

# Deteksi Isolat *Bacillus thuringiensis* Indonesia yang Mengandung Gen *Cry* IAa, IAb, dan IAc dengan PCR

Edy Listanto, Sutrisno, S. Brotonegoro, B. Santoso,  
B. Soegiarto, dan M.S. Sudjono

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

## ABSTRAK

*Bacillus thuringiensis* telah dikembangkan sebagai biopestisida sejak beberapa dekade yang lalu. Beberapa isolat *B. thuringiensis* Indonesia telah diketahui keefektifannya dalam membunuh serangga hama dari berbagai tanaman pangan. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendeteksi isolat-isolat *B. thuringiensis* Indonesia yang mengandung gen *cry* IAa, IAb, dan IAc dengan PCR. Beberapa cara pengelompokan *B. thuringiensis* telah dilakukan, antara lain berdasar tipe antigen, protein kristal, serangga sasarannya dan teknik sidik jari. Sebanyak 33 isolat telah diisolasi DNA plasmidnya dan telah diamplifikasi dengan PCR menggunakan tiga set primer khusus untuk gen-gen tersebut. Dari 33 isolat yang diteliti dua isolat mengandung gen *cry* IAa dan IAc, yaitu isolat Jtm 341 dan Jtm 944, satu isolat hanya mengandung gen *cry*IAC, yaitu isolat M7.71, enam isolat mengandung gen *cry* IAc dan menghasilkan fragmen DNA berukuran kurang dari 500 bp dengan primer untuk deteksi gen *cry* IAb, yaitu isolat Jtm 342, Jtm 1042, BtK<sub>3</sub><sup>2</sup>, BtE33, Jtg 541, dan Jtg 841, empat isolat menghasilkan fragmen DNA berukuran kurang dari 500 bp dengan primer untuk gen *cry* IAb, yaitu isolat Jtm 1842, B 405, T42, dan Bt com.

**Kata kunci:** *Bacillus thuringiensis*, plasmid, PCR, gen *cry*.

## ABSTRACT

*Bacillus thuringiensis* has been developed as biopesticide since several decades ago. Several isolates of Indonesian *B. thuringiensis* have been known to be effective against insect pest of food crops. This experiment was conducted to detect Indonesian *B. thuringiensis* isolates containing *cry* IAa, IAb and IAc genes by PCR. Grouping of *B. thuringiensis* was done based on antigen type, crystal protein, insect target and fingerprinting technique. Plasmid DNA of 33 isolates were isolated and amplified by PCR using 3 sets of specific primer for these genes. Out of 33 isolates tested, two isolates contained *cry* IAa and IAc genes, namely isolate Jtm 341 and Jtm 944, one isolate contained *cry* IAc gene only was isolate M7.71, six isolates contained *cry* IAc gene and produced DNA fragment of less than 500 bp using *cry* IAb primers, namely isolate Jtm 342, Jtm 1042, BtK<sub>3</sub><sup>2</sup>, BtE33, Jtg 541, and Jtg 841, four isolates produced DNA fragment of less than 500 bp only using *cry* IAb gene primers, namely isolate Jtm 1842, B 405, T42, and Bt com.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, plasmid, PCR, *cry* gene.

## PENDAHULUAN

Pengembangan biopestisida telah berjalan sejak beberapa puluh tahun yang lalu sebagai upaya untuk menyediakan alternatif pestisida kimia. Salah satu biopestisida tersebut adalah protein kristal yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* merupakan bakteri gram-positif yang berbeda dengan bacilli lain karena kemampuannya menghasilkan protein kristal (dikenal sebagai  $\delta$ -endotoksin) yang beracun terhadap serangga (Gonzalez *et al.*, 1981; Yamamoto dan Powell, 1993; Carlton dan Gawron-Burke, 1993).

*B. thuringiensis* telah dikelompokkan secara taksonomi berdasarkan antigen-flagella menjadi 15 serotipe dan digunakan sebagai dasar pengelompokan ke arah subspecies (Wabiko *et al.*, 1986). Gonzalez *et al.* (1981) dan Kronstad *et al.* (1983) dalam Kronstad dan Whiteley (1986), menyebutkan bahwa perbedaan di antara subspecies dari *B. thuringiensis* ditentukan oleh perbedaan gen pengkode protein kristal (gen *cry*) yang terletak pada satu atau lebih plasmid dengan ukuran 45 - 225 kb (kilobase pair). Selain itu, beberapa strain *B. thuringiensis* membawa lebih dari satu homolog gen pada DNA plasmid dan beberapa strain yang lain mungkin membawa gen *cry* pada kromosom. Tergantung pada strain, gen *cry* ini dapat dijumpai pada plasmid yang besar, pada kromosom atau keduanya (Klier *et al.*, 1983). Pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian Schnepf dan Whiteley (1981) serta Held *et al.* (1982) dalam Adang *et al.* (1985). Mereka mendapatkan gen pengkode protein kristal dari sebuah plasmid besar *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Dipel. Penelitian lain yang dilakukan oleh Gonzalez *et al.* (1981) dan Whiteley *et al.* (1982) menunjukkan bahwa gen pengkode protein kristal terletak pada plasmid sebesar 75 kb dari *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (Adang *et al.*, 1985).

Berdasarkan pada serangga sasaran dan ukuran protein kristal, Hofte dan Whiteley (1989) dalam Yamamoto dan Powell (1993) mengklasifikasikan gen tersebut menjadi empat kelompok. Kelompok gen *cry* I mengkode protein sebesar 130-kDa (kiloDalton) yang beracun terhadap keluarga Lepidoptera. Kelompok gen *cry* II mengkode protein sebesar 70-kDa yang beracun terhadap keluarga Lepidoptera (gen *cry* IIA mengkode protein yang beracun terhadap keluarga Lepidoptera dan Diptera). Kelompok gen *cry* III mengkode protein sebesar 70-kDa yang beracun terhadap keluarga Coleoptera, dan kelompok gen *cry* IV mengkode protein sebesar 70 dan 130-kDa yang beracun terhadap keluarga Diptera (Yamamoto dan Powell, 1993).

Pengelompokan gen *cry* selain berdasarkan pada uji serotipe, ukuran protein kristal, dan serangga sasaran juga dapat berdasarkan pada sidikjari genom dan uji kimiawi. Namun demikian, dua teknik terakhir ini cukup mahal dan membutuhkan waktu (Masson *et al.*, 1990; Miteva *et al.*, 1991; dan Prefontaine *et al.*, 1987 dalam: Bourque *et al.*, 1993). Salah satu teknik molekuler yang cepat untuk menentukan jenis gen *cry* pada *B. thuringiensis* adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Beberapa penelitian membuktikan bahwa teknik ini telah dapat menentukan adanya

gen *cry* IAa, gen *cry* IAb, gen *cry* IAc, gen *cry* IIIA, gen *cry* IIIB, gen *cry* IVA dan gen *cry* IVB dari berbagai subspecies dan strain dari *B. thuringiensis* (Carozzi *et al.*, 1991) dengan menggunakan primer khusus, gen *cry* IAc, gen *cry* IAb, dan gen *cry* IAc dari *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bourque *et al.*, 1993), dan gen *cry* IC dari *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* (Kalman *et al.*, 1993).

Beberapa isolat *B. thuringiensis* dari beberapa daerah di Indonesia telah dikoleksi dan diuji keefektifannya terhadap hama serangga dari berbagai jenis tanaman. Berdasarkan persentase dari tingkat kematian serangga uji tersebut telah diperoleh beberapa isolat terpilih dengan prosentase kematian serangga antara 70 - 100%. Dalam tulisan ini disampaikan hasil penelitian tentang karakterisasi gen *cry* yang ada pada isolat-isolat *B. thuringiensis* Indonesia melalui PCR untuk menentukan adanya gen *cry* IAa, gen *cry* IAb dan gen *cry* IAc dengan primer-primer khusus berdasarkan metode Bourque *et al.* (1993).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan isolat-isolat *B. thuringiensis* yang dikoleksi dari berbagai daerah di Pulau Jawa, Sumatera, dan Bali, yaitu Jtm 341, Jtm 342, LT 284, BTN 41, R 861, Q 41, BTDP<sub>2</sub>, Jtm 1744, Jtm 1041, Jtm 941, Jtg 2741, Jtg 1141, Jtg 841, Jb 1951, Bt 032, Jtg 141 dan Jb 2461. Isolat-isolat tersebut dipilih berdasarkan keefektifannya dalam membunuh beberapa serangga pengganggu tanaman. Di samping beberapa isolat tersebut juga diperlukan bahan-bahan perbanyakan isolat, isolasi DNA dan PCR yaitu media Lauria Broth (LB), bufer TE atau bufer A (10 mM Tris-HCl pH 8,0 dan 1 mM EDTA pH 8,0), bufer B (0,2 N NaOH, 1 % SDS), bufer C (3 M Kalium asetat pH 5,2), iso-propanol, alkohol 70%, larutan PEG (13% PEG/Poly ethylene glycol-6000 dan 1,6 M NaCl), RNase, enzim Taq DNA Polymerase dan bufer PCR 10 X, dNTP (dATP, dTTP, dCTP dan dGTP), 3 pasang primer (SB-1 dan U8-15C untuk gen *cry* IAa, SB-2 dan U3-18C untuk gen *cry* IAb, RB-19 dan U8-15C untuk gen *cry* IAc), gel agarose dan film polaroid. Penelitian ini juga menggunakan alat-alat sebagai berikut pipetmenn P20, P200 dan P1000, mikrosentrifuse dan centrifuge, tabung 1,5 ml, tabung 0,5 ml, tangki elektroforesis dan kamera polaroid.

### Isolasi DNA Plasmid Isolat *B. thuringiensis*

Setiap isolat ditumbuhkan pada media LB cair sebanyak 50 ml selama satu malam sambil digoyang. Isolasi DNA plasmid dilakukan berdasarkan metode lisis alkali yang dimodifikasi dengan PEG (Sambrook *et al.*, 1989; Yeung dan Lau, 1993). Kultur Isolat disentrifugasi pada tabung 50 ml pada kecepatan 4,000 rpm selama 10 menit. Endapan dilarutkan dengan bufer A sebanyak 5 ml dan ditambah bufer B sebanyak 5 ml, lalu dicampur rata dengan membolak-balikkan tabung beberapa kali dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambah bufer C

sebanyak 5 ml dan dicampur dengan vorteks, lalu diinkubasi di dalam es selama 15 menit. Tahap selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 4.000 rpm dan larutan bagian atas yang mengandung DNA plasmid dipindahkan ke tabung sentrifuge baru melalui penyaringan dengan *miracloth* empat lapis. Pengendapan DNA plasmid dilakukan dengan menambahkan iso-propanol sebanyak satu kali volume pada larutan tersebut dan dicampur dengan cara membolak-balik tabung beberapa kali, lalu dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit. Selanjutnya, larutan disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm selama 25 menit untuk mendapatkan endapan DNA plasmid. Endapan dilarutkan dengan bufer TE sebanyak 500 µl dan dipindahkan ke tabung 1,5 ml, lalu ditambah dengan larutan PEG sebanyak 500 µl, divorteks selama lima detik dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit. Tahap selanjutnya endapan DNA diperoleh dengan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. DNA dicuci dengan alkohol 70%, dikering-anginkan selama 15 menit, lalu dilarutkan dengan bufer TE sebanyak 500 µl dan DNA siap digunakan tahap selanjutnya.

### **Amplifikasi Sekuen DNA Sasaran dan Elektroforesis**

Amplifikasi PCR dilakukan berdasarkan metode Bourque *et al.*, 1993 yang telah dimodifikasi. Setiap reaksi amplifikasi dengan volume 100 µl terdiri dari 3 µl DNA plasmid sebagai "template/cetakan", 10 µl 10 X bufer PCR yang mengandung 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, dATP, dTTP, dCTP dan dGTP masing-masing pada konsentrasi 200 µM, 2,5 unit enzim Taq DNA Polymerase (Boehringer Mannheim), primer SB-1 dan U8-15C dengan urutan basa nukleotida 5'TGC ATA GAG GCT TTA AT3' dan 5'CAG GAT TCC ATT CAA GG3' untuk gen *cry IAa*, primer SB-2 dan U3-18C dengan urutan 5'TCG GAA AAT GTG CCC AT3' dan 5'AAT TGC TTT CAT AGG CT3' untuk gen *cry IAb*, dan primer RB-19 dan U8-15C untuk gen *cry IAc* dengan urutan basa nukleotida 5'GGG ACT GCA GGA GTG AT3' dan 5'CAG GAT TCC ATT CAA GG3' (Integrated DNA Technologies, INC, Iowa, USA) dan ddH<sub>2</sub>O sampai volume 100 µl. Setiap reaksi ditutup dengan mineral oil sebanyak 50 µl dan dipanaskan pada suhu 94°C selama 5 menit sebagai awal denaturasi dengan mesin PCR (Ericomp, INC Twin Block System, San Diego, California, USA). Amplifikasi dilanjutkan sebanyak 15 siklus dengan parameter sebagai berikut 94°C (tahap denaturasi) selama satu menit, 45°C (tahap annealing/penempelan primer) selama dua menit dan 72°C (tahap extention/pemanjangan) selama tiga menit. Tahap akhir amplifikasi diperpanjang dengan inkubasi pada suhu 72°C selama empat menit. 15-25 µl dari setiap reaksi dicampur dengan bufer *loading* dan dimasukkan pada lobang-lobang gel agarose 1% dalam satu kali bufer TAE, lalu dijalankan proses pemisahan (elektroforesis), setelah selesai diwarnai dengan ethidium bromida dan diambil gambarnya dengan film polaroid.

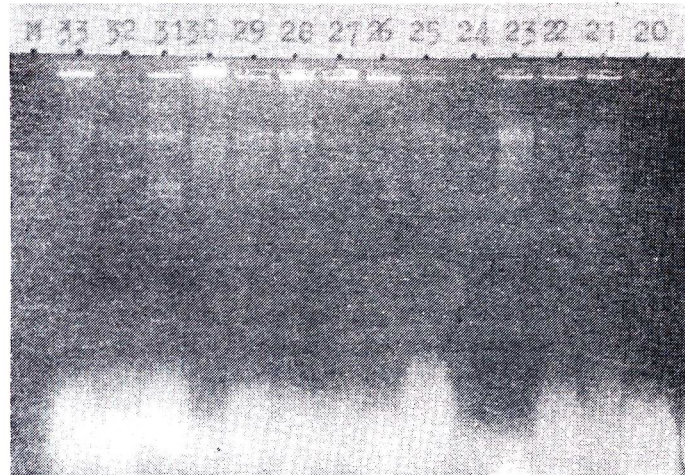
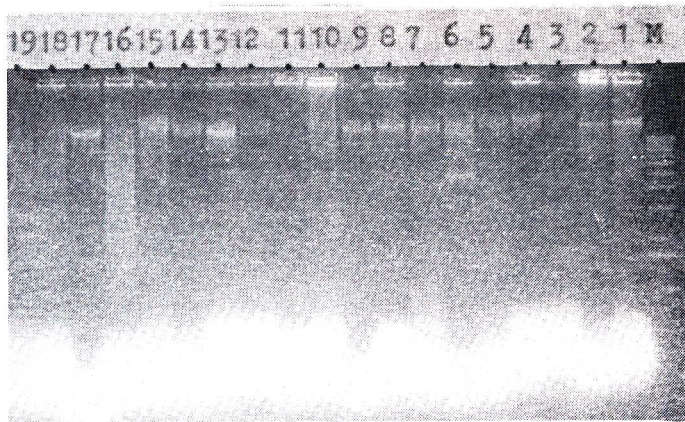
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuh belas isolat *B. thuringiensis* yang berasal dari beberapa daerah di Pulau Jawa, Bali, dan Sumatera telah diisolasi DNA plasmidnya berdasarkan metode lisis-alkali yang dimodifikasi dengan larutan PEG. DNA plasmid dari isolat tersebut dapat dilihat dari Gambar 1. Hasil isolasi DNA plasmid tersebut dapat digunakan sebagai cetakan (template) amplifikasi menggunakan PCR dengan primer spesifik.

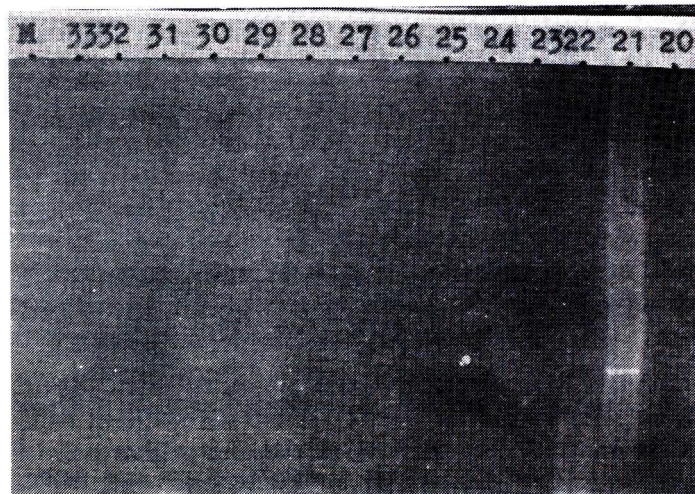
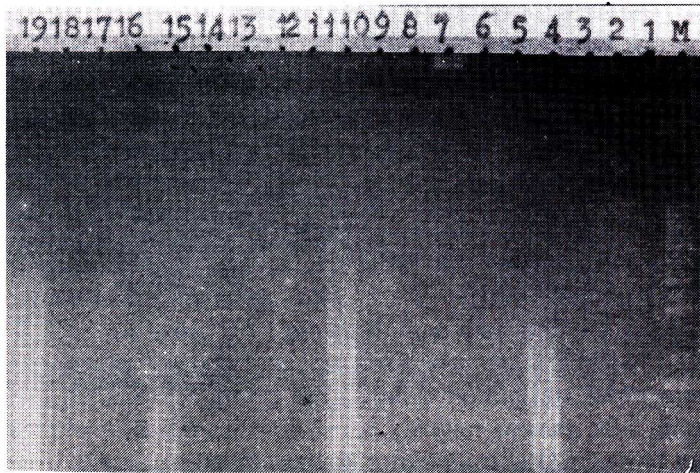
Masing-masing DNA plasmid diamplifikasi dengan menggunakan tiga set primer untuk deteksi adanya gen *cry* IAa, IAb dan IAc berdasarkan metode Bourque *et al.* (1993). Hasil amplifikasi dari isolat-isolat DNA plasmid dengan PCR dapat dilihat pada Gambar 2. Dari 16 isolat DNA plasmid yang diamplifikasi dengan primer SB-1 dan U8-15c yang spesifik terhadap gen *cry* IAa hanya isolat Jtm 341 dan Jtm 342 yang menghasilkan amplifikon (fragmen DNA) yang berukuran lebih kurang 1500 bp. Amplifikasi DNA plasmid dari semua isolat dengan primer SB-2 dan U3-18c tidak menghasilkan amplifikon, sedangkan pada amplifikasi DNA plasmid tersebut dengan primer RB-19 dan U8-15c hanya DNA plasmid dari isolat Jtm 341 dan Jtm 342 yang menghasilkan pita berukuran lebih kurang 653 bp (spesifik terhadap gen *cry* IAc).

Hasil amplifikasi tersebut membuktikan bahwa isolat Jtm 341 dan Jtm 342 mengandung 2 macam gen *cry* di dalam plasmidnya, yaitu gen *cry* IAa dan IAc. Kenyataan tersebut juga menunjukkan bahwa isolat Jtm 341 dan Jtm 342 adalah identik, karena berasal dari lokasi yang sama. Adanya dua gen tersebut didukung oleh penelitian Bourque *et al.*, 1993 yang melaporkan bahwa primer SB-1 dan U8-15c merupakan satu set primer yang khusus untuk mengenal gen *cry* IAa dari kelas 4,5 kb. Hal ini disebabkan kedua primer ini mempunyai komplemen basa nukleotida dengan basa nukleotida dari gen tersebut. Sedangkan primer RB-19 dan U8-15c sebagai set primer pengenal gen *cry* IAc dari kelas 6,6 kb, di mana kedua primer tersebut komplementer dengan basa nukleotida dari gen tersebut.

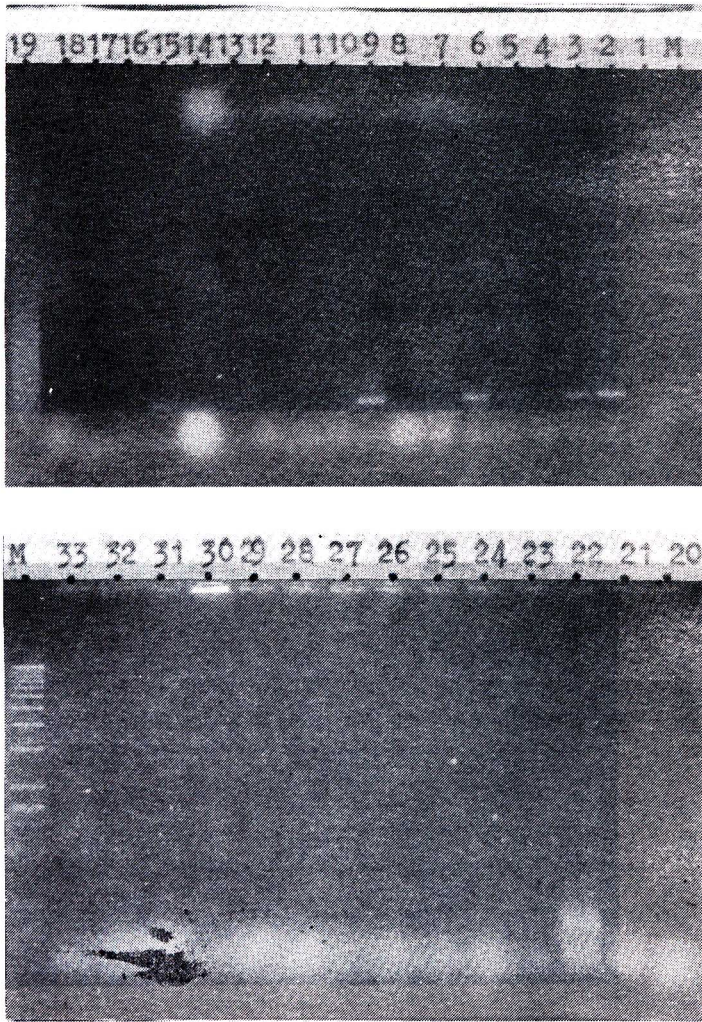
Beberapa isolat yang tidak menunjukkan adanya amplifikasi diduga mempunyai gen lain yang tidak komplemen dengan ketiga set primer tersebut di atas. Dengan demikian perlu adanya pengkajian lebih lanjut menggunakan primer spesifik yang lain. Hasil tersebut juga membuktikan bahwa dengan PCR dan set primer spesifik maka keberadaan gen *cry* dapat dideteksi secara cepat sebagai teknik alternatif dari teknik deteksi yang sudah ada. Selain itu teknik ini dapat mempersingkat waktu dalam isolasi dan kloning gen *cry* untuk penelitian rekayasa genetika yang mengarah ke pembentukan tanaman transgenik tahan serangga hama.



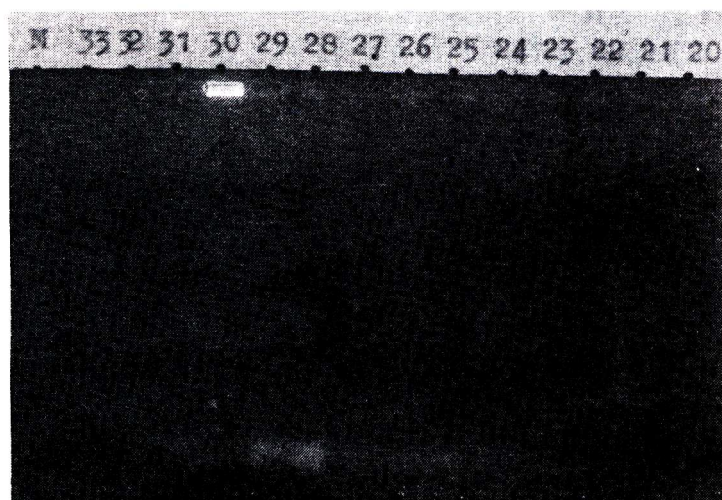
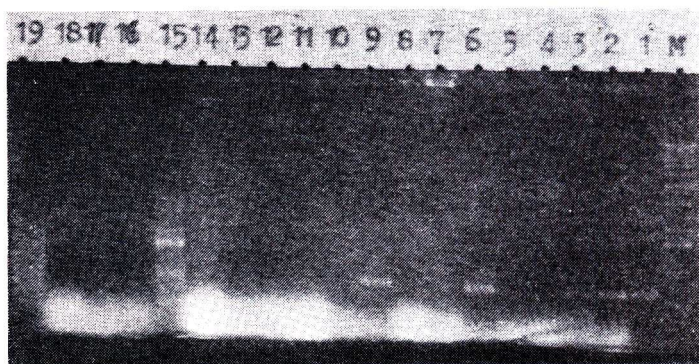
**Gambar 1.** DNA plasmid *B. thuringiensis* setelah di elektroforesis. 1. Jtm 341, 2. Jtm 342, 3. LT 284, 4. Jtm 1744, 5. BTN 41, 6. BtDP2, 7. Jtm 1041, 8. Jtg 2741, 9. Jtg. 1141, 10. R 861, 11. Q 41, 12. Jtg 841, 13. Jtm 941, 14. Jb 1951, 15. Bt 032, 16. Jb 2461, 17. Jtg 141, M. 1 kb DNA ladder.



**Gambar 2.** Pola pita hasil amplifikasi PCR dengan 3 set primer. 2A. Hasil amplifikasi dengan primer SB-1 dan U8-15c untuk gen *cry* IAa, 2B. Hasil amplifikasi dengan primer SB-2 dan U3-18c untuk gen *cry* IAb, 2C. Hasil amplifikasi dengan primer RB-19 dan U8-15c untuk gen *cry* IAc. 2D. Skema gambar 2A. M. 1 Kb DNA ladder, 1. Jtm 341, 2. Jtm 342, 3. LT 284, 4. Jtm 1744, 5. BTN 41, 6. BtDP2, 7. Jtm 1041, 8. Jtg 2741, 9. Jtg. 1141, 10. R 861, 11. Q 41, 12. Jtg 841, 13. Jtm 941, 14. Jb 1951, 15. Bt 032, 16. Jb 2461, 17. Jtg 141.



**Gambar 3.** Pola pita hasil amplifikasi PCR dengan set primer SB-2 dan U3-18c untuk gen *cry IAb*. 1. Jtm 341, 2. Jtm 342, 3. Jtm 1042, 4. Jtm 1842, 5. B 405, 6. BtK<sub>3</sub><sup>2</sup>, 7. Jtg 1551, 8. Bt 032, 9. Bt E33, 10. B 51.4, 11. Jtm 941, 12. Jtm 2741, 13. Jtg 141, 14. LS 134, 15. Jtg 541, 16. R 861, 17. Jtm 1141, 18. Jb 1951, 19. Q 41, 20. Jb 2461, 21. Jtm 944, 22. Jtg 841, 23. LT 284, 24. Jtm 1744, 25. BTN 41, 26. BtDP<sub>2</sub>, 27. Jtm 1041, 28. M 7.71, 29. LT 36.5, 30. Q 44, 31. Jtg 2151, 32. T 42, Bt com, M. 1 kb DNA ladder.



**Gambar 4.** Pola pita hasil amplifikasi PCR dengan set primer RB-19 dan U8-15c untuk gen *cry IAc*. 1. Jtm 341, 2. Jtm 342, 3. Jtm 1042, 4. Jtm 1842, 5. B 405, 6. BtK<sub>3</sub><sup>2</sup>, 7. Jtg 1551, 8. Bt 032, 9. Bt E33, 10. B 51.4, 11. Jtm 941, 12. Jtm 2741, 13. Jtg 141, 14. LS 134, 15. Jtg 541, 16. R 861, 17. Jtm 1141, 18. Jb 1951, 19. Q 41, 20. Jb 2461, 21. Jtm 944, 22. Jtg 841, 23. LT 284, 24. Jtm 1744, 25. BTN 41, 26. BtDP<sub>2</sub>, 27. Jtm 1041, 28. M 7.71, 29. LT 36.5, 30. Q 44, 31. Jtg 2151, 32. T 42, Bt com, M. 1 kb DNA ladder.

**Tabel 1.** Isoat-isolat yang terdeteksi mengandung gen *cry* IAa, IAb, dan IAc.

No.	Kode isolat	gen <i>cry</i> IAa	gen <i>cry</i> IAb	gen <i>cry</i> IAc
1.	Jtm 341	+	-	+
2.	Jtm 342	-	+++	+
3.	Jtm 1042	-	+++	+
4.	Jtm 1842	-	+++	-
5.	B 405	-	+++	-
6.	BtK <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-	+++	+
7.	Jtg 1551	-	-	-
8.	Bt 032	-	-	-
9.	BtE 33	-	+++	+
10.	B 51.4	-	-	-
11.	Jtm 941	-	-	-
12.	Jtm 2741	-	-	-
13.	Jtg 141	-	-	-
14.	LS 134	-	-	-
15.	Jtg 541	-	+++	+
16.	R 861	-	-	-
17.	Jtm 1141	-	-	-
18.	Jb 1951	-	-	-
19.	Q 41	-	-	-
20.	Jb 2461	-	-	-
21.	Jtm 944	+	-	+
22.	Jtg 841	-	+++	+
23.	LT 284	-	-	-
24.	Jtm 1744	-	-	-
25.	BTN 41	-	-	-
26.	BtDP <sub>2</sub>	-	-	-
27.	Jtm 1041	-	-	-
28.	M 7.71	-	-	+
29.	LT 36.5	-	-	-
30.	Q 44	-	-	-
31.	Jtg 2151	-	-	-
32.	T 42	-	+++	-
33.	Bt com	-	+++	-

\* mempunyai fragmen DNA lain berukuran lebih kurang 1200 bp.

\*\* mempunyai fragmen DNA berukuran kurang dari 500 bp.

## KESIMPULAN

Dari 17 DNA plasmid *B. thuringiensis* Indonesia yang telah diisolasi hanya dua DNA plasmid yang mengandung gen *cry* IAa dan IAc, yaitu DNA plasmid yang berasal dari isolat Jtm 341 dan Jtm 342. PCR merupakan teknik alternatif untuk deteksi secara cepat adanya gen *cry* pada isolat *B. thuringiensis*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.
- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie, and R.C. Levesque. 1993. Multiplex Polymerase Chain Reaction for detection of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 59 No. 2: 523-527.
- Carlton, B.C. and C. Gawron-Burke. 1993. Genetic improvement of *B. thuringiensis* for bioinsecticide development. In Leo Kim. 1993. Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, INC. New York, Basel, Hongkong. pp. 43-61.
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola, and M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Chain Reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 57 No. 11: 3057-3061.
- Gonzalez, JR., H.T. Dulmage, and B.C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5: 351-365.
- Honigman, A., G. Nedjar-Pazerini, A. Yawetz, U. Oron, S. Schuster, M. Broza, and Such. 1986. Cloning and expression of the lepidopteran toxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* in *Escherichia coli*. *Gene* 42: 69-77.
- Kalman, S., K.L. Kichne, J.L. Libs, and T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel *cry* IC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gelleriae*. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 59 No. 4: 1131-1137.
- Klier, A., C. Parsot, and G. Rapoport. 1983. *In vitro* transcription of the cloned chromosomal crystal gene from *Bacillus thuringiensis*. *Nucleic Acids Research* Vol. 11 No. 12: 3973-3987.
- Kronstad, J.W. and H.R. Whiteley. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene* 43: 29-40.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning, a laboratory manual 2<sup>nd</sup> edition, Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wabiko, H., K.C. Raymond, and L.A. Bulla, JR. 1986.** *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA Vol. 5 No. 4: 305-314.
- Yamamoto, T. and G.K. Powell. 1993.** *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity. *In* Leo Kim. 1993. Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, INC. New York, Basel, Hongkong. pp. 3-42.
- Yeung, M.C. and A.S. Lau. 1993.** Fast and economical large-scale preparation of highquality plasmid DNA. BioTechniques Vol. 15 No. 3: 381-382.