

Bifenazate 저항성 점박이응애에 대한 교차저항성과 미토콘드리아 cytochrome *b*의 점돌연변이

이규리 · 구현나 · 윤창만 · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

(2010년 8월 21일 접수, 2010년 8월 29일 수리)

Cross Resistance and Point Mutation of the Mitochondrial Cytochrome *b* of Bifenazate Resistant Two-spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae*

Kyu-Ri Lee, Hyun-Na Koo, Changmann Yoon and Gil-Hah Kim*

Department of Plant Medicine, College of Agriculture, Life, and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, South Korea

Abstract

Two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* was collected from the rose greenhouse in Chilgok, Gyeongbuk Province in December 2000. This population has been selected for ten years with bifenazate (over 450 times), and increased 855.9 fold in resistance as compared with susceptible strain (S). Cross resistance of bifenazate resistant (BR) strain to eight miticides was investigated. The BR strain exhibited high and low cross resistance to acequinocyl (614.0 fold) and to chlorfenapyr (9.1 fold), respectively. Against fenazaquin (0.3 fold) and fenpyroximate (0.1 fold), however, showed the strain negatively correlated cross resistance. Each strain collected in Choeng-ju (CJ), Kang-jin (KJ), and Chung-ju (CUJ) showed 5.5-, 964.5-, and 21.8-fold resistance to bifenazate, respectively. The detoxifying enzymes of the BR strain showed 1.6-fold activity in cytochrome P₄₅₀-dependent monooxygenase (P₄₅₀) as compared with susceptible one. By comparing the mitochondrial cytochrome *b* (*cytb*) sequence, G126S point mutation was detected in the BR and KJ strains.

Key words *Tetranychus urticae*, Bifenazate, Cross resistance, Point mutation, Cytochrome *b*

서 론

점박이응애(*Tetranychus urticae*)는 우리나라 뿐 만 아니라 전 세계적으로 농업과 원예 분야에 경제적 손실을 일으키는 주요해충으로 알려져 있다. 점박이응애는 발육 기간이 짧고, 연간 발생 세대수가 많아 살비제에 의한 도태의 기회가 많기 때문에 저항성 발달이 쉽고(Lee *et al.*, 2003; Song *et al.*, 1995), 이동성이 적고, 근친 교배가 일어나기 쉬우며, 외부로부터 감수성 유전자를 가진 개체의 침입이 적으므로 살

비제 저항성 발달이 다른 해충들에 비하여 빠르게 나타날 가능성을 지니고 있다(Lee *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007). 이와 같이 점박이응애는 약제에 대한 저항성 개체 출현이 빠르고, 교차저항성 발달 가능성이 높으므로 항상 약제저항성 모니터링을 통한 효과적인 방제대책이 필요하다.

곤충 체내에서 분비되는 Esterase(EST), glutathione S-transferase (GST), cytochrome P₄₅₀-dependent monooxygenase(P₄₅₀)와 같은 무독화효소는 방제를 위해 살포된 약제를 산화, 가수분해, conjugation 등의 과정을 거쳐 약효를 저하시키기도 한다. 이러한 무독화효소의 활성은 해충의 저항성 발현기작과도 밀접한 연관을 갖는 것으로 알려져 있다(Payne and Brown,

*연락처 : Tel. +82-43-261-2555, Fax. +82-43-271-4414
E-mail: khkim@chungbuk.ac.kr

1984; Song *et al.*, 1993; Kim and Chang, 1996). 예를 들어 malathion 저항성 모기의 esterases 활성이 감수성 모기의 esterases의 활성보다 최대 74배 높았다는 연구결과(Gopallan *et al.*, 1997)가 있는데, 이러한 결과는 약제의 약효감소와 저항성 해충 발달에 무독화 효소가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

Bifenazate [D2341; isopropyl 3-(4-methoxybiphenyl-3-yl)carbazate]는 1990년에 Uniroyal Chemical Company Inc.에 의해 발견된 carbazate계 화합물로 2000년에 상업화한 살비제이다(Tomlin, 2006). 국내에는 굴응애, 사과응애, 점박이응애에 대한 방제약제로 등록되어 있다(KCPA, 2009). Bifenazate는 곤충신경계의 post-synaptic GABA 수용체에 작용하는 신경독소로 먼저 알려졌다(Dekeyser, 2005), 최근 연구에 의하면 bifenazate 저항성은 모계유전이고(Yu *et al.*, 2005), 이 저항성이 미토콘드리아 복합체 III(bc1 복합체, ubihydroquinone : cytochrome *c* 산화환원효소 복합체)의 Q_o 지점에 작용한다고 보고되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2006; 2008). Cytochrome *b*(*cytb*)는 오직 미토콘드리아에서 물질을 변화시켜 주는 산화환원 단백질이며, 미토콘드리아 복합체 III에서 *Cytc₁*과 철분-유황 단백질(ISP)과 함께 촉매역할을 한다(Boore, 1999). 또한 bifenazate 저항성은 미토콘드리아 *cytb*에서의 점 돌연변이(point mutation)와 밀접하게 연관된다고 보고되었다(Van Leeuwen *et al.*, 2008; Van Nieuwenhuysse *et al.*, 2009). Bifenazate에 높은 저항성을 보이는 strain은 Q_o 지점의 cd1 helix에서 3개의 점 돌연변이(G126S, I136T, 그리고 S141F)와 ef helix에서의 1개의 점 돌연변이(P262T)를 보였다(Van Nieuwenhuysse *et al.*, 2009). 또한 유기인계 저항성 점박이응애의 acetylcholinesterase의 점 돌연변이 F331W,

G328A와 A201S를 확인(Khajehali *et al.*, 2009) 하는 등 최근 들어 약제 저항성을 확인하는 방법 중 작용 기작과 관련된 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다.

이에 본 연구는 2000년 12월 경북 칠곡 장미 재배지에서 채집한 집단(Lee *et al.*, 2003)을 실험실에서 10년간 도태하면서 bifenazate에 대한 저항성 발달 정도와 교차저항성의 유무를 조사하였고, bifenazate 저항성과 관련된 미토콘드리아 *cytb*의 유전자 변이를 찾기 위해 염기서열 분석을 수행하였으며 또한 청주, 강진, 충주 지역에서 채집한 점박이응애를 bifenazate 저항성 모니터링 자료에 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험약제

본 실험에 사용된 살비제는 시판되고 있는 abamectin(1.8% EC), acequinocyl(15% SC), bifenazate(13.5% SC), chlorfenapyr(5% EC), cyflumetofen(20% SC), fenazaquin(20% SC), fenpyroximate(5% SC), milbemectin(1% EC), tebufenpyrad(10% EC) 등 9종이었다.

실험곤충 및 저항성 선발

시험에 사용된 감수성계통(S)은 울릉도에서 채집한 점박이응애를 서울대학교에서 분양받아 2005년부터 충북대학교 식물의학과 곤충사육실에서 약제 처리 없이 누대 사육한 것을 사용하였다. Bifenazate 저항성계통 점박이응애는 2000년 12월에 경북 칠곡의 장미재배지에서 채집한 것을 대상으로 10년간 실내에서 bifenazate를 LC_{20~30} 농도로 희석하여 7일 간격으로 분무처리 하였다. 이렇게 도태시킨 결과 2010

Table 1. Cross resistance of several miticides against bifenazate susceptible (S) and resistant (BR) strains of *T. urticae* female adults

Miticides	LC ₅₀ (ppm) (95% CL ^{a)})		RR ^{b)}
	S strain	BR strain	
Abamectin	0.029(0.025-0.033)	0.023(0.004-0.034)	0.8
Acequinocyl	6.06(5.05-7.16)	3721(3251-4398)	614.0
Chlorfenapyr	5.10(4.41-5.85)	46.43(39.50-55.84)	9.1
Cyflumetofen	10.81(8.39-13.30)	12.54(9.77-15.50)	1.2
Fenazaquin	163.7(113.6-417.2)	45.26(33.52-57.79)	0.3
Fenpyroximate	119.2(92.66-168.3)	11.24(10.10-12.38)	0.1
Milbemectin	0.079(0.059-0.099)	0.067(0.054-0.084)	0.8
Tebufenpyrad	29.13(23.00-38.25)	20.24(15.55-26.84)	0.7

^{a)} 95% Confidence limits.

^{b)} Resistance ratio = LC₅₀ (ppm) of BR strain divided by LC₅₀ (ppm) of S strain.

년에 성충의 저항성비가 855.9배였으며, 이를 8종의 살비제에 대한 교차저항성 실험에 이용하였다(Table 1).

야외종에 대한 bifenazate 감수성 정도를 비교하기 위하여 지역별로는 청주, 강진, 충주에서 점박이응애를 채집하였다. 비교군으로서 2001년 1월 경남 김해의 장미재배지에서 채집한 점박이응애를 9년간 acequinocyl로 누대 선발하여 614배의 저항성을 획득한 개체군을 acequinocyl 저항성계통으로 사용하였다. 실내 사육조건은 온도 25~27°C, 광주기 16L : 8D, 상대습도 40~60%로 조절하였고 강낭콩을 기주로 하여 사육하였다.

살비제 처리방법

직경 5.5 cm의 페트리디쉬 내에 물을 충분히 적신 탈지면을 깔고 그 위에 직경 3 cm의 강낭콩 잎을 올려놓은 후 점박이응애 성충 20마리를 접종하였다. 적정농도로 희석된 약액을 스프레이를 이용하여 분무법으로 처리하였으며, 약제 처리 48시간 후에 살비율을 조사하였다. 실험은 3반복 이상으로 실시하였다. 살비율은 Finney(1971)의 probit계산법으로 LC₅₀값을 구하였다.

교차저항성과 지역별 계통 약제 저항성 실험

교차저항성 실험과 지역별 계통에 대한 저항성 실험은 살비제 처리방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, abamectin 등 8종에 대한 bifenazate 저항성계통의 LC₅₀(ppm)을 구하여 살비제 종류별 교차저항성 정도를 비교, 검토하였고 지역별 계통과 acequinocyl 저항성계통은 bifenazate 약제에 대한 저항성을 비교하였다.

효소활성 측정

암컷 성충 300마리를 2 ml glass-glass tissue grinder에서 200 μ l의 추출 buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 7.8)을 넣고 마쇄하였다. 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 EST, GST, P₄₅₀ 활성의 효소로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법(Bradford, 1976)을 사용하였으며, bovine serum albumin을 기준 단백질로 하였다.

Esterase (EST)

EST 활성은 Asperen(1962)의 방법을 변형하여 측정하였다. 10 μ g의 단백질 효소액에 각각 0.2 mM의 α -naphthyl acetate (α -NA)와 β -naphthyl acetate (β -NA)를 첨가한 다음 25°C에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 stop solution 50 μ l (0.2%

fast blue RR salt와 0.2% sodium dodecyl sulfate)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 흡광도 측정은 Bio-Rad Benchmark Microplate Reader (BIO-RAD, Hercules, CA)를 사용하여 595 nm의 흡광도를 측정하였다.

Glutathione S-transferase (GST)

GST활성은 Yu(1984)의 방법을 변형하여 측정하였다. 10 μ g의 단백질 효소액에 20 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)와 10 mM GSH(reduced glutathione)을 첨가한 다음 25°C에서 10분간 반응 후 Bio-Rad Benchmark Microplate Reader(BIO-RAD, Hercules, CA)을 이용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Cytochrome P₄₅₀-dependent monooxygenase (P₄₅₀)

단백질 효소액 100 μ g에 0.4 mM 7-ethoxycoumarin(7-EC)과 1 mM NADPH를 첨가한 후 96-well microtiter plate에 넣고 30°C에서 30분간 반응시켰다. 10 μ l oxidized glutathione (100 mM)과 20 μ l glutathione reductase(1 unit)(Chauret et al., 1999)를 첨가하여 실온에서 10분간 반응 후 125 μ l 50% acetonitrile을 넣어 반응을 중지시켰다. 반응 후 7-hydroxycoumarin(7-HC)를 SPECTRAMax GEMINI XS spectrofluorometer(Molecular Device Inc., Sunnyvale, CA)를 이용하여 390 nm 여기파장과 465 nm의 방출파장으로 측정하였다.

미토콘드리아 *cytb* 염기서열 분석

점박이응애의 genomic DNA는 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 분리하였다. 암컷 성충 100마리에 tissue lysis buffer를 가하여 유리막대로 마쇄한 후 20 μ l의 proteinase K를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 binding column tube를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR은 Van Nieuwenhuyse(2009)가 제시한 점박이응애 *cytb* primers [Cytbdia2F (5'-TTAAGAACTCTAAAACCTTTTCGTTC)와 Cytbdia2R (5'-GAAACAAAAATTATTATTCCTCCAC)]로 1 pmol의 template와 Ex-taq[™] DNA polymerase (Takara, Shiga, Japan)로 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 2분간 반응시켰다. 그리고 더 정확한 염기서열 분석을 위해 internal primer [cytbWTF(5'-CGGAATAATTTTACAAATAACTCATGC)와 cytbWTR(5'-TGGTACAGATCGTAGAATTGCG), PEWYF1 (5'-AAAGGCTCATCTAACCAAATAGG)와 PEWYR2

(5'-AATGAAATTTCTGTAAAAGGGTATTC)]을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR Purification Kit(Macrogen, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 PCR산물을 sequencing하여 비교분석하였다(Macrogen, Seoul, Korea).

결과 및 고찰

교차저항성

감수성계통 성충에 대한 bifenazate의 LC₅₀(ppm)은 2.9 ppm이었다. 저항성계통은 2000년 12월 채집할 당시 성충에 대해 6.0 ppm으로 저항성비는 2.1배이었으나, 10년 동안 bifenazate로 선발한 후에 성충에서의 LC₅₀(ppm)값은 2,482 ppm으로 저항성비는 855.9배로 발달하였다(Fig. 1).

Bifenazate에 대한 저항성비가 855.9배인 계통의 성충에 대한 8종 살비제의 교차저항성 유무를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 교차저항성 관계는 저항성비에서 어느 정도 값으로 할 것인가에 대한 명확한 기준은 없지만, 본 연구에서는

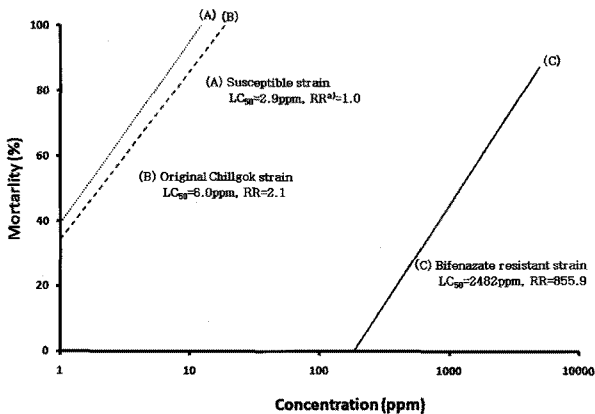


Fig. 1. Dose-dependent response of bifenazate susceptible, original Chilgok, and bifenazate resistant strains of *T. urticae* female adults.

^{a)} Resistance ratio = LC₅₀ (ppm) of each strain by LC₅₀ (ppm) of S strain.

Table 2. Bifenazate susceptibility against an acequinocyl resistant (AR), Cheong-ju (CJ), Kang-jin (KJ) and Chung-ju (CUJ) strains of *T. urticae* female adults

Strain/Population	LC ₅₀ (ppm) (95% CL ^{a)})	Slope ± SE	RR ^{b)}
AR	4.71 (3.95 - 5.69)	1.75 ± 0.20	1.6
CJ	15.9 (12.3 - 19.4)	1.81 ± 0.18	5.5
KJ	2797 (2524 - 3090)	2.88 ± 0.30	964.5
CUJ	63.2 (51.7 - 74.9)	1.94 ± 0.21	21.8

^{a)} 95% Confidence limits.

^{b)} Resistance ratio = LC₅₀ (ppm) of each strain by LC₅₀ (ppm) of S strain.

5 이상의 값을 나타낸 약제를 bifenazate와 교차저항성으로 정하였다. 한편 역상관교차저항성은 0.5이하의 값으로 하였으며, 비교차저항성은 0.6~4.9 사이의 값으로 하였다(Takahashi, 1979). Bifenazate 저항성계통의 성충에 대한 acequinocyl과 chlorfenapyr의 저항성비는 각각 614.0배와 9.1배의 교차저항성을 나타내었으며, abamectin, cyflumetofen, milbemectin, tebufenpyrad는 비교차저항성을 나타내었다. Chlorfenapyr, abamectin, tebufenpyrad 약제 저항성 점박이용애의 교차저항성에 관한 연구가 되어 있는데 Van Leeuwen *et al.*(2004)은 chlorfenapyr 저항성 점박이용애가 amitraz, clofentezine과 dimethoate에 높은 교차저항성을 보였고 비교차저항성을 보인 약제로는 acequinocyl, bifenazate, spiroadiclofen등을 보고하였다. 그리고 abamectin 저항성 응애는 milbemectin에 교차저항성을, fenpyroximate, cyhexatin, propargite와 dimethoate에는 비교차저항성을 보였다. Tebufenpyrad 저항성 응애는 pyridaben, fenpyroximate와 chlorfenapyr에 교차저항성을 나타내었다(Sato *et al.*, 2005; Herron and Rophail, 1998). 이처럼 많은 약제들의 작용점이 다르다는 것을 고려한다면, 교차저항성 발달은 독성역학보다는 공통으로 해독하는 작용점 때문일 것이다(Fergusson-Kolmes *et al.*, 1991; Devine *et al.*, 2001; Stumpf and Nauen, 2001; Kim *et al.*, 2004). 본 실험에 사용된 bifenazate 저항성계통은 그 유래가 야외 개체군이기 때문에 채집 이전의 포장 상태에서 이미 교차저항성을 나타낸 약제에 대해서 저항성이 발현되었을 수도 있다는 것을 배제할 수는 없지만, bifenazate 저항성계통에 대해서는 이들 약제의 살포를 지양해야 할 것이다. 역상관교차저항성을 나타낸 약제는 fenazaquin과 fenpyroximate로 저항성비가 각각 0.3, 0.1배를 나타내었다. Fenpyroximate 저항성 점박이용애는 pyridaben과 dimethoate에 교차저항성을 보였으며, propargite, abamectin, milbemectin, fenprophathrin과 cyhexatin에 대해 비교차저항성을 나타냈다(Sato *et al.*, 2004). Bifenazate 저항성을 보인 농가에서는 역상관교차저항성을

보인 fenazaquin과 fenpyroximate를 bifentazate와 교호로 살포한다면 효율적으로 점박이응애를 방제할 수 있을 것이다.

청주, 강진, 충주에서 채집한 점박이응애와 대조계통으로 acequinocyl 저항성계통과 bifentazate 저항성비를 확인해 본 결과, 강진 개체군이 964.5배로 높은 저항성비를 보였다. 그러나 청주와 충주에서 채집한 점박이응애의 저항성비는 각각 5.5, 21.8배로 다소 낮은 저항성비를 나타내었고, acequinocyl 저항성 계통에 대해서도 1.6배의 낮은 저항성비를 나타내었다(Table 2). Bifentazate 저항성 점박이응애가 acequinocyl 약제에 교차저항성을 보이는 반면, acequinocyl 저항성 점박이응애는 bifentazate에 대해 비교저항성을 나타내었다. 이는 앞서 언급한 bifentazate 저항성응애가 chlorfenapyr 약제에 대해 교차저항성을 보였으나, chlorfenapyr 저항성 응애가 bifentazate에 비교저항성을 나타낸 것과 같은 의미의 결과이다. 현재까지 이러한 결과와 관련된 원인 규명은 이루어지지 않고 있다. 따라서 분자생물학적 기법을 이용하여 작용 메커니즘에 어떠한 차이가 있는지를 연구해야 할 필요가 있다.

효소활성

감수성 계통, bifentazate 저항성, acequinocyl 저항성 그리고 청주, 강진, 충주의 세 지역에서 채집한 점박이응애의 EST, GST와 P₄₅₀의 효소활성을 비교하였다(Table 3). 그 결과, EST와 GST의 활성은 감수성과 차이가 없는 반면 P₄₅₀의 활성은 bifentazate와 acequinocyl의 저항성 점박이응애에서 각각 1.6배와 1.2배 높게 나타났다. 강진 개체군의 경우, P₄₅₀ 활성도가 감수성에 비해 1.3배 높은 것으로 나타났다. 생물검정에서 강진의 점박이응애가 bifentazate에 대해 저항성을 보이는 것으로 보아 bifentazate 저항성 점박이응애는 P₄₅₀의 효소활성이 저항성과 관련이 있을 것으로 사료되나 이를 증명

하는 추가실험이 필요하다. 또한 알려진 약제 해독방법 확인의 효소활성이 저항성과 모두 관련되어 있는 것은 아니다 (Van Leeuwen *et al.*, 2010). 즉, 이러한 효소활성만으로는 약제 저항성의 메커니즘을 규명하고 또 100% 확신하는 것은 오류를 범할 수 있다. 그러므로 효소활성을 통하여 약제 저항성 메커니즘에 접근한 후 점 돌연변이 확인 등 유전자 차원에서 분석하는 것이 바람직하다.

Bifentazate 저항성 점박이응애 cytb의 점 돌연변이

Bifentazate 저항성계통의 유전적 성향을 보이는 개체에서 점 돌연변이를 확인하기 위하여 미토콘드리아 cytb의 특정 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. 1,063 bp의 PCR 산물을 얻은 후 염기서열 분석을 통해 아미노산 서열을 비교해 본 결과, G126S 한 개의 점 돌연변이를 확인 할 수 있었다 (Fig. 2와 Table 4). Bifentazate에 대해 높은 저항성을 보인 강진 개체군의 cytb에서도 G126S 점 돌연변이를 확인 할 수 있었다. 그러나 낮은 저항성을 보인 청주 개체군과 충주 개체군은 돌연변이가 없는 것으로 확인되었다. 그리고 bifentazate 저항성 계통에 acequinocyl의 약제가 교차저항성을 나타내어 작용점이 같을 것으로 예상하여 acequinocyl 저항성 점박이응애의 미토콘드리아 cytb의 염기서열도 확인해 보았으나 bifentazate 저항성에 관련된 G126S 돌연변이는 발견되지 않았다. 그러나 I256V와 N321S의 다른 점 돌연변이가 확인되었다. 현재까지 bifentazate와 acequinocyl은 작용점이 같은 것으로 밝혀져 있지만, bifentazate 저항성 계통에 acequinocyl 약제가 교차저항성을 보이는 반면 acequinocyl 저항성 계통에는 bifentazate 약제의 교차저항성이 보이지 않는 것은 아직까지 밝혀지지 않은 다른 작용 기작이 있을 것으로 생각되므로, 이러한 현상과 관련된 유전자 변이를 찾는 연구가 필요하다. Van Nieuwenhuysse *et al.*(2009)는 실내에서 사육하던

Table 3. Comparison of detoxification enzyme activities to various substrates among the susceptible (S), bifentazate resistant (BR), acequinocyl resistant (AR), Cheong-ju (CJ), Kang-jin (KJ), and Chung-ju (CUJ) strains of *T. urticae* female adults

Strain	Enzyme activity (OD/mg protein)				Fold ratio to S			
	EST		GST	P ₄₅₀	EST		GST	P ₄₅₀
	α-NA	β-NA	CDNB	7-EC	1-NA	2-NA	CDNB	7-EC
S	301.2	138.1	194.6	252.7	1.0	1.0	1.0	1.0
BR	225.8	179.3	198.7	399.0	0.7	1.3	1.0	1.6
AR	291.2	120.2	236.3	304.8	1.0	0.9	1.2	1.2
CJ	280.0	152.4	187.5	315.1	0.9	1.1	1.0	0.1
KJ	310.4	132.0	202.0	334.5	1.0	1.0	1.0	1.3
CUJ	298.3	141.9	183.8	273.0	1.0	1.0	0.9	0.1

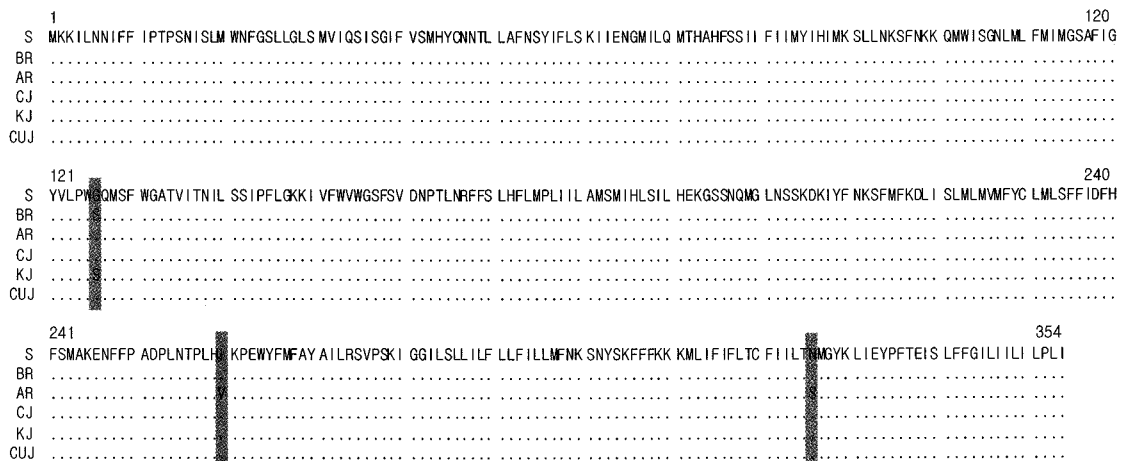


Fig. 2. Alignment of deduced amino acid sequences of mitochondrial *cytb* from susceptible (S), bifenazate resistant (BR), acequinocyl resistant (AR), Cheong-ju (CJ), Kang-jin (KJ), and Chung-ju (CUJ) strains of *T. urticae* female adults.

Table 4. Correlations of strain and miticide resistance ratio or P₄₅₀ activity or mutation (s)

Strain	Resistance ratio	P ₄₅₀ activity	Point mutation (s)
S	Low	Low	No
BR	Very high	Intermediate	G126S
AR	Low	Intermediate	I256V, N321S
CJ	Low	Low	No
KJ	Very high	Intermediate	G126S
CUJ	Low	Low	No

감수성 계통을 LC₉₀값으로 도태시켜 5세대 후 미토콘드리아 *cytb* 에서 G126S, I136T, S141F, P262T의 점 돌연변이를 발견하였는데 이 논문의 결과와는 다소 차이가 있다. 그 이유는 여러 가지 환경적 조건과 저항성 정도 차이 때문일 것으로 보인다. Van Nieuwenhuysse *et al.*(2009)이 제시한 bifenazate 저항성 점박이응애는 LC₅₀값이 100,000 ppm 이상이었으나 본 실험에 사용한 bifenazate 저항성 점박이응애는 2,482 ppm으로 저항성이 다소 낮은 경향을 보였다. 이는 도태시킬 때의 처리약제의 농도를 높인다면 좀 더 많은 점 돌연변이를 확인 할 수 있으리라 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 점박이응애에 대한 bifenazate 의 저항성 발달은 빨랐으며, 강진 개체군의 bifenazate 저항성은 미토콘드리아 *cytb*의 G126S 돌연변이가 저항성 발달에 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 또한 이러한 결과는 G126S 돌연변이가 저항성 모니터링을 위한 좋은 분자진단 마커로서의 가능성을 제시한다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 수출농업기술과제의 연구비지원 (20100401-030-003-001-04-00)과 교육인적자원부의 제2단계 두뇌한국 21사업의 지원으로 수행되었다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Asperen, K. V. (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* 8:401~416.

Boore, J. L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767~1780.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annu. Rev. Biochem.* 72:248~254.

Chauret, N., N. Tremblay, R. L. Lackman, J. Y. Gauthier, J. M. Silva, J. Marois, J. A. Yergey and D. A. Nicoll-Griffith (1999) Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal. Biochem.* 276: 215~226.

Dekeyser M. A. (2005) Acaricide mode of action. *Pest Manag. Sci.* 61:103~110.

Devine, G. J., M. Barber and I. Denholm (2001) Incidence and inheritance of resistance to METI-acaricides in European strain of the Two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Acari: Tetranychidae). *Pest Manag. Sci.* 57:443~448.

Fergusson-Kolmes, L. A., J. G. Scott and T. J. Dennehy (1991)

- Dicofol resistance in *Tetranychus urticae*(Acari: Tetranychidae): cross-resistance and pharmacokinetics. J. Econ. Entomol. 84:41~48.
- Finney, D. J. (1971) Probit analysis. 3rd ed. pp.333, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gopallan, N., B. K. Bhattacharya, S. Prakash, and K. M. Rao (1997) Characterization of carboxylesterases from malathion-resistant *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Pestic. Biochem. Physiol. 57:99~108.
- Herron, G. A. and J. Rophail (1998) Tebufenpyrad (Pyranica®) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia. Exp. App. Acarol. 22:663~641.
- KCPA. (2009) Guide book use pesticide. pp.1135, Seoul.
- Khajehali, J., T. Van Leeuwen, M. Grispou, E. Morou, H. Alout, M. Weill, L. Tirry, J. Vontas and A. Tsagkarakou (2009) Acetylcholinesterase point mutations in European strains of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) resistant to organophosphates. Pest Manag. Sci. 66:220~228.
- Kim, Y. and D. Chang (1996) Role of general esterases in deltamethrin resistance mechanism of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. Korean J. Appl. Entomol. 35:74~79.
- Kim, Y. J., S. H. Lee, S. W. Lee and Y. J. Ahn (2004) Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. Pest Manag. Sci. 60:1001~1006.
- Kim, Y. J., S. W. Lee, J. R. Cho, H. M. Park and Y. J. Ahn (2007) Multiple resistance and biochemical mechanisms of Dicofol resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) J. Asia Pacific Entomol. 10:165~170.
- Lee, S. Y., K. S. Ahn, C. S. Kim, S. C. Shin and G. H. Kim (2004) Inheritance and stability of etoxazol resistance in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its cross resistance. Korean J. Appl. Entomol. 3:43~48.
- Lee Y. S., M. H. Song, K. S. Ahn, K. Y. Lee, J. W. Kim and G. H. Kim (2003) Monitoring of acaricide resistance in two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose greenhouses in Korea J. Asia Pacific Entomol. 6:91~96.
- Payne, G. T. and T. M. Brown (1984) EPN and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate as synergist of methyl parathion in resistance tobacco budworm larvae (Lepidoptera:Noctuidae). J. Econ. Entomol. 77:294~287.
- Sato, M. D., T. Miyata, M. Da Silva, A. Raga and M. F. De Souza Filho (2004) Selections for fenpyroximate resistance and susceptibility and inheritance, cross-resistance and stability of fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Appl. Entomol. Zool. 39:293~302.
- Sato, M. E., M. Z. Da Silva, A. R. Ra and M. F. De Souza Filho (2005) Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): Selection, Cross-resistance and stability of resistance. Neotropical Entomol. 34:991~998.
- Song, C., G. H. Kim, S. J. Ahn, N. J. Park and K. Y. Cho (1995) Acaricide susceptibilities of field-collected populations of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Korean J. Appl. Entomol. 34:328~333.
- Song, S. S., H. G. Oh and N. Motoyama (1993) Seasonal fluctuation of carboxylesterase activity in field collected populations of the green peach aphid. Korean J. Appl. Entomol. 32:348~353.
- Stumpf, N. and R. Nauen (2001) Cross-resistance, inheritance and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 94:1577~1583.
- Takahashi, Y. (1979) Pesticide design: strategy and tactics (by Yamamoto, I and J. Fukami). pp.663~692, Soft Science, Inc.
- Tomilin, C.D.S. (2006) The pesticide manual. pp.91-92, British Crop Protection Council, Fourteenth Edition.
- Van Leeuwen, T., V. Stillatus and L. Tirry (2004) Genetic analysis and cross-resistance spectrum of a laboratory-selected chlorfenapyr resistant strain of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 32:249~261.
- Van Leeuwen, T., L. Tirry and R. Nauen (2006) Complete maternal inheritance of bifenazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. Insect Biochem. Mol. Biol. 36:869~877.
- Van Leeuwen, T., B. Vanholme, S. Van Pottelberge, P. Van Nieuwenhuysse, R. Nauen, L. Tirry and I. Denholm (2008) Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:5980~5985.
- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw and L. Tirry (2010) Acaricide resistance mechanism in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. Insect Biochem. Mol. Biol. 40:563~572.
- Van Nieuwenhuysse, P., T. Van Leeuwen, J. Khajehali, B. Vanholme and L. Tirry (2009) Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifenazate and acequinocyl. Pest Manag. Sci. 65:404~412.
- Yu, J. S., D. K. Seo, E. H. Kim, J. B. Han, K.S. Ahn and G. H. Kim (2005) Inheritance and cross resistance of bifenazate resistance in twospotted spider mite, *Tetranychus urticae*. Korean J. Appl. Entomol. 44:151~156.
- Yu, S. J. (1984) Interactions of allelochemicals with detoxication enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. Pestic. Biochem. Physiol. 22:60~68.

Bifenazate 저항성 점박이응애에 대한 교차저항성과 미토콘드리아 cytochrome *b*의 점돌연변이

이규리 · 구현나 · 윤창만 · 김길하*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

요 약 2000년 12월 경북 칠곡의 장미재배지에서 점박이응애를 채집하여 10년 동안 bifenazate로 도태시켜 855.9배의 저항성 계통을 얻었다. 이 계통의 성충에 대한 8종 살비제의 교차저항성 유무를 조사한 결과, acequinocyl에 614.0배의 높은 교차저항성을 나타내었고, chlorfenapyr는 9.1배의 낮은 교차저항성을 나타내었다. 한편 fenazaquin(0.3배)와 fenpyroximate(0.1배)는 역상관 교차저항성을 나타내었다. 청주, 강진, 충주에서 채집한 점박이응애의 bifenazate 저항성을 확인해 본 결과, 청주와 충주의 개체군은 각각 5.5배, 21.8배의 낮은 저항성을 보였고 강진 개체군은 964.5배의 높은 저항성을 나타내었다. 또한 esterases(EST), glutathione S-transferase(GST)과 cytochrome P₄₅₀-dependent monooxygenase(P₄₅₀)의 효소활성을 조사한 결과, bifenazate 저항성 점박이응애의 P₄₅₀의 활성이 감수성계통에 비해 1.6배 높은 것으로 나타났다. 감수성계통과 저항성계통의 미토콘드리아 cytochrome *b*의 DNA 염기서열과 아미노산을 비교한 결과, G126S의 점 돌연변이(point mutation)를 확인하였고 bifenazate 약제에 높은 저항성을 보이는 강진 개체군에서도 G126S의 점 돌연변이를 확인하였다.

색인어 점박이응애, Bifenazate, 교차저항성, 점 돌연변이, 시토크롬 *b*
