

# 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis* Uchida et Inouye)에 관한 연구 Ⅲ.

## —地理的 隔離에 따른 生理, 形態的 差異—

### Physiological and Morphological Differences Depending on Geographical Segregation in *Thecodiplosis japonensis* Uchida et Inouye

朴 容 喆<sup>1</sup> · 韓 盛 植<sup>1</sup> · 曹 東 鉉<sup>2</sup>

Yong Chul Park<sup>1</sup>, Sung Sik Han<sup>1</sup>, and Dong Hyun Cho<sup>2</sup>

**ABSTRACT** Physiological and morphological differences in larvae and female adults of *Thecodiplosis Japonensis* from Haenam, Chullanamdo, and Chunsung, Kangweondo, were studied by means of electrophoretic technique and scanning electron microscope(SEM). On zymograms of whole body, third instar larvae of *T. japonensis* showed geographic differences in the band patterns of esterase and MDH isozymes, but patterns and the staining density of general proteins were similar in two populations. In female adults, two populations revealed geographic differences in general proteins and esterase isozymens. In external ultrastructures, especially in genital segments, each population had distinctive structures in the 2nd segment of ovipositor.

**KEY WORDS** pine needle gall midge, physiological and morphological difference, geographical segregation

**抄 錄** 同一種에서 地理的 隔離에 따른 生理, 形態學的 差異를 알아보기 위하여 全羅南道 海南과 江原道 春城地域의 솔잎혹파리 幼蟲과 成蟲을 재료로 하여 전기영동법, 그리고 走査電子顯微鏡을 이용하여 比較하였다. 두지역의 3齡 幼蟲에서는 일반 蛋白質의 밴드패턴은 동일하였다. 그러나 同位 酵素 esterase와 MDH는 명확한 차이를 보여주었다. 成蟲에서는 一般蛋白質과 esterase 밴드패턴에서 부분적으로 명확한 差異를 보여주었다. 두지역 성충 생식질의 外部微細構造를 검토한 결과 產卵管의 둘째마디에서 뚜렷한 차이가 관찰되었다.

**儉 素 語** 솔잎혹파리, 생리, 형태적 차이, 지리적 격리

本 研究는 이미 발표된 솔잎혹파리 終齡幼蟲의 體表面微細構造(韓 등 1984), 成蟲生殖節의 表面微細構造(Han et al. 1988)에 이어 series Ⅲ에 해당되는 것이다.

昆蟲은 環境適應力이 매우 강한 것으로 알려져 있으며, 이것은 同一種에서도 地理的 隔離에 따라 環境적응의 차이로 말미암아 다소의 生理的, 形態的 差異를 隨伴하는 境遇가 많다. 이들

差異點들은 種 以下の 단계, 즉 生態型 또는 亞種의 水準을 論하는데 必要한 자료가 된다.

種, 亞種, 그리고 生態型과의 관계는 최근 分類 또는 害蟲防除 분야에 문제점들을 야기시키고 있다. 실제 同一種의 環境에 따른 差異에 관하여 生理學的 側面에서는 주로 전기영동법으로 究明하며, 生態學的으로는 기주식물에 대한 섭식 선호성, 幼蟲의 發育度, 번식력, 그리고 기후에 대한 適應力 등이 연구되고 있다. 또한 形態學的으로는 解剖, 光學, 電子顯微鏡을 이용한 形態比較가 시도되고 있으며 한편으로는 數理統計學을

1 江原大學校 農生物學科(Dept. of Agricultural Biology, Kangweon National University)

2 江原大學校 生物學科(Dept. of Biology, Kangweon National University, Chuncheon, Kangweondo, 200-701)

導入하기도 한다.

昆蟲을 材料로하여 同一種의 地域間 生理的, 形態的 差異에 關한 전기영동 및 走査電子顯微鏡의 研究事例는 다음과 같다.

전기영동의으로는 Saul 等(1976)이 *Aedes aegypti*를 材料로 하여 集團間의 esterase locus 에 關한 遺傳的 差異를 報告하였고, Pamilo 等 (1978)도 *Formica ants*의 酸素活性的 地域的 差異에 關하여 研究하였다. Halliday(1979)는 3 地域에 分布하는 *meat ants*의 esterase 活性에 關한 調査에서 地域間 差異가 나타남을 밝혔다. Ward(1981a) 等은 프랑스와 튀니지아에서 採集한 *Phlebotomine sandflies*의 여러가지 酸素에 關한 多形現象(polymorphism)을 研究하였다.

Nunamaker 와 Wilson(1981)은 브라질의 African honey bee(*Apis mellifera adansonii*. L.)와 Africanized population間의 MDH allozyme pattern을 比較하였다.

走査電子顯微鏡을 利用하여 同一種의 地域間 形態的 差異에 關한 研究事例는 거의 없었고, 단지 Odindo(1982)等이 tsetse flies 4種을 對象으로 同一種의 地域間 微細構造的 差異를 比較한 程度이다.

솔잎혹파리에서는 Yoo(1983)가 忠淸道 一部 地域에 棲息하는 솔잎혹파리의 全發生段階別 일반단백질과 酸素의 生理的 差異를 研究하였을 뿐이다. 이미 잘 알려진 바 1926년 서울, 木浦에서 솔잎혹파리의 發生이 확인된 이래 우리나라 林野의 소나무에 致命的인 타격을 주면서 擴散 一路에 있다. 이들은 60여년동안 發生起點에서는 서로 混合되지 않고 이른바 地理적으로 隔離되어왔다. 이러한 사실은 同一種에서 環境에 따른 生理, 形態的 差異를 파악할 수 있는 좋은 資料가 된다. 따라서 本 研究者는 全羅南道 海南地域과 江原道 春城地域에 棲息하고 있는 솔잎혹파리를 材料로 하여 地域에 따른 生理, 形態的 差異를 찾아보기 爲하여 일반단백질, esterase, 그리고 malate dehydrogenase(MDH)에 關하여 전기영동법으로, 또한 走査電子顯微鏡을 利用하여 生殖節의 外部形態的 微細構造를 比較하여 보았다.

## 材料 및 方法

충영이 形成된 솔잎을 全羅南道 海南과 江原道 春城지역에서 1984年 9月 下旬에 採集하여 동일지역(春川)에서 越冬시키면서 솔잎혹파리 幼蟲은 익년 2월에, 成蟲은 6月 下旬頃 羽化한지 6시간이 지난것을 實驗材料로 使用하였다. 生理的으로는 두지역의 幼蟲과 成蟲을 各各 200個體를 選拔하여 이들 몸무게의 2배 되는 蒸溜水와 混合(W/V)하여 4°C에서 glass homogenizer로 摩碎한 後 6,000 rpm에서 30분간 遠心分離 하였다. 상등액을 20% 食糖溶液과 혼합하여 試料로 使用하였다. 전기영동은 垂直 slab gel 方法으로 實施하였고, 7.5% acrylamide gel에서 10  $\mu$ l 의 시료를 注入하여 7 mA, 100 V로 약 3시간 分離 하였다. 전기영동에 使用된 buffer는 Tris-glycine (pH 8.4)이었다. 일반 단백질은 0.025% Coomassie brilliant blue로 染色 하였다. Esterase 基質은 幼蟲에서  $\alpha$ -naphthyl acetate, 成蟲에서  $\alpha$ -naphthyl propionate를 使用하였다. MDH는 DL-malate를 기질로 하여 Park과 Cho (1972)方法으로 染色 하였다.

表面微細構造的으로는 成蟲을 insect saline에 수회 洗滌한 後 2.5% glutaraldehyde와 1% OsO<sub>4</sub>로 前·後 固定시켰다. 脫水는 70% acetone부터 濃度上昇順으로 한 後 無水 acetone에서는 3回 反復 하였다. 以後 置換은 isoamyl acetate로, 乾燥는 critical point dryer로 施行 하였으며, gold coating은 EIKO IR-3型 ion coater로 400 A 두께로 하였다. 觀察과 撮影은 Hitachi S. 450 型 走査電子顯微鏡으로 15 Kv에서 하였다. 本 實驗의 전기영동적 研究는 5回 反復 하였으며, 走査電子顯微鏡 研究는 各 地域 솔잎혹파리 암컷 20個體 以上씩을 使用하였다.

## 結 果

全羅南道 海南과 江原道 春城 두 지역에 棲息하고 있는 솔잎혹파리 유충과 성충의 전기영동적, 그리고 走査電子顯微鏡의 研究結果는 다음과 같다.

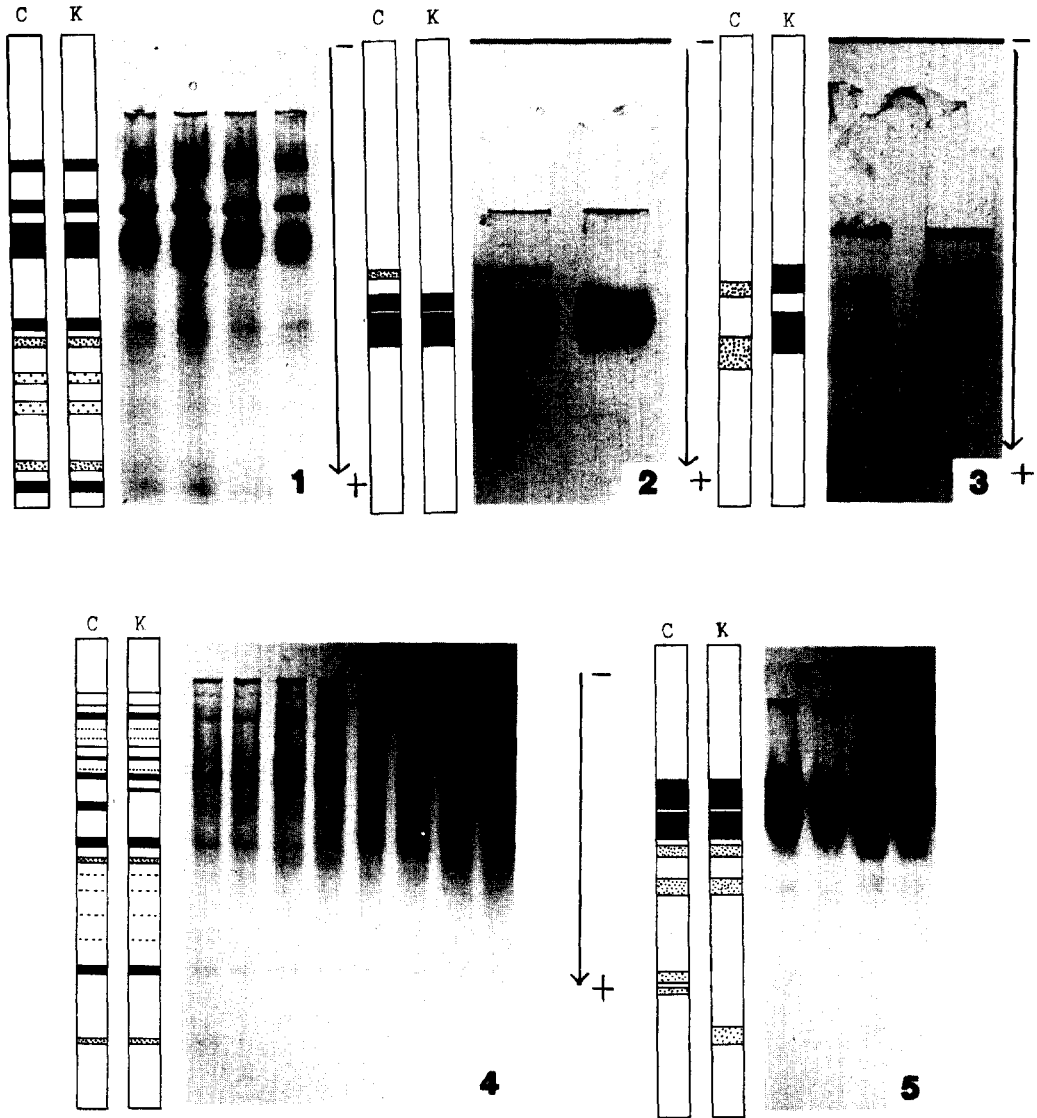


Fig. 1. General proteins of larvae of *Thecodiplosis japoniensis*, which have no difference in quality and quantity. C—from Haenam, Chullanamdo, K—from Chunsung, Kangweondo.

Fig. 2. Esterase of larvae, showing another weak band from Haenam.

Fig. 3. MDH of larvae different in intensity and migration rate between two lanes.

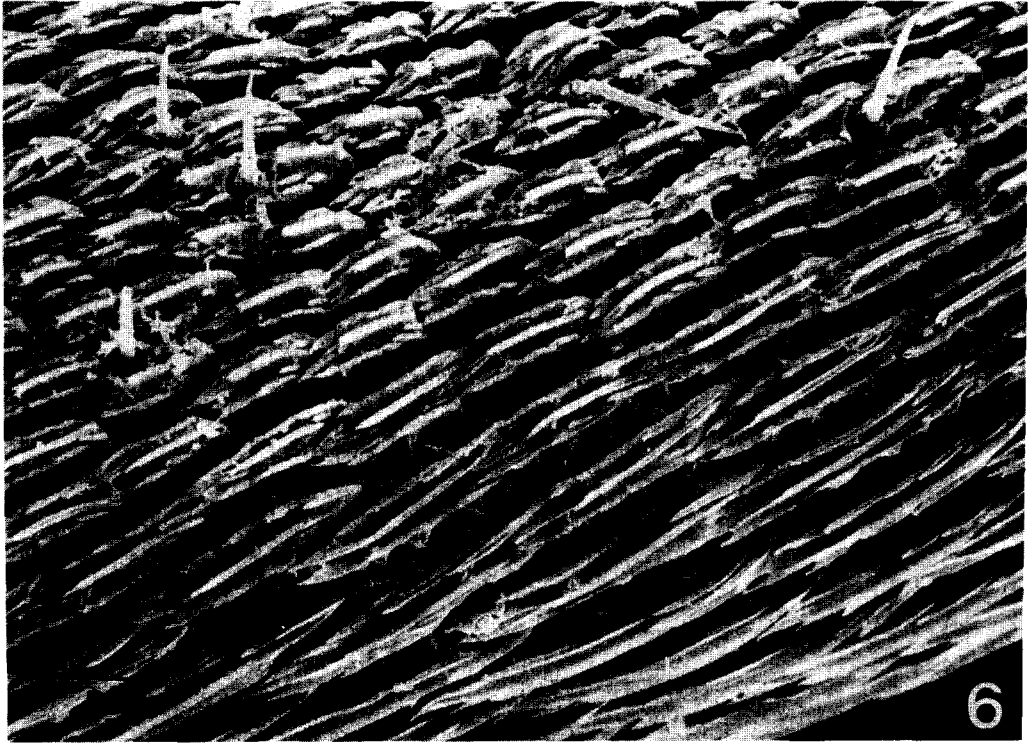
Fig. 4. Among total 18 bands of general proteins of adults, only 10th bands of each lane showed difference in migration and intensity.

Fig. 5. Esterase of adults, showing difference in bands near the anode.

幼蟲의 전기영동적 比較

일반 단백질은 두 지역 모두 9개씩의 band가

나타났으며, 이들 각각에 있어서 band의 위치와 濃度에는 차이가 없었다(Fig. 1). Esterase는 海



**Fig. 6.** Surface structure of the 2nd segment of ovipositor from Chunsung showing difference from Haenam (Han et. al., 1988).

Note projection on the scale-like proglottis and patterns of their contact. Bar = 5  $\mu$ m

南産(C)이 3개, 春城産(K)이 2개의 band로 나타났다. 양극쪽의 넓은 2개의 band는 두 지역 모두 차이가 없었으나 보다 이동율이 낮은 1개의 band가 해남산(C)에서만 관찰되었다(Fig. 2). MDH는 양측 모두 2개씩의 band가 활성을 나타내고 있으나 해남산(C)의 band는 춘성산(K)의 band보다 양극쪽으로 더 이동했으며,染色도弱하였다(Fig. 3).

#### 成蟲의 전기영동적 比較

일반 단백질은 兩側 모두 18개의 band가 존재하였다. 이들중 17개 band는 동일한 농도와 이동거리를 보여주었다. 그러나 두지역의 10번째 band에서 위치 및, 농도의 차이가 있었다. 즉 春城産(K)은 보다 이동거리가 짧았으며 반면 海南産(C)보다 陽極쪽으로 移動되어 있었으며 그 농도는 다소 강하였다(Fig. 4). Esterase는 해남

산(C)에서 6개, 춘성산(K)에서 5개의 band로 分離되었다. 음극쪽의 4개의 band들은 두 지역 모두 동일한데, 해남산에는 gel의 中立位置에 2개의 band가, 춘성산에는 양극에 近接하여 1개의 band가 나타나고 있어 지역적인 차이를 보여주었다(Fig. 5).

#### 産卵管의 微細構造的 比較

全羅南道 海南과 江原道 春城의 솔잎혹파리 産卵管은 모두 3절로 되어있다. 첫째마디에는 해남산과 춘성산 모두 微細한 털(hair)이 덮여 있었으며 별다른 外部構造的 차이를 볼 수 없었다. 셋째마디 역시 해남산과 춘성산 모두 털과 강모(bristle)로 덮여있고, 첫째마디와 마찬가지로 두 지역의 材料를 비교하여 볼 때 별다른 差異點이 없었다. 그러나, 둘째마디에서는 뚜렷한 外部形態的 差異가 觀察되었다. 卽, 해남산에서는

正面에서 볼 때 장축방향으로 外部를 덮고있는 흡사 뒤집혀진 배 모양의 구조물들이 관찰되며, 이 構造物 사이를 다시 작은 돌기물들이 싸고 있다. 側面에서 볼 때는 구조물의 끝 부분이 날카롭게 위로 향하고 있었다(Han et al. 1988). 춘성산은 해남산과는 달리 정면에서 볼 때 구조물 위에 또 다른 작은 돌기물들이 線狀으로 配列하고 있고, 이 구조물사이를 서로 엮물려 안으로 陷入하고 있는 特異한 형태를 하고 있었다. 또한 측면에서 볼 때도 해남산과는 달리 구조물이 날카롭게 突出되어 있지 않았다(Fig. 6).

### 考 察

전기영동으로 分離한 곤충의 일반단백질은 種마다 固有한 樣相을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다. Lunt(1979)는 亞種 單位에서도 일반단백질 band 양상에 차이가 있다고 보고하였다. 그러나 Norment等(1972)은 *Draeculacephala*에 속하는 *D. portola*와 *D. balli* 두 종의 일반단백질을 比較해 본 結果, 암컷들은 12개, 수컷들은 13개의 band가 나타나 性間에는 차이가 있으나 種間에는 차이가 나지 않는다고 報告하였다. 이는 전기영동법의 短點으로 微細한 band의 구분이 容易하지 않았던 까닭이라 생각되며, 위 材料들을 대상으로 좀 더 精密한 실험을 한다면 중간 일반 단백질 樣相이 달리 나타나리라 사료된다. Slab 형의 전기영동법을 이용한 본 실험에서는 성충의 일반단백질은 各各 18개의 band가 나타나지만, 海南産과 春城産에서의 10번째 band가 地域間 活性的의 차이를 보이고 있다.

反면에 유충에서는 두 지역 모두 각각 9개씩의 band가 나타나며, 이들 相互間의 濃度나 이동거리에 있어서도 차이가 없었다. 앞으로 보다 band의 分離力이 좋은 2차원적 전기영동 또는 isoelectric focusing electrophoresis를 한다면 유충에서도 두 지역간 band 樣相이 달리 나타나리라 생각된다.

Yoo(1983)가 忠淸南道 솔잎혹파리의 성충을 材料로 전기영동한 일반단백질의 band 수는 17개로 나타나고 있으나 disk-electrophoresis를

하였으므로 本 實驗結果와 횡적으로 比較해 보기는 어렵다. 同位酵素는 일반적으로 溫度, 濕度 등의 기후적 요인과 영양상태, 그리고 藥劑低抗性에 따라서 生體內 活性이 다른것으로 잘 알려져 있다. Cornuet(1979)은 서로 地理的으로 隔離되어 있는 꿀벌(*Apis mellifera*) 集團의 MDH 활성에 있어서 지역적 차이가 있음을 밝혔고, Ward等(1981b)도 이탈리아 여러지역에 分布하고 있는 *Phlebotomus perfliewi perfliewi*의 phosphoglucomutase에 있어서 地域間 活性에 차이가 나타나는 것은 이들이 서로 다른 氣候에서 棲息하고 있기 때문이라고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 유충의 MDH와 esterase, 그리고 성충의 esterase에서도 두 지역간 서로 다른 band 樣相을 나타냈다.

- 全羅南道 海南과 江原道 春城 두 地域이 地理的, 氣候的으로 相異하며, 또한 솔잎혹파리의 주된 寄主植物인 적송의 變異關係도 생각하지 않을 수 없다. 이러한 要因들 때문에 해남산과 춘성산의 솔잎혹파리의 MDH와 esterase의 活性에 있어서 地域間 차이가 난 것으로 推測된다. 微細構造的으로는 3절로 구성된 產卵管의 둘째 마디에는 두지역간 뚜렷한 外部形態의 차이가 나타나고 있음을 볼 수 있다.

以上の 結果로 볼 때 두 지역에 分布하는 솔잎혹파리는 生理, 形態的으로 뚜렷한 차이점을 나타내고 있으며, 이는 이들 두 집단을 각기 다른 生態型으로 取扱할 수 있는 좋은 資料가 提供된 것으로 思料된다.

앞으로 生理學的인 면에서 두 지역에 있어서 個體間의 變異와 보다 많은 數의 酵素 實驗이 追加되고, 形態學的으로 또 다른 여러 部位들을 比較觀察 한다면 좀더 확실한 生理, 形態的 變異를 볼 수 있으리라 생각한다.

또한 海南과 春城地域을 起點으로 솔잎혹파리의 擴散經路를 따라 여러지역에서 採集하여 본 실험 혹은 上記에 提示된 방법으로 實行하여 보면 環境과 昆蟲의 相互關係, 生態형의 變化 등의 흥미있는 結果를 얻을 수 있을 것이다.

## REFERENCES CITED

- Cornuet, J. M. 1979. The MDH system in honeybee of Guadaloupe. *J. Hered.* 71 : 223~224.
- Halliday, R. D. 1979. Esterase variation at three loci in meat ants. *J. Hered.* 70 : 57~61.
- 韓盛植, 李浩柱, 朴容喆. 1984. 솔잎혹파리의 體表面微細構造 I. 終齡幼蟲. 江原大學校論文集 19 : 11~17.
- Han, S. S., Y. C. Park & C. Y. Lee. 1988. External ultrastructure of the adult genital segments of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis* Uchida et Inouye. *Korean J. Applied Entomol.* 27 : 144~148.
- Lunt, S. R. 1979. Protein band studies of the subspecies in the *Aedes atropalpus* group. *Mosquito News.* 37 : 470~473.
- Norment, B. R., J. R. Haskins & L. W. Hepner. 1972. A comparative electrophoretic study of Cicadellidae and Membracidae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 65 : 1149~1153.
- Nunamaker, R. A. & W. T. Wilson. 1981. Comparison of MDH allozyme patterns in the African honeybee (*Apis mellifera adansonii* L.) and the Africanized populations of Brazil. *J. Kansas Entomol. Soc.* 54 : 704~710.
- Odindo, M. O., P. A. Amutalla, D. A. Turner, E. D. Kokward, W. D. Otieno & D. M. Sabwa. 1982. Morphological variation and incidence of cuticular lesions in the Tsetse *Glossina pallidipes* Austin, G. brevipalpis Newstead and G. austeni Newstead (Diptera : Glossinidae) on the Kenyan coast. *Insect Sci. Application* 3 : 65~71.
- Pamilo, P., R. Rosengren, K. Vepsäläinen, S. L. Varvio-Aho & B. Pisarski. 1978. Population genetics of *Formica* ants. 1. Patterns of enzyme gene variation. *Hered.* 89 : 233~248.
- Park, S. Y. & D. H. Cho. 1972. Separation of dehydrogenase isozymes by celluloseacetate electrophoresis. *Korean J. Zoology* 15 : 101~104.
- Saul, S. H., V. J. Gupta & B. Carig, Jr. 1976. Genetic variation at an esterase locus in *Aedes aegypti*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69 : 73~79.
- Ward, R. D., N. Pasteur & J. A. Rioux. 1981a. Electrophoretic studies on genetic polymorphism and differentiation of Phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae) from France and Tunisia. *Ann. Tropical Med. Parasitol.* 75 : 235~245.
- Ward, R. D., S. Bettini, M. Maroli, J. W. McGarry & A. Draper. 1981b. Phosphoglucumutase polymorphism in *Phlebotomine perfiliewi perfiliewi* Parrot (Diptera : Psychodidae) from central and northern Italy. *Ann. Tropical Med. Parasitol.* 75 : 653~661.
- Yoo, C. M. 1983. Studies on the protein and hydrolase patterns during the metamorphosis of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Korean J. Entomol.* 13 : 9~16.

(1990년 2월 16일 접수)