

담배나방의 발생과 휴면에 따른 혈림프 생체물질의 변화

박희운* · 이형철 · 이옥경 · 박계주 · 유종명

한남대학교 이과대학 생물학과
(1998년 10월 8일 접수)

Changes of Biological Components in Haemolymph of *Helicoverpa assulta*(Guenee) During Development, Diapausing and Cold-Stress

Hee Yun Park*, Hyung Chul Lee, Og Kyoung Lee, Gye Joo Park and Chong Myung Yoo

Department of Biology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

(Received October 8, 1998)

ABSTRACT : Changes of biological components in haemolymph of *Helicoverpa assulta* Guenee were investigated during the development and pupae of cold-stress periods. Protein content was the highest in the larval stage, whereas it showed somewhat lower level at the cold-stressed pupae. The level of free amino acids was high in the larval and adult stages. Although decreased in pupal stage, the level of free amino acid remarkably increased at the cold-stressed pupae. Total lipids were a little increased at the pupal stage, after small quantity decreased in 1-day old adults, and then remarkably decreased at the cold-stressed pupae. Glycogen was increased at the pupal stage, and somewhat decreased in the stage of adult, but remarkably decreased at the cold-stressed pupae. From thin layer chromatographic analysis, glucose was detected in small quantity at 1-day old pupae, one-day old adults, and cold-stressed pupae, respectively. Each activity of acid and alkaline phosphatases was the highest in the 1 and 7-day old pupae, respectively, and both enzyme activities were increased about two-fold compared to the activity in the cold-stressed pupae. A total of 2 phosphatase isozymes were observed in throughout the developmental stage, and a new isozyme specific to cold-stressed pupae was identified.

Key words : biological components, cold-stress, *Helicoverpa assulta* Guenee

담배나방(*Helicoverpa assulta*)은 생활환(life cycle) 중 용(pupa) 상태로 땅속에서 월동하는 완전변태 곤충으로(Boo 등, 1990) 계절적 변화에 따른 극한 환경에 대처하는 다양한 생리, 생화학적 적응력을 가지고 있으므로 발생과 변태 혹은 휴면에 따른 생체물질의 농도 및 조성에 많은 변화가 수반된다(Yoo, 1976; Mullins, 1985). 이러한 저온에서의 적응방법으로 체액의 결빙 회피 혹은 저항성을 나타내는데, 월동곤충의 가장 특이한 변화중 하나는 저

장에너지원인 단백질, 글리코겐 및 지질 등을 분해하여 이용하는 바, 단백질은 저온에 저항성이 강한 것으로 알려진 수종의 유리아미노산(alanine, proline, glycine, threonine, serine 등)들로 유리됨으로써 다른 동물들에 비해 곤충들은 매우 폭넓은 생존온도 범위를 가지는 것으로 밝혀졌다(Tomchaney 등, 1982; Lee, 1987; Duman 등, 1991).

대부분의 월동곤충이 저온노출시 글리코겐을 분해하여 sucrose, glycerol, fructose, glucose 및

* 연락처 : 300-791, 대전광역시 대덕구 오정동 133번지, 한남대학교 이과대학 생물학과

* Corresponding author : Department of Biology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

trehalose 등 저분자량의 탄수화물을 높은 농도로 축적하는 것은 온도 혹은 계절적 변화와 밀접한 연관성이 있다고 보고되어 왔다(Pullin과 Bale, 1989; Lee, 1991; Holden 과 Storey, 1995). Perincott (1960)는 *Musca domestica*에서 지질의 함량을 조사한 결과 유충의 성장과 변태에 따라 많은 변화가 있음을 보고하였고, Wright 와 Rushing (1973)은 stable fly에서 지질과 글리코겐이 변태단계의 주요 에너지원으로 사용된다고 하였다. 한편 곤충이 저온으로의 노출시 생리 및 이화학반응에 작용하는 물질로서 esterase, acid 및 alkaline phosphatase 등 가수분해효소가 중요한 역할을 수행하는 효소로 알려져 왔는데, 대체적으로 곤충의 변태, 휴면이나 저온 순응시 이들효소는 증가되어 많은 이화학적 조절기작을 담당하는 것으로 보고되어 왔으나(Geering 과 Freyvogel, 1975; Kim 등, 1998), 담배나방의 저온순응에 따른 주요 생체물질의 변화에 관한 연구는 아직도 미비한 상태에 있다.

본 연구는 인시목 곤충인 담배나방(*Helicoverpa assulta*)의 저온저항성과 관련된 물질을 알아보기 위하여 발생동안 혹은 용(pupa)의 저온처리에 따른 혈림프내 주요 생체물질들의 변화와 조성을 분석하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

담배나방(*Helicoverpa assulta*)을 인공사료를 먹이로 하여 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$, 광주기 16L : 8D에서 누대사육하면서 실험재료로 사용하였다.

저온처리

담배나방의 휴면용 유도 및 확인은 Boo 등 (1990)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 2령 유충 시부터 휴면 유도조건인 온도 $19 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $65 \pm 5\%$, 10L:14D의 광주기하에서 사육하여 유도된 휴면용을 Low temp. incubator(LTI-600SD, EYELA)를 사용하여 4°C 에서 1개월간 순응시켜 확인하였다. 그리고 저온처리군은 -2°C 에서 10일간 저온처

리하였다.

혈림프의 채취

휴면 용 및 대조 실험군으로서 정상발생시킨 종령(last larva) 유충과 1일, 3일, 5일, 7일 용 및 성충 1일에서 혈림프를 채취하였으며, 유충의 경우 복지를 절단하여, 용의 경우 두정부를 puncture하여 채취하였고, 성충은 날개의 기부를 절단하여 혈림프를 채취하였다. 혈림프 채취시 melanization의 방지를 위하여 소량의 phenylthiourea(PTU)를 첨가하였으며, 채취 직후 8,000rpm으로 15분간 원심분리(Backman, J2-21 centrifuge)를 통해 혈구 및 조직 절편을 제거시킨 후 상등액을 취하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

단백질의 농도 측정

단백질 농도의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 일부 변형하여 실시하였으며, 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였다. 시료의 반응액을 Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer (Milton Roy Co.)를 이용하여 파장 750nm에서 각 시료별로 흡광도를 측정하여 단백질의 농도를 산출하였다.

유리아미노산의 함량 측정

혈림프내 total 아미노산의 측정은 Lee 와 Takahashi(1966)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 혈림프 100 μl 에 ninhydrine-citrate-glycerol 혼합액 1.9ml을 가한 후 100°C 로 12분간 가열하여 반응시키고 실온에서 식힌 다음, 시료의 반응액을 Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer (Milton Roy Co.)를 이용하여 파장 570nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 적용하여 유리아미노산 농도를 측정하였다.

지질의 함량 측정

지질은 각 조건별 혈림프 100 μl 에 chloroform : MeOH(2:1, V/V) 혼합액 4.8ml을 가하여 추출하였고, 지질함량은 Folch 등(1957)의 방법을 일부 변형하여 580nm에서 측정하였다. 표준물질은 palmitic acid를 사용하여 환산하였다.

Glycogen의 함량 측정

정상발생균 및 저온처리된 담배나방의 혈림프 100 μ l에 30% KOH 3ml을 넣고 20분간 100 $^{\circ}$ C에서 가열한 후 Na₂SO₄ 포화용액 0.5ml과 95% EtOH 3.5ml을 넣어 다시 끓인 다음, 3,000rpm에서 15분간 원심분리시켰다. 침전물을 증류수 2ml에 용해시킨 후 95% EtOH 2.5ml을 가하여 재침전시켰다. 침전물에 5M H₂SO₄ 2ml을 넣어 30분간 100 $^{\circ}$ C로 가열하여 가수분해시킨 후 11,000rpm에서 5분간 원심분리시킨 상등액에 0.5M NaOH를 넣어 중화시킨 다음, 총량이 50ml이 되도록 증류수를 가하여 시료로 사용하였다. 시료의 glycogen 농도는 Seifter 등(1950)의 방법에 의해 Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer(Milton Roy Co.)를 사용하여 파장 620nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 glucose를 사용하여 환산하였다.

당의 분석

당의 분리 및 분석은 Ring 과 Tesar(1980)의 방법에 준하여 실시하였다. 시료 100 μ l에 saturated solution(sodium sulphate : chloroform : MeOH = 0.8:1:2, V/V/V)을 혼합한 후, water-chloroform mixture (1:1)를 2ml 첨가하여 완전히 혼합한 다음 두 층으로 분리된 것 중 당이 포함되어 있는 상층액을 시료로 사용하였다. 전처리된 시료를 TLC plate(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck)에 5 μ l씩 점적하여 chloroform-MeOH-H₂O(64 : 46 : 8, V/V/V)의 solvent system으로 전개시켰다. 전개가 끝난 plate는 상온에서 건조시킨 다음 0.3% thymol-H₂SO₄를 가하여 120 $^{\circ}$ C로 10분간 가열한 후 나타난 각 spots를 확인하였으며, 표준물질은 sugar, glucose, fructose를 사용하였다.

Acid 및 alkaline phosphatase의 활성도 측정

Phosphatase의 활성도는 acid phosphatase와 alkaline phosphatase로 구분하여 측정하였다. 각 단계별 혈림프 500 μ l에 substrate solution 1ml을 첨가한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, acid phosphatase의 활성도 측정을 위해서는 0.1N HCl를, 그리고 alkaline phosphatase의 활성도 측정을 위해서는 0.1N NaOH를 각각 4ml씩 첨가하여 발색

시켰다. 반응액을 Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer(Milton Roy Co.)로 파장 420nm에서 흡광도를 측정하였고 표준곡선은 p-nitrophenol을 사용하여 작성하였다.

Phosphatase isozyme의 확인

Enzyme의 분리는 Laemmli(1970)의 native-PAGE 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉 7.5% 농도의 polyacrylamide gel에 각 발생단계 별 시료 30 μ l 씩을 loading하여 처음 2시간은 5mA로, 그 이후는 10mA로 4 $^{\circ}$ C에서 전기영동을 실시하였으며 running buffer는 250mM Tris-glycine buffer(pH 8.6)를 사용하였다. 전기영동에 의해 분리된 gel을 0.2M veronal buffer(pH 8.6) 20ml에 α -naphthyl phosphate 20mg, Fast blue B salt 20mg이 첨가된 염색용액에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분동안 반응시킨 후 alkaline phosphatase isozyme band를 확인하였다.

결 과

혈림프 단백질의 함량

담배나방(*Helicoverpa assulta*) 혈림프 단백질의 농도는 정상발생균에 비해 저온처리균에서 다소 감소하는 것으로 나타났다(Table 1). 정상발생균의 경우 종령유충에서 54.6mg/ml로 가장 높게 나타난 후, 용 1일에 일시적으로 감소하였으나, 후기 발생

Table 1. Protein content of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapause and cold stress

Stages	Protein content (mg/ml haemolymph)*
Mature larva	54.6 \pm 2.8
1-day old pupa	39.5 \pm 0.8
3-day old pupa	42.2 \pm 3.2
5-day old pupa	42.7 \pm 2.1
7-day old pupa	45.9 \pm 2.1
1-day old adult	40.8 \pm 1.8
Diapausing pupa	42.5 \pm 3.5
Cold stressed pupa	38.7 \pm 2.6

* Each value represents the mean \pm SD obtained from three replicate experiments.

이 진행되는 동안에는 비교적 일정한 수준을 유지하였고 휴면용의 경우에도 42.5mg/ml로 정상군의 단백질 농도와 비슷한 수준을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 1, Table 1).

유리아미노산의 함량

저온처리한 실험군에서는 정상발생군에 비하여 총 유리아미노산 함량이 다소 증가하였다(Table 2). 발생단계 중 종령유충과 성충 1일에서 각각 42.0mg/ml로 가장 높은 아미노산 함량을 나타내었고, 용 단계에서 점차적으로 혈림프 유리아미노산의 함량이 감소하였으며, 7일 용에서 30.3mg/ml로 최저 수준을 보였다. 한편 성충으로 우화(adult eclosion)된 직후인 성충 1일에서 다시 증가하여 발생초기의 함량과 같은 수준으로 회복되는 것으로 확인되었다(Fig. 1, Table 2).

Table 2. Free amino acid content of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapausing and cold stress

Stages	Amino acid content (mg/ml haemolymph)*
Mature larva	42.0±1.4
1-day old pupa	41.6±1.9
3-day old pupa	36.8±1.3
5-day old pupa	32.0±6.1
7-day old pupa	30.3±2.1
1-day old adult	42.0±2.9
Diapausing pupa	41.9±6.4
Cold stressed pupa	48.1±4.8

* Each value represents the mean±SD obtained from three replicate experiments.

지질의 함량

혈림프내 지질함량은 저온처리군에서 급격히 감소되어 전 발생군중에서 가장 낮은 22.1mg/ml로 나타남이 확인되었다(Table 3). 정상발생군에서는 용 1일부터 점진적으로 지질의 함량이 증가하여 용 7일에 최고 수준인 39.8mg/ml로 증가하였고, 성충으로 우화되면서 31.4mg/ml로 현저히 감소하는 것으로 확인되었다. 한편 휴면조건인 용에서는 정상발생군의 경우와 비슷한 수준을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 1, Table 3).

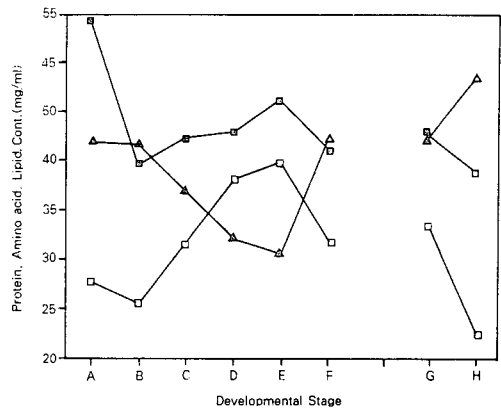


Fig. 1. Changes in protein, free amino acid and lipid contents of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapausing and cold stress. (■; protein, ▲; amino acid, □; lipid) A; mature larva, B; 1-day old pupa, C; 3-day old pupa, D; 5-day old pupa, E; 7-day old pupa F; 1-day old adult, G; diapausing pupa, H; cold stressed pupa.

Table 3. Lipid content of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapausing and cold stress

Stages	Lipid content (mg/ml haemolymph)*
Mature larva	27.7±1.5
1-day old pupa	25.4±0.2
3-day old pupa	31.3±1.1
5-day old pupa	38.0±1.6
7-day old pupa	39.8±1.1
1-day old adult	31.4±0.7
Diapausing pupa	33.8±0.4
Cold stressed pupa	22.1±0.5

* Each value represents the mean±SD obtained from three replicate experiments.

Glycogen의 함량

정상발생군에 비해 저온처리시 혈림프 글리코겐 함량은 감소하는 것으로 나타났다. 정상발생군에서 종령으로부터 용 7일까지 지속적으로 증가하여 용 7일에 최고치인 304.9µg/100µl의 함량을 나타내었으며, 휴면 및 저온처리된 용의 혈림프 글리코겐 함량은 정상 발생군에 비하여 다소 감소되는 것으로 확인되었다(Table 4).

Table 4. Glycogen content of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapausing and cold stress

Stages	Glycogen content ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ haemolymph)*
Mature larva	222.7 \pm 12.0
1-day old pupa	232.3 \pm 23.9
3-day old pupa	234.6 \pm 21.3
5-day old pupa	268.6 \pm 32.4
7-day old pupa	304.9 \pm 19.1
1-day old adult	302.6 \pm 10.2
Diapausing pupa	268.6 \pm 25.7
Cold stressed pupa	253.9 \pm 22.1

* Each value represents the mean \pm SD obtained from three replicate experiments.

당의 조성 변화

담배나방의 발생단계 및 저온처리에 따른 혈림프내 당의 조성을 알아보기 위하여 TLC를 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 정상발생군 및 휴면 용에서는 Rf 0.4 부분의 spots, 즉 이당류 및 다당류가

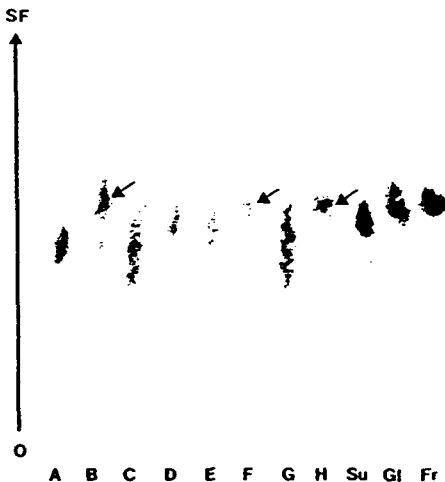


Fig. 2. TLC of haemolymph sugar, glucose and fructose spots during development of *Helicoverpa assulta*. A; mature larva, B; 1-day old pupa, C; 3-day old pupa, D; 5-day old pupa, E; 7-day old pupa F; 1-day old adult, G; diapausing pupa, H; cold stressed pupa, SF; solvent front, O; origin, Su; sugar, Gl; glucose, Fr; fructose. The arrows indicate glucose.

많은 비율로 구성되어 있는 것으로 나타났으며, 변태 직후인 용 1일과 성충 1일에서 Rf 0.56 부분에 spots가 형성된 것으로 보아 glucose가 다소 형성된 것으로 확인되었다. 그러나 저온처리된 실험군은 혈림프 중에 다당류 및 이당류는 전혀 관찰되지 않은 반면, Rf 0.56 부분에서만 spot가 나타나 대부분의 다당류가 glucose로 전환되는 것으로 확인되었다.

Phosphatase의 활성도

Phosphatase의 활성도는 acid, alkaline 그리고 total phosphatase activity로 구분하여 Fig. 3에 나타내었다. 전반적으로 담배나방 혈림프 phosphatase의 활성도는 acid에 비하여 alkaline phosphatase가 높았으며, 정상 발생군에 비하여 휴면 및 저온처리된 발생군이 현저히 높게 나타났다. 정상발생의 경우 acid phosphatase는 1일 용이 121.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 가장 높았으며, alkaline phosphatase는 7일 용이 213.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 최고 수준을 나타내었다. Total activity는 정상발생군에서 각각 용 1일과 7일에서 peak를 나타내었으나 정상발생군에 비하여 저온처리군에서 급격히 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

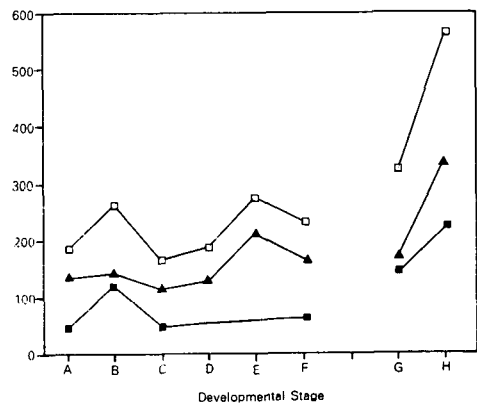


Fig. 3. Changes in activity of acid and alkaline phosphatase of haemolymph in *Helicoverpa assulta* during development, pupae of diapausing and cold stress. (■; acid phosphatase, ▲; alkaline phosphatase, □; total phosphatase). The abbreviations are same as in Fig. 1.

Phosphatase의 isozyme pattern

정상발생균 및 저온처리균의 phosphatase를 7.5% native-PAGE로 분리한 결과(Fig. 4, 5) 모두 3개의 isozyme으로 구성되어 있음이 확인되었는데, 전반적으로 band의 활성이 미약한 반면 용 7일 및 저온처리균에서는 그 활성도가 매우 강하게 나타났다. Gel의 zymogram상에서 양극으로 이동도가 가장 큰것부터 band의 번호를 부여하였는데, 종령

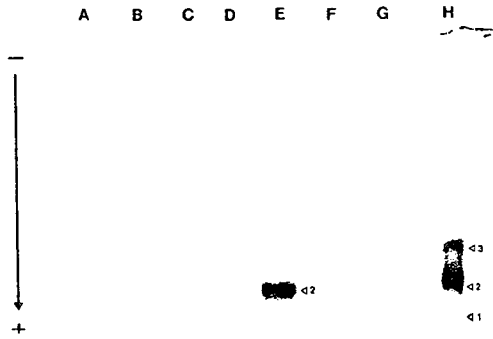


Fig 4. Native-PAGE(7.5% gel) of haemolymph phosphatase in *Helicoverpa assulta* during the development, pupae of diapausing and cold-stress. The bands of alkaline phosphatase isozymes were identified as discribed in Materials and Methods. The abbreviations are same as in Fig. 1.

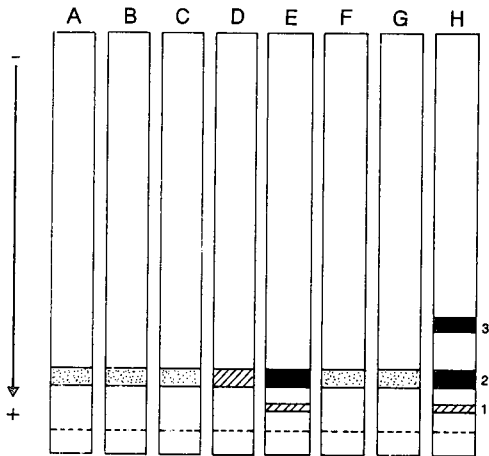


Fig. 5. Zymograms of haemolymph phosphatase of *Helicoverpa assulta*. (■; strong, ▨; weak, □; trace). The abbreviations are same as in Fig. 1.

및 용 5일까지의 발생단계에는 2번 band만이 미약하게 관찰되었고, 용 7일에서는 1번 band와 강한 활성을 보이는 2번 band가, 성충 및 휴면 용에서는 2번 band가 관찰되었다. 한편 저온처리된 용에서는 1, 2번 band 이외에 강한활성을 보이는 3번 band가 새로이 출현하는 것으로 본 연구결과 확인되었다(Fig. 4).

결과적으로 전 발생단계에 걸쳐서 나타나는 band는 2번으로 1개이며, 1번 band는 용 7일과 저온처리된 용에서 출현하였고, 3번 band는 저온처리된 용에서만 새로이 합성되는 것으로 확인되었다(Fig. 5).

고 찰

곤충의 주요 생체물질은 변태 및 생식주기, 취식, 외부환경 등의 영향에 따라 그 조성에 많은 변화가 수반된다. 특히 딱정벌레류(Coleoptera), 파리류(Diptera), 벌류(Hymenoptera), 나비류(Lepidoptera) 등의 육서곤충들은 월동 혹은 휴면할 수 있는 능력이 있으므로 저온에서도 생존이 가능하다. 이러한 곤충들에 있어서 외부온도의 하강에 따른 주요 생체물질의 보호 및 적절한 변화기작은 곤충의 생존에 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 왔다(Ring 과 Tesar, 1980; Lee, 1991).

담배나방(*Helicoverpa assulta*)은 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 발생하는 해충으로써 용 상태로 땅속에서 월동하는 시기를 거치므로 월동기간 중 매우 낮은 온도에서 생존하기 위한 여러 가지 변화를 수반하게 된다. 본 연구에서는 혈림프의 주요 생체물질 중 단백질 함량은 종령유충에서 최대치를 보이다가 용시기에는 비교적 일정한 수준을 유지하였으며, 저온처리균에서 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 일부 단백질이 아미노산으로 분해되어 에너지원으로 이용되거나 저온순응시 필요한 물질로 알려진 alanine과 proline으로 유리됨으로써 혈림프 단백질의 함량이 다소 낮아지는 것으로 생각된다(Morgan 과 Chippendale, 1983; Lefevere, 1989). Sidhu 와 Mukesh(1979)는 *Coccinella septempunctata*에서 유리아미노산의 농도는 종령유충에서 가장 높게 나타난다고 하였는데, 본

연구에서는 정상발생군의 경우 종령유충 및 성충 1일에서 최대의 함량을 나타내어 취식이 활발한 시기에 혈림프 유리아미노산의 함량이 증가하는 경향을 보였고, 용시기에 이르러 지속적으로 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 감소는 먹이섭취를 중단함으로써 유리아미노산이 다른형태의 에너지원으로 전환되기 때문인 것으로 생각된다 (Sidhu와 Dhanesar, 1980; Sidhu와 Kumar, 1980). 한편 저온처리된 용에서 유리아미노산의 농도는 다시 증가하였는데, 이는 저온 손상에 따라 다른 유기물질들이 감소하는 경향과 대조를 보이고 있는 바, 조직의 유리아미노산을 혈림프로 공급함으로써 저온에 생존할 수 있는 능력을 부여하는 중요한 기작 중의 하나로 해석된다 (Lee, 1987; Lee, 1991). 혈림프내의 지질함량은 용시기에 소량 증가하였는데, 이는 유리아미노산이 저장에너지원 형태인 지질로 전환되기 때문인 것으로 사료된다 (Sidhu와 Dhanesar, 1980). 한편 저온처리군의 혈림프 지질함량은 급격히 감소하는 것으로 보아 상당히 많은 양의 지질이 이 시기의 대사작용에서 주요 에너지원으로 사용되고 있음을 시사해주고 있으며, Hill과 Goidworthy (1970)의 연구결과와 마찬가지로 탄수화물의 부족시에 주로 이용되는 것으로 사료된다. 혈림프 글리코겐농도는 전 발생단계를 통하여 종령유충에서 용단계로 진행될수록 점차 증가하는 양상을 보였는데, 이는 용기에 이르러 먹이섭취를 중단함으로써 유리아미노산이 탄수화물과 지질 등으로 전환되기 때문인 것으로 생각된다 (Sidhu와 Dhanesar, 1980; Sidhu와 Kumar, 1980). Moran (1959)은 *Tenebrio molitor*에서 발생과 변태가 진행됨에 따라서 글리코겐은 에너지원으로 사용된다고 보고하였는데, 본 담배나방은 용시기에 글리코겐의 농도가 약간 증가하는 것으로 보아 용 시기에서는 글리코겐을 에너지원으로 많이 사용하는 것 같지는 않으며, 다만 조직에서 혈림프로의 글리코겐 유입이 증가되었기 때문인 것으로 생각된다. 성충 및 휴면 용, 저온처리 용에서의 글리코겐 감소는 성충 이후 혹은 휴면 및 저온처리에 글리코겐을 주로 사용하는 것으로 사료된다 (Hill과 Goldworthy, 1970). 또한 TLC 분석결과 변태직후인 1일 용 및 성충에서 소량의 glucose가 유리됨을 확인하였는데

(Fig. 2), 변태시 수반되는 1차에너지의 공급 및 새로운 cuticle합성에 관련된 것으로 생각되며 (Wright와 Rushing, 1973), 저온처리시 대부분의 글리코겐이 분해되어 glucose로 전환됨으로써 극한의 저온 상태에서는 다량의 glucose가 이용되는 것으로 생각된다.

본 연구에서 가수분해효소의 일종인 담배나방 혈림프의 acid phosphatase 및 alkaline phosphatase의 활성도를 조사한 결과 acid phosphatase의 경우 1일용에서 최대의 활성도를, alkaline phosphatase의 경우 7일 용에서 최대값을 보이고 있는 바, 이는 Ashrafi와 Fisk(1961)의 연구결과 용시기에 최대의 활성도를 보인다는 결과와 잘 일치하였다. 또한 조직에서는 대체적으로 유충시기에 최대의 활성도를 보인다는 연구결과 (Sridhara와 Bhat, 1963)와는 상반된 결과가 관찰되었으나, 이는 혈림프와 조직에 분포하는 phosphatase의 양이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 특히 저온처리된 용의 혈림프에서 약 2배정도 높은 활성도가 측정되었는데, 이는 같은 가수분해효소의 일종인 esterase가 저온처리시 증가한다는 보고 (Kim 등, 1998)와 잘 일치하며, 저온처리시 가수분해효소의 증가는 곤충의 저온저항에 필수적인 것으로 생각된다. Van Der Geest와 Brogsteede (1969)는 *Pieris brassicae*의 haemolymph에서 1개의 acid 및 alkaline band를 관찰한 바 있는데, 본 연구결과 담배나방의 haemolymph에서 전 발생단계에 걸쳐 2개의 alkaline phosphatase isozyme band가 관찰되었고, 모든단계에 나타나는 band는 1개로 Van Der Geest와 Brogsteede(1969)의 결과와 잘 일치하였다. 특히 저온처리된 용에서 그 활성도가 매우 증가함과 동시에 새로이 합성되는 phosphatase band(No. 3)가 확인된 바, 담배나방이 저온에 노출되었을 때 많은 phosphatase가 혈림프에 유리되어 여러가지 중요한 물질대사에 관여함으로써 저온에서도 생존할 수 있는 이화학적 기작을 수행하는 것으로 생각된다. 한편 Eguchi (1965)는 일반적으로 곤충의 phosphatase는 조직에서보다 혈림프에서 그 활성도가 높다고 보고하였으나 본 연구결과 정상발생군의 혈림프에는 phosphatase의 band가 용 7일과 저온처리군을 제외하고는 대체적으로 미약하게 나타나

담배나방의 경우 정상조건에서는 오히려 조직의 phosphatase의 활성이 보다 강한 것으로 추측되며, 저온순응시에 혈림프 phosphatase의 활성도가 급격히 증가됨과 동시에 새로운 isozyme이 합성되는 것으로 생각된다.

결 론

담배나방 (*Helicoverpa assulta*)의 발생과 용의 저온처리에 따른 혈림프내 주요 생체물질의 변화를 확인하였다. 단백질의 함량은 유충에서 최대치를 나타내었고, 저온처리군에서 다소 낮은 수준을 나타내었다. 유리아미노산은 정상발생군에서 중령 유충과 성충에서 비교적 높았고, 용기에서는 감소하였으나, 저온처리군에서 현저히 증가하였다. 지질은 용기에 다소 증가한 후, 성충에서 소량 감소하였고, 저온처리군에서는 급격히 감소하였다. 글리코젠은 용기에서 증가한 후, 성충시기에 다소 감소하였으나, 저온처리군에서는 급격히 감소하였다. TLC 결과 용 1일 및 성충 1일에 glucose가 일부 관찰되었으며, 저온처리군에서는 다량의 glucose만이 확인되었다. Acid phosphatase는 용 1일, alkaline phosphatase는 용 7일에 최대의 활성도를 보였으며, 저온처리군에서는 그 활성도가 약 2배정도 증가하였다. 전 발생단계에서 2개의 alkaline phosphatase isozyme이 존재하였으며, 저온처리시 1개의 band (No. 3)가 새로이 출현하는 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

Ashrafi, S. H. and F. W. Fisk (1961) Acid phosphatase in the stable fly in the *Stomoxys calcitrans*. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 54; 598-602.
 Boo, K. S., H. C. Shinn, M. W. Han and M. H. Lee (1990) Initiation and termination of pupal diapause in the oriental tobacco budworm (*Heliothis assulta*). *Korean J. Appl. Entomol.* 29(4); 277-285.
 Duman, J. G., L. Xu, L. G. Neven, D. Tursman and D. W. Wu (1991) Haemolyph proteins

involved in insect subzero temperature tolerance: ice nucleators and antifreeze proteins. In *Insect at Low Temperature*. p.94-127. Jhon Wiley, Chichester.

Eguchi, M. (1965) Changes in phosphatase zymograms in the silkworm, *Bombyx mori* L. during development. *Bull. Facul. Text. Fib. Kyoto Univ.* 4(3); 351-355.

Folch, J., M. Lees and G. H. Solane-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem.* 226; 497-509.

Geering, K. and T. A. Freyvogel (1975) The distribution of acetylcholin and unspecific esterase in the midgut of female *Aedes aegypti* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B; 775-784.

Hill, L. and Goldworthy (1970) The utilization of reserves during starvation of larvae of the migratory locust. *Comp. Biochem. Physiol.* 36; 61-70.

Holden, C. P. and K. B. Storey (1995) Fructose-1, 6-bisphosphatase from a cold-hardy insect: control of cryoprotectant glycerol catabolism. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* 28(3); 225-236.

Kim, Y. K., H. C. LEE, H. Y. Park, O. K. Lee and C. M. Yoo (1998) Biochemical properties of haemolyph carboxylesterase in diapausing pupae of *Helicoverpa assulta*. *J. Korean Soc. Tobacco Sci.* 20(1); 71-79.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227; 680-685.

Lee, J. J. (1987) A physiological study on freezing tolerance on the larvae of the pine leaf gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Korean J. Ent.* 17(2); 129-136.

Lee, R. J. Jr. (1991) Principles of insect low temperature tolerance. In *Insect at Low Temperature* p.17-45. Eds. Lee, R. E. and D. L. Denlinger. Chapman and Hall, New York and London.

- Lee, Y. P. and T. Takahashi (1966) An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Analy. Biochem.* 14; 71-77.
- Lefevre, K. S., A. B. Koopmanschap and C. A. D. De Kort (1989) Changes in the concentrations of metabolites in haemolymph during and diapause in female colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* 35(2); 121-128.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193; 265-275.
- Moran, M. (1959) Changes in the fat content during metamorphosis of the mealworm, *Tenebrio molitor* L. *J. N.Y. Ent. Soc.* 72; 23-28.
- Morgan, T. D. and G. M. Chippendale (1983) Free amino acids of the haemolymph of the southwestern corn borer and the european corn borer in relation to their diapause. *J. Insect Physiol.* 29(10); 735-740.
- Mullins, D. E. (1985) Chemistry and physiology of the haemolymph. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* Vol. 3. P.375-378. Eds. Kerkut, G. A. and L. I. Gilvert. Pergamon Press, New York.
- Perincott, J. B. (1960) Changes in lipid content during growth and metamorphosis of house fly, *Musca domestica* L. *J. Cell Comp. Physiol.* 55; 167-174.
- Pullin, A. S. and J. S. Bale (1989) Effects of low temperature on diapausing *Aglais urticae* and *Inachio io*(Lepidoptera: Nymphalidae): overwintering physiology. *J. Insect Physiol.* 35(4); 283-290.
- Ring, R. A. and D. Tesar (1980) Cold-hardiness of the arctic beetle, *Pytho americanus* K. coleoptera, pythidae(Salpingidae). *J. Insect Physiol.* 26; 763-774.
- Seifter, S. S., B. N. Dayton and E. Muntyler (1950) The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archs. Biochem. Biophys.* 25; 191-200.
- Sidhu, D. S. and B. Dhaneasar (1980) Free amino acid pool, glycogen and total lipids during larval growth and metamorphosis of *Callosobruchus chinensis* L. *J. Ent. Res.* 4(1); 165-170.
- Sidhu, D. S. and N. Kumar (1980) Pool size of free amino acids during development of *Chilomenes sexmaculata* F. *Indian J. Zool.* 4(1,2); 127-130.
- Sidhu, D. S. and Mukesh (1979) Fate of free α -amino nitrogen(amino acid) concentration during larval growth and metamorphosis in *Coccinella septempunctata* L. *J. Ent. Res.* 3(1); 77-80.
- Sridhara, S. and J. V. Bhat (1963) Alkaline and acid phosphatase of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.* 9; 693-701.
- Tomchaney, A. P., J. P. Morris, S. H. Kang and J. G. Duman (1982) Purification, composition, and physical properties of a thermal hysteresis 'antifreeze' protein from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. *Biochem.* 21; 716-721.
- Van Der Geest, L. P. S. and F. H. M. Borgsteede (1969) Protein changes in the haemolymph of *Pieris barassicae* during the last larval instars and the beginning of the pupal stage. *J. Insect Physiol.* 15; 1687-1963.
- Wright, J. E. and D.D. Rushing (1973) Glycogen in pupal and adult stable flies as affected by an insect juvenil hormone analogue. *Ann. Ent. Soc. Am.* 66; 274-276.
- Yoo, C. M. (1976) Changes in the lipid and glycogen during growth and metamorphosis of the pine moth, *Dendrolimus spectabilis* B. *Korean J. Ent.* 6(1); 30-33.