ARTÍCULO CIENTÍFICO

Uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*

Javier Hernández F.[1],
Leonardo Mariño R.[1],
Martha L. Orozco C.[2]
y Javier Narváez V.[2]

ABSTRACT

Title: **Utilization of Polymerase Chain Reaction for Characterization of Native Isolates of *Bacillus thuringiensis***

A methodology based on Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques was standardized for the molecular characterization of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis*. Four oligonucleotides mixes (*primers*) were used: two General (I and II) –which recognize the genes families *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* and *cry1Ia*–, and two Specific (A and B) which recognize the genes family *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* and *cry1Da*). The quality of bacterial DNA influenced the amplification product specificity and concentration. The quality of the DNA purified by M. He *et al.* fast method (*Nucleic Ac. Res.* 18:1660, 1990) allowed an efficient amplification. The optimum conditions for PCR were achieved using a mixture reaction with a final volume of 20 µL which contained 0.4 µM of each primer, 1X PCR buffer (50 mM KCL, 10mM Tris–HCl, pH 8.3 and 3.0 mM $MgCl_2$), 200 µM dNTP's, 1 U Taq–DNA–polymerase, 10–100 ng of bacterial DNA for the General mixtures and 300–500 ng of bacterial DNA for the Specific mixtures. The amplification program included 30 cycles as follows: denaturation at 94°C, annealing at 53°C and synthesis at 72°C during 20 seconds each one. The standardized methodology could be used routinely in the *cry* genes amplification of native isolates of *B. thuringiensis* for the classification, rapid and precise selection according to the potential biological activity as a previous step to toxicity trials against diverse insect pests of agriculture interest.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxins, proteins *Cry*, PCR.

1. Programa Nacional de Biotecnología Agrícola, CORPOICA, A.A. 240142-Las Palmas, Santa Fe de Bogotá, Colombia,
e-mail: redbtad@colciencias.gov.co;
2. Dirección actual: Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164, U.S.A.

RESUMEN

En este estudio se estandarizó una metodología para la caracterización molecular de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, la cual se basó en la amplificación de los genes *cry* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizaron cuatro mezclas de oligonucleótidos: dos Generales (I y II), los cuales reconocen genes de las familias *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* y *cry1Ia*, y dos Específicos (A y B), que identifican los genes de la familia *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da*). La calidad y concentración del ADN bacteriano influyó sobre la especificidad y concentración de los productos obtenidos mediante la amplificación de los genes *cry*. La calidad del ADN purificado a través del método rápido reportado por M. He *et al.* (*Nucleic Ac. Res.* 18:1660, 1990) permitió una amplificación eficiente. Para realizar la PCR en condiciones óptimas, se utilizó una mezcla de reacción con un volumen final de 20 µL, la cual contenía 0,4 µM de cada oligonucleótido, 1X PCR buffer (50 mM KCL, 10mM Tris-HCl, pH 8,3 y 3,0 mM $MgCl_2$), 200 µM de cada dNTP y 1U de Taq-ADN-polimerasa, además de 10-100 y 300-500 ng de ADN bacterial para las mezclas de los oligonucleótidos Generales y Específicos, respectivamente. El programa de amplificación incluyó 30 ciclos de desnaturalización a 94°C, hibridación a 53°C y síntesis a 72°C durante 20 segundos cada uno. La metodología estandarizada se puede utilizar rutinariamente para amplificar los genes *cry* procedentes de aislamientos nativos de *B. thuringiensis*, lo cual permite clasificarlos y seleccionarlos de una manera rápida y precisa de acuerdo con su actividad biológica y potencial biotecnológico; adicionalmente, como paso previo de los ensayos de toxicidad contra diversas especies de insectos plaga de interés agrícola.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxinas, proteínas *Cry*, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas ocasionadas por insectos plaga que atacan diversos cultivos comerciales representan entre el 10 y el 30% de los costos de producción, llegando a porcentajes mayores en algunos cultivos y épocas del año. Los insecticidas químicos se han constituido en el principal método de control de estas plagas; su uso irracional y masivo ha originado serios problemas de orden ambiental y fitosanitario entre los que se cuenta la resistencia de los insectos a los plaguicidas, la eliminación de poblaciones de fauna benéfica, la contaminación de los ecosistemas y la presencia de residuos tóxicos en los alimentos.

El control biológico de los insectos plaga de relevancia económica en la agricultura, a través del uso de microorganismos entomopatógenos, representa una alternativa de reducido impacto ecológico. Por estar ubicado en la franja ecuatorial, Colombia posee una gran biodiversidad de insectos, tanto plagas como benéficos, además de organismos entomopatógenos que contribuyen a regular las poblaciones insectiles.

Entre los organismos entomopatógenos más destacados se cuenta el *Bacillus thuringiensis*, bacteria gram-positiva, esporulada, nativa del suelo, que se caracteriza por producir cristales paraesporales compuestos por proteínas insecticidas (ICPs) –denominadas "delta-endotoxinas" (Heimpel, 1967)–. En la actualidad, más del 90% de los bioplaguicidas comerciales basados en entomopatógenos, utilizan en sus formulaciones mezclas de esporas e ICPs procedentes de varias cepas de *B. thuringiensis* (Feitelson *et al.*, 1992). Las ventajas de usar bioinsecticidas con base en *B. thuringiensis* se derivan principalmente de su alta especificidad contra los

insectos susceptibles y de su inocuidad para el medio ambiente, la fauna benéfica y demás organismos vivos, incluyendo al hombre.

Algunas de las desventajas del uso de bioinsecticidas comerciales con base en *B. thuringiensis* residen en su alto costo relativo, la pérdida de viabilidad de la bacteria causada por períodos de almacenamiento largos bajo condiciones inapropiadas y la rápida desnaturalización de la toxina en el medio ambiente. Además, su uso se ha limitado casi exclusivamente al control de insectos lepidópteros comedores de follaje, mientras otros grupos significativos de insectos plaga se hallan fuera de su espectro de acción; tal es el caso de los insectos chupadores, los minadores y los barrenadores de los órdenes Lepidóptera, Díptera y Coleóptera, entre otros. Además, la efectividad de las aspersiones de *B. thuringiensis* en condiciones de campo se ve afectada por la cobertura de la aplicación, el tipo de formulación y la susceptibilidad frente al lavado por aguas lluvias.

Puesto que los diferentes aislamientos de *B. thuringiensis* están provistos de una amplia variedad de proteínas insecticidas (ICPs), las cuales difieren en su potencia y especificidad de huésped (Höfte y Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1993), se justifica investigar aquellas cepas nativas que posean toxinas novedosas o más efectivas para el control de insectos plaga, y que sean viables para producir bioinsecticidas de mayor efectividad y espectro de acción. Recientemente se han descubierto nuevas cepas de *B. thuringiensis* con especificidad en contra de diversas familias de insectos, e incluso de nemátodos; éstas podrían extender el uso de este bacilo más allá de las aplicaciones de la agricultura tradicional (Vásquez *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1996; López e Ibarra, 1996).

Aunque en la práctica, la actividad insecticida de una cepa de *B. thuringiensis* únicamente se puede evaluar mediante la realización de pruebas de toxicidad (ensayo biológico) con el insecto de interés, el montaje de dichas pruebas es dispendioso, demorado y costoso. La amplificación de los genes *cry* del *B. thuringiensis* por medio de la PCR, ha permitido clasificar y seleccionar cepas de acuerdo con el tipo de gen *cry* que contienen; ello sirve para predecir su actividad biológica potencial, fase preliminar en los ensayos de toxicidad contra insectos susceptibles (Carozzi *et al.*, 1991; Chak *et al.*, 1994; Cerón *et al.*, 1994 y 1996). De esta manera se puede reducir el número de cepas que se van a evaluar en las pruebas finales de toxicidad, y se ahorran recursos y tiempo. Además, aumenta la probabilidad de poder identificar, en menor tiempo, nuevas cepas con mayor espectro de acción para el control de plagas y/o cepas más tóxicas y ventajosas que las que se conocen y comercializan actualmente; dichas cepas se podrían usar en la producción de bioplaguicidas más efectivos o, mediante ingeniería genética, para la producción de resistencia a plagas en organismos transgénicos.

En este estudio se realizaron diferentes ensayos para estandarizar una metodología de caracterización molecular de cepas de *B. thuringiensis*, basada en la amplificación de genes *cry* mediante la PCR. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para optimizar la reacción de amplificación de los genes *cry* fueron los siguientes: 1) Método de extracción y concentración del ADN del *B. thuringiensis*; 2) prueba de especificidad y concentración de oligonucleótidos; 3) prueba de concentración de $MgCl_2$ y Taq-ADN-polimerasa; y, 4) ensayos con diferentes temperaturas de hibridación y programas de amplificación.

Materiales y métodos

Cepas de Bacillus thuringiensis

Para la estandarización del método de amplificación de los genes *cry* a través de la PCR, se utilizaron como cepas de referencia del *B. thuringiensis*, las siguientes variedades: var. *kurstaki* HD1, la cual contiene los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia*; var. *israeliensis 1884*, que contiene los genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa* y *cyt1A*; var. *san diego*, con el gen *cry3Aa*; y var. *aizawai HD137*, la cual posee los genes *cry1Aa*,

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos Generales usados para amplificar genes *cry* del *B. thuringiensis* mediante la PCR.

PAR DE OLIGONUCLEÓTIDOS (POSICIÓN)	GEN RECONOCIDO	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR (pb*)	SECUENCIA 5' - 3'	REFERENCIA
cry1s (depende del gen amplificado)	*cry1A (a,b,c) cry1Ba, Ca, Da, Ea, Fa.*	272 - 290	GTAGAAGAGGAA GTCTATCCAA TATCGGTTTCTGG GAAGTA	Cerón *et al.*, (1996)
cry1As 1(310-330); 2(780-800)	*cry1A (a,b,c)*	490	CCGGTGCTGGATT TGTGTTA AATCCCGTATTGT ACCAGCG	Carozzi *et al.*, (1991)
cry1Ia 1(648-669); 2(1235-121)	*cry1IAa*	588	AAATCAATGGGAA ATCTTTATG TCTCTTGTAAGTT GGGCTGT	Este estudio
cry2Aa 1(301-320); 2(531-513)	*cry2Aa*	231	ATGTAGCTCCTGT AGTCGGA CCCTTATATTCGC TTGGAG	Este estudio
cry3s (depende del gen amplificado)	*cry3A, B, C, D, E*	688 - 747	TTAACCGTTTTCG CAGAGA TCCGCACTTCTAT GTGTCCAAG	Ceron *et al.*, (1996)
cry3Aa 1(1801 - 1821) 2(2430 - 2450)	*cry3Aa*	649	GTCCGCTGTATAT TCAGGTG CACTTAATCCTGT GACGCCT	Carozzi *et al.*, (1991)
cry4s 1(2551 - 2571) 2(3328 - 3348)	*cry4Aa y 4Ba*	797	CAAGCCGCAAATC TTGTGGA ATGGCTTGTTTCG CTACATC	Carozzi *et al.*, (1991)

*pb: pares de bases

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos Específicos usados para identificar subgrupos de genes de la familia *cry*1 del *B. thurigiensis* mediante la PCR.*

PAREJA DE OLIGONUCLEÓTIDOS (POSICIÓN)	GEN RECONOCIDO	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR (pb**)	SECUENCIA 5' - 3'
cry1Aa 1(1105-1125) 2(1332-1351)	*cry1Aa*	246	5'TTATACTTGGTTCAGGCCC3' 5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3'
cry1Ab 1(1133-1153) 2(1328-1348)	*cry1Ab*	216	5'AACAACTATCTGTTCTTGAC3' 5'CTCTTATTATACTTACACTAC3'
cry1Ac 1(1495-1514) 2(1656-1674)	*cry1Ac*	180	5'GTTAGATTAAATAGTAGTGG3' 5'TGTAGCTGGTACTGTATTG3'
cry1Ba 1(1007 1025) 2(1355-1374)	*cry1Ba*	367	5'CTTCATCACGATGGAGTAA3' 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3'
cry1Ca 1(1306-1325) 2(1416-1436)	*cry1Ca*	130	5'AAAGATCTGGAACACCTTT3' 5'CAAACTCTAAATCCTTTCAC3'
cry1Da 1(837-856) 2(1107-1127)	*cry1Da*	290	5'CTGCAGCAAGCTATCCAA3' 5'ATTTGAATTGTCAAGGCCTG3'

*Según *Cerón et al.* (1994, 1996)

**pb: pares de bases

cry1Ba, *cry1Ca* y *cry1Da*. Estas cepas fueron cedidas gentilmente por el Instituto Pasteur (París, Francia). Además, se utilizaron cepas de aislamientos nativos colombianos depositadas en el Banco de Cepas de CORPOICA.

Las cepas se conservaron a 4°C en tiras de papel de filtro inoculadas con una suspensión de esporas y dentro de ampolletas ámbar previamente esterilizadas. Para establecer los cultivos de estas cepas, las tiras de papel se colocaron en cajas de Petri con el medio LB semisólido (10 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 12 g/L de agar-agar), durante 24 horas a 28°C.

Selección y diseño de los oligonucleótidos

Se seleccionaron pares de oligonucleótidos previamente reportados para la amplificación por PCR de los genes de las familias *cry1*, *cry3* y *cry4*, así como también para los subgrupos de genes de la familia *cry1*, como son: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da*. En las Tablas 1 y 2 se presentan las características de dichas familias y subgrupos de genes (Carozzi *et al.*, 1991; Cerón *et al.*, 1994 y 1996).

Fue necesario diseñar oligonucleótidos que permitieran amplificar los genes *cry2Aa* y *cry1Ia*, basándose en las secuencias nucleotídicas reportadas en la literatura (Donovan *et al.*, 1988; Widner *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1992), para lo cual se hizo uso del programa de computación *Primer* versión 0.5 (Lincoln *et al.*, 1991). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Life Technologies Inc. (Gibco BRL, Custom Primers).

Extracción del ADN del B. thuringiensis

Para extraer el ADN bacteriano que se utilizó en las reacciones de amplificación de los genes *cry*, se ensayaron los métodos de Carozzi *et al.* (1991) y el reportado por M. He *et al.*,(1990). En ambos casos se emplearon cultivos jóvenes de cepas del *B. thuringiensis* incubados entre 18 y 24 horas a 28°C. Siguiendo la metodología de Carozzi, se tomó una muestra de las bacterias con asa bacteriológica de 5 mm de diámetro, la cual se diluyó en 100 µL de agua estéril destilada y desionizada, calentándola al baño María en agua hirviendo durante 10 minutos para inducir la lisis bacteriana.

Los residuos celulares se precipitaron mediante centrifugación rápida (10 segundos) y el sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización. De acuerdo con el método de M. He (1990), las células se diluyeron en 100 µL de solución tampón Tris-HCl (50 mM con pH 8,3; LiCl 2,5 M; Triton X-100 al 4% y EDTA 62,5 mM); en seguida se agregaron 50 µL de fenol (equilibrado a pH 8,0) y 50 µL de cloroformo-isoamílico en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, mezclándolo todo en un vortex y centrifugando por 3 minutos a 14.000 rpm. A la fase acuosa se añadieron 250 µL de etanol absoluto a -20°C, se mezcló por inversión y luego se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se descartó y se agregaron 500 µL de etanol al 70% a -20°C, centrifugando por 5 minutos nuevamente a 14.000 rpm. El *pellet* se secó y se colocó en 50 µL de H_2O estéril destilada y desionizada, en seguida de lo cual se conservó a -20°C hasta que fue usada.

El ADN se cuantificó mediante comparación visual con las bandas de un ADN estándar (Lambda Hind III) de concentración conocida, después de someterlo a electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Adicionalmente, este ADN se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando para ello un GenQuant Calculador de ARN/ADN (Pharmacia Biotech).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para estandarizar las condiciones de la PCR que hicieran posible identificar todas las familias de genes *cry* de una manera específica, se realizaron ensayos de amplificación en cada uno de los oligonucleótidos diseñados a partir de las cepas de referencia, individualmente y en mezclas. Se ensayaron cuatro mezclas de oligonucleótidos: dos Generales (I y II) y dos Específicas (A y B), como se observa en la Tabla 3. Los oligonucleótidos Generales reconocen regiones conservadas de los genes pertenecientes a varios subgru-

pos de una misma familia (v.gr. *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4*). A su vez, los oligonucleótidos Específicos reconocen regiones variables de los subgrupos de genes de la familia *cry1*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo, inicialmente, en un volumen final de 50 µL, utilizando como referencia la mezcla de reacción estándar del GeneAmp kit (Perkin Elmer Cetus). Esta mezcla recomienda usar entre 0,1 y 0,5 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP, 1XPCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 y 3,0 mM $MgCl_2$), y entre 0,5 y 5 U de Taq-ADN-polimerasa. No obstante, se evaluaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0,1 a 1,0 µM), $MgCl_2$ (1,5 a 3,0 mM), Taq-ADN-polimerasa (1 a 4 U) y ADN bacteriano (10 a 800 ng). Además, se probaron varias temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos (48°, 50°, 53° y 55°C) y se corrieron diferentes programas de amplificación, los cuales se presentan en la Tabla 4. Finalmente, la mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral y se calentó, inicialmente, a 94°C por 2 minutos. La amplificación mediante la PCR se llevó a cabo en un termociclador de bloque PTC-100 (MJ Research Inc., U.S.A.). Después de dicha reacción, una alícuota procedente de cada muestra fue sometida a electroforesis en geles de agarosa al 1%, como lo describe Sambrook *et al.* (1989).

Resultados y discusión

La técnica de PCR permite amplificar secuencias específicas del ADN en genes o fragmentos de éstos procedentes de un organismo particular, mediante la utilización de parejas de oligonucleótidos que reconocen y se unen a zonas homólogas del ADN del organismo de interés; éstas sirven de iniciadores (*primers*) para que la ADN polimerasa realice la síntesis repetida del fragmento de ADN localizado entre los dos oligonucleótidos (Saiki, 1992). En este estudio, se realizaron diferentes ensayos para estandarizar una metodología de amplificación mediante la PCR de genes *cry* específicos de cepas nativas del *B. thuringiensis*, de acuerdo con el tipo de gen *cry* que contienen, buscando predecir su actividad biológica potencial, como paso previo a las pruebas de toxicidad contra insectos susceptibles (Carozzi *et al.*, 1991; Cerón *et al.*, 1994; Chak *et al.*, 1994). Los parámetros que se tuvieron en cuenta para asegurar condiciones apropiadas de ocurrencia de las reacciones de amplificación de los genes *cry*, fueron los siguientes: 1) Método de extracción y concentración del ADN del *B. thuringiensis*; 2) prueba de especificidad y concentración de oligonucleótidos; 3) prueba de concentración de $MgCl_2$ y Taq-ADN-polimerasa; y, 4) ensayos con diversas temperaturas de hibridación y programas de amplificación.

Extracción y concentración del ADN del B. thuringiensis

La calidad y concentración del ADN bacteriano constituyen indicadores cruciales que es necesario conocer para implementar, de manera óptima, reacciones de amplificación mediante la PCR (Gibbs *et al.*, 1992). La Figura 1 presenta una fotografía del ADN extraído a partir de varios aislamientos del *B. thuringiensis*, después de someterlos a electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, según las metodologías de extracción del ADN desarrolladas por Carozzi *et al.* (1991) y M. He *et al.* (1994).

Como se puede observar en las secciones A y B de la Figura 1, la calidad y apariencia del ADN aislado en cada uno de los métodos citados, difiere ostensiblemente. Carozzi emplea un método rápido de amplificación directa de los genes *cry*, a partir de extractos crudos obtenidos de células lisadas por calentamiento en un baño de agua hirviendo, sin aplicar ningún procedimiento posterior de purificación del ADN; en consecuencia, dicho ADN contiene indistintamente ADN genómico y ADN plasmídico, los cuales asumen la apariencia de una mancha alargada (*smear*) después de la electroforesis en ge les de agarosa (Figura 1, sección A). Por su parte, M. He utiliza un método rápido de extracción y purificación del ADN bacterial, que usa fenol-cloroformo para desproteinizar la mezcla y etanol para precipitar los ácidos nucleicos; así, el ADN que se aisla por este método está constituido principalmente por ADN plasmídico, el cual aparece como una banda simple en los geles (Figura 1, sección B).

La concentración relativa del ADN aislado presentó variaciones considerables, las cuales fueron independientes del método de extracción aplicado. En efecto, las muestras registraron concentraciones que oscilaban entre unos pocos nanogramos

Tabla 3. Mezclas de oligonucleótidos usadas para amplificar los diferentes grupos y subgrupos de genes *cry* del *B. thuringiensis*.

MEZCLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	GENES RECONOCIDOS	PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN ESPERADO (PARES DE BASES)
Generales I	*cry1A(1Aa, 1ab y 1ac)*	490
	cry2Aa	231
	cry3Aa	649
	cry4As	797
	cry1la	588
Generales II	*cry1s(1Aa,1Ab, 1Ac, 1Ba, 1Ca, 1Da, 1Ea y 1Fa)*	272 a 290*
	cry3s (3Aa, 3Ba, 7Aa y 3Ca)	688 a 747*
Específicos A	*cry1Aa*	246
	cry1Ab	216
	cry1Ac	180
Específicos B	*cry1Ba*	367
	cry1Ca	130
	cry1Da	290

* Depende del gen reconocido

Tabla 4. Programas de amplificación ensayados en la PCR de genes *cry* del *B. thuringiensis*.

Programa	Desnaturación (94°C)	Hibridación (48°, 50°, 53° y 55°C)	Síntesis (72°C)
1	1 seg.	1 seg.	1 seg.
2	20 seg.	20 seg.	20 seg.
3	1 min.	1 min.	1 min.

(10 ng/mL) hasta niveles medidos en microgramos. En algunos casos, la concentración de ADN fue tan baja que no se pudo detectar visualmente en los geles (Figura 1). Por lo general, se acepta que una concentración adecuada del ADN molde (*template*) usado en la reacción de amplificación por la PCR, debe acercarse a 1 g/ml (Gibbs *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993); ello equivale a un rango de concentración del ADN que varía entre 10 y 100 ng, y a un número de copias del ADN blanco (*target*) que oscila entre 10^2 y 10^5 (Saiki, 1992). Por este motivo fue necesario cuantificar el ADN obtenido después de cada extracción, a fin de asegurar la concentración requerida para todas las muestras, antes de proceder a amplificar los genes *cry*. En el transcurso del estudio fue evidente que, para muchos aislamientos de cepas nativas del *B. thuringiensis*, no fue posible constatar la presencia de los productos de amplificación de los genes *cry*, puesto que la concentración de ADN utilizado no fue suficiente para que tuviera lugar una PCR óptima.

En la Figura 2 se presenta el efecto que tuvo la utilización de diferentes concentraciones de ADN plasmídico, obtenido según el método de M. He (1990), sobre la amplificación de los genes *cry* procedentes de la cepa de referencia *kurstaki HD1*. La notable amplificación de los genes *cry1A* (*a*, *b*, *c*) y *cry2Aa*, reacción en la que se usó la mezcla de oligonucleótidos Generales I, tuvo lugar en un rango de concentración del ADN plasmídico que osciló entre 10 y 250 ng (Figura 2, sección A), siendo ligeramente más eficiente en la concentración más baja (10 ng). Por su parte, en la reacción de amplificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*, la cual empleó la mezcla de oligonucleótidos Específicos A, fue necesario llegar a una concentración mínima de 300 ng de ADN (Figura 2, sección B). En ambos casos, a partir de cierta concentración –350 ng en A y 800 ng en B–, no se observaron productos de amplificación de algunos genes, posiblemente por la presencia de agentes contaminantes en el extracto de ADN aislado, cuya concentración alcanzó niveles que inhibieron y/o interfirieron parcialmente la reacción de amplificación (Figura 2, secciones A y B).

Así mismo, en una buena parte de los casos se observó una concentración mayor de los productos de amplificación de ciertos genes *cry* con relación a otros; es el caso del gen *cry1Aa* de la Figura 2, sección B. Esta amplificación diferencial se puede explicar por una abundancia de copias del mismo gen y/o por una mayor estabilidad de la hibridación del par de oligonucleótidos frente a las secuencias homólogas del gen respectivo; ello, a su vez, se puede derivar del tamaño y el contenido de bases G y C en cada oligonucleótido (Gibbs *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1993).

Finalmente, el método de M. He resultó más conveniente en razón de que el ADN aislado se pudo conservar en agua destilada estéril, durante varias semanas, a -20°C, sin que se afectara la reacción de amplificación. Por el contrario, el ADN extraído por el método de Carozzi sufrió una rápida degradación después de pocas horas de congelamiento; aunque la preservación de dicho ADN se realizó inmediatamente después de extraerlo, fue necesario utilizar aislamientos frescos en cada evento de amplificación.

Pruebas de especificidad y concentración de oligonucleótidos

Para comprobar la especificidad de cada uno de los juegos de oligonucleótidos seleccionados, se realizaron reacciones estándar de amplificación por PCR, las cuales se practicaron de forma independiente a cada uno de los genes *cry*. Éstos se amplificaron a partir del ADN aislado de las cepas de referencia correspondientes o de una mezcla de ADNs procedentes de diferentes cepas (Figura 3). De igual

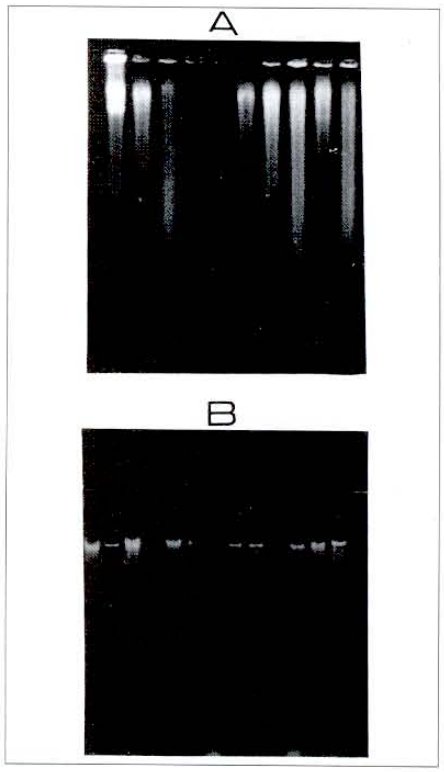


Figura 1. Apariencia del ADN obtenido de aislamientos nativos del *B. thuringiensis*, según los métodos de Carozzi (A) y M. He (B). El ADN aislado se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

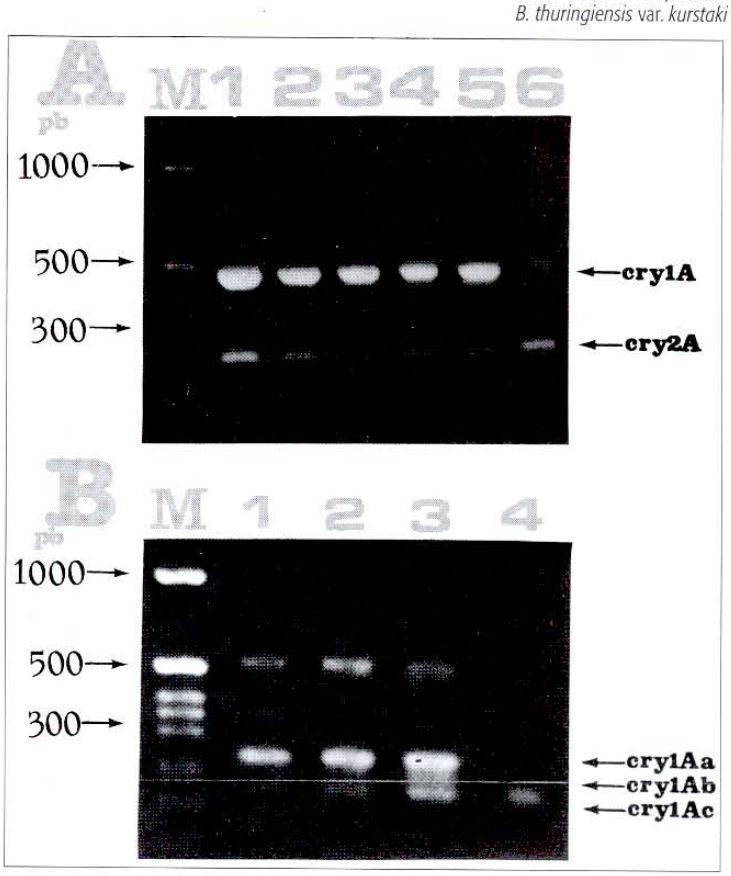


Figura 2. Efecto de diversas concentraciones de ADN sobre la tasa de amplificación de la PCR en genes *cry* del *B. thuringiensis* var. *kurstaki HD1*. La sección A muestra los productos de amplificación de los genes *cry1A* (*a*, *b*, *c*) y *cry2Aa* en seis ensayos con concentraciones de ADN diferentes (10, 50, 100, 200, 250 y 350 ng). La sección B ilustra los productos de amplificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* en cuatro ensayos con diferentes niveles de ADN (100, 250, 500 y 800 ng). *M*: marcador ADN Ladder con 1 Kb de peso (Gibco BRL, U.S.A.).

Figura 3. Productos de amplificación, mediante PCR, de genes *cry* extraídos de cepas de referencia del *B. thuringiensis* utilizando pares de oligonucleótidos individuales o mezclados. En los ensayos 2 a 6 se utilizaron pares de oligonucleótidos individuales, mientras que en los ensayos 1 y 7 se usaron mezclas. Según el origen del ADN, en las amplificaciones aplicadas a los siete ensayos se siguió el siguiente esquema: *ensayos* 1 y 7 (mezcla de las var. *kurstaki HD*1, *san diego* e *israeliensis* 1884); *ensayos* 2, 3 y 4 (var. *kurstaki HD*1); *ensayo* 5 (var. *san diego*); *ensayo* 6 (var. *israeliensis* 1884). *M*: marcador ADN Ladder con 100 bp de peso (Gibco BRL, U.S.A.).

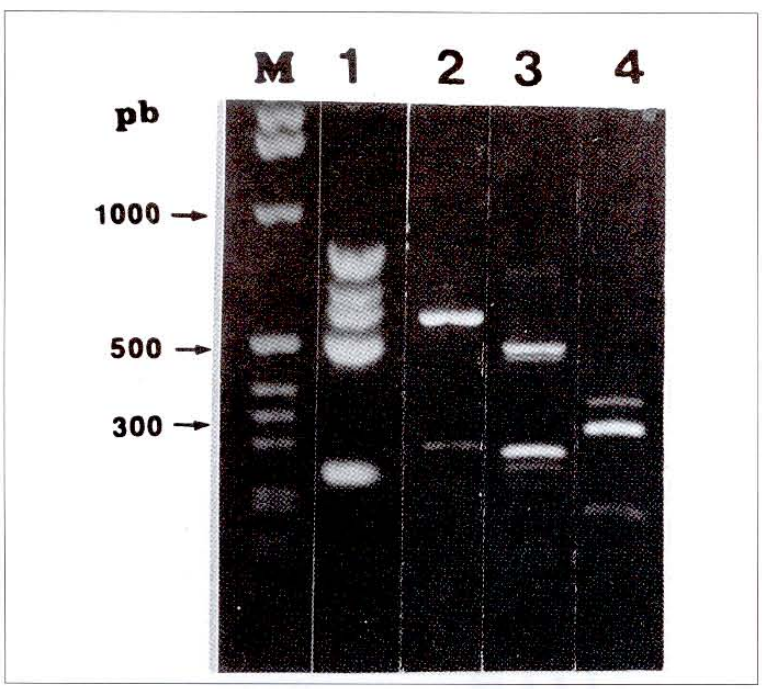


Figura 4. Productos de amplificación, mediante PCR, de genes *cry* extraídos de cepas de referencia del *B. thuringiensis* utilizando mezclas de oligonucleótidos Generales (I y II) y Específicos (A y B). En las amplificaciones aplicadas a los cuatro ensayos, se siguió el siguiente esquema: *ensayo* 1 (fragmentos de los genes *cry2Aa*, *cry1A* [*a*, *b*, *c*], *cry1a*, *cry3Aa* y *cry4*, los cuales se ordenaron de menor a mayor peso molecular; se amplificaron a partir de una mezcla de ADN aislado de las vars. *kurstaki HD*1, *san diego* e *israeliensis* 1884, empleando la mezcla de oligonucleótidos Generales I); *ensayo* 2 (fragmentos de los genes *cry*1 y *cry3*, amplificados a partir de una mezcla de ADN aislado de las vars. *kurstaki HD*1 y *san diego*, empleando la mezcla de oligonucléotidos Generales II); *ensayo* 3 (fragmentos de los genes *cry1Ac*, *cry1Ab* y *cry1Aa*, amplificados a partir de la var. *kurstaki HD*1, empleando la mezcla de oligonucleótidos Específicos A); *ensayo* 4 (fragmentos de los genes *cry1Ca*, *cry1Da* y *cry1Ba*, amplificados a partir de la var. *aizawai HD*137, empleando la mezcla de oligonucleótidos Específicos B). *M*: marcador ADN Ladder con 1 Kb de peso (Gibco BRL, U.S.A.).

manera, este ADN derivado de cepas individuales o de combinaciones de ellas, bajo las mismas condiciones de reacción anteriores, se utilizó para amplificar los diferentes genes con base en las mezclas Generales y Específicas de oligonucleótidos (Figura 4). En otras palabras, los juegos de oligonucleótidos individuales o en combinación, permitieron amplificar de manera específica los fragmentos de genes *cry* para los cuales fueron diseñados; la especificidad de dichos nucleótidos se pudo corroborar al comprobar que el tamaño de los productos de amplificación logrados guardó concordancia con lo esperado (Figura 4).

No obstante, en algunos casos se observaron bandas de ADN adicionales en los geles de electroforesis, las cuales correspondían eventualmente a fragmentos de amplificación inespecíficos (Figura 4). La aparición de dichas bandas pudo verse influida por la calidad y concentración del ADN bacterial, por las secuencias particulares de los genes que se amplificaron (que contienen bases G y C) y por las combinaciones de oligonucleótidos usadas (Rychlik, 1995). Así por ejemplo, las amplificaciones de genes *cry* obtenidas mediante el método de Carozzi *et al.* (1991), presentaron un alto número de bandas inespecíficas que se atribuyen a la presencia o interferencia de ADN de origen genómico (Figura 5, sección A); ello difería notablemente de las amplificaciones logradas a partir del ADN purificado por el método de M. He (1994) (Figura 5, sección B). Aquí es necesario aclarar que algunas de las bandas inespecíficas que se observan, pueden corresponder a la existencia de secuencias homólogas a las de los genes cry de interés, las cuales forman parte de genes cry modificados por fenómenos genéticos como la duplicación, la inversión o la delección (Mahillon *et al.*, 1994).

De acuerdo con Gibbs *et al.* (1992), para llegar a una amplificación óptima, las diversas combinaciones de oligonucleótidos pueden necesitar diferentes condiciones de procesamiento. La concentración de oligonucleótidos en una reacción estándar oscila entre 0,1 y 0,5 µM (GeneAmp Kit, Perkin Elmer Cetus; Saiki, 1992). Con el fin de optimizar las condiciones de reacción para cada mezcla de oligonucleótidos, se evaluaron concentraciones que variaban entre 0,1 y 1 µM. Sin embargo, no se encontraron diferencias apreciables en los resultados de las amplificaciones que usaron el rango de concentración de oligonucleótidos citado, aunque las concentraciones altas incrementaron ligeramente la aparición de amplificaciones inespecíficas. Por lo tanto, para las reacciones de PCR se decidió emplear una concentración de oligonucleótidos de 0,4 µM.

Concentración de $MgCl_2$ y Taq-ADN-polimerasa

La concentración de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción para la PCR, ejerce un profundo efecto en la especificidad y el producto de la amplificación (Saiki, 1992; Williams *et al.*, 1993). Los iones Mg^{2+} forman un complejo soluble con los dNTPs que es esencial para su incorporación durante la reacción de amplificación; además, estimulan la actividad de la polimerasa, incrementando la temperatura media (Tm) de la interacción entre la doble cadena de ADN y los oligonucleótidos (Newton y

Graham, 1994). Regularmente, la concentración de $MgCl_2$ utilizada en una reacción estándar de PCR es de 1,5 mM (Saiki, 1992; Williams *et al.*, 1993).

La Figura 6 muestra el efecto de varias concentraciones de $MgCl_2$ sobre los productos de amplificación de los genes *cry* extraídos de la cepa de referencia *kurstaki HD1*, cuando se utilizó la mezcla de oligonucleótidos Específicos A. Se observó que las concentraciones de $MgCl_2$ por debajo de 2,5 mM, inducen la aparición de bandas inespecíficas en los perfiles de amplificación, las cuales se distinguen por su peso molecular (aproximadamente 600 pb); por su parte, los productos de amplificación de los genes *cry1Ab* y *cry1Ac* presentan una apariencia bastante ligera. Cerón *et al.* (1994) observaron productos inespecíficos similares en la reacción de amplificación al emplear el mismo juego de oligonucleótidos de este estudio y una concentración de $MgCl_2$ de 1,5 mM. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de $MgCl_2$ de 2,5 y 3,0 mM, desaparecieron las inespecificidades, en tanto que los productos de amplificación de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* aparecieron bajo la forma de bandas de gran intensidad, como se puede observar en la Figura 6. Un resultado similar se obtuvo con las demás mezclas de oligonucleótidos, aunque las amplificaciones inespecíficas no siempre guardaron relación con la concentración de $MgCl_2$. En consecuencia, para optimizar la amplificación de los genes *cry* en este estudio, se escogió una concentración de $MgCl_2$ de 3,0 mM.

En las reacciones de amplificación estándar mediante la PCR, se suele utilizar una concentración aproximada de 2,5 U/50-100 µL de Taq-ADN-polimerasa para la mezcla de reacción (Saiki, 1992). Sin embargo, en la amplificación de genes *cry* del *B. thuringiensis*, se han utilizado concentraciones que oscilan entre 0,25 y 2,5 U/50 µL (Saiki, 1992; Bourque *et al.*, 1993; Chak *et al.*, 1994; Gleave *et al.*, 1993; Cerón *et al.*, 1994). En este trabajo, se estudió el efecto de varias concentaciones de Taq-ADN-polimerasa sobre los productos de amplificación de los genes *cry* del *B. thuringiensis*. Aunque la intensidad de los fragmentos de los genes amplificados aumentó proporcionalmente con la concentración de polimerasa, las diferencias en el rango de concentración empleado (1 a 4 U/50 µL) no fueron significativas. Así mismo, como sucedió en el caso de la concentración de oligonucleótidos, el uso de altos niveles de polimerasa tiende a amplificar fragmentos inespecíficos (Gelfand, 1992). Así, la concentración empleada para el análisis rutinario de las cepas nativas, se estableció en 1,0 U/20 µL.

Temperaturas de hibridación y programas de amplificación

La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos frente al ADN blanco, depende de la longitud y contenido de bases GC de aquellos. Usualmente, las temperaturas de hibridación se determinan empíricamente para cada mezcla de oligonucleótidos (Myers *et al.*, 1992). Según Saiki (1992), una temperatura de 55°C es un buen punto de partida para oligonucleótidos con 20 pares de bases y un contenido de bases GC cercano al 50%. No obstante, para el diseño y selección de los oligonucleótidos usados en el presente estudio, se tuvo en cuenta que su temperatura de disociación fuera semejante (aproximadamente 55°C). Por lo tanto, se ensayaron temperaturas de hibridación entre 48° y 55°C para las diversas mezclas de oligonucleótidos.

En la Figura 7 se muestran los productos de amplificación de los genes *cry2Aa*, *cry1A* (*a*, *b* y *c*) y *cry1Ia* del *B. thuringiensis* var. *kurstaki HD1*, obtenidos con la mezcla de oligonucleótidos Generales I bajo diferentes temperaturas de hibridación. Como se puede ver, en el ensayo con la temperatura de hibridación más baja (48°C), además de los productos esperados para los tres genes citados, se obtuvo una banda inespecífica adicional entre los fragmentos *cry1A* y *cry2Aa*. Este producto inespecífico disminuyó conforme aumentó la temperatura de hibridación, hasta desaparecer casi por completo a 55°C. En el ensayo con la mayor temperatura de hibridación (55°C), la intensidad del fragmento *cry1Ia* se redujo notablemente (Figura 7). En términos generales, las temperaturas de hibridación de 53° y 55°C, registraron los mismos resultados con las otras mezclas de oligonucleótidos. Ello permite afirmar que, a mayores temperaturas, la astringencia de la hibridación de los oligonucleótidos se incrementa, y con ésta, aumenta la especificidad de la PCR (Myers *et al.*, 1992; Saiki, 1992; Gibbs *et al.*, 1992).

La amplificación en un termociclador de los fragmentos de ADN, mediante la PCR, se lleva a cabo en tres etapas que se repiten cíclicamente en el tiempo. Estas etapas son: 1) la desnaturalización (separación o linearización) de la doble cadena de ADN; 2) la hibridación de los oligonucleótidos con las regiones homólogas del ADN blanco; y finalmente, 3) la amplificación o síntesis del

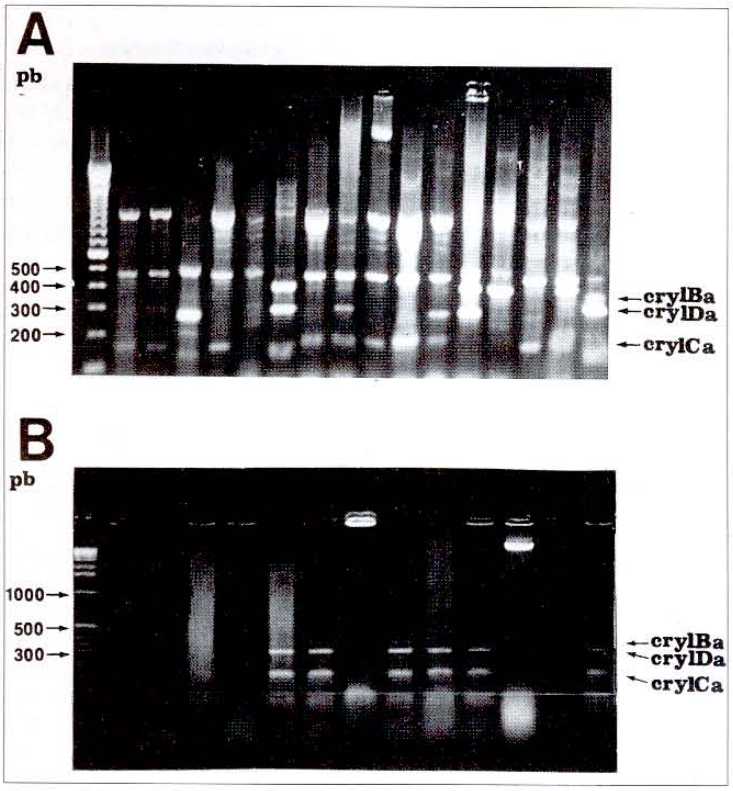


Figura 5. Amplificación, mediante PCR, de fragmentos de los genes *cry1Ba*, *cry1Ca* y *cry1Da* a partir de ADN aislado de cepas nativas del *B. thuringiensis* utilizando los métodos de Carozzi (sección A) y M. He (sección B). La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron las mismas en ambos casos: *sección A* (*M*: marcador ADN Ladder con 100 bp de peso [Gibco BRL, U.S.A.]); *sección B* (*M*: marcador ADN Ladder con 1 Kb de peso [Gibco BRL, U.S.A.]).

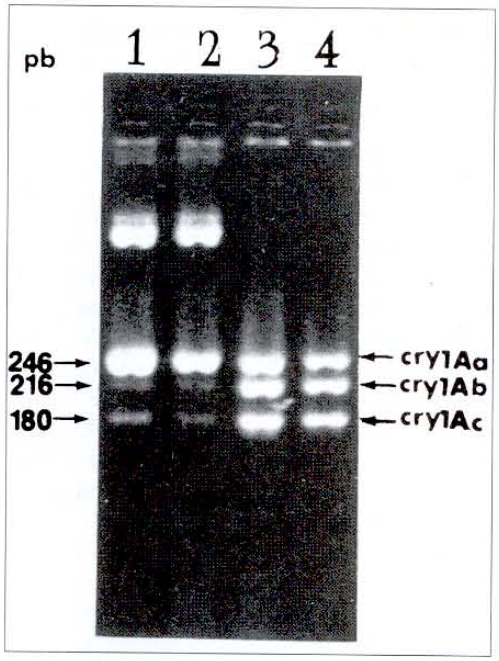
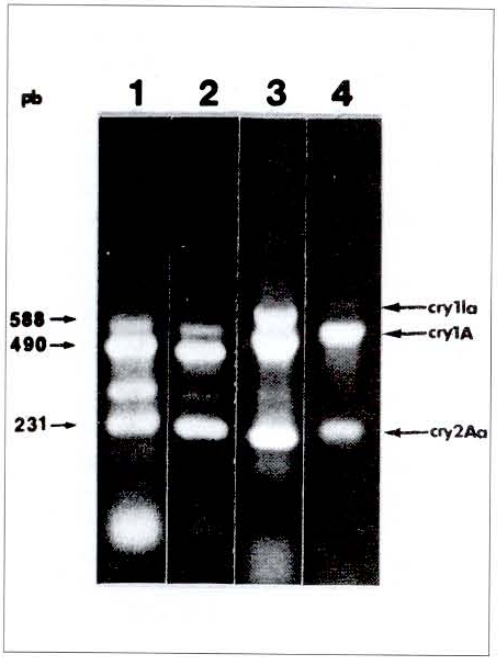


Figura 6. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ sobre la amplificación, mediante PCR, de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac* extraídos de cepas de referencia del *B. thuringiensis*. En las amplificaciones aplicadas en los cuatro ensayos, se utilizaron concentraciones de $MgCl_2$ diferentes (1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mM).

Figura 7. Efecto de diferentes temperaturas de hibridación en la amplificación, mediante PCR, de los genes *cry2Aa*, *cry1A* (*a*, *b* y *c*) y *cry1Ia* aislados a partir de cepas nativas del *B. thuringiensis* var. *kurstaki HD1*. En las amplificaciones aplicadas a los cuatro ensayos, se utilizaron diferentes temperaturas (48°, 50°, 53° y 55°C).



ADN por acción de la enzima termoestable Taq-ADN-polimerasa. En una reacción típica de PCR, la desnaturalización se realiza calentando la muestra entre 90° y 95°C; los oligonucleótidos se unen con su secuencia complementaria entre 40° y 60°C, mientras los fragmentos de ADN son sintetizados entre 70° y 75°C (Saiki, 1992). La duración de cada etapa, en cada ciclo, puede variar desde 1 segundo hasta más de 1 minuto. En este estudio se ensayaron tres programas de amplificación cuyos tiempos de incubación fueron de 1, 20 y 60 segundos para cada una de las tres etapas de cada ciclo (Tabla 4). Los resultados permitieron determinar que el tiempo de incubación de 1 segundo fue suficiente para amplificar los genes *cry* (Mariño *et al.*, 1996); sinembargo, en algunos casos, la concentración de los productos de amplificación fue inferior a la obtenida con los otros programas. Aunque no se encontraron diferencias notorias entre los programas de amplificación corridos bajo los tiempos de incubación de 20 y 60 segundos, para la estandarización de la PCR de este estudio se escogió el programa de 20 segundos, el cual hacía posible reducir, en cerca de la mitad, el tiempo total de amplificación.

Los resultados expuestos hacen posible estandarizar una metodología de gran utilidad para la caracterización molecular de aislamientos nativos de *B. thuringiensis*. La secuencia de dicha metodología se presenta en el recuadro adjunto.

La metodología de amplificación de los genes *cry* del *B. thuringiensis* que ha sido estandarizada en este estudio, permite clasificar y seleccionar, en un tiempo relativamente corto, las cepas nativas del bacilo de acuerdo con su actividad biológica potencial, y como paso previo a la implementación de los ensayos de toxicidad necesarios para el control de aquellas especies de insectos plaga significativas para la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la doctora Alba Marina Cotes por proveer gentilmente las cepas para este estudio; igualmente, reconocen la asistencia técnica de Jaqueline Solarte y Nancy Zamora. Así mismo, la colaboración de Jazmín Encizo en la conservación y mantenimiento de las cepas. Este trabajo fue financiado parcialmente por Colciencias (Contrato Cod. 2106-12-007-93).

METODOLOGÍA

- Cultivo del aislamiento nativo de *B. thuringiensis* en medio LB semisólido
- Incubación a 28°C durante 18 horas
- Extracción orgánica del ADN según el método rápido de M. He (1994).
- Cuantificación y ajuste de la concentración de ADN, según la mezcla de oligonucleótidos escogida, así: entre 10 y 100 ng para mezclas de oligonucleótidos Generales; entre 300 y 500 ng para los oligonucleótidos Específicos
- Realización de las reacciones de amplificación en un volumen final de 20 µL, el cual incluye 0,4 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de cada dNTP, 1X PCR tampón (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 y $MgCl_2$ 3,0 mM), 1 U de Taq-ADN-polimerasa y 10-500 ng de ADN
- Los aislamientos nativos se someten a una primera reacción de PCR con la mezcla de oligonucleótidos Generales I.
- Los aislamientos que no produzcan amplificación, se someten a una segunda reacción de PCR con la mezcla de oligonucleótidos Generales II.
- Las cepas que, en la primera y segunda reacción, amplifican fragmentos de genes *cry*1, se someten a dos nuevas reacciones con mezclas de oligonucleótidos Específicos A y B.
- Inicio del programa de amplificación (Termociclador PTC-100, M.J. Research, U.S.A.): 30 ciclos de desnaturación a 94°C, hibridación a 53°C y síntesis a 72°C, durante 20 segundos cada uno.
- Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis de una alícuota de 10 µL de cada reacción en gel de agarosa al 1%.

BIBLIOGRAFÍA

Bourque, N., Valero, J.R., Mercier, J., Lavoie M.C. and Koziel M.G. 1991. Multipex Polymerasa Chain Reaction for detection and differentiation of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:523-527.

Carozzi, N.B., Kranen, V.A., Warren, G.W., Evola, S. and Koziel, M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol. 57:3057- 3061.

Cerón, J., Quintero R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. 1994. PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60:353-356.

Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L. and Bravo, A. 1996. Specific PCR reaction primers directed to identify *cry*III Genes within a *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 61:3826- 3831.

Chak, K.F., Chao, D.C., Tseng, M.Y., Kao, S.S., Tuan, S.J. and Feng, T.Y. 1994. Determination and Distribution of *cry*-Type

Genes of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 60:2415-2420.

Donovan, W.P., González, J.M. Jr., Gilbert, M.P. and Dankocsik, C. 1988. 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.

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

Gelfand, D. H. 1992. *Taq* DNA Polymerase. Chapter 2. *In*: PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification. H.A. Erlich (Editor). W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. 246pp.

Gibbs, R., Chamberlain, J. and Caskey, T. 1992. Diagnosis of New Mutation Diseases Using the Polymerase Chain Reaction. Chapter 15. *In*: PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification H.A. Erlich (Editor). W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. 246pp.

Gleave, P.A., Williams, R. and Hedges J.R. 1993. Screening by Polymerase Chain Reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the Presence of *cry*V-Lyke Insecticidal Protein Genes and Characterizacion of a *cry*V Gene Cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki.* Appl. Environ. Microbiol. 59:1683-1687.

Heimpel, A. M. 1967. A cristal review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis Berliner* and other crystalliferous bacteria. Ann. Rev. Entomol. 12:287-322.

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

Lereclus, D., Delecluse, A. and Lecadet, M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. *In*: P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs (Eds.) *Bacillus thuringiensis,* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice.p.37-69.

Lincoln, S., Daly, M. and Lander E. 1991. *Primer,* versión 0.5. MIT, Centro de Investigación de Genoma le Instituto de Investigaciones Biomédicas. Cambridge, Massachusetts. 02142.

López, J. E. and Ibarra, J. E. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis.* Appl. Environ. Microbiol. 62:1306-1310.

M. He, W., A. and Kaderbhai, M.A. 1990. A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. Nucleic Acids Rsearch 18: 1660.

Mahillon J., Rezsöhazy, R., Hallet, B. and J. Delcar. 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: A review. Genética 93:13-26.

Mariño, L., Hernández, J., Orozco, M. y Narváez, J. 1996. Caracterización molecular de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* utilizando PCR extra-rápida. Revista corpoica 1:47.

Myers, R., Sheffield, V. and Cox, D. 1992. Mutation Detection by PCR, GC-Clamps, and denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Chapter 7. pp. 71-88. In: PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification. OTechnology. Principles and Applications for ADN Amplification H.A. Erlich (Editor). W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. 246pp.

Newton, C. R. and Graham, A. 1994. PCR. Bios Scientific Publishers. The Alden Press Ltd. Oxford, U.K.

Ohba, M. 1996. *Bacillus thuringiensis* populations naturally occuring in Japan: Diversity in Flagellar serotype flora and insecticidal activities. 39 pp. *In*: Program and Abstracts. The Second Pacific RIM conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the environment. Chang Mai (Ed.). Thailand.

Rychlik, W. 1995. Primer efficient in PCR. Biotechniques 18:84-90.

Saiki, R. K. 1992. The Design and Optimization of the PCR. Chapter 1. pp. 7-16. *In*: PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification H.A. Erlich (Editor). W.H. Freeman and Company, New York, U.S.A. 246pp.

Sambrook, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U.S.A.

Sun, M., Yu, Z., Dai, J., Luo, X., Yu, L., Liu, Z., Wu, L. and Dean, D. 1996. Characterization of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 with high toxicity against *Helicoverpa armigera* larvae. 29 pp. *In*: Program and Abstracts. The Second Pacific RIM conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its impact to the environment. Chang Mai (Ed.). Thailand.

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

Vásquez, M., Parra, C., Hubert, E., Espinoza, P., Theoduloz, C. and Meza-Basso, L. 1995. Specificity and Insecticidal Activity of Chilean Strains of *Bacillus thuringiensis.* J.Invertebr. Pathol. 66:1306-1310.

Widner, W. R. and Whiteley, H. R. 1989. Two highly related insecticidal *cry* proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* possess diferent host ratio specificities. J. Bacteriol. 171:965-974.

Williams, J., Hanafey M., Rafalki, J. and Tingey S. 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic ADN Markers. *In*: Methods in Enzymology. Vol. 218. Academic Press, Inc.