

기생성 및 포식성 천적에 대한 작물보호제 '비티플러스'의 독성 평가

서삼열 · 고이구라 스리칸스 · 권기면¹ · 장신애² · 김용균*

안동대학교 생명자원과학과, ¹생물이용연구소, ²(주) 나비스, 문경

Toxicity Evaluation of 'Bt-Plus' on Parasitoid and Predatory Natural Enemies

Samyeol Seo, Koigoora Srikanth, Gimyon Kwon¹, Sinae Jang² and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 760-749, Korea,

¹BUI, Andong 1319-84, Korea,

²NABIS, Moonkyeong 538-1, Korea

ABSTRACT: Effect of a new crop protectant 'Bt-Plus' on natural enemies was analyzed in this study. Tested natural enemies included two parasitic species of *Aphidius colemani* and *Eretmocerus eremicus*, and four predatory species of *Harmonia axyridis*, *Orius laevigatus*, *Amblyseius swirskii*, and *Phytoseiulus persimilis*. 'Bt-Plus' was formulated by combination of three entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus nematophila* (Xn), *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt), *Bacillus thuringiensis* (Bt)) and bacterial metabolite (BM). All three types of 'Bt-Plus' showed significantly higher toxicities against fourth instar *Plutella xylostella* larvae than Bt single treatment. Two types of bacterial mixtures ('Xn+Bt' and 'Ptt+Bt') showed little toxicity to all natural enemies in both contact and oral feeding assays. However, 'BM+Bt' showed significant toxicities especially to two predatory mites of *A. swirskii* and *P. persimilis*. The acaricidal effects of different bacterial metabolites were evaluated against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. All six BM chemicals showed significant acaricidal effects. The BM mixture used to prepare 'Bt-Plus' showed a high acaricidal activity with a median lethal concentration at 218.7 ppm (95% confidence interval: 163.2 - 262.3). These toxic effects of bacterial metabolites were also proved by cytotoxicity test against Sf9 cells. Especially, benzylideneacetone, which was used as a main ingredient of 'BM+Bt', showed high cytotoxicity at its low micromolar concentration.

Key words: Biopesticide, Natural enemy, Toxicity test, 'Bt-Plus', *Plutella xylostella*

초록: 신작물보호제로 개발된 '비티플러스'의 천적에 대한 영향평가가 이뤄졌다. 분석된 천적은 두 종의 기생성 천적인 콜레마니진디벌(*Aphidius colemani*) 및 황은줄벌(*Eretmocerus eremicus*)과 네 종의 포식성 천적인 무당벌레(*Harmonia axyridis*), 애꽃노린재(*Orius laevigatus*), 지중헤이리응애(*Amblyseius swirskii*) 및 칠레이리응애(*Phytoseiulus persimilis*)를 포함했다. '비티플러스'는 세 가지 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila* (Xn), *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* (Ptt), *Bacillus thuringiensis* (Bt))과 세균 대사물질(BM)을 조합하여 개발되었다. 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 4령충에 대해서 세 종류의 '비티플러스'('Xn+Bt', 'Ptt+Bt' 그리고 'BM+Bt') 모두는 Bt 단독에 비해 높은 살충력을 나타냈다. '비티플러스'의 천적에 대한 영향에서 세균배양액 혼합체('Xn+Bt' 또는 'Ptt+Bt')는 접촉독성 및 섭식독성 분석에서 모두 독성이 낮은 것으로 나타났다. 그러나 'BM+Bt'는 일부 독성을 보였으며, 특별히 지중헤이리응애와 칠레이리응애에 대해서 높은 독성을 나타냈다. 이들 세균대사물질의 살비효과를 점박이응애(*Tetranychus urticae*)를 대상으로 분석하였다. 각 대사물질별로 상이한 살비력을 보인 가운데, '비티플러스'에 이용된 대사물질 복합체는 반수치사약량이 218.7 ppm(95% 신뢰구간: 163.2 - 262.3)으로 비교적 높은 살비효과를 나타냈다. 이들 물질의 독성은 Sf9 세포주에 대한 세포독성 분석을 통해 나타났다. 특별히 'BM+Bt' 제조에 사용된 주성분인 벤질리덴아세톤은 낮은 농도에서도 높은 세포독성을 보였다.

검색어: 생물농약, 천적, 독성평가, '비티플러스', 배추좀나방

상이한 작용점을 가지고 대상 곤충에 병원성을 발휘하는 두 종 이상의 병원 미생물을 혼합하여 상승적 살충 효과를 꾀하는 통합생물방제(integrated biological control: IBC) 기술이 고안되었다(Jung, 2006). 특별히 곤충의 증장세포를 파괴시킬 수 있는

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received January 6, 2012; Revised January 30, 2012

Accepted February 6, 2012

Bacillus thuringiensis(Bt) 세균과 이를 통해 혈강으로 침입하여 곤충면역반응을 억제시키는 *Xenorhabdus nematophila*(Xn) 또는 *Photorhabdus temperata temperata*(Ptt) 세균들의 혼합을 통해 효과적인 생물제제를 개발하고 이를 ‘비티플러스’라 명명하였다(Jung and Kim, 2006a,b, 2007; Kwon and Kim, 2008; Seo and Kim, 2011).

미생물농약 가운데 가장 널리 현용되고 있는 것이 Bt 약제이다. 그러나 Bt는 대상 해충 범위가 비교적 좁고, 화학농약에 비해 약효가 느리고 효과의 안정성이 높지 않아 보다 넓은 해충으로 사용 확대에 어려움을 보이고 있다(Aronson *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 2011). 또한 일부 주요 해충들이 야외에서 Bt 저항성을 획득하여 이 생물농약의 약효가 낮아지는 주 요인이 되고 있다(Tabashnik, 1994). 더불어 최근의 연구는 같은 집단 내에서 유충 영기가 진행함에 따라 Bt의 약효가 낮아진다는 보고가 나왔다. 즉, 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)을 대상으로 Bt를 처리할 경우 어린 유충기에는 방제 효과가 우수하지만, 종령에 이르면 Bt에 높은 내성을 보여 방제 효과가 크게 둔화되었다(Seo and Kim, 2011).

이러한 Bt에 대한 감수성 저하는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 첫째로, Bt 내독소와 대상 곤충의 중장 수용체의 결합능력 저하에 기인될 수 있다. Bt의 살충기작은 궁극적으로 대상 해충의 패혈증에 기인되지만, 이 세균이 혈강으로 들어가기 위해서는 내독소에 의한 곤충 중장세포를 파괴해야한다(Gill *et al.*, 1992). Bt 내독소에 대한 중장 파괴는 중장세포 막에 존재하는 cadherin 단백질, aminopeptidase-N(APN) 단백질 및 alkaline phosphatase(ALP) 단백질과 내독소단백질의 결합에 의존한다(Pigot and Ellar, 2007). 대상 곤충의 섭식 행동에 따라 중장에 도달한 Bt는 알칼리성 pH에서 Bt 내독소가 활성화된다. 이때 활성화된 Bt 내독소가 비교적 빈도가 높은 APN 또는 ALP에 결합하게 되고, 이에 따라 국부적으로 밀도가 높아진 내독소 단백질 사이에 중합체를 이루게 된다(Gómez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009). 이 내독소 중합체는 cadherin과 다시 결합하면서 중장세포막에 구멍을 형성할 수 있는 내독소 올리고결합체를 형성하게 된다(Gómez *et al.*, 2002; Atsumi *et al.*, 2008). 이 내독소 올리고결합체는 다시 glycosylphosphatidylinositol(GPI)에 연결된 ALP 또는 APN과 결합하고, GPI의 도움으로 중장세포막으로 침입하여 구멍을 형성하게 된다(Pardo-López *et al.*, 2006). 이러한 세포막 손상은 중장세포에 급격한 삼투압 변화를 일으켜 세포 붕괴가 일어나고 Bt 세균병이 유발되게 된다. Bt 내독소의 다른 살충 기작으로 내독소 단위체가 cadherin에 결합하게 되면 세포내 cAMP의 농도가 올라가고 이에 따라 protein kinase A 활성화 증가가 유발되고 궁극적으로 세포치사에 이르는 작용도 포함될 수 있다

(Zhang *et al.*, 2006). 따라서 Bt 살충기작은 대상 곤충의 중장세포막에 존재하는 수용체 단백질에 의존하기에 이들의 돌연변이는 Bt에 대한 저항성으로 이어질 수 있다(Heckel *et al.*, 2007).

둘째로, Bt 세균에 대한 곤충의 면역기작으로부터 이 세균에 대한 내성을 획득할 수 있다. 실제로 낮은 농도의 Bt 세균에 미리 노출되면 혈림프의 멜라닌 형성반응과 같은 면역 반응이 증가하여 Bt 감수성 저하로 이어진다(Rahman *et al.*, 2004). Bt 병원성과 곤충 면역작용 사이의 기능적 관계성은 면역억제 물질이 배추좀나방에 대해서 Bt의 감염력을 상승시키는 사실에서도 입증되었다(Kwon and Kim, 2007, 2008). 따라서 대상 곤충의 면역력은 Bt의 감수성 저하를 유도할 수 있는 인자로 간주할 수 있다.

Bt에 대한 감수성 저하에 대한 대처 방안으로 곤충면역억제 효과를 갖는 Xn 또는 Ptt 세균의 혼합처리가 유효했다(Jung and Kim, 2006a,b). Xn과 Ptt는 운동성이 있는 그람음성균으로 장내 세균에 속한다(Akhurst, 1980). 이들 세균류는 곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*와 *Heterorhabditis megidis*에 각각 공생하며 기주 선충과 함께 병원 생활사를 갖는다(Kaya and Gaugler, 1993). 이들 선충은 상이한 발생 기원을 가지지만, 수렴성 진화 과정을 통해 유사한 기생 생활환을 갖는 것으로 추정된다(Adams and Nguyen, 2002). 운동성이 있는 감염태 선충이 기주를 찾으면 개구부를 통해 체내로 침입하고 이후 표피세포층을 뚫고 혈강으로 침투하게 된다. 혈강으로 침입한 감염태 선충은 자신의 특이적 장내 공생세균(*S. carpocapsae*는 Xn와 *H. megidis*는 Ptt)을 곤충기주의 혈강으로 토해낸다(Forst *et al.*, 1997). 혈강으로 나온 공생세균은 자신과 선충기주를 보호하기 위해 대상 곤충의 면역을 억제시킨다(Park and Kim, 2000). 면역기능이 억제된 기주는 체내에서 세균증식이 이루어짐에 따라 공생세균으로부터 나오는 독소단백질과 더불어 기주 곤충의 패혈증을 유발하여 결국 곤충기주를 치사시킨다(Dunphy and Webster, 1991, 1994; French-Constant *et al.*, 2005).

‘비티플러스’는 Bt와 Xn 또는 Ptt의 최적 비율, 즉 최대 살충력을 보이는 두 세균 비율로 혼합되었다(Seo and Kim, 2011). 파밤나방과 배추좀나방 종령 유충을 대상으로 100% 방제 효과가 실내 및 야외 조건에서 나타났다(Seo and Kim, 2011). 이 혼합제제의 생산단가를 낮추는 세균 배양기술이 개발되었다(Seo and Kim, 2010). 특별히 Bt의 살충력을 높이는 물질들이 Xn과 Ptt 배양액에 존재하며(Seo and Kim, 2009), 이들의 화학적 동정이 이뤄졌다(Seo, 2012). 이러한 세균 대사물질은 benzylideneacetone(BZA), acetylated phenylalanine-glycine-valine(Ac-FGV), proline-tyrosine(PY), cyclo PY(cPY), indole, oxindole 및 *p*-hydroxyphenyl propionic acid(PHPP)로 화학 동정되었고, 이들의 공통점은 곤충 면역 증개물질인 아이코사노이드를 생합성하는 phospholipase

A₂(PLA₂)의 효소 활성을 억제한다(Seo, 2012). 또한 이들 물질은 곤충의 면역반응인 소낭형성 및 phenoloxidase(PO) 활성을 억제시켰다(Seo, 2012).

본 연구는 비티플러스를 작물보호제로 개발하기 위해서 이 생물제제에 포함되는 Xn과 Ptt 세균 배양액과 이들 대사물질이 기생성 및 포식성 천적류에 미치는 영향을 평가했다. 또한 이들 대사물질이 갖는 세포독성 작용도 곤충세포주를 이용하여 분석했다.

재료 및 방법

실험동물

실험 천적은 콜레마니진디벌(*Aphidius colemani*), 황온좀벌(*Eretmocerus eremicus*), 무당벌레(*Harmonia axyridis*), 애꽃노린재(*Orius laevigatus*), 칠레이리응애(*Phytoseiulus persimili*), 지중해이리응애(*Amblyseius swirskii*)로서 (주)나비스(Moonkyung, Korea)에서 공급받아 시험하였다. 점박이응애(*Tetranychus urticae*)는 생물이용연구소(Andong, Korea)에서 공급받아 시험하였으며, 천적의 먹이로서 줄알락명나방(*Cadra cautella*), 기장테두리진딧물(*Rhopalosiphum padi*) 및 온실가루이(*Trialeurodes vaporariorum*)는 (주)나비스에서 공급받았다. 비티플러스 약효 검정을 위해 실내에서 배추로 누대 사육(> 10 년)하여 유지시킨 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 종령층(4령)을 대상으로 실시하였다.

세균 배양 및 제제화

곤충병원세균인 Xn과 Ptt는 기주 선충에서 분리된 후 동결보관중인 것을 이용하였다(Jung and Kim, 2006a). 이들 균주는 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 28°C에서 12시간동안 배양하여 단일 균총을 채취하였다. 채취된 단일 균총을 2 mL의 LB 액체배지를 이용하여 28°C에서 16 시간 동안 배양한 후, 글리세롤을 30% 첨가하여 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 48 시간 동안 200 rpm에서 교반 배양하였다. 배양된 세균은 분광광도계(Uvikon 930, Kontron, Ales, France)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 2.4 이상이 되면 동결건조기(PVTFD 100R, Ilshin BioBase, Yangju, Korea)를 이용하여 함수량 14.7% 이하의 조건에서 72 시간 동안 동결 건조하였으며, 동결 건조된 시료에 구조토(Duksan, Seoul, Korea)가 전체 제형의 70%가 되

도록 첨가하였다.

Bt 균주는 (주)고려바이오(Hwasung, Korea)로부터 공급받았으며 *B. thuringiensis* var. *aizawai* NT0423을 사용하였다. 각각의 균주에 멸균수를 1 mL를 혼합하여 현탁액을 만든 후 loop를 이용하여 LB 사면 배지에 세균을 도말하고 30°C에서 48 시간 배양하였다. 평판배지에서 배양된 세균에서 단일 콜로니를 얻고 이를 멸균수로 희석하여 2 mL의 LB 액체배지를 이용하여 30°C에서 24 시간 동안 200 rpm에서 교반배양 후, 글리세롤을 30%가 되도록 첨가하여 동결 분획시료를 만들었다.

세균대사물질

실험에 사용된 dimethylsulfoxide(DMSO), BZA, indole, oxindole 및PHPP는 Sigma-Aldrich Korea(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. Ac-FGV과 PY는 (주)웹트론(Daejon, Korea)에서 합성하여 구매하였고 cyclo-PY(cPY)는 안동대학교 응용화학과에서 합성한 것(Lee, 2012)을 이용하였다.

시험약제 조제

실험약제인 ‘Xn+Bt’ 혼합제 그리고 ‘Ptt+Bt’ 혼합제는 물을 이용하여 1,000 ppm의 농도로 희석하였다. 세균대사물질 복합체(BM)는 BZA, indole, oxindole, cPY, PHPP를 6:1:1:1(g/g)의 비율로 혼합하고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)를 이용하여 1,000 ppm의 농도로 조제한 후 증류수를 이용하여 희석 현탁액으로 만들었다. 이 현탁액에 Bt를 용해시켜 혼합제를 조제하였다.

배추좀나방에 대한 살충력 검정

1,000 ppm으로 조제된 ‘Xn+Bt’, ‘Ptt+Bt’ 그리고 ‘BM+Bt’ 혼합제 시료에 1 cm² 배춧잎을 10 분간 침지시킨 후 과지가 깔려진 용기(직경 9 cm)에서 5 분간 건조시켰다. 각 배추 잎에 배추좀나방 4령충을 10 마리씩 3 반복으로 처리하였으며, 처리 후 5 일째 사망률로 살충 효과를 평가했다. 처리된 배춧잎은 24 시간만 섭식시키고 이후 매일 새로운 무처리 배춧잎으로 교체하여 섭식시켰다. 대조구는 증류수에 침지시킨 배춧잎을 이용하여 동일한 방법으로 살충력을 검정하였다.

천적 독성평가

콜레마니진디벌은 머미 상태로 30 마리씩 3 반복으로 처리하

였다. 처리방법으로는 직경 6 cm의 페트리디쉬를 이용하였다. 접촉독성을 검정할 시료는 모두 DMSO를 이용하여 1,000 ppm으로 제조한 후 스프레이를 이용하여 공중에서 3 회(1 회 살포량 0.7 mL) 살포하였다. 살포 후 25°C 조건에서 배양시키고 7 일 후 생존율을 우화수로 산출하였다. 섭식독성을 검정할 시료는 동일한 방법으로 조제하여 기장테두리진딧물에 3 회 살포하였으며 살포 후 접촉독성과 동일한 방법으로 확인하였다.

황온좁벌 머미, 무당벌레 유충, 애꽃노린재 성충, 칠레이리움 애 성충 그리고 지중해이리움 애 성충을 이용하여 30 마리씩 3 반복으로 위와 같은 방법으로 접촉독성을 검정하였다. 황온좁벌은 온실가루이 알, 무당벌레 유충과 애꽃노린재 성충은 줄알락 명나방 알 그리고 칠레이리움 애와 지중해이리움 애는 점박이애를 이용하여 먹이 곤충에 약제를 처리하여 위와 같은 방법으로 섭식독성을 검정하였다. 무처리구는 모두 증류수 처리로 삼식 및 접촉독 대조구를 구성했다.

점박이애에 생물검정

Ac-FGV, BZA, cPY, indole, oxindole, PHPP 그리고 PY를 DMSO를 이용하여 0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000, 4,000 ppm의 농도로 조제하였다. 페트리디쉬(직경 9 cm) 바닥 전체에 탈지면을 깔고 약 5 mL의 증류수를 처리하였다. 이 탈지면 위에 원형 강낭콩 잎(직경 6 cm) 위에 점박이애 애 성충을 30 마리씩 집중하였다. 각각의 처리구는 스프레이를 이용하여 공중에서 3 회(1 회 살포량 0.7 mL) 살포하였으며 3 반복으로 처리하였으며, 처리 후 5일째 사망률로 살비 효과를 평가했다. 처리된 강낭콩 잎은 24 시간만 섭식시키고 이후 매일 새로운 무처리 먹이로 교체하여 섭식시켰다. 대조구는 증류수에 침지시킨 강낭콩 잎을 이용하여 동일한 방법으로 살비력을 검정하였다.

세포독성검정

세포의 증식 또는 생존 능력을 측정하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 세포독성검정을 실시하였다. 96 well microplate에 2×10^4 cells/well의 세포를 100 μ L의 배양액(TC-100 Insect Medium, Welgene, Daegu, Korea)과 함께 각 well에 분주하여 28°C에서 12 시간동안 배양하였다. 검정에 사용되는 Ac-FGV, BZA, cPY, indole, oxindole, PHPP 그리고 PY는 DMSO를 이용하여 200 ppm으로 조제하였다. 배양된 세포를 대상으로 하여 조제된 대사물질을 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 그리고 100 ppm의 농도가 되게 처리하였으며 배양액을 각 well에 200 μ L가 되

도록 분주하였다. 처리 24 시간 후 MTT(5 mg/mL)를 10 μ L 첨가하여 37°C의 암실에서 4 시간동안 배양하였다. 이후 분광광도계(Uvikon 930, Kontron, Ales, France)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정했다.

통계처리

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

결과

'비티플러스'의 살충력 상승효과 확인

곤충병원세균 유래 신작물보호제의 살충력을 확인하기 위해 배추좁나방 4령 유충을 대상으로 잎 침지법을 이용하여 섭식독성을 검정하였다(Fig. 1). Xn, Ptt 그리고 BM의 단독 살충력은 30% 이하로 낮게 나타났으며, 1,000 ppm의 Bt 생물농약을 단독으로 처리하면 약 60%의 살충력을 나타내었다. 하지만 Xn, Ptt 그리고 BM을 Bt와 1:1 비율로 혼합하여 1,000 ppm으로 처리하면 살충력이 현격하게 증가되어 세균혼합제('Xn+Bt', 'Ptt+Bt')

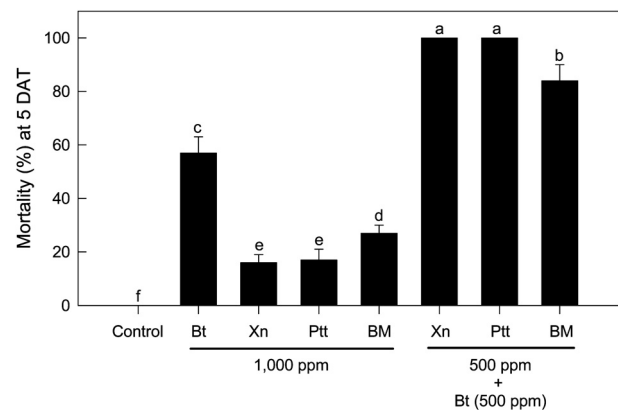


Fig. 1. Insecticidal efficacies of different bacterial metabolites against last instar *Plutella xylostella*. 'Bt' represent *Bacillus thuringiensis* (7.1×10^9 cfu/mg) 'Xn' and 'Ptt' represent freeze-dried culture broths of *Xenorhabdus nematophila* (6.2×10^{10} cfu/mg) and *Photorhabdus temperata temperata* (3.4×10^9 cfu/mg). 'BM' represents a mixture of bacterial metabolites of benzylideneacetone (60%), indole (10%), oxindole (10%), cPY (10%) and PHPP (10%). Each treatment was replicated three times. Each replication used 10 test larvae. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at type I error = 0.05 (LSD test).

의 경우 100%의 방제 효과를 나타냈다. BM의 경우도 Bt와 혼합하면 약 80% 이상의 살충력을 나타냈다. 이러한 결과는 이전 연구(Seo, 2012)에서 보고된 ‘비티플러스’의 살충력 상승효과를 재확인하였고, 이렇게 조제된 ‘비티플러스’를 유용 천적에 대한 안전성 평가에 이용하였다.

‘비티플러스’의 천적 영향평가

기생성천적(콜레마니진디벌, 황온좁벌)과 포식성천적(무당벌레, 애꽃노린재, 칠레이리응애, 지중해이리응애)에 대한 세 종류의 ‘비티플러스’ 독성을 접촉독과 섭식독으로 나누어 평가하였다. 최대 2,000 ppm의 ‘비티플러스’에 대해서 분석된 모든 천적은 접촉독성에 비해 섭식독성이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 2). 세 종류의 ‘비티플러스’ 가운데 BM 혼합체가 포식성응애류에 대해서 높은 독성을 나타내는 것으로 나타났다.

콜레마니진디벌 머미에 살포한 약제들의 접촉 및 섭식독성은 2,000 ppm의 ‘Xn+Bt’ 처리구에서 일부 독성을 나타낸 것을 제외하고 이들 세균복합체(‘Xn+Bt’, ‘Ptt+Bt’)의 경우 거의 모든 처리에서 독성이 없는 것으로 나타났다(Table 2). 그러나 세균대사물질 처리구(‘BM+Bt’)에서는 접촉독성의 경우 500 ppm 이상에서 독성을 나타내는 것으로 나타났다. 황온좁벌의 머미에 살포한 약제들이 경우도 콜레마니진디벌과 마찬가지로 세균복합체는 거의 독성을 보이지 않은 반면, 세균대사물질 처리구에서는 접촉독성의 경우 500 ppm 이상에서 독성을 나타내는 것으로 나타났다. 무당벌레 유충에 살포한 약제들의 경우 높은 농

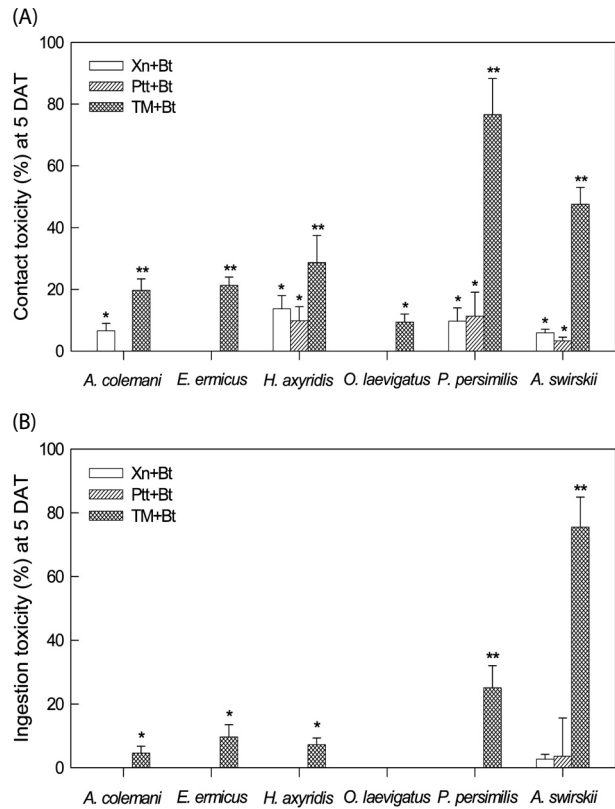


Fig. 2. Effects of three ‘Bt-plus’ formulations on contact and ingestion toxicities against six natural enemies. Each treatment used 30 mummy and was replicated three times. Mortality was measured at 5 days after treatment (DAT). Asterisks above standard deviation bars represent significant difference among means at Type I error = 0.05 for one asterisk and 0.01 for two asterisks (LSD test).

Table 1. Natural enemies (NE) analyzed in this study

NE	Type	Target pests	Source ¹
<i>Aphidius colemani</i>	parasitoid	<i>Aphis gossypii</i> <i>Myzus persicae</i>	Kopper, 7 YLC
<i>Eretmocerus eremicus</i>	parasitoid	<i>Bemisia tabaci</i> <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Koppert, 5 YLC
<i>Harmonia axyridis</i>	predator	<i>Aphis gossypii</i> <i>Myzus persicae</i>	Seoul, 3 YLC
<i>Orius laevigatus</i>	predator	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>Tetranychus kanzawai</i>	Koppert, 5 YLC
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	predator	<i>Tetranychus urticae</i> <i>Tetranychus kanzawai</i>	Koppert, 7 YLC
<i>Amblyseius swirskii</i>	predator	<i>Bemisia tabaci</i> <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Koppert, 5 YLC

¹Koppert¹ is a biopesticide company in Berkel en Rodenrijs, Netherlands.

¹‘Seoul’ represents the collection place.

¹‘YLC’ represents ‘year laboratory culture’.

Table 2. Effects of three 'Bt-plus' formulations on contact and ingestion toxicities of six natural enemies (NEs)

NE Dose (ppm)	Contact toxicity (%)			Ingestion toxicity (%)		
	Xn+Bt	Ptt+Bt	TM+Bt	Xn+Bt	Ptt+Bt	TM+Bt
<i>A. colemani</i>						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	0.0	0.0	4.2±0.6 *	0.0	0.0	0.0
1000	0.0	0.0	12.3±4.5 *	0.0	0.0	0.0
2000	6.6±2.4 *	0.0	19.7±3.7 *	0.0	0.0	4.6±2.2 *
<i>E. eremicus</i>						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	0.0	0.0	7.8±3.3 *	0.0	0.0	0.0
1000	0.0	0.0	17.5±4.1 *	0.0	0.0	3.2±2.3 *
2000	0.0	0.0	21.3±2.9 *	0.0	0.0	9.7±3.8 *
<i>H. axyridis</i>						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	0.0	3.3±0.3 *	4.5±1.5 *	0.0	0.0	0.0
1000	6.3±3.7 *	8.7±3.2 *	19.7±5.6 *	0.0	0.0	0.0
2000	13.7±4.3 *	9.8±4.6 *	28.7±6.8 *	0.0	0.0	7.2±2.1 *
<i>O. laevigatus</i>						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1000	0.0	0.0	5.3±1.8 *	0.0	0.0	0.0
2000	0.0	0.0	9.4±2.6 *	0.0	0.0	0.0
<i>P. persimilis</i>						
125	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
500	1.2±0.3 *	0.0	11.1±1.8 *	0.0	0.0	6.5±4.2 *
1000	8.2±3.6 *	8.2±3.6 *	42.3±12.6 *	0.0	0.0	22.8±4.2 *
2000	9.7±4.3 *	11.3±7.8 *	76.6±11.7 *	0.0	0.0	25.1±6.9 *
<i>A. swirskii</i>						
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
250	0.0	0.0	8.7±2.5 *	0.0	0.0	0.0
500	0.0	0.0	21.3±4.3 *	0.0	0.0	8.5±5.2 *
1000	0.0	0.0	38.9±3.2 *	0.0	0.0	43.8±4.5 *
2000	5.7±1.2 *	3.3±0.9 *	47.5±5.5 *	2.7±0.9 *	3.6±1.2 *	75.5±9.4 *

Each treatment was replicated three times. Each replication tested 30 individuals. Each toxicity is denoted by mean mortality ± standard deviation. Asterisks indicate significant difference of means compared to control (0 ppm) at Type I error = 0.05 (LSD test).

도의 세균복합체에서 일부 접촉독성을 나타냈다. 세균대사물질 처리구에서는 500 ppm 이상에서 높은 접촉독성을 나타냈다. 애꽃노린재 약충에 살포한 약제들도 세균복합체는 거의 독성을

보이지 않은 반면, 세균대사물질 처리구에서는 접촉독성의 경우 1,000 ppm 이상에서 독성을 나타내는 것으로 나타났다.

세균대사물질로 구성된 '비티플러스'의 경우 포식성응애류

에 대해서 높은 독성을 나타냈다(Table 2). 지중해이리응에 약충에 살포한 약제의 접촉독성을 보면 ‘Xn+Bt’와 ‘Ptt+Bt’ 처리구에서는 500 또는 1,000 ppm 이상의 농도에서 적은 살비 독성을 나타냈다. 그러나 ‘BM+Bt’는 250 ppm 이상의 농도에서 높은 살충력을 나타내어 2,000 ppm 처리 시에는 약 76%의 높은 살비 독성을 보였다. 칠레이리응에는 지중해이리응에 비해 다소 높은 내성을 보였다. 세균복합체는 거의 모든 농도에서 낮은 독성을 보였으나, 세균대사물질 복합체의 경우는 250 ppm 이상의 농도에서 높은 살비 독성을 보였다.

세균대사물질의 살비효과

칠레이리응에 및 지중해이리응에 대해 비교적 높은 접촉 독성을 나타낸 BM 처리구의 구성 성분인 BZA, cPY, indole, oxindole 그리고 PHPP의 물질을 대상으로 점박이응애에 대한 살비력을 검증하였다(Fig. 3). 각각의 약제들을 2,000 ppm으로 처리하여 보면(Fig. 3A), 이들 복합체인 BM의 살비력이 100%로 높게 나타났으며, BZA와 PHPP가 약 90%의 살비력을 나타

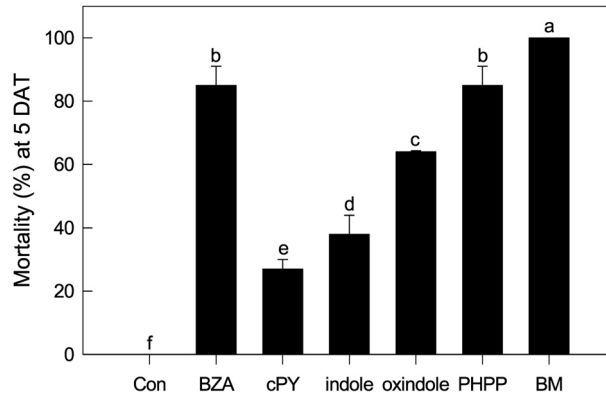
내었으며 oxindole, indole 그리고 cPY 순으로 살비력이 감소하였다.

각 세균대사물질의 점박이응애에 대한 반수치사약량을 평가하였다(Fig. 3B). BM이 가장 낮은 반수치사약량을 보였고, BZA와 PHPP가 다음으로 낮은 치사약량을 보였고, 나머지 약제가 이들 보다 높은 반수치사약량을 보였다.

세균대사물질의 세포독성 효과

포식성응애 및 점박이응애에 대하여 높은 살비력을 나타낸 곤충병원세균 유래물질에 대한 세포독성을 MTT 검증법으로 분석하였다(Fig. 4). 이들 물질들은 모두 10 ppm의 농도에서 모두 세포독성을 보였다(Fig. 4A). 이들의 세포독성 차이를 비교하기 위해 서로 다른 농도로 처리하여 50% 세포치사농도를 산출하였다(Fig. 4B). 그 결과 모든 약제들은 100 µM 이하의 농도에서 50% 세포치사농도를 보였으며, 이 가운데 BZA와 PHPP가 가장 독성이 높은 것으로 나타났다.

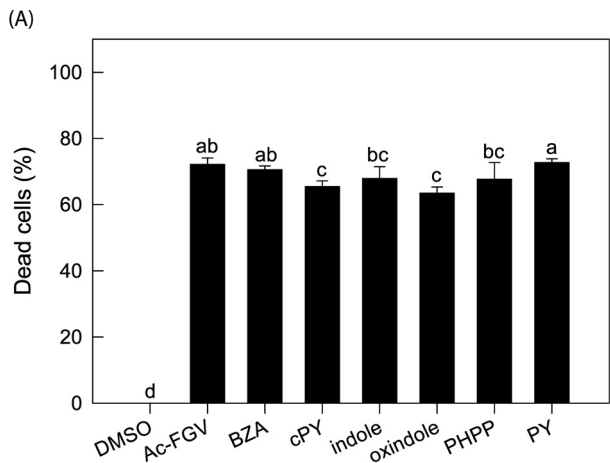
(A)



(B)

BM	LC ₅₀ (ppm)	95% CI	Slope ± SD	x ²	df	P
BZA	568.7	422.3~507.8	13.3 ± 2.1	14.8	6	0.031
cPY	6656.4	5136.2~8055.4	4.3 ± 1.4	9.5	6	0.131
indole	2725.6	2490.1~2958.8	9.4 ± 1.8	11.5	6	0.103
oxindole	1412.1	1231.1~1598.5	10.8 ± 0.8	135	6	0.046
PHPP	692.7	618.9~762.7	12.2 ± 2.3	14.3	6	0.023
BM	218.7	163.2~262.3	17.6 ± 0.5	19.2	6	0.001

Fig. 3. Acaricidal effects of five bacterial metabolites on *Tetranychus urticae* by leaf-disk bioassay. ‘BM’ represents a mixture of bacterial metabolites of benzylideneacetone (60%), indole (10%), oxindole (10%), cPY (10%) and PHPP (10%). Each dose was tested with 30 individuals and replicated three times. Mortality was estimated at 5 days after treatment (DAT). (A) Toxicity comparison of different bacterial metabolites at 2,000 ppm. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Estimation of median lethal concentrations (LC₅₀s) of seven metabolites.



(B)

BM	IC ₅₀ ± SD ¹ (μM)
Ac-FGV	92.3 ± 9.8 a
BZA	7.3 ± 1.2 e
cPY	58.5 ± 16.9 b
indole	32.6 ± 5.5 c
oxindole	12.2 ± 1.9 d
PHPP	8.8 ± 0.9 e
PY	86.2 ± 11.5 a

¹Different letters following standard deviation (SD) indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

Fig. 4. Cytotoxicities of seven bacterial metabolites on Sf9 cells by MTT test. Each dose was tested with 2×10^4 cells on 96 well plate and replicated three times. (A) Cytotoxicity comparison of different bacterial metabolites at 10 ppm. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Estimation of median inhibition concentrations (IC₅₀s) of seven metabolites.

고찰

본 연구는 유용천적에 대해서 ‘비티플러스’의 안전성 분석으로 실시되었다. 세 종류의 ‘비티플러스’가 분석에 이용되었다. 이들 세 종류는 이전 연구(Seo and Kim, 2011)를 바탕으로 Bt와 세균 또는 세균대사물질이 최적의 방제효과를 나타내는 비율로 혼합되었다. 세균혼합물인 ‘Xn+Bt’ 또는 ‘Ptt+Bt’는 비교적 높은 농도에서도 천적 생존에 영향을 주지 않는 반면 세균대사물질인 BM을 기반으로 만들어진 ‘비티플러스’의 경우는 접촉 및 섭식독성을 나타냈으며, 특별히 포식성애류에 대해서는 높은 살비력을 나타냈다. 이러한 결과를 얻기 위해 본 연구는 먼저 분석에 이용될 ‘비티플러스’의 살충력을 재확인하였다. 둘째로 이러한 결과를 바탕으로 천적에 대한 섭식 및 접촉독성을 실제 방제에 이용되는 1,000 ppm을 기준으로 다양한 농도에서 분석하

였다. 이를 통해 섭식보다는 접촉에 기인된 천적 영향이 더 클 것으로 판정되었다. 셋째로 세균대사물질의 살비력을 점박이용애를 대상으로 각각 대사물질 별로 분석했다. 마지막으로 높은 살비력을 이해하기 위해 이들 물질의 세포독성을 분석하여 살비력과 세포독성의 연관성을 밝혔다.

세 종의 ‘비티플러스’ 모두는 배추좀나방의 종령 유충에 대해서 높은 살충력을 보였다. 이러한 살충력 상승효과는 Xn, Ptt 및 세균대사물질이 갖는 면역억제능력에 의해 이해되었다(Jung and Kim, 2006a,b). 곤충 면역 작용은 외래 인자를 인식하는 단계에서 이를 면역기관인 혈구세포와 지방체에 신호를 전파하여 주는 단계 및 작용 세포에서 세포성 및 체액성 면역 작용을 일으키도록 단백질 및 유전자 활성 단계를 거치게 된다. 이때 면역신호의 전파는 면역중개자들에 의해 이뤄지는데 이 과정에서 다양한 병원체에 대해서 기능을 담당하는 아이코사노이드가 핵심적 역할을 담당하게 된다(Stanley and Kim, 2011). 이 아이코사노이드는 탄소수 20개의 다중불포화지방산인 아라키도닉산에서 유래한다. 이 아라키도닉산은 인지질에 주로 존재하며, 인지질의 글리세롤 골격에 두 번째 탄소에 에스테르 결합 형태로 연결되어 있다. 이 에스테르 결합을 가수분해하는 효소가 phospholipase A₂(PLA₂)이며, 이 효소의 활성 변화가 아이코사노이드 생합성 속도를 결정하게 된다. 이 효소활성이 면역과의 관련성은 병원체 감염에 이 효소의 활성 증가에서 알 수 있다(Tunaz *et al.*, 2003; Park and Kim, 2011). 병원체 감염에 따라 활성이 증가된 PLA₂는 아이코사노이드 생합성을 촉진시키고 이에 따라 증가된 아이코사노이드는 세포성 및 체액성 면역 반응을 촉진하게 된다(Shrestha and Kim, 2009). 한편 Xn과 Ptt의 배양액은 PLA₂ 억제 인자를 가지고 있으며, 이를 화학 분석한 결과 7 종의 PLA₂ 억제 물질을 동정하게 되었다(Seo, 2012). 이러한 세균 유래 PLA₂ 억제 물질은 BZA, PY, Ac-FGV, cPY, indole, oxindole, PHPP이며, Xn의 배양액에서는 모두 검출되나, Ptt의 경우는 BZA, cPY, Ac-FGV만 검출되었다(Seo, 2012). 이들 물질은 PLA₂ 억제 뿐만 아니라 PO 효소활성 및 혈구세포의 소낭형성 반응도 억제시켰다(Seo, 2012). 따라서 Xn 배양액, Ptt 배양액 및 세균대사물질인 BM은 모두 면역억제 효과가 있다는 것을 의미하며, 이에 따라 Bt의 병원력을 높여 배추좀나방에 대한 살충력을 증가시켰을 것으로 해석된다.

이 연구는 또한 세균대사물질이 세포독성을 가지고 있다고 밝혔다. 세포독성 분석은 MTT를 이용하였다. MTT는 살아있는 세포의 환원효소 작용으로 분홍색의 formazan 물질로 변하게 되면서 세포 생존력, 증식력 및 특정 물질들의 세포치사효과를 분석하는 데 이용한다(Cory *et al.*, 1991). 이 가운데 BZA와 PHPP의 세포독성은 가장 높은 것으로 나타났다. BZA의 경우

는 두 세균 배양액에 모두 가장 많이 검출되는 세포대사물질이다. 반면에 PHPP는 Xn 배양액에서만 검출되었다. Shrestha and Kim(2010)은 딱정벌레 곤충인 *Tribolium castaneum*에서 이 두 세균의 차등적 병원성을 발견하였다. 두 세균이 생성하는 대사물질의 차이가 차등적 병원력과 연결되는 지는 아직 밝혀지지 않았다. 그러나 흥미로운 것은 세균대사물질(BM)의 영향보다는 Xn 또는 Ptt의 배양액의 상승효과가 높았다는 점이다. 이는 우리가 찾은 7 가지 대사물질 이외의 요인들이 이 연구의 병원력 상승에 작용하였다는 것이다. 따라서 면역억제, 세포 독성 이외의 요인들도 Bt의 병원성 상승에 영향을 주었다고 사료된다.

이 연구에서 분석된 천적류는 모두 6 종류로 기생성 2 종과 포식성 4 종을 포함하고 있다. 진딧물 천적으로 알려진 콜레마니진디벌은 단독 내부기생벌로 진딧물아과에 속한 진딧물에 기생 및 치사를 일으킨다(Stary, 1975). 콜레마니진디벌은 국내에서도 그 방제 효과가 인정되어 시설재배지에서 주로 발생하는 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 및 목화진딧물(*Aphis gossypii*)에 밀도억제가 높은 것으로 확인되었다(Kim *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2011). 황온좀벌은 담배가루이(*Bemisia tabaci*)에 대한 천적으로 북미의 경우 *B. argentifolii*에 가장 많이 발생하는 천적이 이 종이 속한 *Eretmocerus* 속 좀벌류이다(Goolsby *et al.*, 1998). 시설재배지에 발생한 *B. argentifolii*에 대해서 황온좀벌을 처리한 결과 뚜렷한 밀도억제효과를 보였다(Hoddle *et al.*, 1998). 포식성 천적으로 무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 목화진딧물, 복숭아혹진딧물 그리고 온실가루이에 대한 포식 능력이 확인되었다(Seo and Yoon, 2000). 애꽃노린재는 꽃노린재과(Anthcoridae)에 속하는 포식성 천적으로 세계적으로 약 67 종이 분포하며(Yasunaga, 1997), 우리나라에는 *Orius sauteri* 등 5 종이 서식하고 있다(Kim *et al.*, 2001). 애꽃노린재 성충의 체장은 약 2 mm 내외로 총채벌레 뿐만 아니라 나방의 알과 유충, 응애, 진딧물 등을 포식하는 광식성으로 하루에 약 25 마리 내외의 총채벌레 2령 유충을 포식하는 것으로 알려져 있다(Nagai, 1991; Paik *et al.*, 2010). 오이 또는 파프리카를 재배하는 시설재배지에서 지중해이리응애는 담배가루이나 꽃노랑총채벌레의 방제에 효과가 있는 것으로 확인되었다(Kim *et al.*, 2009). 반면에 유사한 포식성응애지만, 칠레이리응애는 점박이응애를 대상으로 밀도감소 효과를 나타냈다(Moon *et al.*, 2006). 이 연구는 이들 천적류에 대해서 세균배양액 혼합 비티플러스('Xn+Bt', 'Ptt+Bt')는 사용 약량 1,000 ppm에서 안전하지만, 세균대사물질 혼합체('BM+Bt')는 독성을 나타냈으며, 특별히 지중해이리응애 및 칠레이리응애에 대해서 살비효과를 나타냈다. 천적에 대한 미생물제제의 독성 연구들이 진행되었다(Romeis *et al.*,

2006). 특별히 비티 독소단백질을 발현하는 형질전환 작물의 천적에 대한 영향 평가가 주목을 받았다. 일부 연구들은 비티 형질전환 작물체가 천적에도 영향을 준다고 보고하였으나(Bernal *et al.*, 2002; Baur and Boethel, 2003) 그러나 이러한 연구들에 있어서 독성 자료 해석이 문제되었다. 왜냐하면, 비티 내독소 자체의 천적에 대한 직접적 영향이라기보다는 비티 형질전환 작물을 섭식하는 기주가 정상적으로 자라지 않은 연구로 천적의 성장에 악영향을 줄 수 있기 때문이다. 이를 해결하기 위한 연구 방법으로 비티에 저항성인 배추좀나방을 이용하여 기주가 정상적으로 성장하게 하고 이에 특이적 천적인 맵시벌 기생봉인 *Diadegma insulare*를 점종한 결과 천적의 성장에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 보고되었다(Chen *et al.*, 2008). 따라서 본 연구에서와 같이 섭식과 접촉독성 분석이 연계되어 천적에 대한 평가 이뤄져야 한다.

세균대사물질들이 보이는 살비효과는 점박이응애를 대상으로 개별 독성을 분석했다. 이들 가운데 BZA와 PHPP가 모두 높은 살비효과를 나타냈다. BZA와 PHPP는 공통적으로 *p*-hydroxyphenyl기를 가진 유사한 화학구조를 지니고 있다(Seo, 2012). 이들 화합물은 세포독성 분석에서도 가장 높은 독성을 나타냈다. 이 화합물들이 갖는 특성은 PLA₂ 억제 및 PO 억제 능력을 보유하고 있다. BZA는 또한 항세균능력을 보유하고 있는 것으로 보고되었다(Ji *et al.*, 2004). PHPP는 포도씨에 풍부한 다가페놀류인 proanthocyanidin의 세균성 분해물로 보고되어 항암 또는 혈전 용해 등의 의학용 물질로 알려졌다(Ward *et al.*, 2004). 그러나 이들 물질이 살비효과를 가지고 있다는 것은 이 연구가 처음이다. 이 연구는 이들 물질의 향후 살비제 개발로의 가능성을 제시하고 있다.

이상의 연구 결과들은 '비티플러스'의 천적에 대한 영향 평가를 분석한 자료이다. 두 곤충병원세균의 상이한 병원기작을 조합하여 제작한 이 생물제제는 IBC 해충 방제 개념(Jung, 2006)의 결과물로서 세균 조합형('Xn+Bt', 'Ptt+Bt') 비티플러스는 야외 포장조건에서도 약효가 우수하고(Seo and Kim, 2011) 약해도 없고, 포유류 독성도 없고, 천적에도 독성이 낮아 새로운 미생물 농약으로 산업화가 가능할 것으로 본 연구는 제시하고 있다. 반면에 세균대사물질은 일부 천적에 대한 독성이 높아 이를 이용한 친환경농자재 개발은 어려울 것으로 본 연구 결과는 나타내고 있다. 그러나 이들 대사물질은 새로운 화학농약으로서의 개발 가능성이 있다. 즉, 이 연구에서 보여 준 BZA와 PHPP의 높은 살비 효과와 이 물질의 고추 탄저병에 대한 방제 효과(Park *et al.*, 2010)는 새로운 작물보호제로의 개발 가능성을 제시하고 있다.

사사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 화학 농약 대체기술)으로부터 지원받아 수행하였다. 서삼열과 스티칸스는 교육과학기술부 2단계 BK21 사업으로부터 지원받았다.

Literature Cited

- Adams, B.J. and K.B. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. *In* Entomopathogenic nematology, ed. by R. Gaugler. CABI Publishing, New York.
- Aronson, A.I., W. Beckman and P.E. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbial. Rev.* 50: 1-24.
- Atsumi, S., Y. Inoue, T. Ishizaka, E. Mizuno, Y. Yoshizawa, M. Kitami and R. Sato. 2008. Location of the *Bombyx mori* 175 kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *FEBS J.* 275: 4913-4926.
- Baur, M.E. and D.J. Boethel. 2003. Effect of Bt-cotton expressing Cry1Ac on the survival and fecundity of two Hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biol. Control* 26: 325-332.
- Bernal, J.S., J.G. Grisot and P.O. Gillogly. 2002. Impacts of developing on Bt maize-intoxicated hosts on fitness parameters of a stem borer parasitoid. *J. Entomol. Sci.* 37: 27-40.
- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S.S. Gill and M. Soberon. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423-431.
- Chen, M., J.Z. Zhao, H.L. Collins, E.D. Earle, J. Cao and A.M. Shelton. 2008. A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS One* 3: e2284.
- Cory, A.H., T.C. Owen, J.A. Barltrop and J.G. Cory. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.* 3: 207-212.
- 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. by L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill. Elsevier, New York.
- Forst, S., B. Dedos, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gómez, I., J. Snachez, R. Miranda, A. Bravo and M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domains I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513: 242-246.
- Gómez, I., I. Arenas, I. Benitez, J. Miranda-Ríos, B. Becerril, G. Grande, J.C. Almagro, A. Bravo and M. Soberón. 2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 281: 34032-34039.
- Goolsby, J.A., M.A. Ciampelik, B.C. Legaspi, J.C. Lepaspi and L.E. Wendel. 1998. Laboratory and field evaluation of exotic parasitoids of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Biotype "B") (Homoptera: Aleyrodidae) in the lower Rio Grande valley of Texas. *Biol. Control* 12: 127-135.
- Heckel, D.G., L.J. Gahan, S.W. Baxter, J. Zhao, A.M. Shelton, F. Gould and B.E. Tabashnik. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 192-197.
- Hodde, M.S., R.G. van Driesche, J.P. Sanderson and O.P.J.M. Mindenberg. 1998. Biological control of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) on poinsettia with inundative release of *Eretmocerus eremicus* (Hymenoptera: Aphelinidae): do release rate affect parasitism? *Bull. Entomol. Res.* 88: 47-58.
- 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.
- Jung, S. 2006. Evaluation of integrated biological control using bacterial and viral pathogens. MS Thesis, Andong National University, Andong, Korea.
- Jung, S. and Y. Kim. 2006a. Synergistic effect of entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus* sp. and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environl. Entomol.* 35: 1584-1589.
- Jung, S. and Y. Kim. 2006b. Synergistic effect of *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 39: 201-209.
- Jung, S. and Y. Kim. 2007. Potentiating effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on pathogenicity of entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* K1 against diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 100: 246-250.
- Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181-206.
- Kim, H.Y., J.H. Kim, S.H. Kang, Y.H. Lee and M.Y. Choi. 2009. Biological control of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber, using *Amblyseius swirskii* (Arari: Phytoseiidae). *Kor. J. Appl. Entomol.* 48: 355-359.
- Kim, J.H., G.S. Lee, Y.H. Kim and K.J. Yoo. 2001. Species composition of *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae) and their

- seasonal occurrence on several plants in Korea. Kor. J. Appl. Entomol. 40: 211-217
- Kim, J.J., D.K. Seo and G.H. Kim. 2006. Evaluation of toxicity of 83 pesticides against aphid parasitoid, *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae), and control effects of the green peach aphid, *Myzus persicae* with a combination of aphid parasitoid and pesticides. Kor. J. Appl. Entomol. 45: 217-226.
- 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.
- 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.
- Lee, S. 2012. Identification, synthesis, and biological activities of cyclic PY. MS Thesis, Andong National University, Andong, Korea.
- Moon, H.C., W. Kim, M.K. Choi, S.H. Kwon, Y.K. Shin, D.H. Kim and C.Y. Hwang. 2011. Biological control of cotton aphid by *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae) in watermelon greenhouses. Kor. J. Appl. Entomol. 50: 79-82.
- Moon, H.C., J.R. Lim, J. Kim, J. Ryu, B.R. Ko, D.H. Kim and C.Y. Hwang. 2006. Biological control of *Tetranychus urticae* by *Phytoseiulus persimilis* in eggplant greenhouse houses. Kor. J. Appl. Entomol. 45: 173-177.
- Nagai, K. 1991. Predatory characteristics of *Orius* sp. on *Thrips palmi* Karny, *Tetranychus kanzawai* Kishida, and *Aphis gossypii* Glover. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 35: 269-274.
- Pacheco, S., I. Gómez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodriguez-Almazan, S.S. Gill, A. Bravo and M. Soberón. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. J. Biol. Chem. 284: 32750-32757.
- Paik, C.H., G.H. Lee, C.Y. Hwang and S.J. Kim. 2010. Predatory response of the pirate bug, *Orius sauteri* Poppius (Heteroptera: Anthocoridae) on *Frankliniella occidentalis*, *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. Kor. J. Appl. Entomol. 49: 401-407.
- Pardo-López, L., I. Gómez, C. Rausell, J. Sánchez, M. Soberón and A. Bravo. 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric prepore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. Biochemistry 45: 10329-10336.
- Park, J. and Y. Kim. 2011. Benzylideneacetone suppresses both cellular and humoral immune responses of *Spodoptera exigua* and enhances fungal pathogenicity. J. Asia Pac. Entomol. 14: 423-427.
- Park, S., M. Jun, W. Chun, J. Seo, Y. Yi and Y. Kim. 2010. Control effects of benzylideneacetone isolated from *Xenorhabdus nematophila* K1 on the diseases of red pepper plants. Res. Plant Dis. 16: 170-175.
- 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.
- Pigot, C.R. and D.J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. 71: 255-281.
- 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, *Ephestia 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.
- Romeis, J., M. Meissle and F. Bigler. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nat. Biotechnol. 24: 63-71.
- SAS Institute. 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Seo, M.J. and Y.N. Yoon. 2000. The Asian ladybird, *Harminia axyridis*, as biological control agents: I. Predaceous behavior and feeding ability. Kor. J. Appl. Entomol. 39: 59-71.
- Seo, S. 2012. Chemical identification and biological characterization of phospholipase A₂ inhibitors synthesized by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. MS Thesis, Andong National University, Andong, Korea.
- Seo, S. and Y. Kim. 2009. Two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ANU101 secrete factors enhancing Bt pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Kor. J. Appl. Entomol. 38: 385-392.
- Seo, S. and Y. Kim. 2010. Study on development of novel biopesticides using entomopathogenic bacterial culture broth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Kor. J. Appl. Entomol. 49: 241-249.
- Seo, S. and Y. Kim. 2011. Development of “Bt-Plus” biopesticide using entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) metabolites. Kor. J. Appl. Entomol. 50: 171-178.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2009. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 2077-2084.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2010. Differential pathogenicity of two entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* and *Xenorhabdus nematophila* against the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. J. AsiaPac. Entomol. 13: 209-213.
- Stanley, D.W. and Y. Kim. 2011. Prostaglandins and their receptors in insect biology. Front. Endocrin. 2: 105.
- Stary, P. 1975. *Aphidius colemani* Vireck: its taxonomy, distribution and host range (Hymenoptera: Aphidiidae). Acta Entomol.

-
- Biochem. 72: 156-163.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39: 47-79.
- Tunaz, H., Y. Park, K. Buyukguzel, J.C. Bedick, A.R. Nor Aliza and D.W. Stanley. 2003. Eicosanoids in insect immunity: bacterial infection stimulates hemocytic phospholipase A₂ activity in tobacco hornworms. Arch. Insect Biochem. Physiol. 52, 1-6.
- Ward, N.C., K.D. Croft, I.B. Puddey and J.M. Hodgson. 2004. Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of 3-hydroxyphenylpropionic acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans. J. Agric. Food Chem. 52: 5545-5549.
- Yasunaga, T. 1997. The flower bug genus *Orius* Wolff (Heteroptera: Anthocoridae) from Japan and Taiwan. Part II. Appl. Entomol. Zool. 32: 379-386.
- Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig and L.A. Jr. Bulla. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/ PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 9897-9902.