

미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석법에 의한 영지의 계통분류

홍순규 · 정확성*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 분자미생물학연구소

영지속 (*Ganoderma*)에 속하는 7종 10균주에 대하여 미토콘드리아 DNA의 제한효소 분석양상 비교를 통한 계통분석을 수행하였다. 여러가지 제한효소들 중 생산된 절편이 충분한 정보를 가지고 있으면서 서로 구별할 수 있는 6가지의 제한효소를 분석에 이용하였다. 절편양상을 서로 비교하여 전체 절편중 공통된 절편의 갯수를 구하고 이로부터 염기위치당 염기치환율을 구하였으며, 이를 균주간의 진화거리로 계산하여 PHYLIP package의 Neighbor-joining 방법에 의한 계통도를 얻고 그 결과를 고찰하였다. 특이한 점은 *G. lucidum*의 3균주와 *G. applanatum*의 2균주가 진화경도에 차이가 있다는 점과 *G. applanatum*의 한 균주와 *G. lobatum*이 유연관계가 많이 있다는 점이다. 이러한 결과는 *G. lucidum*과 *G. applanatum*은 종의 다양성으로 인하여 과거부터 복합종으로 취급되어 왔으며 고전적인 영지속의 분류에 문제점이 많이 있음을 시사해 주고 있다. 따라서 영지속의 분류가 진화경도에 바탕을 둔 자연분류가 되기 위해서는 형태분류 뿐만 아니라 배양 분류와 분자생물학적인 분석등 다양한 기준에 의해서 재고되어야 할 것으로 판단된다.

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

영지는 담자균류 (Basidiomycotina), 민주름버섯목 (Aphylophorales), 구멍장이버섯과 (Polyporaceae)에 속하는 버섯으로서 우리나라에서는 만년버섯 또는 불로초로 불리워 왔다. 영지속 (*Ganoderma*)의 버섯들은 전세계적으로 산림에 널리 분포하고 있으며 흔히 참나무, 밤나무, 상수나무, 자작나무, 팽나무, 벗나무, 뽕나무, 사시나무, 너도밤나무와 같은 활엽수와 일부 소나무나 전나무와 같은 침엽수에 서식하며 생활력이 약해진 나무의 줄기, 죽은 나무의 기부, 또는 고목의 그루터기에서 발생한다 (7). 또한 목재 성분을 분해하여 영양을 얻는 목재부후균류로서 수재부후와 심재부후를 일으키고 섬유소와 리그닌을 모두 분해하여 목재를 표백시키는 전형적인 백색부후균류 (white rot fungi)에 해당하며 종에 따라서는 산림에 막대한 피해를 주기도 한다 (11). 영지는 예로부터 중국에서 탁월한 효험을 지닌 한방 약재로서 강장, 강심, 해열, 진정, 이뇨, 건위, 정장, 간염, 고혈압, 뇌졸중, 및 심장병과 같은 질병 치료제로 사용되어 왔으며 (1) 최근에는 영지의 생약성분이 면역세포의 활성을 강화시켜 항체형성을 돕고 암의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀져 (2) 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

영지는 1881년 Karsten에 의하여 처음으로 단일 종으로 기술된 이래, 이의 분류에 관한 많은 의견들이 제시되어 왔다 (4). 현재 영지속에 대한 분류로서 미국에서는 9종 (7), 일본에서는 5종 (3), 중국에서는 영지분류의 세계적인 권위인 Zhao (16)에 의하여 무려

64 종이나 보고되어 있으며, 우리나라에서는 영지 (일명 불로초 *G. lucidum*), 자흑색불로초 (*G. neo-japonicum*), 및 잔나비결상 (*G. applanatum*, 일명 *Elfvigia applanata*) 3종이 기록되어 있다. 영지에 대한 현재의 개념은 광택나는 적갈색 자실체 표면, 책상조직의 각피, 균사의 trimitic system, 난형내지 절두형에 돌기상 내막의 이중막 포자를 지닌 종류로 제한되어 있으나, 영지속의 버섯들은 외형과 색깔과 크기가 매우 다양하고 변이가 심하여 학명 정리와 형태분류상의 큰 문제점으로 지적되어 있으며 전세계적으로 통일된 분류 집계가 없어서 (7) 이에 대하여 생리화적인 배양분류나 분자생물학적인 계통분류를 이용한 제 3의 분류방법이 요청되어 왔다.

본 연구에서는 형태분류의 주관성을 배제한 자연 분류의 기반을 마련하기 위하여 최근 집단유전학에서 개체의 연관관계를 설정하고 염기서열의 다양성을 연구하는데 흔히 사용되어온 미토콘드리아 DNA를 영지속의 계통분류 연구에 응용하였다. DNA의 특정부위를 자르는 제한효소를 사용하여 개개 균주의 염기서열 차이에 따른 독특한 양상의 DNA 절편들을 얻을 수 있는데 이러한 현상을 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 이라 하며 이와 같은 RFLP pattern을 상호 비교 분석함으로써 영지속의 계통분류를 논할 수 있다 (10). RFLP 분석은 주로 크기가 작은 종류의 핵 DNA (nDNA)나 미토콘드리아 DNA (mtDNA)를 대상으로 클로닝에 유용한 type II 제한효소를 사용하는 것이 보통이다 (9).

동물의 경우 mtDNA는 nDNA보다 10배 정도 진화속도가 빠르므로 mtDNA에 대한 분석은 다른 어떤 방법보다 분류군내의 변이와 진화를 추정하는데 좋은 장점을 지니고 있다(8). mtDNA는 종에 따라서 15~120 kb 크기를 지닌 circular molecule로서 코딩하는 유전자의 종류와 수는 대체로 일정하며 rRNA, tRNA, cytochrome oxidase subunit, cytochrome b, ATPase subunit, NADH dehydrogenase complex subunit 유전자들을 지니고 있다(6). mtDNA는 순수분리가 용이하고 세포당 많은 수가 존재하며 크기가 작은 관계로 제한효소 분석법을 적용하여 실험하기에 유리하며 염기치환의 정도를 비교 분석함으로써 진화과정상 발생한 DNA 염기서열의 변화에 대한 계통학적인 정보를 얻을수 있어(5) 이와 같은 재료는 본 연구에서 다루는 영지의 계통분류 연구를 시도하는데 매우 이상적인 것으로 판단된다. 이에 본 연구에서는 미토콘드리아 DNA의 제한효소 절편양상의 비교에 의하여 계통관계를 추론하고자 하였다.

재료 및 방법

균 주

본 연구를 위하여 담자균류 민주름버섯목 구멍장이버섯과에서 분류학상 실제로 문제가 되고 있는 영지속의 7종 균류들을 위하여 ATCC로부터 7균주를 분양받고 Madison의 Center for Forest Mycology Research (CFMR)의 균주센터에서 2균주를 분양받았으며, 1993년 7월 7일 충북 음성에서 채집한 1균주를 포함하여 도합 10균주를 실험에 사용하였다 (Table 1). ATCC 균주는 *G. applanatum* ATCC 44053, *G. lobatum* ATCC 42985, *G. lucidum* ATCC 64251, *G. meredithae* ATCC 64492, *G. microsporium* ATCC 76024, *G. resinaceum* ATCC 52416, 및 *G. subamboinense* var. *laevisporium* ATCC 52420이고, CFMR 균주는 *G. applanatum* FP-57035-T와 *G. lucidum* FP-103561-T이며, 충북 음성의 균주는 *G. lucidum* ES70701이다.

배양 조건

모든 균주는 ME (malt extract 2%, peptone 0.5%) 배지에 접종하여 24°C에서 배양하였으며, 계대배양은 한천을 첨가한 ME plate에서 1주일간 배양하여 4°C에서 보관하면서 1개월 간격으로 계대배양하였다. Seed 배양은 500 ml baffled flask에 200 ml의 배지를 넣고, plate로부터 5 mm×5 mm의 크기로 균사가 자란 배지를 잘라서 10개 정도 접종하였다. 대량배양은 공기방울 생성기를 이용해 공기를 공급해 주면서 2 l flask에서 수행하였으며, 각 균주마다 배양기간에 차이가 있었으나 짧게는 5일간 길게는 2주일간 배양하였다.

미토콘드리아 분리

배양한 균사는 거즈를 이용하여 수확하였으며 10 mM NaCl로 3번 세척하였다. 미토콘드리아의 분리는 분별원심분리를 이용하였으며 균사에서 물기를 제거한 후 100 ml의 cold lysis medium [0.6 M sorbitol, 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)]에 풀었다. Omni mixer를 이용하여 30초간 균사를 파쇄한 후 3,000 rpm (Sorvall GS3 rotor)에서 10분간 원심분리하여 상층을 회수하였다. Pellet에 다시 100 ml의 cold lysis medium을 넣고 위의 과정을 2번 더 반복하여 회수한 상층을 모두 합하여 50 ml tube에 옮기고 12,000 rpm (Sorvall SA600 rotor)에서 15분간 원심분리하여 미토콘드리아 pellet을 회수하였다. Pellet에 cold lysis medium을 15 ml 넣어 pellet을 풀고 3,000 rpm (Sorvall SA600 rotor)에서 10분간 원심분리하여 상층을 회수한 후 이것을 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 최종적으로 미토콘드리아 pellet을 회수하였다(14).

미토콘드리아 DNA 분리

미토콘드리아 pellet을 500 μ l의 extraction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS]에 풀어서 microfuge tube로 옮기고 다시 extraction buffer-saturated phenol 350 μ l와 chloroform 150 μ l을 넣어서 혼든 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여

Table 1. *Ganoderma* strains used in this study.

종 명	균주번호	서식지	채집지역
<i>G. applanatum</i>	ATCC 44053	<i>Quercus crispula</i>	Japan
<i>G. applanatum</i>	FP-57035-T	oak (<i>uercus</i> sp.)	Maryland, U.S.A
<i>G. lobatum</i>	ATCC 42985	<i>Populus balsamifera</i>	Canada
<i>G. lucidum</i>	ATCC 64251	<i>Acacia confusa</i>	Taiwan
<i>G. lucidum</i>	FP-103561-T	dead willow (<i>Salix</i>)	Louisiana, U.S.A.
<i>G. lucidum</i>	ES70701	-	Eumsung, Korea
<i>G. meredithae</i>	ATCC 64492	<i>Pinus taeda</i>	Louisiana, U.S.A.
<i>G. microsporium</i>	ATCC 76024	<i>Salix babylonica</i>	Taiwan
<i>G. resinaceum</i>	ATCC 52416	<i>Ulmus procera</i>	Argentina
<i>G. subamboinense</i> var. <i>laevisporium</i>	ATCC 52420	-	Argentina

상층을 회수하였다. RNase A (10 mg/ml) 20 μ l를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 500 μ l의 chloroform으로 다시 한번 extraction하였다. 0.54배의 isopropanol을 넣고 상온에서 침전시킨 후 10분간 원심분리하여 미토콘드리아 DNA pellet을 얻고 70% 에탄올로 씻고 speed vac을 이용하여 건조시킨 후 TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 50 μ l에 녹여서 다음 실험에 사용하였다 (13).

제한효소 및 반응조건

제한효소 중에서 *Bam*HI은 KOSCO에서, *Bgl*III와 *Xba*I은 Amersham에서, *Eco*RI과 *Hind*III는 Boehringer Mannheim에서, *Pvu*II는 NEB에서 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 공급자가 제시하는 대로 따랐다. 2 μ l의 DNA에 대하여 5 units의 제한효소로 4시간 반응을 시킨 후 절편을 분석해 보고 부분적인 분절이 일어난 것은 제한효소를 5 units 추가하여 3 시간 동안 더 반응시켰다.

젤 전기영동

TAE 완충용액 (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)을 사용하여 0.5% agarose 겔에서 10 volts/cm의 전기를 걸어 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 0.5 μ g/ml의 EtBr 용액에서 10분간 염색하고 증류수에 20분간 염색액을 제거하여 관찰한 후 사진촬영을 하였다.

제한효소 분절양상 분석

동일한 제한효소에 의하여 같은 크기의 DNA 절편들을 만드는 균주들은 mtDNA의 염기서열이 동일 혹은 유사한 것으로 간주할 수 있으므로 이들 절편의 크기를 비교하여 겔상에서 같은 위치에 나타나는 절편과 다른 위치에 나타나는 절편의 수를 세고 이를 바탕으로 다음의 수식에 의거하여 균주들간의 제한효소 분절 유사도를 계산하였다 (12).

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

(n_x , n_y 는 x, y 각 균주의 DNA 절편수, n_{xy} 는 두 균주의 공통 DNA 절편수)

유사도 F값을 이용하여 다시 염기위치당 염기치환도 (nucleotide sequence divergence value)를 계산하면

염기위치당 염기치환도 $p = (-\ln F) / r$ (r은 제한효소의 인식염기쌍 수)

계산된 p값의 평균을 근거로 p value distance matrix를 작성하고 비교균주간의 유연관계를 도식화하기 위하여 PHYLIP package (Felsenstein, J., University of Washington)의 Neighbor-joining 방법을 이용하여 dendrogram을 작성함으로써 균주간 또는 종간의 계통학적인 유연관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

적정 제한효소 조사

RFLP 분석을 적절하게 수행하기 위해서는 10개 내외의 DNA 절편을 생산하는 제한효소가 가장 적당하다. 그 이유는 DNA 절편의 수가 너무 적을 경우 얻을 수 있는 정보가 너무 적고 반대로 절편의 수가 너무 많을 경우 겔상에서 절편을 서로 구분하기가 어렵기 때문이다. 이에 *Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*III, *Cfo*I, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hin*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sal*I, *Ssp*I, *Sty*I, *Xba*I, 및 *Xho*I의 19개 제한효소를 조사해 본 결과 (결과 미제시) 인지하는 염기가 A와 T로만 이루어진 *Dra*I과 *Ssp*I은 너무 많은 DNA 절편을 만들어 내었으므로 분석용으로 사용할 수 없었고, *Bgl*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, 및 *Xho*I의 경우에는 인지할 수 있는 염기서열이 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 나머지의 효소들 중에서 6개의 염기를 인지하는 *Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*II, 및 *Xba*I의 6개 제한효소를 분석용으로 사용하였다.

제한효소 분절양상 및 계통관계 추정

10개 균주에 대한 6가지 제한효소의 DNA 분절 양상은 Fig. 1에서 Fig. 6까지 나타내었으며, 전체 절편수와 공통 절편수 및 이들 숫자를 근거로 계산한 염기위치당 염기치환도 p값을 Table 2에서 Table 7까지 표시하였다. 그리고 p의 평균값을 Table 8에 나타내었으며 이를 바탕으로 Neighbor-joining 방법에 의한 계통도를 얻었다 (Fig. 7). 계통도의 분석에서 볼 수 있는 특징은 동일종의 다른 균주와의 계통관계가 다른 종간의 계통관계보다 결코 가깝지 않다는 점이다. 동일종의 다른 균주와의 계통관계를 조사한 종은 *G. lucidum*과 *G. applanatum*으로서 이들은 모두 진화 과정에서 서로 다른 경로를 거쳐 왔음을 보여주고 있다.

이들은 모두 서로 다른 대륙이나 지역에서 채집된 균주들로서 (Table 1 채집지역 참조) 같은 종이라도 채집지에 따라서 서로 다른 진화 경로를 거쳐 왔을 가능성을 시사해 주고 있다. 반면에 *G. applanatum* FP-57035-T와 *G. lobatum*은 매우 밀접한 관계를 가지고 있음을 보여주고 있는데, 이들 종은 형태적으로 매우 유사하나 분류학적으로는 갖의 각피가 두꺼운가 얇은가하는 기준에 의하여 구분되고 있다 (7). 이러한 기준은 버섯 자실체의 생장 형태와 관찰자의 주관에 따라서 서로 다른 결론을 내릴 수 있는 형질에 입각한 것으로서, 본 연구 결과는 이들 종이 실제로 서로 다른 종인지에 대한 논란의 여지를 제기하고 있으며, mtDNA의 RFLP 분석법은 형태가 다양하고 변이가 심하여 분류학상 문제점으로 되어 있는 분류군에 대한 객관적인 계통분류 방법으로서의 가능성을 입증하고 있다.

영지속의 기존분류체계에 대한 논란은 배양과 교배실험에 의해서도 제기되었는데, 본 연구에서 동일한 RFLP pattern을 보이는 종류가 없거나 확인이 되지 않아서 고찰에서 제외된 *G. resinaceum*의 유럽종과 *G. valesiacum*의 유럽종은 각각 *G. lucidum*과 *G.*

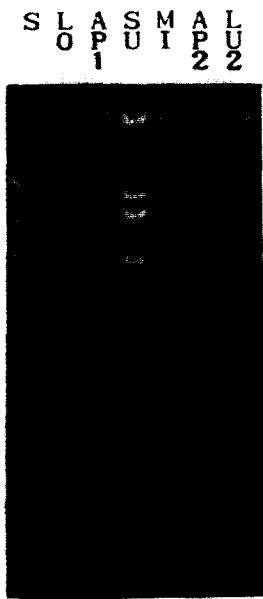


Fig. 1

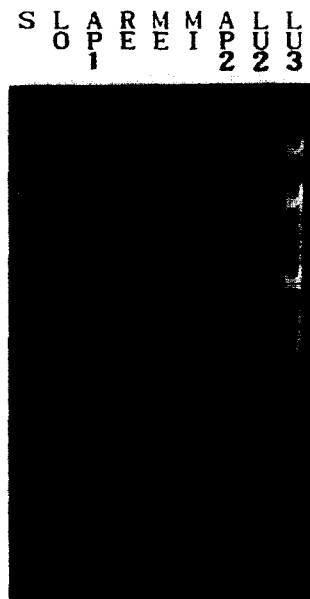


Fig. 2

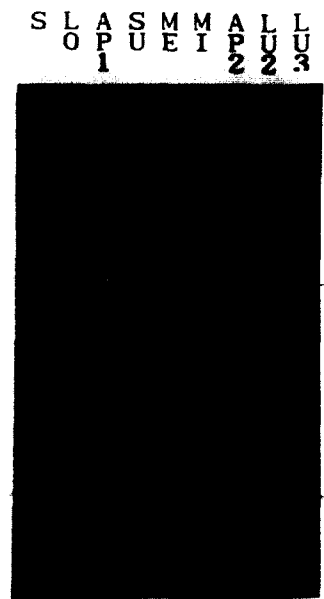


Fig. 3

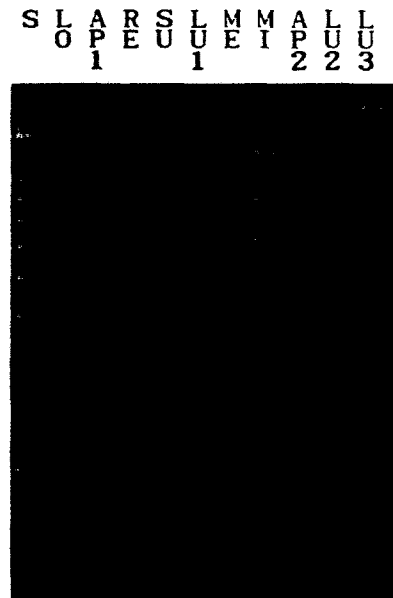


Fig. 4

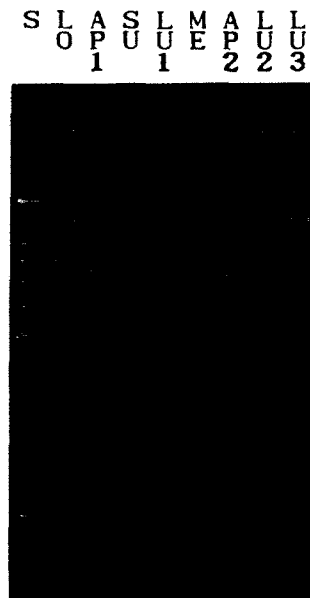


Fig. 5



Fig. 6

Plate 1. mtDNA RFLP profiles produced by BamHI (Fig. 1), BglIII (Fig. 2), EcoRI (Fig. 3), HindIII (Fig. 4), PvuII (Fig. 5), and XbaI (Fig. 6) digestions.

S, 1 kb ladder; LO, *G. lobatum* ATCC 42985; API, *G. applanatum* ATCC 44053; RE, *G. resinaceum* ATCC 52416; SU, *G. subambonense* var. *laevisporum* ATCC 52420; LU1, *G. lucidum* ATCC 64251; ME, *G. meredithae* ATCC 64492; MI, *G. microsporum* ATCC 76024; AP2, *G. applanatum* FP-57035-T; LU2, *G. lucidum* FP-103561-T; LU3, *G. lucidum* ES70701.

Table 2. *Bam*HI.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.2088				0.2412	0.0678	0.2597	
AP1	4/14					0.2841	0.2203	0.3120	
SU	NC	NC				0.3120			
LU1	ND	ND	ND						
ME	ND	ND	ND	ND					
MI	4/17	2/11	2/13	ND	ND		0.2507	0.3466	
AP2	14/21	4/15	NC	ND	ND	4/18		0.3838	
LU2	4/19	2/13	NC	ND	ND	2/16	2/20		
LU3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Table 3. *Bgl*II.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.1780			0.3682	0.2203	0.0394	0.1459	0.1831
AP1	8/23					0.1831	0.1760	0.1831	0.2088
SU	ND	ND							
LU1	ND	ND	ND						
ME	2/18	NC	ND	ND				0.1314	
MI	4/15	6/18	ND	ND	NC		0.3358	0.3752	0.1964
AP2	14/20	8/23	ND	ND	NC	2/15		0.2966	0.3682
LU2	10/24	8/24	ND	ND	10/22	2/19	4/24		0.1314
LU3	6/18	6/21	ND	ND	NC	4/13	2/18	10/22	

Table 4. *Eco*RI.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.3054	0.2007		0.1527		0.0785	0.1964	0.1527
AP1	4/25		0.1736		0.2841	0.1527	0.1964	0.2240	0.2165
SU	6/20	6/17			0.2412	0.3358	0.3919	0.1831	0.2412
LU1	ND	ND	ND						
ME	10/25	4/22	4/17	ND		0.3838	0.2444	0.2915	0.1314
MI	NC	8/20	2/15	ND	2/20		0.2310	0.2764	0.3682
AP2	18/29	8/26	2/21	ND	6/26	6/24		0.1352	0.2444
LU2	8/26	6/23	6/18	ND	4/23	6/21	12/27		0.2240
LU3	10/25	6/22	4/17	ND	10/22	4/20	6/26	6/23	

Table 5. *Hind*III.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.2841	0.4142	0.2240	0.1686	0.3919	0.0908	0.2027	0.2597
AP1	4/22		0.2165	0.3919	0.3938	0.3752	0.2915	0.2379	0.1736
SU	2/24	6/22		0.4071	0.2841	0.2088	0.3054	0.2907	0.2597
LU1	6/23	2/21	2/23		0.3919	0.2007	0.2310	0.1964	0.3682
ME	8/22	2/20	4/22	2/21		0.3752	0.2915	0.1869	0.3567
MI	2/21	2/19	6/21	6/20	2/19		0.3996	0.2966	0.3466
AP2	14/25	4/23	4/25	6/24	4/23	2/22		0.2088	0.2682
LU2	8/27	6/25	6/27	8/26	8/25	4/24	8/28		0.3996
LU3	4/19	6/17	4/19	2/18	2/17	2/16	4/20	2/22	

Table 6. *Pvu*II.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.2507	0.2986		0.3243		0.0581	0.1635	0.3120
AP1	4/18		0.2986				0.3567	0.2310	
SU	2/12	2/12			0.2310		0.2841		0.2310
LU1	NC	NC	NC						
ME	2/14	NC	2/8	NC			0.3120	0.2986	0.1352
MI	ND	ND	ND	ND	ND				
AP2	12/17	2/17	2/11	NC	2/13	ND		0.3358	0.2986
LU2	6/16	4/16	NC	NC	2/12	ND	2/15		0.2841
LU3	2/13	NC	2/7	NC	4/9	ND	2/12	2/11	

Table 7. *Xba*I.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.4513	0.2915			0.3054		0.2626	0.4142
AP1	2/30					0.2764		0.3054	0.2007
SU	4/23	NC				0.3243		0.1831	0.3120
LU1	ND	ND	ND						
ME	ND	ND	ND	ND					
MI	4/25	4/21	2/14	ND	ND			0.1527	0.3358
AP2	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
LU2	6/29	4/25	6/18	ND	ND	8/20	ND		0.2597
LU3	2/24	6/20	2/13	ND	ND	2/15	ND	4/19	

Plate 2. Fraction number of common bands per total bands (below descending diagonals of Tables) and their corresponding p values (above descending diagonals of Tables) produced by *Bam*HI (Table 2), *Bgl*II (Table 3), *Eco*RI (Table 4), *Hind*III (Table 5), *Pvu*II (Table 6), and *Xba*I (Table 7).

DNA bands smaller than 1 kb in Figs. 1, 2, 3, 5, 6 and smaller than 2 kb in Fig. 4 and those bigger than 15 kb were discarded due to the uncertainty in finding and calculating exact positions and sizes of the bands. And RE which was *G. resinaceum* ATCC 52416 developed too few common bands between RE and other strains to calculate p values for the matrix table, so it was not included in the matrix table and the phylogenetic discussion. The abbreviations of species names are same as in Plate 1. NC, no common bands; ND, not determined.

Table 8. Distance matrix table of arithmetic averages of corresponding *p* values above descending diagonals from Table 2 to Table 7.

	LO	AP1	SU	LU1	ME	MI	AP2	LU2	LU3
LO		0.2794	0.3013	0.2240	0.2530	0.2897	0.0722	0.2051	0.2643
AP1			0.2296	0.3919	0.3340	0.2543	0.2482	0.2489	0.1999
SU				0.4071	0.2521	0.2952	0.3271	0.2056	0.2610
LU1					0.3919	0.2007	0.2310	0.1964	0.3662
ME						0.3795	0.2826	0.2279	0.2078
MI							0.3043	0.2899	0.2868
AP2								0.2724	0.2944
LU2									0.2351
LU3									

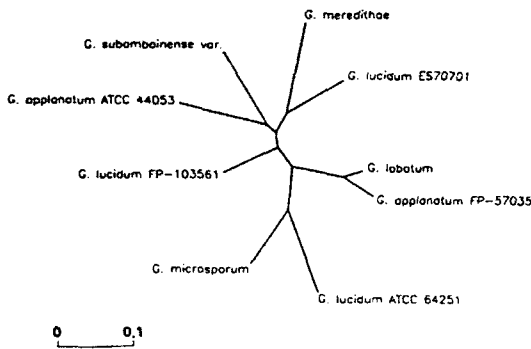


Fig. 7. Phylogenetic tree inferred by the Neighbor-joining method. The bar is 0.1 unit of *p* value.

*tsugae*의 복미종과 거의 유사한 특징을 지니고 있으며, 특히 *G. resinaceum*은 *G. lucidum*과 상호교배가 가능하였으므로 단일종에 대한 서로 다른 이름들이 것으로 판명된 적이 있다(4). 현재 영지속의 분류는 대륙마다 서로 다른 분류체계를 사용하고 있다. 그러나 이들 분류체계에 이용되고 있는 외형적 특징들은 성장환경에 따라 달라질 수도 있고 분류학자들의 주관에 개입될수 있는 여지가 많으므로 본 연구와 같은 분류 방법은 계통분류를 위한 객관적 방법론으로 타당성이 많은 것으로 사료된다. 구멍장이버섯과에서도 가장 어려운 분류군으로 인식되고 있으며 전세계적으로 220여종에 이르는 방대한 종류들이 보고된 영지속의 분류를 (15) 위하여 앞으로 배양실험, 교배실험, 및 보존성이 강한 ribosomal RNA 염기서열의 상동성 비교를 포함한 분자생물학적인 연구를 병행할 필요가 있으며, 이와 같은 결과로부터 진화와 계통학적인 개념에 입각한 객관적인 분류체계의 확립이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 서울대학교 발전기금 일반학술연구비 (연구관리번호 93-06-2082)의 지원과 과학재단 우수 연구센터 (서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비 일부를 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 안덕균, 1992. 한국산 약용 균류. 한국균학회지 20, 154-166.
2. 현진원, 최웅철, 김병각, 1990. 한국산 고등균류의 성분 연구 (제 67보)-영지버섯 자실체의 항암 성분. 한국균학회지 18, 58-69.
3. 今關, 大谷, 本郷, 1988. 日本のきのこ. 山と溪谷社. 東京.
4. Adaskaveg, J.E. and R.L. Gilbertson, 1986. Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. lucidum* complexes. *Mycologia* 78, 694-705.
5. Croft, J.H., V. Bhattacharjee, and K.E. Chapman, 1990. RFLP analysis of nuclear and mitochondrial DNA and its use in *Aspergillus* systematics. pp. 309-320. In R.A. Samson and J.I. Pitt (ed.). *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. NATO ASI series A: Life Sciences Vol. 185. Plenum Press, New York.
6. Dujon, B., 1983. Mitochondrial genes, mutants and maps: A review. pp. 1-24. In R.J. Schweyen, K. Wolf, and F. Kaudewitz (ed.), *Nucleo-mitochondrial interactions*. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
7. Gilbertson, R.L. and L. Ryvarden, 1986. North American polypores. Vol. 1. Fungiflora. Oslo.
8. Kistler, H.C., P.W. Bosland, U. Benny, S.A. Leong, and P.H. Williams, 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Genetics* 77, 1289-1293.
9. Kozłowski, M. and P.P. Stepień, 1982. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of members of the genus *Aspergillus* as an aid in

- taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 471-476.
10. Kurtzman, C.P., 1985. Molecular taxonomy of the fungi. pp. 35-63. In J.W. Bennett and L.L. Lasure (ed.). *Gene manipulations in fungi*. Academic Press, Inc., London.
 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5269-5273.
 13. Raeder, U. and P. Broda, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Let. Appl. Microbiol.* **1**, 17-20.
 14. Rickwood, D., M.T. Wilson, and V.M. Darley-Usmar, 1987. Isolation and characterization of intact mitochondria. pp. 1-16. In V.M. Darley-Usmar, D. Rickwood, and M.T. Wilson (ed.). *Mitochondria—a practical approach*. IRL Press, Oxford.
 15. Ryvarden, L. and R.L. Gilbertson, 1993. *European polypores. Part 1. Fungiflora*. Oslo.
 16. Zhao, J.-D., 1989. The Ganodermataceae in China. *Bibliotheca Mycologica*. Band 132. J. Cramer, Stuttgart.

(Received June 13, 1994)

(Accepted July 27, 1994)

ABSTRACT: Phylogeny of *Ganoderma* Based on the Restriction Enzyme Analysis of Mitochondrial DNA

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

Ten strains of 7 species from the genus *Ganoderma*. *G. lucidum* ATCC 64251, FP-103561-T, and ES70701, *G. applanatum* ATCC 44053 and FP-57035-T, *G. lobatum* ATCC 42985, *G. resinaceum* ATCC 52416, *G. subamboinense* var. *laevisporum* ATCC 52420, *G. meredithae* ATCC 64492, and *G. microsporum* ATCC 76024, were studied to discuss their phylogenetic relationships by utilizing restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of mitochondrial DNAs (mtDNAs). Six restriction enzymes, *Bam*H1, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hind*III, *Pvu*II, and *Xba*I which digested mtDNAs into adequate numbers of restriction fragments for cluster analysis, were used in this study. Restriction profiles of strains for each restriction enzyme were treated as analysis characters to calculate similarity coefficients, which were converted into nucleotide sequence divergence values whose mean values were then arranged in a matrix table. This table was utilized for a phylogenetic analysis using the Neighbor-joining method of the PHYLIP package to construct phylogenetic tree. Three strains of *G. lucidum* and two strains of *G. applanatum* exhibited different lineages each but one of *G. applanatum* strains showed a close relationship with *G. lobatum*, which reflected the species complexity of these species whose strains were phenotypically indistinguishable but genetically distinct. The present results suggest that the natural classification of *Ganoderma* needs to be considered from the viewpoints of molecular biology-based systematics as well as morphological classifications and cultural identifications for better phylogenetic conclusions.