

옥시페탈룸에서 발생한 토마토반점위조바이러스 국내 첫 보고

First Report of Tomato Spotted Wilt Virus in *Oxypetalum coeruleum* in Korea***Corresponding author**

Tel: +82-63-270-4188

E-mail: jyyoon@jbnu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1646-7310>백이슬¹ · Peter Palukaitis¹ · 윤주연^{2,3*} ¹서울여자대학교 원예생명조경학과, ²전북대학교 식물방역학과, ³전북대학교 농식품융합학과Eseul Baek¹, Peter Palukaitis¹, and Ju-Yeon Yoon^{2,3*} ¹Department of Horticultural Sciences, Seoul Women's University, Seoul 01797, Korea²Department of Plant Protection and Quarantine, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea³Department of Agricultural Convergence Technology, Jeonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

Oxypetalum coeruleum, commonly known as Tweedia, is a perennial herbaceous plant of the *Apocynaceae* family native to southern Brazil and Uruguay. Tweedia plants are grown as one of the most popular ornamental flowers for floral arrangement in Korea. In May 2021, several tweedia plants in a single greenhouse in Gimje, Jeollabuk-do were found to show virus-like symptoms including necrotic rings, vein-clearing, chlorotic mottle, and mosaic on the leaves, and necrosis on the stems. Here, we have identified tomato spotted wilt virus (TSWV) in symptomatic tweedia leaves by applying high-throughput RNA sequencing. In the result, a single infection by TSWV was verified without mixed infections of different virus species. To confirm the presence of TSWV, a reverse transcription polymerase chain reaction was performed with a specific primer set to the N gene of TSWV. The complete genomic sequence of L, M, and S segments of TSWV 'Oxy' isolate were determined and deposited in GenBank under accession numbers LC671525, LC671638, and LC671639, respectively. In the phylogenetic tree analysis by maximum likelihood method, 'Oxy' isolate showed a high relationship with TSWV 'Gumi' isolate from *Gerbera jamesonii* in Gyeongsangbuk-do, Korea; for all three RNA segments. To our knowledge, this is the first report of TSWV infection of *O. coeruleum* in Korea.

Keywords: Identification, *Oxypetalum coeruleum*, Tomato spotted wilt virus

Received August 11, 2022

Revised September 19, 2022

Accepted September 26, 2022

서론

Oxypetalum coeruleum 또는 *Tweedia Caerulea*로 표기되는 옥시페탈룸은 박주과리과에 속하는 여러해살이 풀로 브라질 남부와 우루과이가 원산지이다. 국내에는 블루스타로도 알려져 있으며 직경 2-3 cm의 별모양의 꽃형태와 독특한 색으로 최

근 국내에서도 분화 및 절화용으로 인기 있는 수입화훼 식물이다. 특히 스프레이 국화, 스타티스, 안개초 등과 함께 절화 장식을 위한 필러플라워로 사용되고 있다(Ok, 2009; Yoo 등 2010). 현재까지 전 세계적으로 옥시페탈룸에서 발생된 바이러스병에 대한 기록은 없으나 토마토반점위조바이러스(tomato spotted wilt virus, TSWV)와 아라우지아모자이크바이러스(Araujia mosaic virus, ArjMV)의 기주식물 중 하나로서 보고된 바 있다(Elliott 등, 2009; EPPO, 2020; Parrella 등, 2003; Verhoeven과 Roenhorst, 1998). TSWV은 *Orthospovirus*에 속하는 대표적

Research in Plant Disease

eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

인 바이러스로 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella accidentalis*)를 비롯한 10여종의 매개충에 의해 전염하는 것으로 알려져 있다 (Morse와 Hoddle, 2006). TSWV는 현재까지 총 1,090여종의 기주식물에 감염시키는 것으로 알려져 있으며 국내에서는 2004년 파프리카에서 최초 보고된 이후 고추, 토마토, 상추 등의 채소 및 화훼, 약용작물로 피해가 확산되고 있다(Cho 등, 2020; Choi 등, 2010, 2014; Chung 등, 2006, 2021; Kim 등, 2004, 2018; Kwak 등, 2020, 2021; Parrella 등, 2003; Yoon 등, 2016, 2019). 본 연구에서는 2021년 전북 김제시 화훼 시설재배 농가에서 재배 중인 옥시페탈룸의 잎과 줄기에서 퇴록, 윤문반점 및 검은 줄무늬 괴사 등의 바이러스 의심 증상이 발견되어 역전사중합효소 연쇄반응법(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 및 차세대염기서열분석(next generation sequencing, NGS)을 통해 TWSV에 의한 감염을 국내 처음으로 확인하였다. 또한 옥시페탈룸에서 분리한 TSWV 분리주(TSWV-Oxy)의 전체 염기서열을 분석하여 다른 TSWV 분리주와의 유전자 상동성 및 계통분석을 통해 분리주들간의 연관성을 분석하였다.

재료 및 방법

바이러스원 확보 및 접종. 2021년 5월 전북 김제 화훼류 시설하우스에서 재배되고 있는 옥시페탈룸에서 바이러스 의심 증상이 발견되었다. 잎에는 윤문무늬를 동반한 괴사증상 및 퇴록, 모자이크 증상이 나타났고, 줄기에는 검은 줄무늬의 전형적인 토스포바이러스 감염증상이 확인되었다(Fig. 1). 원인 바이러스의 동정을 위하여 병징을 나타내는 옥시페탈룸 잎 4점을 채집하여 공시재료로 사용하였다.

바이러스 증상을 보이는 옥시페탈룸 감염잎 1 g을 막자사발에 넣고 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) 10 ml을 넣어 마쇄한 조즙액을 다음 carborundum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 뿌린 6-8엽의 청양고추(*Cap-sicum annuum* L.) 떡잎에 도말하여 바이러스를 감염시켰다. 식물체는 온실에서 2주간 유지시켜 상엽에 바이러스 병징이 나타나는 것을 확인하였다.

Total RNA 추출 및 차세대 염기서열 분석. 옥시페탈룸에 감염된 바이러스의 유전자 진단을 하기 위해 핵산을 추출하였다. 식물잎 0.1 g을 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 액체질소로 마쇄하였으며 RNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 권장 매뉴얼에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 핵산 순도와 농도는 NanoDrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 결정하였으며 추출된 RNA는 소량

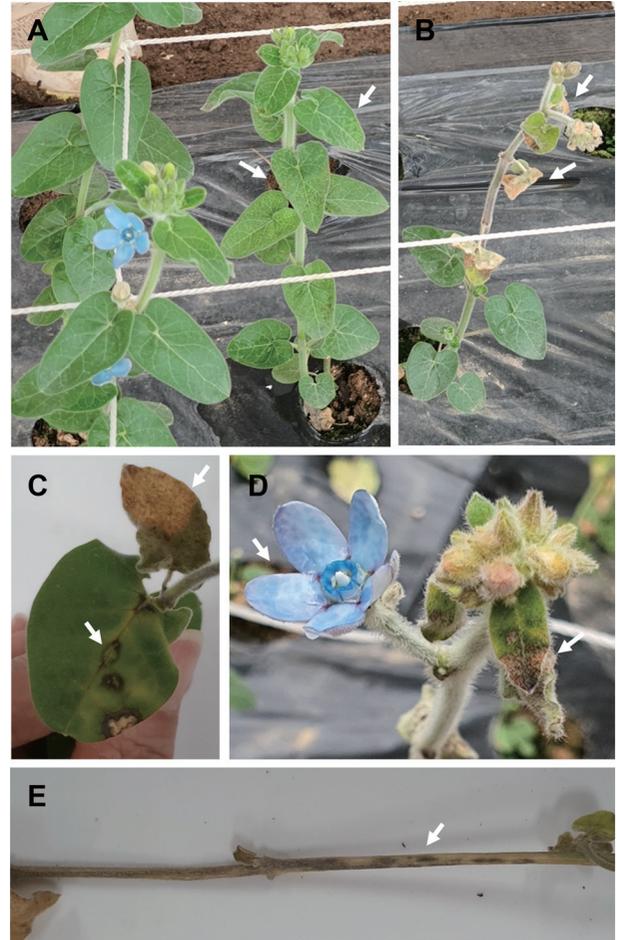


Fig. 1. Symptoms of on the leaves, flowers, and stems of oxypetalum plants infected with tomato spotted wilt virus. Symptomatic leaves showing necrotic ring spot, chlorosis, and mosaic (A-C), flower showing color breaking (D), and stems showing necrosis (E). Arrows indicate the viral symptoms.

씩 분주하여 -80°C 에 보관하여 이후 실험에 사용하였다.

추출된 RNA를 이용하여 TruSeq RNA library Preparation Kit V2 (Illumina, San Diego, CA, USA)을 통해 cDNA library를 구축하였으며, Macrogen (Daejeon, Korea)의 Illumina HiSeq4000 sequencer를 이용하여 high-throughput sequencing 분석을 수행한 이후, Trinity program (ver. 2.10.0)을 통해 *de novo* transcriptome assembly를 구축하였다. 조립된 전사체들 중 BLASTX에 적용하여 바이러스 유전자와 관련된 contig들을 선발하였으며 선발된 유전자들에서 open reading frame (ORF) 예측은 ORFfinder 프로그램(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)을 통하여 수행되었다. 유전자 상동성 분석은 DNASTar 소프트웨어(DNASTar, Madison, WI, USA)의 MegAlign 프로그램을 이용하여 수행되었으며, 유전자계통분석은 MEGA 11 프로그램의 maximum likelihood 방법으로 수행되었다. 계통수

의 가치에 대한 통계적 유의성은 bootstrap 1,000반복을 하여 수행되었다(Kumar 등, 2018).

RT-PCR. NGS 분석결과를 바탕으로 TSWV 존재를 확인하기 위해 바이러스 의심증상을 보인 옥시페탈룸과 고추의 잎에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. One step RT-PCR은 SuPrimeScript RT-PCR Premix (Genet-bio, Nonsan, Korea)를 이용하였으며 추출된 RNA 10 ng과 TSWV 특이적인 진단 프라이머 세트(TSWV-NCP-For, 5'-ATGTCTAAGGTTA-AGCTCACTAAGGAA-3'; TSWV-NCP-Rev, 5'-TTAAGCAAGTTCT-GCAAGTATTGCCTG-3')를 각각 10 pmol씩 넣고 제조회사의 실험방법에 따라 수행되었다. RT-PCR 조건은 50°C에서 30분, 95°C에서 2분 동안 역전사반응을 수행하고 이어 95°C 15 초, 55°C 30초, 72°C, 50초를 35회 반복한 다음, 72°C에서 5분 진행하여 반응을 종료하였다. 전기영동은 0.5× TBE 완충액와 1.0% 아가로스 젤에서 실시하였고, DNA 사이즈 마커로 HiQ 100 bp plus DNA ladder (BioD, Gwangmyeong, Korea)를 이용하였다. PCR 증폭 산물은 130 V에서 40분 동안 전기영동 후 Gel Doc XR+ gel documentation system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

바이러스 병징 및 피해. 시설하우스에서 토경재배되고 있는 옥시페탈룸에서 바이러스 의심증상을 보였다. 초기병징으로 잎 전체에 퇴록증상이 나타났으며 몇몇 잎에서 잎에는 운문무늬를 동반한 괴사증상이 확인되었다(Fig. 1A). 병징이 진전됨에 따라 생육이 저하되는 모습을 보였으며 줄기와 상엽이 괴사되는 증상이 나타나고 꽃에도 color breaking이 관찰되었다(Fig. 1B-E). 재배중인 옥시페탈룸의 약 30% 정도 유사한 피해증상이 확인되었다. 옥시페탈룸 잎 뒷면에서 점박이 응애가 발견되었으나 밀도는 적었으며 꽃 내부에서 총채벌레(잎당 1-2마리)를 발견하였다.

TSWV 분리동정 및 병원성 분석. NGS 분석을 통해 조립된 전사체중 바이러스에 해당하는 contig는 총 5개였으며 모두 TSWV의 유전자에 해당하였다. 이들은 옥시페탈룸 전체 리드의 27% 비중을 차지했으며 각 500 bp 이하의 길이를 가진 cotig 2 개를 제외한 3종류 contig는 각각 TSWV를 구성하는 세개의 절편 S, M, L에 해당하였다. 세종류의 전사체들을 NCBI BLAST 분석한 결과 모두 TSWV 유전자와의 95.3-99.9%의 상동성을 확인하였으며 그 외 다른 식물바이러스 유전자는 확인되지 않았다. 이러한 결과로 옥시페탈룸에서 나타나는 바이러스의 증상이

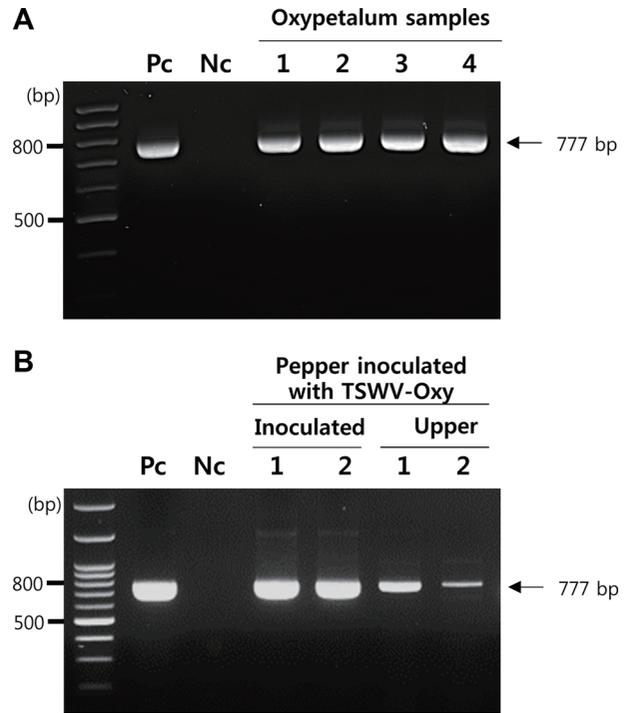


Fig. 2. Detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) by reverse transcription polymerase chain reaction with a TSWV-specific primer set from the symptomatic leaves of four oxyptetalum plants cultivated in the plastic tunnel (A) and from the inoculated and upper leaves of two pepper (*Capsicum annuum* cv. Cheongyang) plants infected with TSWV-Oxy (B). Arrows mark 777 bp in DNA-size standard. Pc and Nc indicate positive and negative controls, respectively.

TSWV 단독감염에 의한 것으로 판단하였으며 TSWV 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 예상 사이즈인 777 bp의 DNA 밴드가 확인되었다(Fig. 2A). 병원성을 분석하기 위해 옥시페탈룸에서 분리한 TSWV를 'Oxy' 분리주(TSWV-Oxy)로 명명하고 병징이 있는 잎을 TSWV의 기주식물인 고추(*Capsicum annuum* cv. 'Cheongyang')에 접종하여 감염 여부를 확인하였다. 감염 후 10일 후 접종엽 및 상엽을 채취하여 RT-PCR 진단한 결과 모든 잎에서 TSWV가 검출되었다(Fig. 2).

TSWV-Oxy 전체 염기서열 결정 및 유연관계 분석. TSWV-Oxy를 구성하는 세개의 절편인 S (2,971 nt), M (4,774 nt) 및 L (8,920 nt)의 전체 염기서열을 결정하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank에 다음과 같은 accession no. (L segment, LC671525; M segment, LC671638; S segment, LC671639)로 등록하였다. TSWV-Oxy에 대한 유연관계 분석을 위해 NCBI에 등록된 TSWV 분리주 13종을 대상으로 S, M, L 유전체의 염기서열 상동성을 비교한 결과, 각각 95.5-99.7%, 95.9-99.7%, 95.3-99.8%의 유사성을 보였다(Fig. 3). 특

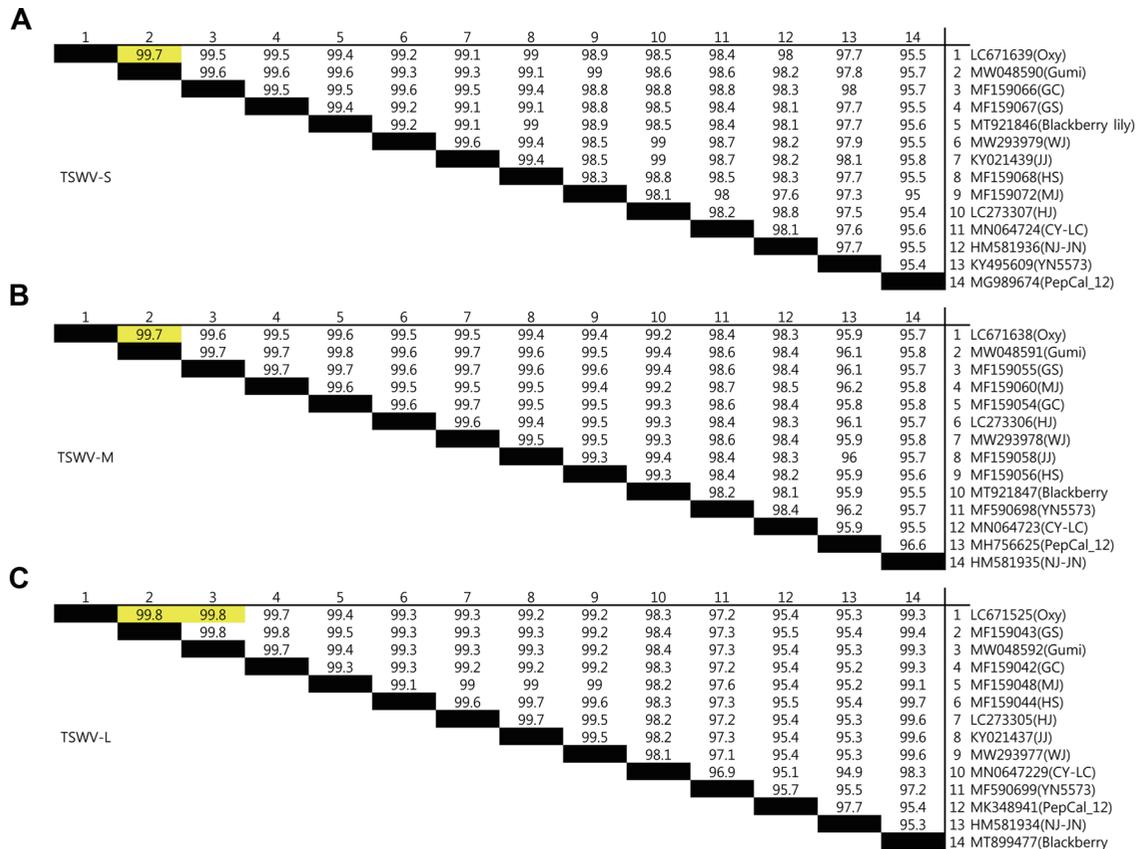


Fig. 3. The comparison of nucleotide sequence identity of tomato spotted wilt virus (TSWV) Oxy isolate with other TSWV isolates retrieved from GenBank database, based on a CLUSTAL W alignment prepared using MegAlign program of DNASTar software. Alignments were generated using the complete nucleotide sequences of S (2,971 bp), M (4,774 bp), and L (8,920 bp) genome segments of TSWV-Oxy. The range of nucleotide sequence identity of S, M, and L segment to those of other TSWV isolates were 95.5–99.7%, 95.7–99.7%, and 99.3–99.8%, respectively. TSWV-Oxy was most closely related to ‘Gumi’ isolate for all three RNA segments (A–C). ‘GS’ isolate (MF159043) was also showed a high homology with TSWV-Oxy for the L segment (C).

히 TSWV-Oxy 유전체는 경상북도 거베라 재배지에서 분리된 ‘Gumi’ 분리주(MW048590, MW048591, MW048592)와 가장 상동성이 높았으며, TSWV-Oxy의 L 유전체의 경우 국내 고추에서 분리된 ‘GS’ 분리주(MF159043)와도 99.8%로 동일하게 상동성이 높았다(Fig. 3C). MEGA 11 프로그램의 maximum likelihood 방법을 이용하여 ‘Oxy’ 분리주와 다른 TSWV 분리주들과의 계통학적 연관성을 비교 분석한 결과, S, M, L 유전체 모두 ‘Gumi’ (MW048590), ‘GS’ (MF159067), ‘GC’ (MF159066) 분리주와 같은 그룹에 속하는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 염기서열 분석 결과를 바탕으로 옥시페탈룸을 감염시킨 TSWV는 국내에서 거베라를 포함한 화훼 또는 고추 재배지에 주로 발생하는 TSWV 일반계통으로 확인되었다. 옥시페탈룸은 종자 및 삽목으로 시설하우스에서 연간 지속적으로 재배되는 작물이고 겨울에도 생육 적온 15°C에서 재배된다(Ortiz 등, 2014). TSWV는 종자전염이 되지 않기 때문에 시설하우스에서 서식하는 총채벌레에 의해 TSWV가 전염되었을 것으로 추정되므로 시설하

스의 TSWV 확산을 막기 위해서는 총채벌레 외부유입 및 개체 수 증가를 억제할 수 있도록 관리가 절실히 요구된다(Dominiguez 등, 2019). 현재까지 옥시페탈룸은 TSWV 기주식물 중 하나로 기록되어 있으나, TSWV의 발생보고, 분리주 정보 및 증상에 대해서는 알려진 바 없다(Parrella 등, 2003; Verhoeven과 Roenhorst, 1998). 본 연구는 국내 옥시페탈룸(*O. coeruleum*)에서 발생한 TSWV에 관한 최초 보고이다.

요 약

2021년 5월 전북 김제시 화훼류 시설재배 농가에서 재배중인 옥시페탈룸(*Oxypetalum coeruleum*)에서 원형괴사 반점등의 전형적인 바이러스 감염 증상을 보이는 잎을 발견하였다. 이상 증상을 보이는 옥시페탈룸에서 원인 바이러스를 동정하기 위해 high-throughput sequencing을 수행한 결과 tomato spotted wilt virus (TSWV)에 의한 단독 감염이 확인되었다. TSWV의 감염

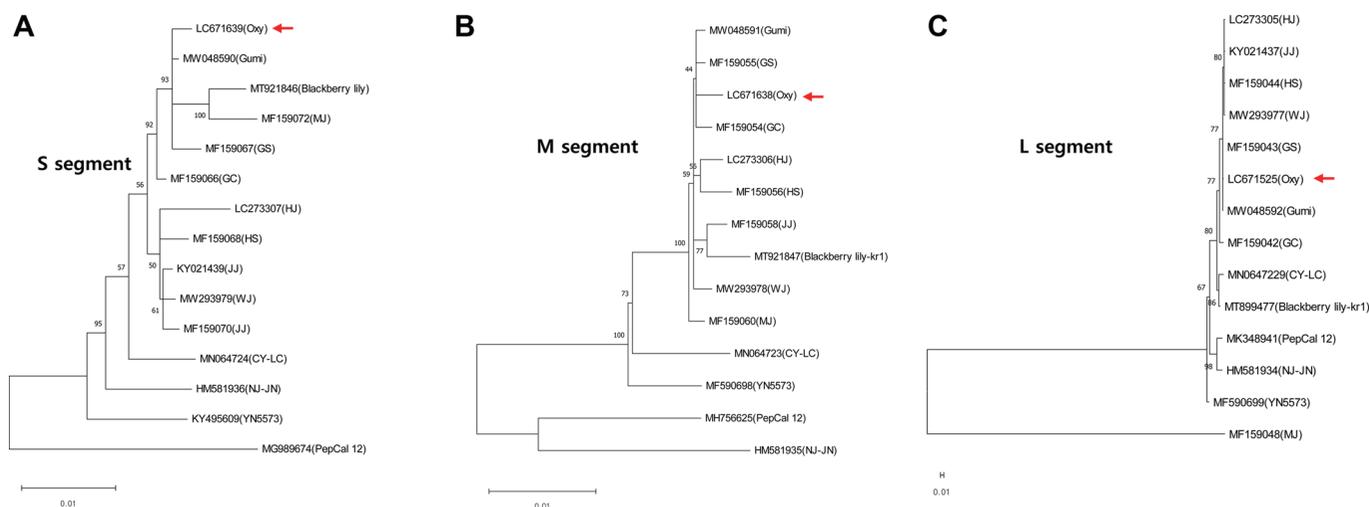


Fig. 4. Phylogenetic analysis using the complete nucleotide sequences of the S (A), M (B), and L (C) RNA segments of tomato spotted wilt virus (TSWV)-Oxy and other 13 TSWV isolates was conducted by maximum likelihood method of MEGA 11. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The red arrows indicate position of S, M, and L segment of TSWV-oxy, respectively. Phylogeny test was conducted by bootstrap method and number of bootstrap replications were 1,000.

을 확인하기 위해 TSWV 특이적인 프라이머를 이용하여 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 진단을 수행한 결과 777 bp의 예상 사이즈의 polymerase chain reaction 산물이 검출되었으며, TSWV의 기주인 청양고추(*Capsicum annuum* cv. 'Cheongyang')에 접종한 결과 TSWV의 전형적인 운문 무늬가 관찰되었으며 RT-PCR 진단법으로 고추에 감염된 TSWV를 확인할 수 있었다. 옥시페탈룸에서 분리한 TSWV (TSWV-Oxy)의 전체 염기서열을 결정하였으며, 기 보고된 13종 TSWV 분리주들의 S, M, L 유전체 염기서열과 상동성을 비교하였다. 'Oxy' 분리주는 국내 거베라에서 분리된 'Gumi' 분리주(MW048590, MW048591, MW048592)와 가장 상동성이 높았으며, 계통학적 연관성을 비교 분석한 결과 거베라 분리주 'Gumi' 및 고추 분리주인 'GS' (MF159043)와 'GC' (MF159066)와 가장 유연관계가 높은 것으로 확인되었다. 옥시페탈룸은 줄기삽목 혹은 종자로 증식되는 작물로서 시설재배지에서 연속적으로 재배되는 작물이다. TSWV는 총채벌레에 의해 잡초 등 TSWV 감염주로부터 시설재배지로 유입되어 발생되었을 것으로 판단된다. 옥시페탈룸은 TSWV의 기주 중 하나로 보고되었으나 전 세계적으로 발생 및 증상에 관한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 우리나라에서 옥시페탈룸에서 TSWV 발생에 관한 최초의 보고이다.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture and Forestry (IPET) Grant number: 32003533HD020 and by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through, Agriculture, Food and Rural Affairs Convergence Technologies Program for Educating Creative Global Leader Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (321001-03).

References

Cho, S.-Y., Kim, S.-M., Kim, S. and Lee, B. C. 2020. First report of tomato spotted wilt virus infecting *Arachis hypogaea* in Korea. *J. Plant Pathol.* 102: 271.
 Choi, H. S., Lee, S. H., Kim, M. K., Kwak, H. R., Kim, J. S., Cho, J. D. et al. 2010. Occurrence of virus diseases on major crops in 2009. *Res. Plant Dis.* 16: 1-9. (In Korean)
 Choi, S.-K., Cho, I. S., Choi, G.-S. and Yoon, J.-Y. 2014. First report of tomato spotted wilt virus in *Brugmansia suaveolens* in Korea. *Plant Dis.* 98: 1283.
 Chung, B. N., Pak, H. S., Jung, J. A. and Kim, J. S. 2006. Occurrence of tomato spotted wilt virus in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *Plant Pathol. J.* 22: 230-234.
 Chung, B. N., Yoon, J.-Y. and Cho, I.-S. 2021. First report of tomato

- spotted wilt virus on *Iris domestica* in South Korea. *Res. Plant Dis.* 27: 32-37.
- Dominguez, G. R., Siclán, M. L. S., Ortigoza, C. A., Martínez, J. G. A. and Dávila, J. F. R. 2019. Tomato spotted wilt *Orthotospovirus* (TSWV) is not transmitted by tomato seed. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 10: 1449-1455.
- Elliott, M. S., Massey, B., Cui, X., Hiebert, E., Charudatan, R., Waipara, N. et al. 2009. Supplemental host range of Araujia mosaic virus, a potential biological control agent of moth plant in New Zealand. *Aust. Plant Pathol.* 38: 603-607.
- EPPO. 2020. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. *Tomato spotted wilt virus*. URL <http://www.eppo.org> [11 August 2022].
- Kim, J.-H., Choi, G.-S., Kim, J.-S. and Choi, J.-K. 2004. Characterization of tomato spotted wilt virus from paprika in Korea. *Plant Pathol. J.* 20: 297-301
- Kim, M., Kim, J. E., Kim, J., Kwak, H. R., Choi, H. S., Lee, H. J. et al. 2018. First report of tomato spotted wilt virus in *Hoya carnosa* in Korea. *Plant Dis.* 102: 1672.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kwak, H.-R., Hong, S.-B., Choi, H.-Y., Park, G., Hur, O.-S., Byun, H.-S. et al. 2021. First report of tomato spotted wilt virus in *Angelica acutiloba*. *Res. Plant Dis.* 27: 84-90.
- Kwak, H.-R., Son, S.-W., Choi, H.-Y., Go, W.-R., Kim, J.-E. Baek, E. et al. 2020. First report of tomato spotted wilt virus in *Lycium chinense*. *Aust. Plant Dis. Notes* 15: 5.
- Morse, J. G. and Hoddle, M. S. 2006. Invasion biology of thrips. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 67-89.
- Ok, J. J. 2009. A study on the recent trend and characteristics of the bridal bouquet. *J. Korea Floral Art Res. Assoc.* 13: 25-36.
- Ortiz, T. A., Moritz, A., de Oliveira, M. A., Lone, A. B., Nakatani, S. H. and Takahashi, L. S. A. 2014. Optimal conditions for germination of seeds of *Epiphyllum oxypetalum*. *Afr. J. Agric. Res.* 9: 2630-2637.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C. and Marchoux, G. 2003. An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *J. Plant Pathol.* 85: 227-264.
- Verhoeven, J. T. J. and Roenhort, J. W. 1998. Occurrence of tospovirus in the Netherland. In: *Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research*, eds. By D. Peters and R. Golbach, pp. 77-80. Wageningen Agricultural University, Section Virology, Wageningen, The Netherlands.
- Yoo, E. H., Kim, K. J., Jeong, S. J., Han, S. W., Jeong, M. I., Lee, D. W. et al. 2010. Characteristics of floral materials used for commercial flower baskets in Korean Online Market. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 28: 156-157.
- Yoon, J. Y., Choi, G. S. and Choi, S. K. 2016. First report of tomato spotted wilt virus in *Eustoma grandiflorum* in Korea. *Plant Dis.* 101: 515
- Yoon, J. Y., Choi, G. S., Kwon, S. J. and Choi, I. S. 2019. First report of tomato spotted wilt virus infecting *Peperomia obtusifolia* in South Korea. *Plant Dis.* 103: 593.