

## 국내 분리 토마토반점위조바이러스의 저항성 판별을 위한 생물검정법 개발

곽해련\*, 최현용, 홍수빈, 허은숙<sup>1</sup>, 변희성, 최홍수, 김미경<sup>2,\*</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업유전자원센터, <sup>2</sup>충북대학교 식물의학과

### Development of a bioassay for screening of resistance to Tomato spotted wilt virus isolate from Korea

Hae-Ryun Kwak\*, Hyeon-Yong Choi, Su-Bin Hong, On-Sook Hur<sup>1</sup>, Hee-Seong Byun, Hong-Soo Choi and Mikyeong Kim<sup>2,\*</sup>

Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Republic of Korea

<sup>1</sup>National Agrobiodiversity Center, National Institute of Agricultural Sciences, Jeonju 54784, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

#### \*Corresponding authors

Hae-Ryun Kwak

Tel. 063-238-3303

E-mail. hrkwakhahn@korea.kr

Mikyeong Kim

Tel. 043-261-2509

E-mail. mkim00@chungbuk.ac.kr

Received: 20 August 2021

Revised: 5 September 2021

Revision accepted: 6 September 2021

**Abstract:** Tomato spotted wilt virus (TSWV) is one of the most destructive viruses worldwide, which causes severe damage to economically important crops, such as pepper and tomato. In this study, we examined the molecular and biological characterization of a TSWV isolate (SW-TO2) infecting tomato and compared it to the recently reported isolates from boxthorn, butterbur, and angelica plants. The phylogenetic analysis based on the complete genome sequences confirmed that SW-TO2 was clustered with those of isolates from boxthorn and pepper in Korea with the maximum nucleotide identities ranging from 98% to 99%. We developed the bioassay method for screening TSWV resistance and tested some commercial pepper and tomato cultivars for resistance evaluation of four isolates of TSWV. TSWV resistance was evaluated as TSWV resistance when all the following three conditions were satisfied: first, when symptoms of necrotic spots or no symptoms were present in the inoculated leaves; second, when there were no symptoms in the upper leaves; and third, when the upper leaves were negative as a result of RT-PCR diagnosis.

**Keywords:** Tomato spotted wilt virus, bioassay, genome sequence, resistance

## 서 론

토마토반점위조바이러스 (Tomato spotted wilt virus, TSWV)는 *Orthospovirus*속의 바이러스로서, 구조는 막 (Ribonucleocapsid core)으로 둘러싸인 80~120 nm 직경의 구형 입자로 구성되어 있으며, 바이러스의 유전자는 L

segment (8.9 kb), M segment (4.8 kb)와 S segment (2.9 kb)의 세개의 분절(segment)로 구성되어 있다(Adkins 2000). L segment는 바이러스복제효소(RNA-dependent RNA polymerase)를 발현한다(de Haan *et al.* 1991). M segment는 이동단백질(movement protein)인 NSm 유전자를 발현하며, 2개의 당단백질(glycoprotein) Gn과 Gc를 생성한다

(Storms *et al.* 1995; Adkins 2000). S segment는 침묵억제인자(gene silencing suppressor) 기능을 하는 NSs 유전자와 외피단백질(coat protein)을 합성하는 N유전자를 발현한다(Adkins 2000). TSWV는 고추, 토마토 등 가지과 작물을 포함하여 약 1,000여 종의 식물에 감염하는 것으로 알려져 있고 작물에 경제적으로 큰 피해를 주는 바이러스 중의 하나이다(Parrella *et al.* 2003; Pappu *et al.* 2009). 국내에서는 2003년 충남 예산지역 파프리카 재배농가에서 처음으로 확인된 후(Kim *et al.* 2004), 현재 고추, 토마토 등의 작물에서 전국적으로 발생하고 있으며(Kwon *et al.* 2017; Kim *et al.* 2020), 2018년 기준으로 총 32종의 작물에 감염이 보고되었다(Kwak 2019). TSWV의 피해증상은 작물의 잎과 과일에 원형반점, 괴사반점, 황화 및 모자이크 증상이 나타나며 심한 경우 식물체 전체가 고사된다. TSWV는 즙액을 활용한 전염이 가능하지만, 주로 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*)를 포함한 10여 종의 총채벌레에 의해 전염하는 것으로 알려져 있다(Morse and Hoddle 2006). TSWV의 넓은 기주범위와 매개충인 총채벌레 방제의 어려움 및 TSWV의 효과적인 치료제가 없기 때문에, 능동적 방제를 위한 저항성 품종을 사용하는 것이 TSWV를 예방하는 가장 효과적인 수단이 될 수 있다.

TSWV 저항성 자원에 관한 연구는 고추 유전자원(*Cap-sicum chinense* PI 159236, PI 152225)에서 단일 우성 유전자인 *Tsw*가 보고되었다(Boiteux and Avila 1994; Boiteux 1995). 또한 토마토 야생종(*Lycopersicon peruvianum*)에서 유래한 TSWV 저항성 유전자 *Sw5*가 보고되었다(Stevens *et al.* 1991). 이러한 저항성 유전자는 저항성 품종 개발에 활용되어 농가에 보급되고 있다. 그러나 최근에는 고온에서 TSWV에 대한 저항성이 깨지는 현상이 나타나고(Roggero *et al.* 1996; Moury *et al.* 1998), *Tsw*와 *Sw5* 저항성을 극복하는 새로운 TSWV 변이 균주(TSWV resistance breaking strain, TSWV-RB)가 보고되고 있다(Roggero *et al.* 2002; Aramburu and Mart 2003; Thomas-Carroll and Jones 2003; Margaria *et al.* 2004; Lopez *et al.* 2011; Batuman *et al.* 2017; Ferrand *et al.* 2019). 최근 국내에서도 TSWV 내병성 고추 품종에 병을 일으키는 새로운 TSWV 변이 균주가 보고되었다(Kwon *et al.* 2021; Yoon *et al.* 2021).

이와 같이 TSWV에 대한 저항성 계통의 유지기간이 짧기 때문에 새로운 품종 육성을 위해 저항성 자원을 지속적으로 발굴하고자 노력하고 있다(Han *et al.* 2012; Yang *et al.*

2012). 또한, 저항성 품종을 선발하기 위한 생물검정 체계의 표준화를 위하여 TWSV 분리주의 특성 분석을 통한 표준균주 선발 및 고효율·저비용의 접종법 개발이 필요하다. 또한 이러한 표준화된 생물검정법을 통해 유전자원의 감수성·저항성 평가 방법을 확립할 필요가 있다.

이 논문에서는 토마토에서 분리된 TSWV 분리주(SW-TO2)의 유전학적, 생물학적 특성을 구명하고, 최근에 농업 현장에서 발생하여 보고된 구기자, 머위 및 당귀에서 분리된 TSWV 분리주와 특성을 비교하였다(Kwak *et al.* 2020, 2021a, 2021b). 또한 TSWV 저항성 품종 선발을 위한 표준화된 생물검정법을 확립하고, 시판되고 있는 고추와 토마토 품종을 대상으로 이들 4종의 TSWV 분리주에 대한 저항성을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 진단

2019년 수원 토마토 재배농가에서 괴사반점과 줄기 괴사 등 바이러스 증상을 보이는 토마토 잎을 수집하였다. 감염 바이러스의 정밀진단을 위해 total RNA를 추출하고(Plant RNA Prep Kit; Biocubesystem, Korea), 토마토 감염 주요 바이러스 10종에 대해 진단프라이머(Supplementary Table 1)를 이용하여 역전사중합효소 PCR(Reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하였다. RT-PCR 반응은 one-step RT-PCR premix (Genetbio, Korea)를 이용하여 제조사의 권장 방법대로 수행하였다. RT-PCR 반응을 위한 온도 조건은 다음과 같다: 50°C에서 30분간 RT 반응을 수행한 후 95°C에서 10분 변성 후, 95°C 30초 변성, 55°C 30초 annealing, 72°C 1분 extension을 35회 수행 후 마지막으로 72°C에서 5분 extension 후 완료하였다.

### 2. 바이러스 분리 및 병원성 검정

감염된 토마토 잎 조직에 10배(W/V)의 0.01 M의 인산 완충액을 첨가하여 마쇄한 뒤 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)에 즙액접종하여 3차례에 걸쳐 단일병반을 순수 분리하고(single local isolation), 담배 야생종(*N. rustica*)에서 증식하여 접종원으로 사용하였다. 기주범위와 병원성을 검정하기 위하여 5과 28종의 지표식물에 3반복으로 접종하고 4주간 접종엽과 상업의 병징을 관찰하고, TSWV 특이

**Table 1.** Symptoms observed on indicator plants mechanically inoculated with leaf extract including TSWVs isolated from tomato

Indicator plant	Symptoms <sup>a</sup> induced by TSWV isolates			
	SW-TO2	CY-LC <sup>b</sup>	NS-BB20 <sup>c</sup>	NS-AG28 <sup>d</sup>
<b>Solanaceae</b>				
<i>Nicotiana benthamiana</i>	nl/m	nl/m	-/m	-/m
<i>Nicotiana clevelandii</i>	nl/nl,m	nl/nl,m	nl/m	nl/nl, m
<i>Nicotiana debneyi</i>	nl/nl, m	nl/nl	-/nl, m	nl/nl, m
<i>Nicotiana glutinosa</i>	nl/m	nl/nl,m	nl/-	nl/nl, m
<i>Nicotiana occidentalis</i>	nl/nl, m	nl/nl,m	nl/nl	nl/nl, m
<i>Nicotiana rustica</i>	nl/rs, m	nl,m,rs/nl,m,rs	-/m	nl,m,rs/nl,m,rs
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi-nc	nl/nl, m	nl/nl	nl, m/m	nl,rs/nl,m,vn
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi	nl/nl, m	*	rs, nl, m/m	rs/-
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	nl/-	*	-/m	rs, nl/m
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. KY57	nl/nl, m	*	nl, m/nl, m	nl/nl,y,vn
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY	nl/nl, m	*	nl, m/m	nl,rs/vn
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Seogwang	nl, m/rs, m	-/m	-/m, rs, nl	-/m
<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Tenten	nl, m/rs, m	*	-/m	-/m
<i>Capsicum annuum</i> cv. Quarri	nl, m/rs, m	*	-/m	rs,nl/m
<i>Capsicum annuum</i> cv. Supermainta	nl, m/rs, m	nl/m,dist	rs/m	rs/m
<i>Petunia hybrida</i>	nl/m	*	nl/-	nl/nl
<i>Datura stramonium</i>	nl/m	*	rs, nl/nl, m	nl/nl,m,rs,dist
<i>Physalis angulata</i> L.	-/-	nl/nl	nl/-	nl/-
<b>Leguminosae</b>				
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-/-	-/-	-/-	*
<i>Pisum sativum</i>	-/-	nl/nl	-/-	-/-
<i>Vigna unguiculata</i>	-/-	-/-	-/-	*
<b>Chenopodiaceae</b>				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	nl/-	pp,nl/-	cl/-	nl/-
<i>Chenopodium quinoa</i>	nl/-	nl/nl	nl/-	nl/nl
<b>Cucurbitaceae</b>				
<i>Cucurbita moschata</i>	-/-	nl/-	-/-	-/-
<i>Cucumis melo</i>	-/-	-/-	-/-	*
<i>Cucumis sativus</i>	-/-	-/-	-/-	*
<i>Citrullus lanatus</i>	-/-	-/-	-/-	*
<b>Amaranthaceae</b>				
<i>Gomphrena globosa</i>	cl/m	nl/-	cl/m	nl/dist

<sup>a</sup>m, mosaic; nl, necrotic local lesions; cl, chlorotic local lesions; rs, ring spots; vn, vein necrosis; dist, distortion; y, yellowing; -, no symptom; inoculated leaf/upper leaf; \*no test; <sup>b</sup>Kwak *et al.* 2020; <sup>c</sup>Kwak *et al.* 2021a; <sup>d</sup>Kwak *et al.* 2021b

프라이머를 이용한 RT-PCR 진단으로 감염 여부를 최종 확인하였다(Kwak *et al.* 2020, 2021b).

### 3. 바이러스 전체 염기서열 분석

TSWV 분리주(SW-TO)의 전체 유전자 염기서열 분석을 위하여 이전에 보고된 TSWV 특이 프라이머를 사용하여 RT-PCR과 클로닝을 수행하였고(Lee *et al.* 2011; Kwak

*et al.* 2020), Bionics사(Bionics, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 전체 염기서열을 얻었다. DNA Star v. 5.02 (Lasergene, Madison, USA)의 SeqMan 프로그램을 사용하여 DNA assembly를 수행하여 최종적으로 염기서열을 결정하였고, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank에 등록하였다. L, M, S segment의 전체 염기서열을 기반으로 한 계통분석을 수행하였다. NCBI GenBank에 등록되어 있는 TSWV 25개 분리주를 이용하여 각각

segment의 전체 염기서열을 Geneious Pro 10 software를 이용하여 alignment를 수행하였고 염기서열 상동성을 분석하였다. 계통분석 (phylogenetic tree)은 MEGA 7프로그램의 Maximum likelihood method를 사용하였고(Kumar *et al.* 2016), 계통수의 가지에 대한 통계적 유의성은 bootstrap 1,000반복을 수행하는 방법으로 분석하였다.

#### 4. TSWV 저항성 판별 생물검정법 설정 및 평가

TSWV 저항성 판별을 위한 표준화된 생물검정법을 확립하기 위하여 대상작물 준비(토마토, 고추 품종 및 유전자원 등), 검정장소(온실, 식물생장상), 성장온도(20~28°C), 접종방법(즙액접종), 접종시기(본엽 전개시기), 접종원(TSWV 표준균주) 준비 및 병 조사방법(병징 육안조사, RT-PCR) 등을 설정하고, 시판 토마토, 고추 품종을 대상으로 저항성·감수성을 평가하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 토마토반점위조바이러스 분리 및 생물학적 특성 분석

2019년 수원 토마토 재배농가에서 수집한 토마토 잎에서 괴사반점과 줄기 괴사 증상 등 바이러스 의심증상을 보여 진단한 결과 TSWV 감염을 확인하였다. 담배(*N. tabacum* cv. Samsun)에서 3차례에 걸쳐 단일병반(single local lesion)을 순수분리하여 담배 야생종(*N. rustica*)에 증식하였다. 분리한 TSWV 분리주(SW-TO2)의 생물학적 특성을 구명하기 위하여 토마토를 포함한 5과 28종의 지표 식물에 접종하여 기주범위와 병원성을 확인하였다(Table 1). 생물검정 결과, 토마토 서광과 텐텐 품종에서는 접종엽에 모자이크와 괴사 증상을 보이고 상업에서는 원형반점과 모자이크 증상을 보였다. 담배 9종 중 *N. tabacum* cv. Samsun을 제외한 8종에서는 괴사, 원형반점 및 모자이크 등의 전신 감염을 보여주었고, 고추에서도 같은 증상을 보였다. 최근에 농업현장에서 발생하여 보고된 구기자(CY-LC), 머위(NS-BB20) 및 당귀(NS-AG28) TSWV 분리주와 특성을 비교하였다(Table 1; Kwak *et al.* 2020, 2021a, 2021b). TSWV에 취약한 작물인 고추와 토마토의 경우, 고추에서는 TSWV 4개 분리주 모두 접종엽과 상업에서 원형반점과 모자이크 증상을 보인 반면, 토마토의 경우 상업에서는 유사한 증상을 보였으나, 접종엽에서는 토마토 분리

주 SW-TO2만 괴사, 모자이크 증상을 보였다. 담배에서는 주로 접종엽에는 원형반점과 괴사 증상을 보였고, 상업에서 괴사 증상과 모자이크 증상을 보였다. 그러나 SW-TO2 분리주는 *N. tabacum* cv. Samsun에서, NS-AG28 분리주는 *N. tabacum* cv. Xanthi에서 전신감염을 확인할 수 없었다. 이들 4개의 분리주는 저항성 품종을 탐색하기 위한 표준균주로 사용하였다.

#### 2. 토마토반점위조바이러스 분리주의 유전학적 특성 분석

TSWV SW-TO2 분리주의 전체 유전자 염기서열 분석을 위하여 이전에 보고된 TSWV 특이 프라이머(Lee *et al.* 2011; Kwak *et al.* 2020)를 사용하여 최종적으로 L (8,914 bp), M (4,772 bp) 및 S (2,974 bp)의 염기서열을 결정하였고, NCBI의 GenBank에 등록하였다(Table 2). 기존에 보고한 구기자, 머위 및 당귀 분리주를 포함한 NCBI GenBank에 보고되어 있는 TSWV 25개 분리주를 이용하여 각각 segment의 전체 염기서열을 Geneious Pro 10 software를 이용하여 염기서열 상동성을 분석하였다. MEGA 7프로그램의 Maximum likelihood method에 의한 계통분석 결과(Fig. 1), TSWV는 크게 4개의 그룹으로 나뉘었고, 토마토 TSWV 분리주 SW-TO2는 세 개의 segment에서 각각 국내 고추에서 분리한 분리주들과 98% 이상의 높은 상동성을 보여 같은 그룹에 속함을 알 수 있었다. 특히 구기자 TSWV 분리주(CY-LC, CY-G1-2)와도 같은 그룹에 속하였다. 구기자 TSWV 분리주는 청양 고추재배 주산지에서 분리되어 고추와 구기자 간의 상호전염 기주로서의 가능성이 제기되었다(Kwak *et al.* 2020). 논산지역의 머위에서 분리된 TSWV NS-BB20 분리주와 당귀에서 분리된 TSWV NS-AG28은 같은 그룹으로 99%의 높은 염기서열 상동성을 보였고, 세 개의 segment에서 스페인의 토마토에서 분리된 TSWV\_LL-N.05 (wild type; Debreczeni *et al.* 2015) 분리주와도 98~99%의 높은 상동성을 보였다. 특히 NS-BB20과 NS-AG28은 L segment에서 토마토 RB strain Pujol1TL3 (Debreczeni *et al.* 2015)와 S segment에서 고추 TSWV RB strain PVR (Debreczeni *et al.* 2015)과 P1 (Yoon *et al.* 2021) 분리주와도 96~98%의 상동성으로 크게는 같은 그룹에 속하였지만, RB strain의 저항성을 극복하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 NSm (C118Y, T120N; Lopez *et al.* 2011)과 NSs (T104A; Almási *et al.* 2017)에서의 아미노산

**Table 2.** Hosts, origins, and accession numbers of TSWV isolates

Isolate	Host plant	Origin	Accession no.		
			L segment	M segment	S segment
<b>SW-TO2</b>	<b>Tomato</b>	<b>South Korea</b>	<b>MT842843</b>	<b>MT842842</b>	<b>MT842844</b>
<b>CY-LC</b>	<b><i>Lycium chinense</i></b>	<b>South Korea</b>	<b>MN064722</b>	<b>MN064723</b>	<b>MN064724</b>
<b>CY-G1-2</b>	<b><i>Lycium chinense</i></b>	<b>South Korea</b>	<b>MT643234</b>	<b>MT842839</b>	<b>MN854655</b>
<b>NS-AG28</b>	<b><i>Angelica acutiloba</i></b>	<b>South Korea</b>	<b>MT643235</b>	<b>MT842840</b>	<b>MN854653</b>
<b>NS_BB20</b>	<b><i>Petasites japonicus</i></b>	<b>South Korea</b>	<b>MT643236</b>	<b>MT842841</b>	<b>MN854654</b>
KP	Paprika	South Korea	AB190813	AB190818	AB190819
YY	Pepper	South Korea	MF159049	MF159061	MF159073
CY	Pepper	South Korea	MF159039	MF159051	MF159063
Tomato NJ-JN	Tomato	South Korea	HM581934	HM581935	HM581936
Pepper1 CY-CN	Pepper	South Korea	HM581937	HM581938	HM581939
TSWV-5	<i>Stellaria aquatica</i>	South Korea	KC261950	KC261951	KC261952
TSWV-12	<i>Lactuca sativa</i>	South Korea	KC261965	KC261966	KC261967
TSWV-18	<i>Chrysanthemum</i> sp.	South Korea	KC261974	KC261975	KC261976
LS3	<i>Leonurus sibiricus</i>	South Korea	KM076651	KM076652	KM076653
P1	Pepper	South Korea	LC549179	LC549180	LC549181
TSWV-YN	Tomato	China	JF960237	JF960236	JF960235
PVR	<i>Capsicum</i> sp.	Spain	KP008132	KP008133	KP008134
LL-N.05	Tomato	Spain	KP008128	FM163373	KP008129
Pujol1TL3	Tomato	Spain	KP008130	hm015520	KP008131
PA01	<i>Capsicum</i> sp.	USA	KT160280	KT160281	KT160282
BasC	Basil	USA	MH745370	KU179514	KU179515
TSWV-QLD1	<i>Capsicum</i> sp.	Australia	KT717691	KT717692	KT717693
WA7	Tomato	Australia	KM365064	KM365065	KM365066
PepCal_10	<i>Capsicum</i> sp.	Italy	MH763621	MH756624	MG989673
PepCal_12	<i>Capsicum</i> sp.	Italy	MK348941	MH756625	MG989674
TswvTRPep	Pepper	Turkey	MK682812	MK715443	MK692930

\*Bold letters indicate isolates in this study. TSWV, tomato spotted wilt virus

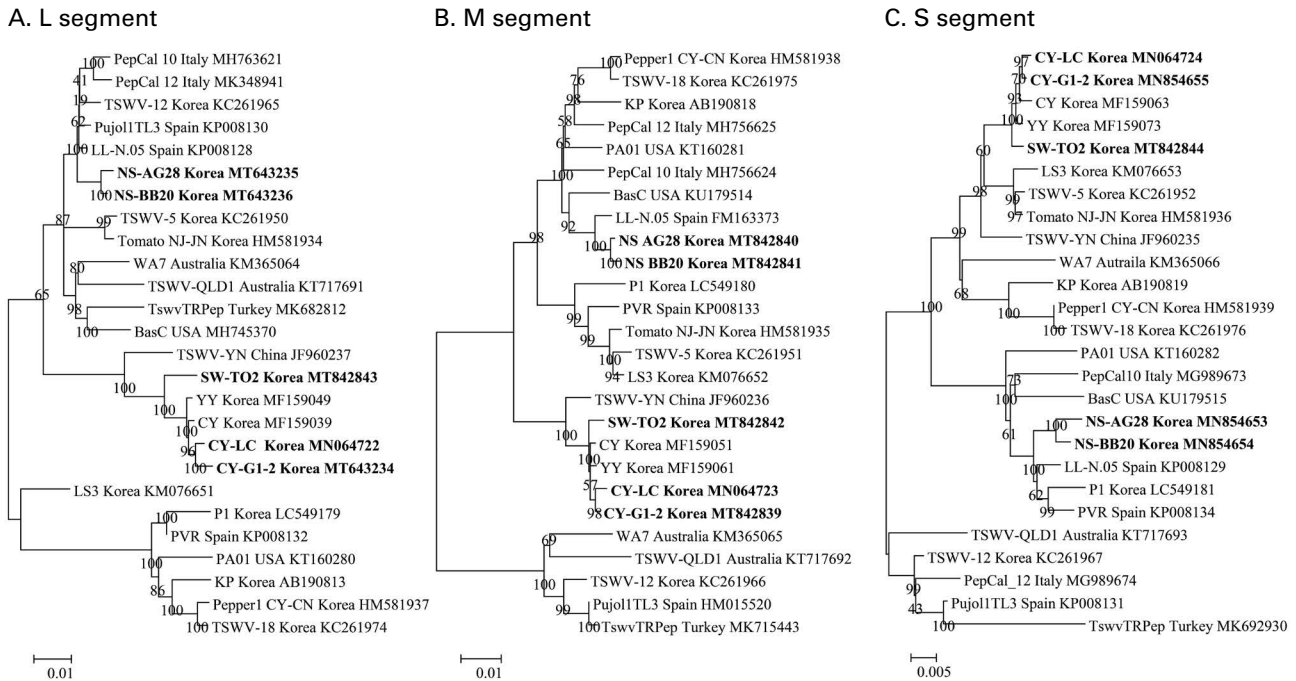
변이는 나타나지 않았다. 본 연구에서 사용한 4개의 TSWV 분리주는 모두 유전학적으로 TSWV RB strain은 아닌 것으로 확인되었다.

### 3. TSWV 저항성 판별을 위한 생물검정법 구축

TSWV 저항성 품종을 효율적으로 판별하기 위해 간편하고 표준화된 생물검정법이 필요하다. 이 논문에서는 국내에서 TSWV가 가장 피해를 주고 있는 가지과 작물인 고추와 토마토 품종을 대상으로 저항성 판별을 위한 생물검정법을 확립하였다. 저항성 판별을 위한 대상작물은 최소 5개체 이상을 준비하고 TSWV 저항성/감수성 판별기주 또는 시판품종을 대조구로 사용한다. 생물검정은 충매 등 바이러스 전염을 차단할 수 있는 온실(실내) 또는 식물생장

상에서 실시하고, 생장온도는 20~28°C를 유지하였다. 접종방법은 식물바이러스의 즙액접종(sap transmission) 방법 중 간단하고 정확하게 접종할 수 있는 미세상처를 통한 기계적 접종법(mechanical transmission)을 사용하였다. 접종시기는 고추 또는 토마토 본엽 3~4엽이 전개된 후에 본엽 1~2엽에 접종하였다. 접종원은 TSWV 감염 표준 시료 1g에 인산완충액(0.01 M Sodium phosphate buffer, pH 7.0) 10 mL (1 : 10 w/v)를 넣어 마쇄한 후 사용하였다. Carborundum (600 mesh; Fisher Scientific, USA)을 접종할 잎(본엽 1~2엽) 표면에 뿌려주고 마쇄한 TSWV 감염 즙액을 문질러 접종하였다. 접종 후 접종엽에 남아있는 Carborundum은 물로 씻어주었다. 병 조사방법은 접종 후 7~21일 동안에 1차 육안조사를 통해 접종엽과 상엽의 병징을 관찰하였으며, 상엽을 대상으로 RT-PCR 진단을 통해





**Fig. 1.** Phylogenetic analysis based on the complete nucleotide sequences of (A) L segments, (B) M segments, and (C) S segments of TSWV isolates. The phylogenetic tree was constructed by the Maximum likelihood (ML) method using best fit nucleotide substitution models L segments (TN93 + G), M segments (T92 + G), and S segments (T92 + G) and 1000 Bootstrap replications.

**Table 3.** Assessment of resistance to TSWV based on symptom monitoring and RT-PCR confirmation

Inoculated leaf	Symptom	RT-PCR* (upper leaf)	Response
	New emerging (upper) leaf		
Necrotic local lesions or no symptom	No symptom	Negative	Resistant
Necrotic local lesions or no symptom	Systemic symptoms (Necrotic local lesion, mosaic, yellowing, necrosis etc.)	Positive	Susceptible

\*RT-PCR using primer TSWV-6F (GAGATTCTCAGAATTCCAGT) and TSWV-6R (AGAGCAATCGTGCAATTTATTTC) amplifying 459 bp (Kim *et al.* 2017)

바이러스 감염 여부를 확인하였다. TSWV 저항성 평가는 Table 3과 같이 첫째, 접종엽에 괴사반점 증상이 나타나거나 병징이 없는 경우, 둘째, 상엽에 병징이 없는 경우, 셋째, 상엽을 RT-PCR 진단한 결과 음성이 나왔을 경우 등 3가지 조건이 다 충족될 때 저항성으로 평가하였다(Table 3).

#### 4. 시판 TSWV 저항성 품종 대상 생물검정 평가

TSWV 토마토 분리주(SW-TO2)를 포함하여 4개의 분리주를 사용하여 시판되는 토마토 10품종(TY달코미, 코모도, 토리, TY하이큐, TS력키, TY센스큐, 데프론, 해피니

스, 서광 및 텐텐)과 고추 9품종(TS챔프, GT-7, GT-5, 불칼라, 칼탄패스, 칼라퍼펙트, PR깁카, 파리 및 슈퍼마니파)을 대상으로 3개체씩 3반복으로 구축된 생물검정법을 적용하여 저항성 여부를 검정하였다. 토마토 품종 중 TSWV 접종하였을 때 상엽에서 병징이 없고, RT-PCR 결과 음성으로 확인되어 저항성으로 평가된 품종은 6품종(TY달코미, 코모도, 토리, TY하이큐, TS력키 및 TY센스큐)이었고, 데프론은 NS-BB20를 제외한 TSWV 3개 분리주에 대해서 감수성을 보였으며, 해피니스, 서광, 텐텐의 경우 모든 분리주에서 감수성을 나타냈다(Table 4, Fig. 2). 고추 품종에서는 TSWV 4개 분리주에 대해 저항성을 보인 품종은 6품종

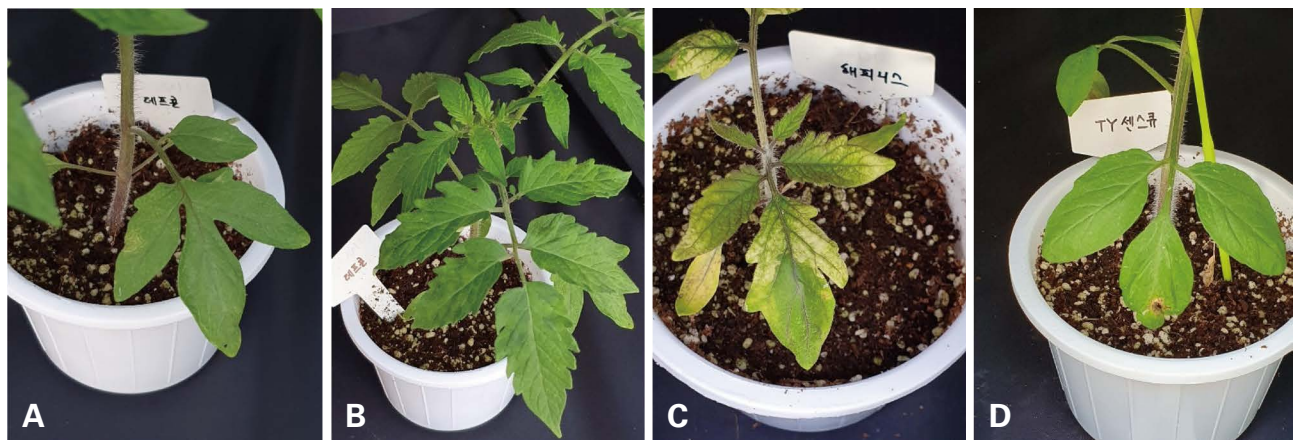
**Table 4.** Symptoms and incidence of TSWV isolates on tomato cultivars

Tomato cultivar	SW-TO2			CY-G1-2		
	Symptom <sup>a</sup>	RT-PCR <sup>b</sup>	Response <sup>c</sup>	Symptom	RT-PCR	Response
TY Dalcomy	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Comodo	-/-	-	R	-/-	-	R
Tory	nl/-	-	R	-/-	-	R
TY HighQ	nl/-	-	R	-/-	-	R
TS Lucky	-/-	-	R	-/-	-	R
TY SenseQ	-/-	-	R	nl/-	-	R
Defcon	nl,rs/rs,m	+	S	m,rs/m,nl,chl	+	S
Happiness	rs/rs,m	+	S	rs/m,chl	+	S
Seogwang	rs/m,rs,nl	+	S	rs/m,rs,nl	+	S
Tenten	rs/m,rs,nl	+	S	rs/m,rs,nl	+	S

Tomato cultivar	NS-BB20			NS-AG28		
	Symptom	RT-PCR	Response	Symptom	RT-PCR	Response
TY Dalcomy	-/-	-	R	nl/-	-	R
Comodo	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Tory	-/-	-	R	nl/-	-	R
TY HighQ	-/-	-	R	nl/-	-	R
TS Lucky	-/-	-	R	nl/-	-	R
TY SenseQ	-/-	-	R	nl/-	-	R
Defcon	-/-	-	R	nl,m,rs/m,dwf	+	S
Happiness	rs,m/m,dwf	+	S	m,nl,rs/m,rs,dwf	+	S
Seogwang	rs/m,rs,nl	+	S	rs/m,rs,nl	+	S
Tenten	rs/m,rs,nl	+	S	rs/mrs,nl	+	S

<sup>a</sup>m, mosaic; nl, necrotic local lesions; chl, chlorosis; rs, ring spots; dwf, dwarf; -, no symptom; <sup>b</sup>-, negative; +, positive to TSWV; <sup>c</sup>R, resistant; S, susceptible (systemic mosaic)



**Fig. 2.** Symptoms induced by TSWV isolates in tomato. Ring spots in inoculated leaves (A) and systemic mosaic (B) in upper leaves of Defcon cultivar susceptible to TSWV SW-TO2; yellow mosaic in upper leaves (C) of susceptible Happiness cultivar and necrotic spot in inoculated leaves and no symptoms in upper leaves (D) of TYsenseQ cultivar resistant to TSWV NS-AG28.

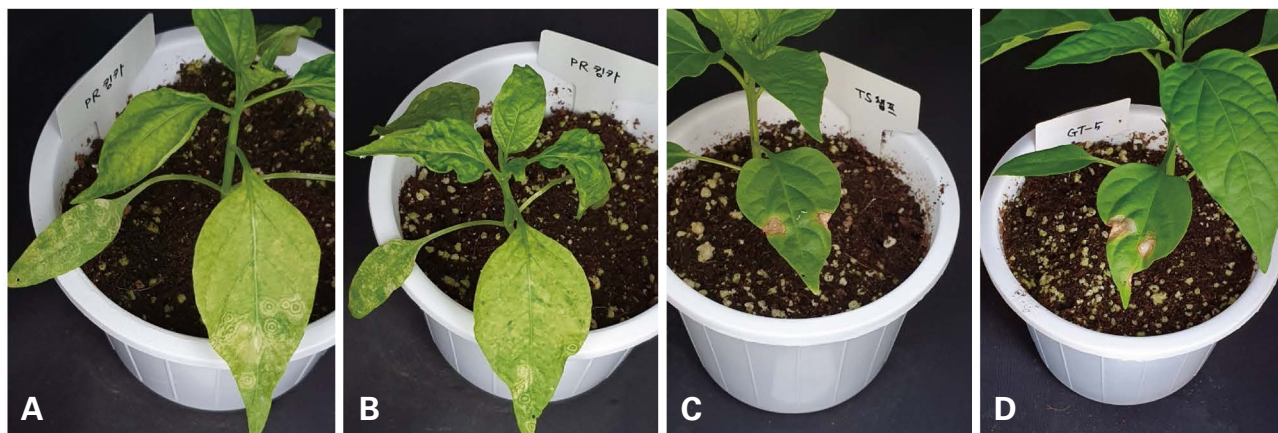
**Table 5.** Symptoms and incidence of TSWV isolates on pepper cultivars

Pepper cultivar	SW-TO2			CY-G1-2		
	Symptom <sup>a</sup>	RT-PCR <sup>b</sup>	Response <sup>c</sup>	Symptom	RT-PCR	Response
TS Champ	nl/-	-	R	nl/-	-	R
GT-7	nl/-	-	R	nl/-	-	R
GT-5	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Firecolor	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Coltanpass	nl/-	-	R	-/-	-	R
Colorperfect	nl/-	-	R	-/-	-	R
PRKingka	rs,m/m,rs	+	S	rs/m,rs	+	S
Quarri	rs/m,rs	+	S	rs/m,rs	+	S
Supermainta	rs/m,rs	+	S	rs/m,rs	+	S

Pepper cultivar	NS-BB20			NS-AG28		
	Symptom	RT-PCR	Response	Symptom	RT-PCR	Response
TS Champ	nl/-	-	R	nl/-	-	R
GT-7	nl/-	-	R	nl/-	-	R
GT-5	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Firecolor	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Coltanpass	nl/-	-	R	nl/-	-	R
Colorperfect	nl/-	-	R	nl/-	-	R
PRKingka	rs/m,rs	+	S	rs,m/m,rs	+	S
Quarri	rs/m,rs	+	S	rs/m,rs	+	S
Supermainta	rs/m,rs	+	S	rs/m,rs	+	S

<sup>a</sup>m, mosaic; nl, necrotic local lesions; rs, ring spots; -, no symptom: <sup>b</sup>-, negative; +, positive to TSWV: <sup>c</sup>R, resistant; S, susceptible (systemic mosaic)



**Fig. 3.** Symptoms induced by TSWV isolates in pepper. Ring spots in inoculated leaves (A) and systemic mosaic in upper leaves (B) of PRKingka cultivar susceptible to TSWV SW-TO2; necrotic spots in inoculated leaves (C) and no symptoms in upper leaves (D) of TSChamp and GT-5 cultivars resistant to TSWV NS-AG28.

(TS챔프, GT-7, GT-5, 불갈라, 칼탄패스 및 칼라퍼펙트)이 있고, PR킹카, 파리, 슈퍼마니라는 모든 TSWV 분리주에서

감수성을 보였다(Table 5, Fig. 3).

이 논문에서 사용한 생물검정법은 다양한 작물에서 분



리한 4개의 TSWV 균주에 대해서 유사한 저항성 평가 결과를 보여주어 저항성 판별을 위한 생물검정법으로 적합한 것으로 판단하였다. 기존에 TSWV 저항성 품종 평가 및 저항성 유전자원을 선별하기 위한 다양한 평가방법들이 보고되었다(Yang *et al.* 2012; Choi *et al.* 2016). Choi *et al.* (2016)은 토마토를 대상으로 1차 유묘검정과 2차 성체 검정을 통해 저항성을 내병성, 중간내병성, 감수성으로 평가하였고, Yang *et al.* (2012)은 증상등급을 6등급으로 나누고, 증상등급에서 병징이 나타나지 않는 유전자원을 저항성으로 보았다. 또한 고온에서 저항성 유전자 발현이 불안정하기 때문에 유묘기에 고온(35°C)에서 저항성 검정을 하는 것이 시간과 노력 등에서 효율적이라고 판단하였다. TSWV 저항성 품종 또는 유전자원을 선별하기 위해 본 연구에서 사용한 저항성 평가기준과 기존의 방법들과 상호 비교를 통해 표준화할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

토마토반점위조바이러스(TSWV)는 고추, 토마토 등 경제적으로 중요한 작물에 심각한 피해를 주는 바이러스들 중 한 종이다. TSWV의 넓은 기주범위, 매개충인 총채벌레 방제의 어려움 및 TSWV의 효과적인 치료제가 없기 때문에, 저항성 품종을 사용하는 것이 TSWV를 예방하는 가장 효과적인 수단이 될 수 있다. 본 연구에서는 토마토에서 분리된 TSWV 분리주(SW-TO2)의 유전학적·생물학적 특성을 구명하고, 최근에 국내에서 분리된 구기자, 머위, 당귀 TSWV 분리주와 비교하였다. 순수분리된 SW-TO2는 28종의 지표식물 중 토마토를 포함한 17종에서 원형반점, 모자이크 증상 등 전신감염 증상을 보였다. SW-TO2의 유전자 계통분석 결과 국내에서 분리된 고추, 구기자 TSWV 분리주와 98~99%의 상동성을 보이며 같은 그룹에 속하였다. TSWV 저항성 평가를 위한 생물검정법을 확립하고, 시판되고 있는 고추와 토마토 품종을 대상으로 4종의 TSWV 분리주에 대한 저항성 평가를 검정하였다. TSWV 저항성 평가는 첫째, 접종엽에 괴사반점 증상이 나타나거나 병징이 없는 경우, 둘째, 상엽에 병징이 없는 경우, 셋째, 상엽을 RT-PCR 진단한 결과 음성이 나왔을 경우 등 3가지 조건이 다 충족될 때 저항성으로 평가하였다.

## 사 사

This research was supported by a grant from the Agenda Program (PJ01424001) funded by the Rural Development Administration of Korea.

## REFERENCES

- Adkins S. 2000. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Mol. Plant Pathol.* 1:151-157.
- Almási A, K Nemes, Z Csömör, I Tóbiás, L Palkovics and K Salánki. 2017. A single point mutation in Tomato spotted wilt virus NSs protein is sufficient to overcome Tsw-gene-mediated resistance in pepper. *J. Gen. Virol.* 98:1521-1525.
- Batuman O, TA Turini, PV Oliveira, MR Rojas, M Macedo, HC Mellinger, S Adkins and RL Gilbertson. 2017. First report of a resistance-breaking strain of Tomato spotted wilt virus infecting tomatoes with the Sw-5 tospovirus-resistance gene in California. *Plant Dis.* 101:637-637.
- Boiteux LS. 1995. Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense*. *Theor. Appl. Genet.* 90:146-149.
- Boiteux LS and AC de Avila. 1994. Inheritance of a resistance specific to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinense* 'PI 159236'. *Euphytica* 75:139-142.
- Choi GS, SK Choi, IS Cho, SJ Kwon, JY Yoon and CH Kim. 2016. Evaluation of Tomato spotted wilt virus-GT tolerance in tomato cultivars. *Res. Plant Dis.* 22:213-216.
- Debreczeni DE, C Lopez, J Aramburu, JA Daros, S Soler, L Galipienso, BW Falk and L Rubio. 2015. Complete sequence of three different biotypes of tomato spotted wilt virus (wild type, tomato Sw-5 resistance-breaking and pepper Tsw resistance-breaking) from Spain. *Arch. Virol.* 160:2117-2123.
- De Haan P, R Kormelink, R de Oliveira Resende, F van Poelwijk, D Peters and R Goldbach. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 72:2207-2216.
- Ferrand L, MMS Almeida, AF Orílio, E Dal Bó, RO Resende and ML García. 2019. Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance-breaking isolates from Argentina. *Plant Pathol.* 68:1587-1601.
- Han JH, HS Choi, JD Lee, JD Kim, WP Lee, HS Choi, JS Kim and JB Yoon. 2012. Screening of Tomato spotted wilt virus resistance in tomato accessions. *Hortic. Sci. Technol.* 30:171-177.
- Kwak HR. 2019. Tomato Spotted Wilt Orthotospovirus. *Nature & Farming.* pp. 36-37.

- Kwak HR, HY Choi, WR Go, E Baek, HS Choi, JE Kim, M Kim and G Park. 2021a. First report of Tomato spotted wilt virus in *Petasites japonicus* in Korea. *Plant Dis.* 105:1235.
- Kwak HR, SB Hong, HY Choi, G Park, OS Hur, HS Byun, HS Choi and M Kim. 2021b. First report of Tomato spotted wilt virus in *Angelica acutiloba*. *Res. Plant Dis.* 27:84–90.
- Kwak HR, SW Son, HY Choi, WR Go, JE Kim, E Baek and HS Choi. 2020. First report of tomato spotted wilt virus in *Lycium chinense*. *Australas. Plant Dis. Notes* 15:5.
- Kwon SJ, IS Cho, JY Yoon and BN Chung. 2018. Incidence and occurrence pattern of viruses on peppers growing in fields in Korea. *Res. Plant Dis.* 24:66–74.
- Kwon SJ, YE Cho, OH Kwon, HG Kang and JK Seo. 2021. Resistance-breaking tomato spotted wilt virus variant that recently occurred in pepper in South Korea is a genetic reassortant. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0205-SC>.
- Kim JH, GS Choi, JS Kim and JK Choi. 2004. Characterization of Tomato spotted wilt virus from paprika in Korea. *Plant Pathol. J.* 20:297–301.
- Kim JH, MK Choi, HC Moon and HG Chon. 2020. Occurrence of major diseases in pesticide-free cultivated tomato and cucumber in Jeollabuk-do, South Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 38:486–495.
- Kim M, HJ Kang, HR Kwak, JE Kim, J Kim, JK Seo and HS Choi. 2017. First report of impatiens necrotic spot virus in *Hoya carnososa* in Korea. *Res. Plant Dis.* 23:383–387.
- Kumar S, G Stecher and K Tamura. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870–1874.
- Lee JS, WK Cho, MK Kim, HR Kwak, HS Choi and KH Kim. 2011. Complete genome sequences of three tomato spotted wilt virus isolates from tomato and pepper plants in Korea and their phylogenetic relationship to other TSWV isolates. *Arch. Virol.* 156:725–728.
- Lopez C, J Aramburu, L Galipienso, S Soler, F Nuez and L Rubio. 2011. Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 92:210–215.
- Margarita P, M Ciuffo and M Turina. 2004. Resistance breaking strain of Tomato spotted wilt virus (*Tospovirus; Bunyaviridae*) on resistant pepper cultivars in Almería, Spain. *Plant Pathol.* 53:795.
- Morse JG and MS Hoddle. 2006. Invasion biology of thrips. *Annu. Rev. Entomol.* 51:67–89.
- Moury B, K Selassie-Gebre, G Marchoux, AM Daubeze and A Palloix. 1998. High temperature effects on hypersensitive resistance to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Eur. J. Plant Pathol.* 104:489–498.
- Pappu HR, RAC Jones and RK Jain. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141:219–236.
- Parrella G, P Gognalons, K Gebre-Selassie, C Vovlas and G Marchoux. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *J. Plant Pathol.* 85:227–264.
- Roggero P, V Lisa, G Nervo and S Pennazio. 1996. Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum chinense* 'PI152225' to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). *Phytopathol. Mediterr.* 35:117–120.
- Stevens MR, SJ Scott and RC Gergerich. 1991. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica* 59:9–17.
- Storms MM, R Kormelink, D Peters, JW Van Lent and RW Goldbach. 1995. The nonstructural NSm protein of tomato spotted wilt virus induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology* 214:485–493.
- Thomas-Carroll ML and RAC Jones. 2003. Selection, biological properties and fitness of resistance-breaking strains of Tomato spotted wilt virus in pepper. *Ann. Appl. Biol.* 142:235–243.
- Yang EY, SK Choi, BN Chung, SY Chae, DK Park, WM Lee, HS Choi and S Kim. 2012. Selection of pepper germplasm resistant to Tomato spotted wilt virus in high temperature. *Korean J. Breed. Sci.* 44:559–566.
- Yoon JY, NH Her, IS Cho, BN Chung and SK Choi. 2021. First report of a resistance-breaking strain of Tomato spotted wilt orthotospovirus infecting *Capsicum annuum* carrying the Tsw resistance gene in South Korea. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1952-PDN>.