

전라남도 해남과 무안의 풀무치 개체군에 대한 미토콘드리아 *NADH dehydrogenase subunit* 들을 이용한 계통분석

이관석[†] · 김영하^{1†} · 정진교² · 고영호^{1*}

국립농업과학원 작물보호과, ¹한림대학교 일송생명과학연구소, ²국립식량과학원 중부작물부

Phylogenetic Analysis of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acridae) in Haenam-gun and Muan-gun, Jeollanam-do, Korea Using Mitochondrial *NADH dehydrogenase subunits*

Gwan Seok Lee[†], Young Ha Kim^{1†}, Jin Kyo Jung² and Young Ho Koh^{1*}

Department of Plant Protection, National Academy of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

¹Ilsong Institute of Life Science, Hallym University, Anyang 14066, Korea

²Department of Central Area, National Institute of Crop Science, Suwon 16429, Korea

ABSTRACT: In a nationwide survey of the occurrence and density of the migratory locust (*Locusta migratoria*), high density was continuously observed in the reclaimed areas of Mangun-myeon in Muan-gun, Jeollanam-do, and Sanye-myeon in Haenam-gun, Jeollanam-do, Korea. We have analyzed the nucleotide sequences of *NADH dehydrogenase subunit* (*NAD*) 2, *NAD4*, and *NAD5* genes in order to determine the origins of the migratory locusts at two sites. According to the analysis, the migratory locusts in Haenam-gun were closely related with those in Liaoning Province and Heilongjiang Province in the northeast China. In contrast, the migratory locusts in Muan-gun were most similar to those in Japan. Because Korean migratory locusts were not included in the previous global study on the evolution and migration of migratory locusts, we did not know the origin of Korean migratory locusts, earlier. Phylogenetic analyses this study suggested that the migratory locusts from the northeast Chinese population might have migrated and settled in Haenam-gun in Korea. Moreover, another northeast Chinese population might have migrated to Muan-gun in Korea though Sakhalin, Russia and Hokkaido, Japan. However, the possibility that the migratory locusts moved from northeast China might be isolated from each other in Korea, and that the Muan population might migrate to Japan cannot be excluded.

Key words: Migratory locusts, *NADH dehydrogenase subunit*, Haenam, Muan, Northeast China

초록: 풀무치의 전국적인 발생현황 및 밀도조사의 결과, 한국에서는 전라남도 해남군 산이면과 전라남도 무안군 망운면 간척지에서 2015년 이후 지속적으로 높은 밀도의 발생이 관찰되었다. 우리는 두 지점에서 발생하는 풀무치의 기원을 알아내기 위하여 *NADH dehydrogenase subunit* (*NAD*) 2, *NAD4* 와 *NAD5*의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 해남풀무치의 경우는 중국동북부의 Liaoning성 과 Heilongjiang성 개체군과 기원이 비슷하고, 무안풀무치의 경우는 일본풀무치와 기원이 비슷하다는 결론에 도달했다. 이전의 전 세계적인 풀무치의 진화에 관한 연구에서 한국의 풀무치가 포함이 되지 않아서 한반도 풀무치의 기원은 알 수 없었다. 본 연구의 결과는 중국북동부 지방에서 8만 년 전에 분리된 풀무치 중 일부가 한반도로 이동을 하여 해남 지역에 정착을 하고 일부는 러시아 사할린과 일본 홋카이도섬을 거쳐서 무안으로 이동하였을 가능성을 보여주고 있다. 하지만, 한반도로 내려온 풀무치가 해남과 무안계통으로 분리된 후 일본으로 이동하였을 가능성도 배제할 수 없다.

검색어: 풀무치, *NADH dehydrogenase subunit*, 해남, 무안, 중국북동부

*Corresponding author: kohyh@hallym.ac.kr

[†]These two authors contributed equally to this work.

Received October 18 2017; Revised November 1 2017

Accepted November 6 2017

풀무치는 아프리카에서 기원해서 남북아메리카대륙과 양극 지방을 제외한 유럽, 아시아, 오스트레일리아와 뉴질랜드에서 분포를 하는 해충이다(Chapuis et al., 2008; Chen et al., 1999; Ma et al., 2012). 풀무치는 대량발생을 하면 먹이를 찾아서 이동을 하는데, 이동 경로에 존재하는 농작물을 포함한 모든 식물체에 심각한 피해를 준다. 최근에는 유럽에서 대량발생은 보고되지 않지만, 아프리카, 오스트레일리아, 뉴질랜드, 중앙아시아, 중국과 일본에서 대량발생이 보고되고 있다(Ernst et al., 2015; Yamagishi and Tanake, 2009). 식생에 심각한 피해를 주는 중요한 해충이기에 풀무치에 대한 다양한 연구가 이루어졌다. 그 중에 풀무치의 발생에 관련된 연구의 결과들은 풀무치의 발육속도는 온도와 높은 상관관계가 있음을 보여주고 있다(Tu et al., 2012; Tu et al., 2014). 연구결과에 따르면, 고온의 열대지방에서는 일 년에 여러 세대가 발생을 할 수 있다. 하지만, 온대지방에서는 초여름 앞에서 깨어나 여름에 성충으로 변태를 완성한 후, 일장이 짧아지고 기온이 낮아지는 가을에 월동을 할 수 있는 알을 땅속에 산란한다. 그리고 성충은 월동을 하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 온도와 연관성이 있는 풀무치의 발육속도는 현재 진행되고 있는 지구 온난화와 상호작용을 하여 온대지방에서도 대량발생 하는 주요 해충이 될 가능성을 보여준다.

전 지구적인 기후변화가 농업에 가져오는 커다란 문제점 중의 하나는 과거에는 문제를 일으키지 않던 곤충들이 서식 환경의 변화와 해충의 생리 변화가 상호 상승 작용을 하여 해충화 되는 것이다(Bebber et al., 2013; Chen et al., 2011; Cornelissen, 2011). 그러한 예 중의 하나가 풀무치로서 2014년 8월에 대한민국의 해남군 산이면 친환경 간척지에서 대량발생이 국내 최초로 발견 되었다(Kim et al., 2014; Jung et al., 2017; Kim et al., 2016; Lee et al., 2016). 최근 3년간 풀무치에 대한 전국적인 채집을 진행한 결과, 도서지역을 포함한 한반도의 거의 전역에 분포함을 알 수 있었다. 풀무치의 발생 밀도가 타 지역보다 높은 지역은 전라남도의 해남군 산이면 덕호리 간척지와 무안군 망운면 피서리 간척지로, 7월부터 성충의 발생이 관찰이 되었다(Jung et al., 2017; Kim et al., 2016). 하지만, 다른 지역의 경우는 풀무치 개체군의 밀도가 높지 않았다. 두 지역의 가지는 공통점은 간척지로서 넓은 면적의 사료작물들이 친환경적으로 재배가 되고 있고, 간척지의 일부분이 경작이 되지 않고 방치되어 다양한 식물상이 존재를 하여, 비행능력이 뛰어난 풀무치 성충은 그 곳으로 도피를 할 수 있는 은신처를 가지고 있다는 공통점이 있다(Kim et al., 2016). 최근에 우리는 미토콘드리아의 cytochrom c oxidase subunit I의 염기서열(Lee et al., 2016)과 16S ribosomal RNA 와 displacement-loop (D-loop) 유전자

서열을 이용한 계통분석 결과(Kim et al., 2016), 해남의 풀무치가 북방계열일 가능성을 보고 하였다. 하지만, 아직까지 무안군 풀무치의 기원에 대한 연구는 진행이 이루어 지지 않았다. 무안군 망운면 간척지는 1960년대에 간척을 시작을 하여 1980년대에 완공이 되었고(<http://www.muannews.com/news/articlePrint.html?idxno=9930>), 해남군 산이면 간척지는 1985년에 간척을 시작하여 2004년도에 완공이 된 신규 간척지(<http://estate.mk.co.kr/news2011/view.php?sc=&year=2009&no=494873>) 라는 시기적인 차이점이 있다. 직선거리는 33 km로 지리적으로 가깝지만, 영산강과 영암호가 사이에 자리잡고 있어서 지리적으로 서로 격리되었을 가능성이 크다. 그리고, 현재까지 무안군 망운면 간척지에서 대량발생이 일어났다는 보고는 없다. 해남 풀무치와 무안풀무치의 머리에 발현되는 micro-RNA들에도 차이가 있음을 우리는 보고 하였다(Jung et al., 2017). 그러므로, 우리는 두 지역에서 채집된 풀무치들의 기원이 다를 것이라는 가설을 세우고 기원을 밝혀내는 연구를 진행하기 위하여 미토콘드리아에 존재하는 *NADH dehydrogenase subunit* 중에서 3개의 염기서열을 밝혀낸 후에 다른 기준에 발표된 서열들과 비교하여 기원을 밝혀내는 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

풀무치채집

2016년 9월에 전라남도 해남군 산이면 덕호리 간척지와 무안군 망운면 피서리 간척지에서 풀무치(*Locusta migratoria*)를 채집하였다.

미토콘드리아 DNA 추출 방법 및 염기서열 분석법

미토콘드리아 DNA를 포함한 전체 유전체 DNA는 Qiagen DNeasy Blood & Tissue genomic DNA extraction kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)를 이용하여 추출을 하였다. 풀무치의 다리를 절단 한 후에 조직 용해 용액을 넣고 균질화를 시킨 후, protein K를 첨가하여 56°C에서 10분간 보관을 하여 단백질을 분해한다. 동일한 튜브에 absolute ethanol (Daejung Chemical & Metals Co. Seoul, Korea)을 첨가한 후, vortex mixer로 15초간 섞어 준 후, 상온에서 8,000 rpm에서 원심분리를 1분간 수행한 후, 상등액을 분리해 낸다. 분리된 상등액은 DNA 결합 컬럼으로 옮긴 후 14,000 rpm에서 3분간 원심분리를 진행한다. DNA 결합 컬럼을 새로운 튜브로 옮긴 후에 100 μ l의 용출용액을 이용하여 genomic DNA와 mitochondrial DNA를 추출한다.

마이토콘드리아 *NADH dehydrogenase subunit (NAD) 2*, *NAD4*와 *NAD5*를 PCR로 증폭을 하였다. PCR에 사용된 primer의 서열은 Table 1에 있다. 증폭된 PCR산물은 pGEMT-easy TA cloning kit (Promega, Fitchburg, WI, USA)로 cloning을 했다. 목표 DNA를 포함하고 있는 plasmid를 가지는 *E. coli*를 액체배지로 배양하여 plasmid miniprep kit (Qiagen)을 이용하여 정제를 하였다. 정제된 plasmid의 양쪽 DNA에 대한 capillary sequencing을 수행하여 3개의 *NAD*의 서열을 확인하였다. 밝혀진 염기서열은 CLC sequence viewer 7.7 (Qiagen)을 이용하여 분석을 진행하였다. 각각 3개체의 genomic DNA를 이용하여 반복 실험을 수행하였다. 반복 간에 유전자 서열의 차이는 존재를 하지 않았다.

해남과 무안 풀무치의 *NAD2*와 *NAD5*을 이용한 phylogenetic analysis

본 연구에서 밝혀낸 해남과 무안의 풀무치의 2개의 *NAD*의 서열을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide BLAST를 수행하였다. 그 결과 total score가

높은 *NAD2*와 *NAD5*의 DNA서열들을 풀무치 전체 마이토콘드리아 서열에서 얻어낸 후, CLC sequence viewer 7.7 (Qiagen)을 이용하여 비교분석을 수행하였다. 다른 종과의 Phylogenetic 연관성 분석을 수행하기 위하여 *Oedaleus decorus asiaticus*와 *Oedaleus infernalis* Saussure (팔중이)의 *NAD2*와 *NAD5*의 서열을 out-group으로 이용하여 분석을 진행하였다. Phylogenetic tree는 Neighbor Joining방법으로 제작하였다. 염기서열 간의 거리는 Jukes-Cantor방법으로 수행을 하였고, Bootstrapping분석은 1,000반복 수행하였다. 결과는 phylogram으로 나타냈고 Bootstrap의 수치를 각각의 분지 점에 표시를 하였다.

결과

해남풀무치와 무안풀무치의 *NAD2*와 *NAD5*의 경우 염기서열에 차이가 있음

본 연구에서 해독한 해남풀무치와 무안 풀무치의 마이토콘드리아의 *NAD2*와 *NAD5*의 서열을 비교 분석하였다. 그 결과 우리는 *NAD2*의 경우는 염기서열 1개가(Fig. 1A), *NAD5*의 경

Table 1. The sequences of primers used for amplifying mitochondrial *NAD2*, *NAD4*, and *NAD5*

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	PCR product size
NAD2	5'-ACTAATGTGCATCTTACACCT-3'	5'-TTCAATTATGATTCTAGACTGCA-3'	1,239 bp
	5'-CCAGCAGTAACAAGAGTAGAAGA-3'	5'-GCTTATTCTTCTGTTGCTCATAT-3'	1,366 bp
NAD4	5'-CACCAGAATAATATAAACCATG-3'	5'-GGTGGTGTATTATTAGATTGT-3'	468 bp
	5'-AACAGAAGAATAAGCAATTAAG	5'-ATTATTGTTCTGTTATTATTCT-3'	1,398 bp
NAD5	5'-ACATCTTCAATGTTATACTCTAC-3'	5'-TTGACTTCCTGCTGCCATGGC-3'	1,145 bp
	5'-CCAGCAGTAACAAGAGTAGAAGA	5'-GCTTATTCTTCTGTTGCTCATAT-3'	1,266 bp

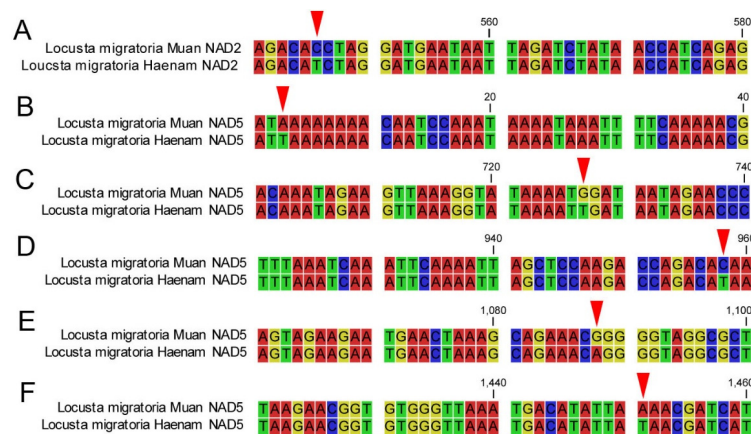


Fig. 1. The mismatched nucleotides in *NAD2* and *NAD5* genes between Muan and Haenam migratory locusts. There was only one mismatch in *NAD2* genes between Muan and Haenam migratory locusts. B-F, There were five mismatches in *NAD5* genes between Muan and Haenam migratory locusts. Mismatched nucleotides have been indicated with red arrowheads.

우는 5개(Fig. 1B~G) 해남과 무안에서 차이가 있음을 밝혀냈다. 하지만, *NAD4*의 경우에는 해남 풀무치와 무안 풀무치에서 차이가 존재를 하지 않았다(KYH and KYH, data not shown). 그러므로, *NAD4*는 풀무치의 기원을 밝혀내는데 사용을 하지 않았다.

해남풀무치는 중국 풀무치 계통과 무안풀무치는 일본 풀무치 계통과 가장 가까웠음

본 연구에서 밝혀낸 해남풀무치와 무안풀무치의 *NAD2*와 *NAD5*의 염기서열을 이용하여 이들의 기원에 관한 연구를 진행하였다. 우선 해남풀무치와 무안풀무치의 *NAD2*와 *NAD5*의 염기서열을 이용하여 NCBI에서 BLAST를 수행하여 가장 높은 상동성을 보이는 *NAD2*와 *NAD5*의 서열을 각각 13개씩 확보하였다. 확보한 염기서열을 이용하여 계통학적인 분석을 수행하였다. 그 결과 해남풀무치의 *NAD2*는 중국의 Liaoning성

(JN858152.1) 과 Jiangsu 성(JN858158.1)에서 채집된 풀무치와 근연 관계가 가장 높게 나타났다. 그리고 무안풀무치의 *NAD2*의 경우는 일본풀무치(JN858148.1)와 가장 근연 관계가 높았다(Fig. 2).

우리는 해남풀무치와 무안풀무치의 기원을 더욱 정확하게 분석을 하기 위하여 *NAD5* 유전자의 염기서열을 이용하여 추가로 분석을 수행하였다. 그 결과, 해남 풀무치의 경우는 중국의 북동쪽 러시아 접경 지역에 위치한 Heilongjiang 성에서 채집된 풀무치(JN858151.1)와 가장 기원이 비슷하였고, 그 다음으로는 Jiangsu성에서 채집된 풀무치(JN858163.1)와 비슷하다는 결과가 나왔다(Fig. 3). 그리고 무안계통의 경우는 일본풀무치(JN858148.1)와 가장 비슷하다는 분석이 나왔다(Fig. 3). 이러한 *NAD5*와 *NAD2*의 분석결과는 해남풀무치와 무안풀무치가 각각 다른 시기에 다른 경로로 이주를 해왔을 가능성을 제기하고 있다.

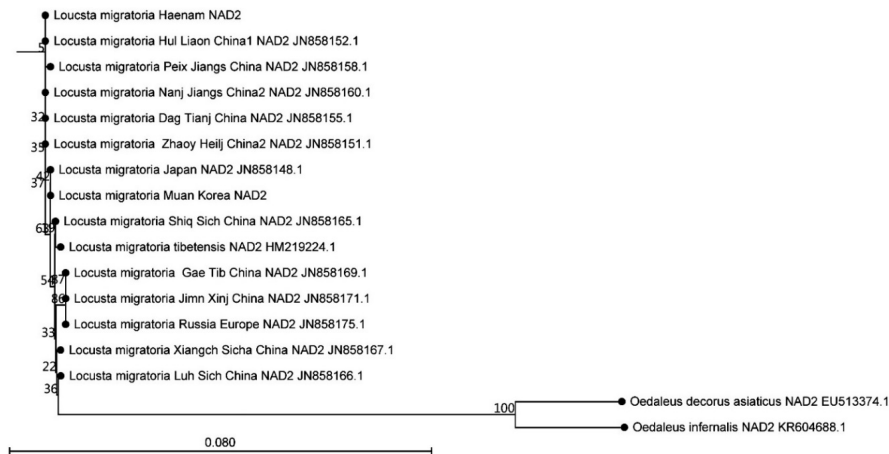


Fig. 2. Phylogenetic analysis using sequences of *NAD2* genes suggested different origins of Muan and Haenam migratory locusts.

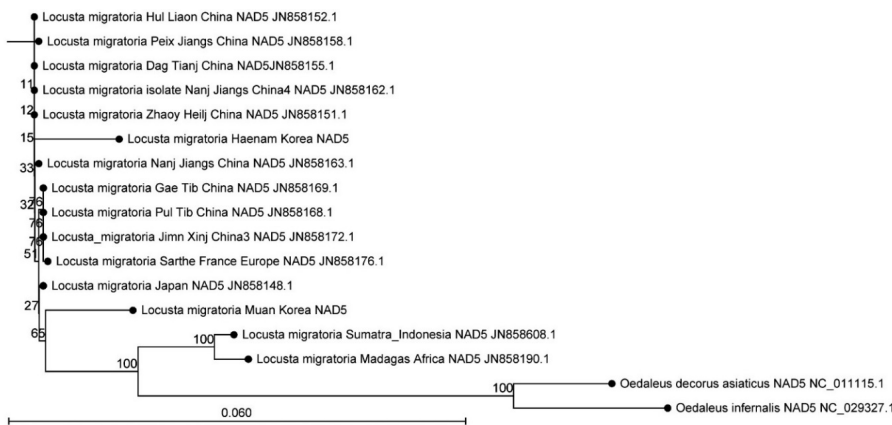


Fig. 3. Phylogenetic analysis using sequences of *NAD5* genes confirmed that Muan and Haenam migratory locusts might have different origins.

고찰

2014년도의 전라남도 해남군 산이면 덕호리 간척지에서의 풀무치의 대량발생은 기후변화와 곤충의 생리 변화가 어떻게 상승작용을 가져오는지를 보여주는 중요한 예이다. 전 지구적인 온난화로 연 평균기온이 지속적으로 상승하고 있다. 이러한 연 평균 기온의 상승, 특히 겨울철 평균기온의 상승은 새로운 해충의 출현을 가져올 수 있다(Bebber et al., 2013; Chen et al., 2011; Cornelissen, 2011). 하나의 예는 이전에는 겨울철 기온이 낮아서 월동을 하지 못했던 비레 해충들이 월동이 가능하게 되면서 도착 해충화 될 수 있다. 두 번째 예는 약제 저항성 해충들의 경우 겨울철 저온에 민감하여 월동 후 생존하는 개체 수가 적었는데, 겨울철 온도의 상승은 월동 후 생존하는 저항성 해충의 수를 급격하게 증가시킬 수 있다. 그러므로, 다음 해에 약제 저항성을 획득한 개체군의 수가 급격히 증가할 수 있다. 마지막으로, 이전에는 문제가 없던 곤충들이 평균 기온의 상승으로 생육가능기간이 길어지고 동시에 발육속도가 빨려져 대량으로 발생할 수 있는 조건이 되므로 해충화 되는 것이다.

풀무치는 뛰어난 환경 적응성 때문에 전 세계에서 가장 넓게 분포하는 해충 중의 하나로서, 아프리카와 아시아와 오세아니아 대륙에서 심각한 작물에 대한 피해를 끼치고 있다(Ma et al., 2012; Ernst et al., 2015; Yamagishi and Tanake, 2009). 하지만, 대한민국에서는 2014년 대량발생 이전에는 풀무치에 의한 작물 피해는 보고된 바 없다. 이러한 대량발생의 원인을 구명하는 연구의 일환으로 전국에서 풀무치의 서식 밀도가 높아 향 후 대량발생의 가능성이 높은 전라남도 해남군 산이면과 무안군 망운면 간척지역 서식하는 풀무치들에 대한 비교 연구를 진행을 하였다. 풀무치의 계통분석연구에는 *NAD*들의 염기서열을 사용한다는 보고가 있어서(Ma et al., 2012; Sorenson and Franzosa, 2007), 우리는 풀무치의 미토콘드리아에 존재하는 3개의 *NAD*에 대한 분석을 진행하였다. 그 결과, *NAD4*의 경우 두 개체군에서 염기서열의 차이가 없었다. 그러나 *NAD2*와 *NAD5*의 경우는 염기서열의 차이가 있어서, 이들을 이용한 비교 연구를 진행하였다(Fig. 1). 우리는 이전의 해남풀무치의 계통분석연구에서 이들이 북방계통에 속한다는 것을 보고 하였다(Kim et al., 2016; Lee et al., 2016). 본 연구의 결과도 동일하게 해남풀무치와 무안풀무치는 북방계통에 속하는데 이들과 가장 비슷한 기원을 가지는 풀무치들은 해남의 경우는 중국 동부해안의 Jiangsu성 개체군이나 동북부의 Liaoning성 과 Heilongjiang성 개체군과 기원이 비슷하고, 무안계통의 경우는 일본개체군과 비슷하다는 결론에 도달 했다(Figs. 2, 3). Ma et al. (2012) 는 북방 풀무치 계통이 8만 년 전에 중국의 동북부 지방에서 분리되

어져서 일부는 중국내륙으로 이동을 하고 일부는 러시아의 사할린과 일본의 홋카이도 섬을 거쳐서 일본으로 이동을 했을 가능성이 있다고 발표를 하였다. Ma et al. (2012)의 논문에서는 한국의 풀무치에 대한 분석 연구가 이루어 지지 않았지만, 우리의 결과는 Liaoning성 과 Heilongjiang성 개체군들이 8만 년 전에 중국 동북부 지역에서 분리되어져 일부는 한반도로 이주를 시작하여 해남지역에 정착을 하고, 일부는 Ma et al. (2012)의 제안처럼, 러시아의 사할린과 일본의 홋카이도 섬을 거쳐서 일본으로 이주를 하여 정착을 한 후, 한반도 무안지역으로 이동을 하였을 가능성이 있다. 하지만, 일본풀무치 개체군도 러시아의 사할린과 일본의 홋카이도 섬을 거치지 않고, 한국의 무안지방을 거쳐서 일본으로 이동을 하여 정착을 하였을 가능성도 배제할 수는 없다. 하지만, 두 가지의 가설 중 어느 경우도 해남풀무치와 무안풀무치 계통은 오래 전에 나뉘어 졌음을 시사하고 있다.

마지막으로 무안풀무치 개체군이 대량발생을 하지 않는 이유는 유전적인 차이점 이외에도 간척지 면적의 차이에 의할 수도 있다. 해남 간척지의 크기는 무안 간척지 보다 수십 배 넓으므로, 풀무치 개체군이 커지면서 군집화 될 가능성이 매우 높다고 하겠다. 그러므로, 향 후 풀무치의 대량발생에 의한 피해를 방지하기 위해서는 한반도 전 지역에 분포하는 풀무치 개체군에 대한 지속적인 발생 예찰과 기원에 대한 연구를 진행이 필요하다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 연구과제(PJ011630042017)의 지원으로 수행되었다.

Literature Cited

- Bebber, D.P., Ramotowski, B.M.A., Gurr, S.J., 2013. Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nat. Clim. Change* 3, 985-988.
- Chapuis, M.-P., Lecoq, M., Michalakakis, Y., Loiseau, A., Sword, G.A., Piry, S., Estoup, A., 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Mol. Ecol.* 17, 3640-3653.
- Chen, Y.L., Zhang, D.E., 1999. Historical evidence for population dynamics of Tibetan migratory locust and the forecast of its outbreak. *Insect Sci.* 6, 135-145.
- Chen, I.C., Hill, J.K., Ohlemüller, Roy, D.B., Thomas, C.D., 2011. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Sci.* 333, 1024-1026.

-
- Cornelissen, T., 2011. Climate change and its effects on terrestrial insects and herbivory patterns. *Neotrop. Entomol.* 40, 155-163.
- Ernst, U.R., Van Hiel, M.B., Depuydt, G., Boerjan, B., De Loof, A., Schoofs, L., 2015. Epigenetics and locust life phase transitions. *J. Exp. Biol.* 218, 88-99.
- Jung, J.K., Nguyen, P., Kim, A.Y., Choi, A.Y., Yu, Y., Lee, G.S., Koh, Y.H., 2017. Identification of microRNAs and their target transcripts in the migratory locust adult brain revealed their roles in the epigenetic regulation of polyphenisms. *J. Asia-Pacific Entomol.* 20, 1396-1401.
- Kim, G.H., Lee, G.S., Seo, B.Y., Jeong, I.H., Lee, S.K., Kim, Y.P., 2014. Discussion in the mechanisms underlying out-break of *Locusta migratoria* at Haenam, Jeollanam-do. *Proc. Korean Soc. Appl. Entomol.* 2014 Autumn Conf., 277 pp.
- Kim, Y.H., Jung, J.K., Lee, G.S., Koh, Y.H., 2016. Phylogenetic analysis of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) in Haenam-gun, Jeollanam-do, Korea using Two Mitochondrial Genes. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 459-464.
- Lee, G.S., Kim, K.H., Kim, C.S., Lee, W.H., 2016. An outbreak of gregarious nymphs of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) in Korea and their genetic lineage based on mtDNA COI sequences. *J. Appl. Entomol.* 55, 523-528.
- Ma, C., Yang, P.C., Jiang, F., Chapuis, M.-P., Shali, Y., Sword, G.A., Kang, L., 2012. Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. *Mol. Ecol.* 21, 4344-4358.
- Sorenson, M., Franzosac E., 2007. *TreeRot*, Version 3. Boston, University, Boston, MA, USA.
- Tu, X., Zhang, Z., Johnson, D.L., Cao, C., Li, Z., Gao, S., Nong, X., Wang, G. 2012. Growth, development and daily change in body weight of *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae) nymphs at different temperature. *J. Orthoptera Res.* 21, 133-140.
- Tu, X., Li, Z., Wang, J., Huang, X.B., Yang, J., Fan, C., Wu, H., Wang, Q., Zhang, Z., 2014. Improving the degree-day model for forecasting *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) (Orthoptera: Acridoidea). *PLoS ONE.* 9, e89523
- Yamagishi, M., Tanake, S., 2009. Overwintering biology and morphological characteristics of the migratory locust, *Locusta migratoria* after outbreaks on Iheya Island, Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 44, 165-174.