

작은뿌리파리에 의한 *Fusarium oxysporum*의 전반

김형환* · 전흥용 · 양창열 · 강택준 · 한유경

농촌진흥청 원예특작과학원 원예특작환경과

Transmission of *Fusarium oxysporum* by the Fungus Gnat, *Bradysia difformis* (Diptera: Sciaridae)

Hyeong-Hwan Kim*, Heung-Yong Jeon, Chang-Yeol Yang, Taek-Joon Kang and You-Kyoung Han

Horticultural Environment Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science,

RDA, Suwon 441-440, Korea

(Received on November 10, 2009; Accepted on December 6, 2009)

The fungus gnat, *Bradysia difformis* was examined for its ability to transmit *Fusarium oxysporum* in PDA culture. Larvae and adults of *B. difformis* were able to transmit the fungus as ingested and sticking. We constructed GFP-expressed mutants with *Fusarium oxysporum*, then feed it to larvae of fungus gnat, *B. difformis*. So that mycelia were placed in the alimentary canal of larva.

Keywords : *Bradysia difformis*, Fungus gnat, *Fusarium oxysporum*, GFP, Transmit

작은뿌리파리(*Bradysia difformis*(=*agrestis*))는 파리목(Diptera) 검정날개버섯파리과(Sciaridae)에 속하는 소형의 파리류(Kim 등, 2000)로 화훼류, 채소류, 목초류, 버섯류, 관상식물 등 기주범위가 넓고 경제적으로도 피해가 큰 해충이다(Lee 등, 2001). 작은뿌리파리 유충은 난균류(Oomycetes), 자낭균류(Ascomycetes), 담자균류(Basidiomycetes)와 같은 균류(Gardiner 등, 1990)와 배지나 토양 중 유기물, 부패된 식물잔재물을 먹이로 한다(Michael 등, 1998). 작은뿌리파리는 유충이 식물의 뿌리나 줄기를 굽듯이 갉아먹거나, 뿌리골무를 뚫고 뿌리의 조직내부로 침입하여 가해하기 때문에 육안으로 관찰이 어렵다(Kim 등, 2003). 유충에 의한 직접적인 피해로 뿌리의 대사활동 저해로 인한 작물의 생육 불량과 함께 유충이 토양 중 *Fusarium*, *Phoma*, *Pythium* 및 *Verticillium*과 같은 병원균을 전반하여 중복 피해를 입힌다(Ludwig와 Oetting, 2001). 성충은 직접적인 피해는 없으나 토양, 상토, 암면배지 표면이나 갈라진 부분에 산란을 하기 위해 배, 다리, 날개 등 몸체가 닿아 토양 전염성 병원균의 균사와 접촉하고 다시 산란을 위해 이동함으로써 병원균을 전반시킨다

(Dennis, 1978).

작은뿌리파리는 Park 등(1999)이 육묘장에서 수박 유묘가 잘록병 및 시들음병과 유사한 증상을 보이며 피해를 받고 있던 원인을 조사하던 중 뿌리와 줄기 조직내에서 유충을 발견하면서 국내에 최초로 기록되었다. 작은뿌리파리는 2008년 이전까지는 주로 수박, 오이, 고추, 토마토 등 과채류를 육묘하는 육묘장이나 수경재배에서 피해가 주로 나타났었다. 그러나 2008년 8월 충주의 토마토 토양재배 온실에서 작은뿌리파리에 의해 50% 이상의 피해를 입은 민원이 제기되었다. 또한 전남 화순, 담양에서도 육안 및 작물체를 채취하여 조사한 결과 토마토 식물체의 대부분에서 작은뿌리파리 유충과 시들음병(*Fusarium oxysporum*)이 분리되었다.

토양 전염성 병원균인 *F. oxysporum*은 국내에서 시설 재배시 관리 소홀 및 불량한 환경조건, 연작지 등의 다양한 과채류 재배지에서 발병하며, 특히 토마토 시들음병(*F. oxysporum*)은 대표적인 토양 전염성 병원균으로 시들음병이 발병하게 되면 식물전체가 시들어 말라죽는 전신성 병해이기 때문에 토마토 재배시에 막대한 피해를 입히고 있다. 토양 전염성 병원균은 주로 작은뿌리파리의 유충이 서식하는 작물체의 뿌리 주위에 분포한다(Gardiner 등, 1990).

따라서 최근 토양재배 토마토에서 작은뿌리파리에 의한 피해가 급속히 증가하는 원인이 작은뿌리파리와 토양

*Corresponding author

Phone) +82-31-290-6227, Fax) +82-31-290-6259

Email) hhkim8753@korea.kr

전염성 병원균인 *F. oxysporum*의 복합 피해에서 기인된 것인지를 구명하고자, 작은뿌리파리의 유충, 번데기, 성충에 의한 *F. oxysporum*의 전반 유무를 밝혀 복합 피해의 기초자료를 제공하고자 본 연구를 수행하게 되었다.

작은뿌리파리 사육. 실험에 사용된 작은뿌리파리 유충과 성충은 Kim 등(2003)의 방법에 따라 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 15~20일 동안 배양한 원형느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)이 들어 있는 87Φ×15 mm 페트리디쉬에 30개체를 넣어 25±2°C 항온기에 보관하면서 누대사육하였다. 페트리디쉬내의 작은뿌리파리 개체가 증가하여 먹이가 부족할 경우 새로 배양된 배지로 유충과 성충을 옮겨가면서 개체수를 늘렸다. 실험에 사용된 작은뿌리파리 유충과 성충은 누대 사육한 2세대 이후의 개체를 이용하였다.

공시균주. 국내의 토마토 재배지에서 분리한 시들음병균 *Fusarium oxysporum*을 이용하였다. 시들음병균은 서울대학교 농생명공학부로부터 분양받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 PDA 배지상에 24°C에서 7일간 배양시킨 후 이용하였다.

배지상에서 작은뿌리파리의 *F. oxysporum* 전반 유무 조사. *F. oxysporum* 균주를 PDA 배지상에 24°C에서 7일간 배양시킨 후 작은뿌리파리의 유충, 번데기, 성충을 각각 다른 PDA 배지상에 접종하였다. 그리고 2일 동안 먹거나 접촉하게 한 후 유충과 번데기는 꺼집어내어 0.6% sodium hypochlorite와 0.1% Triton-X 100의 혼합액에서 1분 동안 표면 살균을 하였다. 살균한 유충과 번데기는 마쇄하여 현탁액을 만들어 깨끗한 PDA 배지에 치상하였으며, 3일 후 생성된 colony 수를 조사하였다. 성충은 살아있는 개체를 깨끗한 PDA 배지에 옮긴 후 3일 동안 생성되는 colony 수를 조사하였다. 실험은 작은뿌리파리의 령기별로 각각 10마리씩을 1반복으로 처리하여 3반복으로 수행하였다.

작은뿌리파리 유충의 *F. oxysporum* 섭식 유무 조사. 작은뿌리파리 유충에 의한 토양 전염성 병원균 *F. oxysporum* 균의 섭식 유무를 관찰하기 위하여 형광발현 형질전환 곰팡이를 제작하였다. 토마토에서 분리한 *Fusarium oxysporum* 균주에 REMI 방법을 이용하여 형광 발현 유전자를 삽입하였다. GFP 유전자가 포함된 벡터 pIGPAPA는 서울대학교 농생명공학부로부터 분양받아 사용하였다. pIGPAPA는 *Neurospora crassa*의 isocitrate lyase(ICL) 유전자의 promoter에 의해 조절되는 GFP 유전자와 *Aspergillus nidulans* TrpC promoter에 융합된 hygromycin B 저항성 유전자(*hygB*)를 포함하고 있다. REMI 형질전환은 Yun 등(1998)의 방법을 이용하였다. REMI를 수행하기 위하여

*Fusarium oxysporum*의 균사로부터 적당량의 원형질체를 얻은 후, 원형질체의 삼투압조절제로는 1 M NH₄Cl 용액, 세포벽분해효소로는 driselase, 재생배지로는 1M sucrose가 첨가된 완전배지를 사용하였다. 여기에 분자량 3,350의 PEG(Polyethyleneglycol)를 첨가한 후 곰팡이 재생배지에 옮겨 1일간 30°C에서 키워 원형질체의 재생을 유도하였다. 그 다음 재생배지 표면에 hygromycin B가 포함된 agar 용액을 부은 후 곰팡이 형질전환체가 형성될 때까지 24°C에서 키웠다. 형성된 형질전환체에 벡터가 삽입되었는지를 확인하기 위해서 입체현미경(Universal Research Stereo-microscope, Carl Zeiss Discovery V12)을 이용하여 형질전환체의 GFP 유전자 발현 양상을 관찰한 후 형광을 띤 돌연변이체를 선발하고 사진을 촬영하였다.

작은뿌리파리의 *F. oxysporum* 전반과 섭식 유무. PDA 배지상에서 작은뿌리파리 유충, 번데기 및 성충에 의한 *F. oxysporum* 균의 전반유무를 조사한 결과 유충에서는 18.0개, 성충에서는 6.7개의 colony가 형성되어 균을 섭식 혹은 몸체에 묻어 전반되는 것으로 밝혀졌다(Fig. 1). 그러나 번데기는 *F. oxysporum* 균을 전반하지 않는 것으로 나타났다. 토마토와 콩에서 뿌리파리류(*Bradysia* spp.)의 유충과 성충이 과실 썩음병(*Penicillium brevicompactum*)과 시들음병(*F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*)를 전반하였으며, 번데기는 전반이 이루어지지 않았다고 하였다(Gillespie와 Menzies, 1993). Jarvis 등(1993)은 작은뿌리파리와 유사한 종인 *B. impatiens*의 유충과 성충이 오이에서 잘록병을 일으키는(*Pythium aphanidermatum*)을 전반하였으나, 난포자의 활력은 유충에서만 나타났다고 하였다. 또한 알팔파에서 *B. impatiens*의 성충 한 마리가 시들음병(*Verticillium albo-atrum*)을 전반하여 100개 이상의 colony를 형성하였다고 보고하고 있다(Kalb와 Millar, 1986).

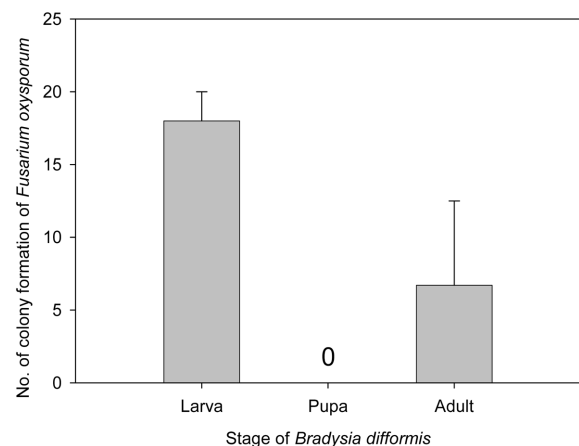


Fig. 1. Transmission of *Fusarium oxysporum* by stage of *Bradysia difformis* in PDA. Vertical bars represent SD.

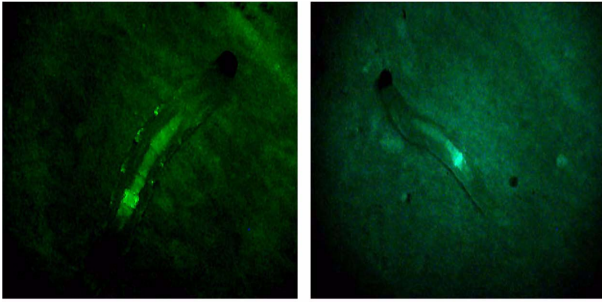


Fig. 2. Expression of GFP in *Bradysia difformis* larvae infected by *Fusarium oxysporum*.

그리고 *B. impatiens*의 유충에 의해 오이로 전반된 *P. aphanidermatum*에 의해 오이의 지체부에 잘록병이 유충한 마리 처리에서 9~12%, 두 마리 처리에서 20~23%가 발병하였으며, *P. aphanidermatum*의 감염율은 각각 30.0~37.5%, 76.7~95.2%를 보여 오이 재배지에서 뿌리파리류에 의한 시들음병 전반의 심각성을 보고하였다(Jarvis 등, 1993).

작은뿌리파리 유충의 전반에 대한 명확한 원인을 구명하기 위하여 형광발현 형질전환 *F. oxysporum* 균을 제작하여 유충에 먹이고 입체현미경으로 형질전환체의 GFP 유전자 발현 양상을 촬영한 결과 유충의 소화관을 따라 *F. oxysporum* 균이 분포하고 있음을 밝혀냈다(Fig. 2). Gardiner 등(1990)도 *B. impatiens*의 유충을 오이의 뿌리 주변에서 분리한 잘록병을 일으키는 *Pythium* spp. (*P. aphanidermatum*, *P. acanthicum* 및 *P. oligandrum*)가 자라고 있던 V8 배지에 넣고 1-14일 동안 균사체를 먹인 후 본 실험에서와 같이 염색 과정을 거쳐 입체현미경으로 유충의 체내에 존재하는 분생포자의 사진을 촬영하여 유충에 의한 전반을 증명하였다. 이와같이 뿌리파리류의 유충은 토양 중에 서식할 때 토양 전염성 병원균을 체내로 섭취하고, 뿌리조직을 뚫고 뿌리 속으로 침입하여 조직을 갉아먹는 과정에서 소화관내의 토양 전염성 병원균이 뿌리조직으로 방출되면서 피해를 더욱 가중시키는 것으로 보고되어 있다(Gardiner 등, 1990). 뿌리파리류 유충에 비해 토양 전염성 병원균의 전반이 적었던 성충은 유충이 섭취에 의해 작물체 뿌리내로 병원균을 옮기는 것과 달리 몸체에 병원균의 균사 등을 묻혀서 전반하기 때문에 전반된 균사수가 적고 직접적으로 식물체와 접촉이 이루어지지 않는에서 피해가 낮은 원인을 찾을 수 있다. 그러나 성충은 이동성이 유충보다 월등히 넓고 활동적이므로 작물체와 작물체 사이에 토양 전염성 병원균을 전반할 수 있는 능력은 뛰어나다고 할 수 있다.

이상의 결과들로 미루어보아 작은뿌리파리는 시설원에

작물 재배지에서 연중 발생하고 시기에 관계없이 령기가 다양하게 발생하기 때문에 토양중에 전염성 병원균이 분포하는 곳이면 유충과 성충에 의해 병원균이 전반됨과 동시에 직접적인 피해도 유발시켜 작물체의 피해를 점진적 혹은 급속히 증가시킬 수 있는 중요한 토양서식성 해충이다. 또한 작은뿌리파리가 속해 있는 검정날개버섯파리과의 대부분의 종들이 균식성임을 감안한다면 작물체의 뿌리 주위에 분포하는 토양 전염성 병원균의 섭취와 전반이 자연스럽게 이루어질 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 국내의 연작 시설재배 토마토와 기타 과채류 재배지에서는 작은뿌리파리와 *F. oxysporum*에 의하여 작물의 생산성 손실이 우려되므로 작물재배 기간중 작은뿌리파리와 *F. oxysporum*의 발생유무에 관심을 기울여 피해의 예방 및 방제에 만전을 기해야 하겠다.

요 약

PDA 배지상에서 작은뿌리파리 유충과 성충은 토양 전염성 병원균인 *Fusarium oxysporum*을 전반하였으며, 성충에 비해 유충의 전반이 높았다. 작은뿌리파리 유충은 *F. oxysporum* 균을 섭취하여 전반하였으며, 성충은 몸체에 균을 묻혀 전반하였다. 형광발현 형질전환 *F. oxysporum* 균을 제작하여 작은뿌리파리 유충에 먹인 결과 균은 소화관을 따라 분포하였다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 원예특작과학원 기본연구사업(과제번호: 2007139020200001102)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Dennis, D. J. 1978. Observations of fungus gnat damage to glasshouse cucumber. *New Zealand J. Exp. Agri.* 6: 83-84.
- Gardiner, R. B., Jarvis, W. R. and Shipp, J. L. 1990. Ingestion of *Pythium* spp. by larvae of the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Ann. Appl. Biol.* 116: 205-212.
- Gillespie, D. R. and Menzies, J. G. 1993. Fungus gnats vector *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Ann. Appl. Biol.* 123: 539-544.
- Jarvis, W. R., Shipp, J. L. and Gardiner, R. B. 1993. Transmission of *Pythium aphanidermatum* to greenhouse cucumber by the fungus gnat *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Ann. Appl. Biol.* 122: 23-29.
- Kalb, D. W. and Millar, R. L. 1986. Dispersal of *Verticillium albo-*

- atrum* by the fungus gnat (*Bradysia impatiens*). *Plant Disease* 70: 752-753.
- Kim, H. H., Choo, H. Y., Lee, H. S., Cho, S. R., Shin, H. Y., Park, C. G. and Choo, Y. M. 2000. Occurrence and damage of *Bradysia agrestis* Sasakawa (Diptera: Sciaridae) in propagation house. *Korean J. Appl. Entomol.* 39: 89-97.
- Kim, H. H., Choo, H. Y., Lee, D. W., Lee, S. M., Jeon, H. Y., Cho, M. R. and Yiem, M. S. 2003. Control efficacy of korean entomopathogenic nematodes against fungus gnat, *Bradysia agrestis* (Diptera: Sciaridae) and persistence in bed soil. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44: 393-401.
- Lee, H. S., Kim, T. S., Shin, H. Y., Kim, H. H. and Kim, K. J. 2001. Host plant and damage symptom of fungus gnats, *Bradysia* spp. (Diptera: Sciaridae) in Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 40: 149-153.
- Ludwig, W. W. and Oetting, R. D. 2001. Evaluation of medium treatments for management of *Frankliniella occidentalis* (Thripidae: Thysanoptera) fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae). *Pest Manag. Sci.* 57: 1114-1118.
- Michael, R. E., Smith, J. N. and Raymond, A. C. 1998. Fungus gnat population development in Coconut Coir and Sphagnum peat-based Substrates. *Hort. Technol.* 8: 106-109.
- Park, C. G., Yoo, J., Sasakawa, M., Choo, H. Y., Kim, H. H. and Lee, H. S. 1999. Notes on newly recorded insect pest, *Bradysia agrestis* (Diptera: Sciaridae). *Korean J. Appl. Entomol.* 38: 59-62.
- Yoo, S. J., Lee, M. S. and Yu, S. H. 1995. Forma specialis and races of *Fusarium oxysporum* isolates from tomato in Korea. *Korean J. Plant Pathol.* 11: 324-329.
- Yun, S. H., Turgeon, B. G. and Yoder, O. C. 1998. REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 53-66.