

포도나무 줄기혹병균에 대한 약용식물의 항균활성 및 병발생억제

김은수·윤해근*

영남대학교 원예생명과학과

In vitro and In vivo Antimicrobial Activities of Medicinal Plants against Crown Gall in Grapevine

Eun Su Kim and Hae Keun Yun*

Department of Horticulture and Life Science, Yeungnam University, Gyeongsan 38541, Korea

*Corresponding author: haekeun@ynu.ac.kr

Abstract

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activities of 9 kinds of medicinal plants against crown gall in grapevine. The medicinal plants extracted with several solvent systems were screened for in vitro antibacterial activity by the disc diffusion method. The ethanol and ethyl acetate extracts from magic lily flowers, tachys roots, asian plantain flowers and seeds, sweet wormwood leaves, stems and flowers, immature bitter melon fruits, cockscomb flowers, and peach tree resin showed in vitro antimicrobial activities against *Rhizobium vitis* with growth inhibition zones ranging from 10 to 27 mm in diameter. The minimum inhibitory concentration values of extracts against *R.vitis* ranged from 10,000 in Asian plantain flower and 50,000 fold diluted extracts in sweet wormwood flowers, stems, leaves, cockscomb leaves and immature bitter melon fruits. The active fractions of ethyl acetate and ethanol extracts from the medicinal plants were partially separated through silica gel column chromatography and thin layer chromatography (TLC). The active fractions were separated at Rf 0.36, 0.69, 0.75, 0.84, and 0.94 in sweet wormwood extracts, Rf 0.96 and 0.99 in cockscomb flower extracts, Rf 0.92 and 0.97 in cockscomb leaf extracts, and Rf 0.85 in immature bitter melon fruit extracts in TLC analysis developed with hexane:ethyl acetate (20:80, v/v) and methanol:chloroform (20:80, v/v). Among extracts from plants with in vitro antimicrobial activities, sweet wormwood, cockscomb leaves, and immature bitter melon fruits showed in vivo antimicrobial activities with inhibition activity of 100, 67, and 83.3%, respectively, in 'Kyoho' grapevine inoculated with *R. vitis* compared with the untreated control. These findings indicate that extracts of medicinal plants could be used as sustainable candidates to control crown gall disease caused by *R. vitis* in grapevines.

Additional key words: Kyoho, *Rhizobium vitis*, sustainable agents



Korean J. Hortic. Sci. Technol. 34(4):537-548, 2016
<http://dx.doi.org/10.12972/kjhst.20160055>

pISSN : 1226-8763
eISSN : 2465-8588

Received: March 2, 2016

Revised: March 21, 2016

Accepted: April 4, 2016

Copyright©2016 Korean Society for Horticultural Science.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ011631)의 지원에 의해 수행되었습니다.

서 언

포도(*Vitis* spp.)는 세계에서 중요한 과수 중 하나이며, 수 많은 세균, 곰팡이 그리고 바이러스에 의한 병해(Pearson and Goheen, 1988)는 과실의 생산량 감소와 품질저하로 인한 경제적인 손실을 유발한다(Burr et al., 1998). 포도나무 줄기혹병은 *Rhizobium vitis*에 의해서 발생하며(Holmes and Roberts, 1981; Ophel and Kerr, 1990), 우리나라에서는 6-8월에 발생한다(Chung and Shim, 1996; Park et al., 2000). ‘거봉(Kyoho)’ 품종은 포도나무 줄기혹병에 대하여 감수성으로 주요 재배지에서 70% 이상의 높은 감염률을 나타내며(Kang et al., 2007), 포도 생산량의 감소로 인한 경제적 손실이 심각한 실정이다(Burr et al., 1998; Schroth et al., 1988). 그러나, 이 병은 화학적 방제가 어려워 저항성 대목 선발 및 피복월동법 등의 경종적 방제가 주로 사용되고 있으며(Kang et al., 2007), 길항세균을 이용한 생물학적 방제(Shim et al., 1998)와 피복식물 추출물을 이용한 방제 연구가 진행되고 있다(Islam et al., 2014).

또한 병을 방제하기 위한 농약의 남용은 약제 내성균의 출현(Kim, 2000), 환경 오염, 자연 생태계의 파괴, 인축에 대한 독성 등의 부작용을 초래하고 있으므로(Cho and Shin, 2004), 항균활성을 미생물과 식물의 추출물을 이용하여 친환경 제제의 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Braverman et al., 2010; Lee et al., 2011; Lim et al., 2006; Park et al., 2005; Song et al., 2012; Yoon et al., 2011).

항균 활성을 나타내는 식물의 2차대사산물로는 대부분 페놀류, terpenoids, essential oils, 알칼로이드계통, lectins, polyacetylenes 등에 속하고 이외에 polypeptides도 포함이 된다(Hajek, 2003). 식물의 추출물은 생태계에 피해가 없으며 부가가치가 높은 친환경 농산물을 생산할 수 있는 장점이 있다(Copping and Menn, 2000). 항균활성을 가지는 식물 추출물에 대한 연구는 대부분 민간요법에서 이용하는 식물이나 한약재로 사용되는 식물을 대상으로 수행되어 의학이나 식품분야에서 향산 화 및 항균물질로 이용되고 있으며(Maregesi et al., 2008; Paik et al., 1998), 식물병원균에 대한 항균효과도 다양하게 보고되고 있다(Kim et al., 2011; Kwon et al., 2010; Park et al., 2006; Yoon et al., 2011).

본 연구에서는 한의학에서 사용되거나 식품 유해 미생물에 항균활성이 보고된 약용식물인 개똥쑥(Kim et al., 2001), 여주(Bae, 2002; Lee et al., 2012), 맨드라미(Kim, 2012) 등 총 9종의 식물체로부터 포도나무 줄기혹병균(*R. vitis*)에 대해 항균활성을 나타내는 약용식물을 탐색하고 활성성분을 분획하고 식물체에 처리하여 줄기혹병 방제를 위한 친환경 소재 개발의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

식물 재료

경상북도 경산시 영남대학교 자연자원대학 부속농장 온실에서 개똥쑥(*Artemisia annua* L.), 맨드라미(*Celosia cristata* L.), 질경이(*Plantago asiatica* L.), 왕질경이(*P. major* var. *japonica* M.), 참비름(*Amaranthus mangostanus* L.), 차조기(*Perilla frutescens* L.), 여주(*Momordica charantia* L.), 수세미오이(*Luffa cylindrica* L.)를 재배하여 사용하였으며, 종자는 대구 약령시의 약제상으로부터 구입하였다. 식물체는 꽃과 잎, 줄기 및 뿌리 등 부위별로 구분하여 추출하였다. 여주와 수세미오이는 식물체와 열매를 수확하여 미숙과와 성숙과로 구분하여 추출하였다. 복숭아나무(*Prunus persica* L.) 수지는 경산시 점촌동에 있는 복숭아 과원에서 채집하여 건조한 뒤 분말로 제조하여 사용하였다.

식물체 추출 준비

식물을 수집하여 물로 세척하고 상온에서 건조시킨 다음 부위별로 잎, 줄기, 뿌리 등으로 구분한 뒤에 분쇄기로 마쇄하였다.

마쇄된 식물체를 여러 용매(에탄올, 에틸아세테이트, 물)를 이용하여 상온에서 15시간 진탕하여 추출한 추출액을 회전감압농축기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd)를 이용하여 농축한 후 4°C에 보관하여 사용하였다. 조추출액을 에탄올 또는 에틸아세테이트에 희석하여 검정에 사용하였다. 복숭아나무 수지는 Gupta et al.(2010)의 추출방법에 따라 건조시킨 후 분쇄한 수지를 여러가지 용매(아세톤, 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, 톨루엔)로 추출하고 감압농축한 후 4°C에 보관하여 사용하였다.

병원균

실험에 사용된 포도 줄기혹병균은 *R. vitis* Cheonan 493(Islam et al., 2012)을 감자한천배지(potato dextrose agar, PDA)에 배양하여 사용하였으며 배양 후 4°C에 보관하면서 이용하였다.

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병균에 대한 항균활성(in vitro) 검사

약용식물 추출물의 항균활성을 검사하기 위해서 Islam et al.(2012)의 paper disc 실험 방법을 사용하였다. 세균 세포현탁액(OD₆₀₀=1.0/mL)을 식힌 PDA 50mL에 혼합하여 Petri-dish에 분주하고 1시간 가량 건조하였다. 식물체의 추출물을 멸균된 paper disc(Whatman No.1, φ8mm)에 각각 50μL/disc씩 적신 후 건조시킨 후 균이 포함된 고체배지에 배치한 다음 24시간 30°C 항온기에서 배양하였다. 항균활성은 paper disc 주위의 균사생장 억제환의 발생과 크기를 측정하여 나타냈다. 대조구로는 시료를 녹이는데 사용한 용매만을 처리하였다.

유기용매를 이용한 약용식물 추출물 분리

항균활성을 나타내는 추출물을 멸균수로 10배 희석한 다음 유기용매(톨루엔, 에틸아세테이트)를 이용하여 순서대로 분획하였다. 분획한 유기용매 층들은 수분을 제거하고 농축한 다음 다시 항균활성을 측정하고 항균활성이 나타나는 층을 선별하였다.

항균 물질의 분리는 column chromatography와 thin-layer chromatography(TLC)를 이용하여 분리하였다. Column chromatography를 이용하여 식물 추출물을 분획하고 농축한 다음 항균활성을 조사하였다. 항균활성을 가지는 분획물을 이용하여 실리카겔 박층유리판에서 크로마토그래피 상승법으로 전개하고 건조한 후, 254nm와 356nm의 자외선 파장에서 조사하여 분석하였다. 전개용매로는 ethyl acetate/hexane(8:2, v/v)과 ethanol/chloroform(2:8, v/v)을 사용하였다.

분획물의 최소억제 농도측정 및 살균효과 검정

약용식물 분획물의 최소억제 농도(minimal inhibition concentrations, MICs)를 검정하기 위해 100mL의 PDB(potato dextrose broth)에 세균을 혼합하고 선별한 분획물을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0%의 농도로 조정하여 추가한 후 배양하면서 3시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 0.1-0.2%의 농도에서 생장저해가 높게 나타나는 분획물을 선별하고, 10mL PDB 액체배지에 18시간 배양한 세균 0.01mL과 항균활성을 나타내는 물질을 멸균수에 1,000배, 5000배, 10,000배, 20,000배, 50,000배, 100,000배로 희석해서 각각 0.01mL씩 첨가하고 배양한 후 96-well plate를 이용하여 측정하였다. 대조구는 PDB 액체배지에 추출물을 섞지 않고 세균만 넣고 사용하였다. 추출물의 최저농도는 실험 미생물의 최소 생장 억제제가 보여지는 정도에서 MIC로 표현하였다. 항균활성을 나타내는 추출물의 정균작용과 살균작용을 검정하기 위하여 12시간 배양한 포도나무 줄기혹병균의 배양용기에 추출물을 첨가한 후 흡광도를 측정하였다.

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병 억제 효과(in vivo) 검정

세균을 PDB에서 18시간 배양한 뒤 원심분리기(3,200rpm, 15min)를 이용해서 PDB 배지를 제거하고 멸균수로 씻은 다음

UV/Vis spectrophotometer (Model S-3130, Sinco Co. Ltd.)를 이용하여 흡광도를 $OD_{600} = 1.0(10^8 \text{CFU/mL})$ 을 조정하여 실험에 사용하였다. 접종은 Yun et al.(2003)의 방법을 적용하여 감수성 식물체인 '거봉' 포도나무 삽수를 사용하였으며 전기드릴 ($\varnothing 3.0 \text{mm}^3$)을 이용해서 삽수에 인위적으로 상처를 준 뒤 주사기를 이용하여 $50 \mu\text{L}$ 씩 접종을 한 다음 파라핀 테이프로 상처부위를 밀봉하고 이틀간 수삽을 하여 삽수에 활력을 가한 다음 파라핀 테이프를 제거하고 삽목을 실시하였다. Islam et al.(2014)의 방법을 수정하여 식물 추출물 중 항균활성이 가장 뛰어난 식물 추출물을 선발하고 각각의 조추출물을 500배, 1,000배, 2,000배로 희석하고 7일 간격으로 추출물을 관수하였다. 삽목 후 60일이 경과한 후에 포도나무 삽수의 접종부위에서 흑의 발생 및 크기를 측정하였다.

통계분석

실험처리는 3반복으로 수행하였으며 각 실험의 결과에 대하여 평균치와 표준오차를 구하고 SAS(Statistical Analysis System, V.6.12, USA) 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple range test법에 의해 평균값간의 차이를 검정하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

결과 및 고찰

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병균에 대한 항균 활성

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병균인 *R. vitis*에 대한 항균 활성을 조사하였다(Table 1 and Fig. 1). 개똥쑥의 잎과 뿌리 추출물에선 각각 직경 9mm의 생장 억제존을 형성하여 항균 활성을 나타내었으나, 잎, 줄기, 꽃을 포함한 추출물에서는 직경 15mm 생장 억제존이 확인되었다. 맨드라미 꽃의 에탄올 추출물에서는 직경 13mm의 항균활성을 확인하였으나 에틸아세테이트 추출물에서는 직경 27mm의 더 높은 항균 활성을 확인하였다. 복숭아나무 수지의 에탄올 추출물에선 직경 10mm의 항균

Table 1. Preliminary in vitro antibacterial activities against *Rhizobium vitis* by medicinal plant extracts.

Sample	Tested part	Diameter of inhibition zone (mm) in solvent phase			
		E ^z	EA	T	W
Asian plantain (<i>Plantago asiatica</i> L.)	F ^y	14 ± 2 ^x	14 ± 2	0	16 ± 2
	F	11 ± 3	11 ± 2	0	0
Asian plantain (<i>P. major</i> var. <i>japonica</i> M.)	Se	16 ± 2	13 ± 2	0	13 ± 2
	F	27 ± 3	27 ± 2	0	19 ± 2
Cockscomb (<i>Celosia cristata</i> L.)	L	13 ± 2	13 ± 2	14 ± 2	18 ± 2
	Immature Fr	22 ± 2	0	0	20 ± 1
Magic lily (<i>Lycoris squamigera</i> MAX.)	F	7 ± 1	0	0	6 ± 1
Peach tree (<i>Prunus persica</i> Batsch.)	Resin	10 ± 1	0	0	11 ± 2
Stachys (<i>Stachys sieboldii</i> Miq.)	R	13 ± 2	0	0	13 ± 1
	L	9 ± 1	8 ± 2	0	9 ± 2
Sweet wormwood (<i>Artemisia annua</i> L.)	L, S, F	15 ± 2	0	12 ± 1	13 ± 1
	R	9 ± 2	0	0	9 ± 1

^zF; flower, L; leaf, S; stem, R; root, Fr; fruit, Se; seed.

^yE; ethyl alcohol, EA; ethyl acetate fraction, T; toluene fraction, W; water fraction.

^xInhibition zones of bacterial growth were measured from the disc (8 mm in diameter) containing 50 μL /disc of plant extracts in plates. Data represent means ± standard error (n = 3).

활성을 나타내었으며 그 외의 용매 추출물에서는 활성이 나타나지 않았다. 왕질경이 꽃의 에틸아세테이트 추출물에서는 직경 11mm, 종자 추출물에서는 직경 16mm의 항균 활성을 확인하였으며 질경이 꽃의 추출물에서는 직경 14mm의 항균 활성이 있음을 확인하였다. 여주 미성숙과의 에탄올 추출물에서 직경 22mm의 항균 활성을 나타내어 공시한 식물체 추출물 중 맨드라미 꽃의 에틸아세테이트 추출물과 함께 큰 항균 활성을 나타내었다. 반면에 여주의 성숙과의 추출물에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 초석잠 뿌리의 에탄올 추출물에서도 13mm의 항균활성을 확인하였다. 이외의 약용식물의 부위별 추출물에선 항균 활성이 나타나지 않았으며 실험에 사용한 양인 50 μ L보다 2배 많은 100 μ L에서도 항균 활성은 나타내지 않았다.

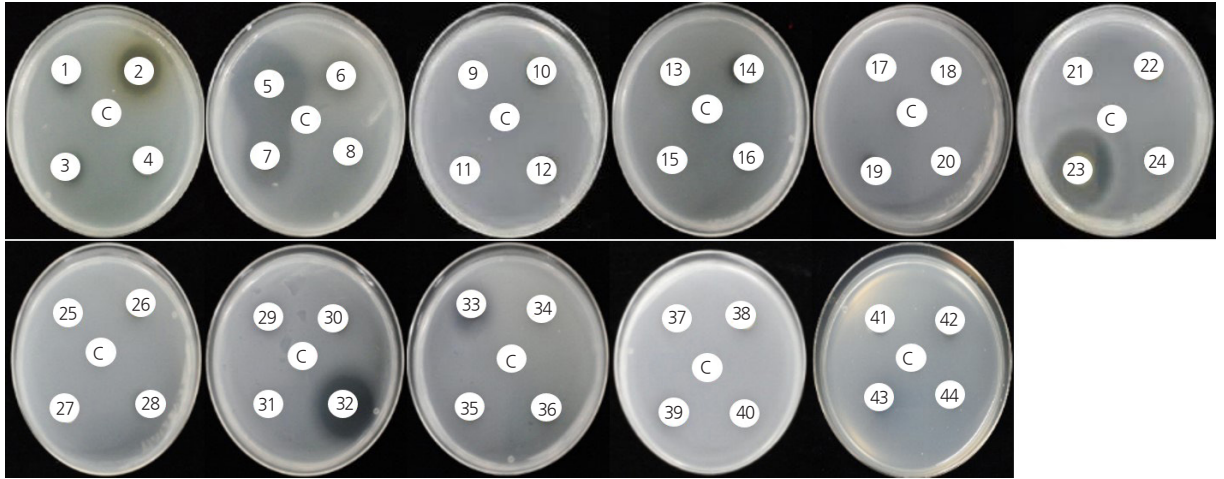


Fig. 1. Antibacterial activities against *Rhizobium vitis* by extracts from several medicinal plants. 1, sweet wormwood (L-E); 2, sweet wormwood (L, S, F-E); 3, sweet wormwood (R-E); 4, kiwifruit (F-EA); 5, cockscomb (F-EA); 6, cockscomb (F-E); 7, cockscomb (L-EA); 8, cockscomb (S-EA); 9, cockscomb (R-EA); 10, peach tree (resin-E); 11, peach tree resin (A); 12, peach tree resin (T); 13, peach tree resin (EA); 14, magic lily (F-E); 15, magic lily (L-EA); 16, magic lily (R-EA); 17, smooth loofah (immature Fr-EA); 18, smooth loofah (immature Fr-E); 19, smooth loofah (mature Fr-E); 20, smooth loofah (L-EA); 21, smooth loofah (R-EA); 22, smooth loofah (S-EA); 23, bitter melon (immature Fr-E); 24, bitter melon (mature Fr-EA); 25, bitter melon (mature Fr-E); 26, bitter melon (L-EA); 27, bitter melon (S-EA); 28, bitter melon (R-EA); 29, asian plantain (F-EA); 30, asian plantain (L-EA); 31, asian plantain (R-EA); 32, asian plantain (Se-EA); 33, asian plantain (F-EA); 34, asian plantain (L-EA); 35, *Stachys sieboldii* (R-E); 36, perilla (F-EA); 37, perilla (L-EA); 38, perilla (R-EA); 39, shen choy (L-EA); 40, shen choy (R-EA); 41, shen choy (S-EA); 42, *Stachys sieboldii* (L-EA); 43, *Stachys sieboldii* (R-E); 44, asian plantain (*Plantago depressa*) (R-EA). A, acetone; E, ethyl alcohol; EA, ethyl acetate; F, flower; Fr, fruit; L, leaf; R, root; S, stem; Se, seed; T, toluene.

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병균에 대한 항균 활성 용매 분획층 분리

항균활성이 나타내는 식물 추출물 중 개풍쑥과 맨드라미 꽃과 잎, 질경이 꽃과 종자, 여주의 미성숙 열매, 초석잠의 뿌리 추출물을 톨루엔, 에틸아세테이트, 물로 분획하여서 항균 활성을 조사한 결과 각각의 분획층에서 항균 활성을 나타내었다(Table 1). 물 분획에선 모든 추출물이 항균활성을 나타내었으며, 특히 여주의 미성숙과 물 분획은 직경 20mm의 높은 항균 활성을 나타내었다. 톨루엔 분획층에서는 개풍쑥과 맨드라미 잎이 각각 12mm, 14mm로 나타났으며, 에틸아세테이트 분획층에서는 질경이 꽃과 종자가 각각 14mm, 13mm의 항균 활성을 나타내었다.

항균 활성 분획물의 최소억제농도(MICs) 검정 및 살균작용효과 검정

항균 활성을 나타내는 모든 식물체의 물 분획물과 개풍쑥, 맨드라미 잎의 톨루엔 분획물, 질경이 꽃과 종자의 에틸아세테이

트 분획물을 이용하여 균의 생장의 저해를 확인해본 결과, 0.5, 1%의 추출물 첨가농도에선 모든 분획물이 첨가하지 않은 대조군에 비해 생육이 저해되거나 유도기가 연장되는 것을 확인할 수 있었다. 초석잠의 물 분획물은 추출물 첨가 농도가 낮아질수록 추출물을 첨가하지 않은 대조군과 비슷한 그래프를 나타내는 것을 확인하였다. 여주 미성숙 열매 물 분획물은 disc방법에선 큰 항균활성을 나타냈으나 예비의 실험에서는 0.5%보다 낮은 첨가 농도에서는 성장억제보다는 유도기를 연장하는 것으로 확인하였다. 개똥쭈과 맨드라미 잎의 톨루엔 분획물은 0.1% 농도까지 성장저해가 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

0.1%와 0.2%의 농도에서 성장저해 또는 성장을 늦추는데 가장 높게 나타내는 개똥쭈과 맨드라미 잎 톨루엔 분획물과 질경이 꽃 에틸아세테이트 분획물, 여주 미성숙 열매 물 분획물을 이용하여 최소 억제농도(MIC)를 측정 해본 결과 개똥쭈, 맨드라미 잎, 여주 미성숙 열매 분획물은 각각 50,000배 희석, 질경이 꽃 분획물은 10,000배 희석 농도까지 최소 억제농도로 확인되었다(Fig. 2). 또한 항균 활성을 나타내는 추출물의 정균 효과와 살균 효과를 검증하기 위하여 12시간 배양한 포도나무 줄기혹병균의 배양용기에 추출물을 첨가한 후 흡광도를 측정한 결과, 세포 생장의 억제는 나타났으나 살균 효과를 보이는 세포수의 감소는 나타나지 않았다.

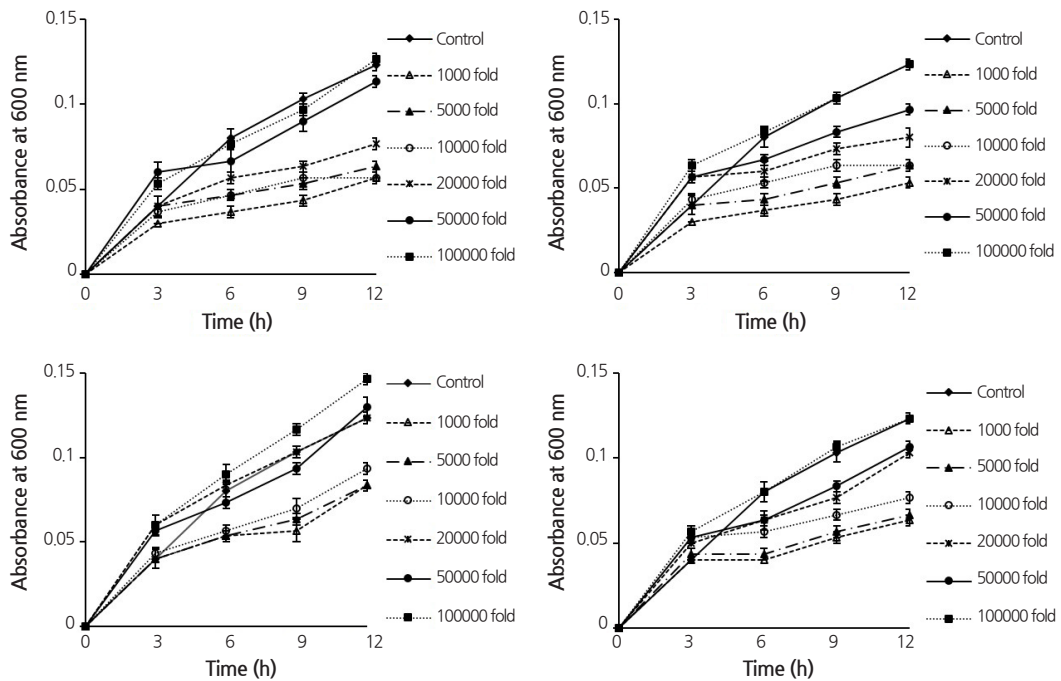


Fig. 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of medicinal plant extracts against bacterial growth. A, sweet wormwood-toluene extracts; B, cockscomb leaves-toluene extracts; C, Asian plantain flowers-ethyl acetate extracts; D, bitter melon immature fruit-water extracts. Vertical bars represent standard error of mean (n = 3).

Chromatography를 이용한 항균 활성 분획

항균 활성을 나타내는 추출물 중 개똥쭈 추출물과 맨드라미 꽃과 잎 추출물, 여주의 미성숙 과 추출물의 항균활성분획의 부분정제를 진행하였으며, 그 과정은 Fig. 3으로 나타내었다. Column chromatography를 이용하여 추출물들을 헥산과 에틸아세테이트, 아세톤을 용매로 용출시킨 후 분획과 농축과정을 거쳐서 항균활성을 확인하였다. 분획물의 항균활성은 대부분 아세톤에서 분리된 층이 항균활성을 강하게 나타내었다. 활성을 나타내는 분획층을 수거하여 TLC(전개용매, hexane/ethyl

acetate(H:EA) = 2:8, 또는 methyl alcohol/chloroform(M:C) = 2:8, v/v)에서 전개하고 분획을 아세톤으로 녹인 후 항균활성을 확인하였다.

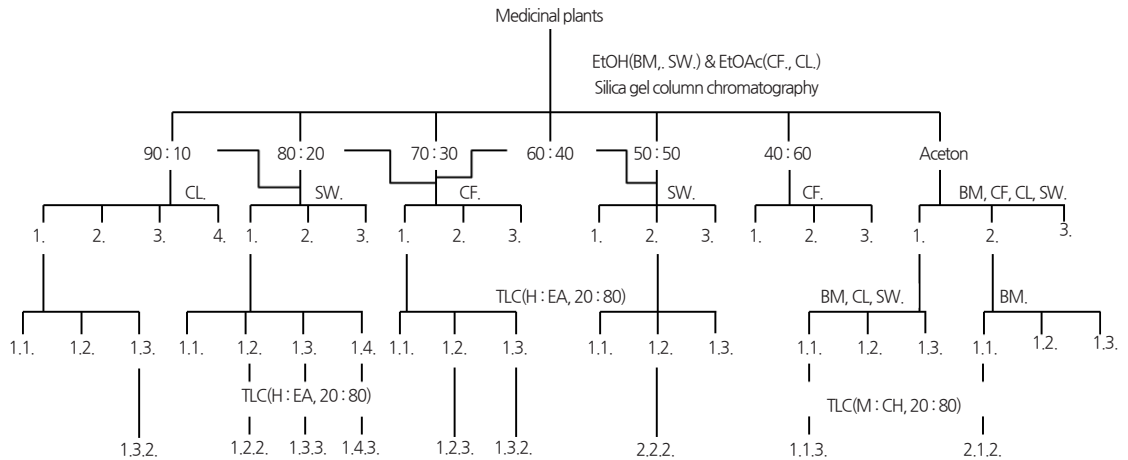


Fig. 3. Flow chart for the fractionation of antimicrobial compounds from ethyl acetate (EA) and ethanol (E) extracts of several medicinal plants. Bold letters represent active antimicrobial fractions against *Rhizobium vitis*. BM, immature bitter melon fruits; CF, cockscomb flowers; CL, cockscomb leaves; SW, sweet wormwoods; TLC, thin layer chromatography.

TLC분석에서 개뽕쑥 추출물은 hexan과 에틸아세테이트로 전개하여 4개의 밴드(Rf 0.36, 0.69, 0.75, 0.94), 메탄올과 클로로포름으로 전개하여 1개의 항균활성을 나타내는 밴드(Rf 0.84)를 확인하였으며, 맨드라미 꽃에서는 2개의 밴드(Rf 0.96과 0.99, H:EA = 2:8), 맨드라미 잎에서도 2개의 밴드(Rf 0.92와 0.97, M:C = 2:8, H:EA = 2:8), 여주의 미성숙과 추출물에서는 2개의 밴드(Rf 0.85, M:CH = 2:8)에서 항균활성을 나타내었다(Fig. 4).

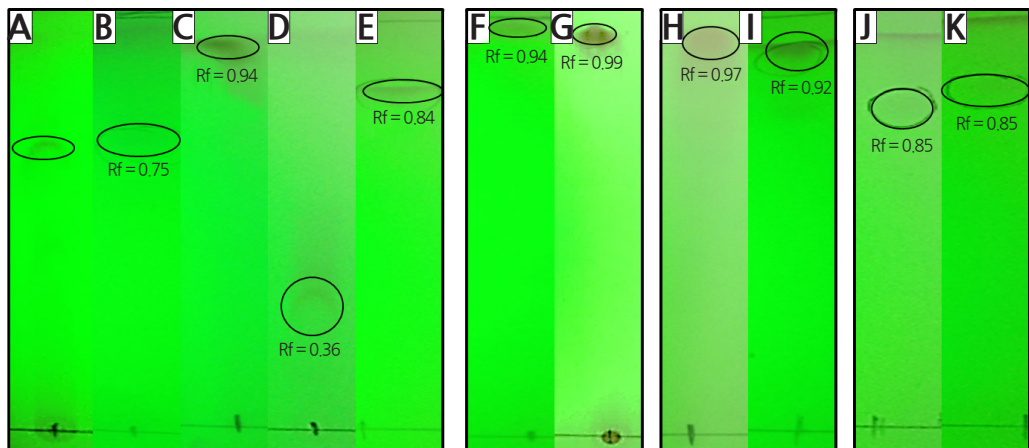


Fig. 4. Antibacterial active fractions of samples in TLC analysis developed with hexane/ethyl acetate (H:EA=2:8, v/v) and methanol/chloroform (M:CH=2:8, v/v). A, sweet wormwood-1.2.2 (H:EA); B, sweet wormwood-1.3.3 (H:EA); C, sweet wormwood-1.4.3 (H:EA); D, sweet wormwood-2.2.2 (H:EA); E, sweet wormwood acetone-1.1.3 (M:CH); F, cockscomb F-1.2.3 (H:EA); G, cockscomb F-1.3.2 (H:EA); H, cockscomb L-1.3.2 (H:EA); I, cockscomb L acetone-1.1.3 (M:CH); J, bitter melon immature Fr acetone-1.1.3 (M:CH); K, bitter melon immature Fr acetone-2.1.2 (M:CH). Fractions from plant extracts were described in Fig. 3. Black circles indicate active antibacterial fractions with Rf value.

약용식물 추출물의 포도나무 줄기혹병 억제 검정

약용식물 추출물의 식물체 상에서의 포도나무 줄기혹병의 발생 억제 효과를 검정하고자 in vitro 상에서 항균활성이 나타나는 추출물 중 개똥쭉 추출물, 맨드라미 잎 추출물, 여주 미성숙 과의 조추출물을 각각 멸균수에 500, 1,000, 2,000배 희석하고 7 일 간격으로 관수하고 60일이 경과한 후 줄기에 발생하는 혹을 확인하고 측정하였다(Table 2 and Fig. 5).

개똥쭉 추출물은 모든 희석액 처리구에서 혹이 전혀 형성되지 않아 100%의 혹발생 억제 효과를 나타내었으며, 맨드라미 잎 추출물은 500배와 1,000배 희석액 농도에는 67%의 억제 효과와, 2,000배 희석액 농도에서는 50%의 병발생 억제 효과를 나타내었다. 여주의 미성숙과 추출물은 500배 희석액 농도에서 83.3% 억제하였고 1,000배와 2,000배 희석액 농도에는 67%의 병 발생 억제 효과를 나타내었다.

Table 2. Inhibition of crown gall formation in 'Kyoho' grapevines by treating extracts from the medicinal plants in a greenhouse.

Treatments	500 x diluted	Reduction		Reduction		Reduction	
		over control (%)	1000 x diluted	over control (%)	2000 x diluted	over control (%)	
Crown gall width (mm)	Control	2.7 ± 0.3					
	Sweet wormwood L,S,F	0	100	0	100	0	100
	Cockscomb L.	1.3 ± 0.3	51.8	1.5 ± 0.3	44.4	2.0 ± 0.2	25.9
	Bitter melon immature Fr.	1.0 ± 0.1	63	2.3 ± 0.3	14.8	2.0 ± 0.2	25.9
Crown gall weight (mg)	Control	60 ± 20					
	Sweet wormwood L,S,F	0	100	0	100	0	100
	Cockscomb L.	20 ± 10	67	20 ± 10	67	30 ± 20	50
	Bitter melon immature Fr.	10 ± 5	83.3	20 ± 15	67	20 ± 10	67

F; flower, Fr; fruit, L; leaf, S; stem. Data represent mean ± standard error (n = 3).

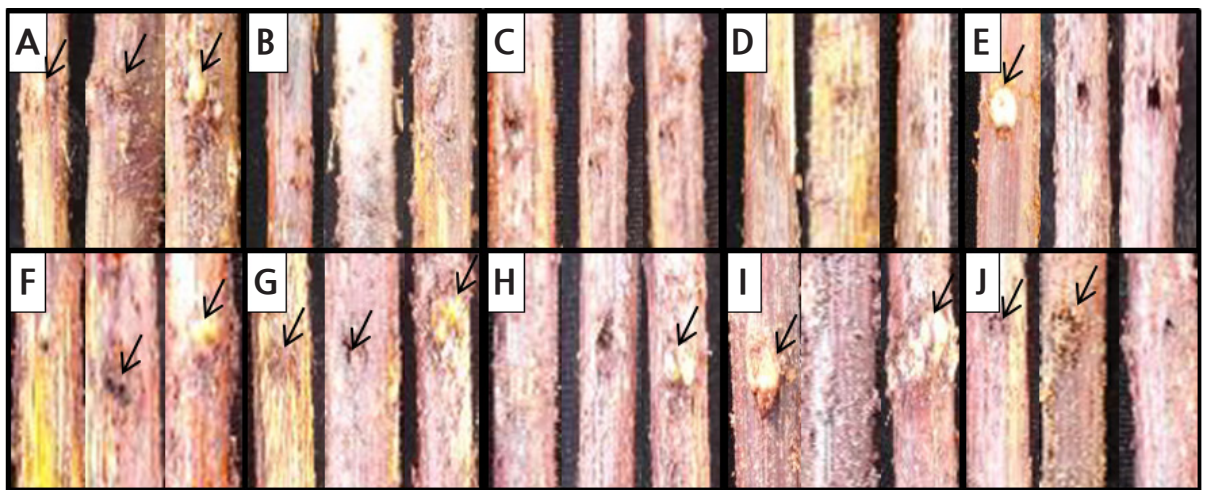


Fig. 5. Tumors formed in pathogen-inoculated 'Kyoho' grapevines treated with the crude extracts from the medicinal plants in a greenhouse. A, control (inoculated with pathogen only); B-D, sweet wormwood (500, 1,000, and 2,000 fold); E-G) cockscomb leaves (500, 1,000, and 2,000 fold); H-J, bitter melon immature fruits (500, 1,000, and 2,000 fold).

소비자들의 농산물 안정성에 대한 관심과 친환경 과실의 생산에 대한 요구가 증가함에 따라 기존의 농약을 대체 할 수 있는 친환경 소재 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 식물 추출물을 이용한 연구는 오래 전부터 의학, 식품 등 여러 분야에서 이루어져왔으며 농업분야에서도 살충효과(Choi et al., 2013; Hwang et al., 2009; Lee et al., 2009; Lim et al., 2007; Park et al., 2008; Yun et al., 2012), 제초효과(Jin et al., 2003; Kim et al., 2014)와 식물 병원균에 대한 항균활성 검정(Cho and Shin, 2004; Doh, 1997; Islam et al., 2012; 2013; 2014; Kim et al., 2001; Park et al., 2006; Song et al., 2012; Yoon et al., 2011)에 관한 연구도 보고되어 있다.

본 연구에서는 개똥쭉과 맨드라미, 질경이, 수세미, 여주, 차조기, 참비름, 초석잠 등 약용식물의 추출물의 포도나무 줄기혹병균(*R. vitis*)에 대한 항균활성을 조사하였다. 포도나무 줄기혹병균에 항균 활성을 나타내는 개똥쭉과 맨드라미의 꽃과 잎, 질경이의 꽃과 종자, 여주의 미성숙 열매, 초석잠의 뿌리, 복숭아나무의 수지 추출물을 선발하였다. 항균 활성을 나타내는 개똥쭉과 맨드라미, 여주 미성숙과의 추출물로부터 column chromatography와 TLC를 이용하여 항균활성이 나타내는 분획과 밴드를 부분정제 하였으며 분획의 항균활성을 검정하였다.

개똥쭉(*Artemisia annua*)은 산비탈이나 길가 또는 황무지 같은 곳에 발견하기 쉬운 식물로써 본초학에서는 항말라리아 작용, 해열 진통 작용, 항균 작용 등이 있다고 전해지며, 2,4-hexadienal, β -pinene 및 cineole 등의 생리활성물질이 존재하여 항균 활성을 나타낸다고 보고되어 있다(Kim et al., 2001). 맨드라미(*Celosia cristata* L.)는 비름과(Amaranthaceae)에 속하는 1년생 초본식물로 생약으로 사용할 때 지혈효과나 설사를 멈추게 하며, 식물의 담배 모자이크바이러스병에 강한 억제력을 나타내는 것으로 알려져 있다(Baranwal and Verma, 1992; Jung, 2006). 여주(*Momordica charantia* L.)는 쓴오이라고도 불리며 비타민 C, 칼륨, 철분, 미네랄 등이 풍부하며 charantin, momordicin이라는 성분을 함유하고 있어서 당뇨 등의 질병을 치료하는데 주로 사용되는 기능성 작물이다(Lee et al., 2012). 또한 *Staphylococcus mutans*에 대해 항균 활성이 있으며 암세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Bae, 2002). 참비름의 에탄올 추출물은 식중독균과 대장균에 증식 억제 효과가 보고되었으며(Oh and Lee, 2005), 단백질 합성 저해 기능이 있는 항바이러스 단백질이 있어서 식물의 바이러스성 병해를 억제하는 효과도 있다고 알려져 있다(Cho et al., 1995). 질경이는 식품부패미생물에 항균활성이 있다고 보고되어 있는데 특히 질경이의 메탄올 추출은 *B. subtilis*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 성장을 완전히 억제한다고 알려져 있다(Jeon et al., 1998). 차조기는 *S. aureus*, *B. subtilis* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서 항균 활성이 나타났다고 보고되었다(Kim et al., 2007). 본 연구에서도 개똥쭉, 맨드라미, 여주 등의 식물체에서 포도나무 줄기혹병균에 대한 항균 활성을 확인하였으며 이들 식물체는 넓은 범위의 미생물에 대한 항균 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

수세미오이의 종자와 잎추출물은 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*(Oyetayo et al., 2007), *Candida albicans*와 *Malassezia furfur*에 대해 항균 활성을 나타내며(Lee and Moon, 2014), 과실의 에탄올 추출물은 그람 양성균과 음성균에 대해 항균활성이 보고되어 있다(Devi et al., 2009). 그러나 본 연구에서는 이들 식물의 부위별 모든 추출물에서 포도나무 줄기혹병균에 대한 항균활성을 확인할 수 없었다.

Islam et al.(2014)은 피복작물의 추출물을 포도나무 식물체에 처리한 결과, 가장 높은 농도에서 75%의 억제 활성을 보고하였다. 본 연구에서는 기내 실험을 통하여 항균 활성이 있는 것으로 확인된 식물 추출물 중 개똥쭉과 맨드라미 잎, 여주의 미성숙 열매 추출물은 포도나무 수체에서 줄기혹병에 대한 발생 억제효과를 나타내었다(Table 2 and Fig. 5). 따라서, 본 연구에서 공시한 약용식물의 추출물은 배지상에서 포도나무 줄기혹병균에 대한 성장을 억제하고, 식물체상에서도 줄기혹병 발생을 억제하여 포도나무 줄기혹병을 방제하기 위한 천연유래 친환경 방제약제로서의 가능성을 나타내었다. 또한, 처리한 식물체 추출물에는 병발생의 억제효과에 차이를 보이는데 공시한 약용식물이 지니는 물질의 종류와 활성차이에 기인한 것으로 여겨지며 향후 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

식물의 추출물을 이용한 식물 병해충의 방제는 안전한 친환경 농산물을 생산할 수 있는 방제방법으로 많은 연구결과가 보고되어 있다(Copping and Menn, 2000; Kim et al., 2011; Song et al., 2012; Yoon et al., 2011). 본 연구에서 사용된 개똥쭉과 여주

미성숙과는 생리활성 성분이나 식품 유해 미생물에 대한 항균활성은 보고되었으나, 식물병원균에 대한 항균활성에 관한 연구 특히, 맨드라미 추출물의 식물병원성 세균 또는 진균에 대한 항균활성과 관련된 연구가 없는 상태이다. 따라서, 차후 개똥썩과 여주의 미성숙 열매, 맨드라미 추출물에서 식물병원성 미생물에 대한 항균활성을 나타내는 물질을 식물의 병 방제에 적용하는 연구와 다른 식물병원성 미생물에 대한 항균활성 등의 연구들을 통하여 천연물 농약 소재로서의 개발 및 활용이 가능할 것으로 사료된다.

초 록

항암, 항산화, 항균 활성을 나타내는 9종의 약용식물을 이용하여 포도나무 줄기혹병의 억제효과를 조사하였다. 공시한 식물 중에서 개똥썩(15mm), 맨드라미의 꽃(27mm)과 잎(13mm), 여주의 미성숙 열매(22mm), 상사화 꽃(7mm), 질경이의 꽃(14mm)과 종자(16mm), 초석잠의 뿌리(13mm), 복숭아나무의 수지(10mm) 추출물 등이 줄기혹병균(*Rhizobium vitis*)에 대해 항균활성을 나타내었다. 항균활성의 분획물의 최소억제농도를 확인한 결과 개똥썩, 맨드라미 잎, 여주 미성숙과 분획물은 각각 50,000배, 질경이 꽃 분획물은 10,000배 희석액이 최소억제농도(MIC)로 확인되었다. 개똥썩, 맨드라미 꽃과 잎, 여주의 미성숙 열매 추출물의 항균활성물질은 column chromatography와 thin layer chromatography(TLC)를 통하여 분획하였다. 헥산/에틸아세테이트와 메탄올/클로로포름(20:80, v/v)으로 전개한 TLC 분석에서 개똥썩 추출물에서는 Rf 0.36, 0.69, 0.75, 0.84, 0.94, 맨드라미 꽃 추출물은 Rf 0.96, 0.99, 맨드라미 잎 추출물은 Rf 0.92, 0.97, 여주의 미성숙열매 추출물은 Rf 0.85에서 항균 활성의 분획을 획득하였다. 개똥썩, 맨드라미 잎, 여주 미성숙 열매 추출물을 물에 희석(500, 1,000, 2,000배)하고 온실에서 *R. vitis*를 접종한 ‘거봉’ 식물체에 7일 간격으로 관수한 결과, 개똥썩 희석액은 100%, 맨드라미 잎 추출물(500배 희석액)은 67%, 여주 미성숙 열매 추출물(500배 희석액)은 83.3%의 억제효과를 나타내었다. 이러한 연구 결과는 약용식물 추출물이 포도나무 줄기혹병을 방제할 수 있는 친환경 제제로서의 적용가능성을 제시한 것이라 할 수 있다.

추가주요어: 항균활성, 줄기혹병, *Rhizobium vitis*, 거봉, 약용식물

Literature Cited

- Bae SJ (2002) The effects on antimicrobial and anticarcinogenic activity of *Momordica charantia* L. Korean J Nutr 35:880-885
- Baranwal VK, Verma HN (1992) Localized resistance against virus infection by leaf extract of *Celosia cristata*. Plant Pathol 41:633-638. doi:10.1111/j.1365-3059.1992.tb02464.x
- Braverman MP, Baron JJ, Kunkel DL (2010) An overview and future trends of US biopesticide regulations. Out Pes Mana 21:132-134. doi:10.1564/21jun06
- Burr TJ (1988) Crown gall. In RC Pearson, AC Goheen, eds, Compendium of grape diseases. APS press, MInnesota, USA, pp. 41-42
- Burr TJ, Otten L (1999) Crown gall of grape - Biology and disease management. Ann Rev Phytopathol 37:53-83. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.53
- Burr TJ, Bazzi C, S le S, Otten L (1998) Crown gall of grape - Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies. Plant Dis 82:1288-1297. doi:10.1094/PDIS.1998.82.12.1288
- Chamberlain GC (1962) The occurrence of aerial crown gall of grapevines in the Niagara peninsular of Ontario. Can Plant Dis Surv 42: 208-211
- Cho HJ, Shin DI (2004) Antifungal activity of some essential oils and their major constituents on 3 plant pathogenic fungi. J Life Sci 14:1003-1008. doi:10.5352/JLS.2004.14.6.1003
- Cho KJ, Yi SI, Kim YT, Hwang YS (1995) Purification and characterization of antiviral protein(AAP29) from the leaves of *Amaranthus mangostanus*. Agric Chem Biotechnol 38:528-533
- Choi JJ, Kwon HH, Lee HH, Son HG, Hong SK, Kang JW, Park YS (2013) Evaluation of insecticidal activity of plant extracts against the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Plutellidae)and vegetable plant. Korean J Plant Res 26:19-25. doi:10.7732/kjpr.2013.26.1.019

- Chung KJ, Shim JS (1996) Isolation and identification of pathogenic bacteria of grapevine crown gall in Korea. *Korean J Plant Pathol* 12:197-201
- Copping LG, Menn JJ (2000) Biopesticides: a review of their action, application and efficacy. *Pest Manag Sci* 56: 651-676. doi:10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U
- Doh ES (1997) Antifungal activity of *Anemarrhena asphodeloides*, *Coptis japonica* and *Phellodendron amurense* extracts against phytophthora blight. *Korean J Plant Res* 10:351-359
- Gupta VK, Roy A, Nigam VK, Mukherjee K (2010) Antimicrobial activity of *Spondias pinnata* resin. *J Med Plants Res* 4:1656-166. doi:10.5897/JMPR10.182
- Holmes B, Roberts P (1981) The classification and nomenclature of *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn1942, *Agrobacterium rhizogene* (Rikeretal.) Conn1942, and *Agrobacterium rubi* (Hilderbrand) Starr & Weiss 1943. *J Appl Bacteriol* 50:443-467. doi:10.1111/j.1365-2672.1981.tb04248.x
- Hwang IC, Kim J, Kim HM, Kim DI, Kim SG, Kim SS, Jang C (2009) Evaluation of toxicity of plant extract made by Neem and Matrine against main pests and natural enemies. *Korean J Appl Entomol* 48:87-94. doi:10.5656/KSAE.2009.48.1.087
- Islam MT, Ahn SY, Vajpai VK, Yun HK (2012) In vitro studies on the antimicrobial activities and chemical characterization of six cover crops against grapevine crown gall pathogen. *J Plant Pathol* 94:591-599
- Islam MT, Ahn SY, Cho SM, Yun HK (2013) Isolation of antibacterial compounds from hairy vetch (*Vicia villosa*) against grapevine crown gall pathogen. *Hortic Environ Biotechnol* 54:272-279. doi:10.1007/s13580-013-0028-8
- Islam MT, Ahn SY, Islam MZ, Kim SA, Yun HK (2014) In vivo antibacterial activity against *Rhizobium vitis* and the induction of defense-related genes in grapevines (*Vitis* spp.) by hairy vetch and ryegrass extracts. *Plant Omics J* 7:133-141
- Jeon YO, Kim KH, Kim SI, Han YS (1998) Screening of antimicrobial activity of the plantain (*Plantago asiatica* L.) extract. *Korean J Food Sci Technol* 14:498-502
- Kang SS, Park SH, Park MK, Park TJ, Kang HW, Choi JE (2007) Selection of resistant rootstock and development of overwintering methods for control of crown gall disease on grapevine. *Res Plant Dis* 13:98-103. doi:10.5423/RPD.2007.13.2.098
- Kim CH (2000) Review of fungicide resistance problems in Korea. *Korean J Pesti Sci* 4:1-10
- Kim HC, Gil BS, Lee YH (2001) The antifungal activity of chemical substances from *Artemisia annua*. *Korean J Ecol* 24:137-140
- Kim JC, Ryu SY, Kim YS, Kim HT, Kim SK, Choi GJ, Kim JS, Lee SW, Heor JH, Cho KY (2001) Antifungal activities of coumarins isolated from *Angelica dahurica* against plant pathogenic fungi. *Korean J Pesti Sci* 5:26-35
- Kim JY, Yoon WJ, Yim EY, Park SY, Kim YJ, Song GP (2011) Antioxidative and antimicrobial activities of *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii* extracts. *Korean J Plant Res* 24:200-207. doi:10.7732/kjpr.2011.24.2.200
- Kim MH, Lee NH, Lee MH, Kwon DJ, Choi UK (2007) Antimicrobial activity of aqueous ethanol extracts of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf. *J Korean Soc Food Cult* 22:266-273
- Kim MH (2012) Antioxidant and antibacterial activity of extracts from *Brassica juncea czerniak et coss.*, *Celosia cristata* L., and *Beta vulgaris* L. *J Korean Soc Food Cult* 27:719-729. doi:10.7318/KJFC/2012.27.6.719
- Kwon SB, Lee HY, Kim BS, Choi JK (2010) Inhibitory effect of extracts from 33 medicinal herbs against TMV and CMV infection. *Korean J Pesti Sci* 14: 280-283
- Lee DW, Choi HC, Kim TS, Park JK, Park JC, Yu HB, Lee SM, Choo HY (2009) Effect of some herbal extracts on entomopathogenic nematodes, silk worm and ground beetles. *Korean J Appl Entomol* 48:335-345. doi:10.5656/KSAE.2009.48.3.335
- Lee GW, Kim MJ, Park JS, Chae JC, Soh BY, Ju JE, Lee KJ (2011) Biological control of phytophthora blight and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54. *Res Plant Dis* 17:86-89. doi:10.5423/RPD.2011.17.1.086
- Lee HJ, Moon JH, Lee WM, Lee SG, Kim AK, Woo YH, Park DK (2012) Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions. *J Bio-Environment Control* 21:379-384. doi:10.12791/KSBEC.2012.21.4.379
- Lehoczyk J (1968) Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection. *J Phytopathol* 63:239-246. doi:10.1111/j.1439-0434.1968.tb02389.x
- Lim SH, Kim HY, Kim KH, Heo SJ, Lim SS, Kim SM (2007) Isolation of herbicidal compound methyl-p-hydroxybenzoate from *Epimedium koreanum* Nakai. *Korean J Weed Sci* 27:235-240
- Lim TH, Kwon SY, Kim JH (2006) Effects of *Streptomyces griseofuscus* 200401 on growth of pepper plants and phytophthora blight by *Phytophthora capsici*. *Res Plant Dis* 12:46-50. doi:10.5423/RPD.2006.12.1.046
- Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, Berghe DA, Vlietinck AJ (2008) Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J Ethnopharmacol* 119:58-66. doi:10.1016/j.jep.2008.05.033
- Oh YS, Lee SH (2005) Isolation and identification of antimicrobial compound from *Amarantus lividus*. *Korean J Microbial Biotechnol* 33:123-129
- Ophel K, Kerr A (1990) *Agrobacterium vitis* sp. Nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 grapevines. *Int J Syst Bacteriol* 40:236-241. doi:10.1099/00207713-40-3-236
- Oyetayo FL, Oyetayo VO, Ajewole V (2007) Phytochemical profile and antibacterial properties of the seed and leaf of the Luffa plant (*Luffa cylindrica*). *J Pharmacol Toxicol* 2:586-589. doi:10.3923/jpt.2007.586.589
- Paik SB, Chung IM, Doh ES (1998) Screening of medicinal plants with antifungal activity on major seedborne disease. *Korean J Medicinal Crop Sci* 6:277-285
- Park JH, Ryu KY, Jee HJ, Lee BM, Gho HG (2008) Evaluation of insecticidal activity of plant extracts against three insect pests. *Korean J*

Appl Entomol 47:59-64. doi:10.5656/KSAE.2008.47.1.059

- Park SM, Jung HJ, Han SH, Yeo SH, Kim YW, Ahn HG, Kim HS, Yu TS (2005) Antifungal activity of extract from *Xanthium strumarium* L. against plant pathogenic fungi. Korean J Life Sci 15:692-695. doi:10.5352/JLS.2005.15.5.692
- Park SM, Jung HJ, Yu TS (2006) Screening of an antagonistic bacterium for control of red-pepper anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*. Korean J Life Sci 16:420-426. doi:10.5352/JLS.2006.16.3.420
- Park KH, Jeong KS, Cha JS (2000) Incidence of severe crown gall disease on tetraploid cultivars of grape in Korea. Plant Pathol J 16:290-293
- Pearson RC, Goheen AC (1988) Compendium of grape disease. APS Press, St. Paul
- Pu XA, Goodman RN (1993) Tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grape plants. Am J Enol Vitic 44:249-254
- Pyo YH, Yoon MY, Son JH, Choe TB (2008) The effect of *Celosia cristata* L. ethanol extract on anti-oxidant & anti-aging activity. Korean J Biotechnol Bioeng 23:431-438
- Schroth MN, McCain AH, Foott JH, Huisman OC (1998) Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. Plant Dis 72:241-246. doi:10.1094/PD-72-0241
- Shim JS, Chung BK, Chung KJ (1998) Biological control of grapevine crown gall. Korean J Pesti Sci 2:97-101
- Song CH, Chung JB, Jeong BR, Park SY, Lee YS (2012) Antifungal activity of crude extract compound from *Rhus verniciflua* against anthracnose fungi (*Collectotrichum* spp.) of red pepper. Korean J Environ Agric 31:60-67. doi:10.5338/KJEA.2012.31.1.60
- Yoon MY, Kim YS, Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Cha BJ, Kim JC (2011) Antifungal activity of decursinol angelate isolated from *Angelica gigas* roots against *Puccinia recondite*. Res Plant Dis 17:25-31. doi:10.5423/RPD.2011.17.1.025
- Yun YB, Kim JH, Jang SJ, Kim DI, Kwon OD, Kuk YI (2012) Effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius* H. Robinson) extracts on herbicidal, fungicidal, and insecticidal activities. Korean J Weed Sci 32:98-106. doi:10.5660/KJWS.2012.32.2.98
- Yun HK, Roh JH, Park KS, Cha JS, Jeong SB (2003) Screening system for crown gall resistance by pathogen inoculation in grapes. Korean J Hortic Sci Technol 21:325-328