

점박이응애의 살비제저항성 발달과 Esterase Isozyme에 관한 연구*

Development of Acaricidal Resistance and Esterase Isozyme of *Tetranychus urticae*
(Acarina : Tetranychidae)

金 桑 洙¹ · 李 升 燦²

Sang Soo Kim¹ and Seung Chan Lee²

ABSTRACT These studies were conducted to examine the mechanism of acaricidal resistance in the twospotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). The resistant strains were obtained by successive selection of five acaricides including carbophenothion and ethion of organophosphorus compound, dicofol of organochlorine compound, cyhexatin of organotin compound and biphenthrin of synthetic pyrethroid. Esterase isozymes were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. The different esterase isozymes were detected between the resistant and the susceptible strains. The differences of the esterase isozymes of the resistant strains were Est. 1, Est. 3 in the carbophenothion-selected strain, Est. 3 in the ethion- and the cyhexatin-selected strains, Est. 1, Est. 3, Est. 7 in the dicofol-selected strain, Est. 3, Est. 7 in the biphenthrin-selected strain as compared to the susceptible strain. With the difference of electrophoretic bands and their activities, esterases were related to the resistant mechanism of tested acaricides.

KEY WORDS Twospotted spider mite, acaricidal resistance, electrophoresis, esterase isozyme

초 록 점박이응애 (*Tetranychus urticae* Koch)의 살비제저항성 기작을 구명하기 위한 기초시험으로서, 유기인계 carbophenothion과 ethion, 유기염소계 dicofol, 유기주석계 cyhexatin 및 합성 pyrethroid계 biphenthrin으로 누대도태한 각 저항성계통과 감수성계통을 공시하여, esterase isozyme의 영동대 차이점 (polyacrylamide gel electrophoresis)을 비교한 결과, carbophenothion 저항성계통은 감수성계통에서 나타나지 않은 Est. 1, Est. 3이 검출되었고, ethion과 cyhexatin 저항성계통에서는 각각 Est. 3이, dicofol 저항성계통에서는 Est. 1, Est. 3, Est. 7이, biphenthrin 저항성계통은 Est. 3, Est. 7이 검출되었다. 이러한 영동대와 기질분해량의 차이점으로 미루어 보아 공시살비제들의 저항성발달에는 esterase가 관여하는 것으로 나타났다.

검 색 어 점박이응애, 살비제저항성, 전기영동, 에스테라제 아이소자임

살충제에 대한 해충의 저항성은 특정농약의 연용에 의한 개체군의 누대선택으로 잠재적이던 저항성 유전인자가 발현되어 후대로 전달되는 진화의 일종으로 (Lee et al. 1986), 이러한 약제저항성의 기작에 대하여 생화학적 유전적 연

구가 근래 활발히 수행되고 있다. 모든 곤충들은 해독능력을 가지고 있지만 그 능력은 종, 발육기간, 곤충의 환경특성에 따라 다양하게 나타나는데, 이러한 활성의 다양성은 살충제의 선택적 독성과 곤충의 저항성발달에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(Terriere 1984). 곤충에서 지금까지 알려진 농약의 해독에 관여하는 중요한 효소계로는 mixed function oxidase, glutathione S-transferase, esterase 그리고

1 순천대학교 농과대학(College of Agriculture, Suncheon Nat'l University)

2 진남대학교 농과대학(College of Agriculture, Chonnam Nat'l University)

* 본 연구는 1988년도 한국과학재단의 연구비 지원으로 수행되었음.

DDT-ase 등이 있는 것으로 알려졌다(Brown 1960, Smith 1962, Oppenoorth 1965, 1985, Plapp 1976). 근래 해충의 약제저항성 연구에 전기영동법이 많이 적용되는데(湯嶋 1968, 宮田 1981), 곤충은 특히 isozyme의 연구에 적합하다고 보고(Wagner & Selander 1974)된 바 있다. 따라서 본 시험연구는 일반농가에서 많이 사용했거나 현재 사용하고 있는 여러 살비제 중 사용빈도가 높은 4가지 화학적 계통에서 대표적인 약제들을 선택하고 누대도태를 실시하여 저항성을 유발시킨 후, 전기영동법을 이용하여 이들 도태저항성계통과 감수성계통의 esterase isozymes를 검토하여 살비제저항성 응애에 관한 효율적 방제대책의 수립에 필요한 기초자료로 활용코자 수행하였다.

재료 및 방법

본 시험에 사용된 점박이용애는 약제에 노출된 적이 없는 감수성계통으로 1986년에 광주시 화정동 개인소유 정원의 국화에서 채집하였으며, 수반상자(85 × 85 cm)내 4~5개의 pot에 원예용 상토를 사용하여 재배한 강남콩(*Phaseolus vulgaris*)에서 사육하면서 시험에 필요한 응애를 확보하였다.

이때 사용한 상자내부에는 water barrier를 설치하여 응애의 이탈과 타계통의 침입을 막았다. 온실의 사육온도는 25 ± 3°C로 유지하였으며, 明暗條件은 전등을 이용하여 16 : 8시간으로 조절하였다.

공시살비제 유기인계인 carbophenothion과 ethion, 유기염소계인 dicofol, 유기주석계인 cyhexatin 그리고 합성 pyrethroid계인 biphenrin 등 5종이었다. 이들 살비제의 화학적 계통, 일반명, 화학명, 유효성분 및 상품명은 Table 1에 표시된 바와 같으며, 시판제품을 주로 사용하였다. 누대도태에 의한 저항성계통을 얻고자 공시된 5종의 살비제를 매세대마다 성충의 밀도가 가장 높을 때 LC75~85值 범위의 도태압으로 감수성계통에 처리하였고, 저항성이 증대됨에 따라 농도를 높여 가면서 도태를 실시하였다. 전기영동에 의한 esterase isozymes의 분리는 도태저항성계통들과 감수성계통을 공시하여 Davis(1964)의 방법을 응용한 polyacrylamide gel electrophoresis method에 의해 수행하였다. 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.5 ml에 점박이용애 10 mg을 넣어 빙냉조건하에서 glass homogenizer로 충분히 마쇄시킨 후 microcentrifuge를 이용하여 4°C에서 12,000 rpm으로 10분동안 원심분리하여 그 상등액을 추출

Table 1. Acaricides used in successive selection on susceptible strain of *T. urticae*

Chemical group	Common name	Chemical name	% a. i.	Trade name
Organophosphate	Carbophenothion	S-4-chlorophenylthiomethyl O, O'-diethylphosphorodithioate	25	Trithion
	Ethion	O, O, O', O'-tetraethyl-S, S'-methylene bis(phosphoro dithioate)	25	
Organochlorine	Dicofol	2, 2, 2-trichloro-1, 1-bis(4-chlorophenyl)ethanol	35	Kelthane
Organotin	Cyhexatin	Tricyclohexylhydroxystannane	25	Plictran
Synthetic pyrethroid	Biphenrin	2-methylbiphenyl-3-yl-methyl(Z)-(1RS, 3RS)-3-(2-chloro-3, 3, 3-trifluoroprop-1-enyl)-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxylate	2	Talster

Table 2. Development of resistance in *T. urticae* under successive selection of several acaricides

Acaricide	Population	No. of generations selected	Equation for probit regres. line(Y)	LC50 in % a. i.	Resistant ratio
Carbophenothion	Selected	22	$3.94 + 2.05X$	3.28961	156.0
	Susceptible	—	$6.71 + 1.02X$	0.02109	1
Ethion	Selected	24	$5.86 + 1.75X$	0.32419	64.1
	Susceptible	—	$7.62 + 1.14X$	0.00506	1
Dicofol	Selected	28	$8.08 + 3.42X$	0.12501	39.7
	Susceptible	—	$10.43 + 2.17X$	0.00315	1
Biphenthrin	Selected	24	$7.53 + 1.72X$	0.03407	25.2
	Susceptible	—	$10.24 + 1.83X$	0.00135	1
Cyhexatin	Selected	20	$9.00 + 2.02X$	0.01057	13.0
	Susceptible	—	$20.44 + 5.00X$	0.00082	1

하고 여기에 20% sucrose를 첨가하여 시료로 사용하였다.

7% polyacrylamide gel은 3M Tris-HCl buffer (pH 8.9)로 조제하여 125 × 140 × 1.5 mm의 vertical slab장비에 gel을 형성시켰다. 시료의 양은 100 μ l로 하였으며, electrode buffer는 0.05 M Tris와 0.4 M Glycine buffer (pH 8.3)를 만들어 이를 1 : 9로 증류수에 희석하여 사용하였다. 20 mA에서 1시간, 40 mA에서 3시간 영동하였다. 전기영동이 끝난 후 acetone 1 ml에 녹인 α -naphthyl acetat 30 mg과 fast blue RR salt 50 mg을 함유한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 100 ml에 gel을 넣고 37°C에서 20분동안 염색하여 도태저항성계통들의 영동대와 그 활성을 감수성계통과 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

누대도태에 의한 저항성 발달

5종의 살비제로 일정기간 누대도태하여 저항성유발 정도를 조사한 결과(Table 2), 살비제의 화학적 계통과 약종에 따라 차이는 있었으나 전반적으로 높은 수준의 저항성이 유발되었다. Carbophenothion과 ethion의 22세대와 24세

대 도태계통은 각각 156배와 64.1배의 저항성이 유발되었는데, carbophenothion은 ethion 도태계통보다 도태회수가 적었음에도 저항성증가는 훨씬 높은 수준으로 유발된 것은 동일계통 약제에서도 약종에 따라 저항성발달 배수에 차이가 있음을 알 수 있었다. Dicofol과 bipenthrin은 28세대와 24세대 도태에서 각각 39.7배와 25.2배의 저항성이 유발되어 carbophenothion이나 ethion의 저항성발달 수준에 비하면 상당히 낮게 유발되었다. 또한 cyhexatin은 20세대 도태에서 13배의 저항성이 유발되었는데, 이는 공시된 5종 살비제중 가장 낮은 수준으로 저항성이 증가된 것이다.

Esterase isozymes의 분리

전기영동을 실시한 결과 도태저항성계통들은 모두 감수성계통과 비교하여 뚜렷하게 차이점이 나타났으며 도태저항성 계통간에도 각각의 특성이 관찰되었다.

Carbophenothion과 ethion 도태저항성계통에서는 각각 6개와 5개의 영동대가 검출되었는데, 감수성계통에서는 4개의 영동대가 확인되었다(Fig. 1).

그들간의 차이점으로서 carbophenothion 저항성 계통은 감수성계통에서 보이지 않은 Est.

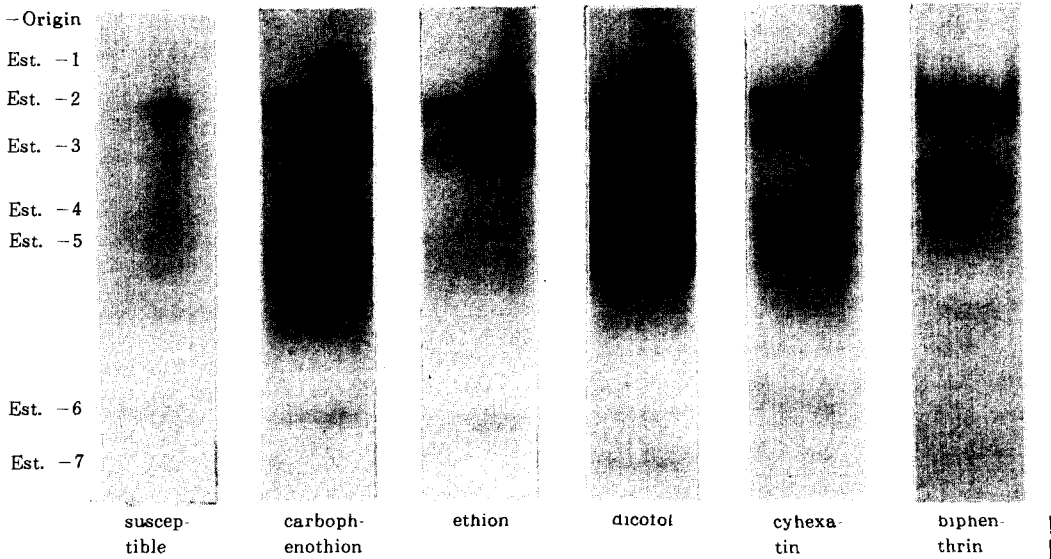


Fig. 1. Patterns of esterase isozymes of several acaricides-selected and susceptible populations of *T. urticae* separated by polyacrylamide gel electrophoresis method.

1과 Est. 3이 나타났는데, 두 계통에서 공통된 Est. 2, Est. 4와 Est. 5, Est. 6서도 감수성계통보다 큰 기질분해능을 보였다. Ethion저항성계통의 경우는 carbophenothion저항성계통에서 나타난 Est. 1이 검출되지 않아 동일계통 살비제에 의한 도태계통에서도 esterase isozymes의 양상은 같지 않았으나 감수성계통에서 보이지 않은 Est. 3이 검출되었으며, 그외의 영동대에서도 정도의 차이는 있지만 도태계통에서 활성이 강하게 나타났다. Maruyama 등(1984)은 malathion저항성 모기(*Culex pipiens*)계통은 감수성계통에 비해 Est. -R₁과 Est. -R₃ 두개의 영동대가 강한 활성을 보인 반면, temephos저항성계통에서는 Est. -R₂가 강한 활성을 나타내고 Est. -R₃와 Est. -R₁은 비교적 낮은 활성을 보였다고 보고하여 동일계통 약제에 대한 저항성계통에서도 그 검출양상은 같지 않음을 알 수 있었다. 그리고 유기인계 살비제에 대한 응애류의 저항성발현은 AChE가 주된 요인으로 보고(Smissaert 1964, Zahavi & Tahori 1970, Kuwahara 1982)된 바 있는데 본 시험의 결과로 미루어 보아 점박이응애의 유기인계 살비제 저항성발현에는 AChE와 esterase가 복합적으로

로 작용하는 것으로 생각된다. Dicofol 저항성계통에서는 모두 7개의 영동대가 확인되어 다른 도태저항성계통에 비하여 가장 많은 수의 영동대가 검출되었는데, 이중 Est. 7은 이 계통의 특징이었다. 이와 같은 검출양상을 감수성계통과 비교해 보면 Est. 1, Est. 3와 Est. 7은 도태저항성계통에서만 나타났으며, Est. 4와 Est. 5에서도 감수성계통보다 훨씬 짙게 검출되어서, 이 약제의 저항성발현에 esterase가 관여하는 것으로 생각된다.

Kono 등(1981)과 Cranham과 Helle(1985)는 dicofol 저항성 응애계통은 이 약제를 수용성물질로 전환하는 breakdown enzyme의 활성이 감수성계통보다 강하다고 보고한 바 있는데, 본 시험결과와 관련지어 보면 어느 요인이 dicofol 저항성 발달에 주요원인이 되는지는 현시점에서 단언할 수 없다.

그러나 해충의 약제에 대한 저항성발달은 피부부과성 해독 그리고 작용점의 감수성을 비롯한 여러가지 요인이 복합적으로 작용하여 유발되는 것이라는 보고 (Lee 1967, Cranham & Helle 1985)가 있어 이러한 점을 고려하여 추후 정밀한 시험연구가 이루어져 검토되어야 할

것이다. Cyhexatin 도태저항성계통에서는 모두 5개의 영동대가 검출되었고, 그중 Est. 3은 도태저항성계통에서만 관찰되었으며, 그외의 영동대도 감수성계통에서 활성이 낮아 그 차이점을 나타내었다.

이러한 결과는 Carbonaro 등(1986)의 cyhexatin저항성계통과 감수성계통간에는 ATPase의 활성에 차이가 있었다는 보고와는 거리가 있는 듯 하나, 진술한 바와 같이 해충의 약제저항성 발달에는 한가지 이상의 요인이 관여한다는 점을 생각할 때, 앞으로 보다 다각적인 방향으로의 시험연구가 요망된다. Biphenthrin 도태저항성계통에서는 감수성계통에서 보이지 않은 Est. 3과 Est. 7이 검출되었고, Est. 2를 비롯한 그외의 영동대에서도 도태저항성계통에서 활성이 높아 이 약제의 저항성발현에 esterase가 관여하는 것으로 생각되는데, Eldefrawi(1985)도 합성pyrethroid제 저항성발현에는 esterase가 한 요인으로 작용한다고 보고한 바 있다. 또한 Scott 등(1983)도 포식성응애(*Amblyseius fallaxis*)의 permethrin저항성 발달에 포함된다고 보고하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 공시된 5종 살비제에 대한 점박이응애의 저항성발달에는 도태저항성계통에 따라 그 정도의 차이는 있으나 esterase가 직·간접적으로 관여한다고 보지만, 주요인으로서의 작용여부는 본 시험의 결과로서는 단정하기 어려워, 앞으로 기존의 여러 살비제에 대하여 보고된 저항성기작을 기초로 하여 보다 다각적이고 체계적인 시험연구가 계속 수행되어야 할 것이다.

또한 전기영동법에 의한 esterase isozymes의 검출은 앞으로 저항성계통의 식별은 물론 나아가 신농약 개발에 적용될 수 있을 것이며, 야외포장에서 점박이응애의 저항성 획득여부를 조사하는데 활용될 수 있을 것으로 思料된다.

인 용 문 헌

- Brown, A. W. A. 1960. Mechanisms of resistance against insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 5 : 301~326.
- Carbonaro, M. A., D. E. Moreland, V. E. Edge, N. Motoyana, G. C. Rock & W. C. Dauterman. 1986. Studies on the mechanism of cyhexatin resistance in the two spotted spider mite, *Teranychus urticae* (Acari : Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 79 : 576~579.
- Cranham, J. E. & W. Helle. 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae, pp. 405~421. *In* W. Helle & M. W. Sabelis(ed.), *Spider mites their biology, natural enemies and control*. Vol. 1 B. Elsevier, Amsterdam.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *New York Academy of Sciences.* 121 : 404~427.
- Eldefrawi, A. T. 1985. Acetylcholinesterases and anticholinesterases, pp. 115~130. *In* G. A. Kerkurt & L. I. Gilbert (ed.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, New York.
- Kono, S., T. Saito & T. Miyata. 1981. Mechanism of resistance to dicofol in the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina : Tetranychidae). *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 25 : 101~107.
- Kuwahara, M. 1982. Insensitivity of the acetylcholinesterase from the organophosphateresistant kanzawa spider mite, *Teranychus kanzawai* Kishida(Acarina : Tetranychidae), to organophosphorus and carbamate insecticides. *Appl. Ent. Zool.* 17 : 486~493.
- Lee S. C. 1967. An investigation of the control of mite populations(*Tetranychus urticae* Koch) resistant to organo-phosphates. Lincoln College, New Zealand. p. 196.
- Lee, S. C., W. Y. Kim & S. S. Kim. 1986. Method comparison of chemical resistance level determination and field resistance of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch to benzomate, cyhexatin, and dicofol. *Korean J. Plant Prot.* 25 : 133~138.
- Maruyama, Y., K. Yasutomi & A. I. Ogita. 1984. Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex*

- pipiens*). Insect Biochem. 14 : 181~188.
- 宮田 正. 1981. 電気泳動法, 農薬実験法. 4. 環境化学及びソフトサイエンス社, 東京.
- Oppenoorth, F. J. 1965. Biochemical genetics of insecticide resistance. Ann. Rev. Entomol. 185~206.
- Oppenoorth, F. J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide, pp. 731~773. In B. A. Kerkut & L. I. Gilbert(ed.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 12. Insect control. Pergamon Press, N. Y.
- Plapp, F. W. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. Ann. Rev. Entomol. 21 : 179~197.
- Scott, J. G., B. A. Croft & S. W. Wagner. 1983. Studies on the mechanism of permethrin resistance in *Amblyseius fallacis* (Acarina : Tetranychidae) relative to previous insecticide use on apple. J. Econ. Entomol. : 6~10.
- Smitsaert, H. R. 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science : 129~131.
- Smith, J. N. 1962. Detoxication mechanisms. Ann. Rev. Entomol. : 465~480.
- Terriere, L. C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann. Rev. Entomol. : 71~88.
- Wagner, R. P. & R. K. Selander. 1974. Isozymes in insects and their significance. Ann. Rev. Entomol. : 117~138.
- 湯嶋 健. 1968. 薄層寒天ゲル 電気泳動法によるエステラーゼの分離・検出法. 植物防疫 22 : 25~28.
- Zahavi, M. & A. S. Tahori. 1970. Sensitivity of acetylcholinesterase in spider mites to organophosphorus compounds. Biochem. Pharmac. 19 : 219~225.

(1990년 5월 17일 접수)