

배추좀나방에 대한 프루텔고치벌과 미생물농약의 통합생물방제

김규순 · 김 현 · 박영욱¹ · 김길하¹ · 김용균*

안동대학교 생명자원과학부 식물의학전공, ¹충북대학교 식물학과

An Integrated Biological Control Using an Endoparasitoid Wasp (*Cotesia plutellae*) and a Microbial Insecticide (*Bacillus thuringiensis*) against the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*

Kyusoon Kim, Hyun Kim, Young-Uk Park¹, Gil-Hah Kim¹ and Yonggyun Kim*

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

¹Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Chungju 361-763, Korea

ABSTRACT: All tested Korean populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, are known to be resistant especially against pyrethroid insecticides by mutation in its molecular target, para-sodium channel. Moreover, *P. xylostella* is able to develop resistance against most commercial insecticides. This study was performed to develop an efficient control technique against *P. xylostella* by a combined treatment of an endoparasitoid wasp, *Cotesia plutellae*, and a microbial insecticide, *Bacillus thuringiensis*. To investigate any parasitism preference of *C. plutellae* against susceptible and resistant *P. xylostella*, five different populations of *P. xylostella* were compared in insecticide susceptibilities and parasitism by *C. plutellae*. These five *P. xylostella* populations showed a significant variation against three commercial insecticides including pyrethroid, organophosphate, neonicotinoid, and insect growth regulator. However, there were no significant differences among five *P. xylostella* populations in their parasitic rates by *C. plutellae*. Moreover, parasitized larvae of *P. xylostella* showed significantly higher susceptibility to *B. thuringiensis*. As an immunosuppressive agent, viral ankyrin genes (vankyrins) encoded in *C. plutellae* were transiently expressed in nonparasitized larvae. Expression of vankyrins significantly enhanced the efficacy of *B. thuringiensis* against the third instar larvae of *P. xylostella*. Thus an immunosuppression induced by *C. plutellae* enhanced the insecticidal efficacy of *B. thuringiensis*. These results suggest that a combined treatment of *C. plutellae* and *B. thuringiensis* may effectively control the insecticide-resistant populations of *P. xylostella*.

Key words: Integrated Biological Control, Insecticide Resistance, *Bacillus thuringiensis*, *Cotesia plutellae*, *Plutella xylostella*

초 록: 국내 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 집단은 피레스로이드 농약에 대해서 저항성을 보이며, 이는 이 살충제의 작용점인 소듐이온채널 유전자의 돌연변이에 기인된다. 더욱이 배추좀나방은 대부분 상용화된 살충제에 대해서 저항성을 발달시킬 수 있다. 본 연구는 배추좀나방을 효과적으로 방제하기 위해 내부기생성 천적인 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)과 미생물농약인 *Bacillus thuringiensis*의 혼합처리 기술을 개발하기 위해 수행되었다. 프루텔고치벌이 감수성과 저항성 배추좀나방에 대한 기생 선호성에 차이가 있는 지 조사하기 위해 다섯 개 서로 다른 집단에 대해서 살충제 감수성과 프루텔고치벌 기생성 차이를 비교하였다. 이들 배추좀나방 집단들은 피레스로이드, 유기인계, 네오니코틴계 및 곤충성장조절제를 포함하는 세 종류의 상용 살충제에 대한 약제 감수성에서 뚜렷한 차이를 보였다. 그러나 이들 집단들은 프루텔고치벌에 의한 기생물에서는 차이를 보이지 않았다. 더욱이 기생된 배추좀나방은 *B. thuringiensis*에 대해서 감수성이 증가되었다. 프루텔고치벌이 갖는 면역억제인자 가운데 바이러스 유래 ankyrin 유전자(vankyrin)를 비기생된 배추좀나방에 발현시켰다. Vankyrin의 발현은 배추좀나방 3령충의 *B. thuringiensis*에 대한 감수성을 현격하게 증가시켰다. 즉, 프루텔고치벌에 의해 야기된 면역저하가 *B. thuringiensis*의 살충력을 증가시켰다. 이러한 결과들은 프루텔고치벌과 미생물농약인 *B. thuringiensis*의 혼합처리가 살충제 저항성 배추좀나방을 효과적으로 방제할 수 있다고 제시하고 있다.

검색어: 통합생물방제, 살충제저항성, 미생물농약, 프루텔고치벌, 배추좀나방

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received November 30 2012; Revised January 18 2013

Accepted January 28 2013

배추좀나방(*Plutella xylostella*)은 배추와 케일과 같은 십자 화과 작물을 가해하는 해충이다. 비교적 짧은 세대 기간과 높은

생식력으로 생육에 적합한 환경이 주어지면 야외에서 높은 밀도로 대발생할 수 있는 해충이다. 더욱이 살충제에 대한 빠른 저항성 발달로 이 해충 밀도를 경제적 피해 수준 이하로 낮추기 어려운 난방제 해충이다. 특별히 전작해충을 대상으로 널리 사용되고 있는 피레스로이드 살충제에 대해서 국내 배추좀나방 야외 집단들이 이 살충제의 작용점인 소듐이온채널 유전자에 돌연변이를 나타냄으로 저항성을 획득하였다고 보고하였다 (Kwon et al., 2004).

국내외 자료를 살펴보면, 배추좀나방은 유기인계, 카바메이트계는 물론이고 생물농약인 *Bacillus thuringiensis* (Bt)에 대해서도 야외 조건에서 저항성을 보여 거의 모든 상품화된 살충제에 대해서 저항성을 발현시킬 수 있어 효과적인 방제에 어려움을 주고 있다.

본 연구는 이러한 배추좀나방 방제에 어려움을 해결하기 위한 대체 기술로서 통합생물방제 전략을 고안하였다. 프루텔고치벌(*Cotesia plutellae*)은 배추좀나방에 의해 특이적 전문 내부 기생충으로 어린 유충의 혈강에 자신의 알을 산란하여 기주가 최종 령에 이를 때 다자란 기생충 유충이 기주 몸을 빠져나와 용화되며 기주는 치사하게 된다(Bae and Kim, 2004). 프루텔고치벌의 성공적 기생을 위해서는 여러 기생인자가 수반되어야 한다. 이러한 기생인자는 어미 유래의 독샘물질, 난소단백질 및 폴리드나바이러스(polydnavirus)를 포함하며 배자 유래의 기형세포(teratocyte) 및 기생충 유충 자신을 포함하게 된다(Kim, 2006). 이들 기생인자 가운데 비교적 연구가 많이 되고 가장 높은 공헌도를 보일 것으로 여겨지는 기생인자가 폴리드나바이러스이다.

폴리드나바이러스는 맵시벌상과에 속하는 일부 아과들의 내부기생충류에서 발견되는 곤충 DNA 바이러스로서 기주인 기생충의 분류군에 따라 맵시벌과에 속한 이크노바이러스(ichnovirus)와 고치벌과에 속한 브라코바이러스(bracovirus)로 구분된다(Webb, 1998). 프루텔고치벌이 갖는 폴리드나바이러스는 브라코바이러스의 일종인 *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV)이다(Bae and Kim, 2004). 배추좀나방 체내에 전달되는 CpBV 게놈은 약 540 kb 길이로서 35 개의 고리조각으로 구성되며 157 개의 추정 유전자를 담고 있다(Chen et al., 2011).

다양한 CpBV 유전자 가운데 viral ankyrin (vakyrin) 유전자가 기주의 세포성 및 체액성 면역 작용을 모두 억제하는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2007; Bae and Kim, 2009). 총 7 개로 구성된 이 유전자군은 기생 초기에 발현하며 기생 기간 동안 지속적으로 발현 수준을 유지하는 것으로 기생충 알과 유충을 기주 면역반응으로부터 기생충을 보호하는 것으로 여겨지고 있다 (Bae and Kim, 2009).

본 연구는 약제 저항성 배추좀나방에 대해서 효과적인 방제 기술을 개발하기 위한 통합생물방제 기술을 개발하기 위해 기생성 천적인 프루텔고치벌을 배추좀나방 전문 천적으로 선발하고, 여기에 미생물농약인 Bt를 추가하는 혼합 생물방제제 처리 기술을 적용하였다. 이는 프루텔고치벌이 약제 저항성과 관련 없이 배추좀나방을 기생하여 치사시킬 것이고, Bt는 감수성 개체는 물론이고 기생충이 기생된 저항성 개체가 면역 작용이 약화되어 Bt에 감수성이 높아질 것이라는 가정에 이 두 생물방제를 혼합하여 적용하려 고안하였다. 이러한 방제 목적을 분석하기 위해 본 연구는 먼저 프루텔고치벌이 약제 감수성 차이에 관련 없이 기생을 시키는 지를 분석했다. 이후 프루텔고치벌에 기생된 배추좀나방의 Bt 감수성 증가를 분석했고, 이를 작용기작 면에서 증명하기 위해 CpBV가 갖는 vankyrin 유전자를 잠시발현(transient expression) 기술(Hepat and Kim, 2012)을 통해 이러한 면역억제와 Bt 감수성 증가와의 인과 관계를 검증하였다.

재료 및 방법

배추좀나방 채집 및 사육

본 연구에 사용된 배추좀나방은 모두 다섯 집단을 이루었다. 먼저 두 실내충이 포함되었다. 하나는 감수성 계통으로 살충제 노출 없이 실내에서 적어도 10년간 유지되어온 집단('LAB')과 충북대학교 식물학과 연구실에서 살충제 저항성 목적으로 선발된 유기인계 저항성 집단('RS') 그리고 야외에서 채집되어 실내에서 증식된 세 개의 야외 집단으로 경북 지역의 청송('CS'), 안동 송천('SC'), 및 안동 송현('SH') 집단을 포함하였다. 유충은 배추 잎으로 사육하였으며 성충은 10% 설탕물을 제공하였다. 모든 발육 시기는 25°C 실내 조건에서 16:8 h 광주기 조건에서 사육되었다.

프루텔고치벌 사육

프루텔고치벌은 안동의 배추 포장에서 채집된 배추좀나방에서 얻은 야외 집단을 실내 조건(온도 약 25°C, 광주기 16:8 (L:D) h)에서 누대 사육하였다. 배추좀나방 2령 유충을 프루텔고치벌 기생에 이용하였다. 배추좀나방 유충에 대한 기생은 우화 후 1 일 동안 미리 교미가 허용된 성충 집단에 배추좀나방 유충을 24 시간 동안 노출시켜 기생시켰다. 이후 기생된 배추좀나방은 일반 사육 방법으로 사육되었으며, 형성된 고치에서 우화된 성충은 50% 설탕물을 먹이로 공급하였다.

배추좀나방에 대한 살충력 검증

살충제에 대한 감수성 분석은 상품화된 제형을 구입하여 옆침 지법으로 처리하였다. 배추좀나방에 적용한 살충제는 flufenoxuron 5% 제형(카스케이드[®]), ethofenprox+penthotoate 7+30% 제형(로드[®]), spinosad 10% 제형(부메링[®])이었다. 각 약제를 증류수를 이용하여 1,000 ppm으로 제조한 후 다시 증류수로 500, 250, 125 ppm으로 연속 희석을 실시하였다. 옆침지는 조제된 농약 현탁액에 2 cm² 배추 잎을 약 10 분간 침지시킨 후 여과지에 올려 약 5 분간 건조시켰다. 각 배추 잎에 배추좀나방 3령충을 10 마리씩 3 반복으로 처리하였으며, 매일 24 시간 주기로 7 일 동안 생존수를 계수하였다. 배추좀나방의 5 일차 살충률을 기준으로 프로빗 프로그램(Raymond, 1985)에 기입하여 반수치사약량을 산출하였다.

기생력 분석

갓 우화한 프루텔고치벌 암수 성충을 기생력 분석에 이용하였다. 첫날 성충을 얻기 위해 기생봉 번데기 각각을 0.6 mL 튜브에 넣고, 고치에서 깨어난 성충을 현미경으로 산란관의 존재 여부를 통해 암, 수를 구분하였다. 각 기생력 분석 상자는 암컷 1 마리, 수컷 2 마리를 배추좀나방 애벌레 100마리씩 사육하는 상자에 집단별로 3반복 실험하였다. 7-8 일간 기생률을 확인하고 고치를 계수 한 후 SAS 프로그램을 이용하여 표준편차를 비교하여 Sigma plot 프로그램으로 그래프를 그렸다. 표준편차를 비교한 결과 산란의 차이가 거의 없었다.

CpBV segment 미량주사

본 연구에 사용된 CpBV segment는 총 네 개(CpBV-S2, CpBV-S8, CpBV-S9, CpBV-S16)였다. 이 segment들은 Choi et al. (2005)에 의해 트랜스포존을 이용하여 제조된 것으로 *Escherichia coli* 복제 origin을 포함하고 있다. 각 CpBV segment의 양을 늘리기 위해 다시 재조합 *E. coli*를 증식시켰고, 여기에서 miniprep을 통해 각 segment DNA를 확보하였다. 각 segment는 50 ng의 양으로 cellfectine 용액인 Metafectene-Pro (Biontex, Planegg, Germany)와 부피 비율로 1:1로 혼합 후 500 nL의 부피로 곤충 체내에 주입하였다(Fig. 3A 참조). 대상 곤충은 3령충 배추좀나방으로 혈강에 주입 후 다시 배추 잎으로 상기의 조건에서 사육하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR

처리된 배추좀나방 유충은 CpBV segment DNA 주입 후 24 시간 간격으로 8-10 마리씩 임의로 선발하여 총 RNA 추출에 이용되었다. RNA 추출은 Trizol 용액(MRC, Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 제조회사의 지침대로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA 1 µL를 RT-Premix[®] (인트론바이오테크놀로지, 서울)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 제조된 cDNA를 이용하여 다음의 조건으로 PCR하였다. 전체 8 개의 vankyrin 유전자를 대상으로 7쌍의 PCR 프라이머를 이용하였으며, 이들 프라이머 서열은 Bae and Kim (2009)에 이용된 것들이었다. PCR 반응물은 94°C에서 1 분, 50°C에서 1 분, 72°C에서 1 분씩 35 회 증폭 반복으로 실시되었다.

Bt를 이용한 CpBV 처리된 배추좀나방의 생물검정

Bt 처리를 위해 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*를 이용하였다. 이 세균의 증식과 미생물 제형화는 Seo and Kim (2011)에 의해 진행된 약제를 이용하였다. Bt 처리 농도는 70 ppm로서 상기에 기술한 옆침지법을 이용하였다. CpBV segment 처리 후 48 시간 경과 후 생물 검정하였다. 각 처리는 10 마리씩 3 반복하였다. Bt 처리 후 5 일 경과 후 생존수를 계수하였으며, 이를 토대로 처리별 살충률을 비교하였다.

통계분석

기생율과 살충율의 자료는 arcsine 수치변화 이후 one way ANOVA 분석을 실시하였다. 처리의 평균간 비교는 Least Squared Difference (LSD) 검정을 실시하였으며, 제I형오류 확률은 0.05로 설정하고 평균치 차이의 유의성을 판별하였다. 모든 통계량 계산은 SAS 프로그램(SAS Institute, 1989)을 이용하였다.

결과

배추좀나방 집단 간 살충제 감수성 변이

배추좀나방 적용 약제 세 종류를 중심으로 전체 다섯 개 배추좀나방 집단에 대한 살충제 감수성 변이를 분석하였다(Fig. 1). 전체적으로 flufenoxuron이 가장 높은 살충력을 보였으며, 다음으로 피레스로이드와 유기인계 혼합제에서 높은 살충력을 나타냈고, neonicotinoid인 spinosad가 비교적 낮은 살충력을 보였다. 이러한 결과를 반수치사약량으로 산출한 결과(Table 1) 각

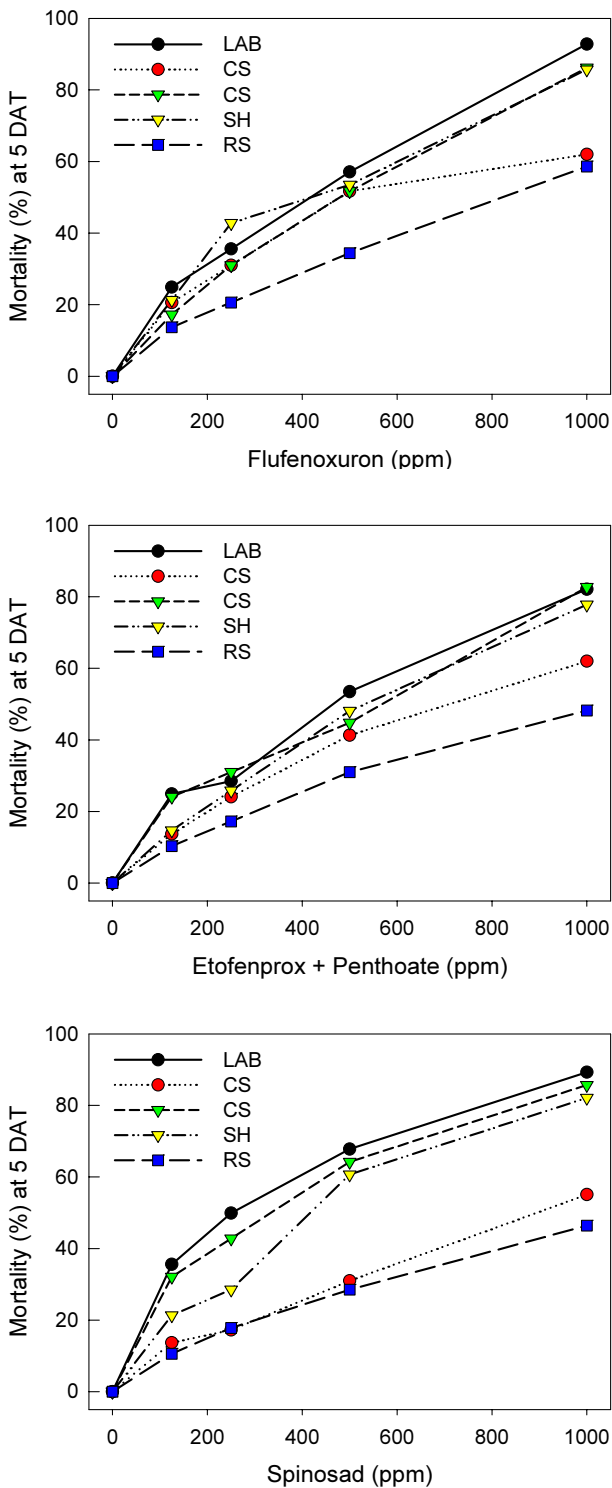


Fig. 1. Susceptibilities of five different populations of *Plutella xylostella* against three different insecticides (flufenoxuron, etofenprox, and spinosad). LAB, 'CS', 'SC', 'SH', and 'RS' represent collection groups of laboratory, Chungsong, Songchun, Songhyun, and resistant strain, respectively. Mortality was measured at 5 days after treatment (DAT). Each measurement was replicated three times. Each replication used 10 larvae.

Table 1. Comparison of insecticide susceptibilities of different strains of *Plutella xylostella* larvae (second instar) in median lethal dose (LC₅₀)

Population ^a	N	LC ₅₀ (95% CI)	X ²	df	P	RR ^b
Flufenoxuron						
LAB	150	327.6 (237.0 - 435.3)	2.988	2	0.776	1.00
CS	150	539.8 (348.3 - 1173.4)	0.223	2	0.105	1.65
SC	150	398.3 (299.2 - 536.1)	1.404	2	0.505	1.22
SH	150	342.9 (236.8 - 479.0)	1.317	2	0.482	1.05
RS	150	804.0 (530.1 - 2102.5)	0.448	2	0.201	2.45
Etofenprox						
LAB	150	396.12 (277.0 - 572.7)	1.985	2	0.629	1.00
CS	150	663.79 (455.0 - 1350.0)	0.071	2	0.035	1.68
SC	150	418.96 (296.9 - 619.6)	3.142	2	0.792	1.06
SH	150	482.49 (346.6 - 702.8)	0.548	2	0.240	1.22
RS	150	1108.34 (665.8 - 5685.9)	0.066	2	0.032	2.80
Spinosad						
LAB	150	230.72 (133.0 - 326.2)	0.586	2	0.254	1.00
CS	150	940.22 (595.9 - 3221.2)	0.830	2	0.340	4.08
SC	150	276.10 (170.2 - 392.8)	0.641	2	0.274	1.20
SH	150	380.23 (272.5 - 526.8)	1.102	2	0.424	1.64
RS	150	1442.07 (693.1 - 17172.3)	0.088	2	0.043	4.95

^a 'Population' indicates collection group of *P. xylostella* used in this study. 'LAB', 'CS', 'SC', 'SH', and 'RS' represent collection groups of laboratory, Chungsong, Songchun, Songhyun, and resistant strain, respectively.

^b 'RR' represents relative ratio of LC₅₀ compared to 'LAB' population in each insecticide.

약제에서 감수성 집단('LAB')이 가장 높은 살충제 감수성을 보였으며, 실내 선발 계통('RS')이 가장 낮은 감수성을 나타냈다. 야외충들은 모든 약제에서 실내 감수성 집단과 선발 집단의 중간 감수성을 보였으며, 야외충 사이에는 청송('CS') 집단이 두 안동 집단들('SH', 'SC')에 비해서 모든 처리 농약에 대해서 낮은 감수성을 나타냈다.

배추좀나방 집단 간 프루텔고치벌 기생력 분석

배추좀나방 적용 살충제에 대해서 차등 감수성을 보인 집단들에 대해서 프루텔고치벌의 기생이 차이를 보이는 지를 검증하기 위해 동일 조건의 기생력 시험이 실시되었다(Fig. 2). 각 기생력 검증 조건은 동일화하기 위해 갓 우화한 암컷 1 마리와 수컷 2 마리를 동일한 시기의 배추좀나방 100 마리에 처리하였다(Fig. 2A). 이러한 결과 약제 감수성 차이와 관련 없이 모든 집단에 기생력 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2B).

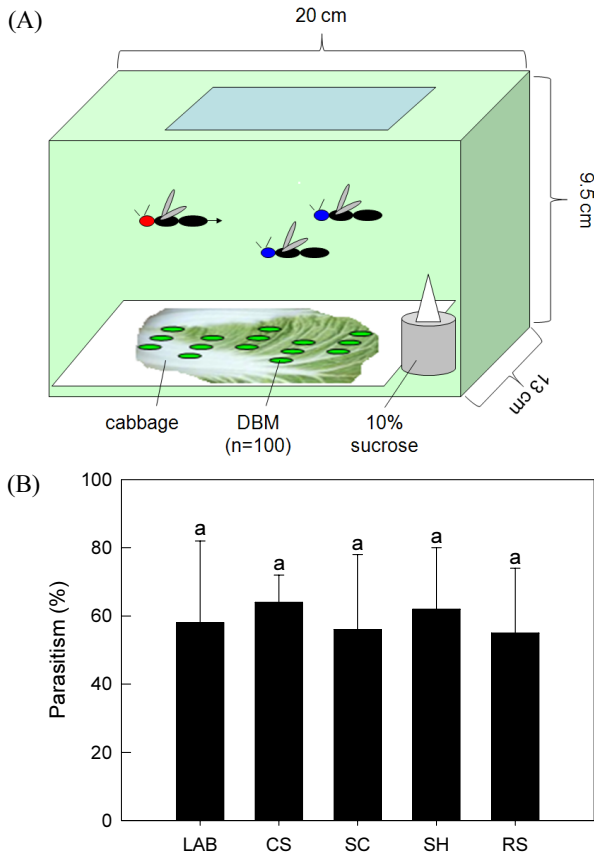


Fig. 2. Comparison of *Cotesia plutellae* parasitism against different populations that exhibit variation in insecticide susceptibilities. (A) A diagram showing a parasitism test. One day old parasitoid adults were used to test the parasitism, in which 'DBM' represents young larvae of *Plutella xylostella*. (B) Parasitic rates. Each treatment was replicated three times. Each replication consisted of 10 larvae. Mortality was measured at five days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). 'LAB', 'CS', 'SC', 'SH', and 'RS' represent collection groups of laboratory, Chungsong, Songchun, Songhyun, and resistant strain, respectively.

기생 배추좀나방의 Bt 감수성 증가

기생된 배추좀나방과 비기생된 개체들 사이에 Bt 생물농약에 대한 감수성이 차이가 분석되었다. 프루텔고치벌에 기생 후 3일 경과된 3령충에 접종한 결과 기생에 따라 배추좀나방은 Bt에 대해서 높은 감수성을 나타냈다. 이러한 결과를 반수치사약량으로 산출한 결과 약 1.51 배의 감수성이 낮아졌다(Table 2).

Vankyrin 유전자의 잠시발현 유도 및 Bt 감수성 증가

기생에 따라 Bt 농약에 대해서 높아진 감수성을 설명하기 위해 기생인자 가운데 면역력을 낮추는 유전자인 vankyrin을 이용

Table 2. Enhanced pathogenicity^a of *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella* larvae^b parasitized by *Cotesia plutellae*

Treatment ^c	N	LC ₅₀ (95% CI)	X ²	df	P
NP	180	71.7 (24.5 - 118.7)	1.57	3	0.333
P	180	47.4 (15.7 - 78.6)	0.92	3	0.180

^a Mortality was measured at 5 days after treatment.

^b Third instar larvae

^c 'NP' and 'P' stand for nonparasitized and parasitized larvae, respectively.

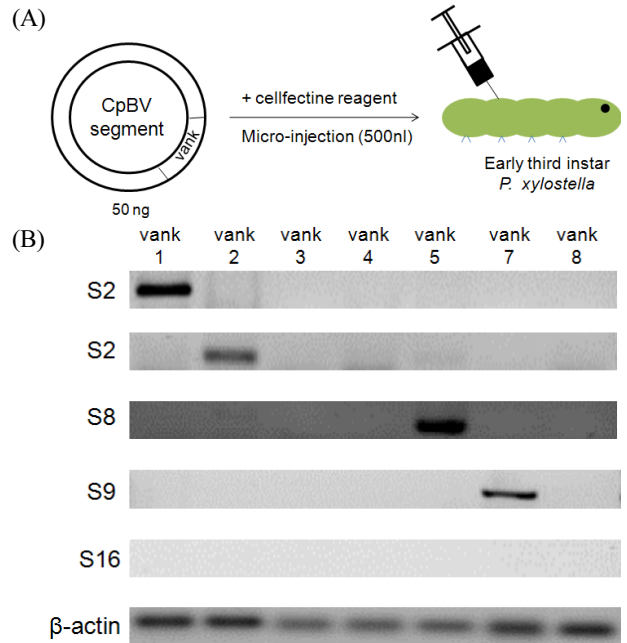


Fig. 3. Transient expression of different vankyrin genes in nonparasitized third instar larvae of *Plutella xylostella*. (A) A schematic procedure of transient expression. Four CpBV segments include S2, S8, S9, and S16. (B) Expression of vankyrin genes (RT-PCR). To confirm cDNA integrity, β -actin expression was analyzed.

하여 잠시발현을 유도하였다(Fig. 3). Vankyrin 유전자를 포함하고 있는 총 네 종류의 CpBV segment를 선발하였다(Table 3). CpBV-S2의 경우 2 종류의 vankyrin을 포함하고 있으며 이 segment를 주입할 경우 두 유전자 모두 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 그러나 CpBV-S8의 경우는 3 개의 vankyrin 유전자를 함유하나 vank5만 발현되었다. 또한 CpBV-S9의 경우 2 개의 vankyrin 유전자를 함유하나 vank7만 발현되었다. CpBV-S16은 1 개의 vankyrin 유전자를 갖고 있으나 발현되지 않았다.

이러한 CpBV segment 주입 후 vankyrin 유전자의 발현 조건에서 Bt 농약에 대한 감수성을 분석한 결과 대조구에 비해 vankyrin이 발현된 개체들이 높은 Bt 감수성을 나타냈다(Fig. 4). CpBV-S16 처리구의 경우 vankyrin의 발현이 나오지 않았고 Bt 감수성 증가도 없는 것으로 확인되었다.

Table 3. Predicted genes encoded in the selected five viral segments of *Cotesia plutellae* bracovirus (CpBV)

CpBV Segment	Size (bp)	Predicted genes			
		ID	Amino acids	Blasted gene	E-value
S2	13,848	ORF201	322	CpBV-PTP11	4e-171
		ORF202	327	CpBV-PTP12	2e-88
		ORF203	352	CpBV-vank1	7e-39
		ORF204	162	CpBV-vank2	2e-70
		ORF205	323	CpBV-PTP13	2e-162
		ORF206	334	CpBV-PTP14	5e-102
S8	10,763	ORF801	270	Hypothetical	-
		ORF802	105	Hypothetical	-
		ORF803	176	CpBV-vank3	4e-31
		ORF804	171	CpBV-vank4	4e-41
		ORF805	125	CpBV-vank5	3e-19
		ORF806	77	Hypothetical	-
S9	10,741	ORF901	125	CpBV-vank6	2e-33
		ORF902	321	CpBV-vank7	6e-41
		ORF903	105	Hypothetical	-
		ORF904	241	Hypothetical	-
		ORF905	264	Hypothetical	-
		ORF906	77	Hypothetical	-
S16	7,482	ORF1601	68	Hypothetical	-
		ORF1602	163	CpBV-vank8	1e-74

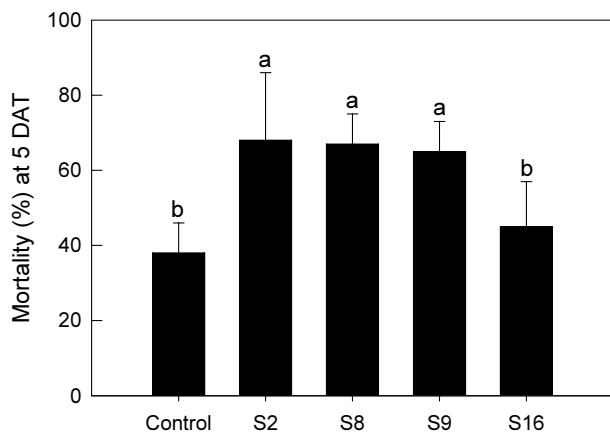


Fig. 4. Enhanced pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) by transient expression of vankyrins. The third instar larvae were micro-injected with CpBV segments containing vankyrins. After 24 h, the treated larvae were exposed to 70 ppm of Bt. Mortality was measured at 5 days after treatment (DAT). Each treatment was replicated three times. Each replication consisted of 10 larvae. Mortality was measured at five days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

고찰

배추좀나방에 대한 약제 방제 효율이 지속적으로 떨어지고 있다. 이러한 주요 원인은 살충제에 대한 배추좀나방의 저항성 발달로 해석되고 있다. 전작 해충을 대상으로 비교적 널리 살포되고 있는 피레스로이드 살충제에 대한 배추좀나방의 저항성 발달은 이 약제의 작용점인 소듐이온채널 유전자의 돌연변이에 기인된 것으로, 상응한 점돌연변이로서 L1014F와 T929I가 존재한다(Schuler et al., 1998). 이때 L1014F는 kdr (knockdown resistance) 저항성이고 이 두 점돌연변이가 결부되면 skdr (super-kdr) 저항성으로 나타나게 된다(Williamson et al., 1996). 한국의 전 지역에서 이러한 저항성 개체들을 분석한 결과 L1014F 돌연변이는 조사 지역 모든 곳에서 나타났으며, T929I는 70% 이상 개체에서 검출되었다고 보고하였다.(Kwon et al., 2004). 또 다른 작용점변화 저항성은 사이클로다이엔계 살충제의 작용점인 GABA 수용체 변형을 통해 나타나며, 배추좀나방의 경우 두 가지 유사체(paralog) 유전자가 발견되었다(Yuan et al., 2010). 생물농약인 Bt에 대해서도 배추좀나방은 야외에서 저항성을 나타냈다. 나비목 곤충에 독성을 보이는 Bt 농약의 Cry IA 독소 단백질은 중장세포 막에 존재하는 cadherin 단백질에 결합하여 작용을 이루는데 이때 돌연변이에 의해 이 cadherin의 변형은 약제 저항성으로 발달될 수 있다(Tabashnik et al., 1997).

본 연구는 상용 화학농약 기반의 배추좀나방 방제가 살충제 저항성 발달로 어려움을 주고 있다는 상황 속에서 생물농약 기반의 새로운 방제 기술을 개발하는 데 목표를 두었다. 본 연구에서 추구한 새로운 방제 기술은 미생물농약인 Bt와 천적인 프루텔고치벌의 혼합 처리를 고안했다. 이는 프루텔고치벌의 배추좀나방에 대한 기생이 약제 저항성 유무와 관련 없이 이뤄질 것이라는 가정에서 출발했다. 따라서 Bt 약제에 저항성으로 생존한 개체는 프루텔고치벌의 기생에 따라 치사에 이르고 또한 이로 인해 차세대 집단에 저항성 유전자의 빈도를 낮추겠다는 전략을 담고 있다. 이러한 가설을 증명하기 위해 우선 살충제에 대한 감수성에서 차등을 보이는 배추좀나방 집단을 대상으로 프루텔고치벌의 기생력을 분석했고, 결과로 프루텔고치벌은 약제 감수성 차등과 무관하게 배추좀나방의 기생을 시도하는 것으로 나타났다. 더욱이 프루텔고치벌에 기생된 개체들은 Bt 농약에 대한 감수성이 증가했다. 이는 이 두 생물인자의 협력 효과로 해석될 수 있다. 이를 기작적으로 증명하기 위해 우리는 프루텔고치벌의 기생이 배추좀나방의 면역을 저하시키고, 이에 따라 미생물제제인 Bt에 대한 감수성이 높아져 이 약제의 배추좀나방에 대한 살충력이 증가한 것으로 해석했다.

프루텔고치벌은 다양한 기생인자를 이용하여 기주의 면역력

을 저하시킨다(Kim, 2006). 특별히 프루텔고치벌의 폴리드나 바이러스인 CpBV는 157 개의 유전자를 가지고 피기생체 배추좀나방 체내로 들어가고, 이들 유전자의 발현을 시도한다(Chen et al., 2011). 기능이 알려진 모든 CpBV 유전자들은 기주의 세포성 및 체액성 면역을 억제할 수 있다(Kim et al., 2007). 특별히 vankyrin 유전자는 대상 기주 세포의 NFκB 신호전달과정을 억제하여 면역저하를 유도하는 것으로 알려지고 있다. 초파리의 NFκB의 핵내 이동을 억제하는 IκB인 Cactus와 유사한 ankyrin 구조를 지니는 CpBV의 vankyrin은 초파리의 Cactus와 비교하여 볼 때 또한 N 말단 신호처리영역과 C 말단 PEST 영역이 결실된 구조를 나타냈다(Bae and Kim, 2009). 이 N 말단과 C 말단은 IκB의 분해에 관여하는 신호를 지니고 있다. 즉, 전형적 IκB의 N 말단에 두 개의 serine 아미노산이 매우 보존적 서열(DSGΨXS: Ψ는 소수성아미노산, X는 임의의 아미노산)에서 나타난다(Karin, 1999; Shirane et al., 1999). 면역신호에 따라 이 serine 부위가 인산화되면, ubiquitin 단백질에 의해 인식되고, 이를 단백질 분해 효소에 의해 IκB가 분해되고, 결과적으로 NFκB가 IκB와의 결합에서 방출되게 된다(Burke et al., 1999; Latimer et al., 1998; Shirane et al., 1999; Lin et al., 2000; Senftleben et al., 2001). 이와 유사하게 C 말단 부위도 인산화되어 단백질 분해효소에 노출되게 된다(Beg and Baldwin, 1993; Liu et al., 1997). 즉, CpBV의 vankyrin은 NFκB와 결합할 수 있는 최소 ankyrin 반복 서열은 유지하되, 세포내 신호체계에 의해 IκB가 조절되는 부위는 결실된 구조를 지니고 있다. 그래서 CpBV-IκB는 NFκB를 항구적으로 결합하여 이 신호체계를 비가역적 억제상태로 유도할 수 있다는 것을 의미하게 된다. *Microplitis demolitor* 폴리드나바이러스에서 유래된 IκB는 초파리의 NFκB 단백질인 Dif, Dorsal 또는 Relish와 결합할 수 있고, 이러한 결합은 이들 NFκB의 DNA 프로모터 결합을 방해하여, 궁극적으로 항생펩타이드 유전자 발현을 억제시켰다(Thoetkiattikul et al., 2005). *Campoplex sonorensis* 폴리드나바이러스에서 유래된 7 개의 서로 다른 IκB들은 조직별 발현 특이성을 보였고, 발현 단백질이 핵내에서도 존재하는 것을 보여, 이들 IκB가 NFκB의 신호체계를 억제할 수 있다는 것을 뒷받침했다(Kroemer and Webb, 2005). 따라서 CpBV의 vankyrin은 기생된 배추좀나방에서 주요 면역억제 인자로서 작용하게 된다. 본 연구에서는 이 유전자의 발현을 *in vivo* transient expression 기술(Hepat and Kim, 2012)에 의해 유도되었고, 이렇게 발현된 vankyrin은 배추좀나방의 Bt 감수성을 뚜렷하게 저하시켰다. 따라서 프루텔고치벌에 기생된 배추좀나방은 vankyrin을 포함한 다양한 기생인자에 의해 면역억제가 유도되었고, 이는 Bt의 감수성을 증가시키는 요인이 된 것으로 해석된다.

프루텔고치벌은 국내 배추좀나방의 야외 밀도를 제한하는 생물방제인자로 여겨진다. 중국의 항조우 지역에서 배추좀나방에 발생하는 기생인자들을 연중 조사한 결과 프루텔고치벌은 연중 높게 기생률을 기록하는 것을 보고하였다(Liu et al., 2000). 프루텔고치벌의 기생이 배추좀나방의 약제 저항성과 무관하다는 사실을 고려한다면 프루텔고치벌은 야외 배추좀나방의 약제 저항성 빈도를 낮추는 생물적 인자로 평가를 받을 수 있다. 더욱이 프루텔고치벌은 Bt 독소에 내성을 보이는 것으로 나타났다(Schuler et al., 2004). 이러한 호완성과 대조적으로 화학농약으로 야외 집단을 처리할 경우 저항성 배추좀나방에 효과가 낮으면서 비교적 감수성인 프루텔고치벌을 치사시킬 수 있어 해충 저항성 문제를 더 악화시키는 결과를 초래할 수 있다(Shi et al., 2004).

본 연구는 기생봉과 Bt의 혼합 방제 기술이 배추좀나방에서 유효하면 특별히 약제에 저항성인 집단에 이러한 혼합 방제의 적용성이 높을 것으로 추정된다. 유사한 종합생물방제 기술이 배추좀나방을 대상으로 개발되었다. 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila*는 면역의 주요 중개 물질인 아이코사노이드의 생합성을 억제시킨다(Park and Kim, 2000). 최근 이 세균으로부터 7개의 대사물질이 화학 동정되었고, 이들이 아이코사노이드 생합성을 억제하여 면역 억제를 유도한다고 밝혀졌다(Seo et al., 2012). 이들 물질 또는 이들 물이 포함된 세균 배양은 Bt의 살충력을 현격하게 증가시켰다(Seo and Kim, 2011). 이러한 결과들은 면역억제물질 또는 유용생물체들이 Bt와 혼합 처리되어 방제 효과를 증가시킬 수 있다는 공통된 기반 기술을 제시하고 있다. 본 연구를 기반으로 다양한 면역억제 인자들의 동정이 요구되면 이들의 종합생물방제에 이용되어 약제 저항성으로 방제가 어려운 해충들을 대상으로 새로운 방제 기술로서 개발될 수 있다고 본 연구 결과들은 뒷받침하고 있다.

사 사

본 연구는 2012년 안동대학교 학부선진화사업(ACE)의 지원으로 수행되었다. 또한 본 연구의 재료비는 2012년도 농촌진흥청 아젠다사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받았다.

Literature Cited

Bae, S., Kim, Y., 2004. Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 39-44.

- Bae, S., Kim, Y., 2009. I κ B genes encoded in *Cotesia plutellae* bracovirus suppress an antiviral response and enhance baculovirus pathogenicity against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 79-87.
- Beg, A.A., Baldwin, A.S., 1993. The I κ B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes Dev.* 7, 2064-2070.
- Burke, J.R., Wood, M.K., Ryseck, R.P., Walther, S., Meyers, C.A., 1999. Peptides corresponding to the N and C termini of I κ B- α , - β , and - ϵ as probes of the two catalytic subunits of I κ B kinase, IKK-1 and IKK-2. *J. Biol. Chem.* 274, 36146-36152.
- Chen, Y., Gao, F., Ye, X., Wei, S., Shi, M., Zheng, H., Chen, X.X., 2011. Deep sequencing of *Cotesia vestalis* bracovirus reveals the complexity of a polydnavirus genome. *Virology* 414, 42-50.
- Choi, J.Y., Rho, J.Y., Kang, J.N., Shim, H.J., Woo, S.D., Jin, B.R., Li, M.S., Je, Y.H., 2005. Genomic segments cloning and analysis of *Cotesia plutellae* polydnavirus using plasmid capture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 487-493.
- Heptat, R., Kim, Y., 2012. *In vivo* transient expression for the functional analysis of polydnviral genes. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 152-159.
- Karin, M., 1999. The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 274, 27339-27342.
- Kim, Y., 2006. Polydnavirus and its novel application to insect pest control. *Kor. J. Appl. Entomol.* 45, 241-259.
- Kim, Y., Choi, J.Y., Je, Y.H., 2007. *Cotesia plutellae* bracovirus genome and its function in altering insect physiology. *J. Asia Pac. Entomol.* 10, 181-191.
- Kroemer, J.A., Webb, B.A., 2005. I κ B-related vankyrin genes in the *Campoletis sonorensis* ichnovirus: temporal and tissue-specific patterns of expression in parasitized *Heliothis virescens* lepidopteran hosts. *J. Virol.* 79, 7617-7628.
- Kwon, D.H., Choi, B.R., Park, H.M., Lee, S.H., Miyata, T., Clark, J.M., Lee, S.H., 2004. Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80, 21-30.
- Latimer, M., Ernst, M.K., Dunn, L.L., Drutskaya, M., Rice, N.R., 1998. The N-terminal domain of I κ B α masks the nuclear localization signal(s) of p50 and c-Rel homodimers. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2640-2649.
- Lin, P.H., Huang, L.H., Steward, R., 2000. Cactin, a conserved protein that interacts with the *Drosophila* I κ B protein cactus and modulates its function. *Mech. Dev.* 94, 57-65.
- Liu, Z.P., Galindo, R.L., Wasserman, S.A., 1997. A role for CKII phosphorylation of the cactus PEST domain in dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 11, 3413-3422.
- Liu, S., Wang, X., Guo, S., He, J., Shi, Z., 2000. Seasonal abundance of the parasitoid complex associated with the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in Hangzhou, China. *Bull. Entomol. Res.* 90, 221-231.
- Park, Y., Kim, Y., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46, 1469-1476.
- Raymond, M., 1985. Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 23, 117-121.
- SAS Institute, 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Schuler, T.H., Denholm, I., Clark, S.J., Stewart, C.N., Poppy, G.M., 2004. Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Insect Physiol.* 50, 435-443.
- Schuler, T.H., Martinez-Torres, D., Thompson, A.J., Denholm, I., Devonshire, A.L., Duce, I.R., Williamson, M.S., 1998. Toxicological, electrophysiological, and molecular characterisation of knock-down resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 59, 169-182.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., Karin, M., 2001. Activation by IKK α of a second evolutionarily conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.
- Seo, S.Y., Kim, Y., 2011. Development of "Bt-Plus" biopesticide using entomopathogenic bacterial (*Xenorhabdus nematophila*, *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) metabolites. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50, 171-178.
- Seo, S.Y., Lee, S., Hong, Y., Kim, Y., 2012. Phospholipase A₂ inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3816-3823.
- Shi, Z., Guo, S., Lin, W., Liu, S., 2004. Evaluation of selective toxicity of five pesticides against *Plutella xylostella* (Lep: Plutellidae) and their side-effects against *Cotesia plutellae* (Hym: Braconidae) and *Oomyzus sokolowskii* (Hym: Eulophidae). *Pest Mang. Sci.* 60, 1213-1219.
- Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., 1999. Common pathway for the ubiquitination of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ mediated by the F-box protein FWD1. *J. Biol. Chem.* 274, 28169-28174.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J.L., Ferre, J., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12780-12785.
- Thoetkiattikul, H., Beck, M.H., Strand, M.R., 2005. Inhibitor κ B-like proteins from a polydnavirus inhibit NF- κ B activation and suppress the insect immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11426-11431.
- Webb, B.A., 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and

evolution, in: Miller, L.K., Ball, L.A. (Eds.), *The insect viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 105-139.

Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L., 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr)

to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51-60.

Yuan, G., Gao, W., Yang, Y., Wu, Y., 2010. Molecular cloning, genomic structure, and genetic mapping of two *RDL*-orthologous genes of GABA receptors in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 74, 81-90.