

# 콩 포장에서 어리팔나방과 팔나방(나비목: 잎말이나방과)의 동시 발생과 시토크롬 c 산화효소 1 유전자 염기서열의 다형성

정진교\* · 김은영 · 한태만

국립식량과학원 재배환경과, <sup>1</sup>국립공원연구원

## Co-occurrence of *Matsumuraeses falcana* and *M. phaseoli* (Lepidoptera: Tortricidae) in Soybean Fields, and Polymorphism of Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Gene Nucleotide

Jin Kyo Jung\*, Eun Young Kim and Taeman Han<sup>1</sup>

Crop Cultivation and Environment Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Suwon 16429, Korea

<sup>1</sup>Korea National Park Research Institute, Korea National Park Service, Wonju 26466, Korea

**ABSTRACT:** Leaf-rolling moths were collected from soybean fields and identified as *Matsumuraeses falcana* and *Matsumuraeses phaseoli* by comparison with laboratory-reared species based on the nucleotide sequence (658 bp) of the mitochondrial cytochrome c oxidase 1 subunit gene (COX1). Ten haplotypes with 0.15-0.46% genetic distance from each other in COX1 were found in 47 samples of *M. falcana*, in which haplotype A was dominant (approximately 70%). Only one type of COX1 was found in 30 samples of *M. phaseoli*, and its sequence showed 4.11-4.61% genetic distance from those of *M. falcana*. Amino acid sequences translated from COX1 were identical in all samples of both species, and they showed synonymous substitutions. Larvae of both species caused damage to soybean leaves and pods and co-occurred simultaneously in the field. The average density of *M. falcana* was 1.5 times higher than that of *M. phaseoli*. The results clearly indicate that soybean was the host plant for both species. In addition, *Elodia flavipalpis* (Diptera: Tachinidae) was found to be a larval parasitoid of *Matsumuraeses* sp. through identification of the COX1 gene.

**Key words:** Soybean, *Matsumuraeses falcana*, *M. phaseoli*, co-occurrence, COX1 gene

**초 록:** 미토콘드리아 시토크롬 c 산화효소 1 (COX1) 유전자 염기서열(658 bp)을 사용하여, 콩 포장에서 채집된 어리팔나방(*Matsumuraeses falcana*)과 팔나방(*Matsumuraeses phaseoli*)의 종을 실험실 집단의 종들과 비교하여 동정하였다. COX1 염기서열 분석에서, 어리팔나방 47개체로부터 10개의 하플로타입이 발견되었고, 종내 유전적 거리는 0.15~0.46%이었다. 이중 하플로타입 A형이 약 70%로 우점형이었다. 팔나방의 30개체로부터는 모두 동일한 하나의 서열만이 확인되었고, 어리팔나방과의 종간 유전적 거리는 4.11~4.61%이었다. 두 종의 COX1 염기서열을 번역한 아미노산 서열은 모두 동일하여 동의적 염기서열 변이(동의치환, 同義置換, synonymous substitution)를 확인할 수 있었다. 포장 조사에서 두 종의 유충이 콩의 잎과 꼬투리를 가해하였고, 한 포장에서 동시에 발생하였다. 전체 포장에서 어리팔나방의 평균 밀도는 팔나방보다 약 1.5 배 높았다. 이 결과는 콩이 두 종의 동일 기주임을 명백하게 제시하였다. 별도로 이 속의 유충 기생파리로서 *Elodia flavipalpis* (파리목: 기생파리과)가 발견되었고, COX1 서열로 동정되었다.

**검색어:** 콩, 어리팔나방, 팔나방, 동시발생, COX1 gene

\*Corresponding author: [jungjk@korea.kr](mailto:jungjk@korea.kr)

Received September 30 2022; Revised November 11 2022

Accepted November 21 2022

현재 한국에는 *Matsumuraeses*속(잎말이나방과) 곤충종으로 팔나방(*M. phaseoli*)과 어리팔나방(*M. falcana*)의 2종이 기록되어 있다(Park, 1983; Byun et al., 2005). Byun et al. (2005)은 어리팔나방의 국내 서식을 처음 보고하면서 국외의 여러 문헌으로부터 모두 콩과(Fabaceae)에 속한 두 종의 기주식물들을 정리하였다. 이 보고에는 콩(*Glycine max*)이 두 종의 공통 기주식물로, 자주개자리(*Medicago sativa*)와 전동싸리(*Melilotus suaveolens*), 팥(*Vigna angularis*), *Tephrosia vogelii*, *Vicia faba*는 팔나방의 기주식물로, 칩(*Pueraria lobata*)과 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*), *Lupinus* sp.가 어리팔나방의 기주식물로 각각 기록되었다. 국내에서는 팔나방이 팥의 꽃과 꼬투리, 줄기에 피해를 입히는 것이 확인되었고, 관련 연구에서 팔나방이 팥을 포함하여 녹두(*V. radiata*)와 동부(*V. unguiculata*) 등의 *Vigna*속 작물의 주요 해충으로 추정된다고 보고되었다(Jung et al., 2007; 2009; 2019). 국외에서 콩이 두 종의 공통 기주인 것은 보고되었으나(Byun et al., 2005), 국내에서는 어리팔나방만이 전라남도 무안의 콩의 어린 잎에 피해를 주는 것이 확인되었고(Heo et al., 2009), 팔나방이 콩을 가해하는 것은 아직 확인되지 않았다. 한편, 일본에서는 4종의 *Matsumuraeses*속 곤충(팔나방, 어리팔나방, *M. ussuriensis*, *M. vicina*)이 Tohoku 지역의 콩 포장들에서 확인되었고, 이중 어리팔나방이 광범하게 발견된다고 보고되었다(Oku et al., 1983).

최근 국내 백령도와 연천, 고성 의 콩 포장에서 나방류 해충을 관찰하던 중에 *Matsumuraeses*속으로 추정된 유충들에 의한 콩 잎과 꼬투리 피해가 발견되었는데, 시토크롬 c 산화효소 1 유전자(COX1) 염기서열 분석을 통해 동정한 결과, 동일포장에서 팔나방과 어리팔나방 유충들이 같이 콩을 가해하는 것이 확인되었다. 여기에 그 분석 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 실험곤충 채집 및 콩 피해 조사

2020년과 2021년 인천시 옹진군 백령면과 경기도 연천군, 강원도 고성군의 콩 포장에서 *Matsumuraeses*속 곤충(유충,蛹,성충)을 채집하면서, 피해주울과 밀도를 조사하였다. 피해주울 계산에는 관찰 당시 동속 곤충의 유충에 의해 최근에 발생한 피해로 추정되는 식물체를 포함시켰다. 채집한 곤충은 전체 84마리(백령도 67, 연천 14, 고성 3마리)였고, 이중 *Matsumuraeses*속 곤충 77마리(결과적으로 어리팔나방 47마리, 팔나방 30마리)와 연천에서 채집한 *Matsumuraeses*속 유충 2개체(중 동정

안됨)을 사육하던 중 각 개체에서 우화된 기생파리 2마리의 유전자가 분석되었다(Table 3). 연천에서 채집한 유충 9마리는 실내에서 사육하여 우화된 성충을 냉동고(약  $-20^{\circ}\text{C}$ )에 보관하였다. 나머지 곤충은 유전자 분석 전까지 95% 에탄올용액에 침지하여 냉장고(약  $4^{\circ}\text{C}$ )에 보관하거나(2020년 시료), 채집된 상태로 냉동고(2021년 시료)에 보관하였다.

한편 어리팔나방과 팔나방으로 종이 구분되어 있는 실험실 집단이 본 연구에 이용되었다. 어리팔나방 집단은 2007년 전남 무안의 콩 포장에서 채집되었고(Heo et al., 2009), 팔나방 집단은 2004년 경기도 수원 의 팥 포장에서 채집되어(Jung et al., 2007), 현재까지 실험실에서 유지되고 있는 집단이었다. 두 종은 Byun et al. (2005)이 보고한 수컷 생식기 형태 차이로 동정되었고, COX1 유전자 염기서열을 이용한 PCR-RFLP [프라이머 C1-J-1751, C1-N-2191 (Simon et al., 1994), 제한효소 Rsa I] 및 종특이 PCR (프라이머: 순방향 팔나방 P-SF2, 어리팔나방 F-SF3; 공통 역방향 C-SR3)에 의한 전기영동 밴드 차이로 COX1 유전자 염기 구성이 다르다는 것이 확인된 집단이다(Heo et al., 2009; Seo et al., 2012). 또 같은 실험실 집단의 중간 인위교잡을 통해 모체가 팔나방인 F1 세대로부터는 F2 자손 세대와 역교잡 BCF1 자손 세대들의 생성이 불가능하여 두 종간의 생식격리가 확인된 집단이다(Jung et al., 2019). 이 실험실 집단에서 종별로 유충 2마리씩 각각의 계놈 DNA가 추출되었다.

### 계놈 DNA 추출 및 COX1 염기서열 동정

실험곤충의 계놈 DNA는 상용 DNA 추출키트(AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction Kit) (BIONEER, Daejeon, Korea)로 제조사의 방법에 따라 추출하였다. 분리된 DNA에서 범용 프라이머인 LCO1490과 HCO2198 (Folmer et al., 1994)을 이용하여, COX1 유전자 전반부의 658 bp을 포함하는 서열(Hebert et al., 2003)을 증폭하였다. 유전자 증폭을 위해 상용 PCR 프리믹스(PrimeSTAR GXL Premix) (Takara Korea Biomedical Inc., Seoul, Korea)를 사용하였다. PCR 반응은  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 처리한 후에  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $49^{\circ}\text{C}$ 에서 30초,  $72^{\circ}\text{C}$  도에서 30초로 33번 반복하고, 마지막으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 처리하는 조건으로 수행하였다. 증폭산물을 (주)마크로젠에 순방향과 역방향 각각의 시퀀싱을 의뢰하여 크로마토그램을 얻고, Chromas (Ver. 2.6.6) (Technelysium, South Brisbane, Australia)에서 피크 검정을 거쳐 신뢰할 수 있는 658 bp의 COX1 염기서열을 얻었다.

미국국립생물정보센터(NCBI) Genbank와 다른 문헌에 팔나방과 어리팔나방에 대한 658 bp 이상의 COX1 영역의 염기서열이 보고된 것이 없기 때문에, 실험실 유지집단 시료로부터 COX1 658 bp 염기서열을 구했고, 이들을 채집한 곤충의 염기서열과 비교하기 위한 참조서열로 이용하였다. Seo et al. (2012)는 C1-J-1751과 C1-N-2191 프라이머(Simon et al., 1994)를 사용하여 439 bp로 해독된 팔나방 서열(accession No. JN119567)과 어리팔나방 서열(JN119566)을 Genbank에 등록하였는데, 그 서열들과 본 연구에서 확보된 실험실 집단의 658 bp 염기서열과 겹치는 서열(421 bp)을 비교하였다. 실험실 집단 두 곤충 종의 COX1 서열(658 bp)은 GenBank 데이터베이스에 등록하였다(팔나방, OP380047; 어리팔나방, OP373141).

한편, 연천에서 채집한 *Matsumuraeses*속 5령 유충을 실내에서 사육하던 중 2마리에서 각각 기생파리가 1마리씩 우화하였는데, 역시 658 bp의 COX1 염기서열을 동정하여 GenBank에 등록하였다(OP484970, OP484971).

염기변이가 발견된 모든 시료의 DNA 서열에 대해서는 스위스 생물정보학 연구소(Swiss Institute of Bioinformatics)의 정보자원 포털인 ExPasy의 Translate 웹사이트에서 단백질의 아미노산 서열로 번역하였다(ExPasy website, N.D.).

## 염기서열 분석

각 지역에서 채집된 곤충 시료에서 확보된 서열들 및 GenBank에 종이 확인되지 않은 상태로 *Matsumuraeses* sp.로 등록되어 있는 동일영역의 염기서열 3개[KF402839 (호주산), KF401056 (호주산), MT578848 (중국산)]를 서로 비교하였다. 이 중 MT578848 서열은 669 bp가 보고되었는데 5' 맨 앞쪽에 오류로 추정되는 8개 염기를 제거하고, 다른 서열과 정렬하여 앞의 빈 14개 염기를 갖는 서열은 다른 서열들이 모두 공통으로 갖는 서열로 대체하였다. 또, 3' 쪽 맨 뒤 프라이머 서열을 제거하여 658 bp를 맞추었다. 서열들에서 두개 염기서열 사이에 서열 유사도는 GenBank BLAST 서비스의 다중서열 비교를 통해 얻었다. 두 서열 사이의 유전적 거리는 MEGA X 프로그램(Kumar et al., 2018)에서 pairwise 방식으로 Kimura 2-parameter 모델(2,000 bootstrapping)로 추정하여 구했다. 발견된 서열들이 애기잎말이나방족(Grapholitini) 안에서 종과 속 수준에서 분리되는지 확인하기 위해 계통수를 작성하였다. 계통수에는 *Matsumuraeses*속 곤충으로 본 연구의 어리팔나방 47마리에서 나타난 변이 염기서열 10개와 팔나방 30마리의 공통된 염기서열 1개 및 GenBank에서 수집한 3개 염기서열을 포함시켰다. 다른

속 곤충으로는 애기잎말이나방족으로 국내에 기록된 종(NIBR website, N.D.) 중 GenBank에 COX1 해당영역 염기서열이 등록된 accession을 종별로 1~3개 수집하였다. 이들은 큰깍지에 기잎말이나방(*Cryptophlebia ombrodelta*), 검정날개애기잎말이나방(*Cydia glandicolana*), 완두애기잎말이나방(*C. nigricana*), 네줄애기잎말이나방(*Grapholita delineana*), 복숭아순나방붙이(*G. dimorpha*), 황머리아기잎말이나방(*G. funebrana*), 복숭아순나방(*G. molesta*), 콩나방(*Leguminivora glycinivorella*), 흑갈애기잎말이나방(*Pammene germmanna*), 긴침애기잎말이나방(*P. ignorata*), 어리도토리애기잎말이나방(*P. nemorosa*), 줄참애기잎말이나방(*Strophedra nitidana*)의 29개 염기서열이었다. 군외군으로 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*) (잎말이나방아과, 잎말이나방족) 염기서열 1개를 적용하였다. 계통수는 MEGA X에서 Kimura 2-parameter 모델과 2,000회 bootstrapping 반복을 적용하여 neighbor-joining 방법으로 추론하였다.

## 결과

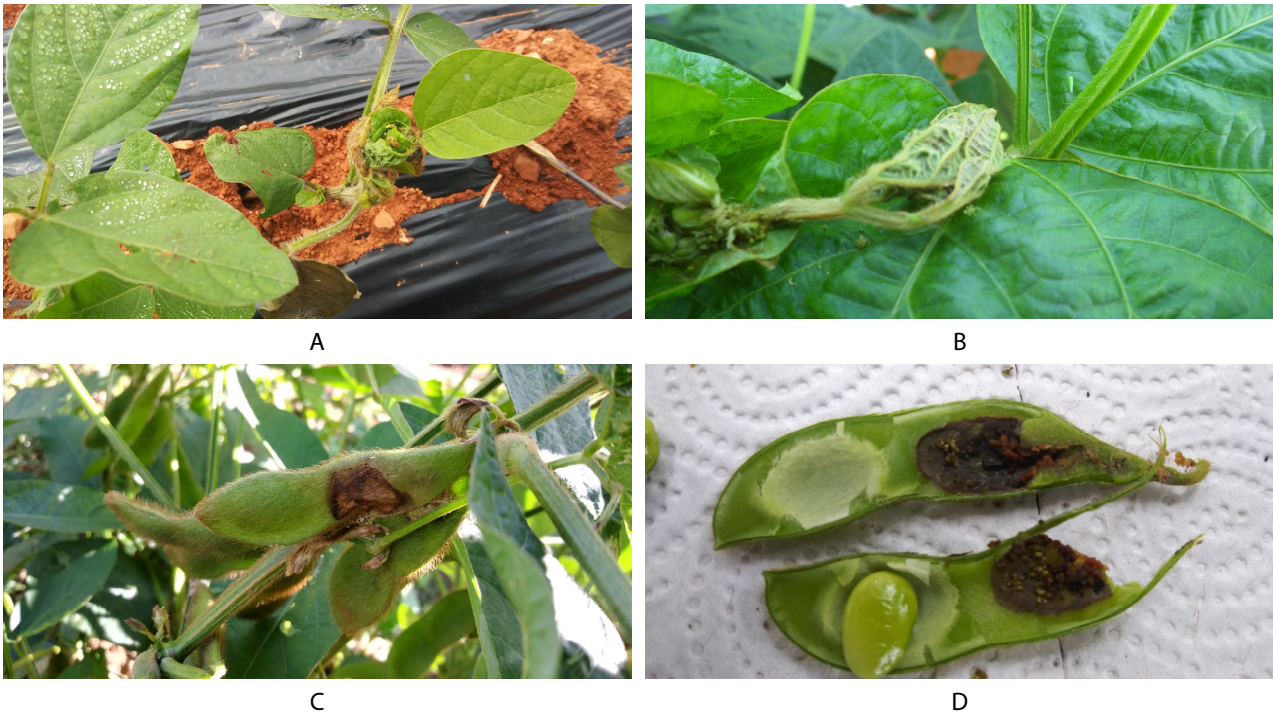
### 콩 피해 현상

*Matsumuraeses*속 유충에 의한 콩 피해는 주변의 잎을 묶어 그 안에서 잎을 섭식하거나(Fig. 1A, B), 잎과 꼬투리 사이를 묶어 잎을 가해하고 꼬투리를 표면으로부터 안쪽까지 섭식하는 것으로 관찰되었다(Fig. 1C, D). 피해율은 연천과 백령도에서 최대 100%까지 관찰되었고, 해충 밀도는 백령도에서 주당 평균 5.3마리가 최대로 관찰되었다(Table 1).

### 시토크롬 c 산화효소 1 유전자 염기서열 변이

본 연구에서 실험실 유지집단의 어리팔나방과 팔나방 2마리씩의 658 bp 염기서열은 GenBank에 등록되어 있는 어리팔나방 염기서열(JN119566)과 팔나방 염기서열(JN119567)과 겹쳐지는 421 bp가 각각 100% 일치(어리팔나방의 경우 하플로타입 A)(Fig. 2)하는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 두 곤충 실험실 집단의 COX1 염기서열 658 bp는 본 연구에서 채집한 시료 분석에서 종을 동정할 참조서열로 이용되었다.

콩 포장에서 채집되어 분석된 47마리의 어리팔나방 염기서열은 본 연구의 자체 참조 염기서열(OP373141)과 모두 일치하거나(하플로타입 A), 1개 혹은 2개의 염기가 치환되어 모두 10개의 하플로타입이 발견되었고, 각각 99.5~99.9%의 서열유사도를 보였다. 종내 유전거리는 0.15~0.46%로 나타났다(Fig. 2,



**Fig. 1.** Photographs of soybean plants injured by *Matsumuraeses* spp. larvae in the field. A and B: leaf damage, Baengnyeong; C and D: pod damage, Yeoncheon.

**Table 1.** Soybean damage ratios and densities of *Matsumuraeses* spp. observed in several soybean fields in the years 2020 and 2021

Area (Coordinate)	Check date	Damaged plant ratio (%)	<i>Matsumuraeses</i> spp. density	
			No. per 100 plants	Stage
Baengnyeong (37°58'N 124°43'E)	3 Jul. 2020	40.0 (30) <sup>1)</sup>	0.1 (1,620) <sup>1)</sup>	Pupa (P)
	21 Jul.	- <sup>2)</sup>	8.0 (100)	Larva (L)
	11 Aug.	3.3 (30)	2.0 (50)	P
	5 Jul. 2021	0.0 (30)	3.3 (30)	Adult
	20 Jul.	20.0 (30)	0.0 (30)	
	3 Aug. 2021	100.0 (10)	530.0 (10)	L
	16 Aug.	0.0 (10)	0.0 (10)	
Yeoncheon (38°03'N 127°04'E)	24, Sep. 2020	93.3 (30)	40.0 (30)	L
	7 Oct.	100.0 (10)	30.0 (10)	L
	13. Jul. 2021	0.0 (20)	0.0 (20)	
	27 Jul.	0.0 (20)	0.0 (20)	
	11. Aug.	40.0 (20)	0.0 (20)	
Goseong (38°23'N 128°29'E)	Jul. 27, 2021	-	10.0 (20)	L, P
	Aug. 10	70.0 (10)	20.0 (10)	L

<sup>1)</sup>No. of plant observed, <sup>2)</sup>Not observed.

Table 2). 팔나방과는 95.6~96.1%의 서열유사도를 보였으며, 4.11~4.61%의 유전거리를 나타냈다. GenBank에서 수집한 *Matsumuraeses* sp. KF402839 (α) 및 KF401056 (β)과의 서열

유사도와 유전거리는 각각 94.8~95.3%와 4.94~5.44%를, MT578848 (γ)과는 96.2~96.7%와 3.45~3.95%를 나타냈다.

분석된 30마리의 팔나방 모든 염기서열은 자체 참조서열

(OP380047)과 100% 일치하였다. 팔나방 염기서열은 어리팔 나방 서열에서 26~28개의 염기가 치환되었다(Fig. 2, Table 2).

팔나방 서열은  $\alpha$  및  $\beta$ 와는 평균 95.7%의 서열유사도와 4.43~4.60%의 유전거리,  $\gamma$ 와는 97.4%의 서열유사도와 2.81%의

P.	Substituted nucleotide											Substituted amino acid				
	<i>M. falcana</i> haplotype											P.	DNA Codon	Name		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	M	$\alpha$				$\beta$	$\gamma$
49	A										T	T	T	16	TCA, TCT	Ser
82	T										C	C		27	AAT, AAC	Asn
85	T									C	A	A		28	CCT, CCC, CCA	Pro
94	A					G								31	TTA, TTG	Leu
118	C									T				39	AAC, AAT	Asn
121	C								T	T			T	40	ACC, ACT	Thr
145	C			T						T	T	T	T	48	ATC, ATT	Ile
163	G	A								A	A	A	A	54	GTG, GTA	Val
169	C									T	T	T	T	56	CCC, CCT	Pro
211	A										G	G		70	ATA, ATG	Met
220	A										G	G	C	73	GCA, GCG, GCC	Ala
263	T									C	C	C	C	88	TTA, CTT	Leu
265	A									T	T	T	T			
271	C									T			T	90	CCC, CCT	Pro
274	T									C	C			91	CCT, CCC	Pro
277	C									T	T	T	T	92	TCC, TCT	Ser
286	C									T	T	T	T	95	ATC, ATT	Ile
316	T				C									105	GGT, GGC	Gly
322	A									T				107	GGA, GGT	Gly
337	A										G	G	G	112	GTA, GTG	Val
355	T									C				118	TCT, TCC	Ser
397	T									C				132	TTT, TTC	Phe
400	G							A		A	T	T	T	133	TCG, TCA, TCT	Ser
406	C									T	T	T	T	135	CAC, CAT	His
415	A									T	T			138	GGA, GGT	Gly
421	A									T	T	T	T	140	TCA, TCT	Ser
424	T									C	C	C	C	141	TCT, TCC	Ser
427	C									T				142	ATC, ATT	Ile
436	T									C				145	GCT, GCC	Ala
445	T										C	C		148	TTT, TTC	Phe
460	C									T	T	T	T	153	ATC, ATT	Ile
469	A									T				156	CGA, CGT	Arg
481	G	A								A	A	A	A	160	ATG, ATA	Met
484	C										T	T		161	TCC, TCT	Ser
485	C									T	T	T	T	162	CTA, TTA	Leu
508	A									T				169	GTA, GTT	Val
512	G									T	T			171	GCA, TCA	Ala, Ser
553	A										G	G		184	CCA, CCG	Pro
562	T										C	C	C	187	GCT, GCC	Ala
565	T									A				188	GGT, GGA	Gly
568	T											C		189	GCT, GCC	Ala
586	G									T	T	T	T	195	ACG, ACT	Thr
598	T										C	C		199	CTT, CTC	Leu
613	C									T	T	T	T	204	TTC, TTT	Phe
616	T			C										205	GAT, GAC	Asp
628	A											G		209	GGA, GGG	Gly
631	T										C	C		210	GGT, GGC	Gly
634	C										T	T		211	GAC, GAT	Asp
643	T												C	214	CTT, CTC	Leu

**Fig. 2.** Polymorphism in the nucleotides (658 bp) of cytochrome oxidase subunit 1 gene of *Matsumuraeses* spp., and those translated amino acids and DNA codons. The two sequences of *M. falcana* haplotype A and *M. phaseoli* (MP) were identical to the sequences (GenBank accession No. OP373141 and OP380047) of respective laboratory populations. Only sequence positions (P.) with substituted nucleotides are presented, compared to the corresponding positions of haplotype A of *M. falcana*. The sequences of ten haplotypes in *M. falcana* and one type in *M. phaseoli* identified in this study were registered with GenBank as follows; *M. falcana* A (accession No. OP373142, OP373144, OP373151, OP373154), B (OP373143, OP373145, OP373152), C (OP373155), D (OP373146), E (OP373147), F (OP373148), G (OP373149), H (OP373156), I (OP373153), J (OP373150), *M. phaseoli* (MP) (OP380048-OP380050). Three sequences of  $\alpha$  (KF402839),  $\beta$  (KF401056), and  $\gamma$  (MT578848) were collected from GenBank. The first eight nucleotides of the 5' region in  $\gamma$  accession were removed due to a presumed error and replaced with the hypothetically-same sequence with those of other *Matsumuraeses* spp. In addition, the final 16 nucleotides of the 3' region in  $\gamma$  accession were removed for alignment.

**Table 2.** Similarities and genetic distances between nucleotide sequences (658 bp) of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene in *Matsumuraeses* spp.

		Similarity (%)													
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	MP	α	β	γ
Genetic distance (%)	A		99.85	99.85	99.85	99.85	99.85	99.85	99.85	99.85	99.70	95.74	95.14	94.98	96.35
	B	0.152		99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.85	95.90	95.29	95.14	96.50
	C	0.152	0.305		99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.54	95.90	95.29	95.14	96.50
	D	0.152	0.305	0.305		99.70	99.70	99.70	99.70	99.70	99.54	95.59	94.98	94.83	96.20
	E	0.152	0.305	0.305	0.305		99.70	99.70	99.70	99.70	99.54	95.90	95.29	95.14	96.50
	F	0.152	0.305	0.305	0.305	0.305		99.70	99.70	99.70	99.54	95.59	94.98	94.83	96.20
	G	0.152	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305		99.70	99.70	99.54	95.59	94.98	94.83	96.20
	H	0.152	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305		99.70	99.54	95.90	95.14	94.98	96.20
	I	0.152	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305	0.305		99.54	95.90	95.14	94.98	96.35
	J	0.305	0.152	0.458	0.458	0.458	0.458	0.458	0.458	0.458		96.05	95.14	94.98	96.66
	MP	4.438	4.272	4.272	4.605	4.272	4.605	4.605	4.272	4.272	4.106		95.74	95.59	97.42
	α	5.104	4.935	4.935	5.274	4.935	5.274	5.274	5.104	5.104	5.104	4.428		99.85	97.42
	β	5.274	5.104	5.104	5.444	5.104	5.444	5.444	5.274	5.274	5.274	4.595	0.152		97.26
	γ	3.781	3.617	3.617	3.946	3.617	3.946	3.946	3.946	3.946	3.781	3.453	2.643	2.650	2.811

Similarities between nucleotides were acquired using the BLAST service between multiple sequences. Genetic distances were calculated by pairwise distance analysis of the Kimura 2-parameter substitution model with bootstrap estimation of 2,000 replicates using MEGA X software.

유전거리를 보였다(Table 2). 본 연구의 채집된 곤충들에서 발견된 염기서열들은 채집 시기(연도)와 장소를 구분하여 변이서열별로 1개씩 GenBank에 등록되었다(Fig. 2).

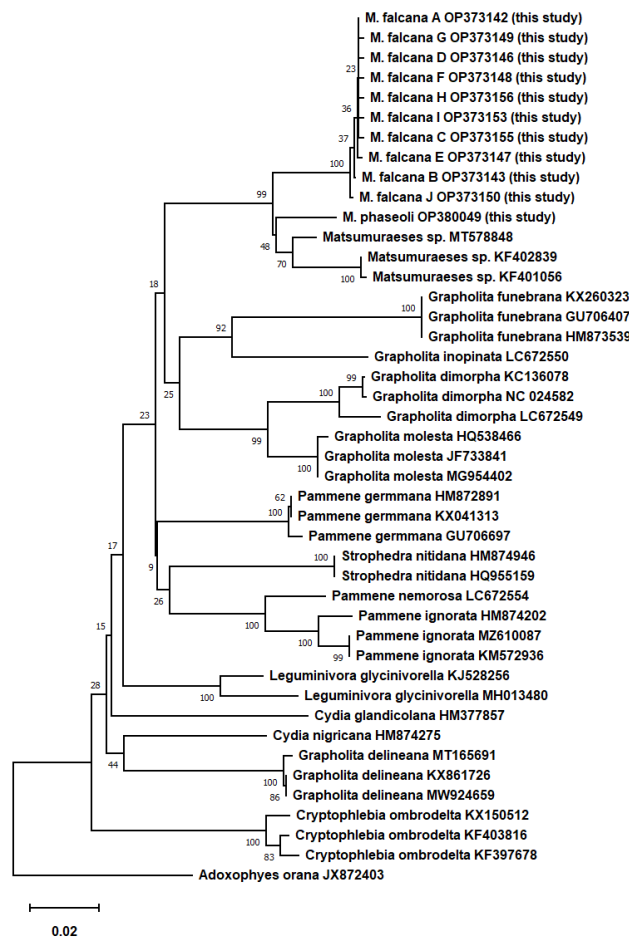
팔나방과 어리팔나방의 모든 변이의 염기서열로부터 번역된 219개 아미노산서열(TLYFIFGIWAGMVGTSLSLLIRAE LGNPGSLIGDDQIYNTIVTAHAFIMIFFMVPIMIGGFG NWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSIMILISSI VENGAGTGWTVYPPPLSSNIAHSGSSVDLAIIFSLHLGAGIS SILGAINFITTIINMRPNMNSLDQMPLFVWAVGITALLL LLSLPVLAGAITMLLTDRNLNTSFFDPAGGGDPILYQHLF)은 모두 동일하였다. 또 GenBank에서 수집한 중국산 *Matsumuraeses* sp. MT578848의 아미노산 서열과도 동일하였다. 그러나 호주산 KF402839와 KF401056의 서열에서는 171번째 아미노산인 알라닌이 세린으로 치환된 것이 확인되었다(Fig. 2). 아미노산으로 번역하는 DNA 코돈은 변이염기를 포함하는 대부분의 코돈에서 세 번째 염기에서 치환이 발생하였고, 88번 아미노산의 코돈은 첫 번째와 세 번째 염기에서, 162와 171번째 아미노산은 첫 번째 염기에서 치환이 발생하였다(Fig. 2).

COX1 유전자 부분서열을 이용하여 유전거리 기반으로 작성된 neighbor-joining 분석에서 어리팔나방 변이 염기서열 전

체는 높은 지지도값(100%)으로 묶여 분지되었다. GenBank 수집서열인 KF402839와 KF401056도 같이 묶여 분지되었다. 전체적으로 어리팔나방과 팔나방, 두 종류의 GenBank 집단들은 중간 수준에서 명료하게 분지되었다. 이 *Matsumuraeses*속 곤충 염기서열 전체는 높은 지지도값(99%)으로 같이 묶여 애기알이나방쪽의 다른 속의 종들과는 독립적으로 분지되었다(Fig. 3).

콩 포장에서 시기와 지역에 따라 분류된 팔나방과 어리팔나방 분포에서, 어리팔나방은 전체 47개 마리에서 COX1 부분염기서열 하플로타입 A형이 약 70.2% (33개체)를 차지하였다(Table 3). B형과 D형이 각 6.4% (3개체)를, E형이 4.3% (2개체), 나머지가 각각 1개체씩으로 2.1%를 차지하였다. A형은 세 지역 모두에서 발견되었고, B형은 백령도와 연천에서, D, E, F, G, J형은 백령도에서만, C형과 H형은 고성에서만, I형은 연천에서만 발견되었다. 고성에서 채집된 3마리는 모두 어리팔나방이었다. 분석된 곤충 전체에서 어리팔나방(47 마리)의 수가 팔나방(30 마리) 보다 약 1.5배 많았다.

연천에서 채집된 유충 2마리로부터 우회한 기생파리 1종의 DNA 바코딩 서열은 GenBank 데이터베이스에서 전체 미토콘드리아 DNA 서열이 참조서열로 등록된 *Elodia flavipalpis* (파리목: 기생파리과)의 accession인 NC\_018118의 COX1의 해당



**Fig. 3.** Neighbor-joining relationships among partial cytochrome c oxidase subunit 1 sequences (658 bp) of several species in the tribe Grapholitini (Tortricidae, Olethreutinae), including *Matsumuraeses* spp. GenBank accessions were collected randomly from the database only for species recorded in Korea. *Adoxophyes orana* (Tortricinae, Archiniini) was selected as an outgroup. Bootstrap estimation of 2,000 replicates were conducted using the Kimura 2-parameter model. The numbers on bars indicate bootstrap confidence values.

**Table 3.** Number of *Matsumuraeses falcana* and *M. phaseoli* identified simultaneously in the same soybean fields based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene (COX1) sequences

Sampling area	Sampling date	Insect No. (analyzed/collected)	M. falcana										M. phaseoli	
			Sequence haplotype											
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	
Baengnyeong	3 Jul. 2020	2/4 <sup>1)</sup>											0	2
	21 Jul. 2020	10/10	4	1									5	5
	3 Aug. 2021	50/53 <sup>1)</sup>	23	1		3	2	1	1			1	32	18
Yeoncheon	24 Sep. 2020	10/11 <sup>3)</sup>	4	1							1		6 (4) <sup>2)</sup>	4 (3) <sup>2)</sup>
	7 Oct. 2020	2/3 <sup>3)</sup>	1										1 (1) <sup>2)</sup>	1 (1) <sup>2)</sup>
Goseong	27 Jul. 2021	1/1								1			1	0
	10 Aug. 2021	2/2	1		1								2	0
Total No.		77/84	33	3	1	3	2	1	1	1	1	1	47	30

<sup>1)</sup>Some sequences could not be acquired because of sample loss or PCR failure. <sup>2)</sup>The numbers in parentheses indicate the number of adults emerged from the collected insects; these adults were identified at the species level via examination of external morphology and COX1 sequences. <sup>3)</sup>*Elodia flavipalpis* (Diptera: Tachinidae) adults emerged from the fifth instar larvae of *Matsumuraeses* sp. collected on different dates; their COX1 sequences are registered under the accession numbers OP484970 and OP484971 in GenBank.

영역 염기서열과 100% 일치하였다.

## 고찰

국내에서 어리팔나방이 콩의 어린 잎을 가해하는 것은 보고되었으나(Heo et al., 2009), 팔나방이 콩을 가해하는 것은 본 연구에서 처음 확인되었다. 두 종이 꼬투리까지 가해하는 것이 연천 콩포장에서 확인되었는데, 백령도나 고성에서 동속 해충에 의한 콩 꼬투리 피해가 관찰되지 않았고, 과거 동속 해충에 의한 콩 꼬투리 피해가 보고된 적이 없었다. 꼬투리 피해 현상으로부터는 어느 정도 자란 유충이 바깥에서 꼬투리 안쪽으로 침입하는 섭식행동을 보이는 것으로 추정되었다. 이 섭식행동은 콩나방이 꼬투리에 산란하여 갓부화 유충이 꼬투리 안으로 들어간 후 안에서 종실을 가해하는 행동(Kobayashi and Oku, 1980)과 매우 다르다. 따라서 이런 사실들에 기초할 때, 콩에서의 두 종 해충의 주 섭식부위는 잎이고, 꼬투리 피해는 밀도가 높거나 식물체 자체의 발육형태(예, 잎과 꼬투리가 밀접하게 붙어있는 경우)에 따라 발생할 것으로 짐작되었다. 이와 관련하여 Kobayashi and Oku (1980)는 이 속 해충들의 꼬투리 가해는 우발적 일 것으로 추정하였다.

채집된 어리팔나방 하플로타입 A 서열은 본 연구의 참조서열과 100% 일치하여 어리팔나방으로 확인되었다. COX1 유전자를 이용해 종내 유전거리를 계산한 경험적 연구들은 나비목의 5개 과에서 0.17~0.36% (Hebert et al. 2003), 잎말이나방과 몇 종에서 약 0~3% (Yang et al., 2021), 애기잎말이나방속 몇 종에서 0~2.98% (Huemer et al., 2014, Appendix)를 제시하였다. 이들 예에 근거하여, 본 연구에서 어리팔나방 A에 대해 1개 혹은 2개 염기가 치환되어 0.15%와 0.30%의 유전거리를 보였던 서열들은 동일종의 종내 염기서열 변이로 판단되었다.

종간 유전거리에 대해서는 Hebert et al. (2003)은 5.8~9.1%, Yang et al. (2021)은 약 1~10% 사이, Huemer et al. (2014)은 애기잎말이나방속 근연종 사이에서 5.3~11.2% 범위의 예를 제시하였다. 한편 Hajibabaei et al. (2006)은 나비목의 몇 개 과(Family)에서, Zahiri et al. (2014)은 밤나방상과(Noctuidae) 곤충들에 대한 분석 예에서 종을 구분 짓는 유전거리 최소 한계값(threshold)으로 2% 이상을 제시하였다. 본 연구의 두 종 사이의 유전적 거리 평균은 4.4% (범위 4.1~4.6%)로 위 보고의 종간 유전거리 한계값보다 컸고, 여러 예의 종간 유전범위 안에 대체적으로 포함되어 있다. 또 본 연구에서 어리팔나방의 평균 0.3%(범위 0.15~0.46%)와 팔나방의 0%의 종내 유전거리와 4.4%의 종간 유전거리와의 격차는 매우 크고 겹쳐지지 않는다. 따라서 이

COX1 유전자 염기서열만을 기준으로 두 종은 분리된 종으로 판단된다. 어리팔나방과 팔나방은 수컷 성충 생식기의 파악기 배쪽 기부 모서리의 형태 차이가 있고(Byun et al., 2005), 짝짓기에 서로 다른 성페로몬 조성을 이용(Wakamura, 1985; Wakamura and Kegasawa, 1986; Cho et al., 2007; Yum, 2010)하는 것으로 추정되었다. 두 종을 인위적으로 교잡시킬 때 팔나방 모계 기원의 자손은 발생하지 못해 두 종 사이에 부분적인 생식격리가 일어나는 것이 보고되었다(Jung et al., 2019). 또 Byun et al. (2005)이 정리한 두 종의 기주식물 비교와 더불어, 국내에서 팔에서는 팔나방만이 발견되는 현상(Jung et al., 2009)도 있어 두 종이 어느 정도 기주식물 범위 차이가 있을 것으로 짐작되고 있다. 이런 결과들은 두 종이 서로 형태와 생리, 행동의 상당 부분을 달리하면서 다른 종으로 분화된 것을 나타낸다.

GenBank에 등록된 서열의 *Matsumuraeses* sp. 종들이 어리팔나방이나 팔나방과 종 분리가 되는가에 대해서, 중간 유전거리 한계값의 예(2% 이상) (Hajibabaei et al., 2006; Zahiri et al., 2014)에 비교하여, 본 연구의 두 종에 대한 GenBank 등록서열의 유전거리는 2.8~5.4%로 커 이들이 *Matsumuraeses*속의 다른 종일 수도 있다고 생각되었다. 특히 호주산의  $\alpha$ 와  $\beta$  서열은 치환된 아미노산이 발견되어 다를 가능성이 더 크다. 그러나 종구분은 형태와 생리, 행동 등의 여러 부분이 고려되어 결정되어야 하기 때문에, 위 추정에 대한 신뢰가 큰 것은 아니다.

정리하면, 본 연구는 콩 포장에서 채집한 곤충의 유전자 염기서열 분석을 통해 팔나방이 콩을 가해하는 것을 처음 밝혔고, 팔나방과 어리팔나방이 한 포장에서 동시에 콩을 가해하는 현상을 확인하였다. 이는 앞으로 어느 기주식물에서 동속 해충종들에 대한 종 동정과정과 이들을 관리하는 방법에 신중하게 접근할 필요성을 나타내었다. 이 경우 본 연구에서 밝혀진 COX1 염기서열들이 상당하는 기준으로 작용할 것으로 생각된다. 한편, 백령도와 연천의 콩 포장에서는 어리팔나방과 팔나방이 동시에 섭식하는 것이 확인되었으나 고성에서는 어리팔나방만 관찰되었다. 관찰수가 충분하지 않아 팔나방이 발견되지 않았을 수도 있는데, 앞으로 적극적인 시료 수집을 통해 지역에 따른 종 분포확인이 필요할 것이다. 또 어리팔나방의 COX1 변이형이 지역에 따라 다른 것이 발견되었는데, 이 역시 향후 더 확인이 필요한 내용이다.

## 사사

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 연구과제(PJ01527801)를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성되었다.



## Statements for Authorship Position & Contribution

Jung, J.K.: Natl. Inst. of Crop Sci., Researcher; Designed the research, conducted the experiments, analyzed data, and wrote and edited the manuscript

Kim, E.Y.: Natl. Inst. of Crop Sci., Researcher; Investigated soybean damage, analyzed nucleotide sequences, and edited the manuscript

Han, T.: Korea Natl. Park Res. Inst., Researcher; Analyzed the data, and edited the manuscript

All authors read and approved the manuscript.

## Literature Cited

- Byun, B.-K., Park, K.-T., Park, Y.-M., 2005. Review of the genus *Matsumuraeses* Issiki (Lepidoptera, Tortricidae) with discovery of *M. falcana* (Walsingham) in Korea. *J. Asia-Pac. Entomol.* 8, 117-122.
- Cho, J.R., Choi, K.S., Jung, J.K., Park, J.H., Seo, B.Y., 2007. Development of sex pheromone trap for monitoring *Matsumuraeses falcana* (Walshingham) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Asia-Pac. Entomol.* 10, 345-349.
- Expasy website, N.D. Translate. <https://web.expasy.org/translate> (accessed on 1 September, 2022).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294-299.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 968-971.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *P. Roy. Soc. Lond. B Bio.*, 270, 313-321.
- Heo, H., Son, Y., Seo, B., Jung, J., Kim, Y., 2009. A molecular marker discriminating the soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* and the podborer, *M. falcana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 48, 547-551.
- Huemer, P., Mutanen, M., Sefc, K.M., Hebert, P.D.N., 2014. Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: large geographic distances have small genetic impacts. *PLoS ONE* 9, e115774.
- Jung, J.K., Park, C.-G., Moon, J.-K., Kim, E.Y., Cho, J.R., Seo, B.Y., 2019. Interspecific hybridization between *Matsumuraeses phaseoli* and *M. falcana* (Lepidoptera: Tortricidae) and postzygotic reproductive isolation. *Korean J. Appl. Entomol.* 58, 305-311.
- Jung, J.K., Seo, B.Y., Cho, J.-R., Kwon, Y.-H., Kim, G.-H., 2009. Occurrence of lepidopteran insect pests and injury aspects in adzuki bean fields. *Korean J. Appl. Entomol.* 48, 29-35.
- Jung, J.K., Seo, B.-Y., Park, J.H., Moon, J.-K., Choi, B.-S., Lee, Y.-H., 2007. Developmental characteristics of soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* (Lepidoptera: Tortricidae) and legume pod borer, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae) on semi-synthetic artificial diets. *Korean J. Appl. Entomol.* 46, 393-399.
- Kobayashi, T., Oku, T., 1980. Sampling lepidopterous pod borers on soybean, in: Kogan, M., Herzog, D.C. (Eds.), *Sampling methods in soybean entomology*. Springer-Verlag, New York, pp.422-437.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
- NIBR (National Institute of Biological Resources) website, N.D., National species list of Korea. <https://species.nibr.go.kr> (accessed on 1 September, 2022).
- Oku, T., Miyahara, Y., Fujimura, T., Toki, A., 1983. Preliminary note on *Matsumuraeses* species (Lepidoptera, Tortricidae) injuring soybeans in Tohoku district. *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 27: 28-34.
- Park, K.-T., 1983. Microlepidoptera of Korea. *Ins. Koreana* 3, 1-195.
- Seo, B.Y., Jung, J.K., Cho, J.R., Kim, Y., Park, C.G., 2012. A PCR method to distinguish *Matsumuraeses phaseoli* from *M. falcana* based on the difference of nucleotide sequence in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I. *Korean J. Appl. Entomol.* 51, 365-370.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Wakamura, S., 1985. Identification of sex-pheromone components of the podborer, *Matsumuraeses falcana* (Walshingham) (Lepidoptera: Tortricidae). *Appl. Ent. Zool.* 20, 189-198.
- Wakamura, S., Kegasawa, K., 1986. Sex pheromone of the podborer, *Matsumuraeses falcana* (Walshingham) (Lepidoptera: Tortricidae): activity of the third component, (*E,Z*)-7,9-dodecadienyl acetate, and 3-component formulation. *Appl. Ent. Zool.* 21, 334-339.
- Yang, M., Li, J., Su, S., Zhang, H., Wang, Z., Ding, W., Li, L., 2021. The mitochondrial genomes of Tortricidae: nucleotide composition, gene variation and phylogenetic performance. *BMC Genomics* 22, 755.
- Yum, K.H., 2010. Identification of sex pheromone of the soybean podworm, *Matsumuraeses phaseoli* Matsumura (Lepidoptera: Tortricidae). MS Thesis, Chungnam Natl. Univ., Daejeon.
- Zahiri, R., Lafontaine, J.D., Schmidt, B.C., deWaard, J.R., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N., 2014. A transcontinental challenge - a test of DNA barcode performance for 1,541 species of Canadian Noctuoidea (Lepidoptera). *PLoS ONE* 9, e92797.