

## LSSP-PCR para la identificación de polimorfismos en el gen *cry1B* en cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*

### LSSP-PCR to identify polymorphisms in the gene *cry1B* of *Bacillus thuringiensis* native strain

Martha Ilce Orozco Mera\*, Jaime Bernal Villegas\*\* y Javier Hernández-Fernández\*\*\*

#### Resumen

Se estandarizó la técnica LSSP-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con un único oligonucleótido en condiciones de baja astringencia), para identificar polimorfismos del gen *cry1B* en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Se evaluaron 164 aislamientos nativos colombianos identificándose el gen *cry1Ba* en 11 de estos aislamientos. Los 11 fragmentos amplificados, junto con el de la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai* HD137, se analizaron por LSSP-PCR y los patrones electroforéticos obtenidos se compararon cualitativamente. Con los productos amplificados mediante el oligonucleótido directo se construyó un dendrograma utilizando UPGMA que mostró tres agrupamientos con similitud de 83, 79 y 68%. La agrupación con 68% de similaridad correspondió al aislamiento nativo *BtGC120* que presentó el patrón de bandas más variable. Con el oligonucleótido reverse el aislamiento *BtGC120* mostró una menor variabilidad (43%). La secuencia nucleotídica obtenida de este fragmento de 806 pares de bases mostró una identidad de 93% con la secuencia de los genes *cry1Bc1* de *Bt morrisoni* y *cry1Bb1* de la cepa BT-EG5847. Se predijo del marco de lectura +3 una proteína de 268 residuos aminoácidos, con 88% de identidad con la proteína Cry1Bc. Esta secuencia reveló dos dominios, una endotoxina N implicada en la formación del poro y otra endotoxina M relacionada en el reconocimiento del receptor. La evaluación biológica del aislamiento *BtGC120* sobre larvas de primer instar del insecto plaga *Spodoptera frugiperda*, mostró una CL<sub>50</sub> de 1,896 ng de proteína total por cm<sup>2</sup>. Este estudio muestra que la LSSP-PCR es una técnica que permite identificar de una manera específica variaciones en las secuencias de los genes *cry* de *Bt*, con potencialidad de encontrar nuevos genes con novedosas actividades biológicas.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, genes *cry1B*, delta-endotoxinas, *Spodoptera frugiperda*, *BTGC120*

#### Abstract

LSSP-PCR (low stringency specific primer-PCR), technique was standardized for polymorphisms in native isolates *cry1B* genes *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) identify. 164 isolates were evaluated by identifying the gene colombian native *cry1Ba*, in 11 of these isolates. The 11 amplified fragments, along with the reference strain *Bt subsp. aizawai* HD137 were analyzed by LSSP-PCR and electrophoretic patterns obtained were compared qualitatively. With the amplified products with direct oligonucleotide was constructed using UPGMA dendrogram showed three clusters with similarity of 83, 79 and 68%. The group with 68% similarity corresponded to the isolation *BtGC120* native who introduced the variable pattern of bands. With the isolation *BtGC120* reverse oligonucleotide showed less variability (43%). The nucleotide sequence obtained from this fragment of 806 bp showed 93% identity with the sequence of the genes of *Bt morrisoni* *cry1Bc1* and *cry1Bb1* BT-strain EG5847. Predicted reading frame of 268 +3 a protein amino acid residues with 88% identity with the protein Cry1Bc. This sequence revealed two domains, an N endotoxin involved in the formation of the pore and other related M endotoxin in re-

\* Centro de Biología Molecular, Gimnasio Campestre. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 3a No. 36 B 05 Edificio 134. Espacio 206

\*\* Instituto de Genética, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 40-62 Edificio 32, Bogotá, Colombia.

\*\*\* Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de investigación: GENBIMOL, Genética, Biología Molecular & Bioinformática. Carrera 4 No 22-61, Bogotá-Colombia. Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co

ceptor recognition. The biological evaluation BtGC120 insulation on first instar larvae of *Spodoptera frugiperda* insect pest, showed an LC<sub>50</sub> of 1.896 ng of total protein per cm<sup>2</sup>. This study shows that the LSSP-PCR is a technique that identifies a specific way variation in the sequences of *cry* genes of *Bt*, with the potential to find new genes with novel biological activities.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *cry1B* genes, delta-endotoxins, *Sodoptera frugiperda*, BTGC120.

**Recibido:** abril 12 de 2011

**Aprobado:** junio 26 de 2012

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es un bacilo Gram positivo esporoformador, el cual está ampliamente distribuido en el suelo (Schnepf *et al.* 1998). Produce una o más proteínas Cry en forma de inclusión cristalina paraesporal, las cuales son tóxicas sobre diferentes órdenes de insectos, entre estos: lepidóptera, díptera, coleóptera, himenóptera, homóptera, ortóptera y malófaga, y aún contra otros organismos como platelmintos, nemátodos, protozoos y ácaros (Hofte and Whiteley, 1989; Feitelson *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 1992, 1998; García-Robles *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2004). Aunque muchas proteínas Cry presentan similaridad en su estructura y función, su diversidad y potencial insecticida es altamente variable. A la fecha, se han identificado más de 500 toxinas Cry clasificadas dentro de 70 grupos según su secuencia aminoacídica ([http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/toxins2.html](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). 2012). De estos, el grupo *cry1* presenta el más alto nivel de biodiversidad con 187 genes reportados, y a su vez, la mayor frecuencia en la naturaleza (Bravo *et al.*, 1998; Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Por más de 40 años se han identificado diferentes cepas de *Bt* con proteínas Cry novedosas, las cuales se han empleado como insecticidas biológicos y los genes codificantes en la generación de cultivos transgénicos autorresistentes al ataque de insectos, con reducción de los costos de producción y menores riesgos para la salud y el ambiente (Bravo *et al.*, 1998; Porcar y Juárez-Pérez, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y otras herramientas moleculares junto con bioensayos, han permitido la caracterización de cepas de *Bt* portadoras de genes que codifican para las toxinas Cry y que poseen actividad insecticida. Se han adoptado algunas técnicas moleculares con base en PCR, las cuales presentan desventajas como dificultades técnicas, falta de especificidad y sensibilidad para la identificación de nuevos genes, etc. De hecho, siempre hay dificultad para una caracterización rápida y específica en grandes colecciones de cepas. Una clase de PCR, es la denominada PCR con un sólo oligonucleótido en baja astringencia (LSSP-PCR), la cual es útil para de-

tecar cambios en la secuencia de DNA dentro de un multibandeo denominado, señal genética. Esta técnica ha tenido aplicaciones en la detección de enfermedades genéticas humanas y en la tipificación genética de agentes infecciosos (Pena *et al.*, 1994; Villa *et al.* 1995; Barreto *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1997; Vago *et al.*, 1996, 2000; Ferreira *et al.*, 2007; Márquez *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2009).

Se ha realizado búsqueda de nuevas cepas de *Bt* portadoras de nuevos genes *cry*, con el fin de descubrir proteínas con un nuevo espectro de acción y toxicidad sobre diferentes insectos plaga, que podrían ser útiles en el manejo de aparición de resistencia. Es importante identificar nuevas toxinas que logren ser utilizadas apropiadamente en combinación con otras toxinas de *Bt* para el control de diferentes insectos plaga y de esta manera retrasar la aparición de resistencia. Algunas cepas portadoras de los genes *cry1B* se han sugerido como herramientas para un control efectivo y manejo de resistencia de muchas especies de insectos plaga lepidópteros importantes agrónomicamente, como *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella*, *Lymantria dispar*, *Diatrea saccharalis* y *Chilo suppressalis* (Chambers *et al.* 1991, Fiuza *et al.* 1996, Tang *et al.* 1996, Peyronnet *et al.* 1997, Bohorova *et al.* 1997, Monnerat *et al.* 2006). La presencia del gen *cry1B* junto a otros genes *cry*, se ha relacionado con un aumento en la toxicidad debido a que se une a receptores diferentes del intestino medio de las larvas (Peyronnet *et al.* 1997, Luo *et al.* 1999). Igualmente, las cepas portadoras del gen *cry1B* se han evaluado como una fuente de nuevas proteínas para ampliar el espectro de acción debido a su actividad dual contra órdenes de insectos Lepidóptera y Coleóptera (Bradley *et al.* 1995, Zhong *et al.* 2000, Rosas *et al.* 2004).

El objetivo de este estudio fue evaluar molecularmente mediante LSSP-PCR 164 aislamientos nativos colombianos con el fin de determinar la presencia de genes *cry1B* e identificar polimorfismos. Cepas que contengan genes *cry1B* con polimorfismos podrían producir nuevas proteínas insecticidas que permitirán ampliar

el espectro de acción de los insecticidas basados en *Bt* o ampliar su uso para la producción de plantas transgénicas resistentes al ataque de insectos lepidópteros plaga.

## **Materiales y métodos**

### **Cepas de *B. thuringiensis***

Se utilizaron 164 aislamientos de *Bt* aislados a partir de muestras de suelo del Centro y Caribe colombiano. Se empleó como control en la amplificación y ensayo biológico, la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai* HD137, la cual fue donada por la unidad de biotecnología y control biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas (Medellín, Antioquia). Todas las cepas fueron cultivadas en medio Luria Bertani durante 7 días a 30°C y se verificó la presencia de esporas y cristales paraesporales mediante observación microscópica (Olympus E-600) con tinción safranina-verde de malaquita. Estas cepas se criopreservaron a -20°C en glicerol al 30% (v/v).

### **Extracción de DNA plasmídico y amplificación del gen *cry1* mediante PCR**

La extracción de DNA plasmídico se realizó utilizando el método de Kotchoni *et al.*, (2003) y se visualizó en gel de agarosa al 1% (Sambrook *et al.*, 2001). Las cepas nativas de *Bt* fueron caracterizadas molecularmente para determinar la presencia de genes *cry1* mediante PCR utilizando oligonucleótidos generales diseñados previamente (Bravo *et al.*, 1998). Los productos de amplificación de aproximadamente 550 pb se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### **Diseño de oligonucleótidos para el gen *cry1B***

Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para el gen *cry1B* que amplificaran una región variable de aproximadamente 1000 pb considerando 11 secuencias nucleótídicas del gen *cry1B* publicadas en la base de datos de GenBank. Se realizó alineamiento de las secuencias con el programa ClustalW (EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson *et al.*, 1994) para determinar regiones variables representativas del gen. Con esta región y utilizando el programa Primer3 (HHMI; [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (Rozen & Skaletsky, 2000) se generaron varios oligonucleótidos candidatos, de los cuales se seleccionó un par que se analizó con el programa BLASTN para determinar su especificidad (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial Invitrogen (USA).

### **Amplificación del gen *cry1B* mediante PCR**

Las reacciones de PCR para identificar genes *cry1B*, se realizaron con los oligonucleótidos específicos diseñados y bajo las siguientes condiciones: 0.5 pmol de oligonucleótidos, 0.2 mM de dNTPs, 1X Buffer PCR (20 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 1 U de Taq DNA polimerasa, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 50 ng de DNA. El programa utilizado fue: 95°C por 5 m, 35 ciclos de 94°C por 1 m, 52°C por 1 m, 72°C por 1 m y una extensión final a 72°C por 6 m. El producto de amplificación se analizó en gel de agarosa al 1% (Sambrook *et al.*, 2001).

### **Amplificación del gen *cry1B* mediante LSSP-PCR**

La banda del producto del gen *cry1B*, se recuperó a partir de un gel de agarosa al 1% (p/v) y se disolvió en una proporción 10:1 con agua destilada desionizada estéril para obtener una dilución de DNA. 3 µL de esta mezcla se utilizó como DNA molde para la reacción de LSSP-PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, utilizando 5 pmol de un sólo oligonucleótido (directo y/o reverso), 0.2 mM de dNTPs, 1X PCR Buffer (20 mM de Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 4 U de Taq DNA polimerasa, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. El programa utilizado fue: 94°C por 5 m, 35 ciclos de 94°C por 1 m y 40°C por 1 m. El producto de amplificación se analizó en gel de poliacrilamida al 6% (p/v) y se tiñó con nitrato de plata (Sambrook *et al.*, 2001).

### **Análisis de los geles**

Los perfiles de las cepas se analizaron cualitativamente mediante la observación de los geles y utilizando el programa ImageJ (Rasband W.S., U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2007). Este programa genera electroferogramas, en los cuales la altura del pico indica la presencia de la banda, y el ancho su intensidad. Con las bandas identificadas se construyó una matriz de presencia o ausencia. La matriz se analizó utilizando el programa NTSYS (Rohlf, 1999). Entre los perfiles de bandas se calculó el grado de similitud mediante el coeficiente de Dice (Dice, 1945) y a partir de la matriz de similaridad se construyó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath and Sokal, 1973). También se evaluó la consistencia de los agrupamientos representados en el dendograma, para lo cual se determinó el valor de correlación entre la matriz de los valo-

res cofenéticos de los datos de similaridad y la misma matriz de similaridad.

### **Secuencia nucleotídica**

Un fragmento amplificado del gen *cry1B* de la cepa *BtGC120* se purificó y secuenció, en un secuenciador automatizado (ABI Prism 310, APPLIED BIOSYSTEMS). La secuencia, se comparó con las publicadas en la base de datos de GenBank utilizando los programas BLASTN y BLASTX (Altschul *et al.*, 1997). Posteriormente, se realizó un alineamiento con el fragmento homólogo de las 11 secuencias del gen *cry1B* publicadas en GenBank, mediante el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) (EMBL -EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y se construyó un dendograma con el programa Phylip, a partir de las distancias evolutivas de pares de bases utilizando el método de *Neighbour-Joining* (Saitou and Nei, 1987) y su confiabilidad se estimó con el método de bootstrap con 1000 repeticiones.

### **Bioensayos**

La cepa de referencia *Bt subsp. aizawai* HD137 y el aislamiento nativo que presentó perfil de LSSP-PCR más variable, se incubaron en agar LB a 30°C por 7 días. A partir de este cultivo se preparó un extracto crudo de esporas y cristales en agua destilada desionizada estéril. La proteína total se cuantificó utilizando el método de Bradford (1976). Las concentraciones se ajustaron en un rango entre 0 y 1500 ng/cm<sup>2</sup>, empleando 6 dosis con una diferencia de 250 ng/cm<sup>2</sup> cada una. Se utilizó un testigo absoluto sin tratamiento. Los ensayos biológicos se realizaron sobre larvas del primer instar de *S. frugiperda*, las cuales se habían colectado de un cultivo de maíz ubicado en el Municipio de El Espinal, Tolima, Colombia. La cría se mantuvo bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 25 +/- 3°C y 65 +/- 5% de humedad relativa. La aplicación de los tratamientos se realizó por el método de contaminación superficial propuesto por Aranda y colaboradores (1996), con un volumen de 400 µl de cada tratamiento sobre el haz y el envés de recortes de hojas de higuera (*Ricinus communis*) de 15 cm<sup>2</sup>, desinfectadas previamente con NaClO al 0.5% y tres enjuagues en agua destilada estéril por 5 minutos cada uno. Posteriormente, se ubicó una toalla de papel húmeda estéril en recipientes plásticos y sobre ésta la hoja de higuera con el tratamiento aplicado y una larva de primer instar de *S. frugiperda* proveniente de la cría del laboratorio.

Se evaluaron tres repeticiones del experimento cada uno con 25 larvas de primer instar. Estas se alimenta-

ron durante 96 horas y se evaluó la mortalidad cada 24 horas. Los datos obtenidos en el bioensayo se analizaron para estimar la CL<sub>50</sub> con un límite de confiabilidad del 95%, empleando el análisis estadístico de regresión logarítmico Probit del programa POLO-PC (Finney, 1971).

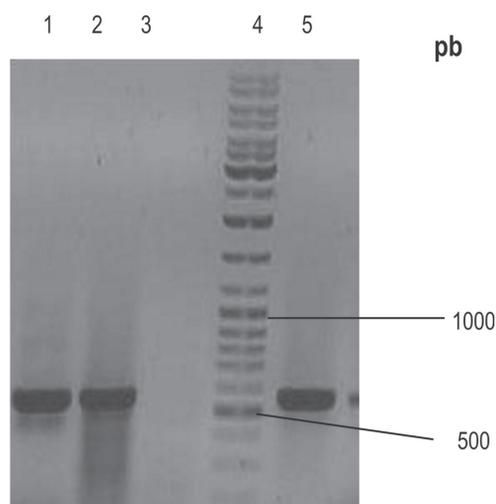
### **Resultados y discusión**

Los 164 aislamientos nativos de bacilos esporulados se evaluaron de acuerdo a la capacidad para producir cristales paraesporales mediante la tinción diferencial safranina-verde de malaquita. Se observaron diferentes formas y cantidades de cristales paraesporales, la forma más común fue la bipiramidal pero se observaron cristales redondos, ovalados y triangulares. La mayoría de cepas presentaron menos de 10 cristales por campo óptico (65%), otras presentaron de 10 a 20 (27%) y solo unas pocas mostraron más de 20 cristales (8%). Es bien conocida la importancia de la caracterización de los cristales debido a su naturaleza proteica, la cual se ha relacionado con la actividad biopesticida potencial de las cepas (Schnepf *et al.* 1998; Hernández *et al.*, 2010).

Se obtuvo DNA plasmídico de los 164 aislamientos nativos y se utilizó para la amplificación por PCR de un fragmento de genes *cry1*. Esta caracterización permitió identificar 70 aislamientos nativos positivos para la presencia de genes *cry1*, los cuales representan un 46% del total de los aislamientos (figura 1). Estos resultados fueron consistentes con estudios previos en los cuales se publicó para el gen *cry1* una frecuencia con un rango entre 40 y 70% (Bravo *et al.*, 1998; Uribe *et al.*, 2003; Porcar *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2010).

### **Diseño de oligonucleótidos y amplificación del gen *cry1B* mediante PCR**

Los genes *cry* poseen regiones conservadas y variables que son reflejo de la estructura aminoácidica que ellos codifican, específicamente las toxinas Cry1 presentan 5 bloques conservados separados por secuencias de diferente longitud con alta variabilidad (Hofte y Whiteley, 1989; De Maagd *et al.*, 2003; Hussain *et al.*, 2010). Se realizaron alineamientos con el programa ClustalW (EMBL -EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (Thompson *et al.*, 1994) de once secuencias de los genes *cry1B* provenientes de NCBI (tabla 1), y se seleccionó una región variable codificante ubicada entre los bloques conservados 1 y 3 de la secuencia aminoácidica, siendo esta región útil para el diseño de oligonucleótidos y el subsiguiente análisis por LSSP-PCR. Además, esta región aminoácidica tiene importancia en la función



**Figura 1.** Productos amplificados por PCR para el gen *cry1* utilizando primers generales. Se observa una banda de 550 pb obtenida para la presencia del gen *cry1*. 1. *Bt subsp. aizawai*, 2. BtGC14, 3. Control negativo, 4. Marcador 1 kb (Bioioine, USA), 5. BtGC15. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Subgrupos de genes *cry1B* reconocidos con los oligonucleótidos diseñados

Gen identificado	Tamaño del gen (pb)	Posición de los oligonucleótidos	Producto PCR (pb)	Número de acceso Genbank
<i>cry1Ba1</i>	3687	533 - 1462	930	X06711
<i>cry1Ba2</i>	4074	718 - 1647	930	X95704.1
<i>cry1Ba3</i>	3687	533 - 1462	930	AF368257
<i>cry1Ba4</i>	4798	953 - 1882	930	AF363025
<i>cry1Bb1</i>	3934	614 - 1546	933	L32020.1
<i>cry1Bc1</i>	3842	688 - 1620	933	Z46442
<i>cry1Bd1</i>	8366	1389 - 2321	933	U70726.1
<i>cry1Bd2</i>	3696	546 - 1480	933	AY138457.1
<i>cry1Be1</i>	3684	-	-	AF077326
<i>cry1Bf1</i>	3687	-	-	AX189649
<i>cry1Bg1</i>	3708	-	-	AY176063

de reconocimiento y unión a receptores localizados en el intestino medio de insectos susceptibles, lo cual es un determinante en la especificidad de la toxina (De Maagd *et al.* 1999; Hussain *et al.*, 2010).

Cuando se analizaron los oligonucleótidos con el programa BLASTN (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), se determinó una mayor similitud con los genes *cry1B* de *Bt* que con otros microorganismos que podrían ser detectadas potencialmente. Los

oligonucleótidos específicos se nombraron CRY1BF directo (5'-TGGTATATGCTCAAGCTGCAA-3') y CRY1BR reverso (5'-CACTACGATGCGTCCAAGAA-3').

Para obtener buenos perfiles en la LSSP-PCR se debe tener una concentración de DNA entre 50 y 150 ng aproximadamente (Pena *et al.* 1994, Wannia *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006). Por esto, se hizo necesario optimizar la reacción de PCR para amplificar el fragmento del gen *cry1B* de 930 pb, utilizando primero la

variable temperatura de anillaje y luego se procedió a estandarizar las condiciones correspondientes a las concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, oligonucleótidos y DNA plasmídico (resultado no presentado).

Se confirmó la especificidad de los oligonucleótidos diseñados, CRY1BF y CRY1BR, al obtener amplificaciones con la cepa *B. thuringiensis subsp. aizawai*, la cual contiene el gen *cry1B*, y no se presentó amplificación con otros genes *cry*, como los de las cepas *B. thuringiensis subsp. kurstaki* y *B. thuringiensis subsp. israeliensis*. Por lo tanto, estos oligonucleótidos permitieron la detección del gen *cry1B* en forma específica.

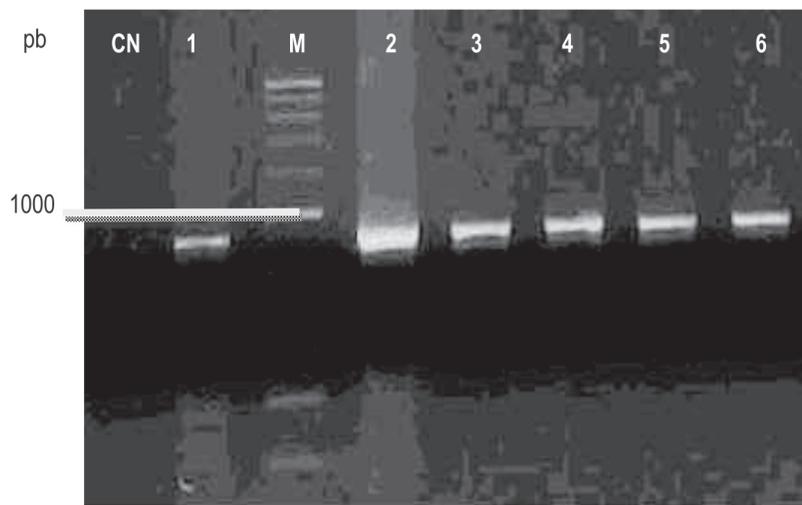
Se evaluaron los 70 aislamientos nativos caracterizados previamente para el gen *cry1*, bajo condiciones estandarizadas para la reacción de PCR utilizando el par de oligonucleótidos diseñados que amplifican el fragmento del gen *cry1B*. Las amplificaciones resultaron en una banda única y de buena intensidad (figura 2). La reproducibilidad se evaluó realizando al menos tres veces la PCR para cada una de los aislamientos bajo las mismas condiciones, instrumentos y reactivos y siempre se obtuvo idénticos resultados.

Se amplificó un fragmento de 930 pb en 11 aislamientos nativos positivos para la presencia del gen *cry1B*, los aislamientos BtGC14, BtGC36, BtGC82, BtGC91, BtGC94, BtGC102, BtGC112, BtGC120, BtGC130, BtGC207 y BtGC240, los cuales representan un 16% de los 70 aislamientos que amplificaron previamente un fragmento del gen *cry1* (figura 2). Estos resultados fueron similares a estudios en las colecciones de cepas

de México, España, Reino Unido y Colombia, en los cuales el porcentaje de aislamientos portando el gen *cry1B* es bajo (30, 13, 17 y 35% respectivamente) (Cerrón *et al.* 1995; Perani *et al.* 2000; Martínez *et al.* 2005; Hernández *et al.*, 2010).

### **LSSP-PCR de los fragmentos amplificados del gen *cry1B***

Desde principios de los 90's, se desarrollaron diferentes herramientas moleculares con la capacidad de detectar variaciones en la secuencia de DNA, obviamente la secuenciación es el método más sensible e informativo, pero para caracterizar grandes colecciones de microorganismos es importante generar metodologías rápidas y eficientes que puedan utilizarse rutinariamente. La técnica denominada PCR con un sólo oligonucleótido en baja astringencia (LSSP-PCR por sus siglas en inglés: low stringency single primer-PCR), fue propuesta por varios investigadores por su sensibilidad, especificidad y capacidad de detección de cambios en una secuencia de nucleótidos de longitud de por lo menos 1000 pb (Pena *et al.*, 1994). Con la LSSP-PCR, se traslada la secuencia de DNA a un multibandeo denominado: señal genética. Cambios tan pequeños como mutaciones en una base alteran significativamente la señal produciendo un fenotipo que es diagnóstico de la alteración en particular (Pena *et al.*, 1994; Villa *et al.*, 1995; Barreto *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1997; Vago *et al.*, 2000; López *et al.*, 2006). De esta manera es posible identificar cambios en la



**Figura 2.** Productos amplificados por PCR del gen *cry1B* utilizando primers específicos. Se observa una banda de 930 pb indicativa de la presencia del gen *cry1B*. CN Control negativo, 1. *Bt subsp. aizawai*, M Marcador 1 Kb (Bioline, USA), 2. BtGC14, 3. BtGC36, 4. BtGC82, 5. BtGC91, 6. BtGC94. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

**Tabla 2.** Tamaño de los productos de LSSP-PCR para el gen *cry1B* utilizando el oligonucleótido directo, CRY1BF.

Cepa	Tamaño de los fragmentos de LSSP-PCR (pb)
<i>B. thuringiensis subsp. aizawai</i>	250*, 275*, 290, 310*, 350, 400, 420, 430, 435, 450*, 630
BtGC207	205, 245*, 270*, 285, 310*, 345, 450*, 500, 610. (12)
BtGC14	250*, 275*, 290, 310*, 350, 400, 420, 450*. (3)
BtGC36	215*, 240, 250, 275*, 290*, 310*, 350, 400, 450*, 630. (5)
BtGC82	215*, 250, 265*, 275, 285*, 365, 410, 420, 445, 450*, 610, 630. (13)
BtGC91	250*, 275*, 310, 350, 400, 420, 430, 450*. (3)
BtGC102	250*, 275*, 310, 350, 400, 420, 450*, 640*. (5)
BtGC112	205*, 250*, 275*, 290, 310*, 350, 400, 450*. (5)
BtGC240	210, 250*, 275*, 290, 310, 350, 450*. (6)
BtGC130	240, 250, 275*, 290, 310, 350, 405, 450*. (7)
BtGC94	215, 265*, 305, 310*, 350, 355, 400*, 410, 420*, 450, 455*. (12)
BtGC120	240*, 300*, 315, 360, 395, 430*, 575*, 590*, 610, 630. (17)

\* Representa el fragmento con mayor concentración de amplificación

( ) diferencias (presencia o ausencia de banda) en el perfil electroforético de LSSP-PCR para cada aislamiento nativo con respecto a la cepa de referencia.

secuencia de genes específicos relacionados con funciones relevantes.

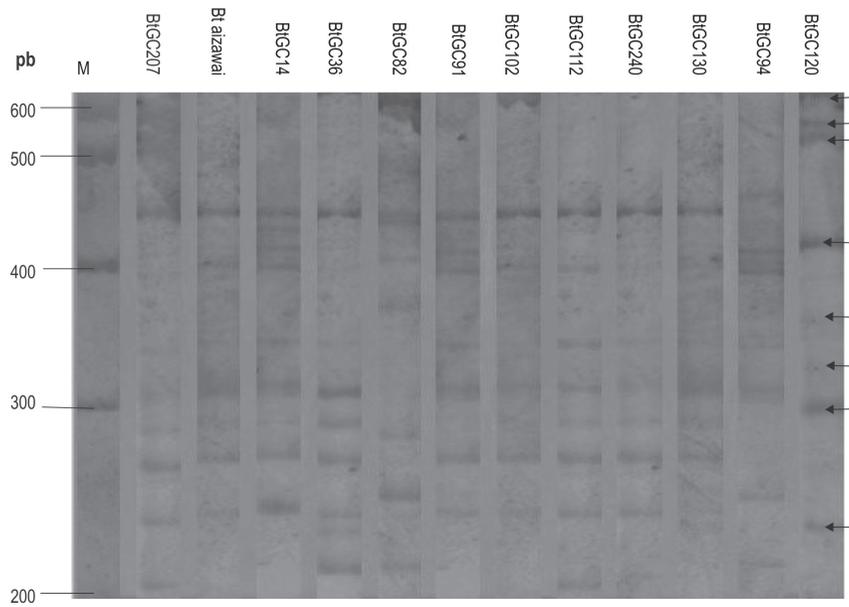
El gen *cry1B* de *Bt* ha sido clasificado de acuerdo a su secuencia aminoácidica codificada en 7 subgrupos (desde *cry1Ba1* hasta *cry1Bg1*) mostrando una variación grande ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), 2011).

Por esta razón, en este estudio se analizaron por LSSP-PCR los productos de amplificación de los genes *cry1B* de los 11 aislamientos nativos de *Bt*, con el fin de determinar la variación en el perfil electroforético que indicará la presencia de polimorfismos en la secuencia nucleotídica al compararlo con la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai*.

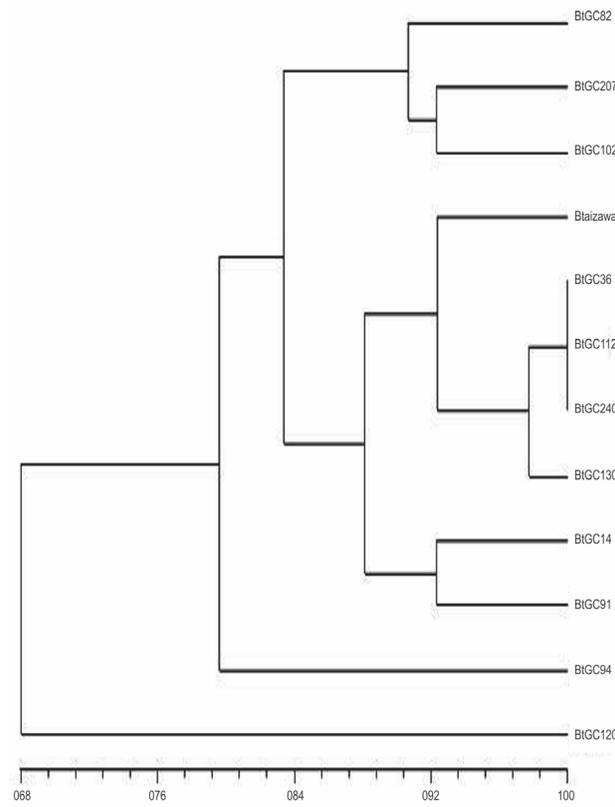
La LSSP-PCR con el oligonucleótido directo, CRY1BF presentó perfiles que variaron desde 7 hasta 12 bandas, con pesos entre 200 y 600 pb. La cepa de referencia presentó un perfil electroforético que consistió en 11 bandas (figura 3, tabla 2). Los aislamientos nativos presentaron perfiles similares pero con diferencias, algunos con ausencia o presencia de otras bandas y variación en la intensidad de las mismas. Se observó una gran variabilidad al no presentarse perfiles idénticos al de la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai*

(figura 3, tabla 2). El dendograma obtenido para los perfiles de LSSP-PCR con este análisis mostró la presencia de 10 agrupamientos, de los cuales únicamente uno comprende 3 aislamientos con un 99% de similitud: BtGC36, BtGC112 y BtGC240 y los 9 restantes están formados por un solo aislamiento (figura 4). El valor de correlación cofenética global calculado fue 0.98, indicando un buen nivel de confiabilidad. La figura 4 muestra la presencia de 2 subgrupos, el primero se divide en dos ramas, una rama con similitud de 83%, que corresponde a los aislamientos BtGC82, BtGC207, BtGC102, la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai*, BtGC36, BtGC112, BtGC240, BtGC130, BtGC14, BtGC91 y la segunda rama con una similitud de 79%, que corresponde al aislamiento BtGC94. Al segundo subgrupo sólo pertenece el aislamiento BtGC120, con una similitud de 68% con respecto a los demás aislamientos. Esta baja similitud del producto amplificado del aislamiento BtGC120 lo identificó como el fragmento más variable del gen *cry1B* entre los 11 aislamientos evaluados (figura 3).

Los perfiles electroforéticos obtenidos cuando se amplificó por LSSP-PCR utilizando el oligonucleótido reverso, CRY1BR, presentaron fragmentos que variaban en tamaño desde 190 a 800 pb. El perfil electroforéti-



**Figura 3.** Perfil de LSSP-PCR utilizando el oligonucleótido directo, CRY1BF. Se presentan los patrones obtenidos con los 11 aislamientos nativos de *B. thuringiensis*, utilizando el oligonucleótido CRY1BF. Las flechas indican las bandas diferenciales (de arriba abajo: 640, 630, 355, 340, 280, 240 pb), que posee el aislamiento nativo BtGC120 con respecto al patrón de bandas de la cepa de referencia. M marcador de tamaño molecular 1 kb (Bioline, USA). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % con tinción de nitrato de plata.



**Figura 4.** Dendrograma de los perfiles de LSSP-PCR utilizando el oligonucleótido directo, CRY1BF. Se indica la posición de la cepa de referencia *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* comparada con los perfiles electroforéticos obtenidos de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. La correlación cofenética para el dendrograma fue de 0.98. Análisis de similitud genética UPGMA, utilizando el coeficiente de Dice.

co de LSSP-PCR para la cepa *Bt subsp. aizawai* consistió en 8 bandas aproximadamente de 210, 230, 310, 390, 400, 510, 520 y 800 pb. Los perfiles generados para cada uno de los amplificados para los 11 aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* presentaron bandas con menor intensidad y su número fue limitado (de 3 a 8) (figura 5 y tabla 3). Los aislamientos nativos BtGC94 y BtGC240 presentaron idéntico perfil a la cepa de referencia (figura 5, tabla 3).

El dendograma obtenido para los perfiles de LSSP-PCR con el oligonucleótido reverso reveló la misma tendencia que el obtenido con el oligonucleótido directo, puesto que se muestra la presencia de 10 agrupamientos, de los cuales 8 están formados cada uno por un sólo aislamiento y los dos restantes por dos aislamientos con un 99% de similaridad (BtGC130 con BtGC36 y BtGC240 con BtGC112) (figura 6). El valor de correlación cofenética global calculado fue de 0.97, indicando un buen nivel de confiabilidad. En la figura 6, se muestra la presencia de 2 subgrupos, el primer subgrupo se divide en dos ramas, la primera con una similaridad de 52%, que corresponde a los aislamientos BtGC94, BtGC207, BtGC102, BtGC14 y BtGC91 y la segunda con una similaridad de 43%, que corresponde al aislamiento BtGC120. De todos

los aislamientos de este subgrupo, BtGC120 presentó la menor similaridad con respecto a los demás, lo cual significa que este produce el perfil más divergente del gen *cry1B* (figuras 4 y 6). El segundo subgrupo se divide en dos ramas, una primera rama con una similaridad de 64%, la cual corresponde a la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai* y 4 aislamientos muy similares entre ellos (BtGC130, BtGC36, BtGC240 y BtGC112) y la segunda rama con una similaridad de 58%, la cual corresponde al aislamiento BtGC82.

Al utilizar la técnica LSSP-PCR, el oligonucleótido directo fue más informativo que el oligonucleótido reverso porque permitió distinguir los aislamientos nativos debido a que evidenció mayor número de bandas polimórficas (figuras 3 y 5), siendo este resultado consistente con estudios previos en los cuales se encontró mayor número de perfiles al utilizar uno de los dos oligonucleótidos (Pena *et al.*, 1994; Vago *et al.*, 2000; López *et al.*, 2006).

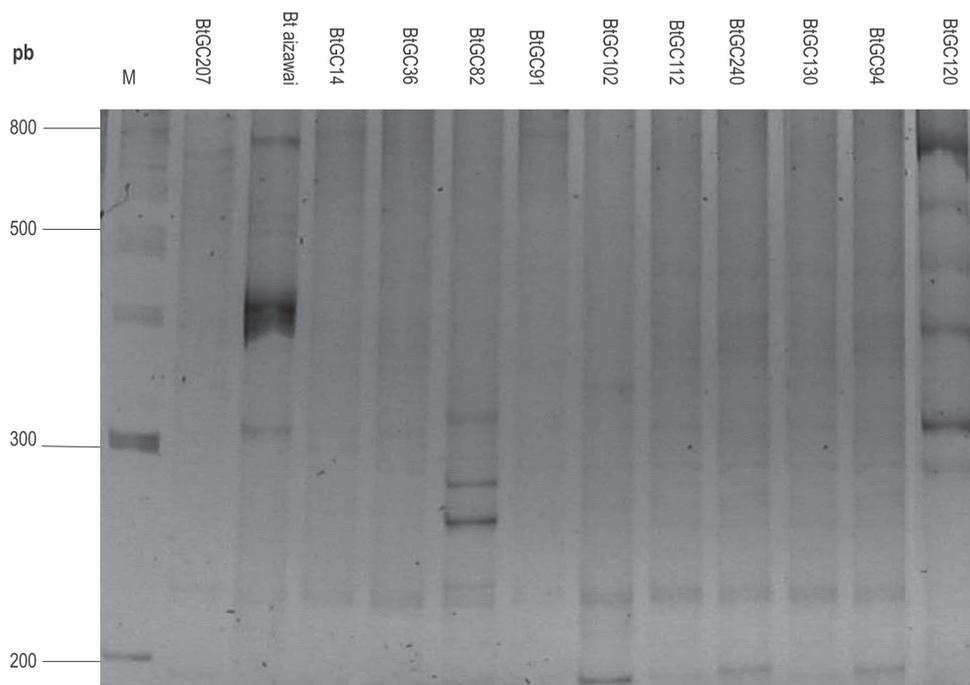
Para seleccionar los aislamientos nativos de *Bt* que portaran variaciones en la secuencia, se tuvo como criterio la presencia de un menor porcentaje de similaridad en los dendogramas deducidos de los perfiles de LSSP-PCR con cada uno de los dos oligonucleótidos

**Tabla 3.** Productos de LSSP-PCR para el gen *cry1B* utilizando el oligonucleótido reverso, CRY1BR.

Cepa	Longitud de los fragmentos de LSSP-PCR (pb)
<i>B. thuringiensis subsp. aizawai</i>	210, 230*, 310*, 390, 400*, 510, 520, 800*
BtGC207	190, 230, 310, 650, 750. (7)
BtGC14	230, 300, 310. (7)
BtGC36	230, 310, 360, 380. (8)
BtGC82	230*, 235, 250*, 270*, 320. (10)
BtGC91	230, 280, 800. (7)
BtGC102	190*, 230*, 250, 280, 310, 340. (10)
BtGC112	190, 230*, 250, 280, 310, 380, 450. (10)
BtGC240	200*, 230*, 280, 310, 380, 450. (10)
BtGC130	190, 230*, 280, 310, 380, 450. (10)
BtGC94	200*, 230*, 280, 310, 380, 450. (10)
BtGC120	280, 315*, 390*, 450*, 550*, 800*. (10)

\* Representa el fragmento con mayor concentración de amplificación

() diferencias (presencia o ausencia de banda) en el perfil electroforetico de LSSP-PCR para cada aislamiento nativo con respecto a la cepa de referencia.



**Figura 5.** Perfil de LSSP-PCR utilizando el oligonucleótido reverso, CRY1BR. Se presentan los patrones obtenidos con los 11 aislamientos nativos de *B. thuringiensis*, utilizando el oligonucleótido CRY1BR. M marcador de tamaño molecular 1 kb (Bioline, USA). Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 % con tinción de nitrato de plata.

**Tabla 4.** Concentración letal media de las cepas BtGC120 y *B. thuringiensis subsp. aizawai*.

Cepas	Concentración letal media (CL <sub>50</sub> ) (ng/cm <sup>2</sup> )	Intervalo de confianza al 95 %	
		Inferior (ng/cm <sup>2</sup> )	Superior (ng/cm <sup>2</sup> )
<i>Bt subsp. aizawai</i>	1685	1366	1922
Cepa nativa BtGC-120	1896	1523	2185

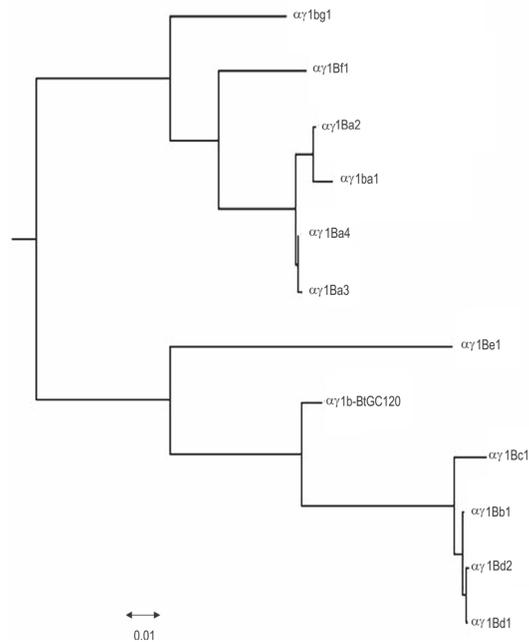
evaluados. Los aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* BtGC82, BtGC94 y BtGC120 presentaron la mayor variación entre sus secuencias amplificadas del gen *cry1B* (figuras 3 y 5). Entre estos aislamientos, el producto amplificado del gen *cry1B* de BtGC120 presentó el menor porcentaje de similaridad. Además, los aislamientos nativos que presentaron el menor grado de variación entre sus secuencias, fueron: BtGC130, BtGC36, BtGC240 y BtGC112. Por este motivo se decidió analizar el fragmento amplificado por PCR-LSSP del aislamiento nativo de *Bacillus thuringiensis* BtGC120.

#### Secuencia nucleotídica

Se purificó el producto de amplificación del fragmento del gen *cry1B* del aislamiento BtGC120 y se secuenció

en ambos sentidos en un equipo automatizado ABI Prism 310 (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos diseñados, CRY1BF y CRY1BR, según Sanger *et al.*, (1977). La secuencia obtenida presentó un tamaño de 806 pb y 93% de identidad con los genes *cry1Bc1* de *Bt morrisoni* (GenBank Z46442) y *cry1Bb1* de la cepa BT-EG5847 (GenBank L32020). La similitud entre la secuencia de aminoácidos deducida del aislamiento BtGC120 y la proteína Cry1Bc (GenBank CAA86568.1) se evidenció entre el aminoácido 232 hasta el 464 región 5' terminal del gen. Se confirmó una alta similaridad de la secuencia del fragmento del gen *cry1B* del aislamiento BtGC120 con la región homóloga del gen *cry1Ba1*, de la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai*, encontrándose 148 cambios en la secuencia del aislamiento nativo BtGC120 representadas por 5





**Figura 7.** Dendrograma comparativo de las secuencias parciales de DNA de los genes cry1B de *B. thuringiensis* con BtGC120. Análisis neighbour-joining de 11 secuencias nucleóticas del gen cry1B obtenidas de GenBank, se incluyó la secuencia de BtGC120. Barra= distancia evolutiva de 0.01%.

nando y secuenciando completamente el gen de este aislamiento nativo.

### Bioensayos

Se realizó un análisis de varianza con los datos de la mortalidad acumulada al quinto día de la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai* HD137, en el cual se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de proteína empleadas. En la tabla 4, se presentan los resultados mediante el análisis Probit, mostrando que el valor de la concentración letal media del aislamiento nativo BtGC120 obtenido para larvas de primer instar de *S. frugiperda* fue superior al de la cepa de referencia *Bt subsp. aizawai*. Sin embargo, la prueba de comparación t-student determinó que estas cepas no presentaron diferencias significativas en cuanto a la variable respuesta  $CL_{50}$  ( $t=18$ ,  $gl= 22$ ,  $\alpha=0.05$ ). Esta respuesta sugiere que el aislamiento nativo es virulento y altamente promisorio para el control de larvas de *S. frugiperda* en campo.

Al comparar la  $CL_{50}$  de las cepas BtGC120 y *Bt subsp. aizawai* sobre larvas de primer instar de *S. frugiperda*, se infiere que las modificaciones de la proteína de BtGC120 como consecuencia de los cambios mutacionales posiblemente se encuentran en regiones de la proteína Cry que no producen alteraciones importantes en la interacción con el receptor de *S. frugiperda*.

Este es el primer reporte de la utilización de la técnica LSSP-PCR para la identificación de polimorfismos dentro de los genes cry de Bt, metodología con la cual es posible, evaluar colecciones de esta bacteria para encontrar genes cry diferentes a los descritos en la literatura, y por ende, identificar proteínas con nuevas actividades, o mayor toxicidad sobre insectos plaga de importancia agronómica.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Sergio Orduz por el suministro de la cepa de referencia.

### Bibliografía

- Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Aranda, E., J. Sánchez, M. Peferoen, L. Guereca, and A. Bravo. 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Baptista, C., A. Schubach, M. Madeira, C. Leal, M.Pires, F. Oliveira, F. Conceicao-Silva, C. Rosalino, M. Salgueiro and R. Pacheco. 2009. Leishmania (Viannia) braziliensis genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp. Parasitol.* 121(4): 317-322.

- Bohorova, N.; Cabrera M.; Abarca C.; Quintero R.; Maciel A.; Brito R.; Hoisington D. and Bravo A. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pest to *Bacillus thuringiensis* CryI type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90:412-415.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley, D.; Harkey M.; Kim M.; Biever K. and Bauer L. 1995. The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65(2): 162-173.
- Bravo A., Hendrickx K., Jansens S. and Peferoen M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 247-253.
- Bravo, A.; Sarabia S.; López L.; Ontiveros H.; Abarca C.; Ortiz A.; Ortiz M.; Lina L.; Villalobos F.; Peña G.; Nuñez-Valdez M.; Soboron M. and Quintero R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4965-4972.
- Brito C., M. Lima, O. Sarquis, M. Pires, C. Coutinho, R. Duarte, R. Pacheco. 2008. Genetic polymorphism in Trypanosoma cruzi I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low stringency single specific primer polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 103(5): 1111-1117.
- Cerón, J.; Ortiz A.; Guereca L. and Bravo A. 1995. Specific PCR reaction primers directed to identify cryI and cryIII genes with a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11): 3826-3831.
- Chambers, J.; Jelen A.; Gilbert M.; Jany C.; Johnson T. and Gawron-Burke C. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp.  *aizawai*. *J. Bacteriol.* 173(13): 3966-3976.
- Crickmore Neil. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2012. En: [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). (Consultado el 10 de mayo de 2012).
- De Maagd, R., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-199.
- De Maagd, R., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H. Schnepf. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.
- Dice, L. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology.* 26: 297-302.
- Estela, A., B. Escriche and J. Ferré. 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1378-1384.
- Feitelson J., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology.* 10 (5): 271-275.
- Ferreira G., F. Soares, S. Vasconcellos, E. Rodroques, R. Werkhauser, M. de Brito and F. Abath. 2007. Discrimination of *Leishmania* braziliensis variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J. Parasitol.* 93(3): 712-714.
- Finney, D. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. Cambridge.
- Fiuza, L.; Nielsen-Leroux C.; Goze E.; Frutos R. and Charles J. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins to the midgut Brush Border Membrane Vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1544-1549.
- García - Robles, I., J. Sanchez, A. Gruppe, A. Martínez-Ramírez, C. Rausell, M. Real and A. Bravo. 2001. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Ins. Biochem. Molec. Biol.* 31: 849-856.
- Hernández-Fernández J., L. Ramírez, N. Ramírez, L. S. Fuentes y J. Jiménez. 2010. Molecular and biological characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains for controlling tomato leaf-miner (*Tuta absoluta* Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Colombia. *World J Microbiol Biotechnol.* 27, ( 3): 579-590, DOI: 10.1007/s11274-010-0493-5
- Hofte H. and H. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53 (2): 242-255.
- Hussain Syed-Rehan A., Flórez Álvaro M., Dean Donald H., Alzate Óscar. 2010. Preferential Protection of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa Toxin by Brush Border Membrane Vesicles. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 12 (2): 14-26.
- Kotchoni, S.; Gachomo E.; Betiku E. and Shonukan O. 2003. A home made kit for plasmid DNA mini-preparation. *Afric. J. of biotechnol.* 2(4): 88-90.
- López Pazos Silvio, Javier Hernández Fernández, Jaime Bernal Villegas. 2006. Identificación y secuenciación parcial de un nuevo gen cry1ab en aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* por LSSP-PCR. *El Astrolabio, Revista de Investigación y Ciencia,* 5(2): 14-21.
- Luo, K.; Banks D. and Adang M. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta-endotoxins using border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2): 457-464.
- Márquez D., L. Ramírez, J. Moreno, A. Pedrosa and E. Lages. 2007. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. *Exp. Parasitol.* 117(1): 35-42.
- Martin, P. and Travers, R. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *AEM.* 55: 2437-2442.
- Martinez, C.; Ibarra J. and Caballero P. 2005. Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. *J. Invertebr. Pathol.* 90(2): 91-97.
- Mejía, A., S. Arboleda, I. Rodríguez, C. Cura, A. Salazar, J. del Mazo, O. Triana and A. Schijman. 2009. Geographical clustering of *Trypanosoma cruzi* I groups from Colombia revealed by low stringency single specific primer PCR of the intergenic regions of spliced leader genes. *Parasitol. Res.* 104(2): 399-410.

- Monnerat, R.; Martins E.; Quiroz P.; Ordúz S.; Jaramillo G.; Benintende G.; Cozzi J.; Real M.; Martínez-Ramírez A.; Rausell C.; Cerón J.; Ibarra J.; Del Rincón-Castro M.; Espinoza A.; Meza-Basso L.; Cabrera L.; Sánchez J.; Soberon M. and Bravo A.. 2006. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11): 7029-7035.
- Pena, S.; G. Barreto; A. Vago; L. De Marco; F. Reinach; E. Días Neto and A. Simpson. 1994. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1946-1949.
- Perani, M.; Bishop A. and Vaid A. 1998. Prevalence of  $\beta$ -exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160(1):55-60.
- Peyronnet, O.; Vachon V.; Brousseau R.; Baines D.; Schwartz J. and Laprade R. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(5): 1679-1684.
- Porcar, M. and Juárez-Pérez V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(5):419-32.
- Rasband, W. ImageJ 1.29x. National Institute of Health USA. (Consultado 2007 enero). Disponible en: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software: Setauket, N.Y.
- Rosas-García, N.; Pereyra B.; Arevalo K.; Galn-Wong L. and Morales L. 2004. Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains against the sugarcane borer *Diatrea saccharalis*. *Biocontrol.* 49(4): 455-465.
- Rozen, S. and Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J.; Russell, D. and Sambrook, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. and Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Sneath, P. and R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. *Nature.* 193: 853-860.
- Tang, J.; Shelton A.; Van Rie J.; De Roeck S.; Moar W.; Roush R. and Peferoen M. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2): 564-569.
- Thompson, J., D. Higgins and T. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Uribe, D. 2004. Ecología y distribución de *Bacillus thuringiensis*. Pp. 101-122 *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. (eds). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Uribe, D.; Martínez W. and Cerón J. 2003. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J. Invertebr. Pathol.* 82(2): 119-127.
- Vago, A., L. Andrade, A. Leite, D. d'Ávila Reis, A. Macedo, S. Adad, S. Tostes Jr., M. Moreira, G. Filho and S. Pena. 2000. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease. Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs. *American Journal of Pathology.* 156(5): 1805-1809.
- Wania S. Carvalho; Silvana Spindola de Miranda; Kátia M. Costa; José G.V.C. Araújo; Claudio J. Augusto; João B. Pesquero; Jorge L. Pesquero; Maria A. Gomes. 2003. Low-Stringency Single-Specific-Primer PCR as a Tool for Detection of Mutations in the *rpoB* Gene of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 ( 7): 3384-3386,.
- Xu Z.; B. Yao; M. Sun and Z. Yu. 2004. Protection of mice infected with *Plasmodium berghei* by *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Parasitol. Res.* 92: 53-57.
- Zhong, C.; Ellar D.; Bishop A.; Johnson C.; Lin S. and Hart E. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.* 76:131-139.