

사업구분	지역특화기술개발	수행구분	전반기	연구기간	'05~(1년차)
연구과제명	강원 중북부지역의 여름재배 과채류 애호박 바이러스병 종합 방제 기술 개발			연구책임자	권순배
세부과제명	항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명 연구				
세부과제책임자	농산물이용시험장 농업연구사 권 순배 (033-258-4511)				
색인용어	박과작물, 항바이러스 물질				

1. 당해연도 목표

- 애호박 주산단지를 중심으로 바이러스에 의한 피해가 매년 증가:
 - 평균 발병율 50%(강원, '02~'04) ⇒ 상품성 저하, 방제대책 시급.
- 노지재배 포장에서도 바이러스 감염을 예방할 수 잇는 방제제 개발 필요
 - 천연물 항바이러스 물질 탐색 ⇒ 실용적인 바이러스 방제용 소재개발

2. 수행방법

(시험 1) 애호박 발생 바이러스 종 조사 및 진단법 확립

가. 애호박 발생 바이러스 양상 조사 : 주산지 (화천, 춘천)

(시험 2-1) 천연물질을 이용한 바이러스 감염(증식) 억제제 탐색

가. 항바이러스 활성검정용 시료확보 : 하수오 등 53종

나. 공시 바이러스 : CMV, ZYMV, TMV, PMMoV

다. 수행내용

- 활성검정용 시료조제 : MeOH 추출, 농축, 동결건조
- 항바이러스 활성검정법 확립 : 감염저해효과

라. 주요 조사 항목 : 방제가, 활성농도 등

(시험 2-2) 항바이러스 활성물질 구조, 동정

가. Gel chromatography에 의한 분리

나. EI-MS, CI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 기기분석에 의한 활성물질 동정

3. 시험성적

(시험 1) 애호박 발생 바이러스 종(계통) 조사 및 진단법 확립

가. 애호박 발생 바이러스 종(계통) 조사

<표 1> 애호박 재배지의 바이러스병 이병주에서 조사된 감염바이러스 종류 조사

바이러스	조사주수(발병율, %)	조사지역
Cucumber mosaic virus(CMV)	14 (7)	춘천, 화천
Zucchini yellow mosaic virus(ZYMV)	26 (13)	"
Watermelon mosaic virus2 (WMV2)	30 (15)	"
CMV+ZYMV+WMV2	48 (2)	"
CMV+ZYMV	30 (15)	"
CMV+WMV2	32 (16)	"
ZYMV+WMV2	20 (10)	"
합계	200 (100%)	

- 조사시기 : 2005. 6. 10~8, 10, - 진단법 : ELISA 진단

(시험 2) 천연물질을 이용한 바이러스 감염(증식) 억제제 탐색 및 항바이러스 활성물질 구조, 동정

가. 항바이러스 활성검정

CMV, ZYMV PMMoV 및 TMV 등 식물바이러스에 대한 항바이러스 활성검정 탐색을 위하여 하수오 등 53종의 약용, 자생식물체를 확보하여, 시료조제 후 활성을 탐색.

<표 2> 53종 식물 메탄올 추출물의 TMV에 대한 항바이러스활성

Scientific Name	Family Name	Inhibition(%) ^{a)}	Scientific Name	Family Name	Inhibition(%) ^{a)}
<i>Acer pseudo-sieboldianum</i> (Faxton) Kom	Aceraceae	39.7	<i>Omphalia lapidescens</i>	Polyporaceae	47.0
<i>Aconitum pseudoaleve</i> var <i>erectum</i>	Ranunculaceae	27.7	<i>Paulownia coreana</i> UIEKI (L)	Scrophulariaceae	18.5
<i>Acorus calamus</i> Linne	Araceae	0	<i>Paulownia coreana</i> UIEKI (P)	Scrophulariaceae	50.35
<i>Ainsliae acerifolia</i> Schultz Bip	Compositae	0	<i>Phytolacca esculenta</i> v	Phytolaccaceae	0
<i>Allium victorialis</i> var <i>platyphyllum</i> M ^{AKIUNO}	Liliaceae	10.5	<i>Pinus densiflora</i> S. st. Z.	Pinaceae	5.5
<i>Aloe vera</i>	Liliaceae	32.4	<i>Pinus koraiensis</i> S. et. Z (L)	Pinaceae	0
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Faboideae	12.8	<i>Pinus koraiensis</i> S. et. Z (P)	Pinaceae	35.9
<i>Angelica dahurica</i>	Apioideae	0	<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	22.8
<i>Angelica gigas</i> NAKAI	Apioideae	0	<i>Polygonatum sibiricum</i>	Liliaceae	13.5
<i>Areca</i> sp. L.	Palmae	98.5	<i>Populus alba x glandulosa</i> (L)	Salicaceae	29.6
<i>Artemisia</i> spl.	Carduioideae	74.7	<i>Populus alba x glandulosa</i> (P)	Salicaceae	24.3
<i>Carpesium abrotanoides</i> L.	Compositae	0	<i>Pulsatilla cernua</i>	Ranunculaceae	30.4
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne(L)	Rosaceae	16.5	<i>Quisqualis indica</i>	Combretaceae	0
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne(P)	Rosaceae	19.8	<i>Rhododendron schlippenbachii</i> mer	Ericaceae	28.5
<i>Diospyros kaki</i> Thunb	Ebenaceae	68.2	<i>Rhus</i> sp. Linne	Anacardiaceae	98.4
<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	Aspidiaceae	45.4	<i>Rumex</i> sp. L.	Polygonaceae	0
<i>Ephedra sinica</i>	Ephedraceae	0	<i>Sambucus</i> sp. L.	Caprifoliaceae	74.02
<i>Equisetum arvense</i>	Equisetaceae	30.7	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	Carduioideae	13.8
<i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg	Myrtaceae	0	<i>Sophora flovescens</i> A. IT	Leguminosae	0
<i>Euphorbia lathyris</i>	Euphorbiaceae	0	<i>Stemona sessilifolia</i>	Stemonaaceae	0
<i>Euphorbia pekinensis</i>	Euphorbiaceae	22.2	<i>Tagetes</i> sp. L.	Compositae	77.9
<i>Euphorbia sieboldiana</i>	Euphorbiaceae	9.5	<i>Teucrium veronicoides</i> Maximo	Labiatae	29.0
<i>Ferula assafoetida</i>	Apioideae	0	<i>Torreya nucifera</i>	Taxaceae	31.8
<i>Foeniculi fructus</i>	Umbelliferae	26.7	<i>Ulmus macrocarpa</i>	Ulmaceae	30.6
<i>Hydnocarpus antheimintica</i>	Racourtiaceae	36.5	<i>Veratrum maackii</i> var. <i>japonicum</i>	Liliaceae	21.9
<i>Kaempferia galanga</i> L.	Zingiberaceae	0	<i>Veratrum posatum</i> Loes. Fil.	Liliaceae	5.0
<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i> M ^{AKIUNO}	Meliaceae	1.54			

a) Total number of local lesion produced on three leaves of *N. glutinosa*.
b) Antiviral activity of extracts were tested at concentration of 10 mg/ml.

각 추출물의 TMV 감염저해활성은 추출물 희석액을 먼저 담배잎(*N. glutinosa*) 반엽에 면봉으로 문질러 도말하고 24시간이 경과한 후 바이러스를 접종하는 전 처리법을 이용하였다. 대조구로는 멸균 증류수를 사용하였으며 접종 2~4일 후 추출물처리구와 증류수 처리구의 국부 병반수를 비교하여 감염저해효과를 산출하여, 그 결과는 상기 표 1에 나타내었다. 그 중에서 70%이상의 감염억제력을 나타내는 추출물 5종을 선발하였고, 그 중에서 오배자 추출물(GAR311)을 이용하여 다음 실험을 수행하였음.

<표 3> GAR311 추출물의 PMMoV에 대한 국부병반기주 *N. glutinosa*에서 감염저해효과

추출물 처리방법	추출물 희석농도(%)	감염저해활성(%)
혼합처리	1	99.4
	0.5	98.8
전처리	1	98.4
	0.5	97.9

- PMMoV : pepper mild mottle virus

<표 4> GAR311 추출물의 PMMoV에 대한 전신감염기주인 samsun 담배에서의 발병저해효과

처리액	접종3주 후 발병 억제효과(%)
GAR311추출물 (1% 수용액)	100
skim milk(10% 수용액)	35.0
sodium alginate트(1% 수용액)	30.0
대조구	0

<표 5> GAR311 추출물의 쥬키니호박에서 CMV 전신감염 억제효과

처리	처리 농도(%)	발병주수		조사주수	감염 억제율(%)	
		2주 후	3주 후		2주 후	3주 후
혼합처리	1	0	0	20	100	100
	0.5	2	2	20	90	90
전처리	1	0	0	20	100	100
	0.5	2	2	20	90	90
이면처리	1	7	8	20	65	60
	0.5	11	11	20	45	45
대조구		20	20	20	0	0

- 품종 : 서울 올쥬키니, - CMV : cucumber mosaic virus

<표 6> GAR311추출물의 항바이러스활성 지속효과

추출물처리 후 바이러스 접종 (일)	처리농도	방제효과(%)		
		접종 2주 후	3주 후	4주 후
즉시		100	100	100
2		100	100	100
3	0.7%	100	100	100
6		100	96.7	96.7
8		96.7	93.3	93.3
대조구	멸균수	0	0	0

- 접종바이러스 : ZYMV(Zucchini yellow mosaic virus), - 시험작물 : 애호박(품종: 각시애호박)

나. GAR311의 항바이러스 활성 기작 구명 연구

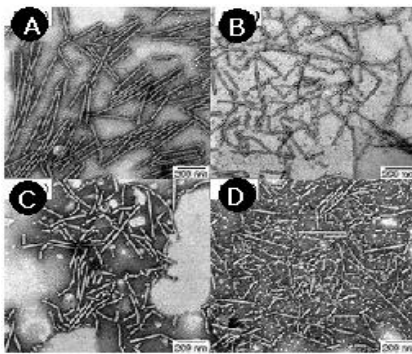


그림 1. GAR311 추출물이 PMMoV 입자 형태 변화에 미치는 영향

A: 추출물을 처리하기전의 PMMoV입자 사진,
 B: 바이러스에 추출물을 처리 직 후의 입자 변화 - 바이러스 입자의 균열현상 나타남,
 C: 처리 후 10분 - 많은 입자가 세절
 D: 처리 후 20분 - 거의 모든 입자가 잘게 세절, 파괴

<표 7> GAR311 추출물의 PMMoV RNA 불활성화에 미치는 영향

RNA 접종농도(ug/ml)	추출물 농도 (%)	형성 국부병반 수 (개)		감염 억제율(%)
		추출물처리	멸균수처리	
100	1	0	327	100
	0.5	3	326	99.1

- 검정기주 및 검정방법 : *N. tabacum* cv. Samsun NN 및 반엽법

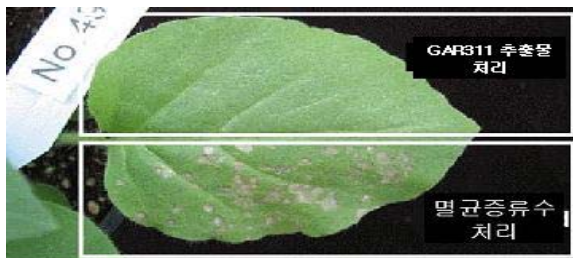


그림 2. GAR311의 PMMoV RNA에 대한 감염억제효과

- 검정 기주 : *N. glutinosa*
 - RNA 접종농도 : 100ug/ml

다. GAR311로부터 항바이러스 활성물질 분리, 동정

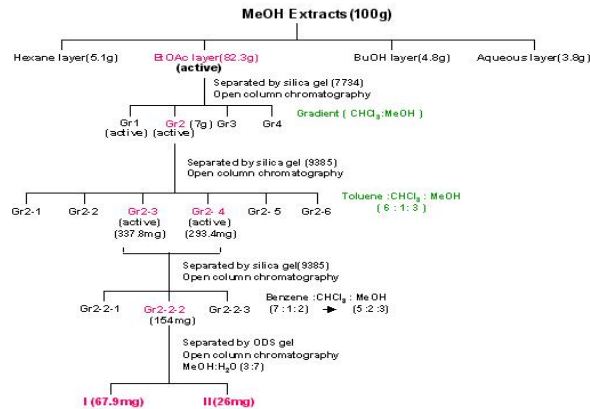
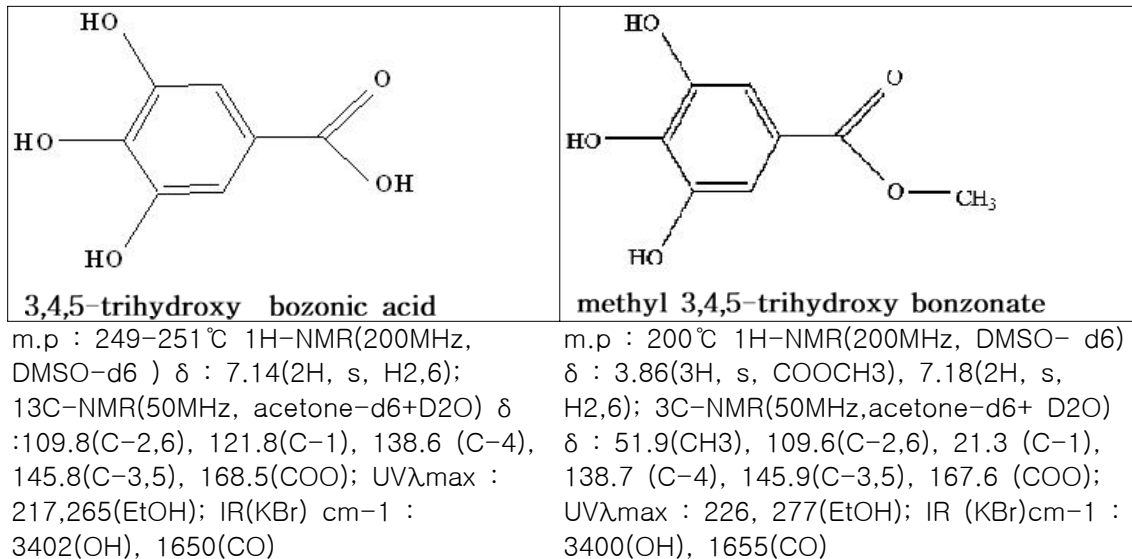


그림 3. GAR311의 항바이러스 활성물질 분리 절차

<표 8> GAR311 메탄올추출물에서 용매 분획된 각 층의 항바이러스 (PMMoV) 활성

용매 추출물	병반수 (개)		감염저해율(%)
	무처리	처리	
n-Hexane 층	140	54	61.4
EtOAc 층	147	2	98.6
BuOH층	119	25	79.0
H ₂ O	157	182	0

- 처리농도 : 5mg/ml



[그림 4] GAR311에서 분리된 2종의 항바이러스 활성물질

4. 주요결과요약

- 애호박 주산지인 화천, 춘천의 포장 병징 발현주 200주 조사 :
 - 발병바이러스 종류: CMV, ZYMV, WMV2, - 발병 양상은 단독감염 35%, 복합감염 65%.
- 54종 추출물의 항바이러스(TMV) 활성검정 : 감염억제율 70%이상 추출물 5종 선발,
- GAR311 추출물은 PMMoV, CMV, ZYMV에 대하여 90~100%의 감염억제효과 확인.
- GAR311 추출물은 PMMoV 입자에 직접적으로 작용하여 바이러스입자를 파괴하고, 바이러스 RNA에 직접 영향을 주어 감염성을 상실시키는 것을 확인
- GAR311 추출물로부터 항바이러스 활성성분 분리
 - 고효성 분획층 (에틸아세테이트 층) : PMMoV감염저해효과 98.6%
 - 2종의 활성물질 (3,4,5-trihydroxy benzoic acid 및 methyl 3,4,5-trihydroxy benzoate)을 분리, 동정하였으며, 현재 새로운 활성 물질의 분리 중임.

5. 금후계획

- 천연물질을 이용한 바이러스 감염억제 및 바이러스 유도저항성 유기체 탐색 및 선발
- 고효성 항바이러스소재 활용 포장방제효과 시험실시