담배거세미나방(*Spodoptera litura*) Chitinase gene의 RNA interference

전미진 · 서미자 · 윤영남 · 유용만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

RNA Interference of Chitinase Gene in *Spodoptera litura*

Mi Jin Jeon, Mi Ja Seo, Young Nam Youn and Yong Man Yu*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences,
Chungnam National University, Daejeon, 305-764;

(Received on September 1, 2014. Revised on September 10, 2014. Accepted on September 23, 2014)

Abstract RNA interference (RNAi) is the method which controls phenotypes of gene in live cells. Chitinase is the enzyme helping digestion and absorption of old cuticles during the ecdysis of insects. In order to investigate molting-inhibition effect with the chitinase related gene in *Spodoptera litura*, RNA was extracted from the 5th instars. cDNA was synthesized and then we obtained about 700 bp size chitinase. After PCR products were cloned into a pGEM T-easy vector, colonies were picked. DNA was extracted from the colony cultures. *EcoR* I enzyme was used to check whether PCR products were inserted or not. And then we confirmed vector band of about 3 kb and insert band of about 700 bp. To synthesize the dsRNA, each DNA was cut with *Spe* I and *Nco* I enzymes (Circular DNA became lineared DNA). After synthesis of dsRNA, approximately 5 μ l dsRNA was injected into the 3rd abdominal segment of *S. litura* 4th larvae. The concentration of dsRNA was about 10 μ g/ μ l. We confirmed larval-larval molting : there were phenotypically abnormal individuals - for instance malformation, molting inhibition and change of integument color. Pupa-adult molting : there were phenotypically abnormal individuals - for instance molting inhibition, change of wings and malformation. Also we could investigate the pupation, emergence and variation about non-injection, treated with DW and dsRNA. Each pupation was non-injection 83.3%, DW 78.3% and dsRNA 66.7%. Each emergence was non-injection 90.0%, DW 72.3% and dsRNA 65.0%. So we considered that chitinase dsRNA induced molting inhibition effect. But each variation was non-injection 8.9%, DW 2.9% and dsRNA 19.2%. Therefore dsRNA group showed the highest variation value. When 18 hours after injecting dsRNA, we could obtain abnormal individual.

Key words Chitinase, dsRNA, molting-inhibition, RNA interference, *Spodoptera litura*

서론

최근 안전농산물에 대한 소비자의 요구가 소득의 증가와 더불어 급격하게 요구되고 있다. 농산물의 생산을 위한 작물보호방법에서 농약이 생산되지 않았던 시기에는 원시적이면서 생물학적, 기계적방법 등으로 소량이면서 불안정적으로 생산되었다. 그러나 1950년대부터 화학농약에 의한 농작물의 보호방법이 바뀌어 감에 따라서 대량생산과 안정적인

로 농산물은 공급되기 시작하였다. 그러나 일부 무분별하게 화학농약을 오남용하여 사용하므로 자연환경의 생태계의 파괴를 유발하게 되었다. 따라서 농작물의 보호방법을 친환경적인 방법이 연구 개발되기에 이르렀다. 다양한 방법에서 최근에 연구가 시작되고 있는 RNA interference (이하 RANi)는 double strand RNA가 곤충의 체내에 들어감으로써 일어나는 gene knockdown 현상이다. dsRNA를 주입하면 target 세포나 조직에서 상보적인 mRNA 전사의 감소를 유발하고 Dicer RNaseIII 효소는 dsRNA를 약 21~23 nt의 siRNA로 자르며, 잘라진 siRNA는 multiprotein RNA-inducing silencing complex (RISC)와 결합한다. 따라서

*Corresponding author

Tel: +82-42-821-5763, Fax: +82-42-823-8679

E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

RISC와 결합한 siRNA의 antisense strand는 상동성의 mRNA와 다시 결합함으로써 target mRNA의 발현을 감소시키는 것으로 보고하고 있다(Jaubert-Possamai *et al.*, 2007). 이러한 RNAi는 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 먼저 연구가 시작되었는데(Fire *et al.*, 1998) 현재는 다양한 곤충 종에서도 보고하고 있다(Niimi *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 2006; Ghanim *et al.*, 2007; Jaubert-Possamai *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Hwang and Kim, 2011; Coy *et al.*, 2012). RANi의 원리는 화학 살충제의 문제점을 보완할 수 있는 생물적 방제 수단이 될 수 있고, 특히 dsRNA는 생태계에 축적되지 않으며 target gene에 대해서만 작용을 하므로 매우 sequence-specific한 장점을 가지고 있다(Coy *et al.*, 2012).

최근 나비목 해충에 대해서도 RNAi 연구가 많이 진행되어 뱀눈에나방 *Hyalophora cecropia* (Bettencourt *et al.*, 2002)을 이용한 연구를 시작으로 담배거세미나방 *Spodoptera litura* (Rajagopal *et al.*, 2002), 배추좀나방 *Plutella xylostella* (Bautista *et al.*, 2009), 밤나방과에 속하는 *S. frugiperda* (Rodriguez-Cabrera *et al.*, 2012), 가문비나무잎말이나방 *Choristoneura fumiferana* (Quan *et al.*, 2013) 등에서도 RNAi 연구가 활발히 이루어지고 있다.

그 중에서도 농업해충으로 방제하기 어려운 담배거세미나방(*S. litura*, tobacco cutworm or common cutworm)을 본 연구의 방제대상 해충으로 선발하였다. 이 종은 나비목(Lepidoptera) 밤나방과(Noctuidae) *Spodoptera* 속에 속하는 난방제 해충으로 아시아, 호주 등에 분포한다. 기주범위가 넓어 채소, 과수, 화훼 등 44과 112종 이상의 작물을 가해하는 광식성 해충으로 알려져 있다(Garad *et al.*, 1984). 우리나라에서는 1990년 이후부터 밭작물의 주요 해충으로 발생했으며 배추, 고추, 과, 양파 등에 심각한 피해를 입히고 있다. 뿐만 아니라 시설재배지에서도 대발생하여 콩, 들깨, 토마토, 카네이션, 거베라 등을 가해하여 큰 피해를 주고 있다(Jung *et al.*, 2010).

한편 곤충의 Chitin은 β -(1,4)-N-acetylglucosamine으로 구성된 polysaccharide 이다(Shinoda *et al.*, 2001). Chitin은 많은 종의 진균에서 세포벽과 격막을 형성하는데 필수적인 물질이지만 곤충에 있어서도 외골격을 형성하고 영양위식막을 형성하는데 필수적인 요소이다(Arakane *et al.*, 2004). Chitinase는 chitin을 분해하는 효소로 진균, 세균, 식물, 동물 등 자연 상에 널리 분포하고 있다. Chitinase는 아미노산 서열에 따라 glycosyl hydrolase family 18과 family 19로 구분할 수 있다(Henrissat, 1991). 그런데 곤충의 chitinase는 탈피액이나 외피, 장내 조직에서 발견 되어(Kramer and Muthukrishnan, 1997) 곤충이 탈피를 하는 동안 cuticle과 중장 표면과 같은 조직에서 chitin을 분해한다(Zhang *et al.*, 2012). 따라서 곤충이 탈피를 하고 발육을 하는 데 필수적인

chitin metabolism, 특히 chitinase는 생물적으로 해충방제에 있어 매력적인 target이 될 수 있다(Shinoda *et al.*, 2001).

본 연구는 곤충 생육에 필수적 요건으로 탈피 과정에 관여하는 chitinase gene을 dsRNA로 합성하여 그것을 담배거세미나방 유충에 주입함으로써 정상적인 유전자 발현의 저해여부에 따라서 형태적 변화가 일어나는 것을 관찰을 통해 확인하였다. 이러한 결과는 chitinase gene의 발현을 저해하게 하여 담배거세미나방의 탈피억제하게 하는 방법으로 생물적 저해방법을 찾고자 검토되었다.

재료 및 방법

시험곤충

본 실험에 사용된 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)은 2004년 농촌진흥청 국립농업과학원으로부터 분양받아 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광주선 16L : 8D, 상대습도 50~60% 조건(Kim *et al.*, 2008)으로 누대 사육하였다. 유충은 인공사료를 먹여 사육하였고 성충은 10% 설탕물을 주었다(Goh *et al.*, 1990).

총 RNA 분리 및 cDNA 합성

총 RNA는 담배거세미나방 5령 유충으로부터 추출하였다. 추출은 Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen, Korea)를 이용하였고 kit의 매뉴얼대로 진행하였다. 약 1 μg 의 RNA를 이용해 cDNA를 합성하였다. ToYoBo Revertra Ace- α -kit (ToYoBo, Japan)를 이용하였고, primer는 Oligo dT (20)를 사용하였다. cDNA 합성은 kit의 매뉴얼대로 진행하였다.

Amplification of chitinase gene

First-strand cDNA를 주형으로 하여 chitinase gene을 증폭시켰다. 조건은 HOT FIREPol[®] DNA Polymerase 0.5 μl (HOT START DNA Polymerase), $10 \times$ Buffer B25Mg 5 μl , 20 mM dNTP mix 0.5 μl , Forward primer 1 μl (10pM), Reverse Primer 1 μl (10 pM), DNA template 5 μl (Solis BioDyne, Estonia)로 하여 총 volume을 50 μl 씩 하였다. PCR에 사용한 primer는 GenBank accession number AB032107 (Shinoda *et al.*, 2001)을 방법으로 제작하였다. dsRNA 합성을 위해 각각의 primer에 T7 polymerase promoter sequence를 붙였다. 사용한 primer 정보는 Table 1에 제시하였다. PCR의 조건은 95°C , 15분, 35cycles로 95°C , 30초, 55°C , 1분, 72°C , 1분 그리고 72°C , 5분으로 하였다.

Chitinase Cloning

Chitinase gene을 cloning하기 위해 2가지 PCR product를 각각 pGEM[®] T-easy vector (Promega, USA)에 삽입시켰다. Usage Information을 일부 변경하여 reaction mixture를 만

들었다. Reaction mixture의 조성은 PCR product 2 μ l, pGEM[®] T-easy vector 1 μ l, Ligase-TaKara Sol I 3 μ l로 하였다. Ligation 조건은 25°C에서 30분간 반응시켰다. Competent cell (*E.coli*)을 이용하여 형질전환을 해주었다.

EZ-Cloning[™] kit(Enzynomics, Korea)의 매뉴얼을 일부 변경하여 실험을 진행하였다. Ice에 competent cell 이 들어 있는 tube를 고정시켜 cell이 slush 상태로 조금 녹을 때 까지 기다렸다가 Ligation mixture 3 μ l를 competent cell 중간 부분에 흔들림 없이 넣어주었다. 열처리과정을 마치고 LB 배지 1 ml를 첨가한 Mixture는 shaking incubator에서 37°C, 250 rpm의 조건으로 1시간 동안 배양하였다. Spreading 방법은 pGEM[®] T-easy vector 매뉴얼을 일부 변경하여 실험에 적용하였다. Shaking incubator에서 배양한 mixture를 LB plate에 도말하기 전 IPTG (Tech & Innovation, Korea) 100 μ l와 X-Gal (Tech & Innovation, Korea) 20 μ l를 먼저 Ampicillin LB plate에 도말하고 X-Gal의 독성을 약 1시간 정도 휘발시켰다. 배양 한 mixture를 spin down 한 후 900 μ l는 버리고 남은 150 μ l와 pellet을 vortexing해준 후, 배양액을 plate에 도말해주고 sealing하였다. 도말 plate는 37°C에서 15시간 동안 배양하였다. Ampicillin LB plate에서 위성 colony가 없는 하얀색의 단일 colony를 선발하여 3 ml의 Ampicillin LB 액체 배지에서 37°C, 250 rpm, 사면 조건으로 12시간 동안 진탕 배양하였다. Ampicillin LB 배지에 배양한 배양액에서 Maestrogen High-Speed Plasmid Mini Kit (Maestrogen, Korea)를 이용하여 각각의 Plasmid DNA를 추출하였다. 방법은 kit의 매뉴얼을 일부 수정 하였다.

pGEM[®] T-easy vector 양쪽에 *EcoR* I site가 있기 때문에 pGEM[®] T-easy vector와 insert site를 잘라 구분이 가능하다. 따라서 pGEM[®] T-easy vector에 insertion이 제대로 되었는지 확인하기 위해 *EcoR* I enzyme (TaKaRa, Japan) 처리를 하였다. 처리 조건은 매뉴얼을 일부 수정하였다. Substrate DNA 5 μ l (약 500 ng), *EcoR* I 0.5 μ l, 10 $\times$ buffer 2 μ l, DW 12.5 μ l로 총 volume은 20 μ l이다. Enzyme 처리는 37°C에서 3시간 30분 동안 반응시켰다.

dsRNA 합성

dsRNA를 합성하기 위해 각각의 plasmid DNA를 linear한 형태로 처리하였다. T7-Forward + Reverse primer set로 증폭한 것은 *Spe* I enzyme (TaKaRa, Japan)으로 잘랐다. 그러나 Forward + T7-Reverse primer set로 증폭한 것은 *Nco* I enzyme (TaKaRa, Japan)으로 잘랐다. *Spe* I과 *Nco* I enzyme 처리는 매뉴얼을 일부 수정하였다.

dsRNA를 합성하기 전 enzyme mixture를 PCR product purification kit (Macrogen, Korea)를 이용해 purification 한다. 매뉴얼을 토대로 하여 30 μ l의 purification product를 획득하였다.

Promega T7 RiboMax Express RNAi System kit (Promega, USA)를 이용하여 dsRNA를 합성하였다. 방법은 매뉴얼을 일부 수정하여 진행하였다. RiboMax Express T7 2 $\times$ buffer 10 μ l, Lineared DNA 약 1 μ g, Enzyme mix, T7 express 2 μ l로 총 volume을 20 μ l로 맞춘다. Mixture를 1.5ml tube에 넣고 pipetting한 다음 37°C에서 30분간 반응시킨다. 30분 후 *Spe* I mixture와 *Nco* I mixture를 하나의 1.5ml tube에 합쳐 70°C에서 10분간 반응시켰다. 이 후 RNase solution 2 μ l와 DNase 2 μ l를 mixture에 혼합시켜 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 때 한 번 희석한 RNase solution을 반복 실험 시 재사용 하지 않았으며, 반응이 끝나면 mixture에 DW 6 μ l를 첨가하여 50 μ l로 맞추었다. 여기에 3M Sodium Acetate 5 μ l (mixture sample의 0.1배 첨가)를 넣고 pipetting 해준 다음, 100% ethanol 137.5 μ l {(mixture sample + 3M Sodium Acetate)의 2.5배 첨가}를 넣고 pipetting하였다. dsRNA를 침전시키기 위해 -70°C deepfreezer에서 2시간 동안 보관한 후 13,000 rpm, 4°C 조건으로 mixture를 20분간 centrifuge 해주었다. 상층액은 버리고 tube에 70% ethanol을 500 μ l씩 첨가한 후 다시 13,000 rpm, 4°C 조건으로 mixture를 10분간 centrifuge 한하였다. 상층액은 버리고 tube를 상온에 10분 동안 방치하여 ethanol을 휘발시켰다. 20 μ l의 DW를 tube에 넣고 pellet을 녹여 dsRNA를 얻었다.

RNA interference 생물검정

RNA interference 생물검정은 담배거세미나방 4령 유충을 대상으로 실시하였다. 5 μ l Micro syringe 7000 series Modified Microliter Syringe (Hamilton, Germany)를 이용하여 dsRNA를 주입하였다. 주입되는 dsRNA의 양은 5 μ l이었으며, dsRNA의 농도는 약 10 μ g/ μ l이었다. 담배거세미나방 유충 복부 2~3절에 알코올 소독을 한 뒤 syringe를 이용해 dsRNA를 주입하였다. 대조구는 2가지 그룹으로 어떤 것도 주입하지 않는 무처리구 그룹과 DW를 5 μ l씩 주입한 그룹으로 나누었다. 실험한 개체의 인공사료는 생물검정이 모두 완료되는 기간인 처리된 개체가 용화될 때 까지 매일 매일 제공해 주었다. 표현형적 변이를 관찰하기 위해 각 처리구 당 담배거세미나방을 20마리씩 선발하여 실험하였고 3반복으로 실시하였다. 그리고 시간에 따른 dsRNA의 표현형적 발현 양상을 관찰하기 위해 각 처리구 당 10마리씩 선발하였다.

결과 및 고찰

담배거세미나방은 국내에서 다양한 농작물을 가해하는 심각한 해충으로 이들의 작물에 따른 생태적 특성의 다양성이나 농약에 대한 심각한 저항성 문제의 출현으로 화학적 방

Fig. 1. cDNA-chitinase PCR products. The major band was identified at the point of about 700 bp. Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: PCR products with T7-FW+RV primers; Lane 3: PCR products with FW+T7-RV primers.

제나 기타 다른 방제방법으로의 접근이 어려운 실정이다. 최근 친환경 농업을 위하여 생물농약이나 친환경 유기농자재와 같은 새로운 방제방법이 개발되고 있으나 이러한 난방제 해충의 방제에 큰 효과를 나타나고 있지 못하고 있다. 최근에는 새로운 해충 방제방법의 하나로 파밤나방(*Spodoptera exigua*) 유충에 chitinase gene의 dsRNA를 주입하여 발육이나 변태를 저해하는 방법이 시도되고 있다(Zhang *et al.*, 2012). 따라서 본 연구에서는 담배거세미나방의 탈피에 관여하는 chitinase의 RNA를 이용하여 탈피 저해 효과를 확인을 시험하였다.

총 RNA 분리 및 Chitinase Cloning

담배거세미나방의 총 RNA를 분리한 다음 NanoDrop을 이용해 농도를 측정하고 1 µg의 template으로 cDNA를 합성하고 primer set를 이용하여 chitinase gene을 증폭하였다. 전기영동의 결과, chitinase gene은 약 700 bp 근처에서 band가 나타났다(Fig. 1).

PCR product를 pGEM® T-easy vector에 ligation 시켜서 competent cell에 형질전환하고 IPTG와 X-Gal이 첨가된 Ampicillin LB plate에 도말하여 분리한 DNA에 chitinase gene이 존재하는지의 여부를 확인 하였다. 그 결과 약 3,000 bp 근처에서 pGEM® T-easy vector의 band가 확인되었고 약 700 bp 근처에서 PCR product인 chitinase의 band가 확인되었다(Fig. 2).

dsRNA를 합성은 circular form의 DNA를 제한효소로 잘라 lineared DNA로 만들었으며 T7-FW+RV primer set를 이용한 sample은 *Spe* I enzyme을 사용하였다. pGEM® T-easy vector에서 *Spe* I과 *Nco* I의 site가 각각 하나씩만 존재하기 때문에 전기영동 결과 약 3,700 bp 근처에서 하나의

Fig. 2. Plasmid DNA patterns restricted with *EcoR* I. Two bands are found. About 3 kb bands indicate pGEM T-easy vector. About 700 bp bands indicate chitinase. Lane 1: 1 kb DNA ladder marker; Lane 2: T7-FW+RV primers were used; Lane 3: FW+T7-RV primers were used.

Fig. 3. An electrophoresis of dsRNA. All bands are shown at the point of about 700 bp. M: 1 kb DNA ladder marker.

band를 확인한 lineared DNA를 주형으로 하여 dsRNA를 합성하였다. dsRNA를 1% Agarose gel에 100V, 35분 동안 전기 영동한 결과 약 700 bp 근처에서 band가 나타났다(Fig. 3).

RNA interference 생물검정

본 연구에서는 담배거세미나방 4령 유충에 dsRNA를 주입하였다. 그러나 보고된 다른 논문에서는 파밤나방 5령 유충에 chitinase gene의 dsRNA를 주입하였다. 파밤나방이 용화 단계가 되기 전 5령 유충 때부터 chitinase의 mRNA 발현량이 증가하는 것을 확인하였기 때문이다(Zhang *et al.*, 2012). 하지만 본 연구의 선행연구결과, 담배거세미나방에서는 5령 유충에 dsRNA를 주입하여도 유전자 발현 억제에 의한 탈피저해 현상이 나타나지 않았다(Date 제시하지 않았음). 주입하는 dsRNA 농도가 적거나 5령에서 변태기가 되기까지의 기간이 파밤나방 보다 길어 target gene에 대한 RNAi 효과가 떨어질 수 있을 것이라 예상 되었다. 그러므로 본 연구는 담배거세미나방 4령 유충에 dsRNA를 주입하여

5령으로의 탈피, 용화 그리고 우화에 대한 표현형적 변이를 관찰하였다. 발표된 논문에서는 2종류의 chitinase (Sechi 그리고 Sechi-h)에 대해 실험을 하였는데, 각각 5 µg/5µl의 농도로 파밤나방 5령 유충에 dsRNA를 주입하였다. 그 결과 Sechi dsRNA를 주입한 그룹에서는 용화율 52.02%, 우화율 40.38%를 나타내었다. Sechi-h dsRNA를 주입한 그룹에서는 용화율 72.38%, 우화율 48.52%를 나타내었다. 또한 풀무치(*Locusta migratoria*)를 대상곤충으로 하여 RNAi 실험을 하였다. Target gene이 chitinase는 아니지만 탈피에 관여하는 β-N-acetylglucosaminidase를 이용해 표현형적 변이 및 mRNA 발현량을 비교하였다. 풀무치 2령 약충에 dsRNA를 주입하여 약충-약충 간의 탈피, 5령 약충에 주입하여 약충-성충 간의 탈피 저해 현상을 관찰하였다. 각 처리구 당 50% 이상의 치사율을 보였다(Rong et al., 2013). 그러나 본 연구에서는 chitinase gene의 dsRNA를 주입한 그룹에서 용화율 66.7%, 우화율 65.0% 그리고 변이율 19.2% (Table 1)를 나타내어 Zhang et al. (2012)의 결과보다 RNA interference 저해 효과가 조금 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서는 우화를 하더라도 완전히 치사하지 않은 개체도 조사하여 변이율로 나타내었다. 하지만, 파밤나방 4령 유

충을 대상으로 키틴합성과 관련된 유전자의 저해효과를 확인한 Chen et al. (2008)의 연구결과에서도 유충 탈피시 31.7% 정도의 치사율을 보여 본 실험결과와 비슷한 양상을 나타내었다.

담배거세미나방 4령 유충에 농도가 약 10 µg/µl인 dsRNA 5 µl를 주사한 결과, 정상개체에 비해 3가지 양상의 표현형적 변이가 나타났다. 변이 유형은 기형발육, 탈피저해, 표피의 색소변이로 확인할 수 있었다(Fig. 4). 첫 번째로 기형발육 개체는 복부 이하의 부분에 비해 유충의 머리와 가슴 부분이 제대로 발육하지 않았으며 두 번째 유형인 탈피저해 현상은 4령에서 5령으로 탈피를 시도할 때 나타났다. 탈피각을 제대로 벗어내지 못해 복부의 중앙에 탈피각이 걸려 더 이상 발육하지 못했다. 세 번째 변이 유형인 색소변이는 4령에서 5령으로 탈피를 한 뒤 확인할 수 있는 표현형적 변이었다. 탈피 후 불특정하게 색소변이가 일어나 얼룩덜룩한 무늬를 확인할 수 있었다. 또한 탈피저해와 색소변이가 함께 일어나는 경우도 관찰할 수 있었다. 기형으로 발육하는 개체와 탈피를 저해 받은 개체는 더 이상 용화를 하지 못하였다. 그러나 표피에 색소변이가 일어난 개체는 다음 영기로 발육하는 데에는 큰 문제가 없어 번데기로 용화를 할 수 있었다.

한편 Chitinase dsRNA가 발육 상에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 개체가 성충으로 우화할 때까지 관찰하였다(Fig. 5). 그 결과 성충으로 우화 시 표현형적 변이 양상은 탈피저해, 날개변이, 기형발육과 같은 3가지 유형으로 나타났다. 첫 번째로 탈피를 저해 받은 개체는 우화 시 번데기 껍질을 제대로 벗지 못해 온전한 성충이 되지 못하고 사망하였다. 그러나 두 번째 변이 유형인 날개 변이 개체는 양쪽 날개가 몸통을 완전히 덮지 못할 뿐 성충으로 우화하는 데에는 큰 영향을 끼치지 않았다. 반면 세 번째 변이 유형 개

Table 1. Comparison of the rates of pupation, emergence and variation of three groups (non-injection, treated with DW and dsRNA). The 60 individuals were used in each treatment (n = 20, 3 replicates)

	Non-injection	DW	dsRNA
	Population (%)	Population (%)	Population (%)
Pupation	50/60 (83.3)	47/60 (78.3)	40/60 (66.7)
Emergence	45/50 (90.0)	34/47 (72.3)	26/40 (65.0)
Variation	4/45 (8.9)	1/34 (2.9)	5/26 (19.2)

Fig. 4. *S. litura* larva treated with dsRNA. 1) A normal individual (5th instar); 2) A malformation in an anterior part; 3) An abnormal individual that didn't success ecdysis; 4) An abnormal individual in integument color; 5) and 6) An abnormal individual in integument color.

Fig. 5. *S. litura* adults treated with dsRNA. 1) Normal individual (adult); 2) Abnormal individual due to failure in emergence; 3) There is abnormal individual that changed in width of its wings. Therefore both front wings couldn't cover its abdomen; 4) Malformation in wings and abdomen.

Fig. 6. Phenotypic changes of larva according to the time elapsed after treatments. After injection, individuals were observed each 6 hours (6 h, 12 h, 18 h and 24 h). There was no change at any time in non-injection and injected with DW. But after 18 h, there was phenotypic change in treated with dsRNA. In dsRNA treatment, ecdysis didn't occur due to the incomplete molting.

체는 번데기 껍질을 벗어 우화를 하는 데에는 성공했지만 날개가 몸통에 비해 짧게 형성되어 기형으로 발육한 개체도 관찰할 수 있었다.

Chitinase gene의 dsRNA를 담배거세미나방 4령 유충에 주입한 후 시간에 따른 유충의 표현형적 변이를 관찰하였다. 주입 후 6, 12, 18, 24시간마다 각각의 개체 변이를 확인한 결과, 주입 후 6시간째에 주입한 개체의 등쪽 표피에서 색소침착이 덜 된 변이를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 주입 후, 18시간째에 탈피각이 몸체의 중간에 걸려 온전히 탈피하지 못하고 있음을 관찰할 수 있었다. 24시간이 지나도 dsRNA를 주입한 개체는 여전히 5령으로 탈피를 하지 못함을 확인할 수 있었다. 반면 무처리구 개체와 DW를 주입한 개체에서는 어떠한 변이도 보이지 않았다(Fig. 7). 키틴합성과 관련된 여러 가지 효소와 관련된 각각의 유전자에 대한 RNA interference 효과가 다르게 나타날 수 있으며, 위의 결과를 통해 2가지 이상의 target gene에 대한 RNAi 효과도 기대해 볼 만하다. 그러나 곤충의 생리적 특성에 따라 target gene을

선발해야 한다. 또한 injection의 방법으로는 담배거세미나방의 효율적인 방제 효과를 기대하기 어렵다. 따라서 앞으로 injection 외에도 feeding 등의 방법을 모색하여 RNA interference에 대한 연구를 수행되어야 할 것이다.

농작물에 발생하는 다양한 해충은 생태계도 복잡하고 발생조건에서도 알, 유충, 성충이 동시 다발적으로 혼합되어 출현하기 때문에 방제에서 많은 어려움이 일어난다. 특히 최근에는 시설재배지가 증가하면서 더 많은 난방제 해충이 발생하고 있으며 나비목 해충인 파밤나방, 담배나방 등과 같이 담배거세미나방도 방제에 어려움을 겪고 있다. 국내에서 사용되는 대부분의 화학농약은 성충이나 유충만을 살생하므로 알이나 번데기가 해충이 되거나 인근에서 날아 들어오는 유입해충 때문에 종합적 방제 시스템이 요구된다. 따라서 대부분이 화학농약을 사용하는 경우가 많으나 최근에는 친환경적인 농산물의 수요가 급증하면서 안전한 농산물 생산의 필요성이 급부상하고 있다. 또한 연속작물의 생산이라든가 화학농약으로 방제가 어려운 경우에는 생물적 방제

Fig. 7. Comparison of different developmental stages of *S. litura* which were non-injection, treated with DW and dsRNA. Individuals treated with dsRNA showed morphological changes remarkably (eg. inhibition of ecdysis) than non-injection and treated with DW.

시스템이 사용되어야 한다. 종합방제방법에서 생물적 방제 방법의 가능성을 암시하는 이 연구과제는 더욱 전문적으로 검토되어야 할 필요성이 제시되었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원에 의해 “담배가루이 제어용 RNAi 발현 토마토 유묘 개발 및 대량 생산 기술 확립”(Project No. 110218-3)과제를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성하였습니다.

Literature Cited

- Arakane, Y., D. G. Hogenkamp, Y. C. Zhu, K. J. Kramer, Charles A. Specht, R. W. Beeman, M. R. Kanost and S. Muthukrishnan (2004) Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development, *Insect Biochem. Mole. Biol.* 34:291-304.
- Bautista, M. A. M., T. Miyata, K. Miura and T. Tanaka (2009) RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin, *Insect Biochem. Mole. Biol.* 39:38-46.
- Bettencourt, R., O. Terenius and I. Faye (2002) Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos, *Insect Mole. Biol.* 11:267-271.
- Chen, X., H. Tian, L. Zou, B. Tang, J. Hu and W. Zhang (2008) Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference, *B. Entomol. Res.* 98:613-619.
- Coy, M. R., N. D. Sanscrainte, K. C. Chalaire, A. Inberg, I. Maayan, E. Glick, N. Paldi and J. J. Becnel (2012) Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA, *J. Appl. Entomol.* 136 (10):741-748.
- Fire, A. S., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391:806-811.
- Garad, G. P., P. R. Shivpuje and G. G. Bilapate (1984) Life fecundity tables of *Spodoptera litura* (Fabricius) on different hosts, *Indian Acad. Sci.* 93(1):29-33.
- Ghanim, M., S. Kontesedlov and H. Czosnek (2007) Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius), *Insect Biochem. Mole. Biol.* 37:732-738.
- Goh, H. G., S. G. Lee, B. P. Lee, K. M. Choi and J. H. Kim (1990) Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera Noctuidae), on an artificial diet, *Kor. J. Appl. Entomol.* 29:180-183.
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *J. Biochem.* 280: 309-316.
- Hwang, J. and Y. Kim (2011) RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*, *J. Invert. Pathol.* 108:194-200.
- Jaubert-Possamai, S., G. L. Trionnaire, J. Bonhomme, G. K. Christophides, C. Rispe and D. Tagul (2007) Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, *BMC Biotechnol.* 7:63-70.
- Jung, S. Y., M. J. Seo, Y. N. Youn and Y. M. Yu (2010) Characteristics of δ -Endotoxin Protein Produced from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 Isolate Showing High Bioactivity against *Spodoptera litura*, *Kor. J. Pest. Sci.* 14(4):446-455.

- Kim, D. A., J. S. Kim, M. R. Kil, S. K. Paek, S. Y. Choi, D. Y. Jin, Y. N. Youn, I. C. Hwang and Y. M. Yu (2008) Characterization of New *Bacillus thuringiensis* Isolated with Bioactivities to Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), Kor. J. Appl. Entomol. 47(1):87-93.
- Kramer, K. J. and S. Muthukrishnan (1997) Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides, Insect Biochem. Mole. Biol. 27(11):887-900.
- Niimi, T., H. Kuwayama and T. Yaginuma (2005) Larval RNAi Applied to the Analysis of Postembryonic Development to the Analysis of Postembryonic Development in the Ladybird Beetle, *Harmonia axyridis*, J. Insect Biotechnol. Seriol. 74: 95-102.
- Quan, G., T. Ladd, J. Duan, F. Wen, D. Doucet, M. Cusson and P. J. Krell (2013) Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: Stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference, Insect Biochem. Mole. Biol. 43(8):683-691.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra and R. K. Bhatnagar (2002) Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor, J. Biol. Chem. 277(49):46849-46851.
- Rodriguez-Cabrera, L., D. Trujillo-Bacallao, O. Borrás-Hidalgo, D. J. Wright and C. Ayra-Pardo (2010) RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin, Environ. Microbiol. 12(11): 2894-2903.
- Rong, S., D. Q. Li, X. Y. Zhang, S. Li, K. Y. Zhu, Y. P. Guo, E. B. Ma and J. Z. Zhang (2013) RNA interference to reveal roles of β -N-acetylglucosaminidase gene during molting process in *Locusta migratoria*, Insect Sci. 20:109-119.
- Shinoda, T., J. Kobayashi, M. Matsui and Y. Chinzei (2001) Cloning and functional expression of a chitinase cDNA from the common cutworm, *Spodoptera litura*, using a recombinant baculovirus lacking the virus-encoded chitinase gene, Insect Biochem. Mole. Biol. 31:521-532.
- Turner, C. T., M. W. Davy, R. M. MacDiarmid, K. M. Plummer, N. P. Birch and R. D. Newcomb (2006) RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding, Insect Mole. Biol. 15(3):383-391.
- Zhang, D., J. Chen, Q. Yao, Z. Pan, J. Chen and W. Zhang (2012) Functional analysis of two chitinase genes during the pupation and eclosion stages of the beet armyworm *Spodoptera exigua* by RNA interference, Arch. Insect Biochem. Physiol. 79(4-5):220-234.
- Zhou, X., M. M. Wheeler, F. M. Oi and M. E. Scharf (2008) RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA, Insect Biochem. Mole. Biol. 38:805-815.

● ●

담배거세미나방(*Spodoptera litura*) Chitinase gene의 RNA interference

전미진 · 서미자 · 윤영남 · 유용만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

요 약 RNA interference(RNAi)는 살아있는 세포 내에서 유전자의 표현 형을 억제하는 작용을 하고 Chitinase는 곤충이 탈피를 하는 동안 오래된 큐티클의 분해와 재흡수를 도와주는 효소로 알려져 있다. 이러한 작용기작을 이용하는 연구를 수행하기 위하여 담배거세미나방의 chitinase와 관련하여 탈피저해 효과를 조사하였다. 담배거세미나방 5령 유충으로부터 RNA를 추출하고 이용하여 cDNA를 합성하고 약 700 bp의 chitinase를 증폭 하였다. 증폭한 PCR product를 pGEM T-easy vector에 cloning하여 competent cell (*E.coli*)에 형질전환 시키고 mixture를 배양 후 colony를 선발하고 plasmid DNA를 추출하였다. 그 결과 약 3 kb size의 vector band와 약 700 bp의 insert band를 확인 할 수 있었다. dsRNA를 합성하기 위해 각각의 DNA를 *Spe* I과 *Nco* I의 제한 효소 처리를 하여 linear form의 DNA로 만들었다. dsRNA 합성 후 약 10 μ g/ μ l의 농도로 5 μ l씩 담배거세미나방 4령 유충에 주입하였다. 그 결과 유충-유충 간의 탈피에서는 기형발육, 탈피저해, 표피의 색소 변이가 나타났다. 번데기-성충 간의 탈피에서는 탈피저해, 날개변이, 기형발육 현상을 볼 수 있었다. 용화율의 경우 무처리구 83.3%, DW 처리구 78.3%, dsRNA 처리구 66.7%로 나타났다. 우화율의 경우 무처리구 90.0%, DW 처리구 72.3%, dsRNA 처리구 65.0%로 나타나 dsRNA를 처리한 그룹에서 상대적인 탈피 저해 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 변이율의 경우 무처리구 8.9%, DW 처리구 2.9%, dsRNA 처리구 19.2%로 dsRNA를 주입한 처리구에서 변이율이 가장 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 표현형적 변이는 dsRNA 주입 후 약 18 시간 이후부터 뚜렷하게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

색인어 RNA interference, dsRNA, 담배거세미나방, Chitinase, 탈피저해

● ●