

## 두 종의 사과 심식나방류[복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*)] 동정용 DNA 분자지표

송승백 · 최경희<sup>1</sup> · 이순원<sup>1</sup> · 김용균\*

안동대학교 생명자원과학과, <sup>1</sup>농촌진흥청 원예연구소 사과시험장

### DNA Markers Applicable for Identification of Two Internal Apple Feeders, *Grapholita molesta* and *Carposina sasakii*

Seungbaeck Song, Kyeonghee Choi<sup>1</sup>, Soonwon Lee<sup>1</sup> and Yonggyun Kim\*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749

<sup>1</sup>Apple Experiment Station, National Horticultural Research Institute, RDA, Kunwi 716-810, Korea

**ABSTRACT** : Two fruit moths of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck), and the peach fruit moth, *Carposina sasakii* (Matsumura), infest apples in Korea by internally feeding behavior. *C. sasakii* is a quarantine insect pest from some other countries importing Korean apples. *G. molesta* is not a quarantine insect pest, but can be incorrectly identified as *C. sasakii* especially when it is found inside apple fruits at its larval stages because it is not easy to identify the two species by morphological characters alone. This incomplete identification results in massive economical loss by fruits needlessly destroyed or turned away at border inspection stations of the importing nations. This difficulty can be overcome by molecular DNA markers. Several polymorphic regions of mitochondrial DNA of both species were sequenced and used for developing specific restriction sites and polymerase chain reaction (PCR) primers. Based on these sequences, three diagnostic PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) sites were detected and validated for their practical uses. Also, species-specific PCR primers were devised to develop diagnostic PCR method for identifying the internal feeders.

**KEY WORDS** : *Grapholita molesta*, *Carposina sasakii*, Apple, Identification, Quarantine

**초 록** : 국내 서식하는 복숭아순나방(*Grapholita molesta* (Busck))과 복숭아심식나방(*Carposina sasakii* (Matsumura))의 유충은 사과 과실내부를 섭식하여 피해를 주는 해충이다. 사과를 수출할 때 복숭아심식나방은 수출대상국들로부터 검역 대상해충이다. 반면에 복숭아순나방은 광범위한 분포로 비교적 수입국으로부터 검역 대상 해충은 아니지만, 사과 과실 내부에서 발견되는 경우 복숭아심식나방으로 오인될 수 있다. 이는 발견되는 유충을 가지고 형태적으로 두 종을 구분하기 어렵기 때문이다. 특별히 수입국 검역단계에서 이러한 불완전한 동정 실패는 수출 사과의 폐기 또는 반송과 수출중단 등과 같은 막대한 경제적 손실을 초래하게 된다. 이에 이들을 구분할 수 있는 분자지표 개발이 요구되었다. 두 종의 미토콘드리아 DNA를 대상으로 다형을 보이는 여러 영역의 염기서열을 분석하였다. 이 서열을 바탕으로 진단용 제한위치가 결정되고 종 특이적 프라이머가 제작되었다. 본 연구는 세 부위의 종 특이적 제한효소 위치에 따라 PCR-RFLP 기술과 종 특이적 프라이머를 이용하여 진단용 PCR 기술을 개발하였다.

**검색어** : 복숭아순나방, 복숭아심식나방, 사과, 동정, 검역

\*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

분자유전학적 기술의 비약적인 발전으로 다양한 생물 종에 대한 객관적이면서도 정밀한 비교를 가능하게 하는 여러 기술들이 축적되었다. 그 대표적인 것이 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)로서 일련의 DNA 시슬을 제한효소로 처리했을 때 생기는 DNA 단편들이 개체간의 유전적 조성의 차이 즉 염기서열상의 차이에 따라서 그 수나 길이가 서로 다르게 나타난다는 사실에 기초한 방법으로 집단 및 진화적 유전연구, 형질개량연구의 유전적 식별, 유전자 분리 및 클로닝을 위한 표식 등 다양하게 이용되고 있다(Neale and Williams, 1991; Haymer, 1994).

모든 진핵생물의 세포내에 에너지 대사에 관여하는 세포내 소기관인 미토콘드리아는 핵 DNA와는 독자적으로 자기복제 능력을 가지고 있으며 세포질에 존재한다. 이 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 작은 크기 때문에 1970년대 후반 DNA 염기서열 결정기술의 급속한 발전으로 가장 먼저 연구된 핵산 분자들 중의 하나이다. 특히 동물의 mtDNA는 보통 15 내지 20 Kb의 비교적 짧은 환상의 구조를 가지며(Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987), 이 구조 내에 13개의 단백질, 2개의 ribosomal RNAs, 22개의 transfer RNAs에 관한 유전정보를 가진다. 또한 AT서열이 많은 나타나는 영역을 지니고 있으며, 이 영역은 주로 mtDNA의 복제 원점으로 작용하게 된다(Brown, 1985). 초파리류인 *Drosophila yakuba*의 mtDNA의 전체 염기서열이 밝혀져 있으며(Clary and Wolstenholme, 1985), 이 외에도 *D. virilis* (Clary and Wolstenholme, 1987), *D. melanogaster* (de Bruijn, 1983; Satta *et al.*, 1987; Garesse, 1988), *Aedes albopictus* (HsuChen and Dubin, 1984; HsuChen *et al.*, 1984), *Apis mellifera* (Vlasak *et al.*, 1987), *Locusta migratoria* (McCracken *et al.*, 1987; Uhlenbusch *et al.*, 1987), *Pyrocoelia rufa* (Bae *et al.*, 2004) 등 약 20종의 곤충 mtDNA 전체 염기서열이 밝혀져 있다. 비교적 매우 높은 A+T 염기 조성을 갖는 곤충의 mtDNA는 비교적 작은 크기, 세포내 많은 복제수, 세포질 유전자로서 생식세포를 만들 때 유전자 재조합이 일어나지 않는 대신 돌연변이가 일어날 확률이 핵 DNA에 비해 높은 특징들 때문에 집단간 비교연구에 많이 이용되고 있다(Harrison, 1989; Simon, 1991; Wolstenholme, 1992). 특히 mtDNA의 부위별로 낮은 변이를 보이는 영역으로부터 비교적 변이가 높은 영역까지 보존성이 다양하여 비교하고자 하는 분류군의 차이 정도에 따라 선택된다(Simon *et al.*, 1994).

사과를 가해하는 주요 해충으로는 잎의 기능을 저해시

키는 응애, 진딧물, 굴나방류와 잎이나 연한 순 또는 열매를 가해하는 잎말이나방류와 함께 열매 내부를 직접 가해하는 심식나방류가 있다(Ahn *et al.*, 1985). 심식나방류는 발생 밀도도 높고 경제적으로 가장 큰 피해를 주는 해충으로서 이들 가운데 복숭아순나방(*Grapholita molesta* (Busck))과 복숭아심식나방(*Carposina sasakii* (Matsumura))이 대표적인 종이다(Park *et al.*, 1977). 특별히 여러 심식류에서 알 수 있듯이 일단 과실 속으로 가해가 진행되면, 방제가 어려워 다량의 약제 살포와 이에 따른 해충의 약제 저항성 및 환경과 식품의 안전성에 우려를 주고 있다(Pree *et al.*, 1998; Borchert *et al.*, 2004).

복숭아순나방은 중국 서북지역에서 유래되어 현재는 아시아, 유럽, 아메리카, 북부 아프리카, 중동, 뉴질랜드와 호주의 핵과류 과실에 피해를 주고 있으며(Roehrich, 1961; Rothschild and Vickers, 1991), 복숭아는 물론이고 산업적으로 중요한 과수인 사과와 배를 가해하는 주요 나비목 해충이다(Ahn *et al.*, 1985). 복숭아순나방은 4월 중순에서 9월 중순까지 4-5회의 성충발생 피크를 보인다. 유충은 과실을 가해할 때 배설물은 침입공 주변으로 배출하는 습성을 보인다(사과나무종합병원: <http://www.iloveapple.co.kr>). 반면에, 복숭아심식나방은 한국과 일본을 중심으로 분포하고 있으며, 사과의 열매가 나타나는 6월 상순에서 8월 하순까지 2회의 성충 발생 피크를 보인다. 유충의 과실 가해습성은 복숭아순나방과는 달리 배설물을 과실 밖으로 내보내지 않는다(사과나무종합병원: <http://www.iloveapple.co.kr>). 두 해충의 지리적 분포 차이 능력은 페로몬 조성에서도 나타나, 복숭아순나방의 경우는 거의 모든 지역에서 유사한 페로몬 성분 조성비를 보여, 이 종이 넓은 지역에 분포할 수 있는 성질을 잘 대변하는 반면, 복숭아심식나방의 경우 한국과 일본 사이에서도 조성 성분비 차이를 보여 주었다(Boo, 1998).

국내 사과를 대만이나 미국으로 수출하는 경우 복숭아심식나방은 대상국의 주요 검역대상이 되므로서 수입국의 요구 사항에 따른 제반관리를 실시하고 식물검역소 주관으로 식물위생증명서를 발급받아야 한다(수출식품 검역: <http://www.npqs.go.kr>). 그러나 열매를 직접 가해하는 복숭아심식나방이 유충시기에 과실에서 발견되는 경우 복숭아순나방과의 구분이 형태적으로 어렵다. 따라서 국내 생산지에서 복숭아심식나방 발생이 없어서 식물위생증명서를 발급 받더라도, 국내 또는 수입국의 통관 검역 지소에서 실시되는 현장 검증에서 어린 복숭아순나방이 복숭아심식나방으로 오인되어 대량으로 반품될 수 있는 가능성이 속출하게 된다.

본 연구는 사과와 수출입 통관 검역지소에서 발생될 수 있는 복숭아순나방과 복숭아심식나방의 정확한 종 동정을 위한 분자지표를 개발하는 데 목적을 두었다. 이를 위해 비교적 중간 변이가 뚜렷한 미토콘드리아의 영역을 대상으로 PCR-RFLP 기술과 종특이적 프라이머를 이용한 PCR 증폭기술을 개발하였다.

## 재료 및 방법

### 시험곤충 및 DNA 추출

유전자 분석을 위한 시료로서 경북 군위에 위치한 원예연구소 사과시험장에서 복숭아순나방과 복숭아심식나방 페로몬 트랩에 각각 포획된 수컷 성충을 이용하였다. 포획된 성충의 끈끈이물질을 제거하기 위해 헥산에 침지시켰으며, 이를 다시 에탄올로 치환한 후 DNA 추출에 이용하였다. 날개를 제거한 각 성충을 400  $\mu$ l의 추출완충용액(10 mM Tris, 0.1 M EDTA, 20  $\mu$ g/ml RNase, 0.5% SDS, pH 8)에서 분쇄한 후, 5  $\mu$ l의 proteinase K (최종농도 100  $\mu$ g/ml)를 첨가하여 50°C 항온수조에서 10분간 반응시켰다. 이후 페놀추출을 실시하였다. 즉, 같은 부피의 phenol:chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1, v : v : v) 용액을 첨가한 뒤 12,500  $\times$  g로 2분 동안 원심 분리하여 상등액을 취하는 과정을 2회에 걸쳐 행하였다. 다시 같은 부피의 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1, v : v)을 첨가한 뒤 12,500  $\times$  g에서 2분 동안 원심분리 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 40  $\mu$ l의 10M ammonium acetate를 넣은 후 총 시료의 2배 부피에 해당하는 100% 에탄올(-20°C)을 첨가한 후 -20°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 12,500  $\times$  g에서 10분간 원심분리한 뒤 침점물을 받았다. 여기에 70% 에탄올(-20°C)을 첨가하고 12,500  $\times$  g로 3분 동안 원심분리 및 침점물을 건조시킨 후 50  $\mu$ l의 3차증류수로

DNA를 녹여서 추출하였다.

### mtDNA 영역 polymerase chain reaction (PCR)

미토콘드리아 DNA 가운데 cytochrome oxidase-I (COI), cytochrome B (CYT-B), 16S rRNA 영역을 universal primers를 바탕으로 (Table 1)으로 Kim et al. (1998)의 방법으로 증폭하였다. 각 PCR 시료의 구성은 다음과 같다. DNA 추출액 2  $\mu$ l, dNTP 5  $\mu$ l, 10x PCR 완충용액 5  $\mu$ l, primer 각각 2  $\mu$ l (25 pmol/ $\mu$ l), Tag polymerase 0.5  $\mu$ l, 3차증류수 33.5  $\mu$ l로 구성되었다. Primer와 Tag polymerase는 (주) 바이오니아(대전, 한국)로 부터 제작 또는 구입하였다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 1분간 불활성단계를 거친 후, 35 반복으로 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 30초간 변성단계와 72°C에서 1분 30초의 사슬 연장 단계는 동일하나, 프라이머 결합 반응은 프라이머별로 상이하여 COI 영역은 48°C에서 30초, CYT-B 영역과 16S rRNA 영역은 56°C에서 30초간 이뤄졌다. 이후 최종 사슬연장 단계가 추가로 72°C에서 10분간 이뤄졌다. PCR 생성물은 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1% 아가로즈젤로 확인하였다.

### mtDNA 영역 염기서열 분석

mtDNA 영역별 PCR 증폭물은 PCRquick-spin ((주) 인트론바이오테크놀로지, 대전)을 이용하여 프라이머를 제거시켰고, PCR2.1 TOPO kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 클로닝벡터에 재조합시켰다. 재조합된 벡터를 (주) 마크로젠(서울)에 염기서열 분석을 의뢰하여 받은 자료를 가지고 DNASTAR 프로그램(Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)을 이용하여 단일염기서열로 정리하였고, 유사종과 근연관계를 알아내기 위해 NCBI Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast 프로그램을 이용하였다.

**Table 1.** Primers used for cloning different mitochondrial DNA regions of *Grapholita molesta* and *Carposina sasakii*

Primers <sup>1</sup>	Sequence
C1-J1751	5'-GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3' (23mer)
TL2-N3014	5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' (25mer)
CB-J10933	5'-TATGTTTACCATGAGGACAAATATC-3' (26mer)
CB-N11367	5'-ATAACTCCTCTAATTTATTAGGAAT-3' (26mer)
SR-J14233	5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3' (20mer)
SR-N14588	5'-AAACTAGGATTAGATACCCATTAT-3' (25mer)

<sup>1</sup> Primers are named by a trinomial method (gene-strand-3' end) of Simon et al. (1994). All sequences and their locations of the genes are designed on the basis of the published *Drosophila yakuba* sequence (Clary and Wolstenholme, 1985). 'J' denotes the major strand to be transcribed and 'N' is the opposite minor strand.

PCR-RFLP

상기에 기술한 PCR 조건으로 얻어진 영역별 PCR 증폭물은 PCRquick-spin으로 프라이머 제거 및 증폭물을 다시 증류수로 용해시켰다. 이 시료를 영역별로 서로 다른 제한효소를 처리하는 데, 이때 COI 영역은 *Dde* I, CYT-B 영역은 *Taq* I, 16S rRNA 영역은 *Sau* 3A로 효소의 구입처인 바이오니아 제조회사의 반응조건에 따라 37°C에서 3시간동안 처리하였다. 제한효소 처리물은 1x TAE에서 1.2% 아가로스젤로 분리한 후 ethidium bromide로 염색 및 UV등에서 확인하였다.

진단용 PCR primer를 이용한 PCR

COI영역 안에서 복숭아순나방과 복숭아심식나방에서

특별히 차이가 나는 부분을 찾아 primer를 제작하였다 (Table 2). 각 PCR 시료의 구성과 반응은 상기에 기술된 조건을 따랐다. 단, 프라이머 결합 반응은 56°C에서 30초 동안 이뤄졌다. PCR 생성물은 1X TAE에서 1% agarose 젤로 확인하였다.

결과 및 고찰

mtDNA 영역별 염기서열 및 중간 다형부위

복숭아순나방과 복숭아심식나방의 DNA 분자지표를 개발하기 위해 mtDNA 영역을 설정하였고, 이 가운데 검역에 있어서 중 구분에 많이 이용되는 COI 영역을 중심으로 염기서열이 분석되었다(Fig. 1). 두 종의 염기서열은

Table 2. Species-specific primers used for diagnostic PCR amplification between *Grapholita molesta* and *Carposina sasakii*

Primer	Sequence	Description
Gm_DI-FP	5'-GATTTTGATTATTACCTCTTCT-3'	Diagnosis of <i>G. molesta</i>
Gm_DI-RP	5'-CCAGCTAATACTGGTAGTGAAAGT-3'	
Cs_DI-FP	5'-GATTTTGACTGCTTCCCCCGTCA-3'	Diagnosis of <i>C. sasakii</i>
Cs_DI-RP	5'-CCAGCAAGAACTGGAAGAGATAAA-3'	

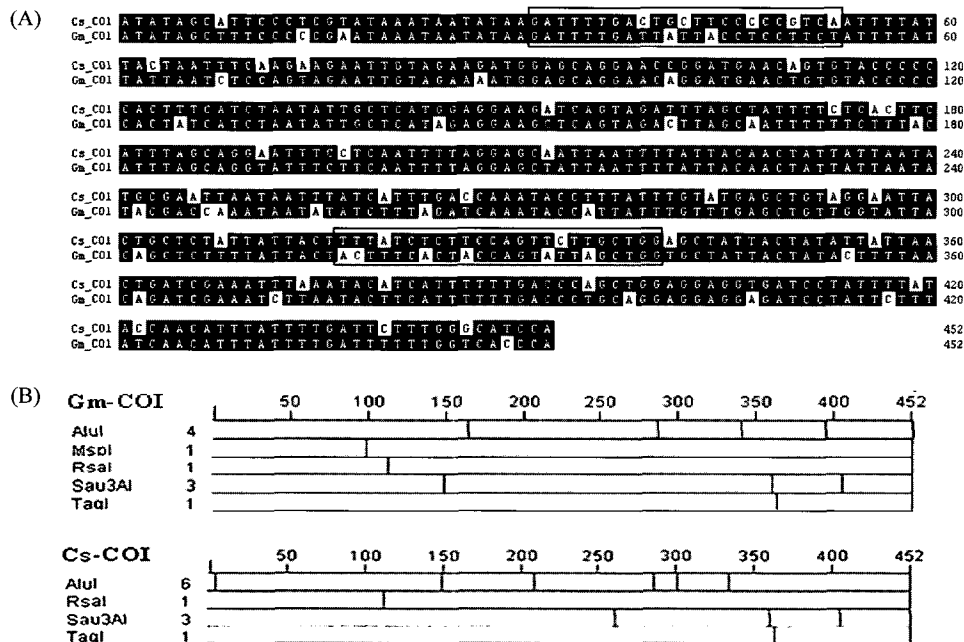


Fig. 1. (A) DNA sequences of *Grapholita molesta* (Gm) and *Carposina sasakii* (Cs) at cytochrome oxidase-I (COI) locus of mitochondrial DNA. Unshaded areas indicate point mutations. Two squares denote the gene-specific forward and reverse primers of each species. (B) Restriction maps of COI of the two species, at which restriction frequency and locations are denoted. The sequence of *G. molesta* was obtained from NCBI DNA database with accession number of AF499023. The sequence of *C. sasakii* is deposited to NCBI GenBank with an accession number of EF684934.

국내에서 채집된 두 개체를 중심으로 분석되었으며, 염기서열은 기존에 밝혀진 복숭아순나방을 포함한 다른 종들의 COI과 높은 상동성을 보였다(미보고자료). 두 종 사이에는 전체 452개 염기 가운데 67곳에서 차이를 보여 14.8%의 변이를 보였다(Fig. 1A). 이 변이 부위는 점돌연변이로 분석하면 transition 돌연변이가 38.8%이고, transversion 돌연변이가 61.2%로 나타났다. 자연히 제한효소의 위치와 밀도에 있어서도 차이를 나타냈다(Fig. 1B). 검역 대상이 되는 여러 해충에서 미토콘드리아의 COI 영역이 DNA 분자지표를 개발하는 데 이용되었다. 예를 들어 *Tetranychus* 응애류(Lee and Lee, 1997), *Bactrocera* 과실파리류(Mun *et al.*, 2000), *Liriomyza* 굴파리류(Scheffer *et al.*, 2001) 그리고 잎말이나방류(Sperling and Hickey, 1995)에 대해 적용되었다.

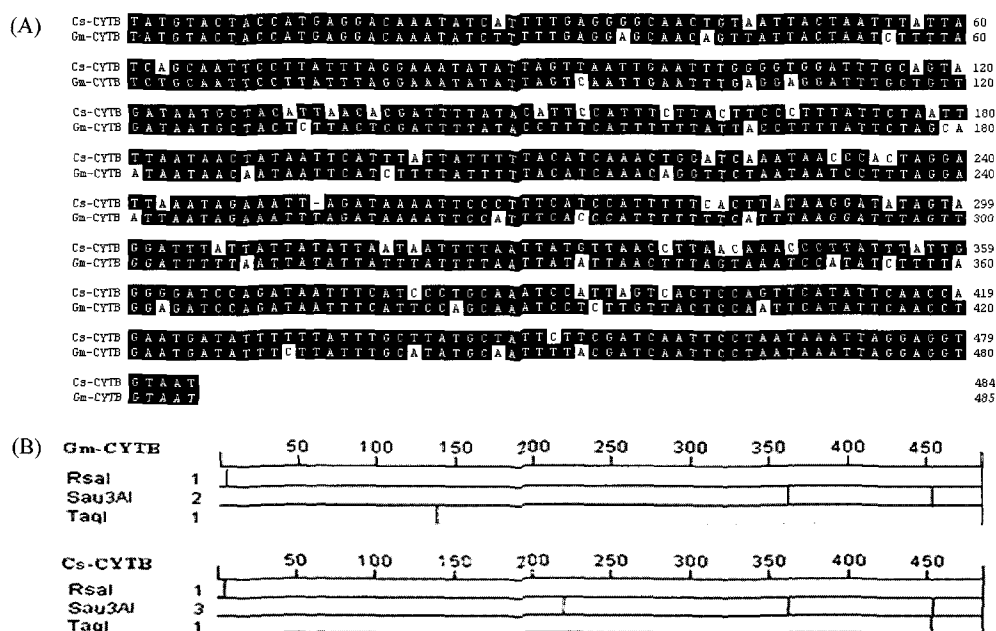
NADH와 같은 다른 미토콘드리아 영역들도 검역 해충 판별에 유용하다는 것이 *Rhagoletis* 과실파리류에서 증명되었다(Salazar *et al.*, 2002). 본 연구에서는 CYT-B가 분석되었다(Fig. 2). 이 영역에서 두 종 염기서열은 기존에 밝혀진 다른 종들의 CYT-B와 높은 상동성을 보였다(미보고자료). 두 종 사이에는 전체 485개 염기 가운데 72곳에서 차이를 보여 14.8%의 변이를 보였다(Fig. 2A). 이 변이 부위는 점돌연변이로 분석하면 transition 돌연변이가 37.5%이고, transversion 돌연변이가 61.1% 그리고 한

곳에서 결실이 나타났다. 자연히 제한효소의 위치와 밀도에 있어서도 차이가 있어 *Taq I* 경우 뚜렷한 제한위치 차이로 진단용 분자지표로 개발하게 할 수 있게 했다(Fig. 2B).

또 다른 다형 부위로서 16S rRNA 영역에서 두 종 사이의 염기서열이 분석되었다(Fig. 3). NCBI 유전자검색을 통해 이 염기서열들이 다른 종의 해당 염기서열과 유사성을 보였다(미보고자료). 두 종 사이에서는 전체 395개 염기 가운데 40곳에서 차이를 보여 10.1%의 변이를 보였다(Fig. 3A). 이 변이 부위는 점돌연변이로 분석하면 transition 돌연변이가 20.0%이고, transversion 돌연변이가 72.5% 그리고 세 곳에서 결실이 나타났다. 자연히 제한효소의 위치와 밀도에 있어서도 차이가 있어 *Sca I* 3A 경우 뚜렷한 제한위치 유무로 진단용 분자지표로 개발하게 할 수 있게 했다(Fig. 3B).

### 진단용 DNA 분자지표

PCR-RFLP를 위한 진단용 분자지표가 이상에서 밝혀진 염기서열을 바탕으로 개발되었다(Fig. 4). RFLP의 판단을 용이하게 하기 위해 제한위치의 유무에 따라 종 구분을 할 수 있게 각 영역별 제한효소를 선별하였다. 또한 이 세 가지 PCR-RFLP에서는 복숭아순나방은 절편을 만들도록 하였고, 복숭아심식나방은 제한위치가 없거나 또



**Fig. 2.** (A) DNA sequences of *Graphophlita molesta* (Gm) and *Carposina sasakii* (Cs) at cytochrome b (CYTB) locus of mitochondrial DNA. Unshaded areas indicate point mutations. (B) Restriction maps of CYTB of the two species, at which restriction frequency and locations are denoted. Both sequences are deposited to NCBI GenBank with accession numbers of EF684936 and EF684935, respectively, to Gm and Cs.

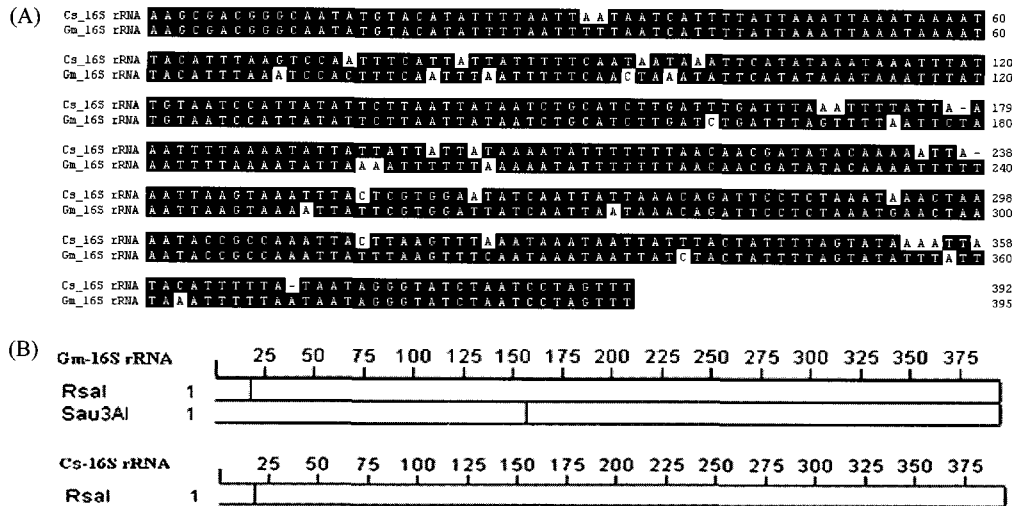


Fig. 3. (A) DNA sequences of *Grapholita molesta* (Gm) and *Carposina sasakii* (Cs) at 16S rRNA locus of mitochondrial DNA. Unshaded areas indicate point mutations. (B) Restriction maps of 16S rRNA of the two species, at which restriction frequency and locations are denoted. Both sequences are deposited to NCBI GenBank with accession numbers of EF684938 and EF684937, respectively, to Gm and Cs.

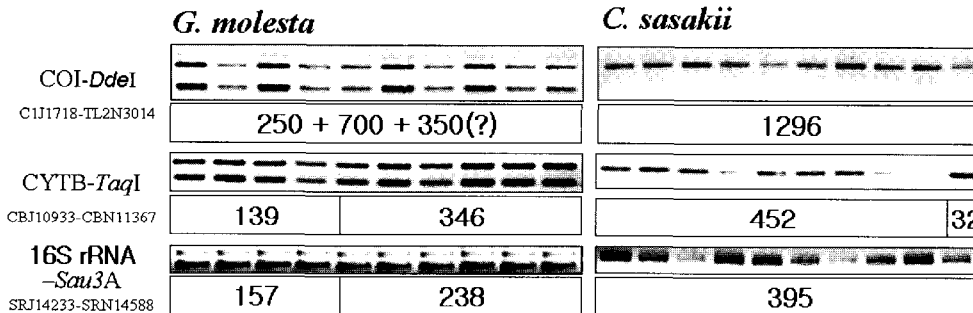


Fig. 4. DNA markers to diagnose *Grapholita molesta* and *Carposina sasakii* using PCR-RFLP at three mitochondrial DNA loci. Forward and reverse primers are denoted under each locus name and explained in Table 1. Figures in the boxes indicate the expected sizes of the digested DNA fragments.

는 말단에 위치하여 전기영동 상에서는 거의 단일밴드가 나타나도록 제작하였다. COI 영역은 염기서열보다 연장된 증폭물을 얻었고 부분적 염기서열을 분석하였다(미보고자료). 이 증폭물은 *D. yakuba*의 mtDNA 염기서열(Clary and Wolstenholme, 1985)을 바탕으로 일부 tRNA 영역이 포함하였다. 이때 *Dde* I의 제한효소가 염기서열 자료를 볼 때 복숭아순나방에서는 두 곳 이상에서 제한위치를 갖으나, 복숭아심식나방의 경우 제한위치가 없어 이상적 진단 좌위로 선발했다. 시험결과 10반복 모두 복숭아순나방은 절편을 보이나, 복숭아심식나방은 절편형성을 하지 못하여 뚜렷한 종 차이를 보였다. CYT-B는 염기서열 분석에서 차이가 나타난 *Taq* I을 이용하여 중간 구분을 하였다. 예상된 위치에서 복숭아순나방은 절편을 형성하였고, 복숭아심식나방은 미절편상태를 유지하였다. 16S rRNA

영역도 염기서열 분석을 토대로 선정된 *Sau* 3A가 예상된 위치에서 복숭아순나방은 절편을 보이나, 복숭아심식나방은 절편형성을 하지 못하여 뚜렷한 종 차이를 보였다. 이상의 PCR-RFLP 분자지표는 PCR 이후 제한효소 처리라는 시간을 요구하게 된다. 이 분석시간을 줄이려는 의도로 종특이적 PCR 프라이머를 이용하여 PCR 단계에서 종을 구분하려는 검역 기술이 모기류에서 적용되었다(Fettene and Temu, 2003; Kampen *et al.*, 2003). 본 연구에서는 중간변이에 자주 이용되는 COI 영역에서 두 종 사이에 변이가 많이 일어나는 부위를(Fig. 1) 중심으로 종특이적 프라이머가 제작되었다(Table 2). 이 종특이적 프라이머를 이용하여 복숭아순나방과 복숭아심식나방을 적용하여 본 결과 서로의 종을 진단할 수 있는 분자지표로서 이용될 수 있음을 보였다(Fig. 5).

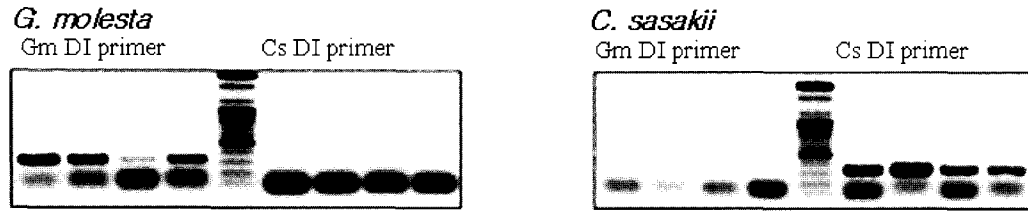


Fig. 5. DNA markers to diagnose *Grapholita molesta* (Gm) and *Carposina sasakii* (Cs) using diagnostic PCR primers at cytochrome oxidase-I locus of mitochondrial DNA. The primers are explained in Table 2.

본 연구는 국내 사과 심식류인 복숭아순나방과 복숭아 심식나방을 구분할 수 있는 진단용 분자지표로서 총 3종의 PCR-RFLP 유전좌위 및 2종의 진단용 PCR 프라이머를 제공하고 있다. 이 이외에 보다 신속한 종 진단 검역기술로서 실시간 정량 PCR 기술이 개발되어 사과 나방류 진단용(Barcenas *et al.*, 2005)으로 개발될 수 있다. 이 기술은 본 연구와 같은 종 특이적 프라이머를 바탕으로 실시간 정량 PCR을 실시할 경우, 검역 대상 해충의 증폭물은 자신의 프라이머이기에 빠르게 증폭되어 임계치를 통과하는 반면 다른 유사종인 경우는 임계치에 다다르지 못하거나 늦게 이르게 된다는 사실에 기초하였다. 즉, 이 기술을 이용할 경우 다시 PCR 시간 단축은 물론이고, 전기 영동하는 시간까지 단축시켜주는 기술적 진보를 이룰 수 있다. 본 연구에서 개발된 종 특이적 프라이머는 이러한 실시간 정량 PCR 진단법에도 필요에 따라 응용될 수 있다.

## 사 사

본 연구는 농림기술관리센터에서 지원한 2007년도 농산업기술개발사업과 농촌진흥청 현장협력기술개발과제로 수행되었습니다. 본 연구기간동안 송승백은 교육부의 2단계 BK21사업 지원을 받았습니다.

## Literature Cited

- Ahn, S.B., H.W. Koh and Y.I. Lee. 1985. Study on apple pests and natural enemy. pp. 417-428. In Research report of RDA: crop protection. RDA, Suwon, Korea.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb and N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Bae, J.S., I. Kim, H.D. Sohn and B.R. Jin. 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 978-985.
- Barcenas, N.M., T.R. Unruh and L.G. Neven. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. *J. Econ. Entomol.* 98: 299-306.
- Boo, K.S. 1998. Variation in sex pheromone composition of a few selected lepidopteran species. *J. Asia-Pacific Entomol.* 1: 17-23.
- Borchert, D.M., R.E. Stinner, J.F. Walgenbach and G.G. Kennedy. 2004. Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) phenology and management with methoxyfenozide in North Carolina apples. *J. Econ. Entomol.* 97: 1353-1364.
- Clary, D.O. and D.R. Wolstenholme. 1985. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22: 252-271.
- Clary, D.O. and D.R. Wolstenholme. 1987. *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequence in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.* 25: 116-125.
- de Bruijn, M.H.L. 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: a novel organization and genetic code. *Nature* 304: 234-241.
- Fettens, M. and E.A. Temu. 2003. Species-specific primer for identification of *Anopheles quadrimaculatus* sp. B. (Diptera: Culicidae) from Ethiopia using a multiplex polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 40: 112-115.
- Garesse, R. 1988. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: gene organization and evolutionary considerations. *Genetics* 118: 649-663.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6-11.
- Haymer, D.S. 1994. Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything we don't already know? *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 717-722.
- HsuChen, C.-C. and D.T. Dubin. 1984. A cluster of four transfer RNA genes in mosquito mitochondrial DNA. *Biochem. Int.* 8: 385-391.
- HsuChen, C.-C., R.M. Kotin and D.T. Dubin. 1984. Sequences of the coding and flanking regions of the large ribosomal subunit RNA gene of mosquito mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 12: 7771-7785.
- Kampen, H., A. Sternberg, J. Proft, S. Bastin, F. Schaffner, W.A. Maier and H.M. Seitz. 2003. Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger* S.S. and *Anopheles petragani* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 195-199.
- Kim, Y., M.L. Lee and C. Chung. 1998. Study on the genetic variation of the mitochondrial DNA in the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), using PCR-RFLP. *Kor. J. Appl. Entomol.* 37: 23-30.

- Lee, M.L. and M.H. Lee. 1997. Amplification mitochondrial DNA identify four species of *Tetranychus* mites (Acarina: Tetranychidae) in Korea. *Kor. J. Appl. Entomol.* 36: 30-36.
- McCracken, A., I. Uhlenbusch and G. Gellissen. 1987. Structure of the cloned *Locusta migratoria* mitochondrial genome: restriction mapping and sequence of its ND-1 (URF-1) gene. *Curr. Genet.* 11: 625-630.
- Moritz, C., T.E. Dowling and W.M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Mun, J.H., J.S. Kim, Y.H. Song, T.H. Kim and G.K. Roderick. 2000. Molecular genetics diagnosis of four fruit fly species (Tephritidae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 3: 89-94.
- Neale, D.B. and C.G. Williams. 1991. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Can. J. For. Res.* 21: 545-554.
- Park, K.T., K.Y. Choe, J.C. Paik and S.C. Han. 1977. Lepidopterous insect pest on apple tree. *Kor. J. Plant Prot.* 16: 33-39.
- Pree, D.J., K.J. Whitty, L. van Driel, G.M. Walker and L. Van Driel. 1998. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara Peninsula of Ontario. *Can. Entomol.* 130: 245-256.
- Roehrich, R. 1961. Contribution a l'étude écologique des populations de la tordeuse de pêcher (*Grapholita molesta* Busk) dans la région Aquitaine. *Annales des Epiphyties.* pp. 114.
- Rothschild, G.H.L. and R.A. Vickers. 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth. pp. 389-314, *In* World crop pest. Vol. 5. Tortricid pests: their biology, natural enemies and control, eds. by L.P.S. van der Geest and H.H. Evhnius). Elsevier, Amsterdam.
- Salazar, M., C. Theoduloz, A. Vega, F. Poblete, E. González, R. Badilla and L. Meza-Basso. 2002. PCR-RFLP identification of endemic Chilean species of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) attacking Solanaceae. *Bull. Entomol. Res.* 92: 337-341.
- Satta, Y., H. Ishiwa and S.I. Chigusa. 1987. Analysis of nucleotide substitutions of mitochondrial DNAs in *Drosophila melanogaster* and its sibling species. *Mol. Biol. Evol.* 4: 638-650.
- Scheffer, S.J., A. Wijesekara, D. Visser and R.H. Lallet. 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method to distinguish *Liryomyza huidobrensis* from *L. langei* (Diptera: Agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *J. Econ. Entomol.* 94: 1177-1182.
- Simon, C. 1991. Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animal via direct sequencing from amplified DNA. pp. 33-71. *In* Molecular techniques in taxonomy, eds. by G.M. Hewitt, A.W.B. Johnston and J.P.W. Young. Springer, Berlin.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Sperling, F.A.H. and D.A. Hickey. 1995. Amplified mitochondrial DNA as diagnostic marker for species of conifer-feeding *Choristoneura* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* 127: 277-288.
- Uhlenbusch, I., A. McCracken and G. Gellissen. 1987. The gene for the large (16S) ribosomal RNA from the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *Curr. Genet.* 11: 631-638.
- Vlasak, I., S. Burgschwaiger and G. Kreil. 1987. Nucleotide sequence of the large ribosomal RNA of honeybee mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 15: 2388.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141: 173-216.

(Received for publication June 21 2007;  
accepted July 14 2007)