

## 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila*) 유래물질의 톱다리개미허리노린재(*Riptortus clavatus*) 장내세균 증식억제 및 살충효과

서삼열 · 김용균\*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

### Antibiotic and Insecticidal Activities of Metabolites Derived From an Entomopathogenic Bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, Against The Bean Bug, *Riptortus clavatus*

Samyeol Seo and Yonggyun Kim\*

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

**ABSTRACT:** A bacterial colony was isolated from the gut of the bean bug, *Riptortus clavatus*. From morphological and biochemical tests, the bacterial isolate showed the highest similarity to *Staphylococcus succinus*. DNA sequence of 16S rRNA gene of the bacterium supported the identification. Oral administration of penicillin G to adults of *R. clavatus* gave a dose-dependent mortality of adults of *R. clavatus* to adults along with significant decrease of the bacterial population in the gut. Similarly, three metabolites (benzylideneacetone, proline-tyrosine, and acetylated phenylalanine-glycine-valine) derived from an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, also inhibited growth of the gut bacterial population and gave significant mortalities to *R. clavatus*. These results suggest that a gut bacterial population classified as *Staphylococcus* sp. is required for survival of *R. clavatus* and that the three bacterial metabolites had toxic effects on the bugs due to their antibacterial properties.

**Key words:** benzylideneacetone, *Xenorhabdus nematophila*, *Staphylococcus*, 16S rRNA, *Riptortus clavatus*

**초 록:** 톱다리개미허리노린재(*Riptortus clavatus*)의 장내세균이 분리되었다. 형태학적 분석과 생화학적 분석을 통하여 세균이 *Staphylococcus succinus*와 가장 유사한 것으로 동정되었다. 16S rRNA 유전자의 염기서열은 이러한 동정 결과를 뒷받침했다. 페니실린G를 톱다리개미허리노린재 성충에게 경구투여 하였을 때 장내세균 밀도 감소와 치사 효과를 유발하였다. 동일한 방법으로 곤충병원세균(*Xenorhabdus nematophila*)의 세 가지 대사물질(benzylideneacetone, proline-tyrosine, and acetylated phenylalanine-glycine-valine)을 처리하였을 때, 톱다리개미허리노린재 장내세균의 밀도감소와 치사효과를 확인하였다. 이러한 결과는 톱다리개미허리노린재의 장내세균이 *Staphylococcus* sp.이며, 곤충병원세균 대사물질의 항균 활성이 장내세균과 궁극적으로 톱다리개미허리노린재의 생존에 영향을 미친다는 것을 제시하였다.

**검색어:** 벤질리덴아세톤, 제노랍두스 네마토틸라, 16S rRNA, 톱다리개미허리노린재

*Xenorhabdus*와 *Photorhabdus*는 곤충병원세균으로 운동성이 있는 그람음성의 장내세균에 속한다(Akhurst, 1980). 이들 세균류는 곤충병원선충인 Steinernematidae와 Heterorhabditidae의 두 과에 각각 공생하는 생활사를 보인다(Kaya

and Gaugler, 1993). 이들 선충은 상이한 발생 기원을 가지지만, 수렴성 진화 과정을 통해 유사한 기생 생활환을 보이는 것으로 추정된다(Adams and Nguyen, 2002). 운동성이 있는 감염태 선충이 기주를 찾으면 곤충의 개구부를 통하여 체내로 들어가고 이후 상피세포층을 뚫고 곤충의 혈강으로 침투하게 된다. 혈강에 침입한 감염태 선충은 자신의 특이적 장내 공생세균을 곤충 혈강으로 배출한다(Forst *et al.*,

\*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received August 17 2010; revised August 31 2010;  
accepted September 6 2010

1997). 혈장으로 나온 세균은 자신과 선충기주를 보호하기 위해 대상 곤충의 면역을 억제시킨다(Park and Kim, 2000). 면역기능이 억제된 곤충은 체내에서 세균증식이 이뤄지면서 세균으로부터 나오는 독소단백질과 더불어 대상 곤충의 패혈증을 유발하여 치사시키게 된다(Dunphy and Webster, 1991, 1994; French-Constant *et al.*, 2005). 또한 치사된 곤충 체내에서 타 미생물의 제2차 감염을 막기 위해 이들 세균들은 다양한 항생물질을 배출하여 자신의 단일 세균 상을 이루게 한다(Forst *et al.*, 1997).

곤충병원세균인 *X. nematophila* 배양액에서 유기용매추출법을 통하여 분리된 물질인 benzylideneacetone (BZA), proline-tyrosine (PY), acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)은 아이코사노이드 생합성을 억제하며 곤충의 면역억제를 유도하였다(Ji *et al.*, 2004; Kwon and Kim, 2008; Shrestha and Kim, 2009). 아이코사노이드는 다양한 병원미생물에 대해서 혈구세포에 의한 포식작용 및 소낭형성의 세포성 면역 반응과 다양한 항생펩타이드 작용으로 비롯되는 체액성 면역 반응을 매개하는 면역중개자이다(Stanley and Miller, 2006; Shrestha and Kim, 2009). 세포성면역반응의 경우 대부분 혈장의 페놀옥시다아제의 활성에 의존한 펄라닌형성 반응에 의존하게 되는데(Kanost *et al.*, 2004), 아이코사노이드는 이 효소의 초기 활성화에 작용하는 것으로 밝혀졌다(Shrestha and 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 면역반응을 억제하여 대상 곤충의 면역저하를 유발하게 된다.

노린재류는 산림의 낙엽 속, 상록수 등의 나무 가지와 조피 사이, 농작물의 잔재물 속에서 성충으로 월동하여 대체로 이듬해 4월 월동에서 깨어나 봄철에 열매를 맺는 화본과 및 두류작물과 유실수 등에서 필요한 양분을 섭취하고 개체군의 밀도를 증식시키고, 7월 이후에는 주변의 두류, 참깨 및 과수 등으로 이동하여 작물 수확기까지 개체군 증식과 더불어 작물에 지속적인 피해를 주게 된다(Chung *et al.*, 1995; Son *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2005).

노린재류는 1990년대 중반까지만 해도 개체군의 발생량이 적어 농작물의 주요 해충으로 인식되지 않았으나, 2000년도 이후부터 발생량이 크게 증가하여 이들 노린재류를 관리하지 않으면 농작물의 정상적인 수확이 어려운 지경에 까지 이르게 되었다(Ha, 2004; Bae *et al.*, 2008). 콩을 가해하

는 주요 노린재는 호리허리노린재과(Alydidae)에 속하는 톱다리개미허리노린재(*Riptortus clavatus*)와 노린재과(Pentatomidae)에 속하는 가로줄노린재(*Piezodorus hybneri*), 풀색노린재(*Nezara antennata*), 일락수염노린재(*Dolycoris baccarum*) 및 썩덩나무노린재(*Halyomorpha halys*)를 들 수 있다(Bae *et al.*, 2005a,b). 콩은 노린재류가 가장 선호하는 기주식물의 하나로 여름철 노린재류의 가장 중요한 밀도 증식 장소이며, 콩 포장에서 증식된 노린재류가 주변의 작물로 이동하여 농작물의 피해를 가중시킴으로 콩 포장에서 발생하는 노린재류의 밀도관리가 매우 중요하다(Bae *et al.*, 2004). 톱다리개미허리노린재를 포함한 콩을 가해하는 주요 노린재류는 비교적 높은 이동성으로 약제를 살포하면 다른 곳으로 이동하였다가 일정시간 경과 후 다시 비래하여 가해한다(Lee *et al.*, 2002).

본 연구는 새로운 작물 보호제 개발 노력의 일환으로 곤충병원세균으로부터 유래된 세 가지 대사물질을 톱다리개미허리노린재(*R. clavatus*)에 적용하여 보기 위해 본 연구를 수행하였다. 선행 연구에서 세균 유래 물질들이 톱다리허리노린재의 생존에 위협을 주어 이 물질들의 살충기작에 관심을 갖게 했다. 이를 해결하기 위해 이들 물질의 특징을 고려하여 노린재 장내세균을 동정하였다. 장내세균의 톱다리개미허리노린재의 생존력에 미치는 영향을 분석하기 위해 일반 상용 항생제를 이용하여 처리하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구에서 분석하려는 세 가지 대사물질의 장내세균에 대한 살균력과 이에 따른 톱다리개미허리노린재에 대한 살충효과를 분석했다.

## 재료 및 방법

### 톱다리개미허리노린재의 사육

본 실험에 사용된 톱다리개미허리노린재는 2005년 안동 지역의 콩 포장에서 발생하는 약충과 성충을 채집한 야외충을 실내에서 누대 사육한 실내충이었다. 성충은 투명한 플라스틱 사각상자(50×50×50 cm)에 비타민 C (2 g/L)와 서리태(*Glycine max* (L.))를 먹이로 공급하였으며 약충은 2,000 ppm의 비타민 C와 강낭콩(*Pisum sativum*) 모종을 먹이로 공급하여 온도 25±1°C, 광주기 16:8 h (L:D), 상대습도 40~60%의 조건에서 사육했다.

### 장내세균 추출 및 증식

톱다리개미허리노린재의 성충을 에틸아세테이트(Sigma-

Aldrich Korea, Seoul, Korea) 숨이 담긴 밀폐용기에 넣어 마취시킨 후 톱다리개미허리노린재의 표면을 70% 에탄올을 이용하여 소독하였다. 이를 다시 파라핀배지 위에 가는 편을 이용하여 고정시켰으며 핀셋을 이용하여 복부 표피층을 제거하였다. 톱다리개미허리노린재의 중장을 떼어낸 후 인산완충용액(100 mM phosphate, 0.7% NaCl, pH 7.4)에 세척하였다. 세척된 중장 3개를 1 ml의 멸균수에 넣고 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 중장조직을 2,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 중장조직과 세균을 분리하였다. 분리된 세균은 Luria-Bertani 배지에 100 µl를 도말하여 28°C 배양기에서 12시간 배양하였다.

### 장내세균의 생화학적 동정

톱다리개미허리노린재의 장내세균의 탄소원 유용성을 미생물동정장치(Microplate reader, Biolog, Hayward, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석용 시료의 전처리하는 Biolog사에서 제시한 방법을 따랐다. Biolog universal growth medium+blood 배지를 이용하여 28°C에서 24시간동안 배양하여 세균을 분리하고 다시 63±3%로 희석하였다. 희석된 세균은 GN2 microplate에서 28°C에서 2일간 배양하였다.

### 장내세균의 주사전자현미경

#### (scanning electron microscope: SEM) 관찰

세균 현탁액( $2.8 \times 10^8$  cfu/ml)을 formvar-coated 격자판에 올려놓고 15초 뒤에 2% 우라닐아세테이트(Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 25분간 염색했다. 염색된 격자판을 주사전자현미경(JMS-6300, Jeol, Tokyo, Japan)을 이용하여 검정했다.

### 장내세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리된 세균을 LB배지에서 28°C, 12시간 동안 배양하였다. 배양한 세균 용액(20 ml)을 원심분리(14,000 rpm, 5분)하여 세균 층을 얻고, 다시 추출완충용액(10 mM Tris, 0.1 M EDTA, 20 µg/ml RNase, 0.5% SDS, pH 8.0)을 넣고 세균 세포막을 분해하였다. 다시 5 µl의 proteinase K (최종 농도 100 µg/ml)를 첨가하여 50°C 항온수조에서 10분간 반응시킨 후 Sambrook *et al.* (1989)에 기록된 페놀추출법과 에탄올침강법으로 세균의 genomic DNA (gDNA)를 분리했다. 분리된 gDNA를 바탕으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR) 프라이머를 사용하여 16S rDNA를 증폭시켰다(약 1.5 kb). 정방향과 역방향 프라이머

는 각각 5'-GAA GAG TTT GAT CAT GGC TC-3'와 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'을 사용하였다. PCR 반응물은 5 µl의 10x PCR buffer, 5 µl의 dNTP (2.5 mM), 2 µl의 25 pmol 정방향 프라이머, 2 µl의 25 pmol 역방향 프라이머, 1 µl의 중합효소(5 U/µl), 1 µl의 주형 DNA와 34 µl의 증류수를 혼합하였다. PCR (Multi Gene Gradient, Labnet international, NJ, USA) 조건은 94°C에서 1분, 52°C에서 40초, 72°C 1분 30초를 35회 순환시켰다. PCR 산물은 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI, USA)로 클로닝하였고 양방향 염기서열분석을 하였다. 모든 염기서열 분석은 DNA 염기서열 분석업체(Macrogen, Seoul, Korea)에 의뢰하였고, 염기서열 분석 자료는 DNASTAR (version 5.01 DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) 프로그램을 사용하여 정리하였다.

### 톱다리개미허리노린재에 대한 생물검정

*X. nematophila* 유래 물질인 BZA (Sigma-Aldrich Korea), PY (Peptron, Daejeon, Korea), Ac-FGV (Peptron)은 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Korea)를 이용하여 1,000 ~ 20,000 ppm의 농도로 조제되었으며 penicillin G (Sigma-Aldrich Korea)는 멸균수를 이용하여 5,000 ppm으로 희석하였다. 각각 희석된 시약은 톱다리개미허리노린재에 공급하기 전에 2,000 ppm의 비타민 C 용액과 혼합하였다. 톱다리개미허리노린재 성충을 사각상자(50×50×50 cm)에 10마리씩 넣고 3반복으로 처리하였으며 페트리디쉬(9×1.5 cm)에 탈지면을 넣고 탈지면이 촉촉이 젖을 정도로 처리약제를 분무하여 공급하였으며 5일간 약제를 지속적으로 공급하였다.

### 통계처리

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

## 결 과

### 톱다리개미허리노린재 장내 세균 동정

톱다리개미허리노린재 성충으로부터 소화관을 적출하였다(Fig. 1A). 중장은 크게 네 부분으로 나뉘어지며, 특별히 4번째 말단 중장 부위가 여러 개의 팽대 부위로 구성되었다. 장내 세균을 분리하기 위해 소화관 추출물을 영양배지에 도말하여 증식시켰다(Fig. 1B). 증식된 세균을 SEM으로

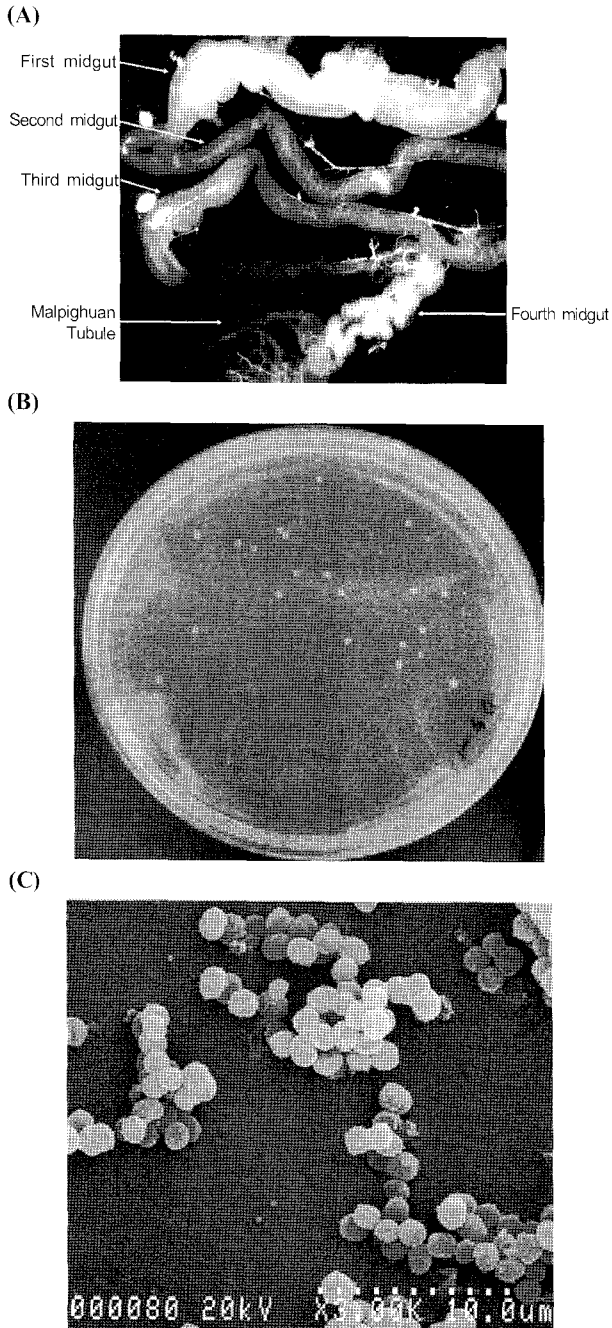


Fig. 1. A bacterial isolate from the intestine of *Riptortus clavatus* adults. (A) Digestive tract showing different areas of the midgut. (B) Bacterial colonies grown on LB medium for 12 h at 28°C. (C) A SEM photo of the bacterial isolates at 3,000x magnification (JSM-6300, SEM, Jeol, Tokyo, Japan).

검경한 결과 구균으로 나타났다(Fig. 1C). 분리된 구균을 대상으로 형태적 특징 및 탄소원 요구도에 따른 생화학적 분석을 한 결과 *Staphylococcus* 속에 속하는 세균 종과 동일한 특성을 나타냈다(Table 1).

형태 및 생화학적 형질로 분석된 동정 결과를 뒷받침하기

Table 1. Biochemical characters of a bacterial isolate from the gut of *Riptortus clavatus*

Characters	Isolate	<i>S. succinus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. equum</i>
Gram test	+	+	+	+
Growth in:				
0-05 $\mu$ g bacitracin ml <sup>-1</sup>	+	+	+	+
40% bile	+	+	-	+/-
1-6 $\mu$ g novobiocin ml <sup>-1</sup>	+	+	+	+
Optochin	+	+	+	+
Reduction of				
Nitrate	-	-	+	+
Glycosidase (PGR)	+	+	+	-
Glycosidase (PGT)	+	+	+	+/-
Phosphatase	+	+	+	+/-
Pyrrolidonase	-	-	+/-	-
Voges-Proskauer test	-	-	+/-	-
Hydrolysis of				
Arginine	-	-	-	-
Indoxyl phosphate	+	+	-	-
Production of				
Urease	+	+	+	+/-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-
Fermentation of				
Raffinose	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	-
Mannose	+	+	+/-	-
Lactose	+	+	+/-	-
similarity with isolate (%)	-	100	85	70

위해 이 세균의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 결정하였다(Fig. 2A). GenBank에 등록된 세균을 16S rRNA 염기서열과 비교하여 본 결과 톱다리개미허리노린재 장내에서 분리된 세균은 *S. succinus*와 가장 유사도가 높은 것으로 나타났다(Fig. 2B).

#### 장내세균과 톱다리개미허리노린재 생존력

톱다리개미허리노린재 소화관에서 분리된 *Staphylococcus* sp.는 항생제인 penicillin G에 대해서 감수성을 보였다(미보고자료). 이에 따라 서로 다른 농도의 penicillin G를 톱다리개미허리노린재에 섭식 처리하였다. 항생제의 농도가 높아짐에 따라 톱다리개미허리노린재의 생존율은 낮아졌다(Fig. 3A). 이러한 생존율 변화를 본 항생제의 표적인 장내세

(A)

GAAGAGTTTG ATCATGGCTC AGGATGAACG CTGGCGGCGT GCCTAATACA TGCAAGTCGA 60  
 GCGAACGGAT AAGGAGCTTG CTCCTTTGAA GTTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTGG 120  
 GTAACCTACC TATAAGACTG GAATAACTTC GGGAAACCGG AGCCAATGCC GGATAACATA 180  
 TAGAACCGCA TGGTCTATA GTGAAAGATG GTTTTGCTAT CACTTATAGA TGGACCCGCG 240  
 CCGTATTAGC TAGTTGGTAA GGTAAAGGCT TACCAAGGCG ACGATACGTA GCCGACCTGA 300  
 GAGGGTGATC GGCCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT 360  
 AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT 420  
 TTTTCGGATCG TAAACTCTG TTATTAGGGA AGAACAAATG CGTAAGTAAC TGTGCGCATC 480  
 TTGACGGTAC CTAATCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT 540  
 AGGTGGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG CGTAAAGCGC GCGTAGGCGG TTTCTTAAGT 600  
 CTGATGTGAA AGCCACGGC TCAACCGTGG AGGGTCATTG GAAACTGGGA AACTTGAGTG 660  
 CAGAAGAGGA AAGTGGAATT CCATGTGTAG CCGTAAAATG CGCAGAGATA TGGAGGAACA 720  
 CCAGTGGCGA AGGCGACTTT CTGGTCTGTA ACTGACGCTG ATGTGCGAAA GCGTGGGGAT 780  
 CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG ATGAGTGCTA AGTGTTAGGG 840  
 GTTTTCCGCC CCTTAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAC TCCGCCTGGG GAGTACGACC 900  
 GCAAGGTTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GACCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT 960  
 AATTCGAAGC AACCGAAGA ACCTTACCAA ATCTTGACAT CCTTTGAAAA CTCTAGAGAT 1020  
 AGAGCCTTCC CCTTCGGGGG ACAAAAGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCTG CAGCTCGTGT 1080  
 CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCC TAACTTAGT TGCCATCATT 1140  
 AAGTTGGGCA CTCTAGGTTG ACTGCCGGTG ACAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA 1200  
 AATCATCATG CCCCTTATGA TTTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGACAA TACAAAGGGC 1260  
 AGCTAAACCG CGAGGTCATG CAAATCCCAT AAAGTTGTTT TCAGTTCGGA TTGTAGTCTG 1320  
 CAACTCGACT ACATGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGTAG ATCAGCATGC TACGGTGAAT 1380  
 ACGTTCCCGG GTCTTGTACA CACCGCCCGT CACACCACGA GAGTTTGTA CACCCGAAGC 1440  
 CCGTGGAGTA ACCATTTATG GAGCTAGCCG TCGAAGGTGG GACAAATGAT TGGGGTGAAG 1500  
 TCGTAACAAG GTAGCCGTAT CGGAAGGTGC GGCTGGATCA CCTCCTT 1547

(B)

Bacteria	NCBI Access number	Analyzed sequence (bp)	Nucleotide identity (%)	Nucleotide gaps (%)	Match score (bits)	E value
<i>Staphylococcus succinus</i>	AF004219.1	1536	99	0	2837	0
<i>S. succinus sp. succinus</i>	NR_028667.1	1536	99	0	2837	0
Bacterium daSW.24	EU935321.1	1478	98	0	2730	0
Bacterium G24	AY345395.1	1470	99	0	2715	0
Bacterium ID4404	EU660431.1	1460	98	0	2697	0

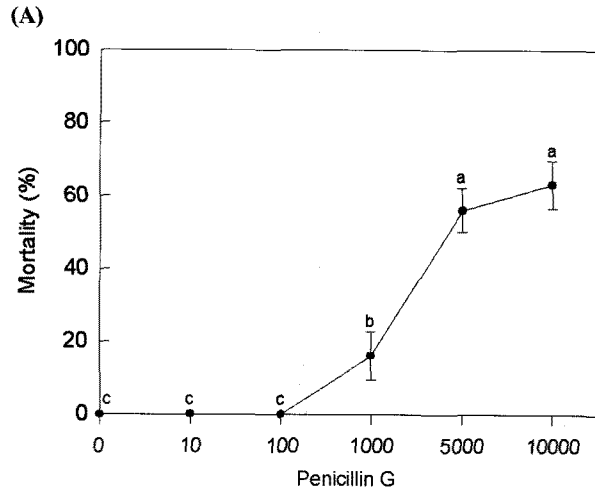
Fig. 2. Identification of a bacterial isolate of the intestine of *Riptortus clavatus* adults using 16S rRNA gene sequence. (A) The nucleotide sequence (accession number of NCBI Genbank: HQ018602). (B) Blast result of the nucleotide sequence.

균의 밀도 저하에서 비롯되었는지 알아보기 위해 5,000 ppm의 penicillin G에 처리된 노린재 성충의 소화관을 분리해 본 결과 대조구에 비해 현격하게 줄어든 세균 밀도를 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

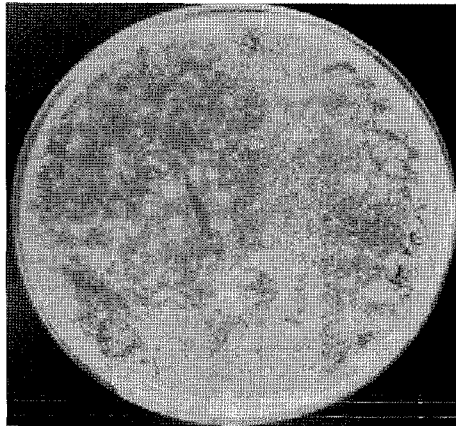
*X. nematophila* 유래 물질의 톱다리개미허리노린재

살충효과

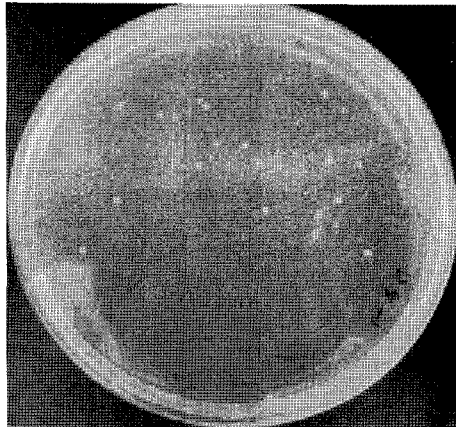
곤충병원세균인 *X. nematophila* 배양액으로부터 유래된 세 가지 물질인 BZA, PY, Ac-FGV의 톱다리개미허리노린재 성충에 대한 경구독성을 분석하였다(Fig. 4). 세 물질 모두 농도에 따른 살충력 증가를 나타냈고( $F = 15.5$ ;  $df = 5, 36$ ;  $P < 0.0001$ ), 10,000 ppm 이상 처리에서는 100%의



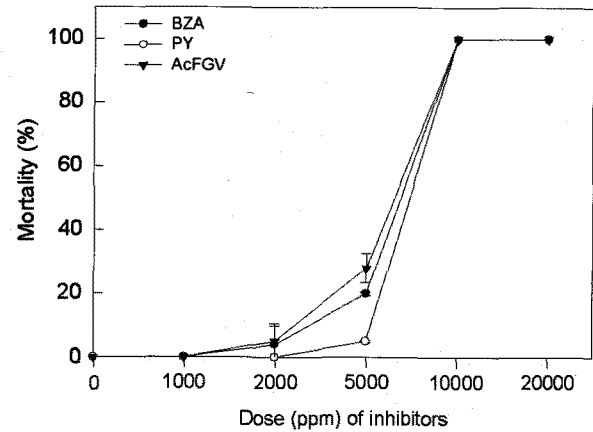
(B) 0 ppm



(C) 5,000 ppm



**Fig. 3.** Effect of penicillin G on survival of *Riptortus clavatus* adults and their intestinal bacterial population. (A) *Per os* administration of different concentrations of penicillin G. Mortality was measured at 4 days after the bacterial administration. Each treatment was replicated three times. Each replication consisted of 10 bugs. Different letters above standard deviations bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Effect of penicillin G (5,000 ppm) administration on the intentional bacterial population growth. The bacteria were cultured on LB medium for 12 h at 28°C.

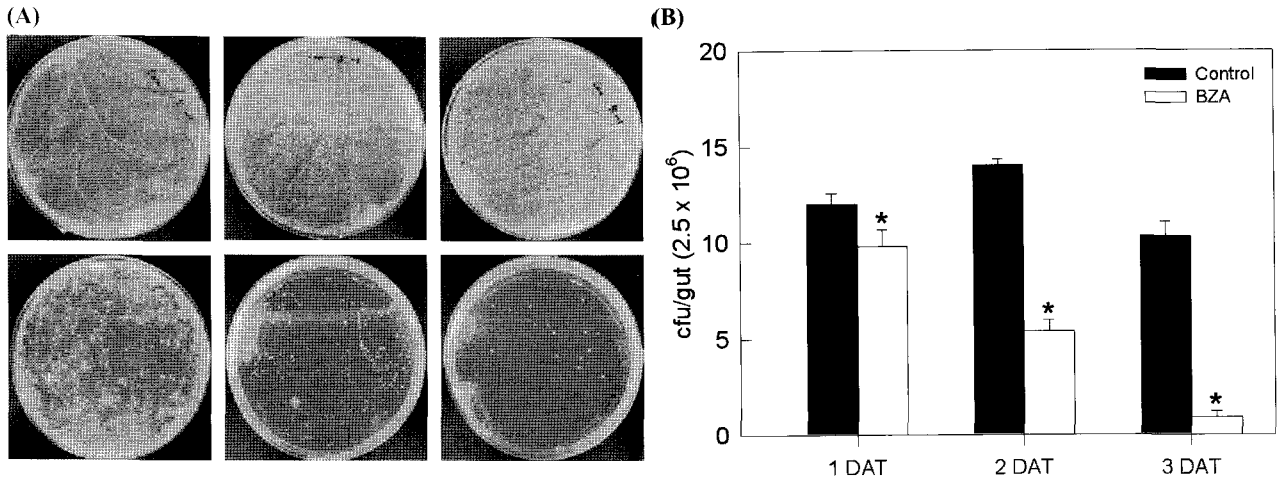


**Fig. 4.** Insecticidal activity of three bacterial metabolites (benzylideneacetone (BZA), proline-tyrosine (PY), and acetylated phenylalanine-glycine-valine (Ac-FGV)) against *Riptortus clavatus* adults. These compounds were *per os* administered to the adults. Mortality was measured at 4 days after the initial treatment. Each treatment was replicated three times. Each replication consisted of 10 bugs. Error bars indicate standard deviations.

살충효과를 보였다. 그러나 이들 세 물질 사이에 톱다리개미허리노린재에 미치는 살충력에 있어서는 동일하지 않았다 ( $F = 2402.04$ ;  $df = 2, 36$ ;  $P < 0.0001$ ). 이러한 살충효과가 이들 물질의 장내세균에 대한 항생 효과에서 유래되었는지 알아보기 위해 5,000 ppm의 BZA를 이용하여 처리 후 시간 별로 장내 세균 밀도를 측정하였다(Fig. 5). 처리 후 시기에 따라 대조구는 세균 밀도 변화가 없지만, BZA 처리구는 처리시간이 진행함에 따라 장내세균 밀도가 현격하게 낮아졌다(Fig. 5B).

## 고찰

본 연구 결과는 톱다리개미허리노린재에 대해 항생물질을 경구 처리하였을 때 장내세균의 증식을 억제하여 톱다리개미허리노린재를 치사시킬 수 있는 것으로 나타났다. 즉, 톱다리개미허리노린재의 장내세균에 널리 알려진 그람양성균의 항생물질인 penicillin G를 처리하였을 때 장내세균의 증식 억제를 보였고 톱다리개미허리노린재에 대해 살충력이 나타나는 것을 확인하였다. 곤충병원세균인 *X. nematophila*의 세 가지 대사물질인 BZA와 PY 그리고 Ac-FGV를 처리하였을 때, 5,000 ppm 이상의 농도에서 세균의 성장을 억제하는 것으로 나타났으며 결국 톱다리개미허리노린재를 치사시키는 것으로 나타났다. *X. nematophila*는 항생물질을 분비하는 세균으로 잘 알려져 있으며(Forst



**Fig. 5.** Bactericidal activity of benzylideneacetone (BZA 5,000 ppm) against the intentional bacterial population of *Riptortus clavatus* adults. BZA was *per os* administrated to the adults. (A) Change of the intestinal bacterial population at different days after treatment (DAT). The bacterial extracts were cultured on LB medium for 12 h at 28°C. (B) Quantitative analysis of the intentional bacterial population. Each treatment was independently replicated three times. Each replication consisted of 10 intestines. asterisks indicate significant difference at Type I error = 0.05 (LSD test) between control and BZA treatment in each DAT.

*et al.*, 1997), 선행연구에서도 식물병원성 세균인 *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* 의 3개 균주에 대해서 세균생장억제 효과를 나타냈다(Park *et al.*, 2009). 톱다리개미허리노린재의 장내세균으로 *Burkholderia* 종이 보고되었고(Kikuchi *et al.*, 2005), *Staphylococcus* 공생균은 본 연구에서 처음으로 보고된다. *Staphylococcus* 속에 속하는 세균류가 응애류(*Dermanyssus gallinae*), 나방류(*Manduca sexta*) 증장 및 흰개미류 소화관에서 발견되었다(Eutick *et al.*, 1978; van der Hoeven *et al.*, 2008; Valiente Moro *et al.*, 2009).

본 연구에서 보듯 톱다리개미허리노린재의 증장 구조는 세분화되어 있으며, 특별히 말단 부위의 증장 구조는 팽배 구조를 이뤄 미생물이 서식할 수 있는 공간으로 알려지고 있다(Kikuchi *et al.*, 2005). 톱다리개미허리노린재와 같은 속에 속하는 호리허리노린재(*Leptocorisa chinensis*)는 모두 Proteobacteria 세균강의  $\beta$  분류군에 속하는 *Burkholderia* sp. 종을 공생균으로 갖는 것으로 보고하였다(Kikuchi *et al.*, 2005). 간균 모양으로 본 연구에서 분리한 세균의 구균 모습과 쉽게 구분될 수 있다. 흥미롭게도 본 연구에서 사용한 노린재류 증장에서는 *Burkholderia* 종이 발견되지 않았다. 이들 노린재류에서 *Burkholderia* 종은 세대간 전파라기 보다는 개체간 또는 중간 수평전파로 장내 공생체를 이루는 것으로 밝혀졌다(Kikuchi *et al.*, 2007). 따라서 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 노린재 집단이 *Burkholderia* 보다는

*Staphylococcus*를 공생균으로 획득했을 가능성을 제시하고 있다. 이들의 공생균 획득에 대한 정확한 기작이 밝혀져 있지 않아 이들의 구분된 세균 공생종의 차이점을 현재로서 본 연구 결과만으로 설명하기 어렵다.

본 연구에서 동정된 *Staphylococcus* sp.에 대해 항균활성을 나타낸 물질인 BZA와 이와 유사한 화학구조의 PY 그리고 Ac-FGV는 곤충병원세균인 *X. nematophila*의 배양액에서 분리되었다(Ji *et al.*, 2004). BZA은 아이코사노이드 생합성을 촉매하는 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)를 억제하며 파밤나방(*Spodoptera exigua*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 면역억제를 유도하였다(Kwon and Kim, 2008). 아이코사노이드는 다양한 병원미생물에 대해서 혈구세포에 의한 포식 작용 및 소낭형성의 세포성 면역 반응과 다양한 항생펩타이드 작용으로 비롯되는 체액성 면역 반응 모두를 매개하게 된다(Stanley and Miller, 2006; Shrestha and Kim, 2009). 세포성면역반응의 경우 대부분 혈장의 페놀옥시다아제의 활성화에 의존한 멜라닌형성 반응에 의존하게 되는데(Kanost *et al.*, 2004), 아이코사노이드는 이 효소의 초기 활성화에 작용하는 것으로 밝혀졌다(Shrestha and 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 면역반응을 억제하여 대상 곤충의 면역저하를 유발하게 된다. 그러나 본 연구에서 보여준 항세균 효과는

이러한 아이코사노이드 생합성 억제 효과로서 설명하기 어렵다. 유사한 세균으로 *Photorhabdus luminescens*는 BZA와 유사한 stilbene 구조의 대사 화합물을 생성하여 분비하는 데 이 물질이 살균 효과를 갖는 것으로 나타났다 (Li *et al.*, 1995). 그러나 이러한 물질들이 구체적으로 세균의 증식을 억제하는 기작은 아직 밝혀져 있지 않다.

이상의 연구 결과는 곤충병원세균인 *X. nematophila*에서 추출된 대사물질인 BZA 와 PY 그리고 Ac-FGV는 항생물질 및 곤충의 면역을 저하시키는 물질이 포함되었으며, 이 물질이 톱다리개미허리노린재의 장내세균인 *Streptococcus* sp.의 성장을 억제시키며 결국 톱다리개미허리노린재를 치사시킬 수 있다는 것을 제시한다. 또한 본 연구 난방제 해충인 톱다리개미허리노린재들의 대한 방제방법을 보여주었으며, 톱다리개미허리노린재 이외의 다양한 종의 노린재에 대해서 새로운 농약으로 개발될 수 있을 것으로 사료된다. 이들 약제의 구체적 살충 기작을 밝히기 위해서는 톱다리개미허리노린재의 생존력에 미치는 이 장내 세균의 영양학적 보조 역할에 대한 연구가 필요하다.

## 사 사

본 연구는 2010년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 화학농약 대체기술)으로부터 지원받아 수행하였다. 본 연구 사업 기간 동안 서삼열은 교육과학기술부의 2단계 BK21사업을 통해 지원받았다.

## Literature Cited

- Adams, B.J. and K.B. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. pp. 1-33. In Entomopathogenic nematology, ed. by R. Gaugler. CABI Publishing, New York.
- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121: 303-309.
- Bae, S.D., H.J. Kim, J.K. Park, J.K. Jung and H.J. Cho. 2004. Effects of food combinations of leguminous seeds on nymphal development, adult longevity and oviposition of bean bug, *Riptortus clavatus* Thunberg. Kor. J. Appl. Entomol. 43: 123-127.
- Bae, S.D., H.J. Kim, C.G. Park, G.H. Lee, S.T. Park and Y.H. Song. 2005a. Reproductive rate of one-banded stink bug, *Piezodorus hybneri* Linnaeus (Hemiptera: Pentatomidae) in various rearing cages. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 293-298.
- Bae, S.D., H.J. Kim, C.G. Park, G.H. Lee and S.T. Park. 2005b. The development and oviposition of bean bug, *Riptortus clavatus* Thunberg (Hemiptera: Alydidae) at temperature conditions. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 325-330.
- Bae, S.D., H.J. Kim, G.H. Lee and S.T. Park. 2008. Development of observation methods for density of stink bugs in soybean field. Kor. J. Appl. Entomol. 46: 153-158.
- Chung, B.K., S.W. Kang and J.H. Kwon. 1995. Damages, occurrences and control of hemipterous insects in non-astringent persimmon orchards. RDA. J. Agri. Sci. 37: 376-382.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1991. Antihemolytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dukki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 58: 40-51.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1994. Interaction of *Xenorhabdus nematophila* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 30: 883-889.
- Eutick, M.L., R.W. O'Brien and M. Slaytor. 1978. Bacteria from the gut of Australian termites. Appl. Environ. Microbiol. 35: 823-828.
- French-Constant, R.H., N. Waterfield and P. Daborn. 2005. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. pp. 239-253. In Comprehensive molecular insect science, eds. by L.I. Gilbert, I. Kostas and S.S. Gill. Elsevier, New York.
- Forst, S. B. Dedos, N. Boemare and E. Stackebrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annu. Rev. Microbiol. 51: 47-72.
- Ha, K.S. 2004. Damages of hemipterous insects on major cultivated soybean cultivars in Gangwon province. Kor. Soyb. Digest 21: 1-5.
- Hu, H.S., W. Huh, S.D. Bae and C.G. Park. 2005. Seasonal occurrence and ovarian development of bean bug, *Riptortus clavatus*. Kor. J. Appl. Entomol. 44: 199-205.
- 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.
- Lee, K.C., C.H. Kang, D.W. Lee, S.M. Lee, C.G. Park and H.Y. Choo. 2002. Seasonal occurrence trends of hemipteran bug pests monitored by mercury light and aggregation pheromone traps in sweet persimmon orchards. Kor. J. Appl. Entomol. 41: 233-238.
- Li, J., G. Chen, H. Wu and J.M. Webster. 1995. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4329-4333.
- Park, Y. and Y. Kim. 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., M. Kim, G. Lee, W. Chun, Y. Lee and Y. Kim. 2009. Inhibitory effects of an eicosanoid biosynthesis inhibitor, benzylideneacetone, against two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and a bacterial wilt-causing pathogen, *Ralstonia solanacearum*. Kor. J. Appl. Entomol. 13: 185-189.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Society. 164 pp. St. Paul, MN, USA.
- SAS Institute, Inc. 1989. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2008. Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. Insect Biochem. Mol. Biol. 38: 99-112.
- Shrestha, S. and Y. Kim. 2009. Biochemical characteristics of immune-associated phospholipase A<sub>2</sub> and its inhibition by an entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*. J. Microbiol. 47: 774-782.
- Son, C.K., S.G. Park, Y.H. Hwang and B.S. Choi. 2000. Field occurrence of stink bug and its damage in soybean. Kor. J. Crop Sci. 45: 405-410.
- Stanley, D.W. and J.S. Miller. 2006. Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. Entomol. Exp. Appl. 119: 1-13.
- Stanley, D. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. Annu. Rev. Entomol. 51: 25-44.
- Kikuchi, Y., T. Hosokawa and T. Fukatsu. 2007. Insect-microbe mutualism without a vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. Appl. Environ. Microbiol. 73: 4308-4316.
- Kikuchi, Y., X.Y. Meng and T. Fukatsu. 2005. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocorisca shinensis* (Heteroptera: Alydidae). Appl. Environ. Microbiol. 71: 4035-4043.
- Valiente Moro, C., J. Thioulouse, C. Chauve, P. Normand and L. Zenner. 2009. Bacterial taxa associated with the hematophagous mite *Dermanyssus gallinae* detected by 16S rRNA PCR amplification and TTGE fingerprinting. Res. Microbiol. 160: 63-70.
- van der Hoeven, R., G. Betrabet and S. Forst. 2008. Characterization of the gut bacterial community in *Manduca sexta* and effect of antibiotics on bacterial diversity and nematode reproduction. FEMS Microbiol. Lett. 286: 249-256.