

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



CORRELACION ENTRE PLASMIDOS ESPECIFICOS Y
ACTIVIDAD DE LA δ -ENDOTOXINA DE
Bacillus thuringiensis.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
INDUSTRIAL

PRESENTA

Q.F.B. JESUS ALBERTO GOMEZ TREVIÑO

MONTERREY, N. L.

DICIEMBRE DE 1996

TM

QR82

.B3

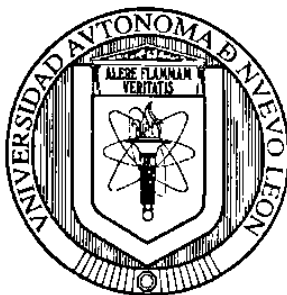
G6

C.1



1080074573

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**CORRELACION ENTRE PLASMIDOS ESPECIFICOS Y
ACTIVIDAD DE LA δ -ENDOTOXINA DE
Bacillus thuringiensis.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
INDUSTRIAL**

PRESENTA:

QFB. JESUS ALBERTO GOMEZ TREVIÑO

TM
QR82
.B3
G6



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

CORRELACION ENTRE PLASMIDOS ESPECIFICOS Y ACTIVIDAD DE LA
 δ -ENDOTOXINA DE *Bacillus thuringiensis*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA:

QFB. JESUS ALBERTO GOMEZ TREVIÑO

COMISION DE TESIS

Dr. Benito Pereyra Alferez.
Presidente.

M.C. Sergio Fernández Delgadillo.
Secretario.

M.C. María Teresa Garza González.
Vocal.

M.C. Martha Alicia Suárez Herrera.
Coord. M. en Ciencias, FCC, UANL.

A mi Familia, con todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., a través de su Jefe, Dr. Luis J. Galán Wong; por todas las facilidades brindadas en el desarrollo de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Benito Pereyra Alférez, por su asesoría y valiosos consejos en el desarrollo de este trabajo de investigación, pero sobre todo por su amistad sincera.

Al Director de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L., Ing. José Manuel Martínez Delgado; por todas las facilidades y el apoyo brindados.

A M.C. Martha Alicia Suárez Herrera, Coordinadora de la Maestría en Ciencias de la División de Estudios Superiores, de la Facultad de Ciencias Químicas en esta Universidad; por todo el apoyo brindado, sus consejos, y sobre todo por su gran ejemplo de incansable lucha.

A la jefatura de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, de la Facultad de Ciencias Químicas de esta Universidad; a través de su Coordinadora, Q.F.B. Emilia E. Vázquez, por todas las facilidades brindadas.

De una manera muy especial, mi más profundo agradecimiento a M.C. María Magdalena Iracheta C.; por la gran ayuda prestada en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros tesisistas, Zacarías, René, Carlos, Luis, Jesús e Ivette; porque de todos los momentos que pasamos juntos trabajando, nació una gran amistad.

También, a la Familia Lara Viera; muy especialmente a América y Jorge por todas sus atenciones, y por compartir juntos tantos días de esfuerzos.

Y no podía faltar, un grandioso gracias, a las cepas de *Bacillus thuringiensis* empleadas en esta tesis, por ofrecernos datos que nos lleven a una mejor comprensión de su potencial.

**Los problemas significantes en la vida
no pueden ser solucionados
al mismo nivel de pensamiento
en el que estábamos...**

...cuando los creamos.

A. Einstein.

**ESTA TESIS SE REALIZO
EN EL LABORATORIO DE
BIOLOGIA MOLECULAR Y GENETICA
DE MICROORGANISMOS DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

INDICE

Lista de abreviaturas	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	4
Antecedentes	5
I. Control biológico	6
II. <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
III. Plásmidos de <i>B. thuringiensis</i>	10
Materiales y métodos	15
I. Selección de cepas	15
II. Desarrollo del proceso de curado de plásmidos	15
III. Obtención de perfiles de plásmidos de cepas nativas y curadas	16
IV. Obtención de los perfiles de proteínas de cepas nativas y curadas	17
V. Bioensayos	18
Resultados	20
I. Curado de plásmidos	20
II. Electroforesis de proteínas e inmunodetección de la δ -endotoxina	26
III. Bioensayos	31
Discusión	32
Conclusiones	37
Apéndice	38
Literatura citada	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ca.	Circa (aproximado)
g	Gramos
mg	Miligramos
µg	Microgramos
%	Por ciento
mM	Milimolar
l	Litros
ml	Mililitros
µl	Microlitros
Md	Megadaltons
kDa	Kilodaltons
µm	Micras
mm	Milímetros
cm ²	Centímetro cuadrado
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celcius
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo
V	Volts
mA	Miliamperios
pH	Potencial de hidrógeno
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
kpb	Kilo pares de bases
SDS	Dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés)
NBT	Azul Nitrotetrazolium (siglas en inglés)
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-Indoil Fosfato (siglas en inglés)
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunos microorganismos utilizados en el control de insectos plaga	6
Tabla 2. Cepas de <i>B. thuringiensis</i> y sus plásmidos	11
Tabla I. <i>B. thuringiensis</i> HD-73 nativa y cepas curadas	20
Tabla II. <i>B. thuringiensis</i> GM-7 nativa y cepas curadas	23
Tabla III. <i>B. thuringiensis</i> GM-33 nativa y cepas curadas	24
Tabla IV. <i>B. thuringiensis</i> GM-10 nativa y cepas curadas	26
Tabla V. Proteínas del cristal de <i>B. thuringiensis</i> HD-73 nativa y cepas curadas	27
Tabla VI. Proteínas del cristal de <i>B. thuringiensis</i> GM-7 nativa y cepas curadas	28
Tablas VII. Proteínas del cristal de <i>B. thuringiensis</i> GM-33 nativa y cepas curadas	29
Tabla VIII. Proteínas del cristal de <i>B. thuringiensis</i> GM-10 nativa y cepas curadas	30
Tabla IX. Mortalidad de larvas de <i>T. ni</i> frente a cepas de <i>B. thuringiensis</i> nativas y curadas	31

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Perfil de plásmidos de cepas HD-73 nativa y curadas	20
Fig. 2. Perfil de plásmidos de cepas GM-7 nativa y curadas	22
Fig. 3. Perfil de plásmidos de cepas GM-33 nativa y curadas	24
Fig. 4. Perfil de plásmidos de cepas GM-10 nativa y curadas	25
Fig. 5. Perfil de proteínas de cepas HD-73 nativa y curadas	27
Fig. 6. Perfil de proteínas de cepas GM-7 nativa y curadas	28
Fig. 7. Perfil de proteínas de cepas GM-33 nativa y curadas	29
Fig. 8. Perfil de proteínas de cepas GM-10 nativa y curadas	30

RESUMEN

Con el objetivo de analizar el posible papel de algunos plásmidos en diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), éstas se sometieron a varios procesos de curado de plásmidos mismos que se relacionaron con la capacidad de sintetizar el cristal paraesporal, la morfología colonial y el peso molecular de las proteínas cristal insecticidas (PCI). Se analizaron cepas de la var. *kurstaki* (cepa HD-73); var. *aizawai* (cepas GM-7 y GM-10); y var. *monterrey* cepa (cepa GM-33). Como era de esperarse, las cepas silvestres variaron en el contenido y talla molecular de los plásmidos. La cepa silvestre de HD-73 posee, al menos, cuatro plásmidos de ca. 10.5, 11.9, 18.2 y 26.7 Md. A partir de la cepa silvestre, se obtuvieron un total de cinco derivadas, tres Cry⁺, productoras del cristal paraesporal, y dos Cry⁻, acristalíferas. Las cepas Cry⁺ variaron en cuanto al tipo de plásmido perdido, pero en ningún caso presentaron cambios en la morfología colonial ni del cristal paraesporal, ni tampoco en los niveles de toxicidad de las PCI. Las dos cepas Cry⁻ presentaron cambios en la morfología colonial. La cepa silvestre de GM-7 mostró poseer al menos cinco plásmidos de ca. 6.8, 10.5, 11.6, 19.8 y 33.8 Md. Se obtuvieron dos cepas curadas productoras del cristal, el cual está presente con la misma morfología y niveles de toxicidad que el producido por la cepa silvestre. Para la cepa GM-10, se estableció que cuenta con al menos cuatro plásmidos de ca. 5.3, 14.7, 19.0 y 37.6 Md. De esta cepa se lograron obtener dos curadas que producen un cristal con la misma morfología y toxicidad que el producido por la cepa nativa. La cepa GM-33 reveló poseer al menos dos plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 20.7 y 52.8 Md, de esta cepa se obtuvieron tres derivadas que producen un cristal paraesporal de peso molecular inferior al producido por la cepa nativa. Las cepas Cry⁺ seleccionadas fueron sometidas a ensayos de inmunodetección utilizando anticuerpos poli anti-Cry1A para las cepas HD-73, GM-7 y GM-10 y el poli anti-Cry7Aa para la cepa GM-33. Los resultados de estos ensayos mostraron que no existió cambio en la especificidad del anticuerpo por las PCI, lo que sugiere que ninguno de los plásmidos perdidos está involucrado en la síntesis del cristal en las cepas HD-73, GM-7 y GM-10. Sin embargo, para la cepa GM-33, se presentaron cambios en la talla molecular de la proteína reconocida por el antisuero, ya que ésta disminuyó el peso molecular pasando de ca. 129 kDa (cepa silvestre) a ca. 103.2 kDa en las cepas seleccionadas. Este hallazgo es importante, porque no existe un reporte previo de que, sin variar la morfología del cristal, la talla molecular de las PCI, sea sustancialmente diferente. Los resultados de los bioensayos contra larvas neonatas de *Trichoplusia ni* revelaron que no existió variación en la actividad biológica de las cepas curadas con respecto a las silvestres cuando se probaron dosis de 0.1 y 1 µg/cm² de dieta para las cepas HD-73, GM-7 y GM-10 y 1.0 y 10 µg/cm² para GM-33.

INTRODUCCION

El control de insectos plaga de importancia agrícola, forestal y salud pública es un problema que involucra a diversos sectores de la sociedad y la compatibilidad de los métodos de control con la ecología y preservación del medio ambiente. Tradicionalmente, el control de este tipo de organismos se realiza mediante la aplicación de insecticidas químicos. Sin embargo, éstos presentan baja o nula especificidad por lo que resultan tóxicos contra insectos benéficos, animales no blanco y para el hombre; presentan alta residualidad, además de ocasionar contaminación del medio ambiente y mantos freáticos. Una alternativa para este tipo de procedimientos lo representa el Control Biológico o Biocontrol. El Biocontrol se define como la utilización de organismos naturales o modificados genéticamente o al uso del producto del (de los) gen(es) para reducir el efecto nocivo de un organismo en favor de un organismo benéfico. Con un antecedente de práctica de al rededor de 1700 años en algunos países de Asia, y más de cien años en Europa y los Estados Unidos de América; este método, por las ventajas que ofrece, se perfila como una solución a muchos de los grandes problemas ocasionados por la excesiva liberación de plaguicidas de tipo químico al medioambiente (Frust y Sullivan, 1990; Gabriel, 1990; Galán-Wong *et al*, 1993).

Los insectos son susceptibles al ataque de un gran número de organismos entomófagos (predadores) y entomopatógenos. Dentro de los entomopatógenos se encuentra una gran variedad de microorganismos donde destacan virus, bacterias y hongos (Rajchapel-Mesaï, 1993). Los microorganismos con mayor actividad entomopatógena pertenecen al grupo de bacterias formadoras de esporas, especialmente *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt es un bacilo Gram positivo, esporulado, con flagelos peritricos y productor de un cuerpo paraesporal, cristal, de naturaleza proteica que puede ser tóxico para diversos ordenes de insectos en sus estadios larvarios. En comparación con los insecticidas químicos, del tipo de los organoclorados y organofosforados, las cepas de Bt producen toxinas con mecanismos de acción altamente específicos, de tal manera que la actividad tóxica de un preparado en particular resulta activo para un cierto grupo de insectos plaga, y no para insectos benéficos u otros organismos incluyendo al hombre. Otra ventaja de estos bioinsecticidas sobre los plaguicidas químicos, es la baja residualidad en el medioambiente, asegurando un nulo impacto sobre los ecosistemas. Esto avala el que Bt se haya

utilizado extensamente como bioinsecticida en agricultura y para combatir algunos insectos vectores de enfermedades (Wiwat *et al*, 1990; Koziel *et al*, 1993).

El cristal de Bt puede estar formado por una o varias proteínas cristal insecticidas (PCI) también llamadas δ -endotoxinas. Este cristal es sintetizado durante la fase de esporulación. Las δ -endotoxinas son sintetizadas en forma de protoxinas, que al ser ingeridas por el insecto blanco son solubilizadas en su intestino y procesadas a péptidos tóxicos por la acción de proteasas, las cuales liberan el fragmento amino terminal generando así la toxina verdadera. La toxina provoca lisis de las células del epitelio intestinal de las larvas y consecuentemente su muerte. Las δ -endotoxinas presentan, de manera general, actividad tóxica contra larvas de lepidópteros, dípteros y coleópteros, aunque recientemente se han reportado cepas que muestran ser activas de manera específica contra protozoarios patógenos, ácaros y algunos tremátodos (Whiteley y Schnepf, 1986; Carlson y Kolsto, 1993). Las δ -endotoxinas pueden estar compuestas por una o varias proteínas, mismas que son codificadas por genes localizados comunmente en plásmidos. Sin embargo, este tipo de genes también pueden estar presentes en el cromosoma bacteriano. Además, se ha establecido que cada cepa de Bt puede contener diferente número de plásmidos, habiendo diferencias inclusive dentro de una misma variedad y serotipo (Gonzalaz *et al*, 1982; Krostand *et al*, 1983).

El estudio de la genética del gen que codifica para la δ -endotoxina se ha basado en el "curado" (eliminación) de diferentes plásmidos, lográndose establecer una relación entre los plásmidos específicos involucrados en la producción de bacteriocinas, inclusiones proteicas cristalinas y partículas fagolíticas. Por consiguiente, se puede establecer con certeza en qué plásmido se localiza el gen que codifica para una función en particular. De esta manera, Gonzalez, Dulmage y Carlton, en 1980, obtuvieron mutantes acristalíferas de Bt, las cuales fueron sometidas a un análisis de su perfil de plásmidos y comparados con los perfiles de las cepas nativas correspondientes. Los resultados obtenidos son evidencia de la relación que existe entre estos elementos de ADN extracromosómico y la producción de la δ -endotoxina en Bt (Gonzalaz *et al*, 1980).

De acuerdo con lo anteriormente señalado, se presentan las siguientes interrogantes: ¿Qué efecto tiene la pérdida de uno o varios plásmidos sobre la morfología del cristal, los niveles de producción de los cristales y la toxicidad de éstos?, ¿existe algún efecto sobre las características de morfológicas una cepa como resultado de la pérdida de algún tipo especial de plásmidos?. Estos cuestionamientos nos llevan a plantear la siguiente hipótesis: La eliminación de ciertos plasmidos podrían generar cepas con diferencias en la producción de la δ -endotoxina, ya sea por la eliminación del plasmido específico que contiene el gen o bien que el plásmido involucrado pudiese participar en algún otro evento metabólico.

Objetivo General:

Establecer la relación que existe entre plásmidos específicos y la actividad de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*, haciendo énfasis en Toxicidad, Morfología y Producción.

Objetivos Particulares:

- 1.- Establecer un sistema de curado de plásmidos.
- 2.- Análisis macro y microscópico de las colonias, cristales y células seleccionadas.
- 3.- Determinación del perfil de plásmidos de las cepas seleccionadas.
- 4.- Determinación del perfil de proteínas y toxicidad de los cristales de las cepas seleccionadas.

ANTECEDENTES

I.- Control biológico.

El uso de insecticidas químicos sintéticos ha sido, por décadas, la base para el control de insectos plaga. Desde su aparición hacia finales de los años cuarenta, este tipo de sustancias junto con muchos otros productos de tipo agroquímico; han contribuido para que los rendimientos en producción agrícola a nivel mundial sean notoriamente más extensos que en los tiempos en los que se carecía de ellos. Además, los plaguicidas químicos han jugado un papel primordial en la eliminación de insectos considerados como vectores de enfermedades importantes como malaria, dengue, filariasis, entre otras (Luck *et al.*, 1977).

Sin embargo, el extenso uso de insecticidas químicos, principalmente del tipo de los organoclorados y organofosforados han llevado a esta estrategia de control unilateral a revelar aspectos, hoy en día considerados desventajas, tales como: efectos de bioacumulación y biomagnificación, efecto residual en productos agrícolas, desarrollo de resistencia por parte del insecto plaga, entre otros. Lo cual ha llevado a reconsiderar la relación que ella misma ofrece en cuanto a riesgo-beneficio se refiere (Wigglesworth, 1945; Picket, 1949).

Como alternativa a toda esta problemática, sin duda, producto del limitado conocimiento de los efectos de sustancias químicas en otros componentes del ecosistema de la plaga; nace al rededor del año 1959 el término "Control Biológico". En un principio definido como la acción de parásitos, predadores o patógenos sobre una población de hospederos o presas, los cuales provocan una posición en su equilibrio generalmente más baja que la que prevalecería en ausencia de estos agentes (Stern *et al.*, 1959). Es hacia 1987, cuando integrado con aspectos tecnológicos más recientes, el concepto se redefine como el uso de un organismo natural o modificado genéticamente, genes o el producto de estos mismos con el propósito de reducir los efectos causados por la presencia de organismos plaga (Frustr y Sullivan, 1990; Gabriel, 1990).

Existe una gran variedad de microorganismos que presentan patogenicidad hacia insectos, entre los que se pueden contar virus, bacterias y hongos (Tabla 1). Sin embargo, cada uno de ellos difieren entre si en la forma de infección, sitio de replicación y mecanismo de patogenicidad.

Mientras unos presentan un amplio espectro de actividad, otros exhiben preferencia hacia ciertas especies en particular, o bien; son selectivos para estadios larvarios o insectos en la etapa adulta. En particular, en el grupo de las bacterias entomopatógenas se incluyen especies con capacidad de infectar insectos sanos, pero también está presente un gran número de patógenos oportunistas que se multiplican rápidamente al tener contacto con el hemocele a través de daños provocados previamente por los primeros (Aronson *et al.*, 1986).

Tabla 1.- Algunos microorganismos utilizados en el control de insectos plaga

Tipo de microorganismo	Nombre científico	Insectos blanco
Hongos	<i>Verticillium lecanii</i>	Pulgón de invernadero
	<i>Bauveria bassiana</i>	Lepidópteros
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Homópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros
Protozoarios	<i>Nosema fumiferanae</i>	Lepidópteros
	<i>Vairimorpha necatrix</i>	Lepidópteros
Bacterias	<i>Bacillus polillae</i>	Coleópteros
	<i>Bacillus lentimorbus</i>	Coleópteros
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Mosquitos
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lepidópteros, coleópteros, dípteros, ácaros, nemátodos, platelmintos, protozoarios
	<i>Clostridium malacosome</i>	<i>Malacosoma sp.</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patógeno oportunista de insectos
	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Insectos susceptibles a <i>Steinernema feltia</i>
Virus	<i>Rickettsiella melolontha</i>	Coleópteros, dípteros, ortópteros
	NPV y GV	Lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros

Adaptado de A. Aronson *et al.*, 1986 y Rajinchaapel-Mesa, 1990.

El mayor grupo de microorganismos con mecanismos para infectar y provocar la muerte de insectos es el grupo de las bacterias formadoras de esporas. Para estas especies, la hemolinfa de larvas de insectos es un ambiente muy propicio que proporciona nutrientes para su proliferación. Dentro de este grupo de bacterias se distingue a *Bacillus thuringiensis*, el cual a

cochado un gran interés tanto científico como económico debido a la producción de una toxina altamente específica sobre una gran variedad de insectos, y por la utilización de la misma en la eliminación de insectos de interés agrícola y de salud pública (Aronson et al, 1986; Galán-Wong, 1993).

II.- *Bacillus thuringiensis*.

1.- Desarrollo.

El descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* se le atribuye al científico japonés S. Ishiwata, quien en 1901, reporta el aislamiento de una bacteria a partir de larvas de *Bombix mori* enfermas, a la cual denomina *Bacillus sotto* (Ishiwata, 1901). Este hecho marca el inicio de un importante cambio tanto en el desarrollo científico como en el del uso y producción de insecticidas biológicos. Una década más tarde, en 1911, Berliner aisla este mismo microorganismo de palomillas de la harina (*Ephestia kuhniella*) enfermas; lo describe como un bacilo esporulado, Gram positivo, con flagelos peritricos; que al final de su crecimiento vegetativo produce, además de la espora, una inclusión a la cual denomina cuerpo de desecho o "Restkorper". Sugiere que este cuerpo de inclusión está formado por material que no se utiliza en el proceso de esporulación y que al inicio de su formación es esférico y más tarde adquiere una forma bipiramidal. En 1915, lo denomina *Bacillus thuringiensis* y en este mismo año Aoki y Chagasaki demuestran que cultivos viejos de esta bacteria contienen una sustancia tóxica que provoca la muerte de algunos insectos (Aizawa, 1972; Dulmage y Aizawa, 1980).

B. thuringiensis es descrito como una variedad de *B. cereus* por Smith y col., en 1946, pues resultaba indistinguible de este último, con excepción de su patogenicidad hacia insectos y la forma oblicua de su espora (Norris, 1978).

Hannay, en 1953, al examinar el proceso de esporulación redescubre este cuerpo confirmando así las observaciones hechas anteriormente en torno al mismo. En su reporte describe cristales en forma de diamantes separados completamente de la espora, haciendo referencia a estos mismos como cuerpos paraesporales. También sugiere que estos cristales al ser ingeridos por el insecto, están relacionados con la formación de una toxina que induce a una

septicemia en larvas de algunos insectos (Hannay, 1953; Heimpel y Angus, 1963; Faust y Bulla, 1982).

Las primeras observaciones hechas sobre la relación del cristal con la actividad tóxica del mismo sobre larvas de insectos es confirmada por Angus, en 1954, quien demuestra que el efecto tóxico en el insecto está asociado con el cuerpo cristalino producido por el bacilo, y que es necesario sea solubilizado en el jugo intestinal de la larva, o bien; en álcali diluido para que sea activo (Angus. 1954; Burges. 1986). Es en 1955, cuando Hannay reporta que la inclusión cristalina producida por *B. thuringiensis* es de naturaleza proteica y que su ingestión resulta efectiva para causar la muerte a larvas de lepidópteros susceptibles (Hannay, 1955). Este cuerpo de inclusión es denominado como δ -endotoxina por Heimpel, en 1967, y es así que se conoce a esta toxina en la actualidad (Dulmage y Aizawa. 1982).

La clasificación de *B. thuringiensis* con el fin de establecer claramente diferencias entre variedades y serotipos, es propuesta por primera vez por H. de Barjac y A. Bonnefoi del Instituto Pasteur de Paris, en 1962. Ellos proponen una clasificación serológica en base a los antígenos flagelares. Esta clasificación permanece vigente en la actualidad y ha sido aumentada año tras año con nuevas variedades y serotipos de reciente descubrimiento (de Barjac y Bonnefoi, 1963).

En 1969, H.T. Dulmage aísla una cepa de *B. thuringiensis* a la cual denomina HD-1. Esta cepa presenta una potencia entre 20 y 200 veces mayor que cualquiera otra ya conocida. Es en base a esta cepa (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*, cepa HD-1) que actualmente se preparan la mayoría de los productos comerciales disponibles contra lepidópteros plaga de importancia agrícola (Dulmage, 1970;1973).

El espectro de actividad de *B. thuringiensis* se amplía en 1977 cuando Goldenberg y Margalit aíslan una cepa activa contra larvas de mosquito y otras especies de dípteros. De igual manera, Krieg y col., en 1983, reportan una nueva variedad efectiva contra larvas de coleópteros. En la actualidad se cuenta con toxinas activas contra protozoarios patógenos, ácaros y algunos tremátodos que parasitan en hígado de animales. Un aspecto desconocido de la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* que se excluye del contexto del control biológico de insectos, pero que ha

cochado un gran interés en los últimos años, es el efecto lítico sobre células neoplásicas observado por Prasad y Shetna (Goldberg y Margalit, 1977; Carlson y Kolsto, 1993).

2- Tipos de toxinas.

Actualmente se conocen siete tipos de toxinas diferentes producidas por *B. thuringiensis*. Estas se denominan: α -exotoxina, β -exotoxina, δ -endotoxina, dos inhibidores de la respuesta inmune en insectos denominados InA e InB, una bacteriocina y otra sustancia más conocida como "factor piojo" (Faust y Bulla, 1982; Whiteley y Schnepf, 1986). De estas toxinas se describen a continuación las más importantes:

α -exotoxina: Esta toxina conocida también como fosfolipasa C o lecitinasa, tiene la capacidad de lisar diferentes tipos de células. Su mecanismo de acción involucra el ataque a lecitina en membrana celular con la formación de un diglicérido y fosforilcolina, provocando así un efecto lítico o necrosante. En estudios de esta lecitinasa se demostró que aparece en la fase logarítmica de crecimiento aproximadamente diez horas después de la inoculación. Esta toxina ha resultado activa contra *Galleria mellonella* y *Plutella maculipennis* (Faust y Bulla, 1982; Galán-Wong *et al*, 1993).

β -exotoxina: Esta toxina es producida solo por algunas variedades de *B. thuringiensis* durante la fase exponencial de su crecimiento. Químicamente es un derivado nucleotídico de adenina unido por una molécula de glucosa a otra de ácido fosfoalárico. Si bien, el mecanismo de acción de esta toxina no ha sido del todo establecido, se ha demostrado que bloquea el proceso de mitosis inhibiendo la ARN polimerasa dependiente de ADN en células de mamíferos y bacterias. Aunque presenta toxicidad contra moscas y otros insectos, a causa de sus efectos mutagénicos, su uso como insecticida no está permitido en Norteamérica y Europa. Sin embargo, su uso y producción es común en países del antiguo bloque socialista (Farkas, 1976).

δ -endotoxina: De las toxinas producidas por *B. thuringiensis* la δ -endotoxina es la más ampliamente estudiada. Esta toxina de naturaleza proteica, termolábil y soluble en soluciones alcalinas se encuentra contenida en el cuerpo de inclusión cristalino, el cual se produce después

que la bacteria inicia el proceso de esporulación. La síntesis es detectada primeramente en la fase II del ciclo de esporulación, pero el mayor crecimiento ocurre durante las fases III y IV. Generalmente el cristal presenta forma bipiramidal, aunque existen cepas productoras de cuerpos paraesporales con distintas formas. De tal manera que los cristales de diferentes serotipos difieren en composición y cantidad de cadenas polipeptídicas. La efectividad de la mayoría de las formulaciones comerciales a base de *B. thuringiensis* está basada en la actividad de la δ -endotoxina. Esta toxina es altamente efectiva contra una gran variedad de insectos en sus estadios larvarios, razón por la cual se le considera la toxina más importante producida por este microorganismo (Luthy, 1980; Dulmage y Aizawa, 1982).

En cuanto al mecanismo de acción de esta toxina, se ha observado que es sintetizada en forma de protoxina; la cual requiere primeramente ser solubilizada en el medio alcalino del intestino del hospedero, para posteriormente ser hidrolizada por proteasas intestinales las cuales liberan fragmentos tóxicos y no tóxicos. Es la fracción amino terminal la que se une a receptores específicos en las células epiteliales del intestino de las larvas, de tal manera que causa una disminución de la permeabilidad en membranas celulares de este epitelio por un rompimiento en la regulación del ion potasio. Este y otros cambios fisiológicos conducen a la formación de poros en el intestino de la larva ocasionando que su contenido se vierta hacia la hemolinfa provocando así la muerte del insecto. El efecto letal de la toxina se ve incrementado por la septicemia provocada por la germinación de las esporas y la presencia de microorganismos patógenos oportunistas. Una vez ingerida la toxina los primeros efectos del envenenamiento comienzan a aparecer, primero la larva deja de alimentarse, hay parálisis del tracto alimenticio; posteriormente se presentan vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la larva muere (Whiteley y Schnepf, 1986; Bravo *et al* 1992; Honée y Visser, 1993).

III.- Plásmidos de *B. thuringiensis*.

1.- Plásmidos de *Bacillus thuringiensis*.

Los primeros trabajos sobre la genética de *B. thuringiensis* describen que el gen que codifica para la δ -endotoxina se encuentra en plásmidos. Sin embargo, el plásmido involucrado en la producción del cristal puede variar de una cepa a otra, aunque pertenezcan a la misma

variedad y serotipo (González y Carlton, 1980, 1984; Lereclus, 1983; Kronstad, Schnepf y Whiteley, 1983). Como se ha mencionado anteriormente, existe variación tanto en la cantidad como en el tamaño de los plásmidos entre los diversos serotipos de *B. thuringiensis*; reportándose desde cero plásmidos (el gen que codifica para la toxina se localiza en el cromosoma bacteriano) para la variedad *entomocidus*; hasta once plásmidos para la variedad *kurstaki* (Tabla 2). (González y Carlton, 1980; González *et al.*, 1982; Tan *et al.*, 1987; Lereclus *et al.*, 1984).

Tabla 2.- Cepas de *Bacillus thuringiensis* y sus plásmidos

Cepa y variedad	Serotipo	No. de plásmidos	Masas de plásmidos (Md)
HD2 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>	1	10	5.2;6.2;7.2;7.6;32;37; 54;57;75;~150
HD42 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> (acristalifera)	1	5	~3.5;5.2;7.1;9.6;52
HD1 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3	7	1.5;5.2;5.6;9.3;30;47; 54
HD1 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3ab	11	~1.4;4.9;5.2;5.4;9.3; ~10;29;44;52;~110; ~120
HD31 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (acristalifera)	3ab	3	5.2;9.3;46
HD73 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3ab	6	4.9;5.2;5.4;7.5;50;50
HD263 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3ab	11	~1.4;4.9;5.0;5.2;5.4; 7.5;43;44;60;~115; ~130
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>	6	0	
HD4 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	5ab	4	5.2;8;7;10.3;~130

Adaptado de González y Carlton, 1980; González *et al.*, 1982; Tan *et al.*, 1982; Lereclus *et al.*, 1983.

Iizuka y col., en 1981, realizaron una comparación del ADN extracromosómico de diversas cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, reafirmando que cepas del mismo serotipo pueden

presentar diferencias en su perfil de plásmidos. También, en 1983, Iizuka y col., realizaron un estudio comparativo de perfiles de plásmidos y morfología del cristal de *B.thuringiensis* subsp. *dramstadiensis*, encontrando diferencias significativas tanto en el perfil de plásmidos como en la morfología del cristal (Iizuka *et al*, 1981; 1983).

2.- Curado de plásmidos.

En 1952, J. Lederberg acuñó el término "plásmido" como designación genérica para todos los determinantes extracromosómicos hereditarios. Hoy sabemos que los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario circular, capaces de replicarse de manera independiente del cromosoma bacteriano. En muchos casos portan también genes que confieren nuevas propiedades a la célula hospedera, como por ejemplo; la resistencia a antibióticos, drogas o la producción de toxinas. Además, muchos plásmidos llevan genes que dirigen el proceso de conjugación (Bernhard, 1978; Hardy, 1981; Stanier *et al.*, 1986).

Los plásmidos pueden identificarse mediante técnicas genéticas y físicas. Genéticamente, se revela la presencia de un plásmido si se puede demostrar que un gen (o conjunto de genes) que dirige una o más propiedades del hospedador no está ligado al cromosoma bacteriano, es decir; que se replica de manera autónoma. Esta autonomía normalmente ha sido inferida a partir de la transferencia independiente del plásmido y el cromosoma durante la conjugación, o a partir de la eliminación irreversible del plásmido, sea espontáneamente o provocado por agentes como el calor, los colorantes de acridina, luz ultravioleta y otros. Estos agentes interfieren el proceso de replicación del plásmido, de tal forma que el plásmido en cuestión no puede ya ser mantenido de manera eficiente para ser transferido a otras células durante el crecimiento del microorganismo (Hardy, 1983; Stanier *et al*, 1986).

Bajo circunstancias ordinarias, la pérdida irreversible de una función genética pudiera también interpretarse fácilmente como una mutación no reversible en un gen localizado en el cromosoma. Sin embargo, la inducción de esta pérdida debida a los agentes mencionados es característica de plásmidos. De esta forma, en los casos en los que no tiene lugar la transferencia, la eliminación inducida a elevada frecuencia se considera prueba evidente del estado plasmídico.

En la eliminación de plásmidos por aplicación de agentes mutágenos se refleja la capacidad de estos últimos para inhibir la replicación plasmídica a concentraciones que no afectan al cromosoma. De esta manera, en el momento de la división celular se originan segregantes libres de plásmidos. Este proceso ha sido denominado "Curado de plásmidos". El criterio de eliminación implica que los plásmidos portan solamente genes de los que la célula puede prescindir, es decir; los plásmidos se definen como elementos autónomos no esenciales (Hardy, 1983; Stanier *et al.*, 1986). En el caso particular de *B. thuringiensis*, tanto los plásmidos que contienen el gen o los genes que codifican para la δ -endotoxina, como el resto de ellos contenidos en cada célula, son susceptibles de ser eliminados mediante métodos especialmente diseñados para este fin. De tal manera que, al realizar ensayos de las propiedades características de una cepa ordenadas genéticamente en un plásmido, después de someter un cultivo a un proceso de curado; pueden establecerse correlaciones entre los plásmidos eliminados y las propiedades específicas de la cepa (Gonzalez *et al.*, 1980).

En 1980, González, Dulmage y Carlton obtuvieron cinco mutantes acristalíferas de *B. thuringiensis* (var. *thuringiensis*, HD-2; var. *kurstaki*, HD-1 y HD-73; var. *alesti*, HD-4; y var. *galleriae*, HD-8). Estas mutantes fueron sometidas a un análisis de su perfil de plásmidos y comparadas con los de las cepas nativas correspondientes. Se logró establecer e identificar el plásmido involucrado en la producción de la δ -endotoxina para cada una de las cepas estudiadas. Esto es evidencia de la relación que hay entre elementos de ADN extracromosómico y la producción de δ -endotoxinas en *B. thuringiensis*.

Lereclus y col., en 1988, realizaron estudios con dos plásmidos de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* de 8.6 y 15 kb respectivamente, los cuales no portan genes para la δ -endotoxina; establecieron una relación entre estabilidad y termosensibilidad de estos plásmidos al ser clonados en *E. coli* y *B. subtilis*. Los resultados de dichos estudios indican que la estabilidad del plásmido es inversamente proporcional a la temperatura a la cual se desarrolla el cultivo, siendo el intervalo de 42°-51°C la temperatura crítica para la pérdida de los mismos. Esto es una prueba clara del efecto de agentes externos sobre las funciones de replicación de plásmidos.

Después de esta revisión sobre la función y características de los plásmidos de *Bacillus thuringiensis* se puede establecer la importancia de estos rasgos tanto en biotecnología, para la obtención de nuevas cepas de *B. thuringiensis* que produzcan variantes en la composición y morfología del cristal; como en el estudio a nivel genético de este importante microorganismo.

MATERIALES Y METODOS

I.- Selección de cepas.

Las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas para la realización del presente trabajo fueron obtenidas de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos depositada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. Se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, cepa HD-73; var. *aizawai*, cepas GM-7 y GM-10; y var. *monterrey*, cepa GM-33. Las cepas *kurstaki* y *aizawai* son tóxicas hacia *Trichoplusia ni*, la cepa GM-33 es atóxica contra lepidópteros.

II.- Desarrollo del proceso de curado de plásmidos.

a) Preparación del inóculo.

1.- Reactivación de las cepas. Las cepas, conservadas en aceite mineral, fueron reactivadas por resiembra en placas de agar nutritivo, se efectuaron hasta tres resiembras para cada una de las cepas incubando a 28-30°C por 24 horas.

2.- Preparación del inóculo. A partir de una colonia aislada de la última resiembra se inocularon 3 tubos con 5 ml. de caldo nutritivo para cada una de las cepas. Los tubos fueron incubados a 28-30°C, con agitación constante a 250 rpm durante 10 horas.

b) Proceso de curado de plásmidos. Las cepas HD-73, GM-7 y GM-33 fueron inoculadas, con el contenido de los tubos de inóculo correspondiente a cada una de ellas, en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo nutritivo con SDS al 0.002, 0.02 y 0.1 % respectivamente. Los matraces se incubaron con agitación constante a 250 rpm durante 10 horas a una temperatura de 28-30°C. La cepa GM-10 fue inoculada en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml caldo nutritivo e incubada a 42-45°C durante 18 horas con agitación constante a 250 rpm.

c) Selección de cepas curadas.

1.- Siembra en placa. Después de someter las cepas al proceso de curado se prepararon series de diluciones de cada uno de los matraces utilizando solución salina de NaCl al 0.85 %. Se

inocularon placas de agar LB con 0.1 ml de la dilución más alta y se extendió sobre la superficie del medio con varilla de vidrio.

2.- Selección de cepas. Las placas inoculadas fueron llevadas a incubación a 28-30°C por un máximo de 5 días. Al término de este período de incubación se seleccionaron un número de colonias para cada una de las cepas. El criterio de selección se basó en dos aspectos principales; la apariencia y morfología de la colonia, y la producción del cuerpo paraesporal. Para lo anterior se evaluaron las características morfológicas de las colonias seleccionadas y se compararon con las de su cepa nativa correspondiente. Además, se realizaron tinciones con cristal violeta para evidenciar la presencia o ausencia del cuerpo paraesporal mediante microscopía directa.

Las colonias seleccionadas se ordenaron en cajas con agar nutritivo asignándoseles un número para su identificación. También se prepararon cultivos puros de todas las colonias seleccionadas con el fin de contar con cultivos de respaldo. Tanto las cepas seleccionadas como los cultivos de respaldo fueron almacenados en refrigeración como cultivos esporulados.

III.- Obtención de los perfiles de plásmidos de cepas nativas y curadas.

a) Obtención del paquete celular. Cada una de las cepas y sus curadas correspondientes fueron reactivadas a partir de los cultivos esporulados en placas con agar LB e incubadas durante 12-14 horas a 28-30°C. Se inocularon tubos con 3 ml de caldo LB para cada una de ellas e incubaron con agitación constante a 250 rpm por 18-20 horas y a una temperatura de 28-30°C. El contenido de cada uno de los tubos se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml. El paquete celular obtenido se sometió a dos lavados consecutivos con solución salina de NaCl al 0.85 %.

b) Electroforesis de plásmidos de cepas nativas y curadas.

1.- Lisado de células. El paquete celular fue sometido a lisis resuspendiéndolo en 50 µl de mezcla de lisozima e incubando a 37°C por espacio de 2 horas, monitoreándose la formación de protoplastos.

2.- Electroforesis de plásmidos en geles de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 0.5 % en buffer Tris-Boratos 1x, con 3 mm de espesor y 15 carriles cada uno. Se utilizó Tris-Boratos 1x como buffer de corrida para el desarrollo de la electroforesis y para evitar efectos de deslizamiento de los geles, estos fueron preparados con una base de agarosa al 2 %.

Se colocaron 40 µl de mezcla de SDS en cada uno de los carriles y se dejó reposar durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se colocaron 25 µl de cada uno de los lisados celulares por debajo de la mezcla de SDS y reposó por espacio de 15 minutos. Se utilizó el plásmido pKK-233-3 (3.1 Md) de *Escherichia coli* como marcador de talla molecular. Tanto el marcador, la cepa nativa y sus curadas correspondientes fueron dispuestas en el gel con tal orden, de manera que permitieran ser comparados posteriormente.

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo con corriente constante a 3.0 mA (10-14 V) por 1.5-2.0 horas, seguido por un cambio con voltage constante a 40 V (8-10 mA) por 50 minutos y finalmente 120 V (25-29 mA) durante 2.5-3.5 horas. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se obtuvieron gráficos mediante fotografía en blanco y negro.

Las cepas que presentaron un perfil de plásmidos diferente a la de su cepa nativa correspondiente fueron seleccionadas y ensayadas nuevamente para verificar la pérdida de plásmidos.

IV.- Obtención de perfiles de proteínas de cepas nativas y curadas.

a) Obtención de proteína del cristal paraesporal.

1.- Cultivo de células. Se inocularon cajas con agar LB con cada una de las cepas que presentaron un patrón de plásmidos diferente a las de sus cepas nativas correspondientes. Las cajas se incubaron a 28-30°C hasta esporulación y se verificó la presencia o ausencia del cristal.

2.- Obtención de proteína del cristal. Se resuspendieron 4-6 asadas de cada una de las cepas en agua y se lavaron dos veces con agua bidestilada. El paquete obtenido por centrifugación se resuspende en 100 µl de mezcla de lisis y se calienta en baño de agua a ebullición por 5 minutos.

b) Electroforésis de proteínas de cepas nativas y curadas.

1.- Electroforésis de proteínas en geles de poliacrilamida. Se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida al 10 % con un espesor de 0.75 mm y 10 carriles por gel. Se colocaron 10 µl de cada una de las soluciones del cristal paraesporal dispuestas de tal manera que permitieran una comparación posterior del perfil proteico de las cepas nativas y sus curadas respectivas. La electroforésis se desarrolló a corriente constante de 10 mA en el gel concentrador y 20 mA en el gel separador utilizando buffer EP 1x. Los geles se revelaron mediante tinción con azul de Coomasie.

2.- Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas. Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida, se electrotransfirieron a filtros de nitrocelulosa con corriente constante a 250 mA durante toda la noche utilizando buffer T 1x como buffer de transferencia. Al término de la electrotransferencia los filtros de nitrocelulosa se lavan dos veces con PBS+Tween 20 al 0.05 % y se bloquean con Tween 20 al 2 % durante 10 minutos. Después se incubaron con el anticuerpo Anti Cry correspondiente (HD-73, GM-7 y GM-10: Anti Cry 1A; GM-33: Anti Cry 7Aa) durante 1 hora. Posteriormente se adiciona el Anti IGg acoplado a fosfatasa alcalina, la cual a su vez se hace reaccionar con la solución cromogénica (NBT+BCIP) para detectar las proteínas que presentan reacción con el anticuerpo mediante la aparición de bandas color azul violeta.

V.- Bioensayos.

Se realizaron bioensayos para evaluar la toxicidad de las cepas nativas y curadas. Para esto se utilizaron larvas neonatas de *Trichoplusia ni* como insecto blanco. Se dispusieron grupos de 25 copas para cada cepa con 6 ml de dieta para larvas por copa. Se adicionaron volúmenes del complejo spora-cristal a cada copa para obtener concentraciones de la toxina de 1.0 y 0.1 µg/cm² para las cepas HD-73, GM-7 y GM-10. Para la cepa GM-33 se utilizaron concentraciones de 10.0 y 1.0 µg/cm². Estas concentraciones de toxina fueron calculadas mediante determinaciones por el método de Lowry (1974).

Se colocó una larva por copa y se llevó al mismo tiempo un blanco sin toxina con el mismo número de larvas. Las copas se incubaron por separado a 28°C durante 7 días, después de

los cuales se contaron las larvas vivas y muertas para determinar el porcentaje de mortalidad para cada una de las cepas evaluadas.

RESULTADOS

I.- Curado de plásmidos.

a) Curado de plásmidos utilizando SDS.

De las cepas tratadas con SDS se eligieron 75 colonias de HD-73, 50 colonias de la cepa GM-7 y 50 colonias de GM-33. Después de obtener los perfiles de plásmidos en geles de agarosa para cada una de ellas se seleccionaron 5 cepas de HD-73, dos de las cuales no producen cristal; 2 cepas de GM-7 y 3 cepas de GM-33. Esta última selección es en base a las diferencias en los patrones de plásmidos que muestran estas cepas seleccionadas respecto de sus cepas nativas correspondientes.

1.- Perfiles de plásmidos de *B. thuringiensis* HD-73 y cepas curadas. De las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas en este estudio, la cepa HD-73 proporcionó el mayor número de mutantes. En total se obtuvieron cinco derivadas de esta cepa, dos de las cuales son acristalíferas (Cry⁻); las tres restantes aún cuando presentan un perfil de plásmidos diferente al de la cepa nativa, siguen produciendo el cuerpo de inclusión (Cry⁺). Las cepas Cry⁻ presentan una morfología colonial diferente a la de la cepa nativa, estas cepas tienen un aspecto translúcido y una coloración amarillo-blanquecina, a diferencia de la cepa nativa que se presenta con un aspecto de mayor opacidad y de color más claro.

En la figura 1 se muestra el patrón de plásmidos de HD-73 nativa, la cual presenta al menos cuatro plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 10.5, 11.9, 18.2 y 26.7 Md. En la figura 1 se muestran también los perfiles de plásmidos de las cinco cepas curadas, estas son denominadas: HD73-4 Cry⁻, la cual presenta la pérdida de los plásmidos de ~11.9, ~18.2 y ~26.7 Md, acompañada por la aparición de una nueva banda de plásmido de ~29.1 Md; HD73-24 Cry⁺, que ha sido curada del plásmido de ~26.7 Md; HD73-35 Cry⁺, la cual muestra haber perdido los plásmidos de ~18.2 y ~26.7, y además presenta la aparición de un nuevo plásmido de ~29.1 Md; HD73-44a Cry⁺, en cuyo perfil de plásmidos desaparece el correspondiente a ~26.7 Md para ser sustituido por una nueva señal de plásmido a ~29.1 Md y otro nuevo plásmido más de ~16.0



Fig. 1. Gel de agarosa 0.5% mostrando perfiles de plásmidos de HD-73. Los números de serie son como sigue: 1, HD73 nativa; 2, 73-4; 73-24; 3, 73-35; 4, 73-44a y 5, 73-44b. El signo (-) indica ausencia de cristal. M corresponde al marcador de talla molecular pKK 233-3.

Md; y por último una mutante espontánea Cry- derivada de HD73-44a, misma que no revela bandas de plásmidos en geles de agarosa. Las cepas curadas Cry+ de HD-73 producen cristales de igual morfología que la cepa silvestre, además; no presentan cambios en cuanto a aspecto y morfología colonial se refiere. Los resultados del curado de plásmidos en HD-73 se resumen en en la tabla I.

Tabla I. *B. thuringiensis* HD-73 nativa y cepas curadas.

Cepa	Espora	Cristal	Morf. cristal	Plásmidos (Md)
HD-73	+	+	bipiramidal	~10.5; ~11.9; ~18.2; ~26.7
HD73-4	+	-	-	~10.5; ~29.1*
HD73-24	+	+	bipiramidal	~10.5; ~11.9; ~18.2
HD73-35	+	+	bipiramidal	~10.5; ~11.9; ~29.1*
HD73-44a	+	+	bipiramidal	~10.5; ~11.9; ~16.0*; ~29.1*
HD73-44b	+	-	-	

(~) indica valor de talla molecular aproximado, (*) nuevo plásmido con respecto a la cepa nativa. (+) positivo, (-) negativo.

2.- Perfiles de plásmidos de *B. thuringiensis* GM-7 y cepas curadas.

Con respecto a la cepa GM-7, se lograron obtener dos cepas Cry+ con perfiles de plásmidos diferentes al patrón de la cepa silvestre. La cepa GM-7 nativa muestra al menos cinco plásmidos de tamaños moleculares aproximados de 6.8, 10.5, 11.6, 19.8 y 33.8 Md. En la figura 2 se presenta el patrón de plásmidos en gel de agarosa de la cepa GM-7 nativa y estas dos derivadas. Las cepas curadas de GM-7 son: GM7-14, la cual muestra haber perdido los plásmidos de ~10.5 y ~11.6 Md, además de que los plásmidos de ~19.8 y ~33.8 Md son sustituidos por dos nuevas señales de plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 16.9 y 30.3 Md; la segunda derivada de GM-7 ha sido denominada GM7-42, y esta cepa presenta la pérdida de los plásmidos de ~6.8 y ~19.8 Md, además; la banda del plásmido que en la cepa nativa aparece a ~33.8 Md, en esta cepa es sustituida por una nueva señal de plásmido de ~37.6 Md. Las tallas moleculares de estos plásmidos, así como algunos otros aspectos de GM-7 y sus cepas curadas se presentan en la tabla II.

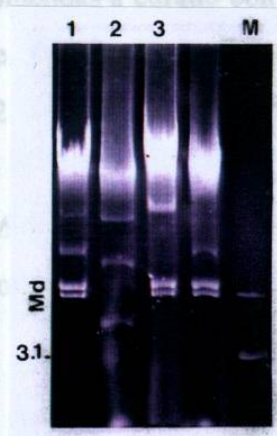


Fig. 2. Gel de agarosa 0.5% mostrando perfiles de plásmidos de GM-7. Los números de serie son como sigue: 1, GM-7 nativa; 2, 7-14 y 3, 7-42. M indica el marcador de talla molecular pKK-233-3.

Tabla II. *B. thuringiensis* GM-7 y cepas curadas.

Cepa	Espora	Cristal	Morf. cristal	Plásmidos (Md)
GM-7	+	+	bipiramidal	~6.8; ~10.5; ~11.6; ~19.8; ~33.8
GM7-14	+	+	bipiramidal	~6.8; ~16.9* ~30.3*
GM7-42	+	+	bipiramidal	~10.5; ~11.6 ~37.6*

(~) indica valor de talla molecular aproximado, (*) nuevo plásmido con respecto a la cepa nativa, (+) positivo.

3.- Perfiles de plásmidos de *B. thuringiensis* GM-33 y cepas curadas.

En cuanto a *B. thuringiensis* GM-33, no se lograron obtener cepas con perfiles de plásmidos diferentes al patrón de la cepa nativa. Sin embargo, los análisis del perfil de proteínas de las cepas de GM-33 que fueron sometidas a curado con SDS, muestran claras diferencias con el patrón ofrecido por la cepa silvestre. La cepa nativa presenta al menos dos plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 20.7 y 52.8 Md. En la figura 3 se presenta el patrón de plásmidos de la cepa GM-33 nativa junto a las tres derivadas que fueron tratadas con SDS, las cuales han sido denominadas GM33-6, GM33-7 y GM33-13. Las tallas moleculares de estos plásmidos, así como los aspectos relacionados con la producción del cristal paraesporal en la cepa GM-33 y sus derivadas se presentan en la tabla III.

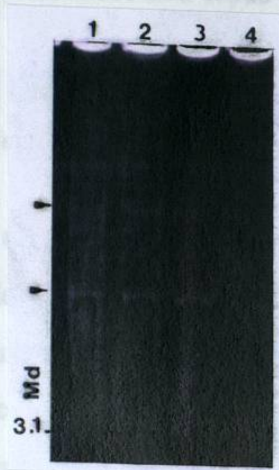


Fig. 3. Gel de agarosa 0.5% mostrando perfiles de plásmidos de GM-33. Los números de serie son como sigue: 1, GM-33 nativa; 2, 33-6; 3, 33-7 y 4, 33-13.

Tabla III. *B. thuringiensis* GM-33 nativa y cepas curadas.

Cepa	Espora	Cristal	Morf. cristal	Plásmidos (Md)
GM-33	+	+	bipiramidal	~20.7; ~52.8
GM33-6	+	+	bipiramidal	~20.7; ~52.8
GM33-7	+	+	bipiramidal	~20.7; ~52.8
GM33-13	+	+	bipiramidal	~20.7; ~52.8

(~) indica valor de talla molecular aproximado, (+) positivo.

b) Curado de plásmidos utilizando calor.

La cepa GM-10 fue inicialmente tratada con SDS como agente de curado, se eligieron 50 colonias para someterlas a análisis de sus perfiles de plásmidos no encontrándose ninguna cepa que presentara diferencias con el patrón de plásmidos de la cepa nativa. Posteriormente esta

misma cepa fue tratada con calor obteniéndose dos cepas con perfiles de plásmidos diferentes al de la cepa silvestre.

1.- Perfil de plásmidos de *B. thuringiensis* GM-10 y cepas curadas.

Para la cepa GM-10 de *B. thuringiensis* se obtuvieron dos cepas Cry⁺ que presentan perfiles de plásmidos diferentes al de la cepa silvestre. La cepa GM-10 nativa revela al menos cuatro plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 5.3, 14.7, 19.0 y 37.6 Md. En la figura 4 se presentan los perfiles de plásmidos en geles de agarosa correspondientes a la cepa GM-10 y estas dos cepas curadas. Estas derivadas se denominaron: GM10-1, la cual ha sido curada de los plásmido de ~14.7 y ~37.6 Md; y GM10-4, cuyo perfil revela haber perdido el plásmido de ~36.7 Md. Estos resultados y algunos aspectos sobre la producción y morfología del cristal se presentan en la tabla IV.

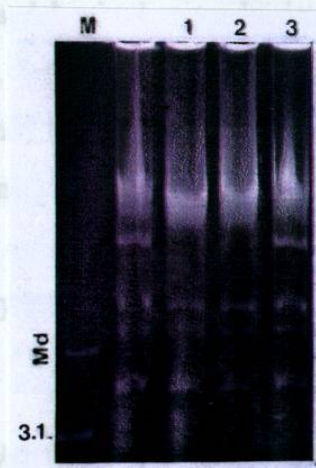


Fig. 4. Gel de agarosa 0.5% mostrando plásmidos perfiles de plásmidos de GM-10. Los números de serie son como sigue: 1, 10-1; 2, 10-4 y 3, GM-10 nativa. M indica el marcador de talla molecular pKK-233-3.

Tabla IV. *B. thuringiensis* GM-10 nativa y cepas curadas.

Cepa	Espora	Cristal	Morf. cristal	Plásmidos (Md)
GM-10	+	+	bipiramidal	~5.3; ~14.7; 19.0; ~37.6
GM10-1	+	+	bipiramidal	~5.3; ~19.0
GM10-4	+	+	bipiramidal	~5.3; ~14.7; ~19.0

(~) indica valor de talla molecular aproximado, (+) positivo.

II.- Electroforésis de proteínas e inmunodetección de la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*.

1.- Perfil de proteínas de *B. thuringiensis* HD-73 y cepas curadas. Los perfiles de proteínas de la cepa HD-73 y sus ccepas curadas se presentan en la figura 5. La banda que se distingue a 134.4 kDa corresponde a la proteína del cristal, estando ésta presente tanto en HD-73 nativa como en las mutantes Cry+ HD73-24, HD73-35 y HD73-44a. Como era de esperarse esta misma banda no se presenta en las cepas denominadas Cry- HD73-4 y HD73-44b. Los resultados de la inmunodetección de estas proteínas, mostrados también en la figura 5, confirman la presencia de esta proteína al ser reconocida por el anticuerpo AntiCry 1A. Los pesos moleculares de la proteína del cristal de HD-73 nativa y las cepas curadas, así como la reacción con el anticuerpo AntiCry 1A se resumen en la tabla V.

2.- Perfil de proteínas de *B. thuringiensis* GM-7 y cepas curadas. Las dos cepas curadas de *B. thuringiensis* GM-7 siguen produciendo una proteína de 119.8 kDa, la cual migra en un gel de poliacrilamida, como se muestra en la figura 6; a la par con la proteína producida por la cepa nativa. Al retar este perfil de proteínas contra el anticuerpo AntiCry 1A, en el filtro de nitrocelulosa (Fig. 6B), se obtienen señales en forma de bandas, las cuales confirman que la proteína producida por las cepas curadas posee la misma identidad antígenica que la producida por la cepa nativa. Los pesos moleculares de la proteína del cristal de las cepas nativa y curadas, así como la reacción con el anticuerpo AntiCry 1A se muestran en la tabla VI.

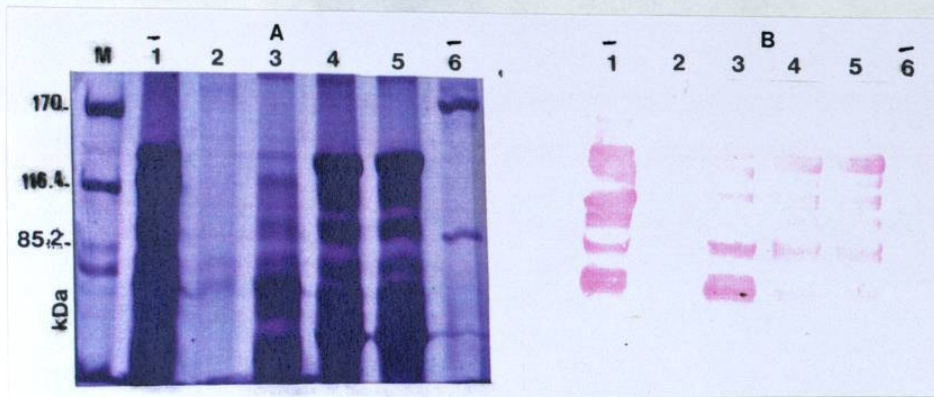


Fig. 5. A) Gel de poliacrilamida mostrando perfiles de proteínas de HD-73 y cepas curadas. B) Inmunodetección de proteínas de cristal en filtro de nitrocelulosa. Los números de serie son como sigue: 1, HD-73 nativa; 2, 73-4; 3, 73-24; 3, 73-35; 4, 73-44a y 5, 73-44b. M indica los marcadores de peso molecular.

Tabla V. Proteínas del cristal de *B. thuringiensis* HD-73 nativa y cepas curadas.

Cepa	Proteína del cristal (kDa)	Reacción con AntiCry 1A
HD-73	134.4	+
HD73-4	-	-
HD73-24	134.4	+
HD73-35	134.4	+
HD73-44a	134.4	+
HD73-44b	-	-

(+) positivo, (-) negativo.

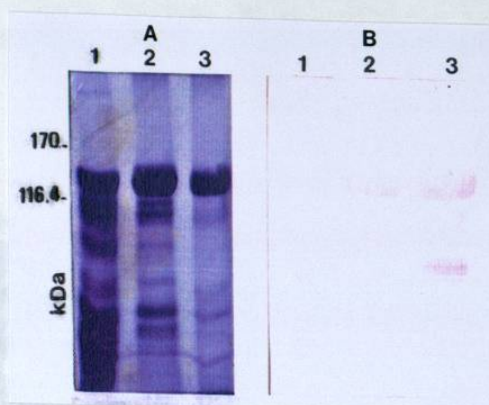


Fig. 6. A) Gel de poliacrilamida mostrando perfiles de proteínas de GM-7 y cepas curadas. B) Inmunodetección de proteína de cristal en filtros de nitrocelulosa. Los números de serie son como sigue: 1, GM-7 nativa; 2, 7-14 y 3, 7-42.

Tabla VI. Proteínas del cristal de *B. thuringiensis* GM-7 y cepas curadas.

Cepa	Proteína del cristal (kDa)	Reacción con AntiCry 1A
GM-7	119.8	+
GM7-14	119.8	+
GM7-42	119.8	+

(+) positivo.

3.- Perfil de proteínas de *B. thuringiensis* GM-33 y cepas curadas. En la figura 7 se muestran los perfiles de proteínas correspondientes a GM-33 y sus cepas derivadas. La banda que aparece a 128.5 kDa corresponde a la proteína del cristal producida por la cepa GM-33 silvestre. En la figura 7 pueden apreciarse también las bandas de la proteína del cristal de las cepas derivadas, que a diferencia con la cepa nativa, estas migran a niveles diferentes en un mismo gel de poliacrilamida. Por lo tanto, estas revelan pesos moleculares inferiores al de la proteína de la cepa silvestre. El peso molecular de estas proteínas calculado en geles de poliacrilamida es de 103.2 kDa. Sin embargo, aún y cuando estas proteínas presentan esta diferencia en peso, siguen

siendo reconocidas por el anticuerpo AntiCry 7Aa. Estos resultados se presentan de manera resumida en la tabla VII.

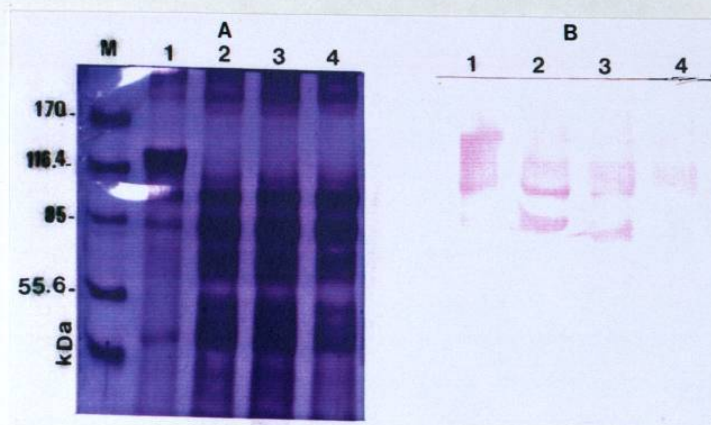


Fig. 7. A) Gel de poliacrilamida mostrando perfiles de proteínas de GM-33 y cepas curadas. B) Inmunodetección de proteína de cristal en filtros de nitrocelulosa. Los números de serie son como sigue: 1, GM-33 nativa; 2, 33-6; 3, 33-7 y 4, 33-13. M indica los marcadores de peso molecular.

Tabla VII. Proteínas del cristal de *B. thuringiensis* GM-33 y cepas curadas.

Cepa	Proteína del cristal (kDa)	Reaccion con AntiCry 7Aa
GM-33	128.5	+
GM33-6	103.2	+
GM33-7	103.2	+
GM33-13	103.2	+

(+) positivo.

4.- Perfil de proteínas de *B. thuringiensis* GM-10 y cepas curadas.

Como puede apreciarse en la figura 8, la cepa GM-10 nativa muestra una proteína de 134.3 kDa que está presente también en los perfiles mostrados por las dos cepas curadas. Esto revela que aún y cuando los perfiles de plásmidos han variado, las cepas derivadas de GM-10 continúan produciendo un cristal con las mismas características que la cepa silvestre. Lo anterior

es confirmado con los resultados del inmunoensayo realizado para estas proteínas, los cuales revelan también que las proteínas producidas por las cepas curadas poseen la misma identidad antigénica que la producida por la cepa nativa. Los pesos moleculares de estas proteínas, así como la reacción con el anticuerpo AntiCry 1A se resumen en la tabla VIII.

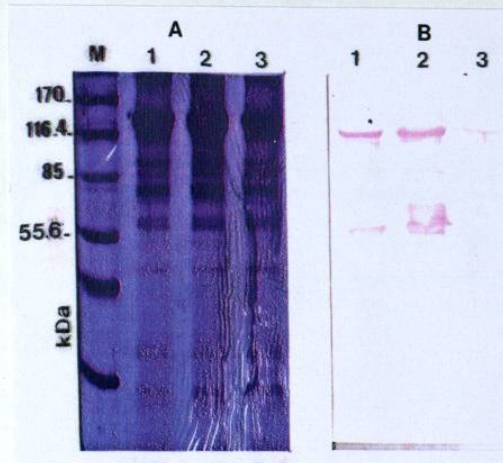


Fig. 8. A) Gel de poliacrilamida mostrando perfiles de proteínas de GM-10 y cepas curadas. B) Inmunodetección de proteína de cristal en filtros de nitrocelulosa. Los números de serie son como sigue: 1, GM-10 nativa; 2, 10-1 y 3, 10-4. M indica los marcadores de peso molecular.

Tabla VIII. Protínas del cristal de *B. thuringiensis* GM-10 y cepas curadas.

Cepa	Proteína del cristal (kDa)	Reacción con AntiCry 1A
GM-10	134.3	+
GM-10-1	134.3	+
GM-10-4	134.3	+

(+) positivo.

III.- Bioensayos.

Los resultados de los bioensayos realizados contra larvas de *Trichoplusia ni* se muestran en la tabla IX. Los valores reportados están expresados en por ciento de mortalidad.

Tabla IX. Mortalidad (%) de *T. ni* frente a cepas de *B. thuringiensis* nativas y curadas.

Cepa	Dosis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% mortalidad
HD-73	1.0	100
	0.1	100
HD73-4	1.0	8
	0.1	4
HD73-24	1.0	100
	0.1	100
HD73-35	1.0	100
	0.1	100
HD73-44a	1.0	100
	0.1	100
HD73-44b	1.0	8
	0.1	8
GM-7	1.0	100
	0.1	100
GM7-14	1.0	100
	0.1	100
GM7-42	1.0	100
	0.1	100
GM-10	1.0	100
	0.1	100
GM10-1	1.0	100
	0.1	100
GM10-4	1.0	100
	0.1	100
GM-33	10.0	20
	1.0	12
GM33-6	10.0	12
	1.0	4
GM33-7	10.0	12
	1.0	8
GM33-13	10.0	12
	1.0	4

DISCUSION

Mediante el sistema de curado de plásmidos establecido en el presente trabajo, se obtuvieron resultados que proveen de evidencia suficiente para establecer una correlación entre elementos de DNA extracromosomal y la producción de la δ -endotoxina en las cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas.

Si bien el método para curado de plásmidos reportado por Gonzalez y colaboradores resulta eficiente, fue necesario hacer algunas modificaciones a este mismo, que permitieran el alcance de los resultados obtenidos. Estas modificaciones se aplicaron de manera general a lo largo de todo el proceso. Primeramente, ensayando la exposición de las cepas a una concentración de SDS no utilizada en dicho proceso (0.1%), después; aumentando los volúmenes del lisado de células, con el propósito de obtener bandas de plásmidos con mayor intensidad; y finalmente, variando los tiempos a los voltajes recomendados durante el desarrollo de las electroforésis. Estas modificaciones reportaron resultados reproducibles durante la realización de este trabajo de investigación.

Puesto que la presencia de plásmidos confiere a las células propiedades que no son vitales para su desarrollo, las cepas de *Bacillus thuringiensis* producidas mediante curado de plásmidos en este trabajo, muestran propiedades diferentes a las de sus cepas nativas correspondientes; aunque aún comparten características que las identifican con estas mismas.

De esta manera, se lograron obtener cepas con perfiles de plásmidos diferentes a los patrones presentados por las cepas originales, después de haber sido expuestas a agentes de curado como SDS o calor, y que han perdido la capacidad de producir el cristal paraesporal, o bien; muestran la pérdida de uno o varios plásmidos y continúan siendo productoras de la δ -endotoxina.

La evidencia más extensa de lo anteriormente señalado, proviene de las mutantes obtenidas de la cepa HD-73. Esta cepa aportó un total de cinco cepas derivadas, tres de las cuales son Cry⁺, y las dos restantes Cry⁻. Las cepas Cry⁻ presentan diferencias en cuanto a morfología colonial se refiere, con respecto a la cepa HD-73 nativa. Estas cepas muestran colonias de

aspecto translúcido y de coloración amarillo-blanquecina, lo cual facilitó de manera general su identificación y aislamiento. Además, estas cepas no se ven afectadas para desarrollarse en los mismos medios de cultivo empleados para las cepas Cry⁺. Lo anterior confirma que los fenotipos conferidos por plásmidos no están involucrados con las funciones vitales básicas en estas cepas.

En cuanto a la cepa Cry⁺ denominada HD73-24, la cual muestra haber perdido el plásmido de ~26.7 Md, se puede decir que este plásmido en particular no se requiere en la síntesis del cristal paraesporal. De manera similar, la pérdida del plásmido de ~18.2 Md en la cepa Cry⁺ HD73-35, no parece tener efecto alguno sobre la producción de este cuerpo de inclusión. Además, esta cepa exhibe la ausencia del plásmido de ~26.7 Md y a la vez la aparición de un nuevo plásmido de ~29.1 Md. Lo anterior induce a plantear una posible reorganización del material genético de plásmidos involucrando al plásmido de ~26.7 Md, lo cual confirma las observaciones hechas en 1980 por J. Gonzalez, H. Dulmage y B. Carlton; con respecto a la aparición de nuevos plásmidos en cepas curadas de *B. thuringiensis*.

Por otro lado, algo similar sucede con la cepa Cry⁺ HD73-44a, que a diferencia de la cepa HD73-35, pierde los plásmidos de ~18.2 y ~26.7 Md, y estos mismos son sustituidos por dos nuevos plásmidos con diferentes tallas moleculares, uno de ~16.0 Md y el otro de ~29.1 Md.

Aunque las alteraciones en el arreglo de plásmidos en las cepas Cry⁺ presentan variaciones en cuanto al número de estos mismos, ya sea que hayan sido eliminados, o bien; sean plásmidos de nueva aparición, estos eventos parecen no tener efecto alguno sobre la producción, morfología y toxicidad del cuerpo paraesporal (δ -endotoxina) de la cepa HD-73 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Lo anterior es confirmado con los resultados obtenidos en el análisis del cristal por microscopía, geles de poliacrilamida e inmunodetección, así como los bioensayos realizados con *Trichoplusi ni*.

En cuanto a *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepa GM-7, se logró establecer que posee al menos cinco plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 6.8, 10.5, 11.6, 19.8 y 33.8 Md. Las dos cepas Cry⁺ derivadas de GM-7 presentan cambios en sus perfiles de plásmidos respecto a

la cepa nativa, pero este evento no tiene ningún efecto sobre la producción, morfología o toxicidad del cristal paraesporal.

De manera particular, la cepa GM7-14 pierde los plásmidos de ~10.5 y ~11.6 Md, y como se afirma anteriormente, estos plásmidos no están involucrados en la síntesis del cristal, y por consiguiente no impactan sobre su morfología ni tampoco sobre su toxicidad. Además, la ausencia de estos plásmidos no provoca cambios en la morfología de la colonia de esta cepa.

A diferencia de GM7-14, la cepa GM7-42 ofrece una variante con respecto a la primera como resultado de la pérdida de plásmidos. Esta diferencia entre las dos cepas curadas es en lo referente al aspecto y morfología colonial. Aunque la pérdida de plásmidos en GM7-42 provoca cambios en la morfología de la colonia de esta cepa, haciendola aparecer con bordes irregulares muy marcados si se le compara con la cepa nativa, y aún con la otra cepa curada GM7-14; estos plásmidos no están involucrados en la síntesis del cristal, por lo que su morfología y toxicidad tampoco revelan cambios. Al parecer, el efecto de cambio en la morfología colonial de esta cepa está relacionado con la ausencia de los plásmidos de ~6.8 y ~19.8 Md, puesto que estos mismos se conservan en GM7-14, y esta derivada comparte todavía identidad en cuanto a morfología colonial se refiere, con la cepa nativa.

Para la cepa GM-33 de *B. thuringiensis* var. *monterrey*, se establece que cuenta con al menos dos plásmidos con tallas moleculares aproximadas de ~20.7 y ~52.8 Md. Las cepas derivadas de GM-33, denominadas GM33-6, GM33-7 y GM33-13, no presentaron perfiles de plásmidos diferentes al patrón de la cepa silvestre al ser analizados en geles de agarosa. Sin embargo, los perfiles de proteínas en geles de poliácridamida de las cepas derivadas muestran diferencias muy claras con respecto al perfil proteico de la cepa nativa.

Las proteínas del cristal producido por las cepas derivadas de GM-33 poseen pesos moleculares inferiores al de la producida por la cepa silvestre. El peso molecular que revela esta proteína de GM-33 nativa es de 128.5 kDa, y el de sus cepas derivadas es de 103.2 kDa. Esta diferencia en peso de 25.3 kDa en la proteína producida por estas derivadas, se debe probablemente a la pérdida de algún elemento génico extracromosomal que presente bandas en un gel de agarosa que son enmascaradas por las señales de plásmidos en los perfiles revelados por

estas cepas. Esto es, que una cepa puede poseer plásmidos que contengan genes que codifican para diferentes funciones, pero estos plásmidos poseen el mismo tamaño molecular; de manera que en un mismo gel de agarosa aparecen como una sola señal.

Si bien la cepa GM-33 es considerada atóxica para lepidópteros, la actividad de la δ -endotoxina producida por las derivadas de esta cepa muestra un ligero descenso en sus niveles de toxicidad contra *T. ni*. Lo anterior debido, tal vez, a los cambios moleculares provocados por la ausencia de la fracción de 20.3 kDa.

Para *B. thuringiensis* var. *aizawai* cepa GM-10, se establece que posee al menos cuatro plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 5.3, 14.7, 19.0 y 37.6 Md. Las dos cepas curadas obtenidas a partir de GM-10, denominadas GM10-1 y GM10-4, muestran perfiles de plásmidos diferentes al presentado por la cepa silvestre al ser analizados en geles de agarosa. Estas diferencias son, para la cepa GM10-1; la pérdida de los plásmidos de ~ 14.7 y ~ 37.6 Md, y para la otra derivada, la pérdida de un solo plásmido de ~ 37.6 Md. Aunque estas cepas han sido curadas de algunos plásmidos, este evento no tiene efecto alguno sobre la producción del cristal paraesporal, ni tampoco sobre su morfología o toxicidad. Además, ninguna de estas cepas curadas presentan cambios en la morfología o el aspecto de su colonia.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede establecer que el proceso de curado de plásmidos se desarrolló con éxito mediante los procedimientos aplicados en este estudio. Las cepas curadas resultantes ofrecen una gran variedad en cuanto a los cambios en sus perfiles de plásmidos se refiere, ya sea en cuanto a la pérdida de alguno(s) de ellos, o bien; a la aparición de nuevos plásmidos. Así mismo, el efecto de la eliminación de plásmidos sobre las características de las cepas estudiadas, va desde la pérdida total en la capacidad de producción del cristal paraesporal, hasta cambios en la morfología colonial de algunas cepas; además de variaciones en el peso molecular de la proteína del cristal producida por algunas otras.

En la búsqueda de nuevas derivadas de *B. thuringiensis* hemos observado que la pérdida de plásmidos muchas veces se acompaña por la aparición de nuevos plásmidos con diferentes movilidades electroforéticas, sugiriendo que algunos eventos como deleciones, inserciones, y tal

vez; hasta recombinaciones, sean relativamente comunes entre estos plásmidos. La combinación entre estas alteraciones de plásmidos en una cepa, pudiera revelar en un momento dado, cómo las cepas HD-73 y GM-7 tienen en común dos plásmidos, uno de ~10.5 y otro de ~11.6 Md. Tales cambios, pudieran interpretarse también como ejemplos de la evolución en los arreglos de plásmidos de estas cepas en condiciones de laboratorio. En ambientes naturales, claro está, el intercambio de material genético de plásmidos puede ser un factor de adición que contribuya a la evolución de los sistemas de DNA extracromosomal.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de la realización de este estudio, se concluye:

- 1.- Se estableció un sistema eficaz para curado de plásmidos en las cepas de *Bacillus thuringiensis*.
- 2.- La cepa HD-73 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* posee al menos cuatro plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 10.5, 11.9, 18.2 y 26.7 Md.
- 3.- La cepa GM-7 de *B. thuringiensis* var. *aizawai* posee al menos cinco plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 6.8, 10.5, 11.6, 19.8 y 33.8 Md.
- 4.- La cepa GM-10 de *B. thuringiensis* var. *aizawai* posee al menos cuatro plásmidos con tallas moleculares aproximadas de 5.3, 14.7, 19.0 y 37.6 Md.
- 5.- La cepa GM-33 de *B. thuringiensis* var. *monterrey* posee al menos dos plásmidos con tallas moleculares de 20.7 y 52.8 Md.
- 6.- La pérdida de plásmidos en las cepas Cry+ estudiadas, no indujo cambios en la morfología ni en la toxicidad del cristal paraesporal.
- 7.- La eliminación de plásmidos en las cepas Cry- provoca la pérdida de la capacidad de producción de la δ -endotoxina, así como cambios en la morfología de la colonia.

APENDICE**I.- Medios de cultivo.****Agar nutritivo (g/l)**

Extracto de carne 3.00

Peptona 5.00

Agar 18.00

Caldo nutritivo (g/l)

Extracto de carne 3.00

Peptona 5.00

Agar LB (g/l)

Peptona 10.00

Extracto de levadura 5.00

NaCl 5.00

Agar 18.00

Caldo LB (g/l)

Peptona 10.00

Extracto de levadura 5.00

NaCl 5.00

II.- Soluciones.

Buffer Tris-Boratos 5x

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

Buffer EP

Tris-base	15.0 g/l
Glicina	72.0 g/l
SDS	5.0 g/l

Buffer de T

Glicina	14.4 g
Tris-base	3.0 g
Agua	800 ml
Metanol	200 ml

Mezcla SDS

Buffer Tris-Boratos 1x	100 ml
SDS	2.0 g
Sacarosa	5.0 g
Azul de bromofenol	0.05 g

Mezcla de lisozima 2

Lisozima de huevo	2 mg/ml
Sacarosa	0.2 mg/ml
RNAasa	100 µg/ml

Mezcla de lisis

Buffer Tris	2.5 ml
SDS	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2- β -mercaptoetanol	1.0 ml
Agua	0.5 ml

Solución de Bromuro de etidio

Bromuro de etidio	0.5 μ g/ml
-------------------	----------------

Solución de azul de Coomasie

Azul brillante R	2.0 g
Metanol	250 ml
Acido acético	50 ml
Aforar con agua	500 ml

Solución cromogénica

BCIP	5 mg
NBT	10 mg
Buffer de sustrato	30 ml

Cristal violeta

Etanol	20 ml
Cristal violeta	2.0 g
Acetato de amonio	0.8 g
Agua	80 ml

Solución fisiológica

NaCl 0.85 g

Agua 100 ml

Nota: Todas las soluciones se preparan con agua bidestilada en los volúmenes especificados según se indique. Los buffers Tris se ajustan a pH=8.0 con ácido clorhídrico y se filtran en membranas de 0.45 μm .

LITERATURA CITADA

- 1.- AMABILE-CUEVAS, C.F. y M.E. CHICUREL. 1992. Bacterial plasmids and gene flux. *Cell*. 70:189-199.
- 2.- ANDERSON, D.G. y L.L. McKAY. 1977. Plasmids, loss of lactose metabolism, and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *Streptococcus cremoris* B₁. *J. Bacteriol.* 129:367-377.
- 3.- ANGUS, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature*. 173:545-546.
- 4.- ARONSON, A.I. y W. BECKMAN. 1987. Transfer of chromosomal genes and plasmids in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1525-1530.
- 5.- ARONSON, A.I., W. BECKMAN y P. DUNN. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
- 6.- ARONSON, A., D.J. TYRELL, Ph.C. FITZ-JAMES y L.A. BULLA Jr. Relationship of the synthesis of spore coat protein in *Bacillus thuringiensis*. 1982. *J. Bacteriol.* 151:399-410.
- 7.- BATTISTI, L., B.D. GREEN y C.B. THORNE. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 162:543-550.
- 8.- BAUM, J.A. 1994. Tn5401, a class II transposable element from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 176:2835-2845.
- 9.- BERNHARD, K., H. SCHREMPF y W. GOEBEL. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 133:897-903.
- 10.- BONNEFOI, A. y H. de BARJAC. 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. *Entomophaga*. 7:223-229.
- 11.- BOURGUOIN, C., A. DELECLUSE, J. RIBIER, A. KLIER y G. RAPOPORT. 1988. A *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis gene encoding a 125-Kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. *J. Bacteriol.* 170:3575-3583.
- 12.- BRAVO A., A. LORENCE y R. QUINTERO. 1992. Perspectivas en la utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. *Biotecnología*. 2:139-154.
- 13.- BURGESS, H.D. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. *MIRCEN Journal*. 2:101-120.

- 14.- CARLSON, C.R. y A. KOLSTO. 1993. A complete physical map of *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.* 175:1053-1060.
- 15.- CARTER, J.B. 1984. Viruses as pest-control agents. *Biotech. and Gen. Eng. Rev.* 1:375-419.
- 16.- Da COSTA DARINI, A.L., O.L. DOMINGUES, A. FURLONETTO Y C.E. LEVY. 1995. Determinação do tamanho de plasmídios por três métodos. *Rev. Lat-amer. de Microbiol.* 37:217-225.
- 17.- De BARJAC, H. 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les mosquitos: *B. Thuringiensis* var. israelensis sérotype 14. *C.R. Acad. Sc. Paris T.* 268, p.p 797-800.
- 18.- De BARJAC, H. y A. BONNEFOI. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their differentiation. *J. Invertebr. Pathol.* 11:347-355.
- 19.- De BARJAC, H. y V.C. DUMANVOIR. 1974. Comparasion entre les exotoxines thermostables de diferénts serotypes de *Bacillus thuringiensis* (Note). *C.R. Acad. Sc. Paris T.* 278, p.p 2843-2845.
- 20.- De BARJAC, H. y A. BONNEFOI. 1962. Essai de classification biochemique et serologique de 24 souches de *Bacillus* type *B. thuringiensis*. *Entomophaga.* 7:6-31.
- 21.- DULMAGE, H.T. y K. AIZAWA. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. *Microbial and viral pesticides.* Edovard Kurstak (Ed). p.p 209-236.
- 22.- DULMAGE, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertbr. Pathol.* 15:232-239.
- 23.- DULMAGE, H.T. y R.A. RHODES. 1971. Production of pathogens in artificial media. En: *Microbial control of insects and mites.* H.D. Burges y N.w. Hussey (Ed). Academic Press, London. p.p 507-538.
- 24.- DULMAGE, H.T. 1972. Distribution, abundance and control of *Heliothis* species in cotton and other host plant. *Southern Coop. Series, Bulletin.* No. 169. USDA. Brownsville, Tx. Jan. p.p. 57-64.
- 25.- DULMAGE, H.T. y H. de BARJAC. 1973. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produces high yields of δ -endotoxin. *J. Invertbr. Pathol.* 22:273-277.
- 26.- ECKHARDT, T. 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid.* 1:584-588.

- 27.- ENTWISTLE, P.F., J.S. CORY, M.J. BAILEY y S. HIGGS. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. 1993. Ed. John Wiley and sons. U.K.
- 28.- FARKAS, J., K. SEBESTA, K. HORSKA, Z. SAMEK y F. SORM. 1976. Structure of the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Collection Czechsloz. Chem. Commun. 42; p.p 909.
- 29.- FAUST, R.M., A. LEE Jr y L.A. BULLA. 1982. Bacteria and their toxins as insecticides. In microbial and viral pesticides. E. Kurstsk y M. Decker (Ed). NY. USA. p.p 75-206.
- 30.- FRUST y SULLIVAN. 1990. Biopesticides: A technology impact report, Frust y Sullivan Inc. N.Y., N.Y. p.p 1-341.
- 31.- GABRIEL, C.J. y C.R. COOK. 1990. Biological control, the need for a new scientific framework. *Bio/Science*. 40:204-207.
- 32.- GALAN-WONG, L.J. *et al.* 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. UNAM (Ed). México.
- 33.- GARZA G., E., A. BERLANGA y V. HERNANDEZ. 1994. Producción de hongos entomopatógenos. Guía técnica. SARH. México.
- 34.- GOLDBERG, L. y J. MARGALIT. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. *Mosq. News*. 37:355-358.
- 35.- GONZALEZ, J.M. Jr., H.T. DULMAGE y B.C. CARLTON. 1980. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 5:351-365.
- 36.- GONZALEZ, 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.
- 37.- GONZALEZ, 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.
- 38.- GONZALEZ, J.M. Jr y B.C. CARLTON. 1980. Patterns of plasmids DNA in crystaliferous and acrytaliferous strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 5:92-98.
- 39.- HANNY, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature*. 127:1004.

- 40.- HANNY, C.L. y P. FITZ-JAMES. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. J. Microbiol. 1:694-710.
- 41.- HARDY, K. Bacterial plasmids. ASM (Ed). 1981. UK.
- 42.- HEIMPEL, A.M. y T.A. ANGUS. 1963. Disease caused by certain spore-forming bacteria. Insect pathology: An advanced treatise. Steinhaus E.A. (Ed). Academic Press, NY. 2:21-73.
- 43.- HOFTE, H. y H.R. WHITELEY. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- 44.- HONEE, G. y B. VISSER. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol. Exp. Appl. 69:145-155.
- 45.- IIZUKA, T., R.M. FAUST y R.S. TRAVERS. 1981. Isolation and partial characterization of extrachromosomal DNA from serotypes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to lepidopteran and dipteran larvae by agarose gel electrophoresis. J. sericult. Sci. Japan. 50:120-133.
- 46.- IIZUKA, T., R.M. FAUST y R.S. TRAVERS. 1981. Comparative profiles of extrachromosomal DNA in single and multiple crystaliferous strains of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki*. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 60:143-151.
- 47.- IIZUKA, T., R.M. FAUST y M. OHBA. 1983. Comparative profiles of plasmids DNA and morphology of parasporal crystals in four satrais of *Bacillus thuringiensis* subsp. *dramstadiensis*. Appl. Ent. Zool. 18:486-496.
- 48.- ISHIWATA, S. 1901. On a kind of severe Flasherie (sotto) disease. Dainihan Sanbshi. Kaiho. 9:1-5.
- 49.- 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.
- 50.- KLOWDEN, M.J., G.A. HELD y L.A. BULLA. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to adult *Aedes aegypti* mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol. 46:312-315.
- 51.- KNOWELS, B.H. y J.A.T. DOW. 1993. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models of their mechanism of action on the insect gut. Bioassays. 15:469-476.
- 52.- KOGAN, M. 1988. Integrated pest management: theory and practice. Entomol. Exp. Appl. 49:59-70.

- 53.- KOZIEL, M.G., N.B. CAROZZI, T.C. CURRIER, G.W. WARREN y S.V. EVOLA. 1993. The insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. *Biotech. and Genetic Eng. Reviews.* 11:171-228.
- 54.- 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.
- 55.- LECADET, M.M., J. CHAUF AUX, J. RIDBIER y D. LERECLUS. 1992. Construction of novel *B. thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:840-849.
- 56.- LERECLUS, D., G. MENO U 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 pAMB1. *Mol. Gen.* 191:307-313.
- 57.- LERECLUS, D., S. GUO y M.M. LECADET. 1988. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* plasmids whose replication is thermosensitive in *B. subtilis*. *FEMS Microbiol. Letters.* 49:417-422.
- 58.- LERECLUS, D., J. RIBIER, A. KLIER, G. MENO U y M.M. LECADET. 1984. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *The EMBO Journal.* 3:2561-2567.
- 59.- LEWIS, R. 1989. Baculovirus for biocontrol and biotechnology. *Bioscience.* 39:431-434.
- 60.- LUTHY, P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. letters.* 8:1-7.
- 61.- MARTIN, P.A.W. 1994. An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. *Amer. Entomol.* p.p 85-90.
- 62.- MEYERS, R.A. Molecular biology and biotechnology. A comprehensive desk reference. 1995. Robert A. Meyers (Ed). USA. p.p 469-473.
- 63.- NORRIS, J.R. 1978. Microbial control of pest insects. En: *Comp. to microbiology.* Bull y Mesdow (Ed). Longman. p.p 459-479.
- 64.- OHBA, M. y K. AIZAWA. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 47:277-288.
- 65.- PICKETT, A.D. 1949. A critique on insect chemical control methods. *Canad. Entomol.* 81(3):67-76.

66.- PICKETT, A.D., W.L. PUTMAN y E.J. Le ROUX. 1958. Progress in harmonizing biological and chemical control of orchard pests in eastern Canada. Tenth Internatl. Congr. Entomol. Proc. 3:169-174.

67.- RAJNCHAPEL-MESAI, J. 1990. Les biopesticides. Biofutur. Juillet/Août 1990.

68.- REDDY, A., L. BATTISTI y C.B. THORNE. 1987. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. J. Bacteriol. 169:5263-5270.

69.- RODRIGUEZ, M.M., M. de la TORRE y E. URQUIJO. 1991. *Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat-amer. Microbiol. 33:279-292.

70.- RUHFEL, R.E., N.J. ROBILLARD y C.B. THORNE. 1984. Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 157:708-711.

71.- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH y T. MANIATIS. Molecular cloning. A laboratory manual. 1989. CSH (Ed). USA.

72.- STANIER, R.Y., E.A. ADELBERG y J.L. INGRAHAM. Microbiología. 1986. 4a. Ed. REPLA, S.A. México.

73.- STERN, V.M., R.F. SMITH, R. van de BOSCH y K.S. HAGEN. 1959. The integrated control concept. Hilgardia. A journal of agricultural science published by the California agricultural experiment station. 2(29):81:101.

74.- TAN, Y., K. KANDA y K. AIZAWA. 1987. Biological role of plasmids in *Bacillus thuringiensis* AF101. Annual Reports of Intl. Center of Coop. Res. Biotechnol. 10:159-165.

75.- WHITELEY, H.R. y H.E. SCHNEPF. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Microbiol. 40:549.

76.- WIGGLESWORTH, V.B. 1945. DDT and the balance of nature. Atlantic Monthly. 176(6):107-113.

77.- WIWAT, Ch., W. PANBANGRED y A. BHUMIRATNA. 1990. Transfer of plasmids and chromosomal genes amongst subspecies of *Bacillus turingiensis*. J. Ind. Microbiol. 6:19-27.

