

# 먹이에 따른 파밤나방 발육과 DNA 메틸화 변이

김태형 · 수닐쿠마르<sup>1</sup> · 김용균<sup>1\*</sup>

안동대학교 자연과학대학 식물학과, <sup>1</sup>안동대학교 생명자원과학과

## Variation in Development and DNA Methylation of *Spodoptera exigua* Fed with Different Diets

Taehyung Kim, Sunil Kumar<sup>1</sup>, Yonggyun Kim<sup>1\*</sup>

Department of Plant Medicals, College of Natural Sciences, Andong National University, Andong 36720, Korea

<sup>1</sup>Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 36720, Korea

**ABSTRACT:** Physiological plasticity of insects can be closely related with their epigenetic change. This hypothesis was tested using a polyphagous lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*, by assessing the effects of different diets on development and DNA methylation. Three different diets (Welsh onion (WO), Chinese cabbage (CC), artificial diet (AD)) were assessed by feeding a cohort of larvae from neonate to last instar. There were significant differences in larval developmental rate, pupal weight and adult emergence according to diet treatments. AD-fed larvae exhibited the fastest developmental rate along with the highest pupal weight and adult emergence. Among natural hosts, WO was more favorable for development of *S. exigua* than CC. Total hemolymph proteins and sugars in the last instar larvae were varied among different diets. Gene expression of an insulin-like peptide (*SeILPI*) presumably associated with development was also varied among diets. Cytosine methylation of genomic DNA was assessed using a monoclonal antibody. Genomic DNA of *S. exigua* larvae was methylated. DNA methylation was apparently varied among different diet-fed larvae. The facts that a cohort of *S. exigua* was differentiated in developmental rate and cytosine methylation by different diets suggest that epigenetic factor(s) may play a crucial role in the physiological plasticity.

**Key words:** *Spodoptera exigua*, Diet, DNA methylation, Development

**초 록:** 곤충 생리현상의 가소성은 후생유전적 변화와 밀접하게 관련을 지을 수 있다. 이 가설을 증명하기 위해 광식성인 파밤나방(*Spodoptera exigua*)을 대상으로 상이한 먹이 조건에 따라 이 곤충의 발육과 DNA 메틸화에 영향을 주는 지 분석하였다. 동일한 코호트로부터 얻은 것 부화한 유충을 최종령에 이르기까지 세 가지 다른 먹이(대파, 배추, 인공사료)로 섭식 처리하였다. 이 결과 상이한 먹이 조건에 따라 유충발육속도, 용화율 및 우화율에서 뚜렷한 차이를 보였다. 인공사료로 사육된 유충이 가장 빠른 유충발육속도와 높은 용화율 및 우화율을 나타냈다. 반면에 두 자연 기주 가운데는 대파가 배추에 비해 파밤나방 발육에 양호하였다. 이러한 먹이에 따른 변이는 혈립 단백질 및 혈당에서도 차이가 나타났다. 또한 발육과 연계되었을 것으로 추정되는 인슐린유사펩타이드(*SeILPI*) 유전자의 발현 정도도 먹이조건에 따라 상이했다. 단일항체를 이용하여 파밤나방 게놈 DNA의 시토신 메틸화를 분석한 결과 이 부위에 DNA 메틸화가 검출되었으며, 메틸화 정도는 먹이 조건에 따라 상이했다. 이 결과들은 동일 집단인 파밤나방이 상이한 먹이 조건에 따라 발육차이를 나타내고 또한 시토신 메틸화에 변이를 보여 이 곤충의 생리적 가소성에 후생유전적 인자가 작용하고 있는 것을 제시한다.

**검색어:** 파밤나방, 먹이, DNA 메틸화, 발육

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 광식성 곤충으로 채소, 화훼 및 과실류까지 피해를 주는 해충이다. 국내 조사에서는 채소

13 종, 전작물 12 종, 화훼류 6 종, 기타 11 종으로 총 42 종의 자연 기주를 파밤나방이 가해한다고 발표하였다(Goh et al., 1990). 범존종으로 파밤나방은 북미의 경우 적어도 18 과에 속하는 90 종 이상의 식물 기주를 가해하는 것으로 보고되었다(Greenberg et al., 2002). 전 세계적으로 파밤나방에 기인한 정확한 경제적

\*Corresponding author: [hosanna@andong.ac.kr](mailto:hosanna@andong.ac.kr)

Received August 14 2015; Revised October 3 2015

Accepted October 13 2015

피해 수치는 보고되어 있지 않지만, 1998년 미국의 경우, 목화 재배지에서만 약 5백만 에이커 면적에 피해를 주었고, 전체 수확량 감소는 1천9백만 달러로 추산되었다(Williams, 1990).

파밤나방을 방제하기 위해 가해시기인 유충을 대상으로 화학약제에 의존하였다. 그러나 약제저항성 발달과 특히 섭식량이 많은 종령시기에 약제에 대한 감수성이 낮아져 효과적인 방제에 어려움을 주고 있다(Brewer and Trumble, 1991; Mascarenhas et al., 1998). 이러한 감수성 저하는 특히 유기인계와 카바메이트계 살충제에 대해서 확연히 나타나는 데 이러한 이유는 이들 살충제의 작용점인 아세틸콜린에스테레이즈의 기질친화도 변화에 따라 약제와 작용점 사이에 결합력이 종령기에 낮아져서 일어난 것으로 해석되었다(Kim et al., 1998). 생물농약인 *Bacillus thuringiensis*가 파밤나방 방제에 이용되었으나, 이 약제에 대해서도 파밤나방이 저항성을 발달시켜 효과적인 방제 효과를 나타내지 못하였다(Moar et al., 1995; Seo and Kim, 2011). 국내에서 파밤나방에 질병을 일으키는 벡클로바이러스, 병원성곰팡이 및 병원성선충이 보고되었다(Goh et al., 1991; Han et al., 1999). 또한 성페로몬을 이용한 교미교란제 처리가 시도되었다(Park and Goh, 1995). 그러나 생물제제의 한계성과 국부적 성페로몬 처리의 비효율성으로 농산업 현장에 적용하는 데는 아직 극복해야 할 과제들이 남아있다.

파밤나방은 국내 노지 대파 재배지에서 4 회 발생피크를 보인다(Goh et al., 1993). 여기에 시기적 또는 지역적으로 예상치 못한 높은 발생 밀도를 기록할 수 있다. 이러한 돌발적 발생은 성충의 이주, 먹이의 질적 변화 및 천적 집단의 밀도 감소 등에 의해 야기될 수 있다(Saeed et al., 2010). 파밤나방의 이동성은 비교적 잘 알려져 있다. 이 가운데 휴면 기작을 가지고 있지 않은 파밤나방이 가을 기간 동안 월동을 위해 남쪽으로 이주하는 장거리 이동성을 레이더 기술로 측정하였다(Feng et al., 2003). 이러한 야외 이동 능력은 실내에서 어린 성충이 약 179 Km를 비행할 수 있다는 결과(Jiang, 1999)를 증명하였다. 국내의 경우 시설재배지의 확대로 인하여 파밤나방은 이주하지 않고도 재배지에서 월동 가능성이 있을 것으로 추정하였다. 이러한 이유는 이 곤충의 비교적 높은 내한성 및 내한성 유기기작에서 비롯되었다(Kim and Kim, 1997). 따라서 이듬해 월동집단과 여기에 다시 새로 이주하여 온 집단이 혼재하면서 적합한 기주를 만날 경우 차세대를 형성시킬 수 있는 번식력이 크게 증가되어 파밤나방의 돌발적 발생을 야기시킬 수 있다는 시나리오를 세우게 된다.

다양한 기주에 대한 파밤나방의 발육 및 생식력 분석이 이뤄져왔다. 이들 연구의 대부분은 상이한 기주에 대한 파밤나방의 적합한 기주를 결정하기 위해 내재적 자연증가율(Saeed et al.,

2010) 및 섭식선호성(Greenberg et al., 2002)을 분석하는 데 목적을 두었다. 그러나 상이한 기주에 따라 나타나는 발육속도의 변이에 대한 생리적 원인을 찾는 연구는 부재하다. 먹이 조건에 따라 다현현상(polyphenism)을 보이는 예로서 꿀벌(*Apis mellifera*)은 왕유의 먹이조건에 따라 동일한 유전적 배경을 갖는 암컷 유충이 일벌과 여왕봉으로 분화하는 데, 이 과정에 관여하는 다양한 유전자 발현 차이는 먹이 조건에 따라 나타나는 DNA 메틸화의 차이에 기인되는 것으로 보고하였다(Kucharski et al., 2008). 따라서 상이한 기주라는 환경 변화에 대해서 최적의 생존 전략으로 적응하려는 파밤나방에게는 먹이에 따른 다양한 유전자 발현의 변화가 동반될 수 있으며, 이는 DNA 메틸화 변화에서 야기될 수 있다는 가설을 세우게 된다. 본 연구는 이러한 후생 유전학적 유전자 발현 변이에 대한 기초 연구로서 상이한 먹이 조건에 따라 나타나는 파밤나방의 발육 변이를 조사하였다. 이 결과를 토대로 파밤나방의 DNA 메틸화가 존재하는 지를 단일 형태로 분석하였고, 또한 먹이에 따라 이러한 메틸화의 차이를 추적하였다.

## 재료 및 방법

### 공시충

공시충은 경북 안동시 송천동 대파 밭에서 채집하여 실내에서 인공사료(Goh et al., 1990)로 유충을 사육하였다. 인공사료는 주성분으로 1,400 mL 물에 콩가루(150 g), 밀배아(150 g), 미량원소(10 g), 이스트 분말(80 g) 및 아가로스(28 g)가 포함되고, 여기에 methyl *p*-hydroxybenzoate (6 g), 비타민 C (18 g), sorbic acid (3 g)와 포르말린 (4.5 mL)이 추가되었다. 성충 먹이로 10% 설탕물을 제공하였다. 전체 사육기간 동안 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 10\%$  및 광주기 16:8 (L:D) h 조건을 유지하였다.

### 먹이처리

처리한 먹이 종류는 인공사료, 대파(*Allium fistulosum* L.) 그리고 배추(*Brassica rapa* L.)를 이용하였다. 대파와 배추의 경우 무농약으로 재배된 것을 이용하였고, 먹이로 공급하기 전 24 시간 동안 증류수에 담가 잔류 물질을 제거한 후 건조시켜 처리하였다. 실내 공시충 집단에서 유래한 갓 부화한 1령충을 임의로 10 마리씩 3 반복으로 각 먹이에 처리하였다. 모든 처리는 각각 플라스틱 사육용기(직경 8.5 cm × 높이 3 cm)에서 개체 사육으로 개체간 상호 경쟁 또는 포식 가능성을 제거하였다. 각 개체에 인공사료는 약  $1\text{ cm}^3$ , 자연 기주는 약  $1\text{ cm}^2$  크기로 제공하

였으며, 매일 동일한 시각에 개체의 발육을 분석하면서 새로운 먹이로 갈아주었다. 모든 발육분석은 온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $60 \pm 10\%$  및 광주기 16:8 (L:D) h 조건에서 실시되었다.

## 발육분석

유충 기간은 부화에서 용화까지의 전체 유충기간으로 24 시간 간격으로 동일한 시각에 조사하여 산출하였다. 용화율은 반복별 10 마리 부화 유충에서 용화된 개체수를 백분율로 표기하였다. 용무게는 용화 첫날의 무게를 측정하였다. 우화율은 각 반복에서 용화된 개체로부터 우화된 개체수를 백분율로 표기하였다. 모든 처리는 3 반복으로 실시되었다.

## 단백질 분석

3령1일째 유충을 대상으로 3 가지 먹이 처리 조건에서 5령3일째까지(7-8일 소요) 사육하였다. 각 먹이별로 3-5 마리의 유충을 수거하여 복부 첫 마디의 헷다리를 제거 후 혈림프를 수거하였다. 수거된 혈림프에 항응고제인 phenylthiourea (Signal-Aldrich Korea, Seoul, Korea)를 소량 첨가 후  $800 \times \text{g}$ 에서 3분간 원심분리 후 상등액 혈장을 수거하였다. 각 처리별 혈장의  $5 \mu\text{L}$ 를 열변성 처리 후 10% SDS-PAGE를 실시하여 혈장 단백질 종류를 비교 분석하였다. 총단백질의 정량 분석을 위해 수거된 혈장을 bovine serum albumin을 표준단백질로 이용하여 Bradford (1972) 방법으로 분석하였다. 각 처리는 3 반복으로 실시하였다.

## 혈당분석

상기 처리에서 얻은 혈장을 3차증류수로 10 배 희석하였다. 이를 Sep-Pak C18 cartridge (Waters Associates, Inc., Milford, MA, USA)를 이용하여 지질 성분을 제거하였다. 다시 필터 공극 크기가  $0.22 \mu\text{m}$ 의 주사위 필터(Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 세균을 포함한 불순물을 제거하였다. 혈당 분석은 Guard column (CarboPac MA1,  $4 \times 50 \text{ mm}$ , Dionex, Sunnyvale, CA, USA)과 주 컬럼(CarboPac MA1,  $4 \times 250 \text{ mm}$ , Dionex)이 부착된 이온크로마토그래프(BioLC, Dionex)를 이용하여 분석되었다. 시료는  $25 \mu\text{L}$ 를 주입하였고, 이동상은  $400 \text{ mM NaOH}$ 를 분당  $0.4 \text{ mL}$ 로 흘려보냈다. 각 피크의 검출은 electrochemical detector (ED40, Dionex)를 pulse amperometry 모드로 하여 실시되었다. 각 처리는 3 반복으로 실시하였다.

## 파밤나방 인슐린유사단백질(*S. exigua* insulin-like peptide 1: *SeILP1*) 발현 분석

3령1일째 유충을 대상으로 3 가지 먹이 처리 조건에서 5령3일째까지(7-8일 소요) 사육하였다. 각 먹이별로 3-5 마리의 유충을 수거하여 지방체 조직을 추출하였다. 이 조직을 대상으로 Trizol 용액(MRC, OH, USA)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였고, 이 전체 RNA ( $1 \mu\text{g}$ )를 주형으로 oligo-dT (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT-3') 프라이머와 RT-premix (바이오니아, 대전)에 포함된 역전사 효소를 통해 cDNA를 합성하였다.

유전자 발현 분석은 *SeILP1* 유전자의 특이적 프라이머 (5'-CAC CAT GAA GAT CTT CTG TAT CCT C-3', 5'-ACA ATA GCT GAG AAA TTC GTC GAT-3')를 reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) 기술로 측정하였다. 상기에서 합성된 cDNA를 바탕으로  $94^\circ\text{C}$ 에서 30 초,  $55^\circ\text{C}$ 에서 30 초,  $72^\circ\text{C}$ 에서 1 분의 반응 순으로 35 회 PCR 산물을 증폭시켰다. 각 PCR 조건의 대조구로서 파밤나방의 라이보솜 단백질인 *RL32* 유전자에 특이적 프라이머(5'-ATG CCC AAC ATT GGT TAC GG-3', 5'-TTC GTT CTC CTG GCT GCG GA-3')를 이용한 유전자 증폭물을 *SeILP1* 증폭물과 비교하였다.

## 시토신 메틸화 분석

3령1일째 유충을 대상으로 3 가지 먹이 처리 조건에서 5령3일째까지(7-8일 소요) 사육하였다. 각 먹이별로 3-5 마리의 유충을 수거하여 장내 미생물 계층 유전자의 오염을 방지하기 위해 소화관을 제거하였다. 이후 DNaseI 반응시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 glass-glass homogenizer로 조직을 분쇄하였다. 원심분리( $4^\circ\text{C}$ , 10분)후 추출된 핵산을  $8 \text{ mM NaOH}$ 로 용해시킨 후 RNase 처리하여 RNA를 제거하였다. 대조구로서 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*)는 DNeasy Tissue Kit (Qiagen)을 이용하여 추출하였으며, calf thymus DNA는 Sigma-Aldrich Korea에서 구입하였다.

추출된 genomic DNA는 일정량( $5 \mu\text{g}$ )으로 변성용액( $0.4 \text{ M NaOH}$ ,  $10 \text{ mM EDTA}$ )에서 10 분간 반응 후 동량의 차가운  $2 \text{ M ammonium acetate}$ 로 중화하였다. 이를 Bio-Rad (Hercules, CA, USA) 제품의 Slot blot 기기의 각 홈에 분주하였다. 사용된 nitrocellulose membrane은  $6 \times$  saline-sodium citrate (SSC) 용액에 처리 후 TE로 세척하였다. DNA는 진공펌프를 통해 미세 여과장치를 통해 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 이후 membrane을  $2 \times$  SSC에서 세척 후 UV-crosslinker를 이용하여

DNA를 membrane에 고착시켰다. 이 membrane을 1 시간 동안 5% 탈지분유 용액에서 여백을 처리한 후 5-methylcytosine에 특이적 항체(Megabase Research, Lincoln, NE, USA, 1: 1,000)로 반응시켰다. 이후 alkaline phosphatase가 부착된 2차항체를 이용하여 결합시킨 후 nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate 용액으로 염색하여 메틸화를 확인하였다.

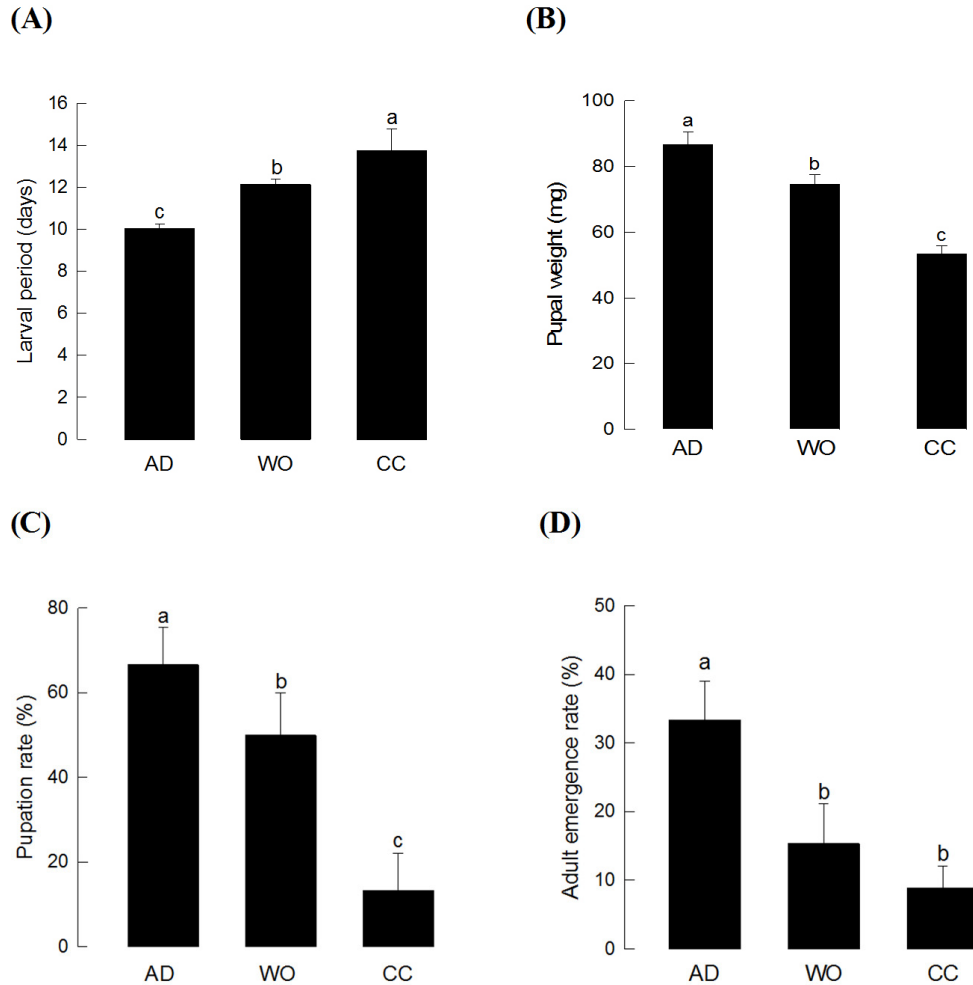
### 통계분석

백분을 자료 결과는 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석하였다. 자료의 도형화는 Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA)을 이용하여 도식화하였다.

## 결과

### 먹이에 따른 발육 변이

세 가지 먹이 조건에 따라 파밤나방의 발육을 분석하였다 (Fig. 1). 전체 유충기간 동안 상이한 먹이를 급여한 결과 자연 기주에 비해 인공사료로 사육한 개체들이 발육속도가 빨랐다 (Fig. 1A). 두 자연 기주 가운데 대파를 먹이로 증식한 유충이 배추 먹이 보다 발육속도가 빨랐다. 용화 직후에 측정된 용무게는 인공사료에서 가장 높았고, 다음으로 대파 그리고 배추 순으로 높았다(Fig. 1B). 이러한 경향은 유사하게 용화율(Fig. 1C) 및 우화율(Fig. 1D)에서도 나타났다.



**Fig. 1.** Effect of different diets on *S. exigua* development: larval period (A), pupal weight (B), pupation rate (C) and adult emergence (D). Three diets included artificial diet (AD), welsh onion (WO) and Chinese cabbage (CC). All treatments were replicated three times. Each replication used 10 individuals. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

## 먹이에 따른 혈림프 단백질 및 혈당 변이

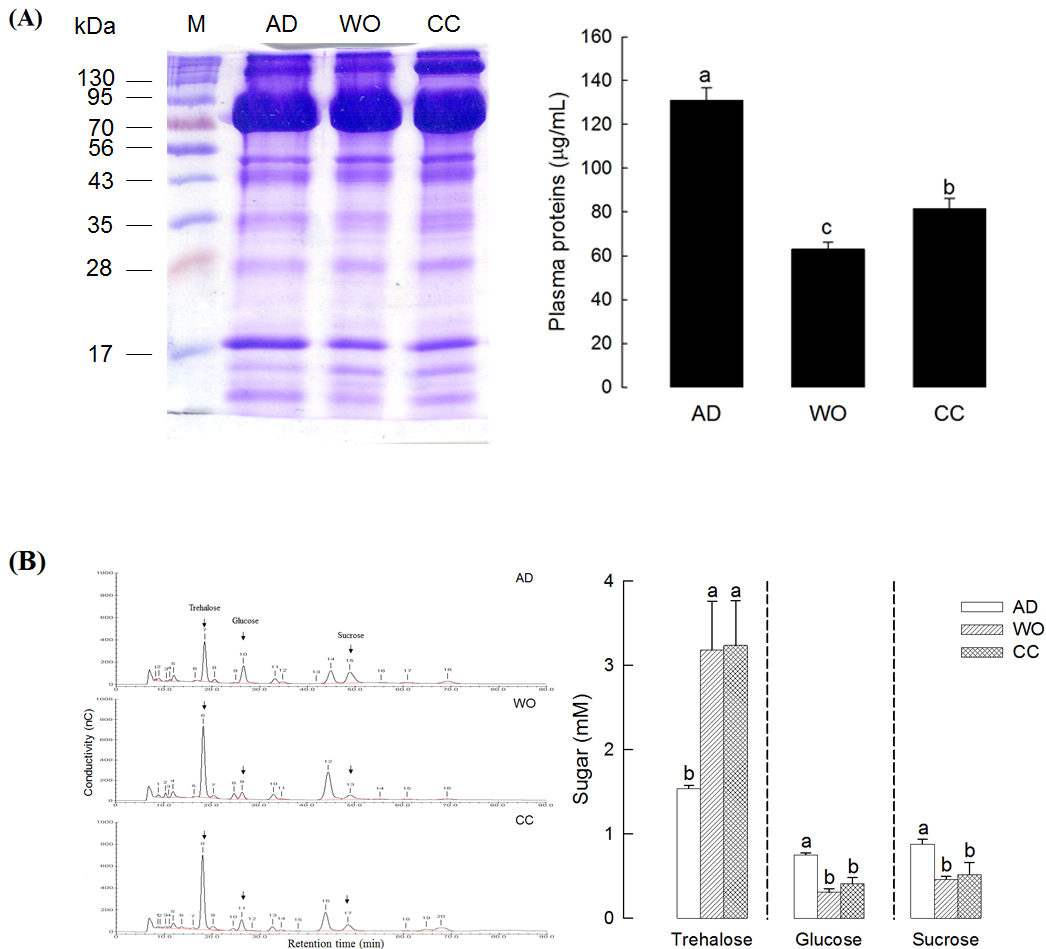
상이한 먹이에 따라 혈림프의 단백질 및 혈당 차이를 분석하였다(Fig. 2). 인공사료로 증식된 유충이 다른 먹이 조건에서 보다 약 2 배의 총단백질량을 나타냈다(Fig. 2A). 그러나 혈림프 단백질의 종류를 살펴보면 먹이에 따라 차이를 보인 단백질 종류는 발견하지 못했다. 혈당의 차이를 분석한 결과 주요 혈당인 트레할로스에서 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 2B). 인공사료로 키운 파밤나방이 다른 먹이 조건에 비해 약 2 배 정도 낮은 함량(약 1.5 mM)을 나타냈다. 반면에 포도당과 설탕은 트레할로스에 비해 적은 양으로 혈림프에 존재하나, 인공사료로 키운 개체들에서 높은 경향을 나타냈다.

## 먹이에 따른 암컷 성충 난모세포 발달

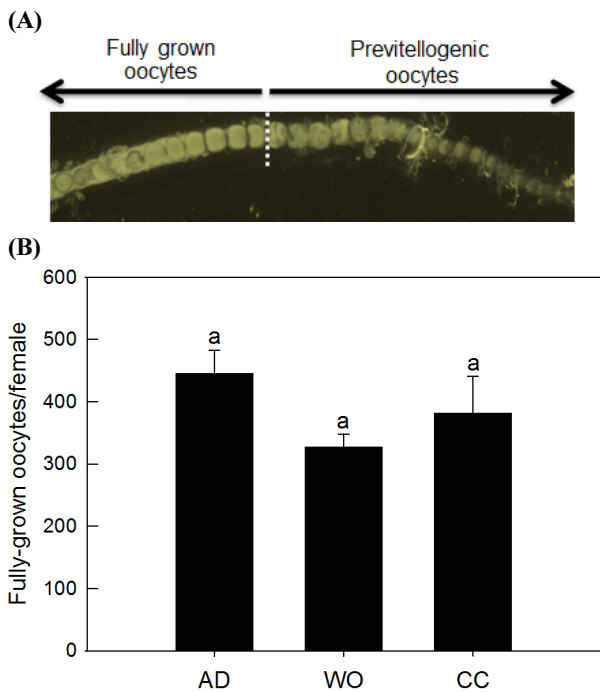
상이한 먹이에 따라 성장된 성충의 생식력을 비교하기 위해 우화한 지 24 시간 경과된 처녀 암컷의 난소를 적출하여 난황형 성과정이 종료된 성숙된 난모세포의 수를 계수하여 비교하였다(Fig. 3). 각 암컷은 1 쌍의 난소를 가지고 각 난소는 4 개의 난소소관을 가지고 있다. 이들 총 8 개의 난소소관이 갖는 전체의 성숙된 난모세포의 숫자는 325.3-445.3 개를 갖고 있었다. 이들의 개수는 유충 때 먹이 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않았다( $F = 2.05$ ;  $df = 2,6$ ;  $P = 0.2101$ ).

## 먹이에 따른 *SeiLP1* 유전자 발현 변이

상이한 먹이 조건에 따라 발육의 차이는 이에 관련된 유전자



**Fig. 2.** Biochemical changes in hemolymph proteins and trehalose levels of *S. exigua* larvae fed with different diets: artificial diet (AD), welsh onion (WO) and Chinese cabbage (CC). (A) Plasma proteins separated on 10% SDS-PAGE. Each well contained 5  $\mu$ l plasma sample. Right panel shows total protein amounts in the plasma. (B) HPLC analysis of plasma sugars. Right panel shows individual sugar levels of the plasma samples. All treatments were replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

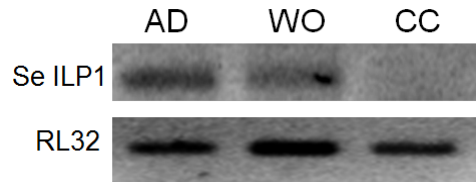


**Fig. 3.** Ovarial development of *S. exigua* larvae fed with different diets: artificial diet (AD), welsh onion (WO) and Chinese cabbage (CC). (A) A picture (50x magnification) showing an ovariole containing full-grown oocytes and previtellogenic oocytes (B) Average fully-grown oocyte numbers in each virgin female (24 h old after emergence). Each treatment used three individuals. Fully-grown oocytes were counted from all 8 ovarioles from a female. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

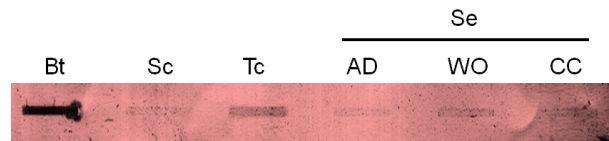
의 발현과도 관련이 있을 것으로 추정하였다. 이를 증명하기 위해 곤충의 발육과 밀접한 영향을 주는 내분비호르몬 인슐린유사펩타이드 유전자인 *SeILP1*의 발현을 RT-PCR 방법으로 분석했다(Fig. 4). 인공사료로 키운 유충이 가장 뚜렷한 발현을 보였고, 다음으로 대파로 키운 유충에서 높은 발현 강도를 나타냈다. 배추에서 키운 유충에서는 이 유전자의 발현을 거의 감지하지 못하였다.

### 먹이에 따른 시토신 메틸화 변이

파밤나방의 게놈 DNA에 메틸화가 이뤄지는 지를 메틸화된 시토신에 특이적 항체를 이용하여 분석하였다(Fig. 5). 척추동물인 송아지의 흉선에서 추출된 DNA의 경우 매우 높은 메틸화가 진행된 것을 확인하였다. 대조적으로 이스트의 경우는 메틸화가 거의 없는 것으로 나타났다. 기존에 메틸화에 대한 증거를 제공한 거릿쌀도둑거저리도 뚜렷한 DNA 메틸화를 나타냈다. 파밤나방의 경우도 메틸화를 보였으나, 먹이 종류에 따라 다소



**Fig. 4.** Variation in *SeILP1* expression of *S. exigua* larvae fed with different diets: artificial diet (AD), welsh onion (WO) and Chinese cabbage (CC). The gene expression analysis was conducted by RT-PCR. A positive control used the expression of *RL32*, a constitutively expressing ribosomal protein gene.



**Fig. 5.** Slot blot analysis of genomic DNA in cytosine methylation of *S. exigua* (Se) larvae fed with different diets: artificial diet (AD), welsh onion (WO) and chinese cabbage (CC). For reference, calf thymus DNA (Bt: *Bos taurus*), yeast DNA (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*) and coleopteran insect DNA (Tc: *Tribolium cataneum*) are assessed. Each slot contained 5  $\mu$ g of genomic DNA.

차이를 나타냈다. 인공사료로 키운 개체에 비해 자연 기주로 키운 개체들의 메틸화가 높은 것으로 나타났다.

### 고찰

상기한 기주는 파밤나방과 같은 광식성 해충에 있어 집단 크기와 돌발 발생을 유도하는 데 주요한 변수가 된다(Singh and Parihar, 1988; Lu and Xu, 1998). 이는 기주의 질적 변이가 초식자 곤충의 성장에 영향을 주고 이러한 성장 변이는 차세대를 형성할 수 있는 생존, 수명 및 번식력을 좌우하기 때문이다(Sequiera and Dixon, 1996; Awmack and Leather, 2002).

본 연구에서 파밤나방은 먹이에 따라 발육이 상이하게 나타났다. 인공사료로 사육한 유충은 발육 속도도 빨랐고, 이후 번데기 및 성충 발달도 양호하였다. 자연 기주 가운데 대파에서 키운 파밤나방이 배추에서 키운 것보다 유충 발육이 양호하였다. 이러한 먹이에 따라 파밤나방의 발육 차이는 이미 다른 연구에서 보고되었다. 파밤나방의 유충 발육, 성충 생식력 및 산란 선호도를 비교 평가한 결과 명아주(*Amaranthus retroflexus* L.)가 다른 자연 기주들인 목화(*Gossypium hirsutum* L.), 고추(*Capsicum annuum* L.), 해바라기(*Helianthus annuus* L.), 배추(*Brassica oleracea* L.)에 비해 양호한 결과를 나타냈으며, 이 가운데 배추는 파밤나방 발육에 가장 불량한 것으로 보고하였다(Greenberg et al., 2001, 2002). 광식성인 파밤나방이 다양한 기주에 대해 상이한 발육 속도를 나타내고 이에 따라 섭식 선호

성을 보인 것에는 기주 식물의 영양적 차이뿐만 아니라 곤충 저항성 인자도 관여하였을 것으로 사료된다. 일반적으로 식물의 곤충저항성은 비선호성(non-preference, antixenosis), 항생성(antibiosis) 그리고 내성(tolerance)로 구분된다(Painter, 1951). 본 연구에서처럼 선택 없이 주어진 먹이를 섭식하게 하는 경우는 식물이 보유한 항생성 물질이 파밤나방 발육에 걸림돌이 될 수 있다. 이러한 항생성 물질이 존재하지 않거나 또는 파밤나방이 이를 극복하는 생리적 및 생화학적 기작을 보유한 경우는 양호한 발육을 나타내고 그렇지 않을 경우는 저조한 발육을 나타내게 될 것이다. 파밤나방에 대한 식물체의 곤충저항성 물질에 대한 연구는 여러 품종의 토마토에서 폭넓게 연구되었다. 이 가운데 분비성 가시(glandular trichome)의 종류에 따라 생성되는 다양한 물질들이 여러 해충에 저항성을 갖게 하는 데, 파밤나방의 경우는 제IV형 분비성 가시에서 생성되는 sesquiterpene carboxylic acids가 비선호성 및 항생성 기능을 발휘하는 것으로 보고하였다(Frechowski and Juvik, 2001). 파밤나방의 가해에 따라 구강 분비물에 함유된 볼리시틴(volicitin, N-17-hydroxylinolenoyl-L-glutamine)은 기주 식물체로 하여금 초식자 가해를 인식하게하고 이에 관련된 항생성 물질 분비를 유도한다(Alborn et al., 1997). 꽃양배추(*Brassica oleracea*)의 경우 내생균에 의해 저항성 유전자 발현 유도되어 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 대해서 항생성을 나타내는 유도 저항성을 보고하였다(Thakur et al., 2013). 특히, 배추와 같은 십자화과 식물의 경우는 겨자유 배당체인 glucosinolate류를 항생성 물질로 생산하는 데, 이와 유사한 물질들이 약 100 종 이상 동정되었다(Rask et al., 2000). 이 물질은 식물의 가해와 함께 발현되는 myrosinase의 활성에 의해  $\beta$ -D-glucose가 제거되면서 불안정한 중간체 물질이 형성되고, 궁극적으로 독성이 높은 isothiocyanate, nitrile, thiocyanate 등의 물질로 변형된다(Bones and Rossiter, 1996). 배추에 특이적으로 가해하는 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 경우는 자신이 만들어내는 glucosinolate sulfatase를 이용하여 glucosinolate를 변형하여 결국 myrosinase의 독성화 반응을 억제함으로써 작물의 항생성을 피하게 된다(Ratzka et al., 2002). 본 연구에서는 파밤나방은 광식성 곤충으로 배추 먹이에 대해서 glucosinolate류를 특이적으로 제어할 인자를 갖지 않을 가능성이 높아, 다른 먹이에 비해 낮은 발육 속도 및 용무게를 나타낸 것으로 사료된다.

유충의 먹이조건에 따라 나타난 발육변이가 성충의 생식력에 영향을 주는 지를 판단하기 위해 우화한 처녀 암컷 성충에서 성숙된 난모세포 수를 비교한 결과, 유충의 발육에서 나타난 차이는 암컷 성충의 난모세포 수에 영향을 주지 않았다. 이러한 이유는 비교적 성충으로의 발육율이 낮은 자연 기주들에 있어

서 앞에서 기술한 바와 같이 항생물질을 극복하여 생존한 개체들이 임계체중 이상으로 발육하여 성충으로 발달된 선발효과로 이해될 수 있다. 즉, 일정 발육 이상으로 성장한 개체만이 성충으로 발육하여 이들이 갖는 생식력에는 차이를 주지 않은 것으로 해석된다. 따라서 본 연구에서 사용된 실내 사육충은 인공 사료 조건에서 누대사육된 것으로 자연 기주에 포함된 항생물질에 대해서 내성을 지닌 개체들이 이들 가운데에서 선발된 결과로 해석되며, 이들의 차세대는 선발된 자연 기주에 대해서 비교적 높은 적응력을 보인 집단으로 발달될 수 있는 가능성을 내포하고 있다. 즉, 자연 기주에 대한 누대 선발집단의 기주 적응력 변화에 대한 후속 연구가 필요하다.

먹이에 따라 상이한 성장 패턴은 이들 혈림프를 중심으로 단백질 및 혈당을 조사한 생화학적 분석에서도 이를 뒷받침하고 있다. 전체 혈장에 존재하는 총단백질량은 인공사료를 키운 유충에서 다른 먹이조건들 보다 높게 나타나 이 먹이조건이 단백질 영양원 공급에서 양호했을 것으로 사료된다. 그러나 SDS-PAGE 조건에서 단백질의 종류를 살펴보면 큰 질적 차이를 발견하지 못했다. 따라서 단백질의 변화 없이 정량적 차이가 이들 먹이조건에 의해 나타난 것으로 추정된다. 혈당을 분석한 결과, 모든 먹이 조건에서 가장 큰 피크는 트레할로스로 나타났다. 트레할로스는 곤충의 주요 혈당으로(Thompson, 2003) 파밤나방도 예외 없이 이를 주요 혈당으로 이용하고 있다(Kim and Hong, 2015). 그러나 이 외에 포도당과 설탕이 검출되었다. 이들의 상대적 비율도 먹이조건에 따라 상이하였다. 포도당의 경우 트레할로스의 분해산물로서 모든 세포의 영양원이라는 점에서 혈림프의 존재 가능성이 해석된다. 그러나 설탕의 경우는 추가 화학분석이 필요한 사항이다. 본 연구에서 사용된 이온수지 크로마토그래피 분리에서 늦게 검출되는 물질로서 이와 유사한 이당류와 검출시간에서 중복성이 있을 수 있기에 이에 대한 화학적 규명이 추가적으로 필요하다.

파밤나방의 인슐린유사펩타이드인 SeILP1이 파밤나방의 트레할로스 혈당을 낮추는 인자로 밝혀졌다(Kim and Hong, 2015). 인공사료로 키운 파밤나방 유충이 다른 먹이조건에 비해 낮은 트레할로스 농도를 보였다. 이러한 이유는 다른 먹이 조건에 비해 인공사료가 SeILP1의 분비가 높았을 것으로 추정하고 있다. 곤충의 인슐린유사펩타이드는 척추동물의 인슐린과 유사하게 혈당, 발육 및 수명을 조절하는 데 관여하고 있다(Wu and Brown, 2006). 즉, 인공사료로 사육된 파밤나방의 경우 높은 인슐린신호를 받게 되고, 이는 혈당을 낮출 뿐만 아니라 발육속도를 증가시킨 것으로 해석된다. 특별히 인공사료가 가장 높은 발현을 보였고, 다음으로 대파에서 발현량이 높아 ILP 발현과 발육 사이에 상관관계가 있다는 것을 나타냈다. 보



다 분명한 인과관계를 주기 위해서는 이 *SELLP1* 발현량을 억제시키는 RNA 간섭 기술을 이용하여 기능 연구를 실시할 필요가 있다.

시토신 메틸화는 후생유전 요인으로 계놈각인, 계놈안정화 및 전이인자와 retrovirus 활성억제에 중요한 역할을 담당한다 (Bird, 2002). 척추동물의 경우를 살펴보면 이 메틸화는 3 종류의 DNA methyltransferases (DNMTs)에 의해 조절된다(Glastad et al., 2011). 이 가운데 DNMT1은 계놈상의 메틸화를 유지하는 기능으로 hemimethylated DNA를 기질로 메틸화를 촉매하고 있다. 반면에 DNMT3는 *de novo* 메틸화를 이루는 것으로 후생유전에서 관심을 갖는 부분이 된다. DNMT2는 주로 tRNA의 메틸화를 촉매하는 것으로 진정한 DNMT로 간주하기 곤란하다. 곤충의 경우는 꿀벌을 포함하는 벌목 곤충에서는 이들 모든 DNMT 유전자들을 갖고 있다(Wang et al., 2006). 그러나 누에(*Bombyx mori*)를 중심으로 분석된 나비목의 곤충류는 DNMT3를 포함하고 있지 않다(Xiang et al., 2010). 그러나 누에의 경우 메틸화가 유전자의 발현 조절 및 mRNA splicing에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀져, 메틸화에 따른 후생유전 기능이 중요한 생리적 가소성에 작용하는 것으로 이해되고 있다(Xiang et al., 2013). 이는 아마도 곤충의 DNMT2 촉매 성질은 척추동물과 달리 다양한 시토신 기질을 포함할 수 있어 DNA 메틸화에 활동적일 것으로 추정되고 있다(Borsti and Mandrioli, 2004). 따라서 비록 DNMT3가 없는 곤충류도 후생유전적 계놈 변이를 이룰 수 있다는 것을 의미하고 있다. 본 연구는 파밤나방 계놈 가운데 시토신 자리에 메틸화가 존재한다는 것을 단일 항체로 밝혔다. 더욱이 먹이 따라 이들 메틸화에 차등을 보여 파밤나방의 후천적 환경 변화인 상이한 먹이가 시토신 메틸화 정도에 변이를 준 것으로 해석된다. 본 연구는 추후 다양한 환경 조건에 따라 이 메틸화의 정도를 정량화하여 상관관계를 규명하는 데 중요한 기초 자료를 제공할 것으로 사료된다.

## 사사

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 농촌진흥청 농산업기술과제(PJ00941601) 지원에 의해 이루어졌습니다.

## Literature Cited

Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H., Tumlinson, J.H., 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. *Science* 276, 945-949.  
 Awmack, C.S., Leather, S.R., 2002. Host plant quality and fe-

cundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 817-844.  
 Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6-21.  
 Bones, A.M., Rossiter, J.T., 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194-208.  
 Borsatti, F., Mandrioli, M., 2004. The structure of insect DNA methyltransferase 2 (DNMT2) DNA binding domain is responsible for the non-CpG methylation in insect genomes. *Caryology* 57, 305-311.  
 Bradford, M.M., 1972. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye finding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.  
 Brewer, M.J., Trumble, J.T., 1991. Inheritance and fitness consequences of resistance to fenvalerate in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 84, 1638-1644.  
 Feng, H.Q., Wu, K.M., Cheng, D.F., Guo, Y.Y., 2003. Radar observation of the autumn migration of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and other moths in northern China. *Bull. Entomol. Res.* 93, 115-124.  
 Frelichowski, J.E., Jr., Juvik, J.A., 2001. Sesquiterpene carboxylic acids from a wild tomato species affect larval feeding behavior and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 1249-1259.  
 Glastad, K.M., Hunt, B.G., Yi, S.V., Goodisman, M.A.D., 2011. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol. Biol.* 20, 553-565.  
 Goh, H.G., Choi, J.S., Eom, K.B., Choi, K.M., Kim, J.W., 1993. Seasonal fluctuation of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), adult and larva. *Kor. J. Appl. Entomol.* 32, 389-394.  
 Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, K.M., Kim, H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29, 180-183.  
 Goh, H.G., Park, J.D., Choi, Y.M., Choi, K.M., Park, I.S., 1991. The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) and its occurrence. *Kor. J. Appl. Entomol.* 30, 111-116.  
 Greenberg, S.M., Sappington, T.W., Legaspi, B.C. Jr., Liu, T.X., Sétamou, M., 2001. Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. *Am. Entomol. Soc. Am.* 94, 566-575.  
 Greenberg, S.M., Sappington, T.W., Sétamou, M., Liu, T.X., 2002. Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host plant preferences for oviposition. *Environ. Entomol.* 31, 142-148.  
 Han, S., Lee, S., Kim, Y., 1999. Pathogenicity and multiplication of entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* Weiser, on beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) and tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). *Kor. J. Appl. Entomol.* 38, 255-260.  
 Jiang, X.F., Luo, L.Z., Hu, Y., 1999. Influence of larval diets on de-



- velopment, fecundity and flight capacity of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Acta Entomol. Sin. 42, 270-276.
- Kim, Y., Hong, Y., 2015. Regulation of hemolymph trehalose level by an insulin-like peptide through diel feeding rhythm of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Peptides 68, 91-98.
- Kim, Y., Kim, N., 1997. Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). environ. Entomol. 26, 1117-1123.
- Kim, Y., Lee, J., Kang, S., Han, S., 1998. Age variation in insecticide susceptibility and biochemical changes of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). J. Asia Pac. Entomol. 1, 109-113.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. Science 319, 1827-1830.
- Lu, Z.Q., Xu, Y.H., 1998. The consideration of the incessant outbreak of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Entomol. Knowl. 35, 132-136.
- Mascarenhas, V.J., Graves, J.B., Leonard, B.R., Burris, E., 1998. Susceptibility of field populations of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to commercial and experimental insecticides. J. Econ. Entomol. 91, 827-833.
- Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K., Adang, M.J., 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Environ. Microbiol. 61, 2086-2092.
- Park, J.D., Goh, H.G., 1995. Control of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), using synthetic sex pheromone. I. Control by mass trapping in *Allium fistulosum* field. Kor. J. Appl. Entomol. 34, 45-49.
- Painter, R.H., 1951. Insect resistance in crop plants. Macmillan, New York.
- Rask, L., Andréasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J., 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. Plant Mol. Biol. 42, 93-113.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D., Mitchell-Olds, T., Kroymann, J., 2002. Disarming the mustard oil bomb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11223-11228.
- Saeed, S., Sayyed A.H., Ahmad, I., 2010. Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Pest Sci. 83, 165-172.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Seo, S., 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.
- Sequiera, R., Dixon, A.F.G., 1996. Life history responses to host quality changes and competition in the Turkey-oak aphid. Eur. J. Entomol. 93, 53-58.
- Singh, O.P., Parihar, S.B.B., 1988. Effect of different hosts on the development of *Heliothis armigera* (Hübner). Bull. Entomol. Res. 29, 2168-2172.
- Thakur, A., Kaur, S., Kaur, A., Singh, V., 2013. Enhanced resistance to *Spodoptera litura* in endophyte infected cauliflower plants. Environ. Entomol. 42, 240-246.
- Thompson, S.N., 2003. Trehalose: the insect blood sugar. Adv. Insect Physiol. 31, 205-283.
- Wang, Y., Jorda, M., Jones, P.L., Maleszka, R., Ling, X., Robertson, H.M., Mizzen, C.A., Peinado, M.A., Robinson, G.E., 2006. Functional CpG methylation system in a social insect. Science 314, 645-647.
- Williams, M.R., 1990. Cotton insect losses 1998. In: Dugger, D., Richter, D. (Eds.), Proceedings, Beltwide Cotton Conference. National Cotton Council. Memphis. TN. pp. 785-806.
- Wu, Q., Brown, M.R., 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. Annu. Rev. Entomol. 51, 1-24.
- Xiang, H., Zhu, J., Chen, Q., Dai, F., Li, X., Li, M., Zhang, H., Zhang, G., Li, D., Dong, Y., 2010. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map. Nat. Biotechnol. 28, 516-520.
- Xiang, H., Li, X., Dai, F., Xu, X., Tan, A., Chen, L., Zhang, G., Ding, Y., Li, Q., Ligan, J., Wailed, A., Guo, Q., XGA, Q., Wang, J., Wang, W. 2013. Comparative methylomics between domesticated and wild silkworms implies possible epigenetic influences on silkworm domestication. BMC Genomics 14, 646.