

오리엔탈과실파리 예찰용 왁스형방출기 제작 및 분자진단기술

김용균* · 김민현 · 김규순 · 모하마드 바탄파라스트¹ · 김예진² · 권기면³

안동대학교 식물의학과, ¹부알리시나대학교 식물보호학과, ²이화여자대학교 특수교육학과, ³생물이용연구소

Formulation of Wax Type Dispenser Monitoring the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*, and Its Molecular Diagnostic Technology

Yonggyun Kim*, Minhyun Kim, Kyusoon Kim, Mohammad Vatanparast¹, Yejin Kim² and Gimyeon Kwon³

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

¹Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

²Department of Special Education, Ewha Womans University, Seoul 03760, Korea

³Bio Utilization Institute, Andong 36728, Korea

ABSTRACT: The Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, has been designated as a main quarantine insect pest. Sensitive monitoring and diagnosis against *B. dorsalis* are required for early quarantine treatment. This study formulated a wax type dispenser containing methyl eugenol and biopesticide to attract and kill this insect. It also developed diagnostic PCR primers against five major quarantine fruit flies of *B. dorsalis*, *B. cucurbitae*, *B. tryoni*, *B. latifrons*, and *Ceratitis capitata*. The lure and diagnostic primers were evaluated in a field located in Kota Kinabalu, Malaysia.

Key words: *Bactrocera dorsalis*, Quarantine, Methyl eugenol, Diagnosis, Monitoring

초 록: 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)는 주요 검역 대상으로 지정된 해충이다. 이 해충에 대한 고감도 모니터링과 진단 기술이 초기 방역 처리에 요구된다. 본 연구는 오리엔탈과실파리를 유인하여 치사시킬 목적으로 메틸유제놀과 생물농약을 혼합한 왁스형 방출기를 제작하였다. 본 연구는 또한 5종의 주요 검역 과실파리(오리엔탈과실파리, 오이과실파리, 퀸즐랜드과실파리, 말레이시아과실파리, 지중해과실파리)에 대한 PCR 진단프라이머를 개발하였다. 이상의 모니터링용 왁스방출기와 분자진단기술을 말레이시아 코타키나발루 지역에서 실증 시험하였다.

검색어: 오리엔탈과실파리, 방역, 메틸유제놀, 진단, 모니터링

농림축산검역본부에서 42종의 과실파리류를 금지급 해충으로 분류하고 있다(http://www.qia.go.kr/plant/imQua/plant_no_imp.jsp). 이 가운데 해충성과 침입성이 높은 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)는 위험도가 가장 높은 I 급 금지 과실파리로 분류되고 있다(Kim and Kim, 2016).

오리엔탈과실파리는 과실파리과(Tephritidae)에 속하며 큰 과실파리아과(Dacinae)로 분류되며, 약 70개 유사종의 복합체로 구성되어 있다(Drew and Hancock, 2000). 이 해충의 유래를 찾아보기 위해 Wan et al. (2012)은 미토콘드리아 게놈 가운데

cytochrome oxidase I의 서열을 바탕으로 여러 지역의 오리엔탈과실파리 집단을 분석한 결과 중국 동남부가 원산지로 추정하였다. 이 연구에 의하면 이 중국 동남부 지역으로부터 북쪽으로 중국 중부 지역, 서쪽으로는 파키스탄, 남쪽으로 동남아시아 그리고 동쪽으로는 타이완과 하이남 섬으로 이동하였을 것으로 추정하고 있다. 또한 멀리 하와이는 아마도 일부 개체들의 초기 정착으로 이뤄진 병목집단으로 간주하였다. 이와 같이 오리엔탈과실파리가 넓은 지역으로 분포할 수 있었던 이유는 바로 이들의 넓은 기주범위, 이동능력 및 다양한 환경에 대한 적응능력으로 이해되고 있다(Vargas et al., 2015). 특히 이동능력은 이들의 침입력과 연계되는 데 일반적으로 이들의 이동 거리를 50 km 이내로 보고지만, 종내 변이가 높은 중국 남부 지역에

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received February 2 2017; Revised June 12 2017

Accepted August 12 2017

서는 100-250 km 까지 이동이 가능한 것으로 보고하였다(Chen et al., 2007; Liu et al., 2007). 최근 들어 특히 기후 온난화와 증가하는 인적 및 물적 교류는 이 해충의 분포지역을 더욱 넓힐 수 있는 기회를 제공할 수 있다.

본 연구는 오리엔탈과실파리가 국내로 침입할 경우 이를 유인하여 포획할 수 있는 유인방출기를 제작하였다. 이에 대한 실증실험은 이 해충이 발생하는 말레이시아 지역에서 실시하였다. 또한 오리엔탈과실파리 이외의 4종의 I 급 금지급 과실파리와 국내 서식하는 2종의 과실파리 해충을 포함하여 총 7종의 과실파리류에 대한 종 특이적 진단프라이머를 개발하여 이를 PCR 방법으로 동정하게 하는 기술을 보고한다.

오리엔탈과실파리 유인 방출기 제작

호박꽃과실파리 유인방출기로 제작한 방식(Kim et al., 2017)을 변형하여 메틸유제놀(methyl eugenol: ME)을 포함한 오리엔탈과실파리 유인 방출기를 제작하였다(Table 1). 간략하게 파라핀왁스(15 g, EMD Millipore Corporation, MA, USA)를 가열자석교반기로 약 70°C에서 용해시킨 후, 유화제(3 g, Emulsifier, Almax 3600, Illshinwells, Seoul, Korea)를 첨가하면서 500 rpm의 속도로 반응물을 혼합시켰다. 유화제가 고르게 혼합되면 항산화물질인 α -tocopherol (0.5 g, Sigma-Aldrich Korea), Jojoba oil (0.5 g, Sigma-Aldrich Korea)을 각각 첨가했다. 여기서 ME 5 g을 디클로메탄 10 mL로 용해시켜 첨가한다. 마지막으로 친환경방제제(응칠이®, 고려바이오)를 제품 기준으로 0.1 mL을 첨가했다. 모든 성분이 용해된 후 탈이온증류수를 24.5 mL을 넣고 1,000 rpm에서 10분간 교반했다. 이를 상온에서 서서히 식힌 후 사용 전까지 냉장(4°C) 보관했다.

진단프라이머 제작 과정

유전자은행인 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)로부터 미

토콘드리아 게놈에 위치한 cytochrome oxidase I (CO-I) 유전자를 대상으로 모두 7종의 과실파리 서열을 모았다(Fig. 1). 이 과정에서 말레이시아과실파리(*Bactrocera latifrons*)로 부터는 37개 서열, 오리엔탈과실파리(*B. dorsalis*)로 부터는 1,099개 서열, 오이과실파리(*B. cucurbitae*)로 부터는 71개 서열, 퀴즐랜드과실파리(*B. tryoni*)로 부터는 78개 서열, 지중해과실파리(*Ceratitiscapitata*)로 부터는 82개 서열, 호박과실파리(*B. depressa*)로 부터는 25개 서열 그리고 호박꽃과실파리(*B. scutellata*)로 부터는 43개의 서열을 각각 얻었다(Fig. 1A). 이들 서열을 DNASTar 회사에서 개발된 Lasergene 프로그램 가운데 SeqMag을 이용하여 각 종의 CO-I 서열을 상호 상동성을 기준으로 배열하였다. 이를 통해 각 종의 공통서열(consensus sequence)을 얻었다. 결과적으로 얻어진 각 종을 대변하는 7개의 공통서열을 다시 SeqMag을 이용하여 상호 배열시키고, 여기서 중간 차이를 보이는 영역을 선택하였다(Fig. 1B). 정방향 프라이머는 오리엔탈과실파리의 CO-I 서열 번호를 바탕으로 770번째에서 1235번째까지 서열을 대상으로 탐색하였다. 역방향 프라이머는 918번째에서 1383 번째까지 서열을 대상으로 탐색하였다. 특히 프라이머의 3' 말단 염기를 종 특이적으로 상이한 것을 찾아 특이적 PCR 효율을 높이려 하였다. 이러한 접근 방식으로 7종 과실파리에 대한 진단프라이머가 디자인되었다(Fig. 1C).

진단프라이머 PCR 증폭 기술

앞에서 디자인된 종 특이적 프라이머들의 PCR 분석 기술을 개발하였다(Fig. 2). 오리엔탈과실파리, 말레이시아과실파리, 오이과실파리, 지중해과실파리는 미국 USDA (Hilo, Hawaii)에서 실내 대량 증식하는 개체로부터 분양받았다. 퀴즐랜드과실파리는 뉴질랜드 Food and Plant Research Institute로부터 불임화된 개체를 분양받았다. 호박과실파리와 호박꽃과실파리는 안동 지역에서 채집한 개체를 분석에 이용하였다. 전체 게놈 DNA는 Chelex 방식(Kim and Kim, 2014)을 이용하여 추출

Table 1. Formulation of methyl eugenol using paraffin wax

Component	Weight (g)	Supplier
Paraffin wax	300	EMD Millipore Corporation, MA, USA
Emulsifier (Almax 3600)	60	Illshinwells, Seoul, Korea
α -Tocopherol	20	Sigma, St Louis, MO, USA
Jojoba oil	20	Sigma, St Louis, MO, USA
Biopesticide (Mite-Kill®)	2	KoreaBio, Inc., Korea
Methyl eugenol	100	Sigma, St Louis, MO, USA
Distilled water	498	
Total	1,000	

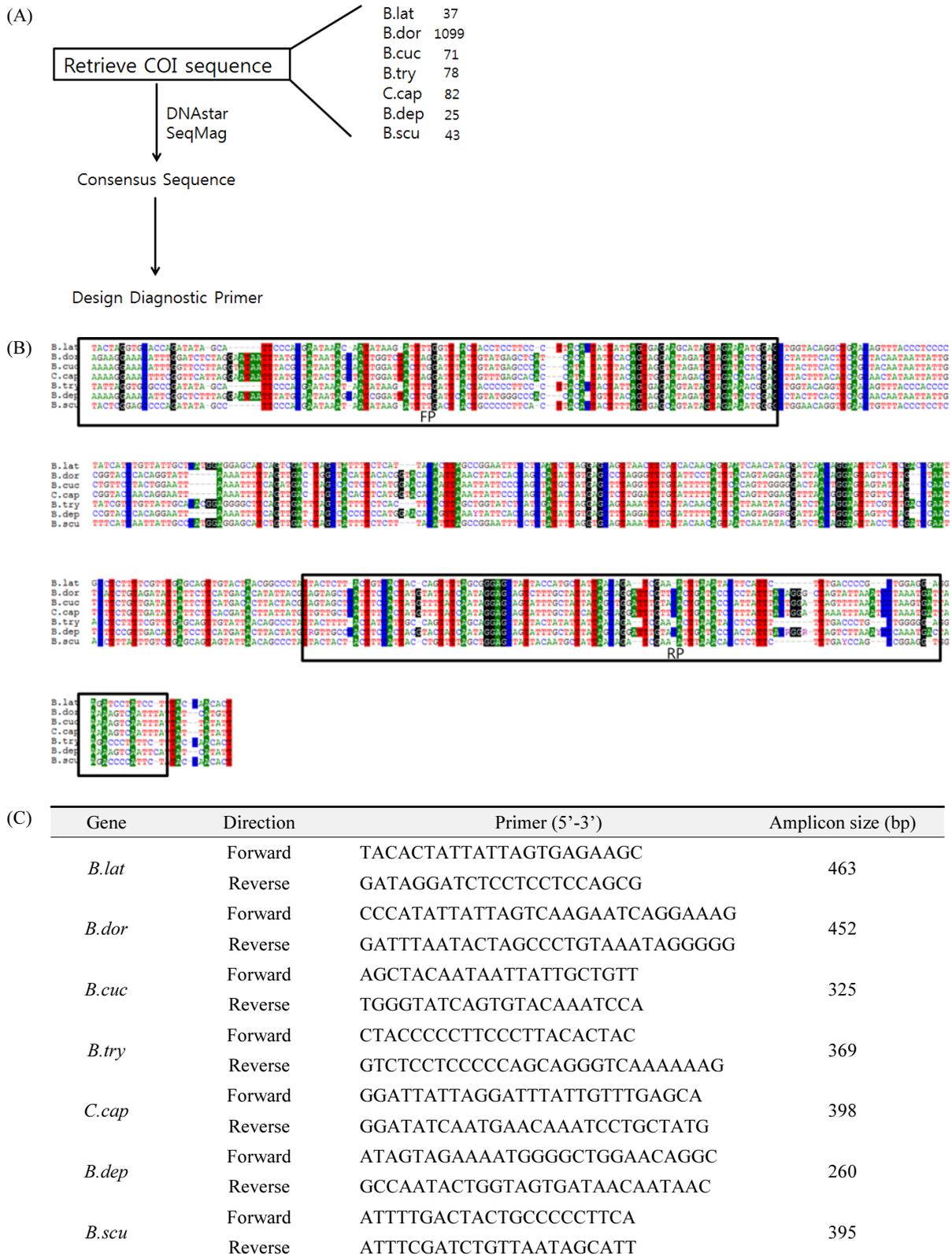


Fig. 1. Design diagnostic primers of *B. latifrons* (*B.lat*), *B. dorsalis* (*B.dor*), *B. tryoni* (*B.try*), *B. cucurbitae* (*B.cuc*), *B. depressa* (*B.dep*), *B. scutellata* (*B.scu*), and *C. capitata* (*C.cap*). (A) A strategy and procedure for designing primers. Cytochrome oxidase I (COI) sequences were collected from GenBank. Numbers indicate numbers of gene sequences in each species. (B) Variable regions for designing forward primer (FP) and reverse primer (RP). Bars indicate consensus residues among species. (C) Designed species-specific primer sequences.

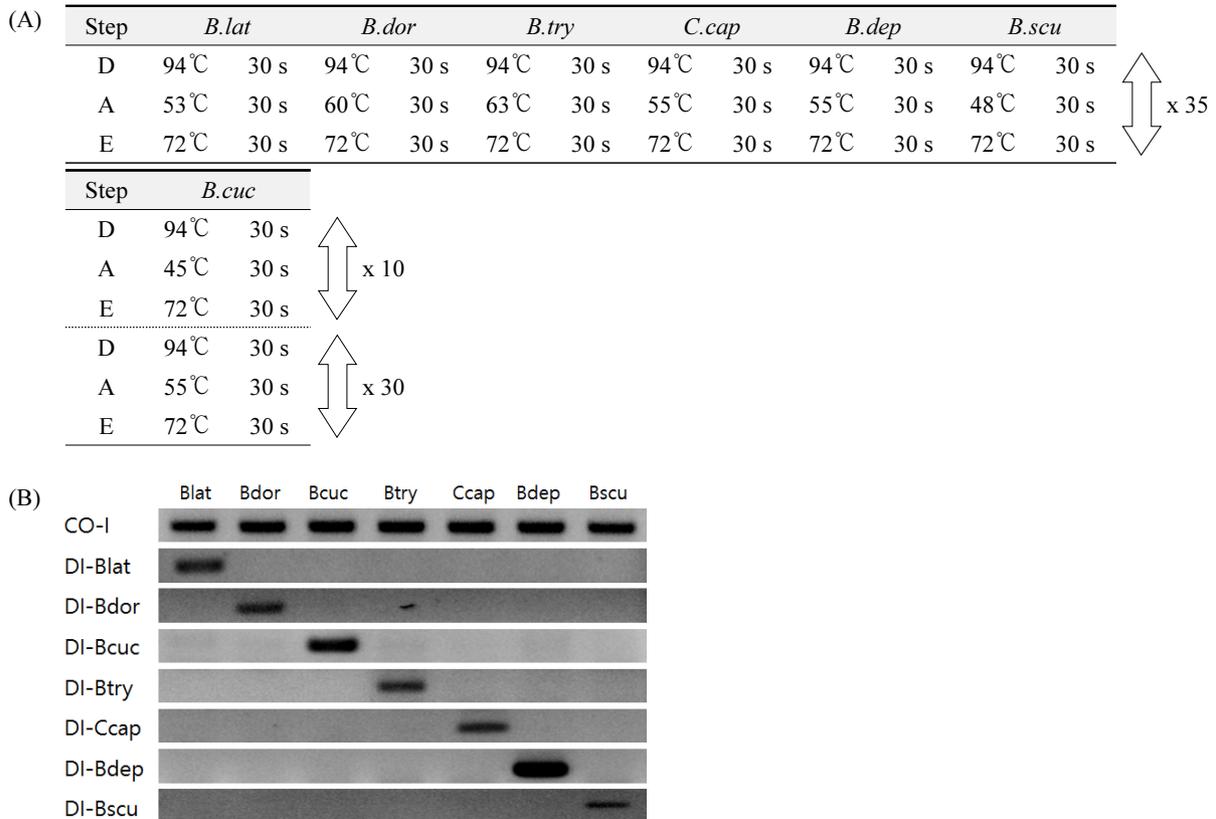


Fig. 2. Diagnostic PCR techniques against *B. latifrons* (B.lat), *B. dorsalis* (B.dor), *B. tryoni* (B.try), *B. cucurbitae* (B.cuc), *B. depressa* (B.dep), *B. scutellata* (B.scu), and *C. capitata* (C.cap). (A) PCR protocols in each diagnostic primers, in which steps indicate denaturation ('D'), annealing ('A'), and extension ('E'). Temperature and time are denoted in each PCR step. All used 35 cycles except *B.cuc*, which used touchdown PCR. (B) Diagnostic PCR products against seven different species. 'DI' indicates diagnostic.

하였다. 간략하게 과실파리 성충 1마리에 500 µl의 20% Chelex를 채우고 95°C에서 20분간 가온하였다. 이후 2분간 얼음에 보관하여 반응을 정지시킨 후 다시 14,000 x g에서 3분간 원심분리한 후 상등액을 추출하여 PCR에 이용하였다.

PCR 조건은 전체 반응용액이 25 µl를 기준으로 주형 DNA는 1 µl, 10 x 완충용액은 2.5 µl, 기질 dNTP (각각 10 mM)는 2.5 µl, 프라이머(10 pmol/µl)는 각각 2.5 µl, Taq polymerase가 1 µl 그리고 탈이온증류수가 13 µl로 구성되었다. 이 PCR 반응용액을 종별로 상이한 조건으로 반응 조건을 맞추었다(Fig. 2A). 이러한 조건에서 PCR을 실시한 결과 기대 크기와 같은 단일 밴드의 증폭물을 얻었다(Fig. 2B). 이때 전체 DNA 증폭의 양성대조는 CO-I 공통 프라이머(5'-CCCGGTAATAAATAAATAATAACTTC-3', 5'-GGATCACCTGATATAGCATTCCC-3')를 이용하였다.

야외 실증 시험

오리엔탈과실파리가 국내에 서식하지 않기에 실증 시험은

말레이시아 코타키나발루(Kota Kinabalu: N 5.98, E 116.07) 지역에서 실시되었다. 이 지역은 오리엔탈과실파리를 비롯한 다양한 과실파리가 서식하는 지역이다(Schutze et al., 2012). 2017년 1월 23일에 오후 4시경에 ME를 포함한 왁스형방출기를 델타트랩(GreenAgrotech, Kyunsan, Korea)에 설치하고(Fig. 3A) 1월 25일까지 2일간 모니터링하였다. 총 37마리 수컷이 포획되었다(Fig. 3B). 후흉 작은등판(scutellum)이 노란색을 띠었고, 큰등판(scutum) 양쪽에 노란색 세로줄이 관찰되었다. 복부 등판(tergum)에 2개 검은색 가로줄이 있고 복부 등판 제 3번째 마디에서 세로줄이 시작하여 복부 마지막 마디까지 이어져 가로줄과 T자 무늬를 이뤘다. 이상의 형태 특징은 채집된 과실파리가 오리엔탈과실파리로 추정되었다. 이들 다수의 오리엔탈과실파리는 왁스형방출기에 붙어서 유인제를 섭식하고 있는 모습이 관찰되었다(Fig. 3C). 그리고 방출기 밑으로 낙하하여 끈끈이판에 붙어 있는 모습을 관찰하였다. 즉, 유인제에 유인되어 유인제를 섭식하다가 이 유인제에 포함된 살충제를 섭식하고 기절하여 끈끈이판으로 떨어진 것으로 추정되었다. 한편 이 지역에서 판매되는 망고스틴(*Garciana mangostana*) 과실

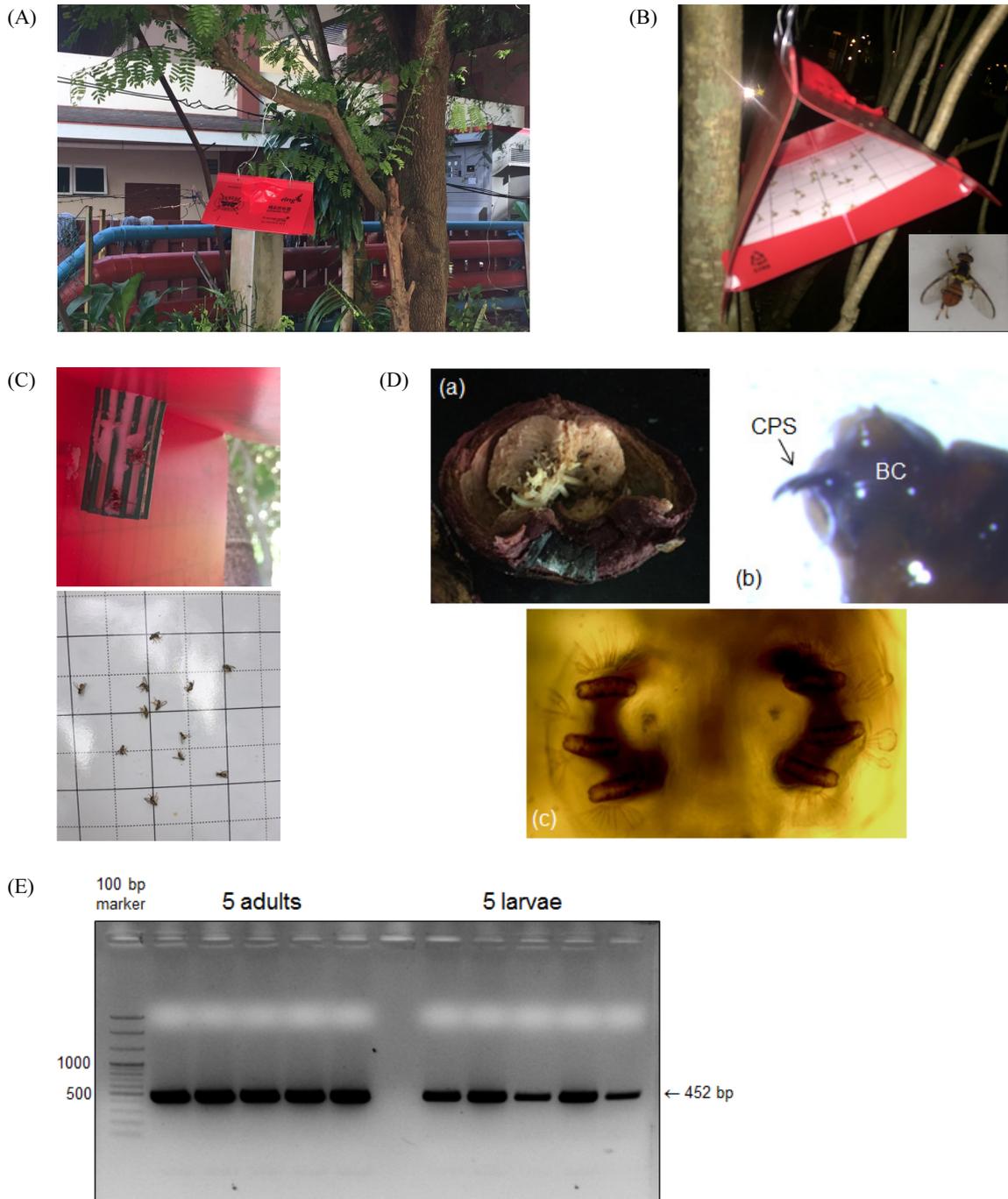


Fig. 3. Field assay in Kota Kinabalu. (A) Installation of Delta trap containing wax dispenser containing methyl eugenol on tree (B) Collected flies to the trap. Inset photo indicates a fly at a dorsal view (C) Flies feeding wax lures and subsequently dropped down on sticky plate (D) Maggots (a) within a mangosteen fruit purchased from the place, where the adults were collected. Head (b) area showing cephalo-pharyngeal skeleton ('CPS') and buccal carinae ('BC'). Posterior end (c) showing metapneustic spiracles. (E) Molecular diagnosis of randomly chosen five individuals from adult and maggot collections.

에서도 과실파리 유충이 발견되었다(Fig. 3D). 한 개 과실에서 모두 20마리의 유충이 검출되었다. 유충의 외부 형태에서 *Bactrocera* 속 과실파리의 특징적인 형태 형질이 관찰되었다. 머리 부위에서는 두부-인두골격(cephalo-pharyngeal skeleton)

과 구강용기(buccal carinae) 형태가 관찰되었다. 복부 말단에서는 3쌍의 후기문이 소수성 털과 함께 관찰되었다.

이상에서 채집된 과실파리가 오리엔탈과실파리인지를 확인하기 위해 이 종에 특이적인 진단프라이머를 이용하여 분자 동

정을 실시하였다(Fig. 3E). 성충과 유충을 임의로 5마리씩 선발하여 분석한 결과 모두 452 bp 영역에서 단일 밴드를 나타냈다. 즉, 말레이시아 코타키나발루 지역에서 ME로 유인된 과실파리는 모두 오리엔탈과실파리로 판정되었다. 말레이시아 지역은 오리엔탈과실파리 가운데 파파야과실파리(*B. papayae*)가 주로 분포하는 지역이다. 그러나 유전자 거리에 의한 재분류 작업 결과 파파야과실파리도 *B. dorsalis* s.s.에 포함된다고 알려졌다(Schutze et al., 2012). 이는 본 연구에서 개발한 오리엔탈과실파리 진단프라이머가 파파야과실파리도 검출할 수도 있다는 의미를 내포한다.

사 사

본 중설은 iPET의 수출전략기술개발사업의 일환으로 수행되었다(과제번호: 316015-04).

Literature Cited

- Chen, P., Ye, H., Mu, Q.A., 2007. Migration and dispersal of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in regions of Nujiang River based on fluorescence mark. *Acta Ecol. Sin.* 27, 2468-2476.
- Drew, R.A.I., Hancock, D.L., 2000. Phylogeny of the Tribe Dacini (Dacinae) based on morphological, distributional, and biological data, in: Aluja, M., Norrbom A.L. (Eds.), *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 491-504.
- Kim, E., Kim, Y., 2014. A report on mixed occurrence of tobacco whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes B and Q in Oriental melon farms in Kyungpook province, Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 53, 465-472.
- Kim, K., Kim, M., Kwon, G., Kim, Y., 2017. Technologies required for development of trap-based MAT control against the striped fruit fly, *Bactrocera scutellata*. *Korean J. Appl. Entomol.* 56, 51-60.
- Kim, Y., Kim, D., 2016. Integrated pest management against *Bactrocera* fruit flies. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 359-376.
- Liu, J., Shi, W., Ye, H., 2007. Population genetics analysis of the origin of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae), in northern Yunnan Province, China. *Entomol. Sci.* 10, 11-19.
- Schutze, M.K., Krosch, M.N., Armstrong, K.F., Chapman, T.A., Englezou, A., Chomic, A., Cameron, S., Hailstones, D., Clarke, A.R., 2012. Population structure of *Bactrocera dorsalis* s.s., *B. papayae* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypothesis using mitochondrial DNA and wing-shape data. *BMC Evol. Biol.* 12, 130.
- Vargas, R.I., Pinero, J.C., Leblanc L., 2015. An overview of pest species of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) and the integration of biopesticides with other biological approaches for their management with a focus on the Pacific region. *Insects* 6, 297-318.
- Wan, X., Liu, Y., Zhang, B., 2012. Invasion history of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in the Pacific-Asia region: two main invasion routes. *PLoS One* 7, e36176.