

파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 살충제 감수성 진단장치모형

Diagnostic Device Model for Insecticide Susceptibilities of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)

김용균 · 이준익 · 강성영 · 한상찬

Yonggyun Kim, Joonik Lee, Sungyoung Kang and Sangchan Han

Abstract – Simple diagnostic kits for monitoring insecticide susceptibility of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) were developed and applied to the field populations. The operation of the kits was based on the correlations between enzyme activities of esterase (EST) and acetylcholinesterase (AChE) and the insecticide susceptibilities. Four different kinds of diagnostic kits (ED, EM, AD, and AM) were designed and classified by diagnostic enzymes (E for esterases and A for acetylcholinesterase) and inhibitors (D for dichlorvos and M for monocrotophos). Diagnostic inhibitor concentrations were 1 mM for ED, 10 mM for EM, 100 mM for AD, and 100 mM for AM. Resistant larvae which were not inhibited by the diagnostic amounts of insecticides developed positive staining (red color), but susceptibles showed negative (no color). An insect was used for both EST and AChE diagnostic kits, but different in their samples: hemolymph for EST and the head for AChE. These four diagnostic kits were applied to 11 different populations which showed variations of insecticide susceptibilities. Four kits were different in the capability discriminating the insecticide susceptibilities according to insecticides: ED to bifenthrin, AD to methomyl, and ED and AM to chlorpyrifos-methyl. These diagnostic devices can be used for insecticide-resistance management program for this insect pest. It also provide a technical guide to insect pest management for farmers, directors, and researchers.

Key Words – Diagnostic kit, *Spodoptera exigua*, Acetylcholinesterase, Esterase

초 록 - 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))의 살충제 감수성을 판별할 수 있는 간편한 진단 장치가 개발되어 야외 집단을 대상으로 판별능력을 시험했다. 이 진단장치의 기본설계원리는 에스테라제와 아세틸콜린에스테라제의 효소활력이 파밤나방의 살충제 감수성과 밀접한 관련성이 있음을 이용하였다. 네가지 형태의 진단장치 (ED, EM, AD 및 AM)가 고안되었고 판별효소 (E-에스테라제, A-아세틸콜린에스테라제)와 억제제 (D-dichlorvos, M-monocrotophos)의 종류에 따라 분류되었다. 판별억제제의 농도는 각각 ED는 1 mM, EM는 10 mM, AD는 100 mM 및 AM는 100 mM이었다. 억제되지 않은 저항성 개체는 두 효소 모두에서 적색을 보이나 억제된 감수성 개체의 시료는 무색으로 나타난다. 한 개체의 파밤나방으로부터 채취된 혈액과 머리시료가 네 가지 판별장치 검색장치에 한꺼번에 이용되었다. 검색장치의 실증검증을 위해 11개의 실내와 야외 집단들을 대상으로 살충제 감수성과 검색장치 판별력을 비교하였다. 이들 집단은 파밤나방 방제에 이용되고 있는 3가지 살충제들 (bifenthrin, methomyl, chlorpyrifos-methyl)에 대해 네 종류의 판별장치는 상이한 약제 감수성을 보였다. ED는 bifenthrin, AD는 methomyl 및 ED와 AM은 chlorpyrifos-methyl에 대하여 약제 감수성변이를 판별하는 데는 각각 효과적이었다. 이상의 본 연구에서 개발된 검색장치는 간편하고 신속하게 특정 집단의 약제 저항성개체의 빈도수를 알려줌으로 효과적인 방제방법을 선정하는데 이용될 수 있다. 특히, 각 지역의 지도소에서 이 검색장치를 이용할 경우 객

관적이고 합리적인 처방을 현장 농민에게 지도할 수 있겠다.

검색어 - 진단장치, 파밤나방, 아세틸콜린에스테라제, 에스테라제

해충의 살충제에 대한 약제저항성은 농업 경영에 막대한 경제적 피해를 줄 뿐만 아니라 효과적 방제를 위해 고농도의 약제 살포로 인해 환경에 위협을 주고 있다. 그러나 현재의 해충방제 기술로서는 해충의 화학적 방제가 불가피함으로 대상 해충에 대한 저항성 발달을 줄이거나, 억제하거나 또는 오히려 감수성을 증가시키려는 의도의 저항성관리 개념이 도입되었다 (Georghiou and Saito, 1983; Roush and Tabashnik, 1990).

우리나라에서 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 이 1988년 이후 남부지역 뿐만 아니라 전국에 걸쳐 대발생하기 시작했다. 이 해충은 넓은 기주범위로 대부분의 발작물에 큰 피해를 주고 있다 (Gho *et al.*, 1991b). 그러나 파밤나방 고유의 약제 저항능력 및 무분별한 살충제 남용으로 기존약제에 대부분 저항성을 보임으로 방제에 큰 어려움을 주고 있다. 그러나 이 약제 저항능력은 집단간 큰 차이를 나타내어 서로 다른 기주식물 및 지역적, 시기적인 요소가 약제 저항능력에 있어 변이 요소로 작용하게 되었다 (Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). 이러한 집단간 살충제 감수성 변이는 에스테라제와 아세틸콜린에스테라제와 같은 효소들의 활성 변이와 매우 높은 상관성을 보였다 (Kim *et al.*, 1997). 일반적으로 이 두 효소를 이용한 타 해충들의 약제 저항능력을 판별할 수 있는 간편한 장치가 개발되어졌다 (Rees *et al.*, 1985; Pasteur and Georghiou, 1989; Dary *et al.*, 1991).

본 연구는 특정 지역의 파밤나방 약제 저항능력을 빠르고 정확하게 파악하는 것이 이 해충의 효과적 방제에 필요함으로 현장에서 간편하고 신속하게 대상집단의 약제감수성 능력을 판정할 수 있는 진단장치를 개발하였다.

재료 및 방법

시험곤충

안동, 의성, 군위, 경산, 진도, 해남, 보성 및 순천 파밤나방 집단들이 이용되었다. 안동집단은 안동시 송천동 파밭에서 채집한 파밤나방을 Goh *et al.* (1991a)의 방법을 이용하여 인공사료로 실내에서 약 20세대 누대 사육된 집단이었다. 경산집단은 수원시 농촌진흥청 농업과학기술원 곤충과 사육실에서 약 25세대 누대 사육된 집단으로 경산근교 파밭에서 채집된 파밤나방의 실내 정착집단을 이용하였다. 이외의 집단들은 각

지역의 파밭에서 채집한 야외집단들중에 5령충은 검색장치에 바로 사용되었으며 생물검정을 위해서 많은 수를 확보하기 위해 인공사료로 사육한 후 다음 세대를 얻어 이용하였다.

살충제 생물검정

파밤나방 유충 3령충을 실내온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 각 농도별 10마리씩 미리 사레에 넣어 얼음판위에 올려서 마취시킨 후 국부처리기로 $1 \mu\text{l}$ 씩 복부등쪽에 처리하였다. 처리후 48시간 경과시 막대봉으로 머리, 가슴, 배를 각각 한번씩 눌러 움직이지 않으면 사충으로 정하였다.

검색장치 제조 및 판별법

네 가지 형태의 진단장치 (ED, EM, AD 및 AM)가 고안되었고 판별효소 (E-에스테라제, A-아세틸콜린에스테라제)와 억제제 (D-dichlorvos, M-monocrotophos)의 종류에 따라 분류되었다. 검색장치의 제조와 판별 방법은 다음과 같다;

1. 장치모형은 일반 유리슬라이드 (가로 $1.5 \text{ cm} \times$ 세로 8 cm)위에 억제제가 들어있는 정사각형 판별여과지 (가로 $1 \text{ cm} \times$ 세로 1 cm)를 4개까지 붙혀 제작되었다. 색깔반응의 대조를 이루기 위해 같은 크기의 무처리된 대조여과지 슬라이드도 준비했다. 판별억제제의 농도는 각각 ED는 1 mM , EM은 10 mM , AD는 100 mM 및 AM은 100 mM 이었다.

2. 파밤나방 개체 (5령충)로부터 채취되는 혈액시료와 머리시료가 각각 에스테라제와 아세틸콜린에스테라제 진단장치에 이용되었다. 혈액시료는 응고를 막기 위해 채취량을 기준으로 1/3 부피의 10 mM phenylthiourea를 첨가하였다. 다시 이 혈액시료를 10배 희석하여 판별 시료로 이용하였다. 머리시료는 5령충 머리 각각을 96well microplate에 넣고 $50 \mu\text{l}$ 의 0.1 M 인산 완충용액 (pH 7.0)을 분주한 후 끝이 둥근 막대로 분쇄하여 상등액이 판별 시료로 이용되었다.

3. 준비된 시료를 $10 \mu\text{l}$ 씩 판별여과지에 옮겨놓은 후 10분간 실내온도에서 억제반응을 시켰다. 잔류 효소의 색깔반응을 나타내기 위해 에스테라제 진단장치는 Van Asperen (1962) 방법, 아세틸콜린에스테라제 진단장치는 Karnovsky and Roots (1964) 방법을 각각 이용하였다.

4. 진단시각은 염색처리 2시간후에 같은 시료중 판별여과지와 대조여과지의 색깔차이에 의해 억제 유무

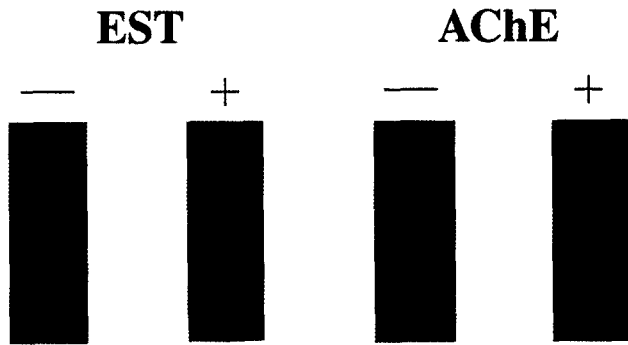


Fig. 1. Examples for esterase (EST) and acetylcholinesterase (AChE) diagnostic kits which discriminated between susceptible (-) and resistant (+) *S. exigua*.

가 결정되어졌다. 즉 억제이 이루어지면 색깔을 보이지 않고 억제가 일어나지 않으면 에스테라제 경우 붉은색, 아세틸콜린에스테라제 경우 갈색을 나타냈다 (Fig. 1).

통계분석

살충제의 감수성을 수치화하기 위해 Raymond (1985)의 probit분석법에 의해 반수치사농도(LD₅₀)가 personal computer를 이용하여 산출되었다. 결정된 반수치사농도와 판별된 저항성개체빈도와의 상관분석 및 회귀분석은 빈도변수를 arcsine transformation 후 SAS (SAS Institute, 1988)의 PROC CORR과 PROC REG을 통해 각각 분석되었다.

결과 및 고찰

네 가지 파밤나방 살충제 저항성 진단장치 모형들 (ED, EM, AD 및 AM)의 실증 효과를 얻기 위해 다양한 지역의 야외 채집충을 대상으로 검색장치결과와 실내 사육후 생물 검정결과를 대조하여 이 두 관계의 상관계수를 분석하였다.

서로 다른 11개의 실내 및 야외 파밤나방집단들은 동일 살충제에 대해서 감수성변이를 보였다 (Table 1). Bifenthrin의 경우 8.7배, methomyl의 경우 9.2배, chlorpyrifos-methyl의 경우 12.0배의 집단간 최대 살충제 감수성변이를 나타냈다. 군위집단의 경우 조사된 세 가지 살충제 모두에 대해 거의 최대 반수치사약량을 나타내서 야외 집단이 기존 살충제에 대해 복합적으로 저항성을 가짐을 나타냈다. 이러한 파밤나방의 집단간 살충제 감수성 변이는 이 해충 고유의 약제 저항 능력과 각 야외집단 특유의 기존에 살충제 처리를 받은 횟수와 종류에 기인된다 (Kim *et al.*, 1997)고 여겨진다.

Table 1. Insecticide toxicities to the third instar larvae of the field *S. exigua* by topical application

Population (Subpopulation)	n	LD ₅₀ µg (95% confidence interval)		
		bifenthrin	methomyl	chlorpyrifos-methyl
Andong (laboratory)	300	0.21 (0.15~0.26)	1.62 (1.12~2.44)	-
Andong (Field)	298	0.20 (0.12~0.33)	1.74 (1.26~2.31)	-
Kyungsan	442	0.31 (0.19~0.51)	1.40 (0.66~2.24)	12.84 (7.13~21.23)
Koonwi	450	0.52 (0.38~0.81)	2.51 (1.76~4.24)	40.39 (21.45~72.16)
Jindo (Kokoon)	450	0.06 (0.00~0.14)	1.06 (0.51~2.15)	6.72 (2.22~10.73)
Jindo (Koonnae)	290	0.32 (0.12~0.96)	0.63 (0.30~1.45)	-
Bosung (Hoichun-1) ¹	440	0.23 (0.16~0.31)	3.39 (2.37~6.16)	8.52 (4.99~11.83)
Bosung (Hoichun-2)	433	0.21 (0.12~0.32)	1.03 (0.58~1.62)	9.33 (6.37~12.12)
Bosung (Hwasung)	265	-	0.37 (0.19~0.71)	3.36 (1.63~6.61)
Haenam (Songji)	450	0.12 (0.06~0.18)	0.81 (0.41~1.26)	8.53 (5.62~11.12)
Haenam (Hwachun)	280	-	1.24 (0.69~2.62)	6.59 (3.37~11.76)

¹ Hoichun 1 and 2 populations were collected from weeds and welsh onion, respectively.

네 가지 파밤나방 살충제 저항성 진단장치로 상기의 집단들을 검색했다 (Table 2). 이 검색 결과를 살충제 생물검정 결과의 반수치사약량과의 상관관계를 조사하였다 (Table 3). Bifenthrin에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 ED 검색장치가 효과적이었다. Methomyl에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 AD 검색장치가 효과적이었다. Chlorpyrifos-methyl에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 ED 검색장치와 AM 검색장치가 효과적이었다. 일반적으로 카바메이트 (methomyl)나 유기인계 (chlorpyrifos-methyl)약제는 작용점이 아세틸콜린에스테라제이고 해독효소인 에스테라제와 높은 상관관계를 가진다 (Roush and Tabashnik, 1990). 반면에 피레스로이드의 주요 작용점은 아세틸콜린에스테라제가 아니나 에스테라제의 분해작용하에 있다 (Soderlund and Bloomquist, 1990). 즉 피레스로이드 약제에 대해서는 에스테라제 판별장치가 유리했고

Table 2. Frequencies of insecticide-resistant larvae among the field *S. exigua* populations by four different diagnostic kits¹

Population (Subpopulation)	n	Frequencies of insecticide-resistant larvae (%)			
		ED	EM	AD	AM
Andong (laboratory)	80	20	37	70	43
Andong (Field)	60	-	40	50	70
Kyungsan	80	50	87	80	82
Koonwi	80	60	67	97	97
Jindo (Kokoon)	60	-	60	0	78
Jindo (Koonnae)	60	-	40	10	70
Bosung (Hoichun-1)	80	14	75	70	50
Bosung (Hwasung)	80	10	20	10	16
Haenam (Songji)	80	20	60	83	50
Haenam (Hwachun)	80	17	50	60	40

¹ ED : esterase diagnostic kit using 1 mM dichlorvos.
EM : esterase diagnostic kit using 10 mM monocrotophos.
AD : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100 mM dichlorvos.
AM : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100 mM monocrotophos.

유기인제나 카바메이트 약제에 대해서는 두 효소 모두 높은 판별능력을 보인 것으로 이러한 약제와 효소 간의 상호 관계성에 기인된다고 사려된다.

이상의 유망한 진단장치 모형들의 진단결과와 실제적으로 나타났던 파밤나방의 약제 감수성 정도를 일반 회귀분석하였다 (Table 4). 본 회귀방정식은 진단결과를 대상 집단에 대한 특정 살충제의 반수치사약량을 70~80%의 신뢰성으로 제시해 주는 의미를 담고 있다. 특히 집단간 파밤나방의 상대적 약제감수성을 판별하는 데 더 큰 의미를 갖겠다.

이상의 본 연구에서 개발된 검색장치는 간편하고 신속하게 특정 집단의 약제 저항성개체의 빈도수를 알려줌으로 효과적인 방제방법을 선정하는 데 이용될 수 있다. 우선 시료곤충이 정확하고 효율적으로 이용되기 위해서 유충의 영기는 포장에서 가장 잘 눈에 띄는 5령충으로 정하였고 에스테라제판별은 혈액시료, 아세틸콜린에스테라제는 머리시료를 이용함으로

Table 3. Correlation coefficients between the insecticide susceptibilities and the diagnostic kit values (arcsine transformed) of the field *S. exigua* populations

Diagnostic kits ¹	LD ₅₀ of the insecticides		
	methomyl	bifenthrin	chlorpyrifos-methyl
ED	0.2684 (0.5606) ²	0.8599 (0.0616)	0.9375 (0.0057)
EM	0.5304 (0.1147)	0.2102 (0.6173)	0.5942 (0.1595)
AD	0.5543 (0.0963)	0.5344 (0.1724)	0.7194 (0.0684)
AM	0.3464 (0.3268)	0.6427 (0.0857)	0.8709 (0.0107)

¹ ED : esterase diagnostic kit using 1 mM dichlorvos.
EM : esterase diagnostic kit using 10 mM monocrotophos.
AD : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100 mM dichlorvos.
AM : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100 mM monocrotophos.
² P value indicating the probability of the type I error of the correlation coefficient.

Table 4. Regression between the insecticide susceptibilities (LC₅₀) and the values of the promising diagnostic kits in the field *S. exigua* populations

Diagnostic kits ¹	Insecticides	Regressions	R ²
ED	chlorpyrifos-methyl	LC ₅₀ = -2.97 + 23.89 × DV ²	0.8789
ED	bifenthrin	LC ₅₀ = -0.07 + 0.58 × DV	0.7394
AM	chlorpyrifos-methyl	LC ₅₀ = -3.68 + 14.76 × DV	0.7585

¹ ED : esterase diagnostic kit using 1 mM dichlorvos.
EM : esterase diagnostic kit using 10 mM monocrotophos.
AD : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100 mM dichlorvos.
² DV represents the diagnostic value after arcsine transformation.

한 개의 파밤나방이 두 가지 진단장치에 사용이 가능하도록 하였다.

합리적 저항성 개체군 관리측면에서 볼 때 개체수 준에서 대상 해충의 생화학적 살충제 저항성 판별은 집단별 해충종의 약제 감수성능력을 현장에서 즉시 제공하고 앞으로 그 집단의 살충제 감수성변천을 예측한다는 점에서 매우 중요하다 (Brown and Brogdon, 1987; Ahn *et al.*, 1991). 특히, 본 연구에서 개발된 파밤나방의 살충제 감수성 판별장치는 각 지역의 지도소에서 이 검색장치를 이용할 경우 객관적이고 합리적인 처방을 현장 농민에게 지도할 수 있겠다.

사 사

본 연구를 수행하는 데 야외 파밤나방을 채집을 도와준 안동대학교 곤충생리실 김남규에게 감사를 드립니다. 이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과입니다.

인 용 문 헌

- Ahn, Y.J., H.M. Park and S.C. Lee. 1991. Insecticide resistance of insect pests. In Applied entomology collections. pp. 430~461. Alumni of Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon.
- Brown, T.M. and W.C. Brogdon. 1987. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 145~62.
- Dary, O., G.P. Georghiou, E. Parsons and N. Pasteur. 1991. Dot-blot test for identification of insecticide-resistant acetylcholinesterase in single insects. *J. Econ. Entomol.* 84: 28~33.
- Georghiou, G.P. and Saito, T. 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum Press. NY.
- Gho, H.K., S.G. Lee, B.P. Lee, K.M. Choi and J.H. Kim. 1991a. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. *Korean J. Appl. Entomol.* 29: 180~183.
- Gho, H.G., J.D. Park, Y.M. Choi, K.M. Choi and I.S. Park. 1991b. The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) and its occurrence. *Korean J. Appl. Entomol.* 30: 111~116.
- Karnovsky, M.J. and L. Roots. 1964. A "direct coloring" thiochloine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 219~221.
- Kim, Y., J. Lee, S. Kang and S. Han. 1997. Variation in insecticide susceptibilities of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner): esterase and acetylcholinesterase activities. *Korean J. Appl. Entomol.* 36: 172~178.
- Kim, Y., J. Lee, S. Kang and S. Han. 1998. Age variation in insecticide susceptibility and biochemical changes of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). *J. Asia-Pacific Entomol.* 1: 109~113.
- Pasteur, N. and G.P. Georghiou. 1989. Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 347~353.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORS-TOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol.* 22: 117~121.
- Roush, R.T. and B.E. Tabashnik. 1990. Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, NY.
- Rees, A.T., W.N. Field and J.M. Hitchen. 1985. A simple method of identifying organophosphate insecticide resistance in adults of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1: 23~27.
- SAS Institute, 1988. SAS/STAT user's guide, Release 6.03, Ed. Cary, N.C.
- Soderlund, D.M. and J.R. Bloomquist. 1990. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In Pesticide resistance in arthropods (Eds. Roush, R.T. & B.E. Tabashnik), pp. 58~90. Chapman and Hall, NY.
- Van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8: 401~416.

(1998년 4월 27일 접수, 1999년 2월 25일 수리)