

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Clonación y expresión del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, que codifica delta-endotoxinas con potencial para el control de insectos de importancia económica”

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado de Magister Scientae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología

ALEJANDRO HERNÁNDEZ SOTO

Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio” Costa Rica

2006

Dedicatoria

A mis padres
A mis hermanos

Agradecimientos

Primeramente a Dios por brindarme salud y fortaleza en cada momento.

A Doña Ana M. Espinoza por la oportunidad de realizar la práctica en el grupo de investigación, por su dedicación, paciencia y labor de dirección que emprendió con sabiduría en este proceso y en especial a la hora de la redacción y evaluación de los resultados.

Al Dr. Jorge E. Ibarra por su dirección, constante asesoría y hospitalidad en todo momento, en especial en el Laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV, Irapuato, donde se realizó la mayor parte de la presente investigación.

A Regina Basurto por su sabia colaboración y enseñanzas en momentos críticos, que permitieron mi desarrollo profesional y personal, y cuyos resultados están impregnados en esta tesis.

A la Dra. Cristina del Rincón, quien hizo posible que se concretaran ideas y experimentos clave. Mi agradecimiento además por su cordialidad, amplio criterio y por el desarrollo de experimentos paralelos que permitieron dilucidar interrogantes planteadas en la presente investigación.

Adriana Obando por su ayuda en los bioensayos con broca y su compañerismo en todo tiempo.

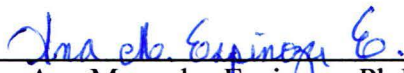
A mis amigos tanto del Laboratorio de México, en especial a Germán Pérez por su ayuda intelectual y motivación en el desarrollo de los experimentos; así como al grupo de Ingeniería Genética de Cultivos del CIBCM por su amabilidad y ayuda.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología.



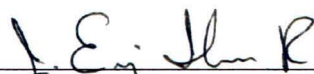
Federico Albertazzi Castro, Ph.D.

Representante del Decano del Sistema de Estudios de Posgrado



Ana Mercedes Espinoza, Ph.D.

Codirectora de Tesis



Jorge E. Barra Rendón, Ph.D.

Codirector de Tesis



Fernando García Santamaría, Ph.D.

Asesor



Jorge Morera Monge, Ph.D.

Director del Programa de Posgrado



Alejandro Hernández Soto, Ing.

Candidato

ÍNDICE

<i>Dedicatoria</i>	ii
<i>Agradecimientos</i>	iii
ÍNDICE	v
RESUMEN GENERAL	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
General:	3
Específicos y actividades:	3
CAPÍTULO I	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1 Antecedentes	4
1.2 Entorno histórico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.3 Mecanismo de sobrevivencia de <i>Bt</i> y colonización de hospederos insectiles	6
1.4 Especificidad de las cepas de <i>Bt</i>	8
1.5 Importancia del uso de genes <i>cry</i> de <i>Bt</i> para conferir resistencia a la broca del café	10
1.6 <i>Bacillus thuringiensis</i> como fuente de genes útiles para la ingeniería genética de plantas ..	11
1.7 El gen <i>cry10A</i>	13
1.7 Plantas modificadas genéticamente con genes <i>cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.8 Control de <i>Aedes aegypti</i> , otro posible uso de Cry10A de la cepa <i>Bti</i>	16
1.10 Bibliografía:	19
CAPÍTULO II	26
Estrategias novedosas de estudio y clonación del gen <i>cry10A</i> de la cepa <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	26
RESUMEN	26
ABSTRACT	27
2.1 Introducción	27
2.2 Materiales y Métodos	31
2.2.1 Cepas y vectores utilizados	31
2.2.2 Amplificación por PCR del gen <i>cry10A</i> , ORF1 y ORF2	31
2.2.3 Clonación en pCR2.1TOPO	32
2.2.4 Unión del ORF1 y el ORF2 en el vector de clonación pMECA para eliminar el GAP	33
2.2.5 Clonación del gen <i>cry10A</i> silvestre, ORF1, ORF2 y ORF1-2 en el vector de expresión para <i>Bt</i> pSTAB	34
2.2.6 Construcción del vector para interrumpir el gen <i>cry10A</i> mediante la inserción del gen de resistencia a Kanamicina por recombinación homóloga	36
2.3 Resultados	38
2.3.1 Clonación del amplicón <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1TOPO	38
2.3.2 Clonación del gen <i>cry10A</i> en el vector de expresión para <i>Bt</i> pSTAB	39
2.3.3 Clonación del amplicón ORF1 del gen <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1TOPO	40
2.3.4 Clonación del amplicón ORF1 del gen <i>cry10A</i> en el vector de expresión para <i>Bt</i> pSTAB	41
2.3.5 Clonación del amplicón ORF2 del gen <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1TOPO	42

2.3.6 Clonación del ORF1 y el ORF2 en el vector de clonación pMECA	43
2.3.7 Clonación del ORF1-ORF2 en el vector de expresión pSTAB	44
2.3.8 Clonación ORF2 en el vector pSTAB	48
2.3.9 Clonación del gen <i>cry10A</i> silvestre en pUC19 como un paso previo para interrumpirlo con el gen de resistencia a Kanamicina	49
2.3.10 Inserción del gen de resistencia de Kanamicina (<i>nptII</i>) en el primer marco abierto de lectura del gen <i>cry10A</i> silvestre	50
2.3.11 Relaciones de la secuencia de aminoácidos de Cry10A con otras proteínas Cry	51
2.4 Discusión	54
2.5 Bibliografía	58
 CAPÍTULO III	 61
Susceptibilidad de <i>Aedes aegypti</i> a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	61
RESUMEN	61
ABSTRACT	62
3.1 Introducción	62
3.2 Materiales y Métodos	64
3.2.1 Transformación y expresión del gen <i>cry10A</i> en cepas acristalíferas de <i>Bt</i>	64
3.2.2 Bioensayos con <i>Aedes aegypti</i>	66
3.3 Resultados	67
3.3.1 Transformación y expresión de la construcción pSTAB- <i>cry10A</i> en la cepa acristalífera 4q7	67
3.3.2 Análisis de la estabilidad del RNAm del gen <i>cry10A</i>	71
3.3.3 Bioensayos con <i>A. aegypti</i>	74
3.4 Discusión	77
3.5 Bibliografía	80
 CAPÍTULO IV	 84
Susceptibilidad de la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i> Ferrari) a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	84
RESUMEN	84
ABSTRACT	84
4.1 Introducción	85
4.2 Materiales y Métodos	86
4.2.1 Cepas y vectores	86
4.2.2 Preparación de complejo espora-cristal <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i>	86
4.2.3 Bioensayos burdos con broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>)	86
4.2.4 Bioensayos burdos con <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Gnathocerus maxillusus</i> y <i>Prostephanus</i>	87
4.3 Resultados	88
4.3.1 Bioensayos con <i>H. hampei</i>	88
4.3.2 Bioensayos con otros coleópteros	90
4.4 Discusión	91
4.5 Bibliografía	95
 CAPÍTULO V	 98
Discusión general	98
5.1 Discusión general	98
5.2 Bibliografía	101
Apéndice	103
Glosario	104

RESUMEN GENERAL

El gen *cry10A* de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* codifica por proteínas bioinsecticidas útiles para el desarrollo de estrategias de control sostenible de plagas como *Hypothenemus hampei* y *Aedes aegypti*. El potencial de la proteína había sido descartada para *A. aegypti*, lo cual se basó erróneamente en bioensayos realizados con cepas recombinantes con bajos niveles de expresión de Cry10A. Además, este gen es interesante pues se encuentra fragmentado en dos marcos abiertos de lectura (ORF1 y ORF2), producto de la inserción de una secuencia de 48 bp (GAP) que presenta codones de terminación. En el presente trabajo se logró el diseño de estrategias de clonación y estudio del gen *cry10A* con lo cual se espera que se logren dilucidar interrogantes con respecto a la importancia de cada ORF tanto en la expresión como en la toxicidad de Cry10A. Se logró la expresión estable y cristalización de las proteínas correspondientes a ambos ORFs del gen *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt*; y se determinó el efecto bioinsecticida contra *H. hampei* y contra *A. aegypti*. El complejo espora-cristal Cry10A resultó ser activo contra *A. aegypti* con una DL_{50} de 2 $\mu\text{g/ml}$; y contra broca con una mortalidad del 20% en bioensayos burdos a una concentración de 50 $\mu\text{g/cm}^2$. Además, esta proteína actúa de manera sinérgica con Cyt1A en ambos insectos con lo que se presentó una mortalidad del 100% en bioensayos burdos con *H. hampei* y una DL_{50} de 41 ng/ml para mosquitos. Los resultados obtenidos en la presente investigación plantean nuevas estrategias para el control de la broca del café y de mosquitos.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, Cry10A, Cyt, sinergismo, *Hypothenemus hampei*, *Aedes aegypti*.

LISTA DE TABLAS

CAPITULO I. Revisión de literatura

CAPÍTULO II. Estrategias novedosas de estudio y clonación del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Tabla II-1 Comparación de las secuencias de nucleótidos del ORF1-2 y el gen <i>cry10A</i> silvestre.	45
Tabla II-2 Comparación <i>in silico</i> de la secuencias de aminoácidos del ORF1-2 y del ORF1 y ORF2 de <i>Cry10A</i> silvestre.	46
Tabla II-3 Distancias genéticas de las secuencias del GAP de <i>cry10A</i> , <i>cry30A</i> , <i>cry39A</i> y <i>cry40A</i> según el modelo de dos parámetros de Kimura (1980).	53

CAPÍTULO III. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a las proteínas *Cry10A* y *Cyt1A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Tabla III-1 Secuenciación de las proteínas purificadas del gel de acrilamida al 10% a partir de cristales puros de la cepa pSTAB- <i>cry10A</i> por MALDI-TOF-MS.....	70
Tabla III-2 Apareamiento y estabilidad de los RNAm correspondientes al ORF1, ORF2 y la secuencia silvestre del gen <i>cry10A</i> (ORF1-GAP-ORF2), determinados mediante cálculos <i>in silico</i>	71
Tabla III-3 Bioensayo burdo del complejo espora-cristal de la cepa <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i> con larvas del cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i> (mosquitos) a una concentración aproximada de 100 µg/ml.	74
Tabla III-4 Bioensayo global fino (3 repeticiones) del complejo espora-cristal de la cepa <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i> con larvas del cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i> determinados a las 24h.....	75
Tabla III-5 Bioensayo fino global (3 repeticiones) de la mezcla de complejo espora-cristal de la cepa <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i> - cristal Cyt (1:1), con larvas del cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i> determinado a las 24h.	75
Tabla III 6 Toxicidades reportadas por distintos autores de las proteínas de <i>Bti</i> con larvas del cuarto instar de <i>Aedes aegypti</i> a las 24h	76

CAPÍTULO IV. Susceptibilidad de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) a las proteínas *Cry10A* y *Cyt1A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Tabla IV- 1 Bioensayo del complejo espora-cristal de la cepa <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i> con larvas del primer instar de <i>Hypothenemus hampei</i> al usar una dosis de 50 µg/cm ² y determinado a los 7 días.	88
Tabla IV- 2 Bioensayo del complejo espora-cristal de la cepa <i>Bt</i> -Cyt con larvas del primer instar de <i>Hypothenemus hampei</i> al usar una dosis de 50 µg/cm ² y determinado a los 7 días.....	89
Tabla IV- 3 Bioensayo de la mezcla de los complejos espora-cristal de las cepas <i>Bt</i> -pSTAB- <i>cry10A</i> y <i>Bt</i> -Cyt con larvas del primer instar de <i>Hypothenemus hampei</i> al usar una dosis de 50 µg/cm ² y determinado a los 7 días.	90

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I. Revisión de literatura

Figura I-1. Mapa del plásmido la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	4
Figura I-2. Esquema del modo de acción del complejo espora-cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> en larvas susceptibles.	7
Figura I-3. Modelo de unión de proteínas Cry a receptores de células de la membrana media de <i>Plutella xilostella</i>	9
Figura I-4. Frutos de café (<i>Coffea arabica</i>) infestados por la broca (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	10
Figura I-5. Cloroplastos vistos al microscopio de luz.....	15
Figura I-6. Mapa que indica en coloración verde la presencia de <i>Aedes aegypti</i> en latinoamérica en las décadas de 1930, en 1970 y en el 2001.	17
Figura I-7. Micrografía electrónica de transmisión del esporangio de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i>	18

CAPÍTULO II. Estrategias novedosas de estudio y clonación del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Figura II-1. Características del gen <i>cry10A</i> y sus transcritos	28
Figura II-2 Estrategias de clonación expresión del gen <i>cry10A</i> de la cepa <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>Israelensis</i>	29
Figura II-3 Amplificación por PCR y clonación del gen <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1 TOPO.....	38
Figura II- 4. Clonación del gen <i>cry10A</i> en el vector de expresión pSTAB.....	39
Figura II-5. Amplificación por PCR y clonación del ORF1 del gen <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1 TOPO.....	40
Figura II 6 Clonación del ORF1 del gen <i>cry10A</i> en el vector de expresión pSTAB.....	41
Figura II 7 Amplificación por PCR y clonación del ORF2 del gen <i>cry10A</i> en el vector pCR2.1 TOPO.....	42
Figura II-8 Clonación de los dos marcos abiertos de lectura en una secuencia única en el vector de clonación pMECA	43
Figura II-9 Clonación de ORF1-ORF2 en el vector de expresión pSTAB	44
Figura II-10. Electroferograma de la secuenciación del producto de 439pb del ORF1-2 del gen <i>cry10A</i>	45
Figura II-11 Alineamiento y análisis de la estructura secundaria de proteínas Cry4 y ORF1-2. ...	47
Figura II 12 Clonación del ORF2 del gen <i>cry10A</i> en el vector de expresión pSTAB.....	48
Figura II-13 Clonación del gen <i>cry10A</i> en el vector de clonación pUC19.....	49
Figura II-14. Inserción del gen de resistencia a Kanamicina (<i>nptII</i>) en la posición 714 (ScaI) de la secuencia <i>cry10A</i> silvestre de la construcción pUC19- <i>cry10A</i>	50
Figura II-15 Alineamiento de los aminoácidos carboxi-terminales de Cry4A, Cry4B; y el ORF2 de Cry10A..	51
Figura II-16 Árboles filogenéticos hechos según el análisis de Bootstrap-Neighborjoin hecho con el programa MEGA 3.1 descrito por Kumar <i>et al.</i> (2004) con 1000 repeticiones de (a) el primer marco abierto de lectura (ORF1) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y el extremo aminoterminal de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B; (b) el segundo marco abierto de lectura (ORF2) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y el extremo carboxiterminal de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B; (c) ambos marcos abiertos de lectura en una secuencia única (ORF1-ORF2) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y la secuencia total de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B;. (d) el primer	

marco abierto de lectura (ORF1) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y la secuencia total de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B. 52

Figura II-17 Alineamiento de la secuencias de nucleótidos del GAP que separan los dos marcos abiertos de lectura de los genes Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C, Cry39A y Cry40A. 53

CAPÍTULO III. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a las proteínas Cry10A y Cyt1A de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Figura III-1 Microscopía de luz a 1000 aumentos de A) <i>Bacillus thuringiensis</i> 4q7 transformado con la construcción pSTAB- <i>cry10A</i> y B) <i>B. thuringiensis</i> 4q7 sin transformar.	67
Figura III-2. Micrografía electrónica de barrido de la cepa <i>Bt-pSTAB-cry10A</i>	67
Figura III-3 Análisis mediante PCR y Blastn de una secuencia conservada del gen <i>cry10A</i> de la cepa <i>Bt-pSTAB-cry10A</i>	68
Figura III-4. Purificación de cristales Cry10A mediante centrifugación en gradientes de bromuro de sodio.	69
Figura III-5. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra en el carril 1 las proteínas de <i>Bt-pSTAB-cry10A</i> solubilizado con NaOH 50mM, dtt 25mM y CAPS 50mM pH 11.5 y en carril 2 el marcador de peso molecular.	70
Figura III-6. Posible estructura 2D del extremo 5' del RNAm generado a partir del gen <i>cry10A</i> silvestre según análisis <i>in silico</i> realizados con el programa RNAdraw v1.1, con una estabilidad de -22.92 kcal a 37°C.	71
Figura III-7. Posible estructura 2D del RNAm generado a partir del: A) extremo 3' de la secuencia del gen <i>cry10</i> utilizada por Thorne et al (1988) (ORF1-GAP-parte del ORF2) con una estabilidad de -16.62 y B) la secuencia del gen <i>cry10</i> utilizada por Hughes et al (2005) (ORF1) con una estabilidad de -9,39 kcal. El análisis se realizó <i>in silico</i> con el programa RNAdraw v1.1 utilizando como temperatura 37°C.	72
Figura III-8. Posible estructura 2D del RNAm generado a partir del extremo 3' del gen silvestre <i>cry10A</i> (ORF1,GAP, ORF2) según análisis <i>in silico</i> realizados con el programa RNAdraw v1.1, con una estabilidad de -23.48 kcal a 37°C.	73
Figura III-9 Bioensayos burdos de <i>A. aegypti</i> con <i>Bt-pSTAB-cry10A</i>	74

CAPÍTULO IV. Susceptibilidad de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

Figura IV-1. Larvas de *Hypothenemus hampei*, 7 días después de iniciado el bioensayo con el complejo espóra-cristal *Bt-pSTAB-cry10A* 88

CAPÍTULO V. Discusión general

APÉNDICE

Figura A-1 Dendograma de proteínas Cry diseñado por Crickmore. 103

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de insecticidas sintéticos ha sido de importancia tanto para el control de plagas agrícolas, como de insectos vectores de enfermedades humanas. Sin embargo, su uso indiscriminado ha ocasionado la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, la selección de insectos resistentes, daños en la flora y fauna, efectos negativos en la salud de trabajadores agrícolas y en los consumidores de productos con residuos tóxicos de dichos insecticidas. Un ejemplo del uso excesivo de tales productos se refleja en el hecho de que en Costa Rica, la importación de plaguicidas aumentó de 330.000 kg en 1991, a 18.522.000 kg en el 2001 (SIDES, 2001). Actualmente, existen alternativas al uso de los insecticidas sintéticos, una de ellas es el empleo de microorganismos entomopatógenos como la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

B. thuringiensis es el microorganismo más utilizado para la formulación de bioinsecticidas en el mundo (Caballero y Ferré, 2001). En la actualidad existen al menos 26 cepas de *Bt* registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), incluyendo 15 cepas silvestres, dentro de los serotipos *kurstaki*, *aizawai* e *israelensis*; y 3 obtenidas por recombinación por conjugación de plásmidos (Doping y Menn, 2000; citados por Schallmeyer *et al.*, 2004). Uno de los aspectos más importantes de esta bacteria es la presencia de diversos genes *cry* que codifican proteínas tóxicas y específicas para diversos órdenes de insectos. Los genes son intercambiables entre cepas de *B. thuringiensis* debido a que se encuentran en elementos extracromosómicos conocidos como plásmidos (Aronson *et al.*, 1986).

La utilidad de este microorganismo no se limita a su uso como bioinsecticida, sino que los genes *cry* que codifican las toxinas pueden introducirse mediante ingeniería genética en el genoma de especies vegetales para conferir resistencia a plagas insectiles. Actualmente, existen en el mercado variedades de maíz-*Bt* que expresan los genes *cry1Ab* y *cry9C*, algodón-*Bt* con los genes *cry1Ac*, ambos para el control de larvas de lepidópteros. También se han comercializado variedades de papa con el gen *cry3A* para el control del coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (Shelton *et al.*, 2002).

Uno de los usos promisorios de esta bacteria es para el control de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*). El Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos (PMGC) del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) cuenta con la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, que expresa la proteína Cry10A, potencialmente tóxica para el control de la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) y el mosquito transmisor del dengue (*Aedes aegypti*). El gen que codifica por la proteína bioinsecticida pueden aislarse y expresarse en cepas de *E. coli*, o bien en cepas acristalíferas de *Bt*. Este proceso es de gran importancia ya que se debe de disponer del gen aislado para su manipulación; además, la expresión del gen *cry10A* permitirá probar la toxicidad de la proteína contra broca y el mosquito *A. aegypti* mediante bioensayos.

En el presente trabajo se establecieron estrategias de clonación y modificación del gen *cry10A*, lo cual permitió su expresión estable; además, se determinó su efecto bioinsecticida contra *H. hampei* y *A. aegypti*.

OBJETIVOS

General:

Clonar y expresar el gen *cry10A* de la cepa *Bti*, que codifica por proteínas Cry potencialmente tóxicas para *Hypothenemus hampei* y para *Aedes aegypti*. Se demostrará además, la efectividad de Cry10A mediante bioensayos con *A. aegypti*; y con *H. hampei*.

Específicos y actividades:

- Desarrollar estrategias de clonación del gen *cry10A*.
 - Amplificar mediante PCR los genes *cry10A* silvestre, ORF1 y ORF2 del gen *cry10A* silvestre e insertarlos en el vector de clonación pCR2.1-TOPO.
- Lograr la expresión estable del gen *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt*.
 - Subclonar los genes *cry10A* silvestre, ORF1 y ORF2 del gen *cry10A* silvestre en el vector de expresión de *B. thuringiensis* pSTAB
 - Transformar células de *Bt* acristalíferas 4q7 (tipo *Bti*) con las construcciones pSTAB-*cry10A* silvestre.
- Determinar la actividad bioinsecticida de Cry10A
 - Realizar bioensayos burdos con las cepas transformadas con la construcción pSTAB-*cry10A* para probar la efectividad contra *A. aegypti* y contra *H. hampei*.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Antecedentes

Cepas de *Bt* activas contra *H. hampei*

Recientemente se descubrió que la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bti*) es activa contra larvas de primer instar de *H. hampei* (López *et al.*, 2003). El laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV, Irapuato, México llevó a cabo bioensayos preliminares con larvas de *H. hampei* y probó individualmente 4 de las 5 proteínas Cry codificadas por la cepa *Bti* (Figura I-1): *cry4A*, *cry4B*, *cry11* y *cyt*, pero no encontró efecto tóxico por parte de dichas proteínas. La única proteína que no se incluyó en el estudio fue la Cry10A (Figura I-1), la cual podría ser la causante de la toxicidad de la cepa *Bti*.

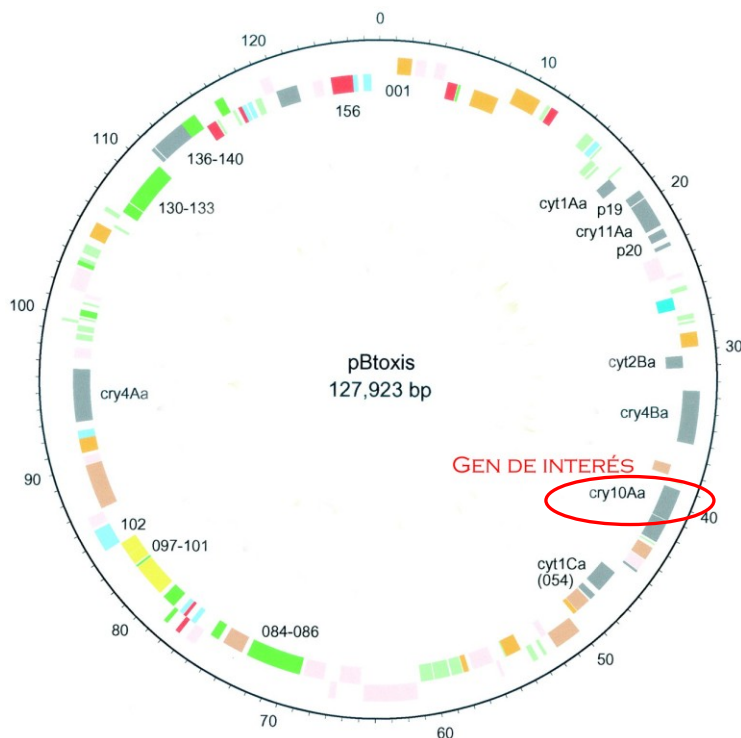


Figura I-1. Mapa del plásmido la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. En un círculo rojo se indica el gen *cry10A*, de interés por el potencial que tiene la proteína codificante en el control de la broca. En diferentes colores se indican los distintos genes: en gris: toxinas y péptidos antibióticos; en rosado relacionado a transposones; en naranja: región conservada; rojo: metabolismo; azul regulatorio, verde brillante genes asociados a superficie; verde claro: desconocido; amarillo: genes de metabolismo misceláneo. Tomado y adaptado de Berry *et al.* (2002)

Es importante indicar que Obando y colaboradores demostraron efecto tóxico de la cepa *Bti* en adultos de *H. hampei* (comunicación personal)¹, detalle que resulta interesante, ya que esta cepa tendría potencial para matar los dos estadios que tienen mayor importancia por su potencial destructivo de los frutos del cafeto.

Cry10A contra *Aedes aegypti*

La proteína Cry10A presenta una toxicidad baja contra *Aedes aegypti* según Thorne *et al.* (1986), Garduno *et al.* (1988) y Delecluse, *et al.* (1988). Estos autores tienen como prueba, bioensayos realizados con cepas de *E. coli*, *B. subtilis* y *Bt* con niveles bajos de expresión de la proteína recombinante. Esto resulta intrigante, y plantea la necesidad de aclarar este resultado mediante la adecuada expresión de Cry10A y su posterior bioensayo con *A. aegypti*.

1.2 Entorno histórico de *Bacillus thuringiensis*

El descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* se presentó en el año de 1901 cuando el japonés S. Ishiwata aisló un bacilo causante de una enfermedad en larvas del gusano de la seda (*Bombyx mori*), el cual bautizó como Sottokin (Ishawata, 1901, citado por Frankenhuyze, 1993). Este nombre era descriptivo de la enfermedad y su significado es “bacillo de muerte súbita”. A pesar de su importante hallazgo, no fue sino hasta 1915 cuando el alemán Ernest Berliner, formalizó el “descubrimiento” de *Bt* al aislar un organismo similar de larvas de *Anagasta kuehniella* provenientes de la provincia de Thuringia (Galán *et al.*, 1996).

El primer producto formulado de *Bt* se llamó Sporoidine y estuvo disponible en el año 1938 y fue producido en Francia por el laboratorio Liebec (Frankenhuyzen, 1993). Este producto era muy efectivo para proteger al trigo de *A. kuehniella*, sin embargo, se dejó de producir debido a los estragos económicos causados por la II Guerra Mundial.

El estudio de *B. thuringiensis* se tuvo en menos entre los años 1920 a 1950. En 1953 los estudios de microscopía electrónica plantearon la hipótesis que el cuerpo paraesporal de *Bt* podría relacionarse con su efecto tóxico (Hannay, 1953). Esta acertada

¹ Obando, A. 2006. Bioensayos de *Hypothenemus hampei* (broca) con la cepa *Bti* (entrevista). San José, Costa Rica, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular.

hipótesis fue demostrada años más tarde y para el año de 1967 Heimpel nombra a esta toxina δ -endotoxina (Cooksey, 1971).

Para el año de 1957 se disponía del producto “Thuricide”, mientras que en los años 1960 aparece en el mercado el “Dipel” preparado con base en el serotipo *kurstaki* (Betz *et al.*, 2000). El auge y la popularidad de *Bt* se alcanza en los años 1980, a medida que los insecticidas químicos fueron perdiendo efectividad debido al desarrollo de resistencia de insectos, o bien se empezaron a dar restricciones ambientales por ser de amplio espectro y muy tóxicos a humanos (Frankenhuyzen, 1993).

En el año de 1987 se presentó el primer reporte de la inserción de genes que codifican para δ -endotoxinas de *Bt* en plantas de tabaco (Barton *et al.*, 1987; Vaek *et al.*, 1987). Actualmente, es común este tipo de inserciones de genes de *Bacillus thuringiensis* en plantas para conferir resistencia a plagas, además, el uso de *Bt* en forma de bioinsecticidas sigue siendo muy utilizado tanto en sistemas de agricultura orgánica como tradicional.

1.3 Mecanismo de sobrevivencia de *Bt* y colonización de hospederos insectiles

B. thuringiensis es una bacteria entomopatógena, Gram positiva, aerobia que forma estructuras de resistencia, llamadas endósporas, cuando se presentan condiciones adversas de estrés (Aronson, 1994). La forma esporulada le permite sobrevivir en ambientes muy desfavorables tales como: altas temperaturas, desecación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos; mientras que en condiciones favorables de crecimiento la endóspora germina e inicia la fase vegetativa (Madigan *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1999).

Ahora bien, *B. thuringiensis* es una bacteria con estrategias de sobrevivencia eficientes, por lo que no solamente produce estructuras de resistencia, sino que durante el proceso de esporulación sintetiza una gran cantidad de proteínas bioinsecticidas contra insectos específicos, conocidas como δ -endotoxinas (Aronson, 1994). Las proteínas bioinsecticidas presentan dos características especiales, la primera es que son sintetizadas en forma de protoxinas inactivas y la segunda es que son compactadas en inclusiones

cristalinas capaces de resistir proteasas y condiciones adversas del ambiente (Agaisse y Lereclus, 1995).

La ingesta por parte de insectos susceptibles de esporas de *Bt* junto con las inclusiones cristalinas, tiene un efecto tóxico sinérgico y es clave en el éxito de la bacteria como organismo entomopatógeno (Barboza e Ibarra, 1998). Inicialmente, los cristales se disgregan debido al pH extremo del sistema digestivo de los insectos (Honée y Viseer, 1993). Una vez disgregados, las protoxinas se convierten en toxinas activas cuando diversas proteasas de este ambiente eliminan parte de los extremos amino y carboxilo de la protoxina (Whalon y Windegerd, 2003). Este proceso varía dependiendo de las proteasas del intestino del insecto: en dípteros y lepidópteros son principalmente serin-proteasas mientras que en coleópteros son proteasas que actúan en sitios con aspartato (Terra *et al.*, 1994 citado por Maag *et al.*, 2001) (Figura I-2).

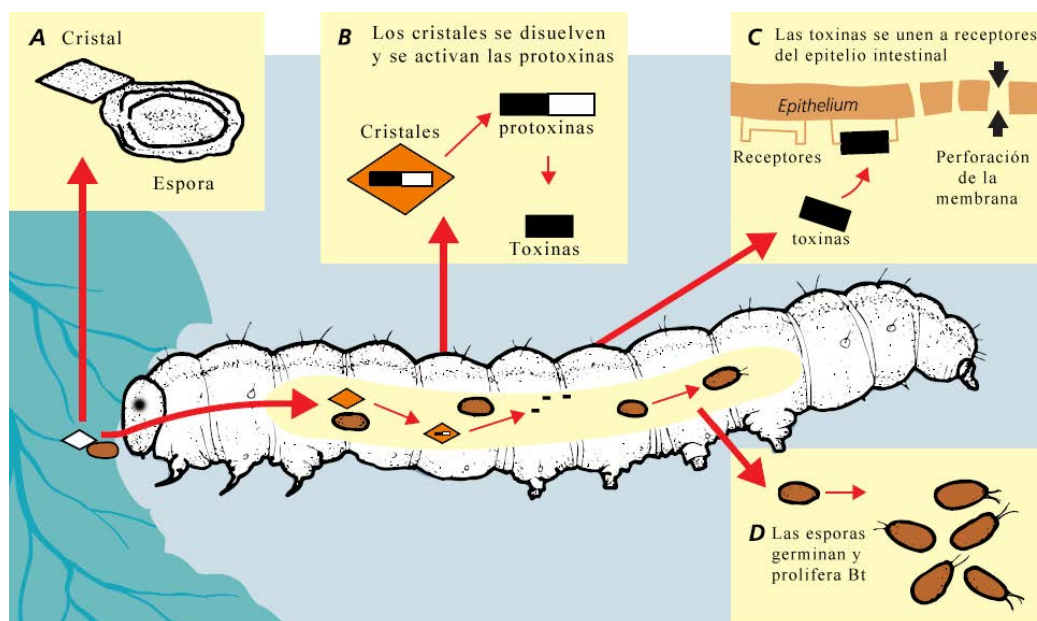


Figura I-2. Esquema del modo de acción del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* en larvas susceptibles. En a) el insecto susceptible ingiere esporas y cristales de *Bt*; b) los cristales se disuelven debido a pH extremo del sistema digestivo del insecto, esto libera las protoxinas, que son posteriormente activadas por proteólisis por distintas enzimas del insecto; c) las toxinas se unen a receptores específicos del epitelio intestinal y favorecen la formación de poros, lo que permite el intercambio de iones y la neutralización del pH del intestino medio; d) las condiciones de pH neutro favorecen la germinación de las esporas y la colonización del insecto hospedero por *Bt* y otras bacterias oportunistas. Tomado y modificado de WHO, 1999.

Las toxinas penetran la membrana peritrófica y se unen a receptores glicoproteicos específicos localizados en las microvellosidades de las células columnares del intestino medio de lepidópteros, coleópteros y dípteros, posteriormente la agrupación de las δ -endotoxinas lleva a la formación de un poro (Galán *et al.*, 1996). El poro hace permeable la membrana, lo que ocasiona un desequilibrio en la concentración de iones y por lo tanto se produce una lisis osmótica de las células del epitelio intestinal del insecto (Gill *et al.*, 1992; Rajamohan *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998). El mecanismo de poro es común en toxinas de otras bacterias, por ejemplo la aerolisina y la toxina α -hemolisina de *S. aureus* (Aronson y Shai, 2001). El intercambio de iones lleva a una neutralización del pH, lo cual provoca una disminución o inhibición de la alimentación del insecto, además, se generan condiciones adecuadas para que la espora germine, de tal manera que la forma vegetativa de *Bt* pueda colonizar el insecto (Whalon y Windegerd, 2003) (Figura I-2). El proceso posterior no se ha estudiado con mucho detalle, pero se conoce que el insecto muere por inanición y/o septicemia (Knowles, 1994).

1.4 Especificidad de las cepas de *Bt*

Los productos formulados con base en *Bt* representan el 90% del total de los bioinsecticidas que se ofrecen en el mercado (Agaisse y Lereclus, 1995). Su amplio uso, tanto en agricultura tradicional como orgánica en el control plagas insectiles de importancia económica, ha demostrado ser una estrategia que protege los ecosistemas agrícolas y naturales (Dulmage 1971; Gustafson *et al.*, 1997). En el campo agronómico, la mayoría de los productos basados en *Bt* van dirigidos hacia larvas del orden Lepidoptera, aunque también existen productos contra coleópteros derivados de cepas de *Bt* cepa *tenebrionis* como DiTera de Laboratorios Abbott; M-one de la Compañía Mycoge, Novodor de Novo Nordisk y Trident de la compañía Termo Trilogy Corporation (Aronson *et al.*, 1986; Caballero y Ferré, 2001). Sin embargo, estos productos no ejercen control sobre *H. hampei*.

La alta diversidad y abundancia de cepas con diferentes especificidades, ofrece una amplia gama de posibilidades de control para más de 18 diferentes órdenes de insectos plaga (Audtho *et al.*, 1999). Además, se pueden utilizar varias cepas con δ -

endotoxinas que reconozcan receptores diferentes, de tal forma que la probabilidad de surgimiento de resistencia a largo plazo se reduce considerablemente (Sivasupramaniam *et al.*, 2000). Por ejemplo en el caso de *Plutella xylostella* se podrían utilizar las proteínas Cry1A, Cry1B y Cry1C, todas ellas con receptores distintos (Ferré y Van Rie, 2002) (Figura I-3).

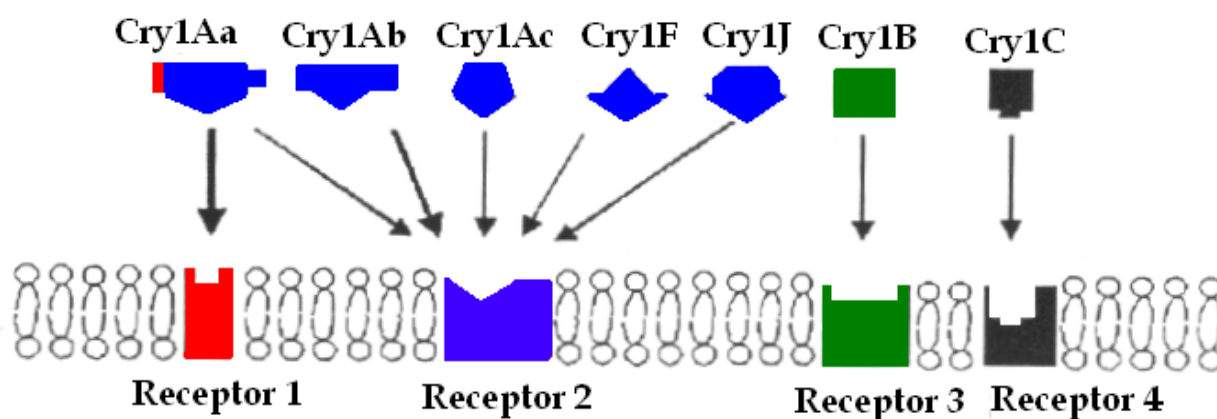


Figura I-3. Modelo de unión de proteínas Cry a receptores de células de la membrana media de *Plutella xylostella* en el cual se postula que Cry1Aa es capaz de unirse al receptor 1 y 2, mientras que Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F y Cry1J solamente se unen al receptor 2; además, tanto Cry1B como Cry1C se unen a un receptor específico distinto, 3 y 4 respectivamente (Tomado de Ferré y Van Rie, 2002).

La especificidad de muchas de las δ -endotoxinas de *Bt* contra grupos particulares de insectos o invertebrados es uno de los atributos más importantes de esta bacteria. Contrario al amplio espectro de los insecticidas sintéticos, las endotoxinas son inocuas a mamíferos, anfibios, pájaros, aves y reptiles (Schnepf *et al.*, 1998; Ballester, *et al.*, 1999). Esto representa una gran ventaja para el ambiente y el agricultor, debido a que los parasitoides y depredadores naturales, así como organismos de importancia en el suelo, no son eliminados del agroecosistema (Prieto-Samsonov *et al.*, 1997).

1.5 Importancia del uso de genes *cry* de *Bt* para conferir resistencia a la broca del café

El café es, desde hace más de 300 años, una de las mercancías más importantes del comercio internacional (González, 1998). En el año 2005, en Costa Rica, el café produjo divisas al país por 230,6 millones de dólares, lo que representó el séptimo puesto en cuanto a los ingresos del país (Procomer, 2006). La cantidad y calidad de café se disminuye drásticamente debido a la broca del cafeto (*Hyphotenemus hampei*) (Le Pelley, 1968; Bustillo *et al.*, 1998). Las pérdidas se deben a que este insecto se alimenta en todas las fases de su ciclo de vida del fruto del café, donde se refugia y reproduce (Castillo *et al.*, 2001) (Figura I-4). Esta plaga está ampliamente distribuida en todos los países productores de café, con excepción de Panamá, y representa un gran problema debido a que las medidas de control que existen son ineficientes, costosas y de difícil implementación (Guharay y Monterrey, 1997).

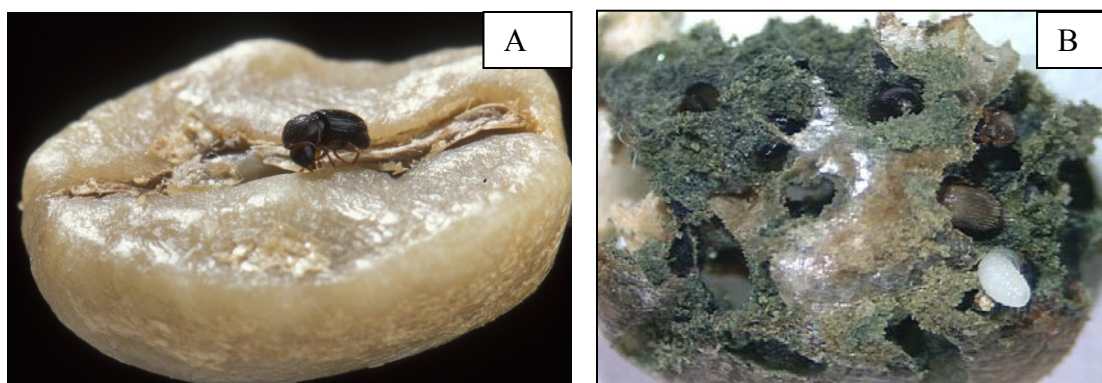


Figura I-4. Frutos de café (*Coffea arabica*) infestados por la broca (*Hyphotenemus hampei*) en A) se muestra una hembra de *H. hampei* antes de colonizar el grano (Greb, 2005) y en B) un grano infestado y casi totalmente consumido por la broca (cortesía de Maribel Portilla).

La alternativa más inmediata para el agricultor en el control de la broca es mediante el insecticida organoclorado Endosulfán. Este insecticida es conocido por ser altamente tóxico (LD₅₀ 160 mg/Kg en ratas) y mutagénico, además, contamina suelos y fuentes de agua, es dañino a la vida silvestre, genera resistencia y favorece el surgimiento de plagas secundarias como los minadores foliares (Bustillo *et al.*, 1998). Por estas razones, es importante buscar nuevas estrategias de control de la broca del café.

La cepa *B. thuringiensis* serovar *israelensis* ha demostrado ser efectiva para el control de *H. hampei* (López *et al.*, 2003). El aislamiento del gen que codifica la proteína tóxica a este insecto permitirá el desarrollo de nuevas soluciones amigables con el ambiente, tal como la generación de plantas de café resistentes mediante ingeniería genética. En la actualidad ya existen reportes de transformación de café con el gen *cryIAc* para conferirle resistencia al minador de la hoja (*Perileucoptera coffeella*) (Leroy *et al.*, 2000). Además, el PMGC desarrolló protocolos de cultivo *in vitro* para la producción de tejidos embriogénicos aptos para la transformación genética y la regeneración de plántulas de café (Gatica *et al.*, 2003). Actualmente, se optimiza los protocolos para la transformación genética de este cultivo, utilizando para ello genes marcadores. Además, cabe indicar que el PMGC del CIBCM tiene experiencia en *Bt*, en el cultivo *in vitro*, transformación genética y evaluación en campo de variedades de arroz modificadas genéticamente (Arrieta, 2003; Espinoza, 2003; Hernández, 2002; Muñoz, 2000).

1.6 *Bacillus thuringiensis* como fuente de genes útiles para la ingeniería genética de plantas

Bacillus thuringiensis es una bacteria con una alta diversidad de genes que codifican para proteínas bioinsecticidas. En la actualidad existen al menos cuatro genes de δ -endotoxinas Cry que se usan en maíz y algodón para protegerlo del ataque de larvas de lepidópteros, estos genes son el Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2 y Cry9 (Shelton *et al.*, 2002). El potencial de los genes de *Bt* es aún mayor, puesto que se conocen más de 300 genes distintos que codifican para δ -endotoxinas Cry y Cyt (Crickmore *et al.*, 1998; actualización disponible en http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/); además, *Bt* dispone de un arsenal de proteínas para colonizar su hospedero cuando se encuentra en su forma vegetativa, como lo son las proteínas Vip (Estruch *et al.*, 1996), proteasas y quitinasas (Schnepf *et al.*, 1998).

El DNA cromosómico de *Bt* es de un tamaño es de 5.2 millones de pares de bases y tiene un contenido de A-T del 65%, dispone de 105 RNAt y 14 RNAr (Ussery *et al.*, 2004; Schnepf *et al.*, 1998). Los genes *cry* se encuentran en plásmidos y pueden llegar a representar entre el 10 al 20% del DNA total (Barboza e Ibarra, 1998). Una cepa de *Bt* puede llegar a tener hasta 12 diferentes plásmidos que varían en tamaño de 1.4 MDa a

180 MDa; aunque lo normal es que se presenten pocos plásmidos de gran tamaño (Aronson, 2002). La codificación de genes en plásmidos es ventajosa para la bacteria, debido a que este tipo de elemento extracromosómico es fácilmente intercambiable con otras cepas de la misma especie mediante conjugación (Aronson *et al.*, 1986). Además, muchos genes *cry* están flanqueados por secuencias similares a transposones (Schnepf *et al.*, 1998), que podrían ser útiles para la movilización de genes entre plásmidos de *Bt*.

Como se mencionó con anterioridad, actualmente se conoce la secuencia de más de 300 genes *cry*, estos genes se han clasificado en más de 22 grupos y diferentes subgrupos de acuerdo con su similaridad en la secuencia de aminoácidos (http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/, Crickmore *et al.*, 1998).

La actividad de algunas δ -endotoxinas no se limita a un orden específico de insectos, sino más bien, existe una amplia diversidad de este tipo de proteínas bioinsecticidas específicas contra insectos de distintos órdenes: Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, además de nemátodos. De manera general, las proteínas Cry1, Cry2 y Cry9 son tóxicas a lepidópteros; Cry3, Cry7 y Cry8 son efectivas contra coleópteros, mientras que las CryIB y CryII tienen un efecto dual contra coleópteros y lepidópteros. Las proteínas Cry5, Cry12, Cry13 y Cry14 actúan contra nemátodos mientras que las Cry2, Cry4, Cry10A, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 y las Cyt son tóxicas a dípteros (Bravo *et al.*, 1998).

Ahora bien, tanto la estrategia de diseño de bioinsecticidas como el desarrollo de plantas transgénicas implican el estudio de genes *cry* específicos que codifican para proteínas bioinsecticidas. Para ello es necesario el aislamiento del gen de interés. Este proceso es posible mediante técnicas directas o indirectas de clonación de genes. Las directas implican la amplificación mediante PCR, y las indirectas, la creación de genotecas y la posterior búsqueda de cepas que contengan el gen en estudio (Hartl *et al.*, 2005; Alberts *et al.*, 1994)

Las técnicas directas de clonación se realizan mediante el diseño de iniciadores que flanqueen el gen de interés. El gen se amplifica mediante PCR y es insertado en un vector de clonación (plásmido) e introducido en un organismo receptor que puede ser *E.*

coli. Posteriormente, el gen puede manipularse e insertarse en vectores de expresión de *E. coli* o bien en cepas acristalíferas de *B. thuringiensis* (Arantes y Lereclus, 1991).

Las técnicas indirectas de clonación conllevan el aislamiento de DNA de *Bacillus thuringiensis*, digestión parcial mediante enzimas de restricción e inserción de los segmentos obtenidos en vectores que son posteriormente introducidos en *E. coli*. El conjunto de clones de *E. coli* que contienen la totalidad de los genes es llamada genoteca. A partir de esta genoteca se realiza una hibridización con una sonda de DNA marcada para identificar la o las cepas que contienen el gen de interés (Hartl *et al.*, 2005; Alberts *et al.*, 1994).

Una vez obtenido el gen, es importante secuenciar y estudiar la expresión de dicho gen mediante técnicas moleculares y bioensayos. Además, en la actualidad existen vectores de expresión de genes *cry*, que permiten la expresión de los mismos en cepas acristalíferas de *Bt* como por ejemplo pHT315, pHT3101y pSTAB (Arantes y Lereclus, 1991; Park *et al.*, 1999).

El Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos del CIBCM tiene particular interés en el gen *cry10A*, debido a su uso potencial para el control de la plaga del café *H. hampei*. El aislamiento y expresión de este gen permitirá determinar la efectividad de la proteína codificada para el control de la broca mediante bioensayos. Esto a su vez, permitirá plantear estrategias novedosas de control sostenible de esta importante plaga del café.

1.7 El gen *cry10A*

El gen *cry10A* fue aislado por primera vez por Thorne *et al.* (1986) de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bti*) y se denominó inicialmente cryIVC. Tanto Thorne *et al.* (1986), como Garduno *et al.* (1988) y Delecluse *et al.* (1988) obtuvieron bajos niveles de expresión de la proteína Cry10A en *E. coli*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. Además, como producto de estos trabajos, actualmente se considera que Cry10A presenta una baja toxicidad contra *A. aegypti*. Por ejemplo, Thorne *et al.* (1986) reporta una mortalidad del 70% con 125 µg/ml de una preparación de *B. subtilis* recombinante; mientras que Delecluse *et al.* (1988) indican una mortalidad de tan solo un 15% a las 24h al utilizar un cultivo concentrado de *E. coli*. Estas mortalidades son muy bajas si se

compara con la DL_{50} de Cry11 de 4,34 $\mu\text{g/ml}$, de Cry4A de 28,0 $\mu\text{g/ml}$, o de Cyt1A con 1,86 $\mu\text{g/ml}$ (Wirth *et al.*, 2004). Sin embargo, estos resultados podrían deberse a una baja concentración de Cry10A, más que a su toxicidad. Además, ninguna de estas cepas sería útil para determinar el efecto de Cry10A en *H. hampei* debido a que la baja expresión de la proteína pondría en duda el resultado. Esto plantea la necesidad de nuevas estrategias de clonación del gen *cry10A* que permitan una expresión estable. La estructura misma del gen es útil en el diseño de estas estrategias y se analiza a continuación.

Anteriormente, se describió que los genes *cry* se traducen como protoxinas que posteriormente son activadas por proteólisis en el intestino medio de insectos susceptibles. El gen *cry10A* es en parte, una excepción a este comportamiento. En realidad este gen se traduce como dos marcos abiertos de lectura (ORFs) (Delecluse *et al.*, 1988). El primero contiene una protoxina corta que se deduce de un peso molecular de 78 kDa; mientras que el segundo ORF codifica para una proteína de 58 kDa que es homóloga al extremo carboxi-terminal de otras proteínas Cry y que se elimina durante la activación de la protoxina (Berry *et al.*, 2002). Se cree que durante el proceso evolutivo de la cepa *Bti*, la secuencia de *cry10A*, cuyo marco abierto de lectura codificaba por una protoxina de 130kDa, se fragmentó en dos ORFs, mediante la inserción de 48 pb que introdujo dos codones de terminación, uno a los 2025 y otro a las 2063 bases corriente abajo del codón de iniciación ATG (Berry *et al.*, 2002).

La estructura del gen *cry10A* que se describió anteriormente es importante en el establecimiento de estrategias de clonación de este gen. En realidad ni Thorne *et al.* (1986), ni Garduno *et al.* (1988), clonaron la secuencia *cry10A* completa con sus dos ORFs, sino solamente el ORF1. El uso de la secuencia completa podría brindar una mayor estabilidad al RNAm de manera similar a lo que ocurre con otros genes *cry* (Schnepf *et al.*, 1998). Además, se podría utilizar un promotor fuerte como Cyt1A, y un estabilizador del RNAm como el Shine Dalgarno de *cry3A*. En el presente trabajo se plantean distintas estrategias de clonación de *cry10A* en las cuales se toma en cuenta cada una de estas consideraciones.

1.7 Plantas modificadas genéticamente con genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*

Los primeros pasos en la ingeniería genética de plantas utilizando genes *cry*, se presentaron al insertar los genes que codifican para la protoxina Cry1Ab de *Bt* en tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens*, resultando en niveles bajos de expresión y de toxicidad (Vaek *et al.*, 1987). Los primeros resultados exitosos se realizaron al utilizar fragmentos que codificaban para la proteína truncada en el extremo amino y carboxi-terminal (Barton *et al.*, 1987; Vaek *et al.*, 1987).

Otro obstáculo al que se enfrentaron los investigadores fueron los menores niveles de expresión de los genes *cry* en comparación con otros transgenes. Lo anterior se debió a que los genes *cry* contienen porcentajes de A-T de alrededor del 64%, mientras que los genes de plantas contienen un 44% en el caso de las monocotiledóneas, y un 55% en las dicotiledóneas (Ely, 1993; Maliga, 2003; Maliga, 2004). Lo anterior resultaba en modificaciones de corte y empalme prematuras del RNAm y por lo tanto un “mensaje” que no codificaba para la toxina completa (Van Rie, 2000). Por otra parte, el tipo de codones para la codificación de las proteínas Cry eran diferentes a los que la planta utiliza (codon usage), por lo cual era necesario “adaptarlos” sin cambiar la secuencia de aminoácidos (Perlak *et al.*, 1990). Estas modificaciones resultaron en niveles de expresión del 0.3% de proteína total (Van Rie, 2000).

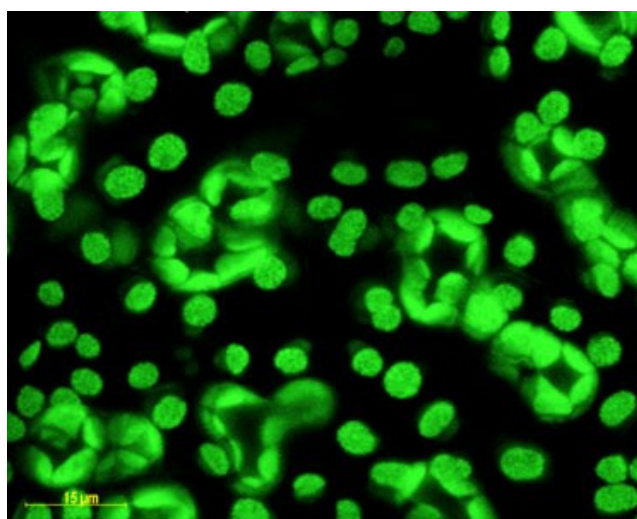


Figura I-5. Cloroplastos vistos al microscopio de fluorescencia. Barra: 15 μm. Tomado de Berg, 2006

Actualmente, existe la tecnología para evitar los inconvenientes anteriormente mencionados mediante la inserción de los genes *cry* en cloroplastos (Figura I-5). Mediante este tipo de transformación genética, los niveles de expresión alcanzan un 3% del total de las proteínas de las plantas, no existe el inconveniente de los codones debido a que la expresión genética del cloroplasto es muy similar a la de los procariontes (codon usage), de tal forma que se puede utilizar el gen sin modificaciones (Kota *et al.*, 1999; Maliga, 2003; Maliga, 2004). Se presentan además otras ventajas como la expresión policistónica de genes, y la herencia materna, lo cual disminuye el riesgo de flujo de genes a través del polen (Maliga, 2003; Maliga, 2004).

El uso de plantas genéticamente modificadas con genes *cry* es una de las mejores tecnologías que existen en la protección de cultivos contra el ataque de insectos. Contrario a la hipótesis de la emergencia temprana de insectos resistentes, y a pesar de las amplias extensiones de cultivos que expresan genes *cry*, todavía no se ha presentado ningún caso de resistencia (Fox, 2003; Tabashnik y Carrière, 2004). Este comportamiento se debe en parte al establecimiento de refugios silvestres libres de variedades transgénicas *Bt*, donde los insectos susceptibles pueden reproducirse y posteriormente cruzarse con un posible insecto resistente (Fox, 2003). Además, los beneficios económicos de las plantas genéticamente modificadas con genes *cry* son notorias en comparación con los cultivos tradicionales (Shelton *et al.*, 2002). Por ejemplo en maíz transgénico sembrado en Estados Unidos, el cultivo produce un adicional de 1,8 millones de kg de comida y fibra por acre; reduce el uso de pesticidas en 21 millones de kg. Además, se disminuye la contaminación de granos por mixotoxinas y fumonisinas, que en los cultivos tradicionales son producto de la contaminación por hongos que se desarrollan en tejidos atacados por insectos (Glaser y Matten, 2003).

1.8 Control de *Aedes aegypti*, otro posible uso de Cry10A de la cepa *Bti*.

El dengue es una enfermedad viral de RNA cadena positiva simple de la familia de los *Flaviviridae* (Shu y Huang, 2004). Los flavivirus son transmitidos por mosquitos de la familia Culicidae, principalmente por *Aedes aegypti* (Guzmán y Kouri, 1996). El reporte más antiguo que se conoce del dengue, data de una enciclopedia china de síntomas y remedios de la dinastía China de Chin (265-420 AC), la enfermedad era

llamada veneno de agua y de algún modo relacionaba insectos voladores con el agua (Gubler, 1998). El virus del dengue se propaga cuando una hembra adulta de *A. aegypti* se alimenta de un humano infectado (Lin *et al.*, 2004). El virus es capaz de replicarse en el intestino medio del mosquito, coloniza la hemolinfa, accede al resto del tejido de *A. aegypti* y se presenta en las glándulas salivales de 8-10 días posteriores a su infección (Malavige *et al.* 2004).

En los años 1950, 1960 y 1970 el programa de control de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para la erradicación de mosquitos en Centro y Sur América logró la disminución de dengue epidémico (Gubler, 2005) (Figura 2). El éxito se debió en parte al uso de insecticidas a gran escala y de uso doméstico, como el DDT (Gubler, 1998). Sin embargo, estos programas se descontinuaron a mediados de 1970. En suma, la expansión de poblaciones urbanas y la vasta cantidad de basura no biodegradable en Latinoamérica, permitió la proliferación y recolonización de *A. aegypti* en los últimos 10 años (Gubler, 2002; Monath, 1994) (Fig I-6). En Costa Rica se presentaron los primeros reportes de dengue en 1993, la primera epidemia se presentó en 1997 con un registro de 14421 casos (Sáenz *et al.*, 1999), mientras que para finales del año 2005 un total de 33000 personas se habían enfermado de dengue a lo largo de todo el país (Bonilla, 2006).

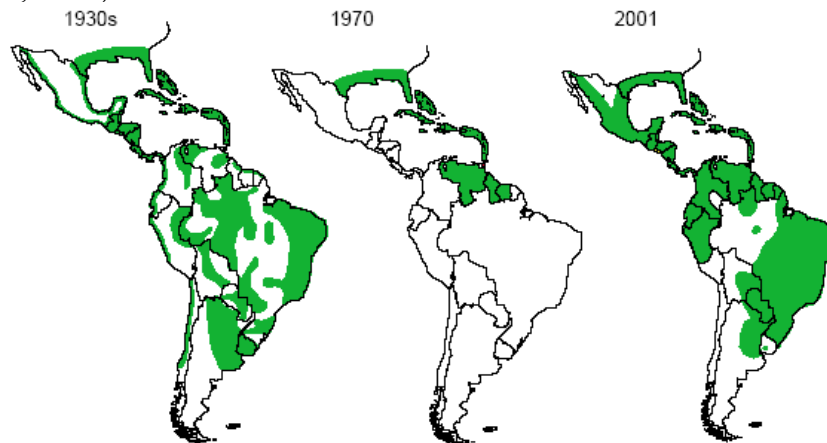


Figura I-6. Mapa que indica en coloración verde la presencia de *Aedes aegypti* en Latinoamérica en las décadas de 1930, en 1970 y en el 2001. Tomado y adaptado de Gubler, 2002. Nótese la reaparición del mosquito para el 2001.

El dengue es una enfermedad humana de gran importancia, debido a que no existen agentes terapéuticos útiles para tratarla. Por el contrario, los esteroides, antivirales o carbazocromos no han probado ser efectivos; mientras que el uso de paracetamol (aspirina) como analgésico debe de evitarse debido al riesgo de hemorragia (Gibbons y Vaughn, 2002). Además, no existe una vacuna contra este virus debido a que los cuatro serotipos de dengue dificultan la creación de una vacuna tetravalente (Gubler, 1998). Por otra parte, el uso de químicos para controlar el mosquito representa un problema pues se ha presentado resistencia de este vector a los químicos temefos, malatión, fenitrotión y pirimifosmetil (Malavige *et al.*, 2004).

El número de personas infestadas en incremento, el aumento de condiciones ideales para la multiplicación de mosquitos, la forma de replicación exponencial de este virus, así como la ausencia de mecanismos de control tanto del virus como del vector, podrían tener consecuencias económicas y sociales de gran importancia (Gubler, 2002).

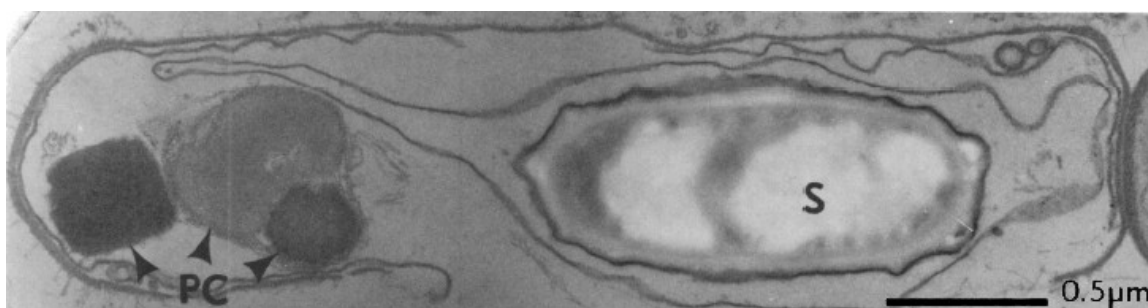


Figura I-7. Micrografía electrónica de transmisión del esporangio de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. Nótese la presencia de los cristales que forman el cuerpo paraesporal (PC) y la espora (S). Tomado de Tyrell *et al.*, 1981.

Una estrategia de control sostenible de larvas de mosquitos es el uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*). *Bti* es altamente activa contra larvas de *A. aegypti* con una DL_{50} de 20ng/ml y no se ha presentado resistencia contra esta bacteria a pesar de su amplio uso. Como se mencionó con anterioridad, esta bacteria dispone de un cristal paraesporal con las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11 y Cyt1Aa (Figura I-7). Todas estas proteínas, con excepción de la Cry10A, han demostrado ser altamente tóxicas contra larvas de *A. aegypti*. Sin embargo, se cree que los bajos niveles de expresión de Cry10A obtenidos por los distintos autores que realizaron los bioensayos contra

mosquitos (Thorne *et al.*, 1986; Garduno *et al.*, 1988; Delecluse *et al.*, 1988), podría subestimar la actividad de esta δ -endotoxina. La expresión estable del gen *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt* permitirá evaluar esta hipótesis y determinar el potencial que su respectiva proteína tiene en el control de *A. aegypti*.

1.10 Bibliografía:

- Agaisse, H.; Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein. *Journal of Bacteriology*. 177: 6027-6032.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. 1994. Molecular Biology of the cell. 3 ed. New York, Garland Publishing. 319-321p.
- Arantes, O; Lereclus, D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*. 108: 115-119.
- Aronson, A.; Beckman, W.; Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Review*. 50: 1-24.
- Aronson, A. 1994. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide. *Plant Breeding Review*. 12: 19-45.
- Aronson, A; Shai, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins are so effective: unique features of their mode of action. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*. 195: 1-8.
- Aronson, A. 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59: 417-425.
- Arrieta, G. 2003. Caracterización molecular de las Endotoxinas de una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas a partir de ecosistemas silvestres y agrícolas de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, CR, Universidad de Costa Rica. 150p.
- Audtho, M.; Valaitis, A.; Alzate, O.; Dean, D. 1999. Production of Chymotrypsin-Resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1 δ -Endotoxin by Protein Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4601-4605.
- Ballester, V.; Granero, F.; Tabashnik, B.; Malvar, T.; Ferré, J. 1999. Integrative Model for Binding of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Susceptible and Resistant Larvae of the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1413-1419.
- Barboza, E.; Ibarra, J. 1998. Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. *Boletín de Educación Bioquímica*. 17:3-10.

- Barton, K.; Whiteley, H.; Yang, N. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*. 85: 1103-1109.
- Berg, H. 2006. Cells. Danforth Center. Visitado el 4 Junio 2006. Disponible en <http://www.danforthcenter.org/Cells>
- Berry, C.; O'Neil, S.; Ben-Dov, E.; Jones, A.; Murphy, L.; Quail, M.; Holden, M.; Harris, D.; Zaritsky, A.; Parkhill, J. 2002. Complete Sequence and Organization of pBtoxis, the Toxin-Coding Plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (10): 5082-5095.
- Betz, F.; Hammond, B.; Fuchs, R. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 32:156-173.
- Bonilla, R. 2006. Distribución espacio temporal de la fiebre dengue en Costa Rica. *Población y Salud Mesoamericana*. 3: 1-8.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; López, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, O.; Lina, L.; Villalobos, F.; Peña, G.; Nuñez, M.; Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4965-4972.
- Bustillo, A.; Cárdenas, R.; Villalba, D.; Benavides, P.; Orozco, J.; Posada, F. 1998. Manejo integrado de la broca del café. CENICAFE, Caldas, Colombia. 134 p.
- Caballero, P.; Ferré, J. 2001. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. Ed. Phytoma. España. 318p.
- Castillo, A.; Infante, F.; de la Rosa, W.; Gómez, J.; Barrera, F. 2001. Investigación sobre la broca del café realizadas por ECOSUR. In Memorias I Seminario Latinoamericano sobre broca. ICAFE-PROMECAFE. Costa Rica. 51p.
- Cooksey, K. 1971. Microbial Control of insects and mites: the protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. New York, H. D. and N.W. Huseey. p. 247-273.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Dean, H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 62:807-813.
- Delecluse, A.; Bourguin, C.; Klier, A.; Rapoport, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics*. 214: 42-47.
- Dulmage, H.T. 1971. Production of delta-endotoxin by eighteen isolates of *Bacillus thuringiensis*, serotype 3 fermentation media. *Journal of Invertebrate Pathology*. 18: 353-358.

- Ely, S. 1993. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. In: *Bacillus thuringiensis*: theory and practice. Edited by Entwistle P, Cory J, Bailey M and Higgs S. John Wiley & Sons. England. 104-124p.
- Espinoza, A.M. 2003. Evaluación de la resistencia al hongo *Magnaphorte grisea*, en líneas transgénicas de arroz. Propuesta de investigación presentada al Fondo de Incentivos del CONICIT.
- Estruch, J.; Warren, G.; Mullins, M.; Nye, J.; Craig, J.; Kozuel, M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceeding of National Academy Sciences*. 93: 5389-5394.
- FAO, 2004. Sitio Web <http://faostat.fao.org/faostat/>. Visitado el 10 de Agosto del 2004.
- Ferré, J; Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. Vol. 47: 501-533
- Fox, J. 2003. Resistance of *Bt* toxins surprisingly absent from pest. *Nature Biotechnology*. 21: 958-959.
- Frankenhuyze, K. 1993. *Bacillus thuringiensis*: theory and practice. London, John Wiley & Sons. p 2-23.
- Galán, L.; Rodríguez, C.; Luna, H. 1996. Avances recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Monterrey, México, Universidad Autónoma de Nuevo León. p. 110-111.
- Gatica, A.; Arrieta G.; Espinoza, A. Regeneración de plantas de café *Coffea arabica* por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Memorias de las Jornadas de Académicas de la Universidad de Costa Rica, 18 al 24 de Agosto del 2003.
- Garduno, F.; Thorne, L; Walfield, A.; Pollock, T. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 277-279.
- Gibbons, R.; Vaughn, D. 2002. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*. 324: 1563-1566.
- Gill, S.; Cowles, E.; Pietrantonio, P. 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37: 615-634.
- Greb, P. 2005. Invasive Species: *Hypothenemus hampei* Ferrari, ID 1355051. USDA Agricultural Research Service. Visitado el 04 junio 2006. Disponible en www.invasive.org/browse/.
- Glaser, J.; Matten, S. 2003. Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic *Bt* corn. *Biotechnology Advances*. 22: 45-69.

- González, A. 1998. Diagnóstico de la competitividad de la industria del café en Costa Rica. INCAE. Disponible en: www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/cafe_mag.pdf.
- Gubler, D. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 480-496.
- Gubler, D. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*. 10: 100-103.
- Gubler, D. 2005. The emergence of Epidemic Dengue Fever and Hemorrhagic Fever in the Americas: A case of failed Public Health policy. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 17: 225-229.
- Guharay, F; Monterrey, J. 1997. Manejo ecológico de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*) en América Central. *Manejo Integrado de Plagas: Hoja Técnica*. 22: I-VII.
- Gustafson, M.; Clayton, R.; Lavrik, P.; Jonhson, G.; Leimgruber, R.; Sims, S.; Bartnicki, D. 1997. Large-scale production and characterization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* insecticidal protein from *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology Biotechnology*. 47: 255-261.
- Guzmán, M; Kourí, G. 1996. Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3: 621-627.
- Hannay C. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. *Nature*. 72: 1004.
- Hartl, D; Jones, E. 2005. Genetics: analysis of genes and genomes. 6 ed. Missisauga, Canada, Jones and Bartlett Publishers. 50-51p.
- Hernández, A. 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Tesis Ing. Biotec., Cartago, CR, Instituto Tecnológico. 69 p.
- Honée, G; Visser, B. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 69: 145-155.
- Ishawata, S. 1901. One kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho*. 114: 1-5.
- Knowles, BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal endotoxins. *Advances in Insect Physiology*. 24: 275-308.
- Kota, M.; Daniel, H.; Varma, S.; Garszynski, S.; Gould, F.; Moar, W. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts

- confers resistance to plants against susceptible and *Bt*-resistant insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 1840–1845.
- Le Pelley, R.H. 1968. Pests of coffee. London, Longman. 590p.
- Leroy, T.; Henry, A.; Royer, M.; Altosaar, I.; Frutos, R.; Duris, D.; Philippe, R. 2000. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Reports*. 19: 382-389.
- Lin, S.; Hsieh, S.; Yueh, Y.; Lin, T.; Chao, D.; Chen, W.; King, C.; Wang, W. 2004. Study of Sequence Variation of Dengue Type 3 Virus in Naturally Infected Mosquitoes and Human Hosts: Implications for Transmission and Evolution. 78: 12717–12721.
- López, M.; Basurto, R.; Ibarra, J. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hyphotenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology letters*. 226: 73-76.
- Maag, R; Bravo, A; Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17: 193-199.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 1999. Brock: Biología de los microorganismos. 8 ed. Madrid, España, Prentice Hall. 96-99p.
- Malavige, G.; Fernando, S.; Fernando, D; Seneviratne, S. 2004. Dengue viral infections. *Postgraduated Medicine*. 80: 588–601.
- Maliga, P. 2003. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology*. 21: 20-28.
- Maliga, P, 2004. Plastids transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 289–313
- Monath, T. 1994. Dengue: The risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 2395-2400.
- Muñoz, M. 2000. Sequences of hoja blanca viruses and attempts to develop viral resistant Costa Rican rice. Ph.D Thesis, Cornell University. 200p
- Park, H.; Bideshi, D.; Johnson, J.; Fredereci, B. 1999. Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 181: 319-327.
- Perlak, F.; Deaton, R.; Armstrong, T.; Fuchs, R.; Sims, S.; Greenplate, T.; Fischhoff, D. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*. 8: 939–943

- Prescott, L.; Harley, J.; Lein, D. 1999. Microbiology. Fourth Ed. McGraw Hill. International Edition. 962p.
- Prieto-Samsonov, D.; Vázquez, R.; Ayra, C.; Gonzáles, J.; De la Riva, G. 1997. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19: 1367-5435.
- Procomer. 2006. Costa Rica: Estadísticas de exportación 2006, Módulo 6 Exportaciones de Costa Rica según principales productos (en línea) San José, Costa Rica. Visitado 16 Abril 2006. Disponible en http://www.procomer.com/est/mercados/PDF/2005/Modulo_6_Principales%20productos.pdf
- Rajamohan, F.; Lee, M.; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research*. 60: 1-25.
- Sáenz, E.; González, L.; Víquez, M.; Lara, J.; Valverde, M. 1999. Circulación del virus dengue 3 en Costa Rica, 1994-1997. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 41: 24-31.
- Schallmeyer, M.; Singht, A.; Ward, O. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Microbiology*. 50:1-17.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.
- Shelton, A.; Zhao, J.; Roush, R. 2002. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology*. 47: 845-881.
- Shu, P.; Huang, J. 2004. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 11: 642-650.
- Sistema de Indicadores sobre el desarrollo sostenible (SIDES).2001. Importación total de agroquímicos en Costa Rica: 1991-2001. Cámara de Insumos Agropecuarios y Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería. Visitado el 01 de Enero del 2005. <http://www.mideplan.go.cr/Sides/ambiental/22-1.htm>.
- Sivasupramaniam, S.; Kabuye, V.; Malvar, T.; Gilmer, A.; Peters, A.; Coyle, D.; Mohan, K.S.; Deeba, F.; Ravi, K.C. 2000. Hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin provide enhanced spectrun of activity on Lepidopteran pest of cotton. In: Dugger P, Richter D, editors. Beltwide Cotton Conference Proceedings. 837-840p.
- Tabashnik, B.; Carrière, Y. 2004. *Bt* Transgenic Crops Do Not Have Favorable Effects on Resistant Insects. *Journal of Insect Science*. 4: 1-4.
- Terra, W.; Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 156: 531-540.

- Thorne, L.; Garduno, F.; Thompson, T.; Decker, D.; Zounes, M.; Wild, M.; Walfield, A.; Pollock T. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. 'kurstaki' and 'israelensis'. *Journal of Bacteriology*. 166: 801-811.
- Tyrell, D.; Bulla, L.; Andrews, R.; Kramer, K.; Davidson, L.; Nordin, P. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Bacteriology*. 145: 1052-1062.
- Ussery, D.; Tindbaek, N.; Hallin, P. 2004. Genome Update: promoter profiles. *Microbiology*. 150: 2791-2793.
- Vaek, M.; Reynaerts, A.; Höfte, H.; Jansens, S.; DeBeuckeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Van Montau, M.; Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*. 328: 33-37.
- Van Rie, J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Journal of Medical Microbiology*. 290:463-469.
- Whalon, M.; Windegerd, A. 2003. *Bt*: mode of action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54: 200-211.
- Wirth, M.; Jianino, J.; Federeci, B.; Walton, W. 2004. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41: 935-941.
- World Health Organization (WHO). 1999. Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria 217. 109p.

CAPÍTULO II

Estrategias novedosas de estudio y clonación del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

RESUMEN

El gen *cry10A* de *Bacillus thuringiensis* tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF1 y ORF2), se cree que fueron creados cuando una secuencia de ADN de 48bp (GAP) se integró en el medio de un marco único de lectura original. El interés en este gen, se debe a que se tiene la hipótesis de que la proteína que codifica podría ser biológicamente activa contra el coleóptero plaga del café *Hypothenemus hampei*, conocido como “broca del café”. El ORF1 del gen *cry10A*, que codifica por la delta-endotoxina, ya ha sido estudiado por distintos autores, lo que dio como resultado bajos niveles de expresión y toxicidad contra *Aedes aegypti*; mientras que no existen reportes acerca de la expresión del ORF2. En la presente investigación se diseñaron nuevas estrategias para el estudio del gen *cry10A* que permitirán entender el rol de cada ORF, de manera separada, o unida con y sin la secuencia de DNA del GAP. Para ello, se insertó la secuencia del ORF1, ORF2, ORF1-2 (sin GAP) y *cry10A* silvestre (ORF1-GAP-ORF2) en un vector de expresión de *Bt* con un promotor Cyt, un estabilizador del ARNm Shine Dalgarno, útiles para la transformación genética y expresión en cepas acristalíferas de *Bt*. Además, se diseñó un vector para interrumpir la expresión del gen *cry10A* con un gen de resistencia a Kanamicina (*nptII*) mediante recombinación homóloga. Este último vector tiene una región de 753 pb y 3012 pb del gen *cry10A* que flanquean el gen *nptII*; esta región fue además amplificada por PCR, como un producto alternativo para realizar la recombinación homóloga en cepas silvestres de *Bti*. Además, análisis filogenéticos de vecino más cercano demostraron que las proteínas codificantes de cada ORF de *cry10A* tienden a agrupar con las secuencias homólogas de las proteínas Cry4 y no con las Cry30. Por otra parte, se encontró que la secuencia correspondiente al GAP es relativamente conservada en otros genes *cry* que igualmente disponen de dos marcos abiertos de lectura tales como: *cry30A*, *cry39A* and *cry40A*.

Palabras clave: Cry10A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, *Hypothenemus hampei*, broca del café, recombinación homóloga.

Estrategias novedosas de estudio y clonación del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis cry10A gene has two open reading frames (ORF1 and ORF2) that were created when a 48bp DNA (GAP) got integrated in the middle of the original sequence. We were initially interested in this gene, since we believed the coding protein could be biologically active against the coleopteran pest *Hypothenemus hampei*, known as coffee berry borer (CBB). Several authors studied the ORF1 of the *cry10A* gene that codifies for the delta-endotoxin, resulting in poor expression levels and low toxicity against *Aedes aegypti*; while no report existed about the expression the ORF2 alone. We developed new strategies in order to study the *cry10A* gene and understand the role of each ORF, separately and together with and without the GAP sequence. *Bt* expression vectors with a strong Cyt promoter, a Shine Dalgarno mRNA stabilizator and the ORF1, ORF2, ORF1-2 and *cry10A* wild type (ORF1-GAP-ORF2) were developed, and are ready to be use for the transformation and expression in acrySTALLIFEROUS *Bt* strains. We also developed a vector for interrupting the first open reading frame of the *cry10A* gene with a Kanamycin resistance gene (*nptII*) by homologue recombination. The vector has 753pb and 3012bp of the *cry10A* gene flanking the *nptII* gene, this region was also amplified by PCR as an alternative specific product for the homologue recombination in *Bti* wild type strains. In addition we found out that the coding protein of each *cry10A* ORF were more likely grouped with the homologous sequences of Cry4 proteins in neighbor-join bootstrap trees, better than Cry30 as described recently. We also found out that the GAP sequence is relative conserved in other *cry* genes that have two open reading frames, such as *cry30A*, *cry39A* and *cry40A*.

Key words: Cry10A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, *Hypothenemus hampei*, coffee berry borer (CBB) homologue recombination.

2.1 Introducción

La cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bti*) fue descubierta en 1977 por Margalit (Goldberg y Margalit, 1977). Esta cepa es muy conocida por su actividad biológica contra mosquitos y se caracteriza por tener los genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11* y *cyt* (Berry *et al.*, 2002). *Bti* es altamente tóxica contra *Aedes* y *Culex* y en menor grado contra *Anopheles* (Tyrell, 1979). Además, es muy efectiva contra larvas del coleóptero *Hypothenemus hampei*, plaga importante del café (López *et. al.*, 2003). Se cree

que la proteína Cry10A podría estar relacionada con la toxicidad contra *H. hampei*, debido a que en ensayos preliminares el resto de las proteínas de la cepa *Bti* resultaron en una baja o nula toxicidad contra este insecto (Datos no publicados).

El gen *cry10A* fue aislado por primera vez por Thorne *et al.* (1986) de *Bti* y se denominó inicialmente *cryIVC*. Este gen presenta la peculiaridad de tener una secuencia de 48 pb con dos codones de terminación (GAP), que se localizan uno a los 2038 y otro a las 2082 bases corriente abajo del codón de iniciación ATG (Fig II-1a) (Delecluse *et al.*, 1988). Se cree que este fragmento de 48 bases segmentó la secuencia original de mayor tamaño en dos marcos abiertos de lectura, que actualmente se conocen como ORF1 y ORF2 (Berry *et al.*, 2002) (Fig II-1b). Es por esta razón, que el producto de la traducción no es una protoxina de 130kDa (Fig II-1c), sino la proteína correspondiente al ORF1 que dispone de la δ -endoxina y se sintetizaría como una proteína Cry truncada de 78Kda (Delecluse *et al.*, 1988; Garduno *et al.*, 1988)(Fig II-1d). Además, se desconoce si el ORF2 se traduce, el mismo correspondería al extremo carboxi-terminal y se deduce que su peso molecular teórico sería de 56kDa (Fig II-1d).

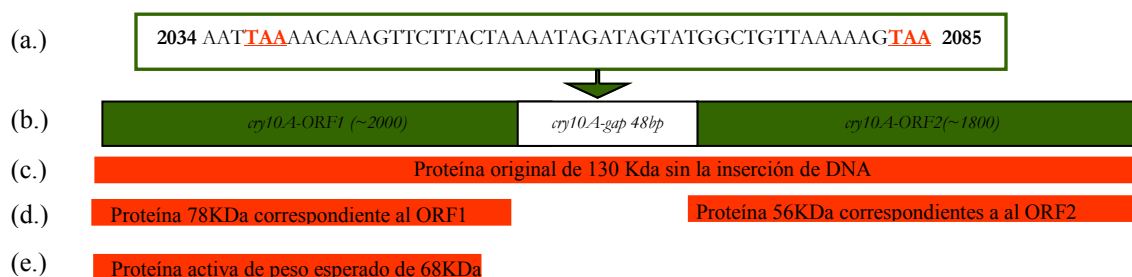


Figura II-1. Características del gen *cry10A* y sus transcritos, en a) la secuencia de DNA de 48bp con dos codones de terminación ubicados 2038 y 2082pb posterior al ATG y que separa la secuencia del gen *cry10A* en dos marcos abiertos de lectura (ORF). En b) el esquema de los marcos abiertos de lectura del gen *cry10A*, separados por una secuencia de 48pb. En c) un esquema de la proteína original de 130Kda que se cree, existía antes de la fragmentación en dos ORF del gen *cry10A*. En d) un esquema del peso molecular de las proteínas predichas para el ORF1 y el ORF2. En e) una representación de la proteína proteolíticamente activa o δ -endotoxina Cry10A.

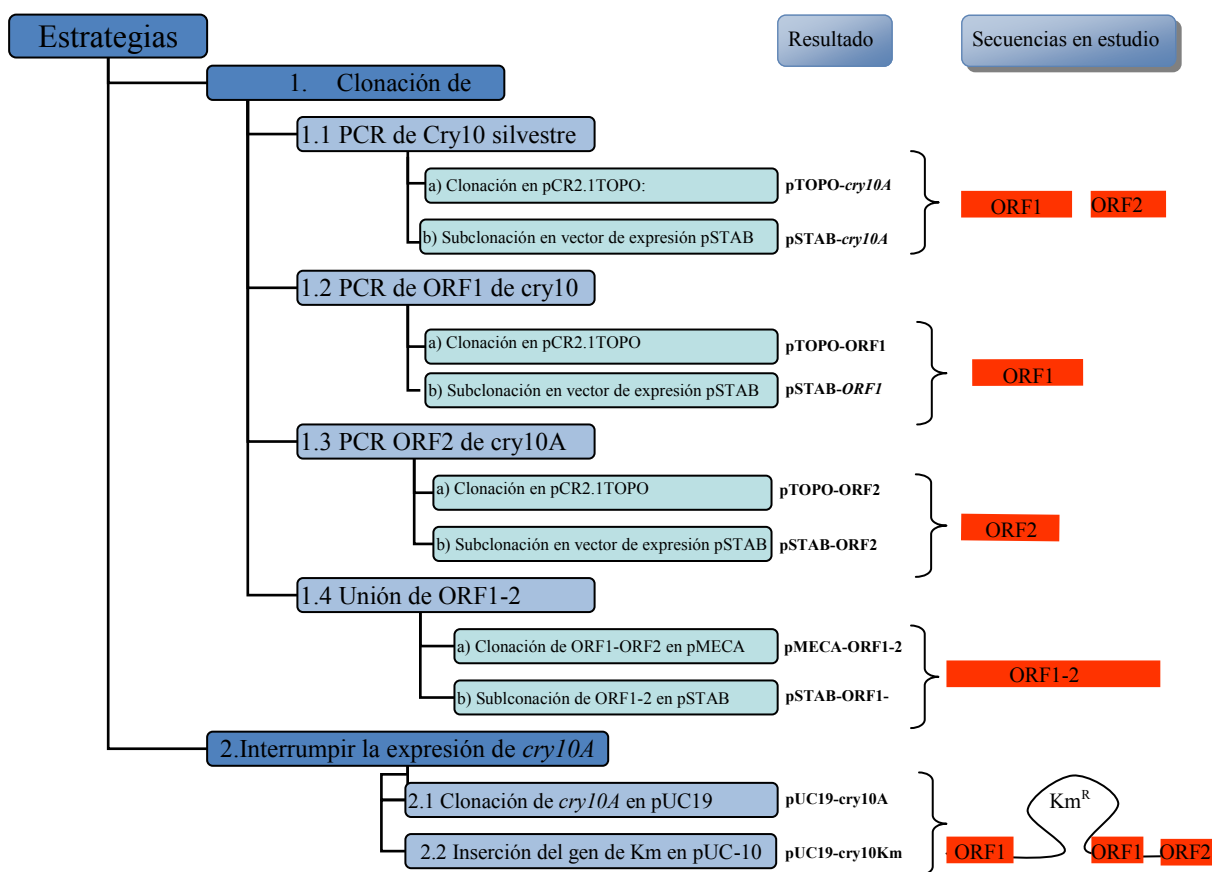


Figura II-2 Estrategias de clonación expresión del gen *cry10A* de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. Se plantean dos estrategias. (1) Clonación del gen *cry10A* silvestre, los marcos abiertos de lectura ORF1 y ORF2 separados en el vector TOPO (1.1a al 1.3a) como un paso previo a la subclonación en el vector de expresión pSTAB (1.1b al 1.3b). La unión del ORF1 y ORF2 sin el GAP en pMECA (1.4). La segunda estrategia (2) se basa en el diseño de un vector útil para interrumpir el ORF1 del gen *cry10A* mediante recombinación homóloga con el gen *npII* (resistencia a Kanamicina), para lo cual se clonó *cry10A* silvestre en el vector pUC19 (2.1). Posteriormente, se insertó el gen de resistencia a Kanamicina en el sitio *ScaI* de *cry10A* (715pb) (2.2). Nótese en rojo una representación de las secuencias en estudio.

La clonación y expresión del gen *cry10A* realizada por distintos autores se basó en el aislamiento del DNA del ORF1 (2000 bp) y parte del ORF2 (≈ 500 bp), con su promotor nativo (Thorne *et al.*, 1986; Delecluse *et al.*, 1988; Garduno *et al.*, 1988). La razón por la cual estos autores no consideraron incluir el ORF2, se debió a que en otras proteínas Cry, este tipo de secuencia se elimina durante el proceso de activación de la protoxina a toxina mediante proteólisis (Hofte y Whiteley, 1989). Cabe mencionar que los genes *cry* se sintetizan como protoxinas de un peso aproximado de 130 kDa, las

cuales se activan mediante la digestión de alrededor de 30 aa en el extremo amino terminal y 600 aa en el extremo carboxi-terminal, lo que genera una δ -endotoxina de un peso molecular de alrededor de 55-65 kDa (Whiteley y Shnepf, 1986; Shnepf *et al.*, 1998). En el caso de *cry10A*, la secuencia del ORF2 correspondería al extremo carboxi-terminal que se eliminaría durante la activación de la δ -endotoxina Cry10A (Delecluse *et al.*, 1988).

Ahora bien, estos autores obtuvieron niveles de expresión bajos y ausencia de cristalización de la proteína Cry10A (Thorne *et al.*, 1986; Delecluse *et al.*, 1988; Garduno *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 2005). Además, solamente se ha descrito una proteína de 58Kda que según Thorne *et al.* (1986) y Garduno *et al.* (1988) corresponde a la forma proteolíticamente activa Cry10A. Todo esto plantea la necesidad de diseñar estrategias de clonación y expresión del gen *cry10A* que permitan dilucidar algunas interrogantes con respecto al papel del ORF2 a nivel de estabilidad del RNAm, cristalización y/o toxicidad de la proteína que codifica.

El presente trabajo tuvo como fin adoptar distintas estrategias de clonación del gen *cry10A*. Dentro de las estrategias se encuentra la selección del vector de expresión para *Bacillus thuringiensis* pSTAB, que cuenta con un promotor Cyt1A y la región estabilizadora Shine Dalgarno del gen *cry3a*, lo que permite una eficiente expresión (Park *et al.*, 1999). Además, se realizó el clonaje de la secuencia original con ambos marcos abiertos de lectura; cada ORF de forma separada; así como una secuencia única producto de la eliminación del GAP (Fig II-2.1). Como estrategia complementaria, se planteó el diseño de un vector que permita interrumpir el gen *cry10A* por recombinación homóloga de manera similar a lo descrito por Delecluse *et al.* (1991), mediante la inserción de un gen de resistencia a antibiótico con su propio promotor, en este caso, el gen *nptII* (del inglés neomycin phosphotransferase) de resistencia a Kanamicina (Fig II-2.2). Esto sería un vector que disponga del gen de resistencia al antibiótico flanqueado por secuencias del *cry10A* e incapaz de replicarse en cepas silvestres de *Bt israelensis*.

Esta etapa de diseño de vectores es fundamental para la transformación y expresión de los distintos marcos de lectura del gen *cry10A* en cepas acristalíferas de *B.*

thuringiensis. Además, permitió contar con un vector para interrumpir la expresión del gen *cry10A* en cepas nativas de *Bti*.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cepas y vectores utilizados

Se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* del *Bacillus* Stock Center de la Universidad Estatal de Ohio, Columbus, OH, USA. Además, se utilizó el vector pSTAB de Park *et al.* (1999) suministrado por este autor al Dr. Ibarra, el plásmido pBEST501 facilitado por la Dra. Olmedo del CINVESTAV y los vectores pCR2.1 TOPO de Invitrogen y pUC19 de Promega.

2.2.2 Amplificación por PCR del gen *cry10A*, ORF1 y ORF2

La secuencia completa del gen *cry10A* se obtuvo mediante un análisis *in silico* de las secuencias del Genbank correspondientes al ORF1 (AN: AL731825), ORF2 (AN: AL731825) y a la secuencia continua descrita por Berry *et. al* (2002), con el paquete de cómputo Bioedit descrito por Hall (1999).

Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar el gen *cry10A* silvestre con los dos ORFs, con el programa Primer 3 del Instituto Tecnológico de Massachusetts, y se añadieron los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sall* y *SphI*. Estos sitios permiten la inserción del amplicón en el vector pSTAB (Anexo 2). Los iniciadores diseñados fueron: el iniciador 10d: directo 5'aatGTCGACttgcaacagaaaag agttgtgtc3' y iniciador 10r: reverso 5'cgaGCATGCacatttccccacaattttca3'. Las letras en mayúscula indican los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sall* y *SphI* respectivamente.

La extracción de DNA de la cepa *Bti* se realizó según el protocolo descrito por Jensen *et al.* (1995). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo con 500ng de DNA, 12.5µl de agua estéril, 2.5µl de solución tampón 10x, 2.5 µl de 225mM MgCl₂, 0.5µl de dNTP, 20µM de cada iniciador y 2.5 U de Taq polimerasa. Se utilizó el termociclador PTC-100 de la casa comercial MJ Research INC con las siguientes

condiciones: un paso inicial de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de un minutos a 95°C, 1.5 minutos a 50°C y 3 minutos a 70°C; así como un paso final de 10 minutos a 70°C.

Además, se diseñaron iniciadores para amplificar el ORF1 y el ORF2 individualmente y sin secuencias del GAP. En el caso del iniciador reverso para ORF1, se une 34 bases antes del GAP, debido a que esta secuencia de 34 bases, rica en adenina y timina, imposibilitó su localización en una región más cercana al GAP. A su vez, esto implicó delecciones introducidas en la secuencia de aminoácidos, que no fueron consideradas debido a que teóricamente forman parte del extremo carboxi-terminal que se proteoliza durante la activación de la protoxina Cry10A. A los iniciadores se les añadió el sitio de restricción *NsiI* con el fin de unir los productos de PCR del ORF1 y ORF2 en una secuencia única. Los iniciadores diseñados son el ORF1r: reverso 5' tctaa taATGCATgagtgattggaataaattcga 3' y el ORF2d: 5' aaaaATGCATcgagaaaggctcgtgaa cccta 3'. Las letras en mayúscula indican los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *NsiI*. El iniciador 10d y ORF1r se utilizaron para amplificar el ORF1, mientras que los iniciadores ORF2d y 10r para amplificar el ORF2. Además, se utilizaron las mismas condiciones y programa de PCR descrito con anterioridad.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 1x (10,8 g TRIZMA-Base, 5.5 g de ácido bórico y 4 ml de 0.5M EDTA pH 8.0 por litro).

2.2.3 Clonación en pCR2.1TOPO

Los productos de PCR correspondientes al gen *cry10A* silvestre, al ORF1 y al ORF2, se ligaron al vector pCR2.1TOPO de la casa comercial Invitrogen como un paso previo para la manipulación de las secuencias y clonación en el vector de expresión pSTAB. La clonación de productos de PCR en vectores pTOPO es muy eficaz y se puede realizar en corto tiempo, debido a que funciona mediante colas de timidina presentes en el vector y que se ligan en segundos mediante la enzima topoisomerasa, a las colas de adenina que son añadidas por la Taq polimerasa a los productos de PCR. Las ligaciones de los productos de PCR en el vector pCR2.1TOPO se usaron para transformar la cepa de *E.coli* TOP-10, según las indicaciones del proveedor. La transformación se

llevó a cabo por temochoque, para lo cual se incubó por treinta minutos en hielo, 30 seg a 42°C y dos minutos en hielo. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio LB y se incubó por una hora a 37°C. Las células obtenidas se plaquearon en medio LB con 100µg/ml de Ampicilina, 20µg/ml XGal y 100µg/ml de IPTG.

El DNA de las colonias derivadas de la clonación se obtuvo por lisis alcalina según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). La presencia y orientación de los amplicones en el vector pCR2.1TOPO, se determinó mediante la digestión del DNA de las posibles colonias transformantes, con las enzimas de restricción *EcoRV*, *EcoRI*, *Sall* y *NsiI* de la casa comercial INVITROGEN, según las indicaciones del proveedor. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa, con las condiciones anteriormente descritas. Los patrones de restricción se compararon con los resultados *in silico* derivados del paquete de cómputo Bioedit (Hall, 1999). Al vector que contenía el amplicón correspondiente al gen *cry10A* se le denominó pCR2.1TOPO-*cry10A*, al vector con el amplicón del ORF1 se le denominó pCR2.1TOPO-ORF1, mientras que al correspondiente al ORF2 se le nombró pCR2.1TOPO-ORF2.

2.2.4 Unión del ORF1 y el ORF2 en el vector de clonación pMECA para eliminar el GAP

La ligación del ORF1 y ORF2 se llevó a cabo en el vector pMECA, debido a que cuenta con los sitios de restricción *Sall* y *SphI*, útiles para clonar estas secuencias. Para ello, un total de 10µg de DNA del vector pMECA se digirió con 10 unidades de las enzimas *Sall* y *SphI* de la casa comercial Fermentas, según las indicaciones del proveedor. De manera similar, 10µg de DNA correspondiente a pCR2.1TOPO-ORF1 se digirió con las enzimas *NsiI* y *Sall*; mientras que el DNA de pCR2.1TOPO-ORF2 con las enzimas *NsiI* y *SphI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa. Las bandas de DNA del peso molecular correspondiente al vector pMECA, al ORF1 y al ORF2 se purificaron con el QIA quick Gel Extraction Kit de QIAGEN según las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se realizó la triple ligación con la relación 1:1:1, 4 µl de buffer 5X, agua para llevar a volumen final de 20µl y una unidad de enzima ligasa GIBCO. Posteriormente, se incubó a 16°C por toda la noche. Para la transformación se utilizaron células TOP-10 termocompetentes, a las cuales se les añadió

3 µl del producto de la ligación y se realizó la transformación por choque térmico según las condiciones que se mencionaron con anterioridad.

El DNA de las colonias se obtuvo por lisis alcalina según Sambrook *et al.* (1989). La presencia y orientación del ORF1 y el ORF2 en pMECA se determinó mediante la digestión del DNA, con las enzimas de restricción *NsiI*, *Sall* y *SphI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa, con las condiciones anteriormente descritas. Los patrones de restricción se compararon con los resultados *in silico* derivados del paquete de cómputo Bioedit (Hall, 1999). Al vector que contenía los amplicones ORF1 y ORF2 en una secuencia única, y unidos por el sitio de restricción *NsiI*, se le denominó pMECA-ORF1-2. Este vector tiene el ORF1 y el ORF2 sin el GAP y se utilizó posteriormente para la subclonación en pSTAB.

2.2.5 Clonación del gen *cry10A* silvestre, ORF1, ORF2 y ORF1-2 en el vector de expresión para *Bt pSTAB*

El gen *cry10A* silvestre, el ORF1, el ORF2 y el ORF1-2 se clonaron en el vector de expresión pSTAB para la posterior transformación de cepas acristalíferas de *Bt*. A continuación se describe la clonación del *cry10A* silvestre, el ORF1 y el ORF1-2; mientras que el ORF2 se describe más adelante debido a que se utilizaron procedimientos distintos. Para la clonación, un total de 10µg del vector de expresión pSTAB, así como las construcciones pCR2.1TOPO-*cry10A*, pCR2.1TOPO-ORF1, pMECA-ORF1-2 (ORF1 y ORF2 sin GAP) se digirieron con 10 unidades de la enzima *Sall*. Posteriormente, se precipitó el producto de la digestión con tres volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 µl de agua estéril. Seguidamente, se añadió 10 unidades de la enzima *SphI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa. Las bandas de DNA del peso molecular correspondiente al vector pSTAB, al gen *cry10A* silvestre, al ORF1 y al ORF1-2 se purificaron QIA quick Gel Extraction Kit de QIAGEN.

La concentración del DNA de los insertos y del vector se analizó por electroforesis en geles de agarosa con el fin de estimar la concentración de DNA. La ligación se hizo con la relación vector-inserto 1:3, 4 µl de buffer 5X, agua para llevar a

volumen final de 20µl y una unidad de ligasa. Posteriormente, se incubó a 16°C toda la noche. La transformación se realizó según las condiciones que se mencionaron con anterioridad.

La presencia y orientación del gen *cry10A*, del ORF1 y del ORF1-2 en el vector pSTAB, se determinó mediante la digestión del DNA de las posibles colonias transformantes, con las enzimas de restricción *EcoRI*, y *EcoRI-SalI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa, mientras que los patrones de restricción se compararon con los resultados *in silico* derivados del paquete de cómputo Bioedit (Hall, 1999). La construcción del vector pSTAB con el gen *cry10A* se le denominó: pSTAB-*cry10A*, la construcción con el inserto ORF1 se le denominó pSTAB-ORF1, mientras que la construcción con el ORF1-2 se le denominó pSTAB-ORF1-2. Además, se diseñaron iniciadores específicos que se ubican al final del ORF1 y principio del ORF2, para comprobar la eliminación del GAP mediante secuenciación. Los iniciadores diseñados son el directo ORF12d: 5'-tagtaccacttcccgccaaa3' y el reverso ORF12r: 5'-tcacttgtagtccatcatgaa 3'. El PCR se realizó según las condiciones anteriormente mencionadas. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: un paso inicial de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de un minutos a 95°C, 1.5minutos a 50°C y 1 minutos a 70°C; así como un paso final de 10minutos a 70°C. La secuencia de nucleótidos se determinó en un secuenciador automático de DNA ABI PRISM 377 de la casa comercial Applied Biosystems.

El ORF2 en el vector pSTAB se obtuvo mediante la digestión de la construcción pSTAB-ORF1-ORF2 con las enzimas *SalI* y *NsiI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa y el fragmento correspondiente al vector pSTAB con el ORF2 se purificó con QIA quick Gel Extraction Kit. Los extremos *SalI* y *NsiI* se hicieron romos con la enzima Klenow de la casa comercial Fermentas a 37°C por una hora según las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se inactivó la enzima mediante incubación a 70°C por 15 minutos y se utilizó el DNA para realizar una ligación. La ligación se hizo con un total de 200 ng de DNA, 2µl de tampón 10X de ligasa, 5 unidades de enzima ligasa y agua para llevar a un volumen final de 20µl, con una incubación de 24h a 16°C. La transformación se realizó mediante termochoque según las condiciones

descritas con anterioridad. El DNA de las clonas seleccionadas se extrajo por lisis alcalina y se analizó mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

2.2.6 Construcción del vector para interrumpir el gen *cry10A* mediante la inserción del gen de resistencia a Kanamicina por recombinación homóloga

Se utilizó pUC19 como vector base para la construcción debido a que contrario al pCR2.1TOPO, este plásmido carece de resistencia al antibiótico Kanamicina. Inicialmente se insertó el gen *cry10A* silvestre en pUC19. Para ello, un total de 10µg del vector pUC19 y de la construcción pCR2.1TOPO-*cry10A* se digirieron con 10 unidades de la enzima *Sall* y 10 unidades de la enzima *SphI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa y se purificaron las bandas de DNA del peso molecular correspondiente al vector pUC19 y al gen *cry10A* silvestre. Se realizó la ligación y transformación de las células termocompetentes. Las cepas transformantes se analizaron mediante lisis alcalina y restricción con las enzimas *Sall* y *SphI*. La construcción obtenida se denominó pUC-*cry10A*.

El gen de resistencia a kanamicina se insertó en el sitio *ScaI*, en la posición 715 del gen *cry10A* corriente arriba del ATG. Esta inserción fue posible mediante digestiones limitadas, debido a que tanto el vector pUC19, como gen *cry10A* disponen de otros sitios de corte *ScaI*. Para realizar la digestión parcial, se utilizó un total de 15µg de DNA de la construcción pUC-*cry10A*, con 1 unidad de la enzima incubada por 30 minutos a 35°C, posteriormente, se inactivó la enzima a 70°C por 15 minutos y se purificó el producto de la digestión.

La secuencia correspondiente al gen de resistencia a Kanamicina o *npt* (del inglés neomycin phosphotransferase) con su promotor (cassette de resistencia) se obtuvo mediante la digestión de 10µg de DNA del vector pBEST501 con 10 unidades de la enzima *SmaI* de la casa comercial GIBCO a 28°C por 4h. El producto de la digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de 1300bp, correspondiente al cassette de resistencia, se purificó con el kit QIAGEN. Para la ligación se utilizó una relación de vector: inserto de 1:10, la ligación y transformación por termochoque se realizaron según las condiciones descritas con anterioridad. Las

células obtenidas se plaquearon en medio LB con 100µg/ml de Ampicilina y 100 µg/ml de Kanamicina.

El DNA de las colonias obtenidas se analizó por lisis alcalina y posterior digestión con la enzima *XbaI* de GIBCO, según las condiciones del proveedor. La construcción obtenida se le denominó pUC-*cry10A*-Km

Además, se realizó un PCR para corroborar la inserción del cassette de Kanamicina en el sitio esperado, para lo cual se utilizaron los iniciadores 10d y 10r que inicialmente se utilizaron para amplificar el gen *cry10A* silvestre. Se siguieron las condiciones de amplificación descritas previamente para estos iniciadores. Se planea disponer de un producto de PCR de 5215pb (ORF1-Km-ORF1-ORF2) útil para bloquear la expresión del ORF1 con el gen de resistencia a Kanamicina mediante recombinación homóloga en cepas silvestres *Bti*. Este producto sería de mayor utilidad en comparación con el vector pUC19-*cry10A*-Km, ya que no dispondría de secuencias propias del vector pUC19 que podrían favorecer recombinaciones no homólogas.

2.3 Resultados

2.3.1 Clonación del amplicón *cry10A* en el vector *pCR2.1TOPO*

La secuencia correspondiente al gen *cry10A* silvestre se amplificó mediante PCR de forma exitosa al utilizar los iniciadores directo 10d: 5'aatGTCGACttgcaacagaaa agagttgtgtc 3' y el reverso 10r: 5'cgaGCATGCacatttcccc acaattttca 3', diseñados en el presente trabajo (Figura II-3a). De igual manera se logró la clonación del producto de 3815pb correspondiente al gen *cry10A* en el vector *pCR2.1TOPO*. La presencia del gen *cry10A* en el vector se confirmó mediante la digestión con *EcoRV*, lo que generó un fragmento de 2632pb proveniente en su mayoría del gen *cry10A* y un fragmento de 5114pb resultado del vector de 3931pb y 1183pb del gen *cry10A* (Figura II-3b, 3c). El esquema de la construcción *pCR2.1 TOPO-cry10A* que se obtuvo se muestra en la Figura II-3c.

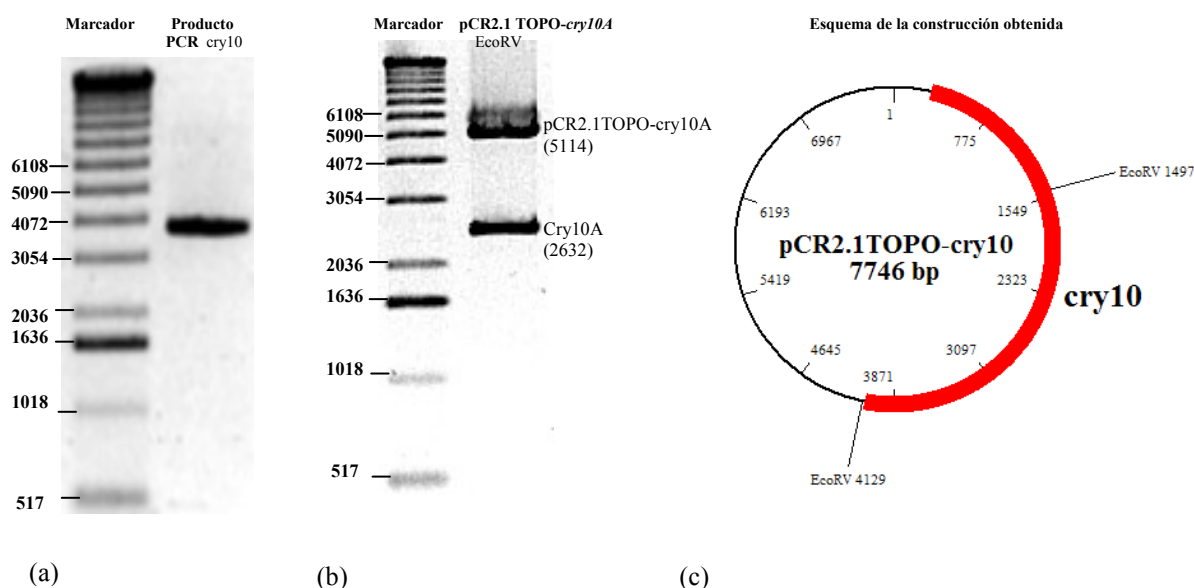


Figura II-3 Amplificación por PCR y clonación del gen *cry10A* en el vector *pCR2.1 TOPO*: a) producto de PCR de 3815bp correspondiente al gen *cry10A*, b) Digestiones de DNA de cepas de *E.coli* con la construcción *pCR2.1TOPO-cry10A* con *EcoRV* y c) esquema de la construcción *pCR2.1TOPO-cry10A*.

2.3.2 Clonación del gen *cry10A* en el vector de expresión para *Bt* pSTAB

El esquema de la construcción que se obtuvo (pSTAB-*cry10A*) se muestra en la Figura II-4a. El producto de 3815 pares de bases correspondientes al gen *cry10A* y obtenido por digestión de pCR2.1TOPO-*cry10A* con las enzimas *Sall* y *SphI*, se clonó con éxito en los sitios *Sall-SphI* del vector pSTAB. El gen *cry10A* está en la posición esperada según se confirmó mediante las digestiones con *EcoRI-Sall*, lo que generó tres fragmentos de 650, 3800 y 6500pb correspondientes al promotor Cyt, el gen *cry10A* y el vector (Figura II-4a, 4b). Además, se realizó una digestión con *EcoRI* lo que generó dos fragmentos de 4350 que corresponden al gen *cry10A* y el promotor Cyt, y 6500bp del vector (Figura II-4a, 4b).

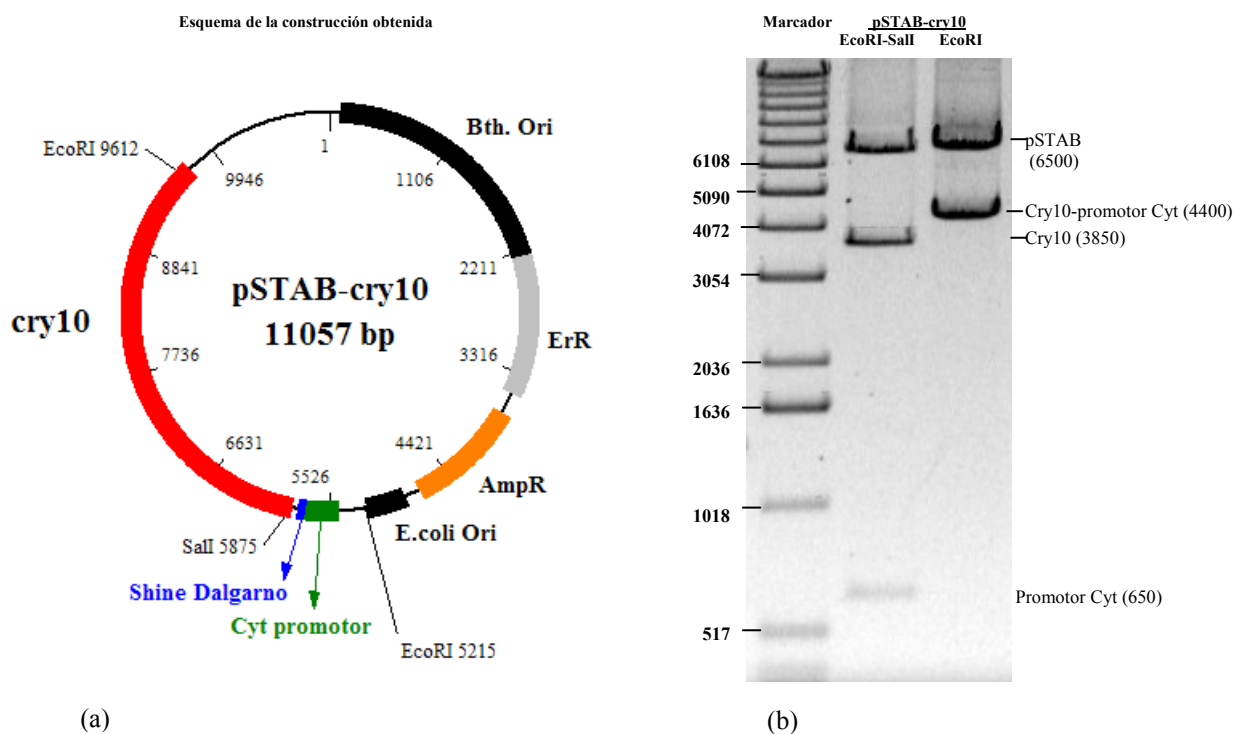


Figura II- 4. Clonación del gen *cry10A* en el vector de expresión pSTAB en a) Esquema de la construcción pSTAB-*cry10A*; y en b) Gel de agarosa correspondiente a las digestiones de la construcción pSTAB-*cry10A* con las enzimas *EcoRI-Sall* y con *EcoRI*.

2.3.3 Clonación del amplicón ORF1 del gen *cry10A* en el vector *pCR2.1TOPO*

La secuencia correspondiente al primer marco abierto de lectura del gen *cry10A* silvestre (ORF1) se amplificó mediante PCR al utilizar el iniciador directo 10d: 5'aatGTCGACttgcaacagaaaagagttgtgtc y el reverso ORF1r: 5' tctaataATGCATgagtga ttggaataaattcga 3'(Figura II-5a). El producto de 2053pb correspondiente al ORF1 se logró clonar en el vector pCR2.1TOPO. La presencia del amplicón en el vector se analizó mediante las digestiones con *Sall* y *NsiI*, obteniéndose un fragmento de 2053pb correspondientes al ORF1 y un fragmento de 3900 del vector (Figura II-5b, 5c). El esquema de la construcción pCR2.1 TOPO-ORF1 que se obtuvo se muestra en la Figura II-5c.

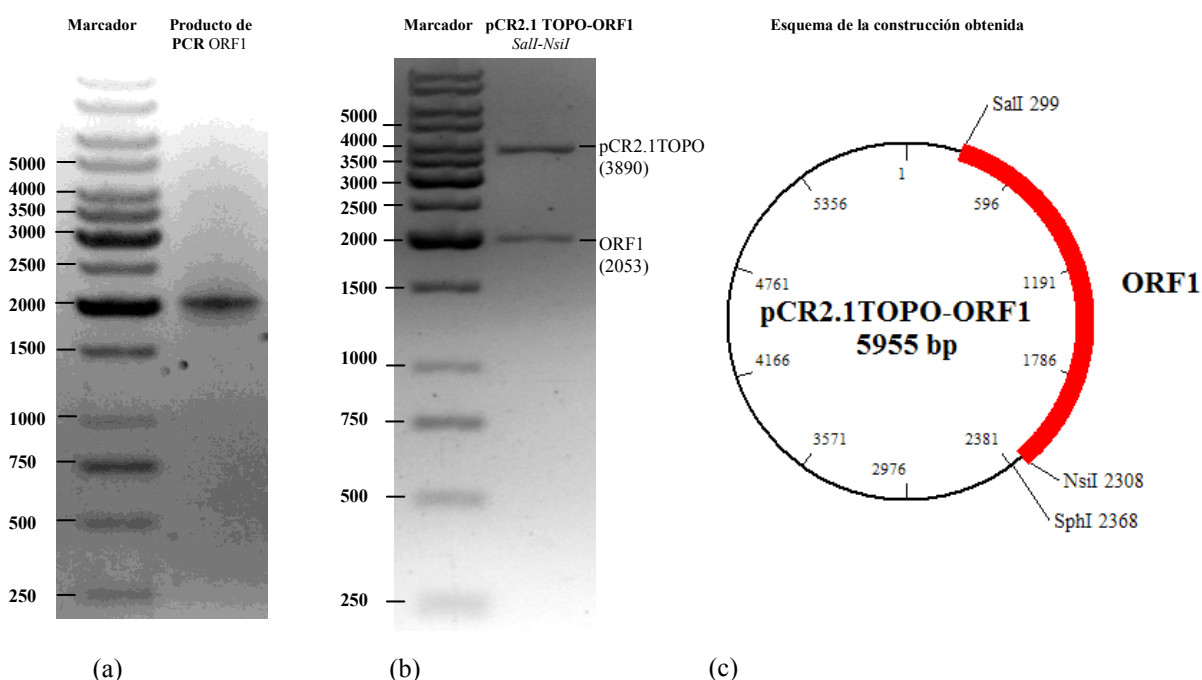


Figura II-5. Amplificación por PCR y clonación del ORF1 del gen *cry10A* en el vector pCR2.1 TOPO. En a) producto de PCR de 2054bp correspondiente al ORF1, b) Digestiones del plásmido pCR2.1TOPO-*cry10A* con *Sall* y *NsiI*, c) esquema de la construcción pCR2.1TOPO-ORF1.

2.3.4 Clonación del amplicón ORF1 del gen *cry10A* en el vector de expresión para *Bt* *pSTAB*

El esquema de la construcción que se obtuvo (pSTAB-ORF1) se muestra en la Figura II-6b. El producto de PCR de 2053 pares de bases correspondientes al ORF1 del gen *cry10A* y obtenido por digestión de pCR2.1TOPO-ORF1 con las enzimas *Sall* y *SphI*, se clonó en los sitios *Sall*-*SphI* del vector de expresión pSTAB. El ORF1 está en la posición esperada según se confirmó mediante la digestión con la enzima *EcoRI*, lo cual generó una banda de aproximadamente 6500bp correspondiente al vector y otra de aproximadamente 2600bp correspondientes al inserto y parte del vector (Figura II-6a, 6b).

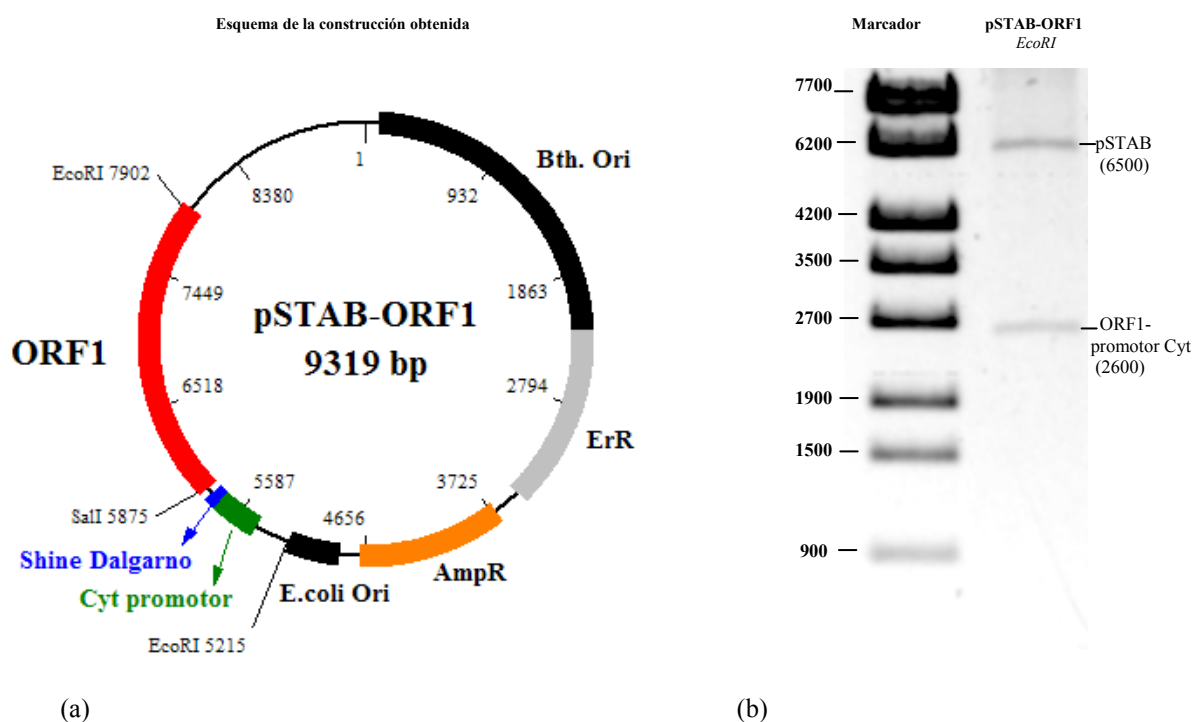


Figura II-6 Clonación del ORF1 del gen *cry10A* en el vector de expresión pSTAB en a) Esquema de la construcción pSTAB-ORF1 y en b) Gel de agarosa correspondiente a las digestiones de la construcción pSTAB-*cry10A* con la enzima *EcoRI*.

2.3.5 Clonación del amplicón ORF2 del gen *cry10A* en el vector *pCR2.1TOPO*

La secuencia correspondiente al segundo marco abierto de lectura (ORF2) del gen *cry10A* silvestre se amplificó mediante PCR (Figura II-7a) al utilizar los iniciadores directo ORF2d: 5' aaaaATGCATcgagaaaggtcgtgaacccta 3' y el reverso 10r: 5'cgaGCATGCac atttccccacaattttca 3'. El amplicón de 1693pb correspondiente al ORF2 se clonó en el vector *pCR2.1TOPO*. La presencia del ORF2 en el vector se confirmó mediante la digestión con *SphI*, lo que generó tres fragmentos de 5625, 3890 y 1735pb correspondientes a la construcción digerida en un único sitio, el vector y el inserto respectivamente (Figura II-7b, 7c). El esquema de la construcción *pCR2.1 TOPO-ORF2* que se obtuvo se muestra en la Figura II-7c.

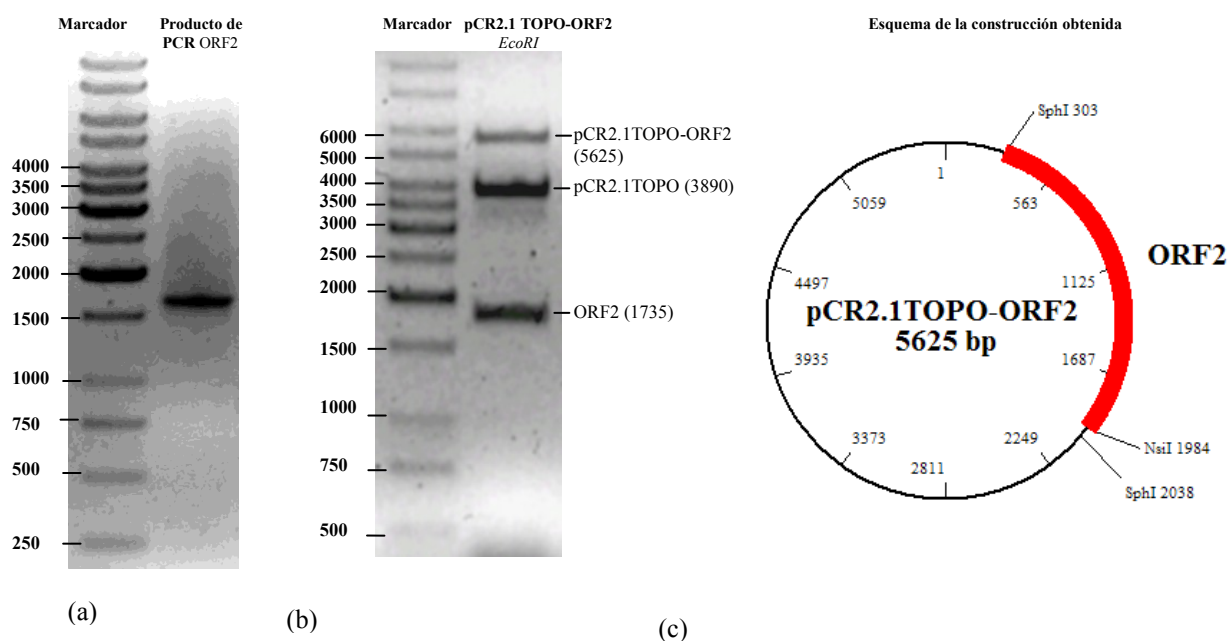


Figura II 7 Amplificación por PCR y clonación del ORF2 del gen *cry10A* en el vector *pCR2.1 TOPO*. En a) producto de PCR de 1693bp correspondiente al ORF2, b) Digestiones del plásmido *pCR2.1TOPO-ORF2* con *EcoRI* y c) Esquema de la construcción *pCR2.1TOPO-ORF2*

2.3.6 Clonación del ORF1 y el ORF2 en el vector de clonación pMECA

Los productos de 2053 del ORF1 y 1693 del ORF2 obtenidas por digestión con *NsiI-SalI* y *NsiI-SphI* de los plásmido pCR2.1TOPO-ORF1 y pCR2.1TOPO-ORF2, se clonaron en los sitios *SalI-SphI* del vector pMECA. La presencia de este único marco abierto de lectura se confirmó mediante la digestión con *NsiI* y *EcoRI*, lo que generó las siguientes bandas: 1693pb del ORF2, 2053pb del ORF1, 2850pb del vector pMECA, 3746pb del ORF1-ORF2 y una banda de 4540pb del vector pMECA-ORF1 (Figura II-8b,8c). El esquema de la construcción pMECA-ORF1-2 que se obtuvo se muestra en la Figura II-8c.

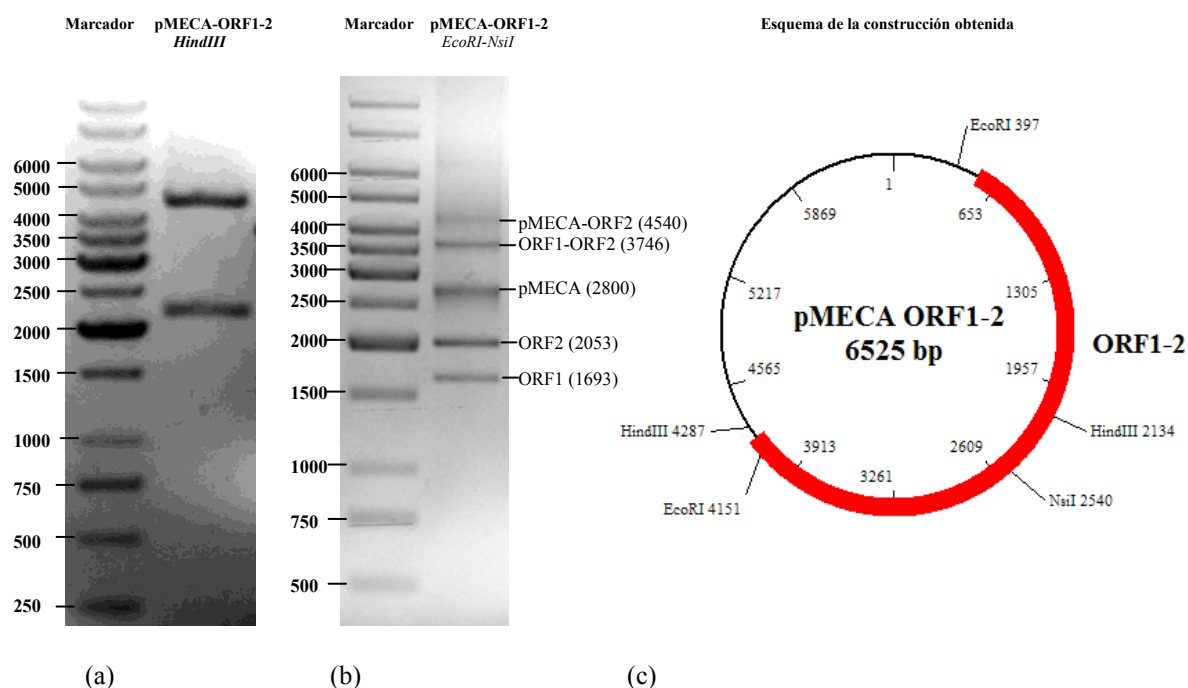


Figura II-8 Clonación de los dos marcos abiertos de lectura en una secuencia única en el vector de clonación pMECA a) digestiones de pMECA-ORF1-2 digerido con *HindIII* y b) *EcoRI-NsiI*, c) esquema de la construcción pMECA-ORF1-2.

2.3.7 Clonación del ORF1-ORF2 en el vector de expresión pSTAB

El esquema de la construcción que se obtuvo (pSTAB-ORF1-2) se muestra en la Figura II-9a. El producto de 3690 pares de bases correspondientes al ORF1-2 y obtenido por digestión del plásmido pMECA-ORF1-ORF2 con *Sall* y *SphI*, se clonó en los sitios *Sall-SphI* del vector de expresión pSTAB. El ORF1-2 está en la orientación esperada según se confirmó mediante la digestión con la enzima *EcoRI* lo que generó tres fragmentos de 4200, 6500 y 10940 correspondientes al ORF1-2 con el promotor Cyt; el vector y el plásmido digerido en un único sitio (Figura II-9b).

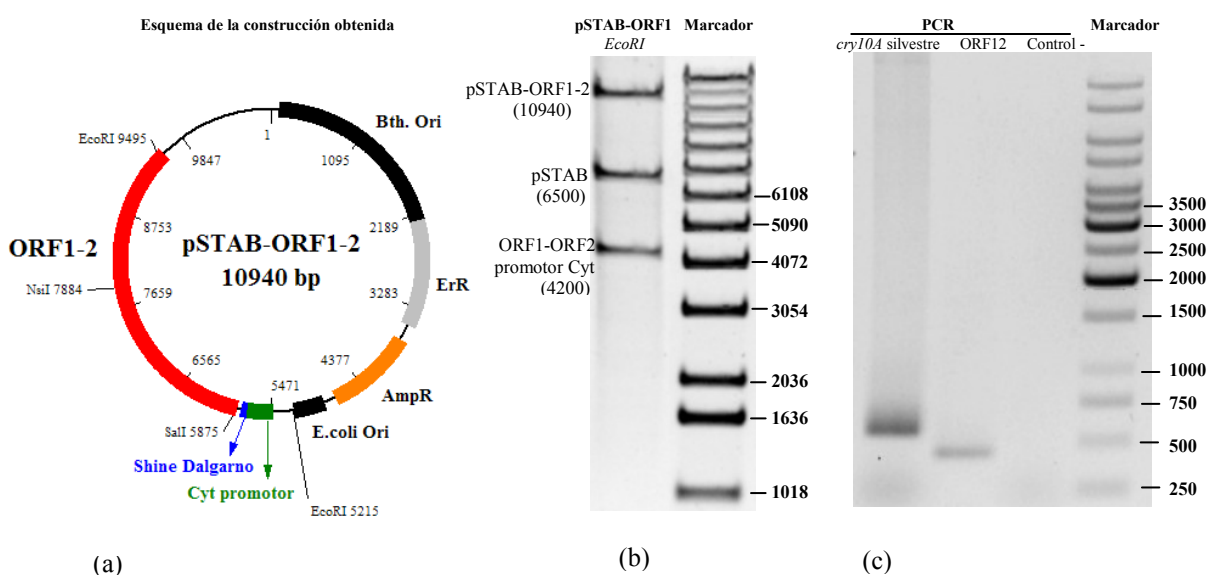


Figura II-9 Clonación de ORF1-ORF2 en el vector de expresión pSTAB, en a) el esquema de la construcción pSTAB-ORF1-2, en b) Gel de agarosa correspondiente a las digestiones de pSTAB-ORF1-2 con la enzima *EcoRI*, en c) Los productos de PCR de la región que flanquea el sitio donde se localizaría el GAP en el gen *cry10A* silvestre. Nótese el menor tamaño del producto de PCR de pSTAB-ORF1-2.

Las secuencias que flanquean el GAP, ubicadas entre el ORF1 y el ORF2, se amplificaron al utilizar los iniciadores ORF12d: 5'-tagtaccacttcccgccaaa3' y el reverso ORF12r: 5'-tcactgtagtccatccatgaa 3', lo cual generó una banda de 556bp para el plásmido

pSTAB-*cry10A* silvestre y otra banda de 439bp para el plásmido pSTAB-ORF1-2 (Figura II-9c). Lo anterior confirmó la delección de las secuencias del GAP en pSTAB-ORF1-2.

Tabla II-1 Comparación de las secuencias de nucleótidos del ORF1-2 y el gen *cry10A* silvestre. Nótese en color morado las secuencias idénticas correspondientes al ORF1, en gris oscuro los nucleótidos idénticos del ORF2, en azul los nucleótidos introducidos y correspondientes al sitio de clonación *NsiI*, en blanco se indican los nucleótidos que se eliminaron (delección) en ORF1-2, en amarillo una mutación de G por A y las letras en rojo indican la secuencia del GAP.

Muestra	Secuencia de nucleótidos que flanquean el GAP
ORF1-2	CAAAACCCAAATGCTACAGATTTAACATATGCAGATTTGGATATGTAACATTCCAAGAACAGTTCC AAATAAACATTTGAAGGAGAAGACACTTTTAAATGACCTTATATGGTACACCAAAATCATTATATA ATATATATATTGACAAAATCGAATTTATTCCAATCACTCA TGCATCGAGAAAAGGTCGTGAACCCATG TTTACAAGTGGTGCAGAAAATAGGTTAAAGCTAGAAACGACAGATTATG GAATAGATCAAGTGGCTA ATGCTATAGAATGTATGTCAGATGAACAATATTCAAAAGAAAACCTGATGTTATGGGATCAAGTAAA AC
Cry10A silvestre	CAAAACCCAAATGCTACAGATTTAACATATGCAGATTTGGATATGTAACATTCCAAGAACAGTTCC AAATAAACATTTGAAGGAGAAGACACTTTTAAATGACCTTATATGGTACACCAAAATCATTATATA ATATATATATTGACAAAATCGAATTTATTCCAATCACTCAATCTGTATTAGATTATACAGAGAAGCAA AAATATAGAAAAACACAGAAAATAGTGAATGATTTATTTGTTAATTAAACAAAGTTCTTACTAAAAAT AGATAGTATGGCTGTAAAAAGTAAAGCAGAAAAGGTCGTGAACCCATGTTTACAAGTGGTGCAGAAA AATAGGTTAAAGCTAGAAACGACAGATTATG AAATAGATCAAGTGGCTAATGCTATAGAATGTATGTC AGATGAACAATATTCAAAAGAAAACCTGATGTTATGGGATCAAGTAAAAC

La posterior secuenciación del fragmento de 439pb, confirmó la delección del GAP y de otros nucleótidos (Tabla II-1). Sin embargo, también elucidó la presencia de una mutación de transversión G-A en la posición 2163 corriente abajo del ATG. La mutación se confirmó al analizar el electroferograma (Figura II-10).

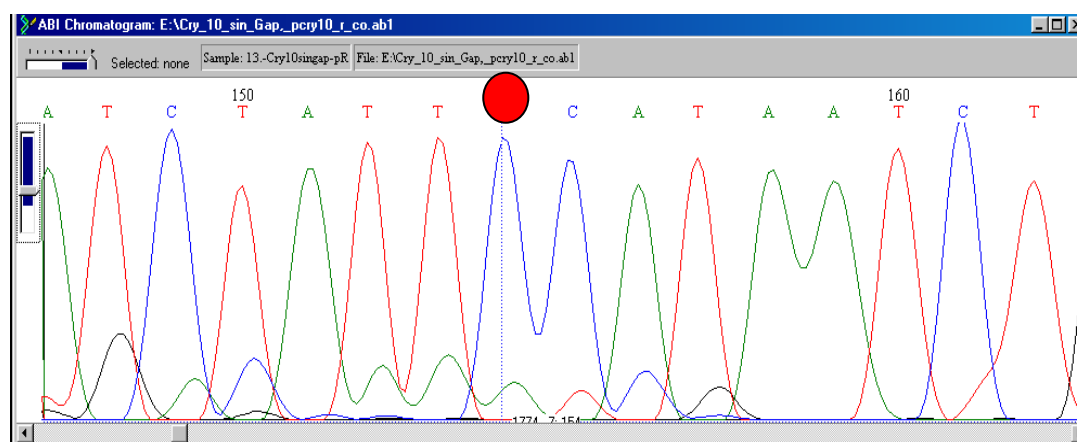


Figura II-10. Electroferograma de la secuenciación del producto de 439pb del ORF1-2 del gen *cry10A*. Nótese en un círculo la presencia de citosina, con una señal nítida. Nótese además, que las secuencias están invertidas y que la citosina corresponde a Guanina en la secuencia directa.

Tabla II-2 Comparación *in silico* de las secuencias de aminoácidos del ORF1-2 y del ORF1 y ORF2 de Cry10A silvestre. Nótese en color morado las secuencias idénticas correspondientes al ORF1; en gris oscuro los aminoácidos idénticos del ORF2; en verde los aminoácidos idénticos derivados de la secuencia intermedia entre el GAP y el ATG del ORF2; en rojo los aminoácidos que se eliminaron (delección); en amarillo una mutación ácido glutámico (E) por glicina (G) y sin coloración, 3 aminoácidos introducidos.

Muestra	Secuencia de aminoácidos
Marco abierto de lectura del ORF1-2 en pSTAB	MGGIDMNPYQNKNEYEIFNAPSNGFSKSNYSRYPLANKPNQPLKNTNYKDWLNVCDNQOYGNNAG NFASSETIVGVSAGIIVGTMLGAFAPVLAAGIISFGTLLPIFWQGSDPANVWQDLLNIGGRPIQEIDKNIH NVLTSIVTPIKNQLDKYQEFFDKWEPARTHANAKAVHDLFTTLEPIIDKDLMDLKNNASYRIPTLPAYAQI ATWHLNLLKHAATYYNIWLQNGINPSTFNSSNYQGYLKRKIQEYTDYCIQTYNAGLTMIRTNATW NMYNTYRLEMTLTVLDLIAIFPNYDPEKYPIGVKSELIREVYTNVNSDTFRITTELENGLTRNPTLFTWINQ GRFYTRNSRDILDPYDIFSFTGNQMAFHTNDDRNIIWGAHVHGNIISQDTSKVFPFYRNKPIDKVEIVRHRE YSDIHYEMIFFSNSSEVFRYSSNSTIENNYKRTDSYMIPKQTWKNKEYGHTLSYIKTDNYIFSVMRERRRVA FSWHTSVDFQNTIDLDNITQIHALKALKVSSDSKIVKPGHTGGDLVILKDSMDFRVRFLKNVSRQYQV RIRYATNAPKTTVFLTIGDITISVELPSTTSRONPNATDLTYADFGYVTFPRTVPNKTFEGEDTLLMTLYGTP NHSYNIYIDKIEFIPITHASRKVVNP MFTSGAKNRLKLETTDYIDQVANAIECMSDEQYSKEKMLMLWDQV KHAKYLSQSRNLLQNGDFEDVFHGWTTSDHMYIQSDNSTFKGNYLNISGARDIYLTIFTPTIYQKIDESKL KPYTRYLVRGFVGSSKDVELVVSRYGKEIDTMNVVPFDIPYVSSRPVCNELYDGEQQPYPNGNVGYNNP MSAFTPSYTSARQCMGPKKQIVCQDSHQKFHIDTGEVDYNTNIGIWMFKISSPDGYALLDNLEVIEE GPIDGEALSRVKHMEKKWNDQMEAKRSETQQAYDVAKQAIDALFTNVQDEALQFDTTLAQIYAEYL VQSIPYVYNDWLSVPGMNYDIYVELDARVAQARYLYDTRNIIKNGDFTQGVGMGWHVTGNADVQQID GVSVLVLSNWSAGVSQNVHLQHNHGYVLRVIAKKEGPGNGYVTLMDCEENQEKLTFTSCEEYITKTVD VFPDPTDCVRIEGETEGSFYIESIELICMNE
ORF1 del gen <i>cry10A</i> silvestre	MGGIDMNPYQNKNEYEIFNAPSNGFSKSNYSRYPLANKPNQPLKNTNYKDWLNVCDNQOYGNNAG FASSETIVGVSAGIIVGTMLGAFAPVLAAGIISFGTLLPIFWQGSDPANVWQDLLNIGGRPIQEIDKNIH LTSIVTPIKNQLDKYQEFFDKWEPARTHANAKAVHDLFTTLEPIIDKDLMDLKNNASYRIPTLPAYAQIATW HLNLLKHAATYYNIWLQNGINPSTFNSSNYQGYLKRKIQEYTDYCIQTYNAGLTMIRTNATW TYRLEMTLTVLDLIAIFPNYDPEKYPIGVKSELIREVYTNVNSDTFRITTELENGLTRNPTLFTWINQGRFYTR NSRDILDPYDIFSFTGNQMAFHTNDDRNIIWGAHVHGNIISQDTSKVFPFYRNKPIDKVEIVRHREYSDIHYEM IFFSNSSEVFRYSSNSTIENNYKRTDSYMIPKQTWKNKEYGHTLSYIKTDNYIFSVMRERRRVA FSWHTSVDFQNTIDLDNITQIHALKALKVSSDSKIVKPGHTGGDLVILKDSMDFRVRFLKNVSRQYQV RIRYATNAPKTTVFLTIGDITISVELPSTTSRONPNATDLTYADFGYVTFPRTVPNKTFEGEDTLLMTLYGTP NHSYNIYIDKIEFIPITQSVLDYTEKQNIKTQKIVNDLFVN
Aminoácidos no traducidos de la secuencia que se encuentran entre el GAP y el ATG del ORF2	RRVVNP
ORF2 del gen <i>cry10A</i> silvestre	MFTSGAKNRLKLETTDYIDQVANAIECMSDEQYSKEKMLMLWDQV KHAKYLSQSRNLLQNGDFEDVFHGWTTSDHMYIQSDNSTFKGNYLNISGARDIYLTIFTPTIYQKIDESKL KPYTRYLVRGFVGSSKDVELVVSRYGKEIDTMNVVPFDIPYVSSRPVCNELYDGEQQPYPNGNVGYNNP MSAFTPSYTSARQCMGPKKQIVCQDSHQKFHIDTGEVDYNTNIGIWMFKISSPDGYALLDNLEVIEE GPIDGEALSRVKHMEKKWNDQMEAKRSETQQAYDVAKQAIDALFTNVQDEALQFDTTLAQIYAEYL VQSIPYVYNDWLSVPGMNYDIYVELDARVAQARYLYDTRNIIKNGDFTQGVGMGWHVTGNADVQQID GVSVLVLSNWSAGVSQNVHLQHNHGYVLRVIAKKEGPGNGYVTLMDCEENQEKLTFTSCEEYITKTVD VFPDPTDCVRIEGETEGSFYIESIELICMNE

El análisis *in silico* de la traducción del marco abierto de lectura de ORF1-2, demuestra distintas mutaciones, una mutación por inserción de 3 aminoácidos nuevos, histidina, alanina y serina provenientes de la secuencia CATGCATCG y derivada del sitio *NsiI* (TGCAT) añadido para la unión de ambos ORFs (Tabla II-1 sitio señalado en coloración azul); la expresión de 6 aminoácidos provenientes de la secuencia no codificante corriente arriba del ATG del ORF2 (ubicada entre el GAP y el ATG del ORF2) (Tabla II-2 , Figura II-11); y la delección de 25 aminoácidos en el extremo 5' de

la proteína derivada del ORF1-2 (Tabla II-2). De esta última delección solamente los aminoácidos QSVLD son conservados en Cry4B, pero no en Cry4A (Figura II-11) y constituyen la hélice $\alpha 9$ en cry4B (Figura II-11B, Figura II-11C). Este tipo de estructura secundaria también se conserva en la proteína ORF1-2 (Figura II-11B). Cabe destacar que la proteína del ORF1-2 dispone de la última lámina $\beta 23$, que forma la parte final del dominio III de las δ -endotoxinas Cry. Además, la mutación de transversión G-A en la posición 2163 corriente abajo del ATG, ocasiona el cambio de un aminoácido de ácido glutámico (E) por un aminoácido alifático de glicina (G) en la posición 18 del ORF2 del gen *cry10A* silvestre (Tabla II-2), la cual corresponde a parte del extremo carboxi-terminal que no forma parte de la δ -endotoxina.

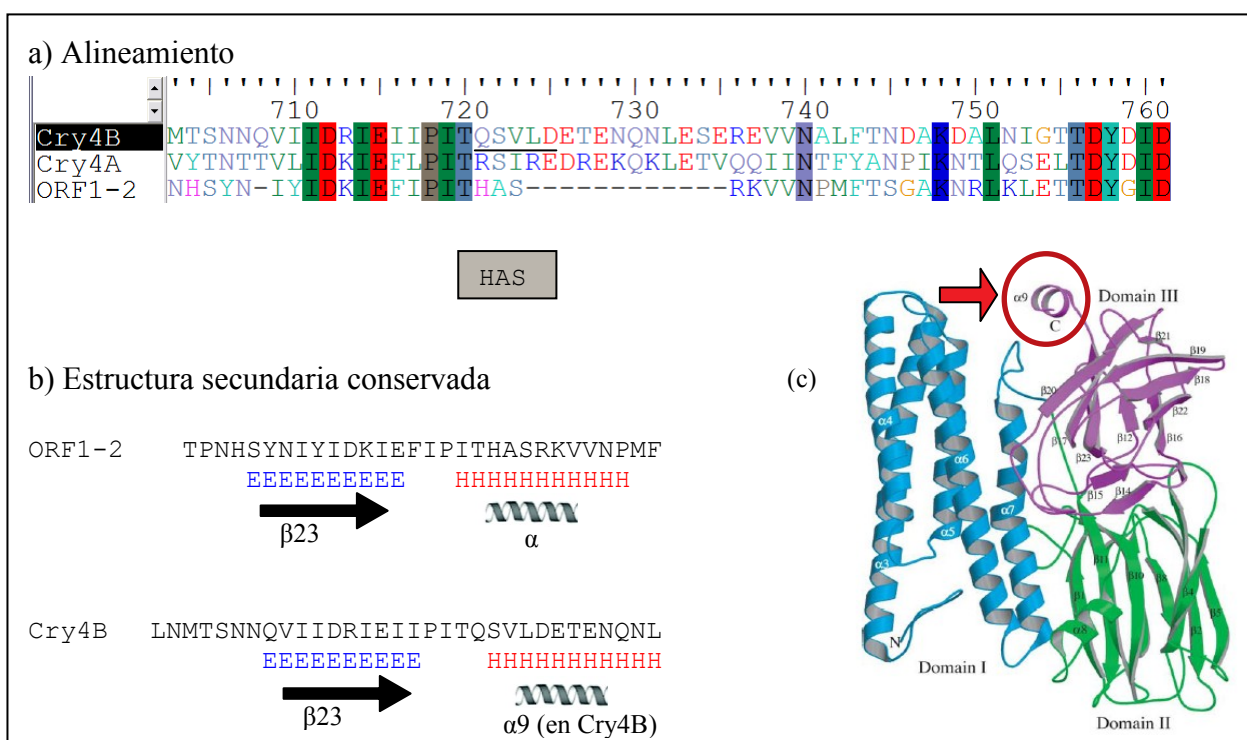


Figura II-11 Alineamiento y análisis de la estructura secundaria de proteínas Cry4 y ORF1-2. En a) se muestra el análisis de agrupamiento (Clustal) de los aminoácidos de la posición 720 a 760 de las proteínas Cry4A, Cry4B y del producto de la traducción ORF1-2. Nótese en un recuadro gris los tres aminoácidos introducidos: histidina, alanina y serina. En b) se presenta la estructura secundaria que se mantiene conservada a pesar de los cambios introducidos en ORF1-2. Nótese la lámina $\beta 23$ que forma la última parte del dominio III de las proteínas Cry, además, se indica la presencia de la hélice conservada $\alpha 9$ en Cry10A y en Cry4B. La estructura secundaria se realizó según Rost *et al.*, 2003. En c) se presenta la estructura terciaria de la proteína Cry4Ba. Nótese con la flecha y el círculo rojo la α -9 que se encuentra al final de una serie de láminas β -plegadas en el dominio III y que se cree es un vestigio de la proteólisis de la protoxina. Tomado de Boonserm *et al.*, 2005.

2.3.8 Clonación ORF2 en el vector pSTAB

El esquema de la construcción del vector pSTAB-ORF2 se muestra en la Figura II-12a. La estrategia de clonación del ORF2 se realizó mediante la eliminación del ORF1 al digerir el plásmido pSTAB-ORF1-2 con las enzimas *Sall*-*NsiI*. La secuencia resultante se recircularizó con lo cual se obtuvo la construcción pSTAB-ORF2. La presencia del ORF2 en el vector pSTAB se confirmó mediante la digestión con la enzima *EcoRI* con lo cual se generó dos fragmentos de 2281 bp y 6684 bp correspondientes al ORF2 con el promotor Cyt y al vector respectivamente (Figura II-12b).

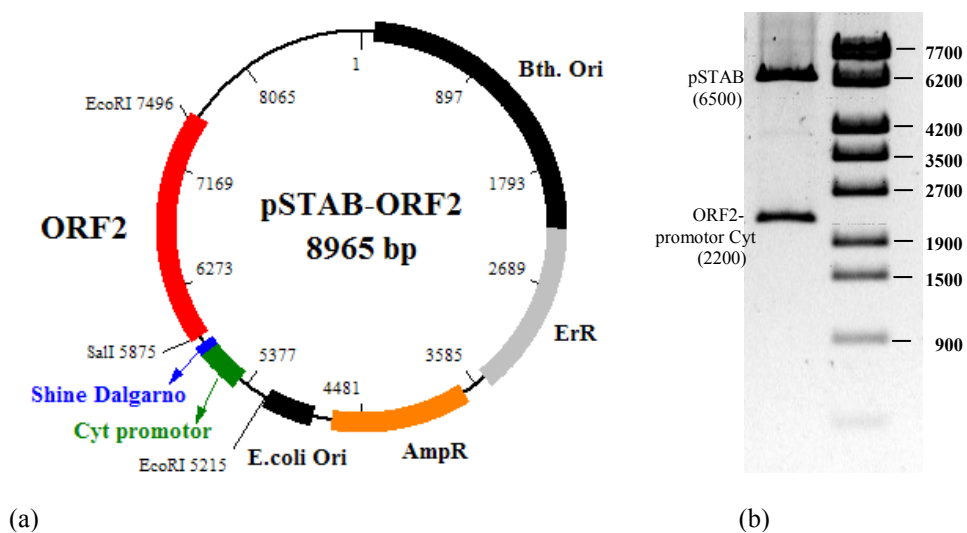


Figura II 12 Clonación del ORF2 del gen *cry10A* en el vector de expresión pSTAB en a) Esquema de la construcción pSTAB-ORF2 y en b) Digestión de pSTAB-ORF2 con la enzima *EcoRI*.

2.3.9 Clonación del gen *cry10A* silvestre en pUC19 como un paso previo para interrumpirlo con el gen de resistencia a Kanamicina

El esquema de la construcción pUC19-*cry10A* se muestra en la Figura II-13a. El gen *cry10A* silvestre se clonó con éxito en los sitios *Sal*-*Sph*I del vector pUC19. La presencia del gen se corroboró mediante el patrón de restricción dado por las enzimas *Sal*I y *Sph*I, generándose un fragmento de 3900pb, uno de 2900 y uno de 6500 correspondientes al gen *cry10A*, al vector pUC19, y a la suma del vector y el gen (Figura II-13a, 13b). Esta clonación se realizó con el fin de disponer del gen *cry10A* silvestre en un vector pequeño que no presentara resistencia a Kanamicina, lo que permitiría para interrumpir el gen *cry10A* con el gen *nptII* (resistencia a Kanamicina).

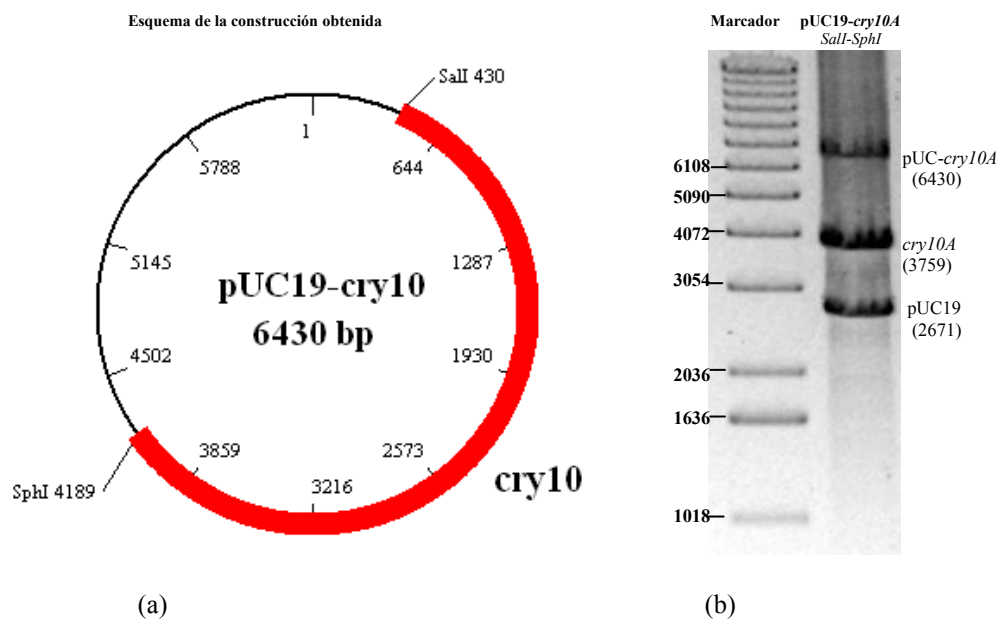


Figura II-13 Clonación del gen *cry10A* en el vector de clonación pUC19. En a) El esquema de la construcción que se diseñó y en b) El producto de la digestión de puc19-*cry10A* con las enzimas de restricción *Sal*I y *Sph*I. Nótese las bandas de 2671, 3759 y 6430, correspondientes al vector pUC19, al gen *cry10A* y a la suma del vector pUC19 y el gen *cry10A* respectivamente.

2.3.10 Inserción del gen de resistencia de Kanamicina (*nptII*) en el primer marco abierto de lectura del gen *cry10A* silvestre

El esquema de la construcción pUC19-*cry10*Km se muestra en la Figura II-14a. La secuencia de 1300bp que dispone del gen de resistencia a Kanamicina con su respectivo promotor y que se obtuvo del plásmido pBEST501 mediante digestión con *SmaI*, se insertó en la posición 715bp (sitio *ScaI*) posterior al ATG de la secuencia *cry10A* silvestre en el vector pUC19. La presencia y orientación de esta nueva construcción denominada pUC19-*cry10A*-Km se analizó mediante una digestión con *XbaI*, con esto se generó una banda de alrededor de 600bp correspondiente a los primeros nucleótidos del gen *cry10A*, 1300 del gen de resistencia a Kanamicina, así como una banda de 1900 de digestión parcial (1300 del fragmento y 600 del gen *cry10A*) (Figura II-14b). Además, se amplificó mediante PCR la secuencia de 700pbcry10-1300bp del gen de Kanamicina- 2000 *cry10A*, lo que generó un producto de 5215pb (Figura II-14c). Este producto de PCR es importante debido a que podrá usarse para bloquear la expresión del gen *cry10A* mediante recombinación homóloga de cepas de *Bti*, en lugar del vector completo pUC19-*cry10A*-Km.

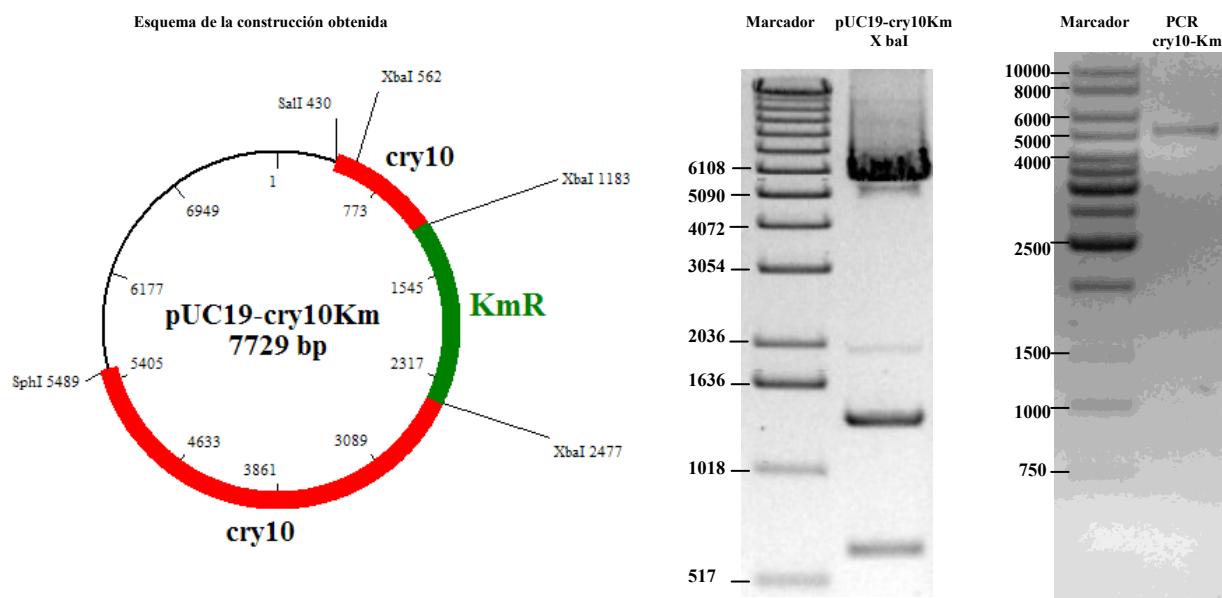


Figura II-14. Inserción del gen de resistencia a Kanamicina (*nptII*) en la posición 714 (*ScaI*) de la secuencia *cry10A* silvestre de la construcción pUC19-*cry10A*. En a) esquema de la construcción pUC19-*cry10A*-Km, en b) la digestión *XbaI* del DNA de pUC19-*cry10A*-Km y en c) el producto de PCR de la pUC19-*cry10A*-Km. Nótese el tamaño de 5215pb correspondientes a 3900bp del gen *cry10A* y 1300 del gen de Kanamicina (*nptII*).

Los árboles filogenéticos obtenidos según análisis de Bootstrap-NJ mostraron que Cry10A agrupa con las proteínas Cry4 cuando se comparan secuencias homólogas. Esto es el extremo amino-terminal de Cry4 con ORF1 (Figura II-16a), el extremo carboxi-terminal con ORF2 (Figura II-16b), o bien las proteínas completas Cry4 con ORF1-2 (Figura II-16c). Este resultado es contrario a lo descrito por Crickmore *et al.* (2006) en donde Cry10A agrupa con Cry30 y existe una menor relación con las proteínas Cry4 (Anexo 1). La única manera de lograr resultados similares a Crickmore es si se compara únicamente el ORF1 de Cry10A (660-680aa) con las secuencias completas Cry4A, Cry4B (1200-1300aa) (Figura II-16d).

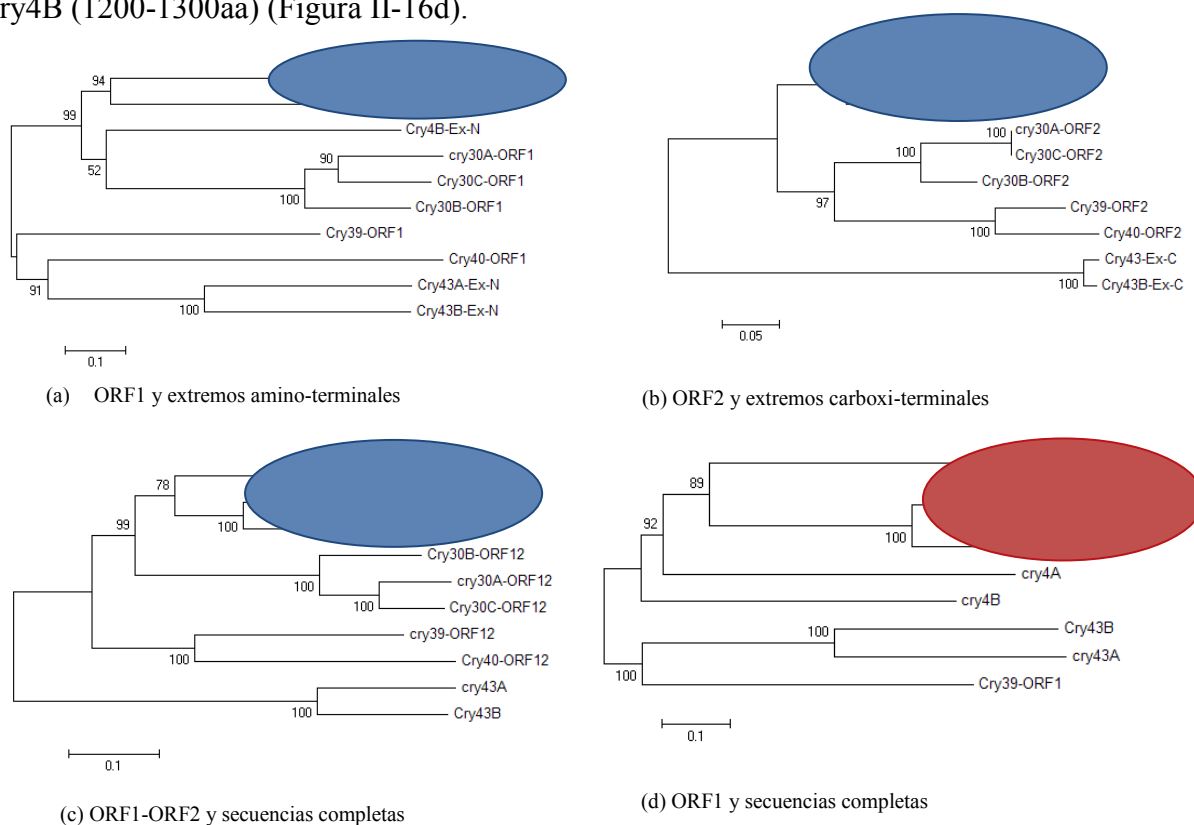


Figura II-16 Árboles filogenéticos hechos según el análisis de Bootstrap-Neighborjoin con corrección de Poisson hecho con el programa MEGA 3.1 descrito por Kumar *et al.* (2004) con 1000 repeticiones de (a) el primer marco abierto de lectura (ORF1) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y el extremo amino-terminal de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B; (b) el segundo marco abierto de lectura (ORF2) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y el extremo carboxi-terminal de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B; (c) ambos marcos abiertos de lectura en una secuencia única (ORF1-ORF2) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y la secuencia total de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B; (d) el primer marco abierto de lectura (ORF1) de las proteínas Cry10A, Cry30A, Cry30B, Cry30C y la secuencia total de las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry43A, Cry43B. Nótese el agrupamiento de Cry10A en todas sus formas (ORF1, ORF2 y ORF1-ORF2) con las proteínas Cry4 señalado con un círculo azul; así como el agrupamiento del ORF1 del Cry10A con las proteínas Cry30 señalado con un círculo azul.

```

cry10A      TAATTAAACAAAGTT-CTTACTAAATAGATAGTATGGCTGTTAAAAAG-TAAGCGAGAAAG 2085
cry30A      TGATTAAACACAAAGTA-GTTACTAAATGAGATAGGATCGTCATTCAA-AAA--AGCG-AAAAG 2169
cry30B      CAATTAAACAAAGTA-----CTAAAGTAGATGGTATTGCTGAAAAAAA-TAAGCGATAAG 2102
cry30C      TAGTTAAACAAAGTG-TTCCTTAAAGTAGGTGATCACTGTTCAAAA-TAAGTAAAAAG 2069
cry39A      CAATTAAACAAATGA-TTAACTAGAGTAGGTGGTATCGCTGTTAAAAAATAAGCGGAAAAAG 2040
cry40A      CAATTAAACAAATAATTTACTAAATAGGTGGTACTGTTGTTTAACTAAATAAGCGAAAAAG 2060
          **** *      *      * * * * *      * * * * *      * *      *

```

Figura II-17 Alineamiento de la secuencias de nucleótidos del GAP que separan los dos marcos abiertos de lectura de los genes *cry10A*, *cry30A*, *cry30B*, *cry30C*, *cry39A* y *cry40A*. La simbología utilizada es (*) para nucleótidos idénticos. En rojo se indican las adeninas, mientras que en verde el resto de los nucleótidos. El análisis se realizó con el programa Clustal W según Chenna *et al.* (2003).

Ahora bien, debido a que existe poca información acerca de la secuencia del GAP y de su origen, se decidió buscar secuencias homólogas en otros genes *cry* constituidos por dos marcos abiertos de lectura como el *cry30A*, *cry39A* y *cry40A*. El alineamiento de estas secuencias demostró que el GAP es idéntico en 28 de 63 nucleótidos (Figura II-17). Según el modelo de dos parámetros de Kimura la distancia genética promedio entre todas las secuencias es de 0,3114. Mientras que, si se elimina el GAP del *cry30A*, la distancia promedio entre las secuencias es aún menor con un valor de 0,2602. La secuencia del GAP de *cry30A* presentan una mayor divergencia, mientras que las menores distancias las muestran la *cry10A-cry30B*, así como la *cry40A-cry39A* con valores de 0,19 (Tabla II-3).

Tabla II-3 Distancias genéticas de las secuencias del GAP de *cry10A*, *cry30A*, *cry39A* y *cry40A* según el modelo de dos parámetros de Kimura (1980). Nótese en verde las secuencias con mayor divergencia y en rojo las más cercanas.

	<i>cry10A</i>	<i>cry30A</i>	<i>cry30B</i>	<i>cry30C</i>	<i>cry39A</i>
<i>cry30A</i>	0,3813				
<i>cry30B</i>	0,1930	0,4557			
<i>cry30C</i>	0,2823	0,4816	0,2778		
<i>cry39A</i>	0,2484	0,4598	0,1686	0,2234	
<i>cry40A</i>	0,2778	0,4728	0,2186	0,3287	0,1943

2.4 Discusión

En el presente trabajo se aisló y clonó el gen *cry10A* silvestre, el primer marco abierto de lectura (ORF1), el segundo marco abierto de lectura (ORF2) y ambas secuencias (ORF1-ORF2) en un marco de lectura único, en el vector para *Bt* pSTAB. Estos plásmidos son el punto de partida para la transformación y expresión de estas secuencias en cepas acristalíferas de *Bt*. El diseño de estos vectores es un paso previo fundamental para dilucidar las relaciones que existen entre las proteínas derivadas de los marcos abiertos de lectura de *cry10A*, en la toxicidad contra *Aedes aegypti* e *Hypothenemus hampei*, insectos de importancia en salud pública y en agricultura. El uso del promotor *cyt* y la región Shine Dalgarno derivada del gen *cry3A* presentes en el plásmido pSTAB permitirá una transcripción más eficiente y mayor estabilidad del ARNm (Park *et al.*, 1999). De igual manera, la preparación del plásmido para interrumpir el gen *cry10A* con el gen *nptII* (resistencia a Kanamicina) mediante recombinación homóloga permitirá bloquear la expresión de *cry10A* y determinar así su papel en la toxicidad contra *H. hampei*.

La estrategia del clonaje de *cry10A* en su forma silvestre ORF1-GAP-ORF2, obedeció a que existía un reporte de Hughes *et al.* (2005) en el cual se presentó bajos niveles de expresión y la ausencia de cristales cuando se clonó en pSTAB el ORF1-GAP-secuencia parcial del ORF2 y se transformaron cepas acristalíferas de *Bt*. La hipótesis de trabajo fue que la estrategia anterior, la cual incluye el ORF2, permitiría mejorar los niveles de expresión y promover la formación de cristales. Además, se estableció una estrategia novedosa para clonar el ORF1 y el ORF2 por separado, así como el ORF1-2 en un solo marco abierto de lectura, con el fin de determinar las interacciones de estas secuencias (ORF1, ORF2 y el GAP) tanto a nivel de transcripción (estabilización del RNAm) como de la traducción y posterior cristalización de las proteínas. Todas las secuencias producto de esta estrategia de clonaje, fueron posteriormente subclonados en el vector pSTAB con el propósito de transformar y expresar los distintos marcos abiertos de lectura de *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt*. Esto con el fin de contar con cada proteína expresada independientemente en *Bt* y determinar su toxicidad real mediante bioensayos con *A. aegypti* y *H. hampei*.

Además, el conocimiento que se derivará de la estrategia planteada para el gen *cry10A*, tendría implicaciones importantes para genes cuya organización genética es similar al *cry10A*, a saber los genes *cry30A*, *cry30B*, *cry30C*, *cry39Aa* y *cry40Aa* (de Maagd *et al.*, 2003; Crickmore *et al.*, 2006). El análisis de comparación de secuencias realizados *in silico*, demostró que el GAP de estos genes podría tener un origen común, ya que existe poca divergencia según el análisis de Kimura de dos componentes. En promedio, la distancia genética de las secuencias excluyendo el *cry30A*, que es el que ha acumulado mayores mutaciones, es de 0,2. Cabe mencionar que el GAP está flanqueado por codones de terminación lo que permite la acumulación de mutaciones ya que es una región no codificante.

Ahora bien, estos GAPs podrían tener una función importante. Podría, por ejemplo, permitir la expresión de una protoxina pre-digerida en su extremo carboxi-terminal y por lo tanto ser más solubles. Cabe señalar que este extremo, rico en cisteínas, permite la formación de enlaces intramoleculares de disulfuro que son útiles para la cristalización (Gill *et al.*, 1992), ésto a su vez hace que requieran condiciones extremas de alcalinidad o condiciones reducidas para la solubilización del cristal (Bietlot *et al.*, 1990). Una mayor solubilidad de la proteína, podría representar una mayor toxicidad en insectos blanco cuyo tracto intestinal no presenta condiciones tan extremas de alcalinidad, como sería el caso de *H. hampei*.

La inclusión de nuevos genes en las bases internacionales de datos hace que se conserven o establezcan nuevos grupos en los dendrogramas de las proteínas Cry. En el presente trabajo, se confirmó el resultado descrito por Crickmore (2006), en donde se presentan relaciones estrechas de Cry10A con Cry30, al comparar las proteína truncadas correspondiente a los ORF1 de Cry10A, Cry30, Cry39 y Cry40 (660-680aa) con las secuencias de las protoxinas de Cry4A, Cry4B y Cry43A (1200-1300 aa). Este resultado implica un error de sesgo en la comparación de secuencias de distinto tamaño. Los alineamientos de secuencias homólogas de similar tamaño, demostraron que tanto el ORF1, el ORF2, así como las secuencias unidas ORF1-ORF2, fueron más cercanas a Cry4 que a Cry30. Este resultado es similar a lo descrito por Bravo (1997) y refleja la necesidad de establecer un análisis más exhaustivo de las relaciones de las proteínas Cry

que se usan como referencia para *Bt*, como es el caso del dendograma descritos por Crickmore (2006, ver apéndice 1).

La estrategia de unir el ORF1-2 del gen *cry10A* podría tener consecuencias positivas en la cristalización de la proteína que se traduce. El ORF2 en dicha proteína, favorecería el establecimiento de enlaces disulfuro que, como se mencionó con anterioridad, podrían mejorar la cristalización (Bietlot *et al.*, 1990; Schnepf *et al.*, 1998). La protoxina final sería de un peso aproximado de 120-130kDa, en lugar de las dos proteínas de 78 (forma activada de 68kDa) y 56kDa que se originarían de manera silvestre por el ORF1 y ORF2 respectivamente. Cabe mencionar que, en el proceso de unir ambos marcos abiertos de lectura, se debió insertar 3 nuevos aminoácidos. Además, se incorporaron 6 aminoácidos provenientes de la secuencia ubicada entre el GAP y el ATG del ORF2. Otra mutación fue la delección de 25 aminoácidos en comparación con la proteína silvestre. La razón por la cual se eliminó una gran cantidad de aminoácidos, se debe a que la secuencia correspondiente de DNA es rica en adenina y timina, lo que imposibilitó el diseño de iniciadores para amplificar el ORF1. De manera hipotética, todos estos cambios no alteran la estructura secundaria de la proteína Cry10A, sino que se mantiene una hélice que es homóloga a hélice alfa-9 de Cry4B (Figura II-11b, Figura II-18). Cabe destacar que según Boonserm *et al.* (2005), esta hélice podría interactuar con sitios hidrófobos del dominio III de la δ -endotoxina Cry4B. Se desconoce la importancia de esta hélice en Cry10A, aunque se propone que la misma podría no tener implicaciones en la toxicidad de la δ -endotoxina por varias razones. Por una parte esta hélice no es parte de la δ -endotoxina, la misma está ausente en Cry4A y existen modelos tridimensionales que la descartan en la δ -endotoxina Cry4B (Angsuthanasombat *et al.*, 2004). Además, Delecluse *et al.* (1988), proponen que el sitio probable de activación de Cry10A es la arginina 643, que se encuentra antes de la hélice alfa-9. Por otra parte, Thorne *et al.* (1986) y Garduno *et al.* (1988) obtuvieron una δ -endotoxina Cry10A de 56 kDa al expresar el ORF1, en lugar de la esperada de 68 kDa. Esta δ -endotoxina sería resultado probable de la proteólisis carboxi-terminal, por lo que se podría suponer que este tipo de hélice terminal también fue eliminada. Por último, esta hélice no está presente en otras proteínas Cry funcionales. En el caso de ORF1-2, la última lámina plegada β -23 del final del dominio III de la δ -endotoxina Cry10A, se mantiene, lo que

significa que la actividad de la misma probablemente no se vea afectada; en especial si se considera que es probable que durante la activación proteolítica de Cry10A la mayoría de los aminoácidos posteriores la lámina β 23 se eliminen. Por otra parte, la amplificación por PCR produjo una mutación que ocasionó un cambio transcripcional de un aminoácido de ácido glutámico (E) por uno alifático de glicina (G). El cambio quizá podría afectar algunas interacciones proteicas para la cristalización, aunque probablemente no tenga efecto en la toxicidad, pues se encuentra en una secuencia que no es parte de la δ -endotoxina Cry10A.

Adicionalmente, en el presente trabajo se logró el diseño de un vector para interrumpir el gen *cry10A* con *nptII* (resistencia a Kanamicina) mediante recombinación homóloga. El principio de esta estrategia radica en que el vector no puede replicarse dentro de *Bt*, debido a que no dispone de un sitio Ori para *Bt*. Esto significa que la única forma en que se obtengan clonas resistentes es mediante la inserción del gen de Kanamina en algún sitio que le permita replicarse. Esta inserción podría ocurrir principalmente por recombinación homóloga en el lugar donde se encuentra el gen *cry10A*. Sin embargo, es importante considerar que el DNA obtenido de cepas de *E. coli* es metilado, no así el DNA de *Bt* (Macaluso y Mettus, 1991). Esto significa que el DNA que ingrese en *Bt* durante la transformación probablemente sufra degradaciones (Macaluso y Mettus, 1991) antes de que ocurra la recombinación. Además, las secuencias de DNA del vector pUC19 podrían representar potenciales sitios para que ocurra recombinación no homóloga en otras partes del genoma o plásmidos de *Bti*. El producto de PCR correspondiente al gen *cry10A*-gen de resistencia a Kanamicina, obtenido en el presente trabajo, representa una solución a este problema, pues no es metilado, no dispone del resto de las secuencias del vector para *E.coli* y es incapaz de replicarse en *Bti*. Además, Kmiec (1999) reporta que se obtienen mejores resultados de recombinación homóloga al usar DNA lineal. Esta opción es de gran importancia, pues solamente existe un reporte en el que se logró la recombinación homóloga en *Bt* con vectores derivados de *E. coli*, en donde se logró interrumpir el gen *cyt* por recombinación homóloga, usando un plásmido con dos genes de resistencia a antibiótico para *Bt* (Delecluse *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en este trabajo son base fundamental para la transformación y expresión de *Bt* con los vectores diseñados. Los resultados futuros serán

producto directo de esta primera etapa de diseño y son importantes por dos razones, la primera tiene que ver con las relaciones de los distintos marcos abiertos de lectura de *cry10A* en la expresión y cristalización de esta proteína. Este tipo de información es importante, ya que puede ser útil para otros genes *cry*. La segunda es de carácter práctico, pues se espera que la obtención de Cry10A, o bien su interrupción, permita determinar la toxicidad de esta proteína contra *H. hampei*. Esto es de gran importancia, pues permitirá entender el modo de acción de *Bti* contra *H. hampei*.

2.5 Bibliografía

- Angsuthanasombat, C.; Uawithya, P.; Leetachewa, S.; Pornwiroon, W.; Ounjai, P.; Kerdcharoen, T.; Katzenmeier, Gerd.; Panyi, S. 2004. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B Mosquito-larvicidal Proteins: Homology-based 3D model and implications for toxin activity. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 304-313.
- Berry, C.; C; O'Neil, S.; Ben-Dov, E.; Jones, A.; Murphy, L.; Quail, M.; Holden, M.; Harris, D.; Zaritsky, A.; Parkhill, J. 2002. Complete Sequence and Organization of pBtoxis, the Toxin-Coding Plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5082-5095.
- Bietlot, H.; Vishnubhatla, I.; Carey, R.; Pozsgay, M.; Kaplan, H. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulfide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 267: 309-316.
- Boonserm, P.; Davis, P.; Ellar, D.; Li, J. 2005. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *Journal of Molecular Biology*. 348: 363-382.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology*. 179: 2793-2801.
- Chenna, R.; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T.; Higgins, D.; Thompson, J. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*. 31: 3497-500.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Bravo, A.; Dean, D. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature". 2006. Visitado el 01 de Enero del 2006. Disponible en http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- De Maagd, R.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, C.; Schnepf, E. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from sporulating entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*. 37: 409-33.

- Delecluse, A.; Bourgouin, C.; Klier, A.; Rapoport, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics*. 214: 42-47.
- Delecluse, A.; Charles, J.F.; Klier, A.; Rapoport, G. 1991. Deletion by In Vivo Recombination Shows that the 28- Kilodalton Cytolytic Polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Is Not Essential for Mosquitocidal Activity. *Journal of Bacteriology*. 173: 3374-3381.
- Garduno, F.; Thorne, A.; Walfield, M.; Pollock, T.J. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 277-279.
- Gill, S.; Cowles, E.; Pietrantonio, P. 1992. The Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37: 615-634.
- Goldberg, L.; Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquitoes News*. 37: 355-358.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hofte, H.; Whiteley, H. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53: 242-255.
- Hughes, P.; Stevens, M.; Park, H.; Federici, B.; Dennis, E.; Akhurst, R. 2005. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 34-39.
- Jensen, G.; Wilkins, A.; Petersen, S.; Damgaard, J.; Baum, J.; Andrup, L. 1995. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pX016. *Journal of Bacteriology*. 17: 2914-2917.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kmiec, E. 1999. Methods in molecular biology. New Jersey, USA. Humana Press Inc. 133p.
- López, M.; Basurto, R.; Ibarra, J. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hyphotenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 226: 73-76.

- Macaluso, A.; Mettus, A. 1991. Efficient Transformation of *Bacillus thuringiensis* Requires Nonmethylated Plasmid DNA. *Journal of Bacteriology*. 173: 1353-1356.
- Park, H.; Bideshi, D.; Johnson, J.; Federeci, B. 1999. Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 181: 319-327.
- Rost, B; Yachdav, G; Liu, J. 2003. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Research*. 32 (Web Server issue): W321-W326.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.
- Thorne, L.; Garduno, F; Thompson, T; Decker, D; Zounes, M; Wild, M; Walfield, AM; Pollock TJ. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. '*kurstaki*' and '*israelensis*'. *Journal of Bacteriology*. 166: 801-811.
- Tyrell, D.; Bulla, D.; Ramoska, W. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*. 28: 656-658.
- Whiteley, H.; Schnepf, E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*. 40: 549-576.

CAPÍTULO III

Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

RESUMEN

La toxicidad de la proteína mosquitocida Cry10A de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* está subestimada, ya que los bioensayos que existen reportados se realizaron con cepas recombinantes con bajos niveles de expresión de *cry10A*. En la presente investigación se obtuvo una adecuada expresión y cristalización del ORF1 y el ORF2 del gen *cry10A*, mediante la clonación de la secuencia silvestre en un vector de expresión de *Bt* con un promotor Cyt y la secuencia estabilizadora Shine Dalgarno derivada del gen *cry3A*. El análisis de microscopía electrónica de barrido demostró la presencia de dos cristales pleomórficos redondeados. El análisis por SDS-PAGE de los cristales puros y solubilizados presentó un patrón de tres bandas de un peso molecular de 78, 68 y 56 kDa, lo que corresponde a la protoxina (ORF1), la δ -endotoxina activa (ORF1) y la proteína del ORF2. Las bandas de 68 y 56 kDa se purificaron y se identificaron mediante MALDI-TOF-MS, lo que resultó en una identidad total con el ORF1 y el ORF2 de Cry10A respectivamente. Se sugiere que la secuencias 3' terminales y correspondientes al ORF2 podrían brindar una mayor estabilidad al RNAm lo que facilitaría la expresión y cristalización de ambos ORF de *cry10A*. El complejo espora cristal fue activo contra larvas de cuarto instar de *Aedes aegypti* con una DL_{50} de 2,061 $\mu\text{g/ml}$ y actúa de manera sinérgica con Cyt1A, lo que aumenta la toxicidad 13,3 veces y resulta en una DL_{50} de 40,909 ng/ml.

Palabras clave: Cry10A, Cyt1A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, sinergismo.

Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*

ABSTRACT

The Cry10A mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxicity against *Aedes aegypti* has been underestimated, as all the bioassays reported were based on recombinant bacteria with low Cry10A expression levels. Here we obtained high expression levels and crystallization of the *Bacillus thuringiensis* ORF1 and ORF2 of the *cry10A* gene, by cloning the complete *cry10A* sequence into a vector with the strong Cyt promoter and a Shine Dalgarno Cry3A RNAm stabilization sequence. Scanning Electron Microscopy (SEM) demonstrated that round pleomorphic crystals were obtained. Purified and solubilized crystals gave a SDS-PAGE pattern of 78, 68 and 56kDa, corresponding to the protoxin (ORF1), active δ -endotoxin (ORF1) and ORF2. The protein PAGE-bands of 68kDa and 56kDa were purified and sequenced by MALDI-TOF-MS resulting in a perfect match with the ORF1 and ORF2. We suggest that 3' termini of ORF2 sequence could help the mRNA *cry10A* wild type to be more stable than mRNA of ORF1 alone, resulting in enhanced expression levels and crystallization of the protein. Spore-crystal suspensions were active against *Aedes aegypti* with a LD₅₀ of 2.061 μ g/ml, and acted synergistically with Cyt crystals enhancing its activity 13.3 times resulting in a LD₅₀ of 40.909ng/ml.

Key words: Cry10A, Cyt1A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Aedes aegypti*, synergism.

3.1 Introducción

La cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bti*) es ampliamente conocida y utilizada por su alta toxicidad contra mosquitos de la familia *Culicidae* y *Simulidae*, principalmente *Aedes aegypti* y en menor grado contra *Anopheles* (Tyrell *et al.*, 1979). Estos mosquitos son de gran importancia para el humano ya que son vectores transmisores de enfermedades como el virus del Nilo (*Culex*), el dengue (*Aedes*) y la malaria (*Anopheles*) (Gibbons y Vaughn, 2002; Sardelis *et al.*, 2001; Shiff, 2002). Actualmente, existe una elevada preocupación con respecto al dengue en Latinoamérica, debido al incremento en la presencia del vector y el virus en la región en los últimos 20 años (Gubler, 2002; Gubler, 2005). En 1993 el dengue mostró una reaparición Costa Rica y Panamá, países centroamericanos libres de la enfermedad (Guzmán y Kourí, 1996). En el caso de Costa Rica, en el año 2005 se reportó un total de 33 000 personas infectadas con dengue (Bonilla, 2006).

La alta eficiencia de *Bti* contra mosquitos se debe a presenta un cristal paraesporal con las proteínas bioinsecticidas Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11 y Cyt. Estas proteínas actúan de manera compleja mediante sinergismos; por ejemplo Cry4A-Cry4B (Angsuthanasombat *et al.*, 1992; Delecluse *et al.*, 1993), Cry4B-Cry10A contra *Culex* (Delecluse, *et al.*, 1988), Cyt-Cry11 (Chang *et al.*, 1993), Cyt con Cry4A y Cry4B (Wu y Chang, 1985; Tabashnik 1992). Ahora bien, Cry4A, Cry4B, Cry11 y Cyt son altamente tóxicas contra *A. aegypti*, mientras que Cry10A es la proteína que presenta menor actividad bioinsecticida según Thorne *et al.* (1986) con una mortalidad del 70% a las 24 horas con 125µg/ml. Sin embargo, esta toxicidad de Cry10A se ha subestimado, debido a que tanto Thorne *et al.* (1986) como Garduno *et al.* (1988) y Delecluse *et al.* (1988) obtuvieron bajos niveles de expresión de dicha proteína y por lo tanto ausencia de cristales. Además, Hughes *et al.* (2005) obtuvieron un resultado similar al transformar cepas acristalíferas de *Bt* con el ORF1 del gen *cry10A*. Se requiere entonces una estrategia de clonación que permita la expresión y cristalización estable de Cry10A, de tal manera que se pueda determinar su actividad contra *A. aegypti* mediante bioensayos. Se desconoce además, si se presenta sinergismo de Cry10A con otras proteínas de *Bti* como Cyt1Aa.

En cuanto a la organización genética de *cry10A*, cabe destacar que presenta dos marcos abiertos de lectura (ORF1, ORF2) (Delecluse *et al.*, 1988). Esto significa que el gen no se traduce como una protoxina de 130kDa, sino que teóricamente el ORF1 codifica para una protoxina de 78KDa y el ORF2 para una proteína correspondiente al extremo carboxilo terminal de 56 kDa. Garduno y colaboradores (1988) demostraron que la proteína codificada por el ORF1 presenta un peso molecular de 58kDa; mientras que se desconoce si el ORF2 se traduce. La presente investigación propone el clonaje de la secuencia *cry10A* con ambos marcos abierto de lectura en el vector pSTAB. Este último, permite una mejor transcripción ya que utiliza el promotor Cyt1Aa de reconocida eficiencia y la secuencia estabilizadora del RNAm Shine Dalgarno del gen *cry3* (Park *et al.*, 1999).

En la presente investigación se demuestra la expresión y cristalización de ambos ORFs del gen *cry10A*. Además, se analizará mediante bioensayos contra *Aedes aegypti* el efecto bioinsecticida de Cry10A y la interacción con Cyt1Aa .

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Transformación y expresión del gen *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt*

Se utilizó el vector pSTAB-*cry10A* cuya construcción se detalló en el capítulo I de la presente tesis para transformar la cepa acristalífera 4q7 obtenida del *Bacillus* Stock Center de la Universidad estatal de Ohio, Columbus, OH, USA. La transformación se llevó a cabo por electroporación según el protocolo descrito por Lereclus *et al.* (1989). La presencia de cristales se determinó mediante el uso de un microscopio de contraste de fases a las 24 y 48 horas de cultivo en medio sólido SP. El medio SP está compuesto por 123 mg de $\text{Mg}(\text{SO}_4)7\text{H}_2\text{O}$, 1.7 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 14mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mg de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 147mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10g de glucosa y 6g de bactopectona por litro, pH 7.4. Las cepas recombinantes se denominaron *Bt*-pSTAB-*cry10A*.

La morfología de los cristales se determinó mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, se cultivó *Bt*-pSTAB-*cry10A* en medio líquido SP hasta alcanzar la autólisis (96 horas a 28°C, 240RPM). El cultivo se centrifugó a 4000 RPM por 10 minutos y se realizaron tres lavados con agua des-ionizada estéril bajo las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente, se colocaron 10µl de la preparación espora-cristal en rejillas de aluminio con cinta adhesiva doble. Las muestras se secaron a 40°C por dos horas, se cubrieron con 30 nm de platino y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2360N a 15kv.

La presencia del gen *cry10A* en las cepas transformadas se confirmó mediante secuenciación con el iniciador directo 5'ATATGAAATATTCAATGCTC3' y el reverso 5' ATAAATTCAAGTGCCAAGTA 3' descritos por Porcar y Juárez (2003). El DNA de *Bt*-pSTAB-*cry10A* se aisló según el protocolo de Jensen *et al.* (1995). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo con 500ng de DNA, 12.5µl de agua estéril, 2.5µl de solución tampón 10x, 2.5 µl de 225mM MgCl_2 , 0.5µl de dNTP, 20µM de cada iniciador y 2.5 U de Taq polimerasa. Se utilizó el termociclador PTC-100 de la casa comercial MJ Research INC con las siguientes condiciones: un paso inicial de 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de un minutos a 95°C, 1.5minutos a 50°C y 1 minutos a 70°C; así como un paso final de 10minutos a 70°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 1x (10,8 g TRIZMA-Base, 5.5g de ácido bórico y 4 ml de 0.5M EDTA pH 8.0 por litro). Posteriormente, se purificó el producto de PCR con el kit de extracción QIA quick de la casa comercial QIAGEN según las instrucciones del proveedor y la secuencia de nucleótidos se determinó en un secuenciador automático de DNA “ABI PRISM 377” de la casa comercial Applied Biosystems.

Los cristales de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* se purificaron mediante centrifugación con gradientes de bromuro de sodio según las condiciones descritas por Ang y Nickerson (1978) a partir de un cultivo esporulado de 200ml en medio líquido SP (96 horas a 28°C, 240RPM). Los cristales obtenidos se lavaron tres veces en agua des-ionizada estéril con centrifugaciones a 12000 RPM por 10min entre cada lavado. Finalmente se resuspendieron en 100µl de agua des-ionizada estéril. Se tomaron 20 µl de la muestra de cristales, posteriormente, se añadió el mismo volumen de tampón (NaOH 50mM, DTT 25mM y CAPS 50mM pH 11.5) y se incubó una hora a 37°C con el fin de solubilizar los cristales. Por último se añadieron 10µl de tampón muestra 4X (2% SDS, 40% glicerol, 5% mercaptoetanol, 0,001% azul de bromofenol, 0.0625M Tris-HCl, pH 8) y se agitó en Vortex. La muestra se colocó por 3 min en un baño de agua hirviendo y se utilizó un total de 15 µl de la solución en un gel de poliacrilamida al 10% preparado según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989), además, se utilizó el marcador de peso molecular marca BIO-RAD 161-0304. Los geles de poliacrilamida al 10% se colocaron en cámaras verticales BioRad Mini Protean II, con el tampón tanque Tris-Glicina-SDS. Las muestras se corrieron a 80 voltios por 4 horas. Por último, las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (0.25% en 40% metanol y 7% de ácido acético), seguido de una decoloración por 3 horas en una solución al 40% metanol y 7% ácido acético.

Las bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida se aislaron y enviaron a la unidad de proteómica del CINVESTAV (Irapuato, México), donde se procesaron y analizaron en una secuenciador MALDI-TOF-MS.

Los análisis *in silico* de la estabilidad del RNAm correspondiente al ORF1, ORF2 y el gen *cry10A* silvestres (con ambos ORFs) se realizó con el programa RNAdraw V1.1.

3.2.2 Bioensayos con *Aedes aegypti*

Se realizó un bioensayo burdo con larvas del cuarto instar de *A. aegypti* provenientes del insectario del CINVESTAV, Irapuato. Para ello, se prepararon envases plásticos con 100ml de agua y 20 larvas (McLaughlin *et al.*, 1983). Posteriormente, se añadió 100µl de una solución líquida del complejo espora cristal de *Bt*-pSTAB-*cry10A* de aproximadamente 100 µg/ml a cada envase. Se utilizó un total de 200 larvas para el bioensayo con el complejo espora cristal *Bt*-pSTAB-*cry10A* y 100 larvas para el control negativo. La mortalidad se determinó a las 24h y se realizó un análisis Probit de los resultados.

El bioensayo fino para determinar la DL50 se realizó con diluciones seriadas de 1:1 a partir de una solución de 20 µg del complejo espora-cristal *Bt*-pSTAB-*cry10A* por ml. Las larvas se prepararon según las condiciones descritas con anterioridad. Para determinar el sinergismo del complejo espora-cristal Cry10A y la proteína Cyt1A obtenida de la cepa pWF45 y facilitada al Dr. Ibarra por B.A. Federeci (Universidad de California, Riverside); se realizó un bioensayo con diluciones seriadas 1:1 a partir de la mezcla de 100ng de cada componente/ml. La mortalidad se determinó a las 24 horas y se realizó un análisis PROBIT de los resultados. La potenciación del sinergismo se calculó según la fórmula de Tabashnik (1992).

3.3 Resultados

3.3.1 Transformación y expresión de la construcción pSTAB-cry10A en la cepa acristalífera 4q7

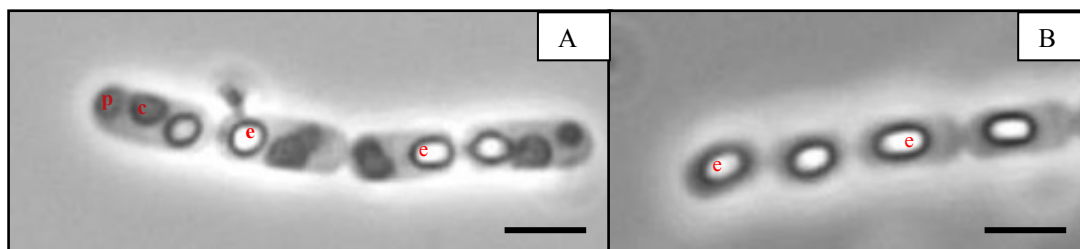


Figura III-1 Microscopía de luz a 1000 aumentos de A) *Bacillus thuringiensis* 4q7 transformado con las construcción pSTAB-cry10A y B) *B. thuringiensis* 4q7 sin transformar. Las letras indican (e)=esporas, (c) cristal redondeado y (p) cristal redondeado pequeño. Barra = 2µm.

La transformación por electroporación con la construcción pSTAB-cry10A de células acristalíferas de *Bt*-4q7, resultó en un total de 20 clones transformantes positivas, todas ellas con inclusiones celulares de morfología redondeada (Figura III-1, Figura III-2). Además, el complejo espora cristal de la cepa *Bt*-pSTAB-cry10A se observó en el microscopio electrónico de barrido, lo que confirmó la presencia de al menos dos inclusiones celulares pleomórficas redondeadas, una de mayor tamaño con respecto a la otra (Figura III-2).

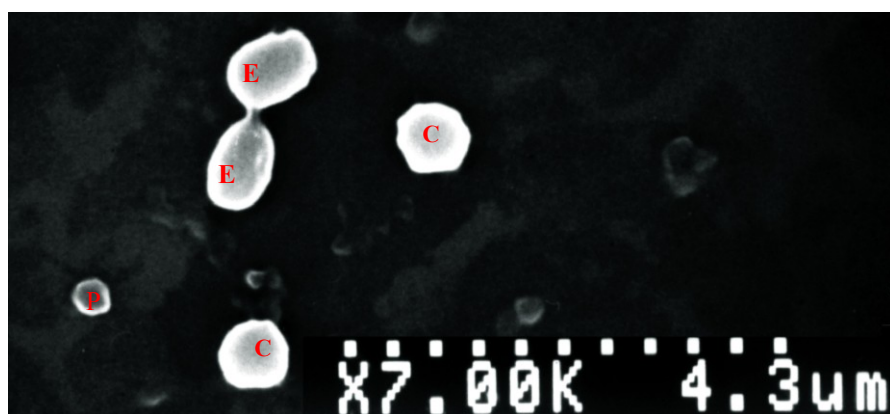


Figura III-2. Micrografía electrónica de barrido de la cepa *Bt*-pSTAB-cry10A. Las iniciales indican (E) esporas, (C) cristales redondeados y (P) cristal redondeado pequeño. Barra = 4,3µm

La amplificación y secuenciación parcial de una región conservada de 600pb del gen *cry10A*, corroboró la presencia del plásmido pSTAB-*cry10A* en las clonas transformantes. La secuencia consenso de este producto de PCR es:

ATATCCATTAGCAAATAAGCCAAATCAACCACTGAAAAACACGAATTACAAAGATTGGCTCA
ATGTGTGTCAAGATAATCAACAATATGGCAATAATGCGGGGAATTTTGCTAGTTCTGAAACTA
TTGTTGGAGTTAGTGCAGGTATTATTGTAGTAGGAAGCTATGTTAGGAGCTTTTGCTGCCCTGT
CTTAGCTGCAGGTATAATATCTTTTGGGACTTTGTTGCCGATCTTTTGCCAAGGATCTGACCCT
GCAAATGTTTGGCAGGATTTGTTAAACATCGGAGGAAGGCCTATACAAGAAATAGATAAAAA
CATAATTAATGTACTAAGTTCTATCGTAACACCTATAAAAAATCAACTTGATAAATATCAAGA
ATTTTTCGATAAATGGGAGCCAGCACGTACACACGCTAATGCTAAAGCAGTACATGATCTCTT
TACTACCTTAGAACCTATAATAGATAAAGATTTAGATATGTTAAAAAATAATGCTAGCTA

Esta secuencia alineó específicamente mediante análisis Blastn con las secuencias correspondientes al gen *cry10A* en los números de acceso AL731825.1 y M12662.1 en la base de datos del GeneBank (Fig III-3).

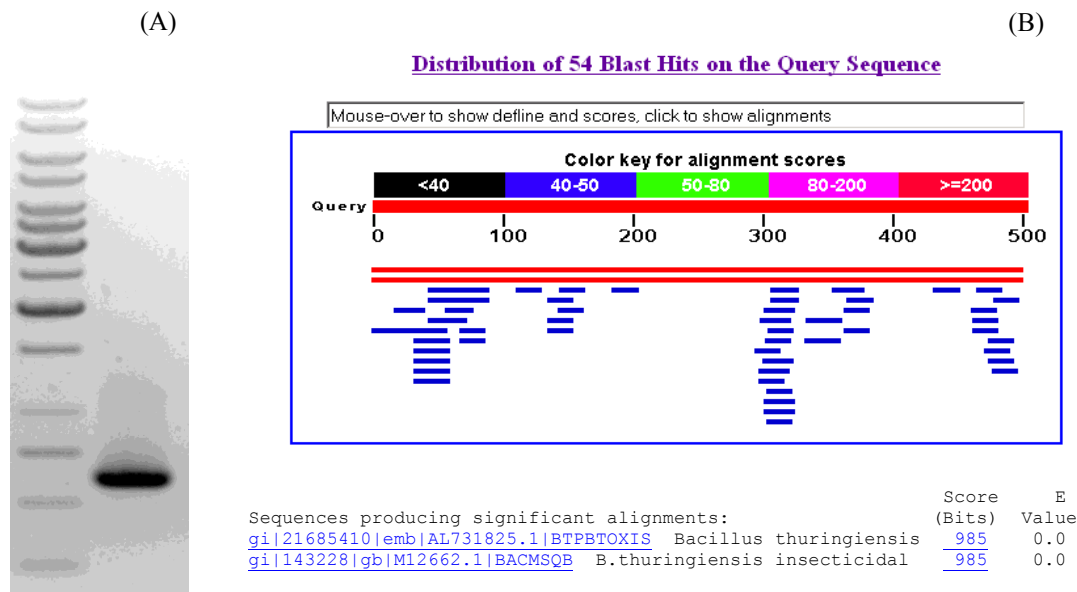


Figura III-3 Análisis mediante PCR y Blastn de una secuencia conservada del gen *cry10A* de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A*. En A) Gel de agarosa que muestra una banda de 550 bp correspondientes al producto de PCR de una región conservada del gen *cry10A* y que se secuenció. En B) el gráfico del alineamiento de esta región secuenciada, así como la descripción de los primeros dos alineamiento correspondientes a las barras de color rojo: AL731825.1 y M12662.1.

La centrifugación del complejo espора- cristal de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* en gradientes de bromuro de sodio, generó una banda a la altura de 1/3 del tubo y un precipitado en el fondo del mismo (Figura III-4a). Esta primera fase (banda) estaba constituida por cristales puros (Fig III-4b), mientras que en el precipitado se observaron esporas y cristales (Figura III-4c).

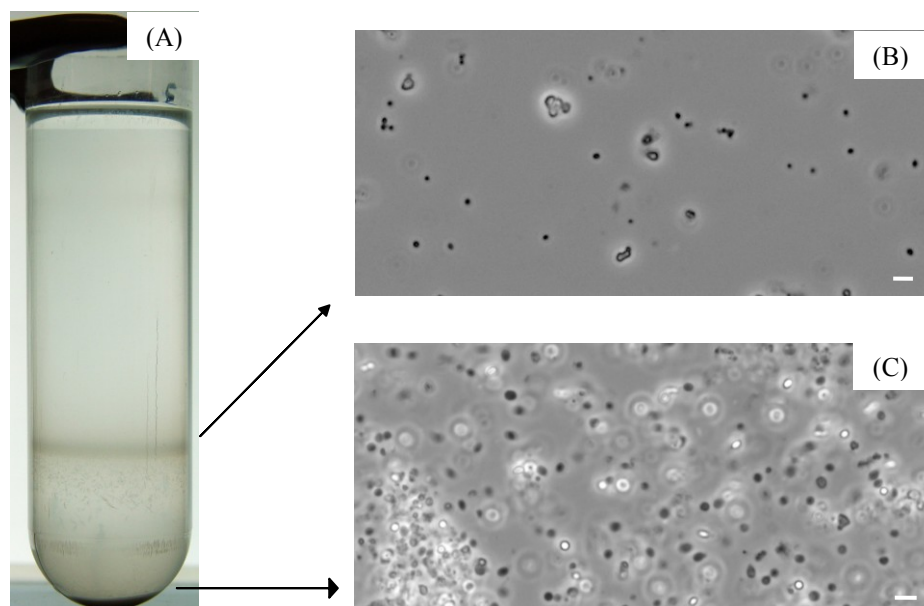


Figura III-4. Purificación de cristales Cry10A mediante centrifugación en gradientes de bromuro de sodio. En A) patrón de bandas obtenido después de la centrifugación, B) Microscopía de luz a 1000 aumentos de la banda observada a 1/3 del tubo y en c) Microscopía de luz a 1000 aumentos de precipitado obtenido después de la centrifugación. Nótese la presencia de cristales puros en (b), así como la presencia de una mezcla de esporas y cristales en (C). Barra = 2 μ m

Los cristales purificados de los gradientes de bromuro de sodio se solubilizaron de al usar el tampón con NaOH, CAPS y DTT, con lo cual se logró obtener dos bandas prominentes de proteínas en el gel de acrilamida de un peso molecular aproximado de 68kDa y 56kDa, así como una banda tenue de alrededor de 78Kda (Figura III-5, carril 1).

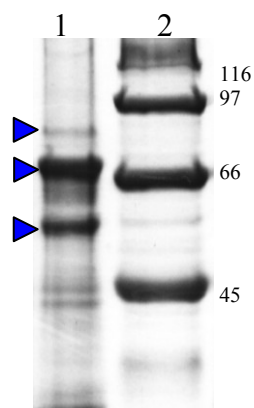


Figura III-5. Gel de poliacrilamida al 10% que muestra en el carril 1 las proteínas de *Bt-pSTAB-cry10A* solubilizado con NaOH 50mM, dtt 25mM y CAPS 50mM pH 11.5 y en carril 2 el marcador de peso molecular. Nótese las marcas de color azul que indica la presencia de tres bandas de alrededor de 78, 68 y 56 kDa.

El análisis de MALDI-TOF-MS de las proteínas aisladas del SDS-PAGE, reveló que la proteína de un peso aproximado de 68kDa corresponde al ORF1 del gen *cry10A* cuyo número de acceso es Gi: 117329, mientras que la proteína de un peso aproximado de 56kDa corresponde al ORF2, número de acceso Gi: 21685445 (Tabla III-1).

Tabla III-1 Secuenciación de las proteínas purificadas del gel de acrilamida al 10% a partir de cristales puros de la cepa pSTAB-*cry10A* por MALDI-TOF-MS.

Muestra	Patrón de aminoácidos desplegado por MALDI-TOF-MS	Identificación
Primer banda de 68Kda	SNNYSRYP LANKPNQPLK	Gi117329, P0966, CAD 30098.1 (ORF1 de Cry10A)
	ELIREVYTNV NSDTFRITTE LENGLTR	
	FPFYRNKPID KVEIVR	
	TDNYI FSVVR	
	FLKNVSR;	
	IRYATNAP KTTVELTGID TISVELPSTTSRONPNATDL TYADFGYVTFPR	
Segunda banda de 56kDa	LMLWDQVK	Gi 21685445, CAD 30099.1 (ORF2 de Cry10A)
	GNYLNISGAR	
	GFVGSSKDVELVVS	
	DVELVVS	
	QIVCQDSHQFK	
	RSETQQAYVAK	
	YLYDTR	

3.3.2 Análisis de la estabilidad del RNAm del gen *cry10A*

El análisis de las estructuras del extremo 5' y 3' del RNAm correspondientes al gen *cry10A* silvestre (ORF1+GAP+ORF2); y a los extremos 3' del RNAm correspondiente a las secuencias de DNA utilizadas por Hughes *et al.* (2005) (ORF1) y a Thorne *et al.* (1988) (ORF1-GAP-parte del ORF2), reveló que el extremo 5' forma una estructura estable de -22,92 kcal, y que existen diferencias con respecto a la estabilidad de los extremos 3'. El extremo 3' del RNAm de *cry10A* silvestre (ORF1+GAP+ORF2) tiene una estabilidad de -23,48 kcal, mientras que el de Hughes *et al.* (2005) (ORF1) es de -9,39 kcal y el de Thorne *et al.* (1988) (ORF1-GAP-parte del ORF2) de -16.62 kcal (Tabla III-2). Las estructuras 2D se describen en las figuras III-6, III-7 y III-8.

Tabla III-2 Apareamiento y estabilidad de los RNAm correspondientes al ORF1, ORF2 y la secuencia silvestre del gen *cry10A* (ORF1-GAP-ORF2), determinados mediante cálculos *in silico*.

Extremos del RNAm	Apareamientos				Estabilidad kcal	
	GC	AU	GU	Total	30°C	37°C
Extremo 5' <i>cry10A</i> silvestre	11	22	3	36	-28.68	-22.92
Extremo 3' <i>cry10A</i> de Hughes*	7	19	3	29	-13.98	-9,39
Extremo 3' <i>cry10A</i> de Thorne**	11	20	4	35	-22.08	-16.62
Extremo 3' <i>cry10A</i> silvestre	7	25	8	40	-29.82	-23.48

* Thorne *et al.*, 1988

** Hughes *et al.*, 2005

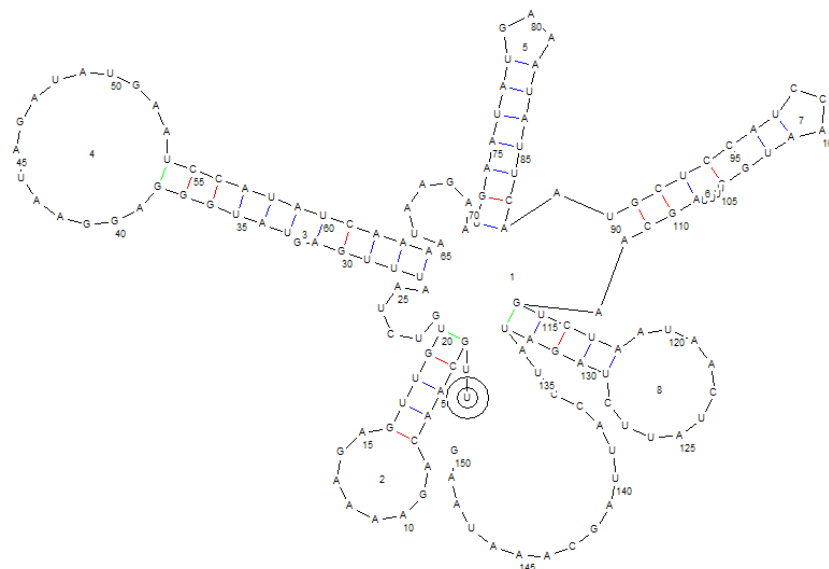


Figura III-6. Posible estructura 2D del extremo 5' del RNAm generado a partir del gen *cry10A* silvestre según análisis *in silico* realizados con el programa RNAdraw v1.1, con una estabilidad de -22.92 kcal a 37°C.

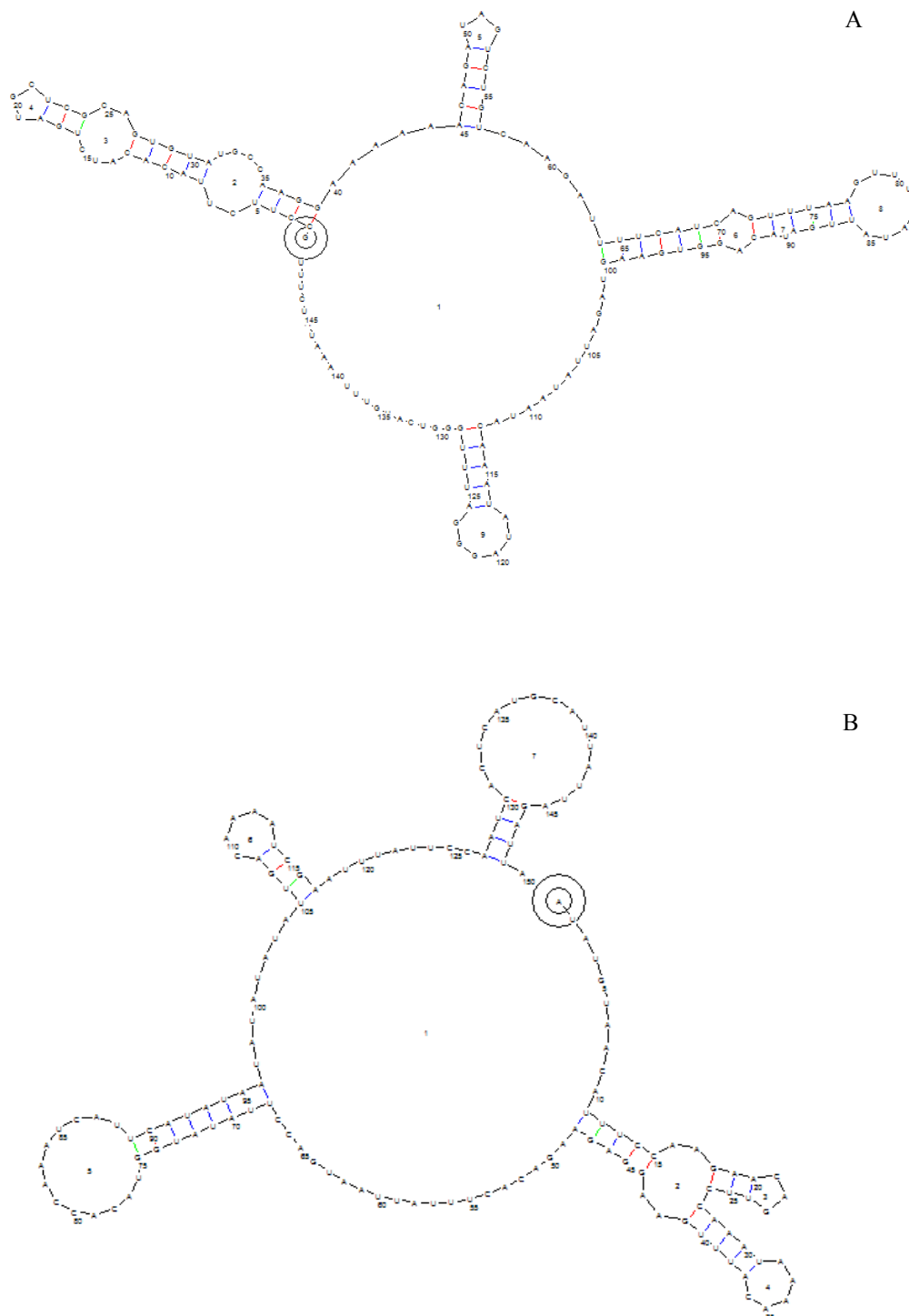


Figura III-7. Posible estructura 2D del RNAm generado a partir del: A) extremo 3' de la secuencia del gen *cry10* utilizada por Thorne *et al.* (1988) (ORF1-GAP-parte del ORF2) con una estabilidad de -16.62 y B) la secuencia del gen *cry10* utilizada por Hughes *et al.* (2005) (ORF1) con una estabilidad de -9,39 kcal. El análisis se realizó *in silico* con el programa RNAdraw v1.1 utilizando como temperatura 37°C.

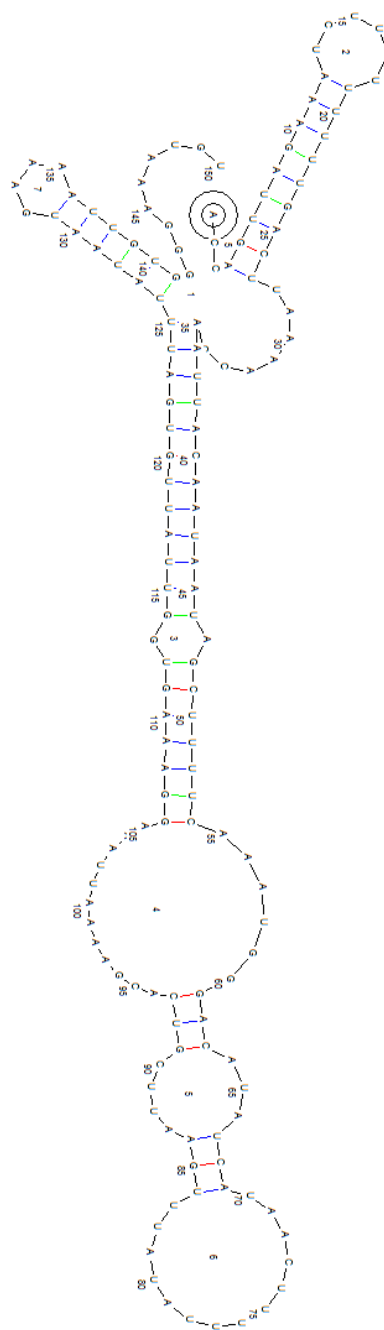


Figura III-8. Posible estructura 2D del RNAm generado a partir del extremo 3' del gen silvestre *cry10A* (ORF1,GAP, ORF2) según análisis *in silico* realizados con el programa RNAdraw v1.1, con una estabilidad de -23.48 kcal a 37°C.

3.3.3 Bioensayos con *A. aegypti*



Figura III-9 Bioensayos burdos de *A. aegypti* con *Bt-pSTAB-cry10A*. En A) larva necrosada de 24 horas que se alimentó con el complejo espора cristal y en B) larva control.

El bioensayo burdo con larvas de *Aedes aegypti* demostró que el complejo espора-cristal de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* presentó toxicidad frente a este insecto (Figura III-9.). La mortalidad fue del 70% a las 24 horas y del 90% a las 48 horas a una concentración aproximada de 100µg/ml (Tabla III-3).

Tabla III-3 Bioensayo burdo del complejo espора-cristal de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* con larvas del cuarto instar de *Aedes aegypti* (mosquitos) a una concentración aproximada de 100 µg/ml.

Tratamientos	24 horas			48 horas		
	Tratados	Muertos	Mortalidad %	Tratados	Muertos	Mortalidad %
Bioensayo repetición 1	20	17	85	20	19	95
Bioensayo repetición 2	20	14	70	20	17	85
Bioensayo repetición 3	20	13	65	20	18	90
Bioensayo repetición 4	20	14	70	20	18	90
Bioensayo repetición 5	20	15	75	20	19	95
Bioensayo repetición 6	20	13	65	20	18	90
Total	120	86	71.66± 3,07			90.8± 3,7
Control Repetición 1	20	0	0	20	0	0
Control Repetición 2	20	0	0	20	0	0
Control Repetición 3	20	0	0	20	0	0
Total	60	0	0	60	0	0

Tabla III-4 Bioensayo global fino (3 repeticiones) del complejo espora-cristal de la cepa *Bt*-pSTAB-*cry10A* con larvas del cuarto instar de *Aedes aegypti* determinados a las 24h

Bioensayo	Dosis (µg/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	Mortalidad corregida	CL 50 (µg/ml)	Límites Fiduciales	CL 95 (µg/ml)	Límites Fiduciales
1	20	60	50	83,3	83,0				
2	10	60	47	78,3	77,9				
3	5	58	36	62,1	61,4				
4	2,5	60	37	61,6	61,0	2,061	1,451-2,927	75,489	30,248-188,393
5	1,25	56	25	44,6	43,7				
6	0,625	56	14	25	23,7				
Control	0	60	0	0	0				

El bioensayo fino permitió el cálculo de la DL_{50} con un valor de 2,061µg/ml, así como la DL_{95} con un valor de 75,489 µg/ml (Tabla III-4). De manera similar, el bioensayo fino que se realizó con la mezcla Cry10A-Cyt1Aa, permitió el cálculo de la DL_{50} con un valor de 40,909ng de cada componente/ml; mientras que la DL_{95} calculada fue de 121,2 ng/ml (Tabla III-5).

Tabla III-5 Bioensayo fino global (3 repeticiones) de la mezcla de complejo espora-cristal de la cepa *Bt*-pSTAB-*cry10A*- cristal Cyt (1:1), con larvas del cuarto instar de *Aedes aegypti* determinado a las 24h.

Bioensayo	Dosis (ng/ml)	Tratados	Muertos	Mortalidad %	DL_{50}	Límites Fiduciales	DL_{95}	Límites Fiduciales
1	100	60	55	91,6				
2	65	60	48	80				
	42,25	60	29	48,3	40,909	36,831-45611	121,247	99,732-158,253
4	27,4625	60	12	20				
5	17,850625	60	9	15				
6	11,6029063	60	2	3,3				
Control	0	60	0	0				

La DL_{50} del complejo espora cristal Cry10A de 2 µg/ml obtenida en la presente investigación es aún mejor que la reportada para Cry4A (23µg/ml) y Cry11 (4,34µg/ml) por otros autores (Tabla III-6). Además, la toxicidad alcanzada por el sinergismo Cry10A-Cyt1Aa de 40,9ng, es casi el doble de lo reportado para el complejo espora cristal de la cepa *Bti* (22,3ng) (Tabla III-5 y Tabla III-6).

Tabla III 6 Toxicidades reportadas por distintos autores de las proteínas de *Bti* con larvas del cuarto instar de *Aedes aegypti* a las 24h

Tratamientos	LC ₅₀	LC ₉₅	Referencia
Cry4A (espora-cristal)	28,0µg/ml	906 µg/ml	Wirth <i>et al.</i> , 2004
Cry11 (espora-cristal)	4,34 µg/ml	52,2 µg/ml	Wirth <i>et al.</i> , 2004
Cry11 (cristal)	0,235µg/ml	-	Bravo, 2005
Cyt (cristal)	1,86 µg/ml	36,5 µg/ml	Wirth <i>et al.</i> , 2000
Cyt (cristal)	1,244 µg/ml	-	Bravo, 2005
Cyt (cristal)	0,732 µg/ml	-	Ibarra, 2006 (datos no publicados)
<i>Bti</i> (espora-cristal)	0,0223 µg/ml	0,138 µg/ml	Wirth <i>et al.</i> , 2004
<i>Bti</i> (cristal puro)	0,00019 µg/ml	0,0017 µg/ml	Tyrell <i>et al.</i> , 1979

El aumento de la toxicidad del complejo espora cristal Cry10A generado al adicionar cristales Cyt1Aa, o potenciación, según la fórmula de Tabashnick es de 13,3. La DL₅₀ de los cristales Cyt1Aa puros fue facilitada por el Dr. Ibarra con un valor de 739,29ng/ml. La ecuación se describe a continuación:

$$DL_{50(m)} = \left[\frac{r_a}{DL_{50(a)}} + \frac{r_b}{DL_{50(b)}} \right]^{-1}$$

a: Cry10WT (espora-cristal), *b*: Cyt1A (cristales puros)

$$DL_{50(m)} = \left[\frac{0.5}{2\,061} + \frac{0.5}{739.294} \right]^{-1}$$

$$DL_{50(m)} = \left[0.0009189216 \right]^{-1}$$

$$DL_{50(esperada)} = 1088.232117$$

$$DL_{50(estimada)} = 81.819$$

$$\text{Potenciación} = 13.3$$

3.4 Discusión

La cepa *Bti* presenta inclusiones paraesporales con un arsenal de proteínas bioinsecticidas: Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11 y Cyt. La proteína Cry10A tiene una concentración mínima en este cristal paraesporal, mientras que su clonación en distintos sistemas tiene una expresión baja, según varios autores (Thorne *et al.*, 1986; Delecluse *et al.*, 1988; Garduno *et al.*, 1988). De igual manera no se había logrado a la fecha, la cristalización de la proteína y se creía que la toxicidad ante *A. aegypti* era baja (Thorne *et al.*, 1986; Delecluse *et al.*, 1988; Garduno *et al.*, 1988). La presente investigación permitió aislar, expresar y cristalizar las proteínas codificadas por los dos ORF del gen *cry10A* en la cepa acristalífera de *Bt-4q7*. Además, se demostró la cristalización de estas dos proteínas, así como su toxicidad contra *A. aegypti* con una DL₅₀ de 2 µg/ml. También se encontró que Cry10A actúa en forma sinérgica con Cyt1Aa potenciando la toxicidad 13,3 veces contra *Aedes aegypti* con una DL₅₀ conjunta de 40ng/ml.

La expresión de un gen se ve afectada por la eficiencia de transcripción, traducción y por la estabilidad de su respectivo RNAm (Grunberg, 1999). En los genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* se conocen dos mecanismos de estabilidad del RNAm, la secuencia UTR (untranslated region, o regiones no traducibles) 5' estabilizadora Shine Dalgarno (STAB-SD) de los genes *cry3*, y los extremos traducibles 3' TGGTGTAAATGAAAAACGGACATCACCTCCATTGAAACGGAGTGATGTCCGTT T de diversos genes *cry* (Wong y Chang, 1986). La secuencia 5' STAB-SD es una región no traducible localizada en la posición 139 río arriba del ATG que permite la unión del ARNm a la subunidad 16S del ribosoma. Mientras que los extremos traducibles 3' tienen la capacidad de formar horquillas que evitan la actividad de exoribonucleasas 3-5 conocidas como PNPasas (del inglés polynucleotide phosphorylase), lo que aumenta la vida media del RNAm en el citoplasma (Glatron y Rapoport, 1972; Wong y Chang, 1986). Los mecanismos de estabilidad de RNAm son más importantes en *Bacillus* en comparación con *E. coli*, puesto que las PNPasas de *Bacillus* actúan en menor grado sobre RNAm con estructuras secundarias complejas tanto *in vitro* como *in vivo* (Condon, 2003).

El presente trabajo planteó dos estrategias para aumentar la estabilidad del RNAm. La primera es la adición de la región STAB-SD mediante el uso del vector pSTAB (Park *et al.*, 1999), mientras que la segunda se basó en añadir las secuencias correspondientes al ORF2 con lo cual se aumenta la estabilidad, aunque mediante un mecanismo distinto al descrito por Wong y Chang (1986) para el gen *cry1A*. Según nuestro análisis *in silico* de la estructura 2D del extremo 3' terminal del RNAm del ORF1-GAP-ORF2, se presenta un aumento de 14,09 kcal y 6,86 kcal en la estabilidad de dicho RNAm, en comparación con los RNAm de las secuencias utilizadas por Hughes *et al.* (2005) y por Thorne *et al.* (1988); esto a pesar de que no existen secuencias homólogas a las descritas por Wong y Chang (1986). La menor estabilidad del ARNm de la secuencia utilizada por Hughes *et al.* (2005), explicaría la ausencia de cristales descrita por estos autores, en donde se clonó únicamente el ORF1 (sin el ORF2) en el mismo vector usado en esta investigación (pSTAB). Ambas estrategias permitieron incrementar la expresión de las proteínas correspondientes al gen *cry10A*, lo que posiblemente favoreció la formación de cristales. El mecanismo de estabilidad del RNAm descrito en el presente trabajo podría presentarse para otros genes *cry*, como Cry39A, Cry40A y Cry43A.

La morfología de las inclusiones paraesporales de *Bt* puede ser muy variable en la cantidad, tamaño y morfología. En el caso de la cepa *Bti*, se han relacionado las proteínas Cry4A, Cry4B y Cyt con inclusiones amorfas y cristales compuestos (Federeci *et al.*, 1990), mientras que la Cry11 con inclusiones en forma de barra (Ibarra y Federeci, 1986). En esta investigación se demostró la presencia de dos cristales pleomórficos redondeados de diferente tamaño en la cepa *Bt*-pSTAB-*cry10A*. Esta morfología podría relacionarse con las inclusiones amorfas Cry4A y Cry4B, en especial si se considera la similaridad que existe entre estas proteínas y Cry10A (Capítulo I). Cabe destacar, que se desconoce si las inclusiones son producto de la cristalización de cada proteína por separado (ORF1, ORF2), o bien de la mezcla de los mismos. Sin embargo, la necesidad de condiciones alcalinas y el agente reductor DTT para disolver los cristales Cry10A, sugiere que ambas proteínas podrían estar mezcladas. Es posible que las cisteínas presentes en el ORF2 permitan el establecimiento de enlaces disulfuro entre proteínas de su misma naturaleza y con proteínas del ORF1. Este tipo de enlaces se pueden romper en condiciones

reductoras y alcalinas, solubilizando así la proteína (Couche *et al.*, 1987; Bietlot *et al.*, 1990). Por el contrario, el ORF1 no presenta esta condición, esto significa que de formar un cristal separado del ORF2, teóricamente no debería de presentarse baja solubilidad, en especial si se considera que otras proteínas truncadas como la Cry3 se solubilizan con facilidad.

El peso molecular de las proteínas observadas en el SDS-PAGE confirmó que la proteína de 78KDa corresponde a la protoxina derivada del ORF1 de Cry10A; mientras que la secuenciación confirmó que la proteína de 68Kda corresponde a la δ -endotoxina activada por proteólisis, mientras que la de 56Kda es la proteína derivada del ORF2. La baja concentración de la proteína de 78Kda, es probablemente resultado de la conversión de protoxina a toxina mediante proteólisis durante la solubilización del cristal (Koni y Ellar, 1994), convirtiéndola en la forma activa de 68kDa. En contraste, otros autores reportaron una forma proteolítica de 58 y 60kDa para la proteína derivada del ORF1 (Delecluse *et al.*, 1988). La protoxina de 78kDa no había sido descrita anteriormente.

El bioensayo con el complejo espora-cristal contra *A. aegypti* presentó una DL_{50} de 2 μ g/ml, lo cual contrasta con la baja toxicidad reportada por Delecluse y colaboradores (1988), que observó una toxicidad del 10% a las 24h al usar un cultivo concentrado de *E.coli*. La alta toxicidad que se obtuvo en este trabajo, puede atribuirse a la alta expresión y cristalización de Cry10A, en contraposición con los bajos niveles de expresión indicados por los autores anteriormente mencionados. La toxicidad es aún mayor que la reportada para Cry11 y Cry4A, lo cual podría permitir la elaboración de nuevas estrategias de control biológico de *A. aegypti* mediante el uso de Cry10A.

Por otra parte, las proteínas Cyt1Aa tienen la característica de hacer sinergismo con proteínas Cry de *Bti* como Cry4A, Cry4B y Cry11 (Butko, 2003), y antagonismo con la Cry1Ac (del Rincón *et al.*, 1999). Este efecto ya ha sido determinado contra *A. aegypti* y *Culex* y es una de las razones por las cuales no existe a la fecha, ningún reporte de resistencia contra *Bti* a pesar de su uso frecuente en control biológico de mosquitos. En el caso del complejo espora cristal Cry10A, existe una potenciación de 13,3 con cristales Cyt1Aa, lo cual es elevada, y probablemente será mayor con cristales puros Cry10A. Esto sugiere un potencial hasta la fecha no descubierto para Cry10A y un comportamiento

similar y/o mejor que la potenciación de 18,5 reportada por Bravo para cristales puros Cry11-Cyt1Aa. El mecanismo de sinergismo de Cyt1Aa con Cry10A podría ser similar a lo reportado por Pérez *et al.* (2005) para Cry11-Cyt1A. Según Pérez *et al.* (2005), existe una interacción específica entre los aminoácidos K198, E204 y K225 de Cyt, con los aminoácidos S259 y E266 de Cry11 funcionando como un receptor. Esta hipótesis es además, similar a lo postulado por Wirth *et al.* (1997) en donde Cyt es un facilitador de la unión y/o inserción de las toxinas Cry en la membrana microviliar. Es posible que Cry10A presente algún tipo de interacción similar a la descrita por Pérez *et al.* (2005). Las relaciones de Cry10A son aún más interesantes, pues se conoce que Cry10A es sinérgico con Cry4B contra *Culex pipiens* (Delecluse *et al.*, 1993). Estas dos actividades de sinergismo plantean que Cry10A podría tener un elevado potencial todavía inexplorado, tanto de estudio como de acción contra mosquitos.

3.5 Bibliografía

- Ang, B.; Nickerson, W. 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 625-626.
- Angsuthanasombat, C.; Crickmore, N.; Ellar, D. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 94: 63-68
- Bielotlot, H.; Vishnubhatla, I.; Carey, P.; Pozsgay, M. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 267: 309-315.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2415-2422.
- Chang, C.; Man, Y.; Dai, S.; Law, S.; Gill, S. 1993. High-Level *cryIVD* and *cytA* Gene Expression in *Bacillus thuringiensis* Does Not Require the 20-Kilodalton Protein, and the Coexpressed Gene Products Are Synergistic in Their Toxicity to Mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 815-821.
- Condon, C. 2003. RNA Processing and Degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 67: 157-174.

- Couche, G.; Pfannenstiel, M.; Nickerson, K. 1987. Structural disulphide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Protein Crystal. *Journal of Bacteriology*. 169: 3281-3288.
- Delecluse, A.; Bourgouin, C; Klier, A; Rapoport, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics*. 214: 42-47.
- Delecluse, A.; Poncet, S; Klier, A; Rapoport, G. 1993. Expression of *cry4A* and *cry4B* genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3922-3927.
- Del Rincón, C.; Huerta, B.; Ibarra, J. 1999. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2049–2053.
- Federeci, B.; Lüti, P.; Ibarra, J. 1990. The parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: structure, protein, composition and toxicity. In: de Barjac, H and Sutherland, S. Bacterial control of mosquito and blackflies: biochemistry, genetics and application of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press. New Brunswick, NJ. 16-44p.
- Garduno, F.; Thorne, A.; Walfield, M; Pollock, T.J. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 277-279.
- Glatron, M.; Rapoport, G. 1972. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. *Biochimie*. 54: 1291–1301.
- Gibbons, R.; Vaughn, D. 2002. Dengue: an escalating problem. *British Medical Journal*. 324: 1563-1566.
- Gubler, D. 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*. 10: 100-103.
- Gubler, D. 2005. The emergence of Epidemic Dengue Fever and Hemorrhagic Fever in the Americas: A case of failed Public Health policy. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 17: 225-229.
- Guzmán, M.; Kourí, G. 1996. Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3: 621–627.
- Grunberg, M. 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annual Review Genetics*. 33: 193–227
- Hughes, P.; Stevens, M.; Park, H.; Federici, B.; Dennis, E.; Akhurst, R. 2005. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus*

- thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 34–39.
- Ibarra, J.; Federeci, B. 1986. Isolation of a Relatively Nontoxic 65-Kilodalton Protein Inclusion from the Parasporal Body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology*. 165: 527-533.
- Koni, P.; Ellar, D. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic deltaendotoxins. *Microbiology*. 140: 1869-1880.
- Lereclus, D.; Arantes, O.; Chaufax, J.; Lecadet, M. 1989. Transformation of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEM Microbiology Letters*. 60: 211-218.
- McLaughlin, R.; Dulmage, H; Alls, R; Couch, T; Dame, D; Hall, J; Rose, R; Versoi, P. 1983. U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Bulletin of Entomology Society of the Americas*. 30: 26-29.
- Park, H.; Bideshi, D.; Johnson, J.; Federeci, B. 1999. Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 181: 319-327.
- Pérez, C.; Fernandez, L.; Sun, J.; Folch, J.; Gill, S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 18303–18308.
- Porcar, M.; Juarez, V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Reviews*. 26: 419-432.
- Sardelis, M.; Turell, M.; Dohm, D.; O'Guinn, M. 2001. Vector Competence of Selected North American *Culex* and *Coquillettidia* Mosquitoes for *West Nile Virus*. *Emerging Infectious Diseases*. 7: 1018-1022.
- Shiff, C. 2002. Integrated Approach to Malaria Control. *Clinical and Microbiology Reviews*. 15: 278–293.
- Tabashnik, B. 1992. Evaluation of Synergism among *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3343-3346.
- Thorne, L.; Garduno, F.; Thompson, T.; Decker, D.; Zounes, M.; Wild, M.; Walfield, A.; Pollock T. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. 'kurstaki' and 'israelensis'. *Journal of Bacteriology*. 166: 801-811.

- Tyrell, D.; Bulla, D.; Ramoska, W. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to Mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*. 28: 656-658.
- Wirth, M.; Georgiou, G.; Federici, B. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 10536–10540.
- Wirth, M; Federeci, B; Walton, W. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1093-1097.
- Wirth, M; Jianino, J; Federeci, B; Walton, W. 2004. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41: 935-941.
- Wong, H; Chang, S. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83: 3233–3237.
- Wu, D; Chang, F. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 190: 232–236.

CAPÍTULO IV

Susceptibilidad de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) a las proteínas Cry10A y Cyt1Aa de la cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* es altamente tóxica contra el coleóptero *Hypothenemus hampei* Ferrari conocido como “broca del café”. En la presente investigación se demuestra el efecto sinérgico del complejo espора- cristal Cry10A y Cyt1A, lo que resultó en una mortalidad del 100% de larvas de broca mediante bioensayos burdos, utilizando una concentración de 50 µg/cm². Para los bioensayos se utilizó complejo espора- cristal de una cepa recombinante de *Bt* con altos niveles del gen *cry10A*, lo que resultó en una mortalidad del 20%; mientras que los bioensayos con complejos espора- cristal Cyt1A resultaron en un 50% de mortalidad. Además, se probaron estas proteínas de manera individual y en combinación contra los coleópteros plagas de granos almacenados: *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* y *Prostephanus*, lo que resultó en una mortalidad nula. Se sugiere que las diferencias en el pH y las enzimas presentes en el intestino medio de la broca en comparación con estos últimos coleópteros, podrían explicar las diferencias observadas en la toxicidad. Los genes *cry10A* y *cyt1Aa* podrían utilizarse en el futuro desarrollo de plantas de café genéticamente modificadas para conferir resistencia a la broca del café.

Palabras clave: Cry10A, Cyt1A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Hypothenemus hampei*, sinergismo.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis serovar *israelensis* is highly toxic against the coleopteran *Hypothenemus hampei* Ferrari known as coffee berry borer (CBB). Here we report synergic effect of Cry10A and Cyt1A spore-crystal suspension, resulting in 100% mortality of CBB larvae in coarse bioassays, at a 50 µg/cm² concentration. We used a spore-crystal suspension of a recombinant *Bt* expressing high amount of *cry10A* gene in coarse bioassays against CBB resulting in 21% of mortality; while bioassays with Cyt resulted in 50%. We also tested the same proteins against the coleopterans *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* and *Prostephanus*, important pest of grains, resulting in null toxicity for both proteins. We suggest the pH and enzyme content in the midgut of CBB differs from those coleopterans evaluated and could explain differences in toxicity observed. The *cry10A* and *cyt1A* genes could be used in the future development of genetically modified coffee plants, to confer resistance to CBB.

Key words: Cry10A, Cyt1A, *Bacillus thuringiensis israelensis*, *Hypothenemus hampei*, synergism.

4.1 Introducción

Las esporas y cristales de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se utilizan para el control de insectos plaga mediante la formulación de bioinsecticidas (Aronson, 1994). Así mismo, los genes que codifican las proteínas insecticidas (genes *cry*) son útiles para desarrollar, mediante ingeniería genética, variedades resistentes a insectos (Shelton *et al.*, 2002).

Actualmente existe interés en estudiar genes *cry* que codifican para proteínas útiles para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), con el fin de utilizarlos para conferir resistencia a la planta del café mediante ingeniería genética. La broca es la plaga de mayor interés económico en el cultivo del café, puede ocasionar pérdidas hasta del 80% de la cosecha y las medidas de control que existen son ineficientes debido a la naturaleza del insecto de llevar a cabo la mayor parte de su ciclo de vida en el interior del grano (Le pelley, 1968; Guharay y Monterrey, 1997).

La cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* (*Bti*) es altamente tóxica contra larvas de la *H. hampei* (López *et. al*, 2003). Esta cepa es ampliamente conocida por su efecto tóxico contra mosquitos y se caracteriza por formar una cristal paresporal bioinsecticida con las proteínas Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11 y Cyt. Se cree que al proteína Cry10A tiene relación con la toxicidad contra *H. hampei*, debido a que en bioensayos preliminares el resto de las δ -endotoxinas de la cepa *Bti* resultaron en niveles bajos o nulos de toxicidad contra este insecto (Datos no publicados). Además, se tuvo como hipótesis que la proteína citolítica de *Bti* (Cyt1A) podría estar involucrada debido a que existen reportes de su toxicidad contra al menos un coleóptero (Federici y Bauer, 1998).

El gen *cry10A* dispone de dos marcos abiertos de lectura que se traducen como una protoxina de 78Kda (ORF1) y una proteína correspondiente al extremo carboxilo terminal de 56 kDa (ORF2) (Capítulo III de la presente Tesis). Además, Garduno *et al.* (1988) demostraron la presencia de la proteína Cry10A en las inclusiones cristalinas de la cepa *Bti*, lo cual sugiere que dicha proteína podría estar involucrada en la actividad insecticida de la *Bti* contra *H. hampei*. Lo anterior se contrapone a autores que consideran

que el gen *cry10A* es críptico (no se expresa) (Rajamohan *et al.*, 1998), en cuyo caso no tendría relación con la toxicidad contra *H. hampei*.

Por otra parte, Cyt1A es tóxica contra los dípteros *Aedes aegypti*, *Anopheles spp.*, *Culex* y el coleóptero *Chrysomelida scripta*. Además, esta proteína actúa en forma sinérgica con las δ -endotoxinas de *Bti*, esto significa que la toxicidad de Cyt en combinación con las proteínas Cry4A, Cry4B y Cry11, es mayor que la suma de sus toxicidades individuales (Tabashnick, 1992). En el presente trabajo se analiza el efecto individual de Cyt1Aa, de Cry10A y el efecto sinérgico de ambas contra *H. hampei*. Además, se evalúan los coleópteros *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* y *Prostephanus* mediante bioensayos burdos con el fin de determinar si el efecto bioinsecticida es de amplio espectro.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Cepas y vectores

Se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* del *Bacillus* Stock Center de la Universidad estatal de Ohio, Columbus, OH, USA como control positivo para los bioensayos. Además, se utilizó la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* generada por Hernández en la presente tesis, así como la cepa pWF45 que expresa la proteína Cyt1A y facilitado por el Dr. Brian Federeci (Universidad de California, Riverside) al Dr. Jorge Ibarra.

4.2.2 Preparación de complejo espora-cristal *Bt-pSTAB-cry10A*

La cepa *Bt-pSTAB-cry10A* se cultivó en medio líquido SP hasta alcanzar la autólisis (96 horas a 28°C, 240 rpm). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos y se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril bajo las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente, se resuspendió en 2 ml de agua desionizada estéril y se liofilizó por 48 h. La presencia de cristales se determinó mediante el uso de un microscopio de contraste de fases a las 24 y 48 horas de cultivo en medio sólido SP.

4.2.3 Bioensayos burdos con broca del café (*Hypothenemus hampei*)

Los bioensayos burdos para *H. hampei* se hicieron con 50 µg de complejo espora-cristal por cm² de dieta. La dieta artificial para broca se conoce como “CENIBROCA” y cada litro está compuesto de 15 g de agar, 750 ml de agua destilada, 15 g de caseína, 15 g de levadura, 15 g de levadura de torula, 2 g de benzoato de sodio, 2 ml de formaldehído al 37%, 10 g de sacarosa, 120 g de café oro sin tostar en polvo, 10 ml de etanol al 90%, 0.5 g de vitaminas Vanderzant, 0.8 g de sales de Wenson y 1 g de fungicida Benomil®. Para el bioensayo se colocaron 10 larvas de primer instar de *H. hampei* en cada celda de platos multipozo, y al menos tres repeticiones por cada bioensayo. Se determinó el efecto de los complejos espora-cristal Cry10A; cristales Cyt1A y de la mezcla Cry10A-Cyt1A. Este último bioensayo se realizó con 50 µg de Cry10A y 50 µg de Cyt1A. La mortalidad se determinó a los 7 días y se realizó un análisis PROBIT de los resultados.

4.2.4 Bioensayos burdos con *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillulus* y *Prostephanus*

Los bioensayos burdos para *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillulus* y *Prostephanus* se hicieron con 1 µg de complejo espora-cristal por miligramo de harina de trigo los dos primeros y harina de maíz para *Prostephanus*. Para ello, se pesó 1,6 mg de complejo espora cristal, se añadió 100 µl de colorante vegetal verde y se hizo una mezcla homogénea. Posteriormente, se añadió a 1,6 g de harina a la mezcla de espora-cristal-colorante, se maceró hasta alcanzar una consistencia homogénea y se colocó un total de 250 mg de esta dieta en tubos Eppendorf de 1,5 ml. En cada tubo se colocaron 10 larvas del primer instar de cada coleóptero y el bioensayo se determinó a los 7 días. El control positivo se realizó de igual manera, sin el complejo espora cristal.

4.3 Resultados

4.3.1 Bioensayos con *H. hampei*

El bioensayo burdo con larvas del primer instar de *H. hampei* demostró que el complejo espora-cristal de la cepa *Bt-pSTAB-cry10A* presentó una mortalidad de 21% al utilizar una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura IV-1; Tabla IV-1). Las larvas que murieron presentaron necrosamiento y un menor tamaño comparado con el control (Figura IV-1), posible indicio de la acción temprana de la toxina. Además, las larvas que no murieron presentaron en su mayoría una disminución de tamaño. Por otra parte, el bioensayo con el complejo espora cristal Cyt1A resultó en una mortalidad del 50% (Tabla IV-2), de manera similar, las larvas muertas presentaron un menor tamaño y necrosis.



Figura IV-1. Larvas de *Hypothenemus hampei*, 7 días después de iniciado el bioensayo con el complejo espora-cristal *Bt-pSTAB-cry10A*. En A) el control negativo y en B) larva expuesta a *Bt-pSTAB-cry10A* a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La escala de cada recuadro equivale a 1mm².

Tabla IV- 1 Bioensayo del complejo espora-cristal de la cepa *Bt*-pSTAB-*cry10A* con larvas del primer instar de *Hypothenemus hampei* al usar una dosis de 50 µg/cm² y determinado a los 7 días.

Tratamientos	Tratados	Muertos	Mortalidad %
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Complejo espora cristal Cry10A	10	3	30
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Complejo espora cristal Cry10A	10	2	20
Total	70	15	21%
Control negativo Repetición 1	10	0	0%
Control negativo Repetición 2	10	0	0%
Control negativo Repetición 3	10	0	0%
Control negativo Repetición 4	10	1	10%
Total	40	1	2,5%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 1	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 2	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 3	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 4	10	10	100%
Total	20	20	100%

Tabla IV- 2 Bioensayo del complejo espora-cristal de la cepa *Bt*-Cyt con larvas del primer instar de *Hypothenemus hampei* al usar una dosis de 50 µg/cm² y determinado a los 7 días

Tratamientos	Tratados	Muertos	Mortalidad %
Complejo espora Cyt1A	10	4	40
Complejo espora Cyt1A	10	6	60
Complejo espora Cyt1A	10	5	50
Complejo espora Cyt1A	10	5	50
Total	40	20	50%
Control negativo Repetición 1	10	0	0%
Control negativo Repetición 2	10	0	0%
Control negativo Repetición 3	10	1	10%
Control negativo Repetición 4	10	1	10%
Total	40	2	5%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 1	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 2	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 3	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 4	10	10	100%
Total	40	40	100%

El bioensayo burdo con la mezcla de 50 µg/cm² del complejo espora-cristal *Bt*-pSTAB-*cry10A* y 50 µg/cm² del complejo espora cristal Cyt, con larvas del primer instar de *Hypothenemus hampei* resultó en una mortalidad del 100% (Tabla IV-3). El efecto no

es aditivo pues la suma de los componentes resultaría en un 71,5%, la mortalidad observada sobrepasa la calculada, por lo cual hay sinergismo.

Tabla IV- 3 Bioensayo de la mezcla de los complejos espora-cristal de las cepas *Bt*-pSTAB-*cry10A* y *Bt*-*Cyt* con larvas del primer instar de *Hypothenemus hampei* al usar una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y determinado a los 7 días.

Tratamientos	Tratados	Muertos	Mortalidad %
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Complejo espora cristal Cry10A+Cyt1A	10	10	100%
Total	80	80	100%
Control negativo Repetición 1	10	0	0%
Control negativo Repetición 2	10	0	0%
Control negativo Repetición 3	10	1	10%
Control negativo Repetición 4	10	1	10%
Total	40	2	5%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 1	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 2	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 3	10	10	100%
Control positivo <i>Bti</i> Repetición 4	10	9	100%
Total	40	39	97,5%

4.3.2 Bioensayos con otros coleópteros

El bioensayo burdo con larvas de *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* y con *Prostephanus* no presentó mortalidad con la Cry10A, ni con Cyt1A, y de igual manera tampoco presentó mortalidad al usar la mezcla Cry10A-Cyt1A. Los insectos alcanzaron el estadio de pupa y completaron su ciclo de vida.

4.4 Discusión

En el presente trabajo se demuestra la actividad de Cry10A contra el coleóptero *H. hampei*, con una mortalidad del 21% a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; y de Cyt con un 50%. De igual manera se reporta el sinergismo del complejo espora-cristal Cry10A con la proteína Cyt1A contra este coleóptero, con una mortalidad del 100% en bioensayos burdos. Además, se indica la ausencia de toxicidad de Cry10A y Cyt1Aa contra *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillulus* y *Prostephanus*.

El bioensayo realizado con el complejo espora-cristal Cry10A presentó un toxicidad contra *H. hampei* del 21% al utilizar una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta. El que una toxina efectiva contra *A. aegypti* (díptero) presente toxicidad contra un insecto tan distinto como *H. hampei* (coleóptero) es un evento novedoso, pues se conocen de otras toxinas Cry con efecto dual contra lepidópteros y dípteros como la Cry2, y contra lepidópteros y coleópteros como la cry1IK, pero hasta la fecha no se habían reportado toxinas con la dualidad dípteros y coleópteros. El mecanismo de acción no se tiene todavía claro y es necesario disponer de mayor información. Sin embargo, se podrían plantear que Cry10A dispone de sitios novedosos de unión a receptores del epitelio intestinal de *H. hampei*. Además, debido a que Cry10A es muy insoluble (capítulo II de la presente Tesis), se cree que una solubilización previa en condiciones alcali podría aumentar la toxicidad contra *H. hampei*.

En un principio, la toxicidad del 21% con una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Cry10A fue inesperada porque se pensó que esta toxina era la principal responsable del efecto insecticida contra *H. hampei*. La razón por la cual se planteó inicialmente esta hipótesis se debe a que ensayos preliminares indicaban que el resto de las toxinas de la cepa *Bti* no presentaban actividad (comunicación personal)². La baja toxicidad de Cry10A indicaba que el efecto bioinsecticida de la cepa nativa (*Bti*) podría ser producto de la interacción de distintas proteínas, de las cuales se postuló Cyt1A. Existen dos aspectos fundamentales a considerar y que fueron útiles para dicha postulación, la primera es el

² Ibarra, J. 2004. Bioensayos de *Hypothenemus hampei* (broca) con las proteínas de la cepa *Bti* (entrevista). Irapuato, México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV).

reconocido sinergismo de Cyt1Aa (Delecluse *et al.*, 1988; Wirth *et al.*, 1997; Wirth *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1994) y la segunda es la alta actividad de Cyt a pH ácido (Butko, 2003), situación que se presenta en el intestino medio de broca (pH entre 4,5 y 5,2) (Valencia *et al.*, 2000). Cabe destacar que Cry4A y la Cry4B no serían solubilizadas en este ambiente debido a necesidad de la ruptura de enlaces disulfuro en el extremo carboxi-terminal, que ocurre a pH alcalino (Couche *et al.*, 1987; Biełotłot *et al.*, 1990). Además, existe un precedente de la actividad de Cyt contra coleópteros (Federeci y Bauer, 1998).

Las consideraciones anteriores, plantearon la necesidad de realizar un experimento con Cyt1Aa. Los bioensayos con el complejo espora-cristal Cyt1Aa, demostraron una toxicidad del 50% en bioensayos burdos contra *H. hampei* al usar una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La mortalidad observada es similar a los resultados obtenidos por Federeci y Bauer (1998) con cristales puros no solubilizados de Cyt1Aa contra el coleóptero *C. scripta*, en donde se obtuvo una DL50 de 13,26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0,1326 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$). En este sentido, cabe mencionar que en contraposición con estos autores, en el presente estudio se utilizó complejos espora-cristal y no se solubilizó la proteína Cyt1Aa. El uso de cristales puros, así como la solubilización de los mismos probablemente aumentaría la efectividad de Cyt1Aa contra *H. hampei* al igual que lo reportado por Federeci y Bauer (1998) con *C. scripta*. Por otra parte, el comportamiento bioquímico de Cyt1Aa a distintos pH podría explicar la actividad de Cyt1Aa a un pH ácido. Se conoce que los cristales Cyt1Aa se solubilizan a un pH alcalino, sin embargo, esta toxina es altamente hidrofóbica y de mayor eficiencia en un pH ácido (Butko, 2003; Manceva *et al.*, 2004). Además, un pH muy ácido de menos de 4.3 puede ocasionar la precipitación de Cyt1Aa (Butko, 2003). Es probable que una concentración muy disminuida de proteínas Cyt1Aa se solubilicen en el pH ácido entre 4,5 y 5,2 de broca. Las proteínas que alcanzan esta condición, podrían presentar una eficiencia alta sin que se presente la precipitación, lo que explicaría, al menos en principio, la razón de la actividad de Cyt1Aa en *H. hampei*. Este mecanismo, podría ser similar en crisomélidos, donde se presenta un pH ácido entre 4.5-6.6 (Grayson, 1958), lo que quizá pueda explicar la toxicidad observada por Federeci y Bauer (1998).

Existe un aspecto que todavía no se ha considerado con respecto a la toxicidad de la cepa *Bti* contra *H. hampei* la cual radica en la probable activación de Cyt1Aa durante la solubilización de los cristales para las pruebas de bioensayos (López *et al.*, 2003). Federeci y Bauer (1998) observaron una mejor toxicidad de la proteína Cyt1Aa contra *Chrysomelida scripta* al solubilizar Cyt1Aa. Esta proteína citolítica no solo debe de ser solubilizada, sino también necesita ser activada proteolíticamente en los extremos amino y carboxi-terminal (Koni y Ellar, 1994). Este último proceso puede ser llevado a cabo por más de 10 diferentes proteasas que producen fragmentos estables y activos de 20-22,5kDa (Du *et al.*, 1999). Además, se conoce que durante la solubilización de los cristales obtenidos de *Bti*, en condiciones de laboratorio, también puede ocurrir la activación de Cyt debido a la actividad residual de proteasas presentes en los cristales (Koni y Ellar, 1994). Este fenómeno no ocurre en cristales obtenidos de *E. coli* (Promdonkoy y Ellar, 2000). Es probable que tanto Cyt1Aa como Cry10A, se activaran durante la solubilización de los cristales de *Bti* antes de ser evaluada en bioensayos contra *H. hampei*. Esto explicaría las grandes diferencias entre la DL_{50} de 210 ng/cm² de cristales puros y solubilizados de *Bti* (López *et al.*, 2003) y las mortalidades de tan solo 20 y 50% en bioensayos burdos con 50 µg/cm² de complejo espora cristal no solubilizado de Cry10A y Cyt1Aa.

La mortalidad del 50% de complejo espora-cristal Cyt1Aa en bioensayos burdos con *H. hampei* no deja de ser importante, en especial porque contrario a broca, bioensayos con los coleópteros *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* y *Prostephanus* resultaron en toxicidades nulas. La razón de la actividad de Cyt contra broca podría relacionarse con la manera inespecífica de unión de Cyt a fosfolípidos insaturados como fosfatidiletanolamina (Thomas y Ellar, 1983). Por el contrario, el modelo de acción de Cyt mediante la formación de poros catiónicos (modelo cuestionado por Butko (2003) no sería útil en *H. hampei*, ya que este tipo de estructuras se presentarían a un pH alcalino de alrededor de 9.5 (Knowles *et al.*, 1989). Ahora bien, un mecanismo de acción tan inespecífico dada la presencia de fosfolípidos insaturados, se esperaría algún grado de actividad para los otros coleópteros evaluados. Sin embargo, la ausencia de toxicidad podrían deberse a diferencias en el ambiente del intestino medio como pH y tipo de enzimas proteolíticas. Por ejemplo *T. castaneum* tiene un pH de 6,5

(Oppert *et al.*, 2003); en estas condiciones de pH cercano al neutro, la eficiencia de Cyt disminuye si se compara con uno más ácido como el de la broca (Manceva *et al.*, 2004). Cabe destacar que, el efecto bioinsecticida de Cyt no es tan inespecífico, pues no es activa contra larvas de lepidópteros (de pH alcalino) (Meyer *et al.*, 2001). Además, Cyt podría afectar microorganismos simbioses que se encuentran en *H. hampei* como la levadura *Pichia burtonii*, que se cree sintetiza enzimas útiles en la nutrición de broca (Vega *et al.*, 2003). En este sentido, se conoce que tanto Cyt como Cry4 y Cry11 tienen actividad antibacterial (Yudina *et al.*, 2003).

Ahora bien, las proteínas Cyt son sinérgicas con las δ -endotoxinas de la *Bti* como Cry4A, Cry4B y Cry11, y presentan antagonismo con la Cry1Ac (del Rincón *et al.*, 1999). Este efecto ya ha sido determinado contra *A. aegypti* y *Culex* y es una de las razones por las cuales no existe a la fecha, ningún reporte de resistencia de mosquitos contra cepas *Bti*. En la presente investigación se demostró que existe efecto sinérgico de Cyt1A con Cry10A contra el coleóptero *H. hampei*. Se desconocen los mecanismos por los cuales se presenta la acción sinérgica de Cry10A con Cyt1Aa en *H. hampei*. En otros sistemas como *A. aegypti*, se propone que Cyt1Aa podría funcionar como un receptor para las proteínas Cry11; en donde Cyt1A se une a los fosfolípidos de la membrana y facilita la interacción (Pérez *et al.*, 2005). Si este mecanismo funciona de manera similar en *H. hampei*, surge el interrogante de los aminoácidos de Cyt1A que interactúan con Cry10A ya que el pH de intestino medio de *H. hampei* es considerablemente más bajo que el de *A. aegypti*. Cabe mencionar que la toxicidad nula de Cyt1A, de Cry10A, y de la mezcla Cyt1Aa-Cry10A contra *Tribolium castaneum*, *Gnathocerus maxillusus* y *Prostephanus* sugiere que el mecanismo de acción podría ser restringido a la broca del café y quizá a especies de coleópteros que presentan un pH ácido en su tracto intestinal. Esta característica sería de gran relevancia para el desarrollo de plantas genéticamente modificadas de café, resistentes a un rango estrecho de insectos.

4.5 Bibliografía

- Aronson, A. 1994. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide. *Plant Breeding Review*. 12:19-45.
- Bielotlot, H.; Vishnubhatla, I.; Carey, P.; Pozsgay, M. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 267: 309-315.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypothesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 2415-2422.
- Couche, G.; Pfannenstiel, M.; Nickerson, K. 1987. Structural disulphide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Protein Crystal. *Journal of Bacteriology*. 169: 3281-3288.
- Delecluse, A.; Bourgouin, C.; Klier, A.; Rapoport, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics*. 214: 42-47.
- Del Rincón, C.; Huerta, B.; Ibarra, J. 1999. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2049-2053.
- Du, J.; Knowles, B.; Ellar, D. 1999. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxinsin association with a phospholipid bilayer. *Journal of Biochemistry*. 338: 185-193.
- Federeci, B.; Bauer, L. 1998. Cyt1Aa Protein of *Bacillus thuringiensis* Is Toxic to the Cottonwood Leaf Beetle, *Chrysomela scripta*, and Suppresses High Levels of Resistance to Cry3Aa. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4368-4371.
- Garduno, F.; Thorne, L.; Walfield, A.; Pollock, T. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 277-279.
- Grayson, J. 1958. Digestive tract of six species of Coleoptera. *Annual Entomological Society of America*. 51: 403-405.
- Guharay, F.; Monterrey, J. 1997. Manejo ecológico de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*) en América Central. *Manejo Integrado de Plagas: Hoja Técnica*. 22: I-VII.
- Knowles, B.; Blatt, M.; Tester, M.; Horsnell, J.; Carroll, J.; Menestrina, G.; Ellar, D. 1989. A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 244: 259-262.

- Koni, P.; Ellar, D. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta- endotoxins. *Microbiology*. 140: 1869-1880.
- Le Pelley, R.H. 1968. Pests of coffee. London, Longman. 590p.
- López, M.; Basurto, R.; Ibarra, J. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hyphotenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology letters*. 226: 73-76.
- Manceva, S.; Pusztai-Carey, M.; Butko, P. 2004. Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1A: a fluorescence spectroscopy study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1699: 123-130.
- Meyer, S.; Tabashnik, B.; Liu, Y.; Wirth, M.; Federeci, B. 2001. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Lacks Toxicity to Susceptible and Resistant Larvae of Diamondback Moth (*Plutella xylostella*) and Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 462-463.
- Oppert, B., Morgan, T.; Hartzer, K.; Lenarcic, B.; Galesa, K.; Brzin, J.; Turk, V.; Yoza, K.; Ohtsubo, K.; Kramer, K. 2003. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicol Pharmacol*. 134:481-90.
- Pérez, C.; Fernandez, L.; Sun, J.; Folch, J.; Gill, S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 18303-18308.
- Promdonkoy, B; Ellar, D. 2000 Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 350: 275-282.
- Rajamohan, F; Lee, M; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research*. 60: 1-25.
- Shelton, A; Zhao, J; Roush, R 2002. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology*. 47: 845-881.
- Tabashnick, B. 1992. Evaluation of Synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3343-3346.
- Thomas, W.; Ellar, D. 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal endotoxin. *Federation of European Biochemical Societies letters*. 154: 362-368

- Valencia, A.; Bustillo, A.; Ossa, G.; Chrispeels, M. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 207–213.
- Vega, F.E., Dowd, P.F., Blackburn, M.B., Kurtzman, C.P. 2003. Possible Degradative Roles of a Coffee Berry Borer-Associated Yeast. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 107: 19.
- Wirth, M.; Georgiou, G.; Federici, B. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 10536–10540.
- Wirth, M.; Jianino, J.; Federeci, B.; Walton, W. 2004. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41: 935-941.
- Wirth, M.; Park, H.; Walton, W.; Federeci, B. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* Delays Evolution of Resistance to Cry11A in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 185-189.
- Wu, D.; Federici, B. 1993. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*. 175: 5276–5280.
- Yudina, T.; Konukhova, A.; Revina, L.; Kostina, L.; Zalunin, I.; Chestukhina, G. 2003. Antibacterial activity of Cry and Cyt proteins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 49: 37-44.

CAPÍTULO V

Discusión general

5.1 Discusión general

La investigación es un proceso fascinante en donde el conocimiento creciente en un tema nos hace entender pequeñas pinceladas de un gran cuadro. En la presente investigación se plantean resultados que son base fundamental para entender el efecto bioinsecticida de *Bti*, de manera más específica, el efecto de Cry10A y Cyt1A contra la broca el café (*Hypothenemus hampei*) y el mosquito transmisor del dengue (*Aedes aegypti*). En esta discusión general se analizarán y plantearán interrogantes con respecto a cuatro aspectos que son de gran interés para futuras investigaciones y sobre todo para el desarrollo de estrategias de control biológico. En primer lugar se discutirá el motivo por el cual se logró la expresión de *cry10A*; en segundo lugar el efecto insecticida de Cry10A contra *H. hampei* y *A. aegypti*; en tercer lugar el sinergismo con Cyt1A, y por último, las posibilidades del desarrollo de una planta genéticamente modificada con los genes *cyt* y *cry10A*.

En la presente tesis se clonó y expresó *cry10A* en cepas acristalíferas de *Bt*. Dos aspectos fueron fundamentales para este resultado, en primer lugar está el uso del vector pSTAB que presenta un promotor fuerte y una región estabilizadora del RNAm conocida como Shine Dalgarno (Park *et al.*, 1999) y la segunda, el uso de la secuencia completa del gen *cry10A* (ORF1-GAP-ORF2). Cabe mencionar aquí que se cree que *cry10A* codificaba originalmente para una protoxina de 130kDa, sin embargo, una inserción de DNA (también llamada GAP) introdujo codones de terminación ubicados alrededor de los 2000 pb posteriores al ATG de un gen que originalmente era de alrededor de 3500bp, lo que produjo la fragmentación en dos marcos abiertos de lectura (ORF) (Garduno *et al.*, 1988). De estos dos ORFs, el primero codifica por la δ -endotoxina, mientras que el segundo codifica por el extremo carboxi-terminal de la protoxina que por lo general se degrada durante el proceso de activación proteolítica de las protoxinas Cry (Thorne *et al.*, 1986; Garduno *et al.*, 1988; y Delecluse *et al.*, 1988). Ahora bien, con respecto a las

estrategias que permitieron la expresión de Cry10A, el uso exclusivo de un vector efectivo, como pSTAB, no garantiza un resultado positivo, por el contrario Hughes *et al.* (2005) reportan la ausencia de cristales al usar pSTAB y el ORF1 de *cry10A*. En nuestro caso, el uso de ambos ORFs fue clave en la estrategia de clonación y expresión utilizada. La expresión de las proteínas correspondientes a ambos ORFs es un resultado aún más interesante y plantea nuevas inquietudes con respecto al por qué se logró la cristalización de Cry10A. Si bien es cierto, que resultados *in silico* demostraron que la estabilidad del RNAm aumenta al utilizar la secuencia completa, se desconoce si la proteína correspondiente del ORF2 favorece la cristalización. Por ejemplo, podría permitir el establecimiento de enlaces disulfuro entre aminoácidos de cisteína (Bielotlot *et al.*, 1990; Couche *et al.*, 1987). Una serie de preguntas que quedan por resolver se plantean a continuación:

1. ¿Se logrará cristalar la proteína correspondiente a cada ORFs clonado independientemente (Capítulo I)?, o se obtendría un resultado similar al de Hughes?.
2. ¿Se logrará la expresión del ORF1 de *cry10A* en un operón en donde el ORF2 estuviese interrumpido? De ser así, mejoraría la solubilidad de Cry10A por la ausencia del ORF2?
3. Si las secuencias “extra” (el DNA del ORF2) son clave para la estabilidad y la expresión del RNAm, ¿Se podría usar este tipo de secuencias para aumentar la estabilidad de otras proteínas Cry truncadas como Cry3?
4. ¿Tiene el ORF2 algún efecto en la toxicidad?

Todas estas preguntas hacen que esta investigación sea motivante y demuestra lo amplio de un tema, que para algunos podría parecer la simple expresión de un gen.

Los genes de *Bacillus thuringiensis* han sido de gran utilidad en el desarrollo de estrategias sostenibles para el control de plagas de interés para el humano tanto en salud como en la agricultura. La presente tesis demuestra que Cry10A presenta actividad contra insectos de estas dos áreas de interés, *Aedes aegypti* mosquito transmisor del dengue (Guzmán y Kouri, 1996), así como *Hypothenemus hampei*, plaga importante del café (Le

Pelley, 1968). La alta toxicidad del complejo espora-cristal de Cry10A con una DL_{50} de 2 $\mu\text{g/ml}$ contra *A. aegypti* plantea un re-descubrimiento de una proteína que hasta la fecha se creía poco eficiente y que algunos creían que no se expresa (Rajamohan *et al.*, 1998). Esta actividad es comparable a otras proteínas de la *Bti* como la Cry11 (4,34 $\mu\text{g/ml}$) y Cyt (1,76 $\mu\text{g/ml}$) y aún mejor que la Cry4A (28,0 $\mu\text{g/ml}$) (Wirth *et al.*, 2004). Mientras que la actividad biológica de Cry10A contra *H. hampei*, plantea una nueva utilidad de esta proteína, ya que su toxicidad podría aumentarse mediante el uso de cristales puros solubilizados. La actividad de Cry10A contra un díptero y un coleóptero es una dualidad interesante, ya que hasta la fecha solamente se conocía de la dualidad lepidópteros-dípteros (Cry2) y lepidópteros-coleópteros (Cry1I, Cry1K) (Schnepf *et al.*, 1998), esto podría abrir un nuevo campo de investigación en el diseño de proteínas Cry más efectivas y con dualidades novedosas.

El sinergismo observado en el presente trabajo de Cry10A con Cyt1Aa en dos insectos tan distintos como *A. aegypti* y *H. hampei*, plantea nuevos horizontes para este tipo de relaciones, pues las condiciones de pH ácido de *H. hampei* (Valencia *et al.*, 2000) son muy distintas al pH alcalino de *A. aegypti*. Esto probablemente significa que de existir interacciones entre Cyt1Aa y Cry10A, similares a las descritas por Pérez (2006) para Cry11-Cyt1A, estas deberían de ser los suficientemente versátiles como para explicar el sinergismo en ambos insectos. Una serie de interrogantes se plantean a continuación:

1. ¿Es el sinergismo resultado de interacciones específicas o inespecíficas entre Cyt1Aa-Cry10A?
2. De ser específicas, ¿Se presentan las mismas interacciones entre los aminoácidos involucrados de Cyt1Aa-Cry10A a distintos pH, o son distintos los aminoácidos que interaccionan?,
3. De ser inespecíficas, ¿Es el sinergismo producto de una interacción más general entre Cry10A-Cyt1Aa, favorecida porque Cyt1A aumenta la hidrofobicidad por el bajo pH del tracto intestinal de broca?

El uso de los genes de *Bt* se ha centrado en la última década para desarrollar, mediante ingeniería genética, variedades resistentes a insectos (Shelton *et al.*, 2002). Se presenta aquí un reto y a la vez una oportunidad de desarrollar plantas de café resistentes a la broca con los genes Cry10A y Cyt1Aa. El reto consiste en la expresión de Cyt1A, principalmente porque esta proteína puede actuar de manera inespecífica sobre el mismo sistema de expresión, es decir contra las membranas de las células vegetales de café. Una manera de resolver este reto sería mediante el uso de la chaperona p20 (Wu y Federici, 1993) y la transformación de cloroplastos (Maliga, 2004). Estas dos estrategias permitirían en primer lugar una adecuada cristalización de Cyt1Aa (Wu y Federici, 1993) y en segundo lugar el aislamiento de la toxina del resto de las membranas de las organelas la planta. Ahora bien, la nula toxicidad de Cyt1A-Cry10A contra otros coleópteros, es un aspecto fundamental, pues implica que el mecanismo de acción no es de un amplio espectro, lo que significaría un menor impacto ecológico de una posible planta genéticamente modificada.

5.2 Bibliografía

- Bielotlot, H.; Vishnubhatla, I.; Carey, P.; Pozsgay, M. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biochemistry*. 267: 309-315.
- Couche, G.; Pfannenstiel, M.; Nickerson, K. 1987. Structural disulphide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Protein Crystal. *Journal of Bacteriology*. 169: 3281-3288.
- Delecluse, A.; Bourgouin, C.; Klier, A.; Rapoport, G. 1988. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics*. 214: 42-47.
- Garduno, F; Thorne, L.; Walfield, A; Pollock, T.. 1988. Structural relatedness between mosquitocidal endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 277-279.
- Guzmán, M.; Kourí, G. 1996. Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3: 621-627.
- Hughes, P.; Stevens, M.; Park, H.; Federici, B.; Dennis, E.; Akhurst, R. 2005. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88: 34-39.

- Le Pelley, R.H. 1968. Pests of coffee. London, Longman. 590p.
- Maliga, P. 2004. Plastids transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 289–313.
- Park, H.; Bideshi, D.; Johnson, J.; Federeci, B. 1999. Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Letters*. 181: 319-327.
- Pérez, C.; Fernandez, L.; Sun, J.; Folch, J.; Gill, S.; Soberón, M.; Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 18303–18308.
- Rajamohan, F.; Lee, M.; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Progress in Nucleic Acid Research*. 60: 1-25.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.; Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806.
- Shelton, A.; Zhao, J.; Roush, R. 2002. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. *Annual Review of Entomology*. 47: 845–881.
- Thorne, L.; Garduno, F.; Thompson, T.; Decker, D.; Zounes, M.; Wild, M.; Walfield, A.; Pollock T. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. 'kurstaki' and 'israelensis'. *Journal of Bacteriology*. 166: 801-811.
- Valencia, A.; Bustillo, A.; Ossa, G.; Chrispeels, M. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 207–213.
- Wirth, M.; Jianino, J.; Federeci, B.; Walton, W. 2004. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41: 935-941.
- Wu, D.; Federici, B. 1993. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*. 175: 5276–5280.

1°

2°

3°

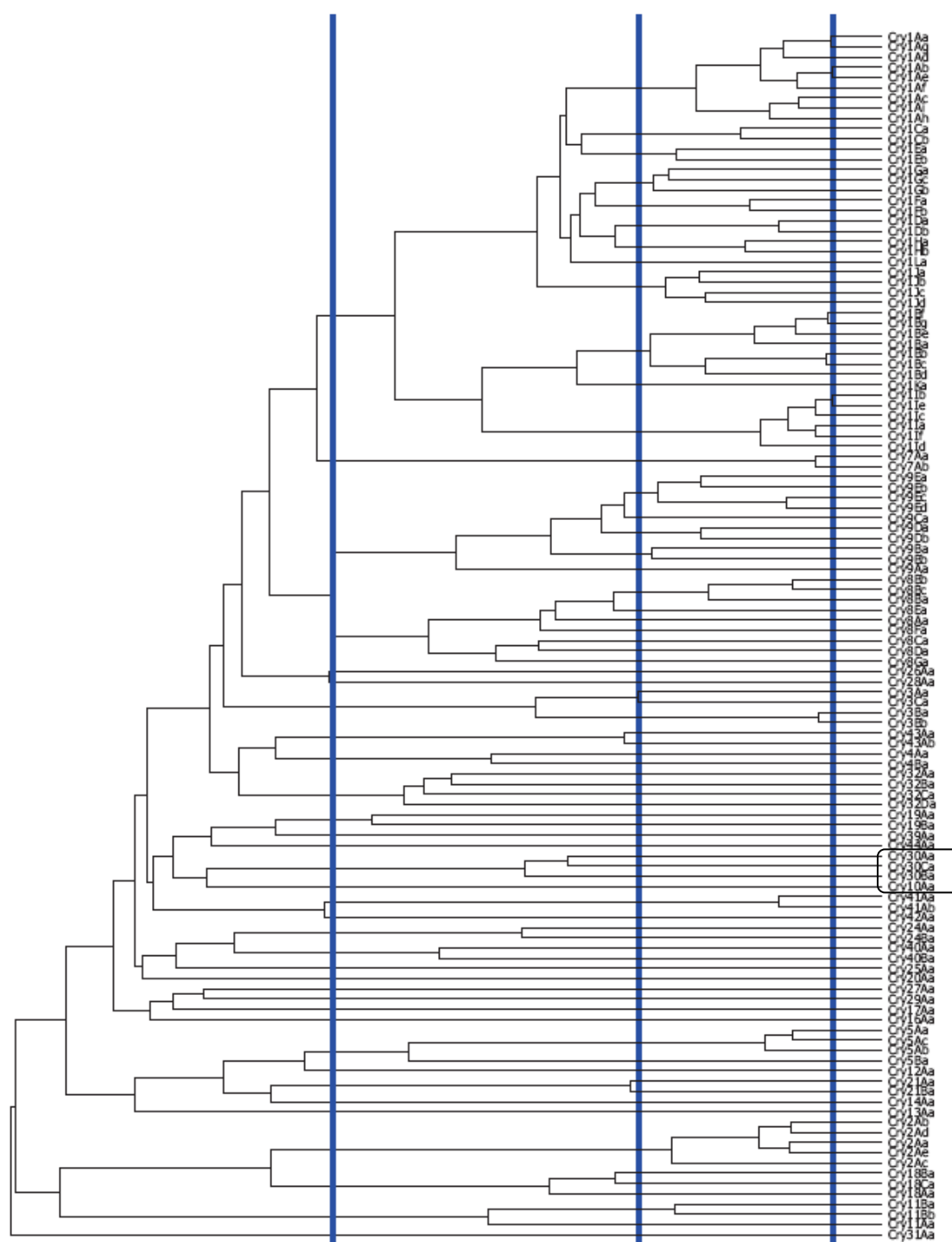


Figura A-1 Dendograma de proteínas Cry diseñado por Crickmore. El árbol se encuentra disponible en http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/3domtree.pdf

Glosario

aegypti, vii, 2, 3, 5, 13, 16, 17, 18, 26, 27, 54, 59, 61, 62, 63, 66, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 86, 91, 94, 98, 99, 100

broca, iii, vii, viii, ix, x, 2, 4, 5, 10, 13, 20, 22, 84, 85, 86, 87, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 100, 101

Bti, 3, 4, 5, 13, 14, 16, 18, 27, 28, 31, 37, 50, 57, 58, 62, 63, 75, 76, 77, 78, 79, 85, 86, 89, 90, 91, 93, 94, 98, 100

café, vii, viii, ix, x, 10, 11, 13, 20, 22, 27, 84, 85, 86, 87, 94, 98, 99, 101

DL50, vii, 14, 76

cloroplastos, 16, 101

control, i, vii, 1, 2, 4, 8, 10, 11, 13, 17, 18, 20, 25, 66, 74, 79, 81, 85, 86, 87, 88, 98, 99

Cry10, vii, viii, ix, x, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 30, 32, 45, 46, 47, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 63, 66, 69, 75, 76, 77, 78, 79, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 93, 94, 98, 99, 100, 101

Cry11, 12, 14, 18, 63, 75, 76, 77, 78, 79, 85, 86, 94, 100

Cry4, ix, 12, 27, 47, 52, 55, 94

Cyt, vii, viii, x, 11, 12, 14, 18, 27, 30, 39, 44, 48, 54, 62, 63, 66, 75, 76, 77, 78, 79, 84, 85, 86, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 97, 98, 100, 101

dengue, 2, 16, 17, 18, 20, 22, 24, 62, 81, 98, 99

hampei, vii, viii, ix, x, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 14, 21, 22, 23, 26, 27, 54, 55, 58, 59, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 102

sinergismo, vii, 63, 66, 75, 79, 90, 91, 92, 98, 100

thuringiensis, i, vii, viii, ix, x, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 58, 59, 60, 61, 62, 67, 77, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 95, 96, 97, 99, 101, 102

transgénicas, 16