

Xenorhabdus nematophila 세균 배양액 유래 미확인 생리활성 물질의 비티플러스 살충력 상승효과

박영진* · 김민우 · 김건우 · 김용균

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

Enhancement of Bt-Plus Toxicity by Unidentified Biological Response Modifiers Derived from the Bacterial Culture Broth of *Xenornabds nematiphila*

Youngjin Park*, Minwoo Kim, Kunwoo Kim and Yonggyun Kim

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

ABSTRACT: 'Bt-Plus' has been developed by mixing spores of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and culture broth of *Xenorhabdus nematophila* (Xn). Despite its high toxicity, it has some imitation to broaden its efficacy against diverse insect pest spectrum. This study focuses on enhancement of Bt-Plus toxicity against semi-susceptible insect, *Spodoptera exitgua*, by addition of Xn metabolites. Two main Xn metabolites, oxindole (OI) and benzylideneacetone (BZA), are known to enhance the Bt insecticidal activities. The addition of OI or BZA significantly increased Bt-Plus pathogenicity. However, when the freeze-dried Xn culture broth was added to Bt-Plus, much less amount was enough to enhance the toxicity compared to the amount of OI or BZA. An HPLC analysis indicated that there were more than 12 unidentified bacterial metabolites in Xn culture broth. These suggest that there are potent biological response modifiers in Xn metabolites other than OI and BZA.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*, *Spodoptera exigua*, Oxindole, Benzylideneacetone, Biological response modifier

초 록: 비티 포자와 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)의 배양액을 혼합하여 비티플러스가 개발되었다. 높은 살충력에도 불구하고 비티플러스는 다양한 해충에 대한 넓은 살충범위를 보이지 않는 한계가 있다. 본 연구에서는 Xn 대사물질 첨가를 통한 파밤나방과 같은 비감수성 해충에 대한 비티플러스의 살충력 향상에 초점을 맞추었다. Xn의 주요 대사물질인 oxindole (OI)과 benzylideneacetone (BZA)는 비티의 살충력을 향상시킨다고 보고되었다. 본 연구에서 OI 또는 BZA의 첨가는 비티플러스의 살충력을 향상시켰다. 그러나 동결건조된 Xn 배양액의 첨가는 보다 낮은 농도의 OI 또는 BZA로도 충분히 비티플러스의 살충력을 상승시켰다. HPLC 분석에서 Xn 배양액에 최소 12개의 대사물질이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 OI와 BZA 외에도 Xn 대사물질에 생리활성물질이 존재하는 것을 제시한다.

검색어: *Xenorhabdus nematophila*, 파밤나방, 옥신돌, 벤질리덴아세톤, 생리활성물질

곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila* (Xn)는 그람 음성 장내세균과에 속하는 간상형 균이다(Park and Kim, 2000). Xn은 토양속에 존재하는 *Steinernematidae*에 속하는 곤충병원 선충인 *Steinernema carpocapsae*의 장속에 공생 한다(Kaya

and Gaugler, 1993; Park and Kim, 2000). 감염태 곤충병원선충이 대상곤충의 혈강으로 침입할 때 Xn이 선충의 장으로부터 기주의 혈강 안에서 분리되어 24 시간안에 병원성을 나타낸다(Park and Kim, 2000). 지금까지의 연구를 통해 곤충에 대한 Xn의 병원성은 기주의 면역억제를 통한 패혈증이 주요 원인이다(Akhurst, 1980; Kaya and Gaugler, 1993; Hwang et al., 2013). 이러한 면역저하는 Xn이 생성하는 대사물질에 의해 기인되며,

*Corresponding author: happy2pyj@gmail.com

Received December 26 2014; Revised March 23 2015

Accepted April 5 2015

이때 이 대사물질이 곤충의 면역계물질인 아이코사노이드의 생합성 경로를 억제하여 세포성 및 체액성 면역과정을 억제한다(Park and Kim, 2003; Kim et al., 2005; Hwang et al., 2013). Xn이 생성하는 대사물질은 tryptic soybean broth (TSB) 배지에서 48 시간 동안 배양되었을 때 최소 8 가지 이상으로 밝혀졌다(Shrestha et al., 2010; Seo et al., 2012). 이러한 Xn 유래의 대사물질들은 주로 인지질을 기질로 분해하는 인지질분해효소인 phospholipase A₂ (PLA₂, EC3.1.1.4)의 촉매작용을 특이적으로 저하시킴으로 면역계과정을 교란하여 기주 곤충의 면역반응을 효과적으로 억제시킨다(Eom et al., 2014).

Bacillus thuringiensis (비티)는 그람양성의 포자를 형성하는 세균으로 살충성 결정체인 내독소단백질을 생성하여 다양한 곤충에 대해 병원성을 나타낸다(Schnepf et al., 1998; Pigott and Ellar, 2007). 이러한 비티의 병원성은 다양한 Cry 유전자에 의해 암호화되어 발현되는 내독소 단백질에 의해 나타나며, 비티의 살충범위가 결정된다(Bravo et al., 2011). 지금까지 약 700 종류의 Cry 유전자가 밝혀졌고, 아미노산 서열을 바탕으로 Cry 유전자가 분류되었다(Crickmore et al., 2014). 비티의 살충기작은 크게 세 가지 단계로 나누어진다. 살충기작의 첫 번째 단계는 곤충에게 섭취된 내독소단백질이 장내의 알칼리성 pH에 의해 용해되는 과정이며, 두 번째 단계는 용해된 불활성형의 내독소단백질이 트립신과 같은 장내 소화효소에 의해 활성화되는 과정이며, 마지막 단계에서는 내독소단백질이 중장내의 위식막을 통과하여 수용체(캐드헤린, alkaline phosphatase, aminopeptidase N, ABCC 수용체)와 특이적 결합을 통해 중장의 미세융모막에 구멍을 형성하여 중장세포의 병변유발이다(Broderick et al., 2006; Park et al., 2014). 궁극적으로 중장세포의 파괴는 pH와 이온농도와 같은 항상성 파괴와 더불어 내강에 존재하는 다양한 장내 미생물들과 비티들이 혈강으로 침입하도록 하며 패혈증으로 대상곤충을 치사시킨다(Schnepf et al., 1998; Broderick et al., 2006). 특히, 활성화된 내독소단백질과 캐드헤린의 결합은 단위체의 내독소단백질을 중합체의 내독소단백질로 구조적인 변경을 야기하여 중장내 구멍 형성(pore formation)을 보다 용이하게 한다(Bravo et al., 2004; Bravo et al., 2011). 또 다른 독성작용으로는 내독소단백질이 캐드헤린에 결합하면 세포내 신호전달과정을 통해 중장세포의 세포사멸을 유발시켜 살충기작을 발휘할 수 있다(Zhang et al., 2005).

광범위한 비티 살충제의 사용은 궁극적으로 비티에 대한 저항성 개체의 출현을 야기하였다. 비티 살충제에 대한 야외집단의 저항성 출현은 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에서 처음으로 보고되었다(Tabashnik et al., 1994). 비티 살충제의 저항성

기작은 내독소단백질의 단백질 분해 효소의 변형으로 중장 내에서 내독소 단백질의 활성화를 억제하는 기작과 중장 막 단백질인 캐드헤린의 변형에 따른 것으로 내독소 단백질과의 결합을 낮추는 기작으로 설명되고 있다(Herbert and Goodrich-Blair, 2007). 이와 같은 비티 저항성 발현으로 인해 국내에서 중요한 해충인 배추좀나방의 방제가 기존의 비티 살충제로서는 한계에 달하였다. 이러한 기존의 비티 살충제에 대한 약점을 보완하기 위하여 비티살충제인 비티플러스가 개발되어 파밤나방과 배추좀나방의 살충력을 높였다(Seo and Kim, 2010).

본 연구에서는 비티플러스의 살충범위를 넓히는 차원에서 곤충의 면역 저하 기능을 갖는 Xn 대사물질을 첨가하는 전략을 세웠다. 이를 위해 두 가지 주요 Xn 대사물질인 oxindole (OI)와 benzylideneacetone (BZA)를 선발하여 이들이 적용곤충에 대해 비티의 살충력을 증가시키는지와 동결 건조된 Xn 배양액을 비티와 혼합 처리하여 살충력 상승이 나타나는지를 비교 분석하였다. 이를 통해 비티플러스의 적용확대를 위한 새로운 전략을 개발하려는 데 연구의 궁극적 목적을 두었다.

재료 및 방법

시험 곤충

비티플러스의 내성곤충으로 파밤나방은 1994년 파 재배지에서 유충을 채집하여 실내에서 인공사료(Goh et al., 1990)를 이용하여 누대 사육하였다. 반면에 대조구로서 비티플러스의 감수성 곤충으로 배추좀나방은 안동시 송천동의 배추 재배지에서 유충을 채집하여 배추를 먹이로 하여 누대 사육하였다. 두 시험충의 성충은 10% 설탕물을 먹이로 공급하였다. 사육배양기의 조건은 온도 25±1 °C, 광주기 16:8h (L:D)이며, 상대습도 40~60%에서 유충과 성충을 사육하였다.

세균 배양

Xn 균주는 기주 선충에서 분리된 후 글리세롤 액침표본으로 보관되어 있는 것을 사용하였다(Eom et al., 2014). NBTA 평판 배지(peptone 5 g, beef extract 3 g, NaCl 5 g, bromothymol blue 0.025 g, triphenyl-2,3,5-tetrazolium chloride 0.040 g, agar powder 15 g, ddH₂O 1 L)에 세균을 도말한 후 48시간 동안 28 °C에서 배양하여 파란색으로 형성된 단일 균충을 primary form으로 판별하였다(Park et al., 2000). 단일 균충은 2 mL의 TSB (MBcell, Seoul, Korea)에서 24 시간 동안 28 °C에서 250 rpm으로 교반 배양한 후, 이 가운데 1 mL의 배양액을 곧바로 1 L의

TSB 배지에 접종하여 48 시간 동안 위와 동일한 조건으로 배양하였다. 이후 Xn 배양액 ($5 \pm 4 \times 10^8$ colony forming unit/mL)은 시험에 이용될 때까지 4°C에 보관하였다.

비티균주는 안동대학교 곤충분자생리실에 글리세롤 액침표본으로 보관되어 있는 *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* (BtA)와 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (BtK)를 TSB 평판배지에 세균을 도말한 후 24 시간 동안 28°C에서 배양하여 단일 균총을 얻었다. 각 균주별 단일 균총은 2 mL의 TSB 배지를 이용하여 위와 동일한 배양조건에서 250 rpm으로 교반하며 접종원으로 배양하였고, 이 가운데 1 mL의 배양액을 곧바로 1 L의 TSB 배지에서 접종하여 48 시간 동안 동일한 조건으로 배양하였다. 이후 비티균주의 포자 형성을 유도하기 위해 두 비티 배양액을 37°C에서 5 시간 동안 열충격 처리를 한 후, 4°C에서 72 시간 동안 저온 처리하였다. 포자형성은 위상차 광학현미경(BX-PHD, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 1,000배 배율에서 확인하여 BtA와 BtK의 포자수는 각각 $7.2 \pm 0.9 \times 10^7$ spores/mL와 $1.2 \pm 1.1 \times 10^8$ spores/mL로 조사되었다. 이후 4,000 rpm에서 30 분간 원심분리를 하여 배양액내의 포자농도를 10 배로 농축하였으며, 실험에 이용될 때까지 4°C 냉장고에 보관하였다.

비티플러스의 제조

곤충병원세균인 Xn과 두 종의 비티균주를 혼합하여 기존의 비티 살충제가 가지고 있는 좁은 작용범위와 낮은 살충력을 보강하는 비티플러스를 제조하였다. 이에 비티플러스의 배합비율은 Eom et al.(2014)의 기존연구를 토대로 BtK:BtA:Xn:에탄올:전착체가 각각 4:10:74:10:2(부피비율, mL)의 비율로 혼합되어 전체 250 mL로 만들어졌다. 에탄올은 순도 99.9% 제품으로 (주) 덕산약품에서 구입하였다. 전착체는 KOREMUL-290M 제품으로 한농화학(용인)에서 구하여 사용하였다.

Xn의 동결건조

Xn을 1 L의 TSB 배지에서 48 시간 동안 28°C에서 250 rpm으로 교반 배양한 후, 4 개의 1 L 플라스크에 각각 250 mL씩 분주하여 -50°C의 냉동고에서 5 시간동안 동결시켰다. 이후 배양액은 EYELA Freeze Dryer FD-5N (Tokyo Rikakikai Co., LTD, Tokyo, Japan)에서 승화반응을 진행시켰다. 동결건조된 배양액은 막사사발을 이용하여 분말화하여 실험에 이용될 때까지 4°C에서 보관하였다. 동결건조된 Xn 배양액 분말은 1 L 당 28.3 ± 0.5 이었다.

OI와 BZA의 준비

OI (2-oxindole)와 BZA (trans-4-phenyl-3-buten-2-one)는 모두 Sigma-Aldrich Korea (Seoul, Korea)에서 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Korea)에 용해되어 분석에 이용되었다.

생물검정

생물검정은 엽침지법으로 시행하였다. 살충력 검정은 1,000 배 희석된 비티플러스 용액 또는 세균 대사물질 첨가용액에 대한 시험곤충의 살충력을 조사하기 위해 배추잎(가로 × 세로, 2 cm × 2 cm)을 10 분간 처리용액에 침지시킨 후 여과지가 깔린 용기에서 30 분간 건조하였다. 또한 파밤나방과 배추좀나방은 각각 3령과 2령 유충을 생물검정에 이용하였으며, 생물검정 전 시험곤충들은 6 시간 동안 절식시킨 후 처리된 배추잎을 섭식시켰다. 각 처리는 시험곤충 10마리씩 3반복으로 구성되었으며, 비티플러스 처리 후 6일동안 매일 동일한 시간에 생존수를 조사하였다. 대조실험은 BtA 품목의 토박이 액상수화제(1×10^8 CFU/mL, 동부팜한농, 서울)와 BtK 품목의 그물망 수화제(16 BIU/kg, 동부팜한농, 서울)과 스킨피온케이 수화제(16 BIU/kg, 한얼싸이언스, 태백)를 이용하여 동일한 방법으로 생물검정을 수행하였다.

HPLC를 이용한 Xn 대사물질 분석

Xn을 TSB에서 48 시간 배양시킨 용액을 분획깔대기에 넣고 330 mL의 헥산을 첨가하여 30 회 흔들어 준 후, 2 시간 동안 방치한 후 헥산 추출 상층액을 회수하고, 다시 배양액 수용액에 330 mL의 헥산을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 추가로 2 회 반복하였다. 이렇게 추출된 1 L의 헥산 추출물을 4°C에 보관했다. 남은 여액에 헥산 추출법과 동일한 방법으로 1 L의 에틸아세테이트 추출을 실시했다. 수집된 헥산층과 에틸아세테이트 층은 각각 2 L의 삼각플라스크에 붓고 무수황산나트륨을 500 g 넣은 후 탈수시켰다. 이후 2 L의 삼각플라스크 입구에 여과지를 설치하고 탈수시킨 유기용매 추출물들을 부어 무수황산나트륨을 제거시켰다. 이 추출물을 감압농축기를 이용하여 40°C에서 1 시간 동안 용매층을 제거하였다. 이에 따라 플라스크에 용출된 대사물질을 5 mL의 메탄올을 첨가하여 용해시켜 회수하였다. 이 5 mL의 시료를 투과 직경이 0.2 μm의 PTFE syringe filter로 여과한 후 10 μL의 미량주사기를 이용하여 HPLC (Waters 996-660, Milford, MA, USA)에 5 μL 주입하였다. HPLC

분석에서 이동상은 물과 메탄올이 60:40의 비율이며, 흐름속도는 분당 0.5 mL이었다. 검출기(Waters 2487)는 254 nm에서 물질을 정량하였다.

통계분석

모든 살충효과에 대한 생물검정 결과는 백분율 자료로서 arcsine 변환 후 SAS PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균간 비교를 실시하였다.

결과

비티플러스의 살충력

비티플러스는 파밤나방 3령과 배추좀나방 2령 유충을 대상으로 시판중인 세 종의 비티제('Bt1-Bt3')보다 살충효과가 높았다(Fig. 1). 파밤나방 3령 유충을 대상으로 비티플러스를 처리한 후 3 일째에 40%의 살충력이 나타나기 시작하여 4 일째에 66%, 그리고 5 일째에 85% 이상의 살충효과가 나타났으며, 대조구로 이용한 세 종의 비티제는 처리 후 5 일째에 75%의 살충효과를 보였다(Fig. 1A). 또한, 배추좀나방 2령 유충을 대상으로 비티플러스는 처리 후 1 일째에 45%의 살충효과가 나타나기 시작하여 2 일째에 73%, 그리고 3 일째에 95%의 살충효과를 나타내었으나 대조구로 이용한 세 종의 비티제는 처리 후 2 일째부터 살충효과가 나타나기 시작하였다(Fig. 1B). 파밤나방과 배추좀나방을 대상으로 비티플러스는 세 대조구와 비교하여 처리 후 5일째에 각각 10~32%, 10~40% 이상의 살충력이 더 높은 것으로 조사되었다(파밤나방: $F = 24.25$; $df = 3, 8$; $P < 0.0001$, 배추좀나방: $F = 21.94$; $df = 3, 8$; $P < 0.0001$).

비티플러스에 대한 OI와 BZA의 첨가효과

파밤나방과 배추좀나방을 대상으로 Xn 대사물질인 OI와 BZA를 비티플러스에 첨가하여 살충력을 비교 분석한 결과 OI와 BZA 모두 비티플러스의 살충력을 상승시켰다(Fig. 2). 파밤나방 3령 유충을 대상으로 비티플러스의 살충력을 상승시켰다(BZA: $F = 10.33$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$, OI: $F = 37.75$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$). OI의 혼합처리는 비티플러스 단독처리와 비교하여 처리 후 4 일째에 2.5 ppm에서 10% 그리고 25 ppm에서 25% 이상의 살충력이 상승하였으며, BZA도 비티플러스에 25 ppm이 첨가되었을 때 처리 후 4 일째에 20% 이상으로 살충력이 상승하였다(Fig. 2A). 또한, 배추좀나방 2령 유충을 대상으

로 한 비티플러스에 대한 OI와 BZA의 혼합처리에서 비티플러스 단독처리와 비교하여 처리 후 비티플러스의 살충력을 상승시켰다(BZA: $F = 20.33$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$, OI: $F = 37.50$; $df = 2, 6$; $P < 0.0001$). OI의 혼합처리는 비티플러스 단독처리와 비교하여 처리 후 2 일째에 2.5 ppm과 25 ppm의 OI가 혼합되었을 때 각각 13%와 23%의 살충력이 상승되었고, 2.5 ppm과 25 ppm의 BZA가 혼합되었을 때 각각 13%와 20%의 살충력이 상승하였다(Fig. 2B).

Xn 동결건조물질의 비티플러스 첨가효과

동일한 농도로 준비된 비티플러스에 동결건조 처리된 Xn 배양액을 희석배수별로 혼합하여 파밤나방과 배추좀나방 유충을 대상으로 살충력 향상 실험을 수행하였다. 그 결과 28 g과 14 g

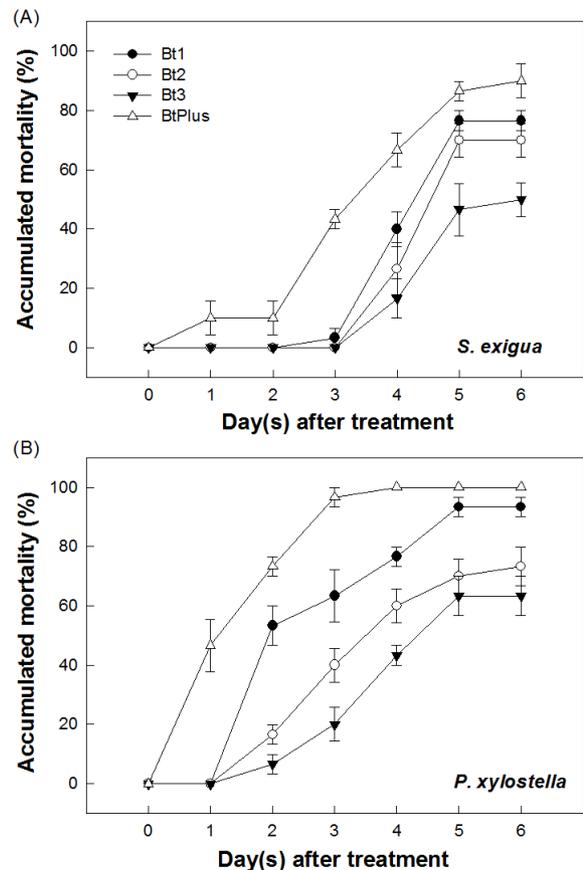


Fig. 1. Insecticidal effect of Bt-Plus or commercial Bt pesticides against *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella* larvae. (A) Third instar larvae of *S. exigua* or (B) second instar larvae of *P. xylostella* were fed 1,000 ppm treatment of BtPlus, Bt1 (Tobaggi), Bt2 (Scorpion), or Bt3 (Goomulmang). Leaf-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 6 days after treatment. Error bar indicate standard deviation.

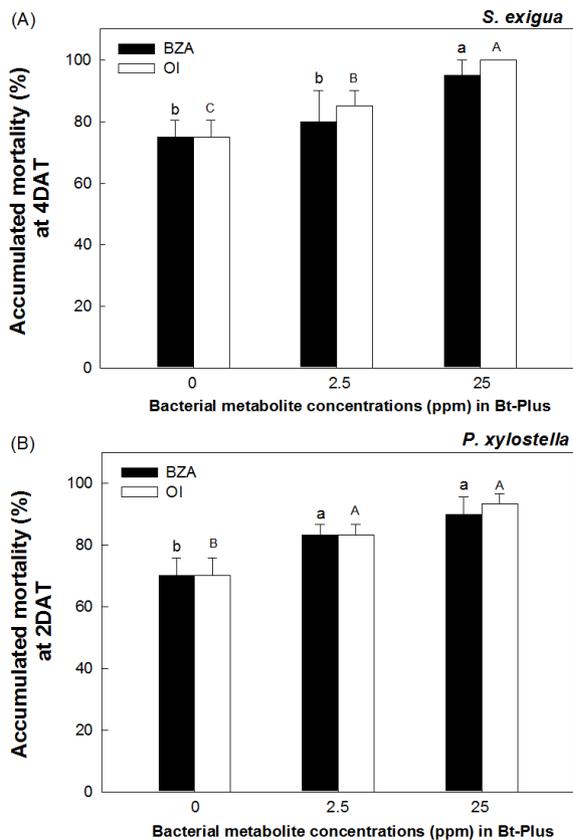


Fig. 2. Additive effect of oxindole (OI) or benzylideneacetone (BZA) on BtPlus against *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella*. (A) Third instar larvae of *S. exigua* or (B) second instar larvae of *P. xylostella* were fed 1,000 ppm treatment of BtPlus with two different doses (2.5 and 25 ppm) of OI or BZA. Leaf-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured at 4 days after treatment (DAT) for *S. exigua* and 2 DAT for *P. xylostella*. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). In panels A and B, lowercase letters above the error bars indicate significant differences in BZA treatments, while uppercase letters indicate significant differences in OI treatments.

의 동결 건조된 Xn 배양액에서 비티플러스 단독처리보다 살충력의 상승과 빠른 속효성이 동시에 나타났다(Fig. 3). 파밤나방 3령 유충에 비티플러스와 동결건조된 Xn 배양액의 혼합 처리 후 3 일째부터 비티플러스 단독처리와 비교하여 10% 높은 살충력이 발휘되어 처리 후 6 일째까지 그 효과가 지속되었다(Fig. 3A). 처리 후 4 일째에 비티플러스 단독처리와 비교하여 가장 높은 살충효과가 나타났다($F = 82.33$; $df = 4, 10$; $P < 0.0001$). 배추좀나방 2령 유충을 대상으로 비티플러스와 동결 건조된 Xn 배양액 14 g와 28 g의 혼합처리에서 처리 후 2 일째에 비티플러스 단독처리와 비교하여 20%와 25% 이상의 살충력이 상승하여 3 일째에 두 처리구에서 95% 이상의 살충력을 나타내었다(Fig. 3B). 특히, 처리 후 2 일째부터 Xn 배양액의 혼

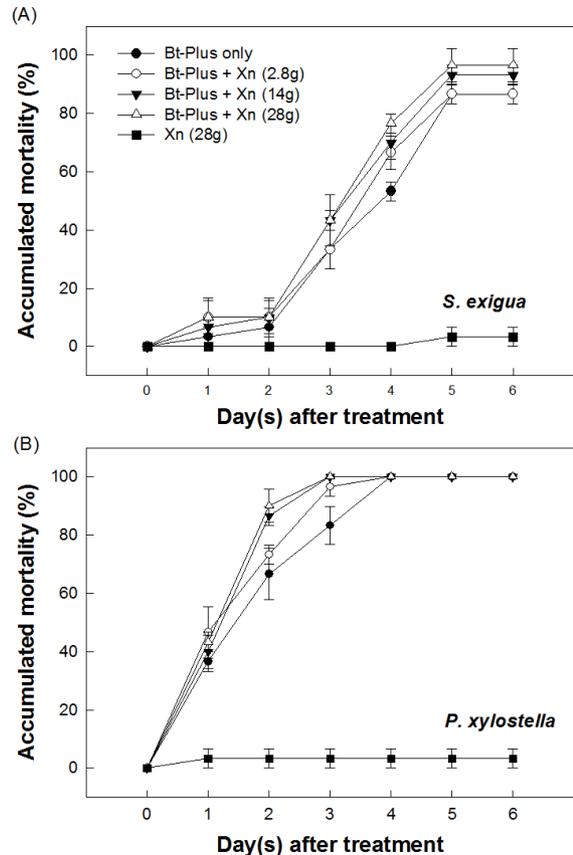


Fig. 3. Synergistic effect of freeze-dried powder of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) culture on BtPlus against *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella*. (A) Third instar larvae of *S. exigua* or (B) second instar larvae of *P. xylostella* were fed 1,000 ppm treatment of BtPlus with different doses of freeze-dried powder of Xn culture. Leaf-dipping method was used to assess the toxicities. Each replication used 10 larvae and was replicated three times. Mortality was measured every 24 h for 6 days after treatment (DAT). Error bar indicate standard deviation.

합처리가 비티플러스의 단독처리와 비교하여 살충력이 빨리 나타나는 속효성을 확인할 수 있었다($F = 114.83$; $df = 4, 10$; $P < 0.0001$). 그러나 동결건조 처리된 Xn 배양액의 단독처리는 파밤나방과 배추좀나방의 살충력에 영향을 주지 못하였다.

HPLC 분석

곤충병원세균인 Xn과 비티플러스의 살충력에 대한 상승효과에 대한 유효물질을 분석하기 위해 Xn 배양액을 에틸아세테이트로 분획하였다. 이후 세균배양액에 존재하는 곤충의 면역억제 물질가운데 OI를 대상으로 HPLC 분석을 통해 그 농도를 조사하였다. 그 결과 1 L의 세균 배양액 안에서 OI의 retention time은 9.59분에 검출되었고 14.04 ppm의 농도로 존재하였다(Fig. 4). 이러한 HPLC 분석결과에서는 OI 외에도 최소 12개

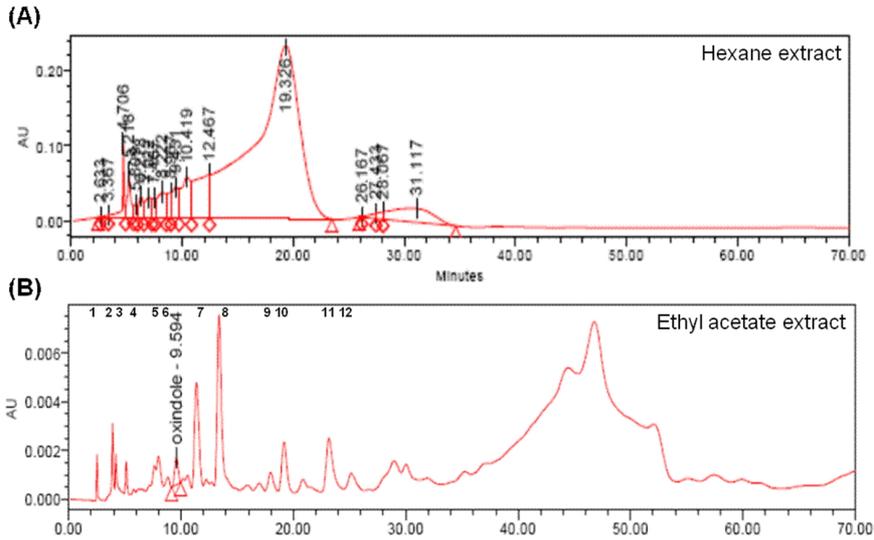


Fig. 4. Analysis on freeze-dried powder of *Xenorhabdus nematophila* (Xn) culture by HPLC. The numbers (1-12) indicate other unidentified bacterial metabolites. See the details of HPLC analysis conditions in materials and methods.

이상의 peak들이 확인되어 배양액 내에 다양한 물질들이 존재하는 것으로 조사되었다.

고찰

친환경적인 해충방제수단 가운데 비티는 다양한 해충에 대해 널리 이용되는 미생물농약이다. 그러나 비티의 방제 효율은 다양한 해충의 저항성 발달로 인해 야외 포장에서 점차 낮아지고 있다. 비티의 살충기작은 일반적으로 증장병변(Broderick et al., 2006)을 통한 증장마비(Gill et al., 1992) 및 세포치사(Zhang et al., 2005)에 의한 패혈증 유발로 대상곤충을 치사시킨다. 비티의 증장병변으로 인한 장조직의 파괴는 대상곤충이 가지고 있는 장 내부 환경에 의해서 기인하며, 이로 인하여 비티제의 살충력 범위가 결정되어 선택적인 살충효과를 나타내게 된다. 비티제의 살충력은 증장 내에서 알칼리성의 pH에 따른 내독소 단백질의 용해, 내독소단백질의 활성을 유도하는 소화효소의 작용, 그리고 내독소단백질과 수용체간의 결합을 통한 내독소 단백질의 올리고머화 등 다양한 조건이 복합적으로 작용해서 발휘된다(Bravo et al., 2011). 이와 같은 비티의 살충기작은 오히려 해충들로 하여금 다양한 형태의 저항성을 유발하기도 한다. 이 가운데 나비목 곤충의 경우 내독소단백질의 수용체가 되는 캐드헤린 단백질의 변형을 유발하여 내독소단백질들간의 올리고머화 저해와 증장병변의 낮은 형성으로 저항성이 발현되기도 하였다(Tabashnik et al., 1997). 따라서 이와 같이 실제 포장에서 나타나는 비티에 대한 해충의 저항성 극복과 비티의 살충력 제고의 중요성은 점차 증가하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 기존의 비티플러스가 가지고 있는 비교적 좁은 적용범위를 보강하기 위해 비감수성 곤충을 대상으로 고도의 병원성을 나타내는 Xn대사물질 첨가 전략을 검증하였다. 곤충 병원세균인 Xn은 아이코사노이드 생합성 억제를 통해 기주곤충의 면역중계반응을 교란시킨 후 혈강내 패혈증으로 기주를 치사시킨다(Park and Kim, 2000; Kim et al., 2005). 아이코사노이드의 생합성은 phospholipase A₂ (PLA₂)의 활성에 의해 조절되며, 곤충의 면역을 포함한 다양한 생리기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Stanley and Kim, 2011; Stanley, 2006). 곤충의 외래 미생물 침입에 대한 방어기작은 선천성 면역반응으로 이루어지며, 외래인자의 인식으로부터 시작하여 PLA₂ 효소의 활성을 증가시킴으로 면역중계 물질인 아이코사노이드의 생합성을 증가시켜 감염곤충의 세포성 및 체액성 면역 반응을 유도하여 감염곤충을 미생물로부터 방어하게 된다(Shrestha and Kim, 2009). 곤충은 이렇게 고도로 발달된 선천성 면역을 가지고 있음에도 불구하고, Xn은 곤충의 방어기작 가운데 면역중계과정을 특이적으로 억제하여 대상곤충의 면역반응의 결핍을 유도한다(Park and Kim, 2000). 이것은 Xn이 병원성 세균으로써 가지고 있는 기주내에서 생존과 병원성 발현을 위해서 매우 효율적인 생존전략이다.

비티와 Xn의 혼합처리를 통한 살충력의 제고 전략이 본 연구 이전에도 시도되었다. Jung and Kim (2006)의 연구에서 살아있는 Xn을 비티와 같이 처리하여 배추좀나방의 유충기가 진행될수록 낮아지는 비티의 감수성을 어린유충기와 동일하게 유지할 수 있었다. 이와 같이 비티와 Xn의 살충력 상승효과는 Xn이 생성하는 다양한 대사물질들에 의해 기인되며, 이들 대

사물질들은 BZA, Pro-Tyr, 그리고 acetylated Phe-Gly-Val 등으로 곤충의 PLA₂ 활성 억제물질로 처음 보고되었다(Shrestha et al., 2010). 이 후 OI, indole, p-hydroxypropionic acid, cyclo-Pro-Tyr, 그리고 4-hydroxyphenylacetic acid와 같은 5 가지 대사물질이 추가로 동정되어 곤충 혈구세포의 PLA₂ 활성을 억제하는 것으로 분석되었다(Seo et al., 2012). 위의 같이 밝혀진 대사물질의 기능은 대부분 PLA₂ 활성 외에도 phenoloxidase 활성, 작은 혹 형성과 같은 곤충의 면역을 주로 억제하는 기능을 가지고 있는 것으로 조사되었다(Eom et al., 2014). 본 연구에서는 Xn이 생산하는 기능성 대사물질 가운데 기존의 Eom et al.(2014)의 연구에서 보고된 BZA와 OI를 비티플러스에 처리하여 파밤나방과 배추좀나방을 대상으로 살충력 상승 실험을 진행하였으며, 유사한 결과를 얻었다. 이를 토대로 Xn 배양액을 동결 건조 처리하여 비티플러스와 함께 처리하여 파밤나방 유충에서 15%(처리 후 5 일째), 배추좀나방 유충에서 28%(처리 후 2 일째)의 살충력이 상승되는 것을 확인하였다. 특히, 파밤나방은 기존의 비티농약에 대한 감수성이 다른 나비목 곤충과 비교하여 낮다(Park and Kim, 2013). 이러한 이유는 비티가 생성하는 Cry1A 또는 Cry1C와 같은 내독소단백질이 곤충의 장내 수용체 단백질인 캐드헤린과 효과적인 결합을 하지 못함으로써 병원성을 나타내지 못하는 것으로 판단된다. 나비목과 딱정벌레목의 곤충을 대상으로 RNA 간섭 기술을 이용한 캐드헤린 단백질의 기능연구를 통해 캐드헤린 유전자의 전사수준이 억제되어 장내 캐드헤린 단백질의 발현이 감소하면 비티의 내독소단백질에 대한 곤충의 감수성이 낮아져 생존율이 향상되었다(Park and Kim, 2013; Hua et al., 2014). 최근의 연구에서 ABC transporter의 기능도 캐드헤린 단백질과 유사하게 내독소단백질의 수용체로서 비티의 병원성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2014). 따라서 비티를 이용한 파밤나방 방제에는 한계가 있었다. 그러나 본 연구를 통해 Xn의 배양액을 이용한 혼합처리에서 파밤나방에 대한 비티의 살충력을 제고할 수 있었고, 이를 이용한 새로운 생물농약으로의 생산 가능성을 제시할 수 있었다. OI 또는 BZA는 각각 비티플러스의 파밤나방에 대한 살충력을 증가시켰다. 이는 이 물질들이 높은 면역억제력 및 세포 독성에 기인한 것으로 추정된다(Seo et al., 2012). 흥미로운 사실은 동결건조된 Xn 배양액은 OI 또는 BZA 단독 처리보다 낮은 농도에서 이러한 살충효과를 주고 있다. 예를 들어, 본 연구는 Xn 배양액에 약 14 ppm의 OI가 포착된 것으로 나타났다. 즉 Xn 추출물이 모두 28 g이기에 상승효과를 준 14 g 처리는 불과 7 ppm의 OI 처리에서 비티플러스에 높은 상승효과를 주었다고 설명한다. 그러나, 단독처리는 이와 같은 높은 상승효과가 25 ppm 첨가처리에서 나타났기에 적

어도 70% 이상의 적은 OI 양이 동결건조 Xn 배양액 처리에서 존재했다고 설명된다. 그렇다면, 이는 Xn 전체 배양액이 갖는 다수의 세균 대사물질에서 추가적 상승요인을 찾을 수 있다. 본 연구결과는 에틸아세테이트 추출물이 OI 이외에 적어도 12종의 상이한 대사물질이 있다는 것을 보여주었다. 기존에 알려진 8종 이외에 적어도 4종 이상의 물질이 Xn 배양액에 존재한다는 의미이다. 이에 대한 추가 화학분석 및 생리활성물질 기능 분석이 요구된다.

본 연구에 이용된 Xn 배양액의 동결 건조 물질과 비티플러스의 혼합처리는 파밤나방과 배추좀나방에서 비티의 살충력을 동시에 상승시켰다. 궁극적으로 이러한 상승효과는 중장병변을 통해 유발된 대상곤충의 패혈증이 확산되는 것을 억제하려는 기주의 면역반응을 억제함으로써 비티의 살충효과를 증가시킨 것으로 판단된다. 다양한 세균유래의 대사물질이 비티 내독소단백질과 이들 수용체(캐드헤린 또는 ABC transporter)간의 상호작용에 어떠한 영향을 미치는지 연구가 되어 있지 않아 추후 이에 대한 연구가 필요하다. 비록 본 연구에서는 동결건조된 물질에 포함되어 있는 다양한 대사물질들의 규명과 살충력 상승에 필요한 이들 물질의 유효농도 및 물질들 상호간의 협력 작용에 관해서는 진행되지 않았다. 따라서 세균 유래의 대사물질로 인한 구체적인 비티와의 살충력 상승효과를 연구하기 위해서는 앞으로 추가적인 연구가 필요하다.

사 사

이 연구는 농림수산식품부의 iPET 사업과 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2013 R1A1A2061353)에 의해 지원되었다.

Literature Cited

- 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.
- Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhang, M., Gill, S.S., Soberon, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to amino peptidase N receptor leading to insertion into membrane micro-domain. Biochim. Biophys. Acta. 1667: 38-46.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 423-431.

- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15196-15199.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., Zeigler, D.R., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.btnomenclature.info>.
- Eom, S., Park, Y., Kim, H., Kim, Y., 2014. Development of a High Efficient "Dual Bt-Plus" Insecticide Using a Primary Form of an Entomopathogenic Bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 507-521.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 615-636.
- Goh, H.G., Lee, S.G., Lee, B.P., Choi, K.M., Kim, J.H., 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Korean J. Appl. Entomol.* 29, 180-183.
- Herbert, E.E., Goodrich-Blair, H., 2007. Friend and foe: the two face of *Xenorhabdus nematophila*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 634-636.
- Hua, G., Park, Y., Adang, M.J., 2014. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 11-17.
- Hwang, J., Park, Y., Lee, D., Kim, Y., 2013. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and Imd pathways but blocked eicosanoid biosynthesis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 83, 151-169.
- Jung, C., Kim, Y., 2006. Potentiating effect of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* on pathogenicity of entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila* K1 against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Econ. Entomol.* 100, 246-250.
- Kaya, H.K., Gaugler, R., 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 181-206.
- Kim, Y., Ji, D., Cho, S., Park, Y., 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A2 to induce host immunodepression. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 258-264.
- Park, Y., Kim, Y., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophila*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46, 1469-1476.
- Park, Y., Kim, Y., 2003. *Xenorhabdus nematophila* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA2 of *Spodoptera exigua*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54, 134-142.
- Park, Y., Kim, Y., 2013. RNA interference of cadherin gene expression in *Spodoptera exigua* reveals its significance as a specific Bt target. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 285-291.
- Park, Y., González-Martínez, R.M., Navarro-Cerrillo, G., Chakroun, M., Kim, Y., Ziarolo, P., Blanca, J., Cañizares, J., Ferré, J., Herrero, S., 2014. ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biol.* 12, 46.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255-281.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT User's Guide, release 6.03 Ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775-806.
- Seo, S., Kim, Y., 2010. Study on development of novel biopesticides using entomopathogenic bacterial culture broth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. *Korean J. Appl. Entomol.* 49, 241-249.
- Seo, S., Lee, S., Hong, Y., Kim, Y., 2012. Phospholipase A₂ inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3816-3823.
- Shrestha, S., Kim, Y., 2009. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A(2) and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. *J. Microbiol.* 47, 774-782.
- Shrestha, S., Hong, Y., Kim, Y., 2010. Two chemical derivatives of bacterial metabolites suppress cellular immune responses and enhance pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Asia Pac. Entomol.* 13, 55-60.
- Stanley, D., 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 25-44.
- Stanley, D., Kim, Y., 2011. Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Front. Entocrinol.* 2:105. doi:10.3389/fendo.2011.00105.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Groeters, F.R., Moar, W.J., Johnson, M.W., Luo, K., Adang, M.J., 1994. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4120-4124.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Mensua, J.L., Ferre, J., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12780-12785.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L., Bulla, L.A. Jr., 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* 12, 1407-1416.