



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0052266

(43) 공개일자

2016년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0152371

(22) 출원일자

2014년11월04일

심사청구일자

2014년11월04일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

유용만

대전광역시 서구 청사로 70 누리아파트 110동 502호

윤영남

대전광역시 유성구 배울2로 61, 대덕테크노밸리 0단지아파트 1008동 902호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

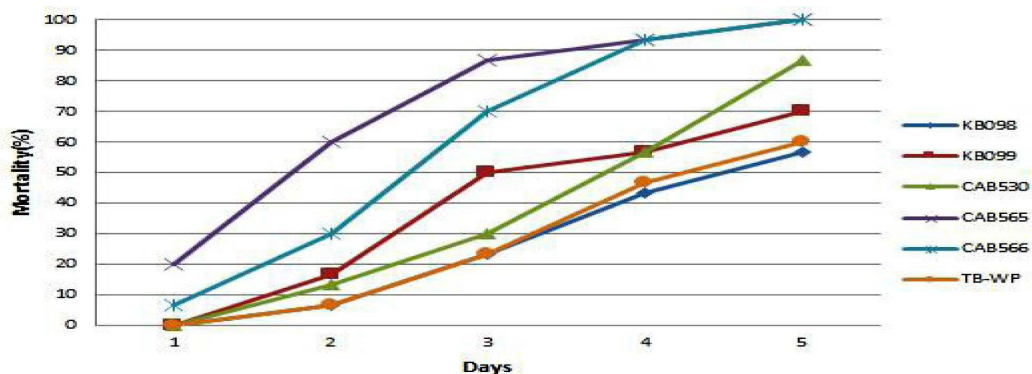
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

서미자

대전광역시 유성구 배울2로 19, 대덕테크노밸리9단지아파트 908동 601호

이유경

경상북도 김천시 시청6길 27, 덕일아파트 102동 601호

김희지

대전광역시 서구 대덕대로 150, 경성큰마을아파트 116동 1508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ010029

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 현장실용화 농업기술-친환경 안전농산물 생산기술-친환경 미생물 농자재의 현장적용 기술
개발- 지역맞춤형 미래농업인재양성사업단

연구과제명 곤충병원 세균을 이용한 나방류 방제기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주 (KCTC18335P).

청구항 2

제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 살충용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 해충은 나비목 해충 또는 파리목 해충인 것을 특징으로 하는 해충 살충용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 해충은 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방 또는 이집트숲모기인 것을 특징으로 하는 해충 살충용 조성물.

청구항 5

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법.

청구항 6

제1항의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 이의 활성 형태가 분자량 65kDa인 것을 특징으로 하는 내독소 단백질.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 토양에서 분리한 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물, 상기 살충제를 식물 또는 토양에 처리하여 해충을 방제하는 방법 및 상기 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)는 소토(sotto) 질병에 걸린 누에로부터 일본에서 처음 발견되었다(Ishiwata, S. 1901 Dainihan Sanbshi Kaiho. 114:1-5). 바실러스 투린지엔시스는 자연환경에서 아주 흔하게 존재하고 있으며 토양을 포함하여 곤충, 낙엽과 침엽수 잎, 물, 저장된 곡물의 가루, 양잠농가 등 우리 주변에 있는 일상 서식지에서 분리된 것으로 보고되었다.

[0003] 미생물 살충제로서 가장 많이 사용되는 바실러스 투린지엔시스의 주요 작용기작인 살충성 단백질은 비선택 유기에 대하여 안전하기 때문에 친환경농업에서 주요 작물보호 농자재로 사용되며 전 세계 생물적 방제의 80~90%를 차지한다. 바실러스 투린지엔시스는 호기성 그람 양성균의 간균으로 내생포자를 형성하며 내독소 단백질로 이루어진 살충성 결정체(crystal) 단백질을 생성한다. 내독소 단백질은 주로 cry와 cyt 독소로 구성되어 있다.

Cry 단백질은 특히 나비목, 파리목 및 딱정벌레목 등의 곤충에 독성을 가지며(Bravo *et al.*, 2005 Elsevier BV, *Amsterdam* 175-806), 이외에도 벌목, 매미목, 메뚜기목, 응애, 선충, 원생동물에 대한 활성도 보고되고 있다(Schnepf *et al.* 1998 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806).

[0004] 바실러스 투린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*)의 결정체 단백질은 곤충의 중장액과 반응하여 독성단백질로 분해되어 세포막에 작은 구멍을 형성해 패혈증을 일으켜 살충활성을 보이는 작용기작을 가지고 있다. 또한 바실러스 투린지엔시스의 독성이 활성을 갖기 위해서는 반드시 해충이 섭식해야하기 때문에 유충만을 죽이고 해충의 알, 번데기, 성충에는 영향을 줄 수 없는 단점이 있다.

[0005] 나비목 난방제 해충인 담배거세미나방과 과밤나방은 나비목(Lepidoptera), 밤나방과(Noctuide)에 속하는 가장 대표적인 농업 해충이다. 세계적으로 잘 알려져 있으며 채소, 화훼 및 과수 등 다양한 재배작물에 피해를 주는 광식성 해충이다. 담배거세미나방의 유충은 왕성한 섭식활동에 의해 경제작물에 미치는 피해가 매우 심하며, 성충은 인모에 덮인 알을 산란하여 증식력이 매우 높기 때문에 선택적 살충제를 번갈아가며 지속적인 방제가 이루어지지 않으면 재배작물에 큰 영향을 미치게 된다. 과밤나방의 유충은 장거리를 이동할 수 있으며 작물의 줄기 속으로 들어가 안쪽에서 표피를 남겨놓고 가해하기 때문에 살충제에 노출될 기회가 적어진다. 배추좀나방은 나비목(Lepidoptera) 집나방과(Hyponomeutidae)에 속하며 십자화과 작물에 주요 해충이다. 연간 발생 세대수가 많고, 발육기간이 짧아 살충제에 의한 노출 기회가 많으며 저항성 발달이 빠르게 나타날 수 있다. 현재 시판되는 대부분의 화학 살충제에 대해서 높은 저항성 개체의 출현으로 방제가 어려워지며, 더욱이 노령 유충으로 갈수록 화학 살충제에 대해 확연하게 낮은 감수성을 나타내기 때문에 화학 살충제 대신할 수 있는 효과적인 방법 중 하나로 바실러스 투린지엔시스를 기반으로 한 미생물농약을 사용하기 시작하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1249283호에서는 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 K B 100 균주 및 이의 용도가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1212020호에서는 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 K B 098 균주 및 이의 용도가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 과밤나방에 높은 독성을 나타내는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566 균주 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 나비목 난방제 해충 또는 파리목 해충 방제를 목적으로 토양에서부터 바실러스 투린지엔시스를 분리·동정하고 생물검정을 통하여 살충효과가 우수하게 나타나는 균주를 선발하였다. 본 발명에서 선발한 투린지엔시스 아종 아이자와이(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주의 살충활성과 형태적 특성, 내독소 단백질과 플라스미드 DNA 패턴 분석 등 분자유전학적인 특성을 알아본 결과, 기존에 알려진 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 균주보다 담배거세미나방, 배추좀나방, 과밤나방 및 이집트숲모기 등의 해충에 대해 훨씬 방제 효과가 뛰어난 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 해충에 대해 살충 활성을 갖는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 해충 살충용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주의 유효량을 식물 또는 토양에 살포함으로써 해충을 방제하는 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주를 처리할 경우, 각 나비목 해충 또는 파리목 해충에 대해 강력한 살충효과를 보이므로 이를 포함하는 본 발명의 조성물은 친환경적인 제제로서 작물에 미치는 영향을 최소화하고 작물에 발생하는 해충을 방제하는데 효과적이며, 속효성을 보임으로써 나비목 해충 또는 파리목 해충에 탁월한 살충효과를 얻을 수 있으므로, 무공해성 해충 방제용 제제의 개발 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 대한 CAB565, CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도(10^5 cfu/ml)로 2령 유충에 처리한 후 사충물을 분석한 결과이다.
- 도 2는 과밤나방(*Spodoptera exigua*)에 대한 CAB565, CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도(10^5 cfu/ml)로 2령 유충에 처리한 후 사충물을 분석한 결과이다.
- 도 3은 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 대한 CAB565, CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도(10^5 cfu/ml)로 2령 유충에 처리한 후 사충물을 분석한 결과이다.
- 도 4는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565(A) 및 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566(B) 균주의 결정체 형태의 위상차현미경($\times 1000$) 사진이다. 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 아종 CAB565(C) 및 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566(D) 균주의 포자 결정체 혼합물의 주사전자현미경 사진이다.
- 도 5는 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 사진이다. M, 단백질 표준 분자량 마커; 라인 1, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098; 라인 2, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099; 라인 3, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565; 라인 4, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566.
- 도 6은 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소 단백질의 SDS-PAGE 사진이다. M, 단백질 표준 분자량 마커; 라인 1, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098; 라인 2, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099; 라인 3, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565; 라인 4, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566.
- 도 7은 과밤나방 중장액의 농도에 따른 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소 단백질의 분해 정도를 나타낸 SDS-PAGE 사진이다. M, 단백질 표준 분자량 마커; 라인 1, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098; 라인 2, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099; 라인 3, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565; 라인 4, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566.
- 도 8은 *cry* 유전자에 대한 특이 프라이머를 이용한 PCR 산물의 아가로스 겔(1.5%) 전기영동 결과를 나타낸다. (A) 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565. 라인 1: *cryIAa*; 라인 2: *cryIAb*; 라인 3: *cryIAc*; 라인 4: *cryIC*; 라인 5: *cryID*; 라인 6: *cryII*. (B) 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566. 라인 1: *cryIAa*; 라인 2: *cryIAb*; 라인 3: *cryIAc*; 라인 4: *cryIC*; 라인 5: *cryID*; 라인 6: *cryII*.
- 도 9는 바실러스 투린지엔시스 균주의 플라스미드 DNA 패턴을 나타낸다. M. Lamda Hind III 마커. 라인 1: 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099; 라인 2: 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 CAB565; 라인 3: 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098; 라인 4: 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 CAB566.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 토양으로부터 분리된, 해충에 대해 살충효과를 가지는 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주(KCTC18335P)를 제공한다.
- [0015] 본 발명에서는 또한 신규한 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주의 순수배양물을 유효성분으로 함유하는 해충의 살충용 조성물을 제공한다. 상기 조성물에서, 상기 해충은 나비목 해충 또는 파리목 해충일 수 있으며, 상기 나비목 해충은 담배거세미나방, 배추좀나방 또는 과밤나방, 상기 파리목 해충은 이집트숲모기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명에서는 또한, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주 (KCTC18335P) 또는 이의 순수배양물을 함유하는 조성물의 유효량을 해충의 방제를 위하여 식물 또

는 토양에 살포하는 것을 특징으로 하는 해충의 방제 방법을 제공한다.

- [0017] 상기 방제 방법에서, 상기 해충은 나비목 해충 또는 파리목 해충일 수 있으며, 상기 나비목 해충은 담배거세미나방, 배추좀나방 또는 파밤나방, 상기 파리목 해충은 이집트숲모기일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에서는 또한, 해충에 대해 살충 활성이 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) CAB566 균주의 배양에 의해 얻어지고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량이 130kDa인 내독소 단백질을 제공한다. 상기 내독소 단백질의 활성 형태는 분자량 65kDa이다.
- [0019] 이하, 본 발명의 설명에 사용되어지는 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0020] “살충성”은 식물해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 물질의 능력을 의미한다.
- [0021] “유효량”은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상으로 투여될 수 있다.
- [0022] “내독소 단백질”은 본 발명의 균주만이 소유하는 단백질로 이 균주가 생산하는 독소 단백질은 일정한 해충에만 특이적으로 방제 활성을 나타낸다.
- [0023] “조성물”은 비활성(예를 들어, 검출가능 약품 또는 표지 또는 액체 담체) 또는 활성(예를 들어, 보조제)인, 담체 또는 조성물과 같이 활성제 및 또 다른 화합물의 조합을 의미하도록 의도된다.
- [0024] 본 발명의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*) 균주 CAB566는 대한민국 충북에서 채집한 토양에서 분리하여 얻은 것으로, 내독소 단백질 유전자를 함유하고 있어, 생장조건이 악화될 경우 이 유전자로부터 내독소 단백질을 생산한다. 이렇게 생산된 내독소 단백질은 이중 피라미드 형태의 결정체를 형성하며, 담배거세미나방, 배추좀나방 또는 파밤나방 등의 나비목 해충, 또는 이집트숲모기 등의 파리목 해충에 대해 우수한 살충 효과를 나타낸다. CAB566 균주를 적절한 배지, 예를 들어 GYS 배지 (0.1% 글루코스, 0.2% 효모추출물, 0.05% 인산제일칼륨, 0.2% 황산암모늄, 0.002% 황산마그네슘, 0.005% 황산망간, 0.008% 염화칼슘)에서 28 내지 30℃, 바람직하게는 30℃에서 산소분압 30 내지 70%, 바람직하게는 60%하에 160 내지 200 rpm으로 3 내지 5일 동안 배양한 후, 이 배양액을 원심분리하여 균체를 수확하고, 이 균체 10 내지 40 중량%, 바람직하게는 20 중량%를 해충 살충제에 통상적으로 사용되는 첨가제 60 내지 90 중량%, 바람직하게는 80 중량%와 혼합하여 해충 살충제를 제조할 수 있으며, 이때 첨가제로는 NT-NX250L, NK-EPB100 등의 계면활성제, 화이트카본, 텍소텍스-25 등의 보조제, 카올린 등의 증량제 등을 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 살충용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 오이, 무, 들깨, 고추, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 식물 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 채소 표면에도 처리될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 Bt 아종 아이자와이 CAB566 균주를 함유하는 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 나비목 해충 또는 파리목 해충 방제에 유용한 조성물은 Bt 아종 아이자와이 CAB566 균주의 배양액 또는 건조분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 혼합하여 해충 살충용 조성물로 제조할 수 있다.
- [0027] 상기 무기염류는 Bt 아종 아이자와이 CAB566 내독소 단백질과 함께 해충의 증장에 들어가서 독소 단백질이 빠르게 활성독소의 형태로 전환되는 것을 도와주거나 증장벽에 물리적인 상처를 주어 독소의 활성을 증진시킬 뿐만 아니라 해충의 체내에서 생리적인 변화를 유도하여 독소의 작용효과를 높일 수 있도록 작용하는 물질로서 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 구입하여 사용할 수 있는 것이다.
- [0028] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단과 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수하다는 특징을 갖는 것으로 이해되는 물질로서, 본 발명에 따른 해충 살충용 조성물 중의 비티가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0029] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닐설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌설포석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼슘염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비

이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

- [0030] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분상화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, Bt 아종 아이자와이 CAB566 균주의 배양액 또는 건조분말과 함께 비티제 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 전분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카올린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 결합제는 상기 활성성분인 Bt 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등을 서로 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 전분, 텍스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0032] 방제 대상인 해충은 레피도프테라(Lepidoptera)이다. 특히 바람직한 양태에서, 해충은 양배추거세미나방[cabbage looper, 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)], 벨벳빈 카테르필라[velvetbean caterpillar, 안티카르시아 겐탈리스(*Anticarsia gemmatalis*)], 배추좀나방[diamondback moth, 플루텔라 크실로스텔라(*Plutella xylostella*)], 담배나방[tobacco budworm, 헬리오티스 비레스스(*Heliothis virescens*)], 과밤나방(*Spodoptera exigua*), 흰불나방(*Hyphantria cunea*), 누에(*Bombyx mori*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 작은각시들명나방(*Palpita indica*), 벼애나방(*Naranga aenescens*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이집트숲모기(*Aedes aegypti*) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 해충 살충제는 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화 될 수 있는데 이에 한정되지는 않으며, 수화제가 바람직하다.
- [0034] 제형화된 살충제는 사용전에 물에 500 내지 2,000 배, 바람직하게는 약 1,000 배로 희석하여 사용할 수 있다.

[0035] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0036] 재료 및 방법

[0037] 시료 채취

[0038] 토양 시료는 충청북도 영동, 옥천의 산과 들 26곳에서 채취하였다. 시료는 토양 표면에서 약 10cm 깊이로 판 후 멸균된 시약스폰을 이용하여 채취하였고 실험에 사용하였다. 산은 주로 나무 밑의 토양에서, 들의 경우 생물농약의 살포가 되지 않는 토양을 중심으로 채취하였고, 토양 샘플은 멸균된 용기에 밀봉하여 4℃에 보관하였다.

[0039] 바실러스 투린지엔시스 균주의 분리 및 동정

[0040] 채취된 토양 시료의 1g을 시험관에 넣은 뒤 멸균수 9mL을 넣고 3~4회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65℃ 항온 수조에서 30분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 흙을 가라앉히고 상층액을 10^{-3} 까지 희석하여 영양 아가 플레이트(Nutrient agar plate)에 고르게 도말하였다. 이 플레이트를 27℃ 배양기에서 3~4일간 배양한 후 형성된 바실러스 콜로니(Bacillus colony) 중에서 외형이 바실러스 투린지엔시스 균주와 유사한 콜로니를 선발하였다. 선발된 콜로니들은 위상차현미경 1,000배로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 멸균수에 희석하여 위와 같은 방법으로 배양한 후, 자가분해(autolysis)가 일어난 것을 확인하고 15,000 rpm으로 15분간 원심분리기(Avanti J-E, Beckman)로 원심 분리하여 집균하였다. 분리된 8개의 바실러스 투린지엔시스 균주 중 2개의 균주를 목원대학교 미생물생태자원연구소에 보내 플라젤린 C(flagellin C) 유전자에 의해 동정을 수행하였다.

[0041] 위상차현미경과 주사전자현미경

[0042] 영양 아가 플레이트 상에서 증식하여 포자형성기가 지난 바실러스 투린지엔시스 균주의 포자와 내독소결정성단

백질의 형태를 알아보기 위해 위상차현미경(Olympus BX51)과 주사전자현미경(Quanta FEG MK2)을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경으로 관찰하기 위해 소량의 균주를 슬라이드 글라스에 떨어뜨린 후 1,000배로 내독소결정성단백질의 형태를 관찰하였다(Kim et al., 1995 *Korean J. Seric. Sci.*, 37(1): 57-61).

[0043] 공시곤충

[0044] 본 발명에 사용된 나비목 해충인 담배거세미나방(*S. litura*), 파밤나방(*S. exigua*)은 인공사료를 먹이로 이용하였고, 배추좀나방(*P. xylostella*)은 열무를 기주로 사용하였다. 성충의 먹이로는 10% 설탕물을 공급하였다. 파리목인 이집트숲모기(*A. aegypti*)는 충남대학교 곤충생리 실험실에서 분양 받아 치어사료에 효모 추출물을 첨가한 먹이로 사육하여 사용하였다. 모든 곤충은 충남대학교 생물적 해충제어 실험실에서, 온도 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60% 조건(Kim et al., 2008 *Korean. J. Appl. Entomol.* 47(1): 87-93)에서 누대 사육하였다.

[0045] 생물활성 검정 및 반수치사농도

[0046] 선발된 2종의 바실러스 투린지엔시스 균주를 영양 아가배지에 접종하고 27°C 에서 5일 동안 배양 후 위상차현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 내독소 단백질을 형성하였을 때, 균을 모아 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 남은 펠렛에 멸균수 20ml를 첨가하여 CAB565는 1.0×10^7 (cfu/ml), CAB566은 1.7×10^7 (cfu/ml)에 해당하는 배양액을 생물검정에 사용하였다. 살충활성을 비교하기 위해 실험실에 보유하고 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 비교 균주로 사용하였고, 혈청형이 아이자와이이면서 생물농약으로 시판중인 TB-WP 제품과 비교 검정하였다.

[0047] 1) 담배거세미나방(*S. litura*) 및 파밤나방(*S. exigua*)에 대한 독성 검정

[0048] 담배거세미나방과 파밤나방에 대한 생물활성 검정은 $200\mu\text{l}$ 의 배양액을 1g의 인공사료에 첨가하여 2령 유충을 5마리씩 페트리 디쉬에 넣고 6 반복 실시하여 120시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0049] 2) 배추좀나방(*P. xylostella*)에 대한 독성 검정

[0050] 배추좀나방에 대한 생물활성 검정은 3령에서 5령 유충을 대상으로 배춧잎을 이용한 잎침지법(Shelton et al., 1993 *J. Econ. Entomol.* 86: 697-705)을 수행하였다. 잎 디스크(직경 5cm)를 40ml의 배양액에 침지하였고, 실온에서 1시간 동안 음건하였다. 대조구는 잎 디스크를 증류수에 동일한 조건으로 처리하였다. 처리된 잎 디스크는 필터 페이퍼를 깔아놓은 페트리디쉬에 옮긴 후 유충 10마리씩 넣고 3반복 실시하여 72시간 동안 치사율을 조사하였다.

[0051] 3) 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 대한 독성 검정

[0052] 이집트숲모기에 대한 생물활성 검정은 WHO(2005)의 실험방법을 일부 수정하여 실험하였다. 2령 유충 10마리씩 30ml의 물이 담긴 90ml 플라스틱 컵에 넣고, 희석한 균액의 0.3ml를 접종하였다. 72시간 동안 치사율을 조사하였고, 3 반복 실험하였다.

[0053] 4) 반수치사농도(LC_{50})

[0054] 모든 실험은 5마리씩 6 반복 실시하였으며, 희석농도는 유충이 모두 사망하는 농도와 생존하는 농도까지 5~7개의 농도범위를 정하여 조사한 사충률로 Finney(Finney, D. J. 1971 Cambridge University Press. London. pp 19-47)의 프로빗(probit) 계산법에 기초한 PC 프로그램을 이용하여 반수치사농도(LC_{50})를 산출하였다.

[0055]

SDS-PAGE

[0056]

실험에 사용된 각각의 균주를 영양 아가배지에 접종하고 27℃에서 5일 동안 배양하여 위상차현미경으로 자가분해(autolysis)가 일어나는 것을 확인한 후, PBS 버퍼를 사용하여 원심튜브에 15,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리를 하였다. 원심 후 상층액은 버리고 세척 버퍼 I (500mM NaCl, 2% Triton X-100)은 3번, 세척 버퍼 II (500mM NaCl)는 2번 세척하였다. 세척된 parasporal inclusion은 멸균수를 첨가한 후 -20℃에 보관하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(Laemmli, U. K. 1970 *Nature* 227: 680-685)의 방법을 일부 수정하여 12% 분리용 겔과 5% 축적 겔을 사용했다. 전기영동이 끝난 겔은 0.5% 쿠마시 블루로 염색하였다.

[0057]

담배거세미나방과 과밤나방의 증장 추출액은 각각의 5령 유충을 -4℃에 10초간 둔 후, 멸균한 해부용 칼을 이용하여 증장만 얼음하의 원심튜브에 넣고 13,000rpm, 4℃, 15분 원심 분리하여 깨끗한 상층액만 에펜도르프 튜브에 넣어 -20℃에 보관하였다. 증장액 처리는 살충성 결정체 독소 단백질과 50mM NaOH 수용액을 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심 분리하여 상층액을 버리고 증장액과 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시킨 후 확인하였다.

[0058]

PCR 분석

[0059]

선발된 2종의 바실러스 투린지엔시스 균주의 내독소 유전자의 Cry형 유전자를 동정하기 위하여 유전자 특이적 프라이머 세트를 사용하였다(표 1). PCR의 증폭은 Thermal Cycle C1000TM(BIO-RAD)을 사용하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP 등이 함유된 프리믹스(Bioneer)에 주형 DNA 1.0μl, 프라이머 세트 각각 1.0μl, 증류수 17μl를 혼합하여 최종 볼륨을 20μl로 하여 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분 총 30회로 94℃에서 1분, 어닐링 57℃에서 1분, 72℃에서 1분, 72℃에서 5분으로 진행하여 PCR 산물 DNA를 생산하였으며, 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하였다.

표 1

[0060]

PCR 분석을 위한 결정체 단백질 유전자 특이적 프라이머

cry gene	primer sequences(서열번호)	size of product (bp)
cry1Aa	5'GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC3'(1)	782
cry1Ab	5'TCGAATTGAATTTGTCC3'(2)	238
cry1Ac	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'(3)	550
cry1B	5'GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC3'(4)	902
cry1C	5'CAACCCTATTTGGTGCAGGTTC3'(5)	288
cry1D	5'GGTACATTTAGATGTTACAGCCAC3'(6)	465
cry1E	5'CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG3'(7)	961
cry1F	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC3'(8)	383
cry13'	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTCTC3'(9)	-
cry1G5'	5'ATATGGAGTGAATAGGGGG3'(10)	235
cry1G3'	5'TGAACGGCGATTACATGC3'(11)	-
cry1I5'	5'GCTGTCTACCATGATTGCTTG3'(12)	1584
cry1I3'	5'CAGTGCAGTAACCTTCTCTTGC3'(13)	-

[0061]

플라스미드 DNA 추출

[0062]

선발된 2종의 바실러스 투린지엔시스 균주로부터 플라스미드 DNA를 추출하기 위하여 Qiagen 미니 키트의 프로토콜을 일부 수정하여 사용하였다. 균주를 LB 배지 5ml에 접종하여 27℃, 180rpm으로 8시간 배양하였다. 배양액을 LB 배지 50ml에 넣고 동일한 조건으로 16시간 배양하였다. 배양된 균은 6,000g, 15분, 4℃의 조건으로 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 P1 버퍼(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA, 50μg/ml of RNase A) 4ml을 넣고 볼텍싱하여 펠렛을 풀어주었다. P2 버퍼 (0.2M NaOH, 1% SDS) 4ml을 넣고 튜브를 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 15~25℃ 배양기에서 5분간 배양하였다. 냉각한 P3 버퍼(4M guanidine hydrochloride, 0.5M potassium acetate, pH 4.2) 4ml을 넣고 4~6번 뒤집어 주어 혼합하고 얼음에서 15분간 배양하였다. 30분간 15,000rpm, 4℃로 원심 분리한 후, 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 15분간 15,000rpm, 4℃로 원심 분리한 후, Qiagen-tip 100을 수평으로 놓고 QBT 버퍼(50mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton X-100) 4ml을 넣어 통과시킨 컬럼에 원심 분리한 상층액을 넣었다. 상층액이 컬럼을 완전히 통과하면 QC 버퍼 10ml로 두 번 Qiagen-tip 100을 세척하였다. QF 버퍼 5ml로 DNA를 녹여서 분리하였다. 상온의 이소프로판올 3.5ml을 첨가하여 DNA를 침전시키고 30

분간 15,000rpm, 4℃로 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 70% 에탄올 2ml을 첨가하여 DNA 펠렛을 세척한 후 10분간 15,000rpm, 4℃로 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 5~10분간 공기건조시키고 3차 증류수 200 μ l를 넣어 플라스미드 DNA를 다시 녹였다. 플라스미드 DNA를 3차 증류수와 혼합시킨 후 멸균한 에펜도르프 튜브에 넣고 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 전기영동은 아가로스 겔을 1×TAE 버퍼에 1% 비율로 혼합하여 열을 가해 녹인 후 겔 트레이에 붓고 20분간 굳힌 아가로스 겔을 사용하였다. 전기영동장치에 겔과 동일한 1×TAE 버퍼를 겔 위로 3~5mm 정도 올라오게 붓고 로딩 다이와 로딩 스타를 5:1의 비율로 섞은 혼합액과 플라스미드 DNA 샘플을 1:5의 비율로 혼합하여 각각의 웰에 넣고 50V에서 60분간 전기영동한 후 UV를 쬔어 밴드 패턴을 확인하였다.

[0063] 실시예 1. 바실러스 투린지엔시스 균주의 분리 및 동정

[0064] 충청북도 영동, 옥천의 산과 들 26곳에서 토양을 채취하여 새로운 바실러스 투린지엔시스 균주 분리의 가능성을 확인하였다. 26개의 토양시료 중 6개의 토양에서 바실러스 투린지엔시스 균주가 분리되어 23%의 높은 비율로 나타났다(표 2). 바실러스 투린지엔시스 균주를 형태적으로 분리하기 위하여 영양 아가 플레이트에서 형성된 5385개의 콜로니 중에서 바실러스 투린지엔시스 콜로니와 유사한 형태의 세균 콜로니를 선발하여 위상차 현미경으로 관찰하였다. 현미경 관찰 결과 5385개의 콜로니 중에서 바실러스 투린지엔시스 콜로니로 확인이 된 것은 8개로 나타났다(표 3).

표 2

수집한 지역의 토양에서 분리된 바실러스 투린지엔시스

지역	Number of soil sample examined	Number of soil sample with <i>B.t</i> isolated
영동		
1> 산	5	1
2> 들	9	2
옥천		
1> 산	4	2
2> 들	8	1
Total	26	6

표 3

박테리아 콜로니로부터 분리된 바실러스 투린지엔시스

지역	Number of colonies sample examined	Number of colonies sample with <i>B.t</i> isolated
영동		
1> 산	2,499	3
2> 들	549	2
옥천		
1> 산	1,708	2
2> 들	630	1
Total	5,386	8

[0067] 분리된 8개의 바실러스 투린지엔시스 균주 중 높은 살충효과를 나타낸 2개의 균주를 목원대학교 미생물생태자원 연구소에서 플라젤린 C(flagellin C) 유전자에 의해 동정을 수행한 결과, CAB565 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*)로 분류되었고, CAB566 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자웨이(*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*)로 분류되었다.

[0068] 실시예 2. 생물활성 검정

[0069] 분리 선발된 8개의 바실러스 투린지엔시스 균주의 기주 범위 및 살충활성을 검정하기 위하여 실험실에서 사육중

인 나비목 해충인 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방과 파리목 해충인 이집트숲모기 등 4종류의 해충에 살충활성을 검정하였다(표 4). 시험한 결과, 8개 균주들의 활성범위 중 배추좀나방에서 6개의 균주로 가장 많은 수가 분리되었다. 이 중 CAB565, CAB566, CAB567 균주가 이 해충에 대해서 90% 이상의 높은 살충활성을 나타냈다. 또한 담배거세미나방에 CAB565, CAB566, CAB567 균주, 파밤나방에 CAB565, CAB566 균주가 90% 이상의 높은 살충활성을 나타내었다. 그리고 이집트숲모기에는 CAB565, CAB566 균주가 나비목보다 낮은 70% 이상의 살충활성을 나타내었다.

표 4

Tested larvae		Lepidoptera			Diptera
		<i>Spodoptera litura</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Aedes aegypti</i>
Strain	CAB559	-	-	-	-
	CAB560	-	-	-	-
	CAB561	+	+	++	+
	CAB562	+	+	++	-
	CAB563	-	-	+	-
	CAB565	+++	+++	+++	++
	CAB566	+++	+++	+++	++
	CAB567	+++	++	+++	+
Total		5	5	6	4

+++ : 효과 높음, 90% 살충률,

++ : 효과 있음, 70~89% 살충률,

+ : 효과 낮음, 50~69% 살충률,

- : 효과 없음, 0~49% 살충률

CAB565, CAB566 균주는 담배거세미나방, 배추좀나방, 파밤나방, 이집트숲모기 등 4종의 곤충에 모두 높은 살충 활성 및 넓은 기주범위를 가지는 것으로 나타내었다. 8개의 균주 중 CAB559, CAB560 균주는 효과가 없는 무독성 균주이다. 이 결과는 국내 토양을 대상으로 하여 분리된 바실러스 투린지엔시스 균주 중에서 약 30%의 비율로 내독소 단백질은 생산하지만, 독성을 띄지 않는 무독성 균주가 보고된 결과와 유사하다(Kim et al., 1995 Korean J. Seric. Sci., 37(1): 57-61). 살충활성이 높은 CAB565, CAB566 균주를 선발하여 실험실에 보유하고 있는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 비교 균주로 사용하였고, 혈청형이 아이자와이이면서 생물농약으로 시판중인 TB-WP 제품과 비교 검정하였다.

담배거세미나방에 대한 생물검정은 2령부터 4령 유충으로 살충활성을 검정 하였다. 그 결과, 2령 유충에 대한 LC_{50} 값이 CAB565 균주에서 1.9×10^3 (cfu/ml)으로 비교 균주인 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주와 TB-WP 제품에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인되었다(표 5). 반면 3령에 대한 LC_{50} 값은 CAB566 균주가 4.6×10^5 (cfu/ml)으로 가장 높은 살충활성을 보였고, 4령 역시 7.7×10^5 (cfu/ml)으로 비교균주인 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 TB-WP 제품에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인하였다. 담배거세미나방은 저항성이 강하며 3령 이상의 유충은 약제에 대한 감수성이 낮아서 방제가 어렵다고 보고되어있다(Bae et al., 2003 Korean J. Appl. Entomol., 42(3): 225-231). 이러한 결과들을 바탕으로 담배거세미나방은 발생초기인 어린 령기의 유충으로 존재할 때 처리하는 것이 효과적인 방제방법일 것으로 분석된다. 파밤나방에 대한 생물검정은 2령부터 5령 유충으로 살충활성을 검정하였다. CAB566 균주에서 2령부터 5령 유충에 대한 LC_{50} 값이 각각 2.5×10^4 (cfu/ml), 3.0×10^5 (cfu/ml), 4.6×10^5 (cfu/ml), 9.7×10^5 (cfu/ml)으로 비교균주인 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 TB-WP 제품에 비해서 상당히 높은 살충활성을 나타내는 것으로 확인되었다(표 6). 2령이 가장 감수성이고 3령부터 5령의 LC_{50} 값은 크게 차이가 나지 않았다.

표 5

[0077]

담배거세미나방에 대한 바실러스 투린지엔시스 균주의 살충활성(LC₅₀)

Strain	2nd(cfu/ml)	3rd(cfu/ml)	4th(cfu/ml)
KB098	9.8×10^5	5.2×10^7	$> 10^7$
KB099	2.7×10^5	3.8×10^6	5.0×10^7
CAB530	2.3×10^5	4.4×10^6	$> 10^7$
CAB565	1.9×10^3	9.0×10^6	$> 10^7$
CAB566	3.9×10^3	4.6×10^5	7.7×10^5
TB-WP	1.4×10^5	5.8×10^7	$> 10^7$

표 6

[0078]

파밤나방에 대한 바실러스 투린지엔시스 균주의 살충활성(LC₅₀)

Strain	2nd(cfu/ml)	3rd(cfu/ml)	4th(cfu/ml)	5th(cfu/ml)
KB098	1.3×10^6	8.7×10^6	9.8×10^6	3.3×10^7
KB099	8.1×10^5	2.3×10^6	2.7×10^6	1.2×10^7
CAB530	2.3×10^5	2.5×10^6	2.7×10^6	9.8×10^6
CAB565	4.9×10^4	3.2×10^5	5.6×10^5	3.0×10^6
CAB566	2.5×10^4	3.0×10^5	4.6×10^5	9.7×10^5
TB-WP	1.0×10^6	3.2×10^6	4.9×10^7	3.8×10^7

[0079]

담배거세미나방과 파밤나방에 대한 CAB565, CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도로 2령 유충에 처리한 후 확인해 본 결과 담배거세미나방의 경우 CAB565 균주, 파밤나방의 경우 CAB566 균주가 다른 균주와 제품에 비해 가장 고독성을 나타내었으며, 더 빠른 살충효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 1 및 도 2). 배추좀나방에 대한 CAB565, CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099균주, TB-WP 제품의 정확한 생물검정과 속효성을 비교하기 위해 동일한 농도로 3령부터 5령 유충에 처리한 후 확인해 본 결과 CAB565, CAB566 균주가 다른 균주와 제품에 비해 가장 고독성을 나타내었으며, 더 빠른 살충효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 3). CAB565, CAB566 균주의 경우 36시간부터 급격하게 사충률이 증가하였고, CAB565 균주는 48시간부터 100%의 사충률을 나타내었으며, CAB566 균주는 60시간부터 100%의 사충률을 나타내었다. CAB565, CAB566 균주는 나비목 난방제 해충에 고독성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 생물학적 방제에 활용하기 좋은 바실러스 투린지엔시스 균주로 예상할 수 있다.

[0080]

실시예 3. 본 발명의 균주의 형태학적 특성

[0081]

나비목 난방제 해충에 높은 살충활성을 가지는 CAB565, CAB566 균주의 결정체(crystal)의 형태를 확인하기 위하여 위상차 현미경으로 결정체와 포자(spore)를 관찰을 하였다. 위상차현미경으로 관찰한 결과 CAB565, CAB566 균주는 일반적인 이중 피라미드 형태의 결정체임을 확인할 수 있었다(도 4A 및 도 4B). CAB565 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주와 유사한 이중 피라미드 형태의 결정체임을 확인할 수 있었고, CAB566 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 유사한 이중 피라미드 형태의 결정체임을 확인할 수 있었다.

[0082]

또한, CAB565, CAB566 균주의 결정체를 비교하기 위하여 주사전자현미경으로 관찰을 하였다. 위상차현미경에서

관찰된 것과 같이 이중 피라미드 형태의 결정체를 가지고 있는 것이 확인이 되었다(도 4C 및 도 4D). 두 균주는 이중 피라미드 형태의 결정체를 가지고 있으며 모두 나비목 해충에 활성이 있는 것으로 두 균주 모두 cry1 독소 유전자를 가지고 있을 것이라고 추측할 수 있다.

[0083] 실시예 4. SDS-PAGE

[0084] 활성검정에서 나비목 난방제 해충에 대해 높은 살충활성을 보인 CAB565와 CAB566 균주를 SDS-PAGE를 통하여 단백질 패턴을 조사하였다. 12% 분리용 젤로 전기 영동한 결과, CAB565 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주와 같은 130kDa의 밴드가 확인되었으며, 매우 유사한 패턴을 나타내 쿠르스타키 균주(strain)로 추정할 수 있었다. CAB566 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 같은 130kDa이 확인되었으며, 같은 크기의 유사한 밴드 2개를 확인할 수 있었다(도 5).

[0085] 두 균주의 parasporal inclusion의 활성 독소 양상을 확인하기 위해 담배거세미나방과 과밤나방의 중장액을 추출하여 각 균주와 37℃에서 반응시켜 보았다. 먼저, 담배거세미나방의 중장액을 처리하였을 때 CAB565 균주와 CAB566 균주의 130kDa의 전독소가 중장액에 의해 분해되어 약 65kDa의 독소단백질 밴드를 확인할 수 있었다(도 6). 과밤나방의 중장액을 처리하였을 때도 마찬가지로 CAB565 균주와 CAB566 균주의 130kDa의 전독소가 중장액에 의해 분해되어 약 65kDa의 독소단백질 밴드를 확인할 수 있었다(도 7).

[0086] 실시예 5. Cry-타입 유전자 동정

[0087] 과밤나방에 활성을 보인 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주는 cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D 유전자를 가지고 있었고, 담배거세미나방에 활성을 보인 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주는 cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry1I 유전자를 가지고 있었다(표 7). 본 실험에서 분리 동정된 CAB565 균주는 cry1Aa, cry1Ac, cry1I 유전자를 가지고 있음이 확인되었으며, 이는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주가 가지고 있는 결정체 유전자와 유사한 경향을 나타냈다(도 8A). 또한 CAB566 균주는 cry1Aa, cry1C, cry1D, cry1I 유전자를 가지고 있음이 확인되었으며, 이는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 일치성을 나타냈다(도 8B).

[0088] 이 중에서 특히 cry1C 유전자는 담배거세미나방과 과밤나방에 매우 높은 활성을 보이고, cry1D는 담배거세미나방에 독성을 보인다고 알려져 있다(Porcar et al., 2000 Entomol. Exp. Appl. 97(3): 339-346). CAB566 균주가 담배거세미나방과 과밤나방에 높은 활성을 보이고 있는 것으로 보아 이 균주가 가지고 있는 cry1C, cry1D 유전자로 인해서 두 해충에 대해 높은 활성이 있을 것이라고 추측할 수 있었다.

표 7

바실러스 투린지엔시스 균주의 cry 유전자

Strain	cry genes
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> CAB565	<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1I</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kustaki</i> KB099	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D, cry1I</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> CAB566	<i>cry1Aa, cry1C, cry1D, cry1I</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> KB098	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1C, cry1D</i>

[0090] 실시예 6. 플라스미드 DNA 분석

[0091] 바실러스 투린지엔시스 대상 해충에 살충활성을 나타내는 결정체 단백질을 형성하는데 관여하는 cry 유전자는 주로 플라스미드 DNA 상에 존재한다. 바실러스 투린지엔시스 내에서 존재하는 플라스미드 DNA는 최대 17개로 이루어져 있고, 길이는 2~250kbp 정도이다(Sarrafzadeh et al., 2007 Enzyme Microb. Tech. 40: 1052-1058). 균주마다 보유하고 있는 플라스미드 DNA의 개수와 길이는 다양하게 나타난다. 이와 마찬가지로 cry 유전자 또한 모든 균주에서 항상 같은 크기의 플라스미드 DNA에 존재하는 것이 아니라 균주마다 서로 다른 위치의 플라스미드 DNA에 존재한다(Kronstad et al., 1983 J. bacteriol. 154: 419-428).

[0092] CAB565 균주와 대조균주로서 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주를 사용하였고, CAB566 균주와

대조균주로서 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주를 사용하여 플라스미드 DNA 패턴을 확인하였다(도 9). CAB565 균주의 전체 플라스미드 DNA를 분석한 결과, 같은 혈청형임에도 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주와 다른 패턴의 플라스미드 DNA를 가지고 있었다. CAB565 균주는 10개, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주는 5개의 플라스미드 DNA를 포함하고 있는 것으로 조사되었다. 또한, CAB565 균주에서는 23.1kb보다 큰 플라스미드 DNA 밴드가 3개, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099는 2개를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었으며, CAB565 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099에 존재하지 않는 9.4kb와 4.4kb 이하의 밴드를 확인할 수 있었다. 앞의 결과와 마찬가지로 CAB566 균주의 전체 플라스미드 DNA를 분석한 결과, 같은 혈청형임에도 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주와 다른 패턴의 플라스미드 DNA를 가지고 있었다. CAB566 균주는 7개, 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주는 9개의 플라스미드 DNA를 포함하고 있는 것으로 조사되었다. CAB566 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주에서 23.1kb보다 큰 플라스미드 DNA 밴드 2개가 확인되었고, 6.6kb 밴드를 확인할 수 있었다. CAB566 균주는 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098에 존재하지 않는 9.6kb와 4.4kb 밴드를 확인할 수 있었으며, 4.4kb 이하의 밴드를 보이지 않음으로서 차이를 확인할 수 있었다.

[0093] 앞의 결과들에서 CAB565 균주와 CAB566 균주를 대조균주 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키 KB099 균주와 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이 KB098 균주 간에 외형적 특성이나 단백질의 특성만으로는 구별하기가 어려웠으며 플라스미드 DNA 분석을 통해 차이가 있음을 확인하였다. CAB565 균주와 CAB566 균주는 해충의 방제를 위해 사용하고 있는 기존 미생물제제의 균주와 같은 혈청형이지만 다른 유전자 양상이 확인되었다.

[0094] 이 두 균주는 기존의 바실러스 투린지엔시스 아종 아이자와이, 바실러스 투린지엔시스 아종 쿠르스타키와 같은 혈청형이지만, 분자학적으로 차이를 나타내며 새로운 균주임을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0095]

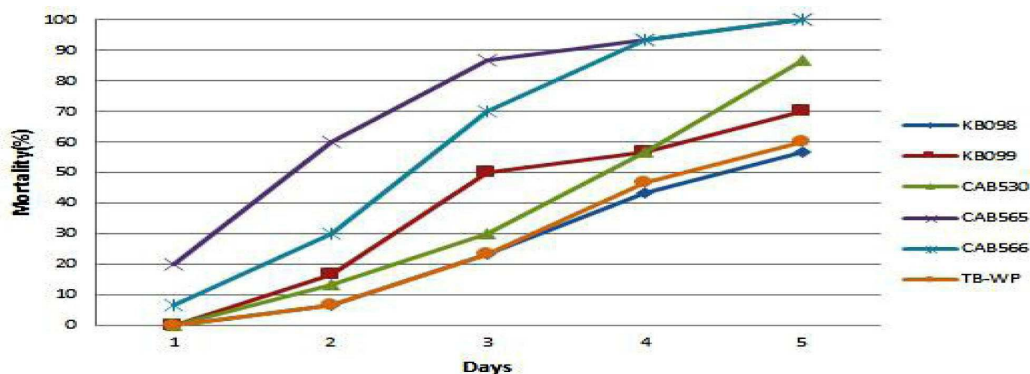
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18335P

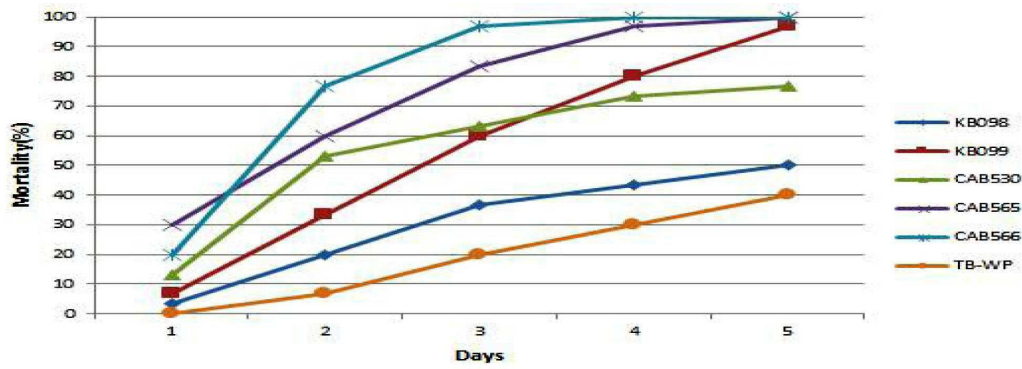
수탁일자 : 20141021

도면

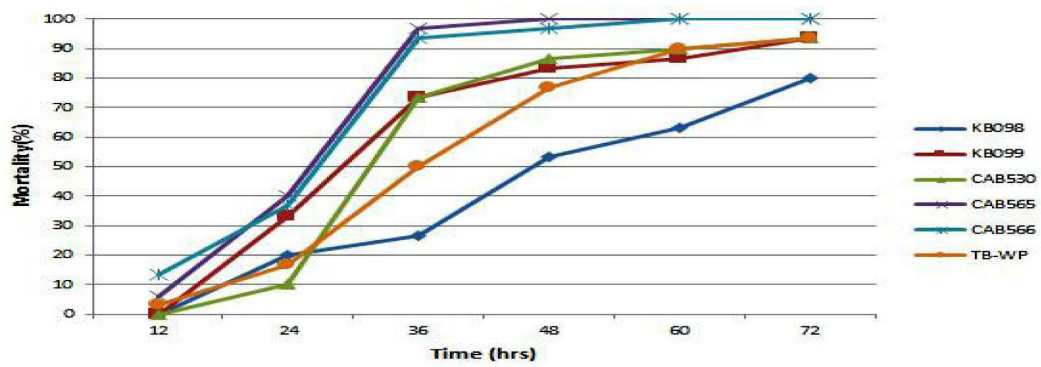
도면1



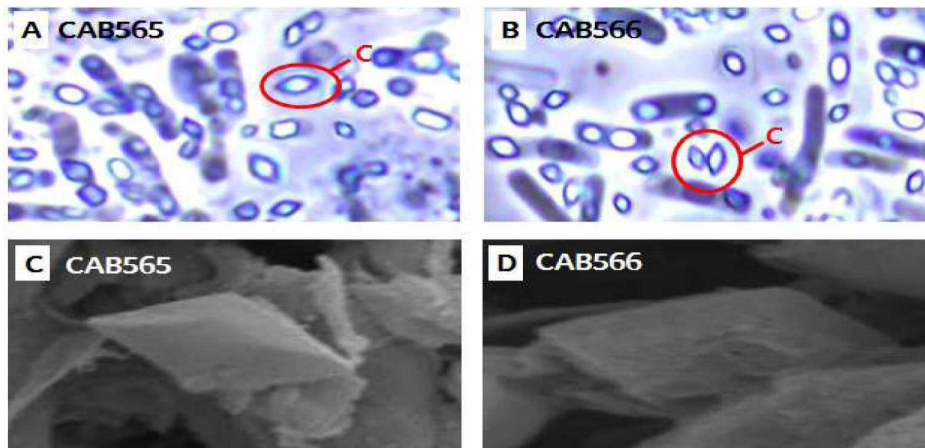
도면2



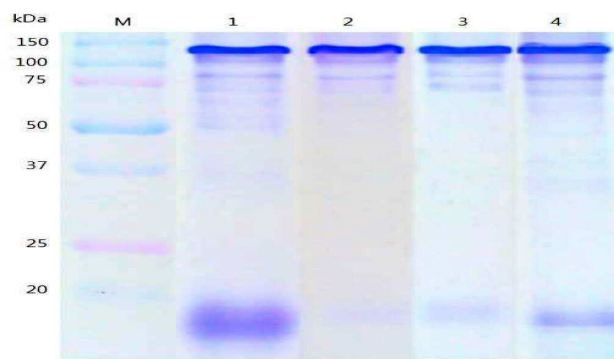
도면3



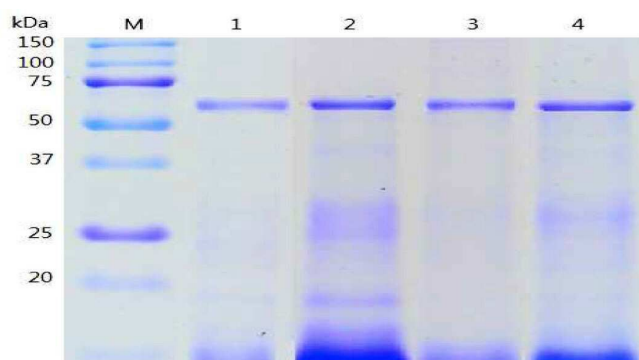
도면4



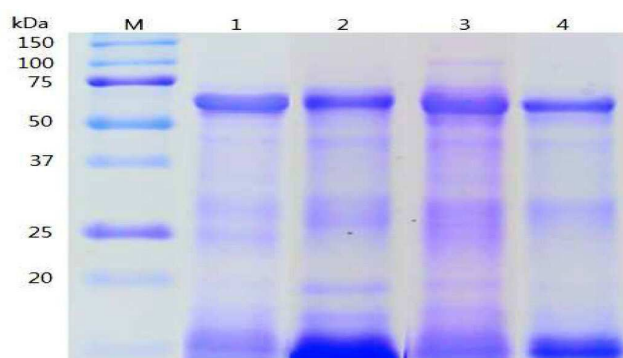
도면5



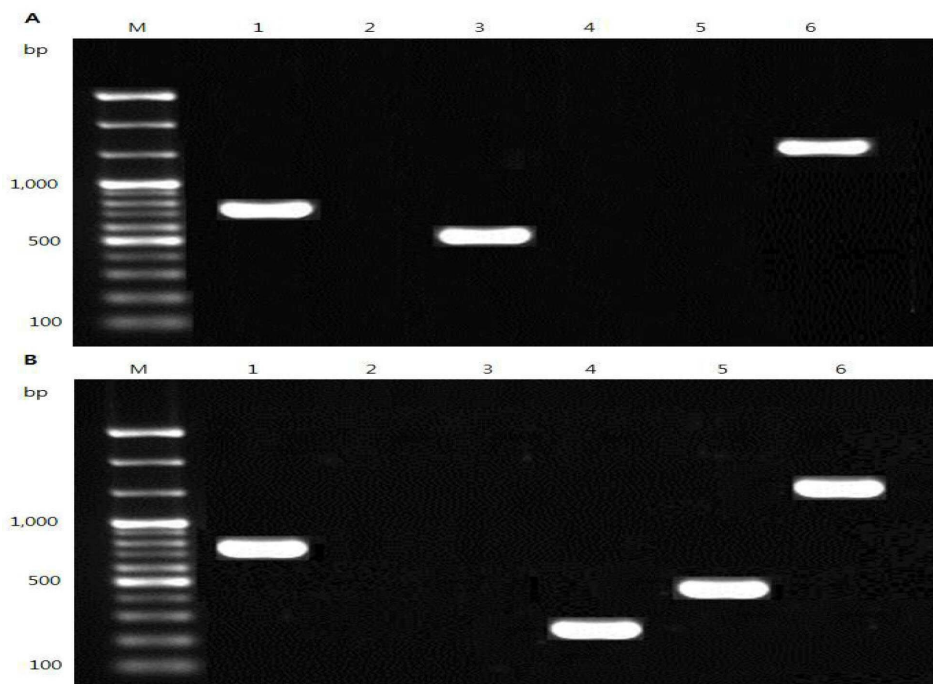
도면6



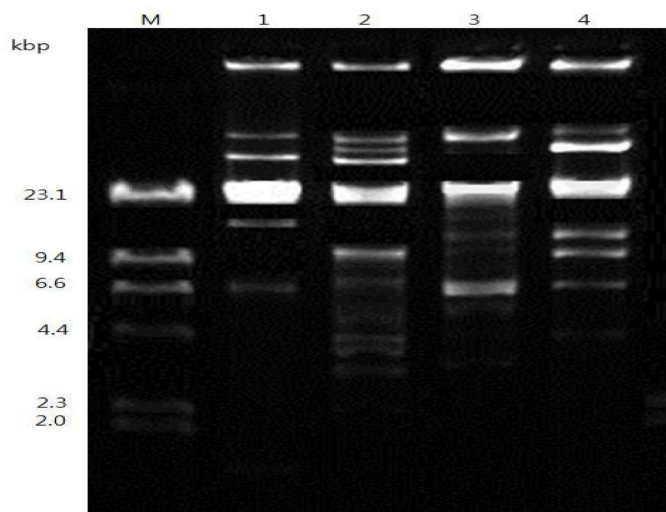
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* strain CAB566 having insecticidal activity and uses thereof
- <130> PN14238
- <160> 13
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 gagccaagcg actggagcag ttacacc 28
 <210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 tcgaattgaa ttgttcc 18
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 gtccaacctt atgagtcacc tgggcttc 28
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gtccaacctt atgagtcacc tgggcttc 28
 <210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 caacctatt tggtcaggt tc 22

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ggtacattta gatgttcaca gccac 25
 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 cttaggata aatgtaagta cag 23

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ccggtgaccc attaacattc caatc 25
 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 atcactgagt cgcttcgcat ctttgacttt ctc 33
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10

atatggagtg aataggggg

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tgaacggcga ttacatgc

18

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gctgtctacc atgattcgct tg

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

cagtcagta accttctctt gc

22