

비름科植物汁液에 의한 담배 모자이크 바이러스의 感染抑制効果

崔 章 京* · 鄭 玉 花*

Inhibition of Tobacco Mosaic Virus Infection by the Crude Sap Extracted from Amaranthaceae Plants

Jang-Kyung Choi* and Ok-Hoa Jung*

ABSTRACT

Crude sap, which was extracted from six Amaranthaceae plants, inhibited local lesion formation on *Nicotiana glutinosa* by tobacco mosaic virus(TMV) infection. Especially the remarkable inhibitory effect to TMV infection was shown on leaves of *N. glutinosa* precoated with the sap from *Amaranthus mangostanus*.

The inhibitory activity of the sap from *A. mangostanus* was stable to storage *in vitro* for 1 day and to dilution 1/4 of the sap with distilled water. However, its activity was lost when the sap was heated at 70°C to 100°C for 10 minutes. When the leaves of *N. glutinosa* precoated with the sap were sprayed with water, the inhibitory effect to TMV infection was maintained for 2 days. The *A. mangostanus* sap readjusted pH 3, pH 5, or pH 9 with 1 N HCl or 1 N NaOH did not decline the inhibitory action but the sap absorbed with 5% to 15% charcoal completely lost their action.

The protein components purified from *A. mangostanus* sap revealed three major bands by 10% polyacrylamide gel electrophoresis and the top component of which showed the inhibitory action to TMV infection.

緒 論

高等植物의 汁液을 利用한 植物바이러스의 感染抑制 効果는 *Phytolacca decandra*에서 처음 報告된 이후⁵⁾, *P. americana*^{7,9,14)} *Chenopodium album*^{2,15,16)}, *C. amaranticolor*^{2,11,12)}, *Dianthus caryophyllus*^{10,13)} 등 에서 報告되었다. 이들 植物에 包含된 바이러스感染抑制 成分으로는 단백질, 糖단백질, phenol 化合物 등으로 알려져 있으나, 바이러스와 이들 植物汁液의 反應 機作에 대해서는 아직 확실치않다.

本 研究는 담배, 고추, 토마토 등 가지科 作物에 매년 막대한 피해를 주고 있는 담배 모자이크 바이러스 (tobacco mosaic virus, TMV)를 供試, 우리주위에 널리 분포하고 또한 손쉽게 이용할 수 있는 野生植物中, 비름 科植物을 選定하여, TMV의 感染抑制 効果 및 그 實用性을 檢討할 것을 目的으로 실시하였다.

材料 및 方法

TMV 感染抑制 効果檢定 : 中心子目中 비름科에 속하는 비름(*Amaranthus mangostanus*), 청비름(*A.*

*江原大學校 農科大學 植物保護學科

[Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Kangwon Nat. Univ. Chunchon, Korea 200]

viridis), 갠드라미(*Celosia cristata*), 개갠드라미(*C. argenta*), 즐갠드라미(*A. caudatus*), 천일홍(*Gomphrena globosa*) 등 6種의 비름科植物을 野外에서 採集, -20°C에서 保存한 後 使用하였다. 凍結된 植物體는 蒸溜水와 1:1(w/v)의 比率로 멸균된 유발에 넣고 磨碎한 後, 두겹의 가아제로 濾過한 汁液을 TMV 抑制物質로 使用하였다. 檢定은 8葉期 정도의 *Nicotiana glutinosa*의 半葉에 各 植物汁液을 塗抹, 그늘에서 말린 後 TMV를 接種하였다.

바이러스源: 供試바이러스는 담배 모자이크 바이러스의 普通系(OM strain)를 *N. tabacum* var. Bright Yellow에 增殖시킨 後, 罹病된 담배잎 1g當 蒸溜水 10 cc를 넣고 磨碎하여 그 汁液을 바이러스源으로 使用하였다. 이때 接種은 Carborandum(600mesh)을 利用하였다. 비름科 植物汁液의 TMV 感染抑制效果는 接種 3日後, *N. glutinosa*에 形成된 局部病斑을 Grasso and Shepherd의 方法⁶⁾으로 算定하였다.

비름汁液의 物理化學的 性質: 供試한 6種의 비름科 植物中 TMV 感染抑制效果가 가장 높은 비름(*A. mangostanus*)을 選定하여 그 汁液의 物理化學的 性質을 調査하였다. 物理的 性質은 耐熱性, 耐保存性, 耐稀釋性을, 化學的 性質은 水素이온 濃度 및 活性炭濃度에 對한 耐性을 檢定하였다. 耐熱性은 60~100°C에서 各 10分間 處理하였고, 耐保存性은 1~5日 동안 室溫에서 保存한 後 使用하였으며, 耐稀釋性은 蒸溜水로 2~128倍까지 稀釋處理하였다. 또한 水素이온濃度의 변화에 따른 비름汁液의 TMV 抑制效果는 pH 3~11을 1N HCl 및 NaOH로 適定한 後 使用하였고, 汁液의 活性炭에 의한 吸着性은 5~15%의 活性炭을 處理하였다. 한편 비름汁液의 利用性은 지금까지 TMV 感染抑制가 높은 것으로 잘 알려진 *C. album*의 汁液과 함께 各 *N. glutinosa*에 塗抹한 後 1日 간격으로 灌水하면서 抑制效果의 持續性을 檢討하였다.

TMV 抑制物質의 純化: 비름汁液으로부터 TMV 抑制物質을 Wyatt and Shepherd의 方法¹³⁾에 따라 純化하였다. 凍結保存한 비름의 잎은 2:1(w/v)의 比率로 蒸溜水를 넣고 磨碎하여 가아제로 濾過한 後, 20% 醋酸을 넣어 pH 4.3으로 만들었다. 그 汁液에 0.375倍의 95% ethanol을 加해 30分間 攪拌시킨 後, 3000 rpm에서 10分間 遠心分離하여, 上澄液을 취했다. 이 上澄液에 다시 95% ethanol을 1.25倍 添加하여 攪拌시킨 다음, 3000 rpm에서 遠心分離하여 얻은 沈澱物에 2% NaCl溶液을 넣고, 1日 동안 懸濁시켰다. 懸濁液은 2000 rpm에서 5分間 遠心分離하여 不容性物質을 除去한 다음, 그 上澄液을 4°C에서 蒸溜水에 1日間 투석하여 TMV 抑制物質을 純化하였다.

電氣泳動: 純化된 비름의 抑制物質은 Davis의 電氣泳動法⁴⁾에 따라 10% polyacrylamide gel을 使用하여 단백질패턴을 調査하였다. 이때 완충액은 Tris-glycine (pH 8.3)을 사용, 各 gel 당 2mA로 1시간 동안 電氣泳動하였다. 泳動한 gel은 0.25% Coomassie Brilliant blue로 染色한 後 Choi 등의 方法³⁾에 따라 水醋酸 및 methanol로 脫色하였다. 한편 電氣泳動結果 나타난 各 단백질成分은 泳動後 marker(bromophenol blue)의 이동거리가 같은 것 일부를 染色하여, 染色된 band와 比較, 各 band를 切斷, 分離시킨 後, 蒸溜水를 넣고 1日間 4°C에서 침출시킨 다음, 各 단백질成分의 TMV 抑制效果를 檢定하였다.

結果 및 考察

供試한 6種의 비름科 植物汁液을 *N. glutinosa*에 塗抹한 後, TMV를 接種한 結果, 비름(*A. mangostanus*)과 개갠드라미(*C. argenta*) 등 2種의 汁液處理區에서 높은 抑制效果를 나타내어, 各 各 94.6% 및 93.9%였다(Table 1). 나머지 4種의 비름科 植物은 50~80%의

Table 1. The inhibitory effects on *Nicotiana glutinosa* against TMV infection of crude sap extracted from Amaranthaceae plants

Test plant	No. of local lesions ^a		Inhibition % ^b
	Leaves pre-coated with the sap	Control leaves	
<i>Amaranthus mangostanus</i>	30	551	94.5
<i>A. viridis</i>	78	636	72.0
<i>Celosia cristata</i>	46	274	83.2
<i>C. argenta</i>	16	260	93.8
<i>A. caudatus</i>	138	333	58.5
<i>Gomphrena globosa</i>	211	526	59.8

^a Total number of local lesions induced on four to eight half-leaves of *Nicotiana glutinosa*.

^b Inhibition % = (No. of lesions without inhibitor) - (No. of lesions with inhibitor) / No. of lesions without inhibitor × 100.

效果를 보였다. 이 結果는 지금까지 植物바이러스에 對한 感染抑制作用이 가장 높은 것으로 알려진 명아주科 植物^{2,7,11,12,15,16)}이나 자리공科植物^{7,9,14)} 등과 同等的 效果를 나타내고 있다.

野外에서 採取한 비름잎의 汁液은 熱處理하였을 때, 溫度가 높아질에 따라 TMV 抑制效果는 급격히 低下되어, 60°C가 77.9%, 100°C 處理에서는 20.9%로 떨어졌다(Table 2). 이 結果는 비름汁液속에 있는 TMV

Table 2. The effects upon the inhibitory action of the crude sap extracted from *A. mangostanus* against TMV infection after heat treatment, storage *in vitro* and dilution

Treatment	No. of local lesions ^a		Inhibition % ^b	
	Leaves pre-coated with the sap	Control leaves		
Heat treatment				
(°C)	60	161	727	77.8
	70	590	881	33.0
	80	539	700	23.0
	90	815	1020	20.0
	100	698	894	21.9
Storage <i>in vitro</i>				
(day)	1	102	766	86.3
	2	157	477	67.0
	3	237	564	57.9
	4	342	702	51.2
	5	457	714	35.9
Dilution with water				
	1	27	430	93.7
	1/2	56	476	88.2
	1/4	122	628	80.5
	1/8	167	528	68.3
	1/16	194	359	45.9
	1/32	280	376	25.5
	1/64	230	261	11.8
	1/128	262	267	1.8

^a and ^b See Table 1.

感抑制物質이 熱에 對해서는 비교적 不安定하다는 것을 나타내고 있다. 비름汁液의 耐保存性은 1日間 保存한 것(86.3%)을 제외하고 2日 以上の 保存은 낮은 抑制作用을 보였으며, 蒸溜水로 倍水稀釋處理한 耐稀釋性도 4 倍까지의 稀釋液에서는 80% 以上の 效果를 보였으나, 그 以上の 稀釋倍水에서는 낮게 나타났다.

한편 비름汁液의 水素이온濃度の 變化에 對한 耐性은 넓은 영역의 pH에 安定性을 보였고, 特別 酸性의 영역에서는 pH3 정도의 強酸에서도 90% 以上の 높은 效果를 나타냈다(Table 3). 그러나 活性炭에는 쉽게 吸着되어 바이러스抑制作用을 消失하는 結果를 보여, 處理한 5~15%의 濃度에서 約 20% 정도의 效果를 나타냈다(Table 4). 이와 같은 結果는 비름汁液의 TMV 抑制物質이 단백질성임을 暗示해 주고 있으며, 이미 報告

Table 3. The effects of charcoal treatment upon the inhibitory action of the *A. mangostanus* sap against TMV infection

Concentration of charcoal(%)	No. of local lesions ^a		Inhibition ^b %
	Leaves pre-coated with the sap	Control leaves	
5	844	1176	28.2
10	609	796	23.4
15	941	1010	6.8

^a Total number of local lesions induced on ten half-leaves of *N. glutinosa*.

^b See Table 1.

Table 4. The effects of hydrogen-ion concentration upon the inhibitory action of the *A. mangostanus* sap against TMV infection

Hydrogen-ion concentration	No. of local lesions ^a		Inhibition ^b %
	Leaves pre-coated with the sap	Control leaves	
pH 3	144	1409	89.7
5	155	1805	91.4
9	326	1868	82.5
11	357	1186	69.8

^a Total number of local lesions induced on twelve half-leaves of *N. glutinosa*.

^b See Table 1.

된 *P. esculenta*¹⁾, 시금치⁸⁾, *C. album*^{2),14),16)} 등과 유사한 結果를 보여주고 있다.

Ethanol 沈澱法으로 精製한 비름汁液의 단백질은 70.7%의 TMV 感抑制效果를 나타내, 비름의 抑制物質이 단백질성임을 나타냈다. 精製한 비름의 단백질을 電氣泳動하였을 때, 3種의 major band와 4種의 minor band가 分離되었는데(Fig. 1), 이들중 3種의 major band를 各各 分離하여, 各成分의 TMV 抑制效果를 調査한 結果, top 成分의 단백질이 TMV 抑制效果를 갖는 것으로 나타났다(Table 5). 그러나 이들 結果는 汁液(crude sap)을 使用하였을 때 보다 바이러스抑制能이 낮게 나타나, top 成分 이외에 다른 抑制因子가 비름汁液에 存在할 可能性을 보여 주었는데, 이는 금후 상세히 검토될 문제로 생각된다. 또한 top 成分이 異質性을 나타냈기 때문에(Fig. 1) 이의 分離 및 精製는 제 2의 抑制因子 탐색에 도움을 줄 것으로 생각된다. 한편 *P. americana*⁷⁾, *C. album*²⁾, *C. amaranticolor*^{2),11),12)} 등의 단백질제된 역시 비름과 유사

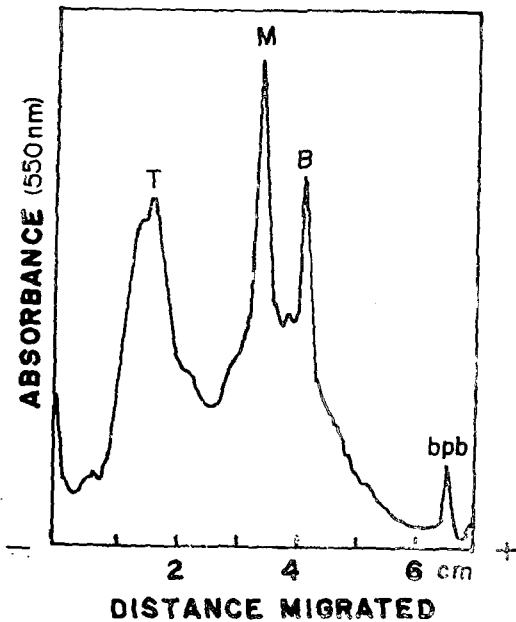


Fig. 1. Densitometric tracing of the protein components purified from *A. mangostanus* in 10% polyacrylamide gel electrophoresis. T: top component, M: middle component, B: bottom component, bpb: bromophenol blue as a marker.

Table 5. The inhibitory effects on TMV infection of protein components eluted from the polyacrylamide gel electrophoresis bands

PAGE-band	No. of local lesions ^a		Inhibition ^b %
	Leaves pre-coated with the protein	Control leaves	
Top	415	891	53.4
Middle	528	576	8.3
Bottom	691	760	9.0

^a Total number of lesions induced on eight half-leaves obtained from two replicates.

^b See Table 1.

한 3種의 major band를 나타내고 있어, 植物바이러스의 感染抑制效果를 갖는 高等植物汁液의 단백질과 葉의 유사성은 매우 흥미있는 結果로 생각된다.

비름汁液의 實用性檢定을 위해서 *N. glutinosa* 잎 표면에 塗抹후의 TMV 抑制持續性을 *C. album* 汁液과 비교한 結果는 *C. album*에 비해 비름汁液의 持續性이 긴것으로 나타나(Fig. 2), 명아주科植物보다도 비름汁液의 實用性이 높을 것으로 생각되었다.

以上の 結果를 종합해 볼 때, 本實驗에서 使用한 비

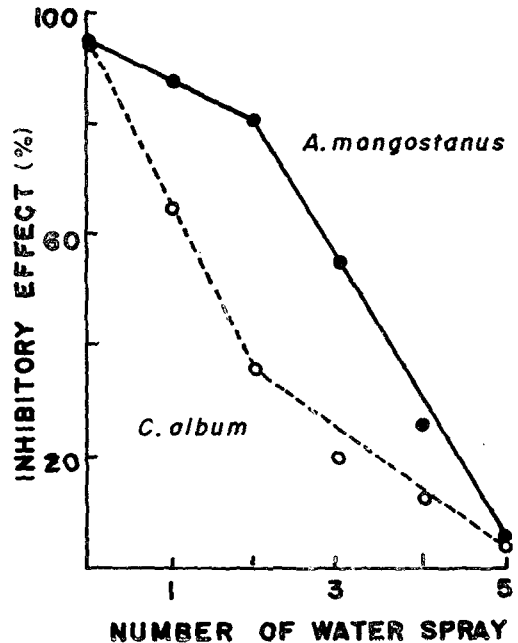


Fig. 2. The inhibitory maintenance against TMV infection after spraying with water on leaves of *N. glutinosa* pre-coated with the sap of *A. mangostanus* and *Chenopodium album*.

름汁液의 TMV 感染抑制效果는 지금까지 잘 알려진 명아주科, 자리공科 植物들의 바이러스感染抑制效果와 同等的한 좋은 結果를 나타냈다. 따라서 어느 곳에서든지 쉽게 採取 調製 利用할 수 있는 비름汁液을 TMV 病 예방을 위해 사용된다면 경제적인 측면에서 유리한 實用性을 기대할 수 있을 것으로 보여진다.

摘 要

비름科 植物汁液에 의한 TMV 感染抑制效果는 供試한 6種의 비름植物중 비름이 94.6%로 가장 높은 效果를 나타냈다. 비름汁液의 物理化學的性質중, 耐熱性은 60°C, 耐保存性은 1日, 耐稀釋性은 1/4 稀釋濃度까지 높은 效果를 나타냈다. 한편 水素이온 濃度의 變化에는 매우 安定된 性質을 보였으며, 特別히 酸性영역에서는 모두 90% 以上の 抑制效果를 보였다. 그러나 비름汁液을 活性炭으로 處理하였을 경우는 TMV에 對한 抑制效果는 거의 消失되었다. 비름汁液에서 抽出한 단백질은 電氣泳動결과, 3種의 主成分으로 分離되었고 이들 중 top 成分에서 TMV 抑制效果가 나타났다. 비름汁液의 實用化를 위한 塗抹液의 效果持續性은 2회 灌水에서 80% 정도의 抑制能을 보였다.

引用文献

1. Bawden, F.C. 1954. Inhibitors and plant viruses. *Advan. Virus Res.* 2 : 31-57.
2. 崔章京. 1983. 명아주科植物汁液의 TMV 感染阻止効果, 江原大論文集 18 : 105-109.
3. Choi, J.K. and S. Wakimoto. 1979. Characterization of the protein components of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45 : 32-39.
4. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. New York Aca. Sci.* 121 : 404-427.
5. Duggar, B.M. and J.K. Armstrong. 1925. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. *Ann. M. Bot. Gard.* 12 : 359-366.
6. Grasso, S. and R.J. Shepherd. 1978. Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. *Phytopathology* 68 : 199-205.
7. Kamiyo, H. and T. Taniguchi. 1982. Isoelectric focusing and some other properties of a virus inhibitor purified from *Phytolacca americana*. *Phytopath. Z.* 104 : 316-324.
8. Kuntz, J.E. and J.C. Walker. 1947. Virus inhibition by extracts of spinach. *Phytopathology* 37 : 561-579.
9. Owens, R.A., G. Bruening and R.J. Shepherd. 1973. A possible mechanism for the inhibition of plant viruses by peptide from *Phytolacca americana*. *Virology* 56 : 390-393.
10. Ragetti, H.W.J. and W. Weintraub. 1962. Purification and characteristic of a virus inhibitor from *Dianthus caryophyllus* L.I. Purification and activity. *Virology* 18 : 232-240.
11. Taniguchi, T. and T. Goto. 1976. Purification of an inhibitor of plant virus infected occurring in the leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 42 : 42-45.
12. Taniguchi, T. and T. Goto. 1979. Purification and some properties of a virus inhibitor occurring in leaves of *Chenopodium amaranticolor*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 45 : 135-141.
13. Van Kammen, A., D. Noordam and T.H. Thung. 1961. The mechanism of inhibition of infection with tobacco mosaic virus by an inhibitor from carnation sap. *Virology* 14 : 100-108.
14. Wyatt, S.D. and R.J. Shepherd. 1969. Isolation and characterization of a virus inhibitor from *Phytolacca americana*. *Phytopathology* 59 : 1787-1794.
15. 吉井甫, 佐古宣道. 1967. アカザ搾汁液のウイルス感染阻止作用について. *日植病報* 33 : 244-252.
16. Yoshizaki, T. and D. Murayama. 1966. Inhibition of tobacco mosaic virus by the juice extracted from *Chenopodium* plants. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 32 : 267-274.