

꽃매미(*Lycorma delicatula*)의 발육단계별 표피탄화수소 비교

조선란 · 이정은 · 정진원 · 양정오 · 윤창만 · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물외과학

Comparison of Cuticular Hydrocarbons of Different Developmental Stages of the Spot Clothing Wax Cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae)

Sun-Ran Cho, Jeong-Eun Lee, Jin-Won Jeong, Jeong-Oh Yang, Changmann Yoon and Gil-Hah Kim*

Dept. of Plant Medicine, Coll. of Agri. Life and Environ. Sci., Chungbuk National University, Republic of Korea

ABSTRACT: Aliphatic cuticular hydrocarbons (CHCs) of different developmental stages of the spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) were analyzed using GC and GC-MS. The numbers of carbons in the major CHCs of each developmental stage 32, 33, 28, 38, 37 in the egg, 1st, 2nd, 3rd, and 4th instar nymphal stages, and adults, respectively. The cuticle of *Lycorma delicatula* contains mainly methyl-branched 9-methylheptacosane (15.11%) in the egg stage, and a high proportion of *n*-heptacosane in nymphal stages (15.75, 22.42, 25.04, and 23.11 % in the 1st, 2nd, 3rd and 4th instars, respectively). In contrast, male and female adults had high proportions of *n*-nonacosane (13.42 and 16.55%). The chemical constituents of CHCs were classified into five groups (*n*-alkanes, monomethylalkanes, dimethylalkanes, trimethylalkanes, olefins) and group profiles of each developmental stage were compared. Egg surface was composed mainly monomethylalkanes (45.39%), a saturated hydrocarbon. Nymph CHCs consisted primarily of *n*-alkanes (37.63 to 46.12%). There was a difference between adult male and female CHCs. However, both contained *n*-alkanes and monomethylalkanes. CHCs with trimethyl or double bonded structure were rare in all stages.

Key words: Cuticular hydrocarbons (CHC), Spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula*, Developmental stage, Composition

조 록: 꽃매미의 발육단계별 표피탄화수소를 비교하기 위하여 GC와 GC-MS를 이용하여 분석하였다. 분석된 꽃매미의 표피탄화수소의 종류는 알이 32종, 약충은 령별로 각각 33, 28, 38, 37종이었고 2령 약충에서 가장 적게 나타났다. 반면 성충은 암·수 모두 46종으로 동일하였으며, 꽃매미의 충태 중 가장 많은 종류의 탄화수소를 함유하고 있었다. 발육단계별 물질 함량을 분석한 결과, 알은 메틸기를 갖고 있는 9-methylheptacosane을 가장 많이 함유하고 있었으며(15.11%), 령기별 약충은 *n*-heptacosane을 가장 많이 함유하고 있었다(15.75, 22.42, 25.04, 23.11%). 반면 성충은 암·수 모두 *n*-nonacosane을 가장 많이 함유하고 있었다(13.42, 16.55%). 표피탄화수소의 구성물질을 5개 그룹(*n*-alkanes, monomethylalkanes, dimethylalkanes, trimethylalkanes, olefins)으로 나누고 물질 함량을 꽃매미 발육단계별로 비교하였다. 꽃매미의 알 표피는 대부분이 monomethylalkanes인 포화탄화수소로 이루어져 있고(45.39%), 약충은 포화탄화수소의 기본구조인 *n*-alkanes이 대부분이었다(37.63-46.12%). 또한 성충은 암·수에 따라 차이가 있었지만, *n*-alkanes과 monomethylalkanes을 고루 함유하는 것으로 나타났다. 반면 모든 충태에서, 3개이상의 메틸기를 갖거나 이중 결합을 포함하는 구조는 극히 적었다.

검색어: 표피탄화수소, 꽃매미, *Lycorma delicatula*, 발육단계별, 함량

곤충의 외표피층에는 곤충의 생존과 번식에 있어서 다양한 역할을 수행하는 왁스층이 공통적으로 존재하며, 탄화수소를 비롯한 왁스에스테르, 스테롤에스테르 및 키톤, 알코올, 알데히

드의 관능기를 갖는 지방성분으로 이루어져 있다. 왁스층은 곤충의 중, 몸 부위, 발육단계, 개체 간에 그 조성이 양적으로나 질적으로 다르게 존재한다(Boo, 2001).

그 중에서도 표피탄화수소는 구조와 기능면에서 많은 연구가 진행된 대표적 물질로 그 중요성이 점차 강조되고 있다 (Lucas *et al.*, 2005). 곤충의 표피탄화수소(CHCs; cuticular hydrocarbons)는 주로 탄소수가 21-49개로 이루어져 있고

*Corresponding author: khkim@chungbuk.ac.kr

Received May 31 2011; Revised July 11 2011

Accepted July 20 2011

(Howard, 1993; Nelson, 1993), 그 구조가 다양하여 long-chain linear alkanes, alkenes, mono-/ di-/ tri-methyl-branched alkanes 과 같은 100여종의 탄화수소의 화합물로 구성되어 있다 (Nelson *et al.*, 1993). 표피탄화수소는 곤충의 체내에서 합성이 되어 체벽에 분포하면서 일차적으로 주로 탈수를 방지하고 (Gibbs *et al.*, 2003), 곤충병원성 미생물의 침투로부터 보호하며 (Blomquist *et al.*, 1987), 외부의 환경으로부터 일생동안 곤충을 보호하는 기능을 수행한다.

표피탄화수소의 조성과 함량은 곤충의 종내 또는 종간에서 차이가 많이 나기 때문에 종내 또는 종간 차이를 인식하고 동종 또는 같은 집단 내 의사소통을 하는데 중요한 기능을 수행한다. 사회성 곤충의 동종 또는 nestmate의 인식과 관련하여 가장 많이 연구가 진행되었는데 (Wagner *et al.*, 2000), 동종 간에도 성별, 연령 또는 계급 (Nelson and Charlet, 2003; Böröczky *et al.*, 2008), 군집 간, 지역, 기후에 따라 다른 종류의 탄화수소 혹은 함유량의 차이를 보여 서로를 인식하기도 한다 (Uva *et al.*, 2004; Akino, 2006). 더욱이 하나의 개체에서도 촉각, 다리 등 부위에 따라 조성비가 다르게 분석되기도 하여 화학분류가 가능하다 (Lee *et al.*, 2003; Böröczky *et al.*, 2008). 이처럼 표피탄화수소의 구성성분과 함량의 차이는 종-특이성이 매우 높아 화학적 분류법에 적용할 수 있는데 (Bernier *et al.*, 1998; Saïd *et al.*, 2005b; Akino, 2006), 때로는 곤충의 형태적 분류가 갖는 시각적인 분류의 한계를 극복하기 위해 이러한 화학적 분류의 특성을 이용하여 종간, 종내 또는 성 감별을 할 수도 있다 (Carlson and Brenner, 1988).

표피탄화수소는 화학적으로 안정하고, 휘발성이 낮아 물리적 기능뿐만 아니라 화학적 측면에서도 동종의 집단 내에서 특별한 화학적 신호로서 의사소통을 가능하게 한다 (Blomquist *et al.*, 1987; Lorenzi *et al.*, 2004; Gamboa, 2004; Lucas *et al.*, 2005). 화학적 의사소통은 개미, 벌, 바퀴와 같은 대표적인 사회성 곤충에서 모두 특정 화학물질에 의해 군집을 형성하고 질서체계를 갖는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 Saïd *et al.* (2005a)은 *Periplaneta* 속의 4종 바퀴들이 각각 동종의 표피탄화수소에 의해 군집이 형성된다는 것을 증명하였고, 성적 의사소통은 대부분 휘발성 페로몬과 연관이 있는데, *Drosophila*는 구애행동 및 교미와 관련하여 표피탄화수소가 페로몬과 같은 역할을 하는 것으로 알려져 있고 (Kim *et al.*, 2004), 사회성곤충인 개미도 똑같은 역할을 수행할 뿐만 아니라 대부분 분화된 계급을 통해 번식과 같이 복잡한 행동을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Lommelen *et al.*, 2006). 또한 곤충의 표피탄화수소는 양성의 동종을 유인하는 aggregation pheromone과 이성의 동종을 유인하는 sex pheromone 등 semiochemicals과 같은 기능을 한다 (Kaib *et al.*, 2004).

꽃매미는 중국과 동남아시아가 원산지인 아열대성 해충으로 (Xiao, 1991), 중국에서 국내로 유입 및 정착하였고, 2006년 이후 전국적으로 확산되어 포도농가에 큰 피해를 주고 있다 (Han *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010). 꽃매미 성충은 특정한 기주에 상관없이 난괴로 산란을 하고 난괴표면을 왁스층으로 덮어놓는다 (Park *et al.*, 2009). 꽃매미의 약충과 성충은 무리를 지으며, 식물을 흡즙한 후 감로를 배출하여 그을음 병을 유발시키기도 한다 (Lee *et al.*, 2009). Park *et al.* (2009)은 꽃매미의 기초적인 생태와 약충의 약제 감수성을 보고하였고, Lee *et al.* (2009)은 꽃매미의 섭식행동과 섭식자극물질 연구를 일부 식물에 대하여 수행한 결과, 포도나무가 꽃매미의 피해에 감수성이 높다고 보고한 바 있다.

그러나, 발육단계별로 형태적으로 큰 차이를 많이 보이는 꽃매미는 국내에서 한 때 희조꽃매미로 분류되기도 하여 형태학적 특징과 미토콘드리아 cytochrome oxidase I 분석을 통해 지금의 ‘꽃매미’로 재등정된 바 있다 (Han *et al.*, 2008). 꽃매미에 대한 형태학적, 분자생물학적 동정은 이루어진 바 있으나 표피탄화수소와 같이 종간 차이를 구분할 수 있는 화학조성에 관한 연구는 진행된 바 없으며, 어느 정도 중요한 의미를 갖는지 아는 바가 없다. 따라서 본 연구는 꽃매미를 발육단계별로 표피탄화수소를 추출하고 분석하여 화학분류의 기초자료로 제공하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험곤충

2010년 1월 이후부터 꽃매미 알을, 5월 이후부터 1~4령 약충 및 성충을 충북대학교 부근의 가죽나무와 포도나무에서 채집하였다. 표피탄화수소 추출에 사용한 부위는 안테나와 날개 등을 포함한 몸 전체이며, 채집 후 실험에 사용하기 전, 건전한 각 층태만을 선별하여 영하 18°C에서 동결 보관하였다.

표피탄화수소 추출

꽃매미의 표피탄화수소를 추출하기 전, 동결 보관된 꽃매미의 각 층태를 건조시켜 체표면 수분을 제거하였다. 층태별로 5~10마리씩 3 ml의 HPLC grade hexane (J.T. Baker, USA)에 헹귀 추출하였다. Glass Pasteur pipette column은 glass wool (Sigma, St. Louis, MO), sodium sulfate (Junsei chemical, Tokyo, Japan)와 silica gel (Merck, Darmstadt, Germany)의 순서로 충전하였고, column을 만든 후 바로 사용하였다. 추출된 핵산 혼합액을

glass Pasteur pipette (Poulten & Graf, Barking, UK) 컬럼에 흘려 정제한 후, 농축하였다. 각 층대별 꽃매미의 탄화수소 분석은 3반복으로 수행하였다.

표피탄화수소 분석

추출하여 얻어진 각각의 표피탄화수소를 1 ml의 hexane에 녹여 gas-chromatography (GC, Agilent Technologies 6890N, Santa Clara, CA)와 gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS, Agilent Technologies 7890A/5975C, Santa Clara, CA)로 분석을 하였다. 표피탄화수소의 분석은 FID(flame ionization detector)가 장착된 GC를 사용하였고, DB-1 (30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA) 컬럼을 사용하였다. Oven 온도는 초기 150°C 에서 10분간 유지한 후, 분당 5°C 씩 상승시켜 310°C 까지 올려주었으며 10분간 유지하였다. 주입구와 검출기 온도는 각각 250°C 와 300°C 로 설정하였고, 이동상으로 분당 2 ml의 질소를 흘려주었다. GC-MS에 사용한 컬럼은 HP-5MS (30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm film thickness, J&W Scientific)를 사용하였다. 각 온도조건은 GC분석과 동일하게 설정하였으며, 이동상으로 헬륨을 사용하였다.

1 ml의 hexane에 녹인 각각 표피탄화수소와 표준물질은 1 μl 씩 주입시켜 분석하였으며, nC₂₀-nC₄₀ 포화탄화수소는 Sigma (St Louis, MO)에서 구입하여 표준물질로 사용하였고, 분석된 피크를 확인하였다.

결과 및 고찰

표피탄화수소의 추출 및 조성 분석

곤충의 표피탄화수소는 종마다 그 구성성분과 함량이 특이적으로 달라 화학분류로도 이용이 가능한데 중간 차이의 구명하는데 수없이 많은 연구에서 진행되고 있다. Lee *et al.* (2010)은 3종의 하늘소의 암수에서 표피탄화수소의 개수를 비교한 결과 *Monochamus saltuarius*의 암수는 각각 23, 25개, *M. alternatus*의 암수는 각각 25, 32개, *Moechotypa diphysis*의 암수는 각각 23, 29개의 탄화수소를 가지고 있는 것으로 확인되어 중간 차이가 있음을 확인하였고, Martin and Drijfhout (2009)는 5아과 78종 개미의 표피탄화수소를 비교하여 중간 차이를 이용하여 계통 분류하였다. Page *et al.* (1997)는 *Grandicollis* 아속에 속하는 pine engraver beetle을 표피탄화수소로 화학분류를 했고, Urech *et al.* (2005)은 *Haematobia* 속의 *H. exigua*와 *H. irritans*를 11-C_{23:1}과 7-C_{23:1}, (Z)-9-and (Z)-5-C_{23:1}의 조

성차이로 화학적 분류를 하였다. Torres *et al.* (2007)은 Argentine ant (*Linepithema humile*)가 표피탄화수소를 화학적 신호로서 인식하여 침입한 Argentine ant를 구별하는 것을 밝혔고, Lee *et al.* (2003)은 동양종과 서양종 꿀벌의 안테나, 날개와 다리 등의 몸의 부위별로 *n*-alkanes의 함량의 차이를 구분하기도 하였다. 이와 같이 곤충의 체표에 분포하는 표피탄화수소는 중간 차이를 구별할 뿐만 아니라 같은 종내에서도 서로를 구별하는 역할을 수행한다. 하지만 대부분의 연구결과에서 보듯이, 곤충의 표피탄화수소의 연구는 화학분류를 위해 곤충의 중간 뿐만 아니라 종내에서 특정단계에 있는 곤충의 표피탄화수소를 비교하였지만 생육의 전 발육단계에 걸쳐 표피탄화수소의 변화를 비교한 연구결과를 찾지 못하였다. 따라서 본 논문은 꽃매미의 발육단계에 따라 표피탄화수소의 조성 및 함량의 변화에 초점을 맞추어 분석 비교하였다.

곤충의 표피탄화수소는 일반적으로 곤충의 몸 전체를 유기용매로 추출한 다음 GC/ GC-MS을 이용하여 분석하기도 하고 (Lee *et al.*, 2010; Yusuf *et al.*, 2010; Kather *et al.*, 2011), 노랑초파리의 경우 성충의 표피탄화수소의 변화를 실시간 이동시보 질량분광계(real-time time-of-flight Mass Spectrometry)를 이용하여 분석하거나(Yew *et al.*, 2008) whole-body 추출법을 포함한 SPME 방법(Everaerts *et al.*, 2010)으로 분석하기도 한다. 본 실험에서는 whole-body를 hexane으로 추출한 다음 GC와 GC-MS를 이용하여 분석하였다.

꽃매미의 알, 1령부터 4령까지 약충과 갓 우화한 암수컷 성충을 구분하여 표피탄화수소를 추출하였고, GC와 GC-MS를 이용하여 분석하여 조성 및 함량의 차이를 비교하였다. 그 결과, x-C_{21:1}부터 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃ 까지 총 51개의 물질을 분석하였다(Fig. 1, Table 1). 분석된 표피탄화수소 종류는 알에서 32개, 약충에서 1령부터 4령까지 각각 33, 28, 38, 37개였으며, 2령 약충에서 가장 적게 나타났다. 암수 성충에서는 모두 46개로 동일하였으며, 층대 중 가장 많은 종류의 탄화수소를 함유하였다. 이는 표피탄화수소가 발육이 진행될수록 대사과정에 따라 합성과 분해가 이루어지면서 변하는 것으로 보인다. 표피탄화수소 사슬의 탄소수는 꽃매미의 알에서 C₂₃ ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 1령 약충은 C_{21:1} ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 2령 약충은 C₂₃ ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 3령 약충은 unknown ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 4령 약충은 C₂₃ ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 암컷 성충은 C_{21:1} ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃, 수컷성충은 C₂₃ ~ 8, 13, 16-,9, 13, 17-triMeC₃₃까지로 구성되어 있음을 확인하였고, 표피탄화수소 사슬의 탄소수는 발육이 진행되어도 큰 변화를 보이지 않았는데, 이는 대부분이 구조적 역할을 수행하는 포화탄화수소이기 때문인 것으로

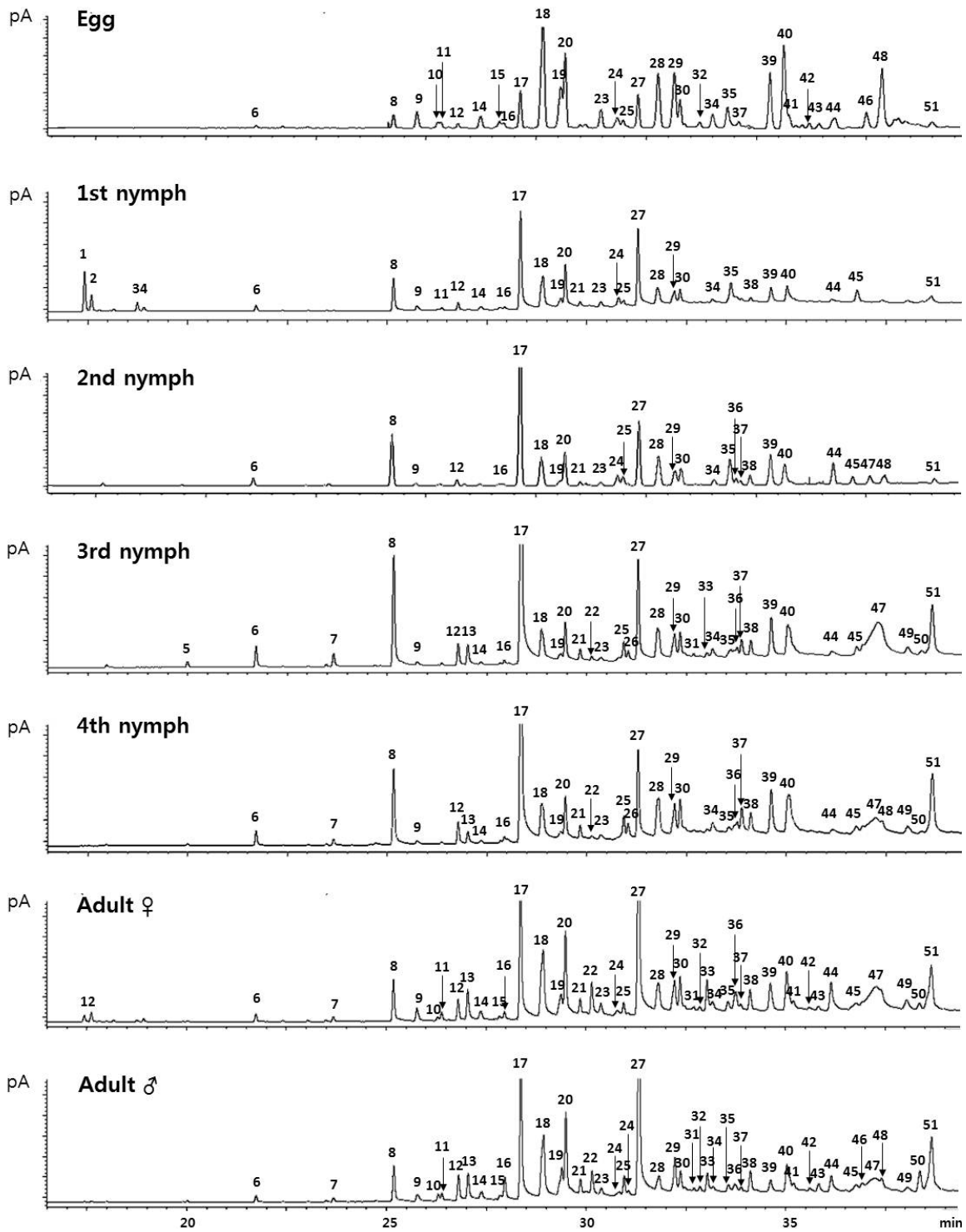


Fig. 1. Gas chromatograms of cuticular hydrocarbons of *Lycorma delicatula* eggs, each nymphal instar, and male and female adults. The numbers refer to the following compounds: 1. x-C_{21:1}, 2. unknown, 3. x-C_{22:1}, 4. 4-; 7-; 8-MeC₂₁, 5. unknown, 6. n-C₂₃, 7. 5, 8-diMeC₂₄, 8. n-C₂₅, 9. 11-MeC₂₅, 10. 8-; 11-; 12-MeC₂₅, 11. 3-MeC₂₅, 12. n-C₂₆, 13. unknown, 14. 4-; 10-MeC₂₆, 15. 10, 11-; 12-MeC₂₆, 16. x-C_{27:1}, 17. n-C₂₇, 18. 9-MeC₂₇, 19. 9, 12-diMeC₂₇, 20. 3-MeC₂₇, 21. n-C₂₈, 22. 10-MeC₂₈, 23. x-MeC₈, 24. 9-; 10-; 13-MeC₂₈, 25. 3-; 12-MeC₂₈, 26. x-MeC_{29:1}, 27. n-C₂₉, 28. 9-MeC₂₉, 29. 9, 16-diMeC₂₉, 30. 3-MeC₂₉, 31. n-C₃₀, 32. 5, 9-; 10, 14-diMeC₃₀, 33. 10-; 11-MeC₃₀, 34. 4-MeC₃₀, 35. 10, 14-diMeC₃₀, 36. 3-; 14-MeC₃₀, 37. x-C_{31:1}, 38. n-C₃₁, 39. 11-MeC₃₁, 40. 11, 15-diMeC₃₁, 41. 7, 11-diMeC₃₁, 42. 6, 10-; 12, 16-diMeC₃₁, 43. 4-; 9-; 12-; 16-MeC₃₂, 44. 5, 8-diMeC₃₂, 45. 8-; 11-; 14-; 15-MeC₃₂, 46. unknown, 47. unknown, 48. n-C₃₃, 49. 8-; 11-; 14-; 15-MeC₃₃, 50. 11-MeC₃₃, and 51. 8, 13, 16-; 9, 13, 17-triMeC₃₃.

Table 1. CHC components identified by GC/MS in all stages of *Lycorma delicatula*

Peak No.	Compound	RI ^{a)}	CN ^{b)}	Diagnostic MS ions[m/z]
1	<i>x</i> -C _{21:1}	2081	21	263, 280, <u>294</u>
2	unknown	2112		180, 207, 222, 236, 264, <u>296</u>
3	<i>x</i> -C _{22:1}	2171	22	207, 220, 263, 281, <u>308</u>
4	4-; 7-; 8-MeC ₂₁	2179	22	180, 193, 207, 222, 265, <u>310</u>
5	unknown	2235		82, 97, 250, 278, <u>296</u>
6	<i>n</i> -C ₂₃	2300	23	<u>324</u>
7	5, 8-diMeC ₂₄	2406	26	82, 97, 250, 278, 306, <u>355</u>
8	<i>n</i> -C ₂₅	2500	25	<u>352</u>
9	11-MeC ₂₅	2536	26	140, 168, 196, 224, <u>366</u>
10	8-; 11-; 12-MeC ₂₅	2569	26	140, 196, 211, 239, 267, <u>365</u>
11	3-MeC ₂₅	2575	26	309, 337, <u>365</u>
12	<i>n</i> -C ₂₆	2600	26	<u>366</u>
13	unknown	2615		181, 196, 211, 351, <u>366</u>
14	4-; 10-MeC ₂₆	2636	27	154, 224, 252, 306, 334, <u>380</u>
15	10, 11-; 12-MeC ₂₆	2666	27	154, 196, 210, 225, 267, <u>379</u>
16	<i>x</i> -C _{27:1}	2674	27	323, 351, <u>378</u>
17	<i>n</i> -C ₂₇	2700	27	<u>380</u>
18	9-MeC ₂₇	2738	28	140, 169, 197, 225, 252, 281, <u>394</u>
19	9, 12-diMeC ₂₇	2768	29	140, 196, 239, 267, 295, <u>393</u>
20	3-MeC ₂₇	2775	28	337, 365, <u>394</u>
21	<i>n</i> -C ₂₈	2800	28	<u>394</u>
22	10-MeC ₂₈	2820	29	154, 257, 281, <u>393</u>
23	<i>x</i> -MeC ₂₈	2836	29	82, 98, 257, 306, 334, 362, <u>405</u>
24	9-; 10-; 13-MeC ₂₈	2863	29	149, 211, 239, 257, 293, <u>407</u>
25	3-; 12-MeC ₂₈	2874	29	257, 351, 379, <u>408</u>
26	<i>x</i> -MeC _{29:1}	2882	29	82, 97, 197, 225, 257, 285, 336, <u>406</u>
27	<i>n</i> -C ₂₉	2900	29	<u>408</u>
28	9-MeC ₂₉	2935	30	140, 280, 309, <u>407</u>
29	9, 16-diMeC ₂₉	2964	31	140, 183, 211, 252, 295, 323, <u>421</u>
30	3-MeC ₂₉	2984	30	365, 393, <u>422</u>
31	<i>n</i> -C ₃₀	3000	30	<u>422</u>
32	5, 9-; 10, 14-diMeC ₃₀	3007	32	85, 155, 255, 252, 323, 393, <u>435</u>
33	10-; 11-MeC ₃₀	3020	31	154, 168, 281, 294, 309, 421, <u>435</u>
34	4-MeC ₃₀	3027	31	362, 390, <u>436</u>
35	10, 14-diMeC ₃₀	3053	32	154, 225, 252, 295, 323, <u>435</u>
36	3-; 14-MeC ₃₀	3067	31	207, 253, 379, 407, <u>435</u>
37	<i>x</i> -C _{31:1}	3073	31	97, 155, 169, 295, <u>434</u>
38	<i>n</i> -C ₃₁	3100	31	<u>436</u>
39	11-MeC ₃₁	3133	32	168, 280, 309, <u>435</u>
40	11, 15-diMeC ₃₁	3159	33	168, 239, 252, 323, <u>449</u>
41	7, 11-diMeC ₃₁	3169	33	112, 183, 281, 308, 351, 379, <u>449</u>
42	6, 10-; 12, 16-diMeC ₃₁	3196	33	183, 207, 253, 281, 323, 365, 393, <u>463</u>
43	4-; 9-; 12-; 16-MeC ₃₂	3209	33	155, 225, 253, 280, 323, 351, 393, 421, <u>463</u>
44	5, 8-diMeC ₃₂	3227	34	362, 390, 418, <u>477</u>
45	8-; 11-; 14-; 15-MeC ₃₂	3264	33	140, 183, 211, 239, 252, 267, 280, 295, 337, 365, <u>463</u>
46	unknown	3272		95, 207, 253, 281, 446, <u>478</u>
47	unknown	3292		183, 205, 225, 253, 275, 295, 450, <u>477</u>
48	<i>n</i> -C ₃₃	3300	33	<u>464</u>
49	8-; 11-; 14-; 15-MeC ₃₃	3331	34	141, 183, 207, 253, 281, 308, 351, 379, 449, <u>477</u>
50	11-MeC ₃₃	3347	34	168, 308, 337, <u>463</u>
51	8, 13, 16-; 9, 13, 17-triMeC ₃₃	3362	36	140, 211, 267, 280, 294, 309, 336, 379, 407, <u>505</u>

^{a)} Retention Index; ^{b)} Carbon number.

생각된다. Cuvillier-Hot *et al.* (2001)은 여왕개미가 없는 *Diacamma ceylonense*의 표피탄화수소를 분석한 결과, C₂₅~C₃₅로 16개의 물질이 분석되었는데, 이 개미는 성, 나이, 생식력에 따라 표피탄화수소의 함량이 다르게 나타났음을 보고하였다.

꽃매미의 발육단계별 표피탄화수소에서 특이적으로 존재하거나 결여되는 조성이 있었는데(Fig. 1, Tables 1 and 2), 알의 경우 5, 9-; 10, 14-diMeC₃₀ (Peak No. 32)가 존재하지만 약충에서는 존재하지 않으며 성충에서 발견되지만 그 함량은 미미하여 의미가 없는 것으로 보인다. 3-MeC₂₇ (No. 20), C₂₈ (No. 21), 3-; 14-MeC₃₀ (No. 36), C₃₁ (No. 38)는 알을 제외한 모든 발육단계에서 비슷한 함량으로 존재하였다. 약충의 경우에는 C_{21:1} (No. 1), unknown (No. 2)가 1령 약충에서만 존재하다가 암컷 성충에서 함량은 미미하게 나타났으며, C_{22:1} (No. 3), 4-; 7-; 8-MeC₂₁ (No. 4)가 1령 약충에서만, unknown (No. 5)는 3령 약충에서만 존재하였고, 다른 모든 발육단계에서는 나타나지 않았다. 알과 1-2령 약충에는 존재하지 않다가 3령 약충부터 나타나기도 하였는데 unknown (No. 2), MeC_{29:1} (No. 26), C₃₀ (No. 31), 10-; 11-MeC₃₀ (No. 33), 8-; 11-; 14-; 15-MeC₃₃ (No. 49), 11-MeC₃₃ (No. 50)는 발육단계가 증가할수록 함량이 대부분 증가하였고, 5, 8-diMeC₂₄ (No. 7)는 발육단계가 증가할수록 함량이 감소하였다. 8-; 11-; 12-MeC₂₅ (No. 10), 10, 11-; 12-MeC₂₆ (No. 15), 5, 9-; 10, 14-diMeC₃₀ (No. 32), 7, 11-diMeC₃₁ (No. 41), 6, 10-; 12, 16-diMeC₃₁ (No. 42), 4-; 9-; 12-; 16-MeC₃₂ (No. 43)가 알과 성충기간에는 미량으로 존재하였지만, 약충발육기간에는 존재하지 않았다. 꽃매미의 성충을 성별로 비교하였을 때, 암컷 성충에서는 unknown (No. 46)과 C₃₃ (No. 48)이, 수컷 성충에서는 C_{21:1} (No. 1)과 unknown (No. 2)이 존재하지 않았지만, 일부 약충 기간에서 발견되어 이 peak들이 암컷과 수컷 성충을 분류하는 기준이 되거나 페로몬 역할을 하는 의미는 없는 것으로 보인다. Lee *et al.* (2010)은 3종의 하늘소의 수컷과 암컷의 표피탄화수소 개수에 있어서도 조성에 큰 차이를 보였다고 보고하였다. 이들 조성은 발육단계별로 알과 약충시기 또는 성충의 우화 후 시간에 따라 그 함량이 변화하지만 어떠한 발육단계에서 특이적으로 존재하는 함량은 없었다. 따라서 동종의 발육단계별로 화학분류를 결정하기에는 어려움이 있을 것으로 판단되며, 이보다는 지역적 차이가 있는 곤충 간에 표피탄화수소의 함량이 차이가 있는지 비교하는 쪽으로 의미를 두고 실험을 진행해야 할 것으로 보인다.

표피탄화수소의 함량분석

꽃매미의 발육단계별 물질 함량을 분석한 결과(Table 2, Fig.

2), 알은 메틸기를 갖고 있는 9-MeC₂₇의 함유량이 가장 많았으며(15.11%), 약충은 *n*-C₂₇을 가장 많이 함유하였다(15.75, 22.42, 25.04, 23.11%). 반면 성충은 암수 모두 *n*-C₂₉를 가장 많이 함유하고 있었다(13.42, 16.55%). 이러한 결과에서 보듯이 물질의 함량은 발육단계마다 변하는 것을 알 수 있었다. 3종의 하늘소간 비교에서는 같은 종내의 수컷과 암컷 간에도 대부분의 표피탄화수소의 함량이 차이가 있으나 함량이 두 배 이상 차이가 나기도 하였으며, 함량만으로 종구별을 단정 짓기에는 어려워 보인다. 북방수염하늘소의 수컷은 암컷보다 2,4-MeC₂₆ (No. 8)를 두 배 이상 가지고 있었고, 반대로 C₂₇ (No. 11)는 암컷이 수컷보다 2.5배 이상 많이 가지고 있었다(Lee *et al.*, 2010). 본 실험에서도 마찬가지로 비슷한 결과를 얻었는데, 꽃매미의 수컷이 암컷보다 11-MeC₃₃ (No. 50)을 2.6배 이상 가지고 있었고, unknown (No. 47)은 암컷이 수컷보다 2.3배 이상 가지고 있었다. 하지만, 단지 암수간 조성함량만으로는 화학적 분류가 어려울 것으로 보이며, 전체적으로 본 연구에서는 암수간에 표피탄화수소의 차이는 크지 않은 것으로 생각되며, 표피탄화수소가 늘 일정한 것이 아니라 환경의 상태에 따라 그 조성과 함량이 변하기 때문인 것으로 판단된다. 실제로, 발육단계에 따라 함량이 변하기도 하며, 군집내 특성에 따라 함량이 변하기도 한다(Nunes *et al.*, 2009). 하지만 본 연구에서 군집간의 차이가 보이지 않은 것은 발육단계별 표피탄화수소의 함량차이가 기주식물별이나 야외종을 실험에 사용하여 같은 군집이 아닐 가능성이 크다. 표피탄화수소의 조성은 환경적 요인의 차이, 자연에서 발견되는 영양분의 종류와 섭취능력에 따라 분비하는 양이 영향을 받는 것이 *Bombus sp.* 에서 보고되었다(Hefetz *et al.*, 1993).

꽃매미의 표피탄화수소의 구성성분을 조성별로 분류한 결과(Fig. 3), 꽃매미의 알 표피에서는 대부분이 monomethylalkanes (45.39%)인 포화탄화수소로 이루어졌으며 그 다음으로 dimethylalkanes으로 이루어져 있었다. 모든 령기별 약충에서는 포화탄화수소의 기본구조인 *n*-alkanes(37.63 ~ 46.12%) > monomethylalkanes(20.57 ~ 36.91%) 순으로 나타났다. 꽃매미 성충에서 수컷은 약충과 마찬가지로 *n*-alkanes(35.47%) > monomethylalkanes(33.40%) 순이었지만, 암컷은 monomethylalkanes (37.72%) > *n*-alkanes(28.82%) 순으로 나타나 종내 발육단계별, 성에 따른 표피 구성성분의 함량에 대한 차이를 나타내었다. Howard *et al.* (1982)은 *Reticulitermes virginicus* 흰개미의 모든 계급은 구성성분은 같으나, 함량은 차이가 있다고 보고하였는데, 본 실험과 비슷한 경향을 나타내었다. 또한 4개 집단, 집합개미는 대부분이 길이가 같은 사슬을 가진 *n*-alkanes보다 2-methylalkanes을 더 풍부하게 가지고 있으며, 집단 및 계급에 따라 구성성분의 차이는 없었으나, 함량의 차이는 있었다고 보

Table 2. Relative distributions of cuticular hydrocarbon fractions from *Lycorma delicatula*

Peak No.	Egg	Nymph				Adult	
		1st	2nd	3rd	4th	♀	♂
1	-	5.11	-	-	-	0.23	-
2	-	2.26	-	-	-	0.34	-
3	-	1.16	-	-	-	-	-
4	-	0.51	-	-	-	-	-
5	-	-	-	0.30	-	-	-
6	-	0.74	1.07	1.08	-	0.30	0.32
7	-	-	-	0.79	0.38	0.19	0.23
8	1.30	4.86	7.65	7.30	4.97	1.70	1.97
9	1.90	0.80	-	0.21	0.27	0.64	0.52
10	0.69	-	-	-	-	0.14	0.33
11	0.51	0.42	-	-	-	0.36	0.45
12	0.43	1.00	0.92	1.35	1.40	0.92	1.50
13	-	-	-	1.54	0.98	1.54	1.79
14	1.52	0.62	-	0.26	0.29	0.65	0.74
15	0.91	-	-	-	-	0.19	0.24
16	0.54	0.50	0.77	0.27	0.39	0.38	1.36
17	3.79	15.75	22.42	25.04	23.11	8.20	8.69
18	15.11	7.68	5.84	4.83	5.63	5.90	5.33
19	5.69	1.71	0.85	1.01	1.08	1.75	1.93
20	-	7.17	5.16	3.37	3.72	5.04	5.21
21	-	0.88	0.58	1.18	1.37	1.06	0.90
22	0.47	-	-	0.54	0.42	2.05	1.56
23	2.23	0.94	0.63	0.47	0.52	1.42	0.66
24	1.55	1.74	1.89	0.28	-	0.71	0.37
25	0.89	1.07	1.55	1.23	1.72	0.79	1.06
26	-	-	-	0.67	1.05	0.33	0.33
27	3.36	13.24	9.59	7.09	6.04	13.42	16.55
28	7.42	5.38	6.14	3.70	3.99	3.78	2.92
29	7.66	3.15	3.16	2.28	2.48	2.67	2.85
30	3.02	2.59	2.98	1.76	2.28	2.11	1.66
31	-	-	-	0.38	0.37	0.81	0.68
32	0.66	-	-	-	-	0.82	0.88
33	-	-	-	0.34	0.41	1.95	1.59
34	1.69	1.31	1.11	0.76	1.39	1.88	1.47
35	2.93	4.42	5.03	0.67	0.75	1.17	1.00
36	-	1.41	1.02	0.59	0.92	1.92	1.22
37	0.71	1.00	0.60	1.17	2.25	1.05	0.89
38	-	1.16	1.65	1.09	2.08	2.40	1.78
39	6.79	2.63	5.36	2.91	4.23	3.23	1.89
40	11.23	3.22	4.15	3.99	7.16	3.25	3.08
41	1.29	-	-	-	-	1.19	1.21
42	0.72	-	-	-	-	0.79	0.83
43	0.68	-	-	-	-	0.98	1.37
44	2.13	0.75	3.74	0.56	0.81	3.47	2.40
45	-	2.63	-	0.86	0.92	1.48	1.47
46	2.15	-	1.41	-	0.80	-	1.11
47	-	-	1.69	13.76	4.62	9.58	4.21
48	9.06	-	2.24	-	2.27	-	3.08
49	-	-	-	0.96	1.15	1.67	1.24
50	-	-	-	0.31	0.33	0.82	2.10
51	0.96	2.18	0.81	5.06	7.45	4.70	7.05
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100

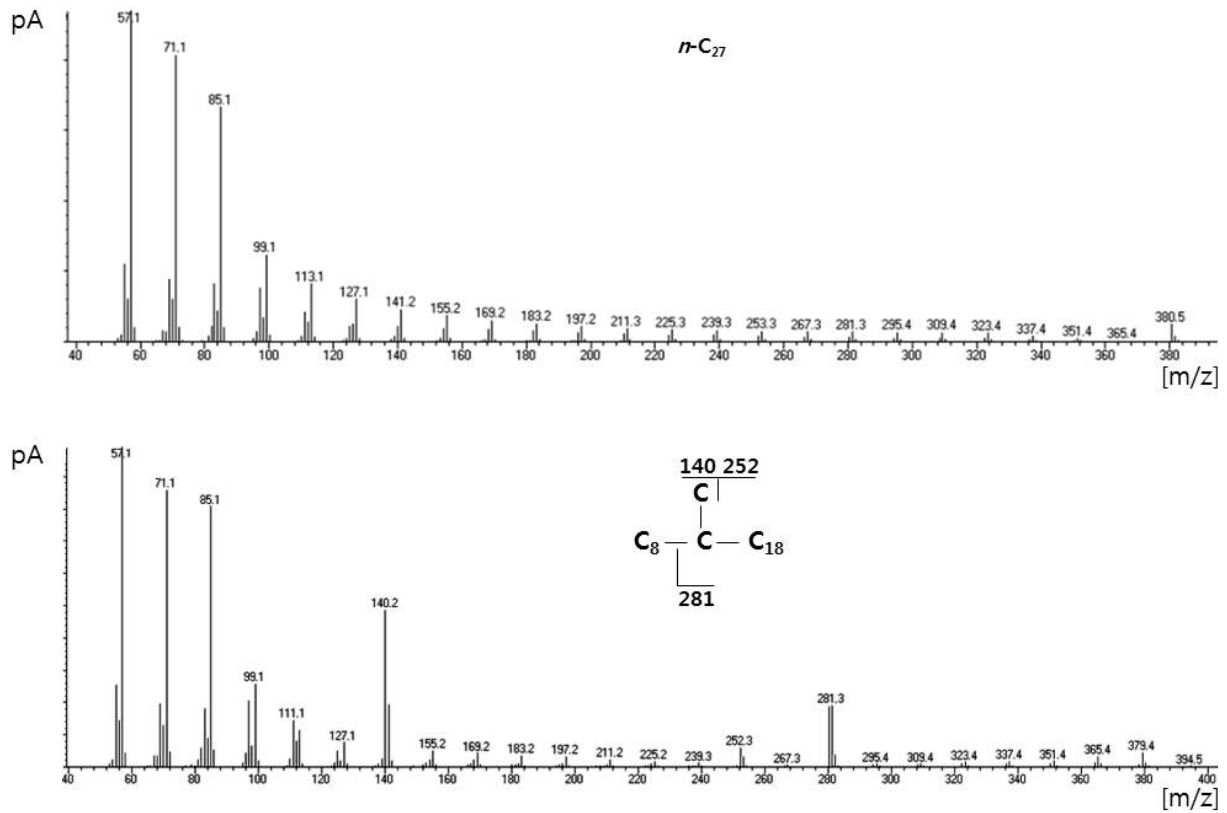


Fig. 2. EI Mass spectra of normal and methyl-branched alkanes from *Lycorma delicatula*. This mass spectra shows *n*-heptadecane (GC peak 17) and 9-methylheptadecane (GC peak 18).

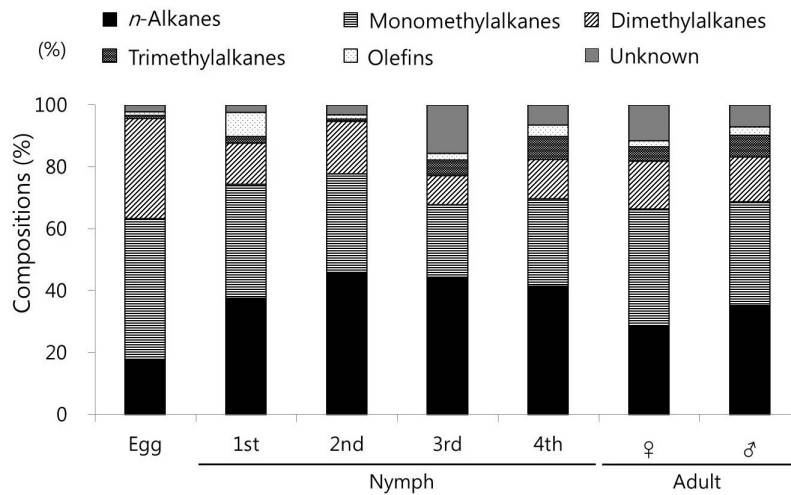


Fig. 3. Composition (%) of cuticular hydrocarbons of different developmental stages of *Lycorma delicatula*.

고되어(Haverty *et al.*, 1990) 본 실험의 결과와 비슷하였다.

꽃매미의 모든 충태에서 3개 이상의 메틸기를 갖거나 이중결합을 포함하는 trimethylalkanes(0.81 ~ 7.45%)과 olefins(1.12 ~ 7.77%)는 극히 적게 나타났는데, 이 결과는 Lee *et al.* (2010)에 의해 보고된 3종 하늘소의 수컷 성충의 표피탄화수소와 비슷한

경향을 나타내었다. Darrouzet *et al.* (2010)은 기생봉인 *Eupelmus vuilleti* 성충에서 암컷이 수컷보다 methyl기가 붙은 화합물이 더 많았다고 보고하였는데, 이는 본 실험과 비슷한 경향을 나타내었다.

종합적으로 본 실험에서는 꽃매미의 발육단계별로 알과 약

층, 암수성층으로부터 표피탄화수소를 각각 추출하였고, 조성
과 함량별 차이를 분석하였다. 본 실험의 결과로 꽃매미는 같은
종내에서는 발육단계별, 성별에 따라 표피탄화수소가 주요 구
성성분의 함량에는 차이를 보였으나, 조성에는 거의 차이가 없
었다. 따라서 앞으로 화학적 분류를 위한 기초자료로 사용할 수
있을 것이다.

사 사

이 논문은 농림수산식품기술기획평가원의 과제 “꽃매미의
친환경적 방제제 개발(과제번호: 110003-03-1-HD110)”과 교
육과학기술부의 2단계 BK21사업의 연구비 지원에 의해 수행
되었습니다.

Literature Cited

- Akino, T. 2006. Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae): Description of new very long chained hydrocarbon components. *Appl. Entomol. Zool.* 41: 667-677.
- Bernier, U.R., D.A. Carlson and C.J. Geden. 1998. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of the cuticular hydrocarbons from parasitic wasps of the genus *Muscidifurax*. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9: 320-332.
- Barbour, J.D., E.S. Lacey and L.M. Hanks. 2007. Cuticular hydrocarbons mediate mate recognition in a species of longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) of the primitive subfamily prioninae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 100: 333-338.
- Blomquist, G.J., D.R. Nelson and M. de Renobales. 1987. Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 6: 227-265.
- Boo, K.S. 2001. *Insect physiology*. Seongmunsa Co. Publishing.
- Böröczky, K., K.C. Park, R.D. Minard, T.H. Jones, T.C. Baker and J.H. Tumlinson. 2008. Differences in cuticular lipid composition of the antennae of *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, and *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 54: 1385-1391.
- Cuvillier-Hot, V., M. Cobb, C. Malosse and C. Peeters. 2001. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. *J. Chem. Ecol.* 47: 485-493.
- Darrouzet, E., S. Lebreton, N. Gouix, A. Wipf and A.G. Bagnères. 2010. Parasitoids modify their oviposition behavior according to the sexual origin of conspecific cuticular hydrocarbon traces. *J. Chem. Ecol.* 36: 1092-1100.
- Everaerts, C., J-P. Farine, M. Cobb and J-F. Ferveur. 2010. *Drosophila* cuticular hydrocarbons revisited: Mating status alters cuticular profiles. *PLoS ONE* 5(3): e9607. doi:10.1371/journal.pone.0009607.
- Fan, Y., D. Eliyahu and C. Schal. 2008. Cuticular hydrocarbons as maternal provisions in embryos and nymphs of the cockroach *Blattella germanica*. *J. Exp. Biol.* 211: 548-554.
- Gamboa, G.J. 2004. Kin recognition in eusocial wasps. *Ann. Zool. Fennici* 41: 789-808.
- Gibbs, A.G., F. Fukuzato and L.M. Matzkin. 2003. Evolution of water conservation mechanisms in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* 206: 1183-1192.
- Han, J.M., H. Kim, E.J. Lim, S. Lee, Y.J. Kwon and S. Cho. 2008. *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Fulgoridae: Aphaeninae), finally, but suddenly arrived in Korea. *Entomol. Res.* 38: 281-286.
- Hefetz, A., J. Tengő, G. Lübke and W. Francke. 1993. Inter-colonial and intra-colonial variation in Dufour's gland secretion in the bumblebee species *Bombus hypnorum* (Hymenoptera: Apidae). pp. 469-480. *In Advances in life sciences. Sensory Systems of Arthropods*, eds. by K. Weise, F.G. Gribakin, and G. Renninger. pp. 469-480. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Howard, R.W., C.A. McDaniel, D.R. Nelson, G.J. Blomquist, L.T. Gelbaum and L.H. Zalkow. 1982. Cuticular hydrocarbons of *Reticulitermes virginicus* (Banks) and their role as potential species- and caste-recognition cues. *J. Chem. Ecol.* 8: 1227-1239.
- Howard, R.W. 1993. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. pp.179-226. *In Insectlipids:chemistry, biochemistry and biology* eds. D.W. Stanley-Samuels and D.R. Nelson, University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska.
- Haverty, M.I., L.J. Nelson and M. Page. 1990. Cuticular hydrocarbons of four populations of *Coptotermes formosanus* shiraki in the united states similarities and origins of introductions. *J. Chem. Ecol.* 16: 1635-1647.
- Jurenka, R.A. and M. Subchev. 2000. Identification of cuticular hydrocarbons and the alkene precursor to the pheromone in hemolymph of the female gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. insect Biochem. Physiol.* 43: 108-115.
- Kaib, M., P. Jmhasly, L. Wilfert, W. Durka, S. Franke, W. Francke, R.H. Leuthold and R. Brandl. 2004. Cuticular hydrocarbons and aggression in the termite *Macrotermes subhyalinus*. *J. Chem. Ecol.* 30: 365-385.
- Kather, R., F.P. Drijfhout and S.J. Martin. 2011. Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Chem. Ecol.* DOI 10.1007/s10886-011-9909-4.
- Kim, J.S., M.K. Kim, J.H. Han, C.M. Yoon, K.S. Choi, S.C. Shin and G.H. Kim. 2006. Possible presence of pheromone in mating behavior of the pine sawyer *Monochamus saltuarius* Gebler (Coleoptera:Cerambycidae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 9: 347-352.
- Kim, Y.K., D.R. Philips, T. Chao and L. Ehrman. 2004. Developmental isolation and subsequent adult behavior of *Drosophila paulistorum*. VI. Quantitative variation in cuticular hydrocarbon. *Behavior Genetics* 34: 385-394.

- Lee, C.J., J.Y. Shen, S.C. Park and J.H. Shim. 2003. Chemical analysis of cuticular hydrocarbons in *Apis mellifera* L. and *Apis ceranea* F. Korean J. Appl. Entomol. 42: 9-13.
- Lee, J.E., S.R. Moon, H.G. Ahn, S.R. Cho, J.O. Yang, C.M. Yoon and G.H. Kim. 2009. Feeding behavior of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and response on feeding stimulants of some plants. Korean J. Appl. Entomol. 48: 467-477.
- Lee, J.E., E.H. Kim, C.M. Yoon and G.H. Kim. 2010. Comparison of cuticular hydrocarbons of the pine sawyer (*Monochamus saltuarius*), Japanese pine sawyer (*Monochamus alternatus*) and oak longicorn beetle (*Moechotypa diphysis*). Korean J. Appl. Entomol. 49: 211-218.
- Martin, S. and F. Drijfhout. 2009. A review of ant cuticular hydrocarbons. J. Chem. Ecol. 35: 1151-1161.
- Nelson, D.R. 1993. Methyl-branched lipids in insects. pp. 271-315. In *Insect lipids: Chemistry, biochemistry and biology*, eds. by D.W. Stanley-samuelson and D.R. Nelson. University of Nebraska Press, Lincoln, Nebraska.
- Nelson, D.R. and L.D. Charlet. 2003. Cuticular hydrocarbons of the sunflower beetle, *Zygotogramma exclamationis*. Comp. Biochem. Physiol. B 135: 273-284.
- Lommelen, E., Johnson, C.A., Drijfhout, F.P., Billen, J., Wenseleers, T. and B. Gobin. 2006. Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the ant *Gnamptogenys striatula*. J. Chem. Ecol. 32: 2023-2034.
- Lucas, C., D.B., Pho, J.M. Jallon and D. Fresneau. 2005. Role of cuticular hydrocarbons in the chemical recognition between ant species in the *Pachycondyla villosa* species complex. J. Insect Physiol. 51: 1148-1157.
- Nunes, T.M., I.C.C. Turatti, S. Mateus, F.S. Nascimento, N.P. Lopes and R. Zucchi. 2009. Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. Gen. Mol. Res. 2: 589-595.
- Page, M., L.J. Nelson, G.J. Blomquist and S.J. Seybold. 1997. Cuticular hydrocarbons as chemotaxonomic characters of pine engraver beetles (*Ips* spp.) in the grandicollis subgeneric group. J. Chem. Ecol. 23: 1053-1099.
- Park, J.D., M.Y. Kim, S.G. Lee, S.C. Shin, J.H. Kim and I.K. Park. 2009. Biological characteristics of *Lycorma delicatula* and the control effects of some insecticides. Korean J. Appl. Entomol. 48: 53-57.
- Saïd, I., G. Costagliola, I. Leoncini and C. Rivault. 2005a. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). J. Insect Physiol. 51: 995-1003.
- Saïd, I., C. Gaertner, M. Renou and C. Rivault. 2005b. Perception of cuticular hydrocarbons by the olfactory organs in *Periplaneta americana* (L.) (Insecta: Dicyoptera). J. Insect Physiol. 51: 1384-1389.
- Shin, Y.H., S.R. Moon, C.M. Yoon, K.S. Ahn and G.H. Kim. 2010. Insecticidal Activity of 26 insecticides against eggs and nymphs of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae). Korean J. Appl. Entomol. 14: 157-163.
- Smith, A.A., B. Hölldober and J. Liebig. 2009. Cuticular hydrocarbons reliably identify cheaters and allow enforcement of altruism in a social insect. Current Biol. 19: 78-81.
- Torres, C.W., M. Brandt and N.D. Tsutsui. 2007. The role of cuticular hydrocarbons as chemical cues for nestmate recognition in the invasive Argentine ant (*Linepithema humile*). Insect. Soc. 54: 363-373.
- Urech, R., G.W. Brown, C.J. Moore and P.E. Green. 2005. Cuticular hydrocarbons of buffalo fly, *Haematobia exigua*, and chemotaxonomic differentiation from horn fly, *H. irritans*. J. Chem. Ecol. 31: 2451-2461.
- Uva, P., J.-L. Clément and A.-G. Bagnères. 2004. Colonial and geographic variations in agonistic behavior, cuticular hydrocarbons and mtDNA of Italian populations of *Reticulitermes lucifugus* (Isoptera, Rhinotermitidae). Insect Soc. 51: 163-170.
- Wagner, D., M. Tissot, W. Cuevas and D.M. Gordon. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. J. Chem. Ecol. 26: 2245-2257.
- Yew, J.Y., R.B. Cody and E.A. Kravitz. 2008. Cuticular hydrocarbon analysis of an awake behaving fly using direct analysis in real-time time-of-flight mass spectrometry. PNAS 105(20): 7135-7140.
- Yusuf, A.A., C.W.W. Pirk, R.M. Crewe, P.G.N. Njagi, I. Gordon and B. Torto. 2010. Nestmate recognition and the role of cuticular hydrocarbons in the African termite raiding ant *Pachycondyla analis*. J. Chem. Ecol. 36: 441-448.
- Xiao, G. 1991. Forest insect of China, forest research institute. 1361pp. Chinese Academy of Forestry, Beijing.