

분자생물학적 방법을 이용한 *Moniliella* 속과 *Trichosporonoides* 속의 분류학적 고찰

신기선* · 신용국¹ · 태경환² · 권오유³ · 이상한⁴

생명공학연구소 유전자은행, ¹조선대학교 단백질소재연구센터
²동부기술원 자생식물연구소, ³충남대학교 의과대학 해부학교실
⁴생명공학연구소 첨단생물소재연구센터

Are the genus *Moniliella* and *Trichosporonoides* closely related in molecular taxonomic relationship?

Kee-Sun Shin*, Yong Kook, Shin¹, Kyoung-Hwan Tae², O-Yu Kwon³ and Sang-Han Lee⁴

Korean Collection for Type Cultures, KRIBB, Taejon 305-333, Korea

¹Research Center for Proteinous Materials and Department of Pharmacology,
School of Medicine, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Korea Native Plants Institute, Dongbu Research Council, Taejon 305-708, Korea

³Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-131, Korea

⁴Center for Advanced Biomaterials, KRIBB, Taejon 305-333, Korea

Abstract

The molecular taxonomic relationship of nine species in the genus *Moniliella* Stolk & Dakin and *Trichosporonoides* Haskins & Spencer and six species of other yeast-like fungi was examined by sequencing analysis of large subunit rDNA D1/D2 variable domain. The fifteen species fell into two major groups corresponding with their genetic relationships. The nine species of the genus *Moniliella* and *Trichosporonoides* were placed at the same cluster. The similarity values based on the D1/D2 domain sequences were 45.4-100% among species of genus *Moniliella*, 45.2-84.4% among genus *Trichosporonoides* species, and 45.6-90.1% among species of genus *Moniliella* and *Trichosporonoides*. Identical sequence similarity was observed between *M. suaveolens* var. *nigra* and *M. suaveolens* var. *suaveolens*. A close relationship of *M. mellis* and *M. acetoabutens* is observed. The result of this study provided an insight into the genetic origins of genus *Moniliella* and *Trichosporonoides* species as well as their genetic relationships. Genus *Moniliella* and *Trichosporonoides* are closely related to each other based on sequence analysis of the large subunit rDNA D1/D2 region and we suggest combination of the genus *Moniliella* and *Trichosporonoides* to single genus.

Key words – *Moniliella*, *Trichosporonoides*, molecular taxonomy

*To whom all correspondence should be addressed
Tel 042-860-4624, Fax : 042-860-4625, E-mail : ksshin@mail.krribb.re.kr

서 론

Moniliella 속[2]과 *Trichosporonoides* 속[3]은 담자성 yeast-like fungi에 속하며 매우 유사한 분류학적 특성을 나타내고 있다. 이러한 특성의 예로는 arthroconidia와 blastoconidia의 생산, urea 분해, diazonium blue B 염색의 양성 반응, multilamellar 형태의 cell wall 구조와 dolipore septa 구조 등이 보고되어 있다[8,9]. 또한 Walker[13]가 실험한 5S 염기서열 분석 결과에서도 *Moniliella acetobutans*와 *Trichosporonoides oedocephalis*는 같은 분류군을 형성하였다. 그러나 두 속(genus)은 형태학적 특성인 blastic conidia의 크기에 근거하여 서로 다른 속으로 구분(differentiation)되어 왔으며, 일반적으로 blastic conidia의 크기가 10 μm 이상인 경우는 *Moniliella* 속으로 10 μm 이하인 경우는 *Trichosporonoides* 속으로 동정하고 있다[1,5].

한편 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) pattern 분석, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석과 특정 유전자의 염기서열분석 등 다양한 분자생물학적 기법을 응용하는 분자분류학이 발전되면서, 균주 (strain)에 따라 다른 결과를 나타내기도 하는 생리·생화학적 특성 차이에 근거하는 분류 및 동정이 지양되고, 분석결과와의 재현성이 높고 data base 확립이 용이한 분자분류

학적 결과를 토대로 하는 새로운 분류 및 동정 체계가 정착되어가고 있다[4,6,7,11].

본 연구는 이러한 미생물 분류관련 연구방법의 변화를 yeast-like fungi 분류에 적용하여, 형태적 분류결과에 기초하여 서로 다른 분류군으로 나누어져 있는 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속 균주들을 대상으로 효모의 분자분류학적 key[4,7]로 최근 널리 이용되고 있는 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기서열을 분석하여 그 결과를 data base화하고 이를 동정을 위한 key로 이용하고자하며 또한 두 속에 포함되어 있는 균주들의 분자분류 결과와 형태 및 생리학적 결과를 비교 분석하여 두 속의 분류학적 연관관계를 재고해 보고자 한다.

재료 및 방법

*Moniliella*속 및 *Trichosporonoides*속 균주들 사이에 존재하는 분자 분류학적 연관관계를 알아보기 위하여 두 속에 속하는 9개 종과 yeast-like fungi에 속하는 4속 (*Aureobasidium*, *Exophiala*, *Phaeococcomyces*, 및 *Rhinoctadiella*속)의 균주 6종을 선발하였다. 실험에 사용한 15개의 균주는 모두 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)에서 구입하였으며 Table 1에 명시하였다. 이들 중 *Moniliella*속 5종과 *Tricho-*

Table 1. List of fifteen species of genus *Moniliella*, *Trichosporonoides* and other yeast-like fungi used for large subunit rDNA D1/D2 region sequence analyses

Species name	Source	Accession number
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	CBS 621.80	AF361049
<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	CBS 249.65	AF361050
<i>Exophiala alcalophila</i>	CBS 520.82	AF361051
<i>Exophiala pisciphila</i>	CBS 537.73	AF361052
<i>Moniliella acetobutans</i>	CBS 169.66	AF335523
<i>Moniliella mellis</i>	CBS 350.33	AF335519
<i>Moniliella pollinis</i>	CBS 451.67	AF335525
<i>Moniliella suaveolens</i> var. <i>nigra</i>	CBS 542.78	AF335524
<i>Moniliella suaveolens</i> var. <i>suaveolens</i>	CBS 126.42	AF335520
<i>Phaeococcomyces nigricans</i>	CBS 652.76	AF361048
<i>Rhinoctadiella compacta</i>	CBS 285.47	AF361053
<i>Trichosporonoides madida</i>	CBS 240.79	AF335522
<i>Trichosporonoides nigrescens</i>	CBS 269.81	AF335527
<i>Trichosporonoides oedocephalis</i>	CBS 649.66	AF335521
<i>Trichosporonoides spathulata</i>	CBS 241.79	AF335526

*sporonoides*속 4종은 모두 표준 균주를 사용하였다.

염기서열분석에 이용할 염색체 DNA를 분리하기 위하여 Malt extract agar (DIFCO Laboratories, Detroit, USA)에 균주를 접종하고 25°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균체로부터 Kurtzman과 Robnett의 방법으로 DNA를 분리하여 large subunit rDNA의 D1/D2 영역을 증폭하였다[6]. PCR로 증폭한 단편들은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 정제하고 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems, USA)를 사용하여 sequencing 반응을 수행하였으며, 생산된 DNA 단편들은 ABI 310 DNA sequencer (PERKIN ELMER, New Jersey, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험한 시료들이 나타내는 분자 진화적인 관계를 살펴보기 위하여 *Moniliella* 속과 *Trichosporonoides*속 9균주의 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기 서열들을 multiple-sequence alignment program인 clustal X [12]를 사용하여 정렬하였다. 분석에 사용한 outgroup인 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 염기배열은 The National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 nucleotide data base에서 받아 사용하였다. 시료들의 D1/D2 변이 영역 염기배열의 유사도는 alignment 결과로부터 계산하였으며 evolutionary distances는 clustal X package에 포함되어 있는 Kimura two-parameter correction방법으로 도출하였다. 시료들 사이에 존재하는 연관관계를 나타내는 계통수 (phylogenetic tree)는 distance matrix 값을 이용하여 neighbour-joining 방법 [10]으로 도식화하였다. 계통수 분석을 위한 계산에서 염기서열에 포함된 gap들과 미결정된 염기(unidentified base)들은 배제하였다.

결과 및 고찰

Yeast-like fungi로 분류되는 6속 15균주의 염기서열 분석결과 얻어진 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기서열들은 NCBI의 GenBank 뉴클레오타이드 염기서열 data base에 등록하였고 각 균주에서 조사된 염기서열의 accession number는 Table 1에 나타내었다.

또한 *Moniliella*속 및 *Trichosporonoides*속 9개 균주의 D1/D2 변이 영역의 염기서열을 비교하여 퍼센트로 나타난 염기서열 유사도(sequence similarity)는 Table 2에 정리하였다.

Table 2. Levels of percent nucleotide similarity for large subunit rDNA D1/D2 domain of nine species in the genus *Moniliella* and *Trichosporonoides*

	1	2	3	4	5	6	7	8
2	72.4							
3	50.5	49.0						
4	68.7	85.5	46.8					
5	82.7	71.4	46.2	69.0				
6	71.5	100.0	48.8	84.7	72.6			
7	49.9	45.4	90.1	45.9	47.2	44.7		
8	46.5	45.6	84.4	45.2	47.0	47.2	84.1	
9	71.6	84.7	46.4	85.3	70.8	84.6	45.6	47.1

Sequence names 1: *Moniliella mellis*, 2: *Moniliella suaveolens* var. *suaveolens*, 3: *Trichosporonoides oedocephalis*, 4: *Trichosporonoides madida*, 5: *Moniliella acetobutens*, 6: *Moniliella suaveolens* var. *nigra*, 7: *Moniliella pollinis*, 8: *Trichosporonoides spathulata*, 9: *Trichosporonoides nigrescens*.

두 속에 속하는 균주들의 염기서열 유사도를 비교해 본 결과 *Moniliella*속 5종들 사이에 존재하는 유사도는 45.4% (*M. pollinis*와 *M. suaveolens* var. *suaveolens*의 유사도)에서 100%(*M. suaveolens* var. *nigra*와 *M. suaveolens* var. *suaveolens*)로 나타났으며 *Trichosporonoides*속 4종들 사이에 존재하는 유사도는 45.2% (*T. madida*와 *T. spathulata*)에서 84.4% (*T. oedocephalis*와 *T. spathulata*)로 나타났다. 또한 *Moniliella*속 종과 *Trichosporonoides*속 종들 사이에 염기서열 유사도를 조사해 본 결과 45.6% (*M. suaveolens* var. *suaveolens*와 *T. spathulata*)에서 90.1% (*M. pollinis*와 *T. oedocephalis*)로 나타났다 (Table 2). 이와 같이 염기서열 유사도 분석결과 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기 서열을 토대로 한 분자분류 결과에서, 각 속내 종들간에 유사도 값이 서로 다른 속의 종들과의 유사도 값과 비교하여 볼 때 높지 않음을 알 수 있었으며 이런 결과는 두 속이 서로 다른 분류군으로 명확히 구분되지 않는다는 것을 시사한다. 그러므로 blastoconidia의 크기를 기준으로 두 속을 구분한 형태학적 분류 결과와 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기 서열을 토대로 한 분자분류 결과는 상이한 결과를 나타내었다.

한편, *Saccharomyces cerevisiae*의 표준균주를 outgroup으로 사용하여 각 균주들 사이의 진화적 거리를 계산하여 도식화한 계통수 (Fig. 1)에서 15개의 yeast-like fungi 균주들

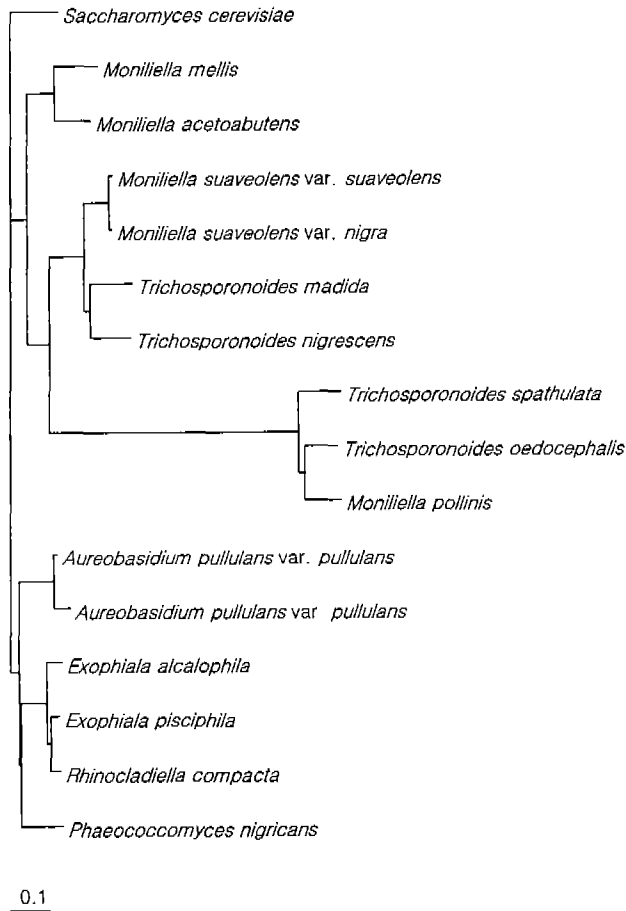


Fig. 1. Distance matrix tree showing phylogenetic affiliations of the yeast-like fungi genus *Moniliella*, *Trichosporonoides* and others.

은 두 개의 major group으로 분리되었으며, 첫 번째 그룹은 *Moniliella*속 5종과 *Trichosporonoides*속 균주 4종을 포함하고 있었으며 두 번째 그룹은 두 속을 제외한 4속 (*Aureobasidium*, *Exophiala*, *Phaeococcomyces*, 및 *Rhinocladiella*속)의 6균주를 포함하고 있었다. 계통수를 기초로 한 분자진화적 연관 관계에서 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속 균주들은 다른 4속의 yeast-like fungi 균주들과는 별개로 단계통 분류군 (monophyletic group)을 형성하여 두 속이 별개의 계통 분류군으로 진화하지 않았음을 알 수 있었다.

또한 첫 번째 그룹은 다시 두 개의 소그룹으로 분리되었으며 첫 번째 소그룹은 *M. mellis*와 *M. acetoabutens*를 포함하고 있었고, 두 번째 소그룹은 *Moniliella* 속과 *Trichosporonoides* 속 균주들이 혼재되어 있었다. *M. mellis* 와 *M. acetoabutens*

는 large subunit rDNA의 D1/D2 영역의 염기서열 분석결과 두 속의 다른 균주들과 별개의 소그룹을 형성하였으나, 현재까지 보고된 두 균주의 분류학적 정보는 생리적 결과만을 포함하므로 정확한 분류학적 위치를 규명하기 위해서는 다상적 분류 (polyphasic classification)방법으로 고찰해볼 필요가 있음을 알 수 있었다.

한편 Martínez등 [9]은 24개의 yeast-like hyphomycetes 균주들을 대상으로 다양한 탄소원의 이용 및 발효특성을 조사하고 이 결과를 dendrogram으로 나타내었는데, 분석결과 *Hyalodendron*속의 5균주는 하나의 그룹으로 묶여 졌으나 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 5개 총 14균주들은 한 그룹 내에 혼재되어 존재하였다. 그러므로 본 연구의 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속 표준균주를 대상으로 조사한 D1/D2 영역의 염기서열 분석에 의한 분자분류 결과와 Martínez 등 [9]이 탄소원 이용성을 토대로 조사한 연관관계는 서로 일치하였다.

M. suaveolens var. *nigra*와 *M. suaveolens* var. *suaveolens*의 경우는 *M. suaveolens* 종의 variety 균주들로 보고 [2]되어 있으나 본 연구 결과 염기 서열 유사도가 100%로 나타나 두 균주 사이에 분류학적 차이가 없음을 알 수 있었다. 그러나 두 variety 균주들의 정확한 분류학적 관계를 규명하기 위해서는 small subunit rDNA full sequencing, 염색체 DNA의 hybridization 등 다양한 분류학적 수단 (taxonomic tools)을 사용하여 종합적으로 평가할 필요가 있으리라 사료된다.

결론적으로 D1/D2 변이 영역의 염기서열분석 결과를 토대로 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 분자 분류학적 연관관계를 조사해 본 결과 두 속은 명확히 다른 분류군으로 구분되지 않았으며, 이와 같은 결과는 두 속을 분자분류학적 관점에서 같은 분류군으로 묶을 수 있음을 의미하며, blastoconidia 크기에 따라 다른 속으로 구분한 형태적 분류 결과와는 상이하였다. 그러나 다양한 탄소원의 이용성 및 5S 염기서열분석에 의한 clustering 결과 [9,13]와 본 연구의 large subunit rDNA D1/D2 변이 영역의 염기서열 분석 결과를 종합하면 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속은 하나의 속 (single genus)으로 통합되어야 한다고 사료되며 이를 위해서는 여러 가지 다양한 분류학적 기법을 응용한 심도 있는 고찰이 보완될 필요가 있다.

요 약

형태 및 생리적으로 유사한 yeast-like hyphomycetes인 *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 분자분류학적 연관관계를 조사하기 위하여 *Moniliella*속 및 *Trichosporonoides*속 9개의 표준 균주와 yeast-like fungi인 *Aureobasidium*, *Exophiala*, *Phaeococcomyces*, 및 *Rhinoctadiella*속 6균주의 large subunit rDNA D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기서열을 분석하고 이 결과를 형태 및 생리적 분류결과와 비교 분석하였다. 분석결과 15개의 균주들은 두 개의 major group으로 분리되었다. *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 9균주는 모두 한 개의 major group을 형성하였으며 각 속의 균주들은 그룹 내에 혼재되어 존재하였으며 서로 다른 분류군으로 명확히 구분되지 않았다. D1/D2 영역의 뉴클레오타이드 염기서열 유사도를 비교해 본 결과 *Moniliella*속 5종간에는 45.4%-100%, *Trichosporonoides*속 4종간에는 45.2%-84.4%, *Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 종들 사이에는 45.6%-90.1%의 유사도를 나타내었다. 또한 *M. suaveolens*의 두 variety균주인 *M. suaveolens* var. *nigra*와 *M. suaveolens* var. *suaveolens*는 100%의 염기서열 유사도를 나타내어 분자분류학적 결과에서 두 variety 균주는 같은 분류군일 가능성을 시사하였다. 또한 *M. mellis*와 *M. acetoabutens*은 두 속 (*Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속)의 다른 균주들과 별개의 소그룹을 형성하였다.

*Moniliella*속과 *Trichosporonoides*속의 분자분류학적 연관관계를 조사해 본 결과 다양한 탄소원의 이용성 분석에 의한 결과와 일치하였으며 이러한 결과를 바탕으로 두 속을 하나의 속으로 통합할 필요가 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- de Hoog, G. S. 1979. Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. *Studies in Mycology* **19**, 1-35.
- de Hoog, G. S. and M. Th. Smith. 1998. *Moniliella* Stolk and Dakin. pp. 785-788. In Kurtzman C. P. and J. W. Fell (eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, Edited by Amsterdam: Elsevier.
- de Hoog, G. S. and M. Th. Smith. 1998. *Trichosporonoides* Haskins and Spencer. pp. 873-877. In Kurtzman C. P. and J. W. Fell (eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn, Edited by Amsterdam: Elsevier.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti and A. Stazzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *IJSEM* **50**, 1351-1371.
- Inglis, G. D. and L. Sigler. 1992. *Trichosporonoides megachiliensis*, a new hyphomycete associated with alfalfa leafcutter bees, with notes on *Trichosporonoides* and *Moniliella*. *Mycologia* **84**(4), 555-570.
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **35**,
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 331-371.
- Martínez, A. T. 1979. Ultrastructure of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. *Stud. Mycol.* **19**, 50-57.
- Martínez, A. T., G. S. de Hoog and M. Th. Smith. 1979. Physiological characteristics of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. *Stud. Mycol.* **19**, 58-68.
- Saitou N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey and N. L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system. *Actinobacteria* classis nov. *IJSB* **47**, 479-491.
- Thompson J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak and D. G. Higgins. 1994. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Walker, W. F. 1984. 5S rRNA sequences from *Atractiellales*, and basidiomycetous yeasts and fungi imperfecti. *Syst. Appl. Microbiol.* **5**, 352-359.

(Received January 18, 2001; Accepted March 5, 2001)