한응곤지 50(2): 131~139 (2011)
Kor. J. Appl. Entomol.
DOI: 10.5656/KSAE.2011.06.0.18

ⓒ The Korean Society of Applied Entomology

스트레스 음파 처리에 따른 아메리카잎굴파리(*Liriomyza trifolii*)의 생리 변화와 프로테오믹 분석

박정아 · Surakasi · Venkara Prasad · 김용균*
안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

Effects of Sound Stress on Physiological Processes of the American Leafminer, *Liriomyza trifolii*, and Proteomic Analysis

Jung-A Park, Surakasi Venkara Prasad and Yonggun Kim*
School of Bioresource Science, College of Natural Science, Andong National University

ABSTRACT: This study investigated the adverse effects of sound treatment on physiological processes of the American leafminer, *Liriomyza trifolii*, during several developmental stages. Larval feeding activity was analyzed by measuring feeding tunnel length. It was significantly suppressed by sound treatment (5,000 Hz, 95 dB). Sound treatment delayed the pupal period at 315 - 5,000 Hz and prevented adult emergence at 1,000 - 5,000 Hz. Female oviposition was also inhibited by the stress sound treatments. However, phototactic adult movement was not affected by sound treatment. Pupae treated with 5,000 Hz showed marked changes in protein patterns analyzed by two dimensional electrophoresis. MALDI-TOF analysis of specific protein spots indicated that trafficking protein particle complex I, triosephosphate isomerase, hypothetical protein TcasGA2_TC013388, polycystin-2, paraneoplastic neuronal antigen MA1, and tropomyosin I (isoform M) were predicted in the control insects and disappeared in the insects treated with sound. By contrast, DOCK9, cytoskeletal keratin II, and F0F1-ATP synthase beta subunit were predicted only in the sound-treated insects. Furthermore, stress sound significantly increased the susceptibility of *L. trifolii* to insecticides. These results suggest that physiological processes of *L. trifolii* are altered by sound stress, which may be exploited to develop a novel physical control tactic against *L. trifolii*.

Key words: *Liriomyza trifolii*, stress sound, feeding behavior, phototaxis, insecticide

초 록: 본 연구는 음파 처리에 따른 아메리카잎굴파리(*Liriomyza trifolii*)의 생리 변화를 발육 시기별로 분석하였다. 유충의 섭식량은 섭식을 통해 형성된 잎 내부 갱도의 길이로 분석했다. 이때 5,000 Hz (95 dB)의 음파 처리는 섭식 행동을 크게 둔화시켰다. 이러한 스트레스 음파는 또한 용 발육에 영향을 주어 315 - 5,000 Hz 음파 범위에서 발육 지연 효과를 나타냈고, 1,000 - 5,000 Hz 음파 범위에서 우화를 억제하였다. 스트레스 음파는 암컷의 산란 행동을 억제시켰으나 성충의 주광성 행동에는 영향을 주지 않았다. 스트레스 음파(5,000 Hz, 95 dB)를 받은 용은 이차원 전기영동 분석 결과 단백질 발현 양상에서 무처리구와 뚜렷한 차이를 보였다. 특정 단백질에 대한 MALDI-TOF 분석 결과는 trafficking protein particle complex I, triosephosphate isomerase, hypothetical protein TcasGA2_TC013388, polycystin-2, paraneoplastic neuronal antigen MA1 및 tropomyosin I (isoform M)의 단백질들이 무처리구에서 발견되고, 음파 처리구에서는 소멸되었다. 반면에 DOCK9, cytoskeletal keratin II 및 F_0F_1-ATP synthase beta subunit은 스트레스 음파 처리에 따라 새롭게 나타나는 단백질로 판명되었다. 이러한 스트레스 음파는 아메리카잎굴파리의 살충제에 대한 감수성을 크게 증가시켰다. 이상의 결과는 아메리카잎굴파리의 생리 과정을 교란하는 스트레스 음파가 작용한다는 것을 제시하고 있다. 또한 본 연구는 이러한 스트레스 음파를 이용하여 아메리카잎굴파리에 대한 새로운 물리적 해충 방제 기술 개발 가능성을 제시하고 있다.

검색어: 아메리카잎굴파리, 스트레스 음파, 섭식행동, 주광성, 살충제

***Corresponding author:** hosanna@andong.ac.kr
Received April 13 2011; **Revised** June 10 2011;
Accepted June 19 2011

아메리카잎굴파리(*Liriomyza trifolii*)는 미국 플로리다 지역이 원산지로 알려져 있으며, 1970 년대 이후로 전 세계에 퍼져 나가 우리나라 작물에 까지 피해를 주게 되었다(Parrella, 1987;

Han *et al*., 1996). 이 해충의 피해는 유충이 엽육 조직에 터널을 형성하면서 식해하는 것과 성충의 흡즙흔에 의한 잎 피해를 포함한다(Parrella and Keil, 1984). 이러한 작물체 잎에 대한 아메리카잎굴파리의 피해는 광합성 저하를 유발하고, 작물체의 상품성을 떨어뜨리는 경제적 손실을 낳게 된다(Trumble *et al*., 1985).

시설재배지를 중심으로 발생하는 아메리카잎굴파리는 비교적 고온에 잘 적응하는 해충으로 7-8 월에 최대 성충 포획량을 보이며, 겨울철에도 온실 내에서 세대를 형성하게 된다(Park *et al*., 2000, 2001). 비교적 발육 기간이 빨라 알에서 성충까지 발육기간은 25℃ 에서 거베라의 경우 16.3 일, 토마토의 경우 12.3 일로서 연중 다세대를 발생시킬 수 있어 작물체 피해는 물론이고 살충제에 대한 저항성 발달이 우려되고 있다(Moon *et al*., 2002; Furguson, 2004). 높은 번식력과 빠른 생활사는 이들의 발생예찰 및 방제 기술을 적용하는데 판단 기준이 되는 경제적 피해 수준의 결정이 요구되었다(Lim *et al*., 2007).

아메리카잎굴파리의 번식능력과 약제저항성 그리고 시설재배지 조건의 안전 농산물 생산에 부합하기 위해 비화학적 해충관리 기술이 요구되고 있다(Kim *et al*., 2007). 본 연구는 스트레스 음파를 이용한 아메리카잎굴파리의 생존력 억제를 밝히고자 이들의 생리적 변화를 분석하였다. 소리 자극에 대해 아메리카잎굴파리가 반응할 수 있다는 근거로서 일반적으로 이러한 세로파 자극원에 대해서 반응할 수 있는 센털형 및 뿔 모양 감각기가 촉각에 존재한다는 것이 보고되었다(Shin *et al*., 2006). 따라서 다양한 주파수의 음파를 아메리카잎굴파리에 처리하고 초래되는 생리적 변화를 분석할 필요가 있다. 이를 위해 본 연구는 이 해충의 유충섭식, 용 발달 및 성충 산란 행동을 대상으로 그 교란 효과를 추적했다. 또한 음파에 따른 체내 생리적 변화를 분자수준에서 규명하기 위해 이차원 전기영동을 통해 단백질 발현패턴 양식을 비교하였다. 이러한 스트레스 음파를 해충 방제 기술에 응용하고자 음파 처리에 따른 살충제 감수성 제고로 이어지는 지를 분석하였다.

재료 및 방법

아메리카잎굴파리 사육

아메리카잎굴파리는 농촌진흥청 연구소 국립농업과학원 생물부 산업곤충과에서 분양받았다. 전 사육기간 동안 온도 25 ± 1°C, 상대습도 60 ± 10%, 광주기 16:8 h (L:D)의 조건에서 유지되었다. 기주 식물로 강낭콩을 이용하였다.

음파처리

음파처리는 목재 재질로 된 나무상자(45 × 45 × 90 cm)에 기기 내부에 소리 반향을 줄이기 위해 방음판을 부착시켰다. 음파 발생기는 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 상자 바닥에 닿는 소리세기를 측정하였다. 이 바닥에 공시충을 올려놓고 실내온도 25°C에서 0, 100, 315, 630, 1,000, 2,000 및 5,000 Hz의 주파수 음파를 95 dB 크기로 처리한 후 생리적 반응을 분석했다.

음파 및 진동에 따른 유충의 섭식량 검정

유충 섭식량은 잎 내부에 식흔(갱도) 길이를 측정하여 나타냈다. 잎의 진동은 Rocker (NB-104, N-Biotek, Seoul, Korea)를 이용하여 100 rpm의 속도로 처리하였다. 음파처리는 5,000 Hz를 95 dB의 소리세기를 이용했다. 모든 처리는 25℃ 에서 산란 직후부터 용시기까지 전체 유충기간에 처리되었다. 각 처리는 10 반복으로 이뤄졌다. 대조구는 위에서 기술한 실내 사육실의 자연 조건에서 사육된 개체를 분석했다.

우화 검정

갓 용화된 아메리카잎굴파리를 각각 10 마리씩 3 반복으로 각각 0, 100, 315, 630, 1,000, 2,000, 5,000 Hz의 주파수별로 24 시간 노출시키고 이후 7일 동안 우화하는 개체수를 계수하였다.

우화리듬 및 성충 주광성 분석

우화 리듬은 700 개의 용을 대상으로 25℃, 16:8 (L:D) h 조건에서 매 시간별로 우화되는 개체수를 조사했다. 주광성 조사는 불 켜진 후 9 시간 동안 매 시각 100 개체를 대상으로 3 반복으로 조사하였다. 조사상자(15 x 20 x 15 cm)의 뚜껑을 검정 도화지로 반쪽을 막아 빛을 차단시켰다. 성충을 조사상자에 방출시킨 후 1 시간 후 명조건에 자리한 성충수를 계수하였다.

산란력 검정

각 산란상자(15 × 15 × 25 cm)에 기주 식물인 강낭콩을 설치하고 갓 우화한 아메리카잎굴파리 성충을 각각 25 마리 씩(10 마

리 이상 암컷) 방사했다. 이들을 각각 3 반복으로 0, 100, 315, 630, 1,000, 2,000, 5,000 Hz의 주파수별로 5일 동안 노출시키고 산란된 개체수를 계수하였다. 평균 산란수는 암컷 한 마리당 산란된 알수로 표현했다.

이차원 전기영동 분석

스트레스 음파(5,000 Hz)로 아메리카잎굴파리를 24 시간 처리한 후 얻는 약 2 mL 분량의 용으로부터 전체 단백질이 추출되었다. 이 곤충시료를 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℃ 조건에서 16,000 x *g*에서 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, 1976)으로 정량화하였다.

이차원 전기영동은 Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용해 분석했다. 이때 isoelectric focusing (IEF)은 시료 단백질량을 300 μg으로 고정하고 100 V에서 1 시간 처리 후 500 V에서 1 시간, 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 Tris-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.

Tandem mass spectrometry (MS/MS) 및 MASCOT 분석

이차원 전기영동 분석 결과 얻어진 특정 단백질들을 젤로부터 도려낸 후 50% acetonitrile로 세척하고 각 단백질 시료당 30 ng의 porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 37℃에서 8-10 시간 동안 반응시켰다. Trypsin 분해 반응물(23 μL)에 5 μL의 0.5% trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가하여 종료시킨 후 C18ZIPtips (Millipore, Billerica, MA, USA)를 통해 반응물을 농축하였다. 이후 이 농축물의 1/2 부피에 해당하는 sodium isothiocyanate (10 mg/mL, Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)와 혼합 후 25℃에서 30분간 처리하였다. TFA (5%)를 첨가 후 탈염과정을 거쳐 C18ZIPtips 여과를 통해 농축시켰다. 다시 동일한 부피의 50% 수용액 상태의 acetonitrile-saturated α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma-Aldrich Korea)를 첨가한 후 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)의 target plate에 적재하였다. 시료의 기화는 337 nm의 N_2 laser illuminator로 실시되었고 20 kV의 injection pulse로 가속 및 절편화가 이뤄졌다. 각 단백질 시료의 mass spectrum이 post-source decay mode에서 y-ion으로 아미노산에 대한 누적 피크로 얻어졌고, MASCOT (www.matrixscience.com) 프로그램을 이용하여 유사한 단백질을 추정하였다.

살충제 생물검정

아메리카잎굴파리 유충을 대상으로 가해 잎을 5분간 살충제에 침지하여 살충력을 분석하였다. 사용된 살충제는 스피노사드 입상수화제 (Dongbang Agro, Seoul, Korea)로 시판되는 제형을 물에 희석하였다. 아메리카잎굴파리 유충이 가해하고 있는 강낭콩 잎을 각각 10 마리당 3 반복으로 농도별로 0, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125 및 250 ppm으로 처리하였다. 또한 음파에 대한 영향을 알아보기 위해 15.625 ppm을 아메리카잎굴파리 유충 각 10 마리씩 3 반복으로 처리하였다. 처리 후 매일 잎이 마르지 않도록 습도를 유지시켜주고 5 일 동안 관찰 후 최종 살충률을 조사하였다.

통계처리

시험 결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. Sigma Plot8.0을 이용하여 그래프 화하였다.

결 과

스트레스 음파처리에 따른 유충섭식량 변화

다양한 주파수의 유화처리에 따른 아메리카잎굴파리 유충의 섭식량 차이를 조사하였다(Fig. 1). 섭식량은 유충의 잎 내부의

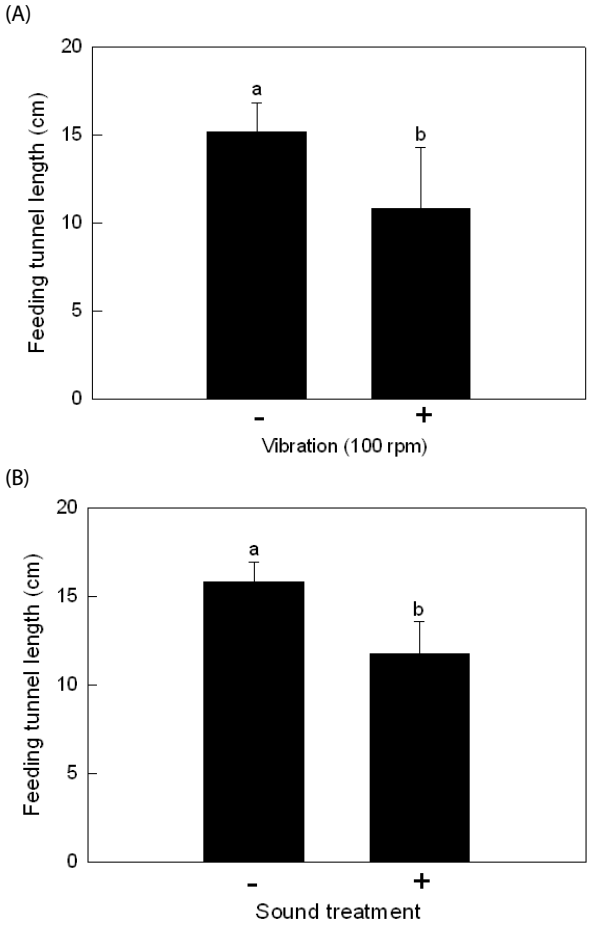


Fig. 1. Effect of sound treatment on larval feeding activity of *Liriomyza trifolii*. Leaves oviposited by females were exposed to sound treatment until pupal development. Feeding activity was analyzed by measuring feeding tunnel length. (A) Vibration effect on the feeding activity. (B) Effect of sound treatment (5,000 Hz, 95 dB) on feeding activity. Each treatment was replicated 10 times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

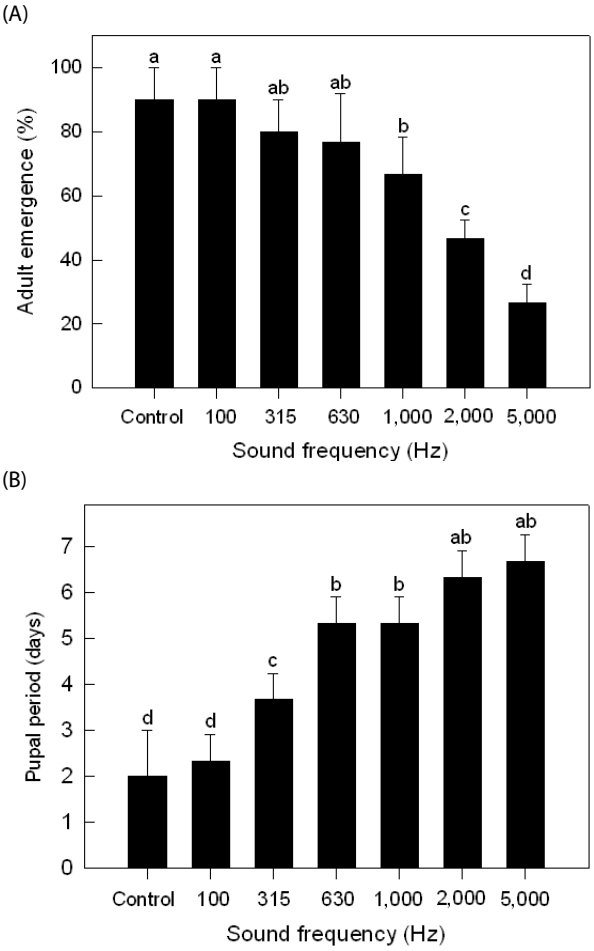


Fig. 2. Effect of sound treatment on pupal development of *Liriomyza trifolii*. Newly molted pupae were exposed to sound treatments until adult emergence. Emergence rate (A) and pupal period (B) were replicated three times with 10 pupae per replication. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

섭식 갱도 길이를 측정하여 나타냈다. 일반적으로 정지 잎에 비해 흔들리는 잎에서 섭식량이 감소했다(Fig. 1A). 이러한 현상은 스트레스 음파에 따라 잎이 물리적으로 진동하였고 이에 영향을 받은 유충이 섭식 행동에 영향을 받은 것으로 보인다. 다양한 주파수에 노출되었을 때 아메리카잎굴파리의 섭식량은 현격한 차이를 보였으며(개인정보), 특별히 5,000 Hz의 음파에서 대조구에 비해 섭식량의 큰 차이를 나타냈다(Fig. 1B).

스트레스 음파처리에 따른 용발육 변화

아메리카잎굴파리의 일반적인 우화율은 약 90%로 높지만, 음파처리에 따라 우화율이 낮아져, 1,000 Hz 이상에서는 대조구에 비해 현격하게 낮은 우화율을 나타냈다(Fig. 2A). 또한 우화기간에도 스트레스 음파는 영향을 주어 주파수가 증가함에 따라(315 Hz 이상) 우화 발육기간이 지연되는 효과를 나타냈다(Fig. 2B).

아메리카잎굴파리의 우화 및 산란행동에 대한 스트레스 음파 효과

다양한 음파처리를 통한 아메리카잎굴파리의 우화 활동에 미치는 효과를 검정하였다. 아메리카잎굴파리의 우화는 낮기간 동안에만 일어나는 일일 리듬성을 나타냈다(Fig. 3A). 또한 우화한 성충을 대상으로 명암의 선택 행동을 조사한 결과 비교적

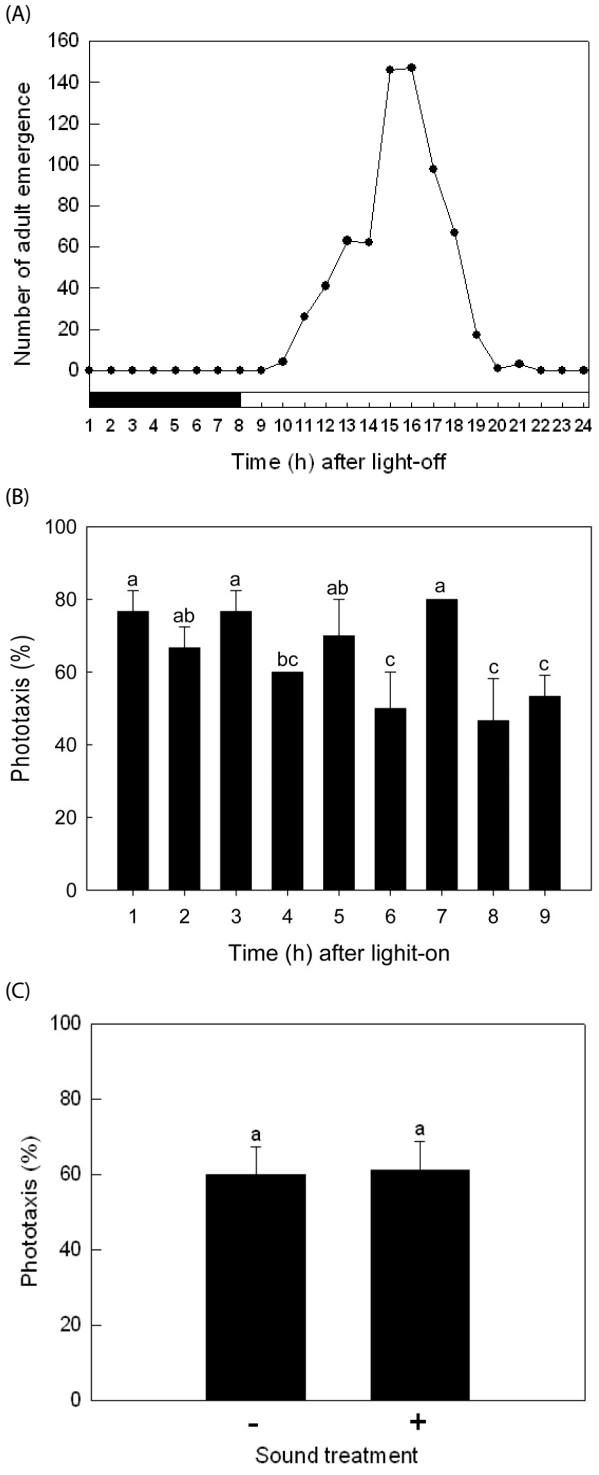


Fig. 3. Effect of sound treatment (95 dB, 5,000 Hz) on phototaxis behavior of adult *Liriomyza trifolii*. (A) Diel rhythm of adult emergence. Shaded area indicates scotophase. (B) Preference test of *L. trifolii* between dark and light chambers in each time at photophase. Each treatment used 100 adults. (C) Effect of sound treatment on the phototaxis behavior. Each treatment used 100 adults with three replications at photophase. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

높은 주광성을 보였으며(Fig. 3B), 특히 명기간 전반부에 이러한 주광성 행동이 후반부에 비해 높았다($F = 9.00$; $df = 8, 18$; $P < 0.0001$). 이러한 주광성은 5,000 Hz의 스트레스 음파 조건에서도 변화하지 않았다(Fig. 3C).

아메리카잎굴파리의 암컷의 산란행동이 조사되었고, 이에 대한 스트레스 음파의 처리 효과를 분석했다(Fig. 4). 아메리카잎굴파리는 비교적 엽경에 가깝게 산란한 것으로 나타났다(Fig. 4A). 스트레스음파는 아메리카잎굴파리의 산란행동에는 영향을 주었다(Fig. 4B). 하루 중 아메리카잎굴파리 암컷 한 마리가 약 3 개의 알을 산란하는데 스트레스음파의 주파수가 증가함에 따라 감소하여, 5,000 Hz 노출 시에는 2 개 이하의 산란수를 기록했다.

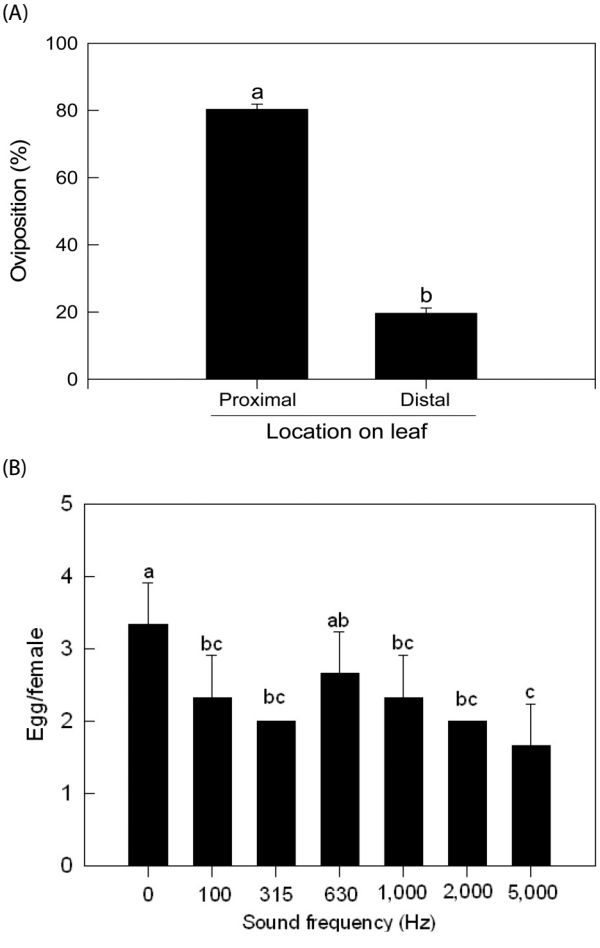
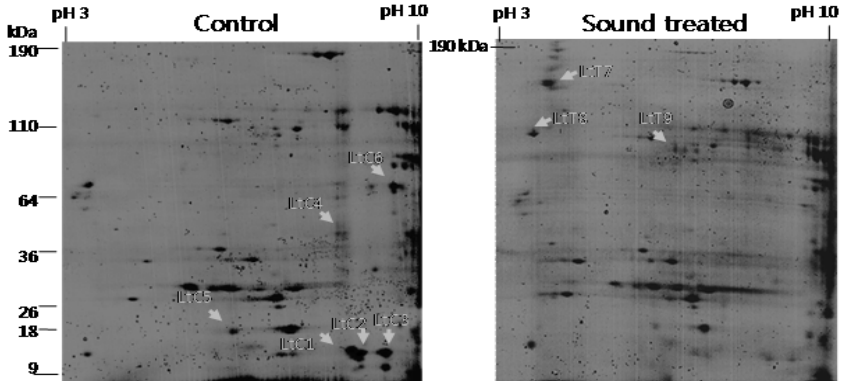


Fig. 4. Effect of sound treatments on female oviposition of *Liriomyza trifolii*. (A) Preference of oviposition site on the leaf. Leaf was longitudinally halved into proximal and distal regions from the leaf stalk. A total of 100 ovipositions were analyzed. (B) Number of eggs per female was analyzed for 5 days at 25℃ under different sound frequencies at 95 dB. Each treatment consisted of more than 10 females. Average number of laid eggs by a female was calculated. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

스트레스 음파에 따른 아메리카잎굴파리의 단백질 변화

음파에 따른 아메리카잎굴파리의 생체 변화를 알아보기 위해 비교적 감수성이 높았던 용에서 5,000 Hz의 음파를 처리하고 대조구에 비해 변화되는 단백질을 이차원 전기영동으로 분석하였다(Fig. 5). 대조구에서 총 80 개의 단백질이 검출되었으며, 처

(A)



(B)

Spots	MW (kDa)	pI	Peptide fragments	MASCOT[1]	Score[2]
LtC1	16.8	8.92	MTVYNIYIFDKNGTLLYYNEWSR NGTLLYYNEWSR EEEGKLMYGMLFSIK	Trafficking protein particle complex 1 (*Tribolium castaneum*) [XP966940]	100
LtC2	14.4	8.90	ANVPKTIGVAAQNCWK TIGVAAQNCWKVEK VEKGAFTGEISAPMIK	Triosephosphate isomerase (*Oleria didymaea*) [CBJ54971]	60
LtC3	12.6	9.80	DSIAYLTSVADLANYDAR NEGAKTRPSDMVVK FVAINGTPNGLHTDAMAAR	Hypothetical protein TcasGA2_TC013388 (*Tribolium castaneum*) [CAG06149]	58
LtC4	109.7	8.49	MVNSSRVQPQQPGDAK SRGLGGYHGAGHPSGR TLSSMEDFWK	Polycystin-2 (*Homo sapiens*) [NP_000288]	58
LtC5	21.6	5.05	NVIFMGDDTWTSLYPGR GRELGNLSLNK YREEEMTVVEEADDDK	Paraneoplastic neuronal antigen MA1 9 (*Strongylocentrotus purpuratus*) [XP_001199315]	60
LtC6	32.8	9.20	KIQTVENELDQTQEALTLVTGK IQTVENELDQTQEALTLVTGK ALQNAESEVAALNR	Tropomyosin 1, isoform M (*Drosophila melanogaster*) [AAN13644]	65
LtT7	190.6	4.00	TQILNDCLREMLLFPYDDFQTAILR TYNSDWHLVNYKYEDYSGEFR YEDYSGEFRQLPNK	Dedicator of cytokinesis 9 (DOCK9) (*Homo sapiens*) [EAX08997]	128
LtT8	66.7	4.50	SGGGFSSGSAGIINYQR SLVNLGGSKSISISVAR FLEQQNQVLQTK	Cytoskeletal keratin II (*Homo sapiens*) [NP_006112]	83
LtT9	53.5	6.90	VLDTGFPIRIPVGAETLGR IINVIGEPIDER VVDLLAPYAK	F_0F_1-type ATP synthase beta subunit (*Glossina morsitans morsitans*) [NP_732002]	196

[1] Species name in parenthesis and NCBI accession number in bracket
[2] MASCOT scores greater than 39 are significant at $P < 0.05$

Fig. 5. Effect of sound treatment (95 dB, 5,000 Hz, 24 h) on pupal proteins of *Liriomyza trifolii*. Arrows indicate specific proteins of control (LtC) and sound treated (LtT) larvae, respectively. Each treatment used 300 μg proteins extracted from approximately 200 pupae. (B) MALDI-TOF analysis of the specific protein spots and MASCOT predictions.

리구에서는 이보다 적은 77 개가 나타났다(Fig. 5A). 이를 분석하여 보면 음파처리 유무에 관계없이 나타나는 단백질 은 72 개이고, 음파처리에 따라 나타나지 않는 단백질이 8 개이었고, 새롭게 나타난 단백질은 5 개로 관찰되었다. 특이적 단백질을 분석하기 위해 음파처리에서 사라진 단백질 5 개와 새롭게 나타난 단백질 3 개를 각각 분리한 후 tandem mass spectrometry 방식으로 각 단백질의 mass spectrogram을 얻었다. 이 자료를 MASCOT database 검색 엔진을 이용하여 동정하였다(Fig. 5B). 무처리구에서 발견되고, 음파처리구에서는 소멸된 단백질은 trafficking protein particle complex I, triosephosphate isomerase, hypothetical protein TcasGA2_TC013388, polycystin-2, paraneoplastic neuronal antigen MA1 및 tropomyosin I (isoform M)으로 추정되었다. 반면에 DOCK9, cytoskeletal keratin II 및 F_0F_1-ATP synthase beta subunit은 스트레스 음파 처리에 따라 새롭게 나타나는 단백질로 판명되었다.

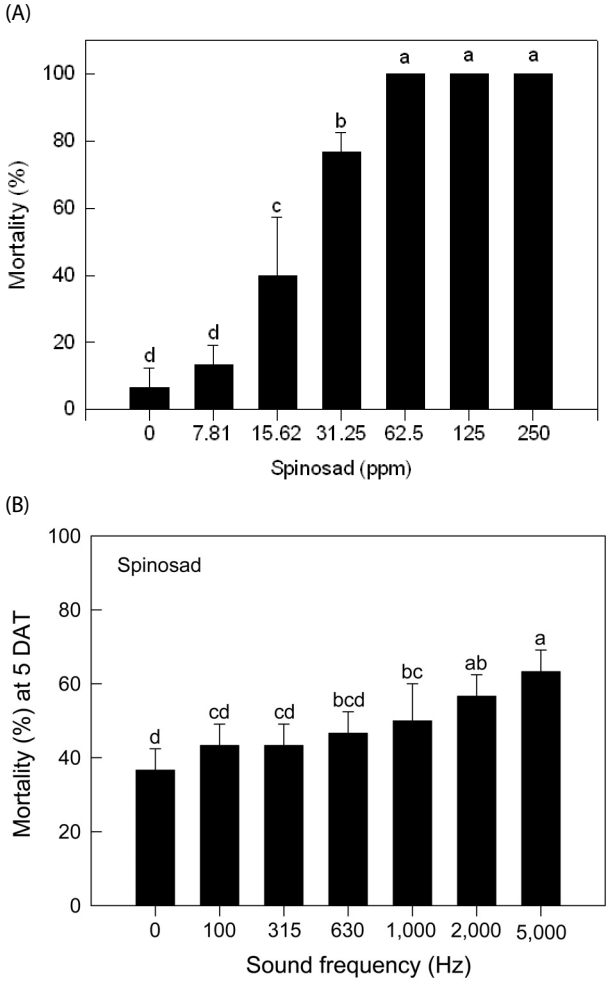


Fig. 6. Effect of sound treatment (95 dB, 5,000 Hz) on insecticidal susceptibility of *Liriomyza trifolii* against spinosad. Leaves infected by *L. trifolii* were soaked into different doses of spinosad for 1 min. Mortality was measured at 3 days after treatment (DAT). (A) Dose-response without sound treatment. (B) Effect of sound treatment on the insecticide susceptibility at 15.62 ppm. Each treatment used 10 larvae and was replicated three times. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

스트레스 음파 처리에 따른 살충제 감수성 변화

스트레스 음파가 아메리카잎굴파리의 살충제 감수성에 미치는 효과가 분석되었다(Fig. 6). 유충에 대해 잎침지법으로 분석되었을 때 스피노사드 살충제의 15.62 ppm에서 반수치사약량을 나타냈다(Fig. 6A). 이 반수치사약량을 기본으로 다양한 음파에 노출시켰을 때 아메리카잎굴파리는 음파주파수에 비례하여 살충제 감수성이 높아졌다($F = 5.67$; $df = 6, 14$; $P = 0.0036$) (Fig. 6B).

고 찰

음파처리에 따라 아메리카잎굴파리의 생리적 변화가 본 연구에서 분석되었다. 유충은 섭식행동에 대해서 서로 다른 주파수의 음파가 미치는 영향이 조사되었다. 섭식 갱도의 길이로 분석되고 섭식량은 음파의 주파수에 비례하여 감소하였다. 선행조사에서 분석한 진동에 따른 섭식량 저하와 비교하여 아메리카잎굴파리는 외부 물리적 요동에 따라 섭식활동이 저해되었다고 볼 수 있다. 본 연구에서 조사되지 않았지만, 자연 조건에서 일어날 수 있는 잎의 진동은 본 연구 결과를 토대로 볼 때 이 해충의 섭식행동에 영향을 줄 수 있다고 유추된다. 일반적으로 아메리카잎굴파리의 엽육 가해는 작물체 생산에 영향을 미쳐 1마리의 유충 가해에 의해 피해 잎의 광합성이 43%까지 감소할 수 있다고 보고되었다(Trumble, 1990). 또한 아메리카잎굴파리는 새로 나온 잎 보다는 다 자란 잎에 가해가 높아(Chandler and Gilstrap, 1986) 피해의 심각성 및 상품적 가치 훼손에 우려를 주고 있다. 따라서 음파처리에 따른 섭식량 저하는 이 해충의 직접적 방제에 효과를 줄 수 있다. 또한 본 실험 결과는 엽육 속에 있는 유충이 이러한 음파를 감지한다는 것을 또한 의미하고 있다.

음파처리는 용발육을 크게 저하시켜 용기간을 연장시키고 우화율을 낮추었다. 음파처리를 받은 용은 체내 단백질 발현 패턴이 무처리에 비해 상이하여 음파에 직간접적으로 영향을 받았다는 것을 분자수준에서 나타냈다. 척추동물의 경우 스트레스 음파는 Tryptophan hydroxylase 활성을 변화시켜 신경계 신경전달물질인 세로토닌의 분비량을 변화시킨다고 보고하였다(Singh *et al*., 1990). 본 연구에서 보여준 용발육 지연 및 우화율 저하는

내분비계 신호 변화로 유추해 볼 수 있다. 즉, 유약호르몬의 이상 분비 또는 엑디스테로이드의 분비 저하는 용발육의 지연 및 우화 저하를 초래할 수 있다(Kim *et al*., 2000; Kamimura and Kiuchi, 2002). 이에 따른 후속 분석 연구가 진행될 필요가 있다.

성충시기에 스트레스 음파는 아메리카잎굴파리가 갖는 주광성에는 영향을 주지 않지만 암컷의 산란력에 억제효과를 나타냈다. 아메리카잎굴파리가 광식성이지만 선호하는 기주가 있다는 증거가 있어(Wei *et al*., 2000), 감각기 수준의 산란 촉각 구조를 살펴보면 화학 및 물리적 신호에 반응하는 다양한 감각기 구조가 관찰되었다(Shin *et al*., 2006). 따라서 스트레스 음파는 암컷 아메리카잎굴파리의 산란 선호성 및 행동에 음파감지 감각기를 통해 음성적으로 영향을 주었을 것으로 사료된다.

스트레스 음파에 대한 생리적 의미를 분석하기 위해 본 연구는 가장 음파에 민감한 시기인 용기간에 스트레스 음파를 처리하고 유전자 발현에 미치는 현상을 프로테오믹 기술로 분석하였다. 이차원전기영동에서 나타난 단백질의 총수는 음파처리구에서 적게 나타났다. 또한 음파처리에 따라 일부 단백질의 발현이 억제되었으며, 반면에 새로운 단백질의 발현이 나타났다. 본 연구는 이러한 특이적 발현 단백질을 동정하고자 MALDI-TOF를 이용하여 각 단백질의 파편 조각을 만들고, 이를 MASCOT 검색엔진을 통해 유사한 단백질을 추정하였다. 음파 처리에 따라 발현이 억제된 단백질들 가운데 trafficking protein particle complex I은 *Tribolium castaneum* 게놈에서 추정된 유전자(XP966940)와 유사성을 보이며 약 16.7 kDa의 단백질 크기를 갖으며 Sedlin_N 유전자군에 속하는 것으로 나타났다. Sedlin_N 단백질은 세포내 단백질의 운송과 연관을 가져 소포체에서 골지체로 운송 또는 핵내 전사요인 활성 조절에 관여하는 것으로 알려졌다(Montpetit and Conibear, 2009; Liu *et al*., 2010). 즉, 스트레스 음파가 이 유전자 발현을 억제하면, 세포 내 물질 이송과 유전자 발현에 교란을 줄 수 있다는 것으로 내포하고 있다. 스트레스 음파가 해당작용에 관여하는 triosephosphate isomerase의 발현을 억제한 것은 대사작용의 억제로 해석된다. 즉, dihydroxy-acetone-3-phosphate가 glyceraldehyde-3-phosphate로 전환되지 않기 때문에 전체적 해당과정의 결함이 생길 수 있다. 이러한 영향이 아메리카잎굴파리의 우화 억제에 관여하였을 것으로 추정된다. 인체에 발현되는 polycystin-2와 유사한 아메리카잎굴파리 단백질이 스트레스 음파에 의해 억제되는 것으로 나타났다. 이 단백질은 세포막 또는 조면소포체 막에 위치하며 비특이적 양이온 전달 통로로서 작용한다(Hoffmeister *et al*., 2010). 이 유전자의 돌연변이는 인체의 경우 유전적 신장이상인 다낭신(polycystic kidney disease)을 유발하게 된다(Cai *et al*., 1999). 즉, 스트레스 음파에 의해 이와 유사한 단백질의 교란은 아메리카잎굴파리의 이온 균형을 교란시키는 악영향을 줄 수 있다고 사료된다. 스트레스 음파에 의해 PNMA1으로 알려진 paraneoplastic neuronal antigen MA1 단백질의 발현 억제는 아메리카잎굴파리의 용기간 중에 일어나는 다양한 조직 재분화에 영향을 줄 것 같다. 왜냐하면 PNMA1이 신경 조직에 발현되면 이 신경의 세포자연치사(apoptosis)를 유도하기 때문이다(Chen and D'Mello, 2010). 즉, 용기간 중에 유충 조직의 세포자연치사가 일어나고 이에 따라 성충 조직의 새로운 분화가 일어나는 변태 과정으로 진행되기 때문에 이 유전자 발현 억제는 변태 기간에 유충 조직의 세포치사를 억제하는 효과를 줄 수 있어 본 연구에서 밝혀진 우화율 저하로 이어질 수 있다. 스트레스 음파에 의해 소멸된 tropomyosin I (isoform M) 단백질은 구조 단백질로서 근육의 액틴 단백질을 안정화시켜주는 역할로서 일반적으로 알려지고 있다. 따라서 이 단백질의 발현 억제는 아메리카잎굴파리의 근육 작용에 영향을 미칠 것으로 사려된다. 이외에 아직 기능이 밝혀지지 않은 hypothetical protein TcasGA2_TC013388도 스트레스 음파에 대해서 발현이 억제되는 것으로 나타났다.

스트레스 음파에 의해 새롭게 발현된 단백질은 dedicator of cytokinesis 9 (DOCK9)로서 세포내 small G protein인 Rac 또는 Cdc42와 결합하는 신호전달 단백질로 알려지고 있다(Yang *et al*., 2009). DOCK9이 음파에 대해서 스트레스로 인식하여 세포내 다양한 생리적 반응과 연계된 이들 Rac 또는 Cdc42를 활성화하는 것으로 추정된다. Cytoskeletal keratin II는 상처에 대한 상피세포의 보호 기능을 하는 것으로 알려지고 있다(Ku *et al*., 2010). 따라서 스트레스 음파에 대한 이와 유사한 유전자의 발현은 아메리카잎굴파리의 생리적 대처 전략으로 해석된다. F_0F_1-ATP synthase beta subunit은 미토콘드리아에 위치하며 산화적 인산화 반응을 통해 ATP를 합성하는 ATP synthase 효소의 구성 요소로 알려지고 있다. 따라서 이 단위체의 발현 증가는 스트레스 음파에 대한 아메리카잎굴파리의 에너지 요구를 반영하는 것으로 분자적 수준의 스트레스 현상을 반영하고 있다고 해석된다.

이상의 스트레스 음파가 아메리카잎굴파리에 미치는 생리적 변화는 응용적으로 살충제 감수성 제고 효과를 기대하였고 본 연구는 스피노사드에 대해서 그 상승효과가 입증되었다. 이러한 스트레스 음파의 살충제 감수성 제고 효과는 약제의 작용점인 Nicotinic acetylcholine receptor에 대한 영향은 물론이고 약제 대사작용의 억제 등으로 추론해 볼 수 있다. 이에 대한 후속 분석 연구가 필요하다. 본 연구는 특정 음파가 아메리카잎굴파리의 발육에 스트레스 인자로 작용할 수 있다는 것을 제시하며, 이러한 스트레스 음파를 이용하여 직접 또는 협력 방제 수단으로 응용이 가능하다는 것을 보여주었다.

사 사

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

Literature Cited

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 71: 248-254.

Cai, Y., Y. Maeda, A. Cedzich, V.E. Torres, G. Wu, T. Hayashi, T. Mochizuki, J.H. Park, R. Witzgall and S. Somlo. 1999. Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. J. Biol. Chem. 274: 28557-28565.

Chandler, L.D. and F.E. Gilstrap. 1986. Within-plant larva distribution of *Liriomyza trifolii* Burgess (Diptera: Agromyzidae) on Bell peppers. Environ. Entomol. 15: 96-99.

Chen, H.C. and S.R. D'Mello. 2010. Induction of neuronal cell death by paraneoplastic Ma1 antigen. J. Neurosci. Res. 88: 3508-3519.

Furguson, J.S. 2004. Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. J. Econ. Entomol. 97: 112-119.

Han, M.J., S.H. Lee, J.Y. Choi, S.B. Ahn and M.H. Lee. 1996. Newly introduced insect pest, american serpentine leafminer, *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) in Korea. Kor. J. Appl. Entomol. 35: 309-314.

Hoffmeister, H., A.R. Gallagher, A. Rascle and R. Witzgall. 2010. The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and intracellular N- and C-termini. Biochem. J. 433: 285-294.

Kamimura, M. and M. Kiuchi. 2002. Applying fenoxycarb at the penultimate instar triggers an additional ecdysteroid surge and induces perfect extra larval molting in the silkworm. Gen. Comp. Endocrinol. 128: 231-237.

Kim, J.H., Y.W. Byoun, G.S. Lee and H.Y. Kim. 2007. Evaluation of biological control of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) using *Diglyphus isaea* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae) in three seasonal culture types of tomato greenhouse. Kor. J. Appl. Entomol. 46: 71-78.

Kim, Y., D. Kim and J. Lee. 2000. Disturbance of adult eclosion by fenoxycarb, a juvenile hormone mimic, in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J. Asia Pac. Entomol. 3: 103-111.

Ku, N.O., D.M. Toivola, P. Strand and M.B. Omary. 2010. Cytoskeletal keratin glycosylation protects epithelial tissue from injury. Nat. Cell Biol. 12: 876-885.

Lim, J.R., H.C. Moon, S.U. Choi, J.H. Kim, K.K. Lee, B.R. Ko, J.S. Choi, Y.K. Jeon and C.Y. Hwang. 2007. Economic injury levels of *Liriomyza trifolii* Burgess (Diptera: Agromyzidae) infesting eggplant in greenhouse. Kor. J. Appl. Entomol. 46: 409-414.

Liu, X., Y. Wang, H. Zhu, Q. Zhang, X. Xing, B. Wu, L. Song and L. Fan. 2010. Interaction of sedlin with PAM14. J. Cell Biochem. 109: 1129-1133.

Montpetit, B. and E. Conibear. 2009. Identification of the novel TRAPP associated protein Tca17. Traffic. 10: 713-723.

Moon, H.C., J.S. Choi and C.Y. Hwang. 2002. Ovipositional characteristics of *Hemiptarsenus zilahisebessi* (Hymenoptera: Eulophidae), ectoparasitoid of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Kor. J. Appl. Entomol. 41: 21-25.

Park, J.D., Y.S. Ku, D.S. Choi and S.S. Kim. 2001. Damaged aspects, seasonal fluctuations, and attractivity of various colors on *Liriomyza trifolii* Burgess (Diptera: Agromyzidae) in Gerbera. Kor. J. Appl. Entomol. 40: 97-103.

Park, J.D., H.B. Lee, S.G. Kim, D.I. Kim, I.J. Park, S.C. Kim and K.C. Kim. 2000. Population dynamics and injuries by *Liriomyza trifolii* (Burgess) in chrysanthemum field. Kor. J. Appl. Entomol. 39: 141-147.

Parrella, M.P. 1987. Biology of *Liriomyza*. Annu. Rev. Entomol. 32: 201-224.

Parrella, M.P. and C.B. Keil. 1984. Insect pest management: the lesson of *Liriomyza*. Annu. Rev. Entomol. 32: 201-224.

SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.

Shin, H.J., M.J. Seo and Y.N. Youn. 2006. Ultrastructure of antennal sensilla on american leafminer, *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Kor. J. Appl. Entomol. 45: 119-129.

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.

Trumble, J.T. 1990. Vegetable insect control with minimal use of insecticides. Hortscience 25: 159-163.

Trumble, J.T., I.P. Ting and L. Bates. 1985. Analysis of physiological growth and yield response of celery to *Liriomyza trifolii*. Entomol. Exp. Appl. 38: 15-21.

Wei, J., L. Zou, R. Kuang and L. He. 2000. Influence of leaf tissue structure on host feeding selection by pea leafminer *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). Zool. Studies 39: 295-300.

Yang, J., Z. Zhang, S.M. Roe, C.J. Marshall and D. Barford. 2009. Activation of Rho GTPases by DOCK exchange factors is mediated by a nucleotide sensor. Science 325: 1398-1402.