HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	昆虫病原細菌 Bacillus thuringiensis の結晶性毒素の形態とプラスミド DNA
Author(s)	飯塚, 敏彦; 石埜, 正穂; 中島, 敏夫
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 13(3), 423-431
Issue Date	1982-11-10
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11983
Type	bulletin (article)
File Information	13(3)_p423-431.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の結晶性毒素の形態とプラスミドDNA

飯塚敏彦・石埜正穂・中島敏夫
(北海道大学農学部蚕学教室)

(昭和57年4月27日受理)

Comparative Morphology of Parasporal Crystals and Characterizations of Plasmid DNA from Various Subspecies of Entomopathogenic Bacteria, *Bacillus thuringiensis*

Toshihiko IIZUKA, Masao ISHINO and Toshio NAKASHIMA
(Laboratory of Sericology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

昆虫病原細菌 *B. thuringinesis* は，昆虫に毒性を示す蛋白質の結晶性毒素を産生することによって *B. cereus* と分類学上の区別がなされている[16]。この結晶性毒素は，昆虫が経口的に消化管内にとり入れた時，消化液中の酵素による分解をうけはじめて腸管麻痺ならびに全身麻痺を伴う毒性を示すことから δ-endotoxin とよばれた[16]。

B. thuringiensis の産生する結晶性毒素は，一般にダイヤモンド型 (diamond-shaped)，重ピラミッド形 (bi-pyramidal)，偏菱形立方体 (rhomboidal) とよばれる形態をしており，芽胞のう内で，芽胞とならんで形成されることから parasporal body とよばれた[15]。結晶性毒素は，芽胞のうの時期を経て芽胞とともに菌体外に遊離するが，その時期は各亜種によって異なり，早いもので培養後24時間から遅いもので約10日である。

ところで，この結晶性毒素の形態が，通常の重ピラミッド形とは異なる不定形立方体 (irregular)，ならびにサイコロ状 (cuboidal) をした亜種が次々と見出された[6,27,3,28,32]。

また，通常，1芽胞当り1個の結晶性毒素が形成されるが，1芽胞当り2個ないし3個形成される菌株も発見された[21,33,1,30]。

現在，*B. thuringiensis* は，de BARJAC and BONNEFOI[4] の提案による鞭毛抗原 (H-antigen) に基づく分類が受け入れられており，serotype 19 までの亜種ならびに鞭毛抗原をもたない2つの亜種と合わせて21亜種 (33菌株) が報告されている。この中，serotype 1, subsp. *thuringiensis* では，*thuringiensis* BERLINER のほかに，同じ血清型であるが REEVES and GARCIA[33] によって見出された bicrystalliferous strain, BA-068 の2菌株，また，serotype 3 a, 3 b, subsp. *kurstaki* では，血清学的に異なり[23]，プラスミド構成も異なる[17] HD-1株，ならびに HD-73株，さらに AMONKAR[1] が見出した multicrystalliferous strain MC の3菌株が記載されている[17]。この外にも，serotype 10, subsp. *darmstadiensis* では，PADUA *et al.*[32] が見出した通常の重ピラミッド形結晶性毒素以外に，不定形立方体の結晶性毒素を産生する 73-E-10-2 ならびに 73-E-10-16 の2菌株が報告されている。

B. thuringiensis の各菌株は，鱗翅目幼虫に強い毒性を示す細菌として認められていたが，近年，蚊の幼虫に強い毒性を示す菌株の存在が次々と報告された[33,14,3,32]。

ところで，IIZUKA *et al.*[18] はこれらの全ての菌株のプラスミドDNAを検索して，結晶性毒素産生能が分子量 50～150 Mdal の巨大プラスミドに遺伝的に支配されている可能性を明らかにするとともに，環状2重鎖DNA (cccDNA) のみを単離することによって[20]，その巨大プラスミドの有する遺伝的役割の重要性を示唆した。

本実験では，serotype 19 までの各亜種ならびに鞭毛抗原をもたない2亜種 (合計30菌株) 全ての結晶性毒素の形態ならびに大きさを走査電子顕微鏡によって明らかにし形態による菌株のグループ分けを試みるとともに，

特に不定形立方体の結晶性毒素産生株ならびにSHARPE and BAKER[35]によって明らかにされた embedded body を産生する菌株等について，その環状2重鎖DNAを単離・検討して，プラスミドと結晶性毒素の形態との関わりについて考察した。また，蚊の幼虫に対する病原性が，結晶性毒素の形態とも関連している可能性についても考察した。

実験材料および方法

供試細菌株

供試した *B. thuringiensis* 菌株は，IIZUKA *et al.*[18]による serotype 16 までの24菌株ならびに鞭毛抗原をもたない subsp. *wuhanensis* に加えて，大庭道夫博士，鮎沢啓夫教授（九州大学農学部）により分与を受けた subspp. *tohokuensis* (serotype 17), *kumamotoensis* (serotype 18), *tochigiensis* (serotype 19) ならびに yunnanensis[40]，また，IIZUKA *et al.*[18]では供試されなかった subsp. *funitimus* (serotype 2) の計30菌株とした。

電子顕微鏡用試料作成法

各菌株の培養は，RUSSEL's[38] enriched agar (Table 1) にて行った。培養温度は30°Cとした。結晶性毒素が産生される時間は，各菌株によって異なるため，培養時間は一定としなかった。集菌した後，試料作成までの処理方法は Fig. 1 に示した。処理後の結晶性毒素・芽胞浮遊液は，アルミ円盤の試料台にのせ，自然乾燥後カーボン・金蒸着を行って走査電子顕微鏡（日本電子 JSM-SI）で観察した。

Table 1. Components of Russel's Enriched Broth*

Components	Volume
Tryptose	4 g
Tryptone	6 g
Yeast extract	3 g
Glucose	1 g
Michaelis' Na-phosphate buffer (pH 7.0)**	150 mℓ
Distilled water	1/ℓ

* Proposed by RUSSEL S. TRAVERS[38]
** 1/30 M KH_2PO_4 : 1/30 M Na_2HPO_4 = 1 : 1

環状2重鎖DNA (cccDNA) の単離法

B. thuringiensis 各菌株からのプラスミドDNAの単離法は，IIZUKA *et al.*[17,18]に従い，cccDNA の単離法は VAN DEN HONDEL *et al.*[39]に従った。即ち，アガロースゲル上にプラスミド混合液をマウントする直前に，その混合液を100°C，2分間熱処理し，直ちに ice-water 中で急冷した後，0.7% アガロースゲル上にマウントし電気泳動を行った。

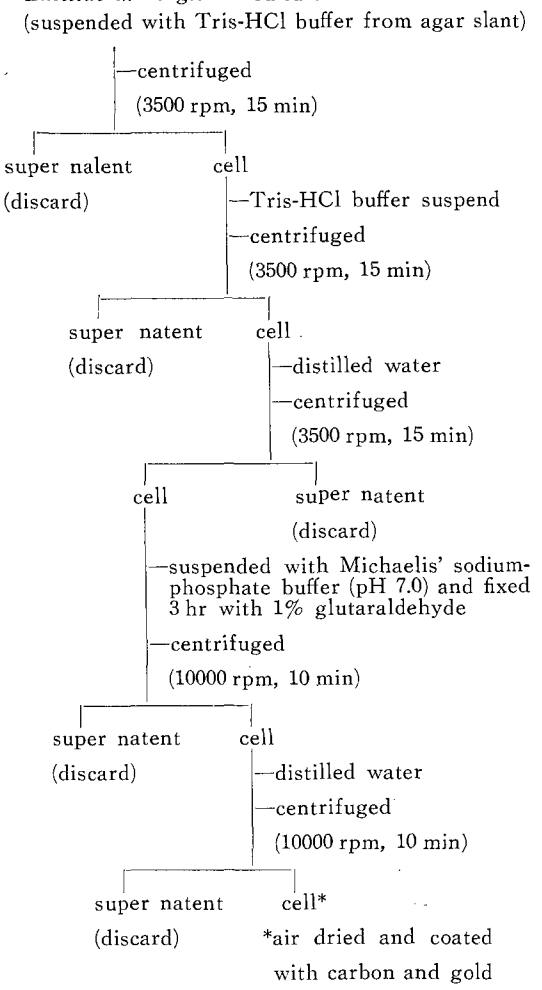


Fig. 1. Procedure for washing and fixing *B. thuringiensis*

結　　果

B. thuringiensis 各菌株の結晶性毒素を走査電子顕微鏡で観察し，Plate I–Plate VI に示した。これら菌株を結晶性毒素の形態に基づいて大別すると，重ピラミッド形ならびに偏菱形立方体を示す群 (A)，不定形立方体ならびにサイコロ状を示す群 (B)，ならびに結晶性毒素がわずかに認められるかほとんど認められない群 (C) と

に分けることができた。また，A群では，結晶性毒素の大きさに差が認められることから，通常の大きさ0.9×1.7 μの結晶性毒素を産生する群A-(1)，小型>0.4×1.2 μの結晶性毒素を含んでいる群A-(2)，ならびに巨大1.0×2.4 μな結晶性毒素を産生するA-(3)にそれぞれ分けることができた。これらをまとめてTable 2に示した。なお，B群では，結晶性毒素の形態は不定形立方体を示したが，subsp. *aizawai* においてサイコロ状の形態を含んでいた。これらの大きさは，0.5～0.7 μであった。C群の subsp. *canadensis* では，結晶性毒素の形態は小型重ピラミッド形で産生される数は極めて少なく，

Table 2. Morphological characteristics of the parasporal crystals produced by strains of *Bacillus thuringiensis*

A. Bipyramidal & rhomboidal forms	
(1) Regular size (0.9×1.7 μ)	
thuringiensis Berliner (996)	*entomocidus*
thuringiensis BA-068*	*tolworthi*
*finitimus***	*toumanoffi**
*alesti**	*pakistani**
kurstaki HD-1*	*indiana*
kurstaki MC*	*tohokuensis**
dendrolimus	*tochigiensis***
subtoxicus	*wuhanensis*****
(2) Regular & small size (0.4×1.2 μ)	
sotto	*darmstadiensis*
*kenyae**	*dakota*
galleriae	*kumamotoensis*
morrisoni	
(8) Giant size (1.0×2.4 μ)	
*yunnanensis**	
B. Irregular forms	
*aizawai**	*israelensis*
kyushuensis	*ostriniae*
C. Few crystal forming	
canadensis	
thompsoni	

* Mixed with cuboidal or irregular form crystals.
** Crystal is not separated with spore.
*** Both tops of some bipyramidal form crystal are lost.
**** A part of regular rhomboidal crystal is lacked.

subsp. *thompsoni* では，光学顕微鏡観察で芽胞のう時に結晶性毒素が認められるもののその後培地中に遊離しずらく，本実験では観察されなかった。

ところで，A群の菌株の中で，基本となる形態の結晶性毒素のほかに，基本形とは異った形態を示す結晶性毒素を含む菌株がいくつか観察された。それはSHARPE and BAKER[35]が subsp. *kurstaki* HD-1 で認めた embedded body を結晶性毒素に含む一群である。本実験の結果，subsp. *kurstaki* HD-1 の外にsubspp. *kurstaki* MC と *kenyae* でサイコロ状の，subspp. *kurstaki* MC, *toumanoffi* ならびに *yunnanensis* で不定形立方体の embedded body が認められた。

subsp. *finitimus* では，結晶性毒素が芽胞と付着したままはなれず，マメコガネの milky disease の病原菌 *Bacillus popilliae* と類似した形態を示した。結晶性毒素の形態は，重ピラミッド形と不定形立方体ともに観察された。

subsp. *tochigiensis* では，通常の重ピラミッド形の両端が欠けた形態を示す結晶性毒素が数多く観察された。

subsp. *wuhanensis* では，重ピラミッド形の一面が大きくまたは小さく欠けている結晶性毒素が数多く観察された。

subspp. *thuringiensis* BA-068, *pakistani* では偏菱形立方体の結晶性毒素の外にサイコロ状ならびに不定形立方体のものが混在して観察された。

これら結晶性毒素の形態学的特徴をもつ *B. thuringiensis* 各菌株のプラスミドを検索して，結晶性毒素の形態発現に関与する遺伝子の存在を知る可能性を検討した。そのため，まずB群の不定形立方体の結晶性毒素を産生する各菌株ならびにA群の結晶性毒素の形態に特徴を示す各菌株について環状2重鎖DNAを単離し検討した。プラスミドの単離は Plate VII, Plate VIII に示した。この結果，subsp. *aizawai* では5.37と5.49 Mdal の DNA，subsp. *kyushuensis* では1.82 Mdal の DNA, subsp. *israelensis* では5.49 Mdal の DNA がそれぞれ cccDNA ではないことが判明した。また，IIZUKA *et al.*[18]によって結晶性毒素産生に関与すると推定されている50-150 Mdal の DNA の比較では，subsp. *sotto* が107.15 Mdal に対し，B群の不定形立方体結晶性毒素を産生する subsp. *aizawai* で117.49 Mdal, subsp. *kyushuensis* で114.15と138.04 Mdal の2つの DNA, subsp. *israelensis* で87.10 Mdal, subsp. *ostriniae* で87.10と117.49 Mdal とそれぞれ異っていた。

また，A群における結晶性毒素の形態に特徴を示す各菌株でも IIZUKA *et al.*[18] の結果と比較すると，subsp. *kurstaki* HD-1 において新たに 107.15 と 138.04 Mdal の DNA が単離され，263.03 と 275.42 Mdal の DNA が単離されなかった。subsp. *pakistani* でも 107.15 と 138.04 Mdal の DNA が単離され，165.96, 229.09, 251.49, 281.84 Mdal の DNA が単離されなかった。なお，6.92 と 6.16 Mdal の DNA が cccDNA でなかった。subsp. *thompsoni* でも 107.15 と 138.04 Mdal の DNA が単離されて 141.25 Mdal の DNA は単離されなかった。subsp. *kenyae* では 134.89 Mdal の DNA は単離されなかった。subsp. *wuhanensis* では 269.15 と 295.12 Mdal の DNA は単離されなかった。subsp. *canadensis* では 4.26 Mdal の DNA が cccDNA でなかった。subsp. *finitimus* と subsp. *tochigiensis* ではプラスミドが単離されなかった。

subsp. *yunnanensis* のプラスミドは，IIZUKA *et al.*[19] に従って分子量を計測した結果，2.57, 3.40, 6.92, 10.96, 138.04, 141.25 Mdal であった。この中，6.92 Mdal の DNA は cccDNA でなかった。50–150 Mdal の分子量をもつ DNA について subsp. *sotto* の 107.15 Mdal との比較では，subspp. *kurstaki* HD-1, *pakistani thompsoni* で 107.15 Mdal のプラスミドを有していたが subspp. *kenyae, wuhanensis, yunnanensis* では 107.15 Mdal 以外の分子量を示した。

論　　議

B. thuringiensis の各菌株は，結晶性毒素を産生することによって1つの分類学的群をなしており，特に突然変異を誘起させる選抜を行わない限りその産生能は失われない。また，結晶性毒素の形態も，継代を重ねている中に一般的には変異しないことから，固有の遺伝的形質と考えられている。近年，*Bacillus* 属細菌において，バクテリオシン産生能，毒素産生能がプラスミドによって支配されていることが報告された。従って，*B. thuringiensis* の結晶性毒素の産生もプラスミドによって遺伝的に支配されていることを証明するために，多くの研究者がプラスミドを単離し，かつ，そのもっている遺伝的形質を明らかにするための研究がなされた.[8,9,12,36,37,24,10,17,18,19,20] この中，IIZUKA *et al.*[18] は，現在記載されている *B. thuringiensis* 全ての菌株を供試し，単離された各々のプラスミド DNA を検討することによって，50–150 Mdal の分子量をもつ巨大プラスミドが全てに共通していること，ならびに subspp. *sotto* と *thompsoni* が1個のプラスミドを有し，それぞれ 107.15 と 141.25 Mdal の分子量をもつ DNA であることから，各菌株の 50–150 Mdal のプラスミド DNA が結晶性毒素産生能を支配する遺伝的情報をもつことを指摘した。

本実験では，現在世界で記載されている *B. thuringiensis* 30 菌株について走査電子顕微鏡学的観察を行い，各菌株が産生する結晶性毒素の形態的な特徴を明らかにした。その結果，結晶性毒素の形態は，従来記載されている基本的な形態(bipyramidal, rhomboidal, cuboidal, irregular)[7,26,13,5,2,30,31,9,32,27,28,29] と特に異なるものは観察されなかったものの，SHARPE and BAKER[35] が subsp. *kurstaki* HD-1 ではじめて観察した embedded body が，本供試菌株中でも観察され，サイコロ状の embedded body が subspp. *kurstaki* HD-1, *kurstaki* MC, *kenyae* で，不定形立方体の embedded body が subspp. *toumanoffi, yunnanensis* でそれぞれ観察された。これら embedded body がどのような過程で作られ，この封入体がいかなる意味をもっているかは必ずしも明確にされていないが，FAST が個人的にのべたという[35] embedded body が感染した幼虫の消化液で溶解しないという事実は，この封入体が結晶性毒素と蛋白質の構成に違いがあることを示している。

一方，*B. thuringiensis* の産生する結晶性毒素が，従来，鱗翅目幼虫に強い病原性を有していたのに対し，REEVES and GARCIA[33] が subsp. *thuringiensis* BA-068 で蚊の幼虫にはじめて病原性を見出して以来，HALL *et al.*[14] が subspp. HD-1, *tolworthi, galleriae, kenyae, entomocidus, aizawai* に，DE BARJAC[3] が subsp. *israelensis* に OHBA and AIZAWA[27] が subsp. *kyushuensis* に，PADUA *et al.*[32] が不定形立方体の結晶性毒素を産生する subspp. *darmstadiensis* 73-E-10-2, 73-E-10-16 にそれぞれ病原性を見出した。これら蚊の幼虫に病原性を有する各菌株の特徴は，subspp. *tolworthi, entomocidus* を除いて，不定形立方体の結晶性毒素を形成する菌株ならびに embedded body 封入体を有する菌株であることが注目される。今後，結晶性毒素の形態と鱗翅目ならびに双翅目幼虫に対する病原性との関連が検討されなければならないと考える。

subsp. *aizawai* において，不定形立方体とサイコロ状の結晶性毒素が同一菌株中に観察された。このことは，これら2つの形態が環境要因によって互に変化する形質である可能性もあるが，それぞれの形態が遺伝的に固定されているとすると，選抜によって2つの形態の菌株に分け得る可能性もある。特に，NISHIITSUTSUJI-

UWO *et al.*[25] が subsp. *aizawai* から重ピラミッド形の結晶性毒素を産生する sporeless mutant を選抜したことから，結晶性毒素の形態を遺伝的形質と考えて検討する上で最適の材料と考えられる。なお，subsp. *finitimus* においても同じ菌株中に重ピラミッド形と不定形立方体の結晶性毒素が観察されており，subsp. *aizawai* とともに検討を続けていきたい。

subspp. *alesti* と *tohokuensis* で結晶性毒素の他に球状体が数多く観察された。OHBA *et al.*[30] によると subsp. *tohokuensis* は，結晶性毒素が培地中に遊離後，次第に溶解して消失することを報告していることから，これら球状体は結晶性毒素の溶解の過程で出現する物質と考えられる。この点の証明については subsp. *alesti* の球状体とともに今後検討したい。

本実験では，結晶性毒素の形態とプラスミドDNA，特に環状2重鎖DNAとの関連を明らかにすべく検討を進めた。IIZUKA *et al.*[18] が明らかにした 50–150 Mdal の分子量をもつプラスミドDNAが，結晶性毒素産生を支配するプラスミドである可能性は，本実験でも依然として可能性のまま残った。即ち，これら 50–150 Mdal の分子量を有するプラスミドDNAが環状2重鎖DNAであることが明らかにされたためである。しかし，subspp. *finitimus* と *tochigiensis* でプラスミドDNAが単離されなかったが，subsp. *finitimus* では FAUST *et al.*[10] が本実験と異なる条件下では単離していること，subsp. *tochigiensis* ではアガロース電気泳動の条件を変えることによって単離される可能性があること（飯塚・未発表）から，必ずしも先の結果[18] とは矛盾しなかった。ただし，本実験の目的の1つである *B. thuringiensis* の産生する結晶性毒素の形態とプラスミドDNAとの関連では，特に明確にし得なかった。

また，結晶性毒素の大きさによって *B. thuringiensis* 各菌株を分類する試みは，この形質が培養条件等環境要因によって変化することから，大きさを決定する各環境要因を検討することが第一の課題と考えた。

IIZUKA et al.[18] の単離したプラスミドDNAと本実験で単離したプラスミドDNAとでは，分子量の大きなプラスミドにおいて相違が認められた。即ち，本実験ではアガロースゲル電気泳動装置を水平型としたが，この装置は分子量の大きいプラスミドDNAの分離能がよくないため相違が出た，と考えられる。

摘　　要

B. thuringiensis 30菌株について，結晶性毒素の形態を走査電子顕微鏡によって観察した。その結果，これら菌株を従来明らかにされている重ピラミッド形，偏菱形立方体，不定形立方体ならびにサイコロ状で分類するとともに (Table 2)，すでに subsp. *kurstaki* HD-1 で存在が知られている embedded body を有する菌株を明らかにした。即ち，subspp. *kurstaki* HD-1, *kurstaki* MC, *kenyae* ではサイコロ状の，subspp. *toumanoffi*, *yunnanensis* では不定形立方体の embedded body が観察された。

subspp. *thuringiensis* BA-068, *finitimus*, *aizawai*, *pakistani* では，2種類の形態の結晶性毒素が混在していることが観察された。

subsp. *tochigiensis* では，重ピラミッド形の結晶性毒素の外に，ピラミッド形の両先端が失われている形態の結晶性毒素が観察された。

subsp. *wuhanensis* では，重ピラミッド形の一面の一部が欠けた状態の結晶性毒素が多数混在しているのが観察された。

これら特徴ある形態を示す結晶性毒素産生菌株について，プラスミドDNA特に環状2重鎖DNAを単離して，*B. thuringiensis* の産生する結晶性毒素の形態を支配するプラスミドを特定することの可能性を検討したが，本実験の結果からは明らかにされなかった。

References

1. AMONKAR, S. T.: Personal Commn. 1980
2. ARONSON, A. I. and FITZ-JAMES, P.: Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. Bact. Rev. **40**: 360–402. 1976
3. DE BARJAC, H.: Toxicite de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves d'*Aedes aegypti* et d'*Anopheles stephansi*. Compt Rend. Acad. Sci. (Paris) **286**: 1175–1178. 1978
4. DE BARJAC, H. and BONNEFOI, A.: Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga **7**: 5–31. 1962
5. BECHTEL, D. B. and BULLA, Jr. L. A.: Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bact. **127**: 1472–1481. 1976
6. BONNEFOI, A. and DE BARJAC, H.: Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga **7**: 221–229. 1963
7. BUCHER, G. E., ANGUS, T. A. and KRYWI-

ENCZYK, J.: Characteristics of a new strain of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* (serotype 1) isolated from the bumble-bee wax moth. J. Invertebr. Pathol. **8**: 485-491. 1966

8. DEBABOV, V. G., AZIZBEKYAN, R. R., CHILABALINA, O. I., DJARHENKO, V. V., GALUSHKA, F. P. and BELICH, R. A.: Isolation and preliminary characterization of extrachromosomal DNA from *Bacillus thuringiensis*. Genetica (USSR) **13**: 496-500. 1977
9. ERMAKOVA, L. M., GALUSHKA, F. P., STRONGIN, A. YA., SLADKOVA, I. A., REBENTISH, B. A., ANDREEVA, M. V. and STEPANOV, V. M.,: Plasmids of crystalforming bacilli and the influence of growth medium composition on their appearance. J. Gen. Microbiol. **107**: 169-171. 1978
10. FAUST, R. M., SPIZIZEN, J., GAGE, V. and TRAVERS, R. S.: Extrachromosomal DNA in *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, var. *finitimus*, var. *sotto*, and in *Bacillus popilliae*. J. Invertebr. Pathol. **33**: 233-238. 1979
11. FAUST, R. M., ADAMS, J. R., ABE, K., IIZUKA, T. and BULLA, L. A.: Comparative morphology and size distribution of the parasporal crsytals from various subspecies of *Bacillus thuringiensis*. J. Sericult. Sci. (Japan) **51**: (in press). 1982
12. GALUSHKA, F. P. and AZIZBEKYAN, R. R.: Investigation of plasmids of strains of different variants of *Bacillus thuringiensis*. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **236**: 1233-1235. 1977
13. GRIGOROVA, R., KANTARDGIEVA, E. and PASHOV, N.: On the shape and structure of the crystal in two strains of *Bicillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **9**: 503-509. 1967
14. HALL, I. M., ARAKAWA, K. Y., DULMAGE, H. D. and CORREA, J. A.: The pathogenicity of strains of *Bacillus thuringiensis* to larvae of *Aedes* and *Culex* mosquitoes. Mosquito news **37**: No. 2. 1977
15. HANNAY, C. L.: Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, **172**: 1004. 1953
16. HEIMPEL, A. M.: A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev., Entomology. **12**: 287-322. 1967
17. IIZUKA, T., FAUST, R. M. and TRAVERS, R. S.: Comparative profiles of extrachromosomal DNA in single and multiple crystalliferous strains of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Fac. Agri. Hokkaido Univ. **60**: 143-151. 1981
18. IIZUKA, T., FAUST, R. M. and TRAVERS, R. S.: Isolation and partial characterization of extrachromosomal DNA from serotypes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to lepidopteran and dipteran larvae by agarose gel electrophoresis. J. Sericult. Sci. (Japan) **50**: 120-133. 1981
19. IIZUKA, T. and FAUST, R. M.: Detection and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus cereus* isolation by agarose gel electrophoresis. J. Fac. Agri. Hokkaido Univ. **60**: 263-274. 1982
20. IIZAKA, T., ABE, K., FAUST, R. M., OHBA, M. and BULLA, L. A.: Isolation of covalently closed circular DNA from *Bacillus thuringiensis* subspp. *tohokuensis*, *kumamotoensis* and *tochigiensis*. J. Sericult. Sci. (Japan) **51**: (in press). 1982
21. KRIEG, A.: Über das Vorkommen verschiedener Varietaten von *Bacillus thuringiensis* in Deutschland. Zentbl. f. Backt., Parasitenk., Infektionskrank. u. Hyg., Abt. I, Orig., **207**: 83-90. 1968
22. KRIEG, A.: *In vitro* determination of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, and related bacilli. J. Invertebr. Pathol. **15**: 313-320. 1969
23. KRYWIENCZYK, J., DULMAGE, H. T. and FAST, P. G.: Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. **31**: 372-375. 1978
24. MITEVA, V.: Isolation of plasmid DNA from various strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. C. R. Acad. Sci. (Bugaria). **31**: 913-916. 1978
25. NISHIITSUTSUJI-UWO, J., WAKISAKA, Y. and EDA, M. (1975): Sporeless mutant of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **25**: 355-361. 1975
26. NORRIS, J. R.: In "Microbiol Control of Insects and Mites" (H. D. BURGES and N. W. HUSSEY eds), pp. 229-246, Academic Press, London and New York. 1971

27. OHBA, M. and AIZAWA, K.: A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* posessing 11a:11c flagellar antigenetic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. J. Invertebr. Pathol. **33**: 387–388. 1979
28. OHBA, M. and AIZAWA, K.: Properties of *Bacillus thuringiensis* subsp. *ostrinlae* and subsp. *wuhanensis*. Proc. Assoc. Plant Prot. Kyushu, **24**: 125–128. 1979
29. OHBA, M., AIZAWA, K. and FURUSAWA, T.: Distribution of *Bacillus thuringiensis* serotypes in Ehime prefecture, Japan. Appl. Ent. Zool. **14**: 340–345. 1979
30. OHBA, M., AIZAWA, K. and SHIMIZU, S.: A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (serotype 17). J. Invertebr. Pathol. **18**: 307–309. 1981
31. OHBA, M., ONO, K., AIZAWA, K. and IWANAMI, S.: Two new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. tochigiensis (serotype 19). J. Invertebr. Pathol. **38**: 184–190. 1981
32. PADUA, L. E., OHBA, M. and AIZAWA, K.: The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. **36**: 180–186. 1980
33. REEVES, E. L. and GARCIA, JR. C.: Pathogenicity of bicrystalliferous *Bacillus* isolate for *Aedes aegypti* and other aedine mosquito larvae. Proc. IV International Colloquium on Insect Pathol. College Park, Maryland USA. 219–228. 1970
34. REEVES, E. L. and GARCIA, Jr. C.: Susceptibility of *Aedes* mosquito larvae to certain crystalliferous *Bacillus* pathogens. Proc. Calif. Mosquito Control Assoc., **39**: 118–120. 1971
35. SHARPE, E. S. and BAKER, F. L.: Ultrastructure of the unusual crystal of the HD-1 isolate of *Bacullus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol. **34**: 320–322. 1979
36. STAHLY, D. P., DINGMAN, D. W., BULLA, L. A. and ARONSON, A. I.: Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **84**: 581–588. 1978
37. STAHLY, D. P., DINGMAN, D. W., IRGENS, R. L., FIELD, C. C., FEISS, M. G. and SMITH, G. L.: Multiple extrachromosomal deoxyribonucleic acid molecules in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. **3**: 139. 1978
38. TRAVERS, R. S.: Personal Commun. 1980
39. VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J., KEEGSTRA, W., BORRIAS, W. E. and VAN ARKEL, G. A.: Homology of plasmids in strains of unicellular cyanobacteria. Plasmid **2**: 323–333. 1979
40. WANG, W., WANG, Q., ZHANG, X. and CHEN, Y.: A new variety of *Bacillus thuringiensis*—*B. thuringiensis* var. *yunnanensis*. Acta Microbiol. Sinica **19**: 117–121. 1979

Summary

Thirty strains of *B. thuringiensis* representing 24 different H-antigen serotypes and 2 non-H antigenic strains were examined by scan-electron microscopy and their parasporal crystals were compared for differences in morphology. The classification by their shapes of parasporal crystals which indicate bipyramidal and rhomboidal, irregular and cuboidal, and a few crystalliferous strains was tried (Table 2).

Inclusion bodies called as embedded bodies other than the parasporal crystals were observed in subspp. *kurstaki* HD-1, *kurstaki* MC and *kenyae*, which shapes were cuboidal, and in subspp. *toumanoffi* and *yunnanensis*, which shapes were irregular.

In subspp. *thuringiensis* BA-068, *finitimus*, *aizawai* and *pakistani*, two kinds of shapes in the parasporal crystals were observed in the mixture.

In subsp. *tochigiensis*, both tops of many bipyramidal form crystals were observed in lost.

In subsp. *wuhanensis*, a part of regular rhomboidal crystals in shape were lacked on the surface.

The covalently closed circular DNA (cccDNA) profiles in these various strains which indicate some specific morphology in parasporal crystals were compared with another strains produced regular bipyramidal and rhomboidal shape crystals. Characteristics of cccDNA from the some strains of *B. thuringiensis* which indicate the difference in the morphology of parasporal crystals were not recognized in cccDNA elements on the slab gel.

Explanation of plates

Plate I

Each number in micrographs indicates serotype serotype based on classification according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Berliner [1 (Ber)], *thuringiensis* BA-068 [1 (BA-068)], *finitimus* (2), *alesti* (3 a), *kurstaki* HD-1 (3 a, 3 b (HD-1)], and *kurstaki* MC [3 a, 3 b (MC)].

SPH indicates spherical bodeis and EM indicates embedded body in each micrograph. Arrows in 3 a, 3 b (HD-1) indicate cavities freed from the embedded body in parasporal crystal. ×10,000.

Plate II

Each number in micrographs indicates serotype based on classfication according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto* [4 a, 4 b (*sotto*)], *dendrolimus* [4 a,4 b (*den*)], *kenyae* (4 a, 4 c), *galleriae* (5 a, 5 b), *canadensis* (5 a, 5 c) and *subtoxicus* [6 (*sub*)].

EM indicates embedded body in each micrograph and allow in 4 a, 4 b indicates cavity freed from the embedded body in parasporal crystal. ×10,000.

Plate III

Each number in micrographs indicates serotype based on classification according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* [6 (*ent*)], *aizawai* [7 (×10,000)], *aizawai* [7 (×3,000)] *morrisoni* (8 a, 8 b) and *ostriniae* (8 a, 8 c).

CUB in 7 (×3,000) indicates cuboidal form crystals and IR in the same micrograph indicates irregular form crystal. ×10,000.

Plate IV

Each number in micrograph indicates serotype based on classification according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* (9), *darmstadiensis* (10), *toumanoffi* (11 a, 11 b), *kyushuensis* (11 a, 11 c), and *thompsoni* (12).

SP in 12 indicates sporangium and allows in 11 a, 11 b indicate irregular form embedded bodies. ×10,000.

Plate V

Each number in micrographs indicates serotype based on classification according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani* (13), *islaelensis* (14), *dakota* (15), *indiana* (16), *tohokuensis* (17) and *kumamotoensis* (18).

IR in 13 indicates irregular form crystal and SPH in 17 indicates spherical bodies. ×10,000.

Plate VI

Each number in micrographs indicate serotype based on classification according to Dr. H. DE BARJAC.

Electron micrographs indicate parasporal crystals (c) and spores (s) of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (19), *wuhanensis* (*wuh*) and *yunnanensis* (*yun*).

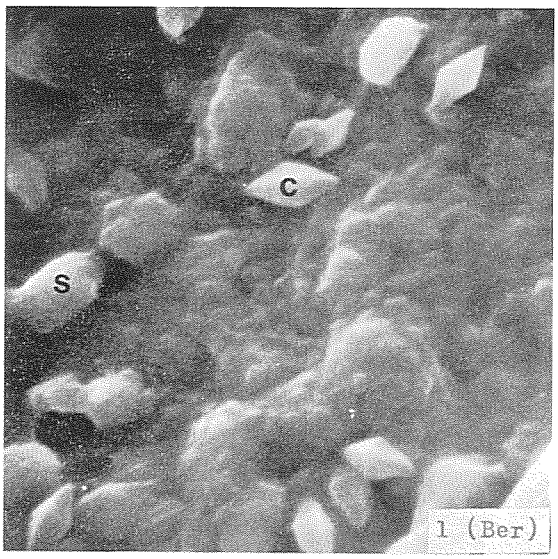
Allows in 19 indicate parasporal crystal lost both tops of bipyramidal form, allows in *wuh* indicate parasporal crystals lacked a part of regular rhomboidal form, and allows in *yun* indicate irregular form embedded bodies. ×10,000.

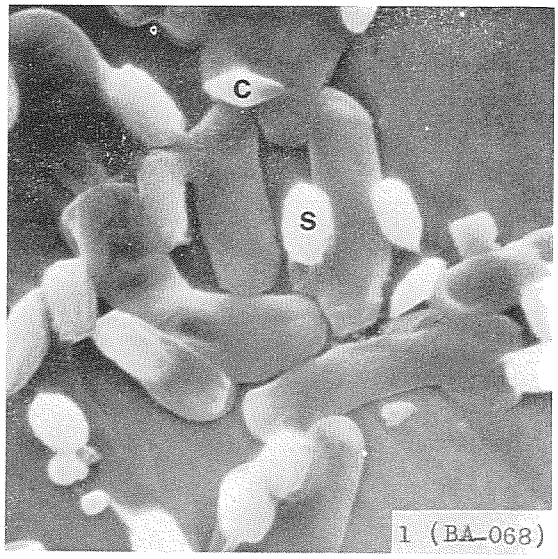
Plate VII

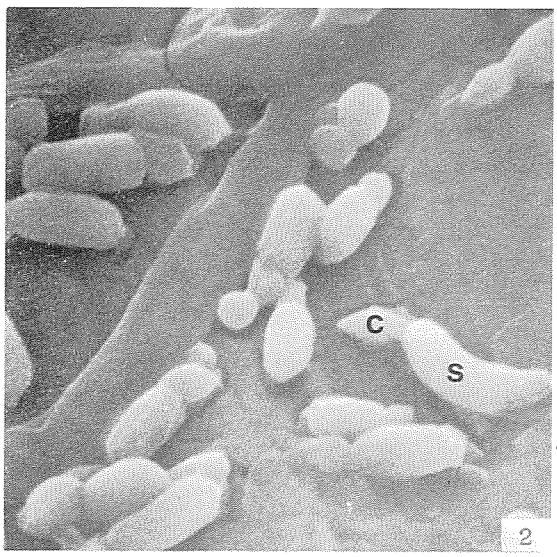
Representative comparison of numbers of plasmid DNA elements isolated from strains of *Bacillus thuringiensis* on agarose gels subjected to electrophoresis. DNA preparations and standards were applied to the sample slots (20–50 $\mu\ell$) of 0.7% agarose slab gel (Tris-EDTA-borate buffer at pH 8.0) and electrophoresis was carried out at 2 mA for 15 min. followed by 40 mA for 5 hr. Direction of migration is from the right to the left. White pointers indicate no covalently closed circular DNA elements as revealed on the original photographic negatives when compared with heat-treated (△) samples. The thick white bandings in the slots are chromosomal DNA.

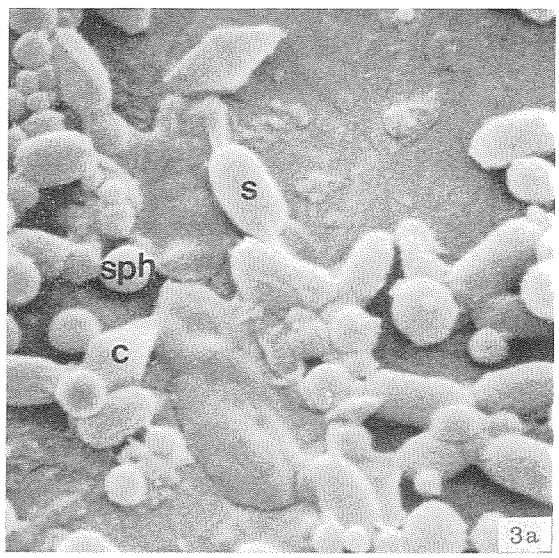
Plate VIII

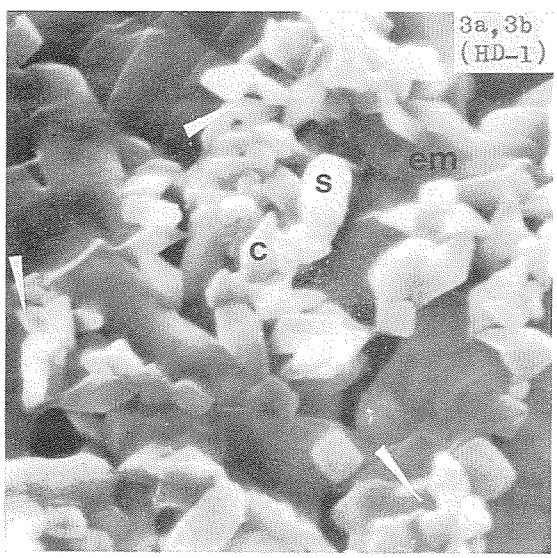
Representative comparison of numbers of plasmid DNA elements isolated from strains of *Bacillus thuringiensis* on agarose gels subjected to electrophoresis. DNA preparations and standards were applied to the sample slots (20–50 $\mu\ell$) of 0.7% agarose slab gel (Tris-EDTA-borate buffer at pH 8.0) and electrophoresis was carried out at 2 mA for 15 min. followed by 40 mA for 5 hr. Direction of migration is from the right to the left. Arrows in the slot indicate no covalently closed circular DNA elements as revealed on the original photographic negatives when compared with heat-treated (△) samples. The thick white bandings in the slots are chromosomal DNA.

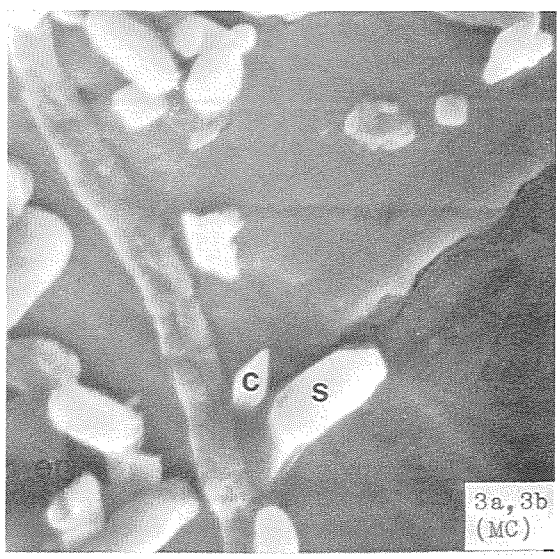

c
s
1 (Ber)

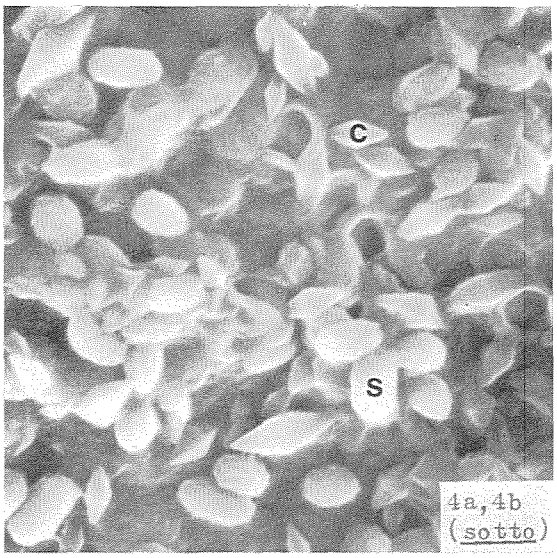

c
s
1 (BA-068)


c
s
2

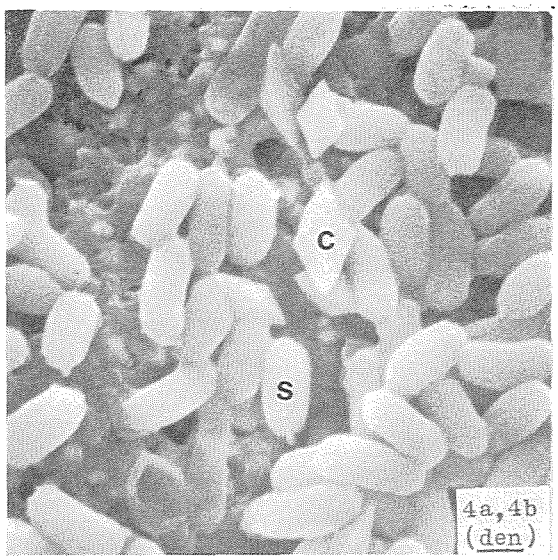

s
sph
c
3a


3a, 3b
(HD-1)
em
s
c

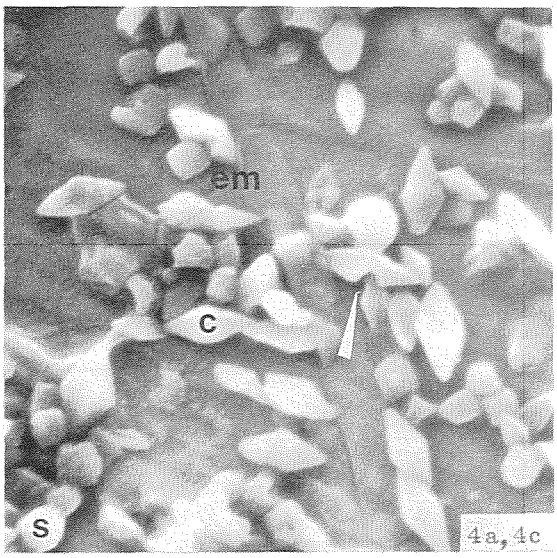

c
s
3a, 3b
(MC)



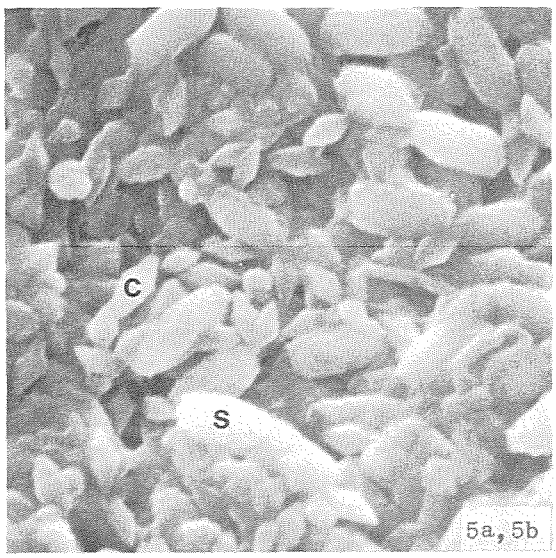
4a, 4b (sotto)



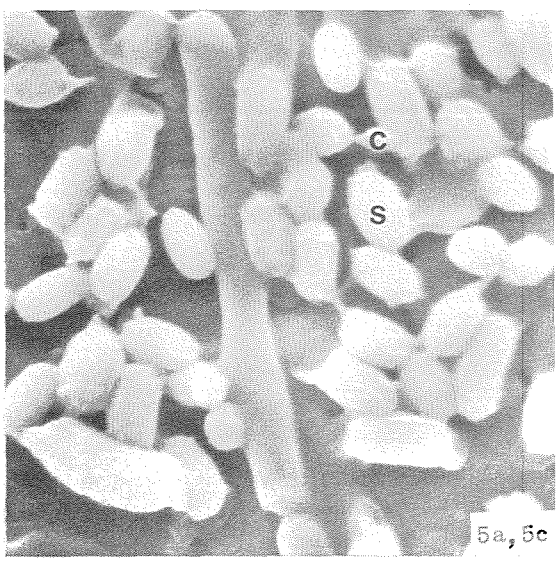
4a, 4b (den)



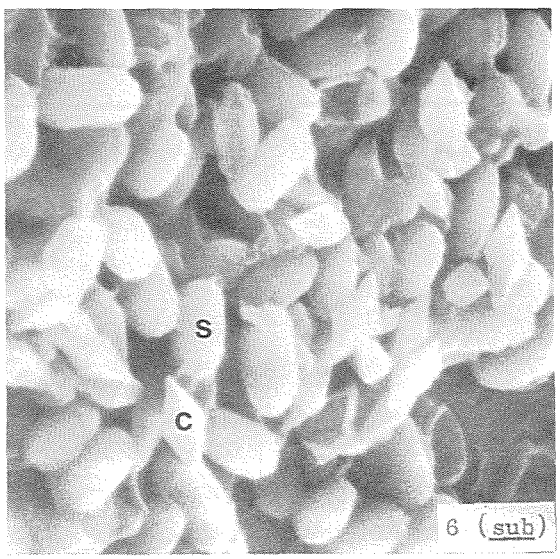
4a, 4c



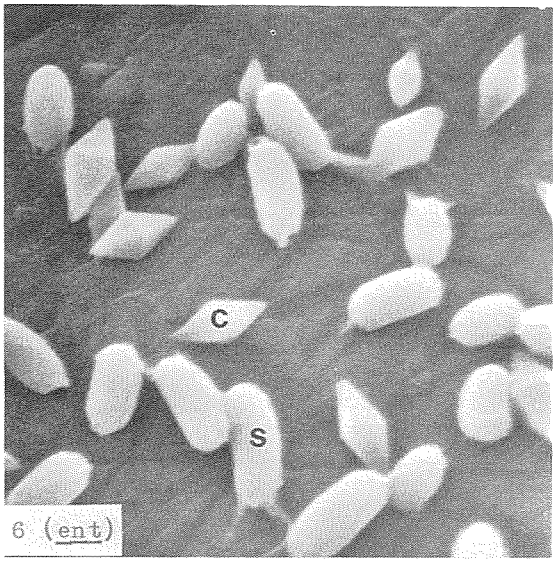
5a, 5b



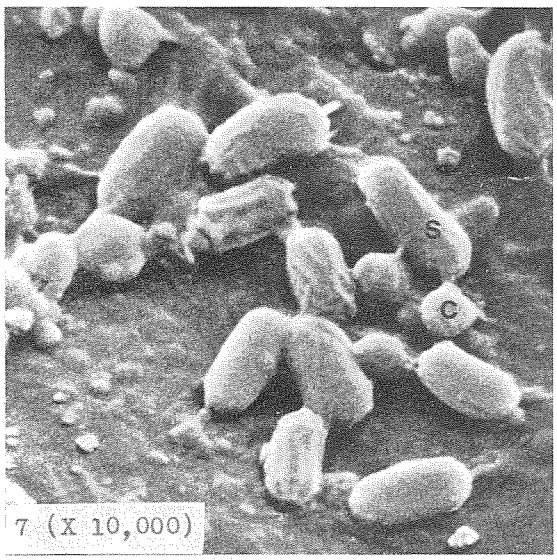
5a, 5c



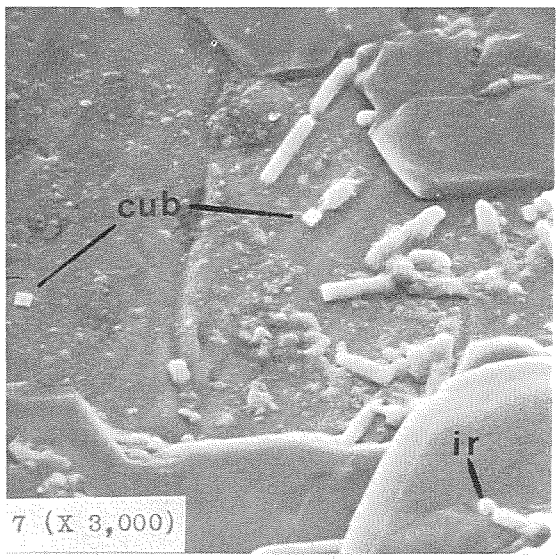
6 (sub)



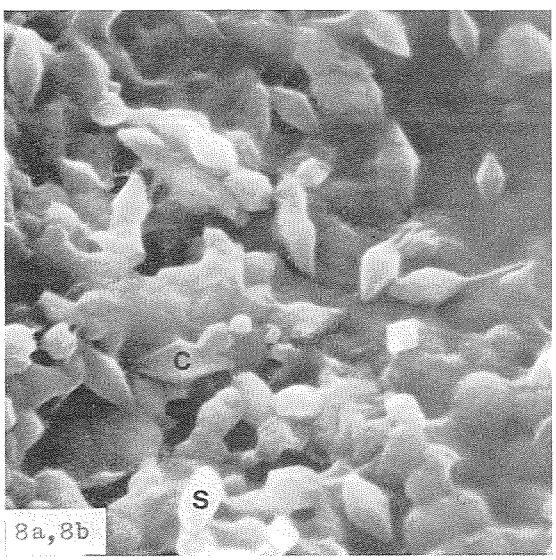
6 (ent)



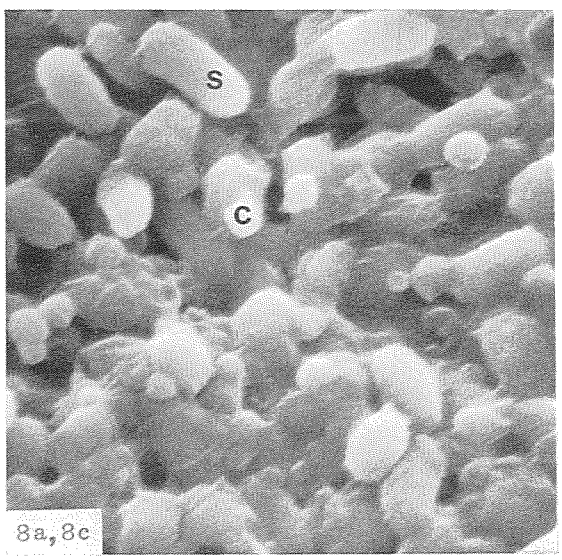
7 (X 10,000)



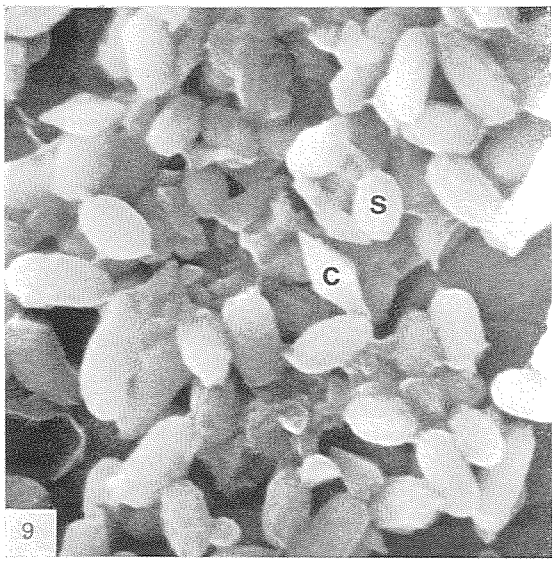
7 (X 3,000)

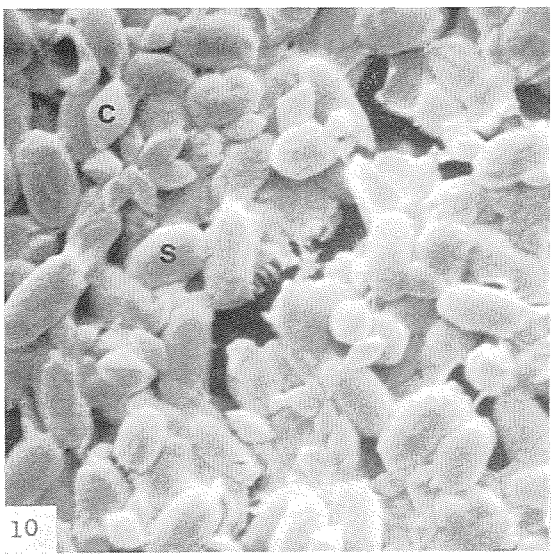


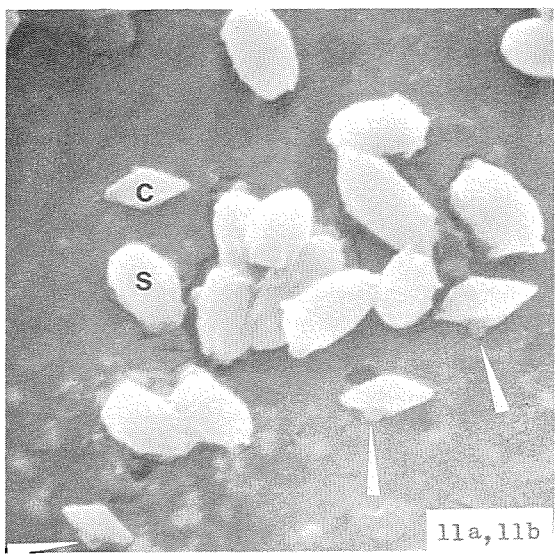
8a,8b

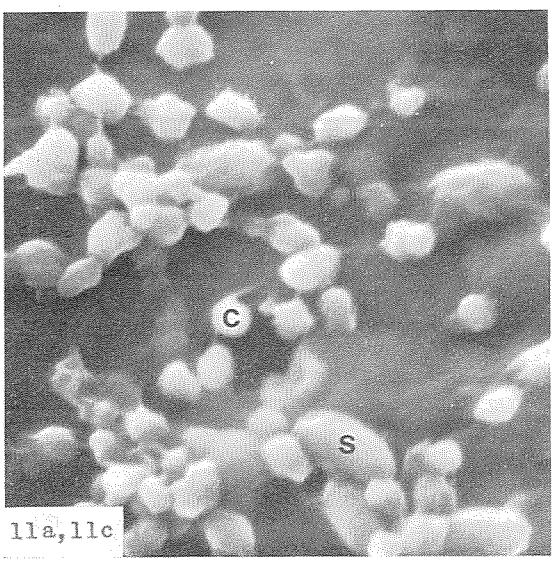


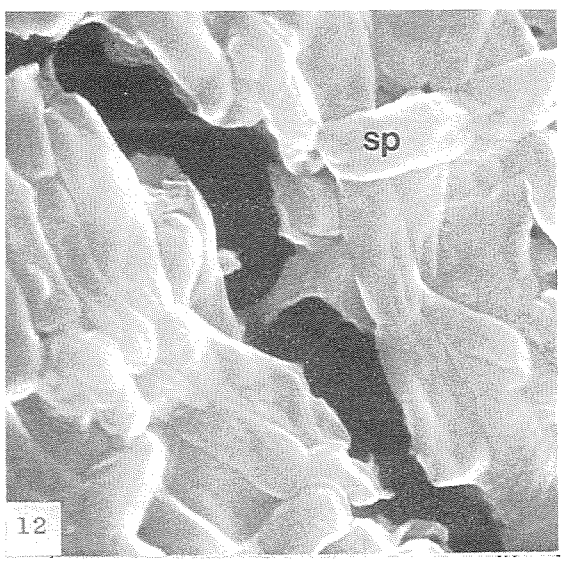
8a,8c

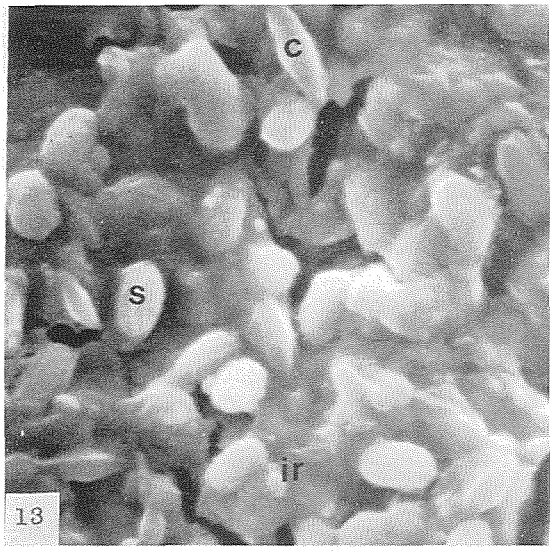

S
C
9

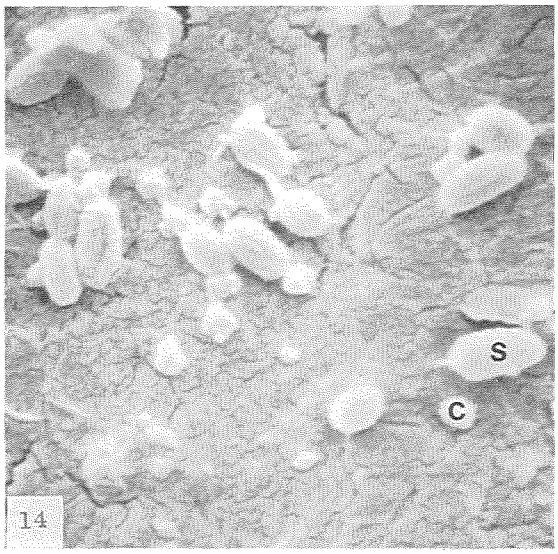

C
S
10

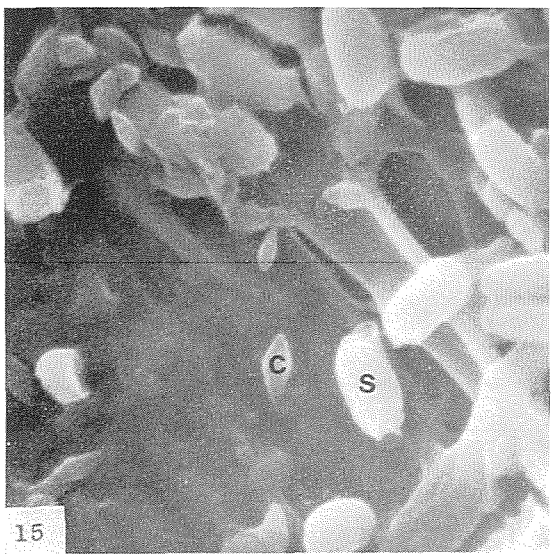

C
S
11a, 11b

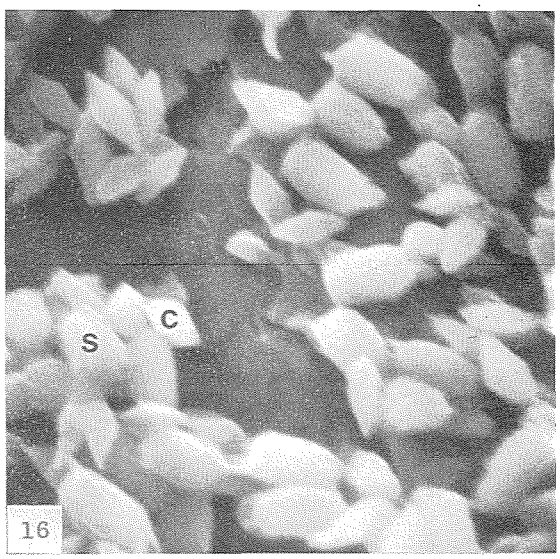

C
S
11a, 11c

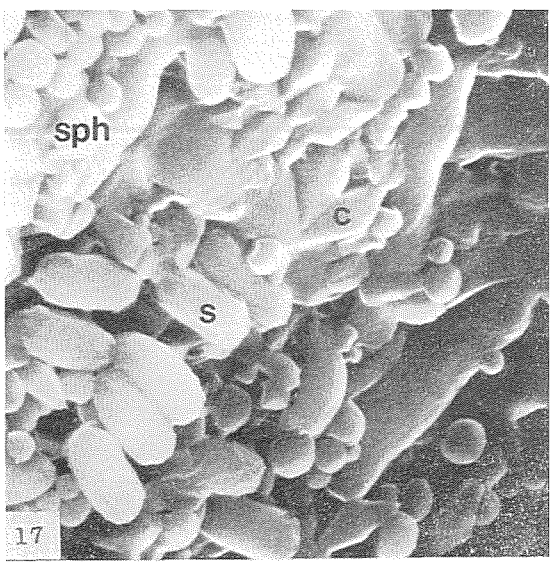

sp
12

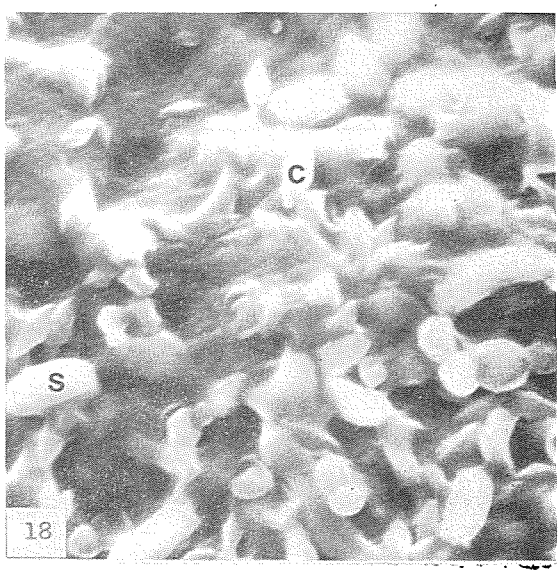

c
s
ir
13

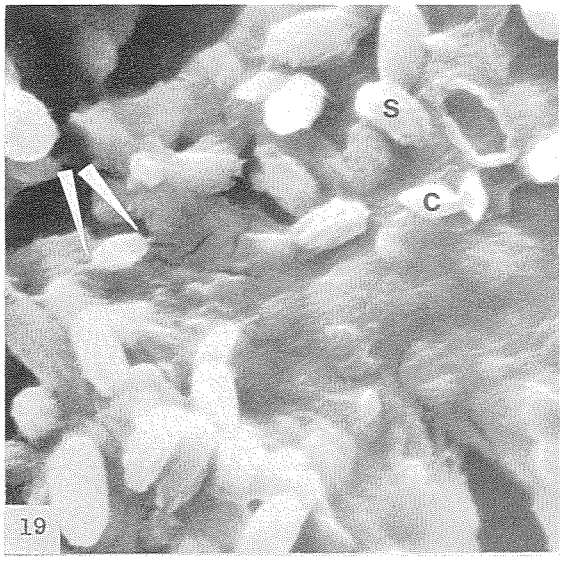

s
c
14

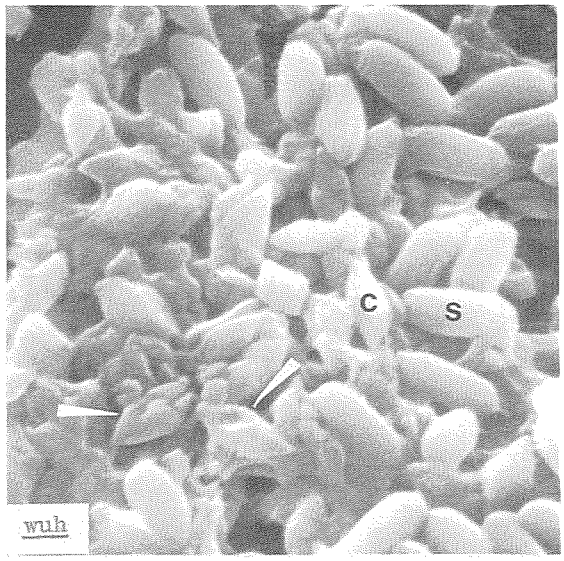

c
s
15

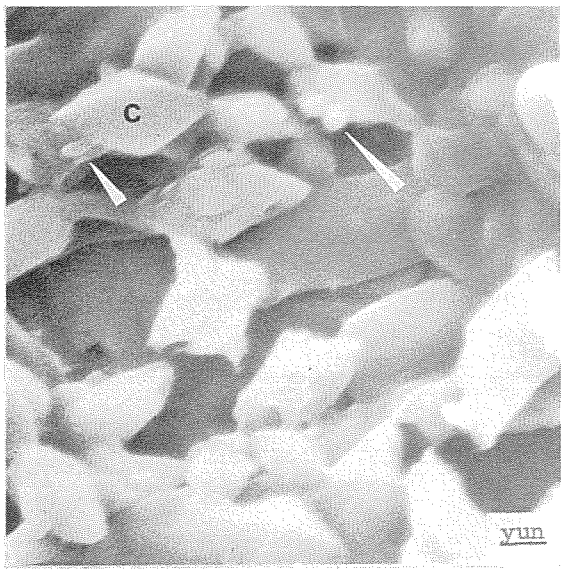

s
c
16

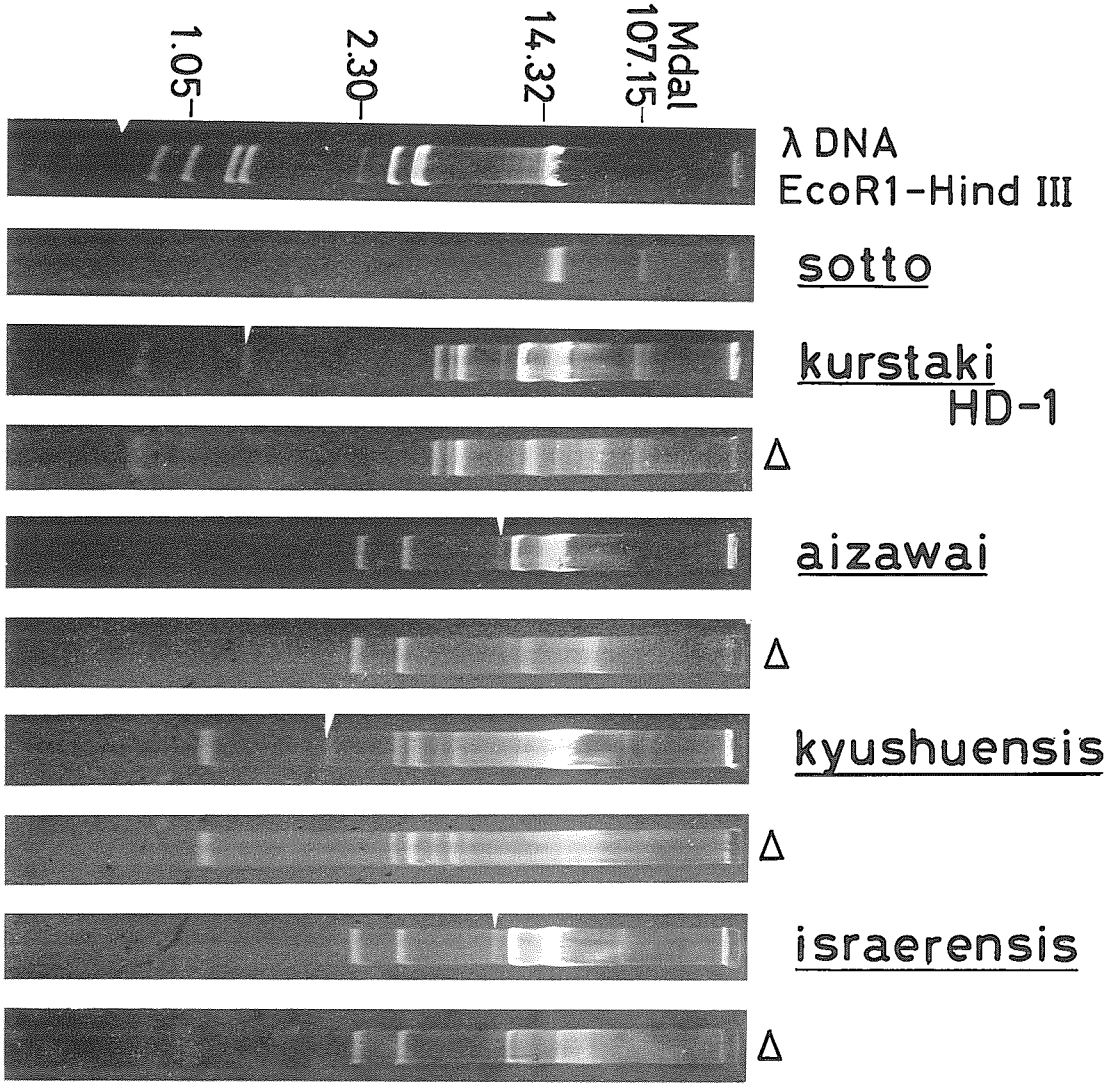

sph
c
s
17

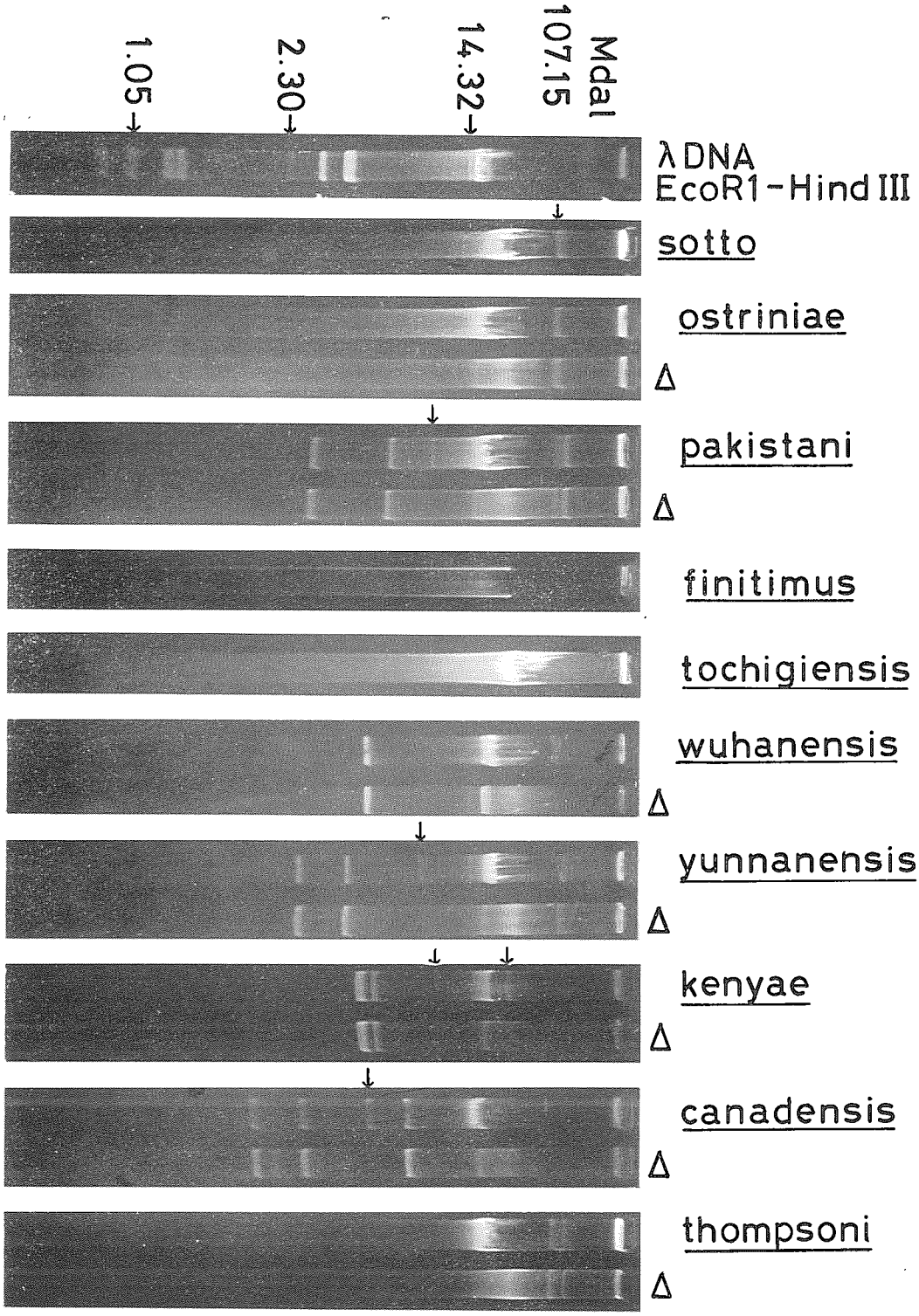

c
s
18


S
C
19


C
S
wuh


C
yun


Mdal
107.15
14.32
2.30
1.05
λ DNA
EcoR1-Hind III
sotto
kurstaki
HD-1
Δ
aizawai
Δ
kyushuensis
Δ
israerensis
Δ


1.05
2.30
14.32
107.15
MdaI
λDNA
EcoR1-Hind III
sotto
ostriniae
Δ
pakistani
Δ
finitimus
tochigiensis
wuhanensis
Δ
yunnanensis
Δ
kenyae
Δ
canadensis
Δ
thompsoni
Δ