

아이코사노이드 생합성 저해제인 벤질리덴아세톤의 점박이응애(*Tetranychus urticae*)와 세균성꽃마름병 세균(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 억제효과

박예슬 · 김민제 · 이건형¹ · 천원수 · 이영근 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학부, ¹(주)나비스

(2009년 9월 21일 접수, 2009년 9월 26일 수리)

Inhibitory Effects of an Eicosanoid Biosynthesis Inhibitor, Benzylideneacetone, Against Two Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*, and a Bacterial Wilt-causing Pathogen, *Ralstonia solanacearum*

Yesol Park, Minje Kim, Geonhyung Lee¹, Wonsoo Chun, Youngkeun Yi and Yonggyun Kim*

School of Bioresource Sciences, Andong National Sciences, Andong 760-749, Korea, ¹Agricultural Environmental Research Center, NABIS Co., Ltd., Moongyeong 745-821, Korea

Abstract

A monoterpenoid compound, benzylideneacetone (BZA), is a metabolite of an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. Its primary biological activity is an inhibitor of phospholipase A₂, which catalyzes the committed step of biosynthesis of various eicosanoids that are critically important to mediate insect immune responses. When BZA was applied to two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, it exhibited a dose-dependent mortality in leaf-disc assay. Subsequently BZA was tested against *T. urticae* infesting apples in a field orchard, in which it showed a significant control efficacy, which was not statistically different with that of a commercial acaricide. BZA also had significant antibacterial activities against three species of plant pathogenic bacteria when it was added to the bacterial cultures, in which it showed the highest inhibitory activity against a bacterial wilt-causing pathogen, *Ralstonia solanacearum*. The bacterial pathogen caused significant disease symptom to young potato plants. However, BZA significantly suppressed the disease occurrence. This study suggests that BZA can be used to develop a novel crop protectant to control mite and bacterial pathogen.

Key words Benzylideneacetone, *Tetranychus urticae*, eicosanoid, phospholipase A₂, *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, bioassay

서 론

곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila*는 그람음성균으로 곤충병원선충인 *Steinernema carpocapsae*의 감염태 유충 장내에 공생한다(Park 등, 1999). 이 감염태 유충이 대

상곤충의 혈강으로 침입하게 되고 이때 장내 공생세균을 곤충의 혈강으로 배출한다(Forst 등, 1997). 혈강으로 나온 *X. nematophila*는 대상곤충의 면역 작용을 억제하기위해 아이코사노이드 생합성 억제물질을 분비하여 면역억제 상태를 유도한다(Park과 Kim, 2000). 면역반응이 억제된 상태에서 *X. nematophila*가 증식하면 대상 곤충은 패혈증이 발생하여 치사에 이르게 되고, 치사된 곤충체에서 곤충병원선충이 증식

*연락처 : Tel. +82-54-820-5638, Fax. +82-54-823-1628
E-mail: hosanna@andong.ac.kr

하게 된다(Kaya와 Gaugler, 1993). 또한 치사된 곤충 기주 체내에 *X. nematophila* 자신의 단일세균상을 만들기 위해 항생물질을 방출하여 2차로 침입할 수 있는 다양한 미생물의 성장을 억제하게 된다(Webster 등, 1998).

벤질리덴아세톤은 모노터펜 물질로서 *X. nematophila*의 배양액에서 분리되었다(Ji 등, 2004). 벤질리덴아세톤은 아이코사노이드 생합성을 촉매하는 phospholipase A₂(PLA₂)를 억제하며 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 면역억제를 유도하였다(Kwon과 Kim, 2008). 아이코사노이드는 다양한 병원미생물에 대해서 혈구세포에 의한 포식작용 및 소낭형성의 세포성 면역 반응과 다양한 항생펩타이드 작용으로 비롯되는 체액성 면역 반응을 매개하게 된다(Stanley와 Miller, 2006; Shrestha와 Kim, 2009). 세포성면역반응의 경우 대부분 혈장의 페놀옥시다아제의 활성에 의존한 멜라닌형성 반응에 의존하게 되는데(Kanost 등, 2004), 아이코사노이드는 이 효소의 초기 활성화에 작용하는 것으로 밝혀졌다(Shrestha와 Kim, 2008). 또한 혈구들이 병원체로 이동하게 하는 반응도 아이코사노이드에 의해 매개되는 것으로 알려졌다(Stanley, 2006). 즉, 아이코사노이드 생합성 억제는 이러한 다양한 세포성 면역 반응 및 체액성 면역 반응을 억제하여 대상 곤충의 면역저하를 유발하게 된다.

또한 벤질리덴아세톤의 항생효과는 식물병원세균에서도 나타나(Ji 등, 2005), 이 물질이 작용할 수 있는 추가 스펙트럼을 분석할 필요가 있었다. 이에 대한 본 연구는 벤질리덴아세톤이 사과 재배에 큰 경제적 피해를 끼치는 점박이응애(*Tetranychus urticae*)에 대한 살비효과와 3종의 식물병원세균에 대한 항생효과를 각각 분석하였다.

재료 및 방법

점박이응애 생물검정

벤질리덴아세톤의 살비효과 분석은 실내에서 강낭콩을 기주로 증식된 점박이응애를 대상으로 잎 침지법의 생물검정으로 실시하였다. Sigma-Korea(Sigma-Korea, Seoul, Korea)에서 구입한 벤질리덴아세톤을 dimethyl sulfoxide(Sigma-Korea)로 용해시켰다. 대조물질로서 Pro-Tyr(PY)은 (주)팜트론에서 합성하여 공급받았다. PY는 증류수로 용해시켰다. 용해된 분석 약제는 다시 증류수로 희석해서 서로 다른 처리농도를 준비하였다. 직경 2.5 cm의 강낭콩을 처리 약제 용액에 1분간 침지한 후 25°C에서 음건하였다. 각 약제 농도에 점박이응애 성충 15 마리를 각각 3반복 처리하였고 매일 생존수를 계

수하였다. 이에 따라 얻어진 처리농도별 살비율은 프로빗분석(Raymond, 1985)으로 반수치사약량을 산출하였다.

식물병원세균 생육억제 효과검정

3종의 식물병원세균(*Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)을 5 ml의 tryptic soy broth(TSB)에 접종하고 28°C에서 16시간 동안 배양시켰다. 벤질리덴아세톤 또는 PY를 40 ml의 TSB에 넣어 최종농도를 1,000 ppm이 되게 한 후, 각 세균배양액(5×10^7 cfu/ml) 40 μ l를 추가하여 배양하였다. 48시간 동안 배양한 후, 처리별 식물병원세균 배양액을 1 ml 씩 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정했다.

식물병 방제효과 분석

고압살균된 토양 350 ml에 *R. solanacearum*의 현탁액(1.4×10^6 cfu/ml) 15 ml와 1,000 ppm 농도의 BZA 용액 20 ml를 골고루 섞어 포트(지름 15 cm x 높이 20 cm)에 넣은 후, 감자 유묘(높이 15 cm)를 심고 안동대학교 온실에서 병 발생 유무를 조사했다. 각 처리는 15포기 씩 완전임의 배치법 3반복으로 배치하였으며, 병 발생 여부는 처리 14일 후에 감자 줄기에서 나타나는 검은 줄 모양의 무름병과 잎 마름 현상으로 판별하였다.

결과 및 고찰

벤질리덴아세톤은 점박이응애에 대해서 뚜렷한 살비력을 발휘하였다(Fig. 1A). 곤충병원세균이 분비하는 또 다른 물질인 PY(Pro-Tyr)와 비교하여서도 높은 살비력을 나타냈다(Fig. 1A). 벤질리덴아세톤의 살비력은 농도 처리에 따라 증가했다(Fig. 1B). 반수치사약량(LC₅₀)이 처리 후 48시간에서 1,059 ppm(95% 신뢰구간: 450-2,706 ppm), 72시간에서 305 ppm(95% 신뢰구간: 192-507 ppm)으로 각각 산출되었다.

포장조건에서 벤질리덴아세톤의 점박이응애에 대한 살비력을 검정하기 위해 안동시 기느리에 위치한 사과원에서 야외 검정이 실시하였다(Table 1). 대조 약제로서 스피로디클로펜 수화제(Bayer, 서울, 한국)를 1,000 ppm으로 처리하였다. 약제 처리시 반복별 점박이응애의 밀도는 50마리 이상이었으며 완전임의배치법으로 3반복 실시하였다. 처리 효과는 벤질리덴아세톤의 속효성을 검정하기 위해 처리후 7일간 조사하였다. 이때 벤질리덴아세톤은 처리 후 7일차에서 약 77%의 방제 효과를 나타냈으며, 이러한 효과는 대조약제의 효과

와 통계적으로 비등하였다. 비교적 저조한 대조약제의 방제 효과는 약제 지효성 및 지역 개체군의 감수성 저하로 사료된다. 이상의 결과는 아이코사노이드 생합성 억제자인 벤질리

덴아세톤이 점박이응애에 대해서 실내와 야외에서 뚜렷한 방제효과가 있다는 것을 보여주었다. 벤질리덴아세톤이 갖는 PLA₂ 억제효과(Kwon과 Kim, 2008) 때문에 본 연구에서 얻은 살비효과가 벤질리덴아세톤에 의한 것이라고 직접 설명하기에는 무리가 있다. 본 연구에서도 보여 주었듯이 벤질리덴아세톤은 여러 항생효과를 나타내고 있는 것으로 알려지고 있다(Ji 등, 2004). 즉, 아직 보고되고 있지는 않지만 점박이응애의 생존에 필수적인 공생세균에 대한 벤질리덴아세톤의 항생능력이 살비효과로 이어졌을 것이라는 가능성을 제기한다. 그러나 추후 이러한 점박이응애에 대한 이 아이코사노이드 생합성 저해제의 살비효과가 밝혀져야 한다.

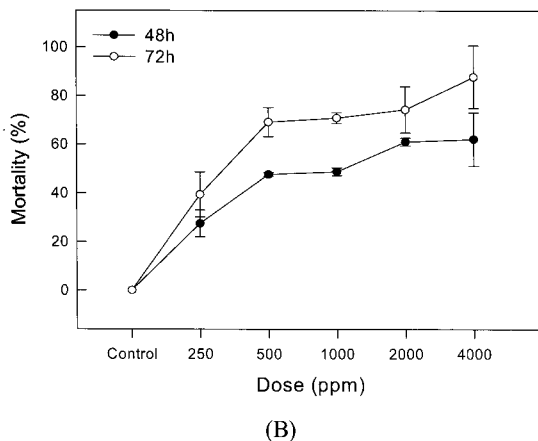
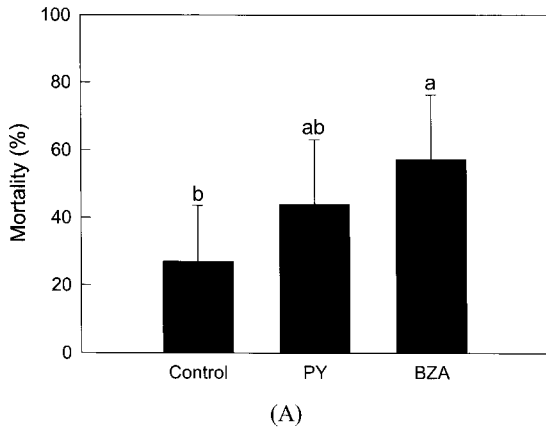


Fig. 1. Acaricidal effect of benzylideneacetone (BZA) on *Tetranychus urticae* by leaf-disk assessment. (A) Effects of BZA (1,000 ppm) and Pro-Tyr (PY, 1,000 ppm) at 48 h after treatment. (B) Dose-mortality of BZA. Each treatment was replicated three times and each replication used 50 adult mites for bioassay. ‘Control’ represents no chemical treatment. Different letters above standard deviations represent significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

식물병원성 세균인 *R. solanacearum*, *P. syringae*, *X. oryzae*의 3개 균주에 대해서 벤질리덴아세톤의 세균생장억제 효과를 분석하였다(Fig. 2). 벤질리덴아세톤은 *X. oryzae*를 제외한 2종의 세균에서 억제효과를 주었는데, 특히 *R. solanacearum*에 대해서 높은 억제력을 보였다. 반면에 PY는 높은 농도에서 *P. syringae*에서 효과를 주었을 뿐, 거의 항균능력을 보이지 못했다. 이러한 벤질리덴아세톤의 차등 살균능력은 이 물질의 PLA₂ 억제 이외의 약리 효과에 기인된 것으로 사료되며 이에 대한 추후 연구가 요구된다.

벤질리덴아세톤의 세균성꽃마름병 방제효과를 조사하기 위하여, 살균된 토양에 *R. solanacearum*과 벤질리덴아세톤을 섞은 후 감자 유묘를 이식하였다(Fig. 3). *R. solanacearum*만 처리된 토양에 심겨진 감자는 50% 이상의 감자에서 잎이 시들고 줄기가 검게 괴사하는 꽃마름병 증상을 보였다. 그러나 1,000 ppm의 벤질리덴아세톤이 처리된 토양에서는 그 절반 수준으로 병 발생이 억제되었다.

*R. solanacearum*은 200종 이상의 광범위한 식물에 꽃마름병을 일으키는 대표적인 토양 전염성 물관병균의 하나이다 (Guidot 등, 2009). 한국에서도 감자, 토마토, 고추, 담배, 참깨, 가지 등 많은 경제작물에서 매년 피해가 발생하고 있다

Table 1. Control efficacy of two eicosanoid biosynthesis inhibitors against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in apple orchard at Andong, Gyeongbuk, Korea. Benzylideneacetone (BZA) and Pro-Tyr (PY) were used for the test chemicals. Spirodiclofen (SPC) was a commercial product (Bayer, Seoul, Korea) and used for control treatment. Each treatment was replicated thrice with a randomized block design. Each replication consisted of more than 50 adults at a chemical treatment.

Test chemicals	Dose (ppm)	3 DAT		7 DAT	
		Survival (%) ¹	Control efficacy (%)	Survival (%)	Control efficacy (%)
BZA	1,000	73.5 ± 7.7 ^{ab}	56.0	124.0 ± 56.6 ^b	77.1
PY	1,000	78.7 ± 16.7 ^{ab}	52.9	371.4 ± 88.2 ^{ab}	31.4
SPC	1,000	60.1 ± 18.9 ^b	64.1	225.9 ± 172.3 ^b	58.3
Untreated	-	167.2 ± 106.2 ^a	-	541.6 ± 362.8 ^a	-

¹Different letters following standard deviations indicate significant differences among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

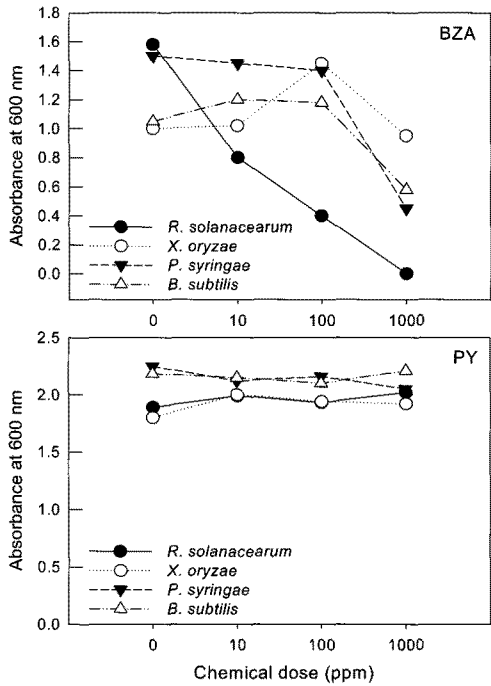


Fig. 2. Effect of benzylideneacetone (BZA) and Pro-Tyr (PY) on bacterial growth for 48 h at 28°C. 40 µl of each bacterial suspension was inoculated in 40 ml of TSB contained 1,000 ppm of BZA. The bacterial populations were monitored by absorbance at 600 nm.

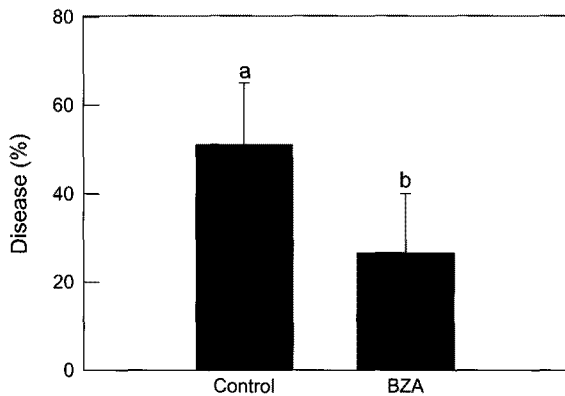


Fig. 3. Control effect of benzylideneacetone (BZA) on the occurrence of a bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on potato plants in semi-field condition. Each sterilized soil (350 g) was contaminated with 15 ml of the bacterial suspension (1.4×10^6 cfu/ml) and 20 ml of BZA solution (1,000 ppm) in a pot, at which a potato plant (about 20 cm height) was planted. Each treatment consisted of 15 pots and replicated thrice. Different letters above standard deviation indicate significant difference between treatments at Type I error = 0.05 (LSD test).

(김 등, 1998; 이, 2005; 이와 임, 2007). 그러나 대부분의 토양전염성세균병과 마찬가지로 이 병에 대해서도 아직 효과적인 방제 약제가 보급되고 있지 못한 실정이다. 이 연구결과는

점박이응애와 더불어 세균성꽃마름병 방제를 위해 벤질리덴 아세톤을 이용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 2009년도 아젠다 사업 지원으로 수행되었다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Guidot, A., M. Elbaz, S. Carrère, M.I. Siri, M.J. Pianzola, P. Prior and C. Boucher (2009) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathol.* 99:1105~1112.

Forst, S.B., N. Dows, N. Boemare and E. Stackebrandt (1997) *Xenorhabdus* and *Heterorhabdus* spp: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:47~72.

Ji, D., Y. Yi, G.H. Kang, Y.H. Choi, P. Kim, N.I. Baek and Y. Kim (2004) Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 239:241~248.

Kanost, M.R., H. Jiang and X. Yu (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insects, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 198:97~105.

Kaya, H.K. and R. Gaugler (1993) Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38:181~206.

Kwon, S. and Y. Kim (2008) Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 101:36~41.

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.

Park, Y., Y. Kim and Y. Yi (1999) Identification and characterization of a symbiotic bacterium associated with *Steinernema carpocapsae* in Korea. *J. Asia Pac. Entomol.* 2:105~111.

Raymond, M. (1985) Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22:117~121.

Shrestha, S. and Y. Kim (2008) Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Physiol.* 38:99~112.

Shrestha, S. and Y. Kim (2009) Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*

- 73:(인쇄중).
- Stanley, D. (2006) Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annu. Rev. Entomol.* 51:25~44.
- Stanley, D.W. and J.S. Miller (2006) Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 119:1~13.
- Webster, J.M., G. Chen and J. Li (1998) Parasitic worms: an ally in the war against the superbugs. *Parasitol. Today* 14:161~163.
- 김지영, 이영근, 송유한 (1998) 경북지역 시설원예작물의 병해발생 상황. *한식병지* 14:41~45.
- 이영근 (2005) 식물세균병학 사전. *안동대학교 농업과학기술연구소*. 205pp.
- 이영근, 임영구 (2007) 2005-2006년도 경북지역 담배 병 발생상황. *식물병연구* 13:1~5.

아이코사노이드 생합성 저해제인 벤질리덴아세톤의 점박이응애(*Tetranychus urticae*)와 세균성꽃마름병 세균(*Ralstonia solanacearum*)에 대한 억제효과

박예슬 · 김민제 · 이건형¹ · 천원수 · 이영근 · 김용균*

안동대학교 생명자원과학부, ¹(주)나비스

요 약 모노터펜의 일종인 벤질리덴아세톤은 곤충병원세균인 *Xenorhabdus nematophila*의 대사산물이다. 이 물질의 주요 생물활성은 인지질 분해효소인 phospholipase A₂를 억제하는 것이다. 이 효소는 아이코사노이드 생합성 반응의 최초 결정단계를 촉매하는 것으로 이 아이코사노이드는 곤충의 면역 반응을 증대하는데 중요하다. 본 연구는 벤질리덴아세톤을 점박이응애(*Tetranychus urticae*)에 처리하였고, 이 물질의 농도 증가에 따라 응애의 치사율이 높아지는 실내 생물검정 결과를 얻었다. 이에 따라 야외 사과원에 피해를 주는 점박이응애 집단에 처리한 결과 현재 상용화하고 있는 살비제와 비교하여 같은 수준의 살비효과를 나타냈다. 벤질리덴아세톤은 또한 3종의 식물병원세균 배양액에 첨가한 경우 이들 세균의 성장을 억제하였다. 특히 세균성꽃마름병을 일으키는 *Ralstonia solanacearum*에 대해서 현격한 억제효과가 나타났다. 이 세균 균주는 어린 감자묘에 병원성을 나타냈으며, 벤질리덴아세톤은 이 병 발생을 억제시켰다. 이 연구결과는 벤질리덴아세톤이 응애와 식물병 세균을 방제하는 데 새로운 작물보호제로서 개발될 수 있다고 제시한다.

색인어 벤질리덴아세톤, 점박이응애, 아이코사노이드, 인지질, 세균성꽃마름병, 생물검정