

담배거세미나방과 파밤나방에 활성이 있는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 균주의 특성

김태환 · 김다아 · 김기수 · 서미자 · 윤영남 · 유용만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 isolate with bioactivities to *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)

Tae Hwan Kim, Da A Kim, Ki Su Kim, Mi Ja Seo, Young Nam Youn and Yong Man Yu*

Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764

ABSTRACT : *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 isolated in Korea is known active against *Spodoptera* sp.. Especially, *B. thuringiensis aizawai* CAB109 isolates showed 100% mortality against *Spodoptera litura* and *Spodoptera exigua*. To screen highly active *B. thuringiensis*, the pathogenicity of *B. thuringiensis* CAB109 was compared with that of commercialized *B. thuringiensis* products. LC₅₀ values of CAB109, product TB-WP and product SC strains of *B. thuringiensis* were 1.3×10^5 , 2.3×10^6 and 5.2×10^5 cfu/ml against the 2nd larva of *S. litura* and 1.8×10^4 , 1.3×10^6 and 1.5×10^6 cfu/ml against the 2nd larva *S. exigua*, respectively. To determine new gene's existence and absence, the plasmid DNA was extracted, and compared to that of *B.t. aizawai* HD-133. Both *B. thuringiensis* were not like plasmid DNA pattern. PCR technique was used to predict both plasmid DNA's cry gene. PCR products analysis showed that *B.t.* CAB109 harbor Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C and Cry1D and *B.t.* HD-133 has Cry1Aa and Cry1Ab, respectively.

KEY WORDS : *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua*, plasmid DNA

초 록 : 국내에서 분리된 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109균주가 난방제 해충으로 알려진 담배거세미나방과 파밤나방에 동시에 높은 독성을 보이는 것으로 나타났다. *B.t.* CAB109 균주의 활성을 평가하기 위해 혈청형이 *aizawai*이면서 미생물농약으로 시판중인 TB-WP제품 및 SC제품과의 살충활성을 비교한 결과, *B.t.* CAB109균주, TB-WP제품, SC제품은 담배거세미나방 2령충에 대한 반수치사농도(LC₅₀)가 각각 1.3×10^5 cfu/ml, 2.3×10^6 cfu/ml, 5.2×10^5 cfu/ml으로 나타났고 파밤나방 2령충에 대한 반수치사농도는 1.8×10^4 cfu/ml, 1.3×10^6 cfu/ml, 1.5×10^6 cfu/ml으로 나타나 두 종 해충 모두에서 *B.t.* CAB109 균주가 독성이 더 높은 것을 볼 수 있었다. *B.t.* CAB109균주가 이미 알려져 있는 *aizawai*와 비교해 차이가 나는 새로운 유전자를 소유하는지 확인하기 위해 Plasmid DNA를 추출하여 전기영동 한 결과 *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133과 다른 패턴을 보이는 것을 확인 할 수 있었고 Cry1-Cry5의 primer를 사용하여 PCR을 진행한 결과 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109균주는 Cry1Aa, 1Ab, 1C, 1D를 *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133은 Cry1Aa, 1Ab를 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

검색어 : *Bacillus thuringiensis*, 담배거세미나방, 파밤나방, Plasmid DNA

*Corresponding author. E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

인류는 지금까지 농업해충의 피해를 최소화하기 위해 많은 화학살충제들을 개발하여 사용 해왔다. 그러나 이런 화학살충제 오남용은 해충이 약제저항성을 획득하게 했고 자연환경에서 환경오염원인이 되어왔다. 또한 해충의 천적 및 익충을 포함한 생태계 전반에 영향을 주어 일부 해충이 증가되는 결과를 초래하였으며, 이는 곧 더 많은 살충제를 사용하게 하는 문제를 되풀이하게 하였다(Tabashink, 1994). 이와 같은 현상을 막고 생태계 보호 및 농작물 생산을 증대하기 위하여 종합적 해충방제 방법이 도입되고 살충제의 사용이 억제됨에 따라 생물학적인 방법에 의한 해충방제에 관심이 높아지게 되었다. 이에 대표적인 것이 곤충병원성 세균인 *Bacillus thuringiensis*(이하 *B.t.*) 균주를 이용한 미생물 농약으로 현재 국내외적으로 사용되는 생물농약 중 가장 많이 생산, 판매, 활용되고 있고 최근에는 숙주범위를 확대시키고 독성을 증진시키기 위해 새로운 균주를 분리하거나 분자생물학적으로도 많은 연구를 하고 있다(Choi *et al.*, 2008, Gill *et al.*, 1995, Park *et al.*, 1995, Zheng *et al.*, 2005).

*B.t.*는 호기성 그람양성 간균으로, 포자를 형성하는 시기에 살충성 단백질 결정체를 동시에 형성하며, 이는 곤충의 유충을 치사시키는 능력을 가지고 있다(Bechtel *et al.*, 1976, Kurstak, 1982). 이 단백질 결정체는 내독소(δ -endotoxin)라 불리는 폴리펩티드로 이루어져 있으며, 이 내독소 단백질의 종류에 따라 나비목(Lepidoptera), 파리목(Diptera), 딱정벌레목(Coleoptera)의 해충에 살충성을 나타내고(Schnepf, 1995, Tamez-Guerra *et al.*, 2004), 기생편형동물(platyhelminths)과 원형동물류(Protozoans)에도 특이성이 있음이 밝혀졌다(Feitelson *et al.*, 1992). 내독소의 작용기작은 내독소 단백질이 분해되어 독소활성을 보이게 되면, 중장세포의 수용체에 이들 독소가 결합하여 구멍을 뚫으므로, 중장세포막의 이온교환의 불균형과 영양분의 흡수가 이루어지지 않게 되며, 이에 따라 패혈증이 유발되어 섭식이 중지되고 결국에는 곤충이 죽게 된다(Gill *et al.*, 1992, Kurstak, 1982). 이러한 단백질분해 활성과정을 거치면서 살충성 단백질을 만드는데 주로 120-140kDa에 해당하는 내독소 단백질이 곤충 중장의 높은 알칼리성 곤충 소화액에 의해서 용해되어 60-70kDa의 저항성 독성 단백질이 형성되어 독성이 나타나는 것으로 보고되어 있다(Lecadet and Martouret, 1967, Yamamoto and McLaughlin, 1981).

이런 내독소 단백질 유전자의 아미노산 염기서열 유사성을 토대로 *Cry* 유전자는 32그룹, *Cyt* 유전자는 2그

룹으로 분류하고 있다(Crickmore *et al.*, 1998). 이 중 몇몇 *Cry*유전자의 경우 *Spodoptera*속 곤충종에 독성을 나타내는 것으로 보고되어 있는데, 그 중에서도 *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1Ad*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1E*, *Cry1F*, *Cry1I*, *Cry1J*, *Cry2Aa*, *Cry2Ab*, *Cry9C*유전자가 존재하고 있는 균주가 *Spodoptera* species에 독성을 나타내고 있는 것으로 확인되고 있다. 이 *Cry* 유전자 중에서 *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1E*, *Cry1F*, *Cry9C*는 담배거세미나방(*Spodoptera exigua*)와 파밤나방(*Spodoptera litura*)에 독성을 보인다고 알려져 있고, *Cry1C*는 *S. exigua*와 *S. litura*에 특히 높은 독성을 보인다고 알려져 있다(Hernandez-Martinez *et al.*, 2008, Porcar *et al.*, 2000). 따라서 위의 두 종 해충, 파밤나방과 담배거세미나방을 방제하기 위해 이용될 *B.t.*균주의 경우, *Cry1C*유전자를 포함한 두 종 해충에 대해 독성을 나타내는 유전자를 가지고 있는 균주를 선발하여 이용하면 높은 살충활성에 의해 방제효과를 높일 수 있을 것이다.

*S. litura*와 *S. exigua*은 나비목(Lepidoptera) 밤나방과(Noctuidae) *Spodoptera*속에 속하는 가장 대표적인 농업해충이다(Bae *et al.*, 1997, Goh *et al.*, 1991, Garad *et al.*, 1984). 파밤나방은 동남아시아가 원산지로서 주로 열대 및 아열대지역에 넓게 분포하고 있으나 이동성이 강하여 최근에 온대지역에도 발생이 증가하고 있다. 기주범위가 광범위하여 채소, 화훼, 과수 등 40과 200여종에 달하고, 국내에서는 파, 배추, 수박 등에 다발생하여 큰 피해를 주고 있다(Ahn *et al.*, 1989). 파밤나방은 우리나라 남부지방의 발작물에 대발생하여 큰 피해를 주고 한국, 중국, 대만을 포함한 아시아지역과 이집트, 인도, 오스트레일리아 및 태평양군도 등에 이르는 열대, 아열대 및 온대에 걸쳐 폭 넓게 분포하고 있는 난지성 해충이다. 담배거세미나방은 두과작물, 십자화과, 가지과, 화본과, 광엽성작물, 화훼류에 이르는 110여종이 넘는 기주를 가해하는 대표적인 광식성 해충의 하나이다. 우리나라에서는 1990년 이후부터 발작물의 주요 해충으로 인식되기 시작하여 시설재배지에서 주로 다발생하여 콩, 들깨, 토마토, 카네이션, 거베라 등을 가해하여 큰 피해를 주고 있다(Bae, 1999).

위 두 종 해충의 유충은 선천적으로 약제에 대한 높은 내성과 낮은 감수성으로 어린 유충기를 제외한 중령 이상의 유충은 약제방제가 매우 어려운 대표적인 난방제 해충으로 보고되어 있다(Choi *et al.*, 1996, Bae *et al.*, 2003). 그럼에도 불구하고 이 해충의 방제에 있어 아직

까지 살충제에 의존하고 있으며 지속적이며 무분별한 사용에 의해 약제저항성이 나타나면서 방제가 어려운 실정이다(Kim and Shin, 1987). 따라서 화학농약과 미생물농약인 *B.t.*를 이용한 교호살포 방제법등이 보고되었다(Jin et al., 2008, Jin et al., 2009).

따라서 본 연구는 국내에서 분리된 새로운 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109(Kim et al., 2008)균주의 살충 활성검정과 살충성 단백질의 특성 조사 및 단백질을 암호화하는 유전자의 분석을 통해, 두 종 해충에 살충효과가 있는 균주의 필수적인 살충성 단백질 유전자를 확인하고자 하였으며, 시판중인 *B.t.* subsp. *aizawai*의 제품인 TB-WP제품, SC제품과의 생물검정을 통하여 활성을 비교하여 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB 109균주의 이용가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주

실험에 사용된 균주는 국내토양에서 분리하여 충남대학교 응용생물학과 생물적해충제어실험실에서 보관중인 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주를 사용하였다. 생물활성과 살충성 독소단백질 유전자를 비교하기 위해, 대조 균주로서 시판중인 *B.t.* subsp. *aizawai* 제품인 TB-WP제품(토박이)과 SC제품(스콜피온)은 구입하여 사용하였다.

공시곤충

본 실험에서 사용된 나비목 해충인 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 파밤나방(*S. exigua*), 담배거세미나방(*S. litura*)은 농촌진흥청 농업기술과학원으로부터 분양받았으며 인공먹이를 사용하여 실험실에서 누대 사육하였다. 인공먹이는 이미 알려진 것을 토대로 하여 만들었다(Goh et al., 1990). 미국흰불나방(*Hyphantria cunea*) 및 암청색줄무늬밤나방(*Arete coerulea*)은 대전 유성구 충남대학교 인근에서 채집하여 사용하였다. 파리목인 모기는 서울대학교 농업생명과학대학으로부터 분양받은 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*), 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)로 치어사료에 yeast extrast를 첨가한 먹이로 사육하여 사용하였다. 딱정벌레목 해충인 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)는 야외개체군을 채집하여 사용하였다. 모든 곤충

은 온도 25±2℃, 광조건 16L:8D, 상대습도 50-60%의 조건에서 사육되었다.

생물활성 검정

실험에 사용된 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109, TB-WP 제품, SC제품은 NA배지에 접종하여 27℃에서 4-6일 동안 배양 후 위상차 현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 배지위의 균을 모아 원심튜브와 원심분리기를 이용해 1.0×10⁶ (cfu/ml)에 해당하는 포자와 내독소단백질이 혼재된 균액을 가지고 살충정도를 4단계로 나누어 생물검정에 사용하였다.

해충에 대한 독성검정

배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 직경 2cm의 배추 잎에 100μl의 희석액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 2령 유충 20마리씩을 petri dish에 넣고 48시간동안 치사율을 조사하였다. 빨간집모기와 이집트숲모기에 대한 생물활성 검정은 300μl의 1.0×10⁹ (cfu/ml)의 균액을 멸균수 30 ml에 희석하여 부화 후 3-4일된 유충 20마리씩을 플라스틱 컵에 넣고 25℃에서 48시간 동안 치사율을 조사하였다(Kil et al., 2008). 쌀바구미에 대한 검정은 쌀 1 g에 200 μl의 희석액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 20마리의 성충을 넣고 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 미국흰불나방과 암청색줄무늬밤나방에 대한 생물활성 검정은 야외충과 기주를 채집하여 직경 3 cm에 200μl의 1.0×10⁹ (cfu/ml)의 균액을 뿌려 음건한 뒤 10마리씩 48시간 동안 관찰하였다. 담배거세미나방과 파밤나방에 대한 생물활성 검정은 희석액 100 μl를 0.5g의 인공 사료에 첨가하여 2령 유충 10마리씩 petri dish에 넣고 각기 120시간, 96시간 동안 치사율을 조사하였다. 모든 실험은 3반복 실시 하였다(Kim et al., 2008, Choi et al., 2008).

파밤나방과 담배거세미나방의 반수치사농도(LC₅₀)

희석농도는 담배거세미나방과 파밤나방 유충이 모두 사망하는 농도와 생존하는 농도까지 일정한 비율로 5-7가지의 농도 범위로 하여 조사된 사충율을 가지고 Finney(1971)의 probit 계산법에 기초한 PC프로그램

(Raymond, 1985)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀)을 산출하였다.

포장실험

실험실 내에서의 생물활성 검정 결과에 기반을 두어 포장에서도 *B.t. subsp. aizawai* CAB109 균주가 독성을 보이는지 확인하기 위해 2008년 8월 11일부터 9월 3일까지 전남 진도군 군내면 녹진리의 파밭에서 파밤나방을 대상으로 포장 검정을 실시하였다. 검정 당시의 포장 상황은 주당 해충 밀도가 약 0.2 마리였으며 피해주율은 20%였다. 토양 시료로부터 분리된 *B.t. subsp. aizawai* CAB109 균주 및 대조군으로서 시판 중인 TB-WP 제품을 약 2.3×10^6 cfu/ml의 농도로 5×2m의 면적에 살포하였다. 약제 처리는 1주일 간격으로 3회 처리하고 모든 실험은 3회 반복 실시하였다. 처리구에서 임의로 파 30 포기를 선택하여 피해주수와 해충수를 확인하였다 (Jin *et al.*, 2008).

Plasmid DNA 추출

실험에 사용된 균주를 LB배지(10 ml)에 접종하여 28-30°C, 180-250rpm의 조건하에서 16시간동안 배양하였다. 배양액의 1ml를 SPY배지(0.2% (NH₄)₂DO₄, 1.4% K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% Sodium citrate, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.1% Yeast extract, 0.1% Glucose)에 접종하여 OD₆₀₀ 측정값이 0.7-1.0이 될 때까지 4시간 정도 배양한 후, 배양된 균은 모두 10,000 rpm, 5분, 4°C의 조건으로 원심분리하여 균체만 회수 하였다. 상청액은 버리고 수확한 균체에 P1용액(50 mM Tris-Cl, pH8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) 4 ml와 라이소자임(50 mg/ml)을 50ul 첨가하고 37°C에서 30분정도 반응시킨 후, P2용액(200 mM 수산화나트륨, 1% SDS) 4ml에 5분, 상온에서 반응시키고 P3용액(3M 초산칼륨) 4ml에 ICE에서 15분동안 반응시키고 12,000rpm, 15분, 4°C의 조건으로 원심분리하였다. 이때 생기는 상청액은 새로운 튜브에 옮겨 15,000rpm, 30분, 4°C의 조건으로 원심분리한 후, 튜브위에 설치한 QIAGEN-tip 100에 미리 QBT용액(750 mM 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올, 0.15% 트리톤) 4 ml을 통과시켰다. QBT용액이 QIAGEN-tip 100을 다 통과한 뒤 원심분리된 상청액을 통과시킨 후 QC buffer(1M 염화나트륨, 50 mM MOPS, 15% 이소프로판올) 10 ml을 두 번 통

과시켰다. 그 후 밑의 튜브는 새로운 것으로 교체하고 QF 버퍼(1.25 M 염화나트륨, 50 mM Tris-Cl, 15% 이소프로판올) 5 ml을 통과시켰다. 튜브에 모인 액체는 2 ml 에펜돌프 튜브에 1ml씩 담고 이소프로판올(IPA)을 0.7 ml 넣은 후 13,000rpm, 30분, 4°C로 원심분리한 후 상청액은 버리고 70°C알콜을 넣어 13,000 rpm, 10분, 4°C의 조건으로 원심한 후 상청액을 버리고 에펜돌프 튜브의 물기가 사라질 때까지 clean bench에 넣고 건조시켰다. 건조후 멸균수 10 ul 넣고 다시 13,000 rpm, 5분, 4°C로 원심분리하여 녹인 후 TBE buffer(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA)에 아가로스겔을 0.7°C로 희석하여 겔을 만든 후 50V로 40분동안 전기영동하였다.

PCR 증폭 및 분석

B.t. subsp. aizawai CAB109 균주의 Cry gene을 확인하기 위해 11개의 primer를 사용하였다(Table 1)(Porcar and Juarez-Perez, 2003). Top DNA polymerase 1U, dNTP 250uM, Tris-HCl(pH 9.0) 10mM, KCl 30mM, MgCl₂ 1.5mM이 포함되어 있는 PCR premix를 이용하여 20ul의 반응물로 PCR을 수행하였다. 주형 DNA는 94°C에서 1분, 47°C에서 30초, 72°C 1분의 조건으로 수행하였다. DNA는 0.8% 아가로스겔에서 전기영동을 통해 분석하였다. DNA 분자 마커는 fragment의 길이를 측정하기 위해 사용하였다.

결과 및 고찰

B.t. subsp. aizawai CAB109의 생물활성 검정

국내 토양에서 분리하여 충남대학교 응용생물학과 해충제어실험실의 보관 중인 *B.t. subsp. aizawai* CAB109 균주는 담배거세미나방에 대해 그 활성의 일부가 조사되어 보고되었다(Kim *et al.*, 2008). *B.t. subsp. aizawai* CAB109균주의 다른 해충으로의 기주범위 및 생물활성을 확인하기 위해 실험실에서 사육중인 나비목 해충인 배추좀나방, 파밤나방, 파리목 해충인 빨간집모기와 이집트소금기 그리고 야외충인 미국흰불나방, 암청색줄무늬나방, 쌀바구미를 채집하여 총 8종에 대한 살충 활성을 검정하였다(Table 2). 검정 결과 파밤나방, 담배거세미나방에는 100%로의 살충력을 보였으며 파리목 해충

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

| Cry gene | primer sequence | PCR product(bp) |
|-----------|--|-----------------|
| Cry1Aa | 5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC3' | 782 |
| Cry1Ab | 5'TCGAATTGAATTTGTTCC3' | 238 |
| Cry1Ac | 5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3' | 550 |
| Cry1B | 5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3' | 902 |
| Cry1C | 5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTTC3' | 288 |
| Cry1D | 5'GGTACATTTAGATGTTTACAGCCAC3' | 465 |
| Cry1E | 5'CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG3' | 961 |
| Cry1F | 5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3' | 383 |
| Cry13' | 5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC3' | - |
| Cry1G5' | 5'ATATGGAGTGAATAGGGGG3' | 235 |
| Cry1G3' | 5'TGAACGGCGATTACATGC3' | - |
| Cry1H5' | 5'GCTGTCTACCATGATTCGCTTG3' | 1584 |
| Cry1i3' | 5'CAGTGCAGTAACCTTCTCTTGC3' | - |
| Cry25' | 5'CAGATACCCTTGCTGGTGTA3' | 1073 |
| Cry23' | 5'ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG3' | - |
| Cry9A5' | 5'GTTGATACCCGAGGCACA3' | 571 |
| Cry9A3' | 5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT3' | - |
| Cry9B | 5'TCATTGGTATAAGAGTTGGTCTATAGAC3' | 402 |
| Cry9C | 5'CTGCTCCCTTTCAATCC3' | 306 |
| Cry9D | 5'CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT3' | 1917 |
| Cry9BCD3' | 5'CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC3' | - |

Table 2. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB109 isolates against lepidopteran, dipteran and coleopteran larva

| <i>B.t.</i> strain | Tested larvae | | | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------|
| | Lepidopteran | | | | Dipteran | | Coleopteran |
| | <i>Plutella xylostella</i> | <i>Spodoptera litura</i> | <i>Spodoptera exigua</i> | <i>Arcte coerulea</i> | <i>Culex pipiens pallens</i> | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Sitophilus oryzae</i> |
| <i>B.t.</i> CAB109 | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - | - |

+++; Highly effective and 100% lethality; ++; Effective, and 80-99% lethality; +; Lowly effective and 50-79% lethality; -: Not effective and 0-49% lethality.

인 빨간집모기와 이집트숲모기, 딱정벌레목인 쌀바구미에는 살충활성을 나타내지 않았다. 또한, 나비목해충인 배추좀나방, 암청색줄무늬나방에 대해 높은 독성 효과를 나타내었다. 위 균주가 독성을 보이는 해충 중에서 난방제 해충으로 알려져 있는 파밤나방과 담배거세미나방에 대해 독성을 보이는 것을 확인하고 좀 더 정확한 살충활성을 확인하기 위해 담배거세미나방과 파밤나방 두 종 나비목해충에 대한 반수치사농도를 확인하였다(Table 3, 4). *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109균주의 담배거세미나방에 대한 LC₅₀값은 1.3x10⁵(cfu/ml) 나타났으며 파밤나방은 1.8x10⁴(cfu/ml)의 값을 보였다.

상품화된 제품과의 비교 실험

담배거세미나방과 파밤나방에 높은 활성을 보인 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주의 살충활성 정도를 확인하기 위해, 시판중인 *B.t.* subsp. *aizawai* TB-WP제품과 SC제품을 배양하여 이들 간의 반수치사농도(LC₅₀)값을 조사하였다. *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109, *B.t.* subsp. *aizawai* TB-WP제품, SC제품은 담배거세미나방 2령충에 대해 각기 1.3x10⁵, 2.3x10⁶ 그리고 5.2x10⁵(cfu/ml)의 반수치사농도를, 파밤나방에 대해서는 각각 1.8x10⁴, 1.3x10⁶, 1.5x10⁶의 반수치사 농도 값을 나타내어 두 종 해충 모두에 있어 시험한 기존 *B.t.* 미생물제제들보다 살

Table 3. Comparative toxicity of *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109, TB-WP and SC products against the 2nd larva of *Spodoptera litura*

| Strain | N | Slope+SE | LC ₅₀ (cfu/ml) |
|--------------------|-----|-------------|---------------------------|
| <i>B.t.</i> CAB109 | 120 | 1.567±0.102 | 1.3×10 ⁵ |
| TB-WP | 120 | 1.519±0.144 | 2.3×10 ⁶ |
| SC | 120 | 1.527±0.101 | 5.2×10 ⁵ |

Table 4. Comparative toxicity of *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109, TB-WP and SC products against the 2nd larva of *Spodoptera exigua*

| Strain | N | Slope+SE | LC ₅₀ (cfu/ml) |
|--------------------|-----|-------------|---------------------------|
| <i>B.t.</i> CAB109 | 120 | 1.800±0.110 | 1.8×10 ⁴ |
| TB-WP | 120 | 1.734±0.107 | 1.3×10 ⁶ |
| SC | 120 | 1.271±0.083 | 1.5×10 ⁶ |

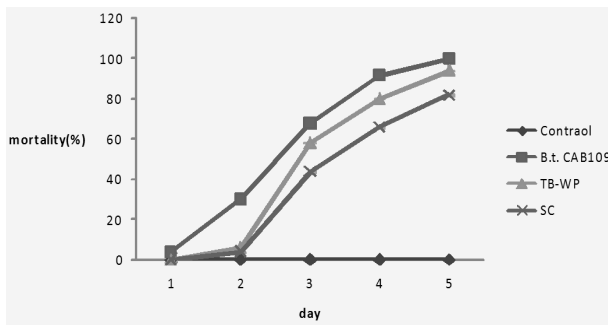


Fig. 1. Mortality ratio of *S. litura* 2nd larva at the same *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109's LC₉₅ concentrations of insecticide treatment.

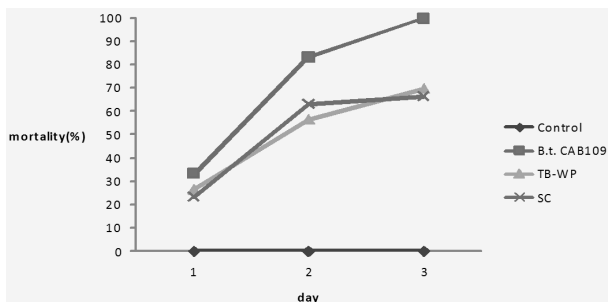


Fig. 2. Mortality ratio of *S. exigua* 2nd larva at the same *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109's LC₉₅ concentrations of insecticide treatment.

충효과가 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Table 3 & 4).

담배겨세미나방과 파밤나방에 대한 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109, TB-WP제품, SC제품의 정확한 생물활성과 속효성 정도를 비교하기 위해, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109의 LC₉₅값으로 대조균주인 두 기존 생물농약의 농도를

Table 5. Mortalities of *Spodoptera exigua* against *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 and TB-WP product with each 3 repeated applications for 3 weeks with 7 day intervals at Jindo

| Type | Mortalities (%) | | |
|--------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | After 1st week | After 2nd week | After 3rd week |
| <i>B.t.</i> CAB109 | 82.00±9.60 | 77.76±8.66 | 51.87±17.01 |
| TB-WP | 36.00±11.50 | 43.27±12.80 | 25.80±16.79 |
| P | 0.006** | 0.018* | 0.132NS |

* P<0.05, ** P<0.0001, NS statistically not significant; t-test in SPSS 17.0.

Table 6. Decrease damages of spring onions infested by *Spodoptera exigua* by *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 and TB-WP product with each 3 repeated applications for 3 weeks with 7 day intervals at Jindo

| Type | Decrease damages (%) | | |
|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | After 1st week | After 2nd week | After 3rd week |
| <i>B.t.</i> CAB109 | 19.33±5.77 | 32.67±5.77 | 26.00±0.00 |
| TB-WP | 19.33±15.27 | 36.00±0.00 | 32.67±5.77 |
| P | 1.000 ^{NS} | 0.423 ^{NS} | 0.184 ^{NS} |

* P<0.05, ** P<0.0001, NS statistically not significant; t-test in SPSS 17.0.

동일하게 처리한 후 확인해 본 결과 *B.t. aizawai* CAB109가 기존 생물농약보다 고독성을 나타내었으며, 실험 후 2일 차부터 다른 생물농약에 비해 더 빠른 살충효과를 보이는 것을 확인 할 수 있다(Fig. 1 & 2).

포장실험

생물검정 결과를 토대로 파 포장에서의 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주 및 기존 생물농약인 TB-WP 제품간의 파밤나방에 대한 살충 효과 및 피해염율을 비교 하였다 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주는 처리 후 1, 2, 3주차에 82.00±9.60%, 77.76±8.66%, 51.87±17.01%의 살충율을 보여 같은 기간 동안 36.00±11.50%, 43.27±12.80%, 25.80±16.79%의 살충율을 보인 TB-WP 제품보다 살충 효과가 뛰어난을 확인할 수 있으며(Table 5), *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109와 TB-WP 제품 간에 처리 후 1주와 2주차의 살충효과간의 차이 또한 통계학적으로도 유의성이 있는 것으로 나타났다. 하지만 3주차에는 살충율에 있어 차이를 보였지만, 이들 간의 차이는 통계학적으로는 유의성이 없는 것으로 나타났다.

두 미생물 균주를 처리한 후 파 잎의 피해흔을 3주간 조사한 결과, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109은 19.33±

5.77%, $32.67 \pm 5.77\%$, $26.00 \pm 0.00\%$ 로 나타났고, TB-WP 제품은 $19.33 \pm 15.27\%$, $36.00 \pm 0.00\%$, $32.67 \pm 5.77\%$ 로 나타나 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 TB-WP 제품보다 파밤나방에 의한 피해가 적은 것을 확인 할 수 있었으나 (Table 6), 통계학적유의성은 없는 것으로 확인되어 살충율에 차이를 보인 두 미생물 균주 처리도 피해엽 비율에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다.

두 실험결과는 실험실에서 뿐만 아니라 재배 포장에서도 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109가 파밤나방에 우수한 살충활성을 나타내어 방제에 이용될 수 있는 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다. 살충 효과에서 보면, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109와 TB-WP 제품 모두 3차 실험에서 살충력이 떨어지는데 이는 피해를 받은 기주가 지속적으로 많아지면서 약을 살포하여도 약이 묻을 기주가 적었기 때문인 것으로 생각된다. Jin *et al.*(2009)에 의하면 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 다른 *B.t.* 미생물 농약 뿐만 아니라 화학농약보다도 더 효과가 좋았던 것을 확인할 수 있다. 그리고 화학농약과의 교호처리에서도 다른 *B.t.* 보다 높은 방제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Plasmid DNA 패턴

실내와 야외포장실험을 통해 담배거세미나방과 파밤나방에 살충활성을 보인 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109가 신규 균주 가능성여부를 확인하기 위해, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주와 대조균주로서 *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133 균주의 plasmid DNA 패턴을 확인하였다. 실험에서 담배거세미나방과 파밤나방에 활성이 있는 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109와 대조균주 HD-133의 전체 플라스미드 패턴을 분석한 결과, 같은 혈청형임에도 불구하고 다른 패턴의 플라스미드를 가지고 있었는데, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 5개, *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133은 6개의 플라스미드를 포함하고 있는 것으로 조사 되었다. 또한 *B.t. aizawai* CAB109 균주는 HD-133에 비해 2개의 플라스미드가 다른 곳에 위치해 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 결과를 토대로 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주는 이미 보고되어 사용하는 있는 대조균주와 동일하지 않은 신규균주임을 확인할 수 있었다.

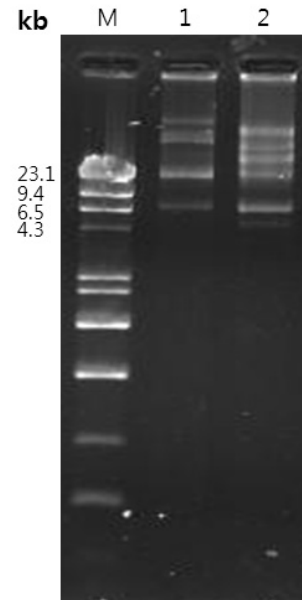


Fig. 3. Plasmid DNA analysis of *B.t.* CAB109 and *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133 on a 0.7% agarose gel. Lane M: Lambda DNA digested with *Hind*III; Lane 1, *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109; Lane 2, *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133.

B.t. subsp. *aizawai* CAB109의 Cry gene

일반적으로 Cry1, Cry2, Cry9 계열의 Cry gene이 나비목해충에 활성이 있다고 알려져 있다. 이 중에서 특히 Cry1C가 파밤나방과 담배거세미나방에 매우 높은 활성을 보이고 Cry 1E, Cry 1F, Cry9C가 파밤나방과 담배거세미나방에 독성을 보이고 Cry1D는 담배거세미나방에 독성을 보인다고 알려져 있다(Porcar *et al.*, 2000). 파밤나방과 담배거세미나방에 독성을 보이는 실험에 사용된 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 균주에 포함되어 있는 Cry gene을 확인하기 위해 plasmid DNA를 PCR 수행한 결과, 담배거세미나방과 파밤나방에 대해 활성을 보이지 않은 *B.t. aizawai* HD-133은 Cry 1Aa, Cry1Ab만을 포함하고 있고 *B.t. aizawai* CAB109는 Cry1Aa, Cry1Ab이외에도 Cry1C, Cry1D를 포함하고 있는 것을 확인할 수 있다(Fig. 4). 본 실험에서 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 *Spodoptera* 속에 속하는 나비목유충에 활성이 높다고 알려져 있는 Cry1C, Cry1D를 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Porcar *et al.*, 2000, Hernandez-Martinez *et al.*, 2008, Luo, *et al.*, 1998). 하지만 나비목해충에 활성이 있다고 알려진 다른 Cry gene은 포함하지 않은 것으로 확인됐다. 또한, 딱정벌레목이나 파리목에 살충활성을 나타내는 것으로 알려진 Cry4, Cry8,

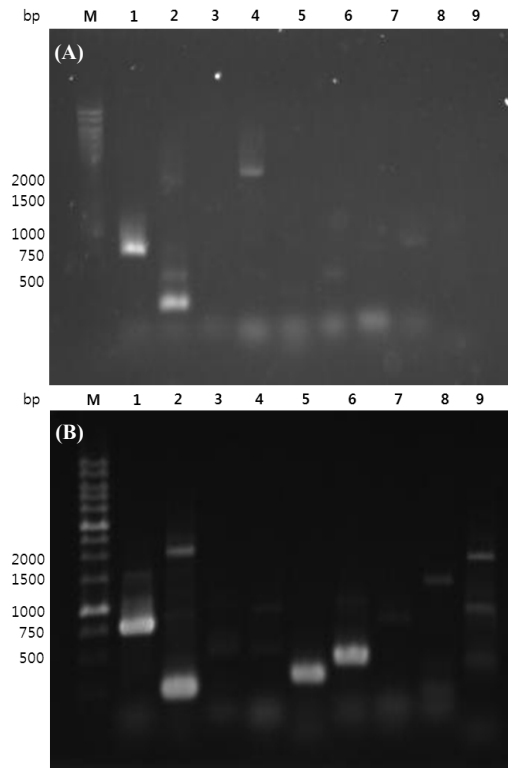


Fig. 4. Agarose gel (0.7%) electrophoresis of PCR products obtained with primers. PCR products analysis of *B.t.* subsp. *aizawai* HD-133 (A) and *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 (B). M: marker; 1: Cry1Aa; 2: Cry1Ab; 3: Cry1Ac; 4: Cry1B; 5: Cry1C; 6: Cry1D; 7: Cry1E; 8: Cry1F; 9: Cry1G.

Cry 11과 같은 Cry gene은 확인되지 않아, 살충 활성을 보이지 않은 것으로 여겨진다(Wasano *et al.*, 2000, Hughes *et al.*, 2005). *B.t.* subsp. *aizawai* TB-WP제품 역시 나비목에 살충효과를 나타낸다고 알려져 있는 Cry1C, Cry1D 유전자를 가지고 있을 뿐만 아니라 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 포함하고 있지 않은 Cry2 gene까지 포함하고 있는 것으로 밝혀져 있으나(Kim *et al.*, 2000), 이번 연구에서 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109 보다 생물활성이 낮은 이유는 내독소단백질내에서 Cry1C, Cry1D가 차지하는 비율이 다르거나 Cry gene이 유전적으로 다른 염기서열로 이루어져 있기 때문으로 생각된다(Masson *et al.*, 1998).

이상의 실험결과를 통해, 새롭게 분리한 *B.t.* subsp. *aizawai* CAB109는 파밤나방과 담배거세미나방에 대해 기존에 시판되어 방제에 이용되고 있는 두 미생물살충제보다 높은 살충활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었으며, 파 재배지에서의 야외포장실험 결과에서도 방제 효과를 보여주었다. 또한, 플라스미드 DNA와 Cry gene

을 PCR로 확인한 결과에서도 두 종 해충의 방제를 위해 사용하고 있는 기존 미생물제제의 균주와 다른 유전 양상이 확인되어, 추후 위의 결과를 토대로 추가적인 생물검정과 Cry 유전자의 염기서열 분석을 통해 분자 생물학적으로 새로운 균주임을 확인함과 동시에, 신규 미생물살충제로서의 가능성을 검토할 계획이다.

사 사

본 논문은 충남대학교 학술연구비 지원으로 수행한 결과입니다.

Literature Cited

- Ahn, S.B., I.S. Kim, W.S. Cho, M.H. Lee and K.M. Choi. 1989. The occurrence of the crop insect pests from Korea in 1988. *Korean J. Appl. Entomol.*, 28(4): 246-253.
- Bae, S.D. 1999. Leaf characteristics of leguminous plants and the biology of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius: I. The larval development and leaf feeding amount. *Korean J. Appl. Entomol.*, 38(3): 217-224.
- Bae, S.D., B.R. Choi, Y.H. Song and H.J. Kim. 2003. Insecticide susceptibility in the different larva of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) collected in the soybean fields of Milyang, Korea. *Korean J. Appl. Entomol.*, 42(3): 225-231.
- Bae, S.D., K.B. Park and Y.J. Oh. 1997. Effect of temperature and food source on the egg and larval development of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius. *Korean J. Appl. Entomol.*, 36(1): 48-54.
- Bechtel, D.B. and L.A. Bulla, Jr. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127(3): 1472-1481.
- Choi, J.Y., H.S. Kim, B.R. Jin, K.Y. Seol, H.Y. Park and S.K. Kang. 1996. Pathogenicity and production of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Korean J. Appl. Entomol.*, 35(3): 228-231.
- Choi, S.Y., M.S. Cho, T.H. Kim, J.S. Kim, S.K. Pack, Y.N. Youn and Y.M. Yu. 2008. Bioactive characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CAB133 isolated from domestic soil. *Korean J. Appl. Entomol.* 47(2): 175-184.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Rie, J.V., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D.H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, 62(3): 807-813.
- Feitelson, J.J., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology.* 10: 271-275.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge University Press. London. 19-47.

- Garad, G.P., P.R. Shivpuje and G.G. Bilapate. 1984. Life fecundity tables of *Spodoptera litura* Fabricius on different hosts. Proc. Indian Acad. Sci. (Anim Sci.). 93: 29-33.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol., 37: 615-636.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and V. Francis. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. J. Biol. Chem., 270: 27277-27282.
- Goh, H.G., S.G. Lee, B.P. Lee, K.M. Choi and J.H. Kim. 1990. Simple mass-rearing of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. Korean J. Appl. Entomol. 29(3): 180-183.
- Goh, H.G., J.D. Park, Y.M. Choi, K.M. Choi and I.S. Park. 1991. The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) and its occurrence. Korean J. Appl. Entomol. 30(2): 111-116.
- Hernandez-Martinez, P., Ferre, J. and Escriche, B. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. J. Inver. Pathol. 97(3): 245-250.
- Hughes, P.A., M.M. Stevens, H.W. Park, B.A. Federici, E.S. Dennis and R. Akhurst. 2005. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. Journal of invertebrate pathology., 88(1): 34-39.
- Jin, D.Y., M.S. Cho, S.Y. Choi, Y.N. Youn, I.C. Hwang and Y.M. Yu. 2008. Selection of crop protectant for friendly environmental control of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Korean J. Appl. Entomol., 47(1): 45-50.
- Jin, D.Y., S.K. Paek, J.S. Kim, S.Y. Choi, C. Park, T.H. Kim, N.Y. Jin, S.Y. Jung, Y.N. Youn and Y.M. Yu. 2009. Environment-friendly control of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Noctuidae: Lepidoptera) to reduce insecticide use. Korean J. Appl. Entomol., 48(2): 253-261.
- Kil, M.R., D.A. Kim, S.K. Paek, J.S. Kim, S.Y. Choi, D.Y. Jin, Y.N. Youn, I.C. Hwang, M. Ohba and Y.M. Yu. 2008. Characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* CAB167 isolate against mosquito larva, Korean J. Appl. Entomol., 47(4): 457-465.
- Kim, D.A., J.S. Kim, M.R. Kil, S.K. Paek, S.Y. Choi, D.Y. Jin, Y.N. Youn, I.C. Hwang and Y.M. Yu. 2008. Characterization of new *Bacillus thuringiensis* isolated with bioactivities to tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), Korean J. Appl. Entomol., 47(1): 87-93.
- Kim, C.H. and H.Y. Shin. 1987. Studies on bionomics and control of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius in southern part of Korea. J. Inst. Agr. Res. Util. Gyeongsang National Univ. 21: 105-122.
- Kim, H.S., M.S. Li, and J.Y. Roh. 2000. Characterization of crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* NT0423 isolate from Korean sericultural farms. Int. J. Indust. Entomol., 1(2): 115-122.
- Kurstak, E. 1982. Microbial and Viral Pesticides. pp. 35-74. Marcel-Dekker, New York.
- Lecadet, M.M. and D. Martouret. 1967. The enzymatic hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* berliner crystals, and the liberation of toxin fractions of bacterial origin by the cycle of *Pieris brassicae* (Linnaeus). J. Invertebr. Pathol. 7: 105-108.
- Luo, K., D. Banks and M.J. Adang. 1998. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. Appl. Environ. Microbiol. 65(2): 457-464.
- Masson, L., M. Erlandson and M. Puzstai-Carey. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. Applied and environmental microbiology., 64(12): 4782-4788.
- Park, H.W., H.S. Kim, D.W. Lee, Y.M. Yu, B.R. Jin and S.K. Kang. 1995. Expression and synergistic effect of three types of crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 214(2): 602-607.
- Porcar, M. and V. Juarez-Perez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS microbiology reviews., 26(5): 419-432.
- Porcar, M., C. Martínez and N. Clara. 2000. Host range and gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains toxic towards *Spodoptera exigua*. Entomol. Exp. Appl. 97(3): 339-346.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse logprobit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM. Ser. Ent. Med. et Parasitol. 22: 117-121.
- Schnepf, H.E. 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins: Regulation, activities and structural diversity. Curr. Opin. Biotech. 6(3): 305-312.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol., 39: 47-79.
- Tamez-Guerra, P., A.A. Iracheta, B. Pereyra-Alferez, L.J. Galan-Wong, R. Gomez-Flores, R.S. Tamez-guerra, and C. Rodriguez-Padilla. 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. J. Invertebr. Pathol. 8: 7-18.
- Wasano N., C. Yasunaga-Aoki, R. Sato, M. Ohba, T. Kawarabata and H. Iwahana. 2000. Spherical parasporal inclusions of the lepidoptera-specific and coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains: A comparative electron microscopic study. Current Microbiol. 40(2): 128-131.
- Yamamoto, T. and R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Ades taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103: 414-421.
- Zheng, S.J., B. Henken, R.A. de Maagd, A. Purwito, F.A. Krens and C. Kik. 2005. Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner) in transgenic *Bt*-shallots (*Allium cepa* L.). Transgenic Research, 14: 261-272.

(Received for publication November 21 2009;
revised November 30 2009; accepted December 5 2009)