

# COMPARACIÓN DE LOS MAPAS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN CONSERVADA DE 490 PARES DE BASES EN LOS GENES *cry1A* DE TRES CEPAS COLOMBIANAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER

Mauricio Pulido Jiménez<sup>1</sup>, Silvia Gómez Daza<sup>2</sup>,  
Santiago Botero Casasbuenas<sup>3</sup>, Nicolás Carvajal  
Ardila<sup>3</sup> y Pedro Santamaría Holguín<sup>3</sup>,

1. Director, CEBM, Gimnasio Campestre.
2. Docente-investigadora, Departamento de Biología, Universidad Pedagógica Nacional
3. Estudiante 11º, Gimnasio Campestre.

Correspondencia para los autores:  
centrobiomol@campestre.edu.co

Recibido: 1 de marzo de 2021  
Aprobado: 29 de marzo de 2021



Fotografía: <http://freepik.com>

## RESUMEN

Los mapas de restricción de las regiones conservadas de los genes *cry1A* en tres cepas colombianas de Bt se construyeron mediante el uso de herramientas computacionales; también se estableció una comparación entre ellos. La diferencia entre los mapas elaborados está determinada por el número de sitios de corte para la enzima HpyCH4V; en los fragmentos correspondientes a las cepas Bt1 y Bt2 hay uno solo (posición 151), mientras que en el fragmento de la cepa Bt3 hay uno en la posición 151 y otro en la posición 199, muy cerca del punto en el que está la única diferencia de secuencia nucleotídica respecto de los otros dos segmentos estudiados. Se estableció que el corte de HpyCH4V sobre los segmentos analizados en las cepas Bt1 y Bt2 genera un fragmento de 151 pb y otro de 339 pb. En el caso del segmento homólogo en Bt3, se producen tres fragmentos de 48,151 y 291 pb respectivamente.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, genes *cry1A*, enzima de restricción, mapa de restricción.

## SUMMARY

The team constructed restriction maps of the conserved regions of the *cry1A* genes in three Colombian strains of Bt using computational tools; these tools were also used to make a comparison between the said maps. The number of cutting sites for the HpyCH4V enzyme determines the difference between the maps produced; the fragments corresponding to strains Bt1 and Bt2 have only one position (151), while the fragment of strain Bt3 has one at position 151 and another at position 199, very close to the point where the only nucleotide sequence difference with respect to the other two segments studied is located. Cutting with HpyCH4V on the segments analyzed in strains Bt1 and Bt2 proved to generate a fragment of 151 bp and another of 339 bp. In the homologous segment in Bt3, three fragments of 48,151 and 291 bp, respectively, were produced.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *cry1A* genes, restriction enzyme, restriction map.

## INTRODUCCIÓN

Después de más de un siglo de uso de insecticidas sintéticos en las prácticas agrícolas convencionales, sus efectos adversos sobre el suelo, los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, la entomofauna edáfica y la salud humana se han hecho evidentes. Como alternativa al uso de insecticidas de origen químico, en las últimas cuatro décadas ha ido ganando espacio el uso de productos biológicos elaborados a partir de *Bacillus thuringiensis* (Bt), bacteria que produce proteínas altamente tóxicas para insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros entre otros (Widner & Whiteley, 1989). Estas proteínas, comúnmente llamadas delta-endotoxinas, han sido asignadas a dos grandes grupos conocidos como familia Cry (del inglés *crystal*) y familia Cyt (del inglés *cytolytic*). Las proteínas Cry se distinguen por actuar de manera muy específica; tal característica está determinada por la presencia de ciertos receptores en la membrana de las células del intestino que no están presentes en todos los grupos de insectos y cuya función es ligar a la toxina (Lee, et al., 1992). La actividad insecticida de las proteínas

Cry puede cambiar en función del grado de variabilidad de los genes que controlan su expresión o como consecuencia de la respuesta adaptativa de los insectos a las toxinas bacterianas, que está determinada por la aparición de cambios en la conformación espacial de los receptores presentes en las células del intestino del insecto (González-Cabrera, Herrero & Ferré, 2001; Downes, Parker, & Mahon, 2010).

La necesidad de estimar el nivel de actividad insecticida de las proteínas Cry ha hecho imprescindible el uso de técnicas de análisis molecular que permiten la caracterización de los genes que las codifican. Aunque los métodos como la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNiP's, por su sigla en inglés) son aquellos que se usan con mayor frecuencia puesto que proporcionan información precisa y altamente específica, otros resultan sencillos, rápidos, confiables y mucho menos costosos. Uno de ellos es el análisis de los sitios de corte para enzimas de restricción. Este tipo de procedimiento se basa en el uso de proteínas catalíticas que tienen la capacidad de reconocer una secuencia de nucleótidos específica dentro de un segmento de DNA y generar cortes en dicha molécula.

Existen tres tipos de enzimas de restricción: las pertenecientes a los tipos I y III producen cortes en la cadena de DNA a cierta distancia del sitio de reconocimiento y además pueden modificarla químicamente mediante la adición de un grupo metilo (fenómeno conocido como metilación). Las enzimas del tipo I cortan al azar y lejos del sitio de reconocimiento (aproximadamente a 1000 nucleótidos), mientras que las del tipo III lo hacen a 25-27 pares de bases del mismo. Las del tipo II generan el corte dentro de la secuencia de reconocimiento o muy cerca de ella. El resultado de la

acción de estas enzimas (en particular las del tipo II) sobre una molécula de DNA es una serie de fragmentos de tamaño diferente denominados “fragmentos de restricción”, que al ser comparados en términos de su presencia o ausencia o de su tamaño molecular, tienen el poder de revelar diferencias en la distribución y frecuencia de los sitios de corte para estas endonucleasas entre genomas diferentes (Pingoud & Jeltsch, 2001; Pingoud, et al., 2005).

La representación física de la manera como se distribuyen los sitios de restricción existentes en un segmento de DNA se conoce como “mapa de restricción”; por mucho tiempo, estos mapas se han empleado como punto de partida para el análisis de la variabilidad genética entre individuos, puesto que los sitios de corte se pueden emplear como marcadores moleculares. Aspectos como la presencia de un sitio de restricción determinado o la distancia (en términos de nucleótidos) entre dos de ellos son el reflejo de diferencias genéticas que a su vez implican procesos de cambio evolutivo diferentes entre los individuos estudiados (Poland, et al., 2012).

Al considerar la aparición de resistencia a las delta-endotoxinas de Bt en diversas especies de insectos plaga, surge la necesidad de identificar nuevos genes *cry* capaces de codificar toxinas con mayores niveles de actividad insecticida. La exploración de la riqueza microbiológica de los suelos del trópico podría ser una manera de satisfacer tal necesidad. Para el sector agrícola colombiano resulta de capital importancia estudiar la variabilidad de los genes *cry* de las cepas nativas de Bt puesto que, si se identifican nuevos genes para el desarrollo de bioinsecticidas con mayor poder de acción, sería posible dejar de lado el uso de insecticidas

de origen sintético. Ancines & Pulido (2017) confirmaron la presencia de genes *cry1A* en tres cepas colombianas de Bt y posteriormente Botero & col. (2020) identificaron diferencias de secuencia en las regiones conservadas de tales genes. En esta investigación se presentan los mapas de restricción para dichas regiones génicas. Los resultados obtenidos indican que la única diferencia a nivel de secuencia nucleotídica entre los fragmentos analizados produce cambios en el número y la ubicación de los sitios de corte sobre los que actúa la enzima HpyCH4V. A partir del número y la localización de los sitios de corte para HpyCH4V sobre las regiones génicas estudiadas, se determinó el tamaño y el número de los fragmentos de restricción que se generan.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de Bt

Las cepas analizadas fueron amablemente cedidas por el cepario del Departamento de Biología de la Universidad Pedagógica Nacional. Para efectos del estudio, las cepas recibidas fueron denominadas Bt1, Bt2 y Bt3. A lo largo de la investigación se utilizó *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (Dipel) como control positivo.

### Secuencias de las regiones conservadas en los genes *cry1A*

Las secuencias utilizadas para el análisis de sitios de restricción se obtuvieron de GenBank. Los códigos de acceso a las secuencias determinadas para las cepas Bt1, Bt2 y Bt3 son MN551183, MN551184 y MN551185, respectivamente.

### Mapas de restricción

Las secuencias de las regiones conservadas en los genes *cry1A* fueron analizadas con el programa NEBcutter2 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003) con el propósito de obtener los mapas de restricción.

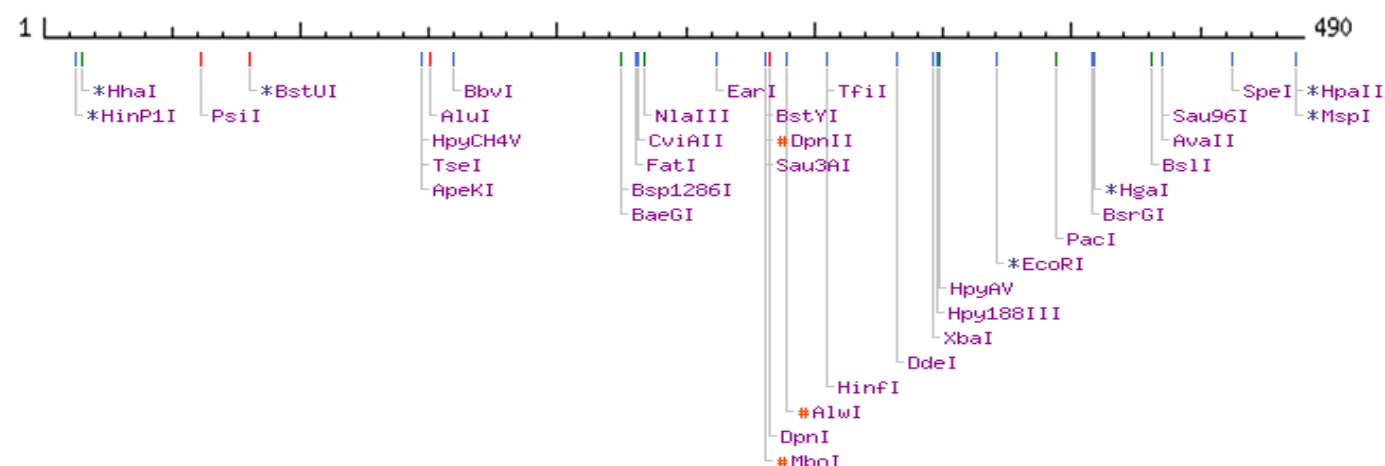


Fotografía: <http://freepik.com>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del número y la ubicación de los sitios de corte para enzimas de restricción en las regiones conservadas de los genes *cry1A* en las cepas nativas estudiadas revela que los fragmentos de Bt1 y Bt2 (490 pb.) son cortados en un solo sitio por 37 enzimas (Figura 1, Tabla 1), mientras que en el caso del fragmento de Bt3 las enzimas que generan un solo corte son 36 (Figura 2, Tabla 2). Este resultado es la consecuencia de que los segmentos estudiados en Bt1 y Bt2 son idénticos, en tanto que el correspondiente a Bt3 presenta una adenina en lugar de una citosina en la posición 201 (Botero & col., 2020).

La diferencia entre los dos mapas de restricción está determinada por la enzima HpyCH4V, que en los fragmentos de las cepas Bt1 y Bt2 tiene un solo sitio de corte (posición 151), mientras que en el fragmento de la cepa Bt3 presenta un sitio de corte en la posición 151 y otro en la posición 199, muy cerca del punto en el que este fragmento presenta la única diferencia a nivel de secuencia nucleotídica respecto de los otros dos. Esta variación explica la aparición del segundo sitio de corte para la enzima HpyCH4V.



**Figura 1.** Mapa de restricción de las regiones conservadas (490 pb.) en los genes *cry1A* de las cepas Bt1 y Bt2. Se indican los sitios en los que cada enzima genera el corte de la secuencia de DNA.

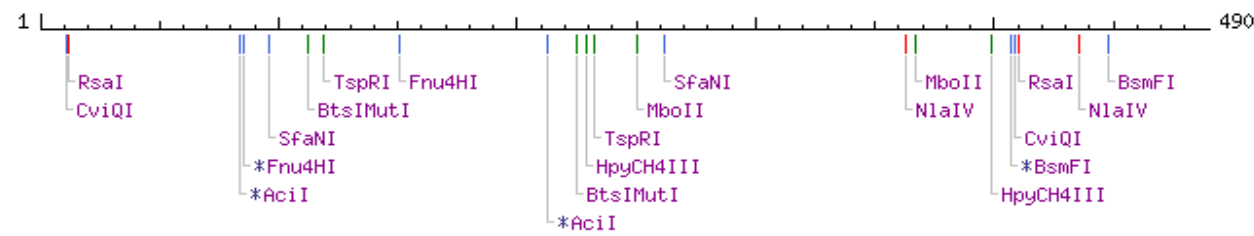
#	Enzima	Secuencia que reconoce	Posición corte y extremo generado (romo - 5' saliente - 3' saliente)
1	AluI	AG <sup>▼</sup> CT	154
2	AlwI	GGATC <sup>▼</sup> NNNN <sup>▼</sup> N <sub>Δ</sub>	291/292
3	ApeKI	G <sup>▼</sup> CWG <sub>Δ</sub> C	151/154
4	Avall	G <sup>▼</sup> GWC <sub>Δ</sub> C	436/439
5	BaeGI	G <sub>Δ</sub> KGCM <sup>▼</sup> C	228/224
6	BbvIS	GCAGC(N) <sub>8</sub> <sup>▼</sup> NNNN <sub>Δ</sub>	163/167
7	BsII	CCNN <sub>Δ</sub> NNN <sup>▼</sup> NNGG	432/429
8	Bsp1286I	G <sub>Δ</sub> DGCH <sup>▼</sup> C	228/224
9	BsrGI	T <sup>▼</sup> GTAC <sub>Δ</sub> A	409/413
10	BstUI	CG <sup>▼</sup> CG	85
11	BstYI	R <sup>▼</sup> GATC <sub>Δ</sub> Y	283/287
12	CviAll	R <sup>▼</sup> GATC <sub>Δ</sub> Y	234/236

**Tabla 1.** Enzimas de restricción que hacen un solo corte en las regiones conservadas (490 pb.) de los genes *cry1A* correspondientes a las cepas Bt1 y Bt2. Se presenta la secuencia reconocida por cada enzima, la posición de la secuencia de DNA en la que hace el corte y el tipo de extremo que genera (rojo: romo, azul: 5' saliente, verde: 3' saliente).

#	Enzima	Secuencia que reconoce	Posición corte y extremo generado (romo - 5' saliente - 3' saliente)
13	DdeI	C <sup>▼</sup> TNA <sub>Δ</sub> G	334/337
14	DpnI	GA <sup>▼</sup> TC	285
15	DpnII	<sup>▼</sup> GATC <sub>Δ</sub>	283/287
16	EarI	CTCTCN <sup>▼</sup> NNN <sub>Δ</sub>	264/267
17	EcoRI	G <sup>▼</sup> AATT <sub>Δ</sub> C	372/376
18	FatI	<sup>▼</sup> CATG <sub>Δ</sub>	233/237
19	HgaI	GACGC(N) <sub>5</sub> <sup>▼</sup> (N) <sub>5</sub> <sub>Δ</sub>	410/415
20	HhaI	G <sub>Δ</sub> CG <sup>▼</sup> C	20/18
21	HinPII	G <sup>▼</sup> CG <sub>Δ</sub> C	18/20
22	Hinfl	G <sup>▼</sup> ANT <sub>Δ</sub> C	307/310
23	HpaII	C <sup>▼</sup> CG <sub>Δ</sub> G	487/489
24	Hpy188III	TC <sup>▼</sup> NN <sub>Δ</sub> GA	349/351
25	HpyAV	CCTTC(N) <sub>5</sub> <sup>▼</sup> N <sup>▼</sup>	350/349
27	HpyCH4V	TG <sup>▼</sup> CA	151
27	MboI	<sup>▼</sup> GATC <sub>Δ</sub>	283/287
28	MspI	C <sup>▼</sup> CG <sub>Δ</sub> G	487/489
29	NlaIII	<sub>Δ</sub> CATG <sup>▼</sup>	237/233
30	PacI	TTA <sub>Δ</sub> AT <sup>▼</sup> TAA	395/393
31	PsiI	TTA <sub>Δ</sub> TAA	66
32	Sau3AI	<sup>▼</sup> GATC <sub>Δ</sub>	283/287
33	Sau96I	G <sup>▼</sup> GNC <sub>Δ</sub> C	436/439
34	SpeI	A <sup>▼</sup> CTAG <sub>Δ</sub> T	463/467
35	TfiI	G <sup>▼</sup> AWT <sub>Δ</sub> C	307/310
36	TseI	G <sup>▼</sup> CWG <sub>Δ</sub> C	151/154
37	XbaI	T <sup>▼</sup> CTAG <sub>Δ</sub> A	348/352

**Tabla 1.** Continuación. Enzimas de restricción que hacen un solo corte en las regiones conservadas (490 pb.) de los genes *cry1A* correspondientes a las cepas Bt1 y Bt2. Se presenta la secuencia reconocida por cada enzima, la posición de la secuencia de DNA en la que hace el corte y el tipo de extremo que genera (rojo: romo, azul: 5' saliente, verde: 3' saliente).

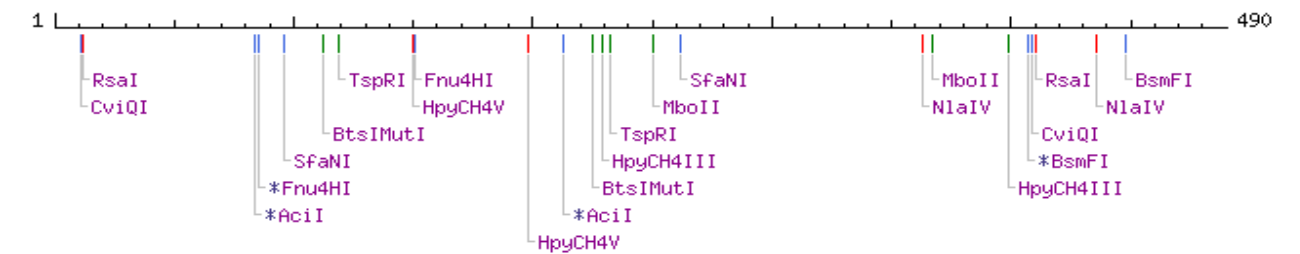




**Figura 3.** Mapa de restricción de las regiones conservadas (490 pb.) en los genes *cry1A* de las cepas Bt1 y Bt2. Se indican los sitios en los que cada enzima genera dos cortes sobre la secuencia de DNA.

#	Enzima	Secuencia que reconoce	Posición corte y extremo generado (romo - 5' saliente - 3' saliente)
1	Acil	C <sup>∩</sup> CG <sub>∩</sub> C	85/87, 214/216
2	BsmFI	GGGAC(N) <sub>10</sub> ∩NNNN <sub>∩</sub>	408/412, 449/453
3	BtsIMutI	CAGTG <sub>∩</sub> NN <sup>∩</sup>	113/111, 226/224
4	CviQI	G <sup>∩</sup> TA <sub>∩</sub> C	12/14, 410/412
5	Fnu4HI	GC <sup>∩</sup> N <sub>∩</sub> GC	86/87, 152/153
6	HpyCH4III	AC <sub>∩</sub> N <sup>∩</sup> GT	230/229, 400/399
7	MboII	GAAGA(N) <sub>7</sub> ∩N <sup>∩</sup>	251/250, 368/367
8	NlaIV	GAAGA(N) <sub>7</sub> ∩N <sup>∩</sup>	364, 437
9	RsaI	GT <sup>∩</sup> AC	13, 411
10	SfaNI	GCATC(N) <sub>5</sub> ∩NNNN <sub>∩</sub>	97/101, 263/267
11	TspRI	∩NNCASTGNN <sup>∩</sup>	120/111, 233/224

**Tabla 3.** Enzimas de restricción que hacen dos cortes en las regiones conservadas (490 pb.) de los genes *cry1A* correspondientes a las cepas Bt1 y Bt2. Se presenta la secuencia reconocida por cada enzima, la posición de la secuencia de DNA en la que hace el corte y el tipo de extremo que genera (rojo: romo; azul: 5' saliente; verde: 3' saliente).



**Figura 4.** Mapa de restricción de la región conservada (490 pb.) en el gene *cry1A* de la cepa Bt3. Se indican los sitios en los que cada enzima genera dos cortes sobre la secuencia de DNA.

#	Enzima	Secuencia que reconoce	Posición corte y extremo generado (romo - 5' saliente - 3' saliente)
1	Acil	C <sup>∩</sup> CG <sub>∩</sub> C	85/87, 214/216
2	BsmFI	GGGAC(N) <sub>10</sub> ∩NNNN <sub>∩</sub>	408/412, 449/453
3	BtsIMutI	CAGTG <sub>∩</sub> NN <sup>∩</sup>	113/111, 226/224
4	CviQI	G <sup>∩</sup> TA <sub>∩</sub> C	12/14, 410/412
5	Fnu4HI	GC <sup>∩</sup> N <sub>∩</sub> GC	86/87, 152/153
6	HpyCH4III	AC <sub>∩</sub> N <sup>∩</sup> GT	230/229, 400/399
7	HpyCH4V	TG <sup>∩</sup> CA	151, 199
8	MboII	GAAGA(N) <sub>7</sub> ∩N <sup>∩</sup>	251/250, 368/367
9	NlaIV	GGN <sup>∩</sup> NCC	364, 437
10	RsaI	GT <sup>∩</sup> AC	13, 411
11	SfaNI	GCATC(N) <sub>5</sub> ∩NNNN <sub>∩</sub>	97/101, 263/267
12	TspRI	∩NNCASTGNN <sup>∩</sup>	120/111, 233/224

**Tabla 4.** Enzimas de restricción que hacen dos cortes en la región conservada (490 pb.) del gen *cry1A* correspondiente a la cepa Bt3. Se presenta la secuencia reconocida por cada enzima, la posición de la secuencia de DNA en la que hace el corte y el tipo de extremo que genera (rojo: romo, azul: 5' saliente, verde: 3' saliente).



De los resultados presentados anteriormente se deduce que la acción de la enzima HpyCH4V sobre el fragmento de 490 pb en las cepas Bt1 y Bt2 genera un fragmento de 151 pb y otro de 339 pb. En el caso del segmento homólogo en Bt3 se producen fragmentos de 48, 151 y 291 pb, respectivamente.

## CONCLUSIONES

Botero y colaboradores (2020) caracterizaron de manera detallada las regiones conservadas de los genes *cry1A* de tres cepas colombianas de Bt y encontraron una variación en la cepa Bt3 (A en lugar de C en la posición 201) con respecto a los fragmentos equivalentes en las cepas Bt1 y Bt2. En el presente estudio se elaboraron los mapas de restricción para dichas regiones génicas. Los resultados obtenidos indican que la única diferencia de secuencia que hay entre los fragmentos analizados produce cambios en el número y la ubicación de los sitios de corte sobre los que actúa una de las endonucleasas considerada en el análisis. A partir del número y la ubicación de los sitios de corte de la endonucleasa HpyCH4V en las regiones génicas estudiadas se determinó el tamaño y el número de fragmentos que se obtienen. La aplicación del análisis del número y la ubicación de los sitios de restricción junto con el uso de electroforesis se propone como una herramienta valiosa para la diferenciación de cepas de Bt. De otro lado, vale la pena destacar el valor de este tipo de análisis para evidenciar pequeñas diferencias a nivel de secuencia de nucleótidos sin tener que recurrir a técnicas más sofisticadas y más costosas.



Fotografía: <https://www.freepik.com>

## LISTA DE REFERENCIAS

Ancines, N., & Pulido, M.A. (2017) Caracterización microscópica y molecular de tres aislamientos colombianos de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *El Astrolabio*, 16(1), pp. 15-22.

Botero, S., Carvajal, N., Santamaría, P., & Pulido, M.A. (2020) Aislamiento y secuenciación de un fragmento de 490 pares de bases correspondiente a la región conservada de los genes *cry1A* en tres cepas colombianas de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *El Astrolabio*, 19 (1), pp. 5-18.

Downes, S., Parker, T., & Mahon, R. (2010). Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. *PLoS One*, 5(9), e12567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012567>

González-Cabrera, J., Herrero, S., & Ferré, J. (2001) High genetic variability for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in a single population of diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11), pp. 5043-5048. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5043-5048.2001>

Lee, M.K., Milne, R.E., Ge, A.Z., & Dean, D.H. (1992) Location of a *Bombix mori* receptor binding region on a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J. Biol. Chem.*, 267(5), pp. 3115-3121. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50702-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50702-5)

Pingoud, A., & Jeltsch, A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, 29 (18), pp. 3705-3727. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3705>

Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., & Wende, W. (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(6), pp.685-707. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4513-1>

Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E., & Jannink, J.L. (2012) Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One*, 7(2), e32253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032253>

Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R.J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.*, 31 (13), pp. 3688-3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>

Widner, W.R., & Whiteley, H.R. (1989). Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J. Bacteriol.*, 171, 965-974.