

복숭아혹진딧물 야외개체군의 살충제 저항성 마커 선발

김주일* · 권민 · 심재동 · 김점순 · 이영규 · 지삼녀 · 이정태 · 류종수 · 유동림 · 이계준

농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터

Selection of Insecticide Resistance Markers in Field-collected Populations of *Myzus persicae*

Ju Il Kim*, Min Kwon, Jae Dong Shim, Jeom Soon Kim, Yeong Gyu Lee, Sam Nyu Jee, Jeong Tae Lee, Jong Soo Ryu, Dong Lim Yoo and Gye Jun Lee

Highland Agriculture Research Center, NICS, RDA, Pyeong-chang, Korea 232-955

ABSTRACT: The resistance levels of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), against 10 insecticides was checked and selected the applicable insecticide resistance markers. We conducted our study in 5 cabbage cultivation regions (Pyeongchang, Hongcheon, Bongwaha, Muju, and Jeju) of Korea, over 3 successive years (2009–2011). We selected a multi-resistant (MR) strain from among the 5 field-collected populations. We analyzed esterase over-expression and mutation(s) in the target sites, by using native isoelectric focusing (IEF) and quantitative sequencing (QS). We detected esterase over-expression and StoF mutation in the acetylcholinesterase 1 gene (*ace1*) in all of the field-collected populations, including the MR strain. We did not detect the LtoF mutation, which is a well-known knockdown resistance (*kdr*) mutation in the para-type sodium channel gene (*para*), in the MR strain; however, the value of the MR strain for bifenthrin was 3,461-fold higher than that of the susceptible strain. Our results indicate that insecticide resistance is more effectively evaluated using molecular markers than by conducting a bioassay. The molecular markers StoF in *ace1* and MtoL in *para* can easily be applied in diagnostic methods such as QS or PCR amplification of specific alleles (PASA). These methods may be extended to management of *M. persicae* resistance in the field.

Key words: *Myzus persicae*, Insecticide resistance, Quantitative sequencing (QS), Esterase over-expression, Mutation

초록: 2009~2011년 동안 국내 주요 배추 재배지 5개 지역(평창, 홍천, 봉화, 무주, 제주)에서 살충제에 대한 복숭아혹진딧물의 저항성 발달 정도를 조사하고, 야외 개체군에 적용 가능한 살충제 저항성 마커를 개발하기 위해 본 연구를 수행하였다. 조사된 5개 지역 개체군 모두 여러 살충제 종류에 대하여 다양한 저항성을 보였다. 다양한 저항성을 보인 5개 지역 야외 개체군으로부터 여러 살충제에 대하여 복합적으로 저항성을 보이는 복합저항성 계통(MR)을 선발하였고, 이 MR과 모든 지역 채집 개체군에 대해 등전점전기영동과 정량염기서열분석(quantitative sequencing, QS)을 통하여 에스테라제 과발현과 살충제 작용점 내 돌연변이를 확인하였다. MR을 포함한 모든 야외 개체군에서 에스테라제의 과발현과 아세틸콜린에스테라제 1 유전자(*ace1*)의 StoF 돌연변이를 확인할 수 있었다. Nick다운 저항성 돌연변이로 잘 알려진 파라 타입 나트륨 채널 유전자(*para*)의 LtoF 돌연변이는 모든 지역 채집 개체군은 물론 비펜스린에 대해 3,461배 저항성을 보이는 MR에서도 발견되지 않았다. 그 외에 MtoL 돌연변이를 발견하였는데, 생물검정 결과 저항성 수준과 돌연변이 발생 빈도가 일치하였다. 따라서 생물검정 대신, 이러한 분자 마커를 활용한다면 더 효율적으로 살충제 저항성 평가가 가능할 것이다. 이러한 분자 마커들(*ace1*의 StoF, *para*의 MtoL)은 정량염기서열분석, PCR amplification of specific alleles (PASA) 등의 진단 방법에 쉽게 응용이 가능하고, 이러한 방법은 야외 복숭아혹진딧물 저항성 관리에 적용이 가능할 것이다.

검색어: 복숭아혹진딧물, 살충제 저항성, 정량염기서열분석(QS), 에스테라제 과발현, 돌연변이

*Corresponding author: forweek@korea.kr

Received January 8 2014; Revised March 8 2014

Accepted April 3 2014

노지 양채류는 배추, 양배추, 녹색꽃양배추 등이 주종을 이루고 있는데, 이 세 종을 모두 가해하는 대표적인 해충이 복숭아혹진딧물(*Green peach aphid, Myzus persicae*)이다. 복숭아혹진딧물은 국내에서는 물론 전 세계적 주요 해충으로 식물 조직을 흡즙하여 잎의 위축, 성장률의 둔화 및 수확량의 감소 등 직접적인 피해와 100여종의 각종 식물 바이러스병의 매개 및 2차적인 그을음병의 유발 등의 간접적인 피해를 준다고 알려져 있다(Lee and Paik, 1977). 복숭아혹진딧물 이외에 무테두리진딧물(*Turnip aphid, Lipaphis erysimi*), 양배추가루진딧물(*Cabbage aphid, Brevicoryne brassicae*) 역시 많은 피해를 주고 있으나(Lee and Paik, 1977; Shim et al., 1977), 이 중에서 배추에 가장 심한 피해를 주는 것은 복숭아혹진딧물이라 할 수 있다(Ahn et al., 1989). 국내에서 복숭아혹진딧물의 살충제 저항성 문제는 1970년대 이후 꾸준히 보고되었다(Shim et al., 1977; Choi and Kim, 1986; Choi et al., 1989; Choi et al., 2001). 국내뿐만 아니라 전세계적으로 저항성 문제가 심각 한데(Devonshire et al., 1998; Foster et al., 2008; Puinean et al., 2010), 농민들이 현장에서 느끼는 저항성 이라 함은 추천농도로 살포했을 때 방제에 어려움을 겪을 정도로 살충력이 현저히 떨어진 경우라고 판단된다. 농민들이 피부로 느끼고 있는 살충제 저항성은 약제의 오남용이 가장 주된 요인이라고 할 수 있으며(Choi and Kim, 1986; Choi et al., 2001), 그에 따른 환경오염과 안전한 먹거리 생산에 큰 악영향을 미친다. 이러한 이유로 살충제 저항성 관리 체계 구축은 매우 중요한데, 1970년대 이후로 유기인계, 카바메이트계의 저항성이 보고되었고, 피레스로이드계 약제 사용이 급속히 증가하면서 1980년대에는 세 계통의 약제에 대한 저항성 수준이 매우 급격하게 증가 하였다(Choi and Kim, 1986; Choi et al., 1989). 이 세 계통의 약제는 현재도 사용되고 있는 약제이기 때문에 저항성 관리를 위한 시스템 구축이 반드시 필요하다. 저항성 발달 정도를 효율적으로 탐지하기 위해 최근 비용과 시간이 많이 소요되는 생물검정을 대체할 수 있는 분자생물학적 진단 기술을 많이 개발하고 있다(Anstead et al., 2004; Cassanelli et al., 2005). 따라서 본 연구는 복숭아혹진딧물의 주요 양채류 재배 지역별 살충제 저항성 수준을 조사하고 우수 약제를 선발하여 저항성 관리 체계의 기초 자료로 제공하고자 수행되었으며, 또한 생물검정을 대체 할 수 있는 저항성 마커를 개발하여 야외 개체군 저항성 관리에 활용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

시험 곤충

복숭아혹진딧물 살충제 감수성 계통은 국립농업과학원에

서 분양 받았으며, 지역별로 채집한 야외 집단은 양채류 재배가 많이 이루어지고 있는 홍천(홍천군 내면), 평창(평창군 대관령면), 봉화(봉화군 석포면), 무주(무주군 무풍면), 제주(서귀포시 대정읍)에서 2009년에서 2011년까지 3년 간 6~8월 사이에 채집하여 배추를 기주로 고령지농업연구센터 곤충사육실(온도 25°C, 광주기 16L: 8D, 상대습도 60±10%)에서 사육하였다.

생물검정 및 복합저항성 계통 선발

2009년 기준 한국작물보호협회에 등록된 살충제 21가지(배추 기준) 중 단일 제제로 구성된 10개의 약제를 선발하고 시중에서 판매하고 있는 약제를 구입하여 시험에 사용하였다(Table 1). 시험 방법은 잎침지법을 사용하였으며, 추천농도로 희석된 살충제에 5 cm로 자른 배추잎을 30초간 침지 후 음건하여 여과지가 깔린 5.5 cm 디쉬에 넣은 후 성충 10 마리씩 접종 후 48 시간 후 사충수를 조사하였다. 모든 실험은 농도별 3반복으로 수행하였으며 사충률을 계산하여 저항성 정도를 비교하였다.

복합저항성 계통은 5개의 야외 지역 채집 개체군 내에서 100 마리씩을 모아서 하나의 사육 상자에 넣은 후 1주일 후 선발을 시작 하였다. 사용된 살충제 계통별 저항성 정도가 높은 메소밀(카바메이트계), 비펜스린(페레스로이드계), 이미다클로프리드(네오니코티노이드계)와 페메트로진, 플로니카미드를 각각 LC₂₀ 값에 준하여 6개월 간 한달 간격으로 총 6회 도태하여 복합저항성 계통(multiple resistance strain - MR)을 만들어서 저항성 기작 연구에 중점적으로 사용하다. 도태 계통을 고정 한 후 한 달에 1회 도태를 지속하면서 저항성 계통을 유지하였다. 생물 검정은 위와 동일한 방법으로 수행하였으며, LC₅₀값은 SAS 프로그램을 이용하여 probit 방법을 사용하였다(SAS institute, 2009).

Table 1. Insecticides used in this study

Insecticide	Formulation	Active ingredient (%)	Recommended concentration (ppm)
Methomyl	WP	45	293
Bifenthrin	WP	2	10
Pymetrozine	WG	25	84
Flonicamid	WG	10	34
Imidacloprid	WP	10	50
Thiamethoxam	WG	10	50
Acetamiprid	WP	8	40
Thiacloprid	SC	10	50
Clothianidin	SC	8	40
Dinotefuran	WG	20	100

지역별 복숭아혹진딧물 약제 저항성 유전자 형질 빈도 조사

복숭아혹진딧물 약제 저항성에 관여하는 것으로 알려진 유전자의 돌연변이 유무를 확인하기 위하여 개체군 및 계통별 전체 DNA를 추출하였다. 각 개체군별 복숭아혹진딧물 무시충 성충을 20 mg 정도 분량씩 모은 다음 DNAzol (MRC, Cincinnati, OH, USA) 400 µl를 넣고 조직분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 이후 과정은 MRC사에서 제공하는 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 20 µl 기준 PCR 수행 시 50 ng 정도를 넣었다. 주형 DNA 1 µl, 0.5 pM 프라이머 1 µl씩, 10 X PCR 완충용액, dNTP (각각 최종 농도가 0.2 mM), ExTaq (TaKaRa, Shiga, Japan)을 넣고 total volume을 20 µl로 맞추어 PCR을 수행하였다. PCR조건은 94°C 4분간 변성과정을 거쳐 94°C 20초, 55°C 20초, 72°C 30초로 35회 반복하여 증폭하였고 마지막에 72°C 에서 5분간 처리하였다. 사용된 프라이머는 Table 2와 같다. PCR 산물은 전기영동으로 확인 후 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up kit (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 정제, 농축하였다. 실험 방법은 kit에서 제공하는 방법을 따랐다. 정제, 농축된 PCR산물의 염기서열을 분석하였다(NICEM sequencing facility, Seoul National University, Seoul, Korea). 염기서열 분석 결과는 Lasergene software (DNASTAR, Madison, WI, USA)를 이용하여 Clustral V방법으로 정렬하고 분석하였다.

저항성 관여 에스테레이즈 동위 효소(esterase isozyme) 분석

각 개체군별 복숭아혹진딧물 무시충 성충을 500 mg 정도 분량씩 모은 다음 0.1% Triton X-100가 포함된 0.1 M Tris-HCl

pH 7.8 완충용액 500 µl를 넣고 얼음 에서 조직분쇄기를 이용하여 균질화 한 후 약 10,000 g로 4°C 에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 지질 제거를 위하여 Wizard® SV gel and PCR clean-up kit에서 제공하는 칼럼에 넣고 7,000 g로 4°C 에서 5분간 원심분리 하였다. 칼럼을 통과한 용액을 Bradford 방법(Bradford, 1976)으로 단백질정량 한 후 단백질 원으로 사용하였다.

추출된 단백질 시료(10 µg)를 비변성전기영동과 등점전전기영동으로 단백질 분리를 실시하였다. 비변성전기영동은 수직 전기영동 장치(Novex mini cell, X-cell sure lock, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 4°C 에서 120 V로 90분간 분리하였다. 두 장의 젤 중 한 장은 Coomassie Blue R-250을 이용하여 염색을 하였으며, 나머지 한 장은 에스테레이즈 활성염색으로, 1 mM alpha naphthyl-acetate, butyrate, propionate, valerate 용액에 5분간 반응시킨 후 0.2% fast blue RR salt 용액에 밴드가 보일 때까지 반응시킨 후 세척하였다. 등점전전기영동은 pH 3-7 pre-cast IEF gel (Novex)과 비변성전기영동을 수행한 전기영동 장치를 사용하였으며 음극 완충용액은 20 mM lysine, 20 mM arginine을 양극 완충용액은 7 mM phosphoric acid를 각각 사용하였다. 분리 조건은 4°C 에서 100 V 60분, 200 V 60분, 500 V 30분이었다. 분리 후 젤을 0.1 M Tris-HCl pH 7.8 완충용액에 10분간 넣어 단백질을 복원시킨 후 동일한 방법으로 에스테레이즈 활성염색을 하였다.

결과 및 고찰

지역별 복숭아혹진딧물 약제 저항성 모니터링 및 저항성 계통 도태

2009년에서 2011년까지 3년간 양채류 재배가 많이 이루어지고 있는 다섯 지역의 복숭아혹진딧물 약제 저항성 수준을 모니터링 한 결과 일부 약제에 대해서는 저항성 수준이 매우 높았다(Table 3). 2009년에는 양채류 재배가 많이 이루어지고 있는 홍천, 평창, 봉화, 무주, 제주 지역 개체군 대부분 메소밀, 비펜스린 등에 대하여 고도의 저항성을 보였으나 2010년에는 지역에 따라 차이가 컸다. 2011년에는 메소밀에 대해 낮은 정도의 저항성을 보인 반면에 비펜스린에 대해 고도의 저항성을 보이는 등 지역별, 약제별 저항성 정도의 차이가 컸다. 네오니코티노이드 계통의 약제(이미다클로프리드, 아세타미프리드, 티아메톡삼, 티아클로프리드, 클로티아니딘, 디노테푸란)가 대체적으로 좋은 살충효과를 나타냈지만, 2011년에는 지역에 따라 디노테푸란의 경우 저항성 차이가 컸으므로 방제 약제를 선택할 때 주의를 기울

Table 2. Primers used in this study

Name	Sequence
For <i>ace1</i> amplification	
Mpace1 pm-F	GGTGGTGGATGGCGCTTTTCTTG
Mpace1 pm-R	CTGGGTCATTTGGGCTGAACCAATC
Mpace1 pm-F1	GCCCAATTGACCGTTGGGACAAT
Mpace1 pm-R1	CCGTGCATCACCCCTGTCATT
For <i>para</i> amplification	
MpparaM-L m-F	CGGGTTACCAAGGACTGTCCGAT
Mppara-F	CCCGTGGAACTTCACCGATT
Mppara-R	GCCGTAGGCACCGATAAATTC
For nAChR beta1 amplification	
MpnAChR beta1-F	GGCCGTGTTCTTCGTCTGTCA
MpnAChR beta1-R	CCCAAGTTCGGATTTCCAGTAGT

Table 3. Toxicities of 10 insecticides to field-collected populations of *Myzus persicae*

Insecticide	Year	Mortality (\pm SD)				
		Hongcheon	Pyeongchang	Bongwha	Muju	Jeju
Methomyl (WP)	2011	90.0 \pm 17.3	82.6 \pm 6.5	86.7 \pm 5.8	53.3 \pm 15.3	85.9 \pm 17.2
	2010	90.0 \pm 0	96.7 \pm 5.8	76.7 \pm 11.5	61.2 \pm 20.1	86.7 \pm 5.8
	2009	17.8 \pm 16.8	6.7 \pm 11.5	33.3 \pm 11.6	33.3 \pm 5.8	50.0 \pm 10
Bifenthrin (WP)	2011	6.4 \pm 5.5	10.0 \pm 17.3	8.3 \pm 15.3	6.7 \pm 5.8	2.0 \pm 3.4
	2010	10.0 \pm 10.0	79.2 \pm 12.1	10.0 \pm 10.0	2.7 \pm 4.8	83.3 \pm 15.3
	2009	3.3 \pm 5.8	6.7 \pm 11.5	6.7 \pm 11.5	3.3 \pm 5.8	30.0 \pm 17.3
Pymetrozine (WG)	2011	11.7 \pm 12.6	23.3 \pm 11.5	26.7 \pm 11.5	36.7 \pm 28.9	19.4 \pm 33.7
	2010	71.5 \pm 24.8	66.7 \pm 15.3	56.7 \pm 22.9	49.6 \pm 19.4	26.7 \pm 11.5
	2009	23.8 \pm 5.8	90.0 \pm 10.0	86.7 \pm 5.8	40.0 \pm 26.5	46.7 \pm 15.3
Flonicamid (WG)	2011	33.3 \pm 15.3	46.7 \pm 25.2	56.7 \pm 25.2	18.2 \pm 10.7	16.7 \pm 15.3
	2010	33.3 \pm 15.3	46.7 \pm 25.2	56.7 \pm 25.2	18.2 \pm 10.7	16.7 \pm 15.3
	2009	24.1 \pm 5.3	56.7 \pm 11.5	86.7 \pm 5.8	20.0 \pm 10.0	33.3 \pm 25.2
Imidacloprid (WP)	2011	90.0 \pm 17.3	66.7 \pm 35.1	86.7 \pm 5.8	96.7 \pm 5.8	93.0 \pm 6.7
	2010	96.7 \pm 5.8	86.7 \pm 15.3	97.9 \pm 3.6	73.5 \pm 9.7	86.7 \pm 5.8
	2009	59.5 \pm 18.9	96.7 \pm 5.8	96.7 \pm 5.8	60.0 \pm 17.3	73.3 \pm 11.5
Thiamethoxam (WG)	2011	67.4 \pm 19.9	92.6 \pm 12.8	80.0 \pm 10.0	93.3 \pm 11.5	61.7 \pm 12.6
	2010	90.0 \pm 10.0	100.0 \pm 0	90.0 \pm 10.0	81.0 \pm 12.9	80.0 \pm 10.0
	2009	93.3 \pm 5.8	93.3 \pm 5.5	93.3 \pm 5.8	80.0 \pm 20.0	80.0 \pm 26.5
Acetamiprid (WP)	2011	83.6 \pm 4.7	96.7 \pm 5.8	86.7 \pm 11.5	96.7 \pm 5.8	56.1 \pm 3.4
	2010	100.0 \pm 0	93.3 \pm 5.8	90.0 \pm 10.0	92.1 \pm 7.7	86.7 \pm 11.5
	2009	90.0 \pm 10.0	93.3 \pm 11.5	96.7 \pm 5.8	96.7 \pm 5.8	93.3 \pm 5.8
Thiacloprid (SC)	2011	86.7 \pm 5.8	100.0 \pm 0	83.3 \pm 5.8	100.0 \pm 0	86.2 \pm 8.1
	2010	90.0 \pm 10.0	90.9 \pm 9.1	100.0 \pm 0	91.7 \pm 14.4	83.3 \pm 5.8
	2009	100.0 \pm 0	80.0 \pm 26.5	100.0 \pm 0	90.0 \pm 10.0	86.7 \pm 15.3
Clothianidin (SC)	2011	82.8 \pm 16.7	80.0 \pm 10	66.7 \pm 5.8	93.3 \pm 5.8	67.9 \pm 10.7
	2010	100.0 \pm 0	90.0 \pm 17.3	93.3 \pm 5.8	69.7 \pm 21.0	66.7 \pm 5.8
	2009	93.3 \pm 11.5	73.3 \pm 5.8	93.5 \pm 11.5	93.3 \pm 5.8	80.0 \pm 10.0
Dinotefuran (WG)	2011	46.7 \pm 32.1	83.3 \pm 15.3	16.7 \pm 15.3	70.0 \pm 10.0	23.9 \pm 5.3
	2010	76.7 \pm 11.5	83.3 \pm 5.8	73.3 \pm 5.8	76.7 \pm 5.8	100.0 \pm 0

여야 할 것이다. 또한, 지역 개체군에서 꾸준히 도태를 시킨 복합저항성 계통(MR)은 감수성에 비하여 다양한 약제에 대해 높은 저항성을 나타냈다(Table 4). 이는 야외 개체군에서도 다양한 약제에 대하여 복합적으로 저항성을 보일 수 있다는 것이다.

복숭아혹진딧물 약제 저항성 유전자 형질 빈도 조사

3년간 실험에 사용된 5가지 야외 계통에서 저항성을 보인 메소밀과 비펜스린의 작용점으로 알려진 아세틸콜린에스테레이즈(*ace*; StoF)와 나트륨채널(*para*; LtoF)에 이미 보고된 돌연변이가 분포를 알아본 결과 *ace*에서는 야외 계통 모두 돌연변이

가 분포하고 있으나 *para*의 경우 높은 저항성을 보였음에도 불구하고 돌연변이가 거의 나타나지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과는 외국에서 보고된 결과(Cassanelli *et al.*, 2005)와 상당한 차이가 있을 뿐만 아니라 생물검정 결과와 정 반대의 결과를 보여 외국에서 보고된 결과를 그대로 인용하기에는 문제가 있을 것으로 사료된다. 외국에서 발표된 일부 논문에서는 복숭아혹진딧물의 *ace*의 StoF, *para*의 LtoF 돌연변이를 좋은 저항성 마커로 활용하기 위해 분자생물학적 진단법을 개발하기도 하였으나 (Anstead *et al.*, 2004; Cassanelli *et al.*, 2005), *para*의 LtoF의 경우 생물검정 결과와 상관관계가 없어 국내에서는 적용하기 어려울 것으로 판단한다. 또한, 본 연구를 통하여 복숭아혹진딧물

*para*에서 LtoF 돌연변이가 발견되는 부근에서 새로운 점돌연변이인 MtoL 돌연변이를 발견하였다. 이 돌연변이는 최초 목화진딧물에서 발견되었으나(Yang and Williamson, 2001), 최근 프랑

스 야외 계통에서도 발견된 예가 있다(Fontaine et al., 2011). 이는 국외의 계통들에서 보이는 돌연변이가 국내 지역 개체군에 똑같이 적용할 수 없는 경우를 보여주는 중요한 사례이다. 이러한 사례는 국내 현실에 맞는 분자 마커 개발의 중요성을 확인시켜주고 있다.

Table 4. Summary of toxicities of to susceptible (S) and multi-resistant (MR) strains of *Myzus persicae*

Insecticide	Strain	LC ₅₀ (ppm)	95%CL ^{a)}	RR ^{b)}
Bifenthrin	S	0.09	0.05-0.17	-
	MR	311.49	239.27-375.57	3,461
Methomyl	S	2.11	1.18-3.64	-
	MR	769.35	569.56-971.34	365
Imidacloprid	S	0.11	0.06-0.22)	-
	MR	28.84	17.21-45.57	262
Flonicamid	S	0.10	0.02-0.24	-
	MR	32.98	20.04-48.35	330
Pymetrozine	S	0.36	0.16-0.70	-
	MR	122.95	89.90-151.00	342

^{a)}Confidence limit.

^{b)}Resistance ratio: LC50 value of multi-resistant (MR) / LC50 value of susceptible (S) strain.

국내 뿐만 아니라 외국에서도 진딧물 방제 약제로서 네오니코티노이드 계통을 많이 사용하고 있는데(Nauen et al., 2008), 현재까지 국내에서는 외국에서 보고된 정도의 고도 저항성을 보이지는 않고 있다(Choi et al., 2001). 외국의 예를 들면, 프랑스 남부 지방에서 채집된 복숭아혹진딧물 FRC계통에서 이미다클로프리드에 대해 1,679배의 저항성을 보였으며, 기타 네오니코티노이드 계통 약제에 교차 저항성을 보였고, 이 계통의 약제 작용점으로 알려진 nAChR beta1 subunit 내 RtoT 돌연변이가 존재함을 확인하였다(Bass et al., 2011b). 돌연변이 이외에도 cytochrome P450의 과별현 역시 주요 저항성 기작으로 보고된바 있다(Puinean et al., 2010). 그러나 본 연구를 통하여 국내에서는 1,000배 이상 고도 저항성을 보이는 개체군은 찾을 수가 없었고, 다만 MR이 감수성에 비하여 약 200배 정도의 저항성을 보였을 뿐이다. 다만, 2000년대 초 보다는 야외 개체군 내 이미다

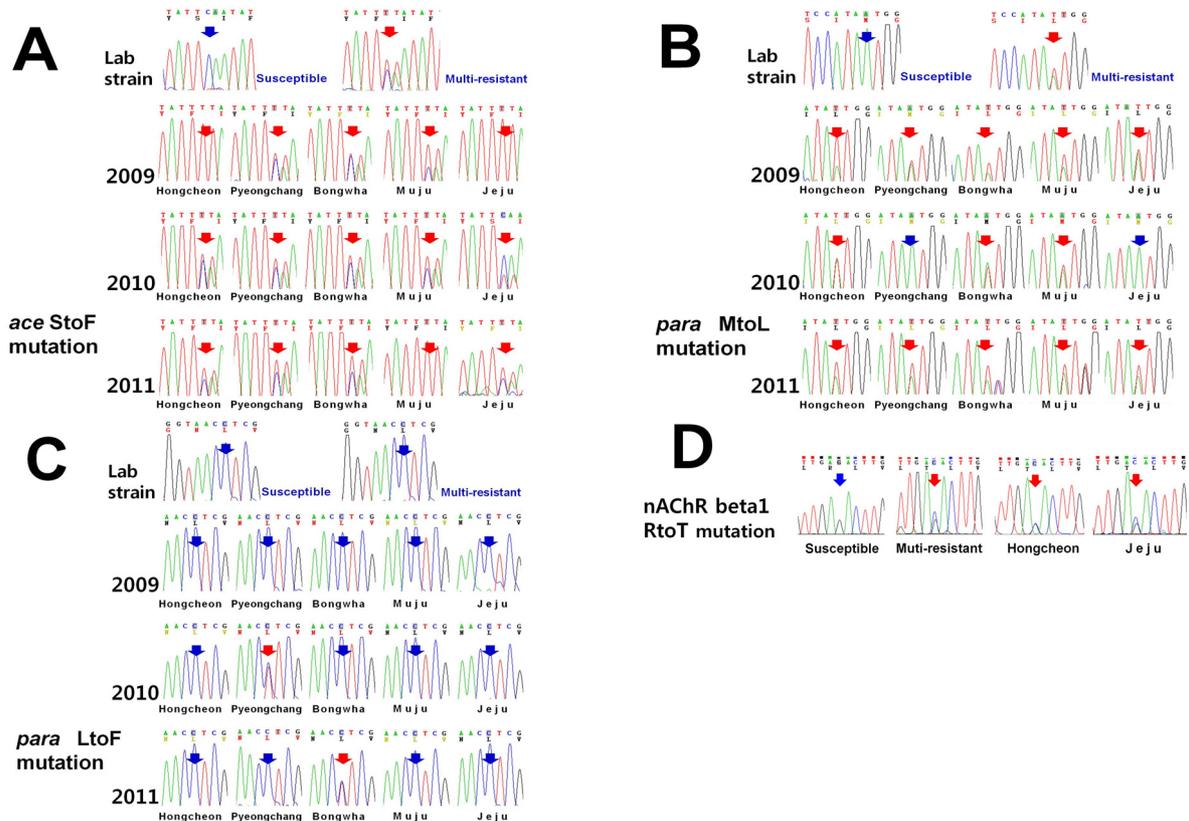


Fig. 1. Sequencing chromatograms of the point mutation sites at *ace1* type acetylcholinesterase (*ace*, A), *para* type sodium channel (*para*, B, C) and nicotinic acetylcholine receptor beta1 subunit (nAChR, D) from *Myzus persicae*. The point mutation site is indicated with arrows. Local populations of *M. persicae* were collected at Hongcheon, Pyeongchang, Bongwha, Muju and Jeju region in Korea from 2009 to 2011.

클로프리드 저항성 수준이 많이 발달된 것을 확인하였다(Choi et al., 2001). 이미 보고된 RtoT 돌연변이는 MR은 물론 이마다 클로프리드에 저항성 정도가 상대적으로 높았던 2011년 제주, 홍천 등의 계통에서 발견되었다. 조사된 3년 동안의 야외 개체군에 대해 돌연변이 유무를 확인하고자 하였으나 유전체DNA (genomic DNA, gDNA) 상에서는 인트론 때문인지 PCR이 잘 되지 않아 2011년 채집된 일부 개체군을 제외하고는 돌연변이를 검출할 수 없었다(Fig. 1). 다만, 2012년에 채집된 야외 개체군에서도 일부 돌연변이가 발견되는 것으로 보아 앞으로 네오니코티노이드 계통의 약제에 대한 고도의 저항성 개체군이 발생할 우려가 있을 수 있다. 또한 외국에서 보여지는 RtoT 돌연변이가 1,000배 이상의 고도의 저항성에서 만 발견되었을 뿐만 아니라 200배 정도의 중도 저항성에서 발견된 것은 국내 복숭아혹진딧물에서는 RtoT 돌연변이가 *para*에서의 LtoF와 같이 외국과는 다른 양상인 것으로 추정된다.

지역별 복숭아혹진딧물 에스테레이즈 동위효소(esterase isozyme) 분석

복숭아혹진딧물 저항성 발달에 에스테레이즈(E4, FE4 type esterase)가 관여하는 것으로 알려져 있는데(Field and Devonshire,

1998), 주로 유전자의 중복(gene duplication)에 따른 수적 증가와 유전자의 과발현(over-expression)에 의한 양적인 증가이다(Field and Foster, 2002). 본 연구에서 에스테레이즈의 양적 증가 여부를 조사한 결과, 복합저항성 계통과 지역계통 특이적 동위효소(isozyme)의 발현정도는 지역 간에 차이가 있었으나, 사용한 4개의 기질간의 차이는 거의 없었다(Fig. 2). 사용한 α -NA, NP, NB, NV 4개의 기질은 결사슬이 각각 1~4개로 결사슬 길어질수록 에스테레이즈가 가수분해되기 어려워져 결사슬 길이에 따른 분해능 차이를 볼 수 있다(Barron and Bernsohn, 1968). 일부 논문에서는 특정 에스테레이즈 동위효소의 과발현을 저항성 발달의 판단 기준으로 삼기도 하였으나(Field et al., 1999; Field et al., 1996), 정량화가 어려워 본 연구에서는 특정 살충제에 대한 저항성 마커로 활용하기는 어려웠다. 추가 연구로 다양한 살충제에 대하여 저항성을 보이는 MR에서 특이적으로 발현되는 유전자를 찾고자 suppression subtractive hybridization 방법으로 cDNA library를 만들어 분석한 결과 cDNA library 중 480개를 분석하여 213,867 bp의 염기서열을 읽었다. 유효한 결과를 얻은 것은 154개로 에스테레이즈 등 잘 알려진 살충제 저항성 관여 유전자뿐만 아니라 ABC transporter 등의 유전자도 검출하였으나, cDNA library 내 검출 비율을 기준으로 평가 하였을 때, 발현량의 차이가 매우 낮은 것으로 판

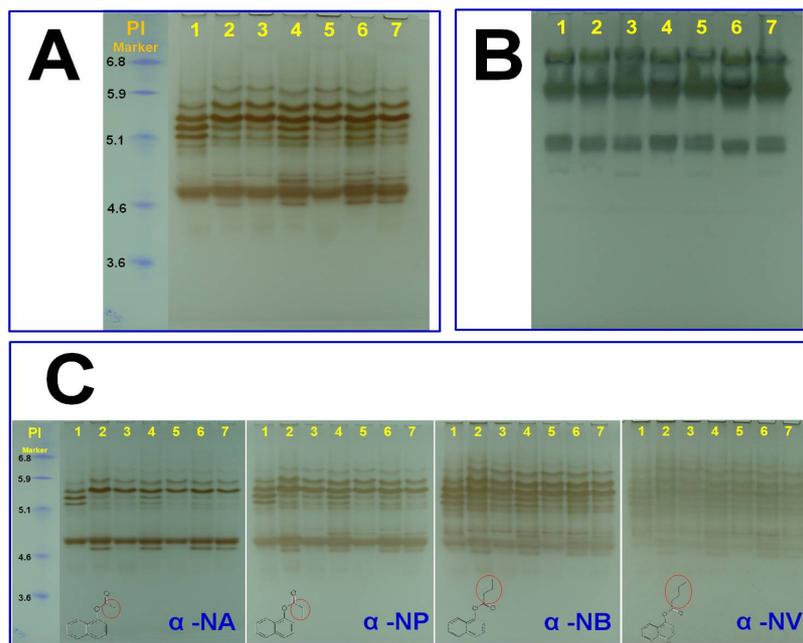


Fig. 2. Molecular forms of *Myzus persicae* general esterase identified by using native isoelectric focusing (IEF) (A, C) or native PAGE (B). Identical amounts (10 mg) of all strain samples from *M. persicae* were focused for 60 min at 100 V, 60 min at 200 V, and 30 min at 500 V (A, C), or run for 90 min at 120 V (B) in a cold chamber. Following the electrophoresis, the gels were stained with 1 mM alpha naphthyl-acetate (α -NA), alpha naphthyl-butyrates (α -NB), 1 mM alpha naphthyl-propionate (α -NP), or 1 mM alpha naphthyl-valerate (α -NV) as substrates, to visualize the activity of esterase isozymes. 1, Susceptible strain; 2, multi-resistant strain; 3, Hongcheon strain; 4, Pyeongchang strain; 5, Bongwha strain; 6, Muju strain; 7, Jeju strain.

단되었다(미보고자료). 이러한 해독 관련 유전자의 발현량을 기준으로 저항성을 판단하는 경우는 에스터레이즈 외에도 P450 등의 유전자가 있기는 하나(Bass et al., 2011a; Karunker et al., 2008; Puinean et al., 2010), 에스터레이즈와 같이 정량화가 어려워 본 연구에서는 마커로 활용하기에는 어려움이 있었다.

위의 결과를 종합해 보면, 살충제에 대한 지역별, 시기별 저항성 정도가 다르기 때문에 정확하게 저항성 정도를 모니터링한 후 약제 방제 체계를 수립 한다면 훨씬 더 효과적인 방제로 약제비 절감 효과를 얻을 수 있을 것이다. 그러나 생물 검정의 경우 많은 시간과 노력이 필요하기 때문에 빠른 시간 내에 저항성 모니터링을 할 수 있는 방법이 필요한데, PCR을 활용한 분자 생물학적인 방법이 그 대체 방법으로 제시 되어왔다(Aketarawong et al., 2011; Clark et al., 2001; Kim et al., 2007; Kim et al., 2012; Kim and Kwon., 2011; Kwon et al., 2004). 따라서 국내 복숭아혹진딧물 살충제 저항성관리를 위하여 본 연구를 통해 선발된 저항성 마커를 활용한다면 더 효율적인 관리가 가능할 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 어젠다 연구과제(PJ006630, PJ906982)를 수행하는 과정에서 얻은 결과를 바탕으로 작성 되었다.

Literature Cited

- Ahn, Y.J., K.H. Kim, Choi, S.Y., 1989. Joint toxic action of insecticide mixtures to the cypermethrin and pirimicarb selected strains of green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer). Kor. J. Appl. Entomol. 28, 32-36.
- Aketarawong, N., Chinvinijkul, S., Orankanok, W., Guglielmino, C. R., Franz, G., Malacrida, A. R., Thanaphum, S., 2011. The utility of microsatellite DNA markers for the evaluation of area-wide integrated pest management using SIT for the fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), control programs in Thailand. *Genetica* 139, 129-40.
- Anstead, J.A., Williamson, M.S., Eleftherianos, I., Denholm, I., 2004. Highthroughput detection of knockdown resistance in *Myzus persicae* using allelic discriminating quantitative PCR. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 871-877.
- Barron, K. D., Bernsohn, J., 1968. Esterases of developing human brain. *J. Neurochem.* 15, 273-284.
- Bass, C., Carvalho, R. A., Oliphant, L., Puinean, A. M., Field, L. M., Nauen, R., Williamson, M. S., Moores, G., Gorman, K., 2011a. Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, CYP6ER1, is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.* 20, 763-73.
- Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., Paul, V. L., Crossthwaite, A. J., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Lind, R., Williamson, M. S., Slater, R., 2011b. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci.* 12, 51.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cassanelli, S., Cerchiari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni, E., Manicardi, G.C., 2005. Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and KDR insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* 61, 91-96.
- Choi, B.Y., Lee, S.W., Lyu., J.K., 2001. Resistance Mechanisms of Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), to Imidacloprid. *Kor. J. Appl. Entomol.* 40, 265-271.
- Choi, S.W. Kim, G.H., 1986. Studies on the resistance of green peach aphids to insecticides (II) - local differences in susceptibility. *Kor. J. Appl. Entomol.* 25, 151-157.
- Choi, S.W., Kim, G.H. and Ahn, Y.J., 1989. Studies of the insecticide resistance in the green peach aphid, *Myzus persicae* Sulzer (V). development of cypermethrin and pirimicarb resistance, and cross resistance. *Kor. J. Appl. Entomol.* 28, 23-27.
- Clark, J. M., Lee, S. H., Kim, H. J., Yoon, K. S., Zhang, A., 2001. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutations associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.* 57, 968-974.
- Devonshire, A.L., Field, L. M., Foster, S. P., Moores, G.D., Williamson, M.S., Blackman., R.L., 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Philos. Trans R. Soc. Lond B. Biol. Sci.* 353, 1677-1684.
- Field, L. M., Devonshire, A. L., Tyler-Smith, C., 1996. Analysis of amplicons containing the esterase genes responsible for insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* 313 (Pt 2), 543-547.
- Field, L.M., Devonshire, A. L., 1998. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochem. J.* 330, 169-173.
- Field, L. M., Blackman, R. L., Tyler-Smith, C., and Devonshire, A. L., 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* 339 (Pt 3), 737-742.
- Field, L.M., Foster, S.P., 2002. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag. Sci.* 58, 889-894.
- Fontaine, S., Caddoux, L., Brazier, C., Bertho, C., Bertolla, P.,

- Micoud, A., Roy, L., 2011. Uncommon associations in target resistance among French populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. *Pest Manag. Sci.* 67, 881-885.
- Foster, S.P., Cox, D., Oliphant, L., Mitchinson, S., Denholm, I., 2008. Correlated responses to neonicotinoid insecticides in clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Manag. Sci.* 64:1111-1114.
- Karunker, I., Benting, J., Lueke, B., Ponge, T., Nauen, R., Roditakis, E., Vontas, J., Gorman, K., Denholm, I., Morin, S., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 634-644.
- Kim, H. W., Baek, J. H., Lee, W. J., and Lee, S. H., 2007. Frequency detection of pyrethroid resistance allele in *Anopheles sinensis* populations by real-time PCR amplification of specific allele (rtPASA). *Pest. Biochem. Physiol.* 87, 54-61.
- Kim, J. I., Joo, Y. R., Kwon, M., Kim, G. H., and Lee, S. H., 2012. Mutation in *ace1* associated with an insecticide resistant population of *Plutella xylostella*. *J. Asia-Pac. Entomol.* 15, 401-407.
- Kim, J. I., Kwon, M., 2011. Development of Variation Marker of *Myzus persicae* by Altitude. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50, 325-333.
- Kwon, D. H., Clark, J. M., Lee, S. H., 2004. Estimation of knock-down resistance in diamondback moth using real-time PASA. *Pest. Biochem. Physiol.* 78, 39-48.
- Lee, J.Y., Paik, W.H., 1977. Studies on the aphid transmission of some cruciferous viruses. *Kor. J. Pl. Prot.* 16, 93-100.
- Nauen, R., Jeschke, P., Copping, L., 2008. In Focus: neonicotinoid insecticides. *Pest Manag. Sci.* 64, 1081.
- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S., Bass, C., 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet.* 6, e1000999.
- Shim, J.Y., Park, J.S., Paik, W.H., Lee, Y.B., 1977. Studies on the life history of green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera). *Kor. J. Pl. Prot.* 16, 139-144.
- Yang, X., Williamson, M.S., 2001. A new super-kdr mutation is associated with resistance to pyrethroid insecticides in cotton aphid, *Aphis gossypii*. GenBank accession no. AF412815, NIH genetic sequence database at NCBI