식물병연구
Res. Plant Dis. 16(3) : 259-265 (2010)
DOI: 10.5423/RPD.2010.16.3.259

Research in Plant Disease
©The Korean Society of Plant Pathology

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*) 균사체 추출물 제제 PLM-WE1의 식물 바이러스에 대한 감염억제 효과 및 활성성분의 동정

권순배* · 배선화[1] · 최장경[1] · 이상용[2] · 김병섭[3] · 권용수[4]
강원도농업기술원, [1]강원대학교 농생물학과, [2]강원대학교 산림환경보호학과,
[3]강릉원주대학교 식물생명과학과, [4]강원대학교 약학과

Inhibitory Effects of PLM-WE1 Formulated from Extract of *Phellinus linteus* Mycelium against Plant Viruses Infection and Identification of Active Compound

Soon-Bae Kwon*, Seon-Hwa Bae[1], Jang-Kyung Choi[1], Sang-Yong Lee[2], Byung-Sup Kim[3] and Yong-Soo Kwon[4]

Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Chunchon 200-150, Korea
[1]Department of Applied Biology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[2]Department of Forest Environment Protection, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[3]Department of Plant Life Sciences, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea
[4]Department of Pharmaceutical Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-150, Korea
(Received on September 27, 2010; Accepted on October 5, 2010)

***Pepper mild mosaic virus*(PMMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV) are important pathogens in various vegetable crops worldwide. We have found that hot water extract of *Phellinus linteus* mycelium strongly inhibit PMMoV and CMV infection. Based on these results, the inhibitor named as 'PLM-WE1' formulated from extract of *Phellinus linteus* mycelium was tested for its inhibitory effects on PMMoV and CMV infection to each local lesion host plant (*Nicotiana glutinosa*: PMMoV, *Chenopodium amaranticolor*: CMV). Pretreatment effect of PLM-WE1 against infections of each virus (PMMoV and CMV) to local host plant was measured to be 99.2% to PMMoV and 80.3% to CMV, and its permeability effect was measured to be 45.0% to PMMoV and 41.9% to CMV. Duration of inhibitory activity of PLM-WE1 against PMMoV infection on *N. glutinosa* was maintained for 3 days at 75% inhibition level and CMV infection on *C. amaranticolor* maintained for 3 days at 62% inhibition level. Inhibitory effects on systemic host plants of PLM-WE1 were measured to be 75~85% to PMMoV and 75% to CMV. Under electron microscope, PMMoV particles were not denatured or aggregated by mixing PLM-WE1. It is suggested that the mode of action of PLM-WE1 differ from that of inactivation due to the aggregation of viruses. The methanol extract of *P. linteus* mycelium was sequentially partitioned with haxane, ethyl acetate, BuOH and H_2O. The H_2O fraction was showed high activity than the other fractions. The active compound was isolated with a partial acid hydrolysis, fractional precipitation with ethanol. The inhibitory effect of the precipitate isolated from 70% ethanol fraction was 99.1% to PMMoV and 88.0% to CMV. The structure of isolated compound was determined by ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR. This compound was identified as a polysaccharide consisting alpha or beta-glucan.**

***Keywords*: *Cucumber mosaic virus*, Extract, Inhibitory effects, *Pepper mild mosaic virus*, *Phellinus linteus* mycelium**

Johnson(1941)은 *Aspergillus niger* 및 *Aerobacter aerogenes*의 배양액 중에 *Tobacco mosaic virus* (TMV)의 감염저해 물질이 함유된 것을 처음 보고하였으며, Gupta와 Price(1950)는 49종의 균류 배양여액에서 식물바이러스 감염억제효과를 조사한 결과, 약 84%가 TMV 및 S*outhern bean mosaic virus* (SBMV)의 감염 저해물질을 포함한다는 것

*Corresponding author
Phone) +82-33-610-8751, Fax) +82-33-648-2523
Email) snbkwon@korea.kr

을 보고하였다. Bawden과 Freeman(1952)은 이들 중 가장 높은 저해작용을 보인 *Trichothecium roseum*과 *Neurospora sitophila*의 배양액에는 바이러스의 감염을 억제하는 2종류의 내열성물질이 포함되어 있고, 그것은 항생물질 trichothecin과 D-galactose가 주성분인 다당질이라는 것을 보고하였다. 한편 세균이 생산하는 항생물질이 식물바이러스의 감염을 저해한다는 것을 처음 보고한 Leben과 Fulton(1952)은 streptothricin과 terramycin이 *Tobacco necrosis virus* (TNV)나 *Tobacco ringspot virus* (TRSV)의 감염으로 형성되는 괴사반점의 진행을 저지한다고 하였다. 또한 Hirai와 Shimomura(1965)는 방선균인 *Streptomyces griseochromogenes*로부터 분리하여 벼 도열병의 치료제로 사용되고 있는 blasticidin S을 TMV를 접종한 담배에 처리하면 바이러스의 증식억제 효과가 있지만 약해가 있다는 것을 보고하였는데, 이 작용이 TMV-RNA의 합성을 저해하기 때문인 것으로 해석하였다. 김 등(2006)은 방선균 *Acinetobacter* sp.의 배양여과액의 분말제제가 수종의 식물바이러스에 대하여 감염억제 효과를 나타내는 것으로 보고하였다. 한편, 일본에서는 고등균류에 속하는 표고버섯(*Lentinula edodes*) 균사체 추출물을 주성분으로 하는 토마토, 피망의 TMV 감염억제제가 생물농약으로 등록되어 있다(Nagai, 1981).

본 연구는 항암활성(Choi 등, 1996; Han 등, 1999), 항종양활성(Ikekawa 등, 1968), 면역활성(Song 등, 1995) 등의 다양한 생리학적 활성을 갖고 있는 것으로 알려진 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*) 균사체 추출물의 *Pepper mild mottle virus*와 *Cucumber mosaic virus*에 대한 감염억제 효과와 그 활성성분을 구명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 항바이러스 활성 검정 시료 조제. 식물바이러스에 대한 감염억제효과를 검정하기 위하여 강원도농업기술원 보유균주 *P. linteus*(GWM40909)를 사용하였다. 균의 배양은 MYA(malt yeast agar)를 기본배지로 하여, 통기량 2.0 vvm의 조건에서 20일간 액체배양을 하였다(이 등, 2004). 배양 후 100 mesh의 체를 이용하여 균사체만을 분리하고, 40°C의 열풍건조기에서 건조시킨 균사체의 분말 100 g에 증류수 3리터를 넣고 수욕상에서 95°C로 24시간 열수 추출하여 여과, 농축 후 계면활성제 및 증량제 등과 혼합하여 분말의 제제를 만들고, 이를 PLM-WE1로 명명하여 본 시험의 활성검정용 시료로 공시하였다.

바이러스 접종원. 바이러스는 *Pepper mild mottle virus* (PMMoV)와 *Cucumber mosaic virus* (CMV)를 공시하였다. PMMoV는 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun에 접종하여 유지하였으며, CMV는 *N. tabacum* cv. Samsun NN에서 계대배양하면서 이용하였다. 항바이러스 활성검정시의 바이러스 접종원으로 0.1 g의 바이러스 이병엽에 10 mM 인산완충액(pH 7.0) 100 m*l*을 넣고 막자사발로 곱게 간 희석액을 사용하였다.

국부감염 기주에서의 감염억제효과의 검정. *P. linteus* 균사체 열수추출물 또는 제형화한 PLM-WE1의 PMMoV에 대한 감염억제율은 이 바이러스의 국부감염기주인 *N. glutinosa*를 사용하여 반엽법(Wyatt와 Shepherd, 1969)으로 검정하였다. 먼저, *P. linteus* 균사체 열수추출물이 바이러스에 직접적으로 작용하여 병반형성억제효과를 갖는지를 검정하기 위하여 PMMoV에 전신감염된 이병엽의 착즙액에 *P. linteus* 균사체 열수추출물의 분말을 일정농도별로 혼합하여 즙액접종한 국부감염기주에서의 억제효과를 조사하였다. 이어서, PLM-WE1제제의 식물체 잎에 대한 부착성, 안정성을 조사하기 위한 전처리효과 실험으로, *N. glutinosa* 성엽의 반쪽엽에 소정농도의 PLM-WE1 희석액을 붓을 이용하여 바르고 나머지 반엽에는 증류수를 처리한 후, 일정시간이 경과된 후에 동일한 잎의 표면에 바이러스 접종원으로서 조제한 PMMoV 희석액에 0.1% carborundum을 혼합하여 면봉으로 즙액접종하였다. 접종 3~5일이 경과된 후에 각 반엽에 형성된 병반 수를 비교하였다. 국부감염기주에서의 바이러스 감염억제율은 다음의 식으로 산정하였다. 감염억제율(%) = 무처리구의 병반수 – 처리구 병반수/무처리구 병반수 × 100. CMV의 감염억제율은 이 바이러스의 국부감염기주인 *C. amalanticolar*에서 위와 동일한 방법으로 수행하였다. 또한, 식물체 잎 조직의 내부로 PLM-WE1제제의 항바이러스 활성 성분이 침투효과가 있는지를 알아보기 위하여 제제를 5, 3, 2, 1 mg/m*l* 농도별로 희석하여 검정식물(*N. glutinosa* 및 *C. amalanticolar*)의 잎 뒷면 반엽에 도포하고, 3시간 경과 후에 동일한 잎의 앞면 반엽에 바이러스를 접종하여 그 병반의 수를 비교하여 제제의 침투성을 평가하였다. 또한, PLM-WE1 제제의 약효지속효과 검정을 위해 *N. glutinosa* 및 *C. amalanticolar*에 분무처리하고, 1시간, 1일, 3일, 5일 및 7일 후에 바이러스를 즙액접종하여 감염억제효과의 지속성을 평가하였다.

전신감염 기주에서의 감염억제효과. PMMoV 전신감염 기주인 *N. tabacum*. cv Samsun과 CMV의 전신감염기주인 *N. tabacum*. cv Samsun NN을 이용하였으며 온실조건에서 5주간 생육시킨 4~5엽기의 유묘를 사용하였다. PLM-WE1 제제는 증류수에 250배로 희석하여 Samsun

및 Samsun NN 담배 20주씩에 200 m*l*씩 분무살포하였다. 3시간 후, 미리 준비한 PMMoV 접종원을 Samsun 담배 20주에 각 식물체마다 2엽씩 즙액접종하였으며, CMV 접종원은 Samsun 담배 20주에 즙액접종하였다. 전신감염 여부는 접종 4주 후 DAS-ELISA로 검정하였다.

전자현미경 관찰. PLM-WE1 제제의 처리에 의한 바이러스 감염억제작용의 기작을 해석하기 위하여 정제한 PMMoV에 제제를 처리하여 바이러스 입자의 형태적 변화를 전자현미경으로 관찰하였다. PMMoV의 정제는 Kwon 등의 방법(1994)을 따랐다.

전자현미경 관찰을 위한 시료는 다음과 같이 제작하였다. 100 μg/m*l* 농도의 PMMoV액에 증류수로 100배 희석한 PLM-WE1액을 1:1(V/V)로 혼합하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 무처리 바이러스는 증류수에 희석하여 사용하였다. 전자현미경 관찰은 각각의 무처리 및 처리시료를 2% phosphotungstic acid (PTA, pH 6.8)로 역염색하여 투과전자현미경(Carl Zeiss, TEM 109, 80 kv)으로 관찰하였다.

목질진흙버섯 균사체 추출물의 용매분획물로부터 PMMoV 감염억제 성분 분리 및 기기분석. 건조한 균사체 200 g을 MeOH로 추출, 감압농축하여 얻은 추출물 20 g을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O로 순차분획하고 감압농축한 후 동결건조하여 각 유기용매별의 활성검정용 분획물을 조제하였다. 각 분획에 대한 바이러스 감염억제활성은 상기에 서술된 국부병반기주를 이용한 반엽법으로 수행하였다. 또한 고활성 성분의 분리를 위하여 산 가수분해 및 에탄올분별침전법(Fig. 1)을 이용하였다. 즉, 분획물의 PMMoV 감염억제효과시험에서 가장 활성이 높은 aqueous 분획층에 90% formic acid를 가하고, 95°C에서 20분간 중탕하여 부분 가수분해를 하였다. 이어서 에탄올 분별침전법을 이용하여 90, 70, 50, 40, 30, 20%로 순차적으로 분획하였고, 에탄올 농도별로 분리된 각 층의 분획물을 농축, 동결건조시킨 후, 상법에 따라 활성검정을 실시하였다. 고활성 분획층으로부터 단리된 화합물의 구조분석에는 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (600 MHz, Bruker AVANCE)을 이용하였다.

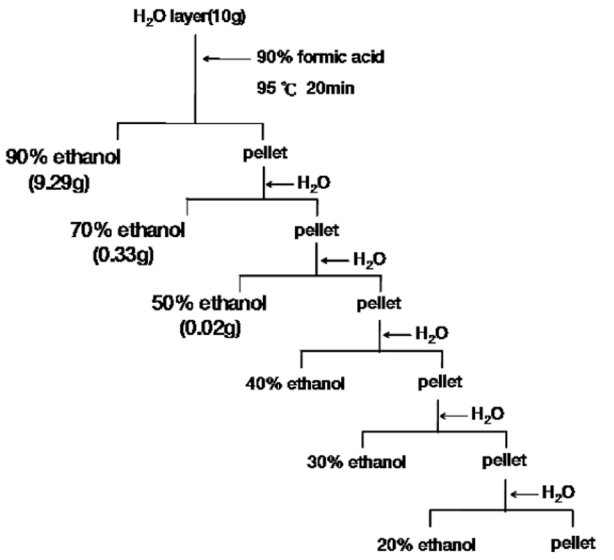

Fig. 1. Partition procedures of high activity fraction from extracts of *Phellinus linteus* mycelium by formic acid hydrolysis and fractional precipitation with ethanol.

결과 및 고찰

국부감염 기주에서의 감염억제효과. 본 실험에 공시한 *P. linteus* 균사체 열수추출물이 PMMoV 및 CMV의 기주식물에서 국부병반 형성 억제에 영향을 미치는지를 검정하기 위하여, PMMoV 이병즙액에 *P. linteus* 균사체 열수추출물 농도가 10 또는 5 mg/m*l*가 되도록 각각 혼합한 액을 *N. glutinosa*에서 반엽법으로 조사한 결과, 10 mg/m*l* 농도에서는 100%, 5 mg/m*l* 농도에서는 98%의 높은 국부병반 형성억제효과를 나타냈다. 위와 동일한 방법으로 CMV를 이용한 *C. amalanticolar*에서의 반엽법 시험에서, *P. linteus* 균사체 열수추출물의 10 mg/m*l* 농도에서는 86%, 5 mg/m*l*에서는 78%의 국부병반 형성억제효과를 보였다. 이 결과를 토대로, *P. linteus* 균사체 열수추출물을 주성분으로 제제화한 PLM-WE1의 식물체에 대한 부착성, 활성성분의 안정성 등을 조사하기 위하여, 제제를 증류수에 농도별로 희석하여 *N. glutinosa* 잎 표면에 도말 처리하고 1~2시간이 경과한 후 PMMoV를 즙액접종하였다. 그 결과 PLM-WE1의 농도 10 mg/m*l*에서 99.2%의 높은 감염억제율을 보였다. 또한 5 mg/m*l*과 3 mg/m*l*의 농도에서도 97.6%, 75.1%의 안정적인 감염억제 효과를 보였으며 1 mg/m*l*의 저농도에서는 33%의 낮은 감염억제효과를 보였다. 본 제제를 *C. amalanticolar* 잎에 도말 처리하고 1~2시간 경과 후에 CMV를 접종시 1 mg/m*l*의 저농도에서는 5%로 매우 낮은 효과를 보였지만 5~10 mg/m*l*의 농도에서는 78.8~80.3%로 안정적인 감염억제효과가 유지되었다(Table 1). 이 결과는 식물바이러스에 대하여 높은 억제효과를 나타낸 *Acinetobacter* sp. KTB의 배양여과액으로부터 제제화한 KNF2022(Kim 등, 2004; 김 등, 2006)의 효과와 비교하였을 때, PMMoV에 대하여는 PLM-WE1제제가 매우 높은 감염억제효과를 보인 반면, CMV에 대하여는 약간 낮았지만, 5 mg/m*l*의 처리농도에서도 78.8%의 억제효과를 보여 다양한 식물바이러스의 감염에 대한 억

Table 1. Pretreatment effect of PLM-WE1 against infections of *Pepper mild mosaic virus* (PMMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV)

Viruses	Concentration of PLM-WE1 (mg/m*l*)	No. of local lesions on 3 half-leaves[a]		Inhibition (%)[c]
		Control	Treatment[b]	
Pepper mild mosaic virus	10	136	1	99.2
	5	140	2	97.6
	3	171	43	75.1
	2	158	49	68.9
	1	146	97	33.0
Cucumber mosaic virus	10	254	50	80.3
	5	264	58	78.1
	3	264	134	49.2
	2	200	121	39.5
	1	156	148	5.0

[a]Total number of local lesions induced on 3 half-leaves of *Nicotiana glutinosa* (PMMoV local lesion host) and *Chenopodium amaranticolor* (CMV local lesion host).
[b]Diluted PLM-WE1 was applied 1 h prior to mechanical inoculation of each virus to host plant.
[c]Inhibition % = (1 − No. of local lesions on treatment/No. of lesions on control) × 100.

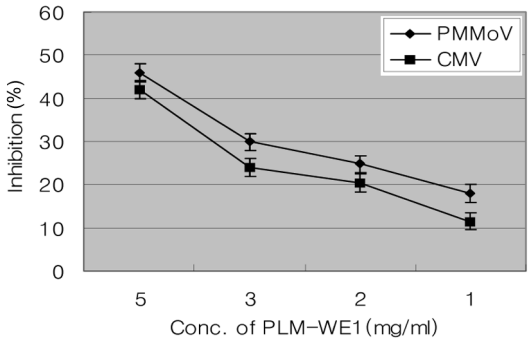

Fig. 2. Permeability effect of PLM-WE1 against PMMoV and CMV, respectively. Dilutions of PLM-WE1 were applied on the backside of half leaf of host plants (*Nicotiana glutinosa* or *Chenopodium amaranticolor*) and the viruses (PMMoV or CMV) were inoculated on the upside of leaves, respectively. Each point represents the mean of three trials and the vertical bars indicate SE ranges.

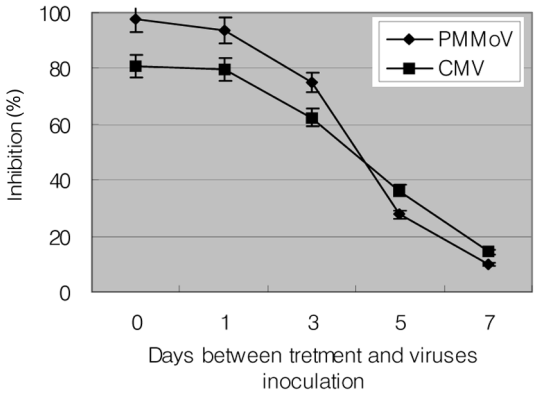

Fig. 3. Duration of inhibitory activity of PLM-WE1 against PMMoV and CMV infection on *Nicotiana glutinosa* and *Chenopodium amaranticolor* leaves, respectively. Each point represents the mean of three trials and the vertical bars indicate SE ranges.

제물질로서의 개발 가능성을 보였다.

PLM-WE1 제제의 항바이러스 활성성분이 식물체 엽조직에 흡수, 이행되거나 식물 조직 내에 영향을 미침으로서 감염저해효과를 나타내는지를 검정하기 위해 제제를 농도별로 희석하여 *N. glutinosa*의 잎 뒷면 반엽에 도말하고 음건시킨 후 잎의 앞면에 PMMoV를 접종하였다. 그 결과 1 mg/m*l*의 저농도에서는 18.0%의 감염억제효과를 나타냈으나 5 mg/m*l*에서는 45.0%의 감염억제효과를 보였으며. 상기와 같은 방법으로 *C. amalanticolar* 잎의 이면에 처리하여 음건시킨 후 CMV를 잎의 앞면에 접종한 경우도 1 mg/m*l*의 저농도에서는 10.6%, 5 mg/m*l*의 고농도에서는 41.9%의 감염억제효과가 관찰되어, PLM-WE1제제는 식물체의 잎 조직에서 일부 흡수효과가 있음이 확인되었다(Fig. 2). 또한, PMMoV - *N. glutinosa* 및 CMV - *C. amalanticolar* 검정조합을 이용하여 PLM-WE1의 바이러스 감염억제 지속효과를 검정하였다. 즉 각각의 검정식물체 잎의 반엽에 PLM-WE1 희석액을 도말하고 일정시간 경과 후, 각 조합의 바이러스를 접종하여, 시간의 경과에 따른 억제효과의 지속효과를 증류수 처리 반엽에 형성된 병반 수와 비교하였다. 그 결과 처리 3일 후까지는 PMMoV 75%, CMV 62% 이상의 수준으로 감염억제효과를 나타냈으나, 처리 5일에는 PMMoV 36%, CMV 27% 이하로 저하되었다(Fig. 3). 이 결과는 균류의 추출물에서 나타난 지속성의 특성(Tagaki, 1978; Kim 등, 2004)과 유사한 효과를 보였으나, 처리 3일 후부터 20% 수준으로 급격하게 저하되는 고등식물 즙액의 감염억제 지속효과(Kalo와 Taniguchi, 1987)와는 다른 성질을 보임으로써, *P. linteus* 균사체의 추출물을 주성분으로 하는 PLM-WE1은 감염억제 성분에서 차이가 있는 것으로 해석되었다.

전신감염기주에서의 감염 억제 효과. PLM-WE1의 PMMoV 및 CMV 전신감염기주식물에 대한 감염억제효과를 유리온실에서 포트시험으로 검정하였다. 2회의 반복시험에서 PLM-WE1의 PMMoV 방제효과는 75~85%, CMV 75%이었으며, 시판 탈지분유(skim milk)의 PMMoV 방제효과 35%, CMV 45%보다는 우수하였다(Table 2). 이

Table 2. Systemic inhibitory effects of PLM-WE1 against PMMoV and CMV infection on the host plants, respectively

Treatment[a]	No. plants infected/inoculated[b]			
	PMMoV		CMV	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
PLM-WE1[a]	3/20[c]	5/20	5/20	5/20
Skim milk	13/20	-	11/20	-
Water (control)	20/20	20/20	20/20	20/20

[a]Experiments were repeated twice with 20 replicate seedlings for each treatment of PLM-WE1(conc. 4 mg/m*l*) and skim milk(conc. 100 mg/m*l*).
[b]Five- to six week old tobacco seedlings (Samsun and Samsun NN) were sprayed with treatment indicated (200 m*l*/20 pots).
[c]Each inoculum was rubbed onto 2 leaves of each plant 3 h after treatment. Infection was confirmed 4 weeks after inoculation by ELISA.

결과는 일본에서 표고버섯 균사체 추출물을 주성분으로 하는 생물농약 LENTEMIN의 피망에서의 PMMoV 감염억제(Oka 등, 2008)와 유사한 효과를 보였다. 담배에서 250배로 희석한 PLM-WE1의 경엽살포로 인한 약해 및 생육억제는 관찰되지 않았다.

PLM-WE1이 바이러스 입자에 미치는 영향. PMMoV 정제액에 PLM-WE1를 혼합하여 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 처리하여 전자현미경으로 관찰하였다. PLM-WE1로 처리된 바이러스 입자의 형태적 변화는 무처리한 PMMoV입자의 형태와 마찬가지로 입자변성이 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이 결과로 PLM-WE1은 PMMoV입자를 응집(aggregation) 또는 분해(disassembly) 시키는 능력은 없음을 알 수가 있었다. 식물바이러스에 대하여 감염억제제로 알려진 Poly-L-lysine, Mozanon 및 Lentemin(Burger와 Stahman, 1951; Kubo와 Tomaru, 1973; Maeda, 1981)은 모두 바이러스 입자를 응집시키는 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 이러한 작용기작에 의하여 바이러스가 불활성화된다고 하였다. 그러나, Hiramatsu 등(1987)이 보고한 표고버섯 자실체 유래의 물질(FBP)은 TMV의 감염

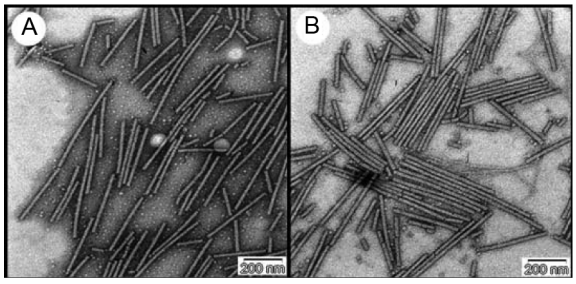

Fig. 4. Electron micrographs of PMMoV particles in the absence (**A**) or presence (**B**) of PLM-WE1.

억제에 효과가 있으나, 이 물질은 바이러스입자를 응집, 변성시키는 능력은 없다고 하였다. 바이러스의 형태적 변화에 미치는 PLM-WE1의 감염억제의 작용기작은 FBP와 유사한 특징이 있음을 알 수가 있었다.

목질진흙버섯 균사체로부터 식물바이러스 감염억제 성분의 분리 및 구조 동정. 식물바이러스에 대한 감염억제 성분의 분리를 위하여 건조한 균사체 200 g을 MeOH로 추출, 감압농축하여 얻은 추출물 20 g을 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 H_2O로 순차분획하고 감압농축한 후 동결건조하여 *n*-hexane 분획(0.6 g), EtOAc(2.4 g), BuOH (3.6 g) 및 H_2O 분획(12.0 g)을 얻었다. 수득된 각 분획물의 PMMoV와 CMV에 대한 감염억제활성을 상기의 국부병반기주에서의 반엽법의 검정방법으로 실시한 결과, 5 mg/m*l* 처리농도의 *n*-hexane, EtOAc 및 BuOH 분획물의 PMMoV와 CMV 감염억제활성은 21.2~45.0%수준으로 매우 낮았으나, H_2O 분획물은 PMMoV에 대하여 98% 그리고 CMV에 대하여 92.5%의 높은 감염억제효과를 나타냈다(데이터는 제시하지 않음). H_2O 분획물에 함유된 고활성 물질을 분리하기 위하여, 분획물 10 g에 90% formic acid를 이용하여 부분 산 가수분해를 한 후 에탄올을 이용한 분별침전법을 실시하였다. 그 결과, 90% 분획층에서 9.29 g, 70% 분획층에서 0.33 g, 50% 분획층에서 0.02 g을 얻었으며 40% 이하의 분획층에서는 분획물을 수득할 수가 없었다(Fig. 1). 90%, 70% 및 50% 분획물에 대한 PMMoV 감염억제효과를 검정한 결과, 그 억제율은 15.0, 99.1 및 100%이었고, CMV의 감염억제효과는 28.8, 88.0%

Table 3. Inhibitory effects of fractions separated with ethanol from aqueous layer of the extract of *Phellinus linteus* mycellium against *Pepper mild mosaic virus* (PMMoV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) infection

Viruses	Fractions	No. of local lesions on 3 half-leaves[a]		Inhibition (%)[c]
		Control	Treatment[b]	
Pepper mild mosaic virus	90% ethanol	132	112	15.0
	70% ethanol	111	1	99.1
	50% ethanol	148	0	100
Cucumber mosaic virus	90% ethanol	125	89	28.8
	70% ethanol	134	21	88.0
	50% ethanol	141	45	85.1

[a]Total number of local lesions induced on 3 half-leaves of *Nicotiana glutinosa* (PMMoV local lesion host) and *Chenopodium amaranticolor* (CMV local lesion host).
[b]Sample (conc. 5 mg/m*l*) from each fractions was applied 2 h prior to mechanical inoculation of each virus to host plant.
[c]Inhibition % = (1 − No. of local lesions on tretment/No. of lesions on control) × 100.

및 85.1% 순으로 에탄올 70% 및 50% 분획층에서 각각 PMMoV 및 CMV의 감염억제활성이 가장 높았다(Table 3). 이들 고활성 분획층 중에서 수득량이 많은 70% 분획층을 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (600 MHz, Gemini 200, Varian)을 이용하여 분석한 결과, α- 또는 β-glucan이 결합된 다당류(polysaccharide)임을 확인할 수 있었다(데이터는 제시하지 않음).

결론적으로, 목질진흙버섯 균사체 추출물은 PMMoV 및 CMV에 대하여 높은 감염억제 효과가 있음을 본 실험의 결과로 알 수 있었으며, 실제 포장에서 이 추출물을 이용하여 식물바이러스병을 방제한다면 여러 작물의 바이러스병의 예방에 적용이 가능하리라고 생각된다. 앞으로 본 실험에 이용된 담배와 명아주 이외에 다른 작물에 대한 적용 확대시험이 추가적으로 요구되며, 또한 식물바이러스에 대하여 감염억제활성 성분으로 밝혀진 α- 또는 β-glucan이 결합된 다당류(polysaccharide)와 그 작용기작 구명 등 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)을 액체 배양한 균사체의 열수 추출물을 이용하여 PMMoV 및 CMV에 대한 감염억제효과를 검정한 결과, PMMoV 및 CMV에 높은 감염억제효과가 발견되었다. 이 결과를 토대로, *P. linteus* 균사체의 열수추출물을 주성분으로 제제화한 PLM-WE1의 효능 평가를 위하여, PMMoV 및 CMV의 국부감염 기주식물에서 PLM-WE1의 바이러스 접종전 처리효과, 엽이면 처리시의 감염억제효과 및 PLM-WE1의 지속효과 실험을 수행하였다. 그 결과, PLM-WE1(처리농도 10 mg/m*l*)의 바이러스 접종전 처리시의 감염억제율은 PMMoV 99.2%와 CMV 80.3%이었으며, 본 제제(농도 5 mg/m*l*)의 엽이면 처리시의 감염억제율은 PMMoV 45.0%와 CMV 41.9%, 약효지속성은 처리 3일 후까지 PMMoV 75%와 CMV 62% 수준으로 감염억제 효과를 보였다. 바이러스 전신감염기주식물을 이용한 감염억제효과는 PMMoV 75~85%와 CMV 75%이었다. PLM-WE1제제의 바이러스 감염억제 기작을 해석하기 위하여, 정제한 PMMoV에 제제를 혼합하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 바이러스 입자의 형태적 변화는 관찰되지 않아, PLM-WE1의 바이러스 감염억제기작은 바이러스입자의 응집(aggregation) 작용과는 다른 기작에 의한 것임이 추정되었다. 목질진흙버섯 균사체로부터 식물바이러스 감염억제 성분의 분리 및 동정을 위하여 유기용매분획, 산 가수분해 및 에탄올 분별침전을 실시하여 고활성 분획을 수득하였다. 이 분획물을 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR을 이용하여 분석한 결과, α- 또는 β-glucan이 결합된 다당류(polysaccharide)로 확인되었다.

참고문헌

Bald, J. G., Gumpt, D. J. and Heick, J. 1974. Transition from common tobacco mosaic virus to the *Nicotiana glauca* form. *Virology* 59: 467-476.

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.

Burger, W. C. and Stahman, M. A. 1951. The combination of lysine polypeptides with tobacco mosaic virus. *J. Biol. Chem.* 193: 13-22.

Burkhard Lerch. 1987. On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. *Antiviral Research*, 7: 257-270.

Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus. Kor. J. Mycil.* 24: 214-222.

Commoner, B. and Mercer, F. L. 1952. The effect of thiouracil on the rate of tobacco mosaic virus biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 35: 278-288.

Gooding, G. V. 1975. Inactivation of tobacco mosaic virus in tomato seed with trisodium orthophosphate and sodium hypochlorite. *Plant Dis. Reptr.* 59: 770-772.

Gupta, B. M. and Price, W. C. 1950. Production of plant virus inhibitors by fungi. *Phytopatholohy* 40: 642-652.

Gupta, B. M. and Price, W. C. 1952. Mechanisms of inhibition of plant virus infection by fungal growth products. *Phytopathology* 42: 45-51.

Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H. and Kim, H. W. 1999. The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol*. 41: 157-164.

Hirai, T. and Shimomura, T. 1965. Blasticidin S, an effective antibiotic plant virus multiplication. *Phytopathology* 55: 291-295.

Hiramatsu, A., Kobayashi, N. and Osawa, N. 1986. properties of two inhibitors of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes* and from leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb. *Agric. Biol. Chem.* 51: 897-904.

Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus. Gann*. 69: 155-157.

Johnson, J. 1941. Chemical inactivation and the reactivation of plant virus. *Phytopathology* 31: 679-701.

Jordan, M., Apablaza, G. and Lippi, P. 1978. Obtention of PVX and PVY-free potato plants from in virto shoot-tip cultures serologically checked by ELISA test. *Cienc. Invest. Agrar.* 5: 207-211.

Kalo, F. and Taniguchi, T. 1987. Properties of a virus inhibitor

from spinach leaves and mode of action. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 159-167.

Kataoka, M., Noriyuki, D. and Hirai, T. 1969. Effects of antibiotics, inhibitors against protein synthesis on tobacco mosaic virus multiplication and the host metabolism. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35: 329-338.

Kim, Y. S., Hwang, E. I., Kim, K. S., Ryu, M. H. and Yeo, W. H. 2004. Inhibitory of Acinetobacter sp. KTB3 on infection of Tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Plant Pathol. J.* 20: 293-296.

김미순, 정민영, 김윤성, 장철, 황인천, 류기현, 최장경. 2006. *Acinetobacter* sp. 배양여과액 분말제제의 식물바이러스에 대한 감염억제 효과 및 작용. 식물병연구 12: 91-98.

Kubo, S. and Tomaru, K. 1973. アルギン酸製劑のタバコモジャイク病防除効果. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 36: 231. (in Japanese)

Kunkel, L. O. 1936. Heat treatment of yellows and other virus disease of peach. *Phytopathplogy.* 29: 809-830.

Kwon, S. B. and Sako, N. 1994. A new strain of tobacco mosaic virus infecting rakkyo (*Allium chinense G*). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60: 36-44.

Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P. and Tumer, N. E. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a cimmercial potato cultivar : resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/Technology* 8: 127-134.

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

이원호, 김수영, 박영진, 김태웅, 김호경, 성재모. 2004. 목질진흙버섯(Phellinus linteus)의 적합한 균사생장. 한국균학회지 32: 95-100.

Lima, J. A. and Nelson, M. R. 1975. Squash mosaic virus variability; Nonreciprocal cross-protection between strains. *Phytopath*. 65: 837-840.

Maeda, H. 1981. Symposium on plant virus inhibitors of the Japan protection association, Tyoko, Abstracts of papers (November): 5 (in Japanese).

Nagai, Y. 1981. Control of mosaic diseases of tomato and sweet pepper caused by tobacco mosaic virus. Spec Bull Chiba Agric Exp Stn. 9:1.109 (in Japanese with English summary).

Oka, N., Ohki, T., Honda, Y., Nagaoka, K. and Takenaka, K. 2008. Inhibition of Pepper mild mottle virus with Commercial Cellulases. *J. Phytopathology* 156: 65-67.

Song, K. S., Cho, S. M. and Lee, J. H. 1995. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pham. Bull.* 43: 2105-2108.

Tagaki, Y. and Ogawa, K. 1978. Inhibitory effect of aqueous extracts from the saw dust-rice bran media grown mycelia of Hymenomycetes on tobacco mosaic virus infection. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 43: 211-214.

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

Tomlinson, J. A. and Shepherd, R. J. 1979. Studies in mutagenensis and cross protection of cauliflower mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 90: 223-231.

Wyatt, S. D. and Shepherd, R. J. 1969. Isolation and characterization of a virus inhibitor from Phytolacca americana. *Phytopathplogy* 59: 1787-1794.

Yasuda, Y., Noguchi, T., Okada, J. and Aoki, A. 1970. Inhibition by citrinin of oxidase activities in *Nicotiana glutinosa* leaves infected with tobacco mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 36: 27-35.