

소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 *Micromonospora* sp.의 분리 및 동정

박동진 · 이재찬 · 김판경 · 김창진*

한국생명공학연구원 기능대사물질연구센터

(2008년 1월 4일 접수, 2008년 3월 7일 수리)

Isolation and Identification of *Micromonospora* sp. Showing Nematocidal Activity Against Pine Wood Nematode

Dong-Jin Park, Jae-Chan Lee, Pan Kyung Kim and Chang-Jin Kim*

Functional Metabolomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52, Oun-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-333, Republic of Korea

Abstract

For the isolation of Actinomycetes showing nematocidal activity against Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, about 2000 culture broth of Actinomycetes were tested and their activity were compared with that of *Streptomyces avermitilis* resulting a selected strain AW050027. The cultural, morphological and physiological analysis was performed for the identification of a selected strain. Phylogenetic analyses based on 16S rDNA gene sequences showed that the selected strain AW050027 belonged to the genus *Micromonospora* and *M. coriariae* NAR01^T was the closest neighbors, sharing 98.9% 16S rDNA gene sequence similarity.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus*, *Micromonospora* sp., nematode, identification

서 론

소나무재선충병은 국내외적으로 소나무에 심각한 피해를 일으키고 있는 국제검역대상 제1호로 분류되어 있는 식물병으로서, 우리나라에서는 1988년 부산 동래구 금정산에서 최초로 발생한 이래 1997년 이후로 급격하게 확산되어 피해를 발생시키고 있다(산림청과 국립산림과학원, 2004).

소나무재선충병은 소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)이 매개충인 솔수염하늘소(*Monochamus alternatus*)를 통해 기주식물에 감염되어 발병하는 것으로, 이 선충이 기주 식물 체내에 감염된 후 사상균인 *Botrytis cinerea*를 먹이로 하여 급격히 증식되어 기주식물의 가도관을 막아 수분의 상승을

차단하고 독소인 cellulase를 분비하여 조직을 파괴함으로써 기주식물을 고사시키는 것으로 알려져 있다(Mamiya와 Enda, 1972; Morimoto와 Iwasaki, 1972; Wingfield와 Blanchette, 1983; Edwards와 Linit, 1992; 국립산림과학원, 2004). 한편, 최근에는 이 선충에 공생하는 여러 세균들과 이들 세균이 생산하는 phenylacetic acid가 소나무재선충병의 주요 원인으로 보고되고 있다(Kawazu 등 1996; Zao와 Lin, 2005).

현재 소나무재선충에 대한 방제는 감염되어 죽은 나무를 벌채하여 집제한 후 메탐소디움액제로 훈증하거나 소각처리 하고 있으며, 아버멕틴(Avermectin)과 에마멕틴벤조이트(Emamectin benzoate) 및 일부 화학제제를 이용한 방제 등으로 이루어지고 있다(산림청과 국립산림과학원, 2004).

따라서, 본 연구에서는 소나무재선충병의 친환경적 생물학적 방제를 위해 다양한 자연환경으로부터 소나무재선충에 살

*연락처 : Tel. +82-42-860-4332, Fax. +82-42-860-4595
E-mail: changjin@kribb.re.kr

선충 활성을 나타내는 방선균을 분리하였으며, 분리한 방선균의 살선충 활성 및 생리학적 특성 연구를 통한 활성균주의 분류학적 특성을 밝혀 보고하고자 한다.

재료 및 방법

방선균 분리원 및 배지

소나무재선충에 대한 살선충 활성을 가진 방선균을 선발하기 위해서 본 연구실(한국생명공학연구원 기능대사물질연구센터)이 보유하고 있는 방선균배양액 라이브리리를 이용하였으며, 활성을 나타낸 배양액에 대하여는 따로 저장(Glycerol stock, 20%(w/v))하고 있는 모균을 Bennett's agar 배지(glucose 10 g, yeast extract 1 g, bacto-peptone 2 g, beef extract 1 g, agar 20 g, pH 7.2, 증류수 1L)에 배양하여 활성을 재확인 한 후 사용하였다. 활성을 나타낸 방선균의 대량배양은 GSS 배지(soluble starch 10 g, glucose 20 g, soybean meal 25 g, yeast extract 4 g, beef extract 1 g, NaCl 2 g, CaCO₃ 2 g, K₂HPO₄ 0.25 g, pH 7.2, 증류수 1L)에서 28°C로 5일간 배양하였다.

소나무재선충 및 배양

소나무재선충병의 주요 병원체인 소나무 재선충(*Bursaphelenchus xylophilus*)은 소나무재선충 감염목의 목질부 절편으로부터 분리한 것을 국립산림과학원 남부산림연구소부터 분양받아 사용하였으며, 곰팡이(*Botrytis cinerea*)가 배양된 PDA(potato dextrose agar)평판 배지(25°C, 7일)에 계대 배양(25°C, 7일) 하면서 배양 후 일주일 된 선충을 살선충 활성측정을 위한 시험용 선충으로 사용하였으며 avermectin 생산균주 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271은 ATCC로부터 분양받아 사용하였다.

소나무재선충에 대한 살선충 활성 검증

살선충 활성 균주 선발을 위해 소나무 재선충을 96 well plate의 각 well에 100마리 정도 분포하도록 200 µl씩 분주한 후 방선균배양액을 20 µl 씩 처리하였으며, 상온에서 24시간 방치한 다음 광학현미경으로 관찰하여 선충의 활동도 또는 사망률을 조사하여 선발하였다. 선발된 균주는 100배까지 배양액을 희석하여 살선충 활성을 재확인 하였으며, 최종 선발된 균주에 대해서는 현재 선충방제에 사용되고 있는 avermectin 생산균주 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271의 배양액을 대조군으로 사용하였다.

선발된 방선균의 동정

최종 선발된 방선균의 속을 결정하기 위하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(Holt 등, 1994)과 International *Streptomyces* Project(ISP)(Shirling과 Gottlieb, 1966)에 의한 방법으로 분석하였다. 방선균 세포벽의 구성 성분인 diaminopimelic acid(DAP) 타입분석은 Lechevalier의 방법(Lechevalier 등, 1970)에 따라 동결건조 균체를 6N HCl로 가수분해 한 후 TLC plate(10 cm×10 cm, Cellulose, Merck CO.)에 점적하였고, methanol : water : 6N HCl : pyridine(80:26:4:10, v/v)을 전개용매로 사용하였다. 분리한 미생물의 포자형태는 Williams와 Davis의 방법(Williams와 Davis, 1967)에 따라 주사전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰하였다.

분자계통분류학적 분석

염색체 DNA상의 16S rDNA는 두 개의 알려진 universal primer [Forward primer는 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(E. coli 16S rRNA positions 8-27), Reverse primer는 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(E. coli 16S rRNA positions 1492-1513)]를 사용하여 증폭하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 염기서열 반응을 위해서 QIAquick PCR purification kit(Qiagen사)를 사용하여 정제하였고, 염기서열 결정반응은 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit(Applied Biosystems)를 사용하였으며, 반응산물은 최종적으로 자동염기서열분석장치(Applied Biosystems model 377 automatic DNA sequencer)를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다(Lane, 1991).

선발된 균주의 16S rDNA 염기서열은 미국 NCBI의 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST)를 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교하여 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹을 1차적으로 선별하였고, 선별된 세균 그룹내의 각각의 균주와 선발균주의 16S rDNA 염기서열간의 상동성 값은 Similarity Matrix version 1.1(Ribosomal Database Project II; <http://rdp.cme.msu.edu/>) (Cole 등, 2007)을 이용하여 계산하였다. 각각의 균주들의 정확한 계통학적 분석을 위해서, 선발균주의 염기서열은 선별된 기존에 알려진 분류군 균주들의 상응하는 유전자의 염기서열과 CLUSTAL W software(Thompson 등, 1994)를 사용하여 비교(alignment) 하였고, 분자계통학적 계통수의 작성은 PHYLIP 프로그램 패키지를 사용하여 수행하였다(Felsenstein, 2002). 분자진화거리는 DNADIST 프로그램

속의 Kimura 2-parameter model(Kimura, 1980) 알고리즘을 이용하여 계산하였고, 최종적인 계통수는 NEIGHBOR 프로그램 속의 neighbor-joining method(Saitou와 Nei, 1987)에 의하여 작성하였으며, 계통수의 안정성은 PHYLIP 프로그램 패키지에 있는 SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR 및 CONSENSE 프로그램을 이용한 bootstrap 분석(1000회 반복)을 통해 평가하였다.

결과 및 고찰

소나무재선충에 대한 살선충 방선균의 선발

본 연구실의 방선균배양액 라이브러리로부터 2,000여개의 시료에 대하여 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 탐색하여 1차적으로 약 100 시료를 선발하였으며 그 가운데 활성이 높은 AW020213, AW050027, AW050136 및 AW050148 4 균주를 선발하여 공시균주인 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271와 살선충 활성을 비교하였다(표 1). 선발된 4균주의 배양액 모두 20배 희석시 100% 살선충 활성을 나타내며 *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271 균주의 70% 보다

높은 활성을 보였다. AW050027 및 AW050148 균주는 60 배 희석액의 경우에도 각각 30% 및 10%의 사멸율을 나타냈으며, 가장 높은 살선충 활성을 나타낸 AW050027 균주를 최종선발 균주로 결정하였다.

선발균주의 배양적, 형태적, 생리적 특성

소나무재선충에 살선충활성을 나타내는 최종 선발 균주의 동정을 위해 International *Streptomyces* Project(ISP)에 따라 여러 가지 배지상에서 분석한 결과 표 2에서와 같이 ISP2 및 ISP6 agar 배지에서는 자라지 않았고 배지종류에 따라 성장 정도의 차이를 보였다. 포자 덩어리 색깔은 배지조건에 따라 노란색에서 올리브색의 균사였고, 반대편은 노란색에서 짙은 초록색을 나타냈으며 모든 배지에서 비확산성의 색소를 생산하지 않았다.

선발균주의 탄소원 이용특성은 표 3에서와 같이 glucose, arabinose, sucrose, xylose, inositol, rhamnose, raffinose 등의 탄소원은 이용하지만 D-mannitol, D-fructose 및 cellulose는 이용하지 못하였다.

선발균주를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 호기적 균사상에서 구형의 단일포자를 형성하였으며, 포자 표면은 가시

Table 1. Effect of the culture broth of Actinomycetes selected on the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*

Actinomycetes	Dilution Rate					
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:60	1:80
AW020213	100±2 ^{a)}	100±3	100±2	30±1	0	0
AW050136	100±3	100±2	100±2	40±2	0	0
AW050027	100±1	100±3	100±1	100±3	30±1	0
AW050148	100±3	100±2	100±2	80±2	10±1	0
ATCC 31271 ^{b)}	100±2	100±2	70±3	10±1	0	0

^{a)} Mortality (%) of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, data are means of 3 replicates.

^{b)} *Streptomyces avermitilis* ATCC 31271.

Table 2. Cultural characteristics of a selected strain AW050027¹⁾

Medium ²⁾	Growth	Spore mass color	Reverse side color	Soluble pigment
ISP3 agar	good	light olive ³⁾	light olive	none
ISP4 agar	good	pale yellow	greyish green	none
ISP5 agar	poor	light yellow	light yellow	none
ISP7 agar	moderate	light yellow	light yellow	none
Bennett's agar	good	deep violet	deep violet	none

¹⁾ The cultural characteristics were observed after cultivation on each agar plate at 28°C for 7 days.

²⁾ ISP2 agar (yeast extract-malt extract agar: 0.4% yeast extract, 1% malt extract, 0.4% glucose, 2% agar), ISP3 agar (oatmeal agar: 2% cooked & filtered oatmeal, 1.8% agar, 0.1% trace salt solution), ISP4 agar (inorganic salt-starch agar: 1% soluble starch, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.1% NaCl, 0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.2% CaCO₃, 0.1% trace salt solution), ISP5 agar (glycerol-asparagine agar: 0.1% asparagine, 1% glycerol, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% trace salt solution, 2% agar), ISP6 agar (peptone-yeast extract iron agar: 3.6% peptone iron agar, 0.1% yeast extract), ISP7 agar (tyrosine agar: 0.5% gelatin peptone, 0.3% beef extract, 0.5% tyrosine, 1.5% agar)

³⁾ The color was assigned by matching the color to ISCC-NBS Centroid Color Charts (ISCC-NBS)

Table 3. Carbon source utilization of a selected strain AW050027¹⁾

Carbon sources	AW050027
D-Glucose	+
L-Arabinose	+
Sucrose	+
D-Xylose	+
Inositol	+
D-Mannitol	-
D-Fructose	-
α-L-Rhamnose	+
D-Raffinose	+
Cellulose	-

¹⁾ Culture condition was at 28°C for 5 days on the basal medium (0.2% peptone, 0.1% yeast extract and 0.1% beef extract)

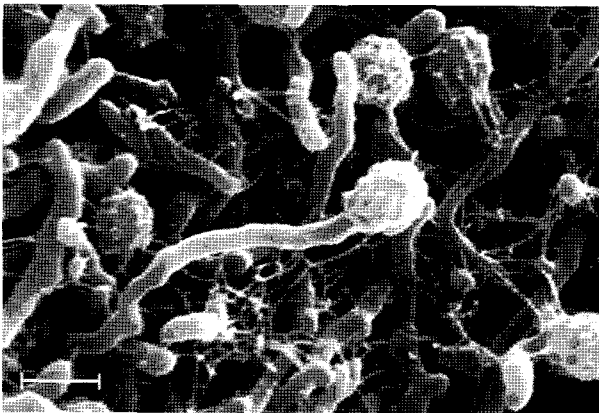


Fig. 1. Scanning electron micrograph of a selected strain AW050027 on Bennett's agar medium at 28°C for 7 days. Bar, 1.0 μm.

모양의 형태를 하고 있었고 0.5~0.8 μm 정도 크기의 포자를 관찰할 수 있었다(그림 1).

한편, 선발균주의 세포벽 성분인 diaminopimelic acid(DAP)는 분석결과 meso-DAP 형태로 존재한다는 것을 확인하였다. 따라서, 단일 포자를 형성하는 형태적 특성과 세포벽의 DAP 타입을 기초로 하여, 최종선발 균주를 *Micromonospora* 속으로 판단하였다.

16S rDNA 염기서열을 통한 계통분류학적 분석

선발균주 16S rDNA의 부분 염기서열(1150 nt)을 NCBI의 BLAST를 사용하여 GenBank 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 계통분류학적으로 분석한 결과 *Micromonospora* 속이 가장 높은 상동성을 나타내는 세균 그룹으로 분류되었고, 분리균주와 16S rDNA 염기서열간의 상동성은 *M. coerulea*

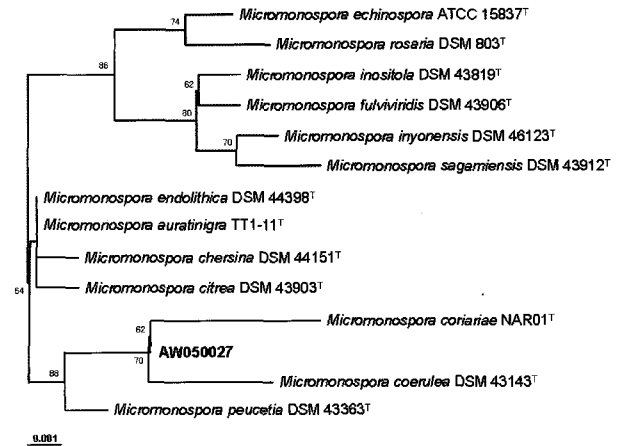


Fig. 2. Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences of a selected strain AW050027 and other related taxa. Bootstrap values are shown in percentages of 1000 replicates, when more than 50 %. The scale bar is equal to 0.001 changes per nucleotide position.

DSM 43143^T, *M. peucetia* DSM 43363^T, *M. chersina* DSM 44151^T, *M. endolithica* DSM 44398^T 및 *M. coriariae* NAR01^T 균주가 각각 98.2%, 98.5%, 98.7%, 98.8% 및 98.9%로 가장 높게 나타났으며, neighbor-joining에 의해 작성한 계통수에서는 분리균주가 *M. coriariae* NAR01^T 균주와 종속 계통발생적으로 가장 근연한 유연관계에 있는 것으로 나타났다(그림 2).

따라서, 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 방선균 선발균주 AW050027은 표현형, 생리·생화학적 분석 및 분자계통학적 분석을 통해 *Micromonospora* 속으로 동정되었으며, *Micromonospora coriariae* NAR01^T 균주와 유사한 것으로 동정되었다.

현재까지 방선균 중 소나무재선충에 대한 생물학적 방제제로서 비수용성의 화합물인 avermectin을 생산하는 *Streptomyces avermitilis* 균주가 사용되고 있는데, 본 연구의 선발균주인 *Micromonospora* sp. AW050027은 *Streptomyces* 속이 아닌 방선균 중 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 가진 균주로서 아직까지 보고된 바가 없으며 수용성의 살선충 물질을 생산함으로써 현재 후속연구가 진행 중인 상태에 있고, 현장 적용에 유리한 특성을 가지고 있어 소나무재선충병에 대한 생물학적 방제제로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 산림청 ‘산림과학 기술개발사업(과제번호 S1-1-2006-L01)’의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

>> 참 / 고 / 문 / 헌

- Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity & J. M. Tiedje (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35 (Database issue): D169-D172; doi: 10.1093/nar/gkl889.
- Edward, O. R. and M. J. Linit (1992) Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through cviposition wounds of *Monachamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *J. Nematol.* 24:133~139.
- Felsenstein, J. (2002). PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.6a, Seattle: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Holt, J. G., N. R. Kriege, P. H. A. Snea, J. T. Staley and S. T. Williams (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 605-703. 9th ed Williams & Wilkins, Baltimore.
- ISCC-NBS Color-Name Charts Illustrated with Centroid Colors. National Bureau of Standards, U.S.A.
- Kawazu, K., H. Zhang, H. Tamashita and H. Kanzaki (1996) Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1430~1415.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111~120.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rDNA sequencing, *In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow, John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom
- Lechevalier, M. P. and H. Lechevalier (1970) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. Syst. Bacteriol.* 20:435~443.
- Mamiya, Y. and N. Enda (1972) Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda : Aphelenchoididae) by *Monachamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae). *Nematologica* 18: 159~162.
- Morimoto, K. and A. Iwasaki (1972) Role of *Monachamus alternatus* (Coleoptera : Cerambycidae) as a vector of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda : Aphelenchoididae). *J. Jap. For. Soc.* 54:177~183.
- Saitou, N. & M. Nei (1987) The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406~425.
- Shirling, E. B. and D. Gottlieb (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16:313~340.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673~4680.
- Williams, S. T. and F. L. Davis (1967) Use of a scanning electron microscope for the examination of Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* 48:171~177.
- Wingfield, M. J. and R. B. Blanchette (1983) The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies. *Can. J. for. Res.* 13:1068~1076.
- Zao, B. G. and F. Lin (2005) Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of genus *Pseudomonas*. *For. Path.* 35:339~345.
- 산림청, 국립산림과학원 (2004) 소나무AIDS 소나무재선충병. 산림과학속보. '04-06.

소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 *Micromonospora* sp.의 분리 및 동정

박동진 · 이재찬 · 김판경 · 김창진*

한국생명공학연구원 기능대사물질연구센터

요 약 소나무재선충에 대한 살선충 활성을 나타내는 방선균의 탐색 및 동정을 위하여 2000여개의 방선균배양액 라이브러리로부터 살선충 활성을 탐색하였다. 현재 소나무재선충에 대한 생물학적 방제제로 사용되고 있는 *Streptomyces avermitilis* 균주 배양액의 살선충 활성과 비교하여 선발한 결과, 강력한 살선충 활성을 나타내는 균주 AW050027을 균주를 최종 선발하였다. 선발균주에 대하여 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성 분석 및 분자계통분류학적 분석을 한 결과 선발균주는 *Micromonospora coriariae* NAR01^T 균주와 98.9%의 상동성을 가진 균주로 동정되었다.

색인어 소나무재선충, 선충, 방선균, 동정