

뽕나무하늘소 (*Apriona germari*) 및 왕똥퐁뎡이 (*Aphodius apicalis*) 사충으로부터 무독성 *Bacillus thuringiensis*의 분리

Isolation of Non-toxic *Bacillus thuringiensis* Strains from the Dead Larvae of *Apriona germari* and *Aphodius apicalis*

장진희 · 박현우 · 진병래 · 윤형주¹ · 마영일¹ · 강석권
Jin Hee CHANG, Hyun Woo PARK, Byung Rae JIN, Hyung Joo YOON¹
Young Il MAH¹ and Seok Kwon KANG

ABSTRACT Four strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated from the dead larvae of mulberry longicorn beetle (*Apriona germari*) and dung beetle (*Aphodius apicalis*). One of four *B. thuringiensis* isolates turned out to be subspecies *darmstadiensis* but the remains were not identified using 33 *B. thuringiensis* flagellar (H) antibodies. Furthermore, bioassays of spore-parasporal inclusion protein mixture conducted against third instar larvae of *A. germari* or *A. apicalis*, second instar larvae of *Bombyx mori*, and third instar larvae of *Culex pipiens pallens* showed that the isolates were non-toxic. To further confirm, four isolates were characterized and analysed by SDS-PAGE and agarose gel electrophoresis. The results revealed that parasporal protein and plasmid DNA patterns of four isolates are different from those of *darmstadiensis* and 20 known non-toxic *B. thuringiensis* strains, suggesting that the four isolates are novel non-toxic *B. thuringiensis*.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, *Apriona germari*, *Aphodius apicalis*, nontoxic

초 록 뽕나무하늘소(*Apriona germari*) 및 왕똥퐁뎡이(*Aphodius apicalis*) 사충으로부터 4종의 *Bacillus thuringiensis*를 분리하였다. *B. thuringiensis*의 편모 항원에 의한 동정 결과, 4종의 분리된 *B. thuringiensis* 중에서 1종은 *darmstadiensis* 아종으로 판명되었으나, 나머지 3종은 33종의 어느 *B. thuringiensis* 편모 항체와도 반응하지 않았다. 분리된 균주의 포자와 내독소 단백질 혼합물을 이용하여 뽕나무하늘소와 왕똥퐁뎡이, 누에(*Bombyx mori*) 및 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*) 유충에 대하여 생물검정한 결과, 이들 분리주들은 검정된 곤충에 대하여 독성을 갖지 않는 것으로 나타났다. 아울러, SDS-PAGE와 agarose gel electrophoresis를 이용하여 분리된 4종 *B. thuringiensis*의 내독소 단백질과 plasmid DNA 패턴을 조사한 결과, *darmstadiensis*와 이미 보고된 20종의 무독성 *B. thuringiensis*와 차이를 보여 새로운 무독성 균주로 사료된다.

검색어 *Bacillus thuringiensis*, 뽕나무하늘소, 왕똥퐁뎡이, 무독성

*Bacillus thuringiensis*는 토양세균으로서 곤충에 강한 독성을 나타내는 내독소 단백질을 생산하기 때문에 미생물적 방제 수단으로서 널리 이용되고 있다. 지금까지 밝혀진 내독소 단백질의 숙주 범위는 대부분 나비목, 파리목, 딱정벌레목 곤충에 국한되고 있으며, 최근에는 선충에 독성이 있는 균주도 보고

서울대학교 응용생물화학부 및 농업생물신소재연구센터 (The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture and Division of applied biology and chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

¹ 농촌진흥청 잠사곤충연구소 (National Sericulture & Entomology Research Institute, RDA, Suwon 441-100, Korea)

되었다(Aronson 등, 1986; Galjart 등, 1987; Feitelson 등, 1992; Tailor 등, 1992). 이러한 내독소 단백질은 숙주 범위와 염기서열에 따라 크게 5가지로 분류되어 있는데, CryI은 나비목, CryII는 나비목과 파리목, CryIII는 딱정벌레목, CryIV는 파리목에 독성을 보이는 것을 말하며, 비교적 최근에 분류된 CryV는 나비목과 딱정벌레목 곤충에 동시 독성을 보이는 내독소 단백질이 이에 속한다(Höfte와 Whiteley, 1989; Tailor 등, 1992). 그러나, 독성이 없는 내독소 단백질을 생산하는 *B. thuringiensis*도 다수 보고되고 있다(Ohba 등, 1987; Du 등, 1994; Roh 등, 1995; 1996; Park 등, 1997).

*B. thuringiensis*는 세계 도처의 다양한 장소에서 분리되고 있는데, 지금까지 보고된 것으로는 일반적으로 알려져 있는 토양(Chicott과 Wigley, 1993; Martin과 Travers, 1989) 뿐만 아니라, 저곡창고(Kim 등, 1995b), 저장곡물(Kaelin 등, 1994), 곡물 운반승강기(DeLucca 등, 1982), 잎표면(Smith와 Couche, 1991), 양잠농가(Kim 등, 1995a) 등이 있다. 그리고 이와 더불어 전형적인 방법으로서 자연생태계에서 채집된 이병충으로부터 직접 *B. thuringiensis*를 분리한 보고도 있다(Feitelson 등, 1992; Vassal 등, 1993). 그러나, 이들 분리된 *B. thuringiensis*의 대부분은 나비목이나 파리목 곤충에 독성을 보이거나, 독성을 보이지 않는 것들이었으며, 지금까지 알려진 균주로서 딱정벌레목 곤충에 독성이 있는 것은 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Sekar 등, 1987), *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (Sick 등, 1990), *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* (Lambert 등, 1992a), *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Lambert 등, 1992b) 뿐이다.

이러한 점에서, 본 연구에서는 우리나라에서 뽕나무를 비롯한 과수에 심각한 피해를 주고 있으나 방제에 어려움이 많은 주요 딱정벌레목 곤충인 뽕나무하늘소(*Apriona germari*)와 식분성 곤충으로 주목을 받고 있는 왕똥뽕땀이(*Aphodius apicalis*) 이병충을 대상으로 딱정벌레목 곤충에 독성이 있는 새로운 *B. thuringiensis*를 분리하고자 하였다. 그 결과, 이들 이병충으로부터 4개의 서로 다른 아종의 *B. thuringiensis* 균주가 분리되었으며 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

*B. thuringiensis*의 분리

잠사곤충연구소 생체기능 연구실에서 인공사육 중 이병된 뽕나무하늘소(*A. germari*)와 왕똥뽕땀이(*A. apicalis*) 유충으로부터 *B. thuringiensis*를 분리하기 위하여, 발견 즉시 -20°C 에 냉동보관한 이병충들을 실온에서 녹여 각각 50 ml Conical tube에 담겨 있는 10 ml의 멸균증류수에 넣고 강하게 교반한 뒤, 상청액을 새로운 tube에 옮겨 65°C 에서 30분간 가열하였다(Kim 등, 1995a, b). 상기 현탁액을 10^{-2} 과 10^{-3} 으로 각각 희석하여 nutrient agar plate에 고르게 도말하고, 28°C 에서 5일간 배양하여 형성된 콜로니 중 *B. thuringiensis*로 판단되는 것들을 위상차 현미경(Nicon, Venox)으로 관찰하여 내독소 단백질과 포자 형성 여부를 조사하였다. 이들을 형성하는 콜로니들만을 nutrient agar plate에 재접종하여 순수배양한 후, 특성조사에 사용하였다.

위상차현미경 관찰

분리된 4종 *B. thuringiensis*의 위상차현미경 관찰은, 각각을 100 ml의 G.Y.S. 배양액(Nickerson 등, 1974)에 단일 콜로니를 접종하여 28°C 에서 150 rpm으로 5일간 진탕배양하여 완전히 autolysis가 일어나게 한 후 1,000배 배율의 위상차현미경으로 관찰하였다.

H 항혈청의 제조와 항원-항체 반응

33종 *B. thuringiensis*에 대한 H 항혈청은 Ohba와 Aizawa(1978)의 방법을 통해 본 서울대학교 응용생물화학부 곤충병리·유전공학 연구실에서 제조한 것을 사용하였다(Roh 등, 1997; Park 등, 1997). H 항원 반응은 96 well plate를 이용하여 수행하였다. 편모를 가진 100 μl 의 세균 부유액을 PBS 완충 용액으로 50배 희석한 100 μl 의 H 항원과 잘 섞은 뒤, 37°C 에서 1시간 동안 방치하여 응집 여부를 관찰하였다.

SDS-PAGE

내독소 단백질의 전기영동은 각각의 *B. thuringiensis*를 G.Y.S.배지에 접종하여 28°C 에서 5일간 배양한 후, 완전히 autolysis가 일어난 것을 3,000 g에서 집균하여 시료로 사용하였다(Roh 등, 1997; Park 등, 1997). 일정량의 시료에 $5 \times$ sample buffer (pH 6.8

의 60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 첨가하고 100°C에서 5분간 끓인 후 상층액만을 12.5% separating gel로 SDS-PAGE를 수행하였다(Laemmli, 1970). 전기영동이 끝난 gel은 0.1% Coomassie brilliant blue (Sigma Co.)로 염색하였다.

Plasmid DNA의 분리

B. thuringiensis 균주를 각각 10 ml의 L.B. 배지에 접종하여 28°C에서 12시간 배양한 후, 다시 50 ml의 S.P.Y. 배지(Kronstad 등, 1983)에 100분의 1의 농도로 재접종하여 OD₆₀₀에서 0.7이 될 때까지 배양하여 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법(Birboim과 Doly, 1979)을 일부 수정하여 실시하였으며, 분리된 plasmid DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하여 그 패턴을 분석하였다.

독성검정

완전히 autolysis가 일어난 4종의 *B. thuringiensis* 균주를 각각 10⁷ cfu/ml의 농도로 하여 접종원으로 사용하였다. 나비목의 경우, 뽕나무 잎을 5 cm × 5 cm로 잘라 각각의 접종원에 담가 충분히 적신 뒤 음건하여, 처리구 당 누에(*Bombyx mori*) 2령 유충 10마리씩을 넣어 48시간 동안 사육하면서 치사여부를 관찰하였다. 파리목의 경우, 처리구 당 접종원 20 ml에 빨간집모기(*Culex pipiens pallens*) 3령 유충 10마리씩을 넣고 48시간 동안 치사여부를 관찰하였다. 딱정벌레목의 경우에는 뽕나무하늘소와 왕똥뽕땀이 3령 유충을 각각의 *B. thuringiensis*가 고루 도말된 인공사료(2 cm × 2 cm × 2 cm)와 소똥을 이용하여 60시간 동안 치사여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

지금까지 딱정벌레목 해충의 방제에 이용되고 있는 *B. thuringiensis* 제제는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 뿐이며, 더구나 이 *B. thuringiensis* 아종은 한정된 딱정벌레목 해충에 대하여는 독성을 보이는 것으로 알려져 있다(Sekar 등, 1987). 이러한 점에서 본 연구에서는 우리나라의 주요 딱정벌레목 해충의 하나인 뽕나무하늘소(*A. germari*)와 식분성 곤충으로 이용되고 있는 왕똥뽕땀이(*A. apicalis*) 이병유충으로부터 딱정벌레목에 독성을 가지는 새로운 *B. thuringiensis*를 분리하고자 하였다.

사육실에서 계대중이던 뽕나무하늘소와 왕똥뽕땀이 유충중에서 세균에 의한 것으로 보여지는 이병충으로부터 *B. thuringiensis*를 분리한 결과, 4종의 *B. thuringiensis*가 분리되었다(표 1). 이중에서 strain Aa18과 Aa22는 왕똥뽕땀이 유충으로부터, strain Ag10과 Ag21은 뽕나무하늘소 유충으로부터 분리되었다. 이들 분리 균주를 각각 33개 *B. thuringiensis*의 편모 항혈청을 이용하여 동정한 결과, 딱정벌레목에 독성을 갖는 균주로 알려진 subsp. *tenebrionis* (H8a 8b), subsp. *tolworthi* (H9), subsp. *galleriae* (H5a5b), subsp. *kurstaki* (H3a3b3c)와 반응하는 균주는 없었으며, strain Aa22만이 subsp. *darmstadiensis*로 판명되었다. 또한 4개 분리주를 이들이 분리된 딱정벌레목의 뽕나무하늘소와 왕똥뽕땀이 뿐만 아니라, 나비목인 누에와 파리목인 빨간집모기 유충을 대상으로 독성을 검정한 결과, 이들은 대상 곤충에 대하여 전혀 독성을 나타내지 않았다(표 1). 이들 무독성의 분리주들이 정확하게 어디에서 비롯되었는지는 알수 없으나, 분리된 숙주곤충인 뽕나무하늘소와 왕똥뽕땀이 유충에 독성이 없는 것으로 보아 2차 감염된 것으로 보여진다. 그러나, 이 경우 분리주들이 뽕나무

Table 1. Properties of four different *B. thuringiensis* strains isolated from *Apriona germari* and *Aphodius apicalis* larvae

Strain	Serotype	Subspecies	Crystal shape	Mass (kDa) of Parasporal protein(s)	Toxicity ^a
Aa18	ND ^b	-	Ovoidal	27	-
Aa22	H10a10b	<i>darmstadiensis</i>	Ovoidal	65, 28, 20	-
Ag21	ND	-	Ovoidal	100, 45, 27	-
Ag10	ND	-	Ovoidal	65, 45, 27	-

^a: Toxicity assay was performed against Lepidoptera, *Bombyx mori*, Diptera, *Culex pipiens pallens*, and Coleoptera, *Apriona germari* or *Aphodius apicalis* larvae.

^b: Not determined

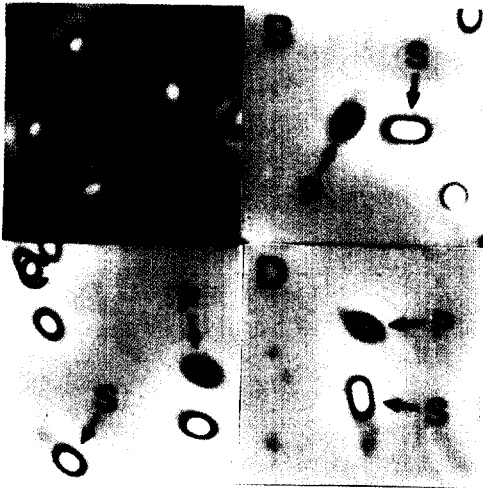


Fig. 1. Phase contrast micrographs ($\times 1,000$) of sporulated cultures of four *B. thuringiensis* isolates. A, Aa18; B, Ag21; C, Aa22; D, Ag10. Spore and parasporal inclusion are indicated as S and P, respectively.

하늘소와 왕뽕퐁뎡이 유충 뿐만 아니라, 누에와 빨간집모기 유충에도 독성을 보이지 않았는데, 이는 단지 사충이 *B. thuringiensis*의 영양원으로 제공된 것으로 보인다. 실제로 Federici (1994)는 *Am-yelois transitella*내에서 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*가 대량으로 증식함을 보고하였는데, 이는 사충이 *B. thuringiensis*의 성장에 매우 적합한 배지임을 가리키는 것으로서 본 실험 결과와도 부합되는 것으로 보여진다.

4종의 분리주들의 형태적인 특성을 알아보기 위하여, 위상차 현미경을 이용하여 각 분리주의 내독소 단백질과 포자를 관찰하였다(그림 1). 그 결과 본 실험에서 분리된 4종의 *B. thuringiensis*는 모두 원형의 내독소 단백질을 생산하였다. 이러한 원형의 내독소 단백질을 생산하는 무독성 *B. thuringiensis*는 이미 Roh 등(1995, 1996)에 의하여 분리 보고되었다.

이들 균주들의 내독소 단백질 패턴을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 4종 모두 일반적으로 *B. thuringiensis*가 가지고 있는 130 kDa의 내독소 단백질 밴드를 나타내지 않았으며, strain Aa18은 약 27 kDa, Ag21은 약 100, 45, 27 kDa, Aa22는 65, 28, 20 kDa, Ag10은 65, 45, 27 kDa의 비교적 저분자의 주요 단백질 밴드를 가지고 있음을 알 수 있었다(그림 2). Strain

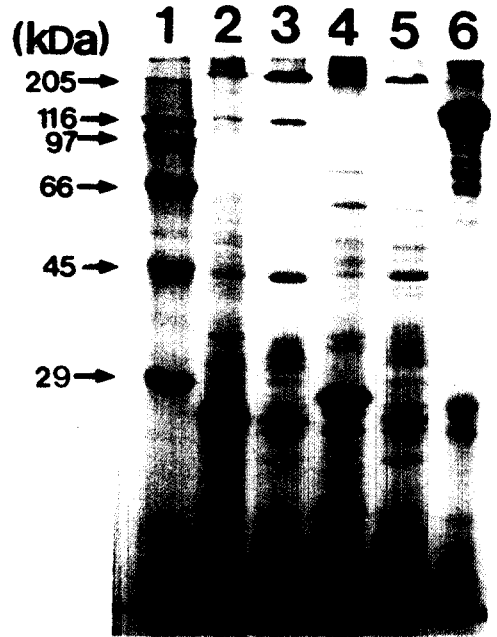


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of selected *B. thuringiensis* isolates. Lanes: 1, Molecular weight marker; 2, Aa18; 3, Ag21; 4, Aa22; 5, Ag10; 6, *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*.

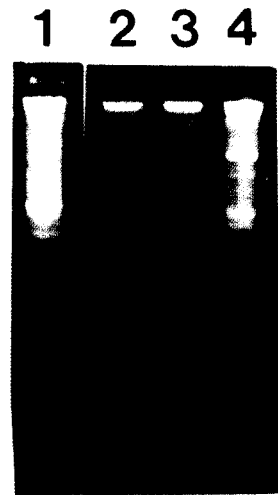


Fig. 3. Plasmid DNA profiles of *B. thuringiensis* isolates. Lanes: 1, Aa18; 2, Ag21; 3, Aa22; 4, Ag10.

Aa22와 Ag10의 경우에는 딱정벌레목에 독성을 보이는 CryIIIa 내독소 단백질과 유사한 크기인 65 kDa 크기의 단백질 밴드가 관찰되었음에도 왕뽕퐁

덩이와 뽕나무하늘소에 대해 독성을 갖지 않는 점이 특이했다. 또 편모 항혈청에 의한 분류에 따라 파리목에 독성이 있는 것으로 알려진 subsp. *darmstadiensis* (Padua 등, 1980)로 분류된 strain Aa22의 경우에 그 type strain인 subsp. *darmstadiensis*과는 다른 단백질 밴드 패턴을 나타냈으며, 아울러 subsp. *darmstadiensis*가 갖는 파리목 독성도 갖지 않아 Aa22는 이와 다른 균주로 보여진다. 또한 이들 분리 균주의 내독소 단백질 패턴은 이미 본 실험실의 Roh 등(1995, 1996)과 Park 등(1997)에 의하여 비교 보고한 20종의 무독성 *B. thuringiensis* 균주들과도 달랐다(data not shown).

한편, 이들 분리균주의 plasmid DNA 패턴을 비교한 결과(그림 3), 이들 분리균주들간에 서로 상이한 plasmid 밴드 패턴을 보였다. 아울러 Roh 등(1995, 1996)과 Park 등(1997)이 보고한 무독성 *B. thuringiensis* 균주들의 plasmid 패턴과도 달랐다(data not shown). 이러한 결과들로 볼 때, 본 실험에서 분리된 4종의 균주들은 새로운 무독성 *B. thuringiensis* 균주로 생각된다.

오래전부터 전 세계적으로 보다 넓은 숙주범위와 해충에 대해 강한 독성을 가지는 새로운 *B. thuringiensis*를 분리하고자 하는 많은 시도가 있었다(Chicott과 Wigley, 1993; Martin과 Travers, 1989; DeLucca 등, 1982). 그 결과 *B. thuringiensis*는 기존에 가장 잘 알려진 토양 이외에도 다양한 서식처에서 존재하고 있음이 밝혀졌다(Kaelin 등, 1994; DeLucca 등, 1982; Smith와 Couche, 1991; Kim 등, 1995a). 한편 Itoua-Apoyolo 등(1995)은 European sunflower moth (*Homoiosoma nebulella*) 이병충으로부터 다섯 가지 아종의 *B. thuringiensis*를 분리하였으며, Kaelin 등(1994)은 역시 저장된 담배와 이병된 권연벌레 (*Lasioderma serricornis*)로부터 78가지의 다양한 *B. thuringiensis*를 분리하였다.

그러나, 본 실험에서는 딱정벌레목에 독성을 나타내는 새로운 *B. thuringiensis*를 분리하지는 못하였지만, 이미 보고된 결과들과 본 결과를 종합해 볼 때 이병충으로부터 그 숙주곤충에 독성을 띠는 균주 외에도 여러 종의 새로운 *B. thuringiensis*가 분리될 수 있다는 가능성을 충분히 보여 주었다.

사 사

본 연구는 서울대학교 농업생물신소재연구센터와 농림수산부 농업특정과제 연구비에 의하여 수행되었음.

인용문헌

- Aronson, A.I., W. Beckman & P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.
- Birnboim, H.C. & J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Chilcott, C.N. & P.J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 244-247.
- DeLucca, A.J., M.S. Palmgren & A. Ciegler. 1982. *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* **28**: 452-456.
- Du, C., P.A.W. Martin & K.W. Nickerson. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3847-3853.
- Federici, B.A. 1994. *Bacillus thuringiensis*: biology, application and prospects for further development. p. 1-15. In R.J. Akhurst (ed.), *Proceedings of the Second Canberra Meeting on Bacillus thuringiensis*. CPN Publications Pty, Ltd., Canberra, Australia.
- Feitelson, J.S., J. Payne & L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**: 271-275.
- Galjart, N., N. Sivasubramanian & B.A. Federici. 1987. Plasmid location, cloning, and sequence analysis of the gene encoding a 27.3-kilodalton protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14). *Curr. Microbiol.* **16**: 171-177.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.
- Itoua-Apoyolo, C., L. Drif, J.M. Vassal, H. deBarjac, J.P. Bossy, F. Leclant & R. Frutos. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of European sunflower moth, *Homoiosoma*

- nebulella*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4343-4347
- Kaelin, P., P. Morel & F. Gadani. 1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). Appl. Environ. Microbiol. **60**: 19-25.
- Kim, H.S., D.W. Lee, H.W. Park, Y.M. Yu, J.I. Kim & S.K. Kang. 1995a.** Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. Korean J. Seric. Sci. **37**: 57-61.
- Kim, H.S., H.W. Park, D.W. Lee, Y.M. Yu & S.K. Kang. 1995b.** Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dusts. Korean J. Appl. Entomol. **34**: 243-248.
- Kronstad, J.W., H.E. Schnepf & H.R. Whiteley. 1983.** Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. J. Bacteriol. **154**: 419-428.
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Lambert, B., H. Höfte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert & M. Peferoen. 1992a.** Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2536-2542.
- Lambert, B., K. Van Audenhove, C. Decock, W. Theunis, R. Agouda, S. Jansens, J. Seurinck & M. Peferoen. 1992b.** Nucleotide sequence of gene cryIIID encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Gene **110**: 131-132.
- Martin, P.A.W. & R.S. Travers. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 2437-2442.
- Nickerson, K.W., G. St. Julian & L.A. Bullar, Jr. 1974.** Physiology of spore forming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. **28**: 129-132.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1978.** Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. Pathol. **32**: 303-309.
- Ohba, M., Y. M. Yu & K. Aizawa. 1987.** Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. Lett. Appl. Microbiol. **5**: 29-32.
- Padua, L.E., M. Ohba & K. Aizawa. 1980.** The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. **36**: 180-186.
- Park, H.W., J.Y. Roh, Y.H. Je, B.R. Jin, H.W. Oh, H.Y. Park & S.K. Kang. 1997.** Isolation of a non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* strain belonging to serotype H8a8b. Lett. Appl. Microbiol. **24**: in press.
- Roh, J.Y., H.W. Park, B.R. Jin, H.S. Kim, Y.M. Yu & S.K. Kang. 1996.** Characterization of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* isolates from Korea. Lett. Appl. Microbiol. **23**: 249-252.
- Roh, J.Y., H.W. Park, H.S. Kim, B.R. Jin & S.K. Kang. 1995.** Isolation of novel non-toxic *Bacillus thuringiensis* from soil samples in Korea. Korean J. Appl. Entomol. **34**: 373-377.
- Roh, J.Y., H.W. Park, Y.H. Je, D.W. Lee, B.R. Jin, H.W. Oh, S.S. Gill & S.K. Kang. 1997.** Expression of mosquitocidal crystal protein genes in noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Lett. Appl. Microbiol. **24**: in press.
- Sekar, V., D.V. Thomson, M.J. Maroney, R.G. Bookland & M.J. Adang. 1987.** Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA. **84**: 7036-7040.
- Sick, A., F. Gaertner & A. Wong. 1990.** Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. Nucleic Acids Res. **18**: 1305.
- Smith, R.A., & G.A. Couche. 1991.** The Phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 311-315.
- Taylor, R., J. Tippett, G. Gibbs, S. Pells, D. Pike, L. Jordan & S. Ely. 1992.** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. **6**: 1211-1217.

(1996년 8월 6일 접수, 1997년 8월 22일 수리)