

점박이응애의 독성시험방법과 유기인계 살비제 AChE 활성저해에 관한 연구

Toxicological Test Methods and AChE Inhibition of Organophosphorus Acaricides of Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*

金道翊·李升燦¹

Do Ik Kim and Seung Chan Lee¹

ABSTRACT These studies were carried out to compare toxicological test methods of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch,; and to investigate relationship between *in vivo* resistant level of highly acaricide-selected population, and *in vitro* insensitivity of the AChE in the same population to carbophenothion and ethion. The slide dip method(CV=8.7%) was of more accuracy and suitability than that of the leaf dip method(CV=12.2%) and leaf disc method (CV=13.6%) in determination of the resistant levels of twospotted spider mite to acaricides. The slide dip method also had the advantages of simple treatment with different populations on a slide at the same time, standardization of post-treatment conditions and living plants excluded from the test. Even though the topical application method(CV=8.1%) showed high accuracy, it had the demerits of the much time consuming, need of expensive equipment and difficulty of test manipulation. For a limited time, the 22nd successive carbophenothion-selected population of two-spotted spider mite showed 156- and 128-fold resistant levels to carbophenothion and ethion(both O/Ps), respectively. However, the 24th successive ethion-selected population revealed 64.1- and 65-fold resistant levels to ethion and carbophenothion, respectively. In the inhibition of AChE activity, the carbophenothion-selected population showed 3.3- and 2.7-fold insensitivity in AChE activity to carbophenothion and ethion, respectively. Likewise, the ethion-selected population exhibited 3- and 2.6-fold insensitivity in AChE activity to carbophenothion and ethion, respectively, as compared with that of susceptible population. As a result, a good relation was recognized between *in vivo* resistance to organophosphorus acaricides and *in vitro* insensitivity of the AChE to corresponding inhibitors.

KEY WORDS *Tetranychus urticae*, resistance, toxicological test methods, successive selection, AChE inhibition

초 록 점박이응애(*Tetranychus urticae* Koch)에 대한 독성시험방법을 비교하고, 감수성계통을 누대도태하여 *in vivo*에서 저항성 발달수준과 *in vitro*에서의 AChE insensitivity의 관계를 실험한 결과는 다음과 같다. 점박이응애의 살비제 저항성 수준결정의 독성시험방법중 slide dip법(CV=8.7%)은 leaf dip법(CV=12.2%)이나 leaf disc법(CV=13.6%)보다 변이가 적고 정확도가 높을 뿐만 아니라 처리방법이 간편하고 한가지 농도에 대하여 여러 계통을 동시에 처리할 수 있고 처리 후의 조건을 균일하게 유지시킬 수 있으며 기주식물 없이 시험이 가능하였다. topical application법(CV=8.1%) 역시 정확도는 높았으나 시험 조작이 어렵고 필요한 장비의 구입 비용이 더 들며 시간이 많이 소요되는 단점이 있었다. 두 유기인계에 의

¹ 전남대학교 농과대학 농생물학과(Dept. Agric. Biol., Coll. Agric., Chonnam Natl. Univ., Kwangju, 500-757, Korea)

한 누대도태결과 22세대 carbophenothion 도태개체군은 동일약제에 156배의 저항성이 발달하였으며, ethion에 대하여 128배의 저항성 반응을 보였다. 24세대 ethion 도태개체군은 동일약제에 64.1배의 저항성 발달이 되었으며, carbophenothion에 대하여도 65배의 저항성반응을 보였다. 도태개체군의 AChE 활성저해도를 보면 감수성계통에 비하여 carbophenothion 누대계통은 carbophenothion은 3.3배, ethion은 2.7배의 활성저해도를 보였다. 또한 ethion 도태개체군에 대해서는 ethion은 2.6배 carbophenothion은 3.0배의 활성저해도를 나타냈다. 위와 같이 *in vivo*에서의 저항성 발달 수준과 *in vitro*에서의 AChE 저해도와는 밀접한 관계가 있는 것으로 보아 유기인계 살비제에 대한 점박이용애의 저항성 발현에는 AChE의 insensitivity가 주요인으로 작용하는 것으로 생각된다.

검 색 어 점박이용애, 저항성, 독성시험방법, 누대도태, AChE활성저해

점박이용애의 약제저항성 수준 결정방법과 약제별 저항성수준, 생화학적 저항성기작 및 유전적연구가 활발히 수행되어 왔다. 약제저항성 수준 결정 방법으로서 Voss(1963)는 topical application법이 일관된 결과를 얻을 수 있는 정밀한 방법임을 보고한 바 있고, Dittrich (1962)는 leaf dip법이 시험결과의 변이가 크을 지적하였는데, slide dip법은 조작상 간편하고 시험결과에 대한 재현성이 우수함을 지적하여 응애류의 저항성 수준결정에 있어 표준방법으로 제시한 바 있다(Busvine(1980)과 이 등 (1986)).

한편 Smissaert(1964)는 유기인계 살비제는 주로 AChE의 저해제로 작용한다는 보고를 하였다. Smissaert 등(1970)과 Voss와 Matsumura(1965)는 유기인계 저항성과 감수성인 점박이용애의 AChE활성을 비교검토 하였으며, Zahavi등(1970)은 유기인계에 대한 응애류의 AChE insensitivity와 저항성발달과의 관계를 보고하였다. 또한 Voss와 Matsumura(1964)는 Malathion 저항성계통의 점박이용애는 감수성계통보다 carboxylesterase와 phosphatase의 활성이 높다고 하였고, Herne과 Brown(1969)은 저항성계통이 감수성계통보다 malathion을 수용성 물질로 전환시키는 능력이 더 크다고 하였으며, Cranham과 Helle(1985)는 저항성발달은 AChE의 insensitivity와 해독작용의 증가, 농약의 피부 투과성 감소 등의 요인이 복합적으로 작용한다고 하였다.

본 시험연구에서는 응애류의 약제저항성 수

준결정방법으로 사용되는 topical application법, slide dip법, leaf dip법과 leaf disc법 등을 비교 검토하여 가장 합리적인 방법을 확립함과 동시에 관용살비제의 저항성 기작을 밝힘에 있어 지금까지 가장 많이 사용되어온 유기인계 살비제 중 ethion과 carbophenothion을 공시하여 감수성계통에 누대도태시킨 후 이들 개체군의 *in vivo*에서의 저항성 발달수준과 *in vitro*에서 AChE activity의 저해도와의 관계를 비교 검토코자 실시하였다.

재료 및 방법

저항성수준 결정방법 비교시험에는 전남 나주의 송강농원에서 채집하여 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.)에 누대 사육한 점박이용애를, 감수성응애 계통은 약제에 전혀 노출되지 않은 응애를 광주시 화정동의 국화에서 채집하여 사육상자(85 × 85 cm) 내의 pot(13 × 11 cm)에 식재된 강낭콩에 사육하면서 각 살비제별로 누대도태 시키면서 공시충을 확보하였다.

공시살비제로는 저항성수준 결정방법 비교시험에는 cyhexatin을, AChE의 활성저해도 시험은 누대도태에 사용한 ethion과 carbophenothion의 technical grade를 공시하였다. 이들 각 살비제의 화학적계통, 일반명과 화학명, 유효성분 및 상품명은 표 1과 같다.

저항성수준 결정방법 비교시험에서 leaf dip법은 강낭콩 잎에 응애를 접촉하였는데, 응애가 이탈하는 경향이 있어 잎 둘레에 끈끈이를

바르고 희석약제에 담가 음건시킨 후 물에 적신 여과지를 칸 샐레에 넣고, leaf disc법은 강낭콩 잎을 약액에 담근 후 음건시켜 샐레에 여과지를 깔고 물에 적신 탈지면을 잎 밑에 깔고 수분을 공급하여 주며 응애를 접종하였고, slide dip법은 slide에 양면 scotch tape를 붙이고 응애의 등면이 tape에 닿도록 붙여 희석약제에 담근 후 RH 80%의 desiccator에 넣었다. 이들 방법은 자성충 30마리를 공시하여 5초동안 약액에 침지하여 25 ± 2°C의 실내에 두었

다. Topical application법은 acetone에 녹인 약액을 0.0005 μl씩 국부처리할 수 있는 capillary-tube pipette을 조작하여 각 약량당 20마리 이상 응애에 처리하여 콩잎에 부착시켰다. 이상 4가지 방법을 한반복당 4~6 회석농도로 처리하여 24시간 후 살비율을 조사하여 probit analysis로 각계통에 대하여 회귀선과 LC₅₀치를 유도하였으며, 같은 시험을 7번 반복한 결과로 변이계수를 산출하여 각 방법의 효율성과 정확성을 비교 검토하였다.

Table 1. Acaricide used in the comparative test methods and the selection on susceptible strain of *T. urticae*

Common name	Chemical name	% Purity in technical grade	Trade name & formulation	
Organophosphate				
Carbophenothion	S-((P-chlorophenyl)methyl)O, O-diethyl phosphorodithioate	91	Trithion	25Wp
Ethion	O,O,O,O-tetraethyl S,S-methylene bisphosphorodithioate	94	Ethion	25Wp
Organotin				
Cyhexation	Tricyclohexylhydroxystannane	96	Plictran	25WP

*in vivo*에서 저항성이 유발된 점박이용애의 저항성발달 수준과 *in vitro*에서 AChE활성 저해도와와의 관계를 구명하기 위한 시험에서, 김과이(1989)가 유발시킨 저항성 점박이용애 계통을 이용하여 저항성 증가 정도와 AChE저해율을 비교하였다. AChE활성 저해도측정은 Ellman 등(1961)의 방법에 의해 측정하였다. Homogenate 조제는 4°C 조건에서 glass homogenizer를 이용하여 0.067M 인산buffer(pH 7.5) 1ml당 점박이용애 4 mg의 비로 충분히 마쇄시킨후, 이 액을 9,000 rpm으로 10분동안 원심분리하여 상등액을 효소액으로 취하였다.

측정순서는 일정량의 효소액(1.8 ml)을 시험관에 넣고 acetone에 녹인 소정농도의 inhibitor 0.6 ml를 효소액에 넣고 30분 동안 preincubation 한 후 acetylthioncholine iodide(32 mg/ml buffer)와 DTNB 용액[54 ml의 5.5-dithiobis(2-

nitrobenzoic acid)와 sodium bicarbamate를 10 ml buffer에 녹인용액]을 1:2의 비로 시험관에 넣고 항온 수조에 30분 동안 incubation 시켰다. 최종적으로 eserine 0.15 ml(최종농도 0.9 × 10⁻³M)를 넣어 모든 반응을 종식시킨 후 Cecil model CE 599/automatic scanning spectrophotometer를 이용하여 412 nm에 흡광도를 측정하였다.

본 시험에서 효소활성의 저해율은 다음식으로 산출하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 대조구의 효소활성
B: 공시약제에 처리된 구의 효소활성

저해율을 기초로 probit analysis를 하여 I₅₀치를 산출하여 계통간의 AChE활성저해도를 비

교 검토하였다.

결과 및 고찰

점박이용애의 독성시험방법 비교

점박이용애에 대한 기존 독성시험방법을 비

교하여 정확하고 합리적인 시험법을 찾고자, 각 방법마다 7회 반복하여 시험한 결과 각 농도별 평균 살비율 LC₅₀치 및 변이계수는 표 2에서와 같다. 방법간 변이계수를 보면 topical application법은 8.1%로 정확도가 가장 높은 방법으로 평가되었으며, slide dip법도 8.7%로

Table 2. Frequency of percent mortality responses in *T. urticae* to cyhexatin by using topical application, slide dip, leaf dip and leaf disc methods with 7 replications

Method	Applied % a.i.	% mortality and replication								CV (%)
		1	2	3	4	5	6	7	X	
Topical application	0.064	64.8	77.1	68.8	65.9	69.7	63.4	67.4	68.2	8.1
	0.032	52.7	54.0	47.8	50.8	51.2	51.9	49.5	51.1	
	0.016	36.0	42.1	35.2	35.2	39.2	35.2	39.2	37.4	
	0.008	12.0	18.7	18.0	17.5	24.1	18.9	22.6	18.8	
	LC ₅₀ *	0.026	0.021	0.025	0.025	0.022	0.025	0.023	0.024	
Slide dip	0.0167	71.2	79.1	74.6	65.9	71.6	79.5	79.5	74.5	8.7
	0.0083	60.0	57.7	55.4	52.7	54.8	61.1	56.8	57.0	
	0.0042	31.7	45.0	38.8	31.1	37.3	39.2	33.2	36.6	
	0.0021	24.6	25.0	22.2	26.6	24.1	21.4	18.4	23.2	
	LC ₅₀ *	0.0054	0.005	0.005	0.006	0.005	0.005	0.006	0.005	
Leaf dip	0.0167	76.1	90.0	77.5	78.0	73.2	72.7	74.2	77.4	12.2
	0.0083	73.9	90.0	70.9	59.3	58.2	59.2	64.2	67.9	
	0.0042	50.8	52.9	55.5	50.9	48.8	49.1	46.2	50.6	
	0.0021	39.6	47.6	31.3	33.6	40.8	38.4	34.5	38.0	
	LC ₅₀ *	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.003	0.004	0.003	
Leaf disc	0.0167	68.6	65.9	52.0	55.7	52.0	57.7	58.5	58.6	13.6
	0.0083	50.8	46.9	36.7	49.4	49.8	48.2	46.1	46.8	
	0.0042	36.7	37.3	40.6	32.0	35.2	39.2	34.5	36.5	
	0.0021	15.8	10.5	25.0	26.6	18.4	31.5	23.6	21.6	
	LC ₅₀ *	0.006	0.007	0.008	0.011	0.009	0.006	0.007	0.008	

*LC₅₀ : Lethal concentration caused 50% mortality of test organisms.

변이가 적은 방법이었다. 다음으로 leaf dip법은 12.2%, leaf disc법은 13.6%로 위의 두 방법에 비하여 변이가 큰 방법임을 알 수 있었다. 또한 동일계통의 점박이용애에 대한 cyhexatin의 LC₅₀치의 평균치를 보면 topical application법이 다른 방법보다 높게 나타나는 경향이었다.

이들 각 방법간 장·단점을 보면 topical application법은 정확도가 가장 높아서 정밀 시험으로서 침투 및 흡수 대사작용 같은 연구에는 적절한 방법이 될 수 있고 적은 개체수로 시험할 수 있다는 장점은 있으나 capillary-tube pipette의 조작과 약제처리 시간이 많이 걸려 대

량의 sample 처리에는 부적절하였다. Lee (1967)는 총체의 치사약량을 정확하게 결정하는 시험에는 topical application법이 요구되어 지나 시간이 slide dip법 보다 많이 걸리며 장비에 드는 비용도 slide dip법이 더 저렴하다는 보고와 본 시험과는 유사한 결과를 보여주었다.

Slide dip법은 처리가 용이하고 같은 농도로 여러 계통을 동시에 처리할 수 있으며 처리 후의 조건을 균일하게 유지할 수 있었으며 기주 식물 없이도 시험할 수 있고, slide상의 응애 개체에 약제의 영향을 고르게 주어 시험오차를 줄일 수 있는 장점이 있었다. 이런 점은

Dittrich(1962)와 Lee(1967)에 의해서 확인된 바 있으며, Busvine(1980)은 slide dip법의 조작의 간편함과 시험결과에 대한 재현성의 우수함을 지적하여 응애류의 저항성 수준결정 방법에서 표준방법으로 제시한 바 있다. 그러나 정확도에 있어서는 topical application법과 큰 차이가 없었으나 slide상에 응애를 등면으로 접촉할 때 시간이 걸린다는 점과 접촉독효과만을 볼 수 있다는 단점이 있었다.

Leaf dip법과 leaf dic법 역시 처리가 용이하고 시간을 절약할 수 있다. 특히 leaf dip법은 접촉독과 중독효과를 동시에 시험할 수 있으며 leaf disc법은 시험목적에 따라 약제의 잔효력을 볼 수 있는 장점이 있었다. 이 방법은 처리 시간이 빠르다는 것으로 여러 연구자들이 사용하고 있으나, Dittrich(1962)가 지적한 바와 같이 처리약액이 응애의 선호서식지인 잎의 주맥을 따라 집결하는 경향이 있어 완전한 시험조건을 표준화가 되지 않아 다른 방법보다는 변이가 크다고 했는데, 본 시험에서도 위와 유사한 결과를 얻었으며, Dittrich(1962)는 leaf dip법으로 시험할 때 최대 50%까지 응애가 이탈하였으며 slide dip법을 사용하면 이 결점을 보완할 수 있어 이 방법의 부적격성을 지적한 바 있다.

따라서 이상 4가지 방법의 장·단점과 시험목적, 비용, 시간, 정확도 등을 종합하여 볼 때 slide dip법이 비교적 정확하고 변이가 적은 결과를 얻을 수 있으며 한 slide에 여러 계통을 동시에 시험할 수 있는 이점으로 보아 앞으로

응애류의 살비제 저항성 수준결정에는 이 방법의 사용이 바람직하다고 생각된다.

AChE 활성저해도

김과 이(1989)가 두 유기인제로 누대도태한 점박이용애의 저항성 반응은, carbophenothion으로 누대도태한 계통이 감수성계통에 대해 carbophenothion 156배, ethion 128배의 저항성 반응을, ethion 누대도태계통은 ethion 64.1배, carbophenothion 65배의 저항성 반응을 보여, 두 도태계통의 AChE 활성저해도 차이를 구한 후, *in vivo*에서 저항성수준과 *in vitro*에서 AChE 활성저해와의 관계를 검토하였다(표 3).

감수성계통의 I₅₀ 치는 carbophenothion이 3.3 × 10⁻⁵M, ethion이 3.1 × 10⁻⁵M로 약제간에 다소 차이가 있었다. Carbophenothion 도태개체군에 두 살비제를 처리하였을 때 감수성 계통의 I₅₀에 비해 carbophenothion은 1.1 × 10⁻⁴M로 3.3배, ethion은 8.4 × 10⁻⁴M로 2.7배의 활성저해도 차이를 보인 반면, ethion 도태개체군에 살비제를 처리하였을 때 I₅₀이 ethion은 8.2 × 10⁻⁵M로 2.6배, carbophenothion은 1.0 × 10⁻⁴M로 3.0배의 활성저해도 차이를 보이고 있다.

*in vivo*에서 누대 도태한 도태개체군의 저항성 발달수준과 *in vitro*에서의 AChE활성저해와는 밀접한 관계가 있어 유기인계 살비제의 저항성 발현에는 AChE의 insensitivity가 주요인으로 작용하는 것으로 사료된다. 본 시험과 유사한 결과가 점박이용애(Smissaert 1964), 점박이용애붙이(*Tetranychus cinnabarinus*, Zahavi

Table 3. I₅₀ values of carbophenothion- and ethion-selected and unselected populations of *T. urticae* to carbophenothion and ethion

Selected-population	Acaricide	I _{50s} (M) ^a	Inhibition ratio
Carbophenothion	Carbophenothion	1.1 × 10 ⁻⁴	3.3
	Ethion	8.4 × 10 ⁻⁵	2.7
Ethion	Ethion	8.2 × 10 ⁻⁵	2.6
	Carbophenothion	1.0 × 10 ⁻⁴	3.0
Susceptible	Carbophenothion	3.3 × 10 ⁻⁵	1
	Ethion	3.1 × 10 ⁻⁵	1

^aI₅₀ : 50% Inhibition of acetylcholinesterase activity.

등 1970), 간자와응애(*Tetranychus kanzawai*, Kuwahara 1982)에서 보고된 바 있다. 그러나 Zahavi등(1970)은 같은 유기인제라도 약종에 따라 I_{50} 에 차이가 있다고 하였으며, Kuwahara (1982)는 malathion의 경우 *in vivo*에서의 저항성 수준과 *in vitro*에서 malaoxon의 AChE insensitivity와는 관계가 없다고 보고하였다. 또한 Voss와 Matsumura(1964)도 malathion 저항성 발현에는 carboxylesterase와 phosphatase가 관여한다고 보고하여 동일 화학계통에서도 약제에 따라 저항성 기작이 같지 않음을 알 수 있다.

해충의 저항성 발현은 피부투과성, 해독, 작용점의 감수성등 여러 요인이 복합적으로 작용한다는 것을 고려하면 유기인제의 경우도 이들 제 요인이 저항성 발현에 미치는 영향에 대하여 시험연구가 계속 이루어져야 할 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Busvine, J.R. 1980. Revised method for spider mites and their eggs. pp.49~53. *In* Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO Plant Prod. Prot. Pap. 21.
- Cranham, J.E. & W. Helle. 1985. Pesticide resistance in Tetranychidae, pp.405~421. *In* W. Helle & M.W. Sabelis(eds.), Spider mites their biology, natural enemies and control. Vol.1B. Elsevier, Amsterdam.
- Dittrich, V. 1962. A comparative study of toxicological test methods on a population of the two-spotted spider mite(*Tetranychus telarius*). *J. Econ. Entomol.* 55(5) : 644~648.
- Ellman, G.L., K.D. Courtney, V. Andres, Jr. & R.M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 : 88~95.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge Univ. Press. Cambridge, Eng. 318 pp.
- Herne, D.H.C. & A.W.A. Brown. 1969. Inheritance and biochemistry of OP-resistance in a New York strain two-spotted spider mite. *J. Econ. Entomol.* 62(1) : 205~209.
- Kim, S.S. & S.C. Lee. 1989. Development of Acaricide Resistance and Cross-Resistance in *Tetranychus urticae*(Acarina: Tetranychidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 28(3) : 146~153.
- Kuwahara, M. 1982. Insensitivity of the acetylcholinesterase from the organophosphate-resistance kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida(Acarina: Tetranychidae), to organophosphorus and carbamate insecticides. *Appl. Ent. Zool.* 17(4) : 486~493.
- Lee, S.C. 1967. An investigation of the control of mite population(*T. urticae* Koch) resistant to organo-phosphates. Thesis Lincoln College, New Zealand. pp.196.
- Lee, S.C. & J.K. Yoo. 1971. Studies on chemical resistance in mites. II. Orchard mite control and their resistance to Metasystox, Folidol and C-8514 in Korea. *Korean J. Plant Prot.* 10(2) : 109~116.
- 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.* 15(3) : 133~138.
- Smitsaert, H.R. 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science.* 143 : 129~131.
- Smitsaert, H.R., S. Voerman, L. Ostenbrugge & N. Renooy. 1970. Acetylcholinesterases of organophosphate-susceptible and resistant spider mites. *J. Agr. Food Chem.* 18(1) : 66~75.
- Voss, G. 1963. A contribution to the technique of testing acaricides in *T. telarius* with special reference to resistance to organic phosphorus compounds. *Z. Angew. Zool.* 50 : 297~309.
- Voss, G. & F. Matsumura. 1964. Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: To different mechanisms of resistance. *Nature.* 20 : 319~320.
- Voss, G. & F. Matsumura. 1965. Biochemical studies on a modified and normal cholinesterase found in the leverkusen strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Can J. Biochem.* 53 : 63~72.
- Zahavi, M., A.S. Tahori & F. Klimer. 1970. Insensitivity of acetylcholinesterases to organophosphorus compounds as related to size of esteratic site. *Molec. Pharmacol.* 7 : 611~619.

(1991년 8월 19일 접수)