

발간등록번호

11-1541000-001397-01

식물추출물을 이용한 작물곰팡이병 방제 친환경농자재 개발

(Development of antifungal protectants for plant disease
using plant extracts)

(재)제주테크노파크

농림수산식품자료실



0009640

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물추출물을 이용한 작물곰팡이병 방제 친환경농자재 개발” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2012년 7월 24일

주관연구기관명 : (재)제주테크노파크

총괄연구책임자 : 정 용 환

연 구 원 : 송 관 필

연 구 원 : 윤 원 종

연 구 원 : 김 길 남

연 구 원 : 오 대 주

연 구 원 : 함 영 민

연 구 원 : 김 지 현

협동연구기관명 : (주)아이지에스

협동연구책임자 : 최 한

협동연구기관명 : 가천대학교

협동연구책임자 : 강 세 찬

요 약 문

I. 제 목

식물추출물을 이용한 작물곰팡이병 방제 친환경농자재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 벼, 잔디 등의 작물곰팡이 병원균에 대한 제주 자생식물 추출물 유래 저독성 친환경농자재 개발에 있다.

화학농약은 작물보호와 생산량 확보에 필수적이거나 최근 본래의 유익한 면보다 농약의 과용, 오용, 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향과 약제 저항성 출현 등에 의한 약효저조 등의 농약에 의한 부작용에 따른 부정적 시각이 점차 증대되는 경향이 높다. 최근, 선진 각국에서 합성농약의 사용을 줄이고자 하는 국가적 연구프로젝트가 많이 증가되고 있으며, 사회적으로도 이러한 활동을 목표로 하는 농업단체가 늘어나고 있다. 우리나라도 2008년 친환경농업 육성법 시행규칙을 확대 개정하는 등 비료와 농약의 사용을 저감하고 유기농산물 생산 장려 및 병해충관리에 대한 친환경 농자재의 사용을 적극적으로 장려하고 있다. 따라서, 천연자원식물로부터 식물병에 효과가 뛰어난 활성성분을 분리 추출해 식물병을 관리·방제하는 작물보호제의 개발 및 산업화가 절실한 실정이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 제주 자생생물 자원 717점을 대상으로 식물도열병(*Magnaporthe grisea*), 라이족토니아병(*Rhizoctonia* spp.) 등의 작물곰팡이병 방제제 또는 선도화합물(유효물질 등)을 개발하여 제주 자생식물 후보군으로부터 작물곰팡이병 억제 추출물 확보, 유효분획 획득, 성분 분리 및 동정 등의 과정을 통하여 물질확보에 대한 노력과 작물곰팡이병 억제 작용메카니즘 규명과정을 통해 특허등록 추진과 함께 시제품을 생산하여 벼 생육관찰을 위해 논과 잔디 생육관찰을 위한 골프장 등 유효 천연물 제제의 현장적용 시험을 통하고 최종 선정 후보군에 대하여 시제품을 생산하여 농촌진흥청고시 “농약의 등록시험기준과 방법”에 따라 안전성 시험을 통하여 상품화하고자 한다.

IV. 연구개발결과

본 연구에서 작물곰팡이병 관련 식물도열병(*Magnaporthe grisea*), 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*), 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 작물역병(*Phytophthora capsici*) 병원균을 대상으로 제주 생물자원 717점을 적용한 결과 식물도열병(*Magnaporthe grisea*) 항곰팡이능을 갖는 추출물은 20점, 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*) 항곰팡이능을 갖는 추출물은 4점, 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*) 항곰팡이능을 갖는 추출물은 7점, 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 항곰팡이능을 갖는 추출물 2점, 작물역병(*Phytophthora capsici*) 항곰팡이능을 갖는 추출물 3점 등 각각의 병원균에 항곰팡이 활성을 갖는 후보균을 확인하였다.

도출된 연구결과를 바탕으로 기존의 문헌, 논문, 특허 등의 조사를 통해 친환경유기농자재 등록 가능성이 있는 최종시료를 JBR325(갯까치수영), JBR563(돈나무), JBR580(자귀나무), JBR701(GNC, 대황추출물) 등 4종을 선정하였다.

JBR325(갯까치수영)인 경우, 갯까치수영 전초의 80% 에탄올 추출물, 그 추출물의 부탄올 등의 분획물 그리고 그 분획물로부터 Anagallosaponin IV, Anagallosaponin VIII, Anagallisin C 등 총 3개의 단일물질을 분리하여 구조분석을 완료했으며 각각의 물질은 식물도열병(*Magnaporthe grisea*)에 높은 활성을 보이는 결과를 도출했다. 또한, 이 추출물은 급성경피독성 및 급성경구독성 평가시 저급독성임을 확인했다.

JBR563(돈나무)인 경우, 돈나무 열매의 80% 에탄올 추출물, 그 추출물의 부탄올 등의 분획물 그리고 그 분획물로부터 Saponin IIIA₃의 단일물질을 분리하여 구조분석을 완료했으며 이 물질은 식물도열병(*Magnaporthe grisea*)에 높은 활성을 보이는 결과를 도출했다. 분리된 물질을 함유하는 추출물인 JBR563(돈나무)은 급성경피독성 및 급성경구독성 평가시 저급독성임을 확인했다.

JBR580(자귀나무)인 경우, 자귀나무 잎과 열매의 80% 에탄올 추출물, 그 추출물의 부탄올 등의 분획물 그리고 그 분획물로부터 Quercitrin 이라는 대표적인 지표물질을 분리하여 구조분석을 완료했으며 이 물질을 포함한 JBR580(자귀나무) 추출물은 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*)에 높은 활성을 보이는 결과를 도출했다. 특히, JBR580(자귀나무) 제제물도 급성경구독성, 급성경피독성, 피부자극시험, 안점막자극시험, 어독성 등 환경독성 분야 모두 III급 또는 IV급 저독성으로 판정되었다.

JBR701(GNC, 대황추출물)은 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*)에 높은 활성을 보이는 결과를 도출하여 어독성 평가 등 환경독성 시험 등의 자료를 바탕으로 농촌진흥청의 고시기준을 통과하여 2010년 4월 15일 친환경유기농자재 목록에 새롭게 등록이 되었다.

각각의 추출물에 대한 분자생물학적 기전연구에서도, 갯까치수영 추출물 및 부탄올 분획물, 이로부터 분리된 anagallosaponin IV, VIII는 벼도열병에 대해 Pectate lyase의 발현을 농도의존적으로 억제하여, 벼의 식물세포벽을 유지하는 pectin 분해를 억제하여 식물곰팡이의 infection을 억제하는

것으로 확인되었다. 특히, 본 연구결과 갯까치수영추출물과 자귀나무추출물이 동시에 pectate lyase 을 억제하는 것으로 보아, 벼도열병의 식물에 대한 병인을 제거하는 기전이 유사할 것으로 판단되는 결과도 도출되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서 작물곰팡이병 방제 가능성을 보여준 제주 자생생물 자원 유래 천연 추출물 4 가지 후보군을 도출하였고 이 결과들은 지적재산권 확보를 위해 3건의 특허가 출원되었으며, JBR701(GNC, 대황추출물)제주물은 농촌진흥청 친환경유기농자재 목록에 등재되었다. 하지만 도출된 성과와 더불어 면밀한 현장적용 평가를 수행하여 작물이 식재된 토양의 미생물과의 상호관계 등 몇가지 해결점을 선행하고 제제 및 제형연구와 품질관리를 위하여 다양한 지표에 대한 후속연구가 필요하다고 사료된다.

향후, 이들의 연구성과 등은 참여기업 또는 그 외 기업들을 통해 조기 상품화를 수행하여 벼도열병 및 제주 친환경골프장 등의 곰팡이병 방제를 위한 친환경유기농자재로 활용할 계획이다.

SUMMARY

The present study aim to develop of antifungal protectants using Jeju natural resources extracts and fractions against plant disease agent *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*, *Pythium graminicola*, *Botrytis cinerea* and *Phytophthora capsici*. In this study, 717 80% ethanol extracts of Jeju natural resources were screened for antifungal activity against several fungi; *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*, *Pythium graminicola*, *Botrytis cinerea* and *Phytophthora capsici*.

Of 717 extracts obtained from Jeju natural resources, four candidate plant extracts, JBR325 (*Lysimachia mauritiana*), JBR563 (*Pittosporum tobira*), JBR580 (*Albizia julibrissin*) and JBR701 (GNC, *Rheum coreanum*), were finally selected based on the inhibition zone diameter and radial growth rate test for antifungal activity.

For antifungal activity, the 80% ethanol extract of *Lysimachia mauritiana* leaf and *Pittosporum tobira* fruits were tested by using the paper disc diffusion method against two fungi, *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* and *R. cerealis*, respectively. The two crude extracts were significantly inhibited the conidial germination of both pathogenic fungi. The results showed that the two crude extracts have 80% or more inhibitory effect on *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* and *R. cerealis*. And then, we analyzed *in vitro* antifungal activity of their *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol, and aqueous-fractions of two plant materials on *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* and *R. cerealis*. The BuOH fractions of their plants were significantly inhibited the conidial germination of both pathogenic fungi.

Anagallosaponin IV, anagallosaponin VIII and anagallisin C are proved functional constituent of JBR325 (*Lysimachia mauritiana*) for antifungal effect by subfractionation and separation test. The saponin IIIA3 are proved functional ingredient of JBR563 (*Pittosporum tobira*). HPLC, NMR, and LC-MS analysis method for four compound, Anagallosaponin IV, anagallosaponin VIII, anagallisin C, and saponin IIIA₃, is determined.

In addition, Anthraquinones are proved major constituent of JBR701 (GNC, *Rheum coreanum*) for antifungla effect by subfraction and separtion test. Chrysophanic acid, aloe-emodin, Emodin wer rheum specific anthraquinones. These JBR701 (GNC, *Rheum coreanum*) registered as a eco-freindly crop protectants in *Rhizoctonia solani* and *R. cerealsis* at the database of Rural Development Administration (RDA) of Korea.

In toxicity test, there were low toxicity in fish, the LD50 value > 10mg/mL at 1 week later. Mortality, organ size, morphological development and severage body weight were unaffected in rats at the high dose. Hereafter, these results show that dissolved bioactive compound, anagallosapon IV, anagallosapon VIII, anagallisin C from JBR325 (*Lysimachia mauritiana*), saponin IIIA₃ from JBR563 (*Pittosporum tobira*), and anthraquinones from JBR701 (GNC, *Rheum coreanum*) played a major role in the biological control capability against *Magnaporthe grisea*, *Rhizoctonia solani* and *R. cerealis*.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Section 1. Research Purpose	1
Section 2. Research Necessity	6
Section 3. Research Organization	9
Chapter 2. Current State of Technological Development	10
Section 1. Technological State of Natural Agricultural Chemicals	10
Section 2. Research State of Natural Agricultural Chemicals	11
Chapter 3. Research Contents and Results	16
Section 1. Materials and Methods	16
Section 2. Results	25
Chapter 4. Research Achievement and Contribution	94
Section 1. Achievement of Purpose	94
Section 2. Contribution	96
Chapter 5. Application Plans of Research Results	98
Section 1. Plans of Industrial Development	98
Chapter 6. Collected Novel Information	99
Chapter 7. References	101

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 목적	1
1.	최종목표 및 내용	1
2.	개발 배경	1
3.	개발대상 제품 개요	2
4.	년차별 연구개발 내용 및 범위	3
제 2 절	연구개발의 필요성	6
1.	연구개발 기술의 중요성	6
2.	친환경농업 시책의 확대 시행	8
제 3 절	연구개발의 추진체계	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	10
제 1 절	천연물 농약 기술개발 현황	10
1.	세계적 기술수준	10
2.	국내 기술수준	10
제 2 절	천연물 농약 연구현황	11
1.	국내·외의 천연물 농약 연구현황	11
2.	국내·외의 천연물 농약 시장현황	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	연구개발 재료 및 방법	16
1.	천연물 확보	16
2.	항곰팡이 효능 평가 - 1차 스크리닝	16
3.	분획물의 항곰팡이 효능 평가 - 2차 스크리닝	17
4.	지표 및 유효성분 분리정제	17
5.	활성물질의 구조분석	17
6.	벼 가뭄스트레스 처리	17
7.	추출물의 항균활성 측정	18
8.	벼 도열병 접종	18

9. 약효 및 약해 평가	18
10. 안전성 시험	19
제 2 절 연구결과	25
1. 작물곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명	25
2. 현장적용 및 병리모니터링	45
3. 작물곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구	54
4. 작물곰팡이병 방제 분자생물학적 기전연구	73
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 1 절 연구개발목표의 달성도	94
1. 목표달성도	94
2. 연구개발 실적	95
제 2 절 관련분야 기여도	96
1. 기술적 측면	96
2. 경제적 측면	96
3. 사회적 측면	97
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	98
제 1절 산업화 계획	98
1. 사업화 계획	98
2. 기술확산 계획	98
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	99
1. ABIC 2009	99
2. 2010 BIO TWIWAN	99
3. 딸기 저장병 방제 관련	100
제 7 장 참고문헌	101

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 최종목표 및 내용

가. 최종목표

제주 자생식물 자원의 추출물을 이용한 작물 곰팡이병 방제 친환경농자재 개발

- (1) 작물곰팡이병 억제 활성 추출물질 분리·동정 및 효과 규명
- (2) 활성물질 생산 최적화 및 활성물질의 quality control system 구축
- (3) 작물곰팡이병 방제용 작물보호제의 현장적용 평가
- (4) 작물곰팡이병 방제용 친환경농자재 개발 및 등록

나. 연구내용

- (1) 작물곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명
 - (가) 제주 자생식물의 천연추출물 대상 작물곰팡이병 방제능 평가
 - (나) 우수분획 분리, 유효성분 및 지표성분 규명
 - (다) 작물곰팡이병 방제 현장적용 연구
- (2) 작물곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구
 - (가) 작물곰팡이병 방제 천연추출물의 원물표준화 연구
 - (나) 작물곰팡이병 방제 천연추출물의 최적추출공정 연구
 - (다) 농자재 등록을 위한 약효, 약해 평가 및 안전성(독성) 평가
- (3) 작물곰팡이병 방제 분자생물학적 기전 연구
 - (가) Gene fishing 기술을 이용한 식물 infection 유전자 규명
 - (나) 유효성분의 유전자 발현양상 평가
 - (다) 유효성분 및 제품의 식물병 방제 작용기전 규명

2. 개발 배경

제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발 이래, rotenone제 및 micotine 제 등이 발견되어 왔으나, 전세계적으로는 현재 작물보호제로는 약 750종이 농약으로 개발되

고 있다. 그러나, 현재 천연물을 이용한 저독성, 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어 왔다. 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다. 현재, 국내 농가에서 이용되고 있는 농약은 98%가 유기합성농약으로 외국에서 개발되어 도입된 것으로 국내에서 개발된 농약이 없는 실정이다. 천연물 유래 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다.

최근 소비자들은 안전한 먹거리 요구가 증가에 따라 저독성인 바이오농약의 사용이 점차 증가되고 유기 농업이 지속적으로 신장되고 있다. 국내 바이오농약 시장을 보면 2001년도 전체 농약시장의 0.7% 미만으로 가격경쟁력과 불안정한 품질의 이유로 개발이 늦어지고 있는 실정이다. 국내외적으로 합성농약 개발에 비해 시간 및 비용을 크게 절감할 수 있는 천연물 유래 농약개발에 힘을 쏟고 있으며 이와 관련된 시장은 급격히 증가될 전망이기에 미래의 방제 전략은 병해충 종합관리(IPM)방식이 필수적이며 생물적 방제법과 함께 이용되어야 한다고 할 수 있다. 따라서 저독성, 친환경 천연물 유래 생물농약의 개발이 필수적이라고 할 수 있다.

3. 개발대상 제품 개요

구 분	내 용
대상제품	작물곰팡이병 방제제(벼 및 잔디 위주)
용 도	작물곰팡이병인 식물도열병(<i>Magnaporthe grisea</i>), 라이족토니아병(<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. cerealis</i>), 피시움잎마름병(<i>Pythium graminicola</i>), 잿빛곰팡이병(<i>Botrytis cinerea</i>), 작물역병(<i>Phytophthora capsici</i>) 병원균 억제용 친환경유기농자제
특 성	천연 활성물질을 분리, 이용하므로 화학적 합성을 통한 스크리닝 및 합성비용이 원천적으로 절감됨
기대효과	친환경유기농자제 등록 및 산업화를 통한 국산 농산물의 안정성 확보 친환경 재배 작물의 국제 경쟁력 확보로 인한 구산농산물 수출 증대 화학농약의 사용량 조절에 의한 토양의 질 증대 및 생태계 오염 감소화

4. 년차별 연구개발 내용 및 범위

가. 2009년도(1차년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	작물 곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명 (주관기관/ 제1세부)	천연물 확보	○ 식물유래 조추출물 확보 662점 이상
		항곰팡이력 스크리닝	○ Radial growth test에 항곰팡이력 분석 - 작물도열병, 라이족토니아병, 작물역병 젯빛곰팡이병
		항곰팡이력 효능검증	○ 유효 조추출물의 분획별 항곰팡이력 효능 검증 - fraction guided assay
		유효성분 및 지표성분 규명	○ NMR 구조분석
		작물도열병 현장적용	○ 작물도열병 유효성분 함유 분획물의 현장적용 및 병리 모니터링(위탁)
	작물 곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구 (제1협동)	식물추출물 원물 확보 및 추출 공정 확립	○ 주관기관으로부터 여뀌과 식물들의 원물을 제 공받음
		식물추출물의 유효성분 및 지표성분 규명	○ 지표성분인 Anthraquinone 성분 분석 ○ HPLC를 이용한 지표성분 분석 ○ GC-MS를 이용한 잔류용매 분석
		각 식물추출물의 표준분석법 확립	○ HPLC를 이용한 지표성분 분석
		GNC-011의 안정성시험	○ 급성독성 시험 ○ 어독성 시험
		GNC-011의 식물병에 대한 약효약해 평가	○ 잔디도열병에 대한 약효 약해 시험 수행
	작물 곰팡이병 방제 분자생물학적 기진연구 (제2협동)	추출물, 병인균 수령 / 자료조사	○ 추출물, 병인균 수령/리스트 업 ○ 추출물 / 병인균 stock
		Genefishing 조건 (dose 결정)	○ 농도별 천연물 배지에 따른 생장억제 평가 ○ 생장억제평가에 따른 LD ₅₀ 설정
		유전자 분석 / 규명	○ Genefishing 평가에 따른 유전자 발현양상 평 가 및 발현의 차이를 보이는 유전자 규명
		단백질 발현 평가	○ LD ₅₀ 설정과 유전자 규명에 따른 단백질 평가 준비 및 antibody 설정

나. 2010년도(2차년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	작물 곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명 (주관기관/ 제1세부)	식물유래 천연물 확보	○ 식물유래 조추출물 705점 확보(1,2차년도) - 추출수율: 8~43%
		항공광이력 스크리닝	○ 항공광이력 분석(Radial growth test) - 도열병(벼 및 잔디), 라이족토니아병, - 작물역병, 잿빛곰팡이병
		지표성분 표준분석법 확립	○ 식물추출물의 지표성분을 이용한 표준 분석법 확립 - 단계별 분석법 정립 중
		유효성분 및 지표성분 규명	○ LC-MS/MS 및 NMR spectrum 분석 - 유효물질 4점 규명
		도열병방제 현장적용	○ 도열병균에 대한 유효성분 함유 분획물의 현장적용 및 병리 모니터링(위탁과제)
	작물 곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구 (제1협동)	GNC-011의 친환경 유기 농자재 등록	○ 농촌진흥청 친환경 유기농자재 목록고시 완료(2010. 4. 15)
		JBR563(0.1%)의 최적 추출공정 확립	○ 작물병해 방제 식물추출물의 최적 추출 공정 연구 ○ 6회 반복시험을 통한 공정안정화 시험 ○ Scale up 적용
		JBR563(0.1%)의 안정성시험	○ 급성독성 시험(수행 중) ○ 어독성 시험(수행 중)
		식물병에 대한 JBR563(0.1%)의 약효약해 평가	○ 잔디도열병에 대한 약효 약해 시험 수행 - 시험성적 의뢰를 위한 자체시험 수행
		JBR563(0.1%) 유효물질 최적 추출공정 확립	○ 작물병해 방제 식물추출물의 최적 추출 공정 연구
	작물 곰팡이병 방제 분자생물학적 기전연구 (제2협동)	추출물에 대한 단백질 발현 평가	○ 추출물에 대한 병인균의 단백질 발현 분석 - 각 유전자에 대한 단백질이 밝혀져 있지 않아 transcribe에 대한 작용기전 평가
		유효성분의 유전자 발현양상 분석	○ 유효성분의 유효 dose 설정 ○ 유전자 발현 양상 분석 - 발현 및 억제유전자 탐색
		성분 및 추출물의 작용기전 규명	○ 1차년도의 추출물과 2차년도의 성분에 의한 발현유전자의 차이가 규명되어, 3차년도의 표준추 출공정에 의한 시료와 유효성분에 의한 공통발현 조절 유전자를 선별할 필요가 있음 - 이에 대한 기초연구 완료 (신규 유전자 17개 규명)

다. 2011년도(3차년도)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구범위
3차 년도 (2011)	작물 곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명 (주관기관/제1세부)	유효천연물 함유 식물자원 추가 확보	- 제주 자생식물 대상 추가 자원 확보 - 식용·약용작물 대상 추가 자원 확보
		지표성분 표준분석법 확립	- 지표성분을 이용한 표준분석법 확립 - 지표성분 최대함유 분석조건 확립
		유효물질 분리 및 구조결정	- 유효물질의 최적분리 및 구조결정 - 역병 등 항공광이 효력 유효물질 결정
		유효성분 함유 식물 대량생산 조건 탐색	- 종자과중, 삼목 등 유용 식물자원 대량 번식방법 탐색
		분리 유효물질 적용을 위한 작물 다양화	- 과실 및 채소류 곰팡이병 적용 - 라이족토니아, 달라스팻병 방제물질 분리
		유효추출물의 간접효과 기작규명	- 간접효과가 유도저항성인지 아니면 침 투이행에 의한 것인지를 Po실험을 통 해 규명(위탁과제)
		유효추출물의 도열병 포장방제 효과	- 도열병 상시 발병포장에서 발병율을 통해 규명(위탁과제)
		후보자원의 표준재배법 연구	- 종자과중 및 삼목 등에 의한 재배법 연구
	작물 곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구 (제1협동)	신규 자생식물추출물의 추출공정 표준화 연구	- 작물병해 방제 식물추출물의 표준공정 연구 - 6회 반복시험을 통한 공정안정화 시험 - Scale up 적용
		친환경농자재 등록 시험	- 안전성, 유효성 시험 - 친환경농자재 제제검토 - 제제 안정화 시험: 가온, 가습 등 - 급성독성, 어독성 시험의뢰 (GLP)
		생물농약 기술이전 자료수집 및 전략 수립	- 친환경농자재 등록시험과 병행 - 기술이전을 위한 자료수집 - 기술이전 협의 진행
		시제품 평가	- 토양미생물(세균류) 독성여부 검증 - 시제품의 안전성 평가
		제품화 및 마케팅 활성화	- 식물병 방제제 제형화 연구 - 친환경농자재 마케팅, 홍보, 판매전략 수립 - 유용천연물 함유 제제의 최소희석배 율 적용을 통한 화학농약대비 단가폭 최소화
	작물 곰팡이병 방제 분자생물학적 기전연구 (제2협동)	유효성분 및 최종제품원료에 대한 유전자 발현조절 평가	- 최종제품과 유효성분에 대한 공통발현 조절 유전자 파악 (1,2차년도 유전자 및 3차년도 신규유전자 대상)
		유효성분의 식물병 억제 작용기전 규명	- 유효성분의 식물방제 작용기전 규명 - Target 유전자 mRNA발현 억제 및 조 절 평가
		최종 formulation 제품에 대한 억제 작용기전 규명	- 공통유전자 발현억제 및 증가를 토대 로 분석 및 유전자특허/논문발표 - 기전연구의 실용화를 위한 제품개발

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발 기술의 중요성

가. 벼 도열병

벼 도열병은 *Marnaportha grisea*에 의하여 발생하는 벼의 병해로서 전 세계 거의 모든 벼 재배지역에서 발생하며 벼에 발생하는 병해 중 가장 수량적 피해가 큰 것으로 알려져 있다 (Leung과 Taga, 1988).

벼 도열병의 방제법은 주로 화학약제 처리법과 벼 도열병균에 대한 저항성 벼 품종을 재배하는 방법 등을 사용하고 있으나 화학약제의 사용은 환경오염 및 생태계 파괴 등의 문제들로 인하여 화학약제 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 실정이며(Staub와 Sozzi, 1984) 저항성 벼 품종의 사용은 저항성 벼 품종을 감염하는 새로운 *M. grisea* 생리형 균주의 출현 가능성으로 인하여 그 효과가 감소 할 수 있는 문제점들이 있다. 따라서 이러한 문제점들을 극복하기 위해서는 생물적 분해가 가능한 친환경적이고 저항성 균주의 발생을 최소화시킬 수 있는 새로운 방제법의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 방제법에 대한 연구로는 Blasticidin과 Kasugamycin 등과 같은 미생물에서 유래되는 천연항생제를 이용하는 방제 연구가 이루어졌으며 *M. grisea* 균주에 대한 길항성 세균을 이용하는 생물학적 방제법에 대한 연구도 수행되었다(Kim 등, 1997; Takeuchin 등, 1958; Umezawa 등, 1965). 그러나 미생물 유래 천연항생제는 독성 및 고비용의 생산성 문제가 있으며 길항성 세균을 이용한 생물학적 방제는 환경변화가 방제효과에 많은 영향을 미치는 문제점들을 가지고 있다.

최근에는 항진균 활성을 가지고 있는 물질을 식물 추출물에서 탐색하는 연구가 진행 되고 있는데 식물성 항진균 물질은 식물독성이 적을 뿐 만 아니라 환경오염이 적은 친환경적 물질이라는 장점이 있다(Lange 등, 1993). Lapis와 Dumancus (1978)는 *Helminthosporium oryzae*에 대한 식물 추출물의 항진균 효과를 보여주었으며 Tewari와 Nayak (1991)은 Citrus 잎 추출물의 벼 도열병균에 대한 항진균 활성에 관한 연구를 보고하였다. Amadioha (2001)는 neem 잎의 에탄올과 증류수 추출물 그리고 neem 종자의 오일 추출액이 벼 도열병균에 대한 생장 억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 최근에는 해양미세조류들이 다양한 생리활성물질들을 가지고 있다는 연구결과가 보고되면서 해양 미세 조류로부터 새로운 항생물질 개발의 가능성에 대한 관심이 증대되고 있다 (Woodruf, 1980).

나. 라이족토니아병

Rhizoctonia spp.에 의해서 발생하는 잔디병은 미국에서 1920년부터 브라운패취(brown patch)라는 단일 이름으로 통용되어 왔으나 다양한 병징의 발현에 따라 병명에 혼동을 일으켜 (Couch 등, 1990), 1984년 미국식물병리학회(APS)에서 *Rhizoctonia cerealis*에 의한 것을 *Rhizoctonia blight*(brown patch), *Rhizoctonia cerealis*에 의한 것을 Yellow patch(cool season brown patch(cool season brown patch))로, *Rhizoctonia zea*에 의한 것을 *Rhizoctonia leaf and*

sheath spot으로 구체화하여 명명하였다(Couch 등, 1985). 국내에서도 *Rhizoctonia solani* AG2-2에 의한 벼트그라스 및 한국잔디의 마름증상을 라이족토니아마름병으로 보고한 바 있다(정 등, 1991; Kim 등, 1992). 그러나 발생생태 등에 관한 연구결과는 거의 없어 본 병해의 효율적인 방제가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

*Rhizoctonia cerealis*는 밀의 어린 유묘를 죽이거나 모잘록병을 일으키지만 식물의 줄기 기부에 병반을 더 빈번히 형성하고(Lipps와 Herr, 1982; Clarkson 등, 1983; Cromey 등 2002) 발병이 지속되면 조기 성숙하거나 도복의 피해를 입힌다(Cromey 등, 2005). 국내에서는 김 등(1991)에 의해 국내 토양 중 분포와 병원성이 보고되면서 밀 잎집눈무늬병으로 명명되었다. 또한 현재 우리나라에서 *R. cerealis*에 의한 병해로 밀과 보리의 잎집눈무늬병(sharp eyespot) 외에도, 벼 잎집눈무늬병(sheath eyespot) (Kim과 Kim, 1988), 잔디 누른잎마름병(yellow patch) (김 등, 1992)이 보고되어 있다.

한편 *Rhizoctonia solani*는 토양 전염성 병원균으로서 전세계적으로 폭넓은 기주를 가지고 있는 다범성 병원균이며, 무우 잎마름병, 벼 잎집무늬마름병, 토마토, 가지, 피망, 양배추, 파류 등의 야채류에서 발생하는 모잘록병, 벼 꺾질마름병, 딸기의 싹 마름병, 고추냉이 등의 줄기썩음병 등의 병원균으로 알려져 있다(김, 1995).

또한 *Rhizoctonia solani*는 콩, 가지, 고추, 토마토와 같은 작물의 종자에 침입하기도 하며, 한번 토양에 정착하면 지속적으로 존재할 수 있는 성질을 가지고 있다. 라이족토니아 솔라니 균은 빗물, 관수, 홍수, 기타 농기구 등에 의해서 감염지역으로부터 건전한 지역으로 전반된다.

대부분의 *Rhizoctonia solani*는 감염적온(感染適溫)이 15~18℃인데, 일부 종은 35℃까지의 고온에서도 병을 잘 유발시킨다. 일반적으로 *Rhizoctonia solani*에 의한 식물병은 침수지역이나 건조한 지역의 토양에서보다는 적당히 젖어 있는 토양에서 발생이 더 심하다. 또한 어린 식물체의 감염은 그 식물체가 부적당한 환경으로 인해 생장이 느린 경우 더욱 심하게 된다.

현재 라이족토니아 곰팡이에 의한 식물병 방제법으로는 지오파네이트-메틸(thiophanate methyl)를 사용하는 화학적 방제법이 있으며, *Rhizoctonia solani*에 대해 길항균으로 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*) BW-13균주를 이용한 경우(김 등, 2005), 트리코더마 하지아눔(*Trichoderma harzianum*)을 이용한 경우(Lee 등, 2011), 바실러스 아밀로리퀘파시엔스 KS-4(*Bacillus-amyloliquefaciens* KS-4, 기탁번호: KACC 91247P) 등을 이용한 경우(한국 특허 제10-0781472호), 정향나무(*Eugenia caryophyllata*)의 정향을 이용한 경우 등의 생물학적 방제법이 제안되어 있다.

다. 천연농약 개발의 중요성

제충국의 꽃에 함유되어 있는 살충성분인 pyrethrin의 개발 이래, rotenone제 및 micotine제 등이 발견되어 왔으나, 전세계적으로는 현재 작물보호제로는 약 750종이 농약으로 개발되고 있다. 그러나, 현재 천연물을 이용한 저독성, 친환경농약의 개발 및 필요성이 거의 무시되어 왔다. 천연물의 방대한 자원에 비해 천연물 유래의 농약개발은 매우 극소수이다. 현재, 국내 농가에서 이용되고 있는 농약은 98%가 유기합성농약으로 외국에서 개발되어 도입된 것으로 국내에서 개발된 농약이 없는 실정이다. 천연물 유래 농약은 저독성, 저약량, 저잔류성 등의 환경적 측면만 아니라 농약시장에서도 매우 큰 부가가치가 기대되는 분야이다.

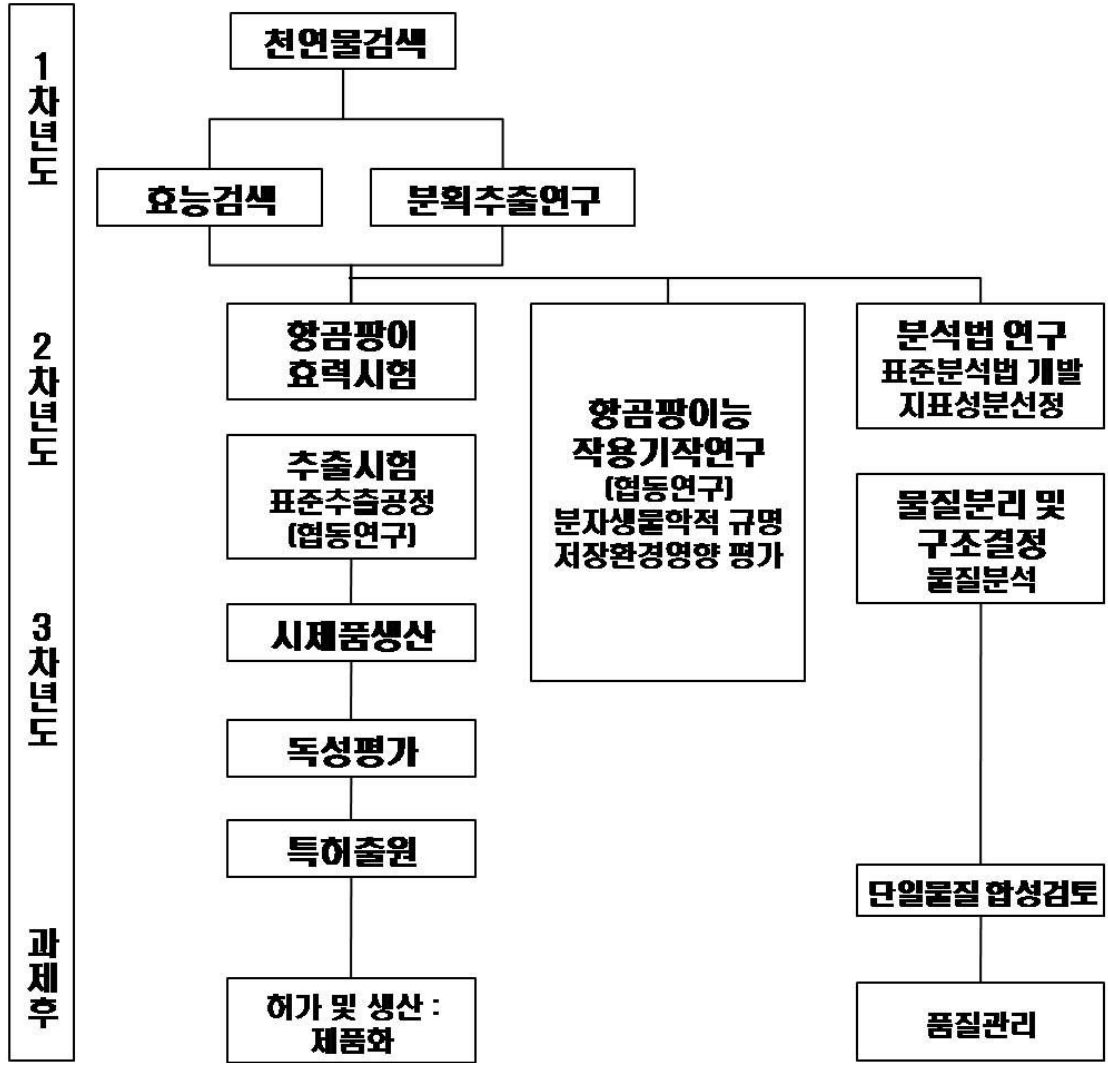
최근 소비자들은 안전한 먹거리 요구가 증가에 따라 저독성인 바이오농약의 사용이 점차 증가되고 유기 농업이 지속적으로 신장되고 있다. 국내 바이오농약 시장을 보면 2001년도 전체 농약시장의 0.7% 미만으로 가격경쟁력과 불안정한 품질의 이유로 개발이 늦어지고 있는 실정이다. 국내외적으로 합성농약 개발에 비해 시간 및 비용을 크게 절감할 수 있는 천연물 유래 농약개발에 힘을 쏟고 있으며 이와 관련된 시장은 급격히 증가될 전망이기에 미래의 방제 전략은 병해충 종합관리(IPM)방식이 필수적이며 생물적 방제법과 함께 이용되어야 한다고 할 수 있다. 따라서 저독성, 친환경 천연물 유래 생물농약의 개발이 필수적이라고 할 수 있다.

2. 친환경농업 시책의 확대 시행

화학농약은 작물보호와 생산량 확보에 필수적이거나 최근 본래의 유익한 면보다 농약의 과용, 오염, 독성, 환경오염 및 자연생태계에 미치는 악영향과 약제 저항성 출현 등에 의한 약효 저조 등의 농약에 의한 부작용에 따른 부정적 시각이 점차 증대되는 경향이 높다. 화학농약의 과다한 사용은 천적을 멸종시키고 토양오염뿐 아니라 수질오염, 식품오염을 초래하여 인간과 동식물 등의 생태에 중대한 영향을 주기 때문이다. 단위 면적당 농약과 비료의 과다 사용이 토양의 질을 저하시키는 영향을 준다.

소비자들의 생활양식이 건강과 환경을 중시하는 쪽으로 바뀌면서 전세계적으로 유기농산물의 소비가 빠르게 증가되고 있는데, 소비자들의 유기농산물 수요증가로 인하여 전세계 유기농산물 재배면적은 1998년 750만ha에서 2006년 3,042만ha로 연 평균 19.1%씩 증가(IFOAM, 2008)하고 있다. 우리나라의 유기농산물 생산실적도 1990년대 후반 이후 급속도로 증가하고 있는데, 연도별 유기농산물 인증실적을 보면, 농가수는 2000년 353호에서 2007년 7,507호로 매년 54.8% 증가하여 인증면적은 2000년 296ha에서 2007년 9,729ha로 매년 64.7% 증가하고 있는 실정이다.

제 3 절 연구개발의 추진체계



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연물 농약 기술개발 현황

1. 세계적 기술수준

현재 전 세계적으로 등록된 바이오농약이 200여종으로 알려져 있으며, 이들 바이오 농약의 개발은 비교적 소규모 회사들을 중심으로 이루어지고 있다는 점과 대부분 미생물에 근간한 미생물농약 개발이 주를 이루고 있음. 세계적으로 이미 약 60여종의 미생물농약이 등록되어 실용화(상품화)되어 있으며, 다음으로 페로몬 및 식물성분을 포함한 생화학농약이 45여종, 천적 부문이 40여종으로 미생물농약, 페로몬 천적이 전체의 77.1%(총 145개)를 차지하고 있다.

제 품	용 도	개 발 현 황
Biotrol	바이러스 살충제	생산단가 인하를 위한 대량생산기술 연구
B.T.	미생물 살충제	현재 시판 중 문제해결을 위한 균주 개량
Gautrol	미생물 살균제	호주에서 시판 중
Devine	미생물 제초제	선택성 제초제, 미국
College	미생물 제초제	선택성 제초제, 미국
Biomol외 4종	미생물 제초제	1992년도 등록, 선택성 제초제
Avermectin	천연물 살충제	저독성 살충제, 시판 중
Bialaphos	천연물 제초제	일본에서 시판 중

(자료: 한국과학기술정보연구원, 2002)

2. 국내 기술수준

국내의 식물병 방제 천연농약에 대한 연구는 1980년을 전후로 기초적인 연구가 시작되어 80년대 중반부터 실질적인 식물병 방제기술이 도입되었으며, 인삼 뿌리썩음병 방제연구를 시작으로 주요 작물의 모잘록병, 역병, 잿빛곰팡이병, 무배추 무사마귀병 등의 방제를 위한 연구가 대학교, 국가 연구기관 및 기업체 등에서 수행되어 왔으며, 그 결과 및 가지 제품이 개발되어 미생물 비료로 등록·판매하였다.

식물병 방제를 위한 미생물농약 연구개발은 화학농약으로는 효과적인 방제가 이루어지지 않는 미생물을 이용한 토양전염병방제용으로 연구로 진행되어 왔으며, 미생물 농약의 경우 화학농약에 비하여 효과가 낮고 약효의 발현이 늦으며 적용 병해의 제한 및 환경에 대한 불안전

등 사용상에 제한이 많고, 제한된 장소 또는 소규모 시험에서 방제효과와 수량 증수에 우수한 효과를 나타내지만, 이를 대면적에 적용하기 위한 대량생산, 제제화 및 사용기술 등 실용화 기술이 부족한 실정이다.

식물추출물을 이용한 방제기술은 일부 대학 및 기업에서 개발을 진행하고 있으나 원료의 확보 및 추출비용 등의 원가 부담에 의해 활발히 진행되지 않으며 최근 현장적용에 문제점을 가지는 미생물농약의 새로운 대안으로 재조명되어 안전성과 범용성을 가지는 차세대 기술로 평가되고 있다.

제 2 절 천연물 농약 연구현황

1. 국내·외의 천연물 농약 연구현황

국내 연구단계는 담배 TMV, 세균성 시들음병, 오이, 딸기의 Fusarium 시들음병, 고추 역병, 벼 도열병과 잎집무늬마름병 등을 대상으로 효과가 있는 균주들이 탐색되었으나, 실용화를 위한 대량 배양과 제형화, 독성 연구 등이 아직까지 미미한 수준이다. 이와 같은 문제점과 국내 농약 기업의 영세성 등으로 지금까지 바이오농약에 대한 연구개발 투자가 낮았으나 최근에 이르러 환경오염과 농약의 위해성이 대두됨에 따라 천연물 유래의 친환경 농약 개발에 많은 투자가 이루어지는 것으로 나타나고 있다.

미국의 경우 1971년부터 병해충 종합관리 프로그램인 IPM 방제프로그램을 시작하여 친환경 바이오농약의 개발 및 관리에서 단연 선진화가 이루어졌으며 환경개선장려계획(EQIP)을 새로 도입하여 IPM을 확대 진행시켰다.

현재 일본에서 사용 가능한 바이오농약은 약 50종류로 알려져 있지만, 1999년 6월까지 등록된 바이오농약은 21종 35제로서 이중 살충제가 26제, 살균제가 8제, 제초제가 1제로 일본의 경우도 화학농약 등록 수(5,359)에 비해 바이오농약개발이 부진하다. 천적제를 포함하더라도 1% 정도에 불과함(한국과학기술정보연구원, 2002.)

국내외 바이오 농약의 개발경향은 미생물 및 천적제가 주를 이루고 있으며 사용의 전문성 저감, 2차적인 생태계 파괴 가능성 등의 이유로 활성화가 늦어지고 있으며 이에 대한 대안으로 식물 추출물을 이용한 방제기술에 대한 관심이 높아지고 있다.

2. 국내·외의 천연물 농약 시장현황

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

국내 바이오농약 시장을 보면 2001년도 전체 농약시장의 0.7% 미만으로 약하며 정식으로 등록된 제품으로 BT 제라는 것을 감안하여 볼 때 통계적으로 밝혀진 시장은 23억원 정도이며,

살충, 살균 효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정한 금액을 더하더라도 82 억원 정도로 규모면에서 걸음마 수준을 벗어나지 못하고 있다. 그러나 농약 활성이 있다고 주장하는 토양미생물제제의 시장 규모가 지속적으로 증가하는 것을 보면 새로운 토양미생물제제를 개발하여 판매하고 있는 벤처형 기업들이 노력한 결과로 판단되며 바이오 농약으로 이들 제제들이 농약관리법 하에서 정식으로 등록 된다면 이들 시장이 농약 시장의 테두리로 들어와 시장 확대가 이루어질 것으로 전망되고 판단된다.

국내 생물 농약 시장 현황

(단위: 백만 원)

연도	계	BT제	토양미생물 제제(추정)			천적 등	기타
			살충제	살균제	제초제		
1995	4,359 (0.7%)	4,359	-	-	-		
1998	2,813 (0.3%)	1,513	300	1,000	-	-	
1999	6,933 (0.7%)	3,132	800	3,000			
2000	7,682 (0.8%)	2,358	1,300	3,100	-	-	
2001	8,238 (0.7%)	2,283	1,500	4,500			

주) () 는 전체농약시장 대비 비율

* 출처 : BT 제 - 농약연보

토양 미생물 제제 : 등록된 토양미생물제제 중 살균 살충 효과가 있다고 주장하는 제품 판매액(추정)

한편, 지난 1998년부터 2000년경의 화학농약 시장규모를 바탕으로 추정된 바이오농약의 침투가능 시장규모는 아래와 같다. 3년간의 화학농약의 평균 판매금액을 적용대상별로 구분했을 때, 침투 가능한 최대 시장규모가 3,310억원으로 추정되었고 세부내역은 살균제 958억원, 살충제가 2,253억원으로 가장 크고 제초제 시장은 불확실한 것으로 분석된 바 있다.

바이오농약의 판매 가능 및 어려운 시장추정

(단위: 백만 원)

바이오농약 판매 가능시장		바이오농약 판매 어려운 시장		
종류	판매액 (‘98-‘00 평균)	종류	판매액 (‘98-‘00 평균)	
살균제	잔디살균제	4,554	종합살균제	95,297
	모잘록병	6,258	종자소독약	4,397
	역병, 노균병	25,172	기타살균	3,473
	흰가루병	841	과수혼합살균제	35,737
	EBI	35,742	동제	56,694
	EBI 기타	4,470	도열병약	62,963
	젯빛곰팡이병	10,822	흰잎마름병약	478
	항생제(무름병)	6,873	수도 기타 살균제	3,256
	부란병	1,012	알타나리아제	15,422
	소계	95,754	문고병약	29,877
살충제	토양해충	20,648	벼멸구	38,838
	깍지벌레	18,207	달팽이	295
	배추좀나방	5,637	초기해충	83,347
	원예나방	52,709	기타(저곡해충)	4,504
	응애	37,458	이화, 흑명나방약	35,161
	응애, 기타	10,871	과수원제초제	88,007
	진딧물	45,630	수도용제초제	115,272
	진딧물, 기타	37,626	원예용제초제	45,220
	기타해충(기계류)	6,476	잔디용제초제	5,914
소계	235,262	전착제	5,152	
		PRG	16,521	
바이오농약침투가능시장	331,016	소계	665,798	
		(‘98-‘00 평균)	996,814	

* 출처 : 바이오농약. 2002. 한국과학기술정보연구원

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

세계 바이오농약 시장은 2001년도에 약 2.5억불로서 전체 농약시장의 1%정도를 유지하고 있어 아직은 미약한 시장을 형성하고 있으며 그 중에서도 BT제가 52%로 제일 큰 비중을 차지하고 있으며 미생물제가 32%, 기타가 나머지를 차지하고 있다.

세계 바이오 농약 시장

(단위: 백만 불)

연도	계	BT제	미생물제	기타
1996-1997	85-90(0.3%)	70	15-20	
1998	120(0.4%)	90	30	
1999	140-145(0.5%)	100	30-35	10
2000	170(0.6%)	110	40	20
2001	250(0.9)	130	80	40

* 출처 : CPL Sci. 1999 Biopesticides

이웃 일본의 경우 식물방역협회에서 발행한 농약요람이라는 통계자료를 보면 바이오농약의 생산과 출하를 별도로 정리하고 보고하고 있어 다른 나라보다 보다 바이오농약 분야의 시장 확대를 위한 관심이 많다는 것을 알 수 있다. 일본의 바이오농약 시장을 보면 2001년도는 11.2억 엔으로 2000년보다 1.5억엔이 감소하였지만 이중 살충성 바이오농약이 약 8.8억 엔으로 79%를 점유하고 있으며 이중에서 BT제가 5.9억 엔으로 바이오농약 시장의 주류를 형성하고 있다.

일본의 바이오 농약 시장

(단위: 백만 불)

연도	계	살충성			살균성	제초성	기타
		BT 제	기타 제	소계			
1998	1,075 (0.27%)	799	221	1,020	5	50	
1999	1,174 (0.30%)	844	252	1,096	6	73	
2000	1,272 (0.34%)	756	332	1,088	118	66	
2001	1,121 (0.29%)	591	296	887	162	72	

주) ()는 전체 농약시장 대비 비율

* 출처 : 일본식물방역협회. 2002. 농약요람

한편 살균성 바이오농약은 1.6억 엔에 불과하지만 매년 크게 증가하는 경향을 보이고 있어 병해 방제용 바이오농약이 많이 개발 보급되고 있음을 알 수 있다. 전체 농약시장에서 바이오농약의 시장 수준을 보면 평균 0.3% 내외로 아직 세계 수준에 미치지 못하고 있음을 알 수 있지만 통계에 나타나지 않는 토양미생물제제 시장도 농약이라는 제도권에 들어오면 세계 수준의 시장을 형성할 것으로 판단되며 일본 내 화학농약 회사들의 움직임도 신속하여 바이오농약 판매 전문회사도 등장하고 있는 실정이므로 시장 확대 가능성은 점점 높아지고 있는 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 재료 및 방법

1. 천연물 확보

본 연구에 사용한 시료인 생물자원은 2009년 8월부터 제주 전역에서 채집한 시료들과 제주 테크노파크 생물종다양성연구소에 기구축된 자원들로서 최소 1kg씩의 생시료를 채취하여 천연 추출물을 만들기 위해 음건한 후 세절하여 사용하였다. 세절한 생물자원의 건조물은 80% 에탄올에 넣고 48시간 동안 침지시켜 3회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 용매를 제거하고 동결건조하여 분말상의 추출물 얻었다. 국명이 중복되는 시료들은 채집시기 및 채취부위가 상이한 자원이다.

2. 항곰팡이 효능 평가 - 1차 스크리닝

준비된 천연물의 각각의 곰팡이병원균에 대한 항곰팡이 효능 평가는 Franz and Grger(2000)의 방법에 따라 일반적으로 항곰팡이 효능 평가에 사용되는 agar diffusion test와 radial growth rate test를 수행했다. 항균성 시험용 평판배지는 멸균 후 petri-dish에 20mL씩 분주하여 응고시키고 전배양한 식물도열병(*Magnaporthe grisea*), 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*), 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 작물역병(*Phytophthora capsici*) 병원균을 무균적으로 평판배지 중앙에 8mm의 paper disc를 이용 도말하였다. 각 추출물은 50mg/mL 농도로 희석하여 멸균된 paper disc에 흡수, 건조시켜 균주가 도말된 plate 표면에 올려놓은 후 27°C 배양기에서 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)을 측정하여 항균활성을 측정하였다.

가. Agar diffusion test: Paper disk diffusion

일정농도의 각 시료들을 serial concentration으로 알코올에 희석하여 6 mm 직경의 paper disk(Dassel, Germany)에 시료를 적신다. 알코올이 모두 증발된 후 균이 접종된 agar plate의 중앙에 놓은 후 배양시키면서 균사체의 크기를 자로 측정한다.

나. Radial growth rate test

시료의 일정농도를 한천배지에 섞어서 고형배지를 만든다. 균주를 시험농도로 한천배지에 접종하여 수일동안 배양시키면서 균중의 크기를 관찰하고 자로 측정한다. 각 농도별로 3개씩 중복 실험한다.

3. 분획물의 항곰팡이 효능 평가 - 2차 스크리닝

717점의 조추출물을 이용하여 항곰팡이 효능을 평가 후 각각의 균주에 대해 항곰팡이능을 보유한 천연물은 각각의 조추출물 10g을 100배량의 20% 메탄올로 현탁 및 용해 시킨 후에 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)로 순차적으로 분획하여 헥산층, 디클로로메탄층, 에틸아세테이트층, 부탄올층 및 잔여 물층을 감압농축 시킨 후 동결하여 각각의 분획물을 얻었다. 각 후보군의 5점의 분획물은 1차 스크리닝과 동일한 방법으로 2차 스크리닝을 수행하였다.

4. 지표 및 유효성분 분리정제

각 균주에 대해 항곰팡이능이 우수한 분획물은 각 분획물에 용해되어 있는 항곰팡이력 우수 물질을 탐색 및 분리하기 위하여 효능 함유 분획물 10g을 역상실리카겔을 이용해 컬럼크로마토그래피를 실시하여 1차 정제물 10개를 얻었다. 실험에 사용된 컬럼의 크기는 7cm X 20cm이며 20, 40, 60, 80, 100% 메탄올을 이동상으로 사용하였다. 각 분획물 1점당 총 50개의 정제물이 획득되면, 50개의 정제물 중 항곰팡이능이 가장 우수한 1차 정제물에 대해 순상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼의 크기는 2.5cm X 50cm이며 클로로포름 : 메탄올 (1:1, v/v)을 이동상으로 사용하였다. 분당 1.5ml의 속도로 이동상을 흘려주었으며 총 10개의 2차 정제물을 얻었다. 그 중 가장 활성이 우수한 2차 정제물을 대상으로 TLC(실리카겔 60 F 254, 클로로포름;메탄올=1:1, v/v)에 전개하여 단일 물질이 확인된 스팟을 이용해 구조분석에 사용하였다. 각 단계별 항곰팡이 효능평가는 1차 스크리닝과 동일한 방법으로 추진하였다.

5. 활성물질의 구조분석

분리된 활성물질의 구조를 분석하기 위해 항곰팡이능 효능을 보인 2차 정제물을 메탄올-d4에 녹여 NMR spectrum을 측정하였다. NMR 스펙트럼은 ^1H NMR 스펙트럼과 ^{13}C NMR 스펙트럼을 분석하였으며, 동정된 물질의 분자량을 측정하기 위해 LC-MS/MS 분석을 실시했다.

6. 벼 가뭍스트레스 처리

동진벼를 1X 스포탁액에서 약 24시간 동안 종자소독을 한 후 2일간 30°C의 진탕기에서 발아시켰다. 유아가 발생한 종자를 각각 플라스틱 포트 (15 x 10cm)에 파종하고 광14시간 암10시간의 유리온실에서 생육시켰다.엽령이 약 5~6엽기인 동진벼를 이용하여 1일 간격으로 유효추출물 농도 200배 희석액을 총 3회 분무(1회 15ml) 하였으며, 7일 뒤 1일 간격으로 물을 관주하여 회복되는 정도를 비교하였다.

7. 추출물의 항균활성 측정

식물추출물의 도열병균에 대한 항균활성 검정을 위해 농업기술원에서 분양받은 도열병균 race KJ105 균주를 사용하였으며 1차적으로 PDA배지에서 약 1주간 25℃ 배양기에서 배양한 후 각각의 실험조건별로 다시 PDA배지에 계대 배양하였다. Hasegawa 등(2010)의 Paper disk 방법에 따라 PDA에 도열병균을 계대배양하고 paper disk에 30%EtOH(Control) 10% JBR701, 10% JBR325, 키타진 원액 50 µl를 각각 처리한 후 약 1 주 후에 도열병균에 대한 원액의 항균 활성 정도를 확인하였다. 농도배지를 이용한 항균활성 검정으로는 PDA배지에 각각의 식물 추출물을 농도별로 희석하여 균한 다음 1차 배양한 도열병균을 계대 배양한 후 약 1주일간 25℃ 배양기에서 배양시켜 항균활성을 확인하였다. 이 때 처리 농도는 PDA only(Control), 200X, 500X, 1000X, 1500X, 2000X, 2500X,과 3000X로 하였다.

8. 벼 도열병 접종

식물추출물의 도열병 방제력 검정을 위하여 호평벼를 사용하였다. 도열병 균주로는 동진, 일미 그리고 호평벼에 감수성을 나타내는 race KJ105균주를 농업 기술원에서 분양받아 사용하였다. 유아가 발생된 종자를 모판에 파종하고 약 1~2엽기의 모를 플라스틱 포트(15 x 10cm)에 이식하여 광14시간 암10시간의 일장조건에서 생육시켰다. 엽령이 약 5~6엽기인 호평벼를 이용하였다.

Hasegawa 등(2010)의 방법에 따라 도열병균 race KJ105를 PDA배지 내에서 일차 배양한 후 쌀겨배지(쌀겨 20g/L, 백설탕 10g/L, Agar 15g/L)에 계대 배양하여 25℃ 배양기에서 2 주간 생육시켰다. 도열병균의 분생포자를 얻기 위해 기중균사를 제거하고 약 3일간 25~28℃의 광조건에 노출시켰다. 포자 현탁액(1×10^5 /ml)에 0.05% Tween 20을 섞어 분무처리 하였다. 처리된 식물체는 dewchamber에서 암조건, 습도 100%와 25℃의 향온 조건으로 약 1일간 처리한 후 유리온실로 옮겨 약 4~5일 뒤에 병반을 확인하였다.

9. 약효 및 약해 평가

가. 약효 및 약해 평가

시 험 약 제	주 성분 함 량 (%)	약 효 시 험		약 해 시 험		시 험 년 차
		희석배수 및 사용량	처리시기 및 방법	기준량	배 량	
JBR701 제제 (GNC-011)	25	1,000배 (1 l /3.3m ²)	발병초 7일 간격 3회 경엽처리 (9/9, 9/16, 9/23)	1,000배 (1 l /3.3m ²) (9/9)	500배 (1 l /3.3m ²) (9/9)	1
티오파네이트 메틸수화제(대조)	70	1,500배	발병초 7일 간격 3회 경엽처리	-	-	-
무 처 리	-	-	-	-	-	-

실험에 사용된 대상은 골프장 잔디로서 켄터키블루글래스(*Poa pratensis* L.)를 사용하였으며, 현장의 시험구 배치 및 면적은 난괴법 3반복으로 수행하였으며 구당면적은 30m²이다.

나. 조사방법

구 분	조사항목	조사횟수	조 사 방 법
약효시험	피해면적율	1회	최종 약제처리 7일후 피해 면적율 조사
약해시험	약해 유무	3회	약제처리 3, 5, 7일후 경엽에 나타나는 외관상 약해유무 달관 조사

10. 안전성 시험

가. 급성경구투여 독성 시험

(1) 시험물질 : JBR325, JBR563, JBR580 제제

(2) 시험계 : 특정병원체 부재(Specific Pathogen Free, SPF) ICR Mouse

(3) 시험물질 조제 : 20배 희석된 상태로 입수된 시험물질에 멸균증류수를 추가로 50배 희석하여 0.1 %의 PTO를 조제하였다. 조제된 시험물질을 비중 1의 100% 제품으로 가정하고 멸균증류수에 용해 시켜 5,000 mg/kg 용량군을 조제하였다.

(4) 시험기준 : 농촌진흥청고시 제 2010-03호(2010년 02월 09일) ‘농약의 등록기준’

(5) 투여경로 및 투여방법 : 투여 당일 아침에 3~4시간을 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다. 투여 후 1~2시간 절식한 후에 사료를 제공하며 절식 중이라도 물은 공급하였다.

(6) 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량(ml/kg)	투여량(mg/kg)
G1	Male	5	1 ~ 5	10	5,000
G1	Female	5	6 ~ 10	10	5,000

(7) 일반증상 관찰 : 투여당일은 투여 후 6 시간까지 매 시간 관찰하였으며, 투여 후 1 일째 부터는 매일 1 회, 14 일동안 일반증상을 관찰하였다.

(8) 체중측정 : 모든 생존동물에 대하여 투여 전, 투여 후 7 및 14 일에 체중을 측정하였다.

(9) 부검 : 투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사 시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

나. 급성경피투여 독성 시험

(1) 시험물질 : JBR325, JBR563, JBR580 제제

(2) 시험계 : 특정병원체 부재(Specific Pathogen Free, SPF) Sprague-Dawley(SD) rats

(3) 시험물질 조제 : 20배 희석된 상태로 입수된 시험물질에 멸균증류수를 추가로 50배 희석하여 0.1 %의 PTO를 조제하였고, 시험물질이 액상이므로 투여 당일 측정하여 경피 투여용 거즈에 놓고 투여직전에 원액을 적용하였다.

(4) 시험기준 : 농촌진흥청고시 제 2010-03호(2010년 02월 09일) ‘농약의 등록기준’

(5) 투여경로 및 투여방법 : 투여 하루전에 구간배부를 중심으로 체표면적의 20% 이상을 제모한 후 투여 당일 첩포용 거즈(4x4cm)에 시험물질을 도포하고 비자극성 테이프를 이용하여 피부에 밀착시켰다. 24 시간이 지난 후에 비자극성 테이프를 제거하고 멸균증류수를 적신 거즈를 이용하여 시험물질을 닦아주었다.

(6) 시험군의 구성

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량(ml/kg)	투여량(mg/kg)
G1	Male	5	1 ~ 5	10	4,000
G1	Female	5	6 ~ 10	10	4,000

(7) 일반증상 관찰 : 투여당일은 투여 후 6 시간까지 매 시간 관찰하였으며, 투여 후 1 일째 부터는 매일 1 회, 14 일동안 일반증상을 관찰하였다.

(8) 체중측정 : 모든 생존동물에 대하여 투여 전, 투여 후 7 및 14 일에 체중을 측정하였다.

(9) 부검 : 투여 후 14 일째에 모든 생존동물을 CO₂가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사 시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

다. 피부자극성 시험

(1) 시험물질 : JBR580 제제

(2) 시험동물 : 토끼(New Zealand White계)

(가) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010-29호의 농약의 독성시험기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가에 이용하는 것이 가능하다.

(나) 체중범위

구분	입수시 체중(kg)	처리시 체중(kg)
시험동물	1.7~1.9	1.9~2.1

(다) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 11일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

(3) 사육환경 및 관리

(가) 사육환경

본시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설(공조기계), 조명시간 12시간(오전7시 ~ 오후7시) 및 조도 200~200Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육상자

순화 및 시험기간중 stainless steel 사육상자(50 × 38 × 40cm)안에 넣어 사육하였다.

(다) 사료 및 물

사료는 토끼용 펠릿사료를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(4) 시험물질의 투여

(가) 시험군의 구성

실험동물은 건강하고 성숙한 동물 6마리를 사용하여 1군으로 구성하였다.

(나) 시험물질 조제

시험물질이 액상으로 처리부위에 직접투여함으로 조제하지 않고 처리하였다.

(다) 투여방법

실험동물은 시험물질 투여 24시간전에 전기면도기를 이용하여 경배부(등부위)의 털을 15×15cm 정도 넓이로 제모한 다음 건강하고 깨끗한 피부(상처가 없는)를 가진 동물만을 사용하였다. 투여직전 토끼의 척추를 중심으로 좌우에 대각선 방향으로 18G 주사침을 이용하여 2×3cm 넓이의 피부에 각질층만 파괴하도록 주의하여 [#]형 찰과상을 입혔고 조제된 시험물질을 0.5mL씩 처리부위에 도포한후 시험물질의 유실 및 방출을 방지하기위해 Tegaderm Film지로 잘고정하여 적용 4시간동안 시험물질이 경구 및 안점막 등 타 경로로 유입되지 않게 처리하였다.

(라) 시험물질의 제거

시험물질은 4시간 후 제거하고 피부에 묻은 잔여물질은 생리식염수로 잘 닦고 휴지로 물기를 흡수시킨 다음 케이지에 넣어 두었다.

(5) 관찰 및 조사항목

(가) 일반증상관찰

시험물질 적용 후 72시간까지 일반증상의 변화, 중독증상 및 사망동물의 유·무를 관찰하였다.

(나) 체중 측정

시험물질 적용직전과 적용 후 24, 72시간에 개체별 체중을 측정하였다.

(다) 정용부위 관찰

시험물질 도포 종료 후 1, 24, 48 및 72 시간에 홍반, 부종 및 가피형성 유·무를 관찰하였다.

라. 안점막자극시험

(1) 시험물질 : JBR580 제제

(2) 시험동물

(가) 동물종(계통) : 토끼(New Zealand White계)

(나) 시험계의 선택사유

농촌진흥청고시 제 2010-29호의 농약의 독성시험기준과 방법에 백색토끼를 사용하도록 되어 있으며 New Zealand White계 토끼는 농약의 독성시험에 널리 사용되고 있어 기초자료가 충분히 축적되어 있으므로 시험결과 해석 및 평가에 이용하는 것이 가능하다.

(다) 체중범위

구분	입수시체중(kg)	처리시 체중(kg)
시험동물	1.7 ~ 1.8	1.8 ~ 2.0

(라) 순화 및 검역

동물을 구입한 후 10일 동안 동물실험실의 환경하에서 순화시키면서 일반 건강상태를 관찰하여 건강한 개체를 선별, 본 시험에 사용하였다.

(3) 사육환경 및 관리

(가) 사육환경

본시험의 사육환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기시설(공조기계), 조명시간 12시간(오전7시 ~ 오후7시) 및 조도 200~200Lux의 실험실조건에서 사료와 음용수를 급여하여 순화 및 시험기간 동안 격리 사육하였다.

(나) 사육상자

순화 및 시험기간중 stainless steel 사육상자(50 × 38 × 40cm)안에 넣어 사육하였다.

(다) 사료 및 물

사료는 토끼용 펠렛사료를 자외선 멸균시켜 자유급식 시켰으며 물은 정수필터를 통과한 지하수를 자유 섭취시켰다.

(4) 시험물질 투여

(가) 시험군 구성

군	동물수	좌우구분	처리
비세척군	6	좌 안	시험물질
		우 안	무 처리

(나) 시험물질 조제 및 처리약량

시험물질이 액상이므로 조제하지 않고 처리부위에 원액상태로 1마리 당 제품기준으로 0.1mL을 1회에 한하여 투여하였다.

(다) 투여방법

시험동물은 시험물질 투여 24시간 전에 양쪽눈을 검사하여 눈에 이상이 없는 동물을 사용

하였다. 약제처리는 한쪽 눈의 하안점을 가볍게 잡아당기고 그 결막낭내에 시험물질을 한번에 넣어 처리하고 시험물질의 손실은 막기 위해 양안점을 느슨하게 맞춰 잡고 약 1초간 유지하였다. 무처리한 다른 한쪽눈은 대조로 하였다.

(4) 시험물질 투여

(가) 일반중독증상

시험물질 처리 후 72시간까지 매일 1회씩 일반중독증상을 관찰하여Te.

(나) 안점막반응의 평가

시험물질 처리 후 1, 24, 48시간 및 72시간에 각막혼탁, 홍채이상, 결막발적, 부종, 배출물 등 평점을 기록하고, 안점막자극지수를 산출하였다.

마. 급성어독성시험

(1) 시험물질 : JBR580 제제

(2) 시험동물

(가) 시험어종(학명) : 잉어(*Cyprinus Carpio*)

(나) 순화 및 사육조건

- 순화기간 : 2011년 07월 04일 ~ 2012년 01월 15일
- 사육온도 : 22~24℃
- 광 조 건 : 200~300Lux
- 사료급여 : Bio Meal(채색 광상어 사료-EP타입) 1일 2회 급여

(3) 시험용기 : 원통형의 유리제품 12.5L(높이25.5cm×Ø25.5cm)용기를 사용하였다.

(4) 시험용수 : 지하수

(5) 처리방법

(가) 시험물질의 조제

시험물질 2.1g을 정확히 평량하여 각각 100mg 용량의 volumetric flask에 넣고 시험용수를 가하여 100mg를 채운후 시험용수9,900mg 와 함께 12.5L의 시험수조에 넣고 완전히 현탁될 때까지 충분히 교반시킨 후 시험용액으로 사용하였다.

(나) 시험농도 설정 : 예비시험 후 10mg/L 단일농도로 2회 시험하였다.

(다) 시험어 절식 : 시험물질 처리 24시간 전부터 시험종료일시까지 사료급여를 중단시켰다.

(라) 시험어류수 : 농도당 10마리

(마) 시험 대조구

- 음성대조군 : 시험용수인 지하수로 음성대조군시험을 실시하였다.
- 양성대조군 : 시험어류 입수후 2차에 걸쳐 PCP-Na염(90%)의 잉어에 대한 급성어 독성시험을 실시하였다.

(6) LC50 산출법 : 기초시험(10mg/L)에서 시험이 종료되어 통계처리는 하지 않았다.

(7) 관찰 및 조사항목

(가) 증독증상 및 치사율

시름개시 1시간후 그리고 24시간 간격으로 일반증독증상 및 치사어를 기록하였으며 치사어의 판정은 공시어에 유리막대로 건드렸을 때 움직임이 없거나 아가미 호흡이 중단된 경우 치사로 판정하였다.

(나) 수질측정(DO, pH, 수온) 조사시기 및 방법

수질측정은 시험개시전과 24시간 간격으로 시험종료시까지 DO, pH, 수온을 Orion4 star모델로 측정하여 조사하였다.

제 2 절 연구결과

1. 작물곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명

가. 천연 추출물 확보

한라산을 중심으로 제주 전역에 분포하는 식물자원을 채집, 세절, 음건 및 파쇄하여 분말을 얻었으며, 80% 에탄올 5L에 얻어진 분말 250g을 첨가하여 48시간 동안 침지시켜 2회 반복 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압농축하여 천연추출물 705점을 확보하였다(표 1).

[표 1] 천연추출물 확보 생물자원 리스트

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR001	애벌레	JBR036	사스레 피나무	JBR071	모람
JBR002	해홍나물	JBR037	멸구슬나무	JBR072	종가시나무
JBR003	칠면초	JBR038	송악	JBR073	편백
JBR004	칠면초	JBR039	홍가시나무	JBR074	곰솔
JBR005	방석나물	JBR040	사철나무	JBR075	사스레 피나무
JBR006	통통마디	JBR041	생달나무	JBR076	먼나무
JBR007	해홍나물	JBR042	뱀톱	JBR077	구실갯밤나무
JBR008	칠면초	JBR043	멸꿀	JBR078	비파나무
JBR009	나문재	JBR044	나도히초미	JBR079	소귀나무
JBR010	큰비쭉	JBR045	석송	JBR080	노루발
JBR011	누리장나무	JBR046	보리장나무	JBR081	협죽도
JBR012	압대극	JBR047	멸꿀	JBR082	까마귀쪽나무
JBR013	사철나무	JBR048	줄가시나무	JBR083	비자나무
JBR014	번행초	JBR049	석위	JBR084	말뚝비름
JBR015	기름나무쪽	JBR050	삼나무	JBR085	산철쭉
JBR016	방가지땡	JBR051	밭풀고사리	JBR086	담팔수
JBR017	도깨비고비	JBR052	일엽초	JBR087	제주고사리삼
JBR018	sedum속	JBR053	구상나무	JBR088	소철
JBR019	애기달맞이	JBR054	도깨비고비	JBR089	붓순나무
JBR020	사철쭉	JBR055	송악	JBR090	새덕이
JBR021	갯무	JBR056	광나무	JBR091	후박나무
JBR022	동백나무겨우살이	JBR057	콩짜개 덩굴	JBR092	육박나무
JBR023	망초	JBR058	붉가시나무	JBR093	참가시나무
JBR024	참식나무	JBR059	송악	JBR094	향나무
JBR025	해국	JBR060	풀고사리	JBR095	붉가시나무
JBR026	갯기름나물	JBR061	새덕이	JBR096	회양목
JBR027	붉가시나무	JBR062	참가시나무	JBR097	감탕나무
JBR028	섬갯나무	JBR063	황칠나무	JBR098	후피향나무
JBR029	굴거리	JBR064	센달나무	JBR099	비쭉나무
JBR030	마삭줄	JBR065	팔손이	JBR100	가시나무
JBR031	털머위	JBR066	백량금	JBR101	모람
JBR032	제주조릿대	JBR067	자금우	JBR102	보리밥나무
JBR033	주목	JBR068	마삭줄	JBR103	좁굴거리
JBR034	참식나무	JBR069	다정큼나무	JBR104	콘백시깡깡나무
JBR035	깡깡나무	JBR070	개구리 발톱	JBR105	제주깡깡나무

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR106	식나무	JBR151	유명	JBR196	사토노가오리
JBR107	애기동백	JBR152	남향	JBR197	진지향
JBR108	아왜나무	JBR153	천초	JBR198	한라봉
JBR109	조록나무	JBR154	한라봉M16A	JBR199	한라봉M16A
JBR110	버즘나무	JBR155	대곡이예감	JBR200	구지진18호
JBR111	녹나무	JBR156	백유네블	JBR201	천초
JBR112	은목서	JBR157	하루미M16A	JBR202	대포조생
JBR113	실화백	JBR158	청견	JBR203	풍복
JBR114	돈나무 잎	JBR159	삼전네블	JBR204	구하조생
JBR115	젓나무	JBR160	진지향	JBR205	상야조생
JBR116	금사철	JBR161	세토카	JBR206	남향
JBR117	좁광광나무	JBR162	청봉	JBR207	사세보
JBR118	개가시나무	JBR163	부찌마루	JBR208	석지
JBR119	진굴	JBR164	백운폴	JBR209	유명
JBR120	좌등1	JBR165	부챗말	JBR210	춘견(하루미)
JBR121	하굴	JBR166	미역새	JBR211	천향
JBR122	팔삭	JBR167	들개미자리	JBR212	세복수초
JBR123	사두감	JBR168	접나도나물	JBR213	갯까치수영
JBR124	좌등2	JBR169	여뀌.sp	JBR214	큰비쭉
JBR125	세미놀	JBR170	세토카	JBR215	갯완두
JBR126	알렌레몬	JBR171	청향	JBR216	암대극
JBR127	병굴	JBR172	세미놀	JBR217	갯기름나물
JBR128	인창굴	JBR173	청견	JBR218	국화속.sp ?
JBR129	영과금감	JBR174	삼전네이블	JBR219	인동
JBR130	편굴	JBR175	알렌레몬	JBR220	갯무
JBR131	삼보감	JBR176	백유네이블 오렌지	JBR221	박새
JBR132	문단	JBR177	하굴	JBR222	번행초
JBR133	지각	JBR178	영굴	JBR223	해홍나물.sp
JBR134	당유자	JBR179	문단	JBR224	산달래
JBR135	동정굴	JBR180	지각	JBR225	망초.sp
JBR136	황하	JBR181	금감자	JBR226	등대풀
JBR137	영굴스타치	JBR182	편굴	JBR227	방가지똥
JBR138	유자	JBR183	당유자	JBR228	쫄레
JBR139	편굴	JBR184	(소)유자	JBR229	어린갯질경
JBR140	병굴	JBR185	오로브랑코	JBR230	큰보리장나무
JBR141	오로브랑코	JBR186	영과금감	JBR231	큰보리장나무
JBR142	살갈퀴	JBR187	청봉	JBR232	큰보리장나무
JBR143	갯	JBR188	궁내이예감	JBR233	갯질경(큰)
JBR144	서양민들레	JBR189	뿌찌마루	JBR234	비쭉(큰).sp
JBR145	유채	JBR190	대곡이예감	JBR235	사철쭉(어린)
JBR146	광대나물	JBR191	병굴	JBR236	사철쭉(큰)
JBR147	중문실생	JBR192	유레카레몬	JBR237	소리쟁이
JBR148	사방오리나무	JBR193	삼보감	JBR238	천문동
JBR149	사토노가오리	JBR194	머플리틀오렌지	JBR239	장딸기.sp
JBR150	천향	JBR195	동정굴	JBR240	애기수영

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR241	해국	JBR286	칠면초	JBR331	고사리
JBR242	수영	JBR287	통통마디	JBR332	실거리나무
JBR243	방가지뚝	JBR288	나문재	JBR333	창질경이
JBR244	인진쑥	JBR289	매죽나무	JBR334	구릿대
JBR245	마늘	JBR290	비목나무	JBR335	긴잎달맞이꽃
JBR246	꼬마모자반	JBR291	청미래덩굴	JBR336	미나리아재비
JBR247	부챗말	JBR292	등수국	JBR337	층층나무
JBR248	구멍갈파래	JBR293	보리수나무	JBR338	팔배나무
JBR249	미끈뺨대그말	JBR294	서어나무	JBR339	멀구슬나무
JBR250	그물바탕말	JBR295	털단풍	JBR340	떡윤노리나무
JBR251	부챗말	JBR296	산수국	JBR341	돌나물
JBR252	꼬마모자반	JBR297	산딸나무	JBR342	잔대
JBR253	부챗말	JBR298	덧나무	JBR343	두릅나무
JBR254	그물바탕말	JBR299	줄참나무	JBR344	빈참지누아리
JBR255	경단구슬 모자반	JBR300	고로쇠	JBR345	고리매
JBR256	모자반	JBR301	둥굴레	JBR346	빈참지누아리
JBR257	가시뺨대그말	JBR302	가막살나무	JBR347	주름붉은잎
JBR258	바위수염	JBR303	덜꿩나무	JBR348	쌍발이서실
JBR259	우뭇가사리	JBR304	으름	JBR349	불레기말
JBR260	참도박	JBR305	단풍나무	JBR350	가는개도박
JBR261	서실	JBR306	박새	JBR351	주름붉은잎
JBR262	참가시 그물바탕말	JBR307	개죽도리	JBR352	까막살
JBR263	애기마디 잘록이	JBR308	큰천남성	JBR353	가는개도박
JBR264	진두말	JBR309	새끼노루귀	JBR354	바위두둑
JBR265	가는개도박	JBR310	화살나무	JBR355	진두말
JBR266	모자반	JBR311	아그배나무	JBR356	모로우붉은실
JBR267	돌가사리	JBR312	분단나무	JBR357	그물바구니
JBR268	가시뺨대그말	JBR313	윤노리나무	JBR358	지층이
JBR269	붉은까막살	JBR314	비쑥	JBR359	부챗말
JBR270	바위수염	JBR315	섬오갈피	JBR360	도박
JBR271	진두말	JBR316	약모밀	JBR361	부챗말
JBR272	패	JBR317	개나리	JBR362	파래
JBR273	가는개도박	JBR318	소리쟁이	JBR363	지층이
JBR274	참그물바탕말	JBR319	소리쟁이	JBR364	부챗말
JBR275	참갈고리풀	JBR320	큰방가지뚝	JBR365	까막살
JBR276	타래서실	JBR321	방가지뚝	JBR366	그물바구니
JBR277	모자반	JBR322	방가지뚝	JBR367	쌍발이서실
JBR278	감태	JBR323	섬오갈피	JBR368	서실
JBR279	갯강활	JBR324	갯메꽃	JBR369	땅채송화
JBR280	뱀톱	JBR325	갯까치수영	JBR370	갈퀴꼭두서니
JBR281	염주괴불 주머니	JBR326	큰비쑥	JBR371	천선과나무
JBR282	천문동	JBR327	청미래덩굴	JBR372	인동
JBR283	갯질경	JBR328	붉나무	JBR373	고비
JBR284	해홍나물	JBR329	화살나무	JBR374	아까시나무
JBR285	기수초	JBR330	큰비쑥	JBR375	참나리

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR376	맥문아재비	JBR421	풍계나무	JBR466	마가목
JBR377	비짜루	JBR422	새우나무	JBR467	자귀나무 잎
JBR378	사방오리나무	JBR423	소사나무	JBR468	올벚나무
JBR379	갯까치수영	JBR424	산팽나무	JBR469	털팔배나무
JBR380	명석딸기	JBR425	병개암나무	JBR470	흰갈나무
JBR381	사철쭉	JBR426	까치박달나무	JBR471	팔배나무
JBR382	뽕나무	JBR427	개서어나무	JBR472	사옥
JBR383	청미래덩굴	JBR428	서어나무	JBR473	산벚나무
JBR384	해국	JBR429	상수리나무	JBR474	물푸레
JBR385	예덕나무	JBR430	왕벚나무	JBR475	흑느릅나무
JBR386	노린재나무	JBR431	참꽃나무	JBR476	쪽동백나무
JBR387	땅채송화	JBR432	갯대추	JBR477	고추나무
JBR388	도둑놈의 갈고리	JBR433	황근	JBR478	머귀나무
JBR389	나문재	JBR434	갯버들	JBR479	사람주나무
JBR390	통통마디	JBR435	작살나무	JBR480	솔비
JBR391	토끼풀	JBR436	덜꿩나무	JBR481	황벽나무
JBR392	개망초	JBR437	덧나무	JBR482	육박나무
JBR393	호장근	JBR438	삼색병꽃	JBR483	뽕잎피나무
JBR394	말오줌때	JBR439	통탈목	JBR484	산개벗지
JBR395	다래	JBR440	까마귀베개	JBR485	팽나무
JBR396	꾸지뽕나무	JBR441	소태나무	JBR486	느티나무
JBR397	아왜나무	JBR442	병꽃나무	JBR487	꾸지뽕나무
JBR398	국수나무	JBR443	무환자나무	JBR488	꾸지나무
JBR399	누리장나무	JBR444	매죽나무	JBR489	오구나무
JBR400	층층나무	JBR445	합다리나무	JBR490	광대싸리
JBR401	푸조나무	JBR446	참빗살나무	JBR491	산유자
JBR402	상산	JBR447	무궁화	JBR492	들메나무
JBR403	개다래	JBR448	버드나무	JBR493	칠엽수
JBR404	비목나무	JBR449	좁참빗살나무	JBR494	회화나무
JBR405	무환자나무	JBR450	붉나무	JBR495	옥수수
JBR406	왕모시풀	JBR451	박달목서	JBR496	붉은토끼풀
JBR407	생달나무	JBR452	목련	JBR497	참도박
JBR408	큰천남성	JBR453	참개암나무	JBR498	지층이
JBR409	쥐똥나무	JBR454	이나무	JBR499	미역실
JBR410	왕머루	JBR455	말채	JBR500	잔가시모자반
JBR411	좁은잎천선과	JBR456	비양나무	JBR501	주름진두발
JBR412	좁은잎천선과	JBR457	비자나무	JBR502	괘
JBR413	천선과	JBR458	후피향나무	JBR503	애기풀가사리
JBR414	정금나무	JBR459	꽃맹강	JBR504	툇
JBR415	비과	JBR460	골담초	JBR505	까막살
JBR416	섬오갈피	JBR461	가새뽕나무	JBR506	서실
JBR417	등나무	JBR462	참느릅나무	JBR507	미역실
JBR418	백목련	JBR463	산뽕나무	JBR508	제주풍뎡이
JBR419	굴피나무	JBR464	아그배나무	JBR509	잔대
JBR420	떡갈나무	JBR465	야광나무	JBR510	매죽나무

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR511	섬오갈피	JBR556	영경귀	JBR601	감태
JBR512	땅파리	JBR557	해홍나물	JBR602	경단구슬모자반
JBR513	애기땅빈대	JBR558	수송나물	JBR603	밭풀고사리
JBR514	해홍나물	JBR559	나문재	JBR604	별고사리
JBR515	기수초	JBR560	해홍나물	JBR605	애기달맞이
JBR516	칠면초	JBR561	기수초	JBR606	비쭉
JBR517	방석나물	JBR562	기수초	JBR607	제비쭉
JBR518	해홍나물	JBR563	돈나무 열매	JBR608	지네
JBR519	수송나물	JBR564	해국	JBR609	세또카
JBR520	잔가시모자반	JBR565	참으아리	JBR610	참나무 겨우살이
JBR521	통통마디	JBR566	갯질경	JBR611	등대풀
JBR522	나문재	JBR567	비쭉	JBR612	까마중
JBR523	지층이	JBR568	흰대극	JBR613	소귀나무
JBR524	가는개도박	JBR569	땅파리	JBR614	갯
JBR525	우뭇가사리	JBR570	애기땅빈대	JBR615	나한송
JBR526	은행나무	JBR571	질경이	JBR616	갯장구채
JBR527	개웃나무	JBR572	상사화	JBR617	별노랑이
JBR528	보리수나무	JBR573	으름	JBR618	갯괴불주머니
JBR529	검양웃나무	JBR574	붓순나무	JBR619	돌소리쟁이.sp
JBR530	읍나무	JBR575	천선과나무	JBR620	겨울딸기
JBR531	쇠물푸레	JBR576	좁은잎천선과	JBR621	구실잣밤나무
JBR532	두층나무	JBR577	유동	JBR622	소녀먹물버섯
JBR533	배롱나무	JBR578	땅빈대	JBR623	민달팽이
JBR534	뽕나무	JBR579	반하	JBR624	꽃송이버섯
JBR535	개잎갈나무	JBR580	자귀나무 열매	JBR625	비쭉기나무
JBR536	양버즘나무	JBR581	모람	JBR626	유럽접나도나물
JBR537	버즘나무	JBR582	통통마디	JBR627	자주광대나물
JBR538	대추나무	JBR583	큰뻬무	JBR628	광대수염
JBR539	고추나무	JBR584	누리장나무	JBR629	소녀먹물버섯
JBR540	골담초	JBR585	왕모람	JBR630	무환자나무
JBR541	매실나무	JBR586	잔대	JBR631	제주광나무
JBR542	싸리	JBR587	홍해삼	JBR632	거지덩굴
JBR543	밤나무	JBR588	적해삼	JBR633	개머루
JBR544	주엽나무	JBR589	큰비쭉	JBR634	꾸지나무
JBR545	떡윤노리나무	JBR590	멸꿀	JBR635	참꿀무꽃
JBR546	고욤나무	JBR591	다래	JBR636	미국실새삼
JBR547	고욤나무	JBR592	큰천남성	JBR637	가시뻬대 그물말
JBR548	왕달맞이꽃	JBR593	개족도리	JBR638	부챗말
JBR549	왕달맞이꽃	JBR594	배초향	JBR639	주름뻬대그물말
JBR550	달맞이꽃	JBR595	해홍나물	JBR640	더위지기
JBR551	도라지	JBR596	까마귀쪽나무	JBR641	오가피뿌리
JBR552	구릿대	JBR597	조록나무	JBR642	꽃송이버섯 균사체
JBR553	참나리	JBR598	산유자	JBR643	보리
JBR554	참나리	JBR599	상동나무	JBR644	참억새
JBR555	개머루	JBR600	나비나물	JBR645	제주조릿대

일련번호	자원명	일련번호	자원명	일련번호	자원명
JBR646	보리	JBR671	새우말	JBR696	세뿔여뀌 (50%Acetone)
JBR647	산쭉	JBR672	상산	JBR697	머느리밀씻개 (70%EtOH)
JBR648	사철쭉	JBR673	작살나무	JBR698	머느리밀씻개 (50%Acetone)
JBR649	비쭉	JBR674	갯사상자	JBR699	소리쟁이 (50%Acetone)
JBR650	순비기나무	JBR675	말오줌때	JBR700	족도리
JBR651	나무재속.sp	JBR676	갯강활	JBR701	GNC (80%EtOH)
JBR652	가는갯능쟁이	JBR677	작살나무	JBR702	뱀딸기
JBR653	꽃향유	JBR678	수송나물	JBR703	애기수영
JBR654	남오미자	JBR679	탑꽃	JBR704	광대수염
JBR655	참식나무	JBR680	말뚝비름	JBR705	배초향 줄기
JBR656	계요등	JBR681	까마중	JBR706	배초향 꽃
JBR657	모새낭	JBR682	까마귀쪽나무	JBR707	초피나무
JBR658	센달나무	JBR683	비자나무	JBR708	산수국 꽃
JBR659	개속새	JBR684	파초잎	JBR709	까마귀쪽나무
JBR660	환삼덩굴	JBR685	구멍갈과래	JBR710	등수국
JBR661	가시뼉대그물 바탕말	JBR686	장대여뀌?	JBR711	바위수국
JBR662	곰피	JBR687	고삼뿌리	JBR712	좁은잎천선과
JBR663	곰피(석회)	JBR688	파초줄기	JBR713	떡쭉뿌리
JBR664	동백나무	JBR689	장대여뀌 (70%EtOH)	JBR714	금창초
JBR665	갯금불초	JBR690	장대여뀌 (50%Acetone)	JBR715	떡쭉줄기
JBR666	붉가시나무	JBR691	미꾸리납시 (70%EtOH)	JBR716	울초
JBR667	큰잎알쏭이 모자반	JBR692	미꾸리납시 (50%Acetone)	JBR717	개족도리
JBR668	비틀대모자반	JBR693	봄여뀌 (70%EtOH)		
JBR669	꼬시래기	JBR694	봄여뀌 (50%Acetone)		
JBR670	문주란	JBR695	세뿔여뀌 (70%EtOH)		

※ 용매 및 농도표시가 없는 것은 모두 80% 에탄올 추출물임.

나. 항곰팡이력 스크리닝

717점의 추출물은 식물도열병(*Magnaporthe grisea*), 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*), 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 작물역병(*Phytophthora capsici*) 병원균을 대상으로 1차 항곰팡이 효능을 관찰하였다. 항곰팡이에 대한 균사체 형성 억제능력을 평가하기 위하여 각각의 병원균을 감자한천배지(PDA, Potato Dextrose Agar) 상에서 5일간 배양 후 균총들의 가장자리에서 직경 6 mm의 균사절편을 채취하여 항곰

광이력을 평가할 새로운 PDA plate 중앙에 옮겼으며, 각각의 50mg/mL 농도의 추출물은 40uL를 직경이 8 mm인 paper disk에 떨어뜨린 후 PDA 배지에 4점씩 접종하고 27°C에서 3~7일간 배양하여 균총의 생성을 측정하였다.

(1) 식물도열병(*Magnaporthe grisea*) 억제능 평가

식물도열병 병원균의 생성을 억제시키는 추출물은 총 20개로 나타났으며, 그 중 JBR325(갯까치수영), JBR444(때죽나무), JBR476(쪽동백나무), JBR563(돈나무-열매), JBR580(자귀나무-열매), JBR612(까마중) 등 6점에서 식물도열병 병원균의 생성을 강하게 억제시킴을 확인할 수 있었다 (그림 1).

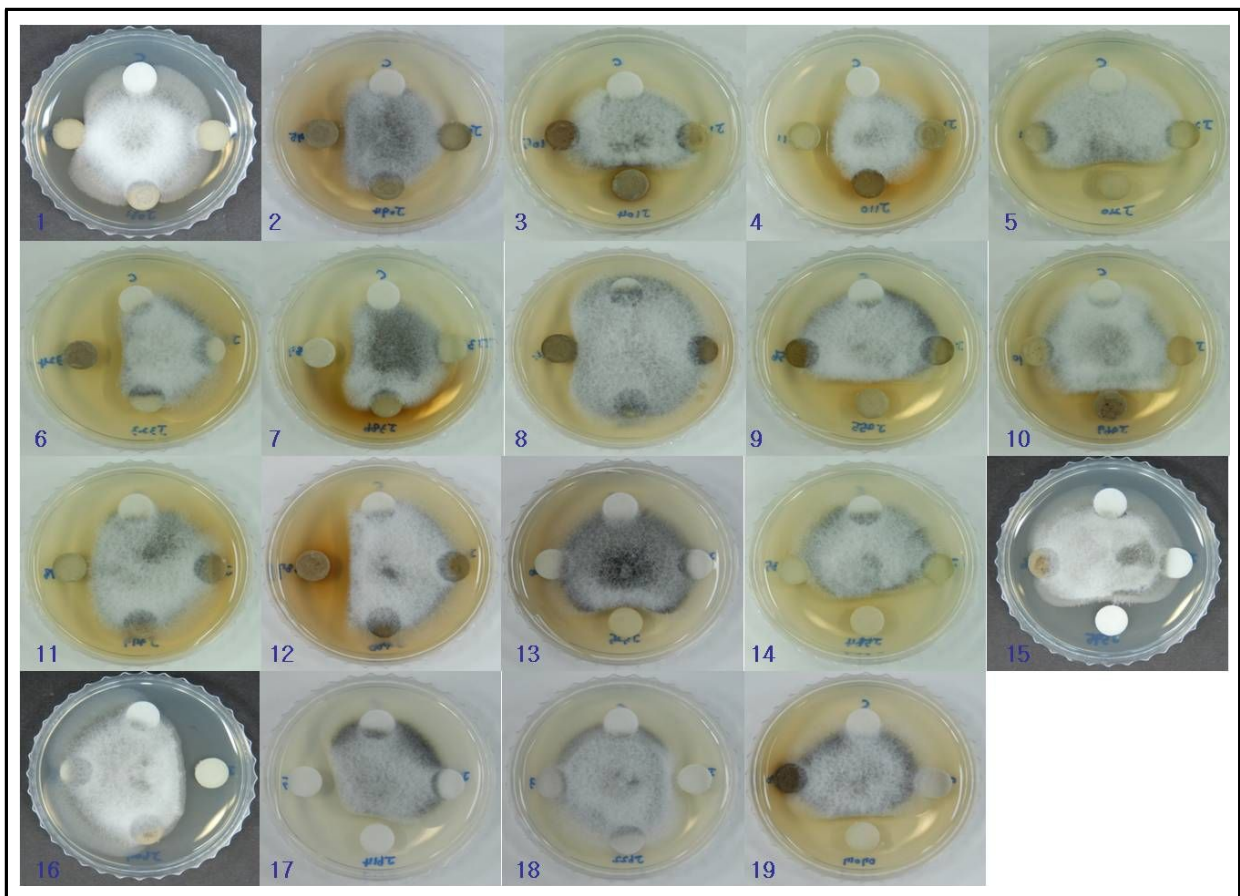


Figure 1. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Magnaporthe grisea*. 1, JBR55; 2, JBR98; 3, JBR107; 4, JBR114; 5, JBR213; 6, JBR325; 7, JBR379; 8, JBR406; 9, JBR444; 10, JBR458; 11, JBR467; 12, JBR476; 13, JBR510; 14, JBR563; 15, JBR573; 16, JBR580; 17, JBR587/JBR588; 18, JBR590; 19, JBR612.

(2) 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*) 억제능 평가

라이족토니아병은 *Rhizoctonia solani* 및 *R. cerealis* 두 개의 병원균의 원인으로 발생된다. 따라서 각각의 병원균의 생성을 억제시키는 추출물을 확인한 결과 *R. solani*에 대해서 항곰팡이 효능을 보이는 것은 총 4개로 나타났으며, 특히 JBR580(자귀나무)과 JBR701(GNC)에서 강한 활성을 보였다(그림 2). 또한, *R. cerealis*에 대해서 항곰팡이력을 보이는 것은 총 11개로 확인되었으며, 특히 JBR467(자귀나무-잎), JBR573(으름), JBR580(자귀나무-열매)에서 병원균의 생성을 강하게 억제시킴을 확인할 수 있었다(그림 3).

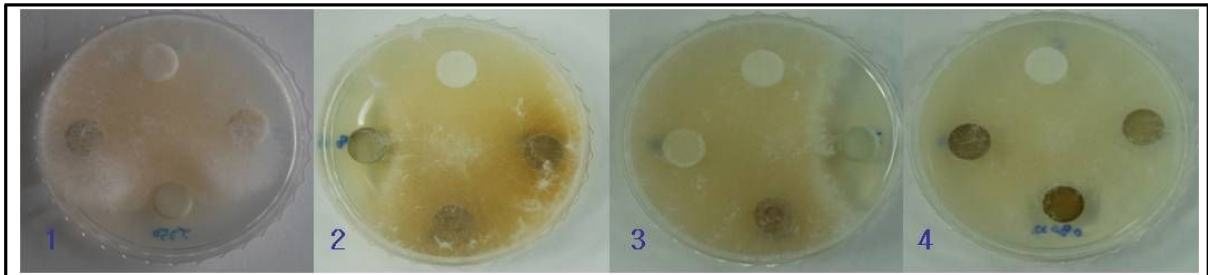


Figure 2. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Rhizoctonia solani*. 1, JBR348; 2, JBR580; 3, JBR701; 4, JBR703.

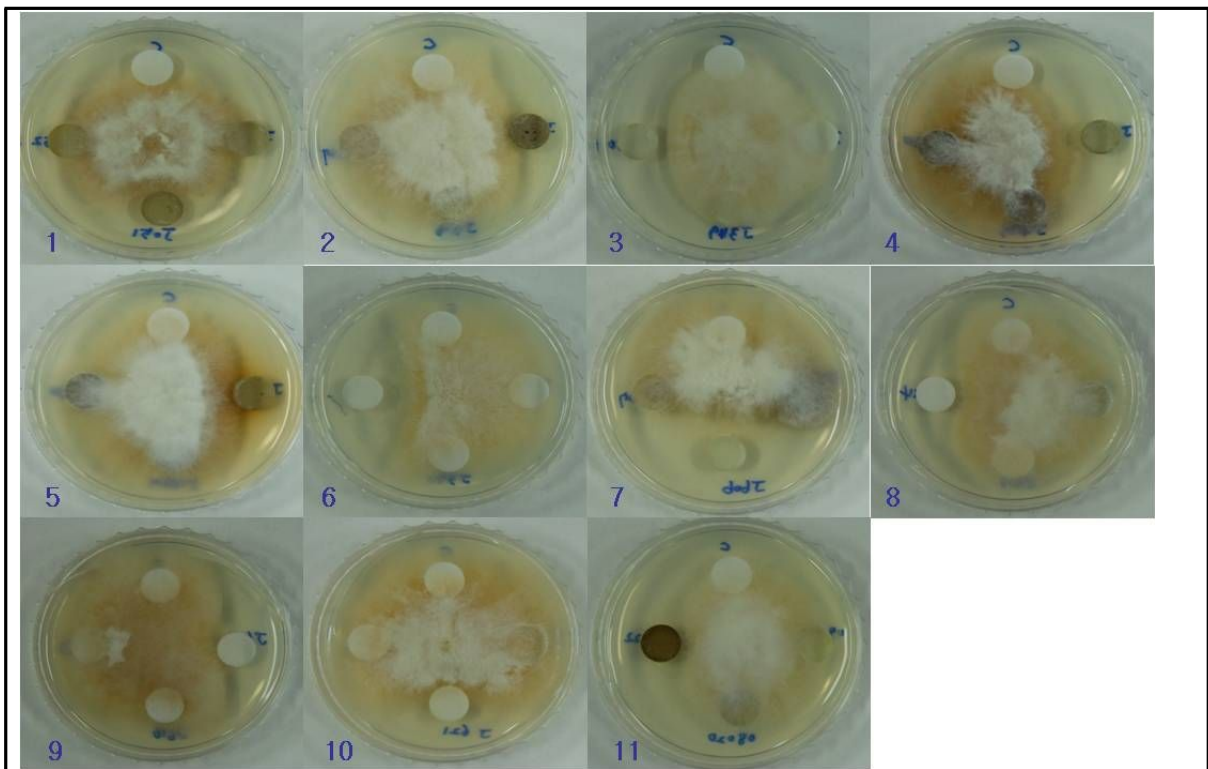


Figure 3. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Rhizoctonia cerealis*. 1, JBR55; 2, JBR213; 3, JBR467; 4, JBR467; 5, JBR476; 6, JBR573; 7, JBR580; 8, JBR587; 9, JBR588; 10, JBR590; 11, JBR687.

(3) 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*) 억제능 평가

피시움잎마름병 병원균의 생성을 억제시키는 추출물은 총 7개로 나타났으나, JBR687(고삼-뿌리), JBR701(GNC-011)에서 어느 정도의 효능을 보일뿐 유효성이 인정될 만큼의 강한 활성을 보이는 천연추출물은 확인되지 않았다(그림 4).

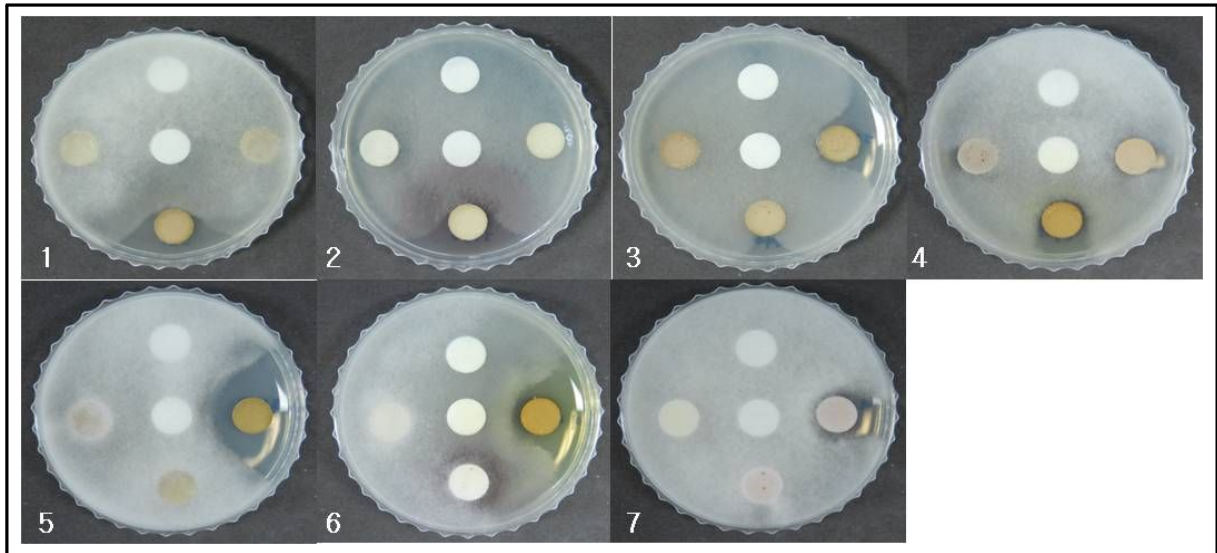


Figure 4. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Pythium graminicola*. 1, JBR113; 2, JBR148; 3, JBR397; 4, JBR699; 5, JBR687; 6, JBR701; 7, JBR710.

(4) 잣빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*) 억제능 평가

잣빛곰팡이병 병원균의 생성을 억제시키는 추출물은 총 2개로 나타났으며, 각각은 자귀나무 잎과 열매추출물로 확인되었다(그림 5).

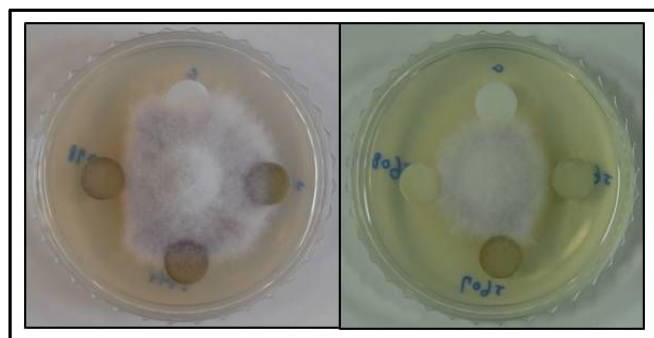


Figure 5. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Botrytis cinerea*. The left and right is JBR467 and JBR580, respectively.

(5) 작물역병(*Phytophthora capsici*) 억제능 평가

작물역병 병원균의 생성을 억제시키는 추출물은 총 3개로 나타났으나, 유효성이 인정될 정도의 활성을 보이지는 않았다(그림 6).

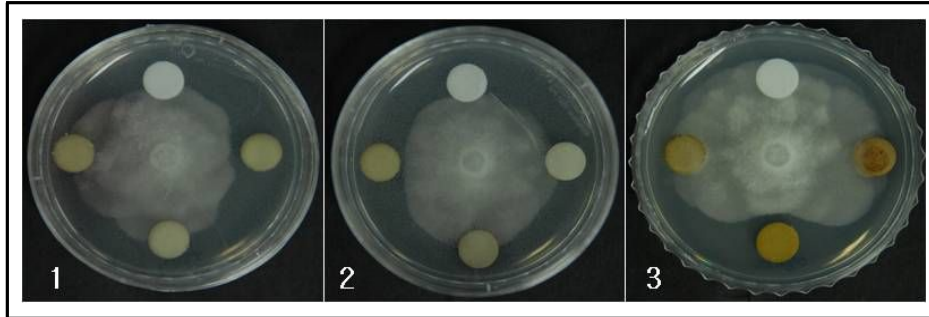


Figure 6. *in vitro* antifungal effects of crude extracts from Jeju native resources against *Phytophthora capsici*. 1, JBR376; 2, JBR381; 3, JBR687.

다. 우수 항곰팡이력 후보군 선발

제주 자생생물 자원 717점의 추출물을 이용하여 식물도열병(*Magnaporthe grisea*), 라이족토니아병(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*), 피시움잎마름병(*Pythium graminicola*), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 작물역병(*Phytophthora capsici*) 병원균을 대상으로 1차 항곰팡이 효능을 관찰한 결과, 식물도열병에는 갯까치수영 추출물을 포함한 6점, 라이족토니아병에는 자귀나무-열매 추출물을 포함한 3점, 피시움잎마름병에는 고삼-뿌리 추출물을 포함한 2점, 잿빛곰팡이병에는 자귀나무 2점, 작물역병에는 고삼-뿌리 추출물 등 3점이 강한 활성을 보였다(그림 1~6).

강한 활성을 보이는 천연추출물을 대상으로 기존 특허 및 논문 등의 지적재산권 분석과 시료 확보 및 대량생산 가능성을 비교하여 최종적인 후보군을 선발하였다(표 2).

[표 2] 우수 항곰팡이력 후보군 선발 시료

병원균	우수후보군	비고
식물도열병 (<i>Magnaporthe grisea</i>)	JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매)	강한활성, 대량생산 가능
라이족토니아병 (<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. cerealis</i>)	JBR701(GNC) JBR467(자귀나무-잎) JBR580(자귀나무-열매)	강한활성, 대량생산 가능
피시움잎마름병 (<i>Pythium graminicola</i>)	해당없음	불안정, 약효 지속력이 떨어짐
잿빛곰팡이병(<i>Botrytis cinerea</i>)	해당없음	불안정, 약효 지속력이 떨어짐
작물역병(<i>Phytophthora capsici</i>)	해당없음	불안정, 약효 지속력이 떨어짐

선발된 최종적 후보군을 대상으로 최적의 항공광이 활성을 보이는 시기의 후보군을 채취하기 위해 채취시기별 활성을 비교하였다. 각각의 시료들은 계절에 따라 나타나는 활성이 현저하게 다른 결과가 도출되었다.

벼도열병균(*Magnaporthe grisea*)에 대한 항공광이 활성 분석에서 갯까치수영인 경우 염생식물로서 3월에 새순이 나타나지만 7월 이후 거의 소멸되는 식물로서 5월 중순에 채취한 시료에서 가장 강한 활성을 보였다. 돈나무 열매인 경우 4월에 어린열매가 달리기 시작하여 바로 채종직전인 6월의 시료에서 강한 활성을 보인다. 돈나무 열매인 경우 7월 중순 이후에는 열매가 모두 벌어지면서 종자를 생산하기에 더 이상의 재료 채취가 불가능하였다.

또한, 라이족토니아병원균(*Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*)에 대한 항공광이 활성 분석에서 GNC인 경우 2월부터 채취가능한 9월까지의 활성을 평가한 경우 5월부터 9월까지 80% 이상의 활성을 보이고 있으며 특히 7월 채취시료에서 가장 강한 활성을 보였다. 자귀나무인 경우 낙엽수로서 4월부터 9월까지 시료를 채취하여 활성을 비교 분석하였다. 8월의 시료에서 가장 강한 활성을 보였으며, 열매인 경우 꽃이 지고 꼬투리가 형성되는 7월부터 9월까지의 시료를 분석하였다. 8월의 시료에서 가장 강한 활성이 나타났다.

병원균	우수후보군	채취시기별 활성(%) ^a							
		2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월
<i>Magnaporthe grisea</i>	갯까치수영	-	65	82	91	75	-	-	-
	돈나무-열매	-	-	-	72	87	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. cerealis</i>	GNC	47	49	68	82	83	88	80	80
	자귀나무-잎	-	-	45	58	63	76	85	75
	자귀나무-열매	-	-	-	-	-	68	88	72

^a대조군(티오파네이트 메틸수화제 등)의 활성을 100%로 기준한 상대활성 임.

라. 분획물 제조 및 유효성분/지표성분 구조 분석

(1) JBR325(갯까치수영)

(가) 유효성분 분리

갯까치수영의 항공광이 유효성분 부탄을 분획(12g)에 대해 역상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 1차 정제를 실시하였다. 컬럼 사이즈는 지름 7cm, 길이 20cm 이며 사용한 용매는 20~100% 메탄올을 사용하여 흘려주었다. 컬럼크로마토그래피 결과 10개의 소분획을 얻었으며 각각의 소분획에 대해 항공광이 효능평가를 실시하여 소분획 9번이 가장 우수한 항공광이 효과가 있음을 확인하였다. 이에 소분획 9번(G-B-9, 1.1g)에 대해 순상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용해 2차 정제를 실시하여 총 8개의 소분획을 얻었다. 8개 소분획에 대해 각각 항공광이 효능평가를 실시한 결과 소분획 4번(G-B-9-4, 137mg), 7번(G-B-9-7, 95mg), 8번(G-B-9-8, 114mg)에서 우수한 항공광이 효능을 확인하였다(그림 7).

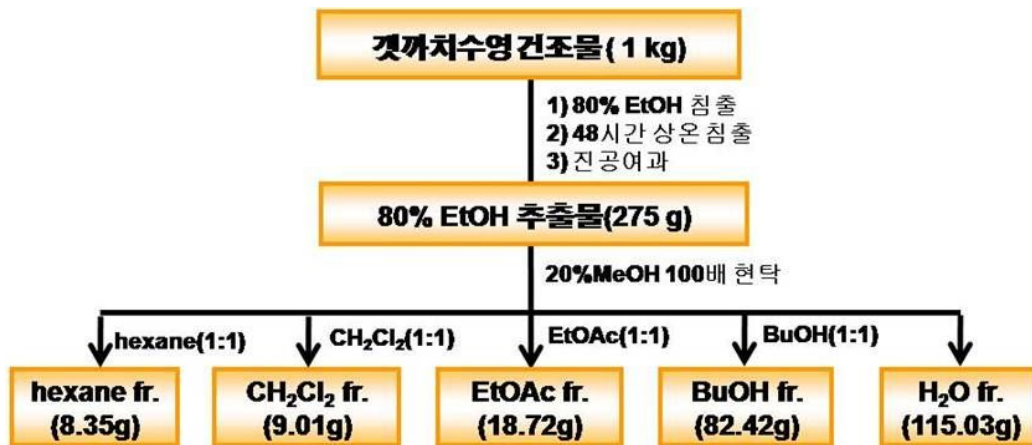


Figure 0. Manufacturing process of *Lysimachia mauritiana* extract.

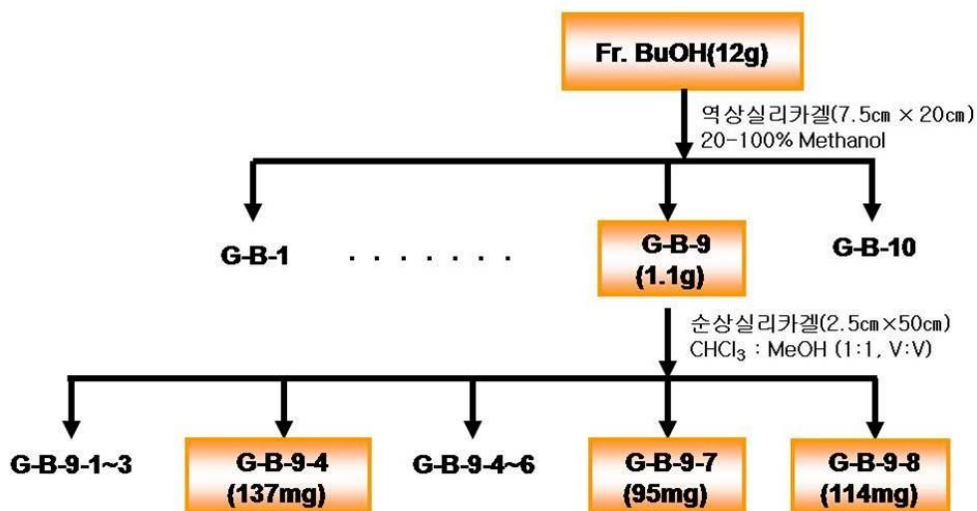
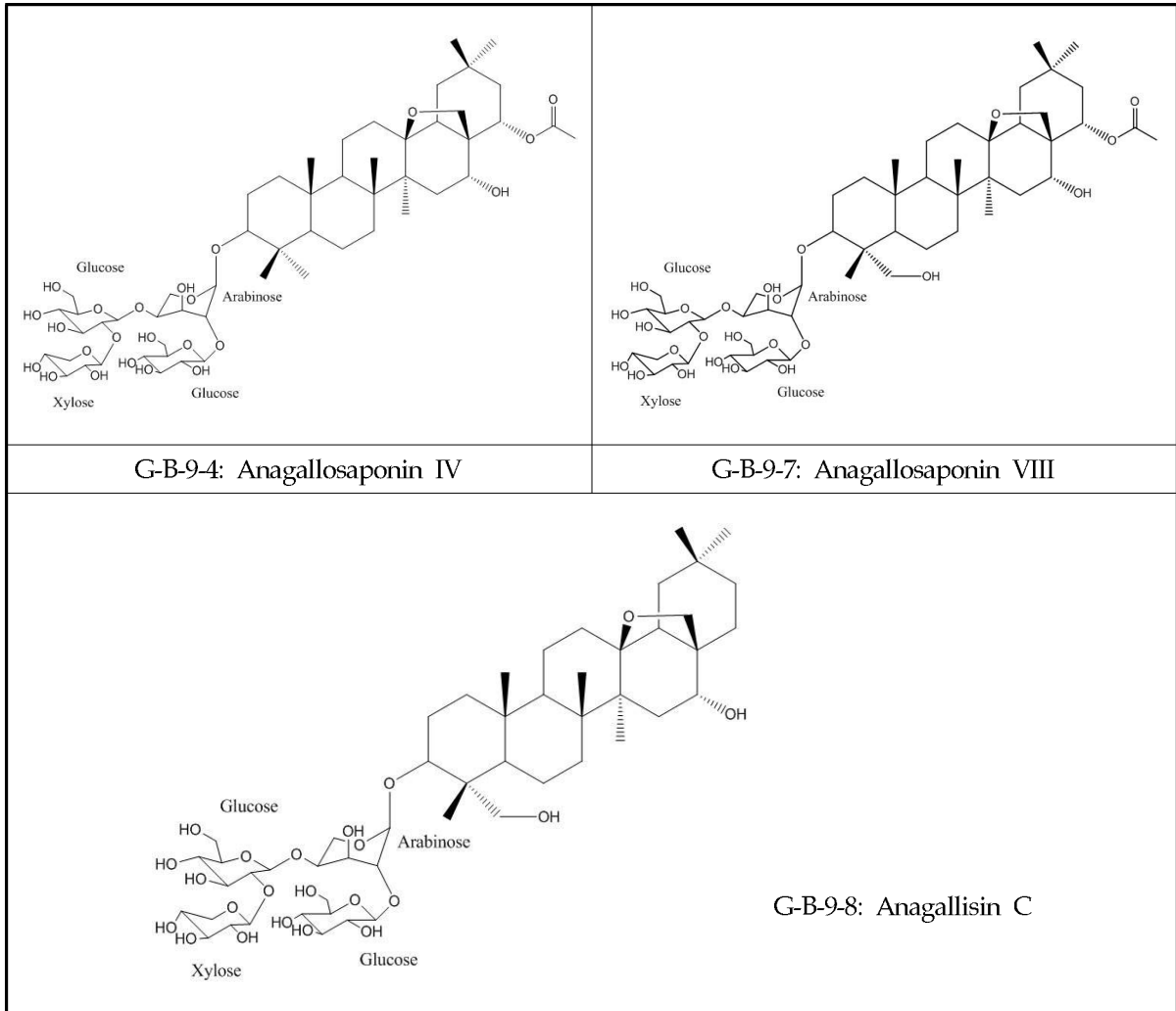


Figure 7. The process of BuOH fraction and BuOH subfractions isolated from the *Lysimachia mauritiana*.

(나) 유효성분 구조동정

효능이 확인된 3개의 소분획에 대해 TLC 분석을 실시한 결과 모두 단일 화합물로 예상되었으며 1H, 13C, 2D NMR 분석 결과 모두 triterpenoid saponin 계열로 확인되었다. 각각의 NMR 스펙트럼을 문헌(Noburu 등, 1994) 과 비교 분석하여 AnagallosaponinIV(G-B-9-4), AnagallosaponinVIII(G-B-9-7), Anagallisin C(G-B-9-8)로 각각 동정하였다.



(다) 유효성분 구조 확인

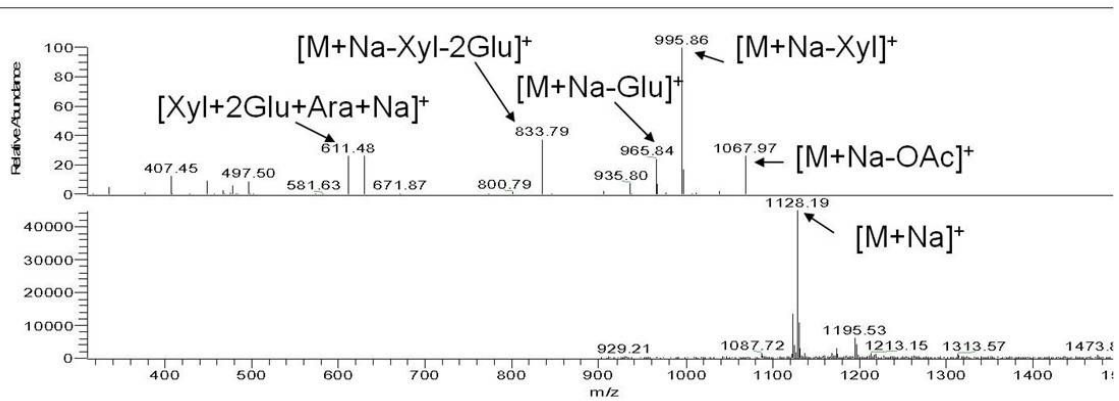
구조 동정된 3개의 물질에 대해 LC-MS/MS를 이용하여 분자량분석을 실시하였다. AnagallosaponinIV의 분자량은 1104.57이며 LC-MS 분석결과 소듐이 결합한 형태인 $m/z=1128.19[M+Na]^+$ 로 분석되었으며 좀 더 명확한 구조 확인을 위해 LC-MS/MS 분석을 실시하여 고유의 쪼개짐 패턴을 확인하였다.

AnagallosaponinVIII의 분자량은 1120.57이며 LC-MS 분석결과 소듐이 결합한 형태인 $m/z=1144.05[M+Na]^+$ 로 분석되었으며 좀 더 명확한 구조 확인을 위해 LC-MS/MS 분석을 실시하여 고유의 쪼개짐 패턴을 확인하였다.

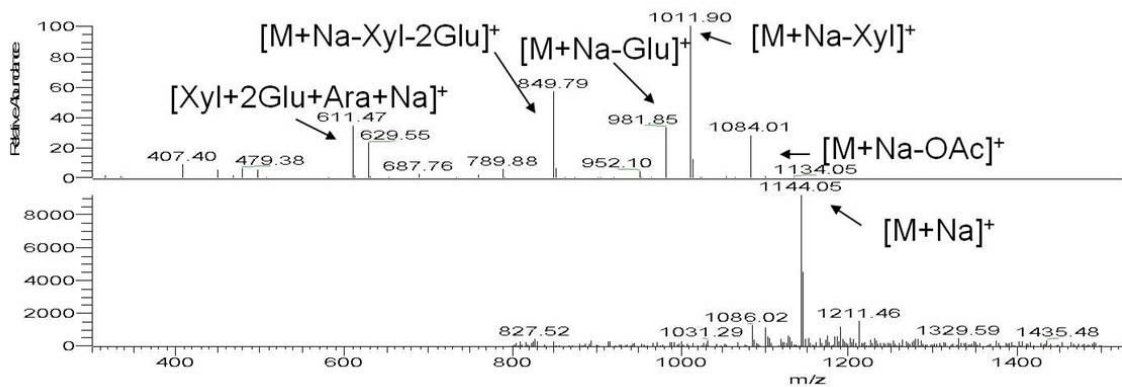
Anagallisin C의 분자량은 1062.23이며 LC-MS 분석결과 소듐이 결합한 형태인

$m/z=1086.23[M+Na]^+$ 으로 분석되었으며 좀 더 명확한 구조 확인을 위해 LC-MS/MS 분석을 실시하여 고유의 조각짐 패턴을 확인하였다(그림 8). 이상의 실험결과를 토대로 갯까치수영으로부터 분리된 사포닌 3종이 항곰팡이 유효성분임을 확인하였다.

A)



B)



C)

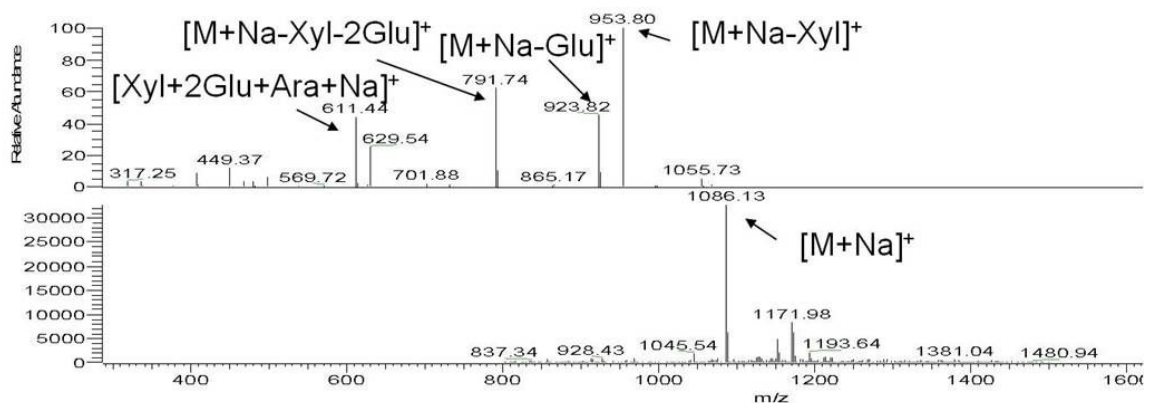


Figure 8. LC-MS spectrum data of isolated compound from the *Lysimachia mauritiana*.

(2) JBR563(돈나무-열매)

(가) 유효성분 분리

돈나무의 항공광이 유효성분 부탄올 분획(10g)에 대해 역상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 1차 정제를 실시하였다. 컬럼 사이즈는 지름 7cm, 길이 15cm 이며 사용한 용매는 20~100% 메탄올을 사용하여 흘려주었다. 컬럼크로마토그래피 결과 14개의 소분획을 얻었으며 각각의 소분획에 대해 항공광이 효능평가를 실시하여 소분획 12번이 가장 우수한 항공광이 효과가 있음을 확인하였다. 이에 소분획 12번(PTO-B-12, 1.2g)에 대해 순상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용해 2차 정제를 실시하여 총 13개의 소분획을 얻었다. 13개 소분획에 대해 각각 항공광이 효능평가를 실시한 결과 소분획 11번(PTO-B-12-11, 706mg) 에서 우수한 항공광이 효능을 확인하였다(그림 9).

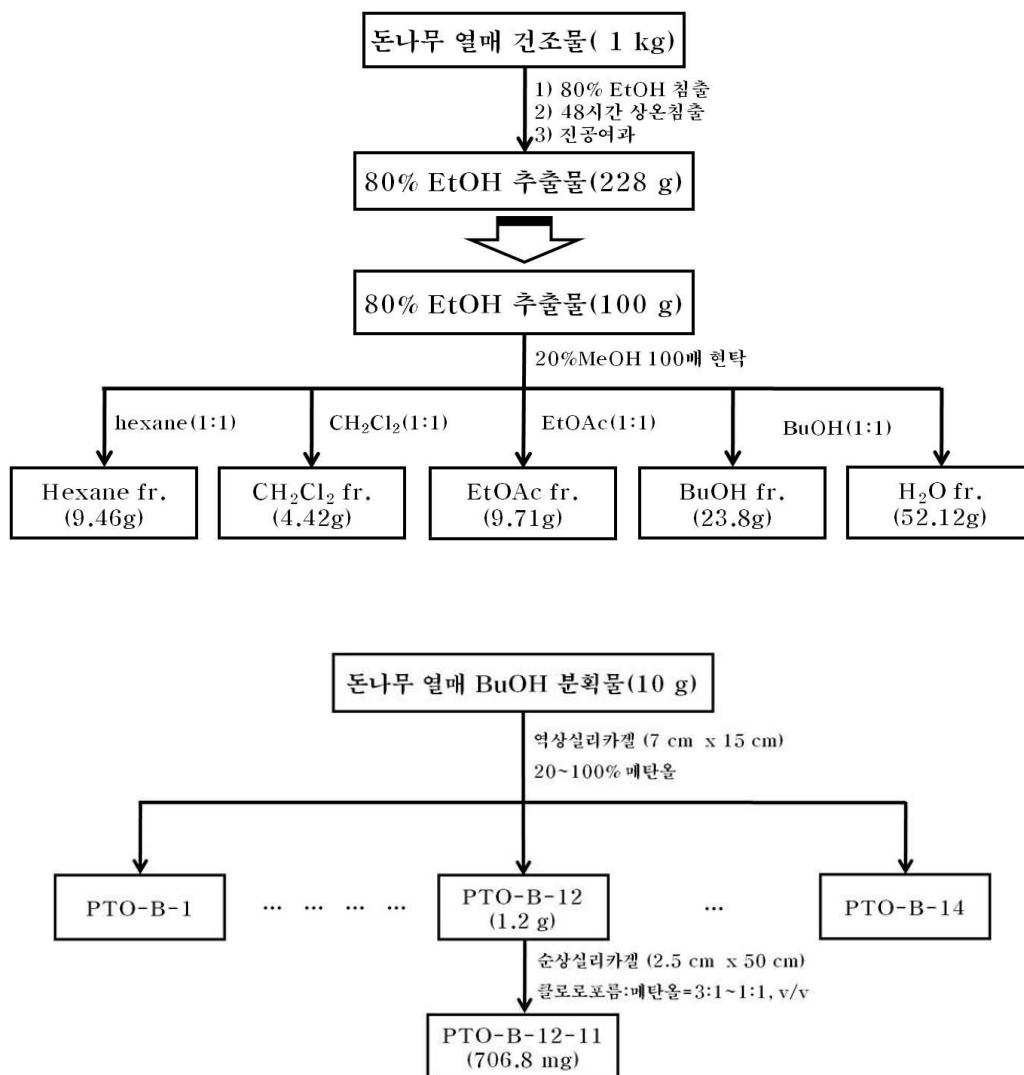


Figure 9. The process of BuOH fraction and BuOH subfractions isolated from the *Pittosporum tobira*.

(나) 유효성분 구조동정

효능이 확인된 소분획에 대해 TLC 분석을 실시한 결과 단일 화합물로 예상되었으며 1H, 13C, 2D NMR 분석 결과 triterpenoid saponin 계열로 확인되었다. 이 물질의 NMR 스펙트럼을 문헌(*Tetrahedron*, 58, 10127 - 10136, 2002)과 비교 분석하여 SaponinIII_A₃로 동정하였다(그림 10).

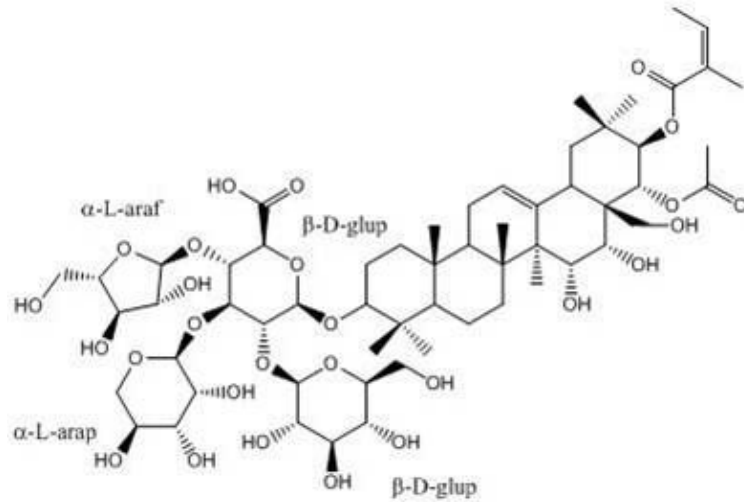


Figure 10. SaponinIII_A₃

(다) 유효성분 구조 확인

구조 동정된 물질에 대해 LC-MS/MS를 이용하여 분자량분석을 실시하였다. SaponinIII_A₃의 분자량은 1232.58이며 LC-MS 분석결과 소듐이 결합한 형태인 $m/z=1256.12[M+Na]^+$ 로 분석되었으며 좀 더 명확한 구조 확인을 위해 LC-MS/MS 분석을 실시하여 고유의 쪼개짐 패턴을 확인하였다(그림 11). 이상의 실험결과를 토대로 돈나무로부터 분리된 사포닌 1종이 항곰팡이 유효성분임을 확인하였다.

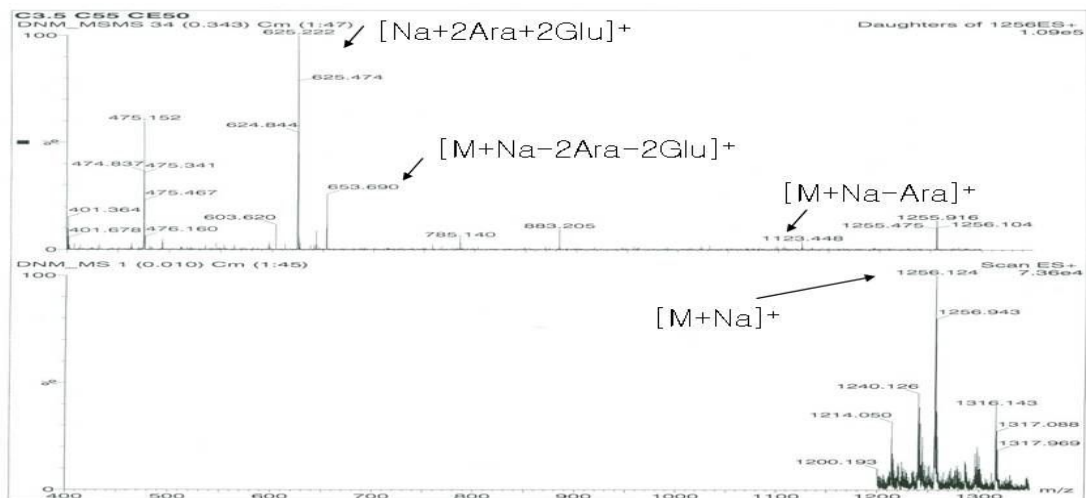


Figure 11. LC-MS spectrum data of isolated compound from the *Pittosporum tobira*.

(3) JBR467(자귀나무-잎) 및 JBR580(자귀나무-열매)

(가) 유효성분 분리

자귀나무의 항곰팡이 유효성분 부탄올 분획(10g)에 대해 역상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 1차 정제를 실시하였다. 컬럼 사이즈는 지름 6cm, 길이 20cm 이며 사용한 용매는 20~100% 메탄올을 사용하여 흘려주었다. 컬럼크로마토그래피 결과 11개의 소분획을 얻었으며 각각의 소분획에 대해 항곰팡이 효능평가를 실시하여 소분획 10번이 가장 우수한 항곰팡이 효과가 있음을 확인하였다. 이에 소분획 10번(JG-10, 1.6g)에 대해 순상실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용해 2차 정제를 실시하여 총 9개의 소분획을 얻었다. 9개 소분획에 대해 각각 항곰팡이 효능평가를 실시한 결과 소분획 3번(JG-10-3, 708mg) 에서 우수한 항곰팡이 효능을 확인하였다. 소분획 3번을 TLC로 분석하였을 때 발색시약(Anisaldehyde-H₂SO₄)의 색상(보라색)을 통하여 소분획 3번이 사포닌 혼합물로 구성되었음을 알 수 있었다(그림 12). 그러나 유효성분의 정제가 더 이상 어렵다고 판단되어 자귀나무 추출물 중 가장 함량이 높은 지표성분을 탐색하고자 하였다.

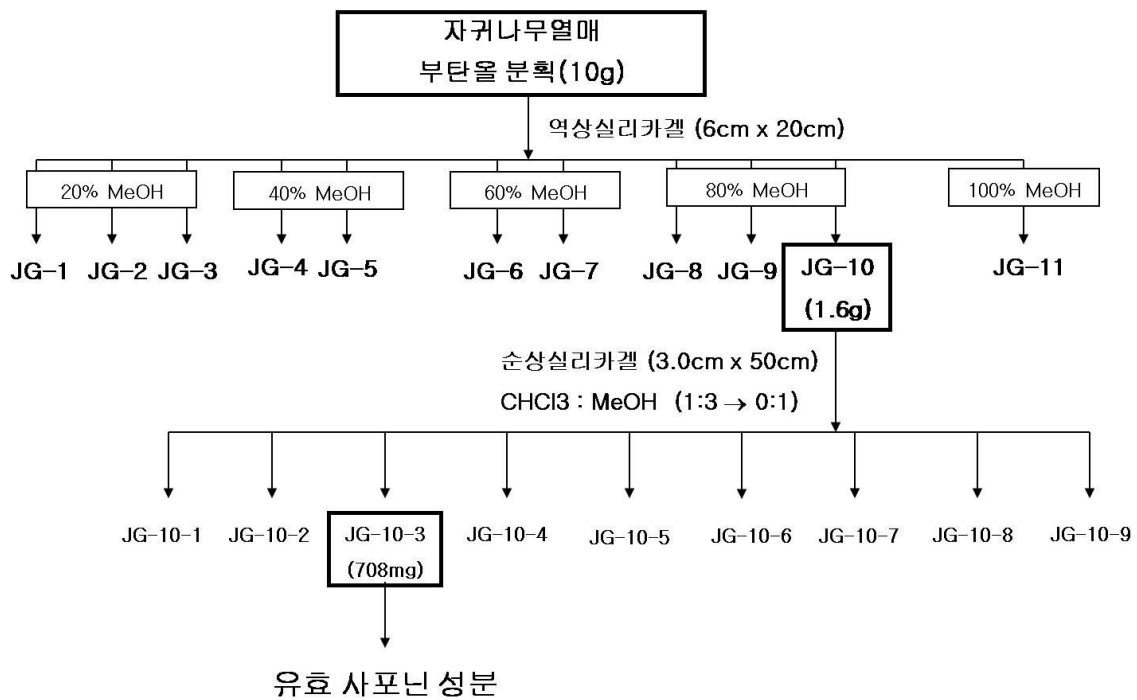


Figure 12. The process of BuOH fraction and BuOH subfractions isolated from the *Albizzia julibrissin*.

(나) 지표성분 선정 및 함량 분석

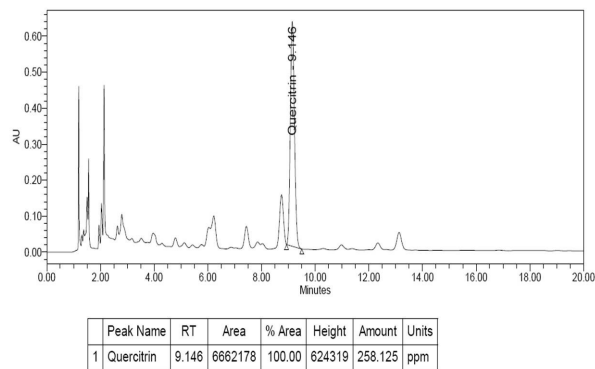
문헌검색(*Applied Biochemistry and Biotechnology*, **130**, 382-391, 2006)을 통해 자귀나무에 다량의 Quercitrin이 포함되어 있음을 예상하였다. 이에 Quercitrin 표준품(Sigma Q3001)을 구매하여 HPLC 장비를 이용해 추출물 중 Quercitrin의 함량 분석을 실시하였다. 분석컬럼은 SunFire

C18(5um, 4.6 x 150mm)을 사용하였고 검출기는 PDA(254nm), 분석시료는 메탄올에 녹여 10000ppm으로 희석하였다. 또한 표준품도 메탄올에 녹여 표준용액을 제조하였으며 각각의 분석시료들은 실린지필터(0.2um)로 여과하여 사용하였다. 이동상의 조성은 다음과 같다.

Time (min)	Flow rate (ml/min)	A% (Water, 0.5%acetic acid)	B% (ACN)
	1	80	20
2	1	80	20
27	1	70	30
30	1	70	30
31	1	0	100
41	1	0	100
42	1	80	20
57	1	80	20

Quercitrin 함량 분석결과 자귀나무 잎 추출물 중 2.58%, 열매 추출물 중 0.3%의 Quercitrin이 포함된 것으로 분석되었으며 본 실험 결과를 통하여 차후 자귀나무 추출물을 활용하여 제품 생산 시 품질관리용 지표성분으로 Quercitrin을 이용할 수 있음을 확인하였다(그림 13).

A)



B)

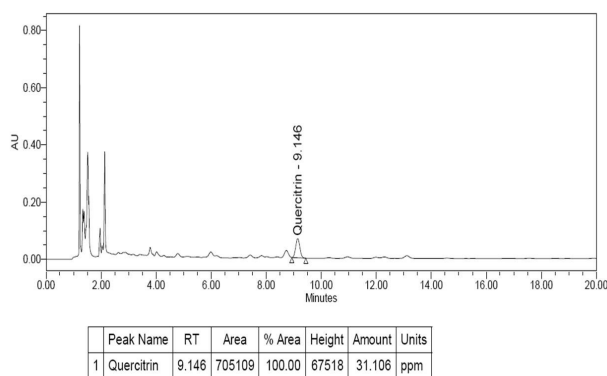


Figure 13. HPLC spectrum of quercitrin isolated from *Albizzia julibrissin* leaf(A) and fruit(B) extracts.

(4) JBR701(GNC)

(가) 유효성분 분리

유효 및 지표성분연구를 위해서 5가지 용매 subfraction을 나누어 유효 subfraction의 성분을 조사하였다. HPLC 분석법으로 분석을 실시한 결과, 가장 항곰팡이능이 우수한 MC fraction의 주성분은 Anthraquinone류 화합물이며 Anthraquinone류 화합물이 항곰팡이능과 매우 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다. 아래의 그림은 MC fraction의 subfraction 과정, 성분에 따른 활성 및 분획물의 성분분석 결과의 선행연구 결과를 도식화 한 것이다(그림 14).

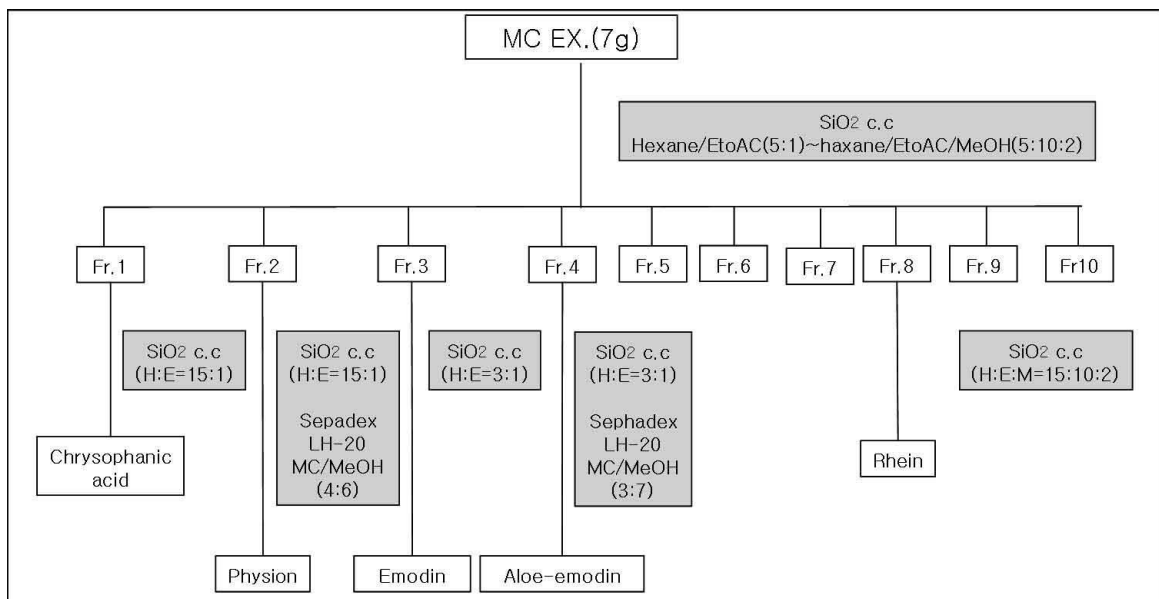
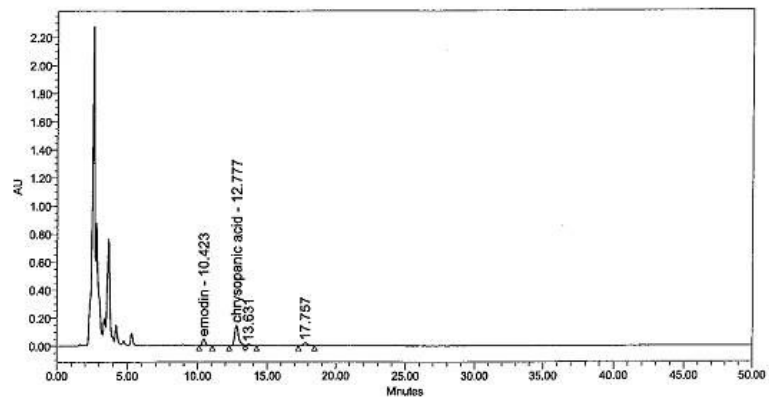


Figure 14. The process of subfraction of MC extracts and each constituent.

(나) 지표성분 분석 및 표준분석법 개발

Anthraquinone류 성분(Chrysophanic acid, Emodin, Aloe emodin)을 지표성분으로 하여 표준분석법을 설정하였다. 표준액의 조제는 Chrysophanic acid(98% CAS 481-74-3, Aldrich 229075), Emodin(>90%, CAS 518-82-1, Aldrich E7881-50MG), Aloe-emodin(95+%, CAS 481-72-1, Sigma A7687-100MG) 표준품 10mg을 정밀히 달아 25mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 표선후 5mL을 취하여 100mL 용량플라스크에 넣고 이동상으로 표선하여 막여과한 후 여액을 표준액으로 하였으며, 검액조제는 GNC 원물250mg을 정밀히 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 이동상으로 표선하여 막여과한 후 여액을 검액으로 하였다(그림 15).



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height	Amount
1	emodin	10.423	783907	18.39	47802	19.741
2	chrysopanac acid	12.777	2792989	65.52	143965	88.758
3		13.631	203903	4.78	9271	
4		17.757	482192	11.31	19526	
5	rhein	24.303				

Figure 15. HPLC profile of Anthraquinones in *Rheum* fractions.

2. 현장적용 및 병리모니터링

가. 식물추출물이 벼 생육 및 생리에 미치는 영향

(1) 종자발아

선발된 식물추출물을 벼 종자 처리제로 사용할 수 있는지의 여부를 알아보기 위해 filter paper위에 식물추출물을 처리 한 후 종자를 치상하는 방법과 water agar 배지에 식물추출물을 농도별로 희석한 배지 위에서 발아율을 검정하는 방법 등 두 가지 방법으로 실시하였다. 그 결과, JBR325(갯까치수영)은 벼 종자의 발아에 미치는 영향이 거의 없는 반면, JBR701(GNC)은 고농도에서는 벼 종자의 발아에 좋지 않은 영향을 주는 것을 확인하였다(그림 16). 한편, 종피를 벗긴 후 water agar 배지에서 종자의 발아력을 검정하여보면 종자의 발아력에 더 나쁜 영향을 미치기 때문에 JBR701(GNC)을 종자소독제로 사용할 때는 반드시 종피가 있는 상태에서 이루어지는 것이 바람직하였다.

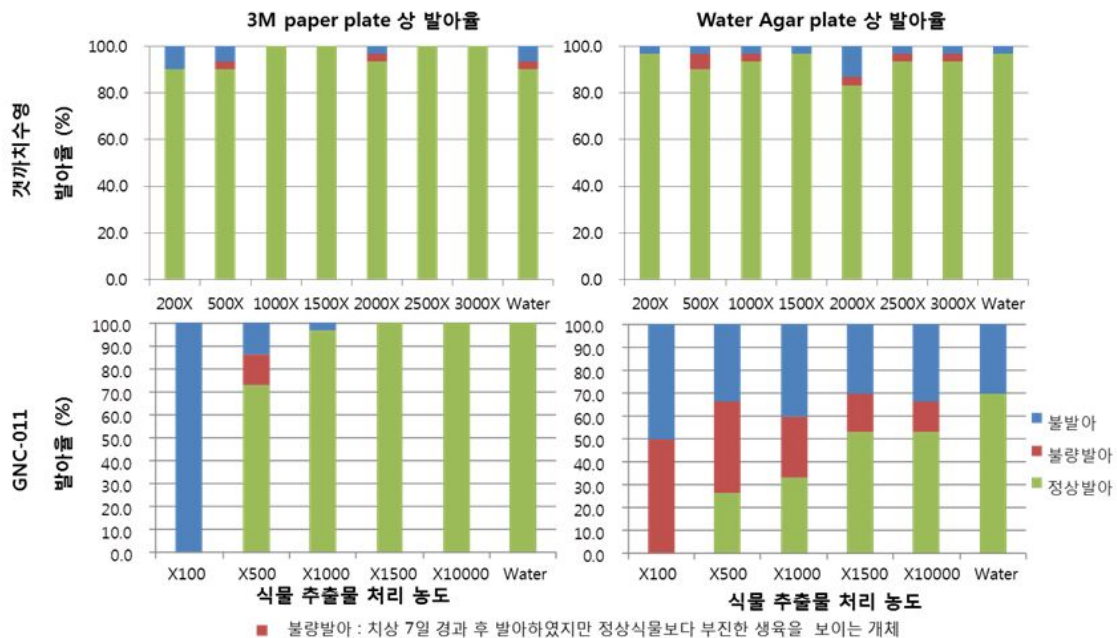


Figure 16. Germination test of rice using JBR325 and JBR701.

(2) 벼의 생육

선발된 식물 추출물이 4~5 엽기(유묘기) 벼의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위해서 동진, 일미 그리고 호평벼를 18 x 14 x 9(cm) pot에 품종별로 10개체씩 파종하여 온실에서 생육시켰으며 발아 후 1주 간격으로 식물 추출물을 농도별로 3회 관주(1회 50ml)하였다. 각 약제를 농도별로 처리하여 4~5 엽기의 초장을 측정해본 결과, JBR325(갯까치수영)의 경우에만 100배 정도의 고농도에서만 벼의 생장을 억제하였을 뿐, 그 이하의 농도에서는 JBR325(갯까치수영)과 JBR701(GNC) 모두 특별히 벼의 생장을 억제하지 않는 것으로 확인하였다 (그림 17).

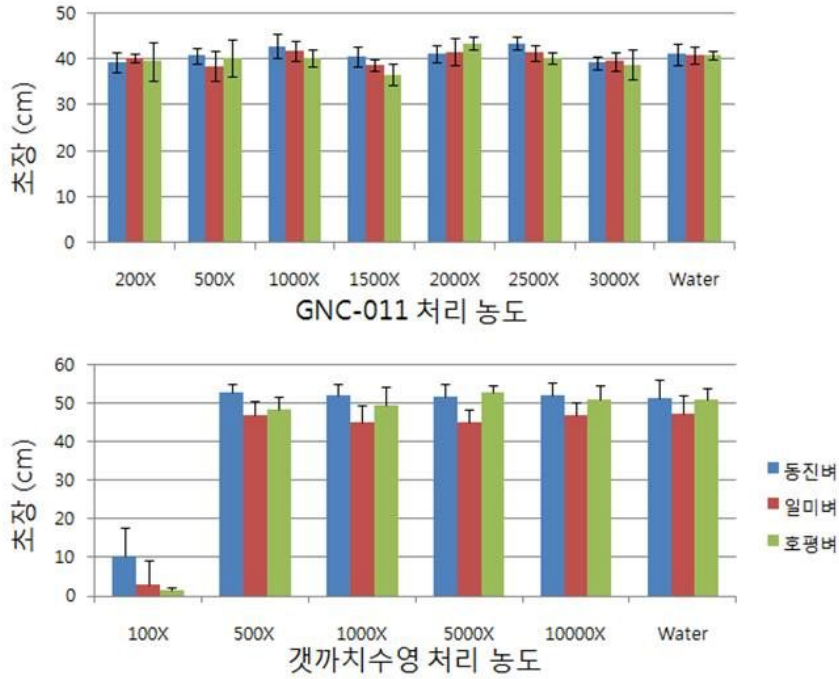
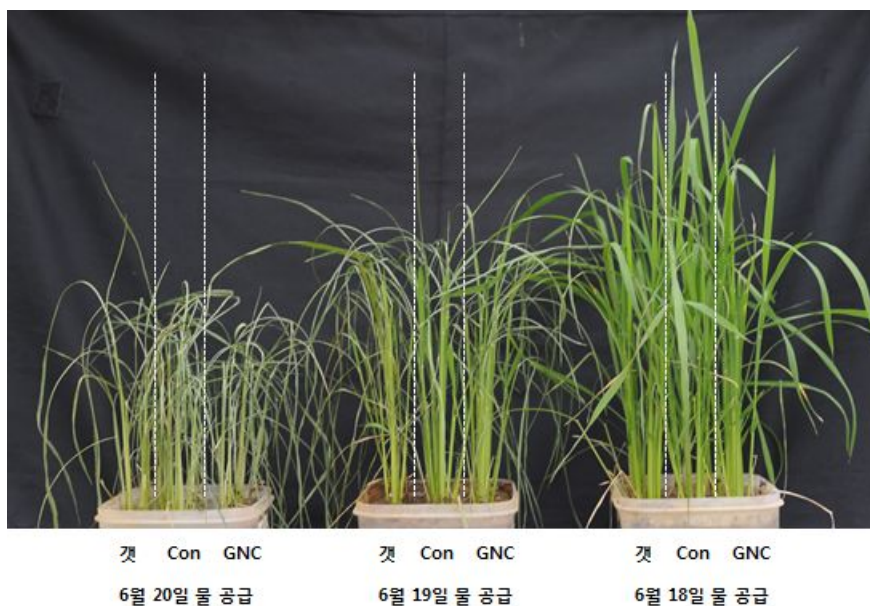


Figure 17. Growth test of rice using JBR325 and JBR701.

(3) 가뭄 스트레스에 대한 내성 유도

일반적으로 병원균에 대한 식물의 병저항성은 가뭄스트레스에 대한 내성과 연결되어 나타나는 경우가 대부분이어서 간접접촉에 의해 벼에 저항성을 유도하였던 유효추출물이 가뭄에 대한 내성도 유도할 수 있는지의 여부를 알아보았다. 엽령 5.5엽기의 동진벼를 이용하여 1일 간격으로 유효추출물 200배 희석액을 총 3회 분무 (1회 15ml) 하였으며 7일 뒤 1일 간격으로 물을 관주하여 회복시킨 결과, 대조구와 약제처리구 간에 차이가 인정되지 않아 공시한 유효추출물들은 가뭄에 대한 내성 유도 능력을 가지지 않았다.



나. 식물추출물의 벼 도열병균 생장억제 효과

식물추출물의 항균활성을 측정하여 JBR325(갯까치수영)과 JBR701(GNC)의 도열병균(Race KJ105)에 대한 생장억제 능력을 antifungal activity test용 paper disk를 이용한 방법과 식물 추출물 농도배지를 이용한 검정방법으로 평가하였다. 대조군으로는 물과 도열병 방제약제로 상품 등록 되어있는 키타진을 사용하였다. 그 결과 물 처리구에 비해 JBR325(갯까치수영)10%액과 JBR701(GNC) 10%액 그리고 키타진 원액이 도열병균의 균사생장에 대해 강한 생장억제 능력을 갖는 것을 확인하였다(그림 18).

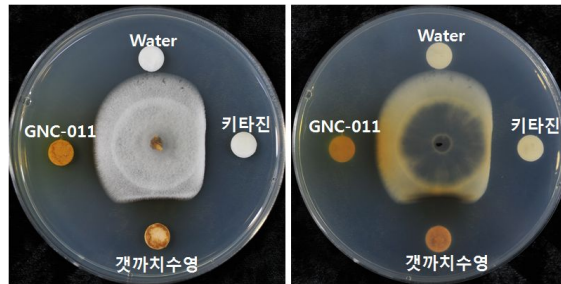


Figure 18. *in vitro* antifungal effects on PDA medium.

또한 도열병균을 식물추출물 농도별 배지에 각각 계대배양을 해본 결과, 일반 PDA배지인 대조구에 비해 JBR701(GNC)이 도열병균의 균사생육을 강하게 억제함을 확인 할 수 있었다(그림 19).

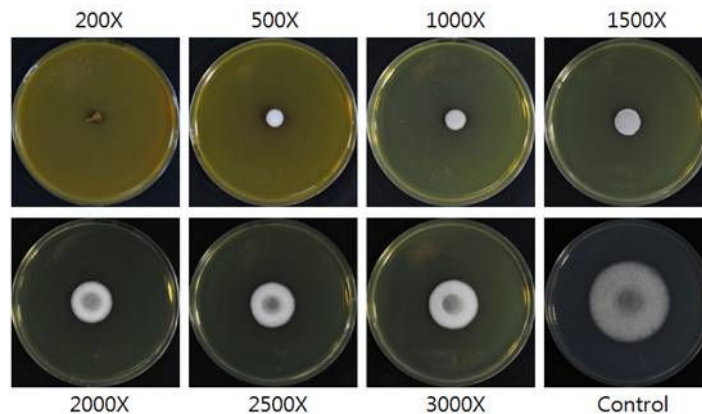


Figure 19. Germination test of *Magnaporthe grisea* between JBR701(above) and control(below).

다. 식물추출물의 벼 도열병 방제효과

(1) 유효 추출물의 관주 처리에 의한 벼 도열병 방제효과 (유도저항성)

식물 추출물을 벼에 처리하면 벼에서 도열병에 대한 저항성이 유도되는지의 여부를 확인해 보기 위해, 식물추출물이 병원균에 직접 접촉하지 않도록 벼가 발아한 후 일주간격으로 농도별로 3회(1회 50ml) 관주하였다. 도열병균 포자현탁액 (포자농도 1×10^6 /ml)을 한 잎 당 5

곳에 10ul 씩 drop 접종한 후 병의 진전을 관찰하였던 결과, JBR325(갯까치수영)의 경우 희석 농도 2500배에서부터 시작하여 추출액 농도가 높아질수록 강력한 도열병 방제효과를 보였으며, JBR701(GNC)의 경우에도 갯까치수영보다 그 정도는 낮았으나 희석배수 1500배 이상의 농도에서는 강력한 도열병 방제효과를 나타내었다. 이 결과는 병반의 크기를 육안 확인하거나 도열병균의 균사를 염색할 수 있는 Lacto phenol trypan blue(LTB) staining을 통해 확인하였다(그림 20).

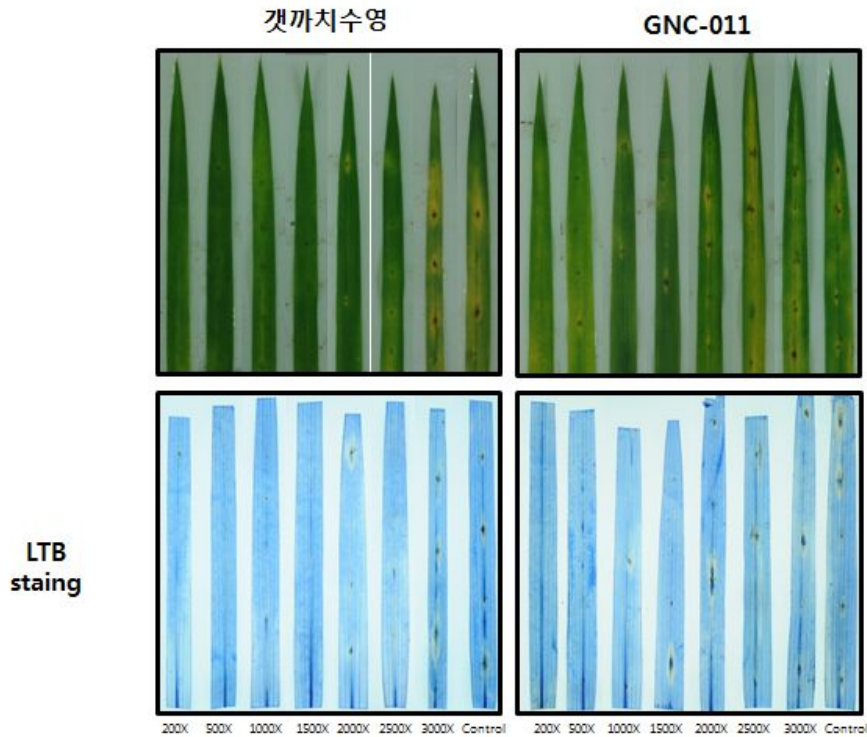


Figure 20. Lacto phenol trypan blue(LTB) staining of *Magnaporthe grisea*.

다른 한편, 도열병 분생포자 현탁액을 분무처리 하였을 때도 저항성이 유도되는지를 알아보고자 도열병균 분생포자 (1×10^5 /ml 농도) 용액을 분무 접종한 후 도열병의 진전을 관찰하였다. 그 결과 JBR701(GNC)과 JBR325(갯까치수영) 모두 3000배 정도의 낮은 농도에서도 강력한 방제효과를 나타내었고 식물 추출액의 농도가 높아질수록 그 효과는 증가하였다. 그러나 JBR325(갯까치수영)의 경우, 200배와 500배의 고농도에서는 대조군과 비슷하게 방제효과가 떨어졌는데 이는 이 약제가 고농도로 처리되면 오히려 유도저항성 효과가 떨어지는 것을 의미하며, 저항성 유도 과정의 생리에 악영향을 미친 결과로 추정된다(그림 21).

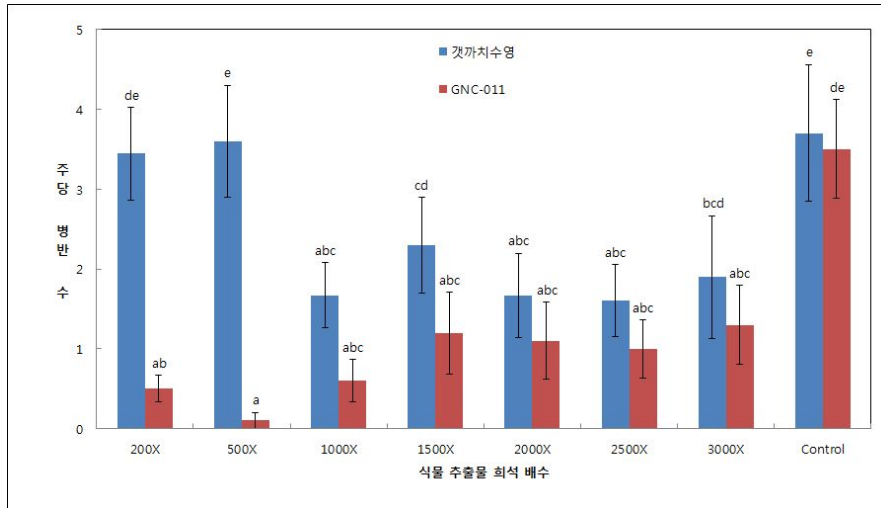
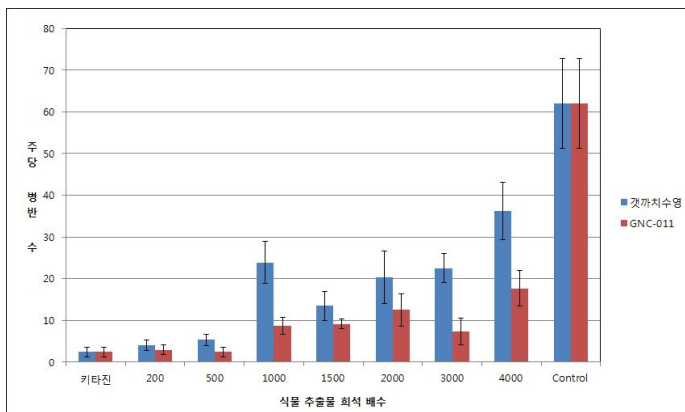


Figure 21. Antifungal effects due to each concentration of plant extracts.

(2) 유효 추출물의 경엽처리에 의한 벼 도열병 방제 효과

유효 추출물이 병원균에 직접 접촉하여 나타나는 벼 도열병 방제 효과를 측정하기 위하여 경엽처리에 의한 유묘검정을 실시하였다. 약 4~5엽기의 벼 품종(호평벼) 유묘에 도열병균 Race KJ105 균주 접종 전후 2일 간격으로 총 3회 (1회 15ml) 분무처리 하였다. 그 결과, JBR701(GNC)과 JBR325(갯까치수영) 모두 추출물의 농도가 높아질수록 강력한 방제효과를 나타냈으며 희석농도가 500배 정도에 이르면 도열병 방제약제인 키타진 입제와 같은 유의도 값을 유지하였다. 직접 접촉에 의한 도열병균 살균효과는 갯까치 수영에 비하여 JBR701(GNC)이 더 좋은 것을 나타내고 있다(그림 22).



Duncan*		유의수준 = 0.05에 대한 부집단						
VAR00001	N	1	2	3	4	5	6	7
키타진	10	2.4000						
G500	10	2.8837						
G200	10	2.8837						
갯200	10	4.0372	4.0372					
갯500	10	4.6139	4.6139					
G3000	10	7.3000	7.3000	7.3000				
G1000	10	8.7000	8.7000	8.7000	8.7000			
G1500	10	10.3814	10.3814	10.3814	10.3814	10.3814		
G2000	10	12.5000	12.5000	12.5000	12.5000	12.5000	12.5000	
갯1500	10	13.8418	13.8418	13.8418	13.8418	13.8418	13.8418	
G4000	10	17.7000	17.7000	17.7000	17.7000	17.7000	17.7000	
갯2000	10		20.3000	20.3000	20.3000	20.3000	20.3000	
갯3000	10			22.5000	22.5000	22.5000	22.5000	
갯1000	10				23.9000	23.9000	23.9000	
갯4000	10					36.2000	36.2000	
Control	10							62.0000
유의확률		.131	.064	.075	.058	.064	.052	1.000

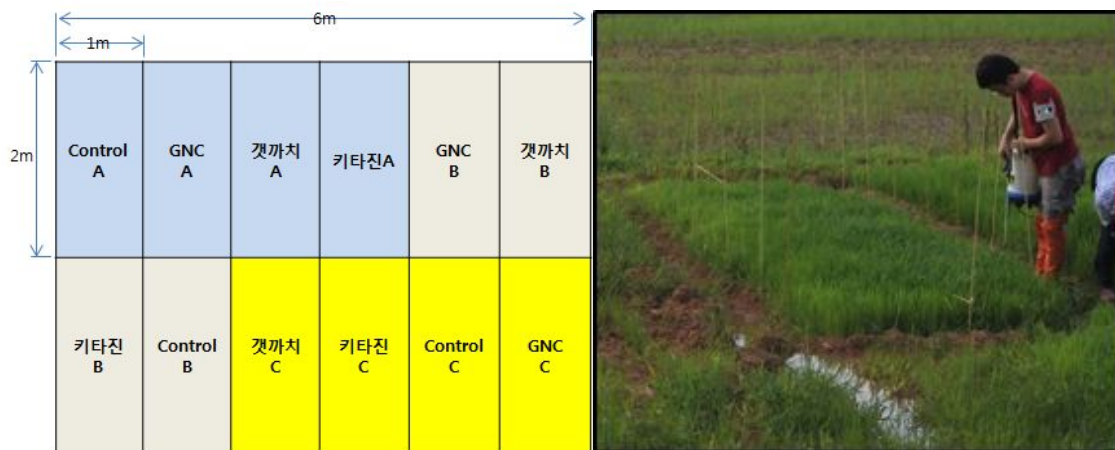
동일 집단군에 있는 집단에 대한 평균이 표시됩니다.
a. 조화평균 표본 크기 10.000(명) 사용됩니다.

Figure 22. The prevention effects of Magnaporthe grisea.

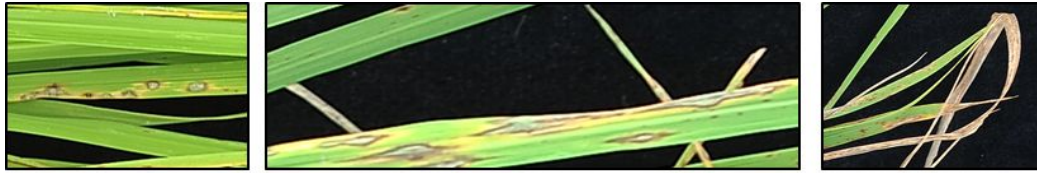
라. 식물추출물의 실제 포장에서 벼 도열병 방제효과

(1) 밭못자리 검정 결과

유묘검정을 통해 JBR701(GNC)과 JBR325(갯까치수영)이 도열병에 대한 방제효과를 나타내었으나 이 약제들이 실제 밭못자리에서도 도열병에 대한 방제효과를 나타내는지의 여부를 확인하고자 밭못자리 검정을 실시하였다. 포장은 전남 나주시 산포 전남 농업기술원의 밭못자리 내에서 실시하였으며 호평 종자를 밭못자리에 뿌리고 상토를 덮어 약 2주 후부터 3일 간격으로 식물추출물을 처리하였다. 약제의 농도는 유묘검정에서 유효농도로 확인된 200배 희석액을 사용하였으며 발병조사 면적은 처리 당 2 m² 으로 총 3반복 조사를 진행하였다. 대조군으로는 무처리구와 상품으로 등록되어있는 키타진 약제를 사용하였다. 도열병 조사 방법으로는 한국작물보호협회 2012년 농약 시험담당자 교육지침서의 방법에 따라 주당 모든 잎의 병반 면적율을 구해 결과를 도출하였다. 그 결과 물 처리구에 비해 JBR325(갯까치수영)과 JBR701(GNC)이 좋은 효과를 보이고 있으며 키타진 약제와 비교 했을 때 거의 비슷한 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.



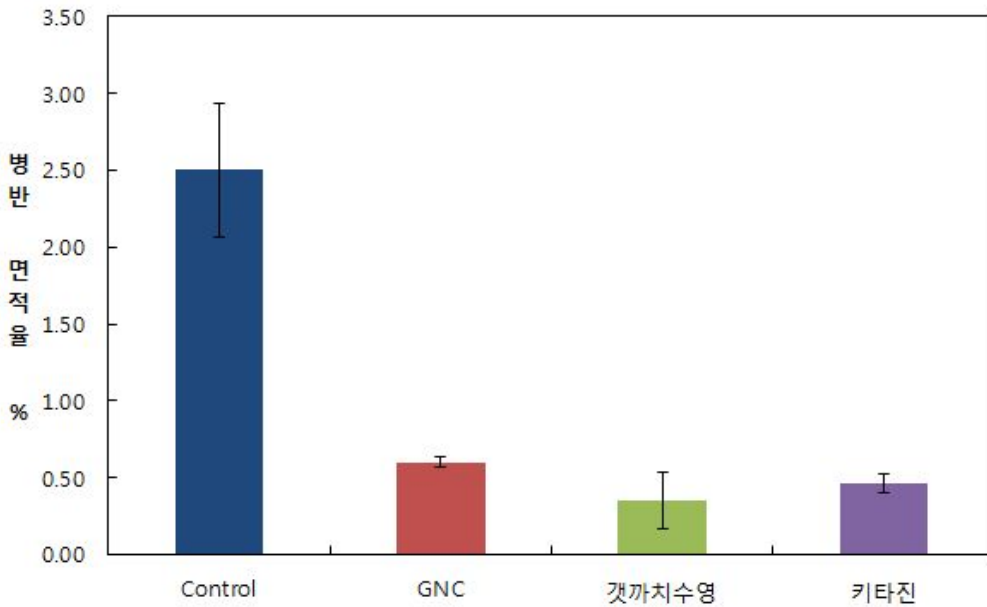
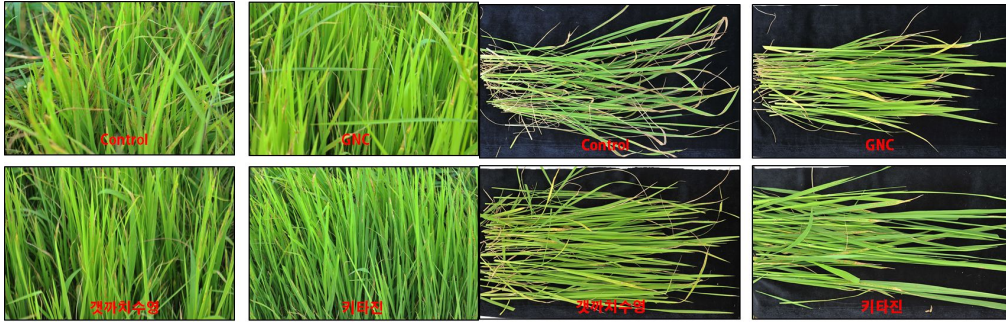
병반면적율(%)	발병상태(주당) -한국작물보호협회 2012년 농약 시험담당자 교육지침서
0	잎 전체에 병반이 전혀 없을 때
0.2	하위엽에 대형병반 1개와 소형병반 1-2개 또는 소형병반 10개 이내
0.5	하위엽에 대형병반 2-3개 또는 소형병반 20개 정도가 산재
1	대형병반 4-5개 주위에 소형병반 산재 또는 소형병반 산재 또는 소형 병반 30-40개 정도
2	하위엽 1-2매가 병반으로 거의 덮이거나 대형병반 10-15개가 주로 하엽에 산재
5	하위엽 2-3매가 반고사하고 대형병반만 30-40개가 산재
11	하위엽 2-3매가 완전히 고사되고 한 잎에 5-6개의 대형병반이 산재
25	상위엽을 포함하여 7-8매의 잎이 완전고사 또는 부분 고사하고 모든 잎에 각각 10개 정도의 병반이 균등히 산재
50	발병이 심하고 식물체가 크게 위축되거나 상위엽의 피해가 현저하여 고사주가 생길 때
100	포기가 완전고사 상태일 때



소형병반

대형병반

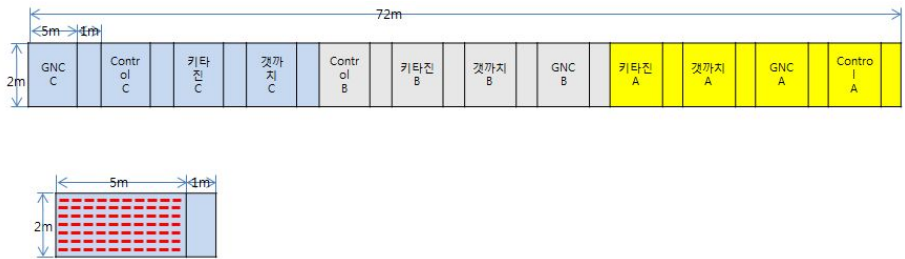
상위엽고사



(2) 실제 벼 포장 검정

유묘검정과 발묘자리 검정에서 확인된 JBR701(GNC)과 JBR325(갯까치수영)의 도열병에 대한 방제효과가 실제 수도포장 내에서도 나타나는지를 확인하기 위해 포장 검정을 실시하였다. 포장은 전남 나주시 산포 전남 농업기술원에서 6년차 유기재배 중인 답작포장 내에서 실시하였다. 공시 품종으로는 호평벼를 사용하였으며 재식밀도는 줄간 30cm 그리고 주간은 15cm로 총 7줄을 검정에 사용하였다. 식물 추출물 처리는 이앙 후 약 한 달 후 부터 일주 간격으로 기준 처리농도 200배로 분무처리한 후 도열병 발병율을 조사하였다. 조사 방법으로는 한국작물보호 협회 2012년 농약 시험담당자 교육지침서에 따라서 이병율로 계산하였다. 대조군으로는 물과


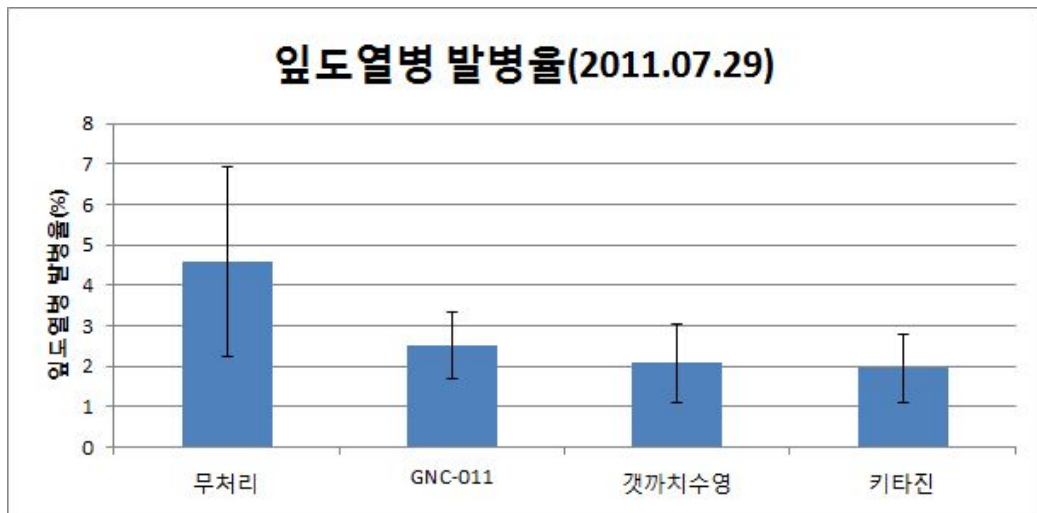
상품으로 등록되어 있는 키타진 약제를 사용하였다. 그 결과 JBR701(GNC)과 JBR325(갯까치수영)이 실제 벼 포장에서도 대조군인 키타진 약제 처리구와 거의 같은 수준의 잎도열병 방제효과를 나타내었다.



공시품종	호평벼
이앙기	2010년 06월 07일
시비량	밑거름을 위해 헤어리비치 재배 후 이앙 다비조건을 위해서 금수강산(유기비료) 2회 처리
잎도열병 실험약제 살포시기	1회-7월 1일 2회-7월 7일 3회-7월 15일
약제 살포 방법	200배(기준농도) 15L 분무 처리
조사면적	2 x 5m = 10mm ²
재식밀도	30 x 15 cm
시험장소	나주시 산포 전남농업기술원 답작포장

Control A	갯까치 200 B	GNC500 C
키타진 A	GNC 200 B	갯까치 200 C
GNC 200 A	Control B	갯까치 500 C
GNC 500 A	갯까치 500 B	Control C
갯까치 200 A	GNC 500 B	키타진 C
갯까치 500 A	키타진 B	GNC 200 C

18m (Total width)
 6m (Plot width)
 3m (Plot height)
 2m (Plot height)

3. 작물곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구

가. 식물추출물 최적 추출과정 확립

(1) 최적추출 공정

건조된 천연물 원물(갯까치수영, 돈나무-열매, 자귀나무 및 GNC)을 입자의 95% 이상의 크기가 4mm 미만인 되도록 분쇄하여 50% Acetone 용매를 1:7 (w/v)의 비율로 사용하여 50°C 온도에서 진탕추출하여 여과 후 감압 건조하여 수상으로 하고 n-Butanol:Toluene(8:2) 용매로 1:1로 3회 액액분리하여 상층을 완전 건조하여 50% Ethanol 용매로 녹인다. 이것을 다시 완전 건조하여 분쇄한 후 최종추출물은 분석을 통하여 지표성분의 함량을 설정하였다(그림 23).

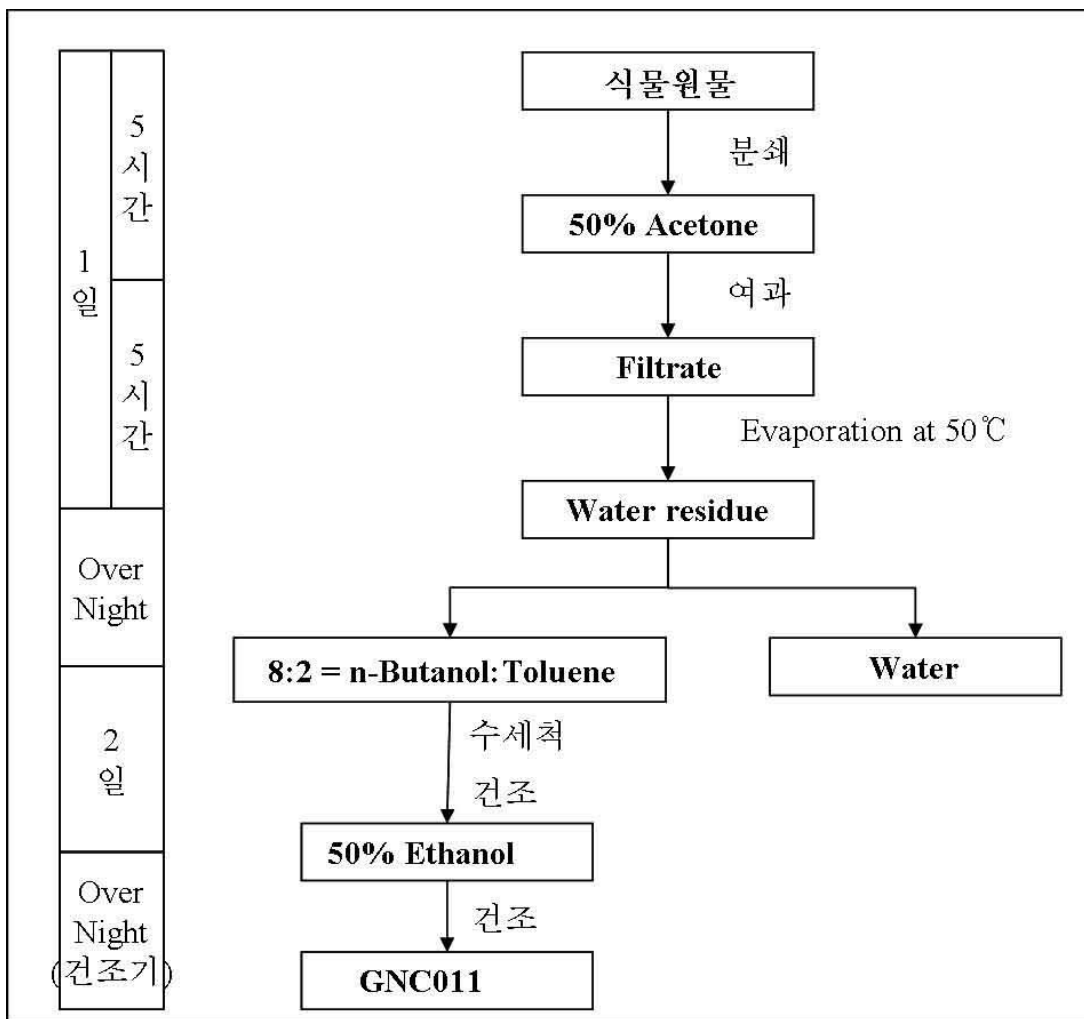


Figure 23. Final standard extraction process.

(2) 시제품 생산 공정

시제품 생산을 위한 공정은 주관기관인 제주테크노파크 바이오융합센터 내 생산공장에서 시행했으며, 원물추출은 60℃에서 50% 아세톤 용액을 5배 w/w로 처리하여 추출하며 추출액을 필터프레스를 사용하여 여과한다. 여과된 추출액은 농축기에 넣고 아세톤이 제거될 때까지 농축한 후 수층을 얻어내고 분획통에 수층을 넣고 동량의 Butanol:Toluene(8:2)를 넣고 1시간 동안 교반한 후 상층을 제거하여 농축기에 넣고 완전 농축시킨 후 50% 에탄올 용액으로 용해한다. 최종적으로 농축 과정으로 에탄올을 제거하고 잔류수층은 동결건조 한다.



[추출기]



[필터프레스]



[농축기]



[교반기]

나. 시제품의 유효성 평가

(1) 시제품의 유효성 평가

연구 수행 전 선행연구 결과로 확보한 JBR701(GNC)를 친환경 유기농자재로 등록시키기 위하여 골프장 잔디의 갈색잎마름병(Rhizoctonia solani)에 약효 및 약해실험을 수행하였다.

(가) JBR701(GNC)

JBR701(GNC) 시제품의 유효성을 평가하기 위하여 최종약제처리 1주일 후 피해면적율을 조사하였다(표 3~6).

[표 3] 약효시험(최종약제처리 7일후 피해면적율 조사) - 제1포장

시 험 약 제	피해면적율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
GNC-011	6.0	4.3	6.7	5.7	a	81.0
티오파네이트 메틸수화제(대조)	5.3	4.7	4.0	4.7	a	84.3
무 처 리	26.0	32.7	31.3	30.0	b	

[표 4] 약효시험(최종약제처리 7일후 피해면적을 조사) - 제2포장

시 험 약 제	피해면적율(%)				유의차 (DMRT)	방제가 (%)
	I 반복	II 반복	III 반복	평 균		
GNC-011	6.0	5.3	6.0	5.8	a	81.8
티오파네이트 메틸수화제(대조)	4.0	3.3	5.3	4.2	a	86.8
무 처 리	34.7	29.3	31.3	31.8	b	

[표 5] 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일차 조사) - 제1포장

시 험 약 제	시험작물 (품종)	약해 정도(0 ~ 5)		비 고
		기 준 량	배 량	
GNC-011	잔디 (켄터키블루글래스)	0	0	약해 없음

[표 6] 약해시험(약제처리 후 3, 5, 7일차 조사) - 제2포장

시 험 약 제	시험작물 (품종)	약해 정도(0 ~ 5)		비 고
		기 준 량	배 량	
GNC-011	잔디 (켄터키블루글래스)	0	0	약해 없음

약효 및 약해시험에 대한 시험결과를 요약하면, 약효시험 부분은 시험약제가 잔디 갈색잎마름 병에 대하여 우수한 방제 효과를 나타내었으며, 약해시험 부분에서 시험약제는 기준량 및 배량에서 외관상 약해 증상이 관찰되지 않았다.



- ◆ 시험구 설치
- 잔디병반이 남아있는 구역
- Nursery에 3개구 설치



1차 실험 : 2009년 11월 17일



2차 실험 : 2009년 11월 27일

(나) JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매)

JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매) 시제품의 유효성을 평가하기 위하여 아래의 그림과 같이 제주도 아라동에 위치한 한라산 CC에서 최종약제처리 1주일 후 피해면적율을 조사하였으며, 약해시험은 약제처리 3, 5, 7일 후 경엽에 나타나는 외관상 약해유무 달관 조사를 실시하였다. 시험결과 시험약제는 잔디도열병에 대하여 우수한 방제 효과를 나타내었으며, 기준량 및 배량에서 외관상 약해 증상이 관찰되지 않았다.



나. 시제품의 안전성 평가

(1) JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매)

(가) 급성경구투여 독성시험

JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매)의 급성경구투여에 의한 급성독성을 조사하기 위해 암·수 Sprague-Dawley(SD) rats을 이용하여 5,000 mg/kg의 투여군을 설정하여, 투여 후 14일 동안 사망동물, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 실험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 체중측정결과, 모든 시험군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었다. 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 JBR325(갯까치수영) JBR563(돈나무-열매)을 랫드에 급성경구투여 한 것의 개략적인 치사량 및 반수치사량(LC₅₀)은 >5,000 mg/kg인 것으로 판단된다(표 7-14).

[표 7] 개체별 체중·일반증상 및 부검소견 - SD계 Rat(♂)

체중변화 (g)			
동물번호	0 day	7 day	14 day
1	29.78	31.84	33.73
2	30.48	34.08	34.22
3	30.04	33.24	35.66
4	30.73	34.55	35.40
5	31.94	35.91	36.73
평균	30.59	33.92	35.15
표준편차	0.84	1.51	1.19

[표 8] 초기임상증상

동물번호	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-

[표 9] 임상증상(day)

동물번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[표 10] 부검소견

동물번호	육안소견
1	NAD
2	NAD
3	NAD
4	NAD
5	NAD

NAD : No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음)

[표 11] 개체별 체중·일반증상 및 부검소견 - SD계 Rat(♀)

체중변화 (g)			
동물번호	0 day	7 day	14 day
6	24.80	26.52	27.74
7	24.54	26.31	30.66
8	24.07	29.74	29.54
9	24.25	27.59	27.47
10	25.68	28.25	31.00
평균	24.67	27.68	29.28
표준편차	0.63	1.40	1.63

[표 12] 초기임상증상

동물번호	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-

[표 13] 임상증상(day)

동물번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
폐사수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[표 14] 부검소견

동물번호	육안소견
6	NAD
7	NAD
8	NAD
9	NAD
10	NAD

NAD : No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음)

[표 22] 부검소견

동물번호	육안소견
6	NAD
7	NAD
8	NAD
9	NAD
10	NAD

NAD : No abnormal detected (육안적 이상소견 관찰되지 않음)

(2) JBR580(자귀나무)

(가) 피부자극성 시험

JBR580(자귀나무)의 피부자극시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 피부에 1회 노출시킨 후 1, 24, 48, 72시간째에 피부반응 정도를 관찰하고 치사수, 체중변화 및 일반중독증상을 관찰·조사한 결과 일반중독증상 및 치사동물수는 모든 시험동물에 있어서 특이적인 임상증상이나 사망동물은 관찰되지 않았다. 체중변화는 시험물질 적용직전, 적용 후 24, 72시간에 개별 체중을 측정하고, 시험물질로 기인한 특이한 체중변화는 없었으며, 피부반응의 평가항목에서 시험물질 노출 종료 후 1, 24, 48 및 72 시간에 피부반응을 관찰한 결과, 시험물질 적용 후 1시간째 찰과 부위에서 아주 가벼운 부종이 4마리에게서 관찰되었고 그 중 3마리는 24시간까지 지속되었다. 72시간째에는 어떠한 피부반응도 관찰되지 않아 1차 피부자극지수(Primary Irritation Index, P.I.I)는 “0.1”로 산출되었다. 이상의 결과를 종합하면 JBR580(자귀나무)은 New Zealand White계 토끼의 피부에 적용시 [피부 1차 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질인 것으로 판단되었다(표 23~28).

[표 23] 일반중독증상 및 치사관찰기록

동물번호	시험물질 처리 후 경과시간			
	1	24	48	72
1	N ¹⁾	N	N	N
2	N	N	N	N
3	N	N	N	N
4	N	N	N	N
5	N	N	N	N
6	N	N	N	N

N¹⁾ : 정상

[표 24] 체중변화측정기록

(단위 : g)

동물번호	시험물질 처리 전/후 경과시간		
	처리전	24	72
1	2000	2000	2100
2	2150	2100	2150
3	2050	2050	2130
4	2040	2000	2100
5	1950	1950	2090
6	1990	1970	2100
Mean ¹⁾	2030.0	2011.7	2111.7
S.D. ²⁾	69.0	54.9	23.2

Mean¹⁾: 평균, S.D.²⁾ : 표준편차

[표 25] 관찰시간대별 피부반응평가기록(1)

구분	동물번호	관찰부위	시험물질 처리 후 경과시간				
			1	24	48	72	
홍반/ 가피	1	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	2	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	3	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	4	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	5	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	6	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0

[표 26] 관찰시간대별 피부반응 평가기록(2)

구분	동물번호	관찰부위		시험물질 처리 후 경과시간			
				1	24	48	72
부종	1	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	1	1	0	0
	2	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	1	1	0	0
	3	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	4	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
	5	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	1	0	0	0
	6	대조부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	0	0	0	0
		처리부위	비찰과	0	0	0	0
			찰과	1	1	0	0

[표 27] 피부반응 평가표

구분	대조부위								처리부위								
	홍반 및 가피형성				부종				홍반 및 가피형성				부종				
	비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		비찰과		찰과		
	24 ¹⁾	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	24	72	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
평균(합/6)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0
평균의 합	0								0.5								
P.I.I ²⁾	0								0.1								

¹⁾시험물질 처리 후 관찰시간

²⁾P.I.I.(Primary Irritation Index) = 총계/4

[표 28] 피부 1차 자극표

구분	피부1차 자극지수(P.I.I.)
없음	≤ 1.0
경도	1.1 ~ 2.0
중도	2.1 ~ 5.0
강도	≥ 5.1

(나) 안점막자극성 시험

JBR580(자귀나무)의 안점막자극성 시험을 토끼(New Zealand White계)를 사용하여 결막낭내에 1회 처리 후 1, 24, 48, 72 시간째에 일반중독증상, 치사수 체중변화 및 안점막자극상을 관찰·조사한 결과, 일반중독 증상 및 치사동물수는 모든 동물에서 시험물질 처리 후 어떠한 중독 증상도 관찰되지 않았으며 치사된 동물도 없었다. 시험물질 처리 후 1, 24, 48 및 72 시간째에 안점막자극성을 조사한 결과 1시간째부터 결막의 발적 및 부종에 대한 자극증상이 6마리에게서 관찰되었고 2마리에게서 배출물이 관찰되었다. 관찰된 안점막 자극성은 24시간째 관찰시 소실되어 모든 시험동물이 정상으로 회복되었다. 이러한 결과로부터 평균안자극지수(M.O.I)는 4.7, 0.0, 0.0 및 0.0으로 각각 산출되었고, 급성안자극지수(A.O.I)는 4.7로 확인되었다. 이러한 결과는 JBR580(자귀나무)는 New Zealand White계 토끼의 안점막에 적용시[안점막 자극표]에 의해 자극성이 없는 물질로 확인된 것이다(표 29~33).

[표 29] 치사동물 및 임상관찰기록

구분	동물번호	관찰시간			
		1	24	48	72
비세안군	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
	5	N	N	N	N
	6	N	N	N	N

N : 정상

[표 30] 체중변화측정기록

(단위 : g)

구분	동물번호	시험물질 처리 전/후 경과시간		
		처리전	24	72
비세안군	1	2000	2000	2100
	2	2000	2000	2130
	3	1850	1860	1930
	4	2000	2040	2150
	5	1850	1850	2000
	6	2020	2040	2120
Mean ¹⁾		1953.3	1965.0	2071.7
S.D. ²⁾		80.4	87.1	87.0

Mean¹⁾: 평균, S.D.²⁾ : 표준편차

[표 31] 안점막반응 평점표

관찰 시간	동물 번호	각막혼탁		홍채 반응 (C)	결막			합계 ¹⁾ (110)	평균 (M.O.I) ²⁾
		정도 (A)	범위 (B)		발적 (D)	부종 (E)	배출물 (F)		
1시간	1	0	0	0	1	1	0	4	4.7
	2	0	0	0	1	1	1	6	
	3	0	0	0	1	1	0	4	
	4	0	0	0	1	1	0	4	
	5	0	0	0	1	1	1	6	
	6	0	0	0	1	1	0	4	
24시간	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	
48시간	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	
72시간	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0
	2	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	0	0	0	

¹⁾ 개체별 안점막반응점수 = (A×B×5)+(C×5)+2(D+E+F)

²⁾ M.O.I. : Mean Ocular Irritation

[표 32] 암점막자극표

구분	급성안점막 자극지수(A.O.I) ¹⁾
없음	≤10
경도	10.1 ~ 30.0
중도	30.1 ~ 60.0
강도	≥ 60.1

¹⁾A.O.I : Acute Ocular Irritation

(다) 급성어독성 시험

JBR580(자귀나무)의 잉어(*Cyprinus carpio*)에 대한 급성어독성 시험을 96시간 동안 실시하여 생사수와 일반중독증상을 관찰하고 체중 및 전장을 조사한 결과, 48시간 및 96시간 반수치사농도(LC₅₀)는 모두 10mg/L이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 III급으로 분류되었다. 이상증상으로는 시험농도인 10mg/L에서 중독증상이 관찰되지 않았으며 음성대조군에서도 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

[표 33] 경시적 수질검사 성적서

구분		시험물질처리직후/ 시험생물투입직전	시험물질처리 48시간후	시험물질처리 96시간후
DO	시험물질	90.5	90.8	95.7
	PCP-Na염 ¹⁾	83.3	64.4	46.7
	음성대조군	90.87	93.7	95.9
pH	시험물질	7.30	7.56	7.79
	PCP-Na염 ¹⁾	7.23	7.09	6.67
	음성대조군	7.64	7.55	7.89
수온		20.2	21.0	20.5

¹⁾양성대조구 시험기간 : 2011. 11. 21 ~ 2011. 11. 25.

(라) 급성경구독성 시험

JBR580(자귀나무)의 급성경구독성을 마우스(ICR계통)를 사용하여 1회 경구투여한 후 14일 동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과, 기초시험결과 투여약량 5,000mg/kg에서 암.수 각각 1마리의 치사동물이 있었으며, 급성경구독성의 LC50값은 수컷과 암컷 모두 5,000mg/kg이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면서 IV급(저독성)으로 분류되었다. 본 시험에서 경구투여 후 일반중독증상은 호흡곤란이 관찰되었으며, 체중변화는 약제 투여 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째까지 감소를 보였으나 3일째부터는 회복되어 증

가추세를 보였다. 부검은 시험 종료 후 CO2로 마취시켜 각 주요의 장기에 대한 육안적 관찰을 실시하였고 약제투여에 의한 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 이러한 시험결과는 JBR580(자귀나무)을 ICR계 마우스에 경구투여했으시 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되었으며 수컷과 암컷 모두에 대한 LC50값은 5,000mg/kg이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다(표 34-37).

[표 34] 시험물질 처리 후 일별치사동물수 조사결과

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 치사동물수														합계	
		분		시간				일수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~		14
수컷	5,000	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	~	0	1/5
암컷	5,000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	1/5

[표 35] 시험물질 처리 후 임상관찰결과

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 치사동물수															
		분		시간				일수									
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~	14	
수컷	5,000	Q ¹⁾	Q	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
암컷	5,000	Q	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾Q : 호흡곤란

²⁾- : 정상

[표 36] 시험물질 처리 후 체중변화측정결과

(단위 : g)

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 경과 일수				
		0	1	3	7	14
수컷	5,000	20.0±0.9(5) ¹⁾	29.6±0.4(4)	30.6±0.4(4)	33.7±1.0(4)	37.4±1.5(4)
암컷	5,000	23.2±1.0(5)	23.1±0.9(4)	23.5±1.0(4)	25.2±1.4(4)	26.7±1.9(4)

¹⁾() : 마리

[표 37] 시험종료 후 부검소견결과

성별	투여약량 (mg/kg)	주요 장기명	육안적소견
수컷	5,000	신장	N ¹⁾
		비장	N
		간장	N
		심장	N
		소화기계	N
		폐장	N
		이외의 장기	N
암컷	5,000	신장	N
		비장	N
		간장	N
		심장	N
		소화기계	N
		폐장	N
		이외의 장기	N

¹⁾N : 정상

(마) 급성경피독성 시험

JBR580(자귀나무)의 급성경피독성을 랫드(S.D.계통)를 사용하여 1회 약제 처리후 14일동안 치사수, 일반중독증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰 조사한 결과, 수컷과 암컷 모두 처리약량 4,000mg/kg 수준에서 치사동물은 없었으며, 수컷과 암컷모두에 대한 급성경피독성 LD50 값은 4,000mg/kg 이상으로 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되며 본 시험에서 약제처리 후 일반 중독증상은 관찰되지 않았다. 체중변화는 약제투여 후 경과일수에 따라 암수 모두에서 1일째 까지 감소를 보였으나 3일째부터 회복되어 증가추세를 보였다. 부검은 시험종료 후 CO2 로 마취시켜 각 주용 장기에 대한 육안적 관찰은 실시하였고 약제투여에 의한 특이한 증상은 관찰되지 않았다. 이상의 시험결과, JBR580(자귀나무)을 S.D.계 FOT에 경피투여했을 시 각 장기에 미치는 영향은 없는 것으로 사료되었으며 수컷과 암컷 모두에 대한 LD50 값은 5,000 mg/kg 이상으로서 농약관리법에 의거 독성을 구분하면 IV급(저독성)으로 분류되었다(표 38-41).

[표 38] 시험물질 처리 후 일별 치사동물 수 조사결과

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 치사동물수														합계		
		분		시간				일수										
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~		14	
수컷	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5
암컷	4,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	~	0	0/5

[표 39] 시험물질 처리 후 임상관찰결과

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 치사동물수														
		분		시간				일수								
		10	30	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	~	14
수컷	4,000	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
암컷	4,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾- : 정상

[표 40] 시험물질 처리 후 체중변화측정결과

(단위 : g)

성별	투여약량 (mg/kg)	시험물질 처리 후 경과 일수				
		0	1	3	7	14
수컷	4,000	207.8±10.0(5) ¹⁾	198.6±9.1(5)	211.9±10.3(5)	242.8±12.3(5)	291.6±17.2(5)
암컷	4,000	157.6±7.0(5)	153.1±3.2(5)	161.0±5.2(5)	179.6±9.4(5)	199.3±4.5(5)

¹⁾() : 마리

[표 41] 시험종료 후 부검소견결과

성별	투여약량 (mg/kg)	주요 장기명	육안적소견
수컷	4,000	신장	N ¹⁾
		비장	N
		간장	N
		심장	N
		소화기계	N
		폐장	N
		이외의 장기	N
암컷	4,000	신장	N
		비장	N
		간장	N
		심장	N
		소화기계	N
		폐장	N
		이외의 장기	N

¹⁾N : 정상

다. 친환경유기농자재 등록

(1) JBR701(GNC)

1차년도(2009년) 4/4분기에 신청한 친환경유기농자재 목록공시 신청자재에 대하여 2010년 4월에 심의한 결과 유기 농산물 생산에 사용가능한 자재로 의결되어 친환경유기농자재 목록에 등재이 완료되었으며, 농촌진흥청 홈페이지(www.rda.go.kr/ 기술정보/ 농자재정보/ 친환경유기농자재)에 공시되었다.

2010년도 2차분 친환경유기농자재 목록등재 알림의 붙임 내용은 아래와 같다.

2010년도 2차분 친환경유기농자재 목록등재 알림(75종, '10. 4. 15)

목록등재번호	자재종류	자재명	상표명	업체명	목록등재일자	목록공시기간(2년)
10-유기-4-134	작물병해관리용 자재	식물추출물	지인씨-011	㈜이이지에스	2010.04.15	2010.04.15~2012.04.14

녹색기술 경제미를 창출하는 농촌진흥



농 촌 진 흥 청

수신자 친환경유기농자재 목록공시 신청업체(55업체) 대표 귀하
(경유)

제목 '10년도 2차분 친환경유기농자재 목록등재 알림

- 귀 업체의 무궁한 발전을 기원합니다.
- '09년도 4/4분기에 귀 업체에서 신청한 친환경유기농자재 목록공시 신청자재에 대하여 친환경농자재심의회('10.4.12)에서 심의한 결과 유기농산물 생산에 사용가능한 자재로 의결되어 붙임1과 같이 친환경유기농자재 목록에 등재하였음을 알려드립니다.
- 아울러 붙임2의 포장지 표기(안)를 참고하시어 농약관리법 또는 비료관리법에 저촉되지 않도록 표기하여 주시기 바라며, 농촌진흥청 홈페이지(www.rda.go.kr/ 농사짓는 기술/ 농자재정보/ 친환경유기농자재)에 공시할 예정이오니 참고하시기 바랍니다.

- 붙임 1. 친환경유기농자재 목록등재 알림 1부(업체별 정보).
2. 포장지 표기(안) 1부. 끝.

농 촌 진 흥 청



010-299-2593 / 031-299-2607 / www.rda.go.kr / rda@rda.go.kr

주우관 성재복 농자재관리과장 04/16
이경하

협조자 주우관 김상수

시행 농자재관리과-4493 (2010. 04. 16.) 접수

우 441-707 경기도 수원시 권선구 서둔동 249 농촌진흥청 연구정책 / www.rda.go.kr

국 농자재관리과

전화 031-299-2593 / 031-299-2607 / rda@rda.go.kr / 대한민국

기술정보
AGRICULTURAL TECHNOLOGY

- ⊕ RDA 인터넷뱅
- ⊕ 농업기술종합정보
- ⊕ 영농기술보급
- ⊕ 농자재정보
- > 농약직권사철상시수요조사
- > 농약일반
- > 농약등록현황및사용기준
- > 농약안전사용교육설시요령
- > 친환경유기농자재
- > 비료품질검사및시료채취
- ⊕ 농축산물가격정보
- ⊕ 연구개발동향



홈 > 기술정보 > 친환경유기농자재

농자재정보

인쇄 스크랩

친환경유기농자재

- ▶ 제조사명: (주)아이지에스 ▶ 연락처: 064-751-6530
- ▶ 주소: 제주특별자치도 제주시 아리1동 4-8 제주하이테크산업진흥원 내 HTS 센터
- ▶ 목록등록번호: 10-유기-4-134 ▶ 등재일자: 10.04.15 / (10.04.15~12.04.14)
- ▶ 자재종류: 작물병해관리용자재 ▶ 자재명 (상표명): 식물추출물 (지엔씨-011)
- ▶ 원료명: 대황추출물 ▶ 사업자등록번호: 135-81-58807
- ▶ 책임보험증서번호: ▶ 품목등록여부:
- ▶ 주의사항: 자재 사용 시 옷에 묻었을 경우 잘 지워지지 않으므로, 주의하십시오.
직사광선을 피하고, 건냉암소에 보관하십시오.
토양에 살포시 가급적 장갑을 사용하여 제품을 살포 하십시오.
어린이 손에 닿지 않게 보관하세요.

시 험 작 율 및 사 용 방 법

작물명	병해충명	사용적기	사용량	안전사용시기 및 횟수
캔터키블루글래스(사료용작물)	갈색잎마름병	발병초 7일간격, 경엽처리	1,000배	()

목록

4. 작물곰팡이병 방제 분자생물학적 기전연구

가. Genefishing을 이용한 유효성분의 발현양상 평가

(1) 작물곰팡이병 관련 유전자 탐색 및 작용기전 연구

벼도열병 및 본 연구과제의 다양한 식물병에 대한 genefishing의 1차년도 연구결과를 대상으로 2~3차년도에는 분획물을 통하여 특히, 벼도열병에 대한 유전자정보가 용이하여 집중적으로 연구하였으며, 자귀나무추출물, 분획물 및 그 성분에 대한 연구결과, 벼 식물세포벽에 존재하는 pectin에 대한 분해를 억제하여 벼도열병을 억제하는 것으로 탐색되었다. 이하, 연구결과에 대하여 순차적으로 서술하였다.

(가) 유전정보 검색

현재까지는 유전자 탐색 시 바이오칩을 제작하여 이용하여 왔으나, 유전자정보가 완전히 밝혀져야 하는 문제점 및 응용성에 제한이 있고, 재현성이 떨어지는 치명적인 단점이 나타나고 있다. Genefishing 평가는 annealing control primer를 이용하여 두 가지 이상의 시료에서 서로 다르게 발현하는 유전자를 검색하는 평가 방법으로 95% 이상의 재현성을 나타내고 있기에 현재, 각각의 식물병원균에 대한 모든 유전자 정보가 없으므로 바이오칩 제작은 불가능하며, 따라서 universal primer를 이용하여 유전체 발현 양상을 평가할 수 있는 genefishing kit를 활용하였다(그림 24).

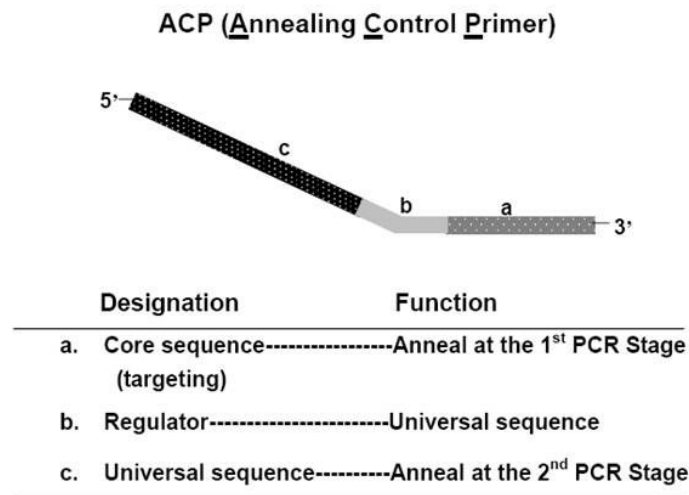


Figure 24. The structure of ACP

ACP1 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3'
 ACP2 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3'
 ACP3 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3'
 ACP4 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3'
 ACP5 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCGCTCG-3'

ACP6 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3'
ACP7 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3'
ACP8 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3'
ACP9 : 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3'
ACP10: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3'
ACP11: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3'
ACP12: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3'
ACP13: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3'
ACP14: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3'
ACP15: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCACCGTGTG-3'
ACP16: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTGACGGTG-3'
ACP17: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3'
ACP18: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3'
ACP19: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3'
ACP20: 5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3'

Figure 25. Oligonucleotide sequences of ACP used in this study.

(1) ACP-1

R. cerealis control에 비해 JBR-563 및 JBR-325 처리군에서 유전자 발현증가가 관찰되었으며, P1 band의 sequencing 결과는 *R. cerealis*에 대한 유전자 database가 구축되어 있지 않아 동정이 불가능했다 (그림 26).

A)

```
CCCTTTGGTCGTTGAGTAATCGTTCGACCCATATGTCCTTTTGTGCTA
GCTGCCTATCATCGTGAATGGTGTACTCGATCTTATGTTGCTTGCTGT
ACTGTACCTGTTTCTTTTGCCTTACGCGTACAGTTAATTTGTTCTTTTT
GTGTTGTATGAGATGATTATTGATTGAAATTTT
```

B)

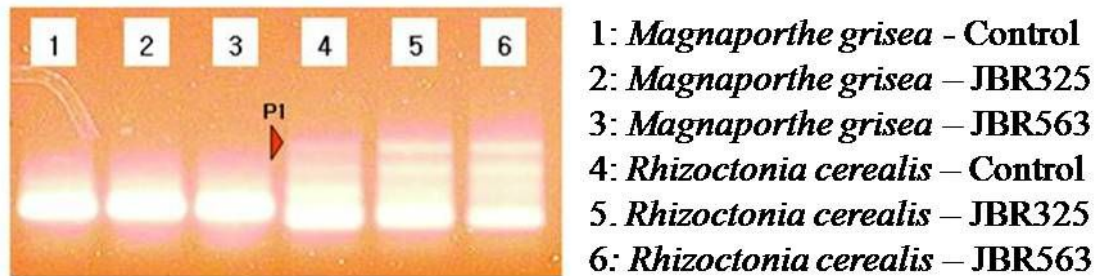


Figure 26. Nucleotide sequences of P1(A) and expression band patterns(B).

(2) ACP-2

M. grisea control에 비해 JBR-563 및 JBR-325 처리 군에서 유전자 발현억제가 관찰되었으며, *R. cerealis* control에 비해 JBR-563 및 JBR-325 처리 군에서 유전자 발현억제 (P2-1) 및 증가 (P2-2) 관찰되었다(그림 27).

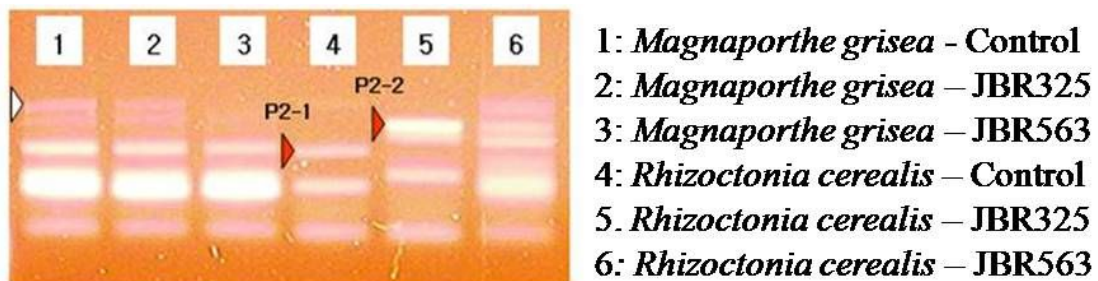


Figure 27. The expression band patterns using ACP-2.

(3) ACP-3

발현양상이 큰 차이가 없다(그림 28).

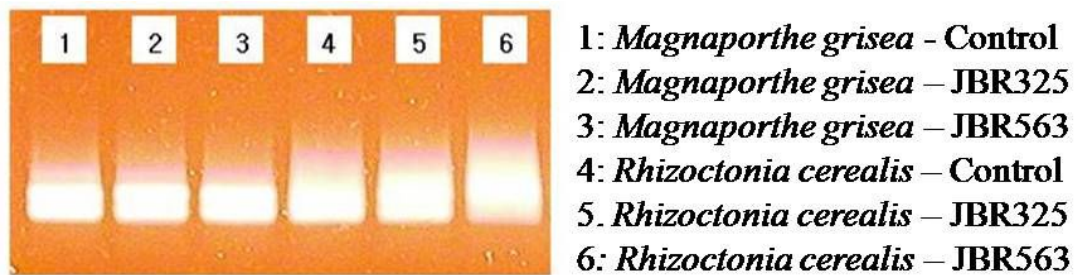


Figure 28. The expression band patterns using ACP-3.

(4) ACP-4

R. cerealis control에 비해 JBR563 처리 군에서 유전자 발현증가 관찰 (P4) 되었으며, P4 band의 sequencing 결과는 *R. cerealis*에 대한 유전자 database가 구축되어 있지 않아 동정불가했다(그림 29).

A)

```
GGTTCCGNGCTAACCNCTCNATAGTACCAAGTCGATAATTCNTGTCCC  
TTGACATCCATGGCTGTTATACATATAATAATAACAATTTTACATACACC  
AAAAAAAAAAAAAAAAAACCCC
```

B)

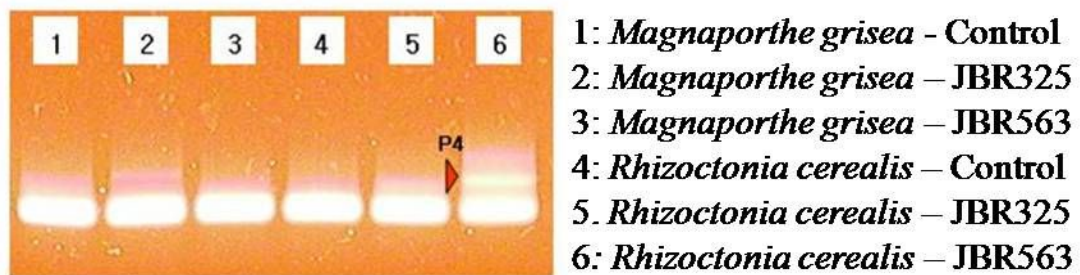


Figure 29. Nucleotide sequences of P4(A) and expression band patterns(B).

(5) ACP-5

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리 군에서 유전자 발현억제가 관찰되었으며(P5-1), *M. grisea* control에 비해 JBR563 처리군에서 유전자 발현억제가 관찰(P5-2) 되었다(그림 30).

A)

CTAAAGGGGAAGAAAGGCTGTATGTTGATGCCAAAATTTGGTTAGAAT
CACATACGCCTGATATAAGATGTTGTAGCAAATATCCTAGGTAAGCTC
AGCACCGTTCGCACCAACAAATCATTGGTCTACTTGGCATGACCGTTGC
CGGTGCATCAAGGGTGGTTTTAGATACCATGTGTAGATTCTAGATTCA
AGAATAGAACTAGTTTCGCATGGCAATGCCCATGCACGGATGC

B)

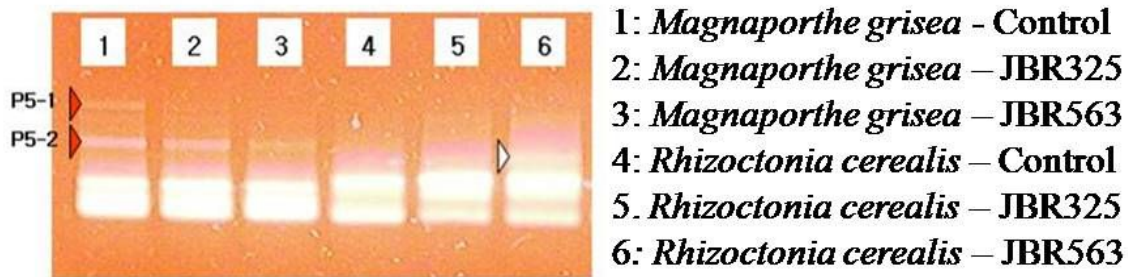


Figure 30. Nucleotide sequences of P5-2(A) and expression band patterns(B).

NIASMg148D01F Details			
Name:	NIASMg148D01F		
Type:	match		
Source:	NIAS EST		
Position:	supercontig6.22:1062977..1063826 (- strand)		
Length:	850		
Sequence:	EST sequence		
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)		
Alias:	DC981029 (accession number)		
Parts:	Type:	match_part	
	Source:	NIAS_EST	
	Position:	supercontig6.22:1062977..1063232 (- strand)	
	Length:	256	
	Query:	NIASMg148D01F	
	Matches:	NIASMg148D01F:250..505 (+)	
		supercontig6.22 1063232 GCGTATGTGATTCTAACCAAATTTGGCATCAACATACAGCCTTCTTTCCCTTTTAGGCG	1063173
		NIASMg148D01F 250 GCGTATGTGATTCTAACCAAATTTGGCATCAACATACAGCCTTCTTTCCCTTTTAGGCG	309
		supercontig6.22 1063172 ATTATCGACGAGCGCACTTGGTTCCTAAGGGCAAGCGCACCAAGAAAAAGTCAAAAA	1063113
		NIASMg148D01F 310 ATTATCGACGAGCGCACTTGGTTCCTAAGGGCAAGCGCACCAAGAAAAAGTCAAAAA	369
		supercontig6.22 1063112 AGCAAGCTTCGGATGGCCAAACCCCTGGCTCTGAGCGTCCCAGGCCACCTCCACCAGAAC	1063053
		NIASMg148D01F 370 AGCAAGCTTCGGATGGCCAAACCCCTGGCTCTGAGCGTCCCAGGCCACCTCCACCAGAAC	429
		supercontig6.22 1063052 TTTCGGCGTTTGTTCGACGTTGGGTTGGCCAGTATTACTAGATGCTTCAGCAGGATTCCG	1062993
		NIASMg148D01F 430 TTTCGGCGTTTGTTCGACGTTGGGTTGGCCAGTATTACTAGATGCTTCAGCAGGATTCCG	489
		supercontig6.22 1062992 AATCTCCGTAATCAG 1062977	
		NIASMg148D01F 490 AATCTCCGTAATCAG 505	
	Score:	99	
	Target:	NIASMg148D01F 250 505 +	

>NIASMg148D01F class=Sequence position=supercontig6.22:1062977..1063826 (- strand)

AACTGTCATA TTAATAAAC CTTTTTTTTC GTTCCCTCAA GGGCGCCCAA GACACGAGTG

TGGGATCAAA TAAATAGGTA CCCTTAGGGC CTTAGGGTAG CACTATTTCT TCGGGAAATT
 TCACACAGAT CGATATCATC ATGGAACGCA AAAGGCTATT ACACCACCTC GACACCCCAT
 TTTCTGCGGT TCAGTGGTGA GTCCCAGATC CGTCAAAGAA TTTTTTGT TTTTGGCCAGACAA
 ACAAACTAAC AAGGTTTGCG CTGCTTGCTA GGCCCCATGT GCTACCCGAA GATCAAGATA
 CGGTCTTGGA ACTCCTCTGC AGGTGAGTTG TCGCTCGATC AGGCGGACTT TGATTTTTGT
 TGCAACATGC CGCTGCGGCG TCGAGGGCAC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGCAT
 CCGTGCATGC GCATTGCCAT GCGAAACTAG TTCTATTCTT GAATCTAGAA TCTACACATG
 GTATCTAAAA CCACCCTTGA TGCACCGGCA ACGGTCATGC CAAGTAGACC AATGATTTGT
 TGGTGCACG GTGCTGAGCT TACCTAGGAT ATTTGCTACA ACATCTTATA TCAGGCGTAT
 GTGATTCTAA CCAAATTTTG GCATCAACAT ACAGCCTTCT TTCCCCTTTA GGCATTATC
 GACGAGCGCA CTTGGTTCCA TCTAAGGGCA AGCGCACCAA GAAAAAGTCA AAAAAGCAAG
 CTTTCGGATGG CCAAACCCCT GGCTCTGAGC GTCCCAGGCC ACCTCCACCA GAACTTTCGG
 CGTTTGTCGA CGTTGGGTTG GCCAGTATTA CTAGATGTCT TCAGCAGGAT TCCGAATCTT
 CCGTAATCAG

(6) ACP-6

발현양상은 큰 차이가 없음.



Figure 31. The expression band patterns using ACP-6.

(7) ACP-7

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리 군에서 유전자 발현억제 관찰(그림 32).

A)

GCTTTTCAAGAGTAGAGGCCTCATGTGACTTGTAGGACATCAAATAAA
 TAGTGTGTCAAAGACGAGAATTTTGACATACTTGCATCCAGATGAAC
 CAAATTACAAAGACAGAAATGCCTAGAATGACAAATCTGGGAGGGG

B)

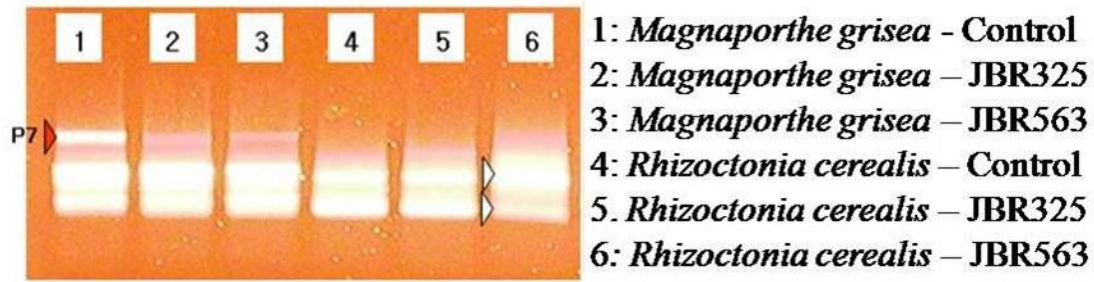


Figure 32. Nucleotide sequences of P7(A) and expression band patterns(B).

NIASMg203D09F Details				
Name:	NIASMg203D09F			
Type:	match			
Source:	NIAS EST			
Position:	supercontig6.27:773704..774387 (+ strand)			
Length:	684			
Sequence:	EST sequence			
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)			
Alias:	DC990222 (accession number)			
Parts:	Type:	match_part		
	Source:	NIAS_EST		
	Position:	supercontig6.27:773704..774387 (+ strand)		
	Length:	684		
	Query:	NIASMg203D09F		
	Matches:	NIASMg203D09F:1..683 (+)		
	supercontig6.27	773704	CAGGTAGTTGCCGGTTCGCATCTTATTAGTGCGGGTAGAAATAACAAATCTGGGATACATT	773763
	NIASMg203D09F	1	CAGGTAGTTGCCGGTTCGCATCTTATTAGTGCGGGTAGAAATAACAAATCTGGGATAC-TT	59
	supercontig6.27	773764	GTGCGGTACSTGTGACTGCCAATATTCATCATGAATGCTTTGCATGTAAGGGAATGTACG	773823
	NIASMg203D09F	60	GTGCGGTACSTGTGACTGCCAATATTCATCATGAATGCTTTGCATGTAAGGGAATGTACG	119
	supercontig6.27	773824	TGAAGCCCTGCCGTAAGAAACAGTAGATGCCATGTGAAAAAGAAATCCATGCTTTGAAT	773883
	NIASMg203D09F	120	TGAAGCCCTGCCGTAAGAAACAGTAGATGCCATGTGAAAAAGAAATCCATGCTTTGAAT	179
	supercontig6.27	773884	CCACTTTTTCGACCTCAAAAAATCAGCTTTGCACCCAGGTAAAAAGATGCAAAAGCTCA	773943
	NIASMg203D09F	180	CCACTTTTTCGACCTCAAAAAATCAGCTTTGCACCCAGGTAAAAAGATGCAAAAGCTCA	239
	supercontig6.27	773944	AATCTGTACAAAAATGCCCGCTTCTCATGAACCAACAGTCAGGTCCCTGAGGCGTCCATT	774003
	NIASMg203D09F	240	AATCTGTACAAAAATGCCCGCTTCTCATGAACCAACAGTCAGGTCCCTGAGGCGTCCATT	299
	supercontig6.27	774004	GAGAATCCAACTCCATGGCGAAACTTGGGTCCGAGTGATCATCAATCTCGGACTTGTCT	774063
	NIASMg203D09F	300	GAGAATCCAACTCCATGGCGAAACTTGGGTCCGAGTGATCATCAATCTCGGACTTGTCT	359
	supercontig6.27	774064	ATCACTTTGACCCGGGCTCGGTTTCGACGTGGCGCTGATCAGTGGCTGATAAATCTCTC	774123
	NIASMg203D09F	360	ATCACTTTGACCCGGGCTCGGTTTCGACGTGGCTGATCAGTGGCTGATAAATCTCTC	419
	supercontig6.27	774124	CTCCATGGCTCCGCGCATGCCCTCTGGGATCTGTTTCTCTGTAACCTCTCGGACCGGAATA	774183
	NIASMg203D09F	420	CTCCATGGCTCCGCGCATGCCCTCTGGGATCTGTTTCTCTGTAACCTCTCGGACCGGAATA	479
	supercontig6.27	774184	AAGGTAGGCAAAGTTGGCAGCCTGCATCAAAAAGGGCGAGTTTTCGACCAAGTATTCAGC	774243
	NIASMg203D09F	480	AAGGTAGGCAAAGTTGGCAGCCTGCATCAAAAAGGGCGAGTTTTCGACCAAGTATTCAGC	539
	supercontig6.27	774244	AAAGGCGTCTTGTCCATCTCCCGCAGAACTGCATATCGGGAAAAACGAGATATTGCAA	774303
	NIASMg203D09F	540	AAAGGCGTCTTGTCCATCTCCCGCAGAACTGCATATCGGGAAAAACGAGATATTGCAA	599
	supercontig6.27	774304	CTGCTCGATGGCTCCGCGGTGCCAAAGATGCTACTGCTGGTCTTGTCTCTTGTCTCTC	774363
	NIASMg203D09F	600	CTGCTCGATGGCTCCGCGGTGCCAAAGATGCTACTGCTGGTCTTGTCTCTTGTCTCTC	659
	supercontig6.27	774364	GCTGCTACTCACTGCTGCAACATC 774387	
	NIASMg203D09F	660	GCTGCTACTCACTGCTGCAACATC 683	
	Score:	99		
	Target:	NIASMg203D09F 1 683 +		

>NIASMg203D09F class=Sequence position=supercontig6.27:773704..774387 (+ strand)
 CAGGTAGTTG CCGGTTGCA TCTTATTAGT GCGGGTAGAA TAACAAATCT

```

GGGATACATT   GTGCGGTACG   TGTGACTGCC   AATATTCATC   ATGAATGCTT
TGCATGTAAG   GGAATGTACG   TGAAGGCCTG   CCGGTAAGAA   ACAGTAGATG
CCATGTGAAA   AAGAAATCCA   TGCTTTGAAT   CCACTTTTTC   GACGTCAAAA
AATCAGCTTT   GCAACCCAGG   TAAAAAGATG   CAAAAGCTCA   AATCTGTACA
AAAATGCCCG   CTTCTCATGA   ACCAACAGTC   AGGTCCTTGA   GGCGTCCATT
GAGAACATCC   AACTCCATGG   CGAAACTTGG   GTCCGAGTGA   TCATCAATCT
CGGACTTGTC   ATCACTTTGA   CCCGGGCTCG   GTTTCGACGT   GGCGCTGATC
AGTGGCCTGA   TAAATCTCTC   CTCCATGGCT   CCGCGCATGC   CCTCTGGGAT
CTGTTTCCTG   TACCTCTCGG   ACCGGAATAA   AAGGTAGGCA   AAGTTGGCAG
CCTGCATCAA   AAAGGGCGAG   TTTTGCGACC   AGTATTCAGC   AAAGGCGTCC
TTGTCCATCT   CCCGCACGAA   CTGCATATCG   GGGAAAACGA   GATATTGCAA
CTGCTCGATG   GCCTCCGGGG   TGCCAAAGAT   GCTACTGCTG   GTCTTGCTGC
TCTTGTCTC   GCTGCTACTC   ACTGCTGCAC   CATC

```

(8) ACP-8

M. cerealis control에 비해 JBR563 처리 군에서 유전자 발현증가가 관찰(P8)되고 있으나, *R. cerealis*에 대한 유전자 database가 구축되어 있지 않아 동정불가(그림 33).

A)

```

GCGGNCGATGACAGCGGAGGGCGAATACGGTCGCGGCGAGGAGGAGC
CGGCAGCGCAAGTTGGAACATGTGAAGAAGCTCGAGGACGAGTTGGAG
GAAGCGAAAAAGGCGATGGAGTTGTGGAAGGAGCGCGCGATTGCCGC
GGANAATATGTTNAANCANTTCNNNGCGNGNGTTTGGTGACNATTTGT
NTGATTTTTTTGTGNTTGGTTAANTTGCNNCTTTTNNGNNTTACTCTTTTT

```

B)

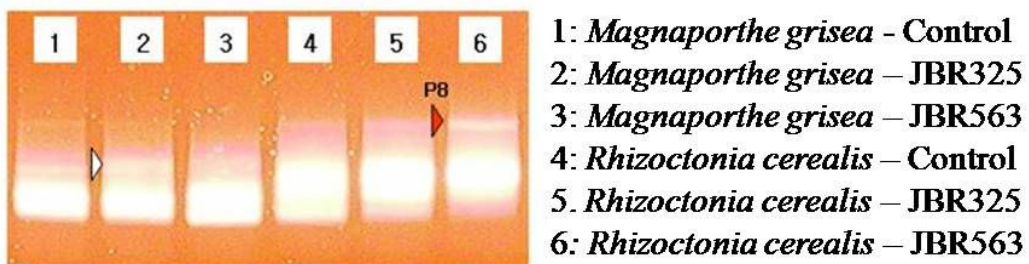


Figure 33. Nucleotide sequences of P8(A) and expression band patterns(B).

(9) ACP-9

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 억제가 관찰(P9-1)되고 있으며 P9-1 band의 염기서열분석 결과 pectate lyase로 판명되었다. 또한, *R. cerealis* control에 비해 JBR325 처리군에서 유전자 발현 억제가 관찰(P9-2) 되었으나, *R. cerealis*에 대한 유전자 database가 구축되어 있지 않아 동정불가(그림 34).

A)

```
TGTTGACCACGTGCAGGGTGCCGAAGCGGAGCAGGGGCGTGCCGCGA
GTTGATGCGCTGCCAGTGGTTGTTGGCATAACCTCACGCGCAGCTTGC
CGCGGTCCTCGCTGGCGTTGTTGTCCGAGTGGCCGATGAGCGAGGC
CTTCCAGCTGTCGGTGGGGGGAGATGGATTTCCAAGTGTTAGCCGT
TGCCCTGTTTTGTTGACCTTGTCTCCACTATC
```

B)

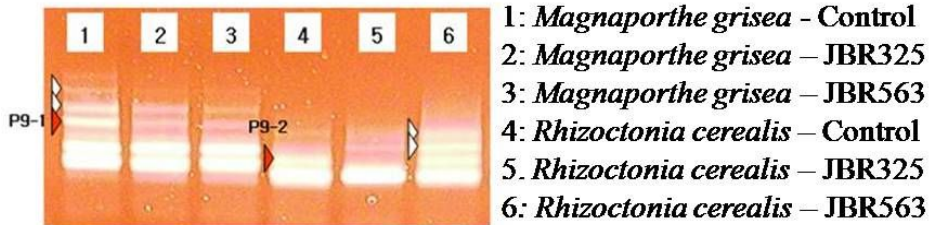


Figure 34. Nucleotide sequences of P9-1(A) and expression band patterns(B).

Summary of Hits by Genome	
M. oryzae 70-15 (MG6)	1
M. oryzae 70-15 mito (MG6)	0

[Show All Alignments] [Hide All Alignments] [View Raw Output]

Target	Score (Bits)	Expect	Alignment Length	Identities	Positives
▼ M. oryzae 70-15 (MG6): MGG_04348.6: pectate lyase	Score = 281.987 (142), Expect=0.0				
	Identities=145/146 (99%), Positives=145/146 (99%)				
Query	CTGGAAGGCCTCGCTCATCGGCCACTCGGACAACAACGCCAGCGAGGACCGCGGCAAGCT				
Sbjct					
Query	GCGCGTGAGGTATGCCAACAACCACTGGCAGCGCATCAACTCGCGCAGCCCCCTGCTCCG				
Sbjct					
Query	CTTCGGCACCCCTGCACGTGGTCAACA				
Sbjct					

Reference
 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

(10) ACP-10

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 억제가 관찰되고 있으며 *R. cerealis* control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 증가가 관찰되었다(그림 35).

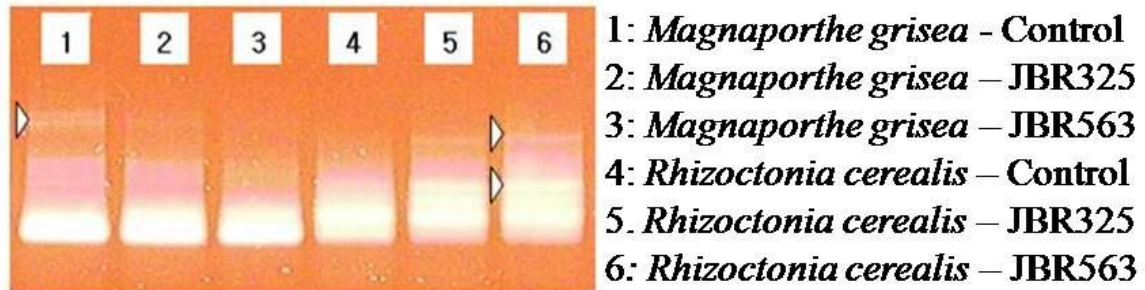


Figure 35. The expression band patterns using ACP-10.

(11) ACP-11

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 억제가 관찰되고 있으며 *R. cerealis* control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 증가가 관찰되었다(그림 36).



Figure 36. The expression band patterns using ACP-11

(12) ACP-12

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현 억제가 관찰(P12-1)되고 있으며 *R. cerealis* control에 비해 JBR325 처리군에서 유전자 발현 증가가 관찰(P12-2)되었으나, *R. cerealis*에 대한 유전자 database가 구축되어 있지 않아 동정불가(그림 37).

A)

```
ACACAGTAATTACATCAACGGTCGTATGACCACAGCTCGCCGCTAT  
CAATGTGCCTGTCCGCTAGGTGACCATAAATCCATCTCATGCCTAGA  
ACGACTCCAATATCAGATGGCAAGTGGACAAAAGATCGAGAAAAA
```

B)

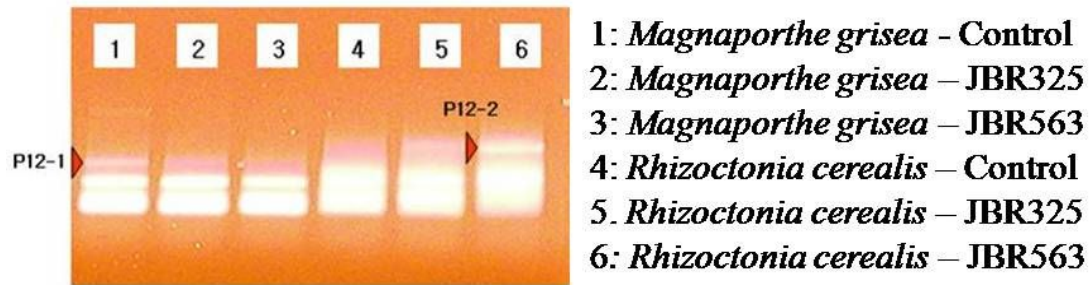


Figure 37. Nucleotide sequences of P12-2(A) and expression band patterns(B).

NIASMg089B02R Details																																																									
Name:	NIASMg089B02R																																																								
Type:	match																																																								
Source:	NIAS EST																																																								
Position:	supercontig6.22:1664844..1665236 (- strand)																																																								
Length:	393																																																								
Sequence:	EST sequence																																																								
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)																																																								
Alias:	DC971386 (accession number)																																																								
Parts:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Type:</th> <th>match_part</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Source:</td> <td>NIAS_EST</td> </tr> <tr> <td>Position:</td> <td>supercontig6.22:1664844..1665236 (- strand)</td> </tr> <tr> <td>Length:</td> <td>393</td> </tr> <tr> <td>Query:</td> <td>NIASMg089B02R</td> </tr> <tr> <td>Matches:</td> <td>NIASMg089B02R:16..408 (+)</td> </tr> </tbody> </table>	Type:	match_part	Source:	NIAS_EST	Position:	supercontig6.22:1664844..1665236 (- strand)	Length:	393	Query:	NIASMg089B02R	Matches:	NIASMg089B02R:16..408 (+)																																												
Type:	match_part																																																								
Source:	NIAS_EST																																																								
Position:	supercontig6.22:1664844..1665236 (- strand)																																																								
Length:	393																																																								
Query:	NIASMg089B02R																																																								
Matches:	NIASMg089B02R:16..408 (+)																																																								
	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1665236</td> <td>GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA</td> <td>1665177</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>16</td> <td>GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1665176</td> <td>TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG</td> <td>1665117</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>76</td> <td>TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG</td> <td>135</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1665116</td> <td>CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA</td> <td>1665057</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>136</td> <td>CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA</td> <td>195</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1665056</td> <td>GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC</td> <td>1664997</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>196</td> <td>GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC</td> <td>255</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1664996</td> <td>CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAGACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG</td> <td>1664937</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>256</td> <td>CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAAACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG</td> <td>315</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1664936</td> <td>GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA</td> <td>1664877</td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>316</td> <td>GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA</td> <td>375</td> </tr> <tr> <td>supercontig6.22</td> <td>1664876</td> <td>GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 1664844</td> <td></td> </tr> <tr> <td>NIASMg089B02R</td> <td>376</td> <td>GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 408</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	supercontig6.22	1665236	GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA	1665177	NIASMg089B02R	16	GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA	75	supercontig6.22	1665176	TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG	1665117	NIASMg089B02R	76	TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG	135	supercontig6.22	1665116	CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA	1665057	NIASMg089B02R	136	CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA	195	supercontig6.22	1665056	GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC	1664997	NIASMg089B02R	196	GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC	255	supercontig6.22	1664996	CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAGACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG	1664937	NIASMg089B02R	256	CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAAACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG	315	supercontig6.22	1664936	GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA	1664877	NIASMg089B02R	316	GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA	375	supercontig6.22	1664876	GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 1664844		NIASMg089B02R	376	GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 408	
supercontig6.22	1665236	GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA	1665177																																																						
NIASMg089B02R	16	GCAGCAGGAATGAAGACCAATGAACTTCTGCTCGCGGATGTCGTCGCGGGCCGGTGTCA	75																																																						
supercontig6.22	1665176	TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG	1665117																																																						
NIASMg089B02R	76	TTGCTCCAGCTGTTGAATCGTAATCGTATGTCACCAGATACGAGGATGCGGCAGGAAGG	135																																																						
supercontig6.22	1665116	CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA	1665057																																																						
NIASMg089B02R	136	CCTCCCCAGCCCGGAATAGTTGCATTGGACATCCATCCACCCTAGTAATCTATTATCAA	195																																																						
supercontig6.22	1665056	GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC	1664997																																																						
NIASMg089B02R	196	GAACTATGTTAAGCACGGGACCTGGCCGGACGGACTTTTGGACTACTCACACCTGTTC	255																																																						
supercontig6.22	1664996	CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAGACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG	1664937																																																						
NIASMg089B02R	256	CCGTCCTGGAACACCGACACCGGACCCGTATGCTAAACGCTGGATGCCAATGCTAGAGG	315																																																						
supercontig6.22	1664936	GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA	1664877																																																						
NIASMg089B02R	316	GACCGAACGAATCCCAACTGTTCATGCAGCACGTCGATGACCCAGCTCGAATGAGTTCA	375																																																						
supercontig6.22	1664876	GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 1664844																																																							
NIASMg089B02R	376	GTCGCTCCGAGGCATCGTTGATGGCCCCCGGT 408																																																							
Score:	99																																																								
Target:	NIASMg089B02R 16 408 +																																																								

>NIASMg089B02R class=Sequence position=supercontig6.22:1664844..1665236 (- strand)

```
GCAGCAGGAA TGAAGACCAT TGAACCTTCT GCTCGCGGGA TGTCGTCGGG
GCCGGTGTCA TTGCTCCAGC TGTTTGAATC GTAATCGTAT GTCACCAGAT
ACGAGGATGC GGCAGGAAGG CCTCCCCAGC CCGGAATAGT TGCATTGGAC
ATCCATCCAC CGTAGTAATC TATTATTCAA GAACTATGTT AAGCACGGGA
CCTGGCCGGA CGGACTTTTG CGACTACTCA CACCCTGTTC CCGTCCTGGA
```

AACACCGACA CCGGCACCGT ATGCTAGACG CTGGATGCCA ATGCTAGAGG
 GACCGAACGA ATCCCAACTG TCATGCAGCA CGTCGTATGA CCACAGCTCG
 AATGAGTTCA GTCGCTCCGA GGCATCGTTG ATGGCCCCGC CGT

(13) ACP-13

R. cerealis control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현증가가 관찰(P12-2)되었으나 유의 있는 수준은 아님(그림 38).



Figure 38. The expression band patterns using ACP-13

(14) ACP-14

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P12-2)되었으나 유의 있는 수준은 아님(그림 39).



Figure 39. The expression band patterns using ACP-14

(15) ACP-15

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P15)되었으며, 특히 JBR563에서는 매우 우수한 억제양상을 보이고 있음(그림 40).

A)

TTTTCTCCCACCGTCCCCGACTTACCATTTCATTCCATGCAGCCTA
 CTGGTATGCAGGCACCTTAGGTACCTTCCCAAAGCGAACATGGC

GAGCAACCACTAAGCATCCCAGCAACCCGGTGCAGTGCAGTCTCC
 AATCAGCACGTGGGTTTTTAGGTGCTAAGTGATTACTGCCTTGCTT
 GCTCTTGGGGAGCAAGGCCTCCCTTTGATTGTCGGCATGTCCAGG
 TTTACGCAACCGTCATCTCATCTTGGATACTTGCATGGGAAGTTGA
 GAGCATTGGCACAGGCC

B)

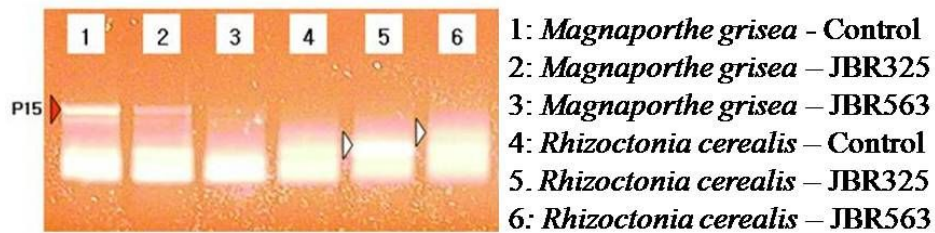


Figure 40. Nucleotide sequences of P15(A) and expression band patterns(B).

NIASMg191D04R Details													
Name:	NIASMg191D04R												
Type:	match												
Source:	NIAS EST												
Position:	supercontig6.27:4128958..4129386 (- strand)												
Length:	429												
Sequence:	EST sequence												
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)												
Alias:	DC988132 (accession number)												
Parts:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Type:</th> <th>match_part</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Source:</td> <td>NIAS_EST</td> </tr> <tr> <td>Position:</td> <td>supercontig6.27:4128958..4129386 (- strand)</td> </tr> <tr> <td>Length:</td> <td>429</td> </tr> <tr> <td>Query:</td> <td>NIASMg191D04R</td> </tr> <tr> <td>Matches:</td> <td>NIASMg191D04R:3..431 (+)</td> </tr> </tbody> </table>	Type:	match_part	Source:	NIAS_EST	Position:	supercontig6.27:4128958..4129386 (- strand)	Length:	429	Query:	NIASMg191D04R	Matches:	NIASMg191D04R:3..431 (+)
Type:	match_part												
Source:	NIAS_EST												
Position:	supercontig6.27:4128958..4129386 (- strand)												
Length:	429												
Query:	NIASMg191D04R												
Matches:	NIASMg191D04R:3..431 (+)												
	<pre> supercontig6.27 4129386 CCAACGAAACGGAACTCCATATAAACTAAATACCCGTTTGACCCGGAAACAATTACTCCCA 4129327 NIASMg191D04R 3 CCAACGAAACGGAACTCCATATAAACTAAATACCCGTTTGACCCGGAAACAATTACTCCCA 62 supercontig6.27 4129326 ATATCTCCGCTTATAGCAATACATTTTGTAACAACACACACACCCCTGTCTCACAGCGC 4129267 NIASMg191D04R 63 ATATCTCCGCTTATAGCAATACATTTTGTAACAACACACACACCCCTGTCTCACAGCGC 122 supercontig6.27 4129266 CAGCCGTGCCACCGCATCCATCATCGAGATTCTGAACGACATGTGGCTCTAAGGTATACC 4129207 NIASMg191D04R 123 CAGCCGTGCCACCGCATCCATCATCGAGATTCTGAACGACATGTGGCTCTAAGGTATACC 182 supercontig6.27 4129206 GGATCTATCTCCCTGACGTAGTGCAAAGACCTCAACAAACCTCAATCAGCAAGATAGCCT 4129147 NIASMg191D04R 183 GGATCTATCTCCCTGACGTAGTGCAAAGACCTCAACAAACCTCAATCAGCAAGATAGCCT 242 supercontig6.27 4129146 AGGCCTCATATGTCTTGATCTGACCCCTCGGCGCTCAAAGGCTGAACAGCSCCGGCATCTG 4129087 NIASMg191D04R 243 AGGCCTCATATGTCTTGATCTGACCCCTCGGCGCTCAAAGGCTGAACAGCSCCGGCATCTG 302 supercontig6.27 4129086 GCGGCGCTGGAAGCTGAGACGCTCGCCATCCATGGTCACATCTTGTGCCATTTCGGAGGC 4129027 NIASMg191D04R 303 GCGGCGCTGGAAGCTGAGACGCTCGCCATCCATGGTCACATCTTGTGCCATTTCGGAGGC 362 supercontig6.27 4129026 CTITGCTCCCCACAGTTCACACGCGCCCTTGAGGCCATCCTGTACTTCGCGCACCCGCC 4128967 NIASMg191D04R 363 CTITGCTCCCCACAGTTCACACGCGCCCTTGAGGCCATCCTGTACTTCGCGCACCCGCC 422 supercontig6.27 4128966 GCCTAAAGG 4128958 NIASMg191D04R 423 GCCTAAAGG 431 </pre>												
Score:	99												
Target:	NIASMg191D04R 3..431 +												

>NIASMg191D04R class=Sequence position=supercontig6.27:4128958..4129386 (- strand)

CCAACGAAAC GGAACTCCAT ATAAACTAAA TACCCGTTTG ACCCGGAACA
 ATTACTCCCA ATATCTCCGC TTATAGCAAT ACATTTTGTA AAACAACACA
 ACCCCCCTGT CTCACAGCGC CAGCCGTGCC ACCGCATCCA TCATCGAGAT
 TCTGAACGAC ATGTGGCTCT AAGGTATACC GGATCTATCT CCCTGACGTA
 GTGCAAAGAC CTCAACAAAC CTCAATCAGC AAGATAGCCT AGGCCTCATA
 TGTCTTGATC TGACCCTCGG CGCTCAAAGG CTGAACAGCG CCGGCATCTG
 GCGGCGCCTG GAAGCTGAGA CGCTCGCCAT CCATGGTCAC ATCTTGTGCC
 ATTCGGAGGC CTTGCTCCCC ACCAGTTGCA ACGGCCGCCT TGAGGCCATC
 CTGTACTIONCG CGCACCCGCC GCCTAAAGG

(16) ACP-16

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P16)되었음(그림 41).

A)

AAAAGTTGCCTCGAACCGGTTATACATCACGTCACGCGGAGACCGG
 TTTGCAACTTTTCGCTACCCATCTTTGTGACGGCGTCTTTCGGGAGGGA
 TGATTTGTCTAGGTTCCCTGCTTGTGTTGCTAGGTTTGCATGTTTAGCTC
 CTCGCGGATAGCGACGTTTGTCTCCTTCTCGGCTGCGAGTCTATCTG
 TTTGCCCTGTGTAGCAGGGTTGCCCGTATAATGGTCCCCTCGATCC
 GAGCCTGGTATCTGCGTTGGAAGAGGGGGGATGC

B)

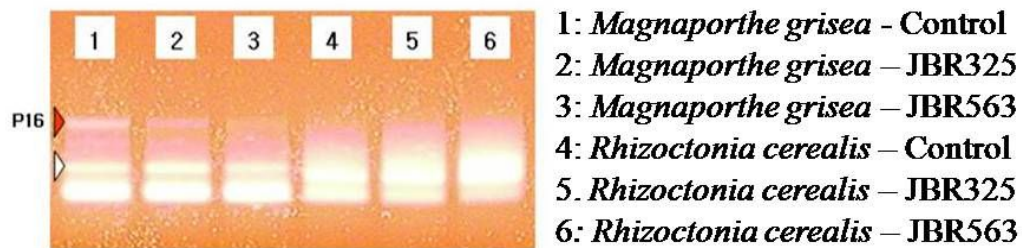


Figure 41. Nucleotide sequences of P16(A) and expression band patterns(B).

NIASMg207G09R Details

Name:	NIASMg207G09R		
Type:	match		
Source:	NIAS EST		
Position:	supercontig6.21:1805425..1805901 (+ strand)		
Length:	477		
Sequence:	EST sequence		
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)		
Alias:	DC991047 (accession number)		
Parts:	Type:	match_part	
	Source:	NIAS_EST	
	Position:	supercontig6.21:1805425..1805901 (+ strand)	
	Length:	477	
	Query:	NIASMg207G09R	
	Matches:	NIASMg207G09R.4..479 (+)	
		supercontig6.21 1805425 ATAGCACCTTAAAAACAAATCAGCTCTGGCTATCGAATGC	1805484
		NIASMg207G09R 4 ATAGCACCTTAAAAACAAATCAGCTCTGGCTATCGAATGC	63
		supercontig6.21 1805485 ACAAACTACATTGGATGTTGAAATCCGGGTATCATTGACAGAAATCAATC	1805544
		NIASMg207G09R 64 ACAAACTACATTGGATGTTGAAATCCGGGTATCATTGACAGAAATCAATC	123
		supercontig6.21 1805545 CCAACCTTTACGAAAAAAGCGCACCATCCATAAAATTCGAAACCGCTTAAGCAAATAA	1805604
		NIASMg207G09R 124 CCAACCTTTACGAAAAAAGCGCACCATCCATAAAATTCGAAACCGCTTAAGCAAATAA	182
		supercontig6.21 1805605 ACTCTTGAAATACAGAACCCACATATTCTTTGTTAAATCTCGTCTCGATTCTCGCCC	1805664
		NIASMg207G09R 183 ACTCTTGAAATACAGAACCCACATATTCTTTGTTAAATCTCGTCTCGATTCTCGCCC	242
		supercontig6.21 1805665 GGGCCCAAGCCTGCAATTTTGTGACGATTCGGGAGATCCAGGCTAGGCAGCTTCATACC	1805724
		NIASMg207G09R 243 GGGCCCAAGCCTGCAATTTTGTGACGATTCGGGAGATCCAGGCTAGGCAGCTTCATACC	302
		supercontig6.21 1805725 ACGCTCGGGGCTGACTGCTGTTGCTGAGAGGCCAAGGGTGGTGATACCTGCGCCCA	1805784
		NIASMg207G09R 303 ACGCTCGGGGCTGACTGCTGTTGCTGAGAGGCCAAGGGTGGTGATACCTGCGCCCA	362
		supercontig6.21 1805785 TGTACCCGCAAGCTGTCAGGAGCTCGTGAGCCAGAGGCTATACCTCATCCCTAGCTC	1805844
		NIASMg207G09R 363 TGTACCCGCAAGCTGTCAGGAGCTCGTGAGCCAGAGGCTATACCTCATCCCTAGCTC	422
		supercontig6.21 1805845 TATTAACCTTTGGCAAAATGCTGTGACAAACCTCAACATTGATGTCAAGAACAGTCC	1805901
		NIASMg207G09R 423 TATTAACCTTTGGCAAAATGCTGTGACAAACCTCAACATTGATGTCAAGAACAGTCC	479
	Score:	99	
	Target:	NIASMg207G09R 4 479 +	

>NIASMg207G09R class=Sequence position=supercontig6.21:1805425..1805901 (+ strand)

```

ATAGCACCTT  AAAAACAAAT  CAGCTCTGGC  TATCGAATGC  AAACCTAGAA
AACAAACAAA  ACAAACTAC  ATTGGATGTT  GAAATCCGGG  TATCATTTCG
ACCCTTGACA  GAATTCAATC  CCAACCTTTA  CGAAAAAATA  ACGCACCATC
CATAAAATTC  GAACCCGCTT  AAGCAAATAA  ACTCTTGAAA  TACAGAACCC
CACATATTCT  TTGTTAAATC  TCGTCTCGA  TTTCTCGCCC  GGGCCCAAGC
CTGCAATTTT  GTCACGATTC  GGGCAGATCC  AGGCTAGGCA  GCTTCATACC
ACGCTCGGGG  TCTGACTGCT  GTTGCTGAGA  GGCCAAGGGT  TGGTGCATAA
CCTGCGCCCA  TGTACCCGGC  AAGCTGTCAG  GAGCTCGTGA  GCCAGAGAGG
CTATACCTCA  TCCCTAGCTC  TATTAACCTT  GGCAAATGT  CTGTGACAAA
CCTCAACATT  GATGTCAAGA  ACAGTCC

```

(17) ACP-17

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P17)되었으며, *R. cerealis* control에 비해 JBR563 처리군에서 유전자 발현증가 관찰(그림 42).

A)

```
ACCTCAAAAGGCTCAAACAAGAAAACGACAGTGGCTACGTTTGG
CGCCCCTTGACTGGTGCCTGAGCAGGTTCGCATTATCGCAAGCGAG
GACAAGGATGATTTTCAGGGGCGACGGAGCCATCGAGTCGAACGA
AAACGATACTGAAAGAGGCCTGAAGAATCCATTTGCGATTCAGA
ACAGACGTCTATCAAATCCTGAAGCTGACAAACGACGAGCTGCC
AAGGTAAAATTGTCAAGTTTGGAGGGAATGCACGAAAAACTCA
TCCAACAAGCAGAGAACGCATGGAATATTATTCTCGAATTTCC
CATGACTTGT
```

B)

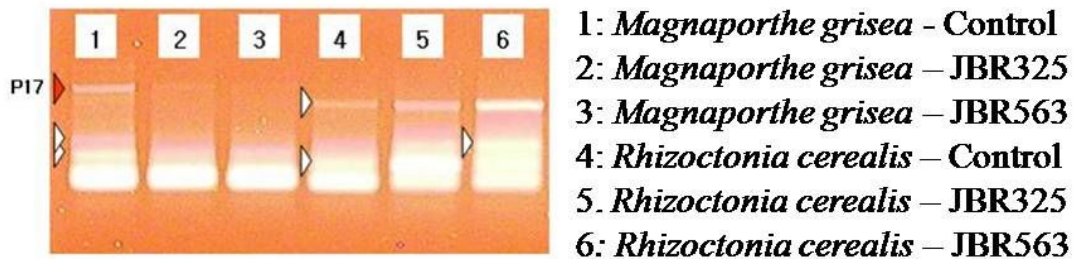


Figure 42. Nucleotide sequences of P17(A) and expression band patterns(B).

NIASMg003C02R Details

Name:	NIASMg003C02R		
Type:	match		
Source:	NIAS EST		
Position:	supercontig6.15:1727284..1727845 (+ strand)		
Length:	562		
Sequence:	EST sequence		
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)		
Alias:	DC958420 (accession number)		
Parts:	Type:	match_part	
	Source:	NIAS_EST	
	Position:	supercontig6.15:1727284..1727845 (+ strand)	
	Length:	562	
	Query:	NIASMg003C02R	
	Matches:	NIASMg003C02R:1..562 (+)	
	supercontig6.15	1727284	GAACCTTCTTGGCCAAGACCCCTGACCACCCAGTGGTTGATTGGGCCAATCCCGTTAAC
	NIASMg003C02R	1	GAACCTTCTTGGCCAAGACCCCTGACCACCCAGTGGTTGATTGGGCCAATCCCGTTAAC
	supercontig6.15	1727344	CAGCAGGCTAGGCTACGTTGGAGTAGCTTCGAAACCAAAGTCCACRACCTAACACAGCAC
	NIASMg003C02R	61	CAGCAGGCTAGGCTACGTTGGAGTAGCTTCGAAACCAAAGTCCACRACCTAACACAGCAC
	supercontig6.15	1727404	AAGTCATGGGAAATTCGAGAATAATATGCCATGCGTTCTCTGCTGTGTGGGATGAGTTTT
	NIASMg003C02R	121	AAGTCATGGGAAATTCGAGAATAATATGCCATGCGTTCTCTGCTGTGTGGGATGAGTTTT
	supercontig6.15	1727464	CCGTGCATCCCTCCAAACTGACAAATTTTACCTTGGCAGCTCGTGGTTGTCAGCTTCA
	NIASMg003C02R	181	CCGTGCATCCCTCCAAACTGACAAATTTTACCTTGGCAGCTCGTGGTTGTCAGCTTCA
	supercontig6.15	1727524	GGATTTGATAGAGCTCTGTCTGAAATCGCAAATGGATTCTTCAGGCCCTTTTCAGTATCG
	NIASMg003C02R	241	GGATTTGATAGAGCTCTGTCTGAAATCGCAAATGGATTCTTCAGGCCCTTTTCAGTATCG
	supercontig6.15	1727584	TTTTCGTTCGACTCGATGGCTCCGTCGCCCTGAAATCATCCTTGTCTCGTTGGGATA
	NIASMg003C02R	301	TTTTCGTTCGACTCGATGGCTCCGTCGCCCTGAAATCATCCTTGTCTCGTTGGGATA
	supercontig6.15	1727644	ATGCGACCTGCTCAGGCACCAGTGCGGCGGGCGCCAAACGTAGCCACTGTCGTTTCTTG
	NIASMg003C02R	361	ATGCGACCTGCTCAGGCACCAGTGCGGCGGGCGCCAAACGTAGCCACTGTCGTTTCTTG
	supercontig6.15	1727704	TTTGAGCCTTTTGGGTCCTCTTCAAAAAGTTTCCAAATACGTGGGCTTGCCTTCGTTCC
	NIASMg003C02R	421	TTTGAGCCTTTTGGGTCCTCTTCAAAAAGTTTCCAAATACGTGGGCTTGCCTTCGTTCC
	supercontig6.15	1727764	TGTTGCTTCTCGGAAGAAAGAACAGAAGGAACGTCATGCAACTTGGCCGACTTGGTTG
	NIASMg003C02R	481	TGTTGCTTCTCGGAAGAAAGAACAGAAGGAACGTCATGCAACTTGGCCGACTTGGTTG
	supercontig6.15	1727824	CGACTTGTATGCTGGTTATAAC
	NIASMg003C02R	541	CGACTTGTATGCTGGTTATAAC
	Score:	99	
	Target:	NIASMg003C02R 1..562 +	

```
>NIASMg003C02R class=Sequence position=supercontig6.15:1727284..1727845 (+ strand)
GAACCTTCTT  GGCCAAGACC  CTGACCACCC  AGTTGGTTGA  TTCGGCCAAT
TCCCGTTAAC  CAGCAGGCTA  GGCTACGTTG  GAGTAGCTTC  GAACCAAAGT
CCACAACCTA  ACAACAGCAC  AAGTCATGGG  AAATTCGAGA  ATAATATGCC
ATGCGTTCTC  TGCTTGTGTT  GATGAGTTTT  CCGTGCATTC  CCTCCAAACT
TGACAATTTT  ACCTTGGCAG  CTCGTCGTTT  GTCAGCTTCA  GGATTTGATA
GACGTCTGTT  CTGAATCGCA  AATGGATTCT  TCAGGCCTCT  TTCAGTATCG
TTTTCGTTCG  ACTCGATGGC  TCCGTCGCC  CTGAAATCAT  CCTTGTCTC
GCTTGCGATA  ATGCGACCTG  CTCAGGCACC  AGTGCGGCGG  GCGCCAAACG
TAGCCACTGT  CGTTTTCTTG  TTTGAGCCTT  TTGAGGTCCT  CTTCAAAAAG
TTTCCAATTA  CGTGGGCTTG  CCTTCGTTTC  TGTTTGCTTC  TCGGAAGAAA
GAACAGAAGG  AACGTCTATG  CAACTTGGCC  GACTTGGTTG  CGACTTGTAT
GCTGGTTATA AC
```

(18) ACP-18

M. grisea control에 비해 JBR563 및 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P18)되었으며, *R. cerealis* control에 비해 JBR563 처리군에서 유전자 발현증가 관찰(그림 43).

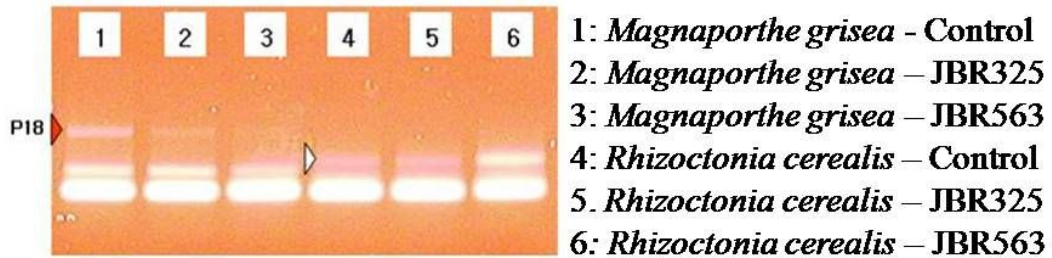


Figure 43. The expression band patterns using ACP-18.

(19) ACP-19

R. cerealis control에 비해 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P19)되었으나, *R. cerealis*에 대한 유전자 databaserk 구축되어 있지 않아 동정 불가(그림 44).



Figure 44. The expression band patterns using ACP-19.

(20) ACP-20

M. grisea control에 비해 JBR325 처리군에서 유전자 발현억제 관찰(P20)되었음(그림 45).

A)

```
TGTAGGGAGAAGAACGTGTCTGGCCACTGGTTACTCATCAAACCA  
TCCCACAATACCCATGCCAGTGTGAAAAAATTACATGATTTGCAT  
AATTGACTTGTGCAGCAATCAAGACACTACGCGCACTGTCCCTAC  
TTCAAAGGTCTTGAGGTATTATTGCACAAGCATCTGGCCTTGGAT  
TAACATACGTAGTATGCAGGGTG
```

B)

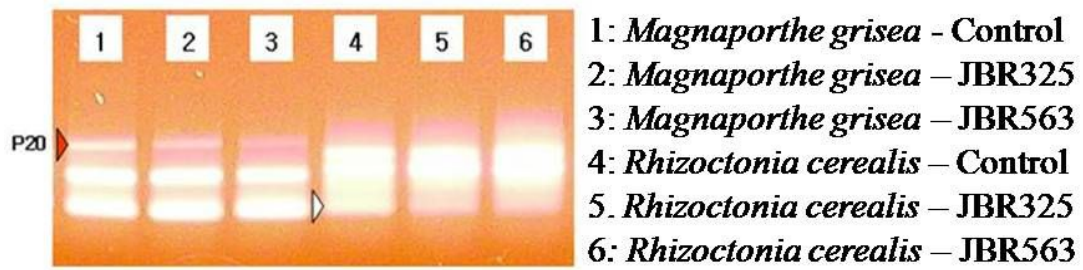


Figure 45. Nucleotide sequences of P20(A) and expression band patterns(B).

NIASMg163B01R Details	
Name:	NIASMg163B01R
Type:	match
Source:	NIAS EST
Position:	supercontig6.18:1296965..1297570 (+ strand)
Length:	606
Sequence:	EST sequence
Link:	Rice Genome Resource Center (clone ordering)
Alias:	DC983337 (accession number)
Parts:	
Type:	match_part
Source:	NIAS_EST
Position:	supercontig6.18:1296965..1297312 (+ strand)
Length:	348
Query:	NIASMg163B01R
Matches:	NIASMg163B01R:1..348 (+)
	<pre> supercontig6.18 1296965 CTTGCACATTTGCTGTGAATATTTTCGTGTCTCTTCTACCTGCCCCCGAATAAATATCA 1297024 NIASMg163B01R 1 CTTGCACATTTGCTGTGAATATTTTCGTGTCTCTTCTACCTGCCCCCGAATAAATATCA 60 ----- supercontig6.18 1297025 AATACGAAAATAAACATGATCAGACAAAACCGATAGTCGCAAGAAATCCGATACTCCCA 1297084 NIASMg163B01R 61 AATACGAAAATAAACATGATCAGACAAAACCGATAGTCGCAAGAAATCCGATACTCCCA 120 ----- supercontig6.18 1297085 AGTCTTAICTTTTCTTTGTCGCTTCTAGTCCACAAAACCTCAAGTGCTCACATGTCAT 1297144 NIASMg163B01R 121 AGTCTTAICTTTTCTTTGTCGCTTCTAGTCCACAAAACCTCAAGTGCTCACATGTCAT 180 ----- supercontig6.18 1297145 ACCGAAAGTCCCTTAATCTAAGAGCTAGTGCCTATCTTGGTGAGTCCCTTCAATGACC 1297204 NIASMg163B01R 181 ACCGAAAGTCCCTTAATCTAAGAGCTAGTGCCTATCTTGGTGAGTCCCTTCAATGACC 240 ----- supercontig6.18 1297205 CCAAGCTGAGAGCCAGACCTTGCATCTGCTTCTTATGCGTACGAAACCGGTGATAGGCC 1297264 NIASMg163B01R 241 CCAAGCTGAGAGCCAGACCTTGCATCTGCTTCTTATGCGTACGAAACCGGTGATAGGCC 300 ----- supercontig6.18 1297265 CATCTTCGCCCTCCTTTTCGATGCTCAGGTTTGCCAGGGCACTCCCTGC 1297312 NIASMg163B01R 301 CATCTTCGCCCTCCTTTTCGATGCTCAGGTTTGCCAGGGCACTCCCTGC 348 </pre>
Score:	100
Target:	NIASMg163B01R 1 348 +
Type:	match_part
Source:	NIAS_EST
Position:	supercontig6.18:1297395..1297570 (+ strand)
Length:	176
Query:	NIASMg163B01R
Matches:	NIASMg163B01R:349..524 (+)
	<pre> supercontig6.18 1297395 CGAATACACTCCTGGCGTAGAGATTTGCACCTAAGGAACTGGCAGTCAACCTTGAGTCCAG 1297454 NIASMg163B01R 349 CGAATACACTCCTGGCGTAGAGATTTGCACCTAAGGAACTGGCAGTCAACCTTGAGTCCAG 408 ----- supercontig6.18 1297455 CCTCGGGAGTCAAGCAGTTCATGTTGGTGGCCTTATAAGCTCATCCAGGAATCCGCGTA 1297514 NIASMg163B01R 409 CCTCGGGAGTCAAGCAGTTCATGTTGGTGGCCTTATAAGCTCATCCAGGAATCCGCGTA 468 ----- supercontig6.18 1297515 GTGCTTGATCTTGCTGTGATGTTGACCTTGTCTCCCACTCAAACCTCTGTCAC 1297570 NIASMg163B01R 469 GTGCTTGATCTTGCTGTGATGTTGACCTTGTCTCCCACTCAAACCTCTGTCAC 524 </pre>
Score:	100
Target:	NIASMg163B01R 349 524 +

>NIASMg163B01R class=Sequence position=supercontig6.18:1296965..1297570 (+ strand)

CTTGCACATT TGCTGTGAAT ATTTTCGTGT CCTCTTCTAC CTGCCCCCGA
 ATAAATATCA AATACGAAAA CTAAACATGA TCAGACAAAA CCGATAGTCG
 CAAGAAGTCC GATACTCCCA AGTCTTATCT TTTCTTTGTC GCTTCTAGTC
 CACAAAAAAC CTCAAGTGCT CACATGTCAT ACCGAAAGCT CCCTTAATTC
 TAAGAGCTAG TGCCATATCTT GGTGAGTCCC TTC AATGACC CCAAGCTGAG
 AGCCAGACCT TGCGATCTGC TTCTTATGCG TACGAAACCG GTGATAGGCC
 CATCTTCGCC CTCCTTTTCG ATGCTCAGGT TTGCCAGGGC ATCCTCGCCT
 GTTTCGAGAC AACGCAGTTA GTAACCAGTG ACTCAACAGC CTTTACGAAC
 CAAATACAAA CGACCCGAAC ACAA ACTTAC CGAATACACT CCTGGCGTAG
 AGATTTGCAC TAAGGAACTG GCAGTCACCC TTGAGTCCAG CCTCGGGAGT
 CAAGCAGTTC ATGTTGGTGG CCTTCATAAG CTCATCCAGG AATCCGCGTA
 GTGTCTTGAT CTTGCTGTTG ATGTTGACCT TGTTCCTCCA CTCAA ACTCT
 GTCCAC

(2) 유전자 발현 양상 결과

JBR325(갯까치수영)에서 분석된 유전자 중 1개는 *Margnaportha grisea*의 MAS1 Protein과 97% 염기서열이 유사한 것으로, 향후 MAS1 유사유전자에 대한 기능을 *Margnaportha grisea*, *Rhizoctonia cerealis* 등으로부터 작용기전을 규명하여, 식물추출물 및 유효성분에 대한 식물병 억제 작용기전을 규명하기 후속연구가 필요할 것으로 판단되었다(표 42).

[표 42] JBR325 및 JBR580의 식물도열병 및 라이족토니아병 관련 억제 및 발현유전자 수

	<i>Margnaportha grisea</i>		<i>Rhizoctonia cerealis</i>	
	JBR563(돈나무)	JBR325(갯까치수영)	JBR563(돈나무)	JBR325(갯까치수영)
억제 유전자	2	-	1	-
발현 유전자	-	2	1	2

유전자 발현 양상 결과에서 확인된 가장 중요한 사항은 M. grisea control 대비 발현이 억제되는 P9-1에 대한 내용으로 이 유전자는 동정 결과 pectate lyase와 99% match 되었으며, 이에 pectate lyase를 target 유전자로 설정하여 억제양상을 측정하였다.

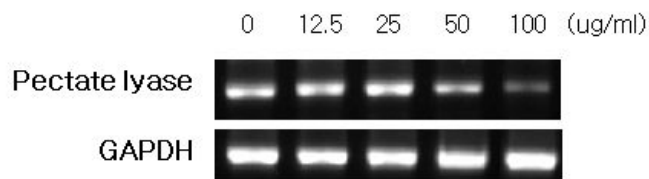
(3) Pectate lyase

Pectate lyase는 식물조직의 붕괴와 cell death에 관여하는 중요한 병원성 인자로서, 펙틴질은 세포의 중층이며, 1차 세포벽의 중요한 구성성분으로서 세포의 유지에 필수적인 역할을 하고, galacturonic acid의 중합체로 이루어진 다당류로서 pectic acid, pectin, protopectin 등의 3종류로 분

류된다. pectic acid는 D-galacturonic acid가 α -1,4-galacturonic bond로 연결되어 있으며, pectin은 pectic acid의 carboxyl기의 일부가 methyl-ester화 되어 있고, protopectin은 식물의 조직내에 들어 있는 불용성 pectic 성분임. 식물 세포벽의 주성분인 pectin 질을 분해하는 효소로는 pectinmethylesterase (PME), polygalacturonase (PG), pectate lyase (Pel), pectin lyase (PNL), oligogalacturonate lyase (OGL)가 있고, 이러한 펙틴 분해 효소는 식물조직의 붕괴를 일으키는 중요한 효소로 알려져 있다. Pectate lyase는 pectic acid의 α -1,4-glucoside 결합을 무작위로 절단하여 4,5 불포화 oligogalacturonate를 생산한다.

(가) 식물도열병원균에 대한 JBR325의 성분(anagallosaponin IV, VIII)의 pectate lyase 억제능 측정
JBR325의 성분이 농도별 (100, 50, 25, 12.5 μ g/ml)로 처리된 배지에서 *Magnaporthe grisea* 배양한 후 각각의 mRNA 추출 후 RT-PCR 수행하였다.

- Forward primer : 5'-GTTGATTGTTGGCAGCACAG-3'
- Reverse primer : 5'-CAACCAGGACTACTGCCACA-3'



JBR325의 성분(anagallosaponin IV) 50, 100 μ g/ml이 처리된 균주에서 pectate lyase가 억제양상을 나타내었으며, 그 중 100 μ g/ml 농도에서 대부분 억제되었다. 특히, anagallosaponin VIII는 IV에 비하여 매우 높은 농도에서 억제되며, 또한 벼도열병의 억제율은 오히려 높게 나타나, 식물병억제에 대한 원인성분은 anagallosaponin IV로 판단되었다.

(나) 작용기전 결론

벼도열병에 대하여, 갯까치수영 추출물 및 부탄올 분획물, 이로부터 분리된 anagallosaponin IV, VIII는 Pectate lyase의 발현을 농도의존적으로 억제하여, 벼의 식물세포벽을 유지하는 pectin 분해를 억제하여 식물곰팡이의 infection을 억제하는 것으로 판단되었다. 또한, 상기의 물질은 곰팡이의 성장을 억제하는 것으로 나타나 갯까치수영 추출물과 부탄올분획물의 다양한 성분에 의하여 벼도열병곰팡이의 성장을 억제함과 동시에, anagallosaponin IV가 VIII에 비하여 곰팡이의 성장 억제율은 낮으나, pectate lyase의 발현억제율이 높아, 갯까치수영 추출물의 다양한 성분에 의한 곰팡이 성장 억제와 동시에 식물에의 infection자체 또한 억제하는 것으로 판단되었다. 특히, 본 연구결과 갯까치수영추출물과 자귀나무추출물이 동시에 pectate lyase를 억제하는 것으로 보아, 벼도열병의 식물에 대한 병인을 제거하는 기전이 유사할 것으로 판단되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 목표달성도

연구개발 목표	연구개발 내용	연구개발 결과	달성도
작물 곰팡이병 방제 유효 및 지표성분 규명	제주 자생식물의 천연추출물 대상 작물곰팡이병 방제능 평가	717점 대상 항곰팡이 효능 평가	100%
	우수분획 분리, 유효성분 및 지표성분 규명	유효성분 규명: JBR325, JBR563, JBR701 지표성분 규명: JBR580	100%
	작물 곰팡이병 방제 현장적용 연구	전남농기원 답장포장 제주한라산CC	100%
작물 곰팡이병 방제 식물추출물 안전성 및 제품화 연구	작물곰팡이병 방제 천연추출물의 원물표준화 연구	완료 및 제품등록	100
	작물곰팡이병 방제 천연추출물의 최적추출공정 연구	완료 및 제품등록	100
	농자재 등록을 위한 약효, 약해 평가 및 안전성(독성) 평가	완료 및 농촌진흥청 제출	100
작물 곰팡이병 방제 분자생물학적 기전 연구	Gene fishing 기술을 이용한 식물 infection 유전자 규명	억제 및 발현유전자 평가 완료	100
	유효성분의 유전자 발현양상 평가	발현양상 평가완료	100
	유효성분 및 제품의 식물병 방제 작용기전 규명	Pectate lyase 기전?	90

2. 연구개발 실적

종 류	일 시	내 용
친환경유기 농자재 등록 (1건)	2010. 04. 15	작물병해관리용 자재(식물추출물) GNC-011 (목록등록번호: 10-유기-4-134)
특허출원 3건	2010. 05. 10	마그나포르테 그리세아에 의한 식물병 방제제 조성물 및 식물병 방제 방법 (출원번호: 10-2010-0047540)
	2011. 01. 11	돈나무 열매 추출물 또는 그것으로 분리한 사포닌 IIIA를 이용한 마그나포르테 그리세아에 의한 식물병의 방제제 조성물 및 식물병 방제 방법 (출원번호: 10-2011-0002672)
	2012. 03. 28	자귀나무 추출물을 이용한 라이족토니아 시리얼리스 또는 라이족토니아 솔라니에 의한 식물병 방제제 조성물 및 방제방법 (출원번호: 10-2012-0031573)
논문발표 (학술발표) 5건	2009. 04. 24	Antifungla activity of <i>Rheum undulatum</i> and <i>Persicaria senticosa</i> extracts against plant diseases(한국응용생명화학회 춘계학술발표회)
	2009. 09. 23	Antifungal activities of plant extracts against crop fungal diseases (ABIC 2009회 추계학술발표회)
	2010. 03. 31	제주도 자생 마디풀과(Polygonaceae) 식물 추출물의 잔디 진균병에 대한 방제효과와 성분 분석(식품천연물자원학회지)
	2010. 04. 22	Antifungal activities of <i>Lysimachia mauritiana</i> leaf extract against gray leaf spot (한국식물병리학회 춘계학술발표회)
	2010. 10. 28	in vitro antifungal activities of <i>Pittosponum tobira</i> fruit extracts against blast disease (한국식물병리학회 추계학술발표회)
	2011. 10. 21	Antifungal activity of the extract and saponin from <i>Pittosponum tobira</i> (Thunb.) W.T. Aiton (한국자원식물학회 추계학술발표회)
대의홍보 20건	2009. 05. 18	곰팡이병 방제 친환경 농약 개발한다(지방일간지 등 9건)
	2011. 03. 14	제주 자생식물 추출물 친환경농약 개발(지방일간지 등 6건)
	2012. 04. 09	제주 자생식물 친환경농자재 소재 개발 (지방일간지 등 5건)
시험성적서 10건	2009. 11. 23.	1. GNC-011의 담수어(잉어)에 대한 영향시험
	2011. 03	1. 갯까치수영 추출물 급성경구독성 시험성적서 2. 갯까치수영 추출물 급성경피독성 시험성적서 3. 돈나무열매 추출물 급성경구독성 시험성적서 4. 돈나무열매 추출물 급성경피독성 시험성적서
	2012. 04. 04	1. 에이제이유의 피부자극성시험 결과보고서 2. 에이제이유의 안점막자극성시험 결과보고서 3. 에이제이유의 급성경구독성시험 결과보고서 4. 에이제이유의 잉어에 대한 급성어독성시험 결과보고서 5. 에이제이유의 급성경피독성시험 결과보고서

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

천연식물로부터 항곰팡이 등의 농약활성 물질의 분리를 통한 농약개발로 신물질을 합성하는 합성농약에 비하여 적은 시설과 인력으로도 바이오농약을 개발할 수 있으며, 기술적으로도 이미 유효분획물을 통하여 농약활성을 가지므로 성공 가능성이 매우 높다. 또한, 천연식물 유래의 농약활성 물질은 합성농약에 비해 인체 및 동물 등에 대한 독성이 적으므로 안전한 환경친화적 농약개발이 가능할 것이다.

기초연구를 통하여 효과가 있음을 확인한 후 분리 동정하기 때문에 분석기술 면에서도 효율성이 높을 것이며 식물유래 항곰팡이 물질의 분리는 농약개발 뿐 아니라 식물유래 항균, 항생제의 개발기술에 대한 적용성이 크다.

또한, 최근에 농용자원을 활용한 식품산업의 시장이 확대되고 있어 천연물 분리를 통한 방부제 등 식품보존제 개발에도 기술적 측면에서 큰 기여를 할 것으로 사료된다.

2. 경제적 측면

2002년 한국과학기술정보연구원이 조사한 보고서에 따르면, 1998년부터 2000년경의 화학농약 시장규모를 바탕으로 추정된 바이오농약의 침투가능 시장규모는 살균제 958억원으로 분석되었다. 또한, 본 연구에서 개발하려는 잣빛곰팡이병, 잔디병, 역병 등은 각각 108억, 251억, 46억원의 판매가능 시장으로 분석되었다. 따라서, 본 연구에서 추진하는 작물병에 대한 친환경농자재가 개발·등록되고 더 나아가 바이오농약으로의 개발이 성공된다면 상품화 및 사업화를 위한 시장은 클 것으로 기대된다.

국내 바이오농약 시장은 2001년도 전체 농약시장의 0.7% 미만으로 매우 취약하며, 정식으로 등록된 제품으로 BT제라는 것을 감안할 때 통계적으로 밝혀진 시장은 23억원 정도이며, 살충, 살균효과가 있다고 주장하는 토양미생물 제제의 판매액을 추정한 금액을 더하더라도 82억원 정도로 규모면에서 걸음마 수준을 벗어나지 못하고 있다. 또한, 국내외 바이오시장의 개발경향은 미생물 및 천적제가 주로 이루고 있으며 사용의 전문성 저감, 2차적인 생태계 파괴 가능성 등의 이유로 활성화가 늦어지고 있으며 이에 대한 대안으로 식물 추출물을 이용한 방제기술에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서, 본 연구에서 개발된 식물 추출물 유래 친환경농자재는 사용의 편리성 및 친환경적이라는 강점을 바탕으로 급격한 시장 확대가 전망된다.

최근 제주의 1차산업은 감귤의 과다생산 등 전체적인 농가소득 감소로 인하여 1차산업이 위기에 처해있다. 이러한 시기에 식물자원 유래 친환경농자재 및 선도화합물이 개발되면, 원료 확보를 위하여 농가와 계약재배로 인한 농가소득을 증대시킬 수 있으며, 또한 선도화합물의 안정적 추출을 위한 최적추출공정법 및 제형이 확립되어 2차산업인 제조업을 활성화시켜 침체된 지역경제 활성화에 큰 기여를 할 것으로 판단된다.

3. 사회적 측면

최근 OECD가 발표한 환경보고서에서 “고에너지를 투입하는 집약농업에서 화학농약과 비료가 지하수, 표면수와 토양오염의 주요 원인”이라고 보고하였으며, 이를 억제하기 위하여 농업에 사용되는 농약과 비료에 매년 2%의 세금을 부과하여 2020년까지 약 50% 세금이 부과되도록 제안하고 있다. 우리나라도 2008년 친환경농업육성법 시행규칙을 확대 개정하는 등 비료와 농약의 사용을 저감하고 유기농산물 생산 장려 및 병해충관리에 대한 친환경 농자재의 사용을 적극적으로 장려하고 있다. 따라서, 천연자원식물로부터 식물 및 작물병에 효과가 뛰어난 활성 성분을 분리 추출해 작물병을 관리·방제하는 친환경농자재 개발은 국내·외의 친환경농업육성에 기여가 클 것으로 기대된다.

또한, 2008년 IFOAM에 보고에 따르면, 소비자들의 유기농산물 수요증가로 인하여 전세계 유기농산물 재배면적은 1998년 750만 ha에서 2006년 3,042만 ha로 연 평균 19.1%씩 증가하고 있다고 한다. 우리나라의 유기농산물 생산실적은 1990년대 후반 이후 급속도로 증가하고 있으며 연도별 유기농산물 인증실적을 보면, 농가수는 2000년 353호에서 2007년 7,507호로 매년 54.8% 증가하여 인증면적은 2000년 296 ha에서 2007년 9,729 ha로 매년 64.7%씩 증가하고 있어, 유기농산물 재배에 적합한 친환경농자재 및 바이오농약의 개발이 시급한 실정이다. 따라서, 본 연구에서 개발된 친환경농자재 및 바이오농약은 국내외적으로 유기농산물의 확대에 효과가 클 것으로 예상된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 산업화 계획

1. 사업화 계획

가. 활용분야: 곰팡이병 방제 유기농자재 또는 선도화합물의 개발

나. 주요활용분야: 벼도열병 및 잔디 잎마름병 등의 곰팡이 발병억제 친환경유기농자재 개발

다. 사업화 방향

- (1) 개발 후 공동개발: 천연물 친환경유기농자재 1건 추가 등록 완료 후 제품발매 시점에서 공동개발, 과제에서 획득된 선도화합물 또는 농약의 기술이전 후 선도화합물을 이용한 효력증가, 잔류량 감소, 저독성의 신규물질 공동연구 지속적 실시
- (2) 기술판매: 참여기업 또는 기타 관심기업으로의 등록특허 실시권 계약, 기술이전 후 매출에 대한 로열티 계약 체결
- (3) 사업화(생산): 친환경농자재 제제화를 위한 지속적인 생산단가 조절을 통한 기업의 유통 경쟁력을 높이기 위한 방안 강구.

☞ 등록 친환경농자재(GNC-011, 100mL, 1000배 희석용)의 생산단가

원료	단가(원)	비고
GNC 추출물	25,000	10g, 인건비, 시설비 포함
Ethanol	100	10mL
식용계면활성제	300	5mL
정제수	50	75mL
계	25,450	100mL

2. 기술확산 계획

가. 농용자원화: 연구결과 도출된 자원식물의 대량생산을 위해 제주특별자치도농업기술원과의 농용자원화 추진

☞ 현재, 제주특별자치도농업기술원 농산물원종장에서 종자과종 및 대량생산 중

나. 적용확산: 제주도내 Eco-Land 등 친환경골프장 방문/협의를 통해 본 연구결과 생산된 제품에 대한 적용확산.

다. 기술확산: 항곰팡이 효능을 가졌으므로 화장품의 천연방부제 또는 피부질환의 항진균성 원료의 적용 추진

라. 본 연구결과 도출된 주요성분의 생화학농약의 lead chemical로 이용

마. 타 작물 및 채소류에 대한 적용 확대 등 적용 미생물군 확대 및 병해충에 대한 확대 적용

바. 도열병 관련 작용기전 등의 논문발표 및 지적재산권 추가 확보

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. ABIC 2009

가. 주최: 국제농업생명공학회

나. 주관: 태국농업생명공학회

다. 참석자: 전세계 농업바이오산업 종사자, 연구자 등 5,000여 명

라. 주요내용

세계적으로 친환경 및 삶의 질 향상에 대한 관심이 날로 증대되고 있고, 특히 먹거리와 밀접한 관련이 있는 농업생명공학의 발전이 급격한 성장을 하고 있어 각국의 농작물을 보다 효율적으로 관리하고 고소득작물로 활용가능하도록 재배, 저장기술 및 가공기술을 발전시켜나가고 있다. 본 행사를 통해 고부가가치 상품의 개발을 위한 다양한 농작물의 활용방법과 각종 친환경경제의 개발 등의 결과물들을 전시하고 홍보하며, 각국의 관련종사자들간의 교류의 장이 마련되어 서로의 제품에 대한 의견을 교환하고 기술의 발전을 위한 토론의 장이 마련되어 있는 농생명공학분야의 지속적인 발전을 도모하는 행사

2. 2010 BIO TWIWAN

가. 현재 연구자와의 기술개발 협의

(1) 기관명: Advanced Green Biotechnology Inc.

(2) 연혁: 2002년 설립(Pingtung County, Taiwan, www.agbt.com.tw)

(가) 다양한 작물(벼, 콩, 유실수, 종자, 잔디, 채소, 차나무 등 각종 작물)에 적용할 수 있는 생물농약 및 생물비료 제조의 선두주자

(나) 농업분야, 조경분야의 친환경보조제 제품 출시 - 2010년 국가발명상 수상

(다) 토양방선균 *Bacillus pumilus*을 이용, Fert P를 제조하여 유리 인산기가 양이온(예, Ca^{2+} , Fe^{3+} 및 Al^{3+})과 결합을 용이하게 하여 complex를 형성시킴으로써 유리 인산들이 작물에 직접적으로 영향을 미칠수 없도록 작용기전을 가짐. 따라서, 효과적인 인산이온과 미량요소들을 쉽게 식물 뿌리가 흡수할 수 있어 식물의 성장촉진을 가져옴.

(라) 적용분야: 식물의 유도저항성을 일으켜 식물 성장촉진을 왕성하게 진행시킴으로써 외부 병원균에 침투를 억제시킴. 따라서 식물의 뿌리 및 잎 썩음병을 억제시키는데 효율적으로 활용할 수 있을것으로 판단됨.

3. 딸기 저장병 방제 관련

딸기를 비롯한 블루베리, 포도와 같이 작은 과실에 경제적으로 손실을 가져오는 두가지 곰팡이 병원균의 방제를 위해 천연물에서 추출분리한 물질의 항균제로 개발되고 있음(미국농업연구청, 2004)

- 가. 미국농업연구청에서 고추 유래 항진균 물질 CAY1에 대한 특허를 획득한 바 있으며, 현재 딸리 곰팡이를 대상으로 이물질의 항균능력에 대한 연구를 진행
- 나. 미국농업연구청의 미생물학자인 Anthony De Lucca는 식물병리학자 David Wedge 및 Barbara Smith와 공동으로 딸기에 질병을 유발시키는 곰팡이에 대한 CAY1의 효과를 1년에 걸친 실험실 및 식물실험 결과를 바탕으로 CAY1의 시판을 위한 연구를 진행하고 있음.
- 다. CAY1의 주성분인 사포닌은 식물체에 널리 발견되는 물질로서 세제의 작용을 가지고 있어 물과 함께 흔들면 거품이 형성됨. 섬유에 침투함으로써 작용을 발휘하는 섬유제제와 같이 고추의 사포닌 역시 세포막에 작은 구멍들을 형성함으로써 곰팡이를 파괴함
- 라. 작은 과실에 경제적으로 손실을 가져오는 collectotrichum과 Phomopsis에 대해 CAY1은 낮은 농도에서도 좋은 효과를 나타냄.

제 7 장 참고문헌

- Amadioha, A.C., 2000. controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection 19: 287-290.
- Clarkson, J.D.S. and R.J. Cook, 1983. Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield loss in winter wheat. Plant Pathology 32: 421-428.
- Couch, H.B., 1985. Common names for turfgrass diseases. In: Common names for plant diseases. ed. by J.D. Hansen. Plant Dis. 69: 649-676.
- Couch, H.B., L.T. Lucas and R.A. Haygood, 1990. The nature and control of *Rhizoctonia* blight. Golf Course Manag. 58: 49-58.
- Cromey, M.G., R.C. Butler, C.A. Munro and S.C. Shorter, 2005. Susceptibility of New Zealand wheat cultivars to sharp eyespot. New Zealand Plant Protection 58: 268-272.
- Cromey, M.G., R.C. Cromry, H.J. Boddington and A. R. Moorhead, 2002. Effects of sharp eyespot on yield of wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. New Zealand J. Crop and Hort. Sci. 30: 9-17.
- Hasegawa, M., I. Mitsuhashi, S. Seo, T. Imai, J. Koga, K. Okada, H. Yamane and Y. Ohashi, 2020. Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. Mol. Plant-Microbe Interac. 23: 1000-1011.
- Kim, H.W., J.Y. Park, H.J. Kim, K.Y. Lee, J.W. Lee, W.B. Choi, S.W. Lee and B.J. Moon, 2005. Isolation and Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13 Active against *Rhizoctonia solani* causing crisphead lettuce bottom rot. Res. Plant Dis. 11: 152-157.
- Kim, K.Y. and S.D. Kim, 1997. Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 396-402.
- Kim, W.G. and C.K. Kim, 1988. Density of over wintered sclerotia in paddy fields in Korea, viability of the sclerotia and pathogenicity of the sclerotial fungi. Kor. J. Plant Pathol. 4: 207-217.
- Lange, L., J. Breinholt, F.W. Rasmussen and R.I. Nielsen, 1993. Microbial fungicides: the

natural choice. Pestic. Sci. 39: 155-160.

Lapis, D.B. and E.E. Dumancus, 1978. Fungicidal activity of crude plant extracts on *Helminthosporium oryzae*. Philippine Phytopathol. 14: 23-27.

Lee, H.M., Z. Khan, S.G. Kim, N.I. Baek and Y.H. Kim, 2011. Evaluation of the biocontrol potential of some medicinal plant materials alone and in combination with *Trichoderma harzianum* against *Rhizoctonia solani* AG 2-1. Plant Pathology Journal 24: 68-77.

Leung, H. and M. Taga, 1988. *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*), The blast fungus. pp. 175-188. In D.S. Ingram, D.H. Williams., Advances in Pathology Genetic of Plant Pathogenic Fungi. Academic press Inc., U.K.

Lipps, P.E. and L.J. Herr, 1982. Etiology of *Rhizoctonia cerealis* in sharp eyespot of wheat. Phytopathology 72: 1574-1577.

Staub, T. and D. Sozzi, 1984. Fungicide resistance: A continuing challenge. Plant Dis. 68: 1026-1031.

Takeuchi, S.K., K. Hirayama, H. Ueda, Sasaki, and H. Yonehara, 1958. Blastocidin S, a new antibiotic, kasugamycin. J. Antibiotics 11: 1-5.

Tewari, S.N. and M. Nayak, 1991. Activity of four-plant leaf extracts against three fungal pathogens of rice. Tropical Agric. (Trinidad) 68: 373-375.

Umezawa, H., Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada and T. Takeuchi, 1965. A new antibiotic, kasugamycin. J. Antibiotics 18: 101-103.

Woodruff, H., 1980. Natural products from microorganism. Sciences 208: 1225-1229.

김완규, 조원대, 이영희. 1991. 4종의 기주에서 분리한 *Rhizoctonia cerealis* 균주들의 균사 융합 및 병원성. 한국식물병리학회지 7: 52-54

김성태, 김인섭, 김진원, 김호준, 심규열, 양승원, 이정재, 함선규, 1992. Golf장 관리의 기본과 실제. 한국잔디연구소 80p.

김완규, 1995. 작물 라이족토니아병 진단 및 방제. 농업과학기술원

김진원, 심규열, 김호준, 이두형. 1992. 잔디 잎마름증상(Yellow patch)을 일으키는 2핵성 *Rhizoctonia*의 동정 및 병원성. 한국잔디학회지 6: 99-112

정영륜, 김홍태, 김태준, 조광연. 1991. 한국들잔디(Zoysiagrass)와 bentgrass에서 분리된 Rhizoctonia spp. 의 배양적 특성과 병원성. 한식병지. 7: 230-235.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.