

버섯에서 분리한 형광성 *Pseudomonas* spp.의 ITS I 영역 분석에 의한 계통 분류

권순우* · 고승주 · 강희완¹ · 전명숙 · 류진창
농업과학기술원 분자유전과, ¹농업과학기술원 세포유전과

Phylogenetic Analysis of Fluorescent *Pseudomonas* spp. Isolated from the Cultivated Mushrooms on the Basis of ITS I Region

Soon Wo Kwon*, Seung Joo Go, Hee Wan Kang¹, Meung Sook Cheun
and Jin Chang Ryu

Division of Molecular Genetics, National Institute of Agricultural Science and Technology

¹Division of Cytogenetics, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: A total of 12 strains of fluorescent *Pseudomonas* isolated from the cultivated mushrooms such as *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* were collected. They consisted of pathogenic *Pseudomonas* spp. and epiphytic *Pseudomonas* spp. of the cultivated mushroom. To analyze the phylogenetic relationships of these strains, ITS I region, the 16S-23S intergenic spacer region in the ribosomal RNA (rRNA) operon, was cloned and sequenced. The spacer regions of these strains were 495-527 nucleotides in length and contained the genes encoding isoleucine-tRNA (tRNA^{Ile}) and alanine-tRNA (tRNA^{Ala}). The reciprocal homologies of each ITS I sequence among these strains were in the range of 84.2%~98.8%. According to the analysis of ITS I sequences, the fluorescent *Pseudomonas* spp. were phylogenetically classified into three clusters. Cluster I consisted of *Pseudomonas fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. 'gingeri'*, and *P. 'reactans'* (WLRO). Cluster II comprised *Pseudomonas fluorescens* biovar C and F. Cluster III composed *P. agarici*. Cluster I and II could be classified into *P. fluorescens* complex. *P. agarici* formed an independent taxon clearly separable from *P. fluorescens* complex.

Key words: fluorescent *Pseudomonas*, ITS I region, phylogeny.

재배 버섯에서 분리되는 형광성 *Pseudomonas* 중에는 병원성 세균과 이들과 유사한 생리생화학적 특성을 나타내며 부생하는 비병원성 세균이 있다. 재배 버섯에 갈반병(brown blotch)을 유발하는 *Pseudomonas tolaasii*는 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 표고(*Lentinula edulis*) 등의 다양한 버섯에서 분리되었다(9, 15, 16, 22, 24, 25). *P. agarici*는 양송이 자실체(cap)의 주름(gill)부위에 drippy gill을 일으키는 병원성 세균으로 Young(30)에 의해 최초로 보고된 바 있고, Bes-sette 등(3)은 갈반병과 유사한 yellow blotch 증상의 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*)으로부터 병원성 세균을 분리하여 *P. agarici*로 동정하였다. 우리나라에서는 진등과 신 등은(12, 24)이 느타리와 팽이로부터 *P. tolaasii*와 생리적 특성이 다른 형광성 *Pseudomonas*를 분리하고 이들을 *P. agarici*로 보고한 예가 있다. Wong 등(27)은 양송이로부터 *P. tolaasii*와는 다소 다른 병징을 유발하는

*Pseudomonas 'gingeri'*를 최초로 보고한 바 있다. *P. tolaasii*가 암갈색의 병반을 형성하고 pitting test에 의해 뚜렷한 갈반증상을 나타내는 반면, *P. 'gingeri'*는 ginger blotch disease의 병원균으로서 황갈색(yellow-brown)의 병반을 수반한다(27). 그러나, 이후 *P. 'gingeri'*에 대한 생리생화학적 및 분류학적 연구는 충분히 이루어지지 않았으며, Bergey의 분류서에 정식 학명으로 등록되지 못한 상태이다(20).

한편, 재배 버섯으로부터 흔히 분리되는 형광성 부생 세균으로는 *Pseudomonas fluorescens* biovar들과 *P. 'reactans'* 등이 있다. *P. fluorescens*의 여러 가지 biovar가 버섯으로부터 분리되었으며(9, 26, 31), 이들은 버섯에서 가장 흔히 발견되는 세균이다. *P. 'reactans'*는 *P. tolaasii*와 대치배양 할 경우, *P. tolaasii*에 의해 분비되는 lipodepsipeptide인 tolaasin과 자신에 의해 생성되는 다른 lipodepsipeptide인 WLIP(white line inducing principle)의 응집반응에 의해 흰색의 침전물 즉 white line을 형성하는 특성을 가지며, 이러한 특성은 *P. 'reactans'*

*Corresponding author.

를 정의하는데 이용된다(10, 26, 28). *P. 'gingeri'*와 마찬가지로 *P. 'reactans'*로 명명되는 여러 계통들에 대한 체계적인 분류학적 연구(systematic taxonomy)는 이루어지지 않았고, 이들은 white line reacting organism (WLRO), indicators, *P. 'reactans'* 등과 같은 다양한 이름으로 불리워지고 있다(9, 28, 31).

이상과 같이 버섯에서 분리되는 형광성 *Pseudomonas*는 병원성에 의해 몇 가지 종으로 분류되고 있지만, 생리생화학적인 특성에서는 병원성 세균들과 *P. fluorescens*의 biovar 및 *P. 'reactans'*를 뚜렷하게 구분하기는 힘들다. 따라서 생리생화학적인 특성에 있어서는 이들을 *P. fluorescens* complex로 분류하기도 한다(31).

Ribosomal RNA gene은 생물종의 계통간 유연관계를 구명하는데 흔히 이용되고 있다(1, 18). rRNA gene cluster중 16S rDNA는 종간의 계통분류를 연구하는데 있어 가장 널리 이용되고는 있지만, 그 염기서열이 상당히 보존적으로 진화(conservative evolution)해 왔기 때문에 유연관계가 가까운 종간(interspecific) 혹은 종내의 계통간(intraspecific)의 유연관계를 해석하는데 있어서는 적절하지 못한 경우도 있다(29). rRNA gene cluster중 변이 정도가 큰 부분으로는 16S rDNA와 23S rDNA 사이의 spacer region인 ITS(Internal Transcribed Spacer) I 영역과 23S rDNA와 5S rDNA 사이에 존재하는 ITS II 영역이 있으며, 이들 중 ITS I 영역은 비교적 크기가 크고 변이정도가 16S rDNA와 23S rDNA에 비해 훨씬 크게 나타나(1, 18), 이들 부분의 염기서열을 분석 비교함으로써 유연관계가 가까운 종간의 계통 분류학적 연구가 가능할 것으로 사료된다.

따라서 본 실험에서는 버섯으로부터 분리되는 여러 종의 형광성 *Pseudomonas*에 대한 ITS I 영역의 염기서열을 비교 분석하여 버섯으로부터 분리되는 형광성 *Pseudomonas*들간의 유연관계를 밝히고, 염기서열의 비교에서 나타나는 종간 혹은 그룹간의 차이 부분을 탐색함으로써

이들의 동정에 필요한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건. 본 실험에 사용된 세균은 Table 1에 나타나 있다. 국내 분리 균주는 갈변한 느타리 버섯의 자실체를 마쇄한 후 그 액을 희석하여 PAF (*Pseudomonas* Agar F)배지에 도말한 뒤 형광을 발현하는 colony로부터 분리하였다. *P. fluorescens* biovar F의 LMG 5939는 토양에서 분리된 균주를 분양받았으며, USA 기원의 균주는 Wells(26)로부터 분양받은 재배버섯 분리균주이다. 공시 균주는 25°C에서 24시간 동안 PAF배지에서 배양되었다.

병원성 및 생리적 특성검정. UV조사에 의해 PAF배지에서 배양된 세균들의 형광성물질 생성유무를 관찰하였다. Pitting test 방법(2, 28)에 의해 세균의 병원성 유무를 간이 검정하였고, white line test는 Wong과 Preece(28)의 방법을 따랐다. Biolog test를 위해 BUMG (Biolog Cat. #70001) 배지에서 배양한 분리균을 0.08~0.17의 농도(optical density)가 되도록 현탁하여 95종류의 탄소기질이 있는 96 well의 GN Microplate에 분주하고, 24시간 후에 기질 이용여부를 판별한 후 Biolog사의 software에 의해 동정하였다.

ITS I 영역의 PCR 증폭. ITS I 영역을 PCR 증폭하기 위해 R16-1과 R23-1R의 primer를 이용하였고(19), primer의 염기서열 및 annealing site는 Fig. 1에 나타내었다. PAF 배지에서 배양된 세균을 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ CFU/ml 농도로 증류수에 현탁한 후, PCR 반응에 이용되었다. PCR 반응조건은 (i) 94°C에서 4분간 denaturation, (ii) 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 3분 35 cycle, (iii) 72°C에서 10분간이었다.

Cloning 및 sequencing. PCR에서 얻은 산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동하여, QIAquick gel extrac-

Table 1. Strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. used in this study

Species or subspecies	Strains ^a	Geographical origins ^b	Sources
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	ATCC 33618 ^T	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	CB6033	Cheongju-shi, Chungbug	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas agarici</i>	ATCC 25941 ^T	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biover. C	J14	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biover. F	LMG 5939	Belgium	Soil
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KN8	Jinju-shi, Kyeongnam	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CB4	Cheongju-shi, Chungbug	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas 'gingeri'</i>	Pf3	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	CB5	Cheongju-shi, Chungbug	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	Pf8	USA	<i>Agaricus bisporus</i>
<i>Pseudomonas 'reactans'</i>	J20	USA	<i>Agaricus bisporus</i>

^aATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA; LMG, Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgium

^bThe strains of origin of USA were provided from Dr. J. M. Wells, USDA, USA.

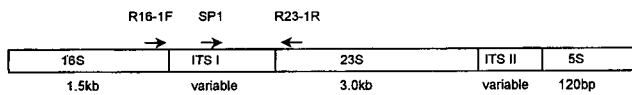


Fig. 1. A structure of ribosomal DNA gene cluster of eubacteria and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS I region used in this study. R16-1F (forward primer): CTTGTACACACCGCCCGTCA (20 mer), R23-1R (reverse primer): GGTACTTAGATGTTTCAGTTC (21 mer), SP1 (sequencing primer): GTAGCTCAGTTGGTTAGAGC (20 mer).

tion kit(QIAquick GmbH, Hilden, Germany)로 ITS I 영역에 해당하는 DNA밴드를 정제한 후, pGEM-T easy vector system(Promega Co.)를 이용해 cloning 하였다. Cloning된 산물의 염기서열은 T7 sequencing kit(Pharmacia Biotech사)를 이용해 결정되었다. Sequencing을 위해 R16-1, R23-1R 및 SP1의 세가지 primer를 이용하였다(Fig. 1)

계통 분류도(phylogenetic tree)의 작성. 계통 분류도를 작성하기 위해 ITS I 영역의 염기서열을 Clustal V program(11)에 의해 배열(alignment)한 후 수작업으로 보정하였다. Distance matrix는 Jukes와 Cantor(13)의 방법을 의해 작성되었으며, 계통분류도(phylogenetic tree)는 MEGA(17)의 neighbor-joining program을 이용, Saitou와 Nei(23)의 neighbor-joining method에 의해 작성되었다.

결 과

병원성 및 생리적 특성에 의한 국내 느타리버섯 분리 균주의 동정. 국내 느타리버섯으로부터 분리된 4균주들에 대한 특성 조사결과는 Table 2에 나타내었다. PAF 배지상에서 4균주는 모두 형광성을 나타내었으며, 병원성 유무를 검정하기 위한 pitting test에서는 CB6044만이 양성반응을 나타내었다. White line test에서는 *P. reactans*의 ATCC 14340과 대치배양시 CB6033이, *P. tolaasii*의 ATCC 33618과 대치배양시 CB5가 각각 white line을 형성하였다. Biolog test에 의한 생리적 특성검정 결과에 따르면 CB6033은 *P. tolaasii*에 가장 가까운 것으로 나타났고, CB4와 KN8은 *P. fluorescens* biovar A로 동정되었다. 그리고 CB5계통은 Biolog test

에서 *P. fluorescens* biovar G로 동정되었으나, ATCC 33618과 대치배양시 white line을 형성하는 것에 비추어 *P. reactans*로 동정하였다.

ITS I 영역의 구조 분석. Fig. 1은 일반적인 eubacteria의 rRNA gene cluster를 나타낸 것이다. ITS I 영역은 16S rRNA gene과 23S rRNA gene의 사이에 존재하는 부위로서, 세균의 속 및 종 등의 분류단위(taxa) 간에 이들의 크기 및 염기서열은 상당히 다른 것으로 보고되고 있다(1, 18). 공시된 형광성 *Pseudomonas*속 12균주에 대한 ITS I 영역의 크기는 495 bp~527 bp였다. *P. agarici*의 표준균주(type strain)인 ATCC 25941의 ITS I 영역의 크기는 527 bp로서 가장 컸으며, *P. fluorescens* biovar C의 G10 균주는 495 bp로 가장 작았다. 12균주의 염기서열 비교에서 나타나는 삽입(insertion), 치환(substitution), 결실(deletion)을 고려한 전체 염기서열의 수는 556 bp였다. ITS I영역에는 두개의 tRNA가 위치하고 있는 것으로 밝혀졌다. 74~76 bp 크기의 tRNA^{Leu} coding gene은 염기번호 97~172 염기사이에 존재하고, 73 bp 크기의 tRNA^{Ala} coding gene은 염기번호 212~284 염기사이에 위치하였다. 이들 두 개의 tRNA coding gene은 상당히 보존된 염기서열을 갖고 있어서 종간 및 계통간의 차이는 매우 적었다.

ITS I의 전체 영역중에는 tRNA coding 영역과 같은 보존 부분(conserved region)뿐 아니라 변이부분(variable region)이 나타나는데, 약 280 bp~320 bp 부분에 나타나는 hypervariable region의 비교에 의하면 *P. agarici*에서는 다른 균주의 ITS I 영역에 비해 염기서열의 상당한 삽입(insertion)이 이루어진 반면, *P. gingeri* 종에서는 염기서열의 결실(deletion)이 관찰되었다(Fig. 2). 그리고, 460 bp~500 bp 부분의 hypervariable region에서는 오히려 *P. tolaasii*를 비롯한 다른 종들에 비해 *P. agarici*에서 염기의 결실이 나타나고, 종간 혹은 그룹간에 4가지 규칙적인 양상의 염기서열 변이가 나타났다(Fig. 2). 이러한 hypervariable region은 ITS I 영역 중에서도 종간 분류에 유용하며, 종 혹은 그룹을 구분하는데 특이적으로 이용 가능하였다.

ITS I 영역을 이용한 계통분석(phylogenetic analysis).

공시된 12균주의 ITS I 영역에 대한 계통간 염기서열 상동성은 Table 3에 나타나 있다. 형광성 *Pseudomonas*

Table 2. Properties of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from *Pleurotus ostreatus*

Strain designation	Fluorescent pigment	Pitting test	White line reaction		Biolog test
			ATCC 33618	ATCC 14340	
CB6033	+	+	-	+	<i>P. tolaasii</i>
CB5	+	-	+	-	<i>P. fluorescens</i> biovar G
CT4	+	-	-	-	<i>P. fluorescens</i> biovar A
KN8	+	-	-	-	<i>P. fluorescens</i> biovar A

Numbering of ITS I region(bp)	280	320
<i>P. tolaasii</i> ATCC 33618	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AA-GTT-TTG-AAAGCT	
<i>P. tolaasii</i> CB6033	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-GA-AGTT-TTG-AAAGCT	
<i>P. 'reactans'</i> CB5	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AA-AGTT-TTG-AAAGCT	
<i>P. 'reactans'</i> J20	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AA-AGTT-TTG-AAAGCT	
<i>P. 'reactans'</i> Pf8	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AA-AGTT-TTG-AAAGCT	
<i>P. fluorescens</i> CB4	TCCACCACCTACTGCTTCTG-C-GTT-ATG-AAAGCT	
<i>P. fluorescens</i> KN8	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AC-GTA-TG-AAAGCT	
<i>P. fluorescens</i> biovar C G10	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AT-TGTA-T-AAAGCT	
<i>P. fluorescens</i> biovar C J14	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-AT-TGTA-T-AAAGCT	
<i>P. fluorescens</i> biovar F LMG 5939	TCCACCAC-TACTGCTTCTG-TT-TGTT-G-AAAGCT	
<i>P. 'gingeri'</i> Pf3	TCCACCACCTACTGCTTCTG-----TC-TTG-AGAGCT	
<i>P. agarici</i> ATCC 25941	TCCACCACCTACTGGTTTTCACCTGCTCTCTAAAGCT	***** ** * ** * ****
Numbering of ITS I region(bp)	460	500
<i>P. tolaasii</i> ATCC 33618	ATTGTGAGTT-CTCTTAATTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. tolaasii</i> CB6033	ATTGTGAGTT-CTCTTAGTTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. 'reactans'</i> CB5	ATTGTGAGTT-CTCTTAGTTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. 'reactans'</i> J20	ATTGTGAGTTACTCGTAATTGAGTATTATCGAATTTTCG	
<i>P. 'reactans'</i> Pf8	ATTGTGAGTT-CTCTTAATTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. fluorescens</i> CB4	ATTGTGAGTT-CTCTTAATTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. fluorescens</i> KN8	ATTGTGAGTT-CTCTTAATTGAGAAAT-TCGAATTTTCG	
<i>P. fluorescens</i> biovar C G10	ATTGTGAGTT-----TAATCG-----CGAATTTTCG	
<i>P. fluorescens</i> biovar C J14	ATTGTGAGTT-----TAATCG-----CGAATTTTCG	
<i>P. fluorescens</i> biovar F LMG 5939	ATTGTGAGTT-----TAATCG-----CGAATTTTCG	
<i>P. 'gingeri'</i> Pf3	ATTGTGAGTT-----AATT-----CG-CGAATTTTCG	
<i>P. agarici</i> ATCC 25941	ATTGTGAGTTA-TCTTA-C-AG-----ATTTTCG	***** * *****

Fig. 2. Hypervariable regions shown on the sequence comparison of ITS I region between strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. *homologous base pair.

12균주간의 염기서열 상동성은 83.6% 이상이었으며, *Pseudomonas agarici* ATCC 25941과 *Pseudomonas fluorescens* biovar C에 속하는 J14의 염기서열 상동성은 83.6%로 가장 낮게 나타났다. 염기서열의 상동성 비교를 통해 작성된 계통 분류도에 의하면 버섯에서 분리된 형광성 *Pseudomonas*는 크게 3가지 cluster로 구분되었다 (Fig. 3). *P. tolaasii* ATCC 33618과 CB6033, *P. fluorescens* CB4와 KN8, *P. 'reactans'* Pf8, J20 및 CB5, *P. 'gingeri'* Pf3 등의 8가지 균주는 cluster I으로 분류되었으며, cluster II는 *P. fluorescens* biovar C의 J14와 G10, *P. fluorescens* biovar F LMG 5939로 이루어져 있다. *P. agarici*의 ATCC 25941은 cluster I, II와는 뚜렷하게 구분되는 독립된 cluster를 형성한다.

Cluster I을 형성하는 계통들은 93.4% 이상의 염기서열 상동성을 보였으며, 동일 종으로 분류되는 *P. tolaasii* ATCC 33618과 CB6033간에는 공식 균주중 가장 높은 99.4%의 염기서열 상동성을 보였다. *P. fluorescens*의 CB4와 KN8의 염기서열 상동성은 98.6%로 비교적 높게 나타났으며, *P. fluorescens* biovar C의 J14와 G10은 96.6%의 염기서열 상동성을 보였다. *P. 'reactans'*로 분류되는 Pf8, J20과 CB5의 염기서열 상동성은 95.5~97.7%

Table 3. Levels of similarity based on ITS I sequences for strains of fluorescent *Pseudomonas* spp.

Organism	% ITS I sequence homology											
	<i>P. tolaasii</i> ATCC 33618	<i>P. tolaasii</i> CB 6033	<i>P. fluorescens</i> CB4	<i>P. fluorescens</i> KN8	<i>P. 'gingeri'</i> Pf3	<i>P. 'reactans'</i> Pf8	<i>P. 'reactans'</i> J20	<i>P. 'reactans'</i> CB5	<i>P. fluorescens</i> biovar C J14	<i>P. fluorescens</i> biovar C G10	<i>P. fluorescens</i> biovar F LMG 5939	<i>P. agarici</i> ATCC 25941
<i>Pseudomonas tolaasii</i> ATCC 33618	100 (509) ^a											
<i>Pseudomonas tolaasii</i> CB6033	99.4	100 (509)										
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CB4	97.7	97.3	100 (510)									
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KN8	98.4	97.8	98.6	100 (509)								
<i>Pseudomonas 'gingeri'</i> Pf3	93.8	93.6	94.3	94.9	100 (498)							
<i>Pseudomonas 'reactans'</i> Pf8	98.2	97.7	98.2	98.8	94.9	100 (511)						
<i>Pseudomonas 'reactans'</i> J20	96.3	95.7	95.9	96.1	93.4	97.3	100 (513)					
<i>Pseudomonas 'reactans'</i> CB5	96.3	96.1	96.5	96.7	94.0	97.5	95.5	100 (512)				
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar C J14	91.8	91.2	91.8	91.9	92.6	91.8	91.0	89.7	100 (496)			
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar C G10	92.9	92.4	93.0	92.6	94.2	93.2	92.8	91.6	96.6	100 (495)		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biovar F LMG 5939	93.5	93.1	94.1	94.1	94.5	93.9	93.0	92.4	95.4	94.6	100 (496)	
<i>Pseudomonas agarici</i> ATCC 25941	84.6	84.4	85.0	85.0	85.3	85.5	84.6	84.6	83.6	84.6	84.3	100 (527)

^a() length of ITS I region expressed as number of base pairs

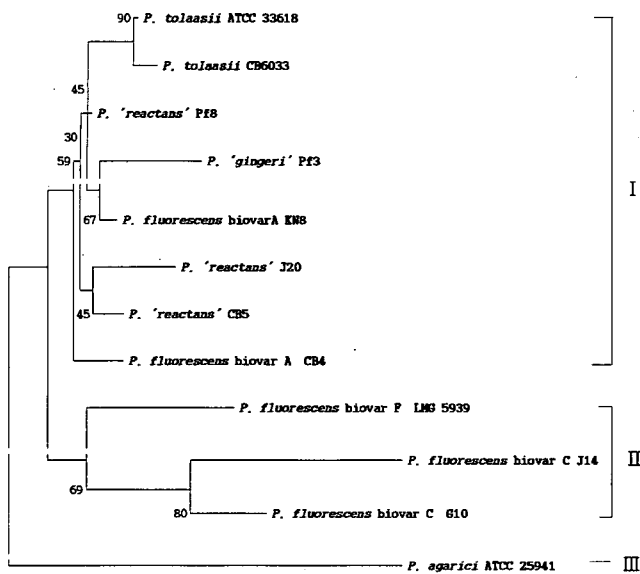


Fig. 3. Phylogenetic dendrogram based on a comparison of ITS I region sequences for fluorescent *Pseudomonas* spp. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method (23). The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled data sets.

로서 종내 계통간 염기서열의 변이는 비교적 크게 나타났다. *P. gingeri*의 Pf3와 cluster I으로 분류된 다른 종간의 염기서열 상동성은 93.4%~94.9%로 가장 낮았다. Cluster II를 형성하는 *P. fluorescens* biovar C와 F의 염기서열 상동성은 94.6%~96.6%로서 나타났으며(Table 3), biovar F의 LMG 5939는 biovar C의 J14와 G10에 각각 95.4%, 95.6%의 염기서열 상동성을 보였고, biovar C의 J14와 G10은 96.6%의 상동성을 나타내었다. Cluster I에 속하는 균주들과 cluster II로 분류되는 균주들간의 염기서열은 89.7% 이상의 높은 상동성을 보인 반면, cluster III로 분류된 *P. agarici*는 cluster I, II에 속하는 균주들과 83.6%~85.3%의 비교적 낮은 염기서열 상동성을 나타내었다.

Cluster I을 구성하는 종들은 다수의 subbranch들로 구분되는데 이들의 bootstrap값은 60% 미만으로 통계적 신뢰도는 그다지 높지 않았다(Fig. 3). 반면, cluster II의 2가지 branch인 *P. fluorescens* biovar C와 *P. fluorescens* biovar F의 bootstrap값은 69%로 비교적 높게 나타나(Fig. 3), ITS I 영역에 의한 계통 분류에서 이들 두 biovar의 구분은 비교적 높은 신뢰도를 갖는 것을 알 수 있었다.

고 찰

버섯으로부터 분리한 형광성 *Pseudomonas*의 여러 종

들에 대한 계통 분류를 위하여 rDNA중 ITS I 영역의 염기서열을 PCR 증폭후 분석하였다. ITS I 영역의 PCR 증폭을 위해 rDNA의 보존 염기서열(conservative sequence)로부터 한쌍의 oligomers를 작성하였다. Forward primer로서 16S rDNA의 3'말단부위를 이용하였으며, reverse primer로서 23S rDNA의 5' 말단부분의 보존염기서열을 이용하였다. 이들 한 쌍의 primer로부터 생성되는 PCR 산물을 agarose gel에서 전기영동 한 결과, DNA 단편의 밴드는 하나 이상 검출되었는데, 이는 Kim과 Song 등(14)이 *Erwinia*와 *Pseudomonas*의 일부종을 이용해 ITS I 영역을 증폭한 경우와 일치한다. PCR 밴드의 수 및 크기는 종에 따라서 차이가 있었으며 밴드의 수는 1~3개였다. 하지만 이들 밴드를 각각 cloning한 후 염기서열을 분석한 바 16S rDNA의 3'말단부위(35 bp 크기)와 23S rDNA의 5' 말단부위(40 bp 크기)의 보존된 염기서열을 갖는 클론(clone)은 공시된 모든 종에서 하나뿐이었다. ITS I 영역을 PCR 증폭하였을 때 하나의 계통에서 길이가 다른 여러 개의 산물이 증폭되는 이유는 명확하지 않지만, 16S rDNA와 23S rDNA의 보존적인 말단부위의 보존 염기서열을 갖는 PCR 산물의 염기서열을 계통간의 유연관계 분석에 이용함으로써 동일한 유전단위에 의한 계통 분류는 가능하리라 사료된다.

한편, 우리 나라의 느타리버섯으로부터 분리된 형광성 *Pseudomonas*중 병원성 및 white line test 등에서 음성 반응을 보이는 균주들에 대해 RAPD를 하여 가장 흔히 나타나는 2개의 RAPD 그룹을 선발하였다. 이들 중 각 그룹에서 5균주를 선발하여 Biolog test 한 결과 10균주 모두 *P. fluorescens* biovar A로 판명되었다(data not shown). 이들 중 각 그룹을 대표하는 균주로 KN8과 CB4를 계통 분류에 이용하였다. 그러나, *P. fluorescens*의 biovars간의 생리적 특성에 의한 구분이 명확하지 않을 뿐 아니라 양송이로부터 분리되는 부생균은 주로 *P. fluorescens* biovar G와 C로 알려져 있음(26, 31)을 고려하여 Biolog test에 의한 국내의 느타리 분리균주는 잠정적으로 *P. fluorescens*로 명명하였다.

Bergey의 분류서(20)에 따르면 *Pseudomonas*속으로 분류되는 종들은 rRNA homology에 의해 크게 다섯가지 group(rRNA homology group I-V)으로 분류되고 있다. 분류서에서는 버섯으로부터 분리되는 세균 종들 중 *P. fluorescens*의 5가지 biovar를 rRNA homology group I으로 분류한 바 있다. 하지만, *P. tolaasii*, *P. agarici*, *P. 'reactans'*, *P. 'gingeri'* 등과 같은 버섯 분리균들에 대해서는 rRNA homology test에 의한 계통 분류학적 연구가 이루어지지 않았다는 이유로, *P. tolaasii*와 *P. agarici*에 대해서만 분류학적 위치가 불명확한 rRNA homology group V로 잠정적으로 분류하였고, *P. 'gingeri'*와 *P. 'reactans'*는 정식학명을 갖지 못한 이유로

rRNA homology group에서 제외되었다(20). *P. tolaasii*, *P. 'gingeri'*와 같은 병원성 균주들과 *P. 'reactans'*, 국내 느타리분리 계통인 *P. fluorescens*와 같은 부생균 등 대부분의 버섯 분리균은 ITS I 영역의 염기서열 상동성이 매우 높을 뿐만 아니라 계통간의 유연관계가 매우 가까운 것으로 나타나 이들 종들은 *P. fluorescens*와 함께 rRNA homology group I으로 분류될 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 De Vos 등(7)과 Goor 등(9)이 각각 DNA:rRNA hybridization test 및 DNA:DNA hybridization test에 의해 *P. tolaasii*가 rRNA group I으로 분류될 수 있다는 주장과 부분적으로 일치한다. 한편, Byng 등(4)의 방향성 아미노산의 생합성경로에 관한 연구에 의해 *P. agarici*는 *P. fluorescens*와 함께 rRNA homology group I으로 분류된 바 있으며, ITS I영역에 의한 분류에서는 rRNA homology group I으로 분류되는 *P. fluorescens* 등과 같은 다른 버섯 분리균과 비교적 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 이러한 결과에 비추어, 버섯으로부터 분리되는 형광성 *Pseudomonas*종들은 계통 분류학적으로 rRNA homology group I으로 재분류될 수 있었다.

Cluster I에 속하는 *P. tolaasii*는 병원성 및 white line test 등에서는 버섯으로부터 분리되는 다른 형광성 *Pseudomonas*종들과 뚜렷이 구분되지만, 생리생화학적인 특성에 있어서는 *P. fluorescens*와 매우 유사하다(9, 26). Bergey의 분류서(20)에 의하면 *P. tolaasii*는 *P. fluorescens*의 biovar B에 유사한 생리적인 특성을 나타낸다고 하였으나, Wells 등(26)은 이들의 생리적인 특성이 *P. fluorescens* biovar G에 유사하다고 하여 생리적인 특성에 의한 분류에 논란이 있어 왔다. ITS I 영역을 이용한 계통간 유연관계의 분석에 따르면 *P. tolaasii*의 ATCC 33618과 CB6033은 *P. fluorescens*의 biovar F 및 C와는 명확히 구분된다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 본 실험에서 *P. fluorescens*의 biovar B와 G는 비교 균주로서 이용되지 않아 *P. tolaasii*가 정확히 어떠한 biovar와 유연관계가 가까운가는 밝히지 못하였으나, Biolog test에서 *P. fluorescens* biovar A로 분류된 국내 느타리버섯 분리 균주들과 유연관계가 가장 가깝게 나타났다. Ginger blotch의 원인균인 *P. 'gingeri'*의 ITS I 영역 또한 *P. fluorescens*와 유사한 것으로 나타나 생리적인 특성에 의한 분류(26, 27)와 일치하는 것으로 나타났다. 한편, *P. tolaasii*와 대치배양시 white line을 형성하는 균들로 정의되는 *P. 'reactans'*의 생리적, 유전적 특성은 계통간 상당한 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(9, 26, 31). Goor 등(9)에 의하면 *P. tolaasii*와 대치배양시 white line을 형성하는 균주간의 DNA:DNA hybridization 값은 매우 낮은 것으로 나타나 종내 유전적인 다양성(heterogeneity)이 존재하는 것으로 보고했으며, Wells

등(26)은 이들을 병원성과 비병원성으로 구분하고, 계통간 생리적인 특성의 차이에 따라 *P. fluorescens* biovar C와 G로 분류하였다. ITS I 영역의 분석에 있어서도 *P. 'reactans'*의 계통간 염기서열 변이는 비교적 큰 것으로 나타나 계통간 다양성이 나타났다. 전체적으로 cluster I과 II로 분류된 종들은 하나의 상위 분류단위(higher taxon)인 *P. fluorescens* complex로 분류될 수 있었고, 이러한 결과는 생리생화학적인 특성에 의한 분류와 일치하였다. 그리고, 병원성적 특성에 의해 서로 다른 종으로 분류된 *P. tolaasii*, *P. 'gingeri'*, *P. 'reactans'*의 ITS I 영역은 상당히 유사하여, 이들 종들의 분화는 비교적 최근에 이루어진 것으로 추정된다.

Cluster I, II와는 염기서열의 상동성이 비교적 낮게 나타난 *P. agarici*는 생리적인 특성에 있어서도 탄소원(carbon substrates)의 이용률이 낮다는 점에서 *P. fluorescens* complex와는 뚜렷하게 구분되며(30), ITS I 영역을 이용한 계통 분류에 있어서도 다른 버섯 분리균과 구분되는 cluster를 형성한다. 특히, 이 종의 ITS I영역은 다른 버섯 분리균의 염기서열과 비교할 때 상당히 다르게 나타나, 이들 특이 염기서열을 이용할 경우 PCR의 진단이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

양송이와 느타리버섯으로부터 분리된 병원성 및 비병원성 *Pseudomonas* 11균주와 토양 분리균 1균주 등 총 12균주의 형광성 *Pseudomonas*를 수집하였다. 이들의 계통 분류학적 유연관계를 분석하기 위해 rRNA gene cluster중 ITS I 영역을 클로닝한 후 염기서열을 밝혔다. 이들의 ITS I 영역은 495~527 염기쌍으로 이루어져 있었으며, 이 영역내에는 Isoleucine tRNA와 Alanine tRNA를 coding하는 gene이 위치하고 있었다. 계통간 ITS I 영역의 염기서열 상동성은 84.2%~98.8%로 나타났다. 이들 염기서열을 이용해 계통 분류한 결과, 버섯 분리 형광성 *Pseudomonas*는 세가지 cluster로 구분되었다. *Pseudomonas fluorescens*, *P. tolaasii*, *P. 'gingeri'*와 *P. 'reactans'* 등은 cluster I으로 분류되었으며, *P. fluorescens* biovar C와 G는 cluster II로 분류되었다. 그리고, *P. agarici*는 cluster III의 구성 종으로 나타났다. cluster I과 II는 보다 고차 분류단위인 *P. fluorescens* complex를 형성하는 반면, *P. agarici*는 이들 복합체와는 뚜렷이 구분되는 독립된 분류단위(taxon)를 형성하였다.

감사의 말씀

본 연구를 수행하는데 *Pseudomonas* 균주를 분양하여

주신 충북대학교 차재순 교수님과 충북 도진홍원의 장후봉 선생님께 감사를 드립니다.

참고문헌

- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. and Gannan, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applic.* 1: 51-56.
- Bessette, A. E. 1985. Use of the mushroom tissue block rapid pitting test to detect brown blotch pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 999-1000.
- Bessette, A. E., Kerrigan, R. W., and Jordan, D. C. 1985. Yellow blotch of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1535-1537.
- Byng, G. S., Johnson, J. L., Whitaker, R. J., Gherna, R. L. and Jensen, R. A. 1983. The evolutionary pattern of aromatic amino acid biosynthesis the emerging phylogeny of pseudomonad bacteria. *J. Mol. Evol.* 19: 272-282.
- Cedergren, R. J., Gray, M. W., Abel, Y. and Sankoff, D. 1988. The evolutionary relationships among known life forms. *J. Mol. Evol.* 28: 98-112.
- Cutri, S. S., Macauley, B. J. and Roberts, W. P. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas 'gingeri'*. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 291-298.
- De Vos, P., Goor, M., Gillis, M. and de Ley, J. 1985. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities of phytopathogenic *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 169-184.
- Doudoroff, M. and Palleroni, N. J. 1974. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ed. Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons, 8th ed. Baltimore, Williams and Wilkins. 1246pp.
- Goor, M., Vantomme, R., Swings, J., Gillis, M., Kersters, K. and de Ley, J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2249-2264.
- Grewal, S. I. S., Han, B., and Johnstone, K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *J. Bacteriol.* 177: 4658-4668.
- Higgins, D. G. and Sharp, P. M. 1988. Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a computer. *Gene* 73: 237-244.
- 진경식, 김정준, 전창성, 이은중. 1994. 버섯갈반병균 *Pseudomonas tolaasii*와 *Pseudomonas agarici*의 분류동정에 있어서의 특성차이. *농시논문집* 36(2): 343-348.
- Jukes, T. H. and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, N. Y.
- Kim, H. M., and Song, Y. W. 1996. Differentiation of major rice -seedborne bacteria by PCR-amplified polymorphism of spacer region between 16S and 23S ribosomal DNA. *Korean J. Plant Pathol.* 12: 11-20.
- 김종완, 권순익, 강희진. 1995. 인공재배버섯에서 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구 2. 버섯 세균성 갈색점무늬병의 병원세균 *Pseudomonas tolaasii*와 White line 형성균의 세균학적 특성. 11(4): 353-360.
- 김종완, 김근희, 강희진. 1994. 인공재배버섯에서 질병을 일으키는 *Pseudomonas*속 병원세균에 관한 연구 1. 인공재배버섯의 부패 변성 원인세균에 대하여. *한국식물병리학회지* 10(3): 197-210.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, University Park.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I., and Decaris, B. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internally transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium phylogeny*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 102-111.
- Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Asada, K., Kato, I., Fujino, K. and Sato, T. 1994. Detection of alcohol-tolerant Hiochi bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 637-640.
- Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas*, p. 141-199. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23: 333-339.
- Rainey, P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of cultivated mushroom. Pages 95-118 in: *Advances in Plant Pathology*, Vol. 8. J. H. Andrews and I. Tommerup, eds. Academic Press, Inc., New York.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 신관철, 전낙범. 1991. 느타리 버섯 세균성 갈반병의 병원균 분류 동정 및 생물학적 방제. *농시논문집(농업산학협동편)*. 34: 1-10.
- Tsuneda, A., Suyama, K., Murakami, S., and Ohira, I. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed on *Quercus* logs. *Mycoscience* 36: 283-288.
- Wells, J. M., Sapers, G. M., Fett, W. F., Butterfield, J. E., Jones, J. B., Bouzar, H. and Miller, F. C. 1996. Postharvest discolorization of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. 'reactans'*, and *P. 'gingeri'*. *Phytopathology* 86: 1098-1104.
- Wong, W. C., Fletcher, J. T., Unsworth, B. A. and Preece, T. F. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 43-48.
- Wong, W. C. and Preece, T. F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 401-407.

29. Yoon, J. H., Lee, S. T., Kim, S. B., Goodfellow, M. and Park, Y. H. 1997. Inter- and intraspecific genetic analysis of the genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S ribosomal DNA (rDNA) and 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 661-669.
30. Young, J. M. 1970. Drippy gill: a bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. *N. Z. J. Agr. Res.* 13: 977-990.
31. Zarkower, P. A., Wuest, P. J., Royse, D. J. and Myers, B. 1983. Phenotypic traits of fluorescent pseudomonads causing bacterial blotch of *Agaricus bisporus* mushrooms and other mushroom-derived fluorescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.* 30: 360-367.

(Received June 3, 1998)