

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS CRY POR SDS-PAGE EN CEPAS NATIVAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Bertha Carreras Solís

Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: mmarquez@inisav.cu

RESUMEN

Se determinó el patrón de proteínas Cry mediante la técnica de SDS-PAGE 10% en 26 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*. El mayor porcentaje de las cepas presentó una primera banda de 130-140 kDa y una segunda de 70 kDa, como las referidas en el estándar internacional HD1. Dos de las cepas mostraron un patrón de proteínas Cry como el del estándar HD137. Las cepas LBT-9 y LBT-56 mostraron una sola banda superior a la de 130-140 kDa. La LBT-19 presentó el patrón reportado para cepas activas contra coleópteros, es decir, una banda de 75 kDa.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry, patrón Cry

ABSTRACT

Cry protein pattern by SDS-PAGE 10% was determined in 26 native strains of *Bacillus thuringiensis*. Strains containing 130-140 kDa and 70 kDa proteins, like the international standard HD1, were the most abundant. Two *B. thuringiensis* strains with a Cry protein pattern like HD137 were also found. Strains LBT-9 and LBT-56 showed a single superior band to that of 130-140 kDa. The strain LBT-19 presented the pattern reported for active strains against coleopterons, that is to say, a band of 75 kDa.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Cry protein, Cry pattern

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis Berliner es un microorganismo entomopatógeno que se caracteriza por producir diversas toxinas, entre ellas las δ -endotoxinas, consideradas como las más importantes por sus propiedades biológicas [Rowe y Margaritas, 1987].

El interés principal en los estudios de las cepas de *B. thuringiensis* es la producción de estas toxinas, también llamadas proteínas Cry, que tienen, en lo individual, un espectro de actividad insecticida definido, usualmente restringida a pocas especies dentro de un orden particular de insectos. Hasta la fecha han sido identificadas toxinas para especies de insectos lepidópteros (mariposas y polillas), dípteros (moscas y mosquitos), coleópteros (escarabajos) e himenópteros (avispa). Una pequeña minoría de toxinas cristal muestra actividad contra especies no insectiles como los nemátodos. Pocas toxinas tienen un espectro de actividad hacia dos o tres órdenes de insectos. La más notable es la Cry1Ba, la cual es activa contra larvas de polillas, moscas y escarabajos [Warren *et al.*, 1996]. La combinación de toxinas dentro de una misma cepa, por tanto, define su espectro de actividad.

Las proteínas que componen el cristal se analizan mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE),

de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli (1970) y Schagger y von Jagow (1987).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el patrón de proteínas Cry mediante SDS-PAGE, como primer paso para la determinación de los genes involucrados en la patogenicidad de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico consistió en 26 aislados de *B. thuringiensis* provenientes de diferentes hábitats y regiones del país conservados en discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro (Anexo).

Para la reproducción de los aislados se utilizaron frascos erlenmeyers de 500 mL con 50 mL de medio LB (Luria Bertani), de acuerdo con la técnica de Sambrook *et al.* (1989), a los que se les añadió un disco de papel de filtro. Los cultivos fueron agitados en una zaranda orbital hasta esporulación total. La presencia del cristal (proteína Cry) se determinó cualitativamente por observación al microscopio óptico 100X con objetivo de inmersión, mediante tinción simple con violeta cristal 0,5%.

Para la determinación de proteínas Cry se tomó un volumen de 1,5 mL de un cultivo completamente cristalífero

y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min en centrífuga Eppendorf 5415C. El pellet fue lavado dos veces con 1 mL de NaCl 1 M y tres veces con 1 mL de agua destilada esterilizada, y finalmente resuspendido en 100 µL de agua destilada y 100 µL de buffer de lisis 2X. La muestra fue calentada durante 6 min a 100°C, según lo establecido por Bravo *et al.* (1998). Se tomaron 15 µL de la muestra para realizar la SDS-PAGE 10%. La tinción de las bandas de proteínas obtenidas se realizó con azul de Coomassie 0,1% R-250 [Brussock y Currier, 1990].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la mayoría de las cepas (84,6%) se observaron dos bandas bien definidas, una de 130-140 kDa y otra de 70 kDa, como las referidas en el estándar Internacional de *B. thuringiensis* HD1. Este estándar es un ejemplo de las cepas de *B. thuringiensis* productoras de inclusiones que contienen mezclas de d-endotoxinas: 1 Cry1 (130-140 kDa) y 2 Cry2 (70 kDa) en el mismo cristal [Glare y O'Callaghan, 2001].

Se presentaron otros patrones Cry en las cepas analizadas, de las cuales dos mostraron un patrón como el del estándar HD137 (una sola banda de 130-140 kDa). Las cepas LBT-9 y LBT-56, sin embargo, mostraron un pa-

trón diferente: una sola banda superior a la de 130-140 kDa. La LBT-19 presentó el patrón reportado para cepas activas contra coleópteros, es decir, una banda de 75 kDa.

La banda de 130-140 kDa corresponde generalmente a las toxinas Cry1, y es la más frecuentemente encontrada en las cepas de *B. thuringiensis* [Yamamoto y Powell, 1993]. Aunque puede generalizarse que todas ellas son activas solo contra lepidópteros, existen excepciones, como Cry1Ab y Cry1Ac, tóxicas tanto para lepidópteros como para dípteros [Smith y Ellar, 1994]. El caso mas extraño es la toxina Cry1Ba, para la cual se ha reportado actividad contra lepidópteros, coleópteros [Bradley, 1995] y áfidos [Warren *et al.*, 1996].

Según Ziniu y Biwang (1998), en la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas en relación con la toxicidad contra nemátodos están involucradas proteínas de 130-140 kDa. Un ejemplo lo constituyen los componentes proteicos de las toxinas Cry5 y Cry12, que son estimados tóxicos tanto para las formas larvarias como para las adultas de los nemátodos [Payne *et al.*, 1992; Narva *et al.*, 1991].

La variabilidad patogénica que muestran las proteínas en el rango de 130-140 kDa es muy grande, visto claramente en los siguientes ejemplos [Galán *et al.*, 1996]:

Proteínas Cry (peso molecular, kDa)	Insecto u organismo plaga
Cry 4 (135 kDa y 128 kDa)	Dípteros
Cry5 (152.3, 141.8 y 140 kDa)	Nemátodos, ácaros
Cry7 (130 kDa)	Coleópteros
Cry8 (130 y 134 kDa)	Coleópteros y ácaros
Cry9 (126 y 130 kDa)	Lepidópteros
Cry12 (142 kDa)	Nemátodos y ácaros

Estas clases de toxinas pudieran estar incluidas dentro de la banda de 130-140 kDa de las cepas analizadas, por lo que estos resultados deben ser corroborados mediante la determi-

nación del gen *cry* que codifica estas proteínas a través de la técnica de PCR. En la *Figura 1* se observa el patrón de proteínas Cry característico en algunas de las cepas analizadas

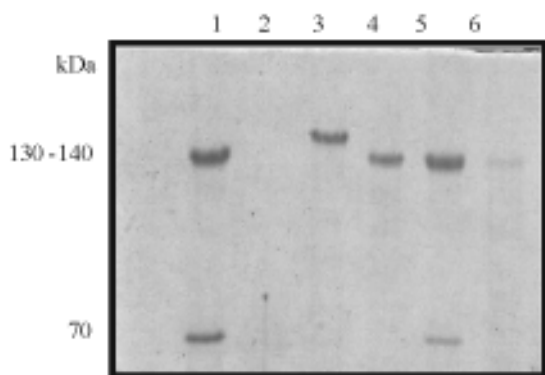


Figura 1a. 1) HD1; 3) LBT-9; 4) LBT-23; 5) LBT-26; 6) LBT-30

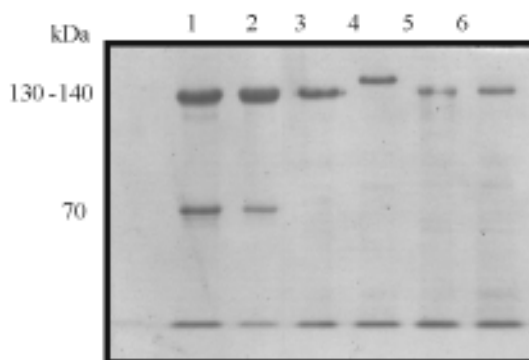


Figura 1b. 1) HD1; 2) LBT-47; 3) LBT-55; 4) LBT-56; 5) LBT-5830; 6) LBT-30

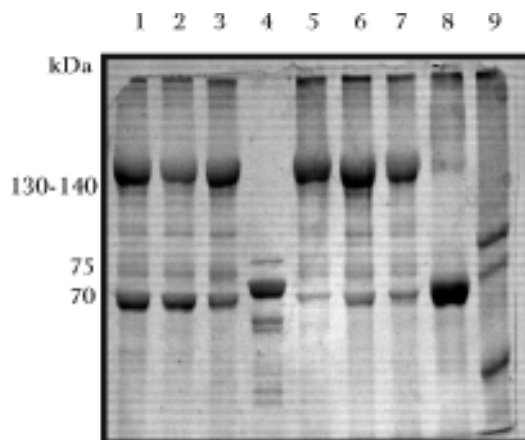


Figura 1c. 1) HD-1; 2) LBT-3; 4) LBT-19; 5) LBT-83; 6) LBT-86; 7) LBT-94; 8) BSA-66kDa; 9) PM

Figura 1. Patrón de proteínas Cry característico en las cepas de *B. thuringiensis* evaluadas.

CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de las cepas de *B. thuringiensis* ensayadas presentó una primera banda de 130-140 kDa y una segunda de 70 kDa, como las referidas en el estándar internacional HD1.
- Dos de las cepas mostraron un patrón de proteínas Cry como el del estándar HD137.
- Las cepas LBT-9 y LBT-56 mostraron una sola banda superior a la de 130-140 kDa.
- La cepa LBT-19 presentó el patrón de proteínas Cry reportado para cepas activas contra coleópteros, es decir, una banda de 75 kDa.

REFERENCIAS

- Bradley, D.: «The Insecticidal CryIB Crystal Protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* Has Dual Specificity to Coleopteran and Lepidopteran Larvae», *J. Invertebr. Pathol.* 65:162-173, 1995.
- Bravo, A.; S. Sarabia; L. Lopez; H. Ontiveros; C. Abarca; A. Ortiz; M. Ortiz; L. Lina; F. J. Villalobos; G. Peña; M.E. Núñez-Valdéz; M. Soberón; R. Quintero: «Characterization of Cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strains Collection», *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4965-4972, 1998.
- Brussock, S. M.; T. C. Currier: «Use of Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis to Quantify *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxins. Analytical Chemistry of *Bacillus thuringiensis*». Chapter 9, *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, ACS Symposium series 432, 1990, pp. 78-87.
- Galán, L. J.; J. A. García; M. E. Santos; I. Quintero: «Mecanismo molecular de acción de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*», *Avances en la biotecnología de B. thuringiensis*, Univ. Autónoma de Nuevo León, México, 1996, pp. 129-155.
- Glare, T. R.; M. O'Callaghan: *Characterization, in Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, Inglaterra, 2001, pp. 6-10.
- Laemmli, N. K.: «Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4», *Nature* 227:680, 1970, pp. 45-46.
- Narva, K. E.; J. M. Payne; G. E. Schwab; L. A. Hickie; T. Galasan; A. J. Sick: «Novel *Bacillus thuringiensis* Microbes Active Against Nematodes and Genes Encoding Novel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates», GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94), 1991.
- Payne, J. M.; R. J. C. Cannon; A. L. Bagley: *Novel Bacillus thuringiensis Isolates for Controlling Acarides*, PCT International Patent Application no. WO 92/19106, 1992.
- Rowe, G. E.; A. Margaritis: «Bioprocess Developments in the Production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*», *J. Ferm Bioeng* (6):87-120, 1987.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold. Spring Harbor, New York, 1989, pp. 88.
- Schagger, H.; G. von Jagow: «Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100k Da», *Analytical Biochemistry* 166:368-379, 1987.
- Smith, G. P.; D. J. Ellar: «Mutagenesis of Two Surface-Exposed Loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC-endotoxin Affects Insecticidal Specificity», *Biochem. J.* 302:611-616, 1994.
- Warren, G. M.; M. G. Koziel; M. A. Mullins; G. J. Nye; B. Carr; N. M. Desai; K. Kostichka; N. B. Duck; J. J. Estruch: *Novel Pesticidal Proteins and Strains*, Patent WO 96/10083. World Intellectual Property Organization, 1996.
- Yamamoto, T.; G. K. Powell: «*Bacillus thuringiensis* Crystal Protein: Recent Advances in Understanding Its Insecticidal Activity», *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc. E.U., 1993, pp. 3-42.
- Ziniy, Y. and H. Biwang: «Biocontrol of Plant-Parasitic Nematodes by Bacteria», *Journal of Fujian Agricultural University* 27(3):316-321, 1998.

Anexo. Procedencia de las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas

Cepa	Procedencia
LBT-3	Lepidóptero (Isla de la Juventud)
LBT-7	<i>Galleria melonella</i> (Matanzas)
LBT-9	<i>Galleria melonella</i> (Matanzas)
LBT-13	<i>Tetranychus tumidus</i> (Banks)
LBT-19	La Habana. <i>P. litus</i> (coleóptero).
LBT-21	La Habana. Lepidóptero
LBT-23	La Habana. <i>Spodoptera</i> spp.
LBT-24	La Habana. <i>Spodoptera</i> spp.
LBT-25	La Habana <i>P. litus</i> . (coleóptero).
LBT-26	Pinar de Río. <i>Spodoptera</i> spp.
LBT-30	Güira de Melena, La Habana <i>Plutella xylostella</i> (L.)
LBT-40	<i>Spodoptera frugiperda</i> . Cría INISAV
LBT-47	La Habana. <i>Spodoptera</i> spp.
LBT-48	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-49	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-50	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-51	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-52	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-53	Sancti Spíritus. Polvo de arroz granero
LBT-55	La Habana. Primavera de la yuca
LBT-56	INISAV. <i>Galleria. melonella</i>
LBT-61	Ciudad de La Habana. Instituto del Arroz. Semilla variedad Perla
LBT-80	Granma. Buey Arriba. Jardín de Rosas, Centro de Referencia Nacional
LBT-83	Granma. Buey Arriba. Jardín de Rosas, Centro de Referencia Nacional
LBT-86	Granma. Buey Arriba. Jardín de Rosas, Centro de Referencia Nacional.
LBT-94	Ciudad de La Habana, Vedado. Hoja de café de patio casa de Acenet Sosa