

분자학적 진단방법을 이용한 bifenazate 저항성 점박이응애 모니터링

이규리 · 신윤호 · 조선란 · 구현나 · 최장전¹ · 안기수² · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과, ¹국립원예특작과학원 배시험장, ²충북농업기술원 친환경농업연구과

(2011년 2월 14일 접수, 2011년 3월 1일 수리)

Monitoring of Bifenazate Resistant Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Using Molecular Detection Method

Kyu-Ri Lee, Yun-Ho Shin, Sun-Ran Cho, Hyun-Na Koo, Jang-Jeon Choi¹, Ki-Su Ahn² and Gil-Hah Kim*

Dept. of Plant Medicine, College of Agriculture, Life, and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, ¹Pear Experiment Station, NHRI, Naju 520-821, Korea, ²Chungbuk Provincial Agricultural Research & Extension Services, Cheongwon, 363-880, Korea

Abstract

In 2010, two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* was collected from the rose greenhouse and apple orchards in Cheongju (CJ), Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Kangjin (KJ), Yesan (YS), and Yeongju (YJ). Among them, KJ and YS strain showed high resistance to bifenazate of 964.5- and 1130-fold, respectively. The other strains showed low resistance to bifenazate. By analyzing the mitochondrial cytochrome *b* (*cytb*) sequence, G126S point mutation was detected in KJ and YS strain. Thus, G126S point mutation in the mitochondrial *cytb* was available molecular detection marker for selection of bifenazate resistant *T. urticae*. Two molecular detection methods, quantitative sequencing (QS) and PCR amplification of specific alleles (PASA) were well detected specific G126S point mutation. Therefore, these methods can be used to monitor the resistance allele in field population of *T. urticae* and bifenazate resistance management strategy.

Key words *Tetranychus urticae*, Bifenazate, Point mutation, Cytochrome *b*, QS, PASA

서 론

우리나라 뿐 만 아니라 전 세계적으로 농업과 원예 분야에 경제적 손실을 일으키는 주요해충인 점박이응애는 발육 기간이 짧아 연간 발생 세대수가 많고(Takafuji *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003a; Lee *et al.*, 2004), 다른 해충들에 비해 이동성이 적어 살비제에 대한 저항성 발달이 쉽고 빠르게 증가할 가능성이 가지고 있다(Lee *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). 점박이응애는 현재 상업적으로 등록되어 있는 살비제의 거의 모든 종류에 대해 저항성이 발달되어 있는 것

으로 보고되어 있다(Whalon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010).

효과적인 방제를 위해서는 빠른 시일 내 저항성 모니터링을 하는 것이 중요하다. 그러나 점박이응애의 약제 저항성 모니터링에 많이 사용되는 생물검정방법인 스프레이법과 침지법은 시간이 오래 걸리고 비용이 많이 들며 어려운 단점이 있다. 최근 들어 이러한 단점을 보완한 분자학적 진단도구를 이용하여 효과적인 약제 저항성 점박이응애의 모니터링이 시도되고 있다. 약제 저항성 분자학적 진단 방법으로 가장 정확한 방법은 작용점의 DNA 염기서열을 분석하는 것이다. 그러나 이 방법은 샘플 DNA의 크기가 클 경우 분석할 때에 비용이 많이 든다는 단점을 가지고 있다. 이를 보완하기 위해 PCR을 기초로 확인하는 유전기술이 발달되어 지고 있다(Kwon *et al.*, 2004;

*연락처 : Tel. +82-43-261-2555, Fax. +82-43-271-4414

E-mail: khkim@chungbuk.ac.kr

Kwon, 2009). 분자학적 진단도구로 DNA의 유전을 기초로 한 기술인 quantitative sequencing(QS), PCR amplification of specific allele(PASA), bi-directional PCR amplification of specific allele(bi-PASA), single stranded conformational polymorphism(SSCP), 그리고 serial invasive signal amplification reaction(SISAR)등이 개발되어졌고, 이러한 방법들이 single nucleotide polymorphisms을 확인할 때에 소용되는 시간과 비용을 줄일 수 있게 되었다(Kwon *et al.*, 2004; Wilkening *et al.*, 2005). 현재 이러한 방법을 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다(Sham *et al.*, 2002; Germer *et al.*, 2000; Livak, 1999). 따라서 이와 같은 방법으로 점박이응애의 특정 약제 저항성에 대한 점 돌연변이(point mutation)와 저항성을 확인한다면 효과적인 저항성 모니터링 방법이 될 것이다.

최근 연구에 의하면 bifenazate 작용기작은 미토콘드리아 복합체 III(bc1 복합체, ubihydroquinone : cytochrome *c* 산화환원효소 복합체)의 Q₀ 지점에 작용한다고 보고되었다. 그리고 미토콘드리아 cytochrome *b*(*cytb*)에서의 점 돌연변이와 밀접하게 연관된다고 보고 되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Nieuwenhuyse *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Lee *et al.*(2010)은 국내에서 bifenazate에 저항성을 보이는 strain에 대하여 *cytb*에서의 G126S 점 돌연변이가 1개를 확인하였고, 높은 저항성을 보인 강진개체군에서도 G126S 점 돌연변이를 확인하였다. 그 결과 bifenazate 저항성은 미토콘드리아 *cytb*의 G126S 점 돌연변이가 저항성 발달에 중요한 역할을 할 것이라 보고하였다.

이에 본 연구는 2000년 12월 경북 칠곡 장미 재배지에서 채집한 집단(Lee *et al.*, 2003a)을 실험실에서 10년간 도태시키면서 855.9배의 bifenazate 저항성 점박이응애의 미토콘드리아 *cytb*의 G126S 점 돌연변이를 바탕으로 acequinocyl 저항성 점박이응애와 지역별 개체군의 DNA 염기서열 분석으로 점 돌연변이 분석을 수행하였고, 생물검정하였다. 또한 분자학적 진단도구로 QS와 PASA를 이용하여 야외 개체군의 bifenazate 약제 저항성 발달 수준을 쉽고 빠르게 확인 할 수 있는 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험곤충

시험에 사용된 감수성계통(S)은 울릉도에서 채집한 점박이응애를 서울대학교에서 분양받아 2005년부터 충북대학교

식물의학과 곤충사육실에서 약제 처리 없이 누대 사육한 것을 사용하였다. Bifenazate 저항성계통 점박이응애(BR)는 2000년 12월에 경북 칠곡의 장미재배지에서 채집한 것을 대상으로 10년간 실내에서 bifenazate를 LC₂₀₋₃₀ 농도로 희석하여 7일 간격으로 분무처리 하여 855.9배의 저항성계통을 얻어 사용하였다.

야외종에 대한 bifenazate 감수성 정도를 비교하기 위하여 2010년에 지역별로 청주(CJ), 강진(KJ), 충주-1(CUJ-1), 충주-2(CUJ-2), 예산(YS), 그리고 영주(YJ) 지역의 장미재배지와 사과과수원에서 점박이응애를 채집하였다. 비교군으로서 bifenazate 저항성계통에 대해 교차저항성을 나타낸 약제인 acequinocyl로 2001년 1월 경남 김해의 장미재배지에서 채집한 점박이응애를 9년간 누대선발하여 614배의 저항성을 획득한 개체군을 acequinocyl 저항성계통(AR)으로 사용하였다(Lee *et al.*, 2010). 실내 사육조건은 온도 25~27°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 40~60%로 조절하였고 강낭콩을 기주로 하여 사육하였다.

살비제 처리방법

직경 5.5 cm의 페트리디쉬 내에 물을 충분히 적신 탈지면을 깔고 그 위에 직경 3 cm로 자른 강낭콩 잎을 올려놓은 후 부드러운 붓으로 점박이응애 암컷성충 20마리씩 접종하였다. 접종 후에 현미경으로 접종 도중 사망한 개체를 제거하였고, 적정농도로 희석된 약액을 소형분무기를 이용하여 분무법으로 처리하여 음건시켰다. 약제 처리 후 온도 25~27°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 40~60% 조건에 보관하면서 처리 후 48시간의 살비율을 조사하였다. 실험은 3반복 이상으로 실시하였고, 살비율은 Finney(1971)의 probit계산법으로 LC₅₀ 값을 구하였다.

지역별 미토콘드리아 *cytb* point mutation 확인

점박이응애의 genomic DNA는 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리하였다. 암컷 성충 100마리에 tissue lysis buffer를 가하여 유리막대로 마쇄한 후 20 μ l의 proteinase K를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 binding column tube를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR은 Table 1에서 제시된 바와 같이 점박이응애 *cytb* primers [Cytbdia2F(5'-TTAAGAACTCCTAAAACCTTTTCGTTTC)와 Cytbdia2R(5'-GAAACAAAAATTATTATTCCCCAC)]의 10 pmol과 1 μ l template와 Hot start Ex-taq[™] DNA polymerase(Takara,

Table 1. Primers used for *cytb* amplification, quantitative sequencing (QS) and PCR amplification of specific allele (PASA)

Name	Sequence (5'-3')	Size (mer)	Product (bp)
For <i>cytb</i> amplification			
Cytdia2F	TTAAGAACTCCTAAAACCTTTCGTTC	23	1063
Cytdia2R	GAAACAAAAATTATTATCCCCCAC	23	
Internal primer			
PEWYF1	AAAGGCTCATCTAACCAAATAGG	23	466
PEWYR2	AATGAAATTTCTGTAAAAGGGTATTC	26	
For <i>cytb</i> point mutation survey, QS			
CybtWTF	CGGAATAATTTTACAAATAACTCATGC	27	627
CybtWTR	TGGTACAGATCGTAGAATTGCG	22	
For PASA (G126S)			
newS-F	ATTAAAAAAATTTTAAACAACATT	24	397
newS-R	CTCCCCAAAAAGATATTTGTCC	22	

Shiga, Japan)로 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분 간 반응시켰다. 그리고 더 정확한 염기서열 분석을 위해 internal primer [PEWYF1(5'-AAAGGCTCATCTAACCAAATAGG)와 PEWYR2(5'-AATGAAATTTCTGTAAAAGGGTATTC)]을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR Purification Kit(Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 PCR산물을 sequencing 하여 비교분석하였다(Macrogen, Seoul, Korea). 그리고 정확성을 위해 이와 같은 방법을 3반복을 실시하였다.

Quantitative sequencing(QS)

점 돌연변이가 있는 구간을 포함한 primer [CytbWTF (5'-CGGAATAATTTTACAAATAACTCATGC)와 CytbWTR (5'-TGGTACAGATCGTAGAATTGCG)] 10 pmol과 1 µl template와 Hot start Ex-taq™ DNA polymerase(Takara, Shiga, Japan)로 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분간 30 cycle을 Takara PCR thermal cycler(Takara, Shiga, Japan)을 사용하여 PCR 반응시켰다(Table 1). 그리고 PCR Purification Kit(Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 PCR산물을 BR : S의 각각의 혼합비율(0:10, 1:9, 3:7, 5:5, 7:3, 9:1, 10:0)로 혼합하여 sequencing결과를 비교분석하였다(Macrogen, Seoul, Korea). 나머지 AR과 지역별 점박이응애를 위와 같은 조건으로 PCR 한 후 sequencing 하여 비교분석하였다.

PCR amplification of specific allele(PASA)

감수성과 BR, 그리고 AR을 포함한 지역별 개체군 점박이응애에 대해 점 돌연변이가 포함되지 않은 primer [newS-F

(5'-ATTAAAAAAATTTTAAACAACATT)와 newS-R(5'-CTCCCCAAAAAGATATTTGTCC)] 2.5 pmol과 10 ng template DNA를 Hot start Ex-taq™ DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan)로 94°C에서 20초, 58°C에서 20초, 72°C에서 30초간 30 cycle을 Takara PCR thermal cycler (Takara, Shiga, Japan)을 사용하여 PCR 반응시켰다(Table 1). 그리고 TBE buffer를 사용하여 1% agarose gel에서 전기영동 하여 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

지역별 Bifenazate 저항성 발달 수준 확인

청주, 강진, 충주-1, 충주-2, 예산, 그리고 영주에서 채집한 점박이응애와 대조계통으로 acequinocyl 저항성계통과 bifenazate 저항성비를 확인해 본 결과, 강진과 예산 개체군이 각각 964.5배, 1130배로 높은 저항성비를 보였다. 그러나 나머지 청주, 충주-1, 충주-2, 영주에서 채집한 점박이응애의 저항성비는 각각 5.5배, 21.8배, 6.7배, 7.8배로 다소 낮은 저항성비를 나타내었고, acequinocyl 저항성 계통에 대해서도 1.6배의 낮은 저항성비를 나타내었다(Table 2). 실내에서 bifenazate 약제를 주기적으로 처리하여 도태시킨 저항성 점박이응애의 저항성비는 855.9배로 높은 저항성이었음에도 불구하고 지역별 강진과 예산 개체군에서 bifenazate 저항성비가 BR계통보다 더 높게 나타났다. 이는 현재 강진과 예산개체군을 채집한 농가에서는 점박이응애의 약제로 bifenazate를 사용할 때에 추천농도 이상으로 처리 되어 높은 약제 저항성을 갖게 되었을 것으로 생각되어진다.

Table 2. Bifenazate susceptibility against susceptible (S), bifenazate-resistant (BR), acequinocyl-resistant (AR), Cheongju (CJ), Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Kangjin (KJ), Yesan (YS), and Yeongju (YJ) strains of *T. urticae* female adults

Strain/Population	LC ₅₀ (ppm) (95% CL ^{a)})	Slope ± SE	RR ^{b)}
S	2.92 (2.24 - 3.74)	2.02 ± 0.11	1.0
BR	2482 (2224 - 2782)	3.12 ± 0.27	855.9
AR	4.71(3.95 - 5.69)	1.75 ± 0.20	1.6
CJ	15.9 (12.3 - 19.4)	1.81 ± 0.18	5.5
CUJ-1	63.2 (51.7 - 74.9)	1.94 ± 0.21	21.8
CUJ-2	19.4 (15.7 - 23.3)	2.25 ± 0.22	6.7
KJ	2797 (2524 - 3090)	2.88 ± 0.30	964.5
YS	3278 (2979 - 3622)	1.89 ± 0.20	1130.0
YJ	22.7 (17.9 - 27.8)	3.47 ± 0.33	7.8

^{a)} 95% Confidence limits.

^{b)} Resistance ratio = LC₅₀ (ppm) of each strain by LC₅₀ (ppm) of S strain.

지역별 미토콘드리아 *cytb* 점 돌연변이 확인

Bifenazate에 대해 높은 저항성을 보인 강진과 예산 개체군의 미토콘드리아 *cytb*에서 bifenazate 저항성 점 돌연변이인 G126S를 확인 할 수 있었다. 그러나 낮은 저항성을 보인 청주, 충주-1, 충주-2, 영주 개체군은 돌연변이가 없는 것으로

확인되었다. 이 결과는 이전에 Lee *et al.*(2010)이 보고한 강진 개체군에 이어서 예산 개체군에서도 G126S 점 돌연변이를 확인 할 수 있었다(Fig. 1과 Table 3). Van Nieuwenhuysse *et al.*(2009)는 실내에서 사육하던 감수성 계통을 bifenazate LC₉₀값으로 도태시킨 후 미토콘드리아 *cytb*에서 G126S, I136T,

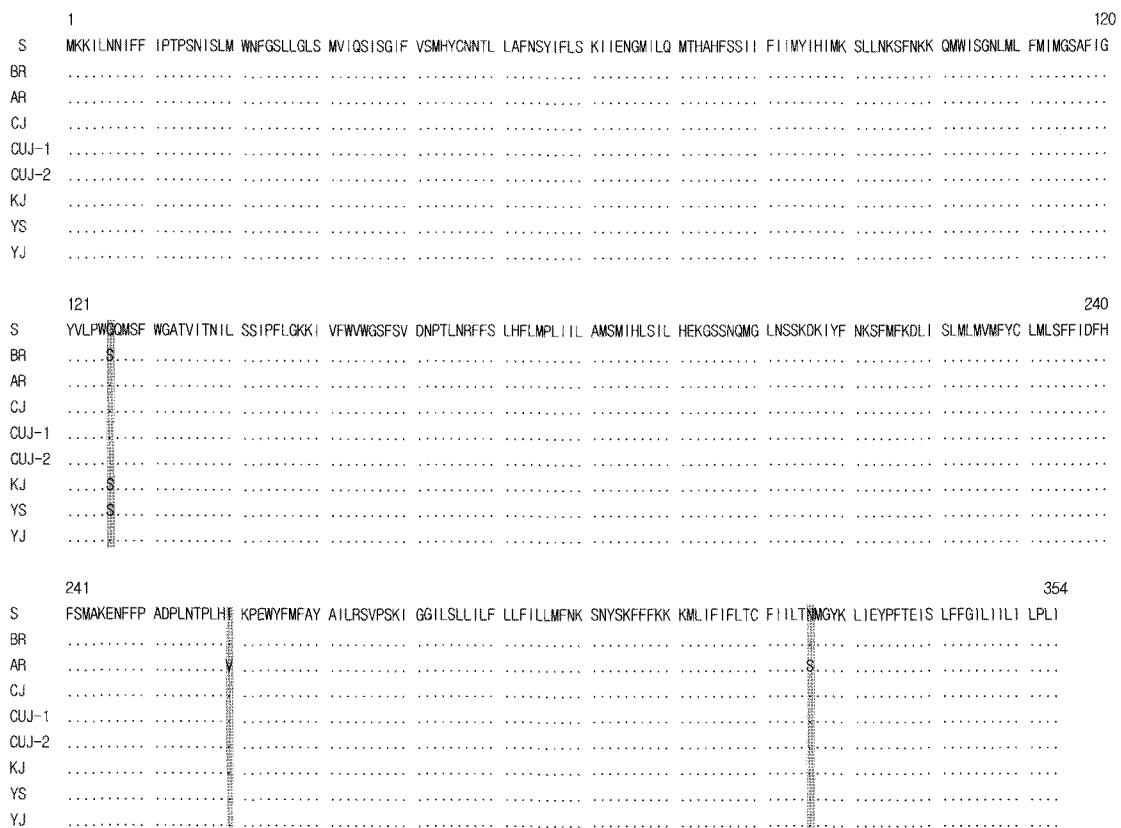


Fig. 1. Alignment of deduced amino acid sequences of mitochondrial *cytb* from susceptible (S), bifenazate-resistant (BR), acequinocyl-resistant (AR), Cheongju (CJ), Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Kangjin (KJ), Yesan (YS), and Yeongju (YJ) strains of *T. urticae* female adults.

Table 3. Correlations of strain and miticide resistance ratio or P₄₅₀ activity or mutation (s) from susceptible (S), bifenazate-resistant (BR), acequinocyl-resistant (AR), Cheongju (CJ), Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Kangjin (KJ), Yesan (YS), and Yeongju (YJ) strains of *T. urticae* female adults

Strain	Resistance ratio	Point mutation (s)
S	Low	No
BR	Very high	G126S
AR	Low	I256V, N321S
CJ	Low	No
CUJ-1	Low	No
CUJ-2	Low	No
KJ	Very high	G126S
YS	Very high	G126S
YJ	Low	No

S141F, P262T의 점 돌연변이를 발견하였는데 이 논문의 결과와는 다소 차이가 있다. 이러한 이유는 실험에 사용한 점박이응애의 여러 가지 환경적 조건과 저항성 정도 차이 때문일 것으로 보인다. Van Nieuwenhuysse *et al.*(2009)이 제시한 bifenazate 저항성 점박이응애는 LC₅₀값이 100,000 ppm 이상이었으나 본 실험에 사용한 bifenazate 저항성 점박이응애는 2,482 ppm으로 저항성에 있어 큰 격차를 보인다. 이는 도태시킬 때의 처리약제 농도를 높인다면 좀 더 많은 점 돌연변이를 확인 할 수 있으리라 생각된다(Lee *et al.*, 2010). 그리고 21.8배의 약제저항성이 있는 청주개체군에서는 점 돌연변이가 없었으나 964.5배의 강진개체군에서 점 돌연변이를 확인 할 수 있었기에 G126S의 점 돌연변이는 1000배 가까지의 약제 저항성을 가진 점박이응애에서 발견 될 것으로 보인다. 그러나 확실한 점 돌연변이의 약제 저항성 수준은 더 많은 생물 검정을 통해 이루어져야 한다고 생각된다.

따라서, 점박이응애에 대한 bifenazate의 저항성 발달은 빨랐으며, 강진과 예산 개체군의 bifenazate 저항성은 미토콘드리아 *cytb*의 G126S 돌연변이가 저항성 발달에 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 또한 이러한 결과는 G126S 돌연변이가 저항성 모니터링을 위한 좋은 분자진단 마커로서의 가능성을 제시한다.

Quantitative sequencing(QS)

Bifenazate 약제 저항성 점박이응애의 점 돌연변이는 G126S로 감수성과 저항성의 PCR 산물을 정해진 비율로 혼합하여 감수성의 염기서열이 GGA에서 저항성 AGA로 바뀌는 정도를 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.

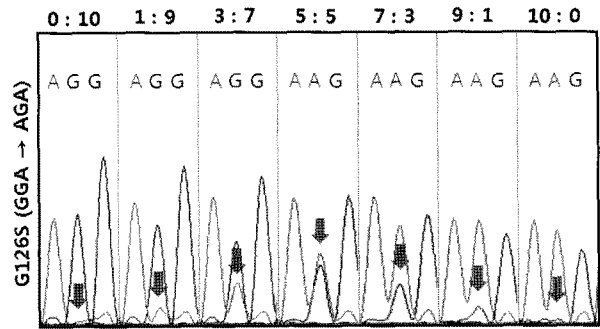


Fig. 2. Sequencing chromatograms of the standard template DNA mixtures with different ratios of resistant and susceptible alleles at the G126S mutation site.

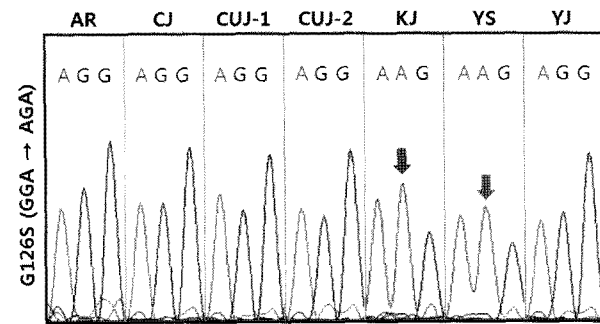


Fig. 3. Sequencing chromatograms of the standard template DNA at the G126S mutation site. acequinocyl resistant (AR), Cheongju (CJ), Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Kangjin (KJ), Yesan (YS), and Yeongju (YJ) strains of *T. urticae* female adults.

BR : S의 비율이 0 : 10일 때는 감수성 계통인 GGA가 나왔으나 BR의 비율을 높일수록 GGA가 AGA로 peak가 점차 바뀌는 결과를 보였다. 특히 5 : 5의 비율에서는 구아닌과 아데닌의 반반의 peak를 보였다. 이에 acequinocyl 저항성 점박이응애와 청주, 충주-1, 충주-2, 강진, 예산, 그리고 영주 개체군의 점 돌연변이의 peak를 확인해 본 결과 저항성을 가지는 강진, 그리고 예산에서 순수 bifenazate 약제 저항성 점박이응애 peak의 점 돌연변이를 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 그러나 acequinocyl 저항성 응애는 bifenazate 교차저항성이 있으나 점 돌연변이가 없는 것으로 확인되어 acequinocyl은 *cytb*가 아닌 미토콘드리아 내 다른 유전자 부분의 점 돌연변이가 저항성에 관여할 것이라 사료되어 진다.

QS를 기초로 하여 개체군의 약제 저항성을 확인하는 연구로 permethrin 약제저항성인 *Pediculus humanus capitis*에 대한 연구결과가 많이 이루어져 있다(Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003b; Kwon *et al.*, 2008; Clark, 2009). 또한 EPN 약제저항성인 *Plutella xylostella*에 대해서도 연구되어 있다(Joo, 2010). 그리고 Clark(2009)은 QS의 방법으로 실험실

내에서 2일 이내 90개체군의 저항성을 빠른 시간 내 확인할 수 있다고 하였다.

이러한 방법으로 새로운 점박이용에 개체군의 bifentazate 저항성을 확인할 때에 실험을 빠르게 진행하여 감수성과 저항성의 비율이 얼마인지 알고 그에 맞게 약제 저항성 발달 수준을 고려해 방제를 한다면 효율성이 더 좋아질 것으로 생각되어진다. 그러나 1000배 이상의 높은 약제저항성을 지닌 개체군에서만 진단 가능한 단점을 가지고 있어 이와 관련된 보완 실험은 향후 진행되어야 할 것이다.

PCR amplification of specific allele(PASA)

분자학적 진단도구의 두 번째 방법인 PASA 실험 결과, 점 돌연변이를 포함하지 않은 감수성 primer를 사용하여 PCR을 수행하였을 경우 bifentazate 약제 저항성인 BR에서는 PCR이 되지 않아 *cytb*의 유전자단편을 발현할 수 없었다. 그리고 G126S의 저항성 돌연변이를 가졌던 강진과 예산 개체군에서도 BR과 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4). 이와 같이 PASA와 같은 진단법을 이용함으로써 저항성 유전형 분석에 소비되는 시간과 비용을 현저하게 줄일 수 있었다. 그러나 PASA를 수행 할 때에 primer 양, template 양, 그리고 PCR 반응온도에 따라 결과가 상이하여 최적의 조건을 설정하더라도 민감하게 반응하는 단점이 있다. 그러므로 추후 G126S 점 돌연변이를 활용하여 real-timePASA(rtPASA)와 SISAR 등 더욱 편리한 분자학적 진단법을 응용할 필요가 있다. rtPASA를 이용하여 개체군의 저항성 발달 수준을 진단하는 연구가 최근 들어 많이 시도되고 있는데 Kwon *et al.*(2004)은 피레스로이드계 저항성 배추좀나방의 나트륨 이온 채널의 점 돌

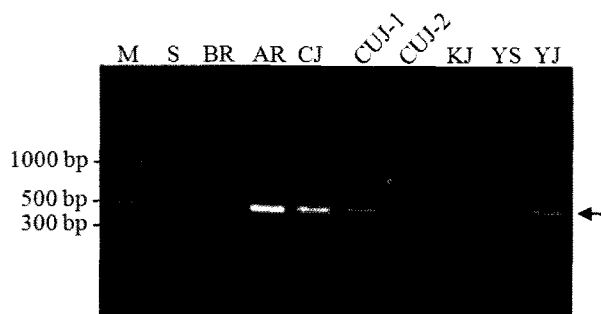


Fig. 4. Result of the PASA for the analysis of insensitive mitochondria *cytb* as determined by the absence of the G126S mutation from susceptible (S), bifentazate-resistant (BR), acequinocyl-resistant (AR), Cheongju (CJ), Kangjin (KJ), and Chungju (CUJ)-1, CUJ-2, Yesan (YS), and Yeongju (YJ) strains of *T. urticae* female adults. Lane M, DNA size marker. *Cytb* fragments are indicated with arrow.

연변이 T921I에 대해서 rtPASA를 하였고, Clark(2009)은 permethrin 약제저항성 *Pediculus humanus capitis*의 점 돌연변이로 rtPASA, 그리고 SISAR에 대해 저항성 진단도구를 적용하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 본 연구에 사용한 QS와 PASA를 통해 야외 개체군의 bifentazate 저항성 발달 수준을 빠르고 간편하고 정확하게 진단할 수 있어 효율적인 방제관리에 도움이 될 것이라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 농촌진흥청 아젠다 사업(대과제명: 농업현장대응/원예·특용작물 경쟁력 제고 기술 개발)의 “수출용 배 국산품종의 중소정형과 생산 및 식품검역 병해충 방제기술 개발(과제번호: PJ0064362010)의 연구비 지원과 교육인적 자원부의 제 2단계 두뇌한국 21사업으로 수행한 결과이다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Clark, J. M. (2009) Determination, mechanism and monitoring of knockdown resistance in permethrin-resistant human head lice, *Pediculus humanus capitis*. J. Asia Pacific Entomol. 12:1~7.
- Finney, D. J. (1971) Probit analysis. 3rd ed. pp. 333. Cambridge University Press, Cambridge.
- Germer, S., M. J. Holland and R. Higuchi (2000) High-throughput SNP allele-frequency determination in pooled DNA samples by kinetic PCR. Genome Res. 10:258~266.
- Joo, Y. L. (2010) Two point mutations in *ace1* associated with EPN resistance in the *Plutella xylostella* and molecular diagnosis. Master's degree Thesis, Chungbuk National Univ.
- Kim, E. H., J. O. Yang, C. M. Yoon, K. S. Ahn and G. H. Kim (2007) Inheritance and cross resistance of acequinocyl resistance in Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. Kor. J. Pestic. Sci. 11:125~130.
- Kwon, D. H., J. M. Clark and S. H. Lee (2004) Estimation of knockdown resistance in Diamondback moth using real-time PASA. Pestic. Biochem. Physiol. 78:39~48.
- Kwon, D. H., K. S. Yoon, J. P. Strycharz, J. M. Clark and S. H. Lee (2008) Determination of permethrin resistance allele frequency of human head louse populations by quantitative sequencing. J. Med. Entomol. 45:912~920.
- Kwon, D. H. (2009) Mechanisms and detection of the Twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, Resistance to monocrotophos, Fenpropathrin and Abamectin. Ph.D Thesis, Seoul

- National Univ.
- Lee, K. R., H. N. Koo, C. M. Yoon and G. H. Kim (2010) Cross resistance and point mutation of the mitochondrial cytochrome *b* of bifenazate resistant Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*. Kor. J. Pestic. Sci. 14:247~254.
- Lee, S. H., K. S. Yoon, M. S. Williamson, S. J. Goodson, M. Takano-Lee, J. D. Edman, A. L. Devonshire and J. M. Clark (2000) Molecular analysis of *kdr*-type resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. Pestic. Biochem. Physiol. 66:130~143.
- Lee, S. H., J. R. Gao, K. S. Yoon, K. Y. Mumcuoglu, D. Taplin, J. D. Edman, M. Takano-Lee and J. M. Clark (2003b) Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis*, (De Geer). Pestic. Biochem. Physiol. 75:79~91.
- Lee, S. Y., K. S. Ahn, C. S. Kim, S. C. Shin and G. H. Kim (2004) Inheritance and stability of etoxazol resistance in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its cross resistance. Kor. J. Appl. Entomol. 43:43~48.
- Lee Y. S., M. H. Song, K. S. Ahn, K. Y. Lee, J. W. Kim and G. H. Kim (2003a) Monitoring of acaricide resistance in two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose green houses in Korea. J. Asia Pacific Entomol. 6:91~96.
- Livak, K. J. (1999) Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. Genet. Anal. 14:143~149.
- Sham, P., J. S. Bader, I. Craig, M. O'Donovan and M. Owen (2002) DNA pooling: a tool for large-scale association studies. Nat. Rev. Genet. 3:862~871.
- Takafuji, A., A. Ozawa, H. Nemoto and T. Gotoh (2000) Spider mites of Japan: their biology and control. Exp. Appl. Acarol. 24:319~335.
- Van Leeuwen, T., B. Vanholme, S. Van Pottelberge, P. Van Nieuwenhuyse, R. Nauen, L. Tirry and I. Denholm (2008) Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:5980~5985.
- Van Nieuwenhuyse, P., T. Van Leeuwen, J. Khajehali, B. Vanholme and L. Tirry (2009) Mutations in the mitochondrial cytochrome *b* of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. Pest Manag. Sci. 65:404~412.
- Whalon, M. E., D. Mota-Sanchez, R. M. Hollingworth and L. Duynslager (2004) Arthropod Pesticide Resistance Database. Angelsee Software Inc.
- Wilkening, S., K. Henminki, R. K. Thirumaran, J. L. Bernejo, S. Bonn, A. Forst and R. Kumar (2005) Determination of allele frequency in pooled DNA: Comparison of three PCR-based methods. Biotechniques. 39:853~858.

분자학적 진단방법을 이용한 bifenazate 저항성 점박이응애 모니터링

이규리 · 신윤호 · 조선란 · 구현나 · 최장전¹ · 안기수² · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물외과, ¹국립원예특작과학원 배시현장, ²충북농업기술원 친환경농업연구과

요 약 2010년에 청주, 충주-1, 충주-2, 강진, 예산, 그리고 영주에서 채집한 점박이응애의 bifenazate 약제 저항성을 확인해 본 결과, 강진과 예산 개체군에서 각각 964.5배, 1130배의 높은 저항성을 나타내었다. 그리고 청주, 충주-1, 충주-2, 그리고 영주개체군에서는 낮은 저항성비를 나타내었다. Bifenazate 약제 저항성 점박이응애의 *cytb* 점 돌연변이인 G126S를 확인해 본 결과, 생물검정에서 높은 저항성을 보인 강진과 예산 개체군에서 G126S 점 돌연변이를 확인할 수 있었다. 이와 같이, G126S 점 돌연변이는 bifenazate 약제 저항성을 가지는 점박이응애 선별에 아주 유용한 분자진단 마커로 이용될 수 있다. 두 가지 분자진단 방법인 quantitative sequencing(QS)와 PCR amplification of specific alleles(PASA)는 G126S 점 돌연변이를 잘 탐지하였다. 따라서 이러한 방법들은 야외 계통의 bifenazate 약제 저항성 형질 모니터링과 저항성 관리에 효율적으로 이용될 수 있을 것이다.

색인어 점박이응애, Bifenazate, 점 돌연변이, 시토크롬 *b*, QS, PASA