시설재배 국화에서 총채벌레의 종 동정 및 보독 바이러스 동시 검출을 위한 다중 진단법 적용

Application of Multiplex RT-PCR for Simultaneous Identification of Tomato Spotted Wilt Virus and Thrips Species in an Individual Thrips on Chrysanthemum

*Corresponding author

Tel: +82-63-238-6324

Fax: +82-63-238-6305

E-mail: juyeon74@gmail.com

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-1646-7310>

윤주연^{1*} · 윤정범¹ · 서미혜¹ · 최승국² · 조인숙¹ · 정봉남¹ · 양창열¹ · Venkata Subba Reddy Gangireddygar¹

¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과, ²농촌진흥청 연구정책국 연구운영과

Ju-Yeon Yoon^{1*}, Jung-Beom Yoon¹, Mi-Hye Seo¹, Seung-Kook Choi², In-Sook Cho¹, Bong-Nam Chung¹, Chang Yeol Yang¹, and Venkata Subba Reddy Gangireddygar¹

¹Department of Horticultural and Herbal Crop Environment, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

²Department of Research Planning and Coordination, Rural Development Administration, Jeonju 54875, Korea

We have developed a simultaneous diagnostic method that can identify both the species of thrips and tomato spotted wilt virus (TSWV) that are problematic in chrysanthemum plants. This is a method of amplifying DNA by performing reverse transcription-polymerase chain reaction by simultaneously adding primers specific to TSWV coat protein (N) gene and primers specific to the internal transcribed spacer 2 region of *Frankliniella occidentalis* and *F. intonsa* using total nucleic acid extracted from one thrips. The sizes of DNA fragments for TSWV, *F. occidentalis*, and *F. intonsa* were 777, 287, and 367 bp, respectively. These results showed species identification of thrips and whether thrips carrying TSWV can be simultaneously confirmed. Further usefulness of the simultaneous diagnostic method was made from greenhouse survey at chrysanthemum greenhouses in Taean (Chungcheongnam-do) and Changwon (Gyeongsangnam-do) to investigate the identification of thrips species and the rate of thrips carrying TSWV. Of thrips collected from the greenhouses, 83.7% thrips was *F. occidentalis* and 72.9% *F. occidentalis* carried TSWV in Taean. Similarly, the diagnostic method showed that 92.2% thrips was *F. occidentalis* and 84.0% *F. occidentalis* carried TSWV in Changwon. These results confirm that *F. occidentalis* is a dominant thrips species and the thrips species plays a crucial role in the transmission of TSWV in chrysanthemum plants in the greenhouses. Taken together, this study showed a simple diagnostic method for thrips identification and epidemiological studies of the timing and spread of TSWV through thrips in chrysanthemum greenhouses in South Korea.

Keywords: Acquisition, Chrysanthemum, Polymerase chain reaction, Thrips, TSWV

Received November 13, 2020

Revised December 10, 2020

Accepted December 11, 2020

Research in Plant Disease

pISSN 1598-2262, eISSN 2233-9191

www.online-rpd.org

© The Korean Society of Plant Pathology

© 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.

서론

국화는 국화과에 속하는 여러해살이 식물로 관상용, 약용과 식용으로 활용된다. 국화는 스탠다드 국화(대국)와 스프레이 국화(소국)으로 구분할 수 있으며, 국내에서는 스탠다드 국화의 재배면적(242.9 ha)이 전체 국화 재배면적(309.1 ha)의 78.6%를 차지한다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2020). 국내 재배지 가운데 경남 창원 및 부산 지역은 신마, 백마, 백선 품종 등을 스탠다드 국화를 시설에서 일본 수출용으로 재배하고 있으며 그 재배면적은 125.5 ha에 달한다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2020).

국화 재배에서 주로 문제가 되는 Orthotospovirus 속에 속하는 바이러스들은 토마토반점위조바이러스(*Tomato spotted wilt virus*, TSWV)와 국화줄기괴저바이러스(*Chrysanthemum stem necrosis virus*, CSNV)로 알려져 있다(Chung 등, 2006; Yoon 등, 2017). TSWV와 CSNV는 3개의 (-) stranded 혹은 ambisense RNA의 분절 게놈(L, M 및 S segments) 형태로 이루어져 있으며, 식물과 식물 사이의 전염은 주로 총채벌레에 의해 매개되어 국화, 고추, 토마토, 잡초류 등 1,090여종 식물을 감염시킨다(Parrella 등, 2003). 국내에서 TSWV는 2003년 예산지역 파프리카 재배농가에서 처음 발견된 이후, 다양한 원예작물에서 피해가 확인되었으며 국화에서는 2006년 충남 태안 및 예산의 국화 시설하우스(품종: 신마, 화랑)에서 TSWV가 처음 보고되었다(Chung 등, 2006; Kim 등, 2004).

전 세계적으로 국화 재배에서 문제되는 해충은 총채벌레, 진딧물, 응애 등이며 그 중 가장 피해를 주는 해충은 총채벌레로 보고되었다(Lewis, 1997). 총채벌레는 세계적으로 약 5,500여종이 보고되었으며 87종이 경제적으로 중요한 작물에 피해를 주고 있는 것으로 보고되었다(Demirozer 등, 2012). 국내에서는 국화, 고추, 파, 오이 등에서 경제적으로 큰 피해를 주는 총채벌레 종류로는 파총채벌레(*Thrips tabaci*), 꽃노랑총채벌레(*Frankliniella occidentalis*), 볼록총채벌레(*Scirtothrips dorsalis*) 및 오이총채벌레(*T. palmi*)로 보고되었으며, 앞서 기술된 총채벌레 종을 포함하여 TSWV를 매개하는 총채벌레는 11종이 보고되었다(Hyun 등, 2012; Morse와 Hoddle, 2006). 이들 총채벌레류는 살충제에 강한 약제 저항성을 가지며, 잎 뒷면 또는 꽃 속에 숨는 특성 때문에 약제 방제가 어려운 해충으로 알려져 있다(Han 등, 1998; Lee, 1996; Schmidt와 Frey, 1995). 성충은 황색 또는 황갈색을 띠며 평균 크기는 1.17 mm 내외이며 식물체 조직 속에 산란하는 것으로 알려져 있다. 잎에서 부화한 알에서 1령 약충 단계를 거쳐 2령 약충 세대를 거치며 이후 주로 토양으로 이동하여 토양에서 번데기 과정(전의용, 후의용)을 거친

다음 성충으로 우화 후 지상부로 이동하여 식물을 가해한다. 국화에서는 문제되는 총채벌레류는 꽃노랑총채벌레와 대만총채벌레(*F. intonsa*)로 알려져 있으나(Okazaki와 Sakurai, 2005; Okuda 등 2013), 노지재배에 비해 시설재배 국화에서 꽃노랑총채벌레가 높은 밀도로 발생되고 있다(Park 등, 2002; Yoon 등, 2020). 총채벌레는 주로 어린 국화 잎을 가해하여 잎의 기형을 초래하고, 국화 꽃이 피기 시작하면 유충과 성충들이 꽃 안으로 들어가 어린 꽃잎을 갉아 상처를 낸다. 이후 꽃잎이 전개되면 상처부위가 시들고 탈색되어 국화의 상품 가치를 떨어뜨리게 된다. 이러한 총채벌레는 TSWV 및 CSNV를 매개한다. 총채벌레는 1-2령 약충 시기에 TSWV를 흡즙하여 영속전염(persistent transmission)으로 전염, 확산시키는 것으로 알려져 있으나 다른 총채벌레 종과 다르게 꽃노랑총채벌레와 대만총채벌레는 성충 단계에서도 TSWV를 전염시킨다(Inoue 등 2004; Maris, 2004; Wijkamp 등, 1996).

총채벌레 종 동정법으로 internal transcribed spacer 2 (ITS2) 영역의 PCR 산물을 제한효소 *RsaI*로 처리하는 polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism 법 및 ITS2 유전자의 종 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR 및 염기서열 분석을 수행하는 방법 등이 개발되어 있다(Brunner 등, 2002; Nakahara와 Minoura, 2015; Toda와 Komazaki, 2002; Yeh 등, 2014, 2015). 일반적으로 감염된 식물체에서 TSWV를 검출하기 위해 효소결합면역흡착검사법(enzyme-linked immunosorbent assay)와 역전사중합효소연쇄반응법(reverse transcription–polymerase chain reaction, RT-PCR), 정량적 역전사중합효소연쇄반응법(quantitative transcription–polymerase chain reaction)이 보고되었다(Chung 등, 2006, Yoon 등, 2017). 또한 총채벌레에서 TSWV를 검출하기 위하여 앞서 기술한 3가지 방법들을 이용 기술이 보고되었으나 이러한 방법은 시간이 많이 소요되거나 민감도가 떨어지고 구입 장비가 비싸다는 단점이 있으며 또한 총채벌레 종 동정을 별도로 수행해야 하는 번거로움이 있다(Bandla 등, 1994; Boonham 등, 2002; Cho 등, 1989; Tsuda 등, 1994).

이번 연구에서 TSWV 외피단백질(N) 유전자 및 총채벌레 ITS2 부분에 특이적인 프라이머를 이용하여 총채벌레 1마리에서 TSWV 보독 여부 및 총채벌레의 종 동정을 동시에 확인할 수 있는 진단법을 개발하였다. 이를 이용하여 국화 재배 온실에서 수집한 총채벌레에서 TSWV 보독률 및 총채벌레 우점종을 동시에 조사할 수 있는 가능성을 보여주며 총채벌레를 통한 TSWV의 시설내 유입시기와 발생 경로 등 TSWV 역학 연구에 활용할 수 있음을 예시해준다. 이러한 연구는 시설국화에서 TSWV 병징이 나타나기 이전 총채벌레를 이용한 TSWV 예찰에 활용할 수 있을 것이라

생각된다.

재료 및 방법

바이러스원 및 총채벌레 수집. 경남 창원시 국화재배 시설 하우스에서 수집한 TSWV 감염 국화(백마 품종)를 공시재료로 사용하였다. TSWV 감염 국화는 상업과 줄기가 뒤틀어져 있고 병이 진전되면 잎과 줄기 끝에 괴사증상이 나타나 고사하였다(Fig. 1). TSWV 감염 조사는 SEB1 완충액(Agdia, Beltsville, MD, USA)에 위의 국화의 병든 잎을 마쇄한 조즙액에 TSWV 특이적 ImmunoStrip (Agdia)을 담근 후 나타나는 결과로 확인하였다. TSWV가 진단된 국화 잎을 0.1 M potassium phosphate (pH 7.2) 완충액에서 마쇄한 조즙액을 carborundum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 뿌린 청양고추(*Capsicum annuum* L.)에 접종하였다. 2주 후 상업에 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레 1-2령 약충을 식물체당 30마리씩 붓을 이용하여 올려 TSWV를 보독시킨 다음 7일 이상 유지시켜 성충으로 유도된 꽃노랑총채벌레 또는 대만총채벌레를 이후 실험에 사용하였다.

개발한 기술을 증명하기 위하여 경남 창원시 및 충남 태안지역 국화 재배지에서 총채벌레를 각 43, 102마리를 포집하였으며 각 총채벌레를 실체현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 간이 동정을 수행하였고 개체별로 70% 에탄올이 담긴 1.5 ml Eppendorf tube에 넣어 -20°C에 보관하거나 핵산 추출에 사용하였다.

핵산 추출. 핵산추출을 위해 증상이 보이는 국화 잎 100 mg 혹은 총채벌레 1-10마리(0.05-0.5 mg)를 액체질소가 들어 있는 1.5 ml Eppendorf tube에 넣은 다음 마쇄하였다. 이후 제조사의 추천 방법대로 Plant RNA/DNA purification kit (Norgenbiotech, Thorold, ON, Canada)를 이용하여 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산의 순도는 NanoDrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 흡광도 260 nm와 280 nm 비율(A_{260}/A_{280})로 결정하였다. 추출된 핵산은 실험에 바로 사용하거나 -80°C 냉동고에 보관하여 이후 실험에 사용하였다.

프라이머 제작 및 RT-PCR. 총채벌레의 종 동정 및 보독하고 있는 TSWV의 단독 혹은 동시진단의 개략적 방법은 Fig. 2A에 제시되었다. 총채벌레의 종 동정 및 보독하고 있는 TSWV의 단독 혹은 동시진단은 핵산 추출을 이용하여 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레 ITS2 부위에 특이적인 프라이머(3' 말단부에 역방향 프라이머로서 공통적으로 ThripsITS2R3이 사용되었으

며 꽃노랑총채벌레는 OCC-ITS2F6, 대만총채벌레는 INT-ITSF1을 정방향 프라이머로 사용)를 이용하여 RT-PCR로 수행하였다(Nakahara 와 Minoura, 2015). 국화 및 총채벌레에서 TSWV를 진단하기 위하여 TSWV의 S RNA에 암호화되어 있는 외피단백질 유전자(N 유전자)를 특이적으로 증폭하도록 고안된 프라이머(TSWV-NCP-For 및 TSWV-NCP-Rev)를 이용하였다(Table 1)(Yoon 등, 2014).

추출된 핵산 10 ng과 TSWV 진단 프라이머 세트(TSWV-NCP-For 및 TSWV-NCP-Rev) 및 총채벌레 진단 프라이머 세트(OCC-ITS2F6와 ThripsITSR3 혹은 INT-ITSF1 및 ThripsITSR3)를 10 pmol씩 반응액에 넣고 제조사의 실험방법에 따라 SuPrime-Script RT-PCR premix (GeNetBio, Nonsan, Korea)를 이용하여 반응시켰다. 교차반응을 확인하기 위해 꽃노랑총채벌레에서 추출한 핵산에 대만총채벌레 진단을 위한 프라이머(INT-ITSF1 및 ThripsITSR3)를 넣었고, 대만총채벌레에서 추출한 핵산에는 꽃노랑총채벌레 진단을 위한 프라이머(OCC-ITS2F6와 ThripsITSR3)를 넣어 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 조건은 50°C에서 50분(1회) 동안 역전사 반응에 이어 95°C에서 2분(1회), 95°C 15초, 55°C 30초, 72°C, 50초(35회 반복), 72°C에서 5분(1회)이었다. 전기영동은 0.5× TBE 완충액과 1.0% 아가로스 젤에서 실시하였고, DNA 사이즈 마커로 HiQ 100 bp plus DNA ladder (BioD, Gwangmyeong, Korea)를 이용하였다. PCR 증폭 산물은 110볼트에서 50분 동안 전기영동 후 UV transilluminator를 이용하여 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

국화에서 TSWV 피해 조사. 2019년 국화 주요 재배지역 중 하나인 경남 창원시 소재 시설하우스에서 재배되는 스탠다드 국화(백마 품종)를 조사한 결과, 2월-3월 국화 정식 이후 4월경 총채벌레가 하우스 시설 내로 유입되어 총채벌레가 TSWV 감염 국화에서 TSWV를 체내 보독 후 지속적으로 TSWV 감염을 확산시키는 것으로 확인되었다. 5월부터 육안 확인이 가능한 TSWV 병징이 나타나기 시작했다. 병징 초기에는 감염 국화 잎이 틀어지거나 줄기가 휘어지는 병징이 나타났으며, 병이 진전되면서 상업에 괴사반점과 줄기 괴사가 나타나 괴사된 방향으로 식물체가 기울지는 병징이 관찰되었다. 감염 이후 2개월 이내에 정단부 줄기가 괴사되면서 상업이 고사되는 초기 병징이 나타났고 이후 식물체가 전체가 고사했다(Fig. 1A). TSWV에 의한 감염여부를 확인하기 위해 감염 잎을 마쇄한 조즙액에 ImmunoStrip (Agdia)를 담가 확인한 결과, TSWV 항체-금 입자가 TSWV와 반응한 붉은 선이 2개가 나타나 TSWV 감염이 확인되

Fig. 1. Symptoms of chrysanthemum plants infected with TSWV and diagnostic results of TSWV in infected chrysanthemum plants. Typical symptoms of chrysanthemum plants infected with TSWV were presented as arrows at different developmental stages. (A) At the early infection stage, most of the TSWV-infected chrysanthemum plants exhibited chlorosis or chlorosis and one-sided necrosis on leaves. At the mid-term infection stage, most of the infected chrysanthemum plants developed necrotic ringspots and necrosis on leaves, severe necrosis on stems, stunting, and terminal buds with signs of necrosis. At the late infection stage, most of the infected chrysanthemum plants exhibited systemically severe necrosis, stunting and drooping leaves. Some plant death was commonly observed. (B) Positive reaction to TSWV in the TSWV-ImmunoStrip (Agdia), suggesting that the chrysanthemum plants authentically were infected with TSWV.

었다(Fig. 1B). 역학 조사 결과, 국화 시설하우스의 측창 주변에 심은 국화에서 가장 먼저 TSWV 증상이 나타나는 것으로 확인되었으며 총채벌레의 증가와 함께 시설하우스 가장 안쪽의 국화까지 확산되는 것으로 확인되었다(data not shown).

총채벌레 종 동정 및 총채벌레 보독 TSWV 동시진단법 개발. TSWV의 특이적인 프라이머를 이용하여 고추에서 증식된 TSWV를 진단한 결과 777 bp가 확인되었다(Supplementary Fig. 1A). 또한 국화 시설하우스 주변에서 채집한 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레를 형태적으로 구분한 후 각 10마리씩을 모아서 핵산을 추출한 후 특이 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 꽃노랑총채벌레는 287 bp, 대만총채벌레는 367 bp의 DNA가 교차반응 없이 증폭되었다(data not shown). 총채벌레 1 마리(0.05 mg)에서 총채벌레에서 종 구분 및 체내에 보독하고 있는 TSWV를 동시진단하기 위해 핵산을 추출하였으며, 정량한 결과 100–200 ng의 핵산이 추출되었다. 10–20 ng 핵산을 이용하여 앞서 기술한 총채벌레의 종 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 증폭산물이 비특이적 반응 없이 증폭되었다(Supplementary Fig. 1B, C). 국화 시설재배지에서 포집한 꽃노랑총채벌레 성충뿐만 아니라 꽃노랑총채벌

레 1령 약충시기에 TSWV를 흡즙시킨 후 사육한 2령 약충과 번데기 1마리에서 TSWV가 진단되었다(Supplementary Fig. 2).

인위적으로 TSWV를 보독시킨 *F. occidentalis* 및 대만총채벌레의 성충 1마리에서 TSWV와 총채벌레 종 동정을 동시 진단한 결과, 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레 교차 반응이 없이 TSWV와 총채벌레 종 특이적인 증폭 산물이 합성이 되어 동시진단이 가능한 것으로 판정되었다(Fig. 2B, C). 기존의 총채벌레의 종을 구분하기 위한 분자진단은 미토콘드리아 DNA cytochrome oxidase subunit I 부분을 PCR로 증폭한 다음 제한효소 *RsaI*으로 절단하여 나타난 DNA 단편의 패턴으로 구분하는 방법이나(Brunner 등, 2002) 혹은 ribosomal ITS2 유전자를 PCR로 증폭 후 총채벌레의 각 종마다 서로 다른 제한효소를 처리하여 restriction fragment length polymorphism 결과로 판정하는 방법을 사용하였다(Brunner 등, 2002; Toda와 Komazaki, 2002). 최근에는 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification) 및 recombinase polymerase amplification 진단법이 개발되었다(Fekrat 등, 2015; Fukuda 등, 2005; Priti 등, 2020; Przybylska 등, 2015). 그러나 처리하는 데 시간이 많이 소요되며 PCR 반응이 끝난 후에도 제한효소를 추가로 처리하거나, 재현성이 떨어지거나, 프라이머 제작에 복잡한 절차가

Fig. 2. Schematic represent of simultaneous diagnostic method for identification of thrips species and TSWV in an individual thrips. (A) Total nucleic acid was extracted from one thrips using DNA/RNA extraction kit. Then, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was used for identification of thrips species and determination of thrips carrying TSWV, based on different sizes of amplified RT-PCR products in agarose gel. (B) Results of simultaneous identification of *F. occidentalis* and the acquired TSWV with primers specific to TSWV and *F. occidentalis* (left) and with primers specific to TSWV and *F. intonsa* (right). Lane M, HiQ 100 bp plus DNA ladder; lane 1, TSWV-infected pepper leaf; lane 2, *F. occidentalis* maintained in the lab; lanes 3–5, *F. occidentalis* that acquire TSWV. (C) Results of simultaneous identification of *F. intonsa* and the acquired TSWV with primers specific to TSWV and *F. intonsa* (left) and with primers specific to TSWV and *F. occidentalis* (right). Lane M, HiQ 100 bp plus DNA ladder; lane 1, TSWV-infected pepper leaf; lane 2, *F. intonsa* maintained in the lab; lanes 3–5, *F. intonsa* that acquire TSWV. Molecular mass of HiQ 100 bp plus DNA ladder was indicated in the left and the amplified RT-PCR products were indicated as narrows.

필요하다는 단점이 있었다. 이번 연구에서 개발된 총채벌레 및 TSWV 동시 다중 PCR 진단법은 국화 시설하우스에서 외부 유입 총채벌레의 바이러스 보독 여부를 쉽고 빠르게 진단할 수 있기 때문에 바이러스병 유입 및 확산을 예측하는 데 활용할 수 있을 것으로 판단된다(Jung 등 2019; Kang 등, 2012).

시설재배 국화에서 수집된 총채벌레의 TSWV 보독률 조사. 총채벌레 1마리에서 TSWV 보독 여부 및 종 동정이 가능한 결과의 효용성을 조사하기 위하여, 국화 재배 하우스에서 총채벌레와 TSWV를 동시 진단을 실시하였다. 이런 목적으로 충남 태안군

소재 스프레이 국화(소국) 재배 하우스 및 경남 창원시 소재 스텐다드 국화(대국) 재배 하우스에서 타락법을 이용하여 각각 43, 102마리를 무작위로 채집한 다음 동시진단법으로 종 동정 및 TSWV 보독 여부를 조사하였다.

태안군에서 채집한 총채벌레에서 꽃노랑총채벌레는 36마리로 83.7%를 차지했으며, 동정된 꽃노랑총채벌레에서 36마리 중 27마리에서 TSWV가 진단되어, 꽃노랑총채벌레의 TSWV 보독률은 72.9%로 조사되었다(Table 2). 종 동정 결과 대만총채벌레는 1마리로 판정되었으며, TSWV는 보독하고 있지 않았으며, 미동정 총채벌레는 43마리 중 6마리이었으며, TSWV 보독률은

Table 1. Primer sequences used in this study

Target species	Primer sequence	Size (bp)	Reference
TSWV	TSWV-NCP-For: 5'-ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGAA-3' TSWV-NCP-Rev: 5'-TTAAGCAAGTTCTGCAAGTATTGCCTG-3'	777	Yoon et al. (2014)
<i>F. occidentalis</i>	OCC-ITS2F6: 5'-GGTCGCTTCACCGCTTCCCG-3' ThripsITS2R3: 5'-CTCTCCTGAACWGAGGTCG-3'	287	Nakahara and Minoura (2015)
<i>F. intonsa</i>	INT-ITS2F1: 5'-GACCAGACTGTTCCGAGA-3' ThripsITS2R3: 5'-CTCTCCTGAACWGAGGTCG-3'	367	

Table 2. Greenhouse survey for thrips collected from greenhouses in Taean and Changwon, South Korea

Thrips species	Taean		Changwon	
	Species identification	No. of TSWV-acquired thrips	Species identification	No. of TSWV-acquired thrips
<i>F. occidentalis</i>	36 (83.7)	27/36 (72.9)	94 (92.2)	79/94 (84.0)
<i>F. intonsa</i>	1 (2.3)	0/1 (0)	4 (3.9)	2/4 (50.0)
Not identified	6 (14.0)	6/6 (100)	4 (3.9)	3/4 (75.0)
Total	43 (100)	33/43 (76.7)	102 (100)	84/102 (82.4)

Values are presented as number (%).

Thrips were subjected to the developed diagnostic reverse transcription-polymerase chain reaction analysis using primers specific to TSWV, *F. occidentalis*, and *F. intonsa*, respectively.

100% (6마리 중 6마리)로 조사되었다(Table 2).

경남 창원시에서 채집한 총채벌레 중 동정 및 TSWV 보독률을 조사한 결과, 102 마리 중 94마리(92.2%)가 꽃노랑총채벌레로 확인되었으며, 94마리 꽃노랑총채벌레 중 79 마리에서 TSWV가 검출되어 TSWV 보독률은 84.0%로 조사되었다(Table 2). 대만총채벌레를 동정한 결과 102마리 중 4마리(3.9%)이었으며 TSWV 보독률은 50%로 조사되었다(Table 2). 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레 이외에 다른 종의 총채벌레는 102마리 중 4마리(3.0%)이었으며, TSWV 보독률은 75%로 조사되었다. 조사된 사실을 종합해볼 때, 국화 시설 하우스에서 우점종은 꽃노랑총채벌레이며 75.0–84.0% TSWV 보독률을 가지고 있어 TSWV 감염 및 전파에 가장 큰 요인임을 판단된다. 흥미롭게도 비록 총채벌레 중 동정은 확인할 수 없었으나 미동정 총채벌레에서 TSWV 보독률은 상당히 높은 수준으로 조사되었다. TSWV를 매개할 수 있다고 알려진 오이총채벌레 여부를 미동정된 총채벌레를 현미경에서 형태학적 분류를 하였으나 오이총채벌레는 확인되지 않았다(data not shown). 그 외 국화에서 서식하는 총채벌레는 파총채벌레, 하와이총채벌레, 미나리총채벌레 등 10여종이 확인되고 있으나 TSWV 보독 여부 등에 대하여 면밀한 조사가 필요하다고 판단된다(van de Wetering, 1999).

요 약

이번 연구는 국화에서 문제되는 총채벌레의 종 동정 및 보독 바이러스인 토마토반점위조바이러스(Tomato spotted wilt virus, TSWV)를 동시에 확인할 수 있는 진단방법을 개발하였다. 이는 총채벌레 1마리에서 추출한 핵산에 꽃노랑총채벌레 및 대만총채벌레의 ITS2 부분에 특이적인 프라이머와 TSWV 외 피단백질(N) 유전자 특이적인 프라이머를 동시에 넣어 reverse transcription-polymerase chain reaction을 수행하여 DNA를 증폭시키는 방법으로 전기영동하여 각각 287, 367, 777 bp의 DNA 단편의 크기를 비교함으로써 총채벌레의 종 동정 및 총채벌레의 TSWV 보독 여부를 동시에 확인할 수 있다. 충청남도 태안 및 경상남도 창원의 국화 시설하우스에서 총채벌레를 포집하여 총채벌레 우점종과 총채벌레의 TSWV 보독율을 조사한 결과, 태안의 국화 시설하우스에서는 꽃노랑총채벌레가 83.7%로 우점하고 있으며 채집된 총채벌레 중 72.9%가 TSWV를 보독하고 있었으며, 창원에서는 꽃노랑총채벌레가 92.2%를 차지하고 있으며 84.0%의 총채벌레에서 TSWV가 진단되었다. 이러한 결과는 *Frankliniella occidentalis*가 우점종이며 온실의 국화 식물에서 TSWV의 전반에 중요한 역할을 한다는 것을 확인해준

다. 이번 연구는 국화 시설하우스에서 총채벌레를 통한 TSWV의 시설하우스내 유입시기 및 확산 경로 등 바이러스의 역학연구를 위한 간편진단법으로 활용 가능성을 제시해준다.

Conflicts of Interest

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

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Basic Research Program (Project no. PJ01359101) of National Institute of Horticultural and Herbal Science, RDA, South Korea.

Electronic Supplementary Material

Supplementary materials are available at Research in Plant Disease website (<http://www.online-rpd.org/>).

References

- Bandla, M. D., Westcot, D. M., Chenault, K. D., Ullman, D. E., German, T. L. and Sherwood, J. L. 1994. Use of monoclonal antibody to the nonstructural protein encoded by the small RNA of Tomato spotted wilt tospovirus to identify viruliferous thrips. *Phytopathology* 84: 1427-1431.
- Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N. et al. 2002. The detection of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* 101: 37-48.
- Brunner, P. C., Fleming, C. and Frey, J. E. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agric. For. Entomol.* 4: 127-136.
- Cho, J. J., Mau, R. F. L., German, T. L., Hartmann, R. W., Yudin, L. S., Gonsalves, D. et al. 1989. A multidisciplinary approach to management of Tomato spotted wilt virus in Hawaii. *Plant Dis.* 73: 375-383.
- Chung, B. N., Pak, H. S., Jung, J. A. and Kim, J. S. 2006. Occurrence of Tomato spotted wilt virus in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in Korea. *Plant Pathol. J.* 22: 230-234.
- Demirozer, O., Tyler-Julian, K., Funderburk, J., Leppla, N. and Reitz, S. 2012. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) integrated pest management programs for fruiting vegetables in Florida. *Pest Manag. Sci.* 68: 1537-1545.
- Fekrat, L., Zaki Aghl, M. and Tahan, V. 2015. Application of the LAMP assay as a diagnostic technique for rapid identification of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 108: 1337-1343.
- Fukuda, S., Ichikawa, K. and Ohya, T. 2005. Identification of the thrips by the LAMP method. *Kanto Tokai Hokuriku Agric. Res. Inf.* 2: 192-193. (In Japanese)
- Han, M. J., Kim, I. S., Ahn, S. B., Lee, M. L., Hong, K. J., Lee, G. H. et al. 1998. Distribution and host plants of recently introduced western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) in Korea. *RDA J. Crop Prot.* 40: 83-88. (In Korean)
- Hyun, J.-W., Hwang, R.-Y., Lee, K.-S., Song, J.-H., Yi, P.-H., Kwon, H.-M. et al. 2012. Seasonal occurrence of yellow tea thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) in citrus orchards and its damage symptoms on citrus fruits. *Korean J. Appl. Entomol.* 51: 1-7. (In Korean)
- Inoue, T., Sakurai, T., Murai, T. and Maeda, T. 2004. Specificity of accumulation and transmission of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in two genera, *Frankliniella* and *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Bull. Entomol. Res.* 94: 501-507.
- Jung, C. Y., Jeong, D. H., Park, H. W., Kim, H. J., Jeon, K. S. and Yoon, J. B. 2019. Molecular identification of thrips in two medicinal crops, *Cnidium officinale* Makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Korean J. Med. Crop Sci.* 27: 17-23. (In Korean)
- Kang, T. J., Ahn, S. J., An, T. J., Cho, M. R., Jeon, H. Y. and Jung, J. A. 2012. Thrips in medicinal crops in Korea: identification and their damages. *Korean J. Med. Crop Sci.* 20: 487-492. (In Korean)
- 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.
- Lee, G. S. 1996. Seasonal occurrence of Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae) in Cheju Island. M.S. thesis. Seoul National University, Seoul, Korea. 76 pp. (In Korean)
- Lewis, T. 1997. Pest thrips in perspective. In: Thrips as Crop Pests, ed. by T. Lewis, pp. 1-13. CAB International, Wallingford, UK.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2020. Production of Flower Crops in 2019 in South Korea. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, Korea. 422 pp.
- Maris, P. 2004. Evaluation of thrips resistance in pepper to control Tomato spotted wilt virus infection. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 120 pp.
- Morse, J. G. and Hoddle, M. S. 2006. Invasion biology of thrips. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 67-89.
- Nakahara, S. and Minoura, K. 2015. Identification of four thrips species (Thysanoptera: Thripidae) by multiplex polymerase chain reaction. *Res. Bull. Plant Prot. Jpn.* 51: 37-42.
- Okazaki, S. and Sakurai, T. 2005. Efficiencies of transmission of *Tomato spotted wilt virus* by *Frankliniella occidentalis* and *Frankliniella intonsa* collected in green bell pepper fields in Oita Prefecture. *Kyushu Plant Prot. Res.* 51: 60-63. (In Japanese)
- Okuda, S., Okuda, M., Matsuura, S., Okazaki, S. and Iwai, H. 2013. Competence of *Frankliniella occidentalis* and *Frankliniella in-*

- tonsa* strains as vectors for *Chrysanthemum stem necrosis virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136: 355-362.
- Park, J.-D., Kim, D.-I. and Kim, S.-G. 2002. Seasonal occurrence and damaged aspects of *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) by cultural environments and varieties of chrysanthemum. *Korean J. Appl. Entomol.* 41: 177-181. (In Korean)
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C. and Marchoux, G. 2003. An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Plant Pathol.* 85: 227-264.
- Priti, Jangra, S., Baranwal, V. K., Dietzgen, R. G. and Ghosh, A. 2020. A rapid field-based assay using recombinase polymerase amplification for identification of *Thrips palmi*, a vector of tospoviruses. *J. Pest Sci.* Online publication. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01284-w>.
- Przybylska, A., Fiedler, Z., Kucharczyk, H. and Obreńska-Stęplowska, A. 2015. Detection of the quarantine species *Thrips palmi* by loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 10: e0122033.
- Schmidt, M. E. and Frey, J. E. 1995. Monitoring of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* in greenhouses. *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.* 60: 847-850.
- Toda, S. and Komazaki, S. 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bull. Entomol. Res.* 92: 359-363.
- Tsuda, S., Fujisawa, I., Hanada, K., Hidaka, S., Higo, K.-I., Kameya-Iwaki, M. et al. 1994. Detection of Tomato spotted wilt virus S RNA in individual thrips by reverse transcription and polymerase chain reaction. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60: 99-103.
- van de Wetering, F. 1999. Effects of thrips feeding on tospovirus transmission in chrysanthemum. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 120 pp.
- Wijkamp, I., Van De Wetering, F., Goldbach, R. and Peters, D. 1996. Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis* median acquisition and inoculation access period. *Ann. Appl. Biol.* 129: 303-313.
- Yeh, W. B., Tseng, M. J., Chang, N. T., Wu, S. Y. and Tsai, Y. S. 2015. Agronomically important thrips: development of species-specific primers in multiplex PCR and microarray assay using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences for identification. *Bull. Entomol. Res.* 105: 52-59.
- Yeh, W.-B., Wu, C. S.-Y., Tseng, M.-J., Chang, N.-T. and Chen, W.-P. 2014. Multiplex PCR for the molecular identification of economically important thrips. *Formosan Entomol.* 34: 211-225. (In Chinese)
- Yoon, J.-B., Choi, S.-K., Cho, I.-S., Kwon, T.-R., Yang, C.-Y., Seo, M.-H. et al. 2020. Epidemiology of *tomato spotted wilt virus* in *Chrysanthemum morifolium* in South Korea and its management using a soil-dwelling predatory mite (*Stratiolaelaps scimitus*) and essential oils. *Virus Res.* 289: 198128.
- Yoon, J.-Y., Choi, G.-S., Cho, I.-S. and Choi, S.-K. 2014. Development of a novel sap extraction buffer for simultaneous detection of pepper viruses using VC/RT-PCR. *Korean J. Int. Agric.* 26: 41-47. (In Korean)
- Yoon, J. Y., Choi, G. S. and Choi S. K. 2017. First report of *Chrysanthemum stem necrosis virus* on *Chrysanthemum morifolium* in Korea. *Plant Dis.* 101: 264.