

Chlorpyrifos 저항성 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 살충제 저항성 특성

김경주 · 김성수 · 김성문 · 허장현*

강원대학교 농업생명과학대학 생물환경학부

요약 : 유기인계 살충제인 chlorpyrifos에 대한 배추좀나방의 저항성 원인을 구명하기 위하여 저항성 인자로 알려진 두 가지 무독화 효소, esterases와 glutathione- *S*-transferase(GST)의 활성과 작용점 효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 insensitivity 정도를 측정하였다. 또한 chlorpyrifos와 작용점이 동일한 계통의 살충제에 대한 저항성 발달과의 상관관계를 조사하여 교차저항성 발달 특성을 검정하였다. 감수성 배추좀나방에 chlorpyrifos의 아치사량을 처리하여 160 배의 저항성을 나타내도록 선발하여 실험에 사용하였다. 저항성 계통의 GST 활성은 감수성 계통의 GST 활성에 비하여 1.7 배 높았으나, 감수성 계통과 저항성 계통간에 esterases 활성 차이는 없었다. 또한 chlorpyrifos의 작용점인 AChE insensitivity 측정결과 저항성 계통이 감수성계통보다 11.6 배 높았다. Chlorpyrifos 저항성 계통은 AChE를 저해하는 것으로 알려진 유기인계 및 카바메이트계 살충제인 dichlorvos, dimethylvinphos, carbofuran에 대해서도 각각 33.6 배, 17.6 배, 18.7 배의 insensitivity를 나타내었다. 그러나 동일한 작용점을 저해하는 phenthoate-oxon에 대해서는 1.7 배의 낮은 insensitivity를 보였다. 또한 이들 약제들에 대한 교차저항성 발달정도를 측정한 결과, chlorpyrifos 저항성 계통은 dichlorvos, dimethylvinphos, carbofuran에 대하여도 각각 82 배, 47 배, 42 배의 높은 교차저항성 발달을 나타내었으나, phenthoate에 대해서는 2.3 배로 낮은 교차저항성 발달을 보여 작용점이 동일한 유사계열 약제들이라도 저항성을 유발하는 기작에는 서로 큰 차이가 있을 수 있음을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과 AChE insensitivity와 저항성 발달비 간에는 정의상관관계($r=0.9951^{**}$, $p^{(0.01)}$)를 보이는 것으로 나타났는데, 이는 유기인계 및 카바메이트계 살충제의 저항성 발달이 AChE에 대한 insensitivity 정도와 관련 있음을 시사하는 것이다. 본 연구의 결과를 통하여 chlorpyrifos에 대한 배추좀나방의 저항성 발달은 작용점인 AChE에 대한 약제의 insensitivity가 주 요인 중 하나이며, 무독화 효소 중 GST 활성증가가 부가적인 요인이 될 수 있음을 확인할 수 있었다.(2003년 10월 29일 접수, 2003년 12월 23일 수리)

Key words : AChE insensitivity, diamondback-moth, esterases, glutathione- *S*-transferase, chlorpyrifos, cross-resistance, insecticide resistance.

서 론

배추좀나방(Diamondback moth, *Plutella xylostella* L.)은 배추(*Chinese cabbage*, *Brassica campestris* L. ssp. *peckinensis* Rupr), 무(*Radish*, *Raphanus sativus* L), 케일(*Kale*, *Brassica oleracea* L. var. *acephala* Alef.(D.C)) 등 십자화과 작물에 많은 피해를 주고 있는 해충이며, 국내에는 배추좀나방 방제를 위하여 유기인계, 카바메이트계, 합성 피레스로이드계, 곤충생장조절제 및

Bt제 등 23종의 약제가 등록사용되고 있다(농약공업협회, 2002). 배추좀나방은 연간 9-12세대의 빠른 생활사로 인하여 해충밀도가 높으며 이로 인해 약제에 대한 저항성 발달이 우려되는 해충이다. 한편 강원도 고랭지 배추경작지에서는 수년간 동일 작물인 배추를 연작재배하고 있어 매년 병해충의 발생이 반복적이고, 이를 방제하기 위한 농약의 연용가능성이 높아 해충에 대한 농약의 저항성 발달이 쉬운 것으로 보고되어있다(김 등, 2002). 김(2003)과 조 등(2001)은 각각 다양한 계열의 살충제에 대하여 강원도 고랭지 배추경작지에서 발생하는 배추좀나방의 저항성 발달조사

*연락처자

를 수행하여 유기인계 및 피레스로이드 계통에서 저항성 발달을 확인하였으며, 특히 배추좀나방 방제에 미등록 약제인 chlorpyrifos에 대하여 160배 이상의 저항성 발달을 보인다고 보고하였다.

유기인계 살충제인 chlorpyrifos는 배추흰나비(Common cabbage worm, *Artogeia rapae* Linnaeus) 및 거세미나방(Turnip moth, *Agrotis segetum*) 등을 방제할 목적으로 등록되어 있으나, 배추 경작자들은 배추좀나방 방제용(미등록)으로도 선호하는 것으로 조사되었다(김 등, 2002; 농약공업협회, 2002). 유기인계 저항성 배추좀나방은 동일한 작용점을 가진 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대하여 저항성을 발달시킬 가능성이 있다고 보고되었다(Noppun, 1987a). 강원도 고랭지 배추경작자들에 대한 설문조사에서 김 등(2002)은 유기인계 살충제 chlorpyrifos가 오·남용되는 것을 확인하였고, 이로 인하여 발생한 저항성 배추좀나방의 효율적인 방제 대책을 모색해야 할 것으로 기대되었다.

본 연구에서는 유기인계 살충제인 chlorpyrifos에 대한 배추좀나방의 저항성 원인을 구명하고자 하였다. 이를 위하여 유기인계 살충제에 대한 배추좀나방의 저항성 발달기작에 관여하는 것으로 알려진 무독화 효소 esterases 및 glutathione *S*-transferase(GST)의 활성 변화(Chiang 등, 1992; Hyroyasu, 1989)와 chlorpyrifos에 대한 작용점 효소인 acetylcholinesterase(AChE)의 insensitivity 정도(Kono와 Shishido, 1994)를 조사하였다. 또한 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방의 교차저항성 특

성을 밝히기 위하여 작용점인 AChE의 insensitivity 정도와 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 저항성 발달과의 상관관계를 살펴보았다.

재료 및 방법

시험곤충

Chlorpyrifos 저항성 계통(Chlorpyrifos-Resistant Strain: CRS)과 감수성 계통(Susceptible Strain: SS) 배추좀나방은 온도 25±1℃, 상대습도 50%, 광주조건 16:8(L:D)의 항온항습실 내에서 사육되었다. 저항성 계통은 감수성 계통을 chlorpyrifos 아치사량으로 6세대 동안 도태시킨 계통을 사용하였고, 대조구인 감수성 계통 배추좀나방은 1999년 8월에 한국화학연구원으로부터 분양 받아 약제에 노출 없이 계대 사육한 개체를 사용하였다.

시험약제

도태에 사용된 살충제는 chlorpyrifos이었고, 저항성 발달 검정에 사용된 살충제는 유기인계 7종과 카바메이트계 3종의 원제이었다. 원제의 일반명, 화학명 및 순도는 표 1과 같았다. 효소활성 실험에 사용된 phenthoate의 활성 형태인 phenthoate-oxon은 두양 산업(주)에 의뢰하여 합성한 후 분양 받아 사용하였다.

Chlorpyrifos 저항성 유발

저항성 계통 선발을 위하여 감수성 계통 배추좀나

Table 1. Insecticides used in this study

Insecticides	Chemical name	Purity(%)
Chlorpyrifos	O,S-Dimethyl acetylphosphoramidothioate	96.0
Dichlorvos	2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate	96.0
Dimethylvinphos	(Z)-2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl dimethyl phosphate	96.3
Diazinon	O,O-Diethyl O-2-isopropyl-6-methyl pyrimidin-4-yl phosphorothioate	95.0
Profenofos	O-4-Bromo-2-chlorophenyl O-ethyl S-propyl phosphorothioate	96.0
Pyraclufos	(RS)-[O-1-(4-Chlorophenyl)pyrazol-4-yl O-ethyl S-propyl phosphorothioate]	95.0
Phenthoate	Ethyl 2-dimethoxyphosphinothioylthio(phenyl) acetate	91.7
Fluopyrazofos	O,O-Diethyl-O-1-phenyl-3-trifluoromethylpyrazol-5-yl phosphorothioate	96.4
Carbofuran	2,3-Dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N-methyl- carbamate	97.9
Furathiocarb	Butyl-2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl N,N'-dimethyl-N,N'-thiodicarbamate	95.0
Benfuracarb	Ethyl-[2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl-oxyl carbonyl(methyl)aminothio]-N-isopropyl-alaniate	90.0

방을 chlorpyrifos(원제: 96.0%) LC₅₀ 수준으로 매 세대마다 잎침지법으로 도태하였으며, 6세대 동안 누대도태하여 저항성을 유발하였다. 도태시기는 유충 3령기에, 도태약량은 매 세대마다 산출한 각각의 LC₅₀ 값으로 하였고, 도태 규모는 매 세대 도태 시 1,000마리 이상으로 하였다.

Esterases 및 GST 활성 검정

공시충인 배추좀나방 3-4령충 0.1 g에 0.1 M sodium phosphate buffer 용액(pH 6.8) 1 mL를 첨가한 후 homogenizer를 이용하여 4°C에서 2분간 균일하게 마쇄하였다. 마쇄액을 600g(4°C)에서 10분간, 1,000g(4°C)에서 10분간, 105,000g(4°C)에서 1시간 동안 초원심분리하여 상등액을 무독화 효소인 esterases와 GST 효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford(1976)의 방법에 준하여 bovin serum albumin(BSA)을 표준품으로 하였고, UV/VIS spectrophotometer 595 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다.

Esterases의 활성측정은 Van Aspern(1962)의 방법에 준하였으며, cytosolic protein 2 mg과 sodium phosphate buffer 용액(0.1 M, pH 6.8) 3.95 mL를 각각 혼합하고 27°C에서 10 분간 incubation시켰다. 기질인 α -naphthyl acetate (30 mM) 100 μ L를 가한 후 37°C에서 20 분간 incubation시켰다. 반응 후 혼합액의 일부를 취하여 diazoblue-sodium laurylsulfate (5 % sodium lauryl sulfate + 1 % fast blue B.N. salt, 5:2 (v:v)) 용액을 첨가하고 상온에서 10 분간 발색시켰다. Esterases의 가수분해산물인 1-naphthol에 대한 흡광도는 600 nm에서 측정하였다.

GST의 활성측정은 Habig 등(1974)의 방법에 준하여 0.1 M sodium phosphate buffer 용액(pH 6.5)에 GST를 함유하는 cytosolic protein 0.2 mg과 100 mM glutathione를 첨가한 후 37°C에서 반응시켰다. 반응 직후 15 mM 1-chloro-2,4-nitrobenzene (CDNB) 10 μ L를 가한 후 1분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

AChE insensitivity 검정

Konno와 Shishido(1994)의 방법에 준하여 배추좀나방으로부터 AChE를 추출하였다. 배추좀나방 3~4령충 0.1 g에 0.1 M sodium phosphate buffer 용액(pH 7.6) 1 mL를 첨가한 후 4°C에서 2분간 균질 마쇄하였다. 마쇄액을 10,500g(4°C)에서 10분간 원심분리한 후 상등

액을 효소액으로 사용하였다.

AChE의 활성과 약제에 의한 활성 저해 정도는 Ellman 등(1961)의 방법을 변형하여 실시하였다. 먼저 효소액 100 μ L와 저해제(10^{-1} ~ 10^{-7} M 농도 조절)로 사용된 chlorpyrifos-oxon, dichlorvos, dimethylvinphos, carbofuran, phenthoate-oxon 30 μ L, 0.1 M sodium phosphate buffer 용액(pH 7.6) 혼합액을 35°C에서 각각 10 분간 preincubation하였다. 혼합액에 기질인 0.1 M acetylthiocholine iodide 20 μ L를 가한 후 25 분간 incubation시켰다. 0.1 M eserine를 가하여 5 분간 incubation시킨 후 반응을 종결시켰다. 반응액에 발색 시약인 10 mM DTNB(5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) 0.5 mL 혼합한 후 412 nm에서 혼합액의 흡광도를 측정하였다. 저해제의 AChE에 대한 저해력은 효소활성의 50%를 저해하는 농도인 I₅₀ 값으로 나타내었다.

저항성 발달 검정

저항성 검정방법은 양배추(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) 절편(지름 4.5 cm)을 시험약액(최종 처리액 10% acetone, 0.01% Triton X-100 함유)에 30초간 침지한 후 1시간 동안 음건하였다. 처리된 엽편을 여과지가 깔린 petri-dish(내경 5 cm)에 놓고, 유충을 반복 당 10마리씩 3반복으로 접종한 후 온도 25±2°C, 상대습도 50±10%, 광주조건 16:8(L:D)의 항온항습실에 두었다. 약제처리 24시간, 48시간 후 생사충수를 조사하여 probit 분석(Finny, 1971)에 의하여 반수치사 농도(LC₅₀)를 계산하였다.

결과 및 고찰

Chlorpyrifos 저항성 유발

감수성 배추좀나방을 6 세대에 걸쳐 chlorpyrifos로 도태하면서 선발한 세대별 저항성 발달비는 표 2에 나타내었다. 감수성 계통 배추좀나방의 chlorpyrifos에 대한 LC₅₀는 6.3 ppm이었으나, chlorpyrifos로 도태한 2~3세대 배추좀나방은 감수성과 비교하여 24시간 후에 각각 2.8 배, 5.7 배의 저항성 발달 정도를 보였다(표 2). 또한 chlorpyrifos로 도태하여 4~5세대까지 누대사육한 배추좀나방의 저항성 발달비는 31 배와 60 배, 6세대 저항성 배추좀나방은 160 배 이상의 매우 빠른 저항성 발달을 보였다(표 2). 이러한 결과는 이

Table 2. Changes of the susceptibility to chlorpyrifos in the selected strain (CRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) to chlorpyrifos at 24 and 48 hours after treatment.

Generation	24hrs				48hrs			
	LC ₅₀ (ppm)	Slope	95% F.L. ^{a)}	RR ^{b)}	LC ₅₀ (ppm)	Slope	95% F.L.	RR
1	6.25	2.09	4.8 - 8.1	-	5.77	2.24	4.6 - 7.2	-
2	17.28	0.85	10.7 - 43.9	2.8	12.91	0.86	7.5 - 21.1	2.2
3	35.72	1.91	27.3 - 46.8	5.7	22.26	1.79	14.8 - 33.4	3.9
4	196.12	1.05	100.2 - 384.6	31.4	128.46	1.07	78.9 - 209.3	22.3
5	373.87	0.50	104.3 - 1341.8	59.8	230.78	1.14	148.9 - 357.4	40.0
6	>1000	-	-	>160.0	>1000	-	-	>173.3

^{a)}Fiducial limit

^{b)}Resistant ratio : LC₅₀ of chlorpyrifos-resistant strain / LC₅₀ of susceptible strain.

등(1994)에 의한 집파리를 이용한 도태 실험 결과 chlorpyrifos가 다른 약제와 비교하여 6세대에서 20배 이상의 빠른 저항성 발달을 보였다는 보고와 상응하는 것이었다.

Esterases 및 GST 활성 차이

감수성 계통과 chlorpyrifos 저항성 계통 배추좀나방의 esterases 활성을 측정한 결과를 표 3에 나타내었다. Total esterases 활성측정 결과 감수성 계통은 118.3 nmole min⁻¹ mg protein⁻¹이었고, chlorpyrifos 저항성 계통은 117 nmole min⁻¹ mg protein⁻¹으로 감수성 계통과 차이가 없었다(표 3). 이러한 결과는 Hyroyasu(1989)가 일본에서 채집한 배추좀나방의 chlorpyrifos 저항성 발달 기작의 하나로 밝힌 esterases 활성 증가에 의한 가수분해 가능성과는 상반된 것이었다. Chlorpyrifos 저항성 배추좀나방 및 이질바퀴(*Blattella germania* L.)의 esterases 활성은 감수성과 비교하여 차이가 없었으나, 전기영동상에서 isozyme에는 차이가 있었다(Scharf 등, 1998; 조, 2002). Scharf 등(1998)은 이러한 결과에 대하여 esterases의 특정 isozyme이 chlorpyrifos 저항성

발달에 미치는 영향을 간과해서는 안 된다고 지적하였다. 본 연구에서도 전기영동을 수행한 결과 두 계통 사이에 esterases의 isozyme 차이를 확인 할 수 있었으며(자료미제시), 추후 연구에 대한 필요성이 인정되었다.

GST 활성검정 결과 chlorpyrifos 저항성 계통(CRS)은 99.3 nmole min⁻¹ mg protein⁻¹이었고, 감수성 계통(SS)과 비교하여 1.7 배 높았다(표 4). Chiang 등(1992)은 GST 활성이 1.6 배, 2.9 배 높다는 사실을 확인 후 4종의 isozyme을 분리하였다. 그 중 GST-3과 GST-4 isozyme들에 의해 유기인계 살충제들이 대사되는 것을 확인한 바 있다. 이러한 경향으로 볼 때 chlorpyrifos 저항성 계통은 GST 활성 증가가 저항성 발달의 추가적인 요인으로 작용한 것으로 판단된다.

AChE insensitivity

Chlorpyrifos의 작용점인 AChE의 insensitivity 검정 결과 감수성 계통은 1.41×10⁻⁸ M, 저항성 계통은 1.66×10⁻⁷ M의 저해력을 나타내어, 저항성 계통이

Table 3. Activities of total esterases extracted from chlorpyrifos-resistant and susceptible strains diamondback moth (*Plutella xylostella* L.)

Strains	α -Naphthol (nmole min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Ratio ^{a)}
SS	118.3 (± 1.6) ^{b)}	
CRS	117.8 (± 1.5)	1.0

^{a)}Ratio : α -naphthol of Chlorpyrifos-Resistant Strain / α -naphthol of Susceptible Strain.

^{b)}Standard Error.

Table 4. Activities of total glutathione-S-transferase extracted from chlorpyrifos-resistant and susceptible strains diamondback moth (*Plutella xylostella* L.)

Strains	CDNB (nmole min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Ratio ^{a)}
SS	57.6 (± 2.8) ^{b)}	
CRS	99.3 (± 2.7)	1.7

^{a)}Ratio : CDNB of Chlorpyrifos-Resistant Strain / CDNB of Susceptible Strain.

^{b)}Standard Error.

Table 5. Insensitivity of acetylcholinesterase (AChE) extracted from chlorpyrifos-resistant and susceptible strains of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) to several insecticides

Insecticide	SS		CRS		IR ^{b)}
	I ₅₀ (M) ^{a)}	S.E.	I ₅₀ (M)	S.E.	
Chlorpyrifos-oxon	1.41×10 ⁻⁸	1.84×10 ⁻⁹	1.66×10 ⁻⁷	2.19×10 ⁻⁹	11.8
Dichlorvos	2.07×10 ⁻⁶	4.29×10 ⁻⁷	6.95×10 ⁻⁵	9.01×10 ⁻⁷	33.6
Dimethylvinphos	4.97×10 ⁻⁶	4.01×10 ⁻⁷	8.76×10 ⁻⁵	1.73×10 ⁻⁵	17.6
Phenthoate-oxon	1.51×10 ⁻⁷	2.01×10 ⁻⁸	2.51×10 ⁻⁷	4.37×10 ⁻⁸	1.7
Carbofuran	2.82×10 ⁻⁶	2.55×10 ⁻⁷	5.28×10 ⁻⁵	6.08×10 ⁻⁶	18.7

^{a)}Inhibition concentration of chemicals to inhibit a given enzyme to 50 percents.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{I}_{50} \text{ of insecticide to susceptible strain (SS)}}{\text{I}_{50} \text{ of insecticide to chlorpyrifos - resistant strain (CRS)}}$$

11.8배 높은 감수성 저하를 보였다(표 5). 이러한 결과는 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방의 저항성 발달원인인 AChE의 감수성 저하에 기인되었을 가능성을 시사한다. Noppun 등(1987b)은 phenthoate 저항성 배추좀나방의 감수성이 9.2 배와 7.6 배 저하된 것을 토대로, AChE insensitivity가 저항성 발달 기작의 하나인 것으로 설명하였으며, 본 연구 결과도 그 설명에 상응하였다.

Chlorpyrifos 저항성 계통은 AChE를 저해하는 다른 유기인계 및 카바메이트계 중 *in vitro* 상에서 독성을 나타내는 약제를 선발하여 AChE insensitivity를 검정한 결과 dichlorvos, dimethylvinphos 및 carbofuran에 대한 insensitivity 정도는 각각 33.6 배, 17.6 배 및 18.7 배를 나타내었고, *in vitro* 상에서 phenthoate의 활성

형태인 phenthoate-oxon은 1.7 배의 감수성 저하가 나타났다(표 5). 이러한 결과는 동일 계열의 살충제일지라도 저항성 발달 기작이 서로 다를 수 있음을 시사해 주고 있다.

유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 교차저항성

감수성 계통에 대한 유기인계 살충제의 LC₅₀는 0.49~9.33 ppm, 카바메이트계 살충제의 LC₅₀는 9.44~13.34 ppm으로 감수성계통에 대한 독성정도를 비교할 때 유기인계 살충제가 더 효과적인 살충제로 사료된다(표 6).

Chlorpyrifos 저항성 계통의 교차저항성 측정 결과, 유기인계인 dichlorvos와 diazinon은 감수성과 비교하여 각각 82.0 배, 91.4 배이었고, profenofos는 44.6배로

Table 6. Cross-resistance of chlorpyrifos-resistant strain (CRS) of diamondback-moth (*Plutella xylostella* L.) to organophosphate and carbamate insecticides at 24hr after treatment as leaf dipping method

Insecticide	SS			CRS			RR ^{b)}
	LC ₅₀ (ppm)	Slope	95% F.L. ^{a)}	LC ₅₀ (ppm)	Slope	95% F.L.	
Chlorpyrifos	6.30	2.09	4.8 - 8.1	>1,000	-	-	>160
Dichlorvos	5.58	2.01	4.4 - 7.1	403.2	1.7	179.5 - 903.3	82.0
Dimethylvinphos	1.88	4.92	1.6 - 2.2	89.7	1.4	62.8 - 128.2	47.7
Phenthoate	1.65	2.53	1.3 - 2.1	3.5	2.0	2.7 - 4.5	2.3
Profenofos	1.05	2.76	0.8 - 1.3	46.6	2.5	37.4 - 58.2	44.6
Pyraclofos	9.33	3.06	5.9 - 14.7	>1000	-	-	>107.1
Flupyrzofos	0.49	3.40	0.4 - 0.6	1.2	7.1	1.1 - 1.4	2.5
Diazinon	5.76	1.79	4.4 - 7.6	526.2	1.6	368.3 - 751.3	91.4
Benfuracarb	13.34	3.31	11.2 - 15.8	>1000	-	-	>74.9
Carbofuran	9.44	3.06	7.6 - 11.7	398.9	1.6	300.3 - 530.2	42.3
Furathiocarb	13.17	2.82	10.9 - 16.0	348.9	0.7	168.3 - 682.0	25.7

^{a)}Fiducial limit.

^{b)}Resistant ratio : LC₅₀ to chlorpyrifos-resistant strain (CRS) / LC₅₀ to susceptible strain (SS).

같은 유기인계에서도 다양하게 교차저항성이 발달되었다(표 6). 그러나 동일 계통인 flupyrazofos와 phenthoate는 감수성과 비교하여 각각 2.3 배, 2.5 배의 낮은 교차저항성을 보였다(표 6). 이에 두 가지 살충제는 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방을 방제하기 위한 효과적인 약제로 판단된다. Flupyrazofos와 phenthoate는 chlorpyrifos와 작용점은 동일하지만 화학구조의 차이로 인하여 교차저항성이 낮게 나타난 것으로 사료된다.

Hama(1992)는 phenthoate가 다양한 유기인계 살충제에 저항성을 나타내는 배추좀나방의 효과적인 방제에 중요하게 사용될 수 있음을 보여주었고, 농약의 화학구조가 교차저항성 발달에 매우 중요하다고 보고하였다. 즉 thiono-type(P=S)의 살충제가 도태압으로 작용할 경우, phosphate-type(P=O)이나 dithio-type(S=P-S)의 살충제는 낮은 저항성을 나타낸다고 보고하였다. Noppun 등(1987a)은 dithio-type인 phenthoate로 도태압을 가한 저항성 배추좀나방에서 phosphate-type인 dichlorvos가 낮은 저항성 발달을 보인 것을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 선행연구를 근거로 조사한 결과 thiono-type인 chlorpyrifos로 선발압을 가한 배추좀나방이 dithio-type 살충제인 phenthoate에 대하여 낮은 저항성 발달을 보였다. 또한 phenthoate와 구조적으로 차이를 갖는 flupyrazofos가 낮은 저항성 발달을 나타내는 것으로 미루어 유기인계 살충제의 화학구조에

따른 저항성 발달 기작 연구가 자세하게 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Chlorpyrifos와 동일한 작용점을 가지고 있는 카바메이트계 중 benfuracarb의 살충활성은 >1000 ppm이었고, carbofuran과 furathiocarb는 각각 398.9 ppm과 348.9 ppm이었다. 감수성과 비교하여 25.7-74.9 배의 저항성 발달을 보였다(표 6). 이러한 결과를 토대로 유기인계 농약에 저항성을 보이는 배추좀나방에 대해 교차저항성이 높게 나타나는 카바메이트계 살충제는 방제효과가 낮을 것으로 추측된다.

유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 교차저항성 발달과 AChE insensitivity와의 상관관계

Chlorpyrifos 저항성 계통은 살충제에 대한 저항성 발달 측정 결과 대부분의 약제에서 25 배 이상의 교차저항성을 보였으나, phenthoate와 flupyrazofos의 경우 낮은 교차저항성을 보였다(표 6). 표 5에서처럼 높은 교차저항성을 보인 dichlorvos, dimethylvinphos 및 carbofuran은 AChE에 대한 I_{50} 이 17 배 이상의 감수성 저하를 보였지만, 낮은 저항성 발달을 나타낸 phenthoate의 활성 형태인 phenthoate-oxon은 1.7 배로 감수성 저하를 보이지 않았다. AChE insensitivity와 저항성 발달비간에는 상관관계수 $r=0.9951^{**}$ ($p<0.01$)로 고도로 유의상관을 보여주었으며(그림 1), 이러한 결과는 AChE의 insensitivity가 유기인계 및 카바메이트계

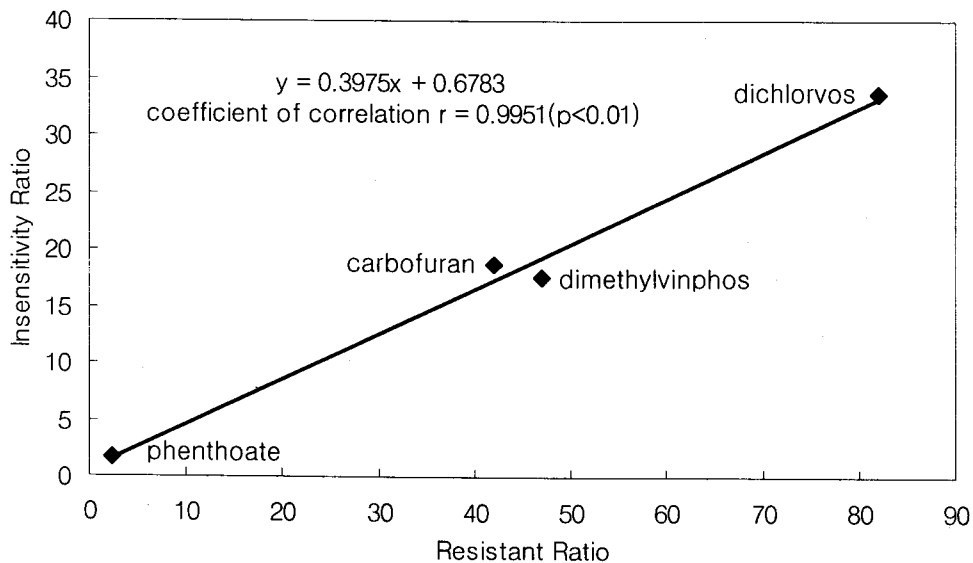


Fig 1. A relationship between Resistant ratio and insensitivity ratio of chlorpyrifos-resistant strain diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) to several insecticides

살충제들의 저항성 발달과 연관성이 있음을 시사하고 있다.

본 연구의 결과들은 무독화 효소인 GST 활성 증가와 작용점인 AChE의 insensitivity가 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방의 저항성 발달과 관련이 있음을 보여주고 있다. 향후 배추좀나방의 효과적인 방제를 위해서 유기인계 살충제의 다양한 화학구조를 고려하여, 각각의 살충제에 대한 저항성 발달 기작, 교차저항성 발달과 교호 살포 방법에 대하여 다양한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구과제인 '고랭지 경사지 토양의 농약오염 특성 및 농약투입 저감방안'의 일환으로 수행되었습니다. 연구비를 지원해 준 농촌진흥청과 합성을 도와주신 두양 산업(주)에 깊은 감사를 드립니다.

인용문헌

- Chiang, F. M. and C. N. Sun (1992) Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45:7~14.
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress, and R. M. Featherstone. 1961. A new rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88~98.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge Univ. Press, pp.9~4.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione-S-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* 249:7130~7139.
- Hama. H. (1992) Insecticide resistance characteristic of diamondback moth. Proceeding, 2nd international workshop on the management of diamondback moth and other crucifer pests, Talekar, N. S., eds, Asian vegetable research and development center, Taichung, Taiwan. 455~463.
- Hyroyasu, A. (1989) *Ecotoxicology and environmental quality series, metabolic maps of pesticides, volume 2.* Academic press, pp.176~160.
- Konno, Y. and T. Shishido. 1994. A relationship between the chemical structure of organophosphates and insensitivity of acetylcholinesterase in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L (Lepidoptera : Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26:595~597.
- Noppun, V., T. Miyata, and T. Saito (1987a) Cross Resistance and Synergism Studies in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Ent. Zool.* 22(1):98~104.
- Noppun, V., T. Miyata, and T. Saito (1987b) Insensitivity of Acetylcholinesterase in phenthoate resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Appl. Ent. Zool.* 22(1):116~118.
- Scharf, M. E., J. J. Neal, and G. W. Bennett (1998) Change of insecticide resistance levels and detoxication enzymes following insecticide selection in the german cockroach, *Blattella germanica* (L.) *Pestic. Biochem. Physiol.* 59:167~179.
- Van Aspern, K. 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive calorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8:401~416.
- 김경주 (2003) 강원도 고랭지대 배추좀나방의 살충제 저항성 발달과 생화학적 특성 연구. 강원대학교 대학원 석사학위 논문.
- 김성문, 최해진, 김희연, 이동경, 김태한, 안문섭, 허장현 (2002) 강원도 고랭지대 배추 경작자들의 농약 사용 실태. *한국농약과학회지* 6(4):250~256.
- 농약공업협회 (2002) 농약사용지침서.
- 이용규, 김정화, 이형래 (1994) 집파리에 대한 Chlorpyrifos, Dichlorvos 및 Permethrin의 저항성 유발과 교차저항성. *한국응용곤충학회지* 33(3):166~172.
- 조준모 (2002) 강원도 고랭지 배추좀나방의 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 저항성 발달과 화학적 방제. 강원대학교 대학원 박사학위 논문.
- 조준모, 김경주, 김성문, 허장현, 한대성 (2001) 강원도 고랭지대 배추경작지 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 저항성 발달. *한국농약과학회지* 5(1):30~35.

Characteristics of Resistance to Chlorpyrifos in Diamondback-moth (*Plutella xylostella* L.)

Kim Kyungju, Sungsu Kim, Songmun Kim, and Jang-Hyun Hur*(*Division of Biological Environment, College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*)

Abstract : To determine the mechanism of the resistance to organophosphorus insecticide, chlorpyrifos, in diamondback-moth (*Plutella xylostella* L.), activities of esterases, glutathione-S-transferase (GST) and AChE insensitivity which were known for causing factor of resistance were measured. Also, the relationship between AChE insensitivity and the resistant ratio was investigated to inquiry the cross-resistance. The resistant ratio of chlorpyrifos-resistant strain (CRS) of diamondback-moth at the 6th generation was developed 160 fold compared to susceptible strain (SS) one. Activity of GST that are extracted from CRS was 1.7-fold higher than that from SS. However, activity of total esterases from CRS was similar to that from SS. In AChE insensitivity test, CRS was 11.8-fold less sensitive than that from SS. CRS was ranged from 17.6 to 33.6-fold less sensitive than SS to other insecticides having same target site with chlorpyrifos such as dichlorvos, dimethylvinphos and carbofuran. Insensitivity of AChE to phenthoate-oxon, however, was 1.7-fold. Resistance of CRS was 82-fold, 47-fold and 42-fold higher than SS to dichlorvos, dimethylvinphos and carbofuran, respectively, but 2.3-fold to phenthoate and then we could identify that the resistance development of insecticide might have a lot of difference among the chemicals with the same target site. The relationship between the AChE insensitivity and the resistant ratio was significantly correlated ($r=0.9951^{**}$, $p^{(0.01)}$). This result indicates that AChE insensitivity was associated with insecticide resistance. Overall, these results suggest that insensitivity of AChE was an important factors to chlorpyrifos resistance in diamondback-moth, and the slightly increased activity of GST may also have contributed to that.

*Corresponding author (Fax : +82-33-241-6640, E-mail : jhhur@kangwon.ac.kr)