

초음파 처리 식물체의 배추좀나방 유충에 대한 섭식 저해활성 및 키틴합성 저해활성

방혜선[†] · 이완주 · 황석조 · 구태원 · 김선여

농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부

Antifeeding Activity and Chitin Synthesis Inhibition Activity of the Ultrasonic Treatment on Plant Extract against *Plutella xylostella*(Lepidoptera: Yponomeutidae)

Hae-Sun Bang[†], Won-Chu Lee, Suk-Jo Hwang, Tae-won Gu and Sun-Yeou Kim

Department of Sericulture & Entomology, The National Institute of Agricultural Science & Technology,
RDA, Suwon 441-100, Korea

Abstract

Effects of the ultrasonic treatment on plant represents antifeeding activity and chitin synthesis inhibition activity against diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) by a leaf-dipping method at a concentration of 5,000ppm. Methanol extracts of leaves of the ultrasonic treatment on plant was sequentially partitioned with n-hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water fractions, and bioassayed. Antifeeding activities were observed in n-hexane, chloroform and ethylacetate fractions. N-hexane fraction has 94.6% of strongest antifeeding activity against *P. xylostella*. From the n-hexane sequentially partitioned showed H6 and H8 fractions of antifeeding activities against *P. xylostella*. And chitin synthesis inhibition activity against *P. xylostella* was obtained the methanol, n-hexane and water fractions.

Key words – Ultrasonic, Antifeeding activity, Chitin synthesis inhibition activity, Plant extract, *Plutella xylostella*.

서 론

식물체에 음파를 이용하는 연구가 한국을 비롯한 일본에서 선행된 바가 있는데, 그에 따른 연구 결과에 의하면 고주파수(3000-5000Hz)의 음파로 식물체에 물리적 자극을 가하면 식물의 생체 전위에 현저한 변화가 생겨 조

기성숙, 생장력 향상, 항 병해충력 증가, 맛 향상 등의 효과가 있다고 하였다[4]. 또한, 식물체에 대한 물리적 자극에 의해 유전자의 염기서열이 변한다는 보고가 있으며 [11], UV를 조사한 식물체에서는 자외선 stress에 의해 식물체내의 변화를 가져와 산성 분획 중 곤충의 섭식저해 인자인 Moracin C와 N이 식물체에서 유도되어 분리·정

[†] Corresponding author

제한 바가 있다[8].

최근에는 살충제의 남용과 농약사용 증대에 따라 환경 오염과 해충의 저항성 유발 등의 부작용이 대두되고 있다. 새로운 형태의 해충방제 개발이 시급한 실정으로 새로운 농약을 개발하는 방법으로 화학적 합성에 의한 방법은 오랜 개발 소요시간 및 막대한 비용의 투입이라는 문제점으로 여러가지 유형의 해충방제 개발이 시도되고 있다. 이들 생물 유래의 해충제어 수단중에서 식물체 및 식물의 2차 대사산물을 직접 해충 방제에 이용되어지고 있다.

식물에 존재하는 종 특유의 2차대사산물 중 독물질(toxins), 유인물질(attractants), 섭식 또는 산란저해물질(deterrents), 기피물질(repellents) 및 곤충생장조절물질(insect growth regulators)을 이용하는 방법을 들 수 있는데[9], 이 중, 천연물 중에서 곤충에 대해 광범위하게 활성을 가지는 것은, 곤충의 섭식을 저지시키는 섭식저해제로서, 이들은 1차적으로 식물체를 찾아 다니는 곤충의 감각기관에 영향을 주어 먹이 탐색에 저해를 주며, 2차적으로는 독성을 가지고 있어서 이들의 복합작용에 의해서 섭식저해와 생장저해 등을 일으킨다는 보고가 있다[10].

본 연구는 음파가 곤충 행동양식에 미치는 영향에 관한 연구에서 초음파 처리에 의한 식물체에 일정 곤충의 섭식저해제로 작용하는 alkaloid 계통의 물질을 분석한 바가 있어 음파가 식물체에서는 일종의 stress로 작용하여 곤충의 생장이나 섭식에 변화를 줄 수 있는 새로운 물질을 탐색하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시충

배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)은 1998년 2월 농촌진흥청 농업과학기술연구원 곤충과로부터 분양 받아, 온도 27±1℃, 상대습도 50~60%, 조광시간 16L: 8D의 조건으로 사육하였다.

식물체 초음파 처리

기주식물인 배추(*Brassica campestris*)는 파종후 2일째 부터 3hr/day씩 오전 6시부터 9시까지 20kHz의 초음파(Kwang-Chun System)를 처리하였다. 초음파를 30일 동안 처리하고 식물체를 채취하여 즉시 증류수에 3회 수세한

후, -70℃에서 급냉시킨 다음 냉동 건조하였다.

기주식물 분획조제

냉동 건조한 배추 250g에 85% methanol 5ℓ를 가하여 초음파로 3시간 연속 추출한 후 감압농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. MeOH 추출물을 극성에 따라 분획하여 n-Hexane, EtOAc, CHCl₃, BuOH 및 H₂O 분획물을 제조하였다.

생물검정

실험 곤충에 대한 각 분획물의 섭식저해활성은 안과 조[1]의 방법에 따라 검정하였다. 각 분획물을 완전 농축하고 메탄올과 Triton X-100수용액을 1:9(v/v) 비율로 혼합하여 농도를 조절하였다. Cork borer로 오려낸 잎 절편(직경 1cm)을 기주식물 분획물에 30초간 침지 한 후 hood에서 2시간 동안 풍건하였다. 여지를 간 petridish에 분획물이 처리된 잎 절편을 놓고 배추 좀나방 3령 유충을 10마리씩 접종하고, 온도 27±1℃, 상대습도 50~60%, 조광시간 16L: 8D의 사육상에 방치한 다음 섭식정도를 24시간 후에 관찰하였다.

처리에 대한 섭식저해 활성(antifeeding activity)은 아래와 같은 식으로 산출하였다.

$$\text{Antifeeding activity (\%)} = (C-T)/(C+T) \times 100$$

C는 대조구의 섭식정도이며 완전히 섭식한 경우에는 100, 섭식하지 않은 경우에는 0으로 하였으며, T는 처리구의 섭식정도로 대조구와 동일하게 계산하여 저해활성정도를 산출하였다[6]. 저해활성이 100~80%일 경우 ++, 80~50%일 경우 +, 50% 미만일 경우 -로 평가하였다.

키틴합성저해활성은 안 등[2]의 방법에 따라 검정하였으며, 검정방법은 섭식저해활성 검정법과 동일한 방법으로 실시하나, 처리 48시간 이상 경과하면 처리잎이 건조되므로 분획물을 처리하지 않은 새로운 잎 절편으로 교체하고, 수일 후 탈피를 하지 못하고 죽은 충수를 조사하였다.

활성 성분내 대한 thin layer chromatography

섭식저해활성을 보인 분획은 Silica gel open column chromatography로 분리하였다. 유리판 칼럼(5.5 × 70cm, PTEE end plate 부착)을 시료의 양에 따라 선택하여 사용하였으며, Silica 60(100~200mesh, Merck)양은 시료의 50

~60배로 하였다. 주 전개용매는 hexane/ethylacetate 또는 methanol/water로 하였다.

분취한 시료는 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)에 의해 hexane/ethylacetate 또는 methanol/water을 부피비로 섞어 전개한 다음, TLC plate(SIL G/UV₂₅₄, 0.25mm layer with fluorescent indicator, Macherey-nagel Co.)상에 전개된 spot을 비교하였다.

결과 및 고찰

섭식저해활성

초음파 처리한 배추의 메탄올 추출물의 수율은 메탄올 추출물의 무게와 건조 시료의 무게비로 구하였으며, 19.53%로서 수율이 낮았다.

초음파 처리한 배추의 메탄올추출물을 유기용매로 순차분획, 농축하여 hexan층 19.1g, 클로로포름층 0.73g, 에틸아세테이트층 0.63g, 부탄올층 4.49g, 물층 23.15g을 얻었다(Fig. 1).

배추좀나방 2~3령 유충에 대하여 초음파 처리 배추의 메탄올 추출물을 유기용매로 분획을 얻은 다음 각 분획을 5,000ppm의 농도로 염침지법으로 처리한 결과 배추좀나방 유충의 섭식저해 활성은 5,000ppm 수준에서 hexan층에 대해 94.6%, 클로로포름층에 대해 24.1%, 에틸아세테이트층에 대해 21.3%의 섭식저해 효과가 확인되었으며, hexan층에서 가장 강한 섭식저해 활성을 보였다(Table 1).

활성 3분획인 hexan, 클로로포름, 에틸아세테이트층에 대한 배추좀나방 유충의 섭식저해활성은 hexan분획 1000ppm 수준에서 45%의 섭식저해 효과가 확인되었다(Fig. 2).

Table 1. Antifeeding activities of *B. campestris* leaf against *P. xylostella*^a.

Sample	Control	Treatment	Antifeeding activity(%) ^b
n-Hexane	90.0 ± 14.14	2.5 ± 5.00	94.59(++)
Chloroform	90.0 ± 4.79	55.0 ± 5.77	24.10(-)
Ethylacetate	92.5 ± 9.57	60.0 ± 11.55	21.31(-)
Butanol	90.0 ± 8.16	68.6 ± 14.36	13.35(-)
Water	65.0 ± 17.32	75.0 ± 30.00	-7.14(-)
Methanol	100 ± 0.00	97.5 ± 5.00	1.26(-)

^a5,000ppm treatment.

^b++ : >80%, + : 80~50%, - : <50%

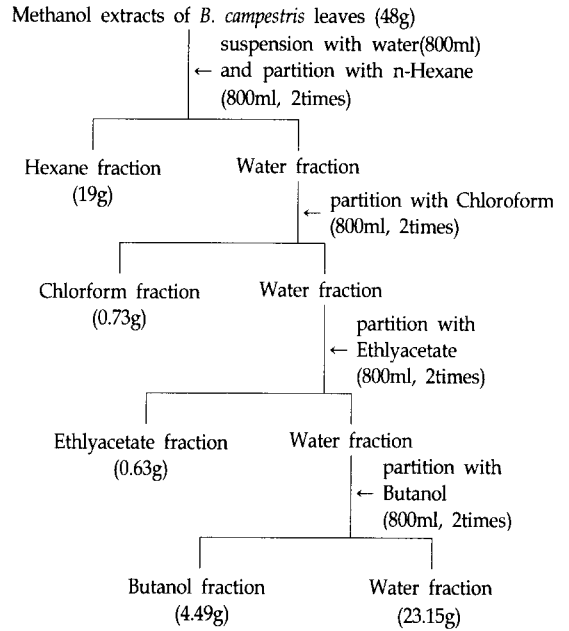


Fig. 1. Fractionation for methanol extracts of *Brassica campestris* leaf treated with ultrasonic

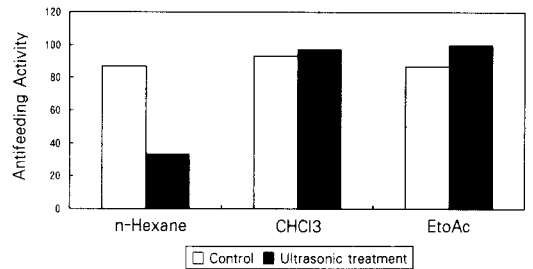


Fig. 2. Antifeeding activity of three fractions from extracts of *B. campestris* leaf against *P. xylostella* (1,000ppm).

hexan층 15g을 Silica gel column chromatography에서 전개용매를 gradient로 하여 9개의 층을 얻어(Fig. 3), 배추좀나방 유충에 2,000ppm으로 처리한 결과, 메탄올층인 H6, H8분획에서 각각 25%, 37%의 섭식저해 효과가 확인되었다(Fig. 4).

hexan층에 대한 TLC상의 관찰에서는 Hexane: Ethyl acetate=1:1 전개용매에서 무처리구에 존재하는 spot이 초음파 처리구에는 존재하지 않았다(Fig. 5).

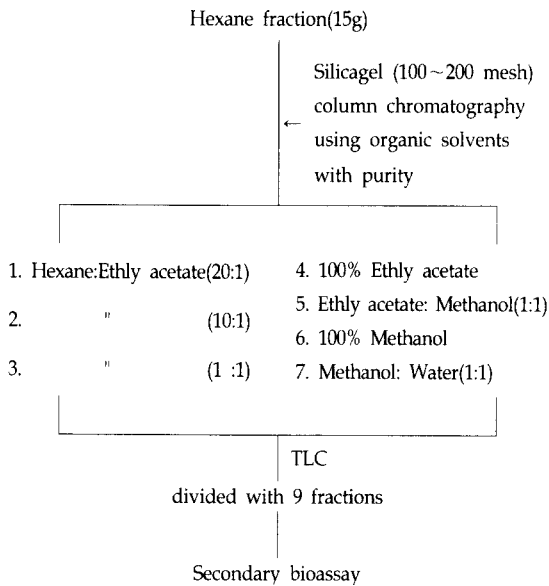


Fig. 3. Isolation of bioactive compounds from n-hexane fraction of *B. campestris* leaf.

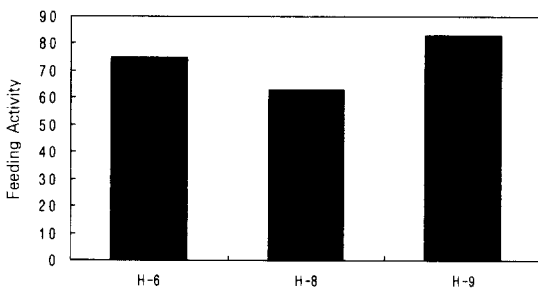


Fig. 4. Antifeeding activities of subfraction of n-hexane fraction for extracts of *B. campestris* leaf against *P. xylostella*(2,000ppm).

키틴합성저해활성

초음파 처리한 기주식물의 각 분획에 대한 배추좀나방 유충의 키틴합성저해활성은 5,000ppm 수준에서 핵산층, 물층, 메탄올층에서 억제효과가 나타났다(Fig. 6).

식물에 존재하는 기피물질은 탄화수소, 알코올, 알데히드, 에스테르, 정유, 질소화합물등 200여 종류의 휘발성 물질이 보고되어 있는데, 이들은 식물과 식물(alleopathic interaction) 및 여러 주위 생물들과 복잡, 다양한 상호관계를 가지고 있다.

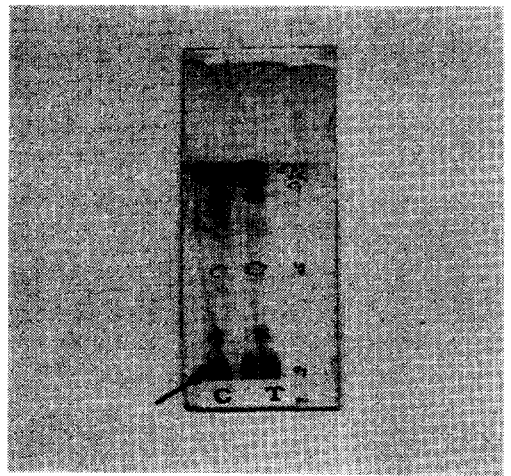


Fig. 5. Thin-layer chromatogram of hexane fraction of *B. campestris* leaf treated with ultrasonic. Plate ; Silicagel 60
Solvent system; n-Hexane - Ethylacetate(50:50,v/v)
Visualization; Carrying by heating with anisaldehyde in H_2SO_4

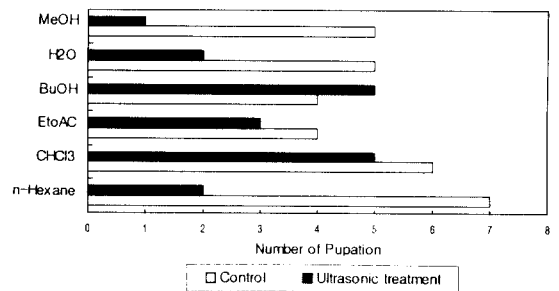


Fig. 6. Inhibition effect of chitin synthesis for extracts of *B. campestris* leaf against *P. xylostella*(5,000ppm).

식물의 해충에 대한 활성물질을 보면 국화과에 속하는 식물중에서 이들 화합물에 속하는 polygodial, warbuganal, muzigadial등의 sesquiterpenoids는 *Pieris brassica*의 5령 유충에 대하여 화학감각수용기에 영향을 주어 섭식을 저해하는 것으로 밝혀져 있으며[10], 탄닌은 곤충에 대해 강한 섭식저해활성을 나타내고 있는데, 이 물질은 단백질, 알칼로이드 등과 결합하여 난용화의 경향을 나타내어 trypsin과 같은 효소의 작용을 억제하여 소화를 저해하는 것으로 밝혀졌다[3].

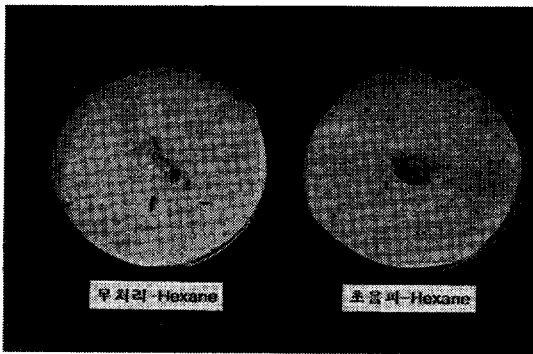


Fig. 7. Antifeeding activity of mixture isolated from n-Hexane fraction of *B. campestris* leaf against *P. xylostella*.

식물성분 중의 대표적인 휘발성분인 monoterpenoids에서 곤충에 대한 기피활성의 예는 기주식물과 주위의 가해 곤충에 대해서 많이 연구되었는데, 이들 화합물은 세포독성을 가지고 있어서, 골지체와 미토콘드리아의 수 및 세포막의 투과성을 감소시킨다[5].

섭식저해물질로서 알칼로이드, 테르펜화합물(terpenoids) 및 페놀화합물(phenolics) 등이 알려져 있는데, 식물의 2차대사산물의 섭식저해작용 메커니즘에 관한 연구는 거의 찾아볼 수 없으나, Mitchell등[11]은 쓴 맛을 내는 대표적인 알칼로이드인 spateine, nicotine, quinine을 *Entomoscelis americana* 성충의 galeal sensillia에 대해 전기생리학적으로 실험한 결과 미각세포 억제에 의한 작용임을 밝혔으며, polygodial, warburganal, muzigadial등의 sesquiterpenoids는 *Pieris brassicae*의 5령 유충에 대하여 화학 감각 수용기에 영향을 주어 섭식을 저해하는 것으로 알려졌다[9].

본 실험에서의 섭식저해활성은 역시 이러한 화합물에 의해서 섭식작용을 나타내는 것으로 추측된다(Fig. 7).

요 약

추출액 처리에 의한 식물체의 배추좀나방의 유충에 대한 섭식저해활성과 키틴합성저해활성에 대한 실험결과 각 분획에 대한 배추좀나방 유충의 섭식저해 활성은 5,000 ppm 수준에서 핵산층에 대해 94.6%, 클로로폼층에 대해 24.1%, 에틸아세테이트층에 대해 21.3%의 섭식억제 효과가 확인되었고, 키틴합성저해활성은 5,000ppm 수준에서

핵산층, 물층, 메탄올층에서 억제효과가 나타났다. 핵산층의 9개 순차적 분획에 대한 섭식저해 활성은 H6, H8 분획에서 각각 26%, 37%의 섭식저해 효과가 확인되었고, 핵산층에 대한 TLC상의 관찰에서는 Hexane: Ethylacetate=1:1 전개용매에서 무처리구에 존재하는 spot이 추출액 처리구에는 존재하지 않았다.

참 고 문 헌

1. 안용준, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. 각종 유기용매가 곤충의 독성과 약해 및 화합물의 용해성에 미치는 영향. 한국응용곤충학회지, 31, 182.
2. 안용준, 김길하, 박노중, 조광연. 1992. 살충제 개발을 위한 생물검정법의 확립. II. 처리방법 및 종간에 따른 살충제 감수성 차이. 한국응용곤충학회지, 31, 452.
3. Dreyer, D. L., Reese, J. C. and Jones, K. C. 1981. *J. Chem. Ecol.* 7, 273.
4. 橋木 康, 高辻正基, 野併 浩. 1993. 植物種苗工場, pp. 45-46, 川島書店.
5. Harborne, J. B. 1988. Introduction to Ecological Biochemistry, 3rd Ed. pp. 1-41, Academic Press, London.
6. Isman, M. B. O. Koul, A. Luczynski and J. Kaminski. 1990. Insecticidal and Antifeedant Bioactivities of Neem Oils and Their Relationship to Azadirachtin Content, *J. Agric. Food Chem.* 38, 1406.
7. Mitchell, B. K. and J. F. Sutcliffe. 1984. Sensory inhibition as a mechanism of feeding deterrence; effect of three alkaloids on leaf beetle feeding. *Physiol. Entomol.* 9, 57.
8. Mitsuo Yazawa. 1997. Characteristics of sucrose formation, and the influence of UV irradiation on the feeding by the silkworm, in leaves of the mulberry. *Bull. Natl. Inst. Entomol. Sci.* 18, 1.
9. Nordlund, D. A., Jones, R. A. and Lewis, W. J. 1989. Semiochemicals; Thier role in pest control. pp. 3-24, A Wiley-Interscience Publication.
10. Schoonhoven, L. M and Y. Fu-Shun. 1989. Interference with Normal Chemoreceptor Activity by some sesquiterpenoid antifeedants in a herbivorous insect *Pieris Brassicae*. *J. Insect Physiol.* 35(9), 725.
11. Sistrunk, M. L., Antosjewicz, D. M., Purugganan, M. M and Braam, J. 1995. Arabidopsis TCH3 encodes a novel Ca²⁺ binding protein and shows environmentally induced and tissue specific regulation. *Plant cell.* 6(11), 1553.