

Chlorantraniliprole 저항성 초파리 계통 확립과 저항성 특성 구명

김아영[†] · 권덕호^{1†} · 정인홍^{2†} · 특안판 · 트란비스안 · 이시혁¹ · 고영호*

한림대학교 일송생명과학연구소, ¹서울대학교 농생명공학연구소, ²국립농업과학원 작물보호부

Establishment of Chlorantraniliprole-Resistant *Drosophila* Strains and Identification of Their Resistant Characteristics

A-Young Kim[†], Deok Ho Kwon^{1†}, In Hong Jeong^{2†}, Thuc Ahn Phan, Tran Vi Ngan, Si Hyeock Lee¹ and Young Ho Koh*

Ilsong Institute of Life Science, Hallym University, Anyang 14066, Korea

¹Research Institute of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

²Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, Jeollabuk-do 55365, Korea

ABSTRACT: Ryanodine receptors (RyRs) regulate the contractions of insect muscles by altering intracellular Ca^{2+} concentration and are the targets of chlorantraniliprole. Recently, a chlorantraniliprole-resistant strain was reported in the diamondback moth *Plutella xylostella* by obtaining point mutations on the RyRs. In the present study, we established two resistant strains from *Drosophila melanogaster*, which were treated with low or high concentrations of chlorantraniliprole, and their resistance levels were determined on the basis of contact and ingestion toxicities. Compared with the control strain, the two resistant strains did not show any significant differences in contact toxicity. However, they showed significantly increased resistance ratios in ingestion toxicity than that by the control strain. The low and high concentration resistant strains exhibited 2.1- and 8.1-fold increased resistance ratios, respectively, compared with that by the control strain. Moreover, we found that the resistant strains had altered expression levels of RyRs and more enhanced Acetylcholinesterase and Glutathione-S-transferase activities than that by the non-selected strain. These results suggested that the resistance development of chlorantraniliprole in the two strains might be mediated by the activation of detoxification pathways in *D. melanogaster*.

Key words: *Drosophila*, Chlorantraniliprole, Ryanodine receptor, Acetylcholinesterase activity, Glutathione-S-transferase activity

초 록: Chlorantraniliprole은 곤충 근육의 Ca^{2+} 농도를 조절하는 Ryanodine 수용기(RyR)에 작용 하는 diamide계통의 작물보호제이다. 최근 에 보고된 chlorantraniliprole 저항성 배추좀나방 계통은 RyR에 돌연변이를 가지고 있다. 본 연구에서는 초파리를 모델 곤충으로 저농도와 고 농도의 chlorantraniliprole로 도태된 두 종류의 저항성 계통을 확보하였다. 두 종류의 저항성 계통은 접촉독성과 섭식독성 평가법을 활용하여 저항성 지수를 산출하였다. 접촉 독성 평가에서 두 종류의 저항성 계통은 대조군과 비교하여 95% 신뢰구간에서 저항성 발달에 차이가 없었지만, 섭 식 독성 평가의 경우에는 고농도 저항성 계통과 저농도 저항성 계통에서 대조군 대비 각각 2.1배와 8.1배의 통계적으로 유의한 저항성 증가가 나타났다. 작용점 유전자인 RyR 발현량 비교 결과, 두 종류의 저항성 계통에서 RyR의 발현량이 유의하게 감소하였고, 주요 약제 관련 효소인 Acetylcholinesterase와 Glutathione-S-transferase 활성은 조직 특이적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 초파리에서 chlorantraniliprole에 대한 섭식독성 저항성의 발달에는 주요 해독 관련 효소의 과활성도 관여할 것임을 보여주고 있다.

검색어: 초파리, Chlorantraniliprole, 저항성계통, Ryanodine 수용기, Acetylcholinesterase 활성, Glutathione-S transferase 활성

다양한 종류의 화학물질의 활용으로 인간은 어느 시기보다

풍요롭고 건강한 삶을 살고 있다. 우리나라를 포함한 대부분의 공업화와 도시화가 이루어진 나라들은 병해충의 방제에 작물 보호제를 사용하여 농업생산량을 증대시켜왔고(Pimentel, 2005; Kathryn and Mark, 2008; Aktar et al., 2009), 특정한 질환을 치료할 수 있는 약물을 이용하여 질병을 고치거나 증상을 억제하

*Corresponding author: kohyh@hallym.ac.kr

Received October 5 2016; Revised October 24 2016

Accepted November 2 2016

[†]These authors contributed equally.

여 수명을 증대시켜 왔다(Kathryn and Mark, 2008; Wijdeven et al., 2016). 하지만, 현재 인류가 대면하고 있는 중요한 문제점 중의 하나는 기존 약제들에 대해서 병해충들과 질환들이 저항성을 가지게 되어 이들을 사용할 수 없어, 신규 약제의 개발이 필요하다는 점이다(Pimentel, 2005; Aktar et al., 2009; Wijdeven et al., 2016). 새로운 약제의 개발은 인간과 동물과 환경에 대한 안전성 평가가 선행되어야 하기 때문에 긴 기간 동안 많은 종류의 시험과정을 거치는 안전성 평가가 필요하여, 신소재 개발 실패의 확률이 높아지고 동시에 개발 비용이 급속하게 증가하고 있다(Pimentel, 2005; Aktar et al., 2009). 그러므로 기존 약물의 효과적인 활용을 위하여 약제 저항성의 획득기전을 밝혀내는 연구가 오랜 기간 이루어져 왔지만, 약제의 종류마다 저항성 발달기전이 다양하여 각각의 약물에 대한 연구가 필요한 실정이다(Kathryn and Mark, 2008).

살충제 저항성은 1908년도 미국 생조제 각지벌레(*Comstockaspis perniciosus* Comstock)에서 처음 보고된 후, 1950년에 이미 살충제 저항성을 보이는 해충이 137종 이상 보고 되었고, 현재는 거의 모든 약제에 대한 저항성 계통의 해충이 보고되고 있다(Han and Kim, 2012). 이러한 저항성 발달을 억제하기 위한 방법으로는 규정농도 준수, 작용기전이 다른 약제의 혼용, 해충밀도나 충태를 고려한 약제방제 및 방제에 대한 정확한 기록 등이 적용되고 있지만, 이러한 조치는 근본적 문제 해결이 아니기 때문에 약제에 대한 저항성 및 내성의 발달 기전에 대한 이해가 없으면 약제저항성에 대한 근본적인 대책이 될 수 없다(Han and Kim, 2012; Kathryn and Mark, 2008).

본 연구에서 3-bromo-N-[4-chloro-2-methyl-6-(methylcarbamoyl)phenyl]-1-(3-chloro-2-pyridine-2-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (chlorantraniliprole)을 연구대상 약제로 선택한 이유는 최근에 상용화된 새로운 diamide 계통으로 저항성 기전이 밝혀진 약제라(Lin et al., 2013), 실험실에서 1950년부터 배양된 초파리는 chlorantraniliprole에 노출되었을 가능성이 매우 낮을 것이라는 사실과 초파리가 전체 유전체에 대한 연구가 가장 정밀하게 이루어진 곤충이라는 사실(Adams et al., 2000)과 chlorantraniliprole의 저항성 유전자인 Ryanodine 수용기(RyR)(Lin et al., 2013)가 초파리에도 유전적으로 보존이 되어져 있다는 사실이다. 본 연구는 초파리를 모델로 이용하여 chlorantraniliprole 저항성의 발달 기전 구명 연구를 수행하기 위해 처리 농도에 따른 두 가지 저항성 계통들을 확립하였다. Chlorantraniliprole의 작용점으로 알려진(Lin et al., 2013) RyR 유전자의 발현 수준과 해독 작용에 관여하는 Acetylcholinesterase (AChE)와 Glutathione-S-transferase (GST)의 활성 정도를 비교하여 차이점을 밝혀냈다.

재료 및 방법

Chlorantraniliprole 저항성 계통 확립

Drosophila melanogaster Canton-S 계통(CS, Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University, Bloomington, IN, USA)의 수컷 성충에 25 mM ethylene methanesulfonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 12시간 동안 섭식시켜서 무작위 돌연변이를 유도한 후, CS 성충 처녀 암컷과 교배를 시켜서 나온 F1에 두 가지 다른 농도의 chlorantraniliprole (Sigma-Aldrich)을 2% sucrose 용액(DaeJung, Seoul, Korea)과 혼합 처리하여 섭식도태를 시작하였다. 저농도 도태 계통은 5 ppm chlorantraniliprole에서 시작을 하여 세대를 거치면서 80 ppm까지 농도를 단계적으로 증가 시켜 주었다. 고농도 저항성 계통은 30 ppm의 높은 농도에서 도태를 시작하여 400 ppm까지 농도를 증대시켜 계통을 확립하였다. 최종적으로 저농도 저항성 계통은 80 ppm에서, 고농도 저항성 계통은 400 ppm에서 각각 60% 내외의 치사율을 보이는 집단들을 선발하였다. 각 집단별로 최종 농도를 지속적으로 처리하여 도태압을 유지하면서, 2개 농도의 chlorantraniliprole 저항성 계통들을 확립하였다.

Chlorantraniliprole 저항성 지수 계산

확립된 저항성 계통들의 저항성 정도를 알기 위해 표면처리(topical application)와 섭식처리(ingestion treatment)법으로 초파리 성충 암컷에 chlorantraniliprole을 농도별로 처리한 후에 반수치사약량을 구하고, 이를 기반으로 각 계통의 저항성 지수를 계산하였다. 표면처리에서는 대조군은 0, 0.4, 1.5, 6.2, 25, 100, 1000 ppm으로, 저농도 저항성 계통은 0, 4, 15, 62, 250, 1000 ppm으로, 고농도 저항성 계통은 0, 4, 15, 62, 100, 250, 1000 ppm으로 각각 약물처리를 하였다. 섭식처리에서는, 대조군은 0, 5, 25, 50, 100, 200 ppm으로, 저농도 저항성 계통은 0, 5, 25, 50, 100, 200, 400 ppm으로, 고농도 저항성 계통은 0, 50, 100, 200, 400, 800 ppm으로 각각 chlorantraniliprole을 처리하였다. 모든 농도 및 처리 군에서 약물처리 48시간 후 각 계통들의 생존율을 계산하였다. 독성 지표 산출을 위해 무처리 사충율을 기반으로 각 농도의 보정 사충율을 계산한 후(Abott, 1925), SPSS 12.0 통계 프로그램(IBM, Armonk, NY, USA)을 이용하여 Probit 분석을 수행하여 반수 치사 약량(LD₅₀)을 구했다(Finney, 1952). 저항성 지수는 도태 계통의 반수 치사 약량을 무도태 계통(대조군)의 값으로 나누어 산출하였다.

Total mRNA 추출, cDNA합성 및 RyR발현 변화 비교

대조군 초파리의 알(12~24시간), 1령 유충(부화 후 24시간), 2령 유충(부화 후 48시간), 3령 유충(부화 후 72시간), 번데기(1일 과 4일)와 암컷성충(1일)에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. DNase I (Promega, Madison, WI, USA)을 처리한 후, Superscript IV (Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, USA)를 이용하여 발달 단계별 cDNA들을 total RNA들을 이용하여 합성을 하였다.

3개의 군집간의 RyR의 발현차이를 확인하기 위하여 1일된 성충 수컷과 암컷을 대조군과 2개의 저항성계통에서 선별을 한 후에 머리와 몸체로 나누어서 위에 언급된 방법으로 cDNA를 합성하여 사용하였다. 모든 실험은 3반복하여 analysis of variance와 Tukey-Kramer post hoc analysis를 Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)을 이용하여 수행하였다.

RyR 유전자의 돌연변이와 chlorantraniliprole에 대한 저항성과는 높은 연관성이 있다고 밝혀졌다(Lin et al., 2013). 본 연구에서는 RyR 유전자의 발현 정도의 변화를 확인하기 위하여 RyR 유전자 특이 프라이머를 제작하여 RyR의 발현량의 발달 단계별 변화와 3개 계통간의 차이를 밝혀냈다. Real time (RT) PCR분석은 AriaMX (Agilent, Santa Clara, USA) RT PCR기계에서 SYBR Green PCR Mater Mix (Applied Bio-system, Foster City, CA, USA)을 이용하여 수행을 하였다. PCR조건은 95도에서 3분간 가열을 한 후에, 95°C에서 5초, 62°C에서 10초, 72°C에서 10초간 진행되는 반응을 40회 실시한 후에 melting curve analysis를 0.5°C의 차이를 가지고 50°C에서 95°C까지 진행을 하였다. 50°C와 95°C에서는 각각 30초간, 다른 온도들에서는 5초간 가열을 하였다. RyR특이 프라이머의 특이성을 melting curve analysis와 PCR산물의 서열을 RyR의 서열과 비교하여 일치함을 확인하였다. RP49유전자(Kim et al., 2015)를 대조유전자로 사용을 하여 정량을 하였다. 사용된 primer의 자세한 정보는 Table 1에 정리하였다.

Acetylcholine esterase와 Glutathione-S-transferase 활성 비교

Acetylcholinesterase (AChE)의 활성측정은 Kim et al. (2010 and 2011)에 보고된 방법을 사용하였다. 우화 후 1일된 성충의 머리와 몸체를 분리한 후에 1.0% Triton X-100, 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH. 7.2)을 이용하여 균질화한 후 4°C에서 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여, 상층액을 수거한다. 상층액에 10 mM 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (Sigma-Aldrich)와 75 mM acetylthiocholine iodide (Sigma-Aldrich)를 섞어 발색 반응을 시켜서 AChE의 활성을 412 nm에서 30초 간격으로 10분간 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA)로 흡광도를 측정하여 계산하였다.

Glutathione-S-Transferase (GST)의 활성을 Phuong et al. (2016)의 방법을 이용하여 측정하였다. AChE의 활성 측정에 사용된 상층액에 0.2 M glutathione (DeaJung)과 0.1 M 2,4-dinitrochlorobenzene (Sigma-Aldrich)을 혼합한 후에, 340 nm에서 30초 간격으로 10분간 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)로 흡광도 변화를 측정을 하여 GST활성을 계산하였다.

결과

저항성 계통들의 저항성 지수 변화

서로 다른 도태압을 통해 확립된 두 계통의 저항성 지수를 표면처리법과 섭식처리법으로 산출하였다. 표면처리법의 경우, 저농도 계통과 고농도 계통은 대조군 대비 각각 3.3배와 2.0배의 저항성 지수를 보였지만, 95% 신뢰구간을 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 2). 반면에, 섭식처리법을 이용한 저항성 지수는 저농도와 고농도 저항성 계통에서 각각 2.1배와 8.1배로 통계적으로 유의한 차이가 있음을 확인하였다(Table 3). 이러한 결과는, 저항성 발달에 섭식 시 반응하는 대사 관련 효소가 약제 투과를 저해하는 인자 보다 깊게 관여함을 보여준다.

Table 1. Primer information used in the present study

Primer	sequences	Tm	Amplified cDNA fragment
RyR forward	GATCGGGACACAGGACATTG	60.2	651~759
RyR reverse	GACAGCTTGTCGTTTCGACG	61.1	
Rp49 forward	CAGTCGGATCGATATGCTAAGCTGT	63.5	67~176
Rp9 reverse	TAACCGATGTTGGGCATCAGATACT	63.5	

Table 2. Toxicity profile of chlorantraniliprole in *Drosophila* females determined by topical applications

Strain	N (df)	Slope ± SE	χ^2	p-value	LD ₅₀ (ng ^a , 95%CL ^b)	Resistance ratio
Control	600 (2)	1 ± 0.1	0.8	0.678	25.9 (18.5~35.4)	1
Low resistance line	750 (3)	0.8 ± 0.1	1.3	0.731	53.8 (38.9~76.6)	2.1
High resistance line	600 (2)	1.3 ± 0.2	3.9	0.142	209.1 (87.1~269906)	8.1

^ang per individual of female

^b95% of confidence limit

Table 3. Toxicity profile of chlorantraniliprole in *Drosophila* females determined by ingestion treatments

Strain	N (df)	Slope ± SE	χ^2	p-value	LD ₅₀ (ng ^a , 95%CL ^b)	Resistance ratio
Control	150 (4)	0.9 ± 0.069	6.9	0.139	27.1 (13.9~67.4)	1
Low resistance line	100 (2)	1.2 ± 0.13	7	0.03	89.2 (26~1383222.4)	3.3
High resistance line	125 (3)	0.9 ± 0.108	4	0.258	54.7 (39.7~82.5)	2

^ang per individual of female

^b95% of confidence limit

저항성 계통에서 RyR 유전자 발현 정도 변화

Chlorantraniliprole의 주요 작용점 유전자인 RyR의 발현 패턴을 발육 영기와 계통별로 비교하여 보았다. 대조군에서 RyR의 발현은 3령 유충에서 가장 많이 발현이 되었고, 번데기 기간과 성충의 머리에서 그 다음으로, 알, 1령 유충, 2령 유충과 성충 몸통에서 제일 낮은 발현을 보였다(Fig. 1A; df = 7, 16, $F = 12.42$, $P < 0.0001$). 3령 유충에서 RyR의 발현이 높은 이유는 RyR이 높게 발현되는 유충 표피근육들이 차지하는 비중이 높기 때문으로 사료된다. 번데기와 성충 암컷의 머리에 비하여 성충 암컷의 몸에서 발현이 낮은 이유는 암컷이 가지고 있는 난소나 지방체와 같은 RyR이 발현이 낮은 조직이 많기 때문으로 사료되는데, 이에 관해서는 앞으로 자세히 검토할 예정이다.

두 도태계통과 대조군 간의 비교도 성충암컷들에서 측정된 RyR 발현 정도 결과에서 3계통 모두 몸통보다는 머리에서 통계적으로 유의하게 높은 RyR 발현이 나타났다(Fig. 1B; df = 5, 12, $F = 13.098$, $P < 0.005$). 머리에서의 RyR 발현량은 고농도 계통에서 가장 적었고, 대조군이 가장 많았다. 저농도 계통에서는 그 중간 정도의 발현 양을 보이므로, 대조군에서 저농도, 고농도 계통으로 갈수록 RyR 발현량이 감소하는 경향이 있었다. 몸통에서도 저농도와 고농도 계통 모두 대조군 보다 발현 양이 통계학적으로 본 결과는 chlorantraniliprole에 대한 초파리의 저항성은 RyR의 발현량과 부의 상관관계에 있는 것으로 추정되었다.

저항성 계통의 AChE와 GST 활성이 증가함

두 저항성 계통은 섭식 독성 평가에서 뚜렷한 저항성 발달

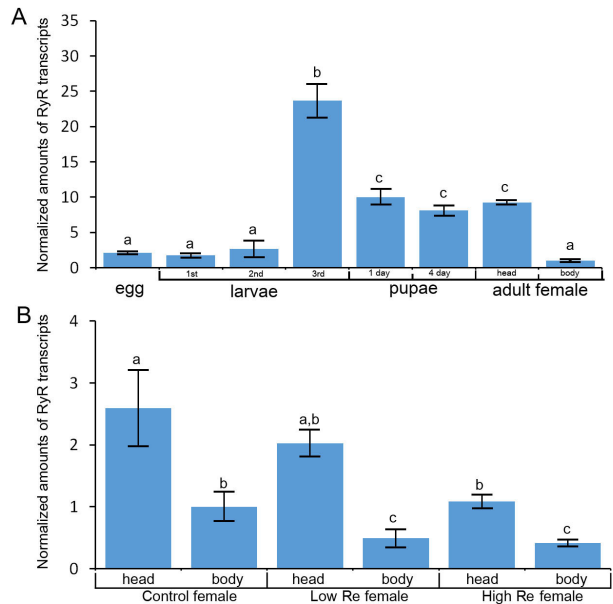


Fig. 1. RyR expression levels in various developmental stages and three different *Drosophila* strains. A: RyR was the most highly expressed in 3rd instar larvae. A median level RyR expression was detected from pupal stages and adult heads. Very low RyR expression levels were detected from eggs, 1st and 2nd instar larvae, and adult bodies. B: The RyR expression was significantly lower in high resistant (Re) female adults than in control females. In the case of low Re female adults, RyR expression levels in the heads were not significantly different from those of the controls. However, RyR expression levels in the bodies were significantly lower than those of control females.

차이를 나타남에 따라, 주요 살충제 저항성 발달 관여 효소인 AChE와 GST의 활성 수준을 비교하여 보았다. AChE는 곤충을 포함한 많은 동물의 신경과 근육에서 신경전달물질의 분해를 담당하는 기능 이외에 외부에서 들어오는 독성물질의 해독

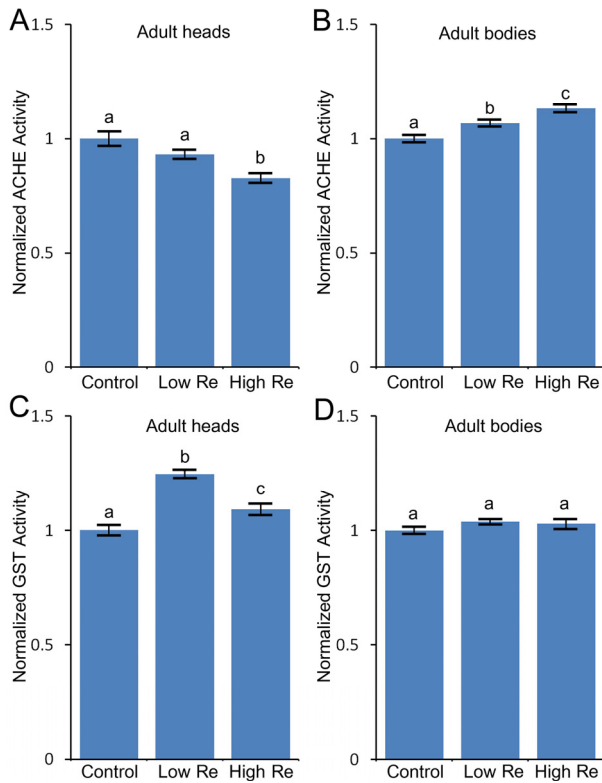


Fig. 2. Altered activities of Glutathione-S-transferase (GST) and Acetylcholinesterase in two resistant strains. A: Normalized AChE activity of adult heads of high resistant (Re) females was significantly lower than that of the controls or low Re females. B: In contrast, normalized AChE activities significantly increased in low or high Re female bodies. C: Normalized GST activities in low or high Re female heads were significantly higher than those of controls. D: In contrast, no difference in normalized GST activities was noted among three strains of female bodies.

에 관여한다고 알려져 있다(Kang et al., 2011). 다른 독성물질들에 노출이 되지 않은 우화한지 1일된 성충을 이용하여 연구를 진행한 결과, 고농도 저항성 계통 초파리들의 성충의 머리에서는 AChE 활성이 대조군과 저농도 저항성 계통에 비하여 통계학적으로 유의하게 낮았지만(Fig. 2A; $df = 2, 15, F = 16.64, P < 0.0005$), 몸통에서는 두 계통 모두 통계학적으로 유의하게 대조군에 비하여 AChE의 활성이 증가되었다. 그리고, 고농도 저항성 계통의 AChE 활성이 저농도 저항성 계통에 비하여 유의하게 증가되었다(Fig. 2B; $df = 2, 15, F = 21.760, P < 0.00005$).

GST 활성은 저농도 저항성 계통의 머리에서 고농도 저항성 계통과 대조군 계통 대비 통계적으로 유의하게 증가된 활성을 보여주고 있었다(Fig. 2C; $df = 2, 15, F = 57.55, P < 0.00001$). 그리고 고농도 도태군의 경우도 대조군 보다는 통계학적으로 유의하게 높은 활성을 보여주고 있었다. 하지만, 두 저항성 계통의 몸통에서의 GST 활성은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2D; $df = 2, 15, F = 2.761, P > 0.05$). 이러한 결과는 chlorantraniliprole

의 몸통에서의 해독과정에는 GST가 관여하지 않고 신경계에 서만 관여할 가능성을 보여주고 있다.

고찰

살충제에 대한 저항성과 내성의 발달은 약물과 해당 해충의 유전적 차이에 따라서 매우 다양하게 나타나므로 현재 개발된 살충제의 효과적인 이용을 위해서는 약제와 해충 종간의 약물 유전학적인 연관성에 대한 연구가 필요하다(Poet et al., 2004). 약제에 대한 저항성의 문제는 한 종의 해충이 저항성/내성을 획득함으로써 방제가 어려워져 농업생산성을 낮춘다는 근원적인 문제점 외에도, 저항성 해충방제를 위한 살충제의 과다사용에 따른 환경오염으로 사용자와 소비자들의 건강 위해성이 높아진다는 점이다(Pimentel, 2005; Aktar et al., 2009; Wijdeven et al., 2016). 예를 들자면 병해충 방제에 사용된 다양한 종류의 화학물질들이 사용자와 생산된 농산물의 소비자들뿐 만이 아니라 지하수와 표지수, 야생 동식물 등에 잔류하여 이들을 섭취한 사람들에게 신경계 질환의 발병가능성을 높인다는 보고가 있다(Kamel et al., 2004). 이런 이유들 때문에 살충제에 대한 해충 저항성/내성 발달 기전에 대한 보다 체계적인 연구가 필요하다.

본 연구의 주요한 결과는 초기 처리 농도에 따라서 chlorantraniliprole에 대해 저항성지수를 보이는 두 가지 저항성 계통을 확립한 것과 두 가지 계통들은 RyR발현 수준과 AChE와 GST의 활성에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 차이가 있다는 점을 발견한 것이다.

본 연구에 따르면, 저농도 저항성 계통과 고농도 저항성 계통의 경우 접촉독성에서는 통계적으로 명확한 차이가 보이지 않았지만, 섭식독성에서는 고농도 저항성 계통의 저항성 지수가 저농도 저항성 계통에 비하여 3.86배 높게 나타났다. 접촉독성에서 의미가 있는 저항성 발달이 나타나지 않은 이유로는 약제 고유의 이화학적 특성에 따른 낮은 초파리 체내 투과율에 기인한다고 가정 할 수 있지만, chlorantraniliprole의 수용성(1.023 mg/L)과 n-octanol/water 분배계수(20°C에서 $\log Kow = 2.76 \pm 0.104$)가 대표적인 침투이행제인 imidacloprid의 수용성(0.61g/L)과 n-octanol/water 분배계수(22°C에서 $\log Kow = 0.57$)(<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.EXE?ZyActionL=Register&User=anonymous&Password=anonymous&Client=EPA&Init=1>)보다 커서 곤충에 대한 chlorantraniliprole의 접촉 독성은 높은 편으로 추정된다. 실제 배추좀나방 유충에 chlorantraniliprole제제 추천농도를 스프레이 기법으로 처리할 경우 접촉 독성이 빠르게 나타남을 확인하였다(Kwon, D.H.,

unpublished observation). 따라서, chlorantraniliprole의 접촉독성이 낮은 이유가 곤충 표피에서의 침투력의 저하 때문이 아니고, 초기 도태농도와 처리 방법에 따라 초파리의 저항성 발달 과정이 다르기 때문으로 사료된다.

살충제에 대해서 곤충이 저항성을 획득하는 기전은 매우 다양하는데, 그 중의 하나가 살충제의 작용점 유전자의 발현이 증가되는 경우이다(Remnant et al., 2013). 그런데 본 연구에서는 RyR의 발현이 chlorantraniliprole농도 의존적으로 유의하게 감소가 되었다(Fig. 1). 이 결과를 설명할 수 있는 가설 중 하나는 초파리 근육의 수축을 조절하는 Ca^{2+} 의 양은 RyR들 이외에도 다른 이온통로들에 의해서도 조절이 되므로, chlorantraniliprole 때문에 기능을 하지 못하는 RyR들의 발현은 줄어 들고, 다른 이온통로들의 발현이 증가 하였기 때문일 수 있다. 그러므로, 향후 이러한 가능성을 검증하는 연구를 수행할 예정이다. 저항성 계통들에서 관찰된 다른 생화학적 변화로는 AChE와 GST 활성 변화다. AChE는 곤충을 포함한 많은 동물에서 신경과 근육에서 신경전달물질의 분해를 담당하는 기능 이외에 외부에서 들어오는 독성물질의 해독에도 관여하므로(Kang et al., 2011), 섭식에 의하여 몸체로 침투한 chlorantraniliprole을 효과적으로 해독하기 위하여 AChE의 활성이 증가되었을 가능성이 있다. 하지만, 성충 몸통에서 대조군과 두 저항성 계통들 사이에 GST 활성에 차이가 없었던 것은, 섭식에 의하여 몸체로 침투한 chlorantraniliprole 해독과정에 GST가 관여하지 않을 가능성이 있음을 보여주고 있다. 이러한 AChE와 GST의 해독작용에서의 역할을 향후 더 검토할 예정이다.

본 연구에서는 살충제 chlorantraniliprole에 대해 두 가지 다른 농도로 도태된 저항성 초파리 계통을 확립하였고, 이 계통들은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높은 chlorantraniliprole에 대한 섭식독성 저항성 지수를 가지고 있음을 확인 하였다. 향후 이 계통들을 이용하여 현재까지 밝혀지지 않은 약제 저항성 및 내성 발달 기작을 밝혀냄으로써 저항성/내성 회피방법을 개발하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구과제(PJ010821032016)의 지원으로 수행되었다.

Literature Cited

Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J. D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 87, 2185-2195.

Aktar, W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicology* 2, 1-12.

Finney, D. J., 1971. Probit analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, New York.

Han, S.-B., Kim, J.-H., 2012. Research trend on secure tools to manage pesticide resistance. *The Korean J. Pesticide Science* 16, 409-417.

- Harris, C.R., Bowman, B.T. 1981. The relationship of insecticide solubility in water to toxicity in soil. *J. Econ. Entomol.* 74, 210-212.
- Kamel, F., Hoppin, J.A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ. Health Perspect.* 112, 950-958.
- Kang, J.S., Lee, D.W., Koh, Y.H., Lee, S.H., 2011. A soluble acetylcholinesterase provides chemical defense against xenobiotics in the pinewood nematode. *PLoS ONE* 6, e19063.
- Kathryn, M.O., Mark, N., 2008. From resilience to resistance: political ecological lessons from antibiotic and pesticide resistance. *Ann. Rev. Anthropol.* 37, 267-282.
- Kim, A.Y., Seo, J.B., Kim, W. Choi, H.J., Kim, S.Y., Morrow G., Tanguay, R.M., Steller, H., Koh, Y.H., 2015. The pathogenic Human Torsin A in *Drosophila* activates the unfolded protein response and increases susceptibility to oxidative stress. *BMC Genomics* 16, 338
- Kim, W., Lee, D., Choi, J., Kim, A., Han, S., Park, K., Choi, J., Kim, J., Choi, Y., Lee, S.H., Koh, Y.H., 2011. Pharmacogenetic regulation of acetylcholinesterase activity in *drosophila* reveals the regulatory mechanisms of ache inhibitors in synaptic plasticity. *Neurochem. Res.* 36, 879-893.
- Kim, W.T., Choi, H.J., Park, Y., Kim, A.-y., Kim, Y.H., Seo, J., Lee, S.H., Koh, Y.H., 2010. Alterations in both acetylcholinesterase activity and synaptic scaffolding protein localization in the nervous system of *Drosophila* presenilin mutants. *J. Asia-Pac. Entomol.* 13, 339-343.
- Lin, Q., Jin, F., Hu, Z., Chen, H., Yin, F., Li, Z., Dong, X., Zhang, D., Ren, S., and Feng, X., 2013. Transcriptome analysis of chlorantraniliprole resistance development in the diamondback moth *Plutella xylostella*. *PLoS One* 8, e72314.
- Nguyen, P., Kim, A.Y., Jung, J.K., Donahue, K.M., Jung, C., Choi, M.Y., Koh, Y.H., 2016. The biochemical adaptations of spotted wing drosophila (Diptera: Drosophilidae) to fresh fruits reduced fructose concentrations and glutathione-s transferase activities. *J. Econ. Entomol.* 109, 973-981.
- Pimentel, D., 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environ. Dev. Sustain.* 7, 229-252.
- Poet, T.S., Kousba, A.A., Dennison, S.L., Timchalk, C., 2004. Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus pesticide diazinon. *Neurotoxicology* 25, 1013-1030.
- Wijdeven, R.H., Pang, B., Assaraf, Y.G., Neeffes, J., 2016. Old drugs, novel ways out: drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics. *Drug Resist. Updates* 28, 65-81.