

복숭아순나방(*Grapholita molesta*) 성페로몬 트랩에 포획된 미동정 나방의 발생패턴과 판별 분자지표

허혜정 · 손예림 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학부 식물의학전공

Occurrence Pattern of an Unidentified Moth Captured by Sex Pheromone Trap of the Oriental Fruit Moth, *Grapholita molesta*, and Its Discriminating Molecular Markers

Hyejung Huh, Yerim Son and Yonggyun Kim*

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

ABSTRACT : An unidentified moth was captured in sex pheromone traps of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, especially at spring season in apple orchards and their vicinity. Though the captured males were similar in appearance to *G. molesta* males, they were easily distinguished by a marked difference in body size. Their occurrence pattern was also similar to that of overwintering *G. molesta* population from April to May, at which more males were captured in the pheromone traps installed in the vicinity of apple orchards than within apple orchards. After May, they were no longer captured in the pheromone traps. To investigate any larval damage due to this unidentified moth, molecular markers needed to be developed. Four PCR-RFLP markers originated from cytochrome b region of mitochondrial DNA could distinguish this unidentified moth from *G. molesta*.

KEY WORDS : Apple, *Grapholita molesta*, Monitoring, Pheromone, Population, Trap

초 록 : 복숭아순나방(*Grapholita molesta*) 성페로몬 트랩에 미동정 나방이 포획되었다. 이들은 주로 봄에 채집되었으며 형태적으로 복숭아순나방과 유사하나 비교적 몸 크기가 커서 육안으로 쉽게 구별할 수 있다. 이들의 발생 패턴도 4-5월의 복숭아순나방 월동세대 발생과 유사하였다. 이 기간 동안 이들은 사과원 내부 보다는 주로 과수원에서 떨어진 곳에 설치된 페로몬 트랩에 집중적으로 포획되었다. 5월 이후 이들 미동정 나방은 복숭아순나방 페로몬 트랩에 더 이상 포획되지 않았다. 이 미동정 나방과 기존의 복숭아순나방과의 계통 분류학적 판별을 위해 분자마커가 개발되었다. 미토콘드리아 cytochrome b 영역을 기반으로 선발된 4종의 PCR-RFLP 분자지표는 이 미동정 나방과 복숭아순나방을 구분할 수 있었다.

검색어 : 사과, 복숭아순나방, 모니터링, 페로몬, 집단, 트랩

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

중 특이적 성페로몬에 바탕을 둔 특정 대상 해충 모니터링은 해충방제에 필수적 요인으로 자리 잡고 있다. 즉, 발생 모니터링 자료와 이 해충의 발육모델을 접목하여 차세대 발생시기 예측은 이상적 해충 방제 적기를 결정하게 할 수 있다(Hyun, 2005). 그러나 최근 현장에서 일부 특정 성페로몬 트랩에 유사한 나방류가 포획되고 있으며, 이는 성페로몬 트랩의 장점을 저해하는 것으로 이들의 종 동정 및 원인 규명이 필요하다.

다양한 종을 포함하고 있는 나비목의 경우 대부분 탄소수 14-18개의 비교적 짧은 지방산을 골격으로 하고 있다(Boo, 1998). 이러한 제약 속에 성페로몬의 특이성은 관능기 및 이중 결합의 수와 위치 및 광학이성체의 차이에 따른 변이성에 의존한다. 또한 두 종 이상의 페로몬 성분을 바탕으로 특이적 성분비는 또 다른 특이성을 줄 수 있는 화학적 요인이다. 그럼에도 불구하고 페로몬 조성이 유사한 유사종의 경우 이들의 교미시간 및 지역적 고립을 통해 생식적 격리가 이뤄지게 한다(Ming *et al.*, 2007).

복숭아순나방(*Grapholita molesta* (Busck))은 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 나비목 주요 해충이다(Ahn *et al.*, 1985). 복숭아순나방은 4월 중순에서 9월 중순까지 4-5회의 성충발생 피크를 보인다(Jung and Kim, 2008).

복숭아순나방을 방제하기 위한 화학적 방제기술은 이들 유충의 과실 속 가해 습성에 따라 약제 노출이 어려워 기대 이하의 낮은 방제 효율 및 이에 따른 살포 약량 증가로 약제 저항성 발현이라는 문제점을 낳게 했다(Pree *et al.*, 1998; Kanga *et al.*, 2001; Usmani and Shearer, 2001). 즉, 복숭아순나방의 가해 습성이 과실 내부이기 때문에 부화하여 과실로 들어가기 전에 방제제를 투여하는 것이 방제에 이상적 시점이라 할 수 있다. 이를 착안하여 복숭아순나방 월동세대의 최대 성충 발생기를 결정하고 이후 유효적산온도 모델을 이용하여 산란 최성기의 횡수 및 제1세대 및 제2세대 산란 최성기를 예측하고 방제시기를 추정하는 기술이 소개되었다(Borchert *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). 이에 따라 월동세대의 성충 모니터링은 차세대 형성 시기를 예측하는 데 중요하다. 그러나 이 시기에 복숭아순나방 페로몬 트랩에 이 해충과 유사한 나방류가 포획되는 것이 안동지역 사과원은 물론이고 군위, 영천 및 경산 지역의 사과 재배지에서도 문제시되고 있다. 본 연구는 이 나방류의 발생 상황을 안동지역을 중심으로

모니터링하였으며, 이 나방류와 복숭아순나방의 판별 지표를 개발하는 데 목표를 두고 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

복숭아순나방 및 미동정 나방류 모니터링

경북 안동시에 위치한 3개 사과원(기느리A, 기느리B, 길안)과 이들 과수원 사이에 위치한 4개의 비사과원 지역을 대상으로 복숭아순나방 성페로몬을 이용하여 모니터링하였다. 기느리A와 기느리B는 서로 100 m 정도 떨어져서 위치했으며, 길안 사과원은 이들로부터 약 10 km 거리에 위치했다. 비사과원 지역은 기느리와 길안 사이 지역에서 인접한(최소 500 m 거리) 사과원이 없는 네 개 장소로서 이들은 서로 1-3 km 거리를 두었다. 성페로몬 트랩은 텔타트랩(그린아그로텍, Model No. 50106, 경산, 한국)을 이용하였으며, 여기에 복숭아순나방의 성페로몬 성분인 Z8-12:Ac, E8-12:Ac, Z8-12:OH를 각각 95.0: 5.0: 1.0 (v/v)로 포함시켰다. 트랩 설치는 3월 말에, 모니터링은 4월 1일을 기점으로(이때까지 야외충의 포획이 없었음) 일주일 간격으로 조사하였다.

나방류 게놈 DNA 추출

각 개체의 수컷 성충을 날개를 제거하고 일반 게놈 DNA 분리 방식(Sambrook *et al.*, 1989)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA 시료는 proteinase A를 처리하고 이후 페놀 추출과 에탄올 침강을 이용하여 순수 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 정량분석한 후 탈이온증류수를 이용하여 약 100 pg/μl로 희석하여 PCR에 이용하였다.

미토콘드리아 영역 polymerase chain reaction (PCR)

미토콘드리아 DNA (mtDNA) 가운데 cytochrome b 영역의 universal primer를 이용하여 Kim *et al.* (1998)의 방법으로 증폭하였다. 이때 프라이머 서열은 5'-CATAT TAAAC CCGAA TGATA YTT-3'과 5'-GATTT TGCTG AAGGT GAATC AGA-3'이다. 각 PCR 시료의 구성은 다음과 같았다. DNA 추출액 2 μl, dNTP 5 μl, 10x PCR

완충용액 5 μ l, primer 각각 2 μ l (25 pmol/ μ l), Taq polymerase 0.5 μ l, 3차중류수 33.5 μ l로 구성되었다. Primer와 Taq polymerase는 (주) 바이오니아(대전, 한국)로부터 각각 제작 또는 구입하였다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 1분간 불활성단계를 거친 후, 35 반복으로 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 30초간 변성단계와 프라이머 결합 반응은 46°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초의 사슬연장 단계로 구성되었다. 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 키트(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.

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)

상기에 기술한 PCR 조건으로 얻어진 영역별 PCR 증폭물은 PCRquick-spin으로 프라이머 제거 및 증폭물을 다시 중류수로 용해시켰다. 이 시료를 영역별로 서로 다른 제한효소를 처리하는 데, 이때 Cytochrome b 영역은 *Msp* I, *Rsa* I, *Dde* I, *Taq* I로 효소의 구입처인 Roche (Mannheim, Germany) 제조회사의 반응 온도조건에 따라 3시간 동안 처리하였다. 제한효소 처리물은 1x TAE에서 1.2% 아가로즈젤로 분리한 후 ethidium bromide로 염색 및 UV등에서 확인하였다.

결과 및 고찰

안동지역 복숭아순나방의 월동세대 성충 발생은 4월 초에 시작하여 5월 말까지 지속된다(Jung *et al.*, 2006).

이 기간 매년 복숭아순나방과 구별되는 유사체('vOFM', Fig. 1A)가 성페로몬 트랩에 포획되었다. 이들은 복숭아순나방과 채색이나 형태가 비슷하나, 날개의 무늬가 비교적 많고 크기가 커서 쉽게 유관으로 판별이 가능하다.

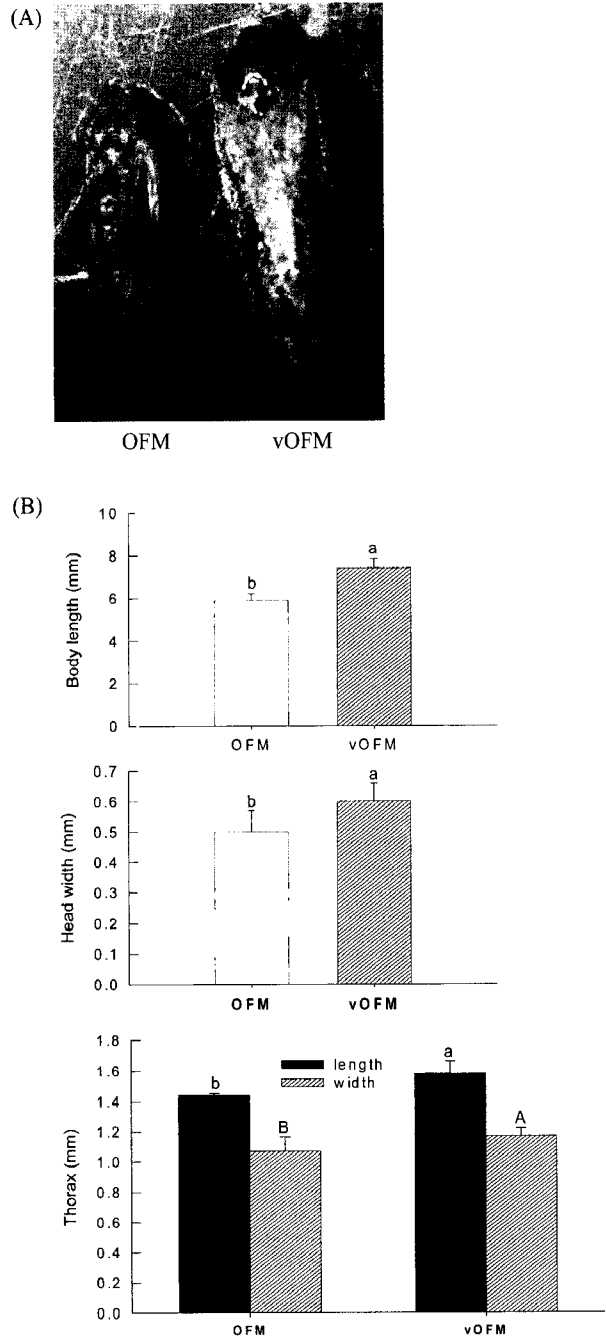


Fig. 1. An unidentified moth ('vOFM') trapped to a sex pheromone trap of *Grapholita molesta* ('OFM'). (A) A photograph of OFM and vOFM males under a stereomicroscope at 6.5x magnification. (B) Size difference between the two moth. Measurement of each morphological character used 20 individuals in each moth. Different letters above standard deviations represent significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

몸의 크기는 머리 및 가슴에서 차이가 크며 전체적으로 복숭아순나방 수컷의 평균 체장이 5.9 mm인데 반해, 유사체는 7.4 mm로서 약 1.25배 크기 차이를 보였다(Fig. 1B).

복숭아순나방 성페로몬 트랩에 포획된 유사체의 발생은 4-5월에 나타났으며, 이 이후로는 트랩에 포획되지 않았다(Fig. 2A). 이 기간 동안 유사체의 포획 밀도 변화는 복숭아순나방의 밀도 변화와 높은 상관성을 나타냈다($r = 0.753$, $df = 10$, $P = 0.0119$). 흥미로운 사실은 이들 유사체의 발생이 사과 과수원 보다는 이들 과수원 인근 지역에서 많다는 점이다(Fig. 2B). 사과원 내에서는 전체 포획 밀도 가운데 4.4%가 유사체인 반면, 사과원 밖에서는 55.9%가 유사체 나방류가 포획되었다. 이는 이들 유사체가 사과 이외의 다른 기주를 갖거나, 사과에 발생하더라도 매우 낮은 밀도로 존재할 수 있다는 것을 내포하고 있다. 이러한 추정치는 이들 유사체가 5월 이후에는 사과원 또는 인근 지역에서 포획되지 않는다는 점에서 뒷받침되고 있다. 그러나, 5월 이후에도 이들 유사체가 실제로 사과에 피해를 주며, 이에 따라 자신들의 암컷 밀도가 높아져 복숭아순나방 트랩보다는 본래의 암컷을 선호할 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 의구점을 풀기 위해서는 사과원에 발생하는 유충을 대상으로 유사체 나방류가 존재하는지를 파악해야 한다. 이들 유충을 구분하기 위해서는 두 곤충을 판별할 수 있는 분자마커의 개발이 필요하다.

두 나방류를 판별하기 위해 비교적 중간 변이가 많은 미토콘드리아의 cytochrome b 영역(Simon *et al.*, 1994)을 선정하였다. 이 cytochrome b 영역을 포함한 PCR 증폭물의 염기서열을 분석한 결과 복숭아순나방은 748 bp이고 유사체는 747 bp를 나타내 단 1개의 염기배열 길이 차이를 보였다(Fig. 3A). 물론 이들 증폭물의 크기는 초파리류(*Drosophila yakuba*)에서 비롯된 예상 크기(713 bp)보다 모두 큰 크기였다(Clary and Wolstenholme, 1985). 염기서열 상에서 복숭아순나방과 미동정 나방은 9.4% (70개)의 점돌연변이를 보였으며, 이 가운데 transition 돌연변이가 51.4%, transversion 돌연변이가 44.3% 그리고 결실 돌연변이가 4.3%를 나타냈다. NCBI GenBank에 이 영역의 염기서열이 등록된 나방류 가운데 유사체는 복숭아순나방(90.6%)과 유전 거리가 가장 가까웠으며, 다음으로 애모무늬잎말이나방(86.3%), 조명나방(84.5%) 및 호랑나비(84.9%) 순으로 나타났다(Fig. 3B). 이러한 염기서열 변이 속에서 제한효소로 분석한 결과 4개의 제한효소가 복숭아순나방과 이 유사체 사이에 비교적 큰 차이를 보여 판별 분자마커로서 유용성을 나타냈다(Fig.

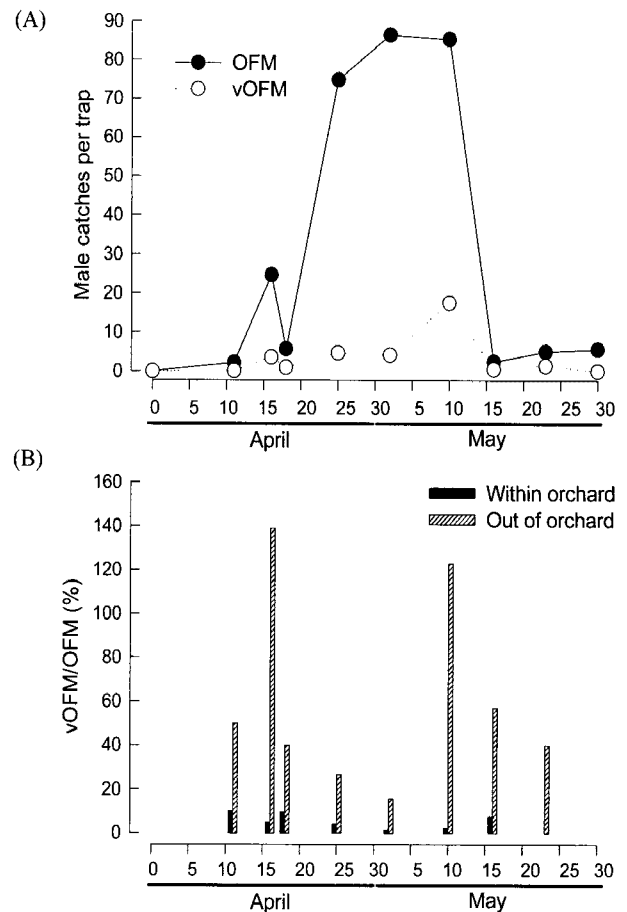


Fig. 2. Occurrence of an unidentified moth ('vOFM') trapped to a sex pheromone trap of *Grapholita molesta* ('OFM') (A) Monitoring of vOFM population in Andong, in which ten pheromone traps were deployed in apple orchards and their vicinity. (B) Comparison of population density of two moth types in apple orchards and their vicinity.

3C). 본 연구 결과는 추후 복숭아순나방 유사체의 분류 동정 결과가 나오게 되면, 이들이 사과에 피해를 주는 정도를 분석하는 데 유용한 분자마커로서 이용될 수 있다고 제시한다.

사 사

본 연구는 농림기술관리센터에서 지원한 2008년도 농산업기술개발사업의 일환으로 수행되었다. 본 연구 기간 동안 손예림은 교육과학기술부의 학술진흥재단에서 지원하는 지방대학혁신역량강화사업을 통해 재정적 지원을 받았다.

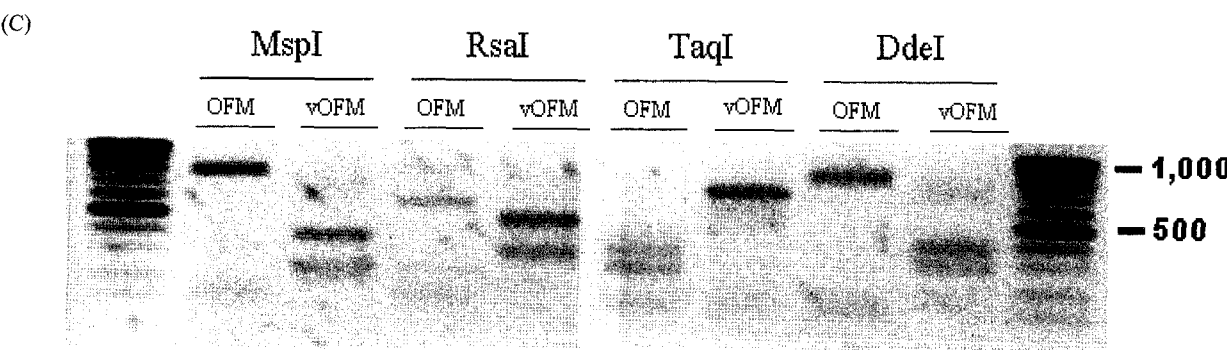
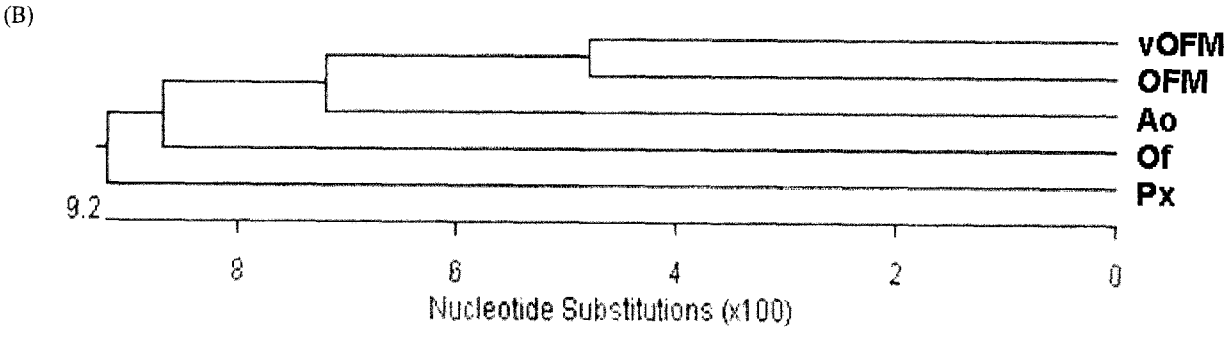
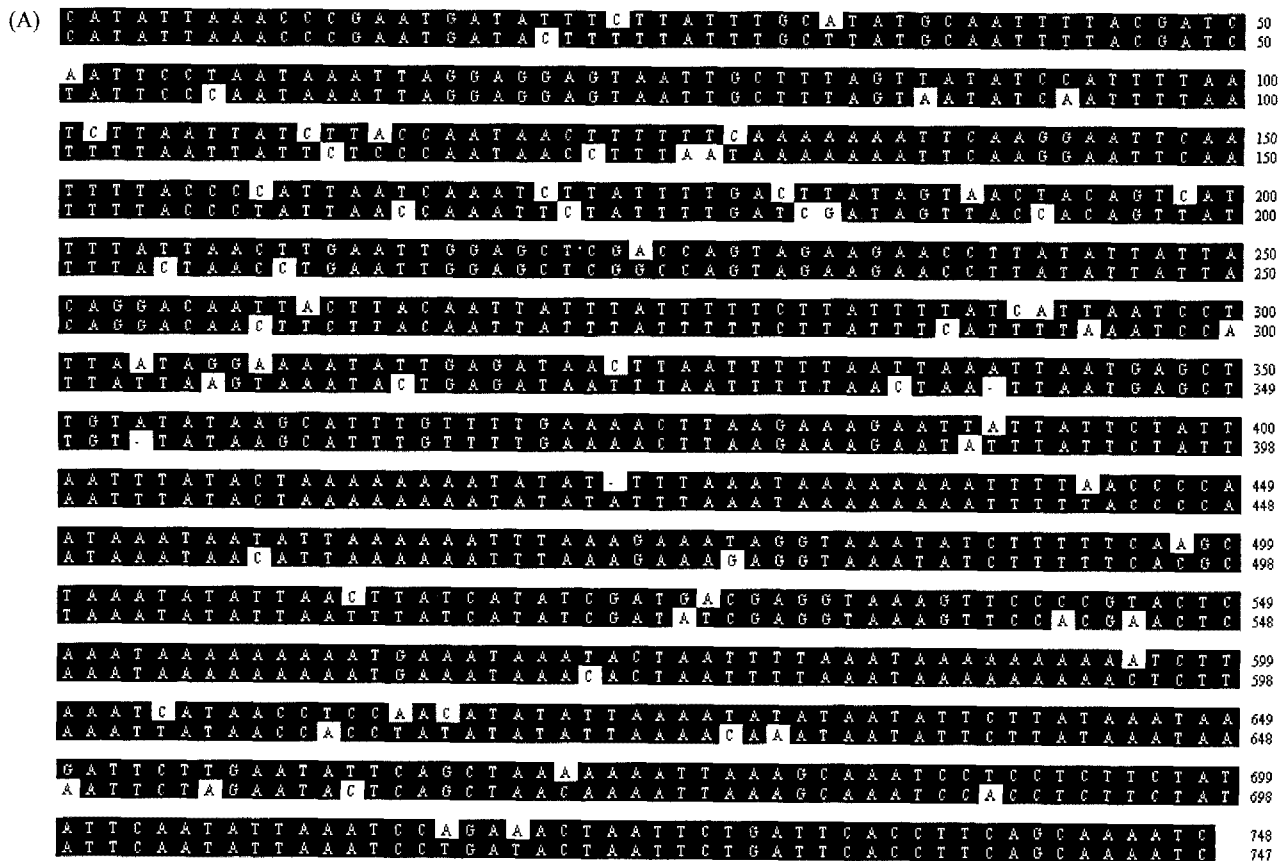


Fig. 3. Molecular markers discriminating an unidentified moth ('vOFM') trapped to a sex pheromone trap of *Grapholita molesta* from *G. molesta* ('OFM'). (A) DNA sequences of vOFM and OFM at cytochrome b of mitochondrial DNA. Unshaded areas indicate point mutations. (B) Sequence alignment of cytochrome b of vOFM with those of other matched species. Sequences of *Adoxophyes orana* ('Ao'), *Ostrinia furnacalis* ('Of'), and *Papilio xuthus* ('Px') are obtained using NCBI accession numbers of DQ073916, AF467260, and EF621726, respectively. (C) Four PCR-RFLP markers discriminating vOFM and OFM.

Literature Cited

- Ahn, S.B., H.W. Koh and Y.I. Lee. 1985. Study on apple pests and natural enemy. Res. Rept. RDA. Crop Protection: 417-428.
- Bochert, 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.
- Boo, K.S. 1998. Variation in sex pheromone composition of a few selected lepidopteran species. J. Asia-Pac. Entomol. 1: 17-23.
- 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.
- Hyun, J.S. 2005. Integrated pest management. Principles and practices. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 73-90.
- Jung, S. and Y. Kim. 2008. Comparative analysis to damage reduction of host plant by applying a mating disruptor of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, in two different cultivation environments of apple orchard. Kor. J. Appl. Entomol. 47: 51-57.
- Jung, S., C. Park, M. Park, S. Lee, K. Choi, Y. Hong and Y. Kim. 2006. Efficacy of commercial mating disruptors on field overwintering populations of Oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). Kor. J. Appl. Entomol. 45: 235-240.
- Kanga, L.H.B., D.J. Pree, F.W. Plapp, Jr. and J.L. van Lier. 2001. Sex-linked altered acetylcholinesterase resistance to carbamate insecticides in adults of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera; Tortricidae). Pestic. Biochem. Physiol. 71: 29-39.
- Kim, D.S., K.S. Boo and H.Y. Jeon. 2004. Evaluation of pheromone lure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and forecasting its phenological events in Suwon. Kor. J. Appl. Entomol. 43: 281-289.
- 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.
- Ming, Q.L., Y.H. Yan and C.Z. Wang. 2007. Mechanisms of pre-mating isolation between *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Insect Physiol. 53: 170-178.
- 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. p.114.
- Rothschild, G.H.L. and R.A. Vickers. 1991. Biology, ecology and control of the oriental fruit moth. pp. 389-412. In World crop pests, Tortricid pests: their biology, natural enemies and control, Vol. 5. eds. by L.P.S. Van der Geest and H.H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam.
- 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.
- Usmani, K.A. and P.W. Shearer. 2001. Topical pheromone trap assays for monitoring susceptibility of male oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations to azinphosmethyl in New Jersey. J. Econ. Entomol. 94: 233-239.

(Received for publication September 1 2008;
revised September 16 2008; accepted September 16 2008)