

국내 감귤류에 발생한 *Citrus vein enation virus* 분포조사

Incidence of *Citrus vein enation virus* in *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata* in Korea

***Corresponding author**

Tel: +82-54-912-0668

Fax: +82-54-912-0654

E-mail: mycomania21@korea.kr

김봉섭 · 양희지 · 이수현 · 고승현 · 박교남 · 최은진 · 이성진*

농림축산검역본부

Bong-Sub Kim, Hee-Ji Yang, Su-Hyun Lee, Seung-Hyun Ko, Kyo Nam Park, Eun Jin Choi, and Seong-Jin Lee*

Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Citrus vein enation virus (CVEV), which was regulated as a quarantine virus in Korea, was firstly found on Jeju Island in 2017. In February 2018, a survey was carried out to determine the distribution of CVEV in the main commercial areas growing *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata*. The survey was performed at 203 groves in the southern Korean Peninsula and Jeju Island. CVEV infection was determined by reverse transcription polymerase chain reaction detection and sequencing. The coat protein (CP) gene sequences obtained from the CVEV-infected samples showed high similarities (more than 98%) to the previously reported CVEV CP sequences. In summary, CVEV was detected in 136 groves (67%), in which 85.4% of *Citrus junos* and 77.8% of *Citrus unshiu* were infected by CVEV. In Jeju Island, the infection rate of CVEV was relatively higher (90.6%). Our result revealed that CVEV has spread widely in *Citrus* and *Poncirus* in Korea. Based on the result, the Korean quarantine agency decide to exclude CVEV from quarantine in Korea.

Keywords: *Citrus vein enation virus*, Quarantine pathogen, Survey

Received December 3, 2019
Revised December 17, 2019
Accepted December 18, 2019

감귤류는 운향과(Rutaceae)와 감귤나무아과(Aurantioideae)의 *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*속 등에 속하는 나무의 열매를 총칭한다(Nicolosi, 2007; Penjor 등, 2013). 국내 감귤 생산량과 재배면적의 90% 이상이 제주도에 재배되고 있으며 전라도, 경상남도에서도 일부 재배중이다(Korean Statistical Information Service, 2018). 또한 국내 감귤 생산량의 약 86%가 온주밀감(*Citrus unshiu*)이고, 약 13%는 만숙성 감귤(레드향, 천혜향, 한라봉, 황금향 등)이 차지하고 있다(Korean Statistical Information Service, 2018). 국내 감귤류에는 *Citrus tristeza virus*, *Citrus tatter leaf virus*, *Citrus mosaic sadwavirus*, *Satsuma dwarf virus*,

Citrus leaf blotch virus, *Citrus vein enation virus* (CVEV) 등 6종의 바이러스가 보고되어 있다(Hyun과 Hwang, 2015; Park 등, 2019; Yang 등, 2019). 그 중 CVEV는 *Luteoviridae*과 *Enamovirus*속 바이러스이며 96년 12월 검역 관리급 병원체로 지정되었다. 2017년 9월, 제주도 온주밀감(*Citrus unshiu*)에서 CVEV가 보고되었다(Yang 등, 2017). 이를 조사하기 위해 2017년 9월, 제주지역의 11개의 과수원에서 무작위 채집을 하여 검사한 결과, 11개 과수원 모두 CVEV가 검출되었다. 제주지역에 대한 일부 조사를 통해 CVEV의 발생을 확인하였고, 검역 관리급 병원체인 CVEV에 대한 광범위한 조사를 수행하여 검역조치를 취하기 위해 본 연구를 실시하였다. 본 연구에서 국내의 전반적인 CVEV의 분포상황 및 기주범위를 확인하기 위해 제주도, 전라도, 경상남도에서 재배되는 온주밀감, 만숙성 감귤, 유자 등 감

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191
www.online-rpd.org

귤류와 조경·올타리용으로 이용되는 탱자나무를 대상으로 분포조사를 실시하였다.

시료채집. 2018년 1월부터 2월까지 감귤 주요 재배지인 제주도를 포함한 4개 도 29개 시군의 203개 감귤류 재배 농가에서 온주밀감, 유자, 만숙성 감귤류(한라봉, 천혜향, 레드향, 황금향) 및 탱자나무를 대상으로 조사하였다(Fig. 1). 시료는 바이러스 증상을 보이는 잎을 위주로 과원별 10점씩 채취하였으며, 특별히 증상이 없는 경우 무작위로 과원별 10점씩 수집하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 바이러스 검출. 과원별 10점씩 채집한 시료는 액체 질소를 이용하여 마쇄한 뒤 혼합하여 1점의 시료로 만들었으며, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 공급사의 매뉴얼에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 전체 RNA는 CVEV 진단 프라이머로 기존에 보고된 VE16F (5'-AATTACGGCG-TATCTATGGTGAGTCG-3'), VE17R (5'-AATGAGATAGCCCGTTGTC-CAG-3') 프라이머(Vives 등, 2013)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 2× RT-PCR Premix SR-8000 (Genetbio, Nonsan, Korea)을 이용하여 수행하였으며 증폭된 PCR 산물은 1× TAE 버퍼를 이용하여 만든 1.5% 아가로스 겔을 GelRed로 염색한 후 전기영동(Hoefler, Holliston, MA, USA)하여 확인하였다. RT-PCR 진단 결과, 양성 반응을 보인 시료는 마크로젠(Marcrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였고, 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 BLAST 검색하여 동정하였다.

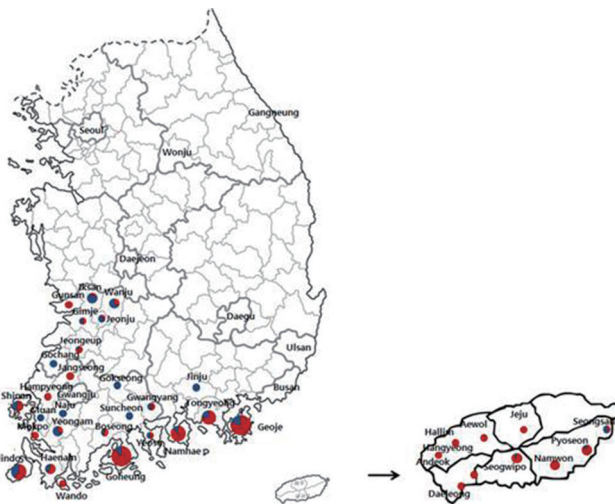


Fig. 1. Map of incidence of *Citrus vein enation virus* (CVEV) in *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata* as a result of survey. Jeju-do was indicated in detail. Red and blue indicate CVEV-infected and CVEV-uninfected, respectively.

외피단백질 염기서열 및 아미노산서열 분석. 진단결과 양성반응을 보인 시료 중 지역별·기주별 15점을 선정하였다. 외피단백질 유전자 부위를 분석하기 위해 외피단백질 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머(CVEV_CP-F2: 5'-CCC CGA AAG GGG ACC ATG AA-3', CVEV_CP-R2: 5'-CC TTC GTA TCC CCA GAA GCG-3')를 제작하였다. GenBank에 등록된 CVEV-분리주들과의 염기서열과 아미노산 서열을 비교한 결과, 98% 이상의 매우 높은 상동성을 보여 기존에 보고된 다른 isolate들과 확연한 차이는 나타나지 않음을 확인하였다.

CVEV의 발생 실태. 전체 시료에 대하여 RT-PCR을 수행하여 203개의 과원 중 136개(67%)에서 CVEV의 감염을 확인하였다. CVEV 검출 과원을 기주별로 분석한 결과, 유자 과원의 85.4%, 온주밀감 과원의 77.8%로 CVEV가 높은 비율로 검출되었으며, 탱자나무와 한라봉 과원에서도 각각 35%, 46.7%의 검출률을 나타냈다(Table 1). 또한, 지역별 분석을 통해 감귤류의 주요 재배지인 제주도에 90.6%의 높은 검출률을 나타낼 뿐 아니라 경상남도, 전라남도, 전라북도 등 감귤류 재배지역에서 CVEV가 높은 비율로 검출됨을 알 수 있었다(Table 2). 기주별·지역별 발생실태 조사를 토대로 국내 감귤류에 CVEV가 만연되어 있음을 확인하였다.

CVEV의 검역병원체 여부. 본 연구에서는 감귤류 주요 재배지인 제주도를 포함하여 전라도, 경상남도 지역에서 온주밀감, 만숙성 감귤, 유자와 탱자나무를 대상으로 CVEV의 분포조사

Table 1. Incidence of *Citrus vein enation virus* in *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata*

Host plant ^a	Surveyed groves	Detected groves	Detection rate (%)
<i>Citrus unshiu</i>	45	35	77.8
<i>C. junos</i>	82	70	85.4
<i>Poncirus trifoliata</i>	20	7	35.0
(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	45	21	46.7
<i>C. hybrid</i> 'Setoka'	5	1	20.0
<i>C. hybrid</i> 'Knpei'	5	2	40.0
<i>C. hybrid</i> 'Ehime Kashi 28 gou'	1	0	0.0
Total	203	136	67.0

^a*Citrus unshiu*: Satsuma mandarin; *C. junos*: Yuzu; *Poncirus trifoliata*: Trifoliate orange; (*C. unshiu* × *C. sinensis*) × *C. reticulata*: Hallabong; *C. hybrid* 'Setoka': Choenhye-hyang; *C. hybrid* 'Knpei': Red-hyang; *C. hybrid* 'Ehime Kashi 28 gou': Hwanggeum-hyang.

Table 2. Distribution of *Citrus vein enation virus* in South Korea

Province	Host plant	Surveyed groves	Detected groves	Detection rate (%)
Gyeongsang nam-do	<i>Citrus junos</i>	38	36	94.7
	<i>Poncirus trifoliata</i>	5	0	0.0
	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	3	0	0.0
	<i>C. hybrid</i> 'EhimeKashi28gou'	1	0	0.0
	Total	47	36	76.6
Jeollanam-do	<i>C. unshiu</i>	3	0	0.0
	<i>C. junos</i>	44	34	77.3
	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	27	12	44.4
	<i>C. hybrid</i> 'Setoka'	4	1	25.0
	<i>C. hybrid</i> 'Knpei'	3	1	33.3
	Total	81	48	59.3
Jeollabuk-do	<i>C. unshiu</i>	3	0	0.0
	<i>P. trifoliata</i>	15	7	46.7
	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	11	5	45.5
	<i>C. hybrid</i> 'Knpei'	2	1	50.0
	<i>C. hybrid</i> 'Setoka'	1	0	0.0
	Total	32	13	40.6
Jeju-do	<i>C. unshiu</i>	39	35	89.7
	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>	4	4	100.0
	Total	43	39	90.6
Total		203	136	67.0

를 실시하여 CVEV의 발생 실태를 구명하였다.

온주밀감과 만숙성 감귤류의 주요 재배지역이 아닌 전라남도 와 경상남도에서 재배중인 유자 과원의 각각 77.3%, 94.7%에서 CVEV가 검출되었으며, 전라북도의 탕자나무의 46.7%에서 CVEV가 검출되었다(Table 2). 유자와 탕자나무는 오래전에 국내에 도입되어 최소한 고려시대부터 재배된 것으로 알려져 있다(Kang, 1990; Lan-Phi 등, 2009). 중국에서는 CVEV가 접목과 진딧물에 의해 광범위하게 전염된 것으로 보고 있으며, 1,500년 동안 감귤류에 존재했을 것으로 보고 있다(Guoqing 등, 1996). 이를 통해 전라도와 경상도에 있는 유자와 탕자나무에 감염된 CVEV는 비교적 오래전에 국내에 유입되었음을 유추해 볼 수 있다.

또한, 국내에서 온주밀감과 만숙성 감귤류의 대부분을 재배하는 제주도의 과원의 90.6%에서 CVEV가 검출되었다. 온주밀감과 대표적인 만숙성 감귤인 한라봉은 고품질의 과실 생산과 수세 강화 등을 위해 탕자나무를 대목으로 이용하고 있다(Ferguson

과 Charparro, 2010; Moon 등, 2010). 대다수의 감귤류는 접목하여 재배되고 있으며 병원체 또한 접목과 진딧물에 의해 전염된다(Hyun 등, 2017). 따라서 CVEV가 제주도의 감귤류에 높은 비율로 나타난 것은 접목재배와 진딧물에 의한 전염일 가능성이 높다.

현재 제주도에서 재배되고 있는 감귤류의 대부분이 20세기 초 일본에서 도입된 품종이다(Hyon 등, 2010; Ko, 2016). 일본에서는 1961년부터 CVEV에 의한 전형적인 병징이 발견되어 왔으며 2017년 유자에서 CVEV의 발생을 보고하면서 CVEV가 흑, 돌기 증상과 관련이 있으며 일본의 다수의 감귤류 재배지에서 관찰되어 온 것을 밝혔다(Nakazono-Nagaoka 등, 2017; Tanaka와 Yamada, 1961). 20세기 초 CVEV에 감염된 감귤류 묘목이 일부 유입되었을 가능성이 있다.

검역병원체란 특정 국가에 분포하지 않거나 분포하더라도 제한적으로 분포하며, 공적 방제가 이루어지고 있는 병원체를 말한다(Food and Agriculture Organization of the United Na-

tions, 2018). 따라서, 본 연구는 CVEV가 국내 감귤류 재배지역에 널리 분포하고 있음을 확인하였으며 병해충 위험평가를 통해 2018년 비검역 병원체로 변경하는 근거로 활용되었다.

요 약

2017년, 감귤류에 *Citrus vein enation virus* (CVEV)의 발생 보고가 있었다. 식물방역법상 관리급 병원체인 CVEV에 대한 검역조치를 위해 감귤의 주요 재배지인 제주도를 포함한 4개도 29개 시군에서 온주밀감, 유자, 만속성 감귤류(한라봉, 천혜향, 레드향, 황금향) 재배과원 등 203개소에서 시료를 수집하고 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 방법과 시퀀싱을 통해 진단하였다. 진단결과, 양성반응을 보인 시료를 대상으로 외피단백질 유전자 부위를 분석하기 위해 Gen-Bank에 등록된 분리주들과의 염기서열과 아미노산 서열을 비교한 결과, 98% 이상의 매우 높은 상동성을 확인하였다. 전체 시료에 대하여 RT-PCR 진단 결과, 136개 과원(67%)에서 CVEV가 검출되었으며, 유자 과원의 85.4%, 온주밀감 과원의 77.8%가 CVEV에 감염된 것으로 파악됐다. 또한, 감귤의 주요 재배지인 제주도에 90.6%의 과원이 CVEV에 감염된 것으로 확인하였다. 기주별·지역별 발생실태 조사를 토대로 국내 감귤류에 CVEV가 만연되어 있음을 확인하였다. 본 연구를 바탕으로, CVEV의 발생실태 조사와 검역병원체 여부를 검토하여 2018년 5월 CVEV를 비검역 병원체로 변경하였다.

Conflicts of Interest

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

References

- Ferguson, J. J. and Charparro, J. 2010. Dwarfing and Freeze Hardiness Potential of Trifoliolate Orange Rootstocks. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS, Gainesville, FL, USA. 6 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. International Standards for Phytosanitary Measures. URL <http://www.fao.org> [30 October 2019].
- Guoqing, C., Hongxiang, W., Senxiang, Y. and Roistacher, C. N. 1996. Occurrence and detection of *Citrus vein enation virus* in Huangyan, Zhejiang, China. In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, eds. by J. V. Da Graca and R. K. Yokomi, pp. 218-219. University of Florida Press, Gainesville, FL, USA.
- Hyon, J.-S., Kang, S.-M., Senevirathne, M., Koh, W.-J., Yang, T.-S., Oh, M.-C. et al. 2010. Antioxidative activities of extracts from dried *Citrus sunki* and *C. unshiu* peels. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 1-7.
- Hyun, J. W. and Hwang, R. Y. 2015. Current status of virus infection on late maturity citrus in Jeju Island. *Res. Plant Dis.* 21: 151. (Abstract).
- Hyun, J. W., Hwang, R. Y. and Jung, K. E. 2017. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of citrus viruses and the incidence of citrus viral diseases in late-maturity citrus trees in Jeju island. *Plant Pathol. J.* 33: 307-317.
- Kang, C. K. 1990. A historical study on fruit in Korea. *J. Korean Soc. Diet. Cul.* 5: 301-311
- Korean Statistical Information Service. 2018. A yield of fruit. URL <http://www.kosis.kr> [30 October 2019].
- Ko, S.-B. 2016. A study on the technology evaluation of development of new variety of citrus unshiu. *J. Korea Acad.-Ind. Coop. Soc.* 17: 127-132.
- Lan-Phi, N. T., Shimamura, T., Ukeda, H. and Sawamura, M. 2009. Chemical and aroma profiles of yuzu (*Citrus junos*) peel oils of different cultivars. *Food Chem.* 115: 1042-1047.
- Moon, Y.-E., Kim, C.-M., Kim, K.-S., Yun, S.-H., Park, J.-H., An, H.-J. et al. 2010. Effect of rootstock on the tree growth and fruit quality of 'Shiranuhi' mandarin hybrid in plastic film house. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 28: 65-69.
- Nakazono-Nagaoka, E., Fujikawa, T. and Iwanami, T. 2017. Nucleotide sequences of Japanese isolates of *Citrus vein enation virus*. *Arch. Virol.* 162: 879-883.
- Nicolosi, E. 2007. Origin and taxonomy. In: Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, ed. by I. A. Khan, pp. 19-43. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Park, C. Y., Park, J., Kim, H., Yi, S.-I. and Moon, J. S. 2019. First report of *Citrus leaf blotch virus* in Satsuma mandarin in Korea. *J. Plant Pathol.* 101: 1129.
- Penjor, T., Yamamoto, M., Uehara, M., Ide, M., Matsumoto, N., Matsumoto, R. et al. 2013. Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on *matK* gene sequences. *PLoS ONE* 8: e62574.
- Tanaka, S. and Yamada, S. 1961. Citrus vein disease in Japan. In: Proceedings of the 2nd Conference of the International Organization of Citrus Virologists, ed. by W. C. Price, pp. 247-252. University of Florida Press, Gainesville, FL, USA.
- Vives, M. C., Velázquez, K., Pina, J. A., Moreno, P., Guerri, J. and Navarro, L. 2013. Identification of a new enamovirus associated with citrus vein enation disease by deep sequencing of small RNAs. *Phytopathology* 103: 1077-1086.
- Yang, H.-J., Oh, J., Lee, H.-K., Lee, D.-S., Kim, S.-Y., Kim, M.-H. et al. 2019. First report of *Citrus vein enation virus* in Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) in Korea. *Plant Dis.* 103: 2703.
- Yang, H. J., Oh, J., Park, C. Y., Lee, H. K., Min, H. G., Lee, D. S. et al. 2017. First report of *Citrus vein enation virus* (CVEV) in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) in Korea. *Res. Plant Dis.* 21: 151. (Abstract)