큰조롱과 넓은잎 큰조롱에서 신종 포티바이러스(큰조롱모자이크바이러스)의 동정

이주희 · 박석진¹ · 남 문¹ · 김민자² · 이재봉³ · 손형락⁴ · 최홍수¹ · 김정수¹ · 이준성¹ · 문제선⁵ · 이수현^{1*}
나래바이오테크(주), ¹국립농업과학원 작물보호과, ²충청북도 농업기술원 식량자원연구과, ³국립식물검역원 중부지원,
⁴경상북도 농업기술원 농업환경연구과, ⁵한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터

Identification of a New *Potyvirus*, *Keunjorong mosaic virus* in *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*

Joo-Hee Lee, Seok-Jin Park¹, Moon Nam¹, Min-Ja Kim², Jae-Bong Lee³, HyoungRac Sohn⁴, Hong-Soo Choi¹,
Jeong-Soo Kim¹, Jun-Seong Lee¹, Jae-Sun Moon⁵ and Su-Heon Lee^{1*}

NaraeBiotech Inc., Gunpo 435-030, Korea

¹Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Food Crop Research Division, Chungcheongbuk-Do Agricultural Research and Extension Services,
Cheongwon 363-883, Korea

³Jungbu Regional Office, National Plant Quarantine Service, Incheon 402-835, Korea

⁴Agricultural Environmental Research Center, Gyongsangbuk-Do Agricultural Research and Extension Services,
Daegu 702-708, Korea

⁵Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Daejeon 305-333, Korea

(Received on October 5, 2010; Accepted on October 27, 2010)

In 2006 fall, a preliminary survey of viruses in two important medicinal plants, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*, was conducted on the experimental fields at the Agricultural Research and Extension Services of Chungbuk province in Korea. On each experimental fields, percentage of virus infection was ranged from 20 to 80%, and especially an average of disease incidence propagated by roots was twice higher than that by seeds. The various symptoms were observed in *Cynanchum* spp. plants, such as mosaic, mottle, necrosis, yellowing, chlorotic spot and malformation etc. In electron microscopic examination of crude sap extracts, filamentous rod particles with 390-730 nm were observed in most samples. The virus particles were purified from the leaves of *C. wilfordii* with typical mosaic symptom, and the viral RNA was extracted from this sample containing 430-845 nm long filamentous rod. To identify the viruses, reverse transcription followed by PCR with random primers was carried out. The putative sequences of P3 and coat protein of potyvirus were obtained. From a BLAST of the two sequences, they showed 26-38% and 62-72% identities to potyviruses, respectively. In SDS-PAGE analysis, the subunit of coat protein was approximately 30.3 kDa, close to the coat protein of potyvirus. In bioassay with 21 species in 7 families, *Chenopodium quinoa* showed local lesion on inoculated leave and chlorotic spot on upper leave, but the others were not infected. RT-PCR detection using specific primer of *C. wilfordii* and *C. auriculatum* samples, all of 24 samples with virus symptom was positive, and five out of seven samples without virus symptom were also positive. On the basis of these data, the virus could be considered as a new member of potyvirus. We suggested that the name of the virus was *Keunjorong mosaic virus* (KjMV) after the common Korean name of *C. wilfordii*.

Keywords : *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, *Keunjorong mosaic virus*, Medicinal plants, Virus disease

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-0432, Fax) +82-31-290-0406

Email) suheon@korea.kr

큰조롱(*Cynanchum wilfordii*)과 넓은잎 큰조롱(*Cynanchum auriculatum*)은 박주가리과(Asclepiadaceae) 백미속(*Cynanchum* sp.)의 다년생식물이다. 큰조롱은 우리나라가 원산지이고, 이 식물체의 뿌리는 ‘백하수오’로 불리며, 한방에서 노인병, 혈관질환, 당뇨병, 국소빈혈 및 노화방지 등에 이용되고 있다(Lee 등, 2001). 한편 넓은잎 큰조롱(중국어명: 이엽우피소)은 중국으로부터 도입된 큰조롱의 유사종으로 중국에서는 ‘백수오(Baishouwu)’라고 하여 대근우피소(*Cynanchum bungei*), 격산우피소(*Cynanchum roilfordii*)에 함께 사용하고 있다. 백하수오와 백수오는 경상북도 영주를 중심으로 약 150 ha 가량 재배되고 있으며, 연간 300톤 이상의 뿌리가 한약재와 식품용으로 소비되고 있는 주요한 약용작물이다. 농가에서는 큰조롱보다 넓은잎 큰조롱이 수량성이 높기 때문에 널리 재배되고 있는데, 대한약전에 기재된 종이 아니기 때문에 한방에서는 약재로 인정받을 수 없다(농촌진흥청). 현대의학에서는 이들 식물체 뿌리의 항암작용(Shan 등, 2005), 활성산소 제거(Song 등, 1997), 면역체계 개선(Gu 등, 1987), 콜레스테롤 수치저하(Niu 등, 1988) 등의 효과에 대한 연구를 진행하고 있다(Shan 등, 2006).

큰조롱과 넓은잎 큰조롱은 뿌리와 종자를 이용하여 번식하는데, 농가에서는 주로 뿌리나누기 방법으로 재배하고 있다. 이들 두 가지 백미속 식물에서 병해충에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다. 해충으로는 주로 뿌리를 가해하는 고자리, 굼벵이, 거세미와 잎을 가해하는 진딧물 등이 알려져 있으나 아직까지 등록된 약제는 없는 실정이다(농약공업협회, 2009). 한편, 이들 약용작물에서 바이러스, 곰팡이, 세균에 의한 병해는 아직까지 보고된 바가 없다(한국식물병리학회, 2004).

2006년 청원에 위치한 충청북도 농업기술원의 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시험재배 포장에서 바이러스 감염주로 예상되는 식물체를 채집하고 발병정도를 조사하였으며,

병원 바이러스를 분리 동정하였다. 이 시험재배 포장은 육안으로 볼 때 바이러스병이 만연하고 있었으며, 채집된 시료를 전자현미경으로 관찰한 결과 많은 시료에서 사상형 바이러스를 관찰할 수 있었다. 본 논문에서는 두 가지 백미속 식물에서 바이러스병의 발생 양상과 이들 시료로부터 분리된 신종 포티바이러스(Potyvirus)의 특성에 대하여 최초로 보고하고자 한다. 이 신종 포티바이러스는 이들 식물체로부터 분리되는 최초의 바이러스이고, 큰조롱이 우리나라가 원산지인 점에서 큰조롱모자이크바이러스(*Keunjorong mosaic virus*, KJMV)로 명명하고자 한다.

재료 및 방법

바이러스병 발생실태 조사. 2006년 9월 23일 충청북도 청원에 위치한 충북 농업기술원 내 큰조롱(*C. wilfordii*)과 넓은잎 큰조롱(*C. auriculatum*) 시험재배 포장에서 바이러스병 발생실태를 조사하였다(Fig. 1). 백미속(*Cynanchum* sp.) 두 가지 약용작물의 바이러스병 발병양상과 번식방법에 따른 바이러스 발병율의 차이를 분석하였다. 바이러스 발병여부는 육안조사로 이루어졌으며, 전형적인 바이러스 병징을 보이는 식물체를 발병한 것으로 간주하였다.

전자현미경 검정. 채집된 잎 조직을 direct negative staining 방법을 이용하여 입자를 관찰하였다(Horne and Wildy, 1963). Formvar film으로 막을 씌운 grid(200 mesh)에 2% phosphotungstic acid(PTA, pH 7.2)를 한 방울 떨어뜨리고, 식물조직의 절단면을 침지해 1분간 놓아둔 후 여과지로 여액을 제거한 다음 투과전자현미경(CARL ZEISS LEO912AB)으로 관찰하였다.

바이러스 순화. 바이러스 병징을 보이는 큰조롱 잎 조직 100 g에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200 ml과 2-mercaptoethanol 2 ml을 넣고 마쇄한 후 추출액을 거즈로 한번 걸렀다. 식물체 찌꺼기를 제거한 추출

Fig. 1. The foreground of *Cynanchum* spp. (*C. auriculatum* and *C. wilfordii*) experimental fields at the Agricultural Research and Extension Services of Chungbuk province in Korea.

액에 8% butanol(V/V)을 첨가하여 60분간 교반하고 10,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 분리한 상층액에 4% PEG와 0.1 M NaCl을 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 magnetic stirrer로 저어 준 후 10,000 g로 20분간 원심분리하였다. 침전물을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 균질화한 다음 12,000 g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 분리하여 90,000 g로 90분간 원심분리하고 침전물은 증류수로 현탁하였다. 정제한 바이러스의 흡광도는 ND-1000 V3.1.1(NanoDrop)을 이용하여 측정하였다.

생물검정. 감염된 식물체에 5배(W/V)의 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가하여 마쇄한 후 silicon carbide를 이용하여 즙액접종하였다. 생물검정은 7과 21종의 지표식물을 사용하여 3회 반복 실험하였고, 접종 후 8주 동안 접종엽 및 상엽에 대해서 나타난 병징을 관찰하였다.

염기서열 분석. 정제한 바이러스에서 proteinase K 방법으로 viral RNA를 분리하였다(Maniatis 등, 1982). 분리한 RNA의 cDNA 합성과 PCR 증폭에는 랜덤 프라이머를 이용하였고, 증폭된 PCR 반응산물은 정제한 후 클로닝 하였다. 정제한 DNA 단편과 pGEM-T Easy vector에 T4 DNA ligase를 넣어 ligation 반응을 시켰고, 칼슘클로라이드를 이용하여 대장균 competent cell을 제작한 후 heat shock 방법으로 형질전환 하였다. 배양 후 얻어진 백색 콜로니에서 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA는 EcoRI으로 절단하고 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 플라스미드 DNA 내의 정제한 DNA 단편의 삽입을 확인하였고, 삽입이 확인된 DNA 단편은 농업생명과학공동기기원(NICEM, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. KJMV의 P3 단백질 유전자로 예상되는 염기서열은 NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 Genbank

Fig. 2. Various symptoms observed in *Cynanchum* spp. (*C. auriculatum* and *C. wilfordii*) plants. Group A is observed to be symptomless. Left; The plant has no virus symptom and is not detected any virus particles on electron microscope. Middle and Right; The plants have no virus symptom, but the filamentous rod viruses are observed on electron microscope. B group shows putative virus symptoms and virus-like particles of filamentous rod are observed in all plants of this group. Observed symptoms; mosaic, mottle, necrosis, yellowing, chlorotic spot, and malformation etc. C group shows violet spot. These violet spots on the leaves are formed by *Cercospora* sp. (confirmed by Dr. Sung-Kee Hong).

데이터베이스에 있는 모든 염기서열들과 비교·분석하였다(Altschul 등, 1997). KJMV의 multiple alignment는 DNAMAN 프로그램의 default parameter를 이용하여 실시하였다.

SDS-PAGE. 외피단백질의 SDS-PAGE는 5% stracking gel [0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% SDS]과 12.5% separating gel [1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4% SDS]를 사용하여 실시하였다. 정제한 바이러스를 5X sample buffer [1 M Tris-HCl (pH 6.8), 50% glycerol, 10% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]와 혼합하고 100°C에서 10분간 열처리한 후 전기영동 완충액[25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, 0.1% SDS]에서 2시간 동안 100 V로 전기영동하였으며, 그 후 coomassie brilliant blue로 염색하고 탈색하여 밴드를 관찰하였다.

KJMV의 진단. 부분적으로 해독된 KJMV의 CI 유전자 영역의 염기서열을 바탕으로 특이 프라이머를 제작하고 RT-PCR을 수행하여 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시료의 KJMV 감염여부를 진단하였다. 진단에 사용된 특이 프라이머는 다운스트림 프라이머, AS71(CTAACCGTCCCAACACTCCATAA)과 업스트림 프라이머, S28(TTTCATGGTGGATCTGGTTTTGTA)이며, 반응산물은 621 bp이다.

결 과

바이러스 병징과 발생실태. 백미속 두 약용작물(큰조롱과 넓은잎 큰조롱)에서는 매우 다양한 바이러스 증상이 관찰되었다. 잎에서 주로 관찰된 증상은 모자이크(mosaic), 얼룩(mottle), 괴저(necrosis), 황화(yellowing), 퇴록반점(chlorotic spot), 기형(malformation) 등이었으며, 식물체는 일반적으로 황화되고 위축되었다(Fig. 2).

종자와 뿌리로 번식된 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시험구에서 바이러스병 발병률은 20-80% 범위였으며, 전체적으로 큰조롱은 약 52%, 넓은잎 큰조롱은 약 39%이었다. 큰조롱은 종자 번식구에서 약 37%와 뿌리 번식구에서 약 67%의 바이러스 발병율을 나타내었다. 넓은잎 큰조롱은 종자 번식구에서 약 22%와 뿌리 번식구에서 약 57%의 바이러스 발병율을 나타내었다. 두 약용작물에서 바이러스 발병율의 차이는 크지 않으나, 번식방법에 따라서는 뿌리로 번식한 시험구에서 바이러스 발병율이 종자 번식구보다 높게 나타났다(Table 1).

전자현미경 검정 및 바이러스 순화. 바이러스 병징을 보이는 시료 24점과 바이러스 병징을 보이지 않는 시료 7점을 채집하여 전자현미경으로 검정하였다. 그 결과 대

Table 1. Incidence of virus diseases of two *Cynanchum* spp. medicinal plants grown in experimental fields when surveyed in September 2006

<i>Cynanchum</i> spp.	Propagating methods	Experimental plot ^a	Diseased plant (%) ^b
<i>C. wilfordii</i>	Seed	A-1	60
"	"	A-2	20
"	"	A-3	30
"	Root	B-1	80
"	"	B-2	70
"	"	B-3	50
<i>C. auriculatum</i>	Seed	C-1	20
"	"	C-2	20
"	"	C-3	25
"	Root	D-1	35
"	"	D-2	70
"	"	D-3	65

^aExperimental replication plots depending on *Cynanchum* spp. and propagation methods.

^bPercentage of typical virus symptomatic plants among overall plants in each experimental plots.

부분의 시료에서 390-730 nm 길이의 사상형 바이러스 입자가 관찰되었다(Fig. 3A, B). 한편, 31점의 시료 중 8점의 시료에서는 사상형 입자가 관찰되지 않았으나, 이들 시료 중 4점의 식물체에서는 전형적인 바이러스 병징이 관찰되었다(Sample No. 4, 5, 8 and 10 in Table 2), 이와는 반대로 3점의 시료는 전형적인 바이러스 병징을 관찰할 수 없었으나 사상형 입자가 관찰되었다(Sample No. 1, 7, 15 in Table 2).

전형적인 바이러스 병징을 보이는 큰조롱 잎으로부터 바이러스 입자를 순화하였다. 전자현미경으로 순화된 바이러스를 관찰한 결과 약 430-845 nm 길이의 사상형 입자만이 확인되었다(Fig. 3C).

염기서열 분석 및 외피단백질 SDS-PAGE. 정제된 사상형 바이러스 입자로부터 추출한 RNA를 이용하여 염기서열 분석을 실시한 결과 바이러스로부터 유래된 668 bp의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이 염기서열을 GeneBank의 protein blast로 분석한 결과 포티바이러스(Potyvirus)속의 P3 유전자의 일부 서열임을 확인되었다. 포티바이러스속의 바이러스 종들과 다중비교(multiple alignment)한 결과 *Peanut mottle virus* (PeMoV)와 38.1%, *Beet mosaic virus* (BtMV)와 35.9%, *Bean common mosaic virus* (BCMV)와 30.6%, *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV)와 30.1%, *Plum pox virus* (PPV)와 29.7%, *Soybean mosaic virus* (SMV)와 28.7%, *Watermelon mosaic virus*

Fig. 3. Electron micrograph of virus particles from *Cynanchum* spp. (*C. auriculatum* and *C. wilfordii*). **A** and **B**: The various size (about 350~730 nm) of filamentous rod particles from *Cynanchum* spp. plants. **C**: Purified virus particles isolated from Keunjong (*Cynanchum wilfordii*).

Table 2. The results of virus symptoms, EM observation and RT-PCR detection collected 31 *Cynanchum* spp. samples

Sample No.	<i>Cynanchum</i> spp. ^a	Propagation methods	Symptoms ^b	EM observation ^c	RT-PCR detection ^d
1	<i>C. a</i>	Seed	-	Fr	○
2	<i>C. a</i>	Seed	mMo	Fr	○
3	<i>C. a</i>	Seed	M	Fr	○
4	<i>C. a</i>	Seed	CS	-	○
5	<i>C. a</i>	Seed	mMo	-	○
6	<i>C. a</i>	Seed	-	-	○
7	<i>C. a</i>	Seed	-	Fr	○
8	<i>C. a</i>	Seed	CS	-	○
9	<i>C. a</i>	Seed	M	Fr	○
10	<i>C. a</i>	Seed	Mo	-	○
11	<i>C. a</i>	Seed	mMo	Fr	○
12	<i>C. a</i>	Seed	-	-	×
13	<i>C. a</i>	Seed	mM	Fr	○
14	<i>C. a</i>	Seed	N	Fr	○
15	<i>C. a</i>	Seed	-	Fr	○
16	<i>C. a</i>	Seed	Mo	Fr	○
17	<i>C. a</i>	Seed	Mo	Fr	○
18	<i>C. a</i>	Root	N	Fr	○
19	<i>C. a</i>	Root	Mo	Fr	○
20	<i>C. a</i>	Root	YD	Fr	○
21	<i>C. w</i>	Seed	CS	Fr	○
22	<i>C. w</i>	Seed	CS	Fr	○
23	<i>C. w</i>	Seed	CS	Fr	○
24	<i>C. w</i>	Seed	mMo	Fr	○
25	<i>C. w</i>	Seed	VC	Fr	○
26	<i>C. w</i>	Seed	-	-	×
27	<i>C. w</i>	Seed	M	Fr	○
28	<i>C. w</i>	Seed	M	Fr	○
29	<i>C. a</i>	Seed	Mo	Fr	○
30	<i>C. w</i>	Seed	-	-	○
31	<i>C. a</i>	Seed	Mal	Fr	○

^a *C. a*: *Cynanchum auriculatum*, *C. w*: *Cynanchum wilfordii*.

^b -: no virus symptom in plants with the naked eye, mMo: mild mottle, M: mosaic, CS: chlorotic spot, Mo: mottle, mM: mild mosaic, N: necrosis, YD: yellow dwarf, VC: vein clearing, Mal: malformation.

^c -: no virus particle on electron microscope, Fr: filamentous rod.

^d KJMV detection was done by RT-PCR using KJMV specific primers. ○: positive reaction, ×: negative reaction.

Fig. 4. Multiple alignment of partial P3 protein sequence of *Keunjorong mosaic virus* (KjMV) and the most closely related potyviruses obtained by NCBI protein blast. ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus* (EF062583), BCMNV: *Bean common mosaic necrosis virus* (NC004047), BCMV: *Bean common mosaic virus* (NC003397), BtMV: *Beet mosaic virus* (NC005304), FVY: *Fritillary virus Y* (NC010954), PeMoV: *Peanut mottle virus* (NC002600), PPV: *Plum pox virus* (NC001445), SMV: *Soybean mosaic virus* (NC002634), WMV: *Watermelon mosaic virus* (NC006262), WVMV: *Wisteria vein mosaic virus* (NC007216). ^aIdentities with KjMV using DNAMAN multiple alignment.

(WMV)와 28.2%, *Wisteria vein mosaic virus* (WVMV)와 27.8%, 그리고 *Fritillary virus Y* (FVY) 및 *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)와는 25.5%의 상동성을 보였다(Fig. 4).

이 염기서열을 바탕으로 특이 프라이머를 제작한 후 염기서열 분석을 계속 수행한 결과 804 bp 길이의 포티바이러스 외피단백질 부분 염기서열을 얻을 수 있었다. 얻어진 염기서열을 GeneBank의 protein blast 분석한 결과 외피단백질로 추정되는 염기서열은 SMV 및 WVMV와는 62%, BCMV (*Peanut stripe virus*), *East Asian passiflora virus*, *Hardenbergia mosaic virus*, *Passion fruit woodiness virus* 및 ZYMV와는 63%, *Ammi majus latent virus* 및 *Bean common mosaic necrosis virus*와는 64%, *Malaysian passiflora virus*와는 68%, 그리고 *Calanthe mild mosaic virus* 및 *Rhopalanthe virus Y*와는 72%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 5). 이러한 결과로 볼 때 분리된 바이러스는 포티바이러스 상과(superfamily) 포티바이러스 속(genus)에 속하는 새로운 종으로 판단된다.

외피단백질 SDS-PAGE 분석. 순화한 바이러스의 SDS-PAGE 분석 결과 약 30 kDa의 외피단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이 결과는 염기서열 분석으로 예상되는 외피단백질, 268 아미노산 잔기(804 bp)의 분자량 30.3 kDa와 일치함을 보여 주었다. 한편 37 kDa의 약한 밴드는 앞으로 아미노산 서열분석을 통하여 또 다른 바이러스에서 유래되었는지 판단하여야 할 것으로 생각된다.

생물검정. KjMV에 감염되어 전형적인 모자이크 증상을 보이는 큰조롱 잎 조직을 접종원으로 사용하여 7과

Table 3. Responses on the indicator plants of KjMV isolated from *Cynanchum* spp.^a

Family	Indicator plants	Symptoms ^b
Atzaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	-/-
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	-/-
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-/-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	L/CS
Compositae	<i>Zinnia elegans</i>	-/-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	-/-
	<i>Cucurbita pepo</i>	-/-
Leguminosae	<i>Glycine max</i>	-/-
	<i>Phaseolus angularis</i>	-/-
	<i>Phaseolus radiatus</i>	-/-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-/-
	<i>Vigna sinensis</i>	-/-
Solanaceae	<i>Capsicum annuum</i>	-/-
	<i>Datura stramonium</i>	-/-
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-/-
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-/-
	<i>Nicotiana glutinosa</i>	-/-
	<i>Nicotiana rustica</i>	-/-
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Ky57	-/-
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	-/-
	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/-
	<i>Petunia hybrida</i>	-/-
	<i>Physalis floridana</i>	-/-

^aThe test plants were observed for 4 weeks after mechanical inoculation.

^bInnoculated leaf/Upper leaf, -: no symptom, L: local lesion, CS: chlorotic spot.

(family) 21종(species)의 지표식물에 즙액접종하여 이 바이러스의 병원성을 생물검정하였다(Table 3). 실험 결과 *Chenopodium quinoa*에서 접종엽에 국부병반과 함께 전신적 황화반점 증상을 나타내었다(Fig. 7). 그러나 *C. quinoa* 이외의 20종의 식물체, *Tetragonia expansa*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Zinnia elegans*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Glycine max*, *Phaseolus angularis*, *Phaseolus radiatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Vigna sinensis*, *Capsicum annuum*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana tabacum* cv. Ky57, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc, *Petunia hybrida* 및 *Physalis floridana*에서는 KJMV에 감염되지 않았다.

큰조롱 및 넓은잎 큰조롱에서 KJMV 감염율. 분석된 염기서열을 바탕으로 KJMV에 대한 특이 프라이머를 제작하고, 이를 이용하여 채집된 31 시료를 RT-PCR 방법으로 진단하였다(Table 2). 그 결과 전체 31점의 시료 중 29점의 시료에서 KJMV가 검출되었다. 세부적으로 바이

Fig. 6. SDS-PAGE analysis of purified virus particles isolated from Keunjorong (*Cynanchum wilfordii*) plants. The M lane is protein size markers, the numbers on the left side mean protein sizes (kDa). The S lane is loaded purified virus sample and the arrow shows the position of the putative KJMV coat protein.

Fig. 5. Multiple alignment of coat protein sequence of Keunjorong mosaic virus and the most closely related potyviruses obtained by NCBI protein blast. BAA25144: *Calanthe mild mosaic virus*, AAF00518: *Rhopalanthe virus Y*, ABU48511: *Malaysian passiflora virus*, BAG71409, *Ammi majus latent virus*, NP_734358: *Bean common mosaic necrosis virus*, CAA79804: *Bean common mosaic virus*, YP_459919: *East Asian passiflora virus*, ABK51601, *Hardenbergia mosaic virus*, AAG43495: *Passion fruit woodiness virus*, CAD12309: *Zucchini yellow mosaic virus*, CAF32243: *Soybean mosaic virus*, AAN76998: *Wisteria vein mosaic virus*. ^aIdentities percentage with Keunjorong mosaic virus in NCBI, Arrow and underline is DAG motif in CP of KJMV.

Fig. 7. The response of *Chenopodium quinoa* inoculated with *Keunjorong mosaic virus* (KjMV). **A:** inoculated leaf, **B:** upper leaf.

러스 병징을 보인 모든 시료에서 KjMV가 검출되었으며, 7점의 무병징 시료 중에서도 5점에서 KjMV가 검출되었다. 또한 전자현미경에서 사상형 바이러스가 관찰된 모든 시료에서 KjMV가 검출되었으며, 사상형 바이러스가 검출되지 않은 8점의 시료중 6점에서도 KjMV가 검출되었다. RT-PCR 진단결과 종자번식한 큰조롱과 넓은잎 큰조롱에서 KjMV에 감염되지 않은 각각 1점의 시료가 존재하였다. 이러한 결과로 볼 때 두 가지 백미속 약용작물에서 KjMV 감염은 매우 심각한 것으로 판단되며, 일부의 무병징 식물체도 대부분 바이러스에 잠복감염되어 있는 것으로 생각된다.

고 찰

백미속 두 약용작물, 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시험포장에서 절반에 가까운 식물체가 뚜렷한 바이러스 병징을 나타내고 있고(Table 1), KjMV의 RT-PCR 진단에서 바이러스 병징이 보이지 않은 7점의 시료중 5점이 감염된 사실로 볼 때(Table 2) 이들 약용작물은 바이러스병에 심각한 피해를 받고 있는 것으로 추정된다. 두 약용작물은 종자와 뿌리로 모두로 번식 가능하며, 대부분의 농가에서는 뿌리를 이용하여 재배하고 있다. 본 연구에서 번식방법에 따른 바이러스 발병율을 비교해 보면(Table 1) 뿌리로 번식한 경우가 종자로 번식한 경우보다 2배 정도 바이러스 발병율이 높은 것으로 나타났다. 이것은 KjMV가 뿌리를 통하여 계대전염되어 더 높은 발병율을 나타내는 것으로 생각되며, 무병식물체로부터 종근을 생산하여 보급한다면 바이러스병의 피해를 많이 줄일 수 있을 것으로 판단된다. KjMV의 종자전염에 대해서는 아직 연구되지 않았지만 무병식물체의 생산과 보급을 위해서는 두 약용작물에서 바이러스 무병종자의 생산은 시급히 이루어져야 될 것이다.

큰조롱과 넓은잎 큰조롱에 대한 바이러스병 조사를 통

하여 KjMV가 최초로 발견되었으며, 두 작물에서 가장 주요한 바이러스로 확인되었다(Table 2). 한편 KjMV는 매우 다양한 병징을 나타내는 모든 시료로부터 전자현미경 또는 RT-PCR 방법으로 검출되었다. 이러한 병징 모두가 다양한 환경적 요인에 의한 KjMV 감염의 결과인지 또는 다른 바이러스가 복합감염되어 나타난 것인지는 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 순화한 바이러스의 SDS-PAGE 분석에서 염기서열 분석 결과로 예상되는 외피단백질 크기 이외에 약 37kDa 정도의 밴드가 함께 검출되었는데, 이 밴드에 대한 추가적인 분석이 필요하지만 다른 바이러스로부터 유래된 결과일수도 있을 것이다.

Potiviridae에 속하는 바이러스들 중 Rymovirus와 Tritimovirus 속은 응애, Ipomovirus속은 가루이, Bymovirus 속은 곰팡이에 의해서 전파되며, Potyvirus와 Macluravirus 속에 속하는 바이러스들은 진딧물에 의해서 전파된다(Berger 등, 2000). 본 실험에서 Potyvirus로 추정되는 KjMV의 외피단백질 염기서열 분석결과 진딧물 전염에 필요한 DAG motif가 존재한다는 것을 확인하였으며, 서론부분에서 언급한 대로 큰조롱의 생육이 왕성해지면 진딧물이 많이 발생한다는 보고로 미루어 볼 때 추가적인 연구가 필요하지만 KjMV 또한 Potyvirus 속에 속하는 바이러스로 진딧물에 의하여 충매전염될 것으로 추정된다.

우리나라에서 큰조롱은 예로부터 중요한 약용작물로써 재배되어 왔으며, 현대의학에서도 항암작용, 활성산소 제거, 면역체계 개선 및 콜레스테롤 수치저하 등에 효능이 있는 것으로 많은 연구(Shan 등, 2006)가 진행되고 있어 앞으로 매우 중요한 약용작물로 대두될 것으로 보인다. 한편 큰조롱의 유사종인 중국으로부터 도입된 넓은잎 큰조롱은 뿌리의 생산성이 높다는 이유로 농가에서 많이 재배되고 있는 실정이다. 그러나 넓은잎 큰조롱은 대한약전에 기재된 종이 아니기 때문에 우리나라에서 약재로 인정받을 수 없으며(농촌진흥청), 본 연구에서 발견된 KjMV의 효과적인 방제가 이루어진다면 큰조롱의 품질과 생산성은 현저히 높일 수 있을 것으로 추정되어 토종 약용식물인 큰조롱의 가치는 새롭게 대두될 것으로 판단된다.

요 약

2006년 9월 충청북도 농업기술원 내 백미속 약용작물, 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시험포장에서 바이러스병 조사를 수행하였다. 각 시험구별 바이러스 발병률은 20-80%의 범위였으며, 뿌리로 번식한 경우가 종자로 번식한 경우보다 발병률이 두 배 정도로 높았다. 두 약용식물에서

는 모자이크, 얼룩, 괴저, 황화, 퇴록반점, 기형 등 매우 다양한 바이러스 병징이 관찰되었다. 전자현미경 분석결과 대부분의 시료에서 390-730 nm 길이의 사상형 입자가 관찰되었으며, 바이러스 병징을 보인 시료 중 일부에서는 바이러스 입자가 관찰되지 않은 것도 있었다. 전형적인 모자이크 증상을 보이는 큰조롱 잎을 순화하여 약 430-845 nm 길이의 사상형 입자를 얻을 수 있었다. 순화한 바이러스로부터 분리된 RNA를 이용하여 염기서열 분석을 실시한 결과 포티바이러스속 P3과 외피단백질 유전자의 염기서열을 얻을 수 있었으며, BLAST 분석결과 포티바이러스속 바이러스들과 각각 약 26-38%와 62-72% 상동성을 나타내었다. 순화한 바이러스의 SDS-PAGE 분석에서 염기서열 분석으로 예상되는 약 30kDa의 외피단백질을 확인하였다. 7과 21종의 지표식물을 사용한 생물검정에서 *Chenopodium quinoa*에서 집중엽의 국부병반과 함께 전신적 황화반점 증상을 나타냈으며, 나머지 지표식물에서는 감염되지 않았다. 채집된 큰조롱과 넓은잎 큰조롱 시료를 특히 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 진단한 결과 병징을 보인 모든 시료에서 양성반응이 나타났으며, 병징을 보이지 않는 7점 중 5점의 시료에서 양성반응을 나타내었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 본 바이러스는 포티바이러스속의 새로운 종으로 확인되었으며, 우리나라가 원산지인 큰조롱에서 최초로 발견된 바이러스인 점에서 *Keunjong mosaic virus*(KjMV)로 명명하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: PJ006999)과 농림수산식품부 농림기술개발사업의 채소병리검정지원사업단(과제번호: 609002-5)의 지원으로 수행된 결과의 일부이며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Berger, P. H., Barnett, O. W., Brunt, A. A., Colinet, D., Edwardson, J. R., Hammond, J., Hill, J. H., Jordan, R. L., Kashiwazaki, S., Makkouk, K., Morales, F. J., Rybicki, E., Spence, N., Ohki, S. T., Uyeda, I., van Zaayen, A. and Vetten, H. J. 2000. Family *Potyviridae*. In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. (eds) *Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, London, pp. 703-724.
- Gu, L. G., Gong, S. S., Tao, J. D., Liu, C. H. and Zhou, Y. 1987. Studies on the regulation effect of Baishouwu on the immunity of mouse. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 7: 37-41.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병목록, 제4판, 779 p. 정행사.
- Horne, R. W. and Wildy, P. 1963. Virus structure revealed by negative staining. *Advan. Virus Res.* 10: 101-170.
- Lee, D. W., Kim, C. H. and Lee, D. U. 2001. Effect of culture conditions on the biosynthesis of gagaminine, a potent antioxidant from the roots of *Cynanchum wilfordii*. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1451-1453.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Niu, J. Z., Ye, B. K. and Wang, D. F. 1988. Observation of the protection effect of Baishouwu towards the liver of the high serum cholesterol mouse. *Acta Medica Sinica* 3: 266-268.
- 농촌진흥청 작물과학원 작물정보센터.
- 농약공업협회. 2010. 농약사용지침서 1199 pp.
- Shan, L., Liu, R. H., Shen, Y. H., Zhang, W. D., Zhang, C., Wu, D. Z., Min, L., Su, J. and Xu, X. K. 2006. Gastroprotective effect of a traditional chinese herbal drug "Baishouwu" on experimental gastric lesions in rats. *J. Ethnopharmacology* 107: 389-394.
- Shan, L., Zhang, W. D., Zhang, C., Liu, R. H., Su, J. and Zhou, Y. 2005. Antitumor activity of crude extract and fractions from root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. *Phytotherapy Research* 19: 259-261.
- Song, J. M. and Ding, X. L. 1997. Study on the scavenging effect of Baishouwu on superoxide free radicals. *Chinese Wild Plant Resources* 17: 1-4.