

Dexamethasone을 이용한 누에 (*Bombyx mori*)에 대한 동충하초균 (*Paecilomyces japonicus*)의 접종율 제고에 관한 연구

Study on the Inoculation Augmentation of *Paecilomyces japonicus* to the Silkworm, *Bombyx mori*, Using Dexamethasone

김길호 · 박영진 · 김용균 · 이영인

Kilho Kim, Youngjin Park, Yonggyun Kim and Young-In Lee

Abstract – Entomopathogenic fungus, *Paecilomyces japonicus*, has been commercially used as medicinal purpose. The silkworm, *Bombyx mori*, as an optimal host for the fungi, has been selected and used for the production of the fungal fruit bodies. In current method, newly molted fifth instar larvae should be exposed to the adverse stress environment of high temperature (30°C), high relative humidity ($\approx 90\%$), and starvation for 24h for better fungal inoculation to the host insects. In this study, an alternative method using chemical agent, dexamethasone (DEX: an eicosanoid biosynthesis inhibitor), was tried to get the immunodepressive effect on the larvae to elevate the inoculation rate of the fungi to the silkworm without any harsh rearing environment. DEX (100 μg) showed significantly synergistic effect on the hemocyte lethality of the fungus, and was effective to decrease cellular immune responses measured by the number of hemocyte microaggregation and phenoloxidase activity of the fifth instar larvae in response to the fungal injection. A detergent of 0.05% Triton-X was effective to increase the inoculation rate of the fungi to the larvae and used in all fungal spraying solutions. Without any environmental stress treatment, only DEX (100 μg) injection to the fifth instar larvae followed by the fungal spray was effective to get the inoculation rate equivalent to the current fungal spray method requiring harsh rearing environment. These results suggest that the inoculation of *P. japonicus* can be elevated by the help of DEX and that the silkworms use eicosanoids to elicit cellular immune response against fungal pathogen.

Key Words – *Paecilomyces japonicus*, *Bombyx mori*, Dexamethasone, Inoculation, Microaggregation, Phenoloxidase, Cellular immune

초 록 – 동충하초로 불리는 곤충병원진균 (*Paecilomyces japonicus*)이 의약적으로 상품화되어 사용되고 있으며, 누에 (*Bombyx mori*)가 이 진균의 최적 기주로 선발되어 자실체 생산에 이용되고 있다. 현재 이 균주의 처리는 갓 탈피한 누에 5령 유충에 접종하고 고온(30°C), 다습(약 90% 상대 습도) 및 24시간 절식 조건에서 스트레스에 의한 면역 저하를 유도하여 균주 접종율을 높이는 방식을 취하고 있다. 본 연구는 면역반응 중개에 중요한 eicosanoid 반응을 억제시키는 dexamethasone (DEX)을 이용하여 물리적 스트레스 환경의 조성 없이도 누에에 면역 저하를 유도시키려는 목적으로 수행되었다. 누에 5령 유충에 주입된 DEX (100 μg)는 병원진균의 혈구치사 능력을 뚜렷이 증가시켰다. 또 DEX (100 μg)는 작은혹형성이나 피막형성에서 나타나는 혈구응집 반응이나, phenoloxidase 활성으로 측정된 누에의 세포성 면역 반응을 뚜렷이 저하시켰다. 효과적 병원진균

의 충체 처리를 위해 곤충체의 부착 능력을 제고시켜 접종율을 높히는 것으로 본 연구에서 판명된 Triton-X (0.05%)를 모든 충체 처리 용액에 이용되었다. DEX (100 µg) 단독처리가 기존의 물리적 스트레스 환경 처리를 통한 방법과 유사한 수준으로 병원진균의 접종율을 나타냈다. 본 연구는 DEX가 동충하초 접종율을 제고시킬 수 있음을 시사했고, 누에는 이러한 진균 병원체에 대해서 eicosanoid를 이용하여 세포성 면역을 발현하는 것으로 제시하고 있다.

검색어 - 동충하초균, 누에, Dexamethasone, 접종, 혈구응집, Phenoloxidase, 세포성 면역

병원체와 기주와의 관계는 침입과 방어의 관계로서 상호간 다양한 기작들을 개발하여 왔다. 곤충은 척추동물과 달리, 특이적 면역반응인 항체 형성과 같은 고도로 발달된 면역 기작은 없으나 다양한 병원체에 대응하는 방어기작을 개발하여 왔다. 이러한 방어 기작은 먼저 외래 인자를 인식하는 단계로부터 인식 정보를 면역 작용자에게 전달하는 증개반응 및 실질적으로 외래자를 공격하게 되는 면역반응 단계 등으로 구별될 수 있다 (Gillespie *et al.*, 1997). 궁극적으로 면역반응은 세포성 및 체액성 면역으로 구별되며, 세포성 면역은 혈구의 직접적 반응으로서 식균작용, 작은혹형성 및 피막형성 등으로 구분되며, 체액성 면역은 항생물질에 의한 살균 또는 흡소닌 반응이다 (Stanley, 2000).

면역의 증개자로서 20-hydroxyecdysone (Gateff, 1996), biogenic amines (Baines *et al.*, 1992), eicosanoids (Stanley-Samuelson, 1994), hemokines (Chadwick and Aston, 1991) 등의 많은 국부 호르몬이 보고되고 있다. 이들 중에 척추동물과 유사하게 곤충에 있어서도 탄소수 20개로 구성된 eicosanoid 불포화지방산류가 면역에 있어서 중요한 증개 역할을 한다는 보고가 메뚜기목 (Miller *et al.*, 1999), 매미목 (Tunaz *et al.*, 1999), 딱정벌레목 (Miller *et al.*, 1996), 나비목 (Stanley-Samuelson *et al.*, 1997; Park and Kim, 2000) 등 다양한 곤충류에서 증명되고 있다. 특히 eicosanoid의 생합성 억제자를 투여하는 경우 면역작용의 저하를 가져오게 되고, 반대로 eicosanoid의 전구체를 투여하는 경우 다시 면역 능력을 회복하게 되어 면역 증개 역할에 있어서 이 호르몬의 중요성이 부각되고 있다 (Stanley-Samuelson, 1994; Stanley, 2000).

누에 (*Bombyx mori*)에 있어서 보고된 진균 중 약 100여 속 700여종이 병원성을 갖는 것으로 알려져 있으며 이들에 대한 항균성 검정과 살충효과 검정 등이 보고되고 있다 (Lee *et al.*, 1998). 이러한 곤충 면역 기능에 대한 이해는 생명 현상 구명 뿐 아니라 면역 강화 및 면역저하를 유도하여 생물 신소재로의 개발과 이용 가능성이 높아 다양한 연구가 진행되고 있는 실정이다 (Lee *et al.*, 1996). 최근에는 동충하초의 수요 급증으로 양잠농가에서 누에를 기주충으로 이용하여 재배생산하고 있으나, 재배 방식에 있어서 문제점이 도출되고 있다 (Park and Kim, 2000). 즉, 5령으로 탈피

한 직후가 동충하초 균의 접종시기로서, 접종한 후 고온(30°C), 다습(90% 상대습도) 및 24시간 절식의 환경 조건에서 누에를 사육하게 됨으로 높은 치사율을 초래할 수 있어 동충하초 균의 안정적 생산을 위협하고 있다 (Park and Kim, 2000). 이러한 조건을 주는 주된 이유가 누에로 하여금 스트레스를 받게 하여 병원균의 침입에 대해 면역력 저하를 유도하여 동충하초 균의 접종율을 높이려는 목적이다 (KSDI, 1998). 만약 이러한 면역저하를 물리적 사육조건이 아닌 단순한 화학물질에 의해 유도할 수 있다면 기주체의 생존율을 높여서 동충하초균의 접종율을 제고시킬 수 있다는 응용적 측면을 고려하여 볼 수 있다. 누에에 있어서 곤충병원세균인 *Serratia marscescens*에 대한 면역 증개반응으로 eicosanoid가 관련되는 것을 보고하여 (Stanley-Samuelson *et al.*, 1997), 이 호르몬의 생합성 억제자로서 dexamethasone (DEX)을 이용할 경우 면역 증개 반응을 억제시켜 궁극적으로 면역저하를 유도시킬 수 있다는 가설을 세울 수 있다.

본 연구는 누에의 동충하초균 접종율을 제고하려는 목적으로 DEX를 처리하여 면역 억제를 유도하여 과도한 사육 환경의 스트레스 없이도 동충하초 접종율을 높이려는 목적으로 수행하였다. 이를 위해서 먼저 개체 수준에서 DEX의 면역 억제 효과를 검증하고, 이러한 결과를 기초로 기존의 동충하초균 접종 방법에 응용시켜 본래 연구의 가설을 증명하고, 응용적 목적을 실현하도록 추진되었다.

재료 및 방법

시험곤충

실험에 사용된 누에는 경상북도 농업기술원 잠사곤충사업장에서 인공사료로 사육된 장려품종 칠보잠(잠 107×잠108)이었다. 시험 곤충은 3령부터 일정 사육 조건(23~25°C, 70~80% 상대습도)에서 뵈옴으로 증식시켰으며, 증식된 5령 기잠을 대부분의 분석에 이용하였다.

동충하초 종균

종균은 농가보급용인 *Paecilomyces japonicus*로 경상북도 농업기술원 잠사곤충사업장에서 농가보급용

포자(10^8 spores/ml)를 분양 받아 이용하여 분석될 때까지 5°C 냉장고에 보관하였다. 시험에 사용하기 2~3 시간 전 실온($23\sim 25^{\circ}\text{C}$)으로 옮긴 후 처리하였다.

동충하초 처리

갓 탈피한(5시간 이내) 5령충을 대상으로 0.05%의 Triton-X를 포함하고 있는 동충하초 종균을 분무기로 기주의 몸 전체에 살포하였다. 일반적인 방법으로 동충하초 처리 후 누에는 고온(30°C)과 다습(상대습도 90% 이상) 조건에서 24시간 절식시켰다. 본 연구에서 규명하려는 DEX 처리는 동충하초 처리 후 일반 사육 조건($23\sim 25^{\circ}\text{C}$, 상대습도 70~80%)에서 바로 급상하였다. 모든 처리는 30마리 3반복하였다.

생물검정

처리된 유충의 용화율과 동충하초 접종율이 측정되었다. 용화율은 각 반복 당 유충 사망율에서 환산되었다. 접종율은 용화 후 경화된 고치 빈도로(KSDI, 1998) 산출되었다. 이후 포자 형성 조건(25°C , 90% 상대습도)에서 나타난 자실체의 유무로 확인하였다.

Dexamethasone (DEX) 처리 및 혈액 채취

약제 처리는 유충 복부 둘째 복지를 통해 미량주사기(Hamilton, USA)를 이용하여 혈강내로 주입하였다. 처리 약량의 크기는 유효 약량 $100\ \mu\text{g}$ 으로 $2\ \mu\text{l}$ 부피로 주입되었다. 대조구는 DEX의 용매인 50% 에탄올이 주입되었다.

혈구조사 또는 phenoloxidase (PO) 활성 조사 목적으로 혈액이 채취되었다. 혈액 채취는 복부 둘째 복지를 멸균된 가위로 자른 후 빠져나오는 혈립프를 차가운(5°C) 1.5ml 튜브에 받았다. 혈구 조사는 이후 바로 분석에 이용되었으나, PO 활성 조사는 분석이 이용될 때까지 -70°C 에 보관되었다.

동충하초 진균 독성

멸균된 생리식염수(0.75% NaCl) $2\ \mu\text{l}$ 에 농도별($6.5, 6.5 \times 10^1, 6.5 \times 10^2, 6.5 \times 10^3, 6.5 \times 10^4, 6.5 \times 10^5, 6.5 \times 10^6$ 및 6.5×10^7)로 희석된 곤충병원진균 포자를 미량 주사기를 이용하여 5령 3일된 누에의 복지를 통해 혈강으로 직접 주사하였다. 실험은 3반복으로 반복 당 8마리의 누에를 이용하였다. 누에의 치사율은 25°C 에서 24시간 지난 후 조사하였다. 조사는 핀셋으로 머리, 가슴 그리고 배 부분을 눌러서 누에의 자의적 움직임이 있는지를 관찰하여 사망 유무를 판별하였다.

혈구수 및 세포성 면역반응 조사

멸균된 생리식염수(0.75% NaCl) $2\ \mu\text{l}$ 에 6.5×10^4 농도의 곤충병원진균 포자를 처리한 후 5령 3일된 누에

의 복지에 접종하였다. 반대 편 복지를 통해 $100\ \mu\text{g}$ 의 DEX을 접종하였다. 대조구에서는 진균 처리 후 50%의 에탄올만 주입하였다. 혈구세포 수 조사는 시간별(1, 2, 4, 8 및 16시간)로 추출되어진 혈액을 0.04%의 Trypan blue로 염색 후, 광학현미경(Olympus, Japan)에서 살아있는 혈구 총수를 조사하였다. 실험은 3반복으로 반복 당 5마리의 누에를 이용하였다. 세포성 면역 조사는 시간별(1, 2, 4, 8 및 16시간)로 해부현미경(Zeiss, Germany)에서 직접 해부를 하여 체내 혈구 응집 총수를 조사하였다. 실험은 3반복으로 반복 당 5마리의 누에를 이용하였다.

Phenoloxidase (PO) 활성의 정량 및 정성 분석

추출된 혈액을 5분간 원심분리($4,000\ \text{rpm}$, 4°C)하였다. 효소 활성의 정량 분석을 위해 분리된 $10\ \mu\text{l}$ 의 혈장에 기질인 DOPA(L-3, 4-dihydroxyphenyl alanine, Sigma) $2\ \text{mg}$ 과 1ml의 0.01 M 인산완충용액(pH 7.4)을 혼합 한 후 PO 활성을 495 nm의 분광광도계(Kontron, USA)를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 1분간 흡수도가 1만큼 변화하는 양으로 표현하였다.

PO 효소 활성을 전기영동 상에서 가시화시켰다. 전기영동은 0.05 M의 Tris-glycine 완충용액(pH 8.3) system을 이용하여 6.5% 비변성조건의 PAGE(polyacrylamide gel)에서 진행되었다. 전기영동은 35 mA 일정 전류에서 염색액이 바닥에 도달할 때까지 이루어졌다. 전기영동 후 젤은 20 mM Tris-HCl(pH 6.5)에서 20분간 침지 후, 20 mM Tris-HCl(pH 6.5) 1 ml 당 1 mg의 DOPA 용액에 약 2시간 동안 염색을 실시하였다.

통계처리

분광형광광도측정에 의한 PO효소 활성, 용화율, 및 접종율 결과는 SAS program의 PROC GLM을 이용하여 통계 처리한 후 그 결과를 그래프로 나타내었다(SAS Institute, 1989).

결과 및 고찰

1. Dexamethasone (DEX)의 누에 면역 억제 효과

동충하초균(*Paecilomyces japonicus*)을 누에 5령충의 혈강속에 주입하였을 경우, 높은 농도에서 급성 독성을 보였다(Fig. 1). 분석된 반수치사농도는 1,204개의 포자(범위 = $335 < LD < 4,144$, 기울기 = 1.34 ± 0.39)로 나타났다. 이것은 나비목 곤충에 패혈증을 유발시켜 기주를 치사시키는(Akhurst, 1982; Park and Kim, 1999) 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophilus*를 누에에 인위적으로 접종시켰을 때, 불과 43개의 세균 수

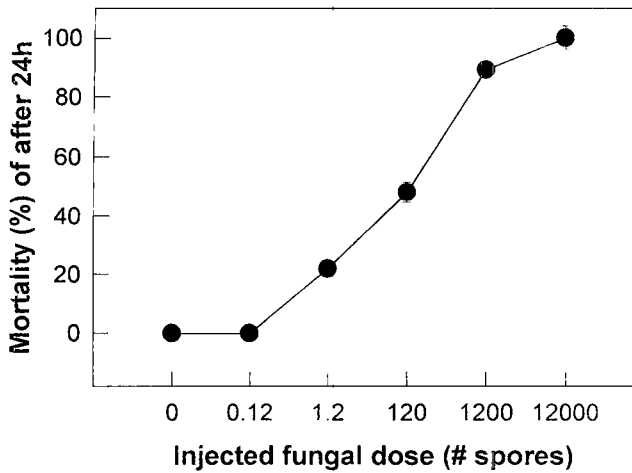


Fig. 1. Dose response of *Paecilomyces japonicus* on the fifth instar larvae of *Bombyx mori*.

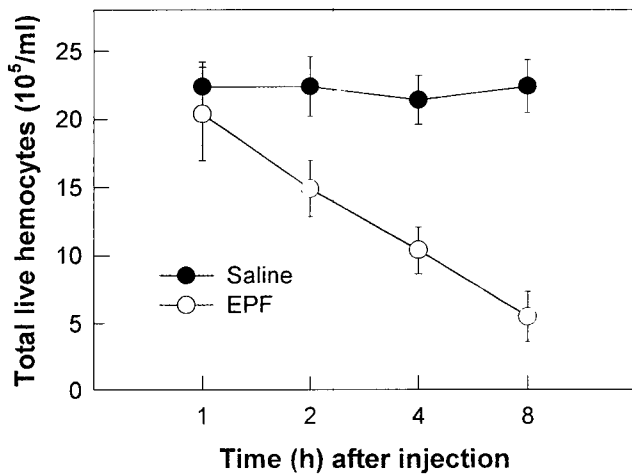


Fig. 2. Effect of entomopathogenic fungi (EPF), *Paecilomyces japonicus* (1.2×10^4 spores), on the hemocytes of the fifth instar larvae of *Bombyx mori*.

(범위 = $11.89 < LD < 194.50$, 기울기 = 1.00 ± 0.26)로 반수치사농도를 기록하는 것과 비교하여 상대적으로 급성 독성이 낮은 것으로 조사되었다.

누에의 혈액 내에서도 나비목에서 발견되는 다양한 혈구 세포들을 관찰할 수 있었다. 동충하초균 포자를 접종하였을 때 처음에는 약 2×10^6 개의 혈구세포를 관찰할 수 있었으나, 접종 후 8시간에서는 5×10^5 으로 혈구세포수가 감소하였다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 그러나 대조구인 생리식염수를 접종하였을 때에는 같은 시간 간격 동안 전체 혈구세포 수의 변화가 없었다. 이는 *P. japonicus*는 혈구 세포를 치사시키는 인자를 분비한다는 것을 내포하게 된다. 즉, *P.*

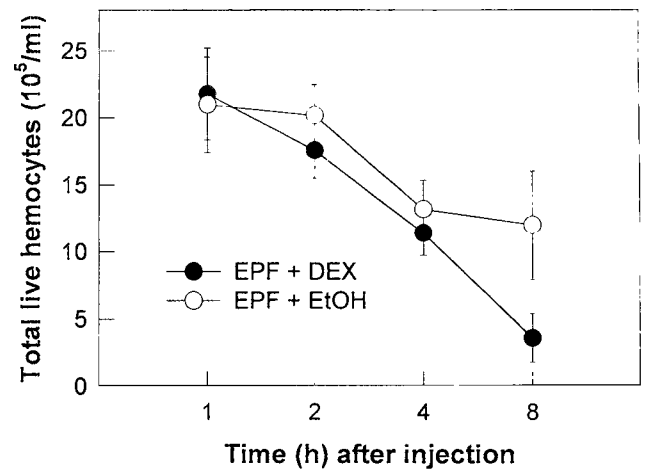


Fig. 3. Effect of dexamethasone (DEX), a PLA_2 inhibitor, on the hemocytes in the fifth instar larvae of *Bombyx mori* which were infected with 1.2×10^4 spores of entomopathogenic fungi (EPF), *Paecilomyces japonicus*.

*japonicus*에 의해 분비되는 세포 독성 물질에 의해 곤충의 면역 기능을 담당하는 혈구 세포의 파괴는 바로 이 병원체의 기주 점유를 의미하게 된다. 이러한 병원체의 기주 면역 조절 작용은 이외에도 곤충병원세균 (*X. nematophilus*)이 꿀벌부채명나방 (Dunphy and Webster, 1984)과 파밤나방 (Park and Kim, 2000) 대해서 확인되었고, 기생충의 일종인 *Camponotus sonorensis*가 나비목 해충인 *Heliothis virescens*의 기주 면역 저하를 피하여 기생 기회를 얻게 된다고 보하였다 (Edson *et al.*, 1980)

또한 phospholipase A_2 의 억제물질인 DEX를 동충하초균과 같이 처리하였을 때 접종 후 시간이 지남에 따라 혈구세포 수가 약 3×10^5 으로 급격하게 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 감소는 대조구로 사용한 곤충병원세균 단독의 효과보다 차이가 나는 것을 ($F = 23.35$; $df = 1, 15$; $P = 0.0002$) 알 수 있어, DEX가 동충하초균의 병원력에 상승작용을 하는 것으로 나타났다.

누에의 동충하초균에 대한 면역작용으로 구체적으로 체내에서 일어나는 반응은 혈구응집 (microaggregation) 현상으로 관찰되었다 (Fig. 4). 본 조사에서 나타난 혈구응집의 크기는 다양하여 대형으로는 직경이 $100 \mu m$ 이상, 소형은 $50 \mu m$ 이하의 범위를 가졌다. 혈구응집 또는 작은혹 (nodulation)은 다세포성 혈구덩어리이다. 혈구 세포들의 분비물에 의해 많은 수의 세균 또는 외래인자가 이 구조에 잡히게 된다. 이러한 작은혹은 다른 조직이나 다른 혹에 서로 붙게 된다. 작은혹과 유사한 혈구덩어리는 LPS, zymosan, laminarin 또는 일부 당단백질에 의해 형성되어진다 (Lackie,



Fig. 4. Microaggregations in the fifth instar larvae of *Bombyx mori* infected with *Paecilomyces japonicus*. Observation under a stereomicroscope at 50X.

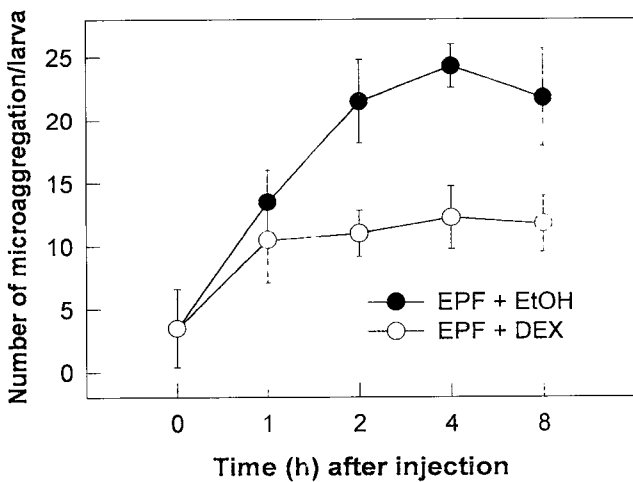


Fig. 5. Effect of dexamethasone (DEX), a PLA₂ inhibitor, on the hemocyte microaggregation of the fifth instar larvae of *Bombyx mori* which were infected with 1.2×10^4 spores of entomopathogenic fungi (EPF), *Paecilomyces japonicus*.

1988). Gunnarsson and Lackie (1985)는 이러한 혈구응집이 외래인자의 종류에 따라 크기가 다양하게 나타나서, 진균과 같이 큰 외래인자에 대해서는 대개 대형 (> 100 μm), β-1, 3-glucan의 올리고당의 경우는 중간 크기, 그리고 laminarin과 같은 소형의 물질에 대해서는 40 μm 이하의 소형 작은혹을 형성한다고 보고하였다. 본 연구에서 나타난 다양한 크기의 혈구응집은 주입된 물질 내에 진균 이외에 다양한 외래 인자에서

기인된다고 이해된다.

동충하초균 포자와 DEX를 같이 접종하였을 때 시간별로 나타난 세포성 면역 반응 수는 접종 후 시간이 지나면서 감소하여 처리후 8시간에는 불과 약 10개의 혈구응집수만을 보였다(Fig. 5). 이는 대조구에서는 약 25개의 혈구 응집수를 나타내어 통계적으로 유의차가 나는 것을 확인할 수 있었다(F=110.57; df=3, 20; P=0.0001). 이것은 바로 DEX가 면역중개 물질인 eicosanoids의 생합성 과정의 phospholipase A₂ 반응에 억제 효과를 주는데 (Stanley, 2000) 기인된다고 사려된다.

곤충의 면역 반응에 있어서 매우 중요한 효소인 phenoloxidase (PO) 활성 조절에 대해서 동충하초균과 면역저해물질인 DEX의 효과를 검정하였다. PO는 본래 불활성화 상태인 prophenoloxidase (pPO) 형태로 존재하고 있다가 serine protease의 작용에 의해 활성화된 PO로 존재하게 된다(Söderhäll, 1992). 대부분의 PO가 혈구막에 존재하며, 일부가 혈장에 존재한다고 보고되었으나 병원균의 침입에 따라 혈장의 활성화된 PO의 활성이 높아진다고 보고하였다(Hung and Boucias, 1996). 본 실험에서는 동충하초균 포자가 접종된 누에의 혈장은 정상적인 혈장에 비해 매우 낮은 PO활성을 갖는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 동충하초균에 감염된 혈장의 낮은 PO의 활성은 다시 DEX 처리에 의해 더욱 낮아 질 수 있음을 보였다(Fig. 7). 이는 동충하초균 포자가 먼저 기주의 면역반응을 약화시킨 상태에서 인위적으로 phospholipase A₂의 억제물질인 DEX를 처리하여 더욱 더 기주 곤충의 면역을

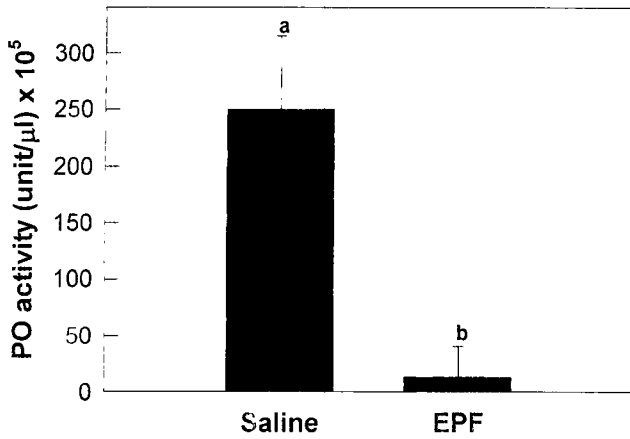


Fig. 6. Effect of entomopathogenic fungi (EPF), *Paecilomyces japonicus* (1.2×10^4 spores), on phenoloxidase (PO) activity of the fifth instar larvae of *Bombyx mori*. Different letters above the error bars indicate significant difference between means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

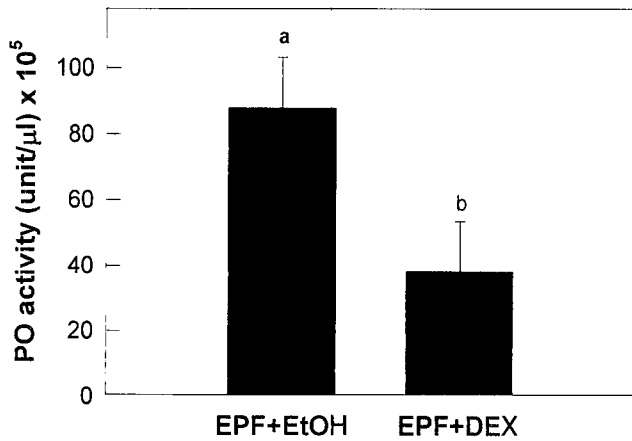


Fig. 7. Effect of dexamethasone (DEX), a PLA₂ inhibitor, on phenoloxidase (PO) activity of the fifth instar larvae of *Bombyx mori* which were injected with 1.2×10^4 spores of entomopathogenic fungi (EPF), *Paecilomyces japonicus*. Different letters above the error bars indicate significant difference between means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

낮추었기 때문으로 사려된다.

PO활성의 변화를 비변성 전기영동을 통해 가시적으로 확인할 수 있었다 (Fig. 8). DEX가 처리된 구는 정상적인 처리구에 비해 매우 낮은 PO활성을 보여준다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들은 면역증개자인 eicosanoids의 생합성 억제자인 DEX가 누에의 면역 저하를 유도할 수 있음을 혈구세포 치사, 세포성 면역 반응 및 PO활성

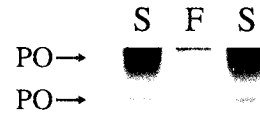


Fig. 8. Inhibitory effect of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces japonicus* on phenoloxidase (PO) activity. 'S' or 'F' indicate the hemolymph samples of saline or the fungal injection, respectively. Hemolymph proteins were separated on 10% nondenaturing PAGE at 35 mV constant. PO was stained at 0.1% DOPA solution for 2h.

Table 1. Effect of Triton-X, a detergent, on the inoculation of *Paecilomyces japonicus* to the fifth instar larvae of *Bombyx mori*

Treatment ¹	N	Pupation (%)	Inoculation rate (%)
Fungal spray on the mulberry leaves	90	82.22 ± 1.92a ²	2.22 ± 3.85a
Fungal spray on the larvae	90	81.11 ± 5.09a	1.11 ± 1.92a
Fungal spray on the larvae with 0.05% Triton-X	90	72.22 ± 8.39a	22.22 ± 3.85b

¹ After different spraying treatments, all the larvae were fed mulberry leaves *ad liv*.

² Means followed by different letters were significantly different at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

저하 등으로 확인하였다. 이 DEX의 면역저하 기능을 이용하여 기존의 동충하초균의 접종율을 제고시키는데 사용하기 위해서 동충하초 처리방법별로 DEX의 접종율 제고 효과를 검정하였다.

2. DEX를 이용한 동충하초 접종율 제고 효과

동충하초균의 접종율을 제고하기 위한 방법의 일환으로 균주의 곤충 표면 부착을 높이기 위해 Triton-X 전착제의 효과를 시험하였다 (Table 1). 이때 동충하초균을 처리한 후 일반 사육조건 (25°C, 70~80% 상대습

도)에서 급상시켰기 때문에 모든 처리구에서 매우 낮은 접종율을 보였다. 우선 동충하초균을 먹이에 처리하였을 경우, 섭식에 의한 동충하초균의 접종 효과는 없음을 나타냈다. 그러나 곤충의 몸에 처리한 경우, 전착제의 효과가 무처리에 비해 탁월한 것을 보여 주었

다. 이는 곤충의 몸 표면이 왁스층으로 구성되어 Triton-X의 비누화성질에 의한 살포 용액의 표면장력 억제에 따라보다 많은 동충하초 균이 누에의 몸 표면에 부착되었을 가능성 때문에 기인된다고 사려된다. 이후 모든 동충하초 처리에는 본 결과에서 입증된 0.05% Triton-X가 첨가되었다.

Table 2. Effect of injection method on the survival of the fifth instar larvae of *Bombyx mori* for 6 days after treatment

Treatment ¹	N	Mortality (%)
Without injection	90	6.7±3.3a ²
Puncturing only	90	18.9±1.9b
Puncturing+Saline	90	15.6±1.9b
Puncturing+DEX	90	16.7±3.3b
Puncturing+EtOH	90	16.7±0.0b

¹ 'DEX' and 'EtOH' represent dexamethasone (100 µg) and 50% ethanol, respectively.

² Means followed by different letters were significantly different at $\alpha=0.05$ (LSD test).

DEX의 면역 억제 효과에 의해 낮은 접종율을 제고 시키려 DEX의 농도별 효과 및 기존의 스트레스 환경조성 살포법과 비교하였다. DEX를 처리하려면 곤충의 혈강내로 주입이 요구된다. 이를 위해 미량주사위를 이용하여 갓 탈피한 누에 5령에 주입할 때, 물리적 요인에 의한 치사 효과가 확인되었다 (Table 2). 그러나 이 정도의 치사 효과는 주사 처리가 없는 조건에서도 스트레스 환경 때문에도 기인되었다 (Fig. 10). DEX의 처리는 대조구인 에탄올 처리구에 비해 월등히 높은 접종율을 나타냈다 (Fig. 9). 또 동충하초균의 농도가 증가할수록 접종율이 제고되는 것을 알 수 있

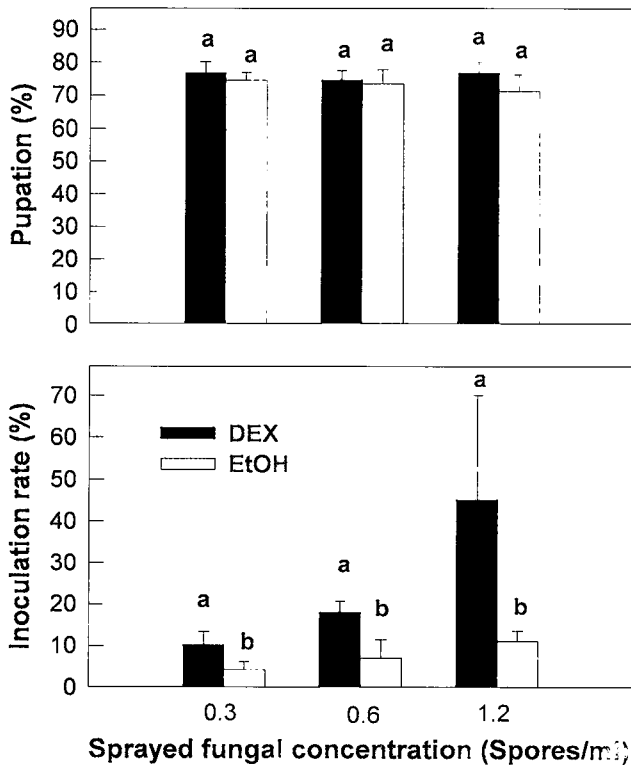


Fig. 9. Dose effect of *Paecilomyces japonicus* on the survival of the fifth instar larvae and on the fungal inoculation rate in *Bombyx mori*. Each treatment consisted of 30 larvae and was replicated three times. 'DEX' represents dexamethasone, a PLA₂ inhibitor. Different letters above the error bars indicate significant difference between means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

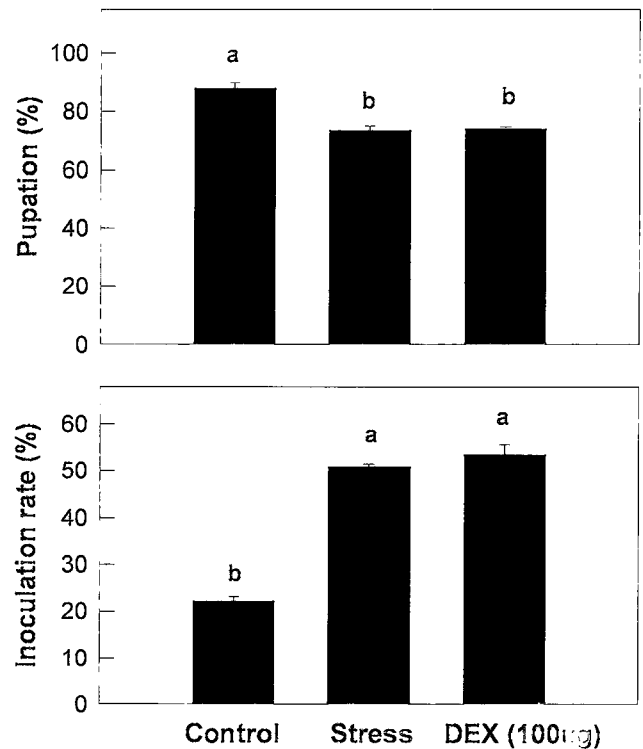


Fig. 10. Comparison of dexamethasone (DEX) and traditional stress treatments on the larval survival and the fungal inoculation rate of *Paecilomyces japonicus* in *Bombyx mori* after the fungi (1.2×10^4 spores/ml) were sprayed on the newly molted fifth instar larvae. Each treatment consisted of 30 larvae and was replicated three times. 'DEX' represents dexamethasone, a PLA₂ inhibitor. Different letters above the error bars indicate significant difference between means at $\alpha=0.05$ (LSD test).

었다. 그러나 기존의 스트레스 환경법에 의한 접종율보다 월등히 우수하지는 못했다 (Fig. 10).

본 연구는 DEX가 면역저하를 유도하여 동충하초균의 접종율을 제고시킨다는 것을 확인하였다. 그러나 아직 DEX를 접종하는 과정에서 일어나는 치사 요인 때문에 기존의 접종율보다는 우수하지는 못하지만 이를 해결할 수 있는 방법만 개발된다면 기존의 동충하초 접종 방법보다 우수한 접종법을 개발할 가능성을 제시하고 있다. 이를 위해서 무엇보다도 주사에 의하지 않고 섭식에 의해 면역저하를 유도할 수 있는 약제의 선별이 추후 연구에서 해결되어야 할 것이다. Eicosanoids의 생합성에 관여하는 효소는 많고 이 각 효소를 특이적으로 억제하는 물질도 다양하여 (Stanley, 2000), 섭식에 의한 면역저해제 개발에 관한 가능성을 제시하고 있다.

인 용 문 헌

- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303~309.
- Baines, D., T. Desantis and R.G.H. Downer. 1992. Octopamine and 5-hydroxytryptamine enhance the phagocytic and nodule formation activities of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes. J. Insect Physiol. 38: 905~914.
- Cary, N.C. K. Söderhäll and V.J. Smith. 1986. Prophenoloxidase-activating cascade as a recognition and defence system in arthropods. In: Gupta. A.P. (Ed.), Hemocytic and humoral immunity in arthropods. John Wiley and Sons, New York, pp. 251~286.
- Chadwick, J.S. and W.P. Aston. 1991. Antibacterial immunity in Lepidoptera. In: A.P. Gupta (Ed.) Immunity in insects and other arthropods. CRC Press, Boca Raton.
- Edson, K.M., C.B. Vinson, D.B. Stoltz and M.D. Summers. 1980. Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. Science 211: 582~583.
- Gateff, E. 1996. The *Drosophila melanogaster* immunoresponsive tumorous blood cell line mbn-2, a tool to study the molecular mechanisms of the immune response and to identify genes instrumental in cell-cell recognition. In: P. Brey, D. Hultmark (Eds.) Molecular mechanisms of immune responses in insects. Chapman & Hall, New York.
- Gillespie, J., M.R. Kanost and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611~643.
- Gunnarsson, S.G.S. and A.M. Lackie. 1985. Hemocytic aggregation in *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* as a response to injected substances of microbial origin. J. Invertebr. Pathol. 46: 312~319.
- KSDI (Kyungbook Sericultural Development Institute). 1998. Handbook of Sericultural Technology. Kyungbook Sericultural Development Institute. pp. 41~61.
- Lackie, A.M. 1988. Hemocyte behaviour. Adv. Insect Physiol. 21: 85~178.
- Lee, E.J., K.D. Kang, K.Y. Hwang, D.H. Kim, S.D. Kim and S.I. Seong. 1998. Isolation and identification of Actinomycetes for the control of agricultural pest and fungal pathogene. Korean J. Seric. Sci. 40: 63~69.
- Lee, I.K., J.B. Seo, B.R. Jin, S.C. Shin, H.Y. Park, B.Y. Lee, C.K. Lee, S.D. Woo and S.K. Kang. 1996. Growth rate on entomopathogenic fungi in mass culture system. Korean J. Seric. Sci. 38: 150~153.
- Miller, J.S., R.W. Howard, T. Nguyen, A. Nguyen, R.M.T. Rosario and D.W. Stanley-Samuelson. 1996. Eicosanoids mediate nodulation response to bacterial infections in larvae of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*. J. Insect Physiol. 42: 3~12.
- Miller, J.S., R.W. Howard, R.L. Rana, H. Tunaz and D.W. Stanley. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. J. Insect Physiol. 45: 75~83.
- Park, Y. and Y. Kim. 1999. Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. J. Asia-Pacific Entomol. 2: 105~111.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. J. Insect Physiol. 46: 1469~1476.
- SAS Institute Inc., 1989. SAS/STAT users guide. SAS Institute Inc.,
- Söderhäll, K. 1992. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. Biol. Zool. 59: 141~151.
- Stanley, D.W. 2000. Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton University Press. 277 pp. New Jersey.
- Stanley-Samuelson, D.W. 1994. Assessing the significance of prostaglandins and other eicosanoids in insect physiology. J. Insect Physiol. 40: 3~11.
- Stanley-Samuelson, D.W., V.K. Pedibhotla, R. L. Rana, A.R. Nor Aliza, W.W. Hoback and J.S. Miller. 1997. Eicosanoids mediate nodulation response to bacterial infections in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. 118A: 93~100.
- Tunaz, H., J.C. Bedwick, J.S. Miller, W.W. Hoback, R.L. Rana and D.W. Stanley. 1999. Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of two 17-year periodical cicadas, *Magicicada septendecim* and *M. cassini*. J. Insect Physiol. 45: 923~931.

(2000년 12월 20일 접수; 2001년 2월 20일 수리)