

## 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 생물무기금지협약 목록물질 내 *Ralstonia solanacearum*와 *Burkholderia mallei* 의 계통도 분석

이수민, 유경희, 임윤택, 최형기  
산업자원부 기술표준원 생물환경과  
Tel. 02-509-7250 Fax. 02-507-1922

### 요약문

Burkholderiales에 속하는 미생물 중 풋마름병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum*과 인·수에 공통으로 적용되는 위트모어씨 병(whitmore's disease)을 유발하는 *Burkholderia mallei* 는 생물무기금지협약 목록물질에 포함되어있다. 생물무기금지협약은 생물무기 및 독소무기의 개발·생산·비축의 금지와 그 폐지와 관한 국제협약으로 1974년 발효되어, 현재 144개국에 가입되어 있다. 여기서는 생물무기금지협약 대상 목록물질 내에서 두 종의 병원성 미생물을 대상으로 16S rRNA 유전자 수준에서의 차이를 살펴보고자 하였다. 이를 위해 Ralstoniaceae에 해당되는 몇 종의 미생물과 Burkholderiaceae에 속하는 몇 종의 미생물에서 가장 보편적인 부분으로 알려져 있는 16S rRNA 유전자 염기서열을 대상으로 하여 multiple alignment를 수행하고, 이를 기반으로 계통도를 분석하여 보았다.<sup>1),5)</sup>

이들의 16S rRNA 유전자 염기서열의 확보는 NCBI Genbank를 통해 확보하였다. 계통도 분석을 위해 사용된 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Ralstonia* 속 15종과 *Burkholderia* 속 15종으로 Table 1.에 나타내었으며, Genbank Accession no.를 표시하였다. 이들을 대상으로, 먼저 일본의 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에서 CLUSTAL W를 이용하여 multi alignment를 수행하였고, 계통도를 분석하기 위해 PHYLIP(phylogenetic inference package ver 3.5)<sup>2)</sup>를 사용하였다. 프로그램 사용 조건으로는 seqboot에서 bootstrap을 100회 반복 수행한 결과를 대상으로 DNAdist 프로그램의 Maximum likelihood 방법을 사용하여 distance를 계산하였으며, transition state를 2.0으로 유지하였다. 계통도를 분석하기 위해 outgroup으로 *E. coli*의 16S rRNA 유전자 염기서열을 사용하였으며, 계통도 작성 시에 neighbor joining 방법<sup>3)</sup>을 사용한 distance matrix를 이용하여 consense 프로그램을 구동하였다. PHYLIP으로부터 얻어진 결과를 시각화하기 위해 treeview(ver 1.6.6)을 사용하였다.

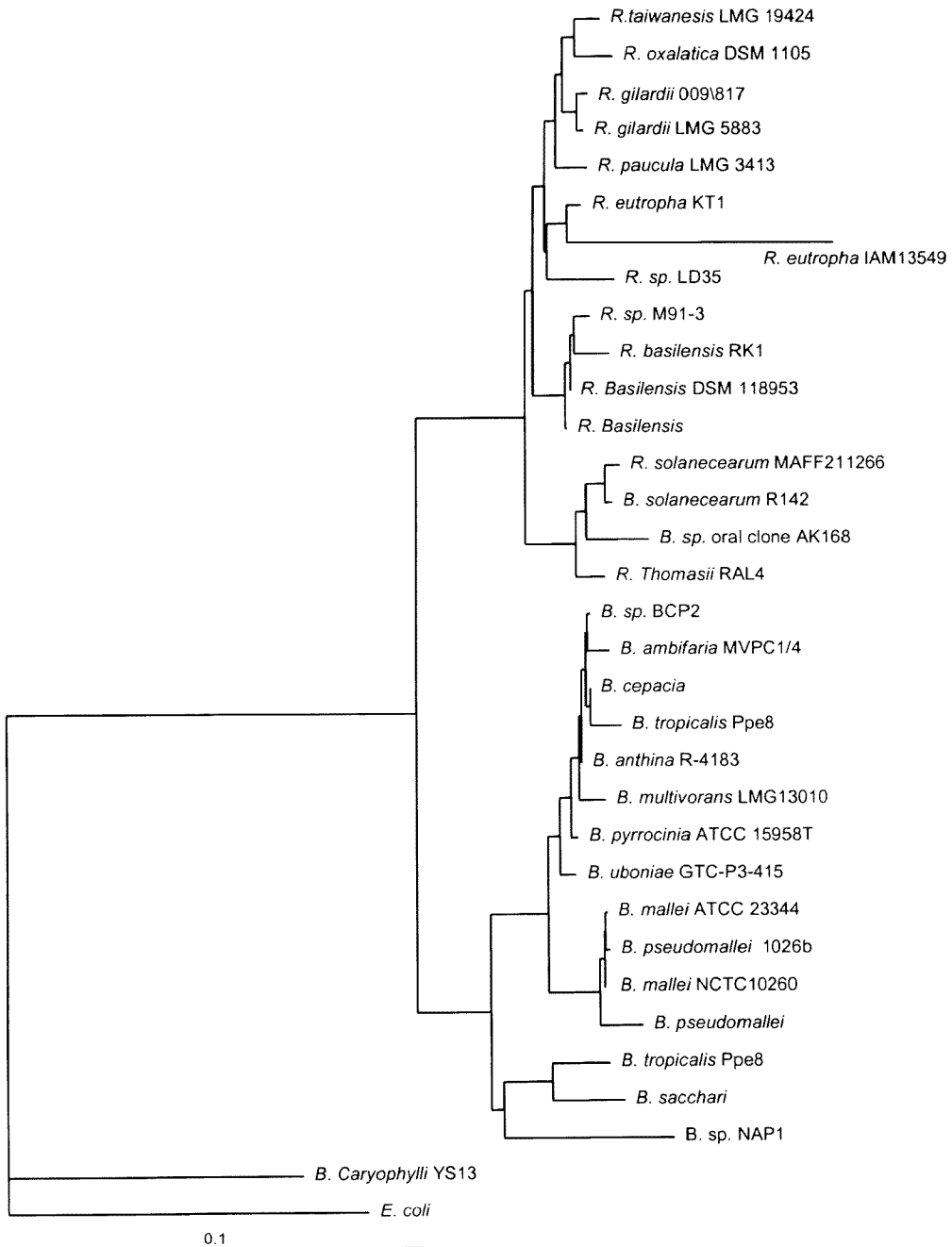
Fig. 1. 계통도에서 제시된 바와 같이, 비교된 *Ralstonia* 종들을 크게 3가지의 분류를 이루는 것을 확인할 수 있었다. 먼저, 그 중에서는 *R. solanacearum*과 *B. solanacearum*는 *R. thomasi*를 포함하여 다른 2개의 큰 group과는 별도의 group을 이루어 존재함을 확인하였다. 이미, *R. solanacearum*과 *B. solanacearum*는 같은 종류의 organism으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 또 다른 group에서는 *R. basilensis* 3종이 group을 형성하여 분류되었으며, 분석을 위해 제시된 나머지 *Ralstonia* 속 미생물들이 별도의 group을 이루는 것을 확인하였다. 또한, 계통도에서 *Burkholderia* 속 미생물에서는 크게 3개의 group으로 구분되는 것을 확인하였다. *B. mallei*,와 *B. pseudomallei* 종들이 별도의 group을 통해 분류되는 것을 확인하였고, *B. tropicalis* 와 *B. sacchari*의 경우에 다른 group을 구성하였다. 여기에서 생물무기금지협약에 포함되는 *Ralstonia* 속 일부 미생물과 *Burkholderia* 속 일부 미생물들의 계통도를 분석하여 생물무기금지협약 목록물질에 포함되는 병원성 미생물들이 별도의 계통 분류를 이루는 것을 확인하였다.

#### 참고문헌

1. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
2. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP phylogenetic inference package version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
3. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
4. Taghavi, M., C. Hayward, L. I. Sly, and M. Fegan. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16SrRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:10-15.
5. Xiang, L., M. Dorsch, T. Del Dot, L. I. Sly, E. Stackebrandt, and A. C. Hayward. 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonas based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 74:324-329.

**Table 1.** NCBI GenBank accession number & list of referred bacteria

Organism	Strain	GenBank Accession No.
<i>B. mallei</i>	ATCC 23344	AF110188
<i>B. mallei strain</i>	NCTC 10260	AF110187
<i>B. pseudomallei</i>		AJ131790
<i>B. pseudomallei</i>	1026b	U91839
<i>B. sp.</i>	BCP2	AF494540
<i>B. cepacia</i>		AF335494
<i>B. tropicalis</i>	Ppe8	AJ420332
<i>B. anthina</i>	R-4183	AJ420880
<i>B. pyrrocinia</i>	ATCC 15958T	AB021369
<i>B. sacchari</i>		AF263278
<i>B. ambifaria</i>	MVPC1/4	AY028444
<i>B. uboniae</i>	GTC-P3-415	AB030584
<i>B. multivorans</i>	LMG 13010	AF148555
<i>B. sp.</i>	NAP1	AF361021
<i>B. sp.</i>	casida	AF226727
<i>R. basilensis</i>	DSM 118953	AF312022
<i>R. taiwanensis</i>	LMG 19424	AF300324
<i>R. sp.</i>	LD35	AF251026
<i>R. gilardii</i>	009\817	RGI306571
<i>R. basilensis</i>		AY047217
<i>R. thomasii</i>	RAL4	RTH270259
<i>R. oxalatica</i>	DSM 1105	AF155567
<i>R. solanacearum</i>	MAFF211266	AF207897
<i>R. paucula</i>	LMG 3413	AF085226
<i>R. gilardii</i>	LMG 5886	AF076645
<i>R. sp.</i>	M91-3	L31650
<i>R. eutropha</i>	KT1	AB15605
<i>R. basilensis</i>	RK1	AJ002302
<i>R. eutropha</i>	IAM13549	D88004
<i>B. solanacearum</i>	R142	U28233



**Fig. 1.** Phylogenetic tree of 16S rRNA genes related with bacteria referred in Table 1. The scale bar indicates a distance in substitutions per nucleotide.