

과제명	강원중북부지역의 여름재배 과채류 애호박 바이러스병 종합방제기술개발					
총괄연구책임자	소속기관	강원도원 농산물이용시험장	직급	농업연구사	성명	권순배
세부과제명	항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명 연구 (농산물이용시험장, 권순배)					
당해년도 연구비	농진청지원금	25,000천원	기업체부담금	0	사업년차	2

## I. 연구목적

- 애호박 주산단지를 중심으로 바이러스에 의한 피해가 매년 반복적 발생 증가 : 애호박 50% 바이러스 발병(강원, '02-'04) ⇒ 상품성 상실, 적극적인 방제대책 수립 시급.
- 식물바이러스 방제용 천연물 항바이러스 소재 탐색, 물질구명 및 애호박 바이러스 방제를 위한 실용화연구

## II. 연구내용 및 결과

### 가. 연구내용

(시험 1) 애호박 바이러스 병 발생양상조사

(시험 2) 항바이러스 물질 선별

- 천연물질을 이용한 바이러스 감염(증식) 억제제 선별
  - 항바이러스 활성검정용 시료조제 : 백화사설초 등 50종
  - 공시 바이러스 : CMV, ZYMV, WMV, Tobamovirus 1종
  - 수행내용
    - 천연 추출물 시료조제 : MeOH 및 열수 추출, 농축, 동결건조
    - 활성검정 : 혼합접종법, 엽표면 접종전 처리법, 엽이면 접종전 처리법, 접종후 처리법
- 항바이러스 활성물질 구조, 동정 : 유기용매분획, 크로마토그래피(TLC, HPLC) 및 GC-MS, NMR
- 바이러스 유도저항성 유기체 탐색
  - 공시물질 : SA 등 3종
  - 주요조사내용 : 처리물질별 기주체내 바이러스 증식량 정량분석, 기주체의 경시적 생육상황 및 상품과율 등

(시험 3) 고효성 항바이러스 소재활용 포장방제효과 시험

- 시험장소 : 주산지 포장 (춘천)
- 주요조사내용 : 포장내 바이러스병 억제율

나. 연구결과

(시험 1) 애호박 바이러스 병 발생양상조사

- 발생 바이러스 : CMV, ZYMV, WMV가 주요 바이러스
  - 발병 양상은 단독 41.5%, 복합감염 58.5%.
- 애호박 재배지의 바이러스병 이병주에서 조사된 감염바이러스 종류 조사

바이러스	이병율(%)		
	춘천(6.20)	화천(8.20)	평균이병율
Cucumber mosaic virus (CMV)	7	10	8.5
Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)	15	20	17.5
Watermelon mosaic virus (WMV2)	15	16	15.5
CMV+ZYMV+WMV2	24	10	17.0
CMV+ZYMV	13	12	12.5
CMV+WMV2	10	12	11.0
ZYMV+WMV2	16	20	18.0
계	100	100	100

- 지역별 조사주수 : 200주, - 조사방법 : ELISA



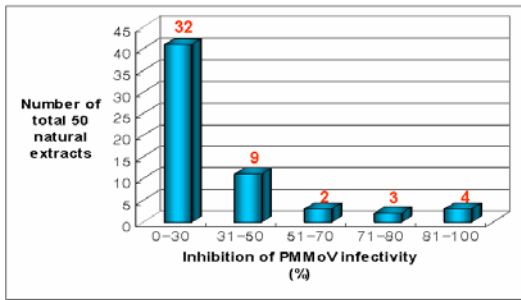
ZYMV에 감염된 애호박 잎의 병징  
증상 : 엽맥녹대, 황화, 모자이크 및 위축



과실 피해증상  
(좌3개)정상, (우2개)ZYMV감염

(시험 2) 항바이러스 물질 선발

- 바이러스 감염(증식) 억제용 천연소재선발: 4종(GAR308, GAR311, GAR506, GAR510)



50종 천연추출물의 항바이러스활성 스크리닝 결과  
PMMoV 억제활성 81%이상 추출물 4종선발



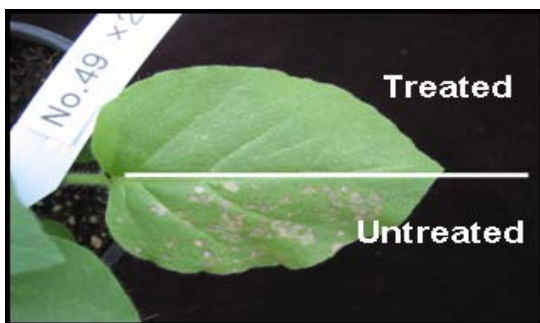
정제 항바이러스 소재 분말  
(좌)GAR311, (우)GAR510

- 3종 추출물의 PMMoV 국부병반 감염증상(local lesion symptom) 억제효과

처리 물질	검정식물	처리방법	조사주수	처리물질농도 <sup>a)</sup> (mg/ml)	감염억제율 <sup>b)</sup> (%)
GAR311	<i>N. glutinosa</i>	반엽법	3	10	99.4
			"	5	98.4
			"	2	85.7
			"	1	68.7
GAR510	"	"	"	10	99.5
			"	5	97.4
			"	2	95.6
			"	1	91.1
GAR506	"	"	"	10	98.9
			"	5	98.0
			"	2	82.0
			"	1	59.7

a) 각 처리물질 농도별 엽면처리, 1시간 후 바이러스 접종(PMMoV, 5ug/ml)

b) 감염억제율 : (무처리구 반엽의 병반수-처리구 반엽 병반수)/무처리구 반엽의 병반수×100



PMMoV 국부병징 억제효과 검정용 반엽법  
(Treated)GAR510처리,(Untreated)열균수



GAR510의 담배 모자이크병 증액전염 예방효과  
(좌)PMMoV전염주,(가)GAR510처리주,(우)건전주

◦ 3종 추출물의 PMMoV 전신감염(systemic symptom) 억제효과

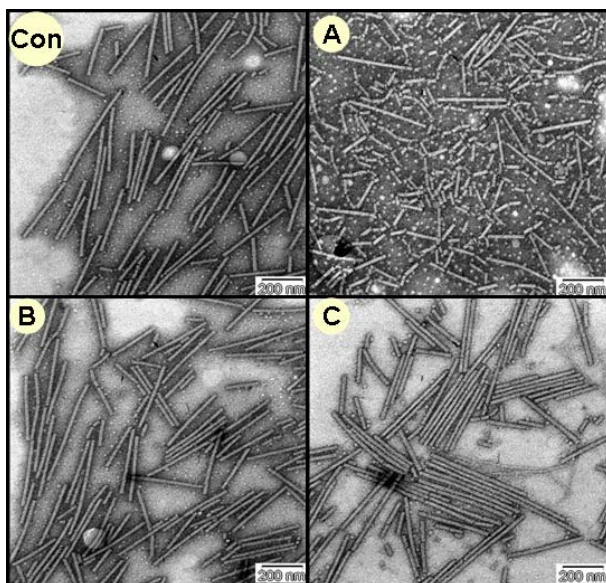
처리물질	검정식물	처리방법	조사주수	처리물질농도 <sup>a)</sup> (mg/ml)	감염억제율 <sup>b)</sup> (%)
GAR311	<i>N. tabacum</i> (Samsun)	분무처리	20	10	100.0
			"	5	95.0
GAR510	"	"	"	10	100.0
			"	5	100.0
GAR506	"	"	"	10	100.0
			"	5	90.0
무처리	"	"	"	증류수	0

a) 각 처리물질 농도별 엽면처리, 1시간 후 바이러스 접종(PMMoV, 5ug/ml)

b) 감염억제율 : (무처리구 이병주수-처리구 이병주수)/무처리구 이병주수×100

◦ 애호박 재배시 GAR510에 의한 바이러스 예방효과 지속기간

약제 엽면살포후 바이러스접종간격(일)	처리농도 (mg/ml)	접종 바이러스	방제효과(%)		
			접종 2주후	3주 후	4주 후
4	5	ZYMV	100	100	100
6	"	"	100	100	100
8	"	"	100	96.7	96.7
10	"	"	96.7	93.3	93.3
무처리 대조구	"	"	0	0	0

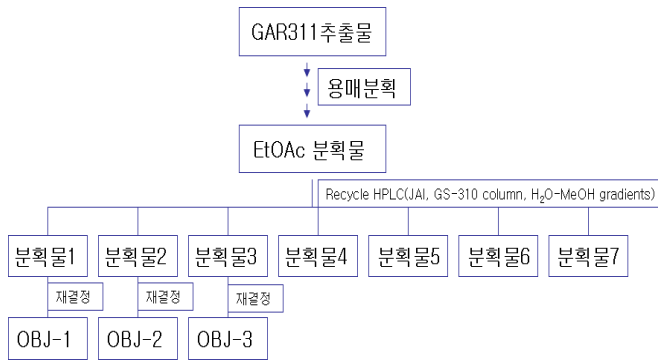


선발된 3종의 항바이러스활성 추출물이 바이러스 형태 변화에 미치는 영향조사

(Con) 무처리 PMMoV입자, (A) GAR311, (B), GAR510, (C) GAR506을 PMMoV에 20분간 처리후, 전자현미경 관찰사진

(2% PTA염색, pH 7.0). Bar=200nm

- 항바이러스 활성물질 구조, 동정
  - GAR311추출물 분획물로 항바이러스활성물질 단리 및 구조동정



GAR311추출 및 성분 분리도

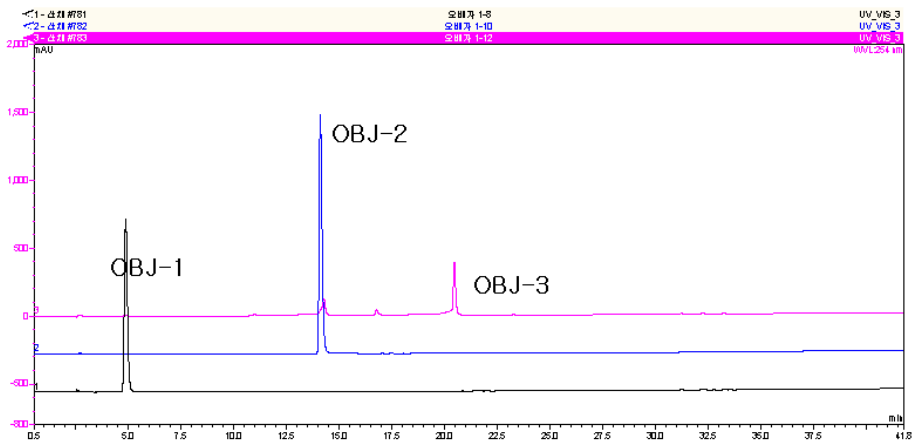


Recycle HPLC로 얻어진 7개 분획물

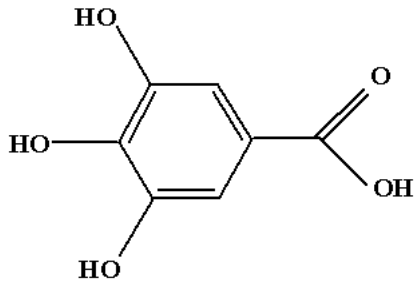
- GAR311에서 분리한 7 groups 분획물의 항바이러스활성 비교

분획물	감염억제 활성 (%)
1	53.0
2	32.5
3	92.0
4	67.6
5	66.2
6	89.0
7	85.0
MeOH Ex.	81.5

- a) 활성검정 각 시료농도 : 2 mg/ml
- b) 활성검정법 : *N. glutinosa*에서 반염법

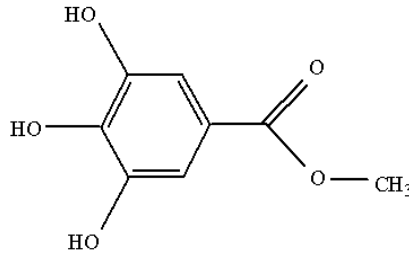


- 분리된 3종 화합물의 HPLC chromatograms (254 nm)



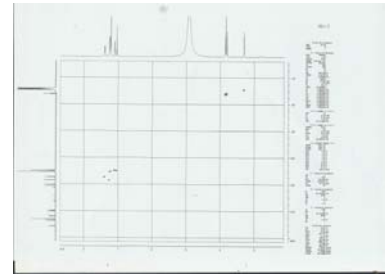
OBJ-1(Gallic acid)

m.p : 249-251°C 1H-NMR(200MHz, DMSO-d6 ) δ : 7.14(2H, s, H2,6); 13C-NMR(50MHz, acetone-d6+D2O) δ : 109.8(C-2,6), 121.8(C-1), 138.6 (C-4), 145.8(C-3,5), 168.5(COO); UVλmax : 217,265(EtOH); IR(KBr) cm-1 : 3402(OH), 1650(CO)



OBJ-2(Methyl gallate)

m.p : 200°C 1H-NMR(200MHz, DMSO- d6) δ : 3.86(3H, s, COOCH3), 7.18(2H, s, H2,6); 3C-NMR(50MHz,acetone-d6+ D2O) δ : 51.9(CH3), 109.6(C-2,6), 21.3 (C-1), 138.7(C-4), 145.9(C-3,5), 167.6 (COO); UV λmax : 226, 277(EtOH); IR (KBr)cm-1 : 3400(OH), 1655(CO)



OBJ-3

(Methyl m-digallate로 예상 확인 중)

◦ 바이러스 유도저항성 유기제 탐색

- CPM 등 3종 물질 : CPM 및 GAR510에서 미약한 병징완화 및 바이러스 증식 저해효과 인정되나, 유효한 수준의 치료효과 없었음.

◦ 3종 처리물질의 모자이크병 치료효과 검증

처리 <sup>a)</sup> 물질	기주 식물 <sup>b)</sup>	접종바이러스 <sup>c)</sup>	검정결과 <sup>d)</sup>		기주 식물	접종바이러스	검정결과	
			육안	ELISA			육안	ELISA
A	애호박	ZYMV	++	0.8±0.2	담배	PMMoV	++	0.8±0.2
B	"		+++	1.4±0.3	"		+++	1.4±0.2
C	"		++	1.0±0.3	"		+++	1.1±0.3
D	"		+++	1.5±0.3	"		+++	1.5±0.3

<sup>a)</sup> 처리물질 : (A) CPM제제(5,000ppm),(B) SA제제(100ppm),(C) GAR510(2,000ppm), (D) 무처리

<sup>b)</sup> 처리주수 : 처리구별 각 10주

<sup>c)</sup> 처리방법 : 기주식물 본엽 5-7매 유묘에 각 바이러스 조제액을 즙액접종 후 약 14일 후 병징발현주에 처리물질 분무살포

<sup>d)</sup>검정방법 : 물질처리 28일 후 검정

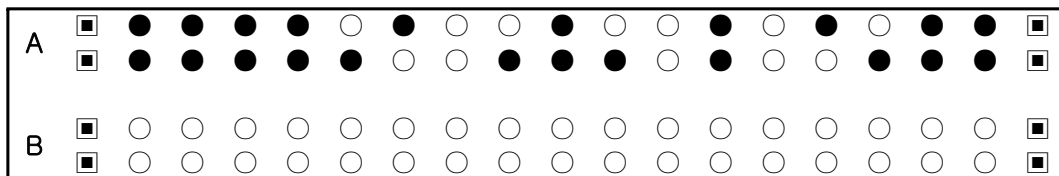
(시험 3) 고효성 항바이러스 소재활용 포장방제효과 시험

- 항바이러스제로 기구 소독시 같은 포장내 바이러스병 확산 0%(관행작업시 바이러스 확산율 59.5%)  
(하기 시험성적 참조)



GAR510제제를 이용한 바이러스 증액전염 방제시험

GAR510제제로 소독한 기구를 이용한 관리작업 장면



- 하우스내 재배관리, 수확작업의 차이에 의한 ZYMV 전염을 비교  
A: 관행(무소독 가위) 관리작업, B: 개선(GAR510제제로 소독한 가위) 관리작업  
정식 : 5.25, 접종: 6.5(처리구별 정식초기 모종4주에 ZYMV접종), ■:접종주, ●:발병주, ○:건전주

다. 적 요

- 애호박 주요 발생 바이러스 종류 및 양상 : CMV, ZYMV, WMV 다발  
(단독 41.5%, 복합감염 58.5%)
- 감염억제 소재 탐색 : 바이러스 감염 억제용 천연소재 선발 4종  
(GAR308, GAR311, GAR506, GAR510)
- 증식억제 소재 탐색 : CPM 및 GAR510에서 미약한 병징완화 및 바이러스 증식 저해효과 인정되나, 유효한 수준의 치료효과 없었음 → 활성 소재 탐색 지속추진 필요.
- 선발 항바이러스 소재이용 포장 바이러스 전염방지효과 시험 : 항바이러스제로 전정가위 소독동일 포장내 바이러스병 확산 0% (관행작업시 바이러스 확산율 59.5%)

라. 금후 연구결과 활용계획 (2007)

- 특허출원 1건  
- GAR510 추출물을 포함하는 식물 바이러스 방제제 및 제조방법
- 논문게재 1건