

배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 deltamethrin 저항성 기작에 관한 에스테라제의 역할Role of general esterases in deltamethrin resistance mechanism of diamondback moth, *Plutella xylostella* L.

김용균, 장동걸

Yonggyun Kim and Dongeol Chang

**ABSTRACT** General esterases were analysed quantitatively and qualitatively to see their role in deltamethrin resistance mechanisms of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. Selection with 0.1 g of deltamethrin in each generation induced the moth to decrease susceptibility to the insecticide and to increase esterase activities of the fourth instar larvae. Both characters were highly correlated so that the correlation coefficient ( $r$ ) between  $LD_{50}$  ( $\mu\text{g}$ ) of deltamethrin and esterase activities ( $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$ ) was 0.9918 ( $P=0.0082$ ). Nondenaturing PAGE (6%) separated 17 esterase bands from the whole body extracts of the fourth instar larvae. Deltamethrin-selected populations had fewer esterase bands than had the unselected. Four esterase bands (E3, E4, E11, and E13) were, however, specific to deltamethrin-selected populations.

**KEY WORDS** Diamondback moth, esterase, deltamethrin, resistance mechanism, electrophoresis

**초 록** 배추좀나방의 deltamethrin에 대한 약제 저항성 기작을 알기 위하여 에스테라제의 활성과 조성을 분석하였다. 0.1  $\mu\text{g}$ 의 deltamethrin으로 매 세대 선발하였을 때 선발세대의 진행에 따라 배추좀나방 4령충의 약제 감수성은 줄었고 에스테라제 활성은 증가했다. Deltamethrin으로 선발된 또는 선발되지 않은 서로 다른 배추좀나방 집단들의 약제감수성과 에스테라제 활성간에 높은 상관관을 보였으며 이들 요인들간에 상관계수는 0.9918( $P=0.0082$ )로 정상관을 보였다. 전기영동(6% gel)의 결과 17개의 에스테라제 밴드가 분리되었다. Deltamethrin에 대해 선발된 집단들은 비선발 집단에 비해 적은 숫자의 에스테라제 밴드를 보여주었다. 그러나 4개 밴드 (E3, E4, E11, E12)는 deltamethrin 선발집단에서만 나타난 밴드였다.

**검색어** 배추좀나방, 에스테라제, 살충제, 저항성기작, 전기영동

곤충의 약제에 대한 저항성 발현은 생리적, 생화학적 및 행동적 요소가 가미된 복합적인 현상이다(Georghiou & Saito 1983, Gould 1984). 수백종의 곤충이 살충제에 대한 감수성 저하를 보여 여러 약제가 많은 종의 곤충에 대해 저항성을 발현시켰고 약제 감수성 정도는 약제의 종류, 살포횟수 및 약량과 시기적 및 지역적으로 다양하다(Georghiou 1986).

배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)은 세계 각지에 걸쳐 광범위하게 분포하고 있으며 십자화과 작물의 주요 해충으로 발육기간이 짧아 응애, 진딧물과 같이 살충제에 의한 도태 기회가 많아져 살충제 저항성 발달이

빠르게 나타날 가능성이 높다. 이 해충에 대한 살충제 저항성은 1953년 Ankersmit가 DDT에 대하여 최초로 보고 하였고 이어 유기인계(Sun *et al.* 1978, Miyata *et al.* 1982, Noppun *et al.* 1984), 카바메이트계(Sun *et al.* 1978, Hama 1986), 합성피레스로이드계(Sinchaisri *et al.* 1980, Liu *et al.* 1981) 등 대부분 곤충 신경계에 작용하는 살충제와 teflubenzuron 및 chlorfluzaron과 같은 IGR계통(Perng & Sun 1987, Perng *et al.* 1988) 뿐만 아니라 *Bacillus thuringiensis*와 같은 미생물 약제에 대해서도 저항성을 보여(Talekar & Shelton 1993, Tabashnik 1994) 이 해충의 방제가 날로 심각해지고 있는

실정이다.

우리나라에서도 각 계통의 약제에 대한 저항성 발현이 조사되었고(조와 이 1994) 이러한 약제 저항성은 지역적으로 심한 변이를 보이고 있다(이 등 1993). 본 연구는 특히 배추좀나방이 피레스로이드 계통에 저항성 유발로 농민에게 방제에 어려움을 주고 있다(김 등 1990, 송 1992, 김과 추 1994)는 점을 감안하여 쉽게 피레스로이드 계통에 대한 저항성 검색장치를 개발하는 데 실용적 목표를 둔다. 본 연구는 배추좀나방의 약제 감수성과 해독효소중 에스테라제 활성 변이와의 상관관계를 파악하기 위해 약제 없이 14~16세대 실내에서 증식한 배추좀나방을 deltamethrin 약제로 누대 도태시켜 저항성 발달 수준과 이에 따른 에스테라제 활성 및 전기영동 분석을 통하여 배추좀나방의 약제 저항성 발현의 기작을 분석하였다.

**재료 및 방법**

**시험곤충**

시험곤충은 1994년 6~7월 안동시 풍산면 소재 배추밭에서 채집한 유충을 약제 처리하지 않고 안동대학교 농생물학과 곤충생리실에서 14~16세대 누대사육한 것을 사용하였다. 유충은 온도 25±1°C, 광주기 16:8h(L:D), 상대습도 40~60%의 incubator에서 배추를 먹이로 사육되었다. 성충은 10% 설탕물을 먹이로 배추잎으로 산란을 유도하였다.

**생물검정법**

Deltamethrin(1% 유제)을 아세톤에 소정 농도로 희석하여 얼음위에서 마취된 4령충의 복부 등쪽에 topical applicator로 충체당 1 µl씩 처리하였다. 처리된 유충은 5마리씩 배추잎이 있는 각 petri-dish(직경 5.5 cm)에 놓고 24시간 경과 후 사충을 구별하였다. 유충의 머리, 가슴, 배를 각각 한 번씩 막대봉으로 눌러 움직임이 없을 때를 사충으로 하였다. Finney (1971)의 probit분석법에 의해 반수치사농도(LD<sub>50</sub>)를 personal computer를 이용하여 산출하였다. 약제선발집단은 매세대 0.1 µg deltamethrin으로 4령충에 국부처리하여 선발되었다.

**에스테라제 및 총단백질 측정**

4령 유충을 200 µl의 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)와 함께 microcentrifuge tube (1.5 ml)에 넣어 homo-

genizer로 간다. 분쇄후 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 얻어 다시 그 buffer로 10배 희석하여 분석 시료로 이용하였다. 에스테라제 활성측정은 Townson(1972)방법을 변형시킨 방법으로 측정하였다. 반응용액은 2 µl의 50 mM p-nitrophenyl acetate, 988 µl의 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8), 10 µl의 시료로 구성된다. 표준용액으로 10~120 M의 p-nitrophenol을 이용하였다. 10분간격으로 400 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 시료내의 단백질량은 Bradford(1976) 방법으로 각 시료당 3반복으로 측정하였으며 표준용액으로 bovine serum albumin을 이용하였다.

**전기영동분석**

배추좀나방 4령을 100 µl의 grinding buffer(40% sucrose, 0.1% bromophenol, 0.04% basic fuchsin, 1.54% dithiothreitol, 0.372% EDTA in 0.125 mM Tris-HCl, pH 8.3)에서 homogenizer로 간 다음 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 0.05 M Tris-glycine buffer(pH 8.3) system의 6% non-denaturing polyacrylamide gel(Davis 1961)에서 10 µl의 시료중에 단백질이 분리되었다. 전기영동은 300 V 일정전압에서 tracking dye가 바닥까지 도달할 때까지 이루어졌다. 에스테라제 염색은 한 등(1995)의 방법에 따라 fast blue RR salt-용액을 이용하였다. 염색후 gel은 50% methanol, 10% acetic acid에서 고정되었다.

**결과 및 고찰**

실내에서 14~16세대 동안 어떠한 살충제에도 노출 없이 누대사육한 배추좀나방은 deltamethrin 약제에 대해 0.44(S1')와 0.66(S2') µg의 낮은 반수치사량을 보였다(Table 1). 반면 deltamethrin 약제에 대하여 선발된 집단(R1'과 R2')은 실내에서 누대로 증식된 세대(S1'과 S2')보다도 반수치사량이 높게 나타났다. 선발된 집단중에서는 1세대 보다도 2세대에서 훨씬 높은 감수성 저하를 나타냈다. 불과 1, 2세대만에 크게 증가된 약제 저항능력은 일반적으로 피레스로이드계 살충제가 타 유형의 살충제에 비하여 저항성 발달이 빠르다는 보고(Noppun *et al.* 1986)와 배추좀나방의 빠른 저항성 획득 현상(Motoyama *et al.* 1992)이라 하겠다.

에스테라제 활성은 비선발 집단(S1'과 S2')에 비해 약제로 선발된 집단(R1'과 R2')에서 높게 나타났고

선발 2세대가 1세대보다 훨씬 높게 나타났다(Table 2). 이러한 현상은 집단간 deltamethrin에 대한 약제 감수성 정도 차이(Table 1)와 유사한 경향으로 집단간 반수치사량과 에스테라제 활성과 매우 높은 정상관 ( $r=0.9918, P=0.0082$ )을 보여준다. 이들 두 변수간에 회귀직선은 다음과 같다.

$$LD_{50}(\mu g) = -0.153 + 0.062 \times EST(\mu M/min/\mu g), R^2 = 0.9837$$

**Table 1. Toxicities of deltamethrin against fourth instar larvae of deltamethrin-unselected and selected populations in *P. xylostella***

Populations <sup>1</sup>	N	LD <sub>50</sub> (μg)	95% FL	Slope ± SE	RR <sup>2</sup>
S1	140	0.44	0.15- 2.94	0.79 ± 0.23	1.00
S2	140	0.68	0.22-22.04	0.84 ± 0.32	1.55
R1	312	1.78	1.29- 2.87	1.88 ± 0.37	4.05
R2	326	4.93	3.12- 9.09	1.15 ± 0.23	11.20

<sup>1</sup> 'S1 and S2' represent the first and the second generations from the parental susceptible strain which had been reared in laboratory for 14~16 generations without any insecticide treatment.

<sup>2</sup> 'RR' represents a relative ratio of LD<sub>50</sub> of a strain to that of 'S1' strain.

여기서 EST는 에스테라제의 활성

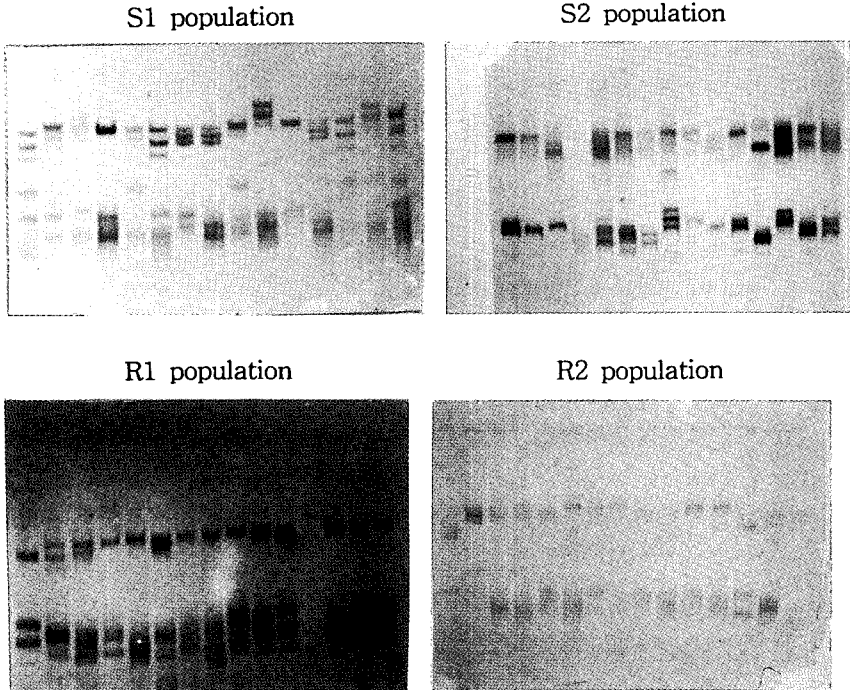
에스테라제는 일반적으로 유기인계 살충제에 중요한 해독효소(Georghiou & Saito 1983)로서 배추좀나방에서는 malathion에 대한 에스테라제의 활성의 증가가 보고(Doichuangam & Thorhill 1989) 된 바 있다. 하지만 본 실험에서 사용된 약제는 피레스로이드 계통의 약제로 에스테라제와의 높은 연관성은 매우 흥미로운

**Table 2. Esterase (EST) activities in fourth instar larvae of deltamethrin-unselected and selected populations in *P. xylostella***

Populations <sup>1</sup>	N	EST activities (μM/min/μg) (mean ± SE)
S1	25	12.30 ± 4.11a <sup>2</sup>
S2	13	15.77 ± 2.29a
R1	25	24.71 ± 5.26a
R2	25	82.32 ± 16.91b

<sup>1</sup> 'S1 and S2' represent the first and the second generations from the parental susceptible strain which had been reared in laboratory for 14~16 generations without any insecticide treatment.

<sup>2</sup> Different letters followed by means were significantly different at  $\alpha=0.05$  (LSD test).



**Fig. 1. Electrophoretic patterns of fourth instar larval esterases in four different populations of *P. xylostella*.**

것이라 하겠다. 피레스로이드에 대한 배추좀나방의 저항성기작은 피부투과성저하(Noppun *et al.* 1989)와 microsomal P<sub>450</sub> monooxygenase활성증가(Yao *et al.* 1988) 등으로 보고된 바 있다. 본 실험에서 에스테라제 활성과 deltamethrin 감수성과의 높은 정상관은 deltamethrin 화학구조내에 에스테르결합이 에스테라제의 작용점으로 제공될 수 있다는 점과 관련있을 것으로 사료된다.

에스테라제에 대한 배추좀나방의 반응은 전기영동상에서 분리된 에스테라제 변이에서도 선발집단과 비선발집단간의 차이에서도 알 수 있다(Fig. 1). 에스테라제는 전기영동상에서 모두 17개의 밴드가 분리되었다(Table 3). 대부분의 각 에스테라제 밴드는 집단간 변이를 나타냈다. 약제 감수성과 에스테라제 밴드와 비교하여 보면 'S1'이 14개, 'S2'가 13개, 'R1'이 13개, 'R2'이 8개로 반수치사능도가 높은 집단일수록 에스테라제 밴드 수는 감소하였다. 즉 선발집단일수록 에스테라제 변이가 줄었다. 그러나 4개 밴드(E1, E2, E11, E13)는

저항성 세대에 특이하게 또는 주로 나타났다. 일반적으로 한 집단내에 존재하는 도태압은 차세대에서 유전적 변이를 감소시킨다(Falconer 1981)는 보고와 같이 본 실험에서 전기영동 결과는 deltamethrin 선발에 따른 에스테라제 변이중 특정 형질들이 도태 또는 선발됨을 나타낸다고 하겠다.

본 실험의 결과는 배추좀나방의 선발 및 비선발집단간 deltamethrin 감수성과 에스테라제 효소활성간에 높은 상관에서 보듯 deltamethrin 약제에 대한 배추좀나방의 약제 저항성은 에스테라제의 활성증가와 관련있다는 것을 보여 주었다. 이 결과는 배추좀나방의 약제 감수성 정도를 단순히 효소활력측정으로 추정할 수 있다는 응용적인 면에서 의의가 있다. 특정 집단의 약제 저항성집단의 양적 파악은 추후의 그 집단의 약제 감수성정도를 예측하는 데 매우 중요하다(Georghiou 1986). 약제에 대한 정확하고 빠른 저항성 해충의 판별법은 해충의 저항성관리(Roush & Tabashnik 1990)에 매우 중요한 요소로서 저항성 개체군의 변동을 파악한

**Table 3. Esterase (EST) band frequencies in fourth instar larvae of deltamethrin-unselected and selected populations in *P. xylostella***

EST #	Rm	EST frequencies of populations <sup>1</sup>				$\chi^2(df=3)^2$	P	$\chi^2(df=1)^3$	P
		S1(n=15)	S2(n=15)	R1(n=15)	R2(n=15)				
E1	0.18	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	1.000	0.00	1.000
E2	0.21	1.00	1.00	1.00	0.87	6.21	0.100	2.07	0.150
E3	0.39	0.07	0.00	0.00	0.87	45.10	0.000	13.42	0.000
E4	0.40	0.00	0.00	0.00	0.53	27.70	0.000	9.23	0.002
E5	0.42	0.13	0.13	0.20	0.53	8.80	0.032	4.36	0.037
E6	0.44	0.27	0.60	0.00	0.27	13.38	0.004	6.65	0.010
E7	0.47	1.00	0.73	0.87	0.07	34.80	0.000	10.08	0.001
E8	0.49	0.53	0.40	0.00	0.00	19.01	0.000	18.26	0.000
E9	0.51	0.67	0.07	0.40	0.00	18.73	0.000	2.86	0.091
E10	0.54	0.20	0.27	0.27	0.00	4.79	0.190	24.16	0.000
E11	0.56	0.00	0.00	0.07	0.00	22.09	0.000	1.02	0.313
E12	0.63	0.40	0.27	0.27	1.00	15.44	0.001	5.41	0.020
E13	0.69	0.00	0.00	0.27	0.00	16.36	0.000	3.88	0.050
E14	0.71	0.60	0.60	0.33	0.00	24.98	0.000	11.92	0.001
E15	0.73	0.27	0.60	0.60	0.00	18.10	0.000	3.23	0.073
E16	0.76	0.73	0.80	0.67	0.00	3.05	0.380	11.38	0.001
E17	0.83	0.13	0.53	0.60	0.00	12.60	0.005	0.08	0.781

<sup>1</sup> 'S1 and S2' represent the first and the second generations from the parental susceptible strain which had been reared in laboratory for 14~16 generations without any insecticide treatment.

'R1 and R2' represent the first and the second generations selected in each generation with 0.1 µg deltamethrin from the parental susceptible strain.

<sup>2</sup> Chi-square test for variation of the EST frequencies among four populations.

<sup>3</sup> Chi-square test for variation of the EST frequencies between unselected ('S1' and 'S2') and selected ('R1' and 'R2') populations.

는 데 매우 유용하다. Deltamethrin에 대한 배추좀나방의 총괄적 저항성기작 규명을 위해서 다른 해독효소들(microsomal oxygenases와 hydrolases 등)의 활력조사와 피부투과성 및 전기생리학적 연구가 뒷받침되어야겠다.

## 사 사

본 논문에 대해 아낌없는 충고와 교정을 하여준 농촌진흥청 작물보호부 곤충생리실에 조점래연구사에게 감사를 드린다.

## 인용문헌

- Ankersmit, G.W. 1953. DDT-Resistance in *Plutella maculipennis* (Curt). *Bull. Ent. Res.* **44**: 421-425.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye finding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- 조영식, 이승찬. 1994. 단제도태에 의한 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 약제저항성 발달과 교차저항성에 관한 연구. *한용곤지*. **33**: 242-250.
- Davis, B. J. 1964. Dis. electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Doichuannam, K. & R. A. Thorhill. 1989. The role of non-specific esterases in insecticide resistance to malathion in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93**: 81-87.
- Falconer, D. S. 1981. Introduction to quantitative genetics (2nd Ed.). Longman Scientific & Technical, John Wiley & Sons.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge Univ. Press. Cambridge England. pp. 19-47.
- Georghiou, G. P. 1986. The magnitude of the resistance problem, pp. 14-43. In *Peswticide resistance: strategies and tactics for management*. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Georghiou, G. P. & Saito, T. 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum Press. New York.
- Gould, F. 1984. Role of bahavior in the evolution of insect adaptation to insecticide and resistant host plants. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **30**: 34-41.
- Hama, H. 1986. Development of pyrethroid resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* Linne (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Ent. Zool.* **22**: 166-175.
- 한혜림, 한상찬, 김용균. 1995. 사과뿌리썩이선충의 침입과 기주의 해부학적 및 생화학적 변화에 관한 연구. *한용곤지*. **34**: 112-119.
- 김길하, 서영식, 이준호, 조광연. 1990. 배추좀나방의 fenvalerate에 대한 저항성 발달과 교차저항성. *한용곤지*. **29**: 194-200.
- 김용균, 추 일. 1994. 안동지역의 농업현황과 U.R.대책. 안동대학교 농업과학연구소논문집. **1**: 23-31.
- 이승찬, 조영식, 김도익. 1993. 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 독성시험 방법 비교와 지역별 약제 저항성에 관한연구. *한용곤지* **32**: 323-329.
- Liu, M. Y., J. Tzeng & C. N. Sun. 1981. Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. *J. Econ. Entomol.* **74**: 393-396.
- Miyata T. H. Kawai & T. Satio. 1982. Insecticide resistance in the diamondback moth., *Plutella xylostella* L (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Ent. Zool.* **17**: 539-542.
- Noppun, V. T., T. Miyata & T. Saito. 1984. Decrease in insecticide resistance in the dimaondback moth, *Plutella xylostella* on release from selection pressure. *Appl. Ent. Zool.* **19**: 531-533.
- Noppun, V., T. Saito & T. Miyata. 1989. Cuticular penetration of esfvalerate in fenvalerate-resistant and susceptible strains of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**: 83-87.
- Perng, F. S., M. C. Yao, C. F. Hung & C. N. Sun. 1988. Teflubenzuron resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* **81**: 277-282.
- Perng, F. S. & C. N. Sun. 1987. Susceptibility of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to conventional insecticides to chitin synthesis inhibitors. *J. Econ. Entomol.* **80**: 29-31.
- Roush, R. T. & B. E. Tabashnik. 1990. Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall,
- Sinchaisri, N., T. Apajirakul & V. Noppun. 1980. Evidence of resistance to insecticides of some pests in Thiland. Abstr. XVI Int. Congr. Entomol., Aug. 3-9, 1980 (Kyoto), p. 411.
- 송승석. 1992. 피레스로이드제에 대한 배추좀나방의 포장약제저항성의 변동. *한용곤지*. **31**: 334-341.
- Talekar, N. S. & A. M. Shelton 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* **38**: 275-301.
- Townson, H. 1972. Esterase polymorphism in *Aedes ae-*

*gypti*: the genetics and Km values of electrophoretically heterogenous forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **66**: 255-266.

Yao, M. G., C. F. Hung & C. N. Sun. 1988. Fenvalerate

resistance and aldrin epoxidation in larvae of the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**: 272-278.

(1995년 11월 10일 접수)