

## 국내 잎들깨에서 발생한 잠두위조바이러스2의 특성 구명

김현선<sup>†</sup>, 변희성<sup>†</sup>, 최유지<sup>1</sup>, 최현용, 서장균<sup>2</sup>, 최홍수, 이봉춘, 김미경<sup>3,\*</sup>, 곽해련<sup>\*</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 작물보호과, <sup>1</sup>금산군 농업기술센터, <sup>2</sup>서울대학교 국제농업기술학과, <sup>3</sup>충북대학교 식물의학과

## Characterization of broad bean wilt virus 2 isolated from *Perilla frutescens* in Korea

Hyun-Sun Kim<sup>†</sup>, Hee-Seong Byun<sup>†</sup>, You-Ji Choi<sup>1</sup>, Hyun-Yong Choi, Jang-Kyun Seo<sup>2</sup>, Hong-Soo Choi, Bong-Choon Lee, Mikyeong Kim<sup>3,\*</sup> and Hae-Ryun Kwak<sup>\*</sup>

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

<sup>1</sup>Agricultural Development and Technology Center, Geumsan 32708, Republic of Korea

<sup>2</sup>Graduate School of International Agricultural Technology, Seoul National University, Pyeongchang 25354, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

### Contribution to Environmental Biology

- BBWV2-GS-PF from *P. frutescens* was a distant genetic and pathogenic BBWV2 isolate.
- Characterization of this new strain of BBWV2 can be helpful for preventing viral spread in major host plants, including *P. frutescens*.

### \*Co-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

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 24 November 2022

First revised: 29 December 2022

Second revised: 20 January 2023

Revision accepted: 14 February 2023

**Abstract:** Broad bean wilt virus 2 (BBWV2) is a species in the genus *Fabavirus* and family *Secoviridae*, which is transmitted by aphids and has a wide host range. The BBWV2 genome is composed of two single-stranded, positive-sense RNAs, RNA-1 and RNA-2. The representative symptoms of BBWV2 are mosaic, mottle, vein clearing, wilt, and stunting on leaves, and these symptoms cause economic damage to various crops. In 2019, *Perilla frutescens* leaves with mosaic and yellowing symptoms were found in Geumsan, South Korea. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with specific primers for 10 reported viruses, including BBWV2, to identify the causal virus, and the results were positive for BBWV2. To characterize a BBWV2 isolate (BBWV2-GS-PF) from symptomatic *P. frutescens*, genetic analysis and pathogenicity tests were performed. The complete genomic sequences of RNA-1 and RNA-2 of BBWV2-GS-PF were phylogenetically distant to the previously reported BBWV2 isolates, with relatively low nucleotide sequence similarities of 76–80%. In the pathogenicity test, unlike most BBWV2 isolates with mild mosaic or mosaic symptoms in peppers, the BBWV2-GS-PF isolate showed typical ring spot symptoms. Considering these results, the BBWV2-GS-PF isolate from *P. frutescens* could be classified as a new strain of BBWV2.

**Keywords:** broad bean wilt virus 2, pathogenicity, genome sequence, symptomatic variation

## 1. 서 론

들깨(*Perilla frutescens*)는 꿀풀과의 1년생 초본의 특용작물이다. 한국에서 수백 년 동안 재배되어 왔으며, 독특한 향과 맛을 가진 잎은 흔하고 대중적인 엽채류로(Lee *et al.* 1998; Seo and Baek 2009; Dhyani *et al.* 2019), 잎과 종자 모두 다양한 음식의 재료로 이용되고 있다(Ko *et al.* 2021). 뿐만 아니라, HIV-1, SARS-CoV-2의 활성을 억제시킬 수 있는 물질을 함유하고 있어, 잠재적인 약용자원으로 활용될 가능성이 있다(Yamasaki *et al.* 1998; Asada *et al.* 1999; Kawahata *et al.* 2002; Tang *et al.* 2021). 국내에서는 재배 면적은 2020년 기준으로 충남, 경기, 전북 등 다양한 지역에서 18,515 ha 재배되고 있다(KOSIS 2020).

들깨에 감염하는 바이러스로는 일본에서 보고된 perilla mosaic virus (PerMV), 중국에서 보고된 broad bean wilt virus 2 (BBWV2) 그리고 국내에서 보고된 turnip mosaic virus (TuMV), cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), tomato spotted wilt virus (TSWV) 등이 있다(Cho *et al.* 2005; Kubota *et al.* 2020; Park *et al.* 2020; Xia *et al.* 2020; Cho *et al.* 2021).

잠두위조바이러스2 (Broad bean wilt virus2, BBWV2)는 *Secoviridae*과 *Fabavirus*속의 대표적 바이러스로(Taylor and Stubbs 1972), 넓은 기주 범위를 가지며 주로 목화진딧물과 복숭아혹진딧물과 같은 진딧물에 의해 비영속적으로(non-persistent manner) 전염되는 것으로 알려져 있다(Benner *et al.* 1985; Brunt *et al.* 1996). BBWV2는 25~30 nm 직경의 구형 입자로 되어 있으며, 유전자는 RNA-1 (약 6 kb), RNA-2 (약 4 kb)의 2개의 절편으로 이루어져 있다(Nakamura *et al.* 1998; Kwak *et al.* 2013a).

BBWV2는 경제적으로 중요한 원예, 관상작물에 피해를 주는 바이러스로, 세계적으로 분포되어 있으며(Taylor and Stubbs 1972; Ferrer *et al.* 2011), 국내에서는 고추(Lee *et al.* 2000), 완두(Choi *et al.* 2001), 잠두(Kwak *et al.* 2013b), 백합(Chang and Chun 1987), 시금치(Lee *et al.* 1979), 용담(Roh and Chang 1998), 글라디올러스(Park *et al.* 1998), 켈러리(Hahm *et al.* 1998), 명월초(Kwak *et al.* 2017) 등 다양한 식물에 감염하는 것으로 보고되었다. 특히, 고추에서는 오이모자이크바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV) 등 다른 바이러스와 함께 복합감염되어 피해를 주고 있다(Kwak *et al.* 2013a). BBWV2에 감염된 잎의

피해 증상은 모자이크, 모틀, 엽맥 퇴색, 황화 반점, 시들 증상 및 위축 등의 증상을 보인다.

본 연구에서는 2019년 충남 금산 지역의 잎들깨를 재배하는 농가에서 잎 엽맥을 따라 황화되고, 잎 표면에 황화 반점이 나타나며, 심한 모자이크와 퇴색 증상을 보이는 들깨 잎을 수집하였고, 수집한 들깨 잎으로부터 BBWV2를 분리하여 전체 유전자 염기서열 분석 및 생물검정을 통하여 잎들깨에서 분리된 BBWV2의 특성을 구명하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 바이러스 진단

2019년 충남 금산지역에서 친환경으로 재배되는 잎들깨의 잎에서 황화 반점과 퇴색 등의 바이러스 병징을 보이는 개체가 발견되었다(Fig. 1). 병징은 병이 진행됨에 따라 심한 모자이크 병징을 보이고 잎 전체가 퇴색되어 잎들깨의 상품성을 떨어뜨렸다. 이러한 증상이 바이러스에 의한 것인지 확인하기 위하여 투과전자현미경(LEO 912AB; Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였고, 바이러스의 정밀진단을 위해 total RNA를 추출하고(Plant RNA Prep Kit, Biocubesystem, Korea), 들깨에 이러한 병징을 일으킬 수 있는 주요 바이러스 10종에 대해 특이 프라이머(Supplementary Table A1)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 50°C에서 30분간 역전사 반응을 수행한 후 95°C에서 10분 변성 후, 95°C 30초 denaturation, 55°C 30초 annealing, 72°C 1분 extension을 35회 수행 후 마지막으로 72°C에서 5분 extension 후 완료하는 조건(Kwak *et al.* 2021)으로 진행하였다.

### 2.2. 바이러스 분리 및 병원성 검증

감염된 들깨 잎 조직에 10배(W/V)의 0.01 M의 인산완충액을 첨가하여 마쇄한 뒤 분리기주인(assay host plant) 흰명아주(*Chenopodium quinoa*)에 즙액 접종하여 3차에 걸쳐 단일병반을 순수분리하고(single local isolation), 담배(*Nicotiana benthamiana*)에서 증식하여 접종원으로



**Fig. 1.** *Perilla frutescens* leaves with mosaic and yellowing were collected from Geumsan, Korea, in 2019.

사용하였다. 기주 범위와 병원성을 검정하기 위하여 7과 26종의 지표식물(Table 1)에 3반복으로 접종하고 4주간 접종엽과 상엽의 병징을 관찰하고, BBWV2 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR 진단으로 감염 여부를 최종 확인하였다(Kwak *et al.* 2013a). 이러한 기주 범위와 병원성 검정 결과는 BBWV2-RP1 분리주의 병원성 검정 결과(Kwak *et al.* 2016)를 대조군으로 하여 본 연구에서 분리된 BBWV2-GS-PF 분리주의 병원성을 비교하였다.

### 2.3. 바이러스 전체 염기서열 분석

BBWV2-GS-PF 분리주의 전체 염기서열 분석을 위하여 감염된 담배(*N. benthamiana*) 잎으로부터 total RNA를 추출하여(RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Germany), NGS(Next-generation sequencing)를 의뢰하였다. NGS는 Illumina NovaSeq 6000 system을 이용하여 마크로젠사에서 수행하였다(Macrogen Inc., Korea). 양 말단의 정확한 염기서열 분석을 위하여, 특이 프라이머를 제작하여

(Supplementary Table A2), RACE(Rapid amplification of cDNA ends, 5' and 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends kit, Thermo, USA)와 클로닝을 수행하여 전체 염기서열을 얻었다. DNA Star v. 5.02(Lasergene, Madison, USA)의 SeqMan 프로그램을 사용하여 DNA assembly를 수행하여 최종적으로 전체 염기서열을 결정하였고, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank에 등록하였다. RNA-1과 RNA-2의 전체 염기서열을 기반으로 한 계통분석을 수행하였다. NCBI GenBank에 등록되어 있는 BBWV2의 18개 분리주와 out-group으로 BBWV1(Broad bean wilt virus 1)의 2개의 분리주를 이용하여 각각의 전체 염기서열을 Geneious Pro 10 software를 이용하여 alignment를 수행하였고 염기서열 상동성을 분석하였다. 계통분석(phylogenetic tree)은 MEGA X 프로그램의 Maximum likelihood method를 사용하였고(Kumar *et al.* 2018), 계통수의 가지에 대한 통계적 유의성은 bootstrap 1,000반복을 수행하는 방법으로 분석하였다.

**Table 1.** Symptoms observed on indicator plants mechanically inoculated with BBWV2 isolated from *Perilla frutescens*

Indicator plants		Symptoms <sup>a</sup>	Incidence <sup>b</sup>
Labiatae	<i>Perilla frutescens</i>	-/m	3/3
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	rs, nl/rs, m, dist	3/3
	<i>N. clevenlandii</i>	rs/-	3/3
	<i>N. debneyi</i>	nl/-	3/3
	<i>N. glutinosa</i>	nl/m	3/3
	<i>N. occidentalis</i>	nl/nl, vn	3/3
	<i>N. rustica</i>	-/rs	3/3
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi-nc	rs/-	3/3
	<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	rs/-	3/3
	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	rs/nl	3/3
Solanaceae	<i>N. tabacum</i> cv. Ky57	rs/-	3/3
	<i>N. tabacum</i> cv. BY	rs/-	3/3
	<i>Petunia hybrida</i>	-/rs, m	3/3
	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Tenten	-/-	3/3
	<i>L. esculentum</i> cv. Seogwang	-/-	3/3
	<i>Capsicum annuum</i> cv. Supermanita	rs/m	3/3
	<i>C. annuum</i> cv. Quari	rs/rs, mm	3/3
	<i>C. annuum</i> cv. PRkingka	rs, m/rs, m	3/3
	<i>C. annuum</i> var. <i>angulosum</i> (Paprika)	crs, rs, m/crs, rs, m	3/3
	<i>Datura stramonium</i>	nl/cl, m	3/3
<i>Physalis angulata</i> L.	rs/nl, rs	3/3	
Leguminosae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	nl/-	2/2
	<i>Vicia faba</i>	n, crs/n	1/3
	<i>Vigna unguiculata</i>	pp/-	2/2
	<i>Pisum sativum</i>	-/-	2/2
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i>	-/-	0/3
	<i>Cucumis sativus</i>	-/-	0/3
	<i>Citrullus lanatus</i>	-/-	0/3
	<i>Cucumis melo</i>	-/-	0/3
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	nl/-	3/3
	<i>C. quinoa</i>	nl/cl, nl, dist	3/3
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	cl/m	2/3
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i>	rs/rs, dist	3/3

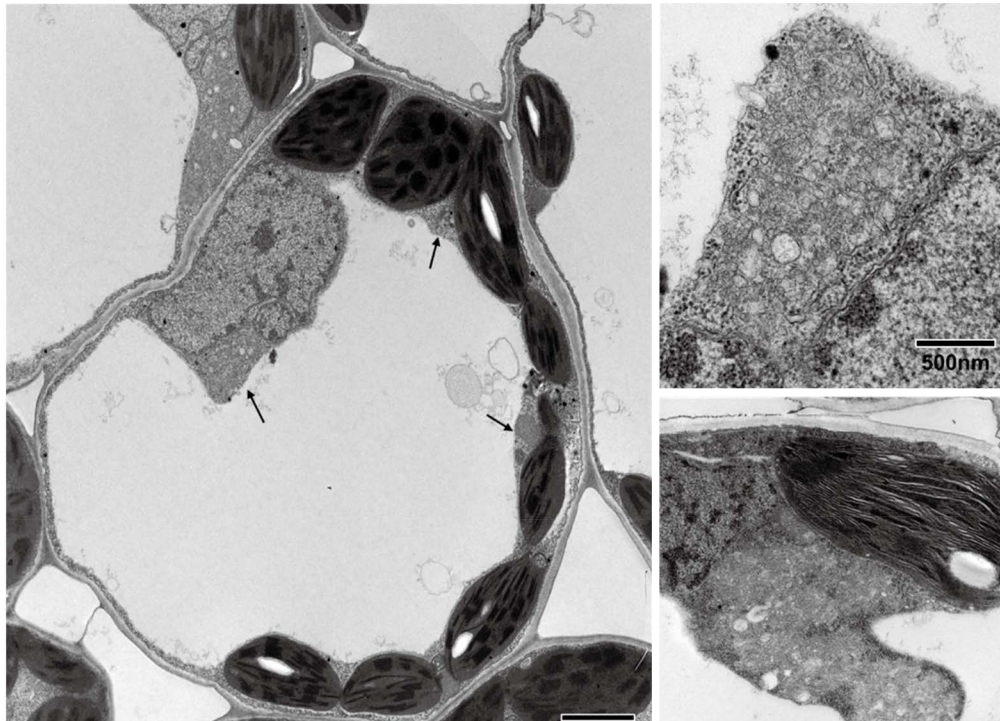
<sup>a</sup>cl, chlorotic local lesion; crs, chlorotic ring spot; dist, distortion; m, mosaic; mm, mild mosaic; nl, necrotic local lesion; pp, pinpoint; rs, ring spot; vn, vein necrosis; -, no symptom. <sup>b</sup>No. of plant infected/No. of plant inoculated.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 잠두위조바이러스2 분리 및 생물학적 특성 분석

2019년 충남 금산지역의 잎들깨 재배농가에서 황화 반점 및 퇴록 증상 등 바이러스 의심 증상을 보이는 잎이 발견되었다. 이러한 잎은 투과전자현미경을 이용하여 세포질

을 관찰했을 때, 바이러스에 의한 세포막 증식(membrane proliferation)을 확인할 수 있었고(Fig. 2), 특이 프라이머를 이용하여 진단한 결과 BBWV2 감염이 확인되었다(Supplementary Fig. A1). 흰명아주(*C. quinoa*)에서 3차례에 걸쳐 단일병반(single local lesion)을 순수분리하여 담배(*N. benthamiana*)에 증식하였다. 분리한 BBWV2-GS-PF



**Fig. 2.** Membrane proliferation, which is one of the inclusion body structures induced by BBWV2, was observed in the cytoplasm of *Perilla frutescens* leaves.

**Table 2.** Symptom comparison on indicator plants induced by BBWV2 isolates

Indicator plants		Symptomatic response <sup>a</sup> to each virus isolate	
		GS-PF	RP1 <sup>b</sup>
<i>Labiatae</i>	<i>Perilla frutescens</i>	-/m	-/y
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	rs, nl/rs, m, dist	-/m
	<i>N. clevenlandii</i>	rs/-	y/mm
	<i>N. occidentalis</i>	nl/nl, vn	nl/nl, vc, m
	<i>C. annuum</i> cv. Quari	rs/rs, mm	y/mm
	<i>C. annuum</i> var. <i>angulosum</i> (Paprika)	crs, rs, m/crs, rs, m	y/mm
<i>Leguminosae</i>	<i>Vicia faba</i>	n, crs/n	-/y
	<i>Pisum sativum</i>	-/-	-/-
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	nl/-	cl/cl, m, dist
	<i>C. quinoa</i>	nl/cl, nl, dist	cl/cl, vc, m, y
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	cl/m	-/mm

<sup>a</sup>cl, chlorotic local lesion; crs, chlorotic ring spot; dist, distortion; m, mosaic; mm, mild mosaic; nl, necrotic local lesion; pp, pinpoint; rs, ring spot; vc, vein clearing; vn, vein necrosis; y, yellowing; -, no symptom. <sup>b</sup>BBSV2-RP1 isolated from pepper (Kwak *et al.* 2016).

분리주의 생물학적 특성을 구명하기 위하여 7과 26종의 지표식물에 접종한 후 접종엽과 상업에서 병징을 관찰하여,

기주 범위와 병원성을 확인하였다 (Table 1). 생물검정 결과, BBWV2-GS-PF는 *N. benthamiana*를 포함한 13종에서

전신감염을 보였으며, 담배에서는 주로 점종엽과 상엽에서 동일하게 원형 반점과 모자이크, 괴사 증상 등을 보였다. 또한 기존에 고추에서 분리된 BBWV2-RP1 분리주의 경우(reference isolate, Kim *et al.* 2021), 고추와 파프리카에서 약한 모자이크 증상을 보이는 것과는 다르게, BBWV2-GS-PF는 모자이크 증상뿐만 아니라 점종엽과 상엽에서 모두 전형적인 원형 반점 증상을 보였다(Table 2, Fig. 3).

*Nicotiana*속 11종 중 *N. clevelandii* 등 6종에서는 점종엽에서만 괴사 및 원형 반점 증상을 보이고 상엽에서는 병징이 나타나지 않았으며, 동부를 포함한 콩과 작물 3종에서는 점종엽에서만 괴사 증상이 나타나거나, 병징이 나타나지 않았다. 오이를 포함한 박과 작물 4종과 토마토 2종에서는 점종엽과 상엽 모두에서 병징이 나타나지 않았다. 이러한 생물검정 결과는 RT-PCR 진단으로 최종 확인되었다.



**Fig. 3.** Symptoms on indicator plants mechanically inoculated with the BBWV2-GS-PF isolate. (A) Mosaic in *Perilla frutescens*, (B) ring spots and mosaic in *Nicotiana benthamiana*, and (C) chlorotic ring spots in *Capsicum annuum* var. *angulosum* (Paprika).

**Table 3.** Database of complete nucleotide sequences for BBWV isolates

Virus	Isolate	Host reported from	Country reported	NCBI accession No.	
				RNA1	RNA2
BBWV2	GS-PF	<i>Perilla frutescens</i>	Korea	OP603931	OP603932
	AB1	<i>Achyranthes bidentata</i>	Korea	MH447988	MH447989
	B935	<i>Vicia faba</i>	China	AF149425	AJ132844
	BB2	<i>Vicia faba</i>	Korea	KC625492	KC625506
	BR	<i>Dioscorea oppositifolia</i>	Korea	KX234809	KX234810
	IA	<i>Gentiana</i> spp.	Japan	AB051386	AB032403
	IP	<i>Capsicum annuum</i>	Japan	AB023484	AB018698
	K	<i>Capsicum annuum</i>	Korea	AF144234	AF104335
	LN	<i>Sesamum indicum</i>	China	MK116519	MK118749
	LS2	<i>Leonurus sibiricus</i>	Korea	KM076648	KM076649
	MB7	<i>Vicia faba</i>	Japan	AB013615	AB013616
	ME	<i>Megaskepasma erythrochlamys</i>	Singapore	NC003003	NC003004
	P2	<i>Pisum sativum</i>	Korea	KC625498	KC625512
	PAP1	<i>Capsicum annuum</i> var. <i>gulosum</i>	Korea	KT380020	KT380021
	PC	<i>Gentiana scabra</i>	Korea	MW939476	MW939477
	RP1	<i>Capsicum annuum</i>	Korea	KT380022	KT380023
	SN	<i>Gynura procumbens</i>	Korea	KX686589	KX686590
	SP	<i>Spinacia oleracea</i>	Korea	KC625505	KC625518
XJ14-3	<i>Lycopersicon esculentum</i> MILL	China	FN985164	HQ283389	
BBWV1	PV132	<i>Spinacia oleracea</i>	USA	AB084450	AB084451
	Ben	<i>Capsicum annuum</i>	Spain	AY781171	AY781172

### 3.2. 잠두위조바이러스2 분리주의 유전학적 특성 분석

BBWV2-GS-PF 분리주의 유전자 분석을 위하여 NGS를 수행한 결과, RNA-1과 RNA-2의 거의 전체 염기서열을 얻었다(Supplementary Table A3). 양 말단의 정확한 염기서열 분석을 위하여, 특이 프라이머를 이용하여 RACE를 진행하였고 시퀀싱을 통해 전체 염기서열을 얻었다. 이러한 염기서열을 DNA star v. 5.02 (Lasergene, USA)의 SeqMan 프로그램으로 DNA assembly를 수행하여 최종적으로 RNA-1 (5,948 bp)과 RNA-2 (3,575 bp)의 염기서열을 결정하였고, NCBI의 GeneBank에 등록하였다(Table 3). 기존에 NCBI GeneBank에 등록되어 있는 18개의 BBWV2 분리주와 2개의 BBWV1 분리주의 RNA-1과 RNA-2의 전체 염기서열을 대상으로(Table 3), Geneious Pro 10 software를 이용하여 alignment를 수행하고 상동성을 비교하였다. BBWV2-GS-PF 분리주의 RNA-1은 한국의 마에서 분리된 BR 분리주와 80.6%의 가장 높은 상동성을 보였고(Table 4), RNA-2는 한국의 잠두에서 분리된 BB2와 익모초에서 분리된 LS2, 일본의 고추에서 분리된 IP, 싱가포르의 적포화에서 분리된 ME 분리주와 77.5%의 가장 높은 상동성을 보였다(Table 5). 기존

에 알려진 BBWV2 분리주들은 RNA-1과 RNA-2 각각 크게 2개의 그룹으로 나뉘고, 그룹 내 상동성은 약 90% 이상, 그룹 간 상동성은 약 78% 이상을 보여주었다(Kwak *et al.* 2013b). BBWV2-GS-PF는 두 그룹과의 상동성이 각각 약 76~80% 나타내어, 어느 그룹에도 속하지 않는 것으로 보인다. 또한, BBWV2 분리주들의 전체 유전자 염기서열을 대상으로 MEGA X 프로그램의 Maximum likelihood method을 이용한 계통분석 결과, BBWV2 RNA-1과 RNA-2는 크게 2개의 그룹으로 나뉘는데, BBWV2-GS-PF의 RNA-1과 RNA-2는 두 개의 그룹에 속하지 않는 새로운 계통으로 분화된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

### 3.3. 잠두위조바이러스2 병원성과 유전학적 특성의 관련성

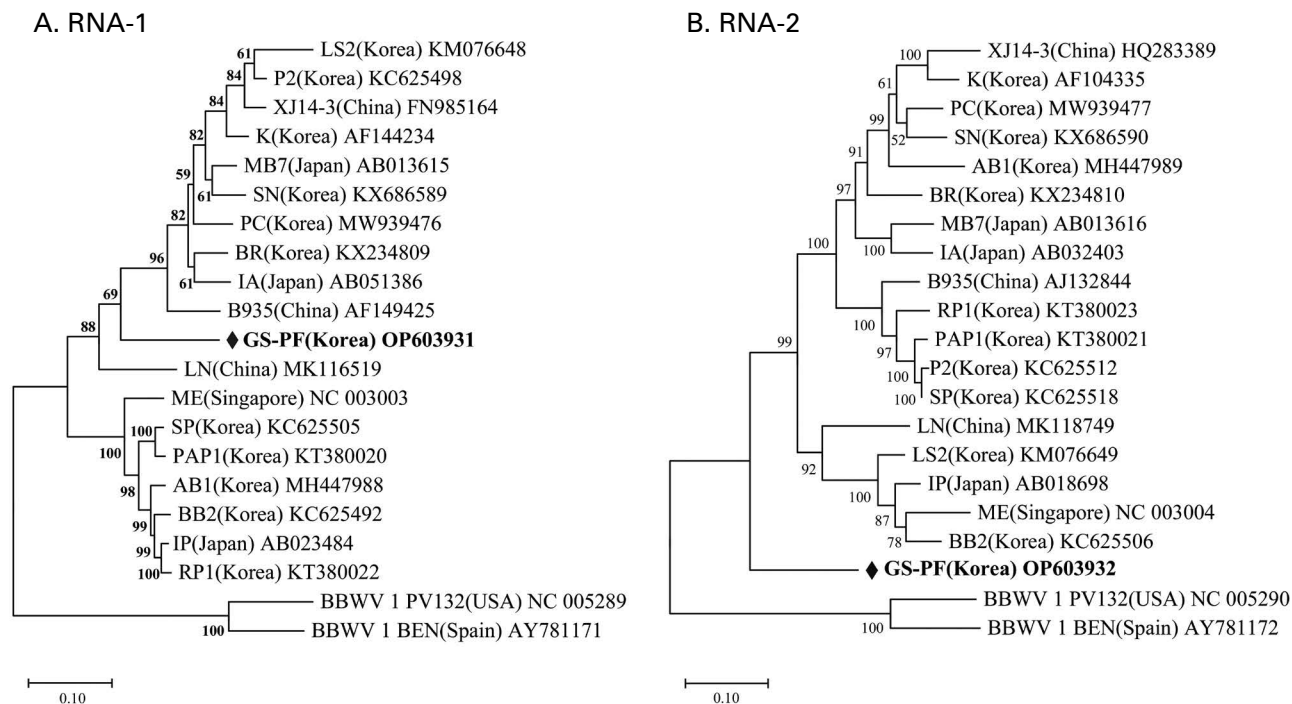
대조군으로 사용한 BBWV2-RP1 분리주는 고추와 파프리카에서 약한 모자이크 병징을 보였으나, 본 연구에서 분리된 BBWV2-GS-PF는 고추와 파프리카에서 모자이크 증상과 함께 전형적인 원형 반점 증상을 보였다(Table 2, Fig. 3). 또한, 들깨와 담배(*N. benthamiana*)에서도 BBWV2-RP1

**Table 4.** Nucleotide and amino acid sequence identities (%) between RNA-1 of the BBWV2 Korean isolate GS-PF and RNA-1 of other BBWV isolates

Virus	Isolate	Full genome (nt)	5' NCR (nt)	Co-pro (aa)	NTBM (aa)	VPg (aa)	Pro (aa)	RdRp (aa)	3' NCR (nt)
BBWV2	AB1	78.9	88	76.5	91.8	92.3	90	91.8	80.7
	B935	79.7	88.9	77.1	92.1	92	92.8	94.3	83.6
	BB2	78.6	88.5	75.9	91.6	92.3	90.4	92.4	81.6
	BR	80.6	83.5	79.3	92.4	92	93.3	94.6	85.8
	IA	79.9	87.2	78.2	92.4	92	92.3	94	85.8
	IP	78.7	88.5	75.6	91.7	96	89.4	92.1	79.8
	K	79.4	74.1	77	91.2	9	93.3	93.4	85.7
	LN	79.6	88	70.1	92.1	96	92.8	93.1	84.1
	LS2	79.7	88.9	76.5	92.3	92.3	92.8	93.4	84.8
	MB7	80.5	87.6	78.8	92.1	92	92.8	94.8	85.1
	ME	78.1	86.3	75.6	91	84	87.5	91.3	81.9
	P2	79.8	87.7	76.3	92.4	92.3	93.3	93.8	84.1
	PAP1	78.4	88.8	75.1	91.8	88.5	90.4	92.4	83
	PC	80	79	79.4	92.4	92.3	92.8	95.1	85
	RP1	78.6	88.9	76.2	91.4	92.3	89.5	92.6	81.4
SN	80.2	88.2	78.5	91.6	92	92.3	94.6	84.1	
SP	78.5	88	75.4	91.6	88.5	90	92.7	83	
XJ14-3	80.2	88.1	78.2	92.4	92	92.8	94	84.1	
BBWV1	BEN	63.8	67.9	39.9	67.7	53.8	57.2	67.8	60.2
	PV132	64.2	70.7	40.8	67.7	50	58.4	67.2	58.2

**Table 5.** Nucleotide and amino acid sequence identities (%) between RNA-2 of the BBWV2 Korean isolate GS-PF and RNA-2 of other BBWV isolates

Virus	Isolate	Full genome (nt)	5' NCR (nt)	MP (aa)	LCP (aa)	SCP (aa)	3' NCR (nt)
BBWV2	AB1	76.7	75.7	83.4	91	89.3	74.7
	B935	76.8	72.3	82.4	92.8	87.8	74.2
	BB2	77.5	78.2	81.5	91	88.8	76
	BR	76.5	72.5	79.3	91.6	89.7	73.6
	IA	76.3	73.8	81.9	91.8	87.3	78
	IP	77.5	77.7	80.4	91.5	88.8	73.5
	K	76.7	74.3	86.1	92	89.3	76.3
	LN	76.2	77.2	81.7	90.5	87.3	69.9
	LS2	77.5	75.9	81.5	91.8	88.3	74.3
	MB7	76.9	73.3	82.6	92	88.8	78.1
	ME	75.7	78	78.9	89.6	86.3	62.4
	P2	77	73.8	83	92.3	89.3	76.9
	PAP1	77	71.7	83	92.3	88.8	77.7
	PC	77	71.7	83	92	89.3	77.6
	RP1	76.9	72	81.9	92	88.8	78
SN	76.9	73.6	83.4	91.8	89.3	75.4	
SP	77	74.2	83.2	92.3	89.3	76.9	
XJ14-3	76.9	74.8	81.9	91.5	89.3	77.4	
BBWV1	BEN	62	67.3	52.5	64.9	59.9	60.6
	PV132	62.7	65.4	52.5	64.9	59.9	61.6



**Fig. 4.** Phylogenetic trees reconstructed based on the complete nucleotide sequences of RNA-1 (A) and RNA-2 (B) in the BBWV2 isolates. The maximum likelihood method implemented in MEGA X was used to reconstruct the trees. Numbers on the branches indicate bootstrap percentages based on 1,000 replicates.



은 황화 또는 약한 모자이크 증상을 나타낸 반면 BBWV2-GS-PF는 각각 모자이크와 원형 반점 증상을 나타냈다 (Table 2, Fig. 3). 이전 보고된 연구 결과에 따르면, BBWV2의 유전자 중 RNA-2는 BBWV2가 감염시킬 수 있는 기주 범위나 병원성 등과 관련이 있으며 (Kwak *et al.* 2016; Kim *et al.* 2021), 특히 고추에서 병징의 심도는 RNA-2의 movement protein (MP) 부분에 의해 결정된다고 알려져 있다 (Seo *et al.* 2017). 위와 같은 이전 연구 결과에 따라서, BBWV2-GS-PF의 병원성 차이가 RNA-2 유전자 차이 때문이라고 유추할 수 있는데, RNA-2가 encoding하는 아미노산 상동성을 NCBI에 등록된 BBWV2의 다른 분리주들과 비교하여 분석한 결과, MP의 아미노산 상동성이 large coat protein (LCP)와 Small coat protein (SCP)보다 비교적 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Table 5). 이러한 RNA-2가 encoding하는 아미노산의 유전적 차이가 실제로 병원성과 연계되는지는 향후 감염성 클론을 제작하여 연구할 계획이다.

BBWV2는 국내 고추 포장에서 가장 많이 발생하는 바이러스 중의 하나이다 (Kwak *et al.* 2013a). 들깨에서 새롭게 분리된 BBWV2 계통은 들깨에서만 아니라 고추로 확산될 경우 피해가 우려된다. 새로운 계통에 대한 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 사료된다.

## 적 요

잠두위조바이러스2 (BBWV2)는 경제적으로 중요한 원예, 관상작물에 심각한 피해를 주는 바이러스 중의 하나이다. BBWV2의 넓은 기주 범위, 매개충 방제의 어려움 등 효과적인 치료제가 없기 때문에, 병을 예방하거나 저항성 품종의 개발 등을 위해서는 BBWV2의 새로운 분리주들의 특성 조사와 연구가 필요하다. 본 연구에서는 2019년 금산지역의 잎들깨 재배농가에서 분리된 BBWV2 분리주 (BBWV2-GS-PF)의 유전학적·생물학적 특성을 구명하고 기존에 보고된 분리주들과의 특성을 비교하였다. 순수 분리된 BBWV2-GS-PF는 기존 분리주와 달리 들깨에서 심한 모자이크 증상과 고추에서 원형 반점 증상을 보였다. BBWV2-GS-PF의 유전자 계통분석 결과, 기존에 알려진 2개의 그룹과 약 76~80%의 비교적 낮은 유전자 상동성을 보이며 계통이 분화된 것을 확인할 수 있었다.

## CRedit authorship contribution statement

HS Kim: Methodology, Data curation, Writing-Original draft. HS Byun: Methodology. YJ Choi: Investigation. HY Choi: Investigation. JK Seo: Data curation. HS Choi: Conceptualization. BC Lee: Data curation. MK Kim: Visualization, Writing-Review & Editing. HR Kwak: Conceptualization, Data curation, Writing-Review & Editing, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Agenda Program (PJ01491302), funded by the Rural Development Administration of Korea.

## REFERENCES

- Asada M, Y Fukumori, M Inoue, K Nakagomi, M Sugie, Y Fujita, N Tomizuka, Y Yamazaki and S Oka. 1999. Glycoprotein derived from the hot water extract of mint plant, *Perilla frutescens* Britton. J. Agric. Food Chem. 47:468-472. <https://doi.org/10.1021/jf9802777>
- Benner CP, CW Kuhn, JW Demski, JW Dobson, P Colditz and FW Nutter Jr. 1985. Identification and incidence of pepper viruses in Northeastern Georgia. Plant Dis. 69:999-1001.
- Brunt AA, K Crabtree, MJ Dallwitz, AJ Gibbs and L Watson. 1996. Viruses of Plants. CAB International. Wallingford, UK.
- Chang MU and JD Chun. 1987. Studies on viruses isolated from *Lilium* spp. in Korea. Plant Pathol. J. 3:223-235.
- Cho IS, JY Yoon, BN Chung and HS Lim. 2021. First report of cucumber green mottle mosaic virus infecting *Perilla frutescens* in Korea and the world. J. Plant Pathol. 103:347. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00672-6>
- Cho JD, JS Kim, JY Kim, JH Kim, SH Lee, GS Choi, HR Kim and BN Chung. 2005. Occurrence and symptoms of tomato spotted wilt virus on vegetables in Korea (I). Res. Plant Dis. 11:213-216. <https://doi.org/10.5423/RPD.2005.11.2.213>
- Choi HS, JD Cho, KH Lee and JS Kim. 2001. Broad bean wilt fabaviruses and their specific ultrastructures. Kor. J. Electron Microscopy 31:215-222.
- Dhyani A, R Chopra and M Garg. 2019. A review on nutritional

- value, functional properties and pharmacological application of *Perilla* (*Perilla frutescens* L.). *Biomed Pharmacol. J.* 12:649–660. <https://doi.org/10.13005/bpj/1685>
- Ferrer RM, I Ferriol, P Moreno, J Guerri and L Rubio. 2011. Genetic variation and evolutionary analysis of broad bean wilt virus 2. *Arch. Virol.* 156:1445–1450. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0990-3>
- Hahm YI, M Kwon, JS Kim, HW Seo and JH Ahn. 1998. Surveys on disease occurrence in major horticultural crops in Kangwon Alpine areas. *Plant Pathol. J.* 14:668–675.
- Kawahata T, T Otake, H Mori, Y Kojima, I Oishi, S Oka, Y Fukumori and K Sano. 2002. A novel substance purified from *Perilla frutescens* Britton inhibits an early stage of HIV-1 replication without blocking viral adsorption. *Antivir. Chem. Chemother.* 13:283–288.
- Kim MH, HR Kwak, B Choi, SJ Kwon and JK Seo. 2021. Genetic plasticity in RNA2 is associated with pathogenic diversification of broad bean wilt virus 2. *Virus Res.* 304:198533. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198533>
- Ko HR, H Kang, EH Kim, EH Park and SG Park. 2021. Incidence of plant-parasitic nematodes in perilla in Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 39:147–155. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.2.147>
- KOSIS. 2020. Crop production survey index. Korea Statistical Information Service, Statistics Korea, Korea.
- Kubota K, T Usugi, Y Tomitaka, Y Shimomoto, S Takeuchi, F Kadono, H Yanagisawa, Y Chiaki and S Tsuda. 2020. Perilla mosaic virus is a highly divergent Emaravirus transmitted by *Shevtchenkella* sp. (Acari: Eriophyidae). *Phytopathology* 110:1352–1361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0013-R>
- Kumar S, G Stecher, M Li, C Knyaz and K Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kwak HR, MK Kim, M Nam, JS Kim, KH Kim, B Cha and HS Choi. 2013a. Genetic compositions of broad bean wilt virus 2 infecting red pepper in Korea. *Plant Pathol. J.* 29:274–284. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2012.0190>
- Kwak HR, MK Kim, YJ Lee, JK Seo, JS Kim, KH Kim, BJ Cha and HS Choi. 2013b. Molecular characterization and variation of the broad bean wilt virus 2 isolates based on analyses of complete genome sequences. *Plant Pathol. J.* 29:397–409. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2013.0036>
- Kwak HR, YJ Lee, J Kim, MK Kim, JS Kim, HS Choi and JK Seo. 2016. A determinant of disease symptom severity is located in RNA2 of broad bean wilt virus 2. *Virus Res.* 211:25–28. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.018>
- Kwak HR, WR Go, M Kim, CS Kim, HS Choi, JK Seo, JG Kim and JS Kim. 2017. First report of broad bean wilt virus 2 in *Gynura procumbens* in Korea. *Plant Dis.* 101:514. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1413-PDN>
- Kwak HR, HY Choi, SB Hong, OS Hur, HS Byun, HS Choi and M Kim. 2021. Development of a bioassay for screening of resistance to Tomato spotted wilt virus isolate from Korea. *Korean J. Environ. Biol.* 39:319–328. <https://doi.org/10.11626/KJEB.2021.39.3.319>
- Lee BH, ST Lee and YS Kim. 1998. Reference review for the scientific researches on perilla. *RDA J. Ind. Crop. Sci.* 40:80–112.
- Lee SH, KW Lee and BJ Chung. 1979. Investigations on the virus diseases in spinach (*Spinacia oleracea* L.) II. Identification of broad bean wilt virus occurring spinach. *Kor. J. Plant Port.* 18:11–14.
- Lee U, JS Hong, JK Choi, KC Kim, YS Kim, IS Curtis, HG Nam and PO Lim. 2000. Broad bean wilt virus causes necrotic symptoms and generates defective RNAs in *Capsicum annuum*. *Phytopathol.* 90:1390–1395. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.12.1390>
- Nakamura S, T Iwai and R Honkura. 1998. Complete nucleotide sequence and genome organization of broad bean wilt virus 2. *Phytopathol. Soc. Jpn.* 64:565–568.
- Park IS, KW Kim, HJ Kyun and MU Chang. 1998. The viruses in *Gladiolus hybridus* cultivated in Korea 2. Broad bean wilt virus, Cucumber mosaic virus and Tobacco rattle virus. *Plant Pathol. J.* 14:83–91.
- Park SH, JS Park, TS Park and JS Hong. 2020. First report of turnip mosaic virus infecting *Perilla frutescens* in Korea. *J. Plant Pathol.* 102: 969. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00536-z>
- Roh SH and MU Chang. 1998. Three viruses isolated from *Gentiana* spp. in Korea. *Plant Pathol. J.* 14:425–432.
- Seo JK, HR Kwak, B Choi, SJ Han, MK Kim and HS Choi. 2017. Movement protein of broad bean wilt virus 2 serves as a determinant of symptom severity in pepper. *Virus Res.* 242:141–145. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.024>
- Seo WH and HH Baek. 2009. Characteristic aroma-active compounds of Korean perilla (*Perilla frutescens* Britton) leaf. *J. Agric. Food Chem.* 57:11537–11542. <https://doi.org/10.1021/jf902669d>
- Tang WF, HP Tsai, YH Chang, TY Chang, CF Hsieh, CY Lin, GH Lin, YL Chen, JR Jheng, PC Liu, CM Yang, YF Chin, CC Chen, JH Kau, YJ Hung, PS Hsieh and JT Horng. 2021. Perilla (*Perilla frutescens*) leaf extract inhibits SARS-CoV-2 via direct virus inactivation. *Biomed. J.* 44:293–303. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.01.005>
- Taylor RH and LL Stubbs. 1972. Descriptions of Plant Viruses. CMI/AAB. UK.

Xia ZH, XR Gao, R Li, M Yu, MN An and YH Wu. 2020. First report of broad bean wilt virus 2 infecting *Perilla frutescens* in China. *Plant Disease* 104:3085. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-2017-PDN>

Yamasaki K, M Nakano, T Kawahata, H Mori, T Otake, N Ueba, I Oishi, R Inami, M Yamane, M Nakamura, H Murata and T Nakanishi. 1998. Anti-HIV-1 activity of herbs in *Labiatae*. *Biol. Pharm. Bull.* 21:829–833.

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

**Supplementary Table A1.** Specific primers for major plant virus infecting *Perilla frutescens*

Virus*	Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Tm (°C)
BBWV2	BBWV2 1-1u	AAACAAACAGCT TTCGTTCGG	380	55
	BBWV2 1R	GCCATCTCATTGGCATGGA		
	BBWV2 1-8F	TGAATCCAGATGGCACATGG	880	55
	BBWV2 1-8R	CCCTCACTACTGAAATTTACTTG		
CMV	CMV 3F	TGGTCGTCCAAC TATTAACCAC	320	55
	CMV 3R	TACTGATAAAC CAGTACCGGTGA		
TSWV	TSWV 6F	GAGATTCTCAGAATTC C CAGT	459	55
	TSWV 6R	AGAGCAATCGTGTCAATTTTATTC		
PMMoV	PMMo-N50	ATTGGGCAGAACTCGGAGTCATCGG	501	55
	PMMo-C20	GTCCACTCGCGCTCTCGAACAGAGC		
PepMoV	PepMoV u1	AATGGCAGTCCCCAAA	705	55
	PepMoV d1	TCTCTCATGCCAACTACGA		
PVY	PVY N40	GCATACGACATAGGAGAACTG	550	55
	PVY C10	TATGATAAAAGTAGTACAGG		
BWYV	BWYV 95F	CGA ATC TTG AAC ACA GCA GAG	690	55
	BWYV 784R	TGT GGG ATC TTG AAG GAT AGG		
TCSV	TCSV-F	TCCCTTGGTTTCATTGACCAAACGC	590	55
	TCSV-R	ACATGACACTTGCAAATGAGACTCC		
	TCSV-F1	GAAGGAACTTCCTCTCTAGGAACC	410	55
	TCSV-R1	TGTTGTTTCGCTTTTGGGATAGACC		
AMV	AMV-N20	AGGAAATGTTACTAGCTGATGAAG	320	55
	AMV-C50	GGTAGCATCATGGTCGGTGTCAAC		
INSV	INSV 1F	ATCAATAGTAGCATTAAACAT	800	55
	INSV 1R	GACTCAATCTGATTCCTTAGA		

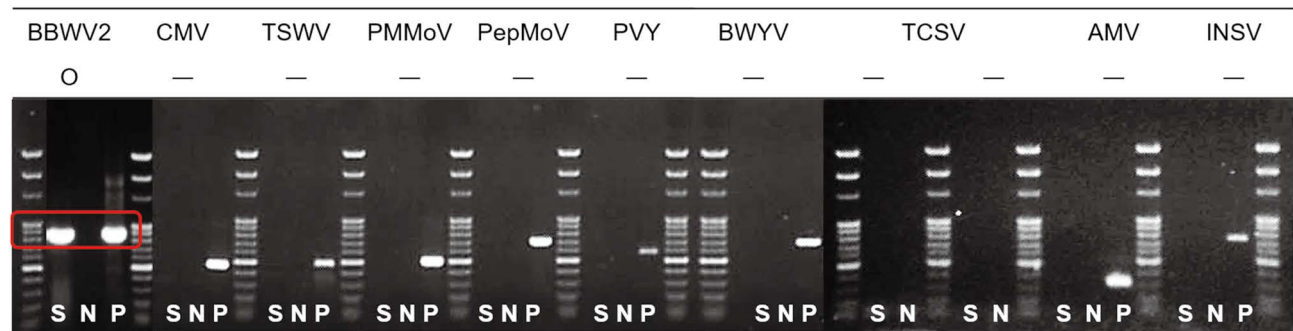
\*BBWV2, Broad bean wilt virus 2; CMV, Cucumber mosaic virus; TSWV, Tomato spotted wilt virus; PMMoV, Pepper mild mottle virus; PepMoV, Pepper mottle virus; PVY, Potato virus Y; BWYV, Beet western yellows virus; TCSV, Tomato chlorotic spot virus; AMV, Alfalfa mosaic virus; INSV, Impatiens necrotic spot virus.

**Supplementary Table A2.** Specific primers for RACE (Rapid amplification of cDNA ends) analysis of BBWV2-GS-PF isolate

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Tm (°C)
5RACE_RNA1	CAAAGGTGAATATGAAGCA	351	50
5RACE_RNA1_nested	CCTTCTCTTCTATTCGTG	323	50
5RACE_RAN2	CGTATAGGAAAACAGACCACAAG	334	50
3RACE_RNA1	GCAGAGAAACACTTYGAAGG	496	50
3RACE_RNA2	GTYTCAGCYCATGARAATAG	486	50

**Supplementary Table A3.** Next-generation sequencing (NGS) result of BBWV2-GS-PF infecting *Perilla frutescens*

Query_ID	Read count	FPKM	Length (nt)	Start	End	Coverage (%)	Target_description
c35170_g1_i1	4176002	62355.35	5936	221	5825	94.42	vg:995329 BBWV2sRNA1gp1
c35170_g2_i1	1873880	47801.16	3557	190	3382	89.77	vg:995330 BBWV2sRNA2gp1



**Supplementary Fig. A1.** Result of RT-PCR from *Perilla frutescens* leaf sample using the specific primers of 10 major viruses that can cause disease in *Perilla* spp. BBWV2, Broad bean wilt virus 2; CMV, Cucumber mosaic virus; TSWV, Tomato spotted wilt virus; PMMoV, Pepper mild mottle virus; PepMoV, Pepper mottle virus; PVY, Potato virus Y; BWYV, Beet western yellows virus; TCSV, Tomato chlorotic spot virus; AMV, Alfalfa mosaic virus; INSV, Impatiens necrotic spot virus; O, positive result of RT-PCR; -, negative result of RT-PCR; S, sample; N, negative control; P, positive control.