

## 국내 토양으로부터 곤충병원성 세균인 *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리 및 생물검정

김다아 · 김진수 · 길미라 · 윤영남 · 박동식<sup>1</sup> · 유용만\*

충남대학교 농업생명과학대학 농생물학과, <sup>1</sup>강원대학교 농업생명과학대학 농업과학연구소

## Isolation and Activity of Insect Pathogenic *Bacillus thuringiensis* Strain from Soil

Da-A Kim, Jin-Su Kim, Mi-Ra Kil, Young-Nam Youn, Dong-Sik Park<sup>1</sup> and Yong-Man Yu\*

Dept. Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764; Research Institute of Agricultural Sciences

<sup>1</sup>College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

**ABSTRACT :** *Bacillus thuringiensis* strains were isolated from the domestic soil and a strain was selected that had a new host range and high toxicity against agriculture insect pest. The 142 samples of soil were sampled from the mountains, paddy fields and patches, in Daejeon, Chungnam, Chungbuk and Jeonbuk and used for the investigation. Sixteen *B. t* strains were isolated from 12 samples among collected samples. There were 11 strains that showed toxic activity on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), 7 strains on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), 5 strains on *Arcte coerulea* (Lepidoptera: Noctuidae), 5 strains on *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) among the 16 isolated *B. t* strains. But there were not any strains that showed activity against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Rhynchophoridae). And also some of *B. thuringiensis* strains showed insecticidal activity with 2, 3 or 4 kinds of insects. But there were also 3 strains that did not show any activities to the 6 insects which were used in the experiment. When examined with a phase-contrast microscope, the insecticidal crystal protein produced from 16 selected strains had 13 bipyramidal and 3 spherical shapes. The insecticidal bioactivity of the *S. litura* showed 100% mortality when there were  $1.3 \times 10^7$  (cfu/ml) of CAB109 isolates.

**KEY WORDS :** *Bacillus thuringiensis*, Isolation, Bioassay, *Plutella xylostella*, *Spodoptera litura*, *Culex pipiens pallens*

**초 록 :** 국내 토양으로부터 *Bacillus thuringiensis* 균주를 분리하여 농업해충에 높은 활성범위를 나타내는 균주를 선발하였다. 토양은 대전, 충청남북도, 전라북도 등의 산과 들에서 142곳의 토양시료를 채취하여 실험에 사용하였다. 142개의 토양시료 중 12개로부터 16개의 *B. thuringiensis* 균주가 분리되었다. 선발된 16개의 *B. thuringiensis* 균주 중에서 나비목의 배추좀나방(*Plutella xylostella*)에 활성을 나타내는 것이 11균주, 담배거세미나방(*Spodoptera litura*)에 7균주, 암청색줄무늬밤나방(*Arcte coerulea*)이 5균주, 파리목의 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*)에 5균주가 독성을 나타내는 것으로 분리되었다. 그러나 나비목인 미국흰불나방(*Hyphantria cunea*)과 딱정벌레목의 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 활성을 나타내는 균주는 이 실험에서 발견되지 않았다. 또한 선발된 *B. thuringiensis* 균주가 2종류, 3종류 그리고 4종류의 해충에

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

함께 활성을 나타내는 것도 있었다. 그러나 시험된 6종류의 모든 곤충에 무독성인 균주도 3개가 나타났다. 선발된 16개 균주의 결정성단백질은 위상차 현미경으로 관찰하였을 때 이중피라미드형태가 13개이고 구형이 3개로 나타났다. 우리나라 난방제해충인 담배거세미나방에 대한 살충활성의 검정은 CAB109 균주가  $1.3 \times 10^7$  (cfu/ml)에서 100%의 사망률을 보였다.

**검색어** : *Bacillus thuringiensis*, 생물검정, 배추좀나방, 담배거세미나방, 빨간집모기

*Bacillus thuringiensis* 균주는 곤충병원성세균으로 친환경농업의 주요 농자재로 사용되는 중요한 생물농약 중의 하나이다. *B. thuringiensis* 균주는 그람 양성 토양세균으로서 성장조건이 악화되면 내생포자와 함께 생성하는 내독소 단백질 결정체가 나비목과 파리목 및 딱정벌레목의 곤충에 대해서 강력한 살충활성을 나타낸다(Aronson et al., 1986; Goldberg and Margalit 1977; Tamez-Guerra et al., 2004). 이러한 *B. thuringiensis*는 현재 국내외적으로 생물농약 중 가장 많이 생산되어 판매·활용되고 있다. 이미 오래전부터 미국을 비롯한 선진국에서는 *B. thuringiensis* 균주를 이용한 무공해 미생물 농약제제가 개발되어 상업적으로 유용하게 쓰이고 있으며, 최근에는 *B. thuringiensis* 균주에 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.t균주에 대한 탐색분리에 관한 연구도 지속적으로 수행되고 있다(Gough et al., 2005; da Silva et al., 2004; Apaydin et al., 2005; Yasutake et al., 2006).

지금까지 분리 보고된 *B. thuringiensis* 균주는 다양한 곳으로부터 분리되어졌다(Bernhard et al., 1997). 특히 *B. thuringiensis* 균주는 세계 각국의 여러 토양에서 분리되고 있으며(DeLucca et al., 1981; Ohba and Aizawa, 1978; Martin and Travers, 1989), 모기 유충에 독성이 강한 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 경우 연못에서 분리하였고(Goldberg and Margalit, 1977), 또한 죽은 곤충의 유충에서 분리한 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*는 딱정벌레목에 강한 독성을 나타내며(Krieg et al. 1983), 이외에도 저장작물(DeLucca et al., 1982; Kim et al., 1998), 버섯재배지(Bernhard et al., 1997), 그리고 잎 표면(Smith and Couche, 1991) 등에서도 분리된 것으로 보고되었다.

우리나라의 농작물에 잡식성 해충으로 잘 알려진 담배 거세미나방(*Spodoptera litura*)은 생태학적으로 토양에

서식하므로 농약으로 방제가 어렵다. 따라서 이 해충에 강한 활성을 갖는 *B. thuringiensis* 균주를 국내 토양으로부터 분리 선발하여 방제할 수 있는 제품을 개발하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료 채취

토양 시료의 채취는 주로 대전, 충청남·북도, 전라북도 등지의 산, 들과 밭의 142곳의 토양을 표면에서 약 10 cm 깊이로 10 g씩 채취하여 실험에 사용하였다. 산은 주로 나무 밑의 토양에서, 밭의 경우는 각종 밭작물이 자라는 토양 등을 중심으로 채취하였다. *B. thuringiensis*의 상품화된 제품은 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*의 T제품과 SB제품, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 SL제품을 구입하여 시험에 사용하였다.

### *Bacillus thuringiensis* 균주의 분리

*B. thuringiensis* 균주의 분리는 Ohba and Aizawa(1978) 방법을 사용하였다. 채취된 토양 시료의 1 g을 시험관에 넣은 뒤 멸균 증류수 9 ml을 넣고 3~4회 정도 강하게 교반하였다. 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 65°C에서 30분 동안 열처리하였다. 열처리 후 5분 동안 정치하여 흙을 가라앉히고 상청액을 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 이 plate를 27°C로 배양기에서 3~4일간 배양 후에 형성된 *Bacillus* 콜로니들 중에서 외형이 *B. thuringiensis* 균주와 유사한 콜로니를 위상차현미경으로 관찰하여 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선발하였다.

## 공시곤충

본 실험에서 사용된 곤충은 나비목 해충인 배추좀나방 (*P. xylostella*)은 야외개체군을 채집하여 25±2°C에서 누대 사육하여 사용하였다. 담배거세미나방(*S. litura*)은 농촌진흥청 농업기술과학원으로부터 분양받아 실험실에서 누대 사육하여 사용하였다. 미국흰불나방(*H. cunea*) 및 암청색줄무늬밤나방(*A. coerulea*)은 대전 유성구 충남대학교 인근에서 채집하여 사용하였다. 파리목인 모기는 서울대학교 농업생명과학대학으로부터 분양받아 사육하는 빨간집모기(*C. pipiens pallens*)를 사용하였다.

## 생물활성 검정

선발된 *B. thuringiensis* 균주를 NA배지에 접종하고 27°C에서 4~7일 동안 배양 후 위상차 현미경으로 내독소 결정체 단백질 형성을 관찰하면서 곤충에 대한 독성검정에 이용하였다. 선발된 *B. thuringiensis* 균주는 생물검정에 사용하기 위하여 배양액을 1.5×10<sup>7</sup> (cfu/ml) 이상으로 만들어 적용하였다.

배추좀나방의 생물검정은 반지름 1 cm의 양배추 잎에 100 μl의 배양원액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 2령 유충 20마리씩을 petri dish에 넣고 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 담배거세미나방에 대한 생물활성 검정은 배양원액 100 μl를 0.5 g의 인공사료에 첨가하여 3령, 20마리의 유충을 petri dish에 각각 1마리씩을 넣고 168시간 동안 치사율을 조사하였다. 빨간집모기에 대한 검정은 100 μl의 배양원액을 멸균수 50 ml에 희석하여 3~4일 유충 20마리씩을 플라스틱 컵에 넣고 25°C에서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 쌀바구미에 대한 검정은 쌀 1 g에 200 μl의 배양원액을 뿌려 습기가 완전히 마를 때까지 음건한 뒤, 각 구당 20마리의 성충을 넣고 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 미국흰불나방과 암청색줄무늬밤나방에 대한 생물검정은 야외충을 채집하여 10마리씩 48시간 동안 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

토양으로부터 *B. thuringiensis* 균주의 분리는 오래전부터 시도되어 왔으며 세계 각국에서 활발히 진행되어지고 있는 실정이다. 특히 일본의 전국 토양에서 약 1%의 *B. thuringiensis* 균주를 분리하였으며 미국에서도 유사한 비

율로 분리 보고되고 있다(Ohba and Aizwa, 1978; Martin and Travers 1989). 따라서 국내 산림, 밭 주변의 부식 토양을 채취하여 그 분포를 확인하고 새로운 균주의 분리 가능성을 확인하였다. 142개의 토양시료 중에서 12개의 *B. thuringiensis* 균주가 나타나 9%의 높은 비율로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 일반적 토양에서 10%의 비율로 선발되는 것을 보고한 것과 같이 토양에 높은 비율로 존재함을 발견할 수가 있었다(Kim et al., 1995b). 이러한 결과는 토양채집 시 부식토등 유기물이 많은 곳으로부터 채집한 결과일 수도 있다. 한편 한국의 양잠농가의 토양 및 잡사의 먼지에서 채집된 결과는 27%의 높은 *B. thuringiensis*가 분리 되었으며 곡물 저장 창고 및 방앗간 주변의 먼지에서는 40%정도의 아주 높은 비율로 *B. thuringiensis*가 분리 되는 것을 알 수 있었다(Kim et al., 1995a, c). 또한 터키에서는 토양, 곡물류, 저곡창고, 죽은 곤충으로부터 63.5%의 높은 비율로 *B. thuringiensis*가 발견되었다(Apaydin et al., 2005).

*B. thuringiensis* 균주를 형태적으로 분리하기 위하여 NA배지 상에서 형성된 2,648개의 세균 콜로니 중에서 위상차 현미경으로 결정성 독소 단백질을 형성하는 것을 선발한 결과 16개로 나타났다(Table 2). 선발된 16개 *B. thuringiensis* 균주의 내독소 단백질의 형태는 이중피라미드형이 13개로 이러한 결과는 선발된 균주에서 가장 많이 얻어진다는 다른 보고자의 결과와 유사하다(Ohba and Aizwa, 1978). 일반적으로 모기에 대하여 독성을 나타내는 구형의 모양이 3개로 분리되었다(Fig. 1.). 그림 1에서 A는 CAB102균주로서 본 시험에서 사용된 해충에는 활성이 전혀 나타나지 않는 무독성이었다. 배추좀나방에만

**Table 1.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soils in Korea

Locality	Number of soil sample examined	Number of soil sample with <i>B. t</i> isolated
Daejeon		
1> Mountain	21	3
2> Field	19	2
Chungnam		
1> Mountain	31	3
2> Field	49	-
Jeonbuk		
1> Mountain	22	4
2> Field	-	-
Total	142	12

특이적으로 활성을 나타내는 사진 B는 CAB107균주이며 이중피라미드형이다. 본 시험에서 사용된 곤충에 가장 넓은 활성범위를 갖고 있는 것은 사진 C로서 이중피라미드형을 보이고 있다. 그리고 사진 D는 구형으로 나비목

해충에 대하여서는 독성을 보이지 않고 파리목인 빨간집 모기 유충에만 활성을 나타냈다. 이는 일반적으로 모기에 대하여 독성을 나타내는 균주의 모양이다(Martin and Travers, 1989).

토양에서 분리 선발된 16개 *B. thuringiensis* 균주를 나비목, 파리목 및 딱정벌레목 등 6종류의 해충에 활성검정을 한 결과는 Table 3과 같다. 이러한 균주들의 활성 범위를 나타내는 것을 보면 배추좀나방에 CAB104균주를 포함하여 11균주로 가장 많은 수가 분리되었으며 이 중 CAB106, CAB107, CAB109, CAB110, CAB111가 이 해충에 대하여 비교적 높은 활성을 나타냈다. Kim 등 (1995a)은 저곡창고에서 분리한 *B. thuringiensis* 균주의 활성을 나비목인 누에에 검토했을 때 84%가 이 곤충에 살충활성을 나타냈다. 지금까지 자연으로부터 새롭게 분리되는 *B. thuringiensis* 균주는 대부분이 나비목 해충에 대하여 활성을 갖는 것이 높은 빈도로 분리되었다. 담배거세미나방에 활성을 보인 것은 CAB104균주를 포함하여 7균주, 암청색줄무늬밤나방에 활성을 나타내는 균주는 CAB108균주를 비롯하여 5균주였으며 본 시험에 사용된

Table 2. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from soils in Korea

Locality	Number of soil sample examined	Number of soil sample with <i>B. t</i> isolated
Daejeon		
1> Mountain	428	6
2> Field	386	2
Chungnam		
1> Mountain	437	4
2> Field	1100	-
Jeonbuk		
1> Mountain	297	4
2> Field	-	-
Total	2648	16

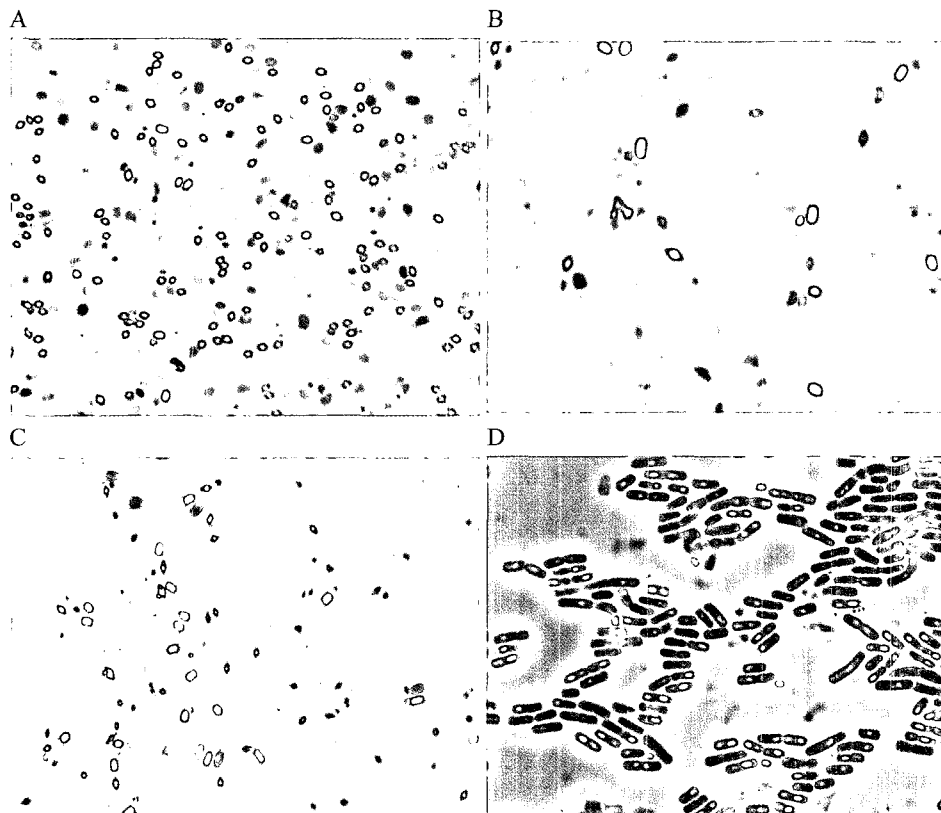


Fig. 1. Phase-contrast microscope of Crystal-spore of *Bacillus thuringiensis* isolates. A, B and C. *B. thuringiensis* isolate shows that crystals are bipyramidal in shape. D. *B. thuringiensis* isolate shows that crystals are spherical in shape.

**Table 3.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against Lepidopteran, Dipteran, Coleopteran larvae.

Tested larvae	Lepidopteran				Dipteran	Coleopteran
	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Spodoptera litura</i>	<i>Hyphantria cunea</i>	<i>Arcte coerulea</i>	<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>Sitophilus oryzae</i>
CAB101	-	-	-	NT	-	-
CAB102	-	-	-	NT	-	-
CAB103	-	-	NT	NT	-	-
CAB104	+++	+++	-	NT	-	-
CAB105	+	+	NT	NT	-	-
CAB106	+++	-	NT	NT	++	-
CAB107	+++	-	NT	NT	-	-
Strain CAB108	++	-	NT	+++	++	-
CAB109	+++	+++	NT	+++	-	-
CAB110	+++	+++	NT	+++	-	-
CAB111	+++	+++	NT	+++	+	-
CAB112	++	-	NT	NT	-	-
CAB113	-	-	NT	NT	++	-
CAB114	++	++	NT	NT	-	-
CAB115	++	-	NT	NT	++	-
CAB116	NT	+++	NT	+++	-	-
Total	11	7	0	5	5	0

※ NT : No Test

+++ : Highly effective, 100% lethality

++ : Effective, 80% lethality

+ : Lowly effective, 50% lethality

- : not effective, 0% lethality

**Table 4.** Bioactivity of *Bacillus thuringiensis* strain against tobacco cutworm, *Spodoptera litura*

Strain	No. of CFU/ml	Mortality (%)
CAB109	$1.3 \times 10^7$	100
CAB111	$2.5 \times 10^7$	75
<i>B. thuringiensis aizawai</i> (T제품)	$1.0 \times 10^7$	80
<i>B. thuringiensis kurstaki</i> (SL제품)	$3.0 \times 10^8$	14
<i>B. thuringiensis aizawai</i> (SB제품)	$2.5 \times 10^5$	0

*B. thuringiensis*에는 모두 강한 독성을 나타냈다. 빨간집모기에 활성을 보인 것은 CAB108균주를 포함하여 5균주 나타났다. 그러나 이번에 분리된 *B. thuringiensis* 균주의 활성 실험에서 나비목 해충인 미국흰불나방과 딱정벌레목인 쌀바구미에 활성을 보인 균주는 없었다. 한편, 담배거세미나방에 활성을 보이는 7개 균주 모두가 배추좀나방에도 살충 효과를 나타냈다. 배추좀나방과 담배거세미나방과 암청색줄무늬밤나방에 함께 활성을 나타내는 균주가 3균주, 배추좀나방과 암청색줄무늬밤나방과 빨간집모기에 동시에 활성을 나타내는 균주가 1균주, 배추좀나방과 빨간집모기에 동시에 활성을 나타내는 균주가 2균주,

살충활성의 강약은 동일하지 않으나 적용범위가 가장 넓은 균주로 CAB111균주는 배추좀나방, 담배거세미나방, 암청색줄무늬밤나방 그리고 빨간집모기 등 4개의 곤충에 활성을 나타냈다. 한편, 무독성인 균주도 3개로 나타났다. Table 4에서 볼 수 있는 것같이 선발된 CAB109 및 CAB111균주와 기존의 상품화된 3개의 제품에 대하여 담배거세미나방 3령 유충으로 생물활성의 활용도를 시험하였다. 시험한 결과 CAB109는  $1.3 \times 10^7$  (cfu/ml)에서 100%의 사망률을 나타내므로 생물농약으로서의 활용 가치가 인정되어 개발을 검토할 예정이다.

## 사 사

본 연구는 2005년도 충남 대학교 학술진흥재단 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

## Literature Cited

- Aronson, A. I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbil. Rev. 50: 1-24.
- Apaydin, Ozgur., A. F. Yenidunya, S. Harsa and H. Gunes. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21: 285-292.
- 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. Invertebr. Pathol. 70: 59-68.
- da Silva, S. M. B., J. O. Silva-Werneck, R. Falcao, A. C. Gomes, R. R. Fragoso, 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.
- DeLucca, A. J., M. S. Palmgren and A. Ciegler. 1981. *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. Can. J. Microbiol. 28: 452-456.
- 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.
- 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.
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu and S. K. Kang. 1995a. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dust. Korean J. Appl. Entomol., 34(3): 243-248.
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu, J. I. Kim and S. K. Kang. 1995b. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soil in Korea. Korean J. Appl. Entomol., 34(4): 344-349.
- Kim, H. S., D. W. Lee, H. W. Park, Y. M. Yu, J. I. Kim and S. K. Kang. 1995c. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. Korean J. Seric. Sci., 37(1): 57-61.
- Kim, H. S., D. W. Lee, S. D. Woo, Y. M. Yu and S. K. Kang. 1998. Biological, Immunological, and Genetic analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from granary in Korea. Curr Microbiol. 37: 52-57.
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*; A new pathotype effective against larvae of coleoptera. J. Appl. Entomol. 96: 500-508.
- Martin, P. A. W., and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437-2442.
- 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.
- Smith, R. A., and G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 311-315.
- 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.). 2005. Transgenic Research, 14: 261-272.

(Received for publication 5 December 2006;  
accepted 11 December 2006)