

파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 곤충병원세균류 배양액의 곤충면역억제활성 및 비티 생물농약과 혼합효과

김지민 · Madanagopal Nalini · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 식물의학 전공

(2008년 1월 7일 접수, 2008년 3월 5일 수리)

Immunosuppressive Activity of Cultured Broth of Entomopathogenic Bacteria on the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, and Their Mixture Effects with Bt Biopesticide on Insecticidal Pathogenicity

Kim, Jeamin, Madanagopal Nalini and Yonggyun Kim*

Major in Plant Medicine, School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Abstract

Entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus nematophila*, *X. sp.* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*) isolated from entomopathogenic nematodes express potent insecticidal activity in insect hemocoel. They are also known to suppress insect immune mediation by inhibiting phospholipase A₂, leading to host immunosuppression. This study analyzed effects of their cultured broths on inhibiting insect immunosuppression. For this, we removed all bacterial cells using 0.2 μ m pore sized membrane from the bacteria-cultured broth. All three sterilized cultured media, in dose-dependent manners, significantly inhibited hemocyte-spreading behavior of 5th instar larvae of *Spodoptera exigua*. However, they showed differential inhibitory activities among different bacterial species, in which *X. nematophila* showed the most potent inhibitory activity. This immunosuppressive effect was applied to increase the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt). All three bacterial cultured broths including bacterial cells significantly potentiated Bt pathogenicity against young *S. exigua* larvae when each of them was orally administered in a mixture of low dose of Bt. Finally, we tested the effect of oral administration of the cultured media containing the immunosuppressive compound(s) secreted by the bacteria. The membrane-sterilized cultured broths were mixed with the low dose of Bt and then orally administered to the young *S. exigua*. Only the cultured medium of *X. nematophila* showed increase of Bt pathogenicity. These results indicated that the cultured media of the three bacteria possessed immunosuppressive factor(s), which may act to potentiate Bt toxicity to young *S. exigua* larvae.

Key words *Bacillus thuringiensis*, entomopathogenic bacteria, immune, *Photorhabdus temperata temperata*, *Spodoptera exigua*, *Xenorhabdus nematophila*

서론

곤충병원세균인 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*에 속한 종

들은 운동성이 있는 그람음성균으로 장내세균과(Enterobacteriaceae)에 분류된다(Akhurst, 1980). 이들은 최근 해충에 유용한 방제인자로서 주목받고 있는 곤충병원선충인 Steinernematidae와 Heterorhabditidae의 두 과에 각각 공생하는 생활사를 보이게 된다(Kaya와 Gaugler, 1993). 이들 선

*연락처 : Tel. +82-54-820-5638, Fax. +82-54-823-1628
E-mail: hosanna@andong.ac.kr

충은 비록 상이한 발생 기원을 가지고 있지만, 이들이 보이는 기생 생활사는 수렴진화의 과정을 통해 유사한 패턴을 보이는 것으로 추정하고 있다(Adams와 Nguyen, 2002). 즉, 운동성이 있는 감염태 선충이 기주를 찾게 되면, 기주곤충의 개구부인 입, 항문 및 기문 등을 통해 체내로 들어오고 이후 표피세포층을 뚫고 곤충 혈강으로 들어가게 된다. 혈강에 침입한 감염태 선충은 자신의 특이적 장내 공생세균(Steinernematidae의 경우는 *Xenorhabdus* 종, Heterorhabditidae의 경우는 *Photorhabdus* 종)을 곤충 혈강으로 내보내게 된다(Forst 등, 1997). 혈강으로 나온 세균은 자신과 선충기주를 보호하기 위해 곤충의 면역을 억제시키게 된다(Park과 Kim, 2000). 면역기능이 억제된 곤충기주 체내에서 세균 증식이 이뤄지면서 세균으로부터 나오는 독소단백질과 더불어 기주곤충의 패혈증을 유발하여 치사시키게 된다(Dunphy와 Webster, 1984, 1991; French-Constant 등, 2005). 이때 치사된 곤충의 체내에는 대부분 선충 유래 곤충병원선충으로 단일세포균을 형성하면서 이들이 분비하는 소화효소 작용으로 곤충 조직의 소화를 촉진시키고, 외부로부터 타 미생물체의 감염을 억제하기 위해 다양한 항생제가 분비되어 선충기주가 증식에 최적의 환경을 갖추도록 한다(Boemare, 2002).

이들 병원세균에 의한 면역억제 기작은 곤충의 세포성 면역와 체액성 면역반응 모두를 겨냥하는 것으로 밝혀지고 있다(Ji와 Kim, 2004; Kim 등, 2005). 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 경우 세균이나 선충 침입에 대해서 혈구 포식작용, 소낭형성 및 피낭형성의 세포성 면역반응을 발현하는 것으로 확인되었다(Park과 Kim, 2007; Shrestha와 Kim, 2007a). 또한 파밤나방은 체액성 면역반응으로 라이소자임이나 세크로핀과 같은 항생단백질이 세균 침입에 대해서 발현되었다(Bae와 Kim, 2003; Ji와 Kim, 2004). 일련의 곤충 면역반응은 외래인자에 대한 인식과 더불어 이에 대한 국부호르몬에 의한 면역신호 중개반응이 궁극적으로 세포성 및 체액성 면역반응을 유기시키게 된다(Gillespie 등, 1997). 이러한 면역중개인자로서 널리 알려진 것이 탄소수 20개의 산화지방산인 아이코사노이드류이다(Stanley, 2000). 세포막 주성분인 인지질로부터 이 분자의 글리세롤 골격의 두 번째 탄소에 붙어 있는 불포화지방산인 아라키도닉산(20:4n-6)을 PLA₂의 *sn*-2 촉매반응을 통해 유리시킨다(Dennis, 1994, 1997). 이후 다양한 산화효소(cyclooxygenase, lipoxygenase 및 epoxygenase)의 작용에 따라 서로 다른 아이코사노이드류를 형성하게 된다(Stanley, 2006). 아이코사노이드류는 세균은 물론이고 진균 및 원생동물에 이르기까지 다양한 병원체의 침입에 대해서 면역 중개 역할을 담당하게 된다(Lord 등, 2002; Garcia 등,

2004). 최근에는 바이러스 침입에 대해서도 아이코사노이드류는 면역중개 역할을 하는 것으로 보고되었으며, 이는 바이러스 침입에 대한 방어기작으로서 페놀옥시다제(phenoloxidase: PO)의 활성이 중요성을 갖는다는 측면에서 이해되고 있다(Büyükgüzel 등, 2007). PO와 아이코사노이드류의 기능적 상관성이 파밤나방을 비롯한 일부 곤충류에서 보고되었다(Park과 Kim, 2003). 즉, 불활성 상태의 페놀옥시다제 전구물질인 proPO가 PO로 활성화되는 과정에서 여러 종류의 serine proteases가 관여하게 된다(Shrestha와 Kim, 2007b). 이 과정에서 아이코사노이드류 가운데 프로스타글란딘류가 혈구의 편도세포가 함유하고 있는 proPO를 세포붕괴과정을 통해 혈장으로 방출되게 하고, 이후 serine proteases에 의해 PO로 활성화된다는 아이코사노이드류의 중개 기능이 밝혀졌다(Shrestha와 Kim, 2008). 활성화된 PO는 다양한 세포성 면역반응을 일으키는 데 이용되게 된다.

곤충의 면역작용은 미생물제제의 살충효과 제고에 걸림돌이 된다. 즉, 곤충의 면역작용을 억제시킬 수 있다면, 이러한 생물제제의 효과를 극대화할 수 있다. 유약호르몬이 파밤나방을 포함한 나비목 곤충의 세포성면역 반응을 억제시킨다는 보고가 있다(Clark 등, 2005; Nalini 등, 2007). 유약호르몬 동력제인 피리프록시펜을 처리한 파밤나방은 *Bacillus thuringiensis*(Bt) 미생물제제에 대해서 훨씬 감수성이 증가하는 것으로 보고되었다(Kwon과 Kim, 2007). 또한 PLA₂ 억제자로 알려진 benzylideneacetone을 처리한 결과 파밤나방의 Bt에 대한 감수성이 높아졌다(Kwon과 Kim, 2008). 이상의 결과를 종합하면, 곤충면역억제 인자와 미생물제 혼합 처리에 따라 보다 효과적 미생물제제의 개발이 기대될 수 있다는 것을 제시하고 있다.

이들 곤충병원세균이 곤충의 혈강에서 높은 살충효과를 보이지만, 이들 세균을 단독으로 섭식 처리할 경우 장내에서 혈강으로 전달이 이뤄지지 않아 살충효과를 거의 보여주지 않았다. 그럼으로 이들 세균을 이용한 생물농약개발을 위해서는 환경에 안정한 세균 제제화 기술 개발이 이뤄져야 하며, 또한 곤충병원선충 이외에 혈강으로 전달하여 주는 대체 전달인자가 필요하다. 먼저 이들 세균이 살충(또는 면역억제) 성분을 합성하여 배양액속으로 분비한다면 또한 이 분비된 물질이 환경에 비교적 안정하다면 세균 보다는 이들 세균의 배양액을 응용하는 것이 이들 세균의 생물농약 산업화로 응용하는 데 높은 가능성을 열어 줄 수 있겠다. 또한 섭식을 통해 장내로 들어온 이들 살충성분을 혈강으로 전달할 인자로서 선충 대신에 Bt를 혈강전달 인자로 선정하여 이에 대한 협력효과를 기대해 볼 수 있다. 이러한 가설들 위에 본 연구는 국내

에서 알려진 곤충병원선충에서 분리된 세 곤충병원세균(*X. nematophila*, *X. sp.*, and *P. temperata* subsp. *temperata*)의 배양액이 이들 세균이 보이는 면역억제활성을 보유하는지를 분석하였으며, Bt와 이들을 혼합 처리하여 살충력 제고를 기대할 수 있는지를 확인하였다.

재료 및 방법

파밤나방 사육 및 곤충병원세균 배양

유충을 1994년 안동시에 소재한 파(*Allium fistulosum* L.) 재배지에서 채집한 후 실내에서 인공사료(고 등, 1991)를 먹이로 누대 사육하였다. 사육 배양기의 조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 h(L:D) 이었다. 성충의 먹이로 10%의 설탕물을 산란상자에 공급하였다.

곤충병원세균은 모두 세 종으로 *X. nematophila* K1 (Xn), *X. sp.* 및 *P. temperata* subsp. *temperata*(Ptt)를 각각 국내 채집 선충종인 *S. carpocapsae*, *S. monticolum* 그리고 *H. megidis*에서 분리하여 동결보관하였던 것을 TSA(tryptic soy agar, Difco, USA) 배지에서 배양하였다.

혈림프 추출

L-cysteine.HCl(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 항응고완충용액을 Tris 완충용액(TBS)으로 준비하였다. TBS는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100 mM dextrose, 5 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl의 농도로 조제하였고, 사용하기 직전에 5 ml 당 4 mg의 L-cysteine.HCl을 첨가하였다. 혈림프 추출을 위해 4령충 배추좀나방의 표면을 70% 에탄올로 세척한 후 멸균된 칼로 흉부 다리를 제거하면서 스며나오는 혈림프를 멸균된 차가운(0°C) 파라필름 표면에 모았다. 배추좀나방 10마리로부터 모아진 혈림프에 100 μl 항응고완충용액을 첨가하여 혈구활착행동 분석에 사용하였다.

혈구활착행동분석

혈구단일층을 형성시키기 위해 상기에 기술된 항응고완충용액에 들어있는 혈구시료 50 μl 를 슬라이드글라스에 지름 약 1 cm의 원형으로 도포하였다. 이를 23°C 의 포화습도 용기에 20분 동안 방치하였다. 이후 상층액을 제거시킨 후 다시 50 μl 의 처리용액으로 혈구단일층에 첨가하였고, 45분간 혈구활착반응을 유도하였다. 혈구활착은 40배 배율의 위상차현미경(BX41, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 혈구활착은 혈구세포로부터 성장된 허족(pseudopodia)의 유무에 따라

판정하였다(Fig. 1).

생물검정

생물농약 Bt는 (주)고려바이오(한국)로부터 지원받았다. 제품 성분은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로서 32,000 IU/mg의 활성을 보유하였다. 처리의 종류는 Bt 단독 또는 다른 세 종류의 병원세균과의 각각의 혼합 처리를 포함하였다. 이들 병원세균은 TSB(tryptic soy broth)에서 16시간 배양시킨 것으로 모두 10^7 cfu(colony-forming unit)/ml의 세균밀도가 되도록 멸균수로 조정하였다. 여기에 Bt는 50 ppm이 되도록 첨가하여 혼합처리액을 조제하였다. Bt 단독 처리는 멸균수에 Bt를 현탁시켜 조제하였다. 무약제처리는 멸균수에 침지한 배추잎을 이용하였다.

배양액 처리효과는 세 종류의 병원세균 배양용액을 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 얻어진 상층액을 0.2 μm 막필터(Acrodisc[®] Syringe Filters, Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 세균을 제거한 여과액을 이용하였다.

약제 처리는 엽침지법으로 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ (가로×세로) 크기의 배추잎을 약제 처리용액에 약 3분간 침지한 후 여과지 위에서 2-3분간 과잉 약액을 제거시켰다. 이를 새로운 여과지가 깔려있는 직경 8.5 cm의 사육용기에 놓고 파밤나방 2령충을 접종하였다. 유충을 접종할 때는 직접 처리 배추잎에 올려놓지 않고 주변 여과지에 올려놓음으로 과수분에 따른 비약제 처리 효과를 줄이고, 최대한 유충의 섭식에 의한 처리효과만 기대하게 했다. 각 사육용기에 10마리씩 접종하였으며, 이 사육용기가 실험단위로 3반복 처리하였다.

유충의 살충 유무는 24시간 간격으로 조사하였다. 이때 치사 유충은 외부 자극에 대해서 능동적 반응 움직임이 없는 개체로 규정하였다.

통계처리

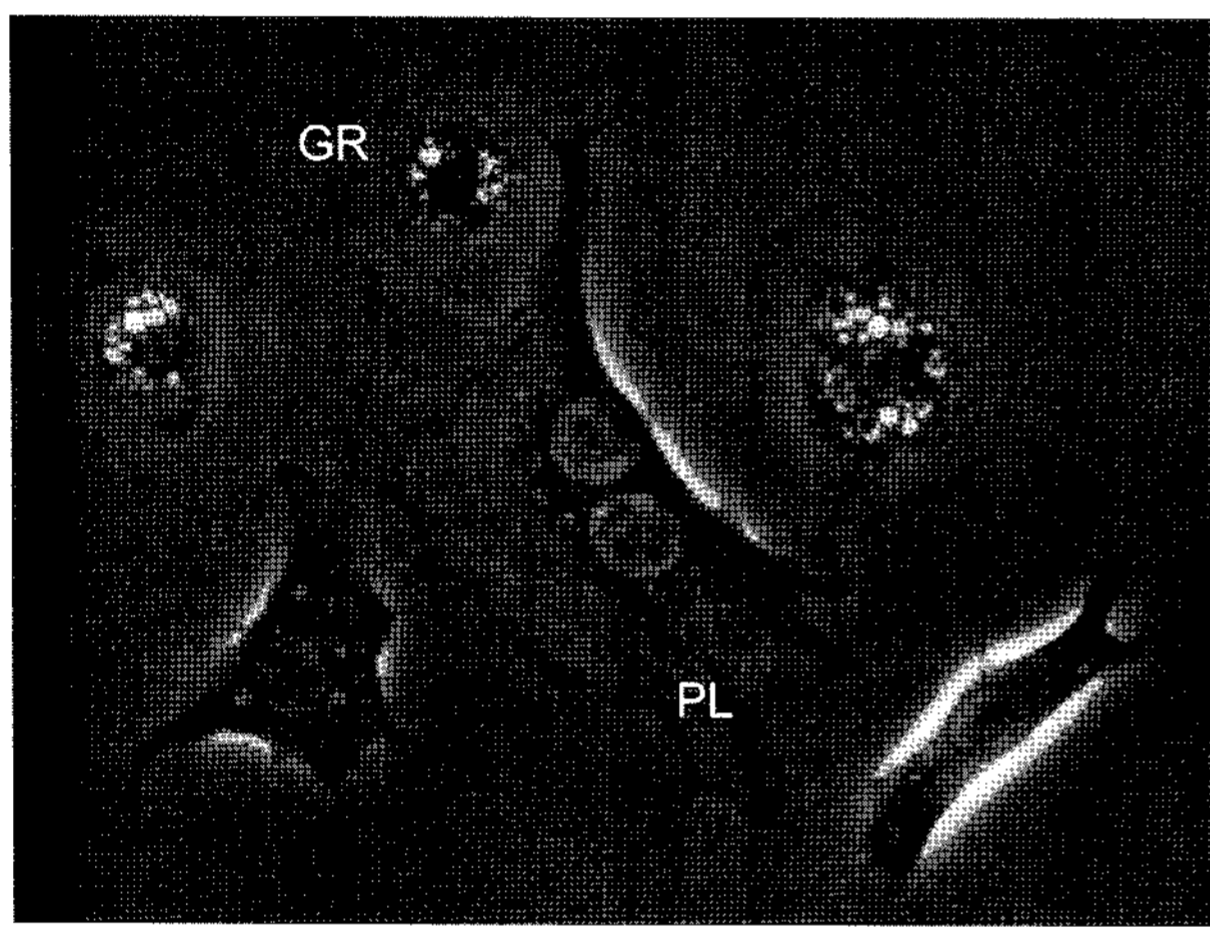
모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM(SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 반수치사시간(median lethal time: LT₅₀)은 probit 분석법(Raymond, 1985)을 이용하여 산출하였다.

결 과

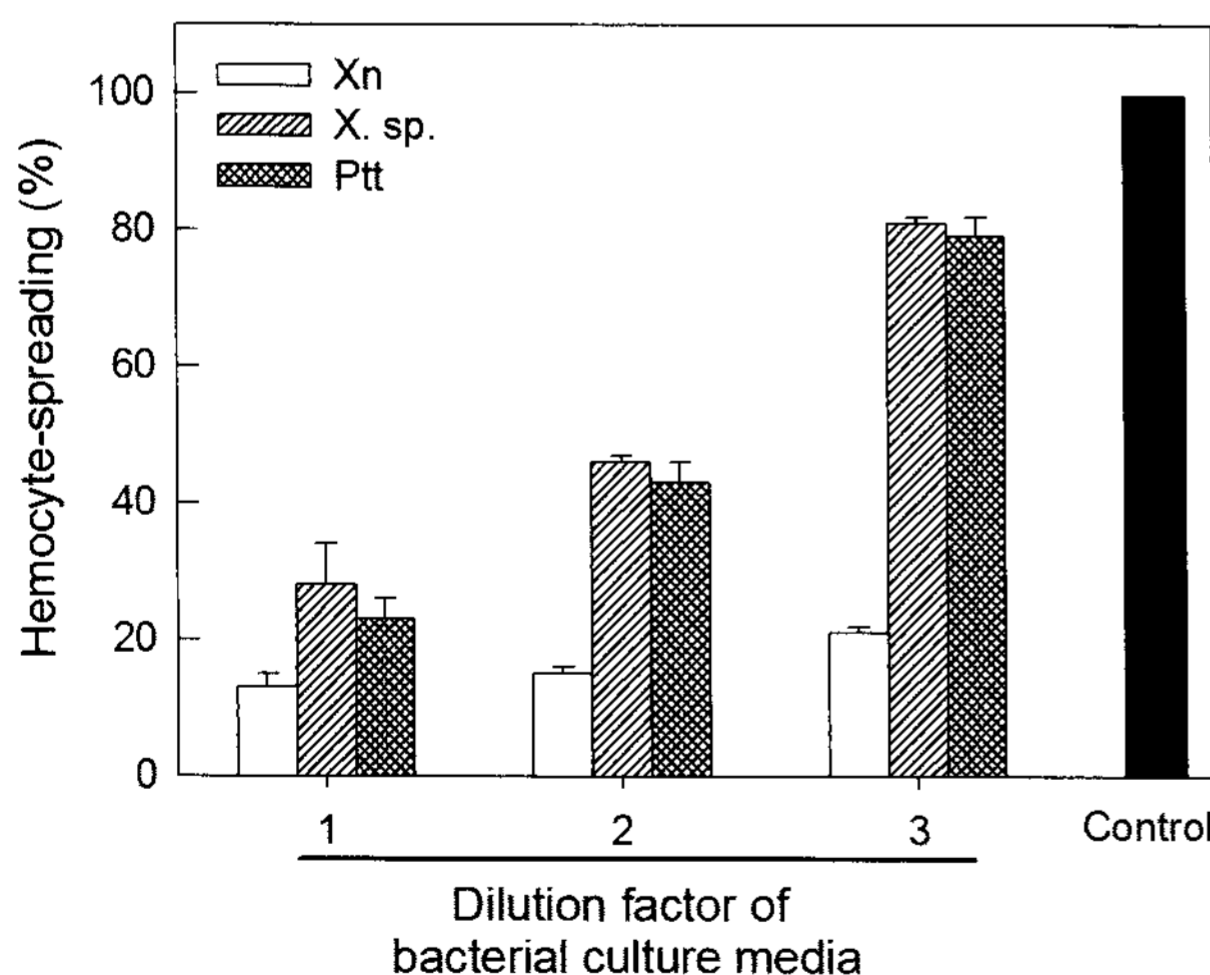
곤충병원세균의 세포성면역억제효과

Xn, *X. sp.* 및 Ptt와 같은 곤충병원세균은 면역중개물질의

합성을 억제하여 대상 곤충의 면역억제를 유도하며, 이는 치사의 직접적 요인이 되는 패혈증을 유발시키게 된다고 보고하였다(Kim 등, 2005). 본 연구에서는 이 세균들의 배양액을 멸균 처리한 후 파밤나방 5령충의 혈구에 대해서 혈구활착현상을 분석하였다(Fig. 1). 파밤나방 혈구의 80% 이상은 과립혈구와 부정형혈구로 구성되었다. 이들은 유리글라스면에 활착하는 모습에서 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 1A). 이러한 혈구의 활착 현상은 세균배양액을 처리한 결과 처리 배양액 농도에 따라 뚜렷하게 억제되었다($F = 407.76$; $df = 2, 18$; $P < 0.0001$)(Fig. 1B). 세 가지 배양액 가운데 Xn의 억



(A)



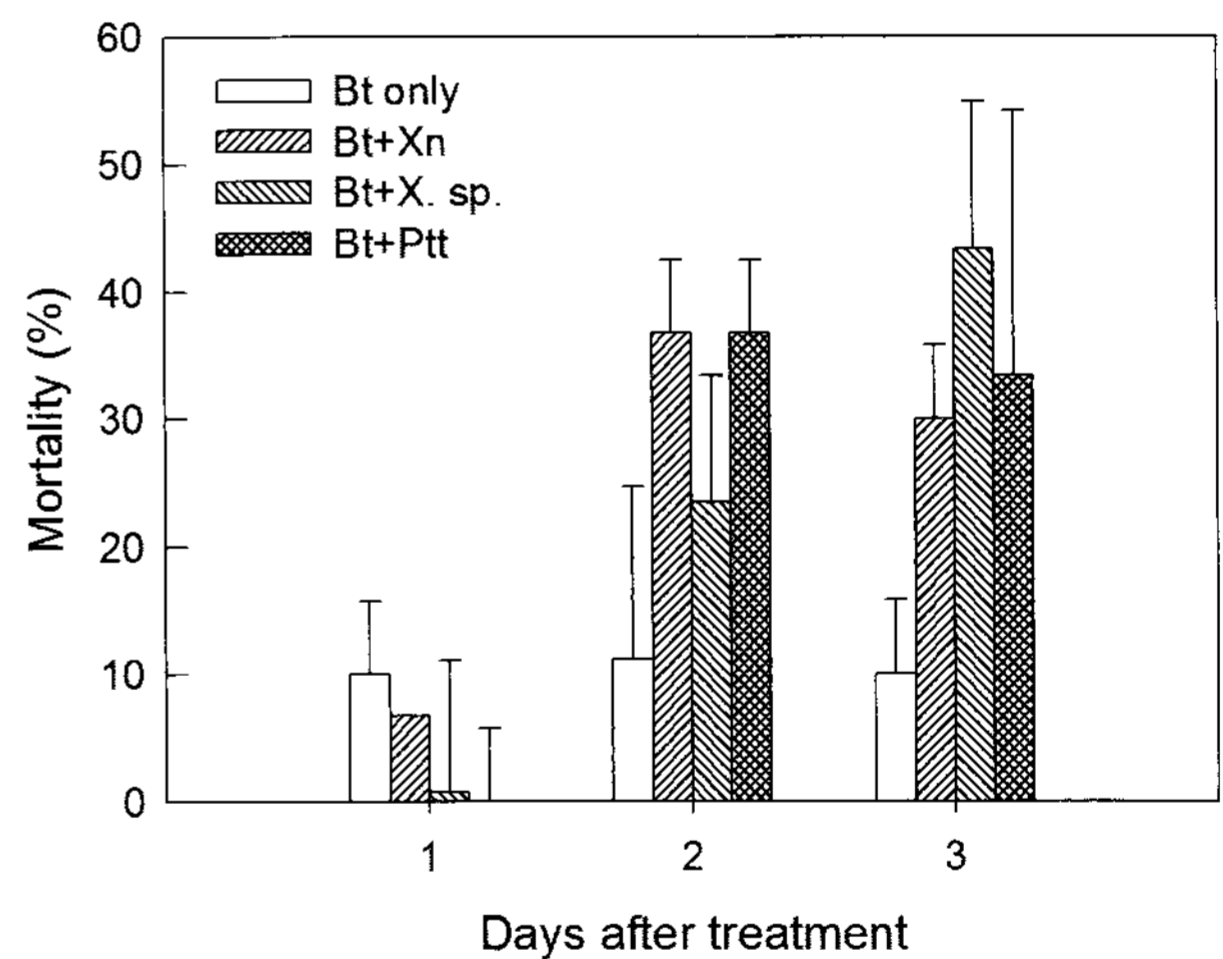
(B)

Fig. 1. Effect of entomopathogenic bacteria on hemocyte-spreading behavior of fifth instar *Spodoptera exigua*. (A) Photo showing hemocyte-spreading of granular cells ('GR') and plasmatocyte ('PL') at 400 x magnification. (B) Inhibitory effect of serially diluted culture broth excluding bacteria on the hemocyte-spreading behavior. Each treatment was replicated three times.

제효과가 모든 처리 농도에서 다른 두 세균의 배양액에 비해 뚜렷하게 높았다($F = 397.24$; $df = 2, 18$; $P < 0.0001$).

곤충병원세균의 Bt 살충성 제고 효과

면역억제효과를 가진 이들 세균이 Bt와 혼합하여 섭식 살충효과를 유발할 수 있는지 분석하였다(Fig. 2). 여기서 Xn, X. sp. 그리고 Ptt 단독으로는 섭식 살충효과를 보이지 않았다. 이들 병원세균들의 Bt와 협력 효과를 조사하기 위해 Bt를 낮은 농도(5 ppm)로 처리하였다. 이 낮은 농도의 Bt 단독효과는 조사된 3일 동안 낮은 살충 효과를 보였다. 즉, 이 농도의 Bt는 파밤나방 2령충에 뚜렷한 병원성을 주지 못하는 것으로 나타났다. 그러나, 이 낮은 농도의 Bt에 Xn, X. sp. 또는 Ptt를 혼합시켜 처리한 결과 살충력에 뚜렷한 증가가 일어났다($F = 7.24$; $df = 11, 20$; $P < 0.0001$). 이러한 혼합효과는 처리 2일후에 일어났으나, 이후 더 이상 살충력 증가는 보이지 않았다.



Treatment	N	LT ₅₀ (95% CI), days	Slope	X ² (df=1)	P
Bt only	30	-	-0.32±0.82	0.0221	0.1181
Bt+Xn	30	4.34 (2.81-113.22)	1.98±0.81	3.2308	0.9277
Bt+X. sp.	30	3.13 (2.63-4.73)	4.58±1.28	0.9192	0.6623
Bt+Ptt	30	3.57 (2.80-7.56)	3.61±1.11	2.6017	0.8932

Fig. 2. Effect of entomopathogenic bacteria on pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) against second instar larvae of *Spodoptera exigua*. Bt used 5 ppm. Mixture treatment was prepared by adding Bt to other bacterial suspension containing 10⁷ cfu/ml, in which a final Bt concentration should be 5 ppm. Xn, X. sp., and Ptt represent *Xenorhabdus nematophila*, *Xenorhabdus* sp., and *Photorhabdus temperata temperata*, respectively. Median lethal time (LT₅₀) of Bt only treatment could not be estimated due to its low mortalities.

곤충병원세균 배양액의 Bt 살충성 제고 효과

세균배양액의 혈구활착억제 효과는 파밤나방의 면역억제 효과를 유발시킬 수 있다는 것을 의미하고, 면역억제는 Bt의 병원력을 높일 수 있다고 보고되었다(Kwon과 Kim, 2006). 이러한 가설 하에 세균배양액과 Bt를 혼합하여 파밤나방에 섭식 처리하였다(Fig. 3). 이때도 낮은 농도(5 ppm)의 Bt를 이용하였으며, 파밤나방에 처리후 3일이 경과하는 동안 불과 약 10%의 살충력만을 나타냈다. 그러나 여기에 곤충병원세균 배양액을 혼합하여 처리한 결과 이들 세균배양액 처리에 따른 뚜렷한 Bt 살충력 변화를 보였다($F = 5.89$; $df = 3, 8$; $P = 0.0201$). 이러한 배양액 효과를 분석하여 보면, 세균 배양액별로 Bt 살충력 변화를 주는 데 차이가 있었다. 즉, X. sp. 또는 Ptt는 Bt 살충력을 상승시키지 못한 반면, Xn 배양액을 혼합하면 Bt 살충력이 유의성있게 크게 증가되었다.

고 찰

본 연구에서 분석된 곤충병원세균은 파밤나방 5령충의 혈강에 주입할 때 모두 높은 살충력을 보였다(Ji 등, 2004a; Kang 등, 2004). 특별히 Xn의 경우 불과 100마리의 세균수

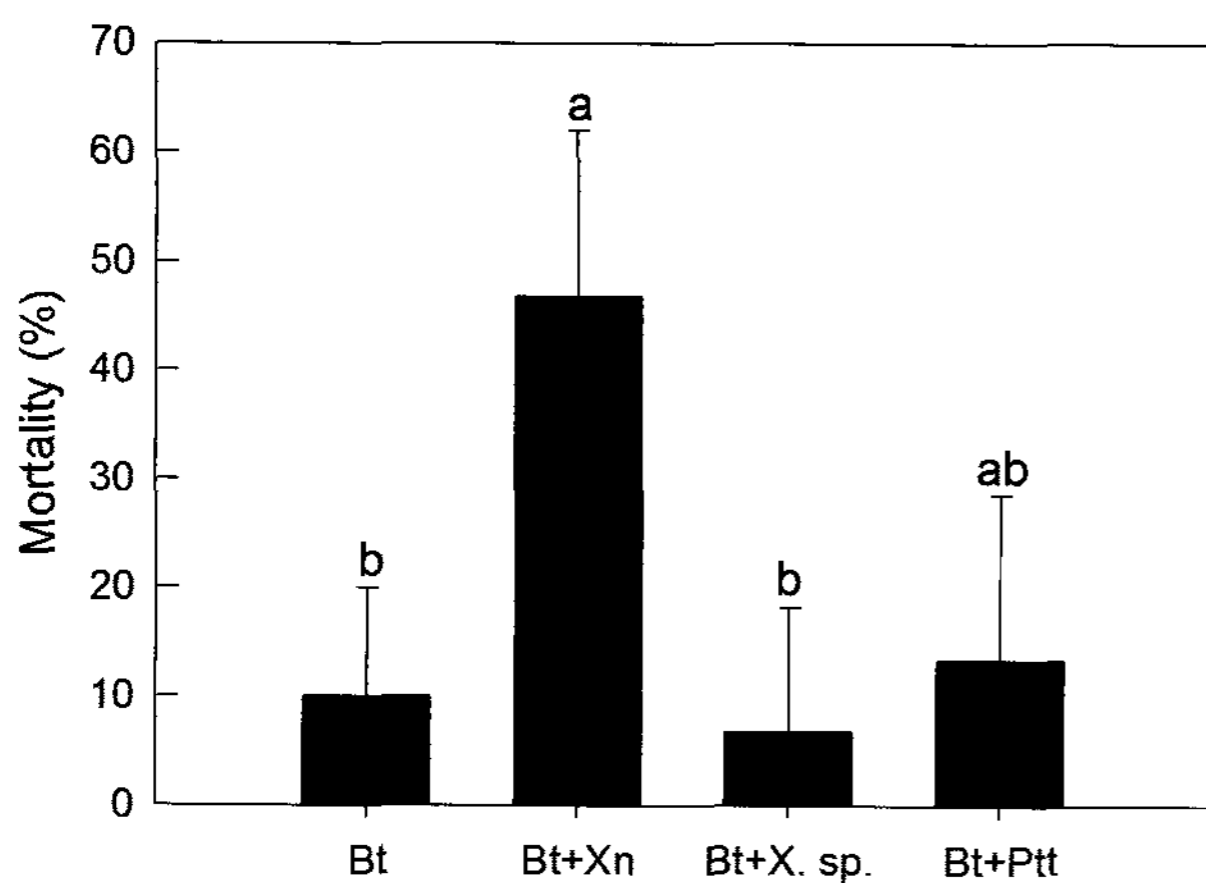


Fig. 3. Effect of sterilized cultured broth of entomopathogenic bacteria on pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) against second instar larvae of *Spodoptera exigua*. Bt used 5 ppm. The sterilized cultured broth was prepared by eliminating bacterial cells from the overnight cultured broth. Mixture treatment was prepared by adding Bt to the sterilized culture broth, in which a final Bt concentration should be 5 ppm. Xn, X. sp., and Ptt represent *Xenorhabdus nematophila*, *Xenorhabdus* sp., and *Photorhabdus temperata temperata*, respectively. Mortality was measured at 3 days after the feeding treatment. Each treatment consisted of three replications, each of which used 10 larvae. Different letters on the standard deviation indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

주입 결과 16시간 이내에 100% 살충효과를 보였다(Park과 Kim, 2000). 그러나 높은 살충 효과에도 불구하고 Bt와 같이 생물농약으로 응용하는 데는 세균 자체의 생물적 한계를 가지고 있다. 즉, 이들 세균들은 모두 그람음성의 장내세균류로서 Bt와 달리 내생포자를 형성하지 않기 때문에 환경에 노출될 경우 이내 생존력을 잃게 된다. 본 연구실에서 건조에 대한 이들 세균의 내성을 분석한 결과, 일단 세균이 건조 환경에 들어가면 수분내에 치사하게 되는 것을 확인하였다. 그렇다면, 이들 세균을 응용할 가능성은 세균의 생존력을 높여주는 이상적 제제화 기술 개발이 이뤄져야 한다. 다른 방도로서 이 세균들이 분비한 다양한 곤충치사물질이 포함되어 있을 것으로 여겨지는 세균 배양액을 응용하는 방향을 선택할 수 있다. 본 연구는 후자의 가능성을 조사하였다.

세 종류의 세균 배양액은 모두 파밤나방의 면역작용을 억제하는 물질을 포함했다. 또한 이러한 면역억제효과는 배양액내 면역억제물질의 농도에 따라 차등이 있다는 것이 이들 배양액의 희석 분석에서 나타났다. 이들 세 세균 종들 가운데 Xn이 가장 높은 면역억제를 보였다. Kim 등(2005)은 곤충병원선충과 공생하는 두 세균 종류인 *Xenorhabdus*나 *Photorhabdus* 모두 곤충의 면역중개물질인 아이코사노이드류의 생합성을 억제하여 곤충의 면역억제를 유도한다고 밝혔다. 또한 *X. nematophila*의 배양액에서 *benzylideneacetone*이라는 화학물질이 구조 동정되었으며(Ji 등, 2004b), 이 물질이 곤충의 면역을 억제하며 Bt의 살충력을 높여줄 수 있다고 보고하였다(Kwon과 Kim, 2008).

곤충병원선충 유래 곤충병원세균들의 Bt와 상승효과는 Bt의 기작적 측면에서 이해될 수 있다. Bt는 포자형성기에 균체내에 δ -내독소라는 독소단백질을 생성한다(Hoffmann 등, 1988; Van Rie 등, 1989). δ -내독소의 작용기작은 이 독소단백질이 곤충의 장내 알칼리성 소화액(pH 10 이상)에서 용해되고 여기에 단백질 분해효소의 작용에 의해 활성화되면서 비롯된다. 활성화된 독소단백질은 중장세포 막 수용체(120 kDa aminopeptidase-N 또는 210 kDa cadherin 유사체)에 부착되고 세포막의 투과성을 변화시켜 중장세포를 파괴하게 한다(Gahan 등, 2001; Gill과 Ellar, 2002; Rajagopal 등, 2002). 이러한 Bt의 중장세포 독성은 중장 내강과 혈강을 이어주는 결과를 초래하고, 이에 따라 혼합 처리된 곤충병원세균이 혈강으로 침입하게 하여줄 수 있다. 이러한 가설은 실험적으로 증명되어, 혼합 처리 후 일정 섭식처리 시간 경과에 따라 혈강에서 Xn의 검출을 확인하였다(Jung과 Kim, 2006). 본 연구에서 혼합처리 한 결과 2일 후 이후에 Bt 단독에 비해 현격하게 높은 치사율을 보였고, 이 이후에는 치사율이 증가하지

않은 것은 기존의 관찰 자료를 미뤄 이들 곤충병원세균에 기인된 협력작용으로 해석할 수 있다. 반증하는 자료로서 붉은 균총을 형성하는 Ptt는 Bt와 처리후 치사체가 적색으로 변하는 것을 관찰하였다.

곤충병원세균의 배양액은 곤충면역억제효과를 보였다. 이러한 면역억제 효과는 세균에 따라 상이했으며, 이러한 차이는 배양액과 Bt의 혼합 처리에서도 연결되었다. 즉, 곤충면역억제물질이 배양액에 존재하였고, 곤충면역억제는 Bt의 살충력을 제고시켰다고 볼 수 있다. 미생물제제인 Bt에 대해 파밤나방의 혈구세포는 세포성면역반응을 보였다(Kwon과 Kim, 2008). 유약호르몬이 곤충의 세포성 면역을 억제키는 작용을 갖고 있다(Clark 등, 2005). 유약호르몬 동력제인 피리프록시펜을 처리한 경우 세포성면역반응이 억제되고, Bt에 대한 감수성이 높아지는 것을 밝혔다(배 등, 2007; Kwon과 Kim, 2007). 본 연구 결과에서 보여준 세균배양액의 세포성면역반응 억제효과는 Bt에 의해 형성된 중장내강과 혈강의 통로를 따라 혈강으로 이동된 세균배양액이 파밤나방의 면역반응을 억제시켰으며, 이는 Bt의 병원력 증가를 초래했을 것으로 사려된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 단기핵심기술사업으로부터 지원받아 수행되었다. MN은 교육부 2단계 BK21사업에서 지원받았다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Adams, B.J. and K.B. Nguyen (2002) Taxonomy and systematics. pp. 1~33, In *Entomopathogenic Nematology* (ed. R. Gaugler), CABI Publishing, New York.

Akhurst, R.J. (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121:303~309.

Bae, S. and Y. Kim (2003) Lysozyme of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: activity induction and cDNA structure. *Comp. Biochem. Physiol.* 135B:511~519.

Boemare, N. (2002) Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. pp. 35-56, In *Entomopathogenic Nematology* (ed. R. Gaugler), CABI Publishing, New York.

Büyükgüzel, E., H. Tunaz, D. Stanley and K. Büyükgüzel (2007)

Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. *J. Insect Physiol.* 53:99~105.

Clark, K.D., Y. Kim and M.R. Strand (2005) Plasmacyte sensitivity to plasmacyte spreading peptide (PSP) fluctuates with the larval molting cycle. *J. Insect Physiol.* 51:587~596.

Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269:13057~13060.

Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends. Biochem. Sci.* 22: 1~2.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster (1984) Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 30:883~889.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster (1991) Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 58:40~51.

French-Constant, R.H., N. Waterfield and P. Daborn (2005) Insecticidal toxins from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. pp. 239~253, In *Comprehensive Molecular Insect Science* (eds. L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill), Elsevier, New York.

Forst, S., B. Dowds, N. Boemare and E. Stackebrandt (1997) *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:47~72.

Gahan, L.J., F. Gould and D.G. Heckel (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857~860.

Garcia, E.S., E.M.M. Machado and P. Azambuja (2004) Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Insect Physiol.* 50:157~165.

Gill, M. and D. Ellar (2002) Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* 11:619~625.

Gillespie, J.P., M.R. Kanost and T. Trenczek (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42:611~643.

Hoffmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens and H. Van Mellaert (1988) Specificity of *Bacillus thuringiensis*-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844~7848.

Ji, D., Y. Yi and Y. Kim (2004a) 16S rDNA sequence and biochemical characters of a Korean isolate of *Xenorhabdus nematophila*. *J. Asia-Pacific Entomol.* 7:105~111.

Ji, D. and Y. Kim (2004) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm,

- Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 50:489~496.
- Ji, D., Y. Yi, G.H. Kang, Y.H. Choi, P. Kim, N.I. Baek and Y. Kim (2004b) Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 239:241~248.
- Jung, S. and Y. Kim (2006) Synergistic effect of *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control 39:201~209.
- Kang, S., S. Han and Y. Kim (2004) Identification of an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 7:331~337.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler (1993) Entomopathogenic nematodes. Annu. Rev. Entomol. 38:181~206.
- Kim, Y., D. Ji, S. Cho and Y. Park. 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A₂ to induce host immunodepression. J. Invertebr. Pathol. 89:258~264.
- Kwon, B. and Y. Kim (2008) Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. (In press).
- Kwon, S. and Y. Kim (2007) Immunosuppressive action of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, enhances pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). Biol. Control 42:72~76.
- Lord, J.C., S. Anderson and D.W. Stanley (2002) Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for lipoxygenase pathway. Arch. Insect Biochem. Physiol. 51:46~54.
- Nalini, M., Y. Lee and Y. Kim (2007) Pyriproxyfen inhibits hemocytic phagocytosis of the beet armyworm. *Spodoptera exigua*. Kor. J. Pesti. Sci. 11:164~170.
- Park, Y. and Y. Kim (2000) Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46:1469~1476.
- Park, Y. and Y. Kim (2003) *Xenorhabdus nematophilus* inhibits *p*-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA₂ of *Spodoptera exigua*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 54:134~142.
- Park, Y. and Y. Kim (2007) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, induces insect immunosuppression by inhibiting phospholipase A₂. J. Basic and Life Res. Sci. 7:31~37.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra and R.K. Bhatnagar (2002) Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA established its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. J. Biol. Chem. 277:46849~46851.
- Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol. 22:117~121.
- SAS Institute, Inc. (1989) SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Shrestha, S. and Y. Kim (2007a) An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A₂. J. Invertebr. Pathol. 96:64~70.
- Shrestha, S. and Y. Kim (2007b) Factors affecting the activation of hemolymph prophenoloxidase of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Asia-Pacific Entomol. 10:131~135.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. Insect Biochem. Mol. Physiol. 38:99~112.
- Stanley, D. (2000) Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton University Press, New Jersey.
- Stanley, D. (2006) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. Annu. Rev. Entomol. 51:25~44.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele and H. Van Mellaert (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis*-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem. 186:239~247.
- 고현관, 이상계, 이비파, 최귀문, 김정화 (1991) 인공사료에 의한 파밤나방의 대량사육법. 한응곤지 29:180~183.
- 배수일, 권성진, 김용균 (2007) 유약호르몬 동력제 pyriproxyfen의 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 혈구세포 활착행동에 대한 억제 효과. 자연자원연구 7:48~53.

파밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 곤충병원세균류 배양액의 곤충면역억제 및 비티 생물농약과 혼합효과

김지민 · Madanagopal Nalini · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 식물의학 전공

요 약 곤충병원선충으로부터 분리된 곤충병원세균들(*Xenorhabdus nematophila*, *X. sp.* and *Photorhabdus temerata* subsp. *temperata*)은 곤충혈강에서 높은 살충효과를 보유하고 있다. 이들 세균들은 또한 phospholipase A₂ 효소 작용을 억제하여 면역중개반응을 무력화하여 곤충기주의 면역억제를 유도하게 한다. 본 연구는 이들 세균이 성장된 배양액이 이러한 면역억제 활성을 보유하는 지를 분석하였다. 이를 위해 0.2 μm 공극 크기의 여과막을 이용하여 세균배양액으로부터 세균을 제거시켰다. 이렇게 멸균된 세균배양액은 배양액 농도에 따라 뚜렷하게 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 5령충의 혈구세포 활착행동을 억제시켰다. 또한 이러한 억제효과는 세균별로 차등을 보였으며, 이 가운데 *X. nematophila*의 배양액이 가장 높았다. 이 세균의 면역억제 활성 성질을 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 감염력 제고에 적용하였다. 세 세균 모두의 배양액(세균 포함)들은 낮은 농도의 Bt와 혼합하여 섭식 처리할 경우 어린 파밤나방 유충에 대해서 뚜렷하게 Bt 감염력을 제고시켰다. 다시 이 세균을 제거한 멸균된 배양액을 낮은 Bt 농도 처리와 혼합하여 섭식 처리하였다. 이때 *X. nematophila*의 배양액만이 Bt의 감염력을 제고시켰다. 본 연구는 이들 세 곤충병원세균의 배양액에 곤충의 면역억제물질이 포함되었음을 보였으며, 이들 물질을 Bt와 혼용하였을 때 Bt의 살충력을 제고시킬 수 있음을 나타냈다.

색인어 비티, 곤충병원세균, 면역, *Photorhabdus temerata temperata*, 파밤나방, *Xenorhabdus nematophila*
