

담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에서 benzoylphenyl urea계의 신규살충제 DBI-1015 및 DBI-3204의 키틴합성 저해 효과

송철* · 신옥균 · 조광연

한국화학연구소 농약활성연구팀

요약 : 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에서 [14 C] 표지된 *N*-acetyl glucosamine, UDP-*N*-acetylglucosamine을 이용하여 신규살충제 DBI-1015와 DBI-3204의 살충 mechanism을 조사하였다. 담배거세미나방의 표피에 incorporation 되어진 방사능의 양은 신규살충제의 농도에 따라 함수관계를 나타내었다. *In vivo* 실험에서 [14 C] *N*-acetylglucosamine에 대한 DBI-1015, DBI-3204와 diflubenzuron의 I_{50} (ppm)값은 각각 0.57, 0.89, 0.26 ppm을 나타내었으며, [14 C] UDP-*N*-acetylglucosamine의 I_{50} (ppm)값은 각각 0.99, 0.53, 0.45 ppm을 나타내었다. 표피절편을 이용한 *in vitro* 실험에서 표피에 incorporation된 [14 C] *N*-acetylglucosamine과 [14 C] UDP-*N*-acetylglucosamine의 양은 적었지만, 2 μ M 농도에서 무처리구에 비해 40~60% 억제되었다.(2000년 5월 4일 접수, 2000년 6월 23일 수리)

Key words : Insecticide, chitin precursor, *N*-acetylglucosamine, UDP-*N*-acetylglucosamine, diflubenzuron.

서론

Chitin은 곤충, 거미, 새우, 게 등 절족동물의 외골격을 이루는 물질이며 (Neville, 1975) 곰팡이 등의 세포벽의 주요 구성원이다(Muzzarelli, 1977). 곤충의 chitin은 *N*-acetylglucosamine 단위체들이 β -1,4 결합으로 이루어진 긴 사슬의 탄수화물로서 원표피층 건물중의 30~50%를 차지한다(Retnakaran 등, 1985). 곤충의 탈피는 apolysis 과정을 거친 후에 낡은 표피를 벗어버리고 새로운 표피가 형성된다(Jenkin and Hinton, 1966).

Chitin은 glucose로부터 생합성되는데 인산화된 sugar는 aminated 되고 acetylglucosamine-6-phosphate로 acetyl화된다. 이 amino sugar는 UDP(uridine diphosphate)와의 결합에 의해서 활성화되고, 그 결과로 chitin에 UDP-*N*-acetylglucosamine이 중합화되어 진다. 중합화 단계는 chitin합성효소에 의해 catalyze되고 chitinase 효소에 의해 chitin 합성이 차단되어 단위체인 *N*-acetylglucosamine과 glucosamine으로 돌아간다(Candy와 Kilby, 1962; Chipendale, 1978; Anderson, 1979; Cohen, 1987; 1993; Hepburn, 1985; 부, 1996).

대부분의 benzoylphenyl urea계열의 화합물들은 표피에서 chitin이 형성되고 축적되는 경로를 방해함으로써 효과를 나타낸다고 한다(Hajjar와 Casida, 1979; Gijwijt 등, 1979; Ivie 등, 1980). 그러나 지금까지도 benzoylphenyl urea계 살충제들의 정확한 메카니즘은 알려지지 않았으며, 이를 위하여 많은 연구자들은 곤충의 충체나 조직, 세포 등의 여러 수준에서 benzoylphenyl urea계열의 작용기

에 관한 연구를 하고 있으며 여러 가지 의견들이 제시되고 있다(Deul 등, 1978; Hajjar와 Casida, 1979; Gijwijt 등, 1979; Marks 등, 1982; Mitsui 등, 1984; Grosscurt와 Jongmsa, 1987; Nakagawa, 1996). 또, 화합물이 효소원(enzyme zymogen)의 단백질 가수분해 활성화(proteolytic activation)을 방해하거나(Leighton과 Marks, 1981), 효소 복합체의 결정적인 spatical arrangement을 파괴하여 미세한 조절 mechanism을 방해한다는 보고(Cohen과 Casida, 1982)도 있다.

그러나 이러한 설 중에서 어떤 것이 정확한 작용기작을 나타내는지는 완전히 해명되지는 않았다(矢島 등, 1990; Nakagawa, 1996). 이런 가운데 최근에 Nakagawa(1996)는 바퀴의 표피로부터 조제된 무세포체에 대해서 몇가지 실험을 통해 diflubenzuron이 단백질의 인산화를 촉진하는 것을 밝혔다. 또, diflubenzuron이 세포내의 칼슘의 수송에 영향을 주는 것을 시사하였는데 이러한 것들이 benzoylphenyl urea계 살충제들의 직접적인 작용기작이라고 하기에는 연구자 자신들도 자신있게 주장하지 못하고 있다.

따라서 본 실험에서는 곤충의 chitin을 합성하는데 신규 살충제 DBI-1015와 DBI-3204가 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 곤충체내에서 chitin으로 합성되기 전단계인 [14 C] *N*-acetylglucosamine ([14 C] GluNAc)과 [14 C] UDP-*N*-acetylglucosamine ([14 C] UDP-GluNAc)의 표지 화합물을 이용하여 실험하였다. 즉, [14 C]으로 표지된 방사성 전구물질들을 곤충체내에 주사했을 때, 이 전구물질들이 곤충의 표피에 incorporation 되는 도중에 DBI-1015와 DBI-3204가 inhibitor로서 영향을 미치는지를 담배거세미나방의 유충을 이용하여 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통해 조사하였다.

*연락처

재료 및 방법

실험곤충

실험에 사용된 공시충은 실내에서 온도, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도, 50~60%, 광주기, 16L:8D의 조건에서 약제의 접촉없이 사육된 담배거세미나방의 종령 유충을 선발하였다.

실험약제

실험에 사용된 약제들은 신규살충제 DBI-1015 [N-(2-chloro-4-fluoro-3-trifluoromethylphenyl)-N'-(2,6-difluorobenzoyl)urea], DBI-3204 [N-(2-chloro-3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl)-N'-(2,6-difluorobenzoyl)urea] 및 diflubenzuron [(1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea)] 등의 원제급을 사용하였고 그 구조는 그림 1과 같다.

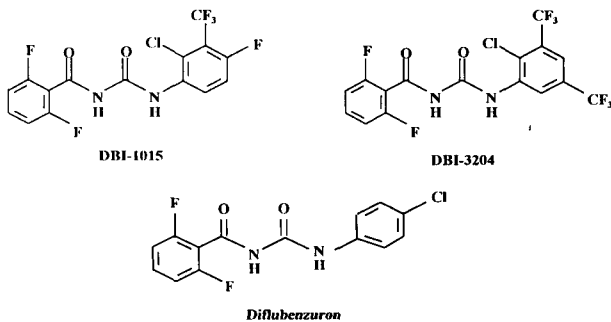


Fig. 1. Chemical structure of new and standard insecticides.

Chitin precursors

[^{14}C] GluNAc : 56 mCi/mmol, 0.1 mCi/ml의 chitin precursor를 Moravek Biochemicals, Inc.에서 구입하여 실험에 사용하였다.

[^{14}C] UDP-GluNAc : 200 mCi/mmol, 0.01 mCi/ml의 chitin precursor를 NENTM Life Science Products, Inc.에서 구입하여 실험에 사용하였다.

실험곤충의 이용 방법

In vivo 및 *in vitro* 실험을 위해서 5령 유충에서 탈피 후 1~2일 이내의 담배거세미나방 6령 유충을 이용하였다 (Mitsui 등, 1981). *In vivo* 실험에서는 유충이 살아있는 채로 실험에 이용하였고, *in vitro* 실험은 Nakagawa 등 (1992)의 실험방법을 참고하여, 먼저 6령 유충을 파라핀위에서 핀으로 복부부분을 위로 향하게 한 후 머리부분과 몸통 끝 부분을 당겨서 고정시킨 후, Ringer 용액을 충체가 잠길만하게 붓고, 해부용 가위로 몸통 아래 부분으로부터 머리부분까지 절개한 후, 혈액, 중장 및 체내의 내용물들을 제거하였다. 증류수로 깨끗이 씻은 후 70% ethanol에서 1분간, 0.1%의 승홍수(昇汞水, HgCl_2)에서 3분간 표피 살균을 하였다. 살균 후 표피를 적당한 크기 (3 mm×5 mm)로 자르고 이 표피 절편을 멸균된 24 well plate에 1 ml씩

담긴 Grace's 배지로 옮겼다. 20-Hydroxyecdysone 호르몬은 ethanol에서 2.2 nmol의 농도로 희석하고, Grace's 배지에 1 μl 씩 처리한 후에 CO_2 incubator에서 24 시간 배양하였다.

살충제의 처리방법

*In vivo*에서의 inhibitor의 chitin synthesis 저해 효과를 조사하기 위해서 먼저 탈피 후 2일 이내의 담배거세미나방 6령 유충을 약 6시간 굶긴 후, 양배추잎을 지름 4.5 cm의 잎 disk로 잘라 엽침지법에 의한 방법으로 살충제를 처리하였다. 이때의 약제 농도는 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm으로 하였고, 약제 처리 후 후드에서 음건시킨 후 직경이 9 cm인 페트리디쉬에 옮겨주었다. ^{14}C 으로 표지된 chitin precursor들을 굶긴 담배거세미나방 유충에 주사한 후, 곧바로 약제 처리한 양배추잎 disk에 접촉하여 충분히 섭취하도록 하였다. *In vitro*에서의 inhibitor의 chitin synthesis 저해 효과를 조사하기 위해서 CO_2 incubator에서 24시간 배양시킨 표피 절편을 호르몬이 제거된 Grace's 배지로 다시 옮겨주었다. 10 μl Hamilton 주사기를 이용하여 살충제를 처리하였으며, 이때 각각의 배지에 처리된 약제의 농도는 2 μM 이 되도록 하였다.

Chitin precursor의 처리

*In vivo*의 경우 chitin precursor의 주입은 ϕ 0.25mm의 Hamilton 주사기를 이용하여 담배거세미나방의 proleg 부분을 통해 haemolymph 내로 1 μl 씩 주사하였다. 유충한 마리당 주사된 방사능의 양은 [^{14}C] GluNAc, [^{14}C] UDP-GluNAc 모두 22,000 dpm이었다. 또 *In vitro*의 경우 약제가 처리된 Grace's 배지에 precursor를 1 μl 씩 처리하였고 처리구마다 [^{14}C] GluNAc, [^{14}C] UDP-GluNAc의 양이 22,000 dpm이 되도록 하였다.

Chitin incorporation 측정

*In vivo*에서 incorporation된 방사능 양의 조사는 약제처리 24 시간 후에 담배거세미나방의 유충 머리를 눌러 압사시킨 후, 2 ml의 microtube에 넣고 2 M potassium hydroxide solution을 1 ml씩 넣었다. 30분 동안 water bath에서 끓인 후, vortex mixer로 잘 섞고, 다시 30분간 더 끓여 non-chitin 물질을 제거하였다. Microtube에서 chitin만 남은 유충을 꺼내어 증류수로 씻고 충분히 건조시킨 후 막자사발로 갈아 가루로 만들었다. 이것을 Sample oxidizer에서(Packard model 307) 태운 후 20 ml의 vial에 Carbo-sorb 5 ml와 permafluor E⁺ 10 ml 등 15 ml의 cocktail과 함께 받은 용액을 liquid scintillation counter (Beckman LS 6500)에서 radioactivity를 측정하였다. *In vitro*에서는 chitin precursor를 처리한 후에 CO_2 incubator에서 72시간 배양하였고, 배양한 표피 절편을 0.5 ml의 증류수로 3회, 70% ethanol로 3회 씻은 후 충분히 건조시켰다. 건조시킨 표피 절편을 가루로 만들어 Aquasol II

cocktail을 7 ml씩 넣고 liquid scintillation counter에서 radioactivity를 측정하였다.

통계처리

저해효과 결과는 Finney(1971)의 probit 계산에 의하여 LC₅₀값으로 나타내었고, 모든 실험은 3반복으로 하였으며, 통계분석은 최소유의차(LSD)로 나타내었다.

결과 및 고찰

In vivo 에서 엽침지법에 의해 처리된 신규살충제 DBI-1015와 DBI-3204 및 대조약제로 사용된 diflubenzuron을 곤충 표피에서 [¹⁴C] GluNAc와 [¹⁴C] UDP-GluNAc의 chitin 저해효과를 그림 2와 3, 표 1과 2에 나타내었다. 그림 2와 3에서 담배거세미나방의 표피에 incorporation 되어진 radioactivity 측정 결과, 처리된 약제 모두 약제의 농도에 따라 [¹⁴C] GluNAc와 [¹⁴C] UDP-GluNAc에 대해 함수관계를 나타내었다. 즉, 낮은 농도에서는 [¹⁴C] GluNAc와 [¹⁴C] UDP-GluNAc이 표피로 incorporation되는 양이 많은 것으로 나타났으나, 농도가 높을수록 표피로 incorporation되는 양이 현저하게 줄어들었다. 이 그림들을 표 1과 2와 같이 50% 억제농도(I₅₀)를 조사하여 나타내었다. 표 1에서 [¹⁴C] GluNAc의 경우 I₅₀ 값은 DBI-1015, DBI-3204 및 diflubenzuron이 각각 0.57, 0.89, 0.26 ppm을 나타냈으며, 표 2에서 [¹⁴C] UDP-GluNAc의 경우 I₅₀ 값은 각각 0.99, 0.53, 0.45 ppm을 나타내었다. 유충의 표피에 incorporation 되어진 저해효과는 diflubenzuron이 신규살충제 보다 더 낮은 농도에서 억제하는 것으로 나타났다.

그러나 송 등(1998; 2000)의 보고에 의하면 엽침지법에

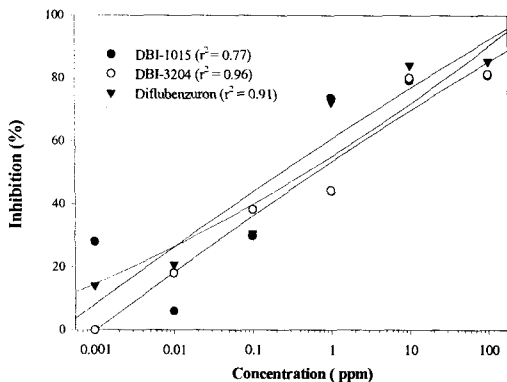


Fig. 2. Inhibition from incorporation into chitin of [¹⁴C]GluNAc injected simultaneously with benzoylphenyl ureas by leaf dipping method to *Spodoptera litura*.

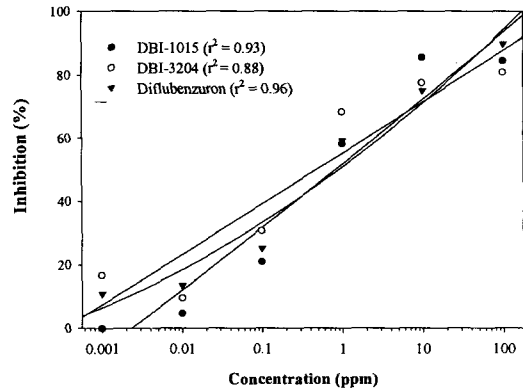


Fig. 3. Inhibition from incorporation into chitin of [¹⁴C] UDP-GluNAc injected simultaneously with benzoylphenyl ureas leaf dipping method to *Spodoptera litura*.

의한 약효조사시 DBI-1015와 3204의 LC₅₀ 값은 각각 0.05 ppm과 0.02 ppm을 나타낸 반면, diflubenzuron은 9.7 ppm으로 살충 효과가 훨씬 낮은 것으로 보고하였다. 그러나 본 실험에서 chitin 전구물질들이 표피로의 incorporation 저해효과는 신규살충제에 비해 diflubenzuron에서 다소 우수한 것으로 나타났다. 이처럼 독성과 생화학적 활성 사이에서 결과가 다르게 나타난 요인은 곤충체내에서 약제들의 대사 능력의 차이에 기인한 것으로 예상된다. Clarke와 Jewess(1990)의 보고에 의하면 diflubenzuron의 대사는 diflubenzuron보다 약효가 우수하였던 flufenoxuron이나 teflubenzuron에 비해 대사가 빠르게 진행된다고 보고하였으나 실제의 약효는 flufenoxuron이나 teflubenzuron의 약효가 diflubenzuron보다 우수한 것으로 보고하였다. 이런 이유는 flufenoxuron이나 teflubenzuron은 충체에 처리되어지면 곤충 체내에서 약 20시간 이후부터 점차적으로 활성이 증가하기 시작하여 그 이후의 유충 발육에 영향을 줌으로써 독성이 높아진다고 하였고, diflubenzuron의 경우는 두 약제보다 초기 활성이 높지만 처리 농도수준이 곤충체내에서 더 빠르게 대사되므로 독성이 flufenoxuron, teflubenzuron보다 낮은 것으로 보고하였다. 이러한 현상은 Tada 등(1987)의 결과와도 일치하는 것으로 독성 실험에서 약효가 낮았던 diflubenzuron이 본 실험의 경우 신규살충제보다 발현속도가 다소 빠르게 나타난 것과 일치하였다.

Deul 등(1978)은 chitinase을 이용한 조사에서 diflubenzuron의 살충작용이 chitin을 분해하는 것이 아니라 chitin의 합성을 방해함으로써 나타나는 결과라고 보고하였다. 또, Eck(1979)는 [³H] 표지된 glucosamine을 이용한 실험에서 diflubenzuron의 살충작용은 마찬가지로 chitin의 합성을 방해함으로써 나타나는 결과라고 보고하였다. 따라서 방사선 동위원소가 표지된 chitin 전구물질을 이용한 신규

Table 1. Inhibition from incorporation of [¹⁴C]GluNAc into chitin injected to *Spodoptera litura* at the commencement of leaf dipping with benzoylphenyl ureas

Insecticides	n	Slope ± SE	I ₅₀ (ppm)	95% FL ^{a)}	I ₉₀ (ppm)
DBI-1015	50	5.08 ± 0.35	0.57	0.29 ~ 1.21	326.0
DBI-3204	50	5.02 ± 0.55	0.89	0.55 ~ 1.49	198.8
Diflubenzuron	50	5.29 ± 0.50	0.26	0.16 ~ 0.45	95.5

^{a)}95% Fiducial limits.

Table 2. Inhibition from incorporation of [¹⁴C]UDP-GluNAc into chitin injected to *Spodoptera litura* at the commencement of leaf dipping with benzoylphenyl ureas

Insecticides	n	Slope ± SE	I ₅₀ (ppm)	95% FL ^{a)}	I ₉₀ (ppm)
DBI-1015	50	5.00 ± 0.75	0.99	0.67 ~ 1.49	50.7
DBI-3204	50	5.15 ± 0.47	0.53	0.31 ~ 0.86	252.8
Diflubenzuron	50	5.16 ± 0.48	0.45	0.26 ~ 0.79	259.1

^{a)}95% Fiducial limits.

살충제들의 작용점은 정확한 경로는 단정할 수는 없지만 GluNAc나 UDP-GluNAc이 chitin으로의 합성되는 과정이 방해받음으로써 정상적인 chitin의 합성을 막고, 그 결과로 새로운 표피가 만들어지지 못함으로써 탈피억제 현상을 나타낸 것으로 생각된다.

한편, 담배거세미나방의 표피 절편을 이용한 실험에서 신규살충제 DBI-1015, DBI-3204와 대조약제로 사용된 diflubenzuron의 chitin 저해효과를 표 3, 4에 나타내었다. 곤충의 표피에 incorporation 되어진 방사능 측정 결과, 신규살충제 모두 무처리구에 비해 chitin 합성을 40~60% 억제하였다. 그러나 *in vivo*와 *in vitro*의 방사능 측정된 결

과를 비교하였을 때 *in vitro*에서 incorporation되는 양이 더 적었으며, Mitsui 등(1980)은 *in vivo*에서 보다 *in vitro*에서 chitin 형성이 적기 때문인 것으로 추측하였다. 또, Nakagawa 등(1992)은 이화명나방(*Chilo suppressalis*) 휴면 유충의 표피 절편을 이용하여 20-hydroxyecdysone을 함께 처리한 경우 주사된 전구물질의 양은 약 30%의 수율을 나타냈다고 하였다 그러나 담배거세미나방의 표피 절편을 이용한 본 실험의 경우 10%이내의 매우 낮은 수율을 나타내었다. 이러한 원인으로 Mitsui 등(1981)은 곤충에 따라 차이가 있음을 보고하였는데, 박각시(*Manduca sp.*)의 진피세포에서 보다 도둑나방(*Mamestra brassicae*)의 진피세포에서

Table 3. Effect of treatment with benzoylphenyl ureas on the incorporation of [¹⁴C]GluNAc into chitin in cultured pieces of integument of *Spodoptera litura*

Insecticides	Concentration (μM/ml)	Radioactivity (dpm) ^{a)}	% Control
DBI-1015	2	592.4c	63.0
DBI-3204	2	903.7bc	43.5
Diflubenzuron	2	1205.1ab	24.7
Control	0	1600.4a	

^{a)}Data are means of three replications. Means followed by the same letters within a column are not significantly different ($p=0.05$; LSD).

Table 4. Effect of treatment with benzoylphenyl ureas on the incorporation of [¹⁴C]UDP-GluNAc into chitin in cultured pieces of integument of *Spodoptera litura*.

Insecticides	Concentration (μM/ml)	Radioactivity (dpm) ^{a)}	% Control
DBI-1015	2	242.8a	43.8
DBI-3204	2	166.7b	61.4
Diflubenzuron	2	148.6b	65.6
Control	0	432.0b	

^{a)}Data are means of three replications. Means followed by the same letters within a column are not significantly different ($p=0.05$; LSD).

chitin형성이 10배나 적게됨을 보고하였고, 이런 차이는 정확하지는 않지만 유전적 원인이나 표피에 부착된 지방체들의 강도에 의한 것으로 추측하였다.

또, *in vitro*에서 표피에 incorporation된 UDP-GluNAc의 양이 GluNAc보다 적었던 이유에 대해 몇몇 연구자들은 UDP-GluNAc이 chitin의 metabolic precursor로서는 더 직접적이지만 진피세포의 chitin 합성 부위에 더 천천히 도달하기 때문에 나타난 결과라고 보고하였으며, 이것은 UDP-GluNAc이 세포막을 통과하기가 쉽지 않기 때문이라고 하였다(Horst, 1981; Eck, 1979). 또, Clarke와 Jewess(1990)는 [14 C] UDP-GluNAc의 반감기가 수용액 상태의 상온에서 8시간으로 짧기 때문에 [14 C] GluNAc과 차이를 나타낸다고 하였다.

이상의 실험에서 신규살충제 DBI-1015와 DBI-3204의 작용 mechanism은 여러 연구자들에 의해 주장된 작용기구를 여러 방법으로 많은 실험을 통해 보다 깊이 조사되어야 하겠지만, 본 실험에서는 단순히 방사선 동위원소가 표지된 전구물질을 이용하여 표피로의 incorporation량을 측정함으로써 신규살충제의 역할을 밝히는 수준에서 그쳤다. 서론에서도 밝혔듯이 많은 연구자들이 benzoylphenyl urea계 살충제 중에서 가장 먼저 개발된 diflubenzuron에 대해 작용기작을 밝히기 위해서 지금까지 많은 노력을 해왔지만, 아직도 정확한 mechanism은 밝혀지지 않았다. 따라서 신규살충제의 작용 mechanism은 화학구조와 약제를 유충에 처리하였을 때 나타나는 외관상의 살충 현상 및 표지된 전구물질의 표피로의 incorporation억제 등을 종합해볼 때 대조약제인 diflubenzuron과 비슷한 것으로 생각되며, 곤충체내에서 chitin으로 합성되는 과정중의 일부 단계를 방해함으로써 살충 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

인용문헌

- Anderson, S. O. (1979) Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomology* 24:24~61.
- Candy, D. J. and B. A. Kilby (1962) Studies on chitin synthesis in the desert locust. *J. Exp. Biol.* 39:129~140.
- Chippendale, G. M. (1978) The function of carbohydrates in insect life process. pp.1~55. *In Biochemistry of insects* (ed. by M. Rockstein) Academic Press, New York.
- Clarke R. S. and P. J. Tewess (1990) The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae by flufenoxuron, teflubenzuron and diflubenzuron. *Pesticide Science* 28:377~388.
- Cohen, E. and J. E. Casida (1982) Inhibition of gut chitin synthetase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 13:129~136.
- Cohen, E. (1987) Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. *Ann. Rev. Entomol.* 32:71~93.
- Cohen, E. (1993) Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22:245~261.
- Deul, D. H., B. J. de Jong and J. A. M. Kortenbach (1978) Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides II. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 8:98~105.
- Eck, van W. H. (1979) Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem.* 9:295~300.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. pp.19~47. Cambridge University Press. London.
- Gijwijt, M. J., Deul, D. H. and B. J. de Jong (1979) Inhibition of chitin synthesis by benzoyl-phenylurea insecticides. III. Similarity in action in *Pieris brassicae* (L.) with polyoxin D. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 12:87~94.
- Grosscurt, A. C. and B. Jongmsa. (1987) Chitin and Benzoylphenylureas. pp.75~99. (eds. J. E. Wright, A. Retnakaran, and W. Junk) Dordrecht, The Netherlands.
- Hajjar, N. P. and J. E. Casida (1979) Structure activity relationships of benzoylphenyl ureas as toxicants and chitin synthesis inhibitors in *Oncopeltus fasciatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 11:33~45.
- Hepburn, H. E. (1985) Structure of the integument. pp. 1~58. *In Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* (eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert) Vol.3. p.625 Pergamon Press, Oxford.
- Horst, M. N. (1981) the biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp. *J. Biol. Chem.* 256:1412~1419.
- Ivie, G. W., D. L. Bull and J. A. Veech (1980) Fate of diflubenzuron in water. *J. Agri. Food. Chem.* 28:330~337.
- Jenkin, P. M. and H. E. Hinton (1966) Apolysis in arthropod moulting cycle. *Nature* 211:871.
- Leighton, T., E. Marks and F. Leighton (1981) Pesticides: Insecticides and fungicides as chitin synthesis inhibition. *Science* 213:905~907.
- Marks, E. P., T. Leighton and F. Leighton (1982) Mode of action of chitin synthesis inhibitors pp. 281~313. *In Insecticide mode of action* (ed. J. R. Coats) 470 pp. Academic Press, New York.
- Mitsui, T., C. Nobusawa, and J. Fukami, J. Collins, and L. M. Liddiford (1980) Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in *Manduca* larvae. *J. Pesticide*

- Science 5:335~341.
- Mitsui, T., C. Nobusawa and J. Fukami (1981) Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in *Mamestra brassicae* L. J. Pesticide Science 6:155~161.
- Mitsui, T., C. Nobusawa and J. Fukami (1984) Mode of inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* L. J. Pesticide Science 9:19~26.
- Mitsui, T., M. Tada, C. Nobusawa and I. Yamaguchi (1985) Inhibition UDP-N-acetylglucosamine transport by diflubenzuron across biomembranes of the mid-gut epithelial cells in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae* L. J. Pesticide Science. 10:55~60.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977) Chitin. (eds. Riccardo A. and R. A. A. Muzzarelli) 309 pp. Pergamon press, New York.
- Nakagawa, Y., M. Matsutani, N. Kurihara, K. Nishimura and T. Fujita (1992) Inhibition of N-acetylglucosamine incorporation into the cultured integument of *Chilo suppressalis* by diflubenzuron. Pesticide Biochemistry and Physiology 42:242~247.
- Nakagawa, Y. (1996) Mode of action of Benzoylphenyl ureas. J. Pesticide Science. 21:460~467.
- Nakagawa Y., S. Ishii, and F. Matsumura (1996) Diflubenzuron stimulates phosphorylation of a 39 kDa integumental protein from newly molted American cockroach (*Periplaneta americana*). Insect Biochem. Mol. Biol. 26:891~898.
- Neville, A.C. (1975) Biology of Arthropod cuticle. Springer-Verlag, New York.
- Retnakaran, A., J. Granett and T. Ennis. 1985. Insect growth regulator. pp.529~601. In Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, (eds. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert) Pergamon Press, Oxford.
- Tada, M., Mitsui, T., Tokuda, K., Mengel, R. and K. Wakabayashi. 1987. J. Pesticide Science 12:455~460.
- 矢島 治明, 岩村 俊, 上野民夫, 鴨下克三. 1990. 殺蟲劑開發の新しい展開. pp. 597~654. in 農薬の開発 III. 710 pp.
- 부경생. (1996) 체벽. pp.1~44. 곤충생리학, ed. by 부경생. pp.618 집현사, 서울.
- 송 철, 김길하, 최용호, 신옥균, 김중호, 조광연 (1998) 해충에 대한 HW-1015 및 HW-3204의 살충스펙트럼 연구(I). 한국농약과학회 춘계 학술발표 pp.43.
- 송 철 (2000) benzoylphenyl urea계 신규화합물 HW-1015 및 3204의 살충특성. 경북대학교 박사학위논문.

The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera litura* by new insecticides of benzoylphenyl urea, DBI-1015 and DBI-3204

Cheol Song*, Wook Kyun Shin and Kwang Yun Cho (Agrochemical Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yusong, Taejeon 305-600, Korea)

Abstract : This study was conducted to investigate insecticidal mechanisms of the new insecticides DBI-1015 and DBI-3204 with label compounds of chitin precursors, [¹⁴C] N-acetylglucosamine and [¹⁴C] UDP-N-acetylglucosamine in *Spodoptera litura*. The concentrations of the insecticides for incorporation of chitin precursors into chitin were founded to be functional relationship. The result of *in vivo* test, I₅₀ (ppm) of the DBI-1015, DBI-3204 and diflubenzuron to [¹⁴C] N-acetylglucosamine were 0.57, 0.89 and 0.26 ppm respectively, and to [¹⁴C] UDP-N-acetylglucosamine were 0.99, 0.53 and 0.45 ppm respectively. *In vitro* test of DBI-1015, DBI-3204 and diflubenzuron by integument fragments, the incorporation rate in the cuticle were low, however, 40~60% inhibitions were observed at 2 μM when compared to the untreated control.

*Corresponding author (FAX : +82-42-861-4913, E-Mail : csong@pado.kRICT.re.kr)