

점박이응애에서 병원성 곰팡이 *Neozygites floridana* 의 발생

최선우 · 이공준 · 문영훈 · 서경원 · 강찬호 · 김진호* · 김재수¹

전라북도농업기술원, ¹전북대학교

Occurrence of the Mite Pathogenic Fungus *Neozygites floridana* on Two Spotted Spider Mite (*Tetranychus urticae*) in Korea

Seon-U Choi, Gong-Jun Lee, Young-Hun Moon, Kyoung-Won Seo, Chan-Ho Kang, Jin-Ho Kim* and Jae-Su Kim¹

Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 54591, Republic of Korea

¹Department of Agricultural Biology, College of Agriculture & Life Science, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

ABSTRACT: An entomopathogenic fungus was isolated from the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in a rearing house, and identified as *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae). A high infection rate induced by *N. floridana* could increase the price of the natural enemy. The body color of mites infected by this fungus changed to red or orange and swelling occurred. Fungal conidia were discharged into the webbing produced by the spider mites, making it relatively easy to infect the mites. Primary conidia were pear shaped and capilliconidia almond shaped. The fungus could not be cultured on solid media (PDA, SDAY, or EYSDA), but could possibly be cultured in liquid media (Grace's insect tissue culture medium + 5% fetal bovine serum). Kidney beans were supplied as food for *T. urticae*, the mite infection rate in a kidney bean canopy was about 36.1%. The density of infected mites was higher on the underside than on the upper side of leaves. Based on the results of this survey, we need to identify methods of fungal control for natural enemy production and biological control agents for *T. urticae* for effective crop management.

Key words: *Tetranychus urticae*, Natural enemy, Mite pathogenic fungus, *Neozygites floridana*

초록: 충남 논산시의 천적생산업체인 세실의 점박이응애 사육장에서 발견된 곰팡이를 조사한 결과 *Neozygites floridana* 1종이 동정되었다. 종 동정은 형태학적 현미경적 특징과 DNA 염기서열 분석을 통해 이루어졌다. 곤충조직배양용 전용배지(Grace's insect tissue culture medium + 5% fetal bovine serum)에서 이 균의 생존을 확인할 수 있었다. 강낭콩 군락 내에서의 감염률은 36.1%이었다. 점박이응애는 잎의 윗면보다 뒷면에 상대적으로 높게 밀집되어 있었다. 곰팡이의 감염률은 윗면보다 뒷면에서 매우 높게 나타나, 균 발생 진단을 위해서는 잎 윗면보다는 뒷면을 확인하는 것이 요구된다. 이 균에 대하여 천적 생산을 위한 방제방법과 더불어 작물을 가해하는 점박이응애 방제를 위한 생물적 조절인자로서의 가능성에 대한 연구가 필요하다.

검색어: *Tetranychus urticae*, 천적, 점박이 응애, *Neozygites floridana*

점박이응애(*Tetranychus urticae*)는 구기를 식물조직에 찢러서 식물세포를 흡즙하여 피해를 주며, 온대와 열대지역을 중심으로 과수, 채소, 화훼 등 다양한 작물에서 발생하고 있다. 시설 가지에서 점박이응애의 요방제수준은 주당 1.8마리(Lim et al., 2008)로 발생 초기에 적극적인 방제가 요구되는 해충이

지만, 점박이응애의 심각한 농약에 대한 저항성 발달은 화학적 방제를 어렵게 한다(Kim et al., 1992). 이를 극복하기 위하여, 포식성응애를 이용한 점박이응애 밀도를 조절하는 생물적 방제가 시도되고 있으며(Kim and Lee, 1994). 칠레이리응애에 대한 농약의 선택 독성과 천적과 농약의 혼용에 의한 점박이응애의 방제효과에 대한 보고(Ahn et al., 2004)가 있다. 이에 따라, 국내 천적회사인 (주)세실에서는 농가에 칠레이리응애 등 식물성 잎응애류의 천적을 보급하기 위하여 천적 먹이로 점박이응애를 대량생산하였다(Lim et al., 2008). 점박이응애를 대량생

*Corresponding author: water86@korea.kr

Received September 7 2016; Revised November 5 2016

Accepted November 7 2016

산하는 사육 온실에서는 수년 전부터 원인이 구명되지 않은 미생물이 발생하여 점박이응애 증식에 영향을 미치고 있으나, 동정이 이루어지지 않아 적극적인 방제방법 모색에 어려움을 겪고 있다고 하였다. 응애에 발생하는 병은 1951년 처음 보고 (Fisher, 1951)되었다. 귤응애(*Panonychus citri*)에서 발생한 *Neozygites* sp.로 32~95% 범위의 치사율이 관찰되었다. *Neozygites* 속은 매미목, 총채벌레목 곤충과 응애에서 주로 보고(Keller, 1997) 되고 있으며, *N. floridana*는 최소한 잎응애류 18종을 감염시킨다(Ribeiro et al., 2009)고 한다. 점박이응애에서 감염은 브라질, 스위스, 베닌 등에서 보고(Keller, 1997)되었다. 같은 속에 대하여, 국내에서는 진딧물병원성 곰팡이 *N. fresenii*를 1998년 6월경 수원 농업과학기술원내의 망초에 서식하는 진딧물(*Dactynotus* sp.)을 감염하는 균에 대한 형태적 특성을 보고(Yoon et al., 1999)하였으나, *N. floridana*에 대한 응애 감염보고는 없었다. 이에 본 조사에서는 (주)세실의 포식성 응애의 먹이 생산을 위한 점박이응애를 사육하는 과정에서 발견된 응애 병원성 곰팡이의 동정과 형태적 및 발생적 특성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

점박이응애 감염 균에 대한 분류 동정

*N. floridana*에 감염된 점박이응애와 곰팡이의 형태를 촬영하기 위하여 (주)세실 점박이응애사육장(36°07'31.8"N 127°07'58.9"E)에서 채집시 소형 petri dish (Ø3 × 1 cm)에 담아 4°C 냉장고에 보관하면서 1~2일 이내에 균의 형태를 관찰하고 분리한 JB95 isolate를 이용하였다. 초기 분리를 시도하였을 때 100여 마리가 넘는 점박이응애에서 *N. floridana*를 분리할 수 있었다. 분리를 위하여, 머미가 형성된 점박이 응애를 1% NaOCl 용액으로 1 min 간 표면소독한 후 멸균수에 3회 세척하였다. 멸균된 소형 petri dish (Ø3 × 1 cm) 뚜껑 안쪽에 굳은 아가를 소독제로 살짝 문힌 뒤 응애를 부착시키고 Water agar (WA)를 분주한 petri dish위로 덮고 밀봉하여 20 °C의 인큐베이터에서 24시간 이내로 습도를 유지시켰다. 머미로부터 포자가 형성되면 WA 위로 떨어지게 된다. 이후 뚜껑을 제거시키고, 분리된 포자 등 수집된 균의 형태적 구조는 광학현미경과 주사전자현미경 (JSM-5410LV)을 이용하여 200배 또는 400배에서 검경하였다. 채집된 균주의 분류기준은 전연구자들이 기술한 분류 동정 기준에 따라(Humber, 1997; Keller, 1997) 실시하였다. 감염된 응애의 모습은 해부현미경(Olympus SMZ-1000)을 이용하여 검경하였다. 분자생물적인 동정을 위하여 감염된 응애로부터

분리된 균을 이용하여 plant genomic DNA isolation kit (Corebiosystem co. Ltd., Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 PCR 검정에서 primer는 *N. floridana*의 small RNA 유전자(NCBI Accession No. AY233985)의 p1f (5' agtgggttggtggcaagag 3')과 p1r (5' ctgcctatgccttgctatcc 3'), p4f (5' agggggctaccaaggtattg 3')와 p4r (5' ttgcctctgctagtcttga 3') 2종을 PCR 반응 혼합물에 가하여 DNA를 증폭시켰다. PCR 처리 조건은 94°C 10 m; <94°C, 40 s; 52°C, 40 s; 72°C, 2 m> 35 cycles; 72°C 10 m이었다. PCR 최종산물의 10 µl를 1% agarose gel을 통하여 1.5 kb band가 있음을 확인한 다음, AccuPrep PCR purification kit로 정제하였다. 정제된 PCR product는 Automated DNA Sequencer로 염기서열을 분석하였다. 이후 CLUSTAL X ver 1.83을 사용하여 염기서열을 조합하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 Advanced Blast search(Altschul et al., 1997)을 통하여 Genebank의 염기서열과 DNA homology (%)를 비교하여 동정하였다.

분리된 곰팡이의 인공배양 특성 조사

분리된 곰팡이를 배양하기 위하여 DWA (Sterilized water agar), PDA (Potato dextrose agar), SDYA (Saubouraud dextrose agar with 1% yeast extract), EYSDYA (Saubouraud dextrose agar with 1% yeast extract + egg yolk + milk), GITCM (Grace insect tissue culture medium + 5% fetal bovine serum)에 분리 균의 포자와 hyphal body를 접종하고 매일 발아와 hyphal body 성장 유무를 관찰하였다.

점박이응애 대량사육을 위한 강낭콩 균락 높이별 *N. floridana* 발생 조사

강낭콩 균락내 *N. floridana*의 발생특성을 조사하기 위하여 (주)세실 내 점박이응애 사육장내의 강낭콩을 3반복으로 잘라 비닐팩에 담고 실험실로 운반하여 4°C 냉장고에 보관한 다음 날翌 발생한 점박이응애 수, 감염되어 머미를 형성하거나, 포자가 발생한 죽은 응애수를 조사하였다. 잎의 윗면과 아랫면을 구분하여 응애 발생수를 조사하였다.

결과 및 고찰

점박이응애 감염 균에 대한 분류 동정

2006년 9월 충남 논산시의 천적생산업체인 (주)세실의 응애

Table 1. Primary conidia and capilliconidia dimensions of *Neozygites floridana* from *Tetranychus urticae*

Characteristics	No.	Length (μm) ($X \pm \text{SD}$)	Width (μm) ($X \pm \text{SD}$)
Primary conidia	100	12.7 \pm 1.91	11.5 \pm 0.80
Capilliconidia	100	17.8 \pm 3.39	8.07 \pm 0.80
Capillary tube	100	63.1 \pm 15.85	-

사육장에서 발견된 곰팡이를 분리하여 ribosomal RNA 유전자에 대한 염기서열을 분석한 결과 *N. floridana* (Weiser & Muma) (NCBI Accession No. AY233985)와 100% 서열이 일치함을 알 수 있었다. *Neozygites*속은 Entomophthorales에 속하며, 이에 감염되면 살아있는 감염된 응애 몸체 안에 hyphal body가 형성된다. 무성생식의 경우, 일차포자(primary conidia)가 형성(Fig. 1G)된다. 충체는 붉은 색으로 변하면서, 몸체가 통통해졌다(Fig. 1B). 감염되어 죽어 머미화된 응애(Van der Geest et al., 2000)는 대체적으로 밝은 갈색을 띠었다. 죽은 응애 머미는 앞뒷면에 매달려 있었다. 이후에 큐티클을 뚫고 올라온 포자는 충체 표면과 주변으로 분산되었다. 포자들은 점박이응애가 만든 줄 위로도 분산되어 부착(Fig. 1C)되었다.

Hyphal body는 부정형이나 대체적으로 구형 또는 막대 형태라고 한다(Humber, 1997). Conidiophore는 단순한 형태로 가지들 만들지 않는다(Fig. 1. F). Primary conidia는 구형태의 난형으로 길이가 12.7 μm , 폭이 11.5 μm 로 L/D = 1.10 이고, 이와 유사한 형태의 secondary conidia를 형성하였다. *Neozygites*

속의 종간에는 primary conidia의 크기가 다르며, *N. floridana* conidia의 크기는 이들 중 중간 정도이다.

Capilliconidia는 길이가 17.8 μm , 폭이 8.07 μm 로 L/D = 2.21이고(Table 1) 육안으로 관찰할 때는 투명한 색으로 보인다. Primary conidia는 12.7~16.7 \times 9.5~15.1 μm 이며, L/D = 1.05-1.36이고, Capilliconidia 13.1~25.4 \times 8.7~14.7 μm 의 L/D = 1.13-2.55 라는 보고(Keller, 1997)와 *N. floridana*의 Primary conidia 크기가 11-18 \times 9-15 μm 이내라 보고(Humber, 1997)가 있다.

*N. floridana*는 새로운 기주를 감염시키기 위하여 capilliconidia를 형성하는데, capilliconidia와 1차 포자의 연결된 부분인 capillary tube은 전형적으로 구부러진 형태(Fig. 1J)를 보였고, cystidia와 rhizoids는 형성되지 않았다(Keller, 1997). Capillary tube는 63.1 \pm 15.85 μm 로 분리한 균주의 27~77 μm 보다 길고, capilliconidia는 기주인 응애의 큐티클을 뚫고 들어갈 발아관을 형성(Keller, 1997)한다.

*N. fresenii*은 짧은 papillar를 지닌 둥근 모양의 primary

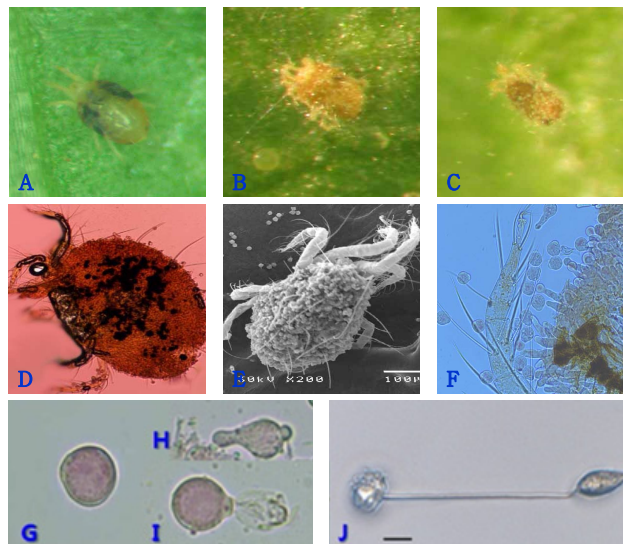


Fig. 1. External signs of *T. urticae* infected by *N. floridana* and morphological characteristics of *N. floridana*. (A) Healthy two-spotted mite; (B) and (C) Dead mite infected by *N. floridana* and conidia up to the mites's webbing; (D) Mite body infected by *N. floridana* (aceto-ocerin solution with lacto phenol 85%); (E) Mite body surface infected by *N. floridana*, Bar = 100 μm .; (F) Under host cuticle stunted conidiophores, some have penetrated the cuticle and form primary conidia; (G) Primary conidium; (H) Primary conidia germination; (I) Secondary conidium formation; (J) Capilliconidium with capillary tube. Bar = 10 μm .

conidia를 형성하며, primary conidia로부터 2종의 포자가 형성되었는데, primary conidia와 유사한 secondary conidia가 생성되었으며, 아몬드 모양의 capilliconidia가 형성되었다(Yoon et al., 1999)고 하였다.

5개의 배지에서 *N. floridiana* 균주를 배양한 결과, 접종한 각각의 배지에서 primary conidia와 capilliconidia의 발아가 이루어졌지만, 발아한 포자가 hyphal body의 형성을 유도하는 결과는 얻기 어려웠다(Table 2). 다만 응애에서 분리한 hyphal body를 5%의 fetal bovine serum을 첨가한 Grace insect tissue culture medium에서 배양하였을 때 hyphal body 일부가 생존하여 약간 성장하는 것을 확인할 수 있었을 뿐 더 이상의 지속적인 성장은 나타나지 않았다.

Neozygites 속의 곰팡이들의 최적 배양에 있어서 곤충세포 배양배지에 FBS 및 다양한 첨가물을 첨가한 NT-1 (IPL41 + 5-10% fetal bovine serum + 0.3% lactalbumin hydrolysate + 0.3% yeastolate)를 이용하였을 때 감염된 살아있는 응애로부터 분리한 hyphal body로 배양하였을 때 배양이 보다 양호함을 확인할 수 있었다(Delalibera et al., 2003)고 하여, 응애로부터 균의 분리시기와 사용하는 배지의 종류가 성장에 영향을 주는 것으로 보이며, 앞으로 보다 자세한 검토가 요구된다.

(㉔)세실은 천적인 이리응애의 먹이로 점박이응애를 사육하였다. 1 m 높이의 선반 위에서 점박이응애 기주식물로 강낭콩을 재배하였다. 25-30 cm 높이로 자란 강낭콩 점박이응애를 집중하여 대량사육하였다. 방제를 위한 기초 정보를 확보하기 위하여 나누어 곰팡이 감염률을 조사한 결과는 Table 3와 같다 강낭콩 군락 내에서의 감염률은 36.1%이었다. 곰팡이의 감염률을 잎의 윗면과 아랫면으로 나누어 조사하였다. 점박이응애는 잎의 윗면보다 뒷면에 상대적으로 높게 밀집되어 있었다. 곰팡이의 감염률은 윗면보다 뒷면에서 매우 높게 나타났다. 군락의

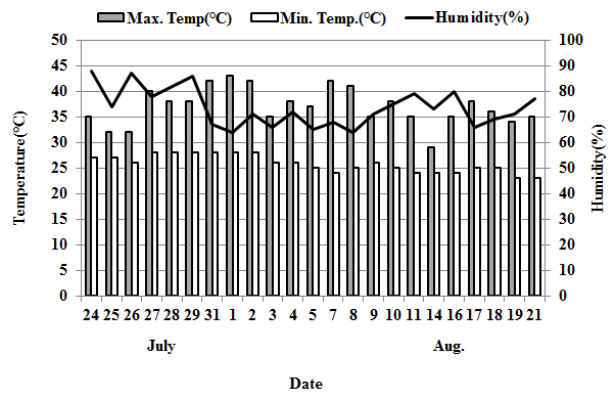


Fig. 2. Temperature and humidity changes during occurrence of *N. floridana* in rearing house for two spotted spider mite (*T. urticae*) production.

상위층에서는 잎 아랫면에서만 감염을 확인할 수 있어, 잎의 윗면보다는 아랫면에서 곰팡이의 피해가 더욱 심한 것으로 판단되며, 균 발생 진단을 위해서는 잎 윗면보다는 뒷면을 확인하는 것이 요구된다. 이 곰팡이는 포자가 자발적으로 분산되어 확산된다. 곰팡이가 발생하였던 시기의 사육실내 온도와 습도 변화는 Fig. 2과 같다. 최고온도는 27°C에서 43°C 사이에서, 최저온도는 23°C에서 29°C 사이에서 변화하였다. 상대습도는 64%에서 92%사이에서 변화하였다. *N. floridana*는 tomato red spider mite, *T. evansi* (Acari: Tetranychidae)를 감염(Wekesa et al., 2010)시키며, 이 곰팡이는 포자형성 최적 온도는 25°C, 포자 발아 최적 온도는 25°C와 29°C로 관찰되었다고 하였다. 또한, 이들은 2011년에 tomato red spider mite와 점박이응애 몸에 부착되는 *N. floridana*의 capilliconidia, 응애 몸 안의 hyphal body의 존재, 곰팡이 감염에 의한 치사율, 응애 머리 형성 등을 여러 기주에서 조사(Wekesa et al., 2011)하였다. 그 중 점박이응애는 이러한 모든 측정변수를 고려하였을 때, 딸기와 작두콩에서

Table 2. Growth response of *N. floridiana* from *T. urticae* in 5 artificial media

Artificial medium Fungus response	DWA	PDA	SDYA	EYSDYA	GITCM
Germination	○	○	○	○	○
Hyphal body formation	×	×	×	×	○

DWA: Sterilized water, PDA: Potato dextrose agar, SDYA: Saubouraud dextrose agar with 1% yeast extract, EYSDYA: Saubouraud dextrose agar with 1% yeast extract + egg yolk + milk, GITCM: Grace insect tissue culture medium + 5% fetal bovine serum.

Table 3. Mite *T. urticae* and *N. floridiana* infection rate in kidney bean canopy

Leaf		Upper part		Lower part	
No. of mite/leaf	Infection rate/leaf (%)	No. of mite/leaf	Infection rate/leaf (%)	No. of mite/leaf	Infection rate/leaf (%)
38.1	36.1	8.0	2.7	30.2	43.8

survey date: 2006. 9.30.

*N. floridana*의 선호도가 가장 높은 것으로 판단되며, 딸기에서 primary conidia의 형성이 가장 높았다고 하였다. 이 곰팡이의 기주선호도는 응애가 가해하는 기주식물의 종류에 따라 다양하게 나타날 수 있어, 이 곰팡이가 번성하는데 중요한 요인이 될 수 있다고 하였다. 이에 따라 점박이응애를 이용하여 천적응애를 생산할 때, *N. floridana*의 발생을 낮출 수 있는 기주식물의 선발이 요구된다. 천적 생산을 위한 점박이응애 사육장에서 갑작스런 밀도 감소가 발생하였을 때, 균류 발생여부에 대한 조기진단을 실시하고, 발생원인을 규명하여 균 확산 억제 대책을 수립할 수 있을 것으로 생각한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청시험연구사업 “시설고추 해충의 천적 중심 최적관리모델 개발” (과제번호: PJ010841072016)의 지원에 의하여 연구가 수행되었습니다.

Literature Cited

- Ahn, K.S., Lee, S.Y., Lee, K.Y., Lee, Y.S., Kim, G.H., 2004. Selective toxicity of pesticides to the predatory mite, *Phytoseiulus persimilis* and control effects of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* by predatory mite and pesticide mixture on rose. Korean J. Appl. Entomol. 43, 71-79.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
- Delalibera, I., Hajek, A.E., Humber, R.A., 2003. Use of cell culture media for cultivation of the mite pathogenic fungi *Neozygites tanajoae* and *Neozygites floridana*. J. Invertebr. Pathol. 84, 119-127.
- Fisher, F.E., 1951. An Entomophthora attacking citrus red mite. Fla. Entomol., 83-88.
- Humber, R.A., 1997. Fungi: identification. Manual of techniques in insect pathology. Academic, San Diego, CA, 153-185.
- Keller, S., 1997. The genus *Neozygites* (Zygomycetes, Entomophthorales) with special reference to species found in tropical regions. SYDOWIA-HORN- 49, 118-146.
- Kim, D.S., Lee, J.H., 1994. Foraging behavior of *Amblyseius longispinosus* (Acarina: Phytoseiidae) for *Tetranychus urticae* (Acarina: Tetranychidae) Eggs. Korean J. Appl. Entomol. 33, 33-38.
- Kim, S.S., Kim, D.I., Lee, S.C., 1992. Joint toxic action of acaricide mixtures to the dicofol and the ethion resistant strain of *Tetranychus urticae*. Korean J. Entomol. 22, 243-250.
- Lim, J.R., Choi, S.U., Kim, J.H., Moon, H.C., Lee, K.K., Kim, D.H., Ryu, J., Lee, S.K., Hwang, C.Y., 2008. Economic Injury Levels of *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae) Infesting Eggplant in Greenhouse. Korean J. Appl. Entomol. 47, 395-400.
- Ribeiro, A.E.L., Gondim, M.G.C., Calderan, E., Delalibera, I., 2009. Host range of *Neozygites floridana* isolates (Zygomycetes: Entomophthorales) to spider mites. J. Invertebr. Pathol. 102, 196-202.
- Van der Geest, L., Elliot, S., Breeuwer, J., Beerling, E., 2000. Diseases of mites. Experimental & applied acarology 24, 497-560.
- Wekesa, V., Moraes, G., Ortega, E., Delalibera, I., 2010. Effect of temperature on sporulation of *Neozygites floridana* isolates from different climates and their virulence against the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. J. Invertebr. Pathol. 103, 36-42.
- Wekesa, V., Vital, S., Silva, R., Ortega, E., Klingen, I., Delalibera, I., 2011. The effect of host plants on *Tetranychus evansi*, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and on their fungal pathogen *Neozygites floridana* (Entomophthorales: Neozygitaceae). J. Invertebr. Pathol. 107, 139-145.
- Yoon, C.S., Lee, M.H., Lee, S.H., Yoo, J.K., Lee, J.O., 1999. First record of the entomopathogenic fungus *Neozygites fresenii* on the aphid in Korea. Kor. J. Mycol. 27, 66-67.