

RESUMEN / ABSTRACT

En el presente estudio se determinó la morfología y la composición proteica de los cristales de las cepas LBIT-499 y LBIT-504 de *B. thuringiensis*, ambas nativas de Guanajuato, México. La primera mostró sólo cristales bipiramidales mientras que la segunda presentó cristales tanto bipiramidales como cúbicos. Estos cristales estuvieron compuestos de proteínas de aproximadamente 130 y 60 kDa, respectivamente. En ambas cepas, además de la LBIT-500 y LBIT-544, se detectó una gran variedad de genes *cry1*. En éstas últimas se encontraron los genes *cry2A* y *cry2B*, en la LBIT-504 sólo el *cry2B* y en la LBIT-499 no se detectó ningún *cry2*.

This report revealed the crystal morphology and protein composition of strains LBIT-499 and LBIT-504 of *B. thuringiensis*, native to Guanajuato, Mexico. LBIT-499 showed only bipyramidal crystals, while LBIT-504 showed both bipyramidal and cubical crystals. These crystals were composed by proteins of ca. 130 and 60 kDa, respectively. Both strains as well as LBIT-500 and LBIT-544, showed a great variety of *cry1* genes, while *cry2A* and *cry2B* were identified in LBIT-500 and LBIT-544, LBIT-504 showed only the *cry2B* gene, and no *cry2* was detected in LBIT-499.

¹ Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Apdo. Postal 311, 36500, Irapuato, Gto.

² Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 629, Irapuato, Gto., México.

Identificación de los Genes *cry* en Cepas Mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con Potencial Insecticida.

T. Rosales-Reyes¹, R. Salcedo-Hernández¹, J. E. Ibarra² y J. Eleazar Barboza-Corona¹.

Artículo invitado para la sección de Tesis Galardonadas, que pasa íntegro y sin la revisión de los Arbitros.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se ha usado ininterrumpidamente por más de 40 años como bioinsecticida. Su principal característica es la producción de cristales (o cuerpos parasporales) proteicos, los cuales constituyen el principio activo de sus productos comerciales. Los cristales están formados de proteínas llamadas Cry, y su expresión está controlada por varios elementos genéticos tales como el número de copias de los genes *cry* y la estabilidad de su RNA mensajero, la formación de puentes disulfuro intermoleculares y la ayuda de chaperonas o proteínas protectoras (Bietlot *et al.*, 1990; Agaisse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995). Las proteínas Cry son tóxicas para una gran variedad de insectos de importancia agronómica (v.g. lepidópteros y coleópteros) y de salud pública (v. g. mosquitos). Algunas de las plagas más importantes que afectan a cultivos del estado de Guanajuato y que pueden ser controlados con *B. thuringiensis* son: la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) y el falso medidor de la col (*Trichoplusia ni*) (Bujanos *et al.*, 1993).

A pesar de que existen grandes avances relacionados con el estudio a nivel molecular del mecanismo de acción de las proteínas Cry (Kumar y Aronson, 1999), el estudio de la resistencia (Ibarra y López-Meza, 1996), la generación de plantas transgénicas (Baute *et al.*, 2002), la obtención de cepas recombinantes con mejores propiedades insecticidas que las silvestres (Park *et al.*, 2001) y la clonación de un gran número de genes *cry* (Crickmore *et al.*, 1998), la selección y caracterización de cepas nativas continúan siendo tema de interés mundial. Esto tiene gran importancia, ya que además de permitir hacer estudios ecológicos (Maduell *et al.*,

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*; Cepas nativas; Genes *cry*; Proteínas Cry; PCR.

KEYWORDS: *Bacillus thuringiensis*; native strains; *cry* genes; Cry proteins; PCR.

2002), permite seleccionar cepas que pueden tener mayor toxicidad que las cepas comerciales contra determinado tipo de plaga característico de la región de estudio, como el Bajío Guanajuatense.

En 1997, Morales-Rivera mostró que cuatro cepas de *B. thuringiensis* denominadas LBIT-499, LBIT-500, LBIT-504 y LBIT-544, aisladas en los municipios de León, Irapuato y Marfil del estado de Guanajuato, presentaron una toxicidad elevada al lepidóptero *P. xylostella*. Este resultado fue interesante ya que la toxicidad fue mayor que *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, cepa de la cual se derivan varios productos comerciales como Biobit, Dipel, Foray, Javelin, Thuricide y Bactospeine. La elevada toxicidad pudo deberse a la existencia de una nueva proteína Cry o bien al efecto sinérgico de las Cry presentes en los cristales de las cepas nativas. Por otro lado, las proteínas del tipo Cry1 son tóxicas a Lepidópteros y las Cry2 a lepidópteros y dípteros (Schnepf y col. 1998). Con base en lo anterior, el propósito de este trabajo fue caracterizar los cristales y determinar el tipo de genes *cry1* y *cry2* presentes en estas cepas. Las perspectivas del trabajo son analizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas de *B. thuringiensis* que se usaron en este trabajo fueron: LBIT-499 subsp. *fukuokensis*, LBIT-500 subsp. *thuringiensis*, LBIT-504 subsp. *kurstaki* y LBIT-544 subsp. *thuringiensis*. Estas bacterias forman parte de la colección de cepas mexicanas de *B. thuringiensis* del laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV-Irapuato. *B. thuringiensis kurstaki* (HD-1 y HD-73), *B. thuringiensis tenebrionis* y *B. thuringiensis israeliensis*, son cepas usadas como estándar y son mantenidas en el mismo laboratorio.

Microscopía electrónica de barrido.

Se preparó una suspensión del complejo espora-cristal en agua desionizada estéril, y se colocaron 20 µl sobre un portaobjetos cilíndrico de

aluminio. Luego la muestra se sombreó con oro en una ionizadora (E.F. Fullan, Modelo EMS-76) y se observó en un microscopio electrónico de barrido Philips, Modelo XL30-ESEM, gentilmente facilitado por el CINVESTAV-Querétaro. Se empleó una velocidad de aceleración de 10-15 KV y aumentos desde 2000 hasta 18000X. Por último, las muestras se fotografiaron por digitalización.

Purificación de los cristales proteicos.

Las cepas se cultivaron a 240 rpm. y 30°C hasta su autólisis en medio de leche peptonizada (Barboza-Corona e Ibarra, 2001). Las muestras se centrifugaron en el rotor Sorvall GSA a 10,000 rpm durante 15 min. La pastilla se lavó tres veces por centrifugación (10,000 rpm 15 min.) con agua destilada y posteriormente se sometió a un gradiente continuo de bromuro de sodio (20 a 36%, peso/volumen) diluido en Tween 80 al 0.01%. Los gradientes fueron centrifugados durante 1 hora a 20,000 rpm, utilizando una ultra centrífuga Beckman XL-90 con un rotor de columpio SW-28. Las bandas que se obtuvieron se recolectaron y lavaron con agua destilada y NaCl 0.5 M. Los cristales fueron congelados y se pulverizaron en una liofilizadora Labconco L4 pH Lock 4.5. Finalmente las muestras se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Separación de las proteínas mediante geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Se prepararon suspensiones de cristales a una concentración de 1 µg/µl en solución reguladora de lisis 1X (Tris-base/HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 0.1%, 2 β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.001%). Las muestras se hirvieron durante 5 min, y se separaron en SDS-PAGE (consultar Tabla 1) al 10% (Schägger y von Jagow, 1987). Para determinar la masa molecular se usaron como marcadores de peso molecular proteínas con masa conocida: miosina, 212 kDa; β-galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa B, 97.4 kDa; albúmina sérica bovina, 66.2 kDa; catalasa, 57.5 kDa; y aldolasa, 40 kDa (Promega).

Tabla 1. Glosario de términos técnicos.

Concepto	Definición
Amplímero	Fragmento de ADN de doble cadena, generalmente de bajo peso molecular (menos de 2000 pares de bases) producto de PCR
Bioensayo	Procedimiento en el que se utilizan animales vivos para probar el efecto de un compuesto natural o artificial.
Control biológico	Procedimientos que tratan de disminuir significativamente las poblaciones de las plagas, mediante la introducción de depredadores, parásitos naturales o entomopatógenos de los organismos que se desea controlar.
Geles en segunda dimensión	Procedimiento analítico para separar proteínas o péptidos. Primero se separan por punto isoeléctrico (primera dimensión) y después por peso molecular (segunda dimensión).
Genes <i>cry</i>	Secuencias de ADN del genoma de <i>Bacillus thuringiensis</i> que codifica las proteínas insecticidas llamadas Cry.
Iniciador, oligonucleótido o "primer"	Pequeña cadena sencilla de nucleótidos que se utiliza para iniciar la reacción de la ADN polimerasa. La especificidad del PCR se basa precisamente en el uso de iniciadores con secuencias bien definidas que van de los 12 a los 30 nucleótidos, con este número de nucleótidos es prácticamente imposible que la polimerasa inicie la síntesis de ADN en sitios diferentes de las secuencias que se quieren amplificar.
Inocuidad de alimentos	Conjunto de procedimientos y prácticas en la producción de alimentos, que dan como resultado alimentos que no dañan o afectan la salud del consumidor.
Kilodaltones	Un daltón es el equivalente al peso atómico del hidrógeno, el peso molecular de macromoléculas se da en miles de daltones (kDa).
Liofilizadora	Instrumento que deshidrata muestras congeladas usando alto vacío.
PCR	Siglas en inglés de la Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa. Procedimiento mediante el cual se sintetizan millones de copias de una secuencia de ADN específica. Debido a que se requiere el uso de altas temperaturas para desnaturalizar el ADN (pasar de doble cadena a cadena sencilla), este procedimiento utiliza ADN polimerasas termorresistentes, las cuales se obtienen de bacterias termófilas.
SDS	Siglas en inglés del detergente dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Técnica analítica que separa proteínas un campo eléctrico de acuerdo a su peso molecular. PAGE son las siglas en inglés de electroforésis en geles de poli(acrilamida). La poli(acrilamida) se usa como soporte mecánico y como una especie de criba molecular, a través de la cual las proteínas migran hacia el extremo positivo de un campo eléctrico. El detergente SDS se une a las proteínas (el cual se encuentra disociado al estar en un medio acuoso) confiriéndoles carga neta negativa, esta carga es proporcional al peso molecular permitiendo que la fuerza con la que la proteína es arrastrada por el campo eléctrico (electroforésis) sea proporcional a su peso molecular, en este caso la poli(acrilamida) influye también sobre la velocidad de migración oponiendo mayor resistencia a las moléculas más grandes.
Subespecie o serovariedad	Unidad taxonómica inferior a la especie. La especie <i>Bacillus thuringiensis</i> contiene a 83 diferentes subespecies.
Tripsina	Enzima que hidroliza proteínas (proteasa), en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína tenga una lisina o una arginina expuestas.

Obtención del fragmento tripsia-resistente (δ -endotoxina).

Suspensiones de cristales (1 μ g/1 μ l) en Na₂CO₃ 50 mM pH 10.5 - ditioneitol (DTT) 25 mM, fueron colocadas en agitación continua durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante fue tratado con tripsina [1mg/ml (Tipo IX de páncreas porcino)] en una relación 1:10 (volumen de tripsina/volumen de proteína solubilizada), a 37°C durante 3 hrs y se analizó por SDS-PAGE.

*Detección de genes *cry1* y *cry2* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

Las cepas se cultivaron en 5 ml de medio LB durante toda la noche a 30°C y 240 rpm. Se inocularon 5 ml de medio LB con 0.1 ml de cultivo de toda la noche y se incubaron a 30°C

por 3 horas con agitación constante a 240 rpm (Juárez-Pérez *et al.*, 1997). El ADN fue extraído siguiendo la metodología descrita en Barboza-Corona e Ibarra (2001) y su concentración fue estimada en un equipo Smart Spec 3000 (Bio-Rad). Para determinar si la cepa tenía genes *cry1* o *cry2*, fragmentos de ellos fueron amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las condiciones de amplificación (con ligeras modificaciones) y los oligonucleótidos iniciadores descritos por Juárez-Pérez *et al.*, (1997) (Tabla 2). Se utilizó un termociclador MJ Research bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 25 ciclos con 1 min a 94°C, 45 s de apareamiento a 45°C o 47°C, y 2 min de extensión a 72°C. Para amplificar los genes *cry1*, se usó el iniciador I(-) en combinación con los

Tabla 2. Iniciadores (primers) utilizados en la detección de genes *cry1* y *cry2*⁻ y sus subtipos.

Oligo	Tamaño esperado (Kb)	Masa (kDa) [∇]	Secuencia
I(-)			5' MDTATYTCTAKRTCTTGACTA 3'
I(+)	1.5 - 1.6	130.0-140.0	5' TRACRHTDDBDGTATTAGAT 3'
1Aa	1.286	133.2	5' TTCCCTTTATTTGGGAATGC 3'
1Ab	1.371	131.0	5' CGGATGCTCATAGAGGAGAA 3'
1Ac	0.844	133.3	5' GGAAACTTTCTTTTAAATGG 3'
1Ad	1.212	~130.0	5' ACCCGTACTGATCTCAACTA 3'
1B	1.323	138.0	5' GGCTACCAATACTTCTATTA 3'
1C	1.176	134.8	5' ATTTAATTTACGTGGTGTTG 3'
1D	1.138	132.5	5' CAGGCCTTGACAATTCAAAT 3'
1E	1.137	132.0	5' TAGGGATAAATGTAGTACAG 3'
1F	0.967	133.6	5' GATTTTCAGGAAGTGATTCAT 3'
1G	1.128	130.0	5' GGTTCTCAAAGATCCGTGTA 3'
II(-)			5' AACTCATCGTTATTTGTA 3'
II(+)	1.536	60-70	5' TTAAGAAAGTGGGGAGTCTT 3'
2A	0.674	70.9	5' TCTCATAGGGGCGACTAATC 3'
2B	0.674	70.8	5' CGGATGCTCATAGAGGAGAA 3'

Código genético : B=C, G o T; D=A, G o T; H=A, C o T; K= G o T; M=A o C; R=A o G; Y=T o C
 ≈ Juárez-Pérez y col., 1997.

∇ Se indica la masa molecular en kilodaltones de las proteínas codificadas por los diferentes genes *cry* indicados. Höfte y Whiteley, 1989.

otros iniciadores: I(+) para *cry1* general y los iniciadores tipo 1 (por ejemplo 1Aa, 1Ab, 1Ac) para los diferentes subtipos. Los genes *cry2* se amplificaron con el iniciador II(-) en combinación con el II(+), 2A y 2B.

RESULTADOS

Morfología de los cristales.

Tanto *B. thuringiensis* LBIT-499 como LBIT-504 presentaron cristales bipiramidales (Fig. 1). Ambas cepas mostraron gran variabilidad en el tamaño de ellos, pero predominaron aquellos de tamaño pequeño. En los cristales bipiramidales de LBIT-504, pudieron observarse las oquedades donde se encontraban incrustados los cristales cúbicos. En LBIT-499 no se encontraron cuerpos parasporales cúbicos.

SDS-PAGE y formación del fragmento tripsina-resistente (δ-endotoxina)

LBIT-499 presentó una banda constituida de una proteína con masa molecular cercana a

130 kilodaltones (kDa). Ese tipo de masa molecular es el valor característico encontrado en las proteínas que constituyen los cristales bipiramidales. Sin embargo, esa cepa carece de proteínas de 60 kDa, lo cual esta en concordancia con la ausencia de cristales cúbicos. Al igual que LBIT-499, la cepa LBIT-504 mostró una proteína de 130 kDa, pero a diferencia de la cepa anterior, mostró una adicional de 60 kDa. (Fig. 2). Cuando los cristales de ambas cepas fueron solubilizados y tratados con tripsina, se observó la formación de un fragmento que fue resistente a la proteólisis con tripsina. Este tipo de fragmento es conocido como δ-endotoxina y tiene una masa molecular cercana a 60 kDa (Fig. 2).

Determinación de los genes cry.

Las cuatro cepas bajo estudio (LBIT-499, LBIT-500, LBIT-504 y LBIT-544) y la cepa control (HD-1) presentaron la amplificación de bandas de entre 1.5-1.6 Kb, que corresponde al tamaño esperado para los genes del tipo *cry1* (Fig. 3, Tabla 2). No se observó amplificación

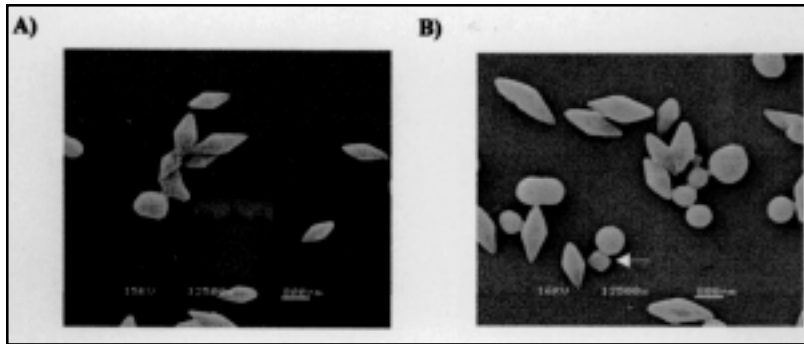


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de los cristales. (A) LBIT-499. (B) LBIT-504. Obsérvese la oquedad en los cristales bipiramidales de LBIT-504. Con una flecha se indica la ubicación de un cristal cúbico en LBIT-504.

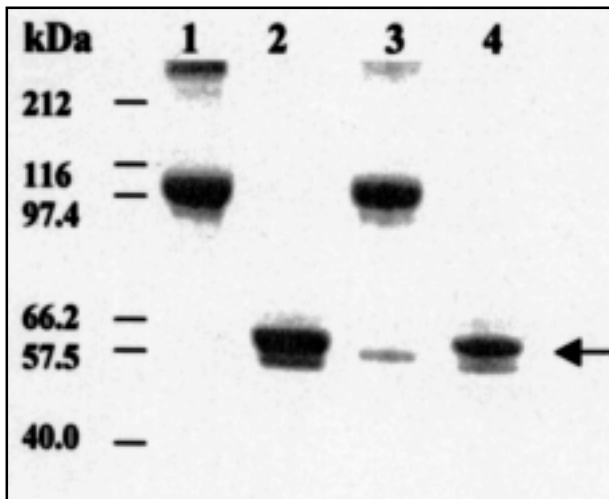


Figura 2. Determinación de los fragmentos tripsina-resistente. 1 y 2, LBIT-499; 3 y 4, LBIT-504. Las muestras 2 y 4 fueron tratadas con tripsina. La flecha indica la localización del fragmento tripsina-resistente.

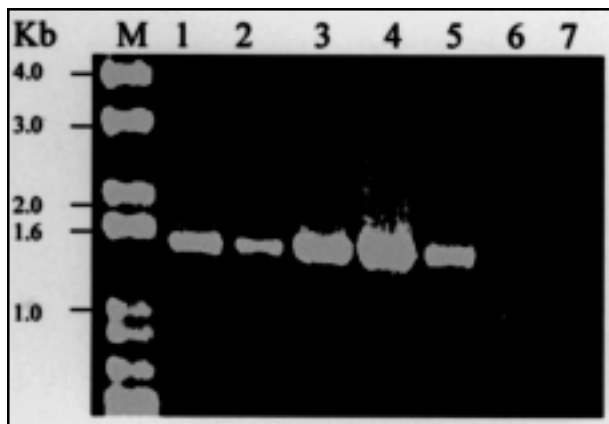


Figura 3. Amplificación de genes *cryI*. M, marcador (Gibco BRL); 2, *B. thuringiensis* HD-1; 3, LBIT-499; 4, LBIT-500; 5, LBIT-504; 6, LBIT-544; 7, *B. thuringiensis tenebrionis*; 7, *B. thuringiensis israelensis*.

con el ADN de los controles negativos (*B. thuringiensis israelensis* y *B. thuringiensis tenebrionis*) (Fig. 3).

Cuando se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de los diferentes genes *cry* de LBIT-544, se obtuvo la amplificación de tres bandas, las cuales tienen los tamaños esperados para los genes *cry1Aa*, *cry1B* y *cry1F* (Fig. 4, Tabla 2). Para las otras cepas, también se encontraron dife-

rentes amplímeros, los cuales son mostrados en la tabla 3 (no se muestran los gels correspondientes).

Por otro lado, solamente en *B. thuringiensis* HD-1, LBIT-500, LBIT-504 y LBIT-544 se detectó la amplificación de genes *cry2* (Fig. 5, Tabla 3). De manera específica, LBIT-500 y LBIT-544 tuvieron *cry2A* y *cry2B*, mientras que LBIT-504 presentó únicamente *cry2B* (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron cepas de *B. thuringiensis* nativas de Guanajuato, México, las cuales previamente habían mostrado ser altamente tóxicas a la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*): plaga que ocasiona daños importantes en brócoli y coliflor (Bujanos *et al.*, 1993). Las cepas estudiadas fueron: LBIT-499, LBIT-500, LBIT-504 y LBIT-544. Las cepas LBIT-500 y LBIT-544 se caracterizaron parcialmente debido a que previamente fueron analizadas por Rangel-Silva *et al.*, (2000).

La caracterización morfológica de los cristales de LBIT-499 y LBIT-504, mostró que éstos producen cristales bipiramidales, lo cual es característico de las cepas del patotipo I (cepas con toxicidad a lepidópteros). Además, LBIT-504 produce cuerpos parasporales cúbicos ausentes en LBIT-499. Los cristales presentes en LBIT-504 son similares a los observados en la cepa estándar HD-1 (no mostrado). Las diferencias en los cristales indican diferencias en el

Tabla 3. Genes *cry* presentes en diferentes cepas de *B. thuringiensis*.

Cepa	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>
LBIT-499	1Aa, 1Ac, 1Ad, 1D, 1E, 1F	-
LBIT-500	1Aa, 1Ab, 1Ac, 1Ad, 1F, 1G (o <i>cry9</i>)	2 A, 2 B
LBIT-504	1Ab, 1Ac, 1F	2 B
LBIT-544	1Aa, 1B, 1F	2 A, 2B

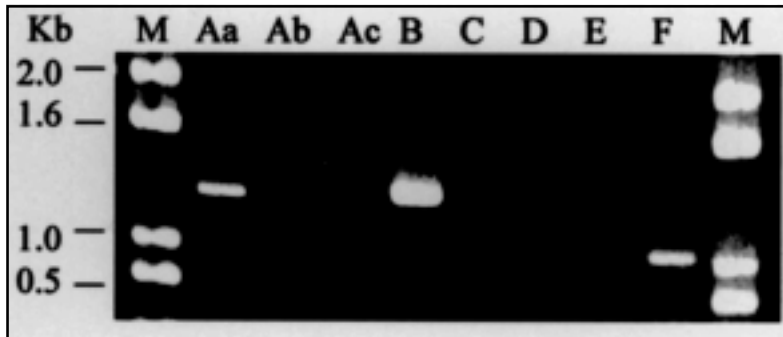


Figura 4. Amplificación de los genes *cry1* en LBIT-544. M, marcador (Gibco BRL).

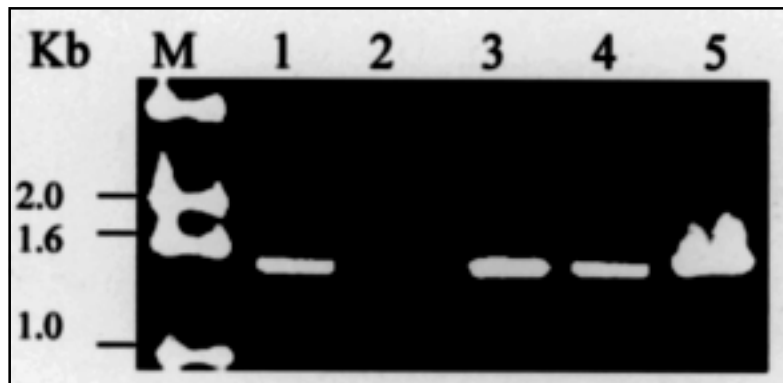


Figura 5. Detección de genes *cry2*. M, marcador (Gibco BRL). 1, HD-1; 2, LBIT-499; 3, LBIT-500; 4, LBIT-504; 5, LBIT-544.

patrón de proteínas de las cepas estudiadas, lo anterior fue confirmado mediante SDS-PAGE (Fig. 2). *B. thuringiensis* LBIT-499, LBIT-504 coincidieron en proteínas con pesos moleculares cercanos a 130, las cuales corresponden a las proteínas Cry1 que son las que generalmente forman los cristales bipiramidales. En forma adicional, solamente la cepa LBIT-504 presentó una proteína con masa molecular cercana a 60 kDa correspondiente a las proteínas Cry2 que forman los cristales cúbicos. El patrón de proteínas de LBIT-504 es similar al que se observa de manera regular en HD-1 (Barboza- Corona e Ibarra, 2001).

La solubilidad de los cristales y la formación del fragmento tripsina-resistente son factores importantes, ya que juegan un papel significativo en la actividad insecticida de las proteínas Cry, debido a que es el paso previo a la formación del fragmento insecticida (Barboza-Corona *et al.*, 1997). Para *B. thuringiensis* LBIT-499 y LBIT-504 se obtuvieron péptidos de entre 60 y 65 kDa, valores que están entre los pesos conocidos de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*. Ya que la solubilización y reacción con la tripsina fueron hechas en condiciones alcalinas, el resultado obtenido indica que un insecto que presente esas condiciones de pH en su intestino medio y tenga además proteasas activas, será capaz de formar la δ -endotoxina.

Por otro lado, el patrón de proteínas en LBIT-499 y LBIT-504 mostró la presencia de una banda ancha de casi 130 kDa. El grosor indica que los cristales bipiramidales pueden estar constituidos de más de una proteína Cry1 con pesos moleculares similares (Masson *et al.*, 1990). Para demostrar lo anterior, se llevó a cabo la determinación del tipo de genes *cry1* mediante la amplificación de fragmentos específicos de ADN por PCR. La presencia de los genes *cry1* en las cepas de *B. thuringiensis* HD-1, LBIT-499, LBIT-500, LBIT-504 y LBIT-544 fue confirmada (Fig. 3). Para identificar de manera específica los genes *cry1* que tiene cada cepa, se emplearon oligonucleótidos específicos. De esta forma, en *B. thuringiensis* LBIT-499 se detectaron los genes *cry1Aa*, 1Ac, 1Ad, 1D, 1E y 1F. En LBIT-500 se detectaron los genes *cry1Aa*, 1Ab, 1Ac, 1Ad, 1F y 9 (anteriormente IG). En LBIT-504 se hallaron *cry1Ab*, 1Ac y 1F, mientras que en LBIT-544 se encontraron los *cry1Aa*, 1B y 1F (Fig. 5). El que se haya detectado una gran variedad de genes *cry1*, no necesariamente implica que todos los genes *cry* se expresen (Danckocsik, *et al.*, 1990), o bien

que las proteínas se expresen pero sean inestables o que sean secretadas y no se acumulen en los cristales (Kostichka *et al.*, 1996). Por ejemplo, si en una cepa de *B. thuringiensis* se detectan 3 genes *cry1*, puede ser posible que solamente una o dos, o quizás las tres proteínas Cry estén constituyendo sus cristales. Para demostrar que proteínas Cry están presentes en una cepa de *B. thuringiensis*, la detección por PCR debe ser complementada con algún estudio bioquímico de los cristales [v.g. geles en segunda dimensión o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)]. Por ejemplo, Masson *et al.*, (1998) haciendo el uso combinado de la detección de *cry* por PCR y de la determinación de las proteínas por HPLC, pudieron demostrar que *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD-133 tiene los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*, *cry2B*, y *cry1I*; sin embargo los cristales sólo estaban constituidos de las proteínas Cry1Ab, Cry1C y Cry1D.

La presencia de genes *cry2* (2A y 2B, Tabla 3) fue confirmada para tres de las cepas estudiadas, excepto para *B. thuringiensis* LBIT-499. Esto era de esperarse, ya que en esta cepa no se encontró mediante microscopía electrónica de barrido ni mediante SDS-PAGE, la presencia de cristales cúbicos y de proteínas cercanas a 60 KDa.

Tomando como punto de partida la premisa de que todos los genes *cry* detectados se traducen y que sus proteínas forman parte de los cristales, es posible plantear una serie de bioensayos dirigidos a los probables insectos susceptibles (Glare y O'Callaghan, 2000). Por ejemplo, la presencia de genes *cry1B* indica que LBIT-544 presenta probablemente toxicidad a *Pieris brassicae*, *Choristoneura fumiferana*, *Plutella xylostella* y *Perlieucoptera coffeella*. La detección del gen *cy1F* en las cuatro cepas, sugiere la toxicidad contra *Spodoptera exigua*, *Trichoplusi ni*, *Ostrinia nubilalis*, *Choristoneura fumiferana*, *Lymantria dispar* y *Orgyia leucostigma*. Por otro lado, la presencia latente de proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B y Cry1F puede explicar la toxicidad de las cuatro cepas hacia la palomilla dorso de diamante (Glare y Callaghan, 2000).

Por último, conviene comentar que para que las cepas estudiadas puedan ser usadas en el control biológico de insectos (parte importante en la inocuidad de alimentos agrícolas), será necesario evaluar su toxicidad contra otras plagas de importancia agronómica y demostrar si las cuatro cepas carecen de β -exotoxinas (compuesto con cierta actividad tóxica a vertebrados) (Levinson *et al.*, 1990).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el invaluable apoyo financiero otorgado por el CONCYTEG y la Fundación Guanajuato Produce a través de los proyectos 01-16-202-113 y 104/00, respectivamente.

REFERENCIAS

- Agaisse, H., y Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology*. 177: 6027-6032.
- Baum, J.A. y Malvar, T. (1995). Regulation of the insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*. 18: 1-12.
- Baute, T.S., Sears, M.K. y Schaafsma A.W. (2002). Use of transgenic *Bacillus thuringiensis* Berliner corn hybrids to determine the direct economic impact of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on field corn in eastern Canada. *Journal of Economic Entomology*. 95(1):57-64.
- Barboza-Corona J.E., López-Meza, J.E. y Ibarra, J.E. (1997). *Bacillus thuringiensis*: Propiedades insecticidas y existencia de cepas no tóxicas. *Acta Universitaria*. 7: 46-53.
- Barboza-Corona J.E. y Ibarra, J.E. (2001). Caracterización de una cepa mexicana de *Bacillus thuringiensis* con bajos niveles de toxicidad. *Scientiae Naturae*. 3:53-63.
- Bietlot, H.P., Vishmulhatla, L.J., Carey, P.R., Pozgay, M., y Kaplan, H. (1990). Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry Journal*. 267: 309-315.
- Crickmore, N., Ziegler D.R, Feitelson, J. Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D. Baum, J. y Dean, D.H. (1998).

- Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal protein. *Microbiology Molecular Biology Review* 62:807-813.
- Bujanos, R., Marín, A., Galván, F., y Byerly, K.F. (1993). *Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) en el Bajío, México*. INIFAP, Celaya Guanajuato.
- Danckocsik, C., Donovan, W.P. y Jany, C.S. (1990). Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Molecular Microbiology* 4:2087-2094.
- Glare, T.R. y O'Callaghan, M. (2000). *Bacillus thuringiensis: Biology, ecology, and safety*. p., John Wiley & Sons, LTD, UK. p. 36
- Ibarra, J.E. y López-Meza, J.E. (1996). Desarrollo de la resistencia a *Bacillus thuringiensis*. *Agrociencia* 31: 121-131.
- Juárez-Pérez, V.M., Ferrandis, M.D. y Frutos, R. (1997). PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2997-3002.
- Kostichka, K., Warren, G.W., Mullins, M., Mullins, A.D., Craig, J.A., Koziel, M.G., y Estruch, J.J. (1996). Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. *Journal of Bacteriology*. 178: 2141-2144.
- Kumar, A.S.M. y Aronson, A.I. (1999). Analysis in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin. *Journal of Bacteriology*. 181: 6103-6107.
- Levinson, B.L.Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.C. y Gonzalez, J.M. Jr. (1990). Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology* 172: 3172-3179.
- Maduell, P., Callejas, R, Cabrera, K.R., Armengol, G. y Orduz, S.(2002). Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of Piper (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microbial Ecology*. 44(2):144-153.
- Masson, L., Préfontaine, G., Péloquin L., Lau, P.C.K., y Brousseau, R. (1990). Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp.*kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochemistry Journal*. 269: 507-512.
- Masson, L., Erlandson, M., Puzstai-Carey, M., Brousseau, R., Juárez-Pérez, V., y Frutos, R. (1998). A Holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4782-4788.
- Morales-Rivera, R. (1997). *Aislamiento de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y su caracterización toxicológica en la palomilla dorso de diamante Plutella xylostella (Hübner) (Lepidoptera: Plutellidae)*. Tesis de Licenciatura. Universidad del Bajío, León Gto. Méx.
- Park, H.W., Delécluse, A., and Federici, B.A. (2001). Construction and characterization of a recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* strain that produces Cry11B. *Journal of Invertebrate Pathology* 78:37-44.
- Schägger, H., y von Jawov, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166:368-379.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., y Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:775-806