

# Caracterización de los genes de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* ssp. *medellin*

Characterization of genes coding for *Bacillus thuringiensis* ssp. *medellin* toxic proteins

Nora Helena Restrepo<sup>1</sup>  
María Mercedes Patiño  
Sergio Orduz  
Thais Díaz  
William Rojas

## Resumen

La resistencia a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) en insectos Lepidoptera y Díptera ha sido demostrada bajo condiciones de laboratorio y en 1990 se reportó por primera vez en el campo. Por tanto, es de gran interés la caracterización de las proteínas tóxicas y la identificación de los genes que las codifican en la cepa recientemente aislada de *B. thuringiensis* ssp. *medellin* (*Btmed*), la cual tiene actividad tóxica para larvas de mosquitos. La generación de una librería genómica de *Btmed* permite el aislamiento de los genes de las toxinas y la caracterización inicial de los mismos. Para fabricar la librería genómica de *Btmed* en el vector lambda ZAP II, el ADN total de *Btmed* se aisló y se sometió a restricción parcial con la enzima EcoRI. La librería se tamizó usando técnicas de inmunodetección. Los clones inmunorreactivos que se purificaron, mostraron un inserto de ADN de casi 4 kilobases (Kb), los cuales codifican una proteína de un peso molecular aproximado de 100 kilodalton (KDa) que mostró actividad tóxica contra larvas de mosquito.

**Palabras Claves:** *Bacillus thuringiensis* ssp. *medellin*, Librería genómica, Proteína tóxica, Inmunodetección, ADN, Métodos.

## Summary

Resistance to *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxins in Lepidoptera and Diptera insects has

been showed under laboratory environments and in 1990 it was reported by the first time under field conditions. Therefore, it is important to characterize the new toxic proteins and identify their genes in the recently discovered strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *medellin* (*Btmed*), with mosquito larvae activity. The generation of a genomic library of *Btmed* allowed the isolation of the toxins genes and their initial characterization. In order to make the genomic library of *Btmed* in the lambda ZAP II vector, total DNA of *Btmed* was isolated and a partial restriction was performed with EcoRI. The library was screened using immunodetection techniques. The purified immunoreactive clones displayed an insert of approximately 4 Kilobases (Kb) which encoded a protein of a molecular weight of 100 Kilodalton (KDa) that shows toxic activity against mosquito larvae.

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram positiva que ha sido ampliamente usada en muchos países en el control integrado de plagas agrícolas y de mosquitos vectores de enfermedades. Las cepas más conocidas de *Bt* para el control de mosquitos pertenecen a las subespecie *israeliensis* (*Bti*) (Goldberg y Margalit 1977) y al aislamiento PG-14 de la subespecie *morrisoni* (*Bti*) (Padua et al. 1984).

En los últimos seis años se han presentado varios reportes de insectos seleccionados con altos niveles de resistencia a las delta endotoxinas de cepas nativas y recombinantes de *Bt*, tanto bajo condiciones de campo como de laboratorio. En cada caso, la especie de insecto tiene apa-

rentemente la capacidad de desarrollar resistencia en pocas generaciones. En el laboratorio se han encontrado altos niveles de resistencia a las delta endotoxinas de *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (*Btk*) en *Plodia interpunctella* (Hübner) y *Cadra cautella* (Walker) (McGaughey 1985; McGaughey y Beeman 1988). También, una cepa de *Heliothis virescens* (Fabricius) ha sido seleccionada como resistente a toxinas de *Btk* producidas en *Pseudomonas fluorescens* transformadas genéticamente (Stone et al. 1989). Más significativo aún ha sido el reporte en los últimos cuatro años de poblaciones de campo de *Plutella xylostella* (L.) de Hawai resistentes a *Btk* (Tabashnik et al. 1990). Este es el primer ejemplo bien documentado de resistencia ocurrida en el campo, aunque reportes preliminares habían sugerido la posibilidad de resistencia a *Bt* en poblaciones de *P. xylostella* en Filipinas (Kirsch y Schmuttere 1988) y en poblaciones de *P. interpunctella* en granos almacenados en los Estados Unidos (McGaughey 1985; McGaughey y Beeman 1988). Además se ha reportado una cepa de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) seleccionada como resistente a una cepa de *Bt* activa contra coleópteros (Miller et al. 1990), y *Culex quinquefasciatus* Say y *Aedes aegypti* (L.) resistentes a *Bti* (Georghiou et al. 1983; Goldman et al. 1986).

La aparición de resistencia a las toxinas de *Bt* en insectos lepidópteros y dípteros ha llevado tanto a los laboratorios de investigación como a las industrias a buscar nuevas moléculas, especialmente de bacterias entomopatógenas, para el desarrollo de nuevas alternativas de control. Orduz et al. (1992) reportaron la subespecie *medellin* de *Bt* (*Btmed*), cepa CIB 163-131 serotipo H-30, un nuevo serotipo de Colombia, el cual es tóxico para larvas de anofelinos y culicinos. Su nivel de toxicidad es diez veces menor que *Bti* y PG-14. En contraste con *Bti* y PG-14, *Btmed* no produce proteínas de tan alto peso molecular (125-135 KDa), pero produce una proteína en el rango de 90-100 kilodalton (KDa) (Orduz et al. 1994). La presencia de una nueva proteína insecticida de aproximadamente 100 KDa en *Btmed* representa una alternativa para los

<sup>1</sup> Respectivamente, Investigadoras, Jefe Sección Control Biológico, Investigadora y Director Científico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Apartado Aéreo 7378, Fax 4415514, Medellín, Colombia.

programas de control de mosquitos en lugares donde la resistencia a las toxinas de *Bti* se presente.

En este estudio se reporta el aislamiento y la caracterización parcial del gen que codifica la proteína tóxica de *Btmed* de aproximadamente 100 KDa de peso molecular.

## **Materiales y Métodos**

### **Generación de la librería genómica de *Btmed***

Para el aislamiento del ADN genómico de la cepa CIB 163-131 se inoculó, al 5%, un erlenmeyer con 200 ml de medio Luria Bertani (LB) (Sambrook et al. 1989) y se incubó a 30°C, 200 rpm hasta una densidad óptica de 1,5 a 600 nm. Luego, el cultivo se centrifugó por 5 minutos a 5.000 rpm y se procedió al aislamiento del ADN genómico mediante un método modificado de lisis alcalina con SDS, tratamiento con lisozima, RNasa y proteínasa K, y finalmente extracción con fenol y cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico (Delécluse)<sup>1</sup>

El ADN total del *Btmed* fue digerido con la enzima EcoRI bajo condiciones que permitieron obtener fragmentos entre 10.000 y 7.000 pares de bases. Se ligaron 600 ng de fragmentos de ADN genómico con 1 µg de los brazos del fago lambda (λ), usando el sistema de ligación de ADN (Stratagene, La Jolla, CA); el producto de la ligación (λ recombinante) fue empacado in vitro usando el sistema de clonaje Lambda ZAP II/EcoRI/CIAP (Stratagene, La Jolla, CA) para obtener un «stock» de fagos. Luego se transfirió a una cepa de *Escherichia coli* hospedante (XL1-BLUE MRF') y se sembró en cajas de petri. Para la siembra de la librería, 1 ml del «stock» de fagos se incubó con 200 ml de células XL1-BLUE MRF' por 15 minutos a 37°C, luego se le agregaron 3 ml de agar semisólido (NZY líquido con 0,7% de agarosa) a 48°C, más 15 ml de

IPTG (Isopropiltio-B-D-galactosidasa) 0,5 M y 50 ml de X-GAL (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-B-D-galactosidasa) a 250 mg/ml, y se vertió en cajas de agar NZY (5 g de NaCl, 2 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 g de extracto de levadura, 10 g de caseína hidrolizada y 15 g de agar por litro, pH 7,5) que se incubaron a 37°C. Las placas de lisis se visualizaron luego de 6 a 8 horas de incubación. Una vez obtenidas las placas se procedió a titular la librería usando 200 ml de células XL1-BLUE MRF' y 1 ml de diluciones seriadas del «stock» de fagos de 10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup>; para determinar el número de unidades formadoras de placas (ufp).

Para la amplificación de la librería se mezclaron alícuotas de la suspensión de fagos, que contenían aproximadamente 28.000 ufp y 340 ml de células XL1-BLUE MRF' frescas. La mezcla se incubó 15 minutos a 37°C y luego de agregarles 3 ml de agar semisólido, se sembraron en cajas de agar NZY y se incubaron por 8 horas a 37°C. Al comenzar a observar placas de lisis se vertió, en cada caja, 5,1 ml de buffer SM (5,8 g de NaCl, 2 g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50 ml de 1 M de Tris-HCl pH 7,5 y 5 ml de gelatina al 2% por litro) y se incubaron nuevamente a 4°C durante toda la noche para permitir la difusión del fago en el buffer. Luego, la suspensión de fagos se recuperó en un tubo de polipropileno estéril, se centrifugó para remover los desechos celulares y al sobrenadante se le adicionó 0,3% de cloroformo y 7% de dimetil sulfóxido (DMSO) para evitar contaminación y preservar los fagos en la congelación, y se hicieron alícuotas en tubos a -70°C hasta su uso. Al tener la librería amplificada se tituló nuevamente haciendo diluciones del «stock» amplificado como se detalló anteriormente.

### **Tamizaje de la librería**

Para la obtención de antisueros contra las proteínas tóxicas de *Btmed*, ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad se inmunizaron mediante inyecciones intraperitoneales con la proteína de 100 KDa de *Btmed*, separada en geles de poliácridamida bajo condiciones denaturantes a partir de un cultivo completo final de *Btmed*. La pri-

mera inyección se hizo con una emulsión del antígeno en adyuvante completo de Freund, la segunda con adyuvante incompleto y los refuerzos posteriores se hicieron con solución salina y antígeno. Sueros de sangrías periódicas se analizaron mediante inmunoblot para determinar su positividad y especificidad.

El procedimiento de inmunoselección consistió en escoger una dilución del «stock» de la librería amplificada que produjera entre 200 y 300 ufp por caja de 90 mm de diámetro. Células XL1-BLUE MRF' se infectaron con 1 ml de una dilución 1:500, se incubaron 15 min a 37°C, se sembraron y se dejaron incubando 4 horas a 42°C. Luego, las cajas se retiraron del incubador y rápidamente se cubrieron en la superficie con membranas de nitrocelulosa secas, previamente impregnadas en IPTG 10 mM, y se incubaron nuevamente a 37°C durante toda la noche para posteriormente retirar la membrana.

Las membranas se procesaron por la técnica de Western blot, usando como anticuerpo el antisuero de ratón previamente preparado contra la proteína de 100 KDa de *Btmed*, seguido de proteína A conjugada a fosfatasa alcalina y usando como sistema de revelado naftol fosfato y fast red (Sigma Chemical Co). De esta manera se analizaron aproximadamente 1.500 placas.

Para la purificación de clones positivos, una vez obtenidos los clones inmunorreactivos en la membrana, se compararon con su respectiva caja para ubicarlos en el agar. Con la punta gruesa de una pipeta de Pasteur estéril se perforó el agar para aislar nueve clones inmunorreactivos que se resuspendieron independientemente en 500 ml de buffer SM y cloroformo y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Estos clones se codificaron como 3A, 3B, 3C, 3D, 4A, 4B, 4C, 4D y 4E. Con estos clones inmunorreactivos se realizaron infecciones sucesivas hasta obtenerlos puros. Al azar se eligió el clon 3A y se utilizaron sus replicaciones para su caracterización y análisis.

1 DELÉCLUSE, A. Comunicación personal.

## Escisión in vivo del fagémido pBluescript SK(-)

Para el proceso de escisión se seleccionaron cinco clones positivos puros que corresponden a replications del clon 3A (3A1-1, 3A2-1, 3A3-1, 3A4-1 y 3A6-1) y 2 clones negativos (2NA, 2NB). Se infectaron 200 ml de células XL1- BLUE MRF<sup>+</sup> con 20 ml del «stock» de fagos correspondiente a cada clon y 1 ml del fago ayudador Ex-Assist que ayuda a la escisión y circularización del inserto existente en los clones positivos. Se incubaron 15 minutos a 37°C y luego se les agregó a cada uno 3 ml de medio YT 2X (10 g de NaCl, 10 g de extracto de levadura y 16 g de bacto tripton por litro) y se incubaron nuevamente por 2,5 horas a 37°C en agitación; luego, los tubos se calentaron 20 minutos a 70°C para matar las células, se centrifugaron a 3.000 rpm por 15 minutos y se recolectó el sobrenadante que contiene el plásmido empacado como una partícula de fago filamentoso. Con 1 ml de este stock se infectaron 200 ml de células de *E. coli* cepa SOLR, se incubaron 15 minutos a 37°C, se sembraron sobre medio LB con 50 µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Al obtener el crecimiento de colonias correspondiente a cada clon, se seleccionaron dos colonias de cada clon, las cuales se repicaron nuevamente a LB con ampicilina para obtener cultivos puros. Las colonias que crecieron en el cultivo contienen el fagémido pBluescript SK(-) con el inserto clonado de *Btmed*. El proceso se realizó siguiendo el protocolo del sistema de clonaje de Lambda ZAP II/EcoRI/CIAP (Stratagene, La Jolla, CA) para aislar el plásmido que contiene la información genética de la proteína aislada.

## Análisis de la actividad tóxica de la proteína sintetizada por las replications del clon 3A

Al obtener el crecimiento de las colonias correspondientes a las replications del clon 3A en LB con ampicilina, se procedió a repicar cada una por duplicado en 5 ml de medio LB líquido, se incubaron por 4 horas a 37°C, 150 rpm; luego, a un grupo se le agregó IPTG en una concentra-

ción de 5 mM y el otro grupo permaneció sin IPTG. Se incubaron nuevamente hasta cumplir 24 horas en iguales condiciones. A las 24 horas se tomaron 500 ml de cada cultivo; con 100 ml se realizó un bioensayo con 10 larvas de *C. quinquefasciatus* de tercer instar, en 100 ml de agua destilada y se realizaron lecturas de mortalidad a las 24 y 48 horas. Los 400 ml restantes se usaron para realizar inmunodetección de la proteína producida.

## Análisis por Western blot de la proteína recombinante del clon 3A

Material equivalente al utilizado para efectuar el bioensayo se separó por electroforesis en gel de poli acrilamida al 10% con SDS (Dodecyl sulfato de sodio). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando corriente eléctrica en un buffer de tris, glicina y metanol. La membrana se coloreó con rojo de Ponceau para confirmar que el procedimiento de transferencia funcionó adecuadamente y determinar la localización de los marcadores de peso molecular. La membrana se procesó entonces con el anticuerpo obtenido en ratón contra la proteína de 100 KDa de *Btmed*, seguido del mismo conjugado y reactivo de color que se usó en el sistema de inmunoselección de la librería.

## Mapa de restricción del fragmento del gen de la proteína de 100 KDa

Para determinar el tamaño del inserto de ADN presente en el clon 3A, se realizó análisis del ADN que se aisló a partir de dicho clon con enzimas de restricción. Se realizaron minipreparaciones de ADN por el método de la lisis alcalina (Sambrook et al. 1989), a los cultivos replica del clon positivo y a algunos negativos para que sirvieran de control. Una vez obtenido los plásmidos, se cortaron con las enzimas EcoRI y HindIII, siguiendo las indicaciones del fabricante. Además se escogió un solo clon positivo para hacer una maxipreparación por el método antes mencionado y una vez obtenido el ADN aislado se realizaron cortes con 16 enzimas de restricción y varias mezclas para hacer un

mapa con la localización de los sitios de corte de las enzimas de restricción.

## Resultados

Al realizar la titulación inicial de la librería se obtuvo un título de librería no amplificada de  $1,9 \times 10^6$  upf/ml y posteriormente se obtuvo un título de librería amplificada de  $5,2 \times 10^8$  upf/ml, con un porcentaje de clones recombinantes mayor del 90%.

## Caracterización del clon 3A

Uno de los aspectos más importantes en la caracterización del clon identificado es la demostración de actividad larvicida. La cepa de *E. coli* que contiene el plásmido con el fragmento de ADN de *Btmed* tiene la posibilidad de sintetizar la proteína recombinante una vez que se induce su producción con la adición de IPTG y se puede evaluar la actividad de la proteína por medio de un bioensayo.

Los resultados del bioensayo se observan en las Figuras 1 y 2. Estos resultados indican que el clon 3A corresponde a una proteína que es tóxica para larvas de *C. quinquefasciatus*, con porcentajes de mortalidad hasta del 80% cuando se indujo la expresión de la proteína con IPTG y mortalidad no mayor del 30% cuando no hubo inducción con IPTG. Es interesante anotar que aislamientos independientes de colonias provenientes del clon 3A, aunque expresan niveles similares de la proteína recombinante, presentan niveles de toxicidad variable.

Para confirmar que el tamaño de la proteína obtenida correspondiera a un peso molecular de aproximadamente 100 KDa, se procedió a efectuar el análisis por Western blot de la proteína recombinante del clon 3A. Los resultados indican que el clon 3A, una vez que se induce con IPTG, sintetiza una proteína que es reconocida por el antisuero y que comigra con el polipéptido de aproximadamente 100 KDa que se observa en el cultivo completo final de *Btmed*. Esto, sumado al resultado del bioensayo en el que se demuestra que la proteína recombinante del clon 3A es tóxica para larvas de mosquito, es evidencia clara de que el clon 3A codifica una de las proteínas tóxicas de

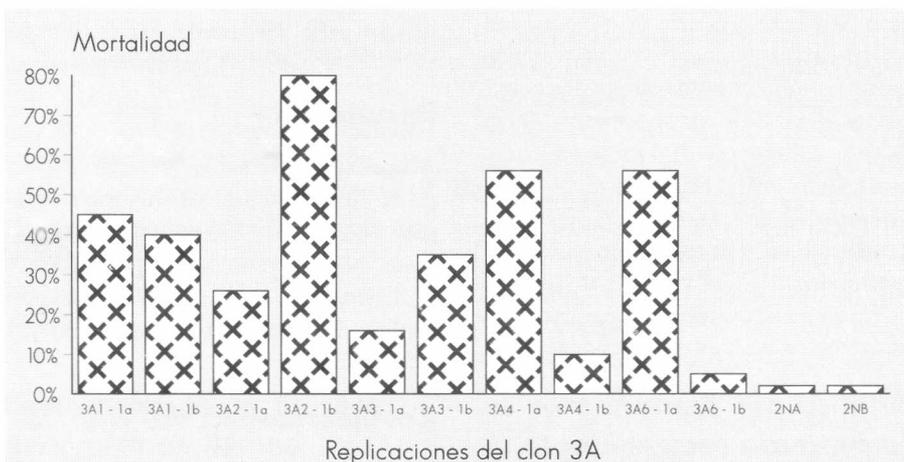


Figura 1. Actividad tóxica de las replications del clon 3A inducidas con IPTG contra larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus*. Los clones 2NA y 2NB fueron no inmunorreactivos contra la proteína de 100 KDa y se usaron como controles negativos. Lectura de mortalidad a las 48 horas.

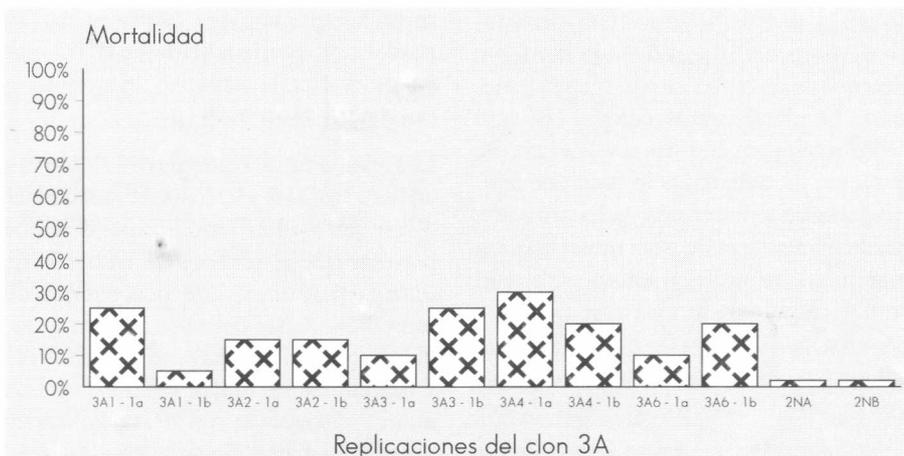


Figura 2. Actividad tóxica de las replications del clon 3A sin inducción con IPTG contra larvas de tercer instar de *Culex quinquefasciatus*. Lectura de mortalidad a las 48 horas.

*Btmed* con un peso molecular de aproximadamente 100 KDa. Estos resultados sugieren además que la proteína de 100 KDa por sí sola es capaz de ejercer toxicidad contra larvas de *C. quinquefasciatus*.

El mapa de restricción del fragmento de los genes de la proteína permitió, además, confirmar que la cantidad de ADN presente en el clon 3A tenía información suficiente para codificar una proteína de 100 KDa como la que se identificó en las inmunotransferencias. Con base en los datos que se presentan en el gel de agarosa, se elaboró el mapa de restricción (Fig.

3). Las restricciones con la enzima *EcoRI* del ADN aislado de las replications del clon 3A revelaron que todos tienen el mismo patrón de corte, liberando un inserto de aproximadamente 4,4 Kb.

### Discusión

En este artículo se describe el clonaje y la expresión del gen que codifica la proteína de aproximadamente 100 KDa de *Btmed* en la cepa de *E. coli* SOLR. La expresión de este gen *cry* produjo una significativa mortalidad cuando células completas de *E. coli* fueron dadas a larvas de tercer instar de *C. quinquefasciatus*. Re-

sultados similares han sido reportados por varios autores, quienes han usado varias especies de *Bacillus* y varias cepas de *E. coli* como huéspedes receptores para la expresión de genes tóxicos tanto de *Bt* como de *B. sphaericus*. Estos huéspedes han sido usados para evaluar la toxicidad de proteínas individuales o estudiar su relación estructura-función sin obtener altos niveles de expresión (Baumann y Baumann 1989; Baumann et al. 1987; Baumann et al. 1988; Davidson et al. 1990; De la Torre et al. 1989; Oei et al. 1990; Thanabalu et al. 1991).

Los genes *cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC*, *cryIVD* y *cytA* del *Bti* han sido individualmente expresados en *E. coli* y las diferencias en la producción de proteína y toxicidad fueron probablemente debidas a diferencias en las células hospedantes, vectores, bioensayos, estabilidad de los polipéptidos y/o a variaciones en la eficiencia del promotor y sitio de unión al ribosoma (Angsuthanasombat et al. 1987, 1992; Chungjatupornchai et al. 1988; Delécluse et al. 1988; Thorne et al. 1986; Waalwijk et al. 1985; Ward et al. 1984; Ward y Ellar 1988).

El gen *cryIVB* es uno de los pocos genes del cristal de *Bti* que ha sido bien expresado en *E. coli*. La proteína de 128 KDa ha sido sintetizada en *E. coli* TG1 y una vez purificada fue debilmente tóxica a larvas de *A. aegypti* (Ward y Ellar 1988), y esta misma proteína sobreexpresada en *E. coli* JM107 fue tóxica a larvas de tercer instar de *A. aegypti* con una  $LC_{50}$  de 43 ng/ml (Chungjatupornchai et al. 1988).

Ward et al. (1984) clonaron y expresaron en *E. coli* JM101 un gen de la delta-endotoxina de *Bti* en el vector pUC12 y se identificaron dos recombinantes produciendo una proteína de 26 KDa. La síntesis de este polipéptido *in vivo* por *E. coli* JM101 fue letal a larvas de *A. aegypti* y citotóxica a células de mosquito *in vitro*, y recientemente Koni y Ellar (1993) clonaron en *E. coli* el nuevo gen de la proteína *cytB* de 29 KDa de *Bt ssp. kyushuensis*.

La variabilidad en la mortalidad de larvas de *C. quinquefasciatus* observada por las diferentes colonias del clon 3A puede ser debida a las condiciones de plega-

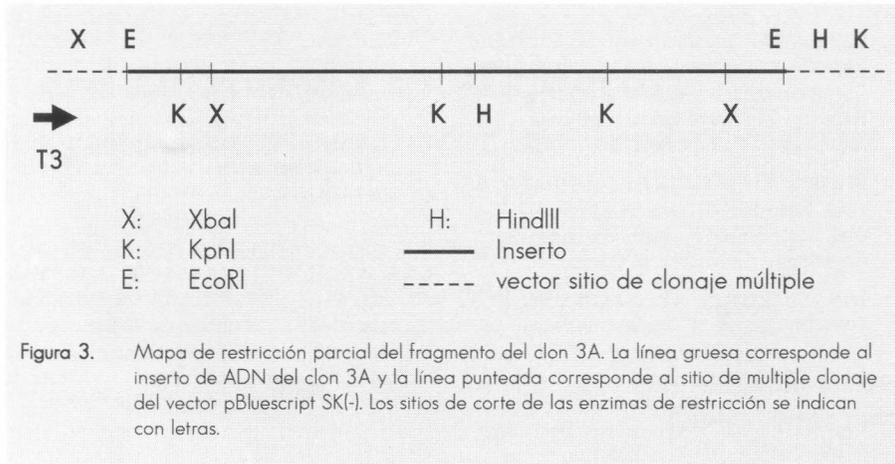


Figura 3. Mapa de restricción parcial del fragmento del clon 3A. La línea gruesa corresponde al inserto de ADN del clon 3A y la línea punteada corresponde al sitio de múltiple clonaje del vector pBluescript SK(-). Los sitios de corte de las enzimas de restricción se indican con letras.

miento de una proteína extraña en la *E. coli*, en la que no toda la proteína producida es necesariamente doblada de modo que se obtenga un producto funcional.

El tamaño de la proteína tóxica de 100 KDa, reportado en este artículo, coincide con el tamaño de la proteína reportada por Orduz et al. (1994), donde la electroforesis y el Western blot revelaron la presencia en *Btmed* de proteínas de aproximadamente 100, 80, 75, 67, 65 y dos dobles de 40-41 y 30-28 KDa y donde la proteína de 100 KDa no presentó reacción cruzada con una mezcla de antisueros (anti-CryIVD, anti-Cry IVA+B y anti-Cyt A) de *Bti*, confirmando que se trata de una nueva proteína.

## Conclusiones

Debido a la presencia de una nueva proteína tóxica en *Btmed* diferente de las proteínas de *Bti*, esta subespecie es en el momento el único candidato disponible para reemplazar a *Bti* en caso de desarrollo de resistencia. Por lo tanto, es muy importante determinar el valor insecticida de las proteínas de *Btmed* y la caracterización de los genes que las codifican, ya que permitirá el estudio de su estructura y homología en relación con otros genes de proteínas insecticidas ya reportados de las cepas de *Bti* activas para mosquitos. Esto puede, además, constituir un sistema de estudio muy valioso para evaluar la sinergia de las diferentes proteínas de *Btmed* en el efecto larvicida y también entre *Btmed* y otras proteínas tóxicas. Además, el conocimiento genético podría

llevar al mejoramiento de las proteínas como plaguicidas durables que sean competitivos con los dañinos plaguicidas químicos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Organización Mundial de la Salud y Colciencias.

## Bibliografía

- ANGSUTHANASOMBAT, C.; CHUNGJATUPORNCHAI, W.; KERTBUNDIT, S.; LUXANABIL, P.; SETTASATIAN, C.; WILAIRAT, P.; PANYIM, S. 1987. Cloning and expression of 130-Kd mosquito-larvicidal delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* (Estados Unidos) v. 208, p. 384-389.
- ; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS-Microbiology Letter*. (Holanda) v. 94, p. 63.
- BAUMANN, L.; BAUMANN, P. 1989. Expression in *Bacillus subtilis* of the 51- and 42- Kilodalton mosquitocidal toxin genes of *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v. 55, p. 252-253.
- ; BROADWELL, A.H.; BAUMANN, P. 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9- Kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *Journal of Bacteriology* (Estados Unidos) v. 170, p. 2045-2050.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; BOWDITCH, R.D.; BROADWELL, A.H. 1987. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequences. *Journal of Bacteriology* (Estados Unidos) v. 169, p. 4061-4067.

- BOURGOUIN, C.; DELECLUSE, A.; DE LA TORRE, F.; SZULMAJSTER, J. 1990. Transfer of toxin protein genes of *Bacillus sphaericus* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* and their expression. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v. 56, p. 340-344.
- CHUNGJATUPORNCHAI, W.; HOFTE, H.; SEURINCK, J.; ANGSUTHANASOMBAT, C.; VAECK, M. 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *European Journal Biochemistry* (Estados Unidos) v. 173, p. 9-16.
- DAVIDSON, E.W.; OEI, C.; MEYER, M.; BIEBER, A.L.; HINDLEY, J.; BERRY, C. 1990. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. *Canadian Journal of Microbiology* (Canadá) v. 36, p. 870-878.
- DE LA TORRE, F.; BENNARDO, T.; SEBO, P.; SZULMAJSTER, J. 1989. On the respective roles of the two proteins encoded by the *Bacillus sphaericus* 1593M toxin genes expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysics Research Communication* (Estados Unidos) v. 164, p. 1417-1422.
- DELECLUSE, A.; BOURGOUIN, C.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israeliensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics* (Estados Unidos) v. 214, p. 42-47.
- GEORGHIOU, G.P.; BAKER, J.; AL-KHATIB, Z.; MELLON, R.; MURRAY, C.; TRAN, H.; VASQUEZ, M.; PELSUE, F.; HAZELRIGG J. 1983. Insecticide resistance in mosquitoes: research on new chemicals and techniques for management. *In: Mosquito Control Research Annual Report*. University of California, Riverside, p. 86-91.
- GOLDBERG, L.J.; MARGALIT, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosquito News* (Estados Unidos) v. 37, p. 355-358.
- GOLDMAN, I.F.; ARNOLD, J.; CARLTON, B.C. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israeliensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v. 47, p. 12.
- KIRSCH, K.; SCHMUTTERER, H. 1988. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in the Philippines. *Journal Applied Entomology* (Alemania) v. 105, p. 249-255.
- KONI, P.A.; ELLAR, D.J. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. *Journal of Molecular Biology* (Reino Unido) v. 229, p. 319-327.

- McGAUGHEY, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science (Estados Unidos) v. 229, p. 193-195.
- ; BEEMAN, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economy Entomology (Estados Unidos) v. 81, p. 28-33.
- MILLER, D.L.; RAHARDJA, U.; WHALON, M.E. 1990. Development of a strain of Colorado potato beetle resistant to the delta-endotoxin of *Bt*. Pest Resistance Management. v. 2 no. 2, p. 25.
- OEI, C.; HINDLEY, J.; BERRY, C. 1990. Analysis of the genes encoding the 51.4- and 41.9-kDa toxins of *Bacillus sphaericus* 2297 by deletion mutagenesis: the construction of fusion proteins. FEMS-Microbiology Letter (Holanda) v. 72, p. 265-274.
- ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M.M.; MONTOTOYA, A.E.; DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 59, p. 99-103.
- ; DIAZ, T.; THIERY, I.; CHARLES, J-F.; ROJAS, W. 1994. Crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovar. *medellin*. Applied Microbiology Biotechnology v. 40, p. 794-799.
- PADUA, L.E.; OHBA, M.; AIZAWA, K. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 44 no.1, p. 12-17.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. p. 6.3-6.8.
- STONE, T.B.; SIMMS, S.R.; MARRONE, P.G. 1989. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) v. 53, p. 228-234.
- TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Journal of Economic Entomology (Estados Unidos) v. 83, p. 1671-1676.
- THANABALU, T.; HINDLEY, J.; JACKSON-YAP, J.; BERRY, C. 1991. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 173, p. 2776-2785.
- THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A.M.; POLLOCK, T. 1986. Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 166, p. 801-811.
- WAALWIJCK, C.; DULLEMANS, A.M.; VAN WORKUM, M.E.S.; VISSER, B. 1985. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Mr 28.000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Nucleic Acids Research (Reino Unido) v. 13, p. 8207-8217.
- WARD, E.S.; ELLAR, D.J.; TODD, J.A. 1986. Cloning and expressions in *Escherichia coli* of the insecticidal d-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*. FEBS LETTERS (Holanda) v. 175, p. 371-382.
- ; —————; 1988. Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* which encode 130-kilodalton mosquitocidal proteins. Journal of Bacteriology (Estados Unidos) v. 170, p. 727-735.