

복숭아혹진딧물 야외개체군의 λ -cyhalothrin, imidacloprid, 그리고 flupyradifurone에 대한 저항성 모니터링과 점 돌연변이 분석

문하현 · 이유노 · 강동현 · 김세은 · 김현경 · 구현나 · 김길하*

충북대학교 식물학과

Resistance Monitoring and Analysis of Point Mutations to λ -cyhalothrin, Imidacloprid, and Flupyradifurone in Field-collected Populations of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)

Ha Hyeon Moon, Yuno Lee, Dong-Hyun Kang, Se Eun Kim, Hyun Kyung Kim, Hyun-Na Koo and Gil-Hah Kim*

Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

ABSTRACT: The green peach aphid, *Myzus persicae* is a representative agricultural insect pest that is polyphagous and causes serious damage to tobacco, potatoes, peppers, cabbage, and peaches. In this study, we analyzed the level of development of insecticide resistance to λ -cyhalothrin, imidacloprid, and flupyradifurone and the point mutations (R81T, L1014F, M918L) in 12 field populations of *M. persicae*. In addition, the expression level of *CYP6CY3*, a cytochrome P450 gene, was analyzed through qRT-PCR. As a result, λ -cyhalothrin showed high resistance ratio (RR) of > 200 in all 12 populations. Imidacloprid and flupyradifurone showed high RR of > 200 in YS, UR, HY, and WJ populations. The R81T was detected in approximately 50%, L1014F in approximately 33.3%, and M918L in 100% of the 12 populations. Additionally, the expression level of subunit *CYP6CY3* was highest in imidacloprid-resistant population (YS). These results suggest that M918L point mutation can be used as λ -cyhalothrin-resistance molecular diagnostic and R81T point mutation and the high expression of *CYP6CY3* can be used as imidacloprid-resistance molecular diagnostic markers.

Key words: *Myzus persicae*, Insecticide susceptibility, Point mutation, *CYP6CY3*

초록: 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 다식성으로 담배, 감자, 고추, 배추, 복숭아 등에 심각한 피해를 입히는 대표적인 농업해충이다. 본 연구에서는 국내 복숭아혹진딧물 야외개체군의 λ -cyhalothrin, imidacloprid 및 flupyradifurone에 대한 약제 저항성 발달 수준과 점 돌연변이(R81T, L1014F, M918L)의 발생 여부를 확인하였다. 또한, qRT-PCR을 통해 사이토크롬 P450 유전자인 *CYP6CY3* 발현량을 확인하였다. 그 결과, λ -cyhalothrin은 저항성비(Resistance Ratio, RR)가 12개 모든 지역이 > 200 으로 높은 저항성을 보였다. Imidacloprid와 flupyradifurone은 YS, UR, HY, 그리고 WJ 개체군에서 > 200 의 저항성비로 높은 저항성을 나타냈다. R81T는 12개 집단 중 약 50%, L1014F는 약 33.3%, M918L은 100%에서 발현하였다. 또한 qRT-PCR을 통해 imidacloprid 저항성 개체에서 subunit *CYP6CY3*의 발현량이 높게 나타난 것을 확인하였다. 이러한 결과는 M918L 점 돌연변이는 λ -cyhalothrin 저항성 진단마커로, R81T와 *CYP6CY3*의 높은 발현은 imidacloprid 저항성 진단마커로 활용이 가능하다는 것을 시사한다.

검색어: 복숭아혹진딧물, 약제저항성, 점돌연변이, *CYP6CY3*

*Corresponding author: khkim@cbnu.ac.kr

Received January 9 2024; Revised February 13 2024

Accepted February 15 2024

복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)은 다식성으로 담배, 감자, 고추, 배추, 복숭아 등에 심각한 피해를 입히는 대표적인 농업 해충이다(Blackman and Eastop, 2000). 세계적으로 분포하는 복숭아혹진딧물은 신초나 새로 나온 잎을 흡즙하여 작물의 생육을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 여러 식물 바이러스들을 매개하여 심각한 경제적 손실을 초래한다(Blackman and Eastop, 2007). 현재 살충제 사용으로 방제가 용이해졌으나 무분별한 사용으로 인해 유기인계, 카바메이트계, 피레스로이드계 및 네오니코티노이드계 등의 살충제에 대한 저항성이 지속적으로 발생하고 있다(Devonshire et al., 1998; Nauen and Denholm, 2005). 피레스로이드계 살충제에 대한 높은 저항성이 발달하면서 1990년대부터 네오니코티노이드계에 크게 의존했고, 이로 인해 네오니코티노이드계 살충제들에 대한 저항성이 수년간 눈에 띄게 증가했다(Voudouris et al., 2017; Margaritopoulos et al., 2021). 네오니코티노이드계의 중요한 대안 중 하나인 flupyradifurone은 네오니코티노이드계와 마찬가지로 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR)에 작용하고(Jeschke et al., 2015), Sivanto라는 이름으로 중미에서 최초로 상업 등록을 획득한 뒤 2014년에 출시된 부테놀라이드 살충제이다. 하지만, 이 약제 또한 최근 들어 복숭아혹진딧물에 대한 flupyradifurone의 높은 저항성이 보고되고 있는 실정이다(Papadimitriou et al., 2022).

지금까지 복숭아혹진딧물에서 살충제 저항성 기작으로는 무독화 효소 활성 증가와 표적 부위 돌연변이 등의 메커니즘들이 보고되었다. 이 중, 효소 활성 메커니즘으로는 유기인계, 카바메이트계 및 일부 피레스로이드 계열에 저항성을 부여하는 카르복실에스테라제(CarE) 활성의 증가를 들 수 있다(Needham and Sawicki, 1971). 추가 연구에서는 *E4* 및 *FE4* 유전자의 과잉 생산으로 인해 살충제가 곤충 신경계의 표적 부위에 도달하기 전에 가수분해된다는 것이 밝혀지기도 하였다(Devonshire et al., 1983; Field et al., 1988). 사이토크롬 P450의 과발현으로 인한 해독 대사 증가 또한 네오니코티노이드계 저항성의 주요 메커니즘이다(Rauch and Nauen, 2003; Puinean et al., 2010). *CYP6-CY3*의 과발현은 담배를 기주로 하는 복숭아혹진딧물에서 처음 발견되어 니코틴과 네오니코티노이드를 효율적으로 대사하는 것으로 밝혀졌다(Bass et al., 2013). 식물의 화학 및 독성 물질에 해독 기능을 가지고 있는 glutathion S-transferase (GST)의 효소 활성은 복숭아혹진딧물에서 십자화과 식물의 글루코시놀레이트와 이소티오시아네이트의 해독에 관여한다(Francis et al., 2005).

표적 부위 돌연변이를 통한 살충제 저항성의 메커니즘 중 하나는 아세틸콜린에스테라제(MACE) 돌연변이로, 세린에서 페닐알라닌으로의 치환을 유발하는 점 돌연변이(S431F)이다

(Nabeshima et al., 2003; Andrews et al., 2004). 1990년대 초 그리스에서 복숭아혹진딧물의 카바메이트 계열 살충제에 대한 저항성이 보고되었는데, MACE가 카바메이트에 대해 강한 저항성을 부여한다고 밝혀졌다(Moore et al., 1994). GABA 수용체의 돌연변이는 가장 중요한 저항성 메커니즘 중 하나이다. 수년 동안 endosulfan에 노출된 복숭아혹진딧물에서 저항성이 미국에서 보고되었다(Unruh et al., 1996). 사이클로디엔에 대한 저항성은 *Rdl* 유전자에 의해 암호화되는 γ -아미노뷰티르산(GABA) 수용체의 M2 영역에 있는 돌연변이(A302S 및 A302G)로 인해 발생한다(French-Constant et al., 2000). Anthony et al. (1998)은 A302S는 endosulfan 저항성과 관계없이 모든 집단에서 나타나고, 대립유전자 G만이 저항성을 부여한다는 것을 확인하였다.

가장 흔한 돌연변이인 녹다운 저항성(*kdr*)은 집파리(*Musca domestica*)에서 처음 발견되었다(Williamson et al., 1996). *kdr*은 나트륨 채널 단백질의 도메인 IIS6 세그먼트 내에서 류신에서 페닐알라닌으로의 치환(L1014F)되는 과정에서 발현되며, 다양한 해충 중에서 보고되었다(Davies et al., 2007). 에스테라제의 과잉 생산 또한 피레스로이드계 살충제 저항성에 관여하지만, *kdr*이 피레스로이드계에 대해 이차적인 저항성을 부여하는 주요 메커니즘이라는 것이 밝혀졌다(Martinez-Torres et al., 1999). 도메인 II에서는 도메인 IIS4-IIS5 링커에 위치한 더 강력한 저항성을 나타내는 *s-kdr*이 확인되었는데(Eleftherianos et al., 2002), 메티오닌에서 트레오닌으로 치환되는 M918T는 L1014F의 존재와 관련이 있다(Eleftherianos et al., 2008). 또한, *s-kdr* 돌연변이의 또 다른 아미노산 치환인 M918L이 확인되었으며 M918T와 달리 *kdr*이 존재하지 않아도 돌연변이가 발현된다(Fontaine et al., 2011). Panini et al. (2015)은 M918T와 M918L이 동시에 존재할 수 있다고 보고하였다.

네오니코티노이드계 살충제, 특히 imidacloprid에 저항성을 나타내는 집단에서 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAChR) $\beta 1$ 서브유닛의 루프 D 영역에서 아르기닌에서 트레오닌으로 치환되는 점 돌연변이(R81T)가 확인되었다(Bass et al., 2011). 이러한 돌연변이는 복숭아혹진딧물에서 imidacloprid에 대한 nAChR의 결합 친화도를 감소시켜 이미다클로프리드 저항성을 유발한다(Slater et al., 2012). Cutler et al. (2013)에 따르면, R81T 돌연변이는 nAChR에 작용하는 다른 살충제(sulfoxaflor 및 flupyradifurone)에 영향을 준다고 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 약제 감수성 평가를 통해 국내에서 채집한 복숭아혹진딧물 야외개체군의 λ -cyhalothrin, imidacloprid 및 flupyradifurone에 대한 저항성 수준을 모니터링하고, 저항성 메커니즘 구명을 위해 점 돌연변이(R81T, L1014F, M918L)

의 발생 여부를 확인 후, qRT-PCR을 통해 사이토크롬 P450 유전자인 *CYP6CY3* 발현량을 분석하였다.

재료 및 방법

시험곤충

본 실험에 사용한 복숭아혹진딧물 감수성 계통(S)은 농촌진흥청에서 분양받아 2022년부터 충북대학교 식물위학과 곤충생태 및 독성학실험실 사육실에서 약제 처리 없이 누대사육한 것을 사용하였다. 복숭아혹진딧물의 야외개체군은 12개의 지역(화성, HS; 김포, GP; 진천, JC; 충주, CJ; 거창, GC; 논산, NS; 군위, GW; 예산, YS; 증평, JP; 의령, UR; 함양, HY; 완주, WJ)에서 채

집하였으며, 실내에서 2주 이상의 기간을 두고 사육한 후 실험에 사용하였다(Table 1). 실내 사육조건은 온도 23~25°C, 광주기 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건으로 농약을 처리하지 않은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유묘를 기주로 사육하였다.

시험약제

실험에 사용된 살충제는 피레스로이드 계열 약제 4종(α -cypermethrin, bifenthrin, fenvalerate, λ -cyhalothrin)과 네오니코티노이드 계열 약제 4종(acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiamethoxam), 부테놀라이드 계열 약제 1종(flupyradifurone) 등 총 9종으로 시판되고 있는 제품을 이용하였다(Table 2). 가장 저항성인 WJ 집단에 대한 피레스로이드 계열 약제 4종과 네

Table 1. Information of *Myzus persicae* populations which collected from field

Population	Date of collected	Region	Host plant
HS	2022. 05	Gisan-dong, Hwaseong-si	Pepper
GP	2022. 06	Sau-dong, Gimpo-si	Pepper
JC	2022. 06	Deoksan-eup, Jincheon-gun	Peach
CJ	2022. 06	Hoam-dong, Chungju-si	Peach
GC	2022. 07	Gabuk-myeon, Geochang-gun	Pepper
NS	2022. 07	Gayagok-myeon, Nonsan-si	Pepper
GW	2022. 08	Bugye-myeon, Gunwi-gun	Pepper
YS	2022. 08	Oga-myeon, Yesan-gun	Pepper
JP	2022. 09	Jeungpyeong-eup, Jeungpyeong-gun	Chinese cabbage
UR	2022. 09	Uiryong-eup, Uiryong-gun	Chinese cabbage
HY	2022. 09	Jigok-myeon, Hamyang-gun	Chinese cabbage
WJ	2022. 09	Iseo-myeon, Wanju-gun	Chinese cabbage

Table 2. Information of the tested insecticides

Insecticide	Mode of action (IRAC No.)	AI ^{a)} (%)	Formulation ^{b)}	Recommended conc. (ppm)
α -cypermethrin	3a	2	EC	20
Bifenthrin	3a	1	EC	10
Fenvalerate	3a	5	EC	50
λ -cyhalothrin	3a	1	EC	10
Acetamiprid	4a	8	WP	40
Clothianidin	4a	8	SG	40
Imidacloprid	4a	8	SC	40
Thiamethoxam	4a	10	WG	50
Flupyradifurone	4d	17.09	SL	42.725

^{a)}Active Ingredient.

^{b)}EC; Emulsifiable concentrate, WP; Wettable powder, SG; Water soluble granule, SC; Suspension concentrate, WG; Water dispersible granule, SL; Soluble concentrate.

오니코티노이드 계열 약제 4종의 감수성을 확인한 후(Table 3), 계열별로 가장 저항성을 보이는 λ -cyhalothrin과 imidacloprid를 선정하였으며, 감수성을 비교하기 위해 비교적 최근에 출시된 약제인 flupyradifurone를 실험에 사용하였다.

약제 감수성 평가

복숭아혹진딧물 성충에 대한 약제 감수성 평가는 잎 침지법으로 실험을 수행하였다. 배추 잎을 ϕ 5.0 cm로 잘라 적정 농도 (λ -cyhalothrin 2.5~640 ppm, imidacloprid 5~1280 ppm, flupyradifurone 1.34 ~ 2734.4 ppm)로 희석한 약액에 침지하여 배추 잎 표면의 물기가 다 마를 때 까지 20분 동안 음건하였다. ϕ 5.0 cm 페트리디쉬 내에 1.5% agar를 깔고 그 위에 침지 후 음건한 배추 잎을 올려놓은 후 복숭아혹진딧물 무시성충을 20마리씩 접종하였다. 약제 처리 후 온도 23~25°C, 광주기 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에 두고 24, 48, 72시간 후 생충수를

조사하였다. 실험은 3반복으로 실시하였고, 보정살충률은 Abbott's formula를 이용하여 계산하였다(Abbott, 1925).

$$\text{보정살충률(\%)} = \frac{\text{무처리 생충률} - \text{처리구 생충률}}{\text{무처리 생충률}} \times 100$$

유전자 PCR 및 염기서열 분석

복숭아혹진딧물의 genomic DNA는 G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron, Seongnam, Korea)를 사용하여 추출하였다. 100마리의 무시성충을 사용하였으며 200 ng의 gDNA를 PCR에 사용하였다(AccuPower® HotStart PCR PreMix, Bioneer, Daejeon, Korea). Table 4의 primer를 이용하여 94°C에서 5분 동안 반응시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분(35 cycles), 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물은 sequencing하여 비교분석하였다(Bioneer, Daejeon, Korea).

Table 3. Susceptibility of *M. persicae* to 8 insecticides

Mode of action	Insecticides	Mortality (%) \pm SD		
		Half recommended conc.	Recommended conc.	2x Recommended conc.
3a	α -cypermethrin	18.8 \pm 10.22	26.7 \pm 3.57	40.7 \pm 7.64
	Bifenthrin	20.0 \pm 8.66	29.0 \pm 10.75	41.0 \pm 5.27
	Fenvalerate	13.2 \pm 9.77	20.7 \pm 2.89	43.1 \pm 8.66
	λ -cyhalothrin	8.3 \pm 10.41	13.0 \pm 6.05	33.1 \pm 7.96
4a	Acetamiprid	45.0 \pm 5.00	49.4 \pm 8.14	73.3 \pm 7.64
	Clothianidin	38.3 \pm 12.58	50.0 \pm 10.00	78.9 \pm 10.58
	Imidacloprid	7.9 \pm 8.31	14.9 \pm 6.99	66.1 \pm 5.77
	Thiamethoxam	41.0 \pm 3.53	68.2 \pm 8.17	71.7 \pm 7.53

Table 4. Sequences of the primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Purpose	Reference
CA_GPA_b1-F	GGCCGTGTTCTTCGTCTGTTC	PCR of R81T	Koo et al., 2014
CA_GPA_b1-R	CCCAAGTTCGGGATTTCCAGTAGT		
5' v _{gsc} _L1014F	AGACCACGAGCTTCCCCGGTG	PCR of L1014F	Oh, 2012
3' v _{gsc} _L1014F	GATGTTGTAGGTTCTGGATAGC		
5' v _{gsc} _M918L	AAGCCGCTCTGAAACTGATGGCG		
3' v _{gsc} _M918L	TCTCCGACGTGTAACAGTCCCAC		
CYP6F	CGGGGTGACGATCATCTATT	qRT-PCR of <i>CYP6CY3</i>	
CYP6R	GGGTGGTCTTTTGACAAAGC		
MpActF1	GTGTCTCACACACAGTGCC	qRT-PCR amplification of the actin reference gene	Bass et al., 2013
MpActR1	GGCGGTGGTGGTGAAGCTG		
Aph1R	TGGTATACACGTTGGTTCTC	qRT-PCR amplification of the para reference gene	
Aph18	ACCACGAGCTTCCCCGGTG		

Quantitative real-time PCR

복숭아혹진딧물의 RNA는 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (Intron, Seongnam, Korea)를 사용하여 추출하였다. 100마리의 무시성충을 사용하였으며 100 ng의 RNA를 cDNA 합성에 사용하였다(ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover, TOYOBO Co., Osaka, Japan). qRT-PCR은 Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)를 이용하였다. Table 4의 primer를 이용하여 95°C에서 10분 동안 반응시킨 후 95°C에서 15초, 57°C에서 15초, 72°C에서 20초의 조건으로 총 40 cycles의 PCR을 수행하였고, 72°C~95°C에서 초당 0.2°C로 melt curve를 분석하였다. qRT-PCR의 결과는 housekeeping genes의 기하 평균을 사용하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법(Livak and Schmittgen, 2001)을 이용하여 계산하였다.

데이터 분석

복숭아혹진딧물에 대한 보정살충률은 채집지역과 약제처리 후 경과 시간별로 probit graph를 이용하여 비교분석하였다(SAS Institute 9.4, SAS Inc.).

결과

지역별 약제 감수성 평가

6개 지역(GP, GC, YS, UR, HY, WJ)에서 채집한 복숭아혹

진딧물 야외개체군을 대상으로 λ -cyhalothrin, imidacloprid, 그리고 flupyradifurone에 대해 추천농도와 추천농도의 1/2에서 약제 감수성을 평가하였다(Table 5). 그 결과, λ -cyhalothrin은 6개 야외개체군 모두 추천농도에서 25% 이하의 낮은 살충률을 보였다. Imidacloprid의 경우 GP와 GC 개체군이 각각 100%, 97.1%의 높은 살충률을 보였으나, YS, UR, HY, WJ 개체군은 14.9~42.2%의 낮은 살충률을 보였다. Flupyradifurone은 GP와 GC 개체군이 각각 100%, 78.9%의 높은 살충률을 보였으며 YS, UR, HY, WJ 개체군은 11.8~47.5%의 낮은 살충률을 보였다.

λ -cyhalothrin, imidacloprid, 그리고 flupyradifurone에 대해 복숭아혹진딧물 야외개체군에 대한 지역별 저항성비(Resistance Ratio, RR)를 감수성 계통(S)의 RR값과 각각 비교하였다(Table 6-8). 그 결과, λ -cyhalothrin은 모든 개체군에서 매우 높은 RR값(>200)을 나타냈다(Table 6). Imidacloprid의 경우 GP (17.5)와 GC (4.1) 개체군은 낮은 RR 값을 보였고, YS, UR, HY, WJ 개체군은 200 이상의 높은 RR 값을 나타냈다(Table 7). Flupyradifurone의 경우 GP와 GC 개체군은 각각 18.3, 104.2의 RR 값을 나타냈고 YS, UR, HY, WJ 개체군은 200 이상의 높은 RR 값을 나타냈으며 imidacloprid와 유사한 경향을 보였다(Table 8).

저항성 점 돌연변이 확인

모든 복숭아혹진딧물 야외개체군(HS, GP, JC, CJ, GC, NS, GW 등)에 대한 저항성 점 돌연변이(R81T, L1014F, M918L) 여부를 확인하였다(Table 9). 그 결과, 감수성 계통에서는 점 돌연변이가 모두 확인되지 않았지만, nAChR $\beta 1$ subunit 유전자

Table 5. Susceptibility of the S strain and 6 field populations of *M. persicae* to 3 insecticides

Popu- lation	Mortality (%) \pm SD					
	λ -cyhalothrin		Imidacloprid		Flupyradifurone	
	Recommended conc. (10ppm)	Half recommended conc. (5 ppm)	Recommended conc. (40 ppm)	Half recommended conc. (20 ppm)	Recommended conc. (42.725 ppm)	Half recommended conc. (21.3625 ppm)
S	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00
GP	14.8 \pm 8.22	3.4 \pm 5.00	100.0 \pm 0.00	98.3 \pm 2.89	100.0 \pm 0.00	100.0 \pm 0.00
GC	24.2 \pm 4.81	20.0 \pm 8.66	97.1 \pm 4.81	93.6 \pm 10.50	78.9 \pm 10.50	35.3 \pm 5.46
YS	21.4 \pm 10.36	19.0 \pm 6.15	21.1 \pm 9.20	15.0 \pm 11.02	27.8 \pm 6.94	14.5 \pm 10.04
UR	14.2 \pm 2.33	6.6 \pm 2.76	40.6 \pm 10.62	36.8 \pm 8.66	47.5 \pm 5.77	15.3 \pm 7.64
HY	19.4 \pm 9.54	4.8 \pm 4.76	42.2 \pm 8.50	30.4 \pm 8.66	24.3 \pm 9.15	5.1 \pm 7.64
WJ	13.0 \pm 6.05	8.3 \pm 10.41	14.9 \pm 6.99	7.9 \pm 8.31	11.8 \pm 10.01	5.2 \pm 5.77

N=60

Table 6. Susceptibility of the S strain and 6 field populations of *M. persicae* to λ -cyhalothrin

Strain	LC ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% CL ^a)	LC ₉₀ (mg L ⁻¹) (95% CL)	Slope ± SE	χ^2	RR ^b
S	0.06 (0.05-0.07)	0.32 (0.23-0.51)	1.70±0.17	102.11	1.0
GP	35.22 (30.01-41.30)	191.69 (151.48-254.94)	1.74±0.11	262.24	587.0
GC	20.66 (17.72-24.37)	82.27 (63.38-115.76)	2.14±0.17	157.31	344.3
YS	15.16 (13.15-17.73)	61.84 (47.29-88.50)	2.10±0.17	147.53	252.7
UR	22.72 (20.29-25.65)	58.65 (48.86-74.27)	3.11±0.24	166.55	378.7
HY	14.69 (13.31-16.38)	30.13 (25.54-37.94)	4.11±0.40	105.49	244.8
WJ	25.05 (22.24-28.31)	78.26 (64.89-99.07)	2.59±0.18	198.69	417.5

^aCL, Confidence limits.^bRR, Resistance ratio, LC₅₀ of field populations/LC₅₀ of S strain.**Table 7.** Susceptibility of the S strain and 6 field populations of *M. persicae* to imidacloprid

Strain	LC ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% CL ^a)	LC ₉₀ (mg L ⁻¹) (95% CL)	Slope ± SE	χ^2	RR ^b
S	0.21 (0.19-0.25)	0.85 (0.69-1.12)	2.14±0.18	149.21	1.0
GP	3.67 (2.61-4.50)	9.64 (8.27-11.95)	3.06±0.48	40.87	17.5
GC	0.87 (0.55-1.23)	9.98 (7.50-13.95)	1.21±0.11	130.28	4.1
YS	86.88 (75.58-100.47)	359.62 (287.97-472.61)	2.08±0.13	246.16	413.7
UR	42.82 (33.39-54.44)	602.44 (407.85-994.73)	1.12±0.08	173.10	203.9
HY	55.69 (41.78-71.25)	789.37 (549.43-1278)	1.11±0.10	130.96	265.2
WJ	71.92 (63.38-81.32)	235.80 (197.57-293.68)	2.49±0.17	202.56	342.5

^aCL, Confidence limits.^bRR, Resistance ratio, LC₅₀ of field populations/LC₅₀ of S strain.**Table 8.** Susceptibility of the S strain and 6 field populations of *M. persicae* to flupyradifurone

Strain	LC ₅₀ (mg L ⁻¹) (95% CL ^a)	LC ₉₀ (mg L ⁻¹) (95% CL)	Slope ± SE	χ^2	RR ^b
S	0.20 (0.18-0.23)	0.50 (0.43-0.62)	3.24±0.27	139.02	1.0
GP	3.65 (3.10-4.28)	11.07 (8.93-14.64)	2.66±0.23	128.13	18.3
GC	20.84 (17.73-24.16)	80.05 (66.47-100.41)	2.19±0.16	194.29	104.2
YS	90.50 (76.79-106.75)	442.97 (342.50-615.37)	1.86±0.14	176.58	452.5
UR	90.52 (70.96-113.66)	> 1000	1.19±0.09	167.92	452.6
HY	46.43 (39.49-53.55)	179.89 (149.88-226.28)	2.18±0.17	161.43	232.2
WJ	83.48 (72.73-96.44)	266.97 (215.51-351.39)	2.54±0.20	168.45	417.4

^aCL, Confidence limits.^bRR, Resistance ratio, LC₅₀ of field populations/LC₅₀ of S strain.**Table 9.** Genotype by general sequencing for target site mutation in *M. persicae*

Target	Point mutation	Field population												
		S	HS	GP	JC	CJ	GC	NS	GW	YS	JP	UR	HY	WJ
nAChR	R81T	S ^a	S	S	S	R ^b	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>kdr</i>	L1014F	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
<i>s-kdr</i>	M918L	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

^aS, Susceptible genotype.^bR, Resistant genotype.

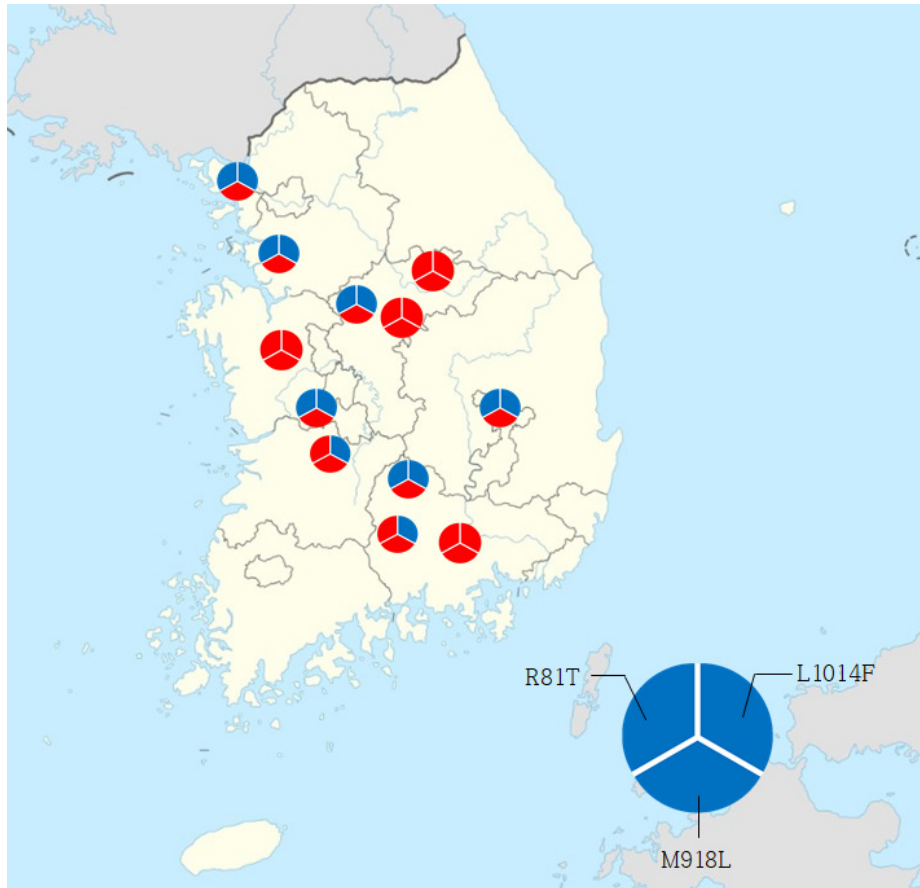


Fig. 1. A map comparing the frequency of R81T (left of circle), L1014F (right of circle), and M918L (bottom of circle) point mutations of field populations in *M. persicae*. Blue means susceptibility in population of *M. persicae*. Red means in resistance population of *M. persicae*.

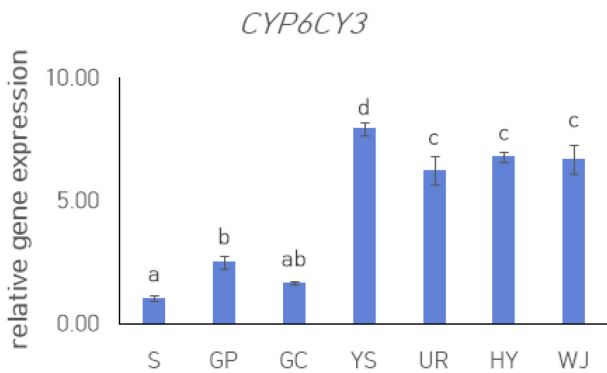


Fig. 2. Cytochrome P450 *CYP6CY3* gene expression level in the S (susceptible) strain and 6 field populations (GP; Gimpo, GC; Geochang, YS; Yesan, UR; Uiryong, HY; Hamyang, and WJ; Wanju) of *M. persicae*. Different letters on the tops of the graph bars are significantly different ($p < 0.05$).

인 R81T는 CJ, YS, JP, HY, UR, WJ 개체군에서 확인되었다. *vgsc* 유전자인 *kdr* 돌연변이 L1014F는 CJ, YS, JP, UR 개체군에서 확인되었고 *s-kdr* 돌연변이 M918L는 모든 개체군에서 확

인되었다. 점 돌연변이 분석 결과는 지역별로 지도에 표시하였다(Fig. 1).

CYP6CY3 발현량 확인

qRT-PCR을 통해 사이토크롬 P450 유전자 *CYP6CY3*의 발현량을 확인한 결과, GC가 1.61로 가장 낮았고 YS 개체군에서 7.90으로 가장 높은 발현량을 나타냈다. 특히 imidacloprid 저항성비가 높은 개체에서 발현량이 가장 높게 나타났다(Fig. 2).

고찰

본 연구에서는 국내 6개 지역에서 채집한 복숭아혹진딧물의 λ -cyhalothrin, imidacloprid 및 flupyradifurone에 대한 저항성 수준을 평가하였다. GP, GC, YS, UR, HY, WJ 등 6개 지역에서 채집한 복숭아혹진딧물의 약제 감수성을 평가한 결과, λ -cyhalothrin은 모든 지역에서 저항성비가 244.8 이상으로 높았

고, imidacloprid와 flupyradifurone은 YS, UR, HY, WJ 개체군에서 저항성비가 203.9 이상으로 저항성이 발달한 것을 확인하였다. 특히 복숭아혹진딧물 야외개체군은 비교적 최근에 출시된 약제인 flupyradifurone에도 저항성이 크게 발달한 것으로 나타났다. 복숭아혹진딧물의 flupyradifurone에 대해 높은 저항성은 스페인(Bass et al., 2015)과 그리스(Papadimitriou et al., 2022)에서도 확인된 바 있다.

저항성 작용기작 구명을 위해 약제 계통별 관련 target site의 점 돌연변이 발현 여부를 조사한 결과, R81T는 50%, L1014F는 33.3%, M918L은 100% 발현되었음을 확인할 수 있었다. R81T는 CJ, YS, JP, UR, HY, WJ 개체군에서 확인되었고, 특히 약제 감수성 평가에서 imidacloprid 저항성으로 나타난 집단에서 돌연변이가 확인되었다. 또한, 약제 감수성 평가에서 imidacloprid에 대해 저항성이 높았던 개체군들은 flupyradifurone에 대해서도 높은 저항성을 보이는 경향을 보였는데, Bass et al. (2015)은 flupyradifurone 저항성에 R81T 연관 가능성이 있다고 보고했다. 따라서 네오니코티노이드와 같은 니코틴성 아세틸콜린 작용제로써, flupyradifurone과 R81T의 상관관계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. M918L은 모든 지역개체군에서 발현되었고, 이는 모든 지역개체군이 λ -cyhalothrin에 대해 높은 저항성을 나타냈던 약제 감수성 평가 결과와 일치한다. 이전 연구에서 M918L는 homotype이 존재하지 않는다고 보고하였지만(Fontaine et al., 2011), Mingeot et al. (2021)과 Hlaoui et al. (2022)이 M918L의 homotype이 나타난 것을 확인한 바 있는데, 본 연구에서도 3개의 집단이 homotype일 가능성을 확인한 바 있다(data not shown). L1014F는 피레스로이드계 살충제 저항성 관련 돌연변이로 알려져 있지만, λ -cyhalothrin 저항성 집단에서 L1014F 돌연변이가 확인되지 않아 분자진단 마커로는 적절하지 않다고 여겨지며 Lee et al. (2022)도 목화진딧물 야외집단에서 L1014F가 저항성 모니터링을 위한 분자진단 마커로 적합하지 않다고 보고한 바 있다.

qRT-PCR을 통해 *CYP6CY3*의 발현량을 확인했을 때, imidacloprid에 높은 저항성을 나타낸 개체군에서 *CYP6CY3*의 발현량이 높은 것으로 나타났다. Wang et al. (2020)은 담배가루이 (*Bemisia tabaci*)에서 flupyradifurone이 imidacloprid에 대해 중간 정도의 교차저항성을 보였다고 보고했지만, GP와 GC 개체군의 발현량 차이를 비교해 볼 때 *CYP6CY3*가 flupyradifurone의 저항성에 직접적인 요인은 아니라고 판단된다. 이는 imidacloprid와 flupyradifurone 사이에 교차저항성이 부족하다는 보고와 일치한다(Nauen et al., 2015). Nakao et al. (2019)과 Hu et al. (2023) 또한 *CYP6CY3*은 flupyradifurone에 영향을 미치지 않았다고 보고한 바 있다.

결론적으로, 국내에 분포하는 복숭아혹진딧물 야외개체군은 지역별로 저항성 정도가 다양한 것을 확인하였고, λ -cyhalothrin에 높은 저항성을 나타내는 야외개체군에서는 M918L 점 돌연변이를, imidacloprid에 높은 저항성을 나타내는 야외개체군에서 R81T 점 돌연변이와 높은 *CYP6CY3*의 발현을 확인했다. 이러한 결과는 M918L 점 돌연변이가 λ -cyhalothrin 저항성 진단 마커로, R81T 점 돌연변이와 *CYP6CY3*의 높은 발현량은 imidacloprid 저항성 진단마커로서의 활용 가능성을 보여준다. 추후 다양한 야외개체군에 대한 연구가 더 필요할 것이라고 판단된다.

사 사

이 성과는 농촌진흥청 지원을 받아 수행된 연구임(RS-2022-RD-010420).

저자 직책 & 역할

문하현: 충북대학교 학석사연계과정; 야외채집, 실험수행, 자료분석, 논문작성

이유노: 충북대학교 학석사연계과정; 야외채집, 실험수행

강동현: 충북대학교 학석사연계과정; 야외채집, 자료분석

김세은: 충북대학교 학석사연계과정; 실험수행

김현경: 충북대학교 초빙교수; 자료분석

구현나: 충북대학교 초빙교수; 실험설계, 논문검토

김길하: 충북대학교 교수; 실험설계, 논문검토

모든 저자는 원고를 읽고 투고에 동의하였음.

Literature Cited

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Andrews, M.C., Callaghan, A., Field, L.M., Williamson, M.S., Moores, G.D., 2004. Identification of mutations conferring insecticide-insensitive AChE in the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol. Biol.* 13, 555-561.
- Anthony, N., Unruh, T., Ganser, D., Ffrench-Constant, R., 1998. Duplication of the *Rdl* GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*. *Mol. Gen. Genet.* 260, 165-175.
- Bass, C., Carvalho, R.A., Oliphant, L., Puinean, A.M., Field, L.M., Nauen, R., Williamson, M.S., Moores, G., Gorman, K., 2011. Overexpression of a cytochrome P450 monooxygenase, *CYP6ER1*, is associated with resistance to imidacloprid in the brown

- planthopper, *Nilaparvata lugens*. Insect Mol. Biol. 20, 763-773.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. Pest Biochem. Physiol. 121, 78-87.
- Bass, C., Zimmer, C.T., Riveron, J.M., Wilding, C.S., Wondji, C.S., Kausmann, M., Field, L.M., Williamson, M.S., Nauen, R., 2013. Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 19460-19465.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. Aphids on the world's crops: an identification and information guide, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2007. Taxonomic issues. in: van Emden, H.F., Harrington, R. (Eds.), Aphids as crop pests, 2nd ed. CAB International, Wallingford, 1-36.
- Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A.J., Maienfisch, P., Hall, R.G., Earley, F.G., Pittner, T., Pal, S., Paul, V.L., Goodchild, J., Blacker, M., Hagmann, L., Crossthwaite, A.J., 2013. Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. Pest Manag. Sci. 69, 607-619.
- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life 59, 151-162.
- Devonshire, A.L., Field, L.M., Foster, S.P., Moores, G.D., Williamson, M.S., Blackman, R.L., 1998. The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 353, 1677-1684.
- Devonshire, A.L., Moores, G.D., Chiang, C., 1983. The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*, in: Miyamoto, J., Kearney, P.C. (Eds.), Pesticide chemistry, human welfare and the environment: proceedings of the 5th international congress of pesticide chemistry. Pergamon Press, Oxford, pp. 191-196.
- Eleftherianos, I., Foster, S.P., Williamson, M.S., Denholm, I., 2008. Characterization of the M918T sodium channel gene mutation associated with strong resistance to pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). Bull. Entomol. Res. 98, 183-191.
- Eleftherianos, I.G., Foster, S.P., Williamson, M.S., Denholm, I., 2002. Behavioural consequences of pyrethroid resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). The BCPC Conference: Pests and diseases, Volumes 1 and 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November 2002, pp. 745-748.
- Ffrench-Constant, R.H., Anthony, N., Aronstein, K., Rocheleau, T., Stilwell, G., 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. Annu. Rev. of Entomol. 45, 449-466.
- Field, L.M., Devonshire, A.L., Forde, B.G., 1988. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. Biochem. J. 251, 309-312.
- Fontaine, S., Caddoux, L., Brazier, C., Bertho, C., Bertolla, P., Micoud, A., Roy, L., 2011. Uncommon associations in target resistance among french populations of *Myzus persicae* from oilseed rape crops. Pest Manag. Sci. 67, 881-885.
- Francis, F., Vanhaelen, N., Haubruge, E., 2005. Glutathione S-transferases in the adaptation to plant secondary metabolites in the *Myzus persicae* aphid. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 58, 166-174.
- Hlaoui, A., Chiesa, O., Figueroa, C.C., Souissi, R., Mazzoni, E., Boukhris-Bouhachem, S., 2022. Target site mutations underlying insecticide resistance in tunisian populations of *Myzus persicae* (Sulzer) on peach orchards and potato crops. Pest Manag. Sci. 78, 1594-1604.
- Hu, J., Chen, F., Wang, J., Rao, W., Lin, L., Fan, G., 2023. Multiple insecticide resistance and associated metabolic-based mechanisms in a *Myzus Persicae* (Sulzer) population. Agronomy 13, 2276.
- Jeschke, P., Nauen, R., Gutbrod, O., Beck, M.E., Matthiesen, S., Haas, M., Velten, R., 2015. Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophore: structural considerations. Pestic. Biochem. Physiol. 121, 31-38.
- Koo, H.N., An J.J., Park S.E., Kim J.I., Kim G.H., 2014. Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. Crop Prot. 55, 91-97.
- Lee, J.M., Jeon, J.C., Kang, W.J., Kim, H.K., Park, B.Y., Koo, H.N., Kim, G.H., 2022. Analysis of point mutations associated with fenvalerate- and imidacloprid-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and selection of insecticides for effective control. Korean J. Pestic. Sci. 26, 140-149.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25, 402-408.
- Margaritopoulos, J.T., Kati, A.N., Voudouris, C.C., Skouras, P.J., Tsitsipis, J.A., 2021. Long-term studies on the evolution of resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) to insecticides in Greece. Bull. Entomol. Res. 111, 1-16.
- Martinez-Torres, D., Foster, S.P., Field, L.M., Devonshire, A.L., Williamson, M.S., 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). Insect Mol. Biol. 8, 339-346.
- Mingeot, D., Hautier, L., Jansen, J.P., 2021. Structuration of multi-locus genotypes associated with insecticide resistance of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in potato fields in southern Belgium. Pest Manag. Sci. 77, 482-491.
- Moores, G.D., Devine, G.J., Devonshire, A.L., 1994. Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. Pest Biochem.

- Physiol. 49, 114-120.
- Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T., Kono, Y., 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 15-22.
- Nakao, T., Kawashima, M., Banba, S., 2019. Differential metabolism of neonicotinoids by *Myzus persicae* *CYP6CY3* stably expressed in *Drosophila* S2 cells. *J. Pestic. Sci.* 44, 177-180.
- Nauen, R., Denholm, I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58, 200-215.
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M.E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., Raupach, G., 2015. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest Manag. Sci.* 71, 850-862.
- Needham, P.H., Sawicki, R.M., 1971. Diagnosis of resistance to organophosphorus insecticides in *Myzus persicae* (Sulz.). *Nature* 230, 125-126.
- Oh, J.H., 2012. Molecular detection of toxicodynamic and metabolic factors associated with the pyrethroid and carbamate resistance in *Myzus persicae* (Sulzer). Master's Thesis, Seoul National University.
- Panini, M., Anaclerio, M., Puggioni, V., Stagnati, L., Nauen, R., Mazzoni, E., 2015. Presence and impact of allelic variations of two alternative *s-kdr* mutations, M918T and M918L, in the voltage-gated sodium channel of the green peach aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* 71, 878-884.
- Papadimitriou, F., Folia, M., Ilias, A., Papapetrou, P., Roditakis, E., Bass, C., Vontas, J., Margaritopoulos, J., 2022. Flupyradifurone resistance in *Myzus persicae* populations from peach and tobacco in Greece. *Pest Manag. Sci.* 78, 304-312.
- Puinean, A.M., Foster, S.P., Oliphant, L., Denholm, I., Field, L.M., Millar, N.S., Williamson, M.S., Bass, C., 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLoS Genet.* 6, e1000999.
- Rauch, N., Nauen, R., 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54, 165-176.
- Slater, R., Paul, V.L., Andrews, M., Garbay, M., Camblin, P., 2012. Identifying the presence of neonicotinoid-resistant peach-potato aphid (*Myzus persicae*) in the peach-growing regions of southern France and northern Spain. *Pest Manag. Sci.* 68, 634-638.
- Unruh, T., Knight, A., Bush, M.R., 1996. Green peach aphid (Homoptera: Aphididae) resistance to endosulfan in peach and nectarine orchards in Washington State. *J. Eco. Entomol.* 89, 1067-1073.
- Voudouris, C.C., Williamson, M.S., Skouras, P.J., Kati, A.N., Sahinoglou, A.J., Margaritopoulos, J.T., 2017. Evolution of imidacloprid resistance in *Myzus persicae* in Greece and susceptibility data for spirotetramat. *Pest Manag. Sci.* 73, 1804-1812.
- Wang, R., Wang, J., Che, W., Fang, Y., Luo, C., 2020. Baseline susceptibility and biochemical mechanism of resistance to flupyradifurone in *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 132, 105132.
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., Devonshire, A.L., 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252, 51-60.