckman L8-80 ultracentrifuge)하였다. 초원심분리 후 자외선등 하에서 나타나는 2개의 DNA band 중 윗 band만을 21 gauge 주사침으로 회수하였다. 회수된 mtDNA 용액 속의 bisbenzimidazole 제거하기 위하여 CsCl-saturated isopropanol을 동일부피로 첨가하여 4°C에서 1,200×g로 원심분리하여 bisbenzimidazole이 포함되어 있는 상등액을 버리는 과정을 3번 수행하였다. CsCl를 제거하기 위해 mtDNA 용액의 3배 부피의 70% ethanol을 첨가하여 4°C에서 1,200×g로 10분간 원심분리하여 mtDNA를 침전, 건조시킨 후 TE buffer에 용해한 후 spectrophotometer (DU-64 spectrophotometer, Beckman)로 정량하였다.

제한효소 처리 및 전기영동

약 3 µg의 mtDNA를 10~20 units의 제한효소 *EcoRI*, *BglII*, *HincII*, *HindIII*로 처리한 후 TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)

를 사용하여 1% agarose gel에서 50 V로 3 시간 동안 분리하였다. 전개 후의 gel은 ethidium bromide로 염색한 후 자외선 투광기하에서 polaroid 667 film을 이용하여 사진촬영하였다.

RFLP 결과분석

제한효소를 처리한 각 균주의 mtDNA조각들을 2 가지의 character states인 0 (fragment absent), 1 (fragment present)로 scoring하였다. 4종의 제한효소 처리 결과로부터 16 isolate×191 character matrix를 만든 후 균주들간의 유전적 연관성을 조사하기 위하여 다음의 공식을 이용하여 유전적 유사값(S)을 구하였다(8).

$$S = 2C_{xy} / (U_x + U_y + 2C_{xy})$$

C_{xy} : the number of fragments in common to isolates X and Y

U_x and U_y : the number of unique bands displayed by isolates X and Y

이렇게 구한 S값을 NTSYS-pc (14) software에 입력하여 phenetic analysis를 수행하였다. Phenogram을 작성하기 위하여 Unweighted Pair-Group Arithmetic Average (UPGMA) analysis 방법을 이용하였고 phenogram의 유효도를 알아보기 위하여 MXCOMP program을 이용하였다.

Monoverticillate 균주들과 terverticillate 균주들간의 유전적 연관성을 조사하기 위하여 다음과 같이 유전적 유사도의 평균값(\bar{S})을 계산하였다(16).

$$\bar{S} = \sum S_{xy} / N$$

S_{xy} : the distance value between isolates X and Y in monoverticillate group and terverticillate group

N: the total number of comparisons between groups

결과 및 고찰

4종의 제한효소와 도합 16종의 균주로부터 얻어진 mtDNA 단편은 총 191개였다. Monoverticillate와 terverticillate group에 속한 균주들간의 유전적 연관성을 조사하기 위하여, 191개의 character들로부터 계산한 유전적 유사값(Table 2)을 이용하여 UPGMA 방법으로 phenogram을 작성해 본 결과 16종의 균주가 두개의 group으로 나뉘어졌다(Fig. 1): monoverticillate group, KCTC 1258, 6012, 6258, 6260, 6271; terverticillate group, KCTC 6052, 6053, 6080, 6114, 6117, 6252, 6253, 6254, 6255, 6257, 6265. UPGMA 방법에 대한 통계학적 신뢰도인 유효도(cophenetic correlation coefficient)는 0.9314로서 상당히 높았다. Monoverticillate group내의 유전적 유사도의 평균값은 0.8094였고 terverticillate group내의 값은 0.7783으로 각 group내의 균주들간의 유전적 연관성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 이는

Table 2. Genetic similarity values among *Penicillium* species.

KCTC	1258	6052	6012	6053	6080	6114	6117	6252	6253	6254	6255	6257	6258	6260	6265	6271
1258	1.0000000															
6052	0.7434555	1.0000000														
6012	0.8010471	0.7539267	1.0000000													
6053	0.7539267	0.9895288	0.7539267	1.0000000												
6080	0.6910995	0.7172775	0.6806283	0.7172775	1.0000000											
6114	0.7539267	0.9895288	0.7539267	1.0000000	0.7172775	1.0000000										
6117	0.7486911	0.7643979	0.7382199	0.7643979	0.7225131	0.7643979	1.0000000									
6252	0.7277487	0.7329843	0.7277487	0.7329843	0.7329843	0.7329843	0.7696335	1.0000000								
6253	0.7277487	0.7434555	0.7382199	0.7434555	0.7329843	0.7696335	0.7696335	0.8638743	1.0000000							
6254	0.7486911	0.7434555	0.7277487	0.7434555	0.7329843	0.7434555	0.7696335	0.8743455	0.8324607	1.0000000						
6255	0.7434555	0.7696335	0.7225131	0.7696335	0.7277487	0.7696335	0.7853403	0.8062827	0.8376963	0.8272251	1.0000000					
6257	0.7329843	0.7382199	0.7434555	0.7382199	0.7172775	0.7382199	0.8062827	0.8167539	0.8795812	0.8167539	0.8534031	1.0000000				
6258	0.8167539	0.7382199	0.7748691	0.7382199	0.6858639	0.7382199	0.7225131	0.7643979	0.7748691	0.7748691	0.7905759	0.7905759	1.0000000			
6260	0.7643979	0.7382199	0.7853403	0.7382199	0.6963351	0.7382199	0.7539267	0.7748691	0.7853403	0.7853403	0.7696335	0.8010471	0.8534031	1.0000000		
6265	0.6858639	0.7015707	0.7068063	0.7015707	0.6806283	0.7015707	0.7068063	0.7172775	0.7382199	0.7382199	0.7748691	0.7643979	0.7329843	0.7225131	1.0000000	
6271	0.8062827	0.7696335	0.8062827	0.7696335	0.7172775	0.7696335	0.7643979	0.7958115	0.8062827	0.7958115	0.7801047	0.8115183	0.8429319	0.8429319	0.7643979	1.0000000

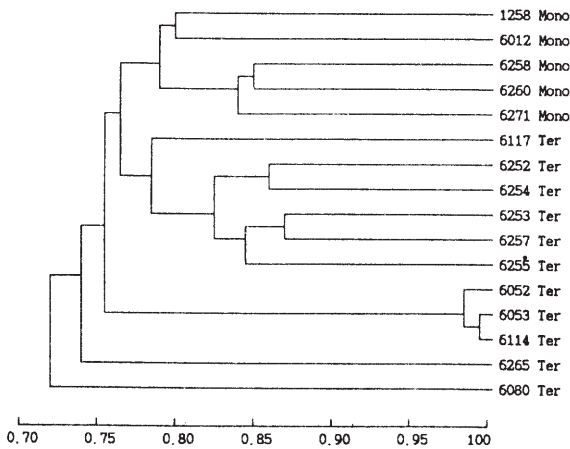


Fig. 1. Phenogram based on RFLP patterns of mtDNA of *Penicillium* species.

The phenogram was constructed from similarity values using the UPGMA method in the software package NTSYS-pc.

Kozłowski와 Stepień (7)의 보고와 같이 형태적 특성이 유사한 균주들은 유전적으로도 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있다. 특히 KCTC 6052 (*P. chrysogenum*), 6053 (*P. notatum*), 6114 (*P. puberulum*)은 유전적 유사값이 1에 가까운 정도로 유전적 연관성이 상당히 높았다. 이러한 결과는 Raper와 Thom (13)과 Pitt (9)의 *P. chrysogenum*과 *P. notatum*에 대한 논쟁 중 Pitt의 주장이 본 연구의 결과와 일치하였다. 즉, Raper와 Thom (13)은 위의 두 균주를 황색 색소생성 유무에 의해 다른 종으로 구별하였지만 Pitt (9)는 이러한 색소는 배양조건에 따라 변하므로 그의 분류기준에 포함시키지 않고 *P. notatum*을 *P. chrysogenum*의 synonym으로 보고하였다. 비록 두 종간의 색소생성에 있어 다소 차이가 있지만 형태 및 유전적 특성이 상당히 유사함을 볼 때 Pitt (9)의 주장이 옳은 것으로 판단된다.

두 group간의 유전적 유사값은 0.7546으로 각 group내의 값보다는 낮지만 두 group간의 유전적 연관성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 이는 monoverticillate와 terverticillate에 속한 종들이 분기형태는 비록 다르지만 동일한 속에 속하기 때문에 두 group간의 genetic system은 크게 다르지 않은 것으로 판단된다. 이러한 결과는 다른 *Penicillium*종들에 대한 RFLP 양상의 조사에서도 비슷하게 나타났다. Pitt 등 (11)은 *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling을 아주 밀접한 관계가 있는 다른 *Penicillium*종들로부터 분류하기 위하여 형태적 특성 뿐만 아니라, 2차 대사산물 생성양상, 동위효소의 분포양상, total DNA RFLP를 이용하였다. 그들의 보고에 의하면, RFLP 양상에 의한 종들의 grouping이 형태적 특성

및 다른 방법에 의한 grouping과 비교적 유사하였고 다른 방법보다 같은 종내에서 분리주들간의 변이도가 더 낮았다. 예를 들면 2차 대사산물 생성양상에 있어서, *P. glabrum* 변이주들 간의 변이도가 다른 종내에서의 변이주들간의 변이도보다 높은 것으로 나타났다. RFLP 양상에 있어서는 같은 종내에서의 변이도가 크지 않은 것으로 나타났으며 비교적 안정적이었다. 그리고 다른 종들과 비교해볼 때 종마다 특이한 RFLP 양상을 보여 주었다. 위의 같은 결과들로부터 Pitt 등 (11)은 *Penicillium*종들의 분류에 있어서 RFLP가 형태적 특성 또는 다른 방법과 함께 사용될 때 분류의 지표로서 아주 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

이상의 결과들로부터 mtDNA의 RFLP 양상이 형태적 특성과 비교적 일치함을 알 수 있었다. 조사 대상인 16종의 균주들은 phenogram에서 나타난 바와 같이 분기적 특성에 따라 2개의 group으로 분리되었으므로 mtDNA의 RFLP가 복잡한 형태를 지닌 *Penicillium*종을 보다 빠르고 정확하게 분류 및 동정을 할 수 있는 방법으로 이용될 수 있음을 알 수 있었다. 이는 Nei (8)가 보고한 바와 같이 *Penicillium*의 mtDNA가 진화속도에 있어서 genomic DNA보다 빨라 가까운 종들 간의 polymorphism을 인지하는데 아주 유용하게 사용될 수 있으며, 본 실험에 사용된 제한효소 이외에 다양한 종류의 제한효소를 사용함으로써 형태적 특성이 유사한 다른 *Penicillium*종들간의 유연관계와 진화정도를 연구하는데 유용하게 이용되리라 기대된다.

사 사

본 연구는 교육부 자유공모과제 (연구관리번호 01-D-0316)와 과학기술처의 지원으로 수행된 연구의 일부임.

참 고 문 헌

1. Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang, and A.C. Wilson, 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**, 225-239.
2. Brown, W.M., M. George, Jr., and A.C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1967-1971.
3. Ciegler, A., D.I. Fennel, G. Sansing, R.W. Detroy, and G.A. Bennett, 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: Classification into subgroups. *Appl. Microbiol.* **26**, 271-278.
4. Ciegler, A., L.S. Lee, and J.J. Dunn, 1981. Production of naphthoquinone mycotoxins and taxonomy of *Penicillium viridicatum*. *Appl. Env. Microbiol.* **42**, 446-449.
5. Cruickshank, R.H. and J.I. Pitt, 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*.

- ium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia* **79**, 614-620.
6. Hwang, B.-K., A.W.A.M. DeCock, G. Bahnweg, H. H. Prell, and R. Heitefuss, 1991. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capsici* isolates from pepper (*Capsicum annuum*). *System. Appl. Microbiol.* **14**, 111-116.
 7. Kozłowski, M. and P. Stepień, 1982. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the genus *Aspergillus* as an aid in taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 471-476.
 8. Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
 9. Pitt, J.I., 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic Press.
 10. Pitt, J.I., 1989. Recent developments in the study of *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. *J. Appl. Bac. Sym. Suppl.* 37S-45S.
 11. Pitt, J.I., M.A. Klich, G.P. Shaffer, R.H. Cruickshank, J.C. Frisvad, E.J. Mullaney, A.H.S. Onions, R.A. Samson, and A.P. Williams, 1990. Differentiation of *Penicillium glabrum* from *Penicillium spinulosum* and other closely related species: An integrated taxonomic approach. *System. Appl. Microbiol.* **13**, 304-309.
 12. Ramirez, C., 1982. Manual and atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical, Amsterdam.
 13. Raper, K.B. and C. Thom, 1949. A manual of the *Penicillia*. Williams and Wilkins, Baltimore.
 14. Rohlf, F., J. Kishpaugh, and D. Kirk, 1979. NTSYS numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State University of New York, Stony Brook.
 15. Specht, C.A., C.P. Novotny, and R.C. Ullrich, 1983. Isolation and characterization of mitochondrial DNA from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Exp. Mycol.* **7**, 336-343.
 16. Yoon, C.-S. and D. A. Glawe, 1993. Association of random amplified polymorphic DNA markers with stromatal type in *Hypoxylon truncatum* sensu Miller. *Mycologia* **85**, 369-380.

(Received October 10, 1994)

(Accepted October 27, 1994)

ABSTRACT: Restriction Enzyme Analysis of Mitochondrial DNA between Monoverticillate and Terverticillate *Penicillium* Isolates

Yoon, Cheol-Sik, Jeong-Eun Choi, Sook-Jeong Choi¹, Hee-Moon Park¹, and Kyung Sook Bae* (Genetic Resources Center, Genetic Engineering Research Institute, Taejon 305-600, and ¹Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea)

Genetic variation between monoverticillate and terverticillate *Penicillium* isolates was assessed by restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA: five isolates from monoverticillate group, 11 from terverticillate group. Results were analyzed phenetically. With four restriction endonucleases, a 191 character by 16 isolate matrix was generated. Phenetic analysis separated the 16 isolates into two genetically distinct group that corresponded with different branch type. The results of the present study suggest that RFLP of mtDNA can be used as an aid in taxonomy of *Penicillium*.