

TRABAJOS DE INVESTIGACION

CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*: UNA NUEVA FUENTE DE BIOPESTICIDAS Y SU PROYECCION BIOTECNOLOGICA¹

LUIS MEZA-BASSO, PATRICIO ESPINOZA, CRISTINA THEODULOZ, MARCELA VASQUEZ, CAROLINA PARRA, JAVIER ZUÑIGA, JULIO SAEZ-VASQUEZ Y ELIZABETH HUBERT

Programa de Biología Vegetal, Facultad de Recursos Naturales, Universidad de Talca²

RESUMEN

En la búsqueda de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (BT) con un rango de insecto-hospedero más amplio, se colectaron muestras de suelo de terrenos pertenecientes a la VII Región de Chile. Más de un centenar de aislados fueron caracterizados, utilizando diversos criterios: microbiológicos, inmunológicos, bioquímicos y de actividad insecticida. Se compararon las propiedades de estos aislados con la variedad comercial *kurstaki* y con otras cepas de BT descritas. Se seleccionaron ocho cepas nativas por análisis "southern" empleando una sonda radiactiva que representa una región muy conservada del gen de la proteína insecticida, confirmando de este modo, la autenticidad de los aislados seleccionados.

ABSTRACT

NATIVE STRAINS OF *Bacillus thuringiensis*: A NOVEL PESTICIDES SOURCE AND ITS BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE

The search of native strains of *Bacillus thuringiensis* (BT) with a wider host-range spectrum was undertaken collecting soil samples from fields belonging to the VII Region, Chile. More than a hundred isolates were characterized using different criteria: microbiological, immunological, biochemical and insecticidal capacity. Their properties were compared to the comercial variety *kurstaki* and other BT strains already described. Eight native strains were selected by means of the "southern" analysis using a radioactive labeled probe which corresponds to a well conserved region of the insecticidal protein gene. This result confirms the authenticity of the selected isolates.

INTRODUCCION

Se ha constatado que las pérdidas causadas por la acción de insectos es del orden del 40% en la producción de ciertos cultivos específicos, tales como poroto, maíz y algunos frutales (1).

Uno de los enfoques interesantes para resolver esta problemática, es la utilización de microorganismos con propiedades insecticidas. El de mayor éxito ha sido la bacteria *Bacillus thuringiensis*, comúnmente referida como BT (2, 3).

Esta bacteria, Gram (+) esporulante, se vende comercialmente para el control de insectos desde 1961. Su actividad se dirige primariamente contra lepidópteros, en su estadio de larva (4). Sin embargo, se ha demostrado que las variedades de *B. thuringiensis* difieren considerablemente en su toxicidad y el rango de hospedero (5).

En general, las subespecies de BT encontradas logran controlar, incluyendo las pestes más serias, alrededor de 200 especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros (6, 7 y 8).

La actividad insecticida de BT está dada por una proteína de alto peso molecular (130-140 kDa) llamada delta-endotoxina, que es producida en forma de un cristal proteico o cuerpo parasporal. Esta inclusión se solubiliza a pH alcalino (pH > 10) en el interior del intestino medio de las larvas susceptibles (9 y 10). Los péptidos tóxicos de 60-65 kDa se unen a un receptor del epitelio del

¹ La investigación fue financiada a través de los proyectos: Fondecyt 0128/91, PNUD/UNESCO RLA 83/003/009 y Dirección de Investigación y Asistencia Técnica, Universidad de Talca.

Los autores agradecen a la Srta. Sandra Alegría por el trabajo secretarial y al Sr. Leonardo Meza por la confección del material gráfico.

² Casilla 747, Talca, Chile.

intestino medio y por un mecanismo no aclarado completamente, causa la parálisis inmediata del intestino, provocando la muerte del insecto al cabo de 2 a 6 días (11 y 12).

Las ventajas comparativas de la utilización del BT como estrategia del control de insectos, se basa en que la toxina es altamente específica, no es tóxica para los organismos animales y no produce contaminación del medio ambiente, constituyéndose, entonces, en una alternativa al empleo de los agentes químicos de control (13). Sin embargo, su uso comercial se ha limitado por el alto costo de producción que esto significa, acompañado de la inestabilidad de la proteína cristalina cuando ésta es expuesta en el campo a la luz solar (14). Adicionalmente, las lluvias reducen, considerablemente, las concentraciones al efectuarse la aplicación directamente sobre el tejido foliar atacado (15).

El conocimiento actual en torno a BT, ha permitido una solución parcial a tales dificultades. Es así como, en lo que se refiere al aspecto de acción, diversos Laboratorios y Centros se han preocupado del aislamiento y caracterización de cepas de BT provenientes de diferentes regiones. Una clasificación efectuada según sus propiedades inmunológicas y de homología estructural, ha permitido agruparlas en 6 diferentes categorías: Cry I (específica para lepidópteros), Cry II (específica para lepidópteros y dípteros), Cry III (específica para coleópteros), Cry IV (específica para dípteros), Cry V y Cry VI (específica para nematodos) (5 y 12). Estos estudios han posibilitado la identificación de numerosas delta-endotoxinas con diferentes especificidades.

Los resultados de esta búsqueda, permiten suponer que es posible aislar cepas de BT con actividad tóxica para, virtualmente, cualquier patógeno potencial. La caracterización de nuevas cepas de BT aparece, entonces, como una de las actividades que deben ser desarrolladas a futuro. Para cumplir este objetivo, se ha iniciado la búsqueda de subespecies nativas de BT, la caracterización, el aislamiento de los genes de las proteínas insecticidas y el clonamiento molecular, en un intento para encontrar bacterias que muestren una actividad entomopatogénica diferencial y con un rango de hospedero más amplio, en relación a las preparaciones comerciales.

MÉTODOS

Cultivo del *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

La subespecie *kurstaki* sirvió como control del

aislamiento de cepas locales de BT. La cepa fue gentilmente cedida por el Dr. Luis Herrera-Estrella, CINVESTAV, México. Un preinóculo de la bacteria fue sembrado en el medio Luthy (16). El cultivo fue mantenido a 28°C en un agitador orbital a 200 rpm por 5 días.

Purificación de la delta-endotoxina del *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

Los cristales fueron purificados desde los cultivos bacterianos en la fase de esporulación. Este proceso fue controlado por tinción de los cristales parasporales con azul de Coomassie (17). Una vez alcanzada la autólisis, el cultivo de centrifugó a 5.000 x g por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se incubó con una solución del NaCl 0,5 M a 30°C por 15 minutos. Esta operación se repitió dos veces, recuperando el sedimento en cada oportunidad mediante centrifugación. El último sedimento se resuspendió en un mínimo volumen de agua y la muestra fue sometida a centrifugación en un gradiente continuo de sacarosa (50-70%) a 8.000 x g a 20°C por 15 minutos. La banda de cristales, una vez recuperada, fue aplicada a un gradiente continuo de NaBr (30-60%). El gradiente fue centrifugado a 12.000 x g a 20°C por 60 minutos y la banda de cristales, una vez colectada, fue almacenada a -20°C en agua.

Aislamiento y caracterización de cepas locales de BT

Se tomaron muestras de suelos, como fuentes potenciales de BT. Los suelos fueron sembrados en agar J (18 y 19) suplementado con sulfato de polimixina B, penicilina G y lisozima. Todas las colonias con características de crecimientos similares al *Bacillus cereus* fueron examinadas en cuanto a la presencia de esporas y cristales. Aquellas colonias que contenían ambas inclusiones, fueron consideradas como, presuntivamente, pertenecientes a la especie BT. El cultivo de las mismas se efectuó en medio Luthy (16) a 28°C en un agitador orbital a 200 rpm por tiempos variables, en tanto que la purificación de los cristales proteicos se realizó siguiendo el mismo procedimiento efectuado para la cepa control var. *kurstaki*.

Análisis electroforético en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida de extractos crudos de bacterias o de cristales pro-

teicos purificados, se realizó siguiendo el protocolo de Laemmli (20). Se utilizaron geles al 12,5% con un grado de entrecruzamiento del 2,6%. Los pesos moleculares aparentes se estimaron mediante el método de Weber y Osborn (21).

Preparación de anti-suero contra la toxina de *BT* var. *kurstaki*

El esquema de inmunización se basó en los protocolos descritos por Hurn y Chantler (22). Para la producción de anticuerpos contra esta proteína, se utilizó como antígeno la protoxina de 130 kDa de la variedad *kurstaki* purificada a homogeneidad. El título del suero fue seguido por la técnica del ELISA (23). La fracción IgG fue purificada empleando cromatografía de intercambio aniónico en una columna de DEAE-celulosa (24).

Detección inmunológica de las toxinas

El análisis fue realizado mediante la electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa desde geles de poliacrilamida ("Western blotting"). Luego de 12 horas de transferencia, el papel de nitrocelulosa fue removido y procesado para la inmunodetección del antígeno. La señal inmunológica fue amplificada, empleando como segundo anticuerpo la fracción anti IgG de conejo crecida en cabra, conjugada a fosfatasa alcalina (25).

Microscopía electrónica de las colonias en fase de esporulación

La identificación del cuerpo parasporal y de la proteína cristalina se efectuó mediante tinción negativa con acetato de uranilo al 2% y observación al microscopio electrónico (26).

Establecimiento del cultivo de *Heliothis zea*

Se estableció el cultivo de *Heliothis zea* bajo condiciones de laboratorio. Las primeras larvas se recolectaron en el campo y se mantuvieron con la siguiente dieta artificial: 7 g levadura seca, 1 g ácido ascórbico, 360 mg ácido sórbico, 1 ml aceite mazola, 9 g sacarosa, 180 mg colesterol, 4,6 g agar, 120 mg inositol y 300 ml de agua destilada. Las pupas fueron depositadas sobre arena estéril húmeda en placas petri y mantenidas a 25°C en cámaras de crianza (25 x 25 x 35 cm.). Luego de 15 días, las pupas eclosionaron, dando origen a mariposas. Estas fueron alimentadas con una mez-

cla espesa de miel de abeja y agua. Los adultos ovipusieron al cabo de 3 semanas y dieron origen a nuevas larvas, las que fueron transferidas a frascos individuales, con la dieta descrita anteriormente, esta vez suplementada con ácido linoléico al 0,03%. Bajo estas condiciones, las larvas evolucionaron al siguiente estadio metamórfico.

Ensayo de la capacidad insecticida de las cepas locales

Los ensayos de actividad insecticida se efectuaron empleando larvas de *Heliothis zea* correspondientes al V estadio larval. Las larvas de peso y tamaño equivalentes y en un número no inferior a 15 individuos por ensayos, fueron mantenidas en frascos individuales con la dieta artificial descrita anteriormente, suplementada con cantidades variables de extractos celulares de cepas nativas de *BT* o en algunos casos, suplementada con endotoxinas purificadas. En forma paralela, se efectuaron ensayos de la capacidad insecticida con la toxina aislada de la cepa control var. *kurstaki*. Un número equivalente de individuos fue mantenido como testigos con la misma dieta, suplementada sólo con la solución acuosa, vehículo de la toxina. El ensayo se prolongó por 6 días, evaluando cada 24 horas la mortalidad y sobrevivencia de los especímenes.

Purificación de DNAs de las cepas nativas de *BT*

Para el aislamiento del DNA de las células de *BT* se utilizó la técnica de lisado aclarado (27). Las bacterias fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (28) y los DNAs fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,0% en amortiguador TBE (29).

Obtención del vector que contiene clonado un fragmento del gen de la delta-endotoxina de *B. thuringiensis* var. *berliner*

La cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa recombinante, utilizada, contenía el vector pUC 19. Este vector lleva clonado en el sitio EcoR I un fragmento de 726 pares de bases, cuya secuencia corresponde a la región más conservada del gen de la delta-endotoxina de los *BT* pertenecientes a la familia Cry I. La cepa de *Escherichia coli* recombinante fue facilitada por el Dr. Luis Herrera-Estrella y contiene este fragmento, aislado del gen de la endotoxina del *B. thuringiensis* var. *berliner* 1715. Para la obtención del vector desde la cepa

DH5 alfa, se utilizó la técnica de lisis alcalina (30). El DNA plasmidial obtenido fue digerido por corte con la enzima de restricción EcoR I. La recuperación del fragmento se efectuó mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE (31).

Marcación de la sonda por "nick translation"

La sonda de DNA fue diluida a una concentración final de 0,5 mg/ml y marcada con alfa ^{32}P dATP, empleando la mezcla de nucleótidos dGTP, dTTP, dCTP, DNAsa I y DNA polimerasa de *E.coli* (32).

Digestiones de DNAs de cepas controles y nativas con la enzima de restricción Hind III

La mezcla de reacción contenía: 10 μg de la preparación de DNA de cada una de las cepas, 1 μl de Hind III (20.000 U/ml.), 2 μl de solución amortiguadora de reacción 10X (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, Mg Cl_2 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) y 7 μl de agua destilada estéril para completar un volumen final de 20 μl . La mezcla se incubó a 37°C por 1 hora, al cabo de la cual la reacción se detuvo, agregando 3 μl de una solución colorante que contenía glicerol al 50%, SDS 5%, EDTA 15 mM y azul de bromofenol al 0,05%. Alicuotas de 5 a 10 μl de estas digestiones fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en amortiguador TBE.

Análisis "dot-blotting"

Los DNAs (0,3-0,5 μg) de las cepas nativas y aquellos de las cepas controles fueron adsorbidos a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de vacío (32). Posteriormente, se procedió a la hibridación, utilizando la sonda marcada por "nick translation".

Análisis "southern"

El procedimiento descrito para la transferencia de DNA desde geles de agarosa a papel de nitrocelulosa y la búsqueda de genes codificantes, se llevó a cabo mediante la técnica de hibridación descrita por Southern (33) utilizando la sonda antes mencionada. Se analizaron preparaciones de DNAs totales y digeridos con Hind III, pertenecientes a cepas descritas y a cepas nativas. La visualización de la reacción de hibridación se realizó mediante técnicas de radioautografía (31).

RESULTADOS Y DISCUSION

Cualquier intento de búsqueda de cepas nativas de un microorganismo dado debe implicar la utilización de metodologías rigurosas a fin de minimizar la probabilidad que un hallazgo positivo, sea sólo una duplicación de organismos ya descritos. En el caso del *BT*, esta condición es de particular importancia debido a que algunas subespecies han sido utilizadas en el país como insecticidas biológicos. La preparación más difundida corresponde al producto Dipel que utiliza como fuente activa al *BT* var. *kurstaki*. Por consiguiente, la búsqueda de cepas locales tiene como control restrictivo la comparación de sus características biológicas con las descritas para esta variedad.

Se procedió a purificar la delta-endotoxina de la variedad *kurstaki* con el propósito de cotejarla con las toxinas de los aislados nativos.

Purificación de la endotoxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

La pureza de la preparación de la delta-endotoxina de *BT* var. *kurstaki* fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. Al término del procedimiento de purificación, el perfil electroforético

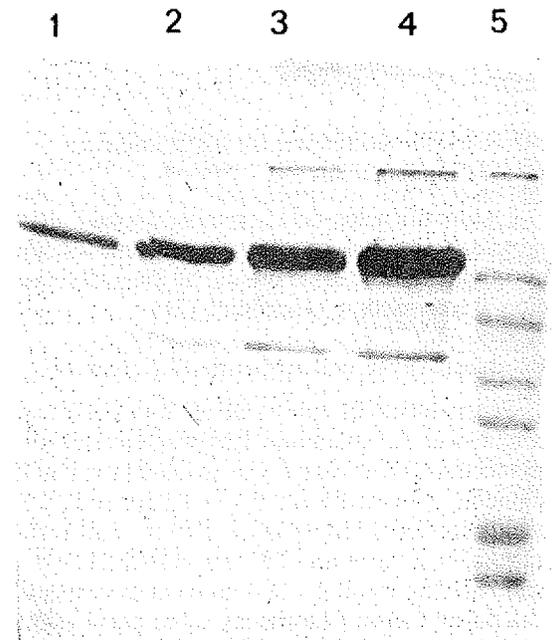


Figura 1. Electroforesis en condiciones desnaturalantes. Carriles 1 al 4: cantidades crecientes de endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Carril 5: marcadores de P.M.

reveló que la preparación era homogénea. El resultado se muestra en la fotografía de la Figura 1, en donde se analizan concentraciones crecientes de la protoxina aislada. Los pesos moleculares aparentes de la protoxina y de la toxina se estiman en 135 y 65 kDa, respectivamente. Estos datos concuerdan con lo descrito anteriormente para esta misma cepa (34). La protoxina de 135 kDa sirvió como antígeno para desarrollar anticuerpos policlonales en conejo.

Búsqueda de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*

La búsqueda de cepas nativas se inició efectuando un barrido de muestras de suelo, obtenidas principalmente en la VII Región del país. Las muestras, convenientemente diluidas en H₂O estéril y sembradas en el caldo J restrictivo descrito en Métodos, dieron lugar en promedio a 175 colonias del género *Bacillus*.

Cada una de las colonias fue examinada y comparada con la cepa control var. *kurstaki*. Se seleccionaron las colonias Gram (+) con las siguientes características morfológicas; tamaño regular, bordes estriados, ligeramente sollevados y de color crema. La selección de las cepas locales incluyó los siguientes criterios.

A. Esporulación y tinción del cuerpo parasporal

Se observó al microscopio el desarrollo de esporulación. Las colonias que alcanzaron el 100% de esporulación fueron teñidas convenientemente. Las cepas positivas dieron lugar a cristales de un color azul destacado visible al microscopio óptico, utilizando un aumento 100 X (dato no mostrado).

B. Microscopia electrónica de los cristales proteicos

Se efectuaron tinciones negativas de las proteínas cristalinas de las cepas locales y de la cepa control. Las preparaciones fueron observadas mediante microscopia electrónica y el resultado se señala en las microfotografías de la Figura 2. Tanto la morfología como la simetría de las proteínas cristalinas de las cepas nativas difiere de la cepa *kurstaki*. Este resultado indicaría la existencia de entidades bacterianas diferentes (35).

C. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes

Otro de los criterios empleados para seleccionar cepas locales, pertenecientes presuntivamente a la especie *thuringiensis*, corresponde al análisis

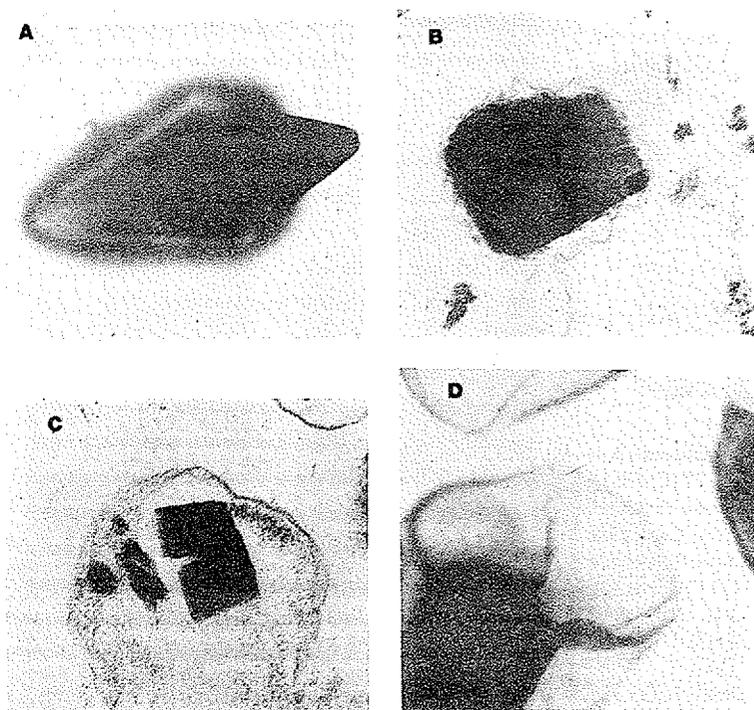


Figura 2. Microscopia electrónica de proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis*. Panel A: var. *kurstaki*; Panel B, C y D: Cepas nativas 16, 20 y 117.

electroforético de extractos celulares en fase esporulación. Se esperaba que en cada perfil electroforético apareciera una o más bandas preponderantes, en razón a que en esta fase las protoxinas representan alrededor del 30% de las proteínas totales (6). Por consiguiente, el criterio electroforético fue de utilidad, ya que permitió descartar aquellos aislados que no cumplieran con esta condición, como también para no duplicar esfuerzos, seleccionando aislados con perfiles electroforéticos repetidos. Las Figuras 3, 4 y 5 muestran tres resultados de análisis de aislados nativos. Se señalan con un asterisco las cepas seleccionadas en consideración a los criterios expuestos anteriormente.

D. Transferencia a nitrocelulosa y detección inmunológica ("Western blotting") de proteínas provenientes de cepas locales

Las proteínas de las cepas locales, positivas de acuerdo a los tres criterios anteriores, fueron analizadas, además mediante técnicas inmunológicas. Un ejemplo de este análisis consultó en primera instancia, la separación electroforética de las proteínas de algunas cepas nativas junto a cepas descritas pertenecientes al cepario del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Al término de la electroforesis, las proteínas fueron trasferidas a papel de nitrocelulosa. Se realizó la

detección inmunológica de los antígenos, empleando anticuerpos contra la protoxina de la subespecie *kurstaki*. La Figura 6 indica el resultado de este ensayo, observándose señales de reconocimiento inmunológico en la región de 130 kDa para las variedades controles *kurstaki*, *berliner* y *sotto* (carriles 1, 2 y 5, respectivamente). De igual

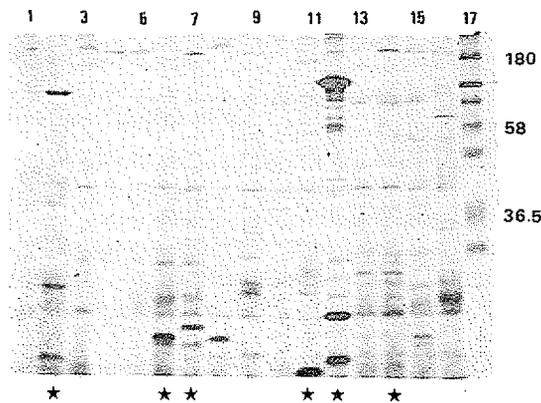


Figura 3. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de proteínas totales de cepas nativas de *BT*. Cepa 37 (Carril 1); Cepa 75 (Carril 2); Cepa 41a (Carril 3); Cepa 61 3b (Carril 4); Cepa 36a (Carril 5); Cepa 198a (Carril 6); Cepa 198b (Carril 7); Cepa 82g (Carril 8); Cepa 197 (Carril 9); Cepa 38 (Carril 10); Cepa 111b (Carril 11); Cepa 111a (Carril 12); Cepa 56a (Carril 13); Cepa 56b (Carril 14); Cepa 100-2 (Carril 15); Cepa 90-10 (Carril 16); marcadores de P.M. (Carril 17).

Los asteriscos identifican las cepas nativas seleccionadas.

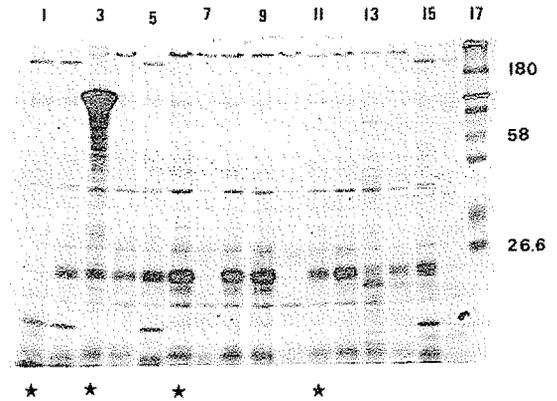


Figura 4. Electroforesis en condiciones desnaturalantes de proteínas totales de cepas nativas de *BT*. Cepa 73a (Carril 1); Cepa 73b (Carril 2); Cepa 73c (Carril 3); Cepa 73d (Carril 4); Cepa 73e (Carril 5); Cepa 125c (Carril 6); Cepa 125b (Carril 7); Cepa 125e (Carril 8); Cepa 125d (Carril 9); Cepa 125a (Carril 10); Cepa 109a (Carril 11); Cepa 109b (Carril 12); Cepa 109c (Carril 13); Cepa 109d (Carril 14); Cepa 109e (Carril 15); Cepa 1-a (Carril 16); marcadores de P.M. (Carril 17).

Los asteriscos identifican las cepas nativas seleccionadas.

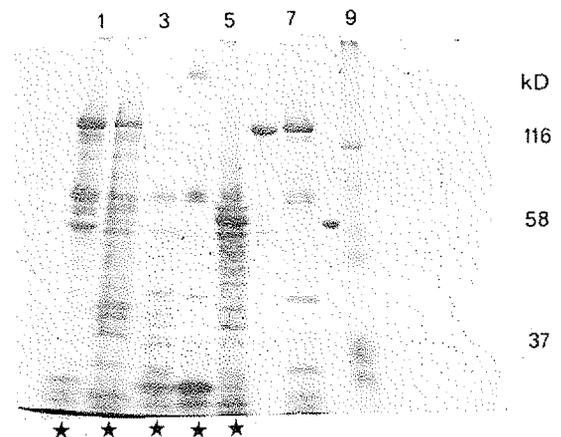


Figura 5. Análisis electroforético en condiciones desnaturalantes de proteínas parasporales de aislados nativos y cepas controles de *Bacillus thuringiensis*. Carriles: 1, aislado 5a; 2, aislado G11g; 3, aislado L19; 4, aislado 106; 5, aislado 117-7; 6, *BT* var. *kurstaki*; 7, *BT* var. *israelensis*; 8, albúmina sérica bovina. Carril 9, marcadores de peso molecular.

Los asteriscos identifican las cepas nativas seleccionadas.

forma, se observa que algunos de los aislados nativos también responden positivamente (carriles 8, 10 y 12), en tanto que en otros casos la respuesta es débil o negativa (carriles 3, 4, 6, 7 y 9). El criterio de selección inmunológica no siempre es excluyente ya que se ha observado que algunas subespecies no reaccionan cruzadamente con el anticuerpo contra la endotoxina de la var. *kurstaki*. Un ejemplo de esta situación es el encontrado con

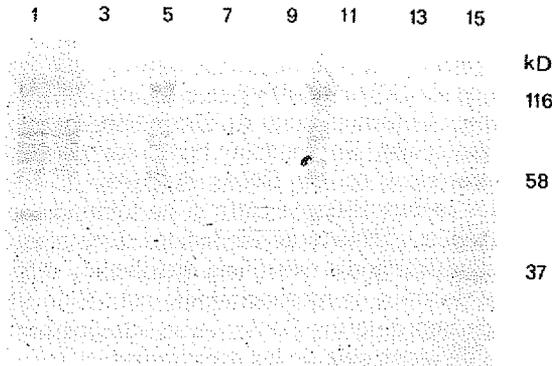


Figura 6. Análisis "western" de proteínas cristalinas de aislados locales y cepas controles de *Bacillus thuringiensis*. La detección inmunológica utilizó anticuerpos contra la protoxina de *BT* var. *kurstaki* como se describe en métodos. Carriles: 1, *BT* var. *kurstaki*; 2, *BT* var. *berliner*; 3, aislado 103i; 4, aislado 174; 5, *BT* var. *sotto*; 6, aislado L19; 7, aislado 106; 8, aislado 5a; 9, aislado 114b; 10, aislado G11g; 11, *BT* var. *israelensis*; 12, aislado 117-7. Controles negativos: Ribulosa bisfosfato carboxilasa de espinaca (carril 13) y extracto de proteínas solubles de *E. coli* (Carril 14). Carril 15, marcadores de PM preteñidos.

una subespecie de la familia Cry IV (*B. thuringiensis* var. *israelensis*, carril 11). Este último resultado concuerda con lo descrito anteriormente (3).

Con estos antecedentes, se purificaron las toxinas de las cepas locales, considerando los comportamientos diferenciales que presentaban en relación a la var *kurstaki*. La purificación se efectuó mediante centrifugación en gradientes de sacarosa. A modo de ejemplo, la Figura 7 (A y B) compara la posición de las bandas al término de la centrifugación para el aislado 117 y para la cepa control. En el caso de la variedad *kurstaki*, se obtienen, dos bandas que contienen mayoritariamente, los cristales y un sedimento formado por esporas; en tanto que para la cepa nativa 117, se obtiene una sola banda formada por cristales con la morfología esferooidal mostrada en la Figura 2.

Luego de los análisis de caracterización se efectuaron los ensayos de actividad biológica insecticida. El insecto blanco elegido correspondió al lepidóptero *Heliothis zea* de amplia distribución en algunos cultivos de país. Para conseguir este objetivo, se estableció el cultivo de este insecto en condiciones de laboratorio.

Ensayo de la capacidad insecticida de las cepas nativas

Los ensayos biológicos de la actividad entomopatogénica de cepas locales de *BT* y de la cepa control *kurstaki* se muestran en las figuras siguientes. Se observa en la Figura 8 el ensayo biológico con toxinas purificadas a partir de la cepa control y de las cepas nativas 16, 20 y 114, a diferentes dosis. El resultado sugiere que algunas cepas nativas tienen una actividad entomopa-

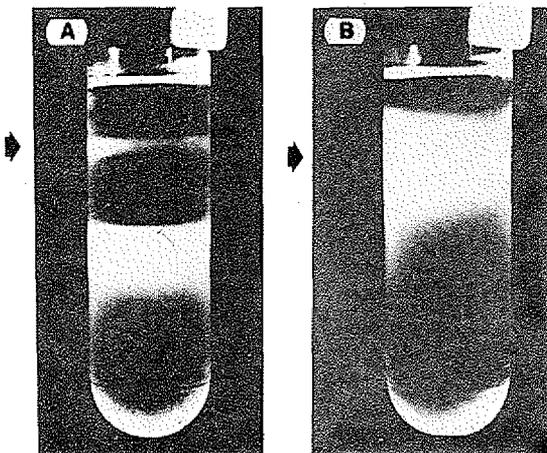


Figura 7. Purificación de los cuerpos parasporales mediante centrifugación en gradientes continuas de sacarosa (50-70%). Las flechas señalan la posición de las proteínas cristalinas. A: cepa control var. *kurstaki*, B: aislado nativo 117.

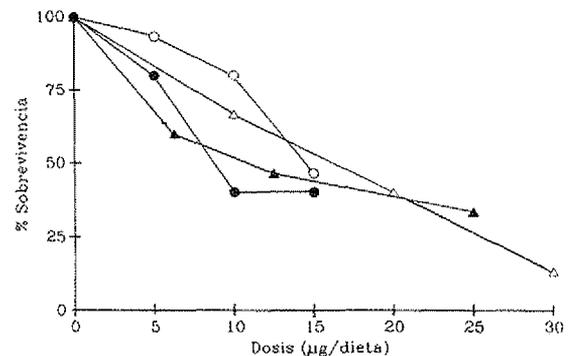


Figura 8. Actividad insecticida sobre larvas de *H. zea*, de las protoxinas purificadas de las cepas var. *kurstaki* (o-o), cepa 20 (●-●), cepa 114 (▲-▲), y cepa 16 (△-△) a los seis días de tratamiento.

tógena al menos equivalente a la de la toxina de la cepa control var *kurstaki*.

A fin de efectuar un barrido rápido para la selección de las cepas más activas contra el lepidóptero hospedero, se analizó el efecto de toxinas sin purificar (esporas y cristales). Dos ejemplos de estos análisis, se muestran en las Figura 9 y 10. Se observa que utilizando una dosis única de 10 µg de toxina, las cepas indexadas con los números: 171, 103, 132, 114, 8 y 159 muestran un nivel adecuado de toxicidad contra larvas de *Heliothis zea*. Sin embargo, otras cepas, presuntivamente pertenecientes a la especie *BT*, no mostraron actividad. Esta aparente inactividad podría deberse a la elección del insecto hospedero (3).

Identificación de los genes de las toxinas de cepas locales

Para la identificación y aislamiento de estos

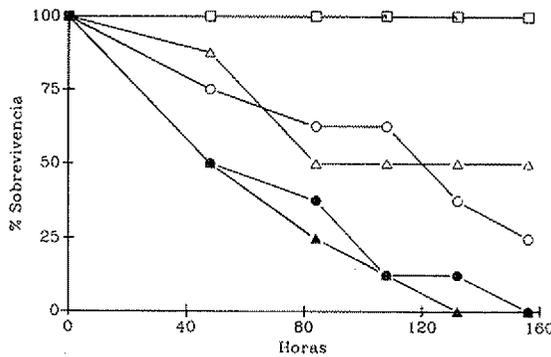


Figura 9. actividad insecticida de cepas nativas sobre larvas de *H. zea*. Las toxinas (10 µg) se adicionaron a la dieta. □—□ control sin toxina, cepas 171 (▲—▲), 144 (△—△), 103 (●—●), 117 (○—○).

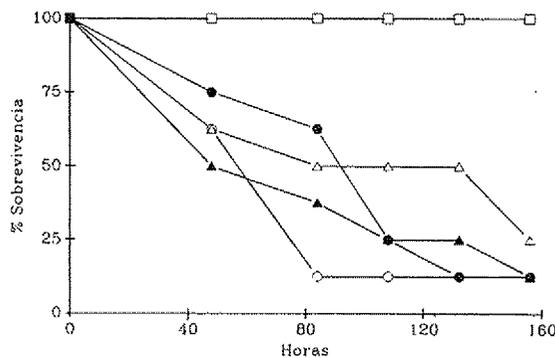


Figura 10. Actividad insecticida de cepas nativas sobre larvas de *H. zea*. Las toxinas (10 µg) se adicionaron a la dieta. □—□ control sin toxina, cepas 132 (△—△), 114 (▲—▲), 8 (●—●), 159 (○—○).

genes, se procedió a la purificación de los DNAs totales de las cepas locales de mayor interés. Alícuotas de estos DNAs fueron digeridos con la enzima de restricción Hind III. El empleo de esta endonucleasa es aconsejable ya que la mayoría de los genes de las endotoxinas de las diferentes subespecies de *BT*, no poseen sitio de reconocimiento para esta enzima (36). La Figura 11 muestra en los carriles impares el resultado de la purificación de 5 DNAs de cepas locales. En los carriles pares se observan estos DNAs digeridos con Hind III.

Se puede concluir en primer término que las muestras de DNAs totales poseen plasmidios de diferentes isoformas tanto de alto como de bajo peso molecular. En segundo lugar, los perfiles electroforéticos de los DNAs digeridos de los aislados nativos difieren entre sí en términos de distribución y tamaño de las bandas. Este resultado significaría que existe una distribución diferencial de sitios de reconocimiento para Hind III en cada uno de estos DNAs. A su vez, los productos de restricción de las cepas controles (var. *kurstaki* y var. *sotto*) son diferentes a aquéllos de las cepas nativas.

“Dot blotting”

A fin de indentificar cuáles de las cepas pertenecen efectivamente a la especie *thuringiensis*, se

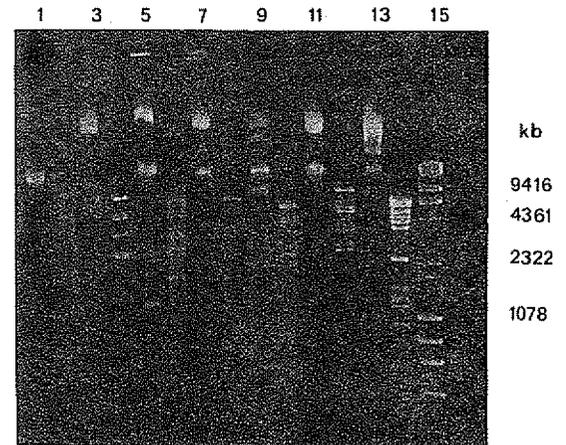


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de DNAs totales (carriles impares) y los mismos digeridos con Hind III (carriles pares) aislados de cepas nativas y controles de *Bacillus thuringiensis*. Carriles 1 y 2 (aislado 5a); carriles 3 y 4 (aislado G11g); Carriles 5 y 6 (aislado L19); Carriles 7 y 8 (aislado 106); Carriles 9 y 10 (aislado 117-7). Se utilizaron como controles el *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (carriles 11 y 12) y la var. *sotto* (carriles 13 y 14). A la derecha se muestran estándares de tamaño molecular en kb.

efectuó un barrido rápido empleando la técnica de "dot-blotting". Esta aproximación experimental permitió descartar aquellos aislados que mostraron una hibridación negativa con la sonda radiactiva. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 12. Se observa que los DNAs de algunos aislados locales indexados como G11g, 105 y 114 hibridan positivamente con la sonda, confirmando de esta forma su categoría de especie *thuringiensis*. Como controles positivos, se utilizaron DNAs de las variedades *berliner*, *kurstaki*, *sotto* y *morrisoni*, en tanto que como control negativo se utilizó el DNA aislado del vector Bluescript KS (+). Se obtuvo una hibridación débil pero, positiva con los DNAs purificados de las cepas indexadas como 106, 117-3, 117-7, 111a, 121, en tanto que la señal fue negativa en definitiva para las cepas indexadas como L15, 145-2, 126, 5a, L19, L18 y 117-g. Sin embargo, en este último caso, no puede descartarse la posibilidad que dicha sonda no presente el grado de homología suficiente para permitir un reconocimiento positivo. Para dilucidar esta disyuntiva, se requeriría de sondas específicas que representen la totalidad de los genes Cry hasta el momento descritos (37).

Análisis Southern

A objeto de identificar el o los fragmentos de

(*) Designación comercial de este vector.

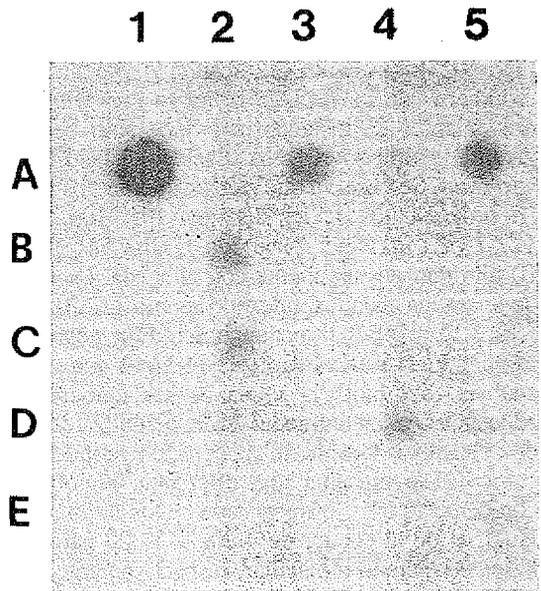


Figura 12. Análisis "dot-blot". Muestras de DNA de cepas controles de *BT* y aislados nativos presuntivos de *B. thuringiensis* fueron adsorbidos sobre membranas de nitrocelulosa e hibridados con al sonda ³²p descrita en Métodos. A-1 (var. *berliner*); A-2 (DNA control, Bluescript); A-3 (var. *sotto*); A-4 (var. *morrisoni*) y A-5 (var. *kurstaki*). Aislados nativos: L15 (B-1); G11g (B-2); 145-2 (B-3); 126 (B-4); 5a (B-5); 106 (C-1); 105 (C-2); 46-4n (C-3); L19b (C-4); L18 (C-5); 117-g (D-1); 117-7 (D-2); 117-3 (D-3); 114 (D-4); 111a (D-5) y 121 (E-5).

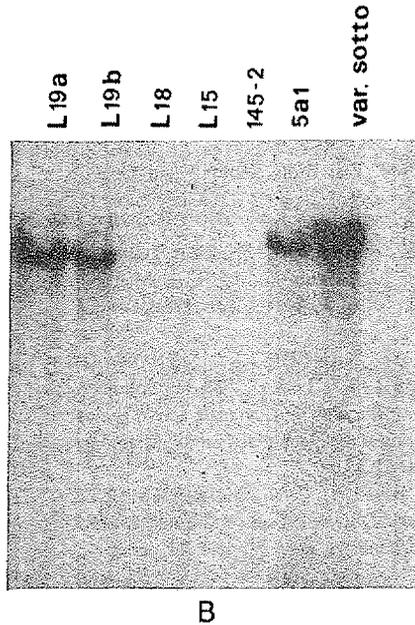
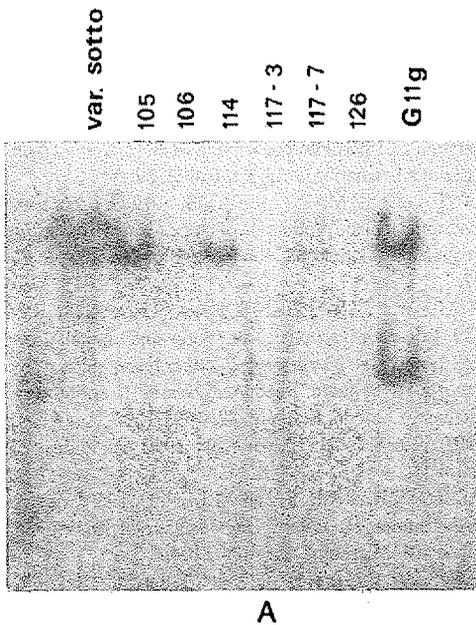


Figura 13. Paneles A y B. análisis "southern" de DNAs digeridos con Hind III, extraídos de aislados nativos, presuntamente pertenecientes a la especie de *B. thuringiensis*. La hibridación molecular se realizó utilizando una sonda de 726 bp marcada radiactivamente. Se empleó como control el DNA digerido con Hind III del *B. thuringiensis* var. *sotto*.

DNA de los aislados locales que contengan gen de la toxina, se realizó un análisis "southern". La Figura 13 da cuenta del resultado del análisis "southern" de los DNAs digeridos con Hind III provenientes de aislados nativos. Como control positivo se utilizó el DNA digerido aislado de la var. *sotto*. Se observa que ciertos fragmentos Hind III provenientes de los aislados 105, 106, 114, 117-7 y G11g (Panel A) y L19a, L19b y 5a1 (panel B) hibridan positivamente con la sonda. En tanto que para los aislados indexados como 117-3, 126, L18, L15 y 145-2 el reconocimiento fue negativo, existiendo la posibilidad que al igual que en el análisis "dot blot" la sonda utilizada no sea la adecuada. Adicionalmente, en relación al resultado del análisis "southern", la cepa nativa indexada como G11g presenta una diferencia importante con respecto a los otros aislados. Dos fragmentos Hind III de alrededor de 4.000 y 1.000 pares de bases de tamaño molecular, respectivamente, son reconocidos por la sonda radiactiva, sugiriendo que esta cepa presentaría genes homólogos o co-

pias múltiples del mismo gen. Este resultado ha sido reportado anteriormente en algunas subespecies de *BT*, como por ejemplo en las variedades HD-73, *berliner* 1715 y HD-2 (36).

Las toxinas de *Bacillus thuringiensis* representan una interesante familia de proteínas relacionadas, estructuralmente, pudiéndose deducir algunas reglas generales, por ejemplo la identificación de regiones específicas que determinan la especificidad hacia el insecto hospedero (37). La modificación de estas regiones por medio de técnicas de la Ingeniería Genética posibilitará construir nuevas clases de toxinas con una gama más amplia de actividad insecticida.

Este conjunto de resultados preliminares promisorios estimulan y justifican la búsqueda de nuevas cepas locales de *BT* en la naturaleza, significando con esto que más que un interés académico por variedades nuevas, se encuentra el empleo potencial de las toxinas de estos aislados en reemplazo de insecticidas contaminantes del medio ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- SERPLAC, Oficina Regional. 1987. Informe Técnico.
- MILLER, L.K., LINGG, A.J., BULLA, L.A. Jr. 1983. Bacterial viral and fungal insecticides. *Science* 11: 715-721.
- ARONSON, A.I., BECKMAN, W. and PETER DUNN. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Rev.* 50: 1-24.
- METCALF, R.L. 1975. **En:** Introduction to Insect Pest Management. Metcalf, R.L. and Luckamann, W. (eds.). John Wiley & Sons, N.Y. p. 234-274.
- FEITELSON, J., PAYNE, J. and KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10: 271-275.
- DEAN, D.H. 1984. **En:** Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. Vol. 2: pp. 341-363, Intercept Ltd., London.
- KRIEG, A. and LANGENBRUCH, G. 1981. Susceptible arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. *Microbial control of pest and plant diseases*. Academic Press, London. pp. 837-896.
- M-LECADET, M., SANCHIS, V., MENOUE, G., CHAFAEUX, J. and LERRECLUS, D. 1989. Multiple delta-endotoxin genes in *Bacillus thuringiensis* active against lepidopteran species in the Noctuidae Family. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84: 21-26.
- TYREL, D.J., BULLA, L.A., ANDREWS, R.E., KRAMER, J., DAVIDSON, L.I. and NORDIN, P. 1981. Comparative biochemistry and entomocidal parasporal crystal of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bacteriol.* 145: 1052-1058.
- KURSTAK, E. and TIJSSSEN. 1982. **En:** E. Kurstak (ed.) *Microbial and Viral Pesticides*, Dekker, N.Y. pp. 3-32.
- BULLA, L.A. 1981. Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 256: 3000-3004.
- HOFTE, H. and H.R. WHITELEY. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- GREEN, M. 1990. Public Health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study. *Amer. J. Public Health* 80(7): 848-852.
- COHEN, E. 1991. Photoprotection of *B. T. kurstaki* from ultraviolet irradiation. *J. Invert. Pathol.* 57: 343-351.
- ROWE, G.E. and MARGARITATIS, A. 1987. Bioprocess development in the production of biopesticides by *Bacillus thuringiensis*. **En:** *Critical Review in Biotechnology* 6: 87-127.
- MOAR, W.J., TRUMBLE, J.T. and FEDERICI, B.A. 1989. Comparative toxicity of spores and crystals from NDR-2 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to neonate Beet Armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 1593-1603.
- CABRERA, S. ICAITI, Guatemala. 1990. Comunicación personal.
- SALEH, S., HARRIS, R. and ALLEN, O. 1969. Method for determining *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* in soil. *Canadian J. Microbiol.* 15: 1104-1104.
- WEST, A., BURGESS, H., DIXON, T. and WYBORN, C. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*

- spore inocula in soil; effects of pH, moisture, nutrient, availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 17: 659-665.
20. LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ *Nature* 227: 680-685.
 21. WEBER, K. and OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determined by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
 22. HURN, B. and CHANTLER, S. 1980. Production of reagent antibodies. *Methods Enzymol.* 70: 104-142.
 23. CRESPO DE ESCRIBANO, M., BENEDIT, V. y CORDIER, J. 1983. Análisis de antígenos y anticuerpos por fijación en membranas de nitrocelulosa e inmunodetección. *Inmunología* 2: 45-57.
 24. PARRA, C., SAEZ, J., PEREZ, H., ALBERDI, M., DELSEN, M. and MEZA-BASSO, L. 1990. Cold resistance in rapeseed (*Brassica napus*) seedlings. Searching a biochemical marker of cold-tolerance. *Arch. Biol. Med. Exp.* 23: 187-194.
 25. TSANG, V.C., PERALTA, J.M. and SIMONS, A.R. 1983. Enzyme linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymology* 92: 377-391.
 26. HELD, G.A. 1990. Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis*. *J. Bacteriol.* 172: 481-483.
 27. GONZALEZ, J.M. and CARLTON, B.C. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 3: 92-98.
 28. MANIATIS, T., FRISCH, E.F. and SAMBROOK, J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
 29. JOHNSON, P. 1977. Electrophoresis of DNA in agarose gels. *Biochemistry* 16: 4217-4225.
 30. BIRNBOIM, H.C. and DOLY, D. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
 31. SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 32. LEARY, J.J., BRIGATTI, D. and WARD, D.C. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4045-4049.
 33. SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragment separation by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
 34. HUBER, H.E., LUTHY, P., EBERSOLD, R. and CORDIER, J.L. 1981. The subunits of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*: size, linkage and toxicity. *Arch. Microbiol.* 129: 14-18.
 35. MIKKOLA, A.R., CARLBERG, T., VAARA, T. and GYLLENBERG, H.G. 1982. Comparison of inclusions in different *Bacillus thuringiensis* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 13: 401-421.
 36. WHITELEY, H.R. and SCHNEFF, H.E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *B. thuringiensis*. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
 37. CAROZZI, N., KRAMER, V.C., WARREN, G.W., EVOLA, S. and KOZIEL, M. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.

SEMINARIO INTERNACIONAL DE VIRUS EN FRUTALES DE CAROZO, POMACEAS Y VIDES

23 y 24 de Noviembre de 1993

Patrocina: Sociedad Chilena de Fitopatología, SOCHIFIT

Organiza: Estación Experimental La Platina, INIA

Sede: Est. Exp. La Platina, Santa Rosa 11610, La Pintana-Santiago

Se invita a participar a los profesionales del agro, viveristas, estudiantes del área,
fruti-viticultores y agricultores en general

INSCRIPCIÓN: \$ 120.000

INFORMACIONES:

Estación Experimental La Platina, Ings. Agrónomos Paulina Sepúlveda, Guido Herrera,
Casilla 439, Correo 3 - Teléfono 5417223 - Santiago, Chile