

세균 *Stenotrophomonas* sp. KTGBP10의 식물 바이러스 감염억제효과

김영숙¹ · 황의일 · 오정훈 · 김갑식 · 여운형*
KT&G 중앙연구원, ¹충남대학교 농과대학 농생물학과
(2004년 9월 9일 접수)

Inhibitory Effects of Bacterial Isolate *Stenotrophomonas* sp. KTGBP10 against Viral Infection to Tobacco Plants

Young-Sook Kim¹, Eui-li Hwang, Jung-Hoon Oh, Kab-Sig Kim, Woon-Hyung Yeo*
KT&G Central Research Institute, ¹Chungnam National University, Taejeon, Korea 305-764.
(Received september 9, 2004)

ABSTRACT : During the screening of antiviral substances having inhibitory effects on tobacco mosaic virus (TMV) infection to tobacco plants, we found a bacterial isolate KTGBP10, which was identified as a *Stenotrophomonas* sp., strongly inhibited the infection of TMV. When the culture filtrate from KTGBP10 was applied on the upper surface of leaves of Xanthi-nc tobacco plants at the same time or 24 hours before TMV inoculation, almost complete inhibition of TMV infection was achieved. And 40% inhibition was shown with application of the culture filtrate to the under surface of leaves. In field trials, transmission of TMV from diseased seedlings to the healthy ones during transplanting work was reduced by 87.1~92.6 % when the culture filtrate or cell suspension was sprayed onto the tobacco seedlings, cv. NC82, 24 hours before transplanting. No toxic effect was observed on the tobacco plants. When the broth filtrate of KTGBP10 was supplied by soaking through the cut-leaves before and/or after virus inoculation, the TMV infection was also inhibited by 50.4~65.3 %.

Key words : viral disease, tobacco plants, *Stenotrophomonas* sp.

바이러스에 의한 식물 병은 매우 다양한 것으로 알려져 있으며 특히 담배모자이크바이러스(TMV), 오이모자이크바이러스(CMV) 및 감자바이러스와이(PVY)는 담배, 토마토, 고추 등의 가장 큰 수량감소의 원인이 되고 있다. 이러한 식물 바이러스 병의 방제를 목적으로 많은 바이러스 저해제가 고등 식물(Hudson 등, 1990; Stevens 등, 1992; Ito 등, 1992), 미생물(Klement 등, 1966; Yeo 등, 1997),

그리고 버섯류(Aoki 등, 1993)등에서 탐색되었으며 몇몇의 활성성분이 분리되고 그 특성이 연구된 바 있다. 그러나 효과를 갖는 대부분의 화합물이 단백질 또는 다당체인 관계로 대량생산이나 전신 이행효과의 결여로 실제포장에서의 적용에 한계를 갖고 있다. 따라서 보다 활성이 우수하고 전신이 이행효과를 갖는 항바이러스 물질을 찾기 위하여 자연에서 분리한 곰팡이, 방선균, 세균 등의 TMV

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

감염억제활성을 조사하던 중 우수한 항바이러스 활성과 전신이행효과를 갖는 세균 KTGBP10 균주를 선발하였다. 본 논문은 KTGBP10 균의 동정 및 그 배양액의 TMV, CMV, PVY등에 대한 항바이러스 활성에 대하여 서술하고자 한다.

재료 및 방법

균 동정 및 배양 : 고추 뿌리에서 분리한 KTGBP10 균주의 동정은 16S rDNA sequence 분석(Maidak 등, 1997; Yumoto 등, 1998)으로 실시하였다. 균 분리 및 계대용 배지로는 Mueller Hinton agar를 사용하였고 동일한 성분의 액체배지(500ml 삼각 플라스크/200ml)에 본 균을 배양(28°C/100rpm/4일)한 후 그 배양액과 cell 현탁액을 항바이러스 활성 조사용 시료로 사용하였다.

Virus와 기주식물 : 식물바이러스로 담배모자이크 바이러스(TMV), 오이모자이크바이러스(CMV) 및 감자바이러스와이(PVY)를 사용하였으며 기주 식물로는 담배 품종 Xanthi-nc, NC82, Burley 21을 사용하였다.

활성검정 : 항바이러스 활성은 국부병반형성억제 효과와 전신감염억제효과로 구분하여 조사하였다. 국부병반형성억제효과는 TMV와 Xanthi-nc 담배에서 조사하였고 전신감염억제효과는 NC82(CMV), Burley21(PVY) 담배에서 조사하였다. TMV 접종원은 바이러스에 감염된 NC82 담배 전엽을 phosphate

buffer(0.02 M, pH 7.3)에 갈아 600배 희석하여 사용하였으며, CMV, PVY는 이병된 생엽 즙액을 5배 희석하여 사용하였다. 국부병반기주에서의 활성은 반엽법으로 조사하였으며 시료처리 방법에 따라 혼합처리, 전처리, 후처리 등으로 구분하여 실시하였다. 전신감염기주에서의 활성은 온실조건에서 5주간 생육시킨 4~5엽기의 NC82, Burley21 담배에 시료를 분무처리한 후 바이러스를 접종하여 병 발생 및 진전 정도를 조사하였다. 바이러스 접종은 면봉에 접종원을 흡수시킨 후 카보랜덤이 처리된 담배 잎에 문질러 실시하였다. 항바이러스 효과는 처리반엽과 무처리반엽의 국부병반수를 조사한 후 다음의 식에 따라 계산하였으며, 전신기주의 경우 이병 주 수를 셈하여 조사하였다. 한편 포장에서의 TMV 감염 방제효과는 이식기에 맞추어 조사하였다. 즉 24시간 전에 공시균의 배양액을 표면 살포한 담배(NC82)를 포장에 이식한 후 TMV 희석액(1000배 희석)을 작업자의 손으로 접종하였으며 접종 2주 후에 발병 주 수를 조사하여 방제효과를 계산하였다.

$$\text{Inhibitory effects (\%)} = \{1 - (T/C)\} \times 100$$

T: 처리구 병반수, C: 무처리구 병반수

결 과

분류학적 특성 : 16S rDNA partial sequence(Fig. 1)를 표준균주와 비교분석한 결과는 Table 1과 같다. 즉 *Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas*

```
5'-AGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAGTCGAACGGCAGCACAGAGGAGCTTGCTCC
TCGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTCTGTGCTGGGGGATAAC
GTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCT
TGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTTAAAGGCCACCAAGGCGA
CGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTG
GGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCCGGCTAATAC
CTGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTCGTTTAA
GTCCGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTA-3'
```

Fig. 1. The 16S rDNA partial sequence of KTGBP10 strain.

Table 1. The similarity between KTGBP10 and type strains by comparison of 16S rDNA partial sequence

Strain	% Similarity	Nucleotide differences /compared
<i>Pseudomonas geniculata</i> ATCC 19374T	99.68	2/621
<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC 19867T	99.04	6/623
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LMG 958T	98.24	11/625
<i>Stenotrophomonas africana</i> CIP 104854T	98.04	12/612
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas campestris</i> LMG 568T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas arboricola</i> LMG 747T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas theicola</i> LMG 8684T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas oryzae</i> LMG 5047T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas hortorum</i> LMG 733T	96.01	25/626
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> LMG 911T	96.00	25/626

hibiscicola 등과 99% 이상의 유사도를 보이고 있는데 이들 균주들은 16S rDNA sequence를 바탕으로 한 계통분류학적 분석 결과 *Stenotrophomonas* 속(Anzai 등, 2000)에 속하는 것으로 알려져 있다. 또한 98% 이상의 유사도를 보이는 4균주(Table 1) 중 어느 한 종에 속한다고 보기 어렵기 때문에 KTGBP10균주는 *Stenotrophomonas* sp.로 동정함이 타당하다고 사료되며 따라서 *Stenotrophomonas* sp. KTGBP10으로 명명하였다.

TMV감염저해활성 : KTGBP10 균의 배양여액과 균체를 이용한 TMV 감염억제활성은 Table 2와 같다. 배양여액과 균체를 TMV 접종액과 1:1로 처리시 모두 100%의 감염억제효과를 보였으며 전처리시 역시 완벽한 감염억제효과를 보였다. 또한 잎 이면에 배양여액 처리 시에도 40%의 감염억제효과를 보여 잎 조직에서의 침투이행 효과를 보였다. 그러나 TMV 접종 30분 후 배양여액 처리시에는 감염억제 효과를 보이지 않았다.

한편 배양여액의 흡수이행효과를 알아보기 위해 배양여액을 담배 잎자루를 통하여 바이러스 접종 전후에 흡수시킨 후 감염억제효과를 조사해본 결과 모두 TMV 감염억제효과를 보였다. 또한 담배 식물체에서의 전신이행효과를 확인하기위해 바이

Table 2. The inhibitory activity of KTGBP10 against TMV infection

Treatment	Inhibitory effects(%)			
	Mixed treatment	Pre-treatment ^a		Post-treatment ^b
		Upper surface	Under surface	
Broth filtrate	100	100	40	0
Viable cells	100	100	0	0

^aThe sample solution was applied onto tobacco leaf surface 24 hours before TMV inoculation.

^bTMV was inoculated 30 min. after sample solution treatment.

러스 접종예정 잎의 바로 하단에 위치하는 잎에 배양여액을 처리하고 24시간이 경과한 후 바이러스를 접종한 결과 62.5%의 감염억제효과가 확인되었다(Table 3). 이러한 결과를 종합해 볼 때, KTGBP10균이 생산하는 항바이러스 물질은 잎 표면에서의 이행효과와 함께 전신이행효과를 보임으로서 기존의 항바이러스 물질과는 그 작용양상이 매우 다름을 알 수 있었다.

배양기간 및 배양방법에 따른 KTGBP10균의 항바이러스 활성 변화는 Table 4와 같다. 즉 배양

Table 3. The inhibitory activity of broth filtrate from KTGBP10 against TMV infection

Treatment methods	Inhibitory effects(%)
Soak treatment (Before TMV inoculation)	65.3
Soak treatment (After TMV inoculation)	50.4
Systemic treatment ^a	62.5

^aSample solution was applied to lower 3 leaves and TMV was inoculated upper 3 leaves 24 hours after.

Table 4. The change of antiviral activity of KTGBP10 at various culture conditions

Cultivation time (day) ^a	Inhibitory activity (%) ^b		
	0 rpm	100 rpm	200 rpm
1	58	61	70
2	98	97	100
4	100	100	100
6	100	100	100
8	100	98	100
12	100	98	100

^a500ml flasks(100ml MH broth/ 28°C).

^bTMV was inoculated 24 hours after sample treatment.

4일째 최대의 활성을 보였으며, 정치배양 또는 교반배양에 따른 활성의 변화는 크지 않음을 알 수 있었다.

담배 잎에서의 활성 지속기간은 배양여액의 경우 11일 경과 후 80% 이상의 효과가 지속되었으나 cell 현탁액에서는 9일 이후 활성이 현저하게 감소하였다(Table 5). 따라서 KTGBP10균의 잎에서의 지속적인 생존은 추정하기 어려웠으며 활성의 본체가 균 자체이기 보다는 균이 생산하는 물질에 의한 것으로 생각되었다. 한편 KTGBP10균은 TMV 뿐만 아니라 CMV 및 PVY의 기계적 감염을 억제하였으며 그 결과는 Table 6, 7과 같다.

Table 5. Persistence of antiviral activity of KTGBP10 against TMV infection in tobacco plants

Time of TMV inoculation after treatment (day) ^a	Inhibitory activity (%)	
	Broth filtrate	Viable cells
1	100.0	100.0
3	98.1	92.4
5	97.7	83.5
7	93.7	84.6
9	80.2	70.5
11	82.4	55.3

^aTMV was inoculated at 1~11 days after treatment of sample solution.

Table 6. The protective effects of KTGBP10 against CMV infection in *Nicotiana tabacum*, NC82

Treatment ^a	No. of infected /treated plants	Protective effects (%)
Broth filtrate	7/20	65.0
Control	20/20	0

^aThe broth filtrate was applied onto upper surface of leaves of tobacco plants and virus was inoculated to the same surface 24 hours after.

Table 7. The protective effects of KTGBP10 against PVY infection in *Nicotiana tabacum*, Br.21

Treatment ^a	No. of infected /treated plants	Protective effects (%)
Broth filtrate	12/20	36.8
Control	19/20	0

^aThe broth filtrate was applied onto upper surface of leaves tobacco plants and virus was inoculated to the same surface 24 hours after.

KTGBP10균의 실제 포장에서의 TMV 감염억제 효과는 Table 8과 같다. 즉 이식기의 담배에 발생하는 TMV에 대하여 배양여액과 cell 현탁액 모두에서 87% 이상의 높은 방제효과를 보였으며 이러한 감염억제효과는 2주 이상 지속되었다.

Table 8. The control efficacy of KTGBP10 against TMV infection in field

Treatment ^a	No. of infected/treated plants	Disease incidence (%)	Control efficacy (%)
Broth filtrate	7/60	11.6	87.1
Viable cells	4/60	6.6	92.6
Control	54/60	90.0	-

^aEach sample was sprayed on the seedlings of NC82 cultivars 24 hours before TMV inoculation.

고찰

많은 고등식물과 미생물이 항바이러스 물질을 생산하는 것으로 보고되었으며 그중 일부의 물질은 정제되고 물리화학적 특성이 밝혀져 있다. 그러나 세균류로부터의 항바이러스 물질에 대한 연구는 매우 드물고 또한 포장에서의 방제효과는 아직 보고된 바가 없다. KTGBP10균은 담배모자이크바이러스(TMV)와 오이모자이크바이러스(CMV) 및 감자바이러스와이(PVY)의 감염을 억제하는 효과가 뛰어나고 또한 실제 포장에서 TMV 감염을 효과적으로 방제하였다. 기존에 보고된 항바이러스 물질의 경우 식물체에서의 침투이행 효과가 확인되지 않아 높은 방제효과를 얻기 위해서는 식물 전체에 약액을 묻도록 처리해야하는 문제점을 갖고 있었으나 KTGBP10균의 경우 잎에서의 조직 침투이행효과와 흡수이행효과가 확인되어 잎 표면 살포에 의해서도 높은 방제효과를 얻을 수 있었다. 이러한 사실은 본 균을 이용한 항바이러스제 개발 가능성을 높게 하는 것으로 특히 접촉감염에 의해 만연되는 바이러스병의 방제에 효과적일 것으로 기대된다.

결론

식물 바이러스병 방제제 개발을 목표로 TMV 감염억제활성을 갖는 미생물을 탐색하던 중 활성이 우수한 KTGBP10 균을 선발하였다. 선발 균은 그람음성의 간상형 세균으로 염기서열 분석에 따라 *Stenotrophomonas* sp.로 동정되었다. KTGBP10 균 배양여액 및 균현탁액은 TMV와 혼합처리 또는 전처리 시 100%의 감염억제효과를 보였으며 배양여액의 이면처리 시 40%이 효과를 보여 침투이행효과가 확인되었다. 또한 흡수이행효과와 함께 전신이행효과도 확인되었다. 포장에서의 방제효과는 담배 유묘 이식 24시간 전 배양여액과 배양균 현탁액 살포시 각각 87.1과 92.6%의 높은 TMV 감염억제효과를 보였다.

참고 문헌

- Anzai, Y., Park, J. Y., Wakabayashi, H. and Oyaizu, H. (2000) "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1563-1589
- Aoki, M., Tan, M., Fukushima, A., Hieda, T., Kubo, S., Takabayashi, M., Ono, K. and Mikami, Y. (1993) Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 278-282
- Hudson, J. B. (1990) Antiviral compounds from plants. *CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.* 200pp.
- Ito, Y., Seki, I., Tanifuji, S. and Hiramatsu, A. (1992) Inhibition of protein synthesis by antiviral protein from *Yucca recurvifolia* leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 518-519
- Klement, Z., Kiraly, J. and Pozsar, I. (1966) Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following

- inoculation with a aphytic bacterium. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1: 11-18
- Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J. and Woese, C. (1997) *The RDP (Ribosomal Database Project)*. *Nucl. Acids Res.* 25: 109-111
- Stevens, W. A. and Reynolds, T. (1992) Plant virus inhibitors from members of the Polygonaceae. *Biomedical Letters.* 47: 269-273
- Yeo, W. H., Kim, Y. H., Park, E. K. and Kim, S. S. (1997) Physico-chemical characteristics and antiviral activity of ASA, an antibiotic produced by Actinomycetes B25. *Korean J. Plant Pathol.* 13: 63-68
- Yumoto, I., Yamazaki, K., Sawabe, T., Nakano, K., Kawasaki, k., Ezura, Y. and Shinano, H. (1998) *Bacillus hortisp.* nov., a new Gram-negative alkaliphilic Bacillus. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48: 565-571