

제 1 차 년 도
연 차 보 고 서

파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발
Development of a diagnostic device
for the insecticide resistant beet armyworm,
Spodoptera exigua (Hübner)

안동대학교 자연과학대학

농림수산부



제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “파밤나방의 살충제 저항성 검색장치개발” 과제의 1년차 보고서로 제출합니다.

1996. 1. 30.

주관연구기관명: 안동대학교

총괄연구책임자: 김 용 균

연 구 원: 한 상 찬

연 구 원: 황 기 섭

요 약 문

I. 제 목

파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발

II. 연구개발의 목표 및 중요성

우리나라에서는 파밤나방이 최근 들어 특히 1988년 이후 남부지역 뿐만 아니라 전국에 걸쳐 대발생하기 시작했다. 이 해충은 넓은 기주범위로 파, 배추, 고추, 콩 등 대부분의 발작물에 큰 피해를 주고 있다. 그러나 무분별한 약제 남용으로 기존약제에 대부분 저항성을 보임으로 방제에 큰 어려움을 주고 있다. 이 약제 저항능력은 집단간 큰 차이를 나타내어 서로 다른 기주식물 및 지역적, 시기적인 요소가 약제 저항능력에 있어 변이 요소로 작용하게 되었다.

따라서, 본 연구는 특정 지역의 파밤나방 약제 저항능력을 농민 또는 지도사들이 현장에서 직접 쉽게 검사할 수 있는 진단 장치를 개발함으로써 농약 종류 및 약량을 합리적으로 선정하는 것이 파밤나방의 효과적 방제에 꼭 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 최종 연구개발 사업목표는 파밤나방의 살충제 관련 효소들의 활력 검정을 통한 정확하고 간편한 살충제 저항성 검색장치 개발하는 것이다. 이를 달성하기 위한 세부 연구개발목표는 다음과 같다.

- (1) 살충제 작용에 관련된 파밤나방의 해독 효소 활력평가법을 확립한다.

- (2) 야외 및 실내선발집단간 살충제 저항능력과 효소활력을 비교분석한다.
- (3) 값싸고 이용하기에 편리한 해독효소활력검색장치개발 및 현장에 적용성 시험한다.

이와 같은 본 연구의 최종성과물을 획득하기 위해 당해연도 연구에는 파밤나방 살충제 관련 효소분석법 확립 및 파밤나방 약제 저항성 집단의 해독 효소변화검정을 목표로 하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

관련효소중 esterase와 acetylcholinesterase의 두 효소의 활력법 확립 및 이들 효소가 약제 저항성과 매우 높은 상관성을 가짐을 나타냈다. 이 결과는 2차년도에서 이 두 효소활력과 약제에 대해 저항능력이 다른 야외 및 실내 집단들의 상호 관계성을 보다 정확히 밝힘으로 3차년도에서는 이 두 효소중 어느 하나 또는 둘 모두를 이용한 진단법 개발에 이용될 것이다. 미국에서는 바로 이 acetylcholinesterase를 이용하여 값싸고 간편한 진단장치를 개발하여 이용하고 있으므로 파밤나방이 이 효소와 약제 저항능력과 연관성은 매우 고무적인 결과로 사려된다.

SUMMARY

I. Title

Development of a diagnostic device for the insecticide resistant beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)

II. Research aims and significance

Big populations of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), has been occurred since 1988 in Korea. The pest has so large a host spectrum (e.g., welsh onion, oriental cabbage, hot pepper, and soybean) that it gives an huge economical damage on most vegetables and other crops. The pest is exposed to a broad array of insecticides because of the extensive use of the chemicals without any consideration on the susceptibility of the pest to a specific chemical. Development of the insecticide resistance failed to provide an adequate control of the pest. There is, however, a high degree of variation in insecticide resistance of the pest among different populations (e.g., in hosts or regions or seasons) because adults are highly mobile and larvae are polyphagous.

This research goal is to develop a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the insecticide resistant beet armyworm. With this device, farmers and extension servicers can easily detect the pest status of a specific population to insecticides so that they decide the kind and dose of the insecticide reasonably.

III. Research plan – progress and contents

A final goal of this research is to develop a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the insecticide resistant beet armyworm through measuring the activities of the enzymes related to insecticide mode of actions. To do this, specific research aims are the followings:

- (1) to develop analytical methods of the insecticide-detoxifying enzymes of the beet armyworm,
- (2) to correlate between the insecticide susceptibilities and the activities of the detoxified enzymes of the different field and laboratory populations,
- (3) to develop a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the insecticide resistant beet armyworm and to finally apply to a field system.

IV. Research results and application

Estimating methods of the activities of esterase and acetylcholinesterase of the beet armyworm were developed. The activities of the both enzymes had high correlations with insecticide susceptibilities of the different populations of the pest. This correlation will be further analyzed by using different populations obtained from different fields or selected in the laboratory in the second year of this research. In the final year of this research, a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the insecticide resistant beet armyworm through measuring the activities of esterase or acetylcholinesterase or both enzymes.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	1
Section 1. Objective and its scope -----	1
1. Background -----	1
2. Need -----	2
3. Technology in domestic and overseas -----	2
4. Weakness of current technology -----	3
Section 2. Objectives of research -----	3
1. Objective of final year -----	3
2. Objective of current year -----	3
Chapter 2. Establishment of testing methods to develop a diagnostic device for insecticide resistant beet armyworm -----	4
1. Improving an efficiency of artificial diet -----	4
2. Establishment of analytical methods for detoxifying enzymes —	6
(1) Protein extraction	
(2) Quantification of total proteins	
(3) Measurement of esterase activity	
(4) Measurement of acetylcholinesterase activity	
(5) Electrophoretic analysis of esterases	
(6) Changes in target sites of insecticides	
3. Establishment of insecticide bioassay -----	8
(1) Bioassay by topical application	
(2) Bioassay by leaf-dipping	
Chapter 3. Correlation between insecticide susceptibility and detoxifying enzyme activity -----	8
(1) Insecticide susceptibilities of laboratory-selected and field-captured populations	
(2) Insecticide resistance vs enzyme activity	
(3) Enzyme variation among different hosts	
(4) Conclusion	

Chapter 4.	Research results and applications	-----	23
Section 1.	Expected outcome	-----	23
Section 2.	Suggested applications	-----	24

목 차

제 1 장	서론	1
제 1 절	연구개발의 목적과 범위	1
1.	연구 배경	1
2.	연구의 필요성	2
3.	국내외 기술 현황	2
4.	현 기술상태의 취약성	3
제 2 절	연구개발사업 목표	3
1.	최종연구 개발사업목표	3
2.	당해연도 연구개발 사업목표	3
제 2 장	살충제 저항성 파밤나방 검색장치 개발을 위한 시험법확립	4
1.	인공사료 개량	4
2.	살충제 기작 관련 효소 분석법 확립	6
(1)	단백질 추출	
(2)	총단백질 정량분석	
(3)	Esterase 활력측정	
(4)	Acetylcholinesterase 활력측정	
(5)	Esterase 의 전기영동분석	
(6)	작용점변환	
3.	파밤나방의 반수치사량 검정법 확립	8
(1)	Topical application 생물검정법	
(2)	Leaf-dipping 생물검정법	
제 3 장	파밤나방 약제 감수성 조사 및 해독효소와의 관계	8
(1)	실내선발 및 야외채집충의 약제 감수성	
(2)	살충제 저항성과 효소활력간의 관계	
(3)	파밤나방 기주변이에 따른 효소변이	
(4)	결론	
제 4 장	연구개발사업 성과 및 성과에 대한 활용 (실용화) 방안	23
제 1 절	기대되는 성과	23
제 2 절	연구개발사업 성과에 대한 활용 (실용화) 방안	24

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 배경

파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 은 나비목, 밤나방과, 흰무늬밤나방아과에 속하며 열대지방으로부터 아열대, 온대지방에 걸쳐 광범위하게 분포하고 있다. 일찌기 우리나라에서는 사탕무우도둑나방이라고도 불리었다.

서유럽에서는 북아프리카 Iberia 반도 등에서 비례하여 오는 것으로 알려져 있는 해충으로 북미에서는 목화밭에 노린재류 방제를 위해 Dimethoate 를 살포할 때 대발생하였는데 이것은 포식성 천적인 *Geocoris fallen* (긴노린재과) 의 알과 유충이 농약에 의해 피해를 받았기 때문이라고 하였다. 미국의 남부 지방에서는 1960년대까지 이 해충을 쉽게 방제할 수 있었으나 1972년 이후 목화, 콩, 땅콩, 알팔파 등의 작물에서 방제가 어려운 해충으로 알려지기 시작하였고 장거리 이동성 해충이어서 최근에는 온대지방에서도 발생량이 증가하고 있다. 네덜란드의 경우 미국 플로리다주로부터 국화묘를 수입하는 과정에서 알이 묻어 들어와 온실내의 화훼류와 채소류에 연중 발생한다고 하였다.

동북아시아에서는 1980년대 중반 이후 중국, 대만, 일본 등지에서 발생량이 급격히 늘면서 피해가 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다 (Cheng et al., 1988). 우리나라에서는 1928년 사탕무우에서 피해가 보고되고 (江口, 1928) 이후 거의 피해가 알려지지 않다가 1986-1987년 진주, 김해, 부산지역에서 소량 발생하여 콩, 배추, 카네이션, 익모초 등을 가해하고 있음을 보고하였고 (조 등, 1986; 조 등 1987; 이 등 1987; 조 등 1988, 김 등 1988), 대발생이 가능한 해충으로 주목해 오고 있었다. 1988년 진도의 파 재배농가, 무안 등지의 콩, 배추 등 밭작물에도 대발생하였다고 한다 (조 등 1988).

우리나라에서 이 해충에 대한 발생소장을 조사한 것은 1926년 부터 1930년 까지 유아등에 의한 발생소장이 황해도 사리원에서 이루어졌다. 유아등에 의한 최초 유살일은 5월 9일이었고 최종 유살일은 10월 27일이었으며 8-9월 사이에 유살량이 현저히 많았다.

고 (1993) 는 pheromone trap 에 의한 발생소장 조사의 우수성을 제시하고 수원 등 10개 지역에서 파밤나방 발생을 조사하였다. 1992년의 경우 전남 고흥에서는 4월 중순 부터 유인 채집되기 시작하였다. 1990년 이후 pheromone trap 에 의한 발생소장 조사에서 해가 경과함에 따라 발생량이 증가하는 경향이였다 (고, 1993). 또한 유인량은 남부지방으로 갈수록 많았다. 발육속도는 계절에 따라 다르나 수원지역에서 산란 최초일이 5월 중순이면 연 4세대 발생 가능성을 보여주었다.

1991년 고 등 (1991) 은 파의 지역별 피해주율은 완도 85%, 진도 86%, 해남 78%였고 서산 1.9%, 아산 1.5%, 청양 1.4%였다. 기타작물에서는 감자 95%, 옥수수 94%, 양배추 82%, 녹두 83%, 콩 56%, 배추 43%, 고구마 43%였다.

경제적 피해수준은 봄 배추에서 주당 2마리, 가을 배추에서 주당 5-6 마리이상, 파는 주당 약 2 마리 이상일때로 보고되였다 (고, 1993). 기주의 범위가 대단히 넓어 여러 작물에 피해를 주고 있다.

2. 연구의 필요성

이 해충에 대한 천적류의 보고에 따르면 녹강균, 핵다각체 바이러스, Mermithidae 이고 기생물은 충남에서 각각 4.3-9.1%, 3.7%, 1.9% 을 보여 방제를 위해서는 화학적 농약에 의존하지 않을 수 없게 되어있다.

파밤나방의 약제저항성의 보고는 DDT, Toxaphone, Parathion, Pyrethroids 뿐만 아니라 비교적 효과가 높았던 성장조절제인 Methomyl 에 대한 저항성이 문제가 되어 방제에 어려움이 있다 (Meinke and Ware, 1978). 또한 *Bacillus thuringiensis* (BT) 에 대해서도 양배추금무늬나방 (*Tricoplusia ni*) 보다 450배나 높은 치사농도 값을 보여 (MacIntosh et al., 1990) BT 에 대해서도 저항성이 문제가 되고 있다.

높은 저항성 발현에도 불구하고 화학적 농약에 의존해야 하는 현실에서 농약의 합리적 사용은 과학적 영농을 위하여서는 꼭 필요하겠다.

농약의 살포를 적은 횟수, 낮은 농도에서 처리함으로 대상 해충의 밀도를 조절하는 이른바 살충제 저항성 관리 (resistance management) 는 대상 해충의 정확한 저항성 기작의 이해가 필수적이다.

본 연구의 결과로 개발될 정확하고 손쉬운 살충제 저항성 파밤나방 감별 방법에 의해 저항성 야외 밀도를 주기적으로 측정함으로 효과적인 농약선정과 살포시기 및 약량을 근거있고 논리적으로 제시할 수 있게된다. 즉, 이 연구는 과학적 영농과 농산물 가격 경쟁력 강화 및 농업 환경 오염 방지에서 큰 기대를 갖게한다.

3. 국내외 기술현황

가. 국내기술 현황

파밤나방의 피해가 문제시 된 것은 80년대 후반으로 보고된 바 있다 (조 등, 1989). 고 (1993) 와 이 (1993) 의 파밤나방 생태 연구외에는 방제나 생리에 대한 연구가 전무한 상태이다. 효과적인 방제법 연구가 시급한 실정이다.

나. 국외기술 현황

살충제 저항성 기작은 약제에 따라 다양하나 살충제가 작용점에 이르는 경로에 따라 크게 행동학적, 생리학적, 생화학적 기작으로 나눌 수 있다. 이 중 분석이 용이하고 가장 연구가 많이 되어 있는 분야가 생화학적 기작이다 (Roush & Tabashnik, 1990). 생화학적 저항성 기작은 다시 해독효소 활성 변화와 작용점 변화로 구분된다.

파밤나방의 약제 저항성의 보고는 DDT, Toxaphone, Parathion, Pyrethroids 뿐만 아니라 비교적 효과가 높았던 성장조절제인 Methomyl 에 대한 저항성이 문제가 되어 방제에 어려움이 있다 (Meinke and Ware, 1978). 또한 *Bacillus thuringiensis* (BT) 에 대해서도 양배추금무늬나방 (*Tricoplusia ni*) 보다 450배나 높은 치사농도 값을 보여 (MacIntosh et al., 1990) BT 에 대해서도 저항성이 문제가 되고 있다.

4. 현 기술상태의 취약성

1980년대 후반이후 이 해충의 돌연 중대 해충화는 여러 요인이 관여하겠으나 그 중 무분별한 농약의 살포에 따른 천적의 소멸과 대상 해충의 저항성 획득이 주요 요인이 될 수 있겠다. 화학적 농약에 의존해야하는 현실에서 개체군의 저항성 관리를 통한 농약의 이용은 꼭 이루어져야하는 선결 과제이다.

제 2 절 연구개발사업 목표

1. 최종연구 개발사업 목표

본 연구의 최종 연구개발 사업목표는 파밤나방의 살충제 관련 효소들의 활력 검정을 통한 정확하고 간편한 살충제 저항성 검색장치 개발하는 것이다. 이를 달성하기 위한 세부 연구개발목표는 다음과 같다.

- (1) 살충제 작용에 관련된 파밤나방의 해독 효소 활력평가법을 확립한다.
- (2) 야외 및 실내선발집단간 살충제 저항능력과 효소활력을 비교분석한다.
- (3) 값싸고 이용하기에 편리한 해독효소활력검색장치개발 및 현장에 적용성 시험한다.

2. 당해년도 연구개발 사업목표

이와 같은 본 연구의 최종성과물을 획득하기 위해 당해년도 연구에는 파밤나방 살충제 관련 효소분석법 확립 및 파밤나방 약제 저항성 집단의 해독 효소변화검정을 목표로 하였다.

제 2 장 살충제 저항성 파밤나방 검색장치개발을 위한 시험법확립

1. 인공사료개량

본 실험실 (안동대학교 농생물학과 곤충생리실)에서 기존의 인공사료에 비하여 용화율과 우화율에서 기존의 사료보다 우세한 개량사료 조성 (Table 1)을 개발하여 대량사육에 이용하고 있다.

Table 1. Modified artificial diet of *S. exigua*

Ingredients	Classical type	Modified type
Soybean powder	30g	30g
Wheat germ powder	30g	30g
Yeast dried	16g	8g
Casein	-	8g
Agar	5.6g	6g
MPH	1.2g	1.2g
L-Ascorbic acid	3.6g	3.6g
Sorbic acid	0.6g	0.6g
Formalin (10%)	0.9ml	0.9ml
Mineral mix	2g	2g
Linseed oil	-	1ml
Vitamin mix	-	1g
Distilled water	280ml	280ml

사육한 결과 (Table 2) 개량된 사료가 기존의 사료에 비해 생존율에서 높고 발육기간이 빨랐다. 개량된 사료에서는 단백질원으로 casein을 추가시켰고 불포화지방성분으로 Linseed oil을 공급했고 Vitamin을 공급시킴으로 생존능력과 발육속도를 양호하게한 효과를 주었으리라 짐작된다. 그러나 두 사료 모두 성충까지 80%이상의 사망율을 기록하여 좀더 사육조건을 개량을 요구한다. 물론 10마리씩의 공간적 부족이 큰 사망율에 주요인이나 이후의 사육에서 3마리씩으로 공간적 확보에도 불구하고 누대사육에 따른 생식력감퇴와 수분에 견디는 능력이 현격히 줄어드는 것을 관찰

하여 이점에 사료성분에서 또는 사육조건에서의 보완이 요구된다.

Table 2. Comparison between classical and modified artificial diets on *S. exigua* development

Stages	Initial #	Dead #	% Mortality	% Cumulative survivals	Period (days)
Classical type					
Larvae					
1st	100	30	30.0	70	2.3
2nd	70	12	17.1	58	3.7
3rd	58	23	39.6	35	2.3
4th	35	19	57.6	16	2.4
5th	16	5	35.7	11	2.1
Prepupae	11	2	22.2	9	2.6
Pupa	9	2	28.6	7	7.3
Adults	7				
Total		93	93.0		22.7
Modified diet					
Larvae					
1st	100	18	18.0	82	1.8
2nd	82	1	1.2	81	2.8
3rd	81	4	4.9	77	2.1
4th	77	13	16.9	64	1.2
5th	64	8	12.5	56	1.0
Prepupae	56	34	60.7	22	2.2
Pupa	22	8	36.4	14	5.7
Adults	14				
Total		86	86.0		16.8

- 10 individuals/ petri dish X 10 replications

2. 살충제기작 관련 효소 분석법 확립

(1) 단백질 추출

Microcentrifuge tube (1.5ml)에 PBS-TX (0.1M sodium phosphate buffer saline, pH 6.5, 0.5% Triton X-100) 용액 1ml을 넣고 각 파밤나방을 넣어 Homogenizer로 간다. 분쇄 후 5분간 15,000rpm에서 원심분리하여 상등액을 얻는다. 이 상등액을 다시 PBS-TX로 10배 희석하여 총단백질 및 효소 분석에 이용된다.

(2) 총단백질 정량 분석

단백질 측정방법은 Bradford (Bradford, 1972) 방법에 따라 실험한다.

- 1) 1ml 의 Bradford용액에 20 μ l의 sample을 섞는다.
- 2) 5분 후 Spectrophotometer (Kontron)로 595nm에서 측정한다.
- 3) Bovine serum albumin을 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μ g/ml 농도로 하여 표준곡선을 얻는다.

영기별 각 유충의 평균 총 수용성단백질은 2령에서 5령까지 약 30배의 차이가 있음을 보인다 (Table 3).

Table 3. Total protein amounts (μ g) of each larval stage of *S. exigua* reared on artificial diet

Stage	N	Protein amount (mean \pm SD) ¹
2nd	10	24.96 \pm 6.17 ^a
3rd	10	136.59 \pm 21.45 ^b
4th	10	453.45 \pm 55.24 ^c
5th	30	757.24 \pm 91.86 ^d

¹ Means followed by different letters differ significantly by LSD test at $\alpha=0.05$.

(3) Esterase 활성 측정

General esterase활력은 Townson (Townson, 1972)의 방법을 파밤나방에 변형하여 개발된 방법을 이용한다.

① Reaction mix

10 μ l	10X 희석된 5령충
2 μ l	50mM PNPA in 80% Methanol
985 μ l	EST buffer

② Mix for 10 min

③ 400nm 에서 10분 간격으로 측정한다.

(4) Acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정

AChE활력은 Ferari (Ferari et al., 1993)의 방법을 파밤나방에 변형하여 개발된 방법을 이용한다.

① 파밤나방의 단백질 추출물 (10x 희석) 500 μ l를 각각 1ml Spectrophotometer tube에 넣는다.

② AChE inhibitor로서 1,5-bis (4-allyl dimethyl ammonium phenyl) pentan-3-one dibromide를 50 μ l씩 넣는다.

③ 500 μ l의 AChE의 기질용액 (100mM acetylcholine iodide (1.2ml)), 12mM 5,5-dithio bis (nitrobenzoic acid) (2.4ml), 2차 증류수 (56.4ml))를 넣는다.

④ 파장 405nm 고정하여 10 분간격으로 흡광도를 측정한다.

(5) Esterase의 전기영동분석

전기영동은 Tris-glycine buffer (0.05M Tris, pH 8.3) system의 6.5% nondenaturing polyacrylamide gel에서 Hoffer vertical slab gel을 사용하였다. 각 sample (ca. 0.7 μ g of protein)은 loading buffer (50% sucrose, 0.01% bromophenol blue, 0.004% basic fuchsin, 0.154% dithiothreitol, 0.0372% EDTA in (1:3 diluted) electrode buffer)로 준비되었다. 전기영동은 300V 일정 전압에서 tracking dye가 바닥까지 도달할때까지 이루어졌다. Gels은 100 ml 염색용액 (0.2M phosphate buffer (pH 6.5) contained 2% α -naphthyl acetate and 0.04g fast blue BB salt)에서 25 $^{\circ}$ C 1시간동안 이루어졌다. 염색후 gels은 고정용액 (7% acetic acid, 5% methanol)에서 관찰할 때까지 보관된다.

(6) 작용점변화 (AChE의 Michaelis-Meten constant (Km) value 결정)

AChE의 활력측정법과 동일하나 AchE의 기질인 acetylcholine iodide를 네가지 다른 농도별 (0.5 mM, 1mM, 2mM, 4mM)로하여 효소활력을 측정하였다.

3. 파밤나방 반수치사량 분석법확립

(1) Topical application 생물검정법

파밤나방 5령충을 실내온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 각 농도별 10마리씩 미리 샐레에 넣어 얼음판위에 올려서 마취시킨 후 Topical applicator로 $1\mu\text{l}$ 씩 등쪽에 국부처리하였다. 처리후 24시간 경과시 막대봉으로 머리, 가슴, 배를 각각 한번씩 눌러 움직이지 않으면 사충으로 검정법을 정하였다.

(2) Leaf-dipping 생물검정법

각 농도별 (0, 25, 50, 100, 500ppm) 약제에 크기 6 X 6 cm의 배추잎을 담근후 1-2시간 Fume hood에서 건조시켰다. 파밤나방 3령충을 (28°C 항온기에서 산란된 지 6-7 유충) 실내온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 처리된 각 배추잎에 5 마리씩 접종하였으며 각 농도에서 10반복하였다. 처리후 24시간 경과시 막대봉으로 머리, 가슴, 배를 각각 한번씩 눌러 움직이지 않으면 사충으로 검정법을 정하였다.

제 3 장 파밤나방 약제 감수성조사 및 해독효소와의 관계

(1) 실내선발 및 야외 채집충의 약제 저항성

세 가지 약제 (parathion, deltamethrin, bifenthrin)에 대한 파밤나방의 감수성 정도는 시험된 모든 집단에서 달랐다. Deltamethrin으로 2세대 선발된 집단을 제외하고 전반적으로 반수치사량 ("LD₅₀")을 비교하여 볼 때 parathion, deltamethrin, bifenthrin의 순으로 파밤나방 5령충에 강한 살충력을 보여줬다 (Table 4). 각 약제에

Table 4. Toxicity of parathion, deltamethrin, and bifenthrin to the laboratory selected strains of *S. exigua* 5th instar larvae

Strains ¹	Insecticides	N	LD ₅₀ (µg)	95% FL	Slope	RR ²
Unselected	Parathion	180	6.25	2.53 - 20.22	0.55 ± 0.12	1.00
	Deltamethrin	180	0.31	0.10 - 0.64	0.85 ± 0.15	1.00
	Bifenthrin	90	0.58	0.11 - 1.51	0.80 ± 0.19	1.00
Deltamethrin						
Gen 1	Parathion	144	23.07	15.4 - 41.02	1.91 ± 0.41	3.47
	Deltamethrin	146	6.89	2.46 - 45.15	0.56 ± 0.13	22.23
	Bifenthrin	144	2.82	1.22 - 8.82	0.70 ± 0.14	4.86
Gen 2	Parathion	144	8.81	3.52 - 30.37	0.70 ± 0.15	1.41
	Deltamethrin	146	12.87	3.25 - 833	0.46 ± 0.14	41.52
	Bifenthrin	144	5.66	0.83 - 209	0.33 ± 0.13	9.76
Parathion						
Gen 1	Parathion	126	86.45	23.1 - 6010	0.61 ± 0.19	13.83
	Deltamethrin	126	0.69	0.14 - 3.67	0.43 ± 0.12	2.23
	Bifenthrin	126	0.12	0.05 - 0.24	1.01 ± 0.16	0.21
Gen 2	Parathion	144	7.45	3.31 - 12.05	1.53 ± 0.43	1.19
	Deltamethrin	144	0.28	0.01 - 1.30	0.36 ± 0.13	0.90
	Bifenthrin	144	0.64	0.21 - 1.34	0.82 ± 0.15	1.10
Field						
1994 Sep	Parathion	150	35.44	5.81 - 49668	0.54 ± 0.18	5.67
	Deltamethrin	150	3.78	1.40 - 24.57	0.56 ± 0.12	12.19

¹ "Unselected" means a susceptible strain which have been reared in laboratory for 6-7 generations without any insecticide treatment.

"Deltamethrin Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 0.1µg of deltamethrin.

"Parathion Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 1µg of parathion.

"Field 1994 Sep" means the field strain captured from the hot pepper farm in Andong in September 1994.

² "RR" represents a relative ratio of LD₅₀ value of a strain to that of the unselected strain.

선발된 집단은 parathion 2세대를 제외하고 세대가 진행함에 따라 선발약제에 대한 감수성이 낮아졌다. Deltamethrin으로 선발된 집단은 deltamethrin 뿐만 아니라 parathion과 bifenthrin에 대한 약제 감수성도 함께 낮아졌다. 이 집단에서 약제 감수성 저하속도를 보면 deltamethrin, bifenthrin, parathion의 순으로 빨랐다. 반면 parathion에 대해 선발된 집단은 감수성 집단과 비교할 때 parathion에 대해 약제 감수성 저하를 보이거나 deltamethrin과 bifenthrin에 대하여서는 그다지 큰 약제 영향을 미치지 못했고 오히려 선발 제1세대와 제2세대에서 각각 bifenthrin과 deltamethrin에 대해 감수성 증가를 보였다.

야외 고추포장에서 얻은 파밤나방과 비교하여 볼 때 실내 누대사육충은 현격하게 약제감수성이 크나 단지 1 세대만 대상 약제에 대해 선발하면 충분히 야외충과 비슷한 약제 저항능력을 지님을 보였다 (Table 4).

파밤나방은 대부분의 살충제에 대하여 약제 저항성을 발현시킬 수 있다고 보고되어졌다. 1994년 안동시 일직면 고추밭에서 얻은 야외 파밤나방과 이 야외충으로부터 실내에서 6-7세대 동안 누대사육한 실내충은 parathion, deltamethrin, bifenthrin순으로 약제 감수성정도가 높았다. 즉 피레스로이드계통보다는 유기인계통의 농약에 약제 감수성정도가 낮았다. 또 감수성집단은 deltamethrin과 parathion 각각의 농약에 선발된 집단에서 각 선발약제에 감수성 저하를 일으킴으로 파밤나방이 두 약제에 대한 약제 저항성기작을 내포하고 있음을 나타낸다. 그러나 두 약제 선발에 따른 약제 감수성 저하 현상은 약간의 차이를 나타낸다 (Table 4). Deltamethrin으로 선발된 집단은 같은 피레스로이드계통인 bifenthrin 뿐만아니라 유기인계인 parathion에 대해 약제 감수성 저하를 유발하나 parathion 선발집단은 두 피레스로이드약제에 적은 영향을 주었다. 이는 deltamethrin약제는 교차저항성을 유발할 가능성이있음을 내포한다.

3령충에 대한 Leaf-dipping방법에 의한 bifenthrin약제에 대한 감수성 정도는 현재까지는 시기적 감수성 변이보다는 지역별 집단 변이가 있음을 내포한다 (Table 5).

AChE의 활력은 감수성집단 ("Unselected")에 비해 약제선발집단들과 야외충에서 낮았으나 EST의 활력은 높아졌다 (Table 6). Deltamethrin 선발집단은 선발세대가 진행함에 따라 AChE의 활력은 천천히 감소한 반면 EST의 활력은 빨리 높아졌다. 반면 Parathion 선발집단은 제1세대에서는 감수성집단에 비해 AChE의 활력은 빨리 감소하고 EST의 활력도 빨리 높아졌으나 제2세대에서는 오히려 제1세대에 비해 AChE의 활력은 증가고 EST의 활력은 낮아졌다. 야외충의 AChE와 EST활력은 각 약제의 제1 또는 2세대의 효소활력과 유사함을 보여준다.

Table 5. Toxicity of bifenthrin to 1995 field *S. exigua* 3rd instar larvae

Collecting date	Location	Host	N	LC ₅₀ (ppm)	95% FL
Aug 08	Iljik	Hot pepper	250	11.89	5.42 - 19.16
Aug 08	Poongsan	Welsh onion	250	14.72	8.17 - 21.70
Aug 11	Onhye	Weed	250	62.52	32.87 - 240.24
Aug 15	Kilan	Soybean	250	13.87	6.52 - 22.20
Sep 01	Eosung	Soybean	250	25.07	13.97 - 37.84
Sep 11	Poongsan	Welsh onion	250	10.24	2.71 - 19.90
Sep 13	Eosung	Soybean	250	13.63	6.82 - 20.48
Sep 25	Poongsan	Welsh onion	250	16.07	3.54 - 32.92
Oct 15	Andong	Welsh onion	250	12.13	0.04 - 29.15

Table 6. Acetylcholinesterase (AChE) and esterase (EST) activities among different strains of *S. exigua* 5th instar larvae

Strains ¹	N	AChE activities (nM/min/ μ g)	EST activities (nM/min/ μ g)
Unselected	20	0.645 \pm 0.251	45.65 \pm 16.37
Deltamethrin			
Gen 1	30	0.623 \pm 0.261	63.04 \pm 22.04
Gen 2	30	0.307 \pm 0.193	148.82 \pm 123.42
Parathion			
Gen 1	30	0.283 \pm 0.206	146.49 \pm 50.76
Gen 2	30	0.339 \pm 0.240	93.02 \pm 38.78
Field			
1994 Sep	58	0.312 \pm 0.215	54.69 \pm 22.22

¹ "Unselected" means a susceptible strain which have been reared in laboratory for 6-7 generations without any insecticide treatment.

"Deltamethrin Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 0.1 μ g of deltamethrin.

"Parathion Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 1 μ g of parathion.

"Field 1994 Sep" means the field strain captured from the hot pepper farm in Andong in September 1994.

² "RR" represents a relative ratio of LD₅₀ value of a strain to that of the unselected strain.

AChE의 변화에 대해 효소 자체의 성질변화를 추적하기 위해 Michaelis-Menten상수인 Km값을 각 집단에서 측정하였다 (Table 7). 감수성집단에서 영기별로 Km값이 뚜렷하게 변함을 알 수 있다. 특별히 제5령충에서 갑자기 Km값의 하락을 보였다. 같은 5령충에서 약제 저항성이 다른 집단간 비교는 뚜렷한 경

향을 찾을 수는 없었으나 Deltamethrin 제1, 2세대에서 보는 바와같이 약제 감수성 정도가 감소함에 따라 Km값이 증가함을 보였다.

Table 7. Km values of Acetylcholinesterase of *S. exigua* larvae

Strains ¹	Age	N	Km (mM)
Unselected	2nd	10	0.085
	3rd	10	0.087
	4th	10	0.069
	5th	10	0.369
Deltamethrin Gen1	5th	10	0.311
	Gen2	10	0.420
Parathion Gen1	5th	10	0.355
	Gen2	10	0.210

¹ "Unselected" means a susceptible strain which have been reared in laboratory for 6-7 generations without any insecticide treatment. "Deltamethrin Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 0.1µg of deltamethrin. "Parathion Gen1 and Gen2" means the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 1µg of parathion.

EST의 변화에 대해 효소 자체의 성질변화를 알아보기 위해 전기영동을 통해 EST의 banding patterns을 비교하였다. 파밤나방은 전체 21개의 esterase bands가 6.5% gel에서 분리되어졌다 (Table 8). 공시충 전체로부터 얻은 수용성단백질시료와 혈림프시료 간에 esterase bands는 서로 거의 유사하나 EST# 1-5는 hemolymph에 주로 분포하는 esterase이고 EST# 7-10, 12-13, 20-21 은 조직내에

주로 분포하는 esterases로서 체내 조직간 약간의 변이를 보여 준다.

약제 감수성 정도가 다른 6개의 집단에서 EST banding patterns을 비교하였다. E17을 제외하고 모든 bands는 집단간의 유의성있게 차이를 나타내는 변이를 보였다 (Table 9). 약제선발 집단에서만 나오는 bands는 E16과 E17이었고 그외에 E2, E7, E8, E11은 감수성 집단에서 보다 약제 선발 집단에서 더욱 많은 빈도를 보이는 bands이었다.

Table 8. Esterase banding patterns of the 5th instar larvae of *S. exigua* on 6.5% nondenaturing PAGE

EST#	Rm ¹	Whole body	Hemolymph	Total ²
1	0.01	-----	-----	-----
2	0.03	-----	=====	=====
3	0.05	-----	=====	=====
4	0.08	-----	-----	-----
5	0.09	-----	-----	-----
6	0.13	-----	-----	-----
7	0.15	-----	-----	-----
8	0.17	-----	-----	-----
9	0.18	-----	-----	-----
10	0.19	-----	-----	-----
11	0.20	=====	=====	=====
12	0.23	-----	-----	-----
13	0.25	-----	-----	-----
14	0.27	=====	=====	=====
15	0.31	=====	=====	=====
16	0.33	-----	-----	-----
17	0.35	=====	=====	=====
18	0.38	-----	-----	-----
19	0.41	-----	-----	-----
20	0.51	-----	-----	-----
21	0.63	-----	-----	-----

¹ Rm: Relative mobility of a band to the total migrating distance of tracking dye

² Esterase reactivity to 2% α,β -naphthyl acetate:

strong (=====), medium (-----), weak (-----).

Table 9. Esterase (EST) banding frequencies of different *S. exigua* strains which showed different survival responses to insecticides

EST ¹	Strains ²						$\chi^2_{df=5}$	P
	S1 (n=43)	S2 (n=15)	D1 (n=28)	D2 (n=15)	P1 (n=14)	P2 (n=10)		
E1	0.512	0.867	0.607	0.000	0.000	0.300	38.73	< 0.001
E2	0.256	0.000	0.214	0.083	0.600	0.256	19.38	0.002
E3	0.279	0.133	0.500	0.267	0.000	0.100	15.80	0.007
E4	0.814	0.733	1.000	0.600	0.500	0.500	20.59	0.001
E5	0.140	0.000	0.286	0.083	0.000	0.000	12.63	0.027
E6	1.000	0.867	1.000	1.000	0.857	0.900	11.78	0.038
E7	0.163	0.000	0.214	0.133	0.500	0.000	16.00	0.007
E8	0.395	0.133	0.536	0.267	0.714	0.900	21.53	0.001
E9	0.861	1.000	0.929	0.533	0.643	0.235	54.89	< 0.001
E10	1.000	1.000	1.000	1.000	0.857	1.000	16.12	< 0.001
E11	0.372	0.133	0.893	0.200	0.786	0.700	39.69	< 0.001
E12	0.698	0.933	0.900	1.000	0.786	1.000	13.49	0.019
E13	0.116	1.000	0.286	0.933	0.643	0.600	57.76	< 0.001
E14	0.000	0.800	1.000	0.800	0.000	0.000	105.24	< 0.001
E15	0.000	0.467	0.321	0.000	0.214	0.700	38.21	< 0.001
E16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	58.79	< 0.001
E17	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	7.39	0.193
E18	0.000	0.333	0.000	0.083	0.000	0.100	26.78	< 0.001
E19	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.900	120.81	< 0.001

¹ Each EST number corresponds to the number in Table 6.

² "S1 and S2" represent the first and the second generations of the susceptible strain which have been reared in laboratory for 6-7 generations without any insecticide treatment.

"D1 and D2" represent the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 0.1 μ g of deltamethrin.

"P1 and P2" represent the first and the second generations selected respectively from the susceptible strain with 1 μ g of parathion.

(3) 파밤나방 기주에 따른 효소변이

배추에서 보다는 케일과 인공사료에서 빠른 발육속도와 생존력을 보였다 (Table 10). 3령충에 대한 약제 감수성 정도는 큰차이를 보이지 않았다 (Table 11).

5령충 혈액으로 부터 EST의 활력 비교는 (Table 12) 인공사료보다는 배추와 케일의 천연사료에서 높았다. EST의 조성을 보면 인공사료에 비해 천연사료에서는 E1, E6, E11이 많이 나타났다. 이들 EST는 모두 carboxyesterase에 속하는 것을 알 수 있다 (Table 14). Fig. 1은 기주별 특이적인 혈액단백질을 갖는다는 것을 보였다.

Table 10. Effects of different diets on *S. exigua* developments

Stage	Period(days)	Survival rate	Mortality
Oriental Cabbage			
1st	2.1±0.3	0.3±0.1	0.7±0.1
2nd	3.3±0.3	0.7±0.2	0.3±0.2
3rd	3.7±0.1	0.6±0.0	0.4±0.0
4th	1.4±0.6	0.7±0.1	0.3±0.2
5th	3.1±1.0	0.9±0.1	0.1±0.1
prepupae	0.9±0.6	1.0±0.1	0.0±0.1
pupae	4.7±1.8	0.8±0.2	0.2±0.3
total	19.2±1.8	0.08±0.05	0.92±0.3
Kale			
1st	2.1±0.3	0.5±0.3	0.5±0.3
2nd	3.5±0.8	0.8±0.2	0.2±0.1
3rd	3.3±0.4	0.8±0.1	0.2±0.1
4th	3.6±0.3	0.8±0.1	0.2±0.1
5th	2.0±1.0	0.8±0.2	0.2±0.1
prepupae	0.9±0.5	1.0±0.1	0.0±0.1
pupae	3.0±1.2	0.8±0.2	0.2±0.2
total	18.4±1.3	0.21±0.19	0.79±1.9
Artificial diet			
1st	1.9±0.2	0.8±0.1	0.2±0.1
2dn	3.0±0.2	0.8±0.1	0.2±0.1
3rd	3.5±0.4	0.8±0.2	0.2±0.2
4th	2.6±0.5	0.8±0.1	0.2±0.1
5th	2.1±1.0	0.7±0.2	0.3±0.2
prepupae	0.8±0.6	0.6±0.5	0.4±0.5
pupae	4.3±1.1	0.7±0.2	0.3±0.2
total	18.2±0.8	0.52±0.31	0.48±0.3

Table 11. Bifenthrin toxicity on different *S. exigua* populations reared on different diets

Diets	LD ₅₀ (ppm)	95%FL	Slope
Oriental Cabbage	12.66	5.66 - 20.63	1.13 ± 0.20
Kale	16.07	3.53 - 32.92	0.66 ± 0.16
Artificial Diet	16.07	3.54 - 32.92	0.66 ± 0.16

Table 12. Esterase (EST) activities of different *S. exigua* populations reared on different diets

Diets	EST (μM/min/μg)
Oriental Cabbage	12.69±6.00 ^{a1}
Kale	11.73±8.21 ^{ab}
Artificial diet	4.86±3.30 ^b

¹ Different letters followed by means were significantly different at α=0.05(LSD test).

Table 13. Hemolymph EST frequencies of different *S. exigua* populations reared on different diets

EST	Oriental cabbage(n=4)	Kale(n=6)	Artificial diet
E1	0.000	0.833	0.000
E2	1.000	1.000	0.833
E3	1.000	1.000	1.000
E4	0.000	1.000	1.000
E5	1.000	1.000	1.000
E6	0.500	1.000	0.000
E11	1.000	0.000	0.000
E14	1.000	1.000	1.000
E15	1.000	1.000	1.000
E16	1.000	1.000	1.000
E17	0.000	1.000	1.000
E18	1.000	1.000	1.000
E19	0.000	1.000	0.833

Table 14. EST characterization of *S. exigua*

EST	α,β -NA ¹	Eserine	Monocrotophes	Dichlorovos
E1	+	-	-	-
E2	+	+	+	+
E3	+	+	+	+
E4	+	+	+	+
E5	+	+	+	-
E6	+	-	-	-
E11	+	-	-	-
E14	+	-	-	-
E15	+	-	-	-
E16	+	-	-	-
E17	+	-	-	-
E18	+	-	-	-
E19	+	-	-	-

¹ α,β -NA : α,β -naphthyl acetate

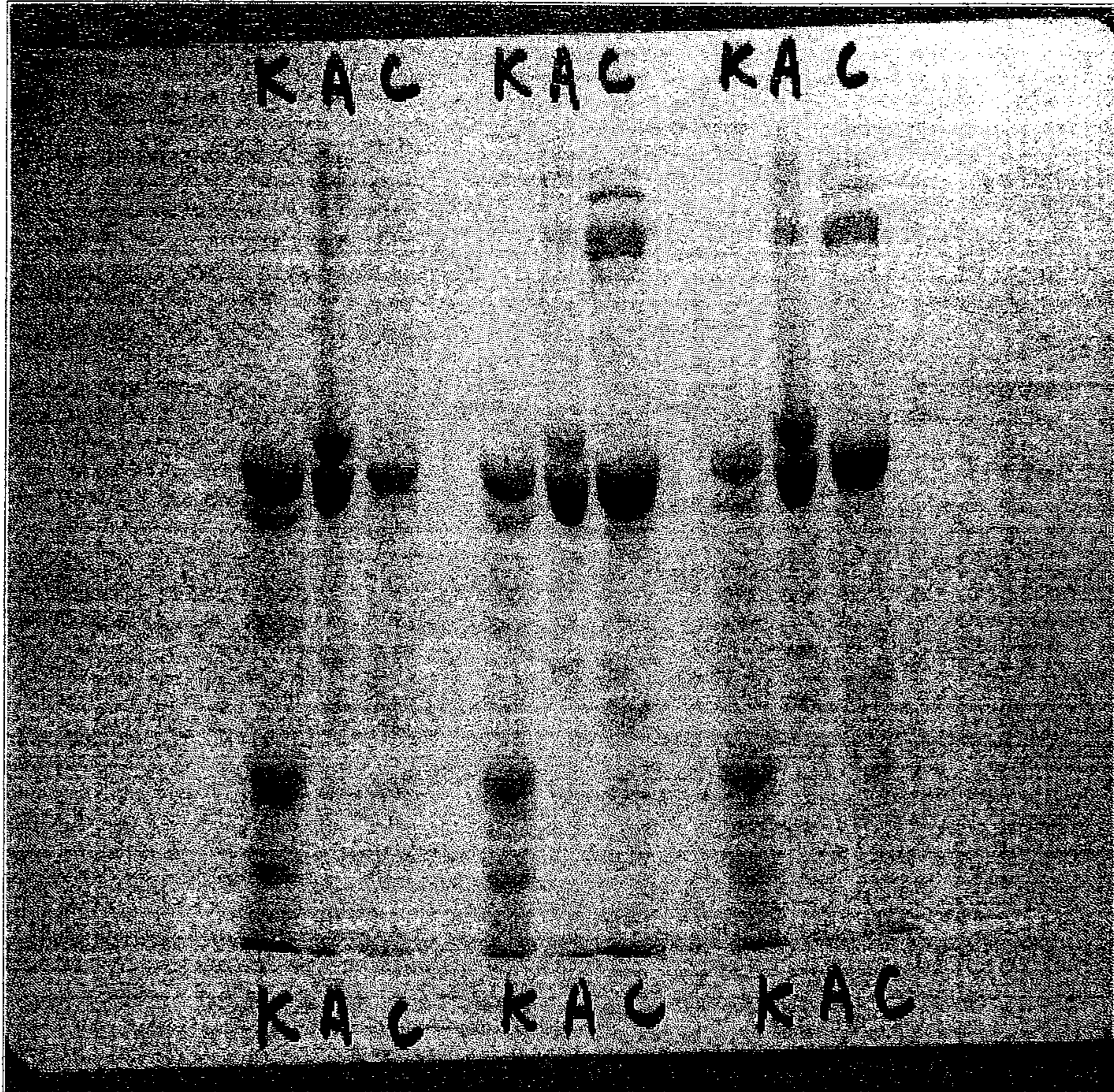


Fig 1. Hemolymph proteins in *S. exigua* reared on different diets
K: Kale, A: Artificial diet, C: Oriental cabbage

(4) 결 론

작용기작면에서 볼 때 유기인계농약은 중추신경계 특히 신경연접부의 acetylcholinesterase (AChE)가 작용부위로 알려져 있다. 이는 약제 감수성저하 집단에서 낮은 AChE활력과 높은 Km값에서 유기인계 농약 저항성 기작중의 하나인 이 작용점변환이 일어났음을 추정할 수 있다. 특이한 사실은 영기가 진행함에 따라 AChE의 Km값에서 현격 차이는 영기별 약제 감수성정도가 다르다고 알려진 파밤나방에게는 주목할 만한 사실이다. 일반적으로 파밤나방은 어린 유충보다는 노숙 유충에서 약제 감수성이 현저히 낮아진다고 보고된다. 이 결과는 다시한번 AChE의 활력이 약제 감수성과 양의 상관관계를 갖는다는 점을 내포한다.

두 약제선발 집단 모두에서 general esterase활력의 증가를 보였다. Esterase는 일반적으로 대부분의 살충제에 중요한 해독효소로서 deltamethrin과 parathion 약제모두 화학구조내에 ester결합을 지니고 있음으로 이 효소의 활력 증가와 약제 감수성저하와는 유관함을 알 수 있다. 전기영동상에서 이 효소의 변이는 뚜렷한 집단간 차이의 경향은 얻을 수 없었으나 E16과 E17는 약제 선발 집단에 특유한 bands로서 주목할 만하다.

이상의 결과로 부터 esterase라는 해독효소활력 증가와 acetylcholinesterase 효소의 활력변환이 파밤나방의 복잡한 살충제기작에 포함됨을 나타낸다.

제 4 장 연구개발사업 성과 및 성과에 대한 활용 (실용화) 방안

제 1 절 기대되는 성과

- 가. 본 연구에서 개량된 인공사료와 사육 방법은 파밤나방의 대량사육 및 누대사육의 가능성을 한층 제고시킨다.
- 나. 파밤나방의 약제 감수성조사와 효소검사서 얻은 결과는 유기인계나 카바메이트계 농약보다는 피레스로이드계통의 농약이 파밤나방 방제에 효과적임을 기리킨다. 그러나 이 피레스로이드 농약은 교차저항성을 일으킬 가능성을 가짐으로 항상 저항성 유발에 주의해야함을 본 실험 결과는 나타낸다.
- 다. Acetylcholinesterase 와 esterase의 살충제 감수성과의 관계는 저항성 파밤나방을 추적해내는 진단장치개발에 유용한 정보를 제공하게된다. 특별히 파밤나방 약제 저항성 기작이 AChE의 작용점변환의 가능성은 최근

미국의 여러 실험실에서 제작하는 저항성 진단장치가 대부분 이 작용점을 이용하고 있어 본 연구의 최종 목표를 달성하는데 매우 고무적인 결과로 사려된다.

제 2 절 연구개발사업 성과에 대한 활용(실용화) 방안

가. 국부적 및 일시적 파밤나방 집단의 저항성정도 파악

나. 이에 따른 효과적인 방제 살충제 종류와 약량 결정

다. 합리적 약제 살포로 인한 천적 보호 및 환경보존