

배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대한 두 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila* K1과 *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ANU101) 배양물질의 Bt 병원성 제고 효과

서삼열 · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부 식물의학전공

Two Entomopathogenic Bacteria, *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ANU101 Secrete Factors Enhancing Bt Pathogenicity against the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*

Samyel Seo and Yonggyun Kim*

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

ABSTRACT : Two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, are known to be potent against the diamondback moth, *Plutella xylostella*, when the bacteria are injected into the hemocoel. This study investigated any pathogenic effect of their culture broth on *P. xylostella* by oral administration. Only culture broth of both bacterial species did not give enough pathogenic effects by the oral administration. However, when the culture broth was orally treated together with *Bacillus thuringiensis* (Bt), both cell-free culture broth significantly enhanced Bt pathogenicity against the 3rd instar larvae of *P. xylostella*. The culture broth was then fractionated into hexane, ethyl acetate, and aqueous extracts. Most synergistic effect on Bt pathogenicity was found in ethyl acetate extracts of both bacterial species. Thin layer chromatography of these extracts clearly showed that ethyl acetate extracts of both bacterial culture broths possessed metabolites that were different to those of hexane and aqueous extracts. These results suggest that the both entomopathogenic bacteria produce and secrete different factors to give significant synergistic effect on Bt pathogenicity.

KEY WORDS : *Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, *Plutella xylostella*, Bt, Pathogenicity, Immunity

초 록 : *Xenorhabdus nematophila* (Xn)와 *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt)의 곤충병원세균을 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 혈강에 주입할 경우 높은 병원력을 보였다. 본 연구는 이들 세균 배양액의 섭식 처리에 따른 배추좀나방에 대한 병원성 유기를 조사하였다. 세균 배양액만을 이용하여 배추좀나방 3령충에 섭식 처리한 결과 뚜렷한 병원성을 유발하지 못하였으나, *Bacillus thuringiensis* (Bt)와 혼합 처리하였을 때 높은 Bt 병원성 제고 효과를 나타냈다. 물질 추적을 위해서 이 세균 배양액을 유기 용매를 이용하여 hexane, 에틸아세테이트 및 수용액 추출 분획구로 분리하였

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

다. 대부분이 Bt 상승효과는 에틸아세테이트 추출 분획구에서 나타났다. Thin layer chromatography 분석 결과는 에틸아세테이트 분획구가 대사물질을 포함하고 있으며, 이들이 핵산 또는 수용액 추출 분획구에 포함된 물질과는 상이하다는 것을 나타냈다. 이러한 결과는 이들 곤충병원세균이 Bt 병원성을 제고시키는 물질을 생산하고 배양액으로 분비한다고 제시하고 있다.

검색어 : 곤충병원세균, 배추좀나방, 비터, 감염력, 면역

곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)와 *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt)는 국내에서 채집된 *Steinernema carpocapsae*와 *Heterorhabditis megidis*의 곤충병원선충에서 각각 분리되었다(Park *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004). 이들 세균은 각 선충 기주의 장내에 서식하면서 종 특이적 공생 생활환을 보인다(Kaya and Gaugler, 1993). 즉 기주인 곤충병원선충이 대상 곤충의 개구부인 입, 항문 및 기관지를 통해 체내 혈강으로 침입하게 되고, 자신의 장내 공생세균을 배출하게 된다(Forst *et al.*, 1997). 곤충 혈강으로 나온 공생세균은 대상곤충의 면역 반응을 억제시켜 세균 자신과 기주선충을 보호하며 병원성을 발휘하게 된다(Dunphy and Webster, 1984, 1991; Park and Kim, 2000).

곤충의 면역반응은 척추동물의 선천성 면역반응의 모습을 갖추고 있고, 이는 다시 세포성 면역반응과 체액성 면역반응으로 나뉘게 된다(Beckage, 2008). 세포성 면역반응은 혈구세포에 의한 면역작용으로 소형 이물질에 대해서는 식균작용 또는 소낭형성작용을 발휘하게 되고, 비교적 대형 이물질에 대해서는 피낭형성작용을 나타내게 된다(Lavine and Strand, 2002). 반면에 체액성 면역반응은 주로 항생단백질에 의한 항균작용과 산화효소인 페놀옥시다아제에 의해 촉매되는 멜라닌 형성 반응을 포함한다(Jiang and Kanost, 2000; Haine *et al.*, 2008).

곤충의 면역반응은 외래인식으로부터 면역반응을 유도하기 위해 일련의 면역중개 반응을 거치게 된다(Gillespie *et al.*, 1997). 다양한 면역 중개 물질이 보고되었지만, 이 가운데 아이코사노이드가 다양한 병원체에 대해 곤충의 면역반응을 중개하는 것으로 알려지고 있다(Stanley, 2006). 아이코사노이드는 탄소수 20개의 아라키도닉산으로부터 일련의 산화 반응을 통해

얻어진 물질로서 대부분 벤젠고리를 갖는 프로스타글란딘류와 긴 사슬 형태의 류코트리엔류가 곤충에서 보고되었다(Stanley, 2000). 따라서 아이코사노이드의 생합성에는 인지질로부터 아라키도닉산의 유리 과정을 촉매하는 phospholipase A₂ (PLA₂)의 작용에서 기인하게 된다(Dennis, 1994, 1997).

두 곤충병원세균인 Xn과 Ptt는 모두 곤충의 PLA₂를 억제시켜 대상 곤충의 면역반응을 억제하게 된다(Kim *et al.*, 2005). 또한 Xn의 경우 이 세균이 생산하는 면역억제물질이 세균배양액으로 분비된다고 알려졌다(Park and Kim, 2003, 2007). 면역반응이 억제된 대상 곤충은 병원미생물에 대한 감염성이 높아지게 된다. 본 연구는 이들 두 종류의 곤충병원세균의 배양액이 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대한 *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 감염력을 제고시키는지 조사하였다. 또한 두 병원세균에서 분비되는 물질을 추적하기 위해 이들 배양을 분리하여, 분획구별로 면역 억제 기능을 분석하고 이들 분획구에 포함된 화학물질 존재를 thin layer chromatography (TLC)를 이용하여 규명하였다.

재료 및 방법

배추좀나방 사육

시험곤충은 안동시 송천동에 소재한 배추밭에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 실내에서 누대 사육한 것을 사용하였다. 유충은 온도 25±1℃, 광주기 16:8h (L:D), 상대습도 40~60%의 배양기에서 배추를 먹이로 사육했다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 배추 잎으로 산란을 유도하였다.

세균배양

곤충병원세균인 *X. nematophila* K1과 *P. temperata temperata* ANU101은 각각 기주 선충에서 분리된 후 (Park et al., 1999; Kang et al., 2004) 동결보관중인 것을 이용하였다. 이들 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지를 이용하여 28°C에서 12시간동안 배양하여 단일 균층을 채취하였다. 채취된 단일 균층을 3 ml의 LB 액체배지를 이용하여 28°C에서 16시간 동안 200 rpm의 속도로 회전 배양한 후, 글리세롤을 30%의 농도가 되도록 첨가한 후 동결 분획시료를 만들었다. 이 동결시료가 추후 반복되는 세균 배양의 원시료로 이용되어 계대배양에 따른 세균 변이 가능성을 줄였다. 글리세롤 동결 세균시료 250 µl를 1 L의 LB 액체배지에 첨가하고 28°C에서 48시간 동안 200 rpm의 속도로 회전 배양하였다. 이 배양액이 생물검정과 물질분리에 이용되었다.

생물 검정

생물농약 Bt는 (주)고려바이오(Hwasung, Korea)로부터 지원받았다. 제품 성분은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*로서 32,000 IU/mg의 활성을 보유하고 있다. LB 배지에서 배양된 곤충병원세균 용액 또는 배양액 추출물에 Bt가 5 ppm (160 IU/ml)이 되도록 첨가하였다. 유기용매 추출액의 희석은 dimethyl sulfoxide (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 다시 증류수를 이용하여 희석 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액에 배추잎(1 cm²)을 10분간 침지시킨 후 여과가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5분간 건조시켰다. 각 배추잎에 배추좀나방 3령충을 10마리씩 3반복으로 처리하였으며, 매일 24시간 주기로 5일 동안 생존수를 계수하였다. 대조구는 Bt 단독 또는 살균수로 상기와 동일하게 처리하였다.

배양액 물질 분리

LB 액체배지에서 48 시간 배양된 1 L의 용액을 5,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 상층액을 분별 깔때기(2 L, Horex, Siheung, Korea)에 수집했다. 핵산 추출은 이 배양액에 330 ml씩 3회 반복하여 실시하였다. 매 반복 배양액과 핵산(Sigma) 용매의 혼합을 10분간 유도하였으며, 층 분리는 중력을 이용하여 25°C

에서 5시간 동안 실시하였다. 추출된 핵산층(990 ml)은 서로 혼합하였으며, 남은 배양액은 다시 에틸아세테이트(Sigma) 추출에 이용되었다. 에틸아세테이트 추출도 마찬가지로 상기의 방법으로 330 ml씩 3회 실시되었다. 추출된 두 유기용매 층은 회전농축기(Ayala, Tokyo, Japan)를 이용하여 37±1°C에서 3시간 동안 150 rpm 속도의 조건에서 각각 5 ml로 농축되었다.

TLC

세균배양액으로부터 유기용매를 이용하여 준비된 핵산 분획구, 에틸아세테이트 분획구 및 남은 배양액 수용액 층으로 추출된 물질들을 TLC로 분리하였다. TLC 판(Merck, Darmstadt, Germany)에 분획구 물질(200 µl)을 각각 처리한 후 isopropanol:H₂O (9:1, v/v)의 전개제를 이용하여 물질 분리를 실시하였다. 전개 용액이 정점에 이르면, TLC 판을 자외선 투영기(Spectroline, New York, USA)를 통하여 분리 띠를 확인한 후, sea sand (Junsei, Tokyo, Japan)와 iodine (Duksan, Ansan, Korea) 혼합물(19:1, g/g) 100 g이 담겨진 병에서 발색시켰다.

통계처리

모든 살충효과 시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 반수치사약량(median lethal concentration: LC₅₀)은 probit 분석법(Raymond, 1985)을 이용하여 산출하였다.

결 과

세균배양액의 Bt 병원력 상승효과

두 곤충병원세균 단독 효과를 알아보기 위해 이들 세균을 48시간동안 배양시킨 배양액(5 x 10⁷ cfu/ml)을 이용하여 배추좀나방 3령 유충에 대해 섭식 처리 효과를 분석했다(Fig. 1). 세균이 제거된 배양액은 단독으로 뚜렷한 살충효과를 나타내지 못했다. 동일하게 처리된 Bt 용액은 낮은 농도에서도 살충력을 발휘하였으며 반수치사약량이 약 7.5 ppm으로 산출되었다. 약 20%의 살충효과를 보이는 Bt 약량을 이용하여 Xn과

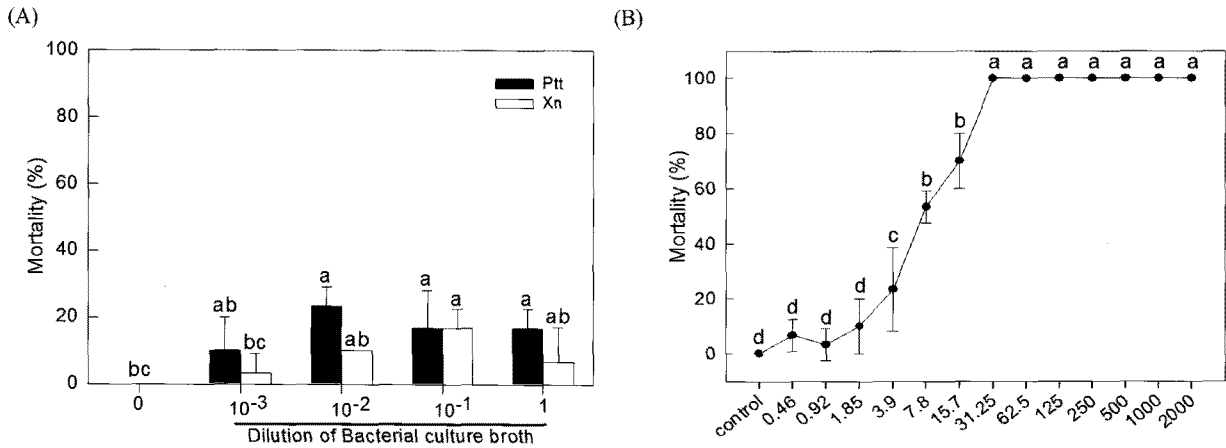


Fig. 1. Effect of oral administration of different entomopathogenic bacteria on 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*. (A) *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) were cultured at 28°C for 48 h, in which the culture broth contained 5x10⁷ bacterial cells/ml. The culture broth was diluted with sterile distilled water. Diet cabbage was dipped into the culture broth and was used to treat the larvae. (B) *Bacillus thuringiensis* (Bt, 32,000 IU/mg) was diluted with the sterile distilled water and used to treat the larvae with the method described above. Each dose treatment used 30 larvae with three replications. Mortality was estimated at 48 h after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at type I error = 0.05 (LSD test).

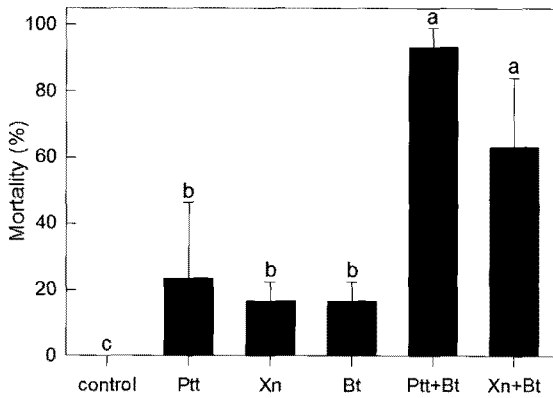


Fig. 2. Synergistic effect of either culture broth of entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) or *Xenorhabdus nematophila* (Xn) on pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) against 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*. Ptt and Xn were cultured at 28°C for 48 h, in which the culture broth contained 5x10⁷ bacterial cells/ml. Diet cabbage was dipped into the culture broth or the culture broth containing Bt in a dose of 5 ppm and was used to treat the larvae. Control represents cabbage soaking in water. Each dose treatment used 30 larvae with three replications. Mortality was estimated at 48 h after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at type I error = 0.05 (LSD test).

Ptt의 배양액의 Bt에 대한 협력 효과를 분석하였다 (Fig. 2). 위에서와 같이 다시 Xn과 Ptt는 단독으로 살충효과가 있었으나, 낮은 농도의 Bt와 혼합할 경우 뚜렷한 Bt 병원력 상승효과를 보였다.

세균배양액의 분리 및 Bt 병원력 상승효과

핵산과 에틸아세테이트를 이용하여 두 곤충병원세균 배양액으로부터 물질 추출을 실시하였고, 이 추출물들의 Bt 병원력 상승효과를 검정하였다(Fig. 3). 낮은 농도의 Bt와 혼합 처리하였을 때, 핵산과 에틸아세테이트의 두 물질 추출 분획구는 모두 병원력 상승효과를 지녔다. 그러나 이 Bt 병원력 상승효과는 핵산에 비해 에틸아세테이트 추출 분획구에서보다 높게 나타났다. 또한 에틸아세테이트의 Bt 병원력 상승효과는 이 추출물의 농도가 높아짐에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 농도에 따른 병원성 증가 경향은 두 세균 배양액 추출물 모두에서 유사하게 관찰되었다. 이 에틸아세테이트 추출물에 포함된 물질을 규명하기 위해 본 연구는 두 세균 추출물을 TLC로 분석하였다 (Fig. 4). 비교적 극성 전개용매에서 에틸아세테이트 추출물은 TLC상에서 이동한 반면에 핵산 추출물은 이동하지 않았다. Xn 유래 에틸아세테이트는 기존에 알려진(Ji *et al.*, 2004) benzylideneacetone (BZA), proline-tyrosine (PY) 및 acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)이 존재하는 것으로 본 TLC는 나타났다. 그러나 본 TLC 결과는 Xn의 주요 대사산물이 이들 세 물질이 아닌 것으로 나타났다. 반면에 Ptt 유래 에틸아세테이트 추출물은 Xn 유래 에틸아세테이트와 서로 다른 추출 물질 양상을 보였다.

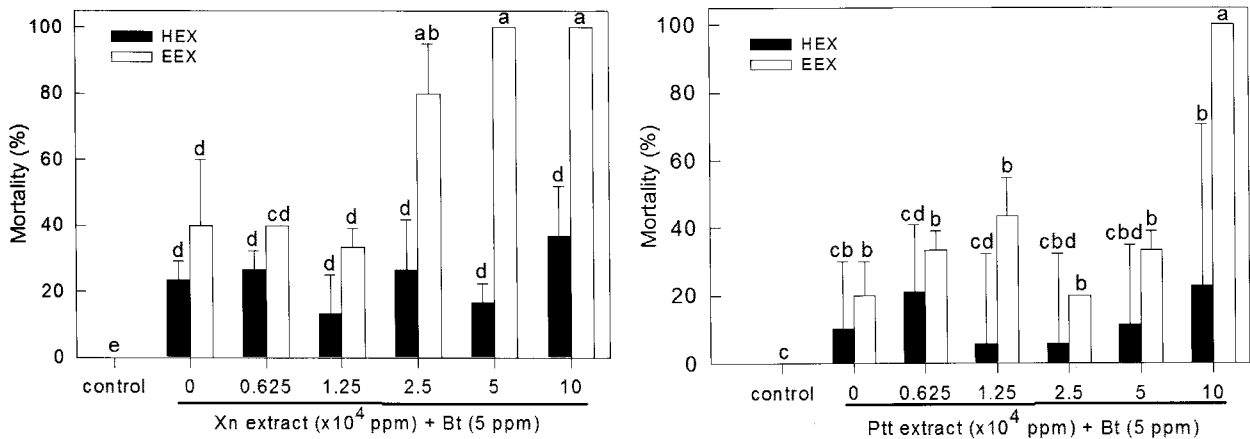


Fig. 3. Synergistic effect of organic extracts of bacterial culture broth on pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) against 2nd instar larvae of *Plutella xylostella*. *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) were cultured at 28°C for 48 h, in which the culture broth contained 5x10⁷ bacterial cells/ml. After removing bacterial cells by centrifugation at 7,000 rpm for 20 min, the supernatant was used for sequential extraction of organic materials with hexane (HEX) and ethyl acetate (EEX) as described in materials and methods. Diet cabbage was dipped into each extract or the extract containing Bt in a dose of 5 ppm and was used to treat the larvae. Control represents cabbage soaking in water. Each dose treatment used 30 larvae with three replications. Mortality was estimated at 48 h after the treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at type I error = 0.05 (LSD test).

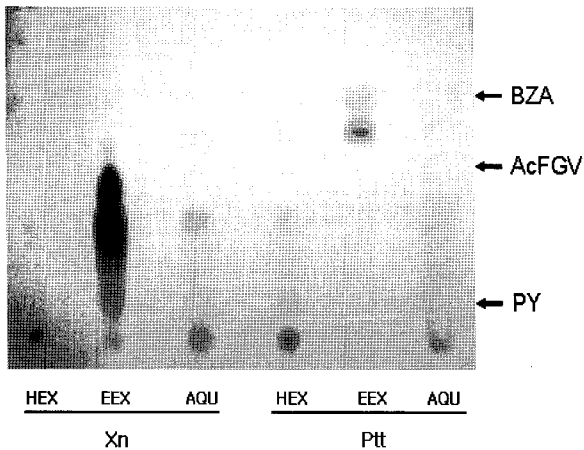


Fig. 4. Thin layer chromatogram of three extracts of two bacterial culture broth. *Photorhabdus temperata temperata* (Ptt) and *Xenorhabdus nematophila* (Xn) were cultured at 28°C for 48 h, in which the culture broth contained 5x10⁷ bacterial cells/ml. After removing bacterial cells by centrifugation at 7,000 rpm for 20 min, the supernatant was used for sequential extraction of organic materials with hexane (HEX) and ethyl acetate (EEX) as described in materials and methods. Remaining aqueous (AQU) phase was used for residual effect. The extract (200 µl) was loaded and developed on PLC plate (20 cm) with isopropanol:water (9:1, v/v). Spots were visualized with iodine vapor and compared with known materials: benzylideneacetone (BZA), proline-tyrosine (PY) and acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV).

고찰

본 연구 결과는 유용물질을 생산하고 분비할 것으로 여겨지는 두 곤충병원세균인 Xn과 Ptt가 Bt의 병원력을 뚜렷하게 제고시키는 것으로 나타났다. 즉 20% 이하의 낮은 병원력을 보였던 Bt 병원력이 이들 세균 배양액과 함께 처리하면 크게 살충력이 증가하였다. 예를 들어, Ptt 배양액과 Bt를 혼합한 경우 약 90% 이상의 살충력 상승효과를 나타냈다. 이러한 Bt 병원력 상승효과는 Xn과 Ptt 배양액 내에 있는 유기물질에 기인된 것으로, 이러한 물질이 에틸아세테이트 유기용매로 추출되었다. 기존의 연구를 토대로 Xn과 Ptt 배양액에 존재하는 물질이 어떻게 Bt의 병원력을 높이는 지에 대해서는 이들 세균이 갖는 면역억제효과를 통해 설명되어질 수 있다.

병원성이 높은 *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*에 속한 세균들을 이용해서 새로운 해충방제를 이용하려는 노력이 진행되고 있다(ffrench-Constant et al., 2005). 이들 세균들은 각각 종 특이적으로 기주선충의 소화관에 공생하면서 세균 단독으로는 곤충의 혈강으로 침입하는 것이 어려워 기주선충에 의한 침입 행동에 의존하게 된다(Forst et al., 1997). 곤충 혈강에 침입한 곤충병원선충은 주로 입을 통해 자신의 소화관에 있는 공생세균을 배출하게 된다(Silva et al., 2002). 이때

곤충은 세균과 선충을 퇴치하기 위해 세포성 및 체액성 면역 작용이 유도되게 된다. 곤충의 면역반응은 패턴인식단백질에 의한 외래 침입자를 인식하고, 이를 아이코사노이드를 이용하여 주변으로 인식 정보를 전달하면 체계적 면역반응이 일어나게 된다(Gillespie *et al.*, 1997). *Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*는 모두 곤충의 면역반응을 억제시킬 수 있는데, 이는 이들 세균이 곤충의 아이코사노이드의 생합성 반응을 억제하는데서 기인하는 것으로 알려지고 있다(Kim *et al.*, 2005). 곤충면역작용이 억제된 상황에서 세균은 생존하고 번식하게 된다. 이에 따른 패혈증은 궁극적으로 곤충을 치사시키고, 치사된 곤충체내에서 선충은 다시 증식하고 자신의 소화관에 공생세균을 다시 재구성한 후 타 기주체로 침입하게 된다.

에틸아세테이트 추출물질이 보인 Bt 병원력 상승효과는 이 추출물에 아이코사노이드 생합성 억제제가 포함되었을 것으로 추정된다. 이러한 추측은 실제로 Xn의 경우 에틸아세테이트 추출물에 BZA, PY 및 Ac-FGV가 포함되었다. 특별히 BZA는 아이코사노이드 활성 억제효과가 있어 Bt 병원력을 크게 증가시키는 것으로 알려졌다(Kwon and Kim, 2008). 그러나 Ptt 유래 에틸아세테이트 추출물에서는 이러한 물질이 포함되어 있지 않거나 또는 있어도 검출 한계보다 낮은 농도로 포함되었을 것으로 여겨진다. 오히려 Xn과 Ptt 유래 에틸아세테이트 추출물들은 이들 세 물질이외의 주요 물질을 포함하고 있는 것으로 TLC 결과는 보여주고 있다. 이들 물질에 대한 곤충생리 교란 기능이 밝혀질 필요가 있다.

Xn과 Ptt에 존재하는 면역억제 물질이 Bt의 병원력을 제고시켰다는 본 연구의 결과는 여러 연구에서 뒷받침하고 있다. Bt는 그람양성 세균으로 곤충 중장의 상피세포에 작용하는 내독소 단백질을 포함하는 내생 포자를 형성한다(Jenkins and Dean, 2000). 광범위한 Bt 사용은 해충들에게 Bt 저항성을 유발시켰다(Tabashnik *et al.*, 2000). 이러한 Bt 둔감성은 상피세포막에 존재하는 Bt 수용체의 구조 변화(Gahan *et al.*, 2001; Ferré and Van Rie, 2002), Bt 독소 단백질 가수분해력 저하(Oppert *et al.*, 1997) 그리고 손상된 상피세포들의 빠른 회복능력(Forcada *et al.*, 1999)을 포함한다. 여기에 Bt 감염력 저하는 곤충의 면역능력 상승에 따라 기인될 수 있어 실제로 낮은 농도의 Bt에 노출되면 혈림프의 멜라닌 형성반응과 같은 면역 반응이 증가하여 비롯될 수 있다(Rahman *et al.*, 2004). 실

제로 BZA 또는 유약호르몬과 같은 면역억제 물질이 배추좀나방에 대해서 Bt의 감염력을 상승시켰다(Kwon and Kim, 2007, 2008). 파밤나방의 경우 아이코사노이드 생합성과 멜라닌 반응을 일으키는 페놀옥시다아제 효소 반응과는 밀접한 관계성을 가지며, BZA의 경우 페놀옥시다아제 활성을 억제시키는 것으로 밝혀졌다(Kwon and Kim, 2008). 비록 페놀옥시다아제의 활성이 면역작용과 이 효과의 지속성에서 중요하지만, 역으로 페놀옥시다아제의 증가가 Bt에 대한 주요 저항성 기작으로 연결하기는 어렵다. 목화다래나방(*Pectinophora gossypiella*)의 경우 Bt 저항성과 감수성 사이에 페놀옥시다아제 활성 차이가 없는 것으로 나타나 이들의 관련성은 좀 더 복잡한 상위 활성화 단계에서 찾아보아야 할 것 같다(Gassmann *et al.*, 2009). 또한 면역 활성을 높게 유지하는 것은 곤충 자체에게 큰 에너지 소비이며 발육에 유리하지 않다는 보고가 나와 있다. 예를 들어, 귀뚜라미류인 *Gryllus campestris*의 경우 그람 음성 균의 외막 물질인 lipopolysaccharide를 처리한 경우 생리적 대사율의 지표인 전체 단백질 함량이 낮아지는 것을 보고하였다(Jacot *et al.*, 2005). 또한 *Mycobacterium marinum*에 감염된 초파리의 경우 에너지 소비 증상을 보여 비축해두었던 지방과 글리코젠을 소비하는 현상을 나타냈다(Dionne *et al.*, 2006). 면역신호과정인 Toll과 JAK을 항시 발현하는 돌연변이체 초파리는 체내 멜라닌종양을 만들고 수명이 짧아지는 것을 보였다(Harrison *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1998). 따라서 Bt에 대한 저항성을 보이는 곤충은 면역 활성화 단계에 있어서 일시에 크게 유기될 수 있다고 본다. 한 예로 척추동물의 후천성면역의 기억 작용과 유사하게 곤충에 있어서 제2차 감염에 따라 신속하게 면역작용이 일어나는 현상이 발견되었으며, 이러한 작용 원리가 미리 높은 농도의 불활성화 형태의 페놀옥시다아제를 이전 감염에서 비축해두었다가 제2차 감염 때 신속하게 많은 양으로 활성화된다고 설명하였다(Pham and Schneider, 2008). 따라서 본 연구에서 보여준 면역억제와 Bt 감수성 증가는 최종적으로 만들어진 면역작용 물질에 대한 억제 보다는 이를 활성화하는 단계인 아이코사노이드 합성효소인 PLA₂를 공략함에 따라 Bt에 대한 선천성 및 일부 후천적 기억 면역 저항 기작을 무력화한다는 의미로 받아들여야 한다.

이상의 연구결과는 Xn과 Ptt의 배양액에 면역억제 물질이 포함되었으며 이 물질이 배추좀나방의 아이코

사노이드 생합성에 주요한 PLA₂ 효소 반응을 억제시킬 가능성이 있는 것으로 제시된다. 추후 두 세균 배양액 에틸아세테이트 추출물을 중심으로 새로운 PLA₂ 면역교란 물질에 대한 화학동정이 필요하다.

사 사

본 연구는 2009년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받아 수행하였다. 본 연구의 물질 추출에 조언을 준 안동대 생명자원학부 김건우 교수님과 화학과 홍용표 교수님에게 각각 감사의 말씀을 드립니다.

Literature Cited

- Beckage, N.E. 2008. Insect immunology. 348 pp. Academic Press, New York.
- 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.
- Dionne, M.S., L.N. Pham, M. Shirasu-Hiza and D.S. Schneider. 2006. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. Curr. Biol. 16: 1977-1985.
- 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.
- Ferré, J. and J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 47: 501-533.
- 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. by L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill. Elsevier, New York.
- Forcada, C., E. Alcacer, M.D. Garcera, A. Tato and R. Martinez. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens* proteolytic and SEM study of the larval midgut. Arch. Insect Biochem. Physiol. 42: 51-63.
- 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.
- Gassmann, A.J., J.A. Fabrick, M.S. Sisterson, E.R. Hannon, S.P. Stock, Y. Carrieré and B.E. Rabashnik. 2009. Effects of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* on phenoloxidase activity and susceptibility to entomopathogenic nematodes. J. Econ. Entomol. 102: 1224-1232.
- Gillespie, J.P., M.R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- Haine, E.R., Y. Moret, M.T. Siva-Jothy and J. Rolff. 2008. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science 322: 1257-1259.
- Harrison, D.A., R. Binari, T.S. Nahreini, M. Gilman and N. Perrimon. 1995. Activation of a *Drosophila* Janus kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. EMBO J. 14: 2857-2865.
- Jacot, A., H. Scheuber, J. Kurtz and M.W. Brinkhof. 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets, *Gryllus campestris*. Proc. Biol. Sci. 272: 63-69.
- Jenkins, J.I. and D.H. Dean. 2000. Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. pp. 33-54. In Genetic engineering: principles and methods, eds. by K. Setlow. vol. 22, Plenum, New York.
- Ji, D., Y. Yi, G.H. Kang, Y.H. Choi, P. Kim, N.I. Baek and Y. Kim. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 239: 241-248.
- Jiang, H. and M.R. Kanost. 2000. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 95-105.
- Kang, S., S. Han and Y. Kim. 2004. Identification of an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, in Korea. J. Asia Pac. 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. 101: 36-41.
- 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.
- Lavine, M.D. and M.R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in cellular immune responses. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1237-1242.
- Luo, H., W.P. Hanratty and C.R. Dearolf. 1995. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. EMBO J. 14: 1412-1420.
- Oppert, B., K.J. Krammer, R.W. Beeman, D. Johnson and W.H. McGaughey. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Biol. Chem. 272: 23473-23476.
- Park, Y., Y. Kim and Y. Yi. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. J. Asia Pac. Entomol. 2: 105-111.
- 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.
- Pham, L.N. and D.S. Schneider. 2008. Evidence for specificity and memory in the insect innate immune response. pp. 97-127. In *Insect Immunology*, ed. by N.E. Beckage. 348 pp. Academic Press
- Qiu, P., P. Pan and S. Govind. 1998. A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125: 1909-1920.
- Rahman, M.M., H.L.S. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari and O. Schmidt. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth, *Ephesia kuehniella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2696-2699.
- 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.
- Silva, C.P., N.R. Waterfield, P.J. Daborn, P. Dean, T. Chilver, C.P. Au, S. Sharma, U. Potter, S.E. Reynolds and R.H. French-Constant. 2002. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell. Microbiol.* 6: 329-339.
- Stanley, D. 2000. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. 277 pp. Princeton University Press, New Jersey.
- Stanley, D. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 25-44.
- Tabashnik, B.E., R.T. Roush, E.D. Earle and A.M. Shelton. 2000. Resistance to Bt toxins. *Science* 287: 42.

(Received for publication August 6 2009;
revised September 18 2009; accepted September 21 2009)