

Análisis de algunas características asociadas a la actividad bioinsecticida de poblaciones obtenidas por curado de plásmidos de la cepa de *Bacillus thuringiensis* IBUN 28.5

Analysis of some characteristics associated to the biopesticide activity of cured derived colonies from the *Bacillus thuringiensis* native strain IBUN28.5

YOLIMA TORRES¹, SONIA BEJARANO¹, DANIEL URIBE², JAIRO CERÓN³

Revista Colombiana de Entomología 27(3-4): 193-199 (2001)

Resumen. *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith) es una plaga que representa pérdidas económicas para diferentes cultivos en nuestro país. El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, interesado en desarrollar estrategias para el control biológico de esta plaga, ha venido evaluando la actividad biopesticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre este insecto plaga. Dentro del proceso de caracterización de cepas nativas cabe destacar la cepa IBUN28.5 por presentar una mayor actividad biopesticida contra *S. frugiperda*, que la cepa estándar Bt subsp. *aizawai* HD137. Con el objeto de obtener colonias con diferente contenido de genes *cry* y evaluar la incidencia de éstos en la actividad insecticida, se aplicó la técnica de curado de plásmidos. Se emplearon naranja de acridina, bromuro de etidio, SDS, temperatura y en algunos casos subcultivos, como agentes para inducir curado de plásmidos en la cepa nativa IBUN28.5 y en la cepa estándar HD137. La selección de colonias curadas de plásmidos se realizó aplicando las técnicas de observación microscópica, perfil plasmídico, análisis electroforético de proteínas y PCR; las colonias seleccionadas se sometieron a ensayos de actividad biológica contra larvas de primer ínstar de *S. frugiperda* evaluando dos concentraciones de proteína liofilizada: 240 y 480 ng/cm², observando como respuesta el porcentaje de mortalidad. Se obtuvieron colonias que presentaban la pérdida de un plásmido de aproximadamente 80 MDa para la cepa nativa y de 77 MDa para la cepa de referencia, los cuales portan el gen *cry1Ab*. Otras poblaciones perdieron los genes *cry1Ab*, *cry1C* y *cry1D*, sin determinarse en cual(es) plásmido(s) se encuentran estos dos últimos genes. Los resultados obtenidos sugieren que todos los genes curados participan de forma importante en la actividad insecticida de la cepa IBUN 28.5 y de la cepa de referencia Bt *aizawai* HD137 y además que la diferencia de actividad presentada entre estas dos cepas reside principalmente en las características intrínsecas de los genes *cry1C* y *cry1D*.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*. Control biológico. Curado de plásmidos. Genes *cry*. PCR. Bioensayos.

Summary. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), is an insect pest which represent economic lost for different agricultural crops in our country. Instituto de Biotecnología from the Universidad Nacional de Colombia, have been interested in develop some strategies for the biological control of this pest, for instance it have been evaluating the biopesticide activity of native strains of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) on this pest insect. Into this process it is important to remark the IBUN28.5 strain because it has a higher biopesticide activity against *S. frugiperda*, than the Bt subsp *aisawai* HD137 standard strain. In order to obtain colonies with different content of *cry* genes, and evaluate the role of each gene in the biopesticide activity, it was used the technique of curing plasmids. It was used acridine orange, etidium bromide, SDS, temperature and in some cases subculturing, like curing agents for the native strain IBUN28.5 and the standard strain HD137. The selection of the cured derivatives was made by microscopic observation, plasmid profiles, insecticidal cristal proteins profiles and PCR analysis. Selected strains were tested in bioassay against first instar larvae of *S. frugiperda*, by using two concentration of freezing dried proteins: 240 y 480 ng/cm². Percentage of mortality was the bioassay's response. It were obtained some colonies without a plasmid of around 80 MDa to the native strain and 77 MDa to the standard strain, both plasmids have the *cry1Ab* gene. Other derivatives lost *cry1Ab*, *cry1C* and *cry1D* genes, but it was not discovered which plasmid contain last two genes. The bioassay results suggest, that whole cured genes have an important role in the biopesticide activity of the IBUN28.5 and the standard strain Bt *aisawai* HD137. In addition to that, the results suggest that the difference in the biopesticide activity of both strains, is because of intrinsic characteristics of the *cry1C* and *cry1D* genes.

Key words: *Bacillus thuringiensis*. Biological control. Plasmids. *cry* genes. PCR. Bioassays.

1 Químico Farmacéutico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

2 Biólogo, MSc Protección de Cultivos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá. E-mail: duribe@ibun.unal.edu.co

3 Químico Farmacéutico, MSc., PhD en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá.

Introducción

Bacillus thuringiensis (Berliner) es el microorganismo más ampliamente empleado como estrategia de control biológico a escala mundial (Feitelson y Kim 1992), de ahí el gran número de productos comerciales a base de este microorganismo y de centros de investigación en todo el mundo, que poseen programas relacionados con la búsqueda y caracterización de cepas nativas para el control de plagas locales de los diversos países (Bravo *et al.* 1998; Hossain *et al.* 1997; Chak *et al.* 1994; Chilcot y Wigley 1993). El Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional ha venido desarrollando una colección de cepas nativas de Bt aisladas de diferentes partes del país. Las cepas de esta colección son sometidas a un proceso de caracterización riguroso que comprende desde la identificación molecular de los genes asociados a su patogenicidad, hasta su actividad biopesticida a nivel de campo, si la cepa amerita avanzar hasta esta instancia en el proceso de caracterización.

La cepa nativa IBUN28.5 ha sido seleccionada dentro de este proceso de caracterización, por su mayor actividad biopesticida contra larvas de *S. frugiperda* a nivel de laboratorio y campo, en comparación con la cepa de referencia HD137 (Grosso *et al.* 1997; Uribe *et al.* 1998). Como es bien sabido la especificidad y actividad biopesticida en Bt está determinada por el contenido de genes *cry* dentro de su genoma, en este sentido es importante tener en cuenta que ambas cepas mencionadas poseen los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1D*. De acuerdo con la literatura, la actividad específica de estas cepas contra *S. frugiperda* reside principalmente en los genes *cry1C* y *cry1D* (Aranda *et al.* 1996; Bravo *et al.* 1998). Esto sugiere que la diferencia en la actividad biopesticida de estas dos cepas está basada en los niveles de expresión o la secuencia específica de los genes que poseen la actividad contra *S. frugiperda*. Aunque cabe mencionar que el papel del gen *cry1Ab* no ha sido suficientemente aclarado, ya que si bien la mayoría de autores coinciden en que dicho gen solo no posee actividad contra *S. frugiperda*, algunos sugieren que si posee actividad (Bohorova *et al.* 1997) y otros proponen que su efecto reside simplemente en un efecto sinérgico, debido al incremento en la solubilidad de las proteínas que si poseen actividad biopesticida (Aronson *et al.* 1991).

Debido a la importancia de *S. frugiperda* como plaga de diferentes cultivos de interés económico en Colombia (Vélez 1997) y el potencial de Bt como alternativa de control de esta plaga, es de gran importancia establecer estudios de caracterización específicos que permitan conocer, a nivel genético, en que residen las diferencias de actividad biopesticida entre ambas cepas. Gracias a que la distribución de los genes *cry* dentro del genoma de Bt es principalmente a nivel plasmídico (Faust *et al.* 1983;

González *et al.* 1981; González y Carlton 1980), en el presente estudio se sometieron ambas cepas (Bt subsp. *aizawai* HD137 e IBUN28.5) a la técnica de curado de plásmidos, con el objeto de obtener colonias derivadas de las cepas silvestres, que presentarían diferente contenido de genes *cry* en su genoma, para así poder establecer relaciones entre la pérdida de algunos genes y la actividad biopesticida de las mismas.

Materiales y Métodos

Colección microbiológica. En el presente estudio se empleó la cepa nativa de *B. thuringiensis* (Bt) IBUN28.5, debido a que posee mayor actividad biopesticida que la cepa de referencia HD137. La cepa nativa fue aislada y caracterizada en estudios previos realizados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (Grosso *et al.* 1997; Uribe *et al.* 1998). Por otra parte se emplearon las cepas de referencia de Bt subsp. *aizawai* HD-137 como patrón de la actividad biopesticida de Bt contra el insecto blanco *S. frugiperda* y la cepa *Bt* subsp. *kurstaki* HD1, como patrón para la determinación del peso molecular del perfil plasmídico de las cepas evaluadas en este estudio. Dichas cepas fueron donadas por el laboratorio de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las cepas fueron mantenidas y crecidas para la elaboración de los bioensayos en medio de cultivo agar nutritivo a 30°C hasta su esporulación.

Material entomológico. El material entomológico empleado en este estudio consistió en un pie de cría de insectos de *S. frugiperda*, colectados en cultivos de algodón en los departamentos de Córdoba y Tolima y mantenidos en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25°C±2, humedad relativa de 65%±5% y fotoperíodo de 12 horas (luz-oscuridad). La alimentación de las larvas se realizó empleando la dieta artificial propuesta por López (1986).

Curado de plásmidos. Para el procedimiento de curado de plásmidos, se llevó a cabo la metodología propuesta por Gill St (Comunicación personal); González *et al.* (1981); Mahillon *et al.* (1988), con algunas modificaciones: En primer lugar se tomó una colonia de la cepa de Bt a tratar, crecida en agar nutritivo con 12 horas de crecimiento. Dicha colonia se sembró en 5 ml de caldo nutritivo y fue incubada durante 12 horas a 30°C. Posteriormente se tomó 1 ml de este cultivo y se llevó a 10 ml de caldo nutritivo en presencia del agente de curado, sometiendo a incubación a la temperatura establecida (en caso de aplicar subcultivos se repiten los pasos anteriores hasta completar el número de repiques deseado). Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo anterior haciendo diluciones seriadas en agua destilada desionizada estéril (DDE), se sembró en agar nutritivo y se llevó a incubación hasta esporulación. La técnica de subcultivos en

medio sólido parte igualmente de una colonia aislada de la cepa seleccionada, la cual se sembró en agar nutritivo con el agente de curado y fue llevada a incubación a la temperatura establecida, hasta esporulación.

Los experimentos de curado de plásmidos se realizaron empleando la temperatura como agente físico de curado y los agentes naranja de acridina y bromuro de etidio (EtBr), (agentes intercalantes de ADN) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (surfactante que altera la permeabilidad de la membrana) como agentes químicos de curado. Así mismo se evaluaron dos combinaciones de estos agentes: naranja de acridina-SDS y EtBr-SDS con él ánimo de observar el efecto de ambos agentes mezclados. Por otra parte se buscó optimizar la inducción de curado de plásmidos empleando en algunos tratamientos la técnica de subcultivo como herramienta complementaria a los agentes de curado (Tabla 1). Al término de cada uno de estos tratamientos se realizaron diluciones seriadas en agua DDE, las cuales se sembraron en agar nutritivo. A las 24 horas de incubación, se seleccionaron 50 colonias de cada experimento de la dilución que presentara un crecimiento entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (o menos en el caso de no crecer las 50 colonias). Todas las colonias fueron analizadas a nivel microscópico. Cabe mencionar que gracias a que la cepa de mayor interés por su actividad biopesticida es la cepa nativa IBUN28.5, ella fue empleada para realizar la optimización del procedimiento de curado. Una vez seleccionados los mejores procedimientos, éstos fueron evaluados en la cepa de referencia HD137. En la tabla 1 se hace un resumen de los diferentes tratamientos empleados en el curado de plásmidos. La mayor parte de los experimentos fueron realizados en medio líquido excepto algunos que están indicados en la Tabla 1.

Selección de las colonias sometidas a curado de plásmidos. Para la selección de las colonias obtenidas luego del tratamiento de curado, se realizaron observaciones a nivel microscópico empleando tinción de cristal violeta a los cultivos esporulados. Las colonias que mostraran disminución en la producción y el tamaño del cristal paraesporal así como cambio en la forma, se seleccionaron para posteriores análisis a nivel bioquímico y molecular con el fin de verificar la pérdida de plásmidos por efecto del tratamiento de curado.

Caracterización bioquímica y molecular. Una vez seleccionadas las colonias, de acuerdo con los parámetros antes mencionados, se procedió a la identificación del perfil de plásmidos de acuerdo con la técnica de lisis alcalina descrita por Kronstand *et al.* (1983). Los plásmidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0.7% a 3.5 v/cm de acuerdo con Maniatis *et al.* (1989). Las colonias con un

Tabla 1. Resumen de los diferentes tratamientos de curado de plásmidos empleados con la cepa nativa de *B. thuringiensis* IBUN28.5 y la cepa de referencia HD137

Agente de curado	Concentración	Temperatura	Subcultivos
Naranja de acridina	1.5 a 4.0 µg/ml ²	37°C	21 repiques
	50 µg/ml	30°C; 37°C ¹ ; 40°C y 42 °C	21 repiques
Bromuro de etidio	50 µg/ml	30°C; 37°C ¹ ; 40°C y 42 °C	---
	1 µg/ml	42 °C	---
SDS ⁴	0.02%	30°C; 37°C ¹ ; 40°C y 42 °C	---
	0.002%	42 °C	---
	0.002%-0.012% ¹²	37°C	21 repiques
SDS/Bromuro de etidio	0.002%/1 µg/ml	42 °C	---
SDS/N acridina	0.002%/50 µg/ml ¹	42 °C	---
---	---	42 °C	21 repiques

¹ Experimento realizado con la cepa nativa de *B. thuringiensis* IBUN28.5 y la cepa HD137.

² La concentración del agente de curado se iba incrementando a medida que se avanzaba en los subcultivos.

³ Las rondas se realizaron cada 24 horas.

⁴ Experimentos realizados en agar nutritivo (el experimento con incrementos de concentración de SDS se realizó en medio líquido).

perfil plasmídico diferente a la cepa silvestre se sometieron a una caracterización electroforética de las proteínas asociadas al cristal mediante la elaboración de geles en poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), de acuerdo con Maniatis *et al.* (1989). Así mismo, con las colonias seleccionadas se llevó a cabo un análisis por PCR para conocer si existe alguna relación entre los plásmidos perdidos y la ausencia de algunos genes *cry*. Los primeros empleados, así como el procedimiento y condiciones de reacción, fueron llevadas a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Cerón *et al.* (1994) y Cerón *et al.* (1995). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 20 v/cm de acuerdo con Maniatis *et al.* (1989).

Determinación de la actividad biopesticida. Las colonias que perdieron algún(os) gen(es) *cry* en el proceso de curado se emplearon para la determinación de la actividad biopesticida sobre larvas de primer instar de *S. frugiperda* de acuerdo con la metodología previamente descrita por Aranda *et al.* (1996). Para este ensayo se emplearon dos concentraciones de proteína liofilizada 240 ng/cm² y 480 ng/cm². Las larvas en presencia del complejo espora-cristal se incubaron a 25°C ± 2 por 7 días, al cabo de los cuales se leyó la mortalidad de las mismas.

Resultados y Discusión

De acuerdo con el diseño metodológico propuesto, la cepa nativa de *Bt* IBUN28.5 y

la cepa de referencia *Bt subsp aizawai* HD137 fueron tratadas con diferentes agentes de curado (Tabla 1). En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos con cada uno de las condiciones de curado ensayadas en este estudio. En la tabla 2 merece la pena resaltar el bajo rendimiento obtenido con los diferentes tratamientos de curado de plásmidos, ya que menos de 10% de las colonias analizadas presentaron la pérdida de alguno de sus plásmidos, además, a pesar de la diversidad de experimentos llevados a cabo, no se logró generar colonias totalmente acristalíferas con ninguna de las dos cepas sometidas a estos procedimientos.

El bromuro de etidio (EtBr) y la naranja de acridina (NA), son agentes intercalantes de

Tabla 2. Resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de curado de plásmidos con la cepa nativa IBUN28.5 (experimento 1 a 19) y la cepa de referencia HD137 (experimentos 20 a 23)

	Condiciones de Experimentación	Dilución de lectura	Colonias evaluadas al microscopio	Colonias seleccionadas ^a	Colonias curadas ^b
1	NA ^c - 50 µg/ml - 30°C	10 ⁵	28	7	---
2	NA - 50 µg/ml - 37°C	10 ⁵	50	7	---
3	NA - 50 µg/ml - 40°C	10 ²	50	4	---
4	NA - 50 µg/ml - 42°C	10 ²	46	7	---
5	NA-1.5a4µg/ml - 37°C-21 rondas	10 ³	48	7	---
6	EtBr ^d - 50µg/ml - 30°C	10 ³	48	7	---
7	EtBr - 50 µg/ml - 37°C	10 ¹	42	7	---
8	EtBr - 50 µg/ml - 40°C	10 ¹	50	7	---
9	EtBr - 50 µg/ml - 42°C	10 ¹	45	7	---
10	EtBr - 1 µg/ml - 42°C	10 ³	50	7	---
11	SDS - 0.02% - 30°C	10 ¹	50	7	---
12	SDS - 0.02% - 37°C	10 ²	50	7	---
13	SDS - 0.02% - 40°C	10 ¹	50	7	---
14	SDS - 0.02% - 42°C	10 ² -10 ³	35-50	7-7	2-2
15	SDS - 0.002% - 42°C	10 ³	50	7	---
16	SDS-0.002 ^a 0.012%-37°C-21rondas	10 ³	50	7	1
17	SDS-NA-0.002%/50µg/ml-42°C	10 ¹	13	4	---
18	SDS/EtBr-0.002%/1µg/ml-42°C	10 ¹	50	7	---
19	42°C - 21 rondas	NR ^e	28	7	3
20	NA-50µg/ml - 37°C-21 rondas	10 ³	50	7	---
21	SDS-0.002 ^a 0.012%-37°C-21rondas	10 ⁵	50	7	3
22	SDS-NA-0.02%/50µg/ml-42°C	10 ¹	4	4	---
23	42°C - 21 rondas	NR	28	7	3
	TOTAL		1065	159	14

^a: Colonias que presentan menor cantidad o tamaño y/o diferente forma de cristal que la cepa silvestre.

^b: Colonias que pierden uno o más plásmidos en relación con la cepa silvestre.

^c: Naranja de acridina

^d: Bromuro de etidio

^e: No se realizó.

ADN empleados como agentes de curado de plásmidos en Bt y otras especies de bacterias (Srivinas *et al.* 1997; Dussan *et al.* 1997; Sekar *et al.* 1987); sin embargo, en este estudio ninguno de los tratamientos con estos agentes indujeron pérdida de plásmidos en las cepas de Bt empleadas. La efectividad baja de estos agentes de curado, posiblemente reside en la agresividad de los tratamientos. Esta agresividad se manifiesta por la disminución en la viabilidad celular, representada por la incapacidad de crecimiento de las células de Bt en diluciones de siembra más altas de 10^{-2} (Tabla 2). Un ejemplo de esto se observa para el caso de EtBr, el cual cuando es empleado a 50 mg/ml y temperaturas entre 37°C y 42°C la biomasa celular recuperada no permitió un crecimiento superior a la dilución de siembra de 10^1 , mientras que el mismo EtBr evaluado a una menor concentración (1 mg/ml) y a 42°C permitió un crecimiento hasta la dilución de 10^{-5} (Tabla 2). Situación similar ocurre con la NA donde el cultivo va perdiendo viabilidad a medida que se incrementa la temperatura de incubación (Tabla 2). Estos resultados si bien no descartan los agentes intercalantes de ADN como alternativa para inducción de curado de plásmidos en Bt, si sugieren que las condiciones aquí evaluadas no son idóneas para este propósito.

Las condiciones de experimentación que permitieron obtener colonias curadas de plásmidos tanto para la cepa nativa IBUN28.5 como para la cepa de referencia HD137 estuvieron asociadas al SDS (a concentraciones crecientes entre 0.002% y 0.012% o una concentración fija de 0.02%), una temperatura de 42°C y/o la técnica de subcultivo o repiques sucesivos en agar o medio líquido.

En la tabla 2 se observa que los experimentos con la mezcla entre SDS y temperatura, o SDS y subcultivos fueron las condiciones más exitosas para la inducción de pérdida de plásmidos en ambas cepas, ya que el total de las colonias curadas fueron obtenidas por alguna de estas técnicas. Estos resultados complementan las condiciones sugeridas por González *et al.* (1981) y Mahillon *et al.* (1988), los cuales evalúan estas condiciones de forma aislada.

Análisis plasmídico de las colonias curadas.

Las 159 colonias que mostraron alguna modificación en la producción de los cuerpos paraesporales se evaluaron para verificar si esta variación respondía a alteraciones en el perfil plasmídico. De todas estas cepas únicamente catorce presentaron el perfil plasmídico modificado, con la falta de uno o tres plásmidos, como se muestra más adelante (Tabla 2). En las figuras 1 y 2 se observan los perfiles plasmídicos de las cepas IBUN28.5 y HD137 respectivamente, tanto de las cepas de partida o silvestres como de algunas de las colonias que perdieron uno o varios plásmidos. Las colonias Cc1-28.5 y Cc2-28.5 evidencian la pérdida de un plásmido

de 80 MDa mientras que la colonia Cc3-28.5 muestra la pérdida de tres plásmidos con pesos aproximados de 95, 80 y 17 MDa (Fig. 1). Por otra parte, la colonia Cc1-137 muestra la pérdida de un plásmido de aproximadamente 77 MDa y la colonia Cc2-137 evidencia la pérdida de tres plásmidos de aproximadamente 99, 77 y 19 MDa (Fig. 2).

Características asociadas a los genes cry.

Ambas cepas de Bt sometidas a los tratamientos de curado de plásmidos poseen los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1D* (Figs. 3 y 4), los cuales codifican para las respectivas proteínas Cry cuyos pesos son 131.0, 132.5, 133.2, 134.8 y 138.0 kDa, respectivamente. Dada la similitud en los pesos moleculares de estas proteínas, los gels de SDS-PAGE al 12% únicamente permiten observar 2 bandas de 135 y 131 kDa aproximadamente, para ambas cepas silvestres (resultados no mostrados).

A pesar de esto, para las colonias seleccionadas por la falta de 1 o más plásmidos, el perfil de proteínas sugiere la pérdida de una pequeña banda ubicada alrededor de 131 kDa, la cual coincide con el peso molecular de la proteína Cry1Ab (resultados no mostrados). Dada la dificultad para sacar alguna conclusión con este tipo de resultados era necesario realizar una prueba más contundente. Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de PCR de las cepas silvestres empleadas en este estudio, así como los perfiles de genes *cry* de las cepas curadas. Estos resultados son muy importantes ya que permiten establecer asociaciones entre los plásmidos perdidos durante el procedimiento de curado y los

genes que no dan reacción positiva en esta prueba. En este contexto los resultados de este estudio sugieren que los plásmidos de 80 MDa y 77 MDa para las cepas IBUN28.5 y HD137 respectivamente, son portadoras del gen *cry1Ab*. Por otra parte, los genes *cry1C* y *cry1D* pueden estar codificados en los plásmidos de 95 o 17 MDa para la cepa nativa o en los plásmidos de 99 o 19 MDa para la cepa de referencia, ya que las colonias que pierden los tres plásmidos, pierden a su vez los genes *cry1C* y *cry1D* (además del *cry1Ab*) (Figs. 1-4). Es importante mencionar que los plásmidos asociados con la actividad biopesticida de las cepas de Bt usualmente son plásmidos de tamaños superiores a 40 MDa (Wilks *et al.* 1998; Lereclus *et al.* 1989; Mahillon *et al.* 1988), lo que hace pensar que los genes *cry1C* y *cry1D* estarían ubicados en los plásmidos de 95 MDa y 99 MDa para la cepa nativa y de referencia respectivamente, aunque se deben realizar trabajos posteriores para comprobar esta hipótesis.

Análisis previos efectuados con otra cepa de Bt subesp. *aizawai*, la Bt *aizawai* 7.29, sugieren que esta cepa posee una copia del gen *cry1Ab* en un plásmido de 45 MDa, y otra copia de este mismo gen a nivel cromosomal; dicha cepa posee además otros tres genes *cry1Aa*, *cry1C* y *cry1D* los cuales son de origen presumiblemente cromosomal (Lereclus *et al.* 1989, Lereclus *et al.* 1993). La ubicación a nivel cromosomal y plasmídico de los genes *cry* en *B. thuringiensis* no es tema de discusión, aunque cabe mencionar que de acuerdo con lo señalado en la literatu-

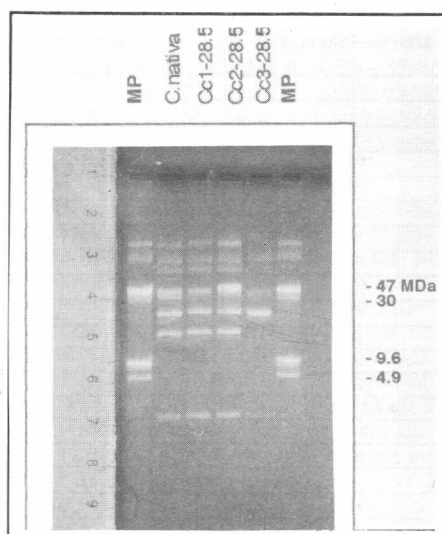


Figura 1. Perfil plasmídico de las colonias curadas obtenidas de la cepa nativa IBUN 28.5. MP: Marcador de peso molecular (cepa Bt subsp. *kurstaki* HD1). C. nativa: Cepa IBUN 28.5 sin tratar. Cc1-28.5: colonia sin el plásmido de 80 MDa. Cc 2-28.5: colonia sin el plásmido de 80MDa. Cc3-28.5: Colonia sin plásmidos de 95 MDa y 17 MDa.

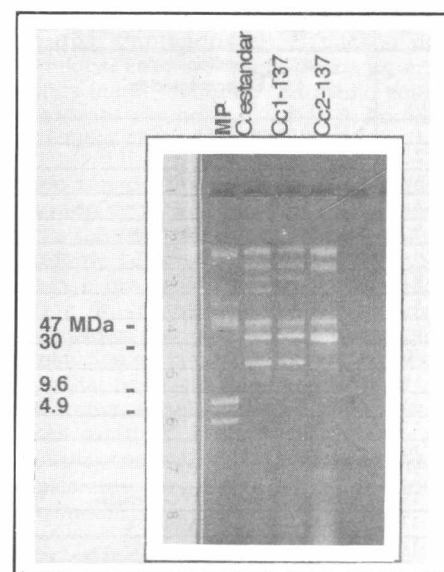


Figura 2. Perfil plasmídico de las colonias curadas obtenidas de la cepa de referencia Bt subsp. *aizawai* HD 137. MP: Marcador de peso molecular (cepa Bt subsp. *kurstaki* HD1). C. estándar: cepa de referencia Bt subsp. *aizawai* sin tratar. Cc1-137: colonia sin el plásmido de 77 MDa. Cc2-137: Colonia sin plásmidos de 99 MDa y 19 MDa.

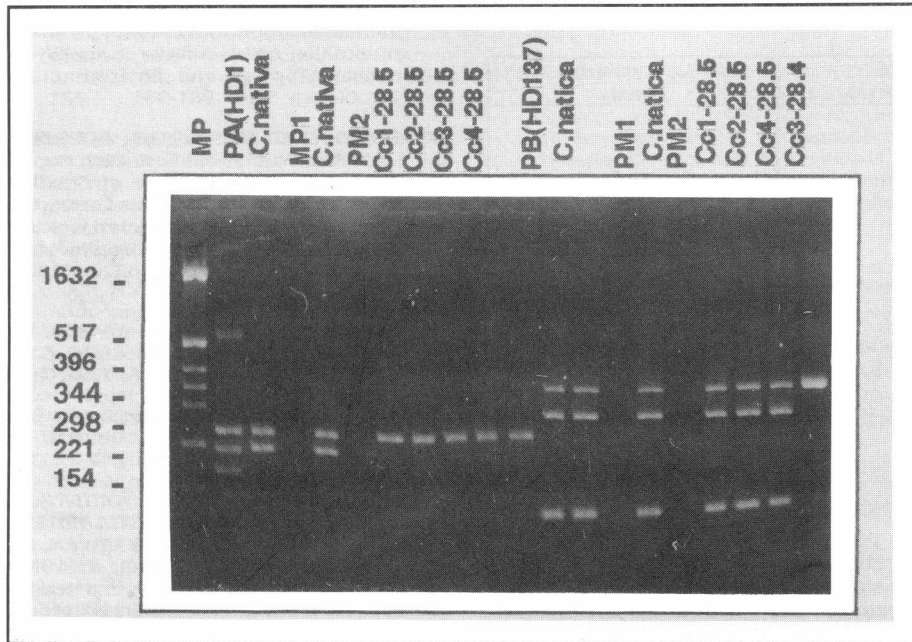


Figura 3. Análisis electroforético de los productos de amplificación de PCR para la cepa IBUN 28.5. MP: Marcador de peso molecular. PA(HD1): Patrón para la mezcla de reacción A, con primers específicos para los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. C.nativa: Cepa nativa 28.5 sin tratar. PM1 y PM2: son muestras sin cargar pérdidas (no cargadas). Cc1-28.5 a Cc3-28.5 mismas colonias que en figura 1. Cc4-28.5 colonia que pierde el plásmido de 80 MDa. PB: patrón para la mezcla de reacción de B con primers específicos para los genes *cry1B* y *cry1D*.

ra existe una distribución mayor de genes *cry* a nivel plásmidico que a nivel cromosomal (Ben-Dov *et al.* 1996; Lereclus *et al.* 1993; Lereclus *et al.* 1989; Donovan *et al.* 1988). Sin embargo, dada la importancia de la cepa Bt *aizawai* HD137 como referencia por su actividad biopesticida contra el insecto blanco *S. frugiperda* (Cerrón *et al.* 1994; Aranda *et al.* 1996; Bravo *et al.* 1998), cualquier caracterización de su genoma asociado a la actividad biopesticida de la cepa es de interés para el desarrollo de trabajos posteriores.

Ensayo de toxicidad. De acuerdo con la prueba de PCR tanto la cepa nativa IBUN28.5 como la cepa de referencia HD137 perdieron los genes *cry1Ab*, *cry1C* y *cry1D*, como resultado del proceso de curado de plásmidos. En este contexto el análisis de la actividad biopesticida de estas colonias puede ayudar a interpretar el significado de las diferencias en términos de dicha actividad entre estas dos cepas. Con esto en mente se realizaron bioensayos con al menos una colonia que representará los perfiles de genes *cry* obtenidos para cada cepa luego del proceso de curado. En la tabla 3 se observa el porcentaje de mortalidad obtenido para las diferentes colonias analizadas a dos dosis 240 ng/cm² y 480 ng/cm².

Con él ánimo de darle un significado estadístico a los resultados de los bioensayos y de esta forma identificar diferencias entre los tratamientos, se llevó a cabo el aná-

lisis de los datos de acuerdo con el criterio de la prueba de Duncan (Tabla 4). Para este análisis se tomaron en consideración cada una de las repeticiones realizadas en las dos dosis evaluadas, la prueba de Duncan agrupó las cepas bajo estudio como se indica en la tabla 4, confirmando-se la superioridad en la actividad insecticida sobre las larvas de *S. frugiperda* de la cepa nativa IBUN28.5 respecto a la cepa de referencia HD137. Así mismo, se observa una disminución en términos de la actividad biopesticida en las colonias que pierden uno o más genes, lo que permite asumir que todos los genes *cry* curados (*cry1Ab*, *cry1C* y *cry1D*) tienen un efecto en la actividad biopesticida de ambas cepas.

La relación directa entre la actividad biopesticida sobre *S. frugiperda* de los genes *cry1C* y *cry1D* no tienen discusión

Tabla 3. Bioensayos de mortalidad en larvas de primer instar de *S. frugiperda* enfrentadas a las cepas silvestres HD137 e IBUN28.5 y sus respectivas colonias curadas de plásmidos

Colonias Evaluadas	Mortalidad (%) 240 ng/cm ²	Mortalidad (%) 480 ng/cm ²
Testigo	8.33	9.85
HD137 (Cepa silvestre)	61.11	83.09
IBUN28.5	80.28	87.32
Cc1-137	36.61	77.72
Cc2-137	37.50	32.39
Cc1-28.5	64.78	83.09
Cc2-28.5	48.61	70.42
Cc3-28.5	15.27	35.21

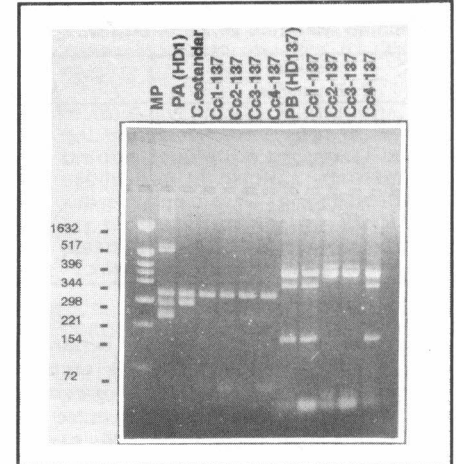


Figura 4. Análisis electroforético de los productos de amplificación de PCR para la cepa HD 137. MP: Marcador de peso molecular. PA(HD1): Patrón para la mezcla de reacción A, con primers específicos para los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. C. estándar: Cepa de referencia HD 137 sin tratar. Cc1-137 y Cc2-137 mismas colonias que en figura 2. Cc3-137 y Cc4-137 colonia que pierden los plásmidos de 99 MDa, 77 MDa y 19 MDa, respectivamente. PB: patrón para la mezcla de reacción de B con primers específicos para los genes *cry1B*, *cry1C* y *cry1D*.

de acuerdo con diferentes anotaciones en este sentido en la literatura (Bravo *et al.* 1998; Smith *et al.* 1996; Aranda *et al.* 1996). Sin embargo, el efecto de la proteína Cry1Ab no es muy claro ya que de acuerdo con Aranda *et al.* (1996), dicha proteína únicamente se une de manera inespecífica a proteínas apicales de alto peso molecular (150 kDa) de las microvellosidades del intestino medio, sin que esta unión esté relacionada con algún nivel de toxicidad en el hospedero.

En este contexto es posible que el efecto de la proteína Cry1Ab esté más relacionado con la posibilidad de desarrollar efectos sinérgicos entre proteínas Cry, como los descritos para las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac contra *Lymantria dispar*, los cuales muestran que al estar juntas en una proporción 1:1 aumentan casi 4 veces más en relación con la actividad esperada debido

Tabla 4. Prueba de Duncan para el porcentaje de mortalidad de las diferentes colonias empleando un límite de confianza de 0.05

Colonias Evaluadas	Porcentaje de Mortalidad (%)	Agrupación de Duncan
IBUN28.5	79.72	A
HD137	66.90	B
Cc1-28.5	64.11	B
Cc1-137	54.70	BC
Cc2-28.5	46.69	C
Cc2-137	34.96	D
Cc3-28.5	33.10	D
Testigo	5.93	E

a la acción de cada proteína por separado (Lee *et al.* 1996). Este tipo de efectos sinérgicos se pueden manifestar gracias a la formación de heterodímeros entre las toxinas, los cuales favorecen más estrictamente la formación de poros en las células del intestino medio de acuerdo con lo sugerido por Lee *et al.* (1996); y/o un incremento en la solubilidad de las otras proteínas que si son tóxicas, como sugieren Aronson *et al.* (1991), para el caso de la acción de la proteína Cry1Ab en la cepa HD133. Se deben llevar a cabo estudios posteriores para dilucidar la importancia del gen *cry1Ab* en la actividad biopesticida de las cepas empleadas en este estudio contra larvas de *S. frugiperda*.

En la tabla 4 se observan diferencias en términos de la actividad biopesticida de la cepa Cc1-28.5 y Cc2-28.5, a pesar de que estas cepas no presentan diferencias en su perfil plasmídico, ni de proteínas asociadas al cristal, ni en el perfil de PCR. Este resultado sugiere que el proceso de curado de plásmidos posiblemente afectó los niveles de expresión de los genes *cry* que permanecieron en las cepas luego del proceso de curado (*cry1Aa*, *cry1B*, *cry1C* o *cry1D*), o algún proceso involucrado en el mecanismo de infección de las mismas hacia el hospedero. Se deben realizar estudios posteriores para sacar afirmaciones más concluyentes. Cabe mencionar que gracias a que la mayoría de estudios coinciden en una pobre actividad biopesticida de la proteína Cry1Ab sobre *S. frugiperda* (Bravo *et al.* 1998, Aranda *et al.* 1996) el valor más cercano a la realidad debe ser el obtenido con la cepa Cc1-28.5.

La diferencia en términos de la actividad biopesticida entre las cepas silvestres de IBUN28.5 y HD137 y las colonias que pierden el gen *cry1Ab* de ambas cepas (Cc1-28.5 y Cc1-137) se mantienen estables después del experimento de curado (de 12.2% y 9.4% respectivamente, Tabla 4). Sin embargo, entre las cepas que pierden los tres genes (*cry1Ab*, *cry1C* y *cry1D*) no se presentan diferencias en términos de la actividad biopesticida (Tabla 4).

Estos resultados permiten sugerir que las diferencias entre ambas cepas residen en características intrínsecas al nivel de secuencia de los genes *cry1C* o *cry1D*, que afectan su expresión y/o actividad biopesticida. Un hallazgo de esta naturaleza sería de gran interés por las posibilidades de corresponder a nuevos genes *cry*, o a dife-

rencias en los niveles de expresión de estos dos genes, lo cual tendría implicaciones importantes para el desarrollo y manipulación de nuevos productos a base de Bt.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que el SDS, la temperatura y/o el repique continuo de las cepas, deben tenerse en cuenta al momento de diseñar un procedimiento para el curado de plásmidos en *B. thuringiensis*. En este contexto, las condiciones propuestas para este diseño son: el empleo de SDS a una concentración entre 0.002 y 0.02% a una temperatura de incubación de 42°C ó la aplicación de subcultivos o repiques continuos cada 24 horas en agar nutritivo.

- El plásmido de 80 MDa en la cepa nativa de Bt IBUN28.5 y el plásmido de 77 MDa de la cepa de referencia HD137 son portadores del gen *cry1Ab*.

- Los genes *cry1C* y *cry1D* están asociados a los plásmidos de 95 MDa y/o 17 MDa para la cepa nativa IBUN28.5 y a los plásmidos de 99 MDa y/o 19 MDa para la cepa de referencia HD137. Sin embargo, se propone que estos genes deben estar asociados al plásmido de mayor peso molecular (95 MDa y 99 MDa), por ser ésta una característica más generalizada en las cepas de Bt.

- La mayor actividad biopesticida de la cepa nativa IBUN28.5, respecto a la cepa de referencia HD137, debe residir en características intrínsecas de la secuencia de los genes *cry1C* y/o *cry1D*.

Agradecimientos

Esta investigación recibió apoyo de COLCIENCIAS y de la Universidad Nacional de Colombia, los autores desean agradecer a estas instituciones sin cuyo apoyo no hubiese podido lograrse esta investigación.

Literatura citada

- ARANDA, E.; SÁNCHEZ J.; PEFEROEN M.; GUERECA L.; BRAVO, A. 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 203-212.
- ARONSON, A.I.; HAN E.-S.; MCGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. 1991. The solubility of

inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology* 57(4): 981-986.

BEN-DOV, E.; EIVAN, M.; PERLEG, N.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. 1996. Restriction map of the 125-kilobase plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (9): 3140 - 3145.

BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C.; QUINTERO, C.; MACIEL, M.; BRITO R.M.; HOISINGTON, D.; BRAVO, A. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI type insecticidal toxins. *Journal of Economic Entomology* 90(2): 412 - 415.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.; PEÑA, G.; NUÑES, M.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4965-4972.

CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; BRAVO, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 353-356.

CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3826-3831.

CHAK, K.F.; CHAO, D.C.; TSENG, M.Y.; KAO, S.S.; TUAN, S.J.; FENG, T.Y. 1994. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (7): 2415-2420.

CHILCOT, C.N.; WIGLEY, P.J. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 244-247.

DONOVAN, W.; DANKOCSEK, C.; GILBERT, M.P. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72 -kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of Bacteriology* 170 (10): 4732-4738.

DUSSAN, J.; ANDRADE, D.; LOZANO, L. 1997. Relación de DNA plasmídico y actividad larvicida en cepas nativas de *Bacillus sphaericus*. *Revista Colombiana de Entomología* 23 (3-4): 103-106.

FAUST, M.R.; ABE, K.; HELD, G.A.; IIZUKA, T.; BULLA L.A.; MEYERS, C.L. 1983. Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid* 9: 98-103.

FEITELSON, J.S.; KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Bio/technology* 10: 271-275.

GONZÁLEZ, J.M Jr.; CARLTON, B.C. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 3: 92-98.

- GONZÁLEZ, J.M Jr., DULMAGE, H.T.; CARLTON, B.C. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxins production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 5: 351-365.
- GROSSO, V.; MARTÍNEZ, W.; D, URIBE.; CERÓN, J. 1997. A native strain of Bt with high activity against *Spodoptera frugiperda*. 30th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 24-29 August. Banff, Alberta, Canada. Abstracts p 23.
- HOSSAIN, M.A.; AHMED, S.; HOQUE, S. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. Journal of Invertebrate Pathology 70: 221-225.
- KRONSTAD, J.W.; SCHNEPF, H.E.; WHITELEY H.R. 1983. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. Journal of Bacteriology 154: 419-428.
- LEE, M.K.; CURTISS, A.; ALCÁNTARA, E.; DEAN, D.H. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gypsy moth *Lymantria dispar*. Applied and Environmental Microbiology 62 (2): 583-586.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M.M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. (Ed.) Entwistle, P.F.; Gory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. John Wiley. NY. pp 311.
- LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. 1989. Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En: Regulation of prokaryotic development. (Ed.) Smith, I.; Slepecky, R.; Setlow, P. ASM. Washington D.C. pp 301.
- LÓPEZ, A. 1986. Estudio básico para la cría de *Meteorus laphygmae* Viereck, parásito de *S. frugiperda*. Programa para graduados Universidad Nacional de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario (Tesis de Magister Science). Bogotá (Colombia). 101 p.
- MAHILLON, J.; HESPEL, F.; PIERSSSENS, A-M.; DELCOUR, J. 1988. Cloning and partial characterization of three cryptic plasmids from *Bacillus thuringiensis*. Plasmid 19: 169-173.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- SEKAR, V. 1987. Location of the crystal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* var *aisawai*. Curr. Microbiol. 14: 2893-2897.
- SMITH, G.P.; MERRICK, J.D.; BONE, E.J.; ELLAR, D.J. 1996. Mosquitocidal activity of the Cry1C δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aisawai*. Applied and Environmental Microbiology 62 (2): 680-684.
- SRIVINAS, G.; VENNISON, S.J.; SUDHA, S.N.; BALASUBRAMANIAN, P.; SEKAR, V. 1997. Unique regulation of crystal protein production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *yunnanensis* is mediated by the Cry protein-encoding 103- megadalton plasmid. Applied and Environmental Microbiology 63 (7): 2792:2797.
- URIBE, D.; MARTÍNEZ, W.; YARA, E.; GROSSO, V.; CERÓN J. 1998. Biopesticide activity in field test of Colombian native strains of *Bacillus thuringiensis*. 3rd Latin-American Meeting of Plant Biotechnology. REDBIO/98. La Habana. Cuba. Junio 1-5. Resúmenes p 457.
- VÉLEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: Bionomía y manejo integrado. Ed Universidad de Antioquia. 2ª Edición. Pp 482.
- WILKS, A.; JAYASWAL, N.; LERECLUS, D.; ANDRUP, L. 1998. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73. Microbiology 144: 1263-1270.

Recibido: 07/00

Aceptado: 05/01