

Dual infections of *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), or *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV), detected in tomato fields located in Chungcheongnam-do in 2017

Go-Woon Choi^{1†}, Boram Kim^{1†}, Hyekyoung Ju¹, Sangwon Cho¹, Eunyoung Seo¹, Jungkyu Kim¹, Jongseok Park², John Hammond³, Hyoun-Sub Lim^{1*}

¹Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

²Department of Horticulture Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

³United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Floral and Nursery Plant Research Unit, Beltsville, MD 20705, United States of America

*Corresponding author: hyounlim@cnu.ac.kr

†These authors contributed equally to this work as the first authors.



OPEN ACCESS

Citation: Choi GW, Kim B, Ju H, Cho S, Seo E, Kim J, Park J, Hammond J, Lim HS. 2018. Dual infections of *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), or *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV), detected in tomato fields located in Chungcheongnam-do in 2017. Korean Journal of Agricultural Science 45:38-42.

DOI: <https://doi.org/10.7744/kjoas.20180008>

Editor: Hae Keun Yun, Yeungnam University, Korea

Received: November 17, 2017

Revised: January 23, 2018

Accepted: February 14, 2018

Copyright: © 2018 Korean Journal of Agricultural Science.



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.

Abstract

Demand for tomatoes has been increasing every year as people desire more healthy food. In Korea, tomatoes are mainly grown in the Chungnam, Chunnam and Kyungnam provinces. Recently, reports of whitefly-transmitted viral diseases have increased due to newly emerging whitefly pressures caused by climate change in Korea. Specifically, in 2017, the main tomato growing areas, Buyeo and Nonsan in Chungnam, showed damage typical of viral infection; therefore, we investigated viral diseases in these areas. We collected samples with virus-like symptoms and found that not only whitefly transmitted *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Tomato chlorosis virus* (ToCV) were detected but also *Tomato mosaic virus* (ToMV, for which no specific vector is known) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, transmitted by thrips). The ToMV-infected samples were mostly co-infected with either TYLCV or ToCV. Mixed infections of different combinations of TYLCV, ToCV and ToMV were detected with the mixed infection of two whitefly-transmitted viruses (TYLCV and ToCV) causing the most severe symptoms. According to the CP sequence of each virus, the 100% identities were shown to be Mexico/ABG73017.1 (TYLCV), Greece/CDG34553.1 (ToCV), China/AKN79752 (TSWV), and Australia/NP078449.1 (ToMV). Based on the sequence data, we presumed that these tomato infecting viruses were transmitted through insects and seeds introduced from neighboring countries.

Keywords: *Tomato mosaic virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato chlorosis virus*, *Tomato spotted wilt virus*, dual infection

Introduction

웰빙 시대에 가장 주목 받고 있는 토마토는 1969년부터 국내에서 시설 재배가 시작되어 현재까지 재배 면적이 급격히 늘어 매년 20만 톤 이상 생산하고 있다. 토마토는 전국적으로 재배되고 있으며 그 중 가장 많이 생산되는 곳은 충청남도 부여이다(Nam and Kim, 2009).

전세계적으로 단일 채소 작물 중 가장 넓은 재배면적을 차지하고 있는 작물인 토마토의 경우 발생이 보고된 바이러스 종류도 다양한데, 대표적으로 *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY) 등이 보고 되어있다. 국내의 경우 ToMV, TSWV, CMV, PVY외에도 *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) 발생이 보고되었다(Choi et al., 2009). 다양한 바이러스병의 출현은 지구 온난화에 의한 남방계 곤충의 북상과 기온 상승의 영향으로 곤충의 발육에 유리한 작용을 하여 세대 수를 증가시켜 Yamamura and Kiritani (1998) 바이러스의 매개가 증가되는 것으로 예측하고 있다(Petzoldt and Seaman, 2006). 진딧물이나 온실 가루이 등 크기가 작은 흡즙성 곤충은 바이러스를 매개하는 대표 곤충이다. 이들 곤충은 온도와 밀접한 관련이 있으며, 온도가 상승함에 따라 밀도가 증가하는 것으로 보고되어 있다(Zhou et al., 1997).

위의 자료를 통해 알 수 있듯이 기후변화와 함께 토마토에 발생하는 바이러스 병에 의한 피해가 심각해지고 있기 때문에, 토마토에 발생하는 바이러스를 파악하고자 토마토가 가장 많이 생산되는 충남 부여와 논산에서 바이러스에 감염된 샘플을 채집하여 진단하였다. 또한, 진단된 샘플로부터 바이러스의 외피 단백질의 염기서열을 조사하여 비교하였다.

Materials and Methods

바이러스 진단

충청남도 부여군과 논산시에서 토마토 바이러스에 감염이 의심되는 토마토 잎을 채집하였다. 토마토의 바이러스 병징에는 황화(yellowing), 모자이크(mosaic), 위축(dwarf), 반점(spot) 등이 있으며, 이러한 바이러스 병징이 나타나는 토마토 잎을 선별하여 채집하였다(Fig. 1). 채집된 시료의 total RNA는 Trizol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 700 μ L Trizol과 250 μ L의 chloroform을 사용하여 추출하고, -70°C 에 보관하였다.

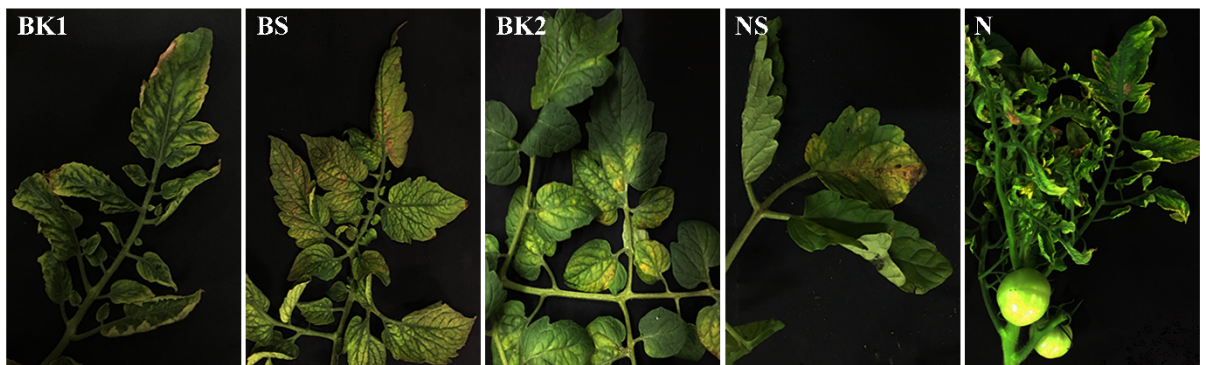


Fig. 1. Typical symptoms of tomatoes infected by TYLCV, ToCV, ToMV and TSWV (BK1, BS, BK2, NS, N); TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; ToMV, *Tomato mosaic virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; BK1, *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato mosaic virus* double infection; BS, *Tomato chlorosis virus* and *Tomato mosaic virus* double infection; BK2, *Tomato chlorosis virus* and *Tomato mosaic virus* double infection; NS, *Tomato spotted wilt virus*; N, *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato chlorosis*.

추출된 RNA를 template로 각각 2000 ng/ μ L의 농도로 정량적으로 cDNA를 합성하였다(ReverTra Ace- α -®, TOYOBO Inc). 그리고 미국 국립생물정보센터(NCBI: National Center for Biotechnology Information)의 유전자 염기서열을 참고하여 각 바이러스의 외피 단백질 염기서열을 바탕으로 바이러스 진단용 PCR primer를 제작하였다 (Table 1). Reverse transcription PCR (RT-PCR)은 GENET BIO Inc의 Prime Taq DNA polymerase 사용하여 진행하였다. 10 X buffer 2 μ L, dNTP 1 μ L, Forward Primer 1 μ L (10 pmol), Reverse Primer 1 μ L (10 pmol), Prime Taq polymerase 0.1 μ L, cDNA 2 μ L, D,W. 12.9 μ L를 섞고 94°C 5분 반응 후, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분으로 30cycle, 그리고 추가로 72°C 5분 반응조건으로 진행하였다. RT-PCR 결과는 1.2% Agarose Gel에 PCR product를 전기영동하여 확인하였다.

Table 1. Nucleic acid sequence of oligonucleotide primers used in this study.

Virus	Sequence	Expected size (bp)
TYLCV	Forward: ATG TCG AAG CGA CCA GGC G Reverse: TTA ATT TGA TAT TGA ATC ATA GAA ATA G	770
ToCV	Forward: ATG GAG AAC AGT GCT GTT G Reverse: TTA GCA ACC AGT TAT TGA TG	770
TSWV	Forward: GGG ACT TTG GAG AAT CTC TT Reverse: TAA AAC TAC TAG AAC TAG TGG TAA	500
ToMV	Forward: ATG TCT TAC TCA ATC ACT TCT Reverse: TTA AGA TGC AGG TGC AGA GG	480

TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; ToMV, *Tomato mosaic virus*.

Coat Protein (CP) Cloning

진단 결과를 바탕으로 각 바이러스 외피 단백질의 염기서열을 분석하기 위하여 샘플과 맞는 각 바이러스 외피 단백질 primer를 이용하여 PCR를 수행하였다(Blend Taq®, TOYOBO Inc, Japan). 증폭된 PCR product를 정제한 후(The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega Inc, Korea), Topo vector (All in one PCR Cloning Kit, BIOFACT Inc, Korea)에 cloning하였다. Cloning 확인은 Vector의 MCS (multiple cloning site)에 있는 Enzyme site를 참고하여 알맞은 restriction enzyme을 사용하여 digestion된 product의 size를 전기영동상에서 확인 후, Sequence 분석(Macrogen Inc, Korea)을 실시하여 진행하였다. 그 후, Sequence 분석 결과를 바탕으로 각 바이러스의 근연 관계를 살펴보았다.

Results and Discussion

Fig. 1과 같이 병징이 구별되는 샘플을 얻었으며 황화, 반점, 위축, 모자이크 등 다양한 병징이 동시에 나타나는 경우가 많았다. ToMV에 감염된 토마토에서는 모자이크, 얼룩, 뒤틀림, 스텐팅 등의 병징이 나타나고 TYLCV에 감염된 토마토에서는 잎말림, 황화, 스텐팅 등 심각한 병징이 나타난다. ToCV에 의한 병징으로는 황화 증상과 함께 그 주변이 갈색으로 퇴색하는 증상이 나타나며, 잎이 점차 두꺼워지고 바삭 마르는 증상이 나타난다. TSWV에 감염된 식물은 초기에 스텐팅 증상이 나타나고 심할 경우 식물이 죽게 된다. 제작된 프라이머(Table 1)를 이용하여 바이러스 진단 결과 동시 감염이 검출이 높았다. 바이러스 진단 결과, BK1에서 TYLCV와 ToMV의 복합 감염이 나타났고, BS와 BK2에서는 ToCV와 ToMV의 복합 감염이 나타났고, NS에서는 TSWV가 진단 되었고, N에서는 TYLCV와 ToCV의 복합 감염을 확인 할 수 있었다(Table 2). 본 연구에서 조사한 TYLCV, ToCV, TSWV, ToMV와 기존에 보고되었던 국내, 국외의 분리 주 간의 유전적 상관관계를 조사하기 위하여 미국 국립생물정보센터(NCBI)에 등록된 바이러스 외피 단백질의 아미노산 서열을 바탕으로 각각의 계통수 분석을 실시하였다. 연구한 결과를

통해 TYLCV 아미노산 서열을 분석한 결과 BK1-1의 샘플은 멕시코에서 보고된 TYLCV (ABG73017.1)와 아미노산 서열이 100% 일치 하였으며 N-4는 기보고된 국내 분리주 ADT65383.1와 100% 동일하였다(Table 3). ToCV의 아미노산을 분석한 결과에서는 그리스에서 보고된 분리주와 99% 일치 하였으며 TSWV는 중국분리주 AKN79752.1과 100% 동일하였다(Table 3) 또한 ToMV는 호주 분리주인 NP_078449.1과 100% 일치하였다(Table 3).

Table 2. Locations of collection of tomato tissue samples, and associated RT-PCR results.

Sample no.	Localization	Date	Viruses detected				No of samples
			TYLCV	ToCV	TSWV	ToMV	
BK1	Gyuam-myeon, Buyeo-gun	2017-06-27	●	-	-	●	3
BK2	Gyuam-myeon, Buyeo-gun	2017-06-27	-	●	-	●	2
BS	Sedo-myeon, Buyeo-gun	2017-06-27	-	●	-	●	2
NS	Seongdong-myeon, Nonsan-si	2017-06-27	-	-	●	-	2
N	Nonsan-si	2017-07-17	●	●	-	-	2

TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; ToMV, *Tomato mosaic virus*.

Table 3. Phylogenetic analysis results by viruses based on amino acid sequence of coat proteins.

Virus	Isolate (accession no.)	Most close	Least close
		Country/Accession no./Identity (%)	Country/Accession no./Identity (%)
TYLCV	BK1-1 (MG787542)	Mexico/ABG73017.1/ 100% (258/258)	South Korea (Jeju)/ADB97302.1/ 99% (256/256)
	N-4 (MG787543)	South Korea (Gwangju)/ADT65383.1/ 100% (258/258)	South Korea (Sungnam)/AFV36744.1/ 98% (254/258)
ToCV	BS-4 (MG001346)	Greece/CDG34553.1/ 99% (255/257)	Taiwan/ASE04579.1/ 89% (230/257)
	BK2-2 (MG001345)	Greece/CDG34553.1/ 99% (255/257)	Taiwan/ASE04579.1/ 88% (227/257)
	N-2 (MG001347)	Greece/CDG34553.1/ 99% (256/257)	Taiwan/ASE04579.1/ 89% (228/257)
TSWV	NS (MG001348)	China/AKN79752.1/ 100% (258/258)	Zimbabwe/APP91803.1/ 99% (256/258)
ToMV	BK1-1 (MG345100)	Australia/NP_078449.1/ 100% (159/159)	China/AFN42536.1/ 99% (157/159)

TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; TSWV, *Tomato spotted wilt virus*; ToMV, *Tomato mosaic virus*.

이와 같이 국내 토마토 농장에 발생하는 조사대상 바이러스인 TYLCV, ToCV, TSWV, ToMV는 세계적으로 1900년 초에 최초 보고되었으며(Cohen and Antignus, 1994; Duffus et al., 1996; Best, 1968; Brunt, 1986), 국내에는 2000년 초에 보고되기 시작하였다(Lee et al., 2010; Kil et al., 2015; Kim et al., 2004;). 따라서 국가 간의 농산물교역 등의 늘어나고 있는 2000년 초부터 바이러스병이 국내에 급격하게 유입되고 있음을 예측할 수 있다. 또한 기후변화가 측정되는 시기와의 일치되어 토마토 농장의 바이러스 병 증가는 이러한 두 가지 이유로 매년 증가하고 있는 것으로 사료된다.

Conclusion

토마토 재배지역의 바이러스 발병 조사를 통하여 본 연구팀은 대부분의 시료 샘플에서 복합 감염이 발생 하고 있음을 확인하였다. 담배가루이에 의한 TYLCV와 ToCV 단독 및 복합 감염을 예측할 수 있으나 종자 전염인

ToMV와의 복합 감염은 종자에 의한 1차 감염 후 가루이에 의한 2차 감염으로 예측할 수 있다. ToMV는 종자감염으로 예측되며 염기서열 분석결과 국내 토마토 종자 수입 국가 및 재배지역에서 발생한 바이러스에 의해 종자로부터 유입된 것으로 판단된다. 따라서 토마토 재배에 있어 바이러스에 의한 피해 손실을 최소화하기 위한 종자 관리 및 해충 관리가 매우 중요하다고 사료된다.

Acknowledgements

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Advanced Production Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (116115-03-2-WT012).

References

- Best RJ. 1968. Tomato Spotted Wilt Virus. *Advances in Virus Research*. Academic Press 13:65-146.
- Brunt AA. 1986. Tomato Mosaic Virus. *The Plant Viruses*. pp181-204. Springer, Boston, MA.
- Choi HS, Lee SH, Kim MK, Kwak HR, Kim JS, Cho JD, Choi GS. 2009. Occurrence of Virus Diseases on Major Crops in 2009. *Research in Plant Disease*. 16:1-9.
- Cohen S, Antignus Y. 1994. Tomato Yellow Leaf Curl Virus, a Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* 10:259-288.
- Duffus JE, Liu HY, Wisler GC. 1996. Tomato infectious chlorosis virus - a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology* 102:219-226.
- Kim JH, Choi GS, Kim JS, Choi JK. 2004. Characterization of Tomato spotted wilt virus from Paprika in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20:297-301.
- Kil EJ, Lee YJ, Cho S, Auh CK, Kim D, Lee KY, Kim MK, Choi HS, Kim CS, Lee S. 2015. Identification of natural weed hosts of Tomato chlorosis virus in Korea by RT-PCR with root tissues. *European Journal of Plant Pathology* 142:419-426.
- Lee HJ, Song WG, Kwak HR, Kim JD, Park JA, Auh CK, Kim DH, Lee KY, Lee SC, Choi HS. 2010. Phylogenetic analysis and inflow route of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and *Bemisia tabaci* in Korea. *Molecules and Cells* 30:467-476.
- Nam SW, Kim YS. 2009. Analysis on the Uniformity of Temperature and Humidity According to Environment Control in Tomato Greenhouses. *Journal of Bio-Environment Control* 18:215-224.
- Petzoldt C, Seaman A. 2006. Climate change effects on insects and pathogens. *climate change and agriculture: promoting practical and profitable responses*. Promoting practical and profitable responses 3:6-16.
- Yamamura K, Kiritani K. 1998. A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones. *Applied Entomology and Zoology* 33:289-298.
- Zhou X, Perry JN, Woiwod IP, Bale JS, Clark SJ. 1997. Temperature change and complex dynamics. *Oecologia* 112:543-550.