

전자빔 조사를 이용한 호박꽃과실파리의 불임 수컷 제조 기술과 유전방제 응용

김용균* · 압둘라알바키 · 권기면¹

안동대학교 식물의학과, ¹(주)생물이용연구소

Technique to Generate Sterile Males of Striped Fruit Flies, *Zeugodacus scutellata*, using Electron Beam Irradiation and their Application to Genetic Control

Yonggyun Kim*, Md. Abdullah Al Baki and Gimyeon Kwon¹

Department of Plant Medicals, College of Life Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

¹Biological Utilization Institute, Andong 36729, Korea

ABSTRACT: The striped fruit fly, *Zeugodacus scutellata*, is endemic in Korea, but it has been regarded as one of the serious quarantine pests throughout the world. Sterile insect release technique (SIT) has been used to eradicate quarantine fruit flies. This study developed a technique to generate sterile males and applied SIT to control *Z. scutellata*. First of all, the reproductive systems of *Z. scutellata* adults were examined with fluorescent microscope. Polytrophic ovaries comprises of around 100 follicles with developing oocytes. Each follicle contains an oocyte with several nurse cells and are surrounded with follicular epithelium. Oocyte development began at 10 days after adult emergence (DAE) and formed chorionated oocytes after 20 DAE. On the other hand, male testes were well developed just after adult emergence. The vas deferens was filled with motile sperms. To generate sterile males, different doses (0~1,000 Gy) doses of electron beam were irradiated to 3~5 days old pupae of *Z. scutellata*. When male pupae were irradiated with electron beam at 200 Gy, they developed and mated with females without any significant difference compared to untreated males. Although the untreated females mated with the 200 Gy-irradiated males laid eggs, no eggs did not hatch. The 200 Gy-irradiated males were then applied to untreated male and female flies in a density ratio of 1:9 (untreated males : treated males). The laid eggs suffered significant infertility. These results suggest that electron beam-irradiated pupae at 200 Gy resulted in male sterility and the resulting males would be applied to SIT.

Key words: genetic control, sterile insect release technique, electron beam, sperm, oocyte, *Zeugodacus scutellata*

조 록: 호박꽃과실파리(*Zeugodacus scutellata*)는 국내 자생종으로 국제적으로는 검역 대상 과실파리 중 하나로 분류되고 있다. 불임충방사기술(sterile insect release technique (SIT))은 검역 대상 과실파리를 박멸하는 데 이용되어 왔다. 본 연구는 호박꽃과실파리를 대상으로 불임충 제조 기술을 개발하여 SIT 기술로 이 해충에 대한 방제 가능성을 분석하였다. 이에 앞서 먼저 형광현미경 기술로 호박꽃과실파리의 생식관련 기관을 관찰하였다. 다영양실형 난소소관을 갖는 1 쌍의 난소는 약 100 개의 난포를 발달시키며, 각 난포는 난모세포와 영양세포를 지니며 난포세포가 둘러싸는 구조를 지닌다. 난소 발육은 우화 후 10 일이 지나 발육을 시작하고 우화 후 20 일이 되면 난자를 가지고 있는 난모세포를 발달시켰다. 수컷의 경우 성숙된 정소가 우화 직후에 관찰되었으며 수정관에는 운동성이 있는 정자로 채워져 있었다. 불임 수컷을 제조하기 위해 다양한 선량(0~1,000 Gy)의 전자빔을 3~5 일 경과된 번데기에 조사하였다. 200 Gy 세기 전자빔으로 번데기에 조사하면 무처리와 차이 없이 성충으로 발육하였고 이후 정상 암컷과 교미행동을 보였다. 비록 이들 처리 수컷의 교미는 무처리 수컷과 비교하여 큰 차이 없는 산란력을 보였지만 산란된 알들은 부화하지 못했다. 다음으로 200 Gy 조사로 형성된 불임 수컷을 정상 암컷과 수컷이 함께 있는 장소에 방사하였다. 이때 불임충 수컷은 정상 수컷에 비해 9 배 많은 수로 방사하였다. 이러한 불임충 처리는 차세대 부화율을 현격하게 감소시켰다. 이상의 결과는 200 Gy 세기의 전자빔으로 호박꽃과실파리의 불임충을 제조할 수 있고, 이렇게 형성된 불임충은 SIT 방제에 적용할 수 있다는 것을 제시하고 있다.

검색어: 유전방제, 불임충방사기술, 전자빔, 정자, 난모세포, 호박꽃과실파리

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

Received November 8 2019; Revised December 18 2019

Accepted January 29 2020

기후변화와 국제 무역량 증가는 국내에 없는 새로운 해충의 출현을 야기하고 있다(Lyu and Lee, 2017). 특별히 동남아시아를 중심으로 널리 분포하고 있는 과실파리는 이러한 환경 변화에 따라 국내로 침입하여 정착할 가능성이 매우 높다(Kim and Kim, 2016). 이는 우리나라 농림축산검역본부에서 지정한 60 종의 금지해충들 가운데 41 종이 이들 과실파리류가 차지한다는 점에서 과실파리의 위험성을 알려주고 있다(Kim et al., 2017a).

농작물에 큰 피해를 줄 것으로 여겨지는 과실파리는 주로 과실파리과(Tephritidae)에 속한 파리류로서 약 4,400 종 이상을 포함하고 있는 대형 분류군이다(White and Elson-Harris, 1992; Norrbom et al., 1999). 국내에도 90 종의 자생하고 있는 과실파리류가 있는데 Dacinae 아과에 4 종, Phyltalmiinae 아과에 4 종, Tephritinae 아과에 39 종, 그리고 Trypetinae 아과에 43 종으로 분류되었다(Han and Kwon, 2010; Han et al., 2014). 이 가운데 농작물에 경제적 피해를 주고 있는 과실파리는 Dacinae 아과에 속한 호박꽃과실파리(*Zeugodacus scutellata*)와 호박과실파리(*Z. depressa*) 등 두 종이다.

호박꽃과실파리는 제주지역을 중심으로 노랑하늘타리(*Trichosanthes kirilowii* var. *japonica* Kitam)에서 자생하지만, 전국적으로는 호박에 피해를 주고 있다(Kim et al., 2017b). 호박의 열매보다는 꽃을 가해하나 암꽃 피해(30.7%) 보다는 수꽃 피해(53.8%)가 더 큰 것으로 보고되었다(Kim et al., 2010). 호박꽃과실파리 성충은 월동세대를 포함하여 연 4 회 이상 발생하는 것으로 추정되고 있다(Al Baki et al., 2017; Kim et al., 2019). 호박꽃과실파리는 화분매개충으로 식물체 유래의 시노몬인 raspberry ketone (4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone)에 유인되는 것을 이용하여 보다 안정된 화합물인 Cuelure (CL: 4-(4-Acetoxyphenyl)-2-butanone)를 합성하여 야외 연중 발생 모니터링에 이용하고 있다(Kim et al., 2012, 2017b).

호박꽃과실파리 유충은 호박꽃 내부에 서식하기 때문에 살포용 약제에 노출되지 않아 방제에 어려움을 주고 있다. 따라서 이 해충의 방제는 야외 노출된 발육 시기인 성충을 방제 대상으로 여겨졌다(Kim et al., 2017b). 예를 들어, 이들 유사한 수컷 과실파리류가 보이는 교미 전에 무리행동(lekking)과 화합물 섭취(pharmacophagy) 습성(Hee and Tan, 2004)을 이용하여 CL에 살충제를 혼합하여 수컷박멸기술(male annihilation technique: MAT)이 호박꽃과실파리 방제에 적용되었다(Kim et al., 2017b). 또한 많은 과실파리 암컷의 경우는 알을 만들기 위해서는 먹이를 통해 영양원의 공급을 받아야 하는 영양의존형(anautogenic) 생식을 보이는 데(Drew and Yuval, 2000), 이를 이용하여 단백질성 유인물질에 살충제를 혼합하여 암컷박멸기술(female annihilation technique: FAT)이 terpinyl acetate를 첨가하여 개

발되었다(Kim and Kwon, 2018).

국내로 검역 대상 과실파리가 침입할 경우 수컷 및 암컷박멸 기술을 이용하여 방제기술을 적용하지만, 궁극적으로는 박멸효과를 얻기 위해서는 불임충방사를 통한 유전적 방제기술이 적용될 수 있다(Kim et al., 2018). 이러한 불임충방사기술(sterile insect release technique: SIT)은 방사선 조사에 의해 수컷을 불임화시키고 이를 야외에 방사시켜, 야생 암컷과 교미하게 하여 무정난을 형성하게 하는 방제 전략에 기초하고 있다(Knipling, 1955). 과실파리 방제에 이 SIT 방제기술이 다양한 지역에서 적용되었다. 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)의 경우 불임 수컷을 만들기 위해 방사선을 이용하였는데 우화하기 2 일 전에 저산소 조건에서 번데기를 방치하고 100 Gray (Gy)의 선량으로 조사하였다(Shelly et al., 2010). 이렇게 해서 얻어진 불임충은 공중 또는 지상에서 오리엔탈과실파리가 발생한 지역에 방사된다. 예를 들어, 미국 하와이에서 실시된 SIT의 경우, 약 8 개월간(2005년 2월 2일~9월 29일) 매주 99,600~595,800 마리가 방사되어 총 11,556,000 마리가 투입되었다(Vargas et al., 2010). 그러나 불임충을 제조하는 데 방사선을 이용하는 경우 방사선 방출물질에 대한 위해성이 거론되어, 이를 해결하기 위해 X 선과 같은 비교적 안전한 불임충 유도 기술이 개발되었다(Mastrangelo et al., 2010). 국내에서는 전자빔을 이용하여 수확 후 농작물에 영향을 주는 식물병원미생물을 사멸하는 기술이 개발되어(Kwon et al., 2014) 이를 이용한 비교적 안전한 불임충 제조 기술 개발 가능성이 제기되어 왔다.

본 연구는 향후 국내로 유입될 검역 과실파리 방제를 대비하여 국내에 자생하는 호박꽃과실파리에 대해서 SIT 기술의 적용 가능성을 검토하였다. 이를 위해 먼저 호박꽃과실파리의 생식 발달 과정을 분석하여 난모세포 및 정자의 발달을 성충 발육 시기별로 분석하였다. 이후 불임충 수컷을 제조하기 위해 여러 선량의 전자빔을 조사하여 합리적 불임충 유도 선량을 결정하였다. 궁극적으로 이런 과정을 통해 제조된 불임 수컷을 간이 모형 상자를 이용하여 불임충을 방사하고 차세대 형성과정을 모니터링하였다.

재료 및 방법

공시충 사육

제주 지역(북위 33.29, 동경 126.25)에서 자생하고 있는 노랑하늘타리 꽃에서 호박꽃과실파리 유충을 채집하였다. 수거된 유충은 호박꽃을 먹이로 실내 조건(온도 24~27°C, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 60~80%)에서 증식되었다. 노숙 유충

시기에 먹이 주변에 상토를 투입하여 용화를 유도하였으며, 우화된 성충은 인공사료(이스트추출물: 전지분유: 설탕: 물 = 2: 2: 4: 1, g/g)와 물을 공급받았다.

난모세포 및 정자 구조의 형광현미경 관찰

Al Baki et al. (2019)의 방식으로 형광물질을 이용한 세포 구조 관찰을 위해 fluorescein isothiocyanate (FITC)-tagged phalloidin을 Sigma-Aldrich Korea (서울, 한국)에서 그리고 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)에서 각각 구입하였다.

성충의 난소 또는 정소 발육을 분석하기 위해 미교미 암수를 상기 사육 조건에서 우화 이후 발육시기별(0~30일)로 임의로 얻었다. 해부현미경(Stemi SV11, Zeiss, Germany)에서 암수로 부터 각각 난소와 정소를 100 mM 인산완충용액(phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4)을 이용하여 적출하였다. 형광분석을 적용하기 위해 난소와 정소를 각각 3.7% paraformaldehyde에서 60분 동안 실내온도 및 암 조건에서 조직을 고정하였다. PBS로 3 회 세척 후에 이들 조직을 PBS에서 0.2%의 농도로 용해된 Triton X-100을 이용하여 20 분간 실내온도에서 반응시켰다. 다시 PBS로 3 회 세척 후 5% skim milk (MB cell, Seoul, Korea)로 실내온도에서 60 분간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척 후 FITC-tagged phalloidin으로 실내온도에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3 회 세척 후 DAPI (1 mg/mL)로 실내온도에서 2 분간 핵을 염색시켰다. 다시 PBS로 3 회 세척 후에 염색된 세포를 형광현미경(DM2500, Leica, Wetzlar, Germany)을 이용하여 200 배의 배율에서 관찰하였다.

전자빔 조사 기술

실내 조건(25°C)에서 용화된 지 5~6 일 경과(성충 조직의 분화가 진행되는 시기로 추정)된 호박꽃과실파리 번데기를 대상으로 전자빔이 조사되었다. 상이한 선량(0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 600, 800, 1,000 Gy)의 방사선 조사는 충북 음성에 소재한(주) 서울방사선 회사에 소재된 전자빔 기기(MB10-8/635, Mevex, Stittsville, Ontario, Canada)를 이용하였다.

전자빔 조사충의 우화율 분석

호박꽃과실파리가 용화된 지 3~5 일 경과 후에 다양한 세기(0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 600, 800, 1,000 Gy)의 전자빔을 조사한 후 앞에서 기술한 실내 조건에서 발육하게 하였다.

각 방사선 처리는 3반복으로 하였으며 각 반복은 10 마리의 번데기를 이용하였다. 매일 우화수를 계수하여 처리 후 15 일간 총 우화된 마리수로 비교 분석하였다.

전자빔 조사충의 성충 수명 조사

다양한 선량(0, 200, 400, 600 Gy)으로 번데기에 방사선 처리한 후 얻어진 암컷 및 수컷을 대상으로 각각 용기(지름 11.5 cm × 높이 8 cm)에 넣고 성충 먹이와 물을 3~4 일 마다 교체하며 제공하였다. 사육 조건은 온도 24~28°C, 습도 60~80%, 광주기 15L: 9D였다. 각 처리는 10~21 마리로 반복하였다. 치사는 자의적 활동이 없는 것으로 판정하였다.

전자빔 처리 수컷의 교미율 및 차세대 형성 능력 분석

상이한 선량으로 조사하여 얻어진 수컷을 대상으로 무처리 암컷과 1쌍씩 용기(지름 11.5 cm × 높이 8 cm)에 넣고 성충 먹이와 물을 제공하였다. 먹이와 물은 3~4 일 마다 교체하였다. 암컷이 산란할 수 있도록 호박꽃대나 호박꽃을 제공하였다. 매일 교미 및 산란 행동 유무를 관찰하였다. 사육 조건은 온도 24~28°C, 습도 60~80%, 광주기 15L: 9D였다. 각 처리는 5 반복하였다. 산란 여부는 꽃대를 분해하여 육안으로 확인하였다. 꽃대에 있는 알을 여과지가 깔린 페트리디쉬(지름 9 cm × 높이 3 cm)에 옮겨 부화유무를 5일간 관찰하였다.

전자빔 조사 수컷 방사를 통한 SIT 간이 모형실험

호박꽃과실파리 번데기에 200 Gy의 전자빔을 조사한 후 일정 크기의 상자(40 × 40 × 40 cm)에 불임 수컷을 36 마리, 무처리 수컷을 4 마리로 넣고 여기에 무처리 암컷을 4 마리 방사하였다. 무처리구의 경우 무처리 수컷을 40 마리와 무처리 암컷 4 마리를 방사하였다. 방사 이후 매일 사망 숫자를 확인하였으며 앞에서 기술한 방식대로 산란된 알을 수거하여 산란수 및 부화율을 분석하였다.

통계분석

우화율에 대한 생물검정 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다. 반면에 교미율 및 부화율과 같은 빈도자료는 PROC FREQ를 이용하여 빈도분석의 독립성 검정을 실시하였다.

결 과

호박꽃과실파리 성충 생식기관 발달

호박꽃과실파리의 난소 및 정소 발육을 분석하기 위해 핵과 세포질을 각각 DAPI (파란색) 및 phalloidin (초록색)으로 염색하면서 관찰하였다(Fig. 1).

각 난소는 약 50 개의 난소소관으로 이루어져 있다. 각 난소

소관은 말단부위는 배아줄기세포(germline stem cell)가 존재 하였으며, 이를 기반으로 난포(follicle)가 분화되었다(Fig. 1A). 초기 난포는 난포세포(follicular epithelium)로 둘러싸인 포낭세포(cystocyte)로 포낭아세포(cystoblast)에서 분열된 모습을 지니고 있다. 난소발육이 진행함에 따라 포낭아세포는 난모세포(oocyte)와 영양세포(nurse cell)로 분화하게 된다. 이후 다자란 난모세포는 난각(chorion)에 둘러싸이게 된다.

정소는 1 쌍으로 존재하고 각각의 긴 공통수정관(vas deferens)

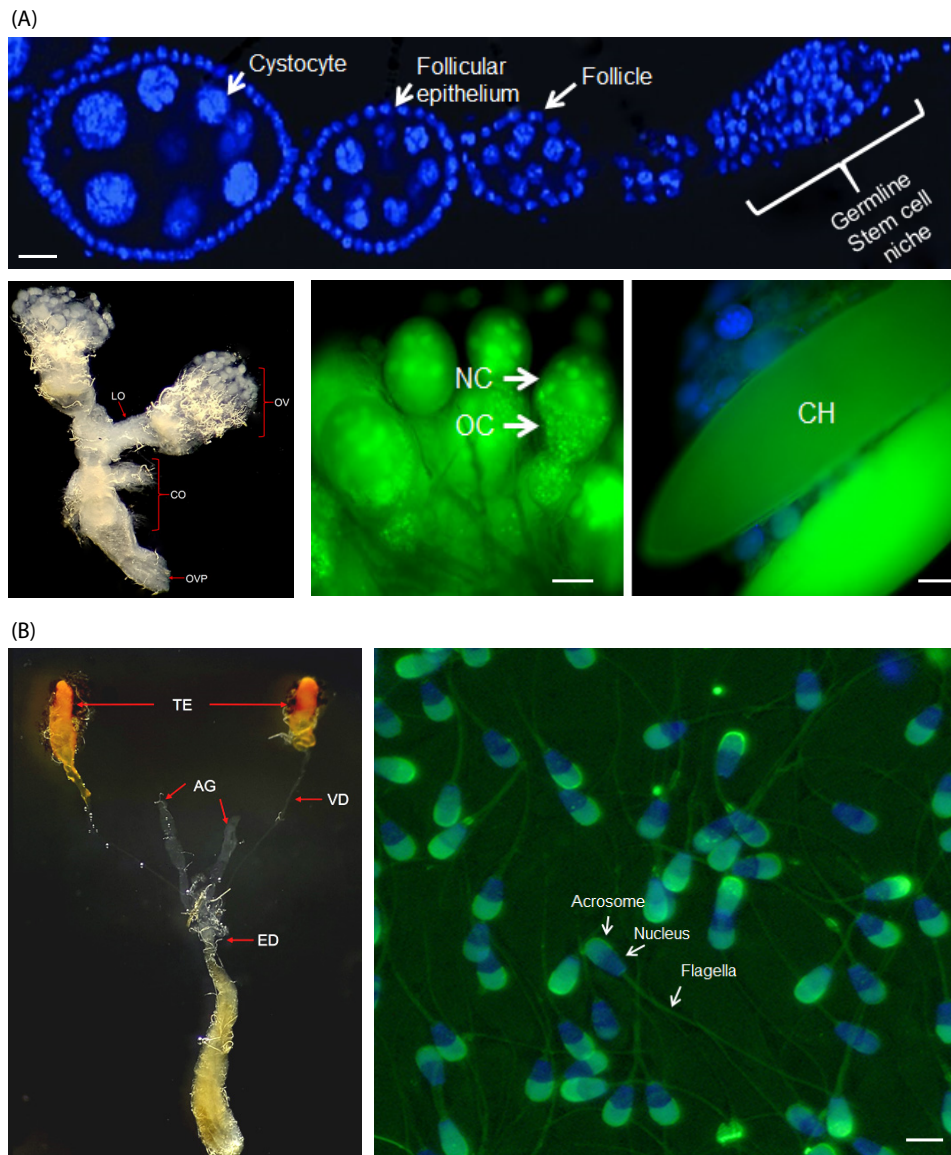


Fig. 1. Internal reproductive systems of *Z. scutellata* and oocyte and sperm development. Green and blue colors in fluorescence are stained with FITC against F-actin and DAPI against nucleus. (A) Female reproductive system. Overall female internal organ includes ovary ('OV'), lateral oviduct ('LO'), common oviduct ('CO'), and ovipositor ('OVP'). Distal region of ovariole was stained with DAPI to demonstrate the follicle development. FITC staining indicates nurse cell ('NC'), oocyte ('OC'), and chorionated oocyte ('CH'). (B) Male reproductive system. Overall male internal organ includes testis ('TE'), vas deferens ('VD'), accessory gland ('AG'), and ejaculatory gland ('ED'). Sperms are extracted from proximal region of testes. Scale bar represents 10 μ m.

이 사정관(ejaculatory duct)에서 모이게 된다(Fig. 1B). 이때 부속샘(accessory gland)이 다시 사정관에 연결된다. 정소의 기부부에 존재하는 측수정관(vas efferens) 부위를 통해 발육된 정소를 형광현미경으로 관찰하였다. 각 정자는 머리와 긴 꼬리를 가지고 있으며, 머리 부위에는 DNA가 존재하는 핵 부위와 말단 부위에 첨체(acrosome)가 관찰되었다.

우화 후 일정 기간별로 난소와 정소의 발달과정을 관찰하였다(Fig. 2). 우화직후의 난소는 아직 난소소관이 분화되지 않은 형

태로 다수의 기관지가 각 난소 부위에 모여 있는 형태로 존재하였다. 우화 후 10 일이 지나면 난소의 비대 성장이 관찰되었으며 15 일이 경과하면 난소소관의 발달을 관찰할 수 있었다. 우화 후 20 일이 경과하면 다수의 난모세포가 난황형성과정을 진행하고 있지만 일부 난모세포는 난각을 지닌 알의 모습을 형성하기 시작하였다. 우화 후 25일 이후에는 대부분의 난소소관은 완전히 발달된 알 구조를 지니고 있어 언제든지 산란이 가능한 모습을 보였다. 정소는 우화 직후부터 완전한 정소 구조를 지녔으며 내부에

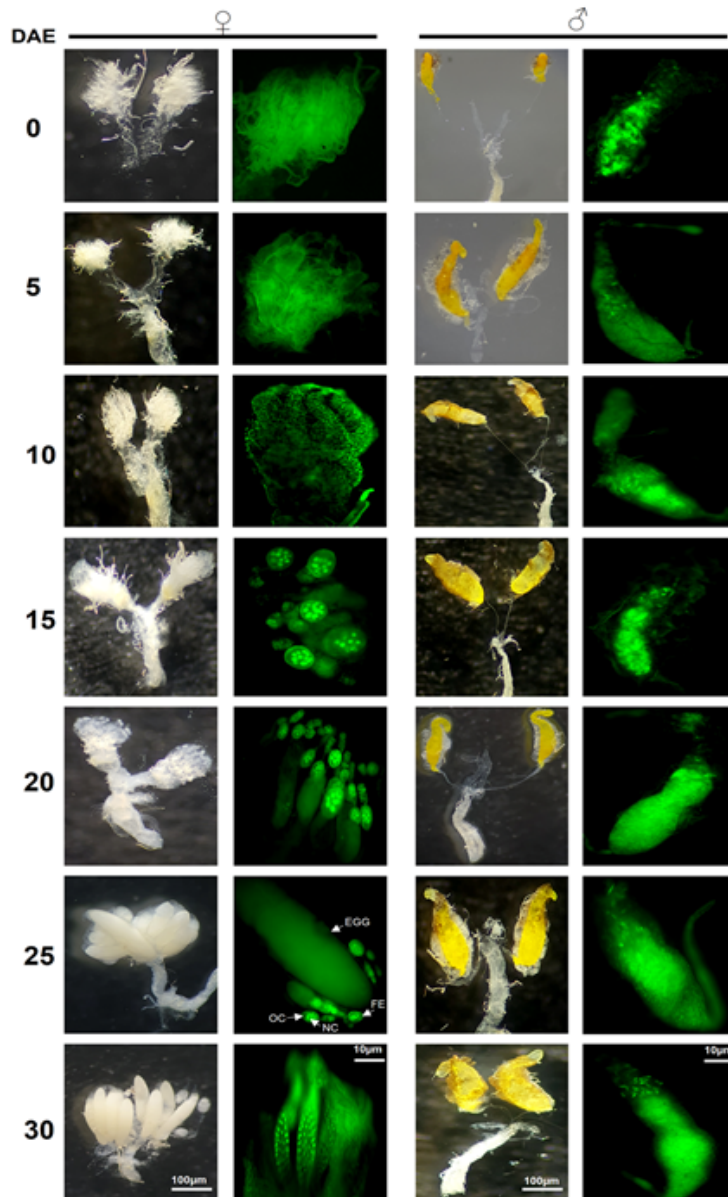


Fig. 2. Ovary and testis development of *Z. scutellata* after adult emergence. These organ were isolated at 0~30 days after emergence ('DAE'). Overall development was observed under a dissecting microscope at 50 x magnification. Fluorescence microscope was used to observed FITC staining against F-actin at 200 x magnification. In 25 DAE, oocyte structure shows nurse cell ('NC'), oocyte ('OC'), and follicular epithelium ('FE'). Scale bars in dissecting microscope photos represent 10 μ m. Scale bars in fluorescence photos represent 10 μ m.

도 다수의 DNA 염색 구조물을 지니는 것이 관찰되었다. 이러한 모습은 우화 후 30 일까지 관찰하면서 유사한 구조를 나타냈다.

호박꽃과실파리 불임 수컷 제조

호박꽃과실파리의 불임 수컷을 형성하기 위해 번데기에 여러 선량의 전자빔을 조사하였다(Fig. 3). 이후 성충의 우화를 관찰하여 전자빔이 호박꽃과실파리 번데기 발육에 미치는 영향을 분석하였다. 전자빔의 선량이 증가하면서 우화율이 현격하게($F = 28.29$; $df = 8, 31$; $P < 0.0001$) 낮아지는 현상을 나타냈다. 특별히 400 Gy 이상에서는 번데기 발육에 심각한 영향을 주어 성충으로 우화를 억제하였다. 그러나 250 Gy까지 처리하

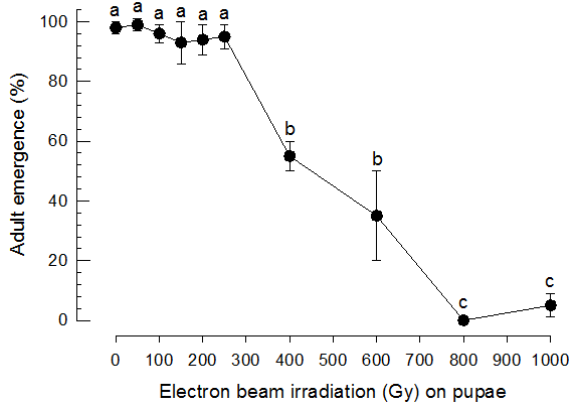


Fig. 3. Effect of electron beam irradiation on adult development. Pupae at 3-5 days old after pupation were exposed to electron beam at different doses. Each treatment was replicated three times. Each replication used 10 pupae. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

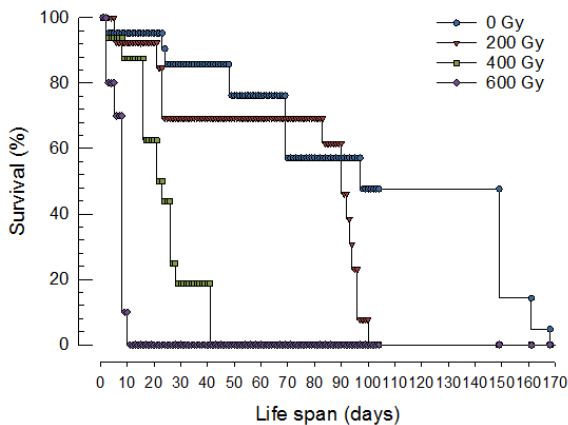


Fig. 4. Different doses of electron beam irradiation on pupae of *Z. scutellata* and their effect on male adult life span. The assays used 21 males for 0 Gy, 12 males for 200 Gy, 16 males for 400 Gy, and 10 males for 600 Gy.

면 성충으로 발육하는 데 무처리와 차이가 없는 것으로 나타났다. 반수치사 전자빔의 조사선량은 약 503 Gy로 추정되었다.

상이한 선량의 전자빔 처리를 통해 발육된 수컷 성충의 수명을 분석하였다(Fig. 4). 무처리 수컷의 경우 최대 약 5 개월 이상

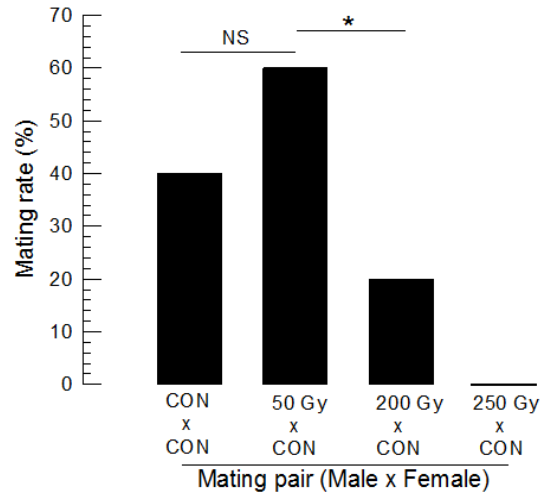


Fig. 5. Effect of electron beam irradiation on subsequent adult mating behavior. Pupae at 3~5 days old after pupation were exposed to electron beam at different doses. Emerged males from the irradiation treatment were mixed with untreated ('CON') females. Each treatment was replicated five times. Each replication used one pair of male and female adults. Asterisk indicates significant difference among means in comparison at Type I error = 0.05 (LSD test). 'NS' represents no significant difference.

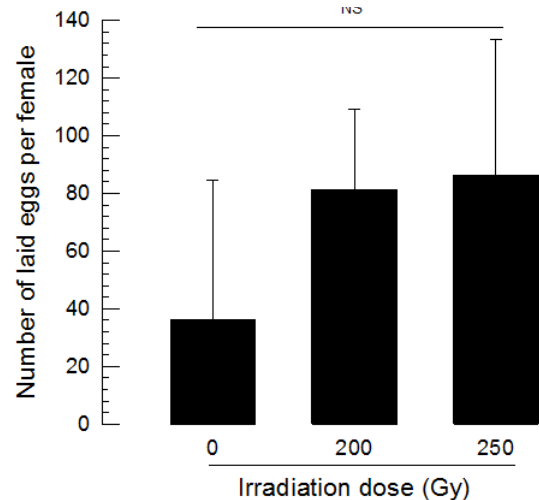


Fig. 6. Effect of electron beam irradiation on subsequent adult fecundity, which was measured by the number of laid eggs. Pupae at 3~5 days old after pupation were exposed to electron beam at different doses. Emerged males from the irradiation treatment were mixed with untreated females. Each treatment was replicated five times. Each replication used one pair of male and female adults. 'NS' represents no significant difference among means in comparison at Type I error = 0.05 (LSD test).

수명을 나타내는 반면 전자빔을 처리하면 수컷 성충으로 우화하여도 성충 수명이 감소하는 현상을 나타냈다. 이러한 수명 단축 현상은 전자빔 선량이 증가하면서 뚜렷이 나타났다. 200 Gy로 처리한 수컷은 대부분 3 개월까지는 무처리와 유사한 생존율을 나타냈다.

전자빔 처리 선량 별 무처리 암컷과 교미하는 비율을 비교하였다(Fig. 5). 무처리 수컷의 경우 약 50%의 교미율을 나타낸 반면 50 Gy와 200 Gy 선량으로 처리 수컷의 경우 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 250 Gy 처리된 수컷의 경우는 교미율이 크게 감소하였다.

전자빔으로 처리된 수컷과 교미한 암컷의 산란력을 무처리 수컷과 교미된 암컷과 비교하였다(Fig. 6). 무처리 수컷과 교미한 암컷의 경우 약 50 개의 알을 산란하였고, 200 Gy 또는 250 Gy 선량으로 처리된 수컷과 교미한 암컷도 이와 유사한 숫자의 산란력을 나타냈다.

전자빔으로 처리된 수컷과 교미한 암컷이 산란한 알들의 부화율을 무처리구와 비교하였다(Fig. 7). 무처리 수컷과 교미한 암컷의 경우 약 90%의 부화율을 기록하였다. 낮은 선량인 50 Gy를 처리한 수컷과 교미하여 얻어진 알을 경우에도 유사한 부화율을 기록하였다. 그러나 200 Gy 이상의 선량으로 처리된 수컷과 교미하여 얻어진 알의 경우는 모두 부화하지 못하였다.

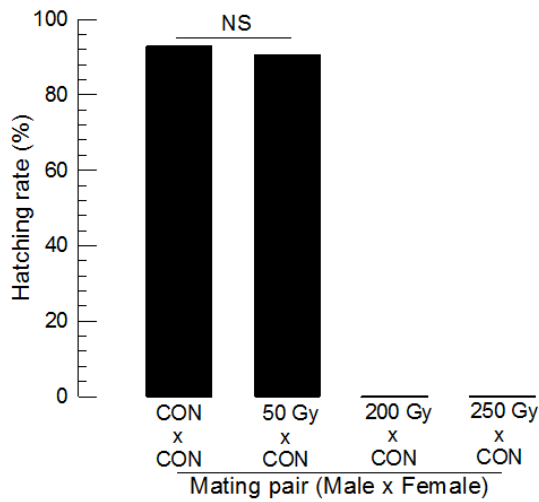


Fig. 7. Effect of electron beam irradiation on egg hatching rate in following generation. Pupae at 3~5 days old after pupation were exposed to electron beam at different doses. Emerged males from the irradiation treatment were mixed with untreated ('CON') females. Each treatment was replicated five times. Each replication used one pair of male and female adults. five times. Each replication used one pair of male and female adults. 'NS' represents no significant difference among means in comparison at Type I error = 0.05 (LSD test).

불임수컷방사 및 호박꽃과실파리의 차세대 형성에 미치는 영향

호박꽃과실파리 번데기에 200 Gy의 전자빔을 조사한 후 우화된 수컷 성충을 무처리 수컷 대비 9 배 많은 숫자로 방사하였다. 방사 후 약 3 개월 동안 성충 사망을 계수한 결과 예상대로 불임충 방사한 상자에서는 수컷의 사망률이 무처리구에 비해 높았지만, 무처리와 처리구 상자에 있는 암컷의 사망률은 거의 유사하였다(Fig. 8). 이러한 조건에서 불임충을 방사한 상자에서는 약 100 일간 산란수와 부화율을 조사한 결과 무처리구에서는 218 개의 알을 산란하여 암컷 1 마리당 54.5 개의 알을 산란하였다. 반면에 처리구에서는 338 개의 알이 산란되어 암컷 1 마리당 약 84.5 개의 알을 산란하였다. 부화율은 무처리구가

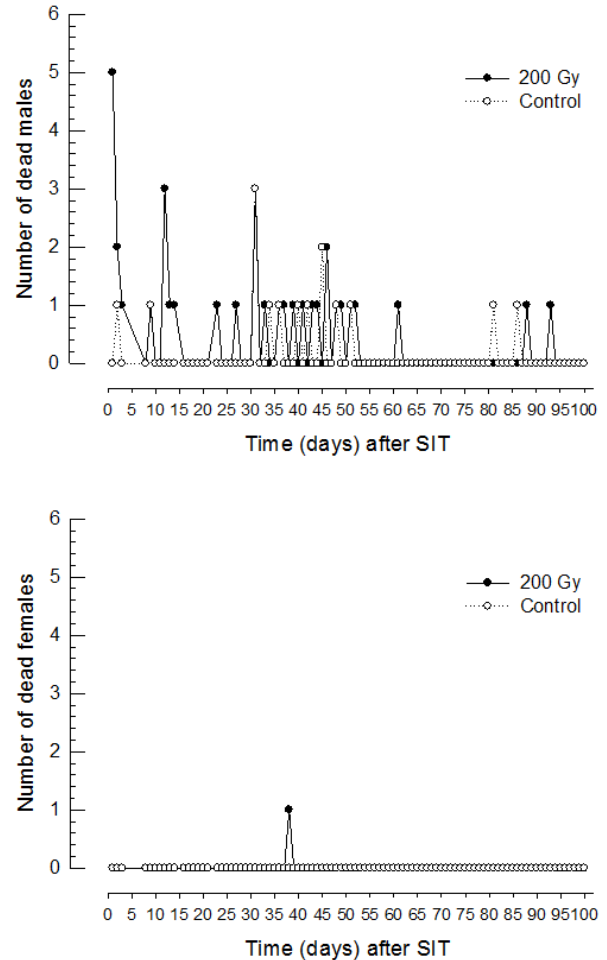


Fig. 8. Daily survival of electron beam (200 Gy)-irradiated males (36 individuals) in mating arena (40 × 40 × 40 cm) with untreated females (4 individuals) under competition with untreated males (4 individuals). During this period, only one female was dead in treated group (low panel).

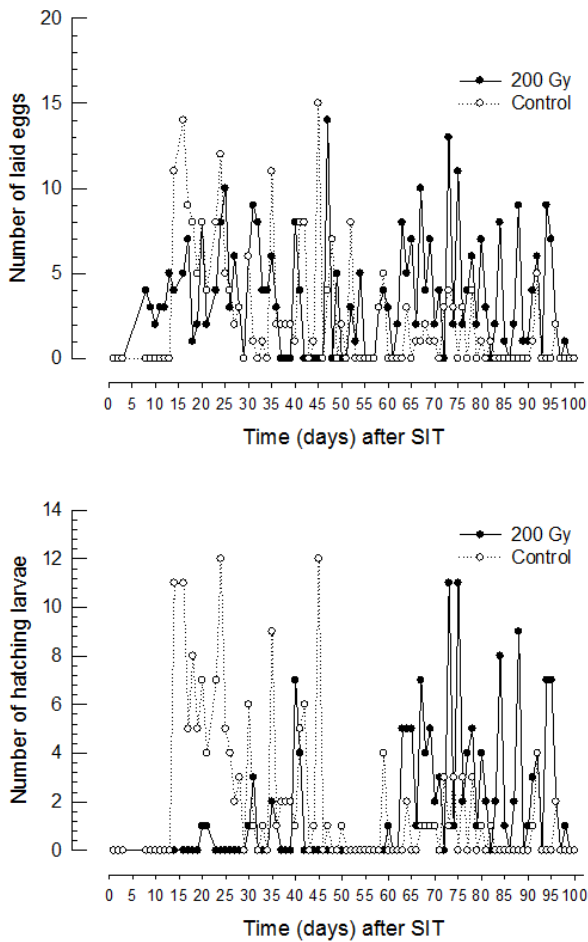


Fig. 9. Influence of release of sterile males (SIT) on fecundity (upper panel) and fertility (lower panel) in subsequent generation of *Z. scutellata*. The electron beam (200 Gy)-irradiated males (36 individuals) were released to a mating arena (40 × 40 × 40 cm) containing untreated females (4 individuals) and untreated males (4 individuals). The same sized control box contained untreated females (4 individuals) and untreated males (40 individuals). Daily laid eggs were incubated for 10 days to measure their fertility. Numbers of laid eggs and hatching larvae were calculated per female.

76.6%이고 처리구가 45.9%였다. 그러나 이러한 차이를 시기적으로 나누어 분석하면 방사후 초기 약 2 달간 산란된 알의 부화율을 조사하였을 때 불임 수컷을 방사한 상자에서는 부화율이 12.7%였고, 대조구에서는 77.6%였다(Fig. 9). 그러나 방사후 2 개월이 지나면 처리구에서도 부화율이 높아져 무처리와 큰 차이를 보이지 않았다.

고찰

국내로 침입하는 외래 해충에 대해서 조기 모니터링과 박멸 프로그램은 국내 농산물 보호라는 검역의 기본적 방향이다. 주

요 금지급 과실파리에 대한 모니터링 유인물질이 개발되어 이용되고 있다. 국내에서도 주요 금지급 과실파리에 대한 유인물질의 제형화를 완성하였고 이를 외국 현지에서 모니터링 능력을 실증하여왔다(Kim et al., 2017b). 박멸프로그램으로 MAT 및 FAT 기술이 개발되어 국내 호박꽃과실파리를 대상으로 실증 시험을 진행하였다. 그러나 비교적 여러 지역에서 금지급 과실파리 침입에 대해서 박멸기술로 알려진 SIT에 대해서는 국내에서 진행된 연구가 부족한 실정이다. 이에 본 연구는 국내 자생하는 호박꽃과실파리에 대해서 SIT 기술 적용을 검토하고 향후 금지급 과실파리에 대해서 본 기술을 바탕으로 적용하려 하였다.

SIT 기술 개발에 앞서 호박꽃과실파리의 체내 생식 생리과정을 분석하였다. 암컷의 경우 1쌍의 난소는 약 50 개의 난소소관을 지니고 있었다. 각 난소소관은 말단에 생식세포 줄기세포들이 관찰되었으며, 이로부터 난포가 연속적으로 성장되어지는 모습을 띠었다. 각 난포는 이를 둘러싸는 난포세포와 내부에 영양세포 및 난모세포로 분화되어 있었다. 즉, 호박꽃과실파리는 전형적인 다영양실형(polytrophic) 난소소관을 지니고 있다. 난모세포의 분화는 줄기세포로 분화되는 난황형성전단계(previtellogenesis), 이후 난모세포가 비대하여지는 난황형성과정(vitellogenesis), 그리고 난모세포를 둘러싸는 난각을 형성하는 난각형성과정(choriogenesis)가 모두 암컷 성충의 나이가 진행됨에 따라 관찰되었다. 우화 이후 약 20 일이 경과되면 난각을 지닌 난모세포가 형성되어 기본적으로 산란의 준비가 된다고 볼 수 있다. 즉, 환경 온도에 따라 다르겠지만 25°C 조건에서 호박꽃과실파리는 산란전기간이 약 20 일로 추정된다. 호박꽃과실파리의 1쌍의 정소는 공통수정관(vas deferens)을 이어 사정관으로 이어지는 구조를 지녔다. 이러한 모습은 우화 직후의 수컷에서도 관찰되었다. 또한 이 시기에 측수정관(vas efferens)에 해당되는 부위를 절단하여 내부 물질을 모아보면 성숙된 정자 모습을 관찰할 수 있었다. Guillén et al. (2016)은 지중해과실파리를 대상으로 생식력이 있는 수컷의 형태적 기준을 완전히 발달된 정소의 모습 그리고 정자분화과정(spermatogenesis)의 가동으로 제시하였다. 이러한 기준에서 보면 생리적으로 호박꽃과실파리 수컷은 우화 직후에 교미할 준비가 되어 있을 것으로 추정된다.

SIT 기술을 개발하기 위해 효과적인 불임충 수컷을 제조하는 기술을 개발하여야 한다. 다양한 방사능 에너지를 방사하는 기기가 존재한다. 본 연구는 전자빔을 이용하여 불임충을 유도하였다. 5~10 MeV의 에너지를 갖는 전자빔은 세포의 DNA 이중 나선구조를 절단하는 작용과 수분 등을 전리시켜 라디칼을 형성하는 간접적인 작용 등에 의해 균을 사멸시킨다(Kwon et

al., 2014). 다양한 선량으로 조사한 결과 250 Gy 보다 높은 선량에서는 번데기 발육에 심각한 피해를 주어 우화율이 낮아졌다. 반면에 250 Gy 이하에서는 선량 증가에 따라 무처리 암컷과 교미율 및 성충 수명이 감소하여 250 Gy에서는 매우 낮은 교미율과 짧은 수명을 보였다. 반면에 200 Gy는 비록 교미율은 낮았지만, 우화 후 일정 기간 동안 교미하는 암컷의 산란수에 영향을 주지 않아 정상적 교미가 이뤄졌다고 판단되었다. 더욱이 조사 받은 성충이 3 달간은 대조구와 차이 없이 성충 수명을 유지하는 것으로 나타났다. 흥미로운 사실은 200 Gy 처리 수컷과 교미한 정상 암컷에서 산란된 알은 전혀 부화되지 않았다. 다른 과실파리의 불임충 유도에 100 Gy 정도를 이용하는 것(Yusof et al., 2019)에 비해 호박꽃과실파리의 불임충 유도에 비교적 높은 에너지가 투입된다는 것을 알 수 있다. 이러한 차이는 곤충 종에 따른 차이보다는 기존의 다른 과실파리에 이용된 방사능 조사가 비교적 에너지가 높은 감마선을 이용한 데에서 비롯된 것으로 사료된다. 방사능 조사에 따른 수명 및 교미행동의 변화가 수명과 교미 행동에 관련된 분자 구조의 변화를 일으켰다는 연구가 방사선 처리 받은 오리엔탈과실파리(*Bactrocera dorsalis*)에서 단백질체학 분석을 통해 나타났는데, 이는 처리 받은 수컷의 경우 35 개의 단백질의 발현이 교란되었고 이들은 주로 에너지 대사 및 페로몬 감지관련 단백질인 것으로 판명되었다(Chang et al., 2015).

불임충 수컷이 200 Gy 크기의 전자빔 조사로 형성되었고, 이들이 실제로 차세대집단 형성에 영향을 주는 지를 간이 실험으로 증명되었다. 정상 암수가 존재하는 사육 상자에 정상 수컷의 9 배의 밀도로 불임충 수컷을 방사하였고, 이를 통해 차세대 형성되는 초기 2 개월 동안 산란된 알들이 대조구에 비해 현격하게 낮은 부화율을 기록하였다. 만약 처리구에 정상 수컷이 없었더라면 모든 산란된 알이 부화하지 못하였을 것이라는 앞의 결과를 토대로 9 배 많은 불임충이 정상 수컷과 임의로 교배하면 부화율은 10%가 나올 것으로 예상되었다. 흥미롭게도 초기 2 개월간 나온 알들은 12.7%의 부화율을 기록하였다. 이는 기대치와 매우 근접된 결과로 해석된다. 그러나 이후에는 처리구에서 부화율이 급격하게 올라가 대조구와 유사하게 나타나는 것으로 미뤄 불임충이 정상 수컷에 비해 짧은 수명을 고려하여 보면 이 후반기에는 불임충의 교미능력이 현격하게 떨어진 것으로 추정된다. 비록 200 Gy 처리가 대조구에 비해 수명에 크게 영향을 주지 않았지만 교미능력에는 영향을 받은 것으로 추정된다. 즉, 방사 후 2 개월 이내에 재 방사가 이뤄져야 더욱 효과적 방제 효과를 거둘 수 있는 것으로 해석된다. 그러나 재 방사의 경우 어떠한 밀도로 어느 특정 지역에 불임수컷을 방사하는 것이 효과적인지는 추후 연구가 진행되어야 할 부분이다.

호박꽃과실파리를 포함한 *Dacus* 아과에 속한 여러 과실파리 종들이 난초과(Orchidaceae) 꽃에서 분비되는 이차대사산물에 유인되어 lekking이라는 특이적 집단 교미행동을 보이기 때문에 방사된 불임충과 야외충이 충분히 혼합될 가능성을 기대할 수 있어 SIT 기술이 이들 과실파리류 방제에 매우 효과적일 것으로 예견되었다(Benelli et al., 2014; Benelli, 2015). 실제로 미국 하와이와 호주의 과학자들은 북부 마리아나 군도의 Rota 섬에 서식하는 오이과실파리(*Zeugodacus cucurbitae*) (Steiner et al., 1965), 호주의 퀸즐랜드과실파리(*B. tryoni*) (Andreawartha et al., 1967), 마이크로네시아의 오리엔탈과실파리(Steiner et al., 1970), 하와이의 지중해과실파리(*Ceratitidis capitata*) (Harris et al., 1986)를 완전박멸하기 위해 SIT 기술을 적용하였다. 일본에서도 침입한 오이과실파리를 박멸하는 데 SIT를 이용하였다고 보고하였다(Koyama, 1996). 태국의 경우 오리엔탈과실파리를 대상으로 SIT가 지속적으로 적용되어 전체 집단의 개체수를 낮추는 데 지대한 효과를 주었다(Aketarawong et al., 2011). 그러나 SIT 기술의 단점은 대량사육과 이어진 방사선 조사를 통한 수컷 성충의 교미능력 저하 및 수명 단축이다(Barry et al., 2003). 이러한 유전적 방제 기술의 단점을 보완하기 위해 또 다른 개념으로 제2차 성징을 나타내는 성결정 시기에 암수에 특징적 전사후과정이 일어나는 transformer 유전자에 대한 조작 기술이 우성치사유전자를 지닌 곤충방사(release of insects carrying a dominant lethal: RIDL)의 하나의 전략으로 제기되었다(Alphey, 2002; Fu et al., 2007). 지중해과실파리에 대해서 적용된 암컷치사RIDL은 간이 모형실험에서 성공적인 박멸효과를 보여주어 이를 입증하였다(Leftwich et al., 2014). 그러나 이 기술은 piggyBac이라는 트랜스포존(transposon)에 의존하여 제작된 형질전환 곤충을 방사한다는 점에서 생태계 유전자 교란이라는 여러 우려를 나타내므로 실제로 야외에 이러한 곤충을 방사하기는 어려울 것으로 예상된다.

본 연구는 원리검증(proof-of-principle)의 접근법으로 SIT 기술이 이론적으로 과실파리 박멸에 이상적인 해충 방제 기술로 이해되고 있는 바를 국내에 자생하는 호박꽃과실파리에 적용하여 이에 대한 실증성을 입증하는 데 연구력을 모았다. 이를 통해 향후 국내로 침입할 검역 대상 과실파리에 대해서 적용 가능한 기술로 응용되기를 기대하고 있다.

사 사

본 연구는 iPET의 수출전략기술개발사업의 일환으로 수행되었다.

저자 직책 & 역할

김용균 : 안동대, 교수; 실험설계 및 논문작성

알바키 압둘라 : 안동대, 석사과정; 생식기관 내부구조 분석 실험수행

권기면 : 생물이용연구소, 소장; 불임충 생식력 실험수행

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음

Literature Cited

- Aketarawong, N., Chinvinijkul, S., Orankanok, W., Guglielmino, C.R., Franz, G., Malacrida, A.R., Thanaphum, S., 2011. The utility of microsatellite DNA markers for the evaluation of area-wide integrated pest management using SIT for the fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), control programs in Thailand. *Genetica* 139, 129-140.
- Al Baki, Kim, H., Keum, E., Song, Y., Kim, Y., Kwon, K., Park, Y., 2017. Age grading and gene flow of overwintered *Bactrocera scutellata* populations. *J. Asia Pac. Entomol.* 20, 1402-1409.
- Al Baki, M.A., Lee, D.W., Jung, J.K., Kim, Y., 2019. Insulin signaling mediates previtellogenic development and enhances juvenile hormone-mediated vitellogenesis in a lepidopteran insect, *Maruca vitrata*. *BMC Dev. Biol.* 19, 14.
- Alphey, L., 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem. Mol. Biochem.* 32, 1243-1247.
- Andrewartha, H.G., Monro, J., Richardson, N.L., 1967. The use of sterile males to control populations of Queensland fruit fly, *Dacus tryoni* (Frogg.) (Diptera: Tephritidae). II. Field experiments in New South Wales. *Aust. J. Zool.* 15, 461-473.
- Barry, J.D., McInnis, D.O., Gates, D., Morse, J.G., 2003. Effects of irradiation on mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae): emergence, survivorship, lure attraction and mating competition. *J. Econ. Entomol.* 96, 615-622.
- Benelli, G., 2015. Aggression in Tephritidae flies: Where, when, why? Future directions for research in integrated pest management. *Insects* 6, 38-53.
- Benelli, G., Daane, K.M., Canale, A., Niu, C.-Y., Messing, R.H., Vargas, R.I., 2014. Sexual communication and related behaviours in Tephritidae: current knowledge and potential applications for integrated pest management. *J. Pest Sci.* 87, 385-405.
- Chang, C.L., Villalun, M., Geib, S.M., Goodman, C.L., Ringbauer, J., Stanley, D., 2015. Pupal X-ray irradiation influences protein expression in adults of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *J. Insect Physiol.* 76, 7-16.
- Drew, R.A.I., Yuval, B., 2000. The evolution of fruit fly feeding behavior, in: Aluja, M., Norrbom, A.L. (Eds.), *Fruit flies* (Tephritidae): phylogeny and evolution of behaviour, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 731-750.
- Fu, G.L., Condon, K.C., Epton, M.J., Gong, P., Jin, L., Condon, G.C., Morrison, N.I., Dafa'alla, T.H., Alphey, L., 2007. Female-specific insect lethality engineering using alternative splicing. *Nat. Biotechnol.* 25, 353-357.
- Guillén, A.J.C., Pérez, L.M., López, E.E., López, V.E.F., Marroquín, S.V.H., Domínguez, V.J.D., Recinos, C.E.C., 2016. Manual to differentiate wild Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Wied.) from unirradiated (fertile) and irradiated (sterile) Vienna temperature sensitive lethal strain flies. Programa Moscamed SAGARPA-SENASICA, Mexico.
- Han, H.Y., Kwon, Y.J., 2010. A list of North Korean Tephritoid species (Diptera: Tephritoidea) deposited in the Hungarian natural history museum. *Korean J. Syst. Zool.* 26, 251-260.
- Han, H.Y., Suk, S.W., Lee, Y.B., Lee, H.S. 2014. National List of Species of Korea 「Insect」 (Diptera II). National Institute of Biological Resources. Incheon. pp. 1-268.
- Harris, E.J., Cunningham, R.T., Tanaka, N., Ohinata, K., Schroeder, W.J., 1986. Development of the sterile-insect technique on the Island of Lanai, Hawaii for suppression of the Mediterranean fruit fly. *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 26, 77-88.
- Hee, A.K.W., Tan, K.H., 2004. Male sex pheromonal components derived from methyl eugenol in the hemolymph of the fruit fly *Bactrocera papayae*. *J. Chem. Ecol.* 30, 2127-2138.
- Kim, Y., Kim, D., 2016. Integrated pest management against *Bactrocera* fruit flies. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 359-376.
- Kim, Y., Kwon, G., 2018. Development of female annihilation technique against pumpkin fruit flies using protein-based terpinyl acetate. *Korean J. Appl. Entomol.* 57, 69-75.
- Kim, Y.P., Jeon, S.W., Lee, S.G., Kim, K.H., Choi, N.J., Hwang, C.Y., 2010. Seasonal occurrence and damage of *Bactrocera scutellata* (Diptera: Tephritidae) in Jeonbuk province. *Korean J. Appl. Entomol.* 49, 299-304.
- Kim, D.S., Jang, Y.S., Choi, K.S., Kang, T.J., Jeon, H.Y., 2012. Olfactory responses of *Bactrocera depressa* (Diptera: Tephritidae) in the field and laboratory. *J. Subtrop. Agri. Biotechnol.* 28, 33-44.
- Kim, Y., Kim, D., Park, K., Han, H., 2017a. Manual for security system against high risk fruit flies. HongReung Science, Seoul, Korea.
- Kim, K., Kim, M., Kwon, G., Kim, Y., 2017b. 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., Park, K., Han, H., 2018. Manual (II) for security system against high risk fruit flies. HongReung Science, Seoul, Korea.
- Kim, Y., Al Baki, M.A., Kwon, G., Kim, D., Park, K.C., Ahn, J.J., 2019. Discrimination of different generations of *Zeugodacus*

- scutellata* using age grading technique and their local genetic variation. *J. Asia Pac. Entomol.* 22, 908-915.
- Knipling, E., 1955. Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48, 459-462.
- Koyama, J., 1996. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* by the sterile insect technique in Japan. Proceedings of IAEA training course on the use of sterile insect and related techniques for the area-wide management of insect pests, Gainesville, FL, USA.
- Kwon, S., Choi, G.J., Kim, K.S., Kwon, H.J., 2014. Control of *Botrytis cinerea* and postharvest quality of cut roses by electron beam irradiation. *Korean J. Hort. Sci. Technol.* 32, 507-516.
- Leftwich, P.T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.F., Zacharopoulou, A., Fu, G., Chapman, T., Econopoulos, A., Vontas, J., Alphey, L., 2014. Genetic elimination of field-cage populations of mediterranean fruit flies. *Proc. R. Soc. B* 281, 20141372.
- Lyu, D.P., Lee, H.S., 2017. The red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) discovered in Busan sea port, Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 56, 437-438.
- Mastrangelo, T., Parker, A.G., Jessup, A., Pereira, R., Orozco-Dvila, D., Islam, A., Dammalage, T., Walder, J.M.M., 2010. A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J. Econ. Entomol.* 103, 85-94.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M., Freidberg, A., 1999. Systematic database of names, in: Thompson, F.C. (Ed.), *Fruit fly expert system and systematic information database*, Diptera Data Dissemination Disk 1 & Myia. pp. 65-251.
- SAS Institute, Inc., 1989. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Shelly, T.E., Edu, J., McInnis, D., 2010. Pre-release consumption of methyl eugenol increases the mating competitiveness of sterile males of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in large field enclosures. *J. Insect Sci.* 10, 8.
- Steiner, L.F., Harris, E.J., Mitchell, W.C., Fujimoto, M.S., Christenson, L.D., 1965. Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. *J. Econ. Entomol.* 58, 519-521.
- Steiner, L.F., Hart, W.G., Harris, E.J., Cunningham, R.T., Ohinata, K., Kamakahi, D.C., 1970. Eradication of the oriental fruit fly from the Mariana Islands by the methods of male annihilation and sterile insect release. *J. Econ. Entomol.* 63, 131-135.
- Vargas, R.I., Piñero, J.C., Mau, R.F.L., Jang, E.B., Klungness, L.M., McInnis, D.O., Harris, E.B., McQuate, G.T., Bautista, R.C., Wong, L., 2010. Area-wide suppression of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, and the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in Kamuela, Hawaii. *J. Insect Sci.* 10, 135.
- Yusof, S., Dzomir, A.Z.M., Yaakop, S., 2019. Effect of irradiating puparia of oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) on adult survival and fecundity for sterile insect technique and quarantine purposes. *J. Econ. Entomol.* (In press).
- White, I.M., Elson-Harris, M.M., 1992. *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International /ACIAR.