Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 35, No. 4, 347–351(2007)

제주도 감자 더뎅이병징에서 분리된 *Streptomyces* spp.의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

이수현 · 고영환[2] · 김창진[3] · 김범준[1] · 이근화*
제주대학교 의과대학 미생물학교실, [1]서울대학교 의과대학 미생물학교실
[2]제주대학교 공과대학 식품생명공학과, [3]한국생명공학연구원

Phylogenetic Differentiation of *Streptomyces* spp. Isolated from Potato Scab Lesions in Jeju Island of Korea on the Basis of 16S rRNA Gene Sequences. Lee, Soo-Hyun, Young-Hwan Ko[2], Chang-Jin Kim[3], Bum-Joon Kim[1], and Keun-Hwa Lee*. *Department of Microbiology, Cheju National University College of Medicine, Jeju 690-756, Korea, [1]Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea, [2]Department of Food Science and Engineering, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, [3]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yusung, Daejeon 305-600, Korea* – Potato scab is prevalent in all potato-growing areas of Jeju Island and causes economically significant losses. *Streptomyces* species are known as pathogens of potato scab. In this study, we analyzed the 16S rRNA sequences of *Streptomyces* spp, which are isolated from potato scab lesions in Jeju Island, and constructed 16S rRNA phylogenetic tree. All isolates were clearly differentiated into the genus *Streptomyces*, and the tree also showed that new scab-causing *Streptomyces* spp or not yet named species of *Streptomyces* are existed in Jeju Island, Korea.

Key words: Scab-causing *Streptomyces* spp., 16S rRNA gene, phylogenetic analysis

Streptomyces spp.은 토양미생물로서 항균제를 포함한 생물학적 활성이 있는 2차 대사산물을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 또한 감자더뎅이병(potato scab)을 일으키는 병원균으로도 알려져 있다[11]. 더뎅이병은 제주도 전 지역에서 발생하는 병해로서, 더뎅이병징은 괴경표면에 코르크 형태로 움푹 파인 증상(deep-pitted lesions)과 표면에 볼록한 증상(raised scab), 표면에 얇게 형성하는 증상(common scab) 등이 알려져 있으며, 더뎅이병에 걸린 감자는 상품가치가 떨어져 시장출하를 할 수가 없게 된다. 따라서 더뎅이병 발생 시 경제적인 손실이 막대하다[11]. 더뎅이병원균은 대부분 *Streptomyces scabies* 에 의한 것으로 알려져 있으나[8, 18], 최근에는 *S. scabies* 외에 *S. acidiscabies*[9], *S. turgidiscabies* [13], *S. caviscaviscabies*[1, 4] 등 많은 새로운 종이 발견 및 보고되고 있다. 또한 지금까지 동정 되지 않은 *Streptomyces* spp.에 의해서도 더뎅이병이 발생하는 것으로 보고되고 있다. 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp.(potato-scab-causing *Streptomyces* spp.)의 분류 및 동정은 포자의 형태, 멜라닌색소의 유무, 배양적 특성, 지방산, 단백질 분석, DNA–DNA 혼성화 그리고 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석을 통하여 이루어졌다[1, 5, 7, 14, 17]. 16S rRNA 유전자의 염기서열은 세균의 계통분석 및 균의 동정에 많이 사용하는 유전자로서, *Streptomyces* spp.의 동정에도 많이 사용되고 있다[7, 12, 16, 19].

따라서 본 연구에서는 제주도의 더뎅이병징이 있는 감자에서 분리, 배양된 *Streptomyces* spp.의 16S rRNA 유전자를 이용하여 계통분석을 실시하였다(Table 1). 병징에서 분리된 *Streptomyces* spp.은 글리세롤이 15% 함유된 *Actinomycete* 분리용 고체배지인 Difco 212168를 이용하여 28°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 *Streptomyces* spp.의 DNA는 bead beater-phenol 추출법을 이용하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다[10]. 배양된 *Streptomyces* spp.를 200 μL의 TEN buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl: pH 8.0)를 이용하여 수집하였다. 수집한 *Streptomyces* spp.은 2.0 mL 원심분리용 tube에 glass beads(diameter, 0.1 mm: Biospec Products, Bartlesville, Okla.)가 함유된 멸균수 100 μL과 Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol(25:24:1) 100 μL을 첨가하였다. *Streptomyces* spp.을 파쇄 하기 위해서 Mini-Bead Beater(Biospec Products)을 이용하여 1분간 oscillation하였으며, *Streptomyces* spp. DNA를 회수하기 위하여 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상청액은 새로운 원심분리용 tube로 옮긴 후 3 M sodium acetate 10 μL와 ice-cold ethanol 250 μL로 *Streptomyces* spp. DNA를 침전시켰다. 침전한 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1

*Corresponding author
Tel: 82-64-754-3852, Fax: 82-64-702-2687
E-mail: yomust7@cheju.ac.kr

Table 1. Strains isolated from potato scab lesion from Jeju-do used in this study.

No.	Isolates	16S rRNA analysis	No.	Isolates	16S rRNA analysis
1	PS3/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	11	DS5/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
2	PS4/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	12	DS8/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
3	PS5/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	13	DS11/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
4	PS6/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	14	DS12/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
5	PS9/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	15	DS14/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
6	PS11/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	16	DS15/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
7	PS12/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	17	DS16/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
8	DS1/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	18	DS17/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
9	DS2/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	19	DS19/Jeju-do	*Streptomyces* spp.
10	DS3/Jeju-do	*Streptomyces* spp.	20	DS20/Jeju-do	*Streptomyces* spp.

mM EDTA, 100 mM NaCl: pH 8.0)에 용해 시켜 본 연구에 사용하였다.

제주도 감자 더뎅이병징에서 분리된 *Streptomyces* spp.의 16S rRNA 유전자를 증폭시키기 위해 대표적인 더뎅이병원균인 *S. scabiei*의 16S rRNA 유전자 염기서열을 바탕으로 primer(Forward primer 5'-ATGAAAGTTATCAAAACA-GCACCTTTGATCCCA-3', Reverse primer 5'-TCAGTCGTT-ACCTCCTTTATC-3')를 제조하였다. PCR반응은 Taq DNA polymerase(1 U), 250 μM deoxynucleoside triphosphate, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, gel loading dye을 포함하고 있는 PCR mixture tube (AccuPower PCR PreMix; Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하였다. 주형 DNA 50 ng과 제조한 Forward/Reverse primer 각 20 pmol을 넣고 증류수로 최종농도가 20 μL가 되도록 첨가하여 혼합물을 만들었다. 중합효소반응은 처음에는 95°C에서 5분 동안 denaturation을 시행한 뒤, 30 cycle로 denaturation 94°C 30초, annealing 60°C 30초, extension 72°C 45초, 최종적으로 72°C에서 10분간 extension을 수행하였다. 중합효소연쇄반응 산물은 1% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동한 PCR 산물은 QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)로 추출한 후에 염기서열 분석을 자동염기서열 분석기(Applied Biosystems model 373A)로 수행하였다. 자동염기서열 분석은 주형 DNA 60 ng, primer 3.2 pmol, 증류수를 혼합하여 12 mL을 만든 후에 BigDye Terminator Premix(Perkin-Elmer Applied Biosystems; part no. 430315512114) 8 mL을 섞어 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 model 9600 thermocycler; Perkin Elmer Cetus을 사용하여, 25 cycle로 95°C 15초, 50°C 10초, 60°C 4분으로 수행하였다. 반응이 끝난 산물은 QIAEX spin column을 이용하여 정제한 후에 5% acrylamide gel에서 1X TBE buffer에서 40 watt로 7시간 전기영동 하여 20개의 제주도 감자 더뎅이병징에서 분리된 균주와(Table 1), 16개의 표준 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 1400 bp를 결정하였다(Table 2). 결정한 16S rRNA 유전자 염기서열은 DNASTAR program MegAlign package의 multialignment algorithm(Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison)으로 정렬하였다. 결정한 16S rRNA 유전자의 염기서열에 대해서 MEGA2 program의 neighbor-joining(NJ) 방법[15]을 사용하여 계통분석 및 계통도를 구축하였다[6, 12]. 또한 통계적 유의성을 가지기 위해서 bootstrap을 1000번 수행하였다.

Table 2. *Streptomyces* reference strains used in this study.

No.	Species	Strains
1	*Streptomyces scabie*	KACC 20193
2	*Streptomyces scabies*	KACC 20200
3	*Streptomyces scabies*	Isolate OH01-5d
4	*Streptomyces europaescabie*	KACC 20186
5	*Streptomyces bottropensis*	NBRC 13023
6	*Streptomyces diastatochromogenes*	NBRC 3337
7	*Streptomyces neyagawaensis*	NBRC 3784
8	*Streptomyces turgidiscabies*	NBRC 16080
9	*Streptomyces acidscabies*	ATCC 49003
10	*Streptomyces griseofuscus*	NBRC 12870
11	*Streptomyces violaceolatus*	NBRC 13101
12	*Streptomyces diastatitus*	NBRC 15402
13	*Streptomyces gelaticus*	NRRL B-2928
14	*Streptomyces ehimensis*	NBRC 13470
15	*Streptomyces kitasatoeensis*	NBRC 13686
16	*Micromonospora* spp.	NAR01

제주도 감자 더뎅이병징에서 분리된 균들은 out-group으로 정한 *Micromonospora* spp.에 대해서 하나의 그룹을 형성하였으며, *Streptomyces* spp. group에 속하였다. 이들은 계통수를 통하여 Group I-VII로 구분하였다(Fig. 1). Group I(*S. scabiei* & *S. diastatochromogens* group)에 속하는 분리균은 DS1, PS9 그리고 DS16이다. 이들은 *S. scabiei*, *S. europaeiscabiei*, *S. bottropensis*, *S. diastatochromogenes*, 그리고 *S. diastatochromogenes*와 염기서열이 같거나 유사하였다. Group II(*S. turgidiscabies* group)에 속하는 분리균은 DS19로 *S. turgidiscabies*와 염기서열이 100% 동일하였다. Group III(*S. acidiscabies* group)는 8개로 PS3, PS4, PS5, PS11, PS12, 그리고 DS17은 *S. acidiscabies*와 염기서열이

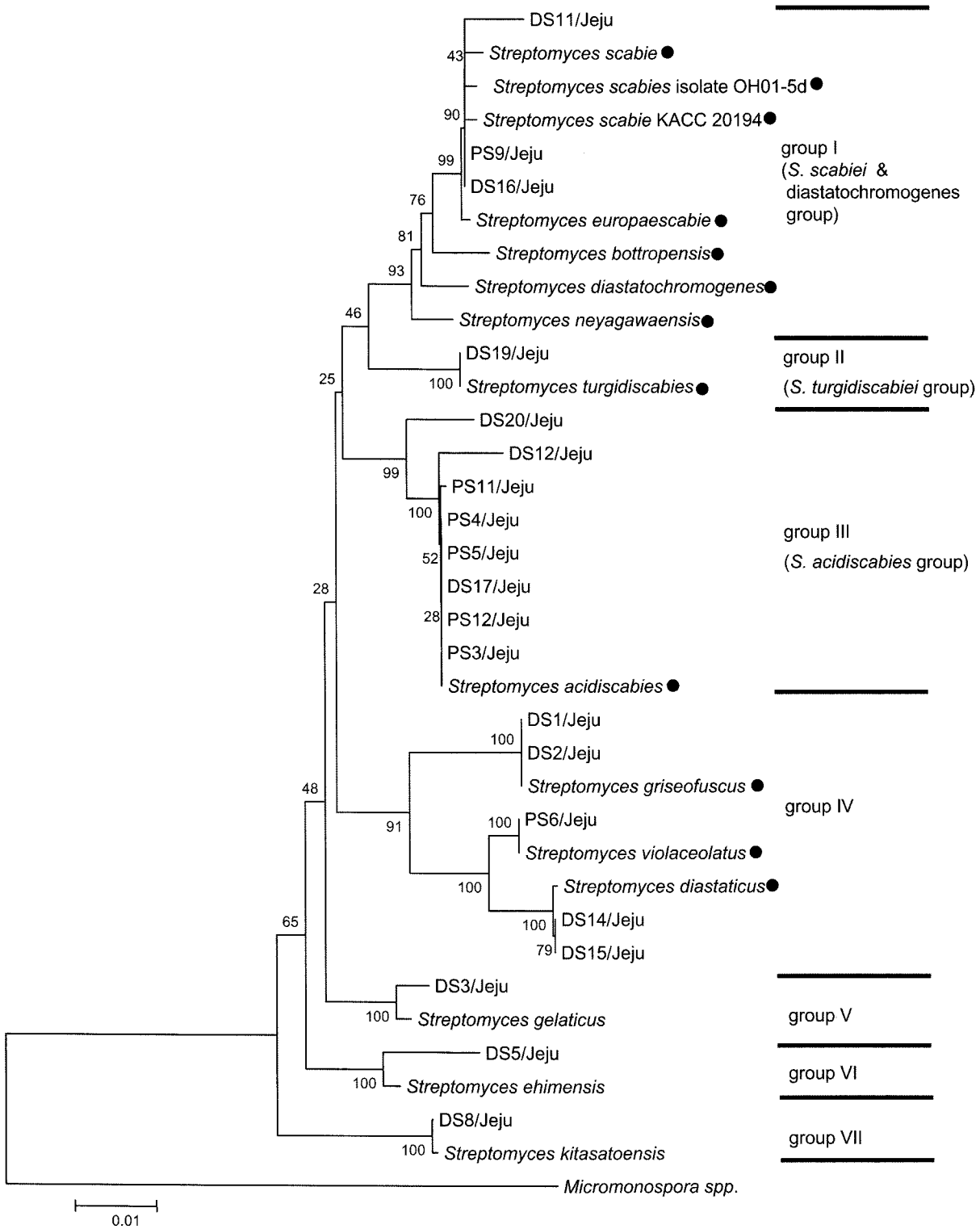

Fig. 1. Phylogenetic relationships among scab-causing *Streptomyces* spp. based on 16S rRNA gene (1400 bp). This tree was constructed by the neighbor-joining method in the MEGA2 program. The bootstrap values presented at the corresponding branches were evaluated from 1000 replications. ●, potato scab causing reference strains.

100% 동일 하였으며, DS12 그리고 DS20는 *S. acidiscabies* 와의 염기서열이 각각 98.1% 그리고 97.6%의 유사도를 보였다. Group IV는 5개로 DS1 그리고 DS2는 *S. griseofuscus*와 100% 동일 하였으며, PS6는 *S. violaceolatus*와 100%동일 하였으며, DS14 그리고 DS15는 *S. diastaticus*의 염기서열과 각각 99.2% 그리고 99.6%의 유사도를 보였다.

분리균 DS3는 Group V에 속하며, *S. gelaticus*와 염기서열이 유사하였다. 분리균 DS5는 Group VI에 속하며 *S. ehimensis*와 염기서열이 유사하였다. 분리균 DS8은 *S. kitasatoensis*와 유사하였다(Group VII). Group I-IV에 속하는 *Streptomyces* spp.는 감자 더뎅이병을 일으키는 병원균들로 알려져 있다. 따라서 Group I-IV에 속하는 분리균은 더뎅이병원균으로 볼 수 있다. 그러나 Group V-VII에 속하는 분리균(DS3, DS5 그리고 DS8)은 지금까지는 더뎅이병과 관련성이 알려져 있지 않은 *Streptomyces* spp.으로서 기존에 알려진 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp.가 아니다. 따라서 본 연구에서 16S rRNA 유전자의 계통분석을 통해 제주도에만 존재하는 새로운 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp., 혹은 아직까지 명명되지 않은 *Streptomyces* spp.가 존재할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 기존에 알려져 있지 않은 더뎅이병을 일으키는 제주 분리균에 대해서는 지방산과 단백질 분석, 그리고 DNA-DNA 혼성화 등과 같은 보다 많은 연구의 수행을 통하여 새로운 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp.인지, 또는 아직까지 명명되지 않은 *Streptomyces* spp.인지를 확인 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

요 약

감자 더뎅이병은 제주도 전 지역에서 발생하는 병해로서 더뎅이병 발생 시 경제적인 손실이 막대한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 제주도 감자 더뎅이병징이 있는 부위에서 *Streptomyces* spp.를 분리, 배양한 후, 16S rRNA 유전자를 이용하여 계통분석을 실시하였다. 계통분석 결과 제주도 감자 더뎅이병징이 있는 부위에서 분리된 균은 모두 *Streptomyces* spp에 속하였으며, 대부분이 기존에 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp.로 확인되었다. 그러나 일부의 분리균은 기존에 알려진 감자 더뎅이병원균과는 다르다. 따라서 이들 병원균에 대해서는 지방산과 단백질 분석, 그리고 DNA-DNA 혼성화 등과 같은 보다 많은 연구의 수행을 통하여 새로운 더뎅이병을 일으키는 *Streptomyces* spp.인지, 또는 아직까지 명명되지 않은 *Streptomyces* spp.인지를 확인해야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

This research was supported by a grant from the KRIBB-JEJU joint research program, funded by the Jeju Special Self-Governing Province, South Korea and by a grant from the Cheju National University Medical Research Fund (2004).

REFERENCES

1. Faucher, E., E. Paradis, C. Goyer, N. C. Hodge, R. Hogue, R. E. Stall, and C. Beaulieu. 1995. Characterization of *Streptomycetes* causing deep-pitted scab of potato in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 222-225.
2. García-Martínez, J., I. Bescós, J. J. Rodríguez-Sala, and F. Rodríguez-Valera. 2001. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res.* **29**: 178-180.
3. Goyer, C., and C. Beaulieu. 1997. Host range of *Streptomycete* strains causing common scab. *Plant Dis.* **81**: 901-904.
4. Goyer, C., E. Faucher, and C. Beaulieu. 1996. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46:** 635-639.
5. Healy, F. G. and D. H. Lambert. 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 479-482.
6. Koch, C. R., M. Kroppenstedt, and F. A. Rainey, and E. Stackebrandt. 1999. 16S ribosomal DNA analysis of the genera *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Catellatospora*, *Catenuloplanes*, *Couchioplanes*, *Dactylosporangium*, and *Pilimelia* and emendation of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 765-768.
7. Kreuze, J. F., S. Suomalainen, L. Paulin, and J. P. T. Valkonen. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology* **89**: 462-469.
8. Lambert, D. H. and R. Loria. 1989a. *Streptomyces* scabies sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 387-392.
9. Lambert, D. H. and R. Loria. 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 393-396.
10. Lee, K. H., M. J. Cho, Y. Yamaoka, D. Y. Graham, Y. J. Yun, S. Y. Woo, C. Y. Lim, K. S. Ko, B. J. Kim, H. C. Jung, W. K. Lee, K. H. Rhee, and Y. H. Kook. 2004. Alanine-threonine polymorphism of *Helicobacter pylori* RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. *J. Clin. Microbiol.*. **42**: 3518-3524.
11. Loria, R., R. A. Bukhalid, B. A. Fry, and R. R. King. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* **81**: 836-846.
12. Mehling, A., U. F. Wehmeier, and W. Piepersberg. 1995. Nucleotide sequences of *Streptomycete* 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for *Streptomycetes* using PCR. *Microbiology* **141**: 2139-2147.
13. Miyajima, K., F. Tanaka, T. Takeuchi, and S. Kuninage. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 495-502.
14. Paradis, E., C. Goyer, N. C. Hodge, R. Hogue, R. E. Stall, and C. Beaulieu. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 561-564.

15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
16. Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis* nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491.
17. Takeuchi, T., H. Sawada, F. Tanaka, and I. Matsuda. 1996. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 476-479.
18. Trüper, H. G. and L. D. Clari. 1997. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) 'in apposition'. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 908-909.
19. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.

(Received Aug. 30, 2007/Accepted Oct. 30, 2007)