

스트레스 음파 처리에 따른 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)의 발육 교란 및 살충 효과

석정균 · 강택준¹ · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원

(2010년 11월 05일 접수, 2010년 11월 21일 수리)

Sound Stress Induces Developmental Alterations and Enhances Insecticide Susceptibility in the Green Peach Aphid, *Myzus persicae*

Jeonggyun Seok, Taekjun Kang¹, and Yonggyun Kim*

School of Bioresource Sciences, College of Natural Sciences, Andong National University, ¹National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration

Abstract

This study investigated effects of different sound frequencies on development and insecticide susceptibility of the green peach aphid, *Myzus persicae*. Under a constant sound intensity (95 dB), different frequency (0-5,000 Hz) sounds were treated on entire developmental period of the aphids. With increase of sound frequencies, nymphal to adult development of the aphids showed significant retardation and the females exhibited a significant decrease in fecundity. The greatest disrupting effects were induced by treatment of 5,000 Hz, which also caused marked change in protein expression of the aphids analysed by two dimensional electrophoresis. Sound frequencies above 2,000 Hz significantly increased susceptibility of the aphids against imidacloprid. This study clearly suggest that there is a stress sound, which can be sensed by *M. persicae* and induces its physiological alteration.

Key words Sound, Development, Imidacloprid, Susceptibility, *Myzus persicae*

서 론

접촉 또는 시각을 이용하는 통신 수단에 비해 소리 통신은 자극원 탐지능력이 떨어지고 에너지 비용이 높은 단점을 갖지만, 화학통신과 유사하게 송신자와 수신자 사이에 장애물 처리능력에서 우수하고 교신 범위가 비교적 넓은 특징을 지닌다(Alcock, 1979). 이러한 소리통신을 이용하는 곤충류를 살펴보면 잘 알려진 매미류 및 귀뚜라미류를 제외하고도 나방류 유충이 내는 찰각소리신호(Brown et al., 2007), 나방류 수컷의 초음파 휘파람소리(Nakano et al., 2009), 일부 노린

재류가 이용하는 진동음(Cockl et al., 2007) 및 벌구류의 마찰음(Claridge, 1985) 등 다양한 곤충 종류에서 나타나고 있다. 주변 매체를 두드리는 진동음을 제외하고 발생하는 곤충의 소리는 비교적 적은 체구에서 형성되기에 저주파 보다는 수 백~수 천 Hz의 주파수 범위가 가장 흔하다(Michelsen and Nocke, 1974). 이렇게 발생된 곤충의 소리는 종내 교미용, 경보용 및 천적으로부터 회피용 및 영역선호용으로 사용된다(Greenfield, 2002).

스트레스 음파에 대한 연구는 척추동물을 중심으로 연구되었다. 급성 스트레스음파에 대해서 스트레스성 무통각증(antinociception)을 유발하는 반면, 장시간 스트레스 음파 노출에 대해서는 반대로 만성통증(fibromyalgin) 또는 류마티

*연락처 : Tel. +82-84-820-5638, Fax. +82-84-820-6320

E-mail: hosanna@andong.ac.kr

스 관절염을 유발하게 된다(Khasar et al., 2005). 이러한 원인으로 실험용 쥐에게 스트레스 음파를 처리하면 뇌에 존재하며 신경전달물질의 합성을 전달하는 tryptophan hydroxylase의 활성을 제고시켰다(Singh et al., 1990; Corley et al., 1992). 곤충에 있어서도 박쥐가 내는 초음파는 밤나방류의 회피행동을 유발하는 스트레스 음파로 작용할 수 있고, 이러한 스트레스는 곤충의 신경계에 존재하는 아세틸콜린에스테라아제의 활성 변이와 연관되었다(Zha et al., 2008).

본 연구는 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)을 대상으로 다양한 주파수의 음파를 처리하여 나타나는 생리적 변화를 분석하였다. 소리의 세기를 일정하게 유지하고 0-5,000 Hz의 주파수 소리를 진딧물 전체 발육단계에 노출시켰다. 이후 초래되는 약충 발육 속도 및 성충의 번식력을 분석하였다. 또한 스트레스 음파에 대한 진딧물의 반응정도를 이차원 전기영동을 이용하여 전체 단백질 패턴 분석을 실시하였다. 끝으로 이 스트레스 음파가 살충제의 감수성에 미치는 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

공시충

복숭아혹진딧물은 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 분양을 받아 실험실에서 배추 잎을 기주로 하여 누대 사육하였다. 사육조건은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16:8 h (L:D) 조건에서 사육하였다.

음파 처리 및 약충 발육 기간

음파처리는 목재로 된 나무상자(45 x 45 x 90 cm)에 기기 내부에 소리 반향을 줄이기 위해 방음판을 부착시켰다. 음파발생기는 MP3기기(GT206, Green Teko, Inc., Suwon, Korea)를 이용하였고, 음파상자 상단에 스피커(GTS20, Green Teko)를 부착시켜 바닥을 향해 소리가 전달되게 했다. 전달되는 소리의 세기는 데시벨 측정기(Minilyzer ML1, NTI, Schaan, Switzerland)로 측정하여 상자 바닥에 닿는 소리가 95 dB이 되도록 고정시켰다. 이 바닥에 복숭아혹진딧물이 가해하는 배추잎(3.5 x 3.5 cm)을 올려놓고 실내온도 25°C 에서 0, 100, 315, 630, 1,000, 2,000 및 5,000 Hz의 음파를 24 시간 처리하였다. 각 반복은 10 마리로 각 처리당 3 반복으로 실험을 진행하였다. 약충발육 조사는 갓 부화한 1령 약충을 음파 처리 하에서 성충이 될 때까지의 기간으로 조사하였다.

이차원 전기영동분석

스트레스 음파(5,000 Hz)로 복숭아혹진딧물 성충을 24 시간 처리한 후 얻는 약 2 mL 분량의 진딧물로부터 전체 단백질을 추출되었다. 이 진딧물 시료를 추출완충용액(50 mM Tris, 30 mM NaCl, 0.02% NaN_3 , 0.01% SDS, 0.01% Igepal, 0.005% phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.005% proteinase inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea))에서 마쇄한 후 4°C 조건에서 16,000 g에서 15 분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 10% trichloroacetic acid에서 단백질을 침강시켜, 침전 단백질을 시료완충용액(8 M urea, 4% CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, IPG buffer pH 3-10, 40 mM dithiothreitol(DTT))으로 용해시켰다. 이 단백질의 양은 Bradford 분석법(Bradford, 1972)으로 정량화하였다.

이차원 전기영동은 Ettan IPGphor II IEF System(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용해 분석했다. 이때 isoelectric focusing(IEF)은 시료 단백질량을 300 μg 으로 고정하고 100 V에서 1시간 처리 후 500 V에서 1시간, 다시 1 kV에서 1 시간, 2 kV에서 2 시간, 4 kV에서 2 시간, 6 kV에서 1 시간, 8 kV에서 8시간 등 총 16 시간 진행했다. IEF 용 막대젤(13 cm, pH gradient 3-10, Immobiline Drystrip, GE Healthcare)을 이용하였다. 변성 SDS-PAGE로 진행하기 전에 IEF 막대젤은 SDS 평형완충용액(6 M urea, 75 mM Tri-HCl, pH 8.8, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue, 10 mg/mL DTT)에 15 분간 침지하였다. 비변성 조건에 포화된 IEF 막대젤은 0.7% agarose 용액으로 12.5% SDS-PAGE 젤에 부착되었다. 이후 10 mA/gel로 1 시간 전기영동이 실시되고 이후 25 mA/gel로 5 시간 추가로 단백질 분리가 실시되었다. 전기영동 후 젤은 silver 염색법(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 제조사의 사용 방법에 따라 분리 단백질이 검출되었다.

살충제 생물 검정

이미다클로프리드 수화제(Dongbu High Tech, Seoul, Korea)를 각 농도별로 희석하여 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액에 배추 잎(3.5 x 3.5 cm)을 10분간 침지시킨 후 여과지가 깔린 용기에서 5분간 건조시켰다. 각 배추잎에 복숭아혹진딧물 약충을 10마리씩 3반복으로 접종하였다. 접종된 배추잎을 서로 다른 주파수(0, 100, 315, 630, 1,000, 2,000, 5,000 Hz)에 처리하였다. 음파 처리는 25°C 에서 5일까지 지속되었으며 이후 생존율을 조사하였다.

통계분석

시험결과는 백분율을 자료로서 arcsine 변환 후 SAS의 PROC GLM(SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 반수치사약량(LC₅₀)은 probit 분석법(Raymond, 1985)을 이용하여 산출하였다. Sigma Plot 8.0을 이용하여 도식화하였다.

결 과

스트레스 음파의 약충 발육에 미치는 효과

다양한 음파주파수(0-5,000 Hz)를 진딧물 약충에 처리한 결과 발육에 영향을 주었다(Fig. 1). 처리 음파의 주파수가 증가함에 따라 성충까지의 발육기간이 지연되었다($F = 3.70$; $df = 6, 14$; $P = 0.0205$). 이러한 지연효과는 630 Hz 이상의 주파수에서 대조구에 비해 뚜렷하게 나타났다. 또한 이러한 스트레스 음파는 복숭아혹진딧물의 증식율에도 영향을 주어 2,000 Hz 이상의 주파수에서는 대조구에 비해 현저히 낮은 증식율($F = 3.45$; $df = 6, 14$; $P = 0.0263$)을 기록했다(Fig. 2).

스트레스 음파처리에 따른 단백질 변화

스트레스 음파가 복숭아혹진딧물의 체내 변화에 대한 영향을 조사하기 위해 5,000 Hz의 음파를 처리하고 대조구와 비교하였다(Fig. 3). 단백질분석은 이차원 전기영동을 이용하

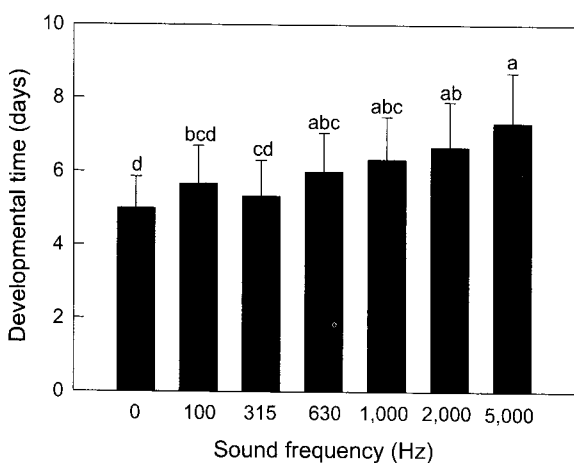


Fig. 1. Effect of different sound frequencies on development of *Myzus persicae* from nymph to adult at 25°C. Sound intensity was 95 dB in all frequency treatments. Newly hatched nymph was exposed to the sound treatment. Each treatment was replicated three times and each replication used 10 individuals. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among at Type I error = 0.05 (LSD test).

였으며, 대조구의 경우 총 67개의 단백질이 검출된 반면 음파 처리구는 66개의 단백질이 나타났다. 특히 음파 처리구는 대조구의 비교적 분자량이 적고 염기성인 7개 단백질의 발현이 억제된 반면 비교적 분자량의 크기가 크고 산성인 6개 단백질은 음파 처리구에서 특이적으로 발현되었다.

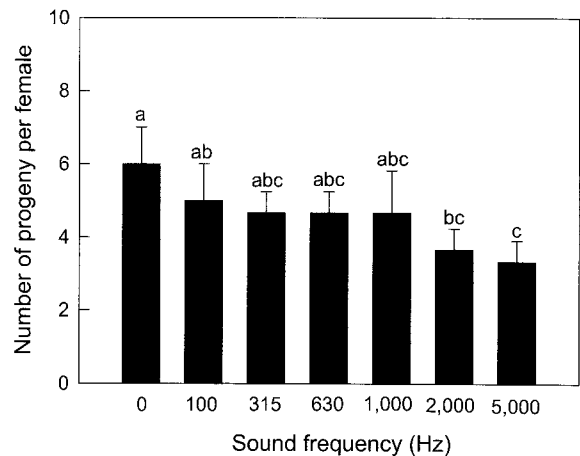


Fig. 2. Effect of different sound frequencies on female fecundity of *Myzus persicae*. Teneral adult females were exposed to different sound treatment at a constant 95dB intensity. Progeny counts were made from the number of laid eggs during treatment period (5 days at 25°C). Each treatment was replicated three times and each replication used 10 individuals. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among at Type I error = 0.05 (LSD test).

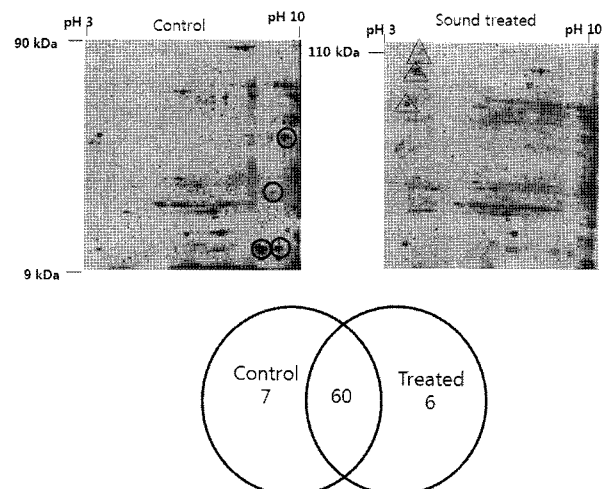


Fig. 3. Effect of a sound stress (5,000 Hz, 95 dB) on protein expression pattern of *Myzus persicae*. A cohort of *M. persicae* was divided into control and treatment group. The sound treatment was performed for 24 h. (A) Two dimensional electrophoresis, where triangle and circle indicate spots specific to control and sound treatment, respectively. (B) Venn diagram of the protein expression pattern of total protein spots (N = 73).

스트레스 음파처리에 따른 살충제 감수성 변화

스트레스 음파에 대한 복숭아혹진딧물의 발육 저하효과는 살충제에 대한 감수성 제고를 일으킬 수 있다는 가설을 검증하였다(Fig. 4). 이미다클로프리드 살충제에 대해서 복숭아혹진딧물은 125 ppm(75.77 < LC < 148.41)의 반수치사약량을 나타냈다. 이 반수치사약량을 이용하여 음파처리효과를 검증하였다. 음파처리에 따라 살충제 감수성 증가가 일어났으며($F = 2.73$; $df = 6, 14$; $P = 0.0571$), 특별히 5,000 Hz 이상의 음파에서는 복숭아혹진딧물의 살충제 감수성을 현격히 높였다.

고 찰

본 연구에서는 음파 처리가 복숭아혹진딧물의 생리적 변

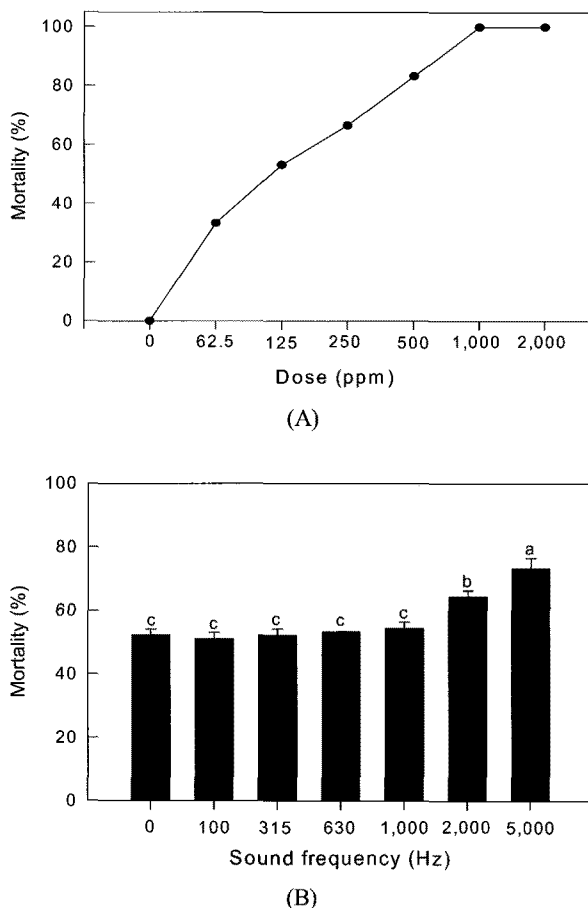


Fig. 4. Effect of different sound frequencies on susceptibility of *Myzus persicae* against imidacloprid. (A) Dose-mortality curve of *M. persicae* against imidacloprid without sound treatment. (B) Enhanced susceptibility of the insecticidal toxicity by higher sound frequencies. Each treatment was replicated three times and each replication used 10 larval. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among at Type I error = 0.05 (LSD test).

화 분석에 목적을 두었다. 이를 위해 일반적 곤충이 소리를 내고 이에 따른 가청 범위에 드는(Michelsen and Nocke, 1974) 다양한 주파수 범위를 설정하고, 이를 처리하였을 때 나타나는 복숭아혹진딧물의 생리적 변화를 분석했다. 비교적 높은 주파수(2,000 Hz 이상)는 약충 발육을 지연시키고, 성충의 생식능력을 떨어뜨리며, 살충제에 대한 감수성을 높였다. 이러한 고주파의 음파는 체내의 단백질 발현 패턴을 변경시켜, 최소한 7개의 단백질의 발현이 억제되고, 6개의 단백질이 새로이 형성되었다. 이러한 결과는 비교적 고주파의 소리가 복숭아혹진딧물의 생리적 교란을 유발하는 스트레스 음파로 작용하였다는 것을 제시하고 있다.

스트레스 음파의 존재 및 이 음파가 곤충의 생리적 변화에 대한 연구는 매우 미미하다. 스트레스 음파가 생리적 변화로 나타나기 위해서는 우선 이 음파를 감지하는 감각기가 존재해야 하며 이를 내부 전기적 신경신호로 전환하여 다양한 내부 기관에서 감지가 있어야 한다(Claridge, 1985). 곤충의 일반적 청각기관으로서 고막, 박각시의 아랫입술수염 및 존스턴기관이 곤충에서 존재한다(Bailey, 1991). 그러나 진딧물류에서는 소리 자체가 진딧물류에 있어서는 주요한 통신수단이 아니고, 아직 이러한 전형적 청각기관이 동정되지 않은 것으로 미루어 보아 복숭아혹진딧물은 고주파의 소리에 대해 몸 자체에 분포하는 기계감각털(trichobothria)을 이용하여 단순 물리적 진동으로 감지했을 가능성이 있다. 이러한 기계감각털은 몸 표면에 있는 털감각기로서 감각신경이 분포하여 물리적 자극을 받아들이는 단순한 구조로서, 나비목 유충의 경우 0.15-1 kHz의 주파수를 91 dB의 세기 한계치에서 감지하는 것으로 알려지고 있다(Tautz, 1977, 1978). 비록 다수의 털감각기 및 비교적 긴 trichobothria 형 감각털이 진딧물 주변으로 발달하지만(미보고자료) 이들 감각기가 청각에 관련이 있을 지는 추후 연구 대상이다.

스트레스 음파에 대해 복숭아혹진딧물은 체내 다양한 단백질 발현 패턴에서 변화를 보였다. 전체적 숫자는 물론이고, 음파 처리구에서는 특이적 단백질들이 사라지거나, 새로이 생성되었다. 흥미로운 점은 새롭게 형성된 단백질들은 비교적 크기가 큰 단백질로 70-90 kDa의 위치했다. 또한 이들은 극도로 산성을 띠는 것으로 나타났다. 스트레스에 따라 발현되는 단백질로서 열충격단백질(heat shock protein: HSP)이 대표적으로 대부분 곤충의 스트레스에 관련된 HSP는 60-90 kDa 크기의 범위에 있다(Pardue, 1988). 이들의 기능은 단백질 수송, 신호전달, DNA 복제 및 단백질 구조 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다(Hartl, 1996). 따라서 본 연구에서 스트레스 음파에 대해서 생존에 중요한 여러 단백질의 올바른

구조 형성에 관여하여 HSP의 발현이 의미를 가질 수 있다고 사료된다. 그러나 이들 특이적 단백질의 본체에 대해서는 추후 동정이 필요하다.

스트레스 음파 처리는 복숭아혹진딧물의 살충제 감수성을 높였다. 특별히 이미다클로프리드는 니코틴계 아세틸콜린 수용체에 작용하는 니코틴염소계 살충제이다(Leicht, 1993). 진딧물을 비롯하여 다양한 매미목 곤충류에 작용하는 이미다클로프리드는 중추신경계에서 신경연접의 후연접 작용을 비가역적으로 억제시키는 신경교란제이다(Bai et al., 1991). 특별히 이미다클로프리드는 니코틴 함유가 높은 담배를 가해하는 복숭아혹진딧물 또는 *M. nicotianae*에게 낮은 독성을 보여 이들의 독성 기작을 뒷받침하고 있다(Devine et al., 1996; Nauen et al., 1996; Nauen and Elbert, 1997). 본 연구에서 나타난 복숭아혹진딧물에 대한 이미다클로프리드의 감수성 증가 효과는 이 약제에 의해 중추신경계의 억제작용에 스트레스 음파에 의한 신경계 교란 효과가 상승적으로 작용한 것으로 유추된다. 다양한 신경저해 약제와 비신경계 작용 약제들이 각각 스트레스 음파와 상승적 독성 작용을 보이는 지 비교 연구가 요구된다.

사 사

본 연구는 2010년도 농촌진흥청 아젠다과제에서 지원한 연구과제로 수행되었다. 음파 처리 시설을 대여하여 준 (주)그린테크에 감사의 말씀을 드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Alcock, J. (1979) *Animal Behavior: An Evolutionary Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Bai, D., S. C. R. Lummis, W. Leicht, H. Breer and D. B. Satelle (1991) Actions of imidacloprid and related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pestic. Sci.* 33:197~204.
- Bailey, W. J. (1991) *Acoustic Behavior of Insects. An Evolutionary Perspective*. Chapman and Hall, London. UK.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye finding. *Anal. Biochem.* 72:248~254.
- Brown, S. G., G. H. Boettner and J. E. Yack (2007) Clicking caterpillars: acoustic aposematism in *Antheraea polyphemus* and other *Bombycidae*. *J. Exp. Biol.* 210:993~1005.
- Claridge, M. F. (1985) Acoustic signals in the Hemiptera: behavior, taxonomy, and evolution. *Annu. Rev. Entomol.* 30:297~317.
- Cokl, A., M. Zorovic and J. G. Millar (2007) Vibrational communication along plants by the stink bugs *Nezara viridula* and *Murgantia histrionica*. *Beh. Proc.* 75:40~54.
- Corley, K. C., V. B. Singh, T. H. Phan and M. C. Boadle-Biber (1992) Effect of gepirone on increase in tryptophan hydroxylase in response to sound stress. *Eur. J. Pharmacol.* 31:417~425.
- Devine, G. J., Z. K. Harling, A. W. Scarr and A. L. Devonshire (1996) Lethal and sublethal effects of imidacloprid on nicotine-tolerant *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Pestic. Sci.* 48:57~62.
- Greenfield, M. D. (2002) *Signallers and Receivers: Mechanisms and Evolution of Arthropod Communication*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571~580.
- Khasar, S. G., P. G. Green and J. D. Leine (2005) Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain* 116:79~86.
- Leicht, W. (1993) Imidacloprid - a chloronicotinyl insecticide. *Pestic. Outlook* 4:17~21.
- Michelsen, A. and H. Nocke (1974) Biophysical aspects of sound communication in insects. *Adv. Insect Physiol.* 10:247~296.
- Nakano, R., T. Takahashi, T. Fuji, N. Skals, A. Surlykke and Y. Ishikawa (2009) Moths are not silent, but whisper ultrasonic courtship songs. *J. Exp. Biol.* 212:4072~4078.
- Nauen, R. and A. Elbert (1997) Apparent tolerance of a field-collected strain of *Myzus nicotianae* to imidacloprid due to strong antifeeding response. *Pestic. Sci.* 49:252~258.
- Nauen, R., J. Strobel, K. Otsu, K. Tietjen, C. Erdelen and A. Elbert (1996) Aphicidal activity of imidacloprid against a carbamate and organophosphate resistant Japanese strain of the tobacco feeding form of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) closely related to *Myzus nicotianae*. *Bull. Entomol. Res.* 86:165~171.
- Pardue, M. L. (1988) The heat shock response in biology and human disease: a meeting review. *Genes Dev.* 2:783-785.
- 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.
- SAS Institute, Inc. 1989. *SAS/STAT User's Guide*, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Singh, V. B., K. C. Corley, T. H. Phan and M. C. Boadle-Biber (1990) Increases in the activity of tryptophan hydroxylase from rat cortex and midbrain in response to acute or repeated sound stress are blocked by adrenalectomy and restored by dexamethasone treatment. *Brain Res.* 516:66~76.
- Tautz, J. (1977) Reception of medium vibrations by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera,

- Noctuidae). I. Mechanical properties of receptor hairs. J. Comp. Physiol. 118:13~31.
- Tautz, J. (1978) Reception of medium vibrations by thoracic hairs of caterpillars of *Barathra brassicae* L. (Lepidoptera, Noctuidae). II. Response characteristics of the sensory cell. J. Comp. Physiol. 125:67~77.
- Zha, Y. P., F. Xu, Q. C. Chen and C. L. Lei (2008) Effect of ultrasound on acetylcholinesterase activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Can. Entomol. 140:563~568.

스트레스 음파 처리에 따른 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)의 발육 교란 및 살충 효과

석정균 · 강택준¹ · 김용균*

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원

요 약 본 연구는 서로 다른 주파수에 따른 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)의 약제 감수성과 그에 따른 효과를 조사하였다. 소리세기를 95 dB로 고정하고 0-5,000 Hz의 서로 다른 주파수 음파를 진딧물의 전체 발육기간에 걸쳐서 처리했다. 처리 음파의 주파수 증가에 따라 진딧물의 유충에서 성충까지의 발육기간이 지연되었고, 암컷 성충의 생식력을 감소시켰다. 이차원 전기영동분석 결과는 5,000 Hz의 음파로 처리된 진딧물이 대조구에 비해 체내의 단백질의 변화가 있었음을 나타냈다. 2,000 Hz 이상의 음파 처리는 이미다클로프리드 약제에 대한 진딧물의 감수성을 증가시켰다. 본 연구는 복숭아혹진딧물이 감응하는 스트레스 음파가 존재하며, 이는 이 해충의 생리적 교란을 유발한다는 것을 제시하고 있다.

색인어 음파, 성장, 이미다클로프리드, 감수성, 복숭아혹진딧물
