

## 담배거세미나방에 살충효과를 나타내는 새로운 *Bacillus thuringiensis* 균주의 특성

김다아 · 김진수 · 길미라 · 백승경 · 최수연 · 김대용 · 윤영남 · 황인천<sup>1</sup> · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, <sup>1</sup>(주)경농 중앙연구소

### Characterization of New *Bacillus thuringiensis* Isolated with Bioactivities to Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

Da-A Kim, Jin-Su Kim, Mi-Ra Kil, Seung-Kyoung Paek, Su-Yeon Choi, Da-Yong Jin, Young-Nam Youn, In-Cheon Hwang<sup>1</sup> and Yong-Man Yu\*

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

<sup>1</sup>Central Research Institute, Kyung Nong Co., Gyeong-ju, Koera

**ABSTRACT :** *Bacillus thuringiensis* with selected high toxicities against tobacco cutworm, *Spodoptera litura* were isolated from domestic soils. When being observed under a phase-contrast microscope, the insecticidal crystal proteins were showed a bipyramidal crystal types. New CAB 109 isolate was identified to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the H serotype. As a results of insecticidal activities between CAB 109 isolate and 3 existing ready-made products against 3rd larva of *S. litura*, CAB 109 isolate showed 100% mortality with spore concentration ( $1.3 \times 10^7$  cfu/ml). It was a very high insecticidal activity compared with a existing ready-made *B. t.* products. LD<sub>50</sub> values of CAB 109 isolate was  $9.78 \times 10^5$ ,  $6.87 \times 10^6$  and  $1.83 \times 10^7$  cfu/ml spore concentration against 2nd, 3rd and 4th larva of *S. litura*, respectively. Unlike *Plutella xylostella*, *S. litura* was slowly died after application up to 7 days. The weight of *S. litura* larva applied with CAB 109 isolate were 6-7 times less than controlled group. Even though it didn't die, it did not grow into next larva. The result observed with scanning electron microscope was that CAB 109 isolate of *B. t. aizawai* formed a typical bipyramidal crystal protein type. Otherwise, when CAB 109 isolate was examined with SDS-PAGE and with trypsin, there was no difference between CAB 109 strain and ready-made products of *B. thuringiensis*.

**KEY WORDS :** *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera litura*, Bioactivity, Durable efficiency, SDS-PAGE

**초 록 :** 국내 토양으로부터 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주에서 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 선택적으로 살충효과를 나타내는 새로운 균주를 선발하였다. 이 균주의 결정성 독소단백질은 위상차 현미경과 주사전자현미경으로 관찰한 결과 전형적인 이중피라미드 형태이며 H serotype으로 동정한 결과 *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109로 동정되었다. 난방제 해충인 담배거세미나방 3령충에 대해 *B. t.* subsp. *aizawai* CAB 109균주의 분리된 다른 3균주의 생물활성을 비교 검토하였다. 살충활성 결과에서 *B. t.* subsp. *aizawai* CAB 109 균주가  $1.3 \times 10^7$  (cfu/ml)에서 100% 사망률로 다른 균주에 비해 높은 활성을 나타내었다. 담배거세미나방은 배추좀나방과 다르게 7일 이상 경과한 뒤에야 100% 사충률을 나타내었다. 한편, 담배거세미나방 2령, 3령, 4령충에 대한 살충활성의 검정에서 *B. t. aizawai* subsp. CAB 109 균주의 LD<sub>50</sub>값이 각각  $9.78 \times 10^5$ ,  $6.87 \times 10^6$ ,  $1.83 \times 10^7$  (cfu/ml)으로 살충활성을 나타내었다. *B. t.*를 섭식한 담배거세미나방 유충의 사망 현상은 지효성이며 대조군보다 무게가 6~7배정도 적으며 다음 령기로 성장하지 못하고 죽었다. 또한 *B. t.* subsp. *aizawai* CAB 109 균주의 SDS-PAGE에서의

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

단백질 패턴과 trypsin을 처리한 단백질의 결과에서 기존의 *B. t. subsp. aizawai*와 CAB 109균주와의 차이점은 발견할 수 없었다.

**검색어** : *Bacillus thuringiensis*, 담배거세미나방, 생물활성, 지효성, SDS-PAGE

담배거세미나방(*Spodoptera litura* Fabricius)은 나비목 밤나방과 *Spodoptera*속에 속하는 국내에서 대표적인 농업해충이다(Goh *et al.*, 1991; Bae *et al.*, 1997; Bae *et al.*, 2007). 이들 해충의 유충은 선천적으로 약제에 대한 높은 내성과 낮은 감수성으로 약제방제가 매우 어려운 난방제 해충으로 보고되어 있다(Choi *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2003). 담배거세미나방은 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 등에도 발생하여 큰 피해를 주고 있다(Ahn, 1989; Bae *et al.*, 1997).

담배거세미나방은 1~2령 유충까지는 군집하여 잎 뒷면에서 소규모의 엽육을 식해하나 3령 이후부터는 분산하고 노숙유충이 되면 다량 섭식하고, 낮에는 토양 속에 숨어 있다가 밤에 나와서 활동하므로 화학농약으로서의 방제가 매우 어려운 실정이다. 따라서 방제하기 어려운 담배거세미나방의 생태학적 특성을 고려하여 친환경적인 생물적방제 인자로 이용하여 방제하고자 국내 서식지의 토양으로부터 *Bacillus thuringiensis* 균주의 선발을 검토하였다.

*B. thuringiensis*는 곤충병원성 세균으로 성장조건이 악화되면 내생포자와 함께 내독소 단백질 결정체(parasporal inclusion, crystal)를 형성한다. *B. thuringiensis*에서 특이적으로 생성되는 내독소 단백질 결정체는 나비목과 파리목 및 딱정벌레목의 유충에 대해서 강한 살충활성을 나타내며, 선충에 독성이 있는 균주도 보고되었다. 내독소 단백질 Cry I은 나비목, Cry II는 나비목과 파리목, Cry III는 딱정벌레목, Cry IV는 파리목, Cry V는 나비목과 딱정벌레목에 각각 독성을 나타낸다. 나비목 유충에 대한 내독소 단백질의 독성은 대부분 130~140 kDa의 분자량으로 곤충 소화액으로 처리하면 50~70 kDa의 단백질을 형성한다(Aronson *et al.*, 1986; Goldberg and Margalit 1977; Tamez-Guerra *et al.*, 2004). 이러한 *B. thuringiensis*는 현재 국내외적으로 사용되는 생물농약 중 가장 많이 생산되어 판매·활용되고 있다. 이미 오래전부터 미국을 비롯한 선진국에서는 *B. thuringiensis*를 이용한 무공해

미생물 농약제제가 개발되어 상업적으로 유용하게 쓰이고 있으며, 최근에는 *B. thuringiensis*에 대하여 숙주범위가 확대되고 독성을 증진시키기 위한 분자 유전학적인 연구가 이루어지고 있고(Gill *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 2005), 동시에 새로운 *B. thuringiensis* 균주에 대한 탐색분리에 관한 연구도 지속적으로 수행되고 있다(Da Silva *et al.*, 2004; Apaydin *et al.*, 2005; Gough *et al.*, 2005; Yasutake *et al.*, 2006).

따라서 본 연구에서는 난방제 해충인 담배거세미나방의 친환경적이며 종합적방제방법에 이용하고자 곤충병원성 미생물 자재의 선발을 검토하였다. 국내 토양으로부터 분리되어 담배거세미나방에 강한 살충활성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109 균주(Kim *et al.*, 2006)를 동정하고 생물검정을 통하여 살충효과의 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 주사전자현미경 관찰

*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주는 일본 규슈대학의 Ohba 교수에 의하여 H serotype으로 동정하여 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109 균주로 판명되었다(Ohba and Aizwa, 1978). 이 균주를 Nutrient agar plate (Difco)을 사용하여 27°C에서 4일간 배양한 뒤, conducting silver paint (Ladd Res., USA)에서 금으로 코팅을 하여 표본을 준비하였으며 Philips XL 30 ESEM (Philips, Netherlands)을 이용하여 관찰하고 사진을 찍었다.

### 생물활성 검정

본 실험에서 사용된 공시곤충으로 나비목 해충인 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)은 농촌진흥청 농업과학기술원으로부터 분양받아 인공사료를 사용하여 실험실에서 누대 사육하였다(Goh *et al.*, 1990). 곤충은 온도 25±2°C,

광조건 16L : 8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 사육되었다. 활성검정에 비교실험에 사용된 상품은 시중에서 구입하여 사용하였다.

선발된 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주를 NA배지에 접종하고 27°C에서 4~7일 동안 배양하면서 위상차 현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하고 나서 곤충에 대한 독성검정에 이용하였다. 선발된 *B. thuringiensis* 균주는 생물검정에 사용하기 위하여 배양액을  $1.0 \times 10^8$  (cfu/ml) 이상으로 만들어 적용하였다.

담배거세미나방에 대한 생물활성 검정은 spore-crystal mixture 희석액 100  $\mu$ l를 0.5 g의 인공 사료에 첨가하여 2~3령 유충은 각각 30마리씩, 4령 유충은 20마리씩의 유충을 petri dish에 넣고 168시간 동안 치사율을 조사하였다.

모든 실험은 3반복 실시하였으며, 담배거세미나방에 대한 치사율은 그 결과를 Finney (1971)의 probit 계산법에 기초한 PC 프로그램(Reymond, 1985)을 이용하여 반수치 사농도(LD<sub>50</sub>)를 산출하였다.

## SDS-PAGE

시험에 사용하는 균주를 Nutrient agar 배지에 접종하여 27°C에서 5일 동안 배양한 후, 위상차현미경에서 autolysis가 일어나는 것을 확인 한 뒤 15,000 rpm으로 원심 분리하여 집균하였다. 모든 샘플은 500 mM NaCl, 2% Triton X-100가 포함된 용액에서 3번, 500 mM NaCl이 포함된 용액에서 3번 세척되어졌다.

Laemmli (1970)의 방법에 따라 12% separating gel (30% Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)과 4% stacking gel (30% Acrylamide/Bis, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)로 SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue로 염색하였다.

## Trypsin 처리

Trypsin 처리는 50 mM NaOH 용액에 5분 처리한 후 원심하고, 0.1% trypsin 1  $\mu$ l를 37°C에서 30분간 처리하여 사용하였다. 12% separating gel (30% Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)과 4% stacking gel (30% Acrylamide/Bis, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, TEMED, 10% Ammonium Persulfate)을 사용하여 전기 영동하였다.

## 결과 및 고찰

최근 국내에서는 시설재배지의 증가와 친환경 유기농업의 발전으로 좋은 서식처가 확보되면서 담배거세미나방의 발생이 증가하고 있으며, 또한 다른 해충에 비해 광식성이며 섭식량이 많은 해충으로 작물에 많은 피해를 주고 있다(Lee et al., 2006). 또한, 이러한 시설재배지에서 담배거세미나방이 빈번히 발생하고 있을뿐더러 4~5령의 노령 유충의 경우 농약으로서 방제가 어렵다. 따라서 Kim et al. (2003)은 친환경 농업에서 문제가 되는 이러한 난방제 해충을 새로운 방제방법인 곤충병원성 미생물을 이용한 생물적 방제방법을 시도하였다. 이러한 나비목 해충의 미생물적 방제인자로서는 *B. thuringiensis*나 핵다각체바이러스의 경우가 많다.

본 시험은 담배거세미나방에 살충효과를 나타내는 새로운 *B. thuringiensis* 균주를 국내에서 분리, 선발을 검토하였다. Kim et al. (2006)은 사전 시험으로 분리된 16개의 *B. thuringiensis* 균주에서 해충에 활성을 나타내는 균주를 선발하여 일본규수대학에 보내 H serotype의 동정을 의뢰하였다. 결과로서 무독성으로 나타난 CAB 101 균주가 *ostrinae* (8ac)로 동정되었고, CAB 104, CAB 110, CAB 111, CAB 116 등의 균주는 *kurstaki* (3abc)로 분류되었으며, CAB 109 균주는 *aizawai* (7)로 분류되었다. 또한 원형 크리스탈을 형성하고 파리목인 빨간집모기에만 활성을 나타낸 CAB 113 균주는 *colmeri* (21)로 분류되었다. 이중 담배거세미나방에 대해 높은 활성을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주를 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주와 살충성 독소 단백질의 형태를 비교해 보기 위해 주사전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 볼 수 있듯이 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주와 CAB 109균주 모두 전형적인 이중피라미드형 크리스탈을 형성하였다. 이들 토양에서 분리 선발된 *B. thuringiensis* 균주에서 담배거세미나방에 50%이상의 활성을 보인 것은 CAB 104 균주를 포함하여 7개의 균주로 나타났으며 모두가 배추좀나방에도 동시에 살충 효과를 나타냈다.

Cho et al. (1996) 등의 연구에서 농약에 대한 감수성이 담배거세미나방의 유충의 령기가 낮을수록 효과가 우수하다고 보고하였다. 이와 유사한 결과로서 새롭게 분리된 *B. thuringiensis*의 CAB 104, 109, 110, 111균주의 경우에서도 담배거세미나방 2령 유충에 대해 모두 100%의 활성을 나타내고 있으나 3령 유충에 대한 활성검정에서는 차이가 나타났다. 이러한 균주의 생물활성 실험 결과, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주가 100%의 가

장 높은 활성을 나타내 CAB 109균주를 선발하여 실험을 수행하였다(Table 1).

한편, 시중에 판매되고 있는 상품과 생물활성을 비교 검토하기 위하여 담배겨세미나방 3령 유충에 대하여 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주 그리고 T와 SB제품을 처리하여 7일 동안 생존율 추이를 조사하였다

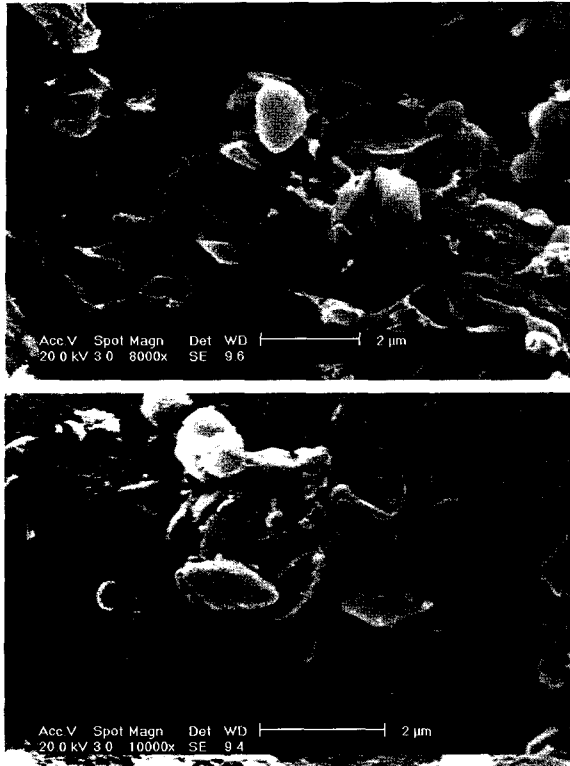


Fig. 1. Scanning electron microscopy of crystal-spore mixtures of *Bacillus thuringiensis*. A: *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*; B: *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109; C : crystal protein.

Table 1. Bioactivity of several *Bacillus thuringiensis* isolated against *Spodoptera litura* 3rd larvae

Isolate	Mortality (%)
CAB 104	73.0
CAB 109	100.0
CAB 110	92.5
CAB 111	94.2

※ Mortality after 5 days

Table 2. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109 against several larval stages of *Spodoptera litura* larvae

Strain & Stages	n	slope (mean±SE)	LC <sub>50</sub> (cfu/ml)
CAB 109	2nd instar	1.38±0.40	9.78×10 <sup>5</sup>
	3rd instar	2.16±0.35	6.87×10 <sup>6</sup>
	4th instar	1.81±0.84	1.83×10 <sup>7</sup>

※ Mortality after 7 days

(Fig. 2). 일반적으로 *B. thuringiensis*의 생물활성 효과는 2~3일에 동안에 죽는 경우가 대부분이다. 그러나 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주는 담배겨세미나방에 대하여 처리 7일 후가 되어서 100%의 사충률로 나타났다. 이 생물효과 실험에서 담배겨세미나방은 5일까지의 초기 사충률에서 T제품은 30%미만의 낮은 사충률을 보인 반면 선발된 새로운 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109 균주는 80%이상의 사충률을 보여 큰 차이를 보였으며 7일 후에는 100%의 사망률로 나타났다.

나방류의 령기에 대한 감수성의 차이를 조사하기 위하여 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109 균주에 대해 담배겨세미나방 2, 3, 4령층의 LC<sub>50</sub>값을 조사하였다. 결과는 각각 9.78×10<sup>5</sup> (cfu/ml), 6.87×10<sup>6</sup> (cfu/ml), 1.83×10<sup>7</sup> (cfu/ml)으로 령기가 높아질수록 *B. t.*에 대한 감수성이 현저히 낮아지는 것을 확인할 수 있다(Table 2). 이러한 결과는 화학농약에 의한 담배겨세미나방 유충의 령기별 약제감수성 시험의 결과에서도 유사한 결과를 나타냈다 (Cho *et al.*, 1996). 또한 방제시기에서 중요하게 작용하는 해충의 발생소장에 따른 방제효과를 보기 위하여 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109의 배양액을 1×10<sup>7</sup> (cfu/ml)의 동일한 농도로 2, 3, 4령층에 처리하여 령기간의 사망속도의 차이를 확인하였다. 령기가 높아질수록 *B. t.*에 대한 초기반응도 2령층은 3일후에 나타나는 반면, 노령층인 4령층은 5일후로 매우 느리게 나타나기 시작하였다. 또한, 4령의 7일 이후의 사망률은 60%로 나타나 100%인 2령층에 비해 현저히 떨어졌다. 야외포장에서는 다양

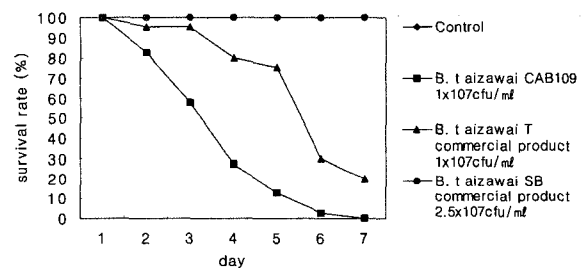


Fig. 2. Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* strain against *Spodoptera litura* 3rd instar larvae.

한 령기가 혼재되어있으므로 2, 3, 4령충이 혼재되어 있다고 가정하고 이들의 사충률의 평균값을 조사했다. 그 결과, 3령유충의 사망률과 비슷한 추이를 보여  $10^6$  (cfu/ml) 이상의 농도로 *B. t.*를 처리하여야 야외포장에서 담배거세미나방을 방제할 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 3). Cho et al. (1996)은 담배거세미나방의 경우 야외 방제시 전령기가 혼재하여 각각 영기별 약제 감수성에서 차이가 나므로 적절한 방제방법이 필요하다고 보고하였다.

곤충병원성 미생물인 핵다각체병바이러스의 경우 담배거세미나방에 생물효과 시험을 하면 8일정도 후에 지효적인 약효를 나타내는 Kim et al. (2003)보고가 있으나 *B. thuringiensis* 균주를 이 해충의 3령충에  $1 \times 10^7$  (cfu/ml)의 농도로 처리하면 7일만에 걸쳐서 사망하게 된다. 사망현상도 섭식 후 24시간이 지나면서 서서히 죽어가면서 섭식을 하지 않고 성장도 못하면서 령기도 변화되지 못하다가 결국 사망에 이른다. 따라서 이들 살아만 있는 해충의 무게를 6일째에 측정하여 비교하고 발육상태를 확인해보았다(Table 3). *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*CAB 109와 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) CAB116을 처리한 유충들은 마리당 각각 9와 8 mg으로 57 mg인 대조군과 6~7배의 차이로 작게 나타나 보였다. 이러한 결과는 *B. t.*를 섭식한 후 사망에 이를 때까지 발육이 중지됨을 알 수 있었다. *B. thuringiensis* 균주를 이용하여 생물적 방제에 사용한다면 Lee et al. (2006)의 연구에서 나타난

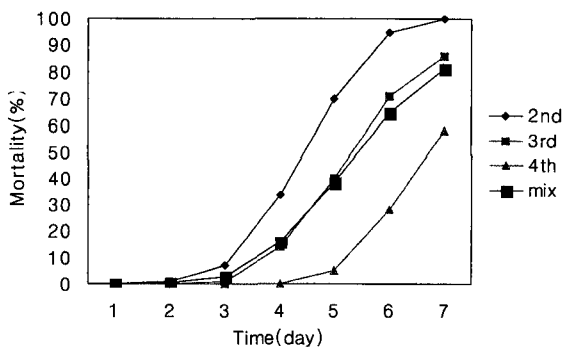


Fig. 3. Mortality of *Spodoptera litura* in the larvae at the same concentrations of insecticide treatment

Table 3. Weight of *Spodoptera litura* 3rd larvae fed *Bacillus thuringiensis* isolates

Strain	No. of cfu/ml	Mortality (%)	Weight (mg)
Control	-	0	57
CAB 109	$1.0 \times 10^7$	70	9
CAB 116	$1.0 \times 10^7$	15	8

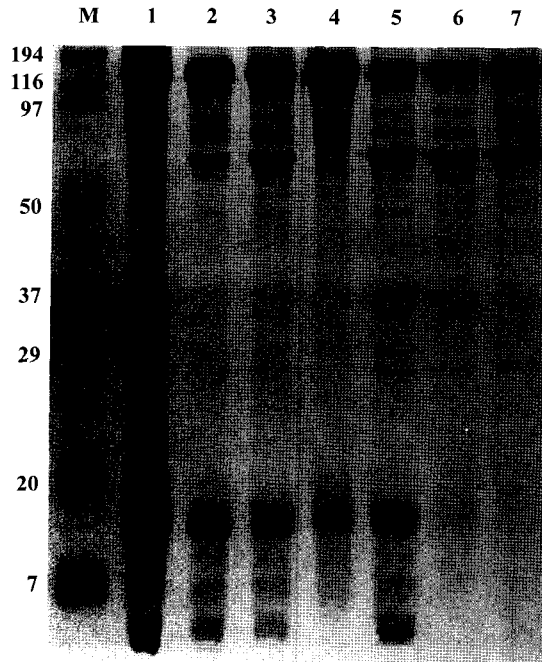
\* Weight after six day

것같이 담배거세미나방은 5령 이후에 섭식량이 급격히 늘어나 일생동안의 94.7%를 차지한다고 보고하였다. 그러므로 생물적 방제제로 사용할 때는 담배거세미나방이 *B. t.*에 대한 감수성이 높고 섭식량도 적은 발생 초기에 방제하는 것이 효과적일 것이다.

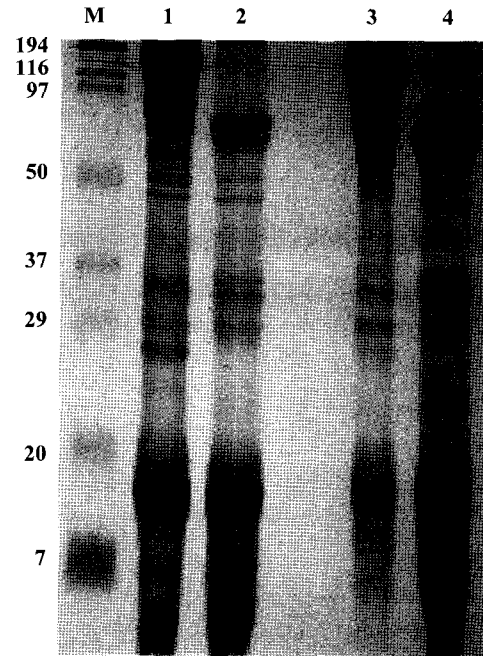
생물활성 검정에서 몇 종류의 나비목 해충에 대해 활성을 보인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) CAB 104, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*CAB 109, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) CAB 110, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (3abc) CAB 116의 5개 균주를 SDS-PAGE를 통하여 단백질 패턴을 비교 조사하였다. 12% separating gel로 전기영동한 결과, CAB 109균주는 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* strain의 주요 단백질과 매우 유사한 패턴을 나타내고 있다. 또한 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*CAB 109와 마찬가지로 나비목 해충에 높은 활성을 보인 4개 균주 CAB 104, CAB 110, CAB 111, CAB 116은 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-173 strain과 유사한 주요 단백질을 포함하였다(Fig. 4).

*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주의 활성 단백질 패턴을 기존의 균주들과의 차이점을 조사하기 위해 trypsin을 처리한 뒤 SDS-PAGE를 실시하였다. 이 결과 담배거세미나방에 대하여 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* CAB 109균주는 살충효과를 높게 나타내나 단백질 패턴에서는 담배나방에 전혀 효과가 없는 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주와 거의 유사하게 나타내었다(Fig. 5).

앞선 결과들에서 볼 수 있듯이 기존 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*와 다르게 새롭게 분리된 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*CAB 109는 담배거세미나방에 높은 활성을 나타내었다. 하지만 이러한 기주특이성은 외형적으로 나타나는 생물검정과 같은 특성이나 단백질 특성만으로는 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* 균주와 구별하기 어려웠다. *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*CAB 109는 기존의 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*가 가지고 있는 Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D protoxin gene 이외에 또 다른 gene을 가지고 있을 것으로 추측된다(Crickmore et al., 1998; Höfte and Whiteley., 1989). 따라서 앞으로



**Fig. 4.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis profiles of *B. thuringiensis* crystal proteins. Lanes M: molecular weight markers; Lane 1: *B. thuringiensis aizawai*; Lane 2: *B. t. kurstaki*; Lane 3: CAB 104; Lane 4: CAB 109; Lane 5: CAB 110; Lane 6: CAB 111; Lane 7: CAB 116.



**Fig. 5.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis profiles of crystal  $\delta$ -endotoxin after trypsin treatments. Lane M: molecular weight markers; Lanes 1: *B. t.* subsp. *aizawai* native crystal protein; Lanes 2: *B. t.* subsp. *aizawai* with trypsin; Lanes 3: *B. t.* subsp. *aizawai* CAB 109 native crystal protein; Lanes 4: *B. t. aizawai* CAB 109 with trypsin.

CAB 109균주에 대한 유전학적 연구가 수행되어 균주의 특성이 판명되어야 할 것이다.

## 사 사

한국 토양에서 새로 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주를 동정하여준 규슈대학 생물적방제 연구실에 감사를 표명한다.

## Literature Cited

- Ahn, S.B., I.S. Kim, W.S. Cho, M.H. Lee and K.M. Choi. 1989. The Occurance of the crop insect pests from Korea in 1988. *Korean J. Appl. Entomol.* 28(4): 246-253.
- Apaydin, O., A.F. Yenidunya, S. Harsa and H. Gunes. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 285-292.
- Aronson, A.I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbil. Rev.* 50: 1-24.
- 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., H.J., Kim, G.H., Lee and S.T., Park. 2007. Seasonal occurrence of tobacco cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius and beet armyworm, *Spodoptera exigua* hubner using sex pheromone traps at different locations and regions in Yeongnam district. *Korean J. Appl. Entomol.* 46(1): 27-35.
- 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.
- Cho, J.R., W.R. Song., S.Y., Hwang, H.S. Kim and J.O. Lee. 1996. Age-related susceptibility of *Spodoptera litura* larvae to some insecticides. *Korean J. Appl. Entomol.* 35(3): 249-253.
- 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.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 807-813.
- Da Silva, S.M.B., J.O. Silva-Werneck, R. Falcao, A.C. Gomes, R.R. Fragozo, M.T. Quezado, O.B.O. Neto, J.B. Aguiar, M.F. G. de Sa, A. Bravo and R.G. Monnerat. 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *J. Appl. Ent.* 128: 102-107.

- Finney, D.J. 1971. Probit analysis, estimation of the median effective dose. Cambridge University Press. London. 19-47.
- Gill, S.S., E.A. Cowles and V. Francis. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC 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* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on an artificial diet. Korean J. Appl. Entomol. 29: 180-183.
- Goh, H.G., J.D. Park, Y.M. Choi, K.M. Cho 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.
- Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstration rapid larvicidal activity against *Anopheles serengotii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News. 37: 355-358.
- Gough, J.M., D.H. Kemp, R.J. Akhurst, R.D. Pearson and K. Kongsuwan. 2005. Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. J. Invertebr. Pathol. 90: 39-46.
- Höfte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53(2): 242-255.
- Kim, D.A., J.S. Kim, M.R. Kil, Y.N. Youn, D.S. Park and Y.M. Yu. 2006. Isolation and activity of insect pathogenic *Bacillus thuringiensis* strain from soil. Korean J. Appl. Entomol. 45(3): 357-362.
- Kim, S.G., J.D. Park, D.I. Kim., D.J. Im., K.C. Kim and Y.M. Yu. 2003. Effects of field application of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus to control *S. litura* in chrysanthemum. Korean J. Appl. Entomol. 42(2): 153-157.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Lee, G.H., S.D. Bae, H.J. Kim, S.T. Park and M.Y. Choi. 2006. Economic injury levels for the common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. Korean J. Appl. Entomol. 45(3): 333-337.
- Ohba, M. and K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. 32: 303-309.
- 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.
- Raymond, M. 1985. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. Cah. ORSTOM, Ser. Ent. Med. et Parasitol. 22: 117-121.
- 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.
- Yasutake, K., N.D. Binh, K. Kagoshima, A. Uemori, A. Ohgushi, M. Maeda, E. Mizuki, Y.M. Yu and M. Ohba. 2006. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. Can. J. Microbiol. 52: 365-372.
- 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 March 8 2008;  
accepted March 17 2008)