

## *Fusarium*속 균주로부터 분리한 Equisetin, Zearalenone 및 8'-Hydroxyzearalenone의 식물병원곰팡이에 대한 항균활성

김진철\* · 박중협 · 최경자 · 김흥태 · 최용호 · 조광연  
한국화학연구원 농약스크리닝연구팀

**Antifungal Activities of Equisetin, Zearalenone, and 8'-Hydroxyzearalenone Isolated from *Fusarium* Species against Plant Pathogenic Fungi.** Kim, Jin-Cheol\*, Joong-Hyeop Park, Gyung Ja Choi, Heung Tae Kim, Yong Ho Choi, and Kwang Yun Cho. Agrochemical Screening Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Jang-Dong 100, Yusong-Gu, Taejeon 305-606, Korea – Antifungal substances were isolated from solid cultures of *Fusarium equiseti* FO-68 obtained from arrowhead and *Fusarium* sp. FO-510 obtained from egg plant, and then their antifungal activities were investigated against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in vivo*. An antifungal substance was purified from rice solid cultures of *F. equiseti* FO-68 and identified as equisetin. In addition, two antibiotic substances were isolated from solid cultures of *Fusarium* sp. FO-510 and their chemical structures were determined to be zearalenone and 8'-hydroxyzearalenone. *In vitro*, equisetin and zearalenone inhibited mycelial growth of most of the plant pathogenic fungi tested, whereas 8'-hydroxyzearalenone hardly inhibited fungal growth. *In vivo*, equisetin effectively controlled the development of tomato gray mold and tomato late blight. Zearalenone exhibited *in vivo* antifungal activity against rice blast, rice sheath blight, tomato gray mold, and tomato late blight. However, 8'-hydroxyzearalenone did not control the development of plant diseases except tomato gray mold. This is the first report on the antifungal activities of equisetin, zearalenone, and 8'-hydroxyzearalenone.

**Key words:** Antifungal substance, *Fusarium* sp., equisetin, zearalenone, 8'-hydroxyzearalenone

농약의 개발에 있어서 곰팡이, 세균, 방선균 및 식물 등으로부터 기원하는 천연생리활성물질들은 많은 기여를 하였다. 이들은 천연물질 자체의 구조의 변화 없이 바로 농약으로 이용되기도 하였으며, 또한 합성농약의 선도물질로서 이용되기도 하였다. 그리고 천연물질이 새로운 작용기작을 가지고 있을 경우 이 작용 기작을 이용한 새로운 생물검정법을 개발하여 보다 단순하고 합성이 용이한 신물질을 발견하는데 기여하기도 한다.

미생물의 경우 새로운 천연물질의 재료로서 최근에 방선균의 비율이 줄어드는 반면 곰팡이의 비율이 상대적으로 올라가는 경향이 있어, 곰팡이에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, 곰팡이 유래 천연물질을 이용하여 개발된 가장 대표적인 농약이 strobilurin계 살균제들이다. 즉, strobilurin계 살균제들은 담자균류인 *Oudemansiella mucida*와 *Strobilurus tenacellus*으로부터 각각 분리된 oudemansin A[18]와 strobilurins[1]을 선도물질로 하여 개발되었다. Kresoxim-methyl[6], azoxystrobin[5], metominostrobin[16] 등의 살균제들이 개발되었으며, 현재도 strobilurin을 선도물질로 한 새

로운 살균제들을 합성하고자 하는 연구들이 꾸준히 이루어지고 있다.

*Fusarium*속 균은 식물병원균, 부생균 및 토양서식균 등으로 전세계적으로 널리 분포하고 있으며, 인축에 독성을 나타내는 진균독소, 식물의 생장에 영향을 주는 phytotoxin 및 미생물들의 생장에 영향을 주는 항생물질 등 다양한 2차 대사산물을 생산하는 균으로 알려져 있다[22].

본 연구팀에서는 *Fusarium*속 균으로부터 새로운 항생물질을 분리하고자 토양 및 다양한 식물 시료로부터 분리한 70개의 *Fusarium*속 균주들을 액체배양 및 고체배양 후에 6가지 식물병에 대해 *in vivo* 항균활성을 조사하였다[19]. 그 결과 가지에서 분리한 *F. equiseti* FO-68균주와 벼풀에서 분리한 *Fusarium* sp. FO-510균주의 고체배양 시료가 강한 항균활성을 나타내어, 이들 두 균주로부터 항균활성 물질을 분리·동정한 후 항균활성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 균 배양

*F. equiseti* FO-68균주와 *Fusarium* sp. FO-510균주는 1990년에 각각 가지와 벼풀로부터 분리하였으며[19], 이들 균주들은 감자한천사면배지에 배양하여 실험에 사용하였고,

\*Corresponding author

Tel: 82-42-860-7436, Fax: 82-42-861-4913

E-mail: kjinc@kriict.re.kr

또한 균주의 장기간 보관을 위해 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 7일 동안 배양된 균주 선단부를 떼어내 멸균한 6% dimethyl sulfoxide(DMSO) 용액에 넣은 다음 -70°C에서 보관하였다.

*F. equiseti* FO-68균주와 *Fusarium* sp. FO-510균주로부터 항균활성 물질을 분리하기 위하여 두 균주를 쌀배지에 배양하였다[14]. 1 L의 삼각플라스크에 담겨 있는 멸균한 쌀배지 200 g에 균사를 포함하고 있는 한천조각(지름 8 mm)을 4개씩 넣어 접종한 다음 25°C에서 28일간 정치 배양하였다.

### 항균물질의 분리

위와 같이 배양한 *F. equiseti* FO-68균주의 쌀배양체(1.6 kg)를 methanol(MeOH)로 추출한 후 농축한 다음 수용액층을 ethyl acetate(EtOAc)로 3회 추출하였다. EtOAc추출물(30.32 g)로부터 항균물질을 분리하기 위하여 flash silica gel column chromatography를 실시하였다. Buchner갈대기[10.5 cm(i.d.)×5 cm(height)]에 silica gel(Kiesel gel 60, 70-230 mesh, 150 g; E. Merck, Darmstadt, Germany)을 충전한 후 시료를 가한 다음 n-hexane, ethyl ether, methylene chloride, EtOAc, EtOAc-MeOH(1:1, v/v) 및 MeOH 등을 각각 800 ml씩 용출하였다. Paper disc method에 의해 벼·도열병균(*Magnaporthe grisea*)에 대하여 항균활성을 조사한 후 활성이 있는 시료들을 모아 농축한 결과 15.8 g의 시료를 획득하였다. 이 시료 1/2을 떼어 silica gel column(3.6 cm × 60 cm; Kiesel gel 60, 70-230 mesh, 300 g; E. Merck)에 가한 다음 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 용매계의 비율을 달리하면서(9:1, 1,000 ml; 7:1, 800 ml; 5:1, 600 ml) 용출하였다. 나머지 시료에 대해서도 동일한 column chromatography를 실시하였다. TLC분석 결과와 생물검정 결과를 토대로 활성분획들을 모아 농축하여 12.0 g의 시료를 획득하였다. 이 시료를 MeOH에 용해한 다음 1/5을 취하여 Sephadex LH-20 resin(50 g; Sigma Co., St. Louis, MO, U.S.A.)이 충전된 column에 가했다. 이동상으로 MeOH을 이용하였으며, 이 column chromatography를 통하여 항균물질을 순수하게 분리하였다. 나머지 시료에 대해서도 동일한 과정을 반복 실시하여 FO68 물질이라 명명된 무색의 물질을 총 7.9 g 획득하였다.

한편, *Fusarium* sp. FO-510균주의 쌀배양체 1.6 kg을 MeOH으로 추출한 후 감압농축하였다. 증류수를 가하여 750 ml로 부피를 조절하여 재용해한 후 동량의 EtOAc로 추출하였다. EtOAc추출물을 감압농축한 후 얻어진 시료(9.9 g)를 silica gel column(3.6 cm×60 cm, Kiesel gel 60, 70-230 mesh, 230 g; E. Merck)에 가한 다음 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH(19:1, 9:1, v/v)로 용출하였다. 이 chromatography를 통하여 얻어진 5개의 분획에 대하여 벼·도열병(rice blast), 벼·잎집무늬마름병(rice sheath blight), 토마토·역병(tomato late blight), 토마토·잿빛곰팡이병(tomato gray mold), 밀·붉은늑병

(wheat leaf rust) 및 보리·흰가루병(barley powdery mildew) 등 여섯 가지 식물병에 대하여 800 µg/ml수준으로 *in vivo* 항균활성을 실시한 결과, 두 개의 분획(F2와 F3)이 활성이 있는 것으로 나타났다. F2(4.1 g)로부터 항균물질의 분리를 위하여 두 번의 silica gel column chromatography를 실시하였다. 용출용매는 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 용매계를 이용하였고, 이 과정을 통하여 FO510-1 물질이라 명명된 무색의 물질을 1.45 g 획득하였다. 또한 F3(2.1 g)으로부터 항균물질을 분리하기 위하여 두 번의 silica gel column chromatography를 수행하였는데, 용출용매는 CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 용매계(93:7, 9:1, v/v)와 n-hexane-EtOAc-MeOH(60:40:1, v/v/v)를 이용하였다. 이 과정을 통하여 0.9 g의 FO510-2 물질이라 명명된 무색의 물질을 분리하였다. 분리한 2개의 물질들은 모두 여러 가지 용매 조건의 TLC분석시 단일 spot으로 나타났다.

### 스펙트럼 측정

분리한 물질들의 구조 분석을 위하여 질량분석은 double-focusing high-resolution(HR) mass spectrometer(JEOL JMS-DX303; JEOL Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 핵자기공명분석은 deuteriochloroform에 용해하여 Bruker AMX-500 (500 MHz) NMR spectrometer(Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, Germany)로 측정하였다. Spectra는 tetramethylsilane(TMS)(<sup>1</sup>H)나 solvent(<sup>13</sup>C) signal을 reference로 하였다.

### *In vitro* 균사생장 억제 실험

분리한 3가지 물질들에 대하여 DMSO에 용해한 후 Poison Food Technique[4]에 따라 8 가지 식물병원균(Table 1)에 대해 *in vitro*에서 균사 생육저해 활성 실험을 실시하였다. PDA 배지는 *Phytophthora infestans*와 *Phytophthora capsici*를 제외한 모든 균들의 기초 배지로 사용하였다. 이 두 균은 PDA 배지 보다 더 잘 자라는 V-8 juice agar 배지를 이용하였다[12]. 각각의 물질이 200, 66.7, 22.2, 7.4, 2.5 와 0.82 µg/ml의 농도가 되도록 배지를 만든 후 실험 균의 균사를 포함하고 있는 agar disc(직경 5 mm)를 배지 중앙에 접종한 후 *P. infestans*와 *Botrytis cinerea*는 20°C에서 배양하였고, 나머지 균들은 25°C에서 배양하였다. 각각의 균주와 농도별로 5반복씩 실시하였으며, 대조구는 DMSO(10 µl/ml)를 첨가한 배지를 이용하였다. 2-6일 동안 배양 후, 균사 생장을 측정하였고, 활성은 IC<sub>50</sub>(50% inhibitory concentration) 값으로 나타내었다.

### *In vivo* 항균활성 검정

분리한 3개 물질들의 *in vivo* 항균활성 검정은 벼·도열병, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·잿빛곰팡이병, 토마토·역병, 밀·붉은늑병 및 보리·흰가루병 등의 6가지 식물병에 대하여 실시하였다. 5%의 MeOH과 250 µg/ml수준으로

[Tween 20이 포함된 용액에 분리한 물질을 용해한 후, 병원균 접종 24시간 전에 잎과 줄기에 살포하였다[11, 12]. 벼 (*Oryza sativa*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 보리 (*Hordeum sativum*) 및 밀(*Triticum aestivum*)을 지름 4.5 cm 플라스틱 포트에 원예용 상토 또는 수도용 상토를 70% 정도 담고 온실( $25 \pm 5^\circ\text{C}$ )에서 1주에서 3주정도 키웠다.

벼·도열병은 2엽기 유묘에 *M. grisea* 포자현탁액( $5 \times 10^5$  포자/ml)을 분무하여 접종한 후  $25^\circ\text{C}$  습실상에서 하루동안 발병을 유도한 다음,  $25^\circ\text{C}$  항온실에 두었다. 벼·잎집무늬마름병은 3엽기 유묘에 *Cortium sasaki*가 7일 동안 배양된 배지(밀기울 90 g, 왕겨 15 g, 증류수 100 ml)를 접종하고  $25^\circ\text{C}$  습실상에서 4일간 처리한 다음,  $25^\circ\text{C}$  항온실에서 4일간 배양하였다. 토마토·역병은 2엽기 토마토 유묘에 *P. infestans*의 유주자낭 현탁액( $10^5$  유주자낭/ml)에서 추출된 유주자낭 현탁액을 분무, 접종한 후  $20^\circ\text{C}$  습실상에서 발병을 유도하였다.

한편, 토마토·잿빛곰팡이병은 토마토 2엽기 유묘에 *B. cinerea* 포자 현탁액( $10^6$  포자/ml)을 처리 한 후에 습실상에서 발병시켰다. 밀·붉은녹병은 1엽기 유묘에 활물 기생균인 *Puccinia recondita*의 포자를 Tween 20 용액( $250 \mu\text{g/ml}$ )에 0.67 g 포자/liter 수준으로 현탁한 후 포자현탁액을 분무 처리하여 하루동안  $20^\circ\text{C}$  습실상에서 발병을 유도한 후 항온실로 옮겨 배양하였다. 마지막으로 보리·흰가루병은 보리 유묘 1엽기에 숙주식물에서 계대 배양된 *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* 포자를 접종하고  $20^\circ\text{C}$  항온실에서 발병시켰다. 대조구로는 1%의 DMSO를 포함하고 있는 Tween 20 용액( $250 \mu\text{g/ml}$ ) 30 ml를 사용하였다. 벼·도열병, 밀·붉은녹병, 보리·흰가루병은 7일 후에 벼·잎집무늬마름병은 8일 후에, 그리고 토마토·잿빛곰팡이병과 토마토·역병은 각각 3일과 4일 후에 병반면적율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리한 물질의 동정

*F. equiseti* FO-68균주의 쌀고체배양체로부터 분리한 FO-68 물질은 EI mode로 질량분석시 분자이온( $[M]^+$ )은  $m/z$  373에서 나왔고, 주요 fragment ion은  $m/z$  355, 343, 327, 212, 246, 203, 175 및 140 등이었다. CI mode로 질량분석시  $[M+1]^+$  이온은  $m/z$  384에서 나타나 FO-68 물질의 분자량은 373 dalton인 것으로 결정되었다. 정확한 구조를 결정하기 위하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ 분석을 실시한 결과, FO-68 물질은 Phillips 등[20]이 보고한 equisetin이라는 물질로 동정되었다(Fig. 1). Equisetin은 *F. equiseti* 균주로부터 처음 보고되었는데, 그람양성균에 활성이 우수한 것으로 알려져 있다[2]. 또한 이 물질의 유도체인 CJ-17572 물질은 여러 가지 항생물질에 저항성을 띠는 *Staphylococcus aureus* 균과 *Enterococcus faecalis* 균의 생장을 효과적으로 저해하는 것

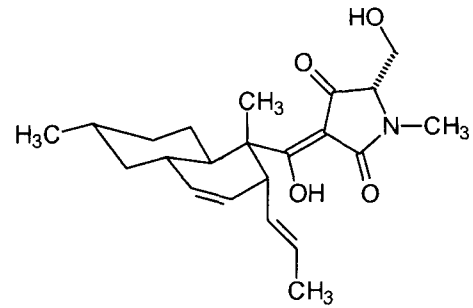


Fig. 1. Chemical structure of equisetin.

로 보고되어 있다[21]. 이 물질은 이외에도 백혈병을 유발하는 물질로 추정되었고[20], 또한 쥐간세포의 미토콘드리아 내막(inner membrane)의 substrate anion carrier를 저해하여 독성을 유발하는 것으로도 보고되어 있다[15]. 또한 equisetin은 최근에 후천성 면역결핍증 바이러스(human immunodeficiency virus) type I(HIV-1) integrase를 억제하는 것으로 나타나[9], anti-HIV 약제를 개발하기 위하여 equisetin 및 유도체들에 대한 연구가 많이 진행되고 있다[3,7,8,24]. 이외에도 equisetin은 다양한 단자엽식물과 쌍자엽식물의 종자 발아와 생장을 저해하는 것으로 보고되어 식물병원균인 *F. equiseti*와 *F. pallidoroseum*의 병원성 인자로서 추정되기도 하였다[23].

한편 *Fusarium* sp. FO-510균주로부터 분리된 두 개의 물질(FO510-1, FO510-2)은 질량분석 및 핵자기공명분석을 통하여 구조를 결정하였다. FO510-1 물질을 EI mode로 질량분석을 실시한 결과, 분자이온( $[M]^+$ )이  $m/z$  318에서 나타났고, 주요 fragment ion으로는  $m/z$  300, 235, 204, 188, 176, 161, 125 및 112 등이 나타나 Jackson 등[10]이 보고한 zearalenone과 일치하였다. 정확한 구조를 확인하기 위하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  분석을 실시한 결과 FO510-1 물질은 zearalenone과 일치하였다.

한편 FO510-2 물질의 구조를 동정하기 위하여 EI mode로 질량분석을 실시하였다. 그 결과 분자이온 ( $[M]^+$ )이  $m/z$  334에서 나타났고, 주요 fragment ion으로  $m/z$  316, 298, 248, 230, 204, 188, 176 및 161 등이 나타나 역시 Jackson 등[10]이 보고한 8'-hydroxyzearalenone과 일치하였다. 구조를 확인하기 위하여 NMR분석을 실시하였는데,  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  data 모두 8'-hydroxyzearalenone과 일치하였다. Fig. 2에서는 zearalenone과 8'-hydroxyzearalenone의 구조와 탄소의 chemical shift를 나타낸 것이다. 즉, zearalenone과 비교할 때 8'-hydroxyzearalenone은 8'번 탄소에 hydroxyl기가 붙어 8'번 탄소의 chemical shift가 downfield로 변했을 뿐만 아니라( $\delta_{\text{C}}$  22.15→65.78 ppm), 주위의 탄소들의 chemical shift도 변하였다.

Zearalenone은 *Fusarium*속 균이 생산하는 대표적인 진균 독소로서 사료와 곡류에 오염되어 진균독소중독증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이 물질에 대해 가장 민감하게 반응

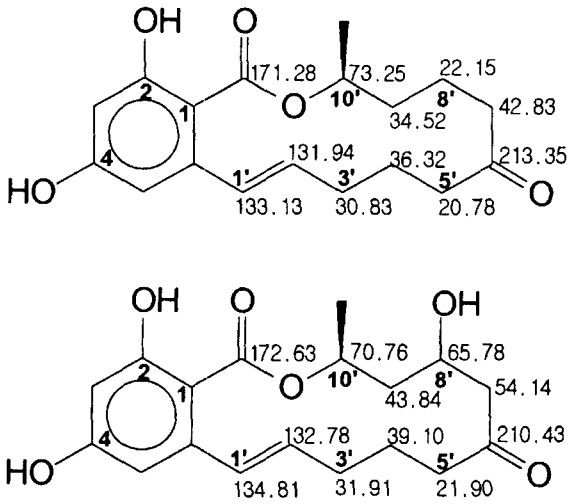


Fig. 2. Chemical structures of zearalenone and 8'-hydroxyzearalenone with chemical shifts of selected carbons.

을 보이는 동물이 돼지인데, 돼지가 사료를 통하여 zearalenone을 섭취하였을 경우 난소가 붓거나 심한 경우에는 불임이 되는 등 성성숙전 증후군을 일으킨다[16]. 돼지 외에 소, 닭, 칠면조 등도 이 물질에 의해 중독증이 유발된다고 보고되어 있다[16]. Zearalenone의 유도체인 zearalenol과 8'-hydroxyzearalenone 등도 곡류에서 함께 발견되는데, 이들 물질들은 주로 *F. graminearum*와 *F. culmorum*에 의해 생산된다. 이들 균주들은 zearalenone과 함께 trichothecene계 진균독소인 deoxynivalenol과 nivalenol도 생산하여, 곡류 및 사료에서 zearalenone은 보통 deoxynivalenol이나 nivalenol과 함께 검출된다[12]. 한편, 지금까지 zearalenone 및 유도체의 인축에 대한 독성은 많이 보고되어 있지만 저자들이 아는 한 항진균활성에 대해서는 보도된 적이 없다.

**In vitro 항균활성**

구조가 동정된 3개 물질들의 8가지 식물병원균에 대한 균사생육억제 활성을 조사하였다(Table 1). 그 결과 equisetin의 경우 토마토·역병균인 *P. infestans*를 제외한 나머지 식물병원균에 대해서는 IC<sub>50</sub> 값이 11 µg/ml 이하로 나타나 항균활성이 비교적 강한 것으로 나타났다. Burmeister 등 [2]은 *F. equiseti*로부터 분리한 equisetin이 *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* 및 *S. aureus* 등의 균의 생장을 1 µg/ml 이하의 농도에서 완전히 저해한다고 하였고, *Neisseria perflava*와 *M. smegmatis* 등의 생장은 2.0~8.0 µg/ml 수준에서 완전히 저해한다고 보고하였다. 한편, Sugie 등[21]은 *Pezizula* sp.에서 분리한 equisetin 유도체인 CJ-17572라는 물질이 여러 가지 항생물질에 저항성을 보이는 *S. aureus*균과 *E. fecalis*균에 대한 IC<sub>50</sub> 값이 각각 10 µg/ml과 20 µg/ml이라고 하였다. 본 실험의 결과 equisetin은 그람양성 세균뿐만 아니라 진균에도 항균활성이 크다는 것을 알 수 있었다. 다

Table 1. Inhibition of equisetin, zearalenone, and 8'-hydroxyzearalenone against mycelial growth of plant pathogenic fungi in vitro

Fungal species <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>		
	Equisetin	ZEA <sup>c</sup>	8'-hydroxyZEA
<i>Alternaria mali</i>	7.5	18	>200
<i>Cortium sasaki</i>	11	13	>200
<i>Botrytis cinerea</i>	5.1	9.7	>200
<i>Phytophthora capsici</i>	1.0	104	>200
<i>Phytophthora infestans</i>	59	26	>200
<i>Fusarium oxysporum</i>	8.8	29	>200
<i>Magnaporthe grisea</i>	3.4	16	56
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	4.4	4.4	>200

<sup>a</sup>Concentration required to cause a 50% inhibition of growth of fungi. <sup>b</sup>All of the test fungi were isolated in our laboratory. <sup>c</sup>ZEA = zearalenone

른 한편으로 지금까지 항세균활성에 대한 보고는 있었지만 진균에 대한 항균활성은 보고된 바가 없고 본 논문에서 처음으로 보고하는 바이다.

Zearalenone은 equisetin보다는 조금 약한 항균활성을 보였지만 실험에 사용한 8가지 식물병원균에 대하여 비교적 높은 항균활성을 보였다. 토마토·잿빛곰팡이병균인 *B. cinerea*와 고추·탄저병균인 *Colletotrichum gloeosporioides*에는 10 µg/ml 이하의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. 그리고 고추·역병균인 *P. capsici*균을 제외하고는 나머지 식물병원균에 대하여 10~30 µg/ml수준의 IC<sub>50</sub>값을 보였다. 고추·역병균에는 IC<sub>50</sub>값이 104 µg/ml을 보여 약한 항균활성을 보였다. Zearalenone과 비교할 때 8'-hydroxyzearalenone은 벼·도열병균인 *M. grisea*균을 제외하고는 나머지 식물병원균들에 대한 IC<sub>50</sub>값이 200 µg/ml 이상으로 나타나 항진균활성이 매우 약했다. Zearalenone과 8'-hydroxyzearalenone은 구조적으로 8'번 탄소에 hydroxyl기의 존재 여부 차이밖에 없으므로 lactone구조내의 8'번 탄소에 hydroxyl기가 없는 것이 항진균활성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 한편 저자들이 아는 한 지금까지 zearalenone 및 유도체들에 대한 항진균활성 및 항세균활성은 보고된 적이 없어 본 보고에서 이들에 대한 항진균활성을 처음으로 보고하는 바이다.

**In vivo 항균활성**

분리된 3개 물질에 대하여 6가지 식물병에 대한 접종 1일 전 예방효과를 조사한 결과 equisetin은 in vivo assay에서 토마토·잿빛곰팡이병과 토마토·역병에 특히 방제효과가 컸으며, 벼·잎집무늬마름병과 밀·붉은녹병에도 예방효과를 보였다(Table 2). *B. cinerea*균에 의해 발생되는 토마토·잿빛곰팡이병과 *P. infestans*균에 의해 발생하는 토마토·역병에 대해서는 500 µg/ml 수준에서도 95% 이상의 높은 방제효과를 나타냈다. Fig. 3은 equisetin의 토마토·역병에 대

Table 2. *In vivo* antifungal activities of equisetin, zearalenone, and 8'-hydroxyzearalenone against various fungal pathogens<sup>a</sup>

Compound	Conc (µg/mL)	Control value (%) <sup>b</sup>					
		RCB <sup>c</sup>	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
Equisetin	1000	0	40	98	99	27	0
	500	0	40	95	95	20	0
	250	0	30	65	63	3	0
Zearalenone	1000	72	90	70	88	53	0
	500	17	70	0	69	53	17
	250	17	60	10	63	0	0
8'-Hydroxyzearalenone	1000	0	0	65	13	0	0
	500	0	0	0	13	0	17
	250	0	0	10	0	0	0
Blasticidin S	50	100	- <sup>d</sup>	-	-	-	-
Validamycin	50	-	100	-	-	-	-
Procyimdone	50	-	-	100	-	-	-
Dimethomorph	10	-	-	-	78	-	-
Benomyl	100	-	-	-	-	100	-
Flusilazole	10	-	-	-	-	-	100

The plant seedlings were inoculated with spores or mycelial suspensions of the test organisms 1 day after the chemical solutions were sprayed to run-off on the leaves. <sup>b</sup>Control value(%) = 100 × {disease severity of untreated plants - disease severity of treated plants} ÷ disease severity of untreated plants. <sup>c</sup>RCB = rice blast; RSB = rice sheath blight; TGM = tomato gray mold; TLB = tomato late blight; WLR = wheat leaf rust; BPM = barley powdery mildew. Not tested.

한 예방효과를 보여주는 것으로서 1000 µg/ml과 500 µg/ml을 처리하였을 경우에는 토마토에 병징이 거의 발생하지 않고 건전한 것에 비하여 대조구는 병징이 심각하게 발생한 것을 알 수 있다.

한편 흥미로운 사실은 equisetin은 *in vitro*에서는 *P. infestans*의 균사 생육저해 활성은 다른 식물병원균보다 높지 않음에도 불구하고 *in vivo*에서는 토마토·역병에 대한 예방효과가 컸다. 이에 반하여, 벼·도열병의 경우 *in vitro*에서는 *M. grisea*균의 생육저해 효과는 비교적 높았으나, *in vivo*에서는 거의 예방효과가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 *in vivo*에서는 식물병원균의 균사생육 저해활성 뿐만 아니라 포자 부착에 대한 활성, 포자 발아에 대한 활성 및 기주에서 병저항성 유도활성 등도 중요하게 작용하기 때문인 것으로 추정된다.

Zearalenone과 8'-hydroxyzearalenone도 6가지 식물병에 대하여 접종 1일전에 약제를 처리하여 예방효과를 조사하였다. 그 결과 *in vitro* 균사생육저해 활성과 마찬가지로 zearalenone은 8'-hydroxyzearalenone에 비하여 전반적으로 높은 예방효과를 보였다. Zearalenone은 1000 µg/ml에서 벼·도열병, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·갯빛곰팡이병 및 토마토·역병에 대하여 70% 이상의 방제효과를 나타내었다(Table

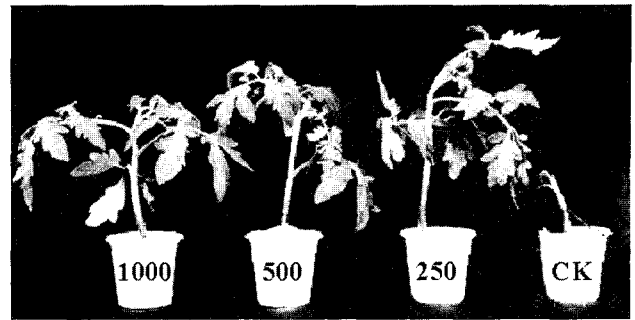


Fig. 3. *In vivo* antifungal activity of equisetin isolated from *F. equiseti* FO-68 against tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*. The plant seedlings were inoculated with zoospores of *P. infestans* 1 day after the chemical solutions (1000, 500, and 250 µg/ml) were sprayed to run-off on the leaves.

2). 그리고 밀·붉은녹병에 대해서도 어느 정도의 예방효과를 보였다. Fig. 4는 벼·잎집무늬마름병에 대한 zearalenone의 처리 농도별 방제효과를 나타낸 것으로서 대조구에서는 심한 병징이 발생하였지만 zearalenone의 농도가 증가하면서 병징이 감소하는 것을 보여준다. 한편, 8'-hydroxyzearalenone은 실험한 6가지 식물병에 대하여 거의 방제효과를 나타내지 않았고, 다만 1000 µg/ml 수준에서 토마토·갯빛곰팡이병에 대하여 약 65%의 예방효과를 보였다.

저자들이 아는 한 equisetin과 zearalenone 및 8'-hydroxyzearalenone의 항진균활성은 본 논문에서 처음으로 보고한다. 일반적으로 천연물질은 농약의 개발에 있어 직접 신농약이나, 선도물질로서 이용되거나 아니면 새로운 작용기작의 제공을 통한 신물질 탐색에 기여하기도 한다. 이러한 측면에서 볼 때 equisetin과 zearalenone 및 8'-hydroxyzearalenone

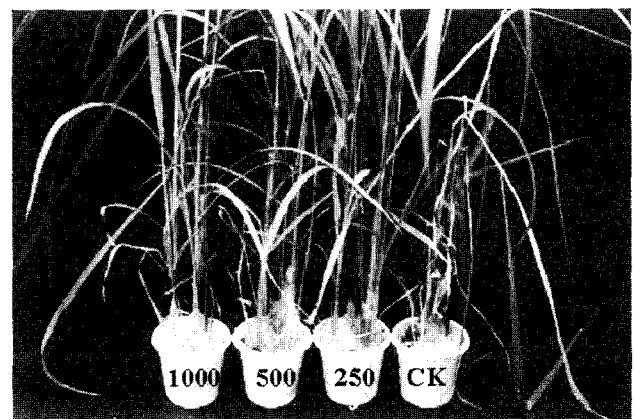


Fig. 4. *In vivo* antifungal activity of zearalenone isolated from *Fusarium* sp. FO-510 against rice sheath blight caused by *Cortium sasakii*. The plant seedlings were inoculated with mycelial suspensions of *C. sasakii* 1 day after the chemical solutions (1000, 500, and 250 µg/ml) were sprayed to run-off on the leaves and stems.

은 인축에 독성을 일으키는 진균독소로 알려져 있고 또한 구조적으로 비교적 복잡함으로 신농약의 선도물질로서 이용되는 것은 어려움이 있다고 사료된다. 다만 이들 물질들의 곰팡이에 대한 작용기전을 규명하여 새로운 작용부위가 발견된다면 새로운 검정법을 개발하여 이를 통한 보다 구조가 간단하면서도 효과가 우수한 새로운 천연물질 및 합성화학물의 개발에 기여할 수 있으리라 사료된다.

## 요 약

가지에서 분리한 *F. equiseti* FO-68균주와 벼풀에서 분리한 *Fusarium* sp. FO-510균주로부터 항균물질을 분리한 후 이들의 식물병원곰팡이에 대한 항균활성을 *in vitro* 및 *in vivo*에서 조사하였다. FO-68균주의 쌀배양체로부터 하나의 항생물질을 순화하였는데, 이 물질은 equisetin이라는 물질로 동정되었다. 그리고 FO-510균주의 쌀배양체로부터는 두 개의 항균활성 물질을 분리하였는데, 이들은 zearalenone과 8'-hydroxyzearalenone으로 동정되었다. Equisetin과 zearalenone은 *in vitro*에서 실험한 식물병원곰팡이 대부분에 대해서 높은 항균활성을 보였지만, 8'-hydroxyzearalenone은 거의 항균활성이 없었다. *In vivo* assay에서 equisetin은 토마토·잰빛곰팡이병과 토마토·역병에 방제효과가 컸으며, zearalenone은 벼·도열병, 벼·잎집무늬마름병, 토마토·잰빛곰팡이병 및 토마토·역병에 대하여 효과를 나타내었다. 하지만 8'-hydroxyzearalenone은 토마토·잰빛곰팡이병을 제외한 나머지 식물병의 발생은 억제하지 못했다. Equisetin, zearalenone 및 8'-hydroxyzearalenone의 항진균활성은 본 논문에서 처음으로 보고하는 바이다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich, and G. Schramm. 1977. The strobilurins-new antifungal antibiotics from the Basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot.* **30**: 806-810.
- Burmeister, H. R., G. A. Bennett, R. F. Vesonder, and W. Hesseltine. 1974. Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **5**: 634-639.
- De Clercq, E. 2000. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med. Res. Rev.* **20**: 323-349.
- Dhiangra, O. D. and J. B. Sinclair. 1986. Chemical control, pp 227-243, *In Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Godwin, J. R., V. M. Anthony, J. M. Clough, and C. R. A. Godfrey. 1992. ICIA5504: a novel, broadspectrum, systemic  $\beta$ -methoxyacrylate fungicide. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases* **1**: 435-442.
- Gold, R. E. and G. M. Leinhos. 1995. Fungicidal effects BASF490F on the development and fine structures of plant pathogenic fungi. *Pestic. Sci.* **43**: 250-253.
- Handy, S. T., D. Omune, and G. Menon. 2001. HIV integrase inhibition: dihydroxynaphthalene analogs of equisetin. *Abstracts of Papers, 222nd ACS National Meeting*, Chicago, IL, USA.
- Handy, S. T. and K. Chang. 2000. Simplified analogs of equisetin: Potential new HIV integrase inhibitors. *Abstracts of Papers, 219th ACS National Meeting*, San Francisco, CA, USA.
- Hazuda, D., C. U. Blau, P. Felock, J. Hastings, B. Pramanik, A. Wolfe, F. Bushman, C. Farnet, M. Goetz, M. Williams, K. Silverman, R. Lingham, and S. Shingh. 1999. Isolation and characterization of novel human immunodeficiency virus integrase inhibitors from fungal metabolites. *Antiviral Chem. and Chemother.* **10**: 63-70.
- Jackson, R. A., S. W. Fenton, C. J. Mirocha, and G. Davis. 1974. Characterization of two isomers of 8'-hydroxyzearalenone and other derivatives of zearalenone. *J. Agr. Food Chem.* **22**: 1015-1019.
- Kim, H.-J., J.-C. Kim, B. S. Kim, H. G. Kim, and K. Y. Cho. 1999. Antibiotic and phytotoxic activities of ophiobolins from *Helminthosporium* species. *Plant Pathol. J.* **15**: 14-20.
- Kim, J.-C., G. J. Choi, J.-H. Park, H. T. Kim, and K. Y. Cho. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag. Sci.* **57**: 554-559.
- Kim, J.-C., H.-J. Kang, D.-H. Lee, Y.-W. Lee, and T. Yoshizawa. 1993. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins(trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3798-3802.
- Kim, J.-C. and Y.-W. Lee. 1994. Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4380-4386.
- Koenig, T., A. Kapus, and B. Sarkadi. 1993. Effects of equisetin on rat liver mitochondria: evidence for substrate anion carriers of the inner membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 537-545.
- Mirocha, C. J., S. V. Pathre, and C. M. Christensen. 1977. Zearalenone, pp.345-364, *In* J. V. Rodricks, H. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman(eds), *Mycotoxins in human and animal health*, Pathotox. Publishers, Inc., Park Forest, IL., USA.
- Mizutani, A., H. Yukioka, H. Tamura, N. Mik, M. Masuko, and R. Takeda. 1995. Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyiminoacetamide fungicide. *Phytopathology* **85**: 306-311.
- Musilek, V., J. Cerna, V. Sasek, M. Semerdzieva, and M. Vondracek. 1969. Antifungal antibiotic of the Basidiomycete *Oudemansiella mucida*. *Folia Microbiol.(Praque)* **14**: 377-

- 387.
9. Park, J.-H. J.-C. Kim, G. J. Choi, H. T. Kim, K. S. Hong, C. Song, J. S. Kim, J. G. Kim, and K. Y. Cho. 2000. Biological activities of *Fusarium* isolates from soil and plants. *Kor. J. Pestic. Sci.* **4**: 19-26.
10. Phillips, N. J., J. T. Goodwin, A. Fraiman, R. J. Cole, and D. G. Lynn. 1989. Characterization of the *Fusarium* toxin equisetin: the use of phenylboronates in structure assignment. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 8223-8231.
11. Sugie, Y., S. Inaki, Y. Kato, H. Nishida, C.-H. Pang, T. Saito, S. Sakemi, F. Dib-Hajj, J. P. Mueller, J. Sutcliffe, and Y. Kojima. 2002. CJ-21,058, a new SecA inhibitor isolated from a fungus. *J. Antibiot.* **55**: 25-29.
22. Vesonder, R. F. and P. Golinski. 1989. Metabolites of *Fusarium*, pp. 1-39. In Chelkowski, J.(ed), *Fusarium mycotoxins, taxonomy, and pathogenicity*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
23. Wheeler, M. H., R. D. Stipanovic, and L. S. Puckhaber. 1999. Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. *Mycological Research* **103**: 967-973.
24. Yuki, K., N. Satoyoshi, M. Shindo, and K. Shishido. 1999. Synthetic studies on fungal metabolites with HIV-I integrase inhibitory activity. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **41**: 295-300.

(Received July 23, 2002/Accepted Sep. 11, 2002)