

Etoxazole 저항성 점박이응애의 미토콘드리아 유전자 서열 분석

박상은 · 구현나 · 윤창만 · 최장전¹ · 김길하*충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 배시험장

(Received on November 7, 2011. Revised on January 20, 2012. Accepted on January 30, 2012)

Analysis of Mitochondrial Gene Sequence in Etoxazole Resistant Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*Sang-Eun Park, Hyun-Na Koo, Changmann Yoon, Jang-Jeon Choi¹ and Gil-Hah Kim*Dept. of Plant Medicine, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea, ¹Pear Research Station, NIHHS, RDA, Naju, Jeonnam, 520-821, Republic of Korea

Abstract

The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), is one of the most important pest species devastating many horticultural and ornamental crops and fruit trees. Difficulty in managing this mite is largely attributed to its ability to develop resistance to many important acaricides. Development of 3,700-folds resistance to etoxazole was found in the population of *T. urticae* collected from rose greenhouses in Buyeo, Chungnam Province in August 2000. This population has been selected for eleven years with etoxazole (over 500 times), and increased over 5,000,000-folds in resistance as compared with susceptible strain. Also, etoxazole-resistant strain was shown to be maternally inherited. The objective of this study was to determine whether resistance of *T. urticae* to etoxazole was linked with point mutations in the mitochondrial gene. DNA sequencing of cytochrome c oxidase subunit I (COX1), COX2, COX3, cytochrome *b* (CYTB), NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1), ND2, ND3, ND4, ND5, and ND6 were analyzed by comparing two etoxazole-susceptible and etoxazole-resistant strains. As a result, differences were not detected between the nucleotide sequences of two strains within a mitochondrial gene.

Key words *Tetranychus urticae*, Etoxazole, Mitochondrial gene, Point mutation

서론

Etoxazole(C₂₁H₂₃F₂NO₂)은 1980년대 중반에 발견된 옥사졸린계 화합물로서 화학명은 2-(2,6-Difluorophenyl)-4-[4-(tert-butyl)-2-ethoxyphenyl]-4,5-dihydrooxazole이며 359.41의 분자량을 지녔다. 이 약제는 *Tetranychus*속과 *Panonychus*속 응애류의 알과 유·약충에 높은 활성을 나타내나, 성충에 대한 살비력은 낮다(Tomlin, 2000; Kobayashi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003a). Etoxazole은 국내에서 1998

년에 상업화 되어 주움(Zoom)이라는 상품명으로 등록되었으며(Pesticide handbook, 2000), 사과, 감귤, 수박, 배, 딸기, 장미 등에서 사과응애, 귤응애, 점박이응애, 차응애에 적용하도록 되어 있다. 작용기작에 대한 연구로는 *Spodoptera frugiperda*에서 chitin 생합성을 저해하는 것으로 밝혀져 있다(Nauen and Smagghe, 2006).

점박이응애(*Tetranychus urticae* Koch)는 기주 범위가 넓으며 우리나라 뿐 만 아니라 전 세계적으로 수많은 농작물을 가해하는 중요한 해충이다(Takafuji *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003a). 점박이응애는 발육기간이 짧아 연간 발생 세대수가 많으므로 살비제에 의한 도태의 기회가 많고, 이동성이 적다.

*Corresponding author: Tel. +82-43-261-2555

Fax. +82-43-271-4414, E-mail. khkim@chungbuk.ac.kr

따라서 근친교배가 일어나기 쉬우며, 외부로부터 감수성 유전자를 가진 개체의 침입이 적으므로 살비제 저항성 발달이 다른 해충들에 비하여 빠르게 나타날 가능성을 지니고 있다 (Asada, 1978). 점박이응애는 현재 상업적으로 등록되어 있는 살비제의 거의 모든 종류에 대해 저항성이 발달되어 있는 것으로 보고되어 있다(Whalon *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010). 특히 응애류는 유전적으로 돌연변이율이 다른 곤충에 비해 높은 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, 2004). 이러한 점박이응애의 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 드는 등 여러 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하여 분자학적 진단도구로 quantitative sequencing(QS), PCR amplification of specific allele(PASA), bi-directional PASA, single stranded conformational polymorphism(SSCP), 그리고 serial invasive signal amplification reaction 등을 이용한 약제 저항성 모니터링에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다(Livak, 1999; Germer *et al.*, 2000; Sham *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003b). 최근 들어 실내에서 사육한 점박이응애 감수성 계통을 bifenazate LC₉₀값으로 도태시켜 5세대 후 미토콘드리아 cytochrome *b*(CYTB)에서 G126S, I136T, S141F, P262T 등 4개의 점 돌연변이(point mutation)를 발견하여, bifenazate 저항성 점박이응애에서의 저항성기작은 미토콘드리아 CYTB에서의 점 돌연변이와 밀접하게 연관되어 있음이 보고되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Nieuwenhuyse *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Lee *et al.* (2010)은 국내에서 bifenazate에 저항성을 보이는 점박이응애 개체군에 대하여 CYTB에서의 G126S 점 돌연변이가 1개를 확인하였고, 야외 채집군 중에서 특히 높은 저항성을 보인 강진 개체군에서도 G126S 점 돌연변이를 확인하였다. 그 결과 bifenazate 저항성은 미토콘드리아 CYTB의 G126S 점 돌연변이가 저항성 발달에 중요한 역할을 할 것이라 보고하였다. 이와 같이 점박이응애의 특정 약제 저항성에 대한 점 돌연변이와 저항성을 확인한다면 효과적인 저항성 모니터링 방법이 될 것이다. 또한 현재까지 etoxazole의 저항성과 점 돌연변이에 대한 연구는 되어있지 않다.

이에 본 연구에서는 2000년 8월 충남 부여의 장미 재배지에서 채집한 집단(Lee *et al.*, 2004)을 실험실에서 11년간 도태시키면서 5,000,000배 이상의 etoxazole 저항성을 지닌 점박이응애의 유전적인 변이를 찾기 위하여 우선 미토콘드리아 내 존재하는 유전자의 점 돌연변이 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

시험약제

본 실험에 사용된 etoxazole(10% SC)은 주음(DongBang Agro, Seoul, Republic of Korea)이라는 상품명으로 시판되는 약제를 구입하여 사용하였다.

시험곤충 및 저항성 선발

시험에 사용된 감수성 계통(S)은 울릉도에서 채집한 점박이응애를 서울대학교에서 분양받아 2005년부터 충북대학교 식물위생학과 곤충사육실에서 약제 처리 없이 누대 사육한 것을 사용하였다. Etoxazole 저항성 계통 점박이응애(R)는 2000년 8월에 충남 부여의 장미 재배지에서 가장 높은 저항성비(3,700배)를 나타낸 개체군을 대상으로 하여(Lee *et al.*, 2003a) 실내에서 11년간 etoxazole을 LC₂₀₋₃₀ 농도로 희석하여 7일 간격으로 분무처리 하였다. 그리하여 현재 저항성비가 5,000,000배 이상 증가됨을 확인하였다(Table 2). 실내 사육조건은 온도 25~27°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 40~60%로 조절하였고, 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.)을 기주로 하여 사육하였다.

살비제 처리방법

직경 5.5 cm의 페트리디쉬 내에 물을 충분히 적신 탈지면을 깔고 그 위에 직경 3 cm로 자른 강낭콩 잎을 올려놓았다. 부드러운 붓으로 점박이응애 성충 40~50마리를 접종하여 5시간 이내 산란 받고 성충을 제거한 후, 산란된 알의 수를 미리 세었다. 산란되어 있는 잎 절편을 약액에 30초 동안 침지하였다가 음건시켰다. 약제 처리 후 온도 25~27°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 40~60% 조건에 보관하면서 7일 동안의 부화율을 조사하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였고, 살비율은 Finney(1971)의 probit계산법으로 LC₅₀(ppm) 값을 구하였다.

미토콘드리아 유전자 염기서열 분석

점박이응애의 genomic DNA는 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Republic of 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. Table 1에서 제시된 바와 같이 cytochrome *b*(CYTB), cytochrome *c* oxidase subunit I(COX1), cytochrome *c* oxidase subunit

II(COX2), cytochrome *c* oxidase subunit III(COX3), NADH dehydrogenase subunit 1(ND1), NADH dehydrogenase subunit 2(ND2), NADH dehydrogenase subunit 3(ND3), NADH dehydrogenase subunit 4(ND4), NADH dehydrogenase subunit 5(ND5), 그리고 NADH dehydrogenase subunit 6(ND6)에 대한 각각의 프라이머를 제작하였다. 염기서열 정보는 감수성 계통인 LS-VL strain(GenBank No. NC_010526)을 참고하였다. PCR은 10 pmol 농도의 프라이머 1 μ l와 Hot start Ex-taqTM DNA polymerase(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에서 전기영동 한 PCR 산물은 PCR purification kit(Macrogen, Seoul, Republic of Korea)를 사용하여 정제한 다음 시퀀싱(sequencing) 하였다(Macrogen, Seoul, Republic of Korea).

염기서열 분석은 BLAST(Basic Local Alignment Search Tools) 프로그램으로 GenBank에 등록되어 있는 염기서열과 상동성을 비교분석하였다. 그리고 정확성을 위해 이와 같은 실험을 3반복 실시하였다.

결과 및 고찰

Etoxazole 저항성 발달 수준 확인

본 실험에 사용된 감수성 계통(S)에 대한 etoxazole의 LC₅₀ (ppm)값은 0.0011 ppm이었고 저항성 계통(R)은 5,000 ppm 이상으로 저항성비가 5,000,000배 이상으로 발달하였다 (Table 2). 2000년 8월 충남 부여에서 채집할 당시에 3.7

Table 1. Primers used for amplification and sequencing of *T. urticae* mitochondrial genes

Name	Sequence (5' → 3')	Size (mer)	Product (bp)
CYTB-F	ATAAAATGAATTATATCAACAAATCA	26	1,064
CYTB-R	CTATTTATTTAAAAAATTATATTATA	27	
COX1-F	ATAAAATGAATTATATCAACAAATCA	26	1,538
COX1-R	CTATTTATTTAAAAAATTATATTATA	27	
COX2-F	TTAAATTTTATTTAAATTTAAAGATAA	27	638
COX2-R	ATGACAAATATAAATTCCTTATGAAT	26	
COX3-F	AATAAAATAAAGTAAATACTCCAATT	26	786
COX3-R	ATGACATTAATAATTTAACTATAAT	26	
ND1-F	AAATATAAAGATACATAATTAATAATA	27	855
ND1-R	ATTTTTATTTTTGAATTTTTATTAATA	27	
ND2-F	ATATTAAATTTATTATTAATATATTATT	28	888
ND2-R	ATAAAAATATAAATATTTAAATTTAAATA	28	
ND3-F	ATGATCATTTTTTTTATTATAATTTTA	27	335
ND3-R	TTATTTAATAAATCAATTTAATCTTAT	27	
ND4-F	ATGTCATTTATATATATATTTTTGT	26	1,153
ND4-R	TATATAAATAAAAAGTAATATTAGATG	26	
ND5-F	ATTATTTTTATTAATATATTTAAAATTT	28	1,565
ND5-R	TTAAATAAATATTTAAAATAATTAATAAT	28	
ND6-F	ATAATTTTATTTTTTATTTTTTGACA	27	399
ND6-R	ACATTTTAATTTTTTTTGTTTTTTG	26	

Table 2. Resistance of etoxazole-susceptible (S), original Buyeo (OB) and etoxazole-resistant strains (R) of *T. urticae* female adults

Strain	LC ₅₀ (ppm) (95% CL ^{a)})	Resistance ratio ^{b)}
S	0.0011 (0.0008 - 0.0014)	1
OB	3.7 (1.1 - 6.3)	3,700
R	> 5,000	> 5,000,000

^{a)}95% Confidence limits

^{b)}Resistance ratio = LC₅₀ of R strain or F1 or F2/LC₅₀ of S strain

ppm으로써 저항성비가 3,700배이었고 이것을 실내에서 3년 동안 etoxazole로 선발한 후에 5,000 ppm 이상으로 저항성 비가 이미 5,000,000배 이상 발달하였다(Lee *et al.*, 2004). 이처럼 점박이응애에서 etoxazole의 저항성은 굉장히 빨랐다. 그 후 8년 동안 계속 주기적으로 etoxazole을 처리하여 저항성 계통을 유지시켰고 현재까지 총 11년 동안 도태시킨 결과 여전히 5,000 ppm 이상으로 정확한 저항성비를 측정할 수는 없었다. 또한 Lee *et al.*(2004)의 연구에서 etoxazole 저항성의 유전양식을 검토한 결과, 교배방식에 따라 억제 감수성에 큰 차이를 보였고 억제저항성 지배유전인자는 수컷보다는 암컷성충에 의존적으로 유전되며 완전우성임을 알 수 있었다. 억제 저항성의 유전양식은 저항성의 발달속도를 조정하는 중요한 요인 중의 하나인데 지금까지 많은 살비제의 저항성 유전양식에 대해 보고가 되었다(Kuwahara, 1977; Inoue, 1984; Yamamoto *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996; Goka, 1998).

미토콘드리아 내 유전자의 점 돌연변이 확인

Etoxazole 저항성 계통에서 점 돌연변이를 확인하기 위하여 미토콘드리아 내 존재하는 CYTB, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, 그리고 ND6에 대한 primer를 제작하였다. 각 유전자에 대한 PCR을 수행하여 1064 bp,

1538 bp, 638 bp, 786 bp, 855 bp, 888 bp, 335 bp, 1153 bp, 1565 bp, 그리고 399 bp 크기의 PCR 산물을 각각 얻은 후 염기서열을 분석하였다.

먼저 CYTB는 LS-VL strain과 비교하였을 때 우리가 보유하고 있는 감수성 계통과 저항성 계통 모두 23군데의 염기서열이 다른 것을 발견 하였다(Fig. 1). 그러나 감수성 계통과 저항성 계통 사이에서의 차이점은 발견하지 못하였다. 따라서 이러한 결과는 etoxazole 저항성 점박이응애의 CYTB는 etoxazole의 작용점이 아니라는 것을 제시해준다. Van Nieuwenhuysse *et al.*(2009)은 실내에서 사육하던 점박이응애 감수성 계통을 bifenazate LC₉₀값으로 도태시켜 미토콘드리아 CYTB에서 G126S, I136T, S141F, P262T 등의 점 돌연변이를 발견하였다. Bifenazate는 곤충신경계의 post-synaptic GABA 수용체에 작용하는 신경독소로 먼저 알려졌다(Dekeyser, 2005), 최근 연구에 의하면 bifenazate 저항성은 모계유전이고(Yu *et al.*, 2005), 이 저항성이 미토콘드리아 복합체 III(bc1 복합체, ubihydroquinone : cytochrome c 산화환원효소 복합체)의 Q_o 지점에 작용한다고 보고되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2006; 2008). Cytochrome b는 오직 미토콘드리아에서 물질을 변화시켜 주는 산화환원 단백질이며, 미토콘드리아 복합체 III에서 *Cyt_c1*과 철분-유황 단백질(ISP)과 함께 촉매역할을 한다(Boore, 1999). 또한 bifenazate 저항성은 미토콘드



Fig. 1. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial CYTB from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.

리아 CYTB에서의 점 돌연변이와 밀접하게 연관된다고 보고 되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Nieuwenhuysse *et al.*, 2009). 국내 연구에서는 Lee *et al.*(2010)이 bifenazate 에 저항성을 보이는 점박이응애 개체군에 대하여 CYTB에서

의 G126S 점 돌연변이 1개를 확인하였고, 높은 저항성을 보 인 약의 채집 개체군에서도 G126S 점 돌연변이를 확인하였 다. 그러나 etoxazole 저항성 점박이응애에서는 CYTB에서 의 점 돌연변이를 확인할 수 없었다.

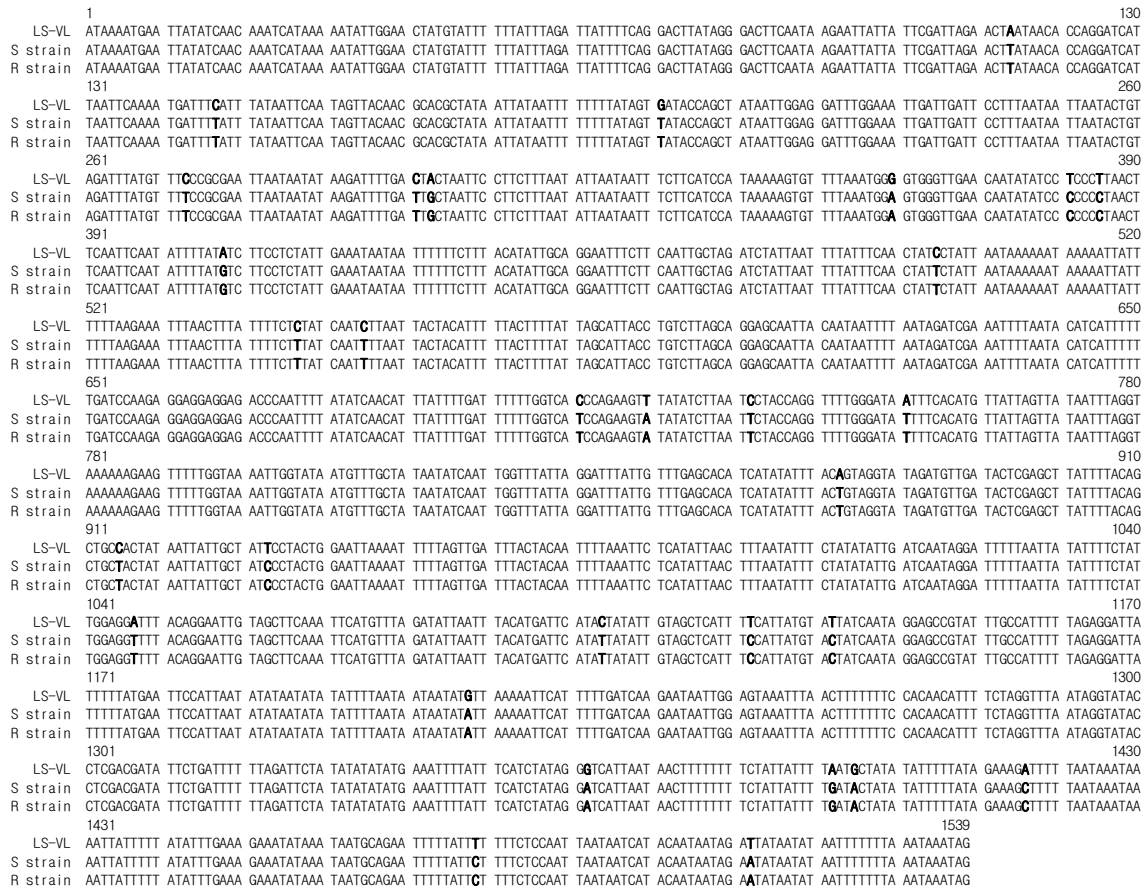


Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial COX1 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.

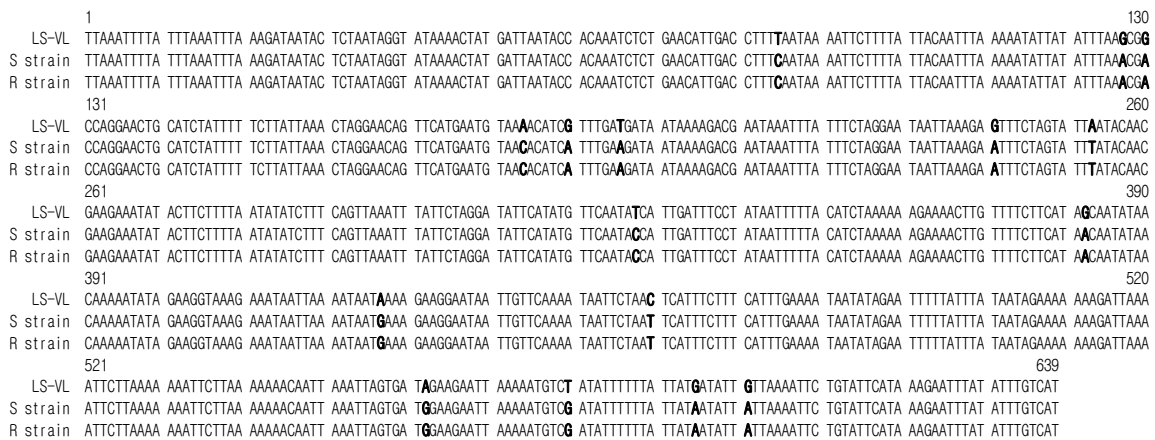


Fig. 3. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial COX2 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.

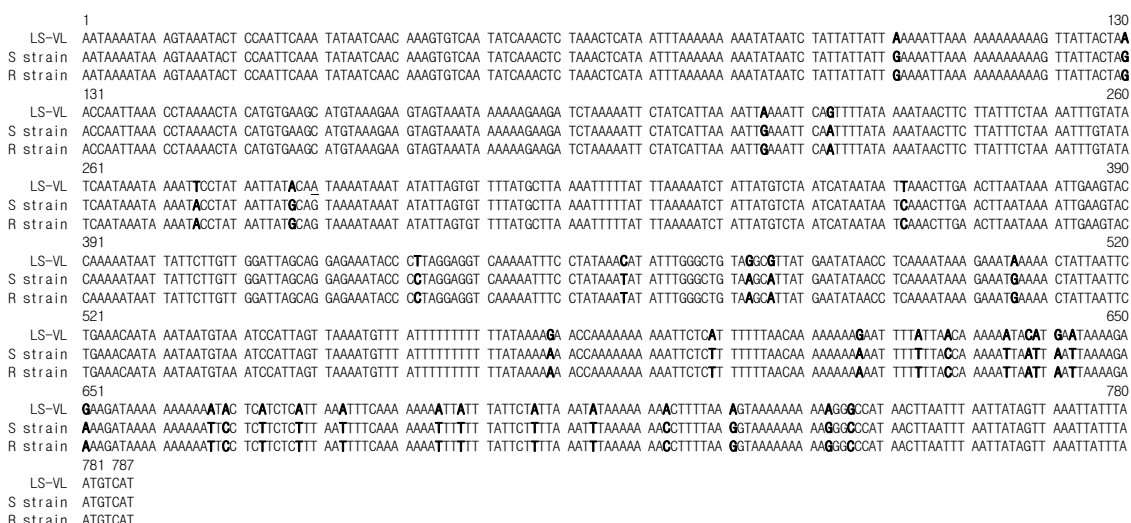


Fig. 4. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial COX3 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.



Fig. 5. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial ND3 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.



Fig. 6. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial ND4 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.

```

1
LS-VL  ATAATTTTAT TTAATTTATT TTTAACAAATA AACCTTTATC CAATAAGAAT AGTAATTAAC TTCTCATTTT TTTTATTAAC TTTTATAGTA AATTTTTTTA TTTTATAATA TGATAAATGA ATAATAATAC
S strain ATAATTTTAT TTAATTTATT TTTAACAAATA AACCTTTATC CAATAAGAAT AGTAATTAAC TTCTCATTTT TTTTATTAAT TTTAATAATA AATTTTTTAA TTTTATAATA TGACAAATGA ATAATAATAC
R strain ATAATTTTAT TTAATTTATT TTTAACAAATA AACCTTTATC CAATAAGAAT AGTAATTAAC TTCTCATTTT TTTTATTAAT TTTAATAATA AATTTTTTAA TTTTATAATA TGACAAATGA ATAATAATAC
131
LS-VL  TTTTAAATTT TTTTATGATT GGAGGAATAA TGATTTTTAT TTCTTTAATT TGTTGTACTA TAAAATTTAA TTTAATAATA AAAAAAAAAA ATTATTTAAT AATTTTTTTA GTTATATTTT ATATATGAT
S strain TTTTAAATTT TTTTATAGTT GGGGGAATAA TAATTTTTGT TTCTTTAATT TGTTGTACTA TAAAATTTAA TTTTATAAT AAAAAAAAAA ATTATTTGAT CATTTTTTTA TTTACATTTT ATTATCATT
R strain TTTTAAATTT TTTTATAGTT GGGGGAATAA TAATTTTTGT TTCTTTAATT TGTTGTACTA TAAAATTTAA TTTTATAAT AAAAAAAAAA ATTATTTGAT CATTTTTTTA TTTACATTTT ATTATCATT
261
LS-VL  AATAAATATA GATATATCTT TCTCAATTTT ACTGTCTATA ATAGATAATG TATTTATATT TTTTTTTTGT TTTTAAATTA TCATAATAAT ATTTTCTTA AAAAAATATT TATTTAAGAA ACAAAAAAAT
S strain AGTAATTTATA GATAATTTCTT TTCAATTTT ATTGACCTTA ATAATAATA TATTTATATT CTTTTTTTGT TTTTAAATTA TTATAATAAT ATTTTCTTA AAAAAATATT TATTGAAAA ACAAAAAAAT
R strain AGTAATTTATA GATAATTTCTT TTCAATTTT ATTGACCTTA ATAATAATA TATTTATATT CTTTTTTTGT TTTTAAATTA TTATAATAAT ATTTTCTTA AAAAAATATT TATTGAAAA ACAAAAAAAT
391 400
LS-VL  ATTAATAAT
S strain ATTAATAATG
R strain ATTAATAATG

```

Fig. 7. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial ND6 from LS-VL, etoxazole-susceptible (S), and etoxazole-resistant (R) strains of *T. urticae* female adults. Polymorphic sites are shown in bold.

다음으로 COX1의 염기서열을 비교한 결과, LS-VL strain과는 모두 31군데에서 염기서열 차이를 보였지만 감수성 계통과 저항성 계통 사이에서는 차이가 없었다(Fig. 2). 또한 COX2와 COX3에서도 LS-VL strain과 비교하였을 경우 각각 16군데, 36군데의 염기가 달랐지만 감수성 계통과 저항성 계통 사이에서는 차이가 없었다(Fig. 3과 Fig. 4).

ND1, ND2와 ND5에서도 LS-VL strain과 비교하였을 경우 몇몇 염기에 있어 차이를 보였지만, 감수성 계통과 저항성 계통 사이에서는 역시 차이가 없었다(data not shown). ND3의 경우에는 36번째 염기가 감수성 계통에서는 thymine(T)이고 저항성 계통에서는 adenine(A)으로 서로 다르게 확인되었으나, 아미노산은 동일하게 이소류신(Ile)을 코드하므로 점 돌연변이라 할 수 없었다(Fig. 5). 또한 ND4와 ND6에서도 감수성 계통과 저항성 계통간 염기서열에 있어 차이점을 발견 할 수 없었다(Fig. 6과 Fig. 7).

이와 같이 etoxazole 저항성 점박이응애는 미토콘드리아의 CYTB, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, 그리고 ND6에서의 점 돌연변이는 나타나지 않는 것으로 보인다. 따라서 etoxazole의 정확한 작용점을 찾기 위해 cytochrome P450(CYP) 등 다른 유전자 부분을 대상으로 현재 분석 중에 있으며, 약제 저항성에 기인하는 target 단백질의 활성화와 발현정도 뿐만 아니라 감수성 계통과 저항성 계통에서의 전체 단백질 발현패턴 분석도 계획 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 어젠다 사업(대과제명: 원예작물 경쟁력 제고 기술)의 “배 수출증대를 위한 규격과 생산 및 주요 병해충 방제기술 개발 연구(PJ008633)”의 연구비 지원과 교육인적자원부의 제 2단계 두뇌한국 21사업으로 수행한 결과이다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

- Asada, M (1978) Genetics and biochemical mechanism of acaricide resistance in phytophagous mites. *J. Pestic. Sci.* 3:61~68.
- Boore, J. L (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767~1780.
- Dekeyser M. A (2005) Acaricide mode of action, *Pest Manag. Sci.* 61:103~110.
- 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.
- Goka, K (1998) Mode of inheritance of resistance to three new acaricides in the kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 22: 699~708.
- Inoue, K (1984) Resistance to amitraz in the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) in relation to population genetics. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 28:260~268.
- Kobayashi, M., S. Kobayashi and T. Nishimori (2001) Occurrence of etoxazole resistance individuals of the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch from a limited region. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 45:83~88.
- Kuwahara, M (1977) The development and inheritance of resistance in the kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida, selected with chlordimeform, dicofol and phenthoate. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 21:163~168.
- Lee, K. R., H. N. Koo, C. Yoon and G. H. Kim (2010) Cross resistance and point mutation of the mitochondrial cytochrome b of bifentazate resistant two-spotted spider Mite, *Tetranychus urticae*. *Kor. J. Pestic. Sci.* 14:247~254.
- 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. 3:43~48.
- 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 (*Tertranychus 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.
- Nauen, R and G. Smaghe (2006) Mode of action of etoxazole. Pest Manag. Sci. 62:379~382.
- Park, C. G., S. G. Lee, B. R. Choi, J. K. Yoo and J. O. Lee (1996) Inheritance of tetradifon resistance in twospotted spider mite (Acarina: Tetranychidae). Korean J. Appl. Entomol. 35:260~265.
- Pesticide handbook (2000) Korea Crop Protection Association (KCPA).
- 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.
- Tomlin, C (2000) The pesticide manual. British crop council Twelfth Edition. 803 pp.
- Yu, J. S., D. K. Seo, E. H. Kim, J. B. Han, K. S. Ahn and G. H. Kim (2005) Inheritance and cross resistance of bifenazate resistance in two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Kor. J. Appl. Entomol. 44:151~156.
- 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 Leeuwen, T., L. Tirry and R. Nauen (2006) Complete maternal inheritance of bifenazate resistance in *Tertranychus urticae* Koch (Acari : Trtranychidae) and its implications in mode of action considerations. Insect Biochem. Mol. Biol. 36:869~877.
- 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.
- Yamamoto, A., H. Yoneda, R. Hatano and M. Asada (1995) Genetic analysis of hexythiazox resistance in the citrus red mite, *Panonychus citri* McGregor. J. Pestic. Sci. 20:513~519.

Etoxazole 저항성 점박이응애의 미토콘드리아 유전자 서열 분석

박상은 · 구현나 · 윤창만 · 최장전¹ · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 배시협장

요 약 점박이응애는 전 세계적으로 농업과 원예 분야에 경제적 손실을 일으키는 중요한 해충으로 많은 살비제에 대해 저항성이 발달하여 방제에 어려움을 겪고 있다. 2000년 8월 충남 부여의 장미 재배지에서 채집한 점박이응애가 etoxazole에 대해 3,700배의 저항성을 나타내었다. 이 집단을 실내에서 11년 동안 etoxazole로 500회 이상 도태하여 5,000,000배 이상의 저항성 계통을 얻었다. Etoxazole 저항성은 모계유전 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 etoxazole 저항성이 모계유전을 하는 미토콘드리아 유전자내 점 돌연변이와 관련이 있는지를 조사하였다. Etoxazole 저항성 계통과 감수성 계통의 CYTB, COX1, COX2, COX3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, 그리고 ND6의 유전자 서열을 비교한 결과 저항성 계통에서의 점 돌연변이는 발견할 수 없었다.

색인어 점박이응애, Etoxazole, 미토콘드리아 유전자, 점 돌연변이