

바퀴(*Blattella germanica* L.)의 살충제 저항성에 관한 연구 3. Esterase 활성 비교

Studies on the Insecticide Resistance of the German Cockroach
(*Blattella germanica* L.) III. Comparison of Esterase Activity

방종렬·김정화·이형래

Jong Ryeol Bang, Jeong Wha Kim, and Hyung Rae Lee

ABSTRACT The German cockroach(*Blattella germanica*) populations were successively selected with chlorpyrifos and permethrin during the six generations. The resulting resistant R_{chlorpyrifos}(Rc) and R_{permethrin}(Rp) strains were studied to investigate the esterase activity by spectrophotometer, filter paper test, and electrophoresis. Esterase- α activities by filter paper test showed 2.65 and 1.82 times higher in the Rc and Rp strains than the susceptible strain, respectively. In the spectrophotometer method, the esterase activities to α - and β -naphthyl acetate were increased 2.34 and 5.28 times in the Rc than susceptible strain, and 1.48 and 2.92 times in the Rp than susceptible strain, respectively. Zymogram patterns of esterase isozyme by agarose gel electrophoresis showed totally five bands. The Rc and Rp strains showed two additive bands as, Est-2 and Est-3, which were not shown in the susceptible strain. but the Rp strain did not show Est-5 bands which was common in the Rc and susceptible strains.

KEY WORDS *Blattella germanica* L., esterase, filter paper test, spectrophotometer, electrophoresis

초 록 바퀴(*Blattella germanica*)의 살충제 저항성 기구를 구명하고자 chlorpyrifos와 permethrin 살충제로 누대선발하여 얻어진 저항성 바퀴를 대상으로 저항성 기작에 관여하는 esterase 활성변화에 관하여 실험한 결과는 다음과 같다. Filter paper test 방법을 통한 esterase- α 의 활성은 chlorpyrifos와 permethrin 도테계통에서 각각 2.65배, 1.82배로 감수성계통보다 증가하였다. Spectrophotometer 방법을 통한 esterase의 활성은 감수성계통보다 chlorpyrifos 도테계통에서 α - 및 β -Naphthyl acetate에 대하여 각각 2.34배, 5.28배, permethrin 도테계통에서는 1.48배, 2.2배 증가하였다. 전기영동 실험을 통한 esterase isozyme pattern은 모두 5개의 band가 분리 검출되었다. Rc와 Rp계통에서는 감수성계통에서 뚜렷하게 검출되지 않은 Est-2와 Est-3 band가 검출되었으며, Rp계통에서는 감수성과 Rc계통에서 검출된 Est-5 band가 검출되지 않았다.

검색어 바퀴, esterase, filter paper test, spectrophotometer, 전기영동

제 2차 세계대전을 전후한 유기합성 살충제의 개발 보급은 주요 농림해충의 방제뿐만 아니라 도시 위생해충의 대표적인 종으로 알려지

있는 바퀴의 방제에도 크게 기여하였다. 그러나 합성 살충제의 무분별한 사용으로 인한 저항성 해충의 출현은 살충제의 방제효과 저하

는 직접적인 문제뿐만 아니라, 해결방법의 하나인 대체살충제의 개발에도 많은 어려움이 있어 살충제의 효과적인 사용이나 새로운 살충제 개발에 큰 제한 요인이 되고있다(Metcalf 1980).

해충의 살충제 저항성 기구를 해석하고자 여러가지 실험이 수행되었으며, 중요한 저항성 기작의 하나인 esterase의 활성변화에 관한 많은 연구결과들이 보고되었다. Van Asperen과 Oppenoorth(1959)은 methyl n-butylrate 가수분해 능력이 비정상적으로 낮은 Esterase를 저항성 집파리에서 확인하였으며, Oppenoorth과 Van Asperen(1960)은 돌연변이에 의하여 phosphatase(or phosphatase) 활성이 높아진 esterase는 aliesterase 활성을 소실한다는 'mutant aliesterase activity'설을 발표하였다.

그 이후 살충제 저항성 해충에 대한 esterase의 활성 증가는 저항성 집파리(Niwa et al. 1977), 꿀등매미충(Miyata & Saito 1976), 모기류(Georghiou & Pasteur 1978, 1980), 복숭아혹진딧물(Takata 1979) 및 간자와응애(Kuwahara 1982) 등에서 보고되었다.

Esterase는 전기영동에 의하여 분리시킬 수 있으며, esterase의 분리형의 계통간 차이가 저항성 기작과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Georghiou et al. 1980). 즉, 꿀등매미충에 있어서는 E₂-E₄ band가(Miyata and Saito 1976), 모기류에서는 A'-band(*Culex pipiens pipiens* L.), B-band(*C. pipiens fatians* Wiedemann), A' 및 B-band(*C. tarsalis* Coquillett)(Georghiou & Pasteur 1978), 복숭아혹진딧물에서는 G-band의 분리 및 활성증가가 보고되었다(Takata 1979).

바퀴(*Blattella germanica*)에 대한 약제저항성 연구는 1948년에 dieldrin과 chlordane에 저항성 증가 보고(申 등 1973)가 최초이며, 그 이후 유기인제, 카바메이트제 및 피레스로이드제 살충제 등에서 저항성이 발달되었다고 보고(Cochran 1973, Robinson & Zhai 1990, Rust & Reiersen 1978)된 바 있으나, 저항성 기작으로

써 중요시 되는 esterase의 활성변화에 관한 보고는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 filter paper test법, spectrophotometer법 및 전기영동법을 이용하여 chlorpyrifos와 permethrin 저항성 계통과 감수성 계통간의 esterase의 활성 차이를 비교 분석하여 살충제 저항성 기작 구명을 위한 기초 자료로 활용코저 수행하였다.

재료 및 방법

공시충

바퀴(*B. germanica*) 계통들은 chlorpyrifos와 permethrin으로 6세대 동안 인위적으로 누대도 테시킨 종이다. 공시한 저항성 계통을 각각 Rc와 Rp로 표시하였으며, 두 저항성 계통은 감수성 계통 보다 각각 3.23배 및 2.1배 저항성이 증가한 것이다(Bang et al. 1993).

Filter paper test법

Esterase 활성을 신속하게 검출하기 위하여 Pasteur와 Georghiou(1981)가 고안한 방법을 사용하였으며 그 과정은 아래와 같다.

Stock solution

1. Sodium phosphate buffer(pH 6.5)

a. Na₂HPO₄ ; 4.8g

b. NaH₂PO₄ ; 9.2g

이차증류수 1,000ml에 a, b를 용해시킴

2. Substrate solution

α -Naphthyl acetate 1g을 acetone 100ml에 용해시킴

3. Fixing solution

10% acetic acid 용액을 고정액으로 사용함

Working solution

A. Solution A

Phosphate buffer 100ml에 substrate solution 10ml을 혼합시킴

B. Solution B

Fast Garnett G.B.C. 0.3g을 이차증류수

100ml에 용해시킨

C. Solution C

Fixing solution 100ml를 사용함

공시충 암컷 성충 1마리(98mg)당 0.01M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 200 μ l를 첨가하고, 유리봉을 사용하여 완전히 부순 다음 파편을 제거한 후 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리(Refregeration Centrifugue/ Europa 24M)하였다. 그런 후 다시 상등액 100 μ l를 취하여 8,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 micro-pipette를 사용하여 침전물과 혼합되지 않도록 분리하여 효소현탁액으로 사용하였다.

Micro-pipette으로 효소현탁액 2 μ l를 취하여 Watman filter paper No. 2에 스며들게 한 다음 A용액에서 90초간 기질반응 시킨 후 흡수지를 사용하여 과량의 수분을 제거하였다. B용액에 다시 90초간 담구어 가수분해산물(α -naphthol)을 발색시켰으며, 발색된 filter paper를 C용액에 다시 담구어 고정된 후 건조시켜 분석하였다.

Esterase의 활성 측정은 Digital Densitometer II (S/N, C 1783)를 사용하여 측정하였다.

Spectrophotometer법

본 실험은 van Asperen(1962)의 방법과 Devonshire(1975), Beck와 Büchi(1980)의 방법을 본 공시충에 알맞게 체계화시켜 사용하였다.

본 실험에 사용한 효소액은 filter paper test에 사용한 동일한 효소 추출액을 사용하였으며, 이어서 층체에 다량 함유된 지질을 제거하기 위하여 여과액에 1:1의 비율로 petroleum ether(41~46 $^{\circ}$ C 분별증류분획)를 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 6,000rpm으로 원심분리하였다. Micro-pipette을 이용하여 원심분리관 내의 수용성분획을 분리해 낸 후 suction flask에 주입하여 진공펌프로 잔존 ether를 제거한 다음, 12,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 esterase 효소액으로 사용하였다. 0.

3M α - 또는 β -naphthyl acetate 1ml를 5ml 용량의 cap tes tube에 넣고 효소액 10 μ l를 micro-pipette을 사용하여 첨가하였다. 38 $^{\circ}$ C Shaking water-bath 안에서 60분간 기질반응 시킨 후 0.4% sodium lauryl sulphate 용액과 0.3% fast blue B.B salt 용액을 5:2(V:V)로 혼합한 혼합액 0.5ml를 첨가하여 38 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 가수분해산물(α -naphthol)의 발색과 활성반응을 정지시킨 후 자외/가시광 분광광도계(Linear UV/visible spectro-photometer)를 이용하여 α -naphthyl acetate는 600nm, β -naphthyl acetate는 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

전기영동법

전기영동은 Ohba 방법(1968)에 준하여 esterase isozyme을 검출하였다.

전기영동에 사용한 효소액은 filter paper test에 사용한 동일한 효소 추출액을 사용하였으며, 영동은 9mA로 3시간 동안 실시하였다. 영동조에 사용한 running buffer는 sodium phosphate buffer(pH 6.8)였다. 기질반응은 2.5% α -naphthyl acetate와 0.5% β -naphthyl acetate를 혼합한 용액을 사용하였으며, 염색은 0.5% fast blue B.B. salt 용액을 사용하였다.

결과 및 고찰

Filter paper test법에 의한 esterase 활성 비교

Chlorpyrifos와 permethrin으로 6세대 도태한 저항성 계통(Rc와 Rp)과 감수성계통간의 esterase 활성을 비교해 본 결과는 표 1과 그림 1에서 보는 바와 같이 감수성계통에 비하여 Rc계통에서 2.65배, Rp계통에서 1.82배의 esterase- α 활성 증가를 보였으며, Rp계통 보다 Rc계통에서 활성이 높게 나타났다.

이상의 결과 감수성계통보다 살충제 저항성 계통이 곤충체내에 α -naphthyl acetate를 가수분해할 수 있는 활성이 높은 esterase를 생성한다고 생각되며, Georghiou 등(1980)은 모기(*Culex quinquefasciatus*)에서 esterase 활성 증가

의 원인은 저항성 발현에 따른 것이라고 보고한 바 있다.

Pasteur와 Georghiou(1981)는 유기인계 살충제의 저항성을 신속하게 판별하기 위하여 filter paper 방법을 사용한 바 있으며, 국내에서는 Kim과 Georghiou(1988)가 본 방법의 가능성을 최초로 확인하여 보고한 바 있고, 본 연구에서도 가능성이 입증되었으므로 살충제 저항성 발현정도의 유무를 쉽게 현장에서 판별하여 효과적인 해충방제에 응용할 수 있도록 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 생각한다.

Table 1. Comparison of esterase activity in the resistant and susceptible female German cockroach strains^a by filter paper test

Strains	Replication	Esterase- α activity ^b
S	16	1.89(1.00) ^c
Rc	16	5.00(2.65)
Rp	16	3.44(1.82)

^a This experiment was carried out with six generation of chlorpyrifos-selected(Rc) and permethrin-selected(Rp) strains.

^b Esterase activity was expressed as μ mole of hydrolyzed α -naphthyl acetate/ 98mg/ sec.

^c The parenthesis means the ratio of esterase activity between the resistant and susceptible(S) strains.

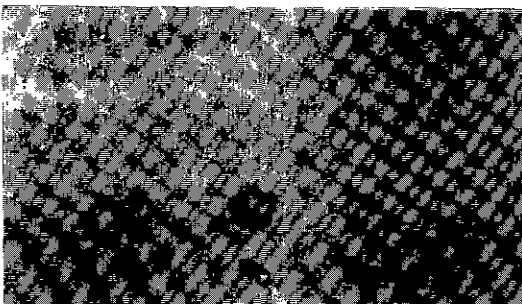


Fig. 1. Comparisons of the esterase- α activity affected by German cockroach, *B. germanica*, after filter paper test.

S : Susceptible strain

Rc : Chlorpyrifos resistant strain

Rp : Permethrin resistant strain

Spectrophotometer법에 의한 esterase 활성 비교

Chlorpyrifos와 permethrin으로 6세대 도태한 저항성계통(Rc와 Rp)과 감수성계통을 α - 및 β -naphthyl acetate를 이용하여 esterase 활성의 차이를 비교해 본 결과 표 2에서 보는 바와같이 기질에 따라 약간 차이는 있으나 Rc계통에서 2.34~5.28배, Rp계통에서 1.48~2.92배의 esterase 활성 증가를 보였고, 감수성계통이 저항성으로 발달됨에 따라 α -에 비하여 β -naphthyl acetate의 분해능력이 증가되었으며, Rp계통보다 Rc계통이 esterase 활성이 높게 나타났다.

Schnitzerling 등(1974)은 저항성 소진드기에서 가수분해 능력 증가를 보고하였고, Georghiou와 Pasteur(1988)는 모기류(*Culex* spp.)에서, Niwa 등(1977)과 Yeoh 등(1981), Kao 등(1984)은 집파리에서 유기인계 살충제 저항성은 esterase 또는 carboxylesterase 활성 증가와 밀접한 관련이 있음을 보고한 바 있다.

독성물질의 빠른 분해·배설이 해충을 xenobiotics로부터 보호해 준다는 것은 이미 알려진 사실이며(Plapp 1976, Scott and Matsumura 1981), 본 실험의 결과 역시 바퀴(*B. germanica*)에 있어서도 esterase의 활성 증가가 유기인계 및 피레스로이드계 살충제 저항성에 관여한다고 생각된다.

Table 2. Comparison of esterase activity^a in the resistant and susceptible female German cockroach strains^b by spectrophotometer

Strains	Substrates	
	α -naphthyl acetate	β -naphthyl acetate
S	2.62(1.00) ^c	1.62(1.00)
Rc	6.18(2.34)	8.55(5.28)
Rp	3.88(1.48)	4.73(2.92)

^a Esterase activity was expressed as μ mole of hydrolyzed naphthyl acetate/ 98mg/ min.

^b This experiment was carried out with six generation of chlorpyrifos-selected(Rc) and permethrin-selected(Rp) strains.

^c The parenthesis means ratio of esterase activity between the resistant and susceptible(S) strains.

Esterase isozyme 비교

Agarose gel 전기영동법에 의하여 chlorpyrifos와 permethrin으로 6세대 도태한 저항성계통(Rc와 Rp)과 감수성계통간의 esterase isozyme을 검출한 바, 그림 2에서 보는 바와 같이 Est-2와 Est-3의 영동대는 Rc와 Rp계통에서 모두 감수성계통보다 뚜렷하게 검출되었으나, 감수성계통과 Rc계통에서는 뚜렷하게 검출된 Est-5 영동대는 Rp계통에서는 검출이 되지 않았다.

Esterase는 전기영동에 의하여 분리시킬 수 있으며 esterase 분리형의 계통간 차이가 저항성 기작과 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있다. 즉, Maruyama(1984)는 malathion 저항성 모기(*Culex pipiens*) 계통은 감수성계통에 비해 Est-R₁ 과 Est-R₃ 두 개의 영동대가 강한 활성을 보인 반면, temephos 저항성계통에서는 Est-R₂가 강한 활성을 나타내었고. Est-R₃ 와 Est-R₁은 비교적 낮은 활성을 보였다고 하였으며, Choi와 Kim(1986a, 1986b)은 복숭아혹진딧물에 대해 acephate 저항성계통에서는 감수성계통에서 보이지 않는 Est-2가 분리되었고, oxydemeton-methyl 저항성계통에서는 Est-2

가 감수성계통보다 훨씬 짙게 검출되었다고 보고하였다.

본 실험의 결과 chlorpyrifos 도태계통은 Est-2와 Est-3 band, permethrin 도태계통은 Est-2, Est-3 및 Est-5 band의 분리 또는 활성 증가가 저항성의 원인인 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합적으로 분석해 보면, 감수성계통보다 저항성계통에서 permethrin 도태계통보다 chlorpyrifos 도태계통에서 esterase의 활성이 높게 나타난 결과와 생물검정은 일치하였으며, Esterase- α 보다 Esterase- β 가 저항성 발현에 더 관여하는 것으로 생각된다. 또한 전기영동 실험에서 저항성에 관여하고 있는 esterase isozyme의 band가 명확하게 구별된 것으로 보아 esterase가 바퀴(*B. germanica*)의 저항성 기작에 크게 관여하여 있는 것으로 생각된다.

인용문헌

Bang, J.R., J.H. Kim & H.R. Lee. 1993. Studies on the insecticides resistance of the German cockroach(*Blattella germanica* L.) II. Resistance development and cross-resistance. Korean J. Appl. Entomol. 32(2): 129~133.

Beck, A.K. & R. Büchi. 1980. Esterase test zum nachweis der insecticide resistance bei der Hopfenblattlaus, *Phorodon humuli* Schrk. Z. angew. Ent. 89: 113~121.

Choi, S.Y. & G.H. Kim. 1986a. Studies of insecticide resistance in the green peach aphid, *Myzus persicae* Sulz(III). Acephate resistance, cross-resistance, and esterase isozyme. Korean J. Plant Prot. 25(2): 99~105.

Choi, S.Y. & G.H. Kim 1986b. Studies of insecticide resistance in the green peach aphid, *Myzus persicae* Sulz(IV). Oxydemetonmethyl resistance development, cross resistance and esterase isozymes. Korean J. Plant Prot. 25(3): 151~157.

Cochran, D.G. 1973. Inheritance and linkage of pyrethrins resistance in the German cockroach. J. Econ. Entomol. 66: 27~30.

Devonshire, A.L. 1975. Studies of the carboxylesterases of *Myzus persicae* resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. pp. 67~79 in Proceedings of the Eighth British Insec-

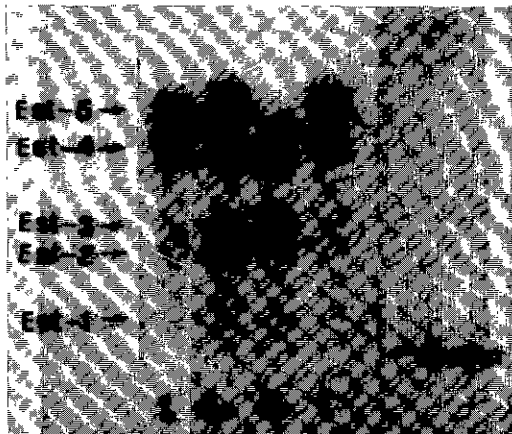


Fig. 2. Zymogram patterns of the esterase isozyme of the German cockroach, *B. germanica*, separated by agarose gel electrophoresis method.

S : Susceptible strain
 Rc : Chlorpyrifos resistant strain
 Rp : Permethrin resistant strain

- ticide and Fungicide Conference, 17th to 20th November 1975, Hotel Metropole, Brighton, England. vol. 1.-pp. 1~372. London, Br. Crop. Prot. Coun.
- Georghiou G.P. & N. Pasteur. 1978. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 71: 201~205.
- Georghiou, G.P. & N. Pasteur. 1980. Organophosphate resistance and esterase pattern in a natural population of the southern house mosquito from California. *J. Econ. Entomol.* 73: 489~492.
- Georghiou, G.P., N. Pasteur & M. Hawley. 1980. Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase- β in *Culex quinquefasciatus* from California. *J. Econ. Entomol.* 73: 301~305.
- Kim, J.H. & G.P. Georghiou. 1988. Studies on the insecticide resistance to the insect. *Res. Rep. Agr. Sci. Chungbuk Nat. Univ.* 6(2): 155~161.
- Kuwahara, M. 1982. Insensitivity of the acetylcholinesterase from the organophosphate resistant kanzawa spider mite. *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acarina: Tetranychidae), to organophosphorus and carbamate insecticides. *Appl. Ent. Zool.* 17: 486~493.
- Maruyama, Y., K. Yasutomi & A.I. Ogita. 1984. Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex pipiens*). *Insect Biochem.* 14: 181~188.
- Metcalf, R.L. 1980. Changing role of insecticides in crop protection. *Ann. Rev. Entomol.* 25: 219~256.
- Miyata, T. & T. Saito. 1976. Mechanism of malathion resistance in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Homoptera: Delphacidae). *J. Pesticide Sci.* 1: 23~29.
- Niwa, Y., T. Miyata & T. Saito. 1977. In vitro metabolism of malathion resistant and susceptible strains of houseflies, *Musca domestica* L., *J. Pesticide Sci.* 2: 151~157.
- Ohba, S. & F. Sasaki. 1968. Esterase isozyme polymorphism in *Drosophila virilis* population. *Proc. XIII Inter. Cong. Gene.* 2: 156~157.
- Oppenorth, F.J. & K. van Asperen. 1960. Allelic genes in the house fly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* 132: 298~299.
- Pasteur, N. & G.P. Georghiou. 1981. Filter paper test for rapid determination of hypenotypes with high esterase activity in organophosphate resistance mosquitoes. *Mosquito News.* 41(1): 181~183.
- Robinson, W. & J. Zhai. 1990. Pyrethroid resistance in German cockroaches. *Pest Control Technol.* 18: 26~30, 32.
- Rust, M.K. & D.A. Reiersen. 1978. Comparison of the laboratory and field efficacy of insecticides used for German cockroach control. *J. Econ. Entomol.* 71: 704~708.
- 신유향, 윤일병, 김진일. 1973. 바퀴에 관한 연구. *고려대학교 연구보.* 5: 3~53.
- Takata, H. 1979. Esterase variation in Japanese population of *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), with special reference to resistance to organophosphorus insecticides. *Appl. Ent. Zool.* 14: 245~255.
- Van Asperen, K. & F.J. Oppenorth. 1959. Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomol. Exptl. et Appl.* 2: 48~57.

(1992년 9월 19일 접수)