

**Universidad Pública de Navarra**

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

**NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA**

**INCIDENCIA NATURAL DE GENES *vip3* EN  
AISLADOS DE *Bacillus thuringiensis*  
PROCEDENTES DE HÁBITATS TERRESTRES Y  
ACUÁTICOS**

Presentado por

Maite Flamarique Flamarique

*aurkeztua*

INGENIERO AGRÓNOMO  
*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN*

Abril, 2011

# UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

## ESCUELA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

### TRABAJO FIN DE CARRERA

Trabajo Fin de Carrera presentado por Maite Flamarique Flamarique al objeto de obtener el título de Ingeniera Agrónoma. Siendo su tutor Leopoldo Palma y su director Primitivo Caballero.

VºBº Director del trabajo:  
Primitivo Caballero

VºBº Tutor del trabajo:  
Leopoldo Palma

Autora:  
Maite Flamarique

## AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo ha sido el final a un duro trabajo que se inicio hace ya unos años cuando decidí estudiar Ingeniería agronómica.

En primer lugar deseo expresar mis agradecimientos a Primitivo Caballero por darme la oportunidad de descubrir el mundo de la investigación y a mi Tutor Leopoldo Palma por su paciencia y dedicación mostradas y por su ayuda en los trabajos de laboratorio.

A mi familia, por apoyarme durante todos estos años de carrera y confiar siempre en mí. Y sobre todo a David por estar siempre a mi lado tanto en los buenos como en los malos momentos.

# ÍNDICE

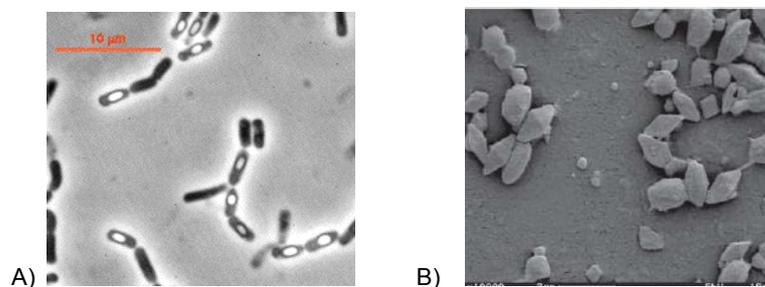
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
2.1 Aislados bacterianos y condiciones de crecimiento .....	8
2.2 Aislamiento de ADN cromosómico y ADN plasmídico .....	8
2.3 Screening de nuevos genes tipo- <i>vip3</i> en la colección Bt .....	9
2.4 Identificación y diferenciación de genes candidatos tipo <i>vip3</i> .....	10
2.5 Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....	11
2.6 Clonaje de los fragmentos de PCR.....	12
2.7 Análisis bioinformático de las secuencias de ADN.....	14
2.8 Análisis estadístico .....	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
3.1 Detección de genes <i>vip3</i> mediante PCR .....	15
3.2 Análisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	21
3.3 Clonaje de los fragmentos de PCR y análisis de las secuencias.....	25
4. CONCLUSIONES .....	30
5. BIBLIOGRAFÍA .....	31

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* (Bt), es el insecticida biológico más aplicado en todo el mundo. Su aislamiento y caracterización, es la base de muchos programas de control de plagas en nuevos trabajos. Bt, es una bacteria cosmopolita que puede ser aislada fácilmente a partir de muestras de suelo y otros muchos substratos. Su característica más importante, es la capacidad de producir proteínas con toxicidad específica contra insectos. En estado vegetativo, presenta unas proteínas de carácter insecticida (Vip), las cuales, son una posible alternativa para las  $\delta$ -endotoxinas que actualmente se utilizan en el control de plagas y en las cuales están comenzando a surgir resistencias. La caracterización e identificación de nuevas proteínas Vip3 de Bt es interesante ya que por un lado, puede contribuir a ampliar el espectro huésped de esta bacteria y por otro, disponer de alternativas en los casos de resistencia. Esta es la razón por la que en este trabajo, se amplía el horizonte de uso de esta bacteria a través de la búsqueda de nuevas cepas y proteínas Vip3. Para ello, se analizó una colección de 192 cepas a partir de muestras de hábitats terrestres y acuáticos. Se emplearon varios métodos para su análisis, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a el conocimiento que se tiene sobre las regiones conservada y variable de los genes *vip3* ya estudiados y el análisis PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de los fragmentos de restricción de productos de PCR amplificados con cebadores degenerados. En el estudio, se encontró que el 73% de las cepas analizadas de Bt contenían un gen *vip3*, siendo la frecuencia de este, mayor en la colección de aislados de hábitat acuático. La evaluación de los aislados dio lugar a la clonación de 8 de ellos, en los cuales se encontró un posible aislado candidato a contener un gen *vip3* nuevo.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Bacillus thuringiensis* (Bt), es un bacilo Gram positivo, de flagelación periférica, que mide entre 1,0-1,2  $\mu\text{m}$  de ancho por 3-5  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 1) y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia. Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganótrofo y con actividad catalasa positiva, perteneciente a la familia Bacillaceae (Stahly *et al.*, 1978).



**Figura 1.** A) Microfotografía al microscopio óptico 1000 X de *B. thuringiensis var kurstaki*. B) Microfotografía al microscopio electrónico de barrido de cristales de aislados de *B. thuringiensis*.

Bt, fue descubierto en 1901 por el científico japonés Shigetane Ishiwata, quién lo aisló a partir de una larva muerta del gusano de seda (*Bombix mori L.*), designándolo *Bacillus soto*. Su denominación como entomopatógeno, se debe a su reaislamiento a partir de larvas muertas de la palomilla de la harina (*Ephestia kühniella*) en 1911, por el científico alemán Berliner, quien cuatro años después le dio su nombre actual. Ciertos indicios, han llevado a pensar que en el antiguo Egipto ya se conoció la actividad insecticida de lo que probablemente fue Bt y que se usó en el control de plagas (Nester *et al.*, 2002).

Es una bacteria cosmopolita, ampliamente distribuida por todo el mundo, asociada al suelo, donde las esporas mantienen su viabilidad durante años

(Martin y Travers, 1989). Sin embargo, ha sido aislada de otros muchos hábitats, como insectos enfermos o muertos (Heimpel y Angus, 1967; Kaelin *et al.*, 1994; Porcar y Caballero, 2000), ambientes acuáticos (Goldberg y Margalit, 1997), hojas de plantas (Smith y Couche, 1991), polvo de productos almacenados (De Luca *et al.*, 1981; Meadows *et al.*, 1992), sedimentos marinos (Maeda *et al.*, 2000), e incluso en muestras de guano, algas y líquenes procedentes de la Antártida (Forsyth y Logan, 2000).

La principal diferencia entre *B. thuringiensis* y otros bacilos estrechamente relacionados, es la formación, durante el proceso de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica (Whitley y Schnepf, 1986) adyacentes a la spora (Figura 1), cada uno con su propia especificidad insecticida. Estas inclusiones, presentan diferentes formas en relación a su composición (bipiramidal, cúbica, esférica o irregular) y pueden estar constituidos por la agregación de proteínas de una o varias clases, denominadas  $\delta$ -endotoxinas, las cuales presentan toxicidad de forma selectiva (Krieg y Langenbruch, 1981), al ser ingeridas por larvas de determinadas especies de insectos, incluyendo importantes plagas de insectos (Macintosh *et al.*, 1990). Estas proteínas, han proporcionado una herramienta única, específica, segura y eficaz para el control de una amplia variedad de especies de insectos.

Existen dos tipos de  $\delta$ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. Ambas proteínas, presentan una homología diferente tanto a nivel de secuencia primaria, como terciaria. Las proteínas Cry, son de gran interés por su elevada toxicidad y relativa especificidad, ya que en general, su espectro de huésped lo constituye un reducido número de especies de insectos. Por el contrario, las proteínas Cyt, muestran una menor toxicidad y mayor inespecificidad para una gran variedad de cultivos celulares, tanto de invertebrados como de vertebrados. Las proteínas Cyt, son interesantes por su efecto sinérgico a las proteínas Cry (Poncet *et al.*, 1995). Estas proteínas, están codificadas por genes denominados *cry* o *cyt*, que se encuentran en los cromosomas y mayoritariamente en los plásmidos que poseen estas bacterias (Sanchis *et al.*, 1988). Existen más de 350 proteínas distintas de *B. thuringiensis* clasificadas en base a sus secuencias de aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998).

El mecanismo de acción de las proteínas Cry, ha sido ampliamente estudiado, para poder realizar un control correcto de las plagas y evitar la aparición de insectos resistentes. Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*, son ingeridos por las larvas, solubilizándose en el ambiente alcalino del intestino medio del insecto y liberando de este modo, proteínas Cry inactivas (protoxinas). El fragmento tóxico de las proteínas cristalinas (toxina activada), es obtenido mediante digestión proteolítica de las protoxinas. Una vez activada la toxina, se une a receptores específicos en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal, donde posteriormente se produce su inserción en la membrana, formando un poro que provoca la lisis celular del intestino larvario como consecuencia de un desequilibrio osmótico (Bravo *et al.*, 2007). De esta forma, se impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva, provocando la muerte del insecto (Knowles y Dow, 1993). Los síntomas que se pueden observar en las larvas de los insectos son, cese de la ingesta, diarrea, parálisis del intestino, vómito, parálisis total y muerte.

La acción de la toxina, es generalmente suficiente para ocasionar la muerte del insecto; sin embargo, su acción puede verse potenciada por esporas contenidas en el intestino que, aprovechando la lisis celular, acceden a la cavidad hemocélica donde proliferan ocasionando una septicemia.

El modo de acción de la proteína Cyt para producir daño no se ha deducido con claridad, indicando la existencia de una variedad de mecanismos dependiendo del tipo de proteína Cyt y del insecto.

El conocimiento de organismos capaces de generar enfermedades en ciertos insectos, originó el descubrimiento de las bacterias para el control de ciertas plagas, siendo *B. thuringiensis* uno de los más utilizados en todo el mundo como biopesticida, debido a sus buenas características insecticidas (alta especificidad para matar sólo aquellos organismos contra los que va dirigido) y a que no resulta perjudicial, al no ser tóxicos para los insectos beneficios, plantas, animales, ni para el ser humano, en contraposición a los insecticidas químicos. Además, es compatible con otras estrategias de lucha contra plagas, como el control biológico basado en la utilización de enemigos naturales; o con estrategias de mejora en la producción mediante el uso de insectos polinizadores. Permitiendo de este modo, una agricultura sostenible con el

medio ambiente. Esto hace, que estos productos sean ecológicamente muy deseados, siendo una clara alternativa para los agentes químicos.

No obstante, un uso excesivo de estos productos, unido al potencial evolutivo de los insectos, puede generar el desarrollo de alguna resistencia contra las proteínas de *B. thuringiensis* (Ferré y van Rie, 2002).

Este hecho, unido a que por el momento el espectro de acción del *B. thuringiensis* es muy reducido, ha llevado al desarrollo de líneas de actuación en busca de nuevos aislados de *B. thuringiensis* con mayor potencia insecticida o un espectro huésped más amplio al actualmente conocido. Estas, se han centrado principalmente, en la identificación de nuevas proteínas insecticidas, que se expresen antes y durante la esporulación y de proteínas insecticidas alternativas que no compartan el modo de acción de las endotoxinas ya conocidas (Ruiz de Escudero *et al.*, 2007)

En los últimos años, se han identificado nuevas proteínas de *B. thuringiensis* secretadas de la célula al medio exterior durante la fase de crecimiento vegetativo, con actividad insecticida contra una amplia variedad de lepidópteros (Estruch *et al.*, 1996; Doss *et al.*, 2002; Mesrati *et al.*, 2005) así como de coleópteros (Estruch *et al.*, 1996). Estas proteínas fueron denominadas proteínas Vip (vegetative insecticidal proteins) (Estruch *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1997). Las proteínas Vip son proteínas insecticidas no relacionadas con las proteínas Cry, no muestran similitud en la secuencia de ADN y aminoácidos con respecto a las  $\delta$ -endotoxinas ya conocidas y no forman inclusiones cristalinas, mostrando un gran espectro insecticida.

Desde el descubrimiento de la primera proteína Vip (Estruch *et al.*, 1996), se han identificado dos grandes grupos dentro de las mismas, siendo un tercero objeto de recientes estudios. El primero está formado por las proteínas binarias Vip1 y Vip2 con especificidad contra coleópteros (Warren *et al.*, 1997). Vip1 y Vip 2 son proteínas de 100 y 52 kDa respectivamente, que forman un sistema binario tóxico. Basándonos en la homología con otras proteínas binarias, la proteína Vip1 activada proteolíticamente, se uniría a receptores específicos en las células epiteliales del intestino medio del insecto formando un canal. Mientras la proteína Vip2 (toxina) penetraría a través del canal, modificando la

actina de las células epiteliales del intestino e inhibiendo su polimerización (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009).

El segundo grupo está formado por las llamadas proteínas Vip3 (Estruch *et al.*, 1996, Fang *et al.*, 2007). Estas proteínas no comparten homología con otras proteínas conocidas y muestran en general un espectro insecticida contra lepidópteros (Estruch *et al.*, 1996). Esta toxina de aproximadamente 88 kDa, se procesa en el intestino medio del insecto a una forma activa, siendo tóxica tras su unión con receptores específicos en las células epiteliales del intestino (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009).

El conocimiento en la diversidad de proteínas Vip3 es muy limitado en comparación con los más de 350 genes *cry* identificados. Hasta la fecha se han identificado 93 proteínas Vip3 y ha surgido un nuevo grupo, denominado Vip4 por el Comité Internacional de Nomenclatura de Toxinas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 2011).

Algunos de los problemas más importantes que actualmente hay planteados en Protección de Cultivos, son consecuencia del uso indiscriminado y casi exclusivo que se ha realizado de los insecticidas químicos de síntesis. Estos insecticidas, presentan un amplio espectro de huésped y una acción rápida, lo que los hace ser muy versátiles. Sin embargo, su uso continuado ha llevado a la acumulación de gran cantidad de residuos tóxicos en el medio ambiente y a causar efectos negativos sobre las cadenas tróficas. Además, se ha producido una disminución de su eficacia, debido a la aparición de resistencias por su alta presión de selección sobre los insectos plaga. El problema de resistencias en insectos es un problema muy grave, pudiendo dejar obsoleto un insecticida en pocos años. Este problema no afecta sólo a los insecticidas químicos, sino que también afecta a los insecticidas microbianos. La aplicación de proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* se ha realizado durante años; sin embargo, el hecho de que su persistencia en campo sea muy baja, hace que se necesite un número elevado de aplicaciones para conseguir una efectividad aceptable. Con la mejora de las técnicas biotecnológicas, se ha conseguido introducir y expresar algunos genes en plantas, que de esta manera adquieren la capacidad insecticida de *B. thuringiensis*. Como ejemplo de ello, podemos ver la expresión de proteínas Cry1Ab en plantas de tabaco, que resultaron ser

tóxicas para larvas de *Manduca sexta* de primer estadio en condiciones de laboratorio (Vaeck *et al.*, 1987). En la última década, los genes de estas proteínas insecticidas, se han utilizado para la construcción de plantas transgénicas con capacidad insecticida (denominadas “plantas Bt”), es una nueva tecnología que amplía considerablemente las posibilidades de utilización de este recurso natural.

Hoy en día, se conocen muchos aislados de *B. thuringiensis* con actividad insecticida. A pesar de ello, solo unos pocos son empleados en la fabricación y comercialización de formulados bioinsecticidas. Debido a esto, y a que el potencial de las toxinas Vip3 para el control de plagas no ha sido extensamente explotado, estas proteínas se presentan como una nueva alternativa al uso de insecticidas químicos de síntesis y como una nueva herramienta para el control integrado de plagas y manejo de resistencias emergentes a las proteínas Cry. Por lo tanto, se planteó realizar este trabajo, motivado por la hipótesis de que en la colección de Bt disponible en nuestro laboratorio existiría la presencia de genes tipo *vip3* no descritos hasta la fecha y que habría correlación entre el tipo de gen y el hábitat del que se ha obtenido el aislado (terrestre o acuático). Para demostrar dicha hipótesis, se llevó a cabo el aislamiento, identificación y caracterización de genes *vip3* mediante diferentes estrategias basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo a el conocimiento que se tiene sobre las regiones conservada y variable de los genes *vip3* ya estudiados (Estruch *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2007) y el análisis PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de los fragmentos de restricción de productos de PCR amplificados con cebadores degenerados (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009).

De esta manera, se pretende aumentar la disponibilidad de genes *vip3*, aumentando el espectro de actividad de la familia Vip3 y llevando a cabo un análisis de la posible relación que exista entre el tipo de gen y el hábitat de origen de los aislados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Aislados bacterianos y condiciones de crecimiento

Los 192 aislados de *B. thuringiensis* (Bt) analizados en este estudio, pertenecen a una colección de la Universidad Pública de Navarra, la cual contiene cerca de 3.000 aislados obtenidos de un programa nacional de búsqueda, realizado mayoritariamente en ecosistemas terrestres de España (Iriarte *et al.*, 1998) y de tomas de muestras de ambientes acuáticos (Iriarte *et al.*, 2000).

Todos los aislados, se mantienen en forma de suspensión de esporas y cristales, en glicerol al 16% a -20 °C para su conservación.

Las transformaciones genéticas de rutina se llevaron a cabo en células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Los aislados de *B. thuringiensis* y *E. coli*, fueron cultivados a 28 y 37 °C respectivamente, en medio LB (Luria-Bertani) (1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, y 1% de ClNa, pH 7.0). Cuando fue necesario, se añadió ampicilina (100  $\mu$ g/ml) para el aislamiento de las cepas de *E. coli* transformadas y resistentes a la ampicilina.

### 2.2 Aislamiento de ADN cromosómico y ADN plasmídico

El aislamiento del ADN total de Bt, se llevó a cabo mediante suspensión de una colonia de cada aislado (crecidas en una placa de LB sembrada el día anterior), en 100  $\mu$ l de agua Mili-Q estéril. Esta suspensión, fue hervida durante 5 minutos para provocar la lisis bacteriana. El lisado, fue centrifugado a 13.000 rpm, durante 5 minutos y a 4 °C para eliminar impurezas (restos de membrana y pared celular) y prevenir la degradación del ADN. El proceso se concluyó, tras pasando 70  $\mu$ l del sobrenadante, el cual contiene el ADN total, a un tubo estéril de centrifuga de 1,5 ml y almacenando el producto a -20 °C hasta su posterior utilización. Cinco microlitros de este ADN, fueron utilizados como ADN molde en cada una de las reacciones de PCR.

Las extracciones de DNA plasmídico de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas, fueron realizadas mediante la utilización del kit de extracción NucleoSpin Plasmid® Kit (Macherey-Nagel, Germany). Tras su extracción, el DNA plasmídico se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

### 2.3 Screening de nuevos genes tipo-*vip3* en la colección Bt

El análisis y búsqueda de genes tipo-*vip3*, fueron realizados siguiendo el método propuesto por Fang y colaboradores (2007). Se comenzó, sintetizando dos pares de cebadores de PCR (V1F-V1R y V2F-V2R) basándonos en la secuencia del gen *vip3Aa1* (Estruch *et al.*, 1996) (Número de acceso GenBank L48811), los cuales amplifican dos productos de PCR entre las posiciones 54 a 498 (F1, con 444 pb) y desde la posición 2006 a la 2370 (F2, con 364 pb), respectivamente (Tabla 1). Análisis previos han demostrado que el fragmento F1 se mantiene más conservado que el F2 entre los genes *vip3*, por lo que, la amplificación exitosa de ambos fragmentos sugiere la presencia de un gen muy similar o el mismo que el *vip3Aa1*, mientras que, un aislado que sólo es capaz de producir la amplificación de un fragmento, indicaría la presencia de un posible nuevo gen tipo *vip3* (Fang *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Secuencia de los cebadores usados en este estudio para la identificación de genes *vip3*

Cebador	Secuencia*	Tamaño (pb)**
V1F	5' TTATTTTAATGGCATTATGGATTTGCC 3'	444
V1R	5' GCAGGTGTAATTTTCAGTAAGTGTAGAG 3'	
V2F	5' CTTCTGAAAAGTTATTAAGTCCAGAAT 3'	364
V2R	5' TTA CTTAATAGAGACATCGTAAAAA 3'	
Vip3-sc.fw	5' TGCCACTGGTATCAARGA 3'	~1,6 kb
Vip3-sc.rev	5' TCCTCCTGTATGATCTACATATGCATTYTRTRTT 3'	

\*Código universal bases degeneradas: R=A, G; Y=C, T

\*\*Tamaño del producto de PCR, se utilizó como referencia el gen *vip3Aa1* (L48811)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo añadiendo 5  $\mu$ l del ADN total extraído de cada aislado a 20  $\mu$ l de mix de PCR, conteniendo esta, 0,4  $\mu$ l de dNTPs (nucleótidos trifosfato: adenina, guanina, citosina, timina, 100  $\mu$ M), 1  $\mu$ l de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (50 mM), 1  $\mu$ l de cada uno de los cebadores (12,5  $\mu$ M), 2,5  $\mu$ l del buffer 10X, 0,2  $\mu$ l (5 U/ $\mu$ l) de *Taq* polimerasa (BioTaq, Boline, UK) y un volumen final hasta completar los 25  $\mu$ l con agua Mili-Q estéril (agua ultrapura). La reacción de PCR consistió en someter todo ello a oscilaciones cíclicas en un Termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany), para ello, se diseñó un programa con las siguientes características, el proceso se inició con una fase de desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min seguida de 34 ciclos compuestos por una fase de desnaturalización cíclica de 1 min a 95 °C, un anillamiento de 1 min a 52 °C y una extensión de 2 min a 72 °C. El proceso terminó con una elongación final de 10 min a 72 °C. En cada PCR, se colocó un control negativo (con agua Milli-Q en lugar de ADN) y un control positivo (ADN molde del gen *vip3Aa1*).

Los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en buffer TAE (TRIS + Acido Acético Glacial + EDTA Sal Disódica 2-Hidrato + agua mili Q), al cual se le añadieron 4  $\mu$ l de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) cada 100 ml de agarosa. En cada gel, se cargaron 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular de 1 Kb HyperLadder I (Boline) y los productos de PCR mezclados con 5  $\mu$ l de buffer de carga 5X (Boline). El gel de agarosa, se corrió a 80 V durante 45 minutos. Los geles se visualizaron y fotografiaron mediante un transluminador de luz UV y su unidad de digitalización (G: box, Syngene, UK).

Utilizando esta metodología, se analizaron 192 aislados, de los cuales 96 eran procedentes de ambientes terrestres y 96 de ambientes acuáticos. Los aislados que sólo amplificaban un fragmento (típicamente el fragmento conservado), fueron seleccionados para su posterior análisis mediante la técnica PCR-RFLP.

#### **2.4 Identificación y diferenciación de genes candidatos tipo *vip3***

La identificación y diferenciación de genes candidatos tipo-*vip3* fue realizada mediante el método descrito por Hernández-Rodríguez *et al.* (2009). Con este objetivo, se realizó una segunda reacción de PCR sobre los aislados

seleccionados en el paso anterior. En esta segunda PCR, se utilizó un par de cebadores degenerados vip3-sc (Tabla 1), los cuales permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 1,6 kb de longitud. Estas reacciones de PCR, fueron llevadas a cabo como se mencionó anteriormente y con una *Taq* polimerasa de alta fidelidad, la PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara, Japón), la cual amplifica nuestro fragmento de interés con una menor tasa de error, previniendo la alteración de la secuencia de ADN. Sin embargo, estos productos de PCR no poseerán en los extremos las colas de poli-A que dejan por error las *Taq* polimerasas normales, por lo que deberán agregarse antes de la ligación con el vector pGEM-T easy. Se seleccionaron sólo aquellos aislados que mostraron amplificación con la nueva pareja de oligonucleótidos.

Los productos de PCR obtenidos, fueron aislados desde el gel de agarosa con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Germany) y digeridos por separado con dos enzimas de restricción de corte frecuente, *AluI* y *Sau3AI* (Takara). Los productos de PCR que no mostraron amplificación con los cebadores degenerados, se identificaron para posteriores estudios mediante otro tipo de análisis.

La mezcla de digestión, estuvo compuesta por 5 µl del producto de PCR purificado (~1,6 kb de tamaño), 5 U de enzima de restricción (*AluI* ó *Sau3AI*) y 2 µl del buffer apropiado (10X) en un volumen final de 20 µl. Las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 4 h y analizadas en gel de agarosa al 0,8%. Los perfiles PCR-RFLP de los genes candidatos, fueron comparados con el perfil del gen control *vip3Aa1* (Número de acceso GenBank L48811) y sólo aquellos que mostraron un perfil RFLP diferente, fueron catalogados como aislados candidatos a contener genes *vip3* nuevos.

## 2.5 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

La preparación de las células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α se realizó mediante la metodología descrita por Seidman y colaboradores (Current protocols in molecular biology, 1997). Se inoculó una colonia de *E. coli* DH5α en 50 ml de LB, dejándolo crecer a 37 °C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. Posteriormente, se inoculó 4 ml de este cultivo en 400 ml de medio LB previamente autoclavado en un matraz de 2 litros, incubando el

inóculo en agitación (270 rpm) a 37 °C, hasta alcanzar una absorbancia 0,375 (590 nm). Una vez alcanzada la absorbancia, se hicieron alícuotas de 50 ml en tubos de prolipropileno previamente enfriados, dejándolos seguidamente en hielo durante 5-10 minutos. El cultivo se centrifugó 7 minutos a 3000 rpm a 4 °C para recoger las células sedimentadas. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de solución  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (60 mM de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 15% de glicerol, 10 mM de PIPES, esterilizado con filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) previamente enfriado en hielo, tras esto, se realizó una segunda centrifugación durante 5 minutos a 2.500 rpm a 4 °C, descartando nuevamente el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 10 ml de solución fría de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , las células resuspendidas, se dejaron reposar en hielo durante 30 minutos. Por último, se prepararon alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en tubos de centrifuga de 1,5 ml y se almacenaron hasta su posterior utilización a -80 °C.

## 2.6 Clonaje de los fragmentos de PCR

Los fragmentos de ~1,6 kb, candidatos a contener genes *vip3* nuevos, fueron tratados para agregarles las colas de poli-A. Para ello, se incubó una reacción durante 30 minutos a 70 °C en el termociclador. La mezcla de reacción incluía: 7  $\mu\text{l}$  de producto de PCR purificado, 5 U de *Taq* polimerasa (Bioline), 1  $\mu\text{l}$  de dATP (25  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  de Buffer 10X y 1  $\mu\text{l}$  de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (50 mM) en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ . Posteriormente, los productos de la incubación, fueron clonados en el vector pGEM-T easy (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la reacción de ligación, se emplearon 5  $\mu\text{l}$  de buffer de ligación 2X, 1  $\mu\text{l}$  del vector pGEM-T Easy, 1  $\mu\text{l}$  de T4 DNA ligasa y la cantidad de producto incubado, con una concentración tal que cumpla la relación molar inserto:vector 3:1, se incubó a 4 °C durante toda la noche. Estas construcciones fueron utilizadas para transformaciones en *E. coli* DH5 $\alpha$ , quimiocompetentes.

Las construcciones, se transformaron en las alícuotas preparadas previamente de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos. Tras ello, se colocaron en un baño de agua a 42 °C durante 1,5 minutos y seguidamente se pusieron nuevamente en hielo durante 2 minutos. El choque térmico a 42 °C, permitió que la pared celular del *E. coli* se despolarizase y el DNA plasmídico

penetrarse dentro, al ponerlas en hielo, los poros se cerraron, obteniendo el *E. coli* con el DNA dentro.

En condiciones de esterilidad, se añadieron a las muestras 900  $\mu$ l de LB líquido sin antibiótico y se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 hora (esto permitió la expresar la resistencia a la ampicilina). Las *E. coli* transformadas, se concentraron por centrifugación durante 1 minuto a 9.000 rpm. En condiciones de esterilidad, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200  $\mu$ l de LB. Posteriormente, se sembraron 100  $\mu$ l de esta suspensión bacteriana en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) previamente tratadas en superficie con 50  $\mu$ l de X-Gal (20 mg/ml). Las placas sembradas se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

Si al día siguiente, las colonias presentan el gen Lac-Z entero del vector pGEM-T, degradará el X-Gal y se producirá un color azul (no tiene inserto); si por el contrario, se incorpora el inserto, el gen Lac-Z estará interrumpido y no podrá degradar el X- Gal, por lo que las colonias serán de color blanco.

En condiciones de esterilidad, las colonias seleccionadas (blancas) de cada placa, se sembraron en 4ml de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se dejaron crecer durante toda la noche con agitación moderada (200 rpm) a 37 °C

El ADN plasmídico insertado se extrajo con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Estados Unidos) y los candidatos se digirieron con la enzima *EcoRI* (Takara) a 37 °C durante toda la noche con el fin de seleccionar para su secuenciación sólo aquellos clones que contenían inserto. La mix de digestión consistió en un volumen final de 20  $\mu$ l compuesto por, 2  $\mu$ l de buffer *EcoRI* 10 x, 14  $\mu$ l de agua Mili-Q estéril, 1  $\mu$ l de enzima y 3  $\mu$ l del ADN plasmídico. Más tarde, los clones seleccionados fueron enviados a secuenciar mediante un servicio externo (Sistemas Genómicos S.L, Valencia, España). El tipo de secuenciación realizado fue en modalidad de alta calidad (High Quality).

## 2.7 Análisis bioinformático de las secuencias de ADN

Las secuencias de ADN obtenidas, fueron analizadas y comparadas mediante diversas herramientas bioinformáticas tales como BLAST (Altschul *et al.*, 1997) y Cap 3 (Huang y Madan, 1999).

Las digestiones virtuales, se realizaron sobre las secuencias de ~1,6 kb de los aislados candidatos mediante la herramienta de digestión con enzimas de restricción del software geneious (Drummond *et al.*, 2010).

## 2.8 Análisis estadístico

Con el objeto de determinar si existía relación entre la presencia o ausencia de genes *vip3* y el hábitat del que se han obtenido los distintos aislados de Bt, se realizó un análisis estadístico mediante un contraste de hipótesis (Test chi-cuadrado de Pearson de Independencia). Este análisis se llevó a cabo con el software S-PLUS (Ugarte y Fernández, 2001)

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Detección de genes *vip3* mediante PCR

En estudios llevados a cabo anteriormente, se han realizado búsquedas de genes *vip* mediante PCR (Doss *et al.*, 2002; Espinasse *et al.*, 2003; Arrieta *et al.* 2004; Bhalla *et al.*, 2005; Mesrati *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Seifinejad *et al.*, 2008; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009).

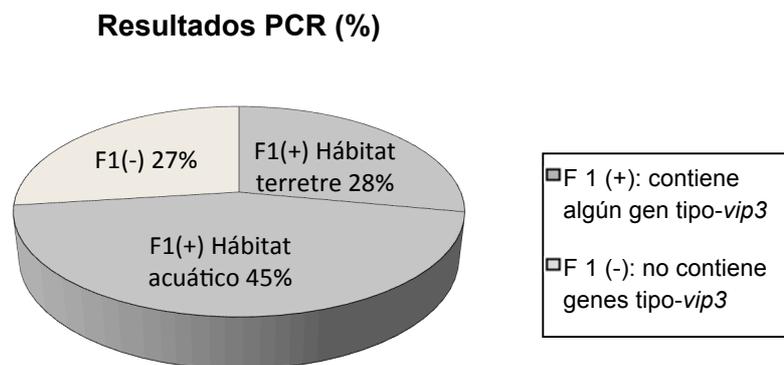
La identificación y el aislamiento de nuevos genes *vip*, nos permitirá contar con una herramienta más amplia para llevar a cabo, una lucha más eficiente contra las plagas de los cultivos y algunas de las especies que comienzan a mostrar resistencia a algunas de las toxinas más utilizadas hasta el momento, como por ejemplo, las proteínas Cry.

Teniendo en cuenta esto, en este estudio se ha llevado a cabo la búsqueda, identificación y clonación de genes *vip3*, en una colección de *B. thuringiensis* pertenecientes a la Universidad Pública de Navarra. Esto nos ha permitido conocer la incidencia natural de este tipo de genes en aislados procedentes de ambientes terrestres y acuáticos, así como también, investigar una posible relación entre el contenido de genes tipo-*vip3* y su hábitat de aislamiento.

En el estudio, se han utilizado un par de cebadores universales diseñados en base a la secuencia del gen *vip3Aa1* (Estruch *et al.*, 1996). Estos cebadores permiten amplificar una región que se mantiene conservada (F1) ubicada hacia el extremo amino terminal, y otra, que presenta una mayor variabilidad (F2) hacia el extremo carboxilo terminal, esta característica se comparte entre los diferentes miembros de este grupo. Estos cebadores, fueron diseñados por Fang y colaboradores (2007), de tal manera que la amplificación de un solo fragmento en el ADN de un aislado Bt (generalmente el conservado) es un claro indicador de que el mismo contiene un gen tipo-*vip3* diferente al *vip3Aa1*. De la misma manera, la amplificación de ambos fragmentos a partir de un

aislado Bt, sugiere la presencia de un gen tipo-*vip3* prácticamente igual al gen *vip3Aa1*.

Utilizando esta metodología, se llevó a cabo la búsqueda de genes *vip3* en 192 aislados, de los cuales, 96 eran procedentes de ambientes terrestres y 96 de ambientes acuáticos. En total, 141 de los aislados analizados (73%), mostraron amplificación positiva para el fragmento conservado (F1), es decir, contenían algún gen tipo-*vip3*. De este 73 %, el 28% correspondían a muestras aisladas de hábitats terrestres y un 45% a hábitats acuáticos (Figura 2). En principio esto indicaría, una mayor incidencia de genes tipo-*vip3* en los aislados provenientes de ambientes acuáticos.

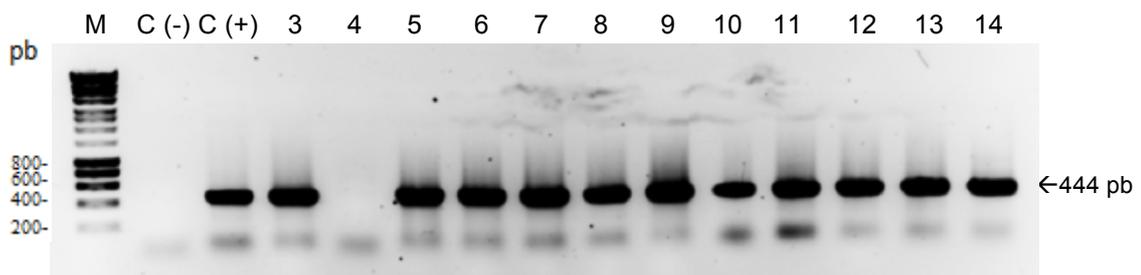


**Figura 2.** Porcentaje de aislados Bt que contienen genes tipo-*vip3* en base a la amplificación por PCR del fragmento conservado F1 Fang *et al.* (2007). (-) No existe amplificación, (+) amplificación.

La cantidad total de genes tipo-*vip3* encontrados en este trabajo, se pudo comparar con las de otras colecciones de *B. thuringiensis* analizadas anteriormente. Así por ejemplo, Espinasse y colaboradores (2003) detectaron que más del 50% de sus aislados testados contenían genes tipo-*vip3*, mientras que Hernández-Rodríguez y colaboradores (2009), obtuvieron que en su colección de aislados, el 48,9% produjeron amplificación para este tipo de genes. En todos los casos mencionados, los cebadores utilizados fueron diseñados en base a regiones específicas y altamente conservadas de las

secuencias de estos genes, por lo que cabría esperar, que no existieran diferencias significativas entre los genes tipo-*vip3* identificados en cada trabajo. Por lo tanto, se pensó que la diferencia en cuanto al número de aislados que contenían genes tipo-*vip3*, se pudo deber a la abundancia relativa de estos genes en la región de cada colección y al número de aislados analizados en cada estudio. Siendo nuestra colección de 192 aislados perteneciente a la Península Ibérica, en comparación con los 1260 aislados de los cinco continentes analizados por Espinasse y a los 507 de Hernández-Rodríguez procedentes de España y México.

En todos los casos se observó, una única banda de ~400 pb, correspondiente al tamaño esperado (444 pb) (Figura 2).



**Figura 2.** Ejemplo PCR con los cebadores descritos en Fang *et al.* (2007) en aislados de agua. Amplificación positiva para F1 en el carril 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14. C (-) control negativo y C (+) control positivo.

De los 96 aislados provenientes de ambientes terrestres, solamente 54 (56 %) amplificaban el fragmento conservado F1, mientras que el resto, 42 (44 %), no mostraban signos de amplificación. En base a estos resultados, se puede decir que este 44% restante no contenía ningún gen tipo-*vip3* (Tabla 2). Estos valores, no coinciden con los señalados previamente por otros autores en muestreos de suelos realizados en distintas regiones de los cinco continentes. Arrieta y colaboradores (2004) obtuvieron que un 74% de sus aislados contenían genes tipo-*vip3* mientras que Mesrati y colaboradores (2005), presentaron que sólo un 30% de sus aislados analizados, contenían dicho tipo de genes. Seifinejad y colaboradores (2008), encontraron que un 82,6% de sus aislados analizados contenían genes de este grupo. Como hemos señalado

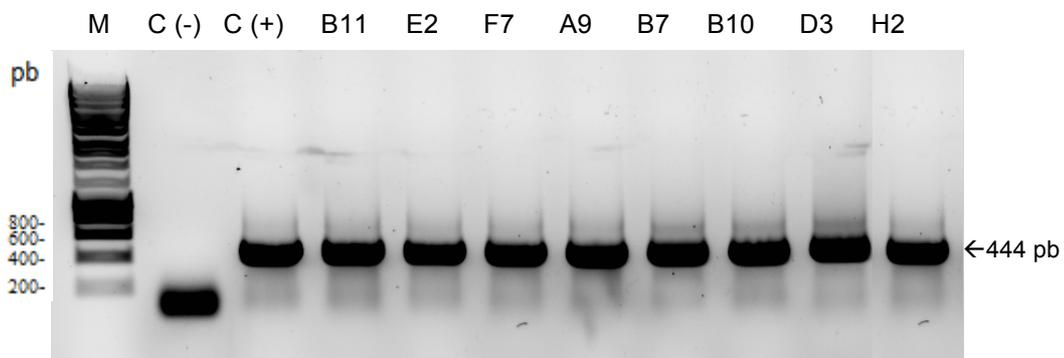
anteriormente, los cebadores utilizados fueron diseñados específicamente y en base a regiones conservadas de estos genes, por lo que no cabría esperar, que existieran diferencias significativas entre los miembros de este tipo de genes. Por lo tanto, se llegó a la misma conclusión planteada anteriormente, la diferencia en cuanto al número de aislados que contenían genes del grupo *vip3*, se pudo deber a la abundancia relativa de estos genes en la región de cada colección y al número de aislados analizados en cada estudio. Así por ejemplo, Arrieta estudió 105 aislados de plantaciones de café procedentes de Costa Rica, mientras que Mesrati estudió 256 aislados de suelos tunecinos y Seifinejad sólo analizó 70 aislados de suelos de Irán

**Tabla 2.** Porcentajes de amplificación obtenidos al analizar un conjunto de cepas de *B. thuringiensis* con los cebadores F1 y F2 Fang *et al.* (2007) y *vip3\_sc.fw* y *vip3\_sc.rv*. Hernández-Rodríguez *et al.* (2009)

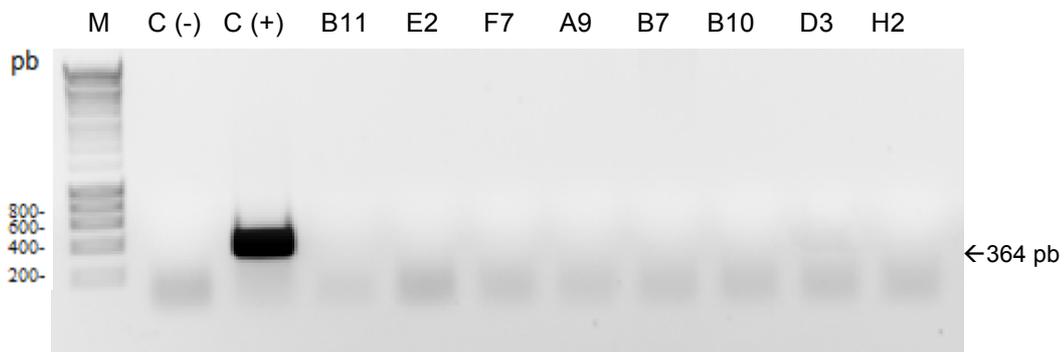
	TIERRA	AGUA	TOTAL
<b>F1(+)</b>	54 (56%)	87 (91%)	141 (73%)
<b>F1(-)</b>	42 (44%)	9 (9%)	51 (27%)
<b>F1(+)<b>F2(+)</b>(Vip3Ah1)</b>	44 (46%)	69 (72%)	113 (59%)
<b>F1(+)<b>F2(-)</b>(Vip3)</b>	10 (10%)	18 (19%)	28 (14%)
<b>F1(-)<b>F2(-)</b></b>	41 (43%)	7 (7%)	48 (25%)
<b>F1(-)<b>F2(+)</b></b>	1(1%)	2 (2%)	3 (2%)
<b>Vip3 sc (+)</b>	8 (8,7%)	16 (16,7%)	24 (12,5%)
<b>Vip3 sc(-)</b>	2 (2%)	2 (2%)	4 (2%)

A su vez, de estos 54 aislados, sólo 10 produjeron amplificaciones del tamaño esperado (444 pb) para el fragmento conservado F1 y no amplificaron el fragmento variable F2 (Tabla 2), lo cual indicaría la posible presencia en estos aislados de genes tipo-*vip3* nuevos (Figura3) Estos aislados fueron entonces seleccionados para el análisis por PCR-RFLP mediante la metodología propuesta por Hernández-Rodríguez y colaboradores (2009).

### Fragmento conservado (F1)



### Fragmento variable (F2)



**Figura 3.** PCR con los cebadores descritos en Fang *et al.* (2007). Amplificación positiva para F1 y ausencia de amplificación para el F2. (M) marcador molecular, C (-) control negativo y C (+) control positivo.

En contraste, de los 96 aislados provenientes de ambientes acuáticos, 87 (91%) mostraron amplificaciones correspondientes al fragmento conservado

F1, mientras que el resto, 9 aislados (9%) no mostraron signos de amplificación para dicho fragmento (Tabla 2).

De estos 87 aislados, sólo 18 produjeron amplificaciones del tamaño esperado (444 pb) para el fragmento conservado y no en el variable, lo cual nuevamente, indicaría la posible presencia en estos, de genes tipo-*vip3* nuevos (Figura 3). Estos aislados, fueron también seleccionados para el análisis mediante PCR-RFLP como se ha comentado anteriormente para los aislados de hábitats terrestres (Tabla 2).

El hecho de contener un gen *vip3*, no tiene por qué estar relacionado con el hábitat al que pertenecen los aislados, mediante el programa estadístico S-PLUS (Ugarte y Fernández, 2001), se analizó con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ , si en nuestra colección el contenido en genes tipo-*vip3* guardaría alguna relación con el hábitat de procedencia de los aislados Bt.

La hipótesis planteada fue la siguiente, por un lado  $H_0$  (hipótesis nula), indica que existiría independencia entre las dos variables cualitativas (hábitat al que pertenecen los aislados y la presencia o ausencia de genes *vip3*), y por otro,  $H_1$  (hipótesis alternativa), que existiría dependencia entre ambas. Los resultados obtenidos fueron de una  $\chi^2$  de 29,08, siendo esta mayor a la tabulada  $qt(0,95, 1)=6,313752$ , por lo que estaríamos en la región de rechazo de la hipótesis nula; sin embargo, el dato de mayor importancia, y en el cual basamos nuestra conclusión final, es el p-value, siendo este de  $6,96e^{-08}$ , al ser menor a 0,05, se vuelve a rechazar la  $H_0$ . Por lo tanto, al encontramos en la región de rechazo de la hipótesis nula, ambas variables serían dependientes. Esto es, existen diferencias significativas en cuanto a la presencia de genes *vip3* en función del hábitat, con un nivel de confianza del 95%. El hecho de contener un gen *vip3*, si está claramente relacionado con el tipo de hábitat al que pertenecen los aislados (Tabla 3).

**Tabla 3.** Representación de los valores observados respecto a los valores esperados en el análisis.

Hábitat	<i>vip3</i> observados		<i>vip3</i> esperados	
	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia
Terrestre	54	42	70,5	25,5
Acuático	87	9	70,5	25,5

Sin embargo, este resultado podría no ser extrapolable a otras poblaciones de *B. thuringiensis*, debido a que los resultados obtenidos podrían estar ligados al número de toma de muestras (aislados analizados) y procedencia de las cepas. Además, hasta la fecha, no existen estudios publicados comparables que permitan confirmar este comportamiento de la incidencia natural de genes *vip3* dependiendo del hábitat al que pertenecen.

Los resultados obtenidos, han mostrado una elevada presencia de genes tipo-*vip3* en los aislados analizados, lo que sugiere que en la Península Ibérica este grupo de genes se encuentra ampliamente distribuido y es comúnmente encontrado tanto en hábitats terrestres como en acuáticos, ya que los aislados que se estudiaron correspondían a diferentes partes de la península (Iriarte *et al.*, 1998 y 2000). Este hecho, brinda la posibilidad de encontrar nuevos genes pertenecientes a este grupo si se continúa con su estudio.

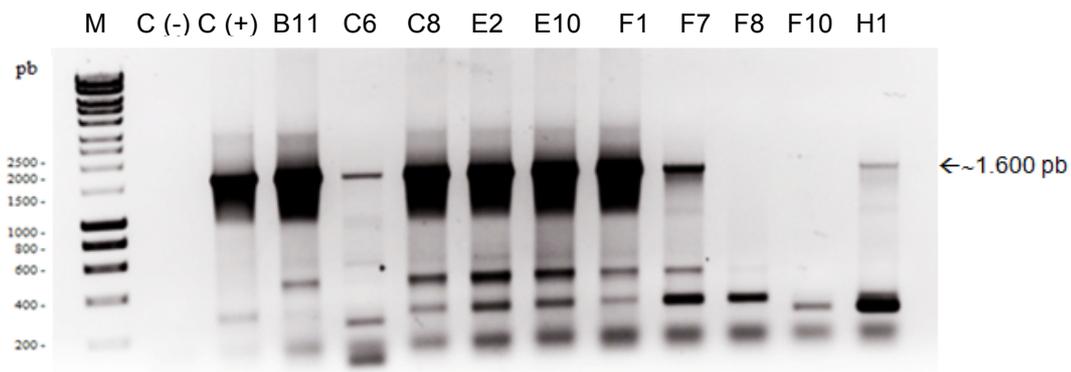
### 3.2 Análisis RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Como se comentó en el punto anterior, los aislados que produjeron amplificaciones positivas para el fragmento conservado F1 y negativas para el

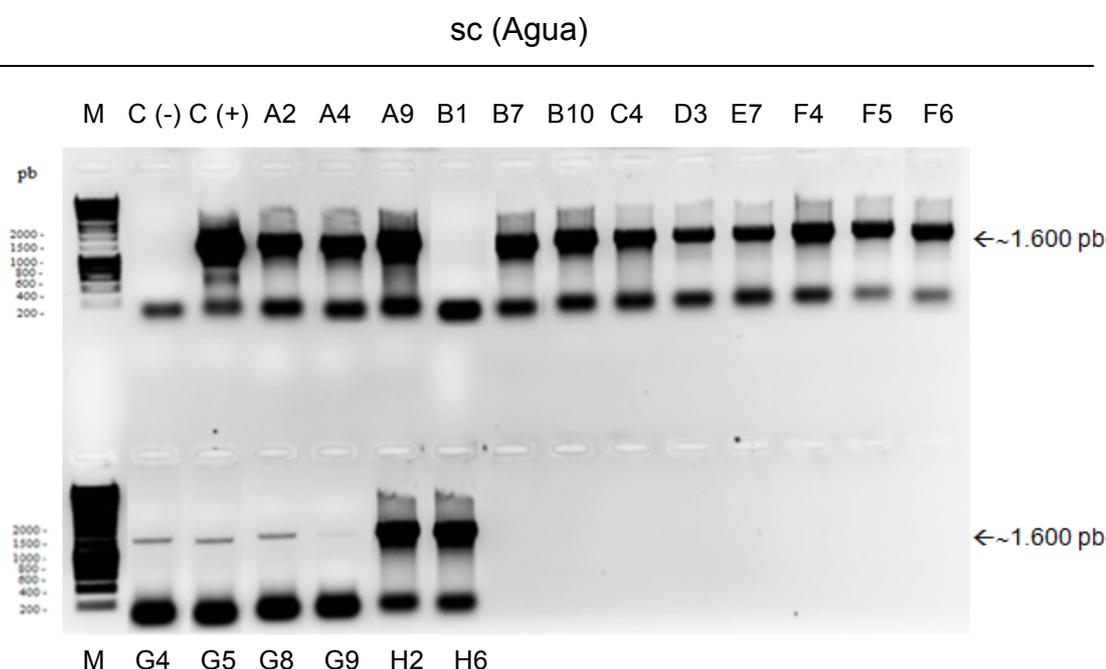
fragmento variable F2, fueron analizados mediante la técnica de PCR-RFLP. Estos aislados, se sometieron a una nueva PCR con un par cebadores degenerados que amplifican una región de aproximadamente 1,6 kb sobre la secuencia de genes tipo-*vip3*.

Se observó una amplificación entre los aislados candidatos a portar un nuevo gen *vip3* de 8 (80%) en el caso de los aislados de hábitats terrestres (Figura 4) y de 16 (89%) en el de los aislados de hábitats acuáticos (Figura 5). Las amplificaciones obtenidas con este par de cebadores mostraron el tamaño esperado de ~1.600 pb.

#### sc (Tierra)



**Figura 4.** PCR con los cebadores descritos en Hernández-Rodríguez *et al.* (2009). Amplificación positiva en B11, C6, C8, E2, E10, F1, F7 y H1. (M) marcador molecular, C (-) control negativo y C (+) control positivo.

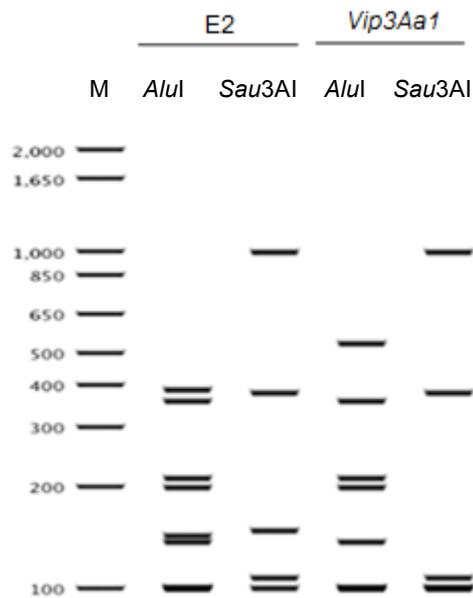


**Figura 5.** PCR con los cebadores descritos en Hernández-Rodríguez *et al.* (2009). Amplificación positiva en A2, A4, A9, B7, B10, C4, D3, E7, F4, F5, F6, G4, G5, G8, H2, H6. (M) marcador molecular, C (-) control negativo y C (+) control positivo.

Los productos de PCR obtenidos, fueron digeridos de forma separada, con las enzimas de restricción *AluI* y *Sau3AI*, obteniéndose un patrón de RFLP para cada cepa analizada.

Estos perfiles de restricción fueron comparados con los obtenidos por digestión del gen *vip3Aa1* (control), obteniéndose un perfil diferente al del *vip3Aa1* en el aislado E2 (Figura 6). Este fragmento de ~1,6 kb, fue entonces clonado y enviado a secuenciar. Aquellos aislados que muestran diferencias con respecto al perfil control, indicarían la presencia de posibles genes nuevos; sin embargo, patrones idénticos a los conocidos también pueden contener secuencias de genes diferentes (si bien es poco probable) pero no pueden ser identificados mediante esta metodología (Liu *et al.*, 2007). En ese caso, las diferencias podrían encontrarse en las regiones que se encuentran entre las dianas de restricción *AluI* y *Sau3AI*. Teniendo en cuenta esto último, se enviaron también

a secuenciar los fragmentos de ~1,6 kb amplificados desde otros aislados (2 de tierra y 5 de agua) que producían perfiles RFLP diferentes al gen *vip3Aa1* pero idénticos entre ellos. Estos aislados fueron el B11 y F7 procedentes de hábitats terrestres y A9, B7, B10, D3 y H2 de hábitats acuáticos. De esta manera, se pretendía además comparar si existían diferencias entre la homología de los fragmentos de ~1,6 kb provenientes de los aislados de ambientes acuáticos y los de ambientes terrestres.



**Figura 6.** Patrón RFLP de genes tipo *vip3* de cepas de *B. thuringiensis*. M, marcador de peso molecular. Digestión del producto de PCR con las enzimas *AluI* y *Sau3AI* en el aislado E2 y en el control positivo *Vip3Aa1*.

Los aislados que mostraron amplificación positiva del fragmento conservado, negativa al fragmento variable y negativa a los cebadores degenerados mediante el análisis por PCR-RFLP, son aislados de interés, ya que amplifican con los cebadores del fragmento conservado F1, lo cual indicaría la presencia de un gen tipo-*vip3* y no amplifican con los cebadores degenerados, lo que sugiere un alto grado de diversificación de su secuencia con respecto a genes tipo-*vip3*, por lo que se reservaron para estudios posteriores mediante otro tipo de análisis.

Con los resultados obtenidos, se muestra que esta metodología es eficiente para realizar la búsqueda de genes tipo *vip3* a gran escala, y también para detectar posibles genes nuevos. El método, sirvió para observar cuales y cuantos aislados contenían genes tipo-*vip3* y cuáles de ellos eran candidatos a ser nuevos.

El estudio sobre este tipo de genes, se encuentra aún en un estado inicial, y el hallar gran cantidad de estos, daría la posibilidad de localizar genes con nueva actividad insecticida.

### 3.3 Clonaje de los fragmentos de PCR y análisis de las secuencias

Los 8 productos de PCR, fueron clonados en el vector pGEM-T easy y secuenciados. Esta secuenciación se realizó desde cada extremo, mediante el par de cebadores universales T7 y SP6, específicos para este tipo de plásmidos. A partir de las secuencias obtenidas, se crearon los correspondientes contigs de ~1,6 kb mediante el uso del software Cap3. La longitud media de cada secuencia consenso de cada aislado fue de aproximadamente 1.620 pb. Estas secuencias, fueron comparadas con genes *vip3* almacenados en bases de datos mediante diversas herramientas bioinformáticas tales como BLASTx y BLASTn.

Los aislados procedentes de ambientes terrestres E2 y F7 y los aislados de agua B10 y D3, produjeron contigs de entre 1.621 pb y 1.623 pb que fueron traducidos a aminoácidos. Comparando entre si las secuencias de nucleótidos de los aislados, se vio que presentaban una homología entre sí menor al 100%; sin embargo, al ser traducidos a secuencia de aminoácidos y comparados con las proteínas existentes en el GeneBank, se obtuvo una homología en todos los casos del 100% con la proteína Vip3Ah1 de *B. thuringiensis* (Número de acceso GenBank ZP\_04075244.1). Esto es debido, a que el código genético es degenerado, es decir, distintos codones pueden codificar para el mismo aminoácido, por lo que estas diferencias en la secuencia nucleotídica no dejan de codificar para una misma proteína, en este caso la proteína Vip3Ah1. En el caso particular del aislado F7, se utilizó la secuencia de nucleótidos Vip3Aa1 para corregir gaps o incongruencias en el centro de la secuencia, por los cuales

se perdía homología y se daban errores de lectura, debido posiblemente a un mal ensamblaje de los dos fragmentos.

La cepa aislada de ambientes acuáticos B7, de la que sólo se obtuvo una secuencia de 1.062 pb con el cebador T7 (reacción SP6 fallida), poseía homología con una proteína hipotética de *B. thuringiensis*. En un principio, se pensó que este resultado podría deberse a contaminaciones producidas en el proceso de clonación; sin embargo, en algunos casos las reacciones de PCR en las cuales se utilizan cebadores degenerados pueden producir amplificaciones inespecíficas debido a que los cebadores pueden aparearse erróneamente a una región que codifica una proteína diferente. Este resultado se ha producido también en otros trabajos de otros miembros del grupo de investigación (Torres, 2010) y sólo puede verse al comparar la secuencia con las almacenadas en la base de datos.

La cepa proveniente de ambientes acuáticos H2, produjo una secuencia parcial de 401 pb, presentando un tamaño menor al esperado al ser amplificada con los oligonucleótidos degenerados, fue comparada con el GeneBank y se obtuvo una alta homología con una amplia variedad de proteínas. Sin embargo, analizando con detalle la secuencia, se observó codones de stop internos que truncan la proteína, por lo que se trataría de un pseudogen.

El fragmento clonado del aislado de tierra B11, produjo una secuencia de 918 pb y 621 pb con los cebadores T7 y SP6 respectivamente, siendo comparadas por separado mediante BLASTx, obteniéndose nuevamente una alta homología con la proteína Vip3Ah1; sin embargo, la homología era del 99% (Figura 7). Este resultado, nos llevó a pensar, que en alguna parte de la secuencia debería encontrarse alguna diferencia. Sin embargo, a pesar de la variabilidad obtenida, en el residuo 159 (base 476 a 478) se genera un codón de stop, lo que indicaría que este gen posee una mutación que produciría una proteína truncada de menor tamaño y no funcional. Teniendo esto en cuenta, se analizó el cromatograma de la secuencia y se determinó que en esa posición la secuencia era de baja calidad y el pico en cuestión podría generar un error de secuenciación que genera dicho codón de stop, por lo tanto, este fragmento se

enviará a secuenciar nuevamente para dilucidar si este stop es real y para confirmar algunos cambios más que se encuentran en esta secuencia.

<b>B11</b>	2	ATGIKDIMNMI FKTD TGGNLT LDEILKNQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNT ELS	181
<b>Vip3Ah1</b>	27	ATGIKDIMNMI FKTD TGGNLT LDEILKNQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNT ELS	86
<b>B11</b>	182	KEILKIANEQNQLVNDVNNKLD AINTMLHIYLPKITSMLS DVMEQNYALS LQIEYLSKQL	361
<b>Vip3Ah1</b>	87	KEILKIANEQNQLVNDVNNKLD AINTMLHIYLPKITSMLS DVMEQNYALS LQIEYLSKQL	146
<b>B11</b>	362	QEISDKLDI INVNV LINSTL TEITPAYQRIKYVNEKfe*ltfateetlkvkkDSSPADIL	541
<b>Vip3Ah1</b>	147	QEISDKLDI INVNV LINSTL TEITPAYQRIKYVNEKFE LTFATETTLVKKDSSPADIL	206
<b>B11</b>	542	Deltel telAKSVTKNDVEDFEFYLN	619
<b>Vip3Ah1</b>	207	DELTELTELAKSVTKNDV DGF E FYLN	232

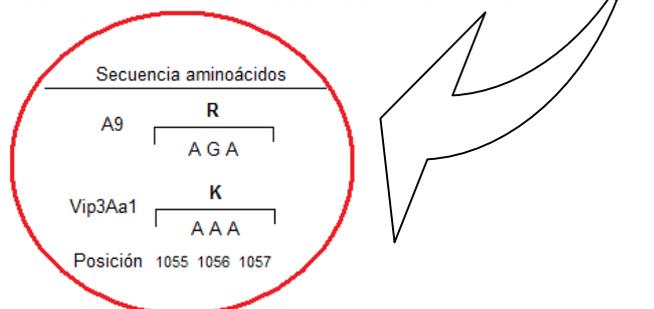


**Figura 7.** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para la cepa B11 con la proteína Vip3Ah1.

La cepa A9 proveniente de hábitats acuáticos, produjo una secuencia contig de 1.622 pb y al igual que las anteriores, fue comparada con las depositadas en las bases de datos. De manera interesante, esta secuencia presentó una alta homología con las proteínas ya descritas (Figura 8), siendo su homología de un 99% con respecto a la toxina Vip3Ah1. Esta diferencia, se debe a un cambio de un nucleótido en la base 1056 (guanina por adenina), que genera el cambio de un aminoácido lisina (K) por una arginina (R). Teniendo en cuenta el posible error de secuenciación del caso anterior, también se analizó el cromatograma y se pudo descartar algún error de secuenciación presente en la secuencia. Por lo tanto, este aislado se presenta como un claro portador de un gen candidato a ser secuenciado en su totalidad, ya que resultaría una nueva variante del único gen *vip3Ah1*. Para confirmar que se corresponde a un gen tipo-*vip3* novel, se realizará una nueva secuenciación del fragmento de ~1,6 kb en modalidad analítica. De esta manera, se pretende descartar posibles errores de

secuenciación y confirmar la diferencia en el cambio del aminoácido antes mencionado.

<b>A9</b>	2	ATGIKDIMNMIFKTDTGGNLTLDLDEILKNQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELS	181
		ATGIKDIMNMIFKTDTGGNLTLDLDEILKNQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELS	
<b>Vip3Ah1</b>	27	ATGIKDIMNMIFKTDTGGNLTLDLDEILKNQQLLNEISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTELS	86
<b>A9</b>	182	KEILKIANEQNQVLNDVNNKLD AINTMLHIYLPKITSMLS DVMKQNYALS LQIEYLSKQL	361
		KEILKIANEQNQVLNDVNNKLD AINTMLHIYLPKITSMLS DVMKQNYALS LQIEYLSKQL	
<b>Vip3Ah1</b>	87	KEILKIANEQNQVLNDVNNKLD AINTMLHIYLPKITSMLS DVMKQNYALS LQIEYLSKQL	146
<b>A9</b>	362	QEISDKLDI INNVVLIN STLTEITPAYQRIKYVNEkfeeltfatettlkVKKDSSPADIL	541
		QEISDKLDI INNVVLIN STLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETTLKVKK DSSPADIL	
<b>Vip3Ah1</b>	147	QEISDKLDI INNVVLIN STLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETTLKVKK DSSPADIL	206
<b>A9</b>	542	DelteletelAKSVTKNDVDGFEFYLN TFDHVMVGNLFGRSALKTASELIAKENVKTS GS	721
		DELTELELAKSVTKNDVDGFEFYLN TFDHVMVGNLFGRSALKTASELIAKENVKTS GS	
<b>Vip3Ah1</b>	207	DELTELELAKSVTKNDVDGFEFYLN TFDHVMVGNLFGRSALKTASELIAKENVKTS GS	266
<b>A9</b>	722	EVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTL	901
		EVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTL	
<b>Vip3Ah1</b>	267	EVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTLTTCRKLGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNI LPTL	326
<b>A9</b>	902	SNTFSNPNYAKVKGSD EDAKMIVEAKPGHALVGFEMSND SIVTLKVYEA <del>KL</del> RQNYQV DDK	1081
		SNTFSNPNYAKVKGSD EDAKMIVEAKPGHALVGFEMSND SIVTLKVYEA <del>KL</del> +QNYQV DDK	
<b>Vip3Ah1</b>	327	SNTFSNPNYAKVKGSD EDAKMIVEAKPGHALVGFEMSND SIVTLKVYEA <del>KL</del> RQNYQV DDK	386
<b>A9</b>	1082	SLSEVIYGD TDKLFCDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKMKM TLRYEVTANFYDSS	1261
		SLSEVIYGD TDKLFCDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKMKM TLRYEVTANFYDSS	
<b>Vip3Ah1</b>	387	SLSEVIYGD TDKLFCDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKMKM TLRYEVTANFYDSS	446
<b>A9</b>	1262	TGEIDLNKKKVESSEAEYR TLSANDDGVYMLPGVISETFLTPINGFGLQADENSRLITLT	1441
		TGEIDLNKKKVESSEAEYR TLSANDDGVYMLPGVISETFLTPINGFGLQADENSRLITLT	
<b>Vip3Ah1</b>	447	TGEIDLNKKKVESSEAEYR TLSANDDGVYMLPGVISETFLTPINGFGLQADENSRLITLT	506
<b>A9</b>	1442	CKSYLRELLLATDLSNKETK LIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLEPWKANNKNAYVDHTGG	1521
		CKSYLRELLLATDLSNKETK LIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLEPWKANNKNAYVDHTGG	
<b>Vip3Ah1</b>	507	CKSYLRELLLATDLSNKETK LIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLEPWKANNKNAYVDHTGG	566



**Figura 8.** Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para la cepa A9 con la proteína Vip3Ah1.

Analizando las secuencias obtenidas de cada contig de ~1,6 kb, se observó que no existen diferencias significativas entre la homología de los aislados de ambientes acuáticos y terrestres, siendo esta, siempre la del gen *vip3Ah1*.

Dado que en un cierto número de insectos se está observando resistencias a las proteínas de *B. thuringiensis* (Tabashnik, 1994; Ferré *et al.*, 1991), es interesante la búsqueda de nuevas proteínas tóxicas que nos permitan obtener alternativas para el manejo en la aparición de estas resistencias, tanto con el diseño de nuevas proteínas bioinsecticidas, como por la introducción de nuevas proteínas Vip en plantas transgénicas. Las supuestas nuevas proteínas encontradas en este trabajo, servirán para ampliar el conjunto de proteínas Vip conocidas y en consecuencia, la posibilidad del desarrollo de nuevos productos bioinsecticidas, construcción de plantas transgénicas y como resultado final, ser una alternativa a las proteínas actualmente utilizadas en los casos de desarrollo de resistencias en las poblaciones de insectos. Por otro lado, este trabajo sugiere que esta colección de aislados puede ser una fuente importante de nuevas proteínas Vip, siendo interesante la colección proveniente de hábitats acuáticos, aunque es necesaria una mayor caracterización de estas antes de poder determinar de forma concluyente su verdadero valor insecticida.

#### 4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, mediante la búsqueda e identificación de genes *vip3* utilizando PCR, PCR-RFLP y el análisis de las secuencias obtenidas se concluye que:

1. La colección de aislados de *B. thuringiensis* procedente de la Península Ibérica, presentó un contenido en genes tipo-*vip3* del 73%.
2. Se constató con un nivel de significación del 5%, la existencia de diferencias significativas en cuanto a la presencia de genes *vip3* en función al hábitat al que pertenecen los aislados. El hecho de contener un gen *vip3* si está claramente relacionado con el tipo de hábitat al que pertenecen los aislados, siendo la presencia de estos genes superior en hábitats acuáticos. Por lo que sería interesante seguir la línea de investigación en este hábitat.
3. El tipo de gen *vip3* encontrado en los contigs analizados fue siempre el *vip3Ah1* y resulta ser independiente del hábitat del que se obtuvo el aislado Bt.
4. La cepa de agua A9 y de tierra B11, son candidatas a poseer una posible variante de la proteína Vip3Ah1, y por lo tanto a presentar una nueva variante del gen *vip3Ah1*.
5. A futuro, se planea obtener el ORF completo del candidato A9 (ambiente acuático) para su clonaje, expresión y análisis de toxicidad y espectro de huésped contra algunas de las plagas más relevantes de Europa.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

**Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402

**Arrieta G., Hernández A., and Espinoza A.M.** (2004) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de Biología Tropical* 52: 757-764

**Bhalla R., Dalal M., Panguluri S.K., Jagadish B., Mandoakar A.D., and Singh A.K.** (2005) Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *B. thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* 243: 467-472.

**Bravo A., Gill S., and Soberón M.** (2007) Mode of action of *B. thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435

**Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., and Dean D.H.** (1998) Revision of the nomenclature for the *B. thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813

**Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., and Dean D.H.** (2011) *B. thuringiensis* toxin nomenclature [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

**De Luca A., Simonson J., and Larson A.** (1981) *B. thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 865-870

**Doss V.A., Kumar K.A., Jayakumar R., and Sekar V.** (2002) Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *B. thuringiensis* in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 26: 82-88.

**Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Duran C., Field M., Heled J., Kearse M., Markowitz S., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T., and Wilson A.** (2010) Geneious v5.3, Available from <http://www.geneious.com>

**Espinasse S., Chaufaux J., Buisson Ch., Perchat S., Gohar M., Bourguet D., and Sanchis V.** (2003) Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Current Microbiology* 47: 501-507

**Estruch J., Warren G., Mullins A., Nye G., Craig J., and Koziel M.** (1996) *Vip3A*, a novel *B. thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 93: 5389-5394

**Fang J., Xu X., Wang P., Zhao J., Shelton A., Cheng J., Feng M., and Shen Z.** (2007) Characterization of chimeric *B. thuringiensis vip3* toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 956-961

**Ferré J., Feal M.D., van Rie J., Jansens S., and Peferoen M.** (1991) Resistance to the *B. thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 88: 5119-5123

**Ferré J. and van Rie J.** (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *B. thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47: 501-533

**Forsyth G. and Logan N.** (2000) Isolation of *B. thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Letters in Applied Microbiology* 30: 263-266

**Goldberg L. and Margalit J.** (1997) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Unanotaenic unguiculara* and *Culex pipiens*. *Mosquito News* 37: 355-358

**Heimpel A. and Angus A.** (1967) A critical review of *B. thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology* 12: 287-322

**Hernández-Rodríguez C.S., Boets A., van Rie J., and Ferré J.** (2009) Screening and identification of *vip* genes in *B. thuringiensis* strain. *Journal of Applied Microbiology* 107: 219-225

**Huang X. and Madan A.** (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.

**Iriarte J., Bel Y., Ferrandis M., Andrew R., Murillo J., Ferré J., and Caballero P.** (1998) Environmental distribution and diversity of *B. thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 97-106

**Iriarte J., Pocar M., Lecadet M., and Caballero P.** (2000) Isolation and Environmental distribution and characterization of *B. thuringiensis* strain from aquatic environments in Spain. *Current Microbiology* 40: 420-408

**Kaelin P., Morel P., and Gadani F.** (1994) Isolation of *B. thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.) *Applied and Environmental Microbiology* 60: 19-25

**Knowles B.H. and Dow J.A.T.** (1993) The crystal  $\delta$  -endotoxins of *B. thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469-476

**Krieg A. and Langenbruch G.A.** (1981) Susceptibility of arthropod species to *B. thuringiensis*. In: *Microbial control of pests and diseases 1970-1980* (H.D. Burges, edition), pp. 293-32. London, Academic Press.

**Liu J., Song F., Zhang J., Liu R., He K., Tan J., and Huang D.** (2007) Identification of *vip3A*-type genes from *B. thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. *Letters in Applied Microbiology* 45: 432-438

**Maeda M., Mizuki E., Nakamura Y., Hatano T., and Ohba M.** (2000) Recovery of *B. thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Current Microbiology* 40: 418-422

**Macintosh S.C., Stone T.B., Sims S.R., Hunst P.L., Greenplate J.T., Marrone P.G., Perlak F.J., Fischhoff D.A., and Fush R.L.** (1990) Specificity and efficacy of purified *B. thuringiensis* proteins against agronomically important insect. *Journal. Invertebrate Pathology* 56: 258-266

**Martin P. and Travers R.** (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2437-2442

**Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarret P., and Burges H.D.** (1992) Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in a animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1344-1350

- Mesrati L., Tounsi S., and Jaoua S.** (2005) Characterization of a novel *vip3*-type gene from *B. thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. *FEMS Microbiology Letters* 244: 353-358
- Nester E., Thomashow L.S., Metz M., and Gordon M.** (2002). 100 years of *B. thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. American Academy of Microbiology. [www.asmtusa.org](http://www.asmtusa.org)
- Poncet S., Delecluse A., Klier A., and Rapoport G.** (1995) Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology* 66: 131-135
- Porcar M. and Caballero P.** (2000) Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *Journal of Applied Microbiology* 89: 309-316
- Ruiz de Escudero I., Estela A., Escribiche B., and Caballero P.** (2007) Potential of the *B. thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 337-340
- Sanchis V., Lereclus D., Menou G., Chaufaux J., and Lecadet M.M.** (1988). Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *B. thuringiensis* aizawai. *Molecular microbiology* 2: 393-404.
- Seidman C., Struhl K., Sheen J., and Jessen T.** (1997) Introduction of Plasmid DNA into Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*.37: 1.8.1-1.8.10
- Seifinejad A., Salehi Jouzani G.R., Hosseinzadeh A., and Abdmishani C.** (2008) Characterization of Lepidoptera-active cry and *vip* genes in Iranian *B. thuringiensis* strain collection. *Biological Control* 44: 216-226
- Smith R. and Couche G.** (1991) The phylloplane as a source of *B. thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 311-315
- Stahly D.P., Dingman D.W., Bulla L.A., Jr., and Aronson I.A.** (1978) Possible origin and function of the parasporal crystal in *B. thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 84: 581-588
- Tabashnik B.E.** (1994) Evolution of resistance to *B. thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39: 47-79

**Torres J.** (2010) Búsqueda de genes vip3A en *B. thuringiensis* (Berliner). UPNA, Máster en Agrobiotecnología

**Ugarte M.D. and Fernández A.** (2001) Estadística aplicada con S-PLUS. Spain: Universidad Pública de Navarra, First edition

**Vaeck M., Reynaerts A., Hofte H., Jansens S., De Beukeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., and Leemans J.** (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37

**Warren G.** (1997) Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants* edition Carozzi N. y Koziel M. pp 109-121. London, Taylor and Francis Ltd.

**Whiteley H.R. and H.E. Schnepf.** (1986) The molecular biology of paraesporal crystal formation by *B. thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology* 40: 549-576