

사업구분	지역특화기술개발	수행구분	전반기	연구기간	'02-'04(2년차)
연구과제명	천연물질을 이용한 주요 산채류 병해충의 방제연구			연구책임자	권순배
세부과제명	고활성 추출물의 포장검정 및 약효우수 물질 분리				
세부과제책임자	농산물이용시험장 농업연구사 권 순배 (033-258-4511)				
색인용어	살균 및 살충활성, 식물 추출물, 천연물질 분리				

1. 당해연도 목표

- 살균 및 살충활성 우수 식물 추출물을 이용한 포장시험 및 물질 분리, 동정

2. 수행방법

가. 포장검정

- 대상산채 및 병해충 : 제1세부과제와 동일
- 공시재료 : 실내검정에서 선발된 약효우수 추출물(5종)
GAR03-43, GAR03-56, GAR03-19, GAR03-42, GAR02-44
- 시험장소 : 포장(해가림시설) 또는 포트시험
- 약효조사 : 적용대상 병해충별 적정 조사기준 의거 ('99 농과원)

나. 약효우수물질의 분리

- 고활성을 보인 조추출물을 대상으로 활성물질 분리
 - GAR03-01, -16, -22, -42, -43, -56 및 GAR02-44
 - 유기용매별 분획 → 감압농축 → 동결건조 → 활성검정

3. 시험성적

표 1. 1차선발된 흰가루병 방제활성이 우수한 식물체 2종의 MeOH추출물을 이용한 곰취 흰가루병의 포장방제시험 결과

처리	농도 (ppm)	1차 ¹⁾		2차		3차	
		발병면적율 ²⁾ (%)	방제가 ³⁾ (%)	발병면적율 (%)	방제가 (%)	발병면적율 (%)	방제가 (%)
GAR03-43	5,000	4.1	85.0	4.1	86.0	4.5	86.0
	2,500	7.4	72.5	8.6	71.0	9.1	72.0
GAR03-56	5,000	4.5	83.5	4.6	84.5	4.8	85.0
	2,500	7.3	73.0	7.8	73.5	8.4	74.0
대조약제	1,000	4.9	82.0	3.8	87.0	4.2	87.0
무처리		27.0		29.5		32.4	

1) 약제처리 및 발병도 조사시기 : 발병초기 7일 간격 3회 및 발병도는 약제처리 7일째 조사

2) 발병도(병반면적율 %) : $(\sum \text{발병엽수} \times \text{계수} / \text{조사엽수} \times 4) \times 100$

0: 발병무, 1: 병반면적율 0.1~5%, 2: 5.1~20, 3: 20.1~40 4: 40.1%이상

3) 방제가(%) = [1-처리구의 발병도/무처리구의 발병도] ×100

표 2. 1차 선발된 살비활성이 우수한 식물체 3종의 MeOH추출물을 이용하여 곰취에 발생한 두점박이응애의 포장방제시험 결과

시료번호	농도 (ppm)	응애 밀도(마리/주)		방제가 ³⁾ (%)
		6. 27 ¹⁾	6. 29(48h후)	
GAR02-44	5,000	86 ²⁾	18	79.0
	2,500	102	37	63.7
GAR03-19	5,000	82	9	89.0
	2,500	95	27	69.0
GAR03-42	5,000	92	11	88.0
	2,500	83	24	71.1
대조약제	1,000	85	7	91.7

1) 약제처리일

2) 약제처리전 진딧물 밀도(조사일 6.27) : 조사주수 5주 평균밀도

3) 방제가(%) = [1-(처리 후의 생충수/처리 전의 생충수)] ×100

표 3. 1차선발된 항균활성 우수 식물체의 MeOH추출물에 대한 용매분획층별 항균효과(in vitro)

시료번호	분획용매	항 균 효 과 1)					
		P	.P	.R	.F	.A	.P
		spinosum	ultimum	solani	oxysporum	solani	infestance
GAR03-01-1	Hexane	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GAR03-01-2	CH ₂ Cl ₂	++	++	++	++	++	++
GAR03-01-3	EtOAc	++	++	-	-	-	-
GAR03-01-4	BuOH	-	-	-	-	-	-
GAR03-01-5	H ₂ O	-	-	-	-	-	-
GAR03-16-1	Hexane	-	-	-	-	-	-
GAR03-16-2	CH ₂ Cl ₂	-	-	-	-	-	-
GAR03-16-3	EtOAc	+++	+++	++	++	-	-
GAR03-16-4	BuOH	-	-	-	-	-	-
GAR03-16-5	H ₂ O	-	-	-	-	-	-
GAR03-22-1	Hexane	+	-	++	+	+	+
GAR03-22-2	CH ₂ Cl ₂	+++	+++	+	-	-	-
GAR03-22-3	EtOAc	-	-	-	-	-	-
GAR03-22-4	BuOH	-	-	-	-	-	-
GAR03-22-5	H ₂ O	-	-	-	-	-	-

1) 처리농도 및 처리량 : 5,000ppm, 50ul/disc

2) 균사생육저지 정도 : - ; 저지원 형성 무, + : 약, ++ : 중, +++ : 심

표 4. 고효성 분획추출물 1종의 입고병균 (P. ultimum)종에 대한 농도별 균사생육 억제도 조사 결과

처 리	분획층	희석농도 ¹⁾			
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
GAR03-1	Hexane	+++ ²⁾	+++	+	-

1) 시료처리 : 각 농도별로 시료를 paper disc당 50ul씩 흡수, 풍건 후 배지에 치상

2) 균사생육저지 정도 : - : 저지원 형성 무, + : 약, ++ : 중, +++ : 심

표 5. 두점박이 응애에 대한 GAR03-42 추출물의 분획층별 살충효과

<i>n</i> -hexane	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	H ₂ O
- ²⁾	-	+	++++	+

1)처리농도 : 5000ppm

2)사충율 : +++++, > 90%; +++, 81 ~ 90%; ++, 61 ~ 80%; +, 40 ~ 60%; and -, <40%

표 6. 두점박이응애에 대한 BuOH추출물의 컬럼크로마토그래피 분획물 살충효과

시료번호	살 충 효 과		
	BA	BB	BC
GAR03-42		+++	++++

표 7. 두점박이응애에 대한 BC분획물의 컬럼크로마토그래피 분획물 살충효과

시료번호	살 충 효 과	
	BCA	BCB
GAR03-42	+++	++++

4. 주요 결과요약

- 가. GAR03-43, 56 추출물을 각각 5,000ppm과 2,500ppm으로 곰취흰가루병 발생포장에서 방제효과를 시험한 결과 5,000ppm처리시 방제가 83.5-86%의 방제가를 나타냈으며, 대조약제 1,000ppm처리시 방제가 82-87%와 차이를 보이지 않아 흰가루병 방제용 천연소재로서 가능성을 확인하였다.
- 나. 곰취에 발생한 두점박이응애 방제효과 시험에서 3종의 자생식물 추출물(GAR02-44, GAR03-19, 42)의 방제가는 5,000ppm 처리시 79-89%의 방제가를 나타내어 대조약제 91.7%에 비해 다소 낮았다.
- 다. 높은 살균활성을 나타낸 추출물 중 GAR03-01, 16, 22, 43, 56에 대해 용매 분획하여 각각 활성을 검정한 결과, GAR03-56, -43, -01 추출물은 Hexane층에서, -22 추출물은 Hexane 및 EtOAc층에서 GAR03-16은 EtOAc층에서 활성이 높아 크로마토그래피에 의한 물질 분획 준비 중이다.

- 라. 높은 항균활성을 나타낸 GAR03-1의 Hexane분획 추출물의 *P. ultimum*에 대한 농도별 항균활성의 희석한계농도는 10⁻³으로 나타났다.
- 마. 두점박이응애에 대해 살충활성을 나타내었던 GAR03-42의 활성물질 확인을 위하여 용매별 분획층의 활성검정결과 BuOH층에서 높게 나타났다
- BuOH 분획물을 흡착(Silica gel 60, 0.040-0.063mm, Merck) 컬럼 크로마토그래피에서 EtOAc:Methanol용액(7:3, v/v)을 이용하여 용출분획한 결과 V_e/V_t (elution volume /column bed volume) 0.11 ~ 0.26(BC), 0.31(BB), 0.56 ~ 0.75(BA)를 얻었음.
 - 활성이 높은 분획물(BC)을 EtOAc:Methanol용액(9:1, v/v)을 이용하여 용출분획한 결과 V_e/V_t 0.18 ~ 0.45(BCB)와 0.62 ~ 0.89(BCA)를 얻었음.
 - 이 중 BCB층의 활성이 높아 컬럼을 통한 재분획을 진행중이며, GC mass, NMR등을 이용하여 구조 동정할 계획이다.

5. 금후 계획

- o 식물추출물 함유 항균물질 조성물, 유효성분 구명 및 그의 분리 방법 (특허출원, '04)
- o 식물추출물 함유 응애 및 진딧물 방제 조성물, 유효성분 구명 및 그의 분리 방법 (특허출원, '04)