

미토콘드리아 COI 영역의 뉴클레오티드 서열 차이를 이용한 팔나방과 어리팔나방의 PCR 판별법

서보윤 · 정진교* · 조점래¹ · 김용균² · 박창규¹

농촌진흥청 국립식량과학원, ¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²국립안동대학교 생명자원과학부 식물의학전공

A PCR Method to Distinguish *Matsumuraeses phaseoli* from *M. falcana* Based on the Difference of Nucleotide Sequence in the Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I

Bo Yoon Seo, Jin Kyo Jung*, Jum Rae Cho¹, Yonggyun Kim² and Chang Gyu Park¹

National Institute of Crop Science, Seodun-dong, Suwon 441-857, Rep. Korea

¹National Academy of Agricultural Science, Seodun-dong, Suwon 441-707, Rep. Korea

²Major in Plant Medicine, School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Rep. Korea

ABSTRACT: The two closely related major leguminous crop pests in Korea, *Matsumuraeses phaseoli* and *M. falcana* (Lepidoptera: Tortricidae) have very similar morphological characters, which occasionally give rise to a failure in distinguishing between the two. In this study, we report an easy PCR-SSP method to distinguish between them, with a sequence specific primer set (P-SF2, F-SF3, and C-SR3) based on single nucleotide mismatch in 3' terminal base of a primer, which is found in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I DNA (mtCOI). Through application of this method, each species may be clearly identified in terms of its PCR band size and pattern, only one band (245 bp) for *M. falcana* and one (409 bp) or two bands (409 bp & 245 bp) for *M. phaseoli*.

Key words: *Matsumuraeses phaseoli*, *M. falcana*, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mtCOI), PCR-SSP

초록: 콩과(Fabaceae) 작물 해충인 팔나방(*Matsumuraeses phaseoli*)과 어리팔나방(*M. falcana*) (나비목: 잎말이나방과)은 형태적으로 매우 유사하여 종 구별이 힘든 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCR-SSP(PCR with Sequence Specific Primers) 방법으로 두 종을 빠르고 정확하게 구별할 수 있는 판별법을 찾고자 두 종의 미토콘드리아 시토크롬 옥시다제 I(mtCOI) DNA 부분영역(439 bp)의 염기서열을 해독하였다. 그리고 다른 나방 종의 mtCOI 염기서열과 함께 나열하여 비교한 후 팔나방과 어리팔나방에서 종 특이적으로 차이가 나는 단일 뉴클레오티드를 프라이머의 3' 말단으로 하는 염기서열 특이 프라이머 조합을 만들었다. PCR 산물들을 전기영동 한 결과, 어리팔나방은 245 bp, 팔나방은 409 bp와 245 bp의 특이적 밴드 패턴을 보여 두 종을 구별할 수 있었다.

검색어: 팔나방, 어리팔나방, 미토콘드리아 시토크롬 옥시다제 I (mtCOI), PCR-SSP

팔나방(*Matsumuraeses phaseoli*)과 어리팔나방(*M. falcana*)은 잎말이나방과(Tortricidae)에 속하는데, 국내에는 현재까지 같은 속에 이 두 종만이 기록되어 있다. 특히 어리팔나방은 팔나방의 성페로몬을 연구하는 과정(Cho *et al.*, 2007; Yum,

2010)에서 성페로몬트랩에 포획된 개체들 중에 발견되어 최근 기록되었다(Byun *et al.*, 2005). 이들은 유충이 콩과(Fabaceae) 작물의 어린 잎을 말고 그 안에서 섭식을 하거나 줄기 속 또는 생식생장기에는 꼬투리 안으로 들어가 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 1978). 국내에서 팔나방은 유충이 팥 생식기관을 주로 가해하는 것으로 관찰되었고(Jung *et al.*, 2009), 어리팔나방은 콩의 어린 순을 가해하는 것이 관찰되었다(Heo

*Corresponding author: jungjk@korea.kr

Received June 14 2012; Revised September 15 2012

Accepted September 28 2012

Table 1. PCR primer sets used to amplify mtCOI region of *M. falcana* and *M. phaseoli*

Primer set	Primer name	D*	Sequence (5' - 3')	Annealing temp.	Length of PCR product
1	C1-J-1751	F	GGATCACCTGATATAGCATTCCC	48 °C	506 bp
	C1-N-2191	R	CCCGGTAATAATATAAACTTC		
2	P-SF2	F	AAATAATATAAGATTTTGAC	46.2 °C	<i>M. falcana</i> : 245 bp <i>M. phaseoli</i> : 409 bp
	F-SF3	F	TAGCTGGAATTTTCATCTATC		
	C-SR3	R	GATGTTGATAAAGAATAGGG		

* D (Direction of transcription), F (forward primer), R (reverse primer)

et al., 2009).

두 종은 형태적으로 매우 유사하여 유충과 암컷은 구별할 수 있는 검색기가 없으며 수컷의 경우에 내부생식기인 파악기의 형태적 차이(Byun *et al.*, 2005)로 동정하고 있으나 그 차이가 뚜렷하게 드러나지 않는 경우가 종종 있어왔다(Jung, J.K., unpublished observation). 또 두 종에 대해 보고된 성페로몬 조성들(Cho *et al.*, 2007; Yum, 2010)을 이용하여 야외에서 성충을 포획하고 파악기의 형태적 특징만으로 구별할 때, 한 종의 성페로몬 트랩에 두 종이 한꺼번에 포획되는 현상이 발견되어 (Jung, J.K., unpublished observation) 형태적 특징 하나만을 이용한 종 동정에 불완전성을 보였다.

따라서 형태 동정의 오류를 극복하고자, 미토콘드리아 시토크롬 옥시다제(mtCOI) DNA 영역의 염기서열을 판독하고 PCR-RFLP 방법으로 두 종이 유전자 수준에서 차이를 보이는 것을 뚜렷하게 밝혀 두 종을 구분할 수 있는 분자판별 도구를 마련하였다(Heo *et al.*, 2009). 그러나 그 보고에서 mtCOI DNA 염기서열 판독에 오류가 발견되었는데, 본 연구에서는 그 오류를 수정하고, 정확한 염기서열에 근거하여 두 종 mtCOI DNA 주형과 프라이머 3' 말단 염기서열 차이(mismatch)에 따른 PCR 반응 효과를 이용한 간단한 PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primer) 방법(Kwok *et al.*, 1990; Steffensen *et al.*, 2000)으로 대량의 샘플을 빠르게 동정할 수 있는 분자표지를 개발하여 보고한다.

재료 및 방법

미토콘드리아 시토크롬 옥시다제(mtCOI) DNA 부분영역 염기서열 해독

팔나방은 2004년 경기도 수원시 팔포장에서, 어리팔나방은 2008년 전라남도 무안군 콩포장에서 채집되어 실내에서 누대 사육되었다. 각 종의 수컷 성충으로부터 G-spin™ Genomic

DNA Extraction Kit (For Cell/Tissue) (iNtRON Biotechnology, Inc)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 순수하게 게놈 DNA를 추출하였다. mtCOI DNA 영역 부분 염기서열 해독을 위해 각각의 게놈 DNA를 주형으로 보존형 PCR 프라이머인, C1-J-1751과 C1-N-2191 (Table 1) (Simon *et al.*, 1994)를 이용하여 PCR 반응을 시켰다. PCR 반응은 AccuPower PCR PreMix ((주) 바이오니아) 튜브에 게놈 DNA 주형 1 µl, 두 종의 프라이머 각각 10 pmol 1 µl씩 넣고 고압 멸균된 3차 증류수를 17 µl를 넣어 최종 20 µl를 만들고 잘 섞어 Heo *et al.*(2009)의 반응 시간 조건을 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 1x TAE 버퍼와 1% 아가로스겔(SeaKem LE Agarose, Lonza)을 이용하여 100V로 30분간 전기영동 시켜 약 500 bp 사이즈의 단일밴드를 확인하였다. 단일밴드는 다시 1% 아가로스겔로부터 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)를 이용하여 순수하게 회수하였다. 순수 분리된 PCR 산물을 주형으로 (주)마크로젠(서울)에 의뢰하여 팔나방과 어리팔나방의 mtCOI DNA 영역 부분 염기서열 439 bp를 해독하였으며 각각의 염기서열을 GenBank에 등록하였다(어리팔나방: JN119566.1, 팔나방: JN119567.1).

종 특이 PCR 프라이머 제작

MegAlign (DNASTar, USA) 프로그램을 이용하여 팔나방과 어리팔나방의 mtCOI 439 bp를 앞말이나방과(Tortricidae)의 코드링나방(*Cydia pomonella*), 복숭아순나방붙이(*Grapholita dimorpha*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*)과 밤나방과(Noctuidae)의 멸강나방(*Mythimna separata*), 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)의 같은 영역의 염기서열과 함께 Clustal W방법으로 나열하고 비교하였다(Fig. 1). 이 비교에서 다른 나방들과 다르면서 팔나방과 어리팔나방 사이에만 특이적으로 차이가 나는 뉴클레오티드를 찾았다. 해당부분을 forward 프라이머의 3' 말단 염기로 하여 Gene Runner 3.01 프로그램(by Spruyt and Buquicchio)을 이용하여 PCR 프라이머

조합을 검색하였다. 3' 말단 염기가 팔나방과 어리팔나방에서 모두 일치하지만 다른 나방 종과는 차이가 나는 곳을 찾아 reverse 프라이머를 설계하였다. 따라서 팔나방과 어리팔나방 종 특이적 forward 프라이머 각각 1개 (P-SF2, F-SF3)와 reverse 프라이머 1개 (C-SR3)로 구성된 염기서열 특이 PCR 프라이머 세트(PCR-sequence specific primer, PCR-SSP) (Table 1)를 (주)마크로젠에 의뢰하여 합성하였다.

종 판별을 위한 PCR 반응 및 전기영동

본 연구에서 설계한 종 특이 PCR 프라이머 세트(P-SF2, F-SF3, C-SR3)를 이용하여 팔나방과 어리팔나방 판별 가능성을 확인하기 위해 팔나방과 어리팔나방의 수컷 성충 머리와 가슴부위로부터 순수하게 추출된 게놈 DNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. 그리고 동일 프라이머 세트를 이용하여 멸균 나방과 왕담배나방의 게놈 DNA를 주형으로 PCR 반응을 하여 예상대로 팔나방과 어리팔나방에서만 특이적으로 작동하는지 확인하였다. 또한 실제로 수원의 야외포장에서 팔나방과 어리

팔나방 성페로몬트랩에 포획된 수컷 성충의 종 판별 가능성을 검토하였다. PCR 반응은 게놈 DNA 1 μ l, 두 종류의 PCR 프라이머(10 pmol) 각각 1 μ l씩 총 3 μ l와 고압멸균 3차 증류수 16 μ l를 AccuPower PCR PreMix ((주) 바이오니아) 튜브에 첨가하고 잘 섞어준 후 MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler (BIO-RAD)를 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 95°C 5분간 반응시킨 후 95°C 30초(denaturation), 46.2°C 30초(Primer annealing), 72°C 30초(Primer extension) 순서로 34회 반복하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 결과를 확인하기 위해 1% 아가로스젤(SeaKem LE Agarose, Lonza)을 준비하고 PCR 산물을 2 μ l씩 로딩하여 1x TAE 버퍼에서 100 V로 30분간 전기영동 시켰다.

결과 및 고찰

mtCOI DNA 부분영역 염기서열 비교

팔나방과 어리팔나방 mtCOI 439 bp의 염기서열을 비교한

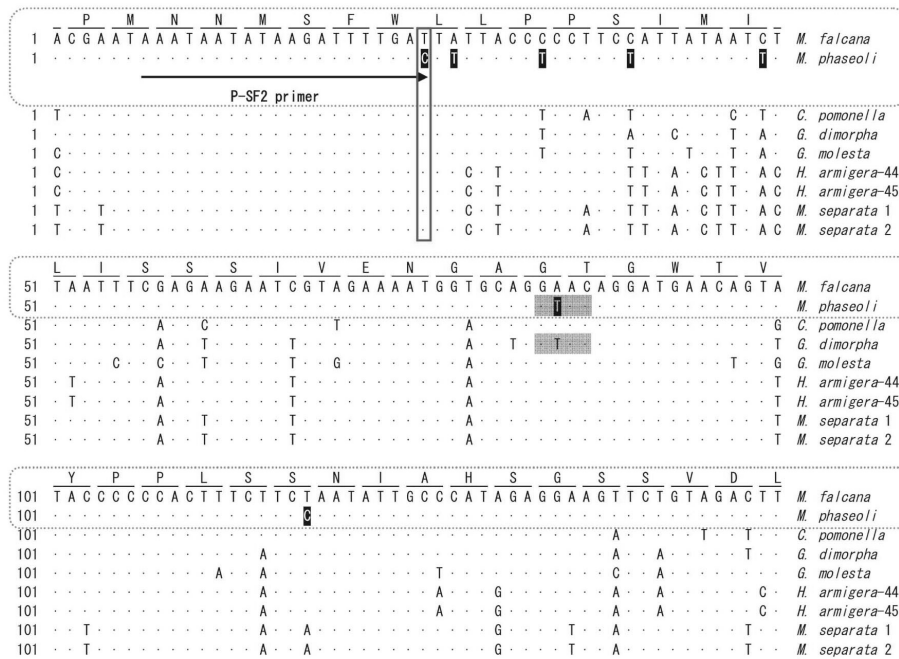


Fig. 1. Alignment of mtCOI DNA sequence (439 bp) of seven different lepidopteran species (five from Tortricidae and two from Noctuidae) and deduced amino acid sequence for *M. falcana* and *M. phaseoli* (dotted line box). A sequence specific PCR primer set (P-SF2, F-SF3, and C-SR3) to distinguish *M. falcana* from *M. phaseoli* is shown by arrow lines (5' to 3' direction) below each target template sequence. Red boxes show one different nucleotide in 3' terminal of primers to specifically identify *M. falcana* and *M. phaseoli*. Nucleotides with black background indicate different sequences between *M. falcana* and *M. phaseoli*. A dot (-) shows identity with sequence of *M. falcana*. Gray box indicates a cleavage site (GTAC) by the restriction enzyme, *RsaI* (Heo *et al.*, 2009).

* GenBank accession number: *C. pomonella* (*Cydia pomonella*; FJ217764.2), *G. dimorpha* (*Grapholita dimorpha*; JQ404437.2), *G. molesta* (*Grapholita molesta*; FJ217775.2), *H. armigera-44, 45* (*Helicoverpa armigera*; Seo, B.Y. *et al.*, unpublished observation), *M. separata-1, 2* (*Mythimna separata*; Seo, B.Y. *et al.*, unpublished observation)

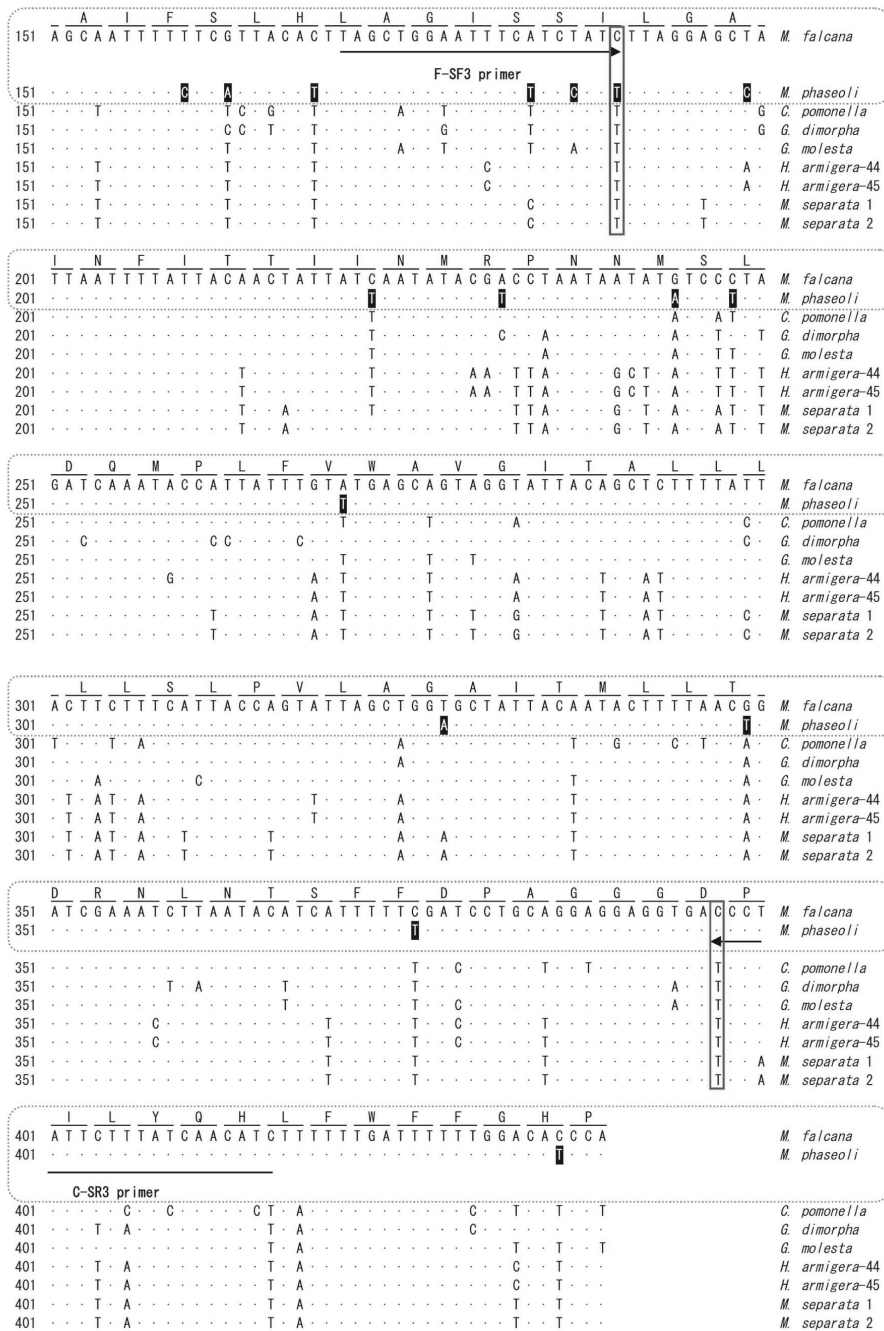


Fig. 1. Continued

결과, 23개의 단일 뉴클레오티드에서 차이가 관찰되었으며 그 중 22개는 코돈(codon)의 세 번째 염기가, 나머지 1개는 첫 번째 염기가 치환되었으나 해당 DNA 염기서열로부터 도출된 아미노산 서열은 두 나방 사이에 100% 일치하였다(Fig. 1). 또한 Heo *et al.*(2009)이 보고한 바와 달리 서로 결실된 뉴클레오티드가 없어 두 나방 사이 해당 유전자의 크기 변이는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 팔나방과 어리팔나방의 종 구분을 위해 Heo *et*

al.(2009)에 의해 보고된 PCR-RFLP 방법에서 제한효소 *RsaI*의 절단영역인 GTAC(Fig. 1, 회색 박스) 염기서열은 팔나방과 복숭아순나방붙이에서 확인되었다. 따라서 종 특이성을 높이기 위해 보존형 PCR 프라이머 보다는 종 특이 프라이머를 통한 PCR 산물에 제한효소를 처리하는 방법이 근연종 판별을 위해 더욱 정확성을 높일 수 있을 것으로 판단되었다.

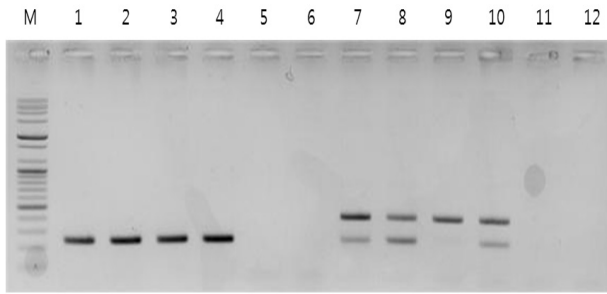


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis (1%) of DNA fragment after PCR amplification with the sequence specific primer set (P-SF2, F-SF3, and C-SR3) from the individual genomic DNA of *M. falcana* (lane 1-4), *M. phaseoli* (lane 7-10), *Mythimna separata* (lane 6 and 12), and *Helicoverpa armigera* (lane 5 and 11)
* M indicates a 100 bp ladder plus molecular size marker (Bioneer)

팔나방과 어리팔나방 판별 PCR-SSP

본 연구에서 설계한 종 특이 PCR 프라이머 세트(P-SF2, F-SF3, C-SR3)를 이용하여 팔나방과 어리팔나방의 게놈 DNA를 주형으로 PCR 반응을 시킨 결과 예상대로 어리팔나방에서 245 bp 사이즈의 단일 증폭산물이 특이적으로 나타났다(Fig. 2). 그런데 팔나방의 경우, 예상했던 409 bp의 단일 증폭산물은 4개체의 팔나방 게놈 DNA로부터 모두 나타났으나, 어리팔나방에서 나왔던 245 bp의 단일 증폭산물은 3개체에서 409 bp 밴드보다 약하거나 동일한 수준으로 함께 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 팔나방 특이 forward 프라이머인 P-SF2가 어리팔나방 게놈 DNA 주형에는 분명하게 작동되지 않았지만, 어리팔나방의 특이 forward 프라이머인 F-SF3가 팔나방 게놈 DNA 주형에서는 어느 정도 작동될 수 있음을 보여주었다. 이는 Kwok *et al.*(1990)의 결과와 고찰에서처럼 같은 DNA 주형이라도 프라이머 3' 말단 염기와 DNA 주형의 염기 종류 조합 차이와 dNTP 농도와 DNA polymerase의 5'→3' exonuclease 활성, 프라이머 annealing 온도 등 반응성분 및 조건 등에 따라 상대적 PCR 증폭 효율이 다를 수 있기 때문으로 추정된다. 그러나 왕담배나방과 멸강나방 게놈 DNA에서는 예상대로 증폭산물이 나오지 않았으며 팔나방과 어리팔나방의 PCR 증폭산물의 밴드 패턴을 통해서 두 종을 구별하는 데 어려움은 없을 것으로 판단된다(Fig. 2). 다만, 현재까지 무안에서 채집된 어리팔나방과 수원에서 채집된 팔나방 집단의 mtCOI DNA 염기서열(439 bp)에서는 개체변이가 관찰되지 않았고 이를 토대로 제작한 종 특이 프라이머 세트를 이용하여 종 판별이 가능하였으나, 만일 해당 프라이머 영역의 3' 말단 염기에서 개체변이가 있을 경우 본 연구에서 개발된 프라이머 세트가 오류를 범할 수 있어 추가로 보완된 마커개발이 필요할 것으로 사료된다.

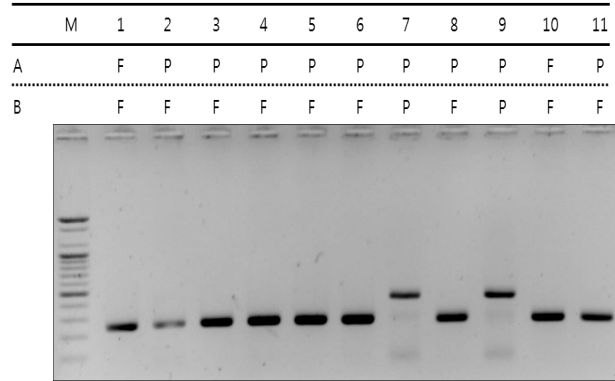


Fig. 3. Example of species identification with the sequence specific PCR primer set (P-SF2, F-SF3, and C-SR3) between *M. falcana* male (F) and *M. phaseoli* male (P) captured by respective sex pheromone traps in the field.

A: Target species of sex pheromone trap

B: Species identification based on the result of PCR-SSP

* M indicates a 100 bp ladder molecular size marker (Bioneer)

한편, 실제 야외에서 발생하는 팔나방과 어리팔나방 샘플에서도 종 특이 PCR 프라이머 세트가 잘 작동하는지 확인하기 위하여 수원지역에 설치된 팔나방(Yum, 2010)과 어리팔나방(Cho *et al.*, 2007) 성페로몬 트랩에서 포획된 팔나방과 어리팔나방 수컷의 게놈 DNA를 주형으로 본 연구에서 제작한 종 특이 PCR 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 시킨 결과, 팔나방과 어리팔나방을 분명하게 구별할 수 있도록 245 bp와 409 bp의 단일 증폭밴드가 나왔다(Fig. 3). 또한 팔나방 성페로몬 트랩에 어리팔나방 수컷 성충들이 포획된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 팔나방과 어리팔나방은 형태적으로 구별하기 어렵고 야외포장의 성페로몬트랩에 두 종이 한꺼번에 포획되기 때문에(Yum, 2010; Jung, J.K. *et al.*, unpublished observation) 본 연구에서 제작된 PCR 프라이머 세트가 팔나방과 어리팔나방을 구분하여 각 종의 피해 및 발생생태를 연구하는데 매우 유용하게 사용될 것으로 기대한다.

사사

근연종의 미토콘드리아 유전자 염기서열에 관해 귀중한 조언을 해 준 국립농업과학원의 박해철 박사과 한태만 씨에게 감사드립니다. 본 연구는 농촌진흥청 기관고유사업(과제번호: PJ008692)의 지원으로 수행한 결과입니다.

Literature Cited

Byun, B.-K., Park, K.-T., Park, Y.-M., 2005. Review of Genus *Matsumuraeses* Issiki (Lepidoptera, Tortricidae) with discovery of

-
- M. falcana* (Walsingham) in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 8, 117-122.
- Cho, J.R., Choi, K.S., Jung, J.K., Park, J.H., Seo, B.Y., 2007. Development of sex pheromone trap for monitoring *Matsumuraeses falcana* (Walshingham) (Lepidoptera: Tortricidae). J. Asia-Pacific Entomol. 10, 345-349.
- Heo, H.J., Son, Y.R., Seo, B.Y., Jung, J.K., Kim, Y.G., 2009. A molecular marker discriminating the soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* and the podborer, *M. falcana* (Lepidoptera: Tortricidae). Korean J. Appl. Entomol. 48, 547-551.
- Jung, J.K., Seo, B.Y., Cho, J.-R., Kwon, Y.-H., Kim, G.-H., 2009. Occurrence of lepidopteran insect pests and injury aspects in adzuki bean fields. Korean J. Appl. Entomol. 48, 29-35.
- Kwok, S., Kellogg, D.E., McKinney, N., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res. 18, 999-1005.
- Park, K.T., Hwang, C.Y., Choi, K.M., 1978. Lepidopterous insect pests on soybean. Kor. J. Pl. Prot. 17, 1-5.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 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.
- Steffensen, R., Thiel, S., Varming, K., Jersild, C., Jensenius, J.C., 2000. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. J. Immunol. Methods 241, 33-42.
- Yum, K.H., 2010. Identification of sex pheromone of the soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* Matsumura (Lepidoptera: Tortricidae), MS Thesis, Chungnam National University, Daejeon.