

ITS-RFLP와 ITS1 염기서열 분석에 의한 피부사상균의 동정과 계통적 유연관계

국립보건원 세균질환부 병원감염과
최연화 · 이영선 · 유재일 · 김봉수

=Abstract=

Identification and Phylogenetic Relationship of Dermatophytes Based on RFLP Analysis and Nucleotide Sequence of Internal Transcribed Spacer (ITS)1 in Nuclear Ribosome DNA

Yeon Hwa Choi, Yeong Seon Lee, Jae Il Yoo and Bong Su Kim

Laboratory of Nosocomial Pathogens, Department of Microbiological Diseases,
National Institute of Health 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-701, Korea

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region was amplified from the reference strains and clinical isolates with ITS1 and ITS4 primers. These primers amplified DNA fragments of 550 bp in *Microsporium audouinii* and *Trichophyton violaceum*, 700 bp in *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, and *Trichophyton tonsurans*, and 750 bp in *Microsporium ferreugineum* and *Microsporium canis*. The restriction enzyme patterns of PCR products digested with 13 restriction enzyme including *Pst*I were distinct among the genera, whereas identical in the same species.

Examination of the ITS (Internal Transcribed Spacers)1 nucleotide sequence revealed that there was the genetic difference in each genera and species. Phylogenetic relationship among each species showed that the *Trichophyton mentagrophytes* was more closely related *Trichophyton tonsurans* than *Trichophyton rubrum*, and *Microsporium gypseum* was less related than *Microsporium* spp..

Key Words: Dermatophytes, ITS-RFLPs, ITS1 sequencing

서 론

인체의 모발, 피부의 각질층 및 조갑에 기생하여 병변을 일으키는 피부사상균은 40종 이상이 존재하는 것으로 알려져 있다^{6,25}. 피부사상균의 기존 분류 및 동정방법은 주로 형태학적 특성 및 생화학적 특성으로 이루어졌고^{1,10,11} 비교적 신속하고 정확한 현미경 방법은 균사와 대분생자, 소

분생자 등을 관찰하고 있지만 임상 가검물과 가축 가검물에서 분리된 균주들은 인체에 기생하기에 적합한 형태로 진화하면서 점차로 유성생식의 능력상실, 본래의 특징적인 형태, 즉 포자형성 및 부속기관 생성능력 소실 등에 의한 다양한 형태의 아형을 보이고 있어 전통적인 형태학적 동정을 하는 데에는 많은 어려움이 있고 정확한 동정을 하기 위해서는 많은 시간이 요구된다²⁶. 또한 대부분의 백선균은 유성세대가 밝혀지지 않아 계

접수 : 2000년 3월 6일, 게재결정 : 2000년 4월 12일

*Corresponding author: 김봉수, 122-701 서울시 은평구 녹번동 5번지 국립보건원 세균질환부 병원감염과
Tel: 02) 380-1478; Fax 02) 380-1550; E-mail: cyeonh@nih.go.kr.

통분류학상 그 위치가 불명확하여 불완전균류에 포함되어 있고 분생자의 형태학적 특징에 따라 인위적으로 *Microsporium*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*의 3군속으로 분류하고 있지만 계통학적으로 매우 밀접하므로 계통분류학적 분류가 불분명하다¹⁵⁾. 최근에는 피부사상균의 분류에 여러 가지 분자생물학적 방법이 시도되고 있다. 종전에는 ribosomal DNA (rDNA)의 일부인 18S rRNA¹²⁾나 28S rRNA¹³⁾가 주로 연구 대상이 되고 있으나 진화학적으로 최근에는 인체에 적합하도록 진화되어서 염기서열이 거의 동일한 것으로 보고되고 있다. RAPD방법은 사전에 염기서열 등의 유전정보가 필요없는 random primer에 의해 쉽고 빠르게 균을 동정할 수 있어 널리 사용되고 있지만¹⁷⁻¹⁹⁾ 가끔 재현성 문제로 균종간의 유연관계, 지역간의 차이를 연구하는 데는 제한적이며 미토콘드리아 DNA의 restriction fragment length polymorphism은 다른 방법보다는 감수성과 속도가 떨어지고 좀더 복잡한 기술이 요구된다^{7-9,20,21,23)}. 그래서 최근에는 진균의 계통분류학적 분석 및 동정을 하는데 있어 ribosomal DNA (rDNA)부분중 18S와 5.8S rDNA 사이에 위치한 ITS (Internal Transcribed Spacers)1 부위가 널리 사용되고 있다. 특히 noncoding ITS 부위는 nuclear ribosome gene의 coding 부위보다 변화가 심하므로 분류학상의 유연관계를 연구하는데 유용한 것으로 알려져 있다^{2,3,15)}. 따라서 국내 피부사상균속의 ITS 부위에 대한 restriction fragment length polymorphism (ITS-RFLP)과 염기서열 분석을 통한 정확한 종의 분류 및 계통학적 유연관계를 확립함으로써 임상검체로부터 피부사상균을 검출할 수 있는 taxon-specific probes와 primer 제작의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

임상 분리주

서울 여의도 성모병원, 대구 카톨릭 피부과의원 및 전남대 병원 내원 환자 중 피부사상증으로 의심되는 환자들의 피부사상균을 수집하였다.

표준 균주

본 실험에 사용한 표준 균주는 *T. rubrum* (KCTC 6345, IFO 9185), *T. mentagrophytes* (ATCC 9129, ATCC 9533, KCTC 6077), *T. tonsurans* (ATCC 9083), *M. gypseum* (ATCC 9085 ATCC 14683), *M.*

audouinii (ATCC 9079), *M. canis* (ATCC 18615), *E. floccosum* (KCCM 11667), *T. violaceum* (ATCC 8376), *M. ferrugineum* (KCTC 6351)를 사용하였다.

Template DNA의 추출

평판 배양한 균의 DNA는 Liu¹⁵⁾ 등의 방법을 변형하여 추출하였다. Sabouraud dextrose agar에 접종하여 30℃에서 2주간 배양한 후 lysis buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 4 ml로 처리하여 40 ml 원심분리 tube에 수집하고 주사침으로 잘게 부순 다음 lysozyme (2.5 mg/ml) 1 ml을 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후, RNase (10 mg/ml) 30 µl를 첨가하여 37℃에서 30분 반응시켰다. 다시 10% SDS 500 µl와 proteinase K (10 mg/ml) 50 µl를 처리하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 6M NaCl 2 ml과 chloroform 7.5 ml을 넣어 잘 혼합하여 10,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 원심분리한 상층액은 새로운 원심 tube에 옮긴 후 차가운 아이소프로판올 7.5 ml을 넣어 DNA를 침전시키고 70% 에탄올로 세척한 후 TE buffer에 녹여 분광측정계를 이용하여 DNA농도를 측정하였다.

ITS PCR과 RFLP

ITS-PCR은 White 등²⁰⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. Buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ 0.01% (w/v) gelatin 5 µl, 200 mM dNTP mixture 4 µl, 50 pM primer (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'과 ITS4: 5'-GCTT-ATTGATATGC-3'), *Taq* polymerase 0.025 units/µl로 하고 template DNA농도는 0.02 µg/µl로 반응 혼합물이 50 µl가 되도록 하였다. 반응 조건은 1차로 denaturation은 94℃에서 2분, annealing 온도는 34℃에서 2분, extension은 72℃에서 4분으로 2회 반복하고 2차로 denaturation (94℃에서 2분), annealing (34℃에서 2분), extension (72℃에서 4분)의 반응 횟수를 35회 실시한 후 마지막에 extension (72℃, 10분)을 시행하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer 9600을 사용하였고 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 80 volt로 40분 동안 전기영동시킨 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 자외선 발광기에서 관찰하였다.

ITS-RFLP 관찰은 Nho 등²²⁾과 박 등²⁴⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 증폭된 ITS1-5.8S-ITSII의 rDNA 산물 2.5 µl, 10X buffer 1 µl, 20개의 제한효

소 0.5 μ l와 증류수 6 μ l를 반응물로 하여 37 $^{\circ}$ C (*Sma*I: 25 $^{\circ}$ C)에서 3시간 반응시킨 후 나타난 절편을 2.0% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV로 관찰하였다. 본 연구에 이용된 제한효소는 *Hind*III, *Pma*CI, *Eco*RV, *Pvu*II, *Eco*RI, *Pst*I, *Bgl*II, *Sma*I, *Bam*HI, *Cfo*I, *Dde*I, *Hae*III, *Ava*I, *Sph*I 등이었다.

ITS1 DNA의 염기서열 결정 및 유전적 유연관계 분석

ITS-PCR product을 DNA sequencing kit (Perkin-Elmer)와 automatic sequencer (ABI Genetic Analyzer 310 & 377; Perkin-Elmer)를 사용하여 직접 염기서열 결정을 하였다. ITS sequence alignment와 phylogenetic tree는 Clustal W computer program을 사용하여 작성하였다.

결 과

ITS PCR amplification

ITS1-5.8S-ITS2 산물을 획득하기 위해서 Primer ITS1과 ITS4를 이용하여 주요 피부사상균의 표준 균주인 *M. audouinii*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *M. ferrugineum*, *M. canis*의 DNA에 대한 PCR결과는 Fig. 1과 같다. 이들 산물은 *M. audouinii*와 *T. violaceum*에서 550 bp, *M. canis*와 *M. ferrugineum*는 750 bp, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, 그리고 *T. tonsurans*은 700 bp로 각각 나타났다.

ITS-RFLP

위에서 생성된 PCR산물에 대한 13종류의 제

Table 1. Apparent lengths of restriction fragments of PCR products from Dermatophytes

Dermatophytes	Fragment length (s) bp							
	<i>Pst</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Cfo</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Ava</i> I	<i>Sph</i> I	uncut
<i>M. audouinii</i>	450	-	300	400	300	350	550	550
	150		200	160	120	200	320	
<i>M. gypseum</i>	-	-	200	460	400	520	700	700
			100	230	100	60	400	
<i>M. ferrugineum</i>	-	500	220	250	400	500	750	750
		200	180	200	100	80	480	
<i>M. canis</i>	-	500	220	250	350	500	750	750
		200	180	200		80	480	
<i>T. mentagrophytes</i> and isolates	-	-	260	460	450	700	700	700
			140	260	100		400	
<i>T. rubrum</i> and isolates	-	-	260	350	400	520	(700)	700
			140	280	100	200	400	
<i>T. tonsurans</i>	-	-	260	460	450	700	(700)	700
			140	260	100		400	
<i>T. violaceum</i>	-	300	250	400	300	320	550	550
		200	150	160	120	180	350	

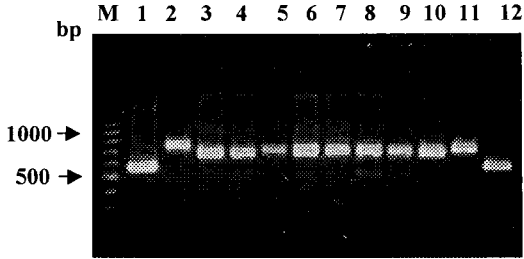


Figure 1. PCR products with primer ITS1 and ITS4. M; 100 bp DNA ladder; Lane 1, *M. audouinii* ATCC 9079; *M. canis* ATCC 18615 (lane 2); *M. gypseum* ATCC 9083 (lane 3); 14683 (lane 4); *T. mentagrophytes* KCTC 6077 (lane 5); ATCC 9129 (lane 6); ATCC 9533 (lane 7); *T. rubrum* KCTC 6345 (lane 8); IFO 9185 (lane 9); *T. tonsurans* ATCC 9085 (lane 10); *M. ferrugineum* KCTC 6351 (lane 11); *T. violaceum* ATCC 8376 (lane 12).

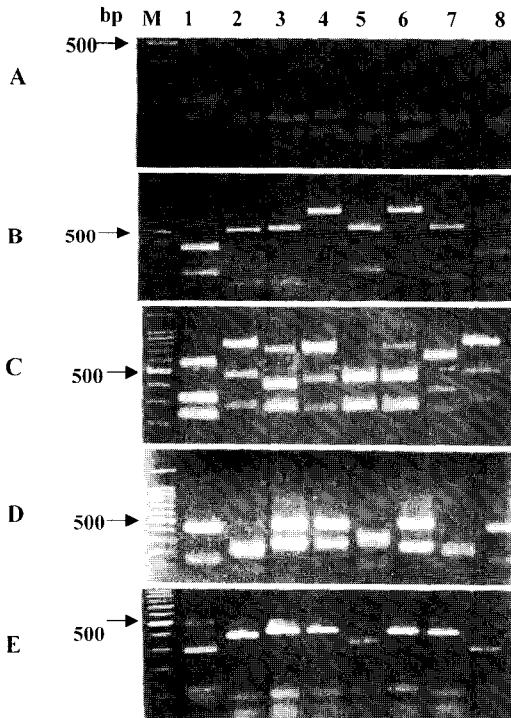


Figure 2. Restriction fragment patterns of ITS1 fragments from Dermatophytes. PCR products were digested with the enzyme *CfoI* (A), *AvaI* (B), *SphI* (C), *DdeI* (D), *HaeIII* (E). Lane 1; *M. audouinii* ATCC 9079; *M. canis* ATCC 18615 (lane 2); *M. gypseum* ATCC 9083 (lane 3); *T. mentagrophytes* ATCC 9533 (lane 4); *T. rubrum* IFO 9185 (lane 5); *T. tonsurans* ATCC 9085 (lane 6); *M. ferrugineum* KCTC 6351 (lane 7); *T. violaceum* ATCC 8376 (lane 8).

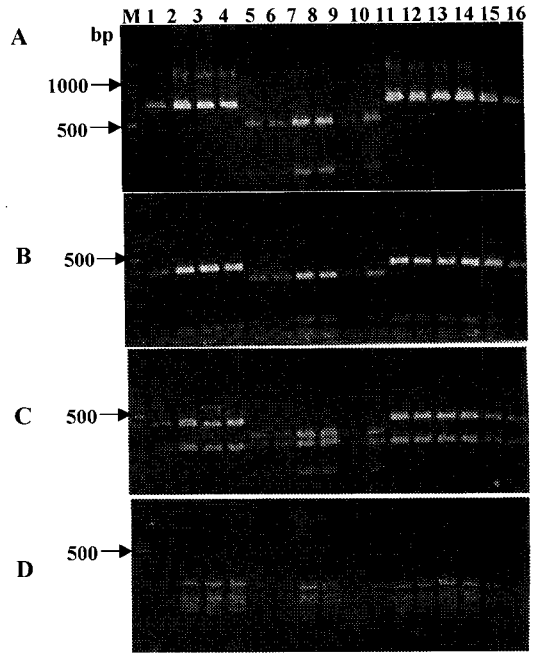


Figure 3. Restriction fragment patterns of ITS1 fragments from *Trichophyton* spp. isolates. Dermatophytes PCR products were digested with the enzyme *AvaI* (A), *HaeIII* (B), *DdeI* (C), *CfoI* (D). Lane 1-4, 11-16: *T. mentagrophytes*, lane 5-10: *T. rubrum*.

한효소를 처리하여 나타난 다양한 절편 양상은 Table 1과 같다. 각 제한효소에 대한 절편 양상을 나타내는 제한효소에 따라 0~3개의 절편 양상을 나타내었다. Fig. 1에서의 결과 분류되지 않았던 species가 *PstI*, *SmaI*, *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *AvaI*, *SphI*을 사용하여 나타난 절편의 양상에서는 각 종에 따른 특정한 밴드양상을 나타내었다. *M. audouinii*와 *T. violaceum*은 *PstI*, *SmaI*, *CfoI*, *AvaI*, *SphI*에서의 밴드양상이 다르게 나타났고 *M. ferrugineum*과 *M. canis*는 *HaeIII*에서 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*은 *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *AvaI*에서 밴드양상이 다르게 나타나고 있으며 *T. mentagrophytes*와 *T. tonsurans*는 *CfoI*에서의 DNA 절편 양상에 차이를 나타내었다 (Fig. 2). *HindIII*, *PmaCI*, *EcoRV*, *PvuII*, *BglII*, *BamHI*의 제한효소에서 사용 균주 모두가 잘라지지 않은 것으로 보아 증폭된 ITS1-5.8S-ITS2 부위에는 이들 제한효소의 인식 부위가 없는 것을 알 수 있었고 각 지역에서 수집된 임상분리주 (*T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*)들도 동일한 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 3).

Figure 4.

TM(AB017171)	A-C-----GCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGCCAAACG---- 42
TMA9129	-----GGA-GCTGGCCCC-----ACGATNG---GGCCAAACG---- 29
TMA9533	-----GGCCCC-----ACGATAG---GGCCAAACG---- 23
TM949	ACC-----GCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGCCAAACG---- 43
TM-C16	AAT-----GAGNNGCCG--GAGGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGCCAAACG---- 43
TM-104	A-C-----GCGCAGGCCG--GATGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGCCAAACG---- 42
TM-T48	AAT-----ANGCNCGCCG--AAGGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGCCAAACG---- 43
TTON(AB017172)	A-C-----GCGCAGGCCG--GAGGCCGGCCCC-----CAGGATAG---GGCAAACG---- 41
TTONT30	A-C-----GCGCAGGCCG--GAGGCCGGCCCC-----CAGGATAG---GGCAAACG---- 41
TR(AB011453)	A-C-----GCGCAGGCCG--GAGGCTGGCCCC-----CACGATAG---GGACCGACG---- 41
TRI9185	A-C-----GC--TGGCCN--GAAGCTGGCCCC-----CNCGATG---GGACCGACG---- 40
TRX6345	-----CTGGCCCC-----ACGATAG---GGACCGACG---- 25
TR-10	-----TNNCCNCA-----ATAGATTT---GGAACGNTN---- 25
TR98-16	A-----GGAATTGNGCCC-----ACGATAG---GGACCGACG---- 31
TR-C32	--C-----TC-CAGGCCG--GANGCTGGCCCC-----CACGATNG---GGAC-GACA---- 41
TR-C36	G-C-----GC--AGCCG--GANGCTGGTCCCC-----ACGATAG---GGACCGACG---- 41
TV1A8376	AAC-----GCGCATGCCGTAATGAGGCCCTCGG-----GGT---CCAACCTCCACCCCGT 49
EP	ACGCGCAGGCCGAGTCGGCCCGTC---CCCTTCT---CTCTGAAT--GCTGGACGGTGTGCGCCGGCCACACGCCCAT 71
EP200	A-----GGACGAANTCGGCCCGTC---CCCTTCT---CTCTGAAT--GCTGGACGGTGTGCGCCGGCCACACGCCCAT 67
EP964	ACTAACCCTGA--GGAATCGGCCCGTC---CCCTTCT---CTCTGAAT--GCTGGACGGTGTGCGCCGGCCACACGCCCAT 70
MG(AB017177)	AC-----G-CGCAGGCCGTTGAAGGGCCCGGGAACCCAGGTCGCGCGTGCAAGTGC CGCCGGCCACACGCCCAT 71
MG14683	ACGCGCAGGCCGACGCGGCCCNCAAGNTCCGTCGCCGATGC---GTCCGGGG--GCGGTGTCTCCGGCCACACGCCCAT 77
MG9083	AANGACTGNTANATGCCG-----TCCCGGATGC---GTCCGGGG--GCGGTGTCTCCGGCCACACGCCCAT 62
MG135	-----ACC--CNCAGGNGNTGAAGGCCGCGCGGACCCAGGTCGCGCGTGCAAGTGC CGCCGGCCACACGCCCAT 70
MG646	-----G-CGCAGGCCGTTGAAGGCCGCGCGGACCCAGGTCGCGCGTGCAAGTGC CGCCGGCCACACGCCCAT 68
MA	ACG-----CGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAA---GCTC----- 34
MC(AJ222622)	ACG-----CGCAAGAGGTCGAAGTTGGCCCCGAA---GCTC----- 34
MC367	ACCT-----CGNAGGAGTTAAGTTGGCCCCGAA---GCTC----- 35
MFK6351	-----CGCAANAAGTCGAAGTTGGCCCCGNA---AGTC----- 32
TM(AB017171)	T-CCATC-----AGGGGTGAGCAG---ATGTGCCCGG----- 71
TMA9129	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAA---ATGTGCCCGG----- 58
TMA9533	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAN---ATGTGCCCGG----- 52
TM949	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAG---ATGTC-GCCGG----- 71
TM-C16	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAN---ATNTGCCCGG----- 72
TM-104	T-CCGTC-----AGGGGTNANCAG---ATGTGCCCGG----- 71
TM-T48	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAN---ATGTGCCCGG----- 72
TTON(AB017172)	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAG---ATGTGCCCGG----- 70
TTONT30	T-CCGTC-----AGGGGTGAGCAG---ATGTGCCCGG----- 70
TR(AB011453)	TTCCATC-----AGGGGTGAGCAG---ACGTGCCCGG----- 71
TRI9185	TTCCATC-----AGGGGTGAACAA---ACGTGCCCGG----- 70
TRX6345	TTCCATC-----AGGGGTGANCAN---ACGTGCCCGG----- 55
TR-10	TTNCTC-----NTGGGTGAG-AAGA---ACNTGCCCGG----- 56
TR98-16	TTCCATC-----AGGGGTGAGCAG---ACGTGCCCGG----- 61
TR-C32	TTCCATC-----AGGGGTNAACAA---ACATGCCCGG----- 71
TR-C36	TTCCATC-----NGGGGTGAACAA---ACGTGCCCGG----- 71
TV1A8376	GTTTAAACAA---ACCTTGTGCTTCGGCGGGCC--CGCCT-----CACG--GCCC----- 92
EP	TCTTGCTACTACCCGGTTCCTCGGCGGGCC--GCGCCCTAGG-----CTG-----CAGTGTCCG 129
EP200	TCTTGCTACTACCCGGTTCCTCGGCGGGCC--GCGCCCTAGG-----CTG-----CAGTGTCCG 125
EP964	TCTTGCTACTACCCGGTTCCTCGGCGGGCC--GCGCCCTAGG-----CTG-----CAGTGTCCG 129
MG(AB017177)	TCTTGCTACT-TTACCAGTTCCTCGGCGGGCCCTCGCGCCCGCAGAGGAGTG-TTAAATTCATGAATACT-GTCCGT 147
MG14683	TCTTGCTAT-TTACCAGTTCCTCGGCGGGCCCGCACTCGT-----GCCGCG 127
MG9083	TCTTGCTAT-TTACCAGTTCCTCGGCGGGCCCGCACTCGT-----GCCGCG 112
MG135	TCTTGCTACT-TTACCAGTTCCTCGGCGGGCCCTCGCGCCCGCAGAGGAGTGATTAATTCATGAATACT-GTCCGT 147
MG646	TCTTGCTACTTACC-CAGTTCCTCGGCGGGCCCTCGCGCCCGCAGAGGAGTGATTAATTCATGAATACTAGTTGGGT 146
MA	TCCGCTCT---CCC---CCCCGG-----GCTCCCGGGGAGGT-----TGC----- 69
MC(AJ222622)	TCCGCTCT---CCC---CCCCGG-----GCTCCCGGGGAGGT-----TGC----- 69
MC367	TCCGCTCT---CCC---CCCCGG-----GCTCCCGGGGAGGT-----TGC----- 70
MFK6351	TCCGCTCT---CCC---CCCCGG-----GCTCCCGGGGAGGT---CTTA-----TGC----- 71

Figure 4. Continued

TM(AB017171)	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TMA9129	-----CCGTACCGCCCC-----	70
TMA9533	-----CCGTACCGCCCC-----	64
TM949	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TM-C16	-----CCGTACCGCCCC-----	84
TM-104	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TM-T48	-----CCGTACCGCCCC-----	84
TTON(AB017172)	-----CCGTACCGCCCC-----	82
TTONT30	-----CCGTACCGCCCC-----	82
TR(AB011453)	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TR19185	-----CCGTACCGCCCC-----	82
TRX6345	-----CCGTACCGCCCC-----	67
TR-10	-----CCGTACCGCCCC-----	68
TR98-16	-----CCGTACCGCCCC-----	73
TR-C32	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TR-C36	-----CCGTACCGCCCC-----	83
TV1A8376	-----	92
EP	TGCAGCGTC-----TCGG-----GGGGCCCGTTCGG---GGGATGGA-GAAGGATGC-----	172
EP200	TGCAGCGTC-----TCGG-----GGGGCCCGTTCGG---GGGATGGA-GAAGGATGC-----	168
EP964	TGCAGCGTC-----TCGG-----GGGGCCCGTTCGG---GGGATGGA-GAAGGATGC-----	172
MG(AB017177)	CTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTA	175
MG14683	CT-----CGANGAAC----CG----	139
MG9083	CT-----CGANGAAC----CG----	124
MG135	CTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTA	176
MG646	CTGAGCGTTAGCAAGTAAAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAA	227
MA	--GGGCG--GCGAG-----GGGTGCC-----TCCGGC-----CGCA-CG--	98
MC(AJ222622)	--GGGCG--GCGAG-----GGGTGCC-----TCCGGC-----CGCA-CG--	98
MC367	--GGGCG--GCGAG-----GGGTGCC-----TCCGGC-----CGCA-CG--	99
MFK6351	--GGGCG--GCGAN-----GGGTNCC-----TCCGGC-----CGCA-CG--	100
TM(AB017171)	-----ATTCTTGCTACCTTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	125
TMA9129	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	112
TMA9533	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	106
TM949	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	125
TM-C16	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	126
TM-104	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	125
TM-T48	-----ATTCTTGCTACATTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	126
TTON(AB017172)	-----ATTCTTGCTACCTTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	124
TTONT30	-----ATTCTTGCTACCTTA-CTCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	124
TR(AB011453)	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	125
TR19185	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	124
TRX6345	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	109
TR-10	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	110
TR98-16	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	115
TR-C32	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	126
TR-C36	-----ATTCTTGCTACCTCA-CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGC-----TC-----	126
TV1A8376	-CCGGGGGGCAT-----CTGC-----CCCGGGC-----CGGGCCGCGC-----	126
EP	CCGGCCGGG---GTTGATCGC---TCCC-----CCA---CCCTGGACA---GCGCTCGCGA-----AG	218
EP200	CCGGCCGGG---GTTGATCGC---TCCC-----CCA---CCCTGGACA---GCGCTCGCGA-----AG	214
EP964	CCGGCCGGG---GTTGATCGC---TCCC-----CCA---CCCTGGACA---GCGCTCGCGA-----AG	218
MG(AB017177)	-----	175
MG14683	-----TCCGGGGACAATCAACTCCCTGGA-----TCGGCCCGCCGG-----AA	178
MG9083	-----TCCGGGGACAATCAACTCCCTGGA-----TCGGCCCGCCGG-----AA	163
MG135	-----	175
MG646	TGGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATCCGGGGG	308
MA	CCC-----ATTCTTGCTACTGA---CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGCCTGCTG-TGCTACAGCGG	157
MC(AJ222622)	CCC-----ATTCTTGCTACTGA---CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGCCTGCTG-TGCTACAGCGG	157
MC367	CCC-----ATTCTTGCTACTGA---CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGCCTGCTG-TGCTACAGCGG	158
MFK6351	CCC-----ATTCTTGCTACTGA---CCCGG-----TTG--CCTCGG--CGGGCCGCGCCTGCTG-TGCTACAGCGG	159

Figure 4. Continued

TM (AB017171)	---TCTC---TCAGG-----AGAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTTA---GTGGCT-----CAACGCTGGACC	178
TMA9129	---TCTC---CCANG-----AAAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTT---AGTGGCT-----AAACGCTGGACC	165
TMA9533	---TCTC---CCAGG-----ANAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTT---AGTGGCT-----AAACGCTGGACC	159
TM949	---TCTC---CCAGG-----AGAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTT---AGTGGCT-----AAACGCTGGACC	178
TM-C16	---TCTC---CCAGG-----AAANCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTT---AGTGGNT-----AAACGCTGGACC	179
TM-T104	---TCTC---CCAAG-----AAANCCGTTCG-GCGAACCTCTCTT---AGTGGNT-----AAACGCTGGACC	178
TM-T48	---TCTC---CCAGG-----AGANCCGTTCG-GCGANCTCTCTT---AGTGGCT-----AAACGCTGGACC	179
TTON (AB017172)	---TCC---CAGG-----AGAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTTA-TAGCGGCT-----CAACGCTGGACC	177
TTONT30	---TCC---CAGG-----AGAGCCGTTCG-GCGAGCCTCTCTTA-TAGCGGCT-----CAACGCTGGACC	177
TR (AB011453)	-----CCCTGCCAGGG-----AGAGCCGTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GAGC---CT-----CGA-GCCGGACN	180
TRI9185	-----CCCTGCCAGGG-----AAANCCGTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GAAC---CT-----CGA-NCCGGACC	179
TRX6345	-----CCCTGCCAGGG-----AAANCCGTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GAAC---CT-----CGA-NCCGGACC	164
TR-10	-----CCCTGCCAGGG-----AGANCCGTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GANC---CT-----CGA-NCCGGACC	165
TR98-16	-----CCCTGCCAGGG-----AGAACCCTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GANC---CT-----CGA-ACCCGACC	170
TR-C32	-----CCCTGCCAGNG-----AAANCCNTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GANC---CT-----CGA-NCCGGACC	181
TR-C36	-----CCCTGCCANGG-----AAAACCCTCCG-GCGGGCCCTTCTGG-GAAC---CT-----CGA-ACCCGACC	181
TVIA8376	-----AAANCCACCTG-----TGAACG-CTGT-----	147
EP	GAGTG---ATTC-----TCAGAAATCT-----ACGAA-----ATCTCC-----	249
EP200	GATTG---ATTC-----TCAGAAATCT-----ACGAA-----ATCTCC-----	245
EP964	GAGTG---ATTC-----TCAGAAATCT-----ACGAA-----ATCTCC-----	249
MG (AB017177)		175
MG14683	GAATG-----ATTAAATCC-----ATGAAT-ACTGTTC-GTCT-----	211
MG9083	GATTG-----ATTAAATCC-----ATGAAT-ACTGTTC-GTCT-----	196
MG135		175
MG646	GCATGCCTGTTTCGAGCGTAITTCACCCCTCAAGCGCGCTTGTGTGATGGACGACCGTCCCGCCTCCCGGCTCCGGGGA	389
MA	-----CCGTTCCGG-----GGGACGCCTGAGGGGACTTTTGT-----TTCTTAGGCCACG-CCCCGGGGA	213
MC (AJ 222622)	-----CCGTTCCGG-----GGGACGCCTGAGGGGACTTTTGT-----TTCTTAGGCCACG-CCCCGGGGA	213
MC367	-----CCGTTCCGG-----GGGACGCCTGAGGGGACTTTTGT-----TTCTTAGGCCACG-CCCCGGGGA	214
MFK6351	-----CCGTTCCGG-----GGGACGCCTGAGGGGACTTTTGT-----TTCTTAGGCCACN-CCCCGGGGA	215
TM (AB017171)	GCGCCCGCCGGAGGA-CAGACGCAAAAAA---TTC---TTTCAGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	235
TMA9129	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAANANC---TGTC---GTCTGAG-----CG	223
TMA9533	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAANANC---TGTC---GTCTGAG-----CG	217
TM949	GCGCCCGCCGGAGGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	235
TM-C16	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAANANC---TNTCA---GTCTGAG-----CG	236
TM-104	GCGCCCGCCGGANGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAANANC---TGTC---GTCTGAN-----CG	235
TM-T48	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACGCAAAAAA---ATTC---TTTCAGAAANANC---TNTCA---GTCTGAG-----CG	236
TTON (AB017172)	GCGCCCGCCGGAGGA-CAGACGCAAAAAAATTC---TTTCAGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	237
TTONT30	GCGCCCGCCGGAGGA-CAGACGCAAAAAAATTC---TTTCAGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	237
TR (AB011453)	GCGCCCGCCGGAGGA-CAGACACC-AAGAAAAAAT---TCTCTGAAGANC---TGTC---GTCTGAG-----CG	239
TRI9185	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACA-CCAAGAAAAAAT---TCTCTGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	238
TRX6345	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACA-CCAAGAAAAAAT---TCTCTGAAGANC---TGTC---GTCTGAG-----CG	223
TR-10	GCGCCCGCCGGAGGACANACAC-CAAG-AAAAAAT---TCTCTGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	224
TR98-16	GCGCCCGCCGGGAAGA-CAGACA-CCAAGAAAAAAT---TCTCTGAAGAAC---TGTC---GTCTGAG-----CG	229
TR-C32	GCGCCCGCCGGANGA-CAGACACCCGGAAAAAAT---TCTCTGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	240
TR-C36	GCGCCCGCCGGANGA-CAGACACCCGGAAAAAAT---TCTCTGAAGAGC---TGTC---GTCTGAG-----CG	240
TVIA8376	-----CTGAAG-----TATGCA-GTCTGANA-----	167
EP	-----ATAGGT---GGTTCAGTCT---GAGCGTTGGCAAGCA---AAAACCAGTCA	291
EP964	-----ATAGGT---GGTTCAGTCT---GAGCGTTGGCAAGCA---AAAACCAGTCAA	287
EP200	-----ATAGGT---GGTTCAGTCT---GAGCGTTGGCAAGCA---AAAACCAGTCAA	291
MG		175
MG14683	-----GANCGTTAGCAAG-----TAAATCAG-----	233
MG9083	-----GAACGTTAGCAAG-----TAAATCAG-----	218
MG135		175
MG646	GGGACGCGCCGAAAAGCAGTGGCAGGCCGCGATTCCGCTTCTGGCGAATGGCAACAAACAGCGCCTNAGACCGGCCGGC	471
MA	GCG-CTCGCCGGAGGATTA-----CTCTGGAAAAAC-AC-----TCTTGAAAGAACATACCG	264
MC	GCG-CTCGCCGGAGGATTA-----CTCTGGAAAAAC-AC-----TCTTGAAAGAACATACCG	264
MC367	GCG-CTCGCCGGAGGATTA-----CTCTGGAAAAAC-AC-----TCTTGAAAGAACATACCG	265
MFK635	GCG-CTCGCCGGAGGATTA-----CTCTGGAAAAAC	244

Figure 4. Continued

TM(AB017171)	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	256
TMA9129	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	244
TMA9533	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	238
TM949	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	256
TM-C16	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	257
TM-104	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	256
TM-T48	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	257
TTON(AB017172)	TTAG--CAA-GCAAAA---ATC---AGTTA	258
TTONT30	TTAG--CAA-GCACAA---ATC---AGTTA	258
TR(AB011453)	TTAG--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	259
TR19185	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	258
TRX6345	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	243
TR-10	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	244
TR98-16	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	249
TR-C32	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	260
TR-C36	TTAN--CAA-GCACAA---TC---AGTTA	260
TVI8376	-----CA-----ATTATTAAATTA	181
EP		
EP964		
EP200		
MG		
MG14683		
MG9083		
MG135		
MG646	TCTGGCCTAGITCCGAGAATGTGTGAATTA	503
MA	TCTGAGCGAGCAACGCA-----AATCA-GTTA	290
MC	TCTGAGCGAGCAACGCA-----AATCA-GTTA	290
MC367	TCTGAGCGAGCAACGCA-----AATCA-GTTA	291
MFK635		

Figure 4. Alignment of ITS1 sequence of Dermatophytes. ITS1 rDNA sequence were aligned by using the CLUSTAL X (1.64b) for multiple sequence alignment. Hypens designate gaps added to permit alignment. EP; *Epidermophyton floccosum*, MA; *Microsporium audouinii*, MC; *Microsporium canis*, MF; *Microsporium ferruginum*, MG; *Microsporium gypseum*, TM; *Trichophyton mentagrophytes*, TR; *Trichophyton rubrum*, TTON; *Trichophyton tonsurans*, TVI; *Trichophyton violaceum*.

ITS1 DNA의 염기서열 결정 및 유전적 유연관계 분석

ITS1 DNA 부위의 염기서열을 분석한 결과 *Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton* 사이에 확연한 차이를 볼 수 있어서 속간의 동정이 가능함을 보여 주었다 (Fig. 4). *Trichophyton* 속에서도 종간의 염기서열의 차이를 관찰할 수 있었고 심지어는 같은 종에서도 미세한 차이를 볼 수 있었다. *Trichophyton* 속에서 보면 *T. mentagrophytes*와 *T. tonsurans*가 *T. rubrum*보다는 염기서열의 유사성이 있음이 관찰되었다. 하지만 *Microsporium* 속의 경우 *M. canis*, *M. audouinii* 그리고 *M. ferruginum*의 ITS1 염기서열에는 거의 변화가 없었으나 *M. gypseum*의 경우는 다른 *Microsporium* 속 균주에 비해 같은 종간의 염기서열의 많은 변화가 관

찰되었다. ITS1 DNA 염기서열에 의한 균종간의 유연관계를 살펴본 결과는 Fig. 5와 같았다.

고 찰

대표적인 피부사상균으로 알려진 *Trichophyton*, *Microsporium* 및 *Epidermophyton*은 인체의 모발, 피부의 각질층 및 조갑에 기생하여 병변을 일으키고 이들이 인체에 감염을 일으키는 것은 종에 따라 차이가 있으며²⁸⁾ 이들의 분류에는 대분생자의 형태, 소분생자의 발생 유무와 각각의 형태, 배열 상태, 집락형태, 모발의 친공 검사 등이 사용되고 있으나 이들 방법은 숙달된 경험과 많은 시간이 필요하며 균종에 따라 다양한 형태의 아형을 보이며 일부 균종은 분류학적으로 정립되어 있지

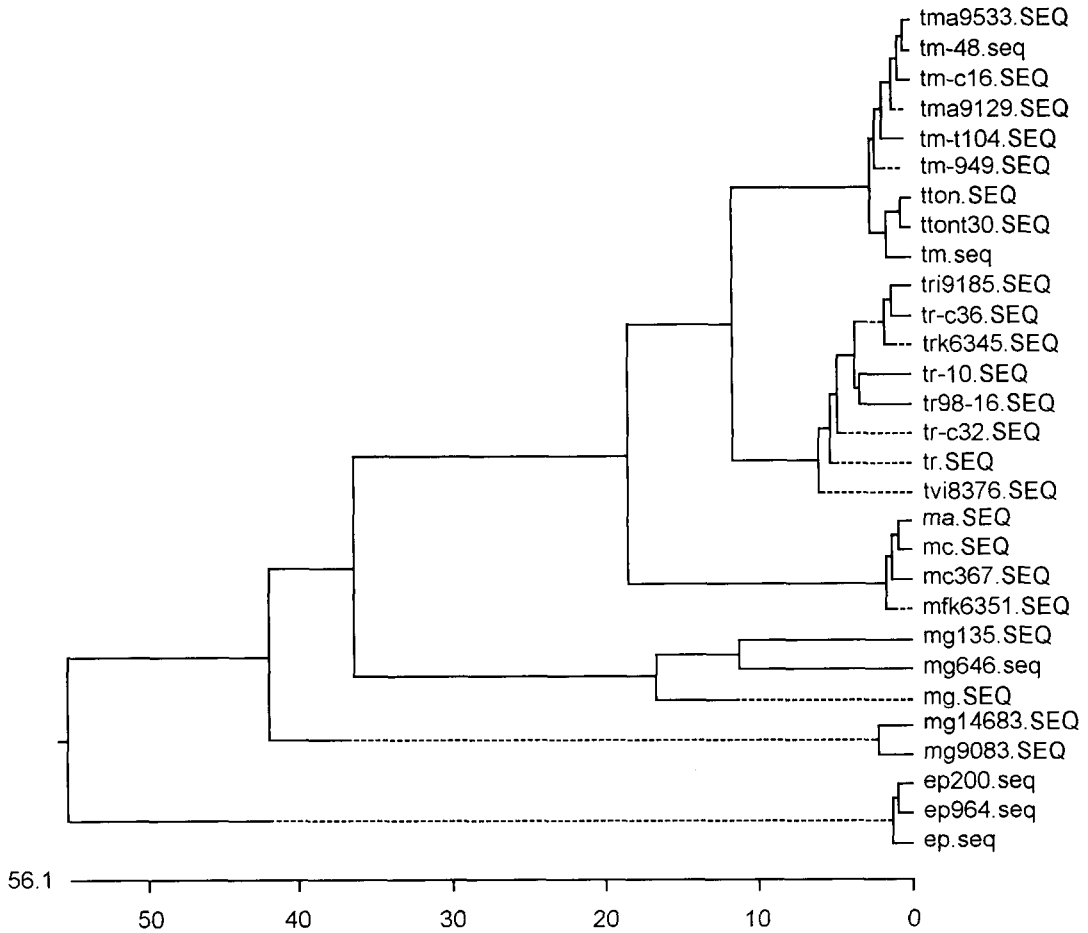


Figure 5. Dermatophytes phylogenetic tree based on ITS1 rDNA sequence using Clustal method with Weighted residue weight table. ep; *Epidermophyton floccosum*, ma; *Microsporium audouinii*, mc; *Microsporium canis*, mf; *Microsporium ferruginum*, mg; *Microsporium gypseum*, tm; *Trichophyton mentagrophytes*, tr; *Trichophyton rubrum*, tton; *Trichophyton tonsurans*, tvi; *Trichophyton violaceum*.

않다. 따라서 DNA분석에 의한 방법이 시도되고 있으나 대부분이 많은 시간을 요하고 또한 균종마다 특이한 염기서열 등의 유전정보를 미리 알아야 하는 어려움이 있다. 최근에는 진균의 계통분류학적 분석 대상으로 rDNA와 ITS 부위가 널리 쓰이고 있다. rRNA gene을 계통분류학적 target DNA sequence 대상이 되는 이유는 많은 균종이 genome당 multicopy로 존재하고 있으며 이들 대부분의 염기서열이 잘 보존되어 있어 이에 대한 PCR primer가 광범위하게 적용될 수 있기 때문이다²⁷⁾. 그러나 rRNA gene중 ITS region은 유전자가 상대적으로 다양하게 변이되어 있어 균종동정 뿐 아니라 진균의 계통유전학적 분석에도 사용되고

있다^{4,13)}. ITS는 ITS1과 ITS2라 불리는 2부분으로 구성되어 있다. ITS는 같은 속에서는 균종 (species)차이를, 심지어는 같은 균종 집단에서도 차이를 보이는 것으로 보고되어 있다. 그래서 이 부위가 이미 세균의 균주동정에 성공적으로 적용된 경우도 있다. ITS-RFLP분석은 primer ITS1와 ITS4를 이용하여 나타난 ITS1-5.8S-ITSII DNA의 산물을 제한효소를 처리하여 나타난 DNA 절편 양상이 진균속에 따른 특이한 DNA fragment 양상으로 나타내고 있어 동정에 유용하게 사용할 수 있고 동일 종에 대한 재현성이 높은 것으로 알려져 있어 PCR-amplified ITS의 restriction analysis는 *Ganoderma*²⁴⁾, *Candida*²⁵⁾ *Phytophthora*²⁷⁾ 등의 진균동정과

유전적 변이를 조사하는 도구로 사용하고 있다. 그러나 아직까지 피부사상균속에 대한 ITS-RFLP 분석은 거의 수행되어 있지 않아 이들 종 (species), 속 (genus), 과 (family)의 다양성에 대한 연구는 미진한 실정이다. 본 연구에서 *Trichophyton*은 *T. violaceum*을 제외하고는 모두 ITS PCR product가 700 bp로 나타난 반면 *Microsporum*속은 균종에 따라 550, 700, 750 bp로 나타나 이는 *Microsporum*속이 유전적 변이가 다양함을 알 수 있다. 피부사상균속의 표준 균주 및 국내 분리주에 대한 ITS-RFLP결과에서는 속에 따라 특이성이 다르게 나타나고 있어 속에 따른 heterogenicity가 비교적 높은 것을 알 수 있으나 같은 균종 내에서는 동일한 양상을 나타내어 DNA 다양성은 관찰할 수 없었다. ITS-RFLP 결과에서 *T. mentagrophytes*와 *T. tonsurans*는 거의 동일한 결과를 나타내고 *CfoI*에서의 양상만이 다르게 나타났다.

본 실험에서도 dendrogram을 작성한 결과 *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, 그리고 *T. violaceum*이 한군을 *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, 그리고 *T. tonsurans*가 또 다른 한군을 이루었다. 이들 그룹은 *T. violaceum*가 *Microsporum*속에 *M. canis*, *M. gypseum*가 *Trichophyton*속과 유전적 상동성이 높은 것으로 나타났으며, 최근까지 *T. ferrugineum*으로 분류되었던 *M. ferrugineum*이 *Trichophyton*속 보다는 *Microsporum*속과 유연관계가 더 가까운 것을 알 수 있었다. 분리주와 표준 균주를 대상으로 ITS 부위 중에서도 염기서열의 변화가 많은 ITS1의 염기서열 분석을 실시하여 피부사상균에 대한 좀 더 정확한 분류학적 유연관계를 보였다. *Trichophyton*속에서는 실험결과 종간의 차이뿐만 아니라 같은 균종간에도 미세한 차이를 보여 주었으므로 지역간의 차이를 볼 수 있는 가능성도 보여 주었다. 그러나 *Microsporum*속에서는 *M. gypseum*을 제외한 다른 균종의 ITS1 염기서열이 거의 동일하였다. ITS1의 염기서열 분석은 균속 및 균종간의 동정 및 유연관계를 동시에 관찰하는데는 매우 유용하지만 균종만 동정할 경우에는 균주의 DNA농도와 조건만 일정하게 맞추어 준다면 RAPD가 훨씬 더 신속하고 경제적인 것으로 나타났다²⁾.

결 론

1. 주요 피부사상균의 DNA에 대한 primer ITS1

과 ITS4를 가지고 PCR하여 나타난 ITS1-5.8S-ITS2 부위의 rDNA산물은 *M. audouinii*와 *T. violaceum*이 550 bp, *M. ferrugineum*과 *M. canis*는 750 bp, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, 그리고 *T. tonsurans*은 분자량 700 bp로 나타났다.

2. ITS1-5.8S-ITS2 rDNA산물에 대한 13개의 제한효소를 처리하여 나타난 다양한 절편 양상은 *PstI*, *SmaI*, *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *AvaI*, *SphI*에서는 각 종에 따른 특정한 밴드양상을 보였다. *M. audouinii*와 *T. violaceum*은 *PstI*, *SmaI*, *CfoI*, *AvaI*, *SphI*에서의 밴드양상이 다르게 나타났고 *M. ferrugineum*과 *M. canis*는 *HaeIII*에서 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*은 *CfoI*, *DdeI*, *HaeIII*, *AvaI*에서 *T. mentagrophytes*와 *T. tonsurans*는 *CfoI*에서 DNA 절편 양상의 차이를 나타내었다.

3. ITS1 DNA 염기서열의 비교결과 균속간에 뚜렷한 차이를 보여 주었다. *Trichophyton*속에서는 균종간에 염기서열의 차이뿐만 아니라 같은 균종간에도 미세한 차이를 볼 수 있었지만 *Microsporum*속에서는 *M. gypseum*을 제외한 다른 균종에서는 ITS1 부위에 거의 변화가 없었다. 하지만 *M. gypseum*의 경우는 같은 균종간에도 많은 염기서열의 변화를 볼 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 김성권, 김승곤, 김영권 등: 임상진균학, 고려의학, pp81-114, 1993.
- 2) 이영선, 유재일, 최연화, 주형렬, 김봉수, 김동한: RAPD PCR분석에 의한 국내피부사상균속 분류 및 동정. 대한의진균학회지 3: 107-118, 1998.
- 3) Berbee M, Yoshimura LA, Sugiyama J, Taylor JW: Is penicillium monophyletic An evaluation of phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 87: 210-222, 1995.
- 4) Carbone I, Kohn M: Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* 85: 415-427, 1993.
- 5) Coleman AW, Mai JC: Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for prediction genetic relatedness. *J Mo Evol* 45: 168-177, 1997.

- 6) Currash RS: Taxonomy of the Onygenales; Arthrodermaceae. *Mycotaxon* **24**: 1-216, 1985.
- 7) deBièvre C, Dauguet C, Nauyen VH, Ibrahim-Granet O: Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens. *Ann Inst Pasteur/microbiol* **138**: 719-727, 1987.
- 8) Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Nishimura K, Miyaji M: Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. *Mycopathologia* **134**: 121-128, 1996.
- 9) Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, Mochizuki T, Watanabe S: Phylogenetic relationship of genera Arthroderma and Nannizzia inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* **118**: 95-102, 1992.
- 10) Kim KH: Identification of Dermatophytes. *Kor J Med Mycol* **2**: 1-8, 1997.
- 11) Kwon-Chung KJ, Bennet J: Medical Mycology. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, pp105-161, 1992.
- 12) Harmsen D, Schwinn A, Weig M, Bröcker EB, Heesemann J: Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. *J Med Vet Mycol* **133**: 299-303, 1995.
- 13) Leclerc MC, Philippe H, Guého E: Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J Med Vet Mycol* **32**: 331-341, 1994.
- 14) Leignel VL, Humbert JF, Elard L: Study by ribosomal DNA ITS2 sequencing and RAPD analysis on the systematics of four *Metastrongylus* species (Nematoda: Metastrongyloidea). *J Parasitol* **83**(4): 606-611, 1997.
- 15) Liu D, Coloe S, Baird PR: Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol Lett* **136**: 147-150, 1996.
- 16) Loughio K, Pitt J, Taylor JW: Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual penicillium species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* **85**: 592-604, 1993.
- 17) Mochizuki T, Uehara M: Efficacy of random amplification of polymorphic DNA method to differentiate between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Trichophyton rubrum*. *Jpn J Med Mycol* **37**: 97-100, 1996.
- 18) Mochizuki T, Sugie N, Uehara M: Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. *Mycoses* **40**: 405-409, 1997.
- 19) Mochizuki T, Sugie N, Tanaka K, Uehara M, Kawasaki M: Identification of clinical isolate of dermatophytes using random amplification of polymorphic DNA. *Acta Dermatol (Kyoto)* **93**: 19-22, 1998.
- 20) Mochizuki T, Tanaka K, Watanabe S, Kawasaki M, Ishizaki H: Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. *J Med Vet Mycol* **28**: 191-196, 1990.
- 21) Mochizuki T, Watanabe S, Uehara M: Genetic homogeneity of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* isolated from geographically distant regions. *J Med Vet Mycol* **34**: 139-143, 1996.
- 22) Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW: Species differentiation by Internally Transcribed Spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* **35**(4): 1036-1103, 1997.
- 23) Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H: Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. *Mycopathologia* **117**: 127-132, 1992.
- 24) Park HJ, Shin KS, Yoon CS, et al: Polymorphic relationship of *Ganoderma* Species with the Polyporaceae based on RFLP analysis of the nuclear ITS region. *J Microbiol* **34**(2): 117-123, 1996.
- 25) Rebell G, Taplin D: Their Recognition and Identification. Coral Gables, FL: University of Miami Press, 1970.
- 26) Takashio M: The *Trichophyton mentagrophytes* complex, In K. Iwata (ed.), Recent advances in

- medical and Veterinary Mycology. University of Tokyo press, Tokyo, Japan, pp271-276, 1977.
- 27) Tooley DW, Bunyard BA, Carras MM, Hatziloukas E: Development of PCR primers from Internal Transcribed Spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infection potatoes. *Appl Environ Microbiol* **63**(4): 1467-1475, 1997.
- 28) White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D. H. Gelfand, Sninsky, and T.J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California., pp315-322. 1990.
-