

## 팥나방(*Matsumuraeses phaseoli*)과 어리팥나방(*M. falcana*)의 판별 분자마커

허혜정 · 손예림 · 서보윤<sup>1</sup> · 정진교<sup>1</sup> · 김용균\*

안동대학교 생명자원과학부 식물의학전공, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립식량과학원

## A Molecular Marker Discriminating the Soybean Podworm, *Matsumuraeses phaseoli* and the Podborer, *M. falcana* (Lepidoptera: Tortricidae)

Hyejung Heo, Yerim Son, Boyoon Seo<sup>1</sup>, Jinkyoo Jung<sup>1</sup> and Yonggyun Kim\*

Major in Plant Medicine, School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749

<sup>1</sup>National Institute of Crop Science, 209 Seodun-dong, Suwon 441-851, Korea

**ABSTRACT** : Two closely related species, the soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli*, and the podborer, *M. falcana*, gives differential economic damages on crops. It is difficult to discriminate these potential sympatric species by morphological characters. The goal of this study was to develop a discriminating molecular marker based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). A partial genomic fragment (500 bp) of mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) was sequenced in both species, in which restriction site by Rsa I was selected as a dichotomous marker. PCR-RFLP in the mtCOI region clearly discriminated both species.

**KEY WORDS** : *Matsumuraeses phaseoli*, *Matsumuraeses falcana*, PCR, RFLP, Molecular marker

**초 록** : 팥나방(*Matsumuraeses phaseoli*)과 어리팥나방(*M. falcana*)은 유사한 종으로 작물에 상이한 피해를 주고 있다. 그러나 형태적 특징만으로 이 두 동소적 유사종을 쉽게 구분하기 어렵다. 본 연구는 이 두 종을 뚜렷하게 판별할 수 분자마커를 개발했다. 두 종의 시토크롬 옥시다아제-I의 부분(약 500 bp) 염기서열이 밝혀졌다. 이를 바탕으로 두 종을 구분하는데 이용될 수 있는 판별 제한효소인 Rsa I이 선발되었고 PCR-RFLP를 통해 입증되었다.

**검색어** : 팥나방, 어리팥나방, PCR, RFLP, 분자지표

최근 생명공학기술에 힘입어 미소 곤충류의 동정 및 근연종을 구분하려는 분자마커 기술이 급속도로 발달하였다. 특히, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 기술이 근연종 사이에 차이를 보이는 유전자 영역을 중심으로 이용되고 있다(Loxdale and Lushai, 1998). 이러한 판별 유전자 영역으로 미토콘드리아의 시토크롬 옥시다아제-I이 DNA 바코드 부위로서 많은 종에서 이용되고 있는 데, 이는

미토콘드리아 유전자의 비교적 높은 돌연변이율과 세포질 유전을 따른 유사종의 교잡체의 모계를 추적할 수 있다는 장점에서 널리 이용되게 되었다(Simon et al., 1994).

팥나방(*Matsumuraeses phaseoli*)과 어리팥나방(*M. falcana*)은 주로 콩과식물을 가해하는데(Jung et al., 2009), 콩에서는 한 포장 안에 어리팥나방이 우점하는 가운데 두 종이 혼재하는 것이 보고되어 있다(Oku et al.,

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

1983). 팔나방은 국내에서 팔의 주요 해충 중의 하나로 꽃과 꼬투리에 심한 피해를 야기하고 있어(Jung *et al.*, 2009), 발생생태를 연구하기 위해 예찰수단으로서 성충의 성페로몬 연구가 진행 중이다. 어리팔나방은 2005년 이전까지 국내에서 기록되어 있지 않았는데, 동종에 대해 보고된 성페로몬 조성(Wakamura, 1985; Wakamura and Kegasawa, 1986)을 참조하여, 2004년 경기도 수원에서 콩과 팔 포장 주변에 설치된 성페로몬 트랩에 포획된 수컷 성충들에서 동정되어 국내에 존재하는 것으로 2005년에 발표되었다(Byun *et al.*, 2005). 이후 어리팔나방 국내 개체군의 암컷 성페로몬 조성이 일본 개체군의 그것과 유사한 것으로 확인되었고(Cho *et al.*, 2007), 2008년 전남 무안의 한 콩 포장에서 채집된 유충들이 어리팔나방인 것이 확인되었다(미보고자료). 두 종의 성페로몬은 그 성분이 서로 유사한 것으로 현재 밝혀지고 있는데(미보고자료), 설치된 트랩에 두 종이 같이 포획되는 현상이 발생하고 있지만 외관형태로 두 종을 구분할 수 없어 트랩의 효율성과 관심종의 발생정도를 판단하는데 어려움을 겪고 있다. 수컷 생식기의 형태 차이(Byun *et al.*, 2005)가 현재 팔나방과 어리팔나방 사이 종 구분의 기준이 되고 있으나 그 차이가 매우 미미하여 많은 경험을 필요로 하며, 또 트랩에 포획되는 성충들에서 생식기 형태로도 판정하기 어려운 개체들도 종종 발견된다. 따라서 본 연구는 형태적으로 볼 때는 구분하기가 어려운 팔과 콩의 주요 해충종인 팔나방과 동속 종인 어리팔나방을 PCR-RELP 분자마커를 통해서 판별하는 기술을 소개한다.

## 재료 및 방법

### 실험곤충의 채집 및 사육

팔나방은 2004년 8월 말 경기도 수원시 서둔동에 있는 팔포장(37°16'N 126°59'E)에서 꽃 혹은 꼬투리 안에서 가해하고 있는 유충상태로, 어리팔나방은 2008년 7월 3일 전라남도 무안군 청계면 도대리에 있는 콩포장(34°55'N, 126°25'E)에서 콩의 어린 순들을 묶어 가해하고 있는 유충상태로 채집하였다. 두 종은 Byun *et al.* (2005)의 보고에 있는 수컷 생식기 형태를 기준으로 동정하여 확인하였다. 두 곤충들은 실내에서 보고된(Jung *et al.*, 2007) 방법대로 누대에 걸쳐 사육하였는데, 사료로 당시 보고된 인공사료 조성을 변형하여 제조한 것(아가 13 g, 증류수 800 ml,

포도당 10 g, 종합비타민 5 g, ascorbic acid 4 g, sorbic acid 1 g, 섬유소 10 g, 밀배아 10 g, 적두 20 g, 콩가루 75 g, 카세인 10 g, 콜레스테롤 3 g,  $\beta$ -sitosterol 1 g, methyl-*p*-hydroxybenzoate 1.5 g, aureomycin 0.5 g, fumidil B 0.4 g)을 공급하였고, 사육에 필요한 환경조건은 광주기 15L/9D, 온도 25±1°C, 상대습도 60±10%로 맞추었다.

두 종 사이의 교배에는 성을 미리 구분하여 개체별로 분리한 번데기들로부터 갓 우화한 성충들을 이용하였는데, 팔나방과 어리팔나방 암수 성충들을 서로 교차하여 한 쌍씩 폴리스티렌 용기(72×72×100 mm) (SPL Life Sciences, 서울, 한국) 안으로 방사하였고 먹이로는 증류수와 10% 설탕물을 공급하여 같은 사육조건에 두었다. 교차된 교배집단들로부터 낳아진 알들은 정상적으로 부화되었고, 이 F1세대 유충들을 같은 방법으로 사육하였다.

실험에는 종별로 사육 중인 두 집단들과 두 종 사이의 교배에서 나온 두 종류의 F1 세대 집단들에서 각각 4명 유충들을 임의로 선별하였고, 선별된 유충들은 DNA 추출을 위해 100% 에탄올에 담아 보관하였다.

### 팔나방과 어리팔나방 DNA 추출

팔나방과 어리팔나방 유충을 일반 계놈 DNA 분리방식(Sambrook *et al.*, 1989)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 시료는 proteinase K 를 처리하고, 이후 페놀추출과 에탄올 침강을 이용하여 순수 DNA를 분리하였다.

### 미토콘드리아 시토크롬 옥시다아제 I 영역 PCR

보존형 서열을 중심으로 제작된(Simon *et al.*, 1994) 프라이머인 CI-N-2191 (5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC-3) 과 CI-J-1751 (5'-GGA TCA CCT GAT ATA GCA TTC CC-3)을 이용하여 Kim *et al.*, (1998)의 방법으로 증폭하였다. PCR 시료의 구성은 다음과 같았다. DNA 추출액 1  $\mu$ l, dNTP 5  $\mu$ l, 10x PCR 완충용액 5  $\mu$ l, 각 프라이머(25 pmol/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, Taq DNA 중합효소 1  $\mu$ l, 3차 증류수 36  $\mu$ l로 구성되었다. 프라이머와 Taq DNA 중합효소는 (주)바이오니아(대전, 한국)로부터 각각 제작 또는 구입하였다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 1분간 열처리 후, 35 반복의 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 30초간 변성

계와 프라이머 결합 반응은 48°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초의 사슬연장 단계로 구성되었다. 이후 최종 사슬연장 단계가 추가로 72°C에서 10분간 이뤄졌다. PCR 생성물은 1xTAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1% 아가로즈젤로 확인하였다.

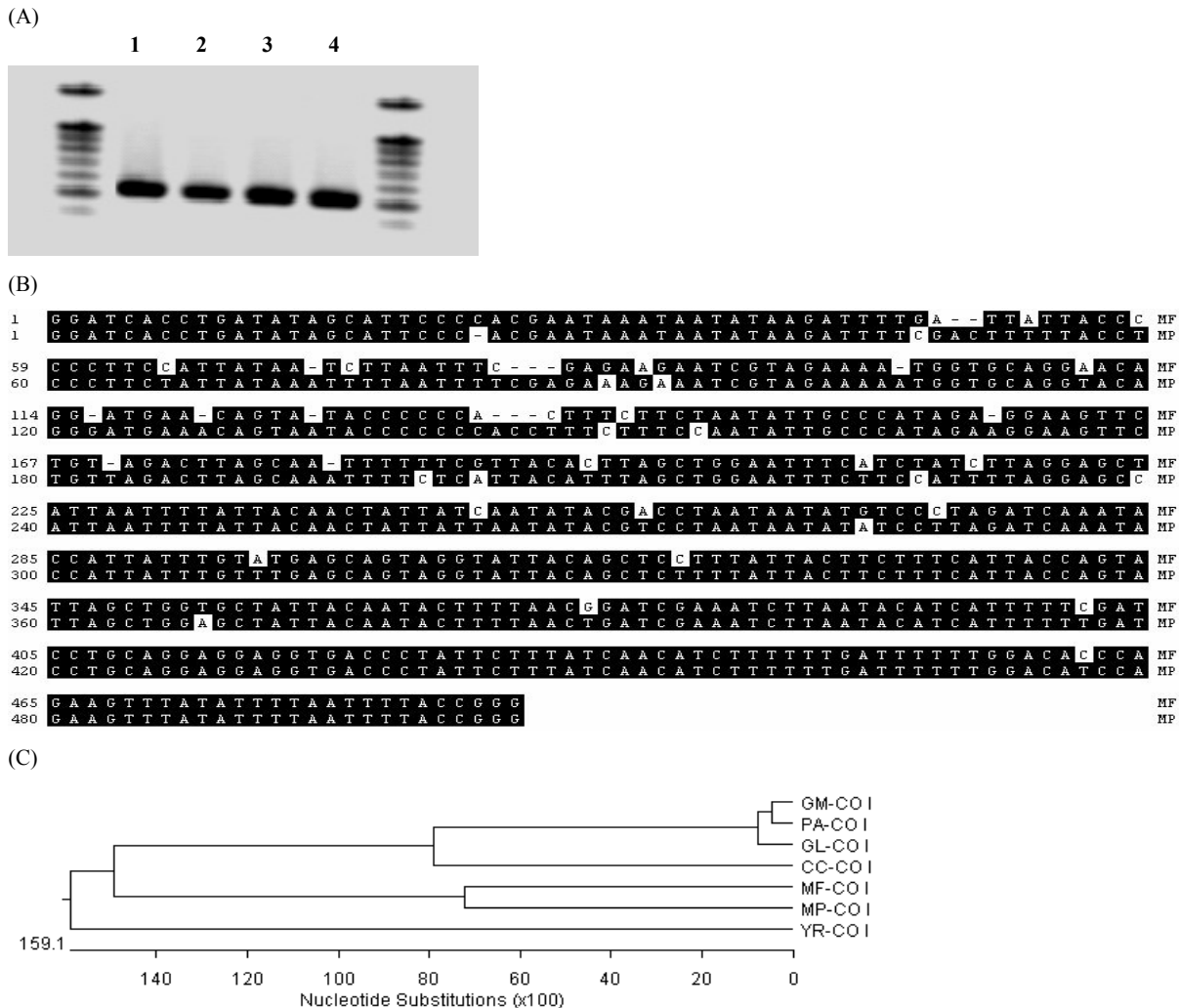
**DNA 염기서열 분석**

PCR 증폭물은 PCR quick-spin ((주)인트론 바이오 테크놀로지, 대전, 한국)을 이용하여 프라이머를 제거시켰고, PCR2.1 TOPO 키트(Invitrogen Carlsbad, CA, USA)

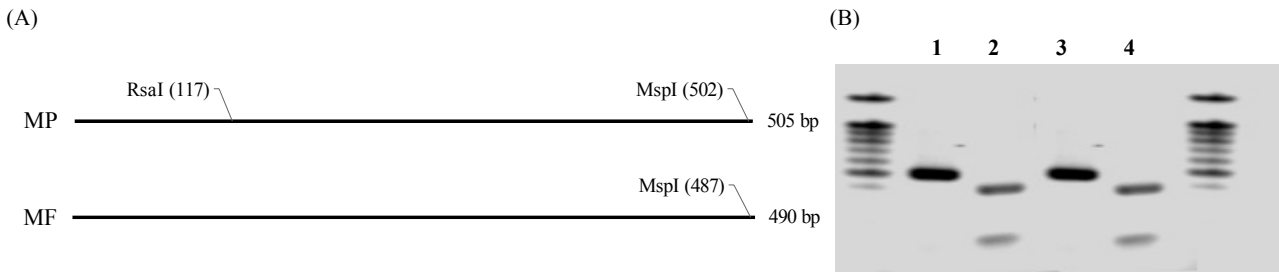
를 사용하여 클로닝벡터에 재조합시켰다. 재조합된 벡터를 (주)마크로젠(서울)에 염기서열 분석을 의뢰하여 받은 자료를 가지고, DNASTAR 프로그램(version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)과 MEGA 4.1 프로그램을 이용하였다.

**PCR-RELP (restriction fragment length polymorphism)**

위에 기술한 PCR 조건으로 얻어진 시토크롬 옥시다아제 I 영역의 증폭물을 PCR quick-spin으로 프라



**Fig. 1.** Mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) of *Matsumuraeses phaseoli* (MP) and *M. falcana* (MF) (A) PCR products of these two species, where lanes 1-4 are MP, MF, MP (♀) x MF (♂), and MF (♀) x MP (♂). (B) Their nucleotide sequences (C) Comparison of the COI sequences with those of other species using a phylogenetic tree. The scale numbers under the tree indicate the percentage of similarity index on each branch as determined using Clustal W. The NCBI accession numbers are FJ217774 for *Grapholita molesta* (GM), GQ149501 for *Pammene albuginana* (PA), FJ217788 for *Grapholita lobarzewskii* (GL), AF187757 for *Chlosyne cyneas* (CC), and AY728147 for *Grapholita molesta* (YR).



**Fig. 2.** PCR-RFLP of mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) of *Matsumuraeses phaseoli* (MP) and *M. falcana* (MF) (A) Prediction of a different restriction site between these two species (B) Digestion of PCR products with *Rsa* I, where lanes 1-4 are MF, MP, MF (♀) x MP (♂), and MP (♀) x MF (♂).

이며 제거 및 증폭물을 다시 용해시켰다. 이 시료를 *Rsa* I의 제한 효소(Roche, Mannheim, Germany)로 제조회사의 반응 온도조건에 따라 3시간 처리했다. 제한효소 처리물은 1xTAE에서 1.2% 아가로스 젤로 분리한 후, ethidium bromide로 염색하고, UV등에서 확인하였다.

## 결과 및 고찰

두 종의 시토크롬옥시다아제-I 영역이 이들의 교잡 차세대(F1)와 함께 증폭되었다(Fig. 1A). 모두가 예상한 약 500 bp 길이의 단일 증폭물을 나타냈다. 이들 사이에 길이 차이는 1.2% 아가로스젤 상에서는 구분하기 어려웠다. 팔나방과 어리팔나방의 증폭물을 클로닝벡터에 삽입 후, 염기서열을 분석하였다(Fig. 1B). 이 둘 사이에 50 개의 점 돌연변이 부위를 발견할 수 있다. 이는 전체(505 bp)의 9.9%로서 이 두 종의 시토크롬 옥시다아제-I 염기서열은 타 종의 해당 유전자 부위와 비교한 결과 종과 가장 높은 상호성을 보였고, 파리목 또는 딱정벌레목과는 비교적 차이점을 나타냈다(Fig. 1C).

팔나방과 어리팔나방의 분자마커를 개발하기 위해 두 염기서열에서 차이를 보이는 영역을 중심으로 *Rsa* I의 제한효소 부위를 찾았다(Fig. 2A). 이는 PCR 증폭물은 *Rsa* I으로 처리할 경우 팔나방의 경우는 388 bp와 117 bp크기의 두 개 절편을 만드는 반면, 어리팔나방은 제한부위를 만들지 못할 것으로 예측되었다. 이를 바탕으로 두 종과 이들의 F1의 시토크롬옥시다아제-I을 증폭시키고, *Rsa* I을 처리한 결과, 예상대로 팔나방은 2개의 절편을 나타냈고, 어리팔나방은 PCR 증폭물 그대로의 모습을 보였다(Fig. 2B). 예상대로 F1은 모계의 종에 따라 제한부위 형태를 나타냈다. 이러한 분자지표를 두

종 및 F1에서 각각 임의의 10 개체에 적용하였을 때 동일한 예상 결과를 얻어(미보고자료) 근연종 판별 분자지표로서 이용 가능성을 제시하였다.

현재 국내에는 팔나방과 어리팔나방이 속한 *Matsumuraeses* 속에 이 두 종만이 기록되어 있는데, 이들의 상호 먹이식물의 범위가 아직 분명하지 밝혀져 있지 않다. 두 종은 유충상태에서 외관상 구분되지 않는데(Kobayashi and Oku, 1980). 앞으로 본 연구에서 개발된 분자지표가 종별 먹이식물의 범위를 정확히 측정하는 수단이 될 것으로 예상된다. 또 유충상태로 종구분이 어려울 때, 한 포장에 두 종이 혼재되어 있는 경우 종별 유충 밀도를 실시간으로 판단할 수 없는데, 콩의 경우 기존 보고(Oku *et al.*, 1983)와 같이 두 종이 함께 발생할 수 있어, 앞으로 분자지표가 종별 밀도수준을 판단하는 데 기여할 수 있다. 한편 성충의 외부 형태 역시 외관상 구분하기 힘들고, 생식기 모양 차이로도 두 종이 뚜렷하게 중간 격리된 것을 확신할 수 없는 상태이다. 이에 앞으로 위 분자지표는 두 종의 성페로몬 연구에서 각 종별 성페로몬을 정확히 동정하고, 대상종의 감각과 비행행동을 이해하는데 이용될 것이다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부의 NURI 지원사업으로 수행되었다.

## Literature Cited

- Byun, B.K., K.T. Park and Y.M. Park. 2005. Review of the genus *Matsumuraeses* Issiki (Lepidoptera, Tortricidae) with discovery of *M. falcana* (Walsingham) in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 8: 117-122.

- Cho, J.R., K.S. Choi, J.K. Jung, J.H. Park and B.Y. Seo. 2007. Development of sex pheromone trap to monitoring *Matsumuraeses falcana* (Walshingham) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 10: 345-349.
- Jung, J.K., B.Y. Seo, J.R. Cho, Y.H. Kwon and G.H. Kim. 2009. Occurrence of lepidopteran insect pests and injury aspects in Adzuki bean fields. *Kor. J. Appl. Entomol.* 48: 29-35.
- Jung, J.K., B.Y. Seo, J.H. Park, J.K. Moon, B.S. Choi and Y.H. Lee. 2007. Developmental characteristics of soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* (Lepidoptera: Tortricidae) and legume pod borer, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae) on semi-synthetic artificial diets. *Kor. J. Appl. Entomol.* 46: 393-399.
- 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.
- Kobayashi, T. and T. Oku. 1980. Sampling lepidopterous pod borers on soybean. pp. 422-437. *In* Sampling methods in soybean entomology, eds. by M. Kogan and D.C. Herzog. 587pp. Springer-Verlag, New York.
- Loxdale, H.D. and G. Lushai. 1998. Molecular markers in entomology. *Bull. Entomol. Res.* 88: 577-600.
- Oku, T., Y. Miyahara, T. Fujimura and A. Toki. 1983. Preliminary note *Matsumuraeses* species (Lepidoptera, Tortricidae) injuring soybeans in Tohoku district. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 27: 28-34.
- Sambrook, J.E., F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 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.
- Wakamura, S. 1985. Identification of sex pheromone components of the podborer, *Matsumuraeses falcana* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl. Entomol. Zool.* 20: 189-198.
- Wakamura, S. and K. Kegasawa. 1986. Sex pheromone of the podborer, *Matsumuraeses falcana* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae): activity of the third component, (Z,E)-7,9-dodecadienyl acetate, and 3-component formulation. *Appl. Entomol. Zool.* 21: 334-339.

(Received for publication September 21 2009;  
revised October 1 2009; accepted October 4 2009)