

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA CEPA DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICA A *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Artiom Carmona<sup>1</sup>

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es el organismo entomopatógeno más utilizado para el control de insectos plaga del orden Lepidoptera. A las proteínas insecticidas del cristal parasporal de Bt se les denomina “Cry” y se encuentran altamente relacionadas entre sí. En este trabajo se aisló y caracterizó parcialmente una cepa de *B. thuringiensis* denominada UCLA-10. La bacteria fue reconocida básicamente por la presencia de un cristal parasporal dentro del esporangio y por la forma típica bacilar de la misma. Mediante geles desnaturalizantes de Poliacrilamida (SDS-PAGE) se pudo visualizar la presencia de una proteína de aproximadamente 130 kDa, la cual migró a la misma altura que las proteínas del tipo Cry1 de la cepa estándar HD-1. Los bioensayos cualitativos contra larvas de primer instar de gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), utilizando el complejo spora- cristal, revelaron niveles de toxicidad equivalentes a los del control positivo HD-1. Los resultados encontrados sugieren la existencia en Venezuela de cepas con alta toxicidad hacia el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*. Además, revelaron la importancia de continuar con la búsqueda de cepas de Bt que puedan ser utilizadas como agentes biológicos para el control de insectos plaga.

**Palabras clave adicionales:** Bioinsecticidas,  $\delta$ -endotoxinas, lepidoptera, Bt

## ABSTRACT

### Isolation and partial characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain toxic to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is the most used entomopathogen organism for control of insect pest of the order Lepidoptera. The crystal parasporal insecticidal proteins are named “Cry” and are highly related among them. In this work, a strain of Bt was isolated, partially characterized and named UCLA-10. The bacterium was recognized basically due to the presence of a parasporal crystal inside the sporange, and the typical bacilar shape. SDS-PAGE analysis showed the presence of a 130 kDa protein that migrated at the same level as Cry1 proteins of the standard strain HD-1. Qualitative bioassays against first instar larvae of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera), using spore-crystal complex, showed levels of toxicity similar to the protein control HD-1. These results suggest the existence in Venezuela of strains with high levels of toxicity against larvae pest in corn. In addition, they reveal the importance of continuing with the search of strains of Bt, which can be used as biological agents for the control of insect pest.

**Additional key words:** Bioinsecticide,  $\delta$ -endotoxins, lepidoptera, Bt

## INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria aeróbica, gram positiva, que se caracteriza por la producción de una inclusión parasporal durante su fase de esporulación, la cual contiene las proteínas insecticidas (Höfte y Whiteley, 1989). El control biológico mediante el uso de organismos entomopatógenos representa una alternativa para el manejo integrado de insectos, plaga de importancia económica en la agricultura. Esta forma de control tiene un menor

impacto ecológico que el uso de plaguicidas de origen químico. *Bacillus thuringiensis* es el organismo entomopatógeno más utilizado para el control de insectos plagas del orden Lepidoptera, en diversos cultivos comerciales (Lambert y Peferoen, 1992; Schnepf et al., 1998). A las proteínas insecticidas que conforman el cristal parasporal de Bt se les ha denominado “Cry”, encontrándose éstas altamente relacionadas entre sí (Adang, 1991). La clasificación subespecífica de Bt se ha realizado mediante enfoques comparativos entre la estructura primaria de las

---

Recibido: Mayo 3, 2001

Aceptado: Octubre 23, 2001

<sup>1</sup> Posgrado de Fitopatología. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. E-mail: acarmona@ucla.edu.ve

diferentes proteínas Cry y a partir de ensayos serológicos, bioquímicos y toxicológicos (Höfte y Whiteley, 1989; Crickmore et al., 1998).

El espectro de actividad insecticida dentro de las cepas de *B. thuringiensis* está caracterizado principalmente por tres patotipos: contra los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera. Sin embargo, en los últimos años la búsqueda incesante de nuevas cepas ha llevado al encuentro de actividades poco comunes como hacia nemátodos, ácaros y adultos de mosca doméstica (Feitelson et al., 1992). Las bacterias del patotipo I, con actividad tóxica frente al orden Lepidoptera, se caracterizan en su mayoría por la presencia de un cristal bipiramidal, el cual está constituido por proteínas de peso molecular de 125 a 140 kDa. Este cristal puede estar formado por diferentes tipos de proteínas, como es el caso de la cepa HD-1 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), cuyo cristal lo conforman las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de 133,2; 131,0 y 133,3 kDa, respectivamente, o bien por un solo tipo, como en la cepa HD-73 (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) cuya proteína es la Cry1Ac (Whiteley y Schnepf, 1986; Höfte y Whiteley, 1989). Es común encontrar la presencia de un cristal cúbico asociado o incluido en el cristal bipiramidal. Las proteínas que constituyen este cristal son denominadas Cry2 y están en el rango de 65-71 kDa, presentando una actividad dual contra lepidópteros y dípteros (Yamamoto y McLaughlin, 1981; Wu et al., 1991; Baum y Malvar, 1995).

El patotipo II con actividad tóxica contra mosquitos y jejenes está representado por una inclusión amorfa o semiesférica, constituida por 4 proteínas con pesos moleculares de 27, 72, 128 y 135 kDa (Höfte y Whiteley, 1989). Finalmente, las bacterias del patotipo III presentan actividad tóxica contra el orden Coleoptera y muestran un cristal en forma de cojinete o cuadrado aplanado, el cual está formado por proteínas de aproximadamente 70 kDa. Se han reportado otros tipos de proteínas que poseen un tamaño de 129 kDa y un cristal de forma bipiramidal, las cuales también son tóxicas a coleópteros (Lambert et al., 1992a); Lambert et al., 1992 b). Por otra parte, también se ha reportado la existencia de una

proteína insecticida de 80 kDa la cual es tóxica tanto a coleópteros como a lepidópteros (Tailor et al., 1992).

A pesar de que en la actualidad Bt tiene una gran importancia como bioinsecticida, se conoce muy poco sobre la biología y el papel que tiene su cristal insecticida en la naturaleza. Bt puede ser aislada de una gran variedad de hábitat siendo el suelo el más común. Sin embargo, también se reportan aislamientos de muestras de pastos, barredura de silos, insectos muertos y ambientes acuáticos (Martin y Travers, 1989; Iriarte et al., 2000). La diversidad de hábitat en los cuales se ha encontrado a Bt, refleja que su ecología es probablemente muy compleja, aunado al hecho de no encontrarse crecimiento en muchos de los lugares de donde fue aislada. Por otra parte, una característica importante es que a diferencia de los virus, hongos y protozoarios, esta bacteria no produce epizootias.

Debido a la importancia que tiene el control de insectos plaga del orden lepidóptera en muchos de los cultivos agrícolas en Venezuela, nos hemos dado a la tarea de buscar cepas nativas de *B. thuringiensis* que puedan ser utilizadas para tal fin en nuestros agroecosistemas. En el presente trabajo se describe parcialmente una cepa de *B. thuringiensis* con altos niveles de toxicidad hacia larvas de *Spodoptera frugiperda*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de la cepa

La cepa UCLA-10 fue aislada de una muestra de suelo proveniente de un cultivo de repollo (*Brassica oleracea* L.) ubicado en la localidad de La Y en el estado Trujillo. Se verificó, mediante una encuesta hecha a los agricultores de la zona, que nunca se habían utilizado productos conteniendo Bt para el control de insectos en esos campos de cultivo. Las muestras de suelo fueron pulverizadas y tamizadas para facilitar su procesamiento. Posteriormente se tomó 1 g de la muestra y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de agua destilada estéril, homogeneizando la muestra mediante agitación vigorosa durante 1 minuto. Se colocó 1 mL de la muestra en un tubo Eppendorf y se

sometió al proceso de pasteurización en un Termo Blot a 80 °C durante 10 minutos y enfriada instantáneamente después en hielo. De la suspensión se extrajeron alícuotas de 10 y 3 µL, las cuales fueron aforadas a 200 µL y plaqueadas en cajas de Petri con agar nutritivo. Estas se incubaron a 30 °C durante 24 h, lo que permitió el desarrollo de colonias aisladas, las cuales se seleccionaron por la apariencia propia de cada colonia comparándolas con colonias derivadas de cepas típicas de Bt tales como HD-1. Las colonias así seleccionadas fueron sembradas en placas de Petri con agar nutritivo, donde se incubaron por 48 h a 30 °C, hasta obtener la esporulación de cada una.

El próximo paso fue la identificación de cada aislamiento bajo el microscopio de luz con contraste de fase (1000X). Esto permitió identificar la presencia del cristal o inclusión parasporal típica de *B. thuringiensis*. Las cepas reconocidas como Bt fueron incubadas individualmente en cajas de Petri con agar nutritivo por 5 días y evaluadas al microscopio para comprobar la autólisis completa del cultivo con el objeto de obtener suficiente material para la realización de pruebas posteriores.

#### **Obtención del complejo espora-cristal**

Un primer paso para realizar las pruebas de caracterización de proteínas y los ensayos toxicológicos, fue la preparación adecuada del material. Para ambos casos se utilizó polvo liofilizado de la mezcla espora-cristal de la cepa seleccionada, procediéndose de la siguiente manera para la obtención del mismo. La colonia fue inoculada en cajas de Petri conteniendo agar nutritivo e incubada a 30 °C durante 5 días hasta su autólisis. Con ayuda de una micropipeta se resuspendió el cultivo bacteriano en 1 mL de solución 1,5 M de NaCl estéril y se centrifugó en una microcentrífuga Eppendorf durante 10 min a 12000 rpm. Se realizó este procedimiento de centrifugación tres veces consecutivas, resuspendiendo la muestra cada vez en la solución de NaCl, con el objeto de eliminar las posibles exotoxinas excretadas y los desechos celulares y evitar la posible degradación de las proteínas del cristal insecticida. Finalmente, el precipitado obtenido fue congelado y liofilizado para su uso posterior.

#### **Patrón de péptidos**

El análisis de las proteínas de la cepa seleccionada se realizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970) y Schägger y von Jagow (1987). La concentración de acrilamida que se utilizó para los geles de concentración y de separación fue de 4 y 10%, respectivamente.

A partir de las muestras liofilizadas que contenían al complejo espora-cristal de las cepas UCLA-10 y HD-1, utilizada como control positivo, se prepararon las muestras de la siguiente manera para ser cargadas en el gel. Se pesó una cantidad apropiada de complejo espora-cristal liofilizado para preparar una suspensión de 0,5 mg/mL. De esta suspensión se tomó una muestra que se mezcló en una relación 1:1 con amortiguador de carga 2x (Tris-HCl 25 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 1,28 M; azul de bromofenol 2,89 mM; SDS 0,138 M; glicerol 2,17 M). Posteriormente las muestras fueron hervidas por 10 min para su desnaturización y se centrifugaron por 1 min a 12000 rpm para precipitar las esporas. De estas muestras se usó de 1-2 µg para ser cargados en el gel. Como marcador de peso molecular y control positivo se utilizó una muestra de la cepa HD-1, la cual contenía proteínas insecticidas de 130 kDa y 65 kDa. La electroforesis se realizó con un potencial eléctrico de 50 volts durante 30 min y posteriormente a 100 volts por 1 h y 30 min, utilizando una solución amortiguadora de corrida a base de Tris-glicina y SDS (Tris-Base 0,05 M, glicina 0,38 M, SDS 0,1%, pH 8,8). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R al 0,1% (en una solución de etanol 45%, ácido acético 9%), con un tiempo de tinción de 30 min. Posteriormente el gel se destiñó con una solución de etanol al 5% y ácido acético al 7,5%. Los geles, una vez desteñidos, se secaron para su preservación colocándose entre dos pliegues de papel celofán a una temperatura de 37 °C por 24 h.

#### **Bioensayo**

El efecto tóxico de la cepa UCLA-10 fue evaluado utilizando larvas del primer instar de

*Spodoptera frugiperda*, criadas durante 24 horas en dieta artificial. Para la realización de los bioensayos, el complejo espора- cristal liofilizado se resuspendió en agua destilada estéril conteniendo Tween 20 al 0,02%. Posteriormente se inoculó  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de complejo espора- cristal de la muestra sobre la dieta artificial, de donde se alimentarían las larvas. Se utilizaron 40 larvas por ensayo, realizándose un total de tres ensayos independientes. El testigo negativo consistió de agua destilada y Tween 20, como se mencionó anteriormente. La mortalidad fue registrada a los 5 días después del tratamiento y el efecto sobre el crecimiento se evaluó durante todo el período del bioensayo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

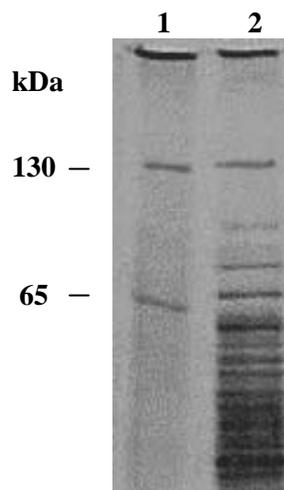
### Colecta de las muestras

Al cultivar la bacteria en cajas de Petri con agar nutritivo, las características morfológicas de la colonia fueron similares a las observadas en la cepa estándar de *B. thuringiensis* HD-1. Las observaciones hechas bajo el microscopio de luz, en contraste de fase (1000X) revelaron la presencia de una inclusión en los esporangios (células bacilares con una espора en su interior). Estas inclusiones se encontraron ubicadas al lado de la espора (cuerpos de inclusión parasporal) y mostraron una forma irregular. Esta forma irregular del cristal la ubica dentro del grupo de cepas atípicas de Bt. Cabe mencionar que la

aparición de esta estructura cristalina dentro de los esporangios, así como también la forma de los mismos, permite afirmar la presencia de una cepa de Bt. Por otra parte, es importante mencionar que el aislamiento de cepas de Bt a partir de muestras de suelo es un hecho frecuente.

### Evaluación del patrón de proteínas

Para apoyar la caracterización de las cepas de Bt es necesario analizar varios parámetros que permitan realizar una adecuada descripción. Uno de estos parámetros es el patrón de proteínas del cristal parasporal. Para el estudio de esta propiedad se utilizó la técnica de electroforesis de geles de poliacrilamida, los cuales permitieron separar las proteínas de acuerdo a su tamaño. Estas moléculas de proteína constituyen, parcial o totalmente, el cuerpo parasporal. Para el caso de la cepa UCLA-10 se distingue claramente en el gel de poliacrilamida una banda de aproximadamente 130 kDa, la cual coincide con la banda típica del control positivo HD-1 (Figura 1). Esta proteína es la que presenta la actividad insecticida contra especies del orden Lepidoptera, en el caso de HD-1 y pertenece al grupo de proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* (Schnepf y Whiteley, 1981; Crickmore, et al., 1998). La cepa UCLA-10 reveló también una serie de proteínas por debajo de la banda de 130 kDa, las cuales podrían ser



**Figura 1.** Electroforesis SDS-PAGE mostrando patrón de proteínas del complejo espора- cristal de *B. thuringiensis*. Líneas: 1, Control positivo *B. thuringiensis* HD-1; 2, cepa UCLA-10.

producto de degradación de una proteína mayor (Carmona e Ibarra, 1999). Sin embargo, es importante mencionar que el control positivo HD-1 presenta una banda a la altura de 65 kDa (Höfte y Whiteley, 1989) que está asociada a un cristal cúbico incrustado al cristal bipiramidal. La existencia de proteínas de tamaño similar (65 kDa) en la muestra UCLA-10, no puede relacionarse directamente con la proteína del mismo peso en la cepa HD-1, ya que no se observó la presencia del cristal cúbico formado por este tipo de proteínas. Es posible que la abundancia de proteínas de bajo peso molecular en la muestra UCLA-10 esté relacionada con el hecho de que la muestra se deriva del complejo espora-cristal. Estas proteínas de bajo peso molecular podrían estar asociadas con la superficie de la espora, ya que cepas artificialmente acristalíferas como la 4Q7, presentaron proteínas similares al ser evaluadas mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Carmona e Ibarra, 1999).

#### Evaluación toxicológica

El tipo de bioensayo realizado permitió determinar cualitativamente la toxicidad de la cepa aislada contra insectos del orden Lepidoptera (*S. frugiperda*). Los ensayos se realizaron a partir de la muestra liofilizada del complejo espora cristal, lo cual permitió tener concentraciones conocidas de la cepa. En el Cuadro 1 se observa con claridad que la cepa UCLA-10 mostró toxicidad frente a larvas de *S. frugiperda* en niveles similares a la cepa estándar HD-1, utilizada como control positivo. Estos resultados se relacionan directamente con el patrón de proteínas que muestra la cepa UCLA-10, donde se evidencia la presencia

de una banda de proteína de alto peso de aproximadamente 130 kDa. Este tipo de proteínas presentan comúnmente actividad hacia larvas de lepidópteros y fue esta la razón principal por la que se probó dicha cepa contra larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda*. Además, este insecto es una plaga importante en cultivos de maíz y otros de interés económico, tales como pimentón, tomate, algodón y maíz (Apablaza y Vaughan, 1990).

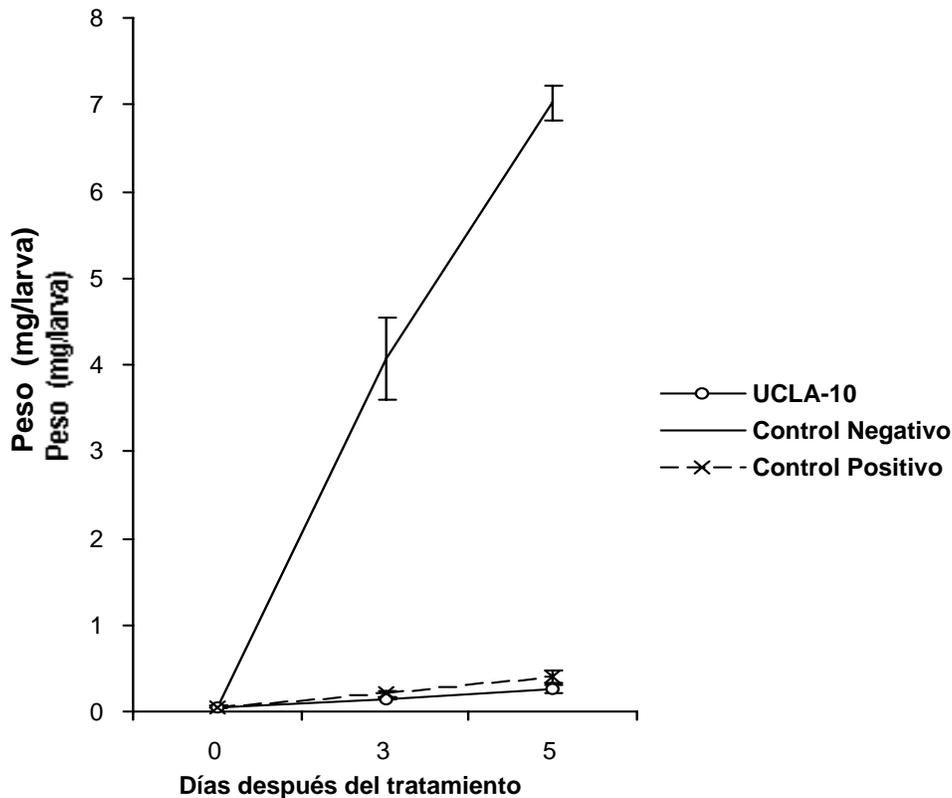
El efecto causado por la cepa UCLA-10 sobre el crecimiento de las larvas, del insecto se ilustra en la Figura 2. Es común encontrar una correlación positiva con el efecto tóxico de una cepa y el desarrollo de las larvas. Sin embargo, se puede encontrar que existen cepas de Bt que no tienen un efecto marcado sobre la mortalidad, pero sí sobre el desarrollo de las larvas. Esto evidentemente trae como consecuencia una disminución de la viabilidad de los individuos y un deterioro de la población del insecto para la próxima generación. La utilización de la información del efecto sobre el desarrollo de las larvas, puede tener implicaciones importantes desde el punto de vista del manejo de resistencia hacia *B. thuringiensis*. Una de las estrategias para retardar la aparición de resistencia se basa en la utilización de dosis subletales. Es bien sabido que las dosis subletales de Bt retardan significativamente el crecimiento del insecto (De León e Ibarra, 1995). Si bien en el caso de la cepa UCLA-10, la diferencia no es muy marcada al compararla con HD-1, es importante realizar este tipo de evaluaciones y escrutinios ya que podrían permitir el descubrimiento de nuevas cepas aptas de ser utilizadas en programas de control de plagas.

**Cuadro 1.** Efecto tóxico de la cepa UCLA-10 sobre larvas de primer instar de *S. frugiperda*

Cepa	Peso de larvas mg $\pm$ DE	Mortalidad %
UCLA -10	0,40 $\pm$ 0,06	90
HD-1	0,25 $\pm$ 0,04	90
Control Negativo	7,02 $\pm$ 0,2	10

DE= Desviación estándar

Evaluación a los 5 días del tratamiento



**Figura 2.** Efecto tóxico de la cepa UCLA-10 sobre el crecimiento de larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda*

## CONCLUSIONES

La presencia de una banda de proteína de alto peso molecular en los geles de poliacrilamida de la cepa UCLA-10, que a su vez coincidió con la banda típica del control positivo HD-1, permite relacionar esta proteína con la actividad tóxica encontrada frente a *S. frugiperda*.

De manera general, se demostró la existencia de cepas nativas con alta toxicidad hacia el gusano cogollero del maíz, *S. frugiperda*, que potencialmente podrían ser utilizadas en el campo como agentes biológicos para el control de insectos plaga.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), por el financiamiento de la pasantía Postdoctoral y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), por el apoyo financiero a través del proyecto AG-007-2000. Al Dr. Francisco Ferrer por la donación de las larvas utilizadas, a la MSc. Mariadaniela López por la traducción del resumen y a la Prof. Martha Dávila por el apoyo logístico prestado.

## LITERATURA CITADA

1. Adang, M. J. 1991. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. In: K. Maramorosch (ed.). *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*. CRC Press Boca Raton, Fla. pp. 3-24.
2. Apablaza, J. y M. Vaughan 1990. Plagas de las hortalizas. Manual de manejo integrado. B. Latorre (ed.) Oficina Regional de la FAO. Chile. 520 pp.
3. Baum, J. A. y T. Malvar. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18: 1-12.
4. Carmona, A. y J.E. Ibarra. 1999. Expression and crystallization of a Cry3Aa-Cry1Ac chimerical protein of *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 455-463.
5. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
6. De León, T. y J.E. Ibarra. 1995 Alternative bioassay technique to measure activity of CryIII proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 88: 1596-1601.
7. Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology* 10: 271-275.
8. Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
9. Iriarte, J., M. Porcar, M. M. Lecadet y P. Caballero. 2000. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Current Microbiology* 40: 402-408.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
11. Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42: 112-122.
12. Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferone. 1992a. Novel *Bacillus thuringiensis*. Insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2536-2542.
13. Lambert, B., W. Theunis, R. Aguda, K. Van Audenhove, C. Decok, S. Jansens, J. Seurinck y 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.
14. Martin, P. A. E., y R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2437-2442.
15. Schägger, H. y G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
16. Schnepf, E. y H. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2893-2897.
17. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
18. Tailor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D.

- Pike, L. Jordan y S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. 6: 1211-1217.
19. Whiteley, H. R. y H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40: 549-576.
20. Wu, D., X.L. Cao, Y.Y. Bai y A. Aronson. 1991. Sequence of an operon containing a novel  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 81: 31.
21. Yamamoto, T. y R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to mosquito larvae, *Aedes taeniorhynchus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 414-421.