



Biochemical mechanisms of fumigant toxicity by ethyl formate towards *Myzus persicae* nymphs

Kyeongnam Kim¹ · Byung-Ho Lee² · Jeong Sun Park³ · Jeong Oh Yang³ ·
Sung-Eun Lee¹

복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*) 약충에 대한 에틸포메이트 훈증 독성의 생화학적 메커니즘

김경남¹ · 이병호² · 박정선³ · 양정오³ · 이성은¹

Received: 26 August 2017 / Accepted: 29 August 2017 / Published Online: 30 September 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract Ethyl formate has been used for the control of insect pests by fumigation. However, there were not many reports to show its target site of fumigant toxicity on insect pests since its first use in the agricultural industry. In the present study, we showed the presumable target sites of ethyl formate fumigation in insect pests using *Myzus persicae* nymphs. After ethyl formate fumigation, the nymphs of this species were collected and the changes at the biochemical and molecular level were determined. The activity of cytochrome c oxidase (COX) was approximately two-fold higher after ethyl formate fumigation. In addition, the expression levels of acetylcholinesterase (AChE) decreased gradually with increasing ethyl formate concentration. These two findings

suggested that COX and AChE might be the major target sites of ethyl formate fumigation. In addition to these results, the analysis of lipid content using MALDI-TOF MS/MS identified 9 phospholipids differently generated 2-fold higher in the ethyl formate-treated nymphs than that in the control nymphs, thereby leading to changes in cell membrane composition in *M. persicae* nymphs. Therefore, the ethyl formate fumigation caused lethal effects on *M. persicae* nymphs by changing COX activity, AChE gene expression, and phospholipid production.

Keywords Acetylcholinesterase · Cytochrome c oxidase · Ethyl formate · Fumigation · MALDI-TOF MS/MS · *Myzus persicae*

Jeong Oh Yang and Sung-Eun Lee equally contributed to this paper as corresponding authors.

Sung-Eun Lee (✉)
E-mail: selpest@knu.ac.kr

¹School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²Department of Plant Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

³Plant Quarantine Technology Center, Animal and Plant Quarantine Agency (APQA), Gimcheon 39660, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

훈증제의 사용은 곡물의 저장뿐만 아니라 다양한 농업제품의 수출입에 관계하여 일정온도 및 압력하에서 대상해충을 박멸하는데 사용하는 약제이다(Kim 등, 2016; Lee 등, 2017). 이들의 사용으로 인하여 훈증 대상 해충에 대한 강력한 방제효과와 함께 훈증 물질의 대한 품질 저하가 나타나지 않아야 한다(Austel 등, 2017).

더불어 인축독성이 발견되지 않아야 하고 작업자의 건강에 영향을 미치지 않아야 한다(Nagami 등, 2017). 이러한 이유로 새로운 훈증약제의 개발이 보다 더 안전하다고 여겨지는 천연물에 집중되고 있다. 다만 천연물 중 쉽게 휘발이 될 수 있는 물리적 특성을 지닌 물질들이 제한적이어서 천연물 유래 훈증

제 개발은 가까운 시일에 이루어지기가 어렵다고 보여진다(Liang 등, 2017).

천연 유래 훈증제 중 가장 널리 활용되는 물질 중 하나가 에틸포메이트(Ethyl formate)다(Yang 등, 2016). 에틸포메이트는 에탄올과 포름산이 반응하여 생성되는 물질이며 과일 향이 나는 특성을 지녔다. 이들의 존재는 식물계에서 쉽게 발견된다(Yamashita 등, 1977).

에틸포메이트 훈증 처리 효과는 물리적인 호흡을 저해하는 것으로 알려져 있으나 보다 분명한 생화학적 작용점(target site)은 미토콘드리아의 전자전달계 중 최종 전자를 산화시키는 산화효소인 cytochrome c oxidase (COX)의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Haritos와 Dojchinov 2003).

그러나 이러한 생화학적 작용점에 대한 영향을 실제 훈증 처리 조건에서 확인한 바 없으며 에틸포메이트의 작용점이 이 효소에 국한되는지에 대해서도 정확한 연구가 진행된 바 없다. 따라서 작용점인 COX 효소의 훈증 시 변화 양상과 이 효소 외에 다른 작용점이 더 존재하는지를 본 연구에서 구명하고자 하였다.

다른 작용점의 존재를 탐색하기 위하여 대사체 분석을 실시하여 지질생성에 미치는 영향을 평가하였으며 대사체학 기법 중 MALDI-TOF MS 또는 SELDI-TOF MS를 활용한 방법을 활용하여 신규 작용점을 탐색하고자 하였다(Nam 등, 2015). 이러한 대사체학 기법은 엔도설판(endosulfan)에 노출된 줄지렁이의 지질대사체 변화, 피난트렌(phenanthrene)에 노출된 줄지렁이의 지질대사체 변화, 클로피리포스(chlorpyrifos)에 노출된 송사리에서의 지질대사체 변화 등에 활용되어 보고된 바 있다(Nam 등, 2015; Jeon 등, 2016).

재료 및 방법

사용물질

Ethyl formate와 bovine serum albumin (BSA), cytochrome c는 Sigma-Aldrich 사(St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. QIAzol Lysis reagent와 Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit는 QIAGEN사(Hilden, Germany), Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase는 Thermo Fisher Scientific사(Hudson, NH, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

복숭아혹진딧물 기주식물 및 사육

복숭아혹진딧물의 기주식물로 알려진 열갈이배추를 먹이 및 사육장소로 제공하기 위해 파종 후 약 17일 경과 후 잎의 길이가 약 5–7 cm까지 자란 열갈이배추를 이용하였다. 온도 30±1 °C, 상대습도 30% 조건의 유리온실에서 재배하였다. 복숭아혹진딧물은 농림축산검역본부 식물검역기술개발센터에서 온도 25±1 °C, 상대습도 50–60% 조건에서 사육하였으며, Acrylic cage (30×30×45 cm)에 열갈이배추 화분 4–5개를 넣어 성충과 약충을 함께 사육하였다.

공시충 준비 및 에틸포메이트 훈증처리

에틸포메이트 훈증처리는 복숭아혹진딧물 약충을 대상으로 수행하였다. Insect breeding dish (Φ 5.5×1.5 cm)내 습도유지를 위해 탈지면과 filter paper (Φ 5.5 cm)를 깔 후 1차 증류수로

적셔준 후 열갈이배추를 Insect breeding dish 크기에 맞춰 잘라 제공하였다. 약충을 한 개의 Insect breeding dish 내 30개체씩 접종하였으며, 3반복 수행하였다. 에틸포메이트 처리는 농림축산검역본부 식물검역기술개발센터(김천, 경북)에서 수행하였다. 처리조건은 온도 20±1 °C, 상대습도 60±10% 조건의 훈증실에서 12 L Desiccator (Duran, Germany)에 1시간 동안 처리하였다. 정확한 처리농도를 확인하기 위하여 모든 실험구를 대상으로 샘플링을 실시하였으며, 샘플링은 에틸포메이트 처리 후 1시간 후에 수행하였다. 1 L Tedlar bag (SKC, Dorset, United Kingdom)에 60 mL syringe를 이용하여 60 mL씩 샘플링을 수행하였으며, 에틸포메이트의 농도는 GC system (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

미토콘드리아 추출

에틸포메이트 훈증 처리 후 약충을 -70 °C에 보관하고 이를 효소 희석 용액(250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 200 µL을 넣고 얼음에 유지한 채로 균질화 하였다. 균질화한 용액은 4 °C, 600 G, 10분간 원심분리 하였다. 분리한 상등액을 4 °C, 10,000 G, 15분간 다시 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 침전물은 효소 희석 용액 20 µL에 녹여 미토콘드리아 원액으로 사용하였다. 단백질 정량은 bradford법을 따라 시행하였으며, 표준 단백질로 BSA를 사용하여 표준곡선을 얻었다. 96 well plate에 염색시약 250 µL와 시료 5 µL를 혼합하고 5분간 반응시킨 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytochrome c oxidase (COX) 활성 측정

기질로 환원형 Cytochrome c를 사용하였고 Cytochrome c (2.7 mg)를 칭량하여 증류수 1 mL에 용해하였다. 이 용액에 0.1 M Dithiothreitol 5 µL를 넣고 상온에서 30분간 갈색에서 분홍색으로 변할 때까지 반응시키고 30초 간격 10분간 550 nm에서 흡광도 변화의 유무를 확인하였다. 완전히 환원된 cytochrome c 용액을 Tris-buffer 용액 (120 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 10배 희석하여 효소 활성 반응액으로 사용하였다. 추출한 미토콘드리아 원액을 위 미토콘드리아 추출 시 사용한 효소 희석 용액으로 재희석 하였으며 20 µL를 효소 활성 반응액 180 µL과 혼합하여 30초 간격 60분 동안 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. COX 활성은 Unit/mg 단위로 표현하였으며, 1 Unit은 1 µmole의 환원된 cytochrome c가 1분당 산화되는 것으로 정의하였으며 이때 조건은 상온, pH 7.4였다. 결과는 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA 및 Tukey test 통계처리 하였다.

RNA 추출 및 유전자 발현 확인

에틸포메이트 훈증 처리 후 살아있는 약충 개체를 모아 QIAzol Lysis reagent를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 µDrop™ Plate(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 A260/280 비율이 1.8–2.0이 됨을 확인하였다. 또한 1% agarose gel에 전기영동하여 추출한 RNA의 상태를 확인하였다. 추출한 RNA 2 µg을 Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase 를 사용하여 Complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit를 이용하여 qPCR를 실시하였다.

PCR조건은 95 °C 10분, 그 후 95 °C 10초, 60 °C 15초, 72 °C 20초로 40회 실시하였다. 실험에 사용한 primer의 서열은 Fig. 1에 나타내었고, 결과는 Actin, ribosomal protein S2 유전자를 이용하여 표준화 하였으며 최종 나타낸 결과는 delta delta Ct 방법을 이용하여 분석하였다. 또한 결과는 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA 및 Tukey test 통계처리 하였다.

지질 추출 및 MALDI-TOF MS/MS 분석

에틸포메이트에 1시간 노출 시킨 복숭아혹진딧물 약충을 죽은 개체, 살아있는 개체에 상관없이 60개체를 모아 메탄올-클로로포름(1:2, v/v) 500 µL를 넣고 균질화하여 상온에서 20분간 진탕하였다. 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 0.9% 염화나트륨 용액 300 µL를 첨가하여 혼합하고 2000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층부를 제거한 후 하층부를 취하여 분석에 사용하였다. 1 µL 지질 추출액을 엠티피 384 타겟 플레이트 그라운드 스틸(MTP 384 ground steel target)에 놓고 상온에서 말려주었다. 샘플이 완전히 마른 후, 0.5 µL 포화 아미노아크리딘 매트릭스 용액(2-propanol/acetonitrile, 60/40, v/v)을 말린 샘플 위에 놓고 상온에서 말려주고 질량분석기(MALDI-TOF MS)를 통해 지질을 분석하였다. 결과는 지질 데이터베이스(www.lipidmaps.org)를 이용하여 지질 질량분석 결과를 확인 하였다.

결 과

에틸포메이트의 훈증처리에 따른 COX의 활성 변화

에틸포메이트의 훈증처리 후 복숭아혹진딧물 약충으로부터 COX

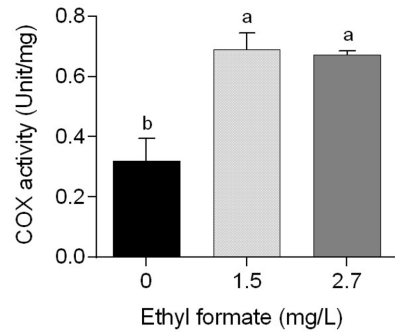


Fig. 1 Cytochrome c oxidase activities in *Myzus persicae* nymphs after exposure to the fumigation using ethyl formate. Two treated concentrations were 1.5 and 2.7 mg/L and the enzyme activity was expressed in Unit per mg proteins. Different letters indicate statistically differences ($p < 0.05$) between the control and the treated nymphs

의 활성을 측정하였다(Fig. 1). 훈증 처리 되지 않은 복숭아혹진딧물 약충의 COX의 활성은 단백질(mg) 당 약 0.3 unit로 나타났으며, 1.5 mg/L의 에틸포메이트를 훈증 처리한 약충에서는 COX의 활성은 오히려 2.3배 증가하여 약 0.7 Unit를 나타내었다. 이 활성은 2.7 mg/L수준에서도 비슷하게 관찰되었다. 이들을 통계처리 하였을 때 대조군에 비하여 에틸포메이트가 처리가 된 약충의 COX 값은 유의한 수준으로 나타났다. 또한 에틸포메이트 처리구에서의 COX 활성은 통계적으로 유의하지 않았다.

에틸포메이트의 훈증처리에 따른 유전자 발현 변화

에틸포메이트가 처리된 복숭아혹진딧물 약충은 무독성화 효소인 cytochrome P450 CYP6CY3 (CYP6CY3)의 발현을 1.5

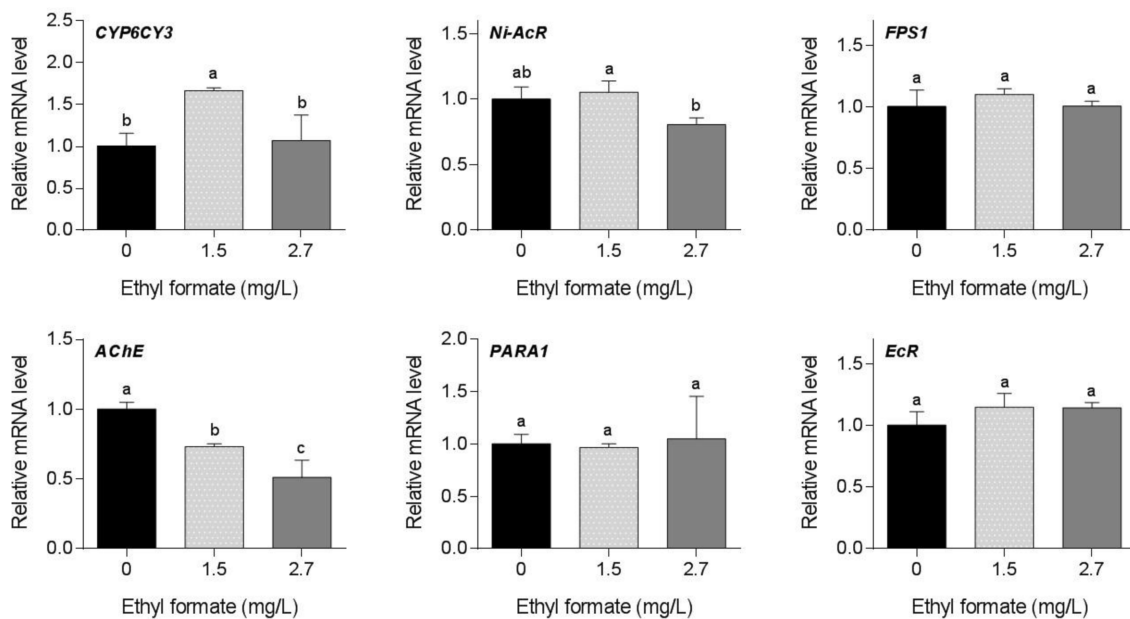


Fig. 2 mRNA expression levels in the ethyl formate-treated *Myzus persicae* nymphs in comparison to the non-treated nymphs as the control. CYP6CY3, Cytochrome P450 CYP6CY3; FPS1, Farnesyl diphosphate synthase 1; AChE, Acetylcholinesterase; PARA1, Voltage gated sodium channel subunit 1; Ni-AcR, Nicotinic acetylcholine receptor alpha 3 subunit; EcR, Ecdysone receptor. Different letters indicate statistically differences ($p < 0.05$) between the control and the treated nymphs

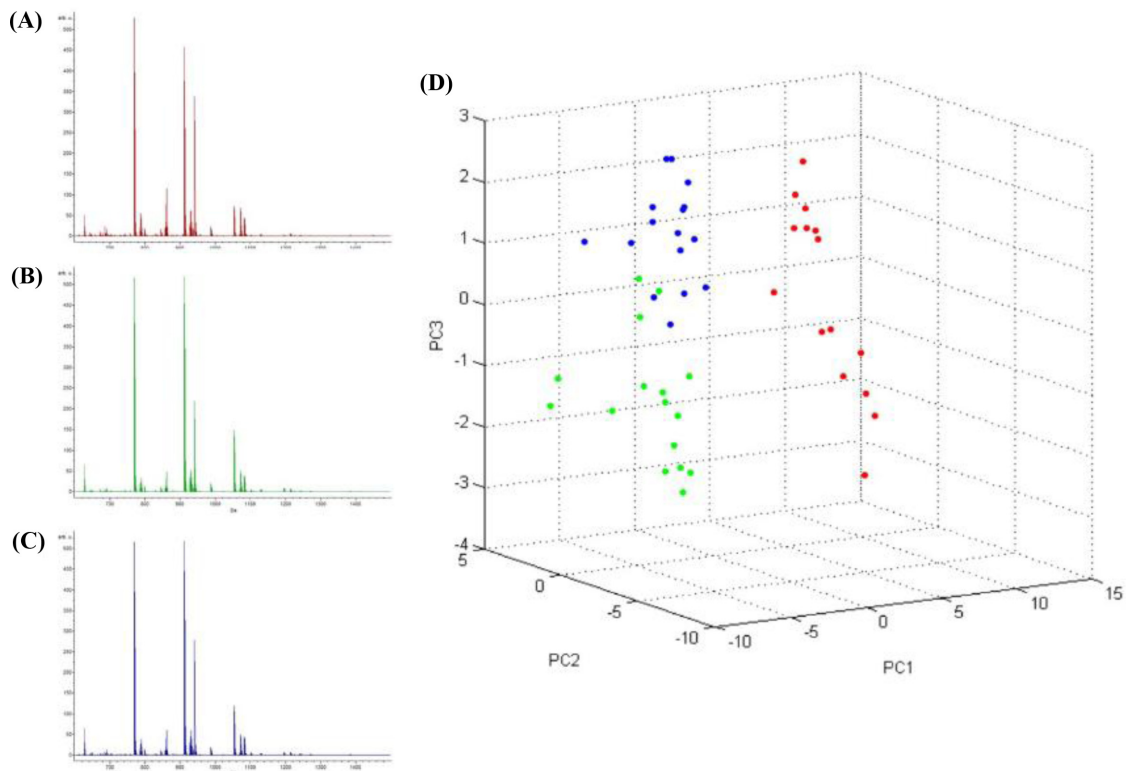


Fig. 3 Total mass ion chromatograms of lipids extracted from the non-treated *Myzus persicae* nymphs (A), the ethyl formate-treated *Myzus persicae* nymphs at the concentration of 2.6 mg/L (B), the ethyl formate-treated *Myzus persicae* nymphs at the concentration of 4.0 mg/L (C). PCA analysis of the lipid peaks after the analysis using MALDI-TOF MS/MS (D). red closed circle, the control; green closed circle, the ethyl formate-treated *Myzus persicae* nymphs at the concentration of 2.6 mg/L; blue closed circle, the ethyl formate-treated *Myzus persicae* nymphs at the concentration of 4.0 mg/L

mg/L 수준의 처리농도에서는 1.7배 증가시킨 후 2.7 mg/L 수준에서는 정상발현으로 회귀하였다. Acetylcholinesterase (AChE)의 발현의 경우 에틸포메이트의 처리 농도 차이에 따른 통계학적 유의성이 나타났으며 처리농도의 증가는 AChE 효소의 발현을 감소시켰다. 이러한 AChE의 발현과 관계하여 Nicotinic acetylcholine receptor alpha 3 subunit (Ni-AcR)의 발현은 1.5 mg/L 수준에서 증가하였으나 2.7 mg/L 수준에서는 발현이 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. Farnesyl diphosphate synthase (FPS1)의 경우 에틸포메이트의 처리와는 무관하게 발현하였다. 다른 pyrethroid계 농약의 주요한 작용점으로 알려진 Voltage gated sodium channel subunit 1 (PARA1)의 경우 에틸포메이트의 혼중 처리와는 무관하게 발현하였다. Ecdysone receptor (EcR)의 발현 또한 혼중 처리에 따른 변화를 보이지 않았다(Fig. 2).

에틸포메이트의 혼중처리에 따른 지질대사체의 생성 변화 분석
에틸포메이트가 혼중 처리된 약충과 대조군에서 각각 지질을 추출한 후 지질을 MALDI-TOF MS/MS를 이용하여 분석하였다. 전체 이온 크로마토그래피는 Figs. 3A, B, C와 같이 얻을 수 있었고 다변량 분석을 실시하여 Fig. 3D와 같이 무처리 대조군은 에틸포메이트가 각각 다른 농도로 처리된 복숭아혹진딧물의 약충에서 유의성 있게 관찰되었다.

MALDI-TOF MS/MS 분석을 통하여 2배 이상의 증감을 보인 23종의 지질 대사물들을 분석하였다(Table 2). 이들 중 11

종의 지질들을 lipid map을 이용하여 이들의 구조와 조성을 확인하였고 9종은 인지질이었으며 나머지 2종은 황 원소를 지닌 지질과 탄소, 수소, 산소로 구성된 diglycerol 계통의 지질이 확인되었다. 확인된 지질 중 생성이 증가된 지질은 세배 이상이 증가된 M(IP)2C(d35:1)이었으며 가장 감소된 지질은 MGDG (26:1)으로 관측되었다.

복숭아혹진딧물은 고추, 배추, 감자, 담배, 목화 등에 상당한 피해를 입히는 해충으로 알려져 있으며 이들의 방제를 위하여 경엽처리제 및 토양살충제를 혼합 처리하고 있다(Rawat 등, 2013). 그러나 이들 살충제에 대한 강력한 저항성의 유발되어 전세계적으로 복숭아혹진딧물의 방제가 상당한 어려움에 봉착해 있는 실정이다(Silva 등, 2012). 이와 함께 곡물의 수출입에 있어서는 검역과정과 관련하여 에틸포메이트 등의 혼중제를 살포하여 박멸하고 있으나 정확한 에틸포메이트를 포함한 혼중제들의 작용점 및 효과적인 박멸이 어려운 실정에 있다(Stewart와 Aharoni 1983).

본 연구를 통하여 에틸포메이트를 처리한 후 복숭아혹진딧물 약충 내 생화학적 변화 양상과 지질대사체의 생성 변화를 분석하여 보다 효율적인 방제법을 얻으며 에틸포메이트에 대한 저항성유발 억제 방법을 확립하고자 하였다.

본 연구에서 에틸포메이트의 혼중 처리 시 복숭아혹진딧물 약충에 대한 독성작용점으로 알려진 COX의 활성을 측정할 때 2배 이상 증가된 COX의 활성을 에틸포메이트 처리구에서 모

Table 1 Primer list for quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) in *Myzus persicae*

Gene name	Gene symbol	Primer sequence (5'-3')	Accession #
Actin	Actin	F) GGTGTCTCACACACAGTGCC R) CGGCGGTGGTGGTGAAGCTG	Bass et al. (2011)
Ribosomal protein S2	RPS2	F) TGCCAAAGAAGCATTGCCTG R) TGCTACTGCACCCTCATTC	KF246568.1
Cytochrome P450 CYP6CY3	CYP6CY3	F) TCTTTTCAGGGAGCTGTGCC R) ACGCCGAGTGAAAGAAGTCA	HM009309.1
Farnesyl diphosphate synthase 1 (FPS1)	FPS1	F) GTCGCTCTGATTCCGGTTGA R) CGIATGGATCGTTGGTCGGT	EU334430.1
Acetylcholinesterase	AChE	F) AGAGGAATCACACAGGCAGC R) GCGAGGGTGCCTAAACCTAA	KJ561353.1
Voltage gated sodium channel subunit 1	PARA1	F) TGACGCGGAGGAACACTTAC R) GTATGACACGGGCACGATGA	FN601405.1
Nicotinic acetylcholine receptor alpha 3 subunit	Ni-AcR	F) TCCCGITCGATGAACAGACG R) ACTACTCGTGAACCGCTGAC	AJ236786.1
Ecdysone receptor	EcR	F) CAAAGCTGGATTGGGAGATGC R) CGATGGCGTCAATAAGGCA	EF174334.1

Bass et al. (2011) is listed in the reference section

두 발견하였다(Fig. 1). 이는 에틸포메이트 훈증 처리 시 독성 작용점으로서 복숭아혹진딧물 약충의 COX와 연관되어 있음을 증명할 결과였다. COX의 활성 증가는 에틸포메이트에 노출되어 이의 활성이 저해를 받는 상황에서 COX 효소의 발현을 더 증가하여 저해진 활성을 회복하고자 생화학적인 변화를 복숭아혹진딧물 약충이 시행하였다고 보여진다. 이러한 양상은 다른 농약의 처리 시에도 많이 발견이 되는데 유기인계 농약인 말라치온(Malathion)과 클로피리포스-메칠(Chlorpyrifos-methyl)에 처리된 톱가슴머리대장(*Oryzaephilus surinamensis*)의 carboxylesterase 및 glutathione-S-transferase 등의 활성이 증가되었다(Lee와 Lees 2001).

본 실험을 통하여 AChE의 발현이 에틸포메이트의 처리 농도에 따라 통계학적 유의성을 보였으며(Fig. 2) 이는 학계에 처음으로 보고하는 사례가 되어 에틸포메이트의 훈증 처리 시 작용점으로써 AChE 발현을 제시하였다. 이와 함께, 아세틸콜린 수용체(Ni-AcR)의 발현도 증감을 보였는데 저농도 처리 시 AChE의 감소로 인한 아세틸콜린의 생성 저하는 아세틸콜린 수용체의 발현을 증가시켰다. 그러나, 이러한 생화학적 변화는 고농도에서 유지되지 못하고 아세틸콜린 수용체의 발현도 감소하는 경향을 나타내었다. 이 두 유전자의 발현의 변화는 에틸포메이트의 훈증 처리로 인한 독성이 아세틸콜린 신경전달물질을 생성 수용하는 메커니즘과 연관이 깊다는 것을 의미한다고 본다.

에틸포메이트는 무독성화 효소인 CYP6CY3의 발현을 저농도(1.5 mg/L) 처리 시 1.7배 증가시켰는데 이는 무독성화 효소의 발현 증가로 인하여 에틸포메이트의 분해를 복숭아혹진딧물 약충이 시도한 것으로 보이나 고농도(2.7 mg/L)에서는 이러한 생화학적인 변화가 정상으로 회귀하였다. 다른 세 종류의 유전자(FPS1, PARA1, EcR)들은 에틸포메이트의 처리와는 크게 관계가 없음을 동시에 확인하였다.

에틸포메이트의 훈증 처리 후 복숭아혹진딧물 약충의 지질생성 변화에 대한 대사체 연구를 통하여 2배 이상 생성에 증감을

보인 지질 중 확인이 된 11종은 대체로 세포막 형성 관여하는 물질들로서 이들의 증감을 통하여 생체막 형성에도 에틸포메이트가 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 농약의 처리 후 세포막 형성에 관여하는 인지질의 조성의 변화에 관한 논문은 다양한 생물을 이용하여 보고되었다. Rosas 등(1980)은 다양한 살충제들이 대장균의 인지질 생성에 미치는 연구를 실시하였고, 현재는 사용 금지된 파라치온(Parathion)의 경우 모든 인지질의 농도를 증가시켰고 반면에 DDT는 세린기를 지닌 인지질의 생성을 낮추는 것으로 보고하였다(Rosas 등, 1980).

본 연구를 통하여 에틸포메이트의 훈증 처리는 복숭아혹진딧물 약충의 생화학적 변화를 유도하는데 COX의 활성 증가, AChE 유전자의 발현 감소, Ni-AcR 및 CYP6CY3 유전자들의 증감을 유발하였다. 다른 주요한 세 유전자들을 에틸포메이트 처리와는 무관하게 발현의 변화를 보이지 않았다. MALDI-TOF MS/MS를 이용한 지질대사체 분석으로 2배 이상 생성에 증감을 보인 23종의 지질을 확인하였고 이 중 11종의 지질을 동정하였다. 11종 중 9종은 인지질로써 에틸포메이트의 훈증 처리는 복숭아혹진딧물 약충의 세포막 형성에도 상당한 영향을 미쳤음을 본 연구를 확인할 수 있었다. 따라서, 에틸포메이트의 훈증 처리시 독성작용점으로서 COX의 활성 저해와 AChE 유전자 발현 감소에 따른 신경계의 교란, 세포막 형성의 주요한 인지질의 조성 교란등을 들 수 있다.

초 록

에틸포메이트는 해충을 방제하기 위한 훈증제로서 사용되어 왔다. 그러나 농산업에서 해충을 박멸하기 위하여 사용된 이 물질이 일으키는 훈증독성의 작용점에 대해서는 많은 연구가 수행되지 않았다. 본 연구에서 저자들은 복숭아혹진딧물 약충에 에틸포메이트를 훈증 처리 하였을 때 추측 가능한 작용점들을

Table 2 Lipids expressed at least two-fold differences after ethyl formate fumigation on *Myzus persicae* (Sulzer) and identification by MALDI-TOF MS/MS

No	Detected Mass ion	Matched Mass ion	Ethyl formate (mg/L)			Identified lipids	Formulas
			0	2.6	4.0		
1	1053.55	- ^{a)}	74.31	150.09	120.09	-	-
2	1196.62	1196.6116	2.80	8.73	6.02	M(IP)2C(d35:1)	C ₅₃ H ₁₀₀ NO ₂₄ P ₂
3	803.4	803.4046	2.93	1.32	1.71	SQDG(34:9)	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂ S
4	1198.62	1198.6272	1.36	3.75	2.68	M(IP)2C(d35:0)	C ₅₃ H ₁₀₂ NO ₂₄ P ₂
5	802.40	-	2.82	1.15	1.48	-	-
6	1199.62	-	0.76	1.79	1.37	-	-
7	1339.75	-	0.20	0.44	0.33	-	-
8	1195.62	-	2.70	8.49	5.97	-	-
9	1057.54	1057.5424	9.64	20.89	16.61	PIP(44:8(OH))	C ₅₃ H ₈₇ O ₁₇ P ₂
10	787.39	787.3804	55.62	23.4	27.53	LPIP(26:2)	C ₃₅ H ₆₅ O ₁₅ P ₂
11	788.4	-	31.74	12.54	14.89	-	-
12	1251.75	1251.7458	0.33	0.66	0.56	PIP(58:9(OH))	C ₆₇ H ₁₁₃ O ₁₇ P ₂
13	643.45	643.4427	8.36	3.60	2.99	MGDG(26:1)	C ₃₅ H ₆₆ O ₁₀
14	673.5	673.4926	8.61	3.99	3.21	PE-Cer(134:2)	C ₅₆ H ₇₀ N ₂ O ₇ P
15	658.45	658.4453	-	-	-	PE(30:2)	C ₃₅ H ₆₅ NO ₈ P
16	1223.73	-	0.52	1.02	0.93	-	-
17	675.49	675.497	-	-	-	PG(43:7)	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₀ P
18	685.47	-	23.00	7.72	5.81	-	-
19	956.43	-	3.97	1.73	2.26	-	-
20	686.49	-	9.03	3.23	3.32	-	-
21	860.55	-	35.72	14.37	18.77	-	-
22	859.55	-	79.13	32.43	42.42	-	-
23	861.57	861.5651	117.5	49.08	61.07	PG(43:7)	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₀ P

^{a)}Not matched

^{b)}All data were statistically analyzed by PWKW ($p < 0.05$)

제시하였다. 에틸포메이트 훈증 처리 후 복숭아혹진딧물 약충에 대한 생화학 및 분자적 수준에서의 변화를 측정하였다. Cytochrome c oxidase (COX)의 활성은 에틸포메이트 훈증 처리된 복숭아혹진딧물 약충에서 약 2배 이상 증가하였다. Acetylcholinesterase (AChE)의 경우 에틸포메이트의 훈증 처리 농도가 증가됨과 함께 유전자 발현이 감소되었다. 이 두 발견은 COX와 AChE가 주요한 에틸포메이트 훈증독성의 작용점임을 시사하였다. 이 결과들과 함께 MALDI-TOF MS/MS를 이용하여 지질대사체를 분석한 후 2배 이상 증감을 보인 9종 인지질들을 동정하였고 이들이 세포막 구성에 변화를 유발함을 밝혔다. 결론적으로 복숭아혹진딧물 약충에 대한 에틸포메이트의 훈증독성은 COX 활성 변화, AChE 발현 변화, 그리고 인지질의 생성 변화에 기인하였다.

Keywords 복숭아혹진딧물 · 시토크롬 c 산화효소 · 아세틸콜린에스터레이스 · 에틸 포메이트 · 훈증

감사의 글 본 연구는 2017년도 국립수의과학검역원 용역연구사업의 연구비 지원 (Z-1543086-2017-19)에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

References

Austel N, Schubert J, Gadau S, Jungnickel H, Budnik LT, Luch A (2017)

- Influence of fumigants on sunflower seeds: Characteristics of fumigant desorption and changes in volatile profiles. *J Hazard Mater* 337: 138–147
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crossthwaite AJ, Denholm I LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor b subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience* 12: 51
- Haritos VS, Dojchinov G (2003) Cytochrome c oxidase inhibition in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) by formate, the toxic metabolite of volatile alkyl formates. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 136: 135–142
- Jeon HJ, Lee YH, Mo HH, Kim MJ, Al-Wabel MI, Kim Y, Cho K, Kim TW, Ok YS, Lee SE (2016) Chlorpyrifos-induced biomarkers in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Pollut Int* 23(2): 1071–1080
- Kim BS, Park CG, Moon YM, Sung BK, Ren Y, Wylie SJ, Lee BH (2016) Quarantine treatments of imported nursery plants and exported cut flowers by phosphine gas (PH₃) as methyl bromide alternative. *J Econ Entomol* 109: 2334–2340
- Lee BH, Yang JO, Beckett S, Ren Y (2017) Preliminary trials of the ethanedinitrile fumigation of logs for eradication of *Bursaphelenchus xylophilus* and its vector insect *Monochamus alternatus*. *Pest Manag Sci* 73: 1446–1452
- Lee SE, Lees EM (2001) Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl. *J Econ Entomol* 94: 706–713
- Liang JY, Guo SS, Zhang WJ, Geng ZF, Deng ZW, Du SS, Zhang J (2017) Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from *Artemisia dubia* and its main compounds against two stored product pests. *Nat Prod Res* doi: 10.1080/14786419.2017.1331227

- Nagami H, Suenaga T, Nakazaki M (2017) Pesticide exposure and subjective symptoms of cut-flower farmers. *J Rural Med* 12: 7–11
- Nam TH, Jeon HJ, Mo HH, Cho K, Ok YS, Lee SE (2015) Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ Geochem Health* 37(6): 943–951
- Rawat N, Singh R, Sharma PL (2013) Evaluation of some insecticides against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Indian J Entomol* 75(2): 113–117
- Rosas SB, del Carmen Secco M, Ghittoni NF (1980) Effects of pesticides on the fatty acid and phospholipid composition of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 40(2): 231–234
- Silva AX, Jander G, Samaniego H, Ramsey JS, Figueroa CC (2012) Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: A transcriptomic survey. *PLoS ONE* 7(6): e36366
- Stewart JK, Aharoni Y (1983) Vacuum fumigation with ethyl formate to control the green peach aphid in packaged head lettuce. *J Am Soc Horticult Sci* 108: 295–298
- Yamashita I, Lino K, Nemoto Y, Yoshikawa S (1977) Studies on flavor development in strawberries. 4. Biosynthesis of volatile alcohol and esters from aldehyde during ripening. *J Agric Food Chem* 25: 1165–1168
- Yang J, Park Y, Hyun IH, Kim GH, Kim BS, Lee BH, Ren Y (2016) A combination treatment using ethyl formate and phosphine to control *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) on pineapples. *J Econ Entomol* 109: 2355–2363