

03088

4
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**CLONACION, CARACTERIZACION Y MANIPULACION DEL GEN
QUE CODIFICA PARA LA δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus
thuringiensis* CEPAS GM-7 Y GM-10.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

BENITO PEREYRA ALFEREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MORELOS. 1992

**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.

INDICE GENERAL

	PAG.
INTRODUCCION	1
CONTROL BIOLÓGICO COMO ALTERNATIVA A PESTICIDAS QUÍMICOS	1
<i>Bacillus thuringiensis</i> EN EL CONTEXTO DE LOS MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS	1
COMPUESTOS TÓXICOS DE <i>B. thuringiensis</i>	9
MEJORAMIENTO DE LOS PRODUCTOS A BASE DE <i>B. thuringiensis</i>	10
CLASIFICACION DE <i>B. thuringiensis</i>	11
ESTRUCTURA Y ORGANIZACION GENICA Y PROTEICA DE LAS δ -ENDOTOXINAS.	17
ORGANIZACION GENICA	17
ORGANIZACION PROTEICA	20
MODO DE ACCION	26
RESISTENCIA A LA δ -ENDOTOXINA DE <i>B. thuringiensis</i>	31
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y METODOS	36
RESULTADOS	37
ARTICULO No. 1	38
ARTICULO No. 2	39
CLONACION DEL GEN <i>cryIA(b)</i> DE LAS CEPAS GM-7 y GM-10	40
ARTICULO No. 3	53

DISCUSION

54

LITERATURA CITADA

62

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, la cual se caracteriza por producir un cristal paraesporal de origen proteico (δ -endotoxina) durante la fase de esporulación. Las δ -endotoxinas son sintetizadas como protoxinas, mismas que después de ser ingeridas por las larvas de insectos susceptibles, son procesadas por proteasas del intestino medio para generar el fragmento tóxico (mitad N-terminal de la protoxina). Los genes que codifican para las proteínas del cristal, han sido clasificados en seis clases y varias subclases. Las clases son: Clase *cryI* (específica para lepidópteros), *cryII* (lepidópteros y dípteros), *cryIII* (coleópteros), *cryIV* (dípteros), *cryV* y *cryVI* (nemátodos). En el orden Lepidoptera se encuentra una plaga de gran importancia agrícola, *Spodoptera frugiperda*, la cual no es controlada por preparaciones comerciales de Bt. Este problema motivó nuestro interés por trabajar con dos cepas de Bt, GM-7 y GM-10, las cuales desarrollan alta actividad insecticida contra este insecto. Para clonar el fragmento tóxico del gen de la δ -endotoxina de las cepas GM-7 y GM-10, en este trabajo desarrollamos un sistema de amplificación génica por medio de la reacción de polimerasa en cadena (PCR). A partir de regiones altamente conservadas entre los genes de la clase *cryI*, diseñamos los oligonucleótidos BP-7 y BP-3, a los cuales se les creó un sitio para las endonucleasas *PstI* y *BclI*, respectivamente. A partir de ADN total, obtuvo un producto único de 2.09 kpb. Este sistema de PCR nos permitió la clonación y expresión de dos diferentes genes a partir de la cepa GM-10 y uno de GM-7. Después de hibridaciones con probadores radiactivos, inmunodetección con diferentes anticuerpos y la determinación de la secuencia nucleotídica, el gen de GM-7 y uno de GM-10 fueron identificados como *cryIA(b)*.

Otro objetivo de este trabajo, fue el de analizar los patrones estructurales de la familia de proteínas Cry. Este análisis reveló la presencia de un motivo hidrofóbico altamente conservado en el bloque de homología D2, el cual se encuentra presente tanto en toxinas específicas contra lepidópteros, dípteros y coleópteros. Interesantemente, en la parte media de este motivo hidrofóbico se encuentra un residuo de ácido aspártico. Comparaciones realizadas con patrones estructurales de la toxina de difteria (TD), revelaron que ésta también contiene un motivo hidrofóbico similar al encontrado en Bt, mismo que juega un papel fundamental en la actividad biológica de TD. Creemos que, al igual que en TD, este ácido aspártico podría jugar un papel importante en la actividad biológica de las δ -endotoxinas de Bt.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive soil bacterium characterized by its ability to produce crystalline protein inclusions during sporulation. The insecticidal crystal proteins (ICP) are synthesized as protoxins. After ingestion by susceptible larvae, the ICPs are dissolved and then processed by gut proteases to generate the true toxin (N-terminal half of the protoxin). The ICP genes have been classified into six classes: *cryI* (Lepidoptera-specific), *cryII* (Lepidoptera- and Diptera-specific), *cryIII* (Coleoptera-specific), *cryIV* (Diptera-specific) and *cryV* and *cryVI* (Nematoda-specific). In the lepidopteran order there is a very important agricultural pest, *Spodoptera frugiperda*, which is not well controlled by the commercial preparations of Bt. This problem motivated our interest to work with two Bt strains, called GM-7 and GM-10, which display high toxicity against *S. frugiperda*. In order to clone the toxic-fragment of ICP genes from these strains, we established a polymerase chain reaction (PCR) system. From highly conserved regions among *cryI* genes class, we have designated primers BP-7 and BP-3 which carrying a site for *PstI* and *BclI* endonucleases, respectively. The PCR amplification was done by using total DNA and single product of 2.09 kb was obtained. This PCR system allow us the cloning and expression of two different ICP toxic-fragment genes from GM-10 and one from GM-7. After Southern blot hybridization, Western blot immunodetection and DNA sequencing, one gene from GM-10 and those one from GM-7 were identified to be a *cryIA(b)* gene type.

Another goal of this work was to analyze the structural patterns of the δ -endotoxin proteins family. This study revealed the presence of a highly conserved hydrophobic motif within the previously described block D2, which is present not only in lepidopteran toxins but also in toxins active against diptera and coleoptera. An interesting feature of this hydrophobic motif is the presence of an aspartic residue (highly hydrophilic) in its middle part. Comparison with the amino acid sequence from diphtheria toxin, showed that it also contains a hydrophobic motif, similar to the one present in the Bt toxins. It also contains an aspartic residue in the middle part and some speculations are made in relation to the function of this specific region with regard to the toxic mechanism of action.

I. INTRODUCCION

I.1 CONTROL BIOLÓGICO COMO ALTERNATIVA A PESTICIDAS QUÍMICOS.

La lucha del hombre contra las plagas que atacan y destruyen sus cultivos es, quizás, tan antigua como la agricultura misma. Comúnmente, las pérdidas de alrededor de un 35% de los cultivos en precosecha, se deben a plagas, de los cuales los insectos realizan una tercera parte (Van Rie. 1991). Las labores realizadas para controlar las pérdidas provocadas por insectos han sido desde la intensa labor de selección de métodos físicos (cuarentenas, cultivo de meristemos, fuego, etc.) (Gabriel and Cook. 1990) hasta la aplicación de insecticidas químicos de amplio espectro (Riba, et al. 1989; Van Rie. 1991).

Entre la mas serias consecuencias del uso de biocidas químicos se encuentran: la contaminación del medio ambiente y mantos fráticos, la potenciación de los residuos químicos a través de la cadena alimenticia, el avance de plagas de menor a mayor importancia debido a la desaparición de enemigos naturales y la selección de insectos resistentes (Cunningham. 1988). En las últimas 2 décadas en Estados Unidos y Europa, un gran número de productores de granos y legumbres, han tomado la decisión de evitar el uso excesivo de pesticidas químicos en favor del biocontrol (Simon. 1991).

Con el desarrollo de las técnicas de DNA recombinante, el concepto de control biológico ha cambiado en los últimos años. Hoy en día se entiende como control biológico al uso de organismos naturales o modificados genéticamente ó al producto de gen(es), para reducir el efecto de un organismo indeseable a favor de organismos benéficos (Gabriel and Cook. 1990). Los agentes usados para el control biológico se han dividido en entomófagos (predadores y parásitos) y entomopatógenos (virus, hongos, bacterias, protozoarios y nemátodos) (Cunningham. 1988).

La tabla 1 muestra algunos de los organismos más usados en el control biológico de diversos organismos plaga (Rajchapel-Mesañ. 1990).

I.2 *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTEXTO DE LOS MICROORGANISMOS ENTOMOPATOGENOS.

Los insectos son susceptibles al ataque de una gran variedad de microorganismos, entre los que sobresalen virus, hongos y bacterias (Tabla 2).

TABLA 1.- Algunos organismos usados en el control biológico de diferentes tipos de plagas*.

ORGANISMO	ORG. BLANCO	CULTIVO	PAIS	NIVEL
<i>Tricograma maidis</i> (Lepidóptero)	Piral del maíz	Maíz	Francia Alemania	C C
<i>Encaricia formosa</i>		legumbres y hortalizas en invernadero	Francia	C
<i>Aphelinus abdominalis</i> (Himenóptero)	<i>Macosiphum</i> (Pulgón)	Tomate en invernadero	Francia	C
<i>Diglyphus isaea</i> (Himenóptero)	<i>Lyriomiza trifoli</i>	Tomate en invernadero	Francia	C
<i>Phytoseiulus persimilis</i> (Acaro)	<i>Tetranychus urticae</i> (Acaro)	Cultivos de flores y leg.	Francia	C
NEMATODOS				
<i>Neoplactena sp.</i>	Lepidópteros y Coleopteros	Flores y plantas de ornato	Francia	E
HONGOS				
<i>Endothia parasitica</i> (Cepa atenuada)	<i>E. parasitica</i>	Castaño	Francia	C
<i>Fusarium oxisporum</i> (Cepa atenuada)	<i>F. oxisporum</i>	Cultivos en invernadero	Francia	D
<i>Hansfordia pulvinata</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	Tomate	Francia	D

<i>Trichoderma harzanium</i>	<i>Stereum porpureum</i>	Arboles frutales	Francia	M
<i>Arthrobotrys irregularis</i>	<i>Meloidogine</i> (Nemátodo)	Cultivo de flores	Francia	C
<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Morenia odorata</i> (Malezas)	Huertas de cítricos	EUA	C
<i>Alternaria casiae</i>	<i>Cassia obtusifolia</i> (Malezas)	Soya, cacahuate y algodón	EUA	C
<i>Colletotrichum gleosporoides</i>	<i>Aeschynomene virginica</i>	Arroz y soya	EUA	C
	Cuscute (Malezas)	Soya	China	
<i>Puccinia condrollina</i>	<i>Condria juncea</i> (Malezas)		Australia	C
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Acaros de cítricos		Australia	C
<i>Verticillium lecanii</i>	Pulgón de Invernadero		Australia	C
BACTERIAS				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Phytlum, Rhizoctonia</i> (Hongos)	Algodón	EUA	C
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Arboles frutales, ornamentales y viñas	Australia Francia	NC
Bacterias entomopatógenas		(Ver Tabla 2)		
VIRUS		(Ver Tabla 3)		

* Adaptada de Rajnchapel-mesai, 1990.

C= Comercial; E= Experimental; D= Desarrollo; M= Depende de la demanda; NC= No comercial.

TABLA 2.- Microorganismos patógenos de insectos*.

TIPO	ESPECIES REPRESENTATIVAS	INSECTO BLANCO
BACTERIAS	<i>Bacillus popillae</i>	Coleópteros
	<i>Bacillus lentimorbus</i>	Coleópteros
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Mosquitos
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lepidópteros, dípteros, coleópteros y nemátodos. (Ver Tabla 4)
	<i>Clostridium malacosoma</i>	<i>Malacosoma sp.</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patógeno oportunista para la mayoría de los insectos.
	<i>Xenorhabdus nematopholus</i>	Insectos susceptibles al nemátodo <i>Steinernema feltiae</i> .
	<i>Rickettsiella melolontha</i>	Coleópteros, dípteros y ortópteros.
VIRUS	NPV y GV	Lepidópteros, himenópteros, coleópteros, dípteros, neurópteros y otros (ver Tabla 3).
HONGOS	<i>Bauveria bassiana</i>	Lepidópteros, homópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros.
	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	
PROTOZOARIOS	<i>Nosema fumiferanae</i>	Lepidópteros
	<i>Vairimorpha necatrix</i>	Lepidópteros

* Adaptada de Aronson y col. 1986.

Los virus pertenecientes a varias familias y varios subgrupos dentro de esas familias, causan enfermedades en lepidópteros y 10 diferentes subgrupos son patógenos a himenópteros. Sin embargo, muchos virus que atacan mamíferos pertenecen a alguno de esos grupos (Crook and Jarret. 1991). No obstante, los virus que forman la familia Baculoviridae infectan exclusivamente a artrópodos y nunca se han localizado en vertebrados o plantas (Wood and Granados. 1991). La limitada variedad de huéspedes de los baculovirus los ha hecho atractivos para su uso como bioinsecticidas (Merryweather, et al. 1990). De éstos, los más conocidos y usados son el virus de la nucleopoliedrosis (NPV) y el virus de la granulosis (GV). Además, el uso de NPV como vehículo para otro tipo de gen(es) tóxicos a insectos se ha desarrollado rápidamente (Jarvis, et al. 1990; O'Reilly and Miller. 1991), por ejemplo se ha hecho posible la construcción de un virus que porta el gen de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* HD-73 el cual resultó ser igualmente tóxico que los cristales puros (Merryweather, et al. 1990; Martens, et al. 1990).

No obstante, la producción a nivel industrial de NPV y GV es aún limitada (Tabla 3), ya que el virus requiere ser producido en larvas ó líneas celulares y las condiciones de almacenamiento son más críticas que para otros pesticidas (Cunningham. 1988).

Por lo que respecta a los hongos entomopatógenos, se requiere del contacto de las conidias, blastosporas ó zoosporas, según sea el caso, con la cutícula del insecto blanco, ya sea en estado larvario ó adulto. La mayoría de los hongos patógenos de insectos producen quitinasas, lipasas y proteasas, encontrándose que, en algunas ocasiones, la producción de quitinasa no siempre se correlaciona con virulencia (Domnar and Warner. 1991). Por otra parte, Liger y col. (1986) reportaron que algunos hongos entomopatógenos producen amino y carboxipeptidasas, esterases, quitobiasas, quimoelastasas y N-acetil-D-glucosaminidasas, las cuales, en su conjunto, producen la muerte del insecto (Domnar and Warner. 1991). Los hongos más utilizados para el control biológico son: *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* (Aronson, et al. 1986) (Tabla 2). No obstante, existen limitantes para su producción y ésta depende de grandes fluctuaciones en el mercado (Rajncapel-Mesai. 1990).

El grupo de bacterias entomopatógenas incluye especies con capacidad para infectar insectos sanos, así como a un gran número de patógenos oportunistas, los cuales se multiplican rápidamente si ganan acceso al hemocele a través de heridas ó por infecciones primarias. Un ejemplo de esto último es la bacteria *Xenorhabdus nematophilus*, la cual habita en el

Tabla 3.- Virus usados como bioinsecticidas*.

TIPO	INSECTO BLANCO	PAIS	NIVEL
NPV	<i>Neodiprion sertifer</i>	Finlandia	C
		Reino Unido	C
		EUA	E
		Francia	E
NPV ⁺	<i>Heliothis zea, H. armigera, H. virescens, Mamestra brassicae, Spodoptera exigua, S. littoralis.</i>	Francia	E
		Francia	E
NPV80 ⁺	<i>Autographa californica, S. exigua, Plutella xylostella, Estigmene acrea, Trichoplusia ni, Pseudoplusia includens</i>	Guatemala	C
NPV82 ⁺	<i>S. sunia y S. exigua</i>	Guatemala	C
GV	<i>Cydia pomonella</i>	EUA	E
		Bélgica	E

* Tomada de Cunningham. 1988.

C= Comercial; E= Experimental.

+ = Sus dos productos virales no son completamente activos.

tracto alimenticio del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae*. El nemátodo actúa como jeringa para inocular la bacteria a las larvas susceptibles, el microorganismo se multiplica rápidamente y la larva muere por septicemia (Aronson, *et al.* 1986).

Aunque si bien, se conocen muchas bacterias que atacan insectos, solo algunas cuantas son producidas a nivel industrial. La bacteria mas ampliamente usada en el control microbiológico de insectos plaga es *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Van Rie. 1991; Aronson, *et al.* 1986).

Existen otras bacterias del género *Bacillus* que se usan para el control de ciertas plagas de importancia agrícola y de salud pública, entre las que sobre salen *B. popillae*, *B. lentimorbus* y *B. sphaericus* (Balaraman and Hoti.1988) (Tabla 2). De acuerdo con la National Pesticide Information, se dice que hay 410 formulaciones registradas para Bt, 6 para *B. popillae* y *B. lentimorbus* (Aronson, *et al.* 1986) y ninguna, a nivel comercial, para *B. sphaericus* (De Barjac, *et al.* 1984; Aronson, *et al.* 1986). *B. lentimorbus* y *B. popillae* producen "la enfermedad lechosa" en las larvas de algunos coleópteros (Bakhiet and Stahly. 1985; Bulla, *et al.* 1978).

Los bacilos que producen la enfermedad lechosa tienen la gran ventaja de persistir por mucho tiempo en el medio natural, pero la desventaja radica en que su producción se realiza en larvas vivas (Bulla, *et al.* 1978).

Por otra parte, *B. sphaericus* produce una toxina en forma de cristal, la cual tiene que ser activada en el intestino de las larvas de dípteros (Broadwell and Baumann.1987). El cristal está constituido por dos proteínas, una de 51 y otra de 42 KDa; éstas, una vez activadas, dan lugar a péptidos de 44 y 39 KDa, respectivamente (Broadwell and Baumann. 1987; Baumann, *et al.* 1991; Clark and Baumann. 1990; Broadwell, *et al.* 1990). Este procesamiento involucra la remoción de aminoácidos en ambos extremos de la proteína (Broadwell and Baumann.1987; Clark and Baumann. 1990). La actividad larvicida se lleva a cabo por la acción binaria de las proteínas del cristal (Broadwell, *et al.* 1990). Los genes que codifican para cada una de las proteínas han sido clonados y determinada su secuencia nucleotídica, encontrándose gran similitud entre los dos genes, pero difieren mucho con respecto a los genes de la δ -endotoxina (Baumann, *et al.* 1988).

Por lo que respecta a Bt, este bacilo sintetiza un cristal de naturaleza proteica, el cual es tóxico contra las larvas de diferentes órdenes de insectos. La mayoría de los productos comerciales a base del cristal de Bt son activos contra lepidópteros (Tabla 4) (Dulmage. 1989; Rajnchapel-Mesai. 1990). El aislamiento de cepas específicas contra dípteros

(Goldberg and Margalit. 1977) y coleópteros (Herrnstad, *et al.* 1986) y su rápida comercialización, han ampliado el mercado potencial de Bt. Los bioinsecticidas comerciales a base de Bt son efectivos contra más de 50 especies de lepidópteros (Fischhoff, *et al.* 1987).

Se ha estimado que las ventas de insecticidas es de 3,000-5,000 millones de dólares anuales a nivel mundial, de los cuales solo en EU se invierten 400 millones en el control de lepidópteros (Goldburg and Tjaden. 1990). La ventas anuales de Bt representan solo el 1% del total del mercado de pesticidas, aunque éstas podrían incrementarse dramáticamente en los próximos 10 años, sobre todo por la producción de plantas y microorganismos modificados genéticamente con genes que codifican para la δ -endotoxina provenientes de diferentes cepas de Bt (Dart. 1990; Simon. 1991; Fox. 1989).

TABLA 4.- Cepas de *Bacillus thuringiensis* más usadas*.

SUBESPECIE	LUGAR DE AISLAMIENTO	INSECTO	USO
<i>kurstaki</i> (HD-1)	Texas, 1968	L	Hortalizas y bosques.
<i>kurstaki</i> (HD-12)	Connecticut, 1980	L	Más potente (2-4X) que HD-1 contra la palomilla gitana.
<i>aizawai</i>	Inglaterra, 1977	L	Control de <i>Galleria mellonella</i> en apiarios.
<i>israelensis</i>	Israel, 1977	D	Control de mosquitos y moscas acuáticas.
<i>morrisoni</i>	Japón, 1985	D	Igual que <i>israelensis</i> .
<i>tenebrionis</i>	Alemania, 1983	C	Escarabajo colorado de la papa.
<i>san diego</i>	California, 1985	C	Igual que <i>tenebrionis</i> .

* Tomada de Dulmage. 1989.

I.3 COMPUESTOS TOXICOS DE *B. thuringiensis*.

Bt sintetiza diversos tipos de factores tóxicos, entre los que se encuentran la α y β exotoxinas, la δ -endotoxina y el "factor piojo" (Whiteley and Schnepf. 1986; Van Rie. 1991).

La α -exotoxina es una lecitinasa C termolábil. Esta enzima hidroliza lecitina y esfingomiélin, y aunque ha sido catalogada como toxina, se trata de una de las varias exoenzimas que secreta Bt durante la fase de crecimiento exponencial (Angus. 1962; Whiteley and Schnepf. 1986; Van Rie. 1991).

Por otra parte, la β -exotoxina, también llamada thuringiensina, es una toxina altamente termoestable, y es producida por algunas cepas de Bt que muestran alta actividad tóxica contra insectos (moscas), ácaros y nemátodos, aunque también es tóxica a plantas y vertebrados (Van Rie. 1991). Químicamente, la β -exotoxina es una adenina con un residuo de glucosa y ácido alárico. El mecanismo de acción de la β -exotoxina no es muy claro, pero se ha encontrado que interfiere con la RNA polimerasa DNA dependiente. También se ha demostrado que inhibe la mitosis en meristemos de raíz simulando el efecto de la colchicina y vinblastina (Marec, *et al.* 1989). Bt produce la β -exotoxina en la fase de crecimiento logarítmico y su aplicación se encuentra circunscrita a la Unión Soviética, ya que debido a sus características mutagénicas, ha sido prohibida en EU, Europa y Japón (Rajncapel-mesai. 1990).

La δ -endotoxina es, indudablemente, la toxina mas importante de Bt. La δ -endotoxina se acumula durante la fase de esporulación formando un cristal parasporal, el cual representa de 20-30% del peso seco de cultivos esporulados (Aronson, *et al.* 1986; Höfte and Whiteley. 1989). A diferencia de la α y β exotoxinas, la actividad tóxica de la δ -endotoxina es muy específica para algunos insectos en su estadio larvario y es la que mas ampliamente se ha utilizado en productos comerciales.

Además de las toxinas anteriores, Bt sintetiza algunos otros compuestos que podrían influir de manera importante en el aspecto global de la toxicidad, sobre todo cuando la bacteria se encuentra en la fase vegetativa. Se han logrado identificar dos inhibidores inmunes, el A (InA) y el B, los cuales bloquean de manera selectiva el sistema de defensa humoral del insecto contra *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, respectivamente (Edlund, *et al.* 1976). InA es una metaloproteasa neutra que degrada selectivamente dos proteínas antibacterianas (attacinas y

cecropinas) producidas en la hemolinfa del insecto (Dalhammar and Steiner. 1984; Lövgren, *et al.* 1990).

Bt también produce una bacteriocina llamada thuricina. Este compuesto demostró poseer actividad antibacteriana contra 48 de 56 cepas de Bt y otras Gram positivas, pero no contra algunas especies de Gram negativas. Algunas preparaciones parcialmente puras de thuricina tuvieron actividad de fosfolipasa A (Favret, *et al.* 1989).

1.4 MEJORAMIENTO DE LOS PRODUCTOS A BASE DE *B. thuringiensis*.

El avance realizado en la tecnología de fermentaciones y formulación de producto de Bt, han reducido los costos de producción del biopesticida (Meeusen. 1990).

La alta especificidad de la toxina producida por la mayoría de las cepas de Bt, puede ser una desventaja cuando determinado cultivo es atacado por diferentes especies de insectos. Esta limitante ha sido contrarrestada en dos formas: 1) el aislamiento y selección de cepas con amplio espectro de huéspedes; 2) la transferencia de genes entre diferentes cepas de Bt para producir cepas con mayor espectro insecticida (Klier, *et al.* 1983; Gonzalez, *et al.* 1982; Gonzalez and Carlton. 1984; Battisti, *et al.* 1985; Jarrett and Stephenson. 1990; Crickmore, *et al.* 1990; Gonzalez. 1990; Honée, *et al.* 1990; Caramori, *et al.* 1991; Lecadet, *et al.* 1992; Lereclus, *et al.* 1992).

La estabilidad de la δ -toxina en el medio ambiente es muy baja, ya que diversos factores ambientales la inactivan. Tal es el caso de la luz solar (Pusztai, *et al.* 1991) y el contenido y tipo de taninos del follaje de los cultivos (Lüthy, *et al.* 1985). Una de las posibles alternativas para incrementar la persistencia de la toxina es la microencapsulación. Esto ha sido posible por la clonación del gen de esta proteína en *Pseudomonas fluorescens* y la adición de un fijador químico al tanque de fermentación. El fijador mata a la célula recombinante, dándole a la toxina una cápsula biológica. Otra forma de protección que ha dado buenos resultados ha sido la clonación del gen de la δ -endotoxina en cepas de microorganismos (*Rhizobium* sp. y *Pseudomonas* sp.) que colonizan la raíz de diferentes cultivos obteniéndose resultados similares a lo que ocurre con las cepas nativas de Bt (Obukowicz, *et al.* 1986; Nambiar, *et al.* 1990; Stock, *et al.* 1990; Waalwijk, *et al.* 1991). Así mismo, también se ha logrado controlar al gusano barrenador del maíz, mediante la introducción del gen de la δ -endotoxina en la bacteria endofítica *Clavibacter xyli*, habitante normal del

xilema del maíz y otras plantas (Turner, *et al.* 1991).

La estabilidad de la δ -endotoxina en el campo también se ha mejorado mediante la inserción de la parte del gen que codifica para parte tóxica de la δ -endotoxina en el genoma de plantas, resultando en cultivos transgénicos, quedando, así, protegidos contra el ataque de diversos insectos (Barton, *et al.* 1987; Vaeck, *et al.* 1987; Delannay, *et al.* 1989; Knight, 1989; Stark and Beachy, 1989; Goldberg and Tjaden, 1990; Fischhoff, *et al.* 1987).

Por otra parte, en el control de larvas de mosquitos de importancia médica, se ha demostrado que Bt subespecie *israelensis* controla eficientemente a *Anopheles subpictus* y *Culex sitiens* causando una reducción del 96.2% en las larvas del primer estadio (Rawlins, 1989). Sin embargo, las esporas-cristales son rápidamente removidos del área de alimentación de la larva. La clonación del gen de la δ -endotoxina en cianobacterias podría ser una buena alternativa, ya que estos microorganismos crecen y habitan la superficie de habitats acuáticos (Van Rie, 1991; Murphy, *et al.* 1992; Thanabalu, *et al.* 1992)

1.5 CLASIFICACION DE *B. thuringiensis*.

El grupo de cepas de Bt presenta muchas similitudes fenotípicas y genéticas con *B. cereus*. La determinación del porcentaje de G-C, así como los datos de hibridación de DNA sugieren una sola genoespecie para Bt, *B. cereus* y aún para *B. anthracis* (De Barjac and Frachon, 1990). Los resultados de la determinación de ácidos grasos confirma la similitud entre estas tres especies de *Bacillus* (Kaneda, 1968). Sin embargo, la gran importancia de Bt en el control biológico de diversos insectos de interés médico, agrícola y forestal, apoya la decisión de clasificar a Bt como una especie aparte. No obstante la diferencia en patogenicidad y especificidad de Bt, hizo necesario implementar un método de clasificación para Bt. Esta se basó, en primer término, en la caracterización serológica y fenotípica (Tabla 5) y, posteriormente, en patotipos (Tabla 6) (Höfte and Whiteley, 1989).

La capacidad de discriminar diferentes serotipos de cristales implicó la presencia de diferentes tipos de endotoxina. El análisis de cristales de varias cepas de Bt con diferente especificidad mostraron diferencias en el peso molecular de las δ -endotoxinas (Calabrese, *et al.* 1980; Lilley, *et al.* 1980; Tyrell, *et al.* 1981). En 1983, Takashi Yamamoto demostró que Bt cepa HD-1 sintetiza dos tipos diferentes de toxinas, a las que denominó P1

y P2. Estas toxinas poseen diferencias en peso molecular y especificidad, ya que P1 fué tóxica a lepidópteros y P2 a mosquitos (Yamamoto. 1983).

TABLA 5.- Clasificación de *Bacillus thuringiensis* de acuerdo a su antígeno flagelar*.

ANTIGENO H	SEROVARIEDAD	ABREVIATURA	1ª. MENCIÓN Y VALIDACION
1	<i>thuringiensis</i>	THU	Berliner, 1915; Helmpel & Angus, 1958.
2	<i>finlayi</i>	FIN	Helmpel & Angus, 1958.
3a	<i>alesti</i>	ALE	Toumanoff & Vago, 1951; Helmpel & Angus, 1958.
3a3b	<i>kurstaky</i>	KUR	de Barjac & Lemille, 1970.
4a4b	<i>solto</i>	SUT	Ishiwata, 1905; Helmpel & Angus, 1958.
4a4c	<i>konyae</i>	KEN	Bonnefoi & de Barjac, 1963.
5a5b	<i>gallorise</i>	GAL	Shvetosova, 1959; de Barjac & Bonnefoi, 1962.
5a5c	<i>canadensis</i>	CAN	de Barjac & Bonnefoi, 1972.
6	<i>entomocidus</i>	ENT	Helmpel & Angus, 1958.
7	<i>aizawai</i>	AIZ	Bonnefoi & de Barjac, 1963.
8a8b	<i>morrisoni</i>	MOR	Bonnefoi & de Barjac, 1963.
8a8c	<i>ostriniae</i>	OST	Galzin, <i>et al.</i> , 1975.
8b8d	<i>nigeriensis</i>	NIG	de Barjac, <i>et al.</i> , no publicado.
9	<i>tolworthi</i>	TOL	Norris, 1964; de Barjac & Bonnefoi, 1968.
10	<i>darmstadtensis</i>	DAR	Krieg, 1968.
11a11b	<i>toumanoffi</i>	TOU	Krieg, 1969.
11a11c	<i>kyushuensis</i>	KYU	Ohba & Aizawa, 1979.
12	<i>thompsoni</i>	THO	de Barjac & Thompson, 1970.
13	<i>pakistan</i>	PAK	de Barjac, <i>et al.</i> , 1977.
14	<i>israelensis</i>	ISR	de Barjac, 1978.
15	<i>dakota</i>	DAK	De Lucca, Simonson & Larson, 1979.
16	<i>indiana</i>	IND	De Lucca, Simonson & Larson, 1979.
17	<i>tohokuensis</i>	TOH	Ohba, Aizawa & Shimizu, 1981.
18	<i>kumamotoensis</i>	KUM	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981.
19	<i>tochiensis</i>	TOC	Ohba, Ono, Aizawa & Iwanami, 1981.
20a20b	<i>yunnanensis</i>	YUN	Wan-yu, <i>et al.</i> , 1979.
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	PON	de Barjac, <i>et al.</i> , no publicado.
21	<i>colmeri</i>	COL	De Lucca, <i>et al.</i> , 1984.
22	<i>shandongensis</i>	SHA	Ying, Jie & Xichang, 1986.
23	<i>japonensis</i>	JAP	Ohba & Aizawa, 1986.
24	<i>neoleonensis</i>	NEO	Rodríguez-Padilla, <i>et al.</i> , 1988.
25	<i>coreanensis</i>	COR	de Barjac & Lee, no publicado.
26	<i>silo</i>	SIL	de Barjac & Lecadet, no publicado.
27	<i>mexicanensis</i>	MEX	Rodríguez-Padilla & Galán-Wong, 1988.

*Tomada de De Barjac and Frachon. 1990.

TABLA 6.- Clasificación de las proteínas del cristal producido por *Bacillus thuringiensis*, de acuerdo a su organización proteica y rango de huésped*.

TIPO DE PROTEINA	PESO MOLECULAR (KDa)	HUESPED
CryIA(a)	133.2	L
CryIA(b)	131.0	L
CryIA(c)	133.3	L
CryIB	138.0	L
CryIC	134.8	L
CryID	132.5	L
CryIE	133.2	L
CryIF	133.6	L
CryIG	130.0	L
CryIIA	70.9	L-D
CryIIB	70.8	L
CryIIIA	73.1	C
CryIIIB	74.3	C
CryIIIC	129.4	C
CryIIID	73.0	C
CryIVA	134.4	D
CryIVB	127.8	D
CryIVC	77.8	D
CryIVD	72.4	D
CryV?	81.2	L-C
CryVA(a)**		N
CryVA(b)**		N
CryVIA**		N
CryVIB**		N
CyIA	27.4	Citotóxica

*Adaptada de Höfte and Whiteley. 1989. El peso molecular es dado a partir de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica del primer gen reportado para cada una de las clases.

L= Lepidópteros; C= Coleópteros; D= Dípteros; N= Nemátodos.

**El peso molecular no se ha reportado.

? Apareció después de Feitelson y col 1992.

Estudios posteriores revelaron que el cristal de la mayoría de las cepas de Bt puede estar constituido por diferentes tipos de proteínas (Haider, *et al.* 1990), tal es el caso de Bt *aizawai* 7.29, la cual produce, al menos, 5 tipos de δ -endotoxina y cada una desarrolla diferente especificidad (Lecadet, *et al.* 1988; Sanchís, *et al.* 1988).

No es muy claro si esas proteínas actúan sinérgicamente ó nó, aunque se creé que en algunas cepas puede existir algún tipo de interacción o sinérgismo (Yu, *et al.* 1987; Ohba, *et al.* 1988; Arvidson, *et al.* 1989; Aronson, *et al.* 1991).

La expresión de las δ -endotoxinas no se realiza a los mismos niveles y su síntesis puede diferir entre cepas que contienen el mismo tipo de gen, además, algunos genes que codifican para la δ -endotoxina pueden ser crípticos (Masson, *et al.* 1989; Dankocsik, *et al.* 1990).

Por lo anterior, se puede concluir que la diferencia de diferentes tipos de proteínas en el cristal, su relativa abundancia y sus probables interacciones, podrían explicar, en parte, la gran variación en el espectro insecticida (Van Rie. 1991).

La secuencia nucleotídica de más de 50 genes que codifican para δ -endotoxina ha sido reportada; muchas de esas secuencias son idénticas o muy parecidas, por lo que representan al mismo gen. En base a la estructura primaria y espectro de actividad insecticida los genes que codifican para las proteínas del cristal, han sido clasificados en 6 grandes clases y varias subclases. Las 6 clases son: Clase *cryI* (específica para lepidópteros), *cryII* (lepidópteros y dípteros), *cryIII* (coleópteros), *cryIV* (dípteros), *cryV* y *cryVI* (nemátodos) (Tabla 6). Clases adicionales podrían ser agregadas posteriormente, por ejemplo genes que codifican para δ -endotoxinas atóxicas (Höfte and Whiteley. 1989; Feitelson, *et al.* 1992).

CLASE *cryI*.- Las δ -endotoxinas pertenecientes a esta clase son las mas comunes, y se encuentran distribuídas en casi todos los diferentes serotipos de Bt (Visser. 1989). Hasta el momento, se han caracterizado 11 diferentes tipos de genes *cryI* (Visser, *et al.* 1990; Chambers, *et al.* 1991; Feitelson, *et al.* 1992; Gleave, *et al.* 1992). Todas las proteínas *CryI* son sintetizadas en forma de protoxinas de alrededor de 130-140 KDa, las cuales forman cristales bipiramidales y son altamente específicos contra lepidópteros. La única excepción es una *CryIAb* producida por Bt var. *aizawai* IC1, la cual posee actividad contra lepidópteros y dípteros (Haider and Ellar. 1988).

Las protoxinas requieren ser procesadas para dar lugar al fragmento

tóxico cuyo peso molecular es de alrededor de 60-70 KDa (Höfte and Whiteley. 1989; Aronson, *et al.* 1986; Aronson and Arvidson. 1987).

CLASE *cryII*.- Las δ -endotoxinas *CryII* poseen un peso molecular de 65-70 KDa. Estas proteínas forman cuerpos cuboidales en cepas de diferentes serotipos y fueron nombradas, en primer instancia, como P2 (factor mosquito) (Yamamoto. 1983).

En esta clase solo se han caracterizado dos subclases, *cryIIA* y *cryIIB*. A pesar de su alta homología (87% a nivel de aminoácidos), *CryIIA* es específico contra lepidópteros y dípteros, mientras que *CryIIB* es tóxico solo a los primeros (Donovan, *et al.* 1988(a); Widner, *et al.* 1989).

Estudios posteriores revelaron que la diferencia de especificidad está determinada por un segmento de 75 aminoácidos (307-382). En esta región *CryIIA* y *CryIIB* difieren solo en 18 residuos, indicando que la especificidad puede ser dada por el cambio de unos cuantos aminoácidos (Widner and Whiteley. 1990).

La activación protelítica de las δ -endotoxinas *CryII* produce fragmentos tóxicos de 50-60 KDa (Nicholls, *et al.* 1990).

CLASE *cryIII*.- Las proteínas pertenecientes a esta clase son específicas contra coleópteros y, con excepción de la subclase *cryIIIC*, todos los genes *cryIII* han sido clonados a partir de cepas que producen cristales romboidales (Donovan, *et al.* 1988(c); Herrnsstadt, *et al.* 1986; Van Rie. 1991(b)). La expresión del gen *cryIIIA* en *E. coli*, dió como resultado la síntesis de un péptido de 72 KDa. Esta proteína es convertida a un péptido de 66 KDa, por proteasas asociadas con la esporulación, las cuales remueven 57 residuos de la parte N-terminal (McPherson, *et al.* 1988). La parte amino terminal es homóloga a su contraparte en las clases I y IV, careciendo de la región correspondiente a la mitad carboxilo terminal de *cryI* y *cryIV* (Höfte and Whiteley. 1989; Sanchis, *et al.* 1989).

La secuencia nucleotídica de, al menos, 3 *cryIIIA* ha sido reportada, mismas que resultaron ser idénticas a la reportada en primera instancia, *Bt var. san diego* (Herrnsstadt, *et al.* 1987; Höfte, *et al.* 1987; Sekar, *et al.* 1987; John, *et al.* 1987).

Las δ -endotoxinas *CryIIIB* y *CryIIID* son 69 y 74% homólogas a *CryIIIA*, respectivamente (Sick, *et al.* 1990; Lambert, *et al.* 1992).

CLASE *cryIV*.- La clase *cryIV* está compuesta por un grupo muy heterogéneo de δ -endotoxinas específicas contra dípteros. Hasta el momento se han descrito 4 diferentes tipos de genes que codifican para las δ -endotoxinas clase *CryIV*. El gen de las subclases *cryIVA*, *cryIVB*, *cryIVC* y *cryIVD*, codifican para proteínas de 135, 128, 78 y 72 KDa,

respectivamente (Tabla 6). Los 4 genes fueron clonados a partir de un mismo plásmido de 72 MDa, presente en *Bt var. israelensis*. Todas las proteínas señaladas conforman un cristal complejo de forma ovoide (Höfte and Whiteley. 1989). Aunque si bien, ninguna toxina, en forma individual, es tan tóxica como el cristal intacto, preparaciones provenientes de diferentes fuentes, *Bt var israelensis* (Chilcott and Ellar. 1988), cepas recombinantes de *E. coli* (Bourgouin, *et al.* 1988; Chunjatupornchai, *et al.* 1988; Delécluse, *et al.* 1988) o *B. subtilis* (Donovan, *et al.* 1988(b); Garduno, *et al.* 1988; Yamamoto, *et al.* 1988), han mostrado que todos los componentes del cristal son, en diferente grado, tóxicos contra larvas de dípteros. Una posible explicación a estos resultados, es que dos ó más proteínas actúan en forma sinérgica para dar la actividad insecticida (Yu, *et al.* 1987). Tal evidencia ha sido mostrada para la proteína CytA, que también forma parte del cristal de algunas cepas de *Bt subsp. israelensis*, la cual posee nula ó muy baja actividad contra dípteros, ya que se ha reportado que CytA incrementa significativamente la actividad tóxica de CryIVA, CryIVB y CryIVD contra larvas de *Aedes aegypti* (Wu and Chang. 1985).

La organización de CryIVA y CryIVB es muy similar a CryI. CryIVA y CryIVB son procesadas a péptidos de 53-78 KDa. El fragmento tóxico radica en la mitad N-terminal, esto fue confirmado para CryIVB (Chunjatupornchai, *et al.* 1988; Delécluse, *et al.* 1988; Pao-Intara, *et al.* 1988).

El gen *cryIVC* codifica para una proteína de 78 KDa. Este gen fue denominado ORF1. Un segundo frente abierto de lectura (ORF2), fue localizado 45 pb debajo del codón de terminación del ORF1. Es interesante notar que *cryIVC* (ORF1) muestra gran homología con la parte 5' de otros genes *cry*, mientras que ORF2 desarrolla la homología a la parte 3', sugiriendo que ORF 1 y ORF 2 formaban un solo gen (Thorne, *et al.* 1986).

Finalmente, *cryIVD* codifica para una proteína de 72 KDa (Donovan, *et al.* 1988(b)). Esta toxina, a diferencia del resto CryIV, es convertida a un péptido de 30 KDa (Chilcott and Ellar. 1988; Ibarra and Federicci. 1986; Pfannenstiel, *et al.* 1986). La comparación de secuencia de aminoácidos reveló una muy limitada homología con otras δ -endotoxinas (Höfte and Whiteley. 1989).

1.6. ESTRUCTURA Y ORGANIZACION GENICA Y PROTEICA DE LAS δ -ENDOTOXINAS.

1.6.1 ORGANIZACION GENICA.

Los genes que codifican para la δ -endotoxina se ha localizado tanto en el cromosoma como en plásmidos conjugativos en diferentes cepas de Bt.

Una característica muy importante de la organización estructural de los genes *cry* es la presencia de secuencias repetidas que flanquean al gen (Kronstad and Whiteley. 1984). Estudios realizados con varios genes *cryI*, mostraron que éstos son flanqueados por dos tipos de secuencias repetidas invertidas (IR), IR2 de 2150 pb (Kronstad and Whiteley. 1986) y por elementos de transposición (Lereclus, *et al.* 1984; Lereclus, *et al.* 1989), las cuales son acompañadas por verdaderas secuencias de inserción (IS) (Lereclus, *et al.* 1986; Mahillon and Lereclus. 1988; Mahillon, *et al.* 1985; Menau, *et al.* 1990). Algo similar fue encontrado para el gen *cryIVA* (Bourgouin, *et al.* 1988) (Fig. 1).

El análisis de la secuencia nucleotídica de tres elementos IR revelaron todas las formas de una secuencia de inserción (Mahillon, *et al.* 1987). El elemento de transposición, Tn4430 (Fig. 1), cuya transposición fue obtenida tanto en Bt (Lereclus, *et al.* 1983) como en *E. coli* (Lereclus, *et al.* 1986), ha sido relacionado con la familia de Tn3. Así, este transposón, de 4149 pb se define como un nuevo tipo de elemento de movilización genética clase II (Lereclus, *et al.* 1989).

Se ha especulado que la presencia de los genes *cry* en plásmidos conjugativos, además de las secuencias de inserción y elementos de movilización, podría conferir una ventaja adaptativa a las especies de Bt, asegurando una rápida dispersión de los genes *cry* a otras cepas de Bt ó especies relacionadas (Delécluse, *et al.* 1991; González, *et al.* 1981) ya sea por conjugación (Battisti, *et al.* 1985; Reddy, *et al.* 1987) ó transducción (Ruhfel, *et al.* 1984; Lecadet, *et al.* 1980), facilitando así la posible creación de nuevos genes *cry* por medio de recombinación homóloga (Crickmore, *et al.* 1990; Caramori, *et al.* 1991; Van Rie. 1991(b)).

La síntesis de las δ -endotoxina en Bt posee dos características muy particulares: a) es dependiente de la fase de esporulación y b) es muy eficiente. Aunque si bién, no se ha demostrado feacientemente, que la síntesis de la toxina sea regulada por los elementos génicos que flanquean al gen, el nivel de síntesis de la toxina es mas dependiente del número de copias del plásmido donde reside el gen y el número de copias del gen en esos plásmidos ó en el cromosoma bacteriano (Lereclus, *et al.* 1989).

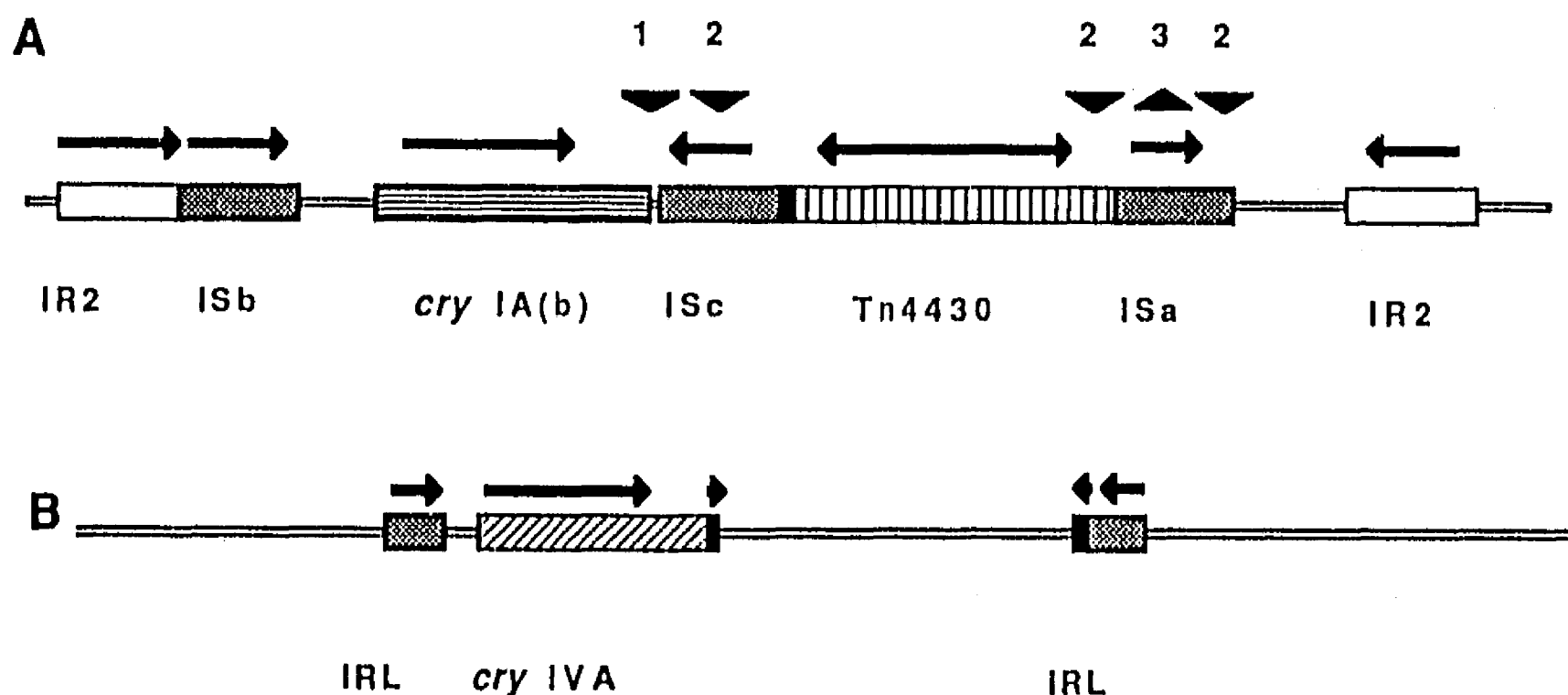


FIGURA 1.- Organización estructural génica de los elementos de inserción y transposición que flanquean a los genes *cry*. **A:** Este modelo resume lo encontrado en diferentes plásmidos y cromosoma de algunas cepas de Bt. Las cabezas de flecha 1 y 2, indican inserción y la 3 deleción, para Bt HD-73 (1), *aizawai* 7.29 (2) y HD-1 (3). IR, secuencia invertida repetida; IS, secuencia de inserción. La notación ISa, b y c se refiere a que son iso-elementos de IS235. **B:** Representa a un fragmento de DNA del plásmido de 72 MDa residente en Bt subsp. *israelensis*. Las flechas en los paneles A y B indican la dirección de la transcripción y la relativa orientación de IR2, IS e IRL. El doble sentido en Tn4430 implica que el transposón puede ser encontrado en ambas orientaciones.

La regulación de la expresión de los genes *cry* se puede realizar tanto a nivel de transcripción como de traducción. Diversos estudios realizados con cepas de Bt *spo-* indican claramente que la síntesis de la toxina es dependiente de la esporulación ya que mutantes *spo-* bloqueadas en t_0 (t_0 , t_1 , etc. se refiere a número de horas después que ha iniciado la esporulación), no produjeron cristal, mientras que mutantes bloqueadas después de t_2 sí lo hicieron.

El mayor conocimiento de la región del promotor del inicio de la transcripción lo ha dado el estudio del gen *cryIA(a)*, el cual es transcrito a partir de dos sitios, separados por 11 pb, BTI y BTII (Fig. 2). Estos promotores son activados a diferentes tiempos durante la fase de esporulación (Wong, *et al.* 1983). BTI es activado en fases tempranas de esporulación (t_1 - t_2), mientras que BTII lo es desde la fase media hasta la tardía (t_4 - t_6) (Höfte and Whiteley. 1989). Estudios *in vitro*, realizados con los genes *cryIA(a)*, *cryIB* y *cytA* han demostrado que la transcripción a partir de BTI, es catalizada por una RNA polimerasa que contiene una

subunidad sigma de 35 KDa (σ^{35}) (Brown and Whiteley. 1988). Mientras que otra RNA polimerasa, conteniendo una subunidad sigma de 28 KDa (σ^{28}) es la que dirige la transcripción a partir de BTII (Brown and Whiteley. 1990). Ninguno de esos dos promotores es activado por subunidades sigma de fase vegetativa (Klier, *et al.* 1983). Sin embargo, en *E. coli* el gen de la delta-endotoxina es transcrito desde la fase de crecimiento exponencial a partir de un promotor que se encuentra entre BTI y BTII, mismo que es específico para *E. coli* (Wong, *et al.* 1983).

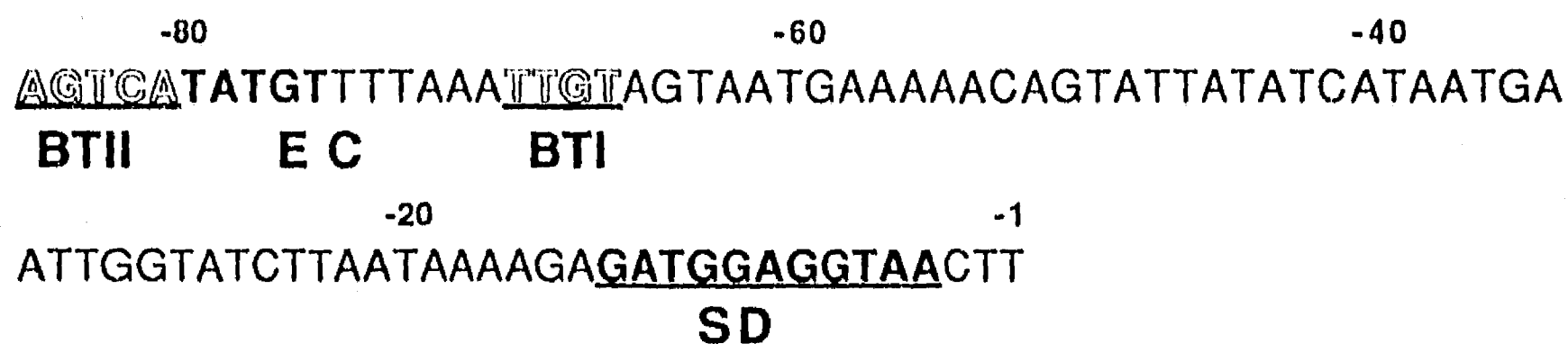


FIGURA 2.- Secuencia nucleotídica de la región de inicio de transcripción del gen *cryIA(a)*. BTI, BTII y EC representan la posición del inicio de la transcripción para *B. thuringiensis* y *E. coli*, respectivamente. SD indica la secuencia Shine-Dalgarno. Los números indican el número de bases hacia el 5' del gen estructural de *cryIA(a)*.

La secuencia a nivel de aminoácidos del factor σ^{35} y σ^{28} mostraron 88 y 85% de identidad con respecto a σ^E y σ^K de *B. subtilis*, respectivamente. Los factores σ^{35} y σ^{28} fueron capaces de sustituir eficientemente a σ^E y σ^K por lo que se piensa que las subunidades sigma de los promotores de las δ -endotoxinas de Bt podrían ser las equivalentes de σ^E y σ^K en *B. subtilis* (Adams, *et al.* 1991). Sin embargo, los promotores BTI y BTII no son los únicos identificados en genes que codifican para la δ -endotoxina de Bt (Van Rie. 1991; Ward and Ellar. 1986). De esta forma, la regulación de la expresión de los genes que codifican para la toxina, a nivel transcripcional parece ser debido a grandes cambios en los factores sigma (Waalwijk, *et al.* 1985; Shekar, *et al.* 1987).

Los altos niveles de expresión de los genes que codifican para las δ -endotoxinas han sido correlacionados con la alta estabilidad del RNA_m (Wong and Chang. 1986), misma que puede ser determinada por la estructura del terminador transcripcional (Emory, *et al.* 1992). En el caso del gen *cryIA(a)* se mostró que el terminador transcripcional actúa como

un retrorregulador positivo e incrementa la estabilidad del RNA_m (Wong and Chang. 1986).

1.6.2 ORGANIZACION PROTEICA.

Las proteínas que conforman el cristal de las diferentes cepas de Bt poseén, como característica primordial, la de ser sintetizadas como protoxinas. Estas deben ser procesadas, en el intestino de las larvas susceptibles, a la forma biológicamente activa, la toxina. Las protoxinas de 125-145 KDa son convertidas a fragmentos tóxicos de 60-70 KDa. Las protoxinas CryIII, CryII, CryIVA y CryIVB también producen una toxina de 60 KDa, mismas que son resistentes a posteriores proteólisis.

Estudios realizados con diferentes protoxinas y toxinas han mostrado que, no obstante su divergencia en estructura primaria, se ha podido obtener un consenso de estructura secundaria. De esta manera, por medio de métodos físicos y teóricos, se ha deducido que la region N-terminal es rica en α -hélice y el C-terminal contiene, en forma alternada, β -plegadas y formas sin estructuración (loops y coils) (Carey, *et al.* 1986; Bietlot, *et al.* 1989; Choma, *et al.* 1990; Convents, *et al.* 1990).

Mediante experimentos de proteólisis, deleciones e inserciones, se ha demostrado que la fracción tóxica reside en la mitad N-terminal de la clase *cryI* (Chestukhina, *et al.* 1982; Nagamatsu, *et al.* 1984; Adang, *et al.* 1985; Schnepf and Whiteley. 1985; Wabiko, *et al.* 1985; Wabiko, *et al.* 1986).

Ensayos realizados con cristales puros de Bt subsp. *dendrolimus*, revelaron la presencia de una secuencia única en el N-terminal de la protoxina (M-D-N-N-P-N-I) y después de digerir los cristales con tripsina, la banda de 145 KDa (protoxina) dió un fragmento tóxico de 58 KDa, cuya secuencia de aminoácidos en el N-terminal difirió del de la protoxina, dando C-D-X-G-Y-T (Nagamatsu, *et al.* 1984). La secuencia del N-terminal del fragmento tóxico, correlaciona con la secuencia de aminoácidos de muchas otras CryI en la posición 28-30 (Höfte and Whiteley. 1989), lo que sugiere que la protoxina es digerida tanto en el amino como en el carboxilo terminal. Esta hipótesis fue demostrada por Schnepf y Whiteley (1985) usando inserciones con Tn5 en *cryIA(a)*, donde inserciones mas allá de codón 60 y antes del 645 diéron como resultado una proteína inactiva. Resultados similares se obtuvieron con deleciones del extremo 3' de *cryIA(b)*, donde deleciones, de 3'a 5', hasta el codón 612 resultaron en un producto tóxico, mientras que toxinas con deleciones a partir del 603 ó después fueron atóxicas (Wabiko, *et al.* 1986).

Como se ha mencionado anteriormente, la tripsina produce el fragmento tóxico a partir de la protoxina. Sin embargo, la proteólisis del cristal se realiza mediante un proceso bastante inusual, mediante 7 rompimientos específicos, los cuales ocurren en secuencia ordenada iniciando en el C-terminal hacia el extremo amino. En cada paso se generan fragmentos de 10 KDa, mismos que son rápidamente digeridos en péptidos muy pequeños (Choma, *et al.* 1990).

El resultado anterior, aunado a lo reportado por varios grupos donde se muestra que la mitad N-terminal de la protoxina es rica en regiones hidrofóbicas y la parte C-terminal lo es en hidrofílicas (Whiteley, *et al.* 1984; Schnepf, *et al.* 1985; Yamamoto, *et al.* 1988) hacen suponer que la protoxina está organizada en subdominios. Los dominios son representados por el dominio N-terminal y C-terminal. En el dominio amino, existen dos subdominios y en el carboxilo cuatro (Fig. 3) (Debabov, *et al.* 1984; Chestukhina, *et al.* 1990).

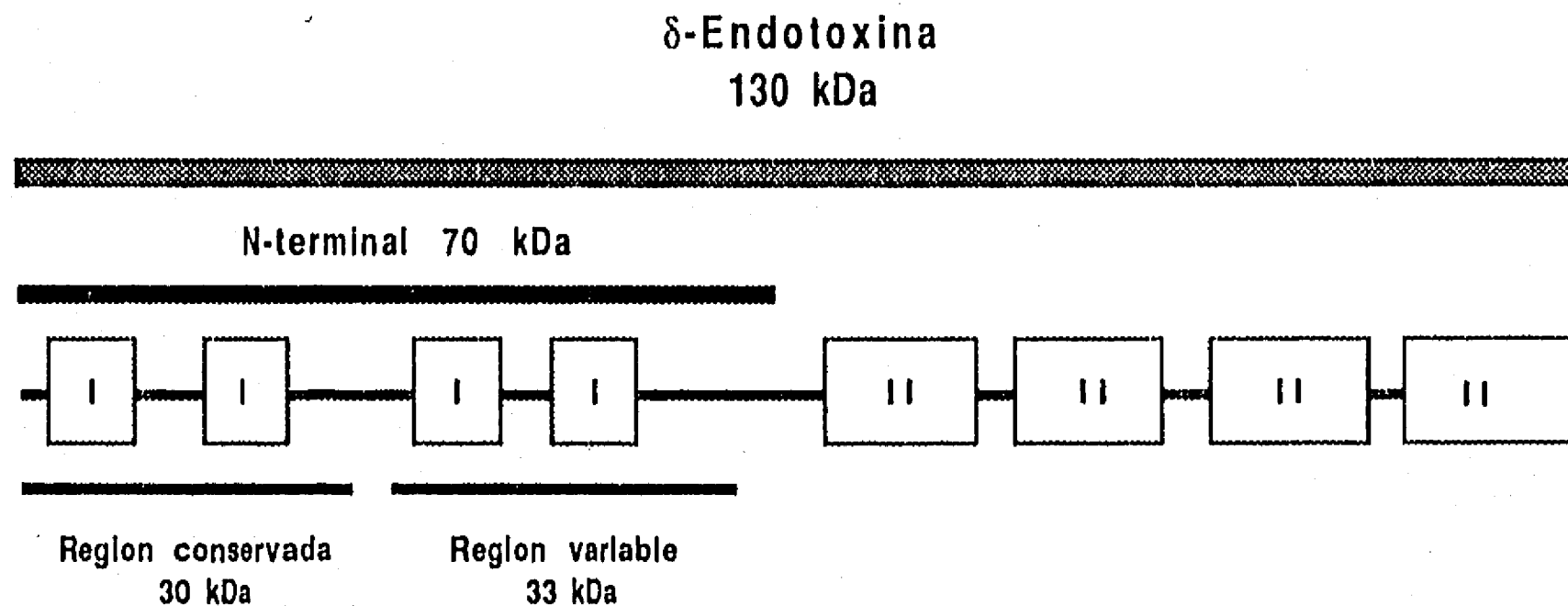


FIGURA 3.- Organización de la cadena polipeptídica de la δ -endotoxina de *Bt* subsp. *alesti*. Los rectángulos muestran la organización en subdominios. Los números I y II indican 10 y 15 KDa, respectivamente.

El hallazgo realizado por Bietlot y col. (1990) de que todos los residuos de cisteínas en la mitad C-terminal de la protoxina forman múltiples puentes disulfuro intercadenas, resulta en un arreglo cristalino, es consistente a lo encontrado por Choma y Kaplan (1990) de que la fracción tóxica y la parte C-terminal de la protoxina de CryIA(c) se pliegan y despliegan en forma independiente, pareciendo como si se tratase de dos proteínas autónomas que fueron fusionadas, donde al parecer la mitad carboxilo sirve solo para la formación del cristal, ya que la mayoría de las

cisteínas se encuentran presentes en este dominio (Dastidar and Nickerson. 1979; Huber, *et al.* 1981; Höfte and Whiteley. 1989; Choma and Kaplan. 1990).

Por otro lado, en experimentos realizados con la protoxina y toxina de CryIA(c) bajo condiciones desnaturalizantes (6M de cloruro de guanidinio y 8M de urea) demostraron una condición bifásica de desplegamiento de la protoxina, donde la mitad C-terminal se despliega rápidamente, mientras que el fragmento tóxico, se despliega a tasas mucho más bajas, semejante a lo que ocurre con la toxina pura. Este fenómeno se repite también con otras toxinas (Bt subsp. *alesti* y Bt subsp. *israelensis*), sugiriendo que la organización de dominios y subdominios podría ser una característica general de las proteínas Cry (Choma and Kaplan. 1990; Chestukhina, *et al.* 1990; Convents, *et al.* 1991; Choma, *et al.* 1991).

La comparación de la secuencia de aminoácidos del fragmento tóxico de las tres subclases de CryIA revelaron que la parte N-terminal (residuo 1-280) es muy conservado, mientras que la parte C-terminal (281-618) es muy variable. Esto sugiere que las diferencias en el espectro insecticida de esas toxinas puede ser debido a la variación en el C-terminal (Jaquet, *et al.* 1987).

El alineamiento y comparación del fragmento tóxico de las subclases CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIB, CryIC, CryID, CryIIIA, CryIVA, CryIVB y CryIVC, revelaron la existencia de 5 bloques de secuencia de aminoácidos muy conservados (Fig. 4) (Höfte and Whiteley. 1989). Esto implica que las diferencias de aminoácidos entre las diferentes clases y subclases no se encuentran distribuidas al azar, además, las regiones altamente conservadas se encuentran separadas por regiones muy variables (Van Rie. 1991). Otro hecho notable es que todas las δ -endotoxinas, excepto CryII y CryIVD, contienen, en posición comparable en la secuencia de aminoácidos, porciones hidrofóbicas que podrían ser secuencias transmembranales (Höfte and Whiteley. 1989).

Es claro que la diferencia en la región hipervariable (346-600) debe residir la especificidad hacia el insecto blanco, lo cual ha sido demostrado por Wu y Aronson (1992) quienes al mutar una región altamente conservada entre las toxinas CryIA (codón 84-93 de CryIA(c)) se modificó la toxicidad pero no la unión al receptor ni la capacidad de competencia con la toxina nativa. Estudios preliminares realizados por el grupo del Dr. David Ellar ya hacían suponer que la región importante para el reconocimiento al receptor se debería encontrar en la parte C-terminal de la toxina (Ward, *et al.* 1988; Ahmad and Ellar. 1990; Raymond, *et al.* 1990;

Honée, *et al.* 1991), ya que en esta parte se encuentran sitios de corte para proteasas. Un ejemplo de esto es el caso de Bt subsp. *aizawai* IC1, la cual ha sido clasificada como CryIA(b) pero posee actividad dual (lepidópteros y dípteros). Esta capacidad está dada por el cambio de tres aminoácidos (L por F en la posición 537, I por P en 545, I por T en 568) con respecto a otras CryIA(b). Estas modificaciones mapean entre el bloque de homología 4 y 5 y, al realizar mutagénesis sitio-dirigida en esos residuos sustituyéndolos por el correspondiente de las otras CryIA(b), la actividad tóxica se redujo a lepidópteros (Haider and Ellar. 1989). Otro ejemplo de toxinas muy relacionadas y que desarrollan diferente toxicidad es el de Bt subsp. *kenyae* (CryIA(c)) la cual difiere en 7 residuos con respecto a otra CryIA(c) (HD-73), pero es menos tóxico contra *Plutella xylostella* (Tersch, *et al.* 1991). Lo anterior muestra que toxinas muy relacionadas pueden interactuar en diferente forma con la célula blanco ó interactuar con diferentes huéspedes (Van Rie. 1991).

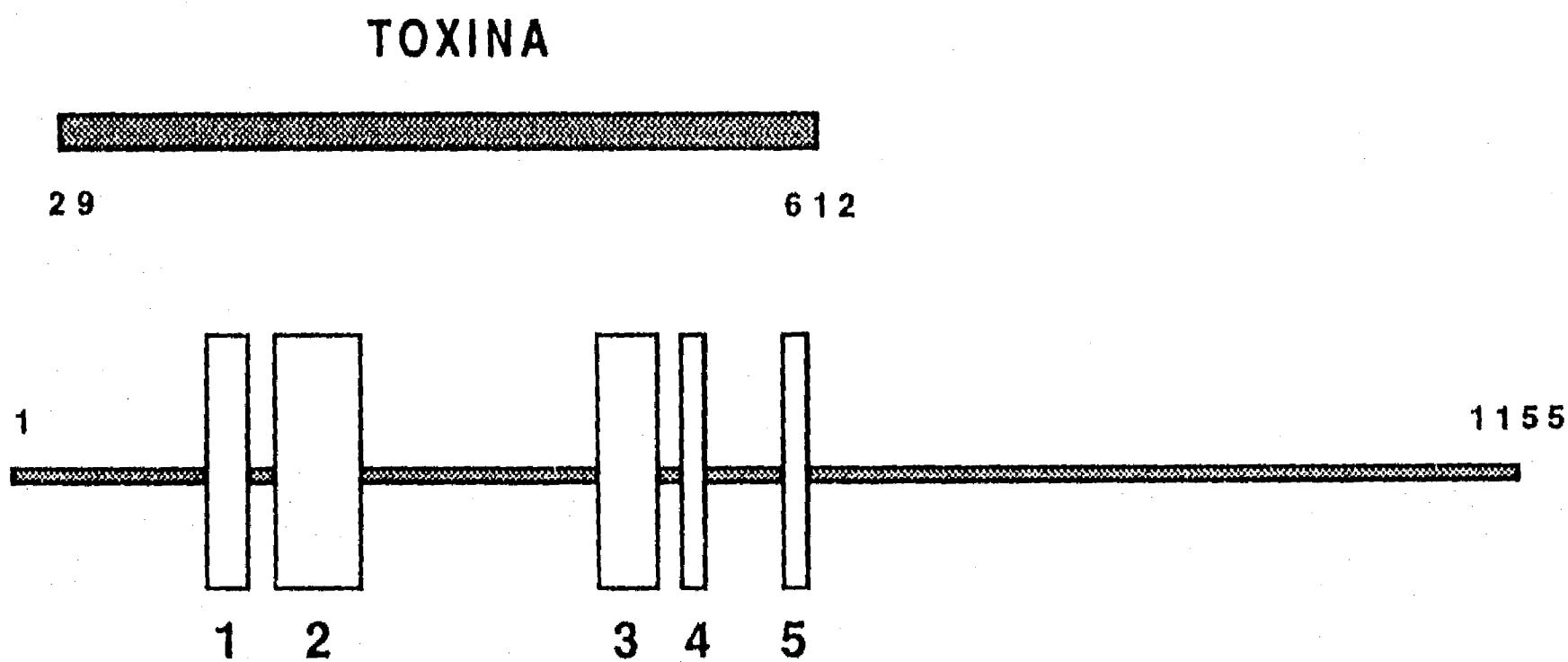


FIGURA 4.- Bloques de homología a nivel de aminoácidos entre las diferentes clases de las δ -endotoxinas. Los 5 bloques de homología son indicados por los rectángulos. La secuencia, de amino a carboxilo terminal es: Bloque 1 del aminoácido 153 al 183; Bloque 2, del 203 al 270; Bloque 3, del 453 al 501; Bloque 4, 522 al 531; Bloque 5, 597 al 609. El número de los residuos esta dado en base a CryIA(b), tanto en los bloques como para la toxina y protoxina.

Un análisis mas fino del papel de los subdominios de la toxina, ha sido realizado mediante el intercambio de segmentos de las regiones variables e hipervariables entre diferentes genes *cry* que codifican para toxinas con diferente grado de toxicidad hacia algún insecto blanco. Tal es el caso

reportado por Ge y col. (1989) para los genes *cryIA(a)* y *cryIA(c)*, donde *CryIA(a)* es casi 400 veces más tóxica que *CryIA(c)* contra *Bombix mori*. Encontrando que la región responsable de la especificidad contra *B. mori* se localiza entre los residuos 332-350. De la misma manera, se encontró que la región comprendida entre los residuos 335-450, en *CryIA(c)*, se encuentra asociada con la especificidad contra *Trichoplusia ni*, y de 365 a 615 da completa especificidad contra *Heliothis virescens* (Ge, et al. 1991). Estudios realizados por Schnepf y col. (1990) usando *CryIA(a)* y *CryIA(c)* contra *H. virescens* y *Manduca sexta*, observaron que al intercambiar segmentos de *cryIA(a)* en *cryIA(c)* (X, 332-428; Y, 429-447; Z, 448-722) cada segmento contribuyó en forma sustancial y aditiva en la eficiencia hacia *H. virescens*. De esta manera, el reemplazamiento del segmento Y de *cryIA(c)* con el de *cryIA(a)* resultó en una proteína menos tóxica (27-50 veces) contra *M. sexta*, mientras que para *H. virescens* fue solo de 3-4 veces. La subdivisión del segmento Y y el reemplazamiento de residuos en este segmento redujo la toxicidad contra *M. sexta* de 5-2000 veces, dependiendo de los residuos modificados, mientras que para *H. virescens* se redujo solo de 3-10 veces. Estas observaciones indican que: a).- regiones diferentes pero sobrelapadas en *cryIA(c)* determinan la especificidad hacia cada uno de los insectos probados, b).- algunos de los segmentos interactúan en determinar la especificidad. y c).- diferentes secuencias en *cryIA(a)* y *cryIA(c)* son requeridos para la máxima toxicidad contra *M. sexta* (Schnepf, et al. 1990).

Es indiscutible que la solución, ó parte de ella, concerniente al papel que juega cada región de la toxina solo sería resuelto mediante la elucidación de la estructura tridimensional de la toxina (Holmes and Monro. 1965; Li, et al. 1988; Garfield and Stout. 1988). La resolución de la estructura tridimensional de Bt subsp. *tenebrionis* a 2.5 Å (*CryIII_A*), reveló la existencia de tres dominios, de amino a carboxilo terminal, un grupo de 7 hélices, un dominio de tres β -plegadas y uno de β -sandwich (Fig. 5).

El dominio I, que va del residuo 58 al 290 está compuesto de 7 α -hélices donde una hélice central está rodeada completamente por las 6 restantes. La hélice central es la α_5 , la cual está orientada con su C-terminal hacia el β -sandwich. El orden de las hélices restantes es, en contra de las manecillas de reloj, α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_6 y α_7 , con las α_1 y α_7 adyacentes a los dominios de β -plegadas.

El arreglo de las 7 hélices es muy parecido al dominio formador de poros de la colicina A. En forma similar a las hélices de la colicina A, el

conjunto de hélices de la toxina de Bt podrían ser las directamente involucradas en la formación del poro en la membrana celular del intestino medio de las larvas susceptibles.

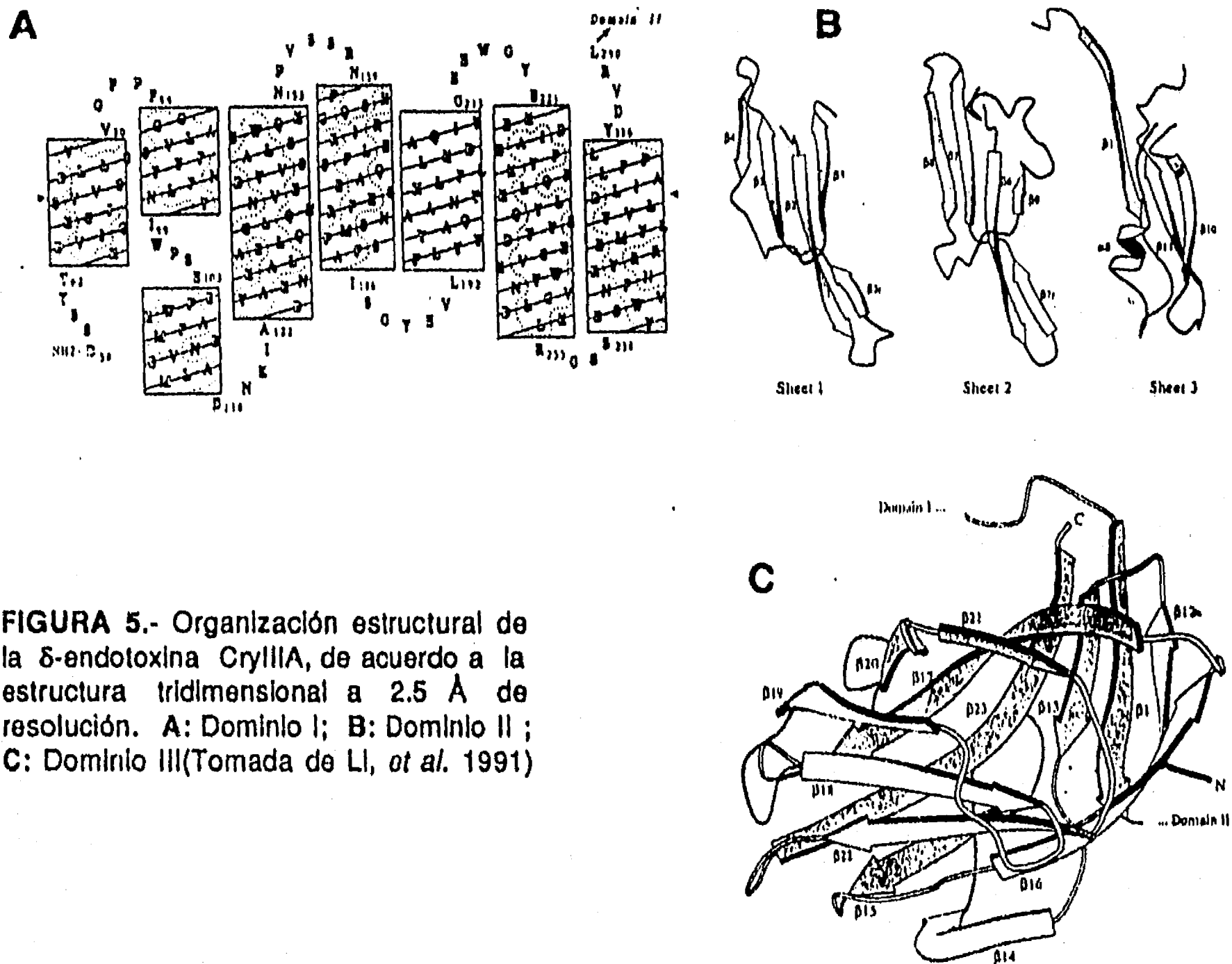


FIGURA 5.- Organización estructural de la δ -endotoxina CryIIIa, de acuerdo a la estructura tridimensional a 2.5 Å de resolución. **A:** Dominio I; **B:** Dominio II; **C:** Dominio III (Tomada de Li, *et al.* 1991)

Dominio II.- Este dominio está formado por tres β -plegadas y va del residuo 291 al 500. En este dominio existe una aparente duplicación estructural entre las β -plegadas 1 y la 2. Cada β -plegada está constituida por 4 hebras antiparalelas. Las conexiones en la cadena son: β_4 , β_3 , β_2 , y β_5 para la β -plegada 1 y, β_8 , β_7 , β_6 , β_9 para la β -plegada 2, siguiendo el orden de una topología típica de "llave Griega". Este dominio está en contacto con la α_7 del dominio I sobre la cara de la β -plegada 3. A este dominio se le ha conferido el papel del reconocimiento al receptor en la membrana de las células del intestino medio del insecto susceptible.

Dominio III.- El último dominio, del residuo 501 al 644, consiste de un sandwich de 2 estructuras tipo β -plegada antiparalelas y junto con el dominio I, forman los extremos de la molécula. La β -plegada que contiene la hebra del extremo carboxilo terminal (hebra interna) esta en contacto con el dominio I. Al final del β -sandwich, se forman hebras paralelas por medio de puentes de hidrógeno de las hebras β_{12} a β_{16} al final de la hebra externa y β_1 a β_{13} al final de la hebra interna.

La distribución de los dominios, en base a los 5 bloques de homología entre las δ -endotoxinas (Höfte and Whiteley. 1989) revelaron que el bloque 1 (residuos 189-218 CryIII A) corresponde a la hélice central (α_5) del dominio I. El bloque 2 (239-305) el cual se sobrelapa con la segunda parte de α_6 , con α_7 y β_1 , corresponde a la unión entre los dominios I y II. El bloque 3 (491-538) se sobrelapa con la última parte de β_{11} , la cual se une por un puente de hidrógeno a β_1 y con los loops conectando al dominio II y III. El resto del bloque 3, junto con el 4 y 5 (560-569 y 633 al extremo C-terminal) constituyen las tres hebras de la β -plegada interna del dominio III. El alto grado de conservación de los dominios internos implica que proteínas homólogas podrían adoptar una estructuración similar (Li, *et al.* 1991).

1.7 MODO DE ACCION

Estudios *in vivo* e *in vitro*, usando líneas celulares de insectos y liposomas, han mostrado que la δ -endotoxina producida por las diferentes subespecies de Bt perturban membranas lipídicas de manera muy similar aunque estas toxinas varíen considerablemente en su rango de huésped (Thomas and Ellar. 1983; Yunovitz and Yawetz. 1988; Haider and Ellar. 1989).

Una vez que el insecto ha ingerido la δ -endotoxina, los primeros síntomas de envenenamiento son los siguientes: deja de comer, parálisis del intestino y tracto alimenticio, vómito, diarrea, parálisis total y , finalmente, la muerte (Aronson, *et al.* 1986; Van Rie. 1991).

Los cambios histopatológicos observados al microscopio óptico muestran los efectos de la toxina sobre las células del epitelio del intestino medio larvario (Fast, *et al.* 1978). Se ha reportado que existe hipertrofia de las células goblet y columnares, vacuolización del citoplasma, disgregación de las microvellosidades apicales e hinchamiento celular, lo que conduce a la lisis celular (Mathavan and

Sudha. 1989). En el interior de la célula afectada también se observan cambios estructurales tanto en el retículo endoplasmático rugoso, como en el complejo de Golgi y mitocondrias (Ebersold, *et al.* 1978; Ebersold, *et al.* 1980).

Datos recientes han demostrado que la toxina no se internaliza y que las células blanco presentan un receptor específico para la toxina (Tojo. 1986).

Estudios previos, indican que una vez que la larva ha ingerido la protoxina ésta es solubilizada en el ambiente alcalino del interior del intestino y es procesada a la forma tóxica por acción de las proteasas presentes en el intestino larvario. El siguiente paso es la unión de la toxina a su blanco celular. El hecho de que los primeros efectos de la toxina esten confinados a cambios estructurales en la membrana apical y a la ausencia de un período lag, sugieren que la toxina no se internaliza (Ellar, *et al.* 1985; Tojo. 1986; Höfte and Whiteley. 1989). Además, estudios inmunocitoquímicos de la localización de la toxina en el intestino de larvas intoxicadas han demostrado que la protoxina se une a la microvellosidad apical y nunca es internalizada durante todo el síndrome patológico (Bravo, *et al.* 1992).

Experimentos posteriores revelaron que la toxina se une a sitios específicos localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio (Hofmann and Lüthy. 1986; Hofmann, *et al.* 1986; Hofmann and Lüthy. 1988). Los estudios de unión y competencia realizados con las toxinas CryIA(b) y CryIB, en vesículas de la microvellosidad apical aisladas de *Manduca sexta* y *Pieris brassicae*, mostraron que existe una correlación estricta entre la toxicidad observada *in vivo* y la unión específica de las toxinas a su receptor, ya que CryIA(b) que es tóxica para ambos insectos se unió a saturación a las vesículas aisladas de ambos insectos mientras que CryIB, que es tóxica solo para *P. brassicae*, solo se unió a las vesículas de este insecto y no a las de *M. sexta*. Además, otras dos toxinas, una específica para dípteros (CryIVB) y otra para coleópteros (CryIIIA) no se unieron ni a las vesículas de *M. sexta* ni a las de *P. brassicae*. Los estudios presentados en el trabajo de Hofmann y col. (1988) demostraron que CryIA(b) y CryIB se unen a diferentes receptores en *P. brassicae* (Hofmann, *et al.* 1988).

En 1989 Van Rie y col. estudiaron la importancia del papel que juegan los receptores para la toxicidad. Mediante el uso de tres diferentes toxinas (CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c)) las cuales desarrollan igual toxicidad contra *M. sexta* pero difieren contra *H. virescens*, mostraron que

la afinidad de las tres toxinas por las vesículas de la microvellosidad no fue significativamente diferente para *H. virescens*, sin embargo la concentración de los sitios de unión para cada una de las toxinas mostró grandes diferencias, lo cual podría ser el reflejo directo de la variación de toxicidad *in vivo* (Van Rie, *et al.* 1989)

Estos datos, en su conjunto, muestran que la heterogeneidad en el tipo y número de los receptores dentro del intestino larvario ocurre frecuentemente y resulta en la sensibilidad a más de un tipo de toxina (Van Rie, *et al.* 1990). Aunque si bien, los resultados anteriores señalan el papel preponderante del receptor para la δ -endotoxina, existen otros factores que también influyen en la toxicidad. Lo anterior se demostró para CryIA(b) y CryIA(c), donde la primera es casi 400 veces más tóxica contra *Lymantria dispar* (palomilla gitana) y sin embargo, la afinidad de CryIA(c) por las vesículas aisladas de este insecto es 10 veces más grande que para CryIA(b) (Wolfersberger. 1990).

En cuanto al efecto que produce la toxina en la membrana del intestino, se ha hipotetizado que ésta inhibe el transporte activo de potasio (K^+) de las células epiteliales hacia el lumen. En 1986, English y Cattle reportaron que la toxina de Bt subespecie *kurstaki* inhibió una ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ sugiriendo que este fenómeno está relacionado con un sistema de intercambio de K^+H^+ dirigido por ATP. Sin embargo, esto implica que la toxina se internalizó y migró hacia el interior de la membrana basal, ya que la ATPasa se localiza en el lado de la hemolinfa, contradiciendo las evidencias de que la toxina no se internaliza. Se ha discutido que esa actividad, se podría atribuir a efectos secundarios no específicos, similar a lo reportado por Knowles y Farndale (1988) de que la toxina de Bt HD-1 presentó un efecto positivo en la activación de la adenilato ciclasa en células de *Mamestra brassicae*, ya que en ambos casos fue necesario añadir concentraciones muy altas de la toxina. Himeno y col. (1985) propusieron que la δ -endotoxina actuaba sobre una ATPasa de Na^+K^+ , así como sobre un canal de Na^+ en la línea celular TN-368 (proveniente de ovarios) de *T. ni*. Sin embargo, el tipo de las células no fueron las adecuadas ni los experimentos se pudieron reproducir en medios para cultivo de tejidos (Van Rie. 1991(b)).

Gupta y col. (1985) demostraron que después de la administración de cristales de Bt HD-1 a *M. sexta* la concentración intracelular de K^+ disminuyó un 78% en las células goblet. Estos resultados fueron interpretados como un efecto directo de la toxina sobre la bomba de potasio de la membrana apical de las células goblet, similar a lo reportado

por Griego y col. (1979) de que la permeabilidad celular y el transporte de K^+ en el intestino medio de *M. sexta*, fue rápidamente afectado después de la ingestión de la toxina.

En 1986, Sacchi y col. encontraron que la toxina de Bt redujo tanto la toma inicial como la acumulación transitoria de histidina en vesículas preparadas a partir de las microvellosidades del intestino medio de *P. brassicae* y que la toxina no afectó el equilibrio de distribución de histidina entre el espacio intravesicular y la solución externa, demostrando que la toxina de Bt inhibe la toma de histidina debido al un incremento en la permeabilidad para el potasio y no por la interacción directa de ésta con el sistema de transporte de aminoácidos. Además, la toxina no incrementó la permeabilidad para Na^+ ni H^+ en las vesículas de *P. brassicae*. Por los resultados anteriores, se propuso que la acción primaria de las toxinas de Bt es la de abrir ó formar canales de K^+ en la membrana apical de las células columnares. Esta hipótesis fue corroborada por el grupo de Slatin en 1990 mediante experimentos donde utilizaron dos bloqueadores de canales de potasio (Ca^{+2} y Ba^{+2}) al añadir ambos cationes divalentes a un sistema *in vitro* de células epiteliales se logró prevenir y revertir el efecto de la δ -endotoxina, concluyéndose que la formación ó apertura de canales es parte fundamental de la toxicidad de las toxinas de Bt (Slatin, *et al.* 1990). Resultados semejantes se obtuvieron con la línea celular CF-1 (purificada de *Choristeneura fumiferana*) donde se observó la formación de poros de 10-20 Å de diámetro catión-selectivos. Aunque si bien, la magnitud del daño celular puede variar de toxina a toxina, el efecto global es el mismo (Knowles and Ellar. 1987; Prince. 1990; Reuveni and Dunn. 1991; Wolfersberger. 1991).

Se ha hipotetizado que la formación del poro en la membrana del epitelio del intestino medio del insecto es realizada por la acción de las hélices hidrofóbicas y anfipáticas del dominio I (en relación a la estructura tridimensional), las cuales podrían penetrar en la membrana, previo cambio conformacional e iniciar, en forma cooperativa, la formación del poro (Li, *et al.* 1991).

Las investigaciones realizadas para elucidar el modo de acción de la toxina de Bt, han sido muy variadas tanto en el tipo de toxina como de ensayo utilizado. Sin embargo, a pesar que no se cuenta con el proceso molecular de la formación del poro, Li y col. (1991) propusieron el modo el siguiente mecanismo como modelo general:

1º.- El "disparo" para el cambio conformacional puede ser dado por la unión de la toxina al receptor.

2º.- La inserción en la membrana es rápida y la toxina ya no puede ser desplazada por otras toxinas que comparten el mismo tipo de receptor.

3º.- El extremo del dominio II junto con el dominio I se insertan en la membrana, con las hélices orientadas hacia el citoplasma. De esta manera, se cree que el par de hélices α_6 y α_7 son los iniciadores en la formación del poro, ya que éstas forman una región muy conservada en la interfase del dominio I y II (Li, *et al.* 1991).

En cuanto a los estudios relacionados con el receptor de la toxina, se ha descrito muy poco. La purificación y caracterización del receptor están aún en proceso. Existen algunos reportes donde se afirma que el receptor es una glicoproteína de 146 KDa. Esto se ha demostrado por el uso de aglutininas que se unen específicamente a N-acetilgalactosamina. Mediante este ensayo, se inhibió el efecto del cristal de Bt HD-1 sobre la línea celular CF-1 (Knowles, *et al.* 1984; Knowles and Ellar. 1986). No obstante, existe la duda de que ésta proteína sea el receptor, debido a que el cristal de Bt HD-1 está compuesto por 3 diferentes toxinas y la línea celular CF-1 no proviene del intestino medio de *C. fumiferana*. Usando otra estrategia metodológica, Oddou y col. (1991) encontraron que en *H. virescens* las toxinas CryIA(a) y CryIA(b) se unen, en diferentes sitios, a una proteína de 170 KDa, mientras que CryIA(c) lo hace a dos péptidos, uno de 140 y otro de 120 KDa. También demostraron que esas proteínas no forman un complejo proteico y, a diferencia de lo reportado por Knowles y Ellar (1964), la remoción de los azúcares de la glicoproteína de 170 KDa no evitó la unión de CryIA(a) ni de CryIA(b). En ese mismo año Garczynski y col. trabajando con CryIA(c) y con 4 diferentes insectos, 2 sensibles (*M. sexta* y *H. virescens*), 1 moderadamente sensible (*Helicoverpa zea*) y 1 resistente (*S. frugiperda*) encontraron que los 4 insectos presentaron alta afinidad y sitios saturables de unión para CryIA(c), logrando identificar como receptor una molécula de 120 KDa para *M. sexta* y una de 148 KDa para *S. frugiperda*. Pero para *H. zea* y *H. virescens*, el receptor resultó estar formado por un complejo proteico que consta de 5 proteínas cuyo peso molecular es de 155, 120, 103, 90 y 63 KDa. De estos resultados se puede concluir que, la presencia del receptor es importante pero no es lo único que determina la toxicidad ya que *S. frugiperda* es resistente a CryIA(c) y sin embargo, presenta sitios saturables de unión para esta toxina.

De los datos disponibles con respecto al modo de acción y tipo de receptor para la δ -endotoxina, indican que falta mucho trabajo en este aspecto. Creemos que con la clonación del gen que codifica para el

receptor, la caracterización de la proteína y la incorporación de ésta a bicapas lipídicas, se daría un avance significativo en la elucidación del proceso molecular del modo de acción de las toxinas de Bt. Sin embargo, podemos decir que para que una protoxina de Bt realice su actividad tóxica, es necesario que se lleven a cabo los siguientes eventos:

- 1º.- La solubilización del cristal para liberar la(s) protoxina(s).
- 2º.- El procesamiento proteolítico de la(s) protoxina(s) para dar lugar a la(s) toxina(s).
- 3º.- La unión de la toxina al receptor.
- 4º.- La formación de un poro ó apertura ó formación de un canal para provocar la lisis celular.

I.8 RESISTENCIA A LA δ -ENDOTOXINA DE *B. thuringiensis*.

Los insectos constituyen una de las clases mas importantes del reino animal. Cientos de especies de insectos se relacionan con el hombre de una u otra manera, donde los vinculados con la destrucción de los cultivos y con salud pública reciben especial atención. Para contrarrestar la actividad nociva de muchos insectos, el hombre ha inventado y producido muchos compuestos tóxicos. Sin embargo, ha tenido que contender con el desarrollo de resistencia de los insectos hacia dichos productos químicos ó biológicos. Hoy en día, se usan mas de 8,000 formulaciones de insecticidas de los cuales mas de 500 estan constituídos por mas de un producto activo (Tripathi. 1988). No obstante, mas de 500 especies de insectos son resistentes a uno ó mas insecticidas. Muchos de eso insectos poseen genes que codifican para altos niveles de proteínas destoxicantes. Un ejemplo de ello es la amplificación del gen que codifica para la esterasa B-1 en colonias resistentes de *Culex pipiens*, la cual le confiere resistencia contra insecticidas organofosforados (Poirié et Pasteur. 1991).

Por lo que respecta a Bt, se ha demostrado que algunos insectos pueden desarrollar resistencia hacia alguna de las toxinas del cristal. En 1985, MacGaughey encontró que *Plodia interpunctella*, plaga de granos almacenados, fue capaz de desarrollar resistencia a preparaciones de Bt HD-1 en unas cuantas generaciones. La resistencia se incrementó 30 veces en solo 2 generaciones y alrededor de 100 veces después de 15 generaciones. De este estudio se concluyó que la resistencia se hereda en

forma recesiva, ya que al realizar cruza entre la colonia resistente (R) y la sensible (S), la progenie resultó ser susceptible (MacGaughey. 1985).

El mecanismo de resistencia a la toxina de Bt, a nivel molecular, ha mostrado ser diferente en diversos insectos. En 1990b, Van Rie y col. reportaron que el mecanismo de resistencia de *P. interpunctella* hacia preparaciones de Dipel (Bt HD-1) es debido a una disminución de 50 veces en la constante de afinidad del receptor para CryIA(b), pero la colonia R resultó ser mas sensible para CryIC, ya que en la colonia R, la concentración del receptor para CryIC se incrementó 3 veces (CryIC no se encuentra presente en Dipel). Estos datos sugieren que en *P. interpunctella* han ocurrido 2 cambios importantes; 1.- que el receptor para CryIA(b) no solo ha reducido la afinidad para la toxina sino que también ha sido funcionalmente afectado y 2.- que esta pérdida es compensada por el incremento en la concentración del receptor para CryIC (Van Rie. 1990; Van Rie. 1991b). Similarmente, Ferré y col. (1991) reportaron que una colonia de *Plutella xylostella*, colectada de cultivos de Filipinas es resistente a Dipel (la LC₅₀ de la colonia R es 200 veces mayor que para la colonia S), estos investigadores demostraron que la resistencia fue debido a una sensible disminución en la constante de unión para CryIA(b), pero la colonia R es aún susceptible para CryIB y CryIC (Ferré, et al. 1991).

Por otra parte, MacIntosh y col. (1991) trabajando con una colonia de *H. virescens* seleccionada en el laboratorio por su resistencia a CryIA(b) y CryIA(c) encontraron que en colonia R, la constante de afinidad se redujo de 2-4 veces pero la concentración del receptor se incrementó 4-6 veces, sugiriendo que el desarrollo de resistencia puede ser debido a: mutaciones múltiples ó a modificación de los eventos post-unión toxina-receptor y que cambios en la afinidad de unión al receptor podrían ser perjudiciales para el insecto (MacIntosh, et al. 1991).

Otro factor que podría estar involucrado en el desarrollo de resistencia es el de la modificación en el tipo y/o concentración de las proteasas responsables de la activación de la protoxina. Pero esto no ha sido demostrado, ya que los resultados de los patrones electroforéticos y actividad del contenido del intestino medio de larvas de colonias R y S de *P. interpunctella* no dieron diferencias significativas por lo que se cree que no existe modificación en el tipo de proteasas intestinales en las colonias R (Johnson, et al. 1990).

Se ha sugerido que asperjar los campos con productos de Bt que esten constituidos por 2 ó mas diferentes tipos de toxinas, que actuen sobre el mismo insecto pero que se unan a diferentes receptores, podría ser una

buena alternativa para demorar la aparición de resistencia (Lambert and Peferoen. 1992). Este tipo de aplicación se podría correlacionar a lo reportado para insecticidas químicos, donde se observó que la aplicación de dos ó mas pesticidas, en la misma formulación, retrasan la aparición de resistencia en varios órdenes de magnitud (medida como el número de generaciones a la cual se presenta la resistencia) (Mani. 1985).

OBJETIVOS

En nuestro país, una de las plagas más importantes es la larva de *Spodoptera frugiperda* -gusano "cogollero del maíz"-, el cual no es controlado adecuadamente por preparaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis*. Sin embargo, en la Universidad Autónoma de Nuevo León se aislaron, a partir de suelos agrícolas, dos cepas de Bt (GM-7 y GM-10) que resultaron ser 20 veces más tóxicas que el producto comercial Dipel, a base de Bt HD-1, contra *S. frugiperda* tanto a nivel de laboratorio como de campo.

Resulta interesante determinar: porqué las cepas GM-7 y GM-10 desarrollan tan alta actividad insecticida?, la alta toxicidad se debe a que estas cepas sintetizan una δ -endotoxina diferente a las reportadas? y de ser así, dónde radican las diferencias?

El objetivo de esta tesis es el de estudiar a estas cepas tan potentes. Con el fin de contestar las preguntas anteriormente señaladas, proponemos que la clonación del gen de la δ -endotoxina de estas cepas como una manera de obtener la información necesaria que permita hacer un análisis de su secuencia nucleotídica. La mayoría de las cepas de Bt poseen más de un gen que codifican para diferentes δ -endotoxinas, por lo tanto es fundamental contar con una estrategia de clonación que permita la clonación de los diferentes genes presentes en la cepa a estudiar, por lo que proponemos utilizar las metodologías de amplificación génica por medio de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR). Mediante el diseño de oligonucleótidos de regiones altamente conservadas entre las diferentes clases de genes que codifican para la δ -endotoxina.

Como se mencionó en la introducción, la δ -endotoxina pertenece a una familia de proteínas con actividad biocida contra un amplio rango de insectos.

Las comparaciones de la secuencia de aminoácidos y patrones estructurales (hidrofobicidad, probabilidad de superficie, predicción de estructura secundaria, etc) de las δ -endotoxinas nos podrán proporcionar información de la existencia de motivos estructurales conservados. El análisis de estos parámetros nos podrían indicar si las diferencias entre las toxinas con diferente especificidad, mapean en sitios de posible relevancia biológica, tales como la región de reconocimiento por el receptor ó la región responsable de la formación del poro.

En este trabajo presentaremos un análisis completo, que incluye a todas las secuencias de la δ -endotoxina reportadas a la fecha, utilizando el programa Predict7, el cual incluye el algoritmo de Kite y Doolittle y el de Janin y Emmini para hidrofobicidad y probabilidad de superficie, respectivamente.

Una cepa con alta actividad tóxica contra un insecto dado tiene un alto valor comercial. Sería interesante determinar si el conocimiento de una toxina más potente nos pudiera dar información sobre las posibles formas para hacer que otras toxinas incrementen su potencia contra otro insecto plaga.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y condiciones de cultivo. Las cepas de *Bacillus thuringiensis* GM-7 y GM-10 fueron proporcionadas por el Dr. Luis Galán Wong de la Fac. de Ciencias Biológicas de la UANL. Las cepas se hicieron crecer en agar LB a 30°C hasta total esporulación. Los cristales fueron purificados en un gradiente discontinuo de sacarosa de acuerdo a Thomas y Ellar (1983). Todas las electroforésis en poliacrilamida fueron corridas en condiciones desnaturizantes de acuerdo a Laemmli y Fabre (1973).

Purificación de ADN. Las cepas se crecieron en 50 ml de LB en agitación constante a 30 °C hasta la fase exponencial tardía y el ADN total se purificó de acuerdo a Kronstand y Whiteley (1984). Todas las electroforésis de ADN fueron corridas en geles de agarosa 0.8 % en buffer de tris-acetatos (Maniatis y col. 1982). Cuando fue necesario purificar bandas de ADN a partir de los geles de agarosa, ésta se realizó el método de extracción con fenol y cloroformo (Benson. 1984).

Diferentes técnicas de ADN recombinante. Las reacciones de digestión y ligación del ADN, se hizo bajo las condiciones recomendadas para cada una de las enzimas usadas. Para marcar radiactivamente el plásmido pBT200 se usó $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP usando el kit de nick-translation y para marcar los oligos, se usó $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP usando la Polinucleotido kinasa de T4 (Boehringer). Las condiciones de hibridación se realizaron de acuerdo a Maniatis y con (1982). Para las amplificaciones de ADN por medio de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) se utilizó la *Taq* polimerasa y el buffer 10X de Promega. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Mezcla de reacción; dNTP's, 200 μM ; templado, 10 ng; primeros, 50 pmol; buffer 10X, 10 μl ; *Taq* DNA polimerasa, 5 U; agua para 100 μl . Condiciones; cada ciclo consistió de 1.5 m a 92 °C; 1.5 m a 55 °C y 3.0 m a 70 °C para desnaturalización, alineamiento y polimerización, respectivamente. Se dieron 30 ciclos mas un ciclo de 15 m a 70 °C para polimerización. El producto de PCR fue purificado por GENCLEAN y visto en gel de agarosa. Las transformaciones de *E. coli* se realizaron por el método de Inoue (1990).

Determinación de la secuencia nucleotídica. La determinación de la secuencia nucleotídica fue realizada usando ADN proveniente de *E. coli* DH5 α , por el método de secuencia en doble cadena "caminando en el gen" usando diferentes oligos, de acuerdo a lo recomendado en el manual de Sequenasa ver. 2.0 (USB).

El resto de los métodos utilizados se mencionan en los artículos generados en este trabajo.

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se presentarán en el siguiente orden:

1º.- "Polymerase Chain Reaction Amplification, Cloning and Expression of the Insecticidal Protein Toxic-Fragment from a *Bacillus thuringiensis* Strain". Este artículo se presenta como un manuscrito listo para ser enviado a publicación en la revista Journal of General Microbiology.

2º.- Resultados de la determinación de la secuencia nucleotídica del gen *cryIA(b)* de las cepas GM-7 y GM-10. La secuencia del gen de la cepa GM-7 se enviaron al GenBank, y una vez que se tenga la clave de acceso, el manuscrito se enviará a la revista Nucleic Acids Research.

3º.- Resultados del esquema de clonación del gen *cryIA(b)* de las cepas GM-7 y GM-10.

4º.- "The delta-endotoxin protein family displays a hydrophobic motif which might be implicated in toxicity". Este artículo fue aceptado para su publicación en la revista Molecular Microbiology. 1992. volumen 6.

ARTICULO No. 1

TITLE:

POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION, CLONING AND EXPRESSION OF THE INSECTICIDAL PROTEIN TOXIC-FRAGMENT FROM A *Bacillus thuringiensis* STRAIN.

AUTHORS:

Benito Pereyra-Alfárez¹, Alejandra Bravo* and Rodolfo Quintero.

ADDRESS:

Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos. México CP 62272.

*Corresponding Author

¹Present address: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Apartado Postal 414. San Nicolás de los Garza, N.L. México CP 64000.

SUMMARY

A polymerase chain reaction (PCR) system in order to clone the toxic-fragment of insecticidal crystal protein (ICP) genes from *Bacillus thuringiensis* was established. From highly conserved regions among *cryI* genes class, we have designated primers BP-7 and BP-3 which carrying a site for *PstI* and *BclI* endonucleases, respectively. The PCR amplification was done by using total DNA and a single product of 2.09 kb was obtained. The PCR product was digested and ligated to pUC13 plasmid. This PCR system led us the cloning and expression of two different ICP toxic-fragment genes in *Escherichia coli*. After Southern blot hybridization and Western blot immunodetection one gene was identified to be a *cryIA(b)* gene type.

INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive soil bacterium characterized by its ability to produce crystalline protein inclusions during sporulation. These inclusions can be composed of one or several different δ -endotoxin proteins. The insecticidal crystal proteins (ICP) are synthesized as protoxins. After ingestion by susceptible insect larvae, the ICPs are dissolved and processed by the gut proteases to generate the true toxin (Aronson *et al.*, 1986; Hofte & Whiteley, 1989).

Höfte & Whiteley, (1989), have classified the *B. thuringiensis* ICP genes into four major classes and several subclasses based on amino acid sequences and insecticidal spectra of the encoded proteins. The classes are CryI (Lepidoptera-specific), CryII (Lepidoptera- and Diptera-specific), CryIII (Coleoptera-specific) and CryIV (Diptera-specific). However, recently two new classes, CryV and CryVI (Nematoda-specific) have been added to these classification (Feitelson *et al.*, 1992). In spite of the high specificity of the ICPs, several workers have reported the presence of insect resistance to *B. thuringiensis* ICP (McGaughey, 1985; Van Rie *et al.*, 1990; Van Rie, 1991; Ferré *et al.*, 1991). This problem has motivated the interest on isolating new strains bearing novel ICP genes for the preventive management of insect resistance (Carozzi *et al.*, 1991; Gleave

et al., 1992).

Until now, the cloning of the ICP genes has been carried out by using conventional methodologies. However, the utilization of the polymerase chain reaction (PCR) has led to the amplification of specific DNA fragments using oligonucleotides as primers. Moreover, PCR has the advantage of allowing the creation of restriction enzymes specific sites, making easier the further cloning (Higuchi *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1988; Carozzi *et al.*, 1991).

On the other hand, it is known that only the N-terminal half of the protoxin is necessary for the insecticidal activity (Schnepf & Whiteley, 1985; Wabiko *et al.*, 1985; Aronson & Arvidson, 1987). In this report we describe the amplification and cloning of the N-terminal half genes from *B. thuringiensis* GM10. This strain was isolated from an agricultural soil samples in México. The above strain produces a crystal which is toxic to lepidopteran pest and it proves to be highly toxic to *Spodoptera frugiperda* larvae, when compare with HD-1 strain (Table 1).

METHODS.

Bacterial strains and culture conditions. *B. thuringiensis* GM10 was obtained from the collection of the Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, Facultad de Ciencias Biológicas UANL México. *B. thuringiensis* was grown in LB broth (Maniatis *et al.*, 1982) at 30°C until sporulation. The culture was washed twice with deionized sterile water, the spore-crystal mixture was dried and stored at 4°C. *Escherichia coli* DH5 α was This strain was used as host strain for plasmid pUC13 (Pharmacia) derivatives. *E. coli* recombinant clones were grown at 37°C in LB containing ampicillin (100 μ g ml⁻¹).

Purification of the crystal δ -endotoxin. The method used for crystal δ -endotoxin purification was performed as described by Thomas and Ellar (1983). The ICPs were solubilized and trypsinated as reported by Höfte *et al* (1986).

DNA manipulations. All DNA procedures were carried out according to Maniatis *et al.* (1982) unless otherwise indicated. Restriction enzymes, T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase and dNTP's were purchased from Boehringer Mannheim, Taq DNA polymerase and PCR buffer 10X from Promega.

Total DNA from *B. thuringiensis* GM10 was purified according to

Kronstad *et al.* (1986) and DNA from *E. coli* recombinant clones was obtained by alkaline-method.

PCR amplification. The PCR experiments were performed using BP7 and BP3 oligonucleotides as primers (Table 2). They were synthesized by the phosphito-triester method in an automated DNA synthesizer (Systec, Inc. Model 1450A). PCR conditions were as follow: dNTP's, 200 μ M; DNA template, 10 ng; primers, 50 pmol; PCR buffer 10X, 10 μ l; Taq DNA polymerase, 5 U; water to 100 μ l. Amplification mixture reaction was placed in a BioSyccler (Bios Corporation) using the step-cycle program set to denature at 92°C for 1.5 min, anneal at 55°C for 1.5 min and extend at 72°C for 3.0 min, for a total of 30 cycles, afterward, one cycle of 10 min at 72°C was performed. Following amplification, 2 μ l of the PCR reaction mixture was analyzed by agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and photographed.

In order to clone the PCR product, it was purified using the GENCLEAN Kit (Bio 101 Inc. La Jolla, Ca). The PCR product was digested with *Pst*I and *Bcl*I endonucleases and ligated to pUC13, previously digested with *Pst*I and *Bam*HI. *E. coli* DH5 α competent cells were transformed with the ligation reaction mix. The cells were submitted to electroporation in a

GENPULSER apparatus (BioRad) by using the conditions recommended by the manufacturer. The transformant cells were selected in LB agar medium supplemented with ampicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$), $40 \mu\text{g}$ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) ml^{-1} and 0.2 mM -isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). White colonies were toothpicked in the same medium without IPTG and X-gal. DNA from the those colonies was purified and a dot blot hybridization technique was performed by using the oligonucleotide Rb-9 as probe (Table 2). The oligonucleotides were labeled at their 5' end by reaction with (γ - ^{32}P ATP) ($3,000 \text{ Ci.mmol}^{-1}$; Amersham) and T4 polynucleotide kinase. A typical reaction used 20 pmol of oligonucleotide, $80 \mu\text{Ci}$ of (γ - ^{32}P)ATP, and 5 U of enzyme for 1 h at 37°C . The kinase mixture was used directly in the hybridization step. Nitrocellulose filters were incubated overnight at 37°C and washed once with SSC2X-0.1% SDS at 37°C for 15 min . The filters were exposed to X-omat films at -70°C for 14 h , then they were developed with Kodak reagents.

Polyacrilamide gel electrophoresis and immunoblotting. Colonies giving positive signal in the dot-blotting experiments, were inoculated in 5 ml of LB plus ampicillin and incubated at 37°C for 40 h (Haider & Ellar, 1989).

The cultures were washed twice with deionized sterile water and sonicated. A gel of 10% SDS-PAGE was loaded with samples containing 100 μ g total protein. The electrophoresis was carried out as described by Laemmli & Fabre (1973). Proteins were transferred electrophoretically to nitrocellulose filters (Towbin *et al.*, 1979). Immunoblotting was performed according to Knowles & Ellar, (1988) by using a polyclonal antibody raised to the toxic fragment of CryIA(b) protein from *B. thuringiensis berliner*1715, as described by Haider *et al.* (1986). The specificity and sensitivity of the polyclonal antisera were determined in a dot blot assay. A dilution series of purified CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIB, CryIC, CryID, CryIIIA proteins and bovine serum albumin (BSA) were spotted on nitrocellulose filter. Then incubated 1h with poly CryIA(b) (1/20,000) and 1h with (1/1000) peroxidase conjugated goat antirabbit antibody solution (Sigma). The peroxidase was detected with freshly prepared DAB/H₂O₂ solution (25 mg Diaminobenzidine in 100 ml 0.1M KH₂PO₄, pH 7.5, 20 μ l H₂O₂).

RESULTS

Characterization of the insecticidal crystal proteins from B. thuringiensis GM10.

To characterize the proteins present in the crystals of GM-10 strain, we analyzed the molecular weight (MW) of the intact crystal proteins, the MW of the tryptic core fragments and their reactivity with the polyclonal antisera (polyCryIAb) raised against the toxic fragment of purified CryIA(b).

The MW of the crystal proteins was determined by using SDS-PAGE (Fig. 1A). GM-10 strain produced a crystal composed by at least two different proteins of ca. 130-140 kDa.

The proteolytic activation of *B. thuringiensis* protoxins which *in vivo* depends of proteases inside the larval midgut, can also be carried out *in vitro* with trypsin or other proteolytic enzymes. The GM-10 crystal proteins were treated with trypsin and analysed by electrophoresis in SDS-PAGE. Fig. 1B shows that the trypsin-digested crystals from the GM-10 strain were resolved in two bands (Lane 1), one of ca. 70 kDa and other one of ca. 65 kDa. The CryIA(b) trypsin-treated protoxin yield one band of ca. 65 kDa (Lane 2). The crystal proteins and their tryptic fragments were

further characterized by using the polyCryIAb antisera. Fig. 1C and 1D shows the results obtained in the immunoblots of crystal proteins and toxins respectively, from GM-10 strain incubated with this antisera. The polyCryIAb recognized the 130 kDa crystal component and the 65 kDa tryptic fragment present in GM-10 strain and it also strongly reacts with the control CryIA(b) toxin. The specificity and sensitivity of the polyclonal antisera was determined using different purified Cry proteins. The antibody proved to be highly specific for its antigen CryIA(b) and also gave a cross-react with CryIA(a), CryIA(c), CryID and CryIE. This antisera did not react with CryIIIA and bovine serum albumine (BSA) but niether with CryIB and CryIC (Fig. 2).

PCR Amplification, cloning and expression of the toxic-fragment gene.

The amplification of the ICP's genes was done by using the oligonucleotides BP7 and BP3 as primers. Primers were selected to amplify specifically the toxic fragment sequence. They were made corresponding to highly conserved regions among *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryID*, *cryIE* and *cryIF* genes (Table 2). Primer BP-7 corresponds to the region -118 to -102 from *cryIA(b)* sequence, and in this primer a *Pst*I endonuclease site was created. It shares 100% homology with *cryIA*

genes and 1 to 3 mismatches with *cryID*, *cryIE* and *cryIF* (Data not shown). The primer BP3 carries a natural site for *BclI*. This primer corresponds to the region 2071 to 2095 from *cryIA(b)* sequence. This region is highly conserved among *cryI* genes. it represents up to 90% homology among all *cryI* gene including *cryIB* and *cryIC*. When both primers were included in the PCR reaction mixture a single product of 2.09 kb was obtained (Fig. 3). The PCR product was digested with *PstI* and *BclI* and ligated to pUC13 plasmid, previously digested with *PstI-BamHI*. The ligation reaction mixture was used to transform *E. coli* DH5 α . The positive recombinant clones were selected by dot-blot hybridization using Rb-9 oligonucleotide as probe. Two different clones were selected (10A and 10B) and further characterized. In order to determine if those clones produce a toxin similar to the one present in GM-10 strain, a Western blot immunodetection was performed using the polyCryIAb antisera. The clones were grown in appropriate medium until late stationary phase. A crude-extract proteins were obtained and electrophoresed. Fig. 4 shows that clone 10A express a protein that cross reacted with the antiserum while there is no cross reaction with any one of the proteins expressed by the clone 10B.

DNA plasmid was purified from both clones and its restriction pattern

was determined to find out if the genes cloned on them were different. Fig. 5 shows the results obtained after the DNA digestion with *Cla*I, *EcoRV*, *Hind*III, *Pst*I and *Xba*I enzymes. We found that the restriction pattern is different to both clones, suggesting that different genes were cloned in each one. The data obtained from the restriction pattern suggest that the clone 10A harbour a gene type *cry*IA(b).

In order to identify the gene from the clone 10B an hybridization analysis using several oligonucleotides specific to *cry*IB, *cry*IC and *cry*ID was performed (Table 2). We also use Rb-9 oligonucleotide as probe which is homologous to *cry*IA genes. We found that the clone 10A hybridized only with the Rb-9 probe, while clone 10B did not hybridize with any one of the tested probes (Fig. 5).

DISCUSSION

B. thuringiensis produces a crystalline protein inclusion which displays a very specific insecticidal activity. However, there are several reports that have demonstrated the presence of insect resistance to the some commercial preparation based on the *B. thuringiensis* insecticidal crystal. These resistance has been demonstrated not only at laboratory level but also in field studies (McGaughey, 1985; Van Rie *et al.*, 1990; Van Rie, 1991; Ferré *et al.*, 1991). This problem has motivated the isolation and characterization of new strains bearing novel ICPs. Some reports have shown that the cloning of these ICP genes could be not easy, because the ICP genes have a very low clonation efficiency in *E. coli* (Oeda *et al.*, 1987; McLinden *et al.*, 1985; Held, *et al.*, 1982). For these reasons, it is necessary to develop methodologies that led to a rapid prediction of the insecticidal activity (Carozzi *et al.*, 1991) as well as the efficient cloning of these genes.

In this work we have developed a system of amplification and clonation that, theoretically, will led the cloning of the toxic-fragment from the *cryI* class genes. This system is based on the PCR by using two primers selected from two highly conserved sequences among ICP genes class I.

On the other hand, is known that pests belowing to *Spodoptera* genus are

not well controlled by the major of *B. thuringiensis* preparations (Sanchis *et al.*, 1989). The *B. thuringiensis* GM-10 strain is an interesting strain because it is highly toxic against *S. frugiperda* (Table 1). The intact crystal of this strain is composed for, at least, two different proteins, and when it was trypsin-digested, it was resolved in two different bands. This results are very similar to those found in other *B. thuringiensis* strains, such as the subsp. *colmeri*, however this strain is not toxic to *S. frugiperda* (Haider *et al.*, 1986). The results of the immunoblotting showed that only the minor band, cross reacted with the polyCryIAb antisera. We believe that the band of high molecular mass could be a CryIB, CryIC or other ICP protein that our antibody is unable to recognize, because the specificity of the polyCryIAb, showed to be specific to all CryI proteins, except to CryIB and CryIC.

In order to clone different genes, we performed the PCR experiments using total DNA from GM-10 and the oligonucleotides BP-7 and BP-3. The PCR product was visualized, on agarose gel, as a single band, which might be composed by several different *cry* genes. From the PCR product, we were able to clone two different genes which were expressed in *E. coli* (clones 10A and 10B).

The toxic-fragment gene from the clone 10A was found to be a *cryIA(b)*

gene type. This gene was full sequenced and only one mismatch was found in three different clones having identical restriction pattern, indicating that these change was not due to a nucleotide misincorporation in the amplification process. This change is localized on the codon 287, where a residue of threonine was changed by one of isoleucine (data not shown). According with the tridimensional structure from the CryIIIA toxin, the amino acid change maps in the domain II on the loop between the helix α_8 and the β_2 (Li *et al.*, 1991). We do not think that this single change could account for the high toxicity against *S. frugiperda* displayed by this strain. The toxic-fragment gene from the clone 10A encodes for a protein product which cross-reacted strongly with the polyCryIAb antisera and its restriction pattern is identical to *cryIA(b)* gene, in contrast the clone 10B bearing a gene with different restriction pattern and immunological properties than the clone 10A. Moreover, the Southern hybridization shows that this gene gave a very weak signal with the probe Rb-9. This results suggest that this clone harbours a different gene of *cryIA(b)*. Actually, the sequence of this gene is in progress. The hybridization analysis performed with several specific *cryIB*, *cryIC* and *cryID* oligonucleotide probes demonstrate that the clones 10A and 10B do not represent clones of these genes.

In this paper we have reported a PCR system in order to perform the amplification, cloning and expression of the *cry* genes. We think that with the oligonucleotides BP-7 and BP-3 different *cry* genes can be cloned.

References

Aronson, A. I., Beckman, W. & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiological Reviews* 50, 1-24.

Aronson, J. N. & Arvidson, H. C. (1987). Toxic trypsin digest fragment from the *Bacillus thuringiensis* parasporal protein. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 416-421.

Brizzard, B. L. and Whiteley, H. R. (1988). Nucleotide sequence of an additional crystal gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. *Nucleic Acids Research* 16, 2723-2724.

Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. W., Evola, S. & Koziel, M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strain by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3057-3061.

Chambers, J. A., Jelen, A., Gilbert, M., Jany, C. S., Johnson T. V. & Gawron-Burke, C. (1991). Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Journal of*

Bacteriology 173, 3966-3976.

Feitelson, J. S., Payne, J. & Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Tecnology* 10, 271-275.

Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S. & Peferoen, M. (1991). Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 88, 5119-5123.

Gleave, A. P., Hedges, R. J. & Broadwell, A. H. (1992). Identification of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DSIR517 with significant sequence differences from previously described toxins. *Journal of General Microbiology* 138, 55-62.

Haider, M. Z., Knowles, B. H. & Ellar, D. J. (1986). Specificity of *Bacillus thuringiensis* var *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *European Journal of Biochemistry* 156, 531-540.

Haider, M. Z., Ward, E. S. & Ellar, D. J. (1987). Cloning and heterologous expression of an insecticidal delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* IC1 toxic to both lepidoptera and diptera. *Gene* 52, 285-290.

Haider, M. Z. & Ellar, D. J. (1989). Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid change produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *Journal of Molecular Biology* 208, 183-194.

Held, G. A., Bulla Jr, L. A., Ferrari, E., Hoch, J., Aronson, A. I. & Minich, S. A. (1982). Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki*. *Proceedings of the National Academin of Sciences of the United States of America* 79, 6065-6069.

Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research* 16, 7352-7367.

Höfte, H., Greve, H., Seurink, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C.,

Vandekerckhove, J., Vanderbrugen, H., Montagu, M., Zabeau, M. & Vaeck, M. (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. *European Journal of Biochemistry* 161, 273-280.

Höfte, H. & Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53, 242-255.

Höfte, H., Soetaert, P., Jansens, S. & Peferoen, M. (1990). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. *Nucleic Acids Research* 18, 5545.

Honeé, G., Van der Salm, T. & Visser, B. (1988). Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxic highly active against *Spodoptera* species. *Nucleic Acids Research* 16, 6240.

Knowles, B. H. & Ellar, D. J. (1988). Differential specificity of two insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. *Molecular*

Microbiology 2, 153-157.

Kronstad, J. W. & Whiteley, H. R. (1986). Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene* 43, 29-40.

Laemmli, U. K. & Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4.1. DNA packing events. *Journal of Molecular Biology* 80, 575-599.

Li, J., Carroll, J. & Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, L. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

McGaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 29, 193-195.

McLinden, J. H., Sabourin, J. R., Clark, B. D., Gensler, D. R., Workman, W. E. & Dean, D. H.. (1985). Cloning and expression of an insecticidal k-type

crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 623-628.

Oeda, K., Oshie, K., Shimisu, M., Nakamura, K., Yamamoto, H., Nakayama, I. & Ohkawa, H. (1987). Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* strain *aizawai*PL7 and its high-level expression in *Escherichia coli*. *Gene* 53,113-119.

Prefontaine, G., Fast, P., Lau, P. C. K., Hefford, M. A., Hanna, Z. & Brousseau, R. (1987). Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2808-2814.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H. A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J., Guo, S. & Lecadet, M.-M. (1989). Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*

aizawai 7.29. *Molecular Microbiology* 3, 229-238.

Schnepf, E. H. & Whiteley, H. R. (1985). Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 6273-6280. 2/

Thomas, W. E. & Ellar, D. J. (1983). *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science* 60, 181-197.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4352.

Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. & Van Mellaert, H. (1990). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticidal *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247, 72-74.

Van Rie, J. (1991). Insect control with transgenic plants: resistance

proof?. *Trends in Biotechnology* 9, 177-179.

Visser, B., Munsterman, E., Stoker, A. & Dirkse, W. G. (1990). A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *Journal of Bacteriology* 172, 6783-6788.

Wabiko, H., Held, G. A. & Bulla, L. A., Jr. (1985). Only part of the protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*1715 is necessary for insecticidal activity. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 706-708.

Wabiko, H., Raymond, K. C. & Bulla, L. A., Jr. (1986). *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin sequence and gene product analysis. *DNA* 5, 305-314.

STRAIN

TESTED INSECTS

Spodoptera frugiperda *Heliothis virescens* *Trichoplusia ni*

LC₅₀ (μg. ml⁻¹ diet)

HD-1	1092.2 (1X)	18.9	50
GM10	62.1 (17X)	23.2	50

OLIGO	GENE	DNA SEQUENCE	POSITION
		5'	
BP-7	<i>cryIA(b)</i>	TTAGTCTGCAGTTAGTTGCACTTTGTGC	-118 to -102
BP-3	<i>cryIA(b)</i>	CTAAATTGGATACTTGATCAATAGT	2071 to 2095
Rb-9	<i>cryIA(b)</i>	CTAGTTGATATAATATG	319 to 336 *
C-8	<i>cryIB</i>	CTTCATCACGATGGAGTAA	1007 to 1025
C-10	<i>cryIC</i>	AAAGATCTGGAACACCTTT	1306 to 1325
C-12	<i>cryID</i>	CTGCAGCAAGCTATCCAA	837 to 856

*Prefontaine et al. (1987).

A

B

C

D

1

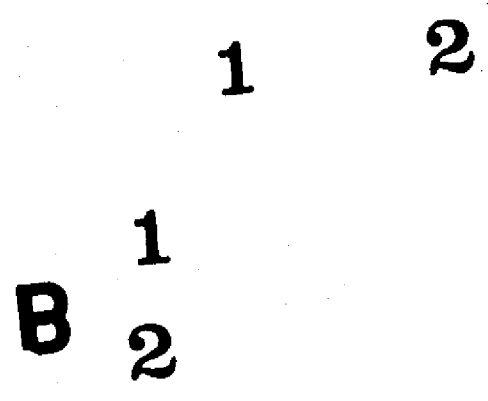
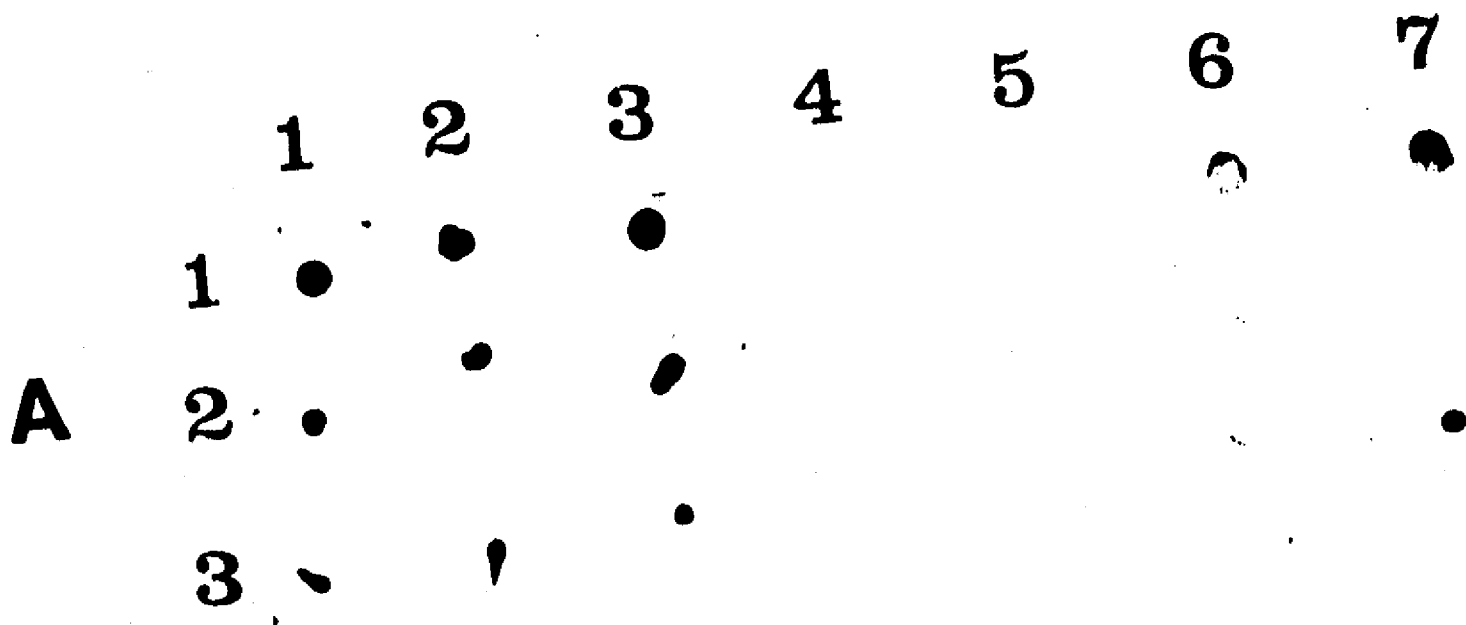
2

1

2

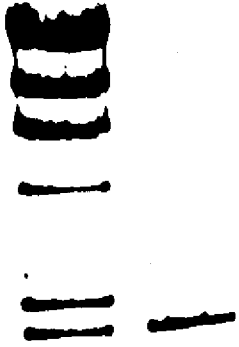


Fig 1



T 14 2

1 2



T.43

1 2 3 4

Fig 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Handwritten characters, possibly a code or signature, located in the upper right quadrant of the page.

Small handwritten mark or character.

Large, dark, irregular ink smudges or blotches located in the lower right quadrant of the page.

F.85



LEGENDS TO TABLES AND FIGURES

Table 1.- Toxicity of *Bacillus thuringiensis* GM-10 strain against different insects*.

Footnote.- * Dr. Luis Galán-Wong Personal communication.

Table 2.- Oligonucleotides used as primers and probes.

Footnotes.- * Prefontaine *et al.*, 1987.

The oligonucleotides C-8, C-10 and C-12 were designated from the sequence reported by Brizzard & Whiteley, 1988; Honeé *et al.*, 1988 and Höfte *et al.*, 1990, respectively.

Figure 1.- SDS-PAGE and Western blotting of intact and trypsin digestions of crystals and CryIA(b) protoxin. (a) Intact crystals. Gel stained with a Coomassie solution; (b) Western blot of same gel using the polyCryIAb antisera; (c) Trypsin-treated samples stained as (a); (d) Western blot as (b). Lanes: 1, 20 µg GM-10 crystals; 2, 40 µg CryIA(b) protoxin.

Figure 2.- Dot-blot immunodetection in order to test the specificity of the polyCryIAb antisera. (a) Different CryI proteins. Lanes: 1, CryIA(a); 2, CryIA(b); 3, CryIA(c); 4, CryIB; 5, CryIC; 6, CryID; 7, CryIE. (b) Unrelated CryI proteins. Lanes: 1, CryIIIA; 2, BSA.

Figure 3.- PCR amplification product using BP-7 and BP-3 as primers. Lanes: 1, Molecular DNA size markers; 2, PCR product.

Figure 4.- Western blot of trypsin-digested crude extracts from the recombinant clones obtained from the PCR-product cloning. Lanes: 1, 100 μ g of total protein from clone 10A; 2, 100 μ g of total protein from clone 10B; 3, 200 μ g of total protein from clone 10B; 4, 30 μ g of CryIA(b) trypsin-treated protoxin.

Figure 5.- Restriction pattern and Southern blot hybridization of the DNA from the recombinant clones 10A, lanes 1-6 and 10B, lanes 7-11. (a) Restriction pattern using several endonucleases; (b) Southern blotting using the oligonucleotide Rb-9 as probe. Lanes: 1, *Cla*I; 2, *Eco*RV; 3, *Hind*III; 4, *Pst*I; 5, *Xba*I; 6, *Cla*I-*Eco*RV; 7-11 same order than lanes 1-5; 12, DNA size markers.

ARTICULO No. 2

TITLE:

Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *cryIA(b)* variant from a *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*.

AUTHORS:

Pereyra-Alferez^{*}, B., R. Meza, A. Bravo^{*}, and R. Quintero.

**Instituto de Biotecnología/UNAM
Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos.
62271, MEXICO.**

***Present address: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Apdo. Postal 414. San Nicolás de los Garza, NL. 64000 MEXICO
Telephone: (52)(83) 522422.**

***Corresponding author.**

aaattgtagtaatagaaaaacagtattatataatgaattggtatcttaataaaagagatggaggaactt 72

atggataaacatccgaacatcaatgaatgcattccttataattglttaagtaaccctgaagtagaagtattagggtggagaagaatagaactggttaccccccaatcgatatttccttg 192
M D N N P N I N Z C I P Y N C L S H P E V E V L G G E R I E T G Y T P I D I S L 40

tcgctaaccgaatttcttttgaagtaatttctccgggtcgtggtttggttaggactagttgatataatggggaatttttggctccctctcaatgggacgacttcttctgaactt 312
S L T O F L L S E F V P G A G F V L G L V D I I W G I F G P S Q W D A F L V Q I 80

gascagtttaattaaccsaagaatgaagaattcgcctaggaaccaagccatttctagatagaaggactaagcaatctttatcaaatctacgcagaatcttttagagagtggaagcagat 432
E O L I N Q R I E E F A R N O A I S R L E G L S H L Y Q I Y A E S F R E W Z A D 120

cctactaatccagcattagaagaagatgcgtattcaattcaatgacatgaacagtgcccttacaaccgctattcctcttttgcagittcaaatatcaagttcctctttatcagta 552
P T N P A L R Z E H R I O F N D H N S A L T T A I P L F A V O N Y Q V P L L S V 160

tatgttcaagctgcaaatctacattatcagtttggagagatggttcagtttggacaaaggtggggtatttgatgccgactatcaatagtcggttataatgatttaactaggcttatt 672
Y V Q A A N L H L S V L R D V S V F G O R W G F D A A T I N S R Y N D L T R L I 200

ggcaactatacagatcagctgctgacgctggtacaatacgggattagagcgtgatggggaccggttctagagattggataagatataatcaattagaagaatcaactaactgta 792
G N Y T D H A V R W Y N T G L E R V W G P D S R D W I R Y N Q F R R E L T L T V 240

ttagatcctgttctctattccgaactatgatagtagaacgtatccaatccgaacagtttcccaattaacaagagaatttatcaaacaccagattagaaaattttgagtggtggttt 912
L D I V S L F P N Y D S R T Y P I R T V S Q L T R E I Y T N P V L E H F D G S F 280

cgaggtcggctcagggcagaagaagatattagggtccacatttgatggatatactaacagataaccatctatacggatgctcatagaggagaatattatggtcagggcattca 1032
R G S A Q G T E G S I R S P H L H D I L N S I T I Y T D A H R G E Y Y M S G H O 320

ataatgcttctcctctgaggggttttcggggccagaattcacttccgctataggaactatgggaatgcaactcccaacaacgtattgttgctcaactaggtcagggcgtgataga 1152
I H A S P V G F S G P E F T F P L Y G T H G N A A P Q Q R I V A Q L G Q G V Y R 360

acattatcgtccactttatagaagacctttatagggataaatacaacaactatctgttcttgacgggacagaattgcttatggaacctccctcaaatctccatccgctgta 1272
T L S S T L Y R R P F N I G I N H O Q L S V L D G T E F A Y G T S S N L P S A V 400

tacagaaaagcgggaacgtagattcgcgtggaatccgccacagaatacaacgctgccaccatggcaaggatttagctatcagtaagccatggttcaatggttctcaggtctt 1392
Y R K S G T V D S L D E I P P Q N N N V P P R O G F S H R L S H V S H F R S G F 440

agtaatagtagtgaatataaagaagctcctatggttctctggatcacatgctgctgaattlaantataatcttccatcaacaattscacaataacctttacaanaatctact 1512
S N S S V S I I R A P H F S W I H R S A E F N N I I P S S O I T Q I P L T K S T 480

aatcttggctctggaactctctgctgtaaaggaccaggtattacagggagatattcttcgaagaacttccctggccagatttcaaccttaagagtaaatattactgcaccattatca 1632
N L G S G T S V V K G P G F T G G D I L R R T S P G Q I S T L R V N I T A P L S 520

caaaatgatalcggglaaqaallcgcctacgcttctaccanaalltacatccatcaatcaatggaggaagactallaatcaggggaattttcagcaactatgagtagtgggaglaat 1752
Q R Y K V H I R Y A S T T H L O F H T S I D G R P I H O G N F S A T H S S G S H 560

ttacagtcgggaagccttaggactgtaggtttactactccgttttaactttcaaatggatcaagtgattttacgtaagtgctatgcttcaattcaggaatgaagtttatatagat 1872
L O S G S F R T V G F T T P F N F S H G S S V F T L S A H V F H S G N E V Y I D 600

cgattgaaatttctccggcagaaglaacctttgagcagaatattgattagaagagcacaanaagcgggtgaatgagctggttacttctccaatcaatccgggttaaaaaagagatgtg 1992
R I E F V P A E V T F E A E Y D L E R A O K A V N E L F T S S H Q I G L K T D V 640

acggtatcatattgatcaagatccaatttagttgagtggtttatctgatgaattttgtctggatgaaaaaaagaaatgtccgagaaggtcaaacatgccaagcagcttagtgatgag 2112
T D Y H I D Q V S N L V E C L S D E F C L D E K K E L S E K V K H A K R L S D E 680

cggaattacttcaagatccaaactttagagggatcaatagacaactagaccgtggctggagaggaagtagcggatattaccatccaaggaggcagtagcgtattcaagagaattacgtt 2232
R N L L Q D P N F R G I N R Q L D R G W R G S T D I T I Q G G D D V F K E N Y V 720

acgctatgggtaccttgatgagtgctatccaaacttlatatcaaaaaatagttgagtgcaaatataaagcctatccccgttaccantaaaggggtatatacgaagatagtcagac 2352
T L L G T F D E C Y P T Y L Y Q X I D E S K L K A Y T R Y Q L R G Y I E D S Q D 760

ttagaantctatttaattcgcctacaatgccaaacacgaacagtaaatgtgccaggtacgggttcttatggccgctttcagccccagtcantgggaaatgtgccatcattccat 2472
L E I Y L I R Y N A R H E T V N V P G T G S L W P L S A P S P I G K C A H H S H 800

catttctccttggacattgagttggtgtagcagacttaaatgagagacttaggtgatgggtgatattcaagattaagacgcaagatggccatgcaagactaggaatctagaatttctc 2592
H F S L D I D V G C T D L N E D L G V W V I F K I K T Q D G H A R L G N L E F L 840

gaagagaaacattagtaggagaagcactagctcgtglaaagaagcgggagaaaaatggagagacaaacgtgaaaaattggaatgggaaacaaatattggttataaagagggcaaaagaa 2712
E E K P L V G E A L A R V K R A E K K W R D K R E K L E W E T N I V Y K E A K E 880

tctgtagatgcttatttgaactctcaatgatagattacaagcggatccaacatcgcgtgattcatgcccagataaacgcttcatagcattcgaagaagct 2820
S V D A L F V N S O Y D R L Q A D T N I A M I H A A D K R V H S I R E A 915

From a *Bacillus thuringiensis* isolate, highly active against several lepidopteran larvae (e.g. *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*), the amino-terminal half of a crystal protein gene was isolated and sequenced. The comparisons with other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins genes showed to be highly homologous to the *cryIA(b)* gene (1). The difference with respect to *cryIA(b)* is localized at 287 codon number where a change T for I was found.

REFERENCES.

1. Hofte, H., and Whiteley, H.R. (1989) *Microbiol. Rev.* 53, 242-255
2. Wong, H.C., Schnepf, H.E., and Whiteley, H.R. (1983) *J. Mol. Chem.* 258, 1960-1967.
3. Wabiko, H., Raymond, K.C., and Bulla, L.A. Jr. (1986) *DNA* 5, 305-314.

LEGEND TO FIGURE.

Figure 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence from the N-terminus of the putative minimum toxic fragment coded for the *cryIA(b)* gene variant. The unique point mutation and the amino acid change are in boldface. Putative BTI promoter sequence (2) is underlined and a putative Shine-Dalgarno sequence is double underlined. The amino acid delineating the C-terminus of the putative toxic fragment (3) is marked (^).

RESULTADOS

Esquema de clonación del gen *cryA(b)* de las cepas GM-7 y GM-10.

La estrategia de clonación del gen de la δ -endotoxina de Bt cepas GM-7 y GM-10 se inició aplicando los criterios tradicionales de clonación, esto es: Primero, era necesario saber de cuántas y qué tipo de proteínas conforman el cristal de ambas cepas. Para ello, se realizó la purificación del cristal, mismo que se sometió a electroforésis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% y teñidos con coomassie. El resultado de la electroforésis reveló la presencia de dos bandas de aproximadamente 130-140 KDa para ambas cepas (Fig. 6A). Otro gel, corrido en iguales condiciones, fue transferido a nitrocelulosa para realizar un experimento tipo "Western". El filtro de nitrocelulosa fue incubado 1 h con un anticuerpo policlonal obtenido contra la fracción tóxica de CryIA(b) y revelado con un 2º anticuerpo acoplado a peroxidasa, observándose que solo la banda inferior dió reacción cruzada con este anticuerpo (Fig. 6B).

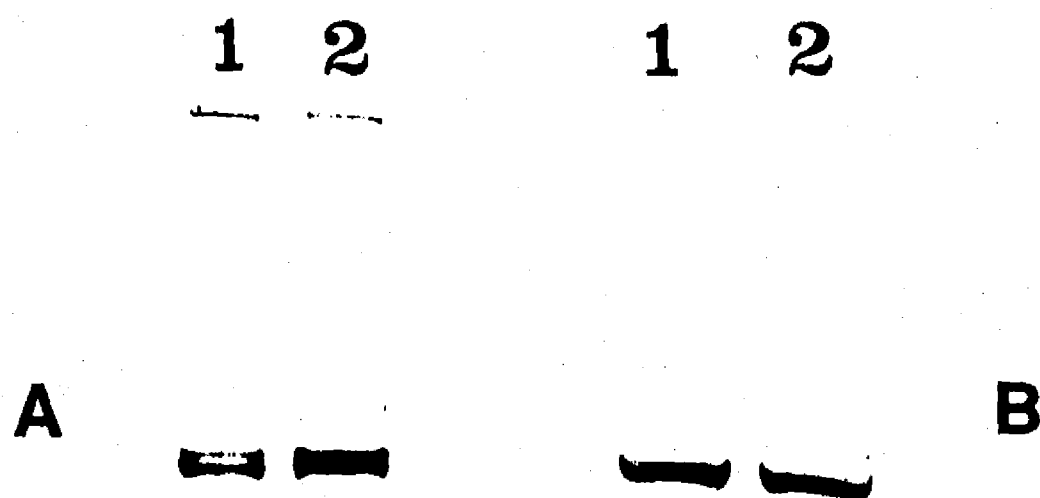


FIGURA 6.-Electroforésis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% del cristal de las cepas GM-7 y GM-10. A.- Patrón electrofóretico de GM-7 , carril 1 y GM-10, carril 2. B.- Western del mismo gel.

Posteriormente, se decidió realizar una digestión de los cristales de GM-

10 y protoxina de CryIA(b) con tripsina y el producto de las digestiones fue sometido a idéntico proceso que los cristales sin digerir. Los resultados mostraron que el cristal de GM-10 se resolvió en dos bandas, una de 70 y otra de 65 KDa, mientras que CryIA(b) solo dió una de 65 KDa (Fig. 7A) y el Western muestra que solo la banda de 65 KDa dió reacción positiva con el anticuerpo usado (Fig. 7B).

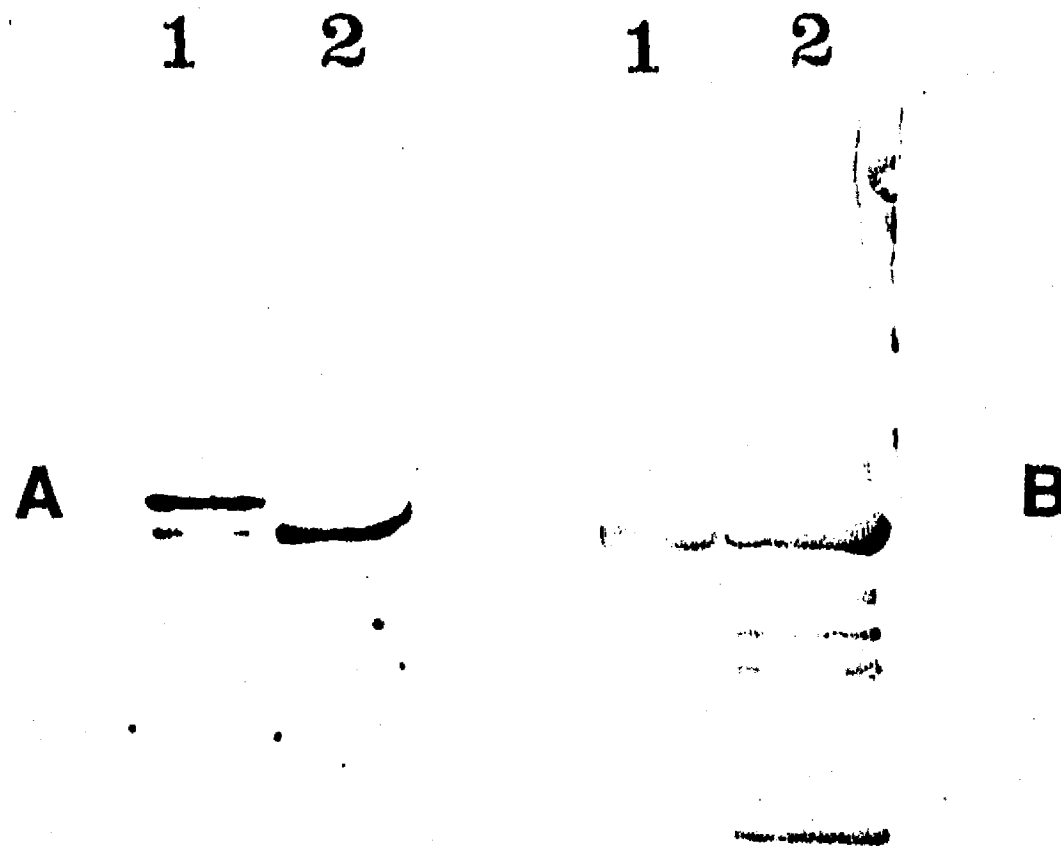
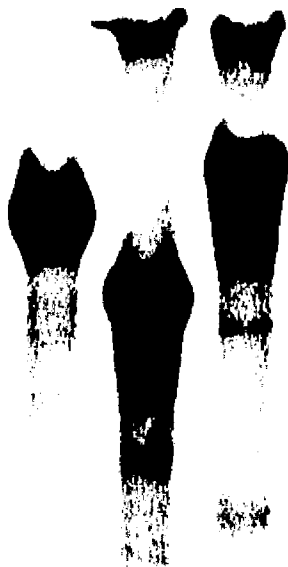


FIGURA 7.- Electroforésis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% de las toxinas de GM-10 y CryIA(b) obtenidas por digestión con tripsina. A.- gel teñido con coomasie. GM-10, carril 1; CryIA(b) carril 2. B.- Western del mismo gel.

PURIFICACION DE ADN Y EXPERIMENTOS DE HIBRIDACION TIPO "SOUTHERN".

El ADN total de ambas cepas fue obtenido y digerido con diferentes enzimas de restricción. En un principio se seleccionaron *Bam*HI, *Bgl*III y *Pst*I debido a que la clonación de los genes reportados hasta ese entonces, se habían realizado usando alguna de estas enzimas. La Fig. 8 muestra el resultado del Southern, usando como probador el plásmido pBT200, el cual contiene el gen completo de *cry*IA(b) clonado a partir de Bt subsp. *berliner*1715 (Wabiko, *et al.* 1986). Este plásmido fue proporcionado por el

1 2 3 4 5 6



FUGURA 8.- Hibridación de la digestión del ADN total de GM-7 y GM-10, usando el gen completo de *cryIA(b)* como sonda marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. GM-7, carril 1, *Bam*HI; carril 2, *Bgl*II; carril 3, *Pst*I. GM-10, carril 4, *Bam*HI; carril 5, *Bgl*II; carril 6, *Pst*I.

Dr. Luis Herrera Estrella. CINVESTAV, Irapuato. Las bandas que dieron señal positiva, resultaron ser de un tamaño muy grande, aproximadamente 24 Kpb para *Bam*HI, 17 Kpb para *Bgl*II y 26 Kpb para *Pst*I en ambas cepas. No obstante el tamaño de las bandas, éstas fueron purificadas del gel de agarosa para intentar clonarlas en *E. coli* usando los plásmidos pBGS19 y pBR322. A la par con estos experimentos, el ADN total de las cepas de Bt, fue digerido con *Hind*III, debido a que previos reportes señalaban que con dicha digestión se podía saber el tipo ó tipos de genes para la δ -endotoxina que poseen las cepas de Bt. La Fig. 9 muestra el resultado de la digestión con *Hind*III, usando como sonda el oligo Rb-9 (Prefontaine, *et al.* 1985) donde se observa que ambas cepas dan solo una señal positiva a la altura de 5.4 Kpb. Así mismo, se realizaron comparaciones múltiples de las secuencias de ADN de los genes *cry* reportadas hasta esa fecha, encontrando, que la enzima *Dra*I podría dar fragmentos de menor tamaño donde se encontrara contenido el gen estructural. Por este motivo decidimos digerir el ADN total de ambas cepas con esta enzima y para

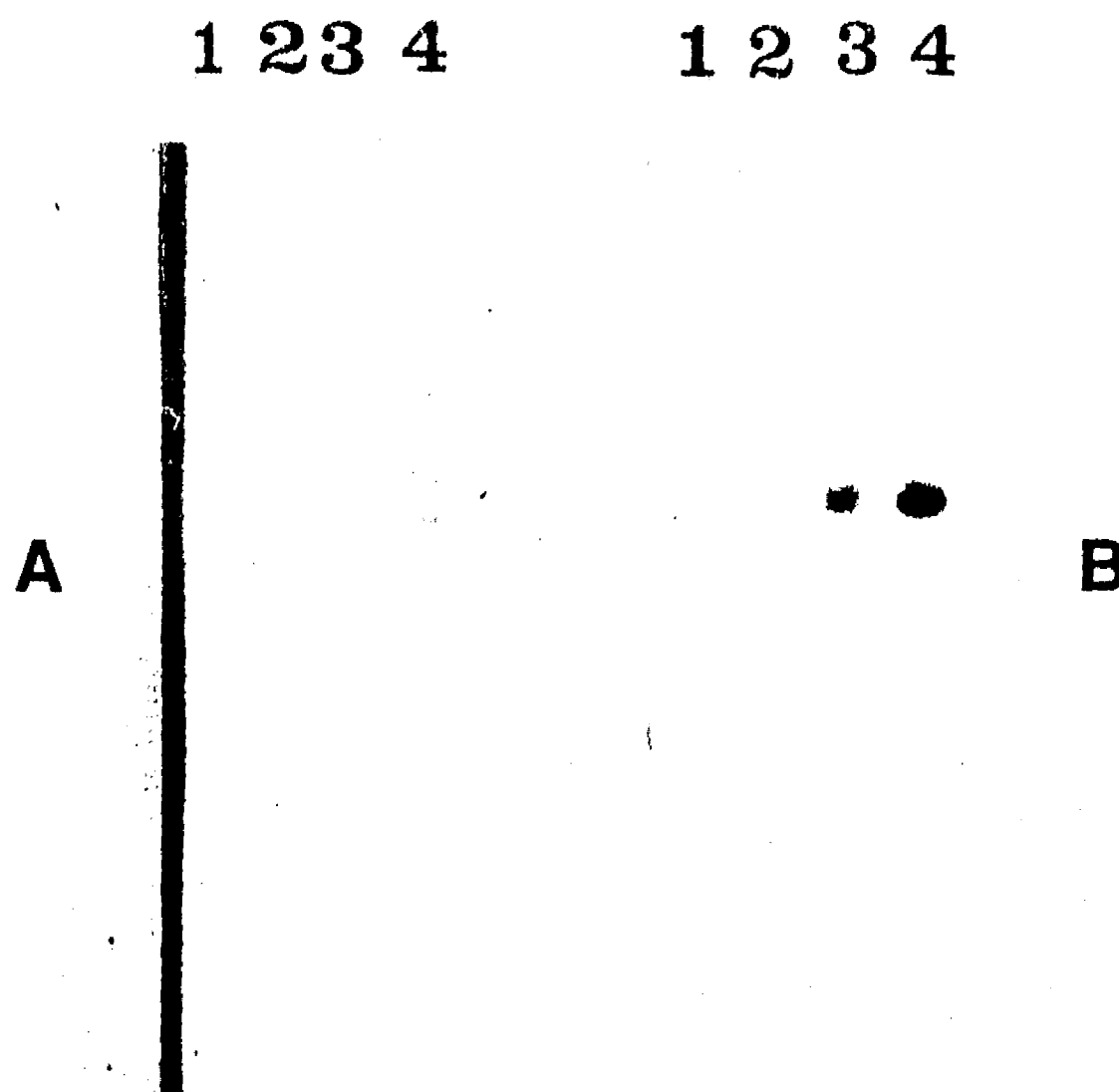


FIGURA 9.- Hibridación de la digestión con *HindIII* del ADN total de GM-7 y GM-10, usando el oligonucleótido ($\gamma^{32}\text{P-ATP}$)-Rb-9 como sonda. **A.-** Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, λ -*HindIII*; carril 2, GM-2, control negativo; carril 3, GM-7; carril 4, GM-10. **B.-** Hibridación del mismo gel, después de ser transferido a un filtro de nitrocelulosa.

saber si el gen estructural se encontraba completo en alguna de las bandas, usamos tres oligos como probadores, marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$, el NH_2 , el Rb-9 y el COOH (Tablas 7 y 8). El resultado del Southern mostró la presencia de una señal positiva, en GM-10 para los probadores Rb-9 y COOH a la altura de 3.7 Kpb y para GM-7 dos señales, una de 4.5 y otra de 3.7 para los mismos oligos (Fig. 10). Las bandas que dieron señal positiva fueron purificadas del gel para intentar clonarse en el plásmido pBGS19 y pUC19 en el sitio *SmaI*, sin resultados positivos.

Debido a los problemas que se tuvieron en la clonación directa de los fragmentos de ADN decidimos realizar la amplificación específica de los genes usando las metodologías de PCR.

TABLA 7.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y su posición con respecto a los genes *cryI**.

TIPO DE GEN	NUMERO DE pb HACIA EL 5'	SECUENCIA
		5'
<i>cryI</i> (a)	-82	CATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAA CAG
<i>cryI</i> (b)	-82	CATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAA CAG
<i>cryI</i> (c)	-82	CATATGTTTTAAATTGTAGTAATGAAAAA CAG
<i>cryI</i> D	-82	CATATGCTTTAAATTGTAGTAAAGAAAAA CAG
<i>cryI</i> E	-86	CATATGTTTAAAATTGTGGTAAAGAAAAAACAG
<i>cryI</i> F	-77	CATATGTTTACATTGTAATACAGTAAG AG
OLIGO NH ₂		CATATGTTTTAAATTGTAGTAATG
OLIGO BP-1		GTCATATGTCC TGCAG AAATTGTAGTAATGAAAAAC*
<i>cryI</i> (a)	-118	TTAGTTGCACTTTGT GC
<i>cryI</i> (b)	-118	TTAGTTGCACTTTGT GC
<i>cryI</i> (c)	-118	TTAGTTGCACTTTGT GC
<i>cryI</i> D	-117	TTCGTTCCAIITTTCT GT
<i>cryI</i> E	-116	TTTGTTGC CTTTGTIGC
<i>cryI</i> F	-113	TTGGTTGCACTTTGT GC
OLIGO BP-7		TTTAGT CTGCAG TTAGTTGCACTTTGTGC**

*No se incluyen los genes *cryI*B ni *cryI*C debido a que la secuencia disponible no llega hasta la región de inicio de la transcripción.

**La secuencia resaltada indica el sitio de corte para *Pst*I. Las bases subrayadas indican el cambio de base con respecto a *cryI*(b).

TABLA 8.- Secuencia de la región 3' de los genes *cryI*, que son tóxicos contra *Spodiptera frugiperda*.

GEN	SECUENCIA
	5'
<i>cryIC</i>	ACTCCTTATGGAGGAATAAGAT ATGT
<i>cryID</i>	ACTCCTTATGGAGGAATAGGACCATGC
<i>cryIE</i>	ACTTCTTATGGAGGAATAATAT ATGC
<i>cryIF</i>	ACTCCTTATGGAGGAATAGTCTCATAAC
OLIGO COOH	GCATGAGATCTATTCTCCA TAAGGAGT*

El triplete resaltado representa al codón de término de síntesis de la proteína.

*El oligo COOH es complementario a la secuencia del gen *cryIA(b)*.

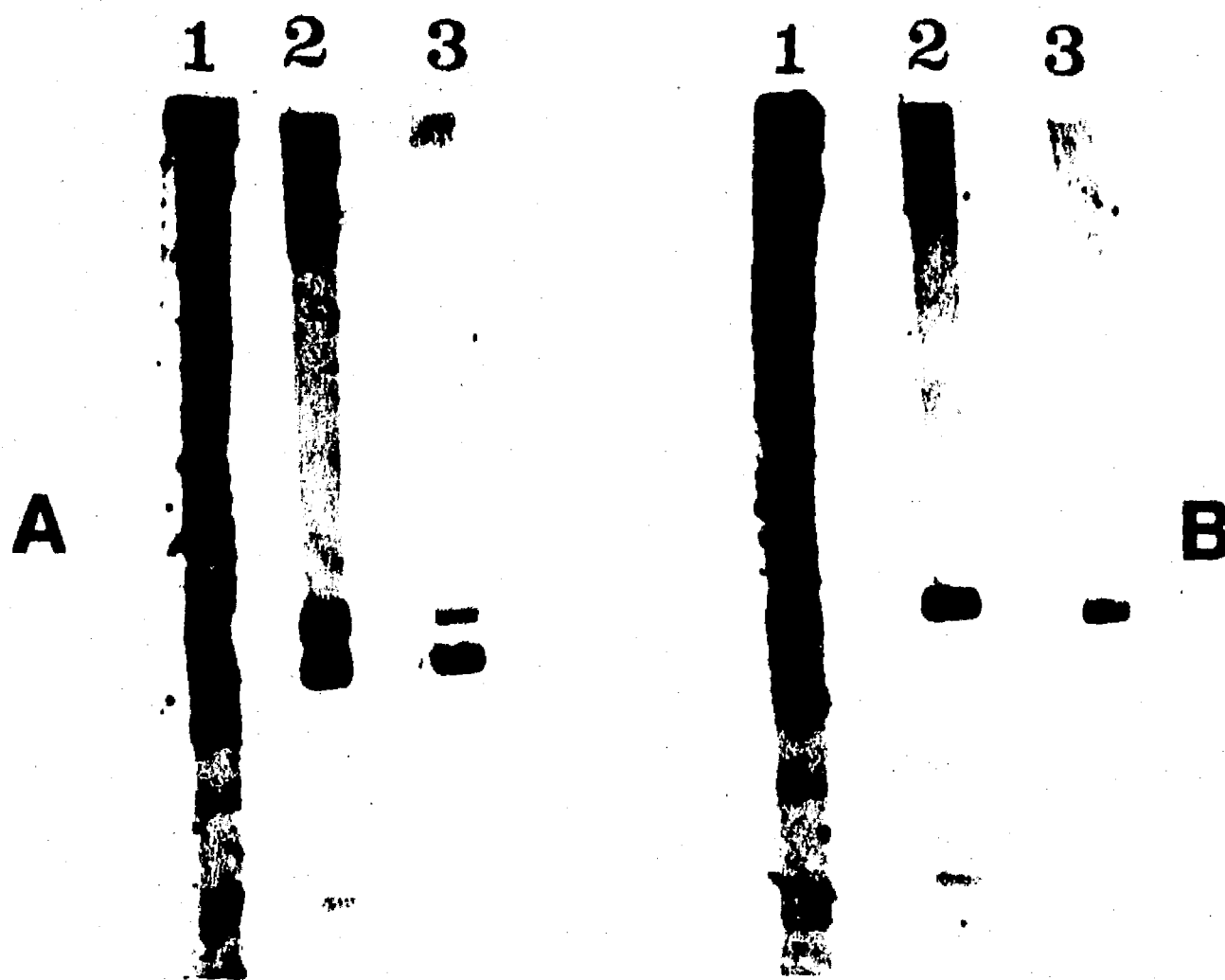


FIGURA 10.- Hibridación del ADN total digerido con *DraI*, usando diferentes oligonucleótidos marcados radiactivamente. A.- GM-7, carril 1, oligo NH₂ ; carril 2, oligo Rb-9; carril 3, oligo COOH. B.- GM-10, mismo orden que para GM-7.

El ADN de nuestras cepas fue parcialmente digerido con *DraI* y totalmente con *BamHI* para realizar los experimentos de PCR, usando los oligos NH₂ y COOH como primeros. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1.5 min a 92 °C; 1.5 min a 55 °C y 3.0 min a 70 °C por ciclo durante 30 ciclos. El experimento de PCR dió un solo producto de 3.6 Kpb para ambas cepas (Fig. 11).

1 2 3 4 5 6 7

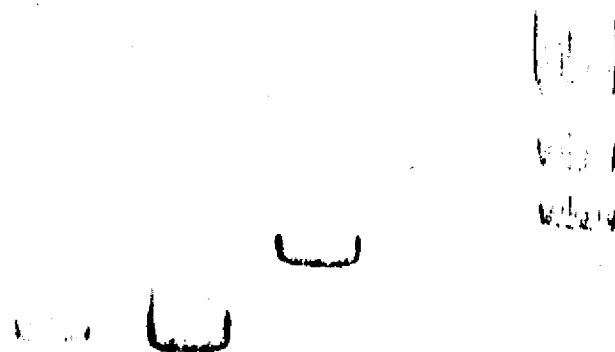


FIGURA 11.- Electroforésis en gel de agarosa de los productos de la reacción de PCR usando los oligonucleótidos BP-1 y COOH como primeros. Carriles 1 y 2, ADN total de GM-7 y GM-10 digerido con *DraI*; carril 3, PCR de GM-7; carril 4, PCR de GM-10; carril 5, fragmento de 5.4 Kpb del plásmido pBT200; carril 6, PCR del fragmento de 5.4 Kpb; carril 7, λ -*HindIII*.

Este producto fue digerido con *HindIII* y *BclI*, dando un patrón semejante a *cryIA(b)* (Fig. 12). Este producto de PCR lo intentamos clonar tanto en pUC19 como en pBGS19 pero en ningún caso obtuvimos transformantes positivas. Debido a los problemas que se tuvieron al intentar clonar el gen completo, decidimos intentar la clonación del fragmento interno de la digestión del producto de PCR con *HindIII*, en el plásmido pBGS19.

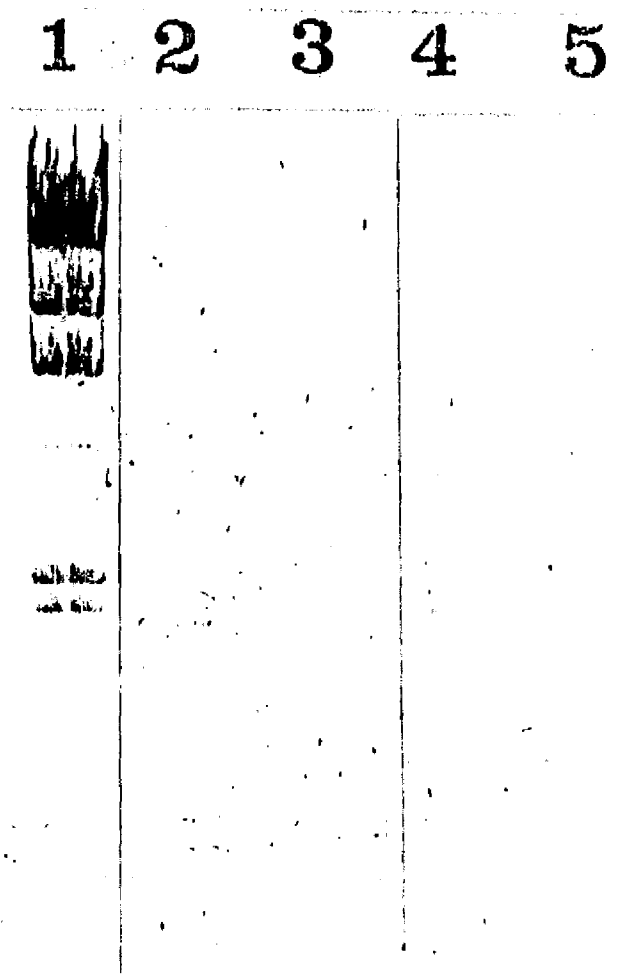


FIGURA 12.- Digestión del producto de PCR de las cepas GM-7 y GM-10. Carril 1, λ -*Hind*III; carril 2, PCR GM-7 digerido con *Hind*III; carril 3, PCR GM-10 digerido con *Hind*III; carril 4, PCR GM-7 digerido con *Bcl*I; carril 5, PCR GM-10 digerido con *Bcl*I.

De esta manera, obtuvimos tres transformantes positivas, una para GM-7 (pLR1) y dos para GM-10 (pLDA1) (Fig. 13).

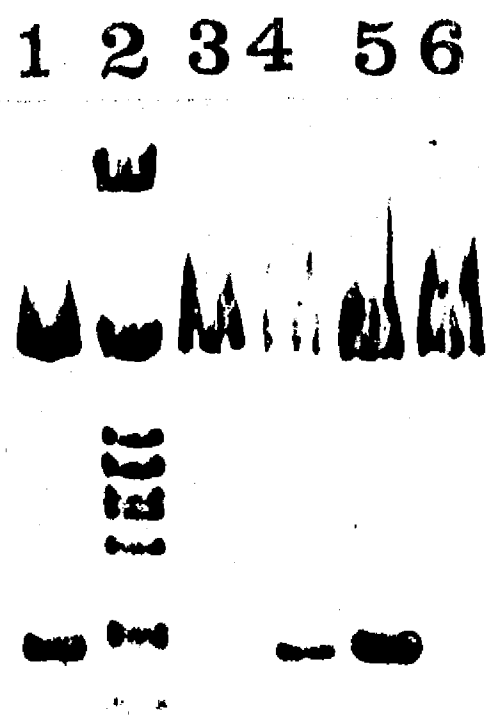


FIGURA 13.- Digestión con *Hind*III del ADN de las clonas recombinantes obtenidas con el fragmento *Hind*III-*Hind*III del producto de la PCR de las cepas GM-7 y GM-10. Carril 1, clona para GM-7; carril 2, λ -*Pst*I; carriles 3, 4 y 5, diferentes clonas para GM-10; carril 6, pBGS19.

A estas clonas se les determinó la secuencia nucleotídica, la cual no reveló cambio alguno a las reportadas para *cryIA(b)* (Wabiko, *et al.* 1986). En base a los datos obtenidos de la secuencia, se diseñó el oligonucleótido BP-3 (Tabla 9) para realizar la amplificación del fragmento tóxico bajo el razonamiento siguiente. Si la mayoría de las diferencias entre los genes *cryI* se localizan en la mitad amino terminal (fragmento tóxico), pues entonces intentemos amplificar y clonar únicamente la región que codifica para la fracción tóxica.

TABLA 9.- Secuencia del oligonucleótido complementario y su posición con respecto a los genes *cryI*.

TIPO DE GEN	NUMERO DE CODON	SECUENCIA *
		5'
<i>cryIA(a)</i>	644	CATATTGATCAAGTATCCAATTTAG
<i>cryIA(b)</i>	644	CATATTGATCAAGTATCCAATTTAG
<i>cryIA(c)</i>	644	CATATTGATCAAGT <u>G</u> TCCAATTTAG
<i>cryIB</i>	672	CATATTGATCAAGTATCCAATTTAG
<i>cryIC</i>	651	CATATTGATCAAGTATCCAATTTAG
<i>cryIC(b)</i>	642	CATATTGATCAAG <u>C</u> TITCCAATTTAG
<i>cryID</i>	628	CATATTGATCAG <u>G</u> TATCCAAT <u>C</u> TAG
<i>cryIE</i>	636	CATATTGATCAAGT <u>I</u> TCCAATTTAG
<i>cryIF</i>	636	CATATTGATCAAGTATCCAATTTAG
OLIGO BP-3		CTAAATTGGATACTTGATCAATATG

*La secuencia resaltada indica el sitio de corte para *BclI*. Las bases subrayadas indican el cambio de base con respecto a *cryIA(b)*.

La amplificación del fragmento tóxico se realizó con los oligos BP-1 y BP-3 (Tablas 8 y 9), al oligo BP-1 se le diseñó un sitio para *PstI* y el oligo BP-3 lleva el sitio natural para *BclI*, de esta manera podríamos clonar el

producto de PCR de manera dirigida usando los sitios de *Pst*I y *Bam*HI del "polilinker" de pBGS19. El producto de la amplificación de ambas cepas (Fig. 14) fue clonado en *E. coli* DH5 α .

1 2 3

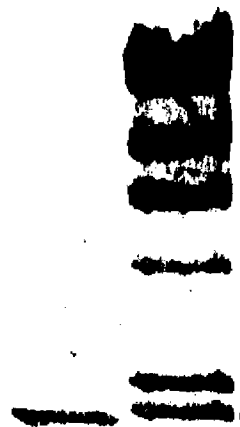


FIGURA 14.- Electroforésis del producto de PCR de las cepas GM-7 y GM-10, usando como primeros BP-1 y BP-3. Carril 1, PCR GM-7; carril 2, PCR GM-10; carril 3, λ -HindIII.

Para la cepa GM-7 se obtuvieron dos clonas positivas, plásmidos pLWM1 y 2 (Fig. 15), mientras que para GM-10 solo una, plásmido pAB1 (Fig. 16). Sin embargo, en ninguna de estas clonas nos fue posible detectar el producto del gen truncado (dato no mostrado) a pesar de que el producto de PCR debería contener la secuencia de unión al ribosoma del gen silvestre. Lo que nos hizo pensar que para poder obtener expresión del gen, era necesario realizar la amplificación a partir de un sitio mas distante, para lo cual se diseñó el oligo BP-7, localizado a 46 pb hacia el extremo 5' del oligo BP-1 (Tabla 8). Para mayores detalles ver artículo 1.

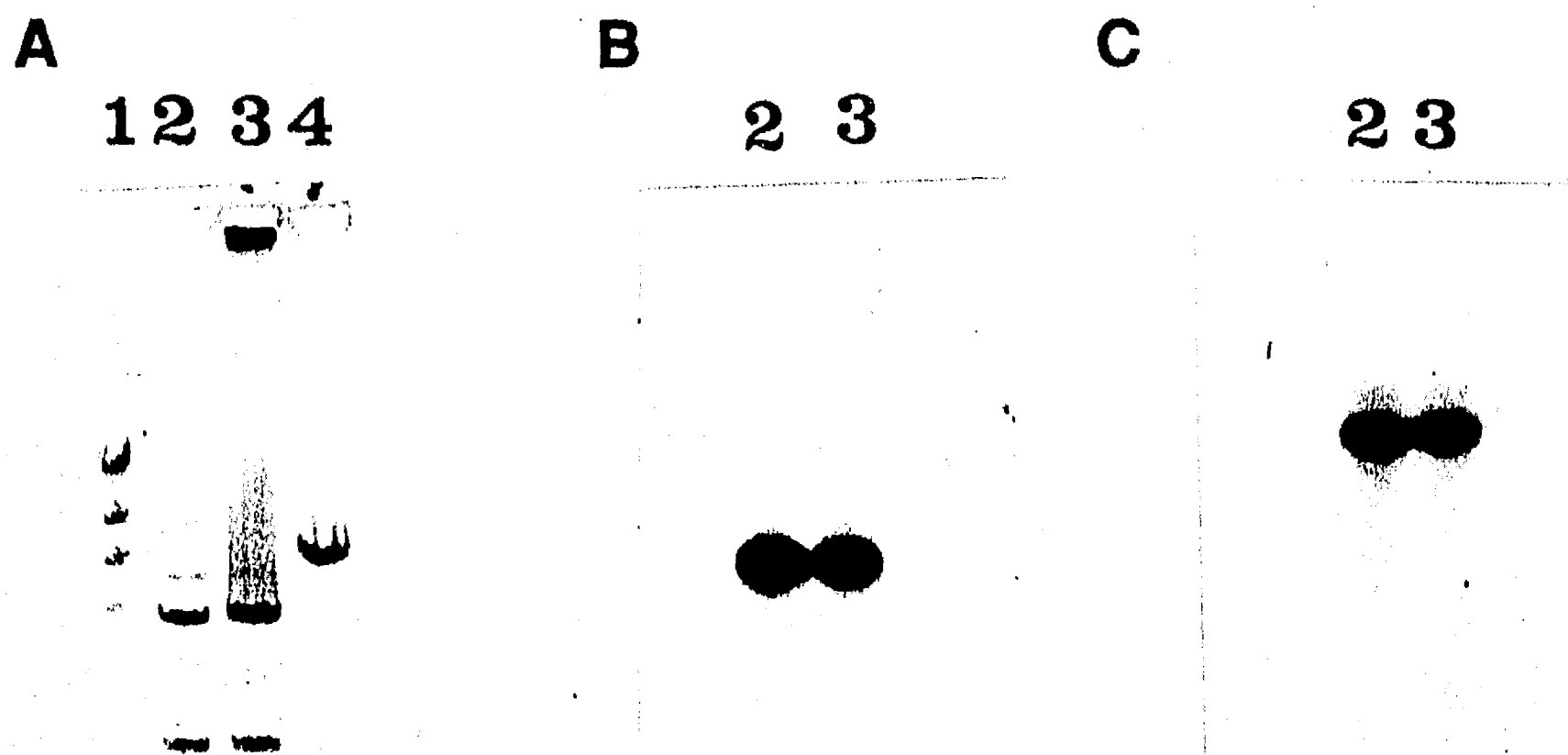


FIGURA 15.- Electroforésis del ADN de las clonas recombinantes obtenidas con el producto de la PCR de GM-7. El ADN plasmídico fue digerido con *Hind*III. **A.-** Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carriles 2, 3 y 4, diferentes clonas. **B.-** Hibridación del gel A, usando Rb-9 como sonda. **C.-** Hibridación del gel A, usando Rb-23 como sonda.

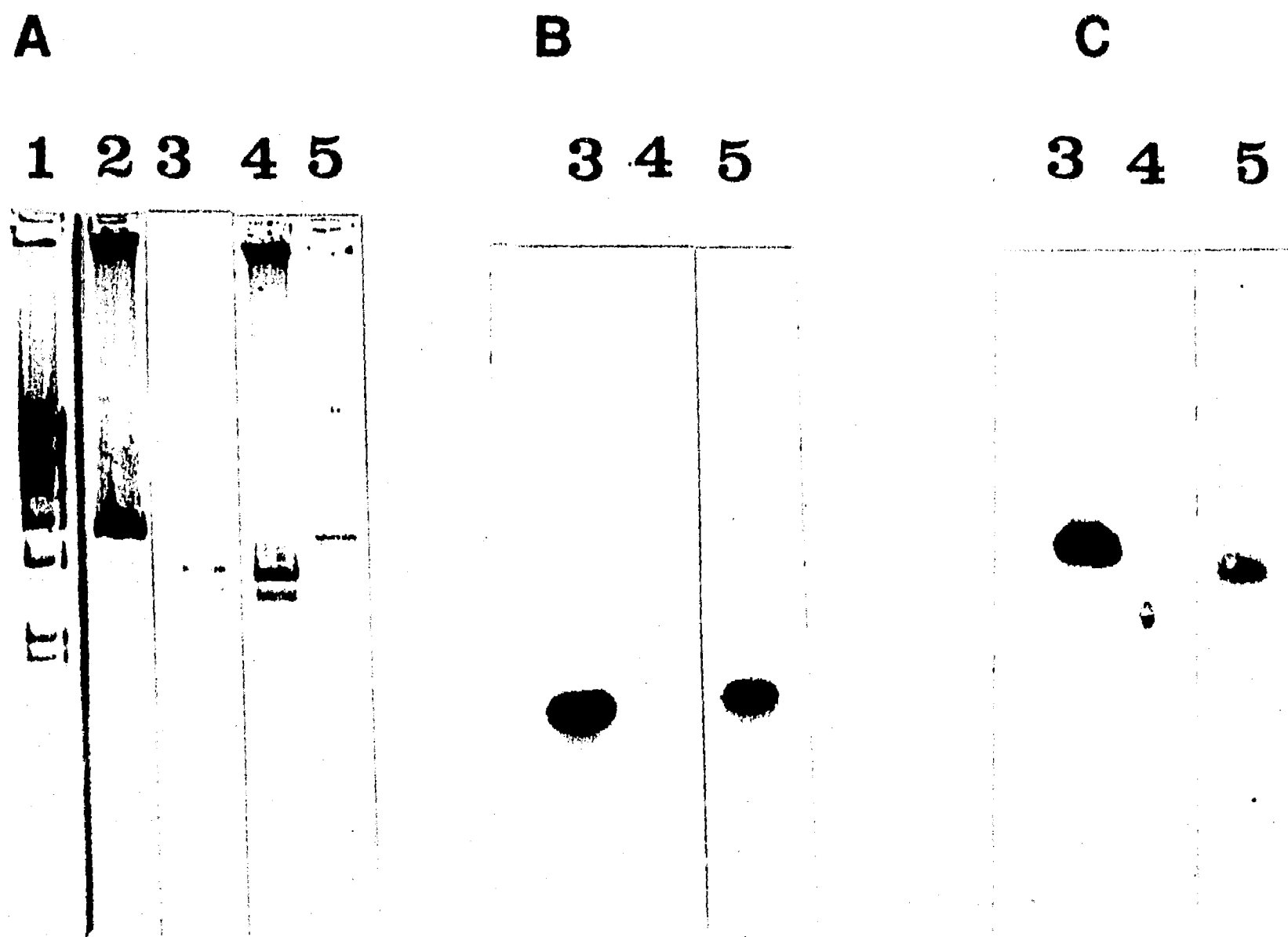


FIGURA 16.- Electroforésis del ADN de las clonas recombinates obtenidas con el producto de la PCR de GM-10. El ADN plasmídico fue digerido con *Hind*III. **A.-** Carril 1, marcadores de tamaño molecular; carril 2, pBGS19; carril 3, clona 7 de la PCR de GM-7; carril 4 y 5, diferentes clonas. **B y C,** igual que en la figura anterior.

La determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en base a los plásmidos pLDA1, pLR1 (fragmento *Hind*III- *Hind*III), pLWM1 y 2 (fragmento tóxico de GM-7) y pAB1 (fragmento tóxico de GM-10) como se describe en la Fig. 17.

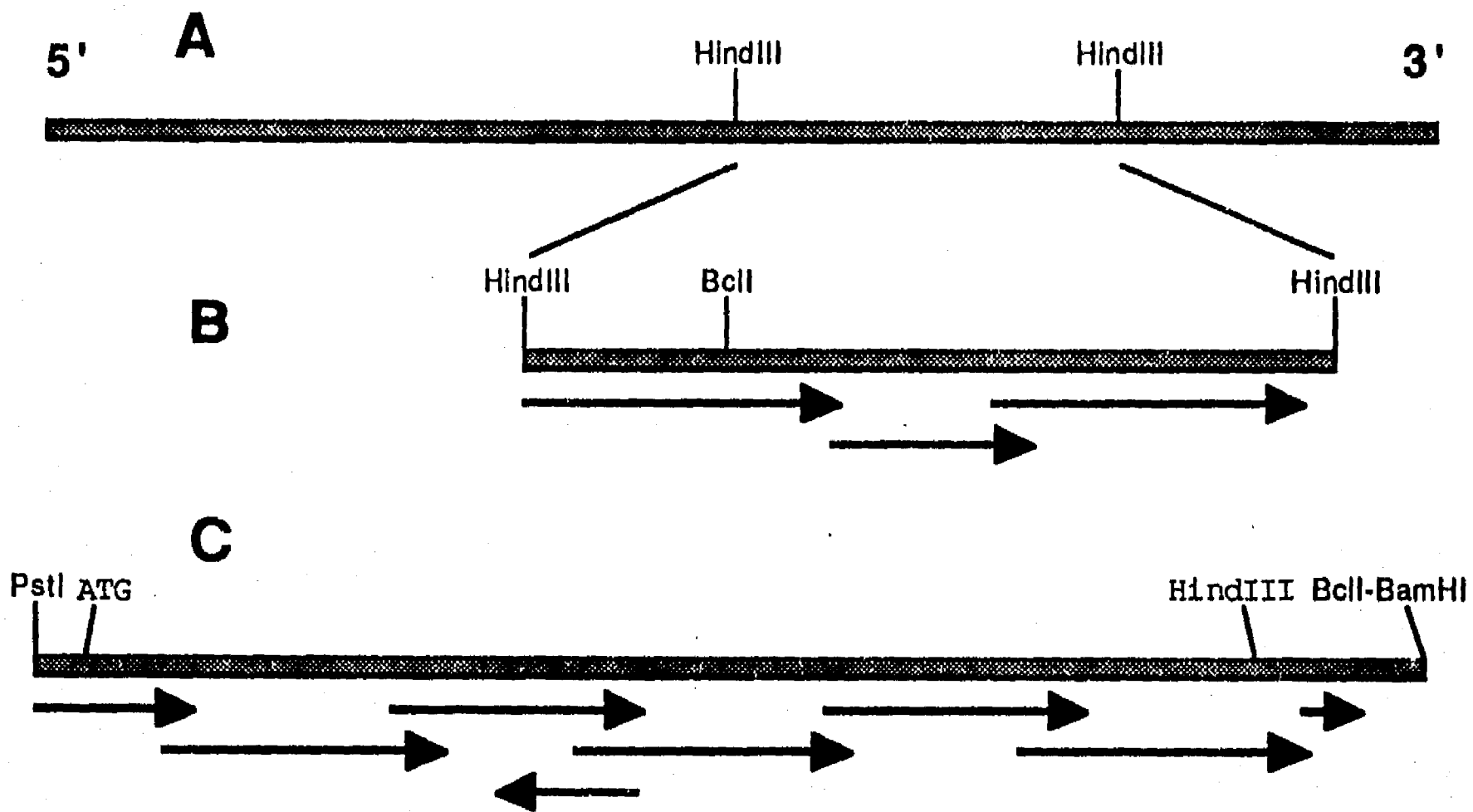


FIGURA 17.- Estrategia diseñada para la realización de la secuencia del gen *cryIA(b)* de las cepas GM-7 y GM-10. **A**, producto de PCR de 3.6 Kpb. **B**, fragmento *Hind*III-*Hind*III de los plásmidos pLDA1 y pLR1. **C**, plásmidos pLWM1 y pAB1. Las flechas indican el sentido de los oligonucleótidos usados para la secuencia. El inicio de cada flecha indica la localización de cada oligo y el final de la flecha indica hasta donde se realizó la lectura.

ARTICULO No. 3

molecular microbiology

Dr. G.K. Schoolnik
Division, Geographic Medicine
Beckman Center 241A
Stanford University School of Medicine
Stanford, CA 94305-5425, USA
(415) 723-8158
(415) 723-1399 FAX

April 16, 1992

Dr. Alejandra Bravo
Instituto de Biotecnologia UNAM
Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Dear Dr. Bravo:

Your revised manuscript entitled "The delta-endotoxin protein family displays a hydrophobic motif which might be implicated in toxicity" has been read by myself and Dr. Calva. I am pleased to report that it has been accepted for publication in Molecular Microbiology.

All future correspondence about this paper should be with Ms. Helen Ure, the Journal's Executive Editor. Her phone number is 011-44-31-226-7232 and her FAX number is 011-44-31-226-3803. Please expect to receive your page proofs in approximately eight weeks.

Thank you for having allowed us to consider this thoughtful and analytical study. Please convey my warmest regards to Dr. Soberon.

Sincerely,



Gary K. Schoolnik
Editor

GKS/er
MS EC9202

Editors

Dr. C.F. Higgins
Dr. G.K. Schoolnik

The delta-endotoxin protein family displays a hydrophobic motif which might be implicated in toxicity.

B. Pereyra-Alferez⁺, A. Bravo^{*}, R. Quintero and X. Soberón.
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, Morelos. México.

* For correspondence:

Instituto de Biotecnología, U.N.A.M., Apartado Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos 62271, México

Telephone No: (52)(73) 172799/172999

Telefax No: (52)(73) 172388

Running title: Computer analysis of delta-endotoxin proteins.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxin, mode of action, hydropathy, surface probability, hydrophobic motif.

⁺Present Address: Departamento de Microbiología e Inmunología.
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
Apartado Postal 414. San Nicolás de los Garza, NL. México.

SUMMARY

A computer-based analysis of hydropathy and surface probability of representative members of each class of the Cry family proteins, was performed. A highly conserved hydrophobic motif within the previously described block D2 (Höfte and Whiteley, 1989. Sanchis *et al.*, 1989), is present not only in lepidopteran toxin genes but also in toxins active against diptera and coleoptera. An interesting feature of this hydrophobic motif is the presence of an aspartic residue (highly hydrophilic) in its middle part. Comparison with the amino acid sequence from diphtheria toxin (Greenfield *et al.*, 1983), showed that it also contains a hydrophobic motif, similar to the one present in the *Bacillus thuringiensis* toxins. It also contains an aspartic residue in the middle part and some speculations are made in relation to the function of this specific region with regard to the toxic mechanism of action.

INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that produces large crystalline inclusions during the sporulation process. These parasporal crystals, protoxins, contain protein molecules called δ -endotoxins that are toxic to the larvae of various insects including lepidoptera (Dulmage, 1981), coleoptera (Krieg *et al.*, 1983) and diptera (Goldberg and Margalit, 1977). The protoxins, upon ingestion, are proteolytically activated to produce a toxic fragment, which binds to specific receptors localized in the midgut epithelium, causing cell lysis and the larval death (Hofmann *et al.*, 1988a, Hofmann *et al.*, 1988b). The molecular lytic mechanisms have not been established with precision, but it appears that the toxin generates small pores causing changes in membrane permeability and disruption of homeostatic ion regulation (Sacchi *et al.*, 1986, Crawford and Harvey, 1988).

The C-terminal part of the protoxin is highly conserved among proteins which possess different specificity, but this region is not important for the toxicity. In contrast, the N-terminal, toxic fragment, shows greater diversity (Chunjatupornchai *et al.*, 1988, Höfte *et al.*, 1986). The determination of secondary structure content of some toxins, showed that the N-terminal half of the toxin contains several alpha-helices, whereas the C-terminal part is rich in β -strand conformation (Convents *et al.*, 1990, Carey *et al.*, 1986, Chestukhina *et al.*, 1982).

The toxic fragment from *B. thuringiensis* δ -endotoxin consists of several structural domains (Convents *et al.*, 1990, 1991). The three-dimensional structure of CryIIIA toxin, determined by X-ray

crystallography, has revealed that this protein comprises three domains: a seven-helix bundle, a three-sheet domain and a β -sandwich. The domain of long hydrophobic and amphipathic helices was proposed to be implicated in pore formation within the insect membrane, and thus in the lytic activity; while the region of the three β -sheet domain was proposed to participate in receptor binding and specificity determination. The β -sandwich region appears to be critical for the structural integrity of the toxin (Li *et al.*, 1991). The presence of protein domains, each exerting a specific function, such as cell recognition and membrane penetration as well as toxic enzymatic activity, has been well documented for other protein toxins like diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A (Olsnes *et al.*, 1988, Hwang *et al.*, 1987).

The analysis and the comparison of deduced amino acid sequences from the different δ -endotoxin genes revealed the presence of five sequence conserved motifs among the toxins of the Cry family (Höfte and Whiteley, 1989. Sanchis *et al.*, 1989). There is little doubt that these conserved motifs play an important role in the insecticidal function of the toxin, since the three-dimensional structure of CryIIIA toxin revealed that the core of the molecule is built from these five conserved motifs, implicating that toxins of widely different specificity could adopt similar folds. The specific role of each one of these conserved blocks remains to be determined, but some observations have been made.

Some mutant proteins, carrying replacements at specific amino acids on the first highly conserved block (D1) near the N-terminus of toxin have been described earlier (Ahmad and Ellar, 1990). The analysis of the mutants have shown that toxicity *in vivo* was reduced by about 70-80%, but these mutants still retain their ability to bind to the

crystallography, has revealed that this protein comprises three domains: a seven-helix bundle, a three-sheet domain and a β -sandwich. The domain of long hydrophobic and amphipathic helices was proposed to be implicated in pore formation within the insect membrane, and thus in the lytic activity; while the region of the three β -sheet domain was proposed to participate in receptor binding and specificity determination. The β -sandwich region appears to be critical for the structural integrity of the toxin (Li *et al.*, 1991). The presence of protein domains, each exerting a specific function, such as cell recognition and membrane penetration as well as toxic enzymatic activity, has been well documented for other protein toxins like diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A (Olsnes *et al.*, 1988, Hwang *et al.*, 1987).

The analysis and the comparison of deduced amino acid sequences from the different δ -endotoxin genes revealed the presence of five sequence conserved motifs among the toxins of the Cry family (Höfte and Whiteley, 1989. Sanchis *et al.*, 1989). There is little doubt that these conserved motifs play an important role in the insecticidal function of the toxin, since the three-dimensional structure of CryIIIA toxin revealed that the core of the molecule is built from these five conserved motifs, implicating that toxins of widely different specificity could adopt similar folds. The specific role of each one of these conserved blocks remains to be determined, but some observations have been made.

Some mutant proteins, carrying replacements at specific amino acids on the first highly conserved block (D1) near the N-terminus of toxin have been described earlier (Ahmad and Ellar, 1990). The analysis of the mutants have shown that toxicity *in vivo* was reduced by about 70-80%, but these mutants still retain their ability to bind to the

receptors on the plasma membrane of susceptible cells. Nothing is known about the role of the other four conserved blocks, specially block D2, which is the largest conserved region.

In this paper we present a computer-based analysis of hydrophathy and surface probability of representative members of each class of the Cry family proteins. We found a highly conserved hydrophobic motif present in all Cry toxins, on block D2, a feature not directly highlighted in the description of the three-dimensional structure. Some speculations may be made in relation to the function of this specific region.

Experimental Procedures

All sequences used here were retrieved from GenBank (Ver. 63). Sequence alignments were carried out using GENALIGN (Intelligenetics) and LFASTA algorithms (Lipman and Pearson, 1985) on a μ Vax computer. Structural parameters determination were done with the PREDICT7 program (Carmenes *et al.*, 1989), running on a PC compatible computer.

RESULTS AND DISCUSSION

Multiple amino acid sequence alignment.

A multiple sequence alignment of the toxic fragments from different insecticidal proteins is unambiguous in revealing short amino acid stretches of significant homology. It is very interesting to note that, within motif D2 (Sanchis *et al.*, 1989), there is a highly conserved hydrophobic stretch (see Table 1), with 60% overall sequence identity among all crystal proteins. All mismatches represent conservative amino acid changes. The aspartic residue present in the middle part of this region is present in all toxins.

Hydropathy and surface probability profiles of amino acid sequences.

Comparisons done with two different algorithms (Kyte and Doolittle, 1982. Hopp and Woods, 1981; these algorithms are included in the Predict7 program) to determine the hydrophilicity profiles of the different insecticidal toxic fragments, as well as the surface probability profile, showed that there is an apparent conservation of hydrophobic and hydrophilic regions among the Cry protein family. Using the hydrophobic values reported by Sharp *et al.*, (1991) yield similar results (data not shown). Figure 1 shows the hydropathy and surface probability profiles of a representative member of each of the CryI, CryIII and CryIV toxins; we found basically similar patterns in all members. There are three prominent hydrophobic peaks present in the N-region of all studied toxins (see figure 1b, 1c, and 1d). The third hydrophobic peak corresponds to the homologous hydrophobic region present within D2. The aspartic acid, which is highly hydrophilic, is located near the most

hydrophobic part within this particular region.

This hydrophobic motif, described in the Table 1, belongs to helix α_7 , which is part of the seven-helix bundle of the CryIIIA crystal structure, denominated domain I, which has been proposed to be directly involved in pore formation in the insect membrane. Furthermore, this helix is also in contact with β -sheet domain II, probably implicated in receptor binding. Helix α_7 is specially important in the proposed insecticidal function, since it forms part of the conserved interface with domain II; also it is well positioned to sense receptor binding, thus being a likely candidate to initiate membrane penetration needed to start pore formation (Li *et al.*, 1991).

Finally we have found an interesting similarity of this hydrophobic motif with another one present at the C-terminal end on fragment B from diphtheria toxin. It is a hydrophobic region of similar length and it also has an aspartic residue in the mid-region as the hydrophobic motif found within the D2 of Cry family proteins (Greenfield *et al.*, 1983)(see Table 1). Diphtheria toxin is composed of two fragments, A and B, where the fragment A is responsible of cellular damage, and the fragment B is implicated in the recognition and binding to the receptor of sensitive cells (Greenfield *et al.*, 1983. Kaczorek *et al.*, 1983). It is interesting to note that a mutation on fragment B of diphtheria toxin, where the aspartic residue has been changed to an asparagine, results in a nontoxic protein (Kaczorek *et al.*, 1983). The diphtheria toxin is a protein that binds to a cell surface receptor and then enters the cytosol, where it promotes its toxic effect (Olsnes, *et al.*, 1988). Although the mode of action of diphtheria toxin is not directly related to that of the delta-endotoxin, we think that some correlation could be speculated, due to

the fact that both toxins bind to a specific receptor and both interact with the plasma membrane.

We are currently working in the generation of specifically designed toxin molecules, by site-directed mutagenesis and *in vitro* recombination, in order to advance our understanding of the molecular mode of action of δ -endotoxins and the specific role that the hydrophobic motif may play in the toxicity.

REFERENCES

Adang, M.J., Staver, M.J., Rocheleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. and Thompson, D.V. (1985) Characterized full length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36: 289-300.

Ahmad, W. and Ellar, D.J.(1990) Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Lett* 68: 97-104.

Bossé, M., Masson, L. and Brousseau, R. (1990) Nucleotide sequence of a novel crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*. *Nucleic Acids Res* 18: 7443.

Brizzard, B.L. and Whiteley H.R. (1988) Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. *Nucleic Acids Res* 16: 4168-4169.

Carey, P.R., Fast, P., Kaplan, H. and Pozsgay, M. (1986) Molecular structure of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis*: a Raman spectroscopic study. *Biochem Biophys Acta* 872: 169-176.

Carmenes, R.S., Freije, J.P., Molina, M.M. and Martin J.M. (1989) Predict7, a program for protein structure prediction. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 687-693.

Chambers, J.A., Jelen, A., Gilbert, M.P., Dany, C.S., Johnson, T.B. and Gawron-Burke, C. (1991) Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J Bacteriol* **173**: 3966-3976.

Chestukhina, G.G., Kostina, L.J., Mikhailova, A.L., Tyurin, S.A., Klepikova, F.S. and Stepanov, V.M. (1982) The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch Microbiol* **132**: 59-162.

Chunjatupornchai, W., Höfte, H., Seurinck, J., Angsuthanasombat, Ch. and Vaeck, M. (1988) Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for diptera and lepidoptera. *Eur J Biochem* **173**: 9-16.

Convents, D., Houssier, C., Lasters, I. and Lauwereys, M. (1990) The *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Evidence for a two domain structure of the minimal toxic fragment. *J Biol Chem* **265**: 1369-1375.

Convents, D., Cherlet, M., Van Damme, J., Lasters, I. and Lauwereys, M. (1991) Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur J Biochem* **195**: 631-635.

Crawford, D.N. and Harvey, W.R. (1988) Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J Exp Biol* **137**: 277-286.

Dulmage, H.T. (1981) Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In "Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980". H.D.Burges, (ed). Academic Press, London, pp.193-222,

Goldberg, L.J. and Margalit, J. (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles serengetii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37: 355-358.

Greenfield, L., Bjorn, M.J., Horn, G., Fong, D., Buck, G.A., Collier, R.J. and Kaplan, D.A. (1983) Nucleotide sequence of the structural gene for diphtheria toxin carried by corynebacteriophage β . *Proc Natl Acad Sci USA* 50: 6853-6857.

Herrnstadt, C., Gilroy, T.E., Sobieski, D.A., Bennet, B.D. and Gaertner, F.H. (1987) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene* 57: 37-46.

Hofmann, C., Lüthy, P., Hütter, R. and Pliska, V. (1988a) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur J Biochem* 173: 85-91.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. (1988b) 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.

Höfte, H., De Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vandrebruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. and Vaeck, M. (1986) Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. *Eur J Biochem* 161:273-280.

Höfte, H., Soetaert, P., Jansens, S. and Peferoen, M. (1990) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new lepidopteran-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. *Nucleic Acid Res* 18: 5545

Höfte, H. and Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.

Honée, G., Vander Salm, T. and Visser, B. (1988) Nucleotide sequence of crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxic protein highly active against *Spodoptera* species. *Nucleic Acids Res* 16: 6240.

Hopp, T.P. and Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**: 3824-3828.

Hwang, J., Fitzgerald, D.J., Adhya, S. and Pastan, I. (1987) Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* **48**: 129-136.

Kaczorek, M., Delpeyroux, F., Chenciner, N., Streeck, R.E., Murphy, J.R., Boquet, P. and Tiollais, P. (1983) Nucleotide sequence and expression of the diphtheria *tox228* gene in *Escherichia coli*. *Science* **221**: 855-858.

Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A. and Schenetter, W. (1983) *Bacillus thuringiensis* var *tenebrionis*: ein neuer gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. *Z. Angew Entomol* **96**: 500-508.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.

Lambert, B., Theunis, W., Aguda, R., Van Audenhoven, K., Decock, C., Jansens, S., Seurinck, J. and Peferoen, M. (1992) Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BTI109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Gene* **110**: 131-132.

Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 A resolution. *Nature* **353**: 815-821.

Lipman, D.J. and Pearson, W.R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**: 1435-1441.

Olsnes, S., Moskaug, J.O., Stenmark, H. and Sandvig, K. (1988) Diphtheria toxin entry: Protein translocation in the reverse direction. *Trend Biochem Sci* **13**: 348-351.

Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Luthy, P. and Wolfersberger, M.G. (1986) *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett* **204**: 213-218.

Sanchis, V., Lerecleus, D., Menou, G., Chafaux, J., Guo, S. and Lecadet, M.M. (1989) Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol Microbiol* **3**: 229-238.

Schnepf, H.E., Wong, H.C. and Whiteley H.C. (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J Biol Chem* **260**: 6264-6272.

Sharp, K.A., Nicholls, A., Friedman, R. and Honig, B. (1991) Extracting hydrophobic free energies from experimental data: relationships to protein folding and theoretical models. *Biochem* 30: 9686-9697.

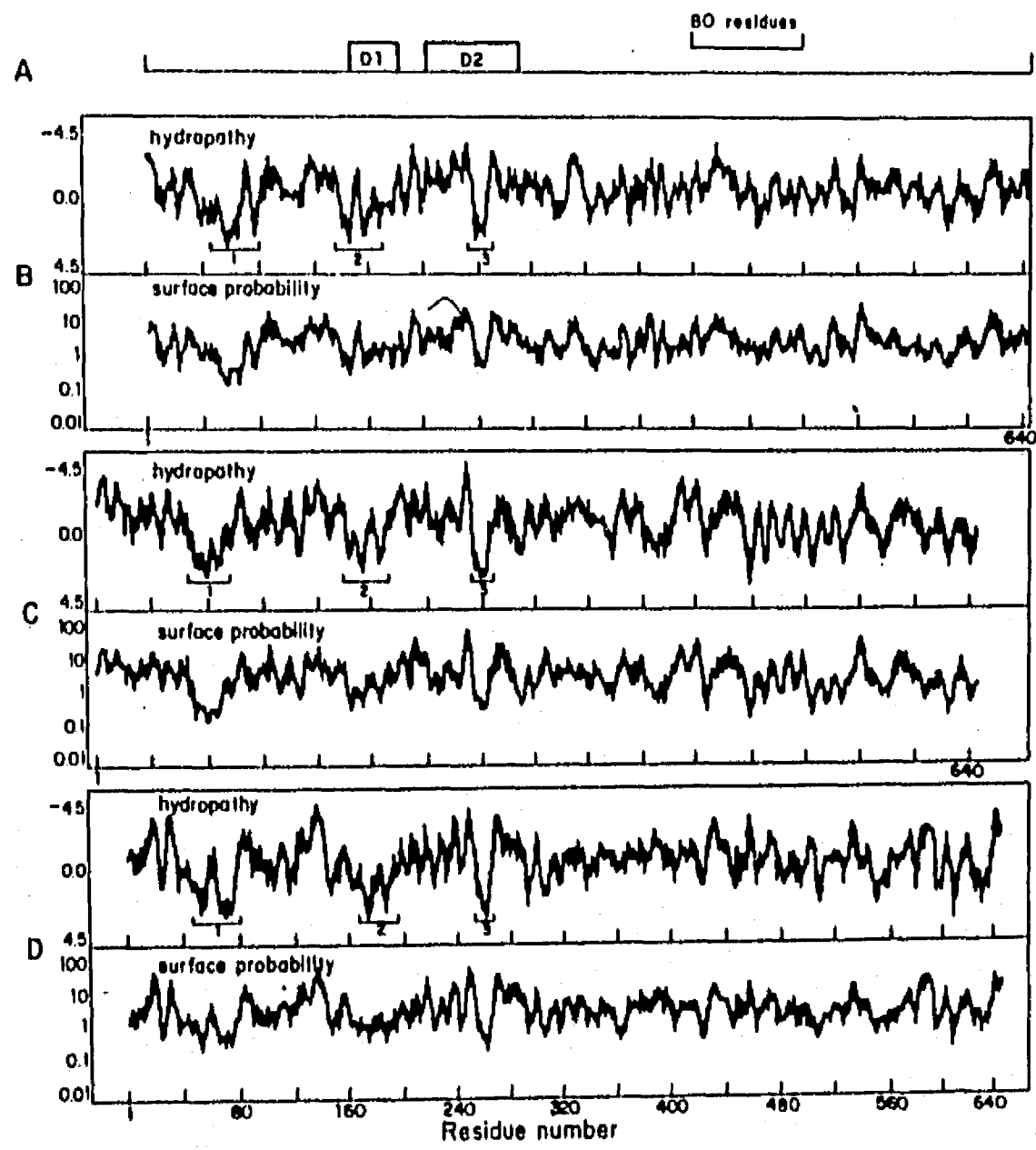
Sick, A., Gaertner, F. and Wong, A. (1990) Nucleotide sequence of a coleopteran active toxin gene from a new isolated of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acid Res* 18: 1305.

Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A.M. and Pollock, T. (1986) Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *J Bacteriol* 166:801-811.

Visser, B., Munsterman, E., Stoker, A. and Dirkes, W.G. (1990) A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J Bacteriol* 172: 6783-6788.

Wabiko, H., Raymond, K.C. and Bulla, L.A. Jr. (1986) *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA* 5: 305-314.

Ward, S. and Ellar, D.J. (1987) Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding a 130 kDa delta-endotoxin. *Nucleic Acid Res* 15: 7195.



Strain	Crystal Protein	Sequence of a common hydrophobic motif	Reference
HD-1	IA(a)	239TVLDIVALF	Schnepf and Whiteley, 1983.
<i>berliner</i> 1715	IA(b)	239TVLDIVSLF	Wabiko et al., 1986.
HD-73	IA(c)	239TVLDIVALF	Adang et al., 1985.
HD-2	IB	258GVLDLVALF	Brizard and Whiteley 1988.
<i>entomocidus</i> 60.5	IC	238TVLDIAAFF	Honée et al., 1988.
<i>kenyae</i>	IC(b)	238SVLDIISFF	Bossé et al., 1990.
HD-68	ID	238SVLDIVAFF	Höfte et al., 1990.
<i>kenyae</i> 4F1	IE	238SVLDIISFF	Visser et al., 1990.
<i>aizawai</i> EG6346	IF	237TVLDIVALF	Chambers et al., 1991.
<i>san diego</i>	IIIA	283TVLDLIALF	Herrnstadt et al., 1987.
<i>tolworthi</i>	IIIB	284TVLDLIVLF	Sick et al., 1990.
<i>kurstaki</i> BT1109P	IIID	273TVLDLITLF	Lambert et al., 1992
<i>israelensis</i>	IVA	302AVLDVVVALF	Ward and Ellar, 1987.
<i>israelensis</i>	IVB	256QVLDILALF	Chunjatupornchai et al., 1988.
<i>israelensis</i>	IVC	288TVLDLIAIF	Thorne et al., 1986.
Diphtheria toxin	fragment B	311ISSDSIGVL	Greenfield et al., 1983.

The sequences presented here are the first sequences reported for each one subclasses

Acknowledgements.

We thank Roberto Meza and Enrique Merino for critically reviewing of the manuscript. This work was supported in part by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

B. Pereyra-Alferez was a recipient of a CONACyT fellowship.

Legends to figures

Figure 1. Hydropathy and surface probability profiles of the N-terminus of a representative member of Cry I, Cry III, and Cry IV toxins. Panel **A**: localization of the highly conserved blocks D1 and D2 within the δ -endotoxin amino acid sequence. Panels **B**, **C**, and **D** show the hydropathy and surface probability profiles of Cry IA(b), Cry IIIA, and Cry IVB toxins, respectively. Brackets 1, 2, and 3 indicate the prominent hydrophobic peaks present in the N-region of all studied toxins.

Table 1. Comparison of the amino acid sequences of a hydrophobic motif present in the Cry protein family.

DISCUSION

El control biológico de insectos de importancia agrícola y salud pública ha tomado mucho auge en las últimas décadas, ya que éste controla las poblaciones de algunos tipos de insectos de manera muy específica sin alterar los ecosistemas.

Dentro de los organismos utilizados para control biológico se encuentra *B. thuringiensis*, el cual sintetiza un cuerpo parasporal de origen protéico, la δ -endotoxina. Esta proteína desarrolla su actividad tóxica de manera muy específica contra un limitado número de insectos.

La clonación de los genes que codifican para diferentes δ -endotoxinas ha dado cierto grado de conocimiento a cerca de niveles de homología, motivos estructurales conservados, especificidad y modo de acción. Sin embargo, aún existen preguntas fundamentales por resolver, por ejemplo porqué algunas toxinas con alto porcentaje de homología (> 80%) desarrollan diferente grado de toxicidad contra el mismo insecto?, a qué se debe la alta potencia insecticida de estas toxinas?

Para contestar estas preguntas, existen varias posibilidades que son:

a).- Que la toxina de mayor potencia posea una mayor afinidad por el receptor; b).- que exista un mayor número de receptores para esta toxina y c).- que tenga incrementada la capacidad de formación del poro en la membrana epitelial del intestino medio del insecto blanco.

Las posibilidades a y b han sido las mas investigadas en diferentes insectos. Los primeros estudios a cerca de la presencia de un receptor en el intestino medio del insecto blanco, fueron realizados con vesículas de las microvellosidades del intestino medio de larvas de *M. sexta*, *H. virescens* y *T. ni*, principalmente. Los resultados obtenidos muestran que, para que una toxina desarrolle su actividad tóxica, es necesaria la presencia de un receptor específico (Van Rie, *et al.* 1990(a)). No obstante, la sola presencia del receptor no garantiza la alta toxicidad, ya que, por ejemplo se han reportado estudios de comparaciones de toxinas con potencias biocidas muy diferentes, encontrándose que la constante de afinidad fue muy similar (Ferré, *et al.* 1991). Por el contrario, Wolfersberger (1990) reportó que para las toxinas CryIA(b) y CryIA(c) existe una correlación inversa entre la afinidad y toxicidad, cuando fueron probadas contra "la palomilla gitana". Resultados a cerca de la cuantificación de la concentración del receptor han mostrado, en primera instancia, que el daño celular producido por toxinas de mayor potencia, se debe a que existe un mayor número de receptores para ésta.

Por lo que respecta a estudios con *S. frugiperda*, existe gran contradicción en los resultados de afinidad y toxicidad, ya que Van Rie y col (1990(a)) reportaron que toxinas que no matan a *S. frugiperda* (CryIA(b)) no se unieron a vesículas de las micovellosidades del intestino medio, pero Garczynski y col. (1991) encontraron que CryIA(c) se unió, de manera saturable a las vesículas de *S. frugiperda*, no obstante que la toxina no mata a este insecto.

Los resultados disponibles en la literatura muestran ser contradictorios y, a veces, confusos. Sin embargo se podría concluir que, para que una proteína despliegue su actividad tóxica, es necesaria la presencia de un receptor, pero también se requieren otros factores, como lo es la capacidad de formación del poro.

La posibilidad c, relacionada con la eficiencia de la formación del poro, ha recibido mucha atención en el último año, sobre todo a raíz del conocimiento de que algunas toxinas se unen pero no matan al insecto. Esto implica que la capacidad para realizar el daño celular se localiza en un dominio diferente al de la unión al receptor y que su actividad no depende estrictamente de éste. Esto fue demostrado por Wu y Aronson (1992) quienes, por medio de mutagénesis sitio-dirigida en el gen *cryIA(c)*, encontraron que algunas proteínas mutantes conservan su capacidad de unión y competencia por el receptor pero la toxicidad se modificó de manera importante (aprox. 20 veces menor), usando a *H. virescens* como insecto de ensayo.

No obstante que las especies del género *Spodoptera* representan un serio problema en la agricultura a nivel mundial, casi no existen trabajos realizados con este insecto. En este sentido, en la Fac. de Ciencias Biológicas/UANL, dentro de un programa permanente de recuperación de cepas de Bt de diferentes fuentes, se lograron aislar dos cepas, denominadas GM-7 y GM-10, las cuales controlan de manera efectiva a algunas especies del género *Spodoptera*.

Este hallazgo nos motivó a iniciar el estudio del gen que codifica para la δ -endotoxina de estas dos cepas. Por lo que nos formulamos las siguientes preguntas: ¿por qué las cepas GM-7 y GM-10 desarrollan tan alta actividad insecticida contra *S. frugiperda*?, ¿la alta toxicidad se debe a que estas cepas sintetizan una δ -endotoxina diferente a las reportadas? y de ser así, ¿dónde radican las diferencias?

Cuando iniciamos este proyecto, solo se sabía que ambas cepas pertenecen a la subespecie *aizawai*, pero no sabíamos el número ni el tipo de proteínas que conforman el cristal, mucho menos el tipo de gen que las

codifica. Por tal motivo, nos avocamos purificar el cristal de las cepas GM-7 y GM-10, para saber de cuantas proteínas esta formado. Como se muestra en la Figura 6A, el cristal de las dos cepas se resolvió en dos bandas de alrededor de 130-140 KDa. Sin embargo, al realizar el ensayo tipo Western, solo la banda inferior dió señal positiva cuando se trató con un anticuerpo policlonal obtenido contra el fragmento tóxico de CryIA(b) (poliCryIAb)(Fig. 6B). Un resultado similar se obtuvo con una preparación de cristales de GM-10 y protoxina de CryIA(b) digeridas con tripsina. Las toxinas de GM-10 se resolvieron en dos bandas, y al realizar el ensayo tipo Western, solo la banda inferior dió señal positiva (Fig. 7). Por lo que asumimos qué, si el anticuerpo es policlonal y debido a que la homología entre la clase CryI es de mas del 50%, el anticuerpo poliCryIAb debería reconocer a la mayoría de las proteínas tipo CryI, concluyéndose que en el cristal de las cepas GM-7 y GM-10 solo existía una proteína tipo CryI. Además, los resultados de la hibridación del ADN total sin digerir (Jairo Cerón, tesis de maestría IBT/UNAM) y digerido con diferentes enzimas, usando el gen completo de Bt subsp. *berliner*1715 (*cryIA(b)*) como probador, hacía suponer que se trataba de un solo gen, ya que en el experimento del ADN sin digerir (dato no mostrado) y en el digerido, la señal positiva importante se observó en una sola banda (Fig. 8). Estas evidencias nos indicaban que se podría tratar de un solo gen tipo *cryI*, lo cual fue corroborado por la digestión del ADN total, de ambas cepas, con *Hind*III y *Dra*I. En la digestión con *Hind*III, solo se observó señal positiva a la altura de 5.4 Kpb, patrón típico de los genes tipo *cryIA(b)* (Kronstad and Whiteley, 1986) (Fig. 9). Para la digestión con *Dra*I, usando los probadores NH₂, correspondiente a la región 5'(-82 a -58), Rb-9 correspondiente a una región muy conservada en la posición 319-336 de los genes *cryIA* (Prefontaine, *et al.* 1987) y COOH, oligo complementario al extremo 3', incluyendo los últimos 5 codones de la toxina y al codón de término (Tablas 7 y 8). Si las cepas poseyeran mas de un tipo de gen, al menos para el oligo COOH esperaríamos observar mas de una banda de diferente tamaño (Fig. 10), ya que la secuencia del oligo COOH se encuentra altamente conservada entre los genes *cryI* que son tóxicos a *Spodoptera* sp., los cuales, con excepción de *cryIF*, ninguno posee el sitio para *Dra*I ni a mitad del gen estructural ni después del codón de terminación (Dato no mostrado). Cuando se inició este trabajo (Sep. 1989), solo se encontraban disponibles las secuencias de *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIB* y *cryIC* (Höfte and Whiteley, 1989). Posteriormente, se publicaron la secuencia nucleotídica de los genes *cryID* (Sep. 1990), *cryIE* (Dic. 1990), *cryIF* (Julio.

1991) y *cryIG* (Feb. 1992), de los cuales solo *cryIC*, ID, IE y IF son tóxicos contra especies de *Spodoptera* (Höfte, *et al.* 1990; Visser, *et al.* 1990; Chambers, *et al.* 1991). No obstante, el oligo COOH muestra alta homología con estos últimos genes (Tabla 8).

Con el propósito de asegurar la clonación de todos los genes de δ -endotoxina presentes en las cepas GM-7 y GM-10, decidimos realizar la amplificación del gen por medio de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), usando como primeros los oligonucleotidos NH2 y COOH (Fig. 11). Sin embargo, este producto de PCR no lo pudimos clonar, pero su patrón de restricción para las enzimas *HindIII* y *BclI* correspondió a *cryIA(b)* (Fig. 12). Las dificultades para clonar el gen de la δ -endotoxina en *E. coli* son grandes. Por ejemplo Oeda y col. (1987) al intentar clonar el gen de Bt subsp. *aizawai*PL7 y después de enriquecer el fragmento que contenía el gen, de 7000 colonias transformantes solo obtuvieron dos positivas. Cuando se clonó el gen *cryIA(a)*, solo se obtuvo una clona positiva (Schnepf and Whiteley. 1981). Resultados similares se han encontrado para otros genes *cry*, como lo reportado por McLinden y col (1985) para *cryIA(c)* donde, de 23 000 transformantes, solo 6 llevaban el gen deseado. En los trabajos anteriores, el gen de la protoxina se clonó en plásmidos, pero cuando éste se intentó clonar en el fago Charon 4A, de 20 000 placas líticas, solo una dió señal positiva en el radioinmunoensayo (Held, *et al.*, 1982).

No es muy claro el motivo por el cual el gen de la δ -endotoxina es difícil de clonar en *E. coli*, pero una vez que ha sido clonado, posteriores manipulaciones (subclonaciones ó retransformaciones) se pueden realizar sin problema alguno. Una de las posibilidades por la cual sea difícil el establecimiento del gen de la protoxina en *E. coli*, podría deberse a la presencia de secuencias invertidas repetidas y secuencias directas que se encuentran en la región 5' del gen estructural y dentro de éste (Oeda, *et al.* 1987) y que debido a éstas el gen adquiera una estructuración secundaria ó topología especial, la cual impida que el sistema de replicación de ADN de *E. coli* lo reconozca ó que por alguna razón, la protoxina resulte ser perjudicial para *E. coli*, tal como se ha visto para otro tipo de genes, por ejemplo *ompA*, mismos que han tenido que ser clonados por partes (J. L. Puente, comunicación personal). Por tal motivo, creímos que podríamos tener mayor éxito si intentásemos clonar el gen de la protoxina en partes. Cosa que logramos al realizar la clonación del fragmento *HindIII-HindIII* (Fig. 13) y, posteriormente, la del fragmento tóxico (Fig. 14).

Los datos de homología de los oligonucleotidos escogidos como primeros

para la amplificación del fragmento tóxico, inicialmente BP-1 y BP-3 y luego BP-7 y BP-3, nos hacen pensar que los productos de PCR deben estar formados por una familia de productos diferentes, aunque el correspondiente para *cryIA(b)* debe estar incrementado porque los oligos fueron diseñados son 100% homólogos a este gen. Sin embargo, debido a que las primeras evidencias señalaban que las cepas GM-7 y GM-10 poseían un solo gen, tipo *cryIA*, la selección de las clonas recombinantes fue realizada usando el oligo Rb-9 como probador (específico para *cryIA*). Debido a que el oligo Rb-9 presenta un 77% de homología con una región del gen *cryIC* (de la base 213 a la 227) (Honeé, *et al.* 1988), se debía esperar que alguna de las clonas fuese tipo *cryIC*, pero no fue así, aún y cuando las condiciones de hibridación y lavados se realizaron a baja astringencia.

Cuando usamos los oligos BP-7 y BP-3 como primeros, fuimos capaces de obtener dos diferentes clonas recombinantes a partir de GM-10 (clona 10A y clona 10B) donde el gen de la clona 10A, por patrón de restricción y datos de Southern y Western, fue identificado como *cryIA(b)*, pero el gen de la clona 10B no ha sido aún identificado, ya que su patrón de restricción es muy diferente al de la 10A, no dió señal positiva con los probadores usados en el Southern ni reacción cruzada con el anticuerpo anti *CryIA*. Por lo que ahora se inició la determinación de su secuencia nucleotídica para conocer que tipo de gen es (artículo 1).

Cuando el trabajo de secuenciación de la fracción tóxica del gen *cryIA(b)* de GM-7 se había concluido (ver manuscrito del artículo 2 y Fig. 18), en el mes de junio de este año se tuvo acceso a proteínas puras de *CryIA(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*, *CryIB*, *CryIC*, *CryID* y *CryIE* y a anticuerpos mono y policlonales específicos para estas toxinas a través de un proyecto de colaboración con la compañía Belga "Plant Genetic Systems". Con estas nuevas herramientas, realizamos pruebas de especificidad del poliCryIAb en ensayos de inmunodetección en gota, demostrando que el anticuerpo es capaz de reconocer a todas las proteínas probadas, con excepción de *CryIB* y *CryIC* (ver primer artículo). Por otra parte, al usar los nuevos anticuerpos en experimentos tipo Western con los cristales de GM-7 y GM-10, encontramos que ambas cepas dieron reacción cruzada con los anticuerpos anti *CryIB*, *CryIC* y *CryID* (Fig. 19).

Los resultados del Western fueron corroborados en bioensayos realizados recientemente. En éstos se probó la toxicidad de los cristales de la cepa GM-10 y HD-137 (HD-137 posee los genes para *CryIA(a)*, *CryIB*, *CryIC* y *CryID*) contra larvas neonatas de *S. frugiperda*. Los resultados señalan que no existe diferencia en la toxicidad de ambas cepas, razón por la cual

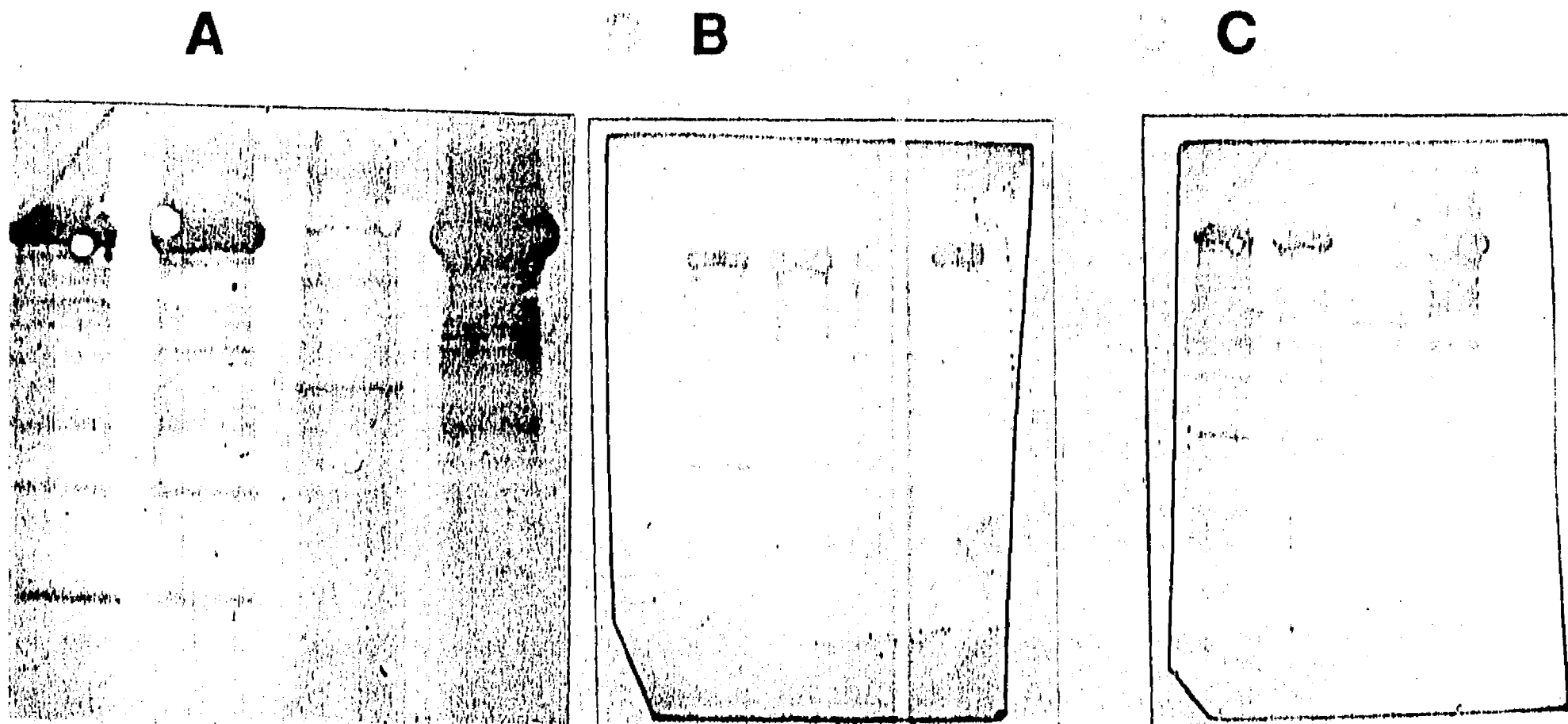


FIGURA 19.- Western de los cristales de las cepas GM-7 y GM-10 usando diferentes anticuerpos monoclonales. A, anti CryB. B, anti CryC. C, anti CryD. El orden de los carriles para las tres figuras es el mismo. Carril 1, cristales de GM-7; carril 2, cristales de GM-10; carril 3, cristales de HD-1; carril 4, cristales de HD-137.

concluimos que la gran potencia de las cepas en estudio, se debe a la presencia de, al menos, 4 toxinas diferentes, dos de las cuales, CryIC y CryID se ha reportado que son altamente tóxicas contra *S. frugiperda* (Honeé, *et al.* 1988; Höfte, *et al.* 1990).

No obstante este resultado, creemos que nuestro sistema de PCR con los oligos BP-7 y BP-3 es capaz de amplificar la mayoría de los genes de la clase *cryI*, además la clonación del producto de PCR se puede realizar de una manera dirigida en los plásmidos tipo pUC13, ya que los sitios para las enzimas *PstI* y *BclI* se encuentran ausentes en el gen estructural ó fuera del fragmento tóxico. Así mismo, para trabajos futuros la selección de las clonas recombinantes se deberá realizar con probadores específicos, en base al Western, para cada una de las proteínas encontradas en el cristal.

La secuencia de ADN del fragmento tóxico del gen *cryIA(b)* de GM-7 reveló un solo cambio, el cual se localiza en el codón 287 (ACA-T por ATA-I) (ver manuscrito Art. 2). Dicho cambio fue corroborado por la secuencia en la hebra complementaria. El mismo cambio fue observado en la otra clona de GM-7 y en GM-10, por lo que se asume que dicho cambio no fue producto de

una incorporación errónea de nucleótidos al momento de realizar la amplificación génica. El cambio de aminoácido, con respecto a otras CryIA(b), mapea en el "loop" entre la α_8 y β_2 (β -plegada 3) y aunque el cambio se localiza en el dominio de reconocimiento por el receptor, éste no influyó en la toxicidad, porque al comparar la actividad tóxica de esta clona con la protoxina de CryIA(b) no se presentaron diferencias (dato no mostrado). Aunque existen reportes donde un solo cambio de aminoácido puede modificar dramáticamente la función de una proteína (Glaser, *et al.* 1991; Newton, *et al.* 1992; Brzovic, *et al.* 1992), los cambios de especificidad en las toxinas de Bt se han localizado en las láminas β -plegadas 1 y 2 (Li, *et al.* 1991).

Un segundo enfoque que se siguió durante el desarrollo de la presente tesis, fue el de analizar los patrones estructurales de la familia de proteínas Cry, mismo que reveló la presencia de una región altamente conservada a nivel de estructura primaria, la cual también se encontró conservada a nivel estructural. En el artículo "The delta-endotoxin protein family displays a hydrophobic motif which might be implicated in toxicity", nosotros reportamos que en la familia de las δ -endotoxinas se localiza un motivo hidrofóbico altamente conservado, con un residuo de ácido aspartico en la parte central del motivo. Esto nos llamó poderosamente la atención y al revisar la literatura, respecto a la presencia de regiones similares en otras proteínas, encontramos que para la toxina de la difteria (TD), un residuo de ac. aspártico localizado en un motivo hidrofóbico, juega un papel muy importante en la actividad biológica de la toxina, ya que en una proteína mutante, donde el residuo de aspártico fue cambiado por asparagina, la actividad tóxica se redujo sensiblemente (aprox. 70%).

Los datos disponibles, antes de la publicación de la estructura tridimensional de TD (Nature, mayo de 1992), solo señalaban la presencia de dos dominios en TD, el dominio A, responsable del daño celular, y el dominio B, responsable de la unión al receptor. De acuerdo a los datos preliminares y al análisis de patrones estructurales de hidrofobicidad y predicción de estructura secundaria, el ac. aspártico (posición 307 de la proteína madura) se localiza al final de una estructura tipo β en el dominio B. Los datos de la estructura tridimensional de TD, revelaron que esta proteína se encuentra organizada en tres dominios, el dominio I, formado por 8 estructuras tipo β y 7 α hélices, es responsable de la actividad catalítica; el dominio II, formado por 9 α hélices, se trata de un dominio

transmembranal y el dominio III, compuesto por 10 estructuras tipo β , es responsable de la unión al receptor (Choe *et al.* 1992). Usando estos datos, encontramos que el aspártico 307, se localiza en el "loop" entre la β_8 y β_9 del dominio III. Así mismo, en 1991, Glasser y col. reportaron que en la toxina de *Bordetella pertussis* (una adenilato ciclasa activada por calmodulina) la afinidad por el sustrato se redujo casi 10 000 veces cuando el aspártico 188 fue sustituido por asparagina. Es importante señalar que el residuo 188 se encuentra en un motivo hidrofóbico conservado entre otras toxinas tipo adenilato ciclasa (Glaser, *et al.* 1991).

Debido a la relevancia biológica que podría tener el ácido aspártico en el motivo hidrofóbico de las δ -endotoxinas, creemos que sería interesante realizar varios tipos de cambios en este residuo, por ejemplo glutámico por aspártico con este cambio, la carga neta no se modificaría; asparagina por aspártico y otro tipo de sustituciones que puedan inducir cambios importantes en la estructuración de la proteína, nos daría mayor conocimiento del papel que juega este motivo hidrofóbico en la actividad global de la toxina.

El grado de conocimiento teórico y práctico que se ha generado en los últimos dos años en este grupo de trabajo y en el resto de los laboratorios donde se trabaja con Bt, ha aumentado de manera significativa. Las metodologías de PCR y transformación de Bt desarrolladas en nuestro laboratorio, así como el uso de anticuerpos mono y policlonales, permitirá hacer mas rápida la clonación y caracterización de nuevos genes de δ -endotoxinas, sobre todo por la necesidad de encontrar cepas de Bt que produzcan toxinas con nuevas y mejores actividades tóxicas, por ejemplo δ -endotoxinas que desarrollen actividad tóxica contra nemátodos y protozoarios de interés agrícola y salud pública.

Creemos que con la publicación de la estructura tridimensional de la δ -endotoxina CryIIIa se abre una puerta muy grande en el campo de *Bacillus thuringiensis*. La posibilidad de diseñar nuevas toxinas se amplía de manera sustancial, sobre todo porque ahora se podrían diseñar toxinas quiméricas, fusionando la región de reconocimiento del receptor de una toxina con alta afinidad a otra que tenga incrementada la formación del poro y viceversa. Así como poder diseñar cambios discretos en regiones que pudiesen incrementar la potencia ó un rango de acción incrementado.

LITERATURA CITADA

Adams, L. F., K. L. Brown and H. R. Whiteley. 1991. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* **173**:3846-3854.

Adang, M. J., M. J. Staver, T. A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Baker and D. V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene.* **36**:289-300.

Ahmad, W. and D. J. Ellar. 1990. Directed mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol Letts.* **68**:97-104.

Angsuthanasombat, C., N. Crickmore and D. J. Ellar. 1991. Cytotoxicity of a cloned *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVB toxin to an *Aedes aegypti* cell line. *FEMS Microbiol. Letts.* **83**:273-276.

Angus, T. A.. 1962. Biochemistry and mode of action of *Bacillus thuringiensis* berliner and its varieties. *Coll. Int. Pathol. Insects. Paris.* 165-173.

Aronson, J. N. and H. C. Arvidson. 1987. Toxic trypsin digest fragment from the *Bacillus thuringiensis* parasporal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:416-421.

Aronson, A. I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**:1-24.

Aronson, A. I., E. S. Han, W. McGaughey and D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:981-986.

Arvidson, H., P. E. Dunn, S. Strnad and A. I. Aronson. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved *in vivo* and in the structure of a purified protoxin. *Mol. Microbiol.* **3**:1533-1543.

Bakhiet, N. and D. P. Stahly. 1985. Studies of transfection and transformation of protoplasts of *Bacillus larvae*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus popilliae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 577-581.

Balaraman, K. and S. L. Hoti. 1988. Comparative costs of mosquito control with larvicidal bacilli and insecticides. *The Environmentalist.* **8**:123-126.

Barton, K. A., H. R. Whiteley and N. Yang. 1987. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant. Physiol.* **85**:1103-1109.

Battisti, L., B. D. Green and C. B. Thorne. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **162**:543-550.

Baumann, L., A. H. Broadwell and P. Baumann. 1988. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* **170**:2045-2050.

Baumann, P. M. A. Clark, L. Baumann and A. H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins, *Microbiol. Rev.* **55**:425-436.

Benson, S. A.. 1984. A rapid procedure for isolation of DNA fragments from agarose gels. *BioTechniques.* **March/April**:66-67.

Bietlot, H., P. R. Carey, C. Choma, H. Kaplan, T. Lessard and M. Pozsgay. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem J.* **260**:87-91.

Bietlot, H. P. L., I. Vishnubhatla, P. R. Carey, M. Pozsgay and H. Kaplan. 1990. Characterization of the cystein residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309-315.

Bourgouin, C., A. Delécluse, J. Ribier, A. Klier and G. Rapoport. 1988. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-Kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. *J. Bacteriol.* **170**:3575-3583.

Brizzard, B. L. and H. R. Whiteley. 1988. Nucleotide sequence of an additional crystal gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. Nucl. Acids Res. 16:2723-2724.

Broadwell, A. H. and P. Baumann. 1987. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. Appl. Environ. Microbiol. 53:1333-1337.

Broadwell, A. H., M. A. Clark, L. Baumann and P. Baumann. 1990. Construction by site-directed mutagenesis of a 39-kilodalton mosquitocidal protein similar to the larva-processed toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. J. Bacteriol. 172:4032-4036.

Brown, K. L. and H. R. Whiteley. 1988. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4166-4170.

Brown, K. L. and H. R. Whiteley. 1990. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. J. Bacteriol. 172:6682-6688.

Brzovic, P. S., A. M. Kayastha, E. W. Miles and M. F. Dunn. 1992. Substitution of glutamic acid 109 by aspartic acid alters the substrate specificity and catalytic activity of the β -subunit in the tryptophan synthase henzyme complex from *Salmonella typhimurium*. Biochemistry. 31:1180-1190.

Bulla, L. A. Jr., R. N. Costillow and E. S. Sharp. 1978. Biology of *Bacillus popilliae*. Adv. Appl. Microbiol. 22:1-18.

Calabrese, D. M., K. W. Nickerson and L. C. Lane. 1980. A comparison of protein crystal subunit sizes in *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 26:1006-1010.

Caramori, T., A.M. Albertini and A. Galizzi. 1991. In vivo generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. Gene. 96: 37-44.

Carey, P. R., P. Fast, H. Kaplan and M. Pozsgay. 1986. Molecular structure of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis*: a Raman spectroscopic

study. *Biochem. Biophys. Acta.* **872**:169-176.

Chambers, J. A., A. Jelen, M. Gilbert, C. S. Jany, 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**:3966-3976.

Chestukhina, G. G., L. I. Kostina, A. L. Makhailova, S. A. Tyurin, F. S. Klepikova and V. M. Stepanov. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin molecular structure. *Arch. Microbiol.* **132**:159-162.

Chestukhina, G. G., S. A. Tyurin, L. I. Kostina, A. L. Osterman, I. A. Zalunin, O. A. Kodova and V. M. Stepanov. 1990. Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins' N-terminal domains. *J. Protein. Chem.* **9**:501-507.

Chilcott, C. N. and D. J. Ellar. 1988. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:2551-2558.

Choe, S., M. J. Bennett, G. Fujii, P. M. G. Curmi, K. A. Kantardjieff, R. J. Collier and D. Eisenberg. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature.* **357**:216-222.

Choma, C. T. and H. Kaplan. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: Evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. *Biochemistry.* **29**:10971-10977.

Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay and H. Kaplan. 1990. Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *J. Protein. Chem.* **9**:87-94.

Choma, C. T., W. K. Surewicz, P. R. Carey, M. Pozsgay, T. Raynor and H. Kaplan. 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. *Eur. J. Biochem.* **189**:523-527.

Choma, C. T., W. Surewicz and H. Kaplan. 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon

activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179**:933-938.

Chunjatupornchai, W., H. Höfte, J. Seurinck, C. Angsuthanasombat and M. Vaeck. 1988. Common features of btur toxins specific for diptera and lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* **173**:9-16.

Clark, M. A. and P. Baumann. 1990. Deletion analysis of the 51-kilodalton protein of the *Bacillus sphaericus* 2362 binary mosquitocidal toxin: construction of derivatives equivalent to the larva-processed toxin. *J. Bacteriol.* **172**:6759-6763.

Convents, D., M. Cherlet, J. Van Damme, I. Lasters and M. Lauwereys. 1991. Two structural domains as a general fold of the toxic fragment of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Eur. J. Biochem.* **195**:631-635.

Convents, D., C. Houssier, I. Lasters and M. Lauwereys. 1990. The *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Evidence for a two domain structure of the minimal toxic fragment. *J. Biol. Chem.* **265**:1369-1375.

Crawford, D. N. and W. R. Harvey. 1988. Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* **137**:277-286.

Crickmore, N., C. Nicholls, D. J. Earp, T. C. Hodgman and D. J. Ellar. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal δ -endotoxin combinations. *Biochem. J.* **270**:133-136.

Crook, N. E. and P. Jarrett. 1991. Viral and bacterial pathogens of insects. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* **70**: 915-965.

Cunningham, J. C.. 1988. Baculoviruses: their status compared to *Bacillus thuringiensis* as microbial insecticides. *Outlook on Agriculture.* **17**:10-17.

Dalhammar, G. and H. Steiner. 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* **139**:247-252.

Dankocsik, C., W. P. Donovan and C. S. Jany. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol. Microbiol.* 4:2087-2094.

Dart, P. J. 1990. Agricultural microbiology: Introduction. En "Agricultural Biotechnology. Opportunities for International Development". Editado por G. J. Persley. C-A-B Internacional. USA. pag. 53-70.

Dastidar, P. G. and K. W. Nickerson. 1979. Interchain crosslinks in the entomocidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *FEBS Letts.* 108:411-414.

Debabov, V. G., R. R. Azizbekyan, V. M. Stepanov and G. G. Chestukhina. 1984. Genetic and biochemical study of *Bacillus thuringiensis*. En "Genetics and Biotechnology of *Bacilli*". Editado por A. T. Ganesan and J. A. Hoch. Academic Press. New York. USA. pag. 345-356.

De Barjac, H., C. J. F. Burgouin, I. Larget-Thiery. 1984. Aspects actuels de la lutte microbiologique dans le domaine de la santé. Present state of microbial agents in the control of vectors of tropical diseases. *BioScience.* 111:11-13.

De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* 35:233-240.

Delannay, X., B. J. La Valle, R. K. Proksch, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J.T. Greenplate, P. G. Marrone, R. B. Dodson, J. J. Augustine, J. G. Layton and D. A. Fischhoff. 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology.* 7:1265-1269.

Delécluse, A., C. Bourguin, A. Klier and G. Rapoport. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of btur *israelensis* toxins encoded by two different genes. *Mol. Gen. Genet.* 214:42-47

Delécluse, A., J. F. Charles, A. Klier and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-Kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for

mosquitocidal activity. J. Bacteriol. **173**:3374-3381.

Domnas, A. J. and S. A. Warner. 1991. Biochemical activities of entomophagous fungi. CRC in Microbiology. **18**:1-13.

Donovan, W. P., C. C. Dankocsik, M. P. Gilbert, M. C. Gawron-Burke, R.G. Groat and B. C. Carlton. 1988 (a). Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. An insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. **263**:561-567.

Donovan, W. P., C. C. Dankocsik and M. P. Gilbert. 1988 (b). Molecular characterization of a gene encoding a 72-Kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. **170**:4732-4738.

Donovan, W. P., J. M. Gonzalez, M. P. Gilbert and C. Dankocsik. 1988 (c). Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet. **214**:365-372.

Dulmage, H. T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* - perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. **84**:113-122.

Ebersold, H. R., P. Lüthy, P. Geiser and L. Ettliger. 1978. The action of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. Experientia. **34**:1672.

Ebersold, H. R., P. Lüthy and H. E. Huber. 1980. Membrane damaging effect of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Experientia. **36**:495-496.

Edlund, T., I. Sidén and H. G. Boman. 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. Infect. Immun. **14**: 934-941.

Ellar, D. J., W. E. Thomas, B. H. Knowles, S. Ward, J. Todd, F. Drobniowski, J. Lewis, T. Sawyer, D. Last and C. Nichols. 1985. Biochemistry, genetics, and mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. En "Molecular biology of cell differentiation". Editado por J. A. Hoch and P. Setlow.

American Society for Microbiology. Washington, D. C.. pag 230-239.

Emory, S. A. P. Bouvet and J. G. Belasco. 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & Develop.* 6:135-148.

English, L. H. and L. C. Cantkey. 1986. Delta-endotoxin is a potent inhibitor of the (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 261:1170-1173.

Fast, P. G., D. W. Murphy and S. S. Sohi. 1978. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: Evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. *Experientia.* 34:762-763.

Favret, M. E. and A. A. Younsten. 1989. Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53:2067-216.

Feitelson, J. S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology.* 10:271-275.

Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens and M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5119-5123.

Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. Kusano- Kretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers and R. T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology.* 5:807-813.

Fox, J. L.. 1989. Natural pesticide a challenge to manipulate. *Bio/Technology.* 7:1084.

Gabriel, C. J. and R. J. Cook. 1990. Biological control-the need for a new scientific framework. *BioScience.* 40:204-207.

Garczynski, S. F., J. W. Crim and M. J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2816-2820.

Garduno, F., L. Thorne, A. M. Galfield and T. J. Pollock. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:277-279.

Garfield, J. L. and C. D. Stout. 1988. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a toxic crystal protein from a subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **263**:11800-11801.

Ge, A. Z., D. Rivers, R. Milne and D. H. Dean. 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.

Ge, A. Z., N. I. Shivarova and D. H. Dean. 1989. Location of the *Bombix mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:4037-4041.

Glasser, P., H. Munier, A.-M. Giles, E. Krin, T. Porumb, O. Barzu, R. Sarfati, C. Pellecuer and A. Danchin. 1991. Functional consequences of single amino acid substitutions in calmodulin-activated adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* **10**:1683-1688.

Gleave, A. P., R. J. Hedges and A. H. Broadwell. 1992. Identification of and insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DSIR517 with significant sequence differences from previously described toxins. *J. Gen. Microbiol.* **138**:55-62.

Goldberg, M. L. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News.* **37**:355-358.

Goldburg, R. J. and G. Tjaden. 1990. Are B.T.K plants really safe to eat?. *Bio/Technology.* **8**:1011-1015.

Griego, V. M., D. Moffett and K. D. Spence. 1979. Inhibition of active K⁺ transport in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *J. Insect. Physiol.* **25**:283-288.

Gupta, B. L., J. A. T. Dow, T. A. Hall and W. R. Harvey. 1985. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. *J. Cell. Sci.* **74**:137-152.

Herrnstadt, C., G. G. Soares, E. R. Wilcox and D. L. Edwards. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Bio/Technology.* **4**:305-308.

González, J. M. Jr., B. J. Brown and B. C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* **79**:6951-6955.

González, J. M. Jr. and B. C. Carlton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid.* **11**:28-38.

González, J. M. Jr., H. T. Dulmage and B. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* **5**:351-165.

González, J. M. Jr..1990. Novel *Bacillus thuringiensis* strains. Patente PCT/US89/04978.

Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1987. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin. *Biochem. J.* **248**:197-201.

Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1987. Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. *Mol. Microbiol.* **1**:59-66.

Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1988. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* aizawai C1entomocidal crystal protein gene. *Nucl. Acids Res.* **16**:10927.

Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1989 (a). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with phospholipid

vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **978**:216-222.

Haider, M. Z. and D. J. Ellar. 1989 (b). Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* **208**:183-194.

Haider, M. Z., B. H. Knowles and D. J. Ellar. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* **156**:531-540.

Haider, M. Z. and S. Mahmood. 1990. *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: Diversity of crystal proteins and its relatness to the toxicity spectrum. *J. Basic. Microbiol.* **4**:251-258.

Held, G. A., L. A. Bulla Jr., E. Ferrari, J. Hoch, A.I. Aronson and S. A. Minich. 1982. Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**:6065-6069.

Henner, D. J.. 1990. Inducible expression of regulatory genes in *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology.* **185**:223-228.

Herrnstadt, C., T. E. Gilroy, D. A. Sovieski, B. D. Bennet and F. J. Gaertner. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene.* **57**:37-46.

Himeno, M., N. Koyama, T. Funato and T. Komano. 1985. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin on insect cells *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* **49**:1461-1468.

Hofmann, C. and P. Lüthy. 1986. Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. *Arch. Microbiol.* **146**:7-11.

Hofmann, C. and P. Lüthy. 1988. Quantitation of the binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to brush border membrane vesicles of *Pieris*

brassicae. Zbl. Bakt. Suppl. 17. En "Bacterial protein toxins". Editado por Fehrenbach, *et al.* Gustav. Fischer. Stuttgart. New York. pag. 109-110.

Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansen and H. Van Mellarert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **85**:7844-6748.

Hofmann, C., M. G. Wolfersberger and P. Lüthy. 1986. Visualization of binding of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. Zbl. Bakt. Suppl. 15. En "Bacterial protein toxins". Editado por Falmage, *et al.* Gustav. Fischer. Stuttgart. New York. pag. 235-236.

Höfte, H., H. Greve, J. Seurink, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, M. 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**: 273-280.

Höfte, H., J. Seurinck, A. Van Houtven and M. Vaeck. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against coleoptera. Nucl. Acids Res. **15**:7183.

Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. **53**:242- 255.

Holmes, K. C. and R. E. Monro. 1965. Studies on the structure of parasporal inclusions from *Bacillus thuringiensis*. J. Mol. Biol. **14**:572-581.

Honée, G., D. Convents, J. Van Rie, S. Jansens, M. Peferoen and B. Visser. 1991. The C-terminal domain of the toxic fragment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding. Mol. Microbiol. **5**:2799-2806.

Honée, G., van der Salm, T. and Visser B. 1988. Nucleotide sequence of crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. Nucl. Acids Res. **16**:6240.

Honée, G., W. Vriezen and B. Visser. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. *Appl. Environ Microbiol.* **56**: 823-825.

Huber, H. E., P. Lüthy, H.-R. Ebersold and J.-L. Cordier. 1981. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: Size, linkage and toxicity. *Arch. Microbiol.* **129**:14-18.

Ibarra, J. E. and B. A. Federicci. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-Kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **165**:527-533.

Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**:23-28.

Jahn, N., W. Schnetter and K. Geider. 1987. Cloning of an insecticidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and its expression in *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiol. Letts.* **48**:311-315.

Jaquet, F., R. Hüter and P. Lüthy. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:500-504.

Jarrett, P. and M. Stephenson. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1608-1614.

Jarvis, D. L., J. G. W. Fleming, G. R. Kovacs, M. D. Summers and L. A. Guarino. 1990. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Bio/Technology.* **8**:950-955.

Johnson, D. E., G. L. Brookhart, K. J. Kramer, B. D. Barnett and W. H. MacGaughey. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistance larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **55**:235-244.

Kaneda, T..1968. Fatty acids in the genus *Bacillus*. Similarity in the fatty acids composition of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* and

Bacillus cereus. J. Bacteriol. **95**:2210-2216.

Klier, A., C. Bourgouin and G. Rapoport. 1983. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. Mol. Gen. Genet. **191**: 257-262.

Klier, A., C. Parsot and G. Rapoport. 1983. *In vitro* transcription of the cloned chromosomal crystal gene from *Bacillus thuringiensis*. Nucl. Acids Res. **11**:3973-3987.

Knight, P.. 1989. Engineered fruit and vegetable crops. Bio/Technology. **7**:1233-1237.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific δ -endotoxin. J. Cell Sci. **83**:89-101.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta. **924**:509-518.

Knowles, B. H. and D. J. Ellar. 1988. Differential specificity of two insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. Mol. Microbiol. **2**:153-157.

Knowles, B. H. and R. W. Farndale. 1988. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and melittin. Toxicity is independent of cyclic AMP. Biochem. J. **253**:235-241.

Knowles, B. H., W. E. Thomas and D. J. Ellar. 1984. Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. FEBS Letts. **168**:197-202.

Kronstad, J. W. and H. R. Whiteley. 1984. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Bacteriol. **160**:95-102.

Kronstad, J. W. and H. R. Whiteley. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. Gene. **43**:29-40.

Lambert, B. and M. Peferoen. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience*. 42:112-122.

Lambert, B., W. Theuris, R. Aguda, K. Van Audenhove, C. Decock, S. Jansens, J. Seurinck and M. Peferoen. 1992. Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Gene*. 110:131-132.

Lecadet, M.-M., M.-O. Blondel and J. Ribier. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner*1715 using a bacteriophage CP-54Ber. *J. Gen. Microbiol.* 121:203-212.

Lecadet, M.-M., J. Chaufaux, J. Ribien and D. Lereclus. 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ Microbiol.* 58: 840-849.

Lecadet, M.-M., V. Sanchis, G. Menou, P. Rabot, D. Lereclus, J. Chaufaux and D. Martouret. 1988. Identification of a δ -endotoxin gene product specifically active against *Spodoptera littoralis* Bdv. among proteolysed fractions of the insecticidal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* 7.29. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2689-2698.

Lereclus, D., C. Bourgoquin, M.-M. Lecadet, A. Klier and G. Rapoport. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En "Regulation of procaryotic development". Editado por I. Smith, R. A. Slepecky and P. Setlow. American Society for Microbiology. Washington, D. C. pag. 255-276.

Lereclus, D., J. Mahillon, G. Menou and M.-M. Lecadet. 1986. Identification of Tn4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 204:52-57.

Lereclus, D., G. Menou and M.-M. Lecadet. 1983. Isolation of DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving a *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *Mol. Gen. Genet.* 191:307-313.

Lereclus, D., J. Ribier, A. Klier, G. Menou and M.-M. Lecadet. 1984. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. EMBO J. 3:2561-2567.

Lereclus, D., M. Valladae, J. Chaufaux, O. Arantes and S. Rambaud. 1992. Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. Bio/Technology. 10: 418-421.

Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature. 353:815-821.

Li, J., R. Henderson, J. Carroll and D. J. Ellar. 1988. X-ray analysis of the crystalline parasporal inclusion in *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. J. Mol. Biol. 199:543-544.

Lilley, M., R. N. Roffell and H. J. Somerville. 1980. Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. J. Gen. Microbiol. 118:1-11.

Lövgren, A., M. Zhang, A. Engström, G. Dalhammar and R. Landen. 1990. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. Mol. Microbiol. 4:2137-2146.

Lüthy, P., C. Hofman and F. Jaquet. 1985. Inactivation of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. FEMS Microbiol. Letts. 28:31-33.

MacGaughey, W. H.. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. 229:193-195.

Macaluso, A. and A.-M. Mettus. 1991. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA. J. Bacteriol. 173:1353-1356.

MacIntosh, S. C., T. B. Stone, R. Scott Jokerst and R. L. Fuchs. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliotis virescens*. Pros. Natl. Acad. Sci. USA. 88:8930-8933.

Mahillon, J. and D. Lereclus. 1988. Structural and functional analysis of Tn4430: Identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate-resolution process. *EMBO J.* 7:1515-1526.

Mahillon, J., J. Seurink, J. Delcour and M. Zabeau. 1987. Cloning and nucleotide sequence of different iso-IS231 elements and their structural association with the Tn4430 transposon in *Bacillus thuringiensis*. *Gene.* 51:187-196.

Mahillon, J., J. Seurink, L. Van Rompuy, J. Delcon and M. Zabeau. 1985. Nucleotide sequence and structural organization of an insertion sequence element (IS231) from *Bacillus thuringiensis* strain berliner1715. *EMBO J.* 4:3895-3899.

Mani, G. S.. 1985. Evolution of resistance in the presence of two insecticides. *Genetics.* 109:761-783.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, L. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Marec, F., V. Matha and J. Weiser. 1989. Analysis of genotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin by means of the *Drosophila* wing spot test. *J. Invertebr. Pathol.* 53:347-353.

Martens, J.W.M. , G. Honée, D. Zuidema, J.W.M. Vam Lent, B. Visser and J.M. Vlak. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2764-2770.

Masson, L., G. Prefontaine, L. Peluquin, P. C. K. Lau and R. Brousseau. 1989. Comparative analysis of the individual protoxin components in P1 crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* isolates NRD-12 and HD-1. *Biochem. J.* 269:507-512.

Mathavan, S., P. M. Sudha and S. M. Pechimuthu. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombis mori* larvae: A histopathological and histochemical study. *J. Invertebr. Pathol.* 53:217-227.

McLinden, J. H., J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Workman and D. H. Dean. 1985. Cloning and expression of an insecticidal k-type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:623-628.

McPherson, S. A., F. J. Perlak, R. L. Fuchs, P. G. Marrone, P. B. Lavrik and D. A. Fischhoff. 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Bio/Technology.* **6**:61-66.

Meeusen, R. L.. 1990. Insect and disease resistance. En "Agricultural Biotechnology. Opportunities for International Development". Editado por G. J. Persley. C-A-B International. USA. pag. 108-121.

Menou, G., J. Mahillon, M.-M. Lecadet and D. Lereclus. 1990. Structural and organization of IS232, a new insertion sequence of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**:6689-6696.

Merryweather, A. T., U. Weyer, M. P. G. Harris, M. Hirst, T. Booth and R. D. Possee. *J. Gen. Virol.* 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta-endotoxin. *J. Gen. Virol.* **71**:1535-1544

Murphy, D. W., S. S. Sohi and P. G. Fast. 1976. *Bacillus thuringiensis* enzyme-digested delta-endotoxin: Effect on culture insect cells. *Science.* **194**:964-956.

Murphy, R. C. and S. E. Stevens, JR. 1992. Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1650-1655.

Nagamatsu, Y., Y. Itai, C. Hatanaka, G. Funatsu and K. Hayashi. 1984. A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol. Chem.* **48**:611-619.

Nambiar, P. T. C., S.-W. Ma and V. N. Iyer. 1990. Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2866-2869.

Nicholls, C. N., W. Ahmad and D. J. Ellar. 1989. Evidence of two different types of insecticidal P2 toxins with dual specificity in *Bacillus thuringiensis* subspecies. J. Bacteriol. 171:5141-5147.

Obukowicz, M. G., F. J. Perlak, K. Kusano-Kretzmer, E. J. Mayer and L. S. Watrud. 1986. Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of rootcolonizing strains of pseudomonads using Tn5. Gene. 45:327-331.

Oddou, P., H. Hartman and M. Geiser. 1991. Identification and characterization of *Heliotis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Eur. J. Biochem. 202:673-680.

Oeda, K., K. Oshie, M. Shimisu, K. Nakamura, H. Yamamoto, I. Nakayama and H. Ohkawa. 1987. Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* strain aizawaiPL7 and its high-level expression in *Escherichia coli*. Gene. 53:113-119.

Ohba, M., Y. M. Yu and K. Aizawa. 1988. Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. System. Appl. Microbiol. 11:85-89.

O'Reilly, D. R. and L. K. Miller. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene Bio/Technology. 9:1086-1089.

Pao-Intara, M., C. Angsuthanasombat and S. Panyim. 1988. The mosquito larvicidal activity of 130 KDA delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 KDA amino-terminal fragment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:294-300.

Pfannenstiel, M. A., G. A. Couche, E. J. Ross and K. W. Nickerson. 1986. Immunological relationships among proteins making up the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystalline toxin. Appl. Environ. Microbiol. 52:644-649.

Poirié, M. et N. Pasteur. 1991. La resistance des insectes aux insecticides. La Recherche. 22:874-882.

Prefontaine, G., P. Fast, P. C. K. Lau, M. A., Hefford, Z. Hanna and R. Brousseau. 1987. Use of oligonucleotide probes to study the relatedness of delta-endotoxin genes among *Bacillus thuringiensis* subspecies and strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2808-2814

Prince, R. C.. 1990. At least one *Bacillus thuringiensis* toxin forms ion-selective pores in membranes. *TIBS.* **15**:2-3.

Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard and P. R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* **273**:43-47.

Rajinchapel-Mesaï, J.. 1990. Les biopesticides. *Biofutur.* Juillet/Aout:23-34.

Rawlins, S. C..1989. Biological control of insect pests affecting man and animals in the tropics. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **16**:235-252.

Raymond, K. C., T. R. John and L. A. Bulla, Jr.. 1990. Larvicidal activity of chimeric *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Mol. Microbiol.* **4**:1967-1973.

Reddy, A., L. Battisti and C. B. Thorne. 1987. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.* **169**:5263-5270.

Reuveni, M. and P. E. Dunn. 1991. Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **181**:1089-1093.

Riba, G., P. Oramas, B. Goyenechea y S. Pérez. 1989. Clonación y expresión de un gen quimérico de la toxina del *Bacillus thuringiensis* var. berliner por P.C.R. *Interf. y Biotech.* **6**:234-241.

Ruhfel, R. E., R. J. Robillard and C. B. Thorne. 1984. Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **157**:708-711.

Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux and M.-M. Lecadet. 1988. Multiplicity of δ -endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* **2**:393-404.

Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux, S. Guo and M.-M. Lecadet. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the N-terminal coding region of the *Spodoptera*-active δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* **3**:229-238.

Schnepf, E. H., K. Tomczak, J. P. Ortega and H. R. Whiteley. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**:20923-20930.

Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:2893-2897.

Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley. 1985. Delineation of a toxic-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **260**:6273-6280.

Schnepf, H. E., H. C. Wong and H. R. Whiteley. 1985. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. *J. Biol. Chem.* **260**:6264-6272.

Sekar, V., D. V. Thompson, M. J. Maroney, R. G. Bookland and M. J. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:7036-7040.

Sick, A., F. Gaertner and A. Wong. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolated of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucl. Acids Res.* **18**:1305.

Simon, A.. 1991. Research on biological pest control moves ahead. *Science.* **252**:211-212.

Slatin, S. L., C. K. Abrams and L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res.*

Comm. 169:765-772.

Stark, D. M. and R. N. Beachy. 1989. Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. *Bio/Technology*. 7:1257-1262.

Stock, C. A., T. J. McLoughlin, J. A. Klein and M. J. Adang. 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. *Can. J. Microbiol.* 36:879-884.

Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan and S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6:1211-1217.

Thanabalu, T., J. Hindley, S. Brenner, C. Oei, C. Berry. 1992. Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:905-910.

Thomas, W. and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.* 60:181-197.

Thorne, L., F. Garduno, T. Thompson, D. Decker, M. Zounes, M. Wild, A. M. Walfield and T. Pollock. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". *J. Bacteriol.* 166:801-811.

Tojo, A.. 1986. Mode of action of bipyramidal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:630-633.

Tripathi, A. K.. 1988. The cytology and biochemistry of pesticide microbiology. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 15:223-246.

Turner, J. T., J. S. Lampel, R. S. Stearman, G. W. Sundin, P. Gunyuzlu and J. J. Anderson. 1991. Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus*

thuringiensis subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Appl. Environ. Microbiol. 57:3522-3528.

Tyrell, D. J., L. A. Bulla. Jr., R. E. Andrews, K. J. Kramer, L. I. Davidson and P. Nordin. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J. Bacteriol. 145:1052-1062.

Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansen, M. De Beuckeller, C. Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature. 328:33-37.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele and H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. Eur. J. Biochem. 186:239-247.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele and H. Van Mellaert. 1990 (a). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56:1378-1385.

Van Rie, J., W. H. MacGaughey, D. E. Johnson, B. D. Barnett and H. Van Mellaert. 1990 (b). Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. 247:72-74.

Van Rie, J.. 1991 (a). Insect control with transgenic plants: resistance proof?. TIBTECH. 9:177-179.

Van Rie, J.. 1991 (b). The role of membrane binding of *Bacillus thuringiensis* berliner insecticidal crystal proteins in specificity and resistance . Tésis doctoral. Universiteit Gent. Gent. Bélgica.

Visser, B..1989. A screening for the presence of four different crystal protein gene types in 25 *Bacillus thuringiensis* strains. FEMS Microbiol. Letts. 58:121-124.

Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker and W. G. Dirkse. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal

protein. *J. Bacteriol.* **172**:6783-6788.

Von Tersch, M. A., H. L. Robbins, C. S. Jany and T. B. Johnson. 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: Gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:349-358.

Waalwijk, C., A. Dullemans and C. Maat. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Letts.* **77**:257-264.

Waalwijk, C., A. M. Dullemans, M. E. S. Van Workum and B. Visser. 1985. Molecular cloning and the nucleotide sequence of M_r 28 000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Nucl. Acids Res.* **13**:8207-8217.

Wabiko, H., G. A. Held and L. A. Bulla, Jr.. 1985. Only part of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 is necessary for insecticidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:706-708.

Wabiko, H., K. C. Raymond and L. A. Bulla, Jr.. 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA.* **5**:305-314.

Ward, E. S. and D. J. Ellar. 1986. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* δ -endotoxin. nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **191**:1-11.

Ward, E. S., D. J. Ellar and C. N. Chilcott. 1988. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *J. Mol. Biol.* **202**:527-535.

Whiteley, H. R. and H. E. Schnepf. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:549-576.

Whiteley, H. R., H. E. Schnepf, J. W. Kronstad and H. C. Wong. 1984. Structural and regulatory analysis of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. En "Genetics and Biotechnology of *Bacilli*". Editado

por A. T. Ganesan and J. A. Hoch. Academic Press. New York. USA. pag. 375-386.

Widner, W. R. and H. R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J. Bacteriol.* **171**:965-974.

Widner, W. R. and H. R. Whiteley. 1990. Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **172**:2826-2832.

Wolfersberger, M. G.. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia.* **46**:475-477.

Wolfersberger, M. G.. 1991. Inhibition of potassium-gradient-driven midgut by two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins correlates with the activity of the toxins as gypsy moth larvicides. *J. Exp. Biol.* **161**:519-525.

Wong, H. C., H. E. Schnepf and H. R. Whiteley. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **258**:1960-1967.

Wong, H. C. and S. Chang. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNA in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**:3233-3237.

Wood, H. A. and R. R. Granados. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:69-87.

Wu, D. and A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311-2317.

Wu, D. and F. N. Chang. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 KDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Letts.* **190**:232-236.

Yamamoto, T. 1983. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol. **129**:2595-2603.

Yamamoto, T., I. A. Watkinson, L. Kim, M. V. Sage, R. Stratton, N. Akanda, Y. Li, D.-P. Ma and B. A. Roe. 1988. Nucleotide sequence of the gene coding for a 130-KDa mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Gene. **66**:107-120.

Yu, Y. M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25- Kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8A:8B) in mosquito larvicidal activity. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**:459-462.

Yu, Y.-M., M. Ohba and S. S. Grill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. **57**:1075-1081.

Yunovitz, H. and A. Yawetz. Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* and liposomes. FEBS Letts. **230**:105-108.