

청동풍뎅이에서 분리한 *Bacillus thuringiensis* CAB530 균주의 살충활성 및 분자학적 특성

범종일¹ · 서미자¹ · 유 주 · 윤영남¹ · 유용만^{1*}

설록차연구소, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

(2011년 5월 31일 접수, 2011년 6월 13일 수리)

Insecticidal Activity and Molecular Characteristics of *Bacillus thuringiensis* CAB530 Isolated from *Anomala albopilosa* (Rutelidae: Coleoptera)

Jong Il Beom¹, Mi Ja Seo¹, Joo You, Young Nam Youn¹ and Yong Man Yu^{1*}

Sulloccha Research Institute, 1241, Seogwang-ri, Andeok-myeon, Seogwipo-si, Jeju-do, 699-924, Korea, ¹Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

Abstract

Bacillus thuringiensis CAB530 was isolated from dead *Anomala albopilosa* (Rutelidae: Coleoptera) and soil of green tea field, and confirmed its insecticidal activities. CAB530 isolate showed a high insecticidal activity against the beet armyworm among the many lepidopteran insects that are difficult to control. LC₅₀ value of CAB530 isolate against the second larva of *Spodoptera exigua* was 1.49×10^4 spore concentration (cfu/ml). SDS-PAGE result of insecticidal toxin protein of CAB530 isolate showed a band at 130 kDa that is similar pattern with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* that took insecticidal activity against *S. exigua*. Otherwise, the crystal protein of the CAB530 isolate was conformed at 65 kDa level after 30 minute of incubation in *S. exigua* midgut juice. Six crystal genes (cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry1F and cryII) were identified by PCR. It different from genes of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Crystal shape and pattern of toxin protein was similar with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, however, insecticidal activity and PCR result of CAB530 isolate was similar with *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*.

Key words *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera exigua*, *Anomala albopilosa*, Insecticidal toxin protein

서 론

*Bacillus thuringiensis*는 질병에 걸린 누에로부터 Ishiwata (1901)에 의해서 처음 분리가 되었다. *B. thuringiensis*는 자연 환경에서 아주 흔하게 존재하고 있으며 토양, 창고, 침엽수와 활엽수의 나뭇잎 표면, 그리고 잔디나 곤충의 서식처에서 손쉽게 분리 할 수 있다(Ben-Dov *et al.*, 1997; Bernhard *et al.*, 1997; Ichimatsu *et al.*, 2000; Uribe *et al.*, 2003;

Vilas-Bôas and Lemos, 2004). 이러한 장소 중에서 *B. thuringiensis*는 토양에 가장 풍부하게 존재한다(Dai *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1990; Ohba *et al.*, 2000). 현재까지 200개 이상의 살충성 결정단백질의 유전자는 연구되었고 염기서열이 밝혀져 있으며 아미노산의 상동성을 기초로 하여 cry 유전자의 32개 group과 2개의 cyt 유전자 group으로 동정이 되었다(Crickmore *et al.*, 1998).

*B. thuringiensis*는 그람 양성이고 내생포자를 형성하는 세균으로 parasporal inclusion을 형성하여 생물학적인 방제 인자로 널리 사용되고 있다. 다양한 *B. thuringiensis* 균주는 나비

*연락처 : Tel. +82-42-821-5763, Fax. +82-42-823-8679

E-mail: ymyu@cnu.ac.kr

목, 파리목, 딱정벌레목, 노린재목, 벌목 그리고 털이목의 유충에 대해 활성을 가지고 있는 각각 다른 parasporal inclusion을 형성한다(Höfte and Whiteley, 1989; Feitelson *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998). 또한 *B. thuringiensis*의 몇몇 균주는 선충류와 원생생물에 독성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다(Edwards *et al.*, 1990; Feitelson *et al.*, 1992). 많은 균주의 결정성독소단백질은 아미노산의 서열과 살충 특이성을 기반으로 동정이 된다(Höfte and Whiteley, 1989).

감수성인 해충의 유충이 *B. thuringiensis*의 crystal-spore 혼합액을 섭식하였을 때 crystal δ -endotoxin은 중장의 알칼리 환경에서 소화가 되어 활성 독소가 된다. 활성 독소는 중장 세포의 표면에 있는 수용체에 결합되고 막으로 삽입되어 세포 내외의 전위차를 방해하는 구멍을 형성하며 그렇게 함으로써 중장의 세포 안쪽의 삼투성 용해를 유도하게 된다(Schnepf *et al.*, 1998).

*B. thuringiensis*에서 생산되는 살충성 결정단백질은 25-140kDa의 큰 분자량을 가지고 있다(Céron *et al.*, 1995; Bernhard *et al.*, 1997). *B. thuringiensis*균주 간에는 parasporal inclusion의 크기와 형태가 서로 다르게 나타난다. 5개의 parasporal inclusion의 형태학적인 차이점으로 bipyramidal crystal은 *Cry1* 살충성 결정단백질과 관계가 있으며(Bechtel *et al.*, 1976), cuboidal crystal은 *Cry2* 살충성 결정단백질과 관계가 있는 것으로 보고되었다(Yamamoto and McLaughlin, 1981). Square, flat형태의 crystal은 *cry3* 결정성독소단백질과 *Cyt* 결정성독소단백질과 관계가 있고(Herrnstadt *et al.*, 1986), 막대형태의 crystal은 *Cry4* 결정성독소단백질과 관계가 있다(Ibarra and Federici, 1986).

파밤나방(*Spodoptera exguia*)은 나비목(Lepidoptera), 밤나방과(Noctuide), *Spodoptera*속에 속하는 광폭식성의 난방제 해충으로 전 세계적으로 분포하고 있는 중요한 해충이다. 파밤나방은 연간 보통 4~5회 발생하고, 남부지방의 경우 6월 상순부터 나타나기 시작하여 11월 하순까지 발생하는데 7월 하순에서 10월 하순에 성충의 발생이 많으며 최성기는 8월 중순경으로 알려져 있다(Goh *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1995a, b; Park *et al.*, 1991). 우리나라에서는 1986년에 전남 진도에서 피해가 확인된 이후(Goh *et al.*, 1993a, b; Park *et al.*, 1991), 1998년부터 전국적으로 대량 발생하여 피해가 심각하다(Ahn *et al.*, 1989). 현재 화학살충제를 사용하여 파밤나방을 방제하고 있지만(Liburud *et al.*, 2000), 현재 시판되는 대부분의 화학살충제에 대해서 높은 저항성 개체의 출현으로 방제가 어려우며, 더욱이 노령 유충으로 갈수록 화학살충제에 대해 확연하게 낮은 감수성을 나타내기 때문에 화학살충제

를 대신할 수 있는 효과적인 방법 중 하나로 *B. thuringiensis*를 기반으로 하는 미생물농약을 사용하기 시작하였다.

본 논문에서는 딱정벌레목인 청동풍뎅이에서 분리 선발한 *B. thuringiensis* CAB530균주가 나비목 해충, 특히 파밤나방에 대해서 살충효과가 우수하게 나타나, 이 균주의 살충활성과 형태적 특성, 결정성독소단백질과 plasmid DNA 패턴 분석 등 분자학적인 특성을 알아보고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

B. thuringiensis 균주의 분리

B. thuringiensis 균주를 분리하기 위하여 제주도 서귀포시의 오설록 녹차밭에서 서식하는 청동풍뎅이의 사체와 경상북도 안동시 풍천면의 마밭의 토양을 수집하였다. 분리는 녹차밭에서 수집한 청동풍뎅이 유충사체를 해부하여 중장을 채취하고 멸균된 시험관에 증류수(0.9 ml)를 넣고 강하게 교반하였다. 포자를 형성시키지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65°C 항온수조에서 30분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 사체조각을 가라앉히고 상층액을 10³까지 희석하여 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 균주의 증식은 27°C로 배양기에서 3~4일간 배양 후에 형성된 콜로니들은 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 결정성독소단백질을 형성하는 균주를 선발하였다. *B. thuringiensis* 균주의 분리는 Ohba and Aizawa(1978) 방법을 사용하였다.

시험곤충

본 실험에서 사용된 파밤나방은 충남대학교 생물적 해충제어 실험실에서, 온도 25±2°C, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건으로 인공사료를 이용하여 누대 사육하면서 사용하였다. 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 공급하였다. 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)과 배추좀나방(*Plutella xylostella*) 농촌진흥청 농업기술과학원으로부터 분양받았으며, 파밤나방과 같은 조건에서 누대 사육하면서 사용하였다. 청동풍뎅이(*A. albopilosa*)는 제주도의 오설록 녹차밭에서 채집을 하여 실험에 사용하였으며, 갈색거저리(*Allomyrina dichotoma*)와 장수풍뎅이(*Phyllostreta striolata*)이 유충은 곤충사육사에서 구입을 하여 실험에 사용하였다. 배추벼룩잎벌레(*Sitophilus oryzae*)는 대전 신탄진의 비닐하우스농가에서 채집하여 실험에 이용하였다.

살충활성 검정 및 반수치사농도

선발된 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient Agar배지에 접

중하고 27°C에서 5일 동안 배양 후 결정성독소단백질이 형성 되었을 때 균을 모아 원심분리 하였다. 상층액은 7.25×10^8 (cfu/ml)에 해당하는 균액으로 만들어서 생물검정에 사용하였다. 파밤나방에 대한 살충활성 검정은 spore-crystal mixture 희석액 100 μ l를 0.5 g의 인공사료에 첨가하여 2령 유충을 5마리씩 petri dish에 넣고 120시간 동안 사충률을 조사하였다. 파밤나방에 대한 살충활성을 비교하기 위해 실험실에 보유하고 있는 파밤나방에 살충활성이 높은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB100균주와 *B. thuringiensis* sunsp. *aizawai* KB098균주를 비교균주로 사용하였다. 담배거세미나방에 대한 살충활성 검정은 파밤나방과 같은 방법으로 수행을 하였고 72시간동안 사충률을 조사하였다. 배추좀나방에 대한 살충활성 검정은 2령 유충을 대상으로 배춧잎을 이용한 엽침지법(Tabashnik *et al.*, 1990, Shelton *et al.*, 1993)을 수행하였다. 잎 디스크(직경 5 cm)를 20초간 침지하였고, 실온에서 1시간동안 음건하였다. 대조구는 잎 디스크를 증류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 디스크는 필터페이퍼를 깔아놓은 페트리디쉬에 옮긴 후 유충 10마리씩을 넣고 48시간동안 치사율을 조사하였다. 청동풍뎡이와 장수풍뎡이 유충에 대한 살충활성 검정은 insect breeding dish에 멸균된 토양 100 g에 spore-crystal mixture 희석액을 20 ml를 첨가하고 각각의 유충을 5마리씩 넣고 148시간동안 치사율을 조사하였다. 갈색거저리에 대한 살충활성 검정은 insect breeding dish에 밀기울 100 g당 15 ml을 spray로 분무하여 음건한 후 10마리씩 넣고 148시간동안 치사율을 조사하였다. 배추벼룩 잎벌레에 대한 살충활성 검정은 insect breeding dish에 배추좀나방의 실험방법과 동일하게 수행하였다.

SDS-PAGE

실험에 사용된 *B. thuringiensis* 균주를 Nutrient Agar배지에 접종하고 27°C에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로

autolysis가 일어나는 것을 확인한 후, PBS buffer를 사용하여 원심튜브에 15,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물은 washing buffer I(500 mM NaCl, 2% Triton X-100)으로 3번, washing buffer II(500 mM NaCl)로 2번 세척하였다. 세척된 결정성독소단백질은 멸균수를 첨가한 후 -20°C에 보관하였다. 일반적 소화 실험을 위하여 *B. thuringiensis*의 결정성독소단백질과 파밤나방의 중장액은 7:3 μ l의 비율로 혼합하여 37°C에서 20분간 소화를 시켰다. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 일부 수정하여 12% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5% Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

PCR analysis

B. thuringiensis 분리균주의 결정성독소단백질의 유전자를 동정하기 위하여 gene-specific primer set(Table 1)를 사용하였다. PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000™(BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP등이 함유된 premix(Bioneer)에 주형 DNA 1.0 μ l, primer set 각각 1.0 μ l, 증류수 17 μ l를 혼합하여 최종부피를 20 μ l로 하여 수행하였다. PCR condition은 94°C에서 5분 총 30cycle로 94°C에서 1분, annealing 54°C에서 45초, 72°C에서 1분, 72°C에서 4분으로 진행하여 PCR product를 생산하였으며 각 실험마다 대조균을 만들었다. PCR 산물은 \times 6 Loading buffer와 \times 6 Loading star를 혼합하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다.

Plasmid DNA 추출

B. thuringiensis CAB530균주로부터 plasmid DNA를 추출하기 위하여 alkaline lysis 방법(Jensen *et al.*, 1995; Porcar *et al.*, 1999)을 이용하였다. Ampicillin이 60 μ l/ml로 첨가된 LB배양액에 균의 colony를 접종하여 37°C에서 진

Table 1. Lists of crystal gene-specific primers for PCR analysis

Cry gene	Primer sequences	Size of product (bp)
<i>cry1Aa</i>	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC3'	782
<i>cry1Ab</i>	5'TCGAATTGAATTTGTTCC3'	238
<i>cry1C</i>	5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTTC3'	288
<i>cry1D</i>	5'GGTACATTTAGATGTTCCAGCCAC3'	465
<i>cry1F</i>	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3'	383
<i>cry13'</i>	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC3'	-
<i>cry35'</i>	5'CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC3'	589
<i>cry33'</i>	5'CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT3'	-

탕 배양한다. 2 ml micro tube에 균이 완전히 자란 배양액을 1.5 ml 담고 15,000 rpm으로 1분간 원심 분리하여 균을 침전시킨다. 상층액을 완전히 제거하고 남은 균 용액을 다시 넣어 침전시킨 후 solution I(50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA)을 넣고 진탕하여 부유시킨다. 그 후 solution II(0.2M NaOH, 1% SDS)를 첨가하고 뚜껑을 닫은 후 시험관을 아래위로 천천히 혼합하여 상온에 5분간 둔다. Solution III(5M potassium acetate 60 ml, glacial acetate acid 11.5 ml, distilled water 28.5 ml)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음 속에 10분간 보관한 후 15,000 rpm, 4°C, 10분 원심 분리하여 상층액을 깨끗한 micro tube에 옮겨 담는다. 상층액의 0.6~1배 부피의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 상온에 20분정도 둔 다음 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 완전히 제거한다. RNase A가 50 µg/ml 함유된 TE, pH 8.0 용액 20~100 µl를 가하여 DNA 침전물을 녹이고 37°C에서 20~30분간 방치한다. 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)용액을 넣고 진탕한 다음 2분간 원심분리하고 상층액을 새로운 micro tube로 옮긴다. 이 과정을 2~3번 반복하여 단백질을 제거한다. 0.1 부피의 3 M sodium acetate, pH 5.2와 2.5부피의 순수한 에탄올을 첨가하고 -20°C에 20분 이상 두어 DNA를 침전시킨다. 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 완전히 제거한 다음 70% 에탄올을 첨가하여 다시 원심분리 하여 세척한다. 상층액을 완전히 제거하고 5분정도 건조시킨 다음 TE buffer, pH 8.0 용액을 넣어 녹인 후 사용한다.

결과 및 고찰

*Bacillus thuringiensis*의 분리

토양으로부터 *B. thuringiensis* 균주의 분리는 오래전부터 시도되어 왔으며 세계 각국에서 진행되어지고 있다. 특히 일본의 전국 토양 샘플에서 약 1%의 *B. thuringiensis* 균주를 분리하였으며 미국에서도 유사한 비율로 분리되어 보고되고 있다(Martin and Travers, 1989; Ohba and Aizawa, 1978). 또한 곤충의 사체에서도 *B. thuringiensis* 균주가 분리되어

보고가 되고 있다.

본 실험실에서는 딱정벌레목에 살충효과를 나타내는 균주를 분리하기 위하여 청동풍뎡이가 서식하는 곳에서 집단적으로 죽어있는 유충과 토양을 채취하여 새롭게 *B. thuringiensis* 균주를 분리하였다. 제주도의 녹차밭에서 6마리의 죽은 청동풍뎡이로부터 중장을 분리하였고 31개의 녹차밭 토양을 채집하였다. *B. thuringiensis* 균주를 형태적으로 분리하기 위하여 Nutrient agar plate에서 형성된 191개의 콜로니 중에서 위상차 현미경으로 확인 한 *B. thuringiensis* 균주는 95로 나타났다(Table 2).

B. thuringiensis CAB530균주의 선발

본 실험에서 분리된 총 95개의 *B. thuringiensis* 균주에서 결정성 독소단백질의 형태학적인 특성과 예비 살충활성 시험을 통하여 6개의 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 Table 3에서 볼 수 있는 담배겨세미나방, 파밤나방 그리고 배추좀나방 등 3종의 나비목에 대하여 활성을 검정하였다. 또한 4종의 딱정벌레목으로 청동풍뎡이(*A. albopilosa*), 장수풍뎡이(*A. dichotoma*), 배추벼룩잎벌레(*P. striolata*) 그리고 쌀바구미(*S. oryzae*) 등의 모두 7종류의 해충에 대한 생물검정을 실시하였다. 생물효과는 담배겨세미나방에 대하여 CAB528, CAB529 균주는 80%이상 사충률을 보였다. 반면에 CAB530, CAB531 균주는 50% 이하의 사충률과 CAB532, CAB533균주는 무독성으로 나타났다. 그러나 파밤나방에 대해서는 CAB533균주를 제외한 나머지 5균주 모두가 100%의 사충률을 보여주었으며, 배추좀나방에 대해서는 6개의 균주 모두가 100%의 사충률을 나타내었다. 이번 실험에서 딱정벌레목에 독성을 나타내는 균주의 선발에 목표를 두고 시도 되었다. 그러나 청동풍뎡이의 사체 및 서식 토양에서 선발된 6개 균주임에도 불구하고 딱정벌레목에 대한 활성검정 결과, 청동풍뎡이에 대해서는 CAB528, CAB529, CAB530, CAB531균주가 50% 이하의 사충률을 보여주었으며, CAB533균주는 전혀 사충률을 보여주지 않았다. 반면에 CAB532균주는 약간 높은 방제효과를 나타내었으나 시험곤충인 청동풍뎡이의 사육이 원활하게 진행되지 못하여 추가 시험의 진행이 어려워 평가를 보

Table 2. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from green tea soils and *Anomala albopilosa* midgut in Jeju island

	Number of samples	Number of colonies	Number of isolate colonies with B.t. isolate
Midgut of <i>Anomala albopilosa</i>	6	108	29
Green tea soils	31	83	66
Total	37	191	95

Table 3. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolates against lepidopteran and coleopteran larva

Isolates		Lepidopteran larva			Coleopteran larva			
		<i>Spodoptera litura</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Anomala albopilosa</i>	<i>Allomyrina dichotoma</i>	<i>Phyllotreta striolata</i>	<i>Sitophilus oryzae</i>
From midgut	CAB528	++	+++	+++	-	-	-	-
	CAB529	++	+++	+++	+	-	-	-
	CAB530	+	+++	+++	+	-	-	-
From soil	CAB531	+	+++	+++	+	-	-	-
	CAB532	-	+++	+++	++	-	-	-
	CAB533	-	+	+++	-	-	-	-
Total	4	5	5	4	0	0	0	

+++ : Highly effective with 100% lethality; ++ : effective with 80% lethality; + : Lowly effective with 50% lethality; - : not effective with 0% lethality

류하였다. 배추벼룩잎벌레와 갈색거저리, 장수풍뎅이 유충에는 6개의 균주 모두가 전혀 활성을 보이지 않았다. 살충활성검정 결과로 보아서 분리된 *B. thuringiensis* 균주는 딱정벌레목인 청동풍뎅이의 사체와 토양에서 분리하였지만 50% 정도의 사망률로 나타나 효과가 매우 빈약한 것으로 나타났다. 이번 실험에서 청동풍뎅이는 서식지인 제주도에서 채집하여 활성검정에 사용하였다. 그러나 채집되어 실험실로 운반되면 쉽게 죽는 경향이 있어서 신뢰성 있는 실험의 결과를 나타내지 못하였다. 이는 앞으로 더 많은 딱정벌레를 수집하여 시험에 사용할 필요가 있다고 판단되었다. 또한 이 결과를 통하여 녹차밭에 존재하고 채집된 BT의 기능에 대하여 생태학적인 연구가 필요하다. 한편 동일 장소에서 채집된 균주가 낮은 살충활성을 나타내는 현상은 이 균주를 유전학적으로 정확하게 분리하여야 원인을 구명할 수 있을 것으로 판단된다.

나비목 해충에 시험된 6개의 균주 중 CAB533 균주를 제외한 나머지 5균주는 파밤나방에 대한 생물검정에서 사충률이 100%로 유사하게 나타났다. 그러므로 파밤나방에 대한 효과가 가장 빠르게 나타난 CAB530 균주를 선발하였다. 선발된 활성이 속효적인 CAB530 균주가 기존 파밤나방에 높은 살충활성을 가지고 있던 균주와 특성을 비교 하였다. 파밤나방에 대한 생물검정 결과 LC₅₀ 값은 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주는 3.34×10⁷ cfu/ml이며 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB100 균주는 1.02×10⁵ cfu/ml로 나타났고, 선발된 CAB530 균주는 1.49×10⁴ cfu/ml로 나타났다(Table 4). *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주는 실험실 연구에서 파밤나방에 대하여 높은 활성이 있는 것으로 확인이 되었으며(특허출원 10-2009-0021683, 2009), 담배겨세미나방, 배추좀나방, 암청색줄무늬밤나방, 빨간집모기 유충에도 활성이 있는 것으로 나타났다. 또한 *B. thuringiensis* subsp.

Table 4. Insecticidal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates and strains against *Spodoptera exigua*

Strains and isolates	LC _{50s} (cfu/ml)
<i>B. thuringiensis</i> CAB530	1.49 × 10 ⁴
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> KB098	3.34 × 10 ⁷
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KB100	1.02 × 10 ⁵
<i>B. thuringiensis</i> CAB110	7.34 × 10 ⁶
<i>B. thuringiensis</i> CAB116	1.57 × 10 ⁶

kurstaki KB099 균주는 배추좀나방, 목화바둑명나방, 파밤나방, 벼애나방, 빨간집모기에 높은 독성을 보였으며, 흑명나방, 이집트숲모기에도 활성이 있을 것으로 나타났다(Jung, 2010). CAB530 균주는 파밤나방과 배추좀나방에 대해서 고독성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 파밤나방에 높은 살충 활성을 가지고 있음이 확인이 되어서 파밤나방 방제에 활용하기 좋은 *B. thuringiensis* 균주로 예상을 할 수 있다.

*B. thuringiensis*의 crystal 형태관찰

파밤나방에 대해서 높은 활성을 가진 CAB530 균주의 crystal의 형태를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 crystal과 spore를 관찰 하였다. 결과 CAB530 균주는 일반적인 bipyramidal 형태의 crystal임을 확인할 수 있었다(data not shown). 이러한 Bipyramidal 형태의 crystal은 *cryI* 독소 단백질을 가지고 있으며, 나비목에 활성이 있는 것으로 보고(Armengol *et al.*, 2007; Donovan *et al.*, 1988)가 된 연구결과와 일치하였다.

또한 CAB530 균주와 파밤나방에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 균주, 모기목에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB191의 crystal을 비교하기 위하여 주사전자현미경으로 관찰을 하였다. CAB530 균

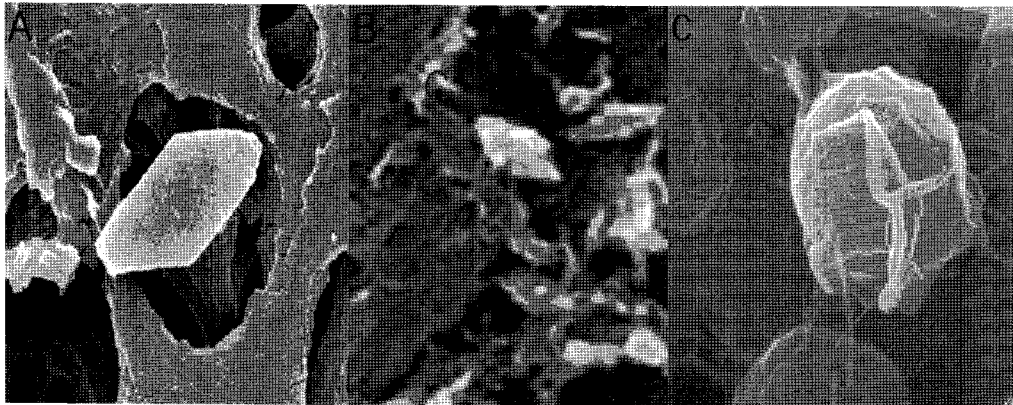


Fig. 1. Scanning electron microscopy of crystal of *B. thuringiensis* strains. A, *B. thuringiensis* CAB530 and B, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 and C, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* KB191. Red arrows indicate crystal (red C).

주는 위상차현미경에서 관찰된 것과 같이 bipyramidal 형태의 crystal을 가지고 있는 것이 확인이 되었으며(Fig. 1A), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주 또한 bipyramidal 형태의 crystal이 확인이 되었으나(Fig. 1B) *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CAB191균주는 spherical 형태의 crystal을 확인 하였다(Fig 1C). CAB530균주와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주는 bipyramidal 형태의 crystal을 가지고 있으며 모두 나비목 해충에 활성이 있는 것으로 두 균주 모두 *cryI* 독소 유전자를 가지고 있을 것이라고 추측할 수 있다.

SDS-PAGE에 의한 독소단백질 확인

나비목에 활성을 나타내는 bipyramidal형의 crystal을 구성하는 *cry* 독소는 해충에 특이적인 독성을 나타낸다. 그리고 이 독소의 작용은 일반적으로 몇 가지 과정을 통해 나타난다 (Burton *et al.*, 1999). *cry* 전독소 단백질이 유충에 섭취되면, 중장 세포 간극안에서 용해되고 중장액 프로테아제에 의해 분해되어 130~140 kDa의 전독소가 60 kDa의 독소단백질로 만들어지고, 이 활성 독소가 중장 세포내 수용체에 삽입된다. 일부 나비목 유충은, cadherin-like 단백질과 독소가 아주 유사했으며 primary 수용체와 같은 기능을 하게 되어 곤충을 치사에 이르게 한다(Vadlamudi *et al.*, 1995).

분리된 균주의 SDS-PAGE를 통해 단백질 특성을 확인 하였다. CAB530균주를 12% separating gel로 전기영동한 결과, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*(3abc)로 동정된 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주와 같은 130 kDa의 밴드가 확인이 되었으며, 파밤나방에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098균주도 같은 크기의 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

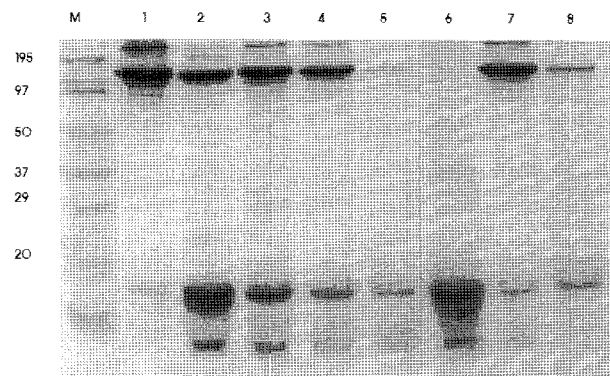


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of crystal of *Bacillus thuringiensis* CAB530 isolate. Lanes M, molecular weight markers; lane 1, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098; lane 2, CAB528; lane 3, CAB529; lane 4, CAB530; lane 5, CAB531; lane 6, CAB532; lane 7, CAB533 and lane 8, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099.

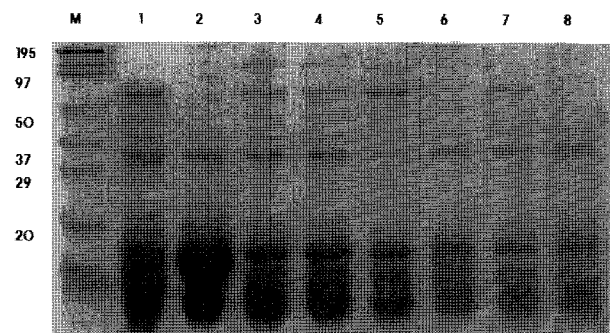


Fig. 3. Effect of digestion of protoxin by migut juice of *S. exigua*. Lane M, standard marker; lane 1, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098, lane 2, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099, lane 3, CAB528 Lane 4, CAB529, lane 5, CAB530, lane 6, CAB531, lane 7, CAB532 and lane8; CAB533.

B. thuringiensis CAB530 균주를 파밤나방의 중장액과 반응을 시킨 후 활성 독소로 만든 후 SDS-PAGE를 관찰하였

다(Fig. 3). CAB530균주의 130 kDa의 전독소가 중장액에 의해 분해되어 약 65 kDa의 독소단백질의 밴드를 확인 할 수 있었다. KB098균주를 파밤나방 중장액으로 소화시킨 결과 130 kDa의 전독소가 60-65 kDa의 2개의 밴드가 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며, CAB530균주는 65 kDa의 밴드만을 확인 할 수 있었다. 분리된 6개의 균주에서 CAB530균주를 파밤나방 중장액으로 소화시킨 65 kDa의 독소단백질 밴드가 다른 5개의 균주들의 독소단백질보다 선명하고 진한 것으로 미루어 보아서 CAB530균주가 다른 균주보다 파밤나방에 대한 활성이 더 높을 것이라고 추정할 수 있었다.

Cry-type 유전자 동정

선발된 CAB530균주의 plasmid DNA를 추출하여 crystal proteins을 확인하기 위해 PCR 분석을 이용하였다. *B. thuringiensis* subsp. *kustaki* KB099는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryII*, *cry2A* protoxin 유전자를 가지고 있다고 보고되었으며(Jung, 2010), 몇몇 *B. thuringiensis* strains, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, subsp. *entomocidus*, subsp. *galleriae*, subsp. *kenya*에서 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIE* 또는 *cryIF* 유전자가 존재하며, 이것은 오직 Spodoptera종에만 활성을 나타내었다(Sanchis *et al.*, 1989; Visser *et al.*, 1990, 1998). *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID* 유전자로 알려져 있으며(Aronson *et al.*, 1991; Crickmore *et al.*, 1998; Höfte and Whiteley, 1989) 이전 실험실에서 파밤나방에 활성을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098 균주 또한 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID* 독소 유전자를 가지고 있었다(Table 5). *CryIAa*, *cryIAb* 그리고 *cryIAc* 살충성 단백질은 배추좀나방과 왕담배나방등 나비목에 활성을 나타내고, *cry3*, *cry7* 그리고 *cry8*은 몇몇의 딱정벌레목에 활성이 있으며 *cry4*는 파리목에 *cry2*는 나비목과 파리목에 활성을 가지고 있다(Armengol *et al.*, 2007; Donovan *et al.*, 1988). 딱정벌레목에 특이적인 *cryIC*와 나비목에 특이적인 *cryIAa* toxin의 crystal의 구조의 분석은 세 개의 다른 도메인의 *B. thuringiensis* toxin으로 구성된 전체적인 구조가 밝혀졌다(Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995). N-terminal

도메인 I은 α -helic 묶음으로 구성이 되어있으며, 곤충의 세포막의 구멍형성에 관계된다(Gazit and Shai, 1993; Cummings *et al.*, 1994). 도메인 II는 수용체의 결합에 관계가 있는 세 개의 β -sheet로 구성되어 있다(Schnepf *et al.*, 1990; Lu *et al.*, 1994). CAB530균주는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID*, *cryIF*, *cryII* 독소 유전자를 가지고 있음이 확인이 되었다(Fig. 4). 또한 *cryIC*와 *cryID* 독소 유전자를 가지고 있는 CAB530균주가 파밤나방에 높은 활성을 보이고 있는 것으로 미루어 보아 *cryIC*와 *cryID* 독소 유전자가 파밤나방에 대한 고독성에 대해서 큰 작용을 할 것이라고 예상이 된다. *cryIC* 독소 단백질은 파밤나방과 도둑나방의 유충에 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며(Moar *et al.*, 1990; De Maagd *et al.*, 1996), 담배겨세미나방(Agrawal *et al.*, 2002, 2004; Rajagopal *et al.*, 2002)에 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. *cryID* 독소 유전자는 파밤나방과 모기에 독성이 있다고 알려져 있다. 분리된 CAB530균주는 *cryIC*와 *cryID* 독소 유

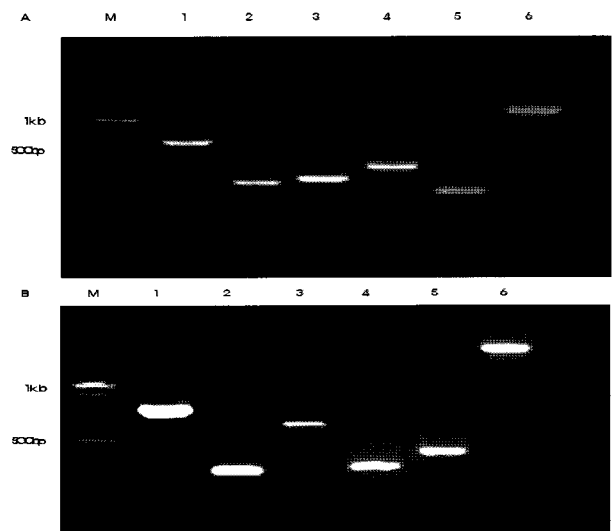


Fig 4. Agarose gel (1.5%) electrophoresis of PCR products obtained from specific primers for the cry genes. (A) *B. thuringiensis* subsp. CAB530. Lane 1: *cryIAa*; lane 2: *cryIAb*; lane 3: *cryIAc*; lane 4: *cryID*; lane 5: *cryIF*; lane 6: *cryII*. (B) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099. Lane 1: *cryIAa*; lane 2: *cryIAb*; lane 3: *cryIAc*; lane 4: *cryIC*; lane 5: *cryID*; lane 6: *cryII*. Lane M indicates standard marker.

Table 5. Comparison of cry gene profiles from several *Bacillus thuringiensis* isolates and strains

Strains and isolates	cry genes					
<i>B. thuringiensis</i> CAB530	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>	<i>cryIF</i>	<i>cryII</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> type strain	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>		
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> KB098	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>		<i>cryII</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> KB099	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIAc</i>			<i>cryII</i> <i>cry2</i>

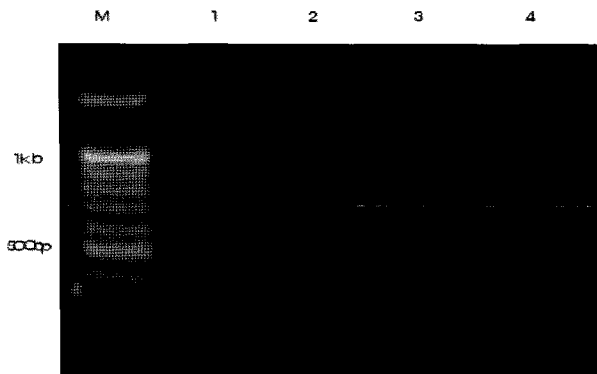


Fig. 5. Agarose gel (0.8%) electrophoresis of PCR products obtained from specific primers for the *cry* genes. Lane 1, 2, 3 and 4 are *cry3* and lane M indicates standard marker.

전자로 인해서 파밤나방에 독성이 있는 것으로 추측 할 수 있다. 또한 딱정벌레목인 청동풍뎅이의 사체에서 분리 선발하였기 때문에 딱정벌레목에 독성을 가지고 있는 *cry3* 독소 유전자를 찾기 위해 수행한 PCR에서는 CAB530균주와 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주 모두에서 *cry3* 독소 유전자는 탐지가 되지 않았으며 딱정벌레목에서 분리 선발을 하였지만 딱정벌레목에 활성이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*가 아닌 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

CAB530균주의 Plasmid DNA 분석

대부분의 *B. thuringiensis*균주는 여러 부분으로 이루어진 특유의 plasmid DNA가 존재한다. Plasmid DNA의 크기(2-250 kb)와 그 수는 균주마다 다양한 것으로 알려져 있다(González and Carlton, 1980; Lereclus *et al.*, 1982; McDowell and Mann, 1991). 하지만 plasmid DNA는 플라스미드에 존재하는 내독소를 코딩하는 *cry* 유전자와 관련된 정보를 얻을 수 있는 좋은 정보가 된다(Loeza-Laraa *et al.*, 2005).

선발된 CAB530균주의 plasmid DNA를 추출하여 전기영동 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. CAB530균주의 plasmid DNA 패턴은 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*와 비슷한 패턴으로 나타났다. CAB530균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099에 존재하지 않는 9.6 kb와 6.6 kb 밴드를 확인할 수 있었으며, 4.3 kb이하의 밴드를 보이지 않음으로서 차이를 확인 할 수 있었다. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098균주는 CAB530균주와 비슷한 plasmid DNA 밴드 패턴을 가지고 있는 것이 확인이 되었다.

앞의 결과들에서 CAB530균주와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099균주간에 외형적 특성이나 단백질의 특성만

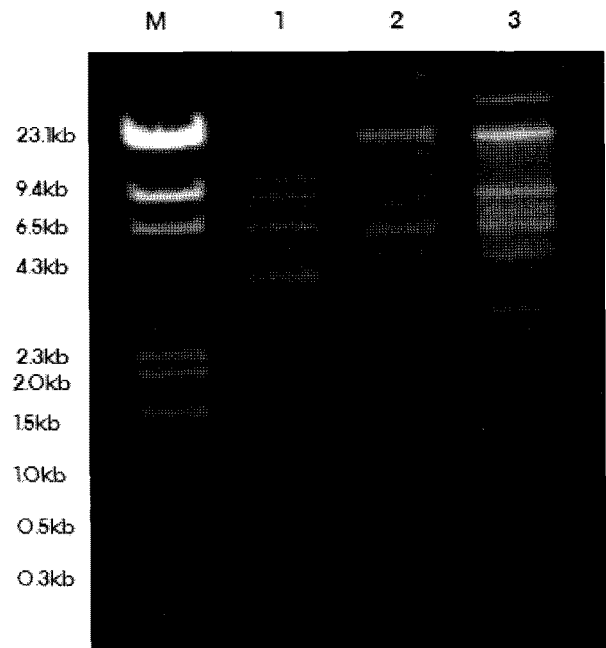


Fig. 6. Plasmid DNA pattern of *Bacillus thuringiensis* strains. M: Lamda DNA Hind III plus; Lane 1: *Bacillus thuringiensis* CAB530; Lane 2: *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* KB098; Lane 3: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099.

으로는 구별하기가 어려웠으며 plasmid DNA 전기영동을 통해 차이가 있음을 확인을 하였으며 이런 패턴의 차이가 균주간의 *cry* 독소 단백질의 차이를 가지고 있을 것이라고 추측이 되고, 앞으로 CAB530균주에 대한 유전학적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산물기술평가원의 농림기술개발사업 과제류공통 수출연구사업단의 “농산물의 품질 및 생산성 향상과 농약에 안전한 병해충 종합 방제방법개발”과제에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

>> 인 / 용 / 문 / 헌

Agrawal N., P. Malhotra and R. K. Bhatnagar (2002) Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein *cry1C*. Appl. Environ. Microbiol. 68:4583~4592.
 Agrawal, N., P. Malhotra and R. K. Bhatnagar (2004) siRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect

- cell. Biochem. Biophys. 320:428~434.
- 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.
- Armengol, G., M. C. Escobar, M. E. Maldonado and S. Orduz (2007) Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. J. Appl. Microbiol. 102:77~88.
- Aronson, A. I., E. S. Han, W. McGaughey and D. Johnson (1991) The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependant upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insect. Appl. Environ. Microbiol. 57:981~986.
- Bechtel, D. B. and Jr. L. A. Bulla (1976) Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127:1472~1781.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinal, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky, N. Berezina and Y. Margalith (1997) Extended screening by PCR for seven cry-groups genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4883~4890.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D. J. Ellis, G. M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers and H. D. Burges (1997) Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. J. Invert. Pathol. 70:59~68.
- Burton, S. L., D. J. Ellar, J. Li and D. J. Derbyshire (1999) N-Acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectinlike fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. J. Mol. Biol. 287:1011~1022.
- Cero'n, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca and A. Bravo (1995) Specific PCR primers directed to identify cry I and cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. and Environ. Microbiol. 61:3826~3831.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. V. Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbio. Mol. Biol. Rev. 62:807~813.
- Cummings, C. E., G. Armstrong, T. C. Hodgeman and D. J. Ellar (1994) Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Mol. Membr. Biol. 11:87~92.
- Dai, S., Gao, Li. X. M and R. Li (1996) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of north and south of China. Acta Microbiol. Sin. 36:295~302.
- De Maagd, R. A., M. S. G. Kwa, H. Van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlask, W. J. Stiekema and D. Bosch (1996) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa (b) result in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. Appl. Environ. Microbiol. 62:1537~1543.
- Donovan, W. P., C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, M. C. Gawron-Burke, R. G. Groat and B. C. Carlton (1988) Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. 263:561~567.
- Edwards, D. L., J. Payne and G. G. Soares (1990) Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. U. S. Patent 4:948~734.
- Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. Bio/Technol. 10:271~275.
- Gazit, E. and Y. Shai (1995) The assembly and organization of the a5 and a7 helices from the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. J. Biol. Chem. 270:2571~2578.
- Goh H. G., J. D. Park, Y. M. Choi and I. S. Park (1991) The host plants of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) and its occurrence. Korea J. Appl. Entomol. 30(2):111~116.
- Goh, H. G., J. S. Choi, K. B. Uhm, K. N. Choi and J. W. Kim (1993a) Spatial distribution pattern of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), larvae in the welsh onion field. Korean J. Appl. Entomol. 32(2):134~138.
- Goh, H. G., J. S. Choi, K. B. Uhm, K. N. Choi and J. W. Kim (1993b) Seasonal fluctuation of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), adult and larva. Korean J. Appl. Entomol. 32(4):389~384.
- González, J. M. and B. C. Carlton (1980) Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*, Plasmid 3:92~98.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau and M. Cygler (1995) *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 254:447~464.
- Herrnstadt, C., G. G. Soares, E. R. Wilcox and D. L. Edwards (1986) A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. Bio/Technol. 4:305~308.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242~255.
- Ibarra, J. E. and B. A. Federici (1986) Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. 165:527~533.
- Ichimatsu, T., E. Mizuki, K. Nishimura, T. Akao, H. Saitoh, K. Higuchi and M. Ohba (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh water of Japan. Curr. Microbiol. 40:212~217.
- Ishiwata, S. (1901) On a kind of severe flachrie (sotto disease). *Dainihon sanshi Kaiho*. 114:1~5.
- Jung, S. Y. (2010) Molecular genetics studies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* KB099 of insecticidal activity of *Spodoptera litura*. Chungnam University MS Thesis.
- Jensen, S., L. Cavarec, M. P. Gassama and T. Heidmann (1995) Defective I elements introduced into *Drosophila* as transgenes can regulate reactivity and prevent I-R hybrid digenesis. Europ. Dros. Res. Conf. 14:198.
- Kim H. S., D. W. Lee, H. W. Park, Y. M. Yu, J. I. Kim and

- S. K. Kang (1995a) Distributional characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. Korean J. Seric. Sci. 31(1):57~61.
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu and S. K. Kang (1995b) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dust. Korea J. Appl. Entomol. 34(3):243~248.
- Lereclus, D., M. M. Lecadet, J. Ribier and R. Dedonder (1982) Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. 186:391~398.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680~685.
- Li, R., S. Dai, X. Li, X. Li, C. Luo, Z. Sheng and M. Sun (1990) Survey of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from soils of four provinces of China and their principal biological properties. Acta Microbiol. Sin. 30:380~388.
- Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. Nature 353:815~821.
- Liburd, O. E., J. E. Funderburk and S. M. Olson (2000) Effect of biological and chemical insecticides on *Spodoptera* species (Lep, Noctuidae) and marketable yields of tomatoes. J. Appl. Entomol. 124:19~25.
- Loeza-Laraa, P. D., G. Benintende, J. Cozzib, A. Ochoa-Zarzoaa, V. M. Baizabal-Aguirrea, J. J. Valdez-Alarcóna and J. E. López-Mezaa (2005) The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. Plasmid. 25:229~240.
- Lu, H., F. Rajamohan and D. H. Dean (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIA (a) associated with membrane binding and toxicity to *Bombix mori*. J. Bacteriol. 176:5554~5559.
- Martin, P. A. W. and R. S. Travers (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55:2437~2442.
- McDowel, D. G. and N. H. Mann (1991) Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1-DIPEL. Plasmid. 25:113~120.
- Moar, W. J., L. Masson, R. Brousseau and J. T. Trumble (1990) Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. Environ. Microbiol. 56:2480~2483.
- Ohba, M. and K. Aizawa (1978) Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. 32:303~309.
- Ohba, M., N. Wasano and E. Mizuki (2000) *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. Microbiol. Res. 155:17~22.
- Park, J. D., H. G. Goh, J. H. Lee, W. J. Lee and K. J. Kim (1991) Flight activity and injury characteristics of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), (Lepidoptera: Noctuidae) in southern region of Korea. Korean J. Appl. Entomol. 30(2): 124~129.
- Porcar, M., J. Irarte, V. Cosmao Dumanoir, M. D. Ferrandis, M. M. Lecadet, J. Ferré and P. Caballero (1999) Identification and characterization of the new *Bacillus thuringiensis* serovars *pirenaica* (serotype H57) and *iberica* (serotype H59). J. Appl. Microbiol. 8:640~648.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra, V. Bhatnaga and K. Raj (2002) Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. J. Biol. Chem. 277:46849~46851.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, S. Gou and M. M. Lecafet (1989) Nucleotide sequence and analysis of the n-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai*. Mol. Microbiol. 3:229~238.
- Schnepf, H. E., K. Tomczak, J. P. Ortega and H. R. Whiteley (1990) Specificity-determining regions of lepidopteran-specific insecticidal proteins produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 265:20923~20930.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van-Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and its insecticidal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:774~806.
- Shelton, A. M., J. L. Robertson, H. D. Tang, C. J. Perez, S. D. Eigenbrode, H. K. Preisler, W. T. Wilsey and R. J. Cooley (1993) Resistance of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. J. Econ. Entomol. 86:697~705.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Inson and M. W. Johnson (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83:1671~1676.
- Uribe, D., W. Martinez and N. J. Cero (2003) Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. J. Invert. Pathol. 82:119~127.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji and Jr. L. A. Bulla (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 270:6783~6788.
- Vilas-Bôas, G. T and M. V. F. Lemos (2004) Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. Can. J. Microbiol. 50:605~613.
- Visser, B., E. Munsterman, A. Stocker and W. G. Dirkse (1990) A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. J. Bacteriol. 172:6783~6788.
- Yamamoto, T. and R. E. McLaughlin (1981) Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to mosquito larvae, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103:414~421.

청동풍뎡이에서 분리한 *Bacillus thuringiensis* CAB530 균주의 살충활성 및 분자학적 특성

범종일¹ · 서미자¹ · 유 주 · 윤영남¹ · 유용만^{1*}

설록차연구소, ¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

요 약 제주도의 녹차 밭에 서식하는 딱정벌레목인 청동풍뎡이(*Anomala albopilosa*)의 사체와 녹차 밭 토양에서 분리한 *Bacillus thuringiensis* CAB530 균주의 생물효과를 검토하였다. 이 균주는 몇 종류의 해충에 대한 살충활성에서 난방제 농업해충 가운데 하나인 파밤나방에 높은 효과를 나타냈다. 파밤나방 2령 유충에 대한 살충활성 검정에서 CAB530 균주는 LC₅₀값이 1.49×10^4 (cfu/ml)으로 고효성을 보였다. 이 균주가 생산하는 살충성 독소단백질의 SDS-PAGE에서는 파밤나방에 살충활성이 있는 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 비슷한 130kDa의 밴드를 나타내었다. 또한 파밤나방 증장액으로 반응을 시킨 후에 약 65kDa의 활성 독성단백질을 확인할 수 있었다. PCR수행에서 CAB530 균주는 *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID*, *cryIF* 그리고 *cryII*등 6개의 유전자가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*기준 균주와 차이가 있었다. 딱정벌레목에서 분리 선발한 *B. thuringiensis* CAB530균주는 crystal의 형태와 SDS-PAGE의 결과는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 유사하게 나타났지만, 살충활성 검정과 PCR product 전기영동 결과는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*와 유사하게 나타났다.

색인어 *Bacillus thuringiensis*, 파밤나방, 청동풍뎡이, 살충활성 단백질