최 종
연구보고서

파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발

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

연구기관

안 동 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11. 30

주관연구기관명 : 안동대학교
총괄연구책임자 : 김 용 균
세부연구책임자 : 한 상 찬
연 구 원 : 이 준 익
연 구 원 : 강 성 영
연 구 원 : 송 원 례

요 약 문

I. 제 목

파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 1988년 이후 남부지역뿐만아니라 전국에 걸쳐 파밤나방 대발생
나. 파밤나방이 지역적으로 약제 저항성을 발현시켜 효과적 방제 실패
다. 파밤나방을 효과적으로 방제하기 위해서는 각 파밤나방 집단별로 약제 감수성 정도를 파악하고 이에 따라 적합한 살충제를 처리해야 함
라. 기존의 집단별 약제 감수성결정 (생물검정법)은 한 세대이상의 사육을 요구함으로 즉각적인 대상 집단의 감수성 정도를 파악하여 대처하는 데 부적합
마. 현장의 파밤나방 상황을 간편하고도 신속하게 판별할 장치의 필요성

III. 연구개발 내용 및 범위

이 과제의 최종목표는 살충제 저항성 파밤나방을 간편한 장비로 판별해내는 진단장치 개발에 있다. 이를 성취하기 위해서는 다음의 단계가 필요하다:

가) 파밤나방 살충제 저항성과 효소활력과의 상관관계를 통한 저항성 관련 지표효소를 결정한다.
나) 살충제의 농도에 따른 이 지표효소의 활력변화를 저항성집단과 감수성 집단에서 비교분석한다. 이를 통한 저항성과 감수성 파밤나방의 판별 기준을 결정한다.
다) 판별기준을 통한 약제 감수성에서 서로 다른 집단간 검정력분석 및 간편한 진단장치 개발

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

파밤나방이 살충제에 대한 반응은 약제에 따라 상이했다. 그러나 저항성집

단의 경우 기존의 대부분의 살충제에 대해 복합적인 약제 저항능력을 보였다. 특히 저항성 파밤나방의 경우 기작면에서 에스테라제와 아세틸콜린에스테라제의 활력변이를 보였다. 본 연구에서 개발된 검색장치는 이러한 점을 이용하여 이 두효소에 대해 육안으로 발색차이를 알아냄으로 특정 파밤나방 집단의 저항성 개체 빈도수를 빠르고 쉽게 판별해내는 장치를 개발하였다. 개발된 장치의 특징은 다음과 같다.

가) 검색장치의 종류는 에스테라제 (E)와 아세틸콜린에스테라제 (A)의 검정 효소에 따라 크게 2종류로 구분되고 또 각 효소는 dichlovos (D)와 monocrotophos (M)의 억제자에 따라 2종류로 나뉘어 총 4가지의 검색장치 (EM, ED, AM, AD)가 개발됫다.
나) 검색장치의 모형을 개발하기 위해 microplate형, disk형, blotto형이 시도되었으나 특수 여과지 (1x1 cm)의 disk형이 가장 시료를 지탱하는 능력이 탁월하여 효과적이었다.
다) 발색반응은 에스테라제의 경우는 Fast Garnet GBC를 이용한 Van Asperen방식을 응용했고, 아세틸콜린에스테라제는 Karnovsky & Roots방법을 응용했다.
라) 판별 억제자의 농도는 에스테라제의 경우 dichlovos는 1mM, monocrotophos는 10mM이며 아세틸콜린에스테라제의 경우는 모두 100mM에서 개체간 억제변이를 보였다. 억제되지 않은 저항성 개체는 두 효소 모두에서 적색을 보이나 억제된 감수성 개체의 시료는 무색으로 나타난다.
마) 검색장치에 이용된는 파밤나방의 시료는 5령충 한 개체로부터 혈액과 머리를 채취하여 위의 4가지 판별장치에 모두 사용하게 했다. 혈액은 복부 앞다리를 잘라 나온 혈액을 미리 혈액응고제 (phenylthiourea)가 들어있는 튜브에 받쳐지고 머리는 50㎕ 인산완충용액에서 마쇄되고 상등액을 검색장치에 이용하였다.
바) 사용에 용이성을 높이기 위해 disk는 유리슬라이드위에 5장을 실리콘으로 붙여 이용되어질 때 까지 호일에 싸서 5℃에 보관하게 된다. 이용시 한꺼번에 5개의 시료를 판별하게 했다.
사) 검색장치의 실증검증을 위해 11개의 실내와 야외 집단들을 대상으로 살충제 감수성과 검색장치 판별력을 비교하였다. 이들 집단은 파밤나방 방제에 이용되고 있는 3가지 살충제들 (bifenthrin, chlorpyrifos-methyl, methomyl) 에 대해 상이한 약제 감수성을 보였다. Bifenthrin에 대한 약제 감수성변이를 판별하는 데는 ED 검색장치가 효과적이었다 ($r = 0.89$, $P = 0.0424$). Methomyl에 대한 약제 감수성변이를 판별하는 데는 ED 검색장치 ($r = 0.80$, $P = 0.0305$)와 AD 검색장치 ($r = 0.64$, $P = 0.0482$) 가효과적이었다. Chlorpyrifos-methyl에 대한 약제 감수성변이를 판별하는 데는 ED 검색장치 ($r = 0.84$, $P = 0.0342$)와 EM 검색장치 ($r = 0.73$,

$P = 0.0605$)가 효과적이었다.

이상의 본 연구에서 개발된 검색장치는 간편하고 신속하게 특정 집단의 약제 저항성개체의 빈도수를 알려줌으로 효과적인 방제방법을 선정하는 데 이용될 수 있다. 특히, 각 지역의 지도소에서 이 검색장치를 이용할 경우 객관적이고 합리적인 처방을 현장 농민에게 지도할 수 있겠다.

SUMMARY

I. Title

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

II. Research Aims and Significance

A. Big populations of the beet armyworm have been occurred since 1988 in Korea.

B. The pest has been exposed to a broad spectrum of insecticides 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.

C. It is highly needed to apply insecticide resistance management tactics on this insect pest. These tactics require the status of the insecticide susceptibilities of a particular population.

D. Current insecticide bioassay takes quite long time to get the information so that it can not apply a proper control method promptly as needed.

E. It is needed to develop a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the inseciticide 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

The final goal of this project is to develop a convenient, cheap, and accurate diagnostic device for the inseciticide resistant beet armyworm. To do this, the following research steps were needed;

A. Detoxifying enzymes related to the insecticide resistance mechanisms of the beet armyworm should be analyzed.

B. *In vitro* inhibition amounts of the insecticides which discriminate the resistant and the susceptible insects should be determined.

C. The LD50 values obtained by the current insecticide bioassay should be compared with the diagnostic values obtained by the kits from the different populations.

IV. Research Results and Application

There was a great variation in insecticide susceptibilities among different populations of the beet armyworm. Insecticide-resistant populations had quite high LD50s to most of the tested insecticides. Esterase (EST) and acetylcholinesterase (AChE) activities had high correlation with the insecticide susceptibilities. This project was focused on development of the diagnostic kits using these detoxifying enzymes. The characteristics of the diagnostic kits are followed;

A. Diagnostic kits were classified by the kind of diagnostic enzymes ('E' for EST and 'A' for AChE) and insecticides ('D' for dichlorvos and 'M' for monocrotophos). Four diagnostic kits (EM, ED, AM, and AD) were developed.

B. Three kit models (microplate type, disk type, and blotto type) were compared. Disk type was the most efficient to give a notable color change according to variable enzyme activities especially when it was made by thick blotto filter paper.

C. Color developing techniques of EST and AChE diagnostic kits used the methods of Van Asperen (1962) and Karnovsky & Roots (1964), respectively.

D. Diagnostic insecticide concetrations were 1mM for ED, 10 mM for EM, 100 mM for AD, and 100 mM for AM. Resistant larvae which were not inhibited by the diagnostic amounts of insecticides developed red color but susceptibles showed no color.

E. An insect was used for both EST and AChE diagnostic kits, but different in their samples. The EST sample was hemolymph bred from the prolegs. The AChE sample was the head which was macerated in 50μℓ of 0.1mM phosphate buffer (pH 6.5).

F. A kit could diagnosis five samples at once. It could be kept in a foil wrap at 5℃ for a long term conservation.

G. These four diagnostic kits were tested in 11 different populations which showed variations of insecticide susceptibilities. 'ED' kit was excellent ($r = 0.89$, $P = 0.0424$) in discriminating the susceptibilities of the larvae to bifenthrin. 'ED' and 'AD' kits were excellent (ED: $r = 0.80$, $P = 0.0305$; AD: $r = 0.64$, $P = 0.0482$) in discriminating the susceptibilities of the larvae to methomyl. 'ED' and 'EM' kits were excellent (ED: $r = 0.84$, $P = 0.0342$; EM: $r = 0.73$, $P = 0.0605$) in discriminating the susceptibilities of the larvae to methomyl.

This diagnostic devices can be used for insecticide-resistance management program for this insect pest. It also provide a technical guide to insect pest management for farmers, directors, and researchers.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

우리나라에서는 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))이 최근 들어 특히 1988년 이후 남부지역 뿐만 아니라 전국에 걸쳐 대발생하기 시작했다. 이 해충은 넓은 기주범위로 파, 배추, 고추, 콩 등 대부분의 밭작물에 큰 피해를 주고 있다 (고 1933). 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 (김 등 1997).

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

1차년도의 시험결과는 acetylcholinesterase와 esterase의 활성 변화와 파밤나방 살충제 저항능력과 높은 상관관계를 보였다. 그러므로 파밤나방의 살충제 저항성 검색장치 개발에 이 두 효소를 지표효소로서 이용될 수 있음을 결정하였다. 2차년도 시험에서는 이 두 효소의 검색장치 개발에 실용화를 꾀하기 위해 지표효소의 동일 집단내에서 발육시기별 활력변이 연구와 서로 다른 집단간 지표효소의 활력 억제를 위한 억제자 (실제로 살충제)의 유효농도 (50% inhibition concentration: IC50) 변이를 결정했다.

최종년도인 제 3차년도에서는 진단장치 개발로 이 장치가 살충제 감수성 정도가 서로 다른 집단을 분별할 수 있는 지를 검정해보는 데 있다. 이를 수행하기 위해 검색장치 시작품제작과 개발된 검색장치의 실증실험으로 구성되었다.

제 2 절 연구개발의 추진체계

이 과제의 최종목표는 살충제 저항성 파밤나방을 간편한 장비로 판별해내는 진단장치 개발에 있다. 이를 성취하기 위해서는 다음의 단계가 필요하다:

1) 파밤나방 살충제 저항성과 효소활력과의 상관관계를 통한 저항성 관련 지표효소를 결정한다.
2) 살충제의 농도에 따른 이 지표효소의 활력변화를 저항성집단과 감수성 집단에서 비교분석한다. 이를 통한 저항성과 감수성 파밤나방의 판별 기준을 결정한다.
3) 판별기준을 통한 약제 감수성에서 서로 다른 집단간 검정력분석 및 간편한 진단장치 개발한다

제 3 절 개발품 활용 및 기대효과

파밤나방이 살충제에 대한 반응은 약제에 따라 상이했다. 그러나 저항성집단의 경우 기존의 대부분의 살충제에 대해 복합적인 약제 저항능력을 보였다. 특히 저항성 파밤나방의 경우 기작면에서 에스테라제와 아세틸콜린에스테라제의 활력변이를 보였다. 본 연구에서 개발된 검색장치는 이러한 점을 이용하여 이 두 효소에 대해 육안으로 발색차이를 알아냄으로 특정 파밤나방 집단의 저항성 개체 빈도수를 빠르고 쉽게 판별해내는 장치를 개발하였다. 특히 야외충 및 실내 선발충등의 여러 집단에서 실증 실험을 통해 이 검색장치의 적용성을 입증했다.

본 연구에서 개발된 검색장치는 간편하고 신속하게 특정 집단의 약제 저항성 개체의 빈도수를 알려줌으로 효과적인 방제방법을 선정하는 데 이용될 수 있다. 특히, 각 지역의 지도소에서 이 검색장치를 이용할 경우 객관적이고 합리적인 처방을 현장 농민에게 지도할 수 있겠다. 그러나 보다 광범위하고 정확한 진단 장치로서 사용하기 위해서는 특정 집단의 조사될 표본의 숫자와 살충제 선정의 문제라든지 또는 선정된 살충제의 살포 농도등에 대한 보충자료의 필요성이 요구된다. 이러한 추가적인 문제는 추후 연구되어야 할 과제로 남는다.

제 2 장 재료 및 방법

시험곤충확보

본 연구에 안동, 의성, 군위, 경산, 진도, 해남, 보성, 및 순천 파밤나방 집단들이 이용되었다. 안동집단은 안동시 송천동 파밭에서 채집한 파밤나방을 고(1993)의 방법을 이용하여 인공사료로 실내에서 약 20세대 누대 사육된 집단이었다. 경산집단은 수원시 농촌진흥청 농업과학기술원 곤충과 사육실에서 약 25세대 누대 사육된 집단으로 경산근교 파밭에서 채집된 파밤나방의 실내 정착집단으로 규명된다. 기타 집단들은 각 지역의 파밭에서 채집한 야외집단들이었다.

살충제 생물검정

파밤나방 유충을 실내온도 25±1℃에서 각 농도별 10마리씩 미리 샤레에 넣어 얼음판위에 올려서 마취시킨 후 국부처리기로 1μl씩 복부등쪽에 처리하였다. 처리후 48시간 경과시 막대봉으로 머리, 가슴, 배를 각각 한번씩 눌러 움직이지 않으면 사충으로 정하였다. Finney (1971)의 probit분석법에 의해 반수치사농도 (LD_{50})를 personal computer를 이용하여 산출하였다.

수용성 단백질 추출 및 총단백질 측정

파밤나방을 한 마리씩 microcentrifuge tube (1.5ml)에 넣고 5°C의 PBS-TX (0.1M sodium phosphate buffer saline, pH 6.5, 0.5% Triton X-100) 용액 1ml로 분쇄하였다. 이후 5분간 15,000rpm에서 분리된 상등액을 다시 PBS-TX로 10배 희석하여 총단백질 및 효소 분석에 이용되었다. 총단백질은 Bradford (1972) 방법에 따라 실험하였다. 표준용액으로 bovine serum albumin 을 이용했다.

Esterase (EST) 활성 측정

EST활성은 Townson (1972)의 방법을 파밤나방에 변형된 방법을 이용했다. 10μl의 10배 희석된 효소용액에 2 μl의 50mM p-nitrophenyl acetate (80% methanol) 및 985 μl PBS-TX를 혼합한 용액을 25℃에서 10분간 반응시킨 후 400nm 에서 10분 간격으로 흡수도의 변화를 double beam spectrophotometer (Uvicon 960, Kontron Instrument)로 측정했다. 표준용액으로 10-120 mM의 p-nitrophenol을 이용하였다. 검색장치를 위해서는 효소활성의 시각화를 위해서 Van Asperen방법 (1962)을 이용하였다.

Acetylcholinesterase (AChE) 활성측정

AChE활력은 Ferari et al. (1993)의 방법을 파밤나방에 변형하여 개발된 방법을 이용하였다. 각 파밤나방의 단백질 추출물 (PBS-TX로 10배 희석) 500μl와

AChE inhibitor로서 1,5-bis (4-allyl dimethyl ammonium phenyl) pentan-3-one dibromide 50μl을 1ml spectrophotometer tube에 넣는다. 이때 500μl의 AChE의 기질용액 (100mM acetylthiocholine iodide (1.2ml)), 12mM 5,5-dithio bis (nitrobenzoic acid) (2.4ml), 증류수 (56.4ml))를 섞었다. 이후 405nm에서 10분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡수도는 thionitrobenzoic acid의 소멸계수 (14150 M-1cm-1)를 이용하여 AChE의 활력을 계산하는데 이용되었다. AChE의 Michaelis-Menten constant (Km) value 결정은 AChE의 활력측정법과 동일하나 AChE의 기질인 acetylthiocholine iodide를 네 가지 다른 농도별 (0.5 mM, 1mM, 2mM, 4mM)로하여 효소활력을 측정하였다. Km결정은 Lineweaver-Burk 선형함수를 이용하여 계산되었다. 검색장치를 위해서는 효소활성의 시각화를 위해서 Karnovsky & Root방법 (1964)을 이용하였다.

EST의 전기영동분석

전기영동은 Tris-glycine buffer (0.05M Tris, pH 8.3) system의 6.5% nondenaturing polyacrylamide gel (Davis 1964)에서 Hoffer vertical slab gel을 사용하였다. 각 시료 (약 0.7 μg 단백질함유)는 loading buffer (0.125mM Tris, pH 8.3, 50% sucrose, 0.01% bromophenol blue, 0.004% basic fuchsin, 0.154% dithiothreitol, 0.0372% EDTA) electrode buffer)로 준비되었다. 전기영동은 300V 일정 전압에서 tracking dye가 바닥까지 도달할 때까지 이루워졌다. EST 염색은 100 ml 염색용액 (0.2M phosphate buffer (pH 6.5), 2% α-naphthyl acetate, 0.04g fast blue BB salt)에서 25℃ 30분동안 이루워졌다. 염색후 겔은 고정용액 (7% acetic acid, 5% methanol)에서 관찰할 때까지 보관된다.

In vitro EST의 활성 저해

Van Asperen의 방법 (1962)을 파밤나방에 변형하여 적용하였다. 혈액시료는 EST완충용액으로 500배 희석한 후 이용하였다. 먼저 혈액시료 45μℓ와 소정의 농도 살충제 5μℓ를 96 well microplate에 분주한 후 25℃에서 10분간 반응시켰다. 이후 각 시료에 100μℓ의 기질용액을 넣고 다시 25℃에서 10분간 반응시켰다. 이때 각 시료에 100μℓ의 염색용액을 넣고 25℃에서 10분간 반응시킨 후 600nm에서 흡수도의 차이를 측정했다.

In vitro AChE의 활성 저해

AChE의 활성 측정법과 동일하며 저해제인 eserine (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 μM), dichlofos (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125μM), monocrotophos (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mM)를 5단계로 PBS-TX 완충용액으로 희석한 후 50μℓ씩 넣고 25℃에서 10분간 반응시켰다. 기질용액을 넣고 10분 간격으로 흡수도를 측

정했다. 전체 AChE 활성의 50%를 나타내는 제해제 농도 (I50)과 저해속도 상수 (Ki)값은 Aldridge (1950)의 방법에 따라 계산되었다.

제 3 장 살충제감수성와 해독효소활성간에 상호관계

제 1 절 집단별 약제 감수성 및 해독효소활성변이

세 가지 약제 (parathion, deltamethrin, bifenthrin)에 대한 파밤나방의 감수성정도는 시험된 모든 집단에서 달랐다. Deltamethrin으로 2세대 선발된 집단을 제외하고 전반적으로 반수치사약량을 비교하여 볼 때 parathion, deltamethrin, bifenthin의 순으로 파밤나방 5령충에 점점 더 강한 살충력을 보여줬다 (Table 1). 각 약제에 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 보이나 deltamethrin과 bifenthrin에 대하여서는 그다지 큰 약제 영향을 미치지 못했고 오히려 선발 제1세대와 제2세대에서 각각 bifenthrin과 deltamethrin에 대해 감수성 증가의 경향을 보였다. 야외 고추포장에서 얻은 파밤나방과 비교하여 볼 때 실내 누대 사육충은 현격하게 약제 감수성이 크나 단지 한 세대만 대상 약제에 대해 선발하면 충분히 야외충과 비슷한 약제 저항능력을 지님을 보였다.

AChE의 활력은 감수성집단 (‘unselected’)에 비해 약제선발집단들과 야외충에서 낮았으나 EST의 활력은 높아졌다 (Table 2). 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 증가하고 EST의 활력은 낮아졌다. 야외충의 AChE와 EST활력은 각 약제로 도태된 제1 또는 2세대선발집단들의 효소활력과 유사함을 보여준다.

AChE의 변화에 대해 효소 자체의 성질변화를 추적하기 위해 Michaelis-Menten상수인 Km값을 각 집단에서 측정하였다. 감수성집단에서 유충의 영기별로 Km값이 뚜렷하게 변함을 알 수 있다 (Fig. 1). 특별히 제5령충에서 갑자기 Km값의 하락을 보였다. 같은 5령충에서 약제 감수성이 다른 집단간 비교는 약제 감수성 정도가 감소함에 따라 Km값이 증가함을 보였다 (Fig. 1).

EST의 변화에 대해 효소 자체의 성질변화를 알아보기 위해 전기영동을 통해 EST의 banding patterns을 비교하였다. 파밤나방은 전체 21개의 EST 밴드가 6.5% gel에서 분리되어졌다 (Table 3). 공시충 전체로부터 얻은 수용성단백질시료와 혈림프시료 간에 EST 밴드는 서로 거의 유사하나 EST# 1-5는 혈림프에 주로 분포하는 esterase이고 EST# 7-10, 12-13, 20-21 은 조직내에 주로 분포하는 에스테라제로서 체내 조직간 약간의 변이를 보여 주었다. 약제 감수성 정도가 다른 6개의 집단에서 EST 밴드 양상을 비교하였다. E17을 제외하고 모든 밴드는 집단간의 유의성있게 차이를 나타내는 변이를 보였다 (Table 3). 약제선발집단에서만 나오는 밴드는 E16과 E17이었고 그 외에 E2, E7, E8, E11은 감수성 집단에서 보다 약제 선발 집단에서 더욱 많은 빈도를 보이는 밴드이었다.

Table 1. Toxicities of parathion, deltamethrin, and bifenthrin to the laboratory selected strains of the fifth instar larvae of *S. exigua*

Populations[1]	Insecticides	N	LD50 (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 - 83.30	0.46∓0.14	41.52
	Bifenthrin	144	5.66	0.83 - 20.90	0.33∓0.13	9.76
Parathion						
Gen 1	Parathion	126	86.45	no estimate	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	no estimate	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 population which have been reared in laboratory for 6-7 generations without exposure to insecticides.
‘Deltamethrin Gen1 and Gen2’ means the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 0.1μg of deltamethrin.
‘Parathion Gen1 and Gen2’ means the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 1μg of parathion.
‘Field 1994 Sep’ means the field population captured from the hot pepper farm in Andong in September 1994.

2 ‘RR’ respresents a relative ratio of LD50 value of a population to that of the unselected population.

Table 2. Acetylcholinesterase (AChE) and esterase (EST) activities among different populations of the fifth instar larvae of *S. exigua*

Populations[1]	N	AChE activities (nmol • min-1• ɧg-1 protein)	EST activities (nmol • min-1• ɧg-1 protein)
Unselected	20	0.645 ∓ 0.251	45.65 ∓ 16.37
Deltamethrin			
Gen 1	30	0.623 ∓ 0.261	63.04 ∓ 22.04
Gen 2	30	0.307 ∓ 0.193	148.82 ∓ 123.42
Parathion			
Gen 1	30	0.283 ∓ 0.206	146.49 ∓ 50.76
Gen 2	30	0.339 ∓ 0.240	93.02 ∓ 38.78
Field			
1994 Sep	58	0.312 ∓ 0.215	54.69 ∓ 22.22

1 'Unselected' means a susceptible population which have been reared in laboratory for 6-7 generations without exposure to insecticides.

'Deltamethrin Gen1 and Gen2' means the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 0.1ɧg of deltamethrin.

'Parathion Gen1 and Gen2' means the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 1ɧg of parathion.

'Field 1994 Sep' means the field population captured from the hot pepper farm in Andong in September 1994.

Table 3. Esterase (EST) banding frequencies of different populations of the fifth instar larvae of *S. exigua* which showed different tolerance to insecticides. ESTs of a whole body extract were separated on 6.5% nondenaturing PAGE.

		Populations[3]							
EST[1]	Rm[2]	S1 (n=43)	S2 (n=15)	D1 (n=28)	D2 (n=15)	P1 (n=14)	P2 (n=10)	$\chi^2_{df=5}$	*P*
E1	0.01	0.512	0.867	0.607	0.000	0.000	0.300	38.73	< 0.001
E2	0.03	0.256	0.000	0.214	0.083	0.600	0.256	19.38	0.002
E3	0.05	0.279	0.133	0.500	0.267	0.000	0.100	15.80	0.007
E4	0.08	0.814	0.733	1.000	0.600	0.500	0.500	20.59	0.001
E5	0.09	0.140	0.000	0.286	0.083	0.000	0.000	12.63	0.027
E6	0.13	1.000	0.867	1.000	1.000	0.857	0.900	11.78	0.038
E7	0.15	0.163	0.000	0.214	0.133	0.500	0.000	16.00	0.007
E8	0.17	0.395	0.133	0.536	0.267	0.714	0.900	21.53	0.001
E9	0.18	0.861	1.000	0.929	0.533	0.643	0.235	54.89	< 0.001
E10	0.19	1.000	1.000	1.000	1.000	0.857	1.000	16.12	< 0.001
E11	0.20	0.372	0.133	0.893	0.200	0.786	0.700	39.69	< 0.001
E12	0.23	0.698	0.933	0.900	1.000	0.786	1.000	13.49	0.019
E13	0.25	0.116	1.000	0.286	0.933	0.643	0.600	57.76	< 0.001
E14	0.27	0.000	0.800	1.000	0.800	0.000	0.000	105.24	< 0.001
E15	0.31	0.000	0.467	0.321	0.000	0.214	0.700	38.21	< 0.001
E16	0.33	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	58.79	< 0.001
E17	0.35	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	7.39	0.193
E18	0.38	0.000	0.333	0.000	0.083	0.000	0.100	26.78	< 0.001
E19	0.41	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.900	120.81	< 0.001
E20	0.51	-	-	-	-	-	-	-	-
E21	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-

1 Each EST was numbered from cathod to anode. Frequencies of E20 and E21 were not recorded.

2 'Rm' represents relative mobility of a band to the total migrating distance of tracking dye.

3 'S1 and S2' represent the first and the second generations of the susceptible population which have been reared in laboratory for 6-7 generations without exposure to insecticides. 'D1 and D2' represent the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 0.1μg of deltamethrin. 'P1 and P2' represent the first and the second generations selected respectively from the susceptible population with 1μg of parathion.

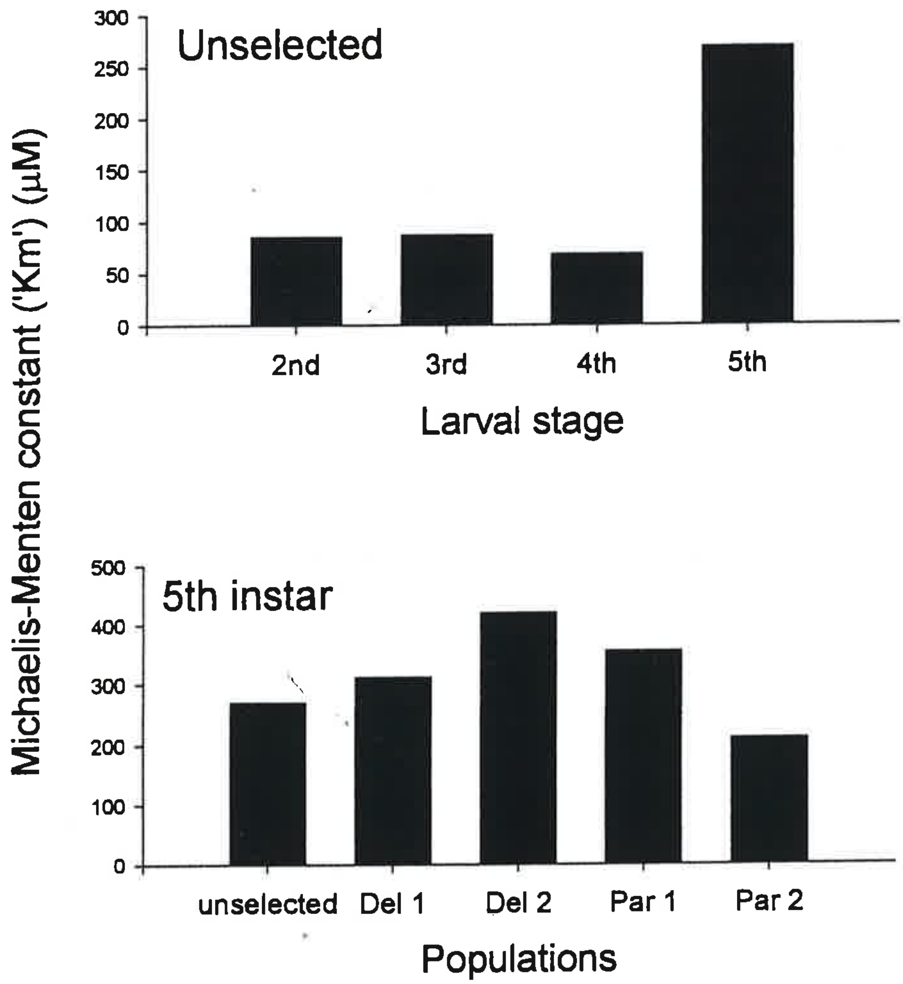

Fig. 1. Michaelis-Menten contants (Km) of acetylcholinesterase among different populations of S. exigua, where 'Del 1', Del 2', 'Par 1', and 'Par 2' represent deltamenthrin or parathion-selected generations 1 and 2.

제 2 절 발육단계에 따른 약제 감수성변이 및 해독효소 활성변이

파밤나방의 약제 저항성 검색장치개발의 핵심은 파밤나방의 약제 저항성관련 해독효소 및 관련효소의 활력변화와 약제감수성의 상관관계이다. 이를 얻기위해 제 1절에서 AChE의 활성변화와 집단간 약제 감수성변화와 밀접한 관계를 가짐을 밝혔다. 그러나 집단간 분석에 앞서 동일 집단내에서 영기별 해독효소 및 AChE의 활력변이를 측정해보는 것이 필요하겠다. 왜냐하면 야외에서는 파밤나방이 다양한 유충영기로 존재하가 때문에 이러한 영기별 대상 해독효소의 활력변이에 관한 정보가 필요하다. 또 해독효소로서 중요한 glutathione-S-transferase (GST)의 활력을 조사함으로 약제 관련 해독효소 분석을 추가시켰다.

영기별 파밤나방의 약제 감수성은 bifenthrin과 같은 pyrethroid 살충제는 반수치사량이 체중증가와 같은 비율로 증가하나 chloropyrifos-methyl과 같은 유기인계 살충제는 영기가 진행함에 따라 살충제 감수성이 현저하게 떨어짐을 보았다 (Table 4).

Table 4. Insecticide toxicities of different larval ages of *S. exigua*

Larval age	Body weight (mg)	RR[1]	LD_{50} (μg) (95% confidence interval) Bifenthrin	RR[1]	Chloropyrifos-methyl	RR[1]
3rd	10.68 ± 1.99	1.00	0.07 (0.04-0.10)	1.00	4.21 (2.24-38.16)	1.00
4th	54.39 ± 16.74	5.09	0.40 (0.23-0.67)	5.71	13.22 (7.19-50.66)	2.90
5th	136.80 ± 16.24	12.81	0.89 (0.57-1.36)	12.71	253.63 (no estimate)	60.24

[1] RR represents the relative ratios compared to the mean value of the third instar larvae.

각 살충제 관련 효소들의 활력을 영기별로 비교하여 보면 esterase (Table 5)는 영기가 진행함에 따라 체중증가에 따른 총 효소활력의 증가로 풀이되나 glutathione-S-transferase (Table 6) 는 4령이후 체중증가에 비해 현저하게 효소활력이 증가함을 보였다. 반면에 acetylcholinesterase (Table 7)은 영기가 진행함에 따라 활력이 떨어짐을 나타냈다. 이러한 경향은 마치 약제 감수성에서 서로 다른 집단의 AChE의 활력이 약제 감수성 정도와 반비례함을 기록했던 1차년도 결과와 같은 경향을 보였다.

Table 5. Esterase (EST) activities of different larval ages of *S. exigua*

Larval age	Total proteins (μg)	Specific EST activity (μM/min/μg)	Total EST activity (mM/min)	RR[1]
3rd	447.74 ± 68.47	126.07 ± 80.06	56.45	1.00
4th	3245.48 ± 775.39	52.83 ± 37.23	171.46	3.04
5th	5645.76 ± 860.82	75.19 ± 49.25	424.50	7.52

[1] RR represents the relative ratios compared to the mean value of the total esterase activity of the third instar larvae.

Table 6. Glutathione S-transferase (GST) activities of different larval ages of *S. exigua*

Larval age	Total proteins (μg)	Specific GST activity (μM/min/μg)	Total GST activity (mM/min)	RR[1]
3rd	298.98 ± 68.47	130.80 ± 46.58	39.11	1.00
4th	1203.79 ± 775.39	200.42 ± 49.85	241.26	11.11
5th	3001.87 ± 860.82	192.40 ± 54.34	577.56	18.55

[1] RR represents the relative ratios compared to the mean value of the total GST activity of the third instar larvae.

Table 7. Acetylcholinesterase (AChE) activities of different larval ages of *S. exigua*

Larval age	Total proteins (μg)	Specific AChE activity (nM/min/μg)	Total AChE activity (nM/min)	RR[1]
3rd	447.74 ± 68.47	3.16 ± 0.77	1414.86	1.00
4th	3245.48 ± 775.39	1.39 ± 0.51	4511.27	3.19
5th	5645.76 ± 860.82	0.60 ± 0.23	3443.91	2.43

[1] RR represents the relative ratios compared to the mean value of the total AChE activity of the third instar larvae.

이 영기별 AChE의 활력변이를 양적 및 질적 비교해 보기 위해 같은 나이의 파밤나방에서 신체 부위별 AChE의 활력을 측정하여 보았다 (Table 8). **대부분의 AChE의 활력이 머리부분에 존재함으로 나타났다. 즉 영기가진행함에 따라**

머리에 비해 다른 부분 특히 복부의 증가 비율이 커짐을 볼 때 또 이 효소의 활력이 신체 구분없이 한 마리 개체로부터 추출된 일정부분의 시료라면 3, 4, 5령으로 진행하면서 시료내에 머리쪽의 시료부분이 상대적으로 줄어 들 수 있다. 이러한 양적 설명으로 AChE의 활력 변이를 일부분 설명할 수 있으나 본질적으로 AChE의 활력변이는 이 효소의 active site의 구조가 영기진행함에 따라 변화되고 있음을 Km과 Vm의 변이로서 알 수 있다 (Table 9).

Table 8. Acetylcholinesterase (AChE) activity of different body tagmata of *S. exigua*

Body part	AChE activity (nM/min/㎍)
Head	59.89 ± 12.19 a1
Thorax	8.33 ± 0.97 b
Abdomen	0.31 ± 0.09 c

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

Table 9. Michaelis-Menten constants of the acetylcholinesterase in *S. exigua*

Larval age	Km (㎍)	Vm (nM/min/㎍)
3rd	100.05 ± 22.80 a1	1.24 ± 0.56 a1
4th	115.41 ± 20.29 a	1.15 ± 0.42 a
5th	187.39 ± 125.23 b	0.58 ± 0.21 b

1 Different letters followed by the means in each column are significantly different at α=0.05 (LSD test).

이상의 효소활력분석결과는 acetylcholinesterase의 활성 변화와 살충제 감수성 변화는 매우 밀접한 관련이 있음을 나타내어 이 효소를 이용한 검색장치의 개발에 더한층 관심을 집중하게 한다. 그러나 이상의 결과가 나타내듯 동일 집단에서도 영기에 따른 이 효소의 활력 변이가 있으므로 결과에 대한 파밤나방의 영기 보정이 필요하겠다. 이러한 보정이 살충제에 어느정도 필요한지를 결정하

기 위해 in vitro조건하에서 직접 살충제에 대해 영기별 억제차이를 분석하였다. 영기에 따른 AChE의 *in-vitro* 저해활성을 세가지 약제 (eserine, dichlovos, monocrotophos)에 대하여 조사하였을 때 (Table 10), AChE 활성의 50% 저해농도 (I_{50})는 monocrotophos의 저해농도가 가장 높았으며, 저해속도 상수 (Ki)는 monocrotophos에서 가장 낮았다. 즉 영기가 진행함에 따라 I_{50}의 상승과 Ki의 감소는 나타나지 않았다. 현재로서는 이러한 대립되는 결과를 증명하기는 곤란하고 파밤나방의 살충제 검색장치에 사용되는 유충영기를 일정하게 둘 필요가 있음을 의미하겠다.

Table 10. Inhibition kinetics of acetylcholinesterase in different larval stages of *S. exigua*

Larval stage	Ki ($mM^{-1}\cdot min^{-1}$)[1]			I_{50} (mM)[2]		
	eserine	dichlovos	monocrotophos	eserine	dichlovos	monocrotophos
3rd	213±165	61±37	0.15±0.07	0.43±0.17	0.99±0.25	470±220
4th	389±117	194±12	0.43±0.42	0.20±0.90	0.36±0.03	270±180
5th	298±205	190±7	0.31±0.20	0.30±0.16	0.36±0.01	300±160

1 Bimolecular rate constant.

2 Median inhibition concentration.

제 4 장 판별해독효소의 *in vitro* 억제 효과

제 1 절 에스테라제의 억제효과

살충제의 해독효소의 일종으로서 파밤나방에 있어 살충제 저항성에 관련이 높은 것으로 알려진 EST**의 살충제에 대한 억제 효과를** Van Asperen (1964)**방법으로 분석됬다. 이 방법의 장점은 무엇보다도** spectrophotometer**의 도움없이도 육안으로 쉽게 효소의 활력 유무를 관찰할 수 있는데 있다. 먼저 이 방법으로 효소의 활력측정은 다음의 순서** (Table 11)**를 따랐다.**

Table 11. Method for *in vitro* esterase (EST) inhibition of the fifth instar larvae in *S. exigua* using 96 well microplate reader

Order	What to do	
1 step	Incubate enzyme extract (45μl) and inhibitor (5μl) for 10 min @ 25℃	
2 step	Add 100μl substrate & incubate 10 min @ 25℃	
	**** substrate ****	
	0.5ml	60mM α-naphthyl acetate in 100% ethanol
	7ml	distilled H_2O
	2.5ml	0.1M phosphate buffer (pH 6.5)
	1.3μl	16mM acetylcholoinesterase inhibitor
3 step	Add 100μl dye & incubate 10 min @ 25℃	
	**** dye ****	
	8.75ml	20% sodium dodecyl sulfate
	41.25ml	distilled H_2O
	40mg	Fast Garnet salt
4 step	Measure the absorbance @ 600nm	

이 방법을 사용할 때 무엇보다도 너무 강력한 색깔반응으로 효과적인 시료 희석 배수가 결정되어야 했다 (Table 12). 160배 이후에서 일련의 희석효과가 나왔다. 640배이후는 낮은 흡수도를 보여 160배와 640배 사이의 희석 농도면 살충제에 대한 이 효소의 억제효과를 분석하는데 적합하겠다. 농도면 160배 이상의 농도에서는 과도한 양의 효소활력으로 600nm 흡수도측정의 한계를 넘어선 것으로 여겨진다.

Table 12. Determination of the dilution scale of the in vitro esterase inhibition test in the fifth instar larval1 *S. exigua*

Dilution	10X	20X	40X	80X	160X	320X	640X	1280X	2560X	5120X
					Absorbance					
	0.393	0.387	0.434	0.504	0.724	0.684	0.459	0.288	0.146	0.078

1 The fifth instar larvae gound in 1.0ml of 0.1M phosphate buffer (pH 6.5)

Dichlorvos와 eserine의 두 약제에 대한 1ml phosphate buffer (pH 6.5)에서 각 5령충을 분쇄후 동일한 완충용액로 500배 희석후 esterase의 억제효과를 예비실험하였다. eserine은 10^{-7}, $5x10^{-7}$, 10^{-6}, $5x10^{-6}$, 10^{-4} M에서 전혀 억제효과가 없었다. 그러므로 이 이상의 농도에서 eserine이 억제된다는 것을 보여 주었다. 그러나 dichlorvos는 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} M에서 일련의 억제 효과를 보였다. 후자 약제의 농도를 이용하여 네 개의 서로 다른 약제 감수성을 보였던 집단을 대상으로 esterase의 억제 효과를 검정하였다 (Table 13).

주어진 농도의 eserine에 대하여 무반응을 보였던 파밤나방 5령충의 esterase는 dichlorvos 0-10 μl의 농도에서 급격한 억제효과를 보였다. 무처리된 시료는 짙은 붉은색의 반응을 보인 반면 esterase가 억제된 시료는 옅게 나타나 육안으로도 쉽게 판정이 가능했다. 이러한 dichlorvos에 대한 esterase의 억제효과는 서로 다른 집단에서 달랐다. 실내충인 ANU와 BIF보다는 야외충인 Hari와 Poongsan이 같은 농도에서 덜 억제되었다. 그러나 무처리의 esterase활력이 전체적으로 낮아 sample 희석 배수를 500에서 200배 정도로 낮추는 것이 바람직하겠다.

Table 13. *In vitro* esterase inhibition by different concentrations of dichlorvos in the fifth instar larval *S. exigua*

Strains	Inhibitor (nM)	Percent activity remaining (10 min incubation)				
		Replications				Mean
		I	II	III	IV	
ANU	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	1	9.41	16.22	20.14	31.30	19.27 ± 9.17
	10	0.00	2.70	1.39	13.04	4.28 ± 5.94
	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
BIF	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	1	8.82	14.29	11.76	32.84	16.93 ± 10.84
	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
	1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00
Hari	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	1	21.31	50.93	10.12	27.34	27.43 ± 17.22
	10	6.23	25.00	7.23	14.19	13.16 ± 8.65
	100	0.66	4.63	1.45	9.00	3.94 ± 3.79
	1000	0.00	0.00	0.00	1.38	0.35 ± 0.69
Poongsan	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	1	27.84	23.08	35.15	26.12	28.05 ± 5.13
	10	2.06	8.65	18.32	13.81	10.71 ± 6.99
	100	1.03	0.00	4.95	5.97	2.99 ± 2.92
	1000	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 ± 0.00

제 2 절 아세틸콜린에스테라제의 억제효과

집단간 살충제에 의한 억제효과는 유기인계 및 카바메이트계농약의 작용점이 되는 acetylcholinesterase에서 여러 살충제를 이용하여 시도되었다 (Tables 14, 15, 16 & 17). 네 가지 농약 모두에서 실내충 집단들 (ANU, Bif IV, Suwon, Binghaek)은 야외충 집단 (Hari, Poongsan)에 비해 낮은 농도의 억제자 조건하에서 유효한 억제효과를 보였다. 약제들 간에도 변이를 보여 같은 시료 조건에서 이들 약제의 파밤나방 5령충의 acetylcholinesterase에 대한 IC_{50}는 실

내충인 ANU를 기준으로 eserine의 경우 0.1μM, DDVP는 10μM, monocrotophos는 200μM, 및 chlorpyrifos-methyl은 대략 400μM에서 보였다.

Table 14. Inhibition of acetylcholinesterases of the 5th instar larvae of *S. exigua* from different strains by eserine.

Strains	Inhibitor (μM)	Percent activity remaining (10 min incubation)						
		Replications						Mean
		I	II	III	IV	V	VI	
ANU	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	0.0625	60.49	.	0.00	76.47	87.72		56.17 ± 39.08
	0.125	54.32	.	0.00	35.29	84.21		43.43 ± 35.29
	0.25	34.57	.	0.00	29.41	56.14		30.03 ± 23.13
	0.5	17.28	.	0.00	0.00	35.09		13.09 ± 16.78
BIF IV	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	0.0625	67.71	.	63.38	53.33	50.00		58.61 ± 8.32
	0.125	79.17	.	29.58	23.33	0.00		33.02 ± 33.30
	0.25	19.79	.	26.76	0.00	25.00		17.89 ± 12.29
	0.5	13.54	.	18.31	0.67	8.33		10.21 ± 7.56
Suwon	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	0.0625	54.54	41.67	100.00	80.77	50.00		65.40 ± 24.25
	0.125	42.86	25.00	100.00	59.62	0.00		45.50 ± 37.64
	0.25	27.27	8.33	100.00	38.46	0.00		34.81 ± 39.47
	0.5	15.58	0.00	100.00	17.31	0.00		26.58 ± 41.86
Binghaek	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	0.0625	.	57.58	.	66.15	55.81		59.85 ± 5.53
	0.125	.	51.52	.	33.85	48.84		44.74 ± 9.52
	0.25	.	30.30	.	10.77	25.58		22.22 ± 10.19
	0.5	.	18.18	.	0.00	11.63		14.90 ± 4.63
Hari	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	0.0625	64.52	66.67	92.31	100.00	76.92		80.08 ± 15.64
	0.125	58.06	0.00	92.31	59.46	100.00		61.97 ± 39.46
	0.25	25.81	16.67	88.46	48.65	69.23		49.76 ± 29.78
	0.5	0.00	0.00	42.31	32.43	42.31		23.41 ± 21.75
Poongsan	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	0.0625	66.67	100.00	69.32	100.00	93.75	98.78	88.09 ± 15.76
	0.125	.	100.00	70.45	0.00	89.58	62.19	64.44 ± 39.02
	0.25	7.41	100.00	62.50	0.00	68.75	39.02	46.28 ± 38.36
	0.5	0.00	0.00	44.32	0.00	60.42	25.61	21.73 ± 26.23

Table 15. Inhibition of acetylcholinesterases of the 5th instar larvae of *S. exigua* from different strains by dichlorvos

Strains	Inhibitor (μM)	Percent activity remaining (10 min incubation)					
		Replications					Mean
		I	II	III	IV	V	
ANU	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	66.67	39.62	.	75.00	.	60.43 ± 18.56
	12.5	58.33	52.83	.	72.50	.	61.22 ± 10.15
	25	37.50	32.08	.	45.00	.	38.19 ± 6.49
	50	20.83	9.43	.	12.50	.	14.25 ± 5.90
BIF IV	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	.	77.30	84.20	.	48.30	69.93 ± 19.05
	12.5	51.70	45.50	37.50	.	.	43.90 ± 7.12
	25	20.70	.	.	.	13.80	17.25 ± 4.88
	50	.	18.20	5.30	.	.	11.75 ± 9.12
Suwon	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	56.52	.	.	52.05	68.75	59.11 ± 8.65
	12.5	41.30	.	.	36.99	43.75	40.68 ± 3.42
	25	36.96	.	.	24.66	37.50	33.04 ± 7.26
	50	.	.	.	6.85	.	6.85 ± 0.00
Binghaek	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	.	52.50	40.00	72.50	60.61	55.00 ± 16.39
	12.5	.	52.50	33.33	62.50	51.52	49.96 ± 12.15
	25	.	37.50	33.33	30.00	45.45	36.57 ± 6.68
	50	.	27.50	73.33	10.00	24.24	33.77 ± 27.45
Hari	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	87.50	.	.	.	76.92	82.21 ± 7.48
	12.5	46.88	.	70.37	.	84.62	67.29 ± 19.06
	25	34.38	.	29.63	.	46.15	36.72 ± 8.50
	50	9.30	.	.	.	3.85	6.62 ± 3.91
Poongsan	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	6.25	48.65	100.00	.	67.39	87.67	75.93 ± 22.62
	12.5	45.95	.	19.61	81.61	53.42	50.15 ± 25.50
	25	35.14	100.00	9.80	60.87	49.32	51.03 ± 33.35
	50	8.11	100.00	0.00	32.61	19.18	31.98 ± 39.95

Table 16. Inhibition of acetylcholinesterases of the 5th instar larvae of *S. exigua* from different strains by monocrotophos

Strains	Inhibitor (μM)	Percent activity remaining (10 min incubation)						
		Replications						Mean
		I	II	III	IV	V	VI	
ANU	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	31.25	92.11	100.00	60.00	.	92.78	77.14	84.41 ± 15.98
	62.5	100.00	66.67	60.00	.	87.63	85.71	80.00 ± 16.34
	125	86.84	.	0.00	.	83.51	85.71	64.02 ± 42.70
	250	65.79	.	0.00	.	67.01	74.29	51.77 ± 34.72
BIF IV	0	100.00	100.00	100.00				100.00 ± 0.00
	31.25	100.00	88.00	69.44				85.81 ± 15.40
	62.5	100.00	80.00	80.56				86.85 ± 11.39
	125	100.00	70.00	76.39				82.13 ± 15.80
	250	100.00	46.00	65.28				70.43 ± 27.37
Binghaek	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00		100.00 ± 0.00
	31.25	100.00	89.58	100.00	95.16	85.42		94.03 ± 6.46
	62.5	100.00	78.13	100.00	85.48	79.17		88.56 ± 10.82
	125	100.00	73.96	100.00	64.52	70.83		81.86 ± 16.90
	250	100.00	50.00	79.17	40.32	59.38		65.77 ± 23.92
Hari	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	31.25	72.73	100.00	83.33	97.92	71.97	100.00	87.49 ± 13.64
	62.5	82.96	100.00	82.29	94.79	75.16	86.04	87.37 ± 9.07
	125	72.73	84.09	72.88	79.17	66.24	69.86	74.00 ± 6.51
	250	59.09	57.95	57.29	58.33	59.87	52.05	57.43 ± 2.78
Poongsan	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	31.25	100.00	.	100.00	81.25	.	89.06	92.58 ± 9.14
	62.5	100.00	.	100.00	43.75	87.80	75.00	81.31 ± 23.41
	125	100.00	.	100.00	25.00	46.34	68.75	68.02 ± 33.04
	250	0.00	50.00	100.00	31.25	14.63	43.75	39.94 ± 34.74

Table 17. Inhibition of acetylcholinesterases of the 5th instar larvae of *S. exigua* from different strains by chlorpyrifos-methyl

Strains	Inhibitor (nM)	Percent activity remaining (10 min incubation)						
		Replications						Mean
		I	II	III	IV	V	VI	
ANU	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 ± 0.00
	156.25	.	.	100.00	.	100.00	.	100.00 ± 0.00
	312.5	.	.	42.86	.	94.74	.	68.8 ± 36.69
	625	.	.	0.00	.	47.37	.	23.54 ± 33.28
	1250	.	.	0.00	.	0.00	.	0.00 ± 0.00
BIF IV	0	100.00	100.00	100.00				100.00 ± 0.00
	156.25	50.00	27.27	73.33				41.87 ± 6.47
	312.5	40.00	18.18	74.55				44.24 ± 6.65
	625	10.00	0.00	0.00				3.33 ± 1.83
	1250	0.00	0.00	0.00				0.00 ± 0.00
Suwon	0	100.00	100.00					100.00 ± 0.00
	156.25	56.00	30.61					43.31 ± 17.95
	312.5	100.00	75.51					87.76 ± 17.32
	625	24.00	34.69					29.35 ± 7.56
	1250	0.00	0.00					0.00 ± 0.00

제 5 장 저항성 검색장치 개발 및 판별력 검정

제 1 절 간편한 진단장치모형구축과 검정

파밤나방의 살충제 저항성에 대한 판별해독효소로서 증명된 EST와 AChE에 대한 검색발색단, 진단시료량 및 검색모형이 개발되었다. 우선 시료곤충이 정확하고 효율적으로 이용되기 위해서 유충의 영기는 포장에서 가장 잘 눈에 띄는 5령충으로 정하였고 EST는 혈액시료, AChE는 머리시료를 이용함으로 한 개의 곤충이 두 가지 진단장치에 사용이 가능하도록 하였다.

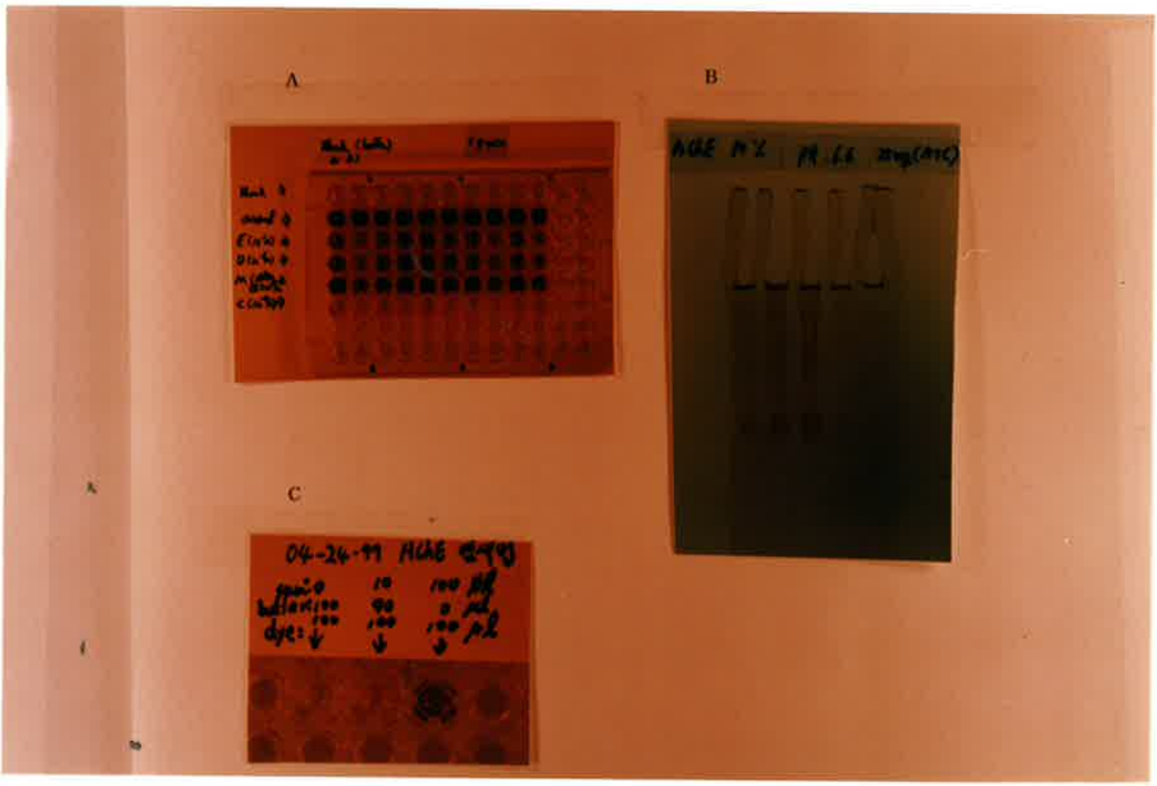

Fig. 2. Staining méthods for the diagnostic devices for insecticide-resistant *S. exigua.* (A) Esterase staining (B) Acetylcholinesterase staining on 10% PAGE (C) Color gradient according to different sample amounts in acetylcholinesterase

발색용액으로 EST는 Van Asperen방법이 탁월함이 제 4 장에서 보여졌다. 이 염색방법을 이용하여 살충제 처리에 따라 개체별로 EST를 발색시킨 결과 색깔에 차이를 두어 검색발색단으로 사용이 가능함을 나타냈다 (Fig. 2A).

AChE의 경우 Karnovsky & Root 방법이 적용되었고 이를 시험하기 위해 우선 10% PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)상에서 시각화되었다 (Fig. 2B). 이는 다시 microplate상에서 농도별 색깔 차이를 보여 주었다 (Fig. 2C).

검색장치모형을 개발하기 위해 일반적으로 타 진단장치에서 널리 이용되고 있는 세 가지 시험모형이 설계 제작되었다. 각각의 특징은 다음과 같다.

진 단 장 치	특 징
Disk 장치	원판 또는 띠 형태의 여과지에 파밤나방의 효소 추출물을 흡습시키고 반응시약에서 반응을 시킨다
Blotting 장치	Disk 장치의 변형된 형태로서 한꺼번에 여러개를 수행하기 위함
Microplate 장치	일반적인 indirect ELISA법을 모방하여 응용시킨 장치 1) 일정 효소추출액을 각 well에 분주 후 10분간 효소가 well의 plastic벽에 붙도록 방치한다. 2) 이후 각 well의 시료를 버리고 소정 농도의 살충제 용액을 각 well에 분주 후 10분간 효소와 억제제간 반응을 행하게 한다. 3) 다시 각 well을 완충용액으로 2번 씻은 후 염색용액을 붓는다. 4) 발현되는 색깔로 저항성 유무를 판단한다.

이들 세 가지의 진단장치의 효율성을 비교하기 위해 일정 효소량을 각 진단장치에서 발색시켰으며 개체간 색깔반응 정도 차이를 비교하였다 (Fig. 3 & Table 18). Blotting장치와 Microplate장치 모두 반응의 정도가 일정하지 못하

였다. 특히 Microplate장치는 같은 감수성개체에서도 반복에 따라 색깔의 차이를 주어 재현성에 문제점을 드러냈다. 반면에 Disk장치는 발색정도가 가장 뚜렷했으며 재현성에서 탁월하여 차후의 검색장치 모형으로 선발되었다.

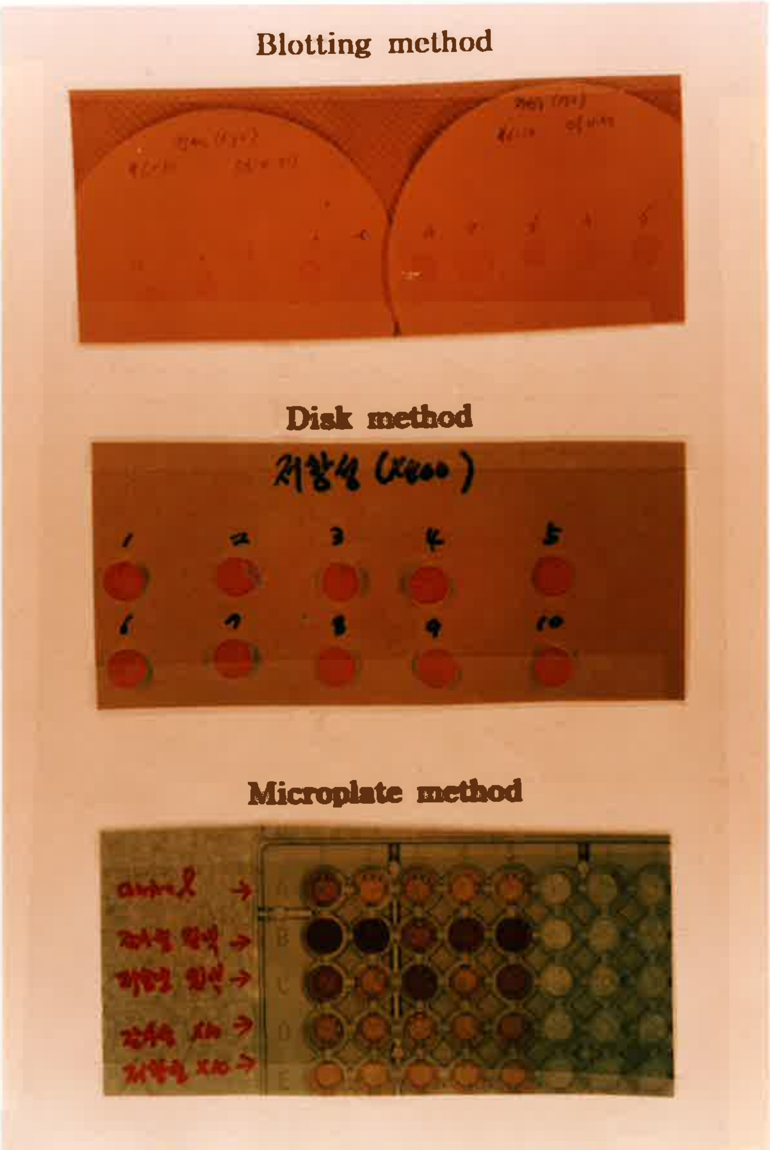

Fig. 3. Comparison of three different diagnostic devices for esterase activity

Table 18. Comparison of the coloring pattern of three different diagnostic devices

Insecticide treatment	Reaction (# positive/ # total)		
	Disk	Blotting	Microplate
control	18/20	18/20	0/20
dichlovos (1mM)	13/20	13/20	0/20
chlorpyrifos-methyl (10mM)	10/20	10/20	0/20

그러나 Disk의 재료인 일반 여과지는 흡수력이 낮아 단백질이나 DNA blotting에 이용되는 Blotting 여과지가 두꺼워서 이를 이용하여 훨씬 뚜렷한 발색효과를 얻어 냈다. Fig. 4는 이러한 Disk장치를 한번에 5개의 샘플을 처리 할 수 있도록 slide glass에 5개의 disk를 붙인 후 살충제에 처리한 후 말리는 장면을 보여 준다.

Fig. 4. Diagnostic device for the insecticide-resistant *S. exigua*. This figure shows the drying step for preparing the slide-disk devices after dipping them into their specific concentrations of insecticides.

EST활성에 따른 저항성 파밤나방 검색을 위해 시료 혈액의 희석량과 시료량을 결정하였다. 30μℓ 혈액이 응고방지를 위해 우선 10μℓ의 10mM phenylthiourea와 혼합되어 원시료를 구성했다. 이 원시료를 10배씩 희석하여 준비시료를 구성했다. 이 준비시료를 각 disk에 10μℓ씩 분주한 후 색깔반응을 조사하였다. 이 때 얻어진 결과가 Table 19과 같다. 그러므로 Disc 장치에 필요한 혈액시료는 최소 6μℓ의 원액시료 (이중 혈액은 5μℓ)이상 있어야 한다.

Table 19. Determination of sample hemolymph amount for esterase diagnostic device

	Dilution scale					
	1	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
Reactivity (# positive/# total)	10/10	9/10	4/10	0/10	0/10	0/10

AChE 활성에 따른 저항성 파밤나방 검색을 위해 시료 머리의 추출완충용액량과 시료량을 결정하였다. 우선 파밤나방 5령충 머리를 각각 20, 30 및 50μℓ 인산완충용액 (pH 6.5)으로 효소를 추출한다. 상등액 10μℓ를 disk에 묻힌 후 각 염색시간에 따라 색깔반응을 조사하였다 (Table 20). AChE의 발색정도는 반응 염색액내에 시간에 따라 무관하였으며 50μℓ의 완충용액에서도 이하의 완충용액량 만큼의 발색정도를 보였다. 그러나 이미 발색된 disk가 시간이 지남에 따라 감수성과 저항성집단간에 더욱 뚜렸한 차이를 보였다 (Table 21). 이후의 AChE의 진단장치에서는 50μℓ의 시료추출용 완충용액량과 25분간 염색 및 2시간후에 판별으로 결정하였다.

Table 20. Determination of the buffer amount to extract the AChE from the fifth instar larval *S. exigua* head for the diagnostic device

Incubation time in dye solution (min)	Amount of grinding buffer		
	20μℓ	30μℓ	50μℓ
0	+	+	+
10	+	+	+
30	+	+	+
60	+	+	+
120	+	+	+

Table 21. Determination of reading time for AChE diagnostic device

	Control					DDVP (100mM)				
	0min	10min	30min	1hr	2hr	0min	10min	30min	1hr	2hr
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

다음으로 각 살충제에 따라 저항성과 감수성 파밤나방을 판별할 수 있는 판별 살충제농도를 결정하였다. 전기영동상에서 EST**의** inhibitor**에 대한 농도별 억제효과를 보였다** (Table 21).

Table 21. Esterase bands inhibited at different insecticide concentrations in *S. exigua*

Inhibitors	Treated concentrations (M)	IC50
dichlorvos	10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}	10^{-6} - 10^{-5} M
Eserine	10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-3} M
monocrotophos	10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3}	10^{-4} - 10^{-3} M
chlorpyrifos-methyl	10^{-5}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-2}	10^{-3} M

Disk**진단장치** (Fig. 5)**에서는 살충제 농도증가에 따라 효소억제 효과로 붉은 색이 엷어졌으며 이는 수치화했을 때** EST **경우** dichlovos**는** 1mM, monocrotophos**는** 10mM**이었고** AChE**에서는** dichlovos**는** 100mM, monocrotophos**는** 100mM**의 판별 농도를 나타냈다**.

이상으로 얻어진 파밤나방의 진단장치의 방법은 다음과 같다.

EST **검색장치**

① **혈액시료 준비** : **혈액** (30μℓ) + 10mM phenylthiourea (10μℓ)
② **검색장치** : disk filter paper (1×1cm)
③ dichlorvos **판별농도** : 1mM, monocrotophos **판별농도** : 10mM
④ **염색방법** : Van Asperen **방법**
⑤ **진단 시각** : **염색처리후** 2**시간 후**

AChE 검색장치

① 머리시료준비 : 5령충 머리 1개 + 50μl 0.1M phosphate buffer(pH 6.5)
② 검색장치 : disk filter paper (1×1cm)
③ 판별농도 : 100mM, monocrotophos 판별농도 : 100mM
④ 염색방법 : Karnovsky & Root 방법
⑤ 진단 시각 : 염색처리후 2시간 후

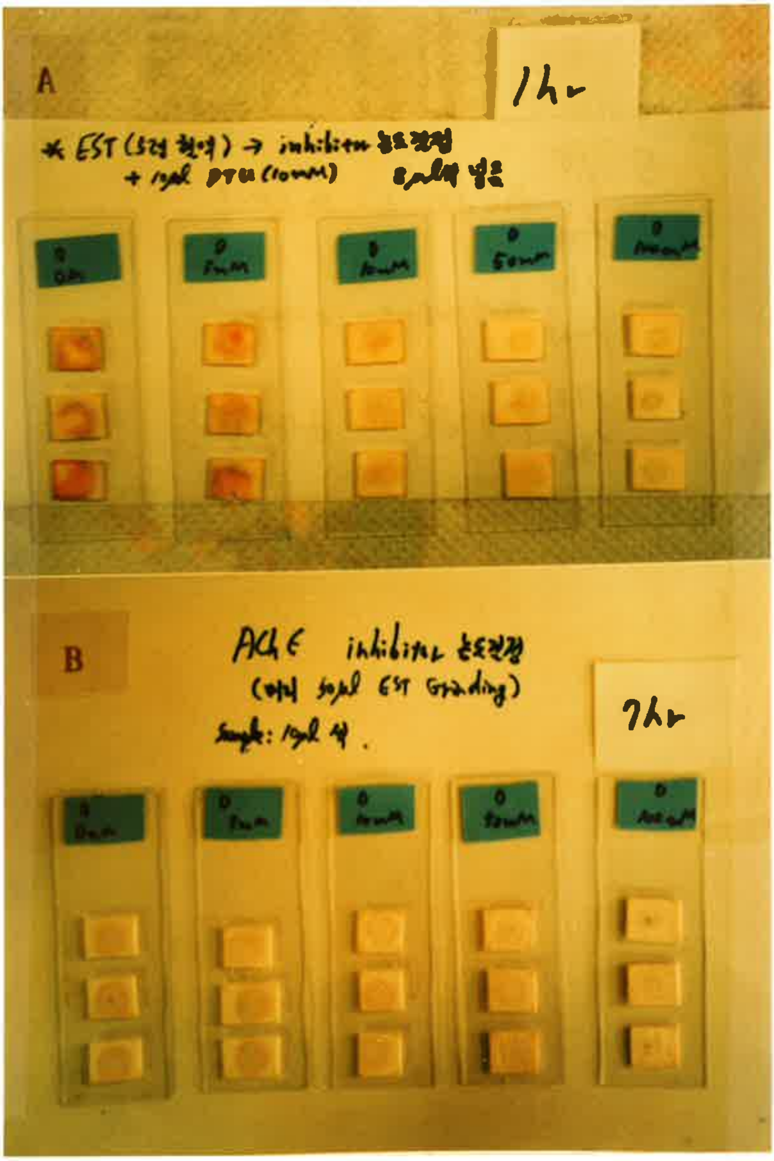

Fig. 5. Examples for determining diagnostic insecticide concentrations in esterase (A) and acetylcholinesterase (B) diagnostic kits

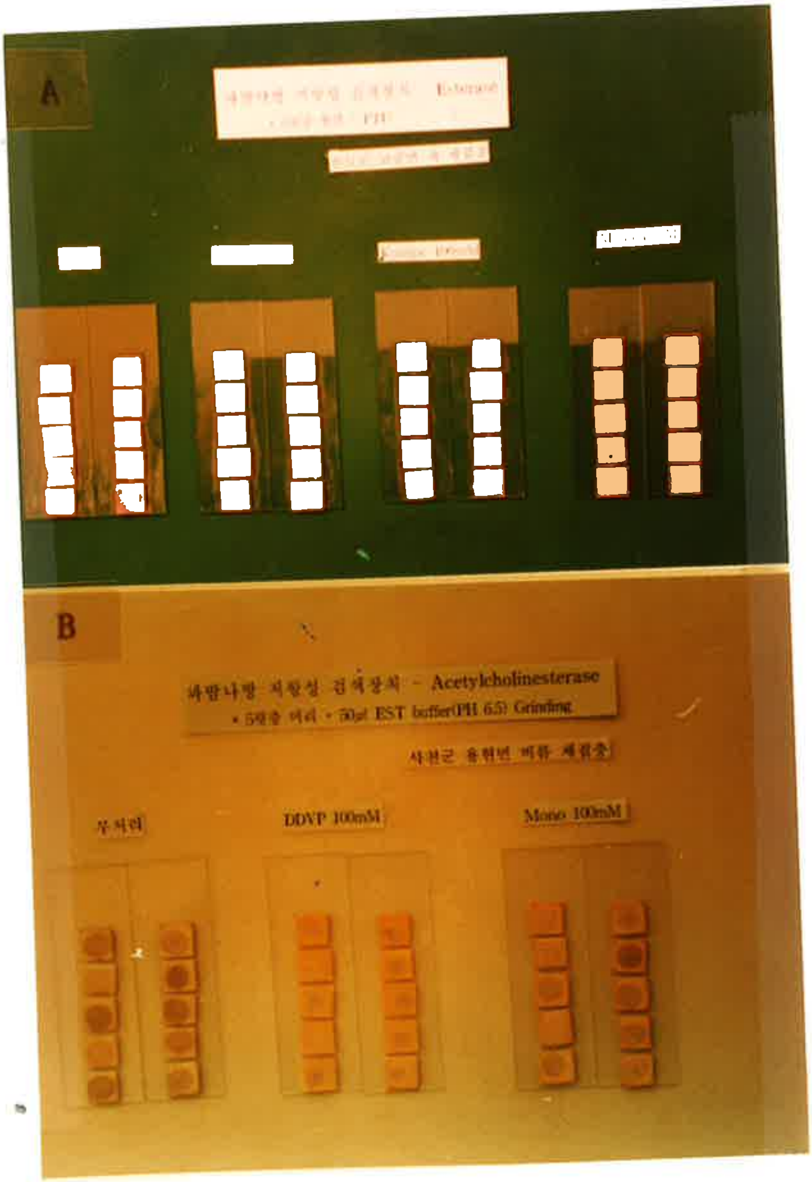

Fig. 6. Examples for determining the insecticide-resistant individuals by the use of the esterase (A) and the actylcholinesterase diagnostic kits in *S. exigua*

제 2 절 야외충에 대한 검색장치 판별력 검증

개발된 네 가지 파밤나방 살충제 저항성 진단장치 모형들 (EST-dichlorvos (ED), EST-monocrotophos (EM), AChE-dichlorvos (AD), and AChE-monocrotophos (AM))**의 실증 효과를 얻기 위해 다양한 지역의 야외 채집충을 대상으로 검색장치결과와 실내 사육후 생물 검정결과를 대조하여 이 두 관계의 상관계수를 분석하였다**.

Table 22. Insecticide toxicities to the third instar larvae of the field *S. exigua* by topical application

Populations	n	LD50 (95% C.I.) μg		
		bifenthrin	methomyl	chlorpyrifos-methyl
Andong (laboratory)	300	0.21 (0.15 - 0.26)	1.62 (1.12 - 2.44)	-
Andong (Field)	298	0.20 (0.12 - 0.33)	1.74 (1.26 - 2.31)	-
Kyungsan	442	0.31 (0.19 - 0.51)	1.40 (0.66 - 2.24)	12.84 (7.13 - 21.23)
Koonwi	450	0.52 (0.38 - 0.81)	2.51 (1.76 - 4.24)	40.39 (21.45 - 72.16)
Jindo (Kokoon)	450	0.06 (0.00 - 0.14)	1.06 (0.51 - 2.15)	6.72 (2.22 - 10.73)
Jindo (Koonnae)	290	0.32 (0.12 - 0.96)	0.63 (0.30 - 1.45)	-
Bosung (Hoichun-1)1	440	0.23 (0.16 - 0.31)	3.39 (2.37 - 6.16)	8.52 (4.99 - 11.83)
Bosung (Hoichun-2)	433	0.21 (0.12 - 0.32)	1.03 (0.58 - 1.62)	9.33 (6.37 - 12.12)
Bosung (Hwasung)	265	-	0.37 (0.19 - 0.71)	3.36 (1.63 - 6.61)
Haenam (Songji)	450	0.12 (0.06 - 0.18)	0.81 (0.41 - 1.26)	8.53 (5.62 - 11.12)
Haenam (Hwachung)	280	-	1.24 (0.69 - 2.62)	6.59 (3.37 - 11.76)

1 Hoichun-1 population collected from weeds.
Hoichun-2 population collected from welsh onion.

11개의 서로 다른 실내 및 야외 파밤나방집단들은 동일 살충제에 대해서 감수성변이를 보였다 (Table 22). Bifenthrin의 경우 8.7배, methomyl의 경우 9.2배, chlorpyrifos-methyl의 경우 12.0배의 집단간 최대 살충제 감수성변이를 나타냈다. 군위집단의 경우 조사된 세 가지 살충제 모두에 대해 거의 최대 반수치사약량을 나타내서 야외 집단이 기존 살충제에 대해 복합적으로 저항성을 가짐을 나타냈다.

본 연구에서 개발된 네 가지 파밤나방 살충제저항성 진단장치로 상기의 집단들을 검색했다 (Table 23). 이 검색 결과를 살충제 생물검정 결과의 반수치사약량과의 상관관계를 조사하였다 (Table 24). Bifenthrin에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 ED 검색장치가 효과적이었다. Methomyl에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 ED 검색장치와 AD 검색장치가 효과적이었다. Chlorpyrifos-methyl에 대한 약제 감수성변이를 판별할 경우 ED 검색장치 와 EM 검색장치가 효과적이었다.

이상의 본 연구에서 개발된 검색장치는 간편하고 신속하게 특정 집단의 약제 저항성개체의 빈도수를 알려줌으로 효과적인 방제방법을 선정하는 데 이용될 수 있다. 특히, 각 지역의 지도소에서 이 검색장치를 이용할 경우 객관적이고 합리적인 처방을 현장 농민에게 지도할 수 있겠다.

Table 23. Frequencies of insecticide-resistant larvae of the field *S. exigua* by four different diagnostic kits1

Populations	n	Frequencies of insecticide-resistant larvae (%)			
		ED	EM	AD	AM
Andong (laboratory)	80	20	37	70	43
Andong (Field)	60	-	40	50	70
Kyungsan	80	50	87	80	82
Koonwi	80	60	67	97	97
Jindo (Kokoon)	60	-	60	0	78
Jindo (Koonnae)	60	-	40	10	70
Bosung (Hoichun-1)	80	14	75	70	50
Bosung (Hwasung)	80	10	20	10	16
Haenam (Songji)	80	20	60	83	50
Haenam (Hwachun)	80	17	50	60	40

1 ED: esterase diagnostic kit using 1mM dichlorvos
EM: esterase diagnostic kit using 10mM monocrotophos
AD : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100mM dichlorvos
AM : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100mM monocrotophos

Table 24. Correlation coefficients between the insecticide susceptibilities and the diagnostic kit values of the field *S. exigua* populations

Diagnostic[1] kits	LD50 of the insecticides		
	methomyl	bifenthrin	chlorpyrifos-methyl
ED	0.8006 (0.0305)[2]	0.8912 (0.0424)	0.8449 (0.0342)
EM	0.5710 (0.0847)	0.5170 (0.1895)	0.7338 (0.0605)
AD	0.6357 (0.0482)	0.4515 (0.2614)	0.6041 (0.1508)
AM	0.6325 (0.0497)	0.5901 (0.1236)	0.7202 (0.0679)

1 ED: esterase diagnostic kit using 1mM dichlorvos

EM: esterase diagnostic kit using 10mM monocrotophos

AD : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100mM dichlorvos

AM : acetylcholinesterase diagnostic kit using 100mM monocrotophos

2 The figure in the parenthesis represents the type I error of the correlation coefficient.

참 고 문 헌

안성복, 이상범, 조왕수. 1990. **전남북 지방의 파잎가해 해충종류 및 피해**. **농시논문집**. 33: 66-73.

안성복, 김인수, 조왕수, 이문홍, 최귀문. 1989. **1988년 해충발생현황 (민원중심)**. **한응곤지**. 28: 246-253.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye finding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brewer, M. J. & J. T. Trumble. 1989. Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1520-1526.

Brewer, M. J., J. T. Trumble, B. Alvarado-Rodriguez & W. E. Chaney. 1990. Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed habitats and relationship to laboratory selection for resistance. *J. Econ. Entomol.* 83: 2136-2146.

Chaufaux, J. & P. Ferron. 1986. Sensibilité différente de deux populations de *Spodoptera exigua* Hüb. (Lépid., Noctuidae) aux baculovirus et aux pyréthrinoïdes de synthése. *Agronomie* 6: 99-104.

Davis, B. J. 1964. Dis. electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.

Ferrari, J. A. & G. P. Georghiou. 1981. Effects of insecticidal selection and treatment on reproductive potential of resistant, susceptible, and heterozygous strains of the southern house mosquito. *J. Econ. Entomol.* 74: 323-327.

Ferrari, J. A., J. G. Morse, G. P. Georghiou & Y. Sun. 1993. Elevated esterase activity and acetylcholinesterase insensitivity in citrus thrips (Thysanoptera: Thripidae) populations from the San Joaquin valley of California. *J. Econ. Entomol.* 86: 1645-1650.

Finney, D. J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge Univ. Press. Cambridge England. pp. 19-47.

Georghiou, G. P. & Saito, T. 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum Press. New York.

Karnovsky, M. J. & L. Roots. A "direct coloring" thiochloine method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem. 12: 219-221.

Kim, Y. & N. Kim. 1997. Cold hardiness of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner). Environ. Entomol. (in press).

김용균, 추 일. 1994. **안동지역의 농업현황과** U.R.**대책**. **안동대학교 농업과학연**

구소논문집. 1: 23-31.

김용균, 장동걸. 1996. 배추좀나방 (*Plutella xylostella* L.)의 deltamethrin 저항성 기작에 관한 에스테라제의 역할. 한응곤지. 35: 74-79.

김용균, 여광동. 1995. 파밤나방 (*Spodoptera exigua* (Hübner))의 섭식행동 연구. 안동대학교 농업과학기술연구소 논문집. 2: 9-15.

高井幹夫. 1987. 高知縣におけるミロイチモジヨトウの生態防除. 農業硏究. 34: 23-30.

고현관. 이상계. 이비파. 최귀문. 김정화. 1991. 인공사료에 의한 파밤나방의 대량사육법. 한응곤지. 29: 180-183.

고현관, 최재승, 엄기백, 최귀문, 김정화. 1993. 파밤나방 성충 및 유충의 발생. 한응곤지. 32: 389-394.

고현관, 박종대, 최용문, 최귀문, 박인선. 1991. 파밤나방의 기주 및 피해조사. 한응곤지. 30: 111-116.

Matsumura, F. 1985. Toxicology of Insecticides. Plenum Press, NY.

Meinke, L. J. & G. W. Ware. 1978. Tolerance of three beet armyworm strains in Arizona to methomyl. *J. Econ. Entomol*. 71: 645-646.

Mikkola, K. 1970. The interpretation of long-range migrations of *Spodoptera exigua* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Anim. Ecol*. 39: 593-598.

Roush, R. T. & J. A. McKenzie. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annu. Rev. Entomol*. 32: 361-380.

Roush, R. T. & B. E. Tabashnik. 1990. Pesticide resistance in arthropods. Chapman & Hall, NY.

Townson, H. 1972. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and Km values of electrophorestically heterogenous forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 66: 255-266.

Van Asperen, K. 1962. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol. 8: 401-416.

Van Laecke, K. & D. Degheele. 1991. Synergism of diflubenzuron and teflubenzuron in larvae of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol*. 84: 785-789.

Yoshida, H. A. & M. P. Parrella. 1987. The beet armyworm in floricultural crops. *Calif. Agric*. 41: 13-15.

Yu, S. J. 1991. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Pestic. Biochem. Physiol*. 39: 84-91.

주　　의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구보고서 입니다.

2. 이 보고서는 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산 특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.