

어젠다코드	11-30-72		구 분	과제완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	P01	작목구분코드	VC-01
과제종류	공동연구		세세부사업	핵심전략기술개발	
연구과제 및 세부과제			수행기간	과제책임자 및 세부책임자	
근권미생물 및 천연물을 이용한 식물바이러스 예방·억제제 개발			'10~'12	국립농업과학원	박진우
1) 식물천연물 유래 항바이러스 물질 분리, 검정			'10~'12	환경농업연구과	권순배
책임용어	근권미생물, 천연물, 식물바이러스, 예방·억제제 개발				

ABSTRACT

This study was conducted to develop the antiviral agents for crops. The results obtained are as follows : ① Selection of two natural materials having potent antiviral activity ; KN10-20, 11-51. ② KN10-20 and KN1151 effectively inhibit many plant virus infection ③ Also, KN10-20 inhibit multiplication of TMV in tobacco leaf-disk cultured and its major antiviral compound is identified as a methyl digallate isomers.

1. 연구목표

농작물 바이러스병은 세계적으로 방제가 어려운 병해로 그 피해율이 전체 생산량의 10% 이상이며, 우리나라의 경우 오이, 호박, 풋고추 등에서는 30%이상의 피해율을 보이는 경우도 많다. 본 연구에서는 다양한 이차대사산물을 가지고 있는 식물유래 천연물질로부터 새로운 항바이러스 고활성 소재 선발을 위한 재료수집, 추출물 조제 및 바이러스 감염억제 활성검정과 고활성 항바이러스 물질의 분리와 동정을 본 세부과제의 연구목표로 수행하였다. 또한 본 과제에서 얻어진 종합결과로 바이러스 예방, 억제제 개발을 통하여 농산물 안정적 생산과 농가 수익증대를 목표로 수행하였다.

2. 재료 및 방법

(시험 1) 항바이러스 소재 선발

분류학적으로 보증된 105종의 생약 및 자생식물체를 확보하여 본 시험에 공시하였다. 시료는 음건 후 마쇄하여 분말로 만들어 각각의 분말시료 100 g씩을 취하여 5L Erlenmeyer flask에 넣고 methanol(MeOH) 3L를 넣어 100 rpm에서 24시간 진탕하여 2회 반복 추출하였다. 또한 일부시료의 열수 추출을 위하여 5ℓ의 증류수를 첨가하여 95℃로 24시간 추출하였다. 추출물은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 메탄올 추출물의 경우 40℃에서 감압농축하고 열수추출물의 경우 80℃에서 농축하여 동결 건조하였다. 건조시료는 -20℃에 보관하면서 각바이러스에 대한 항바이러스 효과를 스크리닝하였다. 바이러스는 *Pepper mild*

mottle virus(PMMoV), Tobacco mosaic virus(TMV), *Cucumber mosaic virus*(CMV), *Cucumber green mottle mosaic virus*(CGMMV), *Zucchini yellow mosaic virus*(ZYMV)를 공시하였다. PMMoV는 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun에 접종하여 유지하였으며, CMV는 *N. tabacum* cv. Samsun NN, CGMMV는 오이, ZYMV는 주키니호박에 계대배양하면서 이용하였다. PMMoV, TMV 및 CGMMV의 항바이러스 활성검정시의 바이러스 접종원으로 0.1g의 바이러스 이병엽에 10mM 인산완충액(pH 7.0) 100ml을 넣고 막자사발로 곱게 같은 희석액을 사용하였다. 또한 CMV 및 ZYMV의 항바이러스 활성검정시의 바이러스 접종원으로 1g의 바이러스 이병엽에 10mM 인산완충액(pH 7.0) 100ml을 넣고 막자사발로 곱게 같은 희석액을 사용하였다.

(시험 2) 항바이러스 생물활성 검정

PMMoV, CMV 및 TMV의 감염억제 활성 검정은 반엽법(Wyatt and Shepherd, 1969)을 이용하였다. PMMoV 및 TMV에 대한 검정은 *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Xanthi nc*, 또는 *N. tabacum*. Samsun NN의 전개엽 중 식물체당 2~4개의 반엽에 각각의 식물체 추출물을 농도에 맞추어 도포하고 나머지 반엽은 증류수를 처리한 후 음건하여 1~2시간 후에 동일한 표면에 바이러스를 접종한 후 그 추출물의 감염억제 효과는 접종 2~3일 후 나타나는 처리반엽과 무처리 반엽의 국부병반수를 세어 다음과 같이 산정한다. CMV의 감염억제효과의 판정은 CMV의 국부감염기주식물인 *C. amalanticolar*에서 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

$$\text{Inhibitory effects(\%)} = \frac{\text{무처리구 병반수} - \text{처리구 병반수}}{\text{무처리구 병반수}} \times 100$$

고활성 추출물 시료의 국부감염 기주에서 감염억제 효과는 혼합처리, 전처리, 엽이면처리 및 활성 지속효과 등을 조사하였다. 또한 전신감염 기주에서 감염억제 효과는 PMMoV, CMV, ZYMV 및 CGMMV 억제효과 등을 조사하였다.

(시험3) KN10-20의 증식억제효과 구명

KN10-20의 TMV 증식억제효과를 구명하기 위하여, GFP 유전자를 발현하는 TMV(infectious clone)를 접종원으로 하여 담배(*N. tabacum* cv. Samsun nn)에 즙액접종을 실시하여 전신감염시킨 후 그 앞에서 채취한 엽절편을 KN10-20 희석액이 채워진 세포배양 플레이트에서 7일간 배양하면서 24시간단위로 형광현미경하에서 관찰하면서 TMV 증식 정도를 무처리구와 비교 관찰하였다.

(시험 4) 고활성 소재로부터 항바이러스 물질 분리 및 동정

항바이러스성 고활성화합물은 분획물로부터 bioassay-guided separation에 의하여 분리하였다. KN10-20로부터 주성분의 분리, 동정을 위하여 사용된 분석기기로는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectra는 각각 400 and 100 MHz에서 Bruker DPX 400 spectrometer(Karlsruhe, Germany)로 분석했다. column packing material로는 Sephadex LH 20 (GE Healthcare Bio-Science AB, Sweden)과 cosmosil 75C18-OPN (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

(시험 5) 포장 방제시험

본 시험에서 선발된 고효성 추출물 KN10-20 및 KN11-51을 주성분하는 수화제형태의 4종의 제제를 본 과제를 공동수행하는 제3세부연구팀에서 개발하였다. 이 3종의 제제를 이용하여 박과 및 가지과에 발생하는 주요 바이러스에 대하여 포장 방제시험을 수행하였다. 공시3종 제제는 KN1162, KN1163 및 KN1201로 명명하였으며, 시험작물과 바이러스는 오이(CGMMV), 호박(ZYMV) 및 고추(CMV)를 공시하여 포장시험을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

(시험 1) 항바이러스 소재 선발

식물바이러스에 대하여 감염억제 효과가 있는 공시시료를 1차적으로 선발하기 위하여 생물검정을 실시하였다. 생물검정에는 고추 마일드모틀바이러스(*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 및 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*, CMV)를 사용하였다. 본 실험에서는 이들 바이러스에 대하여 각각 과민감반응을 나타내는 담배(*N. tabacum* Xanthi nc 또는 *N. glutinosa*) 및 명아주(*C. amaranticolor*)를 이용하여 감염억제활성의 정도를 조사한 결과 PMMoV와 CMV에 대하여 90%이상의 감염 저해활성을 보이는 추출물은 KN10-20 및 KN11-51이었다(그림 1, 표 1).

표 1. PMMoV and CMV에 대한 101종 천연추출물의 항바이러스 활성

No.	Sample code	Part used	Solvent	Inhibitory ratio(%)	
				PMMoV ^b	CMV
1	KN10-01	seed	MeOH	53.0	33.5
2	KN10-02	leaf	MeOH	35.0	32.0
3	KN10-03	root	MeOH	0.0	0.0
4	KN10-04	root	MeOH	0.0	0.0
5	KN10-05	fruit body	H ₂ O	62.4	57.3
6	KN10-06	fruit body	H ₂ O	53.2	56.0
7	KN10-07	fruit body	H ₂ O	46.6	51.0
8	KN10-08	root	MeOH	52.0	53.0
9	KN10-09	fruit body	H ₂ O	62.4	57.3
10	KN10-10	fruit body	H ₂ O	60.7	68.5
11	KN10-11	fruit body	H ₂ O	63.0	58.4
12	KN10-12	fruit body	H ₂ O	62.4	57.3
13	KN10-13	seed	MeOH	32.0	28.0
14	KN10-14	seed	MeOH	38.5	43.8
15	KN10-15	fruit body	H ₂ O	61.0	55.4
16	KN10-16	whole plant	MeOH	62.5	91.7
17	KN10-17	whole plant	MeOH	74.1	96.6

No.	Sample code	Part used	Solvent	Inhibitory ratio(%)	
				PMMoV ^b	CMV
18	KN10-18	stem	MeOH	80.7	41.3
19	KN10-19	leaf	MeOH	40.7	49.5
20	KN10-20	whole plant	MeOH	99.4	100.0
21	KN10-21	whole plant	MeOH	22.0	24.0
22	KN10-22	whole plant	MeOH	32.5	38.0
23	KN10-23	fruit body	MeOH	32.3	64.5
24	KN10-24	fruit body	H ₂ O	69.8	64.0
25	KN10-25	fruit body	MeOH	35.8	38.0
26	KN10-26	fruit body	H ₂ O	62.4	57.3
27	KN10-27	fruit body	MeOH	0.0	0.0
28	KN10-28	fruit body	H ₂ O	3.0	0.0
29	KN10-29	whole plant	MeOH	0.0	5.0
30	KN10-30	fruit body	MeOH	0.0	0.0
31	KN10-31	fruit body	H ₂ O	44.9	47.9
32	KN10-32	fruit body	MeOH	67.0	87.4
33	KN10-33	Seed	MeOH	31.2	28.8
34	KN10-34	root	MeOH	22.4	31.1
35	KN10-35	root	MeOH	9.5	5.0
36	KN10-36	root	MeOH	0.0	0.0
37	KN10-37	fruit	MeOH	26.6	31.6
38	KN10-38	root	MeOH	36.7	26.3
39	KN10-39	root	MeOH	0.0	0.0
40	KN10-40	bark	MeOH	1.5	0.0
41	KN10-41	fruit body	MeOH	47.2	43.7
42	KN10-42	fruit	MeOH	23.1	35.5
43	KN10-43	root	MeOH	30.6	27.6
44	KN10-44	root	MeOH	13.9	18.5
45	KN10-45	root	MeOH	30.6	40.3
46	KN10-46	leaf	MeOH	13.9	18.5
47	KN10-47	root	MeOH	0.0	0.0
48	KN10-48	root	MeOH	0.0	0.0
49	KN10-49	root	MeOH	32.1	28.6
50	KN10-50	root	MeOH	30.6	37.5
51	KN11-01	whole plant	MeOH	20.5	13.3
52	KN11-02	root	MeOH	0	0
53	KN11-03	fruit	MeOH	9.0	8.3

No.	Sample code	Part used	Solvent	Inhibitory ratio(%)	
				PMMoV ^b	CMV
54	KN11-04	whole plant	MeOH	30.5	36.7
55	KN11-05	fruit	MeOH	40.0	45.0
56	KN11-06	root	MeOH	60.0	61.3
57	KN11-07	root	MeOH	22.0	19.7
58	KN11-08	whole plant	MeOH	34.0	34.0
59	KN11-09	root	MeOH	10.0	5.0
60	KN11-10	root	MeOH	0	0
61	KN11-11	fruit	MeOH	60.0	58.8
62	KN11-12	fruit	MeOH	75.0	78.4
63	KN11-13	root	MeOH	83.0	81.1
64	KN11-14	whole plant	MeOH	0	0
65	KN11-15	whole plant	MeOH	40.0	45.1
66	KN11-16	root	MeOH	20.0	15.9
67	KN11-17	root	MeOH	68.0	71.7
68	KN11-18	whole plant	MeOH	20.0	19.7
69	KN11-19	fruit	MeOH	65.0	79.4
70	KN11-20	root	MeOH	0	0
71	KN11-21	root	MeOH	66.0	75.5
72	KN11-22	root	MeOH	42.2	42.2
73	KN11-23	root	MeOH	6.0	4.4
74	KN11-24	root	MeOH	0	0
75	KN11-25	whole plant	MeOH	22.0	18.5
76	KN11-26	whole plant	MeOH	0	0
77	KN11-27	root	MeOH	0	0
78	KN11-28	whole plant	MeOH	0	0
79	KN11-29	whole plant	MeOH	30.0	22.0
80	KN11-30	whole plant	MeOH	30.0	28.1
81	KN11-31	whole plant	MeOH	15.0	12.7
82	KN11-32	root	MeOH	22.0	20.8
83	KN11-33	root	MeOH	22.0	19.2
84	KN11-34	root	MeOH	4.0	4.0
85	KN11-35	root	MeOH	0	0
86	KN11-36	root	MeOH	31.0	28.8
87	KN11-37	root	MeOH	32.0	37.5
88	KN11-38	root	MeOH	18.0	17.2
89	KN11-39	whole plant	MeOH	40.0	38.9
90	KN11-40	whole plant	MeOH	22.0	21.4

No.	Sample code	Part used	Solvent	Inhibitory ratio(%)	
				PMMoV ^b	CMV
91	KN11-41	whole plant	MeOH	38.6	41.8
92	KN11-42	fruit	MeOH	0	0
93	KN11-43	whole plant	MeOH	0	0
94	KN11-44	whole plant	MeOH	22.0	24.6
95	KN11-45	whole plant	MeOH	38.0	40.5
96	KN11-46	root	MeOH	55.6	48.0
97	KN11-47	whole plant	MeOH	0	0
98	KN11-48	whole plant	MeOH	16.8	13.2
99	KN11-49	whole plant	MeOH	46.0	47.7
100	KN11-50	whole plant	MeOH	48.0	46.8
101	KN11-51	fruit body	H ₂ O	92.0	92.0

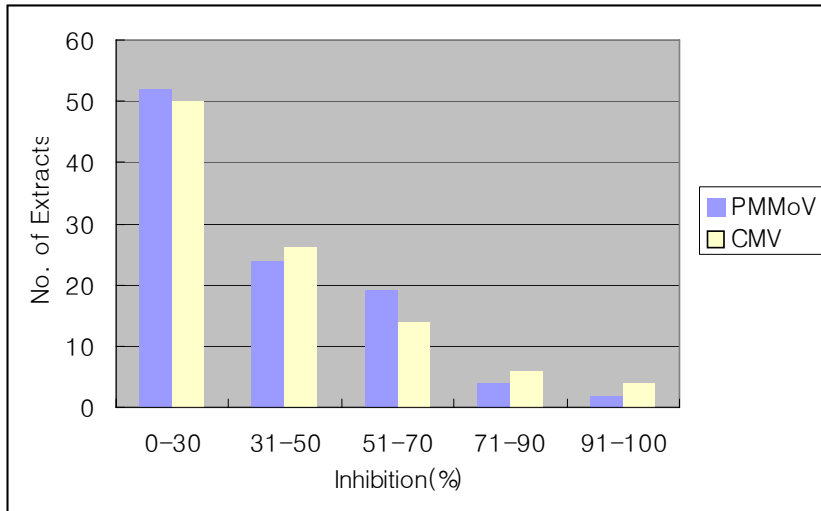


그림 1. 101종(KN10-01~11-51) 천연추출물의 항바이러스 활성 분포도

(시험 2) 항바이러스 생물활성 검정

가. KN10-20의 효과검정

1) 바이러스와 추출물의 혼합처리

바이러스에 직접 작용하여 감염저해를 일으키는지를 조사한 결과는 표2와 같았다. PMMoV이병증액과 KN10-20의 혼합액을 *N. glutinosa*잎에 반엽법으로 처리한 결과 2-10mg/mg의 농도에서 93.8%에서 100%의 강한 감염 저해 활성을 보였다. 또한 KN10-20의 혼합액을 *C. amaranticolor*잎에 반엽법으로 처리한 결과 1-10mg/mg의 농도에서 87.5~100로 탁월한 감염저해 활성을 보였다. 일반적으로 농가에서 바이러스 증액전염 억제수단으로 손쉽게 활용하는 skim milk의 경우 100mg/mg의 고농도에서 82.8~85.1%의 억제효과를 나타내 KN10-20 보다 감염억제효율이 저조하였다.

표 2. KN10-20과 PMMoV 및 CMV의 혼합처리후 기주식물에 즙액접종시 감염억제율

Virus	Concentration of KN1020(mg/ml)	No. of local lesions		Inhibition of PMMoV infectivity(%)
		untreated	treated	
Pepper mild mosaic virus	10	196	0	100
	5	197	1	99.4
	2	196	12	93.8
	1	255	30	88.2
	100(Skim milk)	209	31	85.1
Cucumber mosaic virus	10	334	0	100
	5	411	0	100
	2	380	2	99.4
	1	360	45	87.5
	100(Skim milk)	403	69	82.8

2) 전처리 효과

KN10-20의 부착성, 안정성을 조사하기 위해 *N. glutinosa* 잎 표면에 추출물을 붓을 이용하여 도말처리하고 음건 한 후 잎 표면에 PMMoV 희석액과 0.1% carborundum을 혼합한 PMMoV를 즙액접종하였다. 그 결과 1, 2, 5 및 10mg/ml 농도에서 75.2, 80.6, 93.6 및 97.9%로 감염억제효과를 보였으며, CMV의 경우에는 동 농도 조건에서 71.2, 84.3, 93.9 및 99.5%로 우수한 감염억제효과를 보였다(표 3).

표 3. KN10-20을 처리 후 PMMoV 및 CMV를 기주식물에 즙액접종시 감염억제율

Viruses	Concentration of KN10-12 (mg/ml)	No. of local lesions 3 half-leaves		Inhibition (%)
		Control	Treatment	
Pepper mild mosaic virus	10	192	4	97.9
	5	204	13	93.6
	2	165	32	80.6
	1	194	48	75.2
Cucumber mosaic virus	10	390	2	99.5
	5	393	24	93.9
	2	382	60	84.3
	1	389	112	71.2

3) 이면처리 효과

KN10-20의 항바이러스 활성 성분이 식물체 내부로의 침투효과를 조사하기위해 식물체 잎 이면에 도말 후 음건 하에 24시간 방치 후 PMMoV와 CMV를 각각 접종하였다. 그 결과 PMMoV는 10mg/ml에서 55.7%, CMV는 63.8%의 감염억제율을 나타내었다. 이 결과로부터

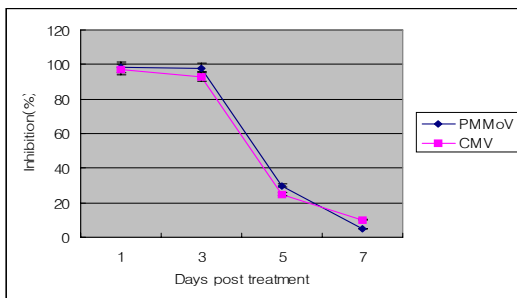
KN10-20의 활성물질은 skim milk에서 보이는 피막효과가 아님을 알 수 있었다(표 4). 이면 처리에서 바이러스에 대한 감염 억제 활성을 보인 것으로 보아 활성물질이 식물 조직 내로 흡수되거나, 식물 조직에 영향을 미침으로서 감염 저해효과를 갖는 것으로 생각된다. 항바이러스 물질 탐색에 있어서 감염억제 효과를 갖는 물질은 다수 보고되어 있으나, 이 중 조직 내 침투 효과를 갖는 것으로는 *Mirabilis jalapa*(Kubo 등, 1990), *Boerhaavia diffusa*(Verma 등, 1979)에서 생산하는 단백질 등이 소수의 보고만 있다.

표 4. KN10-20 옆 이면처리 후 PMMoV 및 CMV를 물 잎의 전면에 접종시 감염억제율

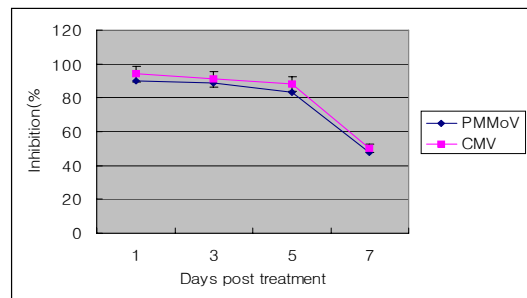
Viruses	Concentration of KN10-12 (mg/ml)	No. of local lesions 3 half-leaves		Inhibition (%)
		Control	Treatment	
Pepper mild mosaic virus	10	235	104	55.7
	5	243	168	32.9
	2	180	141	21.6
	1	216	189	12.5
	100(Skim milk)	226	203	10.2
Cucumber mosaic virus	10	343	124	63.8
	5	320	216	32.5
	2	315	258	18.0
	1	336	310	7.7
	100(Skim milk)	387	368	4.9

4) 감염억제 활성 지속효과

공시 시료를 식물체 잎에 분무한 후 KN10-20의 항바이러스 활성의 지속효과를 검정하기 위해 시료를 처리한 후 일정한 기간 (1일, 3일, 5일 및 7일)의 간격으로 PMMoV 또는 CMV를 접종하였다. 그 결과, KN10-20처리 3일 후까지 98% 이상의 감염억제효과를 보였으나, 5일이 경과하자 20%~30% 감염억제효과가 급격히 떨어졌다(그림 2). 이 결과는 KN10-20에 함유된 바이러스 감염억제 활성물질이 시간이 경과함에 따라 분해되거나, 활성물질의 엽표면 부착성이 약화된 결과로 추정되었다.



[그림 2] KN10-20의 PMMoV와 CMV에 대한 감염억제활성 지속효과



[그림 3] KN11-51의 PMMoV와 CMV에 대한 감염억제활성 지속효과

나. KN11-51의 효과검정

1) 전처리 효과

KN11-51의 부착성, 안정성을 조사하기 위해 *N. glutinosa* 잎 표면에 추출물을 붓을 이용하여 도말처리하고 음건 한 후 잎 표면에 PMMoV 희석액과 0.1% carborundum을 혼합한 PMMoV를 즙액접종하였다. 또한 *C. amaranticolor*에서 CMV에 대한 감염억제효과를 조사하였다. 그 결과 10mg/ml 농도에서 PMMoV 94.2±0.7%와 CMV 93.2±0.5 로 가장 높은 감염억제효과를 보였다(표 5).

표 5. KN11-51을 처리 후 PMMoV 및 CMV를 기주식물에 즙액접종시 감염억제율

Conc. of KN1151 (mg/ml)		10	5	2	1
Inhibition ratio (%)	PMMoV on <i>N. glutinosa</i>	94.2±0.7 ⁾	92.0±1.2	76.6±1.5	60.2±0.5
	CMV on <i>C. amaranticolor</i>	93.2±0.5	91.0±1.0	80.2±1.0	63.2±0.6

2) 이면처리 효과

KN11-51의 항바이러스 활성 성분이 식물체 내부로의 흡수효과를 조사하기 위해 식물체 엽이면에 도말 후 2시간 후 PMMoV를 잎의 앞면에 접종하였다. 그 결과 시료 농도별 (5, 2 및 1mg/ml) PMMoV에 대한 감염억제율은 71.6, 62.3 및 39.5%를 나타냈다(표 6). 이 결과로부터 KN11-51의 항바이러스 활성물질의 엽조직 흡수효과는 Table 4에 나타난 KN10-20 및 skim milk보다 상대적으로 우수함을 알 수 있었다.

표 6. KN11-51의 *Nicotiana glutinosa* 잎 이면처리 후 PMMoV를 전면 접종시 감염억제율

Concentration (mg/ml)	No. of local lesions 3 half-leaves [*]		Inhibition (%) ^{***}
	Control	Treatment ^{**}	
5	303	96	71.6
2	369	139	62.3
1	529	320	39.5

3) 활성 지속효과

KN11-51을 식물체 앞에 분무한 후 항바이러스 활성의 지속효과를 검정하기 위해 시료를 처리한 후 일정한 기간 (1일, 3일, 5일 및 7일)이 경과한 시점에서 PMMoV 또는 CMV를 접종하였다. 처리 5일 후까지 각 바이러스에 대하여 83% 및 88%이상의 감염억제효과를 보였다. 이 결과는 KN10-20보다 그 지속효과가 상대적으로 길게 유지되었다(그림 3). 이 결과로 미루어 KN11-51의 항바이러스 활성물질은 KN11-20이 함유한 물질보다 안정한 물질로 추정되었다.

4) 전신감염 기주에서 감염억제 효과

(1) 담배 (cv. Samsun)에서 감염억제효과

PMMoV와 CMV의 전신감염기주인 담배 (cv. Samsun)에서 KN10-20 및 KN11-51의 감염억제효과를 검정하기 위하여 각 각의 공시 시료를 *N. tabacum* cv. Samsun에 표면 살포하고 1시간 후 PMMoV 및 CMV를 각각 접종하였다. 대조구로서 무처리구(증류수 처리구)와 비교하였다. 바이러스 병징이 충분히 발현되는 기간인 접종 4주 후에 조사 한 결과, KN10-20은 PMMoV에 대하여 90~100%와 CMV에 대하여 75~85%의 감염 억제율을 보였으며, KN11-51은 각각의 공시바이러스에 대하여 80~90% 및 80~85%의 높은 감염억제율을 보이는 결과로부터 새로운 식물바이러스 감염억제제 소재로서 개발 가능성이 확인되었다.

표 7. 담배(cv. Samsun)에서 KN10-20과 KN11-51 처리시 PMMoV 및 CMV 감염억제율

Viruses	Conc. of extracts (mg/ml)	Inhibition ratio (%)		
		KN10-20	KN11-51	Control
PMMoV	10	100	90	0
	5	90	80	0
CMV	10	85	85	0
	5	75	80	0

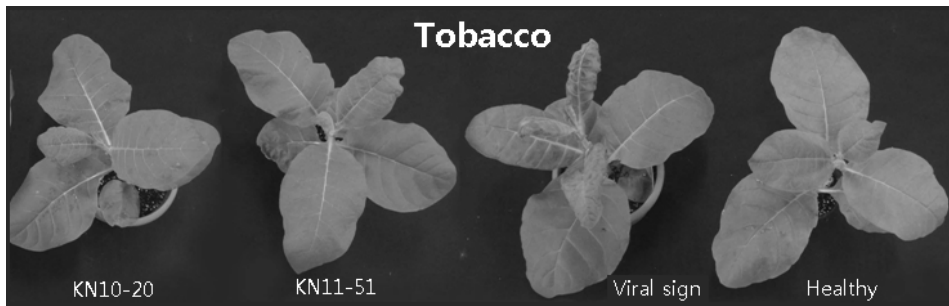


그림 4. 담배 (cv. Samsun)에서 KN10-20과 KN11-51 처리시 PMMoV 감염억제

(2) 박과류 바이러스 감염억제효과

ZYMV에 대하여 전신 감염 기주로는 감수성으로 모자이크 등 전신병징을 나타내는 애호박 및 오이를 사용하였다. KN10-20 및 KN11-51을 각각 20주씩의 식물체의 잎이 충분히 젖을 정도로 분무살포하고 1시간 경과한 후 인위적으로 ZYMV 즙액을 잎에 접종하였다. 본 시험은 2회에 걸쳐 반복 수행하였으며, 접종 4주 후에 잎에 나타난 병징을 육안 조사하였다. 그 결과 애호박에서는 KN10-20의 처리농도 2~10mg수준에서는 87.5~100%, KN11-51은 동일농도에서 82.5~100%의 높은 감염억제율을 보였다(그림 5). 오이에서는 KN10-20의 처리농도 1mg/ml 수준에서 70.0%, KN11-51은 동일농도에서 80.0%이상의 감염억제율을 보여(그림 6), 공시된 2종의 추출물은 박과류 ZYMV의 전염억제제의 개발에 있어 새로운 소재로서의 가치가 인정되었다.

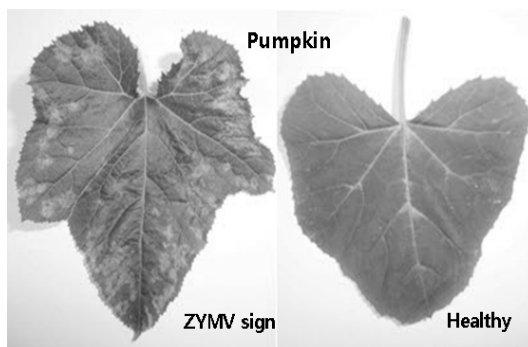
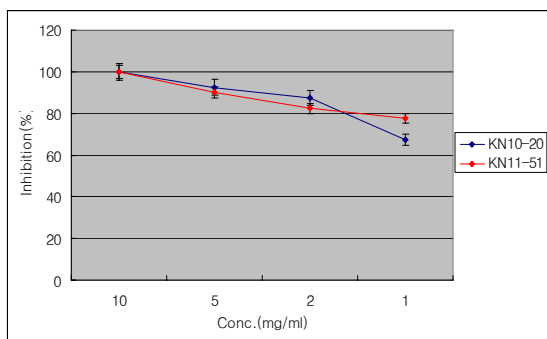


그림 5. 애호박에서 KN10-20과 KN11-51 처리시 ZYMV 감염 억제율

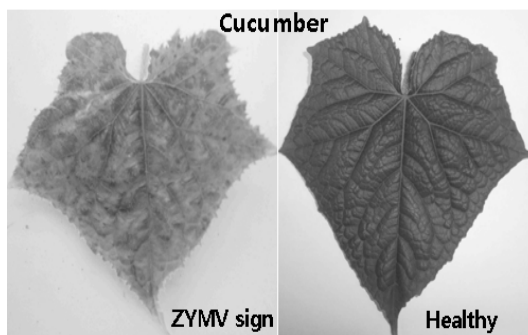
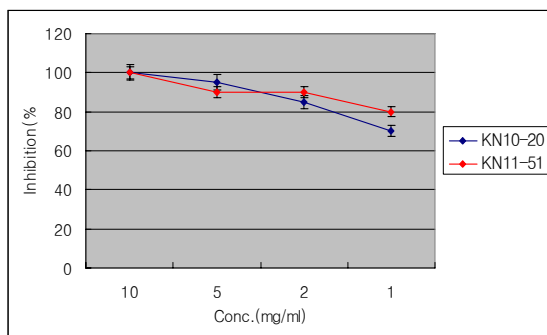


그림 6. 오이에서 KN10-20과 KN11-51 처리시 ZYMV 감염 억제율

5) 오이에서 CGMMV 토양전염 억제효과 시험

CGMMV의 또 다른 주요한 감염은 토양내 잔존하는CGMMV 전염원에 의하여 이루어진다. 따라서 KN10-20 이용한 CGMMV의 뿌리 감염저해효과를 조사하였다. 시판상토를 채운 포트(직경25×높이25)에 CGMMV 이병즙액(100ml)을 처리하고, 포트 당 KN10-20 희석액을 농도별(1%, 0.5%, 0.1% 및 무처리)로 포트당 200ml씩 관주처리한 후, 5주후 발병저해효과를 조사하였다. 각 처리는 10주씩 수행하였다. 그 결과 무처리구의 CGMMV 발병주는 6주이었다. 1%로 희석한 KN10-20 처리구의 CGMMV 발병주는 없었으나, 0.5% 처리구에서는 1주, 0.1% 처리구에서는 3주에서 CGMMV가 발병하였다. 이 결과로부터 KN10-20의 CGMMV토양전염 억제효과가 뚜렷함을 알 수 있었다. 추후 토양전염 바이러스병의 방제제로서의 약제 등록 가능성의 검토를 위하여 적용대상 바이러스의 확대시험, 포장 방제시험 등 추가실험이 필요할 것으로 판단된다.

(시험 3) KN10-20의 증식억제효과 구명

KN10-20의 바이러스 증식억제효과를 구명하기 위하여, GFP 유전자를 발현하는 TMV (infectious TMV)로 접종원으로 하여 담배(*N. tabacum* cv. Samsun nn)에 즙액접종을 실시하여 전신감염 시킨 후 그 앞에서 채취한 잎 디스크를 Figure 7처럼 KN10-20 및 A사 항바이러스 제제 희석액이 채워진 세포배양 플레이트에서 7일간 24시간단위로 형광현미경하에서 관찰하였다. KN10-20에 처리된 이병조직내의 TMV는 처리 1일 후부터 형광발광이 관찰되지

않아 TMV 증식억제효과 있음이 확인되었으나, A사 제제의 경우는 TMV에 의한 형광발광이 7일째까지 지속적으로 나타나 바이러스 증식억제에 효과가 없는 것으로 평가되었다. 또한, 상기의 형광현미경 관찰이 완료된 각 시료를 RT-PCR을 이용하여 TMV를 진단한 결과 Figure 8과 같이 A사 제제의 경우는 모든 처리에서 TMV가 검출되었으나, KN10-20에 처리된 조직에서는 TMV가 전혀 검출되지 않아 KN1020의 TMV 증식억제효과가 재확인되었다.

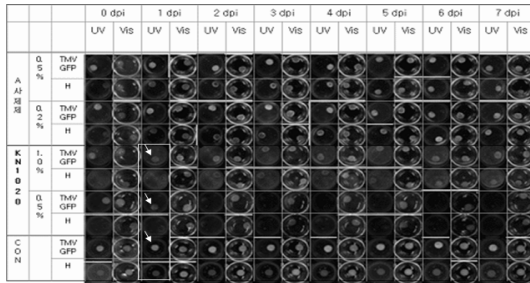


그림 7. 엽절편법 이용 KN10-20 및 A제제의 TMV 증식억제정도 형광현미경관찰

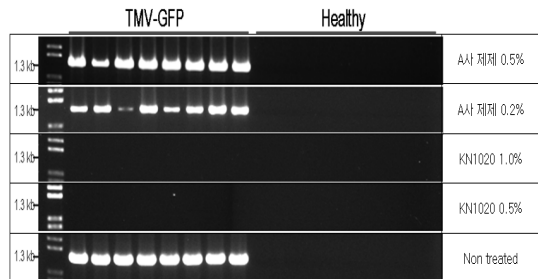


그림 8. 그림 7의 각각의 엽절편에서 TMV 검출을 확인하기위한 RT-PCR 결과

(시험 4) 고효성 소재로부터 항바이러스 물질 분리 및 동정

공시시료 100g을 n-hexane, dichloromethane(DCM), ethyl acetate (EtOAc), n-butanol (BuOH) 그리고 d-H₂O로 순차분획하여 각각 14g, 12g, 47g, 23g과 3g의 분획물을 얻었다. 이 중 EtOAc 분획층의 수율이 가장 높았다. 각 분획물을 2mg/ml의 농도로PMMoV에 대한 감염억제효과를 조사한 결과, EtOAc 분획층에서 86.5±2.0로 가장 높은 감염 억제 효과를 확인할 수 있었다. 이 bioassay-guided separation에 따라 고효성 분획층으로 확인된 EtOAc 분획물로 부터 항바이러스 활성 성분의 분리를 실시하였다. 이 분획물(3 g)을 Sephadex LH 20 column chromatography를 실시하여 7개의 분획(No 1~7)을 수득하여 생물활성검정을 실시한 결과 Fr.3이 92.0%로 가장 높았다. Fraction 1, 2 및 3으로부터 compound 1(50.5mg), compound 2(64.2mg) 및 compound 3(25.5mg)이 분리되었다(그림 9). 그림 10의 결과와 같이 7개의 fraction중 Fr.3, Fr.6 및 Fr.7의 PMMoV 감염억제활성이 83.0%이상으로 우수하였다. 그러나 Fr.4, Fr.5, Fr.6 및 Fr.7에서 얻어진 분획량이 매우 적어서 기기분석에는 이용할 수 없었다.

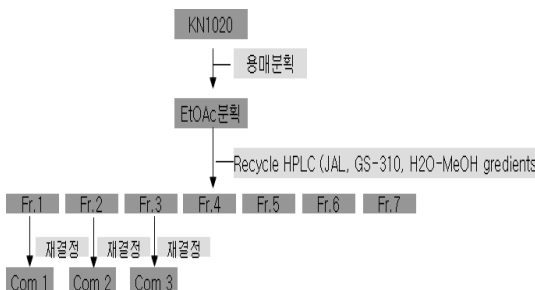


그림 9. Bioassay-guided separation에 의한 EtOAc 분획층으로부터 활성화합물 분리

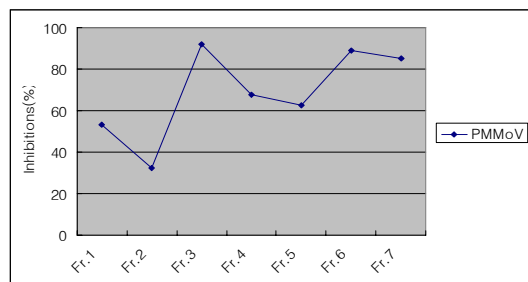


그림 10. KN10-20에서 분리된 화합물 7종의 PMMoV 감염억제율

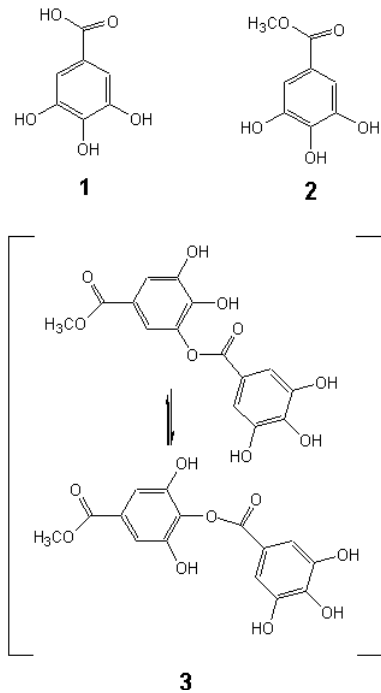
그림11과 같이 Compound 1~3의 기기분석 결과, 각각 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, Gallicin 과 Methyl digallate *meta*-, *para*- isomer mixture로 구명되었다. Compound 3의 methyl digallate는 TLC 및 HPLC상에서 a single spot으로 보였으나, 13C NMR spectrum에서는 24개 이상의 peaks를 보였고, 그중에서 13개는 methyl m-digallate이었다 (data not shown). 이 현상은 이미 gallotannin에 있는 댁시드하게 결합된 galloyl groups은 m- 과 p-hydroxyl-groups 상호간에 이동하며, methyl digallate는 m- 과 p-isomer의 평형상태로 존재한다고 보고되어있다. 이상의 결과로부터 KN10-20 유래의 항식물바이러스효과를 나타내는 주성분으로 Methyl digallate *meta*-, *para*- isomer mixture로 분석되었다.

Compound 1 (Gallic acid / 3,4,5-trihydroxybenzoic acid)¹, C₇H₆O₅, Mw: 170.12, mp: 253 (dec.)°C, UV (λ_{max}, nm) (MeOH): 276 (3.01), IRv (cm⁻¹, KBr): 3372, 1650 (COO), 1H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 7.05 (2H, s, H-2,6), 13C-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 110.7 (C-2,6), 122.8 (C-1), 139.9 (C-4), 146.8 (C-3,4), 172.1 (COO), EI-MS: M⁺ = 170, m/z = 170(100), 153, 125, 79

Compound 2 (Methyl gallate / Gallicin)², C₈H₈O₅, Mw: 184.14, mp: 157°C, UV (λ_{max}, nm) (MeOH): 276 (4.09), IRv (cm⁻¹, KBr): 3360, 1695 (COO), 1620, 1536, 1440, 1374, 1H-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 3.80 (3H, s, COOCH₃), 7.03 (2H, s, H-2,6), 13C-NMR (MeOH-*d*₄) δ: 51.3 (OCH₃), 109.0 (C-2,6), 120.4 (C-1), 138.7 (C-4), 145.5 (C-3,4), 168.0 (COO), EI-MS: M⁺ = 184, m/z = 153 (100), 125, 107, 79

Compound 3 (Methyl digallate *meta*-, *para*- isomer mixture)³ C₁₅H₁₂O₉, Mw: 336.23, mp: 212°C, UV (λ_{max}, nm): 226 (4.8), 275 (4.15), IRv (cm⁻¹, KBr): 3368, 1685 (COO), 1630, 1382, 1H-NMR (MeOH-*d*₄) δ (*m*-isomer) 3.84 (3H, s, COOCH₃), 7.10 (1H, d, J=2.13Hz, H-6')*, 7.23 (2H, d, J=2.04Hz, H-2')*, 7.25 (H, d, J=1.73Hz, H-6), 7.39 (1H, d, J=1.71Hz, H-2); (*p*-isomer) 3.86 (3H, s, COOCH₃), 7.20 (2H, s, H-2,6), 7.21 (2H, s, H-2',6')* 13C-NMR (MeOH-*d*₄) δ (*m*-isomer) 52.5 (OCH₃), 110.9 (C-2',6')*, 114.7 (C-6), 117.3 (C-2), 120.6 (C-1), 121.4 (C-1')*, 139.7 (C-4), 140.0 (C-4')*, 146.4 (C-3',5')* 146.6 (C-5), 147.6 (C-3), 166.3 (COO), 168.2 (COO)*; (*p*-isomer) 52.7 (OCH₃), 109.9 (C-2, 6), 110.2 (C-2',6')* 120.5 (C-1')*, 128.5 (C-1), 132.5 (C-4), 140.1 (C-4')*, 146.3 (C-3',5')* 151.7 (C-3,5), 166.2 (COO), 168.3 (COO)*; FAB-MS: M⁺= 336, EI-MS: m/z = 184 [M- gallate]⁺, 170 [M-methyl gallate]⁺, 153(100), 125, 107, 79

Signals (*) arising from depsidically linked galloyl groups.



1: gallic acid, 2: methyl gallate, 3: methyl digallate isomers (methyl m-digallate and methyl p-digallate)

그림 11. KN10-20에서 분리화합물

(시험 5) 포장 방제시험

본 시험에서 선발된 고효율성 추출물 KN10-20 및 KN11-51을 주성분하는 수화제형태의 4종의 제제를 본 과제를 공동수행하는 제3세부연구팀에서 개발하였다. 이 3종의 제제를 이용하여 박과 및 가지과에 발생하는 주요 바이러스에 대하여 포장 방제시험을 수행하였다. 공시된 3종 제제는 KN11-62, KN11-63 및 KN12-01로 명명하였으며, 시험작물과 바이러스는 오이 (CGMMV), 호박(ZYMV)을 공시하여 포장시험을 실시하였다. 그 결과는 오이포장의 CGMMV 방제효과는 KN11-63의 85.7%로 가장 우수하였으며 (표 8), 호박포장의 ZYMV방제효과에서도 KN11-63이 가장 우수하였다(표 9).

표 8. 오이포장에서 KN11-62, KN11-63, KN12-01의 CGMMV 감염억제효과

Treatments	Planting area(m ²)	Planting No.	CGMMV		
			Infected No.	rate disease(%)	control value(%)
KN11-62	16.5	40	6	15.0	78.6
KN11-63	16.5	40	4	10.0	85.7
KN12-01	16.5	40	8	20.0	71.4
control	16.6	40	28	70.0	-

표 9. 애호박포장에서 KN11-62, KN11-63, KN12-01의 ZYMVV 감염억제효과

Treatments	Planting area(m ²)	Planting No.	ZYMVV		
			Infected No.	rate disease(%)	control value(%)
KN11-62	16.5	40	4	10.0	73.3
KN11-63	16.5	40	2	5.0	86.7
KN12-01	16.5	40	5	12.5	66.7
control	16.6	40	15	37.5	-

4. 적 요

- 가. 식물바이러스 친환경 방제용 고효성 천연소재선발 : 2종(KN10-20, 11-51)
- 나. KN10-20와 KN1151은 PMMoV 등 주요 바이러스에 감염억제효과가 우수.
- 다. KN10-20은 TMV에 대한 증식억제효과 확인되었으며, 항바이러스 활성물질로 methyl digallate isomers 동정.

5. 인용문헌

- Albersheim, P. and B.S. Valent. 1978. Host-plant interactions in plants: plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.* 78:627-643.
- Bawden, F. C. and Freeman, G.G. 1952. The nature and behavior of inhibitor of plant viruses produced by *Trichothecium roseum* Link. *J. Gen Microbiol.* 7: 154-168.
- Commoner, B., and F. L. Mercer. 1952. The effect of thiouracil on the rate of tobacco mosaic virus biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 35: 278-288.
- Dawson, W. O., and D. E. Schlegel. 1976. The sequence of inhibition of tobacco mosaic virus synthesis by actinomycin D, 2-thiouracil, and cycloheximide in a synchronous infection. *Phytopathology* 66:177-181.

Gupta, B. M. and Price, w. c. 1950. Production of plant virus inhibitors by fungi. *Phytopathology* 40 : 642-652.

Hare, W.W. and G. B. Lucas. 1959. Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk. *Plant Dis. Repr.* 43:152-154.

Leben, C., and Fulton, R..W. 1952. Effect of certain antibiotics on lesion production by two plant viruses. *Phytopathology* 42 : 331-335.

Matton, D. P., B. Bell and N. Brisson. 1990. Nucleotide sequence of a pathogenesis-related gene of potato. *Plant Mol. Biol.* 14:863-865.

Taniguchi, T., and Goto, T. 1976. Purification and some properties of a virus inhibitor occurring on the leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45:135-141.

Tomaru, K., and Ohkawa, Y. 1975. The inhibitory activity of alginic acid against tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 41:155-161.

Watanabe, T. Y., K. Masuzawa, and T. Misato. 1980. Inhibitory action of dodecylbenzenesulfonate on tobacco mosaic virus infection. *J. Pesticide sci.* 5:503-509.

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제목
2010(1년)	논문	Inhibitory effects of the extract from <i>Quercus dentata</i> gallnut against plant virus infection. 2010 한국유기농학회지 5권 (비SCI)
	논문	Inhibitory Effects of PLM-WE1 formulated from Extract of <i>P. linteus</i> mycelium against Plant Viruses Infection and Identification of Active Compound 식물병 연구 제16권 제3호, 2010.12, 259-265 (비SCI)
	논문	Inhibitory effect of extracts from 33 medicinal herbs against TMV and CMV infection. 농약과학회지 제14권 3호, 2010.9, 280-283 (비SCI)
2011(2년)	특허출원	떡갈나무 층영추출물을 이용한 식물바이러스 방제 조성물
2012(3년)	영농활용	KN1020을 이용한 식물바이러스 즙액전염 차단효과(중앙)
	특허출원	까치버섯 추출물을 포함하는 식물 바이러스 방제 조성물
	기술이전	KN1020을 이용한 식물바이러스 방제 조성물

7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'10	'11	'12
과제책임자	국립농업과학원	농업연구사	박진우	과제 총괄	○	○	○
세부책임자	환경농업연구과	"	권순배	주관 수행	○	○	○
공동연구자	"	"	문윤기	조사지원	-	-	○
"	"	"	이재홍	조사지원	-	-	○
"	"	"	정태성	조사지원	-	-	○
"	"	"	최준근	조사지원	-	-	○