

초음파 처리에 따른 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 발육 및 교미행동 교란 분석

김용균* · 손예림 · 박복리
 안동대학교 자연과학대학 생명자원과학과

Analysis of Physiological Alterations in Development and Mating Behavior by Ultrasound Treatment in the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*

Yonggyun Kim*, Yerim Son and Bokri Park

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

ABSTRACT: Some high frequency sounds alter physiological processes of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. This study investigated the effect of ultrasound (≥ 20 kHz) on larval feeding, pupal development, and adult mating behavior of *S. exigua*. Ultrasound suppressed feeding behavior of fifth instar larvae, and 30 or 45 kHz treatment inhibited more than 50% of feeding activity. Larvae treated with ultrasound exhibited alterations in major nutrient compositions in the hemolymph plasma. Plasma protein levels decreased with an increase in ultrasound frequency. In contrast, sugar levels increased with an increase in ultrasound frequency. Lipid levels increased with an increase in ultrasound frequency up to 30 kHz and then decreased at treatments > 30 kHz. Hemocytes, the fat body, and epidermis expressed three heat shock proteins and apolipoprotein III. Ultrasound treatment markedly inhibited expression of some stress-related genes. Ultrasound treatment also inhibited *S. exigua* pupal development by extending the pupal developmental period and preventing adult emergence. Last, ultrasound treatment significantly inhibited adult mating behavior, which resulted in a significant decrease in female fecundity. These results show that ultrasound is a physiological stress to *S. exigua*.

Key words: Ultrasound, Stress, Feeding, Mating, *Spodoptera exigua*

초 록: 일부 고주파 음파 처리가 파밤나방(*Spodoptera exigua*)의 생리변화를 유발시킨다. 이 연구는 초음파(≥ 20 kHz) 처리가 파밤나방 유충 섭식, 용 발육 및 성충 교미행동에 미치는 영향을 분석하였다. 초음파 처리는 5령충의 섭식 활동을 억제시켰다. 특별히 30 kHz 또는 45 kHz 초음파 처리를 받은 유충은 50% 이상의 섭식활동이 감소하였다. 이러한 초음파 처리를 받은 유충은 혈장의 주요 영양물질 함량이 변동되었다. 혈장 단백질은 처리 초음파의 주파수 증가에 따라 감소하였다. 그러나 혈당은 처리 초음파의 주파수 증가에 따라 증가하였다. 지질 함량은 30 kHz 처리까지는 증가하다가 이후 감소하였다. 파밤나방 5령의 혈구, 지방체 및 표피세포의 세 조직은 스트레스 관련 유전자들인 세 종류의 열충격단백질과 apolipoprotein III를 발현시켰다. 그러나 초음파를 처리할 경우 일부 스트레스 관련 유전자들의 발현을 크게 억제시켰다. 초음파 처리는 또한 용 발육을 억제시켜, 용기간을 연장시키고 성충으로 우화를 현격하게 낮추었다. 끝으로 초음파 처리는 성충의 교미행동을 억제시켜 암컷의 산란력을 뚜렷하게 낮추었다. 이러한 결과는 초음파가 파밤나방의 생리적 스트레스로 작용하고 있다는 것을 제시하고 있다.

검색어: 배초음파, 스트레스, 섭식, 교미, 파밤나방

일부 곤충은 짝을 찾는 통신수단으로 소리를 이용하고 있다. 이러한 소리는 비교적 낮은 주파수를 이용하는 충돌음과 비교적

높은 주파수를 갖는 마찰음과 진동음으로 나눌 수 있다. 충돌음은 여치류(*Meconema thalassinum*)가 풀잎 위에 앉아서 뒷다리로 잎 표면을 일정한 속도로 두드리면서 나오는 낮은 주파수의 소리 형태가 주변의 같은 종에게 통신 신호로 이용되는 경우이다(Sismondo, 1980). 반면에 몸의 상호 부위가 줄과 마찰편의 구조를 지닐 때 이 두 부위를 비비면서 발생하는 소리는 마찰음

*Corresponding author: hosanna@andong.ac.kr

Received April 10 2012; Revised May 2 2012

Accepted May 10 2012

이 되며, 메뚜기와 귀뚜라미 등 많은 종류의 곤충이 이러한 소리로 교신하게 된다(Haskell, 1957; Stephen and Hartley, 1995). 진동음은 얇은 진동막을 활처럼 진동시키며 발생하는 소리로 교신하는 매미류에서 찾아볼 수 있다(Young and Bennet-Clark, 1995). 소리를 감지하는 곤충의 청각은 물리적 음파 신호를 전기적 신호로 전환하는 감각기와 이를 뇌로 이송하는 신경전달 과정 및 이에 상응한 행동 반응으로 이어지게 된다. 청각 수용은 고막, 기계감각털, 박각시류의 아랫입술수염 및 모기류의 존스틴기관 등 곤충에 따라 다양하게 존재한다(McIver, 1985). 따라서 소리 발생과 청각이 짝을 이루면서 의사소통이 이뤄지며, 이때 소리를 이용한 통신은 종 특이적 주파수와 진동수를 갖게 된다(Jang, 2011).

소리 통신은 또한 곤충과 포식자의 관계에서도 나타나고 있다. 다수의 곤충류는 식충성 박쥐의 음파탐지를 감지할 수 있는 기작을 발달시켰다(Roeder, 1967). 초음파에 대한 회피행동은 이들 곤충류에서는 반사운동으로 프로그램되어 고막기관으로 수신된 초음파는 박쥐 인식으로 감지되고 다시 운동신경으로 연결된다(Schulze and Schul, 2001). 밤나방의 경우 박쥐의 음파탐지 신호를 탐지하는 청각신경을 찾고 이 신경의 전기적 반응을 밝혔다(Payne *et al.*, 1966). 초음파의 세기에 따라 밤나방의 회피행동은 차이를 보여 높은 자극에는 땅에 떨어지는 행동을 보이는 반면 낮은 자극에 대해서는 음파 근원지로부터 멀어지는 비행행동을 보이게 되며, 이때 가장 감각이 높은 주파수는 20-30 kHz로 보고되었다(Miller and Surlykke, 2001). 이때 초음파는 소리 수신자의 가청 범위에 속하나 참의사소통이라기 보다는 오히려 정상적 생리 현상을 교란시킬 수 있는 스트레스 음파로 작용할 수 있다.

스트레스 음파에 대한 연구는 척추동물 중심으로 연구되었다. 쥐의 경우 급성 스트레스 음파에 대해서 스트레스성 무통각증(antinociception)을 유발하는 반면, 장시간 스트레스 음파 노출에 대해서는 반대로 섬유성근통증(fibromyalgin) 또는 류마티스 관절염을 유발하여 스트레스 음파가 신경계와 면역계에 해로운 영향을 줄 수 있다고 밝혔다(Khasar *et al.*, 2005).

스트레스 음파가 곤충 생리적 현상에 미치는 현상이 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 아메리카잎굴파리, 복숭아혹진딧물에서 분석되었다. 이들 곤충류는 모두 5,000 Hz의 주파수 소리에 생리적 반응이 교란되는 현상을 보였다. 파밤나방의 경우 유충의 섭식 활동이 둔화되고, 이에 따라 발육이 지연되며 면역 활동이 낮아지는 현상을 보였다(Park *et al.*, 2011a). 이들 곤충류는 스트레스 음파에 노출될 경우 살충제에 대한 내성이 낮아져서 살충제의 방제 효과를 높여주는 응용적 효과도 보여 주었다.

이러한 기존 연구를 바탕으로 본 연구는 초음파가 밤나방의

일종인 파밤나방에게 주는 생리적 교란 현상을 분석하였다. 먼저 유충과 용의 발육에 미치는 초음파의 영향을 분석하였다. 이후 성충의 교미행동에 미치는 초음파의 영향을 분석하였다. 또한 본 연구는 초음파가 생체내 생화학적 변화를 유발하는 지를 밝히고자 혈장 영양물질의 변동을 조사하고 스트레스 관련 유전자 발현을 분석하였다. 본 연구 결과는 초음파가 파밤나방의 생리적 및 생화학적 변화를 야기시키는 스트레스 자극원으로 작용한다는 것을 보여주었다.

재료 및 방법

파밤나방 사육

파밤나방 유충을 안동시에 소재한 파(*Allium fistulosum* L.) 재배지에서 채집한 후 실내에서 인공사료(Goh *et al.*, 1990)를 먹이로 누대 사육하였다. 사육 배양기의 조건은 온도 25±1 °C, 광주기 16:8 h(L:D) 이었다. 성충의 먹이로 10%의 설탕물을 산란상자에 공급하였다.

초음파 처리

(주)그린테크로부터 제공받은 음파기기는 데시벨 측정기, 음파처리구(45×90 cm), 음파송출기로 구성되어 있다. 이들의 구성 및 기기 전체의 크기는 Park *et al.* (2011a)과 동일하였다. 분석된 파밤나방은 모두 5령충이고 실내온도 25°C에서 주파수는 95 dB로 고정하고 20-45 KHz의 초음파에서 일정 시간 동안 노출시켜 생리변화를 관찰하였다.

초음파처리에 따른 파밤나방의 열충격단백질(hsp70, 74, 83)과 apolipoprotein (ApoLpIII) 유전자 변화 분석

파밤나방 5령 유충을 각 10 마리 씩 각 초음파(20-45 kHz) 처리구에 24 시간동안 노출시킨 후, 해부하여 각 조직(혈구, 지방체, 표피)을 적출하여 Trizol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 회사의 추천 방법으로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 정량분석한 후 탈이온염류수를 이용하여 약 90 ng/μL으로 희석하여 역전사효소(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하여 PCR에 이용하였다. 열충격단백질(hsp) 가운데 *hsp70*, *hsp74*, *hsp83* 유전자를 특정 프라이머(Xu *et al.*, 2011)를 이용하여 증폭하였다. 이때 프라이머 서열은 *SexHsp70*은 5'-CAT GAA TCC TCG CGC ACT GC-3', 5'-CCT TGT CGT TCT TGA TCA CG-3', *SexHsp74*는 5'-CCT

ACC TGA ACA CCT CAG T-3', 5'-GGG ATC GTA GTA TTT CTG GTG-3', *SexHsp83*은 5'-GCT GAC ATT AGC ATG ATT GG-3', 5'-GGC AGG TCC TCA CTG TCT AC-3'이다. 또한 *ApoLpIII* 유전자의 특정 프라이머를 이용하였다. 이때 프라이머 서열은 5'-ATG GTC GCC AAG TTG TTC GTG-3', 5'-CTG CTT GTT GGC AGC CTC-3'이다. 각 PCR 시료의 구성은 다음과 같았다. cDNA 1 μ L, dNTP 2.5 μ L, 10x PCR 완충용액 2.5 μ L, 프라이머 각각 1 μ L (25 pmol/ μ L), Taq polymerase 0.5 μ L, 3차 증류수 16.5 μ L로 구성되었다. PCR 반응조건은 초기 94°C에서 2 분 동안 불활성단계를 거친 후, 35 반복으로 증폭 단계를 거쳤다. 증폭과정은 94°C에서 1 분 동안 변성단계와 프라이머 결합 반응은 *hsp70*, *hsp74*, *hsp83*, 및 *ApoLpIII*가 각각 47, 45, 48, 53°C에서 1 분, 72°C에서 1 분의 사슬연장 단계로 구성되었다. 이후 최종 사슬연장 단계가 추가로 72°C에서 10 분 동안 이어졌다. PCR 생성물은 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1% 아가로스젤로 확인하였다.

혈장 단백질 함량 분석

파밤나방 5령 유충 10 마리를 초음파(20-45 kHz)에 24 시간 동안 노출시킨 후 혈림프를 추출하였다. 이 혈장의 총단백질 함량 분석은 Kim and Son (2006)의 방법을 따랐다. 간략하게, 추출된 혈림프는 250x g에서 5분간 원심분리하여 상등액 혈장을 얻었다. 측정 시료는 1 mL의 1x Bradford 용액(Bradford, 1976)과 20 μ L의 혈장을 넣은 후 5 분 동안 상온에서 반응시켜 595 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정량분석의 표준용액은 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Korea, Seoul, Korea)을 이용하여 단백질 함량 분석 표준식을 얻었다.

혈장 지질 함량 분석

상기 방법대로 초음파 처리 이후 혈장 시료를 얻었다. 이 혈장의 총지질 함량 분석은 Kim and Son (2006)의 방법을 따랐다. 간략하게, 측정 시료는 100 μ L의 혈장과 100 μ L의 지질추출용액(chloroform : methanol (1:1), v/v)을 5 분 동안 반응시킨 후 12,500x g에서 5 분 동안 원심분리를 하였다. 원심분리된 상층액을 95°C의 항온수조에서 20 분 동안 반응시킨 후 200 μ L의 황산을 넣고 95°C의 항온수조에서 10 분 동안 다시 반응시켰다. 상온으로 옮긴 후 5 mL의 Vanillin 용액(600 mg Vanillin, 400 ml phosphoric acid)을 첨가 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 linseed oil (0-500 μ g)을 사용하여 지질 함량 표준 방정식을 얻었다.

혈장 유리당(free sugars) 함량 분석

상기 방법대로 초음파 처리 이후 혈장 시료를 얻었다. 이 혈장의 총 유리당 함량 분석은 Kim and Son (2006)의 방법을 따랐다. 간략하게, 측정 시료는 100 μ L의 혈장에 300 μ L의 2% Na₂SO₄와 600 μ L의 methanol을 첨가한 후 5 분 동안 반응시켰다. 이후 12,500x g에서 5 분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 유리당 분석에 이용하였다. 상층액이 200-300 μ L가 되도록 95°C의 항온수조에서 50 분 동안 증발시켰다. 이후 상온으로 옮긴 후 5 mL의 Anthrone 용액(750 mg of Anthrone, 380 mL H₂SO₄, 150 mL 증류수)을 첨가한 후 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 포도당(0-500 μ g)을 이용하였다.

초음파 처리에 따른 유충 섭식량 검정

파밤나방 5령충(2일차)을 대상으로 주파수는 95 dB로 고정하고 0, 20, 25, 30, 35, 40 그리고 45 kHz의 음파 조건에서 24 시간 동안 노출시켜 섭식량 차이를 조사하였다. 섭식량 조사시 먹이는 배추 잎을 이용하였으며, 처리 전후의 배추잎 무게 차이로 산출하였다. 자연 감소된 배추잎 무게를 산출하기 위해 동일한 조건에서 처리 전후 시간 사이에 감소된 배추 무게 차이를 산출하였다. 각 처리는 10 마리씩 3 반복 실시하였다.

초음파 처리에 따른 용 발육 검정

용화 1 일째 번데기를 각각 10 마리씩 3 반복으로 25°C에서 각 0, 20, 25, 30, 35, 40 그리고 45 kHz의 주파수별로 노출시키고 우화될 때 까지의 기간을 측정하였다. 또한 우화율도 반복별로 분석하였다.

초음파 처리에 따른 성충 교미행동 검정

갓 우화한 암컷 1 마리와 수컷 두 마리를 0.785 L 원통용기 (10 cm 지름 × 10 cm 높이)에 10% 설탕물과 함께 두었다. 이 용기의 윗면은 망사로 덮고 초음파 스피커에 노출시켜 음파처리를 받을 수 있게 하였다. 각 초음파 처리는 0, 20, 25, 30, 35, 40 그리고 45 kHz의 상이한 주파수로 구성되고 4 일 동안 처리하였다. 이후 암컷 당 교미 횟수는 암컷 교미낭에 있는 정자 주머니의 개수로 판정하였다. 또한 용기 내부에 산란된 알 수를 계수하여 산란력을 평가하였다. 각 처리는 5 반복으로 분석하였다.

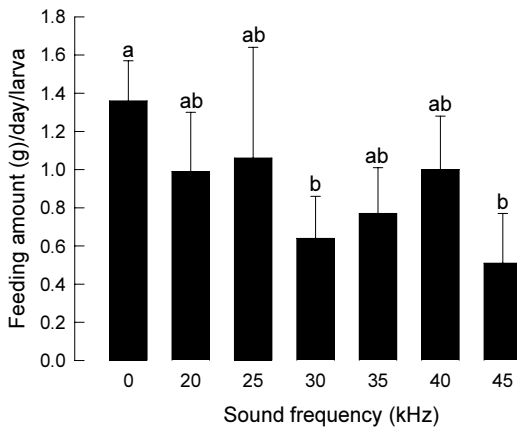


Fig. 1. Effect of different ultrasound treatments (95 dB) for 24 h on feeding amount of fifth instar *Spodoptera exigua*. Different letters above standard deviation bars indicate a significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

자료분석

처리에 따른 평균간 비교는 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다. 자료의 도형화는 Sigma Plot 8.0 (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA)을 이용하여 도식화하였다.

결과

초음파 처리가 유충 섭식 활동에 미치는 효과

파밤나방 5령충을 대상으로 초음파의 유충 섭식 행동에 미치는 영향을 분석했다(Fig. 1). 종령의 파밤나방은 25°C에서 5일 동안 지내고 용화과정으로 진행된다. 이 시기에 섭식은 초기 3일 동안 진행되고, 4일째부터 섭식량이 줄면서 5일째에는 먹이로부터 떨어지는 배회행동을 보이게 된다(Kim, 2012). 따라서 섭식량 분석은 2일째 5령충을 이용하였고, 24시간 동안 상이한 초음파에 노출시키면서 섭식량을 비교하였다. 이때 초음파의 주파수가 증가하면서 섭식량은 감소하는 것으로 나타났으며($F = 2.96$; $df = 6, 14$; $P = 0.0440$), 특별히 30 kHz와 45 kHz 처리에서는 50% 이상의 섭식량 감소를 보였다.

초음파 처리에 따른 생체 물질 변화

초음파 처리에 따른 파밤나방 혈장에 존재하는 전체 단백질 함량 변화를 분석한 결과, 30 kHz까지는 주파수에 상관없이 일정하게 약 4%의 단백질 함량을 보였다(Fig. 2). 그러나 35 kHz 이상에서는 혈장의 단백질의 함량이 줄어드는 것을 관찰

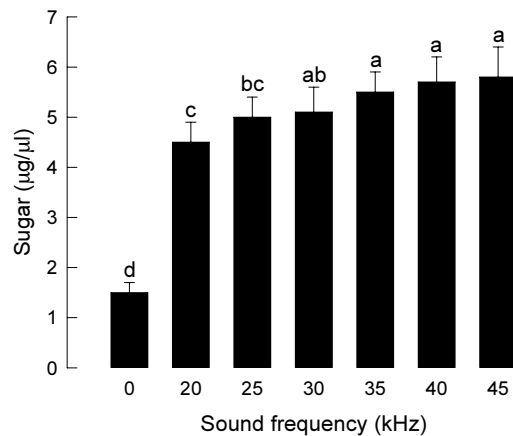
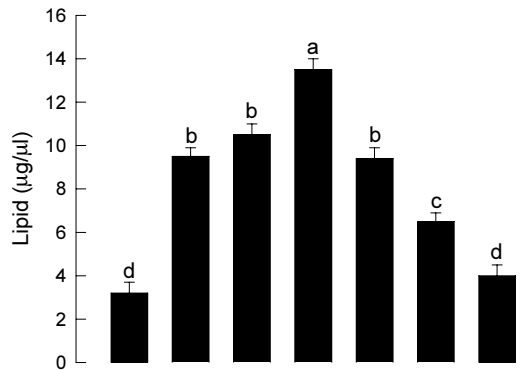
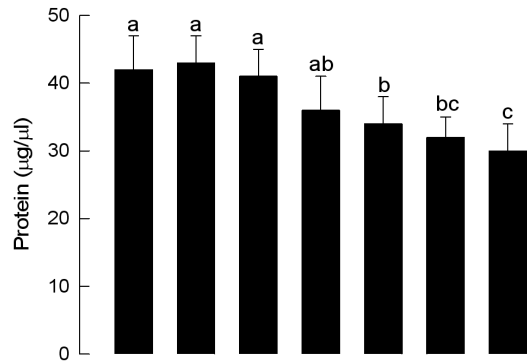


Fig. 2. Changes in plasma protein, lipid and sugar contents of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae in response to different ultrasound treatments at 95 dB for 24 h. Different letters above standard deviation bars indicate a significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test).

하였다. 혈장 내 지질은 대조구에서 약 0.3%를 보였으나, 모든 초음파 처리구에서는 현격하게 증가하여 30 kHz를 처리한 유충의 경우는 약 1.3%로 증가하였다. 그러나 다시 35 kHz 이상 처리에서는 지질 함량이 감소하는 경향을 보였다. 혈장에 존재하는 유리당의 경우 약 0.15%를 보였으나 초음파 처리에 따라 현저하게 증가하여 혈당이 약 0.5%를 차지하였다.

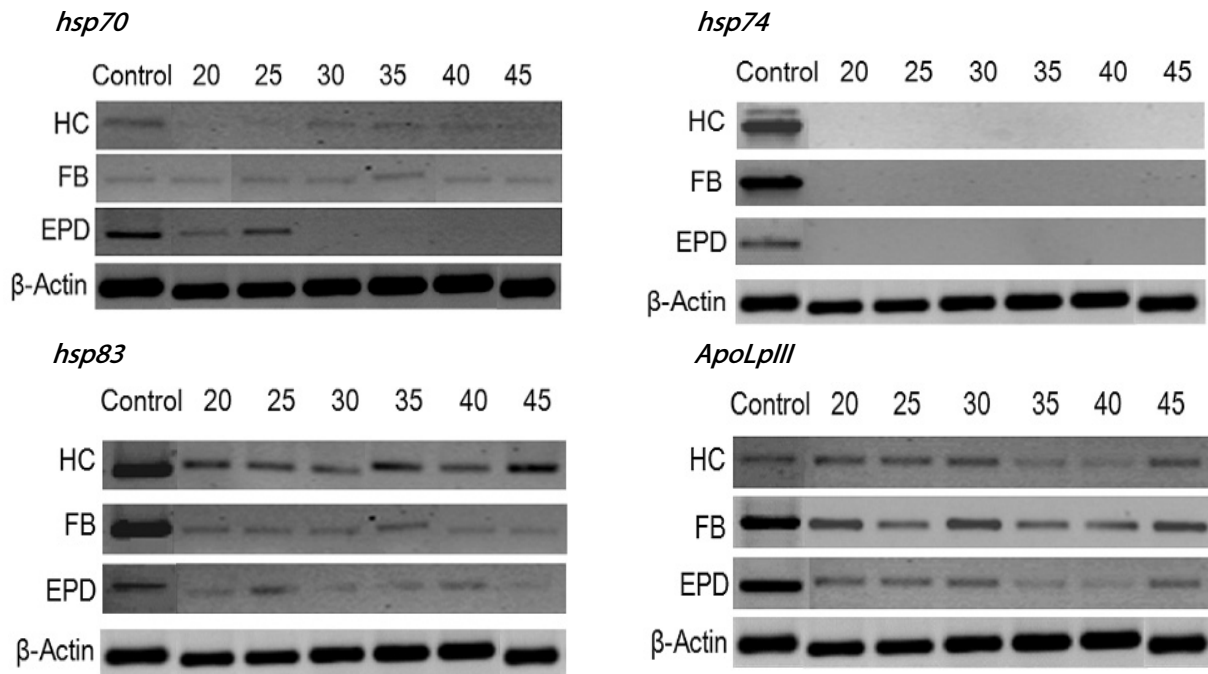


Fig. 3. Changes in stress-related protein gene expressions in different tissues of fifth instar *Spodoptera exigua* larvae in response to different ultrasound treatments at 95 dB for 24 h. HC, hemocyte; FB, fat body; EPD, epidermis. (A) Heat shock protein (hsp)70 (B) hsp74 (C) hsp86 (D) apolipoprotein III (ApoLpIII). β -Actin expression was analyzed to confirm the cDNA preparations.

초음파 처리에 따라 세 종류의 열충격단백질과 지질운송단백질인 *ApoLpIII*의 유전자 발현 양상을 조사했다(Fig. 3). 조사된 4 종의 유전자들은 모두 대조구에서 발현을 보였다. *hsp70*의 경우 음파 처리에 민감하게 발현량이 줄어들었다. 그러나 조직별로 감수성 정도가 달라 혈구의 경우 모든 초음파 처리에서 발현이 감소하였고, 지방체의 경우 대조구에서 보인 약한 발현이 그대로 유지하는 경향을 보였다. 또한 표피세포의 경우는 30 kHz 이상에서 발현량이 크게 줄어드는 경향을 보였다. *hsp74*는 모든 초음파 처리에서 세 조직 모두 발현이 억제되었다. *hsp83*의 경우도 모두 초음파 처리에서 발현량이 감소하였다. *ApoLpIII*는 비교적 초음파 처리에 반응하지 않았으나, 표피세포는 다소 감소하는 경향을 보였다.

용 발육에 미치는 초음파 처리 효과

여러 주파수의 초음파 처리에 따라 파밤나방 용 발육의 변화를 조사하였다(Fig. 4). 처리되는 초음파의 주파수가 증가함에 따라 용 발육 기간이 지연되었다. 일반적으로 25°C에서 약 5일 소요되는 용 발육기간이 45 kHz의 초음파로 처리할 경우 약 8일로 증가하였다. 또한 성충으로 발육이 뚜렷이 감소하여 45 kHz를 처리할 경우 우화율이 30%로 감소하였다.

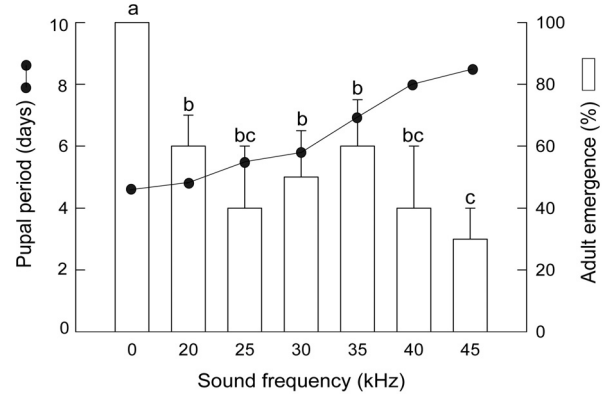


Fig. 4. Effect of different ultrasound treatments (95 dB) on pupal development in *Spodoptera exigua*. (A) Pupation rate at 9 days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate a significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (B) Daily emergence number.

성충 교미활동에 미치는 초음파 처리 효과

성충 생리적 특성에 미치는 초음파의 영향을 분석하기 위해 다양한 주파수의 초음파를 처리하여 파밤나방의 교미율과 산란력을 분석했다(Fig. 5). 파밤나방의 교미는 암컷의 교미낭에 존재하는 정자주머니의 존재 및 개수를 중심으로 파악하였다. 본 연구에서 이용된 0.785 L 용기에서 암컷 한 마리와 수컷 두 마리

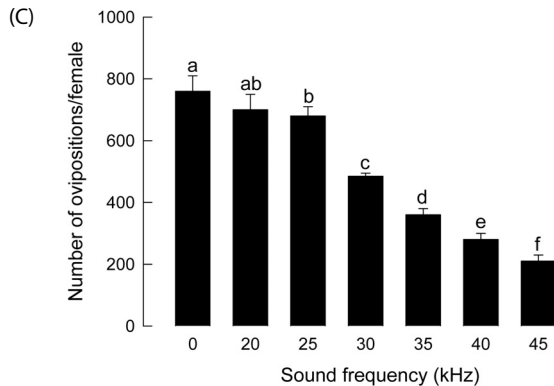
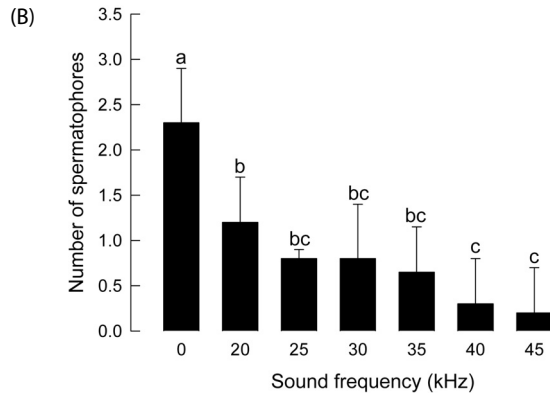
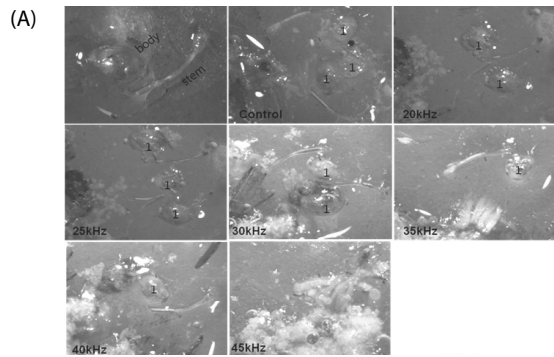


Fig. 5. Effect of ultrasound treatment on *Spodoptera exigua* mating frequency. Each experimental box (0.785 L) contained one female and two males. Treatment was conducted during first four days after adult emergence. Each treatment was replicated five times. (A) Observations of spermatophores in the spermathecae of females under a stereomicroscope at 50x magnification. A spermatophore consists of a stem and body (head area). "1" indicates each spermatophore. (B) Average number of spermatophores per female. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at Type I error = 0.05 (LSD test). (C) Effect of ultrasound treatment on *S. exigua* oviposition.

를 유지한 경우 4일 동안 약 2 회 이상의 교미를 한 것으로 처리 암컷의 교미횟수에 존재하는 정자주머니 개수로 판단하였다(Fig. 5A). 이러한 교미횟수는 초음파 처리에 따라 감소하여 45 kHz를 처리한 경우 평균 0.15 회로 약 10배 이상 감소하였다(Fig. 5B). 이러한 초음파 처리는 암컷의 산란수 감소에도 영향을 미치는 것

으로 나타났다(Fig. 5C). 대조구의 경우 약 780 개의 알을 산란한 반면, 45 kHz 처리한 경우 200 개 이하의 알을 산란하였다.

고찰

스트레스 음파에 대한 곤충의 생리적 변화가 파밤나방을 비롯하여 아메리카잎굴파리(*Liriomyza trifolii*) 및 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)에서 진행되었다(Seok *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011a,b). 분석된 이들 곤충에서 고주파(특히, 5,000 Hz)는 발육 생리, 섭식 행동 및 산란 생리과정에 저해를 주었다. 본 연구는 초음파(≥ 20 kHz)가 파밤나방의 생리적 교란에 미치는 영향을 분석하였다.

초음파는 유충의 섭식 행동을 저하시켰다. 특별히 30 kHz와 45 kHz에서는 50% 이상의 섭식 행동을 억제시켰다. 또한 혈장 내 영양물질의 변동을 일으켰다. 초음파 처리에 따라 단백질의 함량은 감소하지만, 혈당과 지질의 농도는 감소하는 경향을 나타냈다. 무처리구 파밤나방 유충 혈장에 존재하는 영양물질의 함량을 퍼센트 농도로 환산하여 보면 가장 많이 존재하는 것이 단백질이고 다음으로 지질 그리고 혈당으로 이어졌다. 이러한 파밤나방 혈장에 존재하는 영양물질의 함량 변화는 초음파 처리가 스트레스 요인으로 작용할 수 있다는 가능성을 보여준다. 스트레스에 관련되어 곤충에서 분비되는 주요 호르몬은 기질 동원호르몬(adipokinetic hormone: AKH)이다(Gäde *et al.*, 1997). 지질과 혈당을 높여주는 AKH는 체내 이화작용을 높여주는 생리적 변화를 유발시켜 스트레스에 대처하게 한다(Velki *et al.*, 2011). 파밤나방이 스트레스 음파에 노출되면 내분비기관인 카디아체(corpora cardiaca: CC)에서는 AKH를 분비하고 이 호르몬의 작용 기관인 지방체로 하여금 이화작용을 촉진시켜 저장된 중성지질(triglyceride)이나 글리코젠(glycogen)에서 diglyceride와 포도당을 유리시키고, 포도당은 다시 곤충의 혈당인 trehalose로 전환되어 혈림프로 방출되게 된다. 이러한 결과로 스트레스 음파에 노출된 파밤나방은 혈장의 지질 함량과 유리당의 농도가 올라가는 스트레스 대처 상태로 전환되게 된다. 초음파 처리 가운데 30 kHz 이상은 단백질의 함량 저하를 유발시키는 데, 이는 전체적 대사 저하에 기인되는 효과를 초래할 수 있다.

초음파 스트레스에 대한 생리적 대처 능력의 저하는 스트레스 관련 유전자 발현의 억제와 연계된다. 즉, 열충격단백질(HSP)은 고온, 저온, 건조, 영양 결핍 등의 요인에 의해 발현되는 스트레스 관련 단백질이다(Feder and Hofmann, 1999). 이들의 본래 기능은 세포의 단백질 합성에 관여하여 단백질의 3차구조를 정상적으로 이루게 하는 chaperone 역할을 담당하게

된다(Hartl and Hayar-Hartl, 2002; Walter and Buchner, 2002). 이러한 열충격단백질은 일반적으로 네 부류로 분류되어 분자량이 20-30 kDa되는 소형 HSP와 분자량이 60 kDa의 HSP60, 70 kDa의 HSP70 그리고 83 kDa의 HSP83을 포함하게 된다(Xu *et al.*, 2011). 본 연구에서는 파밤나방에서 밝혀진 3 가지 *hsp* 유전자들을 대상으로 초음파 처리에 따른 발현을 분석하였다. 모든 열충격단백질의 유전자 발현이 초음파 처리에 따라 억제되는 것을 세 조직에서 관찰하였다. 이와 같은 초음파 처리에 따른 *hsp* 유전자들의 발현 억제는 파밤나방이 스트레스에 대해 대처하는 능력을 잃게 되는 생리적 악영향을 유발하게 된다. 초음파에 대한 스트레스 민감도는 *ApoLpIII* 유전자 발현에서도 나타났다. *ApoLpIII*는 지질 운송단백질의 구성원으로 비교적 분자량이 큰 *ApoLp I*과 *II*로 구성된 곤충의 혈장 지질운송체인 고밀도 리포포린(high density lipophorin)에 지질이 결합하여 저밀도 리포포린으로 전환될 때 지질의 단백질 결합을 견고하게 하여주는 역할을 담당하게 된다(Weers and Ryan, 2006). 또한 *ApoLpIII*는 세균의 외막에 존재하는 지질다당체를 인식하는 면역물질로도 기능을 담당하고 있다(Halwani and Dunphy, 1999; Halwani *et al.*, 2000). 파밤나방에서 *ApoLpIII*의 발현을 RNA interference로 억제하면 면역력이 크게 저하되고 발육이 억제되는 현상이 보고되었다(Son *et al.*, 2012). 초음파에 의한 단백질의 발현억제는 지질 운송 능력의 저하 및 면역력 감소를 유발할 수 있다. 특별히 초음파 처리에 따라 혈장에 높아진 지질을 운송하려면 그만큼 이들의 면역 작용에 대한 기여도는 낮아져서 외래 병원체 침입에 대한 대처 능력이 떨어지는 면역 결핍으로 이어질 수 있다(Adamo *et al.*, 2008). 이러한 현상은 이전 연구에서 보여준 스트레스 음파 처리에 따른 면역 저하 현상으로 설명되어 진다(Park *et al.*, 2011a).

초음파 처리에 따라 용 발육과 성충 교미행동이 억제되었다. 밤나방 성충의 경우 복부에 첫마디에 존재하는 고막기관을 통해 초음파를 감지하는 것으로 밝혀졌다(Payne *et al.*, 1966). 초음파에 대한 회피행동은 이들 곤충류에서는 반사운동으로 프로그래밍되어 고막기관으로 수신된 초음파는 박쥐 인식으로 감지되고 다시 운동신경으로 연결된다(Schulze and Schul, 2001). 초음파의 세기에 따라 밤나방의 회피행동은 차이를 보여 높은 자극에는 땅에 떨어지는 행동을 보이는 반면 낮은 자극에 대해서는 음파 근원지로부터 멀어지는 비행행동을 보이게 되며, 이때 가장 감각이 높은 주파수는 20-30 kHz로 보고되었다(Miller and Surlykke, 2001). 이러한 회피반응은 야외 조건과 유사한 연구가 수반되어야 하나 본 연구는 초음파가 성충의 정상적 교미행동에 저해를 주어 교미율을 낮추었다는 가능성을 제시한다. 그러나 용의 경우 어떻게 초음파를 감지하였는 지에 대해서

궁금하다. 용 체표면에 존재하는 다양한 기계 감각털이 초음파를 탐지했거나 아니면 용 체내에 발육하는 성충 조직의 고막기관이 이를 감지하는 가설도 세울 수 있으나 이에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

본 연구는 초음파가 파밤나방으로 하여금 생리적 스트레스 음파로 작용할 수 있다는 것을 유충 섭식 저하, 용발육 지연 및 성충 교미행동 저하 및 체내 영양물질 변화로 보여 주었다. 그러나 초음파를 감지하여 이러한 생리 및 생화학적 변화를 유도하는 경로에 대해서는 추후 연구에서 이뤄져야 한다.

사 사

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 아젠다과제에서 지원한 연구과제로 수행되었다. 초음파 처리 시설을 대여하여 준 (주)그린테코에 감사의 말씀을 드립니다.

Literature Cited

- Adamo, S.A., J.L. Roberts, R.H. Easy and N.W. Ross. 2008. Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipoprotein III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. *J. Exp. Biol.* 211: 531-538.
- 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.
- Feder, M.E. and G.E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-282.
- Gäde, G., K.H. Hoffmann and J.H. Spring. 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future direction. *Physiol. Rev.* 77: 963-1032.
- Goh, H.G., S.G. Lee, B.P. Lee, G.M. Choi and J.H. Kim. 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 29: 180-183.
- Halwani, A.E. and G.B. Dunphy. 1999. Apolipoprotein-III in *Galleria mellonella* potentiates hemolymph lytic activity. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 563-570.
- Halwani, A.E., D.F. Niven and G.B. Dunphy. 2000. Apolipoprotein -III and the interactions of lipoteichoic acid with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 233-241.
- Hartl, F.U. and M. Hayar-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
- Haskell, P.T. 1957. Stridulation and associated behaviour in certain Orthoptera. I. Analysis of the stridulation of, and behaviour between males. *Anim. Behav.* 5: 139-148.
- Jang, Y. 2011. Insect communication: concepts, channels and contexts.

- Kor. J. Appl. Entomol. 50: 383-393.
- Khasar, S.G., P.G. Green and J.D. Leine. 2005. Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain* 116: 79-86.
- Kim, J. 2012. Functional genomic analysis of antimetamorphic factors in a polydnavirus, *Cotesia plutellae* bracovirus. MS thesis. Andong National University, Andong, Korea.
- Kim, Y. and Y. Son. 2006. Parasitism of *Cotesia plutellae* alters morphological and biochemical characters of diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Asia-Pac. Entomol.* 9: 37-42.
- McIver, S.B. 1985. Mechanoreception. pp. 71-132. *In* Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 6, eds. by G.A. Kerkut and L.I. Gilbert. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Miller, L.A. and A. Surlykke. 2001. How some insects detect and avoid being eaten by bats: tactics and countertactics of prey and predator. *BioScience*. 51: 570-581.
- Park, J., J. Seok, S.V. Prasad and Y. Kim. 2011a. Sound stress alters physiological processes in digestion and immunity and enhances insecticidal susceptibility of *Spodoptera exigua*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50: 39-46.
- Park, J., Prasad, S.V. and Y. Kim. 2011b. Effects of sound stress on physiological processes of the American leafminer, *Liriomyza trifolii*, and proteomic analysis. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50: 131-139.
- Payne, R.S., K.D. Roeder and J. Wallman. 1966. Directional sensitivity of the ears of noctuid moths. *J. Exp. Biol.* 44: 17-31.
- Roeder, K.D. 1967. Turning tendency of moths exposed to ultrasound while in stationary flight. *J. Insect Physiol.* 13: 873-880.
- SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's Guide, Release 6.03, Ed. Cary, NC, USA.
- Schulze, W. and J. Schul. 2001. Ultrasound avoidance behaviour in the bush cricket *Tettigonia viridissima* (Orthoptera: Tettigoniidae). *J. Exp. Biol.* 204: 733-740.
- Seok, J., T. Kang and Y. Kim. 2010. Sound stress induces developmental alterations and enhances insecticide susceptibility in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Kor. J. Pestic. Sci.* 14: 415-420.
- Sismondo, E. 1980. Physical characteristics of the drumming of *Meconema thalassinum*. *J. Insect Physiol.* 26: 209-212.
- Son, Y., J. Hwang and Y. Kim. 2012. Functional study of the gene encoding apolipophorin III in development and immune responses in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Asia Pac. Entomol.* 15: 106-112.
- Stephen, R.O. and J.C. Hartley. 1995. Sound production in crickets. *J. Exp. Biol.* 198: 2139-2152.
- Velki, M., D. Kodrik, J. Vecera, B.K. Hackenberger and R. Socha. 2011. Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172: 77-84.
- Walter, S. and J. Buchner. 2002. Molecular chaperons-cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 1098-1113.
- Weers, P.M.M. and R.O. Ryan. 2006. Apolipophorin III: role model apolipophorin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 231-240.
- Xu, Q., Q. Zou, H. Zheng, F. Zhang, B. Tang and S. Wang. 2011. Three heat shock proteins from *Spodoptera exigua*: Gene cloning, characterization and comparative stress response during heat and cold shocks. *Comp. Biochem. Physiol. B* 159: 92-102.
- Young, D. and H.C. Bennet-Clark. 1995. The role of the tymbal in cicada sound production. *J. Exp. Biol.* 198: 1001-1019.