

한국<del>응용곤충</del>학회지

Korean J. Appl. Entomol. 53(3): 247-260 (2014) DOI: http://dx.doi.org/10.5656/KSAE.2014.06.0.012 © The Korean Society of Applied Entomology pISSN 1225-0171, eISSN 2287-545X

# ITS2 rDNA 염기서열 분석을 통한 *Trichogramma* 속(벌목: 알벌과)의 조명나방 알기생벌에 대한 종 추정

서보윤\*·정진교¹·박기진²·조점래³·이관석·정충렬⁴

국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과, <sup>1</sup>국립식량과학원 작물환경과, <sup>2</sup>강원도농업기술원 옥수수연구소, <sup>3</sup>농촌진흥청 연구정책국 연구운영과, <sup>4</sup>경성대학교 생물학과

# Molecular Identification of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Egg Parasitoids of the Asian Corn Borer *Ostrinia furnacalis*, Based on ITS2 rDNA Sequence Analysis

Bo Yoon Seo\*, Jin Kyo Jung<sup>1</sup>, Ki Jin Park<sup>2</sup>, Jum Rae Cho<sup>3</sup>, Gwan-Seok Lee and Chung Ryul Jung<sup>4</sup>

Crop Protection Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Developmental Administration, Wanju-gun 565-851, Korea 

<sup>1</sup>Crop Environment Research Division, National Institute of Crop Science, Rural Developmental Administration, Suwon 441-857, Korea 

<sup>2</sup>Maize Experiment Station, Gangwondo Agricultural Research and Extension Services, Hongcheon-gun 250-823, Korea 

<sup>3</sup> R&D Coordination Division, Research Policy Bureau, Rural Developmental Administration, Jeonju 560-500, Korea 

<sup>4</sup>Molecular biology Lab, Department of Biology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

**ABSTRACT:** To identify the species of *Trichogramma* occurring in the corn fields of Korea as egg parasitoids of *Ostrinia furnacalis*, we sequenced the full-length of ITS2 nuclear rDNA from 112 parasitoids collected during this study. As a reference to distinguish species, we also retrieved full-length ITS2 sequences of 60 *Trichogramma* species from the NCBI GenBank database. On the basis of the size and 3' terminal sequence pattern of the ITS2 sequences, the *Trichogramma* samples collected in this study were divided into three groups (K-1, -2, and -3). Evolutionary distances (*d*) within and between groups based on ITS2 sequences were estimated to be ≤ 0.005 and ≥ 0.080, respectively. In the net average distance between groups or species, the *d* value between K-1 and *T. ostriniae*, K-2 and *T. dendrolimi*, and K-3 and *T. confusum* was the lowest, with values of 0.016, 0.001, and 0.002, respectively. In the phylogenetic tree, K-1 and K-2 were clustered with *T. ostriniae* and *T. dendrolimi*, respectively. However, K-3 was clustered with three different species, namely, *T. confusum*, *T. chilonis*, and *T. bilingensis*. NCBI BLAST results revealed that parasitoids belonging to K-1 and K-2 showed 99% identity with *T. confusum* and *T. chilonis*, and one parasitoid in K-3 collected from Gochang had 98% identity with *T. bilingensis*, *T. confusum*, and *T. chilonis*. On the basis of these results, we infer that the species of *Trichogramma* collected in this study are closely related to *T. ostriniae* (K-1) and *T. dendrolimi* (K-2). However, it was not possible to distinguish species of K-3 using the ITS2 sequence alone.

Key words: Ostrinia furnacalis, Zea mays, Trichogramma, ITS2, Molecular phylogenetic tree

검색어: 조명나방, 옥수수, Trichogramma, ITS2, 분자계통수

\*Corresponding author: seoby@korea.kr

Received February 14 2014; Revised June 9 2014

Accepted July 1 2014

알기생벌 천적은 숙주곤충의 알 부화를 막아 유충에 의한 피 해를 최소화 할 수 있으며 대량으로 증식이 가능하고 다른 방제 수단과 함께 쓸 수 있는 장점이 있다(Hassan, 1994; Jung et al., 2005; Kim et al., 2009). 알벌과(Trichogrammatidae)(벌목: 좀 벌상과)에는 전 세계적으로 83속 620여종이 알려져 있으며 이 중 Trichogramma속 알기생벌은 주로 나비목 해충의 알에 기생 을 하는 중요한 생물적 방제 인자로 다양한 농작물과 산림에서 성공적으로 사용되고 있다(Li, 1994; Pinto & Stouthamer, 1994; Smith, 1996; del Pino et al., 2013). 생물적 방제 수단으로 Trichogramma속 알기생벌을 이용하기 위한 가장 기본적이며 중요한 단계는 정확한 종 동정(species identification)이며 이를 통해 야외포장에서 대량방사가 성공할 수 있다(Hassan, 1994). 방제하고자 하는 해충에 대해 효과가 좋은 기생벌 선발이 중요 한데, 대량사육 과정에서 목적하지 않은 종이 섞여 무의식중에 사육하는 종이 완전히 바뀌어 방사할 환경에 부적합한 종이 투 입될 수 있는 이유 등으로 Trichogramma속에 대한 정확한 종 동정은 생물적 방제의 성공을 위해 필요하다(Stouthamer et al., 1999; Sumer et al., 2009). 그러나 Trichogramma spp.는 체장 이 1 mm 이하의 소형곤충이면서 외부 형태적으로 종 구별이 매 우 어려운 것으로 잘 알려져 있다(Pinto and Stouthamer, 1994). 지금까지 Trichogramma속 수컷의 생식기와 더듬이 등의 형태 적 특징(Nagarkatti and Nagaraja, 1971)을 통해 약 200여 종이 알려졌으나 야외에서 암컷만 발견되는 경우와 종내 다양한 형태 적 변이, 불완전한 생식적 격리, 그리고 은폐종(cryptic species)으 로 인해 종 동정이 매우 복잡하고 어렵다(Ciociola, 2001a; del Pino et al., 2013). 따라서 최근에는 핵내 리보솜 DNA 영역, 특히 5.8S와 28S 리보솜 RNA 사이에 있는 internal transcribed spacer (이하 ITS2로 표현)의 염기서열을 이용한 Trichogramma spp. 종동정 방법이 개발되었다(Stouthamer et al., 1999). Trichogramma 속 ITS2 영역의 DNA 역기서열을 해독한 결과 종내 변이가 적 고 종간 염기서열 전체길이와 변이 차이가 커 종 구별을 위해 사 용될 수 있었다(Stouthamer et al., 1999; Li et al., 2004). 그동안 많은 연구자들에 의해서 Trichogramma속 종들의 ITS2 전체 염기서열이 밝혀지고 GenBank 데이터베이스에 등록되고 있 으며 형태적 분류가 어려운 은폐종을 구별하여 왔다(Amornsak et al., 1998; Silva et al, 1999; Stouthamer et al., 1999; Ciociola et al., 2001a, b; Li et al., 2004; Dang et al., 2005; Davies et al., 2006; Honda et al., 2006; Gariepy et al., 2007; Li, 2007; Kumar et al., 2009; Sumer et al., 2009; Jeong et al., 2010; Sumer et al., 2011; Karimi et al., 2012; Poorjavad et al., 2012; del Pino et al., 2013). 그러나 형태적으로 구별이 매우 힘든 T. minutum과 T. platneri 같은 근연종에서는 ITS2 염기서열 비교 분석으로 해 결되지 못하는 부분도 있었다(Stouthamer et al., 2000).

한국곤충명집(The entomological society of Korea and Korean society of applied entomology, 1994)에는 호주알벌(T. australicum Girault), 명충알벌(T. chilonis Ishii), 송충알벌(T. dendrolimi Matsumura), 쌀좀알벌(T. evanescens Westwood), 왜명충알벌(T. japonicum Ashmead), 총 5종의 Trichogramma 속이 기록되어 있다. 이중 옥수수에 가장 큰 문제 해충인 조명 나방의 알기생벌로는 수원지역에서 쌀좀알벌(Lee et al., 1980; Jung et al., 2005)과 경남지역(진주, 하동, 밀양)에서 송충알벌 (Kim and Kim, 1991) 총 2 종이 보고되었다. 중국에서는 수컷 생식기의 형태적 특징과 최근의 ITS2 염기서열 분석 기술을 이 용하여 Trichogramma속 조명나방 알기생벌로 12종이 보고되 었으며 그중 송충알벌, 명충알벌, T. ostriniae Pang and Chen, 쌀좀알벌이 모든 지역에서 발생하며 T. ostriniae Pang and Chen 가 가장 옥수수 포장에서 우점하는 종으로 조사되었다(Li et al., 2004; Wang et al., 2005; Li, 2007). 일본에서도 수컷 생식기의 형태적 특징과 ITS2 염기서열 분석을 통해 Trichogramma속 알 기생벌로 14종을 보고하였으며 그중 문헌 기록에 근거하여 조 명나방의 알에서 채집된 것은 T. ostriniae Pang and Chen, 송충 알벌, T. yabui Honda and Taylor로 기술하였다(Honda et al., 2006). 우리나라에서는 국내 천적회사에서 상용화되고 있는 Trichogramma속 알기생벌에 대한 ITS2 DNA 염기서열 비교 분석을 통한 종 추정 결과가 있었으나(Kim et al., 2009; Jeong et al., 2010) 실제 포장에서 자연발생 하고 있는 Trichogramma속 알기생벌에 대한 수컷 생식기의 형태적 특징과 ITS2 DNA 염 기서열 정보를 통해 종을 동정한 결과가 없는 상황이다.

본 연구에서는 조명나방 생물적 방제에 중요한 Trichogramma 속 알기생벌의 국내 옥수수 포장 내 발생 정보를 얻기 위해 2011~2013년 여러 포장에서 수집한 Trichogramma속 조명나 방 알기생벌들의 ITS2 DNA 염기서열 전체영역을 해독하고 NCBI GenBank 데이터베이스에 등록되어 있는 Trichogramma 종들의 ITS2 DNA 염기서열과 비교분석하여 옥수수 포장에서 실제 자연발생 하는 종을 추정하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

#### 조명나방 알기생벌 수집

조명나방의 알기생벌 수집을 위해 국립식량과학원(수원)에 서 반합성 인공사료(Jung et al., 2005)를 이용하여 실내사육 조 건(25<sup>°</sup>C, RH 60%, 광주기 15L/9D)에서 누대사육 중인 조명나 방으로부터 유산지에 산란된 알 덩어리를 이용하였다. 한 개의

**Table 1.** Egg parasitoids obtained from *Ostrinia furnacalis* egg masses placed in corn fields at eight different locations in Korea [A: No. of egg masses per corn plant, B: Total no. of egg masses examined (No. of corn plant), C: Egg parasitism rate (%) per corn plant]

	Collection site	Geographic coordinates	Exposure starting date	Collection date	A	В	С
1	Buan	+ 35° 46′, + 126° 37′	June 12 2012	June 15 2012	1	50 (50)	4.0
2	Chilgok	+ 35° 57′, + 128° 33′	June 22 2012	June 25 2012	4	68 (17)	22.1
3	Cheongwon	+ 36° 42′, + 127° 33′	June 22 2012	June 25 2012	4	60 (15)	68.9
4	Gochang	+ 35° 26′, + 126° 38′	June 12 2012	June 15 2012	4 or 5	49 (11 + 1)	20.4
5	Hongcheon*	+ 37° 53′, + 128° 20′	July 8 2013	July 12 2013	1	148 (148)	30.4
6	Iksan	+ 35° 56′, + 126° 55′	June 12 2012	June 15 2012	4 or 5	61 (14+1)	47.7
7	Pyeongchang	+ 35° 40′, + 128° 44′	July 20 2011	July 26 2011	5	125 (25)	83.8
8	Suwon	+ 35° 16′, + 126° 59′	June 13 2011	June 16 2011	3	27 (9)	77.8

<sup>\*</sup>Egg parasitoids were collected from a total of six different corn fields located within 1 km distance of each other. In four corn fields out of the six, 30 egg masses were placed in each corn field. In each of the remaining two corn fields, 14 egg masses were placed.

알 덩어리가 포함되도록 유산지를 사각형(약  $2 \times 2$  cm)으로 잘라내고 조명나방 성충이 발생하는 6월과 7월 사이 경기 수원, 전북 부안, 고창, 익산, 충북 청원, 경북 칠곡, 강원 평창, 홍천지역의 찰옥수수 재배 포장 내 옥수수 잎 뒷면에 사무용 침핀( $\emptyset$   $1.6 \times 28$  mm)을 이용하여 옥수수 1주당  $1 \sim 5$ 개의 알 덩어리를 설치하였다(Table 1). 알 덩어리는 7일 이내에 다시 수거하여실험실로 가져와 기생된 알로부터 우화되어 나온 기생벌 성충을 100% 에탄올에 담가 -20% 냉동보관을 하였다.

#### 게놈 DNA 추출

게놈 DNA 추출을 위해 알기생벌 성충 1 마리를 20 mM NaOH 용액 180 비와 함께 1.5 ml 튜브에 넣고 마쇄한 후 95℃에서 10분간 가열하였다. 그리고 1 M Tris-HCl 용액(pH 8.0) (BIONEER, Korea) 20 비를 넣고 중화시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 고속원심분리 하였다. 약 150 비의 맑은 상충부액을 새로운 1.5 ml 튜브에 옮기고 ITS2 영역 증폭을 위한 PCR 반응에 사용하였으며 남은 추출물은 -20℃ 냉동보관을 하였다. Table 1의 부안과 홍천을 제외한 지역들은 각각 10마리 씩 추출을 하였으며 부안은 1마리, 홍천은 포장 당 30마리(10마리/알 덩어리, 3반복) 씩 6포장의 총 170마리(한 포장만 20마리)로부터 게 놈 DNA를 추출하였다.

# PCR 증폭 반응과 염기서열 해독

ITS2 핵내 리보솜 DNA 영역을 증폭하기 위해 진화적으로 잘 보존된 5.8S 리보솜 RNA와 28S 리보솜 RNA 영역의 DNA 염기서열 정보를 이용한 보존형 PCR 프라이머 ITS3(5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3')(5.8S rRNA, 정방향)와 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')(28S rRNA, 역 방향)가 사용되었다(White et al., 1990). PCR 반응액은 Inclone™ Exel TB 2X Taq Premix with dye (Inclonebiotech CO, Korea) 20 μl 에 게놈 DNA 2 μl, 보존형 PCR 프라이머 ITS3 (10 pmol) 1 비와ITS4 (10 pmol) 1 비를 넣고 전체 반응양이 40 비가 되도 록 멸균된 3차 증류수를 넣었다. PCR 반응은 처음 95℃ 에서 5분 간 가열 후 94℃ 30초와 45℃ 20초를 거쳐 72℃ 40초를 2회 반 복하고 다시 94℃ 20초와 56℃ 20초를 거쳐 72℃ 40초를 30회 반복하였다. 그리고 마지막으로 72℃에서 5분간 1회 실시하였 다. PCR 증폭 결과를 확인하기 위해서 1% 아가로스겔과 1× TAE 버퍼에서 100 V로 25분간 전기영동을 하였다. 증폭된 산 물은 1% 아가로스겔로부터 Inclone<sup>TM</sup> Gel & PCR purification kit(Inclonebiotech CO, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따 순수하게 회수되었다. 분리된 PCR산물은 다시 PCR-direct sequencing을 위해 (주)마크로젠(Korea)에 보존형 프라이머인 ITS3와ITS4를 이용하여 각각 양방향으로 염기서열 분석을 의뢰 하였으며 이를 통해 해독한 알기생벌 지역별 개체의 ITS2 핵내

리보솜 DNA 염기서열 정보를 Gene Runner ver. 3.05 (Hastings Software, Inc., 1994) 프로그램을 이용하여 정리하였다.

# ITS2 영역 DNA 염기서열 분석 및 분자 계통 분석

Trichogramma 종 추정에 참고하기 위해서 NCBI GenBank 데이터베이스에서 종명과 ITS2 영역 전체의 염기서열이 명확

하게 등록되어 있는 *Trichogramma* spp.와 *Trichogrammatoidea* spp. 핵내 리보솜 DNA 염기서열 정보를 62종 382개를 얻었다 (Table 2 and Fig. 1). 그리고 염기서열차이(evolutionary distance) 와 분자계통분석(phylogenetic analysis)을 위해 *Trichogramma* spp.의 outgroup으로 알벌과의 *Uscana semifumipennis*와 금좀 벌과(Pteromalidae)의 *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836)의 핵내 리보솜 DNA 염기서열 정보를 얻었다(Li et al., 2004).

Table 2. Size variations and 3' terminal sequence patterns of the ITS2 region in the genus *Trichogramma* 

	Species	3' terminal sequence of ITS2 region	Size (bp)
1 7	T. achaeae	- <u>TTTTCTCC</u> ATCGA-3' or - <u>TTTCTCC</u> ATCGA-3'	514, 515, 520
2 7	T. alpha	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	392, 396
3 7	T. atopovirilia	- <u>TTTTCTC</u> GAT~-3' or - <u>TTTCTC</u> GAT~-3'	560, 564
4 7	T. aurosum	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	<i>381</i> ~ <i>413</i>
5 7	T. australicum	?	317, 333
6 7	T. bilingensis	- <u>TCTCTTTCTC</u> GAT~-3′	415
7 7	T. bourarachae	- <u>TCTTTGATTCTC</u> GAT~-3'	<i>530, 551~558</i>
8 7	T. bournieri	- <u>TCTTTTTCTC</u> GA-3'	401
9 7	T. brasiliensis	- <u>TCTTTTTCTC</u> GATCGA-3'	414
10 7	T. brassicae	- $\underline{\text{TCTTTTTTCTC}}$ GATCGA-3 $^{\prime}$ or - $\underline{\text{TCTTTTTTTTCTC}}$ GAT $\sim$ -3 $^{\prime}$	<i>300~408</i> , <b>408</b> , <b>409</b> , <b>410</b> , <b>411</b> , <b>412</b>
11 7	T. brevicapillum	- <u>TTTTCTC</u> GAT~-3'	374
12 7	Г. сасоесіае	- $\underline{TCTTTTTTCTC}GAT\sim$ -3' or - $\underline{TTCTTTTTTCTC}GAT\sim$ -3' or - $\underline{TCTTTTTTCTC}GATCGA$ -3'	<i>459~478</i> , <b>464</b>
13 7	T. californicum	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	438~446
14 7	T. carverae	-TCGCCTACGAATGCGCG-3'?	443
15 7	T. cf. cacoeciae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	473
16 7	T. cf. deion	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	468
17 7	T. chilonis	- <u>TCTCTTTTCTC</u> GATCGA-3' or - <u>TCTCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	<i>393</i> ~ <b>420, 426, 427</b>
18 7	T. closterae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	474, 475
19 7	T. confusum	- <u>TCTCTTTTCTC</u> GAT~-3′	392~426
20 7	T. cordubensis	- <u>TCTTTTCTCTC</u> GAT~-3′	404~416
21 7	T. cultellus	- <u>TACTTTCTC</u> TAATCGA-3'	409
22 7	T. danaidiphaga	-TTTGGTGAGGGCG~-3'?	743
23 7	T. danausicida	-TGCGCTTGTTTAAAA~-3'?	397
24 7	T. deion	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3' or - <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	397~407
25 7	T. dendrolimi	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	398~409
26	T. papilionis	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	426
27	T. euproctidis	- <u>TCTTTTTCTTC</u> GAT~-3′	345~378
28 7	T. mwanzai	- <u>TCTTTTTCTC</u> GATCGA-3'	389
29 7	T. exiguum	- <u>TCTTTCTTC</u> GAT~-3′	379~382
30 7	T. fuentesi	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3′	436
31 7	T. funiculatum	-TGTACGTGCGTGCGTGG <u>TTTC</u> GATCGA-3'	<i>426</i> , <b>568</b> , <b>569</b>
32	T. galloi	- <u>TCTTTCTTCG</u> AT~-3'	442, 444

Table 2. Continued

	Species	3' terminal sequence of ITS2 region	Size (bp)
33	T. itsybitsi	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	380, 381
34	T. ivelae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	454
35	T. kaykai	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	377~477
36	T. kurosuae	- <u>TCCTTTGTTCTC</u> GAT~-3'	653
37	T. lasallei	- <u>TTTTCTT</u> GAT-3' or - <u>TTTTCTC</u> GAT-3'	452, 484
38	T. lingulatum	- <u>TCTTTTATCTC</u> GAT-3'	684
39	T. lopezandinensis	- <u>TTTTCTC</u> GAT-3'	508
40	T. maidis	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	432, 436
41	T. nr. brassicae	- <u>TGGCTAGCTC</u> G-3'	384, <b>421, 423, 424, 427</b>
42	T. evanescens	- <u>TCTTTTTTCTC</u> GATCGA-3'	<i>383~443</i> , <b>433</b> , <b>435</b> , <b>437</b> , <b>441</b>
43	T. nerudai	- <u>TCCTTTGATTCTC</u> GATCGA-3'	<i>631</i> , <b>634</b> , <b>635</b>
44	T. minutum	-TCTTTTTCTCGATCGA-3'	418, 419, <b>394, 419,</b>
77			420, 421, 422
45	T. nubilale	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT-3'	408
46	T. oka	- <u>TCTTTATAAAAATTTCTC</u> GATCG-3'	495
47	T. oleae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT-3'	398, 402
48	T. ostriniae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GAT-3'	445, 446, 448, 450
49	T. embryophagum	- <u>TCTTTTTCTC</u> GATCGA-3'	<i>436~473</i> , <b>472</b>
50	T. pintoi	- <u>TCCTTTCTTTTAATTCTC</u> GATCGA-3'	580, 583, <b>586, 588</b>
51	T. pretiosum	- <u>TCTTTTTTCTC</u> GAT-3' or - <u>TCTTTGTTGAAAATTTTCTC</u> GAT-3' or - <u>TCTTTTTTTCC</u> GAT-3' or - <u>TTTTTTTTTC</u> GAT-3' or -TTTTTTTTTTTTTTTCTCAAT~-3'	354~535
52	T. pratti	-TCTTTTTCTCGAT-3'	455
53	T. platneri	-TCTTTTTCTCGAT-3'	417, 418
54	T. sathon	-TCTTTTTCTCGAT~-3'	437
55	T. semblidis	- <u>TTCTTTTTCTC</u> GAT~-3'	426
56	T. sibericum	-TCTTTTTTCTCGAT~-3' or -TCTTTCTTCTCGAT~-3'	377~444
57	T. tshumakovae	- <u>TCTTTTTCTC</u> GATCGA-3'	432
58	T. turkestanica	- <u>TCTTTTTTCTC</u> GAT~-3' or - <u>TCTTTTTTCTTC</u> GATCGA-3'	<i>371~378</i> , <b>379</b> , <b>381</b>
59	T. umerus	-TTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGCTGCGTGTGCTGTG CTTTG-3' ?	490
60	T. yabu	- <u>TCTTTTTCTC</u> GATCGA-3′	484
61	Trichogrammatoidea armigera	-TTGTTTCTTCCGAGCGCTCGCT~-3'?	370
62	Trichogrammatoidea bactrae	-CTCATTGCGCCCA~-3'?	451
63	Nasonia vitripennis	-TTTTTCATATATATATACTCGTATATAACGA-3'	439
64	Uscana semifumipennis	-TAAATTTTCGATCGA-3'	477

(bold number: complete sequence; italic number: partial sequence;  $\sim$ : more nucleotides would be in the 3' terminal; ?: sequence pattern of the 3' terminal was not observed)

GenBank 데이터베이스에서 얻은 정보들(384개)과 본 연구에서 해독한 정보(112개)들로부터 리보솜 RNA 부분의 염기서열을 제거한 순수한 ITS2 DNA 염기서열을 얻기 위해서 The ITS2 Database (http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de)의 Annotate 기능을 이용하였다.

확보한 전체 496개의 ITS2 DNA 염기서열들을 비교 분석하기 위해서 multiple sequence alignment를 Kalign (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/)과 MAFFT (http://www.ebi.ac.uk/

Tools/msa/mafft/) 그리고 MEGA5 (Tamura et al., 2011)에 내 장된 ClustalW 알고리즘을 사용하였다. 이때 gap penalty 등 분석 파라미터들은 각 프로그램에 기본설정된 조건을 활용하였다. 각알고리즘들의 alignment 결과들을 비교하였을 때 Kalign 알고리즘이 *Trichogramma*속 ITS2 영역의 시작 염기서열인 5'-TTTATAAAAAC-3'를 가장 잘 정렬하여 Kalign 알고리즘으로 alignment한 결과를 이용하여 MEGA5 프로그램에서 염기서열 차이 분석과 분자계통분석을 실시하였다.

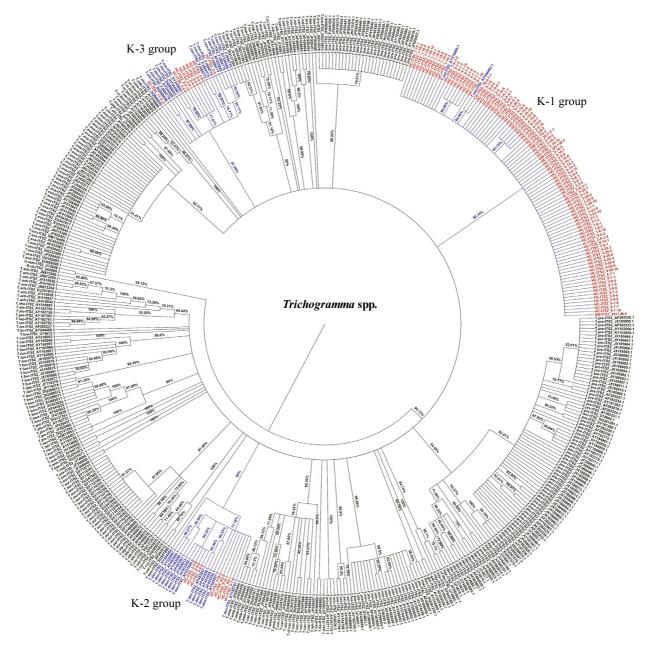


Fig. 1. Phylogenetic tree analysis of the ITS2 sequence of 112 Trichogramma egg parasitoids collected in Korean corn fields, and 62 species of Trichogramma and Trichogrammatoidea (total 382) retrieved from the NCBI GenBank database. Consensus trees were inferred using the neighbor-joining method with the K2P substitution model (bootstrap method: 1,500 replicates, pairwise deletion) and reconstructed by 50% cut-off of bootstrap values. Bootstrap values are expressed as percentages. Uscana semifumipennis (Trichogrammatidae) and Nasonia vitripennis (Pteromalidae) were used as an outgroup. Red-colored letters indicate field-collected samples. Blue- and black-colored letters indicate reference species with GenBank accession numbers.

염기서열 차이 추정값(d: estimate of evolutionary distances from nucleotide sequences) (Nei and Kumar, 2000) C Kimura 2-parameter model (K2P), Uniform rates, Pairwise deletion, Bootstrap method (1,000 반복)으로 설정하여 종 내 또는 그룹 내 차이(within distance)와 종 간 또는 그룹 간 차이(between

distance) 값을 분석하였다. 분자계통분석을 위해서 Neighborjoining method, K2P, Uniform rates, Pairwise deletion, Bootstrap method (1,500 반복)으로 설정하여 추정된 계통수를 얻었으며 다시 Bootstrap 값을 50%로 cut-off한 계통수(Bootstrap consensus tree)를 만들었다. 계통수는 FigTree Ver. 1.4.0 (http://tree.bio.ed. ac.uk/) 프로그램을 이용하여 최종 편집을 하였다.

한편, NCBI BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)의BLASTN 프로그램을 이용하여 본 연구에서 해독된 각 그룹의 ITS2 DNA 염기서열들과 가장 유사한 염기서열을 찾아 종을 동정하는데 참고하였다.

### 결과 및 기찰

## 조명나방 알기생벌 지역 유전자원 수집

전북 부안을 제외한 모든 조사지역들에서 옥수수 잎 뒷면에 설치된 알 덩어리의 주당 알 기생률이 20% 이상이었다(Table 1). 유전자원 수집 지역 중 개활지 포장은 부안, 칠곡, 청원, 고 창, 익산, 수원이었으며 산간지 포장은 평창과 홍천이었다. 전 북 부안의 옥수수 포장은 새만금간척지 내에 위치한 국립식량 과학원 벼맥류부 시험연구포장으로 조사 시기 알기생벌에 의 한 기생은 주당 4%로 낮았다. 홍천지역의 경우 산 아래 포장들 로 주변에 찰옥수수가 많이 재배되고 있었는데 총 905 마리의 알기생벌 유전자원이 수집되었으며 그중에 암컷이 553 마리, 수컷이 139 마리로 전체적인 암:수 성비가 약 4:1로 암컷에 편 중되었다. Jung et al. (2005)에 의해 수행된 실내실험에서도 조 명나방 알에 쌀좀알벌과 T. ostriniae를 각각 기생시킨 결과 우화 한 성충의 약80%가 암컷으로 보고된 바 있다. 이는 Trichogramma 속이 포함된 벌목에서 보고된, 수정되지 않을 경우 반수체 수컷과 수정될 경우 이배체 암컷이 되는 수컷생산단위생식(arrhenotoky) 과 암컷만 생산하는 단위생식인 암컷생산단위생식(thelytoky), 온도, 공생미생물 등 환경요인에 의해 수컷의 발생이 줄어드는 등의, 다양한 생식 방식에 기인된 것으로 판단된다(Stouthamer et al., 1990; Pinto and Stouthamer, 1994; Heimpel and de Boer, 2008; Poorjavad et al., 2012).

#### ITS2 영역 DNA 염기서열 분석

보존형 PCR 프라이머인 ITS3와 ITS4(White et al., 1990)를 이용하여 국내에서 채집된 조명나방 알기생벌 개체들의 게놈 DNA로부터 PCR 반응 결과 약 600 ~ 700 bp 사이의 단일 증폭 산물을 얻을 수 있었다. 단일 증폭산물을 이용하여 PCR-direct sequencing을 수행하였으나 ITS2 영역의 (CA)n 또는 (TGC)n 등의 반복 염기서열이 나오는 부분에서 sequencing 에러가 자 주 발생하여 전체 염기서열을 해독하는데 어려움이 있었다. GenBank에 등록된 reference 종들의 ITS2 전체 길이와 염기서 열 정보를 비교한 결과(Table 2), 종 내, 종 간 길이 변이가 다양 하게 나타났으며, 종 내에도 3'말단의 특이적 패턴 변이가 있거 나 같은 패턴을 종 간 공유하고 있는 것을 알 수 있었다. 그리고 국내 6개 지역에서 수집된 조명나방 알기생벌 112 개체의 ITS2 영역의 전체염기서열 길이와3<sup>'</sup>말단 염기서열 정보를 분석한 결 과 3개의 그룹으로 나눌 수 있었다(Table 3). K-1과 K-2는 3'말 단 염기서열 패턴이 -TCTTTTT~-3'으로 같지만 ITS2 길이에 서 차이가 있었으며 K-3는 3'말단 염기서열 패턴이 -TCTCTTTT~ -3'로 다른 그룹들과 다르고 길이는 K-2와 비슷하였다. K-3의 3'말단 염기서열 패턴은 T. bilingensis, T. chilonis, T. confusum 과 같았다(Table 2, Table 3). K-1 그룹에는 홍천, 수원, 청원, 익 산, 고창, 칠곡 채집 개체들이, K-2 그룹에는 홍천 채집 개체들

**Table 3.** The three groups of *Ostrinia furnacalis* egg parasitoids analyzed in this study based on the full-length size of the ITS2 rDNA region and the 3' terminal sequence

Group	Size (bp)	3' terminal sequence of ITS2	Collection site	Field-collected samples
	421~458	TOTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	НС	1-6-(1, 2, 10), 1-18-(1~10), 2-8-(2~4, 8, 10), 3-9-(6, 8, 9), 3-20-(4, 7, 8~10), 3-23-(9, 10), 4-1-(1~7, 9, 10), 4-10-(1~3, 5~10), 4-20-(3~6, 8~10), 5-2-(1, 4), 5-4-(2~4, 10), 6-1-(2, 6, 10), 6-7-(1~3, 5~7, 9, 10), F5-2, F7-1~2
K-1		- <u>TCTTTTTC</u> TCGATCGA-3' or - <u>TCTTTTT</u> CTCGATCGA-3'	SW	2011-F-1, 2011-M-4, 2011-M-5
			CG	10-A-1-1, 6-A-4-1
			CW	2-2
			IC	2-A-3-(1, 2), 3-A-2-1
			GC	1-A-1-(1, 2), 7-A-2-1
K-2	402, 405, 412	- <u>CTTTTT</u> CTCGATCGA-3'	НС	F10-(1~2), R2-(1~2), 2-4-(5~6), 2-4-8, 4-1-8
K-3	207 404 407 410	-TCTCTTTTCTCGATCGA-3'	НС	2-4-(1~4), 2-4-(9~10), 3-9-(2~3)
K-3	397, 404, 407, 410	- <u>ICICITII</u> CICUAICUA-3	GC	11-A-2-1

**Table 4.** Estimates of evolutionary distance (*d*) within and between species or groups based on ITS2 sequences

	D' .	•.1 •	Net average distance between groups						
Species / Group	Distance w	ithin group —		K-1	K		K-	-3	
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
U. semifumipennis	n/c	n/c	0.414	0.047	0.472	0.054	0.446	0.051	
N. vitripennis	n/c	n/c	0.570	0.070	0.693	0.080	0.677	0.086	
T. achaeae	0.004	0.002	0.246	0.032	0.252	0.032	0.276	0.035	
T. alpha	0.000	0.000	0.122	0.020	0.103	0.019	0.097	0.018	
T. atopovirilia	0.038	0.008	0.298	0.038	0.323	0.042	0.312	0.042	
T. aurosum	0.008	0.002	0.109	0.018	0.103	0.019	0.098	0.018	
T. australicum	0.000	0.000	0.166	0.028	0.225	0.029	0.160	0.027	
T. bilingensis	n/c	n/c	0.087	0.015	0.112	0.019	0.016	0.006	
T. bourarachae	0.023	0.003	0.274	0.033	0.296	0.036	0.281	0.035	
T. bournieri	n/c	n/c	0.129	0.020	0.144	0.024	0.123	0.021	
T. brasiliensis	n/c	n/c	0.120	0.018	0.121	0.019	0.099	0.017	
T. brassicae	0.005	0.001	0.068	0.012	0.108	0.017	0.097	0.016	
T. brevicapillum	n/c	n/c	0.259	0.033	0.282	0.033	0.271	0.034	
T. cacoeciae	0.034	0.005	0.094	0.016	0.119	0.021	0.131	0.022	
T. californicum	0.009	0.004	0.137	0.018	0.152	0.023	0.120	0.020	
T. carverae	0.000	0.000	0.420	0.048	0.410	0.047	0.416	0.048	
T. cf. cacoeciae	n/c	n/c	0.097	0.017	0.131	0.022	0.140	0.023	
T. cf. deion	n/c	n/c	0.163	0.020	0.164	0.021	0.155	0.021	
T. chilonis	0.064	0.010	0.055	0.010	0.093	0.017	0.008	0.001	
T. closterae	0.000	0.000	0.109	0.016	0.152	0.022	0.137	0.020	
T. confusum	0.012	0.003	0.081	0.015	0.112	0.020	0.002	0.001	
T. cordubensis	0.001	0.001	0.147	0.021	0.116	0.021	0.120	0.020	
T. cultellus	n/c	n/c	0.430	0.052	0.431	0.054	0.455	0.058	
T. danaidiphaga	n/c	n/c	0.629	0.066	0.616	0.064	0.643	0.069	
T. danausicida	n/c	n/c	0.334	0.043	0.345	0.045	0.364	0.045	
T. deion	0.016	0.004	0.124	0.021	0.117	0.020	0.091	0.018	
T. dendrolimi	0.013	0.003	0.097	0.017	0.001	0.000	0.104	0.019	
T. embryophagum	0.016	0.004	0.099	0.017	0.123	0.020	0.128	0.021	
T. euproctidis	0.008	0.002	0.084	0.015	0.124	0.021	0.108	0.017	
T. evanescens	0.012	0.003	0.061	0.013	0.105	0.017	0.092	0.017	
T. exiguum	0.024	0.007	0.118	0.020	0.085	0.017	0.095	0.021	
T. fuentesi	n/c	n/c	0.148	0.021	0.142	0.023	0.099	0.019	
T. funiculatum	0.001	0.001	0.357	0.041	0.374	0.044	0.342	0.040	
T. galloi	0.000	0.000	0.128	0.020	0.175	0.024	0.128	0.021	
T. itsybitsi	0.013	0.006	0.099	0.018	0.120	0.019	0.088	0.017	
T. ivelae	n/c	n/c	0.079	0.016	0.146	0.020	0.086	0.016	
T. kaykai	0.086	0.011	0.086	0.017	0.088	0.017	0.069	0.017	
T. kurosuae	n/c	n/c	0.251	0.035	0.225	0.031	0.233	0.032	
T. lasallei	0.034	0.008	0.266	0.035	0.264	0.037	0.286	0.041	
T. lingulatum	n/c	n/c	0.371	0.041	0.365	0.042	0.401	0.045	
T. lopezandinensis	n/c	n/c	0.304	0.036	0.305	0.037	0.324	0.042	
T. maidis	0.002	0.002	0.063	0.013	0.107	0.017	0.093	0.017	
T. minutum	0.045	0.006	0.096	0.015	0.099	0.019	0.083	0.017	
T. mwanzai	n/c	n/c	0.088	0.017	0.086	0.018	0.098	0.019	
T. nerudai	0.027	0.005	0.325	0.038	0.318	0.039	0.311	0.037	
T. nr. brassicae	0.039	0.007	0.060	0.012	0.118	0.019	0.065	0.014	
T. nubilale	n/c	n/c	0.291	0.034	0.317	0.037	0.321	0.038	
T. oka	n/c	n/c	0.303	0.040	0.299	0.037	0.306	0.040	
T. oleae	0.000	0.000	0.126	0.020	0.126	0.019	0.095	0.017	

Table 4. Continued

	Distance within group —		Net average distance between groups						
Species / Group			K	K-1		-2	K-3		
	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	Mean	S.E.	
T. ostriniae	0.074	0.011	0.016	0.003	0.088	0.018	0.068	0.014	
T. papilionis	n/c	n/c	0.085	0.016	0.125	0.020	0.135	0.021	
T. pintoi	0.011	0.003	0.289	0.036	0.295	0.036	0.286	0.035	
T. platneri	0.003	0.002	0.116	0.018	0.124	0.023	0.109	0.019	
T. pratti	n/c	n/c	0.171	0.023	0.184	0.026	0.177	0.024	
T. pretiosum	0.029	0.004	0.104	0.017	0.110	0.018	0.086	0.016	
T. sathon	n/c	n/c	0.114	0.019	0.121	0.019	0.112	0.019	
T. semblidis	n/c	n/c	0.178	0.021	0.108	0.020	0.123	0.020	
T. sibericum	0.085	0.013	0.072	0.010	0.083	0.016	0.066	0.013	
T. tshumakovae	n/c	n/c	0.117	0.019	0.133	0.022	0.155	0.022	
T. turkestanica	0.026	0.005	0.076	0.014	0.119	0.020	0.103	0.016	
T. umerus	n/c	n/c	0.078	0.016	0.132	0.022	0.084	0.017	
T. yabu	n/c	n/c	0.074	0.014	0.136	0.022	0.085	0.016	
T. armigera	n/c	n/c	0.460	0.061	0.567	0.073	0.500	0.069	
T. bactrae	n/c	n/c	0.443	0.054	0.487	0.057	0.483	0.062	
K-1	0.002	0.001			0.100	0.017	0.080	0.014	
K-2	0.001	0.001					0.107	0.019	
K-3	0.005	0.002							

이, K-3 그룹에는 홍천과 고창 채집 개체가 포함되었다(Table 3).

GenBank 데이터베이스 등록 Trichogramma속과 국내 수집 조명나방 알기생벌들의 ITS2 전체영역을 Kimura 2-parameter model (K2P)을 이용하여 종/그룹 내 또는 종/그룹 간 염기서열 차이(d)를 분석한 결과(Table 4), 종 내 비교 시 d 값은  $0.000 \sim 0.086$ 이었으나 국내 수집 조명나방 알기생벌 그룹 내 d 값은 0.005 이하로 매우 낮았으며, 그룹/종 간 비교에서 outgroup인 U. semifumipennis와 N. vitripennis와는 세 그룹 모두 0.4 이상 의 차이를 보였다. 그리고 그룹 간 비교에서도 0.08 이상의 차이가 있었다. 이는 채집된 세 그룹이 서로 다른 종일 가능성을 제안하고 있으며 K-1은 T. ostriniae (d=0.016)와 K-2는 T. dendrolimi (d=0.001) 그리고 K-3는 T. confusum (d=0.002)과 가장 차이가 낮은 것으로 분석되었다(Table 4).

#### 분자 계통 분석과 NCBI BLAST 분석을 통한 종 추정

국내에서 채집된 *Trichogramma*속 조명나방 알기생벌 112 개체들의 ITS2 전체영역과 GenBank 데이터베이스의 64종 384 개의 ITS2 전체영역 정보를 이용하여 Neighbor-joining 방법을 통해 분자 계통수를 추정한 결과 국내의 3 그룹(K-1, K-2, K-3) 모두 각각 다른 계통으로 분지되었다(Fig. 1).

K-1은 *T. ostriniae*와 함께 분지(bootstrap value: 60.7%)되 었는데 각각 중국(AY244463.1)과 일본(AY518695.1)에서 보고

된 집단이었다(Honda et al., 2006). AY518695.1은 1990년 일본 Shimane현의 옥수수 포장에서 채집된 조명나방(O. furnacalis) 알기생벌이다(Honda et al., 2006). T. ostriniae Pang and Chen 의 완모식표본(holotype)은 수컷으로 중국의 베이징에서 유럽 조명나방(O. mubilalis)으로부터 채집되었으며 중국, 하와이, 미국(1990년 도입), 일본에 분포하고 있다(Honda et al., 2006). 특히, T. ostriniae Pang and Chen은 중국 전역에 분포하면서 옥 수수 재배 포장에서 조명나방 알기생벌에 가장 우점하는 종으 로 72% 이상을 차지한다(Wang et al., 2005; Li, 2007). 국내에 서는 Jung et al.(2005)이 중국농업과학원 식물보호연구소에서 분양을 받아 수원의 국립식량과학원에서 실내 사육을 하면서 기생특성을 연구한 바 있다. 또한 국내 천적회사에서 상용화된 Trichogramma속 알기생 벌 천적에 대한 ITS2 염기서열 비교 분석 결과 AY518695.1과 98.8% identity를 보인다고 보고한 바 있다(Jeong et al., 2010). 그러나 문헌조사에 의하면 지금까 지 T. ostriniae를 국내 야외 포장에서 채집된 기록이 없었다. 본 연구에서는 6개 조사지역(홍천, 수원, 청원, 익산, 부안, 고창) (Table 3)에서 채집된 조명나방 알기생벌들의 K-1 그룹이 NCBI BLAST 결과에서 중국(AY244463.1) 또는 일본(AY518695.1) 의 정보와 99% identity를 보였다(Table 5). 염기서열 차이(d) (Table 4)와 계통분석(Fig. 1), 그리고 NCBI BLAST 결과로부 터 옥수수 포장에서 채집된 K-1 그룹은 T. ostriniae로 추정되 었다. 앞으로 K-1 그룹에 대한 명확한 종 동정을 위해서는 ITS2

**Table 5.** NCBI BLAST results for ITS2 sequences of several field-collected egg parasitoids belonging to the three groups examined in this study

Group	Field-collected sample	No.	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identity	Accession No.
K-1	SW-ITS2_2011-M-4		T. ostriniae Japan	806	806	99%	0	99%	AY518695.1
		2	T. ostriniae Baijing strain	797	797	98%	0	99%	AY244463.1
	HC-ITS2_1-18-1	1	T. ostriniae Japan	811	811	99%	0	99%	AY518695.
		2	T. ostriniae Baijing strain	793	793	98%	0	99%	AY244463.1
	HC-ITS2_4-1-6	1	T. sp. JLTO-1 China	815	815	99%	0	99%	FR828481.1
		2	T. ostriniae Baijing strain	808	808	98%	0	99%	AY244463.
		3	T. sp. JLTO-3 China	798	798	99%	0	99%	FR828483.1
		4	T. ostriniae Japan	793	793	99%	0	99%	AY518695.
		5	T. ostriniae South Korea	785	785	97%	0	99%	GQ324625.
	CG-ITS2_10-A-1-1	1	T. ostriniae Baijing strain	817	817	98%	0	99%	AY244463.
		2	T. sp. JLTO-1 China	802	802	99%	0	99%	FR828481.
		3	T. ostriniae Japan	802	802	99%	0	99%	AY518695.
	GC-ITS2_1-A-1-2	1	T. sp. Nabis101 South Korea	817	817	100%	0	99%	GQ228084.
		2	T. sp. JLTO-1 China	806	806	99%	0	99%	FR828481.
		3	T. ostriniae Japan	797	797	99%	0	99%	AY518695.
	CW-ITS2_2-2	1	T. sp. Nabis101 South Korea	817	817	100%	0	99%	GQ228084.
		2	T. sp. JLTO-1 China	806	806	99%	0	99%	FR828481.
		3	T. ostriniae Japan	797	797	99%	0	99%	AY518695.
	IC-ITS2_2-A-3-1	1	T. ostriniae Baijing strain	811	811	98%	0	99%	AY244463.
		2	T. sp. JLTO-1 China	808	808	99%	0	99%	FR828481.
		3	T. ostriniae Japan	808	808	99%	0	99%	AY518695.
K-2	HC-ITS2_2-4-5	1	T. dendrolimi China	728	728	100%	0	99%	AF517576.
		2	T. dendrolimi strain RH China	723	723	99%	0	99%	AF453559.
		3	T. dendrolimi Fukuyama Japan	723	723	100%	0	99%	AB094398.
		4	T. dendrolimi Tden-01 South America	717	717	99%	0	99%	AY182767.
	HC-ITS2_4-1-8	1	<i>T. dendrolimi</i> strain GZ clone 02 China	750	750	99%	0	99%	AF453556.
		2	<i>T. dendrolimi</i> strain GZ clone 03 China	750	750	99%	0	99%	AF453557.
		3	<ul><li>T. dendrolimi strain GZ clone</li><li>01 China</li></ul>	736	736	99%	0	99%	AF453555.
		4	T. dendrolimi strain JN China	736	736	99%	0	99%	AY343057.
		5	T. dendrolimi strain CHA China	i 730	730	99%	0	99%	AF453554.
	HC-ITS2_F10-2	1	T. dendrolimi Tden-01 South America	723	723	99%	0	99%	AY182767.
		2	T. dendrolimi China	723	723	100%	0	99%	AF517576.
		3	T. dendrolimi strain RH China		717	99%	0	99%	AF453559.
		4	T. dendrolimi Fukuyama Japan		717	100%	0	99%	AB094398.
		5	T. dendrolimi strain YBL China		717	99%	0	99%	AF453561.
		6 7	<ul><li>T. dendrolimi strain XZ China</li><li>T. dendrolimi strain JL clone</li><li>03 China</li></ul>		706 706	99% 99%	0	99% 99%	AF453560. AY343056.

Table 5. Continued

Group	Field-collected sample	No.	Description	Max score Total score		Query cover	E value Identity		Accession No.
K-3	HC-ITS2_2-4-9	1	T. confusum strain GZ China	725	725	98%	0	100%	AY343055.1
		2	T. chilonis Guangzhou China	721	721	99%	0	99%	AY244461.1
	HC-ITS2_3-9-3	1	T. confusum Taiwan	747	747	99%	0	100%	FJ694776.1
		2	T. confusum Thailand	747	747	99%	0	100%	FJ694777.1
		3	T. chilonis strain CN02 China	747	747	99%	0	100%	AF422845.1
	GC-ITS2_11-A-2-1	1	T. bilingensis Shenzhen China	704	704	99%	0	98%	AY244459.1
		2	T. confusum Taiwan	699	699	99%	0	98%	FJ694776.1
		3	T. confusum Thailand	699	699	99%	0	98%	FJ694777.1
		4	T. chilonis CN02 China	699	699	99%	0	98%	AF422845.1
	HC-ITS2_3-9-2	C-ITS2_3-9-2 1 <i>T. confusum</i> Taiwan 2 <i>T. confusum</i> Thailand		721	721	99%	0	99%	FJ694776.1
				721	721	99%	0	99%	FJ694777.1
		3	T. chilonis CN02 China	721	721	99%	0	99%	AF422845.1

<sup>\*</sup> BLAST results were sorted in order of the E value closest to 0 with maximum identity.

염기서열 분석 결과를 바탕으로 형태적 형질들을 비교 분석하는 등 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

K-2는 송충알벌(T. dendrolimi Matsumura)과 함께 분지 (bootstrap value: 98.0%) 되었는데, 일본(AY895013.1), 남미 (AY182767.1) 그리고 나머지는 중국에서 보고된 집단들(Li et al., 2004; Dang et al., 2005; Li, 2007) 이었다. 특히, AY895013.1 은 2003년 일본의 Ehime현에서 Asota ficus(밤나방과)의 알에 서 채집되었다(Honda et al., 2006). NCBI BLAST 결과에서도 일본, 중국, 남미의 T. dendrolimi 정보와 99% identity를 보였 다(Table 5). T. dendrolimi의 분포지역으로 우리나라, 일본, 러 시아, 벨라루스, 우크라이나, 몰다비아 지역, 카자흐스탄, 서유 럽, 중국, 대만이 있으며, 숙주곤충은 포충나방과, 잎말이나방 과, 밤나방과 등의 나방류 해충들로(Kim and Kim, 1991; Honda et al., 2006) 주로 소나무와 참나무 등 산림과 과수의 나방류 해 충방제를 위한 천적으로 사용되었다(Smith, 1996). T. dendrolimi 는 중국에서 T. ostriniae와 함께 옥수수 포장에서 주로 발생하는 조명나방 알기생벌로 주로 산림에서 우점하는 종이다(Wang et al., 2005; Li, 2007). 국내에서는 경남지방의 옥수수 포장에서 조명나방 알기생벌로 채집된 바 있다(Kim and Kim, 1991). Table 4의 염기서열 차이(d)와 Fig. 1의 계통분석, 그리고 NCBI BLAST 결과들은 공통적으로 옥수수 포장에서 채집된 K-2 그 룹이 T. dendrolimi 임을 제안하였다. 본 연구에서는 경남지방 보다 높은 위도에 위치한 홍천지역(Table 1, Table 3)의 옥수수 포장에서 T. dendrolimi로 추정되는 표본을 얻을 수 있었으며 이것 또한 명확한 종 동정을 위해 수컷 생식기의 형태적 형질

등을 비교 분석하는 추가 연구가 필요하다.

K-3는 T. confusum, 명충알벌(T. chilonis Ishii), T. bilingensis 모두 3 종과 함께 분지되었는데(bootstrap value: 99.0%), T. confusum은 중국, 대만, 태국, 러시아, 이란, 인도에서, T. chilonis 는 파키스탄, 중국에서, 그리고 T. bilingensis는 중국에서 채집 된 집단이었다. T. chilonis Ishii는 필리핀의 벼 포장에서 이화 명나방의 알기생벌로 채집이 되었고 Ishii (1941)에 의해서 처 음으로 명명되었으나 완모식표본(holotype)이 없다(Nagarkatti and Nagaraja, 1979). 후모식표본(lectotype)의 수컷 생식기와 더듬이의 형태적 형질을 이용한 분류방법을 통해 Nagarkatti and Nagaraja (1979)에 의해서 T. confusum Viggiani(1976)와 동종으로 재분류된 이후 T. confusum은 그동안 T. chilonis Ishii (1941)의 아종으로 분류되어왔다(Li et al., 2004). 그러나 T. confusum Viggiani(1976) 또한 완모식표본이 없는 문제가 있었 다. Li et al.(2004)은 중국에서 채집한(AY244461.1: Guangzhou) 와 (AF422845.1: CN02)가 T. chilonis Ishii(1941)와 형태적으 로 다르고 ITS2 DNA 비교 분석 결과 T. chilonis Ishii, (U74674.1: Kauai, 하와이)와 염기서열 차이(d)가 0.127로 크고 계통분석 에서도 서로 다르게 분리되어 T. confusum으로 동정하였으며 T. confusum을 T. chilonis Ishii의 아종이 아닌 가까운 근연종으 로 제안하였다. 그런데 AY244461.1(2003년 등록)과 AF422845.1 (2001년 등록)은 NCBI GenBank에는 T. chilonis로 등록이 되 어 있어 여전히 이들 종 동정에 혼란이 있는 것으로 보인다. Honda et al.(2006)이 T. chilonis Ishii로 분류한 일본의 Fukuoka 현에서 채집된 AY895014.1(논문에는 AY89017로 오기됨)이

U74674.1(T. chilonis Ishii, 하와이)과 함께 분지가 되었으나 국 내에서 채집된 K-3 그룹과는 다른 계통으로 분리되었다(Fig. 1). 오히려 K-3 그룹은 앞에서 Li et al. (2004)이 T. confusum으 로 제안한 중국의 AY244461.1과 AF422845.1와 같은 그룹으 로 분지되었다. NCBI BLAST 결과에서도 K-3 그룹 내의 홍천 지역 채집 알기생벌은 중국, 대만, 태국의 T. confusum과 99-100% identity를 보였다(Table 5). 이상의 결과로부터 K-3 그룹 내 홍 천지역에서 채집된 알기생벌들은 Honda et al. (2006)의 T. *chilonis* Ishii보다는 Li et al.(2004)이 제안한 *T. confusum*과 가 장 가깝게 추정되었다. 한편, 고창지역에서 채집된 K-3 그룹의 알기생벌은 NCBI BLAST 결과 T. bilingensis (He and Pang, 2000) (AY244459.1), T. confusum과 각각 98% identity를 보였 으나 두 종 간 ITS2 염기서열 차이(d) (Data not shown)가 작아 종 추정이 어려웠다. T. confusum Viggiani와 T. chilonis Ishii 그리고 T. bilingensis He and Pang, 3 종에 대한 분류학적 결론 을 내리기 위해 앞으로 수컷 생식기에 대한 외부 형태적 형질 뿐만 아니라 미토콘드리아와 핵 등 다른 영역의 염기서열 분석 이 병행되어야 할 것으로 보인다.

대상 해충 방제를 위해 가장 적합한 천적을 선발하는 것은 매우 중요한 단계로 토착천적을 우선적으로 조사하게 되는데, 이는 토착천적이 일반적으로 기후, 서식처, 숙주 등 환경조건에 가장 잘 적응되어 있고 자연적 상태에서 기생률이 40~100%로 높을 수 있기 때문이다(Smith, 1996). 실제로 전세계적으로 Ostrinia spp.를 방제하기 위해 Trichogramma속 6종이 지역별 로 다르게 사용되었는데, 미국의 경우 토착종인 T. mubilale와 T. pretiosum, 중국의 경우 T. ostriniae와 T. dendrolimi, 그리고 유럽에서는 T. evanescens와 T. brassicae가 방사되었다(Smith, 1996). ITS2 영역을 해독하고 비교 분석하는 것은 크기가 매우 작고 형태적 형질을 통한 종 동정이 어려운 Trichogramma속을 구별하는데 중요한 분자 검색표(molecular key)가 되고 있으며 이는 rDNA가 multicopy로 분포하고 있어 소량으로도 PCR이 용이하고 종 내 변이가 적고 종 간 변이가 큰 특징과 양쪽에 상 보적인 5.8S와 28S rRNA가 있어 범용 프라이머 사용이 가능한 특징 때문이다(Hillis and Dixon, 1991; Dang et al., 2005). 그동 안 국내에서는 Trichogramma속 알 기생 천적에 대한 연구가 많이 없었는데 분자생물학적 분석기술의 발달과 해외 전문 연 구 그룹의 노력으로 NCBI GenBank 데이터베이스에 주요 Trichogramma속에 대한 ITS2 DNA 염기서열 정보가 60여 종 등록되어 있어 본 연구 결과에서처럼 참고정보와 비교 분석을 통해 종 추정이 가능하게 되었다. 그러나 종 동정을 확정하기 위해서는 수컷 외부 생식기 등 형태적 형질과 생식적 격리와 같 은 생물적 특성에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다. 앞으로 국내 *Trichogramma*속 토착 천적을 활용하기 위해서 지역별, 숙주별, 식물별 발생하는 알기생벌의 종류와 분포 조사가 필요하며 대량분석을 위해 ITS2 DNA 염기서열 정보 확보는 그 시발점이 될 것으로 기대된다.

### 사 사

조명나방 알기생벌 채집을 위해 도움을 주신 국립식량과학 원 권민, 최준열, 백채훈 박사님, 경북농업기술원 허창석 박사님, 그리고 충북농업기술원 안기수 박사님께 감사드립니다. 본 논문은 **농촌진흥청 시험연구사업(과제번호: PJ009338)**의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

# Literature Cited

- Amornsak, W., Gordh, G., Graham, G., 1998. Detecting parasitised eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of Trichogramma australicum Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Australian J. Entomol. 37, 174-179.
- Ciociola, A.I.Jr. Zucchi, R.A., Stouthamer, R., 2001a. Molecular key to seven Brazilian species of Trichogramma (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. Neotrop. Entomol. 30, 259-262.
- Ciociola, A.I.Jr., Querino, R.B., Zucchi, R.A., Stouthamer, R., 2001b. Molecular tool for identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja & Nagarkatti and *T. lasallei* Pinto. Neotrop. Entomol. 30, 575-578.
- Dang, X., Wen, S., He, X., Pang, X., 2005. M-PCR: a powerful method for rapid molecular identification of *Trichogramma* wasps (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Insect Sci. 12, 77-85.
- Davies, A.P., Lange, C.L., O'Neill, S.L., 2006. A rapid single-step multiplex method for discriminating between *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species in Australia. J. Econ. Entomol. 99, 2142-2145.
- del Pino, M., Rugman-Jones, P., Hernández-Suárez., Polaszek, A., Stouthamer, R., 2013. Rapid molecular identification of five species of Trichogramma occurring in the Canary Islands with notes on their distribution in banana groves. BioControl 58, 515-524.
- Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillot, C., Erlandson, M., 2007.Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of arthropods. J. Appl. Entomol. 13, 225-240.
- Hassan, S.A., 1994. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control, in: Wajnberg, E., Hassan, S.A. (Eds.), Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford, pp. 55-71.

- He, Y.R., Pang, X.F., 2000. A new species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [Abstract]. J. of South China Agric. Univ. 21, 45-46.
- Heimpel, G.E., de Boer, J.G., 2008. Sex determination in the Hymenoptera. Annu. Rev. Entomol. 53, 209-230.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66, 411-426.
- Honda, J., Taylor, L., Rodriguez, J., Yashiro, N., Hirose, Y., 2006.
   A taxonomic review of the Japanese *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) with descriptions of three new species.
   Appl. Entomol. Zool. 41, 247-267.
- Ishii, T., 1941. The species of Trichogramma in Japan with descriptions of two new species. Kontyu 14, 167-176.
- Jeong, G., Kim, H., Choi, Y., Kim, W., Park, K., Bae, S., Kim, J., Choi, J., 2010. Molecular identification of two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Korea. J. Asia-Pac. Entomol. 13, 41-44.
- Jung, J.K., Park, J.H., Im, D.J., Han, T.M., 2005. Parasitism of *Trichogramma evanescens* and *T. ostriniae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to eggs of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Korean J. Appl. Entomol. 44, 43-50.
- Karimi, J., Darsouei, R., Hosseini, M., Stouthamer, R., 2012. Molecular characterization of Iranian Trichogrammatids (Hymenotpera: Trichogrammatidae) and their *Wolbachia* endosymbiont. J. Asia-Pac. Entomol. 15, 73-77.
- Kim, C.H., Kim, J.B., 1991. Biological control of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* with *Trichogramma dendrolimi* Matsumura. Rept. RDA (Agri. Institutional Cooperation) 34, 171-175.
- Kim, Y., Heo, H., Kim, G.S., Hahm, E., Kim, J., Kang, S., Kwon, K., 2009. Effect of a low temperature-induced quiescence on short term storage of an egg parasitoid, *Trichogramma* sp. Nabis101. Korean J. Appl. Entomol. 48, 369-375.
- Kumar, G.A., Jalali, S.K., Venkatesan, T., Stouthamer, R., Niranjana, P., Lalitha, Y., 2009. Internal transcribed spacer-2 restriction fragment length polymorphism (ITS-2-RFLP) tool to differentiate some exotic and indigenous trichogrammatid egg parasitoids in India. Biol. Control 49, 207-213.
- Lee, Y.B., Hwang, C.Y., Choi, K.M., Shim, J.Y., 1980. Studies on the bionomics of the oriental corn borer *Ostrinia furnacalis* (Guènèe). Korean J. Pl. Prot. 19, 187-192.
- Li, Y.L., 1994. Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey, in: Wajnberg, E., Hassan, S.A. (Eds.), Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford, pp. 37-53.
- Li, Z., Zheng, L., Shen, Z., 2004. Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of several cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Eur. J. Entomol. 101, 347-358.
- Li, Z., 2007. Molecular differentiation of the four most commonly occurring *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) spe-

- cies in China. Eur. J. Entomol. 104, 363-367.
- Nagarkatti, S., Nagaraja, H., 1971. Redescriptions of some known species of *Trichogramma*, showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. Bull. Ent. Res. 61, 13-31.
- Nagarkatti, S., Nagaraja, H., 1979. The status of *Trichogramma chilo-nis* Ishii (Hym.: Trichogrammatidae). Oriental Insects 13, 115-118.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press. Oxford.
- Pinto J.D., Stouthamer, R., 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*, in: Wajnberg, E., Hassan, S.A. (Eds.), Biological control with egg parasitoids. CAB International, Wallingford, pp. 1-36.
- Poorjavad, N. Goldansaz, S.H., Machtelinckx, T., Tirry, L., Stouthamer, R., van Leeuwen, T., 2012. Iranian Trichogramma: ITS2 DNA characterization and natural *Wolbachia* infection. BioControl 57, 361-374.
- Silva, I.M.M.S., Honda, J., van Kan, F.J.P.M., Hu, J., Neto, L., Pintureau, B., Stouthamer, R., 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. Biol. Control 16, 177-184
- Smith, S.M., 1996. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use. Ann. Rev. Entomol. 41, 375-406.
- Stouthamer, R., Gai, Y., Koopmanschap, A.B., Platner, G.R., Pinto, J.D., 2000. ITS-2 sequence do not differ for the closely related species *Trichogramma minutum* and *T. platneri*. Entomol. Exp. Appl. 95, 105-111.
- Stouthamer, R., Hu, J., van Kan, F.J.P.M., Platner, G.R., Pinto, J.D., 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. BioControl 43, 421-440.
- Stouthamer, R., Luck, R.F., Hamilton, W.D., 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2424-2427.
- Sumer, F., Tuncbilek, A.S., Oztemiz, S., Pintureau, B., Rugman-Jones, P., Stouthamer, R., 2009. A molecular key to the common species of Trichogramma of the Mediterranean region. BioControl 54, 617-624.
- Sumer, F., Oztemiz, S., Tuncbilek, A.S., Stouthamer, R., 2011. Sequence analysis of the ribosomal DNA ITS2 region in two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Arch. Biol. Sci. Belgrade 63, 949-954.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739.
- The entomological society of Korea and Korean society of applied entomology, 1994. Check list of insects from Korea, Kon-kuk university press, Seoul.
- Wang, Z., He, K., Yan, S., 2005. Large-scale augmentative bio-

logical control of Asian corn borer using *Trichogramma* in China: A success story, in: Hoddle, M.S. (Ed.), Proceedings of Second International Symposium on Biological Control of Arthropods Volume II. Davos, Switzerland, pp. 487-494. (USDA Forest Servis Publication FHTET-2005-08)

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics, in: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, pp. 315-322.