

생식형불일치 유형에 따른 국내 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)의 유전적 위치

박정아 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학부

Genetic Identity of a Korean Isolate of an Endoparasitoid, *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), Among Reproductive Incompatibility Types

Junga Park and Yonggyun Kim*

School of Bioresource Sciences, Andong National University

ABSTRACT : Reproductive incompatibility is an important factor to select a specific biological control agent for successful augmentation of the corresponding endogenous population. An endoparasitoid, *Cotesia plutellae* (Kurdjumov), is an effective control agent to diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and has been known to be classified into two groups in terms of reproductive incompatibility. This study analyzed a Korean population of *C. plutellae* in terms of morphological characters and mitochondrial DNA marker, which did not match with either of two reproductive incompatibility groups. These results suggest that a Korean population of *C. plutellae* can be involved in a novel reproductive group. For any augmentation program of *C. plutellae* in Korea, reproductive incompatibility should be seriously considered to select a particular exotic population.

KEY WORDS : Biocontrol, *Cotesia plutellae*, Endoparasitoid, Mitochondrial DNA, *Plutella xylostella*, Reproductive incompatibility

초 록 : 자생밀도의 증가를 위해 도입되는 생물적 방제인자를 선정하는 데 있어서 생식형불일치는 주요한 요인이다. 배추좀나방(*Plutella xylostella* (L.))에 대한 효과적 생물적방제 인자로서 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae* (Kurdjumov))은 집단 사이에 생식형불일치로 크게 두 생식형집단으로 분류되었다. 본 연구는 국내 서식하는 특정 프루텔고치벌 집단에 대해서 형태적 및 미토콘드리아 염기서열 지표분석을 실시하였으며, 이 결과 국내 집단이 기존에 보고된 두 생식형집단에 비해 형태적 형질과 분자지표에서 뚜렷한 차이를 보였다. 이러한 결과는 국내 프루텔고치벌 집단이 새로운 생식형집단일 수 있다는 것을 제시하였다. 또한 본 연구 결과는 외래 프루텔고치벌의 도입을 위해서는 국내 자생종과의 생식형불일치 가능성을 중요하게 고려해야 한다고 보고한다.

검색어 : 생물적방제, 프루텔고치벌, 내부기생충, 미토콘드리아 DNA, 배추좀나방, 생식형불일치

생식형불일치(reproductive incompatibility)는 교미후 난자와 정자사이에 일어나는 불일치에 따라 수정을 저하

또는 잡종억제(hybrid depression)에 따른 자손 생존을 저하에서 비롯된다(Turelli *et al.*, 2001). 특별히 유용 천적을

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

타 지역으로 도입하는 경우 자생하는 집단과의 생식불일치는 생물적 방제 효율의 저하를 유도하게 하는 원인이 된다(Rinco *et al.*, 2006). 즉, 생식불일치를 보이는 천적을 방사하는 경우는 기존의 천적 집단에 대한 불임충방사와 같은 심각한 역효과를 유발하게 된다(Stouthamer *et al.*, 2000). 이러한 생식불일치를 유발하는 주요 원인으로 세포질불일치(cytoplasmic incompatibility)를 유발하는 월바키아(*Wolbachia*) 세균을 들 수 있는데, 이는 비감염 암컷과 감염된 수컷을 교미하는 경우에 나타나는 현상으로 비감염 또는 균주의 특이성이 상이한 세균에 의해 감염된 난자가 이 세균에 의해 변형된 정자를 구제할 수 없어 기인된다(Hoffman and Turelli, 1997; Werren, 1997).

프루텔고치벌(*Cotesia plutellae* (Kurdjumov))은 단독형 내부 기생충으로 배추좀나방(*Plutella xylostella* (L.)) 또는 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)을 기주로 생활한다(Kim *et al.*, 2004). 한국을 비롯한 동남아시아 지역에서 프루텔고치벌은 배추좀나방에 대해서 중요한 생물적 제한 요인이 되고 있다(Lim, 1992; Talekar, 2004). 화학농약은 물론이고 *Bacillus thuringiensis*에까지 저항성을 보이고 있는 배추좀나방(Tabashnik *et al.*, 1990, 1997)을 방제하기 위해서는 프루텔고치벌과 같은 효과적 생물적 방제인자를 도입하게 되는데, 이때 도입집단과 자생집단 사이에 생식형불일치로 여겨지는 원인에 따라 효과적 프루텔고치벌 집단 형성에 어려움이 있다(Cordera and Cave, 1992; Waterhouse, 1992).

프루텔고치벌의 생식형불일치는 월바키아 이외에 이 종이 갖는 잠재적 생태종의 존재에 의해서도 가능하다(Templeton, 1998). 즉, 프루텔고치벌의 지역적 또는 기주에 따른 생식고립과 이에 따른 종분화과정은 이러한 생태종을 유발할 수 있다(Kfir, 1997; Guilloux *et al.*, 2003). Rincon *et al.* (2006)은 전세계적으로 프루텔고치벌이 외부로부터 인위적 도입없이 자생했다고 여겨지는 5개 지역의 집단(South Africa, Benin, Martinique, Reunion Island, Taiwan)을 선발하여 이들의 상호 교잡 분석을 통해 두 개의 생식형불일치 집단으로 분류하였다. 그리고 이들의 생식형불일치 집단을 찾아내는 필요한 유전자표를 형태적 지표와 미토콘드리아 DNA 지표로 보고하였다.

본 연구는 국내 자생한 배추좀나방 집단을 Rincon *et al.* (2006)이 분류한 두 개의 생식형불일치 집단 가운데 어디에 위치하는지를 형태형질과 분자지표로 검정하였다. 아울러 새로운 대립 형태형질을 찾아 국내 집단의 고유한 유전적 성질을 기술하였다.

재료 및 방법

프루텔고치벌과 배추좀나방 사육

프루텔고치벌은 안동 지역의 배추 포장에서 채집된 배추좀나방에서 얻은 야외 집단을 실내 조건(온도 약 25°C, 광주기 16:8 (L:D) h)에서 누대사육하였다. 배추좀나방 유충은 배추잎으로 사육되었으며, 성충에게는 10% 설탕물이 공급되었다. 배추좀나방 2령 유충을 프루텔고치벌 기생에 이용하였다. 배추좀나방 유충에 대한 기생은 우화 후 1일 동안 미리 교미가 허용된 성충 집단에 배추좀나방 유충을 24시간 동안 노출시켜 기생시켰다. 이후 기생된 배추좀나방은 일반 사육 방법으로 사육되었으며, 형성된 고치에서 우화된 성충은 50% 설탕물을 먹이로 공급하였다.

형태형질 분석

생식형불일치를 규명하기 위한 프루텔고치벌 성충 형태분석은 Rinco *et al.* (2006)이 기술한 두 가지 형질을 대상으로 관찰하였다. 즉, 체장은 머리끝에서 복부 끝까지의 길이를 측정하였고, 촉각의 길이 측정은 Kim and Park (2006)의 방법을 따랐다. 각각의 형태적 특징은 암수 각각 80마리를 대상으로 측정되었다.

기타 국내 프루텔고치벌의 고유한 형태적 형질을 찾아내기 위해 겹눈, 복부 옆면 체색, 복부 마디 띠가 각각 대립형질로 나누고 각각의 대립형질 빈도를 암수 각각 100마리 성충을 대상으로 분석하였다(Fig. 2A 참조). 겹눈은 색깔별로 검정색과 적색으로 나뉘어졌다. 복부 윗면 줄무늬는 존재 유무에 따라 그리고 복부 옆면 체색은 황색과 흰색으로 나뉘어 관찰되었다.

미토콘드리아 DNA추출

미토콘드리아 DNA를 초원심분리 과정 없이 분리하기 위해 일반 플라스미드 분리방법을 변형시킨 Birnboim and Doly (1979)의 방법으로 분리하였다. 약 10 mg의 프루텔고치벌 시료를 같은 부피의 균질완충용액(250 mM sucrose, 10 mM EDTA, 30 mM Tris-Cl, pH 7.5)으로 분쇄 후 원심분리(1,000 g)하여 상등액을 취했다. 미토콘드리아를 분리하기 위해 다시 12,000 g에서 원심분리한 후 침전액을 취하여 분해완충용액(150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8.0)으로 녹였다. 이 용액에 2배 부피의 0.2 M NaCl, 1% SDS를 첨가한 후 얼음에서 5분간

반응시켰다. 다시 1.5배 부피의 3 M sodium acetate를 첨가 후 5분간 얼음에서 반응시켰다. 이후 원심분리 (12,000 g)하여 상등액을 취한 후 페놀 추출 및 에탄올 침전으로 DNA를 수거했다(Sambrook *et al.*, 1989).

Cytochrome b 염기서열

곤충 미토콘드리아 DNA중 매우 보존적인 영역에서 디자인된 프라이머 서열(Simon *et al.*, 1994) 가운데 cytochrome b 영역을 증폭시키는 CB1-CB2 프라이머 조합을 이용하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 반응용액은 완충용액(50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris, pH 8.3) 50 µl에 최종농도 약 10-100 ng의 DNA 시료, 50 pmol의 각 CB1-CB2 프라이머, 10 µM의 dNTP 및 0.5 unit의 Taq polymerase로 구성되었다. PCR 반응은 Thermal Cycler (PTC-100, MJ Research Inc.)로 95°C에서 1분 동안 예비반응 후, 94°C에서 45초, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초씩 35과정을 거치며 72°C에서 10분 동안 마지막 사슬연장시킨 후 종료되었다.

증폭된 PCR 결과물은 TA 클로닝 기술로 pGEM[®] 벡터 (Promega, Madison, USA)로 옮겨지고, SP6과 T7 시퀀싱 프라이머를 이용하여 양방향으로 염기서열이 결정되었다. 이렇게 해서 얻어진 염기서열 자료는 DNASTAR 프로그램(Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)으로 단일 염기서열로 연결되었다.

통계처리

SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여

평균간비교 및 분산분석을 하였다. 빈도분석은 PROC FREQ을 이용하였다. 2×2의 빈도분석은 Fienberg (1977)의 방법에 따라 보정된 X² 검정량을 이용했다.

결 과

프루텔고치벌에 있어서 생식형불일치를 보이는 두 집단은 각각 형태적 특징과 미토콘드리아 서열에 의해 서로 구분된다(Rincon *et al.*, 2006). 모든 프루텔고치벌 집단에서 수컷의 촉각 길이가 암컷보다 크게 나타났다. 국내 집단의 경우 Group I과 Group II에 비해 몸 길이와 촉각 길이에서 암수 모두 크게 나타났다. 이는 실험자의 이질적 측정 방법에 기인된다고도 볼 수도 있다. 반면에 이들 두 길이의 상대적 비는 직접 비교가 가능한 객관적 특징일 수 있다. 이들 길이 비를 대상으로 국내 집단을 외국의 두 분류군에 비교하면, 뚜렷한 차이점을 보이고 있다 (Table 1). 즉, 몸 길이에 비해 촉각 길이가 두 집단에 비해 국내 집단은 암수 모두 작았고, 암수 간 몸 길이 비도 두 집단의 대표치의 중간에 위치했다.

DNA 염기서열 지표는 이러한 차이점을 또한 뒷받침하였다(Fig. 1). 프루텔고치벌은 먼저 근연종인 *C. glomerata*와는 260번째 위치에서 구분되었다. 이 위치가 이 유전자 영역에서 중간 차이를 나타내는 부위로 여겨진다. 종내 변이는 이 cytochrome b 영역의 염기서열에서 311번째 염기서열이 'C'이면 Group I이고 'T'이면 Group II의 서로 다른 생식형불일치 집단으로 구분되었다(Rincon *et al.*, 2006). 이 위치에서 본 국내 집단은 'C'로서 Group I과 가까웠지만 365번째 염기서열이 차이가 있어, 두 생식

Table 1. Comparison of a Korean isolate¹ of *Cotesia plutellae* with known morphological groups²

	Korea		Group I (Martinique, South Africa)		Group II (Benin, Reunion, Taiwan)	
	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂
Antennal length (mm)	2.51±0.11	3.10±0.11	2.37-2.55	2.82-3.01	2.35-2.44	2.78-2.89
Body length (mm)	2.66±0.16	2.51±0.13	2.32-2.50	2.33-2.49	2.56-2.64	2.32-2.46
Antenna/ body	0.80±0.05	1.05±0.07	1.02-1.03	1.21-1.22	0.92-0.93	1.18-1.21
Female/ Male body length	1.060		0.996-1.004		1.073-1.103	

¹ Collected from *Plutella xylostella* infesting oriental cabbage in Andong

² Classified from Rincon *et al.* (2006)

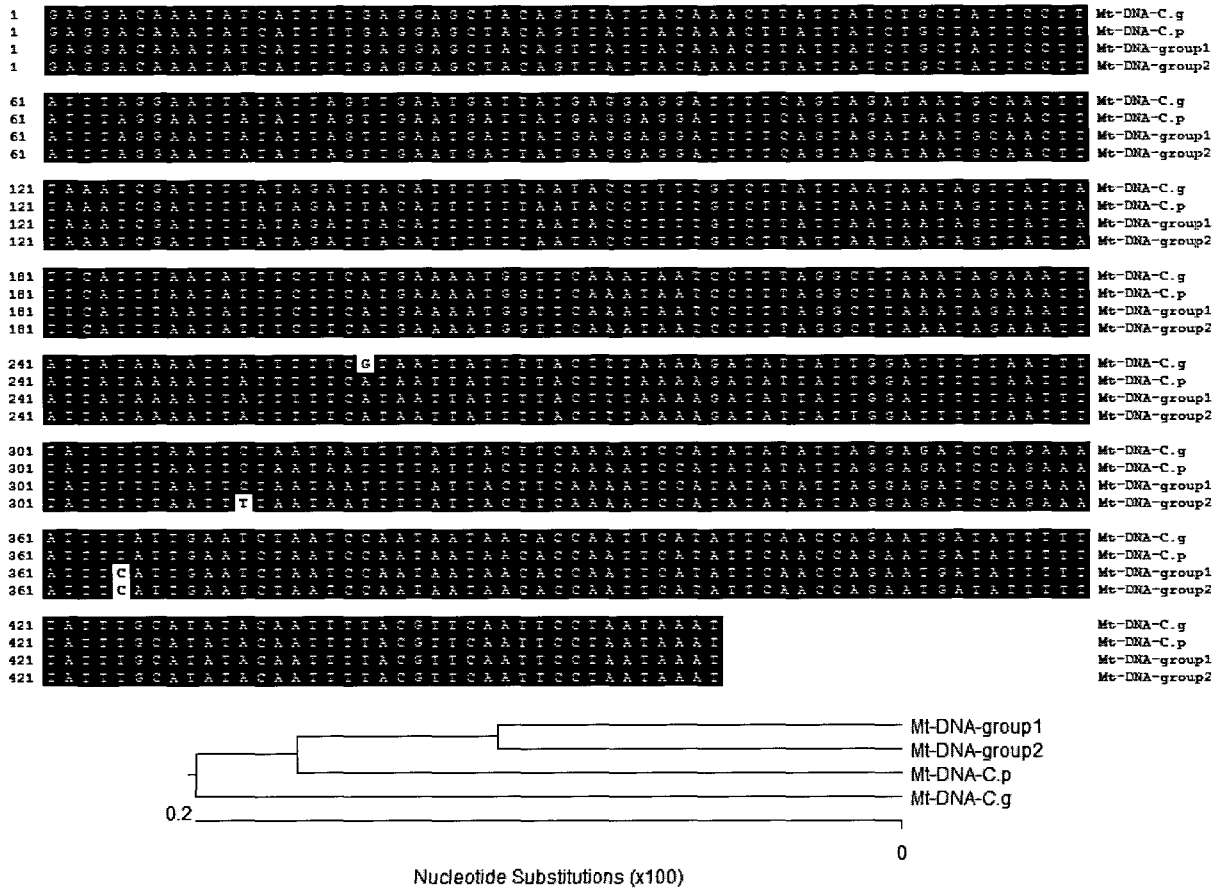


Fig. 1. DNA sequence comparison of cytochrome b region among *Cotesia plutellae* populations. Groups I and II are two *C. plutellae* classified by Rincon *et al.* (2006). 'Mt-DNA-C.p.' represents a *C. plutellae* population collected from *Plutella xylostella* infesting oriental cabbage in Andong. 'Mt-DNA-C.g.' represents a *C. glomerata* population as a reference.

형 집단과 구분되었다.

이상의 형태적 그리고 DNA 형질은 본 국내 집단이 이들 형질에 의해서 분류될 수 없는 집단으로 판단된다. 추후 상호 집단간 비교를 위해서는 국내 집단을 보다 많은 형질에서 분석할 필요가 있다. 이를 위해 본 연구에서는 세 가지 다른 형태 형질을 찾았다(Fig. 2A). 겹눈의 색깔은 대부분 검정색이나 일부 짙은 적색을 보였고(Fig. 2B), 암수 사이에 뚜렷한 차이를 보이지는 않았다($\chi^2=0.89$; $df=1$; $P=0.3478$). 복부 윗면의 마디별 사이가 뚜렷한 줄무늬로 나타나는데, 일부에서는 마디사이가 함께 암화되어 마디 구분이 없게 되었다. 이러한 줄무늬 형질은 암컷에서 보다 많이 관찰되었다($\chi^2=5.34$; $df=1$; $P=0.0231$). 복부 옆면의 체색이 황색과 흰색으로 구분되었고, 암수에 따라 이들의 빈도가 상이하게 나타났다($\chi^2=3.67$; $df=1$; $P=0.0322$).

고 찰

기존의 연구는 서로 다른 지역의 프루텔고치벌 집단이 생식형불일치를 보일 수 있으며, 이러한 일부 집단 사이에 교배는 심각한 생식저하를 초래하였다(Rincon *et al.*, 2006). 이러한 생식저하를 일으킬 수 있는 집단들을 크게 두 개의 지역으로 구분하였다. 즉, Group I과 Group II로 규정되는 집단 사이의 교배는 심각한 생식형불일치가 일어날 수 있다는 의미로서 우리 국내 집단이 이 분류에서 어디에 속하는지를 결정하는 것은 중요하며, 이를 위해 각 집단의 형태적 및 미토콘드리아 DNA 서열과의 연관성을 이용하여 비교하였다. 본 연구는 국내 프루텔고치벌 집단은 형태적 형질과 미토콘드리아 DNA 서열에서 두 집단과 일치하지 않는 특이성을 보여, Rincon *et al.* (2006) 이 제시한 그룹화에 속하지 않았다. 그러나 이러한 차이가 직접적으로 생식형불일치를 나타내지는 이들 지역적

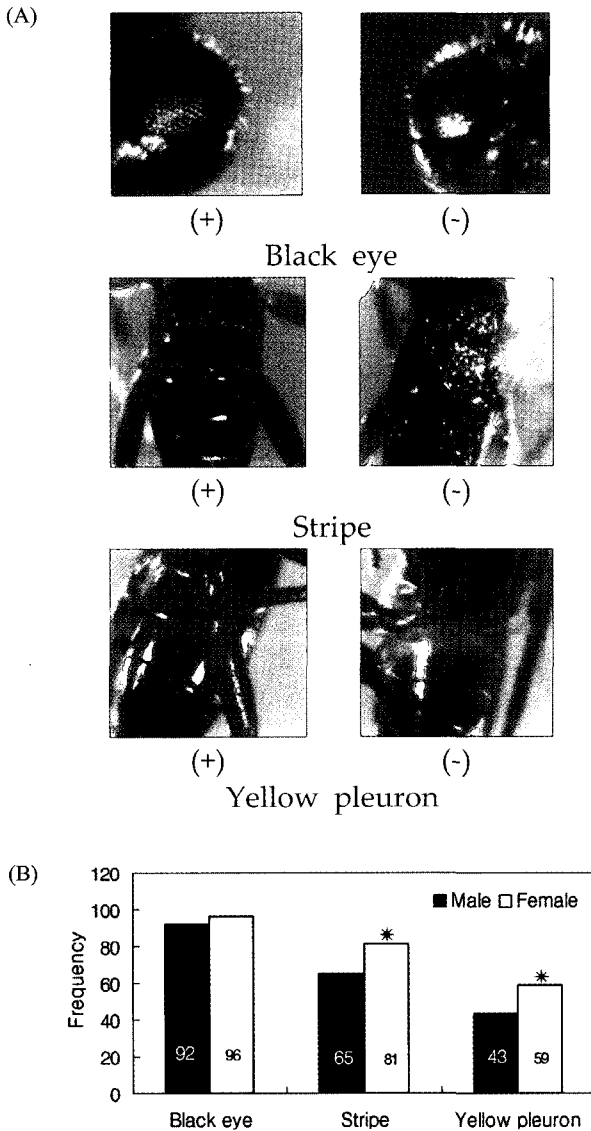


Fig. 2. Characteristics of a Korean population of *Cotesia plutellae* determined with three morphological characters. (A) Photos showing the dichotomous morphological characters taken at 50 × magnification under a stereomicroscope (Olympus, Japan). (B) Frequencies of three morphological characters. Each character was analyzed using 100 individuals in each sex. The asterisks above mean bars indicate the significant difference between sexes at Type I error = 0.05 (χ^2 test).

집단들과 실질적 교배 분석을 실시하여 봄으로 궁극적으로 결정될 수 있다. 또한 다양한 국내 집단을 대상으로 이러한 유전변이를 분석하여 국내 지역집단들 사이에 일어날 수 있는 차이도 밝힐 필요가 있다.

집단간 교배에서 생식형불일치는 교배후 나타나는 자손생산성과 이 가운데 암컷의 비율로 검정하게 된다. 이는 이미 프루텔고치벌에서 보고된 월바키아 감염이 주요 원

인 중 하나이기 때문이다. Vavre *et al.* (2002)는 월바키아 감염으로 생식형불일치가 일어나며, 이러한 불일치된 정자와 난자의 수정난 치사로 자손수의 감소를 일으키게 된다고 보였다. 또한 월바키아 교잡을 통해서 나타나는 자손은 세포질 불일치에 따라 수컷의 증가를 보이게 된다 (Hoffman and Turelli, 1997).

집단간 교배에서 생식형불일치를 보이는 또 다른 원인은 생식고립에 따른 유전적 부동이 일어나고 이에 따른 집단분화를 고려할 수 있다. 본 연구에서 조사한 형태적 형질의 차이점들은 이러한 기작을 설명하여주는 자료로 고려될 수 있다. Lane (1977)은 특정 종은 생식고립을 보이면서 나타나는 유전적 분화를 겪고 있는 여러 집단들로 구성된다고 정의하였다. 본 연구는 기존에 연구 결과에 덧붙여서 프루텔고치벌이 이러한 여러 생식고립을 보이는 여러 집단들로 구성된다는 것을 보여 주고 있다. 그럼으로 일반적인 종분화 원리(Schluter, 2001; Turelli *et al.*, 2001)를 고려하여 이들 집단 사이의 교배는 (1) 집단 간 경쟁에 의해서 한 집단의 소멸을 일으키거나 (2) 상호 교배 후 나타나는 이형 형질들에 대한 자연선택 이후 두 집단의 융합으로 집단분화를 억제하거나 (3) 두 집단이 동일공간에서 공소성(sympatry)을 보이면서 공존하는 결과들을 예상할 수 있다.

생물적 방제를 위해서 유전적 다양성을 보이는 천적 집단을 보유하는 것이 이상적으로 지역적 집단의 도입에 의한 이러한 다양성을 추구할 수 있게 된다. 그러나 본 연구는 프루텔고치벌의 경우에는 생식형불일치를 통한 천적 도입의 실패를 초래할 수 있다는 것을 경고하고 있다. 국내 프루텔고치벌 유전자원을 보강하기 위한 국내 타 지역 집단 또는 국외 집단의 도입을 시도할 경우, 이러한 생식형불일치를 면밀히 검토한 후 진행하는 것이 필요하다. 본 연구는 이러한 궁극적 목표를 이루기 위해, 국내 집단의 유전적 특징을 보다 더 면밀하게 분석할 필요가 있으며, 다양한 지역적 집단과의 실험실내 교배를 통해 생식형불일치를 보이는 집단들을 미리 구분할 필요가 있다.

Literature Cited

Birnboim, H. and S. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7: 1513-1517.
 Cordero, J. and R.D. Cave. 1992. Natural enemies of *Plutella xylostella* (Lep: Plutellidae) on crucifers in Honduras. Entomophaga 37: 397-407.

- Fienberg, S.E. 1977. The analysis of cross-classified data. MIT Press, MA.
- Guilloux, T., R. Monnerat, M. Castelo-Branco, A. Kirk, D. Bordat. 2003. Population dynamics of *Plutella xylostella* (Lep., Yponomeutidae) and its parasitoids in the region of Brasilia. *J. Appl. Entomol.* 127: 288-292.
- Hoffmann, A.A. and M. Turelli. 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects. pp. 42-80. *In* Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction, eds. by S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann and J.H. Werren. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Kfir, R. 1997. Parasitoids of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in South Africa: an annotated list. *Entomophaga* 42: 517-523.
- Kim, Y., S. Bae and S. Lee. 2004. Polydnavirus replication and ovipositional habit of *Cotesia plutellae*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 43: 225-231.
- Kim, Y. and J. Park. 2006. Distribution of antennal sensilla in *Cotesia plutellae* and effect of flagellectomy on parasitism. *Kor. J. Appl. Entomol.* 45:
- Lane, R. 1977. The species concept in blood-sucking vectors of human diseases. pp. 273-289. *In* Species, the unit of biodiversity. eds. by M.F. Claridge, H.A. Dawah and M.R. Wilson. Chapman & Hall, London.
- Lim, G.-S. 1992. Integrated pest management of diamondback moth: practical realities. *In* Diamondback moth and other crucifer pests, ed. by N.S. Talekar. Proceedings of the Second International Workshop, 10-14 December, 1990. Tainan, Taiwan.
- Rincon, C., D. Bordat, B. Löhr and S. Dupas. 2006. Reproductive isolation and differentiation between five populations of *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoid of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Biol. Control* 36: 171-182.
- Sambrook, J.E., F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03. Ed. Cary, N.C.
- Schulter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol. Evol.* 16: 391-399.
- 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.
- Stouthamer, R., P. Jochemsen, G.R. Platner and J.D. Pinto. 2000. Crossing incompatibility between *Trichogramma minutum* and *T. platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): implications for applications in biological control. *Environ. Entomol.* 29: 832-837.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson and M.W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J.L. Ménsua and J. Ferré. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12780-12785.
- Talekar, N.S. 2004. Biological control of diamondback in Asia. pp. 103-113. *In* Improving biocontrol of *Plutella xylostella*, eds. by A.A. Kirk and D. Bordat. Proceedings of the International Symposium, 21-24 October, 2002. Montpellier, France.
- Templeton, A.R. 1998. Species and speciation. Geography, population structure, ecology, and gene trees. pp. 32-43. *In* Endless forms. species and speciation, eds. by D.J. Howard and S.H. Berlocher. Oxford University Press, New York.
- Turelli, M., N.H. Barton and J.A. Coyne. 2001. Theory and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 16: 330-343.
- Vavre, F., F. Fleury, J. Varaldi, P. Fouillet and M. Boulétreau. 2002. Infection polymorphism and cytoplasmic incompatibility in Hymenoptera-*Wolbachia* associations. *Heredity* 88: 361-365.
- Waterhouse, D.F. 1992. Biological control of diamondback moth in the Pacific. *In* Diamondback moth and other crucifer pests, ed. by N.S. Talekar. Proceedings of the Second International Workshop, 10-14 December, 1990. Tainan, Taiwan.
- Werren, J.H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 587-609.

(Received for publication January 30 2007;
accepted March 7 2007)