

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PRODUCCION DE CEPAS DE BACILLUS
THURINGIENSIS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA MODIFICADA

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

Q.B.P. GUILLERMO RENE CUELLAR GOMEZ

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

TM

QR82

.B3

C8

C.1



1080072441

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



SELECCIÓN DE CEPAS DE BACILLUS
THURINGIENSIS CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA MODIFICADA

T E S I S

REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

GUILLERMO RENE CUELLAR GOMEZ

M. A. TORRES, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

TM
QR 82
• B3
C 8



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**PRODUCCIÓN DE CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CON ACTIVIDAD
BIOLÓGICA MODIFICADA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

PRESENTA

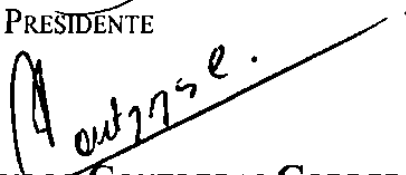
Q.B.P. GUILLERMO RENÉ CUELLAR GÓMEZ

COMISION DE TESIS



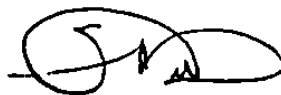
DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ

PRESIDENTE



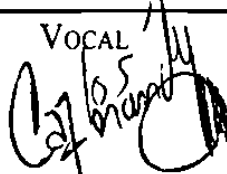
M.C. JUAN FRANCISCO CONTRERAS CORDERO

SECRETARIO



DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG

VOCAL



DR. CARLOS EDUARDO HERNÁNDEZ LUNA

SUPLENTE

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE
MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA. FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS/UANL BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ**

*No hay,
no existe.
obra propia
ni o-ri-gi-nal...*

Miguel Angel Asturias

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	1
Indice de Figuras	3
Indice de Tablas	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Resumen	7
Introducción	8
Hipótesis	11
Objetivo General	11
Objetivos Especificos	11
Antecedentes	12
♦ Plásmidos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
♦ Conjugación	15
Material y Métodos	18
♦ Cepas, medios de cultivo y pruebas de sensibilidad a antibióticos	18
♦ Conjugación	19
♦ Determinación del patrón de proteínas	19
♦ Inmunodetección	20
♦ Determinación del Patron de Plásmidos	20
♦ Análisis de PCR de las cepas transcripiendo	20
♦ Bioensayos	20
Resultados	22
♦ Sensibilidad a antibióticos y obtención de mutantes espontaneas	22
♦ Selección de transconjugantes	23
♦ Análisis de proteínas del cristal	24
♦ Determinación del perfil de plásmidos	29
♦ Análisis de PCR de transconjugantes	32
♦ Determinación de actividad biológica de los cristales	34

Discusión	37
♦ Obtención de Cepas Transconjugantes	37
♦ Cambios en Morfología del Cristal	39
♦ Flujo Genético	40
♦ Modificación de la Toxicidad en las Cepas Transconjugantes	43
Conclusiones	46
Literatura Citada	47
Apéndice A. Medios de Cultivo	56
Apéndice B. Soluciones	58
Apéndice C. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	63
Apéndice D. Fotografiado de los geles de agarosa	65
Apéndice E. Soluciones para electroforesis en geles de Tris/Glicina SDS-Poliacrilamida	67
Apéndice F. Movilidad del ADN (Lineal de doble cadena) durante la electrofóresis en geles de agarosa y poliacrilamida según el porcentaje del gel	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados Celsius
cm ²	Centímetro cuadrado
col.	y colaboradores
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ng	Nanogramos
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
X	Número de veces la concentración con respecto a la de trabajo
l	Litro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
mm	Milímetros

mA	Miliamperios
V	Voltios
kV	Kilovoltios
W	Ohms
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pH	Potencial de hidrógeno
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
lb/pulg2	Libras por pulgada cuadrada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Buffer Tris-Acetatos-EDTA
TBS	Buffer Tris-Boratos
kDa	Kilodaltons
MDa	Megadaltons
U	Unidades

INDICE DE FIGURAS

No. de Figura	Título	Página
1	Morfología del cristal de las cepas nativas y transconjugantes.	25
2	Perfil de proteínas e inmunodetección del cristal de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 como receptora.	26
3	Perfil de proteínas e inmunodetección del cristal de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-7 como receptora.	27
4	Perfil de proteínas e Inmunodetección del cristal de la cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-10 como receptora.	28
5	Perfil de plásmidos de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 como receptora.	30
6	Perfil de plásmidos de transconjugantes obtenidas con la cepa GM-7 como receptora.	30
7	Perfil de plásmidos de transconjugantes obtenidas con la cepa GM-10 como receptora.	31
8	Identificación de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 utilizando los iniciadores para <i>cry 7Aa</i> .	32
9	Identificación del dominio I de <i>cry 1Ac</i> de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33.	33
10	Identificación del dominio III de <i>cry 1Ac</i> de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33.	34

INDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Título	Página
1	Algunas bacterias patógenas contra diversos ordenes de insectos.	8
2	Plásmidos encontrados en diversos serotipos de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	13
3	Bacterias que se utilizaron en este estudio.	18
4	Características de iniciadores utilizados en las mezclas de reacción.	31
5	Determinación de la sensibilidad de diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. sphaericus</i> a diversos antibióticos.	22
6	Antibióticos utilizados en la selección de cepas de <i>B. thuringiensis</i> transconjugantes.	23
7	Relación y morfología del cristal de las diferentes cepas obtenidas por conjugación de <i>B. thuringiensis</i> .	24
8	Toxicidad de las cepas nativas y transconjugantes contra <i>Trichoplusia ni</i> .	35
9	Comparación de toxicidad entre las cepas HD-73, GM-73 y Tc 33/73 contra <i>Trichoplusia ni</i> .	36

DEDICATORIA

A mi esposa

A mis Padres

DEDICATORIA

A mi esposa

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

A mi esposa, por su apoyo y cariño brindado durante todo este tiempo.

A mis padres y hermanos, porque gracias a su apoyo pude alcanzar mis metas.

A mis suegros por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por la oportunidad y apoyo brindado para desarrollar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Hernández, por sus consejos durante la realización de la tesis.

Al M. en C. Juan Francisco Contreras, por sus consejos para la realización de la tesis.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por su apoyo en mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de laboratorio, M. en C. Magda Iracheta por sus consejos y apoyó en los análisis de proteínas y bioensayos; al M. en C. Zacarias Jiménez Salas, Q.B.P. Luis C. Damas B. y Q.B.P. Roberto Vázquez por su ayuda en la realización del análisis molecular.

A mis amigos.

RESUMEN

Se estableció un sistema de flujo genético entre diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Las cepas paternas presentan diferencias en el espectro de actividad, serotipo flagelar y morfología del cristal: Bt subsp. *kenyae* (HD-225) de cristal amorfo, y de cristal bipiramidal las cepas Bt subsp. *kurstaki* (HD-73), Bt subsp. *aizawai* (GM-7 y GM-10), Bt subsp. *monterrey* (GM-33), y Bt subsp. *mexicanaensis* (GM-43). La elección de los marcadores de selección para los experimentos de conjugación, fue determinada en base al patrón de sensibilidad a antibióticos. Una vez realizado el proceso de conjugación, seleccionamos 30 colonias al azar y éstas fueron incubadas en agar LB durante 48 h/37°C. Los cristales se observaron al microscopio óptico y electrónico de barrido, encontrándose que las transconjugantes 7/43, 7/225a, 10/43 y 10/225a presentaban un cristal de forma cuadrada, similar al encontrado en las cepas Cry3. El análisis del perfil y tipo de proteínas del cristal demostró que las transconjugantes que habían variado en la morfología del cristal, a pesar de conservar similar patrón proteico al de las cepas nativas, no daban reacción cruzada con los anticuerpos específicos; por el contrario, las transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33, las cuales conservaban similar morfología del cristal y patrón proteico, daban reacción con los anticuerpos anti-Cry7Aa. También se realizó la determinación del perfil de plásmidos para conocer cuales se habían transferido, en éste se pudo determinar que las cepas que presentaron cambio en la morfología del cristal, se había perdido algunos de los plásmidos; sin embargo, en la transconjugante 33/73 se encontró que aparecían 3 plasmidos adicionales. La identificación a nivel de ADN, por PCR, mostró que las transconjugantes dieron señal con iniciadores específicos del dominio I de *cry1Ac* y *cry7Aa*. Para conocer si se obtuvo éxito en la modificación de la actividad tóxica de las cepas, se realizaron bioensayos contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni*, encontrando que la transconjugante 33/73, originada de la cepa GM-33, presentaba una actividad tóxica modificada, ya que mató al 100% a una concentración de 0.1 µg/cm², mientras que la GM-33 presentó una mortalidad del 16% a dosis de 10 µg/cm². Mientras que algunas de las transconjugantes, que presentaron cambios de morfología de cristal tuvieron una disminución en su toxicidad. Los anteriores resultados demuestran la existencia de un tipo de flujo y variación genética como resultado de los eventos de conjugación y que este tipo de eventos dió como resultado variantes tanto en morfología como en toxicidad.

INTRODUCCIÓN

El control de insectos plaga de importancia agrícola y salud pública es un problema que ha llamado el interés de científicos e inversionistas. Actualmente el control de estos organismos se realiza por agentes químicos; sin embargo, el uso del control biológico aumenta cada día. El biocontrol implica el uso de enemigos naturales de los insectos plaga, donde sobresalen organismos entomofagos (insectos depredadores y parasitoides) y entomopatógenos. Dentro del grupo de organismos entomopatógenos se encuentra una amplia variedad de virus, bacterias, hongos y nemátodos (Tabla 1) (Rajnachapel-Mesaī, 1990).

Tabla 1.- Principales bacterias entomapatógenas.

Bacteria	Insecto Blanco
<i>Bacillus popillae</i>	Coleópteros
<i>Bacillus lentimorbus</i>	Coleópteros
<i>Bacillus sphaericus</i>	Mosquitos
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lepidópteros, dípteros, coleópteros, y nemátodos
<i>Clostridium malacosome</i>	<i>Malacosoma</i> sp.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patógeno oportunista para la mayoría de los insectos
<i>Xenorhabdus nematopholus</i>	Insectos susceptibles al Nemátodo <i>Steinernema feltiae</i>
<i>Rickettsiella melolontha</i>	Coleópteros, dípteros y ortópteros

De los grupos bacterianos el que tiene mayor capacidad para eliminar o infectar insectos es el grupo de las bacterias formadoras de endoespora, principalmente, los pertenecientes al género *Bacillus*. Entre los bacilos de mayor importancia se encuentran *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus*

sphaericus. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el microorganismo de mayor interés económico y científico, ya que produce un cristal proteico (δ -endotoxina) formado por una o más proteínas, las cuales son específicas contra los estadios larvales de diversos ordenes de insectos (Aronson *et al.*, 1986; Pietrantonio y Gill. 1992). Basándose en su actividad biológica, Ellar y col. (1986) clasificaron las cepas de Bt en 5 patotipos, cuatro de estos representan cepas tóxicas contra lepidópteros, dípteros, coleópteros, y dípteros y lepidópteros. El quinto patotipo son aquellos cristales atóxicos, considerándose que este tipo está más ampliamente distribuido que los cristales tóxicos (Ohba y Aizawa. 1986). También se ha realizado una clasificación de los genes que codifican para las proteínas de cristal (δ -endotoxina), de acuerdo a la estructura primaria y espectro de su actividad insecticida, estos se clasificaron por vez primera en 6 clases (CryI a CryVI) (Höfte y Whiteley. 1989; Feitelson *et al.* 1992), actualmente en la nueva clasificación estas comprenden 20 clases (Crickmore, 1996).

En 1981, Schnepf y col., establecieron la posibilidad de que la variación de los diferentes patotipos de Bt, sea resultado del intercambio de regiones entre los diferentes genes que codifican para el cristal. Lo anterior abre la posibilidad para obtener variantes del cristal de la toxina por medio de la introducción de diversos genes para cristales de diferentes orígenes en la misma cepa recipiente (Crickmore *et al.*, 1990; Honée *et al.*, 1990; Caramori *et al.*, 1991; Lecadet *et al.*, 1992), donde el procedimiento de transferencia de plásmidos sería una buena alternativa (Klier *et al.*, 1983).

Creemos que sería posible la generación de cepas de Bt que produzcan variantes en la composición proteica, a partir de cepas de Bt con diferentes propiedades serológicas, patotipo y morfología de cristal, lo que a su vez puede implicar incrementos en el espectro de actividad. Al mismo

tiempo, tal sistema de intercambio genético podría abrir la posibilidad de intercambiar propiedades con otros bacilos afines.

H I P O T E S I S

El flujo genético entre diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* podría originar nuevas cepas con actividad biológica modificada.

OBJETIVO GENERAL

- ♦ **Establecer un sistema de flujo genético entre diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* para la obtención de cepas modificadas en su actividad tóxica.**

OBJETIVOS PARTICULARES

- ♦ **Obtención de cepas mutantes espontaneas resistentes a mayores concentraciones de antibióticos.**
- ♦ **Establecer un sistema de flujo genético entre diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis*.**
- ♦ **Producir de cepas con características tóxicas modificadas.**
- ♦ **Análisis del perfil de proteínas del cristal y plásmidos de las cepas transcripientes obtenidas.**
- ♦ **Bioensayos y selección de cepas modificadas**

ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis (Bt) es un bacilo esporulado, gram positivo, con flagelos peritricos, que se caracteriza por producir una inclusión paraesporal (cristal) de origen proteico, que es tóxico para los estados larvales de diferentes órdenes de insectos. Literalmente hay cientos de aislados del cuerpo paraesporal de los bacilos, habiendo 410 formulaciones registradas a partir del cristal de Bt (Aronson *et al.*, 1986). Basándose en su actividad biológica, Ellar y col. (1986), clasificaron las cepas de Bt en 5 patotipos, cuatro de éstos son cepas tóxicas a lepidópteros, dípteros, coleópteros, y dípteros y lepidópteros. El quinto patotipo se consideró ser atóxico, el cual está más ampliamente distribuidos que los cristales tóxicos (Ohba y Aizawa, 1986). También se ha realizado una clasificación de las proteínas de cristal (δ -endotoxina) de acuerdo a la estructura primaria y espectro de su actividad insecticida, comprendiendo 20 clases (Crickmore, 1996). Aunque si bien, se ha estudiado la composición química de los cristales y los aspectos fisiológicos y morfológicos de la formación de la spora y el cristal, la carencia de un sistema de intercambio genético en Bt ha detenido los estudios de los factores genéticos asociados con la formación del cristal.

Plásmidos de *Bacillus thuringiensis*

El estudio de los plásmidos de diversas cepas Bt, ha demostrado variabilidad tanto en la cantidad como en el tamaño de éstos, reportándose desde 1 (var. *sotto* y var. *thompsoni*) hasta 16 (var. *kurstaki*) plásmidos, cuyo tamaño varió de 2 a 200 MDa. Así mismo, el gen que codifica para las

δ -endotoxinas puede ser localizado en plásmidos de diverso tamaño y en cromosoma (Tabla 2).

Tabla 2.- Plásmidos encontrados en diversos serotipos de *Bacillus thuringiensis*.

Serotipo	Cepa		Plásmidos:		Loc. del gen de la protoxina	Talla mol. de la protoxina (kDa)	Referencias
			Número	Talla molecular (MDa)			
1	<i>thu</i>	HD-2	10	5.2; 6.2; 7.2; 7.6; 32; 37; 54; 57; 75; ~150	75	130	1,2,3,4
		<i>berliner</i> 1715	17	3.9; 5.4; 7.5; 9.5; 15; 17; 21; 25; 28; 39; 42; 51; 60; 77; 100; 120; 180	42, cromosoma*	130	aro, lere82,89
		<i>berliner</i> 22105	7	5.4; 6.2; 7.5; 15; 33; 56; 58	56, cromosoma*	130	aro, lere82, 89
2	<i>fin</i>	CN-1	2	77; 98	98, cromosoma	135	Debro
3a3c	<i>ale</i>	HD-4	10	4.6; 4.9; 5.4; 6.2; 6.4; 35; 37; 39; 46; ~105	105 100	130	aro, gonza, carl, lerec. 89
3a3b3c	<i>kur</i>	HD-1	11	~1.4; 4.9; 5.2; 5.4; 9.3; ~10; 29; 44; 52; ~110; ~120	44; 110 44; 60	131; 133.2; 133.3 70; 130	hoftee, aro, gonza, carl, lerec. 89
			8	1.5; 5.2; 5.6; 9.3; 10; 30; 47; 54			lere. 82
		HD-73	6	4.9; 5.2; 5.4; 7.5; 50; 50	50	133.3	hofte, aro, carl, gon, lere.89
		HD-263	11	1.4; 4.9; 5; 5.2; 5.4; 7.5; 43; 44; 60; 110; 130	44; 60; 110	130	gonz.88 patente
4a4b	<i>sotto</i>		3	5.2; 39; 43	39	133	aro, hoftee, lere82, 89.
			4	33; 37; 66; 73	cromosoma	145	aro, lere 82,89, nagamatsu 84,
4a4c	<i>ken</i>	HD-63	9	5.2; 5.3; 8.5; 12; 40; 49; 94; 125; ~140	125 40	133	vontersh91 lere89
		HD-588	5	4.9; 5.3; 65; 125; ~140	65; 125	133	vontersh
		HD-617	5	4.9; 5.2; 61; 115; ~140	61; 115	133	vontersh
5a5b	<i>gal</i>	HD-8	4	5.2; 8.7; 10.3; ~130	130		carl, gonz81
			5	6.3; 8.6; 20; 51; 74			lere82
6	<i>ent</i>				cromosoma	130-133	aro, lere89
	<i>subtoxicus</i>		2	52; 56	56; cromosoma		aro, lere82, 89
7	<i>aiz</i>	HD-122	15	3.5; 4.7; 5.4; 7.9; 8 lineales; 6; 30; 31; 33; 43; 46; 50; 78; ~110; ~120	110; 46	130-140	gonza patente
			8	3.9; 5.4; 5.6; 7; 8.5; 30; 35; 60			lere82
		7-29			45 45; cromosoma	130-133	aro, lere89

8a8b	<i>mor</i>		5	10 - ~160	145-150 160		lere 89, kronstad83, aro86
	<i>ten</i>				90	70	lere89
8a8c	<i>ost</i>	HD-538	4	50 - ~150	68		carlton
9	<i>tol</i>		6 9	5.2; 7.6; 8; 16; 28; 45 5 - ~150	45; 50; 150 44; 70; 100		lere82 aro, kronstad lere89
10a10b	<i>darm</i>		4 1 5 2	43 - 90 107 3.3; 8.95; 9.47; 15; 107.15 7.78; 107.15	47 60		aro, kronstad lere89 lizuka lizuka
		73-E-10-2 74-E-37-14					
11a11b	<i>tou</i>		5	10 - ~160	150		aro, kronstad
11a11c	<i>kyu</i>				cromosoma		aro
12	<i>tho</i>		4	4 - 100	100		aro
14	<i>isr</i>						

Así mismo, se pudo comprobar que no existe correlación entre el número y talla de los plásmidos con la toxicidad y morfología del cristal (Izuka *et al.*, 1981; Izuka *et al.*, 1983). Por lo que respecta a la localización del gen que codifica para la δ -endotoxina, se reportó que éste puede encontrarse en plasmidos de diversa talla molecular, por ejemplo en *Bt* subsp. *kurstaki* el gen se localiza en un plásmido de 29 MDa, mismo que al ser transferido a *B. cereus*, promovió la síntesis del cristal (Aronson *et al.*, 1984; Carlton y González, 1985). Minnich y Aronson (1984) reportan que un plásmido de 110 MDa puede estar implicado en la regulación de la síntesis de la δ -endotoxina y que su movilización a otras cepas de *Bt*, podría estar relacionada con otros plásmidos en *Bt* subsp. *kurstaki* (Reddy *et al.*, 1987). Lereclus y col. (1983, 1984 y 1985), publicaron que la síntesis y movilización del gen de la δ -endotoxina está asociada a un transposon, de ~3 MDa (Tn4430). Estos resultados concluyen que este es el motivo por el cual el

gen de la δ -endotoxina se puede encontrar en más de un plásmido (Klier et al., 1982; Kronstad et al., 1983).

Conjugación

En 1982, González y Carlton describieron un proceso intercambio genético semejante a la conjugación, para promover la movilización de toxinas entre diversas subespecies de Bt y en ocasiones entre Bt y algunos bacilos gram positivos. Este sistema involucra, preferencialmente, la transferencia de plásmidos. En el mismo año, González y col., realizaron un sistema de la transferencia de los plásmidos que codificaban para el cristal entre cepas de Bt y *B. cereus*. Las clonas resultantes, sintetizaron un cristal que desarrolló la misma toxicidad que la donadora. Posteriormente, Klier y col. (1983) obtuvieron el mapeo heteroespecífico entre una cepa de *B. subtilis*, que contenía el gen del cristal de la cepa *berliner* 1715 y diferentes cepas de Bt. El plásmido fue introducido en cepas acristalíferas (mutantes Cry⁻) de Bt y a Bt var. *israelensis* donde se produjeron cristales con actividad dual hacia lepidópteros y dípteros. Así mismo, González y Carlton (1984), realizaron la transferencia del plásmido que codificaba para el cristal de Bt var. *israelensis* en diversas cepas Cry⁻, y se observó que el cristal producido por las cepas receptoras conservaba la misma toxicidad.

En 1985, Battisti y col., desarrollaron un sistema de transferencia de plásmidos de resistencia a antibióticos, entre cepas de *B. anthracis*, *B. cereus*, y *B. thuringiensis*, encontrando que este método de transferencia interespecies era muy eficiente. Reddy y col. (1987), transfirieron el plásmido pBC16 (codifica para resistencia a tetraciclina) entre 4 subespecies de Bt a *B. anthracis* y *B. cereus*. Posteriormente, se detectó una baja frecuencia de transferencia del gen cromosomal de Bt a *B. cereus* utilizando

un marcador de triptófano. También observaron que en las cepas de *B. cereus* transcripientes, el gen que tenían con mayor frecuencia era el que codificaba para la protoxina (Aronson y Beckman, 1987). Los ensayos de transferencia de material genético inter e intra especie, también podría involucrar a elementos de transposición (transposones) que podrían movilizar al gen de la δ -endotoxina, tal fue el caso reportado cuando *Bt* subsp. *israelensis* fue apareado con *B. subtilis*, el cual transfirió los plásmidos pC194 y pUB110, y el transposón Tn916 (Naglich y Andrews, 1988). Después, Wiwat y col. (1990) transfirieron los plásmidos pBC16 y pC194 de *Bt* subsp. *israelensis* a 25 subespecies de *Bt*. Sus resultados indicaron que la capacidad de la transferencia de plásmidos entre las distintas subespecies no dependía de la presencia de grandes plásmidos. En el mismo año, Jarret y Stephenson, encontraron que la transferencia de plásmidos entre cepas de *Bt*, podría darse en el interior (hemolinfa) de las larvas que eran atacadas por diferentes cepas de *Bt*.

El proceso de conjugación, en *Bt* es un sistema complejo, y éste podría depender de la presencia de otros marcadores o elementos genéticos que promovieran la agregación entre las diversas cepas. En este sentido, Andrup y col. (1993), establecieron que el evento de transferencia genética es unidireccional y depende del fenotipo llamado *agr*. De tal manera, la transferencia se daría de *agr*⁺ a cepas *agr*⁻. En 1993, Carlton, hizo una revisión de los métodos para el mejoramiento de cepas de *Bt*, el cual establece que una buena alternativa, para obtener nuevas cepas con un espectro de hospederos modificado, sería la conjugación, el cual ocurre normalmente en la naturaleza.

Lo antes mencionado, nos abre la posibilidad de poder idear estrategias genéticas, por eventos naturales, para la obtención de cepas modificadas en su actividad biológica, las cuales podrían ser más fácilmente

utilizadas en el campo sin representar riesgos inminentes a la naturaleza. Por lo anterior, en esta investigación se establece la posibilidad del establecimiento de un flujo genético entre diversos serotipos de Bt para obtener nuevas cepas variantes como resultado de eventos de intercambio y recombinación genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas, medios de cultivo¹ y pruebas de sensibilidad a antibiótico

Las cepas bacterianas que se utilizaron en el trabajo son enlistadas en el Tabla 1. Para determinar la sensibilidad a antibióticos, las cepas fueron incubadas en caldo extracto de levadura-peptona (YPB) a 37°C durante 6 h en agitación constante a 150 rpm. Una alícuota de 200 µl fue mezclada en YPA suave y vertida sobre 10 ml de YPA. Una vez solidificada la capa de YPA suave se colocaron sensidiscos para gram positivos (Bigaux Diagnostica, S.A.) y se incubaron durante 24 h/37°C. La sensibilidad y resistencia fue determinada por el diámetro del halo de inhibición, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Tabla 3.- Bacterias que se utilizaron en este estudio.

Bacterias		Origen
<i>Bacillus cereus</i> NRRL 569		Dr. Curtis B. Thome, Univ. de Massachusetts
<i>B. thuringiensis</i>		Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos. F.C.B., U.A.N.L.
cepa	var	
HD-225	<i>kenyae</i>	
HD-73	<i>kurstaki</i>	
GM-7	<i>aizawai</i>	
GM-10	<i>aizawai</i>	
GM-33	<i>monterrey</i>	
GM-43	<i>mexicanaensis</i>	
GM-109	No determinado	
<i>B. sphaericus</i> 2362		

¹ La composición de las soluciones y medios de cultivo utilizados se indican en los Apéndices A y B.

Obtención de mutantes espontáneas. Las cepas se sembraron en cajas de YPA conteniendo gradientes de antibióticos y se incubaron 24 h/37°C. Las colonias seleccionadas se incubaron en caldo con antibiótico en concentraciones ascendentes (Carlton y Brown. 1981).

Conjugación

Para la realización de este proceso, se utilizaron cepas de Bt con diferente patrón de sensibilidad a antibióticos, toxicidad y morfología de cristal, además de cepas de *B. sphaericus* y *B. cereus* (Tabla 3). La conjugación se realizó de acuerdo a lo reportado por González y Carlton (1982), con excepción que el tiempo de conjugación fue de 48 h. Se tomaron alícuotas de 100 µl para realizar diluciones hasta 10^{-6} y se inocularon por difusión en agar nutritivo con antibiótico de selección (ver Tabla 6) y se incubó 18-24 h a 30°C. Se seleccionaron 30 colonias con morfología típica incubándose en agar LB 48h/37°C. La morfología del cristal fue observada al microscopio óptico. Aquellas clonas con morfología atípica, se observaron al microscopio electrónico electrónico de barrido bajo las siguientes condiciones: una gota del complejo espора-cristal se depositó en el portamuestra y se cubrió con oro. La observación se realizó a 30 kV y 2,000 a 20,000 aumentos.

Determinación del patrón de proteínas

Se realizó el patrón proteico de las transcripciones obtenidas utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE)². Los cristales fueron parcialmente purificados por un sistema bifásico de polietilenglicol-buffer de fosfatos (Güereca et al., 1995). Los cristales purificados se solubilizaron y se realizó una electroforesis en PAGE al 10%

² La composición del gel de poliacrilamida se indica en el Apéndice E.

en condiciones desnaturalizantes. El gel se corrió a 20 amp en el gel concentrador y 40 amp en el separador. El gel se tiñó con una solución de azul de Coomasie (Laemmli. 1974).

Inmunodetección

La determinación del tipo de proteínas del cristal fue realizada por inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-CryIA y anti-Cry7Aa que establecen reacción cruzada con las proteínas del cristal de acuerdo a lo reportado por Pereyra y col. (1994).

Determinación del patrón de plásmidos

Se realizó la purificación de plásmidos de las cepas nativas y transcripientes, obtenidas en los experimentos de conjugación, según lo descrito por Pereyra y col. (1994). Los plásmidos purificados se corrieron a 9 mA (40 min), 40 volts (35 min) y 120 volts (2.5 h) en un gel de agarosa al 0.7% en TBS.

Análisis por PCR de las cepas transcripientes

Para conocer la integración de plásmidos y/o genes transferidos a las cepas receptoras se realizaron experimentos de PCR utilizando los oligosdeoxiribonucleotidos (oligos) para el Dominio I y Dominio III de *cryIAc* (Damas Buenrostro. 1995) y *cry7Aa* (Cerón *et al.*, 1995), con los cuales se retaron las cepas transcripientes y cepas nativas (Tabla 4).

Bioensayos

Se realizaron bioensayos para las cepas nativas y transconjugantes, utilizando larvas neonatas de *Trichoplusia ni*. El complejo esporas-cristales se aplicó sobre dieta artificial, utilizando concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Una vez secas, se colocó una larva por copa (25 larvas por concentración). Se incubó por 7 días a 28 °C, después de los cuales se contaron las larvas vivas y muertas para determinar el porcentaje de mortalidad.

Tabla 4.- Características de iniciadores utilizados en las mezclas de reacción.

Par de Primers	Secuencia	Gen Reconocido	Posición
CJIII20	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA	<i>cry7Aa</i>	821 a 840
CJIII21	5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG		1507 a 1529
BP7	5'TTTAGTCTGCAGTTAGTTGCACTTTGTGC	<i>cry1Ac</i>	-128 a -102
ZJ7	5'CTTCTGGATCCATCATAATTCGGGAACAG	Dominio 1	736 a 761
ZJ8	5'ATACATAGATCTGCTGAATTTAAT	<i>cry1Ac</i>	1366 a 1389
ZJ10	5'CTCARCAAAGGTACCTGATAGTGTGAC	Dominio 3	2161 A 2187

RESULTADOS

Sensibilidad a antibióticos y obtención de mutantes espontáneos

Con la finalidad de realizar una adecuada selección de las cepas determinadas a ser posibles receptoras, éstas se seleccionaron en base a los gradientes de antibióticos (Cuellar-Gómez, 1994), en los cuales se obtuvieron mutantes espontáneos con resistencia a 60 µg/ml de cefalotina de las cepas GM-7, GM-10 y HD-225, de las cepas GM-7 y GM-10 resistentes a 5 µg/ml gentamicina. También se obtuvieron variantes de la cepa HD-73 con resistencia a 30U/ml de penicilina y 5 µg/ml de dicloxacilina (Tabla 5).

Tabla 5.- Determinación de la sensibilidad de diferentes cepas de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* a diversos antibióticos.

Antibiótico	Conc. (µg)	Cepas Bacterianas						
		HD-73	HD-225	GM-7	GM-10	GM-33	GM-43	<i>B. sphaericus</i>
Ampicilina	10	-	-	-	-	-	-	-
Cefalotina	30	-	+	-	-	+	-	+
Cefotaxima	30	-	-	-	-	-	-	-
Cefuroxima	30	-	-	+	-	-	-	-
Ceftazidina	30	-	-	-	-	-	-	-
Dicloxacilina	1	-	+	+-	-	-	-	-
Eritromicina	15	+	+	+	+	+	+	+
Gentamicina	10	+	+	+	+	+	+	+
Pefloxacina	5	+	+	+	+	+	+	+
Penicilina	10 U	-	+	-	-	+	-	+
Tetraciclina	30	+	+	+	+	+	+	+
Trimetroprim-Sulfametoxazol	25	-	+	+	+	-	-	+

- Resistente

+ Sensible

Cabe mencionar que las mutantes obtenidas resisten de 2 a 3 veces más la concentración presentada en sensidisco. Las mutantes seleccionadas conservaron su morfología colonial y del cristal, lo cual es de importancia como referencia de que las transconjugantes obtenidas con cambio de morfología del cristal y de colonia, fueran debidas al proceso tipo conjugación, y descartar alteraciones inducidas por el antibiótico. De acuerdo a los resultados del antibiograma y a los gradientes, se realizaron las mezclas de antibióticos para utilizarlos como marcadores de selección (Tabla 6).

Tabla 6.-Antibióticos utilizados en la selección de cepas de *B. thuringiensis* transconjugantes.

Cepa receptora	Cepa donadora						
	HD-73	HD-225	GM-7	GM-10	GM-33	GM-43	<i>Bacillus sphaericus</i>
HD-73	X	P	D	X	P	X	P
HD-225	C	X	C	C	C	X	X
GM-7	X	C	X	X	C	G	C
GM-10	X	C	C	X	C	G	C

Antibióticos: X, No se realizó selección; C, Cefalotina (60 µg/ml); D, Dicloxacilina (5 µg/ml); G, Gentamicina (5 µg/ml); y P, Penicilina (30 µg/ml).

Selección de transconjugantes

Sólo se logró obtener crecimiento en 8 de experimentos de conjugación de las diferentes mezclas que se realizaron (Tabla 7). Basándonos en estudios previos (Cuellar-Gómez, 1994) se seleccionaron 30 colonias al azar y sembraron por picadura en antibiótico de selección, en el cual también se sembraron ambas cepas nativas utilizadas en la mezcla de conjugación, con la finalidad de observar que no hubiera mutaciones espontáneas en las cepas donadoras. Después de 72 h de incubación se

realizó una tinción simple con azul de Coomasie para determinar la morfología del cristal por observación al microscopio óptico (Tabla 7).

Tabla 7.- Relación y morfología del cristal de las diferentes cepas obtenidas por conjugación de *B. thuringiensis*.

Cepas donadoras		Cepas receptoras		Cepas Transcipientes	
Clave	Morfología del Cristal	Clave	Morfología del Cristal	Clave	Morfología del cristal
HD-225	Amorfo	GM-7	Bipiramidal	7/225a	Cuadrado
				7/225b	Amorfo
		GM-10	Bipiramidal	10/225a	Cuadrado
				10/225b	Amorfo
GM-33	Bipiramidal	HD-73	Bipiramidal	33/73	Bipiramidal
		HD-225	Amorfo	33/225	Amorfo
		GM-7	Bipiramidal	33/7	Bipiramidal
		GM-10	Bipiramidal	33/10	Bipiramidal
GM-43	Bipiramidal	GM-7	Bipiramidal	7/43	Cuadrado
		GM-10	Bipiramidal	10/43	Cuadrado

Al analizar la morfología del cristal (Figura 1) de las cepas transconjugantes, sobresalen el cambio de morfología presentado por algunas transconjugantes en las mezclas de GM-7 y GM-10 con las cepas HD-225 y GM-43 (ambas cepas receptoras pertenecen a la variedad *aizawai*). En la revisión de su estructura se notan diferencias en el tamaño y forma del cristal, presentando formas un poco más alargadas en las transconjugantes obtenidas de la cepa GM-10, y mas compactas en las transconjugantes de la cepa GM-7. Las restantes transconjugantes obtenidas conservaron la morfología de cristal similar a las cepas nativas.

Análisis de proteínas del cristal

El análisis del patrón de proteínas del cristal de las cepas transconjugantes obtenidas, revelo que, en algunos casos, éste se modificó,

pero tales modificaciones variaron dependiendo de la mezcla de conjugación. De esta manera, en la figura 2A se observa, que el patrón de las proteínas del cristal de las cepas transconjugantes con la cepa GM-33

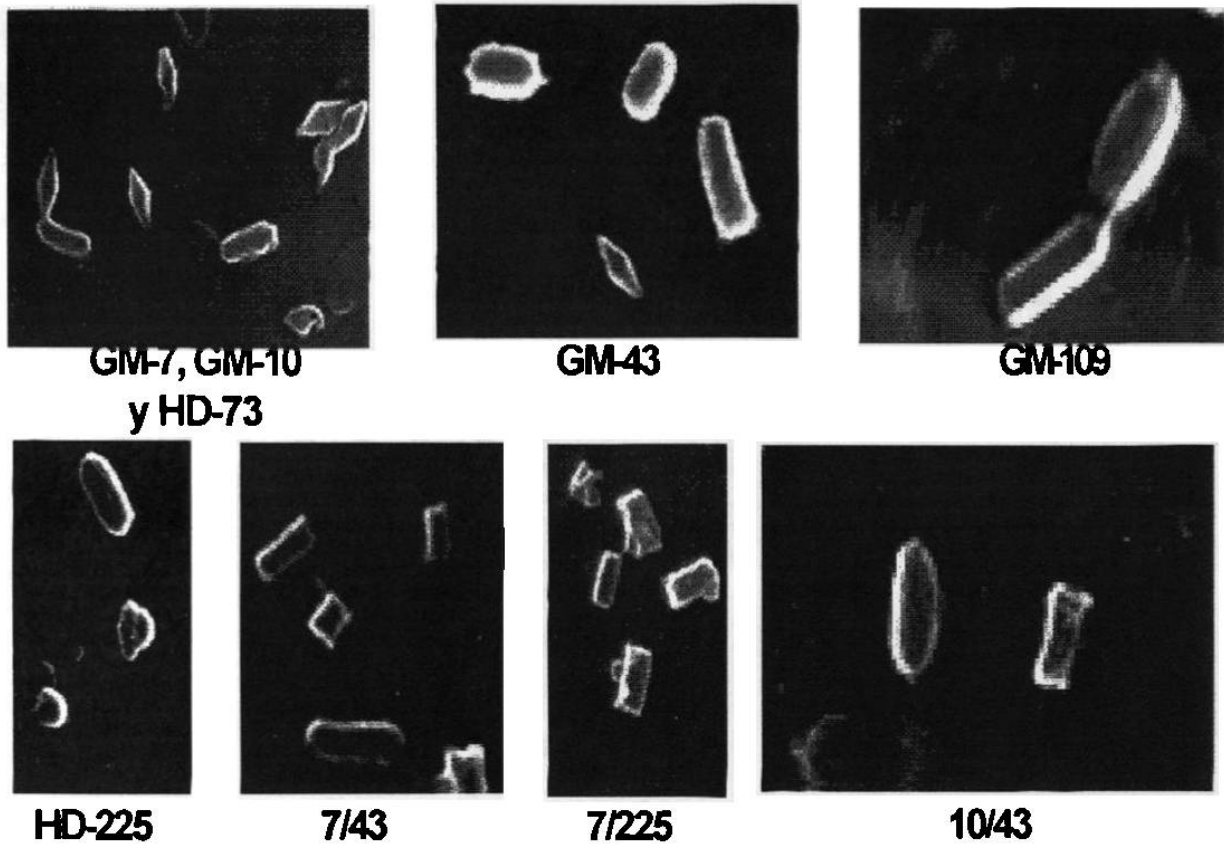


Figura 1.- Morfología del cristal de las cepas nativas y transconjugantes.

como receptora o donadora, presentan un perfil proteico similar al de la cepa nativa; sin embargo, se observa una pequeña banda de aproximadamente 30 KDa en las cepas transconjugantes 33/7, 33/10 y 33/73, y cuando estas se retaron con el anticuerpo anti-Cry1A se observó que el anticuerpo presenta reacción cruzada con la banda principal de 130 KDa de las cepas nativas correspondientes (GM-7, GM-10 y HD-73), lo cual nos indicaría que las cepas transconjugantes carecían de la fracción tóxica de Cry1A (Fig. 2B).

Al realizar la inmunodetección con anti-Cry7Aa de las cepas nativas y transconjugantes se observa que daban reacción cruzada la cepa GM-33 nativa y las transconjugantes 33/7, 33/10 y 33/73 (Figura 2C), no presentándose dicha reacción en la transconjugante 33/225 (Carril 8) lo cual indica que la cepa HD-225 fue incapaz de transferir material genético con la cepa GM-33.

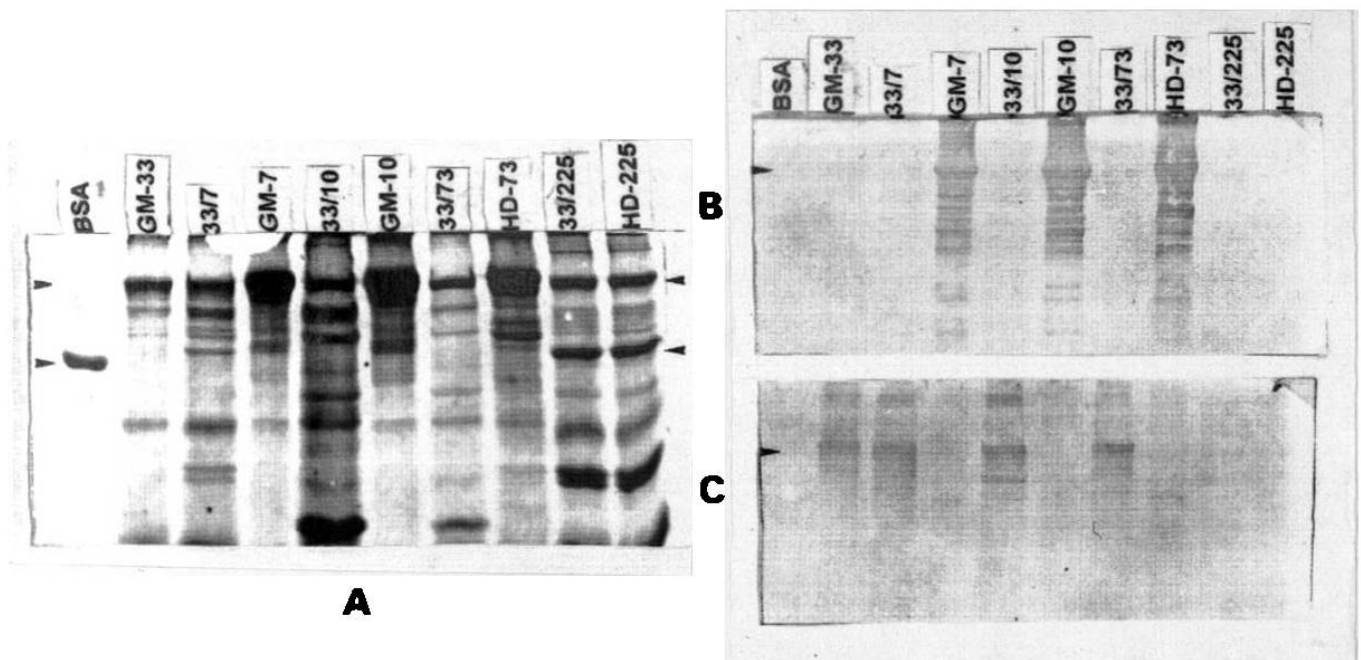


Figura 2.- Perfil de proteínas e inmunodetección del cristal de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 como receptora.

Los resultados anteriores contradecían lo esperado, ya que se esperaba que las cepas transconjugantes presentaran un perfil de proteínas con algunas modificaciones y/o dieran reacción cruzada con ambos anticuerpos, lo cual nos indicaría que el evento de conjugación fue un éxito.

En la figura 3A, se observa el patrón de proteínas de las cepas transconjugantes en las cuales se utilizó la cepa GM-7 como cepa donadora, aquí se puede observar que las cepas transconjugantes 7/43 y 7/225a presentan un patrón de proteínas similar a la cepa GM-7 nativa, aún cuando en ambas transconjugantes el cristal es cuadrado (ver Figura 1). Por otra parte el perfil de proteínas de la 7/225b (Fig. 3A, carril 5), es distinto a la 7/225a, ya que aquí no se presenta la banda principal de 130 KDa, que se observa en GM-7 y de las bandas de aprox. 127 y 69 KDa de la cepa HD-225. Sin embargo, cuando se utilizó la GM-7 como receptora, se observó que sólo se presenta reacción cruzada en la cepa GM-7 nativa (Fig. 3B, carril 1). El resultado negativo en la reacción de las cepas transconjugantes (Carriles 2, 4 y 5), nos indica que la modificación recibida por esta cepas fue de tal magnitud que pudo haber afectado la morfología y composición original del cristal proteico.

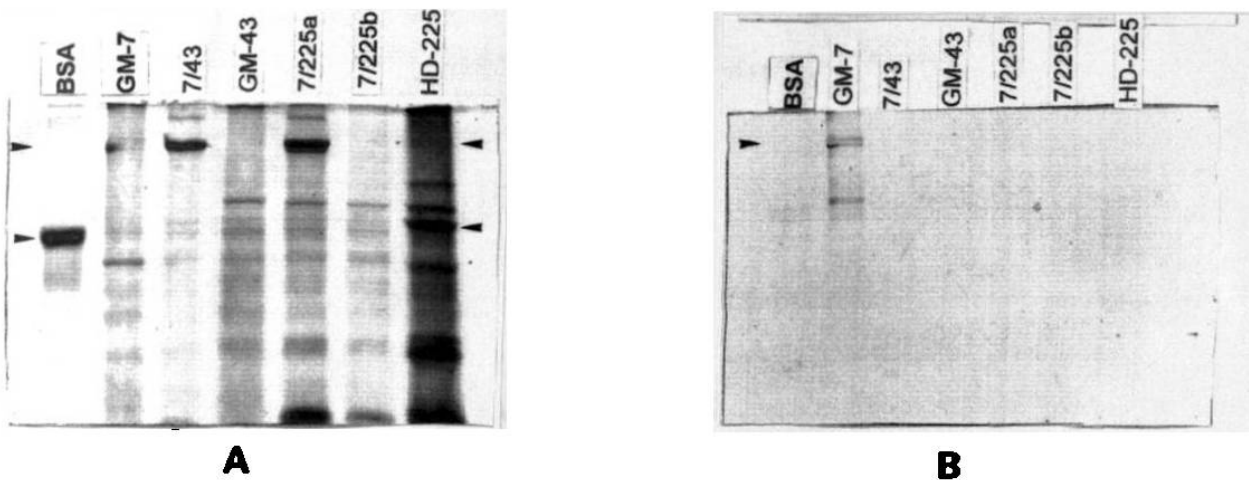


Figura 3.- Perfil de proteínas e inmunodetección del cristal de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-7 como receptora.

En la figura 4A, se observa el patrón de proteínas de las cepas transconjugantes en las cuales se utilizó la cepa GM-10. En esta observamos que el perfil de las transconjugante 10/43 (Fig. 4A, carril 2) y 10/225a (carril 4) presentan un perfil similar a la cepa receptora (Carril 1), por el contrario, en la transconjugante 10/225b se observa que ha perdido la banda de 130 KDa, que se observa en la cepa receptora, y tampoco presenta las bandas de 127 y 69 KDa de la cepa donadora.

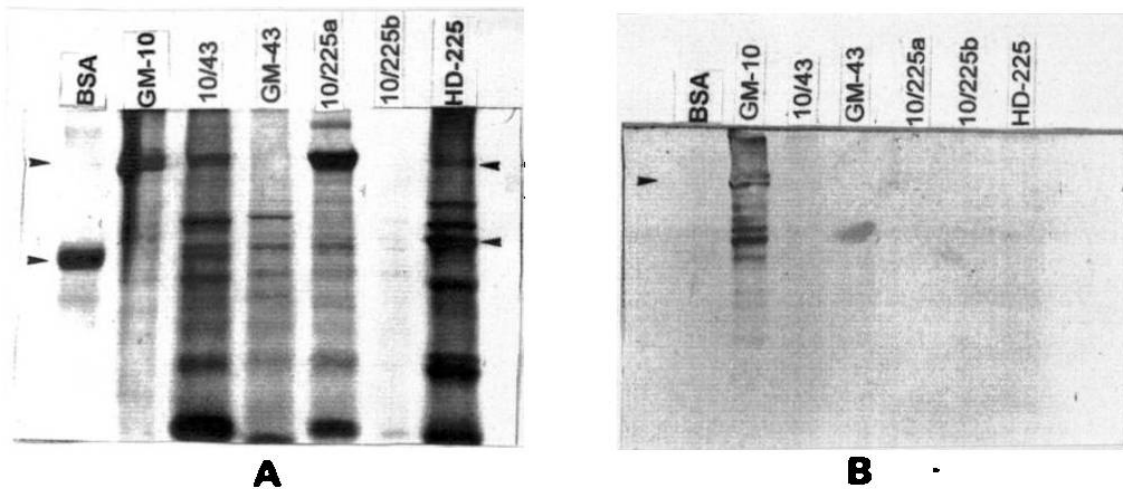


Figura 4.- Perfil de proteínas e Inmunodetección del cristal de la cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-10 como receptora.

En la figura 4B, se observa la inmunodetección con anti-Cry1A de las cepas transconjugantes, en las cual se utilizó la cepa GM-10 como receptora, en está, al igual que en la figura 4A, solo se presentó reacción cruzada con la cepa GM-10 nativa, coincidiendo con los resultados observados en la figura antes dicha. Lo cual nos podría indicar que debido a

la relación tan cercana existente entre ambas cepas nativas (ambas variedad *aizawai*), presenten alteraciones genicas de igual magnitud lo cual arroja resultados similares.

Determinación del perfil de plásmidos

En la figura 5 se observa el perfil de plásmidos de las cepas transconjugantes en las cuales se utilizó la cepa GM-33 como receptora o donadora, y también se puede observar el perfil de plásmidos de las cepas nativas utilizadas en los experimentos de conjugación. En esta se puede observar que las transconjugantes obtenidas con la utilización de las cepas GM-7 y GM-10 (Figura 5, carriles 2 y 4, respectivamente) no se observan plásmidos extras, así como tampoco cuando se utiliza la cepa HD-225 como receptora de la GM-33 (Carril 8) se alcanza a observar la transferencia de algún plásmido. Sin embargo, en la transconjugante 33/73 (Carril 6), claramente se observa que se llevó a cabo la transferencia de los plásmidos de 7.5 y 5.4 MDa, además de observarse un nuevo plásmido de aprox. 30 MDa.

En el perfil de plásmidos de las cepas transconjugantes que involucraron a la cepa GM-7, se observa que las cepas transconjugantes 7/43 y 7/225a poseen sólo dos plásmidos, mientras que la transconjugante 7/225b presenta un plásmido de aprox. 40 MDa (Figura 6). El plásmido presente en ambas cepas es de aprox. 40 MDa, y otro de aprox. 5.4 MDa; sin embargo, en la transconjugante 7/225a este último migra ligeramente menos, lo cual nos indica que tiene una talla molecular mayor que en la transconjugante 7/43. Estos resultados nos muestran que la modificación en la morfología del cristal podría deberse a la pérdida de plásmidos implicados en la síntesis de la proteína, y probablemente implicados en la toxicidad.

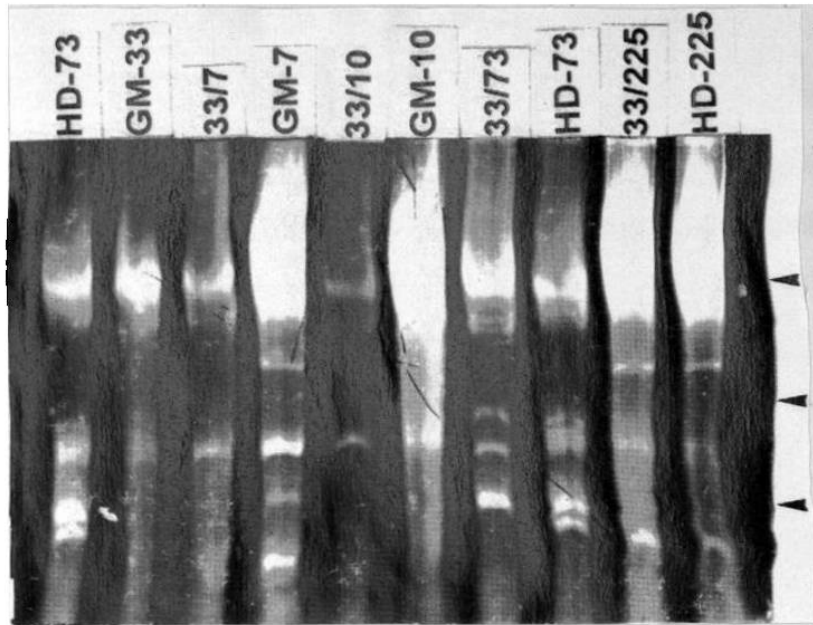


Figura 5- Perfil de Plásmidos de transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 como receptora.

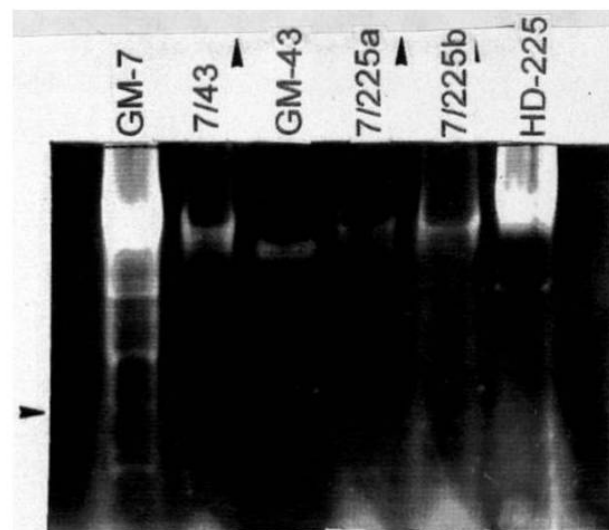


Figura 6- Perfil de Plásmidos de transconjugantes obtenidas con la cepa GM-7 como receptora.

En la figura 7, se observa el patrón de plásmidos de las cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-10. Observamos que, al igual que las transconjugantes de la cepa GM-7, las transconjugantes 10/43 (Carril 2) y 10/225a (Carril 4) que presentan una morfología de cristal cuadrado, diferente a las nativas, presentando plásmidos de apróx. 6 y 40 MDa ambas cepas, sin embargo la transconjugante 7/43 presenta un tercer plásmido de apróx. 30 MDa, lo cual nos indica de talla molecular igual a la nativa. Podemos suponer que el plásmido de menor talla molecular sea una derivación del plásmido de 7.5 MDa presente en la cepa nativa. También llama la atención que la transconjugante 7/225b, que su morfología de cristal es indefinida, presente sólo el plásmido mayor de 40 MDa.

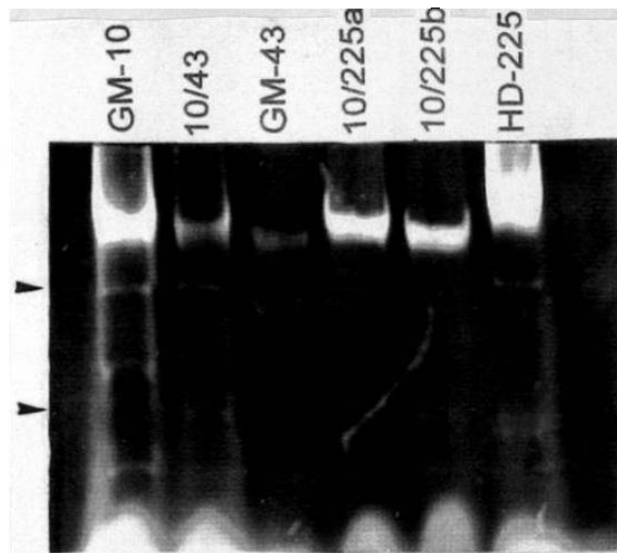


Figura 7- Perfil de Plásmidos de transconjugantes obtenidas con la cepa GM-10 como receptora.

Análisis de PCR de transconjugantes

El análisis de las transconjugantes de la cepa GM-33, demostró que las transconjugantes obtenidas generaban un producto igual que la GM-33 nativa, lo cual nos indica que realmente estas cepas contienen el gen que codifica para la Cry7Aa, el cual es tóxico contra coleópteros (Figura 8). Solamente no amplificó la supuesta transconjugante 33/225, lo cual viene a apoyar los resultados anteriores de que la cepa HD-225 fue incapaz de realizar intercambios de material genético con la cepa GM-33.

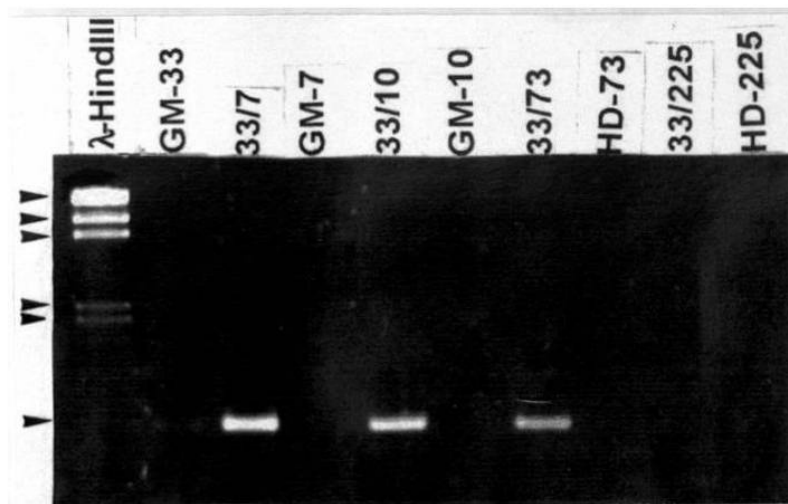


Figura 8.- Identificación de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33 utilizando los iniciadores para *cry 7Aa*.

Al realizar el análisis por PCR de las transconjugantes de la cepa GM-33, utilizando oligonucleótidos específicos para dominio I de *cry1Ac* (Figura 9), se encontró que la cepa GM-33 (Carril 1) daba una débil amplificación con dichos oligos. Esto indica que quizás exista una pequeña zona de complementaridad en dicho dominio entre las toxinas CryIAc

(HD-73, Carril 7) y Cry7Aa (GM-33). Sin embargo, llama la atención que en la transconjugante 33/7 (Carril 2) fuera negativa dicha amplificación.

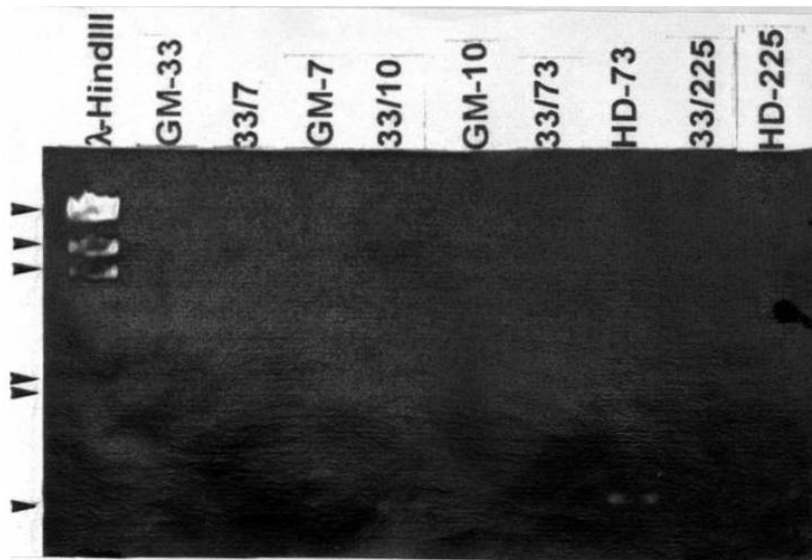


Figura 9.- Identificación del dominio I de *cry 1Ac* de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33.

Por lo que respecta al análisis de las transconjugantes de la cepa GM-33, utilizando oligonucleótidos específicos para el dominio III de *cry1Ac*, encontramos que solamente fue amplificado la cepa nativa HD-73 (Figura 10, carril 7). Estos resultados indican que la cepa transconjugante 33/73 tal vez sólo contuviera alguna parte del gen que codifica para *cry1Ac*, por lo cual dicha toxina no era detectada por los anticuerpos específicos en las inmunodetecciones.

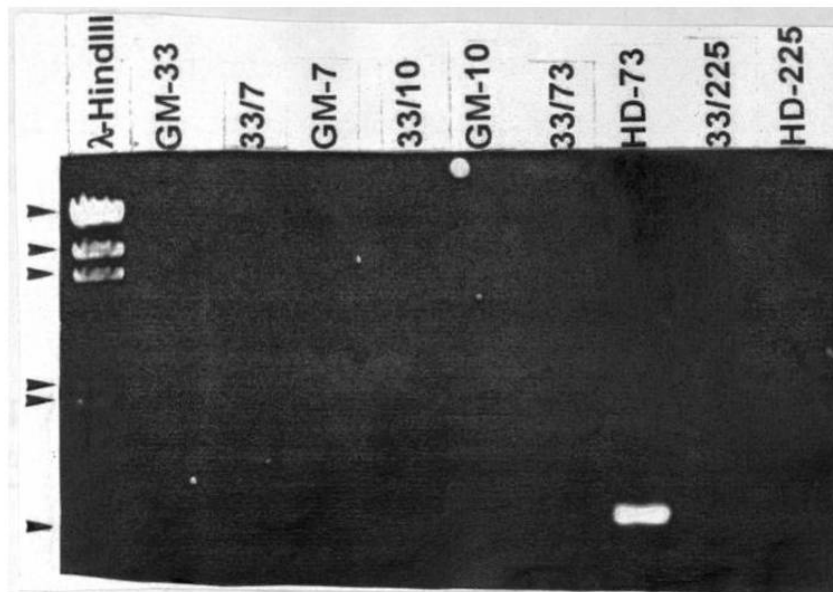


Figura 10.- Identificación del dominio III de cry 1Ac de cepas transconjugantes obtenidas con la cepa GM-33.

Determinación de actividad biológica de los cristales

En los resultados obtenidos en bioensayos con *Trichoplusia ni* se observa que las transconjugantes 7/43 y 10/43 presentan una considerable disminución en su toxicidad en comparación de las cepas silvestres GM-7 y GM-10 (Tabla 8). Estos resultados eran de esperarse ya que ambas transconjugantes, a pesar de que presentaban un patrón de proteínas similar al de las cepas receptoras (Figuras 4 y 6), en la inmunodetección la reacción con el anticuerpo fue negativa. Además el perfil de plásmidos fue diferente al de ambas cepas nativas.

Resultados similares se obtuvieron en las transconjugantes 7/225a, 7/225b y 10/225a, en las cuales la cepa HD-225 fue la donadora, en las

cuales se observó una notoria disminución en la toxicidad de dichas cepas. Por el contrario, la transconjugante 10/225b, que igual a las anteriores, fue totalmente distinta a la cepa receptora (GM-10) en los diversos análisis realizados, podría considerarse tóxica a dosis de 10 µg/cm², pero se observa una considerable disminución de toxicidad en la dosis de 1 µg/cm². Similarmente, los resultados de toxicidad de las transconjugantes 33/7, 33/10 y 33/225, tampoco muestran una actividad tóxica importante contra *T. ni* (Tabla 8).

Tabla 8.- Toxicidad de las cepas nativas y transconjugantes contra *Trichoplusia ni*.

Cepa	% Mortalidad	
	Dosis (µg/cm ²)	
	1	10
Control	0	0
GM-7	100	100
GM-10	100	100
GM-33	8	16
GM-43	0	40
HD-73	100	100
HD-225	0	8
33/7	0	28
7/43	8	16
7/225a	0	12
7/225b	20	56
33/10	8	12
10/43	12	32
10/225a	4	40
10/225b	32	92
33/73	100	100
33/225	8	12

Se usaron 25 larvas de *Trichoplusia ni* con cada una de las dosis por cepa.

En cambio la toxicidad de la cepa transcripiente 33/73 fueron sorprendentes, ya que esperábamos que su toxicidad fuera nula al igual que en la cepa GM-33 nativa. También se realizaron bioensayos a concentraciones menores (Tabla 9), en los cuales se observa que dicha transconjugante es tóxica contra *T. ni*. Con estos resultados se demostró que el proceso de conjugación se había llevado satisfactoriamente para producir cepas con actividad dual.

Tabla 9.- Comparación de toxicidad entre las cepas HD-73, GM-73 y Tc 33/73 contra *Trichoplusia ni*.

Cepa	% Mortalidad	
	Dosis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	0.100	0.500
Control	0	0
GM-33	4	8
HD-73	100	100
33/73	100	100

Se usaron 25 larvas de *Trichoplusia ni* con cada una de las dosis por cepa.

DISCUSIÓN

Actualmente, existen una gran cantidad de reportes sobre la diversidad de toxicidad de la δ -endotoxina de las diversas cepas de Bt; así mismo, estos reportes también describen una gran variedad en la composición y formas de estas inclusiones. Lo antes mencionado, podría ser explicado por los diversos procesos evolutivos, lo cual implica que las secuencias de ADN estén sujetas a modificaciones debido a procesos de mutación y recombinación, y que a través de la estabilización y transmisión de estos productos, exista la diversidad entre las cepas de Bt (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992). Por lo tanto, para comprobar dichos eventos, en el estudio detallado en las páginas anteriores, se estableció un sistema de transferencia de material genético por el proceso tipo conjugación, donde se requiere que las cepas donadora y receptora crezcan juntas durante varias generaciones, después de este proceso las células recipientes podrían adquirir uno o más plásmidos donadores en la ausencia de cualquier selección para los plásmidos marcadores (González y Carlton, 1984). De acuerdo a los diferentes resultados obtenidos en este trabajo sobresalen principalmente 4 puntos de importancia:

- 1.-Obtención de Cepas Transconjugantes.
- 2.-Cambios en Morfología del Cristal.
- 3.-Flujo Genético.
- 4.-Modificación de la Toxicidad en las Cepas Transconjugantes.

1.- Obtención de Cepas Transconjugantes

Al realizar la selección de transconjugantes se obtuvieron en diferente número, lo cual probablemente se vio afectado por diversos factores, entre

los que se encuentran la velocidad de colisión entre la donadora y receptora, la presencia del fenotipo *agr*⁺ el cual daría la capacidad a la cepa donadora para aparearse (Andrup *et al.*, 1993), la segregación del plásmido en las células receptoras en división, y la retransferencia del plásmido por las recipientes (Chapman y Carlton, 1985), así como también la densidad de las células paternas afecta el número de transconjugantes (Fernandez-Astorga *et al.*, 1992).

El proceso de transferencia genética es unidireccional, ya que es determinado por la presencia del fenotipo *agr*⁺, pero durante el proceso de conjugación dicho fenotipo puede ser segregado (Andrup *et al.*, 1993), ya que se encuentra en plásmido, por lo cual puede ocurrir ambas cepas paternas, en un momento dado, pueden actuar como donadoras o receptoras de plásmidos en el proceso de intercambio (Chapman y Carlton, 1985). Por lo anterior, se puede deducir que las cepas transconjugantes derivadas de Bt GM-33 (utilizada como cepa donadora, Tabla 6) pudo haber ocurrido eventos de retransferencia de plásmidos por lo cual finalmente prevalecieron sólo transconjugantes de esta cepa, tal vez al mantenerse con mayor estabilidad los plásmidos en está cepas.

En muchas subespecies los plásmidos crípticos pueden interferir con la transferencia de algunos plásmidos. Uno o más de estos plásmidos crípticos pueden codificar para una bacteriocina que puede inhibir a las potenciales recipientes, o bien pueden alterar las propiedades de superficie de la célula donadora y, así, afectar la formación de parejas de apareamiento (Aronson *et al.*, 1986). La experiencia de los diversos experimentos realizados indican que la eficiencia de la transferencia depende de la cepa de Bt utilizada como receptora. Esto puede sugerir que

el contenido extracromosomal de la cepa recipiente interfiere con la transferencia del plásmido intergénico (Lereclus *et al.*, 1983).

2.- Cambios en la Morfología del Cristal

En algunas de las transconjugantes obtenidas hubo un cambio en la morfología del cristal, lo cual se podría deber a un proceso de recombinación (Aronson *et al.*, 1986), aunque en el patrón de proteínas no hay una variación visible en comparación a la cepa receptora, en la inmunodetección estas no son reconocidas, lo cual podría deberse a que la especificidad antigénica (y además, las proteínas estructurales) del cristal transcripente, es independiente de la cepa utilizada como receptora y ésta podría ser determinada por el reacomodo de plásmidos en la cepa donadora, se podría concluir que el(los) gen(es) estructural(es) que codifican para la(s) proteína(s) del cristal de la δ -endotoxina reside en los plásmidos transmisibles implicados (González *et al.* 1982).

Entre los diversos tipos de morfología de cristal obtenidos, llaman la atención las cepas transconjugantes que presentaron un cristal de forma cuadrada, ya que dicha morfología sólo ha sido reportada en las cepas Cry3, las cuales desarrollan especificidad contra coleópteros (Höfte y Whiteley. 1989). Es importante notar que dicho cambio de morfología tampoco ha sido reportados en los diversos estudios de producción de cepas oligosporogénicas (Jonhson *et al.*, 1980)

También se ha encontrado la morfología de cristal tetrahédrico, en cepas clasificadas como Cry3A (Sekar *et al.* 1987; Donovan *et al.*, 1988; Donovan *et al.*, 1992), Cry3B (Sick *et al.*, 1990) y Cry3C (Lambert, 1992), las cuales tienen actividad contra coleópteros, pero dichas toxinas se ha

encontrado que tienen un peso molecular de 68 a 73 KDa, y la toxina producida por las transconjugantes del trabajo es de aprox. 130 KDa.

3.- Flujo Genético

La evidencia más fuerte de que el gen de la δ -endotoxina reside en plásmidos en diversos serotipos de Bt, ha sido reportada utilizando los métodos de aislamiento de plásmidos de cepas deficientes en la producción del cristal, asociando así a los plásmidos con la producción del cristal (ver Tabla 2).

En 1982, González y col., reportaron una elevada frecuencia en la transferencia de plásmidos, especialmente uno de 50 MDa conteniendo el gen de la protoxina de Bt subsp. *kurstaki* HD-73 a *B. cereus*, derivados acristalíferos de HD-73, o Bt subsp. *thuringiensis* HD-2. La transferencia también fue observada de cepas subsp. *kurstaki* (HD-263-1) a HD-73 y *B. cereus* y de un derivado de subsp. *thuringiensis* HD-2 a *B. cereus*. En muchos casos, los plásmidos que contenían los genes de la protoxina fueron transferidos y las células receptoras (transcipientes) produjeron la protoxina con propiedades antigénicas idénticas a la cepa donadora. En algunos apareamientos, transcipientes conteniendo dos distintos plásmidos que codificaran la protoxina fueron construidos en pasos sucesivos (Kalman et al., 1995), y las transcipientes produjeron ambas especies de protoxina. En todos los casos, los plásmidos no contenían un marcador de selección por lo que se seleccionó por la cepa receptora. Estas fueron escogidas al azar por el perfil de plásmidos o la producción de una inclusión o ambas porque la frecuencia de transferencia de plásmidos en todos los casos fue muy elevada. Es interesante observar que a pesar de utilizar diversas mezclas de conjugación (Tabla 5) en el estudio, en algunas no se observó que se llevaría a cabo el evento de transferencia de plásmidos deseada, pero no se puede

asegurar que hubiera ausencia de transferencia de material genético, ya que muy pocas subespecies de Bt transfieren plásmidos a frecuencias suficientemente altas para ser detectados sin marcadores de selección apropiados (González *et al.* 1982). En otros estudios los plásmidos pBC16 y pC194 de *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *israelensis* cepas A084-16-194 fueron transferidos a 25 subespecies de Bt por un proceso tipo conjugación utilizando la técnica de apareamiento. Las frecuencias de transferencia varió considerablemente entre los diferentes pares de apareamiento, variando desde 1.1×10^{-9} a 9.8×10^{-6} ; además, la transferencia cromosomal también se pudo demostrar en 10 subespecies de Bt con muy baja frecuencia (4.3×10^{-9} a 3.7×10^{-7}) (Wiwat *et al.*, 1990). El apareamiento intersubespecies en un grupo de cepas de 8 subespecies tuvo una mayor frecuencia de transferencia que los apareamientos entre las subespecies. Este resultado era de suponerse, ya que los sistemas de modificación/restricción del ADN juega un papel muy significativo en el éxito de la transferencia de los plásmidos. Además, los resultados indicaron que la capacidad para transferir plásmidos entre las varias subespecies no dependía de la presencia de grandes plásmidos (Wiwat *et al.*, 1990). Otra posible explicación, es que hay una disminución de 20 a 1000 veces en la frecuencia de transferencia de plásmidos entre cepas conteniendo el mismo plásmido autotransmisibles (Batisti *et al.*, 1985).

Se observó, que en la pareja de conjugación HD-73 (*cry1Ac*) y GM-33 (*cry7Aa*), la transferencia de plásmidos entre las cepas fue muy eficiente, prevaleciendo finalmente 3 plásmidos en la cepa GM-33 (Figura 8, Carril 6), uno de los cuales es de aprox. 30 MDa, lo cual nos indica que probablemente se transfirió una porción del plásmido de 50 MDa de HD-73, lo cual es de gran relevancia ya que éste ha sido detectado en estudios anteriores como el responsable de la toxicidad hacia lepidópteros (González

y Carlton, 1980). La transferencia de plásmidos de HD-73 a GM-33 se podría deber a que la eficiencia de intercambio genético se ve aumentada cuando las cepas donadora y receptora contienen diferentes plásmidos conjugativos (Reddy *et al.*, 1987).

Aún que al realizar los ensayos de PCR para detectar la posible integración del gen de la toxina en la transconjugante 33/73, este no fue amplificado por los oligos del dominio III de *cry1Ac* (Figura 13), pero si son reconocidos por los oligos contra *cry7Aa* (Figura 11), coincidiendo con los estudios de caracterización de Cry1I (Tailor *et al.* 1992) donde reportan que una cepa de Bt la cual presenta actividad dual contra lepidópteros y coleópteros, al realizar ensayos de hibridación son reconocidas por sondas del gen *cry1Ac* (actividad contra lepidópteros) pero no son detectados con sondas de *cry3A* (actividad contra coleópteros).

Otro evento que pudo haber ocurrido en la obtención de la transconjugante 33/73, es que debido a la alta similitud de ciertas regiones de los genes de la protoxina, como se comprobó con el Dominio I de ambas cepas nativas (Figura 10, carriles 1 y 7), podría ser un factor en la recombinación involucrando a 2 especies de protoxinas que queden integradas establemente, contando para la multiplicidad de protoxinas en subespecies o a la presencia de genes crípticos (Aronson *et al.*, 1986). La recombinación y/o movilización genética podría deberse a la existencia de una secuencia transponible (transposon o secuencia de inserción), que posiblemente este involucrada en funciones de inserción, esta secuencia se puede localizar en diversos plásmidos de Bt y esta conservada entre serotipos que difieren en la especificidad de la δ -endotoxina (Lereclus *et al.*, 1984). Lo antes mencionado, haría suponer que las señales de amplificación de la transconjugante 33/10 (Figura 10, carril 4), fueran debidas a esta complementaridad más que hubiera existido una recombinación entre los

genes de GM-10 y GM-33, dando como resultado la formación de un dominio diferente a la cepa GM-10.

Debido a las similitudes de plásmidos intravarietades entre el complejo de Bt (Carlton y González, 1985), sería necesario realizar una revisión que auxiliara en la identificación de nuevos plásmidos de la toxina transmisibles, que puedan ser combinados en una sola cepa de Bt para generar cepas con múltiples plásmidos de la toxina, por lo que sería de gran importancia continuar estudios del flujo genético en Bt para conocer que plásmidos se encuentran involucrados y que cepas de Bt servirían como vehículos de una combinación de múltiples genes que codifiquen para la protoxina.

4.- *Modificación de la Toxicidad en las Cepas Transconjugantes*

Al analizar la toxicidad de las transconjugantes se observan resultados variados, ya que en la mayoría hay una disminución o pérdida total de la toxicidad en comparación con la cepa receptora (Tabla 8). Pero en el caso de la transconjugante 33/73 se observa un aumento considerable en la toxicidad al compararla con la cepa receptora (GM-33) (Tablas 8 y 9), lo cual es sorprendente, ya que dicha cepa, a pesar de que se demostró que había ocurrido una transferencia de plásmidos importante entre ambas cepas nativas, los plásmidos transferidos son de menor talla molecular a los que se han reportado estar involucrados en la toxicidad. Además los análisis de PCR (Figuras 9-11) y de proteínas (Figuras 2 y 3, carril 6), no se detectó que la transconjugante produjera los dos tipos de toxina ya que al realizar la inmunodetección, ésta fue reconocida sólo por el anti-Cry7Aa pero no por anti-Cry1A. Resultados similares obtuvieron (Bradley *et al.*, 1995), que al estudiar la actividad dual (contra coleópteros y dípteros) de la cepa BtS2, la toxina fue reconocida por anticuerpos contra Cry3A, pero la reacción con

anti-Cry1B fue negativa. Lo anterior coincidiría con algunas observaciones de Aronson y col. (1984) y, Minnich y Aronson (1984), los cuales encontraron que algunas transconjugantes, a pesar de haber obtenido el gen del cristal no lo expresaban hasta encontrarse en la temperatura permisible. También se podría suponer que la actividad contra lepidópteros expresada por la cepa transconjugante 33/73, fuera debido a una nueva proteína diferente a Cry1Ac (Bradley *et al.*, 1995). Respecto a este evento, algunos investigadores han reportado que la interacción de 2 o más protoxinas puede resultar en inclusiones más tóxicas y estables (Aronson y Beckman, 1987) o con especificidades sobrelapadas (Aronson *et al.*, 1986; Honée *et al.*, 1990), aún que existe la posibilidad que las nuevas combinaciones de δ -endotoxinas puede resultar en actividades contra insectos no afectadas por los componentes individuales (Crickmore *et al.*, 1990).

En los resultados de toxicidad de las cepas transconjugantes 33/7, 33/10 y 225/33, a pesar de ser casi nulos, eran los esperados, ya que dichas transconjugantes en los diversos análisis realizados, demostraron conservar idénticas características moleculares a las cepas nativas (GM-33 y HD-225), y estas tampoco tienen actividad tóxica contra *T. ni*.

Con respecto a las transconjugantes que presentaron un cambio en la morfología de la estructura de la proteína, también se observa que disminuye casi por completo su toxicidad, lo que concuerda con la observación de Lereclus y col. (1985), respecto a que la menor modificación en la estructura de la proteína llevará a un cambio dramático en la especificidad hacia el huésped .

Se ha reportado, que muchas cepas de Bt poseen una compleja forma de actividades de proteínas del cristal, lo cual explica la diversidad de actividades insecticidas observadas, entre cepas con el mismo serotipo

flagelar (Dulmage *et al.*, 1981), las observaciones anteriores, indican que la transferencia de plásmidos puede ocurrir bajo condiciones similares a las que encuentra la bacteria en el ambiente, aún que la transferencia varía de acuerdo a la cepa utilizada. Existe el potencial para que nuevas combinaciones de la toxina sean producidas en la naturaleza. Puede ser que el crecimiento de Bt en larvas susceptibles o en otros ambientes adecuados permita la transferencia del plásmido, creando nuevas combinaciones de la δ -endotoxina (Amábile-Cuevas y Chicurel, 1992; Jarret y Stephenson, 1990).

Finalmente, cabe resaltar que en los resultados obtenidos, se observa que hubo un cambio tanto en morfología como en la variación de toxicidad del cristal de algunas transconjugantes. Además en este trabajo reportamos la construcción de una cepa transconjugante (33/73) la cual presenta nueva actividad tóxica contra lepidópteros. Si bien se han reportado que en la naturaleza existen cepas de Bt que presentan actividad dual contra lepidópteros y coleópteros, la presente investigación es la primera en su tipo que se realiza a nivel nacional, y además aporta nuevos conocimientos respecto al sistema de flujo genético en Bt, ya que se ha reportado que la aparición de los diferentes tipos de proteínas tóxicas de Bt se debe a un intercambio de los genes *cry* (Aronson *et al.*, 1987; Carlton, 1993), las cuales a través de un proceso de recombinación dan origen a nuevos tipos de cristal con su actividad tóxica modificada (Lereclus *et al.*, 1984). Para obtener más conocimientos sobre los mecanismos de recombinación que se dan como resultado de éste flujo genético, es necesario realizar pruebas de toxicidad (bioensayos) contra diferentes ordenes de insectos para conocer que tanto se varia la especificidad por estos mecanismos de recombinación.

CONCLUSIONES

- 1.-El flujo genético vía conjugación es una buena herramienta para la obtención de cepas con nueva actividad biológica.**
- 2.-Se encontró una modificación en la morfología del cristal y de su toxicidad.**
- 3.-El cambio en la morfología del cristal en algunas cepas modificó su actividad tóxica.**
- 4.-El incremento en la actividad tóxica puede ser debido al intercambio de ciertas regiones génicas, las cuales darían una modificación en el reconocimiento del receptor en insecto.**

LITERATURA CITADA

- 1) Amábile-Cuevas, C.F. y M.E. Chicurel. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**:189-199.
- 2) Andrup, L., J. Damgaard y K. Wassermann. 1993. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. *J. Bacteriol.* **175**:6530-6536.
- 3) Aronson, A.I., W. Beckman y S.A. Minnich. 1984. Regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin production. pp 359-374. En: A.T. Ganesan y J.A. Hoch (eds.), *Genetics and biotechnology of Bacilli*. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y.
- 4) Aronson, A.I., W. Beckman y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**:1-24
- 5) Aronson, A.I. y W. Beckman. 1987. Transfer of chromosomal genes and plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1525-1530.
- 6) Battisti, L., B.D. Green y C.B. Thorne. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **162**:543-550.
- 7) Bora, R.S., M.G. Murty, R. Shenbagarathai, y V. Sekar. 1994. Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*

subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 214-222.

- 8) Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever y L.S. Bauer. 1995. The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invert. Pathol.* **65**:162-173.
- 9) Carlton, B.C. y J.M. González Jr. 1984. Plasmid-associated delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. pp 387-400. En: A. T. Ganesan y J.A. Hoch (Ed.), *Genetics and Biotechnology of bacilli*, vol. 2. Academic Press, Inc., Nueva York.
- 10) Carlton, B.C. y J.M. González. 1985. Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Biol. Microb. Differ., Proc. Int. Spore Conf.* pp 246-252.
- 11) Carlton, B.C. 1993. Genetics of Bt insecticidal crystal proteins and strategies for the construction of improved strains. pp 326-337. En: R.D. Lumsden y J.L. Vaughn (eds.), *Pest Management: Biologically Based Technologies*. American Chemical Society.
- 12) Caramori, T., A.M. Albertini y A. Galizzi. 1991. In vivo generation of hybrids between two *B. thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene.* **98**:37-44.

- 13) Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca y A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3826-3831.
- 14) Crickmore, N., C. Nicholls, D.J. Earp, T.C. Hodgman y D.J. Ellar. 1990. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal δ -endotoxin combinations. *Biochem. J.* **270**:133-136.
- 15) Crickmore, N, 1996, Italia
- 16) Cuellar-Gómez, G.R. 1994. Flujo genético entre serotipos de *Bacillus thuringiensis*. Tesis. F.C.B. U.A.N.L.
- 17) Chapman J.S. y B.C. Carlton. 1985. Conjugal plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*. pp 453-467. En: D.R. Helinski, S.N. Cohen, D.B. Clewell, D.A. Jackson y A. Hollaender (eds.), *Plasmids in Bacteria*. Plenum Press. Nueva York y Londres.
- 18) Damas-Buenrostro, L.C. 1995. Tesis. FCB/UANL.
- 19) Donovan, W.P., J.M. González Jr., M.P. Gilbert y C. Dankocsik. 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.
- 20) Donovan, W.P., M.J. Rugar, A.C. Slaney. T. Malvar, M.C. Gawron-Burke y T.B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis*

insecticidal crystal proteins toxic to *Coleoptera* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3921-3927.

- 21) Dulmage, H.T., Cooperators. 1981. En Burges, H.D. (ed), *Microbial control of pests and plants disease 1970-1980*. Academic Press, London. pp 193-222.
- 22) Ellar, D.J., B.H. Knowles, M.Z. Haider y F.A. Drobniowski. 1986. Investigation of the specificity, cytotoxic mechanisms and relatedness of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins from different pathotypes. En: P. Falmagne, J.E. Alouf, F.J. Fehrenbach, J. Jelyaszewicz (ed.), "Bacterial Protein Toxins". Gustav, Fisher, Suttgart. pp 41-28.
- 23) Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology*. **10**:271-275.
- 24) Fernandez-Astorga, A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry y I. Barcina. 1992. Biotic and abiotic factors affecting-plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:392-398.
- 25) González, J.M., Jr. y B.C. Carlton. 1980. Patterns of plasmid ADN in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. **3**:92-98.
- 26) González, J.M., Jr., H.T. Dulmage y B.C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. **5**:351-365.

- 27) González, J.M., Jr. y B.C. Carlton. 1982. Plasmid transfer in *Bacillus thuringiensis*.
En: "U.N. Streips, S.H. Goodgal, W.R. Guild, y C.A. Wilson (ed)". Genetic Exchange: a Celebration and a New Generation. Marcel Dekker, Inc., New York. pp 85-95.
- 28) González, J.M., Jr., B.J. Brown y B.C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**:6951-6955.
- 29) González, J.M., Jr. y B.C. Carlton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *B. thuringiensis* variety *israelensis*. Plasmid **11**:28-38.
- 30) Höfte, H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *B. thuringiensis*. Microbiol. Rev. **53**:242-255.
- 31) Honée, G., W. Vriezen y B. Visser. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. Appl. Environ. Microbiol. **56**:823-825.
- 32) Izuka, T., R.M. Fausty R.S. Travers. 1981. Comparative profiles of extrachromosomal DNA in single and multiple crystalliferous strains of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki*. J. Seric. **50**:120-133.
- 33) Izuka, T., R.M. Faust, y M. Ohba. 1983. Comparative profiles of plasmid DNA and morphology of parasporal crystals in four strains of *Bacillus thuringiensis* subsp *darmstadiensis*. Appl. Ent. Zool. **18**:486-494.

- 34) Jarret, P. y M. Stephenson. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1608-1614.
- 35) Johnson, D.E., D.M. Niezgodski y G.M. Twaddle. 1980. Parasporal crystal produced by oligosporogenous mutants of *Bacillus thuringiensis* (Spo⁻Cry⁺). *J. Microbiol.* **26**:486-491.
- 36) Kalman, S. K.L. Kiehne, N. Cooper, M.S. Reynoso y T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3062-3068.
- 37) Klier, A., F. Fargette, J. Ribier y G. Rapoport. 1982. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain *berliner* 1715. *EMBO J.* **1**:791-799.
- 38) Klier, A., C. Bourgoïn y G. Rapoport. 1983. Mating between *B. subtilis* and *B. thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. *Mol. Gen. Genet.* **191**:257-262.
- 39) Kronstad, J.W., H.E. Schnepf y H.R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.* **154**:419-428.
- 40) Lambert, B., H. Höfte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2536-2542.

- 41) Lecadet, M.M., J. Chaufaux, J. Ribier y D. Lereclus. 1992. Construction of novel *B. thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:840-849.
- 42) Lereclus, D., G. Menou, y M.M. Lecadet. 1983. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *Bacillus thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAM β 1. *Mol. Gen. Genet.* **191**:307-313.
- 43) Lereclus, D., A. Klier, G. Menou y M.M. Lecadet. 1984. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J.* **3**:2561-2567.
- 44) Lereclus, D., M.M. Lecadet, A. Klier, J. Ribier, G. Rapoport y R. Dedonder. 1985. Recent aspects of genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis*. *Biochimie* **67**:91-99.
- 45) Minnich, S.A. y A.I. Aronson. 1984. Regulation of protoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **158**:447-454.
- 46) Naglich, J.G. y Andrews, R.E., Jr. 1988. Tn916-dependent conjugal transfer of pC194 and pUB110 from *Bacillus subtilis* into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid* **20**:113-126.
- 47) Ohba, M. y K. Aizawa. 1986. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolates from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**:12-20.

- 48) Pereyra-Alferéz, B., M.M. Iracheta-Cardenas, G.R. Cuéllar-Gómez, Z. Jimenez-Salas y L.C. Damas-Buenrostro. 1994. Manual de genética de microorganismos. F.C.B., U.A.N.L.
- 49) Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill. 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongiensis*: characterization and screening for insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:295-302.
- 50) Rajnchapel-Mesaí, J. 1990. Les biopesticides. *Biofutur*. Juillet/Aout: 23-34.
- 51) Reddy, A., L. Battisti y C.B. Thorne. 1987. Identification of self-transmissible plasmids in four *B. thuringiensis* subspecies. *J. Bacteriol.* **169**:5263-5270.
- 52) Sekar. V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland y M.J. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:7036-7040.
- 53) Sick, A. F. Gaertner y A. Wong. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.* **18**:1305.
- 54) Schnepf, H.E. y R. Whieley. 1981. Cloning and expresion of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:2893-2897.
- 55) Tailor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan y S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin

entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* **6**:1211-1217.

- 56) Wiwat, C., W. Panbangred y A. Bhumiratama. 1990. Transfer of plasmids and chromosomal genes amongst subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *J. Ind. Microbiol.* **6**:19-27.

APÉNDICE A

Medios de Cultivo.

(Todos los medios se ajustan a pH 7.0 y se esterilizan en autoclave a 15 lb/pulg² por 20 min).

AGAR NUTRITIVO (g/l)

Extracto de carne	3
Peptona	5
Agar	18

CALDO NUTRITIVO (g/l)

Extracto de carne	3
Peptona	5

YPA (g/l)

Peptona	8
NaCl	5
Extracto de levadura	1
MgSO₄·7H₂O 0.01 M	250 µl
CaCl₂ 0.1 M	250 µl
Agar	15

YPA SUAVE (g/l)

Peptona	8
NaCl	5
Extracto de levadura	1
MgSO₄·7H₂O 0.01 M	250 µl
CaCl₂ 0.1 M	250 µl
Agar	6

YPB	(g/l)
Peptona	8
NaCl	5
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 M	250 µl
CaCl ₂ 0.1 M	250 µl

Caldo Luria-Bertani (LB)*

Triptona	10 g/l
Extracto de Levadura	5g/l
NaCl	10g/l

Agar LB*

Igual que el caldo LB, excepto que contiene 15 g/l de agar-agar.

APÉNDICE B

Soluciones.

(A menos que se especifique lo contrario, todos los buffer Tris se ajustan a pH 8.0 y se filtran con membrana millipore de 0.45 mm).

Buffer TAE 10X

Tris base	48.4 g
Ac. Acético Glacial	11.51 ml
Aforar con agua bidestilada a 1 l.	

Buffer Tris-Boratos 5X

Tris	89 mM
EDTA Na ₂	2.5 mM
Acido bórico	89 mM

Buffer TBS 10X

Tris base	100mM
NaCl	1.5 M

Buffer de Transferencia

Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml
Agua Bidestilada	800 ml

**Buffer de Electroforesis de
Proteínas 1X**

Tris	3.75 g/l
Glicina	18 g/l
SDS	1.25 g/l

Buffer Tris 1.5 M (pH 8.8)

Tris	181.5 g/l
------	-----------

Buffer Tris 1.0 M (pH 6.8)

Tris	121.1 g/l
------	-----------

Mezcla Litica

Buffer Tris	2.5 ml
SDS 10 %	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2-β-mercaptoetanol	1.0 ml
H ₂ O	0.5 ml

Buffer de Carga

Azul de Bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol en agua	30%

Tween 20 al 2%

Tween 20	2 ml
Buffer TBS	98 ml

Tween 20 al 0.05%

Tween 20 2% en TBS	2.5 ml
Buffer TBS	97.5 ml

Solución Cromogénica

Tris	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl ₂	0.05 M
BCIP	5 mg
NBT	10 mg
Ajustar a pH 9.5	

Solución de Tinción

Azul Brillante R	0.012 g
Metanol	20 ml
Ac. Acético	3.6 ml
Agua Bidestilada	26 ml

Solución de Destinción I

Metanol	100 ml
Ac. Acético	20 ml
Agua Bidestilada	80 ml

Solución de Destinción II

Acido Acético	70 ml
Metanol	50 ml
Agua Bidestilada	930 ml

Mezcla Lítica

Buffer Tris 1 M (pH 6.8)	0.31 ml
SDS	2.0 ml
Glicerol	1.0 ml
2-Mercaptoetanol	0.5 ml
Agua bidestilada	1.34 ml

Mezcla SDS

Buffer Tris-boratos 1 X	100 ml
SDS	2 g
Sacarosa	5 g
Azúl de bromofenol	0.05 g

SDS 10%

Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua bidestilada

Persulfato de Amonio 10%

Disolver 1 g en 9 ml de agua bidestilada

Solución de Ponceau S

Ponceau S	2 g
Ac. tricloroacético	30 g
Ac. sulfosalicílico	30 g
Aforar con agua bidestilada a 100ml	

Solución Sustrato

Tris-HCl	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl₂	0.05 M
pH	9.5

Acrilamida-Bisacrilamida 30%

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Aforar con agua bidestilada a 100 ml	
Filtrar en membrana millipore de 0.45 mm.	

Solución de Lizosima

Lizosima	2 mg/ml
Sacarosa	0.2 µg/ml
RNAasa	100 µg/ml
En buffer TE	

Buffer TE

Tris	10 mM
EDTA Na₂	1 mM

APÉNDICE C

Electroforesis horizontal en gel de agarosa

- 1.-Fundir la agarosa 1% preparada en buffer TAE en una plancha térmica. Dejar enfriar a aproximadamente 50°C y verter el volumen apropiado para formar una capa de 5 mm en el molde. Previamente el molde debe de haberse montado según las especificaciones del fabricante. Colocar el peine para formar los hoyos donde se depositarán las muestras, dejando un espacio de 1 mm entre el borde inferior del peine y la base del molde. Dejar gelificar completamente la agarosa (alrededor de 20 min). Retirar el peine y lavar los hoyos con buffer TAE o agua bidestilada para eliminar restos de agarosa no gelificada.
- 2.-Colocar el gel con su base en la cámara de electroforesis horizontal, y llenar el depósito con el volumen de buffer TAE necesario para cubrir el gel con un exceso de aproximadamente 1 o 2 mm por encima del mismo.
- 3.-Mezclar 5 ml de la solución de ADN con 2 ml de buffer de carga. Usar la puntilla de la micropipeta para mezclar bien.
- 4.-Depositar el ADN en cada hoyo, usando una micropipeta.
- 5.-Colocar la tapa de la cámara y conectar los cables de los electrodos de tal forma que el negativo quede atrás de las muestras y el positivo en el extremo opuesto. Conectar los cables a la fuente de poder y dejar correr el gel a 100 V hasta que el indicador azul de bromofenol llegue a 3/4 del gel (aprox. 45-60 min).

- 6.-Apagar la fuente de poder, retirar la tapa y sacar el gel con su base.
- 7.-Colocar el gel en una charola de plástico y agregar un volumen de bromuro de etidio suficiente para cubrirlo completamente. El bromuro de etidio es un potente carcinógeno, de aquí en adelante el gel debe de manejarse con guantes de látex y con las precauciones necesarias para evitar que entre en contacto directo con la piel. Dejar teñir por tres min.
- 8.-Devolver el bromuro de etidio a su recipiente y lavar el gel con abundante agua corriente.
- 9.-Colocar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta para observar el ADN que aparece como bandas color anaranjado fluorescente. La luz ultravioleta puede causar graves lesiones en la piel y ojos si se expone directamente, usar anteojos y/o escudo de plexiglass. El ADN se desplaza más lejos del polo negativo conforme sea más pequeño o más compacto.

APÉNDICE D

Fotografiado de los geles de agarosa.

- 1.-Colocar el gel sobre el transiluminador de luz ultravioleta (sin encenderlo) acoplado a la cámara Polaroid. Enfocarlo usando los controles de la cámara hasta que un letrero colocado sobre el gel aparezca nítido en la pantalla de la cámara.
- 2.-Colocar el cartucho de la película blanco y negro Polaroid 55 en el reservorio de cartuchos, teniendo la precaución de que éste se encuentre en la condición L (Load=carga).
- 3.-Colocar el reservorio en el carro de exposición de la cámara y correr este carro hasta dejarlo sobre el obturador.
- 4.-Apagar las luces y encender el transiluminador, estirar el cartucho de la película por las pestañas para exponer la película. La luz ultravioleta puede causar graves lesiones en la piel y ojos si se expone directamente, usar anteojos y/o escudo de plexiglass. Realizar la exposición moviendo la palanca del obturador a la posición de abierto. Dejar exponer por 2 min.
- 5.-Sin encender la luz, cerrar el obturador, devolver la película dentro de su cartucho y apagar el transiluminador. Después de esto (y sólo después), encender las luces.
- 6.-Desmontar el reservorio de cartuchos del carro de exposición. Mover la palanca del reservorio a la posición P (Processing=Revelado). Estirar suave, pero firmemente el cartucho por las pestañas para

revelar la película. Sacar completamente el cartucho y colocarlo en una superficie plana por dos min para que se efectúe el revelado.

7.- Desprender las dos caras del cartucho jalando las pestañas de cada una. Separar el negativo de la película y desmontarlos del cartucho.

8.- El negativo debe lavarse con agua destilada en agitación constante por 2 h.

APENDICE E

Soluciones para electroforesis en geles de Tris/Glicina SDS-Poliacrilamida

6%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
H ₂ O	2.700	5.300	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
Mezcla de Acrilamida 30% ^a	1	2	3	4	5	6	8	10
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10% ^b	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10% ^c	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ^d	0.004	0.008	0.012	0.016	0.020	0.024	0.032	0.040
8%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50ml
H ₂ O	2.3	4.6	7	9.3	11.7	13.9	18.6	23.2
Mezcla de Acrilamida 30%	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.030
10%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50ml
H ₂ O	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
Mezcla de Acrilamida 30%	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012	0.016	0.020
12%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50ml
H ₂ O	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
Mezcla de Acrilamida 30%	2	4	6	8	10	12	14	20
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012	0.016	0.020
15%	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50ml
H ₂ O	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
Mezcla de Acrilamida 30%	2.5	5	7.5	10	12.5	25	20	25
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.010	0.012	0.016	0.020

Gel Concentrador	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Mezcla de Acrilamida 30%	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
Tris 1.0 M (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
APS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.010

^a Comunmente Acrilamida 29.2% y N,N'-metilen-bis-acrilamida 8%; ^b Dodecil Sulfato de Sodio; ^cPersulfato de amonio; ^dN,N,N',N'-Tetrametilendiamina.

APÉNDICE F

MOVILIDAD DEL ADN (lineal de doble cadena) DURANTE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA SEGUN PORCENTAJE DEL GEL.

% Agarosa	Limite de Separación (pb)	Naranja G	Azul de Bromofenol	Xilencianol
0.7%	500 - 10,000	300	1400	15000
1.0%	350 - 7,000	170	1000	6500
1.5%	200 - 4,000	70	450	3000
2.0%	100 - 2,000	40	240	1500

% Poliacrilamida	Limite de separación (pb)	Azul de bromofenol	Xilencianol
3.5%	100 - 1,000	100	460
5.0%	80 - 500	65	260
8.0%	60 - 400	45	160
12.0%		20	70
20.0%	10 - 100	12	45

