

Expresión y toxicidad de cepas de *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* portadoras del gen que codifica la principal δ -endotoxina mosquitocida de *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*

.....

Expression and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* strains harbouring the gene encoding the main mosquitocidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*

.....

Mauricio Realpe¹
Sergio Orduz²

Resumen

La proteína de 94 kDa (MED94) de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* ha sido reconocida como el principal determinante de la toxicidad que esta bacteria exhibe hacia larvas de mosquitos. A partir de una genoteca de ADN total que se evaluó por inmunoblot con anticuerpos policlonales dirigidos contra MED94, se logró identificar, clonar y posteriormente secuenciar el gen que codifica esta endotoxina. En este trabajo se describe la subclonación de este gen procedente del fagémido pBluecript SK(-) que sirvió como donador, haciendo parte de un fragmento de 3.3 kpb flanqueado EcoRI-HindIII (RH3), en dos vectores bifuncionales (pBU4 y pMK3) cuyos orígenes de replicación son compatibles con *B. thuringiensis*. Estos plásmidos difieren en procedencia, número de copias, marcador de selección y estabilidad estructural y segregacional. Al transformar *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* por electroporación con cada uno de los constructos, se obtuvieron cepas recombinantes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q2-81 (cepa acristalífera) y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 (serotipo H14, usado en formulaciones comerciales), las cuales expresaban el gen introducido, según se evidenció por Western blot y bioensayos de toxicidad. Los recombinantes se analizaron mediante Southern blot para detectar la presencia e integridad del gen introducido,

también se analizó la expresión de las δ -endotoxinas nativas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 y se estimó por análisis Probit la concentración letal media (LC50) de proteína cristalina como medida de la toxicidad hacia larvas de tercer ínstar de *Aedes aegypti* expuestas a muestras de los cristales parasporales purificados, comparando las cepas recombinantes con las cepas silvestres.

Palabras claves: *B. thuringiensis*, Resistencia, Manipulación genética, Control biológico, Vectores bifuncionales.

Summary

The 94 kDa protein (MED94) of *B. thuringiensis* subsp. *medellin* has been recognized as the main toxicity factor of this bacterium to mosquito larvae. From a genomic library evaluated by immunoblot with polyclonal antibodies raised against MED94, it was possible to identify, clone, and sequence the gene encoding this endotoxin. This report describes the subcloning procedure of this gene using the phagemid pBlueScript SK(-) as a donor of a 3.3 kpb fragment flanked EcoRI-HindIII (RH3). Two shuttle vectors (pBU4 and pMK3), harbouring replication origins compatible with *B. thuringiensis*, were the receptors of the gene. These plasmids differ in source, copy number, selection marker, and structural-segregational stability. The transforming procedure of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* through electroporation with each construct, gave rise to recombinant strains of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q2-81 (acrystalliferous strain) and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 (H14 serotype, used in commercial formulations), this strain expressed the introduced gene, according to Western blot and toxicity bioassays results. Recombinants were tested by

means of Southern blot experiments to detect the presence and integrity of the introduced gene, it was also analyzed the expression of native δ -endotoxins of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884. The half lethal concentration (LC50) of crystal protein was estimated by Probit analysis, as a measure of the toxicity against third instar larvae of *Aedes aegypti* exposed to samples of the purified parasporal crystals, and compared to the toxicity produced by native strains.

Key words: *B. thuringiensis*, Mosquito resistance, Genetic manipulation, Biological control, Shuttle vectors.

Introducción

La proteína de 94 kDa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (MED94) se asemeja en tamaño, actividad y secuencia a la toxina Cry11Ba de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* y en menor grado a la toxina Cry11Aa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Orduz 1997); los genes que codifican estas toxinas han sido clonados y expresados, tanto en *Escherichia coli* como en mutantes acristalíferos de *B. thuringiensis*. Se ha observado que la toxicidad de cada proteína hacia larvas de mosquitos es inferior, comparada con los cristales completos de las cepas silvestres de donde provienen, no obstante existen diferencias importantes entre las tres toxinas mencionadas de acuerdo con la especie de mosquito analizada; así, la toxina Cry11Ba exhibe la mayor potencia contra larvas de *Culex quinquefasciatus*, mientras que, tanto esta proteína como Cry11Bb, son más tóxicas que Cry11Aa contra larvas de *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti* (Orduz 1997; Restrepo *et al.* 1997).

El gen que codifica la proteína Cry11Aa ha sido clonado, evaluado individualmente y en combinación con el gen que codifica la toxina Cyt1Aa también de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, encontrándose que en combinación, son el factor más importante para la toxicidad de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* hacia larvas de *Culex pipiens* y *A. aegypti*; sin embargo, no supera el efecto tóxico del cristal parasporal completo (Poncet *et al.* 1993; Wirth *et al.* 1996). Adicionalmente *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* sintetiza tres δ -endotoxinas más, Cry4Aa (135 kDa), Cry4Ba (125 kDa) y Cry10Aa (72 kDa) (Delécluse 1991), las cuales sumadas a las anteriores, exhiben sinergismo en su actividad tóxica (Angsuthanasombat *et al.* 1992; Tabashnick 1992).

A nivel de laboratorio es posible seleccionar mosquitos resistentes a las toxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y el tiempo requerido es directamente proporcional al número de toxinas diferentes que se emplee en

1 Biólogo. Investigador de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas. A. A. 7378. Medellín, Colombia.

2 Biólogo Ph.D. Jefe de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico. Corporación para Investigaciones Biológicas. A. A. 7378. Medellín, Colombia.

la selección (Georghiou y Wirth 1997), lo cual exige empezar a regular el uso de esta cepa como agente de control biológico y planear estrategias para disminuir el riesgo de desarrollo de resistencia (WHO/TDR 1996). Ante ello, se cuenta hoy en día con otras dos cepas muy potentes contra mosquitos y que poseen toxinas diferentes a aquellas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, son ellas *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* y *B. thuringiensis* subsp. *medellin*. Una estrategia a considerar sería la manipulación de los genes que codifican estas últimas toxinas con el objeto de incrementar la actividad larvicida de estas bacterias.

En este trabajo se transfirió el gen que codifica la toxina MED94 de *B. thuringiensis* subsp. *medellin* a *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, haciendo uso de vectores de clonación bifuncionales, con el propósito de estudiar su expresión en huéspedes homólogos y evaluar su viabilidad como estrategia para incrementar la efectividad de los métodos de control biológico disponibles hasta ahora.

Materiales y Métodos

Manipulación de cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en LB (2.0%-Bacto Triptona, 0.5%-Bacto Yeast Extract, 10 mM-NaCl, 2%-Agar, pH 7.2). Las cepas de *B. thuringiensis* se cultivaron en LB ó en medio M1 (Orduz *et al.* 1992). Las cepas usadas se describen en la tabla 1.

Los cultivos de *E. coli* se mantuvieron a 37°C durante 15 h mientras que las cepas de *B. thuringiensis* se cultivaron durante 15 h a 30°C para la selección de recombinantes y durante 48 h ó más para lograr la producción de cristal parasporal y evaluar su toxicidad; en medio líquido los cultivos se mantuvieron a 200 rpm. Como antibiótico de selección se usó ampicilina para las cepas de *E. coli* (80-100 µg/ml); mientras que para *B. thuringiensis* se usó tetraciclina (30-35 µg/ml) ó kanamicina (50-60 µg/ml).

La producción de esporas y cristales fue monitoreada por microscopía de luz después de colorear muestras de los cultivos con verde de malaquita y safranina como colorante de contraste, según modificación de la técnica señalada por Hendrickson y Krenz (1991). Para la transformación de *E. coli*, se siguieron metodologías estándar (González *et al.* 1995), similarmente se electrotransformó *B. thuringiensis* de acuerdo con las técnicas descritas por Bone y Ellar (1989) y Lereclus *et al.* (1989).

Subclonación y transformación

Los procedimientos para manipulación del DNA se hicieron de acuerdo con metodologías estándar (Sambrook *et al.* 1989). Esquemáti-

camente el procedimiento se resume en la figura 1. Se usaron sistemas comerciales de extracción y purificación de DNA plasmídico a partir de *E. coli* (Wizard de Promega, Madison, WI, USA; Quantum Prep y Prep-a-Gene de BioRad, Hercules, CA, USA). Las reacciones de corte y ligación sobre el ADN se efectuaron con endonucleasas de restricción y T4 ADN-ligasa adquiridas de Amersham (Buckinghamshire, UK) y New England Biolabs (Beverly, MA, USA). La elución de ADN a partir de agarosa se realizó por el método del nitrógeno líquido (Tautz y Renz 1985).

Se usaron como cepas-huésped de plásmidos las incluidas en la tabla 1, *E. coli* SOLR mantuvo el fagémido pBlueScript SK(-) recombinante procedente por excisión *in vivo* del sistema de clonación Lambda Zap II/ *EcoRI*/CIAP (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y *E. coli* SURE porta el fagémido con el fragmento RH3 que se subclonó; *E. coli* XL1-BLUE MRF' se usó como huésped intermedio en el proceso de subclonación a vectores bifuncionales para selección estricta por (-complementación del sistema reportero *lacZ* (selección blanco/azul). *E. coli* JM83 y *E. coli* JM109 sirvieron como fuente de los vectores bifuncionales, pBU4 y pMK3, respectivamente.

Los vectores bifuncionales que sirvieron como receptores del gen fueron dos, pMK3 (Sullivan *et al.* 1984), derivado mediante fusión de pUB110 (plásmido de resistencia a kanamicina original de *Staphylococcus aureus*) y pUC9 de *E. coli*; y el vector pBU4 (Bourgouin *et al.* 1990), producto de la fusión de pBC16(1 (fragmento *EcoRI-EcoRI* del plásmido de resistencia a tetraciclina pBC16 de *B. cereus*) y pUC19 de *E. coli*. El fagémido donador pBlueScript SK(-) tiene 3.0 kpb; el gen está incluido en un segmento denominado RH3 de 3.3 kpb flanqueado *EcoRI-HindIII* en la cepa *E. coli* SURE, orientado 5'-3' respecto al gen reportero *lacZ* (Fig. 1).

El inserto RH3 fue subclonado en el vector pBU4 haciendo uso de los extremos cohesivos dejados por *EcoRI* y *HindIII* (5' y 3' respectivamente) mientras que, para el vector pMK3, se usaron las secuencias de corte para *PstI* corriente arriba del extremo 5' y *SalI* corriente abajo del extremo 3', de tal manera que la orientación del gen se mantuvo 5'-3' tal como en el fragmento original (Fig. 1). Luego de obtener los recombinantes de *E. coli*, se extrajeron los plásmidos por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979) y luego fueron introducidos a través de electrotransformación en una cepa acristalífera de *B.*

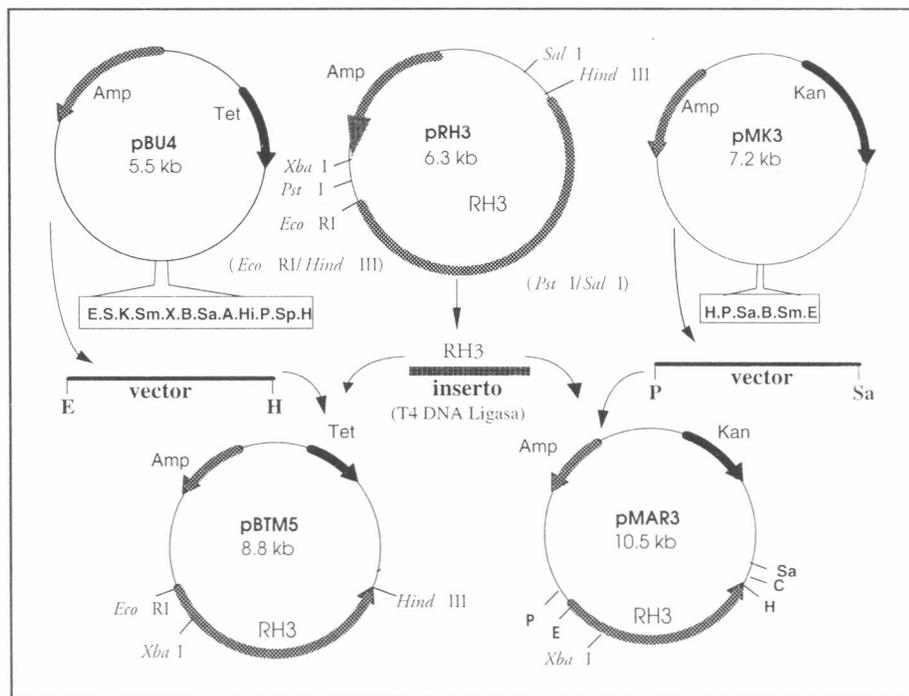


Figura 1. SUBCLONACION EN VECTORES BIFUNCIONALES. Se ilustra el fragmento E-H de 3.3 kpb (RH3) como parte del fagémido recombinante pRH3 y se indican las endonucleasas relevantes para subclonación. Nótese la orientación del fragmento y compárese con su orientación en el polylinker de los vectores bifuncionales; para pBU4 se usaron los sitios E y H mientras que para pMK3 se usaron P y Sa, en cada caso el fagémido original se cortó con las mismas enzimas que el vector. S *SacI*, X *XmaI*, B *BamHI*, Sm *SmaI*, P *PstI*, E *EcoRI*, H *HindIII*, C *ClaI*, Sa *Sall*, Hi *HincII*, K *KpnI*, A *AccI*, Sp *SphI*.

Tabla 1. Cepas Bacterianas Utilizadas en este Estudio con sus Respectivos Marcadores Genéticos y Procedencia.

BACTERIAS	GENOTIPO	FUENTE
<i>E. coli</i> SOLR	e14'(McrA) ? (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5(kan ^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 (F' proAB lacI ^q Z' M15) Su ^r .	STRATAGENE, La Jolla.
<i>E. coli</i> XL1 BLUE MRF'	(McrA)183 ? (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 SupE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI ^q Z' M15 Tn10(tet ^r)].	STRATAGENE, La Jolla.
<i>E. coli</i> SURE	e14'(McrA) ? (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 SupE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kan ^r) uvrC [F' proAB lacI ^q Z' M15 Tn10(tet ^r)].	STRATAGENE, La Jolla.
<i>E. coli</i> JM109	e14'(McrA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r _k m _k ⁺)SupE44 relA1 ? (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q Z' M15].	PROMEGA, Madison.
<i>E. coli</i> JM83	Ara ? (lac-proAB) RpsL (80d lacZ' M15. F.	Instituto Pasteur, París.
Bti 4Q2-81	<i>cry</i> ⁻ . Mutante acristalífero por curación de todos sus plásmidos residentes.	Bacillus Genetics Stock Centre, Ohio.
Bti 1884	tipo silvestre.	Instituto Pasteur, París.
Btmed 163-131	tipo silvestre.	CIB, Medellín.

E. coli *Escherichia coli*. Bti *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*. Btmed *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*

thuringiensis subesp. *israelensis* designada 4Q2-81. Esta cepa realizaría el procedimiento de modificación propio de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, el cual posteriormente permitiría introducir los plásmidos recombinantes en la cepa tóxica para mosquitos *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884.

Evaluación de la presencia del gen introducido

Se efectuó Southern blot (Southern 1975) e hibridación específica usando el sistema directo de marcación y detección de ADN ECL (Amersham, Buckinghamshire, U.K.). El ADN plasmídico de las cepas recombinantes fue obtenido siguiendo el método de lisis alcalina y se sometió a digestión con *EcoRI* y *HindIII* para luego separar los fragmentos en agarosa y transferirlos a membranas de nylon con carga positiva.

La membrana se sometió a hibridación con una sonda de 527 pb. obtenida por corte con *XbaI* sobre el subclón pRH3, que comprende 30 pb. del polylinker de pBlueScript SK(-) más los primeros 497 pb. del inserto *EcoRI-HindIII* que incluyen el extremo 5' del gen entre los nucleótidos 173 y 497 donde se ha observado que yace la variabilidad de los genes *cry* (Lereclus 1988; Thompson *et al.* 1995). Previamente se evaluó la especificidad de esta sonda según análisis comparativo de secuencias con el programa de computador MacDnasis (Hitachi Software Engineering Co., San Bruno, CA), y experimentalmente, mediante dot-blot (resultados no mostrados).

Evaluación de la expresión del gen introducido

Se prepararon cultivos líquidos de 48 h con cada una de las cepas de *B. thuringiensis* silvestres y recombinantes en medio de esporulación M1, para electroforesis de proteínas en gel de poli(acrilamida) denaturante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); se cosecharon 500 (µl. de cultivo completo final, se lavó el precipitado 2 veces por centrifugación con 1.0 ml de agua estéril y luego se incubó en NaCl 1.0 M durante 30 minutos a 37 °C; posteriormente, las células fueron sometidas a 2 lavados más y se resuspendieron en 50 µl. de buffer Laemmli (Ausubel *et al.* 1995).

Luego de su separación por electroforesis, las proteínas se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa y se realizó detección específica de MED94 mediante anticuerpos policlonales generados en ratón (Orduz *et al.* 1996); en forma separada, se realizó detección de las proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa) usando una mezcla de los respectivos anticuerpos policlonales específicos para cada una (suministrados por la Dra. Armelle Delécluse, Instituto Pasteur). Luego, se reveló el complejo antígeno-anticuerpo usando anticuerpos de cabra anti-ratón acoplados a fosfatasa alcalina (BioRad, Hercules, CA, USA) como anticuerpo secundario y se detectaron con substratos formadores de color, en tampón carbonato pH 9.6. Después de confirmar la expresión del gen introducido usando cultivo completo final para la selec-

ción de las cepas transformadas, se repitió el Western blot con los cristales parasporales para analizar su composición.

Análisis de actividad tóxica

Se incubaron cultivos líquidos en 250 ml de medio M1 a 200 rpm y 30°C durante 48 h.; se adicionó a cada uno 500 ml de agua estéril y se incubaron, adicionalmente, hasta esporulación máxima. Se realizó entonces la purificación de cristales mediante extracción orgánica en un sistema de bipartición líquido-líquido con CCl₄ y Na₂SO₄ (Otieno-Ayayo *et al.* 1993).

Las muestras enriquecidas en cristales se sometieron a solubilización en una solución 0.05 N de NaOH incubando a 37°C durante 1 h y precipitando 30 minutos a 12.000 rpm y 4°C; posteriormente, se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas siguiendo la metodología recomendada en el sistema Protein Assay (BioRad, Hercules, CA., USA). Se usaron diluciones 1:500 y como estándar, albúmina de suero bovino (BSA).

Posteriormente se dispusieron bioensayos de toxicidad tratando larvas de tercer ínstar de *A. aegypti* con diferentes concentraciones de cristales (20 individuos por tratamiento en 100 ml de agua microfiltrada) y tres réplicas de acuerdo con metodologías estándar, con tres repeticiones en días diferentes (Orduz *et al.* 1992). Como control positivo, se adicionaron 100 µl de un cultivo completo final de 48 h de *B. thuringiensis* subesp. *medellin* en medio M1. Los bioensayos para determinar la actividad tóxica se realizaron a 30°C y la lectura de mortalidad se hizo al cabo de 24 h. Mediante análisis Probit se estimó la concentración letal media (LC₅₀) para cada cepa con un programa de computador desarrollado por E. Frachon en el Instituto Pasteur, este análisis se realizó en un computador Macintosh Performa 630.

Resultados

Obtención de plásmidos y cepas recombinantes

Como producto del proceso de subclonación se obtuvieron dos plásmidos recombinantes que se designaron pBTM5 y pMAR3 (RH3 subclonado en pBU4 y en pMK3, respectivamente). Al cortar con *EcoRI* y *HindIII* el primer vector (pBU4), produjo un fragmento de 5.5 kpb mientras que el segundo formó dos, de 5.4 kpb y 1.8 kpb, el inserto RH3 fue de 3.3 kpb aproximadamente (Figs. 1 y 2A).

En la transformación de *E. coli* se observó una eficiencia aproximada de 10⁵ transformantes/µg de ADN al usar células competentes preparadas y almacenadas a -70°C, lo cual no fue muy diferente a la eficiencia mostrada por cé-

lulas competentes adquiridas comercialmente (10^5 - 10^6 transformantes/ μ g de ADN). En la electrotransformación de *B. thuringiensis* se observó baja eficiencia (entre 10^1 y 10^2 transformantes/ μ g de ADN); sin embargo, ello fue suficiente para seleccionar clones positivos (resistentes al antibiótico de selección) y confirmar luego, mediante análisis de restricción, la integridad de los constructos dentro de cada cepa (Fig. 2A). Además se demostró expresión de la proteína recombinante mediante Western blot y pruebas de toxicidad sobre larvas de tercer ínstar de *A. aegypti*.

Evaluación de la presencia del gen introducido

Al ser cortado con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII* el ADN plasmídico extraído de cada uno de los recombinantes de *E. coli* JM109, *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 4Q2-81, y *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884, se encontraron las señales esperadas para los plásmidos recombinantes, aparentemente sin modificación estructural alguna. En la figura 2A se observa que en las líneas 7 y 14 (pRH3 y p3A6.1A, respectivamente) se presenta un fragmento aproximadamente de 3.3 kpb que corresponde al inserto RH3 subclonado en los vectores mostrados en los carriles 3 y 10 (pBU4 y pMK3, respectivamente); así se confirma la presencia en cada cepa, de los plásmidos recombinantes pBTM5 (líneas 4, 5 y 6) y pMAR3 (líneas 11, 12 y 13).

Posteriormente, se evaluó si el fragmento subclonado correspondía al gen mediante hibridización con la sonda *XbaI* sobre el ADN separado en gel y transferido a membranas de Nylon con carga eléctrica positiva. Se generaron señales para el inserto RH3 (aproximadamente 3.3 kpb) en todas las cepas que lo portan, tanto de *E. coli* (carriles 4 y 11), como de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 4Q2-81 (carriles 5 y 12) y *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 (carriles 6 y 13), se confirma así la identidad del fragmento subclonado (Fig. 2B).

Evaluación de la expresión del gen introducido

Para analizar si el gen introducido se expresaba como una proteína Cry (haciendo parte del corpúsculo parasporal), se purificaron cristales de cada cepa y se separaron las proteínas mediante SDS-PAGE; luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se pusieron en contacto con anticuerpos contra MED94 de *B. thuringiensis* subesp. *medellin* (Fig. 3B), ó con anticuerpos contra las (δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (Fig. 3A). Se encontró que la proteína MED94 se expresó individualmente tanto en *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 4Q2-81 (líneas 9 y 10), como en la cepa 1884 de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (líneas 12 y 13). Además,

esta última cepa expresó simultáneamente sus propias proteínas Cry (carriles 3 y 4) que hacen parte del cristal parasporal.

En los recombinantes y la cepa silvestre de *B. thuringiensis* subesp. *medellin*, la movilidad electroforética mostrada por la proteína MED94 coincidió con una banda de 94 kDa aproximadamente. No obstante al observar la expresión del gen introducido y los genes nativos de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, la esporulación y formación de cristal parasporal sufrieron un retraso significativo en las cepas transformadas; la tabla 2 reúne los datos de tiempo que cada cepa necesitó para alcanzar el 80% de esporulación.

Actividad tóxica

Los cristales producidos por las cepas recombinantes adoptaron formas variadas (redondos, ovoides, alargados); como pauta general, tendieron a ser de mayor tamaño y amorfos.

Se registraron los datos de mortalidad correspondientes a cada preparación de cristales y se estimó la LC_{50} ; al respecto, las cepas silvestres mostraron el patrón de toxicidad característico (Orduz *et al.* 1992); el valor de toxicidad obtenido con los dos recombinantes de la cepa 4Q2-81 (uno con cada constructo) fue muy semejante entre sí y solo levemente inferiores a los recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884. La dispersión de los datos experimentales estuvo dentro de rangos aceptables y por ello, la estimación cuantitativa se mostró estadísticamente confiable (Tabla 3). La información derivada de los bioensayos, sugiere que cuantitativamente deben existir cambios importantes en la expresión de las (δ -endotoxinas, pues se encontró que las cepas recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 exhibieron valores mayores de LC_{50} y por tanto, niveles de toxicidad 10 veces inferiores con respecto a las cepas silvestres (Tabla 3).

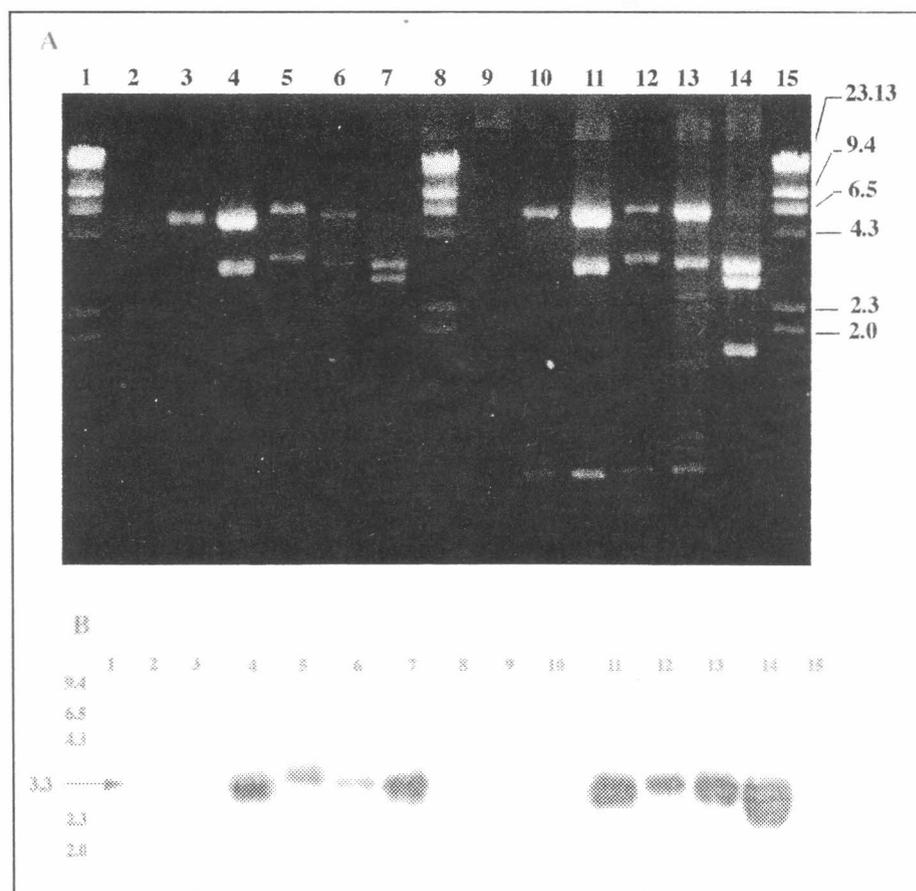


Figura 2. A. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (1%) CON DNA PLASMIDICO DIGERIDO *EcoRI-HindIII* (excepto líneas 2 y 9). B. SOUTHERN BLOT USANDO COMO SONDA UN FRAGMENTO *XbaI* DE 527 pb. Carriles 1, 8 y 15 h/*hindIII*; carriles 2 y 9 DNA plasmídico total de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* 163-131 y *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 sin cortar; carriles 3 y 10 vectores bifuncionales pBU4 y pMK3; carriles 4 y 11 pBTM5 y pMAR3 de *Escherichia coli* JM109; carriles 5 y 12 pBTM5 y pMAR3 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q2-81, carriles 6 y 13 pBTM5 y pMAR3 de Bti 1884; carriles 7 y 14 fagémidos originales pRH3 y p3A6.1A.

Tabla 2. Tiempo Requerido por cada Cepa Recombinante para Alcanzar la Esporulaci3n en Medio M1.

Cepa	50% de Esporulaci3n	80% de Esporulaci3n
Bti 1884	24 horas	48 horas
Bti 1884 (MAR3)	96 horas	>120 horas
Bti 1884 (BTM5)	96 horas	>120 horas
Bti 4Q2-81(MAR3)	72 horas	>150 horas
Bti 4Q2-81(BTM5)	72 horas	>150 horas
Btmed 163-131	24 horas	48 horas

E. coli *Escherichia coli*. Bti *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis*. Btmed *Bacillus thuringiensis* subesp. *medellin*

Tabla 3. Evaluaci3n de la Toxicidad de las Cepas Recombinantes Comparada con las Cepas Silvestres *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 y *B. thuringiensis* subsp. *medellin* 163-131.

Cepa	LC ₅₀ (ng/ml) *	L3mites (5%)	LC ₉₀ (ng/ml)
Bti 1884	0.55	0.5-0.61	2.54
Bti 1884 (MAR3)	5.85	5.46-6.25	15.06
Bti 1884 (BTM5)	7.96	7.5-8.43	18.79
Bti 4Q2-81(MAR3)	11.56	10.44-12.72	60.88
Bti 4Q2-81(BTM5)	8.43	7.78-9.18	32.72
Btmed 163-131	5.56	5.01-6.04	19.83

Bti *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*; Btmed *B. thuringiensis* subsp. *medellin*

* Calculado a partir de tres experimentos con tres repeticiones en cada uno.

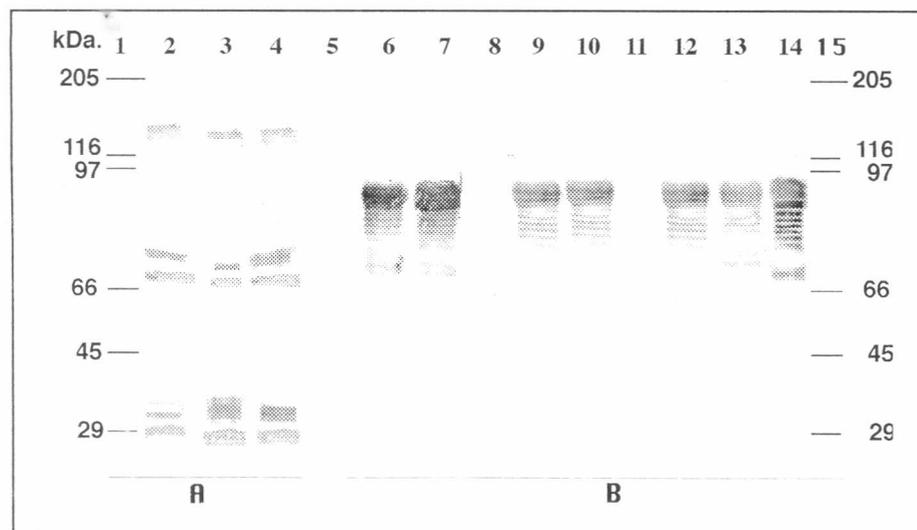


Figura 3. WESTERN BLOT CON PROTEINAS CRISTALINAS DE LOS RECOMBINANTES. Carriles 1 y 15 marcador de peso molecular. Panel A: Carril 2 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 nativo, carril 3 y 4 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 transformado con pBTM5 y pMAR3 respectivamente. Panel B: Carril 5 *Escherichia coli* con el vector pMK3; carriles 6 y 7 cepa acristal3fera de *B. thuringiensis* subsp. *medellin* transformada con pBTM5 y pMAR3; carril 8 cepa acristal3fera sin transformar; carriles 9 y 10 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q2-81 transformada con pBTM5 y pMAR3; carril 11 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, carriles 12 y 13 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 1884 transformada con pBTM5 y pMAR3; carril 14 *B. thuringiensis* subsp. *medellin*. N3tese que los carriles 2 y 13 corresponden a la misma cepa, al igual que los carriles 3 y 12, y los carriles 4 y 13. El panel A fue revelado con anticuerpos dirigidos contra las proteinas cristalinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, mientras que el panel B se revel3 con anticuerpos dirigidos contra MED94 de *B. thuringiensis* subsp. *medellin*.

Discusi3n

Desde el comienzo de esta d3cada se han venido desarrollando trabajos de transferencia de genes que codifican toxinas mosquitocidas de *B. thuringiensis* con resultados muy variables (Porter 1996); sin embargo, se espera que ellos aporten resultados exitosos cuando se depuren los m3todos usados y se disponga de mayor conocimiento sobre la expresi3n de estos genes (WHO/TDR 1996).

Se ha observado que la introducci3n de pl3smidos de alto n3mero de copias en *B. thuringiensis* ocasiona importantes efectos que se manifiestan por la inestabilidad segregacional y estructural de los vectores, adem3s de perturbar fisiol3gicamente a la bacteria en lo que respecta al conjunto de eventos que dan lugar a la esporulaci3n (Aga3sse y Lereclus 1995). Sin embargo, en este trabajo no se observ3 tal inestabilidad como lo evidencia la figura 2A.

Por otro lado, la expresi3n de las proteinas t3xicas nativas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* confirma que la introducci3n del gen que codifica MED94, no ocasion3 la p3rdida ni interfiri3 significativamente con la segregaci3n y expresi3n dependiente del pl3smido de 125 kpb de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*. Ello sugiere que el origen de replicaci3n del pl3smido introducido podr3a ser compatible con el pl3smido nativo como ya fue propuesto (Bron 1990; Gonz3lez et al. 1982; Loprasert et al. 1986; Seyler et al. 1993). Similarmente, la expresi3n del gen introducido es semejante en la cepa silvestre *B. thuringiensis* subsp. *medellin* y las cepas recombinantes obtenidas; lo cual indica que la prote3na producida no est3 sujeta a modificaciones postraduccionales que le ocasionen cambios estructurales adicionales.

Del3cluse (1991), al comparar los vectores bifuncionales pBU4, pMK3 y pHT3101, como veh3culos para la introducci3n de genes de *B. thuringiensis* en *B. sphaericus*, encontr3 que los tres vectores dan lugar a retrasos en el crecimiento de los transformantes, siendo menor en el caso del vector pMK3 (vector utilizado en el constructo pMAR3) y mucho mayor con pHT3101. Un elemento a considerar en la elecci3n de un vector de clonaci3n para los genes *cry* es la relaci3n entre el n3mero de copias del pl3smido y el nivel de expresi3n de la prote3na Cry.

El uso de3rdenes de replicaci3n propios de *B. thuringiensis* permite mantener un n3mero de copias igual 3 semejante al del pl3smido original y ello asegurar3a la expresi3n adecuada del gen introducido. Lo anterior ha sido considerado en algunos trabajos, pero tambi3n se han logrado introducir genes con el uso de vectores que poseen 3rdenes de replicaci3n diferentes, aunque compatibles, con los

plásmidos de *B. thuringiensis* como es el caso de pBC16 (Baum *et al.* 1990), plásmido fuente del vector pBU4 empleado en este trabajo. Con este último se ha logrado transformar *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* previamente encontrándose que la esporulación y expresión de las toxinas originales de esta subespecie no se ve alterada en su presencia (Bourgouin *et al.* 1990). En ese mismo trabajo se demostró que la alteración fisiológica de las cepas recombinantes tiene como causa el gen introducido y no el vector usado, resultado que puede ser extrapolado al trabajo aquí presentado, por lo menos en lo que respecta al constructo pBTM5 que fue formado sobre el vector en mención.

En este trabajo, el análisis por Southern blot confirmó la identidad del gen introducido con base en el resultado aportado por los controles positivos y negativos (Fig. 2, carriles 7 y 14, y carriles 3 y 10). La ausencia de señal en el carril 2 (Fig. 2B) se debe a que el ADN plasmídico fue obtenido por un método propio de plásmidos de bajo peso molecular, mientras que los genes *cry* de *B. thuringiensis* se encuentran en plásmidos de muy alto peso molecular como es el caso con el plásmido de 125 kpb (72 MDa) de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (Ben-Dov *et al.* 1996; Gonzalez *et al.* 1982), la razón es que estos plásmidos desaparecen en las extracciones debido a fuerzas de cizalladura (shearing forces) que los degradan y los vuelven susceptibles a las nucleasas contaminantes.

En el Western blot (Fig. 3A) se observó señal específica para la δ -endotoxina de 94 kDa de *B. thuringiensis* subesp. *medellin* en todos los recombinantes (Fig. 3, carriles 6, 7, 9, 10, 12 y 13), lo que sugiere que la expresión está teniendo lugar incluso como el patrón multibanda característico de la cepa silvestre (carril 14). Al nivel de resolución estudiado, no se observaron diferencias de expresión en cuanto se las relaciona con el tipo de vector bifuncional usado (compárense líneas 6 y 7, 9 y 10, ó 12 y 13). También se observa la expresión, al menos en forma cualitativa, de las δ -endotoxinas nativas en las cepas recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, lo cual parece indicar que la expresión de los genes nativos no está disminuida por la expresión del gen introducido, como fue indicado por Bar *et al.* (1991), quienes usaron un vector derivado de pUB110 (pPL603E) como vehículo para la introducción de todos los genes *cry* de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* en *B. sphaericus*, ellos obtuvieron recombinantes que mostraron moderada estabilidad y esporulación retrasada (aunque esto no ocurrió en presencia del vector solo). Esta alteración se explicó por el mayor tiempo necesario para expresar los genes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* introducidos pero aún así, no se logró mejorar ostensiblemente

la toxicidad de la bacteria hacia larvas de *A. aegypti*, particularmente, la proteína Cyt1Aa no se alcanzó a expresar y ello pudo hacer parte de las razones que explican la falta de toxicidad.

En el presente trabajo se observó que la toxicidad de las cepas recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 hacia larvas de *A. aegypti* disminuyó en un orden de 10 veces, según lo sugieren los valores aproximadamente diez veces mayores de LC₅₀ comparados con la cepa silvestre (Tabla 3); al nivel de resolución estudiado, no es posible atribuir tal disminución a diferencias cuantitativas de expresión entre los genes nativos y el gen introducido.

El retraso en la esporulación de las cepas recombinantes que fuera observado en este trabajo impidió superar un 80% de células esporuladas, al cabo de siete días de cultivo (Tabla 2). Si se considera el alto nivel de expresión en la cepa donante del gen transferido (Fig. 3, línea 14), es admisible proponer un fenómeno de "saturación de la maquinaria de expresión" (transcripción y traducción involucrando todas las subunidades σ^{35} y σ^{28} disponibles de la ARN polimerasa bacteriana), para explicar el retraso en la esporulación; cuando se separaron en gel las proteínas de los cristales extraídos (datos no mostrados), se notó una disminución en la intensidad de la señal correspondiente a las dos δ -endotoxinas Cry4Aa y Cry4Ba de los recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, comparada con la cepa silvestre, lo cual podría ser reflejo del fenómeno postulado. En caso de presentarse tal saturación, se retrasa el conjunto de procesos que proceden desde las fases iniciales hasta las fases finales de la esporulación, incluyendo la biosíntesis de las endotoxinas (Pigot *et al.* 1994).

Este trabajo permitió obtener recombinantes de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 4Q2-81 y *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 que expresan la δ -endotoxina MED94 de *B. thuringiensis* subesp. *medellin*. Hasta el momento los resultados indican que es factible obtener cepas que soportan los plásmidos recombinantes introducidos; así mismo, se confirma la expresión del gen introducido y la expresión de los genes nativos en *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884, y se evalúa la toxicidad hacia larvas de *A. aegypti*; sin embargo, hace falta ampliar el análisis de toxicidad para evaluar el efecto del gen introducido y su papel como parte del arsenal tóxico que caracteriza a esta bacteria y le confiere toxicidad hacia larvas de otras especies de mosquitos.

Conclusiones

- El gen que codifica la principal δ -endotoxina de *B. thuringiensis* subesp.

medellin (MED94), puede ser transferido a *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* cepas 1884 y 4Q2-81, mediante vectores bifuncionales con orígenes de replicación diferentes pero compatibles a los de *B. thuringiensis* (pBU4 y pMK3).

- La δ -endotoxina MED94 puede ser expresada tanto en el mutante acristalífero 4Q2-81 como en la cepa silvestre *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884; en esta última, la expresión de las δ -endotoxinas nativas ocurre simultáneamente. La expresión del gen recombinante da lugar a importantes modificaciones fisiológicas que alteran el proceso normal de esporulación, anteriormente se había comprobado que este evento no era debido al vector utilizado.
- La δ -endotoxina MED94 expresada independientemente en el mutante acristalífero *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 4Q2-81, exhibe mayor toxicidad hacia larvas de tercer instar de *A. aegypti*, que cualquiera de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* 1884 expresadas individualmente. La expresión simultánea de la δ -endotoxina recombinante (MED94) y las nativas, al parecer no genera ningún tipo de efecto aditivo ó sinergismo en la toxicidad hacia larvas de *A. aegypti* con base en la LC₅₀ observada en cada caso; por el contrario, la actividad tóxica en las cepas recombinantes es 10 veces menor.

Agradecimientos

Esta investigación recibió apoyo económico de COLCIENCIAS, el Instituto Pasteur y la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Bibliografía

- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. 1995. How does *B. thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology* (Estados Unidos) 177: 6027-6032.
- ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. 1992. Comparison of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *Federation of European Microbiology Societies, Microbiology Letters* (Holanda) 94: 63-68.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (Eds.). 1995. *Short Protocols in Molecular Biology* (Third Edition). (Estados Unidos), John Wiley and Sons, Inc.
- BAR, E.; LIEMAN-HURWITZ, J.; RAHAMIM, E.; KEYNAN, A.; SANDLER, N. 1991. Cloning and expression of *B. thuringiensis israelensis* δ -endotoxin in *B. sphaericus*. *Journal of Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) 57: 149-158.

- BAUM, J.A.; COYLE, D.M.; GILBERT, M.P.; JANY, C.S.; GAWRON-BURKE, C. 1990. Novel cloning vectors for *B. thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 56: 3420-3428.
- BEN-DOV, E.; EINAV, M.; PELEG, N.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. 1996. Restriction map of the 125-Kilobase plasmid of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 62: 3140-3145.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research (Reino Unido) 7: 1513-1523.
- BONE, E.J.; ELLAR, D.J. 1989. Transformation of *B. thuringiensis* by electroporation. Federation of European Microbiology Societies, Microbiology Letters (Holanda) 58: 171-178.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; DE LA TORRE, F.; SZULMAJSTER, J. 1990. Transfer of the toxin protein genes of *B. sphaericus* into *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 56: 340-344.
- BRON, SIERD. 1990. Plasmids. En: Harwood, C.R.; Cutting, S.M. (Eds.). Molecular biological methods for *Bacillus*. Modern Microbiological Methods. (Estados Unidos). John Wiley and Sons, Inc. p. 75-174.
- DELÉCLUSE, A. 1991. Caracterisation des genes codant pour les toxines de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*. actif sur les larves de dipteres, vecteurs de maladies tropicales. (Francia). Paris. These de Doctorat de l'Universite Paris VII. 233 pp.
- GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 63: 1095-1101.
- GONZALEZ, J.M. (JR.); DULMAGE, H.T.; CARLTON, B.C. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *B. thuringiensis*. Plasmid (Reino Unido) 5 351-365.
- GONZALEZ (JR.), J.M.; BROWN, B.J.; CARLTON, B.C. 1982. Transfer of *B. thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proceedings of the National Academy of Sciences (Estados Unidos) 79: 6951-6955.
- GONZALEZ, D.O.; PALACIOS, N.; TOHME, J. (Comps., Eds). 1995. Protocolos para marcadores moleculares. (Colombia), Cali. CIAT-Unidad de Investigación en Biotecnología. 78 p.
- HENDRICKSON, D.A.; KRENZ, M.M. 1991. Reagents and stains. In: Balows, A. (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, 5th Edition. (Estados Unidos), Washington. ASM Press. p. 1289-1314.
- LERECLUS, D. 1988. Génétique et biologie moléculaire de *B. thuringiensis*. Bulletin of Institute Pasteur (Francia) 86: 337-371.
- LERECLUS, D.; ARANTES, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M.M. 1989. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *B. thuringiensis*. Federation of European Microbiology Societies, Microbiology Letters (Holanda) 60: 211-218.
- LOPRASERT, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. 1986. Transfer of plasmids pBC16 and pC194 into *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) 48: 325-334.
- ORDUZ, S. 1997. Aspectos Bioquímicos y Moleculares de la bacteria patógena de mosquitos. *B. thuringiensis* subsp. *medellin*. (Colombia). Medellín. Tesis de Ph.D., Universidad de Antioquia. 134 pp.
- ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M.M.; MONTOYA, A.E.; DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *B. thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. Journal of Invertebrate Pathology (Estados Unidos) 59: 99-103.
- ORDUZ, S.; DIAZ, T.; RESTREPO, N.; PATIÑO, M.M.; TAMAYO, M.C. 1996. Biochemical, immunological and toxicological characterization of the crystal proteins of *B. thuringiensis* subsp. *medellin*. Memories do Institute Oswaldo Cruz (Brasil) 91: 231-237.
- OTIENO-AYAYO, N.Z.; CHIPMAN, D.M.; ZARITSKY, A.; KHAWALED, K. 1993. Integrity of the 130 kDa polypeptide of *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* δ -Endotoxin in K-S sporulation medium. Insect Science Applications (Estados Unidos) 14: 377-381.
- PIGOT, P.J.; MORAN (JR); C.P.; YOUNGMAN, P. (Eds.). 1994. Regulation of bacterial differentiation. (Estados Unidos), Washington. AMS Press.
- PONCET, S.; ANELLO, G.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. 1993. Role of the CryIVD polypeptide in the overall toxicity of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 59: 3928-3930.
- PORTER, A.G. 1996. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. Parasitology Today (Reino Unido) 12: 175-179.
- RESTREPO, N.; GUTIERREZ, D.; PATIÑO, M.M.; THIÉRY, I.; DELÉCLUSE, A.; ORDUZ, S. 1997. Cloning, Expression and Toxicity of a Mosquitocidal Toxin Gene of *B. thuringiensis* subsp. *medellin*. Memories do Instituto Oswaldo Cruz (Brasil) 92: 257-262.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. (Estados Unidos), New York. Cold Spring Harbor Laboratory.
- SEYLER, R.W.; YOSTEN, A.A.; THAL, T.S.; BURKE Jr, W.F. 1993. Stability of pUB110 and pUB110-derived plasmids in *B. sphaericus* 2362. Applied and Microbiological Biotechnology (Estados Unidos) 39: 520-525.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology (Estados Unidos) 98: 503-517.
- SULLIVAN, M.A.; YASBIN, R.E.; YOUNG, F.E. 1984. New shuttle vectors for *B. subtilis* and *Escherichia coli* which allow rapid detection of inserted fragments. Gene (Reino Unido) 29: 21-26.
- TABASHNICK, B.E. 1992. Evaluation of synergism among *B. thuringiensis* toxins. Applied and Environmental Microbiology (Estados Unidos) 58: 3343-3346.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1985. An optimized freeze-squeeze method for recovery of DNA fragments from agarose gels. Biochemistry (Reino Unido) 132: 14-19.
- THOMPSON, M.A.; ERNEST, H.E.; FEITELSON, J.S. 1995. Structure, function and engineering of *B. thuringiensis* toxins. En: Genetic Engineering. (Estados Unidos). Plenum Press. 17: 99-117.
- WHO/TDR. 1996. Genetic manipulation of larvicidal bacteria for disease vector control. Informal Consultation. (España). Cordoba. September 6-8.
- WIRTH, M.C.; GEORGHIOU, G.P.; FEDERICI, B.A. 1996. CytA overcomes high levels of resistance in *Culex quinquefasciatus* to combinations of *B. thuringiensis* CryIV toxins. Abstracts of the 29th Congress of the Society for Invertebrate Pathology (Annual Meeting on *B. thuringiensis*). (España). Córdoba. Septiembre 01-06.