

Acinetobacter sp. 배양여과액 분말제제의 식물바이러스에 대한 감염억제 효과 및 작용

김미순 · 정민영 · 김윤성¹ · 장 철¹ · 황인천¹ · 류기현² · 최장경*

강원대학교 응용생물학과, ¹(주)경농 중앙연구소, ²서울여자대학교 환경생명과학부

Inhibitory Effect on Infection of Plant Viruses by Filtrate Powder from Culture Broth of *Acinetobacter* sp. and Its Mode of Action

Mi Soon Kim, Min Young Jung, Yun Sung Kim¹, Cheol Jang¹, In Cheon Hwang¹,
Ki Hyun Ryu² and Jang Kyung Choi*

Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹Central Research Institute, Kyung Nong Co. Ltd., Gyeongju 780-110, Korea

²Division of Environment & Life Sciences, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

(Received on June 26, 2006)

A filtrate powder, designated as KNF2022, produced from culture broth of *Acinetobacter* sp. KTB3 was tested for their inhibitory effects on *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) infection to *Nicotiana glutinosa* or *N. tabacum* cv. Xanthi nc. When 1/100 dilution with distilled water was treated to the plants and PMMoV was inoculated, the inhibition was estimated to be 94.3 and 95.6%, respectively. The same concentrations of KNF2022 inhibited infections of *Pepper mottle virus* (PepMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) on *Che-nopodium amaranticolor* by 97.1 and 92.5%, respectively. Duration of inhibitory activity of the filtrate powder from *Acinetobacter* sp. culture broth against PMMoV infection on *N. glutinosa* was maintained for 2 days at 80% inhibition level, however, the inhibitory effect was diminished from 4 days after treatment to 50% levels. To evaluate inhibitory effects on systemic host plants of the antiviral agent, symptom developments of PMMoV, PepMoV and CMV on KNF2022-treated pepper plants were investigated. Delayed symptom developments until 10 days after inoculation (DAI) were observed for all the three viruses when the viruses were inoculated individually, and these delayed symptom development effects were maintained until 30 DAI in case of PepMoV. Moreover, PepMoV was not detected by RT-PCR and ELISA until 30 DAI. These delayed symptom development effects were diminished in all combinations of three virus co-inoculations due to synergism of three viruses on symptom developments. Inhibitory effect of KNF2022 was verified under electron microscopic examinations using purified virus preparations. Particles of PMMoV and PepMoV were observed on specimens from 5 min after KNF2022 treatment, and the particle sizes were reached in the range of 200-250 nm and 400-600 nm, respectively. Furthermore, the viral particles were destructed and particle sizes were reached in the range of 100-150 nm and 300-500 nm, respectively, on 60 min after treatments. Reduction of local lesion numbers on *N. tabacum* cv. Xanthi nc and *C. amaranticolor* were accompanied with reduction of virus particle sizes. In the case of CMV destructed particle numbers were also increased according to incubation period after KNF2022 treatment and local lesions on *C. amaranticolor* were reduced.

Keywords : *Acinetobacter* sp., Electron micrograph, Inhibitory effect, PMMoV, PepMoV, CMV

미생물 유래의 물질, 특히 균류나 세균의 생산물이 바이러스의 감염이나 증식을 억제한다는 사실은 Johnson(1938)

이 *Aspergillus niger* 및 *Aerobacter aerogenes*의 배양액 중에 *Tobacco mosaic virus*(TMV)의 감염저해 물질을 포함하고 있다는 보고에서 처음 알려졌다. 그 후 많은 미생물의 배양여과액이 식물바이러스에 대해 저해작용을 갖는다고 알려지게 되었다. Gupta와 Price(1950)는 49종의 균류

*Corresponding author

Phone)+82-33-250-6432, Fax)+82-33-241-1721

E-mail)jkchoi@kangwon.ac.kr

배양액을 조사한 결과, 약 84%가 TMV, *Tobacco necrosis virus*(TNV) 및 *Southern bean mosaic virus*(SBMV)의 감염 저해물질을 포함한다는 것을 보고하였다. Bawden과 Freeman(1952)은 이들 중 가장 높은 저해작용을 보인 *Trichothecium roseum*과 *Neurospora sitophila*의 배양액에는 바이러스의 감염을 억제하는 2종류의 내열성물질이 포함되어 있고, 그것이 항생물질 trichothecine과 D-galactose가 주성분인 다당질이라는 것을 보고하였다. 한편 세균이 생산하는 항생물질이 식물바이러스의 감염을 저해한다는 것을 처음 보고한 것은 Leben과 Fulton(1952)이 streptothricin과 terramycin이 TNV나 *Tobacco ringspot virus*(TRSV)의 감염으로 형성되는 과사반점의 발달을 저지한다는 것이었다. 또한 Hirai와 Shimomura(1966)는 방선균인 *Streptomyces griseochromogenes*로부터 분리하여 벼도열병의 치료제로 사용되고 있는 blastidin S(BcS)의 0.2 ppm 용액을 TMV를 접종한 담배 잎 디스크에 처리하면 바이러스의 증식이 90% 억제되지만 약해가 있다는 것을 보고하였는데, 이 작용이 TMV-RNA의 합성을 저해하기 때문인 것으로 해석하였다. 이들 이외에도 지금까지 여러 가지 항생물질이 식물바이러스의 감염이나 증식을 저해한다는 것이 보고되었으나, 세균의 바이러스 억제물질에 관한 연구는 대부분 세균이 생산하는 항생물질에 초점을 두고 이루어져왔기 때문에, 세균의 배양여과액 중에 존재하는 다양한 물질의 항바이러스 작용에 관한 연구는 구체적으로 접근되지 않은 것이 현실이다.

최근 Kim 등(2004)은 방선균 *Acinetobacter* sp.의 배양여과액이 TMV의 감염에 탁월한 억제작용을 가지고 있다는 사실을 보고하였다. 이 연구는 이 방선균의 배양여과액을 분말제제로 제작하여, 몇몇 주요 식물바이러스에 대한 항바이러스효과를 검증하였으며, 그 작용기작을 해석하기 위한 기초실험을 실시하였다.

재료 및 방법

공시 세균 및 배양여과액 분말제제의 제작. 식물바이러스에 대한 감염억제 효과를 검증하기 위하여 공시한 세균은 토양에서 분리한 *Acinetobacter* sp. KTB3 계통(Kim 등, 2004)을 공시하였다. 공시균은 Mueller-Hinton 배지에서 30°C로 48시간 진탕배양 후 배양여과액을 수집하였다. 이 배양여과액은 동결건조 후, 증량제 카올린(kaolin) 등과 혼합하여 분말의 제제로 만들고, 이를 KNF2022로 명명하여 바이러스 억제제로 공시하였다.

바이러스 접종원. KNF2022의 바이러스 감염억제 효과를 검증하기 위하여 *Pepper mild mottle virus*(PMMoV,

P계통), *Cucumber mosaic virus*(CMV, Mf 계통) 및 *Pepper mottle virus*(PepMoV, Vc 계통)를 공시하였다(Kim 등, 2005). 이들 각 바이러스는 *Nicotiana benthamiana*에 접종하여 증식시킨 후 접종원으로 사용하였다. 바이러스 감염 억제 효과의 검정을 위한 접종원은 각 바이러스의 이병엽에 0.01 M 인산완충액(pH 7.0)을 40배량(w/v) 넣고 막자사발에서 파쇄한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 상등액을 사용하였다. 또한 각 바이러스를 정제한 다음, 정제 바이러스를 이용한 각 제제의 억제효과 및 작용기작을 검증하였다. 이때 각 바이러스의 정제는 공시한 PMMoV, PepMoV 및 CMV를 증식기주에 접종하고 2주 후, 감염된 잎을 50 g씩 채취하여, PMMoV는 Leberman(1966)의 방법, PepMoV는 Berger와 Shiel(1998)의 방법, CMV는 Takanami(1981)의 방법을 이용하여 바이러스 입자를 정제하였으며, 정제된 바이러스는 4°C에 보존하면서 억제제처리 및 전자현미경관찰 시료로 이용하였다.

공시식물. KNF2022의 바이러스 감염억제 효과는 각 바이러스의 국부병반식물 및 전신감염기주를 이용하여 검증하였다. 즉 PMMoV는 *N. glutinosa* 또는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc, CMV와 PepMoV는 *Chenopodium amaranticolor*를 국부병반식물로 이용하였으며, 3종의 바이러스에 대한 전신감염기주는 고추(*Capsicum annuum* var. Nockwang)을 이용하였다.

국부감염기주를 이용한 감염억제효과의 검증. 제제의 바이러스에 대한 억제효과를 검증하기 위하여 공시한 *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi nc 및 *C. amaranticolor*의 전개엽을 이용하여, 각 잎의 주맥을 중심으로 반엽접종법에 따라 한쪽 반엽에 처리액을, 대응하는 반엽에는 증류수를 도말처리한 후 일정 농도의 바이러스 접종원을 카보런덤법으로 접종하였다. 접종 3~5일 후 각 반엽에 형성된 병반수를 비교하였다. 바이러스의 감염억제 효과는 다음의 식으로 계산하였다. 감염억제율(%) = $(1 - x/y) \times 100$. 단 x 및 y는 각 처리구 및 대조구의 총병반수를 나타낸다.

한편 KNF2022의 감염억제 지속효과를 검증하기 위하여 PMMoV와 *N. glutinosa*의 조합을 이용하였다. 즉 제제를 *N. glutinosa*의 반엽에 도말 처리한 후, 즉시, 1일, 2일, 4일 및 7일 후 PMMoV를 접종하고, 형성된 병반의 수를 무처리 반엽에 형성된 병반수와 비교 검증하였다. 검증은 처리당 전개엽 4매씩, 3회 반복실험을 실시하였다.

전신감염기주를 이용한 감염억제효과 검증. 전신감염기주인 고추에서의 감염 억제효과는 PMMoV, PepMoV 및 CMV를 단독으로 접종하였을 경우와 3종의 바이러스

를 PMMoV + PepMoV, PMMoV + CMV, PepMoV + CMV 및 PMMoV + PepMoV + CMV의 조합으로 복합 감염시켰을 경우로 나누어 검정하였다. 고추의 유묘(본엽 4-5엽기)의 제 1본엽 및 제 2본엽에 제제를 일정 농도로 희석한 액을 도말 또는 분무처리한 후, 같은 잎에 바이러스를 접종하고 경시적으로 상엽에 나타나는 병징의 발현을 관찰하였으며, 일정 기간 후 상엽을 채취하여 국부병반기주를 이용한 반엽법으로 무처리 고추에 증식된 바이러스의 농도와 비교 검정하였다. 한편 증식된 바이러스의 농도를 정밀하게 해석하기 위하여 바이러스를 접종하고 10일, 20일 및 30일 후, RT-PCR 및 ELISA 검정을 통하여 처리구의 바이러스 농도를 무처리구와 비교하였다. RT-PCR을 위하여 사용된 각 바이러스의 primer는 이미 보고된 외피단백질(coat protein, CP) 영역에 대한 염기서열의 primer(Choi 등, 1998; Yoon, 2003)를 이용하였으며, PCR의 조건 및 전기영동은 Choi 등의 방법(1998)을 따랐다. 한편 ELISA 검정은 DAS-ELISA법(Clark와 Adams, 1977)을 이용하였다. 즉 각 바이러스의 검정을 위한 마이크로플레이트는 PMMoV, PepMoV 및 CMV의 immunoglobulin(Agdia) 1.25 µl/ml을 이용하여 37°C에서 2시간 동안 코팅하였다. 바이러스 항원은 각 바이러스에 감염된 고추의 잎을 0.01 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에서 착즙한 즙액(1 g/20 ml)을 넣고 4°C에서 12시간 동안 정치하였다. 이어서 conjugate immunoglobulin(1/1,000희석)을 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. ELISA 반응의 결과는 *p*-nitrophenyl phosphate substrate를 넣고 30분 후, Microplate Reader(Bio-Rad Model 680)로 A405 nm의 값을 측정하였다.

전자현미경 관찰. KNF2022의 바이러스 감염억제작용의 기작을 해석하기 위하여 정제된 PMMoV, PepMoV 및 CMV에 제제를 처리하여 바이러스 입자의 형태적 변화를 전자현미경으로 관찰하였다. 전자현미경 관찰을 위한 시료는 다음과 같이 제작하였다. 즉 정제된 각 바이러스는 미리 전자현미경으로 관찰하면서 각각의 입자 형태를 쉽게 구분할 수 있을 정도의 농도가 되도록 증류수로 희석한 바이러스액을 공시하였다. 이와 같이 조정된 각 바이러스액은, 1/100 농도의 KNF2022 희석액과 1:1(v/v)로 혼합한 다음, 5분, 30분 및 60분간 실온에 정치하였다. 이때 무처리 바이러스는 증류수와 1:1로 혼합하여 사용하였다. 전자현미경관찰은 처리 및 무처리 혼합액을 2% PTA(phosphotungstic acid, pH 6.0)으로 염색하고 투과형전자현미경(Carl Zeiss, Model LEO 912AB)을 이용하여 바이러스 입자를 관찰하였다. 이때 바이러스 입자의 변화를 측정하기 위하여 전자현미경으로 관찰한 각 처리별 시료의 사진을 제작하고 이를 이용하여, PMMoV

와 PepMoV는 처리별로 약 100~300입자의 길이를 무처리 입자와 비교하였으며, CMV는 파괴된 입자의 수를 무처리와 비교하였다. 한편 시간별로 제제를 처리한 바이러스의 감염성을 검정하기 위하여, 공시한 각 바이러스의 국부병반기주를 이용하여 무처리 바이러스와 반엽법으로 접종하여 병반수를 검정하였다.

결과 및 고찰

KNF2022의 바이러스 감염억제효과. *Acinetobacter* sp. KTB3의 배양여과액 분말제제인 KNF2022의 바이러스 감염억제 효과를 검정하기 위하여, 우선 제제의 희석 농도에 따른 바이러스 감염억제 효과를 PMMoV-*N. glutinosa* 또는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc 시스템을 이용하여 반엽법으로 검정하였다. 그 결과 제제의 증류수 희석 농도 1/100(배양액의 실질 농도 10,000 ppm)에서 94.3~95.6%의 높은 감염억제 효과를 나타냈으며, 1/200의 농도에서도 69.4~67.0%의 억제율을 보였다. 이 결과를 기초로 1/100 희석농도를 이용하여 다른 종류의 바이러스에 대한 감염억제효과를 각각의 국부병반기주에서 검정하였다. 그 결과 PepMoV에 대한 감염억제효과는 97.1%, CMV에 대해서는 92.5%의 억제효과를 나타냈다(Table 1). 이와 같은 결과는 지금까지 식물바이러스에 대한 감염억제 효과가 높은 것으로 보고된 미생물유래 물질이나, 고등식물유래 물질의 감염억제효과(Takagi와 Shimada, 1977; 최와 정, 1984; Kalo와 Taniguchi, 1987; 여 등, 1997; Kim 등, 2004)와 유사한 결과를 나타냄으로서 다양한 식물바이러스의 감염에 대한 억제물질로서의 이용 가능성을 보였다.

Table 1. Inhibitory effect of filtrate powder from the culture broth of *Acinetobacter* sp. on infections of *Pepper mild mottle virus*, *Pepper mottle virus* and *Cucumber mosaic virus*

Viruses	No. of local lesions on 8 half-leaves ^a		Inhibition (%) ^c
	Treated ^b	Control	
<i>Pepper mild mottle virus</i> (A)	44	770	94.3
<i>Pepper mild mottle virus</i> (B)	48	1,086	95.6
<i>Pepper mottle virus</i>	9	312	97.1
<i>Cucumber mosaic virus</i>	26	348	92.5

^aTotal number of local lesions induced on 8 half-leaves of *Nicotiana glutinosa* [PMMoV(A)], *N. tabacum* cv. Xanthi nc [PMMoV(B)] and *Chenopodium amaranticolor* (PepMoV and CMV).

^bThe filtrate powder from *Acinetobacter* sp. culture broth was diluted 1/100 fold (10,000 ppm) with water and was applied to the half-leaves of the local host plants.

^cInhibition % = (1 - No. of lesions on treatment/No. of lesions on control) × 100.

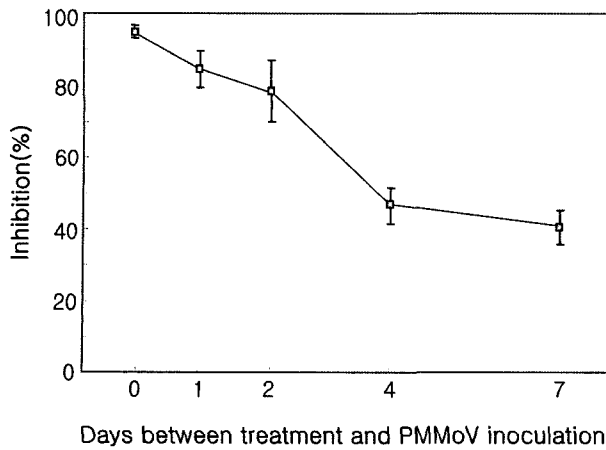


Fig. 1. Duration of inhibitory activity of filtrate powder produced from *Acinetobacter* sp. culture broth against *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) infection on *Nicotiana glutinosa* leaves. Each point represents the mean of three trials and the vertical bars indicate SE ranges.

한편 PMMoV-*N. glutinosa*를 이용하여 KNF2022의 바이러스 감염억제 지속효과를 검정하였다. 즉 1/100 희석액을 *N. glutinosa*의 반엽에 도말하고 일정 시간 경과 후

PMMoV를 접종하여, 시간의 경과에 따른 억제효과의 지속성을 증류수 처리 반엽에 형성된 병반 수와 비교하였다. 그 결과 처리 2일 후까지는 바이러스의 감염을 약 80% 선에서 억제하는 결과를 나타냈으나, 처리 4일 후부터는 40~50% 수준으로 저하되는 패턴을 보였다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 공시균주의 배양여과액으로 조사한 TMV 감염에 대한 감염억제 지속효과(Kim 등, 2004)와 매우 유사한 결과를 나타냄으로서, 배양여과액을 분말제제로 제작한 KNF2022에서도 억제성분이 효과적으로 보존되고 있음을 시사하였다. 또한 이 결과는 버섯류의 배양액에서 나타난 TMV감염억제 지속성의 특성(Takagi, 1978)과도 유사한 패턴으로 나타났으나, 처리 3일 후부터 20% 수준으로 급격하게 저하되는 고등식물 즙액의 감염억제 지속효과(Kalo와 Taniguchi, 1987)와는 다른 성질을 보임으로서, KNF2022와 바이러스 감염 억제성분에서 차이가 있을 것으로 해석되었다.

전신감염기주에서의 바이러스 억제효과. 공시한 녹광 고추의 4-5엽기에 KNF2022를 처리한 후 3종의 바이러스를 접종하고 발현되는 병징을 무처리구와 비교하였다. 그 결과 각 바이러스를 단독으로 접종하였을 경우, 바이러스

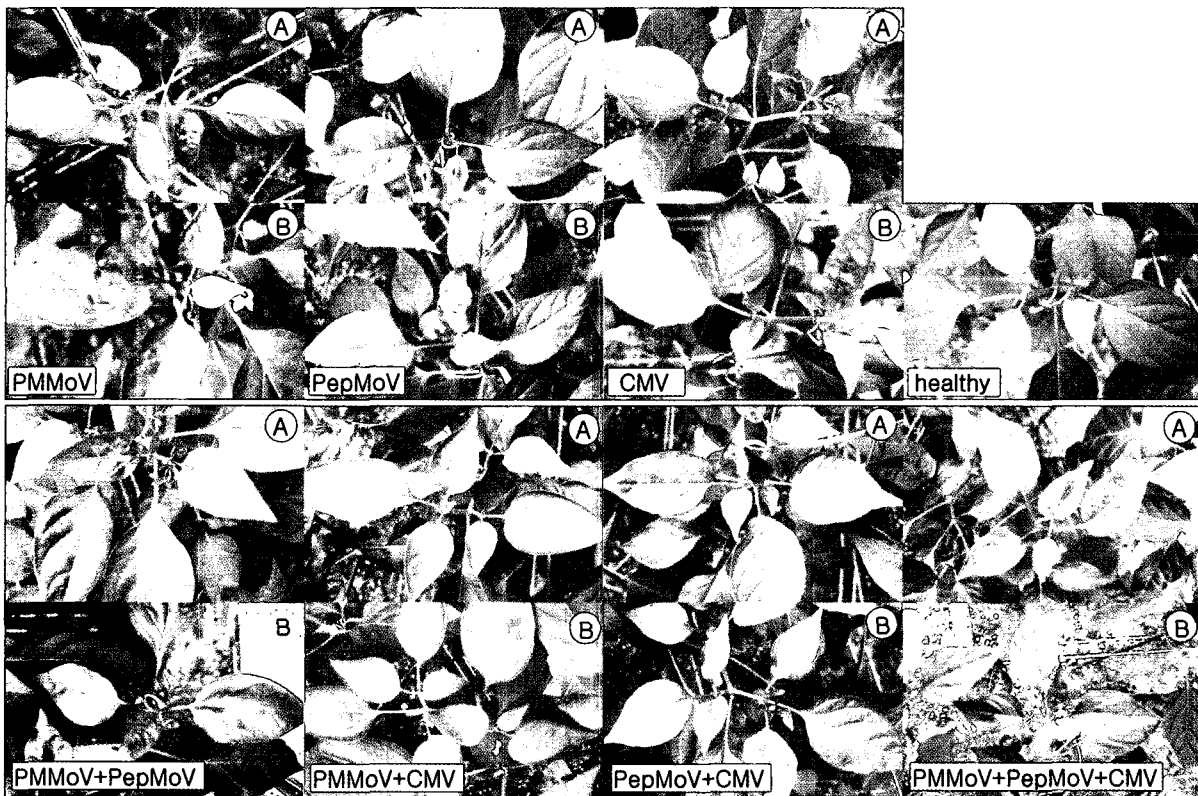


Fig. 2. Symptoms of pepper leaves infected with *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Pepper mottle virus* (PepMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) after treatment of culture filtrate of *Acinetobacter* sp. Columns A and B: KNF2022-treated and control pepper plants, respectively. Photographs were taken 30 days after inoculation with the viruses.

의 종류에 관계없이 KNF2022를 처리한 고추에서 접종 후 10일 정도까지 병징발현이 지연되는 효과를 보였다. 특히 PepMoV를 접종한 경우는 접종 후 30일까지 병징발현이 억제되어 제제처리의 효과가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2). 그러나 PMMoV와 CMV의 경우, 무처리 식물보다 4-6일 정도 늦은 접종 2주 후부터 병징이 발현되기 시작하여, 접종 후 20일이 지나면서부터는 무처리구의 병징과 유사하게 발전되었다. 한편 이들 3종 바이러스의 복합감염에 대한 KNF2022의 효과를 검증한 결과, 모든 바이러스 간 조합에 의한 감염이 각 바이러스의 단독감염보다 강하게 발현됨으로서 병징억제의 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다(Fig. 2). 다만 병징의 강도를 기준으로 판단하였을 때, PMMoV + PepMoV의 조합과 PepMoV + CMV의 복합감염에서 접종 후 약 10일까지 제제처리의 효과가 인정되었다. 이와 같은 결과를 구체적으로 해석하기 위하여 처리 및 무처리 고추에서 증식된 바이러스의 농도를 PCR 및 ELISA로 검정하였다. 우선 PMMoV, PepMoV 및 CMV의 CP 영역에 대한 특이적 primer를 이용하여 RT-PCR 기법으로 각 바이러스를 검출한 결과, KNF2022를 처리한 후 PepMoV를 단독으로 접종한 고추의 경우, 접종 후 30일까지 cDNA가 검출되지 않았다(데이터는 제시하지 않음). 한편 PMMoV 및 CMV를 단독으로 접종한 고추에서는 접종 후 10일부터 모든 식물에서 PCR 산물의 증폭이 인정되었다. 다만 PMMoV를 접종한 고추에서는 KNF 2022의 처리구에서 접종 후 20일

까지 cDNA의 증폭이 무처리구에 비해 상대적으로 적게 검출되었다. 복합감염의 경우, PepMoV + CMV를 접종한 고추에서 접종 후 20일까지 바이러스의 검출이 되지 않았다. 한편 RT-PCR 검정에서 약제처리의 효과가 인정된 PepMoV와 그 복합감염의 조합에 대해서 동일 시료를 이용하여 ELISA 검정을 실시하였다. 그 결과 PCR 검정에서 얻어진 결과와 유사한 ELISA 패턴을 보여, KNF2022의 PepMoV에 대한 감염억제 효과는 뚜렷하게 인정되었다(Table 2). 이러한 결과는 PepMoV의 전신감염 기주에 대한 KNF2022의 특이성이 존재할 가능성을 나타냄으로서, 제제의 실용화를 위한 바이러스의 적용범위를 설정할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 KNF2022의 바이러스 감염억제 효과에 대한 작용 메커니즘을 구명하기 위한 바이러스의 소재로서 PepMoV가 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

KNF2022가 바이러스입자에 미치는 영향. PMMoV, PepMoV 및 CMV를 각 증식기주에 접종하고 2주 후, 전신 감염된 모자이크 잎을 채취하여 바이러스 입자를 정제하였다. 정제된 바이러스 입자를 전자현미경으로 관찰한 결과, PMMoV는 길이 300 nm 폭 18 nm의 전형적인 막대형 바이러스 입자가 다수 관찰되었고, 정제된 시료에는 기주식물의 잔사나 협잡물은 관찰되지 않았다. 정제된 PepMoV는 길이 약 700 nm 폭 12 nm의 사상형 입자로 관찰되었으며, CMV는 직경 약 30 nm의 구형 입자가 확인되었고, 두 바이러스의 정제 시료에서도 다른 협잡물은 관찰되지 않았다. 이렇게 정제된 각 바이러스 입자는 전자현미경 관찰이 용이하도록 증류수로 희석시킨 다음, KNF2022의 1/100 희석액과 혼합하여 시간의 경과에 따른 입자의 변화를 전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과 KNF2022를 처리한 PMMoV 및 PepMoV의 경우, 처리 5분 후에 이미 많은 숫자의 바이러스 입자가 절단된 상태로 관찰되었으며, 제제처리 30분 후에는 대부분의 입자가 1/2~1/3의 길이로 절단된 것이 관찰되었다(Fig. 3). 특히 제제를 처리한 정제 바이러스는 처리 전에는 많은 바이러스의 입자가 side-to-side의 응집된 형태로 관찰되었으나, 처리 후에는 절단된 대부분의 바이러스 입자가 분산된 형태로 관찰되는 특성을 보였다. KNF2022를 처리하여 전자현미경으로 관찰한 시료로부터 정확한 바이러스 입자의 변화를 분석하기 위하여, 각 처리별 전자현미경 사진을 이용한 입자 길이를 측정하여 무처리 입자와 비교하였다. 그 결과 KNF2022를 처리한 PMMoV나 PepMoV는 처리 5분 후에 각각 200~250 nm 및 400~600 nm의 길이로 절단된 입자가 많았고, 처리 60분 후에는 100~150 nm와 300~500 nm의 절편으로 절단된 것으로 분석

Table 2. Concentration of each virus in ELISA detection from pepper plants of single and multiple infections after treatment of the filtrate powder of *Acinetobacter* sp.

Inoculum	Antiserum	Days after inoculation	Absorbance value (A_{405}) ^a		
			Treatment	Control	Healthy plant
PepMoV	PepMoV	10	0.183 ^b	0.981	0.232
		30	0.443	1.900	- ^c
PepMoV + PMMoV	PepMoV	10	0.574	1.200	0.243
		30	0.822	1.876	-
	PMMoV	10	1.330	-	-
		30	1.428	1.366	-
PepMoV + CMV	PepMoV	10	0.266	-	-
		30	0.716	1.892	0.187
	CMV	10	0.950	-	-
		30	1.285	1.964	-

^aLeaf tissue was triturated in coating buffer at 1:20 dilution (w/v). The immunoglobulins used were 1.25 μ l/ml.

^bAverage of two experiments.

^cNot tested.

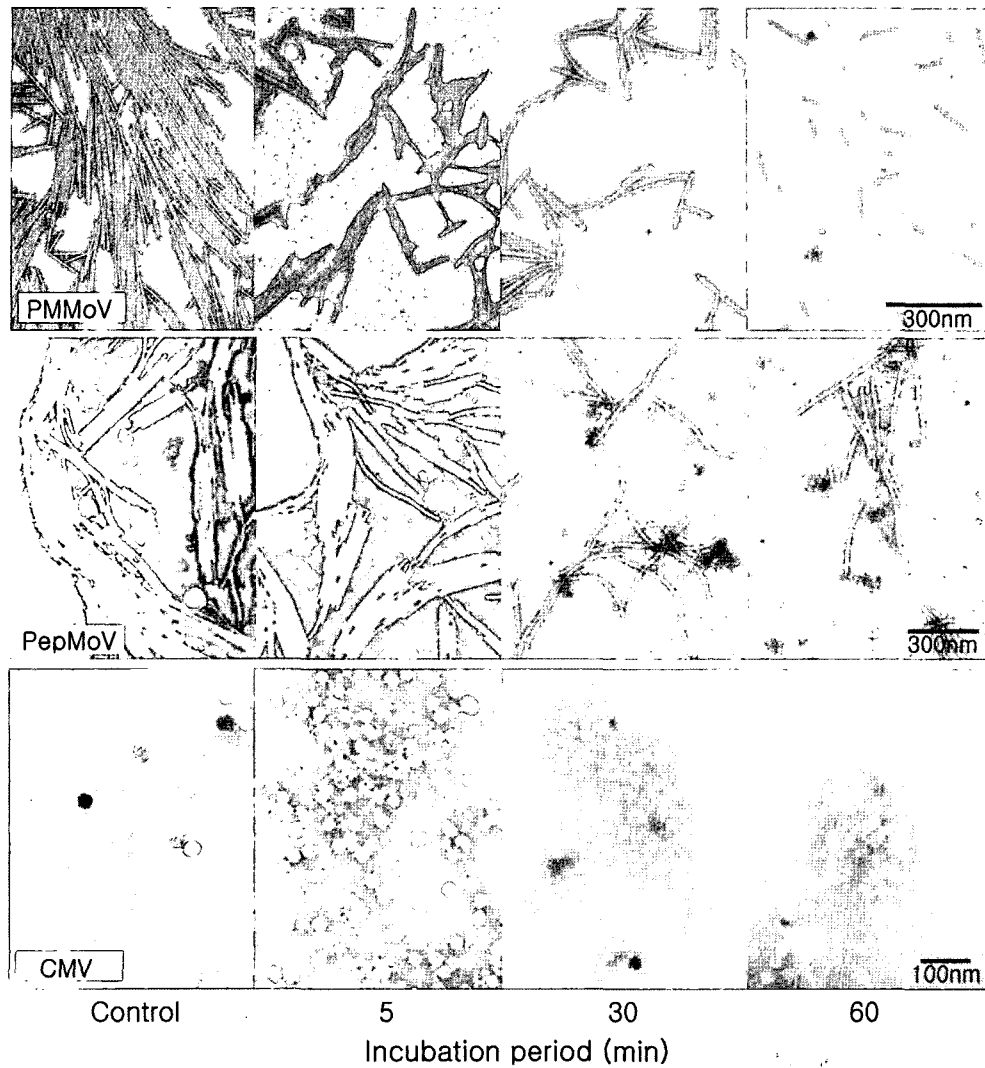


Fig. 3. Electron micrographs of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Pepper mottle virus* (PepMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) treated with culture filtrate of *Acinetobacter* sp. Treated virus preparations stained with 2% phosphotungstic acid.

되었다(Fig. 4). 한편 절단된 바이러스입자가 증가할수록 *N. tabacum* cv. Xanthi nc 및 *C. amaranticolor*에서 실시한 생물검정에서 나타난 병반의 수는 급격하게 감소되는 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과는 KNF2022의 PMMoV와 PepMoV에 대한 작용기작이 바이러스 입자를 절단하는데 기인된다는 것을 강하게 시사하였다. 한편 KNF2022를 처리한 후 전자현미경을 관찰한 CMV의 바이러스 입자는 처리시간에 비례하여 파괴된 입자의 수가 증가하였으며(Fig. 5), 파괴된 바이러스입자가 증가할수록 *C. amaranticolor*에서 나타난 병반수는 감소되는 경향을 나타냈다. 이상과 같은 결과를 종합해 보았을 때, KNF2022의 바이러스 감염억제효과는 각 바이러스 입자에 대한 물리적 절단 또는 파괴가 바이러스의 불활성화로 연결되

는 것으로 추측되었다. 지금까지 바이러스 감염억제물질의 바이러스 입자에 미치는 영향을 직접 전자현미경으로 관찰한 예는 매우 드물다. 또한 비이온 계면활성제인 polyoxyethylene과 TMV의 작용을 전자현미경으로 관찰한 연구(Takagi와 Ogawa, 1978)의 경우, polyoxyethylene을 48시간 처리한 시료에서도 TMV 입자의 형태적 변화는 없었다고 보고하였다. 이와 같은 결과는 적어도 KNF2022의 바이러스에 대한 작용점이 계면활성제 등과는 기본적으로 다르다는 것을 시사하였다. 따라서 KNF2022의 작용기작을 밝히기 위해서는 바이러스 입자의 절단 또는 파괴의 규칙성을 해석하고, 바이러스 CP 또는 게놈 RNA에 대한 작용점을 찾는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

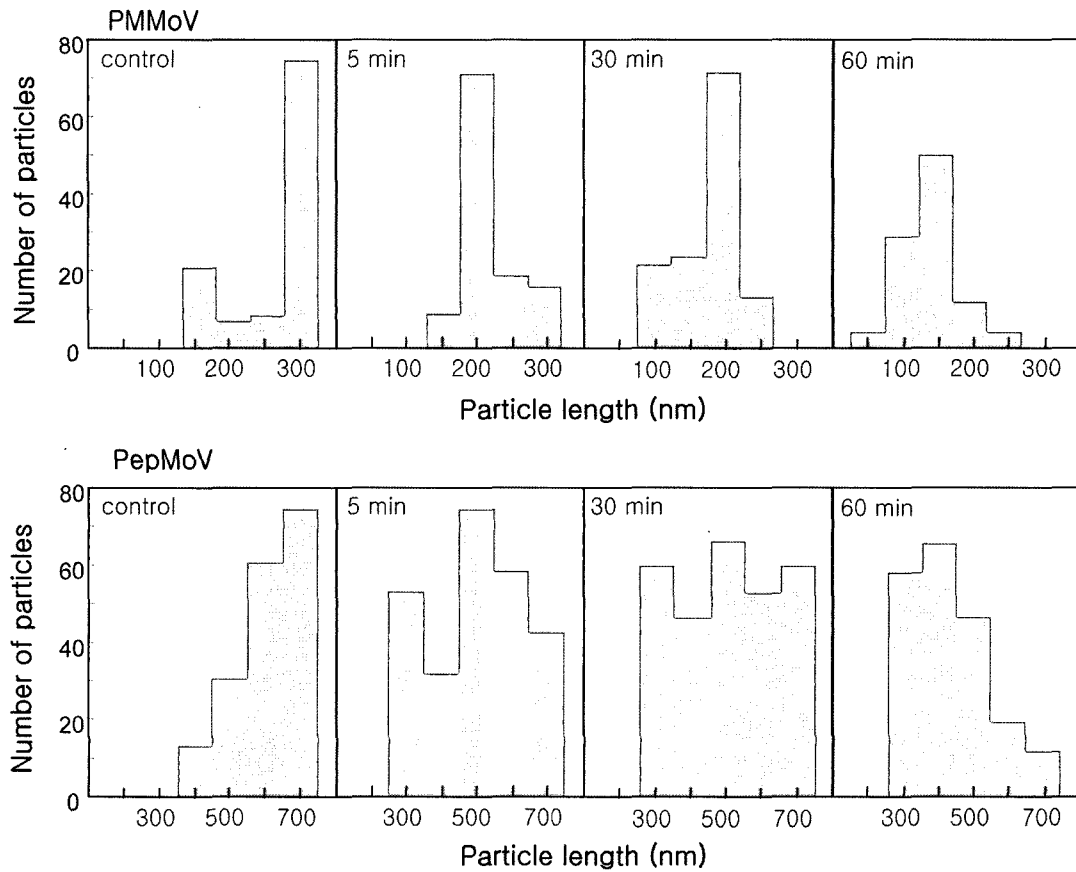


Fig. 4. Particle-length distribution of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and *Pepper mottle virus* (PepMoV) after mixed with culture filtrate of *Acinetobacter* sp. Incubation period of virus preparations and the filtrate powder represents as 5 min, 30 min and 60 min, respectively.

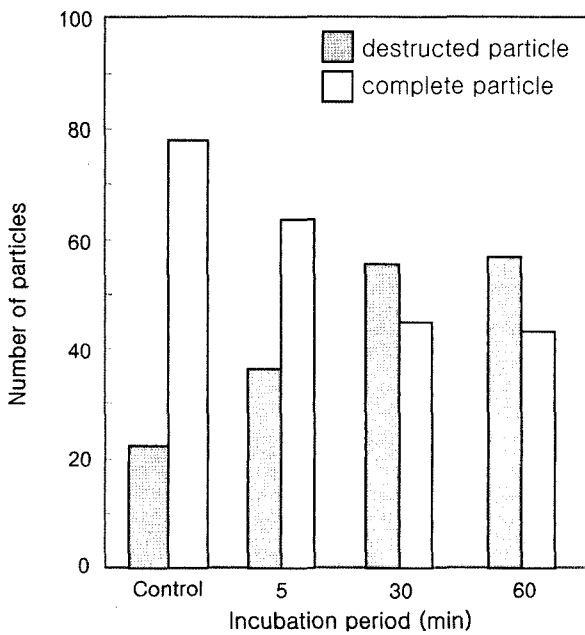


Fig. 5. Distribution of destroyed particles of *Cucurbit mosaic virus* after mixed with culture filtrate of *Acinetobacter* sp.

요약

Acinetobacter sp. KTB3의 배양여과액으로 제조한 분말제제 KNF2022의 바이러스 감염억제 효과를 PMMoV와 *N. glutinosa* 또는 *N. tabacum* cv. Xanthi nc를 이용하여 검증한 결과, 증류수 1/100(배양액의 실질 농도 10,000 ppm) 희석농도에서 94.3~95.6%의 높은 감염억제 효과를 나타냈다. 이 1/100 희석농도를 이용하여 PepMoV-*C. amaranticolor*에서 검증한 억제효과는 97.1%, CMV-*C. amaranticolor*에서는 92.5%의 감염억제를 나타냈다. KNF2022 희석액을 *N. glutinosa*의 반엽에 도말하고 일정 시간 경과 후 PMMoV를 접종하여 조사한 억제효과의 지속성은 처리 2일 후까지 약 80% 선에서 억제효과를 나타냈으나, 처리 4일 후부터는 50% 수준으로 저하되었다. 고추에 KNF2022를 처리한 후 3종의 바이러스를 접종하고 발현되는 병징을 조사한 결과, 각 바이러스를 단독으로 접종하였을 경우는 바이러스의 종류에 관계없이 접종 후 10일까지 병징발현이 지연되는 효과를 보였다. 특히 PepMoV를 접종한 경

우는 접종 후 30일까지 병징발현이 억제되어 제제의 처리효과가 뚜렷하게 나타났다. 한편 이들 3종 바이러스의 복합감염에 대한 KNF2022의 효과는 모든 바이러스 조합에서 단독감염 보다 강하게 발현되어 병징억제의 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 제제를 처리한 고추에서 증식된 바이러스의 농도를 PCR 및 ELISA로 검출한 결과, PepMoV를 단독으로 접종한 경우, 접종 후 30일까지 cDNA가 검출되지 않았다. RT-PCR 검정에서 억제효과가 인정된 PepMoV와 그 복합감염의 조합에 대해서 ELISA 검정을 실시한 결과, PCR 검정에서 얻어진 결과와 유사한 패턴을 보여 PepMoV에 대한 감염억제효과가 뚜렷하게 인정되었다. KNF2022를 처리하여 전자현미경으로 관찰한 PMMoV와 PepMoV는 처리 5분 후에 각각 200~250 nm 및 400~600 nm의 길이로 절단된 입자가 많이 관찰되었고, 처리 30분 후에는 대부분 100~150 nm와 300~500 nm의 절편입자로 관찰되었다. 이와 같이 절단된 입자가 증가할수록 *N. tabacum* cv. Xanthi nc와 *C. amaranticolor*에서 나타난 병반수는 급격하게 감소되었다. 한편 KNF2022를 처리한 후 전자현미경을 관찰한 CMV의 바이러스 입자는 처리시간에 비례하여 파괴된 입자의 수가 증가하였으며, 파괴된 바이러스입자가 증가할수록 *C. amaranticolor*에서의 병반수도 감소되었다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 농림기술관리센터의 농림기술개발 연구비(과제번호 505030-3)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Berger, P. H. and Shiel, P. J. 1998. Potyvirus isolation and RNA extraction. In : *Plant Virology Protocols*. ed. by G. D. Foster and S. C. Taylor, pp. 151-160. Humana Press, Totowa, USA.
- 최장경, 정옥화. 1984. 비름과식물 즙액에 의한 담배 모자이크 바이러스의 감염억제효과. *한국식물보호학회지* 23: 137-141.
- Choi, J. K., Kim, H. J., Hong, J. S., Kim, D. W. and Lee, S. Y. 1998. Identification and differentiation of cucumber mosaic virus isolates in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 7-12.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Gibbs, A. and Harrison, B. 1976. The effects of inactivators on virus particles. In: *Plant Virology, The Principles*. ed. A. Gibbs and B. Harrison, pp. 129-136, Edward Arnold, London.
- Kalo, F. and Taniguchi, T. 1987. Properties of a virus inhibitor from spinach leaves and mode of action. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 159-167.
- Kim, M. S., Kim, Y. S., Jang, C., Hwang, I. C., Ryu, K. H. and Choi, J. K. 2005. Effect of individual and multiple infections with three viruses on disease progress and growth of pepper plants. *Plant Pathol. J.* 21: 427.
- Kim, Y. S., Hwang, E. I., O, J. H., Kim, K. S., Ryu, M. H. and Yeo, W. H. 2004. Inhibitory effects of *Acinetobacter* sp. KTB3 on infection of *Tobacco mosaic virus* in tobacco plants. *Plant Pathol. J.* 20: 293-296.
- Leberman, R. 1966. The isolation of plant viruses by means of "simple" coacervates. *Virology* 30: 341-347.
- Moghal, S. M. and Francki, R. I. B. 1976. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses. *Virology* 73: 350-362.
- Mossop, D. W., Francki, R. I. B. and Grivell, C. J. 1976. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. V. Purification and properties of a cucumber mosaic virus inducing severe chlorosis. *Virology* 74: 544-546.
- Takagi, Y. and Ogawa, K. 1978. Inhibitory effect of nonionic surface active agents on tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 282-287.
- Takagi, Y. and Shimada, K. 1977. Inhibitory effect of aqueous extracts from the saw dust-rice bran media grown mycelia of *Hymenomyces* on tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43: 211-214.
- Takanami, Y. 1981. A striking change in symptoms on *cucumber mosaic virus*-infected tobacco plants induced by a satellite RNA. *Virology* 109: 120-126.
- 여운형, 김영호, 박은경, 김상석. 1997. 방선균 B25균주가 생산하는 항생물질 ASA의 물리, 화학적 특성 및 항바이러스 활성. *한국식물병리학회지* 13: 63-68.
- Yoon, J. Y. 2003. Molecular characterization of symptom attenuation of *Pepper mild mottle virus*. Doctoral Thesis, Seoul Women's Univ., Seoul, 166 pp.