

한밭 수목원의 과일과 꽃으로부터 효모의 분리

현세희¹ · 민진홍¹ · 김선아² · 이종수¹ · 김하근^{1*}¹배재대학교 바이오 · 의생명공학과, ²한밭수목원

Yeasts Associated with Fruits and Blossoms Collected from Hanbat Arboretum, Daejeon, Korea

Se-Hee Hyun¹, Jin-Hong Min¹, Seon-A Kim², Jong-Soo Lee¹ and Ha-Kun Kim^{1*}¹Department of Biomedical Science and Biotechnology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea²Hanbat Arboretum, Daejeon 302-834, Korea.

ABSTRACT: Yeasts are common inhabitants of the phyllosphere, but our knowledge of their diversity in various fruits and blossoms are limited. We collected different kinds of blossoms and unripened fruits from Hanbat arboretum, Daejeon, Korea at the year of 2013. Yeasts were isolated by plating of suspensions prepared for collected samples onto YPD medium containing antibiotics. BLAST searches were subsequently performed for the comparison of the partially determined sequences of D1/D2 domain of 26S rDNA. As a result, we isolated 57 yeast strains of 31 species from 29 different kinds of blossoms and 6 kinds of fruits samples. We found huge differences in yeast flora depending on the sample collection season.

KEYWORDS : Hanbat Arboretum, D1/D2 region of 26S rDNA, Blossoms, Fruits, Yeasts

효모는 전통적으로 발효에 중요한 역할을 해 오고 있는 미생물이며, 자연계 및 여러 식품으로부터 분리되어 왔다 [1-4]. 뿌리 등 식물의 지하부를 표현하는 근권(rhizosphere)에 대비하는 용어로서, 줄기, 잎, 꽃, 과일 등 식물의 지상부를 엽권(phyllosphere)이라 하는데, 엽권에 존재하는 효모의 다양성 및 밀도에 관한 연구는 지금까지 많지 않다 [5]. 효모는 식물 영양소를 소비하며, 식물 대사를 촉진시키고, 식물의 병원성 미생물들의 성장을 억제하는 길항작용을 함으로써, 고등 식물과 공생관계를 이룬다는 것이 알려져 있다 [6]. 엽권에서의 효모 분포는 지정학적 위치, 기후 조건, 계절, 식물의 종류 그리고 식물 기관과 관련이 있는

것으로 알려져 있다 [5]. 본 연구는 대전시 서구 만년동에 위치한 대전 한밭 수목원의 효모분포를 조사함으로써, 새로운 효모 자원을 확보함과 동시에 수목원에서 특정식물과 효모의 공생관계를 연구하기 위한 기초 자료를 확보하고자 수행하였다.

효모를 분리하기 위해, 대전 시립 한밭수목원에서 2013년 개화한 꽃과 과일을 봄과 가을에 걸쳐 채취하였다. 멸균된 증류수 10 mL에 시료를 30분간 진탕한 후, 항생제 앰피실린 (50 µg/mL)이 함유된 Yeast extract-peptone dextrose 한천배지에 도말하고 30°C에서 48시간 배양함으로써, 효모 균락들을 얻었다 [4]. 한천배지에서 균락을 이룬 효모들을 동정하기 위해, LN1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')과 NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3') 프라이머들을 이용하여 PCR 반응을 수행하여 26S rDNA의 D1/D2의 부위를 증폭하였다 [4]. 증폭된 DNA를 1.5%(w/v) 아가로스 겔을 이용하여 전기영동을 수행하여 증폭된 DNA들을 확인한 후, 증폭된 PCR 산물은 QIAEX II 겔 추출 키트(QIAGEN)를 사용하여 정제하였다. 회수한 DNA의 염기서열 결정은 코스모젠텍사(Seoul, Korea)에 의뢰하여, ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 ClustalX2 프로그램을 사용하여 정렬하였고, 이를 NCBI가 운영하는 BLAST를 사용하여 데이터베이스에

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 178-182
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.178
pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
© The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
E-mail: hakun@pcu.ac.kr

Received June 23, 2014
Revised June 24, 2014
Accepted June 26, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

축적되어 있는 염기서열들과의 상동성을 조사하였다[4]. 본 연구를 통해 얻은 효모의 염기서열 정보들은 BankIt을 통해 GenBank에 등록하였다.

2013년 4월말부터 6월초까지 한밭수목원에 식재되어 있는 19종의 꽃, 6종의 유과를 채취하였고, 2013년 9월에 10

종의 꽃을 수집하였다. 무균조작에 의해 제조한 이들 현탁액을 YPD한천배지에 도말하여 생성된 균락들을 분석하여, 봄철에 분리한 시료로부터 10속, 24종에 속하는 효모 43균주를 분리하였다. 또한 가을철에 수집한 시료로부터 4속, 7종에 속하는 효모 14균주를 분리하였다. 봄철에 채집된 꽃

Table 1. List of yeast species isolated from Hanbat Arboretum, Daejeon, Korea during the spring season of 2013

Strain No.	GenBank accession number (26S rDNA D1/D2 region)	Putative species name	Related GenBank sequence	Identity (%)	Sampling date	Isolation source
HB30-1	KJ507247	<i>Candida pimensis</i>	FJ614654.1	532/539 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Weigela subsessilis</i>
HB46-2	KJ507256	<i>Candida pimensis</i>	FJ614654.1	534/541 (99%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum sargentii</i> for. sterile
HB19-2	KJ507257	<i>Candida</i> sp. HB19-2	AB294739.1	572/574 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB16-1	KJ507258	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JN400746.1	641/641 (100%)	2013-05-02	flower of <i>Viburnum erosum</i>
HB38-2	KJ507259	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JN400746.1	641/641 (100%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>
HB51-1	KJ507260	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JN400746.1	641/641 (100%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Chaenomeles lagenaria</i>
HB51-2	KJ507261	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JN400746.1	641/641 (100%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Chaenomeles lagenaria</i>
HB67-1	KJ507262	<i>Cryptococcus adeliensis</i>	JN400746.1	640/641 (99%)	2013-06-11	flower of <i>Vitis vinifera</i>
HB26-1	KJ507263	<i>Cryptococcus albidus</i>	AF335982.1	624/624 (100%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum sargentii</i> for. sterile
HB29-1	KJ507264	<i>Cryptococcus flavus</i>	EU177572.1	639/640 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Spiraea prunifolia</i>
HB72-2	KJ507248	<i>Cryptococcus magnus</i>	AY242120.1	640/640 (100%)	2013-06-11	flower of <i>Rosa hybrida</i>
HB19-5	KJ507249	<i>Cryptococcus magnus</i>	AY242120.1	640/641 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB48-2	KJ507265	<i>Cryptococcus magnus</i>	AY242120.1	643/643 (100%)	2013-05-16	flower of <i>Spiraea prunifolia</i>
HB55-1	KJ507266	<i>Cryptococcus magnus</i>	AY242120.1	643/643 (100%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Cornus kousa</i>
HB26-2	KJ507267	<i>Cryptococcus saitoi</i>	JN400762.1	637/639 (99%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum sargentii</i>
HB44-3	KJ507268	<i>Cryptococcus saitoi</i>	JN400762.1	638/639 (99%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum carlesii</i>
HB18-2	KJ507250	<i>Cryptococcus</i> sp. HB18-2	JQ327851.1	638/641 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Cornus kousa</i>
HB22-2	KJ507269	<i>Cryptococcus</i> sp. HB22-2	GQ181171.1	638/639 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Caragana sinica</i>
HB31-3	KJ507251	<i>Cryptococcus</i> sp. HB31-3	JX067803.1	629/639 (98%)	2013-05-02	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB32-2	KJ507270	<i>Cryptococcus</i> sp. HB32-2	JQ327851.1	643/643 (100%)	2013-05-02	unripe fruit of <i>Prunus mume</i>

Table 1. Continued

Strain No.	GenBank accession number (26S rDNA D1/D2 region)	Putative species name	Related GenBank sequence	Identity (%)	Sampling date	Isolation source
HB23-1	KJ507271	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	KC006556.1	626/627 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Viburnum carlesii</i>
HB34-1	KJ507252	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	DQ663696.1	613/615 (99%)	2013-05-16	flower of <i>Vitis vinifera</i>
HB68-2	KJ507272	<i>Filobasidium floriforme</i>	AF190007.1	648/653 (99%)	2013-06-11	flower of <i>Duchesnea chrysantha</i>
HB70-3	KJ507273	<i>Filobasidium floriforme</i>	AF190007.1	648/653 (99%)	2013-06-11	flower of <i>Digitalis lanata</i>
HB33-1	KJ507274	<i>Lachancea thermotolerans</i>	CU928180.1	605/615 (98%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Chaenomeles sinensis</i>
HB44-2	KJ507253	<i>Meira geulakonigii</i>	GQ917048.1	636/636 (100%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum carlesii</i>
HB25-1	KJ507275	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KC119207.1	613/613 (100%)	2013-05-02	flower of <i>Malus haliana</i>
HB41-5	KJ507254	<i>Microstroma juglandis</i>	EU069497.1	638/643 (99%)	2013-05-16	unripe fruit of <i>Morus alba</i>
HB65-2	KJ507276	<i>Microstroma juglandis</i>	EU069497.1	640/642 (99%)	2013-06-11	flower
HB66-2	KJ507277	<i>Microstroma juglandis</i>	EU069497.1	637/642 (99%)	2013-06-11	flower
HB45-1	KJ507278	<i>Ogataea polymorpha</i>	HQ684705.1	598/599 (99%)	2013-05-16	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB48-1	KJ507279	<i>Ogataea polymorpha</i>	HQ684705.1	599/599 (100%)	2013-05-16	flower of <i>Spiraea prunifolia</i>
HB12-1	KJ507255	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	AF189921.2	629/629 (100%)	2013-04-30	flower of <i>Pyrusserotina</i> var. <i>culta</i>
HB31-4	KJ507280	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	AF189921.2	629/629 (100%)	2013-05-02	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB44-1	KJ507281	<i>Rhodotorula glutinis</i>	FJ345357.1	617/617 (100%)	2013-05-16	flower of <i>Viburnum carlesii</i>
HB29-3	KJ507282	<i>Rhodotorula graminis</i>	EU563930.1	614/615 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Spiraea prunifolia</i>
HB62-2	KJ507283	<i>Rhodotorula himmulea</i>	AB038130.1	621/631 (98%)	2013-06-11	flower
HB16-3	KJ507284	<i>Rhodotorula minuta</i>	AB026001.2	635/638 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Viburnum erosum</i>
HB70-1	KJ507285	<i>Rhodotorula mucilaginis</i>	EU285542.1	613/613 (100%)	2013-06-11	flower of <i>Digitalis lanata</i>
HB6-1	KJ507286	<i>Rhodotorula phylloplana</i>	AM748546.1	629/629 (100%)	2013-04-30	flower of <i>Malus sieboldii</i>
HB31-1	KJ507287	<i>Rhodotorula phylloplana</i>	AM748546.1	628/629 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Elaeagnus multiflora</i>
HB32-3	KJ507288	<i>Rhodotorula slooffiae</i>	AB566328.1	639/640 (99%)	2012-05-02	unripe fruit of <i>Prunus mume</i>
HB23-2	KJ507289	<i>Rhodotorula</i> sp.	GU571096.1	601/602 (99%)	2013-05-02	flower of <i>Viburnum carlesii</i>

과 유과로부터 분리된 43 효모 균주들 중에서 *Cryptococcus* 속이 7종 18 균주가 분리됨으로써, 가장 많이 발견되었다 (Table 1). 덜꿩나무 (*Viburnum erosum*)의 꽃 그리고 3종의 과일나무인 살구나무 (*Prunus armeniaca* var. *ansu*), 산당화나무 (*Chaenomeles lagenaria*), 포도나무 (*Vitis vinifera*)의 유과로부터 *Cryptococcus adeliensis*가 5균주 분리되어 *Cryptococcus* 속 중 가장 흔하게 분포하였다 (Table 1). 이들 5균주 중 4균주는 기존에 보고되어 있던 서열 (GenBank number JN400746.1)과 100% 동일성을 보였으나 (Table 1), 포도나무에서 분리된 HB67-1은 기존에 보고되어 있던 서열 (GenBank number JN400746.1) 641뉴클레오티드와 1뉴클레오티드의 차이를 보였다. 또한 보니카 (*Rosa hybrida*), 딸보리수 (*Elaeagnus multiflora*), 달기조팝나무 (*Spiraea prunifolia* for. *simpliciflora*)의 꽃 그리고 산딸나무 (*Cornus kousa*)의 유과로부터 *Cryptococcus magnus*가 4균주 분리되었다. 이들 중 딸보리수에서 분리된 *Cryptococcus magnus* HB19-

5균주만이 기존에 보고되어 있던 서열 (GenBank number AY242120.1) 641뉴클레오티드와 1뉴클레오티드의 차이를 보였고, 다른 3균주는 기존에 보고되어 있는 서열 (GenBank number AY242120.1)과 100% 동일한 서열을 갖고 있었다.

또한 *Cryptococcus* sp.가 산딸나무 (*Cornus kousa*), 골담초 (*Caragana sinica*), 딸보리수 (*Elaeagnus multiflora*), 그리고 매실유과 (*Prunus mume*)로부터 4균주 분리되었다. 이들 중 매실유과에서 분리된 *Cryptococcus* sp. HB32-2 균주만이 기존에 보고되어 있던 서열 (GenBank number JQ327851.1)과 100% 동일한 서열을 갖고 있었으며, 산딸나무에서 분리한 HB18-2 균주는 GenBank JQ327851.1 서열과 3뉴클레오티드 차이를, 골담초에서 분리된 HB22-2 균주는 GenBank GQ181171.1 서열과 1뉴클레오티드의 차이를, 그리고 딸보리수에서 분리된 HB31-3 균주는 GenBank JX067803.1 서열과 10뉴클레오티드의 차이를 보였다.

2013년 9월에 수집한 10종의 꽃으로부터 4속, 7종에 속

Table 2. List of yeast species isolated from Hanbat Arboretum, Daejeon, Korea during the fall season of the year of 2013

Strain No.	GenBank accession number (26S rDNA D1/D2 region)	Putative species name	Related GenBank sequence	Identity (%)	Sampling date	Isolation source
HB84-1	KJ507290	<i>Cryptococcus laurentii</i>	FJ743631.1	636/637 (99%)	2013-09-05	flower of <i>Dianthus chinensis</i> var. <i>chinensis</i>
HB80-4	KJ507291	<i>Cryptococcus rajasthanensis</i>	AM262324.1	637/637 (100%)	2013-09-05	flower
HB75-1	KJ507292	<i>Metschnikowia koreensis</i>	AF296438.1	532/532 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Impatiens balsamina</i>
HB85-5	KJ507293	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	JX103182.1	526/539 (98%)	2013-09-05	flower
HB75-4	KJ507294	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Impatiens balsamina</i>
HB81-1	KJ507295	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Mentha suaveolens</i>
HB84-2	KJ507296	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Dianthus chinensis</i> var. <i>chinensis</i>
HB86-1	KJ507297	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Platycodon grandiflorum</i>
HB92-1	KJ507298	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Acanthopanax sessiliflorus</i>
HB94-2	KJ507299	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	643/645 (99%)	2013-09-05	flower of <i>Physostegia virginiana</i>
HB94-7	KJ507300	<i>Pseudozyma aphidis</i>	JN940520.1	645/645 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Physostegia virginiana</i>
HB92-2	KJ507301	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	KC006616.1	605/606 (99%)	2013-09-05	flower of <i>Acanthopanax sessiliflorus</i>
HB93-2	KJ507302	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	KC006616.1	605/606 (99%)	2013-09-05	flower of <i>Hibiscus syriacus</i>
HB77-2	KJ507303	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	HQ670686.1	614/614 (100%)	2013-09-05	flower of <i>Tagetes erecta</i>

하는 효모 14균주를 분리하였다. 이들 중 *Pseudozyma aphidis*가 가장 흔하게 분리되는 효모였는데, 봉숭아(*Impatiens balsamina*), 애플민트(*Mentha suaveolens*), 상록패랭이(*Dianthus chinensis* var. *chinensis*), 도라지(*Platycodon grandiflorum*), 오갈피나무(*Acanthopanax sessiliflorus*), 꽃범의꼬리(*Physostegia virginiana*) 등 6종의 꽃으로부터 *Pseudozyma aphidis* 7균주가 분리되었다. 이들 중 꽃범의꼬리에서 분리된 *Pseudozyma aphidis* HB94-2는 기존에 보고되어 있던 서열(GenBank number JN940520.1)과 645뉴클레오티드 중 2뉴클레오티드가 차이가 있었으며, 나머지 6균주는 기존에 보고되어 있던 서열(GenBank number JN940520.1)과 100%의 동일성을 보였다(Table 2). *Pseudozyma aphidis*는 생물계면활성제인 mannosylerythritol 지질을 생성한다는 사실이 잘 알려져 있다[7]. 또한 최근에는 이들이 식물 방어시스템을 유도하는 역할을 하기 때문에, 병원균을 생물제어하기 위해 사용하려는 연구가 진행되고 있다[8]. 흥미 있는 사실은 봄철에 분리된 효모 43균주와 가을에 분리된 14균주들 중 중첩되는 효모가 발견되지 않았다는 사실이다. 이런 효모 분포의 차이는 봄철에 개화된 화밀의 종류와 가을철 개화된 화밀의 종류가 달라서 효모들의 서식 환경의 차이 때문에 기인된 것으로 사료된다.

Kurtzman 등은 약 500종의 효모들이 갖고 있는 26S rDNA의 D1/D2 가변지역을 PCR에 의해 증폭하고 이들 부위가 분화된 정도를 비교하여, 동정 및 계통 분류에 사용할 수 있음을 보였다[9]. 이들은 26S rDNA의 D1/D2 지역의 뉴클레오티드는 약 600여개에 해당하는데, 이 지역에서 약 1% 이상의 차이를 보이는 효모들은 다른 종에 속할 가능성이 크며, 0-3 뉴클레오티드 차이가 있는 균주들은 동종이거나 아니면 자매 종일 가능성이 있다고 제안하였다[8]. 이러한 관점에서 한발수목원에서 분리한 효모 57균주들 중, *Candida pimensis* HB30-1 (532/539, 98.7%), *Cryptococcus* sp. HB31-3 (532/539, 98.4%), *Lachancea thermotolerans* HB33-1 (605/615, 98.3%), *Rhodotorula hennulea* HB62-2 (621/631, 98.4%), *Metschnikowia pulcherrima* HB85-5 (526/539, 97.5%) 등 5균주들은 GenBank 데이터베이스에 보고되어 있는 염기서열들과 1% 이상의 뉴클레오티드 차이가 발견된 것들로서, 신종일 가능성이 매우 크다고 사료된다. 따라서 이들이 신종인가 여부를 정확하게 판단하기 위하여, 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

적 요

효모는 엽권의 중요한 서식사이지만, 효모의 분포와 역할

을 정확하게 이해하고 있지 못한 형편이다. 2013년 봄과 가을에, 대전시 서구 만년동에 위치한 한발 수목원에 식재되어 있는 각종 꽃과 과일로부터 효모를 분리하였다. 분리된 효모 집락을 PCR 방법에 의해 26S rDNA의 D1/D2 지역을 증폭하고 염기서열을 결정한 후, BLAST를 이용하여 데이터베이스와 비교하여 효모를 동정하였다. 그 결과 29종의 꽃과 6종의 과일로부터, 14속 31종에 속하는 효모를 57균주를 분리하였다. 그 결과 봄과 가을, 계절에 따라서 같은 수목원에서 분리되는 효모 중에 현저한 차이가 있는 것을 발견하였다.

감사의 글

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR 2014-02-001).

REFERENCES

1. Hong SK, Lee KH, Bae KS. Diversity of Yeasts Associated with Natural Environments in Korea. *J Microbiol* 2002;40:55-62.
2. Lee JS, Yi SH, Kim JH, Yoo JY. Isolation of wild killer yeast from traditional meju and production of killer toxin. *Kor J Biotechnol Bioeng* 1999;14:434-9.
3. Lee JS, Choi YJ, Kwon SJ, Yoo JY, Chung DH. Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional Doenjang and Kochujang. *Food Biotechnol* 1996;5:54-8.
4. Min JH, Hyun SH, Kang MG, Lee HB, Kim CM, Kim HK, Lee JS. Isolation and identification of yeasts from wild flowers of Daejeon city and Chungcheongnam-do in Korea. *Kor J Mycol* 2012;40:141-4.
5. Vadkertiov R, Molnrov J, Vrnov D, Slvikov E. Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees. *Can J Microbiol* 2012;58:1344-52.
6. Glushakova AM, Chernov IY. Seasonal dynamics of the numbers of epiphytic yeasts. *Microbiology* 2007;76:590-5.
7. Konishi M, Morita T, Fukuoka T, Imura T, Kakugawa K, Kitamoto, D. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus *Pseudozyma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;75:521-31.
8. Buxdorf K, Rahat I, Gafni A, Levy M. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid- and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. *Plant Physiol* 2013;161:2014-22.
9. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:331-71.