

Caracterización genética de bacterias del suelo



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

Este trabajo hace parte de la línea de investigación “Identificación de nuevos genes cry en cepas colombianas de Bt” que surgió en el Centro de Estudios en Biología Molecular desde su creación en 1999. Los resultados que se presentan en el artículo son el producto de seis años de esfuerzo de los “Jóvenes Investigadores” del CEBM, quienes continuaron el trabajo desarrollado por Nicolás Ancinés Reyes (exalumno de la promoción 2016). Las secuencias génicas que se determinaron en este estudio fueron depositadas en GenBank, la base de datos de secuencias genéticas más importante del mundo.

Santiago Botero Casasbuenas, Nicolás Carvajal Ardila, Pedro Santamaría Holguín
Estudiantes 11º grado, Gimnasio Campestre.

Mauricio Pulido Jiménez

Director Centro de Estudios Biología Molecular,
Gimnasio Campestre.

Correspondencia para los autores:

centrobiomol@campestre.edu.co

Recibido: 28 de febrero de 2020

Aceptado: 27 de marzo de 2020

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es objeto de estudio de numerosas investigaciones dada su capacidad para producir proteínas que actúan como insecticidas naturales, hecho que la ha convertido en una alternativa de naturaleza biológica al uso de productos químicos en el control de insectos plagas. En este trabajo se presentan el aislamiento y la determinación de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 490 pb. localizado en la región conservada de los genes *cry1A* en tres cepas colombianas de Bt. Las secuencias nucleotídicas de las cepas Bt1 y Bt2 resultaron idénticas, mientras que la correspondiente a la cepa Bt3 mostró una variación en la posición 201 (adenina en lugar de citosina). Esta modificación implica una substitución conservativa en la posición 96 (fenilalanina en lugar de leucina) del segmento de proteína hipotética *cry1A* deducida para Bt3. Las secuencias analizadas, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, mostraron niveles de similitud superiores al 98% con respecto a las previamente reportadas. En el fragmento de proteína hipotético deducido a partir de las secuencias nucleotídicas determinadas se identificó el dominio N-terminal conservado de las σ -endotoxinas producidas por bacterias del género *Bacillus*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), genes *cry1A*, proteínas Cry.



SUMMARY

Bacillus thuringiensis (Bt) is the subject of numerous investigations given its ability to produce proteins that act as natural insecticides, which has made it a biological alternative to the use of chemicals in pest control. In this work, we present the isolation and determination of the nucleotide sequence of a 490 bp fragment located in the conserved region of the *cry1A* genes in three colombian strains of Bt. The nucleotide sequences of the Bt1 and Bt2 strains were identical, while the sequence of the Bt3 strain showed a variation in position 201 (adenine instead of cytosine). This modification implies a conservative substitution at position 96 (phenylalanine instead of leucine) of the hypothetical Cry1A protein segment deduced for Bt3. The sequences analyzed, both at nucleotide and amino acid level, showed similarity levels higher than 98% with respect to those previously reported. The preserved N-terminal domain of σ -endotoxins produced by bacteria of the genus *Bacillus* was identified in the hypothetical protein fragment deduced from the determined nucleotide sequences.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Polymerase Chain Reaction (PCR), *cry1A* genes, Cry proteins.



INTRODUCCIÓN

Son muchas las variables que determinan la productividad de un terreno agrícola. Algunas de ellas, de naturaleza fisicoquímica, están relacionadas con la estructura y la resistencia mecánica de los suelos, la disponibilidad de agua y nutrientes, la temperatura del ambiente y el intercambio de gases a nivel edáfico (Jayawardane & Chan, 1994; Lipiec & Hatano, 2003). De otro lado están los factores biológicos como la respuesta de las variedades cultivadas a las condiciones ambientales, la presencia de especies vegetales invasoras y el ataque de insectos plagas. La aparición de estos dos elementos puede reducir de manera muy significativa la productividad de los cultivos de importancia nutricional y económica, hecho que tiene el poder de repercutir directamente en el costo de los alimentos y en la seguridad alimentaria de una nación. Hasta el presente, el recurso de primera mano para el control de plagas y malezas ha sido la aplicación de agroquímicos (Knoepp et al., 2000).

El uso de insecticidas sintéticos ha acompañado a las prácticas agrícolas convencionales desde principios del siglo XX, cuando la industria química logró desarrollar la tecnología para diseñar y producir moléculas capaces de exterminar las plagas

(langostas, polillas, escarabajos, etc.) que atacan a los cultivos (Obere-mok et al., 2015). Sin embargo, después de más de un siglo de uso de estos productos, sus efectos adversos sobre el suelo, los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, la entomofauna edáfica y la salud humana se han hecho evidentes. Los insecticidas químicos son los responsables de la mayoría de casos de intoxicación laboral en el sector agrícola (Benítez, 2012).

Como alternativa al uso de insecticidas de origen químico, en la actualidad ha ido ganando espacio el uso de productos biológicos elaborados a partir de extractos de plantas, hongos y bacterias o de moléculas derivadas de sus respectivos metabolismos (Pérez-García et al., 2011; Berlitz et al., 2014). Uno de tales casos es el de *Bacillus thuringiensis* (Bt), microorganismo que fue descrito en Japón por Shigetane Ishiwatari hacia 1902 y que se ha venido utilizando como materia prima en la elaboración de formulaciones para la erradicación de insectos plagas. El uso masivo de productos basados en Bt se debe a su accesibilidad y bajo costo; durante las temporadas de cultivo de 2013-2014 en Brasil, el uso total de bioplaguicidas Bt alcanzó una cifra superior a 4,5 millones de litros/kilogramo, lo que corresponde a una superficie tratada de aproximadamente 9 millones de hectáreas (Polanczyk et al., 2017).

Bt es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, quimioorgano-trofa, nativa del suelo y que pertenece a la familia Bacillaceae (West et al., 1984); su forma se asemeja a la de un bastón y sus dimensiones oscilan entre 1 y 1.2 micrómetros de ancho y entre 3 y 5 micrómetros de largo. La bacteria produce esporas y además proteínas cristalinas que tienen propiedades insecticidas. Las esporas son estructuras de dispersión y supervivencia que le permiten a la bacteria soportar condiciones adversas, lo cual explica su condición de ubicuidad; esta especie se ha encontrado en ambientes tan diversos como suelos, rizósfera, filopla-no e insectos (Travers et al., 1987; Cinar et al., 2008; Raymond et al., 2010). De otro lado, produce proteínas altamente tóxicas para insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros (Widner & Whiteley, 1989). Estas proteínas, comúnmente llamadas σ -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 caracterizan

por actuar de manera muy específica. Esta especificidad está mediada 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 proteína insecticida.

Una vez consumidas por el insecto, las proteínas Cry se solubilizan en el tracto digestivo y posteriormente se ligan a las células del intestino medio del animal. Dicha interacción propicia la formación de poros en la membrana, hecho que la desestabiliza y provoca la lisis celular. Algún tiempo después, el insecto deja de alimentarse y muere (Meadows, 1993). La razón por la cual las proteínas Cry de la bacteria sólo afectan a ciertos insectos es que en el intestino medio deben darse ciertas condiciones para que la toxina se solubilice y actúe. Para que la solubilización suceda, el lumen intestinal debe tener un pH alcalino y además un ambiente reductor. El procesamiento y activación de las proteínas Cry se da en varias fases: 1. solubilización del cristal dentro del intestino del animal, 2. ruptura enzimática de la proteína y liberación de la región tóxica, 3. unión de la toxina al receptor de superficie (localizado en la membrana de la célula), 4. inserción de la toxina en la membrana, 5. formación del poro en la membrana celular y finalmente citólisis (Gringorten et al., 1992; Knowles, 1994).





Tomando en consideración las problemáticas ambientales y de salud pública anteriormente expuestas, surge la necesidad de identificar nuevos genes *cry* capaces de producir toxinas con mayores niveles de actividad frente a insectos plagas. La solución podría encontrarse en la exploración de la riqueza microbiológica de los suelos colombianos. Debido a que está localizado en el trópico, Colombia es un país con una gran biodiversidad, condición que se evidencia también en términos de sus poblaciones de microorganismos (Rangel, 2010). Resulta de capital importancia para el sector agrícola estudiar los microorganismos nativos de los suelos colombianos puesto que si se logra identificar nuevos genes para el desarrollo de bioinsecticidas con mayor poder de acción, es posible dejar de lado el uso de insecticidas de origen sintético. Ancines y Pulido (2017) determinaron la presencia de genes *cry1A* en tres cepas nativas de Bt. En esta investigación se presentan el aislamiento y la determinación de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 490 pb. localizado en la región conservada de los genes *cry1A* de las cepas antes referidas.



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.

Cultivos bacterianos

Las bacterias fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) líquido durante 18-24 horas a temperatura constante de 28.5 °C (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989).

Caracterización microscópica de las cepas

Colonias de cada cepa fueron sometidas a tinción con verde de malaquita-safranina (coloración de Shaeffer-Fulton) y posteriormente observadas con un microscopio Olympus CX21 (1000X).

Extracción y purificación de plásmidos

La extracción de DNA plasmídico a partir de las bacterias cultivadas se realizó utilizando el protocolo descrito por He, Wilde y Kaderbhai (1990).

Amplificación de los genes *cry1A*

La amplificación de los fragmentos de los genes *cry1A* se realizó mediante PCR. Se utilizaron los iniciadores *cry1A*-F (5' CCG GTG CTG GAT TTG TGT TA 3') y *Cry1A*-R (5' AAT CCC GTA TTG TAC CAG CG 3') (Cazzoli et al., 1991). Con el propósito de lograr productos de amplificación específicos se evaluaron temperaturas de alineamiento entre 55 °C y 60 °C y concentraciones de MgCl₂ entre 1 y 3 mM. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (90 V, 40 min). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

Purificación de los productos de PCR

Los productos amplificados mediante PCR fueron purificados empleando el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA).

Clonación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR 2.1 TOPO TA (Thermo Fisher Scientific, USA). La secuencia de nucleótidos de los fragmentos clonados se obtuvo empleando el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger et al., 1977) y los mismos iniciadores utilizados para producirlos (*Cry1A*-F y *Cry1A*-R). Los fragmentos se secuenciaron por ambos extremos con el fin de confirmar la información lograda.

Secuencia consenso de los fragmentos aislados

Las secuencias correspondientes tanto a la cadena positiva como a la negativa de los fragmentos aislados fueron alineadas empleando el programa CodonCode Aligner versión 2.0.4 (CodonCode Corporation, USA) con el fin de generar una secuencia consenso definitiva para cada cepa.

Identificación de marcos de lectura abiertos

Para identificar los marcos de lectura abiertos en los fragmentos secuenciados se utilizó el programa ORF Finder (NCBI, USA).

Análisis de similitud

Con el fin de determinar el grado de semejanza de las secuencias nucleotídicas determinadas y de las secuencias aminoacídicas derivadas de las primeras respecto de los genes y proteínas Cry1A previamente reportadas en otras especies, se hizo un análisis de similitud utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1990).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de fragmentos conservados de los genes *cry1A*

El ADN plasmídico de las cepas colombianas de Bt se sometió a PCR con el fin de amplificar fragmentos correspondientes a regiones conservadas de los genes de la subfamilia *cry1A*. Para tal fin se evaluaron diferentes condiciones de reacción y programas de amplificación. Se hizo una prueba inicial con temperatura de alineamiento de 58 °C y concentración final de 2 mM de MgCl₂. Sin embargo, utilizando una concentración final de MgCl₂ de 1,5 mM y una temperatura de alineamiento de 59 °C se logró un incremento considerable en la cantidad de producto amplificado. Las condiciones óptimas para la amplificación de los fragmentos deseados se presentan en la tabla 1. El programa de ciclaje utilizado se presenta en la tabla 2.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen/ reacción
Agua	-	-	11.06 µl
PCR Buffer	5X	1X	5.0 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	1.5 µl
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 µl
<i>cry1A</i> -F	10 µM	0.25 µM	0.62 µl
<i>cry1A</i> -R	10 µM	0.25 µM	0.62 µl
Taq Pol.	5 u/ µl	1 unid/reac.	0.2 µl
DNA (dil 1:10)	-	-	4.0µl
			Total= 25.0 µl

Tabla 1. Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación por PCR de los fragmentos de 490 pb. de los genes *cry1A* en las cepas colombianas de Bt.

Etapa	Temperatura / tiempo	Número de ciclos
Denaturación inicial	94 °C x 4 minutos	1
Amplificación		45
Denaturación	94 °C x 30 segundos	
Anillaje	59 °C x 20 segundos	
Extensión	72 °C x 20 segundos	
Extensión final	72 °C x 12 minutos	1

Tabla 2. Programa de ciclaje utilizado para la amplificación por PCR de los fragmentos de 490 pb de los genes *cry1A* en las cepas colombianas de Bt.

Secuencia nucleotídica de los fragmentos amplificados mediante PCR

Los fragmentos amplificados mostraron una longitud de 490 pares de bases (figura 1). Los correspondientes a las cepas Bt1 y Bt2 están constituidos por 157 adeninas (32,04%), 149 timinas (30,40%), 82 guaninas (16,73%) y 102 citocinas (20,81%). El fragmento de Bt3 está constituido por 158 adeninas (32,24%), 149 timinas (30,40%), 82 guaninas (16,73%) y 101 citocinas (20,61%). Las secuencias de Bt1 y Bt2 resultaron idénticas, mientras que la correspondiente a Bt3 mostró solo una diferencia respecto a las anteriores: en la posición 201 hay una adenina en lugar de una citosina (figura 2). Las secuencias están registradas en GenBank bajo los números de acceso MN551183, MN551184 y MN551185 respectivamente.

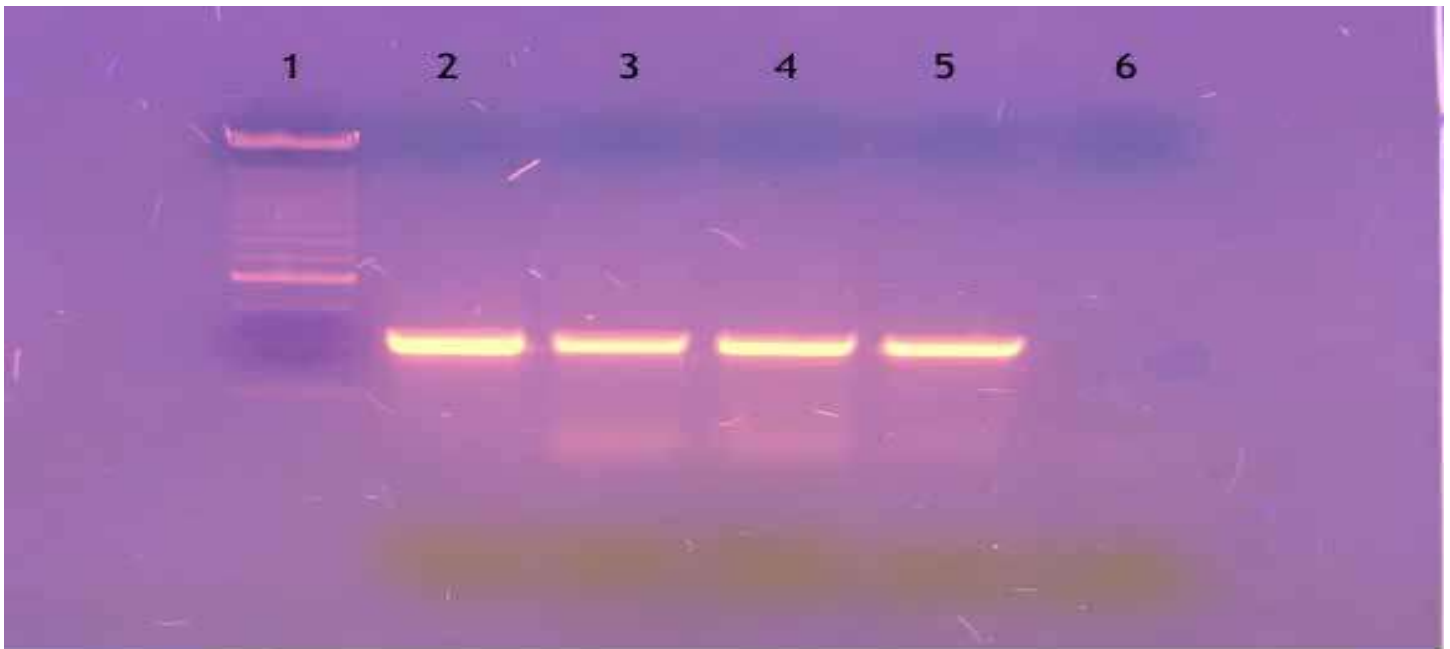


Figura 1. Amplificación del fragmento de 490 pb. a partir de la región conservada de los genes *cry1A* en las cepas colombianas de Bt. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: control positivo (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), Carril 3: cepa Bt1, Carril 4: cepa Bt2, Carril 5: cepa Bt3, Carril 6: blanco.

Bt1

```
AATCCCGTATTGTACCAGCGCACAGCATAATCTGTATAGTTGCCAATAAGCCTA-  
GTTAAATCATTATAACGACTATTGATAGTCGCGGCATCAAATCCCCACCTTTGTC-  
CAAACACTGAAACATCTCTCAAAACTGATAAATGTAAATTTGCAGCTTGAACA-  
TATACTGATAAAAGAGGAACTTGATAATTTTGAAGTGCCAAAAGAGGAATAG-  
CGGTTGTAAGGGCACTGTTTCATGTCATTGAATTGAATACGCATCTCTTCTCTTA-  
ATGCTGGATTAGTAGGATCTGCTTCCCCTCTCTAAAAGATTCTGCGTAAATTT-  
GATAAAGATTGCTTAGTCCTTCTAATCTAGAAATGGCTTGGTTCCTAGCGAATTC-  
TTCTATTCTTTGGTTAATTAAGTGTCAATTTGTACAAGAAATGCGTCCCATTGA-  
GAGGGACCAAAAATTCCCCATATTATATCAACTAGTCCTAACACAAATCCAG-  
CACCGG
```

Bt2

```
AATCCCGTATTGTACCAGCGCACAGCATAATCTGTATAGTTGCCAATAAGCCTA-  
GTTAAATCATTATAACGACTATTGATAGTCGCGGCATCAAATCCCCACCTTTGTC-  
CAAACACTGAAACATCTCTCAAAACTGATAAATGTAAATTTGCAGCTTGAACA-  
TATACTGATAAAAGAGGAACTTGATAATTTTGAAGTGCCAAAAGAGGAATAG-  
CGGTTGTAAGGGCACTGTTTCATGTCATTGAATTGAATACGCATCTCTTCTCTTA-  
ATGCTGGATTAGTAGGATCTGCTTCCCCTCTCTAAAAGATTCTGCGTAAATTT-  
GATAAAGATTGCTTAGTCCTTCTAATCTAGAAATGGCTTGGTTCCTAGCGAATTC-  
TTCTATTCTTTGGTTAATTAAGTGTCAATTTGTACAAGAAATGCGTCCCATTGA-  
GAGGGACCAAAAATTCCCCATATTATATCAACTAGTCCTAACACAAATCCAG-  
CACCGG
```

Bt3

```
AATCCCGTATTGTACCAGCGCACAGCATAATCTGTATAGTTGCCAATAAGCCTA-  
GTTAAATCATTATAACGACTATTGATAGTCGCGGCATCAAATCCCCACCTTTGTC-  
CAAACACTGAAACATCTCTCAAAACTGATAAATGTAAATTTGCAGCTTGAACA-  
TATACTGATAAAAGAGGAACTTGATAATTTTGAAGTGCAAAAAGAGGAATAG-  
CGGTTGTAAGGGCACTGTTTCATGTCATTGAATTGAATACGCATCTCTTCTCTTA-  
ATGCTGGATTAGTAGGATCTGCTTCCCCTCTCTAAAAGATTCTGCGTAAATTT-  
GATAAAGATTGCTTAGTCCTTCTAATCTAGAAATGGCTTGGTTCCTAGCGAATTC-  
TTCTATTCTTTGGTTAATTAAGTGTCAATTTGTACAAGAAATGCGTCCCATTGA-  
GAGGGACCAAAAATTCCCCATATTATATCAACTAGTCCTAACACAAATCCAG-  
CACCGG
```

Figura 2. Secuencia de nucleótidos correspondiente a los fragmentos de 490 pb. amplificados a partir de los genes *cry1A* en las cepas colombianas de Bt. La única diferencia entre las secuencias se presenta en la posición 201 (señalada en color rojo).



Análisis de similitud de las secuencias nucleotídicas determinadas

Las secuencias nucleotídicas de los tres fragmentos aislados se compararon con secuencias homólogas previamente reportadas en GenBank. El análisis BLAST reveló niveles de similitud que oscilan entre 99% y 100% y valores E iguales a cero (0) respecto a cepas de *Bacillus thuringiensis* de diversos puntos geográficos del mundo (tablas 3 y 4). La comparación de las tablas antes referidas evidenció que los genes que muestran niveles de similitud elevados con los fragmentos de Bt1 y Bt2 son diferentes a los que tienen similitud significativa con el fragmento de Bt3. Esto se debe a la variación encontrada en la secuencia de Bt3 (adenina en lugar de citosina en la posición 201). El análisis hecho pone de manifiesto que un solo cambio en la secuencia del gen determina variaciones en el grado de similitud o diferencia respecto a genes de cepas provenientes de lugares diferentes (Betancor et al., 2008).

Identificación de marcos de lectura abiertos

Para las tres secuencias caracterizadas, el programa ORF Finder permitió encontrar marcos de lectura abiertos de 486 nucleótidos en la cadena negativa (tabla 5); estos comienzan en la posición 488 y se extienden hasta la posición 3. Las tres proteínas deducidas tienen 162 aminoácidos; en la posición 96 las proteínas deducidas de los fragmentos secuenciados para Bt1 y Bt2 tienen una leucina (L) mientras que la proteína deducida del fragmento secuenciado para Bt3 tiene una fenilalanina (F). La leucina es una molécula hidrofóbica que se caracteriza por poseer una cadena lateral hidrocarbonada larga que incluye dos grupos metilos. La fenilalanina es un aminoácido aromático y además hidrofóbico, su cadena lateral presenta un anillo bencénico. Puesto que los dos aminoácidos pertenecen al grupo de los hidrofóbicos (apolares), se puede afirmar que el cambio observado es conservativo. Las secuencias de aminoácidos están registradas en GenBank bajo los números de acceso QHB35418, QHB35419 y QHB35420 respectivamente.

Descripción del gen	Valor E	% Identidad
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa NB6	0,0	100,00
<i>cry1A-like Bacillus thuringiensis</i> cepa PS9-D12	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa YC-10	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> var. kurstaki HD-1	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa HTS-S-38	0,0	100,00
<i>cry1A-like Bacillus thuringiensis</i> cepa PS9-C12	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa PS9-E2	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa LS-R-21	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa A-19-31	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa HTS-S-38	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa PS9-C12	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa PS9-E2	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa LS-R-21	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa A-19-31	0,0	100,00
<i>cry1Ac Bacillus thuringiensis</i> cepa 146-158-01	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i>	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa INTA Mo1-12	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa Bt3	0,0	100,00

Tabla 3. Niveles de similitud (expresados como porcentaje de identidad) de la secuencia de 490 pb. caracterizada en las cepas Bt1 y Bt2 respecto a genes homólogos reportados en otras cepas.

Descripción del gen	Valor E	% Identidad
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa CPB012	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa JSc1	0,0	100,00
<i>cry 1 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> cepa HD-29	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> cepa YBT-1520	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa SC6H8	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> cepa IS5056	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> cepa SK-798	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> cepa HD-771	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>chinensis</i>	0,0	100,00
<i>cry1Ab Bacillus thuringiensis</i> cepa C006	0,0	100,00
<i>cry1Aa13 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> clone 44	0,0	100,00
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa ly30	0,0	100,00
<i>cry 1 Bacillus thuringiensis</i>	0,0	100,00
<i>cry1 Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	0,0	100,00
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa Bt2	0,0	99,80
<i>cry1A Bacillus thuringiensis</i> cepa Bt1	0,0	99,80
Constructo sintético <i>cry1Ac- cry9AaMod</i>	0,0	99,80
Constructo sintético <i>cry1Ac- cry9Aa</i>	0,0	99,80
<i>cry1Aa Bacillus thuringiensis</i> cepa NB6	0,0	99,80

Tabla 4. Niveles de similitud (expresados como porcentaje de identidad) de la secuencia de 490 pb. caracterizada en la cepa Bt3 respecto a genes homólogos reportados en otras cepas.

Cepa	Proteína deducida
Bt1	GAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGL-SNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIP L AVQNY-QVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGN-YTDYAVRWYNTG
Bt2	GAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGL-SNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIP L AVQNY-QVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGN-YTDYAVRWYNTG
Bt3	GAGFVLGLVDIIWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRLEGL-SNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIP F AVQNY-QVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGN-YTDYAVRWYNTG

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos deducidas de los fragmentos de 490 pb. caracterizados en las cepas colombianas de Bt. La única diferencia entre las secuencias se presenta en la posición 96 (señalada en color rojo).

Análisis de similitud de las secuencias proteínicas determinadas

El análisis BLASTP pone de manifiesto que los segmentos de proteína Cry1A deducidos a partir de los fragmentos de ADN secuenciados muestran niveles de similitud que oscilan entre 98% y 100% respecto a proteínas de la familia Cry1A de cepas caracterizadas en diversos lugares del mundo (tablas 6 y 7). La fluctuación de los valores E observados, que ocurre entre 2×10^{-113} y 1×10^{-108} indica que los alineamientos entre las secuencias analizadas y aquellas reportadas en las bases de datos son suficientemente significativos. De otro lado, los resultados evidencian que el cambio de un solo aminoácido observado en la cepa Bt3 no altera de manera sensible los niveles de similitud que muestra este fragmento de proteína en comparación con los observados en el caso de las proteínas hipotéticas de Bt1 y Bt2.

Descripción de la proteína	Valor E	% de Identidad
Cry1A <i>Bacillus thuringiensis</i>	2e-113	99,38
Proteína insecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	1e-112	99,38
Proteína híbrida Cry1Ac/Cry1Ab (constructo sintético)	2e-110	99,38
Cry1Aa <i>Bacillus thuringiensis</i>	5e-110	99,38
Cry1Aa <i>Bacillus cereus</i> cepa ISP2954	1e-110	100,00
Proteína fusión Cry1Ab/Cry1Ac (vector pMCS)	1e-109	98,15
Cry1Ac (constructo sintético)	2e-109	100,00
Cry1Aa <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	2e-109	100,00
Cry1Ac <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	3e-109	100,00
Proteína insecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	3e-109	100,00
Proteína insecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	4e-109	100,00

Tabla 6. Niveles de similitud (expresados como porcentaje de identidad) de los fragmentos de proteína Cry1A de las cepas Bt1 y Bt2 respecto a proteínas homólogas reportadas en otras cepas.



Descripción de la proteína	Valor E	% de Identidad
Cry1A <i>Bacillus thuringiensis</i>	2e-113	99,38
Proteína insecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	5e-113	100,00
Proteína insecticida <i>Bacillus thuringiensis</i>	5e-112	98,77
Proteína híbrida cry1Ac/ cry1Ab (constructo sintético)	3e-111	100,00
Cry1Aa <i>Bacillus thuringiensis</i>	9e-111	100,00
Proteína fusión cry1Ab/ cry1Ac	1e-110	98,77
Cry1Aa <i>Bacillus cereus</i> cepa ISP2954	5e-110	99,38
Cry1Ac (constructo sintético)	9e-110	100,00
Cry1Ac <i>Bacillus thuringiensis</i> (cadena A)	1e-109	100,00
Proteína híbrida cry1Ac- cry9Aa (constructo sintético)	1e-109	100,00
Cry1Aa3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	9e-110	100,00
Cry1Ac (constructo sintético)	2e-109	100,00
Cry1Ac truncada (constructo sintético)	2e-109	100,00
Cry1A <i>Bacillus thuringiensis</i> (cadena A)	2e-109	99,38
Cry1Ac1 (constructo sintético)	2e-109	100,00
Cry1Aa (constructo sintético)	2e-109	99,38
Cry1Ab1 (constructo sintético)	3e-109	99,38

Tabla 7. Niveles de similitud (expresados como porcentaje de identidad) del fragmento de proteína Cry1A de la cepa Bt3 respecto a proteínas homólogas reportadas en otras cepas.

Dominio conservado de las σ -endotoxinas

Los dominios pueden ser definidos como unidades estructurales y/o funcionales distintas en una proteína. A menudo se observa que la región de una determinada cadena polipeptídica que muestra un plegamiento particular también ejecuta una función específica. Desde el punto de vista de la naturaleza de su secuencia, los dominios se definen como regiones muy conservadas evolutivamente que adquieren mayor relevancia si son descritos como módulos móviles, es decir, presentes en diferentes familias de proteínas con arquitectura diversa (Marchler-Bauer et al., 2007).

Los dominios contienen patrones de secuencia conservados o motivos, los cuales permiten su detección en la cadena de polipéptidos. Sin embargo, la distinción entre dominio y motivo no es clara, especialmente en el caso de las unidades repetitivas cortas. Los motivos funcionales también están presentes fuera del alcance de los dominios conservados estructuralmente (Marchler-Bauer et al., 2007). El análisis realizado con la herramienta CDD reveló que la totalidad de los fragmentos de proteína deducidos de las secuencias nucleotídicas encontradas en las cepas analizadas hacen parte del dominio N-terminal característico de las σ -endotoxinas producidas por especies bacterianas del género *Bacillus*. Este dominio se extiende desde el residuo 3 (glicina) hasta el residuo 162 (glicina) (figura 3). El dominio N-terminal de las σ -endotoxinas está involucrado en la inserción de la proteína a la membrana celular y en la formación del poro, mientras que los dominios 2 y 3 participan en la unión de la proteína al receptor de la membrana.

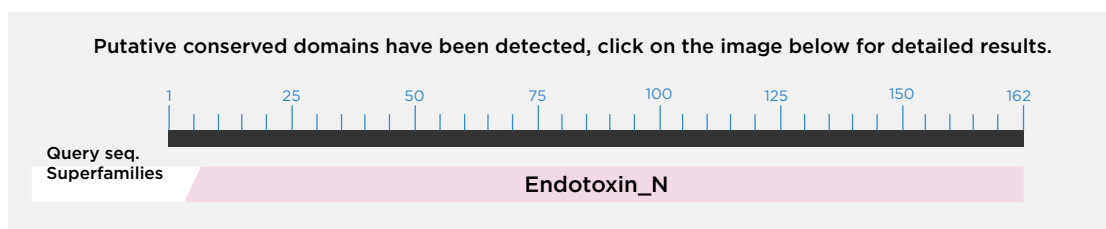


Figura 3. Ubicación de los fragmentos de proteína Cry1A (hipotéticos) deducidos de las secuencias determinadas dentro de la región N-terminal del dominio conservado de las σ -endotoxinas Cry.

CONCLUSIONES

En trabajos orientados a explorar la naturaleza genética de cepas de Bt provenientes de diversos puntos geográficos y predecir su capacidad para producir proteínas insecticidas, se ha empleado la técnica de PCR con iniciadores altamente específicos para amplificar determinadas familias y subfamilias de los genes *cry* (Hernández y col.,1997; Carozzi et al., 1991). Ancines y Pulido (2017) verificaron la presencia de genes de la familia *cry1* y de la subfamilia *cry1A* en las tres cepas colombianas de Bt que analizaron. Con el propósito de hacer una caracterización más detallada de dichos genes, en este trabajo se determinó la secuencia nucleotídica de las regiones amplificadas por PCR empleando los iniciadores diseñados por Geiser et al. (1986). De acuerdo con Cerón y colaboradores (1994) y otros estudios relacionados con genes *cry1A*, el fragmento de DNA amplificado con los iniciadores diseñados por Geiser muestra un tamaño de 490 pares de bases. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportes anteriormente referidos. La comparación de las tres secuencias obtenidas permitió identificar una variación en el gen *cry1A* de la cepa Bt3 (A en lugar de C, posición 201) respecto a los genes de las cepas Bt1 y Bt2. Los análisis de similitud elaborados revelaron que las secuencias determinadas muestran niveles de semejanza que oscilan entre 98% y 100% con genes homólogos de cepas aisladas en diferentes lugares del mundo. La variación nucleotídica observada en la cepa Bt3 se vio reflejada en la posición 96 de la secuencia aminoacídica deducida, en la que se observa una fenilalanina en lugar de una leucina. Este cambio se puede considerar conservativo puesto que la leucina y la fenilalanina pertenecen al grupo de los aminoácidos apolares. Este hallazgo resulta llamativo puesto que se presenta en una región de la proteína que ha sido descrita como conservada. El efecto de esta variación en la toxicidad de la proteína solo se puede determinar mediante la realización de bioensayos en los que larvas de lepidópteros sean alimentadas con dietas que incluyan a las proteínas Cry1A purificadas a partir de los aislamientos estudiados.

Puesto que los genes *cry* son muy numerosos, para facilitar su estudio han sido organizados en familias, algunas de ellas muy poco frecuentes como el caso de *cry5*, *cry12* y *cry21*, entre otras (Schnepf et al., 1998). De manera contrastante, hay otras que están conformadas por una significativa cantidad de genes, como el caso de las familias *cry1* y *cry3* (Cerón et al., 1994; Cerón et al., 1995). Tomando en consideración la abundancia de genes en tales familias, su notable variabilidad, así como los resultados de esta investigación, resultaría valioso adelantar investigaciones que permitan hacer una caracterización molecular más detallada tanto de las regiones variables e hipervariables de los genes *cry1A* como de sus regiones conservadas y establecer la relación de tal condición respecto del nivel de toxicidad de las proteínas codificadas por ellos frente a insectos plagas.



LISTA DE REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215(3), 403-410.
- Ancines, N., & Pulido, M.A. (2017). Caracterización microscópica y molecular de tres aislamientos colombianos de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *El Asrolabio* 16(1), 15-22.
- Benítez, R.L. (2012). Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: un estado del arte. <http://www.ser-pajpy.org.py/wp-content/uploads/2014/03/Plaguicidas-y-efectos-sobre-la-salud-humana1.pdf>
- Berlitz, D.L., Knaak, N., Cassal, M.C., & Fiuza, L.M. (2014). *Bacillus* and biopesticides in control of phytonematodes. In: K. Sahayaraj (eds.), *Basic and applied aspects of biopesticides* (pag. 3-16). Springer.
- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2008). Genética bacteriana. En: Temas de bacteriología y virología médica. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GeneticaBacteriana.pdf>
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S., & Koziel, M.G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(11), 3057- 3061.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., & Bravo, A. (1994). PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1), 353-356.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R., Güereca, L., & Bravo, A. (1995). Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (11), 3826-3831.
- Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A.F., Harsa, S., & Gunes, H. (2008). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. *J. Appl. Microbiol.*, 104 (2), 515-525.
- Geiser, M., Schweitzer, S., & Grimm, C. (1986) The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *kurstaki* HD1. *Gene*, 48(1),109-118.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S., & Van Frankenhuyzen, K. (1992). Suppression of *Bacillus thuringiensis* endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.*, 60, 47-52.
- He, M., Wilde, A., & Kaderbhai, M. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 18(6), 1660.
- Hernández, J., Mariño, L., Orozco, M., & Narváez, J. (1997). Uso de la reacción en cadena de la polimerasa para caracterizar aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Corpoica*, 2 (1), 1-9.
- Jayawardane, N.S., & Chan, K.Y. (1994). The management of soil physical properties limiting crop production in Australian sodic soils - a review. *Aust. J. Soil Res.*, 32(1), 13 - 44
- Knoeppa, J. D., Coleman, D. C., Crossley Jr., D.A. & Clark, J. S. (2000). Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. *For. Ecol. Manag.*, 138, 357-368.
- Knowles, B.H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal endotoxins. *Advan. Insect. Physiol.*, 24, 275-308.
- Lipiec, J., & Hatano, R. (2003). Quantification of compaction effects on soil physical properties and crop growth. *Geoderma*, 116, 107-136.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., González, N.R., Gwadz, M., Hao,

L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., & Bryant, S.H. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucl. Acids Res.*, 35, D237-240.

Meadow, M.P.(1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assesment. In P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey & S. Higgs (Eds.), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice* (pag. 193 – 220). Wiley.

Oberemok, V.V., Laikova, K. V., Gninenko, Y.I., Zaitsev, A.S., Nyadar, P.M., & Adeyemi, T.A. (2015). A short history of insecticides. *J. Plant Prot. Res.*, 55 (3), 221-226.

Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotech.*, 22(2), 187-193.

Polanczyk, R.A., van Frankenhuyzen, K., & Pauli, G. (2017). The american *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In: L.M. Fiuza, R.A. Polanczyk, & N. Crickmore (eds), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus. Characterization and use in the field of biocontrol*. Springer.

Rangel, O. (2010). *Colombia: diversidad biótica*. Universidad Nacional de Colombia.

Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.*, 18 (5), 189-194.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, 5463-5467.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 (3), 775-806.

Travers, R.S., Martin, P.A., & Reichelderfer, C.F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (6), 1263-1266.

West, A.W., Burges, H.D., White, R.J., & Wyborn, C.H. (1984). Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. *J. Invertebr. Pathol.*, 44 (2), 128-133.

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.

ARTÍCULOS RELACIONADOS

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

http://astrolabio.phppages.com/storage/instance_10229/Bioinsecticidas.pdf