

03088
I
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE NUEVOS GENES DE
 δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

JAIRO A. ^{leusa} CERON ^{Sabatana}

CUERNAVACA, MORELOS

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL DEPARTAMENTO DE
BIOINGENIERIA DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA BAJO LA
DIRECCION DE LOS DOCTORES RODOLFO QUINTERO RAMIREZ Y
ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA.

JURADO DE EXAMEN:

PRESIDENTE: Dr. LOURIVAL POSSANI P.

SECRETARIO: Dr. RAFAEL VASQUEZ D.

VOCAL: Dr. RODOLFO QUINTERO R.

VOCAL: Dr. FEDERICO SANCHEZ R.

VOCAL: Dra. AMELIA FARRÉS

SUPLENTE: Dr. JOEL OSUNA Q.

SUPLENTE: Dra. ALEJANDRA VASQUEZ

INDICE

I.	USO E IMPORTANCIA DE LOS BIOINSECTICIDAS	1
I.1	¿Cómo actúa la δ -endotoxina?	3
I.2	Clasificación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
I.3	Homología de las proteínas de la familia Cry	7
I.4	Importancia de caracterizar colecciones de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
I.5	Uso del PCR en <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
II.	OBJETIVO	15
II.1	Estrategia metodológica	17
III.	RESULTADOS	19
IV.	DISCUSION	20
V.	BIBLIOGRAFIA	32

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se caracteriza por su capacidad para producir inclusiones cristalinas paraesporales durante el proceso de esporulación; dichos cristales están constituidos por proteínas denominadas δ -endotoxinas (proteínas Cry), de diverso tamaño molecular y que presentan actividad tóxica específica contra diferentes organismos plaga ubicados a lo largo de la escala filogenética entre los que destacan insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros, así como platelmintos, nemátodos, ácaros y hormigas.

Dadas las características de Bt como agente de control biológico se ha realizado una intensa búsqueda de cepas de Bt con mayor espectro de acción, cepas con nuevos espectros para controlar plagas que aún no se controlan por este bioinsecticida y con mayor potencia biocida.

Numerosos genes de δ -endotoxina han sido clonados, secuenciados y clasificados con base en su homología y especificidad en 6 diferentes clases, *cryI* a *cryVI*. Dos plagas con efectos devastadores en las cosechas, son lepidópteros y coleópteros. Dentro del grupo de proteínas CryI (tóxicas a lepidópteros) hay 11 diferentes subclases; cada una de éstas tiene un rango específico de acción contra diferentes insectos lepidópteros. Dentro del grupo de proteínas CryIII (tóxicas a coleópteros) han sido descritas 5 subclases. Nuestro interés es aislar y caracterizar cepas de Bt nativas que posean genes de los grupos *cryI* y *cryIII*.

Uno de los más importantes aspectos en el establecimiento de una colección es tener un método que permita una rápida y segura caracterización de la misma. El PCR ha probado ser una poderosa metodología para la identificación de genes específicos de la δ -endotoxina presentes en las diferentes cepas de Bt.

En este trabajo presentamos una estrategia de PCR diseñada para identificar cepas de Bt que porten algunos de los genes conocidos *cryI* y/o *cryIII*. Para ello se diseñaron 35 oligonucleótidos agrupados en 5 mezclas (A,B,C,D y E). Estas 5 mezclas fueron seleccionadas para amplificar fragmentos de DNA de tamaño definido para las clases CryI o CryIII y sus subclases respectivas.

Con el sistema desarrollado se ha caracterizado el 40% de nuestra colección de cepas nativas de Bt pertenecientes a las clases de proteínas CryI y CryIII.

Al utilizar este sistema de análisis encontramos en la colección una cepa que produce un producto de PCR de tamaño no esperado al utilizar tanto los oligonucleótidos de la mezcla C (específicos de *cryIE*, *F* y *G*) como de la mezcla E (específicos de *cryIIIA*, *B*, *C*, *Cg*, *D* y *E*). Estudios posteriores de esta cepa indican que efectivamente se trata de una δ -endotoxina que tiene un peso de 105 KDa, la cual no corresponde con el peso de ninguna otra proteína Cry y que forma un cristal bipiramidal del doble de largo de los cristales típicos de las cepas CryI o CryIII. La especificidad de esta cepa aún no la conocemos pero definitivamente se trata de un nuevo gen *cry* que porta secuencias parecidas a genes de *cryIE*, *cryIG* y *cryIIIC*. La secuencia de este gen nos aportará información sobre la naturaleza del mismo.

Se cuenta con una potente herramienta que permite caracterizar colecciones de cepas de Bt con la potencialidad de encontrar nuevos genes con actividades no descritas ya que cuenta con las siguientes ventajas: es práctico, rápido, seguro, específico, no genera falsos positivos, es reproducible y se puede utilizar como proceso de rutina.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram positive bacterium with an outstanding trait: it produces parasporal crystalline inclusions during the sporulation process. The crystals are made up of one or several proteins known as δ -endotoxins (Cry proteins) of different molecular size, and with specific toxic activity against a wide array of pest organisms within the phylogenetic scale. Among the most important are lepidopteran, coleopteran and dipteran insects, as well as platyhelminthes, nematodes, mites and, recently, ants (hymenopteran insects).

Because of Bt's importance as biological control agent, an intense search has been initiated looking for strains of Bt having a wider range of action, strains with new specificities to control pests which are not yet controlled by this kind of bioinsecticide and, also, with greater biocide potency.

Numerous genes of the δ -endotoxin have been cloned, sequenced and classified, based on homology and specificity, within six different classes, from *cryI* to *cryVI*. Two kinds of destructive insect pests of cultivars are grouped within the insect orders lepidoptera and coleoptera. Within the group of proteins CryI (toxic to lepidopterans) there are 11 different subclasses. Each subclass has a very specific range of action against different species of lepidopterans. Within the class of proteins CryIII (toxic to coleopterans), five subclasses have been described. Our interest is to isolate and to characterize native strains of Bt which might be carriers of genes belonging to classes *cryI* and *cryIII*.

One of the most important aspects in the establishment of a collection is to have a method that allows a quick and accurate characterization of the strains of the collection. The method of PCR has proven to be a powerful methodology to identify specific genes of the δ -endotoxins present in the different strains of Bt.

In this research, we present a PCR strategy designed to identify Bt strains carrying some of the already known genes *cryI* and/or *cryIII*. To reach this goal, we designed as much as 35 oligonucleotides grouped in five mixtures (lettered A, B, C, D and E). All mixtures were chosen to amplify DNA fragments of known size for *cryI* or *cryIII* and the respective subclasses.

With the system that has been developed, we have been able to characterize 40% of our collection of native strains belonging to classes of proteins CryI and CryIII. By using this system of analysis in our collection, we found a strain which produces a PCR product of unexpected size, when using oligonucleotides of mixture C (specific to *cryIE*, *F* and *G*), as well as those from mixture E (specific to *cryIIIA*, *B*, *C*, *Cg*, *D* and *E*).

Further analysis of this strain indicated that, probably, it is a δ -endotoxin with a molecular weight of about 105 KDa. This molecular weight does not correspond to the size of any other Cry protein. Besides, the strain produces a bipyramidal crystal which is twice the length of the typical crystals from strains producing CryI or CryIII proteins. Although the specificity of this strain is yet not known, it is very likely to be a novel *cry* gene carrying similar sequences to those of genes as *cryIE*, *cryIG* and *cryIIIC*. The sequence of this new gene will give us a great deal of information about its nature.

Finally, we would like to stress that, have a potent tool which allows the screening of Bt strains collections, with the potentiality to find new genes with undescribed biological activities. Our methodology has the following advantages: it is practical, quick, accurate, specific, it does not generate false positives, it is reproducible and can be used as a routine process.

BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE NUEVOS GENES DE δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis*

I. USO E IMPORTANCIA DE LOS BIOINSECTICIDAS

Los insecticidas químicos desarrollados y aplicados en la última mitad de este siglo plantean serios riesgos a la salud y causan problemas ambientales. Esto ha generado un gran interés por plantear y desarrollar alternativas más eficientes y seguras al uso de insecticidas químicos para el control de insectos plaga. Como una alternativa a esta necesidad, se ha dirigido la atención al desarrollo de insecticidas de origen biológico (1), conocidos como bioinsecticidas.

Se ha venido incrementando el uso y relevancia del control biológico de plagas en la práctica agrícola a nivel mundial. En particular con el inicio de la aplicación de la Biotecnología a la agricultura; se ha considerado que es posible incrementar el uso de organismos vivos y/o de sus productos metabólicos para controlar o disminuir el efecto negativo de las plagas en los cultivos(1).

Existen alternativas para controlar plagas y vectores de enfermedades a niveles de eficiencia aceptables, con la consecuente mejora en la producción de alimentos y en el nivel de salud pública respetando el delicado equilibrio del entorno ecológico. Este interés se ha centrado en la selección de entomopatógenos como bacterias, hongos, virus, protozoarios y nemátodos que actúan a través de mecanismos como la producción de toxinas (ej: *Bacillus thuringiensis*), parasitismo invasivo (ej: *Hirsutella thompsoni*, *Beauveria bassiana*), patogenicidad y competencia (ej: baculovirus), ó parasitismo (ej:*Heterorhabditis heliothidis*)(2).

Para 1991, el mercado mundial de pesticidas fue de 26,800 millones de dólares, de los cuales el 1% correspondió a productos de origen biológico. El mercado de Estados Unidos para bioinsecticidas derivados de bacterias, hongos, virus y feromonas en 1990 fue de 107 millones de dólares, y se incrementó en un 60% en 1991. Se estima que pasará a los 300 millones de dólares para el año 2000 (2,3).

Los productos más importantes en términos de volumen y ventas, fueron aquellos derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis*; los cuales cubren el 95% del mercado mundial de bioinsecticidas(3,4). Diversas formulaciones de *Bacillus thuringiensis* han sido empleadas por más de tres décadas como insecticidas biológicos para el control de plagas agrícolas, forestales y urbanas así como de insectos vectores de enfermedades en hombre y animales domésticos.

El principio activo del bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* se basa en una proteína(s) llamada δ -endotoxina(s). Estas ofrecen varias ventajas sobre los insecticidas químicos, puesto que la toxicidad de estas proteínas tiene un rango de hospedero limitado y altamente específico, son inocuos para insectos no blanco, vertebrados, no contaminan el medio ambiente y son biodegradables.

El interés generado en el estudio de *Bacillus thuringiensis*, radica en su capacidad para producir inclusiones cristalinas paraesporales durante el proceso de esporulación, que se encuentran constituidas principalmente por proteínas llamadas δ -endotoxinas (proteínas Cry), de diverso tamaño molecular y que presentan actividad tóxica específica contra diferentes organismos nocivos, ubicados a lo largo de la escala filogenética, entre los que destacan insectos (Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros)(5), así como platelmintos, nemátodos, ácaros y hormigas(6).

El descubrimiento de cepas específicamente tóxicas a nemátodos, protozoarios, platelmintos y ácaros ha ampliado el uso potencial de *Bacillus thuringiensis* en el control de diversas plagas (6). Debido a su alta especificidad, tiene como desventaja, que el intervalo de acción se encuentra limitado a cierto tipo de insectos. Es por esto que en una correcta utilización de los productos de *Bacillus thuringiensis* se recomienda conocer el tipo de plaga que se desea combatir a fin de aplicar la δ -endotoxina más adecuada.

Estas características del *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico han llevado a una intensa búsqueda de cepas con mayor espectro de acción así como cepas con nuevos espectros que permitirán controlar plagas que aún no se controlan por este bioinsecticida y de cepas con mayor potencia biocida.

Recientemente, algunos de los genes que codifican para la δ -endotoxina se han introducido en el genoma de plantas, siendo entonces estas plantas protegidas del ataque de insectos (6).

1.1. ¿Cómo actúa la δ -endotoxina?

Las proteínas Cry son sintetizadas en forma de protoxinas inactivas cuyo peso molecular oscila entre 70 KDa y 130 KDa, para poder ejercer su efecto tóxico deben ser ingeridas por el insecto blanco, solubilizadas y procesadas en el intestino medio de las larvas de los insectos por las condiciones de pH y las proteasas presentes en él, hasta un fragmento tóxico de menor tamaño cuyo peso molecular se encuentra entre 50 KDa y 70 KDa (5). La toxina activada se une a receptores presentes en las membranas de las microvellosidades apicales de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco (7,8).

Posterior a la unión, ocurren varios eventos: la toxina se inserta de manera aparentemente irreversible en la membrana plasmática y forma un poro que conduce a un desbalance iónico con los consecuentes cambios en el transporte de iones, nutrientes, agua y otros metabolitos, lo que finalmente produce la citólisis y en consecuencia, la muerte del insecto por inanición y septicemia (9,10). En general el mecanismo propuesto es un proceso en dos etapas, en el cual la toxina primero reconoce y se une a un receptor de superficie en el intestino medio del insecto y segundo, induce la formación de poros en la membrana.

La presencia de receptores ha sido demostrada por experimentos de competencia con toxinas marcadas con yodo radiactivo. Los insectos susceptibles poseen receptores para la toxina en las células epiteliales del intestino medio y la unión de la proteína a estos receptores es una etapa esencial en la toxicidad. Se ha descrito una relación directa entre la unión de la toxina a las microvellosidades y la toxicidad, además diferentes receptores podrían coexistir en el mismo insecto, por lo que un insecto puede ser sensible a diferentes toxinas, de tal manera que la presencia o ausencia de estos receptores determinan la toxicidad de la δ -endotoxina (11). Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional de la δ -endotoxina CryIIIa producida por *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*(12). La estructura descrita reveló la

existencia de tres dominios estructurales: el dominio I constituido por 7 α -hélices, el dominio II conformado por 3 láminas β -plegadas antiparalelas y el dominio III formado por un β -sandwich.

Al dominio I, se le ha asignado la formación del poro, ya que las α -hélices presentan la longitud y características propias de una proteína de membrana para atravesar la membrana. El dominio I, esta conformado por un grupo de siete α -hélices, donde una hélice central (hélice α -5) está rodeada por las seis restantes. Estas α -hélices son de naturaleza anfipática y con una longitud capaz de atravesar la membrana celular. Mutaciones puntuales en la región que codifica para la hélice α -5 en la toxina CryIA(c) generaron mutantes capaces de competir con la toxina silvestre por la unión al receptor, pero con baja o nula toxicidad (13); esto permite asumir que están afectadas en el mecanismo de inserción a la membrana y la capacidad de formación de poro. La conformación de las 7 α hélices es muy similar al arreglo de las hélices de la colicina A, la cual se sabe también forma poro (14).

El dominio II esta formado por tres láminas β plegadas, constituidas a su vez por once láminas β y una α -hélice. A este dominio se le ha asignado un papel en la especificidad porque en diversos experimentos en donde se intercambiaron fragmentos de genes *cryIA(a)*, *cryIA(b)* y *cryIA(c)* que codifican para diferentes regiones de este dominio, se *oBacillus thuringiensis*uvieron proteínas con especificidad intercambiada (15,16). Se asume que aparentemente existen diferentes sitios de este dominio que son importantes para el reconocimiento del receptor. Además parece ser que el sitio de la toxina que interacciona con el receptor pudiera ser diferente para las diferentes toxinas, encontrándose siempre en este dominio II, principalmente en las regiones más expuestas de la proteína.

Por último al dominio III se le ha implicado en ayudar a la protección de la proteólisis; la función de este dominio no está tan clara ya que hay grupos que dicen que algunas partes de este dominio podrían contribuir en la formación de poro (17) y otros que este dominio podría participar en el reconocimiento por el receptor (18).

Se propone que una vez que el dominio II reconoce y se une al receptor en la membrana del intestino medio, la proteína sufre un cambio conformacional en el dominio I, exponiendo los residuos hidrofóbicos de las α -hélices llevando a que este dominio se inserte en la membrana, dando como resultado la formación o apertura de un poro, conduciendo a un cambio osmótico (11,12). Dicha alteración resulta en un flujo bidireccional de iones acompañado por una entrada de agua, dando como resultado que las células del intestino de la larva se inflamen y terminen lisándose.

1.2. Clasificación de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* han sido clasificadas utilizando diversos métodos; el primer aporte fue hecho por Heimpel y Angus (19), se basaron en las características morfológicas y bioquímicas; pero las pruebas bioquímicas fueron inadecuadas porque no puede separar o diferenciar las serovariedades, ya que varias de éstas dan la misma reacción con un mismo sustrato. Posteriormente, De Barjac y Franchon (20) clasificaron las cepas con base en el análisis del serotipo antígeno flagelar además de las características bioquímicas. Esta clasificación ha permitido agruparlas en 38 grupos antigénicos y 12 subgrupos que permiten distinguir 42 serovariedades; esta clasificación aporta muy poca información sobre la actividad insecticida de cada cepa.

A la fecha se ha clonado y determinado la secuencia de varios genes que codifican para la δ -endotoxina. Estos se han organizado en 6 diferentes clases(6) basados en las similitudes en la secuencia nucleotídica, así como en su espectro de toxicidad (especificidad) contra los diferentes organismos plaga. Hasta ahora se han agrupado 28 genes diferentes que codifican para estas proteínas donde cada una es altamente específica para un insecto determinado. Como se muestra en la Tabla 1 (5,6), las 6 clases principales son:

Las proteínas CryI: son δ -endotoxinas específicas contra lepidópteros, el peso molecular varía entre 130-140 KDa y la activación proteolítica de éstas genera un fragmento tóxico de 60-70 KDa. Se han caracterizado 11 tipos diferentes de genes en esta clase. Cada toxina CryI tiene un rango de toxicidad limitado contra diferentes insectos lepidópteros.

TABLA 1. Clasificación de las proteínas del cristal producido por *Bacillus thuringiensis*, de acuerdo a su organización protéica e insecto blanco.

TIPO DE PROTEINA	ESPECIFICIDAD	PESO MOLECULAR(kDa)
CryIA(a)	Lepidópteros	133.2
CryIA(b)	Lepidópteros	131.0
CryIA(c)	Lepidópteros	133.3
CryIA(d)	Lepidópteros	133.0
CryIB	Lepidópteros	138.0
CryIC	Lepidópteros	134.8
CryID	Lepidópteros	132.5
CryIE	Lepidópteros	133.2
CryIF	Lepidópteros	133.6
CryIG	Lepidópteros	130.9
CryIH	Lepidópteros	129.0
CryIIA	Lepidópteros y dípteros	70.9
CryIIB	Lepidópteros	70.8
CryIIC	Lepidópteros	70.0
CryIIIA	Coleópteros	73.1
CryIIIB	Coleópteros	74.3
CryIIIC	Coleópteros	129.4
CryIIICg	Coleópteros	74.0
CryIIID	Coleópteros	72.0
CryIIIE	Coleópteros	130.0
CryIVA	Dípteros	134.4
CryIVB	Dípteros	127.8
CryIVC	Dípteros	77.8
CryIVD	Dípteros	72.4
CryVA(a)	Nemátodos	152.0
CryVA(b)	Nemátodos	141.0
CryVB	Nemátodos	142.0
CryVC	Nemátodos	88.0
CryVIA	Nemátodos y ácaros	54.0
CryVIB	Nemátodos y ácaros	44.0
	Platelmintos	130 - 175
	Protozoarios	128.7

Adaptada de Höfte and Whiteley (1989) y Feitelson et al (1992)

Las proteínas CryII: poseen un peso molecular de 65-75 KDa. Se han caracterizado tres subclases CryIIA, CryIIB y CryIIIC; CryIIA posee especificidad dual contra insectos lepidópteros y dípteros, mientras que CryIIB y CryIIIC son específicos solo a lepidópteros. El procesamiento proteolítico genera fragmentos tóxicos alrededor de 50-60 KDa.

Las proteínas CryIII: son δ -endotoxinas específicas contra coleópteros; en esta clase pueden diferenciarse 2 grupos de δ -endotoxinas; el primer grupo, posee un peso molecular de 73 KDa y el segundo grupo, posee un peso molecular de 130 KDa. La activación proteolítica de ambos grupos origina péptidos tóxicos alrededor de 66 KDa, actualmente se conocen 5 subclases pertenecientes a proteínas CryIII.

Las proteínas CryIV: son δ -endotoxinas específicas para dípteros. Se conocen 4 subclases: CryIVA, CryIVB, CryIVC y CryIVD, poseen pesos moleculares que van de 72 a 135 KDa. El procesamiento proteolítico genera fragmentos tóxicos alrededor de 53-78 KDa para las tres primeras subclases y de 30 KDa para la cuarta subclase.

Las proteínas CryV: son δ -endotoxinas específicas para nemátodos. Se han reportado 4 subclases CryVAa, CryVAb, CryVB y CryVC, cuyos pesos moleculares son 152, 141.8, 142.1 y 88 KDa respectivamente. Poseen un 30% de homología entre sí; las tres primeras poseen actividad dual contra nemátodos y ácaros y la última solo contra nemátodos (21,22).

Las proteínas CryVI: son δ -endotoxinas específicas contra nemátodos. Presentan muy baja homología con los genes CryV, así como con los demás genes *cry*. Se han descrito 2 subclases CryVIA y CryVIB cuyos pesos moleculares son 54 y 44 KDa respectivamente.

Las toxinas descritas contra ácaros, amebas y platelmintos no entran dentro de esta clasificación ya que la secuencia no ha sido publicada pero si patentada (22,23).

Es importante resaltar que cada δ -endotoxina es tóxica para un grupo reducido de insectos, por ejemplo proteínas CryI, que presentan 11 subclases, se ha reportado que una de ellas es tóxica solo hacia ciertos

insectos lepidópteros; como se observa en la figura 1; solamente dos proteínas de la clase CryI son específicas particularmente a *Spodoptera littoralis* y cada una de ellas presenta diferente nivel de actividad tanto para éste como para otros insectos lepidópteros(5).

Por ésto es muy importante conocer que insecto se desea combatir para aplicar la toxina adecuada. El grado de conocimiento actual sobre las diferentes proteínas Cry permite seleccionar a las proteínas adecuadas contra determinadas plagas, pero quedan muchas plagas para las cuales aún no se conoce cuál δ -endotoxina las controla, o si existe alguna toxina que sea efectiva.

1.3. Homología de las Proteínas de la Familia Cry

Al realizar alineamientos del fragmento tóxico de las subclases de CryI, CryIIIA, CryIV y CryV, se encontró la existencia de 5 bloques de secuencias de aminoácidos muy conservadas en todos los genes, separados por regiones variables (5) (Figura 2).

La localización de estos 5 bloques en la estructura tridimensional de la proteína, obtenida por difracción de rayos x, los ha ubicado en lo que se llama el corazón de la toxina. Específicamente el bloque 1 (residuos 189-218), corresponde a la hélice central α -5 del dominio I, el bloque 2, (residuos 239-305), se sobrelapa con la segunda parte de la hélice α -6, α -7 y β -1 y corresponde a la unión entre los dominios I y II. El bloque 3 (residuos 491-538), se sobrelapa con la última parte de β -11, donde se une por un puente de hidrógeno a β -1 y con las asas (loops) que conectan a los dominios II y III. El resto del bloque 3, junto con los bloques 4 y 5, (residuos 560-569 y 633 al extremo carboxilo terminal), constituyen las tres hebras de la β -plegada interna del dominio III.

El alto grado de conservación de los residuos internos de la estructura tridimensional implica que las proteínas de la familia Cry podrían adoptar una conformación similar y por lo tanto actuar de manera semejante (12). Feitelson et al (6) reportan el grado de homología entre las diferentes δ -endotoxinas descritas, así como la relación evolutiva entre las diferentes

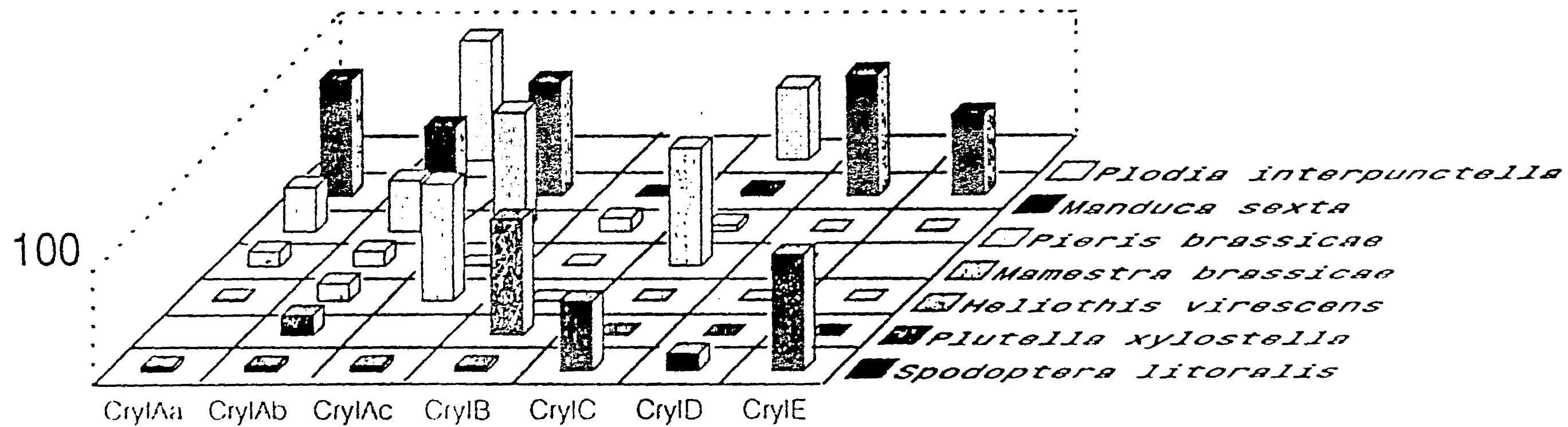
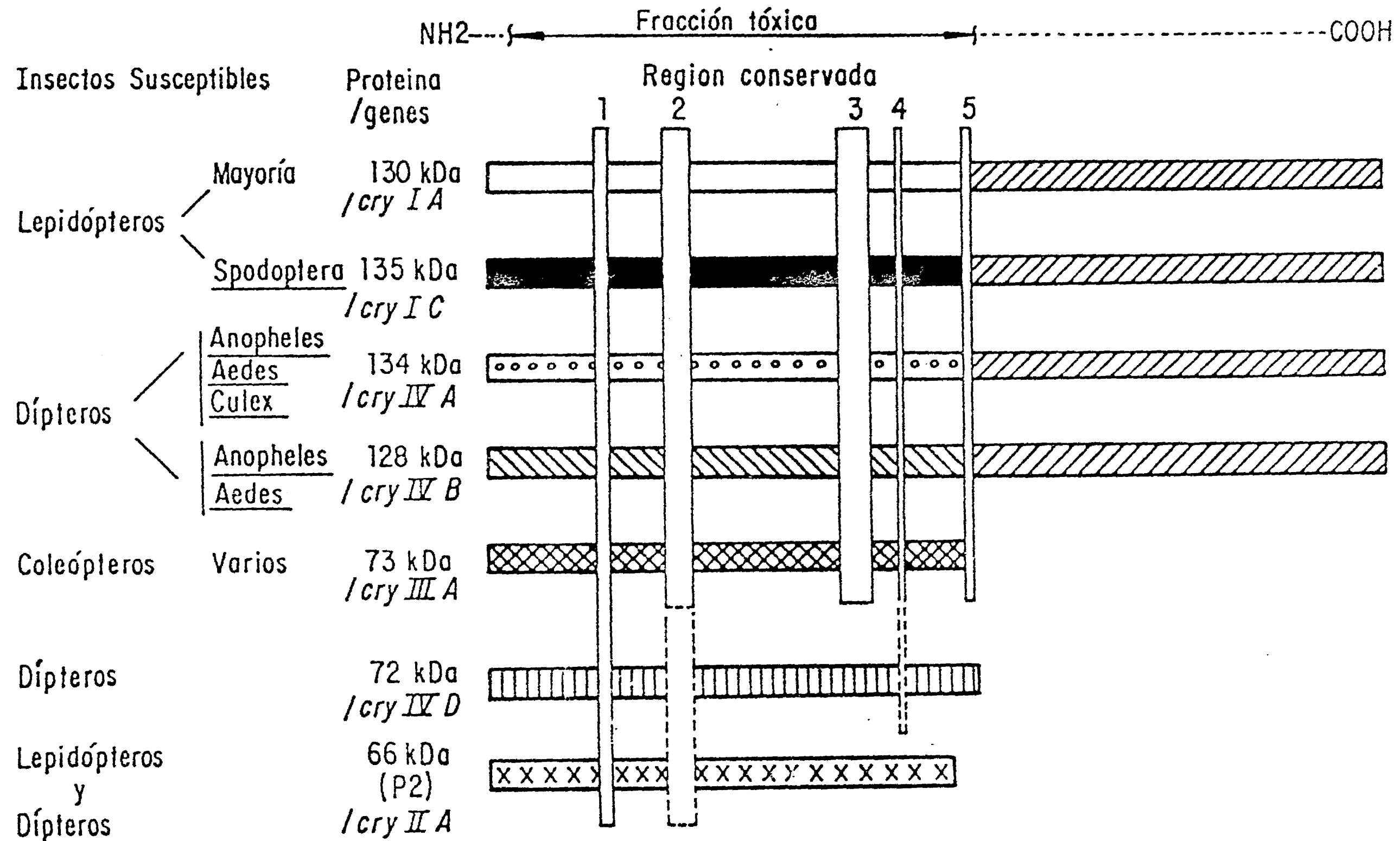


Figura 1. Espectro de especificidad de toxinas tipo CryI contra insectos plaga.



FALLA DE ORIGEN

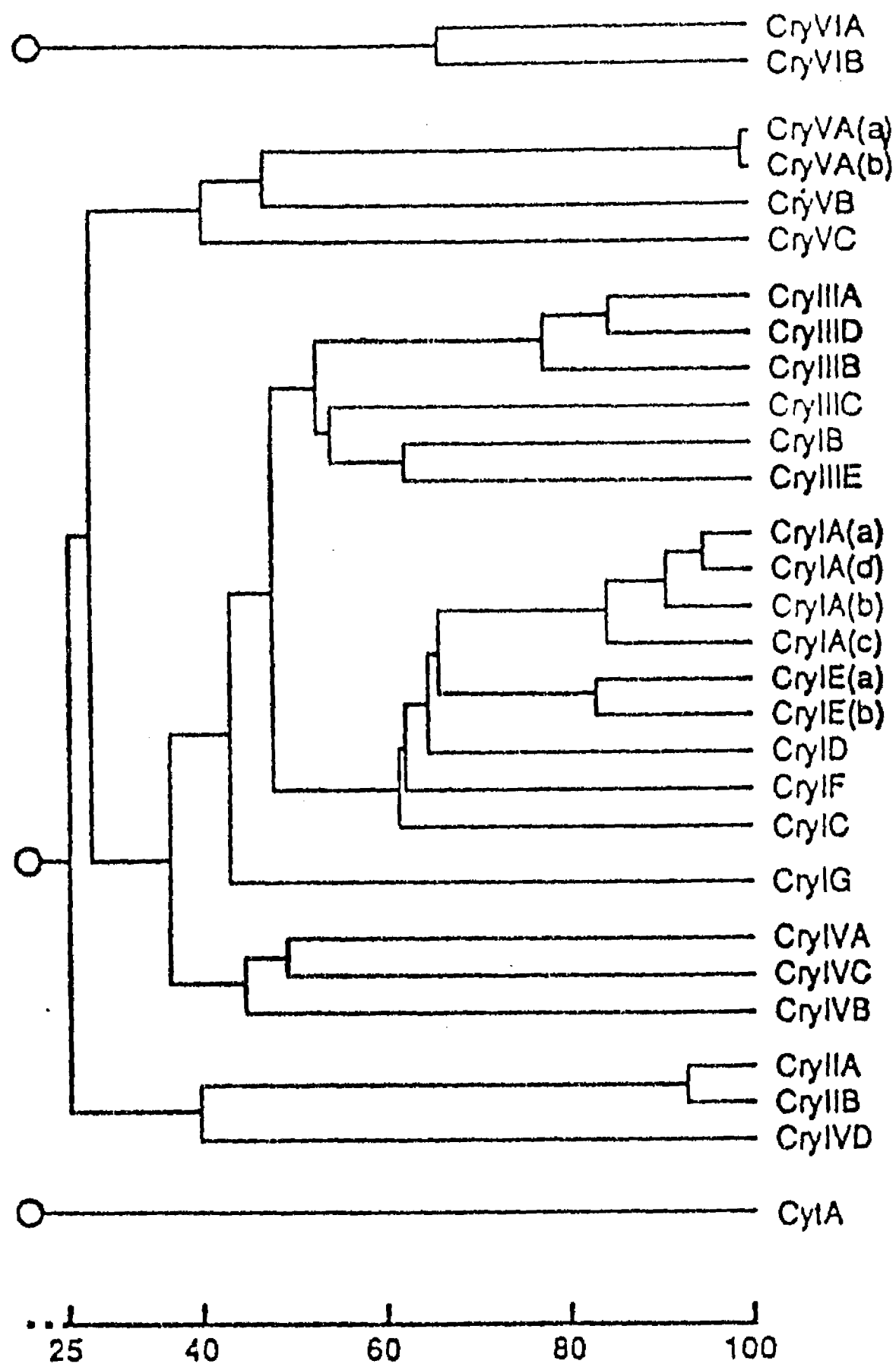
Figura 2. Las 5 regiones representadas por cuadros verticales son regiones altamente conservadas entre las diferentes proteínas Cry (5). Los cuadros punteados corresponden a una menor homología

clases de proteínas observándose el ancestro común entre dos clases de δ -endotoxinas, como se observa en la figura 3. Particularmente en el caso de las proteínas de la familia CryI se observa que todas provienen de un mismo ancestro y todas son activas contra insectos lepidópteros, excepto la CryIB, que aunque también posee actividad contra lepidópteros, está más relacionada evolutivamente con las proteínas CryIII, que son activas a coleópteros.

1.4. Importancia de caracterizar colecciones de cepas de *Bacillus thuringiensis*

Cuando se inició la utilización de insecticidas basados en el producto de *Bacillus thuringiensis*, no se encontraron casos de resistencia en los insectos contra estos productos. Así que en un principio se propuso que difícilmente una especie de insecto pudiese desarrollar resistencia hacia la o las toxinas a los cuales es susceptible; esta creencia se ha desvanecido debido a que se han encontrado y aislado a nivel de campo poblaciones de insectos resistentes como *Plutella xylostella* (24), así mismo a nivel laboratorio se han aislado especies resistentes a alguna toxina. Es interesante notar que en el caso de *Plodia interpunctella* se aislaron insectos resistentes a la toxina CryIAb, pero este mismo insecto se volvió altamente sensible a una toxina alternativa: la CryIC (25). Ambas toxinas se unen a diferentes receptores dentro del intestino de la larva, es por esto que resulta importante identificar nuevas toxinas de las ya descritas, a fin de poder controlar con mayor eficiencia a una plaga determinada y eventualmente poder sobrellevar el problema de generación de insectos resistentes, por medio de aplicación de mezclas de toxinas de *Bacillus thuringiensis* que sean específicas para un insecto determinado pero que reconozcan diferentes receptores.

Para poder encontrar nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*, el primer paso es construir una colección de cepas de esta bacteria, aisladas de diferentes regiones del país; una vez establecida la colección, el siguiente paso es clasificar a las cepas dentro de las categorías ya descritas y seleccionar a las cepas raras que presenten proteínas diferentes a las ya reportadas. Para lograr esto, es necesario disponer de una metodología práctica para la detección e identificación de los genes *cry* presentes en cada cepa.



% Similitud de las secuencias

Figura 3. Relación evolutiva entre diferentes δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (6).

Por otra parte, con el aumento en el deterioro del medio ambiente se está restringiendo cada vez más el uso de insecticidas químicos; se requiere que se establezcan alternativas ecológicamente compatibles, que no dañen el ambiente y que sean efectivas en el control de insectos plaga, ésto ha hecho que se incremente el uso de insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*.

Los métodos que se han utilizado para identificar las cepas ya conocidas, así como las cepas potencialmente nuevas, son:

El bioensayo se realiza enfrentando la toxina a diversos organismos blanco. Este método exige gran número de repeticiones por dosis para garantizar la veracidad del resultado, además es costoso, retardado y laborioso y se requiere tener el insecto en cultivo; por esta razón, el número de insectos diferentes que se pueden manejar es una limitante.

El análisis por Southern blot, en el cual se observa hibridización con genes conocidos (26), tiene la desventaja de que es necesario tener el gen o una porción del mismo para usarlo como sonda marcada.

La inmunodetección con diferentes anticuerpos policlonales y monoclonales (27), cuya producción se realiza en conejo o ratón, utilizando proteínas (δ -endotoxinas) puras presenta la desventaja de que si se desea identificar las subclases es necesario preparar anticuerpos monoclonales, proceso costoso y laborioso, para el cual se requiere infraestructura y personal especializado. Cabe mencionar que con estos dos métodos solo se pueden detectar genes o proteínas ya descritas.

En este trabajo se propone el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (28), para la identificación de genes que codifican para las δ -endotoxinas presentes en una colección de cepas.

La técnica de PCR es un procedimiento rápido, que permite la amplificación e identificación de una secuencia de DNA dentro del genoma que se estudie. Esta técnica involucra la síntesis enzimática *in vitro*, de millones de copias de un fragmento específico del DNA. La reacción está basada en el empalme y extensión de dos oligonucleótidos que flanquean la región blanco en la cadena de DNA. Después de la etapa de

desnaturalización del DNA (templado), cada oligonucleótido hibridiza a una de las dos cadenas de DNA separadas y son entonces extendidos sobre la cadena molde o templado, con una DNA polimerasa termoresistente, dependiente de la concentración de deoxinucleótidos, $MgCl_2$ y número de ciclos.

Estas 3 etapas: desnaturalización, empalme de los oligonucleótidos y síntesis de DNA, representan un solo ciclo de PCR. Cada etapa es realizada a temperaturas discretas, ej: 94°C-98°C; 45°C-65°C y 72°C, respectivamente. La repetición de los ciclos de desnaturalización, hibridización de oligonucleótidos y extensión, resulta en la acumulación exponencial (amplificación) de un fragmento de DNA (28).

Esta metodología tiene aplicaciones en: generación de sondas marcadas y no marcadas (29,30), incorporación de sitios de restricción para clonación (31), detección de secuencias específicas (32), mutagénesis sitio dirigida (33,34), diferenciación de secuencias alelas (35), determinación de mutaciones naturales (36), identificación y clasificación de organismos genéticamente distintos (37), diagnóstico clínico (38), taxonomía y evolución molecular (39), medicina forense (40) y bio-remediación (41).

1.5. Uso del PCR en *Bacillus thuringiensis*

El análisis electroforético de productos de PCR, es una alternativa viable, ya que es altamente sensible, relativamente rápido y puede ser usado como proceso de rutina. En el establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis* es importante tener una metodología de caracterización rápida y segura. Recientemente se han aislado nuevas cepas con potencial tóxico específico contra varios organismos (1), lo que ha despertado el interés en el aislamiento de nuevas cepas con actividades o especificidades no descritas.

Se han reportado muy pocos trabajos en los cuales sea utilizada la técnica de PCR como sistema de identificación y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Carozzi *et al.* (42), reportaron la identificación de tres clases de genes tipo *cry* (*cryI*, *cryIII*, *cryIV*), mediante la utilización de 6 pares de oligonucleótidos, los cuales amplifican dos productos de tamaño diferente para cada clase. Este sistema no puede clasificar a las

diferentes subclases de cada una de estas clases. Así mismo Bourque *et al.* (43) han reportado el análisis por PCR de diferentes subgrupos pertenecientes solo a la subclase *cryIA* (*a*, *b*, *c*) para identificar cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki, utilizando 7 oligonucleótidos, empleando reacciones separadas de PCR para cada subclase de *cryIA*.

De igual forma, recientemente grupos como el de Kalman *et al.* (44) y Chack *et al.* (45), reportan la identificación de un nuevo gen, *cryIC*, por PCR; ellos utilizaron en este estudio un juego de 10 oligonucleótidos con los cuales agruparon en las diferentes subclases, los genes de la subclase *cryI* en una sola reacción de PCR; posteriormente, en una segunda reacción de PCR utilizaron 12 oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia del gen de *cryIC* reportada; con estos oligonucleótidos realizaron un estudio por patrón de bandas de productos de PCR (PCR fingerprint) pudiéndose así identificar un nuevo gen *cryIC*. Lo anterior permite proponer que la técnica de PCR, además de caracterizar genes conocidos, tiene la potencialidad de identificar nuevos genes, que serán aquellos que durante un proceso de amplificación generen fragmentos de tamaño diferente al esperado.

II. OBJETIVO

En el laboratorio se tienen alrededor de 2000 cepas de *Bacillus thuringiensis* que fueron aisladas de diferentes suelos del Estado de Morelos, además se cuenta con 500 muestras de suelos de diferentes partes de la República Mexicana a partir de los cuales se continuará con el aislamiento de cepas nativas.

El objetivo del laboratorio ha sido buscar cepas más potentes, que presenten amplio espectro de acción contra insectos plaga que atacan cultivos económicamente importantes, principalmente maíz y trigo ya que son dos de los cultivos más importantes en el sector agrícola mexicano.

Dentro de los insectos que atacan estos cultivos se encuentran algunos lepidópteros de los cuales se destacan: *Spodoptera frugiperda*, (gusano cogollero), *Spodoptera exigua* (gusano soldado) *Heliothis zea* (gusano elotero), *Pseudolatia unipuncta* (gusano soldado) y coleópteros como *Diabrotica spp.*, *Anomala spp.*, *Phylophaga spp.* (gallina ciega). De estos insectos plaga los más dañinos son: *Spodoptera spp.*, *Heliothis spp.* y *Diabrotica spp.* (que solo habita en el Continente Americano); estas plagas devastan estos cultivos y no se ha logrado hacer un control eficiente de las mismas utilizando agentes químicos.

Como alternativa para el control se ha usado un producto comercial de *Bacillus thuringiensis* que existe en este momento en el mercado internacional. El ingrediente activo de este producto es la cepa de *Bacillus thuringiensis* HD1 (que contiene genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIIA*, y *cryIIB*); se ha demostrado que este producto no presenta actividad contra *Spodoptera* y *Diabrotica*. Por otro lado, recientemente se ha descrito que genes que codifican proteínas CryIC y CryID (44,45,46), son efectivas contra *Spodoptera*. Por el contrario para *Diabrotica undecimpunctata* solo se ha descrito una proteína CryIIIC, tóxica para este insecto (47,48) pero que en realidad presenta niveles de toxicidad muy bajos ya que la LC₅₀ es de 2857 µg/cm² de dieta.

Actualmente en el laboratorio la caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelos se realiza con el método de ELISA, usando anticuerpos policlonales contra las clases CryI, CryII, CryIII y

CryIV. Al caracterizar con esta metodología 800 cepas de *Bacillus thuringiensis* usando cuatro anticuerpos policlonales (polyCryI, poliCryII, polyCryIII y polyCryIV), se agruparon alrededor de 380 cepas de *Bacillus thuringiensis* en: CryI: 92, CryIII: 8, cryII y cry IV: 280; aproximadamente 420 cepas no quedaron agrupadas (no cruzaron con ninguno de estos anticuerpos), aunque cada una de ellas produce un cristal protéico.

Posteriormente se ensayó la especificidad de los anticuerpos policlonales contra una colección de proteínas puras donada por la compañía Plant Genetic Systems (Bélgica), que incluye todas las proteínas CryI, así como CryIII reportadas a la fecha. Este análisis se realizó mediante experimentos de inmunoprecipitación en gota (dot). El anticuerpo polyCryI se enfrentó a todas las proteínas puras CryIAa, CryIAb, CryIAc, CryIB, CryIC, CryID, CryIE, CryIIIA, CryIIIB, CryIIIC, CryIIID, CryIIIE. Este anticuerpo no reconoció a ninguna de las proteínas CryIII como era de esperarse, pero tampoco reconoció a dos proteínas CryI (CryIB y CryIC).

Por otro lado el anticuerpo polyCryIII también se enfrentó a todas las proteínas puras antes citadas y no reconoció a ninguna de las proteínas CryI como era de esperarse, pero tampoco reconoció a dos proteínas CryIII (CryIIIB y CryIIIC). Esto nos indica que los anticuerpos utilizados, si bien son policlonales, no reconocen todas las proteínas de la familia CryI o CryIII, por lo cual este método de caracterización no es lo suficientemente confiable, pues puede producir falsos negativos, dejando fuera a muchas cepas que pudieran pertenecer a estas clases.

Esto nos lleva a considerar la siguiente pregunta:

¿Se puede establecer un método mas práctico, que posea alta capacidad de resolución, el cual permita diferenciar categóricamente proteínas muy parecidas e identificar a las subclases?

Para responder esta pregunta nos planteamos como objetivo: Desarrollar un sistema de búsqueda y caracterización de nuevos genes de δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, mediante la utilización de la técnica del PCR.

Para cumplir este objetivo proponemos utilizar oligonucleótidos específicos generados de las regiones homólogas y no homólogas para las clases y subclases *CryI* y *CryIII*, de tal manera que nos permita diferenciar rápidamente cepas pertenecientes a dichas clases.

II.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el desarrollo de este trabajo primero se propuso diseñar una estrategia que permitiera identificar en una sola reacción a cepas que portaban genes pertenecientes al grupo *cryI* o al grupo *cryIII*.

Al usar el programa de GeneWorks 2.4, se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias de los genes de cada clase *cryI* y *cryIII* reportados. El porcentaje de homología reportado entre las clases *cryI* y *cryIII* oscila entre el 45-50%.

Estas comparaciones múltiples permitieron ubicar las regiones altamente homólogas entre estas dos clases, así como las regiones homólogas para cada clase; de estas comparaciones se generaron los oligonucleótidos específicos para cada clase en particular, tomando en consideración que los productos de PCR que se generen para cada clase, *cryI* y *cryIII*, deben tener una diferencia en tamaño entre 50-500 pares de bases.

El diseño de los oligonucleótidos (primeros de la reacción de PCR) se realizó teniendo en cuenta que como mínimo deben estar conformados por 18 bases nucleotídicas, con un contenido de GC del 30-40%, con terminación en sus extremos de GC, que no tengan más de tres bases idénticas continuas, que no formen dímeros y no hibridicen sobre si mismos, que sean incompatibles entre ellos y un aspecto muy importante, que solo reconozcan la secuencia con la cual son 100% complementarios y no hibriden con ninguno de los genes *cry* de la otra clase y que los productos de amplificación tengan como mínimo una diferencia de 30 pares de bases.

Esto permitió amplificar fragmentos de DNA de diferente tamaño para cada clase (*cryI* y *cryIII*) y posteriormente al analizar los productos de PCR por electroforesis, identificar y diferenciar estas dos clases,

permitiendo la selección de cepas de la clase *cryI* activas a lepidópteros y cepas *cryIII* activas a coleópteros. Al caracterizar las cepas por el tamaño de los fragmentos producidos por PCR era posible que algunas de estas cepas generaran fragmentos de diferente tamaño al esperado, esto podría ser un indicio de la presencia de un gen diferente.

Segundo, se propuso diseñar una metodología que permitiera identificar exactamente a la subclase a la que pertenece cada uno de los genes clasificados dentro del grupo de genes *cryI* o *cryIII*. Esto se llevó a cabo realizando alineamientos múltiples con las secuencias reportadas de los genes de la clase *cryI* por un lado y *cryIII* por otro lado, permitiendo ubicar las regiones no homólogas de cada subclase, pudiéndose entonces diseñar oligonucleótidos específicos con las características antes mencionadas y como requisito importante, que solo reconocieran la secuencia de la subclase con la cual son 100% complementarios.

Al analizar los productos de PCR por electroforesis se podrían identificar los genes presentes en una cepa por el tamaño definido del producto para cada gen, permitiendo caracterizar las cepas de *Bacillus thuringiensis* en las diferentes clases y subclases respectivas de *cryI* y de *cryIII*, dado que el interés del laboratorio es atacar plagas de lepidópteros y coleópteros.

En la caracterización a nivel de subclase existía también la posibilidad de que algunas cepas previamente clasificadas en la clase *CryI* o *CryIII*, generaran fragmentos de diferente tamaño al esperado o que no se identificaran con alguna de las subclases; esto nos indicaría que puede tratarse de un nuevo gen. El siguiente paso sería realizar el bioensayo de esta cepa con insectos de interés (*Spodoptera spp.* o *Pseudolatia unipuncta* si es *CryI* o con *Diabrotica spp.* si es *CryIII*). Posteriormente se procedería a la clonación y secuenciación de este nuevo gen para estudios sobre su caracterización.

Lo mas importante de esta estrategia es el adecuado y racional diseño de los oligonucleótidos, lo que permitirá utilizar este método con un alto grado de seguridad para clasificar genes ya conocidos con la potencialidad de encontrar nuevos genes.

III. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo serán presentados en forma de tres artículos. El primero ha sido publicado en la revista *Applied and Environmental Microbiology* en el volumen 60. El segundo ha sido enviado a publicación en la misma revista. El tercero fue publicado como un capítulo del libro *Proceedings of The Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its impact to the environmental*.

Los títulos de los artículos presentados son:

1- A polymerase chain reaction analysis of the *cryI* insecticidal family genes from *Bacillus thuringiensis*. J. Cerón, L. Covarrubias, M. Ortiz, A. Ortiz, L. Lina, E. Aranda, R. Quintero and A. Bravo. 1994. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 1: 353-356.

2- Specific PCR primers direct to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strains collection. J. Cerón, A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca and A. Bravo. *Applied and Environmental Microbiology*. (Sometido).

3- Screening of *Bacillus thuringiensis* strains with novel insecticidal activities. A. Bravo, J. Cerón, E. Aranda, A. Lorence, R. Quintero. *The Pacific Rim Conference on Biotechnology of Bacillus thuringiensis and its impact to the environment*. (En prensa).

PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Crystal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*

JAIRO CERON,¹ LUIS COVARRUBIAS,² RODOLFO QUINTERO,² ANABEL ORTIZ,²
MYRIAM ORTIZ,² EDUARDO ARANDA,³ LAURA LINA,³ AND ALEJANDRA BRAVO^{2*}

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,² and Universidad Autónoma del Estado de Morelos,³ Cuernavaca, Morelos, México, and Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia¹

Received 1 June 1993; Accepted 2 November 1993

A method allowing rapid and accurate identification of different subgroups within the insecticidal crystal CryI protein-producing family of *Bacillus thuringiensis* strains was established by using PCR technology. Thirteen highly homologous primers specific to regions within genes encoding seven different subgroups of *B. thuringiensis* CryI proteins were described. Differentiation among these strains was determined on the basis of the electrophoretic patterns of PCR products. *B. thuringiensis* strains, isolated from soil samples, were analyzed by PCR technology. Small amounts of bacterial lysates were assayed in two reaction mixtures containing six to eight primers. This method can be applied to rapidly detect the subgroups of CryI proteins that correspond with toxicity to various lepidopteran insects.

Bacillus thuringiensis is characterized by the production of parasporal crystals composed of protein molecules known as δ -endotoxins or insecticidal crystal proteins (ICP) that are toxic to the larvae of various insects.

It has been estimated that up to 15% of crops worldwide are lost because of insect damage alone (2). ICPs have been used as biopesticides during the last 30 years; different commercial products are now available and used in agricultural fields. Furthermore, some ICP genes have been introduced into the plant genome, with a high rate of protection against insect attack (11, 12). The use of *B. thuringiensis* as a microbial insecticide offers several advantages over chemical control agents: ICPs have a highly specific host range that renders them harmless to nontarget insects and vertebrates and the environment. Recently isolated strains with demonstrated toxic potential against various organisms (5) have raised interest in isolating new *B. thuringiensis* strains with specificities for a much broader range of pests, extending the use of *B. thuringiensis* of a pesticide beyond traditional markets.

Numerous ICP genes have been cloned, sequenced, and classified on the basis of their homology and specificity (9). CryI toxins are proteins toxic to lepidopteran insects. To date, seven subgroups of *cryI* genes and four subgroups belonging to the *cryI*A group have been characterized and identified. Each CryI toxin has a narrow range of toxicity against different lepidopteran insects (7), which are some of the most devastating pests in agricultural fields. Therefore, our main goal is to isolate and characterize *B. thuringiensis* strains harboring *cryI* genes.

One of the most important aspects about establishing a *B. thuringiensis* collection is to have a method which allows for rapid and accurate characterization. This is especially important if the different δ -endotoxin genes carried by a certain strain are critical to its specificity and toxicity. Analysis of

these genes by bioassay has proved to be an exhaustive, time-consuming process, since it is necessary to screen all target insect isolates. Different methods have been developed in an effort to reduce the number of bioassays, such as (i) Southern blot analysis in search of known homologous genes (10), (ii) analysis of reactivity to different monoclonal antibodies (8), or (iii) electrophoretic analysis of PCR products using specific primers (4). From the above-mentioned methods, PCR analysis is considered to be the best choice, because it allows rapid determination of the presence or absence of a sequence and it is highly sensitive, relatively fast, and can easily be used on a routine basis. Carozzi et al. (4) performed PCR analysis to identify different δ -endotoxins and reported the sequences of 12 PCR primers that distinguished three major classes of ICP genes (*cryI*, *cryIII*, and *cryIV*). Nevertheless, CryI proteins belonging to different subgroups could exert different insecticidal effects on lepidopteran pests (7). PCR analysis of three *cryIA* subgroups was recently reported (3); however, this analysis did not identify the remaining *cryI* gene subgroups. In order to characterize our *B. thuringiensis* collection, in this study we present a method designed to identify the specific *cryI* genes carried by a particular strain.

Isolation of *B. thuringiensis* strains. To isolate *B. thuringiensis* crystal-producing strains, 148 soil samples were analyzed as described previously (4). A total of 651 crystal-producing strains were isolated, as judged by microscopic observations. *B. thuringiensis* strains were found primarily in soils from active agricultural zones.

These strains were prescreened by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using polyclonal antisera against the toxic fragments of CryIA(b), CryIIIA, and CryIV toxins. A total of 241 strains were characterized by the ELISA. In the group of strains identified as CryI-type producing (47 strains), some strains were isolated from one soil sample and may be sibling strains. In order to identify individual strains, we performed total-protein electrophoresis on the strains isolated from one soil sample (data not shown).

Designing oligonucleotides to identify CryI subgroups. Specific *cryI* genes carried by each strain were identified by

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, México. Phone: (52) 73-11 4900. Fax: (52) 73-17 2388. Electronic mail address: bravo@pbr322.ceingebi.unam.mx.

TABLE 1. Characteristics of primers used

Primer pair ^a	Positions ^b	Gene(s) recognized	Predicted size (bp) of PCR product	Sequence
CJ1, reg 5'	1105-1125	<i>cryIA(a)</i> ,	246	5'TTATACTTGGTTCAGGCC3'
CJ2, reg 3'	1332-1351	<i>cryIA(d)</i>		5'TGGAGCTCTCAAGGTGTA3'
CJ3, reg 5'	1181-1198	<i>cryIA(d)</i>	171	5'CAGCCGATTTACCTTCTA3'
CJ2, reg 3'	1332-1351			5'TGGAGCTCTCAAGGTGTA3'
CJ4, reg 5'	1133-1153	<i>cryIA(b)</i> ,	216	5'AACAACATATCTTCTTGAC3'
CJ5, reg 3'	1328-1348	<i>cryIA(c)</i>		5'CTCTTATTATACTTACTACTAC3'
CJ6, reg 5'	1495-1514	<i>cryIA(c)</i>	180	5'GTTAGATTAATAAGTAGTGG3'
CJ7, reg 3'	1656-1674			5'TGTAGCTGGTACTGTATTG3'
CJ8, reg 5'	1007-1025	<i>cryIB</i>	367	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3'
CJ9, reg 3'	1355-1374			5'CATAATTTGGTTCGTTCTGT3'
CJ10, reg 5'	1306-1325	<i>cryIC</i>	130	5'AAAGATCTGGAACACCTTT3'
CJ11, reg 3'	1416-1436			5'CAAACCTAAATCCPTTCAC3'
CJ12, reg 5'	837-856	<i>cryID</i>	290	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA3'
CJ13, reg 3'	1107-1127			5'ATTTGAATTGTCAAGGCCCTG3'

^a reg, refers to the coding strand.

^b The A of the first ATG is numbered 1.

using PCR technology. Oligonucleotides were designed by computer analysis with a GeneWork 2 program that allows for the simultaneous alignment of several gene sequences. The primers were selected from the highly variable region of the *cryI* genes. Table 1 shows the sequence of each primer, the *cryI* gene subgroup identified, and the predicted size of the PCR product. Table 1 also shows the locations of the primers within the DNA sequence of each gene.

With the use of this set of primers, we were able to identify *cryIA* to *cryID* gene subgroups, including subdivisions inside *cryIA* genes. The selected primers were synthesized in a Microsyn 1450A (Systec Inc.), using the manufacturer's reagents and conditions.

Identification of *cryI* genes on Mexican *B. thuringiensis* isolates. *B. thuringiensis* strains were grown for 12 h on a nutrient agar plate. A loop of cells from a single colony was transferred to 0.1 ml of H₂O, and the mixture was boiled for 10 min to lyse the cells. The resulting cell lysate was briefly spun (10 s, 10,000 rpm [Eppendorf model 5415C]), and 15 µl was transferred to a microcentrifuge tube containing 0.5 to 2.5 U of *Taq* DNA polymerase enzyme from Boehringer Mannheim, 0.1 to 0.5 µM each of the primers used in the reaction, and 2.5 mM each of the four deoxynucleoside triphosphates in a total volume of 50 µl.

HD1 and HD137 *B. thuringiensis* strains were used as control strains to test the set of primers. The HD1 strain contains the *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, and *cryIA(c)* genes, while the HD137 strain contains the *cryIA(a)*, *cryIB*, *cryIC*, and *cryID* genes. PCR with two reaction mixtures containing the *cryI* primers was performed on both control strains. Reaction mixture A contains primers CJ1 to CJ7 and this reaction detects *cryIA* genes [from *cryIA(a)* to *cryIA(d)*] while reaction mixture B contains primers CJ8 to CJ13 and this reaction detects *cryIB*, *cryIC*, and *cryID* genes. Amplification was done in the DNA thermal cycler (Omnigene HB-TR3-CM; Hybaid Limited, Teddington, Middlesex, United Kingdom) with the step cycle program set for 25 cycles (with a cycle consisting of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 53°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min); an extra step of extension at 72°C during 10 min was then

performed. The reaction proved to be highly specific, because after electrophoretical analysis, the PCR products corresponded to the predicted products (Fig. 1). We observed that the HD1 strain did not yield PCR products when

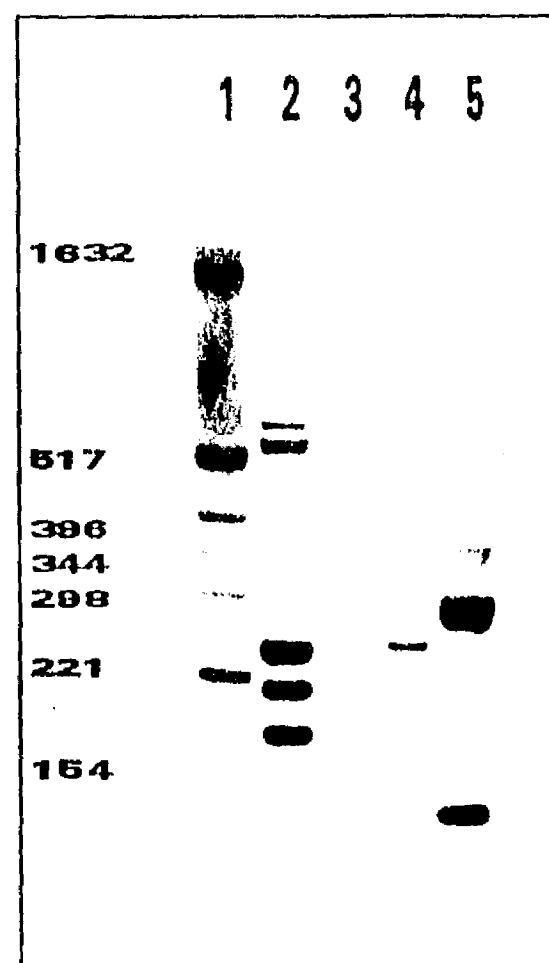


FIG. 1. Agarose (3%) gel electrophoresis of nucleic acid amplification products from *B. thuringiensis* HD1 and HD137 control strains. Lane 1, molecular weight markers (pBR322 digested with *Hinf*I); lanes 2 and 3, PCR products obtained with HD1 strain lysate as the template; lanes 4 and 5, PCR products obtained with HD137 strain lysate as the template. Reaction mixtures A (lanes 2 and 4) and B (lanes 3 and 5) were used. The HD1 strain codes for *CryIA(a)*, *CryIA(b)*, and *CryIA(c)* toxins, while the HD137 strain codes for *CryIA(a)*, *CryIB*, *CryIC*, and *CryID* toxins. The numbers to the left of the gel are molecular weights.

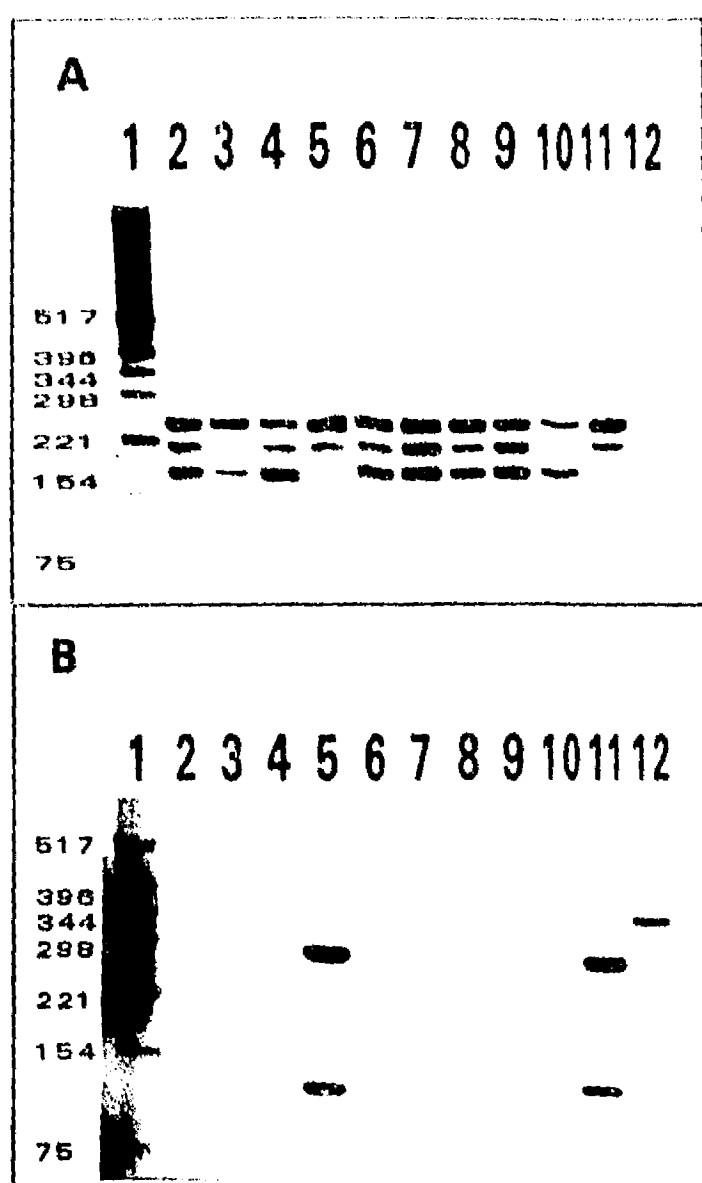


FIG. 2. Agarose (3%) gel electrophoresis of nucleic acid amplification products of representative *B. thuringiensis* strains isolated from soil samples. PCR products obtained with reaction mixture A (A) or B (B) are shown. Lane 1, molecular weight markers (pBR322 digested with *Hin*I); lane 2, IBT10 strain; lane 3, IBT12 strain; lane 4, IBT13 strain; lane 5, IBT17 strain; lane 6, IBT23 strain; lane 7, IBT37 strain; lane 8, IBT42 strain; lane 9, IBT44 strain; lane 10, IBT60 strain; lane 11, IBT98 strain; lane 12, IBT99 strain. The numbers to the left of the gel are molecular weights.

CryIB, CryIC, or CryID primer was used. This result was very important because this strain did not contain these genes. Strain HD137 did not yield PCR products when CryIA(b) or CryIA(c) primer was used.

PCR analysis of the *cryI* genes present in different strains was finally carried out on 11 Mexican *B. thuringiensis* isolates. Figure 2 shows the products obtained after PCR with the *cryI* set of primers; all strains reacted with at least one pair of *cryI* primers. Table 2 summarizes the *cryI* gene contents of the 11 strains. Nine strains harbor the *cryI*A(a) and *cryI*A(b) genes. Seven strains also had a PCR product identified as the *cryI*A(c) gene. Strain IBT60 had only the PCR products identified as *cryI*A(a) and *cryI*A(c) genes. Of the remaining strains, two contained *cryI*C and *cryI*D genes, besides the *cryI*A(a) and *cryI*A(b) genes. Strain IBT99 contained only the *cryI*B gene. We focused these data on IBT17 and IBT98 strains, because both harbor the *cryI*C and *cryI*D genes, which have been reported to be highly toxic to *Spodoptera* insects. In order to determine whether these strains showed increased toxicity to the insect, we performed a bioassay on first-instar *Spodoptera frugiperda* larvae. A freshly prepared artificial diet (1) 1 ml was dispensed into 2-cm² vials (Nunc Multidish-4). Five dilutions of the samples were prepared in buffer solution (10 mM K₂HPO₄ [pH 7.4] with 0.15 M NaCl). A sample dilution was

TABLE 2. Identification of *cryI* genes present in different *B. thuringiensis* strains and their toxicity against *S. frugiperda* larvae

Strain	Genes identified by PCR analysis	LD ₅₀ ^a (mg cm ⁻²)	CI _{95%} ^b of LD ₅₀
HD1	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	969	651-1,363
HD137	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> B, <i>cryI</i> C, <i>cryI</i> D	43	32-71
IBT10	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	ND ^c	
IBT12	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	587	284-795
IBT44	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	ND	
IBT13	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	ND	
IBT23	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	ND	
IBT37	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	790	590-1,250
IBT60	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(c)	787	527-1,089
IBT42	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> A(c)	283	172-372
IBT17	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> C, <i>cryI</i> D	47	35-76
IBT98	<i>cryI</i> A(a), <i>cryI</i> A(b), <i>cryI</i> C, <i>cryI</i> D	43	32-70
IBT99	<i>cryI</i> B	ND	

^a LD₅₀, 50% lethal dose.

^b CI_{95%}, 95% confidence interval.

^c ND, not determined.

applied uniformly to the food surface in each vial and allowed to dry. Four larvae were placed in each vial; 24 larvae were used per sample dilution. Mortality counts were made after 6 days, and the toxicity data were analyzed by probit analysis (6). Table 2 also shows the toxicity of each strain on this insect, indicating that strains which contain the *cryI*C and *cryI*D genes pose the highest toxic threat to this insect larvae. These strains were isolated from soil samples collected from agricultural active zones (maize crops). The fact that most of the analyzed strains were found to harbor the *cryI*A(a), *cryI*A(b), and *cryI*A(c) genes may indicate that these genes are widely distributed among the Mexican *B. thuringiensis* strains and may play an important ecological role in Mexico. Data on the presence of various *cry* genes in different regions of the country would be valuable.

We thank Paul Gaytan and Eugenio Bustos for primer synthesis.

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (contract 0490-N9108). Jairo Cerón gratefully acknowledges the ColCiencias for his Ph.D. fellowship.

REFERENCES

- Bell, R. A., and F. G. Joachim. 1976. Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco budworms and pink bollworms. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69:365-373.
- Boulter, D., A. M. R. Gatehouse, and V. Hilder. 1989. Use of cowpea trypsin inhibitor (CPTI) to protect plants against insect predation. *Biotechnol. Adv.* 7:489-497.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:523-527.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3057-3061.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *BioTechnology* 10:271-275.
- Finney, D. J. (ed.). 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.
- Höfte, H., J. Van Rie, S. Jansens, A. Van Houtven, H. Vanderbruggen, and M. Vaeck. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific

FALLA DE ORIGEN

- insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2010-2017.
9. Höfte, H., and R. H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242-255.
 10. Kronstad, J. W., and H. R. Whiteley. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Gene* **43**:29-40.
 11. Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, and D. A. Fishhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *BioTechnology* **8**:939-943.
 12. Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. DeBeuckeler, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature (London)* **328**:33-37.

Specific PCR reaction primers directed to identify *cryI* and
cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain
collection.

Jairo Ceron¹, Anabel Ortiz², Rodolfo Quintero², Leopoldo Guereca²
and Alejandra Bravo^{2*}

²*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca 62271, Morelos, México and*

¹*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Edificio Uriel
Gutiérrez, Ciudad Universitaria. Ap. Aéreo 14490. Bogotá, Colombia.*

Phone (52) 73 - 11 4900 ext 258.

Fax (52) 73 - 17 2388

Electronic mail address: bravo@pbr322.ceingebi.unam.mx.

*Corresponding author.

ABSTRACT

1
2 In this work we present a PCR strategy directed to the rapid
3 identification of *Bacillus thuringiensis* strains harboring any of the known
4 *cryI* or *cryIII* genes. Four general PCR primers, which amplify a DNA
5 fragment from any of the reported *cryI* or *cryIII* genes, have been selected
6 from conserved regions. Once a strain has been identified as containing a
7 particular type of *cry* gene, it can be easily characterized by additional PCR
8 reactions using specific *cryI* and *cryIII* primers, selected from variable
9 regions. With the methodology reported here, the ten different *cryI* and the
10 five different *cryIII* genes can be precisely identified. One feature of this
11 screening method, is that each *cry* gene is expected to produce a precise
12 molecular weight PCR product. Strains that display different size PCR
13 products are likely to represent strains harboring a potential novel *cry* gene.
14 Finally we present evidence that novel crystal genes may be identified
15 by this methodology.

INTRODUCTION

The main interest in the study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria rely on their production of insecticidal crystal inclusions during the sporulation process. These crystals are composed of proteins denominated delta-endotoxins or Cry proteins. Different Cry proteins have been described, that has toxic activity against larvae of very different insects (lepidopteran, dipteran and coleopteran) and other organisms like platelmintes, nematodes and protozoa (11, 15). The use of Bt as a microbial insecticide offers several advantages over chemical control agents: they are highly specific against a host range and are no toxic to other insects, vertebrates and to the environment.

Cry proteins are synthesized like inactive protoxins, which must be solubilised and activated through the proteases action inside the insect midgut. The activated toxin binds to its specific binding site located in the apical microvilli of susceptible larval midgut epithelial cells (13, 25, 26). After binding, the toxin inserts irreversibly into the cell plasma membrane (27) and forms a pore or lesion that allows net uptake of ions and water, leading to midgut-cell swelling and eventual lysis (3, 18).

Some cry genes have been cloned and sequenced. They are organized in six different groups according to their sequence similarity and range of specificity (11, 15). The CryI-CryV proteins are toxic to lepidopteran, lepidopteran and dipteran, coleopteran, dipteran and nematode larvae respectively. The CryVI proteins are also toxic to nematodes but their origin seems to be different from the remaining Cry protein family (11).

Both, coleopteran and lepidopteran orders contain some of the most devastating crop pests. Within the group of CryI proteins (toxic against lepidopteran) there are ten different subclasses (4, 8, 12, 15, 21, 28). Each subclass of CryI proteins, has a specific range of action against different lepidopteran insects. Within the group of CryIII proteins (toxic against coleopteran), five groups have been described (1, 9, 10, 16, 19, 22). Integrate insect control, needs the knowledge of the most active toxin against selected crop pests.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

The searching and characterization of novel Bt genes is a worldwide project. This knowledge will provide novel alternatives for the control of different insects and for coping with the problem of resistance. In this sense, it is important to have a screening analysis directed toward the identification of the known *cry* genes.

The PCR methodology has proven to be powerful in the identification of the specific insecticidal genes carried by different Bt strains (2, 5, 6, 7). In a previous work, we have reported the sequence of PCR primers directed to identify some lepidopteran-active genes (from *cryIA* to *cryID*), present in soil isolates of *B.thuringiensis* (6). Also this methodology has the potentiality to identify new *cry* genes, as reported by Kalman et al. (17) and Chak et al. (7) in the identification of novel *cryIC* genes.

In this work we present a PCR strategy designed to identify strains harboring any of the known *cryI* or *cryIII* genes. General primers for those genes have been selected from a highly conserved region between *cryI* and *cryIII* genes. Strains with unique PCR product profiles are easily characterized by additional PCR reactions using specific primers as previously reported (6) and novel specific primers described in this work. With the use of this methodology the ten different *cryI* genes and the five different *cryIII* genes can be precisely identified. One feature of this screening method is that it is expected that each *cry* gene will produce a precise molecular weight PCR product. Strains that produce different size products are likely to contain novel genes. We present evidence that by using the PCR methodology, novel *cry* genes could be identified.

MATERIALS AND METHODS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Bacterial strains. *B. thuringiensis* known strains were provided by the Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University, Columbus. Bt strains that express the different CryIIIs proteins were kindly supplied by Dr. Peferoen from Plant Genetic Systems, Belgium. Other Bt strains had been collected from 1991 until 1994 from Mexican soil samples (6). All bacterial strains were maintained in nutrient agar from Difco.

Oligonucleotides PCR primers. General primers used for detection of *cryI* or *cryIII* genes were selected from the highly conserved regions by using simultaneous alignment of all reported sequences. This survey was done by computer analysis with the Gene works 2.3 program (Intelligenetics). Table 1 shows the sequence of the four general primers, their location within the respective sequence and the expected molecular weight of the PCR product.

Specific primers used for identification of specific *cryI* (23) and *cryIII* genes were selected from highly variable regions among all genes. The *cryIE*, *cryIF* and *cryIG* specific primers were designed to be used in the same reaction mixtures. Table 2 shows the sequence of each primer, the location and the size of the expected PCR product. In order to identify *cryIII* type genes, a single directed primer and five reversed primers were used together in one reaction (Table 2).

The oligonucleotides were synthesized in a DNA synthesizer (Microsyn 1450A, Systec Inc.) using the manufacturer's reagents and conditions. Each pair of primers is highly specific and gives a PCR product of known size easily to identify by an electrophoretic analysis in agarose gels.

Sample preparation and PCR reaction. The Bt strain growth, cellular lysate sample preparation and PCR reaction mixtures were done as previously described (6). Reaction mixture C identifies *cryIE*, *cryIF* and *cryIG* genes (primers: CJ14 to CJ19); reaction mixture D contains the four general primers (primers: CJI-1, CJI-2, CJIII20 and CJIII21). Reaction

1 mixture E contains the specific primers designed to identify each of the cryIII genes (primers:
2 CJIII22 to CJIII29). The amplification was done in a DNA thermal cycler (OmniGene HB-TR3
3 Hybaid, Teddington, Middlesex, U.K.) using a single denaturalization step of 2 min at 95°C,
4 followed by step cycle program set for 30 cycles (with a cycle constituted of denaturalization at
5 95°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min); an extra step of
6 extension at 72°C during 5 min was finally performed. A total of 15 µl of each PCR reaction
7 mix was electrophoresed on a 3% agarose gel in 0.5X Tris-borate buffer at 250V during 30-35
8 min, stained with ethidium bromide.

9 **Crystal protein purification.** Crystalline inclusions were purified from spores and
10 cell debris by centrifugation in discontinuous sucrose gradients as described (23). The sucrose
11 gradient used was 67%, 72%, 79%, 84% and 90%. The crystal inclusion bodies were
12 solubilised, activated and purified as in (14).

13 **Electrophoresis and immunoblotting.** Protein analysis was done in SDS-
14 polyacrylamide gel electrophoresis on 10% gels. Bidimensional gel analysis was done by the
15 method of O'Farrel 1975 (20), using pH 4-10 ampholites. Electrophoretic transfer of proteins
16 to nitrocellulose and immunological detection of crystal proteins was done by the method of
17 Towbin et al. 1979 (24). Two different monoclonal antibodies kindly supplied by Dr. Pefereon
18 (Plant Genetic Systems, Belgium) diluted 1:1000 were used as primary antibodies (Mab-16AE
19 specific against CryIE toxin and Mab-6A5 specific against CryIIIA toxin). The secondary
20 antibody was a horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Sigma).
21 Diaminobenzidine 25 mg/100 ml and H₂O₂ were used as peroxidase substrates.

RESULTS

Specificity of cryI and cryIII general primers. The PCR was used to survey a number of *B.thuringiensis* strains for their *cry* gene content. One set of two primer pairs (Table 1) was used to detect, the strains that harbor any of the *cryIs* or the *cryIIIs* genes. The expected PCR product molecular weight for the *cryIs* genes ranges between 272 and 290 bp, while for *cryIIIs* genes range between 688 and 743 bp. Figure 1 shows the results obtained with different cryI control strains (panel A) and cryIII (panel B) control strains using the mixture D. Figure 1 also shows the PCR products obtained when cryI and cryIII primers were used separately with different native *B.thuringiensis* strains (panel C) isolated from different areas (6). The native strain IB31 was the only one that gave both PCR products suggesting that this strain may harbor *cryI* and *cryIII* genes.

Identification of specific *cryI* and *cryIII* genes from soil samples. An additional PCR survey was done with 181 selected strains. Three reaction mixtures were used. The previously described reaction mixtures A and B, that amplify specific regions from *cryIAs* to *cryIDs* genes(6) and the reaction mixture C, described in this work (Table 2), that amplify specific regions from *cryIE*, *cryIF* and/or *cryIG* genes. This analysis, allows the identification of specific *cryI* genes carried by a particular strain, based on the sizes of generated PCR products. We found six different *cryI* gene profiles in our collection. (1: *cryIAa*, *cryIAb*; 2: *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*; 3: *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryID*; 4: *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, *cryID*; 5: *cryIC*, *cryID* and 6: *cryIB*). We have not found any strain that harbors *cryIE*, *cryIG* or *cryIF* gene in our collection.

We have identified a strain (IB31) that produced an unexpected size product of 302 bp, when assayed with the PCR reaction mixture C (figure 2, panel A) suggesting that this strain may harbor a different *cryI* gene. Further analysis, revealed that this PCR product, was obtained with primers CJ15 (reverse primer specific for *cryIE* gene) and CJ18 (directed primer specific for *cryIG* gene).

1 The specific *cryIII* genes type contained in 14 selected strains was analyzed (figure 2, panel
2 B). All strains tested, contained the *cryIIIA* gene. Only strain IB31 contained a different *cryIII*
3 gene, since it produces a PCR product of unexpected size, 224 bp. This fragment is produced
4 when the directed constant primer was used with the reversed *cryIIIC* primer.

5 **Analysis of the crystal proteins from IB31 strain.** The crystal inclusion produced
6 by IB31 strain is a bipyramidal shaped crystal, but it is extremely big and long. This crystal is
7 composed by a single protein of 105 kDa. The tripsination process produces a 95 kDa
8 polypeptide (Figure 3, panel A). The bidimensional electrophoresis of the crystal protein
9 showed a single band in the acidic region (Figure 3, panel B), suggesting that this crystal is
10 composed by a single protein.

11 Immunoblotting experiments showed that this strain produced a crystal inclusion protein that
12 cross-react with two specific monoclonal antisera, raised against purified CryIE or CryIIIA
13 toxins (Figure 4). We do not know its specificity in the insecticidal activity.

14 Bioassays have been performed with different lepidopteran insects (*Spodoptera frugiperda*,
15 *Diatraea grandiosella*, *Diatraea saccharalis*, *Heliothis virescens*) and with one coleopteran
16 insect (*Epilachna varivestis*) no insecticidal activity has been found in the tested insects.

DISCUSSION

There have been described different PCR screening methodologies directed to predict the insecticidal activity of previously uncharacterized *B.thuringiensis* strains (2, 5, 6, 17). But, those methodologies were incomplete, since they do not identify all reported *cryI* and *cryIII* genes. Coleopteran and lepidopteran orders contain some of the most devastating insect crop pests. It is important to search for novel insecticidal proteins that will help in their control. Here, we present a PCR screening method that determines which specific lepidopteran and coleopteran-active genes are present in a determined strain. The screening procedure presented in this work, has proven to be fast and highly specific.

We identify the most common *cryI* and *cryIII* type gene's profiles present in *B. thuringiensis* strains isolated from Mexico. Strains that harbor the three *cryIAs* genes were the most abundant, they represent 48% of the population. Strains harboring *cryIB* gene, was also highly abundant, representing 30% of the population. The strains that harbor both *cryIC* and *cryID* genes represent the most toxic strains against larvae from *Spodoptera frugiperda* (data not shown). We found some strains that carried only the *cryID* gene, and they were also highly toxic to *S. frugiperda* larvae. We do not found any *cryIE*, *cryIG* or *cryIF* gene containing strain, suggesting that the distribution of Bt strains harboring these genes is not abundant in Mexico. Also, the distribution of *cryIII* genes containing strains is not frequently observed.

By using this screening procedure, we have identified a *Bacillus thuringiensis* strain (IB31) that contains a novel and very different crystal protein gene. This strain produced the two expected PCR products when assayed with the *cryI* and the *cryIII* general primers. This data suggests that this strain harbor one or more genes related to the *cry* family genes. However, when this strain was assayed with the *cryI* and *cryIII* specific primers, we obtained PCR products with unexpected molecular weight. The unexpected PCR products were obtained when the reaction mixture C and *cryIII* specific reaction mixture E were used (figure 2, panel A and B). These data indicate that this strain may harbor one or two different *cry* genes. The PCR product produce with the *cryI* specific primers, was obtained with primers CJ15 (reverse

1 primer specific for *cryIE* gene) and CJ18 (directed primer specific for *cryIG* gene). The
2 directed primer CJ18 is located on position 1778-1797, while the reversed primer CJ15 is
3 located on position 1154-1174. These two primers would not be able to amplify a sequence
4 from a similar *cryIE* or *cryIG* gene. We propose that the PCR product obtained with mixture
5 reaction C in this strain may be an artifact produced by inespecific hibndization of at least one
6 primer. The fact that the crystal protein from this strain cross-reacted with the monoclonal
7 antibody specific to CryIE toxin (Figure 4) and that the aberrant PCR product was obtained
8 with the *cryIE* reverse primer, suggests that the crystal protein from this strain may be related
9 to the *cryIE* toxin.

10 The IB31 strain also produced an unexpected sized PCR product when assayed with the
11 *cryIII* specific primers. This PCR product was obtained with the directed constant primer and
12 the *cryIIIC* specific primer. The PCR product obtained by this reaction is 13 pb bigger that the
13 PCR product obtained from a Bt *CryIIIC* producing strain and it was obtained with the same
14 PCR primers, suggesting that the crystal protein from this strain is also related to the *CryIIIC*
15 protein. It is important to notice that both strains produced a bipiramidal crystal (16) but the
16 IB31 strain produces a very long crystal that is at least twice big than the crystal from the
17 *CryIIIC* producing strain. One important difference between both crystals is that the *CryIIIC*
18 crystal protein has a molecular weight of 130 kDa, while the crystal protein from the IB31
19 strain has a molecular weight of 105 kDa (Figure 3A), and that only crystal protein from IB31
20 strain and not that of *CryIIIC* strain, cross reacts with the monoclonal antibodies against *CryIE*
21 and *CryIIIA* toxins (Figure 3B).

22 The results presented here showed that with the PCR methodology a Bt strains collection
23 could easily characterize, but also that it is possible to identify some novel *cry* genes.
24 However, it does not provide a direct information regarding to the insecticidal properties of the
25 putative novel *cry* gene, neither the identification of the protein gene with the highest toxic
26 activity against a selected pest. We agree that this methodology is not able to identify all the
27 new genes from a *B.thuringiensis* collection. A great limitation is that if the novel gene does

1 not have any of the primer sequences, no PCR product will be produced and would be missed.
2 Also, if the novel gene has an identical sequence in the region between the primers, but a
3 different sequence in other regions important for specificity, it would be undetected.
4 Nevertheless, after the screening procedure described here, selected strains could be search for
5 novel genes with the PCR footprinting as described by Kalman et al. 1993 (17), which uses a
6 collection of primers throught the sequence of *cryIC* gene and which has probed to be effective
7 in the identification of novel *cryIC* genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

1
2 We thank Dr. M. Peferoen for providing monoclonal antibodies, *B.thuringiensis* and *E. coli*
3 strains; M.C. Eduardo Aranda and Laura Lina for performing the bioassays; Paul Gaytan and
4 Eugenio Lopez for primer synthesis and Myriam Ortiz and Carolina Abarca for Bt strains
5 isolation and characterization. This work was partially supported by DGAPA, PADEP and
6 CONACyT. Jairo Ceron acknowledges Colciencias for his Ph.D. fellowship.

REFERENCES

1. **Benjar, K.** 1986. Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. FEMS Microbiol. Lett. 33:261-265.
2. **Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque.** 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:523-527.
3. **Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, and M. Peferoen.** 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. 60:247-253.
4. **Brizzard, B., and H. Whiteley.** 1988. Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. Nucleic Acid. Res. 16:2733.
5. **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. Appl. Environ. Microbiol. 57:3057-3061.
6. **Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo.** 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60:353- 356.
7. **Chak, K. F., D. C. Chao, M. Y. Tseng, S. S. Kao, S. J. Tuan, and T. Y. Feng.** 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 60:2415-2420.
8. **Chambers, J., A. Jelen, M. P. Gilbert, T. B. Johnson, and C. Gawron-Burke.** 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. J. Bacteriol. 173:3966.

- 1 9. **Foncerrada, L., Sick, A. J. and J. M. Payne.** 1992. A novel Coleopteran-
2 active *Bacillus thuringiensis* isolate and a novel gene encoding a coleopteran-active toxin.
3 European Patent Application. Publication number: 0 498 537 A2.
- 4 10. **Donovan, R., M. Rugar, A. Slaney, T. Malvar, C. Gawron-Burke,**
5 **and T. Johnson.** 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus*
6 *thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to coleoptera species. Appl. Environ.
7 Microbiol. 58:3921-3927.
- 8 11. **Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and
9 beyond. Bio/technology 10:271-275.
- 10 12. **Gleave, A. P., R. J. Hedgen, and H. Brodwell.** 1992. Identification of
11 insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DS1R517 with significant
12 sequence difference from previously described toxins. J. Gen. Microbiol. 138:844-
13 851.
- 14 13. **Hofmann, C., H. Vandrebruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens,**
15 **and H. Van-Mellaert.** 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is
16 correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of
17 target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7844-7848.
- 18 14. **Hofte, H., H. Greve, J. Seurink, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J.**
19 **Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, M. V. Montagu, M. Zabeau, and M.**
20 **Vaeck.** 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus*
21 *thuringiensis berliner* 1715. Eur. J. Biochem. 161:272-280.
- 22 15. **Hofte, H., and H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus*
23 *thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- 24 16. **Lambert, B., Hofte, H. R., Katrien A., S. Jansens, P. Soetaert, and M.**
25 **Peferoen.** 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent
26 activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 58:2536-2542.

- 1 17. **Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs, and T. Yamamoto.** 1993. Cloning of a
2 novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl.
3 Environ. Microbiol. 59:1131-1137.
- 4 18. **Knowles, B. H., and J. A. T. Dow.** 1993. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus*
5 *thuringiensis* : Models for their mechanism of action on the insect gut. BioEssays
6 15:469-476.
- 7 19. **Lambert, B., W. Teunis, R. Aguda, K. V. Audenhove, C. Decock, S.**
8 **Jansens, J. Seurink, and M. Peferoen.** 1992. Nucleotide sequence of gene *cryIIID*
9 encoding a novel coleoptera-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus*
10 *thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Gene 110:131-132.
- 11 20. **O'Farrell, P.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoretic of proteins. J.
12 Biol. Chem. 250:4007-4021.
- 13 21. **Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, and M. Lecadet.** 1988.
14 Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus*
15 *thuringiensis aisawai* 7.29. Mol. Microbiol. 2:393-404.
- 16 22. **Sick, A., F. Gaertner, and A. Wong.** 1990. Nucleotide sequence of a
17 coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp.
18 *tolworthi*. Nucleic Acid Res. 18:1305.
- 19 23. **Thomas, W. E., and D. J. Ellar.** 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal
20 delta-endotoxin : effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell. Sci.
21 60:181-197.
- 22 24. **Towbin, H. T., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of
23 proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
24 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.
- 25 25. **Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Deghelle, and H. Van Mellaert.** 1990.
26 Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the
27 specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol.
28 56:1378-1385.

- 1 26. **Van Rie, J., W. H. McGaughey, D. E. Johnson, B. D. Barnett, and H.**
2 **Van Mellaert.** 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus*
3 *thuringiensis*. *Science* 247:72-74.
- 4 27. **Van Rie, J., S.Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. Van Mellaert.**
5 **1989.** Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific
6 receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.*
7 186:239-247.
- 8 28. **Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker, and W. G. Dirkse.** 1990. A novel
9 *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* specific crystal protein. *J.*
10 *Bacteriol.* 172:6783-6788.

1 FIGURE LEGENDS

2 **Figure 1.-** Analysis by agarose gel electrophoresis of PCR products obtained by using the
3 general cryI and general cryIII primers pairs. Panel A: lane 1, molecular weight marker; lane 2,
4 HD1 strain (cryIA's); lane 3, HD73 strain (cryIAc); lane 4, HD137 strain (cryIAa, cryIC,
5 cryID); lane 5, IB43 strain (cryIB); lane 6, Escherichia coli cryIC strain; lane 7, E. coli cryID
6 strain; lane 9, PS81 strain (cryIF). Panel B: lane 1, MW marker; lane 2, Bt cryIIIA; lane 3, Bt
7 cryIIIB; lane 4, Bt cryIIIC; lane 5, Bt cryIIID; lane 6, Bt cryIIIE. Panel C: Analysis of native
8 strains. Lane 1, MW marker; lane 2, IB127 strain; lane 3, IB129 strain; lane 4, IB144 strain;
9 lane 5, IB148 strain; lane 6, IB152 strain; lane 7, IB153 strain; lane 8 and lane 10, IB31 strain;
10 lane 9, IB17 strain.

11 **Figure 2.-** Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained with specific primers. Panel
12 A: Analysis using the reaction mixture C, specific for *cryIE*, *cryIF* and *cryIG* genes. Line 1,
13 MW marker; lane 2, HD125 strain (*cryIE*); lane 3, PS81 strain (*cryIF*); line 4, IB31 strain.
14 Panel B: Analysis using specific cryIII primers (reaction mixture E). Line 1, MW marker; line
15 2, Bt cryIIIA strain; line 3, Bt cryIIIB strain; lane 4, Bt cryIIIC strain; lane 5, Bt cryIIID strain;
16 lane 6, Bt cryIIIE strain; line 7, IB17 strain; line 8, IB31 strain. IB17 and IB31 are
17 representative cryIII type strains

18 **Figure 3.-** Analysis of the crystal protein present in IB31 strain. Panel A: PAGE of crystal
19 inclusions purified from different *B. thuringiensis* strains. Line 1, MW markers; lane 2, Bt
20 CryIIIA; lane 3, Bt CryIIIB; lane 4, Bt CryIIIC; lane 5, Bt CryIIID; lane 6, Bt CryIIIE; lane 7,
21 IB31 protoxin; lane 8, IB31 toxin. Panel B: Two-dimensional electrophoresis of crystal protein
22 from IB31 strain.

23 **Figure 4.-** Immunological characterization of the crystal protein from IB31 strain. Panel A:
24 Analysis performed with the monoclonal Mab16A5 specific for CryIE toxin. Panel B: Analysis
25 performed with the monoclonal Mab6A5 specific for CryIIIA toxin.

Table 1. Characteristic of cryI and cryIII general primers used Mixture D.

Primer Pair	Sequence	Gene Recognized	Position	Product size(bp)			
CJI-1	5' TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA	<i>cryIAa</i>	3168-3343	272			
CJI-2	5' TATCGGTTTCTGGGAAGTA						
					<i>cryIAb</i>	3108-3392	284
					<i>cryIAc</i>	3189-3460	272
					<i>cryIB</i>	3321-3610	290
					<i>cryIC</i>	3210-3493	284
					<i>cryID</i>	3138-3421	284
					<i>cryIE</i>	3165-3439	275
					<i>cryIF</i>	3165-3449	284
CJIII20	5' TTAACCGTTTTTCGCAGAGA	<i>cryIIIA</i>	794-1481	688			
CJIII21	5' TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG						
					<i>cryIIIB</i>	821-1514	694
					<i>cryIIICgall</i>	767-1445	679
					<i>cryIIID</i>	788-1490	703
					<i>cryIIIC</i>	796-1490	694
		<i>cryIIIE</i>	800-1547	747			

Table 2. Characteristics of cryI and cryIII specific primers used

Primer Pair	Sequence	Gene Recognized	Position	Product size(bp)
Mixture C				
CJ14	5' GGAACCAAGACGAACTATTGC	<i>cryIE</i>	1029-1049	147
CJ15	5' GGTTGAATGAACCCTACTCCC		1154-1174	
CJ16	5' TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC	<i>cryIF</i>	813-833	177
CJ17	5' CGGTTACCAGCCGTATTTCCG		970-989	
CJ18	5' ATATGGAGTGAATAGGGCG	<i>cryIG</i>	1778-1796	235
CJ19	5' TGAACGGCGATTACATGC		1994-2012	
Mixture E				
CJIIIcte 22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIA</i>	1460-1482	283
CJIIIA23	5' CCCCGTCTAAACTGAGTG		1726-1744	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIB</i>	1493-1515	435
CJIIIB24	5' AACGAAAGATTCTGCTCC		1912-1929	
CJIIIcte22	5' CAATCCCGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIC</i>	1469-1471	535
CJIIIC25	5' CCTATTCTTTCATTTTGACC		1984-2003	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIC-gall</i>	1424-1446	211
CJIIICg26	5' AGTGGAGAGTTTACGGTAGCC		1614-1634	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIID</i>	1469-1471	312
CJIIID27	5' CGAAATACAAATACTATGAG		1759-1780	
CJIIIE28	5' TGACAAGTACTGGATTCTGCAA	<i>cryIIIE</i>	944-966	394
CJIIIE29	5' GTTGTTGATGAGGTTCCCCTT		1316-1337	

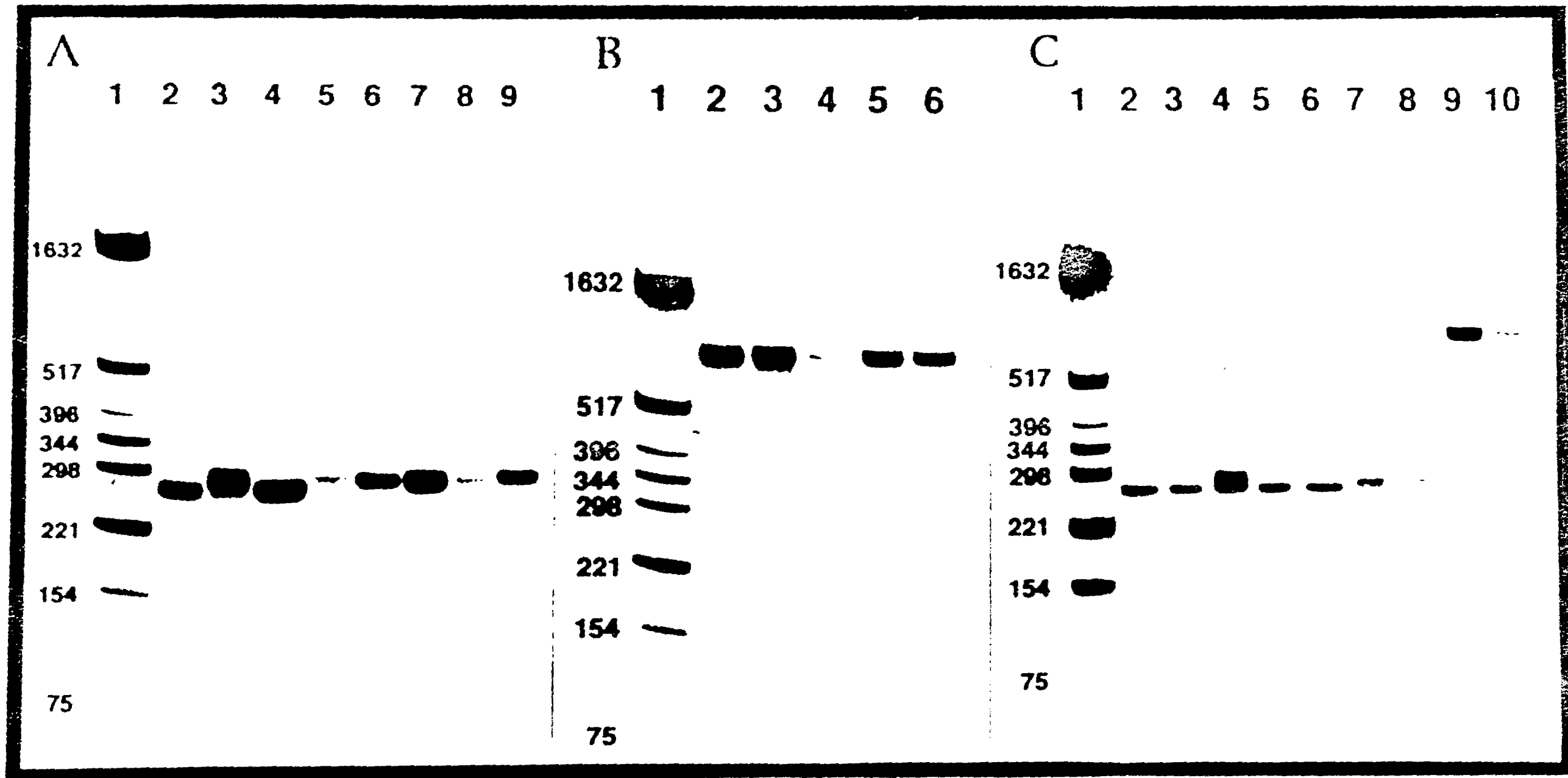


Figure 1.

FALLA DE ORIGEN

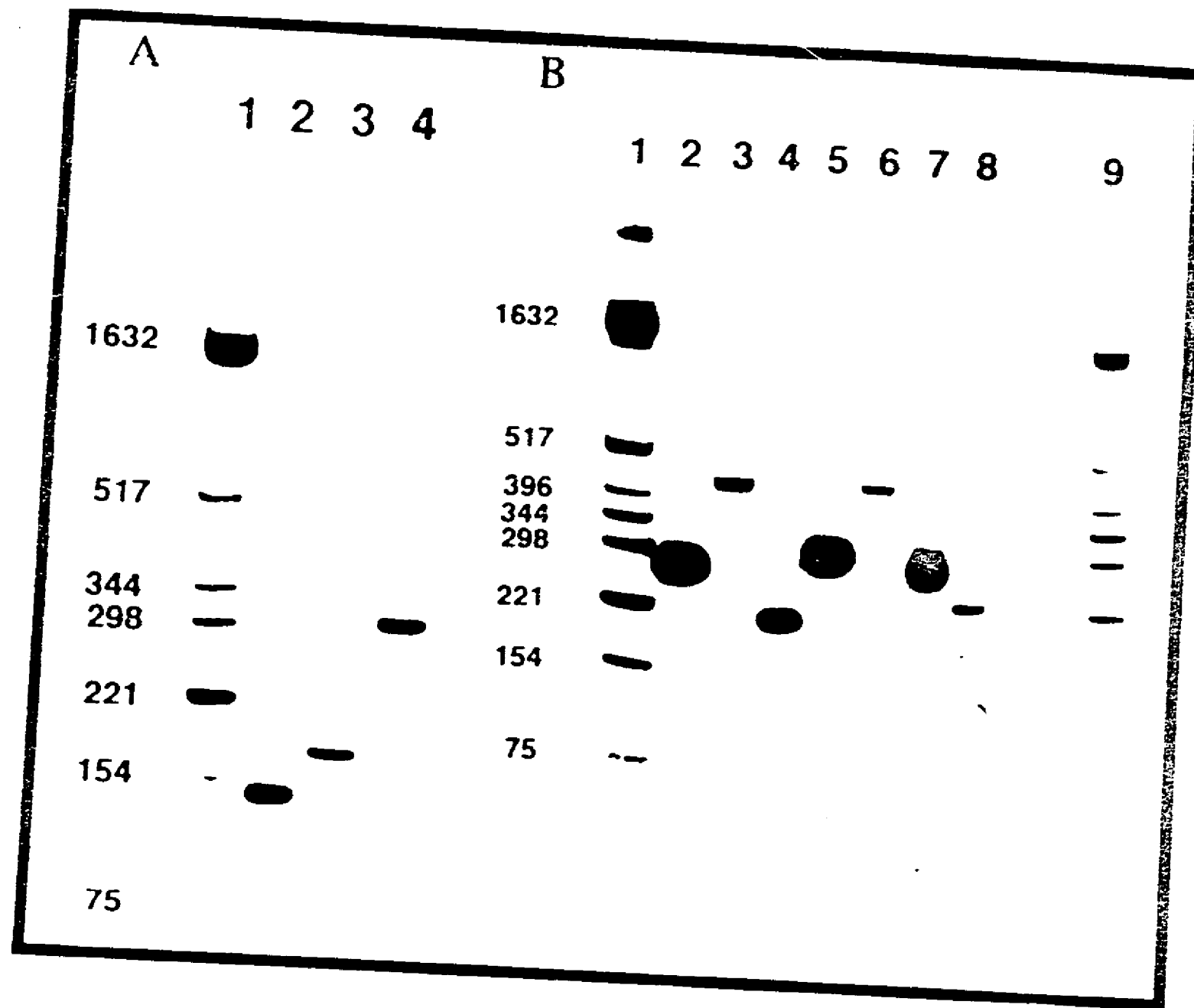


Figure 2.

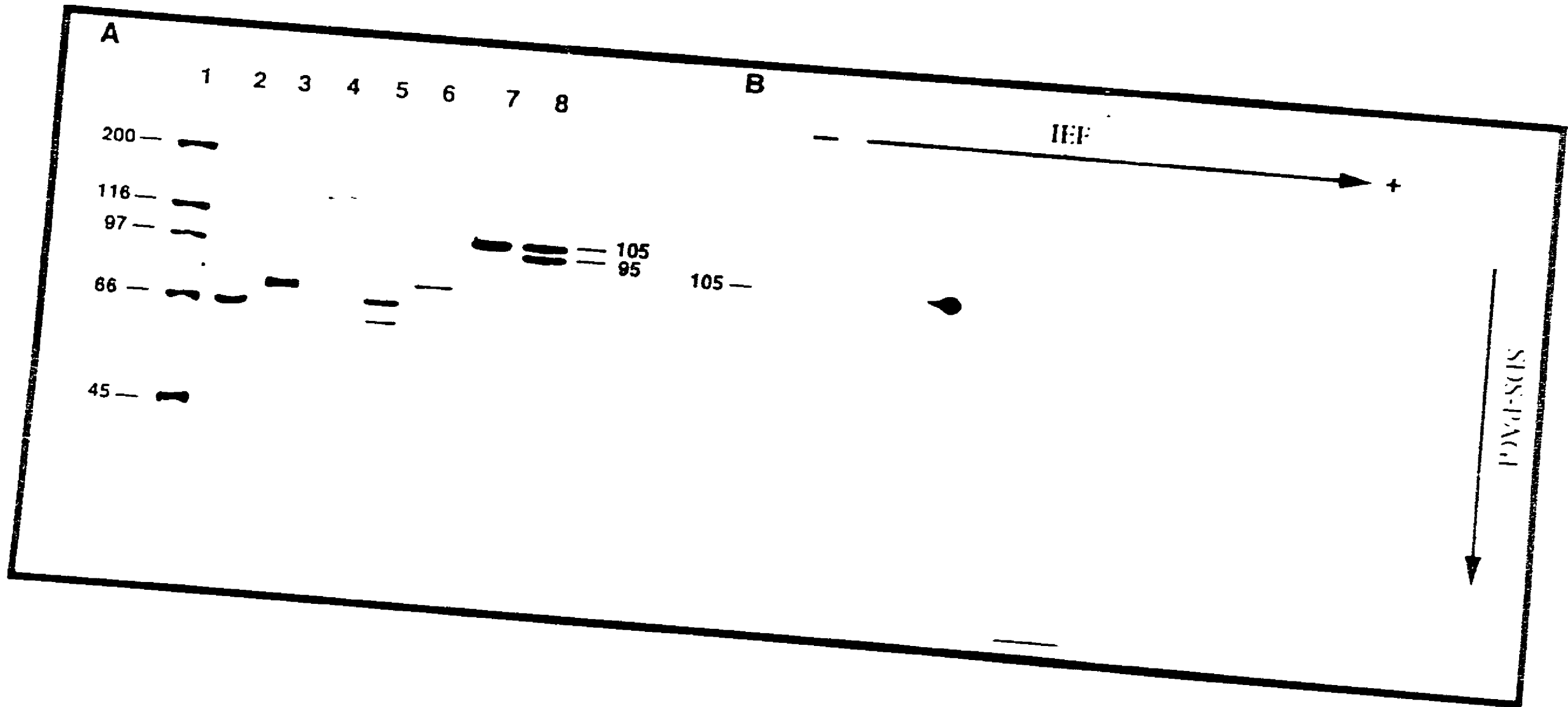


Figure 3.

FALLA DE ORIGEN

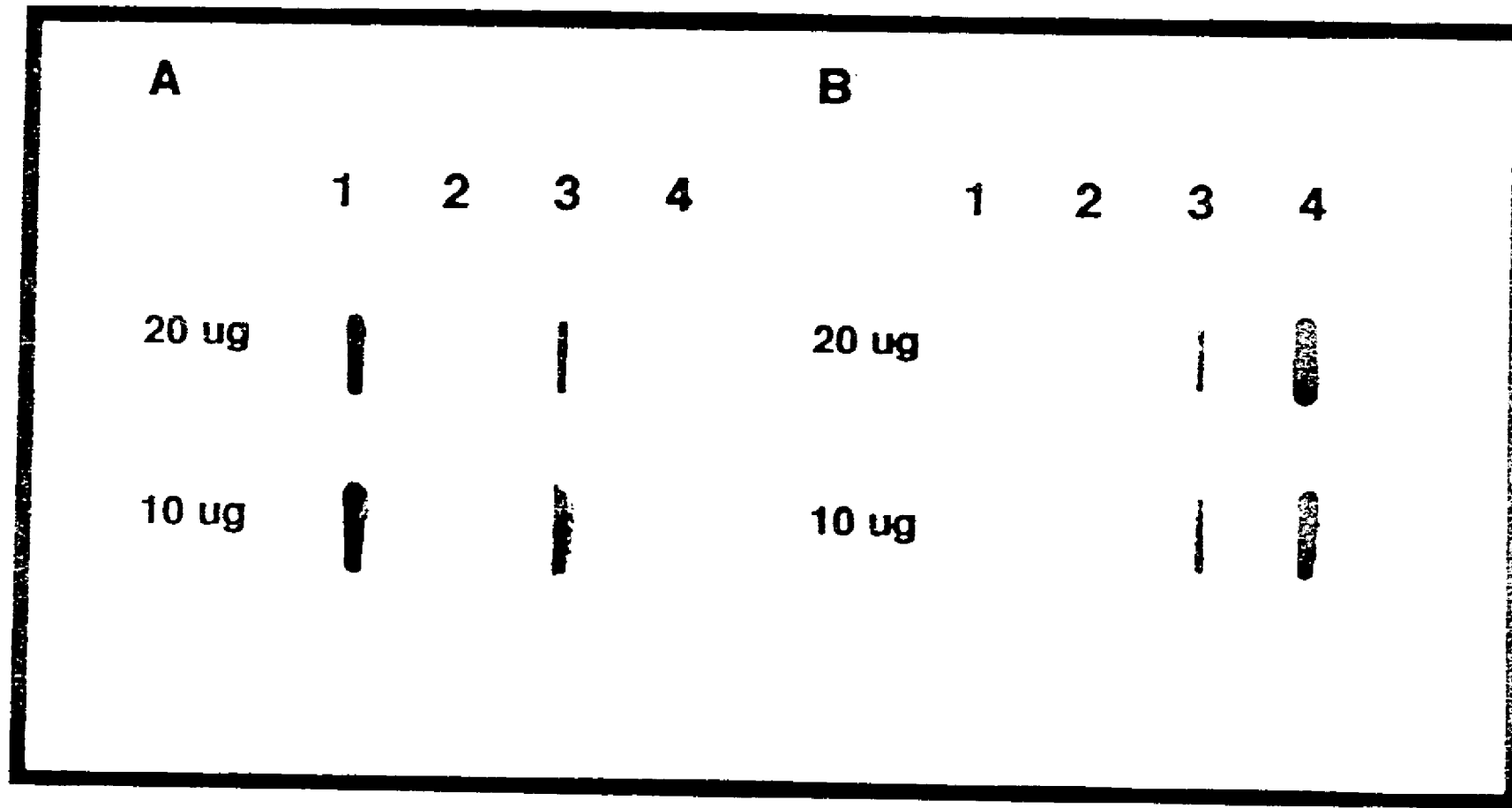


Figure 4.

Screening of *Bacillus thuringiensis* strains with novel insecticidal activities.

Alejandra Bravo*, Jairo Cerón, Eduardo Aranda, Argelia Lorence and Rodolfo Quintero.

* Corresponding author

Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad S/N. Col. Chamilpa. A.P. 510-3 Cuernavaca 72261 Morelos, MEXICO.

ABSTRACT

In this work we present three different strategies directed to the identification of novel insecticidal crystal proteins from large *Bacillus thuringiensis* (*Bt.*) strain collections. The first strategy consists of a PCR analysis designed to identify strains harboring any of the known *cryI* or *cryIII* genes. General primers for those genes have been selected from a highly conserved region between *cryI* and *cryIII* genes. Strains with unique PCR product profiles are easily characterized by additional PCR reactions using specific primers as previously reported (6). By using this methodology, the ten different *cryI* genes and the five *cryIII* genes can be precisely identified. One feature of this screening method, is that with each gene-type it is expected a precise molecular weight product. Genes that produce different size products are likely to represent novel genes.

The second screening methodology, consists on *in vitro* binding analysis of native *Bt.* toxins to midgut tissue sections isolated from a selected target. This methodology allows the identification of toxins that bind saturably to the microvilli of midgut epithelial cells and thus has the potential of been toxic.

Finally, the third strategy consists of the fluorescent determination of the changes in membrane potential produced by *Bt.* toxins on brush border membrane vesicles, isolated from the insect midgut cells. By using this methodology, we could identify toxins that not only interact with their receptor, but also that effect the membrane permeability. This assay correlates with toxicity and could be used routinely to identify toxins with very high potential of been active against a selected pest.

INTRODUCTION

It has been estimated that up to 15% of crops worldwide are lost due to insect damage alone (1). Insecticidal crystal proteins (ICP) from *Bacillus thuringiensis* have been used as biopesticides during the last 30 years; different commercial products are now available and used in the fields. Furthermore, some ICP genes have been introduced into the plant genome, with a high success rate of protection from insect attack (15, 20). The use of *B. thuringiensis* as a microbial insecticide offers several advantages over chemical control agents: ICPs have a highly specific host range that renders them harmless to nontarget insects, vertebrates and the environment. Recently novel isolated strains, which show toxic activity against various organisms (10), have raised the interest in isolating new *B. thuringiensis* bacteria.

Many ICP genes have been cloned, sequenced and classified, based on their homology and specificity (13). Until now, eleven subgroups of *cryI* genes specific to lepidopteran have been characterized and identified. Each *CryI* toxin has a narrow range of toxicity against lepidopteran insects. Five *cryIII* genes specific against coleopteran have been described (10). Both insect orders are some of the most devastating pests in agricultural fields.

The searching of novel *Bt.* genes is a main project worldwide. This will provide different alternatives for insect control and for coping with the problem of insect resistance. In this sense, it is important to have a methodology that allows for a rapid and accurate *Bt.* collection characterization, regarding the known *cry* genes. Also, a screening analysis directed to the identification of the most active toxins against selected pests is necessary. The analysis of ICP toxic activity through bioassay, has proved to be exhaustive and time-consuming process. It is necessary to screen all the isolate in all selected target-insects. Different methodologies have been developed trying to reduce the number of bioassays. The electrophoretic analysis of polymerase chain reaction (PCR) products has proven to be powerful in the identification of the specific insecticidal genes carried by *Bt.* strains (2, 4, 5, 6, 7, 14). Also, PCR has the potential to identify new *cry* genes, as reported by Kalman *et al.* (14) and Chak *et al.* (7), in the identification of novel *cryIC* genes. However, the PCR screening does not provide direct information of the specific insect target of novel genes. Due to this reasons, we have developed two different methodologies directed to identify proteins with a higher potential of been toxic against selected insects. The first one is based on the analysis of *in vitro* binding capacities of ICPs to midgut tissue sections (3). Since binding of toxic ICP to their specific receptor localized in the microvilli of the midgut cells, is one of the first steps in toxicity (11, 21, 22). The second, involved the analysis of ICPs effects on the permeability of brush border membrane vesicles isolated from the target pest. This effect is measured with a fluorescent dye sensitive to changes in membrane potential.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

B. thuringiensis known strains were provided by the *Bacillus* Genetic Stock Center, Ohio State University, Columbus. *B. thuringiensis* strains that express the different CryIIIs proteins were kindly supplied by Dr. Peferoen from Plant Genetic Systems, Belgium. Other *B. thuringiensis* strains had been collected from 1991 until 1994 from Mexican soil samples (6). All bacterial strains were maintained in nutrient agar from Difco.

Oligonucleotides PCR primers

General primers used for detection of *cryI* or *cryIII* genes were selected from the highly conserved regions by using simultaneous alignment of all reported sequences. This survey was done by computer analysis with the Geneworks 2.3 program (Intelligenetics). Table 1 shows the sequence of the four general primers, their location within the respective sequence and the expected molecular weight of the PCR product.

Specific primers used for identification of specific *cryI* (6) and *cryIII* genes were selected from highly variable regions among all genes. The *cryI* specific primers were designed to be used in three different reaction mixtures. Table 2 shows the sequence of each primer, the location and the size of the expected PCR product. To identify *cryIII*-type genes, a single directed primer and five reversed primers were used together in one reaction.

The oligonucleotides were synthesized in a DNA synthesizer (Microsyn 1450A, Systec Inc.) using the manufacturer's reagents and conditions. Each pair of primers is highly specific and gives a PCR product of known size easily identify by an electrophoretic analysis in agarose gels.

Sample preparation and PCR reaction

The *Bt.* strains growth, cellular lysate sample preparation and PCR reaction mixtures were done as previously described (6). Reaction mixture "A" identifies *cryIAa*, *cryIAb* and *cryIAc* genes (primers: CJ1-to CJ7); mixture "B" identifies *cryIB*, *cryIC* and *cryID* genes (primers: CJ8 to CJ13); mixture "C" has the specific primers for detection of *cryIE*, *cryIF* and *cryIG* genes (primers: CJ14 to CJ19); reaction mixture "D" contains the four general primers (CJ1-1, C JI-2, CJ20 and CJ21). The amplification was done in a DNA thermal cycler (Omnigene HB-TR3 Hybaid, Teddington, Middlesex, U.K.) using a single denaturalization step of 2 min at 95 °C, followed by step cycle program set for 30 cycles (with a cycle constituted of denaturalization at 95 °C for 1 min, annealing at 48 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min); an extra step of extension at 72 °C during 5 min was finally performed. A total of 15 µl of each PCR reaction mix was electrophoresed on a 3% agarose gel in 0.5X Tris-borate buffer at 250V during 30-35 min, stained with ethidium bromide and photographed. A molecular weight marker pBR322 previously digested with *Hinf* I was used.

Crystal protein purification

Crystalline inclusions were purified from spores and cell debris by centrifugation in discontinuous sucrose gradients as described (18). The sucrose gradient used was 67%, 72%, 79%, 84% and 90%. The crystal inclusion bodies were solubilized, activated and purified as in (12).

Biotinylation of δ - endotoxins

Purified *Bt.* toxins were dialyzed against borate buffer 0.2M and incubated one h at room temperature with the biotinylation-N-hydroxysuccinimide (Amersham). Biotinylated toxin was separated from free biotin by a sephadex G-25 column as described (9).

Tissue preparation and *in vitro* binding assay.

Midgut tissues were isolated from *Spodoptera frugiperda* last instar larvae. They were fixed and embedded in paraplast as previously reported (3). The *in vitro* binding assay and immunocytochemical staining using different monoclonal antibodies, were done also as previously reported (3).

In vitro binding assays using the biotinylation toxin was done as reported (8, 9). Detection of bound toxin was done with the streptavidine-peroxidase conjugated and revealed with diaminobenzidine 25 mg/100 ml and H₂O₂.

Preparation of the brush border membrane vesicles

BBMV from 5th instar *S. frugiperda* larvae were prepared as reported (23). The vesicles were dialyzed overnight against 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5 (Sigma, St. Louis, MO) and sonicated for six 30 sec periods at 25 °C (BRANSON 1200 sonic bath, Danbury, CT) in the same solution.

Fluorescence measurements

Membrane potential was monitored with the fluorescent positively charged dye, 3,3'-dipropylthiodicarbocyanine (Dis-C₃-(5) 1.5 μ M final, 1 mM stock in DMSO, Molecular Probes, Eugene, OR). Fluorescence was recorded at the 620/670 excitation/emission wavelength pair using a Hansatech system (Norfolk, England), as in (16). Hyperpolarization causes internalization of the dye into the BBMV and fluorescence decrease; depolarization causes the opposite effect. Dye calibration and determination of resting membrane potential were done in the presence of valinomycin (2 μ M), by successive additions of KCl to BBMV (20 μ g) suspended in various media (700 μ l). Treatment with a mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hydrazone (FCCP, Calbiochem, 1 μ M final) or the mitochondrial ATPase inhibitor oligomycin (Sigma, 0.5 μ M final) did not alter the resting potentials, the calibration nor the toxin responses, showing the absence of a significant mitochondrial contamination (data not shown). All determinations were made at 30 °C with constant stirring. Time 0 (t_0) was considered when BBMV were added and the KCl additions were made after 9 min. Cation substitutions in the incubation buffer were made by replacing the *N*-methyl-D-glucamine chloride (MeGluCl) by NaCl (mole per mole), maintaining osmolarity (~150-160 mOsm).

RESULTS AND DISCUSSION

PCR screening

The PCR was used to survey a number of *B.thuringiensis* strains for their *cry* gene content. One set of two primer pairs (Table 1) was used to detect in one reaction, the strains that harbor any of the *cryI*'s or the *cryIII*'s genes. The expected PCR-product molecular weight for the *cryI*'s genes ranges between 272 and 290 bp., while for *cryIII*'s genes range between 688 and 743 bp. This survey has proven to be very fast and highly specific. Figure 1 shows the results obtained with different *cryI*'s (panel A) and *cryIII*'s (panel B) control strains. Figure 1 also shows the PCR products obtained with different native *B.thuringiensis* strains (panel C) isolated from different areas (6). We have isolated ~2000 *Bt* strains, from mexican soil samples. The 40% of these collection has been analyzed by the PCR and ELISA methodologies. These studies showed that ~30% of the strains corresponds to CryI type producing strains, ~25% corresponds to CryIV or CryII producing strains, 5% to the CryIII type and ~40% could not be classified in any of the four main Cry-groups.

An additional PCR survey was done with selected strains, in order to identify the specific *cryI* or *cryIII* genes carried by them. Three mixture reactions, described in Materials and Methods, were used (Table 2). By this analysis, the specific *cryI*'s genes carried by a particular strain were identify, based on the sizes of generated PCR products. We have identified a strain that harbors a different *cryI* gene. This strain (IB31) produced an unexpected size product of 320 bp., when assayed with the PCR reaction mixture C (figure 2, panel A). Further analysis, revealed that this PCR product, was obtained with primers CJ15 (specific for *cryIE* gene) and CJ18 (specific for *cryIG* gene).

The specific *cryIII*-gene type contained in selected strains was also analyzed (figure 2, panel B). Strains IB1, IB17 and IB26 contained the *cryIIIA* gene, while strain IB31 contained a different *cryIII* gene. Since this strain produces a PCR product of unexpected size, 215 bp. This fragment is produced when the directed constant primer was used with the reversed *cryIIIC* primer.

Analysis of the crystal proteins from IB31 strain.

The crystal inclusion produced by IB31 strain is composed by two different proteins, of 103 and 105 kDa, the single trypsin-resistant polypeptide has a molecular weight of 90 kDa. Immunoblotting experiments showed that this strain produced a crystal inclusion proteins that cross-react with three specific monoclonal antisera, raised against purified CryIA, CryIE or CryIIIA toxins. We do not know its specificity in the insecticidal activity, but definitely the crystal inclusion of IB31 strain is composed by novel Cry proteins.

The screening procedure by PCR allows the characterization of a *Bt.* strain collection, in regard to the known *cry* genes. Any way, it does not identify the insecticidal properties of the novel proteins, neither the protein with the highest toxic activity against a selected pest.

The results presented here showed that with this methodology it is possible to find novel *cry* genes. However, the PCR methodology is not able to identify all the new genes from a *B. thuringiensis* collection. A great limitation is that if the novel gene does not have any of the primer sequences, no PCR product will be produced and would be missed. Also, if the novel gene has an identical sequence in the region between the primers, but a different sequence in other regions important for specificity, it would be undetected.

Analysis of *in vitro* binding to midgut tissue sections.

A correlation between toxicity and binding of ICPs to the apical microvilli in midgut tissue sections, has been demonstrated with different lepidopteran (*Manduca sexta*, *Plutella xilostella*, *Ostrinia nubilalis*) (3, 8) and coleopteran (*Leptinotarsa decemlineata*) (3) insects. This methodology has eliminated the need for large numbers of larvae to be dissected and have allowed binding studies to be done with single insects. Also, this methodology has proven to be very useful in the screening for novel insecticidal activities. Principally with insects species that present problems in bioassays because of their small size or difficult rearing conditions. The toxins that bind, are the ones that have the higher potential of been toxic. The toxic activity should be proven by bioassay. By using this methodology we have found toxins that are toxic to *Diatraea grandiocella*, *Spodoptera frugiperda* and against the aphid *Rhopalosiphum maidis*. The proteins to be tested should be recognized by specific antibodies. As an alternative they can be labeled with biotin, to be detected subsequently with streptavidin coupled to the peroxidase enzyme. The binding studies using biotinylated toxins allow to carry on homologous and heterologous competition experiments. The homologous competition experiments identifies ICP toxins that bind to specific and saturable binding sites located in the microvilli. We found that in *Spodoptera frugiperda* larvae, there are several δ -endotoxins that bound to the microvilli. But only those that showed saturable specific-binding, kill the larvae. The CryIAb and CryIAC toxins bind very well in the *in vitro* binding assay to the microvilli of *Spodoptera frugiperda* midgut epithelium cells (Figure 3A). In this insect: only the CryIC and CryID toxins showed high insecticidal activity (LD_{50} of 31.2 ng/cm^2 with a 18-48 Cl_{95} and 77.6 ng/cm^2 with a 17-147 Cl_{95} , respectively), whereas the CryIAa, CryIAb and CryIA(c) and CryIIIA toxins showed no activity. Homologous competition experiments, performed between unlabeled CryIAb and biotinylated CryIAb toxin, showed that 300 fold more unlabeled CryIAb is not able to compete for the toxin binding site (Figure 3B). This data suggest that CryIAb toxin binds insaturably and inespecifically to the brush border membrane. In contrast, CryIC toxin binds to a saturable site (Figure 3C), since the 100 fold more unlabeled CryIC toxin competes for the binding site (Figure 3D).

The analysis of homologous competition experiment in the midgut tissue sections has proven to be helpful in the identification of δ -endotoxins potentially toxic against the selected larvae.

Analysis of the effects on the permeability of brush border membrane vesicles.

Changes in membrane permeability can be measured fluorometrically with a fluorescent dye sensitive to changes in membrane potential. We have developed this system with brush border membrane vesicles isolated from *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* or *Trichoplusia ni* larvae midgut cells. Uemura *et al.* (1992) (19) have worked with a similar system with vesicles from *Bombyx mori*. In all experiments, toxic ICPs produced an effect on ion transportation, while not toxic ICPs were not able to do so. This is a fast system that allows the analysis of different samples in the same day. The advantage of this system is the reduced number of false positive, since here the toxin interacts with its receptor and with the membrane, producing an alteration in permeability. The toxins that could modify the permeability of the vesicles have a higher potential of being toxic.

Spodoptera frugiperda midgut brush border membrane vesicles have been isolated from last instar larvae. We found that addition of 100 nM of either of the active toxins (CryIC or CryID) (approximately 2.5 pmol toxin μg BBMV protein) to

BBMV, suspended in 140 mM MeGluCl, produced a fast hyperpolarization. Also, after toxin exposure, the vesicles increased their response to KCl additions, when compared to the control in which the same amount of buffer was added (Fig. 4A). The hyperpolarization (9 ± 3 mV, $n=23$) and the higher sensitivity of the vesicles to external K^+ are consistent with a toxin induced increase in K^+ permeability possibly mediated by ion channel opening.

To explore the selectivity of CryIC and CryID toxins response in *S. frugiperda* BBMV, MeGluCl was replaced by NaCl in the external media. Under this condition which is more close to physiological conditions, both CryIC and CryID toxins induced a depolarization (Fig. 4B). This response is due to the electrogenic uptake of Na^+ and suggests that the toxin-induced permeability pathway is not very selective among monovalent cations.

The present work presents additional evidence that BBMV contain a functional *Bt.* toxin receptor. Also, that ICP after interacting with their receptors, induce an increase in cation membrane permeability. The responses were observed at toxin concentrations (nM) which correlate with the *in vivo* lethal doses and with the range needed to inhibit aminoacid uptake into BBMV of others insects (17).

In order to search novel δ -endotoxin genes from a *Bt* strain collection, it is necessary to perform different selection methodologies. The PCR methodology provide information on which δ -endotoxin genes are carried by a each strain. Known genes could be easily identify. Some novel genes could be selected by this methodology but the probability to find a new gene exclusively by the PCR methodology are low. Also, this methodology would not give any information regarding the insecticidal rage of the novel gene. In order to detect specific proteins with potential to kill a selected pest, two different methodologies could be used. One involve the selection of toxins that bind saturable to the midgut brush border membrane. This technique is useful especially when the insects are very small or difficult to rear. The other technique, studies the effects of toxins on the permeability properties of membrane vesicles isolated from midgut cells. Midgut brush border vesicles should be prepared from the selected pest, so it will be difficult to do with very small insects. This analysis is relatively fast and will provide accurately data in the selection of the toxin with higher potential to kill the insect.

Acknowledgements

We thank Myriam Ortiz, Anabel Ortiz and Jorge Sanchez for technical assistance, Dr. M. Peferoen for providing monoclonal antibodies and *E. coli* strains, and Laura Lina for performing the bioassays. This work was partially supported by DGAPA and CONACyT.

Figure 1.- Analysis by agarose (3%) gel electrophoresis of PCR products obtained by using the general *cryI* and general *cryIII* primers pairs.

Panel A: lane 1 molecular weight marker, lane 2 HD1 strain (*cryIA's*), lane 3 HD73 strain (*cryIAc*), lane 4 HD137 strain (*cryIAa, IC, ID*), lane 5 IB43 strain (*cryIB*), lane 6 *Escherichia coli cryIC* strain, lane 7 *E. coli cryID* strain, lane 9 PS81 strain (*cryIF*).

Panel B: lane 1 MW marker, lane 2 *Bt cryIIIA*, lane 3 *Bt cryIIIB*, lane 4 *Bt cryIIIC*, lane 5 *Bt cryIIID*, lane 6 *Bt cryIIIE*.

Panel C: Analysis with native strains, lane 1 MW marker, lane 2 IB127 strain, lane 3 IB129 strain, lane 4 IB144 strain, lane 5 IB148 strain, lane 6 IB152 strain, lane 7 IB153 strain, lane 8 and lane 9 IB31 strain, lane 9 IB17 strain.

Figure 2.- Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained with specific primers.

Panel A: Analysis using specific *cryI* primers, mixture C. line 1 MW marker, lane 2 HD125 strain (*cryIE*), lane 3 PS81 strain (*cryIF*), line 4 IB31 strain.

Panel B: Analysis using specific *cryIII* primers. line 1 MW marker, line 2 *Bt cryIIIA* strain, line 3 *Bt cryIIIB* strain, lane 4 *Bt cryIIIC* strain, lane 5 *Bt cryIIID* strain, lane 6 *Bt cryIIIE* strain, line 7 IB17 strain, line 8 IB31 strain.

Figure 3.- Localization of biotinyne-labeled Cry toxins with streptavidin coupled to peroxidase enzyme in *Spodoptera frugiperda* midgut tissue sections. *In vitro* binding experiments were done as described in Materials and methods.

Panel A: Binding of biotinylated CryIAb toxin.

Panel B: Homologous competition experiment between biotinyne labeled CryIAb and unlabeled CryIAb toxins(1:300).

Panel C: Binding of biotinylated CryIC toxin.

Panel D: Homologous competition experiment between biotinyne labeled CryIC and unlabeled CryIC toxins(1:100).

Figure 4.- Changes in membrane potential of *Spodoptera frugiperda* brush border membrane vesicles, measured with the fluorescent dye DiSC3-(5). Fluorescence was recorded at 620/670 excitation/emission wavelength pair. Hyperpolarization causes internalization of the dye into the BBMV and fluorescent decrease; depolarization causes the opposite effect.

Panel A: CryID response of BBMV suspended in 140 mM methylglucamine chloride, 10 mM Hepes pH7.5. In control same amount of buffer was added.

Final K^+ concentration were (mM): 1=4; 2=13; 3=30; 4=64; 5=133.

Panel B: CryIC and CryID effects in BBMV suspended in 10 mM KCL, 130 mM NaCl, 10 mM Hepes pH 7.5. Control trace was obtained with buffer addition as well as with CryIIIA, CryIAc and boiled CryIC and CryID toxins. Final K^+ concentration were (mM): 1=23; 2=44; 3=85; 4=165; 5=367.

REFERENCES

1. Boulter, D., A. M. R. Gatehouse, and V. Hilder. 1989. Use of cowpea trypsin inhibitor (CPTI) to protect plants against insect predation. *Biotechnol. Adv.* 7:489-497.
2. Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *App. Environ. Microbiol.* 59:523-527.
3. Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, and M. Peferoen. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Path.* 60:247-253.
4. Brousseau, R., A. Saint-Onge, G. Prefontaine, L. Masson, and J. Cabana. 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *App. Environ. Microbiol.* 59:114-119.
5. 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. *App. Environ. Microbiol.* 57:3057-3061.
6. Cerón, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *App. Environ. Microbiol.* 60:353-356.
7. Chak, K. F., D. C. Chao, M. Y. Tseng, S. S. Kao, S. J. Tuan, and T. Y. Feng. 1994. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *App. Environ. Microbiol.* 60:2415-2420.
8. Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, and J. V. Rie. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *App. Environ. Microbiol.* 59:1828-1837.
9. Denolf, P., S. Jansens, S. VanHoudt, M. Peferoen, D. Degheele, and J. V. Rie. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *App. Environ. Microbiol.* 59:
10. Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology* 10:271-275.
11. Hofmann, C., H. Vandrebruggen, H. Höfte, J. VanRie, S. Jansens, and H. Van-Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.
12. Höfte, H., H. Greve, J. Seurink, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, M. V. Montagu, M. Zabeau,

- and M. Vaeck. 1986. Structural and Functional Analysis of a Cloned Delta Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* 161:272-280.
13. Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
14. Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs, and T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel *cry/C*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *App. Environ. Microbiol.* 59:1131-1137.
15. Perlak, F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate, and D. A. Fihshoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/technology* 8:939-943.
16. Reynaud, E., L. d. D. I. torre, O. Zapata, A. Lievano, and A. Darszon. 1993. Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS letters.* 329:210-214.
17. Sacchi, V. F., P. Parenti, G. M. Hanozet, B. Giordana, P. Lüthy, and M. G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS letters* 204:213-218.
18. Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin : effect in insect and mammalian cells *in vitro*. *J. Cell. Sci.* 60:181-197.
19. Uemura, T., H. Ihara, A. Wadano, and M. Himeno. 1992. Fluorimetric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biosci.Biotech.Biochem.* 56:1976-1979.
20. Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Höfte, S. Jansens, M. Debeuckeller, C. dean, M. Zabeau, M. VanMontagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328:33-37.
21. Van-Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Deghelle, and H. Van-Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *App. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
22. Van-Rie, J., S.Jansens, H. Höfte, D. Degheele, and H. Van-Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
23. Wolfersberger, M., P. Luethy, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana, and G. M. Hanozet. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A:301-308.

Primer sequences	Gene Recognized	Position	Product size (bp)
5'TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA 5'TATCGGTTTCTGGGAAGTA	<i>cryIAa</i>	3168, 3341	272
"	<i>cryIAb</i>	3108, 3391	284
"	<i>cryIAc</i>	3189, 3460	272
"	<i>cryIB</i>	3321, 3610	290
"	<i>cryIC</i>	3210, 3493	284
"	<i>cryID</i>	3138, 3421	284
"	<i>cryIE</i>	3165, 3439	275
"	<i>cryIF</i>	3165, 3448	284
5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA 5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	<i>cryIIIA</i>	794, 1481	688
"	<i>cryIIIB</i>	821, 1514	694
"	<i>cryIIIC</i>	767, 1445	679
"	<i>cryIIID</i>	788, 1490	703
"	<i>cryIIIC74</i>	796, 1490	694
"	<i>cryIIIE</i>	800, 1547	747

Table 1.- Characteristics of general primers used.

Primer	Sequence	Gene recognized	Position	Product size (bp)
CJ1	5'TTATACTTGGTTCAGGCCC	cryIAa	1105, 1351	246
CJ2	5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	cryIAd		
CJ4	5'AACAACCTATCTGTTCTTGAC	cryIAb	1133, 1348	216
CJ5	5'CTCTTATTATACTTACACTAC	cryIAc		
CJ6	5'GTTAGATTAAATAGTAGTGG	cryIAc	1495, 1674	180
CJ7	5'TGTAGCTGGTACTGTATT			
CJ8	5'CTTCATCACGATGGAGTAA	cryIB	1007, 1374	367
CJ9	5'CATAATTTGGTTCGTTCTGTI			
CJ10	5'AAAGATCTGGAACACCTTT	cryIC	1306, 1436	130
CJ11	5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC			
CJ12	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA	cryID	837, 1127	290
CJ13	5'ATTTGAATTGTCAAGGCCTG			
CJ14	5'GGAACCAAGACGAACTATTG	cryIE	1029, 1174	147
CJ15	5'GGTTGAATGAACCCTACTCC			
CJ16	5'TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC	cryIF	813, 989	177
CJ17	5'CGGTTACCAGCCGTATTTC			
CJ18	5'ATATGGAGTGAATAGGGCG	cryIG	1778, 2012	235
CJ19	TGAACGGCGATTACATGC			

Table 2.- Characteristics of *cryI* specific primers used.

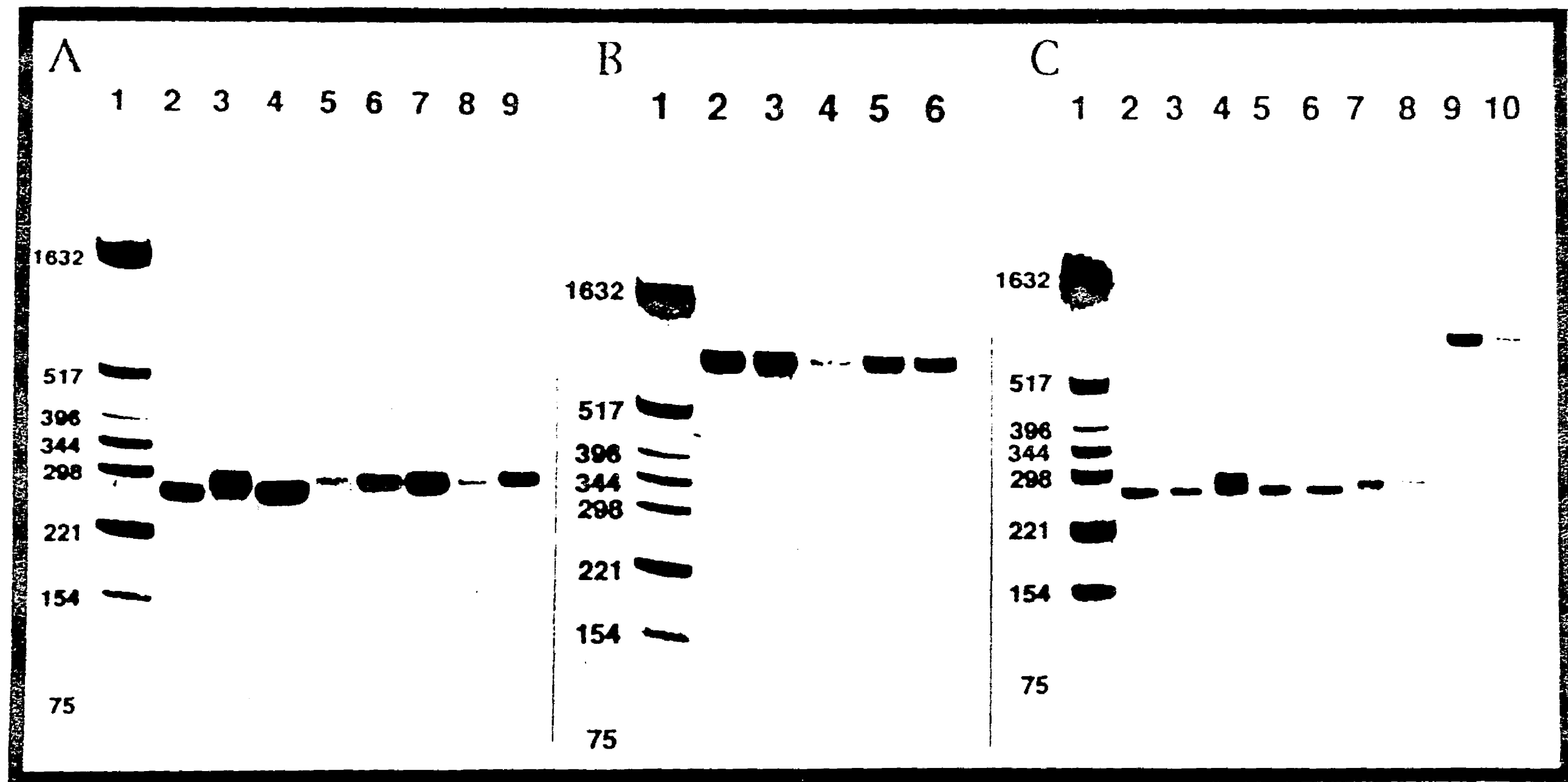


Figure 1.

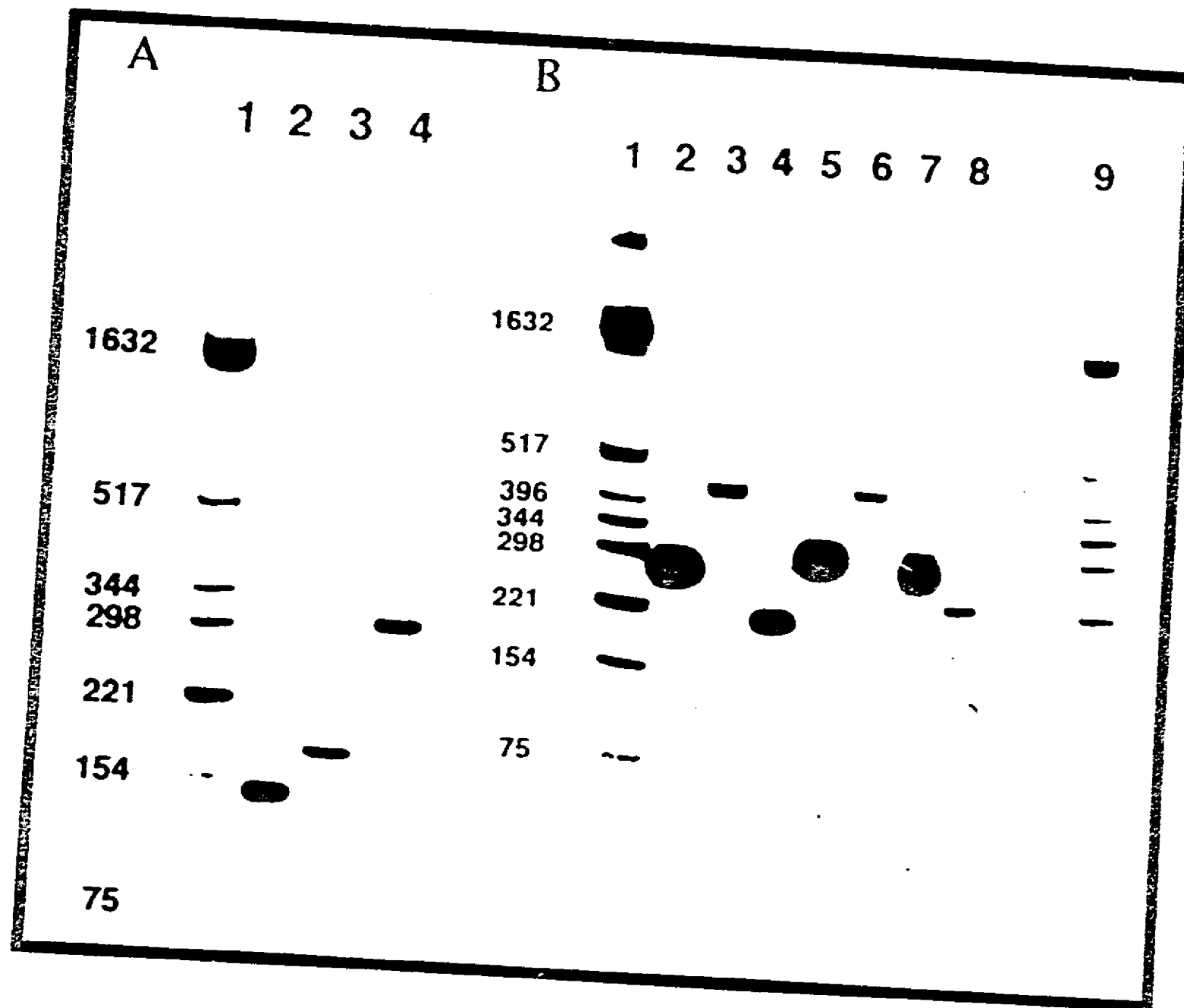


Figure 2.

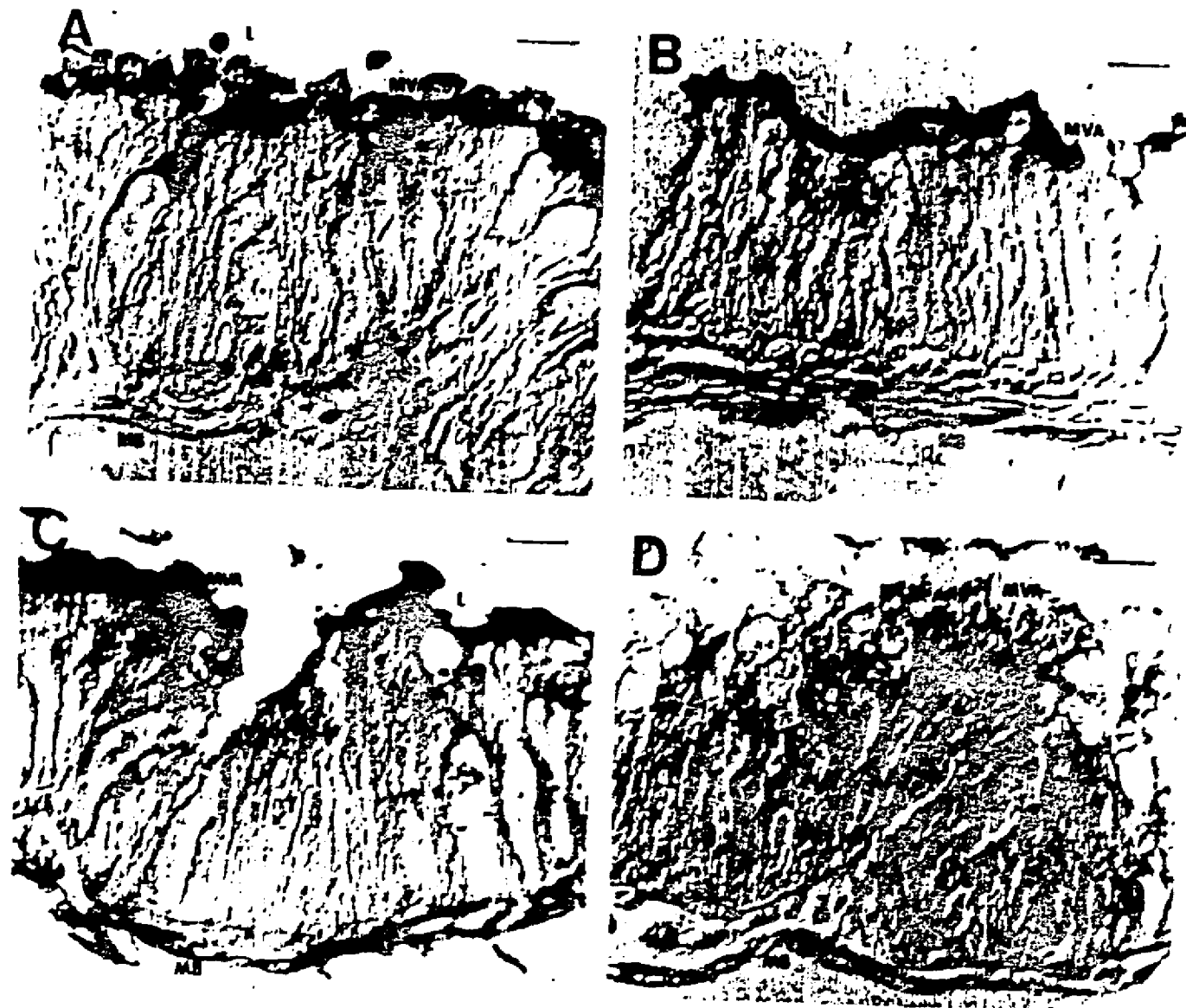


Figure 3.

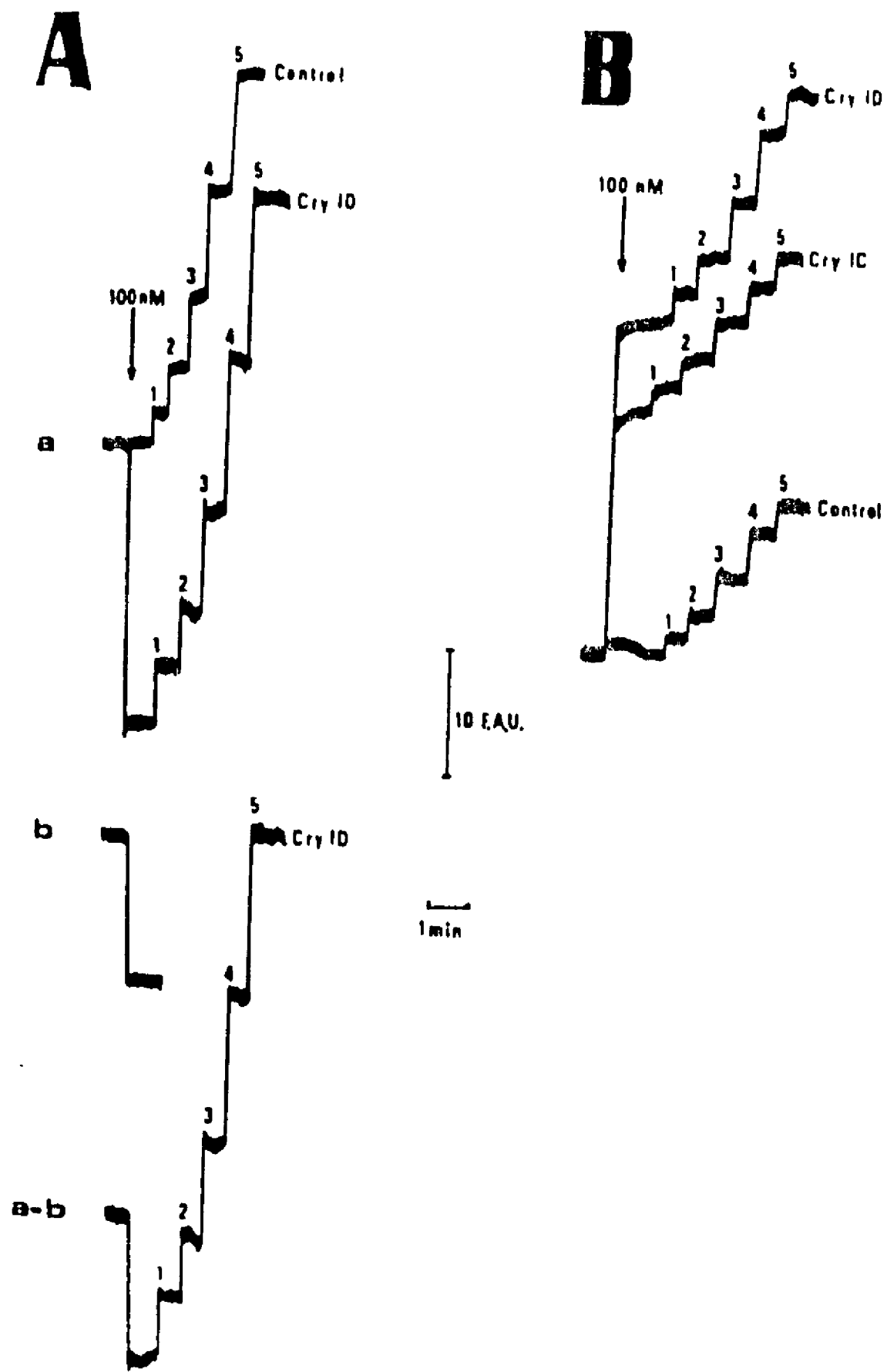


Figure 4.

FALLA DE ORIGEN

IV. DISCUSION

La pregunta planteada es:

¿Se puede establecer un método más práctico, que posea alta capacidad de resolución, el cual permita diferenciar categoricamente proteínas muy parecidas e identificar a las subclases?

Para responder esta pregunta nos planteamos como objetivo: Desarrollar un sistema de búsqueda y caracterización de nuevos genes de δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, mediante la utilización de la técnica del PCR, el cual fué cumplido totalmente, como se aprecia a continuación.

En este trabajo se presentó el desarrollo de una estrategia para la caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*, utilizando la técnica del PCR, con la potencialidad de encontrar nuevos genes. Al caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* se puede conocer que clase de genes de δ -endotoxina posee una cepa; permitiendo así predecir su actividad insecticida ya que cada δ -endotoxina tiene un rango de acción determinado.

Se han diseñado 35 oligonucleótidos específicos, que están agrupados en 5 diferentes mezclas A, B, C, D y E (tablas 2, 3 y 4) y en cada reacción de PCR se usa una sola de ellas. Estas 5 diferentes mezclas fueron seleccionadas para amplificar fragmentos de DNA de tamaño definido para las clases CryI o CryIII y sus subclases respectivas.

Fueron aisladas 2000 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*; a partir de muestras de suelo de diferentes partes de la República Mexicana; el 40% de esta colección fue analizado usando la técnica de ELISA, utilizando diferentes anticuerpos policlonales (anti-CryI, anti-CryII, anti-CryIII y anti-CryIV). Este análisis mostró que aproximadamente el 12% de las cepas corresponde a cepas pertenecientes al grupo CryI, el 35% a los grupos CryII y CryIV y el 1% al grupo CryIII. En este mismo análisis se encontró que el 40% de las cepas no cruzaron con ninguno de los anticuerpos policlonales utilizados, no obstante que todas ellas producen cuerpos de inclusión. Sabemos que estos anticuerpos policlonales no cruzan con todas las proteínas Cry descritas, es por eso que dentro de este

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos específicos de genes *cryI*

Oligo N°	Secuencia	Gen Reconocido	Posición	Producto tamaño(bp)
Mezcla A				
CJ1	5' TTATACTTGGTTCAGGCC	<i>cryIAa</i>	1105-1125	
CJ2	5' TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	<i>cryIAd</i>	1332-1351	246
CJ3	5' CAGCCGATTTACCTTCTA		1181-1198	
CJ2	5' TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	<i>cryIAd</i>	1332-1351	171
CJ4	5' AACAACTATCTGTTCTTGAC		1133-1153	
CJ5	5' CTCTTATTATACTTACTACTAC	<i>cryIAb</i>	1328-1348	216
CJ6	5' GTTAGATTAATAGTAGTGG		1495-1514	
CJ5	5' TGTAGCTGGTACTGTATTG	<i>cryIAC</i>	1656-1674	180
Mezcla B				
CJ8	5' CTTTCATCACGATGGAGTAA		1007-1025	
CJ9	5' CATAATTTGGTCGTTCTGTT	<i>cryIB</i>	1355-1374	367
CJ10	5' AAAGATCTGGAACACCTTT		1306-1325	
CJ11	5' CAAACTCTAAATCCTTTCAC	<i>cryIC</i>	1416-1436	130
CJ12	5' CTGCAGCAAGCTATCCAA		837-856	
CJ13	5' ATTTGAATTGTCAAGGCCTG	<i>cryID</i>	1107-1127	290
Mezcla C				
CJ14	5' GGAACCAAGACGAACTATTGC		1029-1049	
CJ15	5' GGTTGAATGAACCCTACTCCC	<i>cryIE</i>	1154-1174	147
CJ16	5' TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC		813-833	
CJ17	5' CGGTTACCAGCCGTATTTCCG	<i>cryIF</i>	970-989	177
CJ18	5' ATATGGAGTGAATAGGGCG		1778-1796	
CJ19	5' TGAACGGCGATTACATGC	<i>cryIG</i>	1994-2012	235

Tabla 3. Características de los oligonucleótidos generales de genes *cryI* y *cryIII*

Mezcla D

Oligo N°	Secuencia	Gen Reconocido	Posición	Producto tamaño(bp)	
CJI-1	5' TGTAGAAGAGGAAGTCTATCCA	<i>cryIAa</i>	3168-3343	272	
CJI-2	5' TATCGGTTTCTGGGAAGTA		<i>cryIAb</i>	3108-3392	284
			<i>cryIAc</i>	3189-3460	272
			<i>cryIB</i>	3321-3610	290
			<i>cryIC</i>	3210-3493	284
			<i>cryID</i>	3138-3421	284
			<i>cryIE</i>	3165-3439	275
			<i>cryIF</i>	3165-3449	284
CJIII20	5' TTAACCGTTTTTCGCAGAGA		<i>cryIIIA</i>	794-1481	688
CJIII21	5' TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG			<i>cryIIIB</i>	821-1514
		<i>cryIIICgall</i>		767-1445	679
		<i>cryIIID</i>		788-1490	703
		<i>cryIIIC</i>		796-1490	694
		<i>cryIIIE</i>		800-1547	747

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos específicos de genes *cryIII*

Oligo N°	Secuencia	Gen Reconocido	Posición	Producto tamaño(bp)
Mezcla E				
CJIIIcte 22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIA</i>	1460-1482	283
CJIIIA23	5' CCCCCTCTAAACTGAGTG		1726-1744	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIB</i>	1493-1515	435
CJIIIB24	5' AACGAAAGATTCTGCTCC		1912-1929	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIC</i>	1469-1471	535
CJIIIC25	5' CCTATTCTTTCATTTTGACC		1984-2003	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIIC-gall</i>	1424-1446	211
CJIIICg26	5' AGTGGAGAGTTTACGGTAGCC		1614-1634	
CJIIIcte22	5' CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC	<i>cryIIID</i>	1469-1471	312
CJIIID27	5' CGAAATACAAATACTATGAG		1759-1780	
CJIIIE28	5' TGACAAGTACTGGATTCTGCAA	<i>cryIIIE</i>	944-966	394
CJIIIE29	5' GTTGTTGATGAGGTTCCCCTT		1316-1337	

grupo se encuentran las proteínas Cry que no son reconocidas por estos anticuerpos así como las proteínas nuevas.

El grupo de cepas que fueron clasificadas por ELISA como cepas tipo Cry fueron analizadas por la técnica de PCR usando oligonucleótidos generales para reconocer todos los genes tipo *cryI* y *cryIII* (mezcla D). Todas las cepas analizadas presentaron el fragmento del tamaño correspondiente para genes tipo *cryI* mientras que ninguna presentó el fragmento esperado para genes tipo *cryIII*. Esto comprueba la especificidad de los oligonucleótidos generales para genes *cryI* y *cryIII*.

Para conocer a que subclase pertenecen las cepas agrupadas en tipo CryI, se realizó un segundo análisis de PCR, utilizando las tres mezclas de oligonucleótidos específicos para reconocer los subgrupos de genes *cryI* (desde *cryIA* hasta *cryIG*; mezclas A,B,C). Se encontraron 12 diferentes patrones de genes tipo *cryI* presentes en la colección de cepas mexicanas:

Grupo	Genes									%
	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIAc</i>	<i>cryIB</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>	<i>cryIE</i>	<i>cryIF</i>	<i>CryIG</i>	
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	20
3	+	+	+	-	+	-	-	-	-	9
4	+	+	+	-	+	+	-	-	-	1
5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	14
7	+	+	+	-	+	+	-	+	-	1
8	+	+	-	-	+	+	-	-	-	14
9	+	+	-	+	-	-	-	-	-	33
10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1
11	+	-	-	-	+	+	-	-	-	1
12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	4

De las cepas que no cruzaron con ninguno de los anticuerpos policlonales utilizados, aproximadamente el 4% presentó un fragmento del tamaño definido para genes *cryI* y el 1% mostró un fragmento del tamaño definido para genes *cryIII*, indicando una mayor sensibilidad del método de PCR frente a la técnica de ELISA.

En la colección sólo se ha encontrado hasta el momento una cepa que porta el gen *cryIF* y ninguna que posea el gen *cryIE* o *cryIG*., lo que significa que estos genes están muy poco representados en los suelos mexicanos.

Para validar este sistema de caracterización se realizaron bioensayos con cepas representativas de los perfiles anteriormente descritos, usando larvas de *Spodoptera frugiperda*, encontrando que las cepas que portan los genes *cryIC* y *cryID* presentaron mayor actividad contra este insecto, tal y como se reporta en la literatura (44,45,46).

Cabe mencionar que al realizar este análisis encontramos una cepa que produce un producto de PCR de tamaño no esperado al utilizar tanto los oligonucleótidos de la mezcla C, correspondiente a los genes específicos de *cryI(E,FyG)*, como con la mezcla E correspondiente a los genes específicos de *cryIII*. Estudios posteriores de esta cepa indican que efectivamente se trata de una nueva δ -endotoxina que tiene un peso de 105 KDa el cual no corresponde con el peso de ninguna otra proteína Cry y que forma un cristal bipiramidal del doble del largo de los cristales típicos de las cepas CryI. La especificidad de esta cepa aún no la conocemos, pero definitivamente se trata de un nuevo gen *cry* que porta secuencias parecidas a genes de *cryIE*, *cryIG* y *cryIIIC*; la secuencia de este gen nos aportará información sobre la naturaleza de este gen.

Se cuenta con una potente herramienta que permite caracterizar colecciones de cepas de *Bacillus thuringiensis*, con la potencialidad de encontrar nuevos genes con actividades no descritas, ya que cuenta con las siguientes ventajas: es práctico, rápido, seguro, específico, no genera falsos positivos, es reproducible y se puede utilizar como proceso de rutina.

Las limitaciones de este sistema son:

1-Existe la posibilidad de que algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* no den ningún producto de PCR al utilizar los oligonucleótidos que reconocen a los genes de las clases *cryI* y *cryIII*, pero que produzcan un cristal visible al microscopio. Esto ocurriría en el caso de cepas que portan genes de otra clase y no poseen genes de las clases *cryI* y *cryIII*. Una alternativa que podría utilizarse para resolver este problema, es determinar si estas nuevas cepas producen proteínas pertenecientes a la familia Cry; para esto se pueden diseñar oligonucleótidos que reconozcan y diferencien a genes de las otras cuatro clases restantes: *cryII*, *cryIV*, *cryV* y *cryVI*, pero en el caso de *cryV* se necesitarían 8 oligonucleótidos, ya que en esta clase hay 4 subclases; al realizar alineamientos múltiples con las secuencias de estos genes reportados no hay zonas conservadas entre ellos, lo cual dificulta el diseño de un solo par de oligonucleótidos que reconozcan zonas conservadas entre todos ellos y que amplifiquen un producto de tamaño definido para esta clase. Para las clases *cryII*, *cryIV* y *cryVI* se necesitarían dos pares de oligonucleótidos generales para cada una.

Si se desea analizar completamente una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* por el método de PCR sin excluir ningún gen reportado, sería necesario contar con el sistema completo de análisis, el cual requeriría de alrededor de 60 oligonucleótidos. Cada cepa requeriría de 6 reacciones de PCR para poder agruparla dentro de las diferentes clases; posteriormente se necesitarían dos reacciones de PCR adicionales para definir la subclase a la cual pertenece. Se pueden diseñar oligonucleótidos de las regiones altamente conservadas entre todos los miembros de la familia Cry, como de la hélice α -5 o en la región que une al dominio I con el dominio II, específicamente en el bloque 2 conservado.

Esta estrategia mostraría si esas cepas poseen genes *cry* y se podrían almacenar para una posterior caracterización cuando surgiera el interés en buscar cepas con actividad a dípteros, nemátodos o protozoarios. En este momento el interés del laboratorio es sobre las plagas agrícolas, el cual se enfoca principalmente a lepidópteros y coleópteros. Las nuevas cepas (genes nuevos) que se identifiquen se utilizarán en bioensayos contra los insectos de interés.

2-Un nuevo gen, con idéntica secuencia en las regiones donde fueron diseñados los oligos de genes conocidos, pero que puede tener diferente secuencia en la región interna entre los oligos o en otras regiones importantes que determinan una nueva actividad insecticida, no sea identificado como un gen diferente y sea clasificado como un gen conocido.

Como resultado, una nueva cepa sería clasificada por error como si perteneciera a una subclase conocida; solo hasta cuando se probara su actividad en bioensayo pudiera ser el caso que esta cepa mostrara una actividad diferente al compararla contra la actividad de cepas estandar.

Una alternativa para reconocer si existen cepas nuevas entre las agrupadas como pertenecientes a una clase específica sería realizar un análisis con enzimas de restricción de los productos amplificados por PCR y comparar estos resultados con un análisis similar de la cepa silvestre estandar. Si se presentan diferencias en este resultado esto podría ser indicio de que se tratase de un gen nuevo.

3-Por último, en la caracterización a nivel de subclase existe la probabilidad de que algunas cepas previamente clasificadas en la clase CryI o CryIII no se identifiquen dentro de alguna de las subclases. Esto puede suceder porque los oligonucleótidos para cada subclase son específicos para cada una de ellas, solamente reconociendo a la secuencia en la región de la cual fueron diseñados, por lo tanto estos oligonucleótidos específicos no reconocerían a un gen totalmente diferente. Esto en realidad apuntaría a pensar que posiblemente se trate de un gen diferente a los reportados y por lo tanto que represente una nueva variedad. Sería recomendable el realizar bioensayos de estas cepas con los insectos de interés que se deseen combatir.

Particularmente, sólo cuando se tiene un fragmento de diferente tamaño al esperado con los estandares, es indicio de que se trata de un gen nuevo, diferente, el siguiente paso es tener el gen completo para secuenciarlo.

En este caso parte del sistema desarrollado nos permite producir un fragmento de tamaño mayor al obtenido, esto se logra diseñando un oligonucleótido con sitio de restricción en 5', éste sería el oligonucleótido directo, se diseñaría de la región altamente homóloga de

los genes en cuestión reportados, a partir del codón de iniciación (ATG) y como reverso se usaría el oligonucleótido que inicialmente se usó para obtener el primer fragmento de menor tamaño. Esto permitiría obtener un fragmento mayor, el cual sería clonado y posteriormente secuenciado; con estos nuevos datos al realizar alineamientos con los genes reportados arrojaría información acerca de la similitud y diferencia de este gen con los reportados.

De manera similar para encontrar la otra parte del gen restante, hacia el carboxilo terminal, se cuenta ya con los oligonucleótidos, el directo, aquel con el cual se obtiene el fragmento de menor tamaño y como reverso se usaría el oligonucleótido reverso general para *cryI* o *cryIII* según sea el caso, igualmente se clonaría y secuenciará obteniéndose así el gen de una manera más rápida. También existe la posibilidad de clonar el gen a partir de un banco de genes de la cepa portadora del nuevo gen, usando el producto de PCR como sonda.

Como se mencionó anteriormente, son pocos los trabajos en los cuales se han tratado de clasificar cepas de *Bacillus thuringiensis* usando la técnica de PCR. Carozzi, *et al.* (42) reportaron la identificación de genes *cryI*, *cryIII* y *cryIV* mediante la utilización de 12 oligonucleótidos, pero no caracterizan las subclases respectivas; en este reporte se observa que estos oligonucleótidos fueron diseñados en dos regiones: una en el amino terminal y otra en el carboxilo terminal, es decir, que una cepa puede generar para cada clase, productos por PCR de dos tamaños diferentes, utilizan dos pares de oligonucleótidos por clase, a diferencia de nuestro sistema que utiliza un solo par de oligonucleótidos; esto se debe a que los oligonucleótidos generales para genes *cryI* se diseñaron en el carboxilo terminal, el cual es altamente conservado para todos los genes reportados de *cryI* y cuya región no está presente en los genes *cryIII* y los oligonucleótidos generales de *cryIII* se diseñaron de una región altamente conservada de los genes reportados de *cryIII*, pero no conservada en genes *cryI*. Nuestro sistema, con 4 oligonucleótidos generales diferencia cepas con genes *cryI* y *cryIII* y requeriría de solo dos oligonucleótidos más para diferenciar la clase *cryIV* y con un PCR adicional es posible definir la subclase a la cual pertenece.

Bourque *et al.* (43) reportaron el análisis por PCR de diferentes subgrupos pertenecientes solo a la subclase de genes *cryIA* (*a, b, c*) para identificar cepas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, diseñaron 7 oligonucleótidos de la región carboxilo terminal (zona conservada), para diferenciar estas tres subclases. Este sistema solo permite diferenciar estos 3 tipos de gen, pues las otras subclases de genes de *cryI* son altamente conservadas en la zona en que se diseñaron dichos oligonucleótidos. Nuestro sistema tiene la gran ventaja de que puede diferenciar además la subclase *cryIAd* y las demás subclases reportadas de genes *cryI*. Esto es posible, puesto que los oligonucleótidos específicos de *cryI* fueron diseñados entre los bloques conservados 2 y 3 (Figura 2), que es una zona altamente hipervariable para los genes *cryI*. Por otra parte, estos autores emplean reacciones de PCR separadas para cada subclase de genes *cryIA*, mientras que con nuestro sistema, en una sola reacción (mezcla A) podemos definir la presencia de estos 3 genes.

Kalman *et al.* (44) reportaron 10 oligonucleótidos: 8 directos y dos reversos, que permiten agrupar en las diferentes subclases los genes de la clase *cryI* (A,B,C,D,E,F) en una sola reacción de PCR. También en este reporte presentan el diseño de una nueva metodología para encontrar nuevos genes *cryIC*, ésta se basa en la utilización de 12 oligonucleótidos: siete directos y cinco reversos, completamente homólogos al gen *cryIC*.

Al realizar la reacción de PCR utilizando estos 12 oligonucleótidos, se produce un bandeo característico que representa a todos los productos de PCR que se pueden producir con estos oligos a partir de este gen, este bandeo se denomina "PCR fingerprinting" del gen *cryIC*. Los autores reportan que con la primera reacción de PCR utilizando sus 10 oligonucleótidos para diferenciar subclases, encontraron una cepa (HD29) que portaba un gen *cryIC*. Posteriormente, utilizando cepas estándares que portan el gen *cryIC*, así como la cepa HD29, realizaron un segundo PCR utilizando los doce oligonucleótidos específicos del gen *cryIC*.

Al observar los fragmentos de DNA amplificados encontraron que cuatro de los seis fragmentos amplificados de la cepa HD29 comigraban con los de los estándares del gen *cryIC* y dos de ellos eran de diferente tamaño. Este dato los llevo a pensar que se trataba de un nuevo gen *cryIC* el cual fue aislado y secuenciado (Genbank M79880). Al realizar bioensayos usando

dos larvas de insectos diferentes: *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua* encontraron que la proteína del nuevo gen *cryIC* tenía igual actividad tóxica (LC₅₀: 7 ppm) que la proteína estandar de *CryIC* contra *Trichoplusia ni*, pero presentaba mayor actividad tóxica (LC₅₀: 34 ppm) contra *Spodoptera exigua*. Esta metodología presenta una alternativa interesante en la búsqueda de nuevos genes que estén muy relacionados a un gen específico.

Es importante mencionar que cuando nosotros revisamos con cuidado esta publicación observamos que en la figura donde se presenta la electroforesis de los productos de PCR producidos con los primeros 10 oligonucleótidos, no está claro que la cepa HD29 presenta el producto de 288 pb correspondiente al gen *cryIC* es decir, no es visible la banda que corresponde a este peso. Cuando analizamos por medio de los programas de cómputo: Geneworks y Oligo 4, cuales son los posibles productos de los genes *cryIC* silvestre y *cryIC* de la cepa HD29 (ambos genes reportados en el Genbank), encontramos que sólo el gen silvestre *cryIC* puede producir el fragmento esperado de 288 pb, en cambio con el nuevo gen de *cryIC*, esos oligonucleótidos no pueden amplificar ya que no son homólogos a la secuencia blanco. Cuando buscamos con los mismos programas, cuales son los posibles productos de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados en este trabajo para el gen *cryIC*, la computadora nos dice que con ambos genes se produce un fragmento de 130 pb.

En la literatura hasta el momento no ha sido reportada ninguna técnica de PCR para caracterizar cepas con genes de las diferentes subclases de genes *cryIII*. Hemos diseñado 8 oligonucleótidos específicos (mezcla E) para cada una de las subclases de genes reportados de *cryIII* (A, B, C, Cg, D y E). Para las subclases A, B, C, Cg y D se diseñó un oligonucleótido directo de una región altamente conservada para todos ellos y el reverso se diseñó de una región específica presente sólo para cada una de las diferentes subclases, y para E se diseñaron dos oligos. Estos oligonucleótidos específicos permiten amplificar fragmentos de tamaño definido para cada una de las subclases; ésto ha sido comprobado con la utilización de estándares de cada una de estas subclases.

Particularmente con la utilización de las mezclas C y E se han encontrado 2 fragmentos de diferente tamaño, uno en cada mezcla, de una cepa nativa, IB31; esta cepa produce una proteína de un peso molecular de alrededor de 105 KDa. Esto comprueba que el sistema desarrollado no solo tiene la capacidad de caracterizar cepas conocidas sino también la potencialidad de encontrar nuevos genes.

Este sistema permite conocer cuales genes de δ -endotoxina posee una determinada cepa. Actualmente la tendencia en el mundo es a encontrar nuevas cepas, con actividades aún no descritas y además se está dirigiendo la búsqueda a encontrar nuevas actividades, es decir, a ampliar el rango de actividad de las cepas ya conocidas.

Este sistema juega un papel importante en el conocimiento de que genes porta una cepa permitiendo predecir su actividad y que acompañado de otros sistemas de análisis en biología molecular permite la caracterización de nuevos genes.

Esta estrategia proporciona una herramienta de trabajo muy importante en el desarrollo de biocidas. Los grupos de trabajo que estén realizando investigaciones afines, se van a ver favorecidos al contar con un método que les permita caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* en forma segura ya que cuenta con varias ventajas importantes, entre otras: permite una caracterización práctica, rápida y eficiente de cepas nativas, de las cuales podremos conocer con certeza la clase y subclase de genes *cry* y por lo tanto predecir de una manera muy exacta la especie de insecto blanco hacia el cual se dirige. Además esta estrategia es una herramienta que permitirá identificar nuevos genes y con base en su organización, clasificarlos dentro de las subclases correspondientes o inclusive conformar una nueva clase.

BIBLIOGRAFIA

1. Starnes, R., Liu, I. and Marrone, P. 1993. History, use and future of microbial insecticides. *Ann. Entomol.* 39: 83-93.
2. Smith, S. 1990. The broad perspectives of biological control. In: *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases.* R. Baker and P. Dunn eds; Alan R. Liss, Inc., New York, EUA. p: 45-48.
3. Frost and Sullivan. 1990. *Biopesticides.* Frost and Sullivan. USA.
4. Quintero, R. 1992. Estudio de prefactibilidad técnico-económico de una planta productora de bioinsecticidas para los países del Pacto Andino. Corporación Andina de Fomento, Caracas, Venezuela.
5. Höffe, H and Whiteley, R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Rev.* 53: 242-255.
6. Feitelson, J. and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis: insects and beyond.* *Biotechnology.* 10: 271-275.
7. Hofmann, C., Van Derbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J. and Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7844-7848.
8. Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H. Degheele, D. and Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186: 239-247.
9. Knowles, B. and Dow. 1993. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* models for mechanism of action on the insect gut. *BioEssays.* 15: 469-476.
10. Bravo, A., Koen, H., Jansens, S. and Perferoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Inver. Pathol.* 60: 247-253.
11. Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Deghleele, D. and Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *B. thuringiensis* δ -endotoxins. *Appl. Environ. Microb.* 56,5: 1378-1385.

12. Li, J., Carroll, J., Ellar, D.J. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *B. thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*: 353:815-820.
13. Wu, D. and Aronson, A. I. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* 267,4: 2311-2317.
14. Lakey, J., González-Mañas, J., Van der Goot, F. and Pattus, F. 1992. The membrane insertion of colicins. *FEBS*. 307,1: 26-29.
15. Ge, A. Shivarova, N. and Dean, D.H. 1989. Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4037-4041.
16. Ge, A., Rivers, D., Milne, R. and Dean, D. 1991. Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* 266: 17954-17958.
17. Chen, X.J., Lee, M.K. and Dean, D. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombix mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 9041-9045.
18. Aronson, A., Wu, D. and Zhang, C.. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *En prensa*.
19. Heimpel, A.M. and Angus, A. 1958. The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus*. *Can. J. Microb.* 4: 531-541.
20. De Barjac, E. and Franchon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*. 35: 233-240.
21. Payne, J., Kennedy, M., Randall, J., Meier, H. and Uick, H. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolates active against hymenopteran pests and gene(s) encoding hymenopteran-active toxins. European Patent Application, No. Publication 0516306-A2.
22. Payne, J., Cannon, R., and Bagley, A. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. PCT International Patent Application No. WO92/19106.
23. Edwards, D., Payne, J. and Soares, G. 1990. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. US Patent No. 4498734.
24. Whalon, M. and McGaughey, W. 1993. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *En: Advanced engineered pesticides*. Kim, L. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York. USA? p:215-232.

25. Van Rie, J. McGaughey, D, Johnson, D., Barnet, B. and Van Mellaert. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*. 247: 72-74.
26. Kronstand, J.W. and Whiteley, H.R. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene*. 43:29-40.
27. Höfte, H., Van Rie, J., Van Houtven, A., Van Derbreuggen, H. and Vaeck, M. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2010-2017.
28. Erlich, H., Gelfand, D. and Sninsky, J. 1991. Recent advances in the Polymerase chain reaction. *Science*. 252: 1643-1650.
29. Bednarczuk, T., Wiggins, R. and Konat, G. 1991. Generation of high efficiency, single-stranded DNA hybridization probes by PCR. *BioTechniques*. 10,4:478.
30. An., S., Franklin, D. and Fleming, K. 1992. Generation of digoxigenin-labeled double-stranded and single-stranded probes using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. 6: 193-198.
31. Kaufman, D. and Evans, G. 1990. Restriction endonuclease cleavage and the termini of PCR products. *BioTechniques*. 9: 304-306.
32. Triglia, T., Peterson, M. Kemp, D. 1988. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.
33. Nassal, M. and Rieger, A. 1990. PCR-based site-directed mutagenesis using primers with mismatch 3'-ends. *Nucleic Acids Res.* 18: 3077-3078.
34. Upender, M., Raj, L. and Weir, M. 1995. Megaprimer method for in vitro mutagenesis using parallel templates. *BioTechniques*. 18: 29-30.
35. Economou, E., Bergen, A., Warren, A. and Antonorakis, S. 1990. The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87: 2951-2954.
36. Lo, Y., Lo, E., Patel, P., Tse, C. and Fleming, K. 1991. Heteroduplex formation as a means to exclude contamination in virus detection using PCR. *Nucleic Acids Res.* 19: 6653.
37. Giovannoni, S. Britschgi, G., Moyer, L. and Field, G. 1990. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature*. 345: 60-63.
38. Bej, A. DiCecare, J. Haff, L. and Atlas, R. 1991. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella spp.* in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1013-1017.

39. Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. and Fedak, G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2; 341-345.
40. Higuchi, R., Von Beroldingen, C., Sensabaugh, G. and Erlich, H. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature.* 332: 543-546.
41. Tsai, Y. and Olson, B. 1992. Rapid method of separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2292-2295.
42. Carozzi, N., Kramer, V., Warren, G., Evola, S. and Koziel, M. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
43. Bourque, S., Valero, J., Mercier, J., Lavoie, M. and Levesque, R. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523- 527.
44. Kalman, S., Kiehne, K., Libs, J. and Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. galleriae. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.
45. Chak, K., Chao, D., Tseng, M., Kao, S., Tuan, S. and Feng, T. 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415-2420.
46. Bosse, M., Masson, L. and Brousseau, R. 1990. Nucleotide sequence of a novel crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. kenya. *Nucleic Acids Res.* 18: 7443.
47. Donovan, W., Rupar, M., Slaney, A., Malvar, T., Gawron-Burke, M and Johnson, T. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3921-3927.
48. Donovan, W., Rupar, M. and Slaney, A. 1992. *Bacillus thuringiensis* cryIIIc(b) toxin gene and protein toxic to coleopteran insects. PCT International Patent Application No. WO92/13954.