

발육영점온도에서 파밤나방 5령 유충의 유전자 발현 저하

최봉기 · 박영진 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학과

Suppression of Gene Expression in the Fifth Instar Larvae of *Spodoptera exigua* at Low Developmental Threshold Temperature

Bongki Choi, Youngjin Park and Yonggyun Kim*

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

ABSTRACT: This study aimed to understand the physiological status of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* at low developmental threshold temperature (LTT) through analysis of gene-expression patterns associated with different functions (metabolism, nervous system, immune, and stress). The estimated LTTs for egg, larval, and pupal developments varied with 5.5 ~ 11.6°C. Larvae were able to develop at the lower temperatures than eggs and pupae. However, the physiological LTT (15°C) in the fifth instar was much higher than the estimated LTT (10.3°C). Gene expression patterns estimated by a quantitative RT-PCR (qRT-PCR) indicate that most genes in different functional groups increased their expressions with increase of larval instars. In the same fifth instar, as the treatment temperatures increased, the gene expression levels increased. Moreover, the newly molted fifth instar larvae were different in their gene expression rates according to their previous culturing temperatures. Most gene expressions were suppressed in the fifth instar larvae at the physiological LTT (15°C). However, the larvae at 15°C gradually exhibited significant increase in the gene expression rates with rearing time just like those at the higher temperature. These results suggest that *S. exigua* at LTT exhibits a typical gene expression pattern with maintaining significantly suppressed levels.

Key words: *Spodoptera exigua*, Temperature, Growth, Gene expression, Climate change

조 록: 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 발육을 일으키는 최저온도를 결정하고, 이 상태의 생리적 특성을 서로 다른 기능군(대사, 신경, 면역 및 스트레스) 유전자의 발현 양상을 이해하기 위해 본 연구를 수행하였다. 알부터 번데기까지 파밤나방의 발육영점온도는 5.5~11.6°C로 다양하였다. 유충은 알과 번데기에 비해 비교적 낮은 온도에서 발육이 가능하였다. 5령충의 경우 생리적 발육영점온도가 추정치(10.3°C)와 다르게 이보다 높은 15°C에서 관찰되었다. 정량적 RT-PCR로 분석된 유전자의 발현양상은 유충 영기가 진행됨에 따라 모든 기능군의 대부분 유전자의 발현량이 증가하였고, 또한 5령 시기에서도 처리온도가 증가함에 따라 이들 유전자의 발현량도 증가하였다. 비록 동일한 것 탈피한 5령이라 하더라도 이전에 노출된 외부 온도에 따라 발현량이 상이하였다. 5령충의 생리적 발육영점온도인 15°C에서 대부분의 유전자 발현량은 저하되었다. 그러나 높은 온도에서와 마찬가지로 발육기간이 증가함에 따라 이들 유전자의 발현량이 증가하였다. 이상의 결과는 발육영점온도에서 파밤나방의 발육 관련 유전자의 발현이 전체적으로 수준은 낮지만 지속적으로 진행되고 있다는 것을 의미한다.

검색어: 파밤나방, 온도, 성장, 유전자 발현, 기후변화

곤충은 변온동물로서 외부 환경에 따라 자신의 체온이 변동된다. 생체에서 일어나는 거의 모든 화학 반응은 온도에 따라 반응 속도가 변동되기에 외부 온도는 곤충의 생체 반응을 변화

시키고, 궁극적으로 곤충의 발육에 직접적으로 영향을 주는 최대 환경 인자가 된다(Chen et al., 2011).

파밤나방(*Spodoptera exigua*)은 성충의 높은 이동성을 바탕으로 아열대지역에서 온대지역으로 서식지를 넓히는 있는 곤충이다(Mikkola, 1970; Fey and Carranza, 1973; Feng et al., 2003). 최근 기후 조건 관련 곤충 분포예측 모델링 프로그램인

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received May 27 2013; Revised August 12 2013

Accepted August 30 2013

CLIMEX를 이용하여 파밤나방의 월동이 가능한 중국 내륙 북방한계지역을 보고하였다(Zheng et al., 2012). 국내 파밤나방 집단의 유전적 변이가 34개의 동위효소로 분석한 결과 평균이형접합율이 32.8%이고, 이들 유전좌위 당 평균 2.52개의 대립유전자가 존재하며, 이 가운데 평균 1.72개가 유효대립유전자로 나타나 다른 곤충에 비해 유전적 다양성이 높은 것으로 보고된(Kim and Kim, 1998) 바와 같이 파밤나방은 기후변화와 같은 환경변화에 대처하여 적응하는 능력이 높은 것으로 추정된다.

파밤나방은 온대지역에서 다가알콜류 생성을 기반으로 초냉각의 기능을 보유하고 있어 낮은 온도에서도 생존을 유지할 수 있는 기작을 보유하고 있다(Kim and Kim, 1997). 더욱이 가을기간의 야외 조건과 같이 순차적 온도 감소는 이 곤충으로 하여금 저온순화기능을 발현하게 하여 낮은 온도에 저항하는 내한성유기 기작을 보유하게 한다(Song et al., 1997; Zheng et al., 2011). 저온 기간 중에는 발육이 억제되어 약 13°C 이하에서는 발육이 정지되는 것으로 보고하였다(Kim et al., 2000). 그러나 Kim and Song(2000)에 의하면 이 발육영점온도 이하에서도 발육에 영향을 줄 수 있다는 것이 변온 조건의 실험에서 나타났다. 따라서 산술적 추정치인 발육영점온도에 대한 생리적 요구심을 갖게 했다.

곤충의 발육은 다양한 유전자가 관여하게 된다. 기본적으로 에너지 대사에 관여하는 유전자로부터 성장과 변태를 유발하는 유전자 그리고 다양한 생리현상을 유지하는 유전자까지 거의 모든 유전자의 발현이 곤충의 발육에 관여하는 것으로 여겨진다(Garrity et al., 2010). 따라서 온도에 따라 일어나는 곤충의 발육에는 이러한 거의 모든 유전자의 발현이 영향을 받을 것으로 추정된다.

본 연구는 파밤나방에 대한 발육영점온도에 대한 생리적 현상을 추적하기 위해 미성숙 시기의 파밤나방에 대한 발육단계별 발육영점온도를 결정하였다. 특별히 이 곤충의 종령에 해당하는 5령충에 대해서 실제 다음 단계로 발육이 진행되지 않는 생리적 발육영점온도를 결정하였다. 이를 기반으로 발육영점온도 조건에서 체내에서 일어나는 생리적 상태를 이해하기 위해 대사, 변태, 스트레스 및 면역생리에 관여하는 10개의 유전자의 발현량을 분석하였다.

재료 및 방법

파밤나방 사육

시험 곤충은 경북 안동시 송천동 파밭에서 채집하여 실내에서 인공사료(Goh et al., 1990)로 유충을 사육하였다. 성충에게 먹

이로 10% 설탕물을 제공하였다. 전체 사육기간 동안 온도 25 ± 1°C, 상대습도 60 ± 10% 및 광주기 16:8(L:D) h 조건을 유지하였다.

발육영점온도 결정

각기 다른 발육 시기의 개체를 30마리씩 3반복으로 4개 온도(15, 20, 25 및 30°C) 조건에 처리하였고, 16:8(L:D) h 광조건을 유지하였다. 유충은 각각 플라스틱 사육용기(직경 8.5 cm × 높이가 3 cm)에서 인공사료를 먹이로 개체 사육되었다. 알기간은 산란에서 부화까지의 일수, 유충 각 영기간과 용기간은 허물벗기를 기준으로 일수로 계산하였다. 발육속도는 발육기간의 역수로 산출하고, 이 발육속도와 발육온도간에 SAS의 PROC REG(SAS Institute, 1989)을 이용하여 회귀분석을 통해 발육영점온도를 결정하였다.

cDNA 합성과 유전자 발현량 분석

온도별 또는 발육시기별로 처리된 유충을 대상으로 Trizol 용액(MRC, OH, USA)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였고, 이 전체 RNA(1 µg)를 주형으로 oligo-dT(5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TTT-3') 프라이머로 RT-premix(바이오니아, 대전)를 이용하여 역전사하였다.

유전자 발현량 분석은 각 유전자의 특이적 프라이머(Table 1)를 바탕으로 Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아, 대전)을 이용하여 SYBR 그린 형광물질과 형광분석방법을 가미한 real time quantitative PCR(qRT-PCR) 기술로 측정하였다. qRT-PCR 반응은 Accupower Greenstar™ PCR premix(바이오니아, 대전)로 진행하였다. 이 반응물(20 µl)은 1x Greenstar™ master mix, 10 mM MgCl₂, 0.5 µM의 각 프라이머, 250 ng의 cDNA가 포함되어 있다. 반응조건은 Hotstart Taq DNA polymerase를 활성화시키기 위해 95°C에서 15분간 가열하였으며, 이후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 반응 순으로 40회 PCR 산물을 증폭시켰고, 증폭된 산물의 형광반응이 실시간으로 측정되었다. 각 처리는 3반복으로 각 반복은 독립된 반응을 의미한다. 나비목 유충의 보존적 β-actin 유전자 부위를 결정하여 이를 바탕으로 프라이머를 제작하였고(Table 1), 이 유전자 증폭물을 각 유전자 반응의 정량적 표준화대조구로 이용하였다. 얻어진 PCR 증폭물의 형광량을 Exicycler™ 프로그램에 의해 실시간으로 도식화하였고, 정량적 임계 반응횟수(critical threshold, CT)를 산출하였다. 다시 각 유전자의 CT는 β-actin 유전자 CT에 대한 차이(ΔCT)로 산출한 후, 이를 상대적 수치

Table 1. Genes analyzed in this study and their PCR primer sequences

Genes	GenBank accession number	Primer sequences
β-Actin	JN410820	GACGAGGCCAGAGCAAGAG CAGCGGTGGTGGTGAAGG
Cytochrome oxidase-I (CO-I)	AY722705	GGGGCAGGTAAGTGGATGAAC CTCCCCCTCCTGCAGGATC
Peritrophin (PTN)	AF545582	ACTTCCACGTCCATCTGCTG TGTCGCCGCCGTTGTTGTTG
Chitin synthase (CS)	AB271784	AGAGCTGCGAACTCATCCGTC CATCGAGCCCGTTAGTTTCTG
Acetylcholinesterase (Ace)	AY032625	TAATGGCGTCTTCGAGTGATGT AAGCCTAGTATTCCAGTGTAAG
Odorant receptor 83b (OR)	GO923610	CAACGGGCTCACGCAGAAG TCCAGAGACACGGTGAAGAACT
Cecropin (Cec)	GU206789	CGCAGTGGCCAGTGTGTCG GGCTTGTCCGATGACAGC
Peptidoglycan recognition protein (PGRP)	EU399240	GTTGTGCTCATGCAGGGTG GACCACTGCGTATGAGTGAG
Phenoloxidase (PO)	FJ151228	CCTGCACCATTGGCACTGG GCTGTGCCCATTTGTTGTAATG
Heat shock protein 70 (Hsp70)	AB282645	CCATCGAGCACGGCATCATC CAGGGCGACGTAGCAGAGC
Cytochrome P450 (CYP)	FJ023535	CAGCAGTGAAGCCAAAAGGAG CCACTGCCGAAAGGTATGAATG

($2^{-\Delta\Delta CT}$)로 환산하여 비교하였다(Livak and Schmittgen, 2001).

유충 발육시기별 유전자 발현 분석

위에서 기술 방법대로 25°C에서 인공사료로 증식시킨 파밤나방 3, 4, 및 5령충 각 30, 10 및 5마리를 임의로 선택하여 전체 RNA를 추출하였다. qRT-PCR은 10개 유전자를 대상으로 3반복 실시하였다.

상이한 온도조건에 증식된 5령 유충의 초기 유전자 발현 분석

일반 사육 조건에서 증식된 4령 유충을 서로 다른 네 가지 온도(15, 20, 25 및 30°C)에 처리하였고, 이후 각 온도에서 갓 탈피한 5령 유충 5마리를 수거하여 RNA를 추출하였다. 유전자 발현 시험은 각 온도에서 3반복 실시하였다.

온도별 5령 유충의 유전자 발현 분석

25°C에서 증식된 파밤나방 5령 유충을 15, 20, 및 25°C의 온도에 처리하고, 이후 15°C의 경우 1, 3, 5, 7 및 9일 간격으로, 20°C

의 경우 1, 3, 5 및 7일 간격으로, 25°C에서는 1, 3일에 각각 5마리씩 수거하여 3반복으로 RNA를 추출하여 유전자 발현 분석에 사용하였다.

통계분석

백분율 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

파밤나방 발육태별 온도 발육 속도

발육이 일어나는 최저 온도를 규명하기 위해 파밤나방 각 발육태별 발육영점온도를 결정하였다(Table 2). 전체적으로 각 발육태에 따라 발육영점온도는 5.5~11.6°C로 나타났으며, 발육태에 따라 상이하였다. 유충은 알과 번데기에 비해 낮은 온도에서도 발육하는 것으로 나타났다. 또한 유충 영기에 따라서도 발육은 상이하였으며, 특히 5령은 번데기로 발육하는 데 비교

Table 2. Threshold temperatures (TTs) for growth in *Spodoptera exigua*

Developmental stage ¹	N	TT (°C) ± SD	Coefficient of Determination
Egg	296	8.51 ± 0.42	R ² = 0.88; df = 1,2; P = 0.0028
Larva	368	5.53 ± 0.41	R ² = 0.96; df = 1,2; P = 0.0201
L1	185	3.36 ± 0.42	R ² = 0.95; df = 1,2; P = 0.0228
L2	96	7.96 ± 0.41	R ² = 0.94; df = 1,2; P = 0.0273
L3	49	2.15 ± 0.41	R ² = 0.97; df = 1,2; P = 0.0128
L4	25	4.52 ± 0.43	R ² = 0.70; df = 1,2; P = 0.1616
L5	13	10.26 ± 0.39	R ² = 0.98; df = 1,1; P = 0.0588
Pupa	61	11.62 ± 0.40	R ² = 0.96; df = 1,2; P = 0.0226

¹ 'L1~L5' stand for larval instars.

Table 3. Development of different stages of *Spodoptera exigua* at 15°C

Development ¹	N	Developmental rate (%)	Developmental period (days)
Egg → L1	97	58.7 ± 7.6	8.0 ± 1.0
L1 → L2	90	47.7 ± 7.7	8.5 ± 2.4
L2 → L3	43	41.8 ± 8.6	4.6 ± 2.1
L3 → L4	18	61.1 ± 1.1	4.0 ± 1.7
L4 → L5	11	54.5 ± 5.4	5.1 ± 1.2
L5 → Pupa	11	0	-
Pupa → Adult	20	55.0 ± 0.0	21.7 ± 1.7

¹ 'L1~L5' stands for each larval instar.

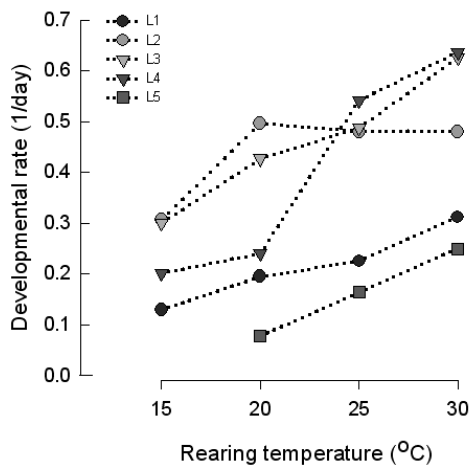


Fig. 1. Development of each larval instar (L1~L5) of *Spodoptera exigua* at different temperatures. Each temperature treatment was replicated three times.

적 높은 온도를 요구하였다(Table 2, Fig. 1). 유충 영기별 발육 속도도 상이하여, 1, 5령은 2, 3령에 비해 발육 속도가 상대적으로 느렸다. 그러나 4령의 경우는 낮은 온도에서는 1, 5령과 같이 느린 반면, 높은 온도에서는 2, 3령과 같이 빠른 발육 속도를

보여 중간형태의 발육 패턴을 보였다. 발육영점온도가 5령의 경우 평균 10.3°C로 산출되었으나, 이 보다 높은 15°C 사육 조건에서 번데기로 발육하지 못하였다(Table 3).

유충 발육시기별 유전자 발현

파밤나방 유충의 발육시기에 따른 총 10개 유전자의 발현량을 측정하였다(Fig. 2). 이들 유전자는 파밤나방 유충 영기가 진행함에 따라 발현량이 증가하는 유전자와 뚜렷한 차이를 보이지 않는 유전자로 나뉘어졌다. 발현량이 증가하는 유전자는 대사 관련 유전자(CO-I, PTN 및 CS)과 신경계 관련 유전자(Ace 및 OR), 그리고 일부 면역 관련 유전자(PO) 및 스트레스 관련 유전자(Hsp70) 등의 유전자를 포함하였다. 발현량에 차이를 보이지 않는 유전자는 면역 관련 유전자(Cec 및 PGRP) 및 스트레스 관련 유전자(CYP)를 포함하였다.

온도별 5령 유충의 유전자 발현

동일한 발육태인 5령 유충에서 상이한 발육 온도 조건에서

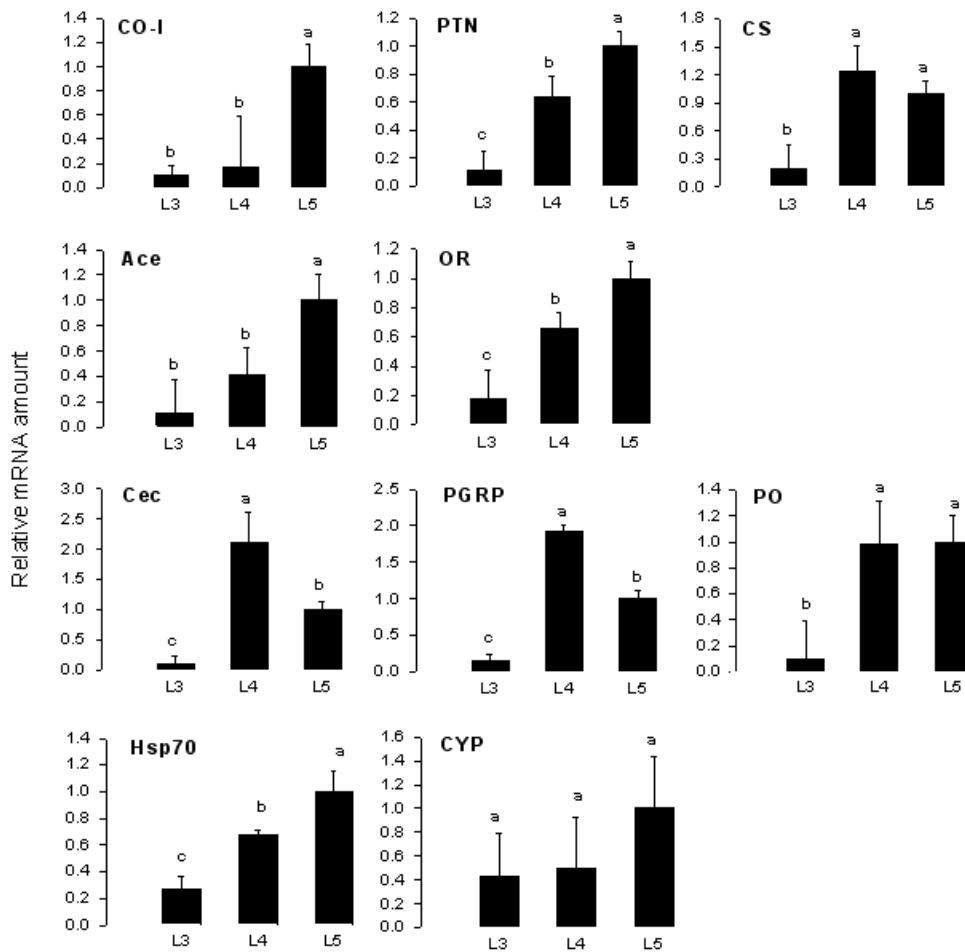


Fig. 2. Effect of developmental ages on expression of 10 genes classified into metabolism-associated genes (CO-I, PTN, and CS), nerve system-associated genes (Ace and OR), immune-associated genes (Cec, PGRP, and PO), and stress-associated genes (Hsp70 and CYP). Transcript quantity was estimated by relative amounts after normalization with the amount of a constitutively expressed gene, β -actin. 'L3~L5' represents each larval instar. Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

발육이 진행함에 따라 10개 유전자의 발현량을 분석하였다 (Fig. 3). Chitin synthase(CS)를 제외하고 대부분의 유전자는 처리 온도가 증가함에 따라 발현량이 증가하였고, 온도 처리 일수가 1일(Fig. 3A)에 비해 3일(Fig. 3B)째 더욱 뚜렷한 경향이 있었다. CS를 제외한 모든 유전자 발현이 15°C에서 가장 낮은 발현량을 보였다.

상이한 온도에서 갓 탈피한 5령 유충의 유전자 발현

각기 다른 온도 조건에서 증식되어 동일한 조건의 발육시기인 5령에서 유전자 발현 양상 차이를 분석하였다(Fig. 4). 분석된 10개 유전자 모두에서 비록 발육시기는 동일하지만, 이전에 노출된 처리 온도에 따라 유전자의 발현량이 동일하지 않았다. 특히 5령의 생리적 발육영점온도인 15°C에서 증식된 갓 탈피한

5령이 가장 낮은 유전자 발현 양상을 보였다. 그러나, 이 이상의 온도에서는 온도증가에 따라 발현량 증가를 보인 유전자는 Cec, PGRP 및 CO-I이고, 나머지 7개 유전자는 높은 온도(30°C) 보다는 20°C 또는 25°C에서 최대 발현량을 보였다.

발육영점온도(15°C) 노출 시기별 5령 유충의 유전자 발현

25°C 조건에서 사육된 파밤나방 5령 유충을 15°C의 생리적 발육영점온도에 노출하였을 때 일어나는 유전자 발현 양상을 분석하였다(Fig. 5A). 총 9일간 2일 간격으로 유전자 발현 양상을 분석한 결과 나이가 진행함에 따라 CS를 제외하고 발현량이 정의상관으로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 증가는 마치 발육이 허용되는 온도 조건인 20°C(Fig. 5B)와 유사하게 나타났다.

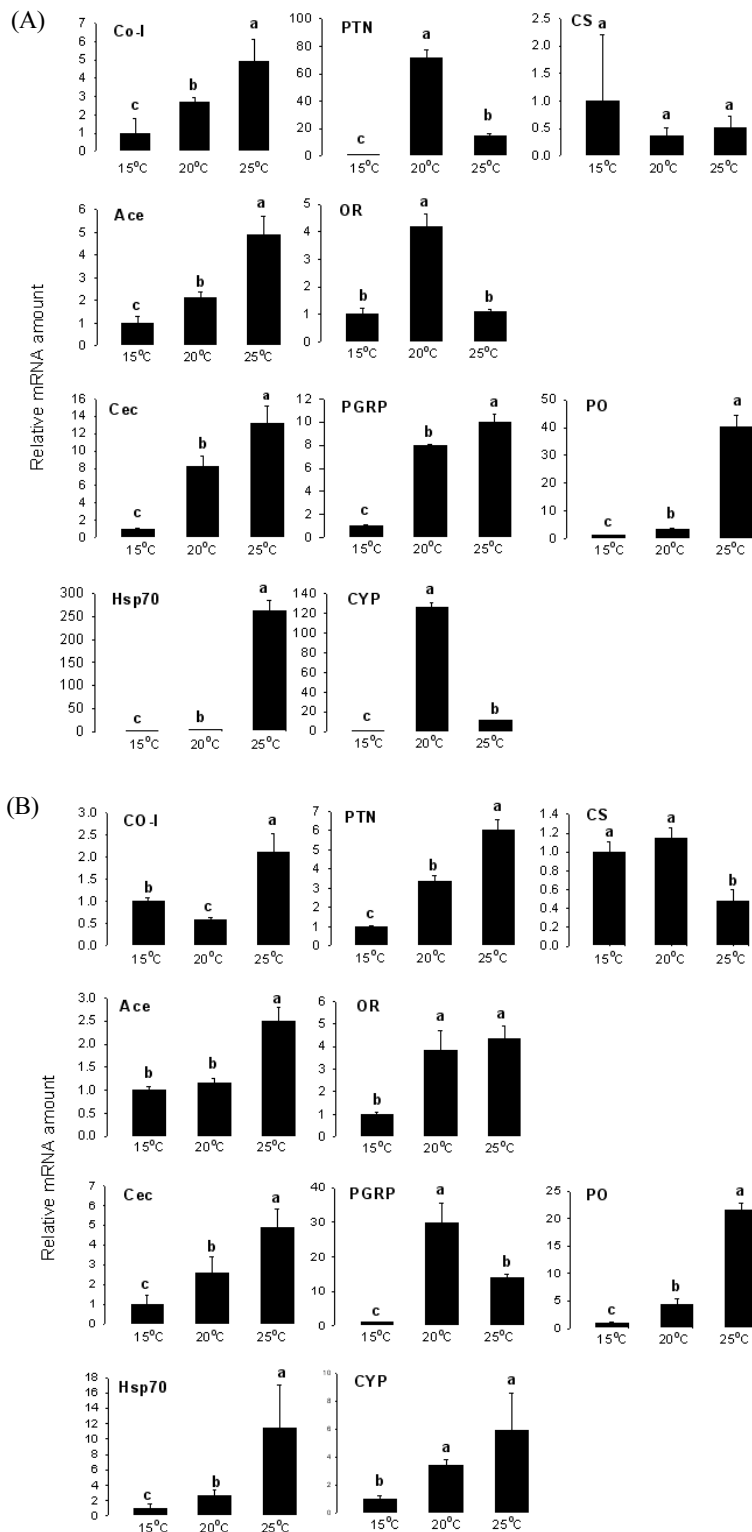


Fig. 3. Effect of rearing temperatures (15, 20, and 25°C) in fifth instar *Spodoptera exigua* on expression of 10 genes classified into metabolism-associated genes (Co-I, PTN, and CS), nerve system-associated genes (Ace and OR), immune-associated genes (Cec, PGRP, and PO), and stress-associated genes (Hsp70 and CYP). Transcript quantity was estimated by relative amounts after normalization with the amount of a constitutively expressed gene, β -actin. The quantitative analyses were performed at two exposure periods at (A) 1 day after treatment (1 DAT) and (B) 3 days after treatment (3 DAT). Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

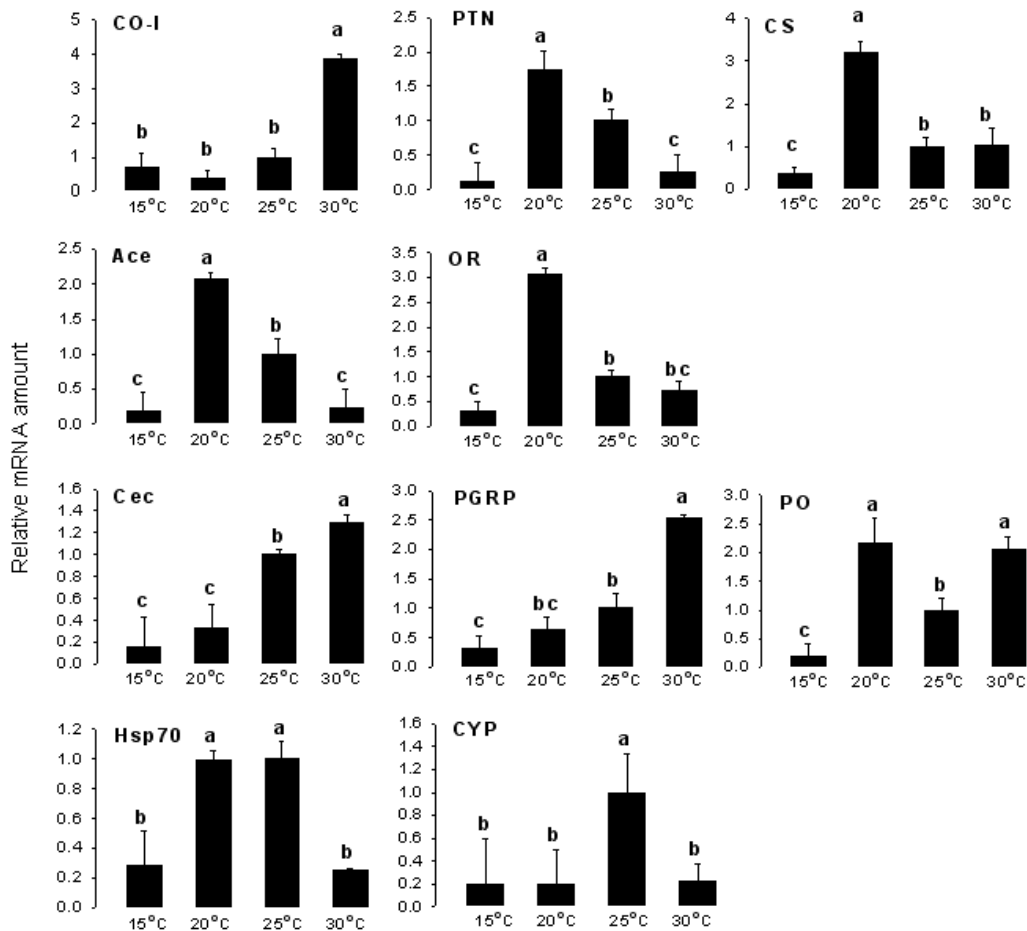


Fig. 4. Effect of previously exposed-rearing temperatures (15, 20, 25, and 30°C) prior to newly molted fifth instar *Spodoptera exigua* on expression of 10 genes classified into metabolism-associated genes (CO-I, PTN, and CS), nerve system-associated genes (Ace, OR), immune-associated genes (Cec, PGRP, and PO), and stress-associated genes (Hsp70, CYP). Transcript quantity was estimated by relative amounts after normalization with the amount of a constitutively expressed gene, β -actin. Each treatment was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

고찰

발육이 허용되는 온도범위 및 발육속도는 곤충의 종류와 발육시기에 따라 다를 수 있다. 파밤나방의 발육 최저 한계온도인 발육영점온도가 여러 연구에서 결정되었다(Goh, 1993; Lee, 1993; Kim et al., 2000). 그러나 개별 연구들 사이에 발육영점온도의 추정치는 차이를 나타냈다. 본 연구에서는 파밤나방의 발육태별로 발육영점온도를 측정하여 용시기와 더불어 전체적으로 5.5 ~ 11.6°C의 발육영점온도를 결정하였다. 이상의 모든 연구에서 공통적으로 유충에 비해 용의 발육은 높은 발육영점온도를 나타냈다. 이러한 이유는 첫째로 상이한 파밤나방 집단에 따른 유전적 변이에 기인되었을 수 있다. 또 다른 이유로서는 발육영점온도 자체는 이론적 추정치로서의 한계로, 실제 생리적으로 발육이 정지되는 환경온도로 보기 어렵다는 가변성

이 존재한다. 따라서 실험적으로 이러한 발육영점온도를 결정할 필요가 있다. 본 연구에서는 파밤나방 5령충이 15°C에서 용으로 발육이 진전되지 않는 것을 관찰하였다. 즉, 파밤나방의 발육영점온도 이하에서 발육이 정지되는 것은 온도에 비례하여 자연적으로 생체 생화학 반응율이 낮아지는 데에서 기인될 수 있다. 다른 한편으로는 불리한 온도조건은 곤충 자체가 이를 감지하고 자신의 발육을 억제하려는 적극적 자체 조절 기작이 작용하였을 것으로도 해석된다. 파밤나방도 일반 곤충과 마찬가지로 외부 온도에 따라 체온이 변동되는 변온동물로서 자신의 최적 발육을 도모하려면, 온도를 감지하는 감각기를 보유하고, 극단의 온도를 피하고 자신의 발육에 최적인 외부온도를 선별하는 행동을 보여야 한다. 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서는 자신의 생존과 발육에 최적인 온도조건을 선택하려는 온도선호행동(temperature preference behavior: TPB)을 보이

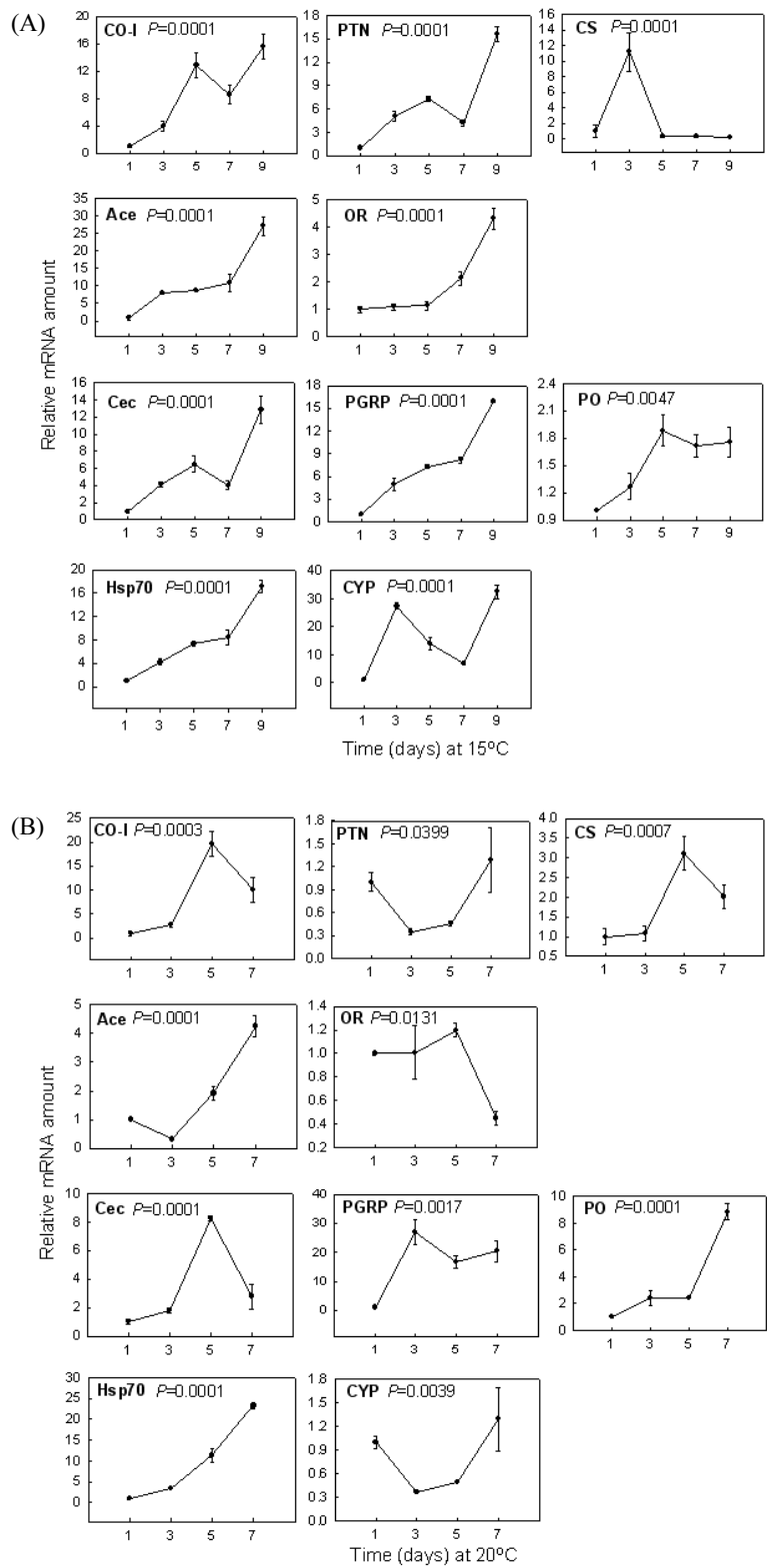


Fig. 5. Effect of a physiological threshold temperature (15°C) in fifth instar *Spodoptera exigua* on expression of 10 genes classified into metabolism-associated genes (CO-I, PTN, and CS), nerve system-associated genes (Ace and OR), immune-associated genes (Cec, PGRP, and PO), and stress-associated genes (Hsp70 and CYP). Transcript quantity was estimated by a relative amount after normalization with the amount of a constitutively expressed gene, β -actin. Each treatment was replicated three times. The expression patterns at 15°C (A) were compared with those at 20°C (B). P-values indicate Type I errors of significant difference among means.

는 것으로 밝혀졌다. 이는 TRPA1을 발현하는 신경의 자극에 의해 증대되며, 이러한 행동은 극한의 위험 온도에 대해서 회피하는 선천성 행동(Neely et al., 2011)과 구별된 것으로 뇌의 유병체에서 일어나는 cAMP-dependent protein kinase(PKA)에 의해 조절된다(Hong et al., 2008). 이 PKA에 대한 표적분자를 찾아내기 위해 초파리 게놈 전체를 대상으로 유전자를 추적한 결과 cytochrome P450의 일종인 *cyp6a17*로서 동정되었으며, 기능적으로 TPB를 유발하는 것으로 증명되었다(Kang et al., 2011). 따라서 본 연구 결과에서처럼 5령충을 포함한 파밤나방의 유충은 15°C 이상의 온도 조건을 선호하고, 이 온도 이상에서는 다양한 발육 유전자를 발현시키는 것으로 해석된다.

파밤나방의 발육이 진전됨에 따라 다양한 유전자 활성이 필요할 것으로 사료된다. 본 연구는 파밤나방 유충 영기가 진행됨에 따라 또 같은 5령이라 하더라도 온도가 증가함에 따라 모든 기능군의 유전자 발현이 증가하였다. 대사 관련 유전자와 신경계 유전자는 발육이 진전됨에 따라 이들의 기능적 요소가 높아지는 것으로 발현량의 증가를 설명할 수 있다. 흥미로운 사실은 발육에 따라 면역 관련 유전자의 발현이 증가된 것이다. 발육 온도에 따라 면역 유전자의 발현량이 증가되는 것이 일부 곤충에서 보고되었다(Muturi et al., 2012). 온도 증가에 따른 열충격이 면역 관련 유전자의 발현 유도를 일으킨다는 것이 열충격단백질(heat shock protein: Hsp)의 분해와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 불리한 조건의 외부온도에서는 생체 물질을 보호하기 위한 노력으로 Hsp가 관여할 수 있다(Ritossa, 1962; Linquist, 1986). 파밤나방에서도 Hsp 유전자들이 동정되었다(Xu et al., 2011). Hsp70과 Hsp83은 장기간 열충격 처리 및 회복에 중요하며, Hsp74는 단기간 열처리 및 회복에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 최근 파밤나방의 Hsp에 대해서 추가 연구에서 Hsp90의 유전자 정보를 추가하였으며, 온도 스트레스에 대한 발현량 연구에서 Hsp70이 RNA와 단백질 수준에서 동일하게 대처하는 반응을 보이는 것으로 밝혔다(Jiang et al., 2012). 본 연구에서도 처리온도가 증가함에 따라 Hsp70의 발현량이 증가하였다. 즉, 열충격에 따른 정상 단백질의 변이 형태는 면역 관련 유전자의 발현을 유발하는 Toll 또는 Imd 신호전달체계(Lemaitre and Hoffmann, 2007)에 영향을 주었다는 것으로 판단되나 이에 대해서 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

발육영점온도에서 파밤나방 5령의 유전자 발현량은 발육이 허용되는 온도의 개체들에 비해 현저히 낮았다. 그러나 이 상태에서 이들 유전자의 발현이 정지되지 않고 지속적으로 발현량을 증가시키는 것이 본 연구에서 밝혀졌다. 발육이 일어나지 않는 온도에서 이러한 지속적 유전자 발현은 우선 두 가지로 해석된다. 첫째 이 온도에서 실제로 발육은 진행되었으나, 용화와 같

은 큰 생리적 변화가 일어나지 않았을 수 있다. 15°C에서 사육된 일부 개체는 몸의 크기 성장을 보였다. 그러나 15°C에서 5령충은 더 이상의 섭식행동을 하지 않았기 때문에 성장에 한계를 나타냈다. 따라서 변태를 진행하기 위한 임계 몸크기에 이르지 못해 5령에서 발육이 정지하였을 가능성이 있다. 즉, 변태를 진행하기 위한 임계크기에 다다르면, 알라타체에서 유약호르몬의 생성이 억제되고 전흉샘축진호르몬의 분비를 유도하고 궁극적으로 전흉샘에서 탈피호르몬이 분비되어 변태를 유도하게 된다(Nijhout, 2003). 여기서 몸크기를 측정하는 데 중요한 척도가 탈피호르몬을 분비하는 전흉샘의 발달로 여겨진다(Mirth and Riddiford, 2007). 곤충의 몸 크기 성장을 유도하는 호르몬은 ILP로서 섭식행동에 따른 체내 영양분의 상태를 감지한 뇌가 ILP를 분비하여 몸의 여러 조직은 물론이고 전흉샘의 성장을 유도하게 된다(Mirth et al., 2005). 따라서 발육영점온도에서 섭식활동의 억제는 전흉샘의 임계크기에 다다른 것을 억제하여 용화에 이르지 못하게 한 것으로 해석된다. 둘째로 발육영점온도에서 보였던 유전자 발현량은 생명현상을 유지하기 위한 최소한의 수준으로 이해될 수 있다. 이때 발현량의 증가는 위에서 설명하였듯이 일부 몸 크기의 성장과 함께 일어나는 것으로 특정 몸 크기의 최소한의 발현량이 이 온도 조건에서 일어나는 것으로 보인다. 관찰 자료에 의하면 파밤나방 5령은 15°C에서 약 2달 동안 살아있을 수 있었다. 즉 15°C는 저온 피해 없이 지낼 수 있는 온도조건으로 여겨진다. 따라서 이러한 온도조건을 파밤나방의 월동 상황으로 연결시키려면, 저장된 영양분을 보충하기 위한 간헐적 섭식행동이 따라야 한다(Kim and Song, 2000). 이러한 조건이 가능한 곳에서 파밤나방은 월동이 가능할 것으로 판단된다.

발육영점온도의 생리적 현상을 규명하려는 본 연구는 파밤나방 5령충의 생리적 발육영점온도에서 유전자 발현율이 낮아 지지만, 지속적으로 발현을 유지하는 생명현상을 보여 주었다. 그러나 본 연구에서 분석된 10개의 유전자로 전체 현상을 규정하기는 곤란하므로 추후 전체 발현 유전체를 중심으로 발육영점온도에서의 포괄적 검토가 요구된다.

사사

본 연구는 2013년 농촌진흥청 농업과학기술개발 협동연구 과제(PJ00941601) 지원비로 수행되었습니다.

Literature Cited

Chen, S., Fleischer, S.J., Tobin, P.C., Saunders, M.C., 2011.

- Projecting insect voltinism under high and low greenhouse gas emission conditions. *Environ. Entomol.* 40, 505-515.
- Feng, H.Q., Wu, K.M., Cheng, D.F., Guo, Y.Y., 2003. Radar observations of the autumn migration of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and other moths in northern China. *Bull. Entomol. Res.* 93, 115-124.
- Fey, R.E., Carranza, R.L., 1973. Cotton pests: overwintering of three lepidopterous species in Arizona. *J. Econ. Entomol.* 66, 657-659.
- Garrity, P.A., Goodman, M.B., Samuel, A.D., Sengupta, P., 2010. Running hot and cold: behavioral strategies, neural circuits, and the molecular machinery for thermotaxis in *C. elegans* and *Drosophila*. *Genes Dev.* 24, 2365-2382.
- Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, G.M. and Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29: 180-183.
- Goh, H.G., 1993. Ecological aspects of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), major pest of vegetables. Ph.D. Dissertation. 77 pp. Chungbuk National University, Chungju, Korea.
- Hong, S.T., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Jeong, K., Paik, D., Chung, J., Kim, J., 2008. cAMP signalling in mushroom bodies modulates temperature preference behavior in *Drosophila*. *Nature* 454, 771-775.
- Jiang, X., Zhai, H., Wang, L., Luo, L., Sappington, T.W., Zhang, L., 2012. Cloning of the heat shock protein 90 and 70 genes from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and expression characteristics in relation to thermal stress and development. *Cell Stress Chaperons* 17, 67-80.
- Kang, J., Kim, J., Choi, K.W., 2011. Novel cytochrome P450, *cyp6a17*, is required for temperature preference behavior in *Drosophila*. *PLoS One* 6, e29800.
- Kim, Y., Kim, K., 1998. Analysis of the isozyme loci of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Kor. J. Appl. Entomol.* 37, 19-22.
- Kim, Y., Kwon, D., Kim, C., 2000. Effect of fluctuating temperature on development of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Kor. J. Soil Zool.* 5, 119-123.
- Kim, Y., Song, W., 2000. Effect of thermoperiod and photoperiod on cold tolerance of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 29, 868-873.
- Lee, S.D., 1993. Effects of host plants and temperature on the development of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). M.S. Thesis. 36 pp. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol.* 25, 697-743.
- Linguist, S., 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.
- Mikkola, K., 1970. The interpretation of long-range migrations of *Spodoptera exigua* Hb (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Anim. Ecol.* 39, 593-598.
- Mirth, C., Riddiford, L.M., 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioassays* 29, 344-355.
- Mirth, C., Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 15, 1796-1807.
- Muturi, E.J., Nyakeriga, A., Blackshear, M., 2012. Temperature-mediated differential expression of immune and stress-related genes in *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 28, 79-83.
- Neely, G.G., Keene, A.C., Duchek, P., Chang, E.C., Wang, Q.P., Aksoy, Y.A., Rosenzweig, M., Costigan, M., Woolf, C.J., Garrity, P.A., Penninger, J.M., 2011. TrpA1 regulates thermal nociception in *Drosophila*. *PLoS One* 6, e24343.
- Nijhout, H.F., 2003. The control of body size in insects. *Dev. Biol.* 261, 1-9.
- Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Song, W., Kim, Y., Cho, J., Kim, H., Lee, J., 1997. Physiological factors affecting rapid cold hardening of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *Kor. J. Appl. Entomol.* 36, 249-255.
- Xu, Q., Zou, Q., Zheng, H., Zhang, F., Tang, B., Wang, S., 2011. Three heat shock proteins from *Spodoptera exigua*: gene cloning, characterization and comparative stress response during heat and cold shocks. *Comp. Biochem. Physiol.* 159B, 92-102.
- Zheng, X., Cheng, W., Wang, X., Lei, C., 2011. Enhancement of supercooling capacity and survival by cold acclimation, rapid cold and heat hardening in *Spodoptera exigua*. *Cryobiology* 63, 164-169.
- Zheng, X.L., Wang, P., Cheng, W.J., Wang, X.P., Lei, C.L., 2012. Projecting overwintering regions of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* in China using the CLIMEX model. *J. Insect Sci.* 12, 13.