

## 강원도 고랭지 Chlorpyrifos 포장저항성 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 저항성 특성

조준모<sup>1</sup> · 김경주 · 김성수 · 박홍열 · 임춘근<sup>2</sup> · 허장현<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>(주)파이오니아, <sup>2</sup>강원대학교 농업생명과학대학 생물자원공학부 응용생물학과,  
강원대학교 농업생명과학대학 자원생물환경학과

**요약** : 본 연구는 강원도 고랭지 배추경작지에서 채집한 chlorpyrifos 포장저항성 계통의 배추좀나방에서 추출한 무독화 효소 esterases와 glutathione-S-transferase(GST)의 활성과 단백질의 sequestration 비율 및 acetylcholinesterase(AChE) insensitivity를 측정하여 저항성 발달기작을 구명하고자 수행되었다. Esterases의 경우 저항성과 감수성 배추좀나방간의 활성 차이는 없었으나, 전기영동상에서는 특정 isozyme의 차이가 확인되었으며, GST 활성은 포장저항성 계통이 감수성 계통보다 약 1.5배 높았다. 두 계통 간 단백질의 sequestration 차이는 없었으며, chlorpyrifos에 대한 AChE의 sensitivity는 포장저항성 계통의 AChE가 감수성 계통보다 약 460배 낮은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 실내에서 저항성을 유도하여 파악한 배추좀나방의 저항성 특성결과와 동일한 것으로 강원도 고랭지 chlorpyrifos 포장저항성 배추좀나방의 저항성 발달은 AChE의 insensitivity가 주요 요인이며, 부가적으로 GST의 활성 변화도 작용하는 것으로 판단되었다.(2006년 2월 16일 접수, 2006년 3월 20일 수리)

**색인어** : 무독화효소(esterases, glutathione-S-transferase)의 활성, 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.), 살충제 저항성, acetylcholinesterase(AChE) insensitivity, chlorpyrifos

### 서 론

강원도 고랭지 배추경작지는 기후적, 지형적 특징으로 동일작물이 연속재배 되며, 이에 따라 동일 병해충 발생으로 동일약제의 연속사용이 불가피한 농업환경을 지니고 있다(박 등, 2004). 이로 인한 문제점 중의 하나인 해충의 약제 저항성 유발이 가장 심각하여 본 연구실에서는 이 지역의 주요 해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)이 chlorpyrifos, diazinon, fenitrothion 등과 같은 유기인계 및 carbofuran, benfuracarb 등과 같은 카바메이트계 살충제에 대하여 저항성을 나타내고 있음을 보고한 바 있으며(조 등, 2001), 이러한 저항성은 약제에 대한 acetylcholinesterase (AChE)의 insensitivity와 glutathione-S-transferase (GST) 활성증가에 의한 것이며, 저항성 발달 정도가 가장 높았던 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방은 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대하여 교차저항성이 유발됨을 보고 하였다(김, 2003; 김 등, 2003). 이러한 저항성 발달기작에 대한 연구는 실험실에서

chlorpyrifos에 대한 저항성을 유도한 배추좀나방의 무독화효소들의 활성을 이용하여 구명하였으나, 본 연구는 강원도 고랭지 배추경작지 포장에서 직접 채집한 chlorpyrifos 포장저항성 계통의 배추좀나방을 대상으로 무독화효소의 활성검정과 단백질의 sequestration 비율 및 AChE insensitivity를 조사하여 저항성 발달특성을 파악하고자 수행되었다.

### 재료 및 방법

#### 시험곤충

포장저항성 계통(field resistant strain: FRS)의 배추좀나방은 강원도 홍천군 내면 자운 3리에서 채집하여 사용하였으며, chlorpyrifos에 대한 저항성 발달은 엽면 침지법으로 확인하였다. 감수성 계통(susceptible strain: SS)은 한국화학연구원으로부터 분양받아 약제에 노출 없이 계대사육하여 사용하였다.

#### 무독화 효소의 활성검정 및 단백질 정량

무독화 효소(esterases 및 glutathione-S-transferase (GST))의 활성 검정을 위한 효소액 추출은 김 등

\* 연락처

(2003)의 방법과 동일하게 3~4령의 공시충 0.1g에 sodium phosphate buffer용액을 첨가하여 원심분리한 후 상등액을 취하여 사용하였다. 추출된 esterases의 활성은 Asperen(1962)의 방법에 준하여 수행하였으며, 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 검정하였다. Esterases의 구조적 차이는 Daniel 등(1996)의 방법을 변형하여 전기영동(native polyacrylamide gel)으로 확인하였다. GST의 활성 검정은 Habig 등(1974)의 방법에 따라 파장 340 nm에서 흡광도 변화로 파악하였다.

효소활성도(enzyme activity) 산출을 위해 Bradford (1976)의 방법에 따라 UV-Vis spectrophotometer로 흡광도를 측정하여 단백질 정량을 하였다.

#### Protein binding에 의한 sequestration 비율차 측정

단백질의 sequestration 측정은 Konno와 Shishido (1989)의 방법을 변형하여 수행하였다. Cytosolic protein 2 mg과 chlorpyrifos와 chlorpyrifos-oxon(Chem Service, USA)을 각각 10 µg을 취하여 27°C 배양기에서 반응시킨 후 원심분리하여 cytosolic protein과 chlorpyrifos와 chlorpyrifos-oxon이 binding된 침전물을 반응액으로부터 분리시켰다. 침전물 중 chlorpyrifos와 chlorpyrifos-oxon을 각각 추출하기 위하여 micro hand-blander로 침전물을 마쇄한 후 acetone 5 mL을 가하여 15분간 초음파처리 하였다. 추출액을 감압농축하고 n-hexane 2 mL에 정용하여 gas liquid chromatograph(nitrogen phosphorus detector)로 분석하였다. 침전물과 분리된 상층액 중 반응하지 않고 남아있는 chlorpyrifos와 chlorpyrifos-oxon을 분석하기 위하여 상층액을 분액여두에 옮긴 후 n-hexane 5 mL를 가하여 2회 분배·추출하였다. 추출액인 n-hexane을 감압농축한 후 n-hexane 2 mL에 정용하여 GLC(NPD)로 분석하였다.

#### Acetylcholinesterase(AChE)의 sensitivity 검정

작용점인 AChE에 대한 insensitivity검정을 위해 Konno와 Shishido(1994)의 방법에 따라 AChE 효소액

을 추출하여 사용하였으며, 포장저항성 계통(FRS)으로부터 AChE 추출 시 추출 전 2세대 동안 chlorpyrifos에 노출시키지 않았다.

AChE의 활성과 약제에 의한 활성 저해 정도는 Ellman 등(1961)이 수행한 방법에 따라 412 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 파악하였다. Chlorpyrifos-oxon의 AChE에 대한 저해력은 효소활성의 50%를 저해하는 농도인  $I_{50}$  값으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 무독화 효소 esterases 및

### glutathione-S-transferase(GST)의 활성

감수성 계통(SS)과 포장저항성 계통(FRS) 배추좀나방으로부터 추출한 esterases의 가수분해산물인 1-naphthol과 2-naphthol에 대한 활성을 측정한 결과 표 1과 같이 계통간의 esterases 활성 차이는 없었다. 이는 김 등(2003)이 실내에서 chlorpyrifos 저항성을 유도한 배추좀나방에서 추출한 esterases의 활성 연구 결과에서 나타난 것과 동일한 것으로 실험실에서 저항성을 유도한 배추좀나방과 포장에서 저항성이 유도된 배추좀나방에서 추출한 esterases의 활성 차이는 없는 것으로 파악되었다.

그러나 esterases의 특정 isozyme이 저항성에 영향을 미친다는 보고에 따라(Scharf 등, 1998) 전기영동장치를 이용하여 isozyme의 band를 확인하였다. 감수성 계통(SS)으로부터 추출된 esterases에서는 총 9개의 band가 나타났으나, 포장저항성 계통(FRS)의 band는 총 11개였다(그림 1).

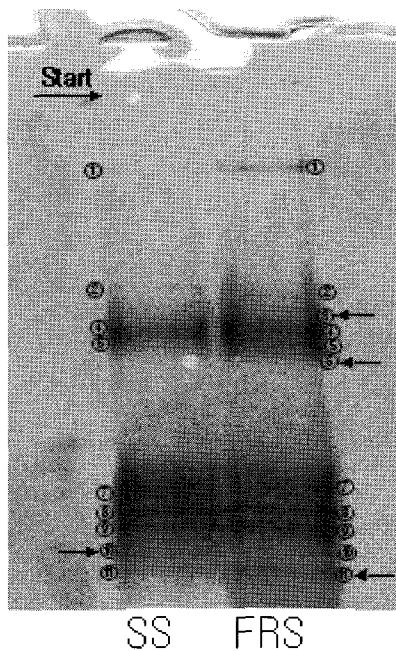
Sun 등(1978)은 배추좀나방의 유기인계 살충제인 diazinon 저항성 발달의 경우에도 전기영동 상에서는 esterases의 band가 감수성 계통과 저항성 계통간에 차이를 나타낸다고 보고하였으며, 감수성 계통에서 나타나지 않는 특정 band를 변형된 cholinesterase라고 보고하였다. 본 연구에서는 이러한 차이점이 저항성 발달에 어떠한 영향을 미쳤는지 설명할 수는 없었지

Table 1. Activity of total esterases extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.)

Strain	Activity of total esterases $\pm$ S.E. ( $\mu\text{mol } 10\text{min}^{-1}$ )	
	1-Naphthol <sup>a)</sup>	2-Naphthol <sup>b)</sup>
SS	22.7( $\pm$ 0.4)	35.2( $\pm$ 0.3)
FRS	24.1( $\pm$ 0.3)	37.8( $\pm$ 0.4)

a) A product of  $\alpha$ -naphthyl acetate hydrolyzed by esterases

b) A product of  $\beta$ -naphthyl acetate hydrolyzed by esterases



Arrows(→) mean the difference bands  
SS and FRS

Figure 1. Native PAGE of total esterases extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.).

만, 향후 특정 esterase isozyme의 효소학적 분석과 특징을 구명한 후 chlorpyrifos 저항성 발달과의 관계를 밝히는 연구의 수행이 필요한 것으로 사료된다.

감수성 계통(SS)과 포장저항성 계통(FRS) 배추좀나방으로부터 추출한 GST의 활성을 비교한 결과, 그림

2와 같이 감수성 계통(SS)으로부터 추출된 GST의 활성은  $120.5 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 인 반면, 포장저항성 계통(FRS)의 GST는  $80.3 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 로 약 1.5배 높은 것으로 나타났다(그림 2).

이러한 결과 또한 esterases 활성 결과와 동일하게 김 등(2003)이 보고한 실험실내 chlorpyrifos 저항성 유도 배추좀나방이 감수성계통에 비하여 GST 활성이 1.7배 높았다는 결과와 유사하였다. 따라서 저항성 계통(FRS)의 높은 GST 활성은 배추좀나방의 chlorpyrifos 저항성 발달에 부가적인 요인이라 사료된다.

#### Protein binding에 의한 sequestration 비율차

무독화 효소 esterases가 결합된 chlopyrifos는 작용점에 도달하지 못하게 되므로 약제의 효력을 상실하게 되며, 이러한 원리로 cytosolic protein이 chlorpyrifos 또는 chlorpyrifos-oxon에 binding하여 무독화 되는 sequestration 과정에 대한 연구는 배추좀나방의 chlorpyrifos에 대한 저항성 발달에 관련이 있는지를 확인하기 위한 하나의 도구로 사용하게 된다. Chlorpyrifos의 경우 감수성 계통(SS)과 포장저항성 계통(FRS) 배추좀나방으로부터 추출된 protein에 의하여 각각 94%, 92% sequestration되었다. 반응여액 중 남아 있는 chlorpyrifos의 양은 각각 6%와 8%로 두 종간의 차이는 없었다(그림 3). Chlorpyrifos-oxon의 경우 감수성 계통(SS)과 포장저항성 계통(FRS) 배추좀나방으로부터 각각 추출된 protein에 의하여 41%와 48%의 sequestration을 나타내어(그림 4) 단백질 sequestration은 저항성 발달에 주요한 요인이 아님을 확인할 수 있었다. Chlopyrifos와 chlorpyrifos-oxon에 대한 단백질의

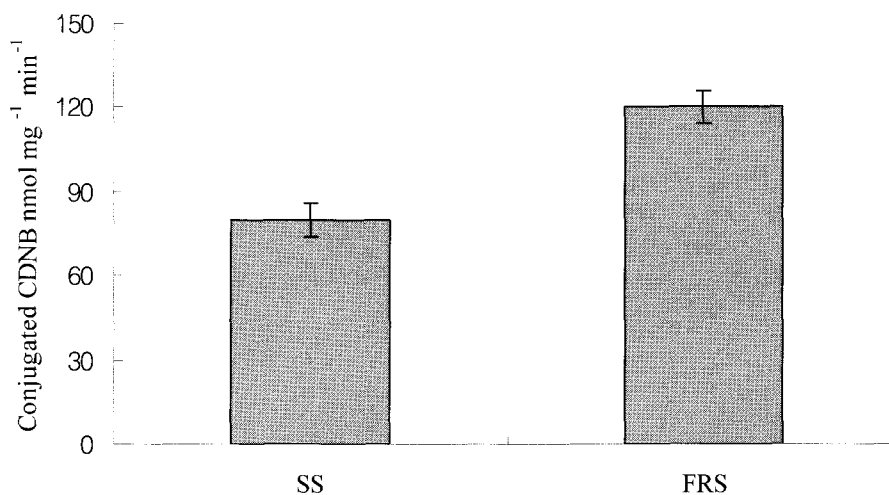


Figure 2. Comparison to activities of GST extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.).

sequestration 비율차이는 두 화합물의 체내활성도에 의존하는 것으로 사료된다.

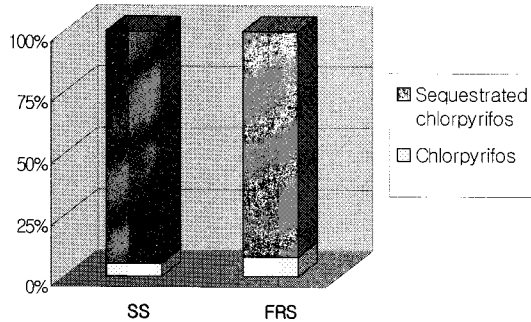


Figure 3. Ratio of chlorpyrifos sequestered and chlorpyrifos non-metabolized by cytosolic esterases extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.).

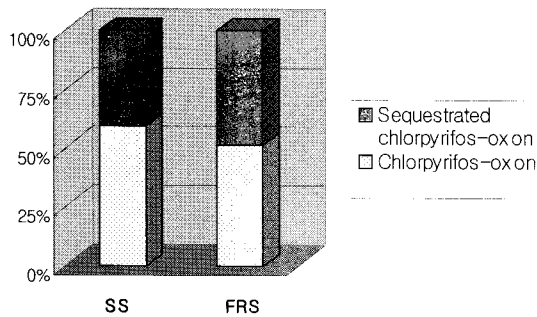


Figure 4. Ratio of chlorpyrifos-oxon sequestered and chlorpyrifos-oxon non-metabolized by cytosolic esterases extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth (*Plutella xylostella* L.).

**Acetylcholinesterase(AChE)의 sensitivity**

Chlorpyrifos가 곤충의 체내에 투입되면 MFO(mixed function oxidase) 효소에 의하여 chlorpyrifos-oxon으로

전환되어 AChE를 저해하게 된다(Hiroyasu, 1989). 따라서 chlorpyrifos-oxon에 의한 AChE의 저해 정도를 측정하면 저항성 기작을 검정할 수 있는 원리를 이용하여, chlorpyrifos-oxon에 의한 AChE의 저해 정도( $I_{50}$ )를 산출한 결과 표 2에서 보는바와 같이 감수성 계통(SS)과 포장저항성 계통(FRS) 각각  $3.75 \times 10^{-8}$  M 수준과  $1.72 \times 10^{-5}$  M로 나타나 포장저항성 계통 배추좀나방에서 추출한 AChE의 저해가 감수성 보다 약 460배 높은 것으로 나타났다.

곤충의 AChE insensitivity가 유기인계나 카바메이트계 살충제에 대한 저항성 발달 기작 중 하나라는 사실은 오래 전부터 알려져 왔으며(Noppun 등, 1987; Metcalf, 1989), 배추좀나방의 경우에도 일부 유기인계 살충제에 대한 저항성 발달이 AChE의 insensitivity에 기인한 것이라고 보고된바 있다(Konno 와 Shishido, 1994).

Yu와 Nguyen (1992)는 chlorpyrifos를 비롯한 6종의 유기인계 및 2종의 카바메이트계 살충제에 대한 포장계통 배추좀나방의 저항성 발달 정도를 측정하여 광범위한 저항성이 유발되어있음을 보고하였으며, 저항성 계통 배추좀나방의 AChE가 감수성계통보다 1.7 배~1.8배 sensitivity 감소되었음을 파악하였고, 이것이 살충제 저항성 발달의 한 원인이라 보고하였다.

김 등(2003)이 실내에서 유도한 chlorpyrifos 저항성 배추좀나방의 살충제 저항성 특성 연구결과 AChE insensitivity가 저항성 계통이 감수성 계통에 비하여 11.8배 높게 나타났다고 보고하였으며, 본 연구 결과에서도 두 종간 460배 정도의 sensitivity 차이는 chlorpyrifos에 대한 배추좀나방의 저항성 발달의 주요인이 AChE의 높은 insensitivity임을 입증하는 것으로 판단되며, 포장 저항성과 유도된 저항성의 sensitivity 차이는 저항성이 발달된 기간의 차이에 의한 것으로 판단된다. 본 실험결과실내에서 저항성을 유도한 것과 포장에서 자연적으로 저항성이 유도된 배추좀나방

Table 2. Inhibition of acetylcholinesterase extracted from susceptible strain (SS) and field-resistant strain (FRS) diamondback moth(*Plutella xylostella* L.) by chlorpyrifos-oxon

Strain	Degree of inhibition, $I_{50}^{a)}$ (M)	S.E <sup>b)</sup> .(M)	Ratio <sup>c)</sup>
SS	$3.75 \times 10^{-8}$	$7.16 \times 10^{-9}$	-
FRS	$1.72 \times 10^{-5}$	$5.93 \times 10^{-6}$	458.7

a) Inhibition concentration of chemicals to inhibit a given enzyme to 50 percents

b) Standard error of  $I_{50}$  (M)

c) Ratio =  $\frac{I_{50} \text{ of chlorpyrifos-oxon to susceptible strain(SS)}}{I_{50} \text{ of chlorpyrifos-oxon to field resistant strain(FRS)}}$

의 저항성 특성은 저항성을 판단하는 효소의 활성도 차이가 다소 있으나, 동일 기작에 의해 저항성이 유발되는 것을 확인하였다.

### 감사의 글

본 연구는 '2004년도 강원대학교 학술연구조성비' 지원사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

### 인용문헌

- Asperen, K. V. (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8:401~416.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248~254.
- Daniel, M. B., M. D. Rozycki and S. J. Edelstein (1996) *Protein Methods*. Second edition. A John Willey & Sons, Inc., USA
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andress and R. M. Featherstone (1961) A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88~98.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974) Glutathione-S-transferase : the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Bio. Chem.* 249:7130~7139.
- Hiroyasu, A. (1989) Metabolic maps of pesticides. pp176~180, *In Ecotoxicology and Environmental Quality Series Vol. 2*. Academic Press Inc., USA
- Konno, Y. and T. Shishido (1989) Binding protein, a factor of fenitrothion detoxication in OP-Resistant Rice stem borers. *J. Pesti. Sci.* 14:359~362.
- Konno, Y. and T. Shishido (1994) A relationship between the chemical structure of organophosphates and insensitivity of acetylcholinesterase in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L (Lepidoptera : Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26:595~597.
- Metcalf, R. L. (1989) Insect resistance to insecticides. *Pestic. Sci.* 26:333~358
- Noppun, V., T. Miyata and T. Saito (1987) Cuticular penetration and metabolism of phenthoate in the resistant and susceptible diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *J. Pestic. Sci.* 12:84~94
- Scharf, M. E., J. J. Neal and G. W. Bennett (1998) Changes of insecticide resistance levels and detoxification enzymes following insecticide selection in the German Cockroach, *Blattella germanica* (L.) *Pestic. Biochem. Physiol.* 59:167~179.
- Sun, C. N., H. Chi, and H. T. Fen (1978) Diamondback moth resistance to diazinon and methomyl in Taiwan. *J. Econ. Entomol.* 71:551~554.
- Yu, S. J. and S. N. Nguyen (1992) Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.* 44:74~81.
- 김경주 (2003) 강원도 고랭지대 배추좀나방의 살충제 저항성 발달과 생화학적 특성 연구. 강원대학교 대학원 석사학위 논문.
- 김경주, 김성수, 김성문, 허장현 (2003) Chlorpyrifos 저항성 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 살충제 저항성 특성. *농약과학회지* 7:288~295.
- 박동식, 김태한, 김성수, 이상민, 김성문, 허장현 (2004) 강원도 고랭지 배추경작지의 토양 및 수질 중 농약 오염 실태. *농약과학회지* 8:189~197.
- 조준모, 김경주, 김성문, 허장현, 한대성 (2001) 강원도 고랭지대 배추경작지 배추좀나방(*Plutella xylostella* L.)의 유기인계 및 카바메이트계 살충제에 대한 저항성 발달. *농약과학회지* 5:30~35.

---

**Characteristics of resistance to chlorpyrifos in diamondback moth(*Plutella xylostella* L.) collected from Chinese cabbage alpine farmland at Gangwon-do, Korea**

Jun-Mo Cho<sup>1</sup>, Kyung-Joo Kim, Seong-Soo Kim, Hong-Ryeol Park, Chun-Keun Lim<sup>2</sup> and Jang-Hyun Hur<sup>\*</sup>(<sup>1</sup>*Pioneer Co, Ltd., Agricultural Building 2 #321, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Republic of Korea;* <sup>2</sup>*Department of Applied Biology, Division of Bioresources Technology, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Republic of Korea;* *Department of Biological Environment, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Republic of Korea*)

**Abstract :** A field-resistant strain of the diamondback-moth(*Plutella xylostella* L.), collected from Chinese cabbage alpine farmland at Gangwon-do, Korea, was used for determination of the characteristics of resistance to chlorpyrifos using the activities of esterases and glutathione-S-transferase(GST), protein sequestration and AChE insensitivity. Although the activities of esterases extracted from resistant strain and susceptible strain were not significantly different, isozyme bands shown on the electrophoresis were different. GST activity from field resistant strain was 1.5-fold higher than that of susceptible. No differences were shown between resistant and susceptible ones in protein sequestration. The insensitivities of AChE to chlorpyrifos, however, extracted from susceptible strain was 460-fold higher than those of resistant. These results indicated that the insensitivity of AChE is the major factor for developing the resistance and activities of GST might be a minor factor.

**Key words :** AChE insensitivity, chlorpyrifos, diamondback-moth, esterases, glutathione-S-transferase, insecticide resistance

---

\*Corresponding author (Fax : +82-33-241-6640, E-mail : jhhur@kangwon.ac.kr)