

나방류에 대한 thiodicarb의 살충활성

최유미 · 김길하*

충북대학교 농과대학 식물의학과

요약 : 본 연구는 6종 나방류(멸강나방, 배추좀나방, 목화바둑명나방, 파밤나방, 담배나방, 담배거세미나방)에 대한 유충영기별 thiodicarb의 살충활성을 조사하였으며, 살충효과 구명을 위하여 효소활성 (esterase, acetylcholinesterase, glutathione S-transferase)등을 검토하였다. 이 약제는 6종의 나방류 어린유충에 대해서 높은 살충효과를 나타내었으나, 노숙유충에 대한 살충효과는 상대적으로 낮았고, 발현속도는 느렸다. 담배거세미나방을 대상으로 한 효소활성저해 실험에서 acetylcholinesterase와 glutathione S-transferase 활성을 저해하였으나, esterase 활성을 저해하지는 않았다.(2004년 2월 23일 접수, 2004년 3월 24일 수리)

Key words : Lepidopterous pests, insecticidal activity, thiodicarb, acetylcholinesterase, esterase, glutathione S-transferase.

서론

Thiodicarb [dimethyl *N, N'*-[thiobis [(methylimino) carbonyloxy]] bis (ethanimidothioate)]는 oxime carbamate계 살충제이며, oxime의 *N*-sulphenyl-*N*-methylcarbamate 유도체로 기존의 살충제인 methomyl과 유사한 구조를 갖고 있다 (Tomlin, 2000). Thiodicarb는 고등동물에 대하여 독성이 매우 강하며, 주로 섭식에 의한 소화중독으로 유충을 치사시키고, 살란 효과도 나타낸다 (Tomlin, 2000). 특히 유기인계에 저항성을 보이는 해충과 응애류에 대해서 효과가 있으므로, 유기인계와 상호보완적으로 사용이 가능하다 (Gunning 등, 1996). 이 약제의 작용기작은 acetylcholinesterase (AChE)의 활성저해에 의한 것으로 보고되었다 (Gunning 등, 1996; Tomlin, 2000). 살충제의 작용기작으로의 thiodicarb는 신경전달물질 acetylcholine을 분해하는 AChE의 활성을 저해하여 신경전달계에 관여한다 (Coats, 1983). Esterase는 다양한 기질의 대사작용에 관여하는 효소로써 곤충의 체내에 다량으로 존재하며, 유기인계와 카바메이트계 살충제에 대해 높은 친화력을 가지고 있어 저항성발달에 깊이 관여한다 (Scott, 1995; Baker 등, 1998). 또한 esterase는 ester 결합을 하고 있는 농약의 분해, 해독에 관여하며, 여러

가지 기질도 ester 결합을 하고 있기 때문에, 일반적으로 esterase는 기질특이성이 매우 낮다 (Maa와 Liao, 2000). 그리고 glutathione S-transferase (GST)는 환원된 glutathione의 thiol group과 electrophilic center를 가지는 다양한 xenobiotic 화합물과의 conjugation 반응을 시켜주는 해독효소의 일종으로 알려져 있어 저항성 발달에 매우 중요한 효소중 하나이다 (Ketterman 등, 2001). 특히 이들 효소들은 살충제가 곤충체내에서 독작용을 억제하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Coats, 1983).

본 연구는 채소류에 문제가 되고 있는 6종의 나비목 해충(멸강나방, 목화바둑명나방, 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방, 담배나방)에 대한 thiodicarb의 유충영기별 살충율을 조사하고, 살충효과에 영향을 미치는 효소활성저해율 (esterase, AChE, GST)을 구하여 분석하였다.

재료 및 방법

시험곤충

멸강나방 (*Pseudaletia separata*)은 1999년 충북대학교 농장 잡초에서, 목화바둑명나방 (*Palpita indica*)은 2001년 충북대학교 농장 오이에서, 파밤나방 (*Spodoptera exigua*)과 담배거세미나방 (*Spodoptera litura*)은 2002년 9월에 경남 의령콩밭에서, 배추좀나

*연락처자

방 (*Plutella xylostella*)은 충북 단양 배추밭에서, 담배 나방 (*Helicoverpa assulta*)은 충북 괴산 고추밭에서 채집하여 실내에서 사육하면서 실험에 사용하였다. 실내 사육조건은 온도 25~28℃, 광주기 16L : 8D, 상대 습도 50-60%이었다.

시험약제

살충제의 작용스펙트럼에 사용된 살충제는 thiodicarb (40% WP, 시중에서 구입)이며, 살충제의 작용기작에 사용된 살충제는 원제로서 thiodicarb (93.3%, 아벤티스)와 chlorpyrifos-methyl (93%)이며, α -naphthyl acetate, fast blue RR salt, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (ATChI), glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)은 Sigma Chemical Company에서 구입하여 실험에 사용하였다.

발육단계별 살충율 조사

실험에 사용된 살충제인 thiodicarb를 증류수에 400 ppm으로 희석하였다. 파밤나방, 담배거세미나방, 배추좀나방 그리고 멸강나방의 경우 조제한 약액에 배추잎절편 (직경 9cm)을 30초간 침지한 후, 후드 내에서 충분히 음건시켜 1회용 페트리디쉬 (9×2 cm)에 여과지를 깔고 약제 처리한 배추잎을 올린 후, 1, 3, 4, 5령 유충을 10마리씩 접종하였고, 배추좀나방은 1, 3, 4령의 유충을 사용하였다. 또한 목화바둑명나방은 오이잎, 담배나방은 고추열매를 세로로 4등분하여 위와 동일한 방법으로 수행하였다. 약액 처리 1, 2, 3, 4일 후의 살충율을 조사하였으며, Abbott (1925)의 보정식을 이용하여 보정살충율을 구하였다. 모든 실험은 5반복으로 수행하였다.

효소활성 저해시험

Esterase (EST) 활성 측정 : Van Asperen (1962)의 방법에 준하였다. 얼음 속에서 담배거세미나방 5령 유충의 혈림프를 500 μ L의 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액과 함께 microcentrifuge tube (2 mL)에 넣어 4℃에서 14000 rpm으로 45분 동안 원심분리한 후, 상층액을 효소원으로 사용하였다. Esterase의 활성 측정 방법은 cuvette에 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액 2.1 mL, 효소액 300 μ L, 기질로서 α -naphthyl acetate (α -NA) 300 μ L을 넣고 30℃의 water bath에서 5, 10,

15, 20분간 incubation 하였고, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate)와 1% fast blue RR salt를 넣어 반응을 중지시킨 후, 600 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 20초간격으로 10분동안 흡광도를 측정하였다. Esterase 저해 시험에 사용된 살충제는 아세톤에 희석 후 최종농도가 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M농도가 되도록 하였다. 이때 이용한 완충용액은 1.9 mL이며, 300 μ L의 효소액과 α -NA 300 μ L를 넣은 후, 각 농도의 살충제를 처리하여 5분간 incubation후에 흡광도를 측정, 저해율을 구하였다.

Acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정 : Ellman 등 (1961)의 방법에 준하였다. 얼음 속에서 5마리의 담배거세미나방 5령 유충의 머리를 잘라 500 μ L 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액과 함께 microcentrifuge tube (2 mL)에 넣고 마쇄하여 4℃에서 14000 rpm으로 45분 동안 원심분리한 후, 상층액을 효소원으로 사용하였다. AChE의 활성 측정방법은 cuvette에 1.3 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액과 600 μ L의 0.5 mM 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 300 μ L의 효소액과 600 μ L의 5 mM acetylcholine iodide를 첨가하여 30℃의 water bath에서 5분간 incubation 시킨 후, 405 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 20초간격으로 10분동안 흡광도를 측정하였다. AChE에 대한 저해시험에 사용된 살충제는 아세톤에 희석하여 최종농도가 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M농도가 되도록 완충용액 1.3 mL를 넣고 600 μ L의 0.5 mM DTNB, 300 μ L의 효소액과 600 μ L의 5 mM acetylcholine iodide 그리고 각 농도의 살충제 200 μ L를 처리하여 5분간 incubation후에 흡광도를 측정하여 저해율을 구하였다.

Glutathione S-transferase (GST) 활성 측정 : Habig 등 (1974)의 방법에 준하였다. 얼음 속에서 5마리의 담배거세미나방 5령 유충의 중장을 잘라 500 μ L 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액과 함께 microcentrifuge tube (2 mL)에 넣고 마쇄하여 4℃에서 1,4000 rpm으로 45분 동안 원심분리한 후, 상층액을 효소원으로 사용하였다. GST의 활성 측정 방법은 cuvette에 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액 2.1 mL, 효소액 300 μ L, 10 mM glutathione (GSH)을 넣고 30℃의 water bath에서 5분간 incubation 시킨 후, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 넣은 후 340 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 20초 간격으로 10분 동안 흡광도를 측정하였다. Glutathione S-transferase 저해 시험

에 사용된 살충제는 아세톤에 희석하여 최종농도가 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M 농도가 되도록 1.9 mL의 완충용액을 넣고 300 μ L의 효소액과 200 μ L의 살충제, 기질로 300 μ L의 CDNB와 GSH를 처리하여 흡광도를 측정, 이를 바탕으로 저해율을 구하였다.

결과 및 고찰

살충스펙트럼과 발현속도

6종 나비목 유충의 영기별 thiodicarb의 사충율을 조사한 결과는 그림 1과 같다. 파밤나방의 경우 1령은 1일후에 100%의 살충활성을 나타내었고, 3령과 4령은 각각 62%와 72%로 사충율이 낮았다. 특히 5령은 55% 이하로 현저히 낮았다. 3, 4, 5령은 영기에 관계없이 처리후 시간이 경과됨에 따라 사충율이 증가하였으며, 처리후 1일째에 활성이 낮았던 4령과 5령도 4일째에 각각 100%와 93.3%의 높은 사충율을 나타내었다. 담배거세미나방의 1령과 3령은 1일째부터 각각 100%와 94%로 높은 사충율을 나타내었다. 그러나 5령은 1일째에 34%에서 4일째에도 64%로 낮은 사충율을 나타내었다. 아직 이 약제는 담배거세미나방의 방제약으로 등록되어 있지 않으나 (농약사용지침서, 2003), 발육초기에 방제하지 않으면 방제효과를 기대하기 어려울 것으로 생각된다. 배추좀나방은 1령과 3령 모두 1일째에 각각 80%와 70%로 사충율이 낮았으나, 3일째부터 모두 100%이었다. 그러나 4령유충은 1일째에 20%에서 4일째에 72%수준에 불과하여 이 해충의 방제에 어려움이 예상된다. 멸강나방의 1령은 1일째에 100%의 사충율을 나타내었고, 3령은 2일째에 100%의 사충율을 나타내었다. 그러나 4령과 5령은 1일째에 50%에서 4일째에 각각 100%와 92%로 시간이 경과됨에 따라 사충율이 높아져 발현속도가 느림을 알 수 있었다. 목화바둑명나방의 1령은 1일째에 100%의 사충율을 나타내었고, 3령은 1일째에 56%에서 2일째에 98%의 사충율을 나타내었다. 한편 4령과 5령은 1일째에 12%와 14%이었으며, 2일째까지도 40%이하의 낮은 사충율을 나타내었다. 그러나 4일째에는 각각 100%를 나타내었다. 담배나방 역시 1령은 1일째에 100%의 사충율을 나타내었다. 3령과 5령은 1일째에 각각 23.3%와 20%였으며, 2일째까지도 모두 50%이하였으나, 4일째에 3령은 93.3%이었고, 5령은 66.7%를 나타내었다. 역시 담배나방유충도 발육초기에 방제하

지 않으면 방제효과를 기대하기 어려울 것으로 판단된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 유충의 발육단계가 진행됨에 따라 이 약제에 대한 내성이 강해지는 것을 알 수 있었다. 6종 해충에 대한 thiodicarb의 독성은 3령까지는 큰 차이가 없었으나, 3령 이후부터는 현저히 떨어졌다. 특히 담배거세미나방, 배추좀나방, 담배나방의 5령유충은 1령과 3령유충에 비하여 현저히 떨어졌다 (Fig. 1). 살충제의 독성에 영향을 미치는 요인에는 발육단계, 성, 수명, 영양조건, 생식조건을 들 수 있다 (Brattsten and Metcalf, 1973). Kim 등 (1998)은 flupyrazofos를 배추좀나방 유충의 발육단계별 LC_{50} 값으로 내성비를 구하여 독성을 비교하였는데, 1령충에 대해서 2령충은 5.1배, 3령충은 8.5배, 4령충은 16.6배로 영기가 진행됨에 따라 내성이 크게 증대하였음을 보고하였다. 이와 같이 내성이 증대하는 요인으로는 곤충의 체중 증가 및 두꺼운 큐티클층에 기인하여 약제 투과성의 저하 그리고 곤충 자체의 생리·생화학적인 변화에 따른 약제에 대한 감수성 저하 등을 들 수 있다.

효소활성저해

담배거세미나방 5령 유충에 대한 thiodicarb의 효소활성저해 (esterase, AChE, GST)에 관한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Thiodicarb의 처리농도에 관계없이 esterase의 활성을 저해하지는 않았지만, 대조 약제인 chlorpyrifos-methyl은 10^{-4} M농도에서 esterase 활성을 저해하였다. 이는 thiodicarb가 esterase에 아무런 영향을 주지 않은 것은 thiodicarb의 대사등에 esterase가 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 한편 이 약제는 10^{-6} M과 10^{-5} M농도에서 대조 약제인 chlorpyrifos-methyl보다 낮은 농도에서 AChE활성을 강하게 저해하였다. 이 시험에 사용된 담배거세미나방은 높은 농도의 chlorpyrifos-methyl에서 AChE가 저해되어 어느정도 저항성을 가지고 있는 개체들로 생각되며, thiodicarb가 보다 낮은 농도에서 담배거세미나방의 AChE를 저해함은 유기인계에 대한 저항성해충의 방제에 이용될 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 또한 thiodicarb는 10^{-5} M과 10^{-4} M농도에서 GST의 활성을 저해하였으나, 대조 약제인 chlorpyrifos-methyl은 GST의 활성을 저해하지는 않았다. 이는 위의 esterase 저해시험과 반대되는 결과로 thiodicarb는 대사시 esterase보다는 GST에 의존하며,

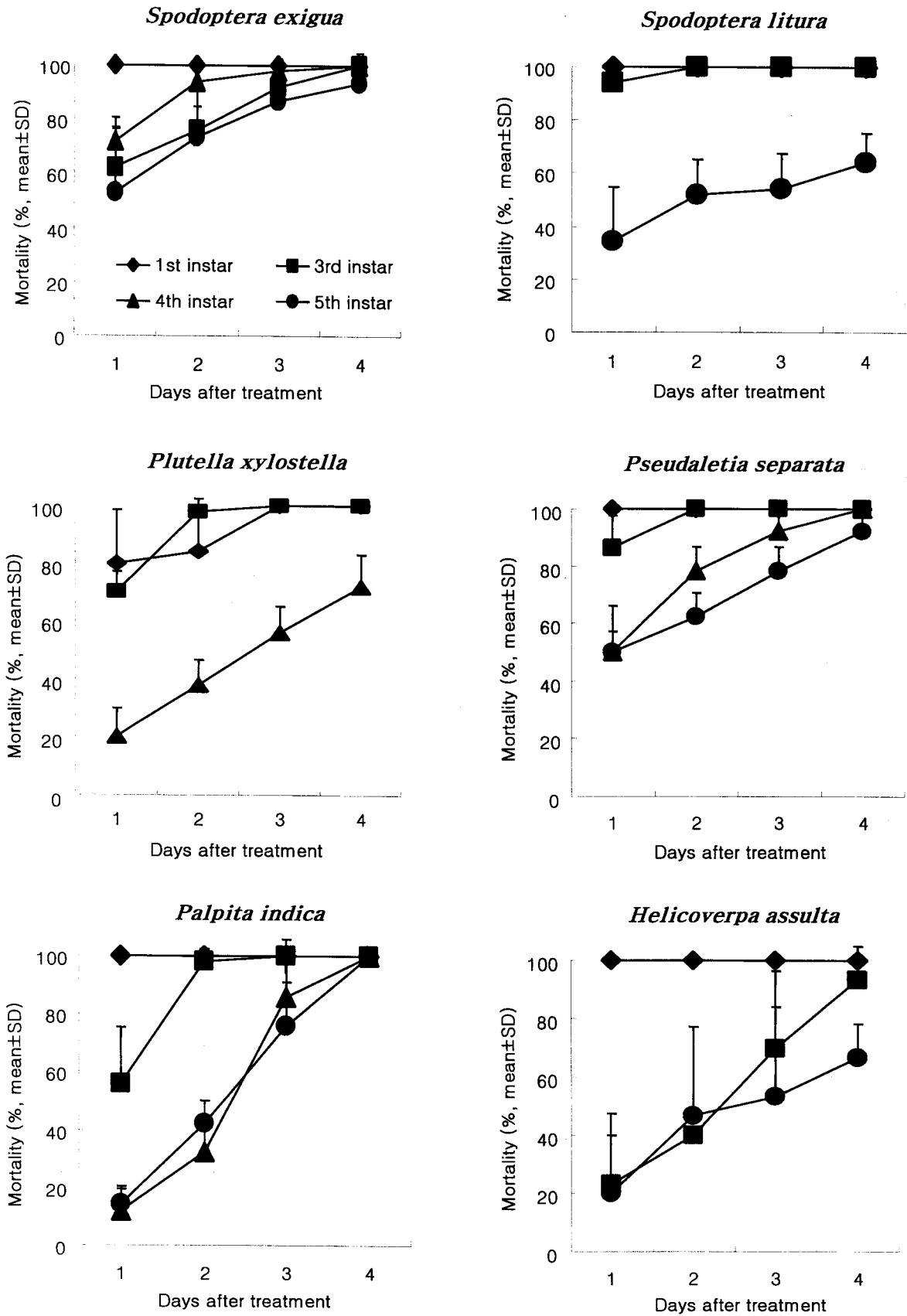


Fig. 1. Insecticidal activity of thiodicarb against developmental stages of six lepidopterous larvae.

저항성 발달은 chlorpyrifos-methyl과는 반대로 GST에 의해 야기될 것으로 추측된다. 위의 결과를 종합해서 판단해보면, thiodicarb는 Tomlin (2000)도 보고한바와 같이 살충효과는 AChE의 저해에 의해 나타나며, 저항성은 AChE의 감수성저하 (Gunning 등, 1996)와 함께 GST의 활성증가에 의해 발달될 것으로 생각된다.

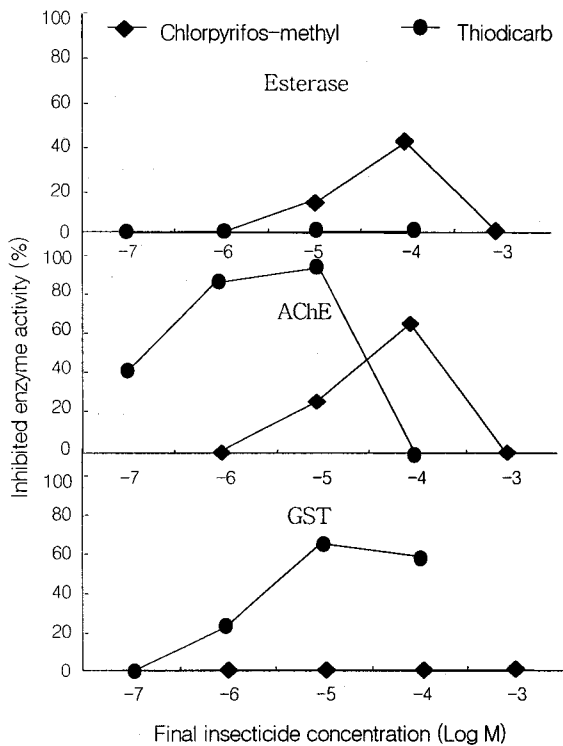


Fig. 2. Inhibition of esterase, acetylcholinesterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) activity from *Spodoptera litura* by thiodicarb and chlorpyrifos-methyl.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 thiodicarb는 6중 나방의 1령과 3령유충에 대해서는 높은 살충효과를 보였으나, 노숙유충에 대해서는 효과가 낮았고, 발현속도도 또한 느렸다. 따라서 thiodicarb를 이용한 나비목 유충의 방제는 유충발육초기에 하여야 방제효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265~267.
 Baker, J. E., J. A. Fabrick and K. Y. Zhu (1998)

Characterization of esterases in malathion-resistant and susceptible strains of the pteromalid parasitoid *Anisopteromalus calandrae*. *Insect. Mol. Biol.* 28:1039~1050.
 Brattsten, L. B. and R. L. Metcalf (1973) Age-dependent variations in the response of several species of diptera to insecticidal chemicals. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3:189~198.
 Coats, J. R. (1983). *Insecticide mode of action.* Academic Press. p.457.
 Ellman, G. L., K. D. Coutney, V. Andres, J. and B. C. Featherstone (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88~95.
 Gunning, R. V., G. D., Moores and A. L. Devonshire (1996) Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in Australian *Helicoverpa amigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 55:21~28.
 Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130~7139.
 Ketterman, A. J., P. Prommeenate, C. Boonchaay, U. Chanama, S. Leetachewa, N. Promtet and L. Prapanthadara (2001). Single amino acid change outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:65~74.
 Kim, G. H., S. J. Moon, Y. D. Chang and K. Y. Cho (1998) Property of action of new insecticide, flupyrazofos against diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Korean J. Pestic. Sci.* 2:117~125.
 Maa, W. C. and S. Liao (2000) Culture-dependent variation in esterase isozymes and malathion susceptibility of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Zoll. Studies.*39:375~386.
 Scott, J. A. (1995) The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Flor. Entomol.* 78:399~414.
 Tomlin, C. D. S. (2000) *The pesticide manual.* BCPC. p.1343.

- Van Asperen, K. J. (1962) A study of housefly esterases by means of sensitive colorimetric method. *J. Insect Pathol.* 8:401~416.
농약사용지침서 (2003). 농약공업협회. p.458.

Insecticidal activity of thiodicarb on lepidopterous pests

Yu-Mi Choi and Gil-Hah Kim*(*Dept. of Plant Medicine, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea*)

Abstract : A series of experiments was conducted to determine the toxicities of thiodicarb on the six lepidopterous pests (*Pseudaletia separata*, *Plutella xylostella*, *Palpita indica*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa assulta*, *Spodoptera litura*) and to elucidate factors insecticidal effects mechanism of thiodicarb. Thiodicarb was very effective against six lepidopterous young larvae, but less effective to the old larvae and it acted slowly. Thiodicarb inhibited acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities, but not inhibit esterase activity.

*Corresponding author (Fax : 82-43-271-4414, E-mail : khkim@trut.chungbuk.ac.kr)