

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)을 이용한 무당벌레(*Harmonia axyridis*: Coccinellidae)의 초시색상패턴의 변이 분석

박초롱 · 김정희 · 유용만 · 윤영남*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Differentiation of Elytra Color Patterns in Multicolored Asian Ladybird Beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera; Coccinellidae), using AFLP analyses

Cho Rong Park, Jeong Hee Kim, Yong Man Yu and Young Nam Youn*

Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT: Elytra of *Harmonia axyridis* exhibit varied color patterns. In the present study, we deciphered the genetic basis for intraspecific diversity of elytra color patterns in *H. axyridis*, using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Twenty-eight AFLP reactions were performed to generate a total of 2,741 bands. Of these, 20 bands were polymorphic for each color pattern. The polymorphic bands showed differences of genetic character among different color patterns of *H. axyridis*. Among them, ten candidate AFLP markers were color-linked. S1, S2, and S20 markers were detected in Succinea 1 and 2 variants of *H. axyridis*, whereas S3 and S5 were specifically detected in the Conspicua variant. S15, S18, and S19 were specific to the Succinea 2 variant. Polymerase chain reaction (PCR) products of these ten AFLP markers were sequenced. BLAST analysis of these sequences against the GenBank database revealed their homology to DNA fragments of unknown function. Based on the color-linked AFLP markers, sequence characterized amplified region (SCAR) markers were designed for PCR amplification of genomic DNA. Of the ten AFLP markers, five were successfully converted into SCAR markers, which could discriminate elytra color polymorphism in *H. axyridis*.

Key words: AFLP, *Harmonia axyridis*, Elytra Color Pattern, Differentiation

초 록: 무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 종내에서 초시색상패턴이 매우 다양하게 존재한다. 본 논문에서는 서로 다른 색상패턴의 무당벌레를 대상으로 amplified fragment length polymorphism (AFLP)을 실시하여 무당벌레의 초시색상 패턴간 유전형질의 차이를 확인하고자 하였다. 총 28 개의 프라이머 조합으로 실험을 실시한 결과, 총 2,741 개의 밴드가 검출되었다. 그 중 20 개의 밴드(S1-S20)만이 특정 색상패턴에서 나타났다. 이들 가운데 9 개의 밴드를 색상에 연관된 AFLP 후보 지표로 선발하였다. 밴드 가운데 S1과 S2, S20은 Succinea 1, 2 변이형에 공통적으로 나타났으며, S3와 S5는 Conspicua 변이형에 특이적이었다. 또한 S13는 Spectabilis 변이형에, S15와 S18, S19는 Succinea 2 변이형에 특이적이었다. 특정 색상패턴에만 나타나는 9 개의 AFLP 지표들은 cloning을 통해 염기서열 분석을 실시하였고, GenBank를 이용해 다른 염기서열과 비교를 해보았지만 아무런 상동성도 찾을 수가 없었다. 무당벌레 종 내 유전적 다양성을 평가한 결과, Spectabilis가 Conspicua보다 Succinea 변이형에 높은 유사성을 보였다. 색상에 연관된 AFLP 후보 지표를 기준으로 sequence characterized amplified region (SCAR) 지표로 변환하여 9 개의 AFLP 분자지표들 가운데에서 5 개만이 SCAR 지표로 전환될 수 있었으며, 이를 통해 AFLP 지표가 무당벌레의 색상과 연관되어 있는지 확인할 수 있었다.

검색어: AFLP, 무당벌레, 초시색상, 변이

*Corresponding author: youngnam@cnu.ac.kr

Received March 3 2016; Revised June 7 2016

Accepted June 23 2016

무당벌레(*Harmonia axyridis* Pallas)는 딱정벌레목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 곤충으로 국내에서는 우리들 생활주변에서 가장 흔히 볼 수 있는 곤충 중 중의 하나이

다. 무당벌레가 속해있는 무당벌레과에는 전 세계적으로 약 490속 4,200여 종이 기록되어 있으며(Iperti, 1999), 이들 가운데 현재 국내에는 74종이 보고되고 있고(ESK and KSAE, 1994), 북미대륙에는 400여종(Belicek, 1976), 유럽에는 110종이 분포하고 있는 것으로 보고되고 있다(Iperti, 1986). 무당벌레과 중에서 무당벌레는 한국, 일본, 대만, 중국 및 사할린을 비롯한 극동 시베리아 및 아시아에 분포하는 토착종으로(Brown et al., 2008; Dobzhansky, 1933; Kuznetsov, 1997; Park, 1993) 전세계에 걸쳐 분포하고 있는 것으로 보고되어 있다(Brown and Miller, 1998; Chapin and Brou, 1991; Day et al., 1994; Kidd et al., 1995; Lamana and Miller, 1998; Nalepa et al., 1996; Seo et al., 2007; Tedders and Schaefer, 1994). 무당벌레는 진딧물을 포식하는 주요 천적일 뿐 아니라 각지벌레, 온실가루이 등을 포함한 여러 해충들을 포식하므로 해충의 생물적 방제에 활용 가능성이 매우 높은 곤충 종으로 오래 전부터 각광받고 있다(Hagen, 1962; Hodek, 1973; Koch, 2003; Majerus, 1994; Roy and Wajnberg, 2008; Seo and Youn, 2000; Sweetman, 1958; Youn et al., 2003). 실제로 진딧물 개체군 밀도 억제측면에서의 무당벌레의 포식활동은 매우 넓어 다른 포식성 곤충이나 기생성 천적들과 비교했을 때 상대적으로 높은 위치를 차지하는 것으로 평가되며(Obata, 1986), 특히 유충과 성충이 모두 진딧물을 비롯한 여러 해충들을 포식한다는 사실은 무당벌레가 천적자원으로서 가치가 높음을 확인시켜준다(Seo, 1999; Seo and Youn, 2000).

무당벌레는 생물적방제인자로서 중요한 면을 가지고 있지만, 무당벌레 초시에 나타나는 색상과 무늬의 변이가 매우 다양하여 관심의 대상이 되고 있다(Seo et al., 2007). Komai (1956)는 무당벌레를 초시색상패턴에 따라 *Succinea*, *Conspicua*, *Spectabilis*, *Axyridis* 변이형의 4가지 그룹으로 나누어 보고한 바 있었는데, 이를 Seo et al. (2007)이 초시에 있는 점의 개수에 따라 *Succinea* 변이형을 *Succinea 1*, *Succinea 2* 변이형으로 나누어 보고하였다. 또한 Tan and Li (1934)에 의해 무당벌레의 초시색상패턴은 유전적으로 분석된다고 보고되었고, Komai et al. (1950)에 의해 초시색상 변이는 무당벌레의 지리적 분포뿐만 아니라 온도에 의해서도 달라질 수 있다고 보고되었다. 또한 Stewart and Dixon (1989)에 의해서 *melanin* 색상 선택의 주요 원인이 태양 에너지라고 보고되었고, Seo et al. (2008)은 무당벌레가 고미시 멜라닌 그룹(*Conspicua* 변이형)을 더 선호하고, 패턴 별로 수컷에서 충체 크기가 다르다고 보고한 바 있다. 이렇듯 초시색상의 다형현상에 대한 연구가 이루어져 왔으나, 아직까지 무당벌레가 가지고 있는 색상변이의 실제적인 원인이 무엇인지는 밝혀지지 않고 있다.

유전적 다양성을 분석하는 기술 중 amplified fragment length

polymorphism (AFLP) 기술은 간편한 분석법과 높은 재현성을 바탕으로 유전자 표지를 발굴하기 위한 연구방법이다(Jones et al., 1997; Li et al., 2006; Mackill et al., 1996; Vos et al., 1995). 본 기술은 유전적 유사도가 가까운 종이나 품종 간에도 고도의 유전적 변이 및 다형현상 검출, 한번에 많은 유전자 좌위(locus)를 검색, 시료의 수가 제한된 경우에도 많은 유전적 변이 검출 등의 다양한 장점을 가지고 있어 유전자 다양성 분석, 잡종 판별, 표현형 관련 분자지표 탐색, 집단구조 분석에 매우 유용하다고 알려져 있다(Bleas et al., 1998; Bonin et al., 2007; Knorr et al., 1999; Mariette et al., 2001; Roa et al., 1997; Wichan et al., 2000; Xiao et al., 2009; Xu et al., 2006; Yeon et al., 2008). 이미 Hawaiian cricket (Parsons and Shaw, 2001)과 쇠똥구리 (Carisio et al., 2004)의 형태적인 차이를 규명하고, Colorado potato beetle (Hawthorne, 2001)에서 Pyrethroid 저항성 후보 유전자와 성염색체를 발견하였으며, 유채의 주요 해충인 *Meligethes aeneus* (Kazachkova et al., 2004, 2007)와 저장해충인 *Tribolium castaneum* (Zhong et al., 2004)의 유전자형을 확인하고, *Heliconius Melpomene* (Jiggins et al., 2005)에서 색상패턴에 관련된 유전자를 탐색하는 등 AFLP 기술을 활용한 바 있다.

본 연구는 AFLP를 통해 무당벌레의 초시색상패턴 사이의 유전형질의 차이를 확인하고 sequence-characterized amplified region (SCAR) 분자지표로 변환을 시도하였다.

재료 및 방법

무당벌레

무당벌레는 월동처로 날아온 월동 개체군을 채집하여 직경 15 cm인 플라스틱 Petri dish에 30-40여 마리씩 낙엽과 함께 넣어 나무상자에 모아 10°C 인큐베이터에서 다음해 봄까지 월동시키고, 3월에 나무상자에서 꺼내어 인공먹이를 제공하여 15°C 인큐베이터에 사육하면서 사용하였다. 각 색상패턴에 특이적인 AFLP 밴드를 확인하고 색상패턴에 특이적인 AFLP 증폭조각이 SCAR 분자지표로 변환이 되었는지 확인하기 위하여, 무당벌레들 가운데서 *Succinea 1* (YBM19), *Succinea 2* (YBM00), *Conspicua* (BRA02), *Spectabilis* (BRA04) 등 4가지 변이형 색상패턴에서 각각 암컷, 수컷 2마리씩 4마리씩을 선발하여 실험을 실시하였다.

DNA 추출

전체 게놈 DNA는 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)

방법(Moeller et al., 1992)을 변형하여 추출하였다. 색소패턴별 무당벌레를 각각 한 마리씩 막자사발에 넣고 0.25–0.55 mM 크기의 유리구슬을 넣고 액체질소를 부어 동결건조 시키며 마쇄용으로 마쇄하였다. 마쇄된 시료는 각각 1.5 ml 튜브에 넣고 extraction 완충용액 (200 mM Tris-HCl[pH 8.0], 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS) 400 μ l 에 현탁해 proteinase K 5 μ l 를 첨가, 37°C 에 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 2% CTAB 완충용액(2% CTAB[w/v], 0.1 M Tris-HCl[pH 8.0], 0.02 M EDTA[pH 8.0], 1.4 M NaCl, 0.5% β -mercaptoethanol) 400 μ l 를 첨가하여 잘 섞어준 뒤, 700 μ l 의 Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25: 24: 1)을 첨가하여 13,000 rpm으로 10분 간 원심분리 하여 얻은 상층액을 깨끗한 1.5 ml 튜브에 옮겼다. 이 과정을 한차례 반복한 뒤, 0.7 배 부피의 isopropanol을 첨가하여 실온에 10분간 두었다가 4°C 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 게놈 DNA가 침전되면 상층액은 버리고 500 μ l 의 70% 에탄올을 첨가하여 DNA를 세척한 후 같은 조건에서 원심분리하였다. 다시 상층액을 버리고 세척이 끝난 DNA는 진공펌프로 30분 이상 건조시킨 후, 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 DNA를 용해시키고 RNase를 첨가해 1시간 동안 37°C 에 반응시켰다. 이렇게 하여 추출된 게놈 DNA는 1.2% 아가로스젤에 전기영동으로 확인한 후, -20°C 에 보관하였다.

AFLP 분석

AFLP는 Vos et al. (1995)의 방법을 변형시켜 4단계로 실험하였다.

게놈 DNA 단편화와 어댑터 부착

각각 시료의 게놈 DNA(200 ng)는 전체 부피 25 μ l 에 10 \times NEBuffer 완충용액에서 7.5 U EcoR I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)을 첨가해 37°C 에서 12 시간 동안 반응시켰다. 잘려진 DNA는 몇 단계의 세척과정을 거친 뒤, 10 μ l 의 멸균된 3차 증류수에 다시 용해되었다. EcoR I에 의해 잘려진 DNA는 전체 부피 20 μ l 에 10 \times NE 완충용액 # 2에서 10 U Mse I(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)을 첨가해 37°C 에서 12 시간 반응시켰다. 잘려진 DNA는 또 다시 몇 단계의 세척과정을 거친 뒤, 10 μ l 멸균된 3차 증류수에 용해되었다. 여기에 5 pmol EcoR I adapter와 50 pmol Mse I adapter, 175U T4 DNA ligase(Takara Bio Inc., Otsu, Japan), 2 μ l 의 10 \times T4 ligase 완충용액을 첨가하여 전체용량을 20.5 μ l 로 만들어 16°C 에서 12시간 반응시켜 EcoR I과 Mse I에 의해 잘린

Table 1. Sequences of AFLP primers and their combinations used in the study

Primer combinations designation	EcoR I primers	Mse I primers
C1	EcoR I primers+ACA	Mse I primers+CTA
C2	EcoR I primers+ACA	Mse I primers+CTC
C3	EcoR I primers+ACA	Mse I primers+CTG
C4	EcoR I primers+ACA	Mse I primers+CTT
C5	EcoR I primers+ACC	Mse I primers+CTA
C6	EcoR I primers+ACC	Mse I primers+CTC
C7	EcoR I primers+ACC	Mse I primers+CTG
C8	EcoR I primers+ACC	Mse I primers+CTT
C9	EcoR I primers+ACG	Mse I primers+CTA
C10	EcoR I primers+ACG	Mse I primers+CTC
C11	EcoR I primers+ACG	Mse I primers+CTG
C12	EcoR I primers+ACG	Mse I primers+CTT
C13	EcoR I primers+ACT	Mse I primers+CTA
C14	EcoR I primers+ACT	Mse I primers+CTC
C15	EcoR I primers+ACT	Mse I primers+CTG
C16	EcoR I primers+ACT	Mse I primers+CTT
C17	EcoR I primers+AGA	Mse I primers+CTA
C18	EcoR I primers+AGA	Mse I primers+CTC
C19	EcoR I primers+AGA	Mse I primers+CTG
C20	EcoR I primers+AGA	Mse I primers+CTT
C21	EcoR I primers+AGC	Mse I primers+CTA
C22	EcoR I primers+AGC	Mse I primers+CTC
C23	EcoR I primers+AGC	Mse I primers+CTG
C24	EcoR I primers+AGC	Mse I primers+CTT
C25	EcoR I primers+AGT	Mse I primers+CTA
C26	EcoR I primers+AGT	Mse I primers+CTC
C27	EcoR I primers+AGT	Mse I primers+CTG
C28	EcoR I primers+AGT	Mse I primers+CTT

* The sequence of *EcoR* I primer was 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', and of *Mse* I primer was 5'-GATGAGTCTGAGTAA-3'.

DNA의 말단에 각각의 어댑터를 부착시켰다. 실험에 사용된 프라이머 서열은 Table 1에 나타내었다.

AFLP의 1차 증폭과정

AFLP의 1차 증폭과정은 4 μ l ligated DNA, 5 μ l 10 \times Ex Taq 완충용액, 250 μ M dNTP mixture, 25 pmol Eco+0 프라이머(5' \rightarrow 3': GACTGCGTACCAATTC) 25 pmol Mse+0 프라이머 (5'

→3': GATGAGTCCTGAGTAA), 5 μ l 0.01% bovine serum albumin (BSA), 2.5 U Ex Taq (Takara)를 넣어 전체용량을 50 μ l 로 조정 후 1차 증폭과정을 실시하였다. PCR 반응조건은 94°C 에서 30 초, 56°C 에서 60 초, 72°C 에서 60 초를 1 주기로 총 20회 반복하였다.

AFLP 2차 증폭과정

증폭된 산물은 멸균된 3차 증류수로 1:5로 희석하여 2차 증폭과정을 실시하였다. 희석된 1 μ l 의 1차 증폭물, 2.5 μ l 10 \times Ex Taq 완충용액, 25 pmol Mse+3 프라이머, 25 pmol Eco+3 프라이머, 250 μ M dNTP, 2.5 μ l 0.01% BSA, 1.25U Ex Taq (Takara)을 넣어 전체용량을 25 μ l 으로 만들어 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 처음 94°C 에서 30초간 변성시켰으며, touchdown PCR법을 이용하여 64°C 에서 30초(회당 0.7°C 감소), 72°C 에서 60초간 12 주기를 실시 후 94°C 에서 30초, 56°C 에서 30초, 72°C 에서 60초로 고정하여 총 23회 반복하였다. 총 28 개의 프라이머 조합으로 실험을 실시하였다.

전기영동과 실버염색법

선별 증폭을 마친 PCR 증폭물에 6 μ l loading dye(40% Sucrose, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol)을 첨가하여 95°C 에서 2분간 변성시킨 후 얼음에 보관했다. 그 중 4 μ l 를 1 \times TBE 완충용액 [pH 8.0]에서 6% 폴리아크릴아마이드젤에 2,100 로 4시간 30분 동안 전기영동하여 DNA 증폭물을 분리시킨 후, Silverstar[®] Staining System (Bioneer Crop., Daejeon, Korea)을 사용하여 현상하였다. 현상한 겔은 건조시켜 사진을 기록한 후, 결과를 분석하였다.

색상 특이적 AFLP 증폭물의 염기서열 분석

특정한 밴드는 razor blade를 이용하여 polyacrylamide gels 에서 오려냈다. DNA 증폭물을 포함하고 있는 잘라낸 겔 조각은 1.5 ml 튜브에 30 μ l 의 멸균된 3차 증류수와 함께 넣어줬다. Pipette tip으로 겔 조각을 부숴주듯이 섞은 뒤, 상온에서 밤샘 시켜 95°C 에서 10 분간 끓였다. 튜브는 10,000 rpm에 5분간 원심분리한 뒤, 4 μ l 의 상층액은 2차 증폭과정에서와 같은 프라이머 조합으로 재증폭하였는데 그 조건은 5 μ l 10 \times Ex Taq 완충용액, 25 pmol Eco+3 프라이머, 25 pmol Mse+3 프라이머, 5 μ l 0.01% BSA, 2.5U Ex Taq (Takara)를 넣어 전체 부피 50 μ l 로 맞추고 94°C 에서 30 초, 56°C 에서 1 분, 72°C 에서 1 분의 주

기로 총 20회 반복하여 실시하였다. 재증폭된 산물은 1.2% 아가로스젤에 전기영동하여 확인하였다.

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA)로 정제한 후, 마크로젠(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 sequencing을 수행하였다. 염기서열 정렬은 Chromas 145-95 program, PHYDIT program을 이용하였고, 색상패턴에 특이적인 증폭조각의 염기서열 데이터는 GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)의 BLAST searching을 이용하여 기존에 알려진 유전자 염기서열과 유사성이 있는지를 확인하였다.

계통수 분석

무당벌레의 4가지 주요 색상패턴(YBM19, YBM00, BRA02, BRA04)의 암컷 2마리씩을 임의로 선발하였다. 실험 층들의 DNA 추출 후, 앞에서 실시한 AFLP 실험에서 특이적 밴드를 가장 많이 생산한 3 개의 프라이머 조합으로 AFLP를 진행하여 Gelcompar II version 2.0을 사용하여 계통수를 분석하였다.

SCAR 분자지표 디자인과 PCR 분석

색상패턴에 특이적인 AFLP 증폭조각의 염기서열 정보를 기초로 프라이머 3 software (<http://www.bioneer.co.kr/tools/>)를 사용하여 Oligonucleotide 프라이머는 디자인되었고, 합성되었다. 색상패턴에 특이적인 AFLP 증폭물이 SCAR 분자지표로 변환되었는지 확인하기 위하여 표준 PCR을 실시하였고, protocol은 1 μ l 의 게놈 DNA, 2 μ l 10 \times Ex Taq 완충용액, 10 pmol 프라이머, 2.5 mM dNTP, 1U i-Taq Plus DNA Polymerase (Intron, Seongnam, Gyeonggi, Korea)을 넣어 전체 용량을 25 μ l 로 맞추고, 94°C 에서 30초, 58°C 에서 30초, 72°C 에서 30초를 1주기로 30회 반복으로 수행하였다. 각 PCR 생성물의 4 μ l 는 cloned AFLP 분자지표가 SCAR 분자지표로 성공적으로 전환되었는지 여부를 확인하기 위해 전기영동을 실시하였다.

결과 및 고찰

패턴별 차별적인 AFLP 증폭조각 확인

무당벌레의 대표적인 초시색상패턴인 Succinea 1, Succinea 2, Conspicua, Spectabilis 변이형 그룹의 암컷과 수컷 2마리씩, 패턴당 4마리의 DNA를 추출하여 총 28 개의 프라이머 조합으로 AFLP를 실시하였다. 총 28 개의 프라이머 조합을 실시한 결

Table 2. Number of unique molecular marker bands specific for each elytra color patterns of *H. axyridis*

Primer combination	Total number of fingerprinting bands	Unique marker bands specific for each elytra color patterns				
		Succinea 1	Succinea 2	Conspicua	Spectabilis	Succinea 1 and 2
C1	110	-	2	1	-	1
C2	104	-	-	-	-	-
C3	98	-	-	-	-	-
C4	82	-	-	-	-	-
C5	98	-	-	-	-	-
C6	93	-	-	-	-	-
C7	135	-	1	1	-	-
C8	122	1	3	-	-	-
C9	123	-	-	-	-	-
C10	115	-	-	-	-	-
C11	96	-	-	1	-	2
C12	104	-	-	-	-	-
C13	78	-	-	1	-	1
C14	67	-	-	-	-	-
C15	79	-	-	-	-	-
C16	88	1	-	-	1	-
C17	119	-	1	-	1	-
C18	89	-	-	-	-	-
C19	100	-	-	-	-	-
C20	99	-	-	-	-	-
C21	68	-	-	-	1	-
C22	85	-	-	-	-	-
C23	75	-	-	-	-	-
C24	115	-	-	-	-	-
C25	120	-	-	-	-	-
C26	95	-	-	-	-	-
C27	83	-	-	-	-	-
C28	101	-	-	-	-	-
Total bands	2,741	2	7	4	3	4

과 20 개의 DNA 증폭조각이 다른 색상패턴에서는 나타나지 않고 오직 한 개나 두 개의 색상패턴에만 특이적으로 나타났다. AFLP는 제한효소의 인지부위와 3' 말단부위에 추가 염기서열의 G와 C 조성 및 프라이머의 조합형에 따라 크게 좌우되며 일반적으로 적절한 프라이머, 제한효소의 선발에 의해 약 50-100 개의 특이적 밴드를 생성해 낼 수 있다고 알려져 있다(Aarts et al., 1998; Reineke and Karlovsky, 2000; Rusell et al., 1997). 총 28 개의 선발된 프라이머 조합에서 총2,741 개의 특이적 밴드가 검출되었으며(Table 2), 각 프라이머 조합당 약 97.89 개의 특이적 밴드가 탐색되어 제한효소 및 프라이머 조합이 적절히 이용되었고, 무당벌레의 집단 내 초시색상패턴 확인에 효과

적으로 적용되었음을 알 수 있었다. AFLP를 통해 얻은 패턴별 차이를 나타내는 밴드를 생성해낸 프라이머 조합은 28 개 중 8 개로 나타났다. 전체 밴드 중에서 다형현상을 나타내는 밴드의 선발은 육안 구별이 명확하고 염색의 강도가 대략 30% 이상 나타난 밴드를 기본으로 하여, 특정 초시색상패턴에서는 나타나지만 다른 초시색상패턴에서는 나타나지 않는 밴드를 분자지표로 선발하였다. 그 결과 각 색상패턴에 독특한 밴드는 총20 개가 나왔다(Table 3). 그 중 2 개는 Succinea 1 변이형에, 7 개는 Succinea 2 변이형에, 4 개는 Conspicua 변이형에, 3 개는 Spectabilis 변이형에 특이적이었고, 4 개는 Succinea 1과 2 변이형에 특이적이었다.

Table 3. Color pattern-specific AFLP markers in *H. axyridis*

AFLP marker designation	Primer combinations Designation	Approximate size of marker (bp)	Specific for	Frequency (%)
S1	C11	474	Succinea 1 & 2	8/10(80)
S2	C11	120	Succinea 1 & 2	8/10(80)
S3	C1	505	Conspicua	7/10(70)
S4	C11	267	Conspicua	6/10(60)
S5	C7	290	Conspicua	10/10(100)
S6	C8	-	Succinea 2	-
S7	C8	-	Succinea 2	-
S8	C8	-	Succinea 2	-
S9	C8	-	Succinea 1	-
S10	C13	-	Conspicua	-
S11	C13	-	Succinea 1 & 2	-
S12	C16	-	Succinea 1	-
S13	C16	256	Spectabilis	9/10(90)
S14	C21	-	Spectabilis	-
S15	C7	299	Succinea 2	7/10(70)
S16	C17	-	Spectabilis	-
S17	C17	-	Succinea 2	-
S18	C1	401	Succinea 2	8/10(80)
S19	C1	408	Succinea 2	9/10(90)
S20	C1	292	Succinea 1 & 2	8/10(80)

후보 AFLP 분자지표의 초시색상패턴 관련 확인

후보 AFLP 분자지표가 무당벌레의 초시색상패턴과 관련이 있는지를 확인하기 위해 AFLP의 차별적인 밴드를 가지고 실험을 실시하였다. 월동개체군 내에서 패턴별로 암컷 5 마리, 수컷 5 마리씩 10 마리를 선발하여 DNA를 추출한 뒤 실험에 사용하였다. 70% 이상 다시 나타난 AFLP 밴드는 초시색상과 관련이 있는 후보 분자지표로 간주하였다(Table 3). S1, S2는 Eco+ACA/Mse+CTG의 프라이머 조합으로 실시한 것으로 474 bp와 120 bp로 이루어져있으며, 둘 다 Succinea 1과 2 변이형에 80%의 재현성을 보였고, S4는 S1, S2와 같은 프라이머 조합으로 실시되었으며 267 bp로 이루어져있고 Conspicua 변이형에 60%의 재현성을 나타내 후보 분자지표에서 제외시켰다. S3은 Eco+ACA/Mse+CTA의 프라이머 조합으로 실시한 것으로 505 bp로 이루어져있으며 Conspicua 변이형에 70%의 재현성을 보였다. S18, S19도 역시 S3과 같은 프라이머 조합으로 실시됐고 401 bp, 408 bp로 Succinea 2 변이형에 80%, 90% 재현성을 나타냈다. S20 역시 같은 프라이머 조합이며 292 bp, Succinea 1과 2 변이형에 80% 재현성을 나타냈다. S5, S15는 Eco+ACC/Mse+CTG의 프라이머 조합으로 실시되었고, 각각 290 bp, 299 bp로 Conspicua 변이형(100%)과 Succinea 2 변이형(70%)에 재현

성을 나타냈다. S13은 Eco+ACT/Mse+CTT의 프라이머 조합으로 실시하였고, 256 bp로 Spectabilis 변이형에 90%의 재현성을 나타냈다.

무당벌레 초시 다형집단의 유전적 거리

다른 AFLP자료들로 보아 무당벌레의 종내에 유전적 다양성이 존재하고 있다는 것을 유추할 수 있다. 본 실험에서는 28 개의 프라이머 조합으로 실험을 실시하였는데, 이중 3 개의 조합이 유전적 거리 계산에 사용되었다. Jaccard 상수 ($J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} = \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|}$)를 사용하여 genetic diversity estimates (GDEs) 값을 구하였고(Table 4), 이를 토대

Table 4. Means of AFLP-based pair-wise genetic diversity estimates (GDEs) among the *H. axyridis* variants using three primer combinations

	Succinea 1	Succinea 2	Conspicua	Spectabilis
Succinea 1	-	0.07	0.36	0.28
Succinea 2	-	-	0.37	0.31
Conspicua	-	-	-	0.38
Spectabilis	-	-	-	-

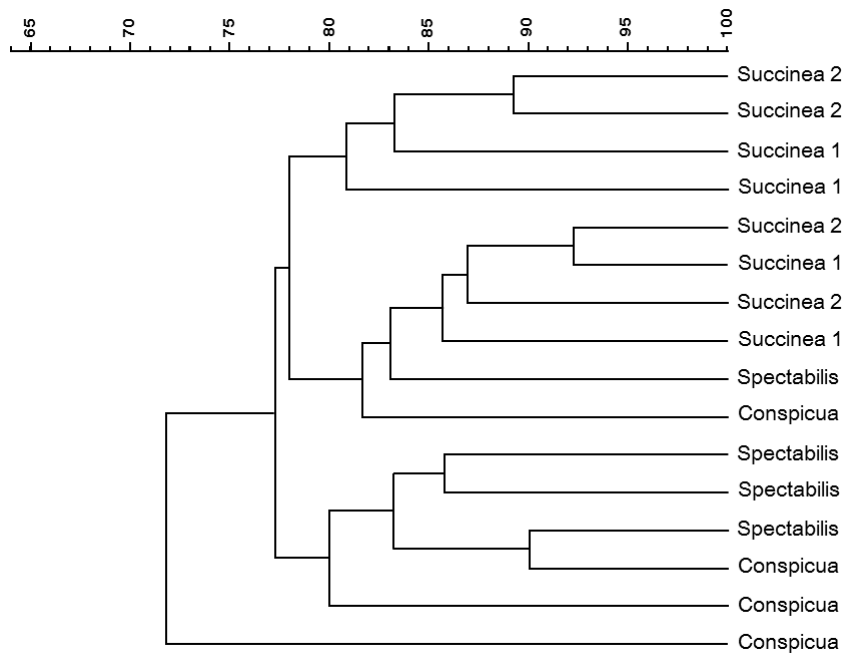


Fig. 1. Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis of AFLP profiles generated by three primer combinations for *H. axyridis*.

Nucleotide sequence of the S1 fragment and the SCAR1 primer designed to amplify S1 – seq1 KX243223

```

1   TTGATGAGTC CCGAGTCCCT CGATGGGGTT CCGATGTGA TGCTGTCGCG CCAAGCATGG
61  AAGATTCCTC CGTGGTAGGG GGTACCATGG AGTTCTTGAG GAGCGCCGAT AGAACACTTC
121 AGCTTCTGCC CGCGTGCTGT TAACTACTGC AGGACGGTGA TATTCGTGCT CGAGGGCGAC
181 ACAACTGTGT ATGGGAATTT TGAAGGGTTG CATGTATCTT GTAGTGCCTC CAATACCAGC
241 AGTCTCGTGC TGACTTATGC GGAGGCCGGT ACTCGTAAAC ATGGATGCTC AGTATATGTC
301 GAGCTACAGT AACTCGTGCG ACTATCCTCA TGGACCACCT CACCGGTGTG ACCCCCTCTG
361 GCAACACTCA GAACTTTTTT GCATATAAGA CTTACACTTG CAAATATGTA CGAGTTTTCA
421 TGGAGTGATG CAGCCGAAAA CAAAAGAGAC AAGAACCTCG TCTTTCCAAC CACA

```

Nucleotide sequence of the S2 fragment and the SCAR2 primer designed to amplify S2 - Seq2 KX243224

```

1   CTTTCTTGAT TTATATTGTG TTTTGGAAA CTGACGTTTA CAAATGAGAA ACAAATAAAA
61  TAGTTTATTC TTCAAATGA AATAACAAAC CTCAAAAAAA CGTGAATTGG TACGCAGTCA

```

Nucleotide sequence of the S3 fragment and the SCAR3 primer designed to amplify S3 - Seq3 KX243225

```

1   TTGACTGCGT ACCAATTCAC AGTTATCCTC ACAAATCATC GGTCCTCAATT ATTCAAACGA
61  TAATTTTTTG TGAACGTTT CAGAATCGTT CTGAACCTCGT AGGCCCATCG TTTTCCAGTA
121 TCTCCTATGA AAAAAAACG TCTATTTTAT ATCAACACCA CCTCAGCAA GTCAAATAAT
181 CCAATAAAAA CGTAACGCCG AAAAAACCCA CCTAGGAAAA AATAACGAAG AAGCTATATC
241 TCAAAAGCTG TAGAGGTTCA TTCGATTCT TTTGTTATGA ACCAATTCGA AATAGTTGTA
301 AAATTGATTC AAATCTCAGA GTGATAAACA TAGATAGAGA AGGCATATGT AATTTTCAGT
361 AACCAAATTT TGTTCCCAAC ATGACCTATC AAATTTGACA TGAAGCGGGC GGAAATATAT
421 CAGTGATTCG ATATTTCACT CAATTCGCGA GTTCTCCAA AAAGAACGCA CTTTTTATGG
481 CCCATAGTTA CTCAGGACTC ATCAA

```

Fig. 2. Nucleotide sequences and GenBank accession numbers of ten AFLP bands designated as S1, S2, S3, S4, S5, S13, S15, S18, S19, and S20.

Nucleotide sequence of the S4 fragment and the SCAR4 primer designed to amplify S4 - Seq4 KX243226

```
1   TTGACTGCGT ACCAATTCAC GTCAGAGCTT TCCTAGTTTT TTATACGAAT CTGGTCCTTC
61  ATCAAATCT TTGATAAGGT TTTCTTTGAA CTGTTCTGTT ACTCCAACTC CAACAGTCTC
121 ATAGGTATAA GAAGTCAAAA TCGAATTGAA AAAGAAAAAA ATATAAGATT ACATTCGTCA
181 ACGTTCAAAT TTATACAAA ATTCCAATAT GGAAACATGA GATGATAATA GGTTATTGTG
241 TTGTTCCAGT TACTCAGGAC TCATCAC
```

Nucleotide sequence of the S5 fragment and the SCAR5 primer designed to amplify S5 - Seq5 KX243227

```
1   TAGGCGTGTC TTCCAGTCTG CGACATTGGT TGTTAATAAT TTGTCATGCC GATGGTTGGT
61  GAAGTTGCTC CCCATTTGCG AAACCTTCTG AGGAAAGAAT CCTCGTTTCT GATATCGGTT
121 CGATGTAAAG CTTGACTGCC TTATGGACAA ATTTATACTG GGCCTCCGTA TGAGGCCTTA
181 TATATTCCTG TTACCTTACC GTCATTCTCT ACTTCTGTGG TCAAACCTCGC TGTTGAGTCT
241 TTCATTACCA TTTCAAGCT TGATCATGTC AATCACTCCC CTCTGATCCA
```

Nucleotide sequence of the S13 fragment and the SCAR13 primer designed to amplify S13 - Seq6 KX243228

```
1   AATTTTTAGG TGTACATATG GAGGGTAATT TGTCATGGAA TGCTCACATC GATAAGGTCT
61  GTAACCTCTAT TACGTCAGGT GTTTTTGCAT TACGATCATT AACTGAGGTT GTATCGGATT
121 CTGTATTATT GTCTGTGTAT CGTGGATTCA TAGAATCTAG AATAACATAT GGTATTTTGT
181 GCTGGGGTCA TGATGCAGGT GTGAAACGAC TCTTTGGATT GCAAAGAAAG GCTGTCAGAG
241 TTTTGGGTAG ACTAAT
```

Nucleotide sequence of the S15 fragment and the SCAR15 primer designed to amplify S15 - Seq7 KX243229

```
1   CGCTCACAGG CCGTGATCTT CCGTGATTCTG CACTCTGCA ACTTCTGTTA TCTGGTTATA
61  AACCTGTAT CTTTCATGGA AATATCTACA AATGAATTCT TCTTTATAA TTTTAACTAA
121 TGTAATTTTT CAAATTCACA AATAACGTCC CTGAGGATAT AAAAGTCCCTA GCTCGAGACT
181 GAGCCAATGT TCCTCTCCG AAGTTGATAA GAACTTTGTG GGTAACAGTT CTTCAATTGT
241 AAGGAGAGTA AATACTGCTG CTTGTAACCT GACAATTGCC AATGATGTTG GGATGACTT
```

Nucleotide sequence of the S18 fragment and the SCAR18 primer designed to amplify S18 - Seq8 KX243230

```
1   GCGTCATTAC GACTATACC TCGAACTCAA AAGGTCCTTA GGCAAAGGTG GGGTTTGGGA
61  AAAGGTTTAT GCATACCTCG TACCACCTGT TGGGAAAATT TTCAAGGGGT AAAGAAGCGA
121 AACGGATACC AAGATTTCAA GATGCAGGGT GTCAAATTC AGGATATAAA TAAAGAAGAG
181 TAGTGGTATT CATATTATAT TCCAAGCCCA CAATGCTCGG TGTGTGCTAG CGGTTACCCG
241 ACCATCTGCT TAGGGGCTCC TGACCCTATG GAAAAAGCGT CAAGCTTGGC CTGAATGGTG
301 GGAGTGCTGG ACAGGACAGT GTGGTCAAAT ACCTGGGAT AACAGTTGAC CGCTTGGGTA
361 AGTGAGTGAG ATGAGATGTT TGTAACATAG CATTGCGCTG A
```

Nucleotide sequence of the S19 fragment and the SCAR19 primer designed to amplify S19 - Seq9 KX243231

```
1   TTTCGAAGGG CGCTCGCATT CATCGCCGTT TGGTACCGCG CTCTGGGCGC CAGTCCTTTC
61  ATCTCCCGAA ACGTTCCTCT GTAGATAGGT GCCGTCCGTT TTCTTAGCGC CTCGTTTCGT
121 CCGATTCAGT GGCGGAGGCG TCTATTCTAT CCGGTAAAGG TTTTCAACGA ATTATGATAA
181 TAAAAAGGAA TAAATGAAAG GTGAAAATTG CGGGTAGAAT CAATCTTTCC GAATAGGTTT
241 CGGTTAGAAT CGGATCTAAA ATGCGTTGAT GGGCAAAATC CGACAAGGGT TCCGTAAATA
301 TGGCCGTTTC ACATTTTTTT TGGTTTTCTC AAAATTGCAG ATTTGATAAA ACCGTAAAGT
361 TATATTGTGA CAAACAAGAT GAACAATTCT AAGCTCGTGC AAAATGTC
```

Fig. 2. Nucleotide sequences and GenBank accession numbers of ten AFLP bands designated as S1, S2, S3, S4, S5, S13, S15, S18, S19, and S20 (Continued).

Nucleotide sequence of the S20 fragment and the SCAR20 primer designed to amplify S20 - Seq10 KX243232

```

1   GGAACTATTT TCCCTTCAGG GGAATATAA ACATGTTGCG GAAGTATCCA TGCGACGGCT
61  TTCTGTATGG TGGCGTCTAA ATTGCAAATC GCATCAGGGT ACACGCATGT CTGATATCAA
121 CTTTTATTGT CGACCAAGAT TCACAGTTGC ATGGCTTTTC GTGGTGGATT GCCAATTCAC
181 GTCATTGCTC CTGCGGCTAT ATCTCCATT ATGCGCGAAT TTCGGACTAC TGATGTATCC
241 GGATTTGAAG TGAACGCGCA CCTTCCACTG TATGTCAATA CGATGAGAAA GT
  
```

Fig. 2. Nucleotide sequences and GenBank accession numbers of ten AFLP bands designated as S1, S2, S3, S4, S5, S13, S15, S18, S19, and S20 (Continued).

Table 5. Nucleotide sequence of the SCAR primers designed to amplify AFLP markers

SCAR primer designation	AFLP marker designation		Sequence
SCAR 1	S1	F	GTCCCGATGTGATGCTGTC
		R	AAAAGAGACAAGAACCTCGTCTTTC
SCAR 2	S2	F	TTGTGTTTTTGGAAACTGACGT
		R	CGTGAATTGGTACGCAGTCA
SCAR 3	S3	F	GTACCAATTCACAGTTATCCTCACA
		R	CCCATAGTTACTCAGGACTCATCAA
SCAR 4	S4	F	CAATTCACGTCAGCGCTT
		R	TTGTTCCAGTTACTCAGG
SCAR 5	S5	F	TCTTCCAGTCTGCGACAT
		R	ATCATGTCAATCACTCCCC
SCAR 6	S13	F	AATTTTTAGGTGTACATATGGAG
		R	GGGGTCATGATGCAGGTAATAA
SCAR 7	S15	F	CGGTGATTCGCGACTCGT
		R	CCTGACAATTGCCAATGAT
SCAR 8	S18	F	GTCATTACGGACTATACCTCGAACT
		R	GGTAAGTGAGTGAGATGAGATGTTT
SCAR 9	S19	F	GCTCGCATTTCATCGCCG
		R	CAAGATGAACAATTCTAAGCT
SCAR 10	S20	F	CAGGGGGAATATAAACATGT
		R	ACGCGCACCTTCCACTGTATGT

로 unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 으로 변환하였다(Fig. 1). GDE 자료를 보면 같은 비암화형인 *Succinea* 1과 *Succinea* 2 변이형의 GDE 값이 0.07로 가장 유사한 것을 볼 수 있다. *Conspicua*와 *Succinea* 1 변이형의 GDE 값은 0.36이고 *Conspicua*와 *Succinea* 2 변이형은 0.37인 반면에 *Spectabilis*와 *Succinea* 1 변이형의 GDE 값은 0.28이고 *Spectabilis*와 *Succinea* 2 변이형의 GDE 값은 0.31이었다. *Conspicua*와 *Spectabilis* 변이형의 GDE 값은 0.38로 가장 큰 차이를 나타내었다. 이로써 *Spectabilis* 변이형이 *Conspicua* 변이형보다 좀더 *Succinea* 1과 *Succinea* 2 변이형에 유사성을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 *Conspicua* 변이형은 검은색 바탕에 황색 또는 붉

은색 점을 2 개 가지고 있는 표현형으로 형태적으로는 검은색 바탕에 황색 또는 붉은색 점을 4 개 가지고 있는 *Spectabilis* 변이형과 유사하지만, GDE값으로 미루어 볼 때 유전학적인 유사성은 *Succinea* 변이형에 좀 더 가깝다는 것을 확인할 수 있었다.

염기서열 분석과 SCAR 분자지표 변환

AFLP를 통해 얻은 패턴별로 차이를 나타내는 밴드 20 개 중 10 개만이 염기서열이 분석되었다(Fig. 2). 염기서열 분석이 완료된 것은 GenBank BLAST searching을 통해 기존에 알려진 염기서열과 유사성을 검색하였다. 그 결과 지브라피쉬, 박테리

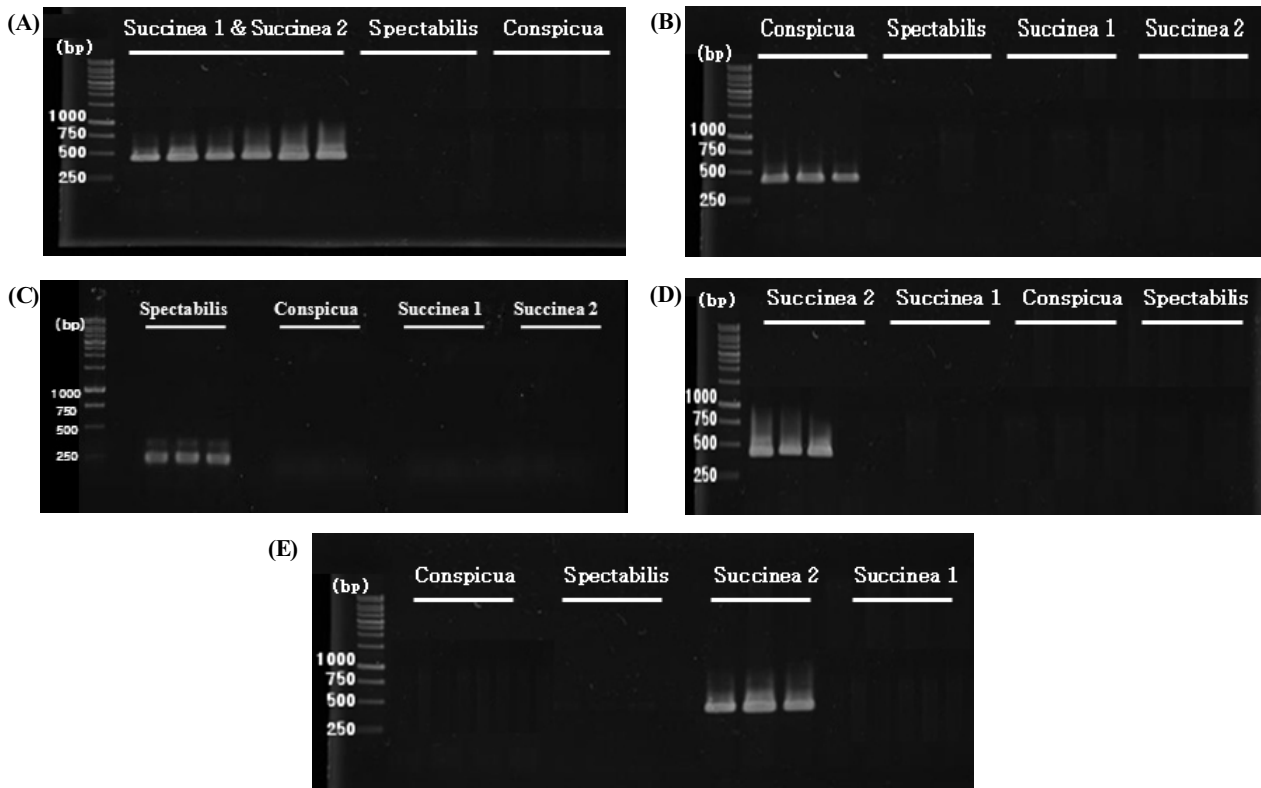


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of products amplified using SCAR markers, (A) S1, (B) S3, (C) S13, (D) S18, and (E) S19.

아 등과 유사성을 보였으나, 그 기능은 확인되지 않았다. 염기 서열분석이 완료된 10 개의 밴드는 염기서열을 기초로 SCAR 분자지표를 디자인하였다(Table 5).

후보 AFLP 분자지표가 SCAR 분자지표로 성공적으로 변환되었는지를 확인하기 위해 다른 DNA 시료를 이용하여 확인하였다. 여기에 쓰인 DNA 시료는 각 색상패턴의 암컷 3 마리의 독립적인 개체를 사용하였다. 그 결과, 10 개 중 S1을 포함한 S3, S13, S18, S19 등 5 개만이 변환된 SCAR 분자지표가 특이적인 색상패턴에 선택적으로 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

감사의 글

본 연구는 2015년도 충남대학교 자체연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

Literature Cited

- Aarts, H.J., van Lith, L.A., Keijer, J., 1998. High resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 131-135.
- Belicek, J., 1976. Coccinellidae of Western Canada and Alaska with analyses of the transmontane zoogeographic relationship between the fauna of British Columbia and Alberta. *Questiones Entomol.* 12, 283-409.
- Blears, M.J., de Grandis, S.A., Lee, H., Trevors, J.T., 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): A review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21, 99-114.
- Bonin, A., Ehrlich, D., Manel, S., 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.* 16, 3737-3758.
- Brown, M.W., Miller, S.S., 1998. Coccinellidae (Coleoptera) in apple orchards of eastern West Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Entomol. News.* 109, 136-142.
- Brown, P.M.J., Roy, H.E., Rothery, P., Roy, D.B., Ware, R.L., Majerus, M.E.N., 2008. *Harmonia axyridis* in Great Britain: Analysis of the spread and distribution of a non-native Coccinellidae. *BioControl* 53, 55-67.
- Carisio, L., Cervella, P., Palestini, C., Delpero, M., Rolando, A., 2004. Biogeographically patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus *Trypocopris* (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. *J. Biogeography* 31, 1149-1162.
- Chapin, J.B., Brov, V.A., 1991. *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera:

- Coccinellidae). Proc. Entomol. Soc. Wash. 93, 630-635.
- Day, W.H., Prokrym, D.R., Ellis, D.R., Chianer, R.J., 1994. The known distribution of the predator *Propylea quatuordecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) in the United States, and thoughts on the origin of this species and five other exotic lady beetles in Eastern North America. Entomol. News 105, 244-256.
- Dobzhansky, T. 1933. Geographical variation in ladybeetles. Am. Nat. 67, 97-126.
- ESK and KSAE., 1994. Check list of insects from Korea (eds). Kon-Kuk Univ. Press. Seoul. 774p.
- Hagen, K.S., 1962. Biology and ecology of predaceous Coccinellidae. Ann. Rev. Entomol. 7, 289-326.
- Hawthorne, D.J., 2001. AFLP-based genetic linkage map of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*: Sex chromosomes and a pyrethroid-resistance candidate gene. Genetics 158, 695-700.
- Hodek, I., 1973. Biology of Coccinellidae. Acad. Sci. Prague.
- Iperti, G., 1986. Les coccinellidae de France. Phytoma 377, pp. 14-22.
- Iperti, G., 1999. Biodiversity of predaceous Coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. Agricul. Ecosys. Environ. 74, 323-342.
- Jiggins, C.D., Mavarez, J., Beltran, M., McMillan, W.O., Johnston. J.S., Bermingham, E., 2005. A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. Genetics 171, 557-570.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breed. 3, 381-390.
- Kazachkova, N., Fahleson, J., Meijer, J., 2004. Establishment of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique for genotyping of pollen beetle (*Meligethes aeneus*)- A noxious insect pest on oilseed rape (*Brassica napus*). Mol. Biol. Rep. 31, 37-42.
- Kazachkova, N., Meijer, J., Exbom, B., 2007. Genetic diversity in pollen beetles (*Meligethes aeneus*) in Sweden: Role of spatial, temporal and insecticide resistance factors. Agricul. For. Entomol. 9, 259-269.
- Kidd, K.A., Nalepa, C.A., Day, E.R., Waldvogel, M.G., 1995. Distribution of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in North Carolina and Virginia. Proc. Entomol. Soc. Wash. 97, 729-731.
- Knorr, C., Cheng, H.H., Dodgson, J.B., 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. Anim. Genet. 30, 28-35.
- Koch, R.L., 2003. The multicolored Asian ladybeetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. J. Insect Sci. 3, 1-16.
- Komai, T., 1956. Genetics of ladybeetles. Adv. Genetics. 8, 155-189.
- Komai, T., Chino, M., Hosino, Y., 1950. Contributions to the evolutionary genetics of the lady-beetle, *Harmonia*. I. Geographic and temporal variations in the relative frequencies of the elytral pattern types and in the frequency of elytral ridge. Genetics 35, 589-601.
- Kuznetsov, V.N., 1997. Lady beetles of Russian Far East. The Sandhill Crane Press, Gainesville.
- Lamana, M.L., Miller, J.C., 1998. Temperature dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Environ. Entomol. 27, 1001-1005.
- Li, Z., Li, J., Wang, Q., He, Y., Liu, P., 2006. The effects of selective breeding on the genetic structure of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* populations. Aquacul. 258, 278-282.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Renona, E.D., Colowit, P.M., 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39, 969-977.
- Majerus, M.E.N. 1994. Ladybirds. Harper Collins Publishers, UK.
- Mariette, S., Chagne, D., Lezier, C., Pastuszka, P., Raffin, A., Plomion, C., Kremer, A., 2001. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite marker. Heredity 86, 469-479.
- Moeller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi fruit bodies, and infected plant tissues, Nucleic Acids Res. 20, 6115-6116.
- Nalepa, C.A., Kidd, K.A., Ahlstron, K.R., 1996. Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. Ann. Entomol. Soc. Am. 89, 681-685.
- Obata, S., 1986. Mechanisms of prey finding in the aphidophagous ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Entomophaga 31, 303-311.
- Park, H.C., 1993. Systematics and ecology of Coccinellidae (Insecta: Coleoptera) in Korea. PhD Thesis. Korea Univ. Korea.
- Parsons, Y.M, Shaw, K.L., 2001. Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. Mol. Ecol. 10, 1765-1772.
- Reineke, A., Karlovsky, P., 2000. Simplified AFLP protocol: replacement of primer labeling by the incorporation of alpha-labeled nucleotides during PCR. Biotechniques 28, 622-623.
- Roa, A.C., Maya, M.M., Duque, M.C., Tohme, J., Allem, A.F., Bonierbale, M.W., 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other Manihot species. Theor. Appl. Genet. 95, 741-746.
- Roy, H., Wajnberg, E., 2008. From biological control to invasion: The ladybird *Harmonia axyridis* as a model species. BioControl 53, 1-4.
- Rusell, J. R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W., Waugh, R., 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95, 714-722.
- Seo, M.J., 1999. Behavioral characteristics and effective control strategies to aphids with the Asian Ladybird Beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Ms. Thesis, Chungnam Nat'l Univ., pp. 68.

- Seo, M.J., Kang, E.J., Kang, M.K., Lee, H.J., Seok, H.B., Lee, D.H., Park, S.N., Yu, Y.M., Youn, Y.N., 2007. Phenotypic variation and genetic correlation of elytra colored patterns of multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Korea. Korean J. Appl. Entomol. 46, 235-249.
- Seo, M.J., Kim, G.H., Youn, Y.N., 2008. Differences in biological and behavioural characteristics of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) according to colour patterns of elytra. J. Appl. Entomol. 132, 239-247.
- Seo, M.J., Youn, Y.N., 2000. The Asian Ladybird, *Harmonia axyridis*, as biological control agent: I. Predacious behavior and feeding ability. Kor. J. Appl. Entomol. 39, 50-71.
- Stewart, L.A., Dixon, A.F.G., 1989. Why big species of ladybird beetles are not melanic. Functional Ecol. 3, 165-171.
- Sweetman, H.L., 1958. The principle of biological control. Brown WC, Dubuque Iowa.
- Tan, C.C., Li, J.C., 1934. Inheritance of the elytral color patterns of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* Pallas. Genetics 68, 252-265.
- Tedders, W.L., Schaefer, P.W., 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in the Southeastern United States. Entomol. News 105, 228-243.
- Vos, P., Hodggers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids. Res. 23, 4407-4414.
- Wichan, E., Yonemori, K., Kanzaki, S., 2000. Amplified fragment length polymorphism analysis for studying genetic relationships among *Mangifera* species in Thailand. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 125, 160-164.
- Xiao, J.P., Chen, L.G., Xie, M., Liu, H.L., Ye, W.Q., 2009. Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. Sci. Horticul. 121, 505-510.
- Xu, D.H., Wahyuni, S., Sato, Y., Yamaguchi, M., Tsunematsu, H., Ban, T., 2006. Genetic diversity and relationships of Japanese peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. Gen. Res. Crop Evol. 53, 883-889.
- Yeon, I.J., Song, M.Y., Hwang, H.J., Sohn, M.H., Kim, J.B., Im, Y.J., Kim, Y.S., Kim, K.S., Bang, I.C., 2008. Population structure of the blue and purple types of the blue crab *Portunus trituberculatus* (Miers) from the west sea of Korea based on morphometric characteristics and AFLP analysis. J. Kor. Fish. Soc. 41, 94-101.
- Youn, Y.N., Seo, M.J., Shin, J.G., Jang, C., Yu, Y.M., 2003. Toxicity of greenhouse pesticides to multicolored Asian lady beetles, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). Biol. Con. 28, 164-170.
- Zhong, D., Pai, A., Yan, G., 2004. AFLP-based genetic linkage map for the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). J. Heredity 95, 53-61.