

갈색거저리(*Tenebrio molitor* L.)에 대한 키틴합성저해제의 활성평가법

The Evaluating Method of the Insecticidal Activity of  
Three Chitin Synthesis Inhibitors against the  
Yellow Mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus

박노중 · 송 철 · 김길하 · 조광연

No Joong Park, Cheol Song, Gil Hah Kim and Kwang Yun Cho

**ABSTRACT** The evaluating method of insecticidal activity of three chitin synthesis inhibitors(CSIs), diflubenzuron, triflumuron and chlorfluazuron, was developed against yellow mealworm using topical application and poisonous bait for larvae, and body dipping and micro-injection for pupae. When topically applied with 10 µg/individual larva and dipped of pupa onto 100 ppm solutions of three CSIs, they were ineffective on larval and pupal development. In the poisonous bait treatment against larvae, the LC<sub>50</sub> values of diflubenzuron, triflumuron and chlorfluazuron were 11.3, 42.7 and 6.2 ppm, respectively. In the micro-injection against pupae, the LD<sub>50</sub> values of diflubenzuron, triflumuron and chlorfluazuron were 0.053, 0.230 and chlorfluazuron 0.340 µg/pupa, respectively.

**KEY WORDS** Yellow mealworm, insecticidal activity, chitin synthesis inhibitor

**초 록** 키틴합성저해제인 diflubenzuron, triflumuron, chlorfluazuron을 갈색거저리의 유충과 번데기에 처리하여 효력검정법을 개발하였다. 유충에 대한 처리는 국소처리와 독먹이처리를 행하였고, 번데기에 대하여 용체침적처리와 미량주사처리를 행하였다. 유충에 대한 10 µg 국소처리와 번데기에 대한 100 ppm 용체 침적처리 결과 세약제 모두 유충 및 번데기의 발육에 아무런 영향을 주지 않았다. 유충에 대한 독먹이 처리에 있어서의 LC<sub>50</sub> 값은 diflubenzuron 11.3, triflumuron 42.7, chlorfluazuron 6.2 ppm이었다. 번데기에 대한 미량주사처리에서는 diflubenzuron 0.053, triflumuron 0.230, chlorfluazuron 0.340 µg/pupa의 LD<sub>50</sub>값을 나타내었다.

**검색어** 갈색거저리, 살충활성, 키틴합성저해제

키틴합성저해제(CSI: Chitin Synthesis Inhibitor)는 1970년대 초반에 제초제인 dichlobenil과 fenuron의 유도체를 검토하는 과정에서 Philips-Duphar의 한 연구자에 의해 발견되었다(Wellinga 등 1973). Benzoylphenyl urea(BPU) 또는 acylurea 계열로 명명된 이 계열의 화합물들은 제초활성을 전혀 보이지 않는 대신 나비목 해충에 대하여 섭식(feeding)에 의한 살충활성을 나타내었으며, 특히 그 살충특성이 기존의 살충제와는 판이하게 다르게 성충 이전의 발육 단계 도중의 탈피시기에 효력을 나타내는 특징이 보고되었다(Mulder와 Gijswilt 1973, Post 등 1974).

Diflubenzuron의 발견 이후 더욱 강력한 acylurea

의 탐색을 통하여 그보다 월등한 활성을 갖는 화합물들이 계속적으로 나타나게 되었으며, chlorfluazuron, teflubenzuron, hexafluron, flufenoxuron 등의 약제는 최초의 BPU 계열화합물인 diflubenzuron보다 수십배 이상 강력한 효력을 나타내는 것으로 알려지고 있다(Cohen 1987, Ishaaya 1990, Hutson과 Roberts 1985, Worthing 1991)

키틴합성저해제의 효력검정은 기존 살충제와는 작용 메커니즘이 완전히 달라서 그 방법도 새로이 확립하여 실시하여 왔으며, 일반적으로 나비목 곤충에 대한 곤충생장조절제의 효력검정은 처리 후 장기간 관찰하여야 탈피억제, 또는 기형적 탈피 등,

생육저해로 인한 살충효과를 판별할 수 있으므로 (Eder와 von Keyserlingk 1985, Kerkut와 Gilbert 1985, Wakabayashi와 Waters 1987) 기존 살충활성 물질의 검정에 비하여 그 검정기간을 연장하여 처리 후 120시간까지 관찰하여 효력을 평가하고 있다(조 1992) 그러나 딱정벌레목(Coleoptera) 곤충에 대해서는 본 목(Order)의 곤충의 발육양상이 적합하지 않은 관계로 키턴합성저해 효과를 위한 생물검정이 실시되지 않았다. 그리하여 본 연구실에서는 딱정벌레목의 곤충중 대량사육에 간편하고 약제 처리시 취급이 용이한 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)를 확보하여 신규 합성 CSI 약제들의 활성평가를 위한 생물검정법의 개발을 목적으로 선발된 3종의 기존 CSI약제들의 활성을 평가하였다.

### 재료 및 방법

실험 CSI 약제는 diflubenzuron(1-(4-chlorophenyl) 3-(2,6-difluoro-benzoyl) urea, A.I. 90.1%), triflumuron(2-chloro-N-[[(trifluoromethoxy phenyl]amino] carbonyl]benzamide, A.I. 92.0%), chlorfluazuron(1-[3,5-dichloro-4-(3-chloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxyphenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea, A.I. 95.0%)의 3종의 약제로서 국내 농약업체로부터 분양받아 이용하였다.

갈색거저리 유충에 대한 약제 처리는 국소처리(topical application) 및 독먹이처리(poisonous bait treatment)를 행하였으며, 체중  $75 \pm 5$  mg의 유충을 이용하였다. 국소처리는 약제를 acetone에 녹여 유충의 가슴등판에 1  $\mu\text{l}$ 씩 국소처리기(Topical Applicator, Model No. PAX-100, Burkard Scientific.)로 처리하였다. 독먹이 처리는 Egaas 등(1988)의 방법을 변형하여 ether대신 acetone을 사용하였는데, 유충먹이로 이용하고 있는 건조효모 : 소맥분(2 : 8) 사료 0.5 g에 일정량의 약제가 용해되어 있는 acetone용액 1 ml를 직접 관주한 후 후드 내에서 24시간 이상 충분히 건조하여 유충에 공급하였다.

번데기에 대한 처리는 미량주사와 충체침적을 행하였다. 번데기의 발육단계에 따라 부속지의 착색화 과정이 단계별로 진행되는 것을 육안으로 확인할 수 있는데, 자세한 것은 표 1에 상세히 나타낸 바와 같이

Table 1. The progress of pupal development and pigmentation in yellow mealworm pupa

Pupal age(day)	Pigmentation	Diagrammatic view
0	No pigmentation	
2	Eye, started	
5	Eye, completed	
7	Mandible	
8	Leg	
9	Abdominal distal part	
10	Adult eclosion	

용화 후 1일 미만의 경우에는 유백색의 모습으로 착색부위가 전혀 나타나지 않고, 그 후 시일의 경과에 따라 복안, 큰턱, 다리, 복부말단의 순서로 착색화가 진행되므로 실험에 이용하는 번데기의 발육단계를 구분할 수 있었다. 실험에 이용한 갈색거저리는 각각 발육단계의 번데기로서 체중이  $100 \pm 5$  mg인 번데기를 이용하였다. 미량주사는 약제를 soybean oil(Junsei Chemical Co., LTD)에 충분히 녹인 후 10  $\mu\text{l}$  hamilton syringe로 1  $\mu\text{l}$ 씩 번데기의 복부 6번째 마디에 주사하였다. 충체침적은 처리약액을 acetone 10 %, Triton X-100 100 mg L<sup>-1</sup> 수용액으로 조제하여 번데기를 30초간 침적처리하였다.

약효의 검정은 유충의 경우 처리 후 2주일간, 번데기의 경우 성충으로의 우화시기까지 처리 후 약 10일간 실내온도  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $65 \pm 5\%$ , 광주기 16 : 8(명 : 암) 조건에서 탈피 저해 및 우화 저해로 인한 살충여부를 조사하였다. LC<sub>50</sub> 및 LD<sub>50</sub>값의 산출은 Finney(1982) Probit법으로 산출하였으며, 통계분석은 StatView™(Abacus Concepts, Inc. 1988)를 이용하였다.

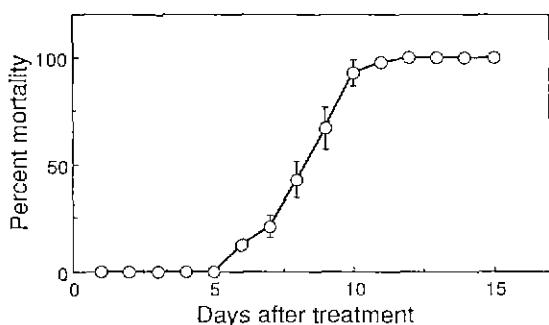


Fig. 1. Change of mean mortality of yellow mealworm larvae treated with diflubenzuron 50 ppm of poisonous bait.

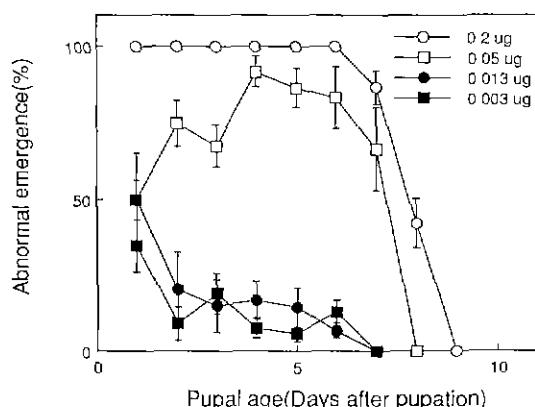


Fig. 2. Change of abnormal emergence rate of yellow mealworm pupae treated with diflubenzuron according to the injection time at each pupal age.

## 결과 및 고찰

그림 1은 유충에 대한 탈피저해 효과의 발현시기를 알아보기 위하여 diflubenzuron 50ppm이 독먹이 처리된 사료를 유충에 섭식 시킨 후 시일이 경과하면서 변화되는 살충률을 나타낸 것이다. 약제가 처리된 사료에 유충을 접종한 후 12일이 지나서야 100%의 탈피저해로 인한 살충활성을 나타내었다. 따라서 갈색거저리 유충에 대한 CSI약제의 독먹이 처리 후 살충활성의 검정은 처리 후 2주 검정을 행하는 것이 바람직하였다.

갈색거저리의 번데기 각각의 발육단계에 diflubenzuron을 4농도로 미량주사한 결과를 그림 2에 나타내었다. 각 처리농도에서 모두 약제가 처리되는 시

기의 번데기의 성숙도에 따라서 성충의 우화율은 둔화되는 것으로 나타났다 즉 약제가 처리될 당시 번데기의 상태가 어릴수록 약효 발현이 민감해짐으로 번데기에 대한 미량주사는 가능한한 용화 직후의 것을 이용하기 위하여 용화 후 1일 미만의 번데기에 처리하여야 한다. 이상에서 알아본 바와 같이 IGR의 생물검정은 기존의 방법과는 달리 약제의 작용특성을 충분히 이해하고 새로운 기준에 근거한 방법에 따라 실시되어야 한다.

표 1은 이제까지 준비된 방법을 기초로 하여 갈색거저리의 유충과 번데기에 대한 diflubenzuron, chlorfluazuron, triflumuron 3약제의 약효를 LC<sub>50</sub> 및 LD<sub>50</sub>값으로 나타낸 것이다. 3약제 모두 번데기와 유충에서 충체침적(100 ppm)과 국소처리(10 µg/individual)로는 아무런 효력을 나타내지 않았다. Webley와 Airey(1982)에 의하면 딱정벌레목 저곡해충의 유충에 대한 접촉활성 평가를 위하여 diflubenzuron을 500 mg m<sup>-2</sup> 표면처리시 *Tribolium castaneum*, *Trogoderma granarium*, *Dermestes maculatus*종 *T. castaneum*과 *T. granarium*은 성충으로의 우화에 영향을 거의 받지 않았으나, *D. maculatus*만이 100% 살충효과를 나타내어 갈색거저리의 유충과 번데기에게 국소처리와 충체침적처리의 결과와 비교할 때 곤충종에 따라 충체내로의 유효한 침투경로가 매우 다양한 것으로 설명될 수 있다. Clarke와 Jewess (1990a, 1990b)에 의하면 *Spodoptera littoralis*의 경우 diflubenzuron, flufenoxuron, teflubenzuron을 각각 섭식에 의한 처리와 국소처리처리를 실시한 후 [<sup>14</sup>C]uridin diphospho-N-acetylglucosamine(UDP-GlcNAc)를 미량주사하여 chitin 합성에 이용되어진 이용율과 살충활성을 비교한 결과, diflubenzuron의 경우 UDP-GlcNAc의 이용률은 다른 두 약제와 거의 비슷한 반면에 살충활성은 극심한 차이가 나고, 또 처리방법에서도 diflubenzuron만이 국소처리에 비하여 섭식에 의한 살충효과는 매우 경미한 것으로 나타났다. CSI약제들의 chitin 합성 저해력과 살충활성간의 불일치 및 약제 처리방법간의 활성차이는 많은 연구자들(Gazit 등 1989, Ishaaya와 Degheele 1988, Laecke와 Degheele 1991, Saidy 등 1989)에 의해 확인되었으며, 그 원인은 각각의 약제들의 충체내 침투율의 차이와 충체내 해독작용증 생분해율의 차이라고 해석되고 있다.

**Table 2.** The LC<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> values of chitin synthesis inhibitors against yellow mealworm larvae and pupae according to different treatment methods

CSIs	Larvae		Pupae	
	TA <sup>a</sup>	PB <sup>b</sup>	BD <sup>c</sup>	MI <sup>d</sup>
Disflubenzuron	>10	11.3(9.74-14.87)	>100	0.053(0.048-0.068)
Triflumuron	>10	42.7(35.71-53.69)	>100	0.23 (0.303-0.397)
Chlorfluazuron	>10	6.2(5.58-6.82)	>100	0.34 (0.303-0.397)

Values within each parenthesis mean 95% fiducial limits.

<sup>a</sup>TA: Topical application ( $\mu\text{g/larva}$ ).

<sup>b</sup>PB: Positionous bait (ppm)

<sup>c</sup>BD: Body dipping (ppm).

<sup>d</sup>MI Micro-injection ( $\mu\text{g/pupa}$ ).

한편, 유충에 대한 독먹이처리는 각각의 LC<sub>50</sub> 값이 각각 chlorfluazuron 6.2, disflubenzuron 11.3, triflumuron 42.7 ppm의 순서로 나타났다. 그런데 반대 기에 대한 미량주사처리는 LD<sub>50</sub> 값이 disflubenzuron 0.053, triflumuron 0.23, chlorfluazuron 0.34  $\mu\text{g}/\text{pupa}$ 의 순으로 유충에 대한 독먹이처리의 결과와는 상이한 약효를 나타내는 것으로 나타났다. Chlorfluazuron은 일반 나비·나방류의 유충에서 disflubenzuron보다 월등한 약효를 경엽처리(foliar treatment)에서 나타내는 것으로 보고되고 있다(Cohen 1987, Ishaaya 1990). 갈색거저리 유충의 독먹이처리의 경우 chlorfluazuron이 다른 IGR 약제에 비해 월등한 것으로 나타난 사실은 다른 곤충 종에 대한 보고와 비슷한 섭식에 의한 약효의 발현인 것으로 이해된다. 그러나 충체내 직접 미량주사는 섭식에 의한 약효와는 달리 직접 혈강(haemocoel)내로 약제를 주입하기 때문에 각종 곤충의 대사작용에 의한 생분해(bio-degradation) 과정이 생략되어지는 것으로 추측되어 섭식에 의한 효력과는 전혀 다르게 그 효과가 나타난 것으로 생각할 수 있다.

결론적으로 CSI 약제의 검정법에 있어서 중요하게 고려되어야 할 사항은 처리방법과 검정시기이다. 약제의 특성상 급이(feeding), 국소처리(topical application) 및 미량주사(micro-injection) 등 그 처리 방법에 따라 약효의 발현이 달라 나타나는 것은 물론이고 검정시기에 있어서도 탈피시기에 효과가 뚜렷이 나타나므로 처리 후 상당 시간 경과 후 약효를 평가하여야 한다. 갈색거저리는 다른 곤충에 비해 그 생활사가 길기 때문에 유충의 생육 기간중 탈피간

격이 길어 탈피 저해 효과의 판별은 약제 처리 후 충분한 시간을 두고 관찰하여야 한다.

이상으로 갈색거저리를 이용한 키틴합성저해제들의 약효를 살펴보았는데, 신규 개발되는 동일계열 약제의 약효검색을 위하여 유충에 대한 독먹이처리와 용화 후 1일 이내의 반대기에 대한 미량주사처리는 매우 효과적인 검색방법으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 인용 문헌

- Abacus Concepts, Inc 1988. StatView 512<sup>+</sup>, the interactive statistics and graphics package. BrainPower Inc., Calabasas, California.
- 조광연. 1992. 신규농약개발을 위한 스크리닝 체계 확대발전(III). 과학기술처, 415 pp.
- Clarke B. S. & P. J. Jewess. 1990a. The uptake, excretion and metabolism of the acylurea insecticide, flufenoxuron in *Spodoptera littoralis* larvae, by feeding and topical application. *Pestic. Sci.* 28: 357-365.
- Clarke B. S. & P. J. Jewess. 1990b. The inhibition of chitin synthesis in *Spodoptera littoralis* larvae, by flufenoxuron, teflubenzuron and disflubenzuron. *Pestic. Sci.* 28: 377-378.
- Cohen, E. 1987. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition *Ann. Rev. Entomol.* 32: 71-93.
- Eder V. & H. C. von Keyserlingk. 1985. The challenge of finding new insecticides for a mature market. In *Approaches to New Leads for Insecticides* (Edited by H. C. von Keyserlingk, A. Jager & C. von Szczepanski), pp. 1-8. Springer - Verlag, Berlin.
- Egaas E., E. G. Jensen & J. U. Skaare. 1988. Activities

- of some microsomal enzymes of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Linne) I. Basal levels and inducibility. *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**: 35-39
- El Saidy M. F., M. Auda & D. Degheele. 1989. Detoxication mechanisms of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **35**: 211-222.
- Finney D. J. 1982 "QUOT 10" for probit analysis (modified by Y. H. Song).
- Gazit Y., I. Ishaaya & A. S. Perry. 1989. Detoxification and synergism of diflubenzuron and chlorfluazuron in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**: 103-110.
- Hutson D. H. & T. R. Roberts. 1985 Insecticides. In *Insecticides* (Edited by Hutson, D. H and T. R. Roberts), pp. 1-34. John Wiley & Sons, New York.
- Ishaaya I. 1990. Buprofezin and other insect growth regulators for controlling cotton pests. *Pesticide Outlook* **1**: 30-33.
- Ishaaya I. & D. Degheele. 1988. Properties and toxicological significance of diflubenzuron hydrolase activity in *Spodoptera littoralis* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* **32**: 180-187.
- Kerkut G. A. & L. I. Gilbert Eds 1985. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. VII. Endocrinology I, 564pp. Pergamon Press, Oxford.
- Mulder R & M. T. Gijswijt. 1973. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pestic. Sci.* **4**: 737-745.
- Post L. C, B. J. Dejong & W. R. Vincent 1974. 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**: 473-483.
- Van Laecke K. & D. Degheele. 1991 Detoxification of diflubenzuron and teflubenzuron in the larvae of the beet armyworm (*Spodoptera exigua*) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **40**: 181-190.
- Wakabayashi N. & R. M. Waters. 1987. Juvenile hormones and related compounds. In *Handbook of natural pesticides, Vol. III: Insect growth regulators, Part A* (Edited by Morgan, E. D and N. B. Mandava), pp 87-152, CRC press, Boca Raton, Florida.
- Webley D. J. & W. A Airey. 1982 A laboratory evaluation of the effectiveness of diflubenzuron against *Dermestes maculatus* De Geer and other storage insect pests. *Pestic. Sci.* **13**: 595-601.
- Wellinga K., R. Mulder & J. J. Van Dallen 1973. Synthesis and laboratory evaluation of 1-(2, 6-disubstituted benzoyl)-3-phenyl ureas, a new class of insecticides. I. 1-(2, 6-dichlorobenzoyl)-3-phenylureas. *J. Agric. Food Chem.* **21**: 348-354.
- Worthing C. R., Ed. 1991. The Pesticide Manual, A World Compendium, 11th Edition, 1141 pp. The British Crop Protection Council, Surrey.

(1994년 10월 18일 접수)