



점박이응애의 살비제 저항성 모니터링 및 단백질체 분석

임경엽 · 신은경 · 구현나 · 김길하 · 윤경재*

충북대학교 농업생명환경대학 식물의학과

Monitoring and Proteomic Analysis of Acaricide-Resistance in the Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

Gyeong Yeop Im, Eungyeong Shin, Hyun-Na Koo, Gil-Hah Kim, and Kyungjae Andrew Yoon*

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

(Received on September 8, 2025. Revised on September 18, 2025. Accepted on September 19, 2025)

Abstract The two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, is a significant agricultural pest that has developed resistance to many pesticides. This study evaluated pesticide resistance levels by comparing the susceptibility of *T. urticae* eggs and adults collected from seven fields with that of a laboratory-susceptible (S) strain. Eggs from all field populations showed high resistance ratios (RRs) to etoxazole, fenpropathrin, pyflubumide, and pyridaben. RRs for each pesticide ranged from 32.5 to 371.4 (abamectin), 1.7 to >2,313 (bifenazate), and 561.5 to >1,818.2 (pyflubumide) in adults, indicating substantial variation among populations. To analyze protein synthesis profiles in *T. urticae*, a proteomic approach combining two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) was used. This study identified forty-five differentially expressed protein spots between the S strain and field populations. As compared to the S strain, several proteins, including aldose reductase, heat shock protein 30D, endoplasmic reticulum chaperone BiP, and natterin-3, were overexpressed in field populations. In conclusion, the findings of this study provide new insights into the molecular mechanisms underlying acaricide resistance in the two-spotted spider mite.

Key words: Acaricide, Proteomics, Resistance, *Tetranychus urticae*

서론

응애과(Tetranychidae family)에는 1,300종 이상이 알려져 있고, 그 중 약 100종은 식물을 가해하는 해충이며 특히 약 10종은 주요 해충으로 간주된다(Migeon and Dorkeld, 2021). 특히 점박이응애(*Tetranychus urticae* Koch)는 전 세계적으로 분포하는 주요 해충 중 하나로 1,100종 이상의 식물을 숙주로 삼는다. 점박이응애의 성충과 약충은 구기를 잎에 찔러 엽록소 등 내용물을 섭취하며 잎 표면에 연한 흰 반점을 만든다. 또한 식물을 거미줄로 덮고 낙엽을 유도하며, 꽃을 감소시키는 등 원예작물 및 농업작물에 큰 경제적 손실을 야기한다(Lee et al., 2004; Lee et al., 2003; Migeon et

al., 2010; Van Leeuwen et al., 2013). 이러한 점박이응애 방제를 위해서는 주로 화학적 방법을 사용하고 있으나(Ilias et al., 2014; Van Nieuwenhuysse et al., 2009), 현재까지 상업적으로 등록되어 있는 거의 모든 살비제에 대한 저항성이 발달되어 있는 것으로 보고되었다(Kim et al., 2019; Lee et al., 2010). 점박이응애는 발육기간이 짧아 연간 발생세대수가 높고, 이동성이 적어 살비제에 의한 도태의 기회가 많고 외부로부터의 감수성 개체 유입이 적으므로 다른 해충들에 비해 저항성 발달이 빠르게 나타난다(Ilias et al., 2017; Khalighi et al., 2016; Riga et al., 2017). 또한 점박이응애는 교차저항성 뿐만 아니라 복합저항성이 출현하여 전 세계적으로 문제가 되고 있다(Hollingworth and Dong, 2008; Khajehali et al., 2011; Sparks and Nauen, 2015; Stumpf et al., 2001; Van Leeuwen and Dermauw, 2016; Van Leeuwen et al., 2013).

*Corresponding author

E-mail: kjyoon@cbnu.ac.kr

Abamectin은 방선균인 *Streptomyces avermitilis*의 발효 물질에서 얻은 성분으로 강력한 살비, 살충 및 살선충 활성을 가지고 있다(Clark et al., 1995). 국내에는 다양한 응애 및 곤충에 대한 방제제로 등록되어 있다(KCPA, 2019). Bifenazate는 미토콘드리아 cytochrome *b* (*cytb*)의 complex III를 억제하여 세포의 에너지 이용을 방해하는 기작을 가지고 있다(Sparks and Nauen, 2015; Van Leeuwen et al., 2010). 알과 성충 모두에 효과적이며 국내에는 굴응애, 사과응애, 점박이응애, 차면지응애, 차응애에 대한 방제제로 등록되어 있다(KCPA, 2019). Etoxazole은 1980년대 중반에 개발된 oxazoline계 화합물로 키틴합성효소 1(*chitin synthase 1*, *CHS1*)에 작용하는 성장억제제 및 탈피억제제로써 알에 대한 효과는 크지만 성충에 대해서는 살비력이 미비하다. 그러나 약제 저항성 발달이 매우 빠른 약제로 알려져 있다(Kobayashi et al., 2001; Lee et al., 2003; Sparks and Nauen, 2015; Tomlin, 2000). Fenpropathrin은 피레스로이드계 화합물로서 신경독성 활성을 가지고 있고(Ryu et al., 1996), voltage-gated sodium channels (*vgsc*)에 작용하는 것으로 알려져 있다(Sparks and Nauen, 2015). Pyflubumide는 미토콘드리아 complex II의 전자전달을 억제하여 살비효과를 나타내며(Sparks and Nauen, 2015), 국내에는 굴응애, 사과응애, 점박이응애에 대한 방제제로 등록되어 있다(KCPA, 2019). Pyridaben은 pyridazine 화합물로 coenzyme site Q₀에서 미토콘드리아 respiratory chain의 complex I에 결합하여 전자전달 저해를 통한 대사 억제 능력을 가진 살비제이다(Hirata et al., 1988; Hollingworth and Ahammadsahib, 1995; Lümnen, 2007; Sparks and Nauen, 2015). 국내에는 응애류 및 가루이류에 대한 방제제로 등록되어 있다(KCPA, 2019).

단백체학(Proteomics)은 2차원 전기영동(2D-PAGE, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)와 MALDI-TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry)를 병행한 분석기술로 분자적 수준에서의 단백질 합성 변화를 비교하는데 유용하게 쓰인다(Kundu et al., 2013; Nicholson et al., 2012). 이 외 유전체학(Genomics)은 어떤 유전자가 존재하는지를 밝히는 학문이고, 전사체학(Transcriptomics)는 서로 다른 세포에서 유전자가 얼마나 활성화되어 있는지를 연구하는 학문이다. 이러한 기술들은 살충제 저항성과 관련된 유전자의 발견을 가속화하는 데 크게 기여했지만 풍부한 단백질의 생화학적 복잡성을 밝히는 데에는 한계가 있다. 지금까지 proteomics 기술을 이용한 해충의 약제 저항성 집단의 전반적인 단백질 합성 패턴을 감수성 집단과 비교한 연구는 많지 않다. 최근에 우리 연구진은 포스핀(phosphine, PH₃) 훈증제에 저항성을 보이는 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)와 감수성 쌀바구미에서 단백질을 추출하여 두 그룹간 단백질 합성 정도를 비교했다(Koo et al., 2021b).

본 연구에서는 7개 야외 지역에서 채집한 점박이응애 알과 성충에 대해 6개의 약제를 처리하여 감수성 여부를 조사하였고, 점박이응애 살비제 저항성 집단과 감수성 집단을 2D-PAGE와 MALDI-TOF/TOF를 실시하여 단백질 합성 패턴을 분석하였다.

재료 및 방법

점박이응애

실험에 사용된 감수성(S) 계통은 농촌진흥청에서 분양 받

Table 1. Detailed information of *T. urticae* collected at seven locations in Korea

Field populations	Date of collection	Region	Host	Locations
CG	2020.12	Chilgok, Gyeongsangbuk-do	Rose	
GJ	2020.12	Gyeongju, Gyeongsangbuk-do	Strawberry	
HS	2020.12	Hongseong, Chungcheongnam-do	Strawberry	
SJ	2020.12	Seongju, Gyeongsangbuk-do	Strawberry	
OC	2020.12	Okcheon, Chungcheongbuk-do	Strawberry	
PT1	2020.03	Pyeongtaek, Gyeonggi-do	Rose	
PT2	2020.12	Pyeongtaek, Gyeonggi-do	Rose	

아 2019년부터 약제 처리 없이 누대 사육한 것을 사용하였다. 7개 지역(칠곡, CG; 경주, GJ; 홍성, HS; 성주, SJ; 옥천, OC; 평택1, PT1; 평택2, PT2)에서 채집한 점박이응애 집단은 실내에서 2주 이상의 기간을 두고 사육한 후 실험에 사용하였다(Table 1). 실내 사육조건은 온도 25~27°C, 광주기 16L:8D, 상대습도 40~60%의 조건으로 강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 유묘를 먹이로 공급하여 사육하였다.

시험약제

실험에 사용된 살비제인 abamectin (1.8% EC), bifentazate (13.5% SC), etoxazole (10% SC), fenpropathrin (5% EC), pyflubumide (10% SC), 그리고 pyridaben (20% WP)은 시중에서 구입하였고, 유효성분 및 제형과 추천농도는 Table 2와 같다. 살비제는 추천농도를 기준으로 증류수에 희석하여 사용하였다. 전기영동용 ultrapure급 수준의 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입했다. Pharmalyte (pH 3.5-10)는 Amersham Biosciences (Cardiff, UK)에서, IPG DryStrips (pH 4-10NL; 24 cm)은 제노마인 (Phohang, South Korea)에서, 그리고 modified porcine trypsin (sequencing grade)은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구매했다.

약제 감수성 평가

성충에 대한 살비효과 검정은 페트리디쉬(지름 60 mm) 내에 물을 충분히 적신 탈지면을 깔고 그 위에 강낭콩 잎(지름 35 mm)을 올려놓은 후 부드러운 붓으로 우화 후 2-3일 점박이응애 암컷 성충을 최소 40마리씩 접종하였다. 처리구의 강낭콩 잎은 적정 농도로 희석된 약액을 소형 분무기를 이용하여 20 cm 거리에서 각 3 ml씩 분무법으로 충분히 젖을 만큼 처리하여 응진시킨 잎을 사용하였다. 약제 처리 후 온도 25~27°C, 광주기 16L:8D, 상대습도 40~60% 조건에 두고 처리 후 대조군의 사망률이 10% 이하인 것을 확인하고 48시간의 살비율을 조사하였다. 각 약제에 대한 LC₅₀ 값은 probit 분석을 이용해 계산하였다(SAS institute, 2010). 실험은 5반복으로 실시하였다.

알에 대한 살란효과 검정은 위와 동일한 페트리디쉬 조건에서 성충 10마리가 24시간동안 산란한 알을 받았으며, 알의 수가 페트리디쉬 당 20개 이상일 경우 성충을 제거하였다. 약제 처리 후 온도 25~27°C, 광주기 16L:8D, 상대습도 40~60% 조건에 두고 처리 후 7일에 대조군의 부화율이 90% 이상인 것을 확인하고 살란율을 조사하였다. 각 약제에 대한 LC₅₀ 값은 probit 분석을 이용해 계산하였다(SAS institute, 2010). 실험은 5반복으로 실시하였다.

단백질 추출 이차원전기영동

약 400마리의 점박이응애 성충은 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% (w/v) dithiothreitol (DTT), 2% (v/v) pharmalyte, 1 mM benzamidine으로 구성된 lysis buffer에 넣고 homogenizer (PowerGen 125; Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 파쇄시켰다. 단백질 추출을 위해서 1시간 동안 vortexing 하였으며, 25°C에서 12,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 Bradford 법으로 수행하였다(Bradford, 1976).

일차 Isoelectric focusing (IEF)를 위하여 IPG strips는 7 M urea, 2 M thiourea, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% dithiothreitol (DTT), 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12-16시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 500 ug씩을 사용하였으며, Amersham Biosciences 사의 Multiphore II system을 이용하여 제조회사의 사용 매뉴얼을 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. IEF 조건은 150 V에서 3,500 V까지의 도달시간을 3시간 되게 하였으며, 3,500 V에서 26시간 지속되도록 하여 최종적으로 96 kWh 가 되도록 설정하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips를 1% DTT를 함유한 equilibration buffer (50 mM Tris-Cl, pH6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 더 incubation 하였다.

Table 2. Information on the tested acaricides

Common name (IRAC, 2021)	Trade name	AI ^{a)} (%)	Formulation ^{b)}	Recommended conc. (ppm)
Abamectin (6)	Allstar	1.8	EC	6.03
Bifentazate (25a)	Acramite	13.5	SC	117.5
Etoxazole (10b)	Zoom	10	SC	25
Fenpropathrin (3a)	Danitol	5	EC	50
Pyflubumide (25b)	Noblesse	10	SC	50
Pyridaben (21a)	Sanmaru	20	WP	200

^{a)}Active Ingredient.

^{b)}EC; emulsifiable concentrate, SC; suspension concentrate, WP; wettable powder.

Equilibration이 완료된 strips를 SDS-PAGE gels (20 × 24 cm, 10-16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences)를 이용하여 20°C에서 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 silver staining으로 시각화되었으며, 염색된 이차원 젤은 SYGENE사의 DYVERSITY로 사진을 찍어 확장자가 TIFF 인 파일의 형태로 컴퓨터에 저장되었다.

이미지 분석

스캐닝된 이미지로부터 단백질 spots의 발현변화 확인을

위한 정량적인 분석은 PDQuest software (version 7.0, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 각 단백질 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평균화(normalization)되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현변화를 보여주는 단백질 spots를 선정하였다.

MALDI-TOF/TOF를 위한 젤 상의 단백질 검출

선택된 spots은 modified porcine trypsin (Promega)를 이용하여 자르고(Shevchenko et al., 1996) 젤에 있는 SDS, salts, 그리고 염색약을 제거하기 위해 50% acetonitrile로 세

Table 3. Susceptibility to acaricides in the field populations of *T. urticae* eggs^{a)}

Acaricide	Population	N	LC ₅₀ (ppm) (95% CL ^{b)})	Slope ± SE	RR ^{c)}
Etoxazole	S	1,780	0.02 (0.02-0.03)	1.95 ± 0.16	1.0
	CG	870	>2,500	-	>125,000
	GJ	1,013	>2,500	-	>125,000
	HS	684	>2,500	-	>125,000
	SJ	589	>2,500	-	>125,000
	OC	530	>2,500	-	>125,000
	PT1	772	>2,500	-	>125,000
	PT2	596	>2,500	-	>125,000
Fenpropathrin	S	1,148	7.31 (6.32-8.49)	0.13 ± 0.14	1.0
	CG	623	>1,000	-	>136.8
	GJ	783	>1,000	-	>136.8
	HS	648	>1,000	-	>136.8
	SJ	823	>1,000	-	>136.8
	OC	535	>1,000	-	>136.8
	PT1	461	>1,000	-	>136.8
	PT2	440	>1,000	-	>136.8
Pyflubumide	S	2,072	0.27 (0.17-0.45)	0.35 ± 0.48	1.0
	CG	876	>1,000	-	>3,703.7
	GJ	797	>1,000	-	>3,703.7
	HS	581	>1,000	-	>3,703.7
	SJ	817	>1,000	-	>3,703.7
	OC	587	>1,000	-	>3,703.7
	PT1	501	>1,000	-	>3,703.7
	PT2	1,275	628.92 (104.78-1,740)	0.43 ± 0.14	2,329.3
Pyridaben	S	462	0.73 (0.31-1.48)	0.91 ± 0.10	1.0
	CG	751	>20,000	-	>27,397.3
	GJ	580	>20,000	-	>27,397.3
	HS	543	>20,000	-	>27,397.3
	SJ	576	>20,000	-	>27,397.3
	OC	571	>20,000	-	>27,397.3
	PT1	1,073	>20,000	-	>27,397.3
	PT2	608	>20,000	-	>27,397.3

^{a)}% Mortality stands for the % mortality at the recommended field concentration.

^{b)}Confidence limits.

^{c)}Resistance ratio = LC₅₀ of field strain/LC₅₀ of susceptible strain (S).

척했다. 젤에 남아있는 세척액은 vacuum으로 건조시켰고 50 mM ammonium bicarbonate (pH8.7)에 trypsin (8-10 ng/ μ l)을 넣어 rehydrate 시켜 37°C에서 8-10시간 두었다. 샘플은 Bruker Autoflex Speed mass spectrometer와 LIFTTM ion optics를 이용하여 분석했다. MS와 MS/MS data는 Smart Beam laser (2-kHz repetition rate)로 획득했고 각 스펙트럼에 대해 4000 shots 이상 축적했다. 데이터는 MS/MS mode (2 keV collision energy)로 수집했다.

데이터 분석

야외에서 채집한 점박이응애에 대한 약제 살비율은 감수성 집단과의 Student's *t* test로 비교하여 분석하였고, *p*값이 0.05보다 작으면 통계적으로 유의하다고 간주하였다(SAS Institute 9.4, SAS Inc.). 단백질 이미징분석은 감수성(S) 샘플을 기준으로 CG, GJ, HS, SJ, OC, PT1, 그리고 PT2의 샘플 중 어느 한 샘플에서라도 양적으로 증가하거나 감소하는 경향을 보이는 spot들을 선정하였고 two-way ANOVA를 수

행하여 spot 강도 간의 유의미한 차이를 detection 했다 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0, Armonk, NY, USA).

결 과

야외 채집 점박이응애의 약제 감수성

국내 7개 지역(CG, GJ, HS, SJ, OC, PT1, PT2)에서 채집한 점박이응애의 살비제 감수성을 평가하기 위해 알에는 etoxazole, fenpropathrin, pyflubumide, pyridaben을, 성충에는 abamectin, bifenazate, 그리고 pyflubumide를 처리하였다. 그 결과, 모든 채집군의 알에서 etoxazole에 대해 125,000배 이상의 저항성비를 보였고 fenpropathrin에 대해 136.8배 이상, 그리고 pyridaben에 대해 27,397배 이상의 높은 저항성비를 보였다(Table 3). Pyflubumide 처리에서는 PT2 집단을 제외하고 3,703배 이상의 저항성비를 보였다. 성충에서는 abamectin을 처리한 결과, 32.5(HS 집단) ~ 371.1배(PT2

Table 4. Susceptibility to acaricides in field populations of *T. urticae* adults^{a)}

Acaricide	Population	N	LC ₅₀ (ppm) (95%CL ^{b)})	Slope \pm SE	RR ^{c)}
Abamectin	S	134	0.21 (0.08-0.82)	1.27 \pm 0.18	1.0
	CG	270	63.02 (23.33-164.79)	0.88 \pm 0.47	300.1
	GJ	240	13.90 (3.27-24.56)	0.69 \pm 0.49	66.2
	HS	270	6.82 (4.78-9.61)	0.23 \pm 0.24	32.5
	SJ	270	14.4 (1.94-31.06)	0.41 \pm 0.25	68.6
	OC	210	17.9 (13.42-22.64)	0.19 \pm 0.11	85.2
	PT1	212	55.0 (22.59-404.53)	1.8 \pm 1.06	261.9
	PT2	240	78.0	0.96 \pm 0.47	371.4
Bifenazate	S	359	5.08 (2.84-10.90)	1.37 \pm 0.23	1.0
	CG	210	427.68 (1.63-11,249)	0.69 \pm 0.24	84.2
	GJ	180	741.33 (99.11-15,487)	0.66 \pm 0.23	145.9
	HS	270	8.62 (0.93-113.34)	0.22 \pm 0.16	1.7
	SJ	270	12.27	0.64 \pm 0.37	2.4
	OC	210	1,706 (1184-2,399)	0.56 \pm 0.17	335.8
	PT1	120	>11,750	-	>2,313
	PT2	270	3,511 (1,230-8,651)	1.00 \pm 0.27	691.1
Pyflubumide	S	180	2.75 (1.32-5.31)	1.27 \pm 0.14	1.0
	CG	180	>5,000	-	>1,818.2
	GJ	222	1,544	0.48 \pm 0.16	561.5
	HS	120	>5,000	-	>1,818.2
	SJ	120	>5,000	-	>1,818.2
	OC	120	>5,000	-	>1,818.2
	PT1	210	3,753	2.29 \pm 0.69	1,364.7
	PT2	120	>5,000	-	>1,818.2

^{a)}% Mortality stands for the % mortality at the recommended field concentration.

^{b)}Confidence limits.

^{c)}Resistance ratio = LC₅₀ of field strain/LC₅₀ of susceptible strain (S).

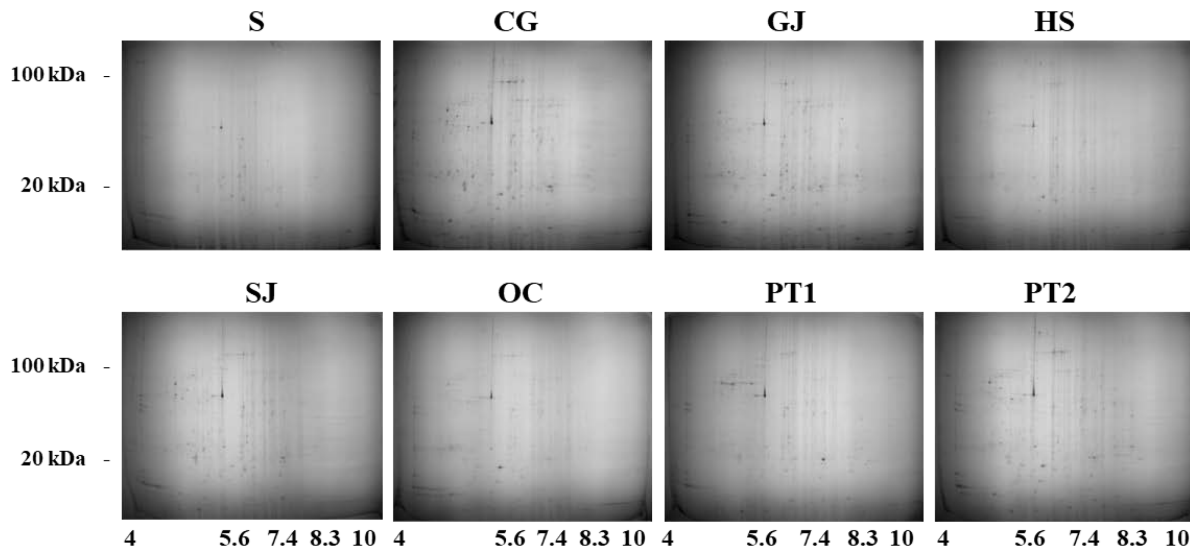


Fig. 1. Representative 2-DE maps of proteins extracted from the *T. urticae* S strain and seven field-collected populations (CG, GJ, HS, SJ, OC, PT1, and PT2). The spots were visualized by silver staining. The 2-DE was repeated at least three times for each group.

집단의 다양한 저항성비를 보였고 bifenazate 처리에서는 PT1 집단이 가장 저항성비가 높았고 HS 집단과 SJ집단은 3 배 이하의 낮은 저항성비를 보였다(Table 4). Pyflubumide 처리에서는 GJ, PT1집단을 제외하고 모두 1818.2배 이상의

높은 저항성비를 보였다.

야외 채집 점박이응애의 단백질 비교분석 및 단백질 동정 위 결과에서 보듯이 야외에서 채집한 점박이응애는 우리

Table 5. Identification of differentially expressed proteins using MALDI-TOF/TOF

Protein name	Experimental pi/MW (kDa)	Accession No.	Level in field populations	Fold change Avg. (min. - max.)
Aldose reductase	6.47 / 32.53	XP_015795160.1	Increased	32.11 (13.17 - 48.42)
Graves disease carrier protein isoform X1	6.15 / 23.20	XP_015794325.1	Increased	32.16 (5.12 - 81.72)
Heat shock protein (HSP) 30D	6.17 / 20.45	XP_015786817.1	Increased	32.65 (20.40 - 54.49)
Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic isoform X1	7.41 / 39.74	XP_015785672.1	Increased	38.91 (14.01 - 67.63)
Uncharacterized protein LOC107363246	4.20 / 23.46	XP_015785927.1	Increased	39.56 (5.18 - 102.28)
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1b	7.56 / 29.22	XP_015789481.1	Increased	39.73 (3.39 - 162.57)
Endoplasmic reticulum chaperone BiP	5.03 / 71.63	XP_015784980.1	Increased	44.80 (21.92 - 80.26)
Natterin-3	6.57 / 14.05	XP_015782147.1	Increased	45.04 (19.40 - 95.18)
Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	4.18 / 43.44	XP_015785272.1	Increased	46.64 (12.25 - 112.17)
Protein disulfide-isomerase A4	6.26 / 49.08	XP_015788270.1	Increased	57.86 (16.98 - 138.19)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	4.84 / 30.61	XP_015792577.1	Increased	65.34 (6.19 - 143.29)
Elongation Factor 1-gamma	6.16 / 41.65	XP_015788318.1	Increased	70.75 (8.28 - 106.32)
Arginine kinase isoform X2	7.44 / 36.28	XP_015786939.1	Increased	74.38 (8.48 - 161.94)
Endoplasmic reticulum resident protein 29	5.95 / 25.68	XP_015786819.1	Increased	111.63 (10.96 - 409.29)
Tubulin beta-2 chain	4.26 / 48.86	XP_015789136.1	Increased	149.72 (3.10 - 388.36)
Glutamine synthetase	7.53 / 36.85	XP_015785304.1	Increased	174.67 (18.08 - 553.38)
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11	6.34 / 29.29	XP_015786119.1	Increased	238.10 (80.09 - 650.36)
Actin, clone 403	5.60 / 37.38	XP_015795605.1	Increased	258.16 (14.50 - 1040.51)
Elongation Factor 1-beta	3.37 / 23.72	XP_015794600.1	Increased	301.59 (1.00 - 796.48)
Proteasome subunit beta type-2	5.74 / 18.86	XP_015794827.1	Decreased	0.36 (0.02 - 1.09)

가 처리한 살비제에 대해 대부분 저항성을 지니고 있었다. 이러한 저항성 집단 점박이용애의 작용기작을 분석하기 위해 우리는 체내 단백질 발현패턴을 비교하였다. 먼저 7개 야외집단과 감수성 점박이용애의 단백질을 추출하여 2차원 전기영동을 수행하였다(Fig. 1). 그 결과, 모든 젤에서 평균적으로 약 1,200여개의 단백질 spots가 관찰되었고 pI 범위는 4~10 사이에, 분자량은 14~120 kDa으로 분포되어 있었다. 스캐닝된 이미지의 정량적인 분석은 PDQuest software (version 7.0)를 이용하여 측정하였고 대조군 즉, 감수성 점박이용애에 비해 야외 채집 집단에서 두 배 이상의 유의한 증감 발현변화를 보이는 spots를 선정하였다. 그 중 감수성에 비해 야외 채집 집단에서 발현이 크게 감소한 15개의 spots와 발현이 증가한 30개의 spots 등 모두 45개의 spots를 동정하기 위해 MALDI-TOF/TOF를 수행하였다. 그 결과 20개의 spots는 동정이 되었지만 25개의 spots는 동정이 되지 않았다(Table 5). 단백질 동정결과, 감수성 집단에 비해 약제 저항성을 지닌 야외 채집 집단에서 과발현된 단백질은 elongation factor 1-beta(평균 301.59배)를 비롯하여 HSP 30D(평균 32.65배), aldose reductase(평균 32.11배), endoplasmic reticulum chaperone BiP(평균 44.8배), natterin-3(평균 45.04배), 그리고 glutamine synthetase(평균 174.67배) 등이 있었고, 반대로 감소한 단백질은 proteasome subunit beta type-2(평균 0.36배)이 동정되었다.

고 찰

본 연구에서 2020년 채집한 국내 7개 지역 점박이용애에 대해 6개의 살비제를 처리하여 감수성 여부를 조사한 결과, 모든 지역의 알은 PT2 집단이 pyflubumide에 2,329배의 저항성을 보인 것을 제외하고 etoxazole(>125,000), fenpropathrin(>136.8), pyflubumide(>3703.7), 그리고 pyridaben(>27397.3)에 대해 높은 수준의 저항성이 나타났다. 성충에 대한 처리 약제 3개 중 abamectin의 경우 PT2 집단이 371.4배로 7개 집단 중 가장 높은 저항성비가 확인되었으며, GJ, HS, SJ, 그리고 OC 집단은 100배 미만의 보통에서 낮은 수준의 저항성비가 확인되었다. Bifenazate의 경우 PT1 집단이 가장 높은 저항성비가 확인되었으며, HS와 SJ 집단은 비교적 낮은 저항성비를 나타냈다. Pyflubumide의 경우, PT1과 GJ 집단에서 각각 1,364.7배와 561.5배의 저항성비가 확인되었으며, 이외의 5개 집단에서 >1,818.2배의 높은 수준의 저항성비가 확인되었다. 이처럼 저항성비를 통한 감수성 평가 결과, 야외에서 채집된 7개의 집단이 모두 복합저항성을 가졌을 것으로 판단되었으며, PT1과 PT2 집단이 비교적 높은 저항성 수준을 보였으므로 집단 중 가장 복합적인 저항성을 가지고 있을 것으로 보였다.

야외 채집 점박이용애에는 여러 종류의 약제에 노출됐을 가

능성이 크므로 교차저항성 및 복합저항성을 보인다. 절지동물 물에서는 크게 두 가지의 살비제 저항성 메커니즘이 알려져 있는데 첫째는 주요 해독 효소의 양적 또는 질적 변화로 인한 노출 감소와, 두번째로 점 돌연변이에 의해 유발된 표적 부위 변화로 인한 감수성 감소이다. 앞서 우리가 보고한 바와 같이(Shin et al., 2021), 약제 저항성 수준과 점 돌연변이의 발생은 종종 일관성이 있다. 따라서 7개의 야외 집단에서 bifentazate, etoxazole, 그리고 pyridaben에 대한 살란효과, 살비효과 그리고 점 돌연변이 간의 상관관계를 조사한 결과 etoxazole과 pyridaben 간의 상관관계는 우리가 이전에 보고한 결과와 일치했다(Koo et al., 2021a). 그러나 abamectin, fenpropathrin, 그리고 pyflubumide에 저항성을 가진 집단에서 점 돌연변이 검출만으로 저항성 진단 마커로 사용하기에는 적합하지 않았다. 즉, 약제마다 상관관계에 차이가 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 우리는 점박이용애의 알려진 약제 저항성 기작 외 다른 기작을 밝히기 위해 단백질 합성의 변화를 초점을 맞췄다. 단백질체 연구는 세포에 스트레스가 가해진 후 내부에서 어떤 일이 일어나는지를 이해하는 데 도움을 준다. Koo 등(2021b)은 훈증제로 잘 알려진 포스핀(PH₃)에 감수성인 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)와 저항성인 쌀바구미에서 단백질을 추출하여 전체 단백질체 프로파일을 비교 분석했다. 이 연구를 통해 PH₃-저항성 쌀바구미에서 일부 단백질들이 높게 발현되거나 또는 낮게 발현되는 것을 밝혀냈다. 특히, cytochrome oxidase subunit I은 PH₃-저항성 쌀바구미에서 감수성보다 15배 높은 발현을 보였다. 또한 citrate synthase 2, delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, 그리고 triose-phosphate isomerase 합성도 증가됐음을 알 수 있었다. PH₃의 작용 메커니즘은 세포 내 대사와 산화적 스트레스를 방해하는 것에서부터 신경 독성에 이르기까지 다양하다. PH₃-저항성은 유전이 되며 미토콘드리아 dihydrolipoamide dehydrogenase complex에 의해 매개된다(Chaudhry and Price, 1990). 비록 더 많은 단백질을 동정하지는 못했지만 PH₃ 작용기작에 관련된 몇몇 단백질의 합성정도를 밝혀낸 의미있는 연구였다. 본 연구의 야외 채집 점박이용애에서 추출된 단백질 중 적게는 32.1배(aldose reductase)에서 많게는 301.5배(elongation factor-1 beta)의 단백질 합성이 증가된 것을 관찰하였다. 32.6배의 증가를 보인 HSP30D는 여러 환경적 스트레스 하에서 유발되는 heat shock protein으로 ATPase를 억제하여 에너지 보존에 관여한다(Piper et al., 1997). 또한 HSP70으로 잘 알려진 ER chaperone BiP는 야외 채집 집단에서 44.8배 증가한 것으로 나타났다. Heat shock protein은 외부로부터의 충격에 의해 발현이 증가되며 증가된 단백질은 그 충격을 극복하려 작용한다. 약제저항성 점박이용애에서 heat shock protein의 합성 증가와 그 기능에 대해서는 추가적인 실험이 필요하다. 반대로, proteasome

subunit beta type-2는 0.36배로 감소했다. 이 단백질은 20S 단백질분해효소 복합체의 완전한 조립에 기여하는 17개의 필수 subunit 중 하나이다. 특히, proteasome subunit beta type-2는 다른 beta subunit과 함께 두 개의 heptameric ring을 형성하고, 그 후 기질 분해를 위한 proteolytic chamber로 조립된다. 진핵생물의 단백질분해효소는 손상된 단백질 등 분해 가능한 단백질을 인식하여 단백질 품질 관리를 위한 목적으로 또는 동적인 생물학적 과정의 핵심 조절 단백질 성분을 위해 작용한다. 실질적으로 이러한 단백질들이 점박이응애 약제저항성 기작에 기여하는지는 추가적인 연구가 필요한 실정이다. 또한 대상으로 한 45개 시료 중 20여개는 동정이 되지 않았는데, 점박이응애의 전체 단백질 데이터 부족에 기인한 것이다. 전기영동상의 등전점 즉 pI와 분자량의 관측값과 이론값은 항상 일치하지 않으며 이는 아마도 post-translational modifications, isoforms, 또는 점박이응애 단백질과 그 동종 단백질 간의 차이로 인한 것일 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 국내 분포하는 점박이응애가 다양한 약제에 대해 저항성이 있다는 것이 확인되었다. 따라서 살비제를 적용할 때는 그 약제에 대해 저항성이 발달했는지 먼저 확인하고, 저항성이 발달한 살비제나 이와 유사한 작용기작을 가진 약제는 피해야 하며, 효과적인 살비제를 교대로 분무하는 것이 필요하다. 또한 우리가 밝힌 약제 저항성 야외 채집 집단에서의 단백질 발현 수준이 살비제 저항성 기작에 관여하고 있다고 추측은 되지만 직접적인 증거는 없는 실정이다. 따라서 살비제 저항성 점박이응애에서 이러한 단백질들을 분자적 진단 마커로 사용하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 충북대학교 국립대학육성사업(2025)지원을 받아 작성되었습니다.

Author Information and Contributions

Gyeong Yeop Im, Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Taught Master student, <https://orcid.org/0009-0005-3324-8429>

Eungyeong Shin, Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Master student

Hyun-Na Koo, Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Visiting professor

Gil-Hah Kim, Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Emeritus professor, <https://orcid.org/>

0000-0001-6256-8759

Kyungjae Andrew Yoon, Department of Plant Medicine, Chungbuk National University, Professor, <https://orcid.org/0009-0008-3405-7693>

Research design; Kim G-H, Investigation; Shin E, Im KY, Data analysis; Koo H-N, Im KY, Writing – original draft preparation; Koo H-N, Writing – review & editing; Kim G-H, Yoon KA.

이해상충관계

저자는 이해상충관계가 없음을 선언합니다.

Literature Cited

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

Chaudhry MQ, Price NR, 1990. A spectral study of the biochemical reactions of phosphine with various haemproteins. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36:14-21.

Clark JM, Scott JG, Campos F, Bloomquist JR, 1995. Resistance to avermectins - extent, mechanisms, and management implications. *Ann. Rev. Entomol.* 40:1-30.

Hirata K, Kudo M, Miyake T, Kawamura Y, Ogura T, 1988. Nc-129 - a new acaricide. Brighton Crop Protection Conference : Pests Disease - 1988, Vols 1-3, 41-48.

Hollingworth R, Ahammadsahib K, 1995. Inhibitors of respiratory complex I: mechanisms, pesticidal actions and toxicology. *Rev. Pestic. Toxicol.* 3:277-302.

Hollingworth R, Dong K, 2008. The biochemical and molecular genetic basis of resistance to pesticides in arthropods, Global pesticide resistance in arthropods. CABI Wallingford UK, pp. 40-89.

Ilias A, Vassiliou VA, Vontas J, Tsagkarakou A, 2017. Molecular diagnostics for detecting pyrethroid and abamectin resistance mutations in *Tetranychus urticae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 135:9-14.

Ilias A, Vontas J, Tsagkarakou A, 2014. Global distribution and origin of target site insecticide resistance mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol.* 48:17-28.

KCPA, Korea crop protection association. 2019. User's Manual of Pesticides.

Khajehali J, Van Nieuwenhuysse P, Demaeght P, Tirry L, Van Leeuwen T, 2011. Acaricide resistance and resistance mechanisms in *Tetranychus urticae* populations from rose greenhouses in the Netherlands. *Pest Manag. Sci.* 67:1424-1433.

Khalighi M, Dermauw W, Wybouw N, Bajda S, Osakabe M,

- Tirry L, Van Leeuwen T, 2016. Molecular analysis of cyenopyrafen resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Pest Manag. Sci.* 72:103-112.
- Kim SI, Koo HN, Choi Y, Park B, Kim HK, Kim GH, 2019. Acequinocyl resistance associated with I256V and N321S mutations in the two-spotted spider mite (Acari: *Tetranychidae*). *J. Econ. Entomol.* 112:835-841.
- Kobayashi M, Kobayashi S, Nishimori T, 2001. Occurrence of etoxazole resistance individuals of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch from a limited region. *Jpn. J. Appl. Entomol. Z.* 45:83-88.
- Koo HN, Choi J, Shin E, Kang W, Cho SR, Kim H, Park B, Kim GH, 2021a. Susceptibility to acaricides and the frequencies of point mutations in etoxazole- and pyridaben-resistant strains and field populations of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insects* 12:7.
- Koo HN, Seok SJ, Kim HK, Kim GH, Yang JO, 2021b. Comparative proteomics analysis of phosphine-resistant and phosphine-susceptible *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Appl. Sci.* 11:9.
- Kundu S, Chakraborty D, Kundu A, Pal A, 2013. Proteomics approach combined with biochemical attributes to elucidate compatible and incompatible plant-virus interactions between *Vigna mungo* and mungbean yellow mosaic India virus. *Proteome Sci.* 11:15.
- Lee K-R, Koo H-N, Yoon C-M, Kim G-H, 2010. Cross resistance and point mutation of the mitochondrial cytochrome b of bifentazate resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Korean J. Pestic. Sci.* 14:247-254.
- Lee S-Y, Ahn K-S, Kim C-S, Shin S-C, Kim G-H, 2004. Inheritance and stability of etoxazole resistance in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its cross resistance. *Korean J. Appl. Entomol.* 43:43-48.
- Lee Y-S, Song M-H, Ahn K-S, Lee K-Y, Kim J-W, Kim G-H, 2003. Monitoring of acaricide resistance in two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) populations from rose greenhouses in Korea. *J. Asia-Pacific Entomol.* 6:91-96.
- Lümmen P, 2007. Mitochondrial electron transport complexes as biochemical target sites for insecticides and acaricides, Insecticides design using advanced technologies. Springer, pp. 197-215.
- Migeon A, Dorkeld F. Spider Mites Web: a comprehensive database for the *Tetranychidae*. 2021. Available from <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb> (Accessed 17/07/2021)
- Migeon A, Nouguier E, Dorkeld F, 2010. Spider mites web: a comprehensive database for the *Tetranychidae*. *Trends Acarol.* 557-560.
- Nicholson SJ, Hartson SD, Puterka GJ, 2012. Proteomic analysis of secreted saliva from Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *J. Proteomics* 75:2252-2268.
- Piper PW, OrtizCalderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M, 1997. Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H⁺-ATPase. *Cell Stress Chaperon* 2:12-24.
- Riga M, Bajda S, Themistokleous C, Papadaki S, Palzewicz M, Dermauw W, Vontas J, Van Leeuwen T, 2017. The relative contribution of target-site mutations in complex acaricide resistant phenotypes as assessed by marker assisted backcrossing in *Tetranychus urticae*. *Sci. Rep.* 7:9202.
- Ryu J-C, Kim K-R, Kim H-J, Ryu E-K, Lee S-Y, Jung S-O, Youn J-Y, Kim M-H, Kwon O-S, 1996. Evaluation of the genetic toxicity of synthetic chemicals (II), a pyrethroid insecticide, fenpropathrin. *Arch. Pharm. Res.* 19:251-257.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M, 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14440-14445.
- Shin E, Cho S, Kang Y, Kim H, Koo H, Kim G, 2021. Analysis of point mutations associated with resistance and acaricides selection for control of field-collected populations in two-spotted mites, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Korean J. Pestic. Sci.* 25:177-187.
- Sparks TC, Nauen R, 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121:122-128.
- Stumpf N, Zebitz CPW, Kraus W, Moores GD, Nauen R, 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 69:131-142.
- Tomlin CD, 2000. The pesticide manual. British Crop Protection Council.
- Van Leeuwen T, Dermauw W, 2016. The molecular evolution of xenobiotic metabolism and resistance in Chelicerate mites. *Annu. Rev. Entomol.* 61:475-498.
- Van Leeuwen T, Dermauw W, Grbic M, Tirry L, Feyereisen R, 2013. Spider mite control and resistance management: does a genome help? *Pest Manag. Sci.* 69:156-159.
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem. Mol.* 40:563-572.
- Van Nieuwenhuysse P, Van Leeuwen T, Khajehali J, Vanholme B, Tirry L, 2009. Mutations in the mitochondrial cytochrome b of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) confer cross-resistance between bifentazate and acequinocyl. *Pest Manag. Sci.* 65:404-412.

점박이응애의 살비제 저항성 모니터링 및 단백질 분석

임경엽 · 신은경 · 구현나 · 김길하 · 윤경재*

충북대학교 농업생명환경대학 식물외학과

요 약 점박이응애는 주요 농업 해충으로 여러 약제에 대해 저항성이 발달해 있다. 본 연구에서는 국내 7개 지역에서 점박이응애를 채집하여 알과 성충에 대해 살비제 감수성을 조사했다. 그 결과, 모든 지역 점박이응애 알은 etoxazole, fenpropathrin, pyflubumide, 그리고 pyridaben에 대해 높은 저항성을 보였다. 성충에서는 abamectin에 대해 32.5~371.4배, bifentazate에 대해 1.7~2,313배 이상, 그리고 pyflubumide에 대해 561.5~1,818.2배 이상의 저항성비를 보여 각 집단마다 조금씩의 차이가 있었다. 저항성 점박이응애 집단의 단백체를 비교분석하기 위해 이차원 전기영동 및 MALDI-TOF/TOF를 수행한 결과, 발현 차이가 가장 큰 45개의 spots를 selection하였다. Aldose reductase를 포함한 heat shock protein 30D, endoplasmic reticulum chaperone BiP, 그리고 natterin-3 등이 과발현 됨을 관찰하였다. 본 연구결과는 점박이응애의 살비제 저항성 기작을 밝히는데 새로운 관점을 제시해 준다.

색인어: 살비제, 단백질, 저항성, 점박이응애