

환경조절열처리 기술을 이용한 뱃나무응애(*Tetranychus viennensis*) 살비 효과

손예림 · 이종호¹ · 김용균*

안동대학교 생명자원과학과, ¹농림수산검역검사본부 식물검역부

Control Efficacy of Controlled Atmosphere and Temperature Treatment System Against the Hawthorn Spider Mite, *Tetranychus viennensis*

Son, Yerim, Jongho Lee¹ and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

¹Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, National Plant Quarantine Service, Anyang 430-757, Korea

ABSTRACT: The hawthorn spider mite, *Tetranychus viennensis*, is a pest of apples and a quarantine pest from some countries that import apples from Korea. A controlled atmosphere and temperature treatment system (CATTS) was developed as an alternative disinfestation method to methyl bromide fumigation treatment, and has been applied to control various insects and other arthropod pests on fruits. We applied CATTS to disinfect *T. viennensis* under conditions that were previously developed to control the peach fruit moth, *Carposina sasakii*. First, *T. viennensis* was sampled from Japanese apricot, *Prunus mume*, and identified by its morphological characters. In addition, both cytochrome oxidase I (COI) and internal transcribed spacer (ITS) sequences supported the morphological identification. Second, the heat-tolerant developmental stage was determined in *T. viennensis*. When a 46°C heat treatment was applied to egg, nymph, and adult stages of *T. viennensis*, adults were the most tolerant stage. Third, when heat temperature was used along with 1% O₂ and 15% CO₂, the mites showed a significant increase in susceptibility to the heat treatment. Finally, CATTS at 46°C with 15% CO₂ and 1% O₂ for 30 min resulted in 100% mortality of all *T. viennensis* development stages. These results indicated that CATTS is applicable to disinfest *T. viennensis* in post-harvest apples.

Key words: *Tetranychus viennensis*, CATTS, quarantine, COI, ITS

초 록: 뱃나무응애(*Tetranychus viennensis*)는 사과 해충으로 수출시 일부 국가에서 주요 검역 대상 해충으로 알려져 있다. 환경조절열처리(controlled atmosphere temperature treatment system: CATTS)는 메틸브로마이드 훈증 처리의 대체 기술로서 과실류를 가해하는 다양한 곤충 및 기타 절지동물 해충류를 소독하는 기술로서 개발되었다. 본 연구는 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*)을 방제하기 위해 개발된 CATTS 조건을 뱃나무응애에 적용하였다. 먼저, 매실나무에서 뱃나무응애를 채집하였고, 이를 형태적 특징으로 동정하였다. Cytochrome oxidase I (COI) 과 internal transcribed spacer (ITS) 영역들의 염기서열은 형태적 동정 결과를 뒷받침하였다. 둘째로, 뱃나무응애의 열처리에 대해 가장 높은 내성을 보이는 발육시기를 결정했다. 알, 약충과 성충을 46°C에서 열처리를 하였을 때 성충에서 가장 높은 내성을 보였다. 셋째, 고온과 변경된 공기 조건(1% 산소와 15%의 이산화탄소)을 결합하여 처리하였을 때 응애의 고온에 대한 감수성이 현격하게 증가하였다. 끝으로 CATTS 조건인 46°C에서 15%의 이산화탄소 농도와 1%의 산소 농도에서 30분 처리는 뱃나무응애의 모든 발육태에서 100%의 살비 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 수확된 사과에 존재하는 뱃나무응애를 사멸하는 데 CATTS 소독 처리 기술을 적용할 수 있다는 것을 제시하였다.

검색어: 뱃나무응애, 환경조절열처리(CATTS), 검역, COI, ITS

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received January 26 2012; Revised April 3 2012

Accepted April 19 2012

뱃나무응애(*Tetranychus viennensis*)는 아시아, 유럽, 러시아 등의 유라시아 지역에 분포하나, 미국을 포함한 북미 대륙에는 서식하지 않아서 이들 지역의 주요 검역 대상 해충이다(USDA, 1982; Bolland *et al.*, 1998). 이 해충은 거미강, 응애목에 속하며

식식성으로 자두나무, 복숭아나무, 앵두나무, 뱃나무 및 사과나무 등의 과실류에 피해를 주고 있다(Gotoh, 1986). 우리나라에서는 1960년대까지는 과수에 널리 분포하였으나, 1990년대에는 야생 뱃나무와 자두나무에서 발생이 있었으나 사과와 복숭아 과일에서는 발생이 없거나 매우 낮은 밀도로 관찰되었다(Choi *et al.*, 1997). 반면에 최근 매실의 해충 조사에서 뱃나무응애는 주요 해충들 가운데 하나로 보고되었다(Lee and Chung, 2011). 비록 최근 국내 사과원에서 뱃나무응애의 발생은 보고되지 않았지만, 이들의 사과 생산에 끼치는 영향은 가능하며, 사과 품종에 따른 발생패턴 다양성도 있는 것으로 보고되고 있다(Kasap, 2003). 따라서 우리나라 사과를 미국으로 수출할 경우 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*)과 복숭아명나방(*Conogethes punctiferalis*)과 더불어 뱃나무응애는 검역 대상 해충으로 주목받고 있다.

수확 후 작물의 소독기술은 크게 화학적 및 물리적 처리법으로 대별된다(Paull and Armstrong, 1994; Sharp and Hallman, 1994). 화학적 처리법은 메틸브로마이드나 포스핀과 같은 화학물질을 이용하는 훈증 처리로서 작물의 심부층까지 침투하여 방제 효과를 나타내게 된다. 또한 수확물 표면에 정착하는 해충을 제거하는 비누화 물질 또는 화학농약 처리도 포함된다. 반면에 물리적 처리법은 온도(고온, 저온)처리, 환경조절처리, 방사선처리 및 이들의 혼합처리를 포함한다. 온도처리는 해충의 온도에 대한 생존 한계 범위를 이용한 방제 기술이고, 환경조절열 처리는 높은 농도의 이산화탄소와 낮은 농도의 산소를 결부한 온도 처리를 의미한다(Carpenter and Potter, 1994; Neven and Drake, 2000). 방사선 조사는 해충의 DNA의 화학결합을 붕괴 시킴으로 소독효과를 발휘하게 한다. 기타 물리적 처리법으로는 오존처리(Hollingsworth and Armstrong, 2005; Kells *et al.*, 2001), 마이크로파처리(Ikedia *et al.*, 1999), 라디오주파 열처리(Nelson, 1996; Tang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002), 고압산소처리(Butz and Tauscher, 1995) 및 진공처리(Liu, 2003)를 포함하게 된다.

물리적 처리기술 가운데 환경조절열처리는 일명 CATTS (controlled atmosphere temperature treatment system)로 불리는데, 높은 농도의 이산화탄소와 낮은 농도의 산소 환경 조건에서 특정 해충의 생존 한계에 해당하는 고온을 처리하여 방제 효과를 극대화하는 기술이다(Neven and Mitcham, 1996). CATTS 기술에 의해 수확 후 소독 처리가 입증된 해충은 코드린나방(*Cydia pomonella*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 자두바구미(*Conotrachelus nemuphar*) 및 과실파리류(*Rhagoletis indifferens*) 등을 포함한다(Neven *et al.*, 2006; Neven and Rehfield-Ray, 2006a,b). 또한 대상 작물체로서 사과, 배, 복숭아, 망고 및 체리가 CATTS 처리에 약해를 보이지 않아, 안전하게 본 기술이 적

용될 수 있다(Yahia, 2000; Neven, 2005; Obenland *et al.*, 2005; Neven and Rehfield-Ray, 2006a,b; Neven *et al.*, 2006). 국내에서는 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*)과 거짓쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)에 대해서 CATTS 처리 기술이 개발되었다(Son *et al.*, 2010a,b).

현재 대미 사과 수출을 위한 이들 검역 대상 해충의 소독 처리는 메틸브로마이드 훈증 처리로서 과육온도 1.1℃에서 40일 간 저온저장 후 상압훈증창고 또는 천막훈증처리 시설에서 이 훈증제를 처리하게 된다(농림수산검역검사본부 고시 제2011-84호). 이 훈증제 처리는 약해와 환경오염의 이유로 사용이 제한되어 지고 있다(FAO, 1983). 본 연구는 사과 과실 내부에 가해하는 복숭아심식나방을 사멸시키기 위해 개발된 CATTS 기술이 뱃나무응애에도 적용될 수 있는지를 알아보기 위해 수행되었다. 이를 위해 먼저 뱃나무응애의 채집과 동정이 필요했다. 또한 열 처리에 대한 가장 내성인 발육시기를 결정하였다. 이러한 결과 바탕 위에 이 해충에 대한 CATTS 소독 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

공시충 채집

뱃나무응애는 2011년 7월부터 10월 중순까지 경상북도 안동시 야생 매실나무에서 채집하였다. 채집된 뱃나무응애는 매실 잎을 이용하여 25±1℃, 16:8 (L:D) h 조건에서 사육하였다.

종 동정 분석법

종 동정을 위해 각각의 응애 개체를 Hoyer's medium (gum arabic 30 g, glycerol 16 ml, chloral hydrate 200 g, distilled water 50 ml)을 이용하여 봉입하였다. 소량(1-5 µl)의 Hoyer's medium 과 곤충 해부용 핀을 이용하여 슬라이드글라스 위에 고정하여 커버글라스로 덮었다. 제작된 응애 표본은 60℃의 건조기에서 약 1 주일간 건조 후 광학현미경으로 Ehara (1999)의 형태검색표를 이용하여 종 동정하였다.

열처리에 따른 뱃나무응애의 생물검정

각 시험구는 페트리디쉬(100 × 40 mm)로서 10 ml의 물과 그 위에 솜을 올리고, 직경 5 cm 원형의 매실 잎에 뱃나무응애 개체를 올려놓았다. 각 시험구는 30 마리의 뱃나무응애로 처리하였으며, 각 처리는 3 반복으로 수행되었다. 발육시기별 열처리에 대한 감수성 차이는 46℃의 항온수조에서 15 분간 처리하여 조

사하였다. 이 열처리에 산소/이산화탄소 농도조절 효과 시험은 이산화탄소 15% 및 산소 1% 조건에서 46°C 열처리를 15 분간 실시하였다. 처리 후 모든 시험구는 25°C 로 옮겨졌으며 24 시간 이 경과한 후 생존수를 조사하였다. 단, 알은 처리 후 7일 이내에 부화되는 개체수로 처리 효과를 분석했다.

CATTS 처리 기기 제작 및 작동

온도와 이산화탄소 농도가 컴퓨터 프로그램(LabView, National Instruments, Austin, Texas, USA)으로 제어되는 연구용 CATTS 기기(189.7 L)가 구축되었다(Son *et al.*, 2010a). 본체는 이산화탄소 인큐베이터(Water-jacketed incubator, Forma Scientific, Canada, USA)를 개조하였고, 이산화탄소, 질소 및 산소의 세 종류 가스가 파일롯트식 two way 고압용 솔레노이드 밸브형의 가스 조절기(VPW214, 두진밸브, Seoul, Korea)로 본체에 연결시켰다. 온도는 15°C 상승시키는 데 1 시간이 소요되도록 설정되었다. 온도의 순환을 돕기 위해 기기 상부와 하부에 팬(1.07 m³/min, Hakko 493, Hakko, Osaka, Japan)을 부착하였다. 이산화탄소 15%와 산소 1%의 농도를 유지하도록 이산화탄소 센서(KCD-HP300X, Korea Digital, Seoul, Korea)와 산소 센서(Model #SS1118, SNKO, Seoul, Korea)를 자동 제어장치에 연결했다.

CATTS 처리 방법

매 처리 전 10 분 동안 감압을 하였고, 약 10 분 동안 질소를 투입하여 CATTS 기기 내 산소 농도를 1%로 낮추었다. 이후 이산화탄소 밸브를 열고 자동으로 농도가 15%에 이르도록 설정하였다. 설정 온도(25°C)에서 인큐베이터 목표 온도(46°C)까지 60 분 동안 온도를 증가시켰고, 이후 이산화탄소 15%, 산소 1%와 매실 잎의 온도가 44°C에 맞춰질 때를 기점으로 0, 15, 30 및 60 분간 처리하였다. 시험구별 처리 개체수 및 생존수 확인은 앞에서 기술한 방법대로 조사하였다.

빛나무응애 DNA 추출

공시충의 genomic DNA 추출은 페놀/클로로포름 추출 방법(Mainali *et al.*, 2008)을 이용하였다. 빛나무응애 200 마리를 200 µl의 균질용 완충용액(0.32 M sucrose, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris, pH 7.3)에서 마쇄기로 조직을 파괴시켰고, 5,000 x g에서 5 분간 원심분리 후 상층액을 얻었다. 이 상층액에 200 µl의 세포 용해 완충용액(75 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.8)을 첨가했다. 이후 10 µl의 20% SDS와 0.5 µL의 pro-

teinase K (20 mg/ml)를 첨가 후 60°C에서 30 분간 반응시켰다. 페놀, 클로로포름과 이소아밀알코올이 25:24:1 (v/v)의 비율로 섞인 페놀용액을 500 µl를 첨가 후 12,500 x g에서 10분간 원심 분리하였다. 이후 얻어진 상층액에 같은 부피의 혼합된 유기용매(클로로포름, 이소아밀알코올(24:1, v/v))을 첨가 후 12,500 x g에서 10분간 원심분리 후 다시 상층액을 얻었다. 이 상층액을 에탄올 침강법으로 DNA를 추출하고 탈이온 증류수를 이용하여 약 100 pg/µl로 희석하여 PCR에 이용하였다.

핵 및 미토콘드리아 DNA 영역 PCR

미토콘드리아 DNA (mtDNA) 가운데 cytochrome oxidase I (COI) 영역은 Navajas *et al.* (1994)이 제시한 프라이머를 이용하였다. 이때 사용된 정반응 프라이머 서열은 5'-TGATTTTTT GGTCACCCAGAAG-3'이고, 역반응 프라이머 서열은 5'-TA CAGCTCCTATAGATAAAAC-3'이다. 또한 internal transcribed space (ITS) 영역은 Vrain *et al.* (1992)이 제시한 프라이머를 이용하였다. 이때 사용된 정반응 프라이머 서열은 5'-TTGATT AGCTCCCTGCCCTTT-3'이고, 역반응 프라이머 서열은 5'-T TGATTAGCTCCCTGCCCTTT-3'이다. 각 PCR 시료의 구성은 다음과 같았다. DNA 추출액 1 µl, dNTP 2.5 µl, 10x PCR 완충용액 2.5 µl, primer 각각 1 µl (25 pmol/µl), i-Taq polymerase 0.5 µl, 3차 증류수 16.5 µl로 구성되었다. 프라이머는 바이오니어 (Bioneer, Daejeon, Korea)으로부터 제작 하였고, Taq polymerase는 인트론(Intron, Daejeon, Korea)으로부터 구입하였다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 3 분간 불활성단계를 거친 후, 35 반복으로 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 1 분간 변성단계와 프라이머 결합 반응은 COI 영역이 51°C, ITS 영역이 46°C에서 1 분, 72°C에서 1 분의 사슬연장 단계로 구성되었다. 이후 최종 사슬연장 단계가 추가로 72°C에서 10 분간 이뤄졌다. PCR 생성물은 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1% 아가로즈젤로 확인하였다.

COI과 ITS 영역 염기서열 분석

COI과 ITS 영역의 PCR 증폭물은 PCRquick-spin (Intron)을 이용하여 프라이머를 제거시켰고, TA 벡터(pGEM T-Easy, Promega, Madison, USA)에 재조합시켰다. 염기서열 분석은 양방향으로 (주)마크로젠(Macrogen, Seoul, Korea)에서 Sanger 방법으로 실시하였다. 얻어진 염기서열은 DNASTAR 프로그램 (Version 5.01, DNASTAR Inc., Madison, USA)을 이용하여 단일 염기서열로 정리하였고, 유사종과 근연관계를 알아내기 위해

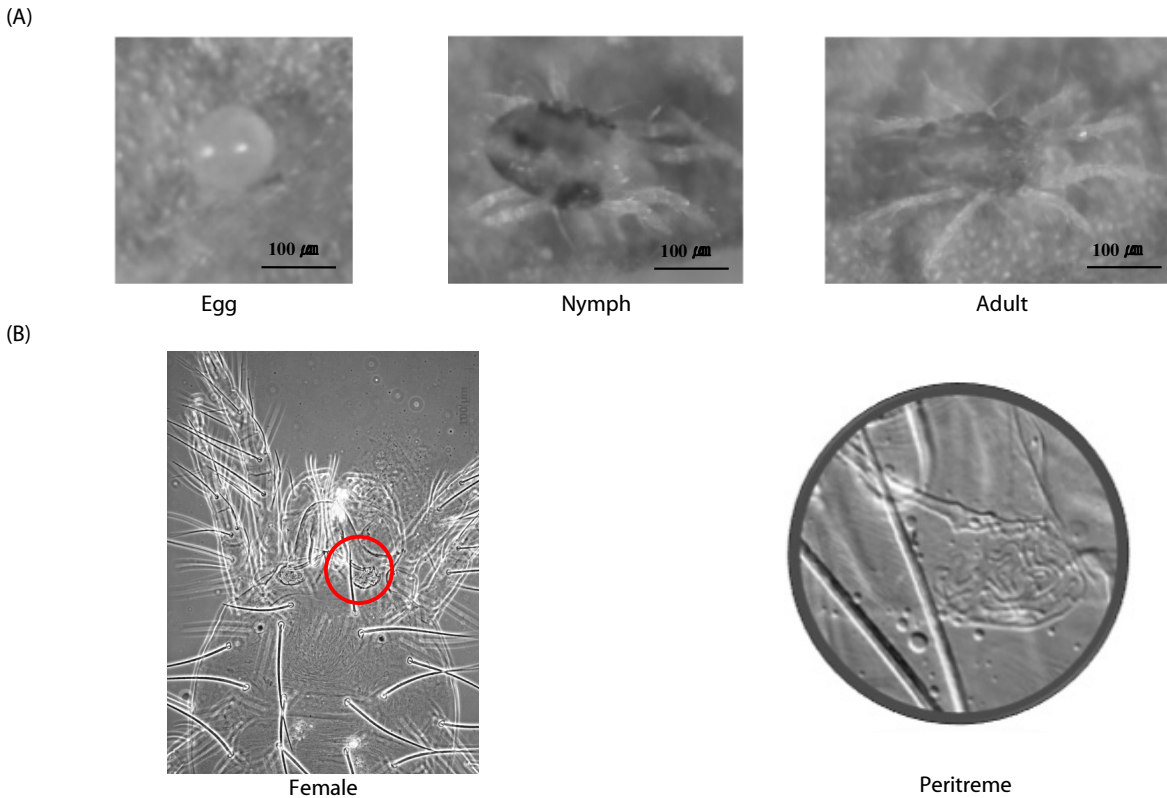


Fig. 1. Morphological characters of a mite sample collected from Japanese apricot, *Prunus mume*. (A) Different developmental stages. Scale bar represents 100 µm. (B) Head and thorax area of a sample female mite. Small circle indicates peritreme at 50x magnification. Large circle shows a distally anastomosed peritreme at 200x magnification.

NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast 프로그램을 이용하였다.

통계분석

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 반수치사시간(median lethal time: LT_{50})은 probit 분석법(Raymond, 1985)을 이용하여 산출하였다.

결과

벚나무응애의 형태적 및 분자생물학적 종 동정

경상북도 안동지역에 자생하는 매실나무 잎 뒷면에 서식하는 응애를 채집하였다. 먼저 이 응애의 종 동정을 위해 형태적 특징을 분석하였다(Fig. 1). 알은 여러 응애와 유사하게 구형 모습이고, 약충은 암적색이고 성충 붉은 색으로 점박이응애 및 사과응애와 구별되었다(Fig. 1A). 벚나무응애의 종 특이적 형태 형

Table 1. Morphological characters to diagnose the mite isolate

Characters	<i>Tetranychus viennensis</i> ¹	Isolate
Host	Japanese apricot, cherry, apple	Japanese apricot
Body color		
Egg	Pale yellow	Pale yellow
Nymph	Pale yellow	Pale yellow
Adult	Red, pale red	Red, pale red
Body size (mm)		
Egg	0.07 - 0.1 mm	0.10 ± 0.01 mm
Nymph	0.2 - 0.3 mm	0.25 ± 0.05 mm
Adult	0.4 - 0.5 mm	0.44 ± 0.05 mm
Diagnostic organs		
Peritreme	Anastomosing distally	Anastomosing distally
Aedeagus	Slender distal portion Proximal projection	Slender distal portion Proximal projection

¹ Morphological characters of Ehara (1999).

질인 두부 근처의 기문 기관 말단이 함류된 모습을 보였다(Fig. 1B). 이러한 기주 및 형태적 특징은 채집된 응애가 벚나무응애와 동일하다는 것을 나타냈다(Table 1).

형태적 종 동정의 결과를 뒷받침하기 위해 핵과 미토콘드리아의 DNA 영역에서 종 특이적 서열을 담고 있는 ITS와 COI 영

역의 염기서열을 분석했다(Fig. 2). 분석된 COI 염기서열은 453 개이고 GenBank에 검색한 결과 다른 생명체의 COI 영역과 높

(A)

```
TGATTTTTTG GTCACCCAGA AGTATATATT TTAATTTTAC CAGGATTTGG TATAGTATCT 60
CATGTTATTA GCTATAAATTT AGGGAAGAAA GAAGTTTTTTG GTAAAATTGG AATAATATTT 120
GCTATAATAT CCATTGGATT ATTAGGATTT GTAGTTTGAG CACATCATAT ATTTACTGTA 180
GGAATAGATG TAGATACTCG AGCATATTTT ACTGCCGCTA CTATAATTAT TGCCATTCCA 240
ACAGGAATCA AAATTTTTAG ATGATTTACT ACTATTATTA ATTCTCATAT TAATTTTAAT 300
ATTTTCATTTT TTTGAGCTTT AGGATTTTTA ATTATGTTTT CTATTGGAGG ATTTACAGGA 360
ATTGTAGCCT CTAACATCATG TTTAGATATT AATTTACATG ATACATATTA TATCGTAGCT 420
CATTTTCATT ACGTTTTTATC TATAGGAGCT GTA 453
```

Accession #	Genes	Species	Blast results of sample sequences		
			Max Identity (%)	Max Score	E-value
GQ141910	COI	<i>Tetranychus viennensis</i>	99	832	0.0
X80861	COI	<i>Tetranychus viennensis</i>	96	639	2e-177
GQ141913	COI	<i>Tetranychus turkestanii</i>	90	593	3e-166
GQ141911	COI	<i>Tetranychus kanzawai</i>	90	582	6e-163
DQ017588	COI	<i>Tetranychus urticae</i>	90	577	3e-161

(B)

```
TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCTGTCGCT ACTACCGATT GAATGGCTTA 60
GTGAGCCCTT GGGATTGGCG CCCGGAAGCT GGCAACAGCA TCTGGATGCC GAAAACCTGT 120
GCAAACCTGG TCATTTAGAG GAAGTAAAAG TCATAACAAG GTTCTGTAG GTGAACCTGC 180
AGAAGGATCA TTAGGGAATT ATAAAACCGG CTTGCCCTC TCGAGGGTGC TCGCCGTAAT 240
TTCTATCCAC AAAACACCGT GAACCCTCGA AAGAGGCGTA ATTTTTTTTC TATAAAAACA 300
CAAAGTCTAT GAAAGTAACA AAACATAAAA AACAAAATAA AACTTTTGAC AACGGATCTC 360
TTGGTTCTCC CATCGATGAA GAACGCAGCG AAACGCGATA GGTATTGTGA ATTGCAGAAT 420
CAGGGAATCA TCGAATTTTT GAACGCACCT TGCGCTCCCT GGTATTCCCTA GGAGCATGCC 480
TGTTTTGAGTG TTGATAGCCT CTCCAAACCT TGGTTTTTTT ATTAAATCAA GTGCTTTGGG 540
TCCCTGGGCC TGTAGCGGCG ACGTTACTTG CCTTAAACA CGCAGCTAGC TACGATAATC 600
GGTGCGAATT GCAGGACACG CCGAGCACTT GAGCTTCTAA CGCACATTGC GGCTTTCGGG 660
TCTTTTCCGA GGTCACACCT GTCTGAGAGT TGACAAGTAA AATAAATAAG CAAAACAATT 720
GCTCTTGCTA GTCAAGGCAA TGTTTTGAGT TGGTGTAATG CTAACCTGAT GTTTTATTCC 780
TTTTCTTCGT TGACTTTTCT CGTCAAGAGA GATCTCAACT TAGTAAGGAG ATGATCAATT 840
CTAACAAAGT GCGTCAAACA ACTATGTTTC TCAAACCTCG CAAACAGTGC AAGAGATAGT 900
CACTGGCAGG GGATCCTGGA TCGGTCGCTT ATCTGACGAC GCCAAAGTCG TACACAGATA 960
ACTACAGCGA TACCGTTTTT CGTGTAGATG GATCTCGTTT GCATTCTAAG GTGACTATAG 1020
CATACGTTTA ATGCAGTTGT TAATTGAGTT TATGCATAAG TTTGTACTACT CTGGCTAGA 1080
TTGATGTAAA AACTTATTTT ACGACAATAG TTTATTGCAA ACTATTTCAA TTCTTTTGAT 1140
CTCAGATCAT ATACAACCTC AAATCAGGTA GGAATACCCG CTGAACTTAA GCATATCAAT 1200
AAGCGGAGGA AAAGAAACTA ACAAGGATTC CCTTAGTAAC GGCGAGTGAA A 1251
```

Accession #	Genes	Species	Blast results of sample sequences		
			Max Identity (%)	Max Score	E-value
X99882	ITS2	<i>Tetranychus viennensis</i>	99	1031	0.0
X99883	ITS2	<i>Tetranychus viennensis</i>	98	980	0.0
AB257731	ITS1+ITS2	<i>Tetranychus viennensis</i>	98	978	0.0
AB257732	ITS1+ITS2	<i>Tetranychus viennensis</i>	98	973	0.0
GQ141925	ITS2	<i>Tetranychus viennensis</i>	98	957	0.0

Fig. 2. DNA sequences of a mite sample collected from Japanese apricot, *Prunus mume*. (A) Sequence of cytochrome oxidase I (COI) and its Blast search analysis. (B) Sequence of internal transcribed spacer (ITS) sequence and its Blast search analysis.

은 염기서열 상동성을 보였다(Fig. 2A). 이러한 상동 서열들을 가지는 종들을 분석한 결과 본 연구의 COI 염기서열은 기존에 보고된 벚나무응애와 가장 높은 유사성을 나타냈다.

본 연구에서 분석된 응애 시료의 ITS 영역(1,251 개)은 18S rRNA에서 28S rRNA 영역을 잇는 ITS1과 ITS2를 포함했다(Fig. 2B). 이 서열은 GenBank에 수록된 염기서열과 상동성을 분석한 결과 우선 얻은 서열이 ITS DNA 영역으로 판명되었고, 이 가운데 벚나무응애의 ITS와 가장 높은 상동성을 나타냈다. 이러한 형태적 및 DNA 형질에 의한 종 동정은 본 시료가 벚나무응애라는 것을 확인시켜 주었다. 동정된 야의 시료를 CATTS 시험에 이용하였다.

처리온도 46°C에서 노출시간별 살충력 조사

열처리에 대한 벚나무응애의 감수성을 분석했다(Fig. 3). 서로 다른 발육 시기의 벚나무응애에 대해서 46°C의 온도에서 10 분간 처리한 결과 알과 약충에 비해 성충이 가장 낮은 감수성을 보였다(Fig. 3A). 다시 성충을 대상으로 46°C의 열처리 조건에서 노출 시간별 사망률을 조사하였다(Fig. 4). 이때 반수치사노출시간(LT₅₀)이 72.12 분(95% 신뢰구간: 67.56~76.39 분)으로 나타났다. 또한 95%를 치사시키는 노출시간(LT₉₅)과 99%를 치사시키는 노출시간(LT₉₉)은 각각 프로빗 검정 결과 204.47 분(194.69~216.35 분) 224.31 분(230.86~235.78 분)으로 산출되었다.

환경조절 조건에 따른 열처리 제고 효과

CATTS의 핵심 기술은 열처리 효과를 극대화하기 위해 열처리 후 일어나는 곤충의 회복 능력을 높은 농도의 이산화탄소와 낮은 농도의 산소 처리에 의해 억제시키는 데 있다. 이를 증명하기 위해 46°C에서 짧은 기간 동안 노출시키고, 15% CO₂ 및 1% O₂ 조건에서 벚나무응애 성충을 노출시켰다(Fig. 4). 처리 후 24 시간이 경과 후에 열처리 단독은 38%의 사망률을 기록한 반면, 열처리와 이산화탄소를 동시에 처리하면 80% 이상의 상승된 살충률을 보였다.

벚나무응애에 대한 CATTS 처리 기술 개발

제작된 연구용 CATTS를 바탕으로 기기 내부 온도가 44°C에 이른 후 노출 시간에 따른 벚나무응애의 방제 효과를 분석하였다(Fig. 5). CATTS는 두 단계로 진행되었다. 먼저 공기조건을 맞춘 후 온도가 46°C에 이르는 시간까지의 전처리단계('ramp')와 이 온도 이후 이어지는 CATTS 단계로 구분되었다. 전처리단계에서 약충과 알이 거의 모두 치사되는 것을 알 수 있었다. 그러나 성충의 경우는 이후 CATTS 단계에서 처리 시간의 증가에 따라 높아지는 경향을 나타냈다. 특별히 30 분 이상의 CATTS 처리는 성충을 포함한 모든 발육시기의 벚나무응애에 대해서 100%의 사멸 효과를 나타냈다.

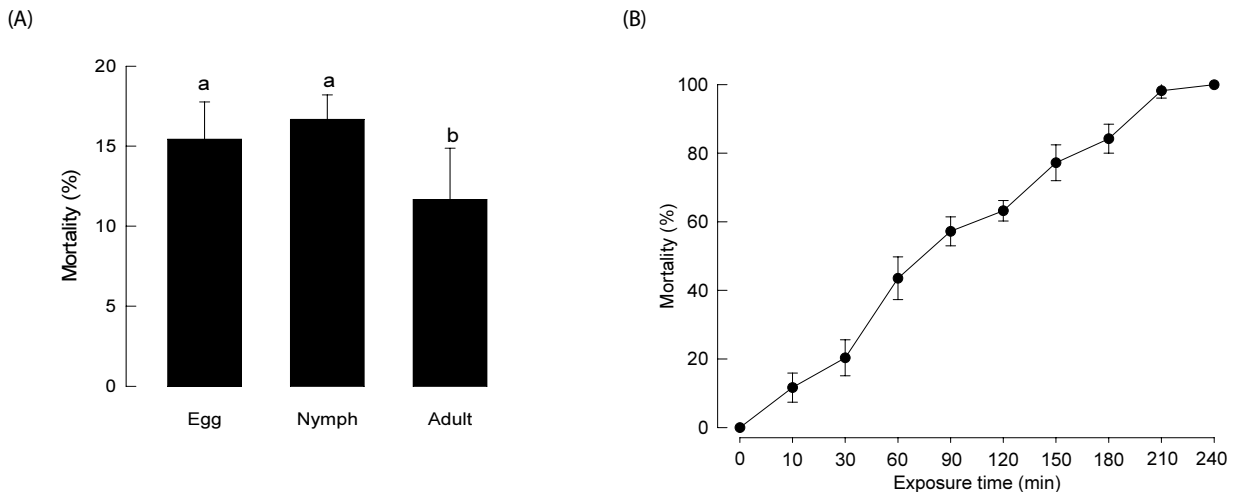


Fig. 3. Susceptibility of *Tetranychus viennensis* to heat treatment (46°C). (A) Effect of a 10 min heat treatment on different developmental stages. (B) Effect of heat treatment on adults using different exposure periods. After treatment, all mite samples were transferred to 25°C and mortality was estimated 24 h after the heat treatment. Eggs were analyzed by hatch at 7 days after the treatment. Each treatment was replicated three times with 30 individuals per replication. Different letters above the standard deviation bars indicate a significant difference between means at a Type I error = 0.05 (LSD test).

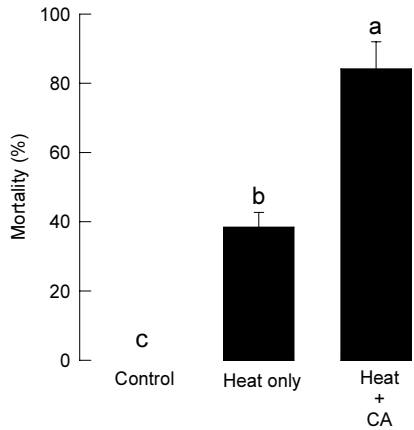


Fig. 4. Potentiation of heat treatment (46°C, 15 min) with the addition of controlled atmospheric (CA) conditions of 15% CO₂ and 1% O₂ against *Tetranychus viennensis* adults. Treated adults were transferred to 25°C and mortality was estimated 24 h after the heat treatment. Each treatment was replicated three times with 30 individuals per replication. Different letters above the standard deviation bars indicate significant difference among means at a Type I error = 0.05 (LSD test).

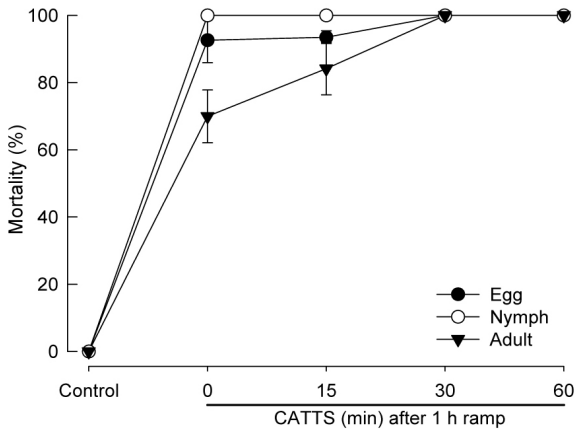


Fig. 5. The effect of a controlled atmosphere and temperature treatment (CATTS) on different developmental stages of *Tetranychus viennensis*. Rate of heating was 15°C/h. Treatment period represents time elapsed at 46°C. The air conditions used were 15% CO₂ and 1% O₂. Treated individuals were transferred to 25°C and mortality was estimated 24 h after the CATTS treatment. Each treatment was replicated three times with 30 individuals per replication. Different letters above the standard deviation bars indicate a significant difference between means at a Type I error = 0.05 (LSD test).

고찰

농산물 수출입 개방화가 증가하면서 외래 병해충 유입에 대한 우려가 높아지고 있다. 이를 억제하는 노력으로 수확 후 소독 처리가 필수적이며, 이에 현용되는 메틸브로마이드 훈증 처리는 검역 병해충 방제를 위해 이용되고 있다. 그러나 메틸브로마이드가 갖는 대기의 오존층 파괴 잠재력(UNEP, 1992)과 인축

독성(Jo *et al.*, 2003) 및 작물에 대한 약해(Park *et al.*, 2011)는 이에 대한 대체 기술 개발을 요구하게 되었다. 본 연구는 이러한 대체 기술 개발의 일환으로 물리적 처리 기술인 CATTS를 사과 대미 수출에 검역 대상인 빛나무응애에 대해서 살비효과를 검증하는 데 목적을 두었다. 처리되는 CATTS 조건은 사과 과실을 가해하는 복숭아심식나방 소독 처리 조건(Son *et al.*, 2010a)과 동일하게 적용하여 이 조건에서 두 해충을 동시에 방제할 수 있는 지를 검증하였다.

국내 사과원에서 빛나무응애의 발생이 거의 보고되지 않는 상황에서(Choi *et al.*, 1997) 분석될 응애 시료는 매실나무에서 채집하였다. 매실은 국내에서 사용 요구가 높아짐에 따라 최근 재배 면적도 증가하고 있는 것으로 알려지고 있다(Lee and Chung, 2011). 매실나무에 서식하여 경제적 피해를 주고 있는 주요 해충은 총 25종으로 이 가운데 빛나무응애는 주요 해충으로 분류되었다(Lee and Chung, 2011). 주요 기주인 빛나무에서는 빛나무응애가 4월 중순에서 11월 중순까지 발견되며, 이후 성충으로 월동하게 된다(Gotoh, 1984). 경북 안동지역의 자연계에서 서식하는 매실나무에서 모든 발육태의 빛나무응애를 채집하여 알 형태와 성충 체색 및 기타 동정 형태 형질을 분석한 결과 Ehara (1999)가 보고한 빛나무응애의 형질과 일치하였다. 이러한 형태 형질의 동정 결과를 보완하기 위해 DNA 분석을 실시하였다. 분석에 이용된 DNA 영역은 핵과 미토콘드리아에서 각각 선발되었다.

응애류를 동정하는 데 분자지표를 이용하는 것은 잎응애(Tetranychidae), 포식성응애(Phytoseiidae), 흑응애(Eriophyidae)를 포함한 많은 응애류에 대해서 널리 이용되고 있다(Navajas and Fenton, 2000). 주로 이용되는 DNA 영역은 핵 DNA의 경우는 rRNA 영역의 ITS이고, 미토콘드리아의 경우는 COI 영역을 가장 많이 이용하고 있다. 미토콘드리아 DNA의 분자적 특징 및 분류학적 특징이 Tetranychidae와 Tenuipalpidae를 포함한 20종의 응애류에 대해서 검토되어 염기구성(약 75%의 높은 A+T) 및 코돈사용에서 비교적 연구가 잘 된 곤충류와 유사하다고 보고하였다(Navajas *et al.*, 1996). 본 연구에서 분석된 COI 영역은 빛나무응애와 가장 높은 염기서열 상동성을 나타내어 형태적 동정 결과를 뒷받침하여 주었다. COI 영역은 빛나무응애를 포함하여 국내에서 발견되는 *Tetranychus* 속에 속한 응애류에 대해서 PCR-RFLP 분자지표를 개발하는 데에도 이용되었다(Lee and Lee, 1997; Lee *et al.*, 1999). 유사하게 ITS 염기서열도 빛나무응애와 가장 높은 염기서열을 나타냈다. 일반적으로 진핵생물체의 ITS는 상이한 rRNA 유전자들(18S, 5.8S, 28S) 사이에 존재하는 전사체 사이 영역으로 전사후 가공 단계에서 제거되는 부위이다. 따라서 생물체의 생존력과 직결되지 않아 비교적 중

간 변이가 높은 영역이다(Hillis and Dixon, 1991). 이에 따라 종 동정의 분자지표로서 이 유전자 영역을 선호하게 된다. 특별히 두 분자지표는 벚나무응애와 형태적으로 유사한 *T. quercivorus* (Ehara and Gotoh, 1990)와 높은 상동성을 보이지 않았다. 이상의 결과는 선발된 핵 유전자와 미토콘드리아 유전자 영역들 모두 염기서열이 벚나무응애와 가장 높은 상동성을 보여 형태 형질을 이용한 종 동정 결과를 뒷받침하여 본 연구에서 채집하여 분석한 응애가 벚나무응애라는 것을 확인시켜 주었다.

동정된 벚나무응애를 이용하여 열처리(46°C)에 따른 발육시기별 감수성을 조사한 결과 알과 약충에 비해 성충이 가장 높은 고온에 대한 내성을 보였다. 곤충의 경우 일반적으로 한계 고온의 온도 범위는 40-50°C의 영역에서 일정하게 나타나고 있다(Heinrich, 1981). 이러한 한계고온에서 같은 종내에서 발육시기별 내성 차이는 여러 곤충에서 보고되었다. 나방류의 경우는 종령 유충에서 높은 내성을 나타내는 것으로 나타났다(Neven, 1998, 2005). 고온의 생리적 피해는 대사, 내분비, 신경계 교란 등으로 일어나, 호흡률의 변화에서 쉽게 추적할 수 있다. 온도가 높아짐에 따라 호흡률도 증가하나 임계 고온 이후에서는 급격하게 감소하여 호흡 저하에 따른 생리적 피해가 일어나는 것으로 관찰된다(Neven, 2000). 특별히 고온에 대한 내성 관련 생리적 현상으로 열충격단백질(hsp: heat shock protein)의 개연성이 분석되었다(Pardue, 1988). 쉬파리(*Sarcophaga crassipalpis*)의 경우 열충격단백질의 고온에 대한 내성 인자로서 hsp70이 관여한다고 보고하였다(Yocum and Denlinger, 1992). 고온 처리 이후 열에 민감한 단백질들이 변성하게 되고, 분자 chaperone의 역할을 담당하는 hsp70이 단백질의 변성을 억제하여 준다 역할을 제기하였다. 본 연구에서 분석된 벚나무응애의 열충격단백질은 연구되지 않았다. 그러나 유사한 점박이응애(*T. urticae*)에서 hsp70과 유사한 hsc70 (heat shock cognate 70)의 유전자를 동정하였고 이 유전자의 스트레스 관련 발현을 보였다(Shim *et al.*, 2006). 벚나무응애의 열충격단백질의 연구가 본 연구 결과를 설명하는 데 필요할 것으로 사료된다.

낮은 산소 및 높은 이산화탄소의 조건에서 벚나무응애의 고온에 대한 감수성은 현격하게 증가되었다. 공기 조성 변화에 따른 환경조절 조건의 상승 소독 효과는 곤충으로 하여금 열충격으로부터 회복하려는 능력을 저해하는 데서 기인하는 것으로 보인다(Neven, 2000). 앞에서 기술한 바와 같이 열충격에 따라 형성되는 열충격단백질이 이러한 스트레스 회복에 관여할 수 있으며, 낮은 산소 조건은 이러한 열충격단백질의 합성을 억제하는 것으로 예상된다. 또한 높은 이산화탄소 조건은 응애로 하여금 기문 활동을 증가시킬 것으로 예상되고, 이에 따른 체내에 있던 산소를 급격하게 낮추는 효과가 있을 수 있다. 그러나

CATTS 처리에 따른 생리적 교란 현상은 아직 정확히 규명되지 않고 있다.

이전 연구는 사과 과실 속에 서식하는 복숭아심식나방을 방제할 수 있는 CATTS 처리 조건이 15% CO₂, 1% O₂의 환경 조건에서 46°C 열처리를 1 시간하는 매뉴얼로 개발되었다(Son *et al.*, 2010a). 이 처리시간은 사과 과실 피해를 주지 않는 것으로 나타났다(Son, Y. and Y. Kim, unpublished data). 본 연구는 이 CATTS 처리 조건을 벚나무응애에 처리하였고, 불과 30 분 만에 전체 발육시기에 대해서 100% 살비효과를 보였다. 이러한 결과는 사과에 가해하는 복숭아심식나방 소독 처리 시간인 1 시간에 비해 짧은 처리로서 복숭아심식나방 소독 처리를 할 경우에 과실에 붙어 있을 수 있는 벚나무응애는 모두 방제할 수 있다는 것을 의미하게 된다. 즉, 본 연구 결과들을 통해 기존에 개발된 CATTS가 대미 수출 사과에 존재할 수 있는 벚나무응애에 대해서도 수확후 소독 처리 기술로서 응용될 수 있다는 것을 보였다.

사 사

본 연구는 농림수산검역검사본부의 외부용역과제로 수행되었다. CATTS 시설에 대한 조언을 하여준 미국 USDA의 Dr. Lisa Neven에게 감사의 말씀을 드립니다.

Literature Cited

- Bolland, H.R., J. Gutierrez and C.H.W. Flechtmann. 1998. World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Butz, P. and B. Tauscher. 1995. Inactivation of fruit fly eggs by high pressure treatment. *J. Food Process. Preserv.* 19: 161-164.
- Carpenter, A. and M. Potter. 1994. Controlled atmospheres. pp. 171-198. *In Quarantine treatments for pests and food plants*, eds. by J.L. Sharp and G.J. Hallman. 290pp. Westview, Boulder, CO, USA.
- Choi, K.H., Y.J. Kwon, S.W. Lee and O.H. Ryu. 1997. The ecology *Tetranychus viennensis* Zacher and its chemical control effects. *Kor. J. Appl. Entomol.* 36: 111-117.
- Ehara, S. 1999. Revision of the spider mite family Tetranychidae of Japan (Acari, Prostigmata). *Species Diversity* 4: 63-141.
- Ehara, S. and T. Gotoh. 1990. A new *Tetranychus* closely related to *T. viennensis* Zacher (Acari: Tetranychidae). *Intl. J. Acarol.* 16: 55-58.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1983. International plant quarantine treatment manual. Plant production and protection paper 50. FAO, Rome.
- Gotoh, T. 1984. Annual life cycle of the hawthorn spider mite,

- Tetranychus viennensis* Zacher. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 28: 254-259.
- Gotoh, T. 1986. Life-history parameters of the hawthorn spider mite, *Tetranychus viennensis* Zacher (Acarina: Tetranychidae), on deciduous oak. Appl. Entomol. Zool. 21: 389-393.
- Heinrich, B. 1981. Ecological and evolutionary perspectives. pp. 236-302. In Insect thermoregulation, ed. by B. Heinrich. Wiley, New York.
- Hillis, D.M. and M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quart. Rev. Biol. 66: 411-429.
- Hollingsworth, R.G. and J.W. Armstrong. 2005. Potential of temperature, controlled atmospheres, and ozone fumigation to control thrips and mealybugs on ornamental plants for export. J. Econ. Entomol. 98: 289-298.
- Ikediala, J.N., J. Tang, L.G. Neven and S.R. Drake. 1999. Quarantine treatment of cherries using 915 MHz microwaves: temperature mapping, codling moth mortality and fruit quality. Postharvest Biol. Technol. 16: 127-137.
- Jo, K.D., S.B. Yim, S.K. Lee, S.H. Choi, T.H. Kim, K.H. Han and K.I. Song. 2003. Two cases of methyl bromide intoxication with seizures and altered mental state. J. Kor. Epilepsy Soc. 7: 125-129.
- Kasap, I. 2003. Life history of hawthorn spider mite *Amphitetranychus viennensis* (Acarina: Tetranychidae) on various apple cultivars and at different temperatures. Exp. Appl. Acarol. 31: 79-91.
- Kells, S.A., L.J. Mason, D.E. Maier and C.P. Woloshuck. 2001. Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. J. Stored Prod. Res. 37: 371-383.
- Lee, H.S. and B.K. Chung. 2011. Occurrences of major pests in Japanese apricot, *Prunus mume* Siebold & Zucc. in Gyeongnam province. Kor. J. Appl. Entomol. 50: 21-27.
- Lee, M.L. and M.H. Lee. 1997. Amplified mitochondrial DNA identify four species on *Tetranychus* mites (Acarina: Tetranychidae) in Korea. Kor. J. Appl. Entomol. 36: 30-36.
- Lee, M.L., S.J. Suh and Y.J. Kwon. 1999. Phylogeny and diagnostic markers of six *Tetranychus* species (Acarina: Tetranychidae) in Korea based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. J. Asia Pac. Entomol. 2: 85-92.
- Liu, Y.B. 2003. Effects of vacuum and controlled atmosphere treatments on insect mortality and lettuce quality. J. Econ. Entomol. 96: 1100-1107.
- Mainali, B.P., S. Shrestha, U.T. Lim and Y. Kim. 2008. Molecular markers of two sympatric species of the genus *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae). J. Asia Pac. Entomol. 11: 45-48.
- Navajas, M. and B. Fenton. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. Exp. Appl. Acarol. 24: 751-774.
- Navajas, M., D. Fournier, J. Lagnel, J. Gutierrez, and P. Boursot. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. Insect Mol. Biol. 5: 281-285.
- Navajas, M., J. Gutierrez, O. Bonato, H.R. Bolland and S. Mapangou -Divassa. 1994. Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. Exp. Appl. Acarol. 18: 351-360.
- Nelson, S.O. 1996. Review and assessment of radio-frequency and microwave energy for stored-grain insect control. Trans. ASAE 39: 1475-1484.
- Neven, L.G. 1998. Effects of heating rate on the mortality of fifth-instar codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). J. Econ. Entomol. 91, 297-301.
- Neven, L.G. 2000. Physiological responses of insects to heat. Postharvest Biol. Technol. 21: 103-111.
- Neven, L.G. 2005. Combined heat and controlled atmosphere quarantine treatments for control of codling moth, *Cydia pomonella*, in sweet cherries. J. Econ. Entomol. 98: 709-715.
- Neven, L.G. and S.R. Drake. 2000. Comparison of alternative quarantine treatments for sweet cherries. Postharvest Biol. Technol. 20: 107-114.
- Neven, L.G. and E.J. Mitcham. 1996. CATTs: controlled atmosphere temperature treatment system, a novel approach to the development of quarantine treatments. Am. Entomol. 42: 56-59.
- Neven, L.G. and L. Rehfield-Ray. 2006a. Combined heat and controlled atmosphere quarantine treatments for control of western cherry fruit fly in sweet cherries. J. Econ. Entomol. 99: 658-663.
- Neven, L.G. and L. Rehfield-Ray. 2006b. Confirmation and efficacy test against codling moth and oriental fruit moth in apples using combination heat and controlled atmosphere treatments. J. Econ. Entomol. 99: 1620-1627.
- Neven, L.G., L. Rehfield-Ray and D. Obenland. 2006. Confirmation and efficacy tests against codling moth and oriental fruit moth in peaches and nectarines using combination heat and controlled atmosphere treatments. J. Econ. Entomol. 99: 1610-1619.
- Obenland, D., P. Neipp, B. Mackey and L.G. Neven. 2005. Peach and nectarine quality following treatment with high temperature forced air combined with controlled atmospheres. HortScience 40: 1425-1430.
- Pardue, M.L. 1988. The heat shock response in biology and human disease: a meeting review. Genes Dev. 2: 783-785.
- Park, M., B. Sung and J. Cho. 2011. Residual characteristics of methyl bromide and hydrogen cyanide in banana, orange, and pineapple. J. Appl. Biol. Chem. 54: 214-217.
- Paull, R.E. and J.W. Armstrong. 1994. Insect pests and fresh horticultural products: treatments and responses. CAB International, Wallingford, UK.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol. 22: 117-121.

- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Sharp, J.L. and G.J. Hallman. 1994. Quarantine treatments for pests and food plants. Westview, Boulder, CO, USA.
- Shim, J.K., D.O. Jung, J.W. Park, D.W. Kim, D.M. Ha and K.Y. Lee. 2006. Molecular cloning of the heat-shock cognate 70 (Hsp70) gene from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its expression in response to heat shock and starvation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145: 288-295.
- Son, Y., K. Choi, Y. Kim and Y. Kim. 2010a. Applicability of CATTS as a postharvest phytosanitation technology against the peach fruit moth, *Carpocapsa sasakii* Matsumura. *Kor. J. Appl. Entomol.* 49: 37-42.
- Son, Y., Y. Kim and Y. Kim. 2010b. Control effect of a stored grain insect pest, *Tribolium castaneum*, by 'CATTS' postharvest treatment. *Kor. J. Appl. Entomol.* 49: 363-369.
- Tang, J., J.N. Ikediala, S. Wang, J.D. Hansen and R.P. Cavalieri. 2000. High-temperature short-time thermal quarantine methods. *Postharvest Biol. Technol.* 21: 129-145.
- UNEP (United Nations Environmental Programme). 1992. Methyl bromide: atmospheric science, technology and economics. UNEP, U.N. Headquarters, Nairobi, Kenya.
- USDA. 1982. Insects not known to occur in the United States. A fruit-tree spider mite (*Tetranychus viennensis* Zacher), pp. 40-41. *In* Pest identification notebook, Vol. 1. USDA/ARS, Frederick, MD.
- Vrain, T.C., D.A. Wakarchuk, A.C. Levesque and R.I. Hamilton. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fund. Appl. Nematol.* 15: 563-574.
- Wang, S., J. Tang, J.A. Johnson, E. Micham and J.D. Hansen. 2002. Process protocols based on radio frequency energy to control field and storage pests in inshell walnuts. *Postharvest Biol. Technol.* 26: 265-273.
- Yahia, E.M. 2000. The mortality of artificially infested third instar larvae of *Anastrepha ludens* and *A. obliqua* in mango fruit with insecticidal controlled atmospheres at high temperatures. *Acta Hort.* 509: 833-839.
- Yocum, G.D. and D.L. Denlinger. 1992. Prolonged thermotolerance in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, does not require continuous expression or persistence of the 72 kDa heat-shock protein. *J. Insect Physiol.* 38: 603-609.