

과제구분	지역특화기술개발연구	수행시기		전반기	
중장기 Code	G	RIMS Code		20070101035007	
연구과제 및 세부과제		연구분야 (Code)	수행 기간	연구실	책임자
강원 중북부지역의 여름재배 과채류 애호박 바이러스병 종합 방제 기술 개발		병리, 미생물 LS0603	'05 ~'07	강원농업기술원 농산물이용시험	권순배
1) 항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명연구		병리, 미생물 LS0603	'05 ~'07	강원농업기술원 농산물이용시험	권순배
색인용어	식물바이러스 방제, 감염억제제, 항바이러스 활성물질				

## 1. 연구목표

애호박 주산단지를 중심으로 바이러스에 의한 피해가 매년 증가하고 있다. 주요 원인으로서는 재배 품종 다양화, 시설재배면적 확대 및 지구온난화 등 재배환경 변화 등으로 근년 들어 애호박 바이러스의 평균 발병율은 50%(강원, '02~'04)에 이르고 있어 애호박 생산량 및 품질저하에 주 원인으로 적극적인 방제대책이 시급한 실정이다. 그러나, 국내외적으로 효과적인 식물바이러스 전염억제제 또는 치료제는 전무한 실정으로 우리 농산물의 안정적 생산 유지와 국제경쟁력 제고를 위하여 실용적인 바이러스 방제제의 개발이 시급하다.

본 연구에서는 애호박 등 과채류에 발생하는 바이러스병 피해 경감기술을 개발하기 위하여 1) 천연물 항바이러스 소재 탐색, 선발 2) 항바이러스성 물질 분리, 동정 3) 선발된 항바이러스 물질을 이용한 포장방제 시험 및 방제제 제형 개발을 목표로 하여 수행하였다.

## 2. 주요 결과

### 가. 항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명연구

#### (시험 1) 애호박 바이러스병 발생양상조사

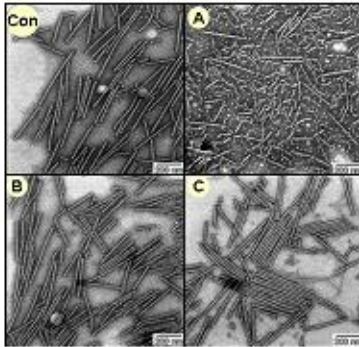
2005~2007년에 걸쳐서 강원도 춘천 및 화천의 애호박 주산지에서 채취한 모자이크증상 또는 위축증상을 나타내는 애호박의 잎으로부터 ELISA검정법으로 바이러스 종류별 발생양상 조사한 결과, 단독감염의 경우 ZYMV > WMV2 > CMV순으로 다발생 하였으며, 2~3종이 중복감염된 경우로 58~63.1%로 단독감염에 비하여 많았다.

#### (시험 2) 항바이러스 물질 선발

##### 1) 식물 및 고등균류 추출물로부터 식물바이러스 감염억제용 천연소재 탐색

약용식물체로 면마과(Aspidiaceae)의 관중(*Dryopteris crassirhizoma* NAKAI)의 150종의 식물 및 고등균류의 추출물을 *Nicotiana glutinosa*에서 반엽법을 이용하여 PMMoV에 대한 항바이

러스활성 검정을 실시한 결과 81%이상의 저해활성을 보이는 추출물은 GAR311, GAR506, GAR510 등 3종이었으며, 51-80%사이의 저해활성 추출물 시료는 5종이 선발되었으며, 대부분의 나머지 시료는 거의 활성을 보이지 않았다. 선발된 3종 추출물 시료를 이용하여 PMMoV의 전신감염 기주식물인 담배 (*N. tabacum* cv. Samsun)에서의 감염억제율을 조사하였다. 각 시료를 5~6엽기의 담배 표면에 살포하고 1일 후 PMMoV를 잎에 인공접종하여 바이러스병 발병 정도와 병징의 진전 속도를 조사하였다. 그 결과 각 시료의 희석농도 10mg/ml 처리구에서는 모두 100%의 감염억제율을 나타냈으며, 희석농도 5mg/ml시에도 3종 시료 모두가 90.0% 이상의 감염억제율을 나타냈다. PMMoV에 대하여 항바이러스활성을 나타내는 3종의 추출물이 PMMoV의 입자 형태에 어떤 영향을 주는지를 전자현미경으로 관찰한 결과 그림 1에서와 같이 GAR311은 PMMoV 입자를 잘게 분절시키는 것을 알 수 있었다. GAR506과 GAR510은 바이러스입자의 형태변화에는 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다.



<그림 1> 3종의 항바이러스활성 추출물 : (Con) 무처리, (A) GAR311, (B),GAR510, (C) GAR506의 바이러스(PMMoV)형태 변화에 미치는 영향. PMMoV에 20분간 처리 후, 전자현미경 관찰사진(2% PTA염색, pH 7.0). Bar=200nm

## 2) GAR311로부터 항바이러스 성분의 분리 및 동정

조제시료를 hexane, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O로 순차적으로 분획한 후, 각 분획층을 감압농축기를 이용하여 완전 농축하여 hexane 5.1 g, EtOAc 82.3 g, BuOH 4.8 g, H<sub>2</sub>O 3.8 g를 얻었다. 이 중 EtOAc 분획층이 수율이 가장 높았다. PMMoV에 대한 감염억제효과를 조사한 결과 EtOAc 분획층에서 98.6%로 가장 높은 감염 억제 효과를 확인할 수 있었다. EtOAc 분획층을 Activity-bioassay guided method로 활성물질을 분리하여, 2개의 단일 화합물을 분리하였으며, Compound 1은 53.0%의 활성을 보였으며, Compound 2는 다소 약한 32.5%의 활성을 보였다. Compound 1을 <sup>13</sup>C-NMR을 실시한 결과 (ppm)109.8(C-2,6), 121.8(C-1), 138.6(C-4), 145.8(C-3,5), 168.5(COO)에서 각각 carbon signal이 확인되었다. <sup>1</sup>H-NMR을 실시한 결과 7.14(2H, s, H-2,6)에서 proton signal이 확인되었다. Compound 2의 <sup>13</sup>C-NMR을 실시한 결과 51.9(CH<sub>3</sub>), 109.6(C-2,6), 212.3(C-1), 138.7(C-4), 145.9(C-3,5), 167.6(COO)에서 각각 carbon signal이 확인되었으며, <sup>1</sup>H-NMR을 실시한 결과 3.86(3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 7.18(2H, s, H-2,6)에서 proton signal이 확인되었다. 이것으로 Compound 1은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(gallic acid), Compound 2는 methyl 3,4,5-trihydroxy benzoate (methyl gallate)로 동정되었다.

### 3) 바이러스 증식억제(치료효과) 물질 탐색

바이러스에 감염된 기주식물에서 바이러스 증식을 억제할 수 있는 물질을 탐색하기 위하여, Cytopeptidemycline(CPM), Salicylic acid 및 GAR510을 공시하여, 처리물질별 기주체내 바이러스 증식량 분석, 기주체의 경시적 생육변화를 조사하였다.  $rm^2$  결과 CPM 및 GAR510에서 미약한 병징완화 및 바이러스 증식 저해효과 인정되나, 유효한 수준의 치료효과에는 미치지 못하는 결과를 보였다. 앞으로 식물바이러스에 치료효과가 높은 물질의 지속적인 탐색이 필요할 것으로 판단된다.

#### (시험 3) 고효성 항바이러스 소재 실용화연구

##### 1) 애호박바이러스에 대한 포장 방제시험

선발된 물질의 애호박 바이러스 증액전염 억제효과를 포장시험에서 확인하기 위하여 방충망이 설치된 비가림시설내에 애호박을 정식하고, 전 생육관리 기간중에 증액전염에 의한 바이러스 확산을 및 작업 농기구 소독시 바이러스확산 억제율을 각각 처리구별로 전 생육기에 걸쳐 조사하였다. 그 결과 농기구를 GAR311계제로 소독하면서 농작업시 바이러스확산은 완전히 저지되는 결과를 얻었으며, 작업도구를 소독하지 않고 작업시에는 전 생육기간에 걸쳐 바이러스 확산율이 59.5%로 나타나, 애호박재배시 증액전염에 의한 바이러스 확산 방지에 GAR311계제의 효과가 우수한 결과를 얻었다.

##### 2) 담배재배 상토에서 TMV 뿌리 감염저해효과

TMV의 또 다른 주요한 감염은 토양내 잔존하는 TMV 전염원에 의하여 이루어진다. 따라서 GAR510와 GAR311을 혼합한 제제(AntiV-2)를 이용한 TMV의 뿌리 감염저해효과를 조사하였다. 시관상토를 채운 포트(직경 25×높이 25)에 고농도( $\times 100$ )의 TMV 이병증액(100ml)을 처리하고, 포트 당 0.5%AntiV-2계제를 관주(500ml)처리한 후, 5주 후 발병저해효과를 조사하였다. 음성대조구로는 증류수액을 처리하였다. 그 결과 AntiV-2계제 처리구에서 100%의 TMV 뿌리감염 저해효과를 보였고 약해도 없음이 확인되었다.

##### 3) 항바이러스 소재의 제형화

GAR311 및 GAR510의 조추출물을 원제로 하고 증량제, 계면활성제, 용매 등 부제와 혼합, 가공하여 물에 잘 용해되는 형태로 제제화한 2종의 수화제를 개발하였다(그림 2).



<그림 2> 증액전염 방제제(Anti V-1)



토양전염 방제제(Anti V-2)

### 3. 고 찰

본 연구에 사용된 150종의 약용식물 및 고등균류의 추출물 중 81%이상의 식물바이러스 감염 저해활성을 보이는 추출물은 *Rhus javanica*, *Lentinus edodes*와 *Phellinus linteus* 등 3종의 추출물이었으며, 본 연구에서는 각각 GAR311, GAR506, GAR510로 명명하여 시험을 수행하였다.

*Rhus javanica*의 주요성분으로는 gallotannin, 수지, 지방, 전분 등이 함유되어 있다. 약리작용에서 오배자의 'gallotannin' 성분은 수렴 작용이 있다. 이질균, 녹농균 등에 항미생물 작용이 있으며 간 기능 보호 작용과 항산화 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(원색한국본초도감, 안덕균저).

GAR311(0.5%액)은 국부 감염 기주에서 98.4%의 높은 감염 억제 활성을 보였으며, 전신 감염 기주에서는 바이러스에 따른 감염 억제 효과를 검정한 결과 PMMoV, CMV, ZYMV에 대하여 100%, 85%, 100%의 활성을 보였다. 이것은 실제 포장에서 한 가지 작물에 다양한 식물바이러스병이 발생하는 특성을 볼 때 본 연구에서 이 추출물을 이용하여 식물바이러스병을 방제한다면 다양한 식물바이러스를 방제할 수 있으며, 여러 작물에 적용이 가능하리라고 생각된다.

한편 GAR311은 TMV이외에 진딧물 전염성 바이러스인 CMV, ZYMV에 대해서도 높은 감염 억제 효과를 보여주었다. 그러나 실제로 포장에서 이용하였을 때 진딧물 매개에 효과가 있을지에 대해서도 구체적인 검토가 필요할 것으로 생각된다.

GAR311은 전자현미경 관찰에서 정제된 바이러스(PMMoV) 입자를 세절 파괴시키는 것으로 관찰되었다.

GAR311의 ethyl acetate 층으로부터 3,4,5-trihydroxy benzoic acid(gallic acid)와 methyl 3,4,5-trihydroxy benzoate (methyl gallate)를 분리·동정하였다. Gallic acid는 Phenol성 물질로서 당과 결합하여 배당체로 존재하는 경우가 많으므로 보통 수용성이다. 주로 목본식물에서 많이 발견되며 gallotannin 형태로 존재하고, 반응력이 매우 큰 것으로 알려져 있다. gallic acid는 식물 병원균인 *M. grisea*, *Erysiphe graminis*에 대하여 높은 활성을 보이는 것으로 보고되고 있다(Ahn 등, 2005). 앞으로 GAR311에서 분리된 gallic acid에 대한 활성 검정과 함께 다양한 식물 생육에 대한 영향과 이것의 활성기작에 관한 연구에 이어 또 다른 활성 fraction에서의 물질탐색도 함께 진행되어야 할 것으로 보여진다.

*Phellinus Linteus*는 자궁출혈, 월경불순 등의 부인병 치료제로 사용되었으며, 최근에는 항암 약리작용이 입증된 바 있다. 즉 소화기계통의 암인 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암 및 간암 수술 후 화학요법을 병행처치시 면역기능을 활성화한다는 것이다.

GAR510(0.5%액)은 국부 감염 기주에서 99.5%의 높은 감염 억제 활성을 보여 주었으며, 전신 감염 기주에서는 바이러스에 따른 감염 억제 효과를 검정한 결과 GAR311의 결과와 같게 우수한 활성을 보였다. 또한 GAR510과 GAR311을 주성분으로 제형화한 시제품(Anti V2)은 담배재배 상토에서 TMV 뿌리 감염저해효과가 우수하였으므로, 추후 토양전염 바이러스병의 방제제로서의 약제등록 가능성의 검토를 위하여 적용대상 바이러스의 확대시험, 포장 방

제시험 등 추가실험이 필요할 것으로 판단된다.

국내의 식물바이러스병 방제에 관한 연구로는 우유치리에 의한 TMV의 감염저해 효과(박과 부, 1980), 계면활성제 염면 살포에 의한 TMV 감염저해 효과(박과 부, 1980), 진딧물 비래 차단망에 의한 PVY 감염억제 효과(박 등, 1993)등이 예비적으로 조사된 바 있다. 이 들 중 우유치리법은 실제 농가에서 TMV 방제 수단으로 사용되고 있으나 단순한 피막작용으로 인한 방제효과의 한계를 드러내고 있다. 또한 최근에 *Pseudomonas* sp. KTB61 균주가 생산하는 glycoprotein은 TMV에 대한 감염억제효과가 매우 좋으며 전신이행효과를 가지는 것으로 보고하였으나 실제 포장단계에서 약효가 낮은 것으로 보고되고 있다(김, 1999).

본 연구 결과는 금후 실용적인 식물바이러스 감염억제제 및 식물바이러스치료제의 산업화에 기여할 것으로 기대하며, 지속적인 연구가 필요하다고 생각한다.

#### 4. 결과활용 요약

	계	시책 건의	영농 활용	지식 재산권	기술 산업화	논문 발표
계	10	1	1	2	2	4
항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명연구	10	1	1	2	2	4

#### 5. 세부과제 Abstract

가. 항바이러스성 소재 탐색 및 활성성분 구명연구('05~'07)

**Screening and selection of antiviral materials active against some plant viruses and identification of active compounds.**

Many traditional medicinal plants have been reported to have strong antiviral activity and some of them have already been used to treat animals and people who suffer from viral infection (Hudson 1990). To control plant viral diseases, researchers have been investigated many inhibitors coming from various higher plants (Hudson,1990; Stevens,1992; Ito et al., 1997), a microorganism (Klement et al., 1966; Yeo et al., 1997), and some mushroom(Aoki et al., 1993). They have also isolated and characterized a few of potent inhibitors. however, there has been little successful control on a commercial scale by the application of antiviral material in field, because their mass production, systemic translocation in plants and damaging effect on the host, this study to obtain more potent inhibitor of plant viruses infection, we have tested on 150 medicinal plants and microbes substances against some plant viruses.

(Exp. 1) Survey of the occurrence of viral diseases infecting summer pumpkin of mid-northern part area in Gangwon province.

1. Occurrence of three viruses (ZYMV, WMV2, and CMV) were surveyed in summer pumpkin fields of Chuncheon and Hwacheon, and the occurrence ratio increased in order of mixed infection of 2-3 types viruses > ZYMV > WMV2 > CMV in ELISA tests.

(Exp. 2) Screening and selection of antiviral materials active against some plant viruses

1. Selection of the natural material of 3 types which have a high infection inhibitory activity : GAR311, GAR506, GAR510
2. Isolation and identification of active compounds : The antiviral active compounds from GAR311 extract were characterized methyl gallate(3,4,5-trihydroxybenzoic acid, methyl ester) and gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid).
3. Screening and selection of suppression material of virus multiplication : The selection failure of the material which has an effect.

(Exp. 3) Research of antiviral agent development using some active materials selected from this examination

1. Formulation : Extracts from GAR311 and GAR510 which showed high control effect against some plant viruses were mixed with carries and surfactants were processed. From the above mixtures, two powder formulations(Anti V-1 and Anti V-2) were prepared. The powder formulations were easy to dissolve in water.
2. Field test : Anti V1 was tested for its activity against sap infection of ZYMV in the summer pumpkin field. The result showed 100% control effect.
3. Soil(root) infection inhibitory effect of TMV from tobacco cultivation soil : Anti V2 was tested for its activity on the tobacco plants in pot. The result showed 100% control effect.