

우리나라 토마토에 발생한 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl geminivirus*)의 초간편 Virion Capture(VC)/PCR 진단법

조점덕 · 김태성¹ · 김주희² · 최국선 · 정봉남 · 최홍수³ · 김정수^{3*}

농촌진흥청 국립원예특작과학원, ¹경상남도 농업기술원

²전라북도 농업기술원, ³농촌진흥청 국립농업과학원

Convenient Virion Capture (VC)/PCR for *Tomato yellow leaf curl geminivirus* Occurring on Tomato in Korea

Jeom-Deog Cho, Tae-Seong Kim¹, Ju-Hee, Kim², Gug-Seoun Choi, Bong-Nam Chung, Hong-Soo Choi³ and Jeong-Soo Kim^{3*}

National Institute of Horticultural & Herbal Science, R.D.A. Suwon 441-440, Korea

¹Gyeongsangnam-do Agricultural Research & Extension Services, Jinju 660-985, Korea

²Jeollabuk-do Agricultural Research & Extension Services, Iksan 570-704, Korea

³National Academy of Agricultural Science, R.D.A. Suwon 441-707, Korea

(Received on October 30, 2008)

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), a newly reported *Geminivirus* from tomato, generated recently large economic losses in Korea. Development of a fast and precise genetic diagnosis technique for detecting TYLCV which Agricultural research and extension services can utilize easy and handy is very important to prevent yield losses. Virion Capture (VC)/PCR is a simple, accurate and economical genetic detection method without any works or commercial kits for the extraction of the nucleic acid from the infected plants. Primers of twenty two for detection of TYLCV were designed and tested with extracted total DNA or crude sap from tomato leaf infected with TYLCV and healthy plant. Nine primers for total DNA using conventional PCR and another 9 primers for VC/PCR were selected eventually. Primers of six having same specificity were selected from the two methods and tested with other *Geminivirus*, *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) by VC/PCR. Finally specific primers of four were selected for detection of TYLCV using VC/PCR, and Deng (540, 541), a degenerate primer for *Geminivirus* reported in 1996, was also developed for VC/PCR.

Keywords : Tomato, *Tomato yellow leaf curl virus*, Virion Capture (VC)/PCR

우리나라 토마토에 발생하는 주요 바이러스는 오이모자이크바이러스(*Cucumber mosaic virus*), 감자바이러스 Y (*Potato virus Y*), 담배모자이크바이러스(*Tobacco mosaic virus*), 위성 담배모자이크바이러스(*Satellite tobacco mosaic virus*), 토마토모자이크바이러스(*Tomato mosaic virus*)와 토마토반점위조바이러스(*Tomato spotted wilt virus*)가 보고되어 있다(한국식물병리학회, 2004; Kim 등, 2004). 또한 2007년과 2008년에 토마토황화잎말림바이러스(*Tomato*

yellow leaf curl virus; TYLCV)가 경남 통영, 거제, 제주, 전북 익산 등에서 발생하여 중요한 문제 바이러스로 대두되었다(Kwak 등, 2008; Ji 등, 2008). TYLCV는 1960년대 중동지역에서 심하게 발생한 이후로 100%의 경제적 피해를 일으키는 심각한 바이러스로 지금은 거의 전세계 지역에서 발생되고 있다(Czosnek과 Laterrot, 1997; Moriones와 Navas-Castillo, 2000). TYLCV는 담배가루이(*Bemisia tabaci*)가 영속 전염하는 single stranded DNA 바이러스로 *Geminiviridae*과의 *Begomovirus*속으로 분류되며 쌍둥이 형태의 바이러스 입자로 20×30 nm 크기의 구형이다. 토마토 유묘 초기에 감염되면 심하게 위축되면서 가지 끝 신초와 정단 부분이 작아지고 잎이 위쪽으로 구

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-0430, Fax) +82-31-290-0406

E-mail) kimjsoo@rda.go.kr

부러지며 가장자리가 황화되고 전혀 수확을 할 수 없게 된다. TYLCV는 우리나라에서 국가관리 대상바이러스로 지정되어 운영되고 있으며, 발생된 농가의 긴급방제로 피해확산을 방지하는데 최선을 다하고 있다.

그러나 담배가루이의 완전방제가 어렵고 주위의 기주 식물을 완전히 제거하는데도 한계가 있어 재발 가능성이 항상 존재한다. 앞으로 담배가루이의 확실한 방제법이나 바이러스에 대한 저항성 품종 개발이 이루어지겠지만 더 이상의 전염을 방지하여 피해가 나타나지 않도록 하려면 바이러스의 정확하고 신속한 진단에 의한 유묘기 감염주 제거와 살충제 살포 등으로 피해를 예방하는 것이 매우 중요하다. 따라서 농업현장의 연구 지도기관 등 일선 현장에서 손쉽게 이용할 수 있는 유전자 진단법이 개발, 보급되는 것이 매우 중요한 필요성을 지닌다. 본 논문에서는 토마토 시료의 즙액을 이용한 초간편 유전자 진단을 위한 Virion Capture(VC)/PCR법을 개발하여 3시간 이내에 바이러스를 확인하여 빠른 현장 대처로 전염과 피해를 막는데 도움을 주고자 연구를 수행하였다. 또한 Geminivirus에 속하는 다른 바이러스의 진단이 가능한 degenerate primer를 이용한 VC/PCR법을 개발하였다.

바이러스 이병주. 경상남도 통영에서 심한 위축과 상업의 소엽화, 황화 및 잎말림증상의 토마토를 경남농업기술원으로부터 제공받았으며(Fig. 1) 익산과 제주 토마토에 동일한 증상을 보이는 시료를 이용하였다. 건전 토마토는 시판품종 '서광'을 이용하였다.

프라이머 제작. NCBI GenBank에 등록된 토마토잎말림바이러스(TYLCV)의 전체 염기서열 중에서 중국 분리주(GenBank accession No. EU031444)를 이용하여 전체 염기서열에 걸쳐 12종의 프라이머를 DNASTAR Lasergene 7을 이용하여 제작하였다(Table 1). 그 외 TYLCV를 진단하기 위해 이미 개발된 다양한 프라이머와 Geminivirus를



Fig. 1. Tomato showing severe stunt, leaf curl, smaller and chlorosis of leaf margin collected from Tongyeong, Gyunsangnamdo.

Table 1. Primers for detection of Tomato yellow leaf curl virus and/or Geminivirus

No.	Primer	No.	Primer
1	TYLC-303	12	TYS-800 ^a
2	TYLC-A324	13	TYRB-800 ^d
3	TYLC-376	14	TYLC-C806
4	TYLC-A377	15	*GD2-912 ^b
5	TYLC-390	16	TYLC-C962
6	TYLC-B413	17	TYLC-B985
7	TYLC-546	18	*GD3-1100 ^c
8	*GD1-550 ^a	19	TYCP-1274
9	TY-570 ^d	20	TYCP-1344
10	TYRA-570 ^d	21	TY(1,2) ^e
11	*GD3-750 ^c	22	*Deng (540,541) ^e

^a Wyatt and Brown, 1996.

^b Li and Hurtt, 2004.

^c Rojas *et al.*, 1993.

^d Davino *et al.*, 2007.

^e Deng *et al.*, 1994; Morris, 2000.

* Degenerate primer for detection of Geminivirus.

진단할 수 있는 degenerate 프라이머 10종(Table 1)을 동시에 이용하였다(Davino 등, 2007; Deng 등, 1994; Li 등, 2004; Morris, <http://www.csl.gov.uk>; Rojas 등, 1993; Wyatt and Brown, 1996). 증폭조건은 보고된 프라이머에 이용된 증폭조건을 평균치를 이용하여 94°C에서 2분 → [94°C에서 30초 → 60°C에서 30초 → 72°C에서 1분 30초] 35 cycles로 증폭한 후 72°C에서 10분간 처리하는 조건으로 실험하였다.

DNA 순수분리. 제작한 프라이머의 특이성을 확인하고 증폭 조건을 설정하기 위해 기본 재료로 순수 분리한 DNA를 이용하였다. 통영에서 채집한 토마토와 익산과 제주에서 채집한 토마토, 그리고 건전한 '서광' 토마토로부터 각각 DNA를 분리하였다. DNA분리는 QIAGEN에서 제공하는 Dneasy Plant Mini kit를 이용하여 제시된 과정으로 순수 분리한 후 냉동 보관하여 이용하였다. DNA를 이용한 PCR은 Promega의 AccessQuick™ System을 이용하여 master mix 10 ul, 10 pmol 프라이머 F와 R을 각각 1 ul씩 넣었으며, 분리한 DNA 2 ul를 넣고 nuclease-free water로 최종부피를 20 ul로 만들어 증폭한 후 0.05% Goldview® 넣은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

Virion Capture (VC)/PCR. 식물체 즙액 추출 완충액(EB)은 0.5% sodium sulfite가 첨가된 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.0을 이용하였다. 식물체 무게 비율로 EB를 1:3(무게:부피)으로 넣고 마쇄하였다. PCR 튜브를 준비하고 마쇄한 즙액을 30~50 ul 넣고 37°C에서

10분간 처리한 후 0.05% Tween-20을 첨가한 EB로 2번 세척하여 튜브 안의 내용물을 세척하였다. PCR 튜브를 얼음 위로 옮기고 nuclease-free water를 이용하여 한 번 더 튜브 내부를 세척하였다. Promega의 AccessQuick™ System을 이용하여 master mix를 10 ul, 10 pmol 프라이머 F와 R을 각각 1 ul씩 넣고 nuclease-free water로 최종 20 ul로 만들어 넣고 설정한 증폭조건에서 PCR한 후 0.05% Goldview® 넣은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였다(Cho 등, 2006; 2007).

순수분리 DNA 이용 일반 PCR에 의한 프라이머 선정. TYLCV 감염 토마토와 건전 토마토로부터 분리한 전체 DNA를 이용하여 제작한 22종의 프라이머로 일반적 증폭 결과 감염주에 대해 특이성을 나타낸 프라이머는 Table 1의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22번의 16종이었으며 건전주에 대해 비 특이 밴드가 없는 특이적 프라이머는 8, 9, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22번의 10종이었다. 따라서 감염주에 특이성이 있으며 건전주에 비 특이적인 프라이머는 9, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22번으로 총 9개가 선정되었다(Fig. 2).

식물즙액 이용 VC/PCR에 의한 프라이머 선정. TYLCV 감염 토마토와 건전 토마토에서 조즙액을 채취하여 VC/PCR 진단법으로 22종의 프라이머에 대한 특이성 검정한 결과 감염주에 대해 특이성을 나타낸 프라이머는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 16, 17, 21, 22, (19,20)번으로 15종이었으며 건전주에 대해 비 특이적인 프라이머는 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22

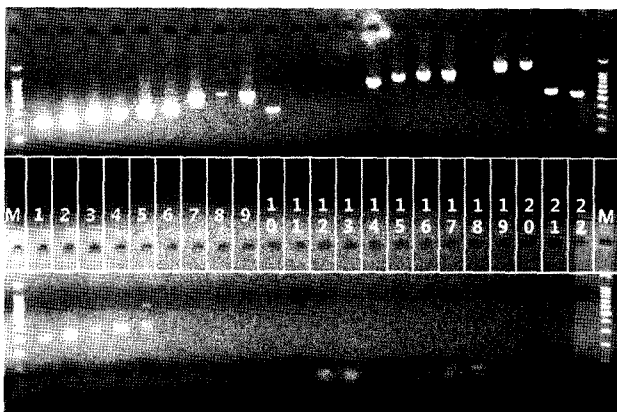


Fig. 2. Specificity test of 22 primers by PCR using DNA extracted from tomato collected at Tongyeong area and healthy tomato plant. The number in the white box in the middle of the graphic is a name of primers noticed on Table 1 and M is a marker sized 100 pair ladder. The upper graphic of the white box is results from tomato infected with *Tomato yellow leaf curl virus*, and the lower one is results from healthy tomato. Specific primers selected from the infected and healthy tomatoes were 9, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21 and 22.

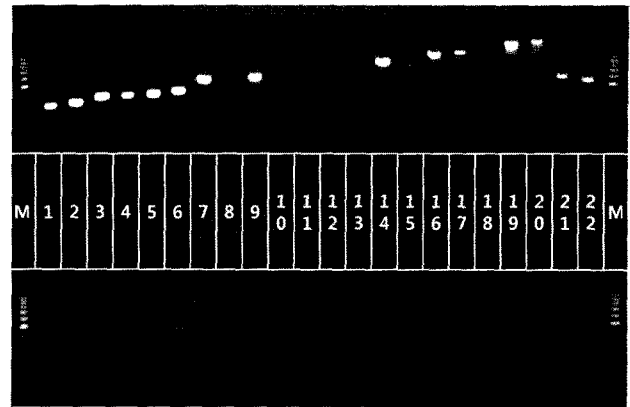


Fig. 3. Specificity test of primers of 22 by Virion Capture (VC)/PCR using crude sap extracted from tomato collected at Tongyeong area and healthy plant. The number in the white box in the middle of the graphic is a name of primers noticed on Table 1 and M is a marker sized 100 pair ladder. The upper graphic of the white box is results from tomato infected with *Tomato yellow leaf curl virus*, and the lower one is results from healthy tomato. Specific primers selected from the infected and healthy tomatoes were 1, 5, 7, 9, 14, 16, 17, 21 and 22.

번으로 17종이었다. 따라서 감염주에 특이적이며 건전주에 비 특이적인 프라이머는 1, 5, 7, 9, 14, 16, 17, 21, 22번으로 총 9종이 선정되었다(Fig. 3).

프라이머 22종에 대해 일반적인 PCR 진단법과 VC/PCR 진단법에서 모두 특이성을 나타낸 프라이머는 9, 14, 16, 17, 21, 22번으로 6종이 최종 선발되었다. 프라이머 16번(TYLC-C962)을 이용하여 증폭한 cDNA를 QIAGEN사의 QIAquick® PCR Purification Kit를 이용하여 순수 분리하여 염기서열을 분석하였다. 962base pair중에서 공통 서열인 858base pair에 대해 NCBI의 Blast search를 통해 등록되어있는 TYLCV 유전자와 비교한 결과 99%의 상동성을 나타내어 TYLCV임을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 TYLCV를 진단하기 위한 VC/PCR법은 핵산을 따로 분리할 필요가 없어 경제적이며 3시간 이내에 감염 여부 결과 확인이 가능한 빠르고 간편하며 정확한 유전자 진단법임을 확인하였다.

VC/PCR진단법을 이용한 TLCV에 대한 특이성 시험. PCR과 VC/PCR결과에 의해 최종 선발된 TYLCV진단용 6종의 프라이머를 이용하여 익산과 제주에서 채집한 TLCV감염 토마토에 대해 VC/PCR 유전자 진단법으로 특이성을 시험하였다. 6종의 프라이머 중 9번과 21번은 TYLCV에 대해 이전 결과와 달리 비 특이 밴드가 나타난 것은 프라이머 자체의 불안전성으로 판단된다. 그러나 나머지 4종의 프라이머들은 TYLCV에 감염된 통영 토마토에 특이성이 확인되었으며 *Genimivirus*의 degenerate

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident	
AB116631.1	Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Japan: Misumi: Stellaria] DNA, complete genome	1539	1539	100%	0.0	99%	
AB116630.1	Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Japan: Omura: Eustoma] DNA, complete genome	1539	1539	100%	0.0	99%	
AB116629.1	Tomato yellow leaf curl virus-Israel [Japan: Mivazaki] DNA, complete genome	1539	1539	100%	0.0	99%	
AF107117.1	Tomato yellow leaf curl virus - Israel DNA, complete genome, strain	1538	1535	100%	0.0	99%	
AY594170.1	Tomato yellow leaf curl virus from Egypt, complete genome	1517	1512	100%	0.0	99%	
EF455426.1	Tomato yellow leaf curl virus isolate cucumber, complete genome	1516	1508	100%	0.0	99%	
AF155955.1	Tomato yellow leaf curl virus TYLCV virion DNA	1516	1508	100%	0.0	99%	
AF763295.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild V1, V2, C1, C2, C3 and C4 genes	1496	1496	100%	0.0	98%	
EF054698.1	Tomato yellow leaf curl virus from Jordan, complete genome	1494	1494	100%	0.0	98%	
EF456044.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild, complete genome	1490	1490	100%	0.0	98%	
AB116630.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Japan: Kiso-zaki] DNA, complete genome	1490	1490	100%	0.0	98%	
AF439547.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Tokai] DNA, complete genome	1485	1485	100%	0.0	98%	
AF105075.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Portugal] complete genome	1485	1485	100%	0.0	98%	
EU142745.1	Tomato yellow leaf curl virus-Mild from cucumber, complete genome	1481	1481	100%	0.0	98%	

Fig. 4. Blast search resulted with sequences from cDNA sized 858base pair from primer of TYLC-962 for detection of *Tomato leaf curl virus* by VC/PCR. The sequence has 99% similarity with 7 isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* including GenBank accession Number AB116631.1.

Table 2. Optimum primers for detection of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Genimivirus* species

No.	Primer	Sequences	Product size (bp)
14	TYLC-C-806-F	GCCGCGCCTTTTCTTTTTTA	806
	TYLC-C-806-R	GGTTGCGGTA CTGGGCTCATTATC	
16	TYLC-C-962-F	GCCGCGCCTTTTCTTTTTTA	962
	TYLC-C-962-R	ATACTTGGCTGCCTCCTGATGA	
17	TYLC-B985-F	GCCGCGCCTTTTCTTTTTATG	985
	TYLC-B985-R	AAGGCGTTTTCAGTATGGTTCTCA	
22	Deng 541	TAA TAT TAC CKG WKG VCC SC	550
	Deng 540	TGG ACY TTR CAW GGB CCT TCA CA	

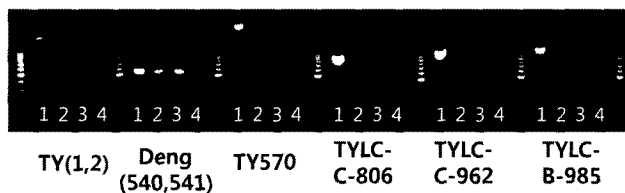


Fig. 5. Specificity test with 6 primers for *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) against *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) through Virion Captur/PCR method.

Primers of TY(1,2) and TY-570 made non-specific bands about TYLCV. Lane 1, tomato infected with TYLCV from Tongyeong area, showed specificity with primers of Deng (540, 541), TYLC-C-806, TYLC-C-962 and TYLC-B-985. Tomato infected with TLCV collected from Iksan area (lane 2) and Jeju area (lane 3) showed specificity with primer of Deng (540, 541). Lane 4 by healthy tomato leaf showed high specificity in all primers. Marker is a 100 base pair ladder and thick band in the middle has 500 base pair.

primer인 Deng(540, 541)은 TYLCV와 TLCV에 모두 특이적으로 잘 증폭되었다(Table 2). Deng(540, 541) 프라이머에 대해 VC/PCR 진단법이 개발되어 Geminivirus를 경제적이며 빠르고 쉽게 3시간 이내에 진단할 수 있게 되었다.

요 약

국내에서 최근 발견된 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)가 토마토에 발생하여 큰 피해가 발생하였다. TYLCV의 피해 발생 예방을 위하여 농업현장의 연구지도연구기관에서 쉽고 간편하게 사용할 수 있는 조기 정밀 유전자 진단기술 개발은 매우 중요하다. TYLCV에 대해 특이적 프라이머를 제작하고 특별한 핵산분리 기술이나 도구가 필요 없는 빠르고 정확하며 경제적인 VC/PCR 진단법을 이용한 유전자 진단법을 개발하였다. TYLCV 진단용 프라이머를 22개 제작하여 감염주 및 건진 토마토의 전체 핵산을 이용해 특이성 검정으로 PCR용으로 9점을 선발하였고, VC/PCR 진단법용으로 9종을 선발하였다. 이러한 두 가지 진단법에 모두 특이적인 프라이머를 6종을 선발한 후 TLCV로 알려진 다른 Geminivirus와의 특이성 검정결과로 총 4종이 최종 선발하였다. 이들 중 Deng(540,541) 프라이머는 Geminivirus를 진단할 수 있는 degenerate 프라이머로 VC/PCR진단법이 개발되었다.

참고문헌

- Cho, J. D., Kim, J. S., Kim, H. R., Chung, B. N. and Ryu, K. H. 2006. Convenient nucleic acid detection for *Tomato spotted wilt virus*: Virion captured/RT-PCR (VC/ RT-PCR). *Res. Plant Dis.* 12: 139-143.
- Cho, J. D., Kim, J. S., Lee, S. H. and Chung, B. N. 2007. Triplex virion capture (VC)/RT-PCR for three seed transmissible tobamoviruses of CGMMV, ZGMMV and KGMMV occurring on Curubitaceae. *Res. Plant Dis.* 13: 82-87.
- Czosnek, H. and Laterrot, H. 1997. A world-wide survey of *Tomato yellow leaf curl viruses*. *Arch. Virol.* 142: 1391-1406.
- Davino, S., Davino, M. and Accotto, G. P. 2007. A single-tube PCR assay for detecting viruses and their recombinants that cause tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *J. Virol. Methods* doi:10.1016/j.jviromet.
- Deng, D., McGrath, P. F., Robinson, D. J. and Harrison, B. D. 1994. Detection and Differentiation of whitefly-transmitted Gemini-viruses in plants and vector insects by the Polymerase chain reaction with degenerate primers., *Ann. Appl. Biol.* 125: 327-336.
- 한국식물병리학회. 2004. 한국식물병명명목록 제 4판. 236 pp.
- Henryk Czosnek. 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Israel. Association of applied biologists. Description No. 368.
- Ji, J., Vijayachandran, L. S., Lee, H. J., Oh, T. K., Kim, S. H., Lee, H. K., Kim, S. C. and Choi, C. W. 2008. Occurrence and characterization of Tomato-infecting geminivirus in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 238 (abstract).
- 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.
- Kwak, H. R., Kim, M. K., Kim, M. J., Ko, S. J., Lee, S. H., Kim, J. S., Kim, K. H., Lee, S. C. and Choi, H. S. 2008. Molecular characterization of begomovirus infecting *Lycopersicon esculentum* in Korea. *Plant Pathol. J.* 24: 237 (abstract).
- Li, R., Salih, S. and Hurtt, S. 2004. Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88: 1347-1351.
- Moriones, E. and Navas-Castillo, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71: 123-134.
- Morris, J. 2000. TYLCV datasheet. CSL Plant Health Ref. QIC/ 55.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Russell, D. R. and Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77: 340-347.
- Wyatt, S. D. and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primer and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.