

복숭아순나방 성충 복부에서 발현하는 불포화효소의 RNA 간섭과 교미교란

김규순 · 정총렬¹ · 양창열² · 권기면³ · 김용균*

안동대학교 식물의학과, ¹국립산림과학원 산림약용자원연구소, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원, ³생물이용연구소

Mating Disruption of *Grapholita molesta* by RNA Interference of a Fatty Acid Desaturase Expressed in Adult Abdomen

Kyusoon Kim, Chung Ryul Jung¹, Chang Yeol Yang², Gimyeon Kwon³ and Yonggyun Kim*

Department of Plant Medicals, Andong National University, Andong 36729, Korea

¹National Institute of Forest Science, Yeongju 36040, Korea

²National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

³Bio Utilization Institute, Andong 36728, Korea

ABSTRACT: Two major sex pheromone components (*Z*-8-dodecenyl acetate and *E*-8-dodecenyl acetate) are known in the peach fruit moth, *Grapholita molesta*. From a putative biosynthetic pathway of these sex pheromone components, delta 10 desaturase ($\Delta 10$ DES) has been proposed to play a crucial role in synthesizing a species-specific stereoisomer of the double bond. However, its molecular identity was not known. This study determined a putative desaturase (*Gm-comp1575*) as a $\Delta 10$ DES candidate from *G. molesta* transcriptome constructed from the sex pheromone gland. Its open reading frame encodes 370 amino acid sequence with a predicted molecular weight at 43.2 kDa and isoelectric point at 8.77. It was predicted to have four transmembrane domains and six glycosylation sites at N-terminal or cytosolic domains. A phylogenetic analysis with its predicted amino acid sequence indicated that *Gm-comp1575* is closely related with known $\Delta 10$ DES genes of other insects. *Gm-comp1575* transcript was detected in female adults at sex pheromone gland and other abdominal tissues. RNA interference of *Gm-comp1575* significantly reduced attractiveness of virgin females in apple orchard compared to control females. These results suggest that *Gm-comp1575* is associated with sex pheromone biosynthesis of *G. molesta*.

Key words: *Grapholita molesta*, Sex pheromone, Desaturase, RNA interference

초록: 복숭아순나방(*Grapholita molesta*)은 두 가지 주요 성페로몬 성분(*Z*-8-dodecenyl acetate and *E*-8-dodecenyl acetate)을 갖고 있다. 이 성페로몬 성분의 생합성 과정 분석은 포화지방산의 10번 탄소에 이중결합을 합성하는 불포화효소($\Delta 10$ DES)가 종 특이적 광학이성체 형성에 필수적이라고 제시하였다. 그러나 이 효소의 분자적 특징에 대해서 분석되지 않았다. 본 연구는 복숭아순나방 성페로몬 샘의 전사체에서 $\Delta 10$ DES로 추정된 불포화효소(*Gm-comp1575*)의 단백질 기능 영역을 분석하였다. *Gm-comp1575* 유전자는 370개의 아미노산 서열 정보를 암호화하고 있으며 분자량은 약 43.2 kDa 그리고 등전위점(pI)은 8.77로 추정되었다. 이 불포화효소는 4개의 막투과영역을 지니고 있으며, 6개의 탄수화물 결합 위치가 아미노 말단과 세포내 영역에서 갖는 것으로 추정되었다. 분자계통분석은 *Gm-comp1575*가 다른 종에서 알려진 $\Delta 10$ DES와 유사성이 높은 것으로 밝혀졌다. *Gm-comp1575* 전사체는 암컷 성페로몬 샘 및 다른 복부 조직에서 발현되었다. 이 유전자 발현에 대한 RNA 간섭 처리는 처녀 암컷으로 하여금 사과원에서 수컷을 유인하는 능력을 크게 감소시켰다. 이러한 결과는 *Gm-comp1575*가 복숭아순나방의 성페로몬 생합성과 관련된 유전자라고 제시하고 있다.

검색어: 복숭아순나방, 성페로몬, 불포화효소, RNA 간섭

복숭아순나방(*Grapholita molesta*)은 중국 북서부 지역에서

유래된 것으로 추정되며(Hallman, 2004) 현재는 전 세계 거의 모든 온대 지역에 분포하며 사과를 비롯한 배, 복숭아 등의 과실류와 함께 장미과 식물 등에도 심각한 피해를 주고 있다 (Rothschild and Vicker, 1991; Knight et al., 2014). 특별히 과

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received November 17 2016; Revised January 13 2017

Accepted February 8 2017

실 내부를 가해하여 이들 농작물의 일차피해를 주게 된다. 이러한 과실 내부의 섭식 행동은 살충제 살포에 따른 접촉을 어렵게 하여 약제 방제에 어려움을 주게 된다. 따라서 이 해충의 방제는 과실 밖에서 활동하는 시기인 성충태가 주목 받게 된다.

복숭아순나방의 교미신호는 성페로몬에 의존하며, 하루 중 일정한 시각에 수컷은 성페로몬 신호에 유인된다(Kim et al., 2011). 복숭아순나방의 성페로몬은 Z-8-dodecenyl acetate (Z8-12:Ac)와 E-8-dodecenyl acetate (E8-12:Ac) 및 Z-8-dodecenol (Z8-12:OH)를 가지며 95:5:1의 구성을 가진다(Han et al., 2001; Yang et al., 2002). 이들 성페로몬의 생합성 과정을 밝히기 위해 성페로몬 샘의 전사체가 RNA-Seq 기술로 분석되었다(Jung and Kim, 2014). 성페로몬 샘 전사체는 지방산 생합성에 관여하는 효소들의 전사체를 포함하고 있었으며, 이를 통해 복숭아순나방 성페로몬이 스테아릭산(stearic acid) 또는 팔미틱산(palmitic acid)과 같은 포화지방산 전구체에서 β -산화를 통해 사슬 길이를 줄이고 다시 이중결합 형성, 환원반응 및 아세틸화를 통해 생합성되는 것으로 추정하였다(Jung and Kim, 2014). 특히 포화지방산 전구체에서 10번 탄소에 이중결합을 주는 불포화효소($\Delta 10$ DES)의 활성이 궁극적으로 종 특이적 성페로몬 생합성에 결정적 역할을 담당한다는 것을 제시하였다(Jung and Kim, 2014). 이러한 전사체 연구를 통해 다양한 불포화효소 유전자를 보고하였으며, 이 가운데 *Gm-comp1575* 전사체가 $\Delta 10$ DES의 후보로 추정하였으나, 성페로몬 생합성에 연관된 기능 연구는 진행되지 않았다.

본 연구는 *Gm-comp1575* 유전자에 대해서 분자구조 및 기능 연구를 통해 복숭아순나방 성페로몬 생합성에 관여하는지를 밝히는 목적을 두었다. 아울러 RNA 간섭 기술을 통한 성페로몬 생합성 억제 효과를 바탕으로 본 연구는 향후 복숭아순나방의 새로운 교미교란 기술을 제시하려 한다.

재료 및 방법

복숭아순나방 사육

안동지역 사과밭에서 채집한 유충을 실내에서 3년 이상 사과를 먹이로 누대 사육하였다. 실내 사육 조건은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 20\%$, 광주기 16:8 h (명:암)이었다. 성충의 먹이는 5% 꿀물을 공급하였다. 성충의 산란은 기주 사과 또는 매끄러운 아크릴판을 이용하여 유도하였으며, 부화하는 유충은 사과로 유인하여 수거하고 차세대 사육에 이용하였다.

Gm-comp1575 유전자 서열 분석

*Gm-comp1575*는 복숭아순나방 전사체(GenBank accession number: PRJNA194591)로부터 염기서열을 얻었다. 염기서열을 바탕으로 Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA)의 EditSeq 프로그램을 이용하여 open reading frame의 아미노산 서열을 추정하였다. 추정된 아미노산 서열은 ExPASy (www.expasy.org)의 단백질체 분석용 프로그램을 이용하여 생체막 투과영역 및 N/O-glycosylation 위치를 추정하였다.

RNA 추출 및 cDNA 제조

복숭아순나방의 발육시기별(유충, 번데기 및 성충) 그리고 암컷 성충 복부 부위별 총 RNA를 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA (반응 당 1 μg)는 RT-PREMIK (Intronbio, Seoul, Korea)를 이용하여 cDNA를 제조하였다.

RNA 간섭

RNA 간섭은 이중나선형 RNA (dsRNA)를 이용하였다. *Gm-comp1575* 유전자에 특이적 양쪽 프라이머 5' 말단에 T7 프로모터 서열을 연장하여 제조한 프라이머(5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAGCATTCTGCTTCGTGTTG-3', 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGGAATGTGTGGTGGTAGTT-3')를 이용하여 247 bp 크기의 PCR 결과물을 얻었다. 이때 PCR 반응은 복숭아순나방 암컷 cDNA를 주형으로 94°C 에서 1분간 변성조건, 50°C 에서 1분간 프라이머 결합조건 그리고 72°C 에서 1분간 사슬연장 조건을 35회 반복하여 이뤄졌다. 얻어진 PCR 결과물을 10배 희석하여 Megascript RNAi 키트(Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 37°C 에서 3시간 반응하여 dsRNA를 제조하였다. 포함된 주형 DNA와 단일사슬형 RNA를 제거하고, 순수한 dsRNA는 GeneQuant 분광광도계(Amersham, Science Park, Singapore)를 이용하여 정량화하였다. dsRNA를 대상 곤충에 주입하기 전에 동일 부피의 Metafectene Pro (Biontex, Plannegg, Germany)를 혼합하여 리포솜을 형성하게 하였다. 이 리포솜 1 μL (300 ng dsRNA)를 복숭아순나방 번데기에 주입하였다. 주입될 번데기는 우화 1일전의 발육시기로서 황색으로 발달된 날개의 모습과 흑색의 겹눈 형태로 판단하였다. dsRNA의 미량주입은 미량주입장치(PV830 Pneumatic Pico Pump, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하였다. 대조군 RNA 간섭 처리는 바이러스 유전자의 dsRNA (Park and Kim, 2010)를 이용하였다.

RT-PCR과 RT-qPCR

복숭아순나방 발육시기별 그리고 조직별 cDNA를 이용하여 *Gm-comp1575* 유전자의 특이적 프라이머(5'-CCGGTATTGGTGTCATCGCTCCTA-3', 5'-CGACAGACACGCCCCAGTTTTC AA-3')로 RT-PCR을 진행하였다. 반응조건은 2분간 94°C에서 초기 변성반응 후 35회 증폭반응을 실시하였다. 증폭반응의 각 주기는 94°C에서 1분, 50°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분의 연속반응으로 구성되었다. RT-qPCR은 SYBR Green Realtime PCR master mixture (Toyobo, Osaka, Japan)를 반응용액으로 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기를 이용하였다. 반응용액(20 µL)은 각 프라이머 5 pmol 씩 그리고 50 ng의 주형 cDNA를 구성되었다. 초기 94°C에서 15분간 활성 반응 이후에 45회 증폭반응을 실시하였다. 증폭반응의 각 주기는 94°C에서 30초, 50°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분의 연속반응으로 구성되었다. 매 주기 증폭물의 형광도를 측정하였고, 반응 후 생성물의 용접을 분석하여 단일 생성물을 확인하였다. 상대 임계증폭주기 횟수(critical threshold: C_T) 방법(Livak and Schmittgen, 2001)을 이용하여 전사체의 상대 양을 산출하였다. 내재하는 항시발현 유전자 대조구로서 라이보솜 단백질 유전자인 *RL32* (5'-ATGCCCAACATGGTTACGG-3', 5'-TTCGTTCTCCTGGCTGCGGA-3')의 증폭량을 이용하여 분석될 시료들의 상대 RNA 추출량을 보정하였다.

야외 유인력 검증

안동시 남선면에 소재하는 사과밭에서 RNA 간섭으로 *Gm-comp1575* 유전자의 발현이 억제된 복숭아순나방 처녀암컷의 수컷 유인 능력을 2회(2016년 7월 1-7일 8일, 7월 22일-8월 1일) 실시되었다. 갓 우화한 암컷 성충을 구형의 찻망(직경 5 cm)에 설탕물과 함께 넣고, 델타트랩(그린아그로텍, 경산, 한국)에 설치하였다(Fig. 5A 참조). 대조구 암컷은 위에서 기술한 비특이적 바이러스 dsRNA를 처리한 개체를 이용하였다. 전체 5만 복이 실시되었다.

결과

Gm-comp1575 추정 단백질 특징

복숭아순나방 성페로몬 샘의 전사체(Jung and Kim, 2014)를 토대로 이 곤충의 성페로몬 생합성에 관여하는 불포화효소

가 미리스틱산(myristic acid)의 10번 탄소에서 불포화를 만드는 $\Delta 10$ DES로 추정하였고, 이러한 분석과정에서 복숭아순나방 전사체 가운데 *Gm-comp1575* 유전자 발현체가 이 불포화효소 서열과 유사성이 있다고 제시하였다. 본 연구에서는 이 유전자의 아미노산 서열을 토대로 기존에 알려진 불포화효소들과 분자계통학적 분석을 실시하였다(Fig. 1). 성페로몬에 발현되고 성페로몬 생합성에 관여하는 곤충 불포화효소들은 $\Delta 9$ DES, $\Delta 10$ DES 그리고 $\Delta 11$ DES로 분지하였다. 이 가운데 본 연구에서 분석하는 *Gm-comp1575*는 이들 가지에 속하지 않고 단독으로 분지되었다. 특별히 유사종인 복숭아순나방붙이의 *Gd-comp305*와 함께 분지되어 있었다. 이는 Jung and Kim (2014)이 분석한 분자계통수에서 $\Delta 10$ DES와 함께 분지되는 것과는 차이를 보이고 있다. 그러나 *Gm-comp1575*는 이들 DES 분지들의 관계에서 $\Delta 10$ DES와 가깝게 위치하는 것은 확인할 수 있었다.

*Gm-comp1575*의 단백질 구조를 분석하여 이 유전자가 기존에 알려진 불포화효소 단백질과 유사한 기능 영역을 갖고 있는지를 분석하였다(Fig. 2). *Gm-comp1575* 단백질의 전체 아미노산 개수는 370개이고 시그널펩타이드는 추정되지 않았다. 이를 토대로 추정한 분자량은 약 43.2 kDa 그리고 등전점(pI)은 8.77로 염기성 단백질로 나타났다. 기존 연구에서(Jung and

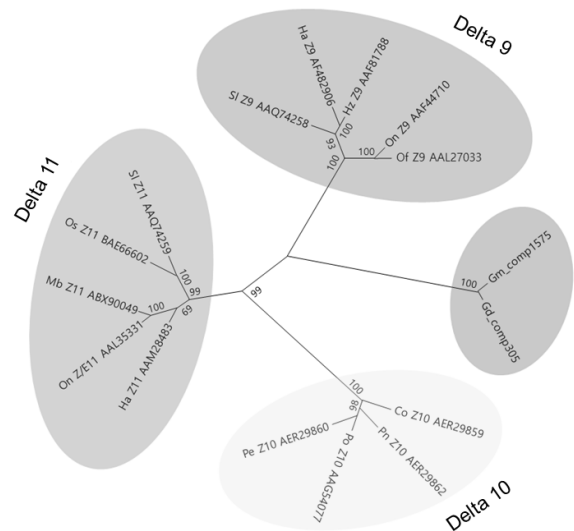


Fig. 1. A phylogenetic analysis of *Gm-comp1575* along with other known desaturase genes with their predicted amino acid sequences. The tree was generated by the Neighbor-joining method using the software package MEGA6.0. Bootstrap values (expressed as percentage of 1,500 replications) are shown next to the branches. GenBank accession numbers followed each species: *Ctenopseustis obliquana* (Co), *Helicoverpa assulta* (Ha), *Heliopsis zea* (Hz), *Grapholita dimorpha* (Gd), *G. molesta* (Gm), *Mamestra brassicae* (Mb), *Ostrinia furnacalis* (Of), *O. nubilalis* (On), *O. scapularis* (Os), *Planotortrix excessana* (Pe), *P. notophaea* (Pn), *P. octo* (Po), and *Spodoptera littoralis* (Sl). 'Z' and 'E' represent stereoisomers of cis and trans double bonds, respectively.

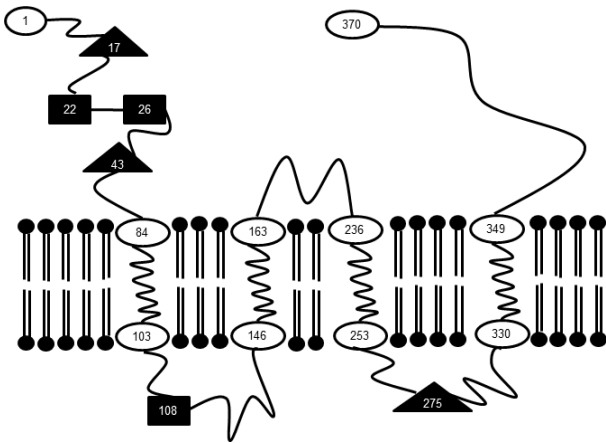


Fig. 2. Domain structure of *Gm-comp1575*. Based on the predicted amino acid sequence (370 residues), transmembrane domains and glycosylation sites were predicted. Four transmembrane domains are denoted in double layer of phospholipid. Triangles and squares represent N-glycosylation and O-glycosylation sites, respectively.

Kim, 2014) 3개의 histidine 보존영역을 보고하였다. 본 연구는 추가하여 총 4개의 막투과영역을 검출하였고, 이를 토대로 N 말단과 C 말단 부위는 세포 밖으로 위치하는 배열을 추정하였다. N-glycosylation은 3개가 추정되었고 이 가운데 2개는 N-말단 세포밖 부위이고, 나머지 하나는 세포내 연결 고리에 위치하였다. O-glycosylation도 3개가 추정되었고 유사하게 2개는 N 말단 부위 그리고 나머지 하나는 세포내 연결 고리에 자리하는 것으로 추정되었다.

Gm-comp1575 유전자 발현 양상

복숭아순나방 성페로몬 샘 전사체에서 얻어진 *Gm-comp1575*

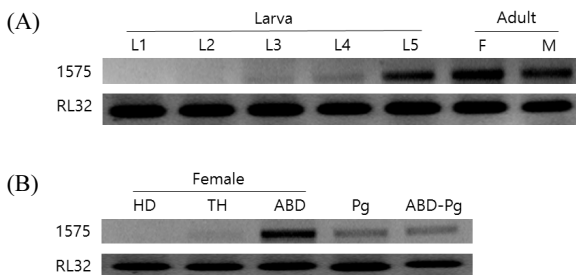


Fig. 3. Expression profile of *Gm-comp1575* (1575) in different developmental stages (A) and tissues (B) of *G. molesta*. Expression was analyzed by RT-PCR using gene-specific primers with a reference of a constitutively expressed ribosomal gene, *RL32*. 'L1-L5' indicate first to fifth instar larvae. 'F' and 'M' represent female and male adults, respectively. 'HD', 'TH', and 'ABD' indicate head, thorax and abdomen of female adults. 'Pg' and 'ABD-Pg' indicate sex pheromone gland and abdomen deleting Pg, respectively.

유전자가 발육시기와 암컷 성충의 조직 부위에서 어떠한 특이적 발현을 하는지를 RT-PCR로 분석하였다(Fig. 3). 이 유전자는 유충 말기에 발현되기 시작하여 성충시기에 암수 모두 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3A). 특히 암컷의 경우 머리, 가슴, 배 부위로 나누어 RNA 추출하고 여기서 얻은 cDNA로 발현을 조사한 결과 배 부위에서만 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). 복부 내에서 성페로몬 샘과 이 페로몬 샘이 빠진 복부로 나누어 분석한 결과 두 부위 모두에서 발현되는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 *Gm-comp1575*가 암컷의 성페로몬 샘뿐만 아니라 다른 복부 조직에서도 발현하는 것으로 확인되었다.

Gm-comp1575 유전자의 RNA 간섭 효과

*Gm-comp1575*의 단백질 구조 및 이 유전자의 성페로몬 샘 발현은 이 유전자가 성페로몬 생합성과 관련이 있을 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위해 RNA 간섭 기술로 *Gm-comp1575*의 기능을 분석하였다. RNA 간섭을 위해 본 연구는 *Gm-comp1575* 유전자의 특이적 dsRNA를 제조하였다. 이를 복숭아순나방 번데기에 주입하고 시간별로 발현되는 *Gm-comp1575*의 전사체량을 RT-qPCR로 정량화하였다(Fig. 4). dsRNA를 주입받은 복숭아순나방 암컷은 처리 후 24시간이 경과하면서 발현량의 감소를 보이고 이 효과는 48시간까지 지속하였다(Fig. 4A).

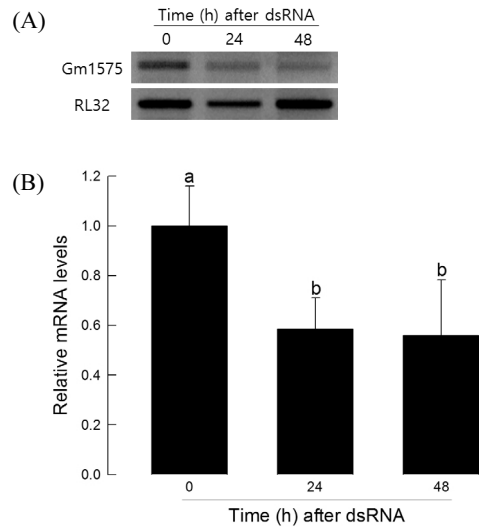


Fig. 4. RNA interference of *Gm-comp1575* in female adults of *G. molesta*. dsRNA (300 ng per individual) was injected to pupa at one day before adult emergence. Expression levels were measured by RT-PCR (A) and RT-qPCR (B). A ribosomal gene, *RL32*, was used for normalization of RNA extracts from different samples because it was regarded as a reference gene that was constitutively expressed. Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

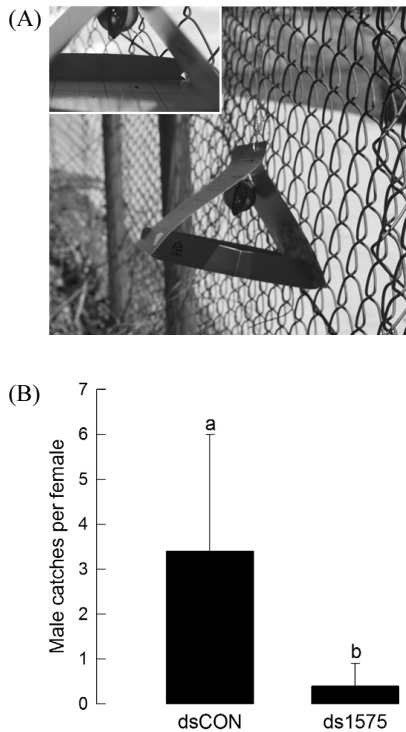


Fig. 5. Field assay of RNAi-treated *G. molesta* females. RNAi was performed by injecting dsRNA (300 ng per individual) to pupa at one day before adult emergence. (A) A delta trap for monitoring male attraction, in which a female was caged in a screen ball with a cotton plug impregnated with 10% sucrose solution. Monitoring was performed for a week per replication. Inset shows a male attracted and fixed on sticky plate. (B) Reduced attraction of females treated with dsRNA specific to *Gm-comp1575* compared to control dsRNA. Each treatment was replicated five times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

이 전사체량을 분석하여 보면 약 50% 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 4B). 반면에 dsRNA 대조구 처리에서는 전사체량 감소를 나타내지 않았다.

이러한 RNA 간섭 조건에서 복숭아순나방의 수컷 유인 능력을 야외 검증으로 실시되었다 (Fig. 5). 갓 우화한 복숭아순나방 암컷을 망사 통에 가두고 모니터링에 사용되는 델타트랩에 설치한 후 이를 사과원에서 유인효과를 검증하였다 (Fig. 5A). 조사 시기는 복숭아순나방의 발생이 있는 7월말에 실시되었다. 각 처리는 1주간 포획 수컷 밀도로 산출한 결과 RNA 간섭을 받은 처리구는 대조구에 비해 현격하게 ($F = 6.34$; $df = 1, 8$; $P = 0.0359$) 낮은 포획능력을 나타냈다 (Fig. 5B).

고찰

나비목 곤충 가운데 95% 이상이 휘발성 성페로몬을 이용하여 교미 통신을 수행하게 된다 (Scoble, 1992; Grimaldi and

Engel, 2005). 이 가운데 대부분의 나비목 종들이 포함된 이문 나방아목 (Ditrysia)은 지방산에서 유래된 성페로몬 성분을 이용하고 있다 (Roelofs, 1995; El-Sayed, 2007). 그러나 성페로몬의 기능을 발휘하기 위해서는 휘발성을 가져야 하기에 지방산의 탄소수가 12-18개로 제약이 되며, 다양한 나비목 종류에 비해 성페로몬 신호의 다양성을 추구하기 위해 상이한 광학이성체의 이중결합 추가 및 관능기의 분화 (알코올, 알데하이드 및 아세테이트)를 보이게 된다 (Liénard et al., 2008). 이러한 성페로몬은 이들 나비목 곤충의 경우 복부 8번째와 9번째 마디 사이의 표피세포층이 분화된 성페로몬 샘에서 생합성되어 방출되게 된다 (Percy-Cunningham and MacDonald, 1987). 잎말이나 방과 (Tortricidae)에 속한 복숭아순나방의 경우도 성페로몬 성분은 지방산 유도체이고 이 가운데 두 주요 성분인 Z8-12:Ac와 E8-12:Ac의 상호 비율은 근연종인 복숭아순나방붙이 (*G. dimorpha*)와의 생식적 격리를 유도하는 데 주요하다 (Jung et al., 2012). 복숭아순나방의 경우 복숭아순나방붙이에 비해 높은 cis 비율 혼합체에 유인되었다. 따라서 이 이중결합을 형성하는 불포화효소의 촉매 능력의 차이가 이 두 종의 중분화에 결정적 역할을 하였을 것으로 추정하였다 (Jung and Kim, 2014).

지방산 불포화효소는 사슬형 탄화수소에 이중결합을 형성하는 반응을 촉매하며 이때 이중결합은 위치와 광학이성체에서 특이성을 갖는다. 이 불포화효소는 분자계통학적으로 상이한 두 부류로 나뉘어 한 형태는 생체막에 결합형과 사슬형 탄화수소 운반형으로 분류된다 (Sperling et al., 2003). 운반형 불포화효소는 주로 식물체에서 나타나는 형태로 스테아릭산 (stearic acid)을 올레익산 (oleic acid)로 전환하는 기능을 담당한다 (Kachroo et al., 2007). 대부분의 불포화효소는 생체막 결합형으로 전형적인 histidine box 보존서열을 3개 갖는다 (Shanklin et al., 1994). 본 연구에서 분석된 *Gm-comp1575*는 3개의 histidine box 보존서열을 갖으며, 4개의 생체막 투과영역을 갖는 것으로 아미노산 서열 분석은 보여주었다. 따라서 *Gm-comp1575*는 전형적 생체막 결합형 불포화효소로 간주된다. Hashimoto et al. (2008)은 56 종의 진핵생명체에 존재하는 275개의 불포화효소 아미노산 서열을 분석한 결과 First Desaturase, Omega Desaturase, Front-End Desaturase 및 Sphingolipid Desaturase로 크게 4 종류로 구분하였다. First Desaturase는 많은 불포화효소를 포함하고 주로 팔미틱산 (palmitic acid) 또는 스테아릭산의 9번 탄소에서 이중결합을 만드는 기능을 수행한다. Omega Desaturase는 이미 이중결합을 갖는 지방산에 12번 또는 15번 탄소에 이중결합을 추가하는 기능을 수행한다. Front-End Desaturase는 설정된 이중결합과 카르복실 말단 사이에 이중결합을 추가하는 기능을 담당하여 주로 4, 5, 6번 탄소에 이중결합을 추가하

게 된다. Sphingolipid Desaturase는 스프링고지질의 불포화효소이다. 이러한 부류에서 *Gm-comp1575*가 복숭아순나방 성페로몬 성분이 갖는 10번 탄소 위치의 이중결합을 형성하는 데 관여하게 된다면 First Desaturase에 속하게 된다. 특히 본 연구에서 진행한 분자계통분류 분석에서 *Gm-comp1575*는 $\Delta 10$ DES와 유사하게 분류되었다. 그러나 이러한 유사성이 기능을 대변하는 것이 아니기 때문에 추가 기능 연구는 필요하다.

*Gm-comp1575*는 암컷 성페로몬 샘에서 발현되었다. 추가적으로 종령 유충과 수컷 성충에서도 발현되는 것으로 나타났다. 우선 성페로몬 샘에서 *Gm-comp1575*가 발현되는 것은 성페로몬 생합성에 관여할 가능성을 높여주고 있다. 포화지방산이 이중결합형성과 관능기 치환반응을 거쳐 성페로몬으로 전환되게 하는 일반적 제1형 페로몬 생합성 경로에서 보듯이(Löfstedt et al., 2016) 이 효소가 미리스틱산을 대상으로 10번 탄소 위치에서 cis 형의 이중결합을 형성하면 이후에 β -산화물을 거쳐 탄소수는 12개로 줄어든 라우릭산(lauric acid)로 전환되고, 자연히 이중결합 위치는 8번째로 옮겨지게 된다. 이때 fatty acid reductase와 acetyl transferase에 의해 아세틸기를 추가하면서 Z8-12:Ac 성분의 성페로몬이 생합성되게 된다. 유사한 $\Delta 10$ DES 활성이 두 잎말이나방류인 *Ctenoseustis obliquana*와 *Planotortrix octo*에서 발견되었으며, Z8-14:Ac를 생합성하는 데 관여하였다(Albre et al., 2012). 그러나 본 연구에서 보인 *Gm-comp1575* 유전자의 타 조직에서 발현은 이 불포화효소가 성페로몬 생합성 이외의 기능을 가질 수 있다는 것으로 나타내고 있다. 추후 이 유전자의 추가 발현을 통한 지방산 변화 분석을 통한 기능 연구를 실시하여 정확한 반응 특이성을 분석할 필요가 있다.

Gm-comp1575 유전자의 발현 억제제는 복숭아순나방 암컷의 수컷 유인력 감소를 초래하였다. 이 유전자에 특이적인 dsRNA는 우화하기 직전의 변태기시기에 주입하여 우화한 성충에서 *Gm-comp1575*의 발현량 감소를 초래하였다. 유사한 잎말이나방류인 *Epiphyas postvittana*에서는 유충에 dsRNA를 섭식시킬 경우 유충 중장세포의 유전자 발현을 억제할 뿐만 아니라 성충 촉각에서 발현하는 페로몬결합단백질 유전자에 대한 특이적 dsRNA를 유충에 섭식시켰을 때 성충 시기에 이 유전자의 발현이 감소되는 것을 보고하였다(Turner et al., 2006). 이러한 결과는 비교적 나비목 곤충에서 RNA 간섭 효과를 기대하기 어려운 양상(Huvenne and Smagghe, 2010)과는 달리 잎말이나방류는 dsRNA 처리를 통한 기능 연구가 용이할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 복숭아순나방을 대상으로 진행한 RNA 간섭 연구는 야외에서 수컷 유인력을 분석하여 이뤄졌다. 이러한 분석이 이뤄진 시기가 7월말 경으로 야외 3세대 성충이 발생하는 시기이다(Kim et al., 2009). 살아있는 암컷 성충을 미끼로 유인

력을 분석한 결과로서 비교적 dsRNA 처리한 대조구의 경우 수컷을 유인하는 능력을 유지한 반면에 *Gm-comp1575*에 특이적 dsRNA가 주입된 암컷의 경우는 거의 유인력을 상실하게 되었다. 이러한 결과는 *Gm-comp1575* 유전자가 수컷을 유인하는 성페로몬 생합성에 관여하였을 것으로 추정된다. 그러나 앞에서 기술한 바와 같이 정확한 촉매 부위는 추후 기능 연구를 통해 밝혀질 필요가 있다.

이상의 결과는 복숭아순나방 성페로몬 샘에서 발현되는 불포화효소인 *Gm-comp1575*가 암컷 성충으로 하여금 수컷을 유인하는 데 생리적 기능을 갖는 것으로 제시하고 있다.

사사

본 연구는 농촌진흥청 아젠다연구사업(과제번호: PJ011756)으로 지원되었다.

Literature Cited

- Albre, J., Liénard, M.A., Sirey, T.M., Schmidt, S., Tooman, L.K., Carraher, C., Greenwood, D.R., Löfstedt, C., Newcomb, R.D., 2012. Sex pheromone evolution is associated with differential regulation of the same desaturase gene in two genera of leafroller moths. *PLoS Genet.* 8, e1002489.
- El-Sayed, A.M., 2007. The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. [http://www.pherobase.com/].
- Grimaldi, D., Engel, M.S., 2005. Evolution of the insects. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hallman, G.J., 2004. Ionizing irradiation quarantine treatment against oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in ambient and hypoxic atmosphere. *J. Econ. Entomol.* 97, 824-827.
- Han, K.S., Jung, J.K., Choi, K.H., Lee, S.W., Boo, K.S., 2001. Sex pheromone composition and male trapping of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 4, 31-35.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., Kanehisa, M., 2008. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J. Lipid Res.* 49, 183-191.
- Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.* 56, 227-235.
- Jung, C.R., Ahn, J.J., Eom, H.S., Seo, J.H., Kim, Y., 2012. Occurrence of *Grapholita dimorpha* in Korean pear orchards and cross-trapping of its sibling species, *Grapholita molesta*, to a pheromone lure. *Korean J. Appl. Entomol.* 51, 479-484.
- Jung, C.R., Kim, Y., 2014. Comparative transcriptome analysis of

- sex pheromone glands of two sympatric lepidopteran congener species. *Genomics* 103, 308-315.
- Kachroo, A., Shanklin, J., Whittle, E., Lapchyk, L., Hildebrand, D., Kachroo, P., 2007. The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol. Biol.* 63, 257-271.
- Kim, Y., Bae, S., Son, Y., Park, J., 2009. Analysis of migration of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, in apple-cultivating areas based on population monitoring using sex pheromone and RAPD molecular marker. *Kor. J. Appl. Entomol.* 48, 211-219.
- Kim, Y., Jung, S., Kim, Y., Lee, Y., 2011. Real-time monitoring of oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, populations using a remote sensing pheromone trap in apple orchards. *J. Asia Pac. Entomol.* 14, 259-262.
- Knight, A.L., Barros-Parada, W., Bosch, D., Escudero-Colomar, L.A., Fuentes-Contreras, E., Hernández-Sánchez, J., Jung, C., Kim, Y., Kovanci, O.B., Levi, A., Lo, P., Molinari, F., Valls, J., Gemeno, C., 2014. Similar worldwide patterns in the sex pheromone signal and response in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bull. Entomol. Res.* 105, 23-31.
- Liénard, M.A., Strandh, M., Hedenström, Johansson, T., Löfstedt, C., 2008. Key biosynthetic gene subfamily recruited for pheromone production prior to the extensive radiation of Lepidoptera. *BMC Evol. Biol.* 8, 270.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.
- Löfstedt, C., Wahlberg, N., Millar, J.G., 2016. Evolutionary patterns of pheromone diversity in Lepidoptera, in: Allison, J.D., Cardé, R.T. (Eds.), *Pheromone communication in moths: evolution, behavior, and application*. University of California Press, Oakland, CA. pp. 43-78.
- Park, B., Kim, Y., 2010. Transient transcription of a putative RNase containing BEN domain encoded in Cotesia plutellae bracovirus induces an immunosuppression of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 156-163.
- Percy-Cunningham, J.E., MacDonald, J.A., 1987. Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands, in: Prestwich, G.D., Blomquist, G.J. (Eds.), *Pheromone biochemistry*. Academic Press, Orlando, FL. pp. 27-75.
- Roelofs, W.L., 1995. Chemistry of sex attraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 44-49.
- Rothschild, G.H.L., Vickers, R.A., 1991. Biology, ecology and control of oriental fruit moth, in: Van der Geest, L.P.S., Evenhuis, H.H. (Eds.), *Tortricid pests. Vol. 5: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 389-412.
- Scoble, M., 1992. *The Lepidoptera: form, function and diversity*. Oxford University Press, Oxford.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T.K., Heinz, E., 2003. The evolution of desaturases. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68, 73-95.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B.G., 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787-12794.
- Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P., Newcomb, R.D., 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.* 15, 383-391.
- Yang, C.Y., Jung, J.K., Han, K.S., Boo, K.S., Yiem, M.S., 2002. Sex pheromone composition and monitoring of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in Naju pear orchards. *J. Asia Pac. Entomol.* 5, 201-207.