

방선균 B25 균주가 생산하는 항생물질 ASA의 물리·화학적 특성 및 항바이러스 활성

여운형 · 김영호* · 박은경 · 김상석
한국인삼연초연구원

Physico-chemical Characteristics and Antiviral Activity of ASA, an Antibiotic Produced by Actinomycetes B25

Woon Hyung Yeo, Young Ho Kim*, Eun Kyung Park and Sang Seock Kim
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

ABSTRACT : In the screening of antiviral materials produced by actinomycetes, an isolate named B25 was found to produce an antibiotic substance ASA, which showed a strong inhibitory activity against tobacco mosaic virus (TMV) infection. ASA was purified from culture broth of B25 by silica gel column chromatography, preparative TLC, and reversed phase HPLC. Also MS, IR, UV spectrum, and melting point of ASA were determined and analysed. ASA was white powder soluble in dimethyl sulfoxide, chloroform, and ethyl acetate, having absorption peaks at 223 and 328 nm in UV-VIS spectrum, and had a molecular weight of 548. ASA showed strong inhibitory effect on TMV infection when it was applied as a mixture of TMV to the upper surface of leaves of a local lesion host (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc). It also showed antimicrobial effect against yeast and some phytopathogenic fungi.

Key words : antiviral activity, tobacco mosaic virus, actinomycetes.

식물 바이러스병은 각종 작물에 발생하며 특히 담배, 고추, 토마토 등의 경제 작물과 시설원에 작물에 심하게 발생하여 질적 양적인 수량감소를 초래하고 있다. 식물바이러스병을 방제하기 위해 다양한 경종적 및 유전학적인 방법이 사용되고 있으나 병방제를 위한 농약은 아직 개발되지 않았다.

식물바이러스병의 방제 약제를 개발하기 위하여 지금까지 많은 연구자들이 각종 식물체와 미생물로부터 항바이러스 활성을 갖는 물질을 탐색하였다. 그 결과, 다양한 식물체(12)와 미생물(3, 10)로부터 바이러스의 감염 및 증식을 억제하는 단백질류, 펩타이드류, 다당류, flavonoids(4) 등의 화합물이 분리되었다. 많은 수의 식물체가 항바이러스 활성을 보이는 것으로 보고되었으나 활성에 관여하는 특정 물질에 대한 보고는 그리 많지 않다. 최근에는 YLP(yucca leaf protein)(8), PAP(pokeweed antiviral protein)(2) 등의 식물체 유래 항바이러스 활성 단백질이 분리되고 이들의 특성에

관한 연구가 수행되었으며, 담자균류로부터 분리된 단백질 또는 다당류의 항바이러스 활성에 관한 연구가 수행되었다(1). 그러나 개발된 항바이러스 물질 대부분은 실용화되지 못하였고 실제 사용되고 있는 항바이러스제로는 sodium alginate, peptide glucan(1) 등이 손꼽힐 정도이다.

한편 방선균류(Actinomycetes)는 지금까지 개발된 생물활성 물질중 살균 및 살충, 제초활성물질의 70% 이상을 차지하는 것으로 보고되고 있으나(5) 이들의 항바이러스 활성물질에 관한 보고는 식물체와 곰팡이류에 비해 미미한 실정이다. 방선균류가 생산하는 항생물질중 herbimycin A(6), gentamycin(9), blasticidin S(7), actinomycin D(11) 등이 바이러스 감염 또는 증식 저해작용이 보고되어 있을 뿐이다.

필자들은 방선균류로부터 유용한 항바이러스 활성 물질을 개발하기 위해 방선균을 분리하고 이들이 생산하는 바이러스 감염 억제물질을 탐색하였다. 그 결과 방선균 B25 균주의 배양여액이 담배 모자이크 바이러스의 감염을 강하게 억제하는 것을 확인하였다.

*Corresponding author.

따라서 본 균주가 생산하는 항바이러스 물질의 분리·정제를 실시하고 정제된 활성물질의 물리·화학적 특성과 항바이러스 활성 및 항균활성을 조사하였다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 배양. 방선균 분리는 채집된 토양시료를 건조시키고 멸균증류수로 10^3 까지 희석한 후 방선균 분리용배지(soluble starch, 10 g; casein, 1 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.02 g; agar, 15 g/L; pH 7.0~7.5)에 0.5 ml씩 처리하여 한천배지 회석법(pour plate method)으로 수행하였다. 한편 분리방선균의 항바이러스 활성 조사를 위해서는 항생물질 생산용 배지(glucose, 20 g; soluble starch, 10 g; meat ext., 1 g; yeast ext., 4 g; NaCl, 2 g; KH_2PO_4 , 0.05 g; soybean flour, 25 g/L; pH 7.3) 20 ml(100 ml 삼각플라스크)에 방선균을 접종 후 27°C, 250 rpm으로 배양하여 그 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 15 min)한 후 상징액(上澄液)을 사용하여 항바이러스 활성을 조사하였다.

바이러스와 검정식물. 항바이러스 활성물질 스크리닝에 사용된 접종원은 담배 모자이크 바이러스(TMV)에 이병된 건조한 담배(*Nicotiana tabacum* cv. NC82)일 0.1 g을 인산완충액(0.02 M, pH 7.0) 20 ml로 마쇄한 후(200배액) 여과(Whatman No. 1)하여 사용하였다. 검정식물은 TMV에 국부병반을 일으키는 담배 품종인 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc를 사용하였다.

분리 방선균의 항바이러스 활성. 항바이러스 활성은 방선균의 배양여액(broth filtrate)이나 균체 및 배양액의 용매 추출물을 사용하여 반엽접종법으로 조사하였다. 즉 배양여액이나 배양여액과 동등한 농도로 조정된 용매추출물 0.5 ml와 동일한 양의 바이러스용액(건조한 이병 담배잎의 200배액)을 혼합하여 멸균된 면봉에 흡습시키고 carborundum(500 mesh)을 담배잎에 소량을 뿌려준 후 담배식물 1주당 3반복으로 접종하였다. 대조구는 배양여액 대신 여과된 항생물질 생산용 배지를 사용하여 바이러스액과 혼합하여 접종하였다. 접종 3~5일 후 담배잎에 형성된 국부병반(local lesion)의 수를 조사하였다. 바이러스 감염저지율은 각 반엽의 국부병반(local lesion) 수를 조사한 후 다른 쪽 반엽(대조구) 병반 수에 대한 처리 반엽의 병반 수의 백분율을 구하여 바이러스 감염 저지율로 나타내었다. 항바이러스 물질의 1차 screening에 있어서는 배양여액 수준에서 80% 이상의 바이러스 감염저지율을 보이는 균주를 선발하였고 선발된 균주는 배양액의 각종 용매추출액의 활성을 조사하여 항바이러스 활성

물질의 재현성을 조사하였다.

방선균 B25 균주의 배양기간에 따른 항바이러스 활성물질의 생산성. B25 균주의 항생물질 생산을 위한 배양은 전배양(seed culture)과 본배양으로 구분하여 실시하였다. 먼저 사면배지상의 공시균주 1백균리를 취하여 항생물질 생산용 배지 100 ml(500 ml 삼각플라스크)에 접종하고 27°C로 24시간 전배양(250 rpm)하였다. 본배양은 500 ml 삼각플라스크에 동일한 생산용배지 100 ml를 분주한 후 전배양액 1 ml를 접종하고 27°C, 250 rpm으로 4일간 실시하였다. B25 균주의 시간별 활성물질 생산성을 알아보기 위해 상기의 조건으로 배양하면서 매 24시간을 주기로 9일간 배양액 2 ml를 취하여 10,000 rpm으로 15분간 원심분리 후 상징액의 항균 및 항바이러스 활성과 pH 변화를 조사하였으며, 이를 기초로 B25 균주의 항바이러스 활성물질 생산을 위한 최적 배양기간을 조사하였다.

활성물질 ASA의 분리과 정제. B25가 생산하는 ASA의 정제 방법은 Fig. 1과 같다. 즉 4일간 배양된 B25 균주의 배양액을 원심분리(8,000 rpm/15 min)하여 상징액과 균체를 분리하였다. 균체내에 존재하는 활성물질은 70% 함수 acetone으로 12시간 추출하고 여과 후 농축하여 유기용매를 제거하였다. 균체 추출물을 상징액과 합하고 ethylacetate로 용매추출하고 농

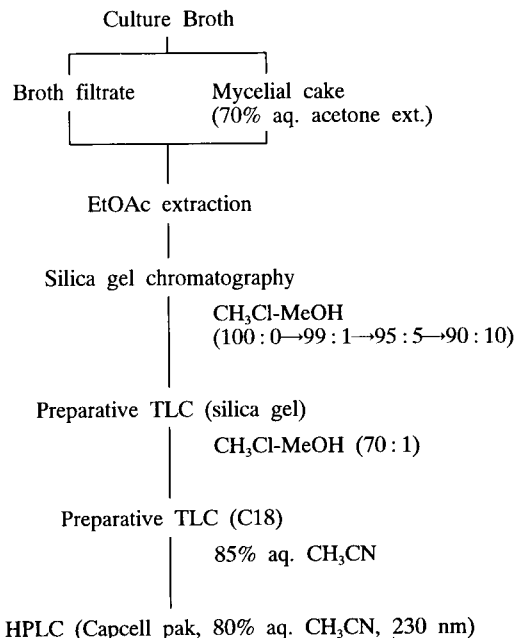


Fig. 1. Purification procedure for ASA produced by actinomycetes B25.

축하였다. 이 추출물을 소량의 chloroform에 녹인 후 silica gel column chromatography를 수행하였다. 전개 용매로 chloroform과 methanol을 100:0, 99:1, 95:5, 90:10의 순으로 점차 용매의 극성을 높이면서 사용하였으며 활성분획은 농축 후 chloroform-methanol(70:1)로 preparative TLC(silica gel)를 수행하였다. 그 다음 85% 함수 acetonitrile로 2차 preparative TLC(C18)를 수행한 후 활성분획을 HPLC로 최종 정제하였다.

활성물질 ASA의 물리·화학적 특성조사. 화합물 ASA의 UV visible spectrum은 chloroform을 용매로 Hewlett Packard Spectrophotometer를 사용하여 200~700 nm까지 scanning 하였다. 활성물질의 분자량은 JEOL DX-300 Mass Spectrophotometry를 이용하여 FAB ion(positive)화 방법으로 glycerol을 matrix로 하여 측정하였다. 녹는점 측정은 Fisher Johns 측정기를 사용하여 실온부터 서서히 온도를 상승시키면서 물질의 변성 및 녹는점을 조사하였다. HPLC는 Waters 510 기종을 사용하였고, TLC 분석은 Merck사 제품의 Silica gel 60 F₂₅₄를 사용하였다.

활성물질 ASA의 농도별 항바이러스활성. 화합물 ASA의 TMV에 대한 활성은 전순한 바와 같이 국부병반 담배(cv. Xanthi-nc)를 사용하여 반엽접종법에 의하여 조사하였다. ASA를 소량의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 멸균증류수로 희석하여 최종농도가 100, 10, 1 µg/ml이 되도록 조제한 후 시료로 사용하였다. 이때 사용된 DMSO의 최종 농도는 5%가 넘지 않도록 조절하였다. 접종 후 온실에서 4~6일 경과 후 각각의 반엽(처리반엽과 대조반엽)에 형성된 국부병반(local lesion) 수를 조사하였다.

B25 균주의 항균활성 조사. B25 균주의 배양액과 화합물 ASA의 항균활성은 paper disk법으로 조사하였다. 배양액의 항균활성 조사에서는 사전실험에서 생육억제 효과가 나타난 *Candida albicans*를 검정균으로 사용하였으며, 화합물 ASA의 항균활성 spectrum의 조사에 있어서는 *Staphylococcus aureus* R-209 등 8종 세균, 효모인 *Candida albicans*와 버도열병균인 *Pyricularia grisea* 등 5종의 곰팡이를 공시하였다. 검정균용 배지로 세균류는 Mueller Hinton 배지를, 효모류 및 곰팡이는 Sab 배지를 사용하였다. 배양액의 경우는 배양여액의 원액을 paper disk(Φ 8 mm)에 흡습시켜 사용하였고, 순수하게 정제된 활성물질 ASA는 chloroform에 녹여 filter disk(Φ 8 mm)당 40 µg씩 되도록 흡수시켰다. 이 paper disk를 검정균이 혼합된 agar plate에 올려놓고 2~3일 후에 paper disk 주위에 형성된 저지환의 크기를 측정하였다.

결 과

항바이러스 활성균주의 선발. 토양으로부터 분리한 방선균 300 균주를 대상으로 항바이러스 활성을 조사한 결과, 20 균주가 배양여액 수준에서 80% 이상의 감염저지 효과를 보였다(자료미제시). 그러나 이들의 대부분은 재현성이 없어 ethylacetate, butanol 등의 유기용매 추출 또는 정제과정시 활성이 소실되었다. 다만 B25 균주는 배양여액은 물론, ethyl acetate 추출물에서도 지속적인 활성을 보여 본 균주가 생산하는 활성물질을 분리·정제하고 물리·화학적 특성을 조사하였으며 정제된 활성물질의 항바이러스활성과 항균활성을 조사하였다.

배양시간에 따른 B25 균주의 활성물질 생산. B25 균주의 시간별 활성물질 생산은 Fig. 2와 같다. 배양 1일부터 활성물질을 생산하기 시작하여 배양 2~4일째 가장 높은 활성을 보였으며, 4일 이후부터는 활성이 점차 감소하여 6일 이후에는 급격히 저하하였다. 배양액의 pH 변화는 일반적인 방선균의 배양특성과 비슷한 양상을 보여 배양 초기 pH 7.3에서 배양 2일까지 낮아져 pH 6.6까지 되었다가 다시 높아져 4일에는 pH 7.8, 6일째에는 pH 8.3, 마지막 조사일인 배양 9일째엔 pH 8.6까지 상승하였다. 그러나 이러한 pH 변화는 다양한 pH 범위를 가지는 각종 방선균 배양액의 항바이러스 활성 조사 실험에서 비추어보건데 항바이러스 활성과 큰 관련성은 없는 것으로 생각된다. 한편

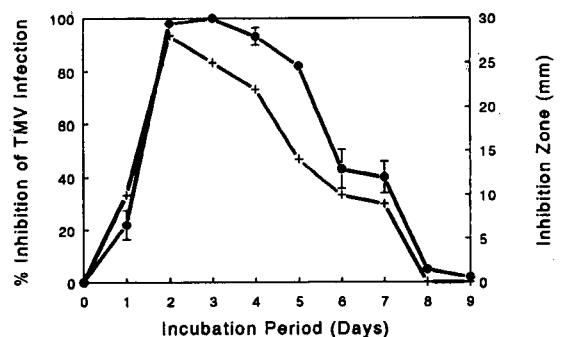


Fig. 2. Antiviral and antimicrobial activities of culture filtrate of actinomycetes B25 according to incubation period. Antiviral activity of culture filtrate was assayed by the half-leaf inoculation method using local lesion host plants (*N. tabacum* cv. Xanthi-nc). For antifungal activity, inhibition diameter of *Candida albicans* around paper disks soaked with culture filtrate was examined. Vertical bars represent standard deviations of 3 replicates. —●—, Antiviral; —+—, Antifungal

본 균주가 생산하는 활성물질의 *C. albicans*에 대한 항균활성을 조사한 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 배양기간별 항균활성의 정도가 항바이러스 활성과 일치된 변화를 보여 배양 2~4일에 가장 강한 활성을 나타내었으며 배양 8~9일 후에는 항균활성을 전혀 갖지 않았다.

활성물질의 용매추출성과 열에 대한 안정성. B25 균주가 생산하는 항바이러스 활성물질은 배양여액과 균체 추출물에서 모두 확인되었으며, 열처리에 의해 항바이러스 활성이 감소하였고 ethylacetate층으로 항바이러스 활성물질이 가장 많이 이행하였다(Fig. 3). 즉 균체추출물의 경우 배양여액과 비슷한 수준의 항바이러스 활성을 보임으로서 활성물질이 균체내에 비슷하게 존재한다는 것을 알 수 있었고, 이 활성물질은 *n*-hexane과 butanol 층으로 이행되지 않았으며 대부분 ethyl

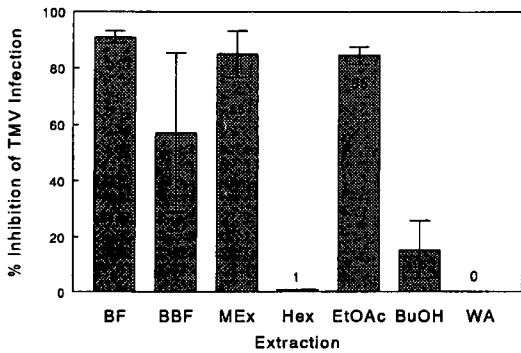


Fig. 3. Antiviral activity (inhibition of TMV infection) of actinomycetes B25 cultures and solvent extraction fractions of the culture broth. All fractions were prepared from 3 day-old culture of B25. BF: broth filtrate, BBF: boiled broth filtrate (100°C for 15 min), MEx: mycelial extract, Hex: *n*-hexane layer, EtOAc: ethylacetate layer, BuOH: butanol layer, WA: water layer. Vertical bars represent standard deviations of 3 replicates.

Table 1. Physico-chemical properties of ASA produced by actinomycetes B25

Characteristic	Properties
Appearance	White powder
MP (°C)	113°C
FAB-MS (m/z)	549(M+H) ⁺
R _f value of TLC ^a	0.49
Solubility	
soluble	DMSO, EtOAc, CHCl ₃
slightly soluble	MeOH, CH ₃ CN
insoluble	H ₂ O

^a Silica gel, CHCl₃-MeOH (70 : 1).

acetate로 추출되는 지용성 화합물이었다. 또한 3일 배양한 배양여액을 100°C로 15분간 처리한 후 항바이러스 활성을 조사한 결과, 열처리되지 않은 배양여액에 비해 활성이 많이 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 3).

ASA의 물리·화학적 특성. 활성물질 ASA는 정제 시 흰색의 분말상이었으며 dimethyl sulfoxide, chloroform, ethylacetate 등에 가용성, methanol, acetonitrile에

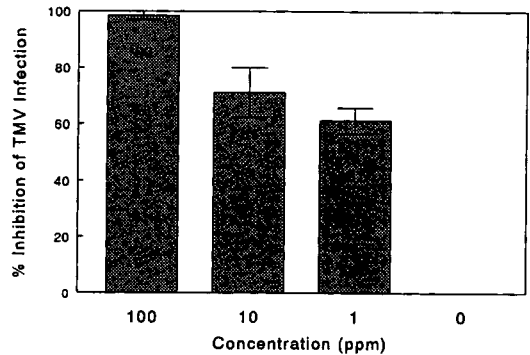


Fig. 4. Inhibitory activity of ASA with different concentrations against TMV infection in Xanthi-nc tobacco leaves. Vertical bars represent standard deviations of 3 replicates.

Table 2. Antimicrobial activity of ASA produced by actinomycetes B25

Test organism	Diameter of inhibition zone ^a (mm)
Gram negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	0
Gram positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Sarcina lutea</i>	0
<i>Streptococcus</i> sp.	
Yeast	
<i>Candida albicans</i>	13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Fungi	
<i>Pyricularia grisea</i>	32
<i>Alternaria mali</i>	12
<i>Fusarium solani</i>	9
<i>Colletotrichum tabacum</i>	18

^a Paper disks (8 mm in diameter) with 40 µg of ASA were placed on agar media, and inhibition diameter was examined.

는 난용성이었으며 water에는 불용성이었다. TLC 분석시 ASA는 chloroform-methanol(70:1)의 용매계에서 Rf치가 0.45였다. 한편 FAB-MS 측정결과 (M+H)⁺ 피크가 m/z 549에서 측정되어 본 화합물의 분자량은 548로 추정되었다. Chloroform을 용매로하여 측정한 UV-VIS spectrum은 223, 328 nm에서 최대 흡수피크를 보였으며 용점은 113°C에서 측정되었다(Table 1).

ASA의 항바이러스 활성과 항균활성. 순수하게 정제된 활성물질 ASA의 담배 모자이크 바이러스의 감염억제 효과는 Fig. 4와 같다. 활성물질 ASA를 담배잎의 표면에 반엽접종법으로 처리시 100 ppm에서 99%, 10 ppm에서 71%, 1 ppm에서 61%의 감염억제 효과를 보였다. 또한 ASA의 항균활성은 효모를 포함한 조사 곰팡이에 대해 선택적으로 작용하였으며 그람 양성 및 음성 세균에는 항균활성을 보이지 않았다.

고 찰

배양기간에 따른 B25 균주의 항바이러스 활성과 항균활성의 변화로 미루어보아 이 두가지 활성을 가지는 물질은 동일한 물질로 추측된다. 실제로 실험기간 중 항바이러스 활성물질의 분리 중간 단계에 *C. albicans*에 대한 항균활성을 항바이러스 물질의 분리에 이용하였다. 또한 이 실험에서도 나타났듯이 정제된 화합물 ASA는 항바이러스 활성과 항균활성을 모두 가지고 있으므로 배양액 상태에서 나타난 활성은 ASA에 의한 활성으로 생각된다.

B25의 항바이러스 활성이 배양 2~4일에 가장 많이 생산되었고 또 배양 후기에 급격히 감소한 것으로 보아 이 항바이러스 또는 항균물질은 이 균의 중간 대사산물로 초기에 생성되었다가 다시 균에 의해 이용되는 물질이 아닌가 생각된다. 또한 열처리에도 의해 활성이 크게 저하되었으며, 배양 후기에 배양액의 pH가 높아졌고 그 배양액의 항바이러스 활성이 크게 낮아진 것으로 보아 열이나 알칼리 상태에서 물질이 쉽게 분해될 가능성도 있다. 특히 배양 2일 후에 가장 큰 활성을 나타낸 것은 일반적인 균의 2차 대사산물의 특성과는 차이를 보이는 것이라 생각할 수 있다.

이 물질은 항바이러스 활성외에 항균활성도 가지고 있는데 항균활성의 경우 곰팡이에 한하여 활성을 보이고 있는 점이 특이하다. 지금까지 방선균류가 생산하는 항생물질중 herbimycin A(6), gentamycin(9), blastidicin S(7), actinomycin D(11) 등이 항바이러스 활성을 가지는데 이들중 herbimycin A가 분자량, 용매에 대한 용해도가 유사하고 항균 spectrum도 곰팡이에 한

정되어 있어서 ASA가 herbimycin 계열의 물질과 매우 유사하다. 앞으로 물질 동정을 위한 추가적인 연구가 수행될 예정이다.

ASA가 TMV 감염을 저지하는 기작에 대해서는 아직 연구가 이루어지지 않았다. ASA를 담배 잎의 뒷면에 처리하고 표면에 바이러스를 접종한 결과 미미한 감염억제 효과를 보여 이 물질의 침투성은 크지 않은 것으로 생각되었다(자료미제시). 앞으로 물질의 동정과 아울러 이 물질의 실용성을 가름하기 위하여 항바이러스 효과의 지속성, 침투효과, 바이러스 감염 억제에 대한 mechanism에 대한 연구도 있어야 할 것이다.

요 약

토양에서 분리한 방선균 300 균주의 항바이러스 활성을 TMV의 감염억제 효과를 이용하여 탐색한 결과, 항바이러스 활성이 높고 재현성이 있는 방선균 B25 균주를 분리하였다. 본 균주의 배양액을 ethylacetate로 추출하고 silica gel column chromatography, 역상 HPLC를 수행하여 순수정제하였고, 정제된 화합물(ASA)의 몇 가지 물리화학적 특성과 항바이러스 및 항균활성을 조사하였다. ASA는 223, 328 nm(UV-VIS spectrum)에서 최대흡수 피크를 보였으며 FAB-MS로 측정한 분자량은 (M+H)⁺ 피크가 m/z 549에서 확인되어 본화합물의 분자량은 548로 추정되었다. 화합물 ASA는 반엽접종법에 의한 항바이러스 활성은 100 ppm에서 99%, 10 ppm에서 71%, 1 ppm에서 61%의 높은 바이러스 감염저지 효과를 보였으며, 효모를 포함하는 곰팡이류에 선택적으로 항균활성을 보였다.

참고문헌

1. Aoki, M., Tan, M., Fukushima, A., Hieda, T., Kubo, S., Takabayashi, M., Ono, K. and Mikami, Y. 1993. Antiviral substances with systemic effects produced by basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 278-282.
2. Bonness, M. S., Ready, M. P., Irvin, J. D. and Mabry, T. J. 1994. Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism. *The Plant Journal* 5 : 173-183.
3. Chandra, K., Gupta, B. M. and Verma, H. N. 1981. Acquired local and systemic antiviral (TMV) resistance induced by treatment with T-poly (*Tricothecium polysaccharide*) in non-hypersensitive host plant *Nicotiana tabacum* cv. NP-31. *Curr. Sci.* 50 : 69-71.
4. Christopher, J. F. and Neil Towers, G. H. 1992. In-

- hibition of infectivity of potato virus X by flavonoids. *Phytochemistry* 31 : 3017-3020.
5. Cross, T. 1982. Actinomycetes: A continuing source of new metabolites. *Developments in Industrial Microbiology* 23 : 1-18.
 6. Duros, J. and Suffness, M. 1981. New antitumor substances of natural origin. *In: Cancer Treatment Review* 8, ed. by K. Hellmann *et al.*, pp. 63-87. Academic Press, New York.
 7. Hirai, T. and Shimomura, T. 1965. Blasticidin S, an effective antibiotic against plant virus multiplication. *Phytopathology* 55 : 291-295.
 8. Ito, Y., Seki, I., Tanifugi, S. and Hiramatsu, A. 1993. Inhibition of protein synthesis by antiviral protein from *Yucca recurvifolia* leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 518-519.
 9. Kassanis, B., White, R. F. and Woods, R. D. 1975. Inhibition of multiplication of tobacco mosaic virus in protoplasts by antibiotics and its prevention by divalent metals. *J. Gen. Viol.* 28 : 185-191.
 10. Klement, Z., Kiraly, J. and Pozsar, B. I. 1966. Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophytic bacterium. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1 : 11-18.
 11. Lockhart, B. E. L. and Semanick, J. S. 1968. Inhibition of the multiplication of plant virus by actinomycin D. *Virology* 36 : 504-506.
 12. Stevens, W. A. and Reynolds, T. 1992. Plant virus inhibitors from members of the Polygonaceae. *Biomedical Letters* 47 : 269-273.

(Received 15 Nov. 1996)