

## Tesis de Posgrado

# Estudios genéticos en *Bacillus Thuringiensis* : Transformación, mutagénesis y clonado molecular

Rubinstein, Clara Patricia

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rubinstein, Clara Patricia. (1988). Estudios genéticos en *Bacillus Thuringiensis* : Transformación, mutagénesis y clonado molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2113\\_Rubinstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2113_Rubinstein.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rubinstein, Clara Patricia. "Estudios genéticos en *Bacillus Thuringiensis* : Transformación, mutagénesis y clonado molecular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2113\\_Rubinstein.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2113_Rubinstein.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTUDIOS GENETICOS EN *Bacillus thuringiensis*  
TRANSFORMACION, MUTAGENESIS Y CLONADO MOLECULAR

Clara Patricia Rubinstein

Tesis para optar al título de  
Doctor en Ciencias Biológicas

Director: Dra. Carmen Sánchez de Rivas

1988

Instituto de Investigaciones en Ingeniería  
Genética y Biología Molecular (INGEBI).

CONICET

- Para aquellos que creyeron en  
mí.

- Para Santiago, mi hijo.

2113  
Ej. 2.

Reporte No 2113

*"Tarde o temprano el Hombre se tropezará con la Verdad. Pero la mayoría de las veces se levantará y seguirá su camino".*

*Comentario de Churchill sobre el Hombre (de las Leyes de Murphy)*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero agradecer a la Dra Carmen Sanchez de Rivas por haberme guiado en tan difícil camino y por haberme brindado su amistad y optimismo a ultranza.*

*Asimismo, quiero expresar mi reconocimiento al Dr Héctor N. Torres por la confianza que ha depositado en mí y que espero no haber defraudado.*

*Deseo también expresar mi agradecimiento a las siguientes personas:*

*A la Dra Mirtha M. Flawiá, por transmitirme su genuino entusiasmo ante un experimento bien hecho.*

*A los Dres María Teresa Tellez de Iñón, Mónica Torruella y Luis Molina y Vedia por su grata amistad y ayuda en los duros comienzos.*

*Al Dr Alejandro Paladini(h) por su experta colaboración y amistad a lo largo de estos años.*

*A mi amiga Alejandra Mandel, por su cálida amistad y ayuda incondicional.*

*A mis amigas, Valy Carricarte y Rita Ulloa por su afecto y apoyo cotidianos.*

*A mis compañeros, Ricardo Attar y Daniel Altschuler por haber compartido estos años, siempre dispuestos a brindar su ayuda.*

*A mis compañeros de laboratorio, Laura Moratinos, Omar Coso y Sandra Ruzal por compartir el trabajo diario y por su colaboración permanente.*

*Quiero agradecer especialmente al Dr James E. Trosko, por la influencia que tuvo en mi formación científica, así como por su constante estímulo y amistad.*

*Asimismo, quiero expresar mi gratitud al grupo de Bioquímica Microbiana del Instituto Pasteur de París en general y a los Dres Georges Rapoport, Andre Klier, Marguerite Lecadet, Catherine Bourgouin, Didier Lereclus, Maryvonne Arnaud y Vincent Sanchis por haberme brindado la oportunidad de visitarlos y por su inapreciable colaboración en los proyectos conjuntos.*

*Gracias a Adriana Urman por su paciencia para descifrar mis manuscritos y su eficiente labor dactilográfica, y a Leonardo Erijman por su disponibilidad permanente para asistirme en el uso de la computadora.*

*A Norberto Contreras, María Julia Alvarez, Leonor Acevedo, Claudio Alonso, Gabriel Paissán y Alejandro Cicinelli por la excelente asistencia técnica aportada.*

*A Norberto Malarini, por su constante buen humor y afectuosa colaboración.*

*A mi familia y amigos, y a mi esposo, por haber soportado estoicamente estos años, estimulándome y apoyándome en todo momento.*

*Finalmente, a todos los miembros del INGEBI por compartir lo bueno y malo que tiene este trabajo tan particular.*

# I N D I C E

Pág.

INTRODUCCION.....	1
1. ASPECTOS GENERALES.....	3
2. ASPECTOS APLICADOS.....	8
3. SUBESPECIES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	12
4. TOXINAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	14
4.1. Dominios activos e inactivos de la $\delta$ -endotoxina....	17
4.2. Relación entre la síntesis de cubierta esporal, germinación y formación del cuerpo paraesporal....	19
4.3. Ensayos Biológicos.....	20
5. PLASMIDOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	22
6. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GENETICA EN <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
6.1. Transducción.....	26
6.2. Conjugación.....	27
6.3. Transformación.....	33
7. CLONADO MOLECULAR DE LOS GENES DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA.....	35
7.1. Localización.....	35
7.2. Organización de los genes codificantes para la $\delta$ -endotoxina.....	37
7.3. Delimitación de los diferentes dominios de $\delta$ -endotoxina.....	43
8. ELEMENTOS TRANSPONIBLES EN <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	48
9. REGULACION DE LA EXPRESION DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA.....	50
10. LA SUBESPECIE <i>israelensis</i> .....	59
11. CONCLUSIONES Y OBJETIVOS.....	65

## MATERIALES Y METODOS

ABREVIATURAS.....	69
1. CEPAS UTILIZADAS.....	70
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	70
1.2. <i>Bacillus subtilis</i> .....	71
2. PLASMIDOS UTILIZADOS.....	71
3. MEDIOS DE CULTIVO.....	72
4. MEDIOS PARA GENERACION DE PROTOPLASTOS.....	75
5. REACTIVOS.....	76
6. SINCRONIZACION DE CULTIVOS PARA LA OBTENCION DE SUSPENSIONES DE ESPORAS Y CRISTALES DE <i>B. thuringiensis</i> .....	78
7. Generación de protoplastos de <i>B. thuringiensis</i> .....	78
8. Generación de protoplastos de <i>B. subtilis</i> .....	79
9.1. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS POR ADN PLASMIDICO.....	79
9.2. PROTOCOLOS ALTERNATIVOS PARA <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	80
9.2.1 Protocolo de Heierson modificado.....	80
9.2.2 Protocolo modificado de Takahashi.....	81
10. FUSION DE PROTOPLASTOS.....	82
11. PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO DE <i>B. subtilis</i> .....	82
11.1. PURIFICACION DE ADN EN PEQUENA ESCALA ("MINIPREPARACIONES").....	82
11.2. PURIFICACION A GRAN ESCALA DE ADN DE <i>B. subtilis</i> .....	84
11.3. PURIFICACION DE ADN DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	85
11.4. SOLUCIONES UTILIZADAS.....	86
12. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.....	87
12.1. Geles de agarosa horizontales.....	87
12.2. GELES VERTICALES.....	88
12.3. SOLUCIONES UTILIZADAS.....	89

13.	PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROELUCION.....	89
14.	USO DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.....	90
15.	MARCACION RADIOACTIVA DE ADN.....	91
15.1.	Marcación por <i>nick translation</i> .....	91
15.2.	MARCACION RADIOACTIVA POR <i>PRIMING AT RANDOM</i> .....	91
15.3.	MARCACION POR EL METODO DE <i>FILL IN</i> (o rellenado)...	92
16.	LIGADO DE FRAGMENTOS DE ADN A VECTORES.....	93
16.1.	Preparación de los vectores.....	93
16.2.	LIGADO DE FRAGMENTOS DE ADN A LOS VECTORES.....	95
17.	HIBRIDIZACION <i>IN SITU</i> DE COLONIAS BACTERIANAS.....	96
17.1.	Transferencia de las colonias.....	96
17.2.	HIBRIDIZACION.....	97
17.3.	LAVADOS.....	97
18.	TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA..	98
19.	TECNICA DE SEMBRADO DE MANCHAS ( <i>DOT BLOT</i> ).....	100
20.	AUTORRADIOGRAFIAS.....	101
21.	COLORACION DE ESPORAS Y CRISTALES DE <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	101
22.	ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	102

## RESULTADOS

<u>CAPITULO I:</u>	ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS EN <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	107
I.1.	PRODUCCION DE PROTOPLASTOS.....	107
I.2.	INDUCCION AUTOLITICA DE PROTOPLASTOS.....	113
I.3.	REGENERACION.....	121
I.4.	TRANSFORMACION DE "AUTOPLASTOS" POR ADN PLASMIDICO.....	128
I.4.1	Aislamiento y purificación de plásmidos en <i>Bacillus</i> .....	128
I.4.2	Transformación de protoplastos con ADN plasmídico.	130

I.4.3	Protocolos alternativos.....	135
I.5.	FUSION INTERESPECIFICA.....	137
I.6.	DISCUSION.....	141

CAPITULO II: MUTANTES REGULATORIAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*  
SUBESPECIE *ISRAELENIS*.....146

II.1.	MUTANTES ACRISTALIFEROS.....	146
II.2.	MUTANTE SUPERPRODUCTOR DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ..	159
II.3.	DISCUSION.....	167

CAPITULO III:

III.1.	INTRODUCCION.....	173
III.1.1	Vectores.....	174
III.1.2	Transformación.....	176
III.1.3	Restricción y modificación.....	179
III.1.4	Estabilidad de genes heterólogos clonados en <i>Bacillus subtilis</i> .....	181
III.1.5	Expresión en <i>Bacillus subtilis</i> .....	183
III.1.6	Conclusiones y Objetivos.....	190
III.2.	RESULTADOS.....	191
III.2.1	Subclonado en <i>Bacillus subtilis</i> GSY1104.....	191
III.2.2	Subclonado en <i>Bacillus subtilis</i> IA510.....	195
III.3.	DISCUSION.....	210

**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

1. CONCLUSIONES.....217

2. PERSPECTIVAS.....228

**BIBLIOGRAFIA**

## **INTRODUCCION**

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva cuya originalidad reside en su capacidad de sintetizar toxinas entomopatógenicas durante la fase de esporulación. Con seguridad, de no ser por esta particularidad *Bacillus thuringiensis* no habría motivado las investigaciones que se realizan en este campo desde hace algunos años.

Como será expuesto en lo que sigue, luego de una década de estudios bioquímicos llevados a cabo sobre la  $\delta$ -endotoxina de esta especie (entre los años 1970 y 1980), ha surgido el interés por el estudio de la genética de estos bacilos. En efecto, numerosos laboratorios se han interesado en el determinismo genético de la síntesis de la toxina. En este sentido, el estudio de los aspectos genéticos de la síntesis y regulación en estos bacilos implica la superación de obstáculos diversos tanto tecnológicos como teóricos. El desarrollo de nuevas técnicas aplicadas a estos microorganismos (técnicas de extracción y transferencia de ADN, por ejemplo), representa uno de tales obstáculos.

Los trabajos aquí presentados, se circunscriben a la resolución de este tipo de problemas, de manera de poder contar con un buen manejo de estos bacilos tanto a nivel fisiológico como genético.

### 1. ASPECTOS GENERALES

Los agentes de control biológico de plagas han despertado gran interés en los últimos años. Esto se debe en parte, a la toma de conciencia acerca de los peligros del uso indiscriminado de pesticidas químicos.

Por otro lado, es conocido el hecho de que los insecticidas sintéticos no sólo afectan a otros insectos beneficiosos, sino que por su persistencia en el ambiente son particularmente peligrosos.

La relación entre insecticidas químicos y mutaciones, cáncer, enfermedades asociadas en humanos, daño a la vida silvestre y toxicidad en plantas, ha sido ampliamente demostrada en los últimos 20 años. Es más, las poblaciones de insectos tienden a adquirir resistencias que originan nuevos brotes de plagas rápidamente. Todo esto, ha generado un cambio de mentalidad respecto del uso de estos productos químicos.

En la última década, los avances de la biotecnología han permitido contar con los medios necesarios para encarar el desplazamiento de los insecticidas sintéticos que actualmente dominan el mercado.

Las ventajas del uso de agentes biológicos en el control de plagas residen justamente en su alta especificidad y su naturaleza ecológicamente sana, así como en la baja o nula resistencia desarrollada por los insectos susceptibles.

## Introducción

Los agentes de control biológico están constituidos por organismos de naturaleza variada como: virus, bacterias, hongos y protozoarios (ver Tabla 1). Los virus de insectos son altamente específicos; por ejemplo, los de la familia *Baculoviridae* no presentan similitud alguna estructural o bioquímica con virus de vertebrados o plantas superiores. Sin embargo, los insecticidas virales presentan la desventaja de ser de acción más lenta que sus equivalentes químicos

Una gran parte de las bacterias y hongos insecticidas, son patógenos facultativos que afectan al huésped por diferentes mecanismos como invasión de tejidos y/o producción de toxinas (MILLER *et.al.*, 1983).

Las bacterias pueden dividirse en tres tipos ecológicos: 1) patógenos obligados como *Bacillus popilliae* o *Bacillus lentimorbus*, 2) bacilos productores de toxinas cristalinas como *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis*, o 3) patógenos facultativos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Achromobacter sp.*

Cerca de 100 tipos de bacterias han sido descritas como entomopatógenos, pero sólo cuatro han sido seriamente consideradas como agentes de control. Este grupo está constituido por bacilos esporulantes. *Bacillus popilliae* y *Bacillus lentimorbus*, patógenos para larvas de escarabeidos, crecen en la hemolinfa de estas larvas y acumulan billones de esporas antes de matar al huésped. Estas esporas permiten sobrevivir al patógeno en estado latente por largos períodos y constituyen su medio de diseminación. *Bacillus sphaericus* sintetiza una toxina capaz de matar larvas de dípteros (específicamente mosquitos), si bien no hay aún formulaciones comerciales disponibles.

TABLA 1: MICROORGANISMOS ENTOMOPATOGENICOS

GRUPO	ESPECIES REPRESENTATIVAS	ORDENES DE INSECTOS SUSCEPTIBLES
Virus	<i>Heliothis</i> NPV* <i>Autographa californica</i> NPV	Lepidopteros Hymenopteros, Dipteros, Coleopteros y otros
Hongos	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarrhizium anisopliae</i>	Lepidopteros, Hymenopteros, Coleopteros Dipteros
Bacterias	<i>Bacillus popilliae</i> <i>Bacillus sphaericus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>  <i>Clostridium malacosome</i> <i>Pseudomonas auriginosa</i>	Coleopteros Dipteros, Lepidopteros, Dipteros, Coleopteros Lepidopteros Amplio espectro de acción

\* *Nuclear polyhedrosis virus*

## Introducción

Este entomopatógeno se está estudiando con gran interés, ya que resulta altamente atractivo por su alta eficacia y persistencia en ambientes acuáticos.

De estos cuatro agentes, el único grupo de bacilos que ha sido desarrollado con éxito como insecticida, está constituido por *B. thuringiensis*.

Su uso ha sido recomendado en campos de cultivo, árboles, huertas y más recientemente en grano almacenado para el control de larvas de lepidópteros (ver Tabla 2).

La subespecie *israelensis* es efectiva contra larvas de dípteros como moscas y mosquitos, y difiere en varios aspectos de las demás subespecies de *thuringiensis*. Recientemente, se ha descrito una subespecie tóxica para algunas larvas de coleópteros (FALCON, 1971).

La patogenicidad de estos bacilos radica en la producción de inclusiones cristalinas tóxicas durante la esporulación; dichos cristales, constituidos por glicoproteínas, al ser ingeridos por las larvas susceptibles, ejercen sus efectos tóxicos si bien el mecanismo exacto no es todavía conocido.

Existe un gran interés por parte de numerosos laboratorios en el estudio de estos bacilos, ya que la manipulación de los genes de las toxinas representa un gran potencial de aplicación. Por otro lado, el estudio de la regulación de la síntesis de cristal larvicida, así como de la localización y estructura de los genes responsables de dicha síntesis, representa un desafío en sí mismo debido a las particularidades del sistema.

## Introducción

**TABLA 2: PLAGAS SUSCEPTIBLES AL CONTROL CON PREPARACIONES**

**DE *Bacillus thuringiensis***

<b>PLAGA</b>	<b>Trichoplusia ni</b>	<b>Handuca sexta</b>	<b>Handuca Quinque Maculata</b>	<b>Lycantria Dispar</b>	<b>Helio - this zea</b>	<b>Colias erytheme</b>	<b>Plodia interpunctella</b>
<b>Cultivos afectados</b>	<b>Coles, apio, lechuga, papa,</b>	<b>Tabaco</b>	<b>Tomate</b>	<b>Forestaciones</b>	<b>Algodón</b>	<b>Alfalfa</b>	<b>Grano almacenado</b>

### 2. ASPECTOS APLICADOS

Un insecticida microbiano debe reunir ciertas condiciones de aceptabilidad, entre ellas, ser: a) de formulación aplicable (como polvo o spray, solo o en conjunción con productos químicos, parásitos u otros patógenos), b) almacenable, c) económico, d) fácil de producir, e) seguro y estéticamente aceptable, f) no debe dejar residuos peligrosos, especialmente cuando se utilizan diluyentes o materiales de soporte.

Puesto que deben ser ingeridos para causar efecto, los virus y bacterias deben ser aplicados en el momento en que el insecto susceptible comienza a alimentarse, es decir, antes de que haya causado daños económicos importantes. Los hongos patogénicos no deben ser necesariamente ingeridos para ejercer su acción, ya que son capaces de matar al insecto colonizando su superficie.

En la década pasada se han desarrollado tecnologías que involucran métodos fermentativos (para producir insecticidas bacterianos y micóticos) o de cultivo de células y establecimiento de insectarios (para la producción de virus).

Si bien existen aproximadamente 1500 agentes entomopatógenos naturales conocidos, sólo unos pocos han sido aplicados con éxito al control biológico de plagas. Entre los bacilos entomopatógenos, se ha dado especial énfasis al desarrollo comercial de *Bacillus thuringiensis* cuya aplicación a diversos cultivos ha sido mundialmente practicada durante dos décadas.

El valor comercial de *B. thuringiensis* reside en el llamado cristal proteico insecticida (CPI) o  $\delta$ -endotoxina, que se sintetiza durante la esporulación. La administración por vía oral

## Introducción

de CPI a larvas de insectos lepidópteros o dípteros causa daños en el epitelio digestivo e interrupción de la alimentación (FAST *et.al.*, 1978)

Se cuentan en la actualidad más de 400 formulaciones registradas de *Bacillus thuringiensis* aprobadas para su uso en el campo (ver Tabla 3). La mayor ventaja de la utilización de este sistema radica en la producción de esporas fácilmente formulables para su uso con los equipos de aplicación convencionalmente utilizados en control de plagas; asimismo, estas formulaciones resultan altamente seguras para la salud de humanos, otros mamíferos y demás fauna beneficiosa (ARONSON *et.al.*, 1986).

Por otro lado, preparaciones de esporas y cristales de *B. thuringiensis* aplicadas al follaje, son lavadas por efecto de las lluvias y pueden ser inactivadas por luz ultravioleta o temperatura (GRIEGO y SPENCE, 1978). Es por esto que *B. thuringiensis* debe ser usado como un insecticida convencional y ser aplicado repetidamente para obtener una protección de los cultivos a largo plazo.

La biotecnología puede afectar la producción industrial y la eficiencia de los costos de los agentes de control biológico de plagas. Respecto de la producción de CPI, la investigación ha sido dirigida a la producción de mutantes asporogénicos de *B. thuringiensis* (YOUSTEN, 1986) que podrían aumentar la productividad de 3 a 5 veces. También, se han encarado estudios que involucran la manipulación genética tendiente a modificar fundamentalmente las características moleculares de los diferentes CPI. En este sentido, se han logrado resultados espectaculares desde el punto de vista de la Biología Molecular como por ejemplo el clonado del gen de la  $\delta$ -endotoxina de la subespecie *kurstaki* (la más

TABLA 3: PRODUCTOS COMERCIALES DE *Bacillus thuringiensis*

SUBESPECIE/SEROTIPO	NOMBRE COMERCIAL	INSECTO BLANCO	FABRICANTE/PAIS
<i>kurstaki</i> H3 (HD-1)	Dipel	Lepidópteros	ABBOTT/USA
<i>kurstaki</i> H3 (HD-1)	Turicide	Lepidópteros	SANDOZ-WANDER/USA
<i>thuringiensis</i> H-1	Bathurin	Lepidópteros	CHEMAPOL-BIOKRMA/CHECOSLOVAQUIA
<i>kurstaki</i> H3 (HD-1)	Sporeine	Lepidópteros	LIBEC/FRANCIA
<i>dendrolimus</i> (H-4)	Dendrobacillin	Lepidópteros	GLAVNIKROBIOPROM/USSR
<i>thuringiensis</i> (H-1)	Brotoksy Bacillin	Lepidópteros	AGRICULTURAL MICROBIOLOGY/USSR
<i>thuringiensis</i> H-1(exotoxina)	Toxobakterin	Lepidópteros	GLAVNIKROBIOPROM/USSR
<i>israelensis</i> H-14	Bactmos, Vectobac, Teknar	Culex sp Aedes sp Anopheles sp	BIOCHEM PRODUCTS/FRANCIA ZOEKAN/SANDOZ/USA

## Introducción

activa contra larvas de lepidópteros) en *Pseudomonas fluorescens* (colonizadora de raíces vegetales), con el objeto de proteger plantas de maíz contra orugas que se alimentan de sus raíces (OBUCOWICZ *et.al.*, 1987). O la construcción de plantas transgénicas de tabaco conteniendo un gen de  $\delta$ -endotoxina que la planta es capaz de expresar contra el insecto blanco (VAECK *et.al.*, 1987).

A pesar de estos logros, el uso extensivo de estos productos recombinantes es aún muy limitado por razones de seguridad ambiental y comercialización.

El método principal para la producción comercial de *B. thuringiensis* es actualmente la fermentación en masa, cuyo producto final contiene células, esporas, enzimas extracelulares y proteínas, además de los CPI.

En cuanto a la resistencia de los insectos, un solo caso ha sido reportado hasta el momento. Se trata de un lepidóptero que ataca grano almacenado (*Plodia interpunctella*), que es capaz de desarrollar resistencia en unas pocas generaciones (Mc GAUHEY, 1985). Sin embargo, este caso constituye una excepción y se espera que las técnicas de Ingeniería Genética sean útiles en la obtención de organismos modificados que permitan prever y solucionar este tipo de problema. Asimismo, estas técnicas harán posible obtener complejos espóra-cristal más resistentes a condiciones ambientales extremas y con rangos de huésped más amplios, aumentando de esta manera la efectividad y rentabilidad de las formulaciones.

3. SUBESPECIES DE *Bacillus thuringiensis*

Existen más de 1000 aislamientos de bacilos formadores de cuerpos paraesporales descritos. Algunos de los más estudiados se presentan en la tabla 4. de Barjac y colaboradores, han efectuado en el Instituto Pasteur (centro de referencia de estos bacilos) una clasificación en base al serotipo flagelar (deBARJAC *et.al.*, 1973).

En general, existe correlación entre el serotipo flagelar y el serotipo del cristal; una excepción a esta regla la constituye la subespecie *kurstaki*, ya que posee dos tipos de cristal (KRYWIENCZYK *et.al.*, 1978), con diferentes características y especificidades. Los tipos de cristal han sido subdivididos en base a su espectro de acción.

Dulmage (DULMAGE, 1971) examinó la actividad de 38 aislamientos conteniendo el serotipo *thu* en sus cristales (de la subespecie *thuringiensis*) y 36 con serotipo k-1 (de *kurstaki*). Comparó varios tipos de larvas de insectos susceptibles con el fin de encontrar la potencia relativa de las toxinas.

Este estudio resultó en un re-agrupamiento en 19 tipos. Esta subdivisión, hace hincapié en la complejidad y variabilidad de los cristales de *Bacillus thuringiensis*. Una posible explicación puede basarse en el intercambio genético a través de elementos extracromosómicos o elementos transponibles entre estas subespecies, como será oportunamente discutido.

TABLA 4: LOCALIZACION DE LOS GENES DE TIPO I Y II DESCRIPTOS POR Klier *et.al.*.

	Genes		Origen
	I	II	
<i>berliner</i>	+	+	C P
<i>kurstaki</i>	+		P
<i>dendrolimus</i>		+	P
<i>aizawai</i>	+	+	C P
<i>subtoxicus</i>	+		C

4. TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

El componente predominante de las inclusiones para esporales de la mayor parte de las subespecies de *Bacillus thuringiensis* está constituido por polipéptidos de 130 a 150 Kd (BULLA *et.al.*, 1977). Sin embargo, existen variaciones en cuanto al número, forma y composición de estas inclusiones (Ver Tabla 4).

La síntesis de cristal, que aparece a partir del estadio II de la esporulación, se efectúa a partir de un ARN mensajero relativamente estable (PETIT-GLATRON y RAPOPORT, 1976) transcrito preferencialmente por una ARN polimerasa específica de la esporulación (KLIER *et.al.*, 1978). Al final del proceso, el cristal es liberado de la célula madre, y representa aproximadamente 25% del peso seco de la bacteria. La estructura cristalina de la inclusión resulta del ensamblaje de subunidades proteicas o protoxinas en las cuales la masa molecular varía según las subespecies (BULLA *et.al.*, 1977; HUBER *et.al.*, 1981).

El cristal proteico digerido a pH alcalino por las proteasas del tubo digestivo del insecto, es transformado en toxinas activas de 50 a 70 Kd (LECADET *et.al.*, 1962; BULLA *et.al.*, 1979). Estas observaciones han sido hechas para la mayor parte de la cepas en las cuales la toxicidad para larvas de lepidópteros se halla asociada a un cristal de tipo bipiramidal o cuboide (Ver Figura 1). La subespecies *israelensis* constituye un caso diferente que será presentado en ítem aparte.

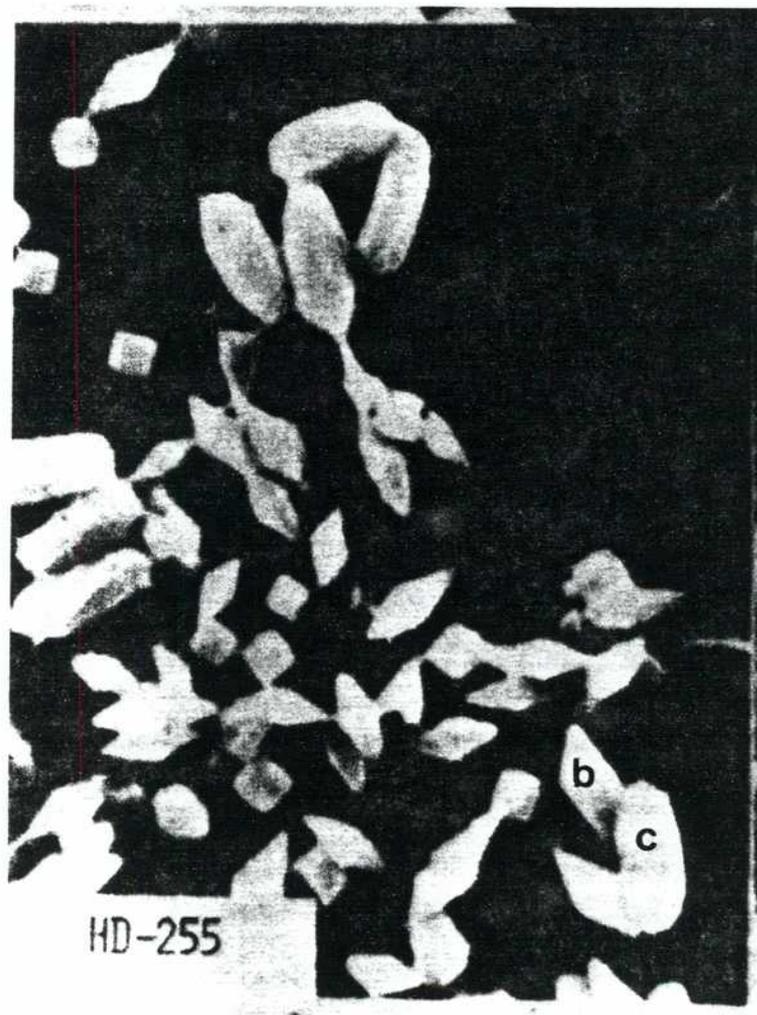


Figura 1

Cristales de *B. thuringiensis* subespecie *kurstaki* HD-255

Microfotografía de barrido, mostrando los dos tipos de cristal en *kurstaki* Hd-255

b: bipyramidal (tóxica para larvas de lepidópteros)

c: cuboidea (tóxica para dípteros)

(Tomado de Iizuka y Yamamoto, 1983)

## Introducción

En la subespecie *kurstaki* HD-1 se han descrito dos actividades tóxicas: la actividad larvicida en Lepidópteros se asocia a un polipéptido de 130 Kd o P<sub>1</sub>, mientras que la actividad tóxica en Dípteros se halla asociada a la presencia de polipéptidos de 65 y 67 Kd (YAMAMOTO y McLAUGHLIN, 1981; KIM *et.al.*, 1984); la proteína de 65 Kd o P<sub>2</sub>, es de naturaleza diferente a la  $\delta$ -endotoxina de 130 Kd.

Recientemente, Heider y colaboradores (HEIDER *et.al.*, 1987), han demostrado que una cepa de la subespecie *aisawai* (serotipo 7) sintetiza una  $\delta$ -endotoxina de 130 Kd que resulta tóxica en larvas de lepidópteros y dípteros. Esta doble especificidad resultaría de una proteólisis diferencial de la protoxina por las proteasas de los insectos.

Existen otras dos subespecies que pueden ser distinguidas en función de su cristal proteico: *tenebrionis* y *san diego* de serotipo 8, son tóxicas para larvas de coleópteros y sus cristales (de estructura rectangular) están constituidos por subunidades proteicas con masas moleculares de alrededor de 65 Kd (KRIEG *et.al.*, 1983; BERNHARD, 1986; HERRNSTADT *et.al.*, 1986).

Un cierto número de cepas producen una toxina termoestable o  $\beta$ -exotoxina desde el comienzo de la fase de esporulación (LECADET y de BARJAC, 1981). Esta toxina es de naturaleza nucleotídica; se ha estudiado su estructura molecular, así como su mecanismo de acción sobre la ARN polimerasa (FARKAS *et.al.*, 1969; SEBESTA *et.al.*, 1970). Su efecto inhibitorio sobre esta enzima, hace que el espectro de acción de la  $\beta$ -exotoxina sea menos específico que el de la  $\delta$ -endotoxina. En efecto, ésta es activa contra numerosos insectos pertenecientes a diferentes órdenes. De este modo, su aplicación en agricultura se hace más difícilmente

controlable, y no está autorizada en la mayor parte de los países. Más aún, se han observado efectos teratogénicos de la  $\beta$ -exotoxina en coleópteros.

Existe otra forma, la  $\alpha$ -exotoxina, que se produce durante la fase vegetativa de numerosas cepas de *Bacillus thuringiensis* y de *Bacillus cereus* (una bacteria emparentada evolutivamente con *B. thuringiensis*). Es probable que se trate de fosfolipasa C o lecitinasa, sintetizada en cantidades importantes por este microorganismo (TAGUCHI *et.al.*, 1980).

En cuanto al modo de acción de la  $\delta$ -endotoxina, se admite generalmente que la toxina se adhiere en forma específica sobre las células epiteliales del intestino del insecto. Esta unión sería de naturaleza glicoproteica, para las toxinas activas en lepidópteros, y de naturaleza lipídica para las activas en dípteros (THOMAS y ELLAR, 1983; KNOWLES *et.al.*, 1984). Se trataría de un desequilibrio a nivel de la permeabilidad de la membrana de estas células (SACCHI *et.al.*, 1986; KNOWLES y ELLAR, 1987), el cual provocaría en pocos minutos lesiones de importancia en el epitelio intestinal, así como una parálisis del tubo digestivo y mandíbula.

### 4.1. Dominios activos e inactivos de la $\delta$ -endotoxina

El cristal glicoproteico de la subespecie *kurstaki* denominado P<sub>1</sub> (activo contra larvas de lepidópteros) es solubilizado en el tubo digestivo y convertido por las proteasas del insecto,

## Introducción

en una molécula tóxica con una masa molecular comprendida entre 30 y 80 Kd (FAST *et.al.*, 1978).

Recientemente, Yamamoto y colaboradores (YAMAMOTO *et.al.*, 1981) encontraron que la protoxina de *Bacillus thuringiensis* HD-1 y HD-73 eran clivadas por proteasas digestivas, a un polipéptido de 62 Kd que llamaron "núcleo resistente", activo contra larvas en los ensayos biológicos.

Los estudios más recientes, están de acuerdo en asignar un peso molecular de entre 55 y 70 Kd a la toxina activa de P<sub>1</sub>. La porción activa de P<sub>1</sub>, se localiza en el fragmento N-terminal del polipéptido (NAGAMATSU *et.al.*, 1984), siendo los primeros 28 aminoácidos no esenciales.

En cuanto a la porción C-terminal, se halla conservada en diferentes subespecies, lo que llevó a pensar que tendría alguna función en la toxicidad. Sin embargo, los estudios efectuados hasta el momento indicarían que no es el caso.

Se le han asignado posibles funciones a este dominio de la  $\delta$ -endotoxina como: protección de la protoxina, participación en el mecanismo de unión a las células epiteliales o en los procesos de deposición y ensamblado de la proteína en forma de inclusión cristalina (FAST *et.al.*, 1978; KNOWLES *et.al.*, 1984).

4.2. Relación entre la síntesis de cubierta esporal, germinación y formación del cuerpo paraesporal

Las esporas de la mayor parte de las subespecies de *B. thuringiensis* germinan lentamente. Sin embargo, las esporas de muchos mutantes acristalíferos de la subespecie *kurstaki* HD-1, germinan rápidamente y poseen cubiertas esporales completas. Por alguna razón, el mecanismo de germinación es defectivo en esporas (ARONSON *et.al.*, 1982) provenientes de cepas capaces de formar inclusiones paraesporales. Existen deficiencias en las cubiertas esporales de dichas cepas que pueden involucrar mecanismos relacionados con la germinación.

En subespecies con cubiertas más delgadas, existe deposición de protoxina en la superficie de la espora, de manera que las esporas *per se* resultan tóxicas, a menos que se disocien las proteínas con lavados que las remuevan.

Una excepción a este fenómeno, está constituida por la subespecie *israelensis* que produce esporas no tóxicas que germinan rápidamente. En esta subespecie se forman inclusiones que no se adhieren a la superficie de la espora, la que presenta una cubierta completa. Aparentemente, un segundo evento sería necesario para coordinar la síntesis de protoxina con la disminución de la formación de proteínas de cubierta esporal.

Si el "propósito" de la síntesis de protoxina es producir un entorno rico en nutrientes (la hemolinfa del insecto), podría resultar adaptativamente ventajoso producir esporas que contengan protoxina (o inclusiones que directamente se encuentren

dentro del exosporio, como en el caso de la subespecie *finitimus*). Existe evidencia en estos bacilos, de que la regulación de la síntesis de cubierta esporal está correlacionada con la síntesis de protoxina. Algunas variedades acristalíferas obtenidas por diferentes métodos presentan una cubierta esporal completa y propiedades de germinación rápida (ARONSON, 1986).

En conclusión, *Bacillus thuringiensis* tiene la capacidad de producir cubiertas esporales completas, pero esta potencialidad no es expresable, probablemente debido a alguna propiedad de los genes que codifican para la protoxina u otros genes involucrados en su regulación.

### 4.3. Ensayos Biológicos

Se han desarrollado varias formas de bio-ensayo para esporas y cristales (o toxinas) de *Bacillus thuringiensis*. Estas incluyen la evaluación de la mortalidad (DULMAGE *et.al.*, 1971) o de la disminución de las funciones alimentarias (BURGERJON, 1962), por ensayo de: 1) preparaciones administradas a larvas por vía oral, o 2) hojas o plantas pre-tratadas con las soluciones de ensayo y ofrecidas como alimento (DULMAGE, 1973).

La elección del insecto, el estadio larval, el método de administración, el parámetro medido como indicador de toxicidad y las condiciones ambientales de los ensayos, pueden afectar los resultados de éstos y, por lo tanto, deben ser cuidadosamente evaluados.

## Introducción

Existe una alternativa a los ensayos sobre animales enteros para preparaciones solubles de proteínas tóxicas. Estos ensayos se basan en la sensibilidad que ciertas líneas celulares (como la CF-1 del gusano del abeto) presentan frente a preparaciones de toxina activada (ARONSON, 1986). En estos ensayos, la actividad de las preparaciones puede ser medida por observación histopatológica (MURPHY *et.al.*, 1976), por coloración vital (THOMAS y ELLAR, 1983b), por cuantificación de lisis celular (THOMAS y ELLAR, 1983a), o por ensayo de liberación de enzimas intracelulares, como lactato deshidrogenasa (EBERSOLD *et.al.*, 1980).

En 1971 se adoptó en los Estados Unidos, un ensayo estandarizado para la comparación de las potencias de diferentes materiales, en referencia a una preparación estándar de la subespecie *kurstaki* HD-1 (DULMAGE, 1973; BURGERJON y DULMAGE, 1977). En bioensayos de materiales sobre larvas acuáticas de dípteros, existe un grupo de problemas totalmente diferentes que se relacionan con la conservación de las muestras en las zonas de alimentación de las larvas (BURGESS, 1982). Algunas especies necesitan aguas quietas y otras en movimiento, para asegurar la ingestión de las muestras a ser ensayadas. En este sentido, se cuenta con un método estándar para bioensayos de *Bacillus thuringiensis israelensis*, contra larvas de mosquito desarrollado por la OMS (WHO, 1981). Es importante notar que los ensayos efectuados con cristales solubilizados, en larvas de mosquitos, resultan en una pérdida de la eficiencia ya que existen proteasas liberadas al medio por las larvas, que inactivan total o parcialmente la toxina (GARCIA PATRONE *et.al.*, 1986).

### PLASMIDOS DE *Bacillus thuringiensis*

En general, las subespecies de *Bacillus thuringiensis* poseen una porción substancial de su información genética contenida en plásmidos; el número y tamaño de los plásmidos varía considerablemente (Ver Figura 2). En las subespecies que presentan el mayor número de elementos extracromosómicos, como *berliner* o *kurstaki*, existe un amplio rango de tamaños, con un grupo mayoritario alrededor de los 4 a 6 Md, otro constituido por plásmidos mayores de 30 Md y algunos megaplásmidos de más de 100 Md.

En subespecies con pocos plásmidos (*subtoxicus* o *finitimus*), éstos tienden a ser mayores (ARONSON, 1986). Existen variaciones en los perfiles plasmídicos reportados por diferentes laboratorios para las mismas subespecies; dichas variaciones probablemente se deben a: 1) procedimientos diferentes de extracción que pueden afectar sobre todo a los megaplásmidos (>100 Md), o 2) diferencias intrínsecas a los diferentes aislamientos dentro de la misma subespecie.

Los primeros resultados que indicaron la presencia de ADN extracromosómico en *B. thuringiensis* (GONZALES y CARLTON, 1980) también demostraron que existía una relación entre la síntesis de  $\delta$ -endotoxina y la presencia de ciertos plásmidos. En efecto, los autores pudieron establecer una correlación entre la degradación del cristal proteico y la pérdida de una parte o todo el ADN extracromosómico en estos bacilos.

El análisis más profundo de los contenidos plasmídicos de numerosas cepas, ha conducido a la caracterización física de los plásmidos en función de sus masas moleculares (GONZALES *et.*

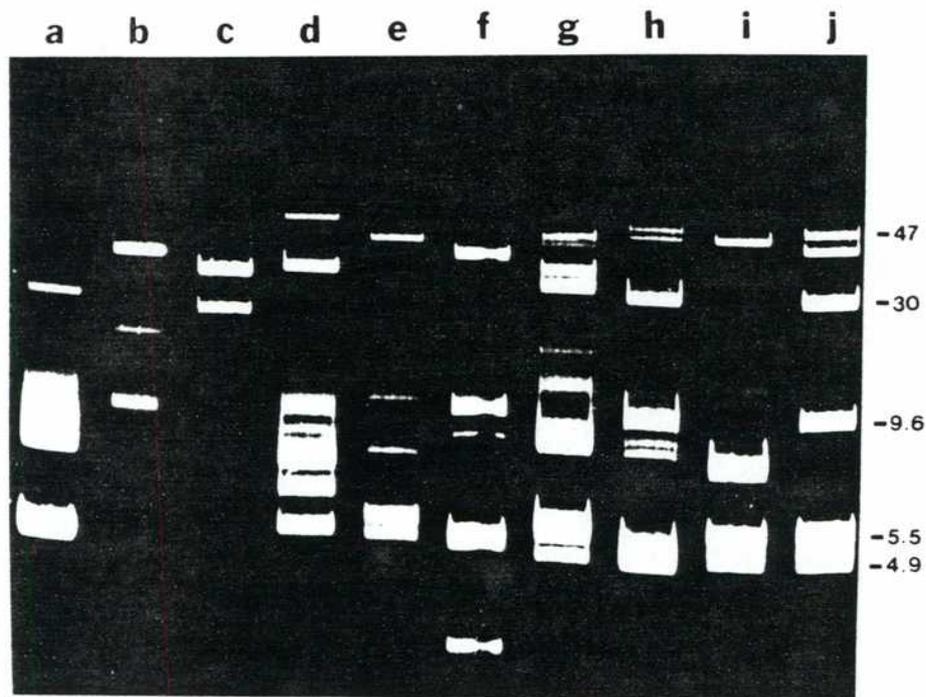


Figura 2

Diversidad plasmídica en *B. thuringiensis*

Contenido plasmídico de diferentes subespecies de *Bacillus thuringiensis*:

a: *tolworthii*; b: *darmstadiensis*; c: *sotto*; d-g: *thuringiensis* F-10, HD-290, H-120, HD-2; h-j: *kurstaki* Hd-244, HD-73, HD-1. Los números en el margen indican el tamaño de los plásmidos en Md. (Tomado de WHITHELEY *et al*, 1982).

## Introducción

al., 1981; LERECLUS *et.al.*, 1982). En la Tabla 5 es posible apreciar la complejidad y diversidad de los esquemas plasmídicos puestas en evidencia por técnicas como la electroforesis en geles de agarosa o por microscopía electrónica. Es importante notar que todas aquellas cepas que son capaces de sintetizar un cristal tóxico, presentan plásmidos de tamaño elevado (superior a 30 Md).

La hipótesis de una correlación sobre la producción de cristal proteico insecticida y la presencia de ciertos plásmidos ha motivado numerosos estudios sistemáticos que permitieron asociar la desaparición del cristal (fenotipo acristalífero o Cry-) con la pérdida de un plásmido específico.

Estos estudios se realizaron en parte con mutantes espontáneas (Cry-) y en parte con cepas tratadas con agentes como SDS (sodio dodecilsulfato) o temperatura (42°C), que provocan pérdida de plásmidos. De estas investigaciones, se concluyó que, por ejemplo, en el caso de tres cepas: *thuringiensis* HD-2, *kurstaki* HD-73 e *israelensis* HD-567, los plásmidos de 75, 50 y 72 Md se encontraban respectivamente ausentes en las mutantes estudiadas (GONZALES y CARLTON, 1981; GONZALES *et.al.*, 1982).

Asimismo, se llevaron a cabo estudios sobre homologías moleculares existentes entre los diferentes plásmidos de 11 cepas productoras de cristal. Dichos estudios han demostrado que la diversidad física de los arreglos plasmídicos, no se correlacionaba a nivel molecular.

Como ya dijéramos, se pueden distinguir dos grupos de tamaño, uno superior a 30 Md y otro inferior. Estos dos grupos no presentan homología alguna, si bien internamente existe una conservación parcial o total de ciertos plásmidos entre los diferen-

**TABLA 5: CONTENIDO PLASMIDICO DE 19 CEPAS DE  
*Bacillus thuringiensis* PRODUCTORAS DE  $\delta$ -ENTODOXINA**

Cepa/serotipo	Número de plásmidos	Plásmidos observados por electroforesis en geles de agarosa*
<i>berliner</i> /1 1715	17	3.9;5.4;7.5;9.5;15; 17;21;25;28;39;42; 51;60;77;100;120;180
<i>thuringiensis</i>	9	5.2;6.2;7.2;7.6;32; 37;54;57;75;≈150
<i>kurstaki</i> HD1/3a3b	8	1.5;5.2;5.6;9.3;10; 30;47;54
<i>kurstaki</i> HD73/3a3b	6	4.9;5.2;5.4;7.5;50;
<i>galleriae</i> G1/5a5b	5	6.3;8.6;20;51;74
<i>subtoxicus</i> /6	2	52;56
<i>aizawai</i> 7-21/7	8	4;6.6;7.5;8.9;15;18; 40;50
<i>israelensis</i> HD569/9	9	3.2;4.1;4.9;≈10; 10.5;66;72;≈100;≈130

\* Masas moleculares en Md

Las masas moleculares de las cepas *berliner* 1715 y *thuringiensis* HD-2, fueron determinadas por microscopía electrónica por mediciones del contorno de la forma circular abierta. Estos plásmidos han sido utilizados como marcadores en geles de agarosa para determinar el tamaño de otros plásmidos de *Bacillus thuringiensis*.

## Introducción

tes serotipos estudiados (LERECLUS *et.al.*, 1982). Es más, se ha mostrado que en una misma cepa, ciertos plásmidos presentan homologías entre ellos y, a su vez, existen secuencias homólogas entre el ADN cromosómico y ciertos megaplásmidos.

Por otro lado, bajo ciertas condiciones de cultivo, se han observado rearrreglos ya sea entre dos tipos de plásmidos, o entre plásmidos y cromosoma (GONZALES *et.al.*, 1981 y 1982). Esta inestabilidad puede explicarse por fenómenos de recombinación homóloga. Sin embargo, la presencia de elementos transponibles y secuencias de inserción en los plásmidos es también una fuente de rearrreglos permanentes, como lo veremos más adelante.

Por último, es importante destacar el posible papel que los plásmidos de *Bacillus thuringiensis* jugarían en la regulación de la síntesis de proteínas, que será discutido en el ítem correspondiente.

## 6. SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GENETICA EN *B. thuringiensis*

### 6.1. Transducción

Descrito por primera vez por Thorne (THORNE, 1978), el sistema de transducción en *Bacillus thuringiensis* ha sido utilizado por numerosos equipos para localizar marcadores cromosómicos y determinar así, grupos de ligamientos en diferentes cepas de estos microorganismos (THORNE, 1978; PERLAK *et.al.*, 1979; LECADET *et.al.*, 1980; LANDEN *et.al.*, 1981).

## Introducción

Varios fagos transductores han sido aislados y usados en estudios preliminares; dos fagos han sido los más utilizados: CP54 de *B. cereus* y el fago  $\Phi$ 63 de *B. thuringiensis* (BARSOMIAN *et.al.*, 1984; HEIERSON *et.al.*, 1983). Estos dos fagos tienen la capacidad de transferir ADN por un mecanismo de transducción generalizada con frecuencias desde  $5 \times 10^{-7}$  a  $5 \times 10^{-8}$  para un marcador determinado.

Un derivado del fago CP54, denominado CP54Ber, fue el más estudiado. Posee una estructura icosaédrica, y su material genético está constituido por una molécula de ADN lineal de aproximadamente 70 Md (LECADET *et.al.*, 1980).

En la Tabla 6, se han reunido un cierto número de loci correspondientes a marcadores de auxotrofia y resistencia a antibióticos, en cinco grupos de ligamiento. Si bien los estudios han sido efectuados con cepas diferentes, estos resultados pueden constituir una base de trabajo para un estudio más fino acerca del determinismo genético de la síntesis de  $\delta$ -endotoxina.

### 6.2. Conjugación

Se ha puesto en evidencia un fenómeno asimilable a la conjugación que permite la transferencia de un número limitado de plásmidos en *Bacillus thuringiensis* (GONZALES *et. al.*, 1982). Dicho mecanismo necesita del contacto celular de dos poblaciones bacterianas en crecimiento y no resulta efectivo para todas las cepas de *Bacillus thuringiensis* ni para todos los plásmidos presentes en dichas cepas.

**TABLA 6: GRUPOS DE LIGAMIENTO DE MARCADORES CROMOSOMICOS  
OBTENIDOS POR CO-TRANSDUCCION EN *Bacillus thuringiensis***

CEPA	MARCADORES <sup>a</sup>	GRUPO DE LIGAMIENTO <sup>b</sup>
<i>berliner</i> 1715	asp 1, trp 1, his 1, lys 1, cys 4	I
<i>thompsoni</i>	his 1, cys 1, cys 2, leu 2, trp 1	I
<i>berliner</i> 1715 <i>thompsoni</i>	met D o met C arg 0	II
<i>berliner</i> 1715	met A, pen A, cys A, rif	III
<i>galleriae</i>	nal A, rif A, str A,	IV
<i>berliner</i> 1715	gly 1 ura 1 gly 2	IV

a: la nomenclatura de los marcadores corresponde a la utilizada para *Bacillus subtilis*.

b: valores de co-transducción de marcadores mayores que 10%.

## Introducción

En efecto, ciertos plásmidos son transferibles con alta frecuencia, mientras que otros no lo son; es más, entre los plásmidos transmisibles no todos son auto-transferibles. Este es el caso del plásmido de 75 Md de la cepa *israelensis* HD-567 y de los plásmidos pequeños de la cepa *kurstaki* KTo. La transferencia del primero, requiere de la presencia del plásmido de 135 Md en esa cepa y en el segundo caso, (plásmidos de 5,2 y 5,4 Md) la transferencia ya no es posible cuando se encuentran aislados como únicos residentes en la cepa HD-1 de *kurstaki*. Es posible que la transferencia de esos plásmidos dependa de la presencia de un plásmido de 54 Md en la cepa original KTo. (GONZALES *et.al.*, 1982; GONZALES y CARLTON, 1984).

Si bien no se han llevado a cabo estudios sobre el determinismo genético de este proceso, las evidencias disponibles indicarían que no se trata de un fenómeno de permeabilidad pasiva, sino más bien de un sistema limitado a ciertos plásmidos autotransferibles o movilizables. En este sentido, los resultados reportados hasta el momento, parecen indicar que los determinantes necesarios y suficientes para la transferencia de plásmidos, se encuentran asociados a plásmidos de masa molecular superior a 40 Md (ver Tabla 7).

Con respecto a la transferencia interespecífica, se ha logrado introducir el plásmido conjugativo pAM $\beta$ 1 de *Streptococcus faecalis* en varias cepas de *Bacillus thuringiensis* por conjugación sobre filtros de nitrocelulosa (LERECLUS *et.al.*, 1983). La transferencia recíproca (es decir desde *Bacillus thuringiensis* a *S. faecalis*) también ha sido demostrada. Este plásmido de amplio espectro de transferencia, que porta un gen de resistencia a eritromicina, se ha utilizado como marcador selectivo en cruzamien-

**TABLA 7: TRANSFERENCIA INTRAESPECIFICA DE PLASMIDOS  
EN *Bacillus thuringiensis***

Cepas donantes	Cepas receptoras Stra	Plásmidos transferidos	% de trans- ferencia <sup>b</sup>
<i>kurstaki</i> HD73-6	<i>thuringiensis</i> HD2	50Mdc 43Md 6,7Md 4,9Md	20 50
<i>kurstaki</i>	<i>kurstaki</i> HD1	5,6Md 5,2Md	≈50
<i>kurstaki</i> HD1	<i>thuringiensis</i> HD2	Ninguno	
<i>subtoxicus</i> Em <sup>R</sup> (pAMβ1) <sup>d</sup>	<i>kurstaki</i> HD1	52 o 56Md	>50
<i>israelensis</i> HD67	<i>israelensis</i> HD567-61	135Md 75Mde 68Md; 10Md	Variable

- a- En todos los casos los receptores son derivados acristalíferos
- b- Colonias Str<sup>R</sup> o Str<sup>R</sup>Em<sup>R</sup> (Str: Estreptomycin; Em: Eritromicina)
- c- La introducción de este plásmido restauró el fenotipo cristalífero
- d- La transferencia se observó entre los transconjugantes luego de una selección en Erm, indicando que el plásmido pAMβ1 presente en el donante había sido transferido
- e- La transferencia de este plásmido es posible sólo si el de 135Md se encuentra en la cepa dadora

## Introducción

tos intraespecíficos de *Bacillus thuringiensis*, y ha permitido facilitar la detección de transconjugantes que hubieren recibido plásmidos residentes, crípticos en su mayoría.

Plásmidos derivados de pAM $\beta$ 1, delecionados en su región de transferencia, no resultan conjugativos en *B. thuringiensis*, lo que sugiere una intervención de genes específicos en el sistema de conjugación de éstos (LERECLUS, 1987, no publicado).

Utilizando la transferencia interespecífica, Klier (KLIER *et.al.*, 1983) ha podido introducir un plásmido recombinante (pBT42) en una cepa acristalífera de la subespecie *kurstaki* que fue capaz de expresar la proteína tóxica de la cepa *berliner* 1715

Es asimismo posible, seleccionar la transferencia de marcadores cromosómicos utilizando receptores auxótrofos apropiados (CARLTON y GONZALES, 1984). En este caso también, los plásmidos juegan un papel central; en efecto, se ha observado que la transferencia de marcadores cromosómicos en un derivado de *kurstaki* HD-1 que carece de un megaplásmido de 110Md, aumenta su frecuencia en dos órdenes de magnitud respecto de la cepa original ( $10^{-7}$ ) (ARONSON, no publicado).

Paralelamente, el plásmido de 29 Md de *kurstaki* HD-1 se encuentra siempre en los transconjugantes, y parece ser esencial para la movilización cromosómica. Se ha detectado una región de homología de aproximadamente 2 Kb entre este plásmido y el cromosoma, que podría estar involucrada en el mecanismo de movilización.

## Introducción

La capacidad de intercambio genético entre plásmidos y entre éstos y marcadores cromosómicos, podría explicar en parte la variabilidad observada en cuanto a serotipos paraesporales dentro de un mismo serotipo flagelar (ARONSON, 1986). Asimismo, podrían ocurrir recombinaciones entre dos genes de proteína paraesporal, conduciendo a especies híbridas y contribuyendo a la evolución de protoxinas relacionadas.

En la naturaleza, los microorganismos rara vez alcanzan suficientes concentraciones como para que ocurra el intercambio genético por contacto celular. Sin embargo, la densidad celular es de hecho muy alta en la hemolinfa de las larvas susceptibles, y podría resultar apropiada para que ocurran fenómenos de conjugación que permitan intercambios genéticos evolutivamente favorables.

En conclusión, entre los mecanismos de transferencia genética conocidos en *Bacillus thuringiensis*, la conjugación ofrece un alto potencial para la formación de intercambios genéticos en la naturaleza, y constituye un método efectivo de introducción de plásmidos si bien muy limitado y poco controlable.

6.3. Transformación

No se ha reportado hasta el momento sistema alguno de transformación de células competentes de *Bacillus thuringiensis*. Por el contrario, numerosos intentos de transformación de protoplastos han sido llevados a cabo con resultados diversos. En este sentido, se han aplicado metodologías derivadas de la original de Chang y Cohen (CHANG y COHEN, 1979) descritas para protoplastos de *Bacillus subtilis*.

Dichos métodos se basan, en su gran mayoría, en la transformación de los protoplastos con ADN plasmídico en presencia de polietilenglicol. Las experiencias de transformación han sido llevadas a cabo con diferentes plásmidos aislados de organismos Gram positivos, y utilizando:

a) protoplastos obtenidos con altas concentraciones de lisozima, o

b) protoplastos generados por inducción autolítica.

Las experiencias de transformación reportadas, incluyen las realizadas con los plásmidos pBC16 de *B. cereus* (ALIKHANIAN *et.al.*, 1981), pUB110 (MITEVA *et.al.*, 1981) y pC194 (MARTIN *et.al.*, 1981; FISCHER *et.al.*, 1984) para protoplastos generados con altas concentraciones de lisozima (entre 7 y 10 mg/ml), y, muy recientemente, con pGR71 y pTV53 de *Bacillus subtilis*, para protoplastos generados por autólisis.

## Introducción

También recientemente (HEIERSON *et.al.*, 1986), se ha reportado un procedimiento de transformación de células vegetativas, tratadas con PEG en ausencia de lisozima, con frecuencias que varían entre  $10^{-7}$  y  $10^{-4}$  transformantes/célula/ $\mu\text{g}$  de ADN (utilizando pBC16).

En general, un análisis de estos resultados revela la existencia de problemas relacionados con las dos etapas críticas del proceso de transformación en protoplastos: 1) protoplastización y 2) regeneración.

En todos los casos, se trabajó con altas cantidades de ADN (entre 1 y 10  $\mu\text{g}$ ) y las frecuencias de transformación obtenidas fueron bajas y dependían fuertemente de las cepas utilizadas. En cuanto a la transformación con plásmidos recombinantes, aún no ha sido reportada.

Con respecto a la generación de protoplastos de *B. thuringiensis*, es conocida la resistencia que presentan estos microorganismos a los tratamientos por enzimas hidrolíticas de la pared, probablemente debida a la ausencia de grupo N-acetilo en las moléculas de mureína presentes en la pared celular de estos bacilos (HAYASHI *et.al.*, 1973).

Es por esto que se piensa que los protoplastos podrían formarse por una activación de autolisinas, antes que por la digestión enzimática de la pared (ARONSON, 1986).

El uso de la lisozima no sólo resulta en bajos rendimientos de obtención de protoplastos, sino que también tiene efectos no deseados sobre los procesos de regeneración ulteriores.

## Introducción

Ha sido sugerida la existencia de cierto factor o factores asociados con las células durante la fase de crecimiento rápido, que podrían conferir sensibilidad aparente a lisozima (TEMEYER, 1987). Estos factores se hallarían relacionados con la remoción autolítica de la pared celular en estos bacilos. En efecto, Kingan y Ensing (KINGAN y ENSING, 1968) describieron tres actividades autolíticas asociadas a la esporulación en *Bacillus thuringiensis* que podrían ser activadas (parcial o totalmente) bajo ciertas condiciones de cultivo y/o tratamientos específicos. Este sistema autolítico activado podría ser el responsable de la formación de "autoplastos" en estos microorganismos.

En cuanto a los procesos de regeneración, ocurren con baja eficiencia y son poco reproducibles. Esto probablemente se deba a que los protoplastos de *B. thuringiensis* presentan muy pocos o ningún resto de pared celular que pueda actuar como *primer* de los procesos regenerativos, fenómeno que será oportunamente discutido.

## 7. CLONADO MOLECULAR DE LOS GENES DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA

### 7.1. Localización

Como ya mencionáramos oportunamente, existe una relación entre la síntesis de cristal proteico y la presencia de ciertos plásmidos. Esta observación ha sido verificada por experimentos de transferencia de plásmidos y clonado molecular. En efecto, la transferencia de plásmidos capaces de restaurar la síntesis de cristal en cepas Cry- ha sido posible.

## Introducción

Aún más, la utilización de sondas radioactivas correspondientes a genes de  $\delta$ -endotoxina clonados ha permitido identificar por hibridización molecular la localización de estos genes u otros homólogos en numerosas cepas de *Bacillus thuringiensis*.

La localización de los genes de la  $\delta$ -endotoxina se resume en la tabla 7 para las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* estudiadas. Estos resultados obtenidos ya sea por conjugación, clonado molecular o hibridización molecular, ponen de manifiesto la complejidad del sistema. De todos modos, la localización de los genes en plásmidos de un tamaño comprendido entre 30 y 50 Md, constituye un rasgo predominante. Por el contrario, las subespecies *dendrolimus*, *entomocidus* y *wuhsensis* no parecen tener plásmidos portadores de genes para  $\delta$ -endotoxina.

Asimismo, es frecuente encontrar una doble localización (plasmídica y cromosómica). Esta característica refleja la multiplicidad de los genes de  $\delta$ -endotoxina en una misma cepa y coincide con los trabajos de Calabrese *et.al.* (CALABRESE *et.al.*, 1980) que muestran una heterogeneidad en los cristales.

Estos resultados son particularmente ejemplificados por la cepa *aizawai* en la cual trabajos recientes demuestran la existencia de 5 ó 6 genes de  $\delta$ -endotoxina. Estos genes presentan homologías parciales entre ellos y codifican polipéptidos de alrededor de 130 Kd, que no poseen la misma especificidad tóxica contra insectos (SANCHIS *et.al.*, no publicado).

Otros dos estudios recientes, han determinado la existencia de dos  $\delta$ -endotoxinas en estas cepas, con actividades tóxicas diferentes y en las cuales los genes correspondientes se ha-

## Introducción

llan uno en el cromosoma y el otro en un plásmido (JARRET, 1985; SEKAR, 1987).

En el caso de numerosas cepas de la subespecie *kurstaki*, el gen que codifica para la proteína P<sub>2</sub> de 65 Kd (tóxica en dípteros), y el gen de la  $\delta$ -endotoxina (P<sub>1</sub> en estas cepas), están localizados en plásmidos de aproximadamente 110 Md (SEKAR y CARLTON, 1985). Un caso similar es el de la subespecie *darnsta-diensis* en la cual se hallan codificadas en el plásmido de 62 Md (conjugativo) la  $\delta$ -endotoxina y la  $\beta$ -exotoxina (OZAWA e IWAHANA, 1986).

Estas observaciones indican que los genes responsables de la patogenicidad de *Bacillus thuringiensis*, se encuentran generalmente agrupados en plásmidos a menudo movilizables o conjugativos, lo que los haría candidatos a una fuerte diseminación horizontal. Asimismo, las evidencias reunidas acerca de la múltiple localización de estos genes, hace pensar en la presencia de elementos transponibles involucrados.

### 7.2.. Organización de los genes codificantes para la $\delta$ -endotoxina

El primer clonado de un gen de  $\delta$ -endotoxina fue realizado a partir de ADN plasmídico de la cepa *kurstaki* HD-1 por Schnepf y Whiteley (SCHNEPF y WHITELEY, 1981) en 1981.

El gen, clonado en *E. coli*, produjo en bajas cantidades una proteína de 130 Kd que resultó tóxica en larvas de lepidópteros, y reaccionó positivamente con anticuerpos dirigidos contra el cristal proteico.

En 1982, Klier y colaboradores (KLIER *et.al.*, 1982) clonaron, a partir de la cepa *berliner* 1715, dos genes de la  $\delta$ -endotoxina, uno de origen plasmídico y el otro de origen cromosómico en *E. coli* y *B. subtilis*. La copia plasmídica del gen permitió la síntesis de una proteína de 130 Kd tóxica, mientras que la copia de origen cromosómico no fue funcional en ninguno de los dos microorganismos utilizados como receptores.

Fragmentos de ADN internos al gen plasmídico de *kurstaki* y al gen cromosómico de *berliner*, han servido como sondas para localizar los genes de  $\delta$ -endotoxina pertenecientes a numerosas cepas de *Bacillus thuringiensis* (KRONSTAD *et.al.*, 1983; KLIER *et.al.*, 1985).

La realización de experimentos de hibridización molecular con estos fragmentos y el mapeo de restricción de los diferentes genes clonados de  $\delta$ -endotoxina, llevaron a agrupar estos genes en por lo menos dos tipos estructurales que difieren en las porciones codificantes para los extremos C-terminales de las proteínas y sus regiones 3' adyacentes (KLIER *et.al.*, 1983). Por otro lado, resultó claro en estos experimentos que no existía correlación entre la organización estructural de los genes de  $\delta$ -endotoxina y su localización cromosómica o plasmídica (Ver Tabla 8 y 9).

**TABLA 8: LOCALIZACION DE LOS GENES CODIFICANTES  
PARA LA  $\delta$ -ENDOTOXINA**

Cepa	Plásmi- dosa <sup>a</sup>	Cromo- soma <sup>b</sup>	Modo de determinación
<i>thuringiensis</i> HD2	75Md	---	Cura de plásmidos- conjugación
<i>berliner</i> 1715	42Md	+	Clonado molecular- hibridización
<i>kurstaki</i> HD-1	47Md		Hibridización y clona- do molecular
<i>kurstaki</i> HD73	50Md		Cura de plásmidos- conjugación
<i>kurstaki</i> HD73	56Md		Clonado y expresión heteroespecífica
<i>dendrolimus</i>		+	Hibridización molecu- lar con el fragmento clonado
<i>israelensis</i>	72Md		Cura de plásmidos- conjugación

- a- En esta columna se indican las masas moleculares de los plásmidos portadores del gen
- b- El signo + indica la presencia del gen en el cromosoma o en un plásmido mayor de 150 Md, indistinguible del ADN cromosómico (KRONSTAD, 1983)

**TABLA 9: DISTRIBUCION DE LOS GENES TIPO I Y II DESCRIPTOS  
POR KLIER *et.al.* (1983) EN LAS 4 CEPAS ESTUDIADAS**

Cepa	Genes de $\delta$ -endotoxina		Localización <sup>a</sup>
	Tipo I	Tipo II	
<i>berliner</i>	+	+	Cr Pl
<i>dendrolimus</i>	+		Pl
<i>aizawai</i>	+	+	Cr Pl
<i>subtoxicus</i>	+		Cr

Cr: Criba; Pl: plasmidica

Si bien los patrones generales de restricción son similares entre los diferentes genes del cristal, la actividad biológica de los mismos es diferente. Por lo tanto, es evidente que las diferencias estructurales entre estos genes se traducen en grandes cambios a nivel de las potencias de las proteínas insecticidas.

Utilizando las técnicas de conjugación anteriormente descritas, Lereclus y colaboradores (LERECLUS *et.al.*, 1983), aislaron una secuencia de ADN de 3 Md (común a algunos plásmidos de *Bacillus thuringiensis*) que se había insertado *in vivo* en el plásmido pAMB1 introducido en *Bacillus thuringiensis*. Dicha secuencia (denominada Th), por sus propiedades insercionales *in vivo*, así como por la generación de deleciones adyacentes a los sitios de inserción y por su estructura al microscopio electrónico, fue considerada un elemento transponible, si bien no posee capacidad codificante que permita asignarle función accesoria alguna (LERECLUS *et.al.*, 1986).

La secuencia Th fue detectada por experimentos de hibridación en asociación con plásmidos residentes de *Bacillus thuringiensis* que portan los genes de la  $\delta$ -endotoxina (Tabla 10). Es importante el hecho de que esta secuencia pudo ser también detectada en plásmidos menores (9,5 y 10 Md de las cepas *berliner* 1715 y *aisawai*, respectivamente). Estos resultados se hallan de acuerdo con las homologías entre estos plásmidos (que no llevan información para el cristal) y los plásmidos mayores previamente observadas.

Basándose en datos estructurales obtenidos anteriormente para el gen plasmidico de  $\delta$ -endotoxina de *berliner* 1715 (KLIER *et.al.*, 1982), se efectuaron experimentos adicionales con la se-

**TABLA 10: DISTRIBUCION Y LOCALIZACION DE LA SECUENCIA Th Y DEL GEN DE  $\delta$ -ENDOTOXINA**

Cepa	Localización de la secuencia Th		Localización del gen de $\delta$ -endotoxina	
	Plásmidos	Cromosoma	Plásmidos	Cromosoma
<i>berliner</i> 1715	42Md 9,5Md		42Md	+
<i>kurstaki</i> KTo	54Md	+	51Md	+
<i>aisauai</i>	45Md 10Md		45Md	+

La presencia de la secuencia Th, fue determinada por la técnica de transferencia de *Southern* e hibridación con el fragmento KpnI-FvuII (2 Md) de un plásmido portador de dicha secuencia.

cuencia Th que resultaron en el esquema de organización estructural del plásmido residente de 42 Md (portador del gen del cristal en esta cepa) (LERECLUS *et.al.*, 1984), presentado en la Figura 3.

En esta figura, se aprecia la compleja distribución de secuencias repetidas a lo largo del plásmido y en las regiones que flanquean al gen del cristal y la secuencia Th. Estos resultados se correlacionan con las observaciones de Kronstad y colaboradores (KRONSTAD *et.al.*, 1984), que determinaron la presencia de repeticiones invertidas flanqueando al gen del cristal de la cepa *kurstaki* HD73.

Estos resultados sugieren fuertemente que los genes de  $\delta$ -endotoxina y las secuencias Th se encuentran en estructuras semejantes a transposones, flanqueados por secuencias de ADN repetidas e invertidas. Este hecho, tiene importantes implicancias evolutivas y explicaría muchas de las observaciones efectuadas en cuanto a multiplicidad de localización y conservación de la secuencia Th entre las diferentes especies de *B. thuringiensis*.

### 7.3. Delimitación de los diferentes dominios de $\delta$ -endotoxina

Se dispone de las secuencias nucleotídicas de cinco genes de  $\delta$ -endotoxina clonados y analizados por diferentes laboratorios (ADANG *et.al.*, 1985; SHIBANO *et.al.*, 1985; SCHNEPF y WHITELEY, 1985). Los datos indican que los cinco genes examinados son de tamaño similar ( $\approx 3500$  pb) y codifican para proteínas con masas moleculares comprendidas entre 130 y 140 Kd. Un análisis de

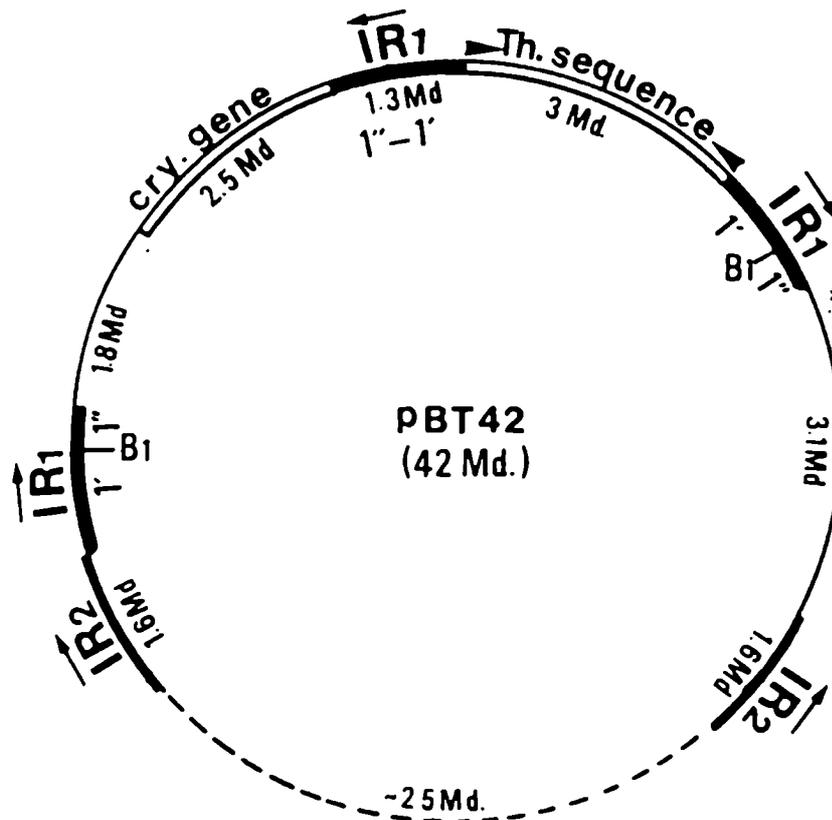


Figura 3

Organización estructural del gen del cristal de la cepa *berliner* 1715 y su entorno, en el plásmido recombinante pBT42

IR: repeticiones invertidas; Th: secuencia correspondiente al transposón Tn4430; B1: sitios para la enzima BamHI que delimitan el fragmento clonado de 9,5 Md (Tomado de LERECLUS *et.al.*, 1985).

los polipéptidos, muestra que éstos pueden dividirse claramente en porciones variables y constantes (Ver Figura 4). La primera porción N-terminal, así como la mayor parte del fragmento C-terminal, se encuentran fuertemente conservadas entre las cinco proteínas estudiadas. Por el contrario, la porción central de cada una de las  $\delta$ -endotoxinas comprende por lo menos dos elementos variables. En el conjunto, parecería que cada polipéptido está constituido por secuencias potencialmente intercambiables por recombinación homóloga, mediante la cual se producirían los cinco arreglos posibles representados en la Figura 4.

Otro resultado importante surgido de la secuencia nucleotídica de estos genes y del estudio de los productos de síntesis obtenidos a partir de genes deletados, es la identificación precisa de la porción tóxica de la proteína.

Ya ha sido mencionado que la toxina propiamente dicha sufre un clivaje proteolítico llevado a cabo en el intestino de insectos susceptibles y que posee un tamaño promedio de 65 Kd. Recientemente, (NAGAMATSU *et.al.*, 1984; CHESTUKHINA *et.al.*, 1986) la secuencia aminoácida de las fracciones tóxicas ha permitido establecer (en concordancia con la secuencia nucleotídica) que el residuo NH<sub>2</sub>- terminal de la toxina activada, corresponde al aminoácido 29 en la protoxina. De acuerdo a estos datos, los trabajos realizados sobre genes deletados en sus regiones 5' y 3', demuestran que la parte del gen necesaria y suficiente para dirigir la síntesis de una proteína tóxica está comprendida entre los codones 29 y 607 y cubre, por lo tanto, la mitad N-terminal de la  $\delta$ -endotoxina (SCHNEPF y WHITELEY, 1985). Esto permite inferir que, tanto la mitad C-terminal de la proteína como la primera porción correspondiente a los 29 primeros aminoácidos, jugaría un papel esencial en la formación y estabilidad

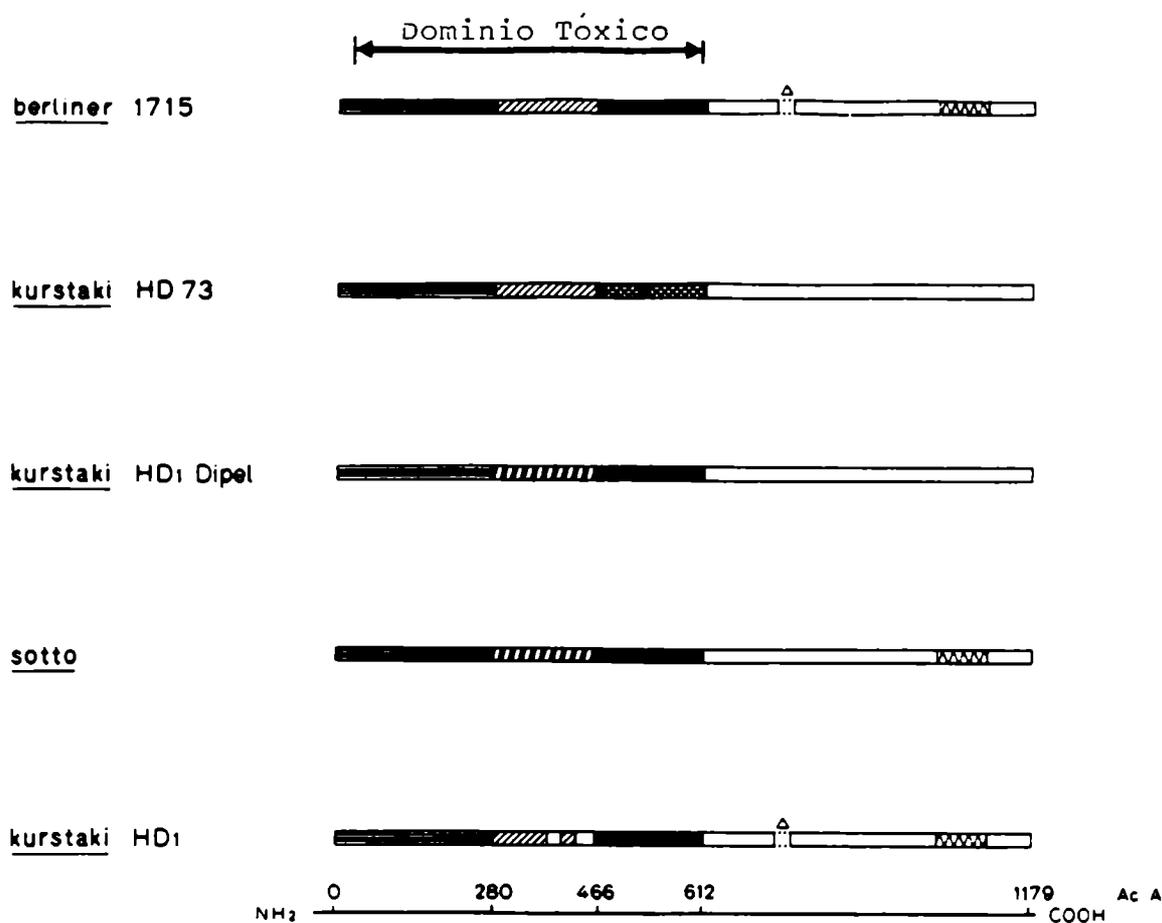


Figura 4

Esquema comparativo de las secuencias de aminoácidos de 5  $\delta$ -endotoxinas activas contra lepidópteros

Las regiones simbolizadas de la misma forma, presentan más de 95% de homología; las esquematizadas diferentemente tienen homologías inferiores o iguales a 65%.

$\Delta$  = delección de 25 aminoácidos

En el extremo C-terminal, las partes heterólogas presentan sólo un 15% de aminoácidos diferentes. (Tomado de LERECLUS, D., tesis doctoral).

de la estructura cristalina. En efecto, estas porciones de la proteína presentan un alto contenido relativo de moléculas de cisteína, las que por intermedio de puentes disulfuros, bien pueden ser responsables de la estabilidad del cristal proteico.

En cuanto a las fracciones tóxicas obtenidas, ya sea a partir de genes truncados (SCHNEPF y WHITELEY, 1985) o de cristales nativos degradados (LECADET y MARTOURET, 1967) por las proteasas de los insectos, se observa una conservación de las propiedades tóxicas y de especificidad de la  $\delta$ -endotoxina inicial. Por lo tanto, se admite que el determinante tóxico así como el o los responsables de la especificidad, se incluyen en las fracciones peptídicas de alrededor de 60 Kd, correspondientes a la mitad N-terminal de la  $\delta$ -endotoxina.

El efecto de las variaciones de las diferentes proteínas sobre la especificidad de las mismas, no resulta evidente. En efecto, las  $\delta$ -endotoxinas sintetizadas a partir de genes cuya secuencia nucleotídica es conocida no presentan diferencias suficientes en sus espectros de acción, limitados a las mismas especies de lepidópteros (*Pieris brassicae*, *Manduca sexta* o *Bombyx mori*).

En este sentido, la construcción de genes híbridos debería permitir distinguir los determinantes implicados en la toxicidad y especificidad, en caso de que éstas sean físicamente independientes.

Resulta evidente, entonces, que también a nivel molecular, los genes del cristal son muy variados, así como su localización, su entorno y el espectro de toxicidad de sus productos de expresión. Con respecto a estos últimos, hemos visto que los da-

tos disponibles hasta el momento no permiten establecer una relación de causa y efecto entre éstos y la variabilidad molecular observada

### 8. ELEMENTOS TRANSPONIBLES EN *Bacillus thuringiensis*

Como ya ha sido mencionado, experimentos de clonado y conjugación han permitido abordar el estudio de la organización estructural de los genes de  $\delta$ -endotoxina y establecer así el entorno de los genes de cristal (plasmídicos), que está constituido por dos series de secuencias invertidas repetidas (IR1 o IR1750, e IR2 o IR2150) y por un elemento transponible, llamado inicialmente secuencia Th, ahora denominado Tn 4430 (KRONSTAD y WHITELEY, 1984). Estos elementos se encuentran en un gran número de cepas sobre los mismos plásmidos portadores de los genes del cristal. Si bien con algunas modificaciones (inserciones y/o deleciones), existe un alto grado de conservación de las posiciones relativas de cada uno de ellos en los diferentes plásmidos estudiados (KRONSTAD *et.al.*, 1983; LERECLUS *et.al.*, 1982).

Un estudio más detallado ha sido efectuado sobre las secuencias de IR1 y Tn4430 por Mahillon y colaboradores (MAHILLON *et.al.*, 1985), y ha revelado que los elementos IR1 de 1656 pb, poseen un marco de lectura abierto que puede codificar una proteína de 478 aminoácidos que presenta homologías significativas con la transposasa de la secuencia de inserción IS4 de *E. coli*.

## Introducción

Debido a las repeticiones inversas de 20 pb que los IR1 presentan en sus extremos, característicos de secuencias de inserción, los autores la han denominado IS 231 (MAHILLON *et.al.*, 1987).

Paralelamente, ha sido demostrado que Tn 4430, es capaz de transponer en *E. coli*. Su transposición sobre el plásmido pBR322, ha permitido demostrar la presencia de 38 pb situados en orientación inversa en cada una de sus extremidades y de una duplicación de 5 pb en el sitio de inserción sobre el ADN receptor. Por estas características, Tn4430 ha sido ubicado entre los transposones de la familia del Tn3 (LERECLUS *et.al.*, 1986). La secuencia completa de este elemento (4149 pb), y su análisis genético en *E. coli*, demuestran que este transposón codifica dos proteínas de 32 y 110 kd, implicadas en el proceso de transposición. La primera, presenta homologías significativas con varias recombinasas sitio-específicas. Como la integrasa del fago- en *E. coli*, esta proteína parece ser expresada de manera poco eficaz, y actúa (como resolvasa) en la resolución de estructuras co-integradas generadas por el mecanismo de transposición.

En cuanto a la proteína de 110 Kd emparentada con la transposasa de Tn3, es necesaria y suficiente para la transposición (LERECLUS *et.al.*, 1986).

El conjunto de estos estudios, sugiere fuertemente que las secuencias IR así como el Tn4430, se hallan involucrados en fenómenos de amplificación de genes de  $\delta$ -endotoxina dentro de una misma cepa, así como de transmisión horizontal, a través de la formación de estructuras co-integradas con plásmidos conjugativos entre diferentes cepas.

9. REGULACION DE LA EXPRESION DE LA  $\delta$ -ENDOTOXINA

Existen ciertos eventos esporogénicos, excluyendo la formación de cristal, que son únicos a *Bacillus thuringiensis*, si bien el patrón general de esporulación en este microorganismo es similar al de otros bacilos esporulantes (BECHTEL y BULLA, 1976).

El tipo de envolvimiento subpolar de la espora es único de *Bacillus thuringiensis*, en contraste con el tipo polar descrito para otros bacilos (FITZ-JAMES, 1960). Los estadios de esporulación se definen con respecto a los descriptos para *Bacillus subtilis* y se basan en las modificaciones morfológicas que se van sucediendo a partir de  $t_0$ , que determina el final de la fase exponencial de crecimiento (Ver Figura 5).

La secuencia de eventos correspondiente al desarrollo de la espora y formación del cristal paraesporal en *B. thuringiensis* se esquematiza en la Figura 6. El estadio I, comprende la formación de filamento axial; durante el estadio II, comienza la formación del segmento de la prespora, proceso que involucra al mesosoma. En el estadio III, se produce el envolvimiento de la futura espora con participación del mesosoma, así como también la aparición del cristal paraesporal. Los estadios IV a VI, comprenden (9-12 horas) la formación del exosporio, cortex y demás cubiertas esporales, así como la condensación del nucleoide de la espora. Más allá de las 12 horas se completan los procesos madurativos de la espora (estadio VII).

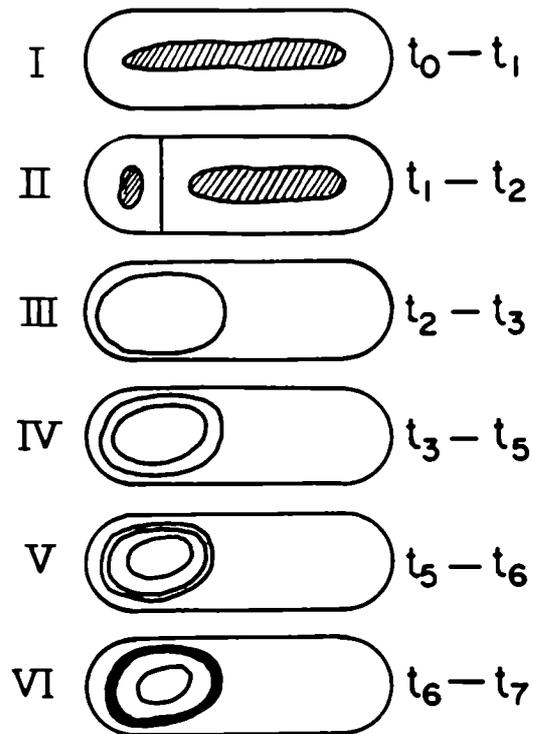


Figura 5

Esquema de los principales estadios de esporulación  
en *Bacillus subtilis*

- I. núcleo en forma de filamento axial
- II. septum de la espora
- III. pre-espora intracitoplásmica limitada por membrana doble
- IV. formación del cortex
- V. formación de las envolturas de la futura espora
- VI. espora madura incluida en el esporangio

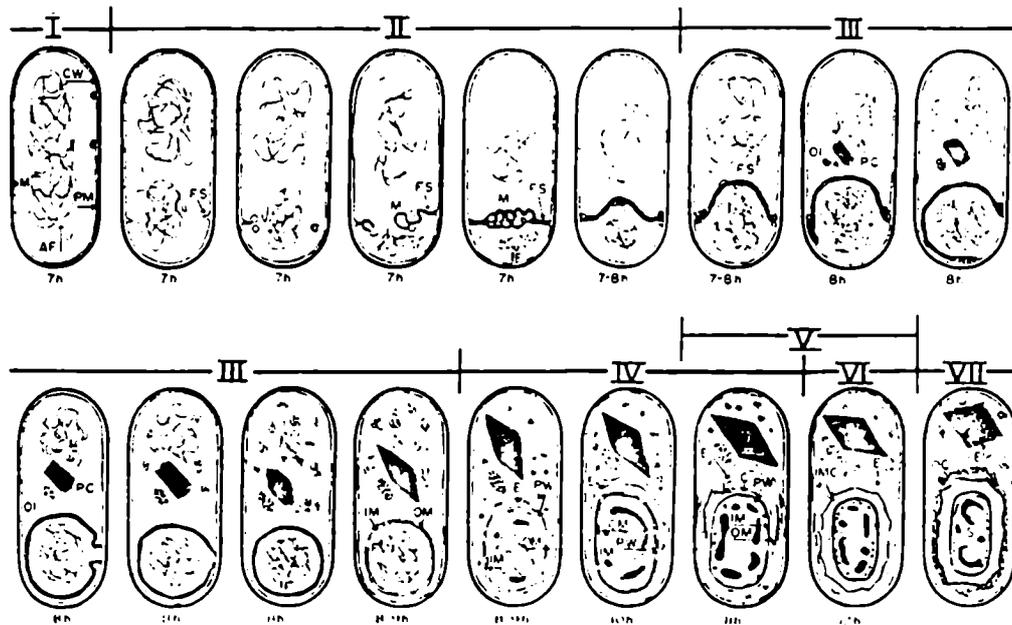


Figura 6

Esquema diagramático de la esporulación en *B. thuringiensis kurstaki*

M: mesosoma; CW: pared celular; PM: membrana plasmática; AX: filamento axial; FS: septo de la pre-espora; IF: pre-espora incipiente; OI: inclusión ovoidea; PC: cristal paraesporal; F: pre-espora; IN: membrana interna; OM: membrana externa; PW: pared celular primordial; E: exosporio; LC: envoltura esporal lamelar; OC: envoltura esporal externa; C: cortex; IMC: citoplasma materno incorporado; S: espora madura en la pre-espora no lisada. (Tomado de BECHTEL y BULLA, 1976).

En cuanto al cristal paraesporal, alcanza su mayor tamaño, que es aproximadamente igual al de la espora, entre el estadio IV y VI. El cristal resultante, constituye de un 10 a un 30% del contenido proteico total del esporangio (LECADET y DEDONDER, 1971).

La cantidad de proteína producida, representa de hecho una fracción sustancial de la actividad de síntesis proteica que ocurre en los cultivos en esporulación.

En general, el momento de la aparición de la inclusión se correlaciona con el aumento de antígenos paraesporales y actividad tóxica (ANDREWS *et.al.*, 1980), así como con la aparición de ARN mensajero que hibridiza con una sonda derivada de un clon de *kurstaki* HD1 (WONG *et.al.*, 1983).

En consecuencia, la acumulación de protoxina se hallaría acoplada en el tiempo a una activación de la transcripción y la traducción de estos genes.

En la mayor parte de las subespecies, los genes de protoxina se encuentran en megaplásmidos como ya ha sido mencionado. Incluso, si consideramos que éstos se hallan en bajo número de copias (menos de cinco por célula), podría aún existir un considerable efecto de dosis genética.

La regulación de la síntesis de  $\delta$ -endotoxina, involucra otros factores además del dosaje génico. Entre éstos, figuran secuencias promotoras únicas, factores sigma de transcripción específicos, etc. En este sentido, se observó que la expresión de genes clonados en *E. coli* resulta muy pobre (1%) y aún en *B. subtilis* se produce sólo un 10% de la protoxina normalmente sintetizada en las cepas parentales.

Paralelamente, existen evidencias (obtenidas a partir de experimentos de cura y transferencia de plásmidos), del papel que jugarían ciertos plásmidos (en su mayoría crípticos) en la regulación.

La síntesis condicional de protoxina en ciertos derivados de la subespecie *kurstaki*, implica que la regulación de la síntesis de protoxina puede involucrar factores fisiológicos únicos no requeridos para la esporulación (ARONSON, 1986). Dicha cepa esporula bien a 25 o 32°C, pero produce protoxina sólo a 29°C (MINNICH y ARONSON, 1984). En efecto, se conoce que variaciones en la composición de los medios de crecimiento influyen los rendimientos relativos de esporas y cristales (DULMAGE *et.al.*, 1971).

En *Bacillus subtilis*, la presencia de formas de ARN polimerasa específicas, es necesaria pero no suficiente para la expresión de los genes de esporulación. Se sabe que ciertas mutaciones que afectan la función de factores de transcripción específicos, alteran o impiden la transcripción de genes de esporulación (GILMAN y CHAMBERLIN, 1983).

Estudios bioquímicos habían demostrado (KLIER *et.al.*, 1983) que una forma modificada de ARN polimerasa era necesaria para la transcripción del gen de la  $\delta$ -endotoxina de la cepa *berliner* 1715.

Un gran número de promotores presentes en *E. coli*, ha sido secuenciado. Se encontró que contenían secuencias hexanucleotídicas altamente conservadas en las posiciones -10 y -35, responsables de la unión específica a la ARN polimerasa (ROSENBERG y COURT, 1979).

En *Bacillus subtilis*, existen promotores que son reconocidos: 1) por ARN polimerasa holoenzima (de la fase vegetativa); éstos son similares a los encontrados en *E. coli*; 2) por formas específicas de ARN polimerasa (que difieren en sus factores sigma). Estos últimos promotores, presentan secuencias de -35 y -10 que difieren significativamente entre sí y de las secuencias consenso reportadas (LOSICK y PERO, 1981).

Más recientemente (WONG *et.al.*, 1983), se ha puesto en evidencia la existencia de dos sitios de iniciación de la transcripción utilizados de modo secuencial, uno en los estadios II y III, y el otro a partir del estadio III de la esporulación.

Las dos regiones promotoras situadas a 100 nucleótidos del sitio de iniciación de la traducción están íntegramente conservadas en los cinco genes de  $\delta$ -endotoxina secuenciados. En la Tabla 11 se resumen los datos de las secuencias comparativas de -35 y -10 entre promotores de *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

Si bien estos promotores no son utilizados en las mismas etapas de la esporulación, resulta evidente que existe similitud entre ellos. Por el contrario, no hay relación alguna entre la región -35 de *Bacillus subtilis* reconocida por el factor  $E\sigma 43$  (de la fase vegetativa) y la correspondiente a la fase de esporulación. Asimismo, es notable la diferencia entre la región -35 de *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, a pesar de una homología significativa de las regiones -10.

Ya hemos mencionado los bajos niveles de expresión obtenidos en células de *E. coli* y *B. subtilis* transformadas por plásmidos recombinantes portadores del gen de  $\delta$ -endotoxina. En ambos

TABLA 11: REGIONES PROMOTORAS CONSERVADAS EN *B. thuringiensis*

PROMOTOR/FACTOR $\sigma$	REGION -35	ESPACIADOR	REGION -10
<i>B. subtilis</i>			
VEGETATIVO/ $\sigma$ 43	TTGACA	17-19 pb	TATAAT
ESPORULACION	TT-AAA	14-17 pb	CATATT
<i>B. thuringiensis</i>			
ESPORULACION			
Bt I	GCATTTT	14 pb	CATATG
Bt I	GCACTTT	11 pb	CATAAG
PB I	GCAAGTT	6 pb	CATAAT
PB II	GCATCTT	13 pb	CATAGA
CONSENSO	GCA--TT	12 pb	CATA--

casos, las secuencias de ADN utilizadas como promotor son diferentes de aquéllas que funcionan en *Bacillus thuringiensis* (WONG y CHANG, 1986; WARD y ELLAR, 1986).

Klier y colaboradores (KLIER *et.al.*, 1983), encontraron que la expresión del gen de  $\delta$ -endotoxina de la cepa *berliner* 1715 en *Bacillus subtilis* estaba limitada a la fase post-exponencial de crecimiento (esporulación). Sin embargo, otros autores (SHIVAKUMAR *et.al.*, 1986) obtuvieron recientemente clones transformantes de *B. subtilis* que fueron capaces de expresar la  $\delta$ -endotoxina de la cepa *kurstaki* HD-1 durante la fase vegetativa de crecimiento. Aún más, encontraron expresión en mutantes asporogénicos, lo que los llevó a concluir que la expresión en *Bacillus subtilis* no estaría acoplada al proceso de esporulación.

Independientemente de la regulación ligada al proceso de esporulación, se ha demostrado (WHITELEY *et.al.*, 1986) que en *E. coli*, inserciones o deleciones localizadas antes de la región promotora, aumentan la transcripción del gen de la  $\delta$ -endotoxina de la cepa *kurstaki* HD-1. Los autores sugieren la intervención de un mecanismo de regulación negativa.

En cuanto a los altos niveles de síntesis de protoxina observados en las cepas parentales, se pueden aducir varias causas posibles; en particular, la estabilidad de los ARNm que codifican estas proteínas (PETIT-GLATRON y RAPOPORT, 1976). Asimismo, ha sido demostrado que el terminador de la transcripción de los genes de cristal juegan un papel de "retroreguladores", aumentando la estabilidad del mensajero (WONG y CHANG, 1986). Una fusión del terminador al extremo 3' de genes heterólogos, les confiere un mejor nivel de expresión. Se postula que la estructura secun-

daria de este terminador , protege al ARNm de la degradación nucleásica, aumentando su estabilidad y la síntesis proteica subsiguiente.

Entre los otros factores que pueden intervenir en la regulación de la expresión de estos genes, se ha señalado la presencia de plásmidos de pequeño tamaño (MINNICH y ARONSON, 1984; MITEVA y GRIGOROVA, 1987). Genes de proteína clonados a partir de la subespecie *kurstaki* HD1 y HD73, poseen secuencias idénticas en la porción inicial de la región codificante y en las regiones regulatorias. Sin embargo, cuando los plásmidos nativos que llevan estos genes son introducidos a *Bacillus cereus* por conjugación, sólo se expresa el gen de HD73. El plásmido de 44 Md de HD-1 produjo muy poca toxina, a menos que otro plásmido endógeno de esta cepa (de 4,9 Md) se hallara presente.

Ya hemos mencionado que existen variantes de la subespecie *kurstaki* que presentan un fenotipo condicional (termosensible) respecto de la producción de toxina. En dichas variantes, la pérdida de un megaplásmido (que no lleva información para el cristal) de 110 Md se ha asociado a dicho fenotipo (MINNICH y ARONSON, 1984).

En conclusión, la expresión de la  $\delta$ -endotoxina estaría regulada a dos niveles:

- a) transcripcional: por especificidad diferencial de secuencias promotoras y/o co-factores de las ARN polimerasas, presencia de secuencias retro-regulatorias en el ARNm que serían de gran importancia en la estabilidad del mismo (WONG, 1986), y efectos de dosis genética; y

- b) post-transcripcional: factores involucrados en el ensamblado de la inclusión cristalina y su morfogénesis acoplada al proceso de esporulación.

Estos datos revelan que un gran número de mecanismos se ponen en juego para regular la expresión de los genes de la  $\delta$ -endotoxina. La multiplicidad de estos sistemas, así como su conservación entre las diferentes cepas estudiadas, reflejan no sólo la importancia adaptativa que posee el cristal proteico para esta especie, sino también el hecho de que su síntesis debe ser rigurosamente controlada.

#### 10. LA SUBESPECIE *israelensis*

Las particularidades de esta subespecie y las diferencias que presenta en numerosos aspectos respecto de los demás miembros de la especie, justifican su presentación en un capítulo aparte.

En 1976, se llevó a cabo un relevamiento de agentes de control biológico para mosquitos en Israel, del cual surgió (por aislamientos efectuados a partir de material extraído de larvas muertas de *Culex pipiens*) el primer aislamiento de una cepa denominada ONR-60A, del cual derivan todos los cultivos conocidos de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)(GOLDBERG y MARGALIT, 1977).

## Introducción

Desde su detección, Bti ha sido probado en todo el mundo, y resultó efectivo contra prácticamente todas las larvas filtradoras ensayadas de moscas y mosquitos. Entre estos últimos, hay 72 especies susceptibles pertenecientes a los géneros *Anopheles* (21 especies), *Aedes* (21), *Culex* (17), *Culiseta* (5), *Limatex* (2), *Uranotaenia* (1), *Psorophora* (1), *Mansonia* (1), *Armigeres* (1), *Trichoprospon* (1) y *Coquillettidia* (1). Asimismo, Bti también resulta efectivo contra 22 especies de la mosca negra *Simulium*.

En los países tropicales y subtropicales, un gran número de enfermedades son transmitidas por estos insectos. Los mosquitos son vectores de malaria, fiebre amarilla, filariasis y dengue, mientras que las moscas negras transmiten onchocerciasis (ceguera del río) y filariasis, de importantes consecuencias económicas.

Una de las razones por las cuales no disminuye la incidencia de estas enfermedades, es el desarrollo de resistencias a los pesticidas químicos por estos insectos.

Se han realizado experimentos de campo con preparaciones de Bti y, en 1980 la OMS desarrolló un programa extensivo para el control de la onchocerciasis en Africa occidental. En efecto, la mosca negra ya es resistente a un amplio rango de insecticidas, no habiendo drogas que actúen eficientemente contra los parásitos transmitidos. En este caso, Bti parece representar la única alternativa (MARGALIT y DEAN, 1985).

A diferencia de las demás subespecies, Bti no presenta un cristal de forma bipiramidal bien estructurado. La inclusión para-esporal de Bti se compone de tres proteínas: una mayoría-

ria de 28 Kd y dos menos importantes de 65 y 130 Kd (CHEUNG y HAMMOCK, 1985).

Hurley (HURLEY *et.al.*, 1985) y Lee (LEE *et.al.*, 1985), encontraron que el polipéptido de 65 Kd era el responsable de la actividad tóxica, siendo el polipéptido de 28 Kd el que contiene la actividad hemolítica observada en estos cristales (HELD *et. al.*, 1986). Sin embargo, también se ha asignado la actividad larvicida al polipéptido de 130 Kd (WU y CHANG, 1985). Más aún, Ibarra y Federici (IBARRA y FEDERICI, 1985) aislaron fragmentos poliédricos del cristal correspondientes al polipéptido de 65 Kd, que resultaron ser sólo relativamente tóxicos y sugirieron que los polipéptidos de 65 y 28 Kd pudieran actuar sinérgicamente para ejercer su actividad tóxica (Ver Figura 7).

Así como las demás subespecies de *Bacillus thuringiensis*, *israelensis* lleva la información para la  $\delta$ -endotoxina en un megaplásmido. El arreglo plasmídico de la cepa ONR60A tiene 9 plásmidos de peso molecular variado (Ver Tabla 5). González y Carlton (GONZALES y CARLTON, 1984) determinaron que un plásmido de 72-75 Md transmisible era requerido para la producción de cristal larvicida en la cepa HD-567. Este plásmido lleva toda la información necesaria para la síntesis de inclusión paraesporal, es decir, para las tres proteínas que lo constituyen.

A diferencia de los otros miembros de la especie, en Bti sólo los cristales son tóxicos para dípteros (no así las esporas) y, mientras que para las demás subespecies los cristales y sus subunidades representan protoxinas sin actividad biológica, los cristales Bti no requieren de activación proteolítica alguna para ejercer sus efectos tóxicos.

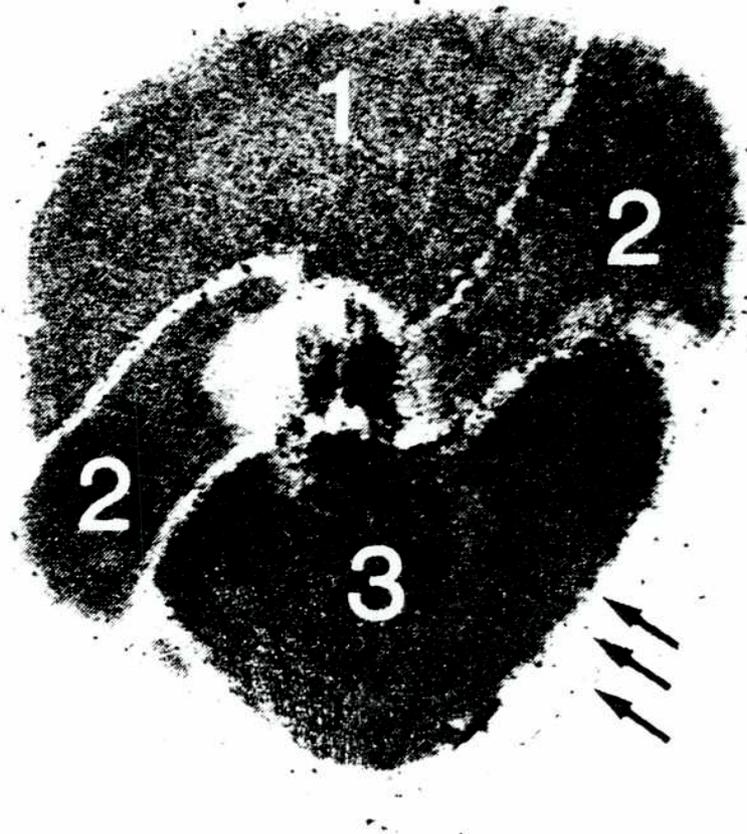


Figura 7

Características ultraestructurales del cristal de  
*Bacillus thuringiensis israelensis*

Sección representativa obtenida luego de la purificación de los cristales. Los números indican los diferentes componentes presentes en la inclusión: 1 correspondería a la hemolisina de 28 Kd, 2 al polipéptido de 65 Kd y 3 a la toxina de 130 Kd. Las flechas indican las diferentes capas de la envoltura que limita a cada inclusión y al cuerpo parasporal. (Tomado de IBARRA y FEDERICI, 1986).

El modo de acción de la toxina de Bt1 no está aún bien comprendido, si bien se sabe que actúa sobre las membranas celulares del epitelio digestivo *in vivo* e *in vitro*. Thomas y Ellar (THOMAS y ELLAR, 1983) observaron que una preparación soluble de cristales causó la lisis rápida de células de mamífero y de insecto en cultivo, e identificaron ciertos fosfolípidos de membrana como los blancos de la toxina.

En efecto, la interacción de la toxina con lípidos de membrana específicos como fosfatidil colina, esfingomiélin y fosfatidil etanol-amina (siempre que presenten residuos acilo insaturados) causa re-arreglo de los mismos (por un efecto detergente) que lleva a la ruptura de la integridad de la membrana y eventualmente a la citólisis.

Experimentos de clonado molecular de las toxinas de Bt1 han sido llevados a cabo por diferentes laboratorios (WARD *et. al.*, 1984; SEKAR y CARLTON, 1985; BOURGOUIN *et. al.*, 1986; ANGUSTHANASOMBAT *et. al.*, 1987). Estos experimentos indican que, en efecto, los genes de la citolisina y de la  $\delta$ -endotoxina son llevados por el plásmido de 72 Md.

Asimismo, Bourguin menciona la presencia de dos copias (parcialmente homólogas) del gen que codifica la proteína de 130 Kd sobre dicho plásmido. Estos dos genes resultaron idénticos, excepto en su parte central y probablemente en su extremo 5' también (BOURGOUIN *et. al.*, 1986). Aparentemente, una de las dos copias sería contigua al gen que codifica una proteína tóxica de 58 Kd (correspondiente a uno de los polipéptidos de la inclusión) clonada por Thorne en 1986 (THORNE *et. al.*, 1986). Este mismo la-

boratorio, determinó la existencia de homologías en la secuencia de aminoácidos y en las zonas regulatorias de los genes de  $\delta$ -endotoxina de Bti y de *kurstaki* HD-1 P2 (tóxica para dípteros).

Con respecto al gen de la citolisina (polipéptido de 28 Kd), no se encontró homología alguna entre éste y los genes de  $\delta$ -endotoxina (de 130 Kd) estudiados. Ward (WARD y ELLAR, 1986) han identificado el promotor del gen de la citolisina. Se trata de un promotor específico de esporulación con un sitio de iniciación de la transcripción que es utilizado desde el estadio II al VI.

En el caso de Bti también se observa que la expresión de genes clonados tanto en *Escherichia coli* como en *Bacillus subtilis*, es de bajo nivel comparado con la observada en las cepas parentales.

Trabajos recientes indican que una secuencia de ADN de 0,8 Kb localizada 4 Kb por delante del gen de la citolisina de Bti, es necesaria para obtener un alto nivel de síntesis (McLEAN *et.al.*, 1987). Esta región puede actuar en cis o en trans, y el mecanismo de activación sería post-transcripcional.

En cuanto a la presencia de elementos transponibles en Bti, se han encontrado copias (totales o parciales) del gen de  $\delta$ -endotoxina en otros plásmidos (de 68 y 80 Md) y en el cromosoma de ciertos derivados que habían perdido espontáneamente el plásmido de 72 Md (SEKAR y CARLTON, 1985; GONZALES y CARLTON, 1984). Si bien no se ha determinado por secuenciación o estudios de microscopía electrónica la presencia de elementos transponibles, la

única explicación plausible para estas observaciones, es la existencia de estos elementos e incluso la posibilidad de que el gen de  $\delta$ -endotoxina esté incluido en una estructura de ese tipo.

En conclusión, Bti resulta única dentro de la especie en cuanto a: 1) forma, tamaño y composición de la inclusión parasporal y 2) especificidad de acción. El uso de esta subespecie se ha hecho extensivo a todo el mundo, si bien existen inconvenientes como la baja persistencia en ambientes acuáticos, que hacen que se justifique el esfuerzo continuado tendiente a mejorar su eficiencia.

En este sentido, las tecnologías aportadas por la ingeniería genética permitirán transferir los genes de la  $\delta$ -endotoxina a receptores que sean capaces de sobrevivir en ambientes con bajas condiciones orgánicas, como la mayoría de las aguas estancadas, donde se desea aplicar el insecticida. Asimismo, será factible construir cepas de Bti que sinteticen los polipéptidos insecticidas y no las hemolisinas no específicas. Por otro lado la obtención de bacilos multiespecíficos podría aumentar el espectro de acción de las preparaciones.

## 11. CONCLUSIONES Y OBJETIVOS

El primer rasgo destacable surgido de los datos presentados, es la estrecha correlación que existe entre la presencia de material extra cromosómico y la capacidad para sintetizar to-

xinas entomopatógenas en estos bacilos. Una relación de este tipo entre factores de virulencia y elementos diseminables (plásmidos y/o transposones), se observa frecuentemente en el caso de las enterotoxinas bacterianas (BETLEY *et.al.*, 1986).

Una segunda característica es la diversidad de toxinas y elementos extracromosómicos. Si bien es indudable que las múltiples toxinas y sus diferentes especificidades contribuyen a la diseminación y a la virulencia de *Bacillus thuringiensis*, el rol de los diferentes plásmidos y transposones no ha sido aún claramente definido. Es altamente probable sin embargo, que los plásmidos conjugativos y las secuencias de inserción intervengan respectivamente en la propagación y la amplificación de los genes de las toxinas

Consecuencia, estos elementos ofrecen a *Bacillus thuringiensis* una fuerte capacidad evolutiva, así como una flexibilidad adaptativa que le permite desarrollarse en nichos ecológicos variables y constituidos por poblaciones naturales

que hace a la regulación de la síntesis de cristal. Es evidente que existen factores únicos en *Bacillus thuringiensis* involucrados, por lo que los estudios de la regulación deberán ser realizados en el organismo parental, más que en clones de *E. coli* - *B. subtilis* recombinantes, si bien éstos han sido y son de gran utilidad en dichos estudios. Para ello, se debe contar con procedimientos reproducibles de transformación por plásmidos, así como con mutantes regulatorias que faciliten el análisis de un sistema tan complejo.

## Introducción

Por otro lado, resulta claro de lo anteriormente expuesto que el desarrollo de las investigaciones en *Bacillus thuringiensis* para su aplicación a la lucha biológica, debe orientarse hacia el aislamiento, modificación y amplificación de los genes de  $\delta$ -endotoxina, seguidos por la re-introducción en las cepas de origen de *Bacillus thuringiensis* o bien por la producción en masa por otros microorganismos receptores.

Los trabajos que aquí se presentan, intentan cubrir algunas de estas áreas, y resolver algunos de estos problemas. En primer lugar, se ha encarado el establecimiento de un sistema de transformación de protoplastos por ADN plasmídico. En segundo lugar, la obtención de mutantes de interés para el estudio de la regulación, ha sido llevada a cabo.

Por último, hemos considerado importante contar con la tecnología de clonado molecular en bacilos Gram positivos, como primer paso hacia estudios básicos relacionados con la regulación de la síntesis de estas toxinas y, eventualmente, como base para la construcción de cepas isogénicas más eficientes, o bien de otros *bacillaceae* productores de altos niveles de toxina a nivel industrial. Asimismo, sería interesante obtener cepas mejor adaptadas y capaces de sobrevivir por largos periodos en ambientes acuáticos.

## **MATERIALES Y METODOS**

## ABREVIATURAS

ARNm:	Acido ribonucleico mensajero
BSA:	seroalbúmina bovina
CIP:	fosfatasa alcalina de intestino de ternera
PEG:	polietilenglicol
Pipes:	ácido piperazin-N-N'-bis-(2- etanosulfónico)
Tris-base:	Tris(hidroximetil)aminometano
DTT:	ditiotreitól
SDS:	Lauril sulfato de sodio
D.O:	densidad óptica
dNTPs:	mezcla de los 4 deoxinucleósidos trifosfato
EDTA:	etilendiaminotetraacetato disódico
Erm:	eritromicina
Kan:	kanamicina
Tet:	tetraciclina
Cm:	cloranfenicol
mM:	milimolar
mU:	miliunidades
pmol:	pico mol
µl:	microlitro
Md:	mega dalton
Kd:	kilodalton
Kb:	kilobase
Bti:	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
ORF:	<i>Open reading frame</i> (marco de lectura abierta)
SMM:	sacarosa/maleato/magnesio
SMT:	sacarosa/magnesio/Tris

## Materiales y Métodos

### CEPAS UTILIZADAS

#### Bacillus thuringiensis

CEPA	FENOTIPO*/N° DE PLASMIDOS	ORIGEN
<i>thuringiensis</i> HD2-5	Cry+, Spo+/8	B. CARLTON, U.S.A.
<i>kurstaki</i> HD73-6	Cry+, Spo+/6	B. CARLTON, U.S.A.
<i>israelensis</i> 1884	Cry+, Spo+/3	S. SINGER, U.S.A.
<i>israelensis</i> 4Q2-72	Cry+, Spo+/1	DEAN, D., U.S.A.

\* Cry+ = fenotipo cristalífero  
Spo+ = esporulación normal

## Materiales y Métodos

### 1.2. *Bacillus subtilis*

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
GSY 1104	purB34,ura1,trpF7	C.ANAGNASTOPOULOS, Francia
IA510	recE4,r-,m-,stp, leuA8, thrA	OSTROFF y PENE, U.S.A.

### 2. PLASMIDOS UTILIZADOS

PLASMIDOS	TAMANO	MARCADOR DE RESISTENCIA	REFERENCIA
pUB110	4,5Kb	Km <sup>R</sup>	KEGGINS <i>et al</i> , 1978
pT127	4,8Kb	Tet <sup>R</sup>	EHRlich, 1977
pTV1	12,4Kb	Cm <sup>R</sup> , Erm <sup>R</sup>	YOUNGMAN <i>et al</i> , 1983
pPL608	5,4Kb	Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	WILLIAMS <i>et al</i> , 1981
pEB111	6,4Kb	Km <sup>R</sup>	TRAUTNER, 1987

Estos plásmidos fueron aislados de cepas de *B. subtilis* por el método de lisis alcalina, y luego purificados por gradientes de densidad de CsCl (Ver puntos correspondientes).

**3. MEDIOS DE CULTIVO**

Medio LB:

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g/l
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g/l
NaCl	10 g/l

pH 7,2 con NaOH 10 N

Medio "Pennassay":

<i>Antibiotic Medium No.3</i> (DIFCO):4x	70 g/l
--	--------

Medio SCG: (SPIZIZEN, 1958)

Sales de Spizizen 2x	50% v/v
Glucosa	5 g/l
Casaminoácidos (libres de vitamina, DIFCO)	1 g/l

Medio MD: (TYRRELL *et al*, 1981)

Extracto de levadura	1,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/l
Glucosa	2 g/l

Medio GYS: (TYRRELL *et al*, 1981)

Extracto de levadura	2 g/l
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/l
MnSO <sub>4</sub>	0,07g/l
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,08g/l
Glucosa	1 g/l

## Materiales y Métodos

### Medio nutritivo de Schaeffer (SCHAEFFER *et al*, 1965)

Caldo nutritivo	8 g/l
SO <sub>4</sub> Mg.7H <sub>2</sub> O	0,25g/l
KCl	1 g/l
MnCl <sub>2</sub> 10- <sup>2</sup> M	1 ml/l pH7,2

### Medio mínimo MB:

Sales de Spizizen 2x	50% v/v
SO <sub>4</sub> Mg	1 g/l
Glucosa	5 g/l

### Medios sólidos:

Se agrega 15 g/l de Bacto-agar (DIFCO)

### Medios de regeneración de protoplastos (en porcentaje p/v):

a)	DM3 (CHANG y COHEN, 1979)	
	MR2x	50 %
	MgCl <sub>2</sub>	0,4 %
	Glucosa	0,5 %
	BSA	0,025%
	Fracción V de sero-albúmina bovina	
	Casaminoácidos	0,5 %
	Extracto de levadura	0,5 %
b)	R (SANCHEZ-RIVAS, 1982)	
	MR2x	50 %
	MgCl <sub>2</sub>	0,4 %
	Glucosa	0,5 %
	BSA	0,025%
	Casaminoácidos	0,5 %

## Materiales y Métodos

c) mR (SANCHEZ-RIVAS, 1982)

MR2x	50	%
MgCl <sub>2</sub>	0,4	%
Glucosa	0,5	%
BSA	0,025%	
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,2	%
Citrato de sodio	0,2	%
Requerimientos de auxotrofia	0,001%*	

\*Para IA510: leucina, treonina y arginina

MR2x

HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7g/l
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	3g/l
Succinato de sodio	180g/l(0.33M) pH 7,3

El agregado de ácido glutámico a los medios R y mR es optativo (0,2% final)

También se utilizó para la regeneración en líquido, SMM o SMT con el agregado de medio "*Pennasay*" 1x final (SMMP o SMTP respectivamente). Los medios de regeneración sólidos llevan 9 o 10 g/l de Bacto-agar (DIFCO).

d) MRE (este trabajo)

MRB2x	50	%
Sacarosa	20	%
Cl <sub>2</sub> Mg	0,4	%
Glucosa	0,5	%
Casaminoácidos	0,5	%
Extracto de levadura	0,25	%
BSA	0,025%	
<u>MRB2x</u>		
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	g/l
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	3	g/l
NaCl	16	g/l pH 7,4

4. MEDIOS PARA GENERACION DE PROTOPLASTOS

SMM (SCHAEFFER *et al*, 1975)

Sacarosa	0,5 M
Maleato de sodio	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM

SMT (este trabajo)

Sacarosa	0,5 M
Tris pH8	35 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM

El agregado de lisozima (cuando corresponde) se realiza a partir de una solución madre de 5 mg/ml conservada a -20°C.

**5. REACTIVOS**

Ficoll	Sigma
Polivinilpirrolidona	Sigma
Tris-base	Sigma
Lisozima	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
Deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma
Espermidina	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
CsCl	BRL
DNA ligasa de fago T4	BRL
Agarosa	BRL
Fenol	IBI
Formamida	Merck
Polietilenglicol 6000	Merck
Succinato de sodio	Merck
Maleato de sodio	Merck
Enzima de Klenow	Promega Biolabs
Sephacryl S-300	Pharmacia
DTT	Boheringher
SDS	Mallinckrodt

## Materiales y Métodos

Enzima de Klenow	Amersham
DNA polimerasa I	Amersham
DNAsa I	Amersham
Membranas de diálisis	Arthur Thomas
Papel de filtro 3MM	Whatman
Papel de filtro 541	Whatman
Película radiográfica Curix RP1	AGFA
Precursores radioactivos ( $\alpha$ <sup>32</sup> PdATP, dCTP, dGTP, <sup>32</sup> PdATP y $\alpha$ <sup>35</sup> SdATP	DuPont (New England Nuclear)
Membranas de nitrocelulosa 0,45 $\mu$	Millipore HAWP
Película fotográfica VGR-100	KODAK
Bacto-agar	DIFCO
Bacto-triptona	DIFCO
Extracto de levadura	DIFCO
Casaminoácidos con y sin vitaminas	DIFCO
Caldo nutritivo	DIFCO
Membrana de nitrocelulosa 0,45 $\mu$	Schleicher & Schüell
Columnas de ELUTIP-d	Schleicher & Schüell
Ribonucleasa A	Worthington
Amido black 10b	Fischer Chem.Index 62C
Fucsina básica	Fischer Chem.Index 677

## Materiales y Métodos

### 6. SINCRONIZACION DE CULTIVOS PARA LA OBTENCION DE SUSPENSIONES DE ESPORAS Y CRISTALES DE *B. thuringiensis*

- A) Se inoculan 20 ml de medio MD con material proveniente de una colonia, y se deja crecer durante toda la noche a 30°C y 250 rpm.
- B) Se inoculan 20 ml de medio GYS con 1 ml del cultivo obtenido anteriormente (5%) y se deja crecer hasta  $D_{0700} = 0,8$  (aproximadamente 90 minutos a 30°C y 250 rpm).
- C) 200 ml de medio GYS fresco, son inoculados al 5% con material proveniente del cultivo anterior. Se incuba a 30°C y 250 rpm aproximadamente 48 horas.
- D) Cosecha: se centrifugan las suspensiones a 15000 rpm y 4°C durante 20 minutos, y se lavan con 1/2 volumen de agua bidestilada estéril. El sedimento se resuspende en 10 o 15 ml de agua bidestilada y se congelan las muestras a -70°C para su conservación. De estas suspensiones se efectúan diluciones que se conservan a 4°C para su uso posterior como fuente de inóculos.

### 7. Generación de protoplastos de *B. thuringiensis*

Ver Figura I.5.

### 8. Generación de protoplastos de *B. subtilis*

Se siguió el protocolo descrito por Schaeffer *et al* en 1975. Los cultivos exponenciales en medio nutritivo de Schaeffer (D.O<sub>600</sub> = 0,6, aproximadamente 10<sup>8</sup> células/ml) fueron centrifugados y el sedimento resuspendido en medio SMM conteniendo 200 µg/ml de lisozima (volumen necesario para llevar a D.O<sub>600</sub> = 2). Las suspensiones fueron incubadas durante 30 a 45 minutos a 37°C con agitación; la eficiencia del proceso fue seguida microscópicamente y determinada por choque osmótico como se explica en la sección I.1 de los Resultados.

### 9.1 TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS POR ADN PLASMIDICO

Para la transformación de los protoplastos de *B. thuringiensis* se siguió el método clásico utilizado para *B. subtilis*, basado en el originalmente descrito por Chang y Cohen en 1979. Aproximadamente 10<sup>7</sup> protoplastos fueron incubados durante 1 ó 2 minutos a temperatura ambiente en presencia de 20% de PEG<sub>6000</sub> y del ADN plasmídico correspondiente disuelto en SMM o SMT según se trate de protoplastos de *B. subtilis* o *B. thuringiensis*.

Las mezclas de transformación, fueron plaqueadas (puras o diluidas en el medio hipertónico correspondiente) en los medios sólidos de regeneración o directamente diluidas en medios de re-

## Materiales y Métodos

generación líquidos. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C (*B. thuringiensis*) o a 37°C (*B. subtilis*).

La selección de las colonias transformantes se llevó a cabo por dos métodos:

1) directo, en placas de medio de regeneración conteniendo concentraciones apropiadas de antibióticos; este método se utilizó en las transformaciones de protoplastos de *B. subtilis*.

2) indirecto (o en dos etapas), por réplica de las placas de regeneración en medio nutritivo (LB o de Schaeffer) conteniendo los antibióticos correspondientes.

### 9.2 PROTOSCOLOS ALTERNATIVOS PARA *Bacillus thuringiensis israelensis*

#### 9.2.1 Protocolo de Heierson modificado (HEIERSON *et al*, 1987)

Las células se crecen en medio SCG (0,5% de casaminoácidos) hasta una D.O<sub>600</sub> = 0,6, se cosechan por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y se resuspenden (un 1/5 del volumen original) en tampón ST (Tris-HCl 50 mM pH 8,9, Sacarosa 30%. Esta suspensión es incubada por espacio de 25 minutos a 37°C; 0,5 ml de ésta se transforman con la cantidad correspondiente de ADN plasmídico (se utilizan alrededor de 5 µg) en presencia de PEG<sub>6000</sub> al 30% final.

## Materiales y Métodos

Luego de 2 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de transformación se centrifuga y se resuspende en 1 ml de medio nutritivo LB. Se preincuba durante 1 hora a 37°C y luego se plaquea en medio con antibiótico para seleccionar transformantes.

### 9.2.2 Protocolo modificado de Takahashi (TAKAHASHI *et al*, 1983)

Las células se crecen en SCG (0,5% de casaminoácidos) hasta una D.O<sub>600</sub> ≈ 1, se cosechan, se lavan en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y se resuspenden en un volumen de Tris-HCl 50 mM pH 8. Se incuban durante 30 minutos a 37°C, luego de lo cual se centrifugan y se resuspenden en 1/10 del volumen original de medio "Pennasay"1x.

Esta suspensión se transforma como anteriormente, pero incubando 5 minutos a 37°C en presencia de PEG. Al cabo de este tiempo, se centrifuga y se resuspende en 1 ml de medio "Pennasay"1x, incubando 1 hora a 37°C para permitir la expresión; luego se plaquea en medio con antibiótico para la selección de transformantes.

10. FUSION DE PROTOPLASTOS

La fusión interespecífica entre *B. thuringiensis* y *B. subtilis* se llevó a cabo utilizando el método de Schaeffer *et al* (1975).  $10^7$  protoplastos de IA510 fueron mezclados con la misma cantidad de protoplastos de *B. thuringiensis israelensis* 1884 precalentados (80°C, 2 minutos) para provocar su inactivación (Ver Resultados, punto I.2.4). Esta mezcla fue centrifugada y re-suspendida en 100 µl de medio SMM, al cual fueron agregados 900 µl de PEG 50% (disuelto en SMM). Luego de 2 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de fusión fue plaqueada directamente (100 µl) o diluída en SMM y luego plaqueada en medio mR suplementado con leucina, treonina y arginina.

La selección de los productos de fusión (protótrofos), se llevó a cabo en dos etapas, replicando las colonias regeneradas, en medio mínimo (MB) sin suplementos.

11. PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO DE *Bacillus subtilis*

11.1. PURIFICACION DE ADN EN PEQUENA ESCALA

("MINIPREPARACIONES")

Se empleó una modificación del método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979.

## Materiales y Métodos

Se inoculan 2 ml de medio nutritivo de Schaeffer (conteniendo o no el antibiótico correspondiente) con material proveniente de una colonia aislada.

Se cultiva durante toda la noche a 37°C con agitación.

Se cosechan los cultivos (1,5 ml) en tubos de Eppendorf por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y se resuspende el sedimento en 100 µl de solución I (Ver más adelante).

La suspensión se incuba a temperatura ambiente durante 30 a 40 minutos, luego de los cuales se agregan 200 µl de solución II; se mezcla suavemente por inversión del tubo, y se deja a 0°C durante 5 minutos.

Al cabo de este tiempo, se añaden 150 µl de solución III, se agita repetidas veces y se deja en hielo durante 15 minutos.

Se centrifuga a 4°C y 12000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de Eppendorf. A este sobrenadante se le agregan 0,6 volúmenes de isopropanol y se deja a -20°C por espacio de 45 minutos.

Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos, y se resuspende en 200 µl de H<sub>2</sub>O o tampón T.E pH8.

Se re-precipita por agregado de 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 6.5 y 2 volúmenes de etanol 100%, a -70°C durante 20 minutos.

El sedimento obtenido luego de la centrifugación es secado al aire y resuspendido en 20 µl de H<sub>2</sub>O o tampón TE. Se siembran 3 ó 4 µl en los geles de agarosa y 3 µl son suficientes para someter a restricción enzimática.

## Materiales y Métodos

Para obtener muestras más purificadas, luego de la precipitación por isopropanol, se lleva a cabo una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1,V/V/V) y dos veces con un volumen de éter saturado en agua. Luego de esto, se re-precipita con acetato y etanol, como anteriormente.

### 11.2. PURIFICACION A GRAN ESCALA DE ADN DE *Bacillus subtilis*

En este caso, se parte de 1 l de cultivo (D.O<sub>600</sub>=0,8-1) en medio de Schaeffer conteniendo el antibiótico correspondiente.

Se cosecha el cultivo por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 10 minutos en rotor Sorvall GS3 y se resuspende el sedimento en 20 ml de solución I.

Luego de una incubación a temperatura ambiente de 45 minutos, se agregan 40 ml de solución II y se agita muy suavemente. Se deja 10 minutos en hielo y se agregan 30 ml de solución III en frío.

Al cabo de 15 minutos, se centrifuga a 8000 rpm durante 30 minutos (rotor GS3) y el sobrenadante se transfiere cuidadosamente a través de gasa estéril.

Este sobrenadante se precipita con PEG<sub>6000</sub> al 10% final (P/V) durante toda la noche a 4°C.

El sedimento obtenido se prepara para someter a un gradiente de densidad de CsCl, de la siguiente manera:

## Materiales y Métodos

Se resuspende en 7,5 ml de tampón TE, al cual se le agregan 0,25 ml de tampón Tris 1M pH8 con el objeto de neutralizar la solución de ADN.

Se agregan a esta solución 8,3 g de CsCl, (para llegar a un índice de refracción de 1.3920), y una vez disuelto, se agregan 800 µl de una solución de EtBr 10 mg/ml.

Esta suspensión se somete a ultracentrifugación a temperatura ambiente y 36000 rpm en un rotor Beckman 50 Ti por espacio de 40 horas.

Luego de la ultracentrifugación se extrae la banda correspondiente al ADN plasmidico por aspiración con pipeta Pasteur (iluminando con luz UV). El EtBr se elimina por 6 extracciones sucesivas con n-butanol saturado en agua para luego dializar 24 horas contra el tampón TE pH8 (con un cambio de tampón).

### 11.3. PURIFICACION DE ADN DE *Bacillus thuringiensis*

Las modificaciones respecto de la técnica detallada más arriba, consisten en lo siguiente:

- a) Tanto a pequeña como a gran escala, la incubación en solución I se extiende a 1 hora a temperatura ambiente.

## Materiales y Métodos

- b) Los cultivos se llevan a cabo en medio SCG (0,5% en glucosa) en lugar de medio de Schaeffer y se cosechan cuando alcanzan una  $D_{0600} \leq 0,8$ .
- c) Los cuidados que deben tomarse en las etapas de agitación en solución II y en los pasos de resuspensión de los sedimentos de ADN, son mayores que en el caso de *B. subtilis*, ya que los megaplásmidos de *B. thuringiensis* son extremadamente frágiles.
- d) El paso de precipitación con PEG<sub>8000</sub> se reemplaza por una precipitación con 0,6 volúmenes de isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos, posterior extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico y re-precipitación con acetato de sodio y etanol.

Estas modificaciones minimizan la acción de las nucleasas de *B. thuringiensis*, altamente activas.

- e) Finalmente, para extraer las bandas de ADN plasmidico, se trata de exponer los tubos a la luz UV por el menor tiempo posible, para evitar rupturas en los megaplásmidos.

### 11.4. SOLUCIONES UTILIZADAS

#### Solución I:

Sacarosa	0,6 M
----------	-------

## Materiales y Métodos

Tris pH 8	20 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM

Se agrega lisozima 4 mg/ml final en el momento de ser utilizada.

### Solución II:

NaOH	0,2 N
SDS	1%

Se prepara en el momento de utilizar, a partir de soluciones madre de NaOH 10 N y SDS 20%, respectivamente.

### Solución III: Para 100 ml,

60 ml de KAcO	5 M
11,5 ml de HAcO glacial	pH 4,8
28,5 ml de H <sub>2</sub> O	

### Tampón TE:

Tris pH8	50 mM
EDTA pH8	1 mM

## 12. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

### 12.1. GELES DE AGAROSA HORIZONTALES

Se utilizó agarosa en concentraciones de 0,6 a 0,8% (P/V) en tampón TAE 0,5x. Los tamaños variaron entre el de un portaobjetos (minigeles) hasta geles de 20x 18cm. La preparación es similar a la descrita por Maniatis *et.al.* (MANIATIS *et.al.*, 1982) y se corrieron a corriente constante (entre 25 y 60 mA, de-

## Materiales y Métodos

pendiendo de la distancia entre los electrodos de las cubas utilizadas). Para correr geles de megaplásmidos, se utilizó una corriente de 40 mA (con electrodos separados entre sí por 40 cm) por espacio de 3 horas.

La agarosa se disolvió en todos los casos en tampón TAE 0,5x.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron teñidos por inmersión en una solución de EtBr 50 µg/ml durante 10 minutos.

El ADN se observó por transiluminación con luz ultravioleta de 300 nm y se fotografió con una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo y película de alta sensibilidad.

### 12.2. GELES VERTICALES

Esta técnica se basa en la lisis de protoplastos en el pocillo del gel (*in situ*). Para esto, 10 µl de una suspensión de protoplastos (Ver punto 7), fueron sembrados en los pocillos de un gel vertical armado con agarosa 0,5% en tampón TAE 0,5x. Dicha suspensión fue sembrada por debajo de 15 µl de "mezcla de lisis" que fueron previamente sembrados en los mismos pocillos. Las suspensiones fueron suavemente mezcladas con la punta de un escarbadientes una o dos veces, y la electroforesis fue corrida a voltaje constante (3 V/cm durante 1 hora y 5 V/cm durante 2 horas más).

12.3. SOLUCIONES UTILIZADAS

Tampón TAE 50x: Tris-HAcO pH8	2 M
EDTA pH8	50 mM .
Mezcla de lisis <i>in situ</i> :	
SDS	2%
sacarosa	5%
azul de bromofenol	0,05% en tampón TAE pH 8
Mezcla de carga 5x (P/V):	
(Para el sembrado de muestras de ADN)	
Azul de bromofenol	0,25%
sacarosa	40%

13. PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROELUCION

Luego de la separación de bandas plasmidicas o de fragmentos de restricción en geles de agarosa preparativos, se localizaron la o las bandas de interés por iluminación con luz UV.

Se recortó la porción del gel conteniendo dicha banda, y se la transfirió a un pocillo efectuado sobre el mismo gel de agarosa y tapizado con una membrana de diálisis. La electroforesis se continuó por espacio de 30 minutos con el objeto de hacer migrar el ADN desde el bloque de agarosa a la membrana.

Al cabo de ese tiempo, se retiró la membrana sin cortar la corriente eléctrica.

## Materiales y Métodos

El ADN se eluyó con 3 lavados sucesivos en 150  $\mu$ l de tampón TE, luego de lo cual se extrajo con un volumen de fenol y se precipitó con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 6,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 20  $\mu$ l de tampón TE.

En algunos casos, el ADN proveniente de los lavados de la membrana fue purificado utilizando columnas de ELUTIP-d de Schleicher and Schuell, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 14. USO DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se obtuvieron de diversas fuentes comerciales. De acuerdo a la recomendación de los fabricantes, las digestiones se efectuaron en las siguientes condiciones:

Tris pH8	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	de 0 a 100 mM de

acuerdo a las recomendaciones. Las incubaciones se efectuaron a 37°C durante 2 horas, y se utilizaron de 3 a 5 unidades de enzima por  $\mu$ g de ADN.

15. **MARCACION RADIOACTIVA DE ADN**

15.1. **MARCACION POR NICK TRANSLATION(desplazamiento del corte)**

Entre 300 y 500 ng de ADN circular o lineal se incubaron con la siguiente mezcla enzimática: 0,025 unidades de deoxiribonucleasa (DNAsa) de páncreas bovino, 0,05 ng de ADN polimerasa I de *E. coli*, 25  $\mu$ Ci de  $\alpha^{32}$ PdCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol), tampón de *nick translation* 10x y los otros tres deoxinucleótidos no radioactivos en concentración de 50  $\mu$ M.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 30 a 40  $\mu$ l.

Tampón de *nick translation* 10x:

Tris-HCl pH 7,4	50 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
DTT	0,1 mM
BSA	50 $\mu$ g/ml

Se incubó por 45 minutos a 60°C y se detuvo la reacción por el agregado de EDTA 0,5 M pH 8.

El deoxinucleótido radioactivo no incorporado se separó del ADN marcado por cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en tampón TE-NaCl 0,15 M.

15.2. **MARCACION RADIOACTIVA POR PRIMING AT RANDOM  
(iniciaciones al azar)**

## Materiales y Métodos

Para marcar ADN por este método es necesario que dichas moléculas estén linearizadas; para esto, se empleó ADN proveniente de digestión enzimática y luego purificado de un gel de agarosa.

De 5 a 100 ng de ADN lineal en un volumen menor que 10  $\mu$ l, fueron desnaturalizados por calentamiento a 95°C durante 3 minutos.

Se les agregó 4  $\mu$ l de tampón OLB 5x, 2  $\mu$ l de una mezcla con los tres deoxinucleótidos no radioactivos (0,2 M en tampón TE), 2,5  $\mu$ l de  $\alpha^{32}$ PdCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol), 5 unidades de enzima de Klenow y H<sub>2</sub>O para llegar a un volumen final de 20  $\mu$ l.

### Tampón OLB 5x:

Pipes (pH 6,6)	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
DTT	50 mM
<i>Random hexanucleotide primers</i>	1,25 mg/ml
BSA	1 mg/ml

Se incubó a temperatura ambiente toda la noche, y se detuvo la reacción por agregado de 2  $\mu$ l de EDTA pH8 0,5 M.

Se separó el deoxinucleótido radioactivo no incorporado, utilizando una columna de Sephacryl S-300 como en el punto 15.1

### 15.3. MARCACION POR EL METODO DE *FILL IN* (o rellenado)

## Materiales y Métodos

ADN digerido con una o más enzimas de restricción (que originen extremos 5' protruyentes) en un volumen final de 20  $\mu$ l, se trató de la siguiente manera:

Se agregaron 0,5  $\mu$ l de cada uno de los deoxinucleótidos no radioactivos (0,5 nM de cada uno), 2  $\mu$ l del deoxinucleótido radioactivo faltante (dependiendo de la secuencia de reconocimiento de las enzimas utilizadas), 1 unidad de enzima de Klenow y 2  $\mu$ l de tampón de concentración salina media 10x (1x=Tris-HCl pH 8,10 mM; MgCl<sub>2</sub>: 10 nM; NaCl: 50 mM) en un volumen final de 40  $\mu$ l.

Se incubó por espacio de 20 minutos a temperatura ambiente, se agregó 1  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs y se re-incubó por otros 10 minutos en las mismas condiciones.

La enzima se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 20 minutos.

### 16. LIGADO DE FRAGMENTOS DE ADN A VECTORES

#### 16.1 PREPARACION DE LOS VECTORES

Se cortaron entre 5 y 10  $\mu$ g de cada vector (purificados por gradientes de CsCl) con las enzimas de restricción deseadas y se los sometió a defosforilación de los extremos 5' (cuando se cortó con una sola enzima) o bien a marcado y separación por columna en el caso de dos enzimas de restricción.

## Materiales y Métodos

### Tratamiento con fosfatasa alcalina.

Se emplearon 5 mU de enzima por pmol de extremos 5' fosfato y 0,1 mU por  $\mu$ l de reacción final. Las mU necesarias por pmol, se calcularon de acuerdo al tamaño y la concentración del vector, teniendo en cuenta que 5 Kb son aproximadamente  $3 \times 10^6$  dalton. Se empleó tampón CIP 10x y se incubó durante 15 minutos a 37°C y 15 minutos a 56°C. Se agregó la misma cantidad de enzima que en el paso anterior y se re-incubó 15 minutos a 37°C y otros 15 minutos a 56°C.

Para detener la reacción, se llevó el volumen de reacción al doble, y se agregó SDS 0,5% y tampón NET a 1x final. Se calentó durante 15 minutos a 68°C.

#### CIP 10x:

Tris-HCl pH9	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
ZnCl <sub>2</sub>	0,1mM
Espermidina	1 mM

#### NET 10x:

NaCl	100 mM
EDTA pH 8	1 mM
Tris-HCl pH8	10 mM

Los plásmidos cuyo sitio de inserción se obtuvo por digestión con dos enzimas de restricción diferentes, se prepararon del siguiente modo:

Se digirió el vector (5 a 10  $\mu$ g) con una de las enzimas y se controló la eficiencia del corte por electroforesis en gel de agarosa.

## Materiales y Métodos

Se digirió con la segunda enzima.

Se tomó una pequeña alícuota (usualmente 1 o 2  $\mu$ l de la mezcla) y se marcó radioactivamente por el método de *fill-in* (punto 15.3).

La alícuota marcada se reunió con el resto de la preparación y se sometió a cromatografía en columna de 2 ml de Sephacryl S-300 en tampón TE-NaCl 0,15 M. De este modo, el fragmento escindido en la digestión, fue separado del resto del vector.

### 16.2. LIGADO DE FRAGMENTOS DE ADN A LOS VECTORES

Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 20 ó 30  $\mu$ l y se agregaron para 100 o 250 ng de vector, entre 2 y 4 unidades de ADN-ligasa de fago T4. Las relaciones molares de extremos de inserto a vector, fueron de 3 a 1 o de 5 a 1. Se incubó durante toda la noche a 18°C y se utilizaron estas mezclas para transformar protoplastos, como ya se explicara oportunamente.

#### Tampón ligasa 10x:

Tris-HCl pH 7m4	500 mM
MgCl <sub>2</sub>	100 mM
DTT	50 mM
espermidina	1 mM
ATP	10 mM

## Materiales y Métodos

Se consideró aceptable obtener entre 3 y 4 veces más transformantes con las mezclas de ligación que con el control de vector re-ligado.

### 17. HIBRIDIZACION *IN SITU* DE COLONIAS BACTERIANAS

#### 17.1 TRANSFERENCIA DE LAS COLONIAS

El procedimiento seguido se basó en el método descrito por Grunstein y Hogness (GRUNSTEIN y HOGNESS, 1975).

Se colocó un papel de filtro Whatmann 541 estéril sobre la superficie de una caja de Petri donde crecieron las colonias bacterianas.

Se dejó durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, retirando el filtro con las colonias adsorbidas.

El filtro se trató de manera secuencial con las siguientes soluciones, por espacio de 5 minutos:

- a) SDS 10%
- b) NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M
- c) Tris-HCl pH 7,5 0,5 M; NaCl 1,5 M
- d) SSC 2x (1x=citrato de sodio 0,015 M; NaCl 0,15 M)

Los filtros así tratados se dejaron secar al aire y se utilizaron para hibridizar.

17.2. HIBRIDIZACION

La sonda marcada radioactivamente, se desnaturalizó por calor (95°C, 5 minutos) y se agregó a la mezcla de hibridización en la cual se habían incubado previamente los filtros por espacio de 30 minutos (pre-hibridización). Se incubó a 42°C durante 16-20 horas con agitación.

Mezcla de hibridización:

SSC 5x	
Formamida	50%
Denhardt	1x

Denhardt 50x:

BSA	1% (P/V)
Polivinilpirrolidona	1% (P/V)
Ficoll	1% (P/V)

Las condiciones de hibridización, fueron calculadas para obtener un 88% de homología teniendo en cuenta que el ADN de los Gram positivos utilizados presenta un contenido en G+C de alrededor de 33%. Se calculó un volumen de 1 ml de mezcla cada 10 cm<sup>2</sup> de membrana. La sonda radioactiva se inyectó en una concentración  $\geq 10^6$  cpm/ml de solución de hibridización (actividad específica aproximada =  $10^8$  cpm/ $\mu$ g de sonda).

17.3. LAVADOS

## Materiales y Métodos

La sonda no hibridizada se eliminó por lavados sucesivos en la siguiente forma:

SSC 5x/formamida 50%	20 minutos a 42°C
SSC 5x	20 minutos a 42°C
SSC 2x	20 minutos a 42°C
SSC 2x	20 minutos a temperatura ambiente
SSC 0,5x	10 minutos a temperatura ambiente

Una vez concluidos los lavados, los filtros se dejan secar al aire sobre papel de filtro Whatmann 3MM y se exponen a película radiográfica con pantalla intensificadora.

### 18. TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA (SOUTHERN, 1975)

Las muestras de ADN se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Al finalizar la corrida, el gel se sometió al siguiente tratamiento:

Irradiación por luz UV durante 15 minutos (para ADN de alto peso molecular).

Depuración en HCl 0,2 M 30 minutos a temperatura ambiente (para ADN de alto peso molecular).

Desnaturalización en NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M, 45 minutos a temperatura ambiente.

## Materiales y Métodos

Neutralización en NaCl 1,5 M/Tris-HCl pH 8 1 M, 45 minutos a temperatura ambiente.

Luego de este tratamiento, se procedió a transferir el ADN a un filtro de nitrocelulosa Millipore HAWP. Para esto, se cortó un trozo de membrana de las mismas dimensiones que el gel.

Se incubó en una solución de SSC 2x durante 5 minutos y al mismo tiempo, se embebió un trozo de papel Whatmann 3MM en SSC 6x. Este papel se colocó en el fondo de un recipiente, y sobre éste se ubicó el gel a transferir. Sobre el gel, a su vez, se colocó cuidando de no formar burbujas de aire, el filtro de nitrocelulosa humedecido.

Sobre el filtro se dispusieron 2 trozos de papel Whatmann 3MM y una pila de papel absorbente (servilletas). A todo esto se le aplicó un peso de aproximadamente 1/2 Kg y se dejó transferir por capilaridad durante un período mínimo de 6 horas.

Pasado este tiempo, se retiró la membrana, se enjuagó en SSC 2x y se dejó secar a temperatura ambiente.

La membrana se dispuso una vez seca, entre dos papeles Whatmann 3MM y se horneó 2 horas a 80°C para fijar el ADN.

Estos filtros se utilizan en experimentos de hibridización con sondas radioactivas de inmediato o se conservan a temperatura ambiente por períodos relativamente largos para su uso posterior.

La hibridización y los lavados se efectúan de acuerdo a lo descrito en el punto 17.

19. **TECNICA DE SEMBRADO DE MANCHAS (DOT BLOT)**  
(MASON y WILLIAMS, 1985)

Este procedimiento se siguió para ensayos de hibridización en los cuales sólo interesaba detectar la presencia de ciertas secuencias en una preparación de ADN para lo cual no es necesario utilizar preparaciones purificadas.

Se humedece una tira de nitrocelulosa Millipore HAWP en SSC 10x y se deja secar al aire.

Las muestras de ADN se resuspenden en 50  $\mu$ l de Tris-HCl pH 7,6 20 mM/EDTA 1 mM y se calientan a 100°C durante 10 minutos.

Se agregan 50  $\mu$ l de NaOH 1 N y se incuba a temperatura ambiente por 20 minutos, al cabo de los cuales se agregan 50  $\mu$ l de Tris-HCl pH8 1 M y 50  $\mu$ l de HCl 1 N en forma secuencial.

El ADN se precipita con 2,5 volúmenes de etanol absoluto durante 15 minutos a -70°C.

El sedimento obtenido, se resuspende en 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril y se siembran alícuotas de 1 o 2  $\mu$ l sobre círculos marcados en la membrana de nitrocelulosa.

Esta membrana se deja secar y se hornea a 80°C durante 2 horas para fijar las muestras.

## Materiales y Métodos

Esta tira se somete a hibridización como en los casos anteriores.

### 20. AUTORRADIOGRAFIAS

La exposición autorradiográfica se utilizó para detectar fragmentos radioactivos de ADN en membranas de nitrocelulosa o papel Whatmann 541.

Se utilizó película plástica autoadherente ("Rolopack") para cubrir los filtros antes de su exposición.

Se utilizó película Agfa Curix Rp1 para las exposiciones. Se expuso a  $-70^{\circ}\text{C}$  en todos los casos y, dependiendo de la intensidad de la marca, se utilizaron pantallas intensificadoras de tungsteno-calcio-fósforo (Cronex Lightning Plus, DuPont).

### 21. COLORACION DE ESPORAS Y CRISTALES DE *B. thuringiensis* (SMIRNOFF, 1962)

#### Solución A:

Negro Amido	1,5 g	
Metanol 98%	50 ml	Conservar 3 días
H <sub>2</sub> O destilada	40 ml	antes de usar
Acido Acético	10 ml	

## Materiales y Métodos

Glacial

### Solución B:

Fucsina básica	1 g	
Etanol 95%	10 ml	Usar al 30% en
Fenol al 5,5%	90 ml	solución acuosa
en H <sub>2</sub> O destilada		

Se distribuye la muestra sobre un portaobjeto en forma de película delgada y se fija por calor, pasándolo sobre la llama de un mechero 2 o 3 veces.

Se agrega una capa de solución A, y se deja 70 segundos. Al cabo de este tiempo, se lava con agua corriente.

Una vez hecho esto, se agrega la solución B, y se deja actuar durante 20 segundos, luego de los cuales se enjuaga con agua corriente y se deja secar al aire.

Los cristales se tiñen de color negro, mientras que las esporas lo hacen de un color celeste pálido; las células vegetativas toman una coloración rojiza a violeta.

Las microfotografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss al cual se adosó el equipo fotográfico, con un aumento de 100x y utilizando filtros coloreados para aumentar el contraste. Se utilizó película color Kodak VRG-100 de 35 mm.

## 22. ENSAYOS BIOLÓGICOS

## Materiales y Métodos

Las suspensiones de esporas y cristales para los ensayos, se preparan de acuerdo al protocolo detallado en el punto 6, o bien se pueden obtener de cultivos esporulados en placa, según el método de González y Carlton (GONZALEZ y CARLTON, 1983).

Este método consiste en el raspado de las esporas de la placa y su posterior lavado en H<sub>2</sub>O bidestilada. Las suspensiones así obtenidas se titulan en medio nutritivo sólido Schaeffer, y se utilizan diluciones seriadas de éstas para ensayar la toxicidad en larvas de mosquito.

En los ensayos biológicos aquí presentados, se utilizaron larvas de *Aedes sp*, en el estadio L2-L3 (L=larval), que es el más susceptible a la acción de las entomotoxinas.

### 22.1. PROTOCOLO DE ECLOSION DE EMBRIONES DE *Aedes aegypti* (Instituto Pasteur, Dr. deBARJAC)

Las condiciones del insectario son: humedad ambiente 70-80% y 25°C a 27°C de temperatura.

Los huevos provenientes de una puesta sobre papel Whatmann 3MM y secados al aire, se hacen eclosionar en cubetas conteniendo agua corriente de-clorada (por almacenamiento durante 3 o 4 días a temperatura ambiente) y pequeños trozos de alimento para perros.

## **Materiales y Métodos**

Estas cubetas, mantenidas en las condiciones anteriormente mencionadas, son revisadas diariamente para evitar la formación de películas bacterianas sobre la superficie del agua.

Las larvas eclosionan aproximadamente a las 48 horas de iniciada la incubación; tanto los nutrientes como el agua son cambiados día por medio.

Aproximadamente entre las 48 y 72 horas luego de la eclosión, las larvas alcanzan el estadio L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub> que presenta mayor sensibilidad para el ensayo. En este estadio, las larvas nadan activamente y presentan una forma y tamaños característicos (Ver Figura A). Luego de 5 a 7 días post-eclosión, los estadios L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> son de mayor tamaño (ya no atraviesan las mallas de tul con las que se cubren las cubetas) y más resistentes a la acción de las entomotoxinas. Es por esto, que se debe seguir cuidadosamente el desarrollo para tomar las larvas en el estadio apropiado.

### **22.2. ENSAYO DE TOXINAS LARVICIDAS**

Veinte larvas en estadio L<sub>2</sub> son tomadas con la ayuda de una pipeta Pasteur y colocadas en placas de Petri de 100 mm de diámetro, llevando a un volumen final de 10 ml de agua de-clorada.

Una vez dispuestas las placas necesarias para los ensayos que se desea efectuar (por duplicado), se agregan 100 ml de las diluciones correspondientes de las suspensiones a ensayar.

## Materiales y Métodos

Entre las 2 y las 48 horas posteriores al comienzo del ensayo, las placas son revisadas y las larvas contadas para determinar el porcentaje de mortalidad obtenido con las diferentes muestras. Con un 90% de mortalidad a 24 horas, la muestra se considera tóxica; las muestras más activas provocan efectos tóxicos que son visibles a las dos horas de haber sido puestas en contacto con las larvas.

Una vez concluidos los ensayos, las placas (así como las cubetas y pipetas utilizadas) son descontaminadas por el agregado de alcohol 96%.



Figura A: Larvas de *Aedes sp.* en estadio L2-L3.

## **RESULTADOS**

## CAPITULO I: ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS EN *BACILLUS THURINGIENSIS*

### I.1. PRODUCCION DE PROTOPLASTOS

La obtención de protoplastos en *B. thuringiensis* se ve dificultada por la gran resistencia que presenta su pared celular a los tratamientos convencionales con enzimas hidrolíticas (ver punto 6.3 de Introducción).

Basándonos en la metodología utilizada para *B. subtilis* (SCHAEFFER *et.al.*, 1975), se comenzó a ensayar una serie de protocolos tendientes a la producción de protoplastos en diferentes cepas de *B. thuringiensis*, de manera eficiente.

Dichos protocolos tuvieron por objeto:

- a) encontrar el estadio fisiológicamente más susceptible de ser sometido a protoplastización
- b) fragilizar la pared mediante choques osmóticos (lavado en agua bidestilada y en frío), y
- c) generar protoplastos estables y cuya viabilidad y capacidad regenerativa no se viera afectada por estos tratamientos.

## Resultados

En la Tabla I.1 se esquematizan tres de estos protocolos. Utilizados sobre las cepas *thuringiensis* HD2-5 e *israelensis* 1884, resultaron en las eficiencias de protoplastización, resumidas en la Tabla I.2.

El proceso fue en todos los casos seguido microscópicamente para evaluar el progreso del mismo (Ver Figura I.1). No obstante, la eficiencia de protoplastización fue determinada en cada caso, por el plaqueo de las muestras en medio nutritivo de Schaeffer, previa dilución seriada de las suspensiones en medios hipotónicos (NaCl 0.85% o agua bidestilada).

En estos medios, los protoplastos son rápidamente lisados (por "choque osmótico"), de modo que sólo forman colonias aquellos bacilos que han resistido al tratamiento (es decir, aquellos que no se han convertido en protoplastos). Con estos datos, y un recuento efectuado previamente a la incubación con lisozima, se obtiene, por diferencia, el porcentaje de protoplastización alcanzado.

Como es posible observar en la Tabla I.1., la incubación de los bacilos en SMM con el agregado de lisozima en cantidades apreciables (200 µg/ml es suficiente para generar protoplastos en *B. subtilis*), no fue suficiente para que ocurra protoplastización, aún efectuando lavados previos en frío. El hecho de utilizar un medio de cultivo más pobre (SCG), aumentó notablemente la eficiencia del proceso que resultó optimizado diluyendo los cultivos estacionarios en medio nutritivo para el crecimiento exponencial y aumentando la concentración de lisozima a 5 mg/ml durante la etapa de protoplastización. (Ver Figura I.1).

TABLA I.1.

COMPARACION DE DIFERENTES PROTOCOLOS ENSAYADOS SOBRE  
*Bacillus thuringiensis* PARA GENERAR PROTOPLASTOS

Protocolo	Medio de crecimiento <sup>1a</sup>	Medio de crecimiento <sup>2b</sup>	Condiciones y medios de generación de protoplastos
I	LB	LB	SMM+lisozima 1mg/ml, 60 min a 37°C
II	SCG	SCG	SMM+lisozima 1mg/ml, 2 horas a 37°C
III	SCG(0,1%glucosa)	LB	SMM+lisozima 4mg/ml, 2 horas a 37°C

a: cultivo estacionario, incubación de una noche partiendo de una suspensión de esporas.

b: cultivo exponencial, dilución 1:20 (protocolo I) o 1:2 (protocolo II y III) del primer cultivo en el medio de crecimiento<sup>2</sup> e incubación a 30°C hasta una densidad aproximada de  $1 \times 10^8$  células/ml.

c: en todos los casos, el cultivo obtenido fue centrifugado y lavado dos veces con agua bidestilada en frío antes de comenzar las incubaciones en los medios de protoplastización.

TABLA I.2.  
EFICIENCIA DE OBTENCION DE PROTOPLASTOS

Protocolo	Porcentaje de protoplastización <sup>a</sup>	
	<i>thuringiensis</i> HD2-5	<i>israelensis</i> 1884
I	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>
II	80%	85%
III	90%	98%

a: determinado por choque osmótico y plaqueo en medio nutritivo.

b: no determinado por choque osmótico, debido a la baja eficiencia ya evidente por observación al microscopio.

Cultivos exponenciales de las dos cepas fueron sometidos a los diferentes protocolos, luego de lo cual se tomaron muestras que fueron diluidas en solución fisiológica (choque osmótico) y posteriormente plaqueadas en medio nutritivo LB. La diferencia entre el número original ( $10^8$ /ml) y las colonias osmoresistentes, da por resultado el valor de la eficiencia de protoplastización alcanzada.

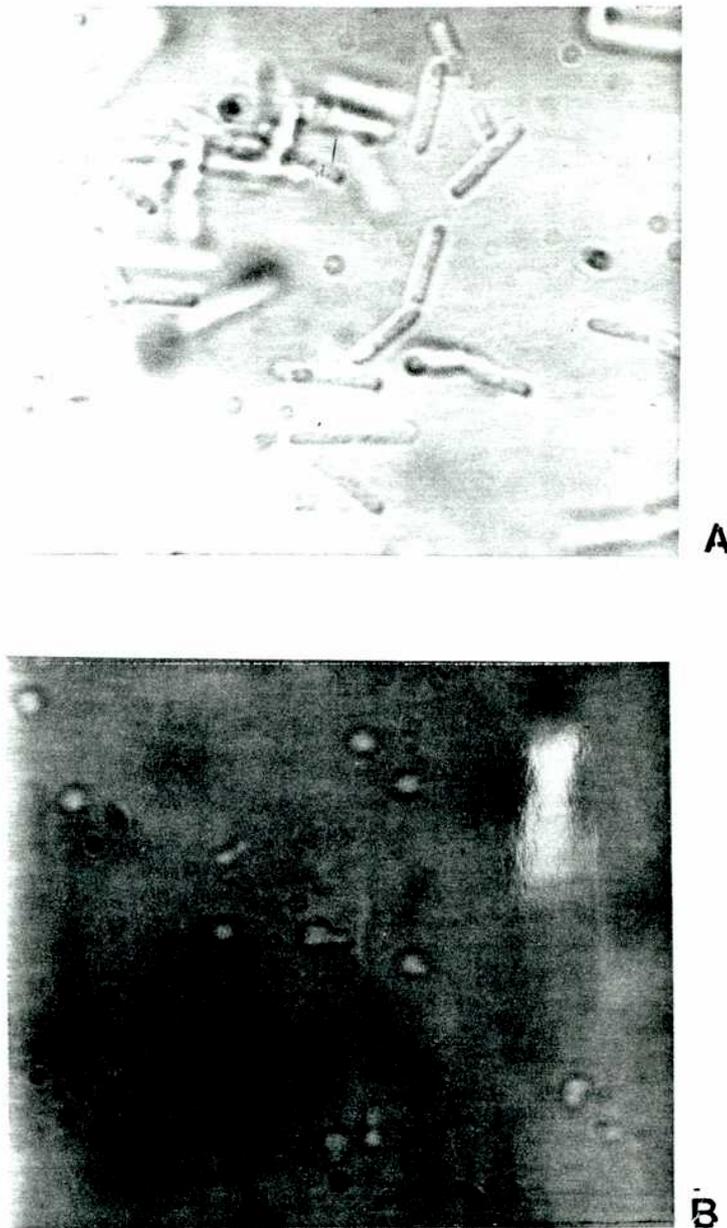


Figura I.1

Protoplastos de *B. thuringiensis*  
subespecie *thuringiensis* HD2-5

A: bacilos en etapa vegetativa  
B: protoplastos obtenidos luego de una incubación en SMM +  
5 mg/ml de lisozima 1 hora a 37 °C. 100x.

## Resultados

Si bien una eficiencia de protoplastización de más del 90% es alta, no es aún suficiente para encarar experimentos de transformación y/o fusión de protoplastos. Un 10% de bacilos "contaminantes" es todavía una cantidad importante que puede enmascarar resultados (este porcentaje representaría aproximadamente  $10^8$  bacterias sobre una población total de  $10^9$ , aunque el 90% fuesen protoplastos).

Es por esto que nos vimos impulsados a continuar buscando protocolos alternativos que permitieran obtener porcentajes más altos de protoplastización. Para esto, se efectuaron ensayos con otro tipo de enzimas hidrolíticas (por ejemplo, gluculasa, utilizada para digerir la pared de hongos como *Neurospora*), sin resultados que superaran las eficiencias obtenidas con lisozima. Por este motivo, optamos por encarar la búsqueda de enzimas que fueran específicas para *E. thuringiensis*, ya que la resistencia evidenciada por la pared de estos bacilos era consecuencia directa de su composición única.

Una aproximación experimental a este problema fue aportada por trabajos efectuados en 1968 por Kingan y Ensing (KINGAN y ENSING, 1968). Estos autores describieron tres actividades enzimáticas asociadas a la fase de esporulación en *B. thuringiensis* que serían las responsables de la ruptura de la pared del esporangio en el momento de la liberación de la espora. Se trata de una muramidasa con un pH óptimo de 4 y dos endopeptidasas con pH óptimo de alrededor de 8, una de las cuales (una N-acetilmuramildesaminasa) es estimulada por iones cobalto.

## Resultados

Teniendo en cuenta estas observaciones, se pensó en ensayar extractos de células en esporulación (efectuadas según el protocolo de estos autores), sobre cultivos en fase vegetativa en las condiciones óptimas para estas actividades.

Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla donde es posible apreciar la alta eficiencia obtenida en el extracto. Esta observación, nos llevó a efectuar otros ensayos, utilizando ahora como medio "base" de protoplastación el SMT (sacarosa, magnesio, Tris), ya que resultó obvio que, en dichas condiciones se estaba activando y/o induciendo el sistema autolítico de las células vegetativas.

### INDUCCIÓN AUTOLÍTICA DE PROTOPLASTOS

La capacidad del sistema autolítico de *Bacillus thuringiensis* para activarse en fase vegetativa fue explotada para generar "autoplastos" en diferentes copas. Para ello, se ensayaron diversas condiciones de incubación y cultivo de las células.

De nuestras anteriores observaciones, resultó claro que el estado fisiológico de los bacilos era crítico en cuanto a la susceptibilidad de éstos a los tratamientos en medios de protoplastación.

Hemos mencionado que el crecimiento en medios más pobres (SCG) confiere una cierta sensibilidad a dichos tratamientos, como había sido reportado por otros autores (GONZALES y

TABLA I.3.

ENSAYO DE EXTRACTOS LITICOS EN LA CEPA *thuringiensis* HD2-5

Agregado de extracto enzimático	Medio de incubación	Porcentaje de protoplastización
	Tris 35 mM pH8 sacarosa 0,5 M Mg <sup>2+</sup> 20 mM Co <sup>2+</sup> 5x10 <sup>-4</sup> M	99,8%
	idem	99%
	idem + lisozima 1 mg/ml	100%
+	idem + lisozima 1 mg/ml	100%

3 ml de cultivo en fase exponencial ( $1 \times 10^8$  células/ml) fueron lavados en agua bidestilada, resuspendidos en 5 ml de la solución **a** y posteriormente incubadas en presencia (o no) de extractos isogénicos a 37°C durante 2 horas. La eficiencia del proceso fue seguida al microscopio y determinada por choque osmótico.

## Resultados

CARLTON, 1980). Esto se hace más notable aún, provocando un "disparo" del crecimiento activo por agregado de nutrientes en el medio de crecimiento exponencial (ver Tablas I.1 y I.2).

La disminución del contenido de glucosa hasta un 0,025% (0,5% en la composición del medio original), favoreció este efecto marcadamente. Asimismo, la densidad a la que se cosechaban los cultivos exponenciales también fue acotada y se determinó que el óptimo para obtener altos rendimientos de protoplastización, se encontraba en alrededor de  $5 \times 10^7$  células/ml de cultivo, lo que corresponde a una densidad óptica de aproximadamente 0,4 para una longitud de onda de 600 nm. En la Figura I.2, se aprecia la inducción del crecimiento rápido por agregado de medio nutritivo LB durante la fase de crecimiento exponencial, así como la densidad "crítica" máxima que permite obtener autoplastos con alta eficiencia.

A partir de este punto se efectuaron experimentos tendientes a optimizar el protocolo, de manera de poder utilizar estos protoplastos en experimentos de transformación y fusión. En la Tabla I.4, se puede observar que el agregado de  $\text{Co}^{2+}$  al medio de protoplastización SMT no es necesario para que el proceso se active, y que la incubación en medio SMM también permite la inducción autolítica, tanto en presencia como en ausencia de lisozima.

Estos resultados nos permiten concluir que la inducción y/o activación del sistema autolítico dependería fundamentalmente de una etapa particular en el estado fisiológico de los bacilos, que se pone en evidencia por incubación de los mismos en un medio

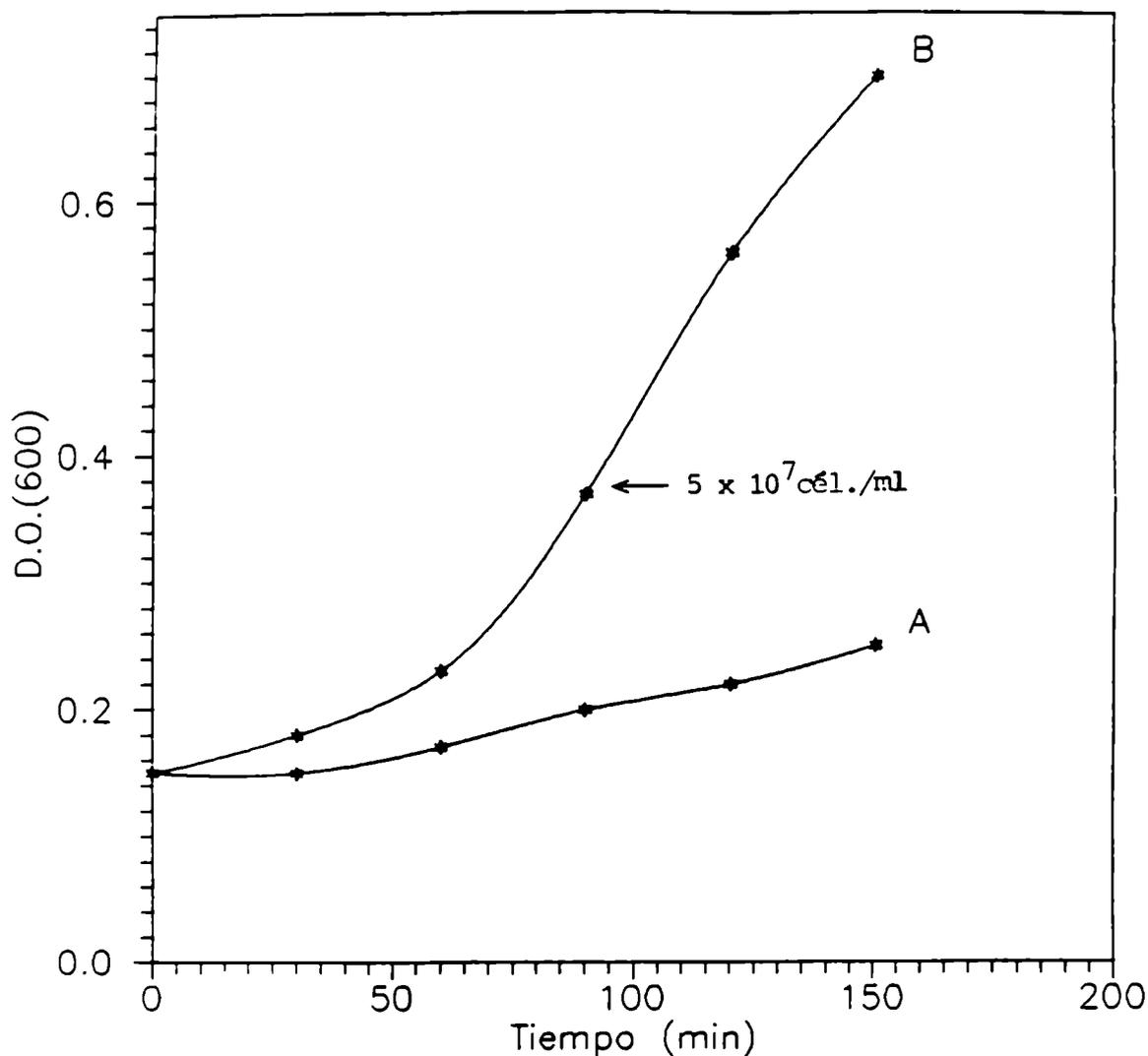


Figura I.2.

Curvas de crecimiento de *israelensis* 1884

**A:** Crecimiento durante una noche a 30°C y 200 rpm en medio SCG y agregado de 1 volumen de medio SCG fresco para continuar la incubación en las mismas condiciones.

**B:** idem **A**, pero diluyendo con 1 volumen de medio nutritivo LB. Se tomaron muestras a los tiempos indicados en la figura, y se midió la densidad óptica de las muestras a 600 nm de longitud de onda. Paralelamente, se efectuaron recuentos sobre medio sólido LB.

Se determinó que a densidades mayores de 0,5, disminuye la eficiencia de protoplastización. A más de  $2 \times 10^8$  células/ml, se forman filamentos y los cultivos se agrupan.

TABLA I.4.

GENERACION DE PROTOPLASTOS DE *Bacillus thuringiensis israelensis* 1884 POR INDUCCION AUTOLITICA

Medio de incubación	Agregado	Porcentaje de protoplastización
SMM	lisozima 1,5 mg/ml	99,75%
SMM		85%
SMT	Co <sup>2+</sup> 5x10 <sup>-4</sup> M	99,90%
SMT		99,88%
SMT	Co <sup>2+</sup> 5x10 <sup>-4</sup> M lisozima 1,5 mg/ml	99,85%

Los cultivos lavados fueron resuspendidos en los medios de incubación correspondientes e incubados a 37°C durante 2 horas con agitación suave. Las eficiencias de protoplastización fueron determinadas como siempre, por choque osmótico.

## Resultados

hipertónico (sacarosa 0,5 M) y que resulta más eficiente a pH 8 (SMT) que a pH 6,5 (SMM). La presencia de ion  $Mg^{2+}$  (20 mM) resultó esencial para la viabilidad de los protoplastos así obtenidos.

En consecuencia, la puesta a punto del sistema se prosiguió llevando a cabo las incubaciones en medio SMT omitiendo el agregado de  $Co^{2+}$  y en ausencia de lisozima.

Con el objeto de estandarizar el sistema y hacerlo más reproducible, se ensayaron diversos métodos de congelación y conservación de los cultivos exponenciales de partida. De éstos, el congelamiento de alicuotas en medio mínimo (ver Materiales y Métodos) en presencia de 15 a 18% de glicerol a  $-70^{\circ}C$ , resultó el más conveniente.

Esta manipulación no sólo simplificó el protocolo, sino que aceleró marcadamente el proceso debido a que el congelamiento y descongelamiento de los cultivos contribuyó a su fragilización. La cinética de este proceso fue determinada para la cepa *israelensis* 1884. Como puede apreciarse en la Figura I.3, luego de 15 minutos se alcanzó una eficiencia de cerca del 100% (tomada como diferencia entre el número de células inicialmente tratadas y el número de colonias osmoresistentes luego del tratamiento).

El proceso fue asimismo seguido microscópicamente y como se muestra en la Figura I.4, involucra la extrusión de las células a través de un orificio en la pared celular, resultando en bacilos con forma de "raqueta" durante los primeros estadios del proceso.

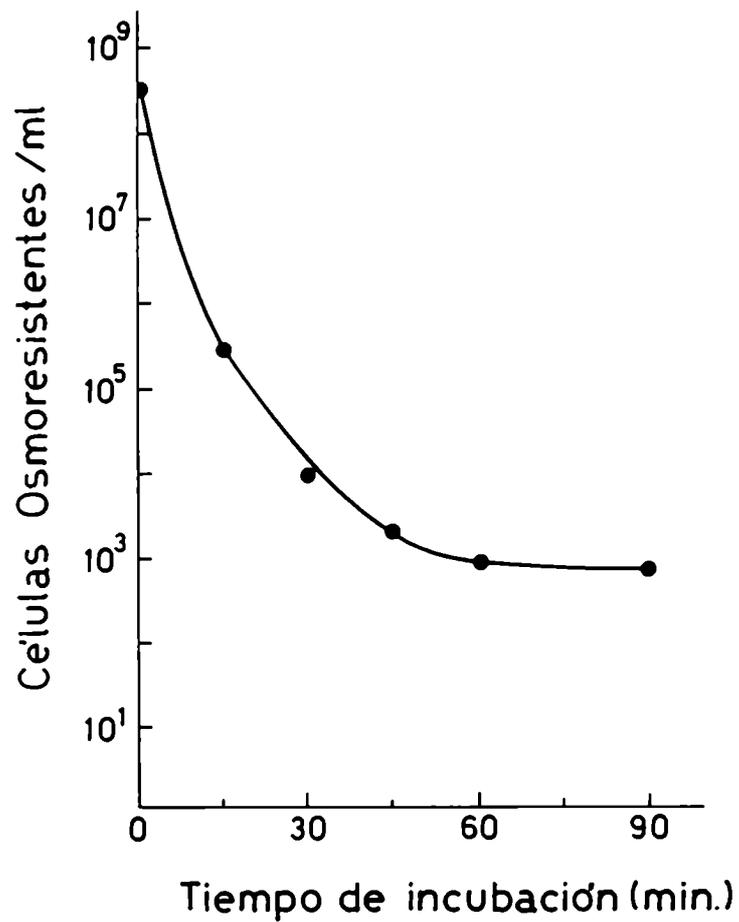


Figura I.3.

Cinética de protoplastización en  
*Bacillus thuringiensis israelensis* 1884

Se tomaron muestras de la mezcla de incubación en SMT a diferentes tiempos, se las sometió a choque osmótico y se las plaqueó en medio sólido LB para determinar el número de colonias osmo-resistentes.

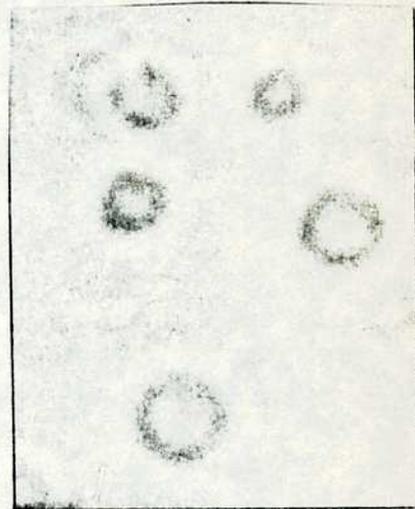
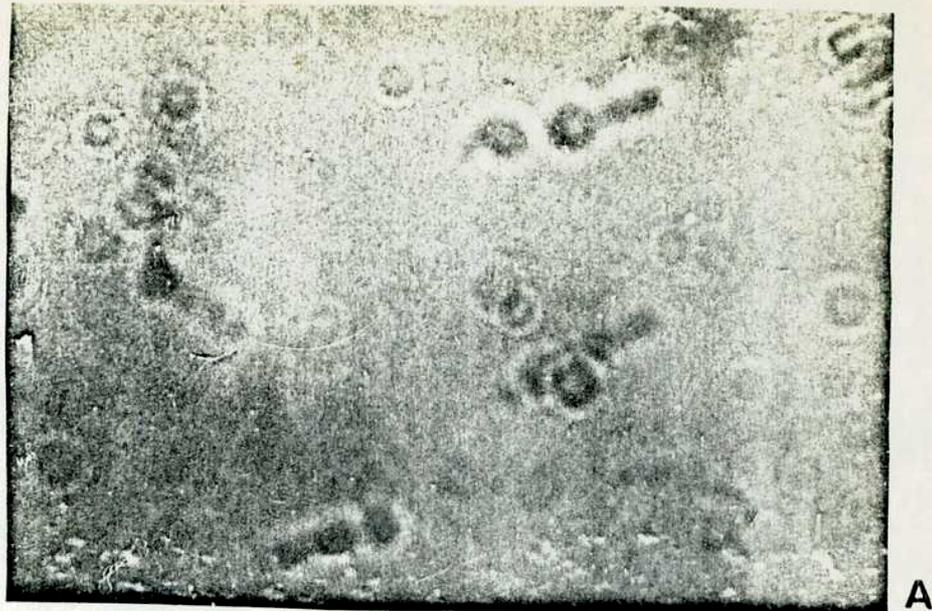


Figura I.4.

Proceso de protoplastización

- A: bacilos en "raqueta" observados luego de 10 minutos de incubación en medio SMT.
- B: el 80% de la población ha completado la extrusión luego de 20 minutos.
- C: protoplastos típicamente redondos, luego de 30 minutos de incubación. 100x.

## Resultados

Luego de 30 minutos de incubación, es posible observar en su mayoría protoplastos de forma circular típica. Sin embargo, todas las células en el estadio "raqueta" fueron sensibles a los tratamientos de choque osmótico.

La optimización de los parámetros más importantes de este sistema (condiciones de cultivo, temperatura de incubación, etc.), llevó finalmente al diseño de un protocolo estándar (ver Figura I.5), que aplicado a tres cepas diferentes resultó en los rendimientos que se resumen en la Tabla I.5.

### I.3. REGENERACION

En vista de nuestro interés por la utilización de estos protoplastos en experimentos de transformación por ADN plasmidico, la reversión de éstos a la forma bacilar era un punto importante a ser resuelto.

Es conocido el hecho de que la regeneración de los protoplastos de *B. thuringiensis* es sumamente difícil de obtener (FISCHER *et.al.*, 1984; ALIKHANIAN *et.al.*, 1981). En este sentido, hemos ensayado una variedad de medios de regeneración y condiciones de generación de los protoplastos con el objeto de aumentar las bajas frecuencias de reversión obtenidas.

Con respecto a los protoplastos, es importante notar que el mecanismo mismo de formación de éstos (por extrusión, ver Figura I.4), tiene importantes implicancias en los procesos de re-

Figura I.5

Protocolo estándar de generación de protoplastos  
por inducción autolítica

- I) Cultivo en medio SCG (0,025% glucosa) durante un noche a 30°C
- II) Dilución 1:50 en SCG fresco y crecimiento a 30°C hasta D.O.<sub>600</sub> = 0,15.
- III) Agregado de 1 volumen de medio rico LB y crecimiento hasta D.O.<sub>600</sub> = 0,4.
- IV) Cosecha y lavado de los cultivos en agua bidestilada en frío.
- V) Resuspensión en medio mínimo MB + 18% glicerol (1/10 del volumen original)
- VI) Congelación a -70°C en alícuotas de 1 ml.
- VII) Descongelamiento a temperatura ambiente.
- VIII) Dilución 1:3 en SMT + 0,8% BSA.
- IX) Incubación a 39°C con agitación suave durante 15 a 30 minutos.

Determinación de la eficiencia por choque osmótico

- X) Utilización
  - Transformación
  - Fusión
  - Extracción de ADN (Eckhardt)

TABLA I.5.

GENERACION AUTOLITICA DE PROTOPLASTOS EN *Bacillus thuringiensis*  
(Protocolo estándar)

Cepa	Número original de células/ml	Colonias osmo-resistentes/ml	Eficiencia de protoplastización
<i>thuringiensis</i> HD2-5	10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>5</sup>	99.6%
<i>kurstaki</i> HD73	10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>5</sup>	99.8%
<i>israelensis</i> 1884	10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>4</sup>	100%

Alicuotas congeladas fueron descongeladas a temperatura ambiente, diluidas en medio SMT/BSA e incubadas a 39°C (con agitación suave durante 30 minutos). Muestras fueron plaqueadas para recuento en medio sólido LB antes y después del tratamiento.

## Resultados

generación ulteriores. Los protoplastos así originados carecen de restos de pared celular que puedan funcionar como iniciadores para que el sistema regenerativo pueda actuar eficientemente.

Teniendo en cuenta este hecho, se ensayaron diversos factores que, agregados a los medios de protoplastización fueron capaces de proteger a estas formas, haciéndolas menos frágiles; algunos de estos factores solos o en combinación, interfirieron con el proceso de protoplastización reduciendo la eficiencia a niveles poco aceptables; el aumento en la concentración de  $Mg^{2+}$ , por ejemplo, no hizo posible que éste ocurriera eficientemente. En la Tabla I.6 se resumen los resultados más significativos de este tipo de experimento.

Es evidente que el agregado de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,8% final constituye el medio más adecuado de protección de los protoplastos, ya que los hace más viables (aumentando su capacidad de regeneración), sin interferir con el proceso de generación de los mismos. El agregado de  $Ca^{2+}$ , si bien presenta baja o nula interferencia, no se eligió como factor de protección pues presenta problemas de precipitación en el medio mínimo de conservación de los cultivos de partida.

Por lo tanto, de aquí en adelante, se utilizó el protocolo estándar (Figura I.5) en presencia de 0,8% final de seroalbúmina bovina en la mezcla de incubación.

De los diferentes medios sólidos de regeneración ensayados, dos resultaron los más convenientes: DM3, utilizado comúnmente para la regeneración de protoplastos de *B. subtilis* y MRE, cuya base osmoprotectora está constituida por sacarosa 0,3 M en lugar del succinato de sodio constituyente del medio DM3.

TABLA I.6.

**EFFECTO DE FACTORES DE PROTECCION  
SOBRE LA EFICIENCIA DE PROTOPLASTIZACION**

Agregados al SMT	Colonias osmoresis- tentes/ml <sup>a</sup>	Eficiencia de protoplastización
	10 <sup>b</sup>	100%
BSA 2%	5.2x10 <sup>5</sup>	99%
Ca <sup>2+</sup> 20 mM	2x10 <sup>3</sup>	100%
BSA 2%+Ca <sup>2+</sup> 20mM	5x10 <sup>6</sup>	90%
BSA 0,8%	100	100%

a: número original de células/ml = 5x10<sup>7</sup>

b: se observa lisis celular por exceso de fragilidad de los protoplastos

Protoplastos de *israelensis* 1884 fueron generados por el protocolo estándar. Los diferentes agregados fueron hechos en el medio SMT antes de resuspender los cultivos congelados.

## Resultados

Las frecuencias de reversión obtenidas utilizando ambos medios en diferentes condiciones (dureza, temperatura de incubación, etc.) no superaron en ningún caso el 5%. En la Tabla I.7 es posible apreciar la interferencia que provoca la presencia de lizozima en las mezclas de incubación en cuanto al nivel de regeneración alcanzado. También es posible observar las diferencias que existen dentro de la especie respecto de las eficiencias de protoplastización y/o regeneración obtenidas para dos cepas diferentes.

Paradójicamente, la regeneración de estos protoplastos en medios líquidos es altamente eficiente; tanto las versiones líquidas de los medios DM3 y MRB, como el agregado de nutrientes a los medios de protoplastización (SMMP, SMTP), permitieron la reversión completa de los protoplastos a la forma bacilar en un mínimo de 12 horas de incubación a 30°C.

Con el objeto de evaluar el nivel de regeneración real, se efectuó la dilución seriada de las suspensiones de protoplastos en los medios de regeneración. De este modo, la presencia de formas bacilares osmoresistentes en las diluciones mayores ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , en las cuales no podrían existir bacilos "contaminantes" que no se hubieran convertido en protoplastos), es indicativa del proceso de regeneración (a pesar de la división celular que ocurre).

Por otro lado, es interesante observar que en las suspensiones concentradas (sin diluir o diluidas 1/5) se produce un efecto inhibitorio de la regeneración que pudo ser superado por el agregado de enzimas proteolíticas como tripsina o pronasa a las suspensiones (ver Tabla I.8). Este resultado sugiere fuerte-

**TABLA 17.**  
**REGENERACION EN MEDIO SOLIDO DE AUTOPLASTOS**  
**DE *Bacillus thuringiensis***

Cepa	Medio de protoplastización	Eficiencia de protoplastización	Eficiencia de regeneración
<i>thuringiensis</i> HD2-5	SMT	98,9%	5 %
	SMT+lisozima 1 mg/ml	99 %	1,2%
<i>israelensis</i> 1884	SMT	100%	0,25%
	SMT+lisozima 1 mg/ml	100%	0

Los protoplastos fueron generados de la manera habitual; la regeneración se llevó a cabo en medio sólido DM3 en ambos casos.

TABLA I.8.

REGENERACION LIQUIDA EN PRESENCIA DE ENZIMAS  
PROTEOLITICAS

Medio líquido	Tratamiento	Regeneración		
		NDa	-3 <sup>b</sup>	-4 <sup>c</sup>
SMTF				+
MRB				+
SMTF	Tripsina 250µg/ml			+
MRB	Tripsina 250µg/ml			+

a: ND= no diluido

b y c: diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  de las suspensiones originales.

Una vez obtenidos los protoplastos en SMT/BSA, fueron centrifugados y resuspendidos en SMTF o MRB líquido y diluidos en SMT o MRB según corresponda.

Los tratamientos con tripsina 250 µg/ml, se efectuaron a 37°C durante 10 minutos. La regeneración se llevó a cabo en estufa a 30°C durante toda la noche.

mente la influencia que ciertos factores proteicos (autolisinas liberadas por los protoplastos) estarían ejerciendo sobre los procesos regenerativos, oponiéndose a ellos.

De todos modos, la regeneración líquida tiene grandes inconvenientes cuando se desea seleccionar transformantes ya que este proceso provoca un alto grado de pérdida de plásmidos (COFRE y SANCHEZ-RIVAS, 1983), disminuyendo en consecuencia las frecuencias de transformación que es posible obtener.

### I.4. TRANSFORMACION DE "AUTOPLASTOS" POR ADN PLASMIDICO

#### I.4.1. Aislamiento y purificación de plásmidos en *Bacillus thuringiensis*

Debido a las dificultades que presenta la extracción de megaplásmidos, se han ensayado diversos métodos de aislamiento. Entre éstos, el método de lisis *in situ* de Eckhardt (ECKHARDT, 1978), permite visualizar los plásmidos residentes con un mínimo de manipulación ya que se basa en la separación de los mismos en geles de agarosa 0,5% verticales en los cuales se siembra una suspensión de protoplastos que se lisa directamente en los pocillos del gel. La Figura I.6 permite observar tanto el megaplásmido de 72 Md como los plásmidos pequeños de 3,5 y 5 Md de la cepa *israelensis* 1884.

Por otro lado, la aplicación de la técnica de lisis alcalina de Birnboim y Doly (BIRNBOIM y DOLY, 1979) adaptada a estos microorganismos (ver Materiales y Métodos), funciona también de manera eficiente, tanto en "minipreparaciones" (partiendo de

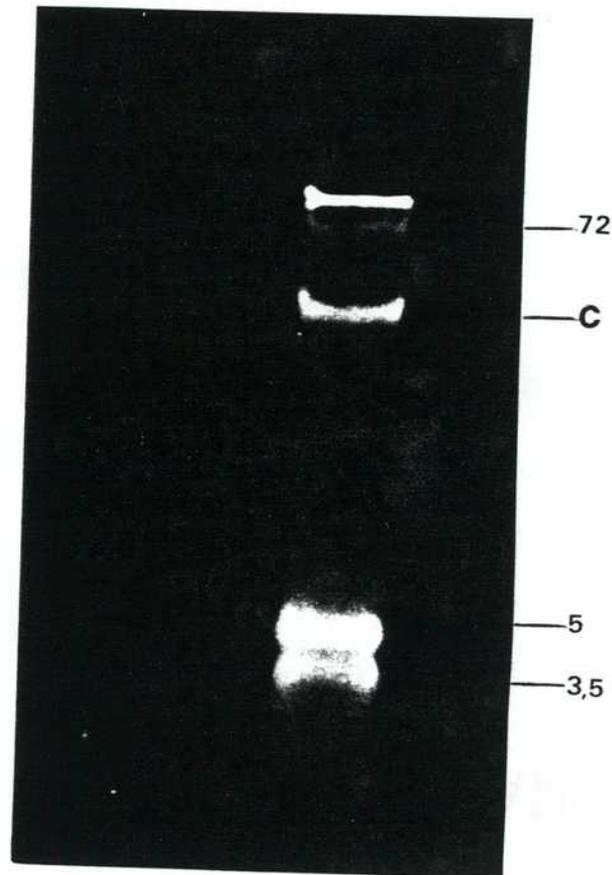


Figura I.6.

Contenido plasmídico de la cepa *israelensis* 1884

La lisis *in situ* se llevó a cabo según lo detallado en Métodos. Se separaron los plásmidos en un gel vertical de agarosa 0,5% a 3 V/cm durante 1 hora y 6 V/cm por espacio de 2 horas. El gel fue revelado en una solución de BrEt 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y fotografiado en un transiluminador U.V. Masas moleculares en Md.

1.5 ml cultivo), como en preparaciones en gran escala para gradientes de densidad de CsCl. Esta última técnica es la que fue utilizada en todos los experimentos aquí descritos.

### I.4.2 Transformación de protoplastos con ADN plasmidico en *Bacillus thuringiensis israelensis*

La transformación se llevó a cabo en todos los casos de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos, que se basa fundamentalmente en el originalmente diseñado por Chang y Cohen (CHANG y COHEN, 1979) para *B. subtilis*.

Los plásmidos utilizados poseen orígenes de replicación compatibles en organismos Gram positivos y confieren resistencia a antibióticos seleccionables en *B. thuringiensis*, si bien existen niveles basales de resistencia a algunos de ellos, como es el caso del cloranfenicol.

En la Tabla I.9, se resumen los resultados de varios experimentos de transformación llevados a cabo en la cepa *israelensis* 1884. Es importante notar que aún con las bajas frecuencias de regeneración obtenidas (y probablemente debido a ello, como se discutirá oportunamente), las frecuencias de transformación en función de los regenerantes es llamativamente alta (en el orden del 1% de los regenerantes). Si bien se hace dificultosa la visualización de los plásmidos introducidos debido a la presencia de plásmidos residentes de tamaño similar y a la alta frecuencia con que ocurren re-arreglos (deleciones, aparición de formas multiméricas), fue posible detectar bandas plasmídicas nuevas (no

TABLA I.9.

**TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE  
*Bacillus thuringiensis israelensis* POR ADN PLASMIDICO**

Plásmido	Marcador de resistencia	Regenerantes UFC/ml <sup>c</sup>	Transformantes UFC/ml
pTV1 <sup>a</sup>	Cloranfenicol Eritromicina	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>2</sup>
pT127 <sup>b</sup>	Tetraciclina	3,5x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>
pTV1 <sup>c</sup>	Cloranfenicol Eritromicina	10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>3</sup>

a y b: cepa *israelensis* 1884

c: cepa 4Q2-72; regeneración en líquido

Protoplastos de *israelensis* 1884 (100% de eficiencia) fueron transformados con los plásmidos pTV1 (a: 600 ng o c: 800ng) y pT127 (b:900 ng), como se describe en los Métodos.

La regeneración fue llevada a cabo en medio sólido MRB y se efectuó la selección indirecta por réplica en medio LB con el antibiótico correspondiente. En el caso de la cepa 4Q2-72, se efectuó en medio líquido MRB y posterior plaqueo en medio LB con antibiótico.

## Resultados

existentes en los receptores originales) en geles de agarosa (ver Figura I.7). En el caso del plásmido pT127, se observó que éste fue capaz de establecerse y mantenerse en Bti aún en ausencia de presión selectiva. Por el contrario, pTV1 (que lleva el transposón Tn917) presenta dificultades en su establecimiento y mantenimiento. Como veremos más adelante, este hecho sea probablemente el responsable de la alta frecuencia de mutagénesis inducida por este plásmido en *B. thuringiensis*.

En la Tabla I.9 se presenta también el resultado de un experimento llevado a cabo con la cepa 4Q2-72 de la subespecie *israelensis*, utilizando el plásmido pTV1 para transformar. Se decidió el uso de esta cepa ya que ésta presenta un único plásmido de 72 Md (portador de la información para el cristal paraesporal), haciendo más fácil la detección de los plásmidos introducidos en geles de agarosa. En este experimento, se observa que la frecuencia de transformación es mucho más baja que en los casos anteriores ( $10^{-5}$  transformantes/célula), y esto es debido a que en este caso, la selección se llevó a cabo a partir de bacilos regenerados en medio líquido.

Este resultado confirma la observación (común a *B. subtilis*), de la abrupta disminución (más de dos órdenes de magnitud) en el número de transformantes cuando se utiliza la regeneración en estos medios. A partir de un transformante Em<sup>R</sup>Cm<sup>R</sup>, se analizó el contenido plasmídico y en la Figura I.8 se presenta el gel de agarosa en el cual se detectó la presencia de una banda plasmídica de menor tamaño que el plásmido pTV1 con el que se transformaron los protoplastos.

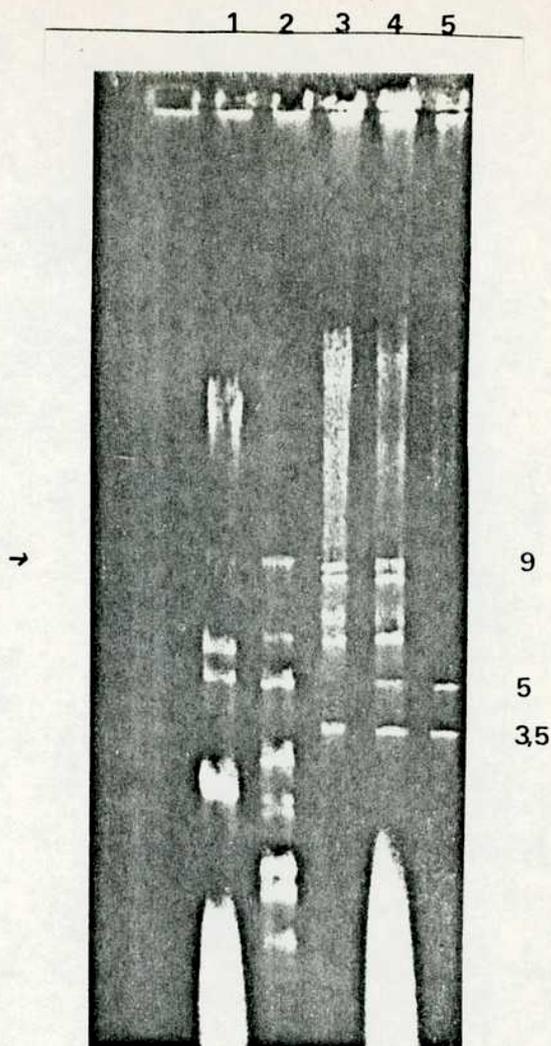


Figura I.7.

Transformación de protoplastos de *B. thuringiensis israelensis* 1884 por ADN plasmídico

Gel de agarosa 0,6% mostrando el contenido plasmídico de un clon transformante de *B. thuringiensis israelensis* 1884 con ADN de pT127; 1 = pT127 (250 ng); 2 = V517 (marcador de peso molecular); 3 = clon T3 crecido en presencia de tetraciclina 10 µg/ml; 4 = el mismo clon crecido sin presión selectiva; 5 = *B. thuringiensis israelensis* 1884. Las masas moleculares se indican en Md.

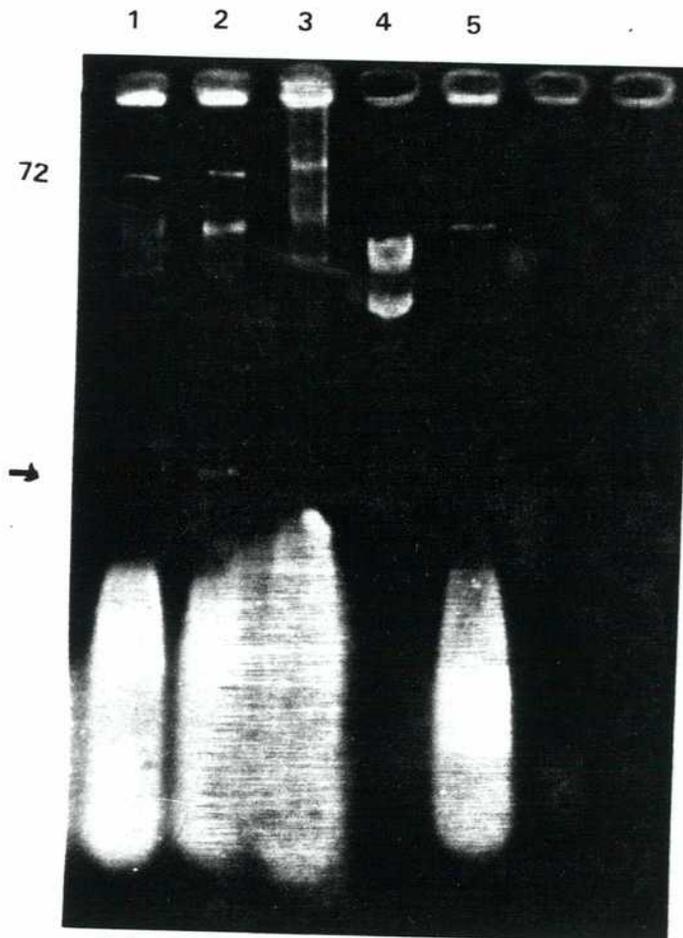


Figura I.8.

Transformación de protoplastos de la cepa 4Q2-72 (*israelensis*) por ADN plasmídico

Minipreparaciones de clones transformantes de 4Q2-72 con ADN de pTV1.

1 = clon 1a Erm<sup>R</sup>; 2 = clon 1 Cm<sup>R</sup> Erm<sup>R</sup>; 3 = 4q2-72 sin transformar; 4 = pTV1 (200 ng); 5 = clon 1b Erm<sup>R</sup>.

## Resultados

Este resultado demuestra que el plásmido pTV1 en Bti es inestable y sufre re-arreglos (en este caso se trataría aparentemente de una delección). En el mismo gel se puede observar que otros clones transformantes seleccionados en medios con eritromicina en ausencia de cloranfenicol, (que resultaron posteriormente resistentes a eritromicina 2  $\mu\text{g/ml}$  pero sensibles a cloranfenicol 5  $\mu\text{g/ml}$ ), no presentan dicha banda. Podría tratarse de clones que han sufrido transposición al cromosoma o al megaplásmido de 72 Md, con pérdida del replicón de pTV1 portador del determinante de resistencia a cloranfenicol.

Este tipo de resultados sugiere de manera evidente, que este sistema presenta grandes dificultades en cuanto a la obtención de altas frecuencias de transformación, en parte por las características de estos protoplastos (de baja capacidad regenerativa), y en parte por problemas que surgen en el establecimiento y mantenimiento de los plásmidos introducidos, como será discutido más adelante.

### I.4.3. Protocolos alternativos

En vista de las dificultades observadas en el uso de los autoplastos en experimentos de transformación, se pensó en desarrollar paralelamente una serie de protocolos alternativos que tuvieron por objeto detener el proceso de protoplastización en los primeros estadios. Esto, probablemente aumentaría las oportunidades de una mejor regeneración en placa, sin afectar el mecanismo de toma del ADN a nivel de las zonas de membrana celular expuesta.

## Resultados

Uno de estos protocolos, se basó en uno descrito para la subespecie *kurstaki* por Heierson y colaboradores (HEIERSON *et. al.*, 1987), quienes describieron un método de transformación de células vegetativas. Sin embargo, las incubaciones efectuadas en medio Tris 50 mM pH 8,9/sacarosa 25% inducen al sistema autolítico con producción de autoplastos, aunque en bajo porcentaje. Este método modificado por nosotros, según lo detallado en Materiales y Métodos, dio por resultado una frecuencia de transformación del orden de  $10^{-6}$  transformantes por célula viable para la cepa *israelensis* 1884, utilizando el plásmido pUB110. Si bien este protocolo aumentó notablemente la viabilidad de las células luego de la inducción autolítica, la frecuencia de transformación obtenida fue mucho más baja que la obtenida con nuestro protocolo original, sobre todo teniendo en cuenta la alta cantidad de ADN utilizada (5  $\mu$ g) en las transformaciones.

Por otro lado, se ensayó un protocolo basado en el utilizado para la transformación de *B. brevis* (TAKAHASHI *et. al.*, 1983) descrito en "Materiales y Métodos". La transformación de la cepa *israelensis* 1884 con el plásmido pTV1 (3  $\mu$ g) resultó en una frecuencia de  $7 \times 10^{-5}$  transformantes/célula viable, que aún se encuentra dos órdenes de magnitud por debajo de las obtenidas anteriormente. En este último caso también se observó un alto porcentaje de pérdida e inestabilidad de pTV1 en los clones transformantes; aproximadamente el 75% de los clones perdieron el determinante de resistencia a cloranfenicol, reteniendo la resistencia a eritromicina cuando se los cultivó en ausencia de presión selectiva.

I.5. FUSION INTERESEPECIFICA

En virtud del interés que presenta la construcción de organismos híbridos, tanto en el aspecto aplicado como desde el punto de vista básico, se encaró la realización de experimentos de fusión de protoplastos. Como primera aproximación, se llevó a cabo la fusión interespecie entre la cepa *israelensis* 1884 y la cepa IA510 de *B. subtilis*. Como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos, 10<sup>7</sup> protoplastos de IA510 fueron fusionados a una cantidad equivalente de protoplastos previamente calentados de Bti 1884. Este tratamiento provoca la inactivación de las células de *B. thuringiensis israelensis* que actuarán sólo como donantes de su contenido en ADN; dicha manipulación asegura la contra selección de estas células, así como la inactivación de factores tóxicos para las células de *B. subtilis*, que impiden su regeneración (observaciones hechas por nosotros en experimentos preliminares de fusión).

Las mezclas de fusión fueron incubadas en medio hipertónico mínimo para permitir la regeneración, suplementado con los requerimientos aminoacídicos de IA510. En este medio se permite la regeneración de protoplastos fusionados y no fusionados, así como de algunas células (presentes en mínima cantidad) de *B. thuringiensis israelensis* que hubieran resistido al tratamiento por calor. Entre un 5 y un 10% (75 colonias /1000 regenerantes en promedio) de las colonias regenerantes seleccionadas en medio mínimo resultaron protótroficas, indicando un alto porcentaje de fusión.

## Resultados

Estos productos de fusión, han recibido de las células de *B. thuringiensis israelensis*, la capacidad de crecer en medio hipotónico mínimo (no suplementado) por complementación y/o posible recombinación entre ambos cromosomas. Dichos clones, poseen la morfología de las células de *B. subtilis* IA510 cuando se los observa microscópicamente. Si bien los pre-esporas de estos clones no mostraron evidencias de inclusiones cristalinas, es claro que existió transferencia de plásmidos de *B. thuringiensis israelensis* a IA510, entre los cuales se encuentra (aparentemente completo) el megaplásmido de 72 Md, como se muestra en la Figura I.9.

Estos resultados muestran que los caracteres genéticos cromosomales de *B. thuringiensis israelensis* pueden ser expresados en *B. subtilis* y también, que los plásmidos de alto y bajo peso molecular pueden ser transferidos por fusión. La cepa IA510 de *B. subtilis* fue elegida para estos experimentos, debido a su mutación *recE4*, que la hace deficiente en recombinación. Dicha característica, hace que esta cepa constituya un buen receptor de ADN exógeno permitiendo su establecimiento y mantenimiento sin el alto nivel de re-arreglos característicos de *B. subtilis*.

Sin embargo, aún en este contexto es posible que ocurran deleciones y/o pérdida de plásmidos por mecanismos *recE4* independientes, o bien por alguna función *Rec* aportada por el ADN del *B. thuringiensis israelensis* dador y expresada en *B. subtilis*, ya que se observan bandas plasmídicas nuevas de menor talla que en el huésped original.

En cuanto a la estabilidad de los productos de fusión, se ha podido determinar que los protótrofos seleccionados en medio mínimo no segregan los fenotipos parentales luego de varias

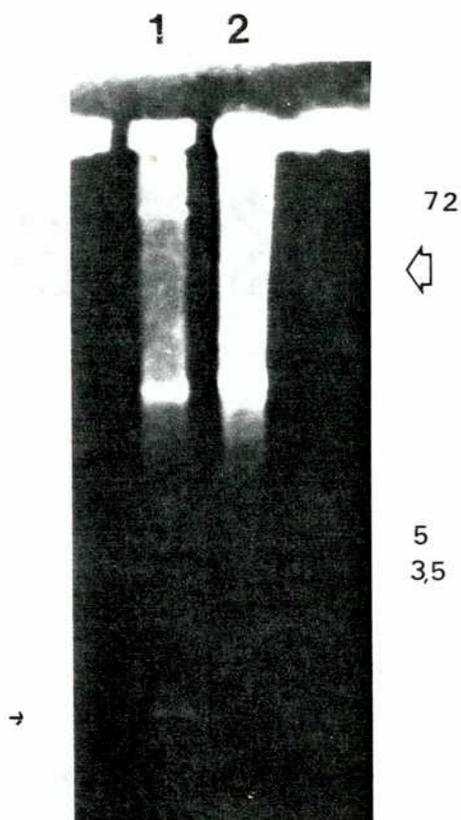


Figura I.9.

Transferencia de plásmidos por fusión interespecífica

Contenido plasmídico de:

1: producto de fusión  $F_2$  (*B. subtilis* IA510 x *B. thuringiensis israelensis* 1844) y 2: *B. thuringiensis israelensis* 1844; la flecha indica la posición del ADN cromosómico. El tamaño de los plásmidos se indica en Md.

## Resultados

generaciones en medio nutritivo; la totalidad de las colonias analizadas provenientes de este medio, resultaron protótrofas cuando se las transfirió a medio mínimo nuevamente. Esto sugiere que los productos de fusión obtenidos han sufrido recombinación y de allí su gran estabilidad.

Es bien conocido que la fusión de protoplastos en *Bacillus subtilis* da lugar a células diploides con propiedades particulares (SCHAEFFER *et.al.*, 1976; SANCHEZ-RIVAS *et.al.*, 1982). Algunos de estos son fenotípicamente recombinantes pero poseen uno de los cromosomas inactivos. El fenómeno de recombinación que origina estos productos es también muy particular ya que es recE4 independiente y ocurre preferencialmente en dos puntos del cromosoma correspondientes al origen y al término de la replicación (SANCHEZ-RIVAS *et.al.*, 1982).

En el caso de nuestros ex-fusionantes no es posible afirmar de qué tipo se traten; sin embargo, es probable que haya ocurrido recombinación de tipo homólogo en ciertas zonas del cromosoma que se superpongan en ambos padres. Los datos de co-transducción disponibles (Ver Introducción), indican que tal superposición física sería factible al menos para los marcadores *leu* y *arg* (IA510 es *leu*, *arg*, *threo*).

I.6. DISCUSION

Se ha diseñado un método de alta eficiencia para la generación de protoplastos en *B. thuringiensis*. El proceso de protoplastización aparentemente involucra la inducción y/o activación de factores endógenos autolíticos bajo condiciones de crecimiento rápido (ARONSON *et.al.*, 1986).

Basados en los estudios efectuados por Kingan y Ensing (KINGAN y ENSING, 1968), hemos ensayado extractos crudos de cultivos en esporulación en nuestras mezclas de incubación para generar protoplastos. Resultó claro entonces, que el agregado de dichos extractos no era necesario para que ocurriera la conversión a protoplastos.

K. Temeyer (TEMEYER, K., 1987) ha descrito recientemente un método de generación de protoplastos en el cual trató a células de un cultivo exponencial con extractos crudos muy similares a los descritos anteriormente. En este caso la adición de los extractos aceleró el proceso, pero los protoplastos así obtenidos resultaron frágiles e inestables. Por otro lado, las incubaciones en ausencia de los extractos en esas condiciones (actividad autolítica intrínseca) resultaron muy lentos (más de 2 horas) y menos eficientes.

Nuestras condiciones óptimas (ver protocolo estándar en Figura I.5), permiten una conversión completa a protoplastos en 30 minutos, si bien cerca del 100% de las células son ya osmosensibles luego de 15 minutos de incubación.

## Resultados

Asimismo, hemos observado que el crecimiento en medios con bajos niveles de glucosa resultó favorable para la obtención de rendimientos mayores, como había sido ya descrito por otros autores (MARTIN *et.al.*, 1981; LERECLUS *et.al.*, 1982).

Es importante notar que la densidad del cultivo en crecimiento exponencial a la cual se cosechan los cultivos es crítica para conseguir altos rendimientos de protoplastos; resultó considerablemente menos eficiente el tratamiento de células cosechadas a densidades ópticas mayores que 0,5 (D.O 600 nm).

El congelamiento de las alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en medio mínimo aumentó sensiblemente la velocidad y eficiencia del proceso; los cultivos también fueron congelados en medio SMT para su conservación pero esto, como era de esperarse, provocó fragilización excesiva de los protoplastos.

En cuanto a los procesos de regeneración, constituyen evidentemente el paso limitante para la utilización eficiente de estos "autoplastos" en experimentos de transformación. En efecto, los resultados expuestos en la Tabla I.9, muestran que es posible obtener altas frecuencias de transformación con protoplastos preparados con nuestro método, teniendo en cuenta los bajos niveles de regeneración obtenidos (entre 1 y  $8 \times 10^{-2}$  transformantes/célula regenerante). Aún más, es una observación común que mayores niveles de regeneración rinden frecuencias de transformación relativas considerablemente menores. Muy recientemente, un método similar fue descrito por Crawford y colaboradores (CRAWFORD *et.al.*, 1987) para autoplastos de la subespecie *kurstaki*; estos autores alcanzaron frecuencias de regeneración más altas, pero a expensas de un menor nivel de transformación ( $1,3 \times 10^{-5}$ ) considerando que una cantidad de ADN diez veces más alta fue utilizada (10  $\mu\text{g}$ ).

## Resultados

También hemos observado este hecho, en experimentos de transformación llevados a cabo con protoplastos generados en medio SMT en presencia de prolina 0,01%, descrita como osmoprotector de formas L en *Bacillus subtilis* (ROGERS y McCONNEL, 1970). Esta modificación dio por resultado eficiencias de protoplastización más bajas que las habituales, pero permitió una regeneración más eficiente en medio sólido DM3 (8%), si bien la frecuencia de transformación no superó  $2 \times 10^{-5}$  transformantes/célula regenerante.

Paralelamente, los protoplastos generados con nuestro sistema pudieron ser eficientemente utilizados en experimentos de fusión interespecífica. Esta fue llevada a cabo entre células de *B. thuringiensis israelensis* 1884 y *B. subtilis* IA510, con el objeto de comprobar la capacidad de nuestros protoplastos para actuar como donantes de ADN y expresar sus caracteres genéticos en otra especie; nuestros resultados muestran que así lo conseguimos, con eficiencia de fusión de hasta un 10%.

En cuanto a la transformación con ADN plasmídico, existe otro punto crítico que debe ser tomado en cuenta; éste se relaciona con el hecho de que no todos los plásmidos se establecen y mantienen de la misma forma aunque posean orígenes de replicación propios de Gram positivos. En efecto, hemos mencionado la gran inestabilidad mostrada por el plásmido pTV1 a diferencia de las observaciones hechas para pT127 en la misma cepa. Si este hecho (también observado en *B. subtilis*, aunque no al mismo nivel) tiene relación con el mecanismo de replicación del plásmido o con la presencia del transposón Tn917 en el mismo, es una posibilidad que queda aún por estudiar (ALONSO *et.al.*, 1987).

## Resultados

De todos modos, los protoplastos generados utilizando nuestro sistema de inducción autolítica pueden ser aplicados a manipulaciones genéticas como transformación por ADN plasmídico y fusión. Sin embargo, los resultados obtenidos por nosotros, así como por otros autores (CRAWFORD *et.al.*, 1987; HEIERSON *et.al.*, 1987) sugieren que el uso de protoplastos en este tipo de experimento involucra un compromiso entre un alto nivel de regeneración y una toma de ADN eficiente, la cual obviamente depende de la existencia de una membrana celular totalmente expuesta.

## CAPITULO II: MUTANTES REGULATORIAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBESPECIE *ISRAELENIS*

La utilización de mutantes regulatorias es una herramienta reconocidamente valiosa para el estudio genético de la regulación de la síntesis proteica en general y del cristal larvicida en particular. Es por esto que consideramos de sumo interés llevar adelante estrategias para obtener y/o detectar mutantes de este tipo en *B. thuringiensis*.

Como ya ha sido mencionado en la Introducción, la formación del cuerpo paraesporal ocurre generalmente de 2 a 3 horas luego de concluida la etapa de crecimiento exponencial (ARONSON *et.al.*, 1982; SOMERVILLE, 1971). Para sintetizar la cantidad de proteína tóxica encontrada en estas estructuras, entre un 25 y un 30% de la actividad biosintética de la célula debe dedicarse a la formación de estos polipéptidos en particular (MINNICH y ARONSON, 1984).

Se ha demostrado que existen varias especies de protoxina (o toxinas) incluso dentro de un mismo serotipo (IIZUKA y YAMAMOTO, 1983; YAMAMOTO y McLANGHLIN, 1981), de modo que podría estar involucrada la regulación de más de un gen en el cromosoma o en megaplásmidos en la subespecie *kurstaki* (ver Introducción). Asimismo, parece ser importante el papel regulatorio jugado por ciertos genes llevados en los plásmidos crípticos de menor tamaño (MINNICH y ARONSON, 1984; ARONSON, 1986; MITEVA y GRIGOROVA, 1987).

En conclusión, es claro que la célula requiere de señales regulatorias elaboradas para asegurar la producción de toxinas en un momento definido y en cantidades necesarias para formar inclusiones tóxicas.

### II.1. MUTANTES ACRISTALIFEROS

Una estrategia posible surgió de la explotación de la inestabilidad plasmídica que presenta pTV1 en las cepas de *B. thuringiensis israelensis* estudiadas. Ya hemos mencionado que este plásmido, portador del transposón Tn917 que confiere resistencia a eritromicina (ver Figura II.1), presenta grandes problemas para su establecimiento y permanencia, si bien es posible obtener transformantes en una primera selección.

Esta observación es aún más acentuada cuando se lleva a cabo la regeneración de los protoplastos en medio líquido. Este hecho, hace que pTV1 funcione como un "plásmido suicida" (si bien logra mantenerse mejor que un típico representante de este grupo) en *B. thuringiensis israelensis* y constituye una fuente de transposición de alta eficiencia. De esta forma, se realizó un experimento de transformación de protoplastos de *B. thuringiensis israelensis* 1884 utilizando el protocolo estándar descrito en el capítulo I, y regenerando en medio MRB líquido a 30°C. En la Figura II.2 se esquematiza el diseño experimental utilizado y el tipo de selección llevado a cabo. Si bien no se detectaron transformantes resistentes a cloranfenicol luego de la regeneración en

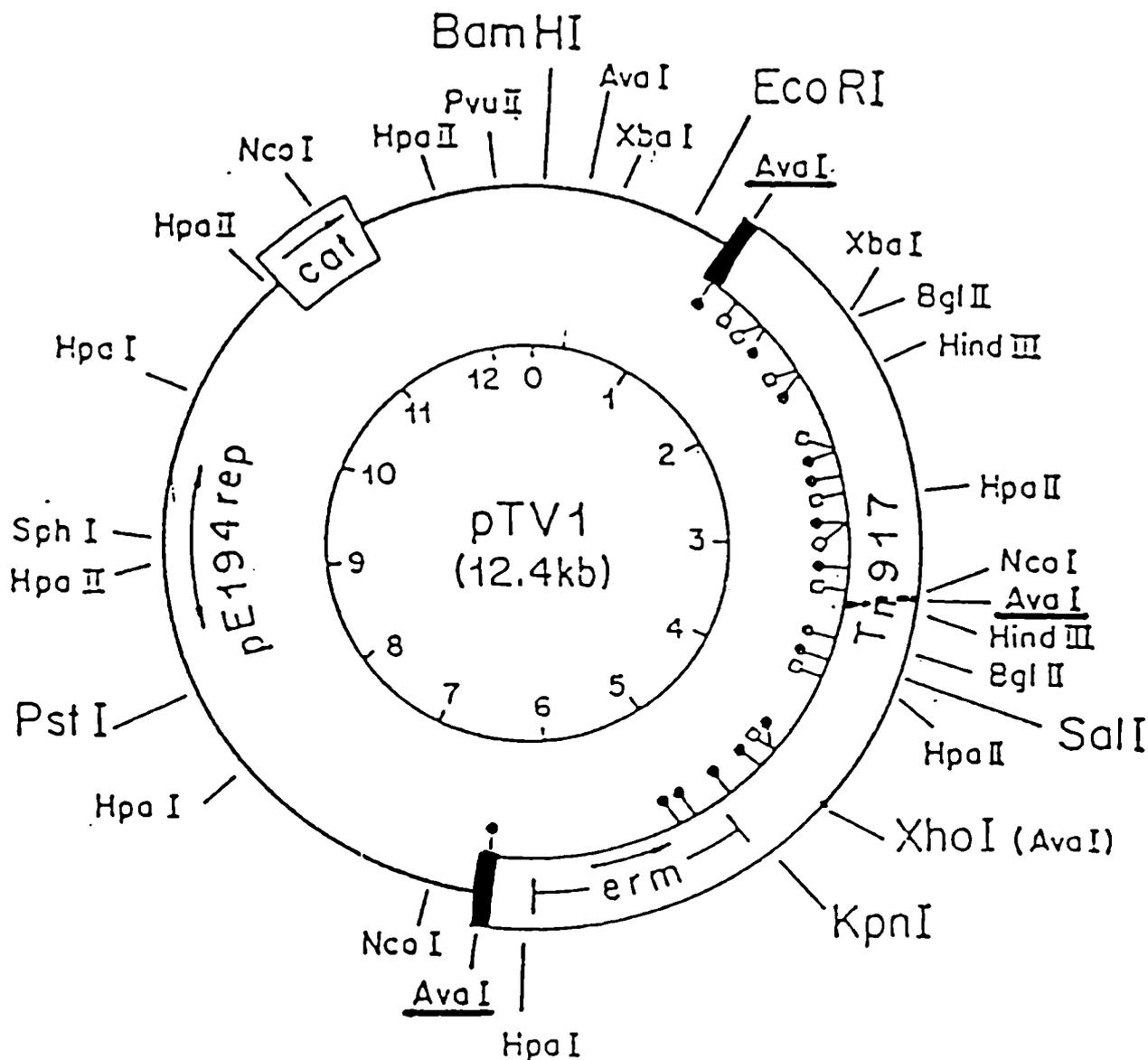


Figura II.1.  
Mapa de restricción del plásmido pTV1::Tn917

Las flechas indican los sitios de corte utilizados para generar la sonda conteniendo Tn917 posteriormente marcada con  $^{32}\text{P}$  e hibridizada con ADN de los mutantes acristalíferos. El plásmido pTV1 posee un origen de replicación termosensible (de pE194) que permite la selección de clones transpuestos en *Bacillus subtilis* (YOUNGMAN et.al., 1983).

Figura II.2.

Diseño experimental para la obtención de mutantes  
por transposición de Tn917

PROTOPLASTOS DE *B. thuringiensis israelensis* 1884



TRANSFORMACION MEDIADA POR PEG CON pTV1 (900 ng)



REGENERACION LIQUIDA 30°C

REGENERACION SOLIDA 30°C



MUTANTES FENOTIPICAS  $Erm^R/Cm^R$   
(2%)

TRANSFORMANTES  $Cm^R/Erm^R$   
( $5 \times 10^{-4}$  transformantes/  
célula regenerante)



MUTANTES  $Cry^-$  ( $\approx 0,7\%$ )

## Resultados

medio líquido y plaqueo en medios con el antibiótico, se obtuvieron con alta frecuencia (2%) colonias fenotípicamente diferentes en medio sólido de Schaeffer sin antibióticos.

De entre estas colonias, aproximadamente la tercera parte (5 colonias) presentaron al microscopio de contraste de fase pre-esporas que contenían una espora bastante más alargada que las colonias fenotípicamente normales y no presentaban inclusión paraesporal alguna. Dichos clones, fueron re-aislados y caracterizados; todos resultaron sensibles a cloranfenicol y resistentes a 2 µg/ml de eritromicina y fueron denominados Cry-. En la Figura II.3 se muestran fotografías de los bacilos de la cepa salvaje y mutante en la etapa de esporulación.

Una vez aislados estos clones, se procedió a extraer los plásmidos con el objeto de determinar si el fenotipo Cry- podía asociarse a algún cambio en el patrón plasmídico de los mutantes. Efectivamente, como es posible apreciar en la Figura II.4, el contenido plasmídico de los clones mutantes resultó considerablemente diferente de su contrapartida salvaje. Contrariamente a lo que cabría esperar en un mutante de inserción, (obtenido por transposición), el plásmido de 72 Md portador del gen del cristal tóxico presenta una delección relativamente importante respecto del megaplásmido salvaje.

Asimismo, los plásmidos de 4 y 5 Md también aparecen afectados y se observan algunas nuevas bandas ausentes en los clones salvajes.

Estos resultados indican que la introducción de Tn917 indujo una serie de re-arreglos complejos en *B. thuringiensis israelensis*, provocando la pérdida de la capacidad de sintetizar el

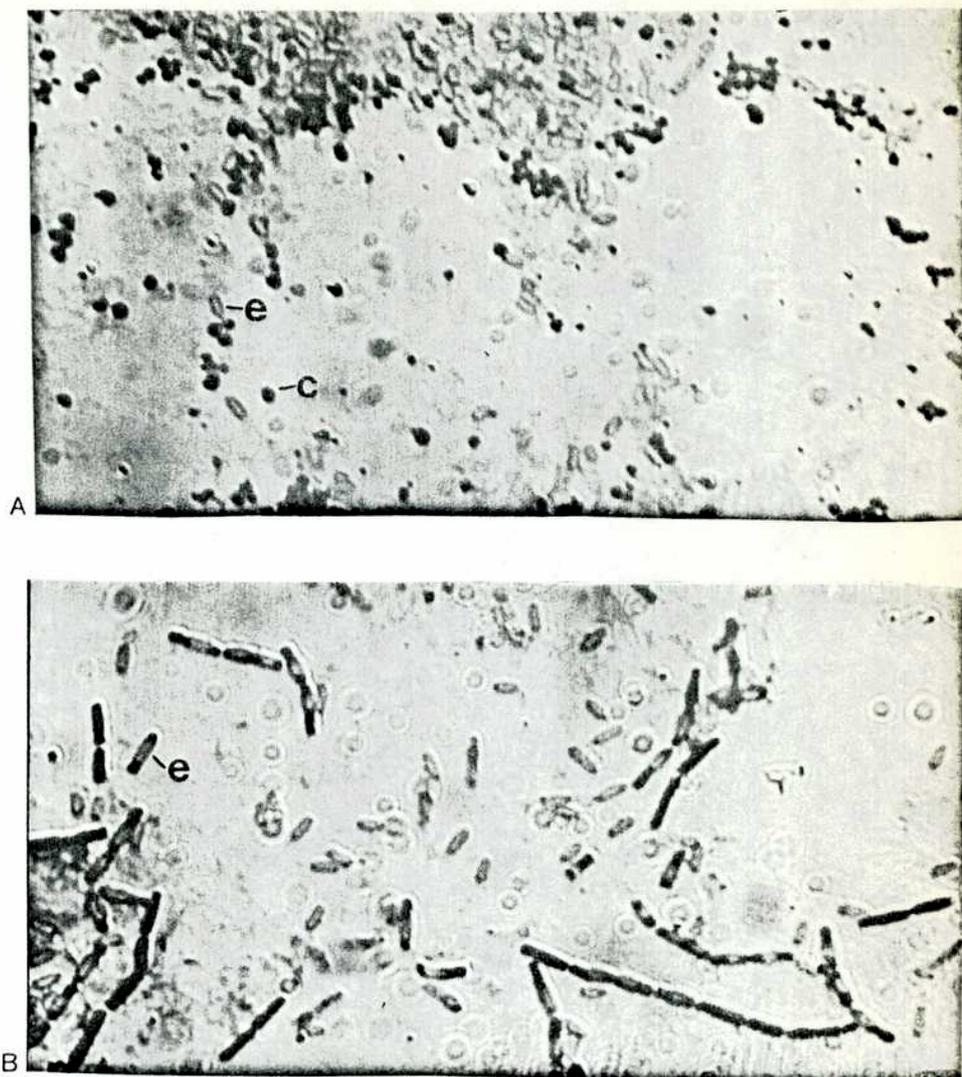


Figura II.3.

Mutantes acristalíferos de  
*Bacillus thuringiensis israelensis* 1884

A: fotografía de esporas y cristales de *B. thuringiensis israelensis* 1884 salvaje; e= espora, c= cristal paraesporal.  
B: mutante acristalífero Cry<sup>-</sup>, mostrando una única inclusión (e) correspondiente a la espora (en forma de banana). Los preparados fueron coloreados por la técnica de Smirnoff (SMIRNOFF, 1962,).

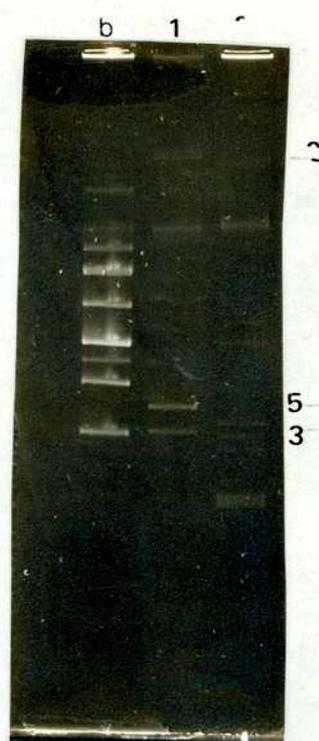


Figura II.4.

Contenido plasmídico de mutantes Cry-

Las preparaciones de plásmidos fueron obtenidas por la técnica de Birnboim y Doly, y posteriormente purificadas por gradiente de densidad de CsCl.

1 = *B. thuringiensis israelensis* 1884; 2 = mutante Cry $\bar{5}$ ; b = cepa *berliner* 1715. Las masas moleculares de los plásmidos se indican en Md.

## Resultados

cristal paraesporal. La atoxicidad de estos mutantes fue confirmada por ensayos *in vivo* sobre larvas de *Aedes sp.* (ver Tabla II.1).

Una de las preguntas pertinentes que cabía formularse, se refería a si estos mutantes lo eran por delección de una zona o la totalidad del gen correspondiente, o si estando esta zona intacta, la pérdida del fenotipo Cry<sup>+</sup> se debía a alteraciones en otras secuencias, involucradas en la regulación de la síntesis del cristal.

Con el objeto de responder a esta pregunta, se llevó a cabo la caracterización molecular de estos mutantes (trabajo en colaboración con la Unidad de Bioquímica Microbiana del Instituto Pasteur, Francia). Para esto, se realizó la hibridización del contenido plasmídico nativo y digerido con la enzima EcoRI con sondas de ADN correspondientes a los genes de los polipéptidos de 130 Kd(toxina) y 28 Kd(hemolisina). Dichas sondas se obtuvieron a partir de los plásmidos pRX8 y pCB4 respectivamente, obtenidos por C. Bourguin en el Instituto Pasteur (BOURGOUIN et.al, 1986). En la Figura II.5 se presentan los mapas de restricción correspondientes a estos plásmidos y los fragmentos que fueron utilizados como sondas.

Las autorradiografías obtenidas luego de 72-96 horas de exposición de las placas, mostraron que, tanto con los plásmidos nativos como con los digeridos, es posible observar que la secuencia correspondiente al gen de la toxina de 130 Kd se halla presente en los mutantes acristalíferos (Ver Figura II.6). En el experimento llevado a cabo con ADN digerido, normalmente aparecen en la cepa salvaje dos bandas que hibridizan con la sonda utilizada (derivada de pRX8).

TABLA II.1.

ENSAYO DE TOXICIDAD DE ESPORAS Y/O CRISTALES  
EN LARVAS DE *Culex sp*

Dilución de la suspensión de esporas	Porcentaje de mortalidad					
	<i>B. thuringiensis israelensis</i> 1884		Cry-2		Cry-5	
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
10-2	ND*	ND	20%	30%	0%	0%
10-3	ND	ND	0%	0%	0%	0%
10-4	100%	100%	0%	0%	0%	0%
10-5	100%	100%	0%	0%	0%	0%
10-6	0%	20%	ND	ND	ND	ND
10-7	0%	20%	ND	ND	ND	ND
10-8	0%	10%	ND	ND	ND	ND

Los ensayos fueron llevados a cabo sobre larvas del estadio L2-L3 en placas de Petri con 10 ml de agua corriente de-clorada. Luego de 24 o 48 horas a temperatura ambiente, se registró el número de sobrevivientes entre las 20 larvas/placa originalmente sembradas.

\*ND = no determinado

a = suspensiones provenientes de cultivos sincrónicos de igual D.O. (ver Métodos)

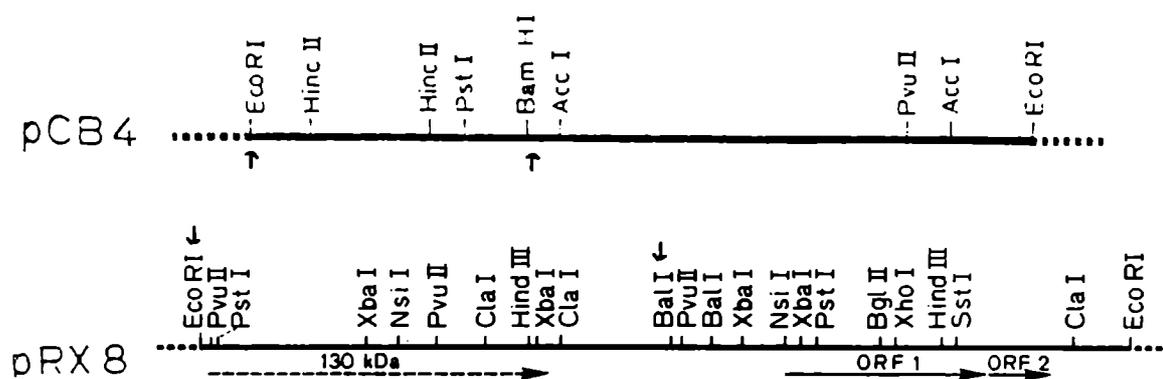


Figura II.5.

Mapas de restricción de pRX8 y pCB4

Las flechas indican los sitios de corte utilizados para generar los fragmentos que fueron marcados e hibridizados con los plásmidos de *B. thuringiensis israelensis* y los mutantes Cry-. pRX8 y pCB4 fueron obtenidos por C. BOURGOUIN en el Instituto Pasteur de París.

ORF1 = codificación para polipéptidos de entre 65 y 72 Kd, probablemente involucrados en la actividad tóxica.

pCB4:  = 1 Kb

pRX8:  = 1 Kb

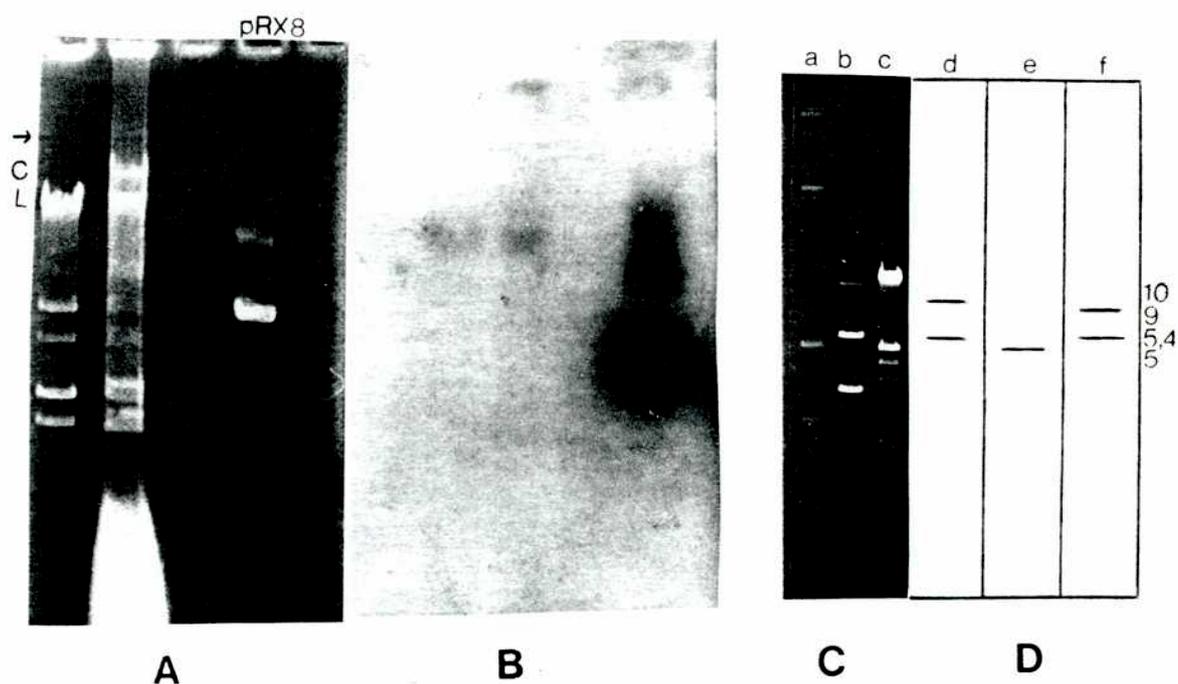


Figura II.6.

## Caracterización molecular de mutantes Cry-

Los plásmidos purificados de *B. thuringiensis israelensis* y de mutantes Cry- fueron hibridizados contra las sondas correspondientes marcadas por *nick translation*, según lo detallado en Métodos.

- A = plásmidos nativos de Cry-4; la flecha indica la posición del megaplásmido de 72 Md; L= forma lineal del megaplásmido; C= ADN cromosómico  
 B = autorradiograma correspondiente a la hibridización de A con la sonda del gen de 130 Kd.  
 C = patrón de restricción de Cry-5 (purificado por gradiente de CsCl)  
 a = plásmidos nativos  
 b = restricción con EcoRI  
 c = ADN de fago (EcoRI/HindIII)  
 D = esquema de las bandas reactivas con las diferentes sondas. Se indican los tamaños de los fragmentos en Kb.  
 d = sonda EcoRI-BalI de pRX8 (gen de 130 Kd)  
 e = sonda EcoRI-BamHI de pCB4 (gen de 28 Kd)  
 f = sonda correspondiente a pTV1::Tn917

## Resultados

Se trata de dos bandas (de 10 y 8 Kb) correspondientes a los genes (parcialmente homólogos) de las  $\delta$ -endotoxinas de tipo I y II descritas por Bourgouin y colaboradores (BOURGOUIN, C. *et. al.*, 1986). La cepa mutante, sin embargo, presenta la banda de 10 Kb pero no la de 8 Kb; en su lugar aparece un fragmento positivo de 5,4 Kb (Ver Figura II.6). Con respecto al gen de la hemolisina (28 Kd) el fragmento EcoRI normalmente reactivo (5 Kb) con la sonda se halla presente también en los mutantes Cry-.

Por otro lado, era importante conocer la localización del transposón Tn917 en estos mutantes; para ello, se efectuaron experimentos similares a los anteriores, utilizando esta vez, un fragmento EcoRI-PstI del plásmido pTV1 que contiene a Tn917 (ver Figuras II.1 y II.6) como sonda radioactiva. La hibridización con los plásmidos nativos, reveló una banda reactiva correspondiente a un plásmido de alrededor de 4 Md en la cepa mutante, si bien ésta era muy tenue. En el caso de los plásmidos digeridos con EcoRI aparecen dos fragmentos positivos (aunque también de baja intensidad) de 9 y 5,4 Kb, respectivamente.

La información disponible hasta el momento, si bien preliminar, permitió inferir que el fenotipo acristalífero en estos mutantes obtenidos por transposición de Tn917 no se debería a una pérdida de la información necesaria para la síntesis del cristal (llevada en el fragmento EcoRI de 10 Kb), ni a una inserción del transposón en dicha secuencia.

Aparentemente, existiría una alteración (delección) a nivel de la segunda copia del gen (que da lugar a la toxina de tipo II), en la cual sí podría encontrarse Tn917 (si bien podría tratarse de otro fragmento EcoRI de 5,4 Kb reactivo con la sonda). Probablemente, la inserción de este transposón en otra se-

## Resultados

cuencia (llevada por el fragmento de 9 Kb reactivo con la sonda), podría estar involucrada en la desregulación de la síntesis de toxina de 130 Kd.

En virtud de la baja intensidad observada en las autorradiografías correspondientes a las hibridizaciones con Tn917 se realizó un experimento de transformación de protoplastos de *Bacillus subtilis* S13 con ADN plasmídico de un mutante acristalífero (Cry-). Dicho experimento se llevó a cabo para determinar si la presencia de Tn917 (con su determinante de resistencia a eritromicina) se hallaba ligada a algún plásmido específico del mutante y no al cromosoma, y confirmar los resultados obtenidos por hibridización.

La Figura II.7 muestra la fotografía de un gel de agarosa en el cual se puede observar una banda plasmídica de alrededor de 3.5 Md en un clon transformante (seleccionado por réplica en medio con eritromicina 3 µg/ml). Dicho plásmido sufrió, muy probablemente, re-arreglos en S13 (ya hemos visto que esto ocurre normalmente, también con plásmidos transferidos por fusión, como se describió en el Capítulo I) y/o deleciones, de modo que bien puede corresponder a un plásmido de mayor tamaño( 4 Md por hibridización) en el huésped Cry- original (ver Capítulo III).

En todo caso, es claro que éste lleva la resistencia al antibiótico y que es capaz de replicarse con un alto número de copias en *Bacillus subtilis* a diferencia del mutante Cry- en el cual siempre se observa una banda débil del mismo. Si este plásmido corresponde a uno de los dos plásmidos pequeños de *Bacillus thuringiensis israelensis* con una inserción de Tn917 o a un producto de re-arreglos entre éstos y pTV1, resta aún por confirmarse.

a      b      c

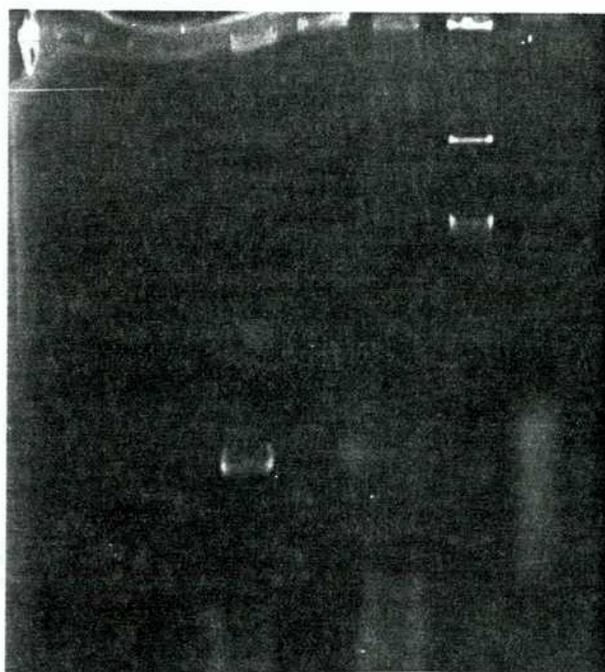


Figura II.7.

Transformación de *B. subtilis* S13 con  
ADN plasmídico de un mutante acristalífero

Protoplastos de *B. subtilis* S13 fueron transformados con plásmidos de Cry-4 (purificados por CsCl), según lo explicado en Métodos. La selección se efectuó por vía indirecta, replicando los regenerantes en medio de Schaeffer conteniendo 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de eritromicina.

Los plásmidos fueron aislados por minipreparación a partir de 3 ml de cultivo. a = pPL608 (3,5 Md); b = clon de S13 transformante; c = mutante Cry-4.

II.2. MUTANTE SUPERPRODUCTOR DE *Bacillus thuringiensis israelensis* 1884

Un mutante surgido espontáneamente fue seleccionado de una placa de medio nutritivo incubada a 30°C en las condiciones normales para *Bacillus thuringiensis israelensis* 1884, por su fenotipo distintivo (colonias más pequeñas y de bordes más netos que el salvaje).

Analizado al microscopio, presenta en la etapa de pre-espore, dos inclusiones paraesporales (ver Figura II.8) y por ese motivo se la denominó "superproductor".

El contenido plasmídico de esta variante (Figura II.9) reveló una característica muy interesante: el plásmido más pequeño (3,5 Md en *B. thuringiensis israelensis*) presentaba una deleción de aproximadamente 0,5 Md (unas 0,8 Kb). Paralelamente, aparecía en todas las preparaciones una mayor intensidad a nivel del plásmido de 72 Md.

Por otro lado, no sólo se obtenía mayor cantidad de megaplásmido reproduciblemente, sino que las preparaciones de ADN no purificadas de este mutante permanecían por mayor tiempo (más de un año) sin sufrir degradación, a diferencia de las preparaciones de ADN de *B. thuringiensis israelensis*.

Una explicación posible para el fenotipo "superproductor" observado, se basó precisamente en la existencia de un mayor número de copias del megaplásmido y por ende, de un efecto de dosaje génico a nivel de la o las proteínas tóxicas.

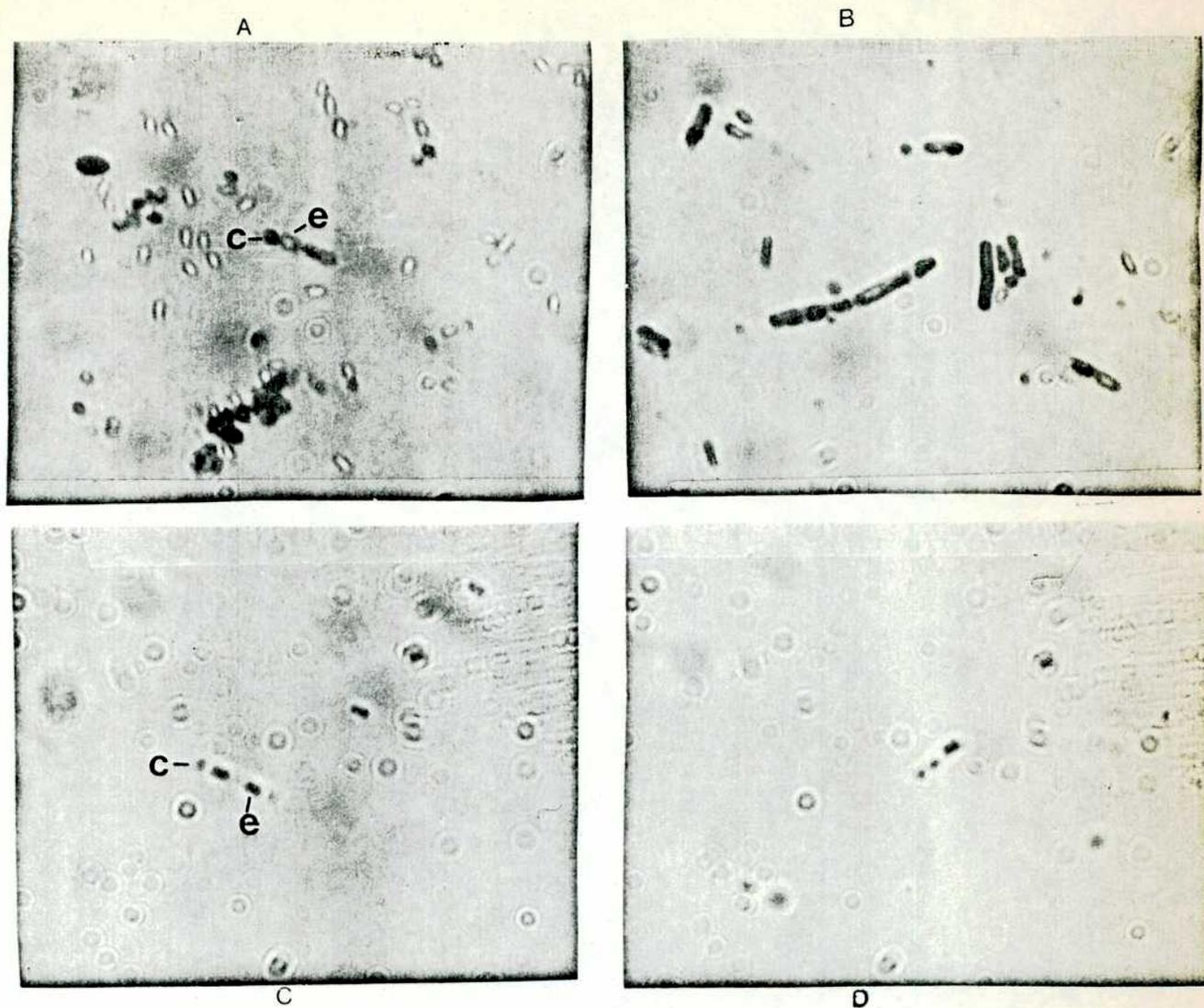


Figura II.8.

Mutante superproductor ( $Cry^S$ ) de  
*Bacillus thuringiensis israelensis* 1884

Pre-esporas de *Bti* 1884 y del mutante  $Cry^S$  obtenidas a partir de colonias crecidas en medio nutritivo de Schaeffer a 30°C. A/C = *Bti* 1884; B/D =  $Cry^S$ ; e = espora; c = cristal  
A y B fueron coloreados según la técnica de Smirnov (Ver Materiales y Métodos).

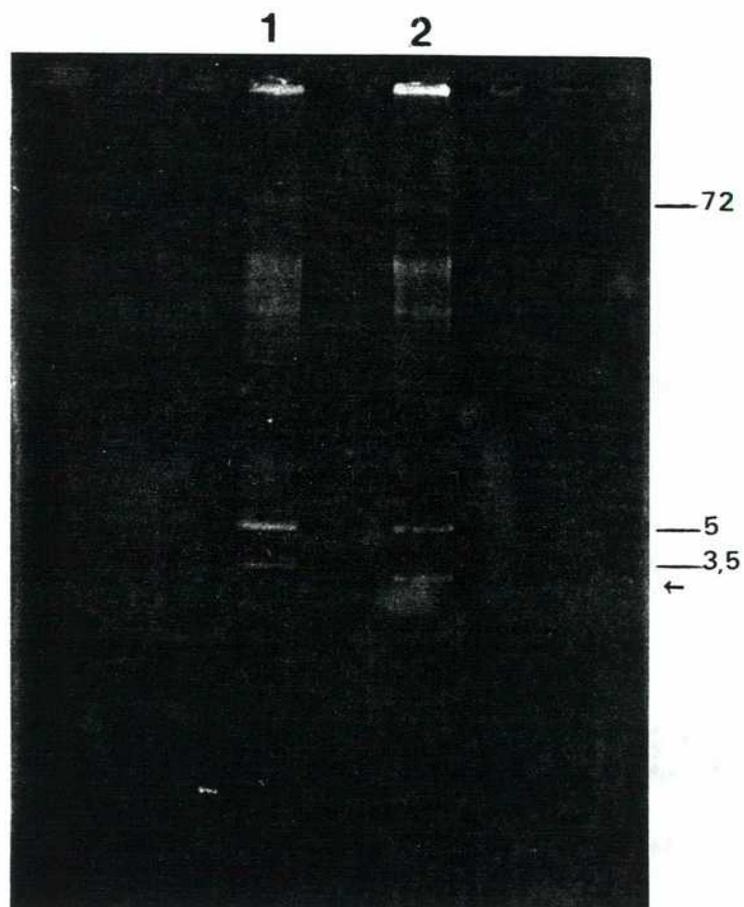


Figura II.9.

Contenido plasmídico del mutante *Cry*<sup>S</sup>

Plásmidos de *Bti* 1884 y mutante *Cry*<sup>S</sup> aislados por minipreparación a partir de 3 ml de cultivo (ambos cultivos se cosecharon a D.O.600 = 0,7). 1 = *Bti* 1884; 2 = *Cry*<sup>S</sup>. Masas moleculares en Md.

## Resultados

Debido a las dificultades que presenta la transferencia de los plásmidos de tamaño elevado a filtros de nitrocelulosa, y a la alta proporción de formas lineales (de aparición variable) derivadas de los megaplásmidos (ver Figuras II.4 y II.6), se decidió realizar un experimento de hibridización en manchas (*Dot blot*). Para esto, se efectuaron preparaciones crudas de ADN de diversos orígenes controlando la cantidad de células de las que se partió (la misma en todos los casos) y estimando la concentración de ADN total por fluorescencia a la luz ultravioleta, en presencia de 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El resultado de la hibridización utilizando como sonda el fragmento EcoRI/HindIII de pRX8 marcado por *nick translation*, se muestra en la Figura II.10.

En dicha figura es posible apreciar manchas positivas a nivel de las muestras de *B. thuringiensis israelensis* salvaje, de la mutante acristalífera Cry-4 y de la cepa superproductora Cry<sup>S</sup>; es notable la intensidad de la mancha en esta última, comparable a la muestra del control positivo pRX8.

Si bien las evidencias de que disponíamos hasta el momento indicaban que el fenotipo Cry<sup>S</sup> también se correlaciona con una mayor cantidad de ADN codificante de la δ-endotoxina, resultaba imprescindible confirmar su actividad biológica por un ensayo *in vivo*. En la Tabla II.2 se resumen los resultados de tal experimento, realizado sobre larvas del segundo estadio de *Aedes sp.* en las condiciones ya descritas. En estos ensayos, los cristales de Cry<sup>S</sup> resultaron más tóxicos que los de la cepa salvaje (aproximadamente el doble); asimismo, puede observarse que esta cepa presenta una mayor estabilidad (o poder residual) que su contrapartida salvaje, ya que a las 48 horas aún continúa siendo altamente tóxica (95% de mortalidad) a concentraciones a las cuales *B. thuringiensis israelensis* ya ha dejado de serlo.

a	b	c	d	e	f	g
		*			●	●

Figura II.10.

Hibridización por manchas en variantes genéticas de *B. thuringiensis israelensis* 1884

La preparación de las muestras de ADN (llevada a cabo por el protocolo de minipreparación) y la metodología para la hibridización en manchas (*Dot blot*) se hallan descriptas en los Métodos. La sonda utilizada cubre la región de pRX8 correspondiente al gen de la toxina de 130 Kd.

a = Cry-4, 2  $\mu$ g; b = Cry-4, 1  $\mu$ g; c = *Bti*1884, 1  $\mu$ g; d = *Bti*1884, 2  $\mu$ g; e = ADN cromosómico de *B. subtilis*, 2  $\mu$ g; f = pRX8, 500 ng; g = CryS, 2  $\mu$ g.

**TABLA II.2**  
**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE MUTANTES CRY**  
**SOBRE LARVAS DE *Aedes sp***

Dilución	Porcentaje de mortalidad <sup>a</sup>		
	<i>B. thuringiensis israelensis</i> 1884	Cry <sup>8</sup>	Cry-4
10-2	100%*	100%*	0%
10-3	100%	100%*	0%
10-4	100%	100%	0%
10-5	20% 80% <sup>b</sup>	50% 100% <sup>b</sup>	ND
10-6	5% 15% <sup>b</sup>	30% 95% <sup>b</sup>	ND
10-7	5% 20% <sup>b</sup>	15%	ND
10-8	ND	100% 20% <sup>b</sup>	ND

a: determinado a las 24 horas

b: determinado a las 48 horas

\* el efecto tóxico ya era evidente a las 3 horas de comenzado el ensayo

Para cada ensayo, 20 larvas del estadio L2-L3 de *Aedes sp*, fueron incubadas en placa de Petri con 10 ml de agua corriente de-clorada y la cantidad correspondiente de suspensión de esporas y cristales en cada caso. Los títulos de las suspensiones fueron: *B. thuringiensis israelensis* 1884 =  $2,5 \times 10^8$ /ml; cry<sup>8</sup> =  $1,5 \times 10^8$ /ml; cry-4 =  $2 \times 10^8$ /ml

## Resultados

Entre las posibles explicaciones para el fenotipo "superproductor" de esta variante (si bien de las más simples), se cuenta la posible falta o inactivación de alguna actividad nucleásica comúnmente presente en las cepas de *B. thuringiensis*. De hecho, se observa una mayor estabilidad de las preparaciones de ADN de esta variante. Esta actividad podría estar codificada en parte y/o regulada, por las secuencias faltantes en el plásmido de 3,5 Md delecionado en Cry<sup>8</sup>. Una forma de estimar esta posibilidad de manera sencilla, consistió en ensayar la actividad nucleásica de diferentes muestras sobre un plásmido purificado (pMK3). Como puede apreciarse en la Figura II.11 la suspensión de protoplastos de Cry<sup>8</sup> posee, en efecto, una menor actividad de nucleasa sobre pMK3 ya que éste aparece con mayor intensidad en su forma monomérica covalentemente cerrada (ccc) respecto del ensayo con protoplastos de la cepa *B. thuringiensis israelensis*, para los cuales la forma abierta (oc) es la más conspicua.

Este resultado es solamente indicativo del hecho de que no se puede descartar como hipótesis que la existencia de una mayor cantidad de ADN se deba a una menor degradación por nucleasas endógenas. Sin embargo, la posibilidad de que el mayor rendimiento de plásmido provenga de una desregulación del número de copias del megaplásmido (normalmente bajo: entre 1 y 4 copias por genoma) y que ésta desregulación tenga su origen en las secuencias deletadas en el plásmido de 3,5 Md, es muy atractiva. No obstante, la confirmación de esta hipótesis demandaría experimentos de mayor envergadura que se planean llevar adelante próximamente.

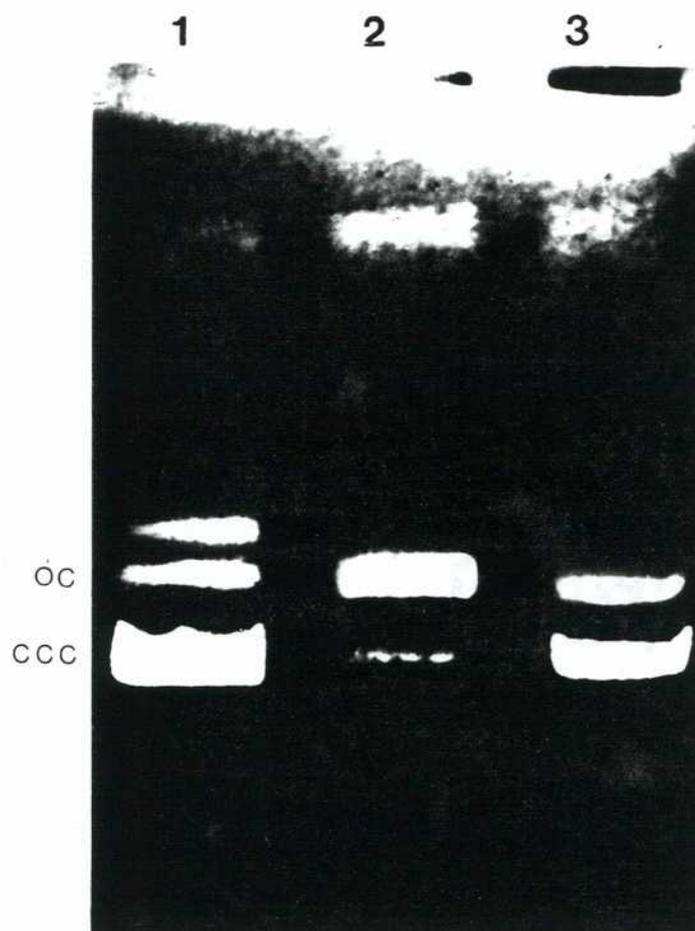


Figura II.11.

Ensayo de actividad nucleolítica en protoplastos

1  $\mu\text{g}$  de ADN de pMK3 (1) purificado por gradiente de densidad en ClCs, fue incubado con suspensiones de protoplastos de *Bti* 1884 (2) o del mutante *Cry<sup>S</sup>* (3) durante 3 minutos a temperatura ambiente (Ver Materiales y Métodos).

CCC = monómero covalentemente cerrado

OC = forma abierta circular

II.3. DISCUSION

Dos tipos de mutantes han sido aislados por diferentes vías y parcialmente caracterizados. El objeto de producir y/o aislar estos mutantes fue contar con variantes genéticas que presentasen alteraciones (en uno u otro sentido) en la síntesis de proteína larvicida. Si dichas alteraciones ocurren a nivel regulatorio, sería interesante utilizar estos mutantes en estudios genéticos sobre la regulación del proceso de síntesis de estas toxinas.

Es por esto que nos propusimos llevar adelante la mutagénesis de *B. thuringiensis israelensis*, utilizando para ello el transposón Tn917 llevado por el plásmido pTV1 como ya lo explicáramos oportunamente. El efecto mutagénico de la transposición de Tn917 no nos permitió detectar (como lo hubiésemos esperado) mutantes por inserción del transposón en el gen de la toxina de 130 Kd (o gen de tipo I según Bourgouin *et.al.*, 1986), sino que indujo mayoritariamente rearrreglos complejos a nivel plasmídico (y tal vez con el ADN cromosómico) que afectaron en especial a la segunda copia de este gen (o gen de tipo II) sin afectar al gen de la hemolisina de 28 Kd.

En un experimento preliminar de hibridización contra los plásmidos nativos del mutante, se observó una banda reactiva con la sonda de Tn917 a nivel de un plásmido pequeño. Este resultado fue parcialmente confirmado por transformación de protoplastos de *Bacillus subtilis* (no transformables por ADN cromosómico) con ADN plasmídico del mutante Cry-4.

## Resultados

Los datos disponibles hasta el momento sugieren que nos hallamos frente a un mutante de tipo regulatorio en el cual la información para la toxina de 130 Kd, así como para la hemolisina de 28 Kd se hallan intactas, habiéndose afectado el segundo gen de toxina parcialmente homóloga a la de 130 Kd. En cuanto al gen que codifica al polipéptido de 65 Kd (ORF<sub>1</sub> y ORF<sub>2</sub> de la Figura II.5) no poseemos información aún debido al tipo de sondas utilizadas.

Como ha ya sido mencionado, el patrón polipeptídico de los cristales de *B. thuringiensis israelensis* revela fundamentalmente tres polipéptidos: a) 130 Kd (se observan generalmente dos bandas a este nivel); b) 65-72 Kd y c) 28 Kd. La existencia de dos tipos de genes para la toxina de 130 Kd podría estar relacionada con la detección de dos bandas en los patrones polipeptídicos de *B. thuringiensis israelensis*, como ha sido demostrado para los cristales de la subespecie *kurstaki* (WHITELEY *et.al.*, 1985).

El papel que cada uno de estos polipéptidos juega en la actividad biológica *in vivo*, no es del todo claro. En este sentido, el plásmido recombinante pRX8 que lleva el gen de tipo I y el gen del polipéptido de 65 Kd, es muy activo contra larvas de mosquito, mientras el pRX8-1 (un sub-clon que lleva sólo el gen de tipo I) resultó mucho menos activo en los ensayos biológicos (BOURGOUIN *et.al.*, 1986).

Un estudio llevado a cabo por Ibarra y Federici (IBARRA y FEDERICI, 1986) permitió separar físicamente tres tipos diferentes de componentes del cristal paraesporal de *B. thuringiensis israelensis* (ver Figura 6), y asociar a cada una de estas sub-inclusiones un polipéptido correspondiente. De este modo, se pudo aislar el polipéptido de 65 Kd componente de la sub-inclusión de

## Resultados

tipo 2, que resultó ser sólo levemente tóxico en los ensayos biológicos. Asimismo, estos autores confirmaron la actividad hemolítica del polipéptido de 28 Kd (componente de la inclusión de tipo 1) y sugieren que las proteínas de 28, 65 y 130 Kd actúan de manera sinérgica para ejercer el efecto tóxico característico de los cristales enteros, contribuyendo las dos últimas a la especificidad de los mismos.

En el caso de nuestros mutantes, si bien es claro que no depositan ninguna de estas proteínas en forma de inclusión cristalina y que resultan atóxicos en los ensayos biológicos, no se conoce aún a qué nivel se ve afectada la expresión de estos polipéptidos y si el defecto (o defectos) abarca a todos o sólo a algunos de ellos.

Desde el punto de vista estructural, sería aparentemente factible para estos mutantes sintetizar los polipéptidos de 130 y 28 Kd (y probablemente el de 65 Kd).

Los resultados que poseemos hasta el momento, indican que no sólo el gen de tipo II se vería afectado (delecionado y probablemente con una inserción de Tn917), sino que secuencias presentes en un fragmento EcoRI de 9 Kb (reactivo con la sonda de Tn917) estarían involucradas en la regulación de la expresión de los genes de  $\delta$ -endotoxina. Asimismo, tanto la deleción detectada a nivel del plásmido de 72 Md (que no afecta al gen de tipo I) como la aparición de ciertas bandas de bajo peso molecular, sugieren que los re-arreglos complejos inducidos por el transposón podrían haber provocado el pasaje de secuencias regulatorias a localizaciones no favorables para su actividad (si ésta dependie-

## Resultados

ra de su configuración en cis, por ejemplo), haciendo que se alteren ya sea la dosis génica o el nivel de expresión de estos polipéptidos.

Recientemente, Ward y Ellar (WARD y ELLAR, 1988) clonaron los genes correspondientes a las toxinas de tipo I y II (ambas de 130 Kd) y determinaron que sólo una de ellas (la de tipo I) es altamente tóxica y se expresa activamente en clones recombinantes, mientras que la otra lo hace con muy baja eficiencia.

Asimismo, determinaron por secuenciación de estos clones que ambos genes presentan un alto grado de homología en sus porciones 3' (correspondientes al dominio C-terminal de las toxinas), y no así en sus zonas 5' (extremo N-terminal). Estos autores también sugieren una actividad conjunta de estos dos polipéptidos en las cepas parentales que, por efecto sinérgico, conferiría a los cristales su alta toxicidad.

De todos modos, es probable que la influencia que ejerza el polipéptido de tipo II afectado por los re-arreglos, sea poco importante frente a la anulación o disminución de los niveles de expresión de los polipéptidos involucrados en la toxicidad.

En este sentido, los plásmidos pequeños (afectados por los re-arreglos) podrían jugar un papel importante en la disminución de los niveles de expresión, como ha sido demostrado para la subespecie *kurstaki*. En efecto, en esta subespecie, al menos uno de los plásmidos pequeños (5 Md) parece estar involucrado en la regulación de la cantidad de protoxina sintetizada (MINNICH y ARONSON, 1984).

## Resultados

Con respecto a la variante Cry<sup>s</sup> (superproductora), es aquí donde resulta más evidente la función regulatoria de ciertos genes llevados en los plásmidos de bajo peso molecular. De hecho, la única alteración observable a nivel plasmídico al menos, es la deleción detectada en el plásmido más pequeño de esta cepa (aproximadamente 3,5 Md). Si esta deleción es la responsable de la ausencia de un control negativo normalmente ejercido por este plásmido sobre el número de copias del megaplásmido de 72 Md, o si el fragmento delecionado contenía secuencias relacionadas con la presencia de alguna actividad nucleásica en el salvaje, aún no podemos afirmarlo.

Lo que sí es posible afirmar a la luz de las evidencias obtenidas, es que nos encontramos frente a dos variantes genéticas de síntesis de cristal larvicida (una por defecto y otra por exceso), y que los defectos que las originaron no se sitúan a nivel de los genes estructurales correspondientes. Probablemente, blancos regulatorios diferentes se hallen afectados en los dos tipos de mutantes.

Sería interesante poder efectuar experimentos de complementación para evaluar la dominancia y/o recesividad entre las mutantes. Es claro que por el momento no se puede postular a qué nivel se halla afectada esta regulación: secuencias, estabilidad de los transcriptos, ensamblado de los polipéptidos. Es evidente que la expresión de estos genes es dependiente de la esporulación, por lo que sería esperable la existencia de factores sigma ( $\sigma$ ) específicos, tal vez propios de la transcripción de estos genes. Varios procesos morfogenéticos son codificados por unidades independientes del cromosoma, como en el caso de ciertos bacte-

## Resultados

riófagos ( GEIDUSHIK e ITO, 1982) los cuales aportan su batería propia de enzimas o factores. La producción de cristal larvicida también podría presentar una complejidad similar.

CAPITULO III: CLONADO MOLECULAR EN *Bacillus subtilis*

III.1. INTRODUCCION

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante ha utilizado a *Escherichia coli* como sistema receptor, así como a una gran variedad de plásmidos y fagos endógenos como vehículos o vectores de clonado. La utilización de este sistema resultó en la mayor comprensión de una gran cantidad de fenómenos biológicos, tanto en organismos procariontes como eucariontes.

Siendo *Bacillus subtilis* el organismo procarionte Gram positivo más estudiado, resultaría ventajoso disponer de un sistema de clonado molecular desarrollado para el estudio de los procesos bioquímicos y genéticos de este microorganismo. Asimismo, un sistema de clonado en *B. subtilis* permitiría estudiar fenómenos biológicos de diferenciación como la esporulación y la expresión de genes ligada a este proceso.

*B. subtilis* presenta ciertas propiedades que lo hacen aplicable al desarrollo de un sistema de clonado. En primer lugar, no es patogénico ni se lo ha asociado con enfermedad humana alguna; en segundo lugar, se dispone de un mapa genético bien caracterizado (HENNER y HOCH, 1980) y se conocen varios plásmidos endógenos (LOVETT y BRAMUCCI, 1975) y bacteriófagos (HEMPHILL y WHITELEY, 1975) que constituyen vectores potenciales de clonado.

Por otro lado, *B. subtilis* presenta sistemas eficientes de transformación tanto de células competentes como de protoplastos. Finalmente, posee una superficie celular simple en cuanto a composición, constituida sólo por peptidoglicano y ácido teicoico. Esto hace que cualquier proteína secretora sintetizada en *B. subtilis* por un vector recombinante, no se encuentre contaminada con endotoxinas de la envoltura celular (que de todas formas no presentan actividad pirogénica), lo que representa un problema potencial con los sistemas de *E. coli*.

### III.1.1. Vectores

Un prerequisite para llevar adelante el clonado en cualquier organismo es la disponibilidad de vectores apropiados. Un vector plasmídico, además de ser capaz de replicarse en el receptor de clonado, debe llevar un marcador genético (o más) fácil de seleccionar, y al menos un sitio único para alguna endonucleasa de restricción.

La primera generación de vectores plasmídicos desarrollados en *B. subtilis* que reunían estas condiciones, fueron los aislados de *Staphylococcus aureus* (NOVICK, 1976; ERLICH, 1977-1978; CRYCZAN y DUBNAU, 1978).

## Resultados

Estos plásmidos han sido utilizados para construir plásmidos quiméricos que llevan múltiples resistencias a antibióticos, permitiendo la inactivación insercional por ADN exógeno (GRYCZAN *et.al.*, 1980).

Asimismo, se han construido vectores por "marcado" de plásmidos crípticos de *B. subtilis* con determinantes de resistencia a antibióticos clonados en éstos (por ejemplo, el plásmido pHV400 en el cual se clonó el fragmento HindIII de pT127 que contiene el gen de resistencia a tetraciclina (NIAUDET y EHRlich, 1979).

Por otro lado, un gran número de vectores plasmídicos de gran utilidad ha sido desarrollado; se trata de la construcción de plásmidos híbridos con orígenes de replicación compatibles en *E. coli* y *B. subtilis*, también llamados vectores bifuncionales. El plásmido pHV33, por ejemplo, se replica en ambos huéspedes y lleva las tres resistencias a antibióticos provenientes de los dos plásmidos parentales (cloranfenicol de pC194 de *S. aureus* y ampicilina y tetraciclina de pBR322 de *E. coli* (ERLICH, 1978).

Estos plásmidos quiméricos, en general sufren deleciones y/o re-arreglos en *B. subtilis*; los plásmidos resultantes son más estables y aún son capaces de replicarse en ambos huéspedes.

III.1.2. Transformación

Otro aspecto de estas tecnologías es la introducción de ADN en el receptor de clonado. La transformación de *B. subtilis* fue descrita 20 años atrás (SPIZIZEN, 1958); sin embargo, la introducción de ADN plasmídico en células competentes pudo sólo ser estudiada recientemente, cuando se pudo disponer de plásmidos con marcadores genéticos adecuados (EHRlich, 1977).

Este sistema de transformación presenta características particulares; entre ellas, es interesante el hecho de que las moléculas oligoméricas (ccc u oc) pero no las monoméricas, son capaces de transformar células competentes (CANOSI *et.al.*, 1978). Asimismo, moléculas diméricas son virtualmente inactivas en transformación, mientras que los trímeros y formas multiméricas son activas. Estas observaciones han sido efectuadas tanto en células competentes Rec<sup>+</sup> como recE<sup>4</sup>.

Cualquiera sea el mecanismo de procesamiento del ADN multimérico, estas moléculas son llevadas a la forma monomérica por un proceso Rec independiente, a diferencia de la situación en *E. coli* (POTTER y DRESSLER (1977). Estas observaciones, explicadas apelando al mecanismo de toma del ADN por células competentes (de VOS *et.al.*, 1961) en las cuales el ADN penetra en forma de simple cadena. En favor de esto, se encuentra la observación de que protoplastos de *B. subtilis* pueden ser transformados por monómeros ccc y por monómeros circulares abiertos (oc) con la misma frecuencia que por moléculas multiméricas (GRYCZAN

*et.al.*, 1980). Por lo tanto, el requerimiento de formas multiméricas parece ser una consecuencia del mecanismo de toma de ADN en el estado de competencia.

Este hecho tiene importantes consecuencias en la aplicación de estas técnicas al clonado de ADN en *B. subtilis*. Experimentos realizados en este sentido indican que durante la etapa de ligado, es necesario producir moléculas conteniendo repeticiones internas (MOTTLES *et.al.*, 1979; MICHEL *et.al.*, 1982). Cuando los segmentos de ADN a ser clonados son heterogéneos (en el caso de la construcción de una genoteca, por ejemplo), las repeticiones internas son provistas por el vector; por esto, durante la etapa de ligado se requieren concentraciones relativamente altas de vector; hasta un 20% de híbridos puede ser obtenido en estos casos (MICHEL *et.al.*, 1980).

Por el contrario, cuando los segmentos a clonar son homogéneos, las repeticiones pueden ser formadas tanto por los segmentos de ADN exógeno como por el vector mismo. Las concentraciones de vector pueden ser más bajas en estos experimentos y la recuperación de híbridos aumenta al 80%.

Como alternativa a la transformación de células competentes, ha sido desarrollada en *B. subtilis* la transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (CHANG y COHEN, 1979). Luego de la transformación, estos protoplastos pueden ser eficientemente regenerados a la forma bacilar.

## Resultados

La eficiencia de este método es de hasta un orden de magnitud mayor que para células competentes; se han alcanzado eficiencias de hasta un 80% de las células originales transformando con el plásmido pC194 (CHANG y COHEN, 1979).

Otros estudios han demostrado que los protoplastos pueden ser transformados por formas monoméricas y oligoméricas ccc con la misma eficiencia (GRYCZAN *et.al.*, 1980). El ADN lineal transforma protoplastos con el 1% de la eficiencia de las moléculas circulares, mientras que las formas monoméricas circulares abiertas (oc) lo hacen con igual eficiencia que las formas ccc.

Sin embargo, esta técnica no ha sido muy utilizada debido a que su uso involucra la manipulación de protoplastos en general frágiles y que requieren medios ricos de regeneración, lo que hace imposible, por ejemplo, seleccionar en forma directa marcadores de auxotrofia. Asimismo, la selección directa de numerosos marcadores de resistencia a antibióticos es difícil de observar (SANCHEZ-RIVAS, 1988 en prensa).

Es por esto, que resultaría de gran utilidad contar con medios de regeneración más adecuados para hacer más accesible la utilización de la selección directa en este sistema.

Por último, ha sido demostrado que mezclas de ADN lineal con el agregado de "colas" homopoliméricas y ADN del fago T7 tratado de la misma forma, son capaces de transformar protoplastos de *B. subtilis* (SCHERZINGER *et.al.*, 1980) con baja frecuencia. Los plásmidos resultantes sufren deleciones, indicando que son inestables. Sin embargo, este estudio demuestra que moléculas de

ADN no ligadas (*annealed*) covalentemente entre sí, son capaces de transformar protoplastos, no así células competentes de *B. subtilis* (RAPOPORT *et.al.*, 1979).

Esta y otras evidencias han sugerido que la inestabilidad observada sería consecuencia de la acción de sistemas de restricción y modificación, antes que del proceso mismo de toma de ADN.

### III.1.3. Restricción y modificación

Se han descrito sistemas de modificación y restricción en *B. subtilis* (TRAUTNER *et.al.*, 1974; SAITO *et.al.*, 1979). La cepa 168 de *B. subtilis*, competente para transformación, restringe el crecimiento de ciertos bacteriófagos crecidos en huéspedes heterólogos, si bien este efecto es débil (UOZUMI *et.al.*, 1977). Otro de los aislamientos de *B. subtilis* (salvaje) especifica un sistema de restricción (*Bsu*) con la misma especificidad que la enzima HaeIII (TRAUTNER *et.al.*, 1974). Sin embargo, los genes que especifican este sistema de restricción-modificación, han sido transferidos a la cepa 168 con muy poco o ningún efecto sobre la transformación con ADN bacteriano.

La transformación de *B. subtilis* con plásmidos aislados de *S. aureus* y *B. cereus* es aproximadamente 50 veces menos eficiente que con plásmidos aislados de *Bacillus subtilis*, en la cual dichos plásmidos habían sido introducidos por transformación

(EHRlich, 1977; GRYCZAN *et.al.*, 1978). Si bien esta observación fue atribuida a fenómenos de restricción en *B. subtilis*, también se sugirió que podría deberse al grado de oligomerización del ADN plasmidico introducido (CANOSI *et.al.*, 1978; MOTTLES *et.al.*, 1979).

Recientemente, el efecto de los sistemas de restricción-modificación de *B. subtilis* ha sido estudiado (TANAKA, 1979). Usando plásmidos crípticos de *B. subtilis* llevando clonado el gen *leu*, se observó que cuando estos plásmidos (endógenos) se aislaban de una cepa deficiente en restricción-modificación, y se transformaba con ellos una cepa salvaje para esos caracteres pero de genotipo *leu recE4*, la frecuencia de transformación se reducía notablemente. La transformación de una cepa *rec+* con estos plásmidos (en las cuales la integración del ADN donante puede ocurrir) no se vio afectada ya sea en receptores deficientes o no en sus sistemas de restricción.

Estos resultados sugieren que la transformación mediada por plásmidos en *B. subtilis* es afectada por sistemas de restricción y modificación controlados por el huésped. Es más, esto implica que el uso de cepas deficientes en estos sistemas es de gran importancia cuando se desea introducir moléculas de ADN recombinante en *B. subtilis*.

En este sentido, un mutante de restricción-modificación fue aislado en *B. subtilis* (UOZUMI *et.al.*, 1977) y demostró ser transformable con alta eficiencia por ADN heterólogo (HOSHINO *et.al.*, 1980).

En conclusión, es evidente que incluso un sistema de restricción débil como el que presenta la cepa 168 de *B. subtilis* (transformable por competencia), puede ejercer un fuerte efecto en experimentos de clonado molecular, y es por esto que la construcción de cepas deficientes en estos sistemas es considerada de gran importancia para su aplicación en experimentos de este tipo.

### III.1.4. Estabilidad de genes heterólogos clonados en *Bacillus subtilis*

La estabilidad de varios genes clonados en *B. subtilis* parece depender de la fuente del ADN clonado, el vector empleado y la cepa receptora utilizada. Como ya ha sido mencionado, muchos de los plásmidos híbridos construidos a partir de plásmidos originarios de *S. aureus* son estables (en cuanto al mantenimiento del replicon). Sin embargo, ocurren deleciones con alta frecuencia resultando en una pérdida de ADN parental (GRYCZAN y DUBNAU, 1978).

Este fenómeno ha sido también observado en plásmidos bifuncionales *B. subtilis*-*E. coli* (o vectores *shuttle*)(EHRlich *et. al.*, 1978).

Por otro lado, los genes de origen cromosómico de *B. subtilis* que han sido clonados por diferentes técnicas en *B. subtilis* son razonablemente estables (GRYCZAN *et. al.*, 1980a).

## Resultados

Numerosos genes de *B. subtilis* clonados en plásmidos de *E. coli*, en vectores bifuncionales o en fagos lambdoides, son capaces de expresarse en *E. coli* (HORINOUCI, 1977; MAHLER y HALVORSON, 1977; SEGALL y LOSICK, 1977). Por el contrario, cuando clones aislados de *E. coli* en vectores bifuncionales se introdujeron en *B. subtilis*, fueron capaces de expresarse (RAPOPORT *et. al.*, 1979) pero se observó una gran inestabilidad de estos plásmidos recombinantes.

Asimismo, Kreft y colaboradores (KREFT *et. al.*, 1982) estudiaron el fenómeno de inestabilidad de plásmidos heterólogos en *B. subtilis*. Estos autores observaron que tanto plásmidos derivados de organismos Gram positivos, como *B. cereus* (pBC16 que confiere resistencia a tetraciclina), como plásmidos bifuncionales construidos a partir de éstos y plásmidos de *E. coli*, sufren deleciones, en algunos casos de segmentos específicos.

Dichos segmentos serían preferencialmente eliminados debido a la conformación que adquieren durante la etapa de ligado *in vitro* y que deriva evidentemente de su secuencia de bases (por ejemplo, estructuras en forma de bucles o *loops*). Estas observaciones han sido efectuadas en contextos genéticos *rec+* o *recE* indistintamente (TANAKA, 1979), y se han atribuido las deleciones observadas, a sistemas de restricción específicos controlados por el huésped.

En efecto, en el caso de los plásmidos híbridos, las porciones pertenecientes a *E. coli* no fueron deleccionadas, mientras que las derivadas de *B. cereus* lo fueron reproduciblemente en los mismos fragmentos.

De todos modos, se observan con alta frecuencia re-arreglos y deleciones, aparentemente producidas al azar, cuando las moléculas introducidas sobrepasan cierto tamaño que resultaría limitante para su replicación y/o mantenimiento en *B. subtilis* (KREFT *et.al.*, 1982).

### III.1.5 Expresión en *Bacillus subtilis*

El análisis de genes clonados en *B. subtilis*, se ha llevado a cabo usando dos métodos recientemente desarrollados: el sistema de minicélulas y el sistema de amplificación de plásmidos. El desarrollo del primero (REEVE *et.al.*, 1973) y su adaptación para el análisis de ADN plasmídico (LEVENTHAL y CHAMBLISS, 1979) han permitido grandes avances en el análisis de las proteínas codificadas por plásmidos. De este modo se han identificado proteínas especificadas por los plásmidos pUB110, pC194, pE194 y sus mutantes de número de copias, cop6(SHIVAKUMAR *et.al.*, 1979).

La localización en el mapa genético y el mecanismo de regulación de los polipéptidos de pE194, han sido identificados usando el sistema de minicélulas (SHIVAKUMAR, 1980). Este sistema también ha sido utilizado para analizar la expresión de varios genes de *E. coli* en *B. subtilis* llevados en plásmidos bifuncionales.

El análisis de proteínas codificadas por genes plasmídicos, también puede efectuarse en condiciones de dosaje genético alto. Se ha observado que mutantes de replicación dna-ts de *B.*

*subtilis* a la temperatura no permisiva, retardan la replicación del cromosoma, si bien permiten que la replicación del plásmido pUB110 continúe (SHIVAKUMAR *et.al.*, 1978b). Esta observación se ha extendido al plásmido pC194 y al plásmido quimérico pBD9.

### III.1.6. Conclusiones y Objetivos

El desarrollo de un sistema de clonado molecular en *B. subtilis* ha sido tomado con gran interés en los últimos años. Tanto la construcción de vectores de clonado de mayor utilidad, como la modificación y mejoramiento de los métodos de transformación de genes clonados y de análisis de los productos de estos genes, han sufrido un gran avance en su desarrollo.

Si bien el sistema de *B. subtilis* ha mostrado dificultades en la expresión de secuencias de genes de *E. coli* (KREFT *et. al.*, 1982), la utilización de ambos sistemas en conjunto puede ser de gran ayuda en la comprensión de estos fenómenos.

Este sistema de clonado, es especialmente importante para la producción y el análisis de productos de genes pertenecientes a otros bacilos de interés industrial, así como de otros organismos Gram positivos, como por ejemplo, *Streptomyces sp.*

En efecto, se ha mostrado gran interés en el clonado de los genes de  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* en *B. subtilis*. Si bien varios laboratorios han introducido plásmidos recombinantes

conteniendo dichos genes en diferentes cepas de *B. subtilis* (ver Introducción, punto 9), los problemas concernientes a inestabilidad y baja expresión de los clones obstaculizan los estudios.

Es por esto que encaramos el desarrollo de un sistema de clonado estable y eficiente en *B. subtilis*, utilizando para ello una cepa recE4 deficiente en restricción-modificación (IA510; OSTROFF *et.al.*, 1983) como receptor. Paralelamente, se resolvió una serie de problemas relacionados con la regeneración y selección de transformantes en esta cepa.

Para llevar a cabo estos experimentos, se encaró el subclonado del gen de la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis israelensis* en plásmidos de expresión diseñados para *B. subtilis*, ya que resulta de gran interés para nuestro laboratorio contar con dichos recombinantes.

### III.2. RESULTADOS

#### III.2.1. Subclonado en *Bacillus subtilis* GSY1104

Esta cepa, se eligió como representativa de un contexto genético salvaje en cuanto a las funciones de recombinación, esporulación y capacidad de regeneración. Para llevar adelante esta estrategia se utilizó el plásmido pPL608 (un vector de expresión)

ya que nos interesa contar con subclones de ese tipo para estudios posteriores sobre la regulación de la expresión genética del cristal paraesporal.

El plásmido pPL603, fue construido por Williams y colaboradores con el objeto de contar con un vector para detección de secuencias promotoras en *B. subtilis* (WILLIAMS *et.al.*, 1981), clonando en pUB110 un fragmento EcoRI de 1,44 Md proveniente de ADN de *B. pumilus*. Este fragmento, contiene un gen estructural que especifica una cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) inducible por cloranfenicol. El vector, pUB110, confiere resistencia a neomicina y posee alto número de copias en *B. subtilis*. Uno de los derivados de esta primera construcción, contiene un fragmento de *B. subtilis* (0,2 Md) correspondiente al promotor del fago SPO2 (Ver Figura III.1) y fue denominado pPL608.

El promotor presente en este vector es de tipo fuerte y se sugirió que éste provee las secuencias necesarias para la iniciación de la transcripción, que ocurriría por un mecanismo de lectura "de corrido" (*read through*) sobre el gen estructural de CAT. Este gen, posee un sitio de clonado HindIII que lo inactiva, y un sitio PstI previo a éste que permite su expresión.

Este vector fue elegido para llevar a cabo el subclonado del gen de la  $\delta$ -endotoxina de tipo I de *Bacillus thuringiensis israelensis*, según la estrategia descrita en la Tabla III.1 (estrategia I). El clon de partida fue en este caso, el plásmido pRX8 ya presentado en el capítulo anterior. El subclonado se efectuó por digestión de pRX8 con la enzima PstI y posterior liga-

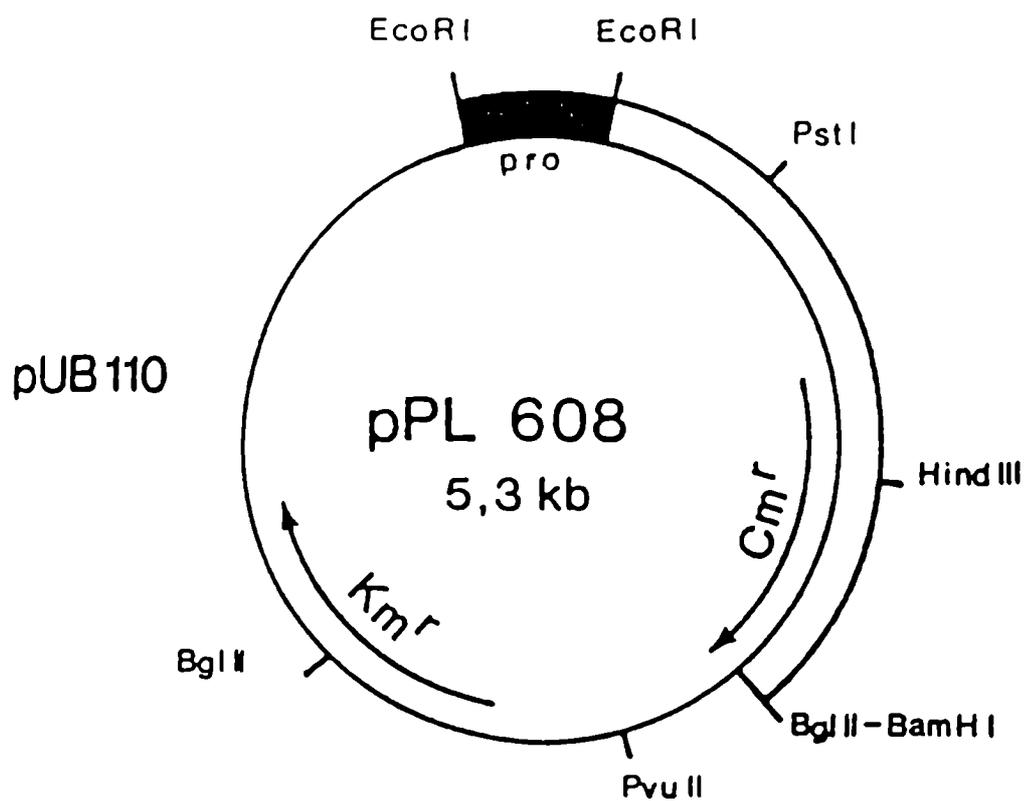


Figura III.1.

Mapa físico de pPL608

Pro = promotor del fago SP02

TABLA III.1.  
ESTRATEGIAS DE SUBCLONADO .

	Vector	Inserto	Cepa receptora	Regeneración <sup>c</sup>
I	pPL608/PstI <sup>a</sup>	pRX8/PstI(6Kb)	GSY1104	DM <sub>3</sub> /Neos <sub>30</sub>
II	pEB111/EcoRI <sup>b</sup> HindIII	pRX8-7/EcoRI HindIII(2,2Kb)	IA510	R+G.A/Neos <sub>30</sub>
III	pEB111/EcoRI <sup>a</sup>	pRx8/EcoRI (9,6Kb)	IA510	R+G.A/Neos <sub>30</sub>

a: los vectores fueron tratados con fosfatasa alcalina, según lo indicado en Materiales y Métodos.

b: el fragmento pequeño EcoRI-HindIII fue separado del resto del vector por marcado con <sup>32</sup>P (*fill in*) y posterior columna de Sephacryl S-300 (Ver Materiales y Métodos).

c: G.A = ácido glutámico; Neos<sub>30</sub> = neomicina 30 µg/ml.

do de los fragmentos generados con el vector digerido por la misma enzima y sometido a tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Ver Materiales y Métodos)..

Las mezclas de ligación se efectuaron de manera tal que existiera una relación molar de extremos inserto-vector de 2 a 1 o 5 a 1. Estas mezclas fueron introducidas en protoplastos de la cepa 1104 de *B. subtilis* (salvaje para los sistemas de recombinación y restricción-modificación). Los resultados de esta transformación efectuando la selección directa de los clones resistentes a la neomicina, se resumen en la Tabla III.2. En esta tabla es posible apreciar que la capacidad transformante del ADN re-ligado (en forma oc) es del orden de la del plásmido ccc para un exceso molar de extremos de inserto, de cinco veces respecto del vector.

Una vez obtenidos los clones transformantes se realizó la hibridización *in situ* de los mismos con una sonda correspondiente al fragmento de 6 Kb purificado a partir de un gel de agarosa, proveniente de la digestión con PstI de pRX8. La transferencia de los clones y la hibridización posterior se efectuaron según lo detallado en Materiales y Métodos. En la Figura III.2 se puede apreciar un número considerable de clones positivos en la autorradiografía, siendo mayor la densidad en las placas provenientes de la transformación B de la Tabla III.2. Esto confirmaría el hecho de que una relación mayor de inserto a vector, favoreció la formación de moléculas recombinantes.

TABLA III.2.  
 TRANSFORMACION DE *Bacillus subtilis* GSY1104  
 CON MEZCLAS DE LIGACION\*

A	B	C	D	E
1,6x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>2</sup>	0

\* Transformantes/ml de mezcla

A: relación molar inserto-vector 2 a 1

B: relación molar inserto-vector 5 a 1

C: pPL608 (100 ng)

D: pPL608 digerido con PstI, tratado con fosfatasa alcalina y re-ligado (100 ng)

E: pPL608 digerido con PstI y tratado con fosfatasa alcalina (100 ng)

La transformación de protoplastos de *B. subtilis* se llevó a cabo como está indicado en los Métodos. La regeneración se efectuó en medio sólido DM3 conteniendo 30 µg/ml de neomicina (selección directa).

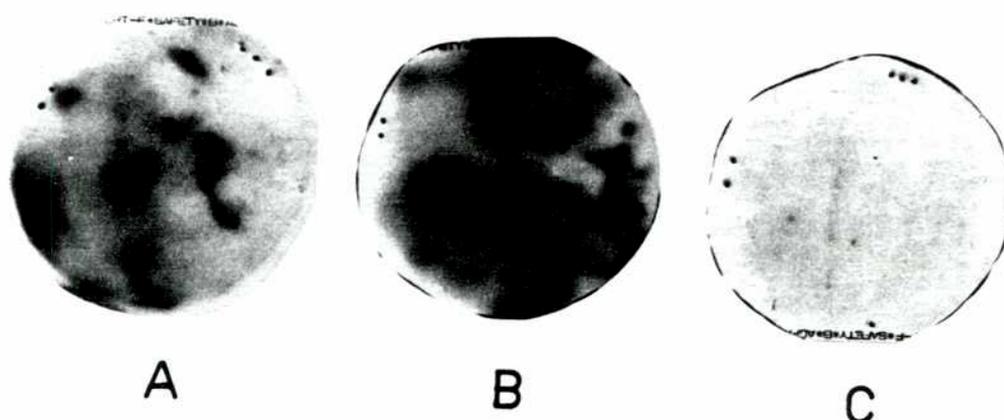


Figura III.2.

Hibridización *in situ*  
de clones transformantes en GSY1104

La transferencia a hibridización de las colonias provenientes de las placas de regeneración selectiva, se efectuó según lo detallado en Materiales y Métodos.

La sonda utilizada corresponde al fragmento de 6 Kb PstI de pRx8, aislado de un gel de agarosa y marcado radioactivamente por *nick translation*. Las placas fueron expuestas durante 72 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y posteriormente reveladas.

A: mezcla de ligado A de la Tabla III.2; B: mezcla de ligado B de la Tabla III.2; C: placa control (no transformada)

## Resultados

Los clones positivos fueron re-aislados en medio nutritivo con neomicina 10  $\mu\text{g/ml}$  y analizados por minipreparación de plásmidos según Materiales y Métodos.

En la Figura III.3 se muestra el análisis de los clones positivos, que reveló una gran inestabilidad de los plásmidos recombinantes. En efecto, se encontraron en su gran mayoría, formas delecionadas que presentaron el mismo peso molecular del vector pPL608 e incluso formas de menor tamaño.

Si bien los experimentos de clonado descritos en *B. subtilis* revelan esta inestabilidad, éstos no fueron hechos utilizando la transformación de protoplastos. Sin embargo, es claro que las deleciones no surgen como consecuencia del mecanismo particular de toma y procesamiento del ADN plasmídico en células competentes, ya que en nuestro caso (donde el ADN es englobado por los protoplastos) ocurren del mismo modo.

Una posibilidad es que el plásmido recombinante fuera demasiado grande (5,4 Kb de pPL608 + 6 Kb de pRX8 = 11,4 Kb), haciéndolo inestable, o bien que existieran fenómenos de restricción que actuaran sobre el ADN del inserto ya que éste provenía de un plásmido propagado en *E. coli*. Un análisis de dos de estos clones delecionados tomados al azar (de tamaño similar al pPL608), mostró que las deleciones fueron aparentemente hechas al azar, ya que en uno de los clones no se revelan secuencias que hibridicen con la sonda utilizada, mientras que en el otro sí las hay (Ver Figura III.4).

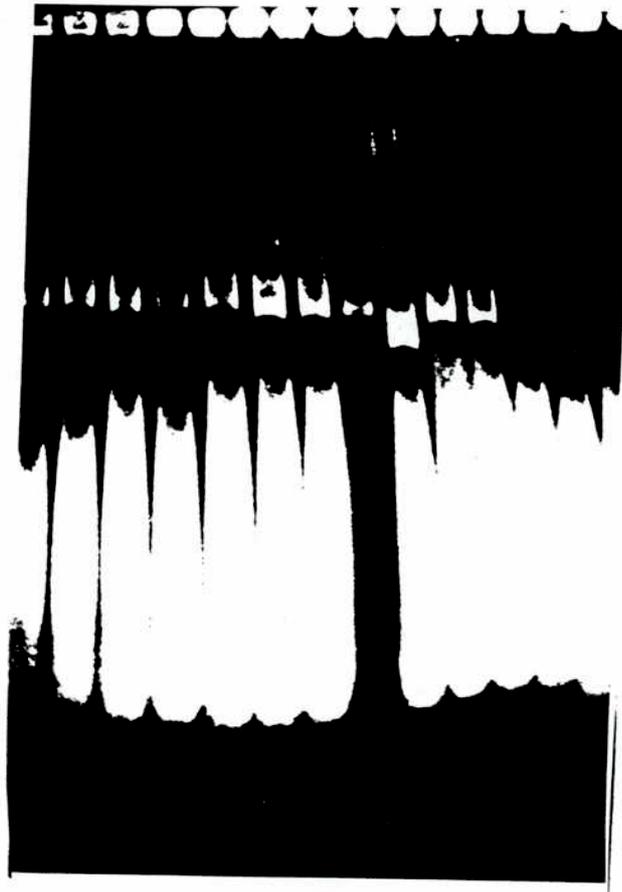


Figura III.3.

Análisis de los clones positivos

Contenido plasmídico de 12 clones positivos por hibridización molecular, provenientes del sub-clonado del fragmento PstI de 6 Kb de pRx8 en pPL608.

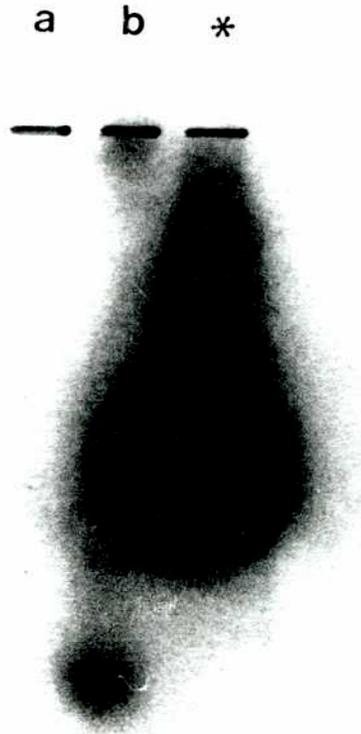


Figura III.4.

Inestabilidad estructural de los clones recombinantes

Autorradiografía correspondiente a dos clones recombinantes (a y b) delecionados, hibridizados con una sonda radioactiva correspondiente al fragmento PstI de pRx8; \* = pRx8.

Por este motivo, se decidió llevar adelante una segunda estrategia de subclonado, esta vez utilizando como receptor a la cepa IA510 de *B. subtilis*, por sus características particulares en cuanto a recombinación, restricción y modificación. Asimismo, se decidió utilizar un nuevo vector de expresión (pEB111) que será descrito con detalle en la próxima sección.

### III.2.2. Subclonado en *B. subtilis* IA510

La cepa IA510 (originalmente denominada PSL1) fue aislada por Ostroff y Pène en 1983 (OSTROFF y PENE, 1983). Se trata de una mutante espontánea que presenta alta transformabilidad. Esta cepa, deriva de la cepa MI112 (recE4) y fue utilizada para clonar fragmentos de ADN en vectores bifuncionales de *E. coli-B. subtilis*. Estos autores transformaron células competentes de IA510, encontrando que éstas aceptaban ADN recombinante preparado en *E. coli* y lo mantenían establemente hasta un tamaño de inserto de 4 Kb.

La estrategia utilizada en nuestro caso, se describe en la Tabla III.1 (Estrategia II) y se basó en la transformación de protoplastos de IA510. En esta oportunidad se utilizó el plásmido pEB111 (TRAUTNER, 1987)) como vehículo de clonado ya que éste es un vector de expresión recientemente desarrollado, que presenta las siguientes ventajas: a) múltiples sitios de clonado aportados por el *poli-linker* del plásmido pUC8 de *E. coli* (VIEIRA y MESSING

## Resultados

*et.al.*, 1982), b) promotor *lac* (triptofano-lactosa, AMANN, 1983), c) orígenes de replicación de pBR322 de *E. coli* y de pUB110 de *S. aureus*, lo que lo hace bifuncional, y d) secuencias terminadoras de la transcripción que la hacen más específica y dan mayor estabilidad al ARNm resultante. En la Figura III.5 se esquematiza el mapa físico de pEB111.

En una primera etapa, se decidió subclonar un fragmento pequeño (de 2 Kb aproximadamente); se partió del plásmido pRX8-7 (BOURGOVIN *et.al.*, no publicado), un subclon de pRX-8 capaz de sintetizar un polipéptido (de 65 Kd) que aún posee actividad tóxica sobre larvas de *Aedes sp.* (Ver Figura III.6).

El plásmido pRX8-7, fue digerido con las enzimas EcoRI y HindIII, del mismo modo que el vector pEB111; éste último fue además, marcado radioactivamente por *fill in*, y el fragmento EcoRI-HindIII de pUC8 fue removido por separación en una columna de filtración molecular (Ver Materiales y Métodos).

La relación molar de extremos inserto-vector utilizada fue de 4 a 1, y las mezclas fueron introducidas en protoplastos de IA510 por el protocolo convencional. La regeneración de estos protoplastos, sin embargo, presenta ciertos inconvenientes característicos de las cepas Rec-; en este caso, se apeló al uso de un agente osmoprotector como el ácido glutámico (ROGERS *et.al.*, 1980) que, agregado al medio de regeneración elevó notablemente la eficiencia de la misma. Es más, esta modificación permitió utilizar suspensiones de protoplastos conservadas a -70°C en SMM sin pérdida de su capacidad regenerativa ni transformante (RUBINSTEIN *et.al.*, no publicado).

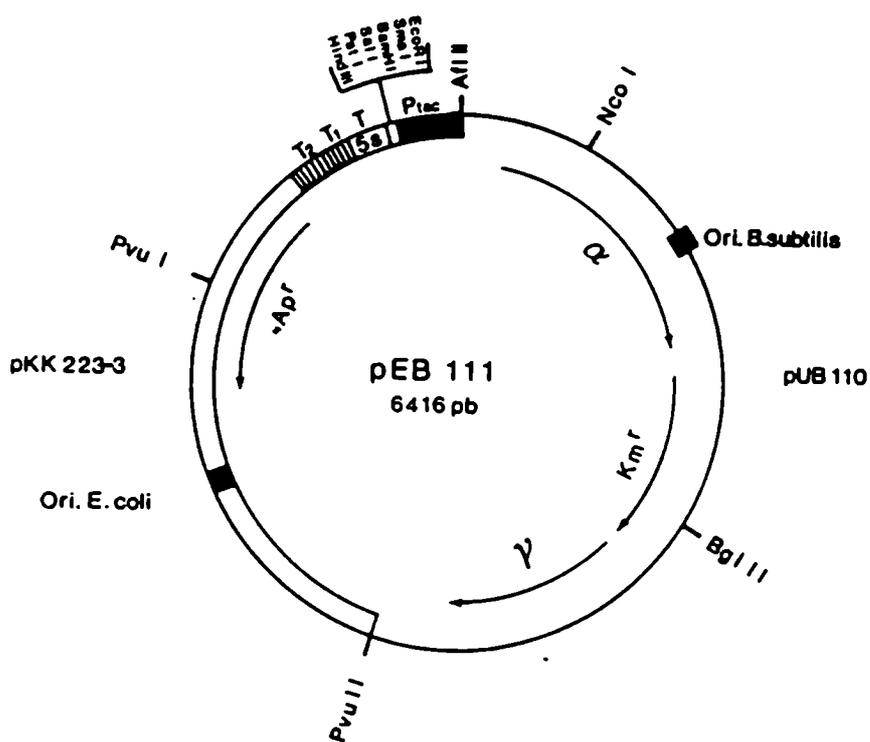


Figura III.5.

Mapa físico de pEB111

T1 y T2 = terminadores de la transcripción  
 Ptac = promotor híbrido triptofano-lactosa

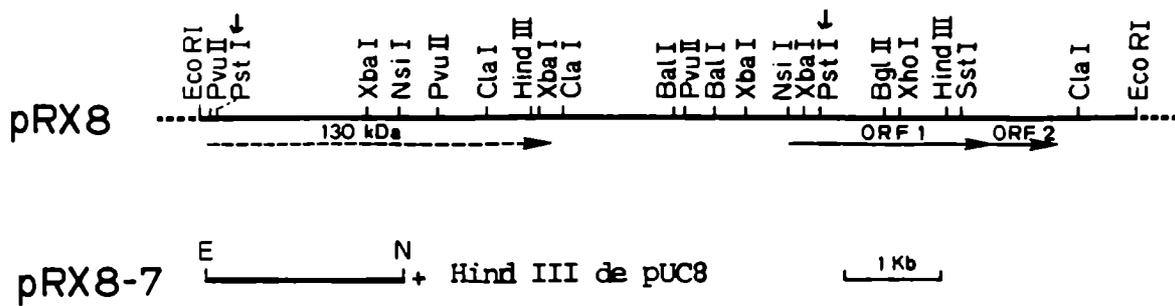


Figura III.6.

Mapas de restricción de pRx8 y pRx8-7\*

\*Estos clones fueron obtenidos por C. BOURGOUIN en el Instituto Pasteur de Paris. Las flechas indican los fragmentos utilizados para subclonar.

## Resultados

El resultado de la transformación con las mezclas de ligación, llevando a cabo la selección directa de los clones transformantes, reveló que las moléculas provenientes del ligado de los fragmentos de PRX8-7 y pEB111, transformaron con una eficiencia que resultó del 26% de la obtenida con el plásmido nativo utilizado como control. Este dato está de acuerdo con el obtenido (23%) para la transformación de la cepa 1104 con los plásmidos recombinantes (pPL608-pRX8) del subclonado anterior.

En la Figura III.7 se pueden apreciar las bandas plasmídicas resultantes del análisis de 16 clones transformantes escogidos al azar sobre los cuales se detectaron 5 que presentaban plásmidos retrasados que fueron re-aislados para su posterior caracterización.

Estos y otros clones supuestamente positivos, fueron hibridizados con una sonda correspondiente al fragmento EcoRI-HindIII de 2,2 Kb de pRX8-7 marcado radioactivamente por la técnica de "iniciaciones al azar" (Ver Materiales y Métodos). En la Figura III.8 se observan las bandas reactivas con dicha sonda, que corresponden a 7 de los 12 clones analizados.

En la Figura III.9 se muestra la autorradiografía correspondiente a la hibridización de seis clones digeridos con EcoRI y HindIII para confirmar la existencia del inserto de 2,2 Kb. De estos seis clones, tres fueron positivos en el autorradiograma, confirmando los resultados obtenidos con los plásmidos nativos.

1 2 3 4 5 6 \* 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

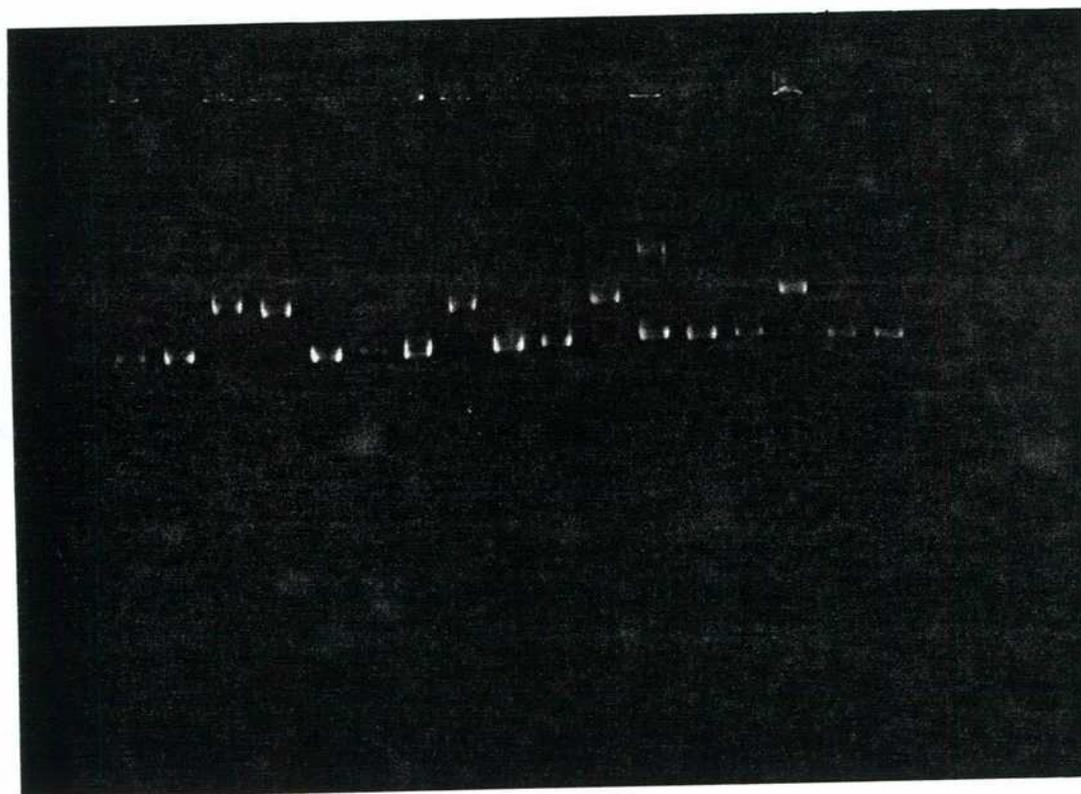


Figura III.7.

Análisis de clones transformantes  
en IA510 (estrategia II)

Gel de agarosa que muestra el contenido plasmídico de 18 clones transformantes escogidos al azar (minipreparaciones efectuadas según lo descrito en Materiales y Métodos) entre los obtenidos luego de transformar protoplastos de IA510 con la mezcla de ligación entre pEB111 y pRx8-7 (digeridos con EcoRI y Hind III).  
1 a 18 = clones 3,7,10,11,14,16,20,22,24,28,30,32,37 y 40.  
\* = pEB111

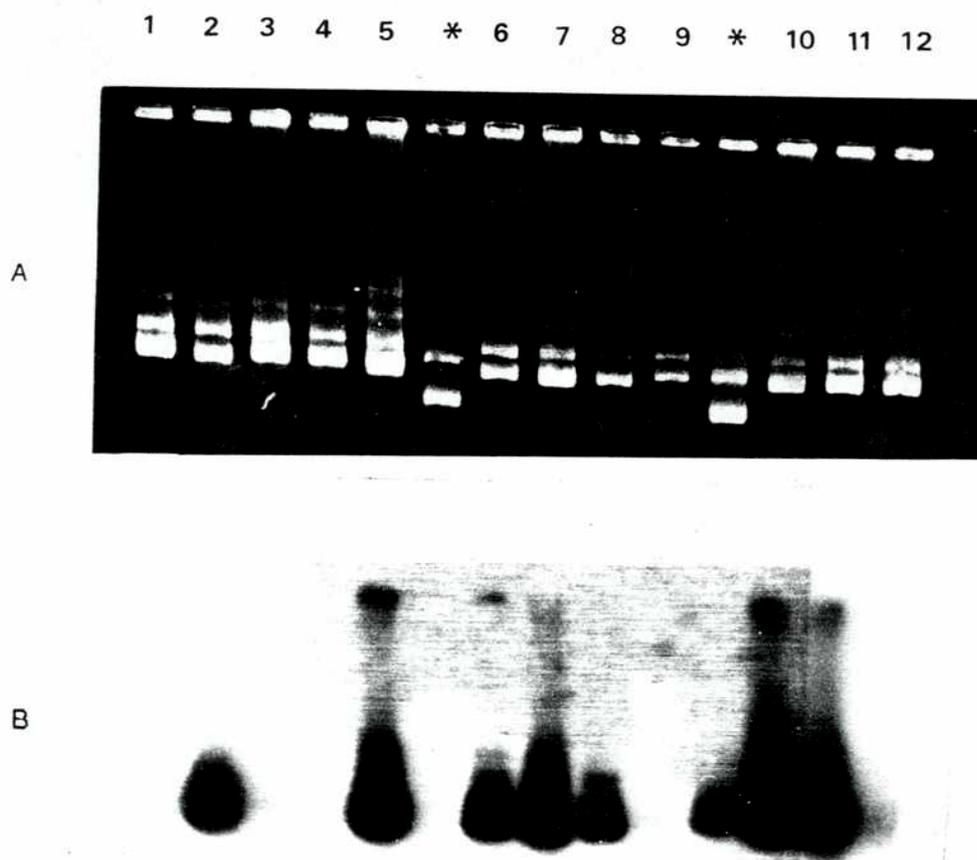


Figura III.8.

Confirmación de los clones positivos  
por hibridización

A = gel de agarosa correspondiente a 12 clones recombinantes.  
B = autorradiografía correspondiente al gel A. De 1 a 12 = clones  
IA4,6,8,28,5,30,31,36,9,11 y 14.

\* = pEB111

El gel (A) con los plásmidos recombinantes obtenidos fue transfe-  
rido a un filtro de nitrocelulosa (ver Materiales y Métodos) e  
hibridizado con la sonda correspondiente al fragmento EcoRI-  
HindIII de pRx8-7 (2,2 Kb), purificado y marcado por *priming at  
random*.

a b c d e f



Figura III.9.

Caracterización de los clones  
recombinantes obtenidos (I)

Autorradiografía correspondiente a la hibridización de 6 clones recombinantes escogidos por su movilidad electroforética retrasada respecto del vector pEB111. Estos, fueron digeridos con EcoRI y HindIII, transferidos a nitrocelulosa e hibridizados contra la sonda de 2,2 Kb de pRx8-7.

a = IA11; b = IA14; c = IA28; d = IA30; e = IA40; f = IA47  
a y e = digestiones parciales

Debido a la estrategia utilizada, se esperaba obtener alrededor de un 50% de clones no específicos, formados por el vector pEB111 y un inserto de 2,7 Kb aproximadamente, que corresponde al vector pUC8 digerido con EcoRI y HindIII. En efecto, se encontraron los dos tipos de clones en la proporción esperada.

En la Figura III.10 se muestra un gel de agarosa correspondiente a la restricción de los dos tipos de clones obtenidos, en el cual se pueden apreciar bandas correspondientes a los insertos de 2,2 y 2,7 Kb, respectivamente.

En cuanto a la estabilidad de los clones, hemos determinado que es muy alta, ya que los clones cultivados por varias generaciones en ausencia de presión selectiva, conservan intacto su contenido plasmídico (ver Figura III.11). Esto es también cierto para los clones que llevan el inserto de 2,7 Kb correspondiente a pUC8. Esto indica la gran estabilidad del sistema, ya que estos clones presentan extensas regiones de homología aportadas por las secuencias de pUC8 presentes en el inserto y en pEB111.

Por lo tanto, el uso de la transformación de protoplastos de cepas recE4 deficientes en restricción y modificación parece ser adecuado para su aplicación al desarrollo de un sistema de clonado en *B. subtilis*.

Como próximo paso en el desarrollo de este sistema, se procedió a subclonar en el mismo vector pEB111, un fragmento de mayor tamaño proveniente de pRX3 (estrategia III, Tabla III.1) con el objeto de ensayar la estabilidad de clones con insertos mayores que 5 Kb (Ver punto III.1.3).

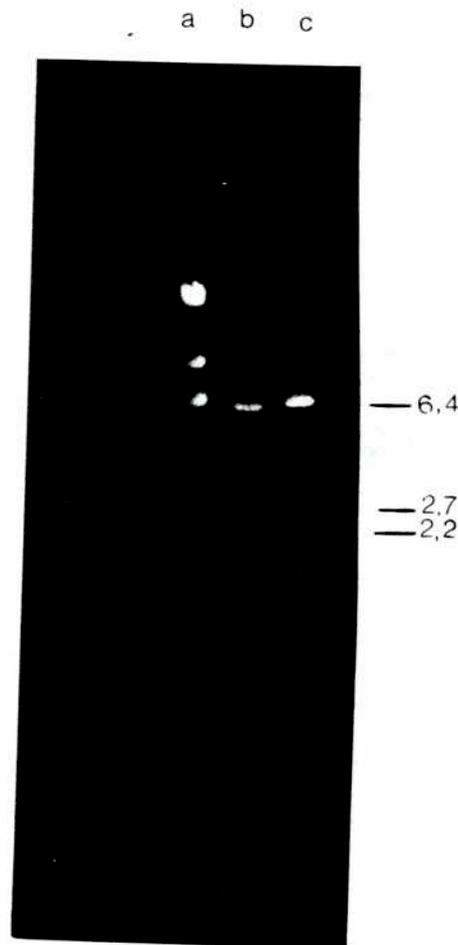


Figura III.10.

Caracterización de los clones recombinantes obtenidos (II)

Los dos tipos de clones recombinantes obtenidos (positivos y negativos en las autorradiografías) fueron digeridos con EcoRI y HindIII para recuperar los dos tipos de inserto esperados por la estrategia de clonado utilizada. Los tamaños de los fragmentos se indican en Kb.

a = ADN de  $\lambda$  digerido con HindIII; b = IA30; c = IA36

a b c d e f



Figura III.11.

Estabilidad de los clones en IA510

Cuatro clones recombinantes fueron incubados en ausencia de presión selectiva y sus plásmidos fueron analizados de la manera usual.

a = IA5; b = IA6; c = IA9; d = control negativo (pEB111); e = IA17; f = IA6 crecido en presencia de neomicina 5  $\mu$ g/ml.

## Resultados

Para ello, pRX8 y pEB111 fueron restringidos con EcoRI; por la estrategia de clonado utilizada para construir pRX8, esta restricción rinde dos fragmentos: uno de 9,6 Kb que incluye el gen de tipo I y los ORF1 y 2 (Ver Figura III.6), y el otro de 2,9 Kb perteneciente al vector de clonado pUC8.

En este caso, el vector pEB111 fue tratado con fosfatasa alcalina previamente a la etapa de ligado; la transformación de los protoplastos se llevó a cabo del mismo modo que anteriormente, con una modificación a nivel del medio de regeneración. Se utilizó medio R (Ver Materiales y Métodos), ya que hemos observado que esta cepa regenera más eficientemente en un medio de este tipo con el agregado de ácido glutámico (ROGERS *et.al.*, 1980; RUBINSTEIN *et.al.*, 1988, aún no publicado). La eficiencia de la transformación en estos experimentos fluctuó entre un 10 y un 15% de la alcanzada para el vector nativo.

En la Figura III.12, se presenta un gel de agarosa de los plásmidos nativos correspondiente al análisis de clones transformantes escogidos al azar. La restricción de los plásmidos retrasados con EcoRI, permitió la recuperación del fragmento de 9,6 Kb subclonado en pEB111. Se eligieron tres clones de este tipo (denominados 6, 14 y 15) y se llevó a cabo un ensayo de estabilidad segregacional mediante sucesivas generaciones crecidas en ausencia de presión selectiva. El contenido plasmídico de los clones fue el mismo en ambas condiciones (Ver Figura III.13), indicando una alta estabilidad segregacional (y estructural, puesto que no había variado el tamaño de los plásmidos).

1 c d 2 3

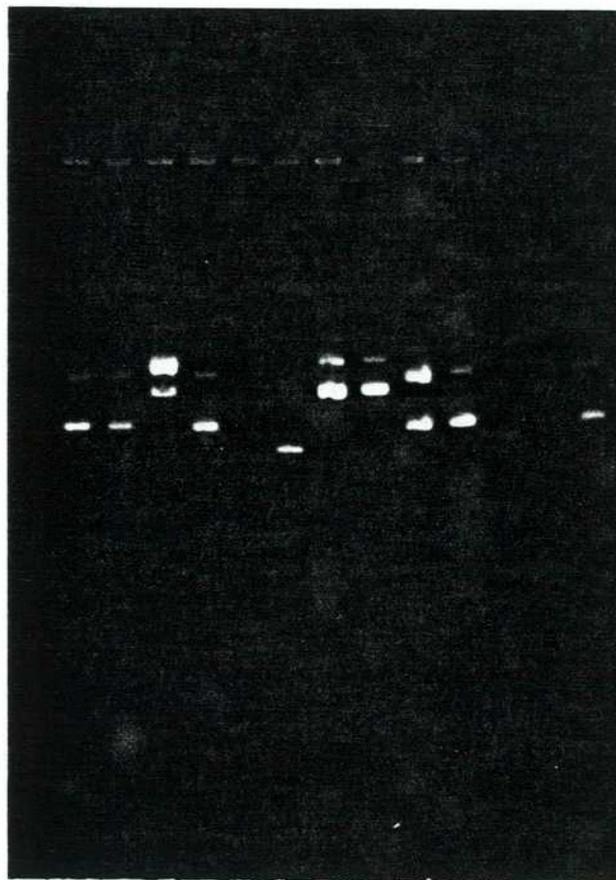


Figura III.12.

Análisis de clones transformantes de IA510  
(estrategia III)

Clones resistentes a neomicina fueron escogidos al azar y su contenido plasmídico fue analizado por minipreparación. Se observan bandas retrasadas (1, 2 y 3) respecto del vector pEB111 (c) y una banda de menor tamaño (d).

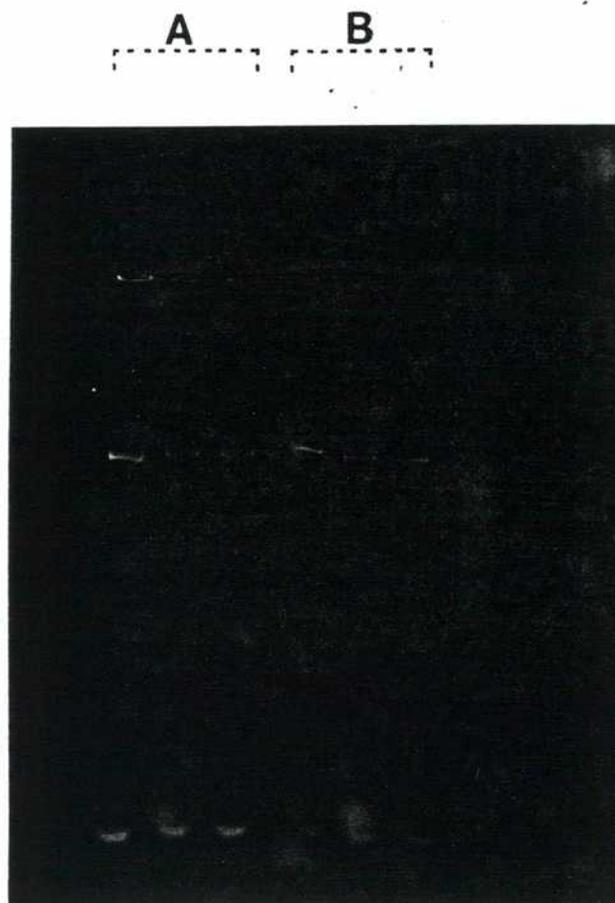


Figura III.13.

Estabilidad segregacional de los clones recombinantes

Análisis de los plásmidos de los clones 6, 14 y 15, crecidos en ausencia (A) y presencia de presión selectiva (B) por más de 15 generaciones.

## Resultados

La expresión de los genes de  $\delta$ -endotoxina clonados en *B. subtilis* (con formación de inclusiones cristalinas) ha sido reportada por diferentes laboratorios para las subespecies *berliner* (KLIER *et.al.*, 1985), *kurstaki* (SHIVAKUMAR *et.al.*, 1986) e *israelensis* (hemolisina, BOURGOUIN *et.al.*, 1986). En dichos estudios, la transformación de células competentes de *B. subtilis* fue utilizada y, a excepción del llevado a cabo en la subespecie *kurstaki*, los resultados indicaron que la expresión de estos genes estaba ligada a la esporulación también en *B. subtilis*. En cuanto a los niveles de expresión alcanzados, fluctúan alrededor de un 1 a un 10% de la proteína celular total.

En la Figura III.14, se muestran microfotografías correspondientes a uno de los clones recombinantes aislados; las pre-esporas de este clon presentan inclusiones no habituales ya sea solas o en asociación con la espora que, a su vez, presenta una ubicación subpolar respecto de la polar normalmente observada en preesporas de *B. subtilis*.

Estas preparaciones, fueron coloreadas por el método de Smirnoff (SMIRNOFF, 1962; ver Materiales y Métodos), por el cual es posible diferenciar células vegetativas de esporas y cristales: las primeras toman color rojizo a violeta (dependiendo del tiempo de coloración y de los filtros utilizados para su observación), mientras que las esporas se tiñen de color rosa pálido o liláceo. En cuanto a los cristales, se colorean intensamente de violeta oscuro a negro.

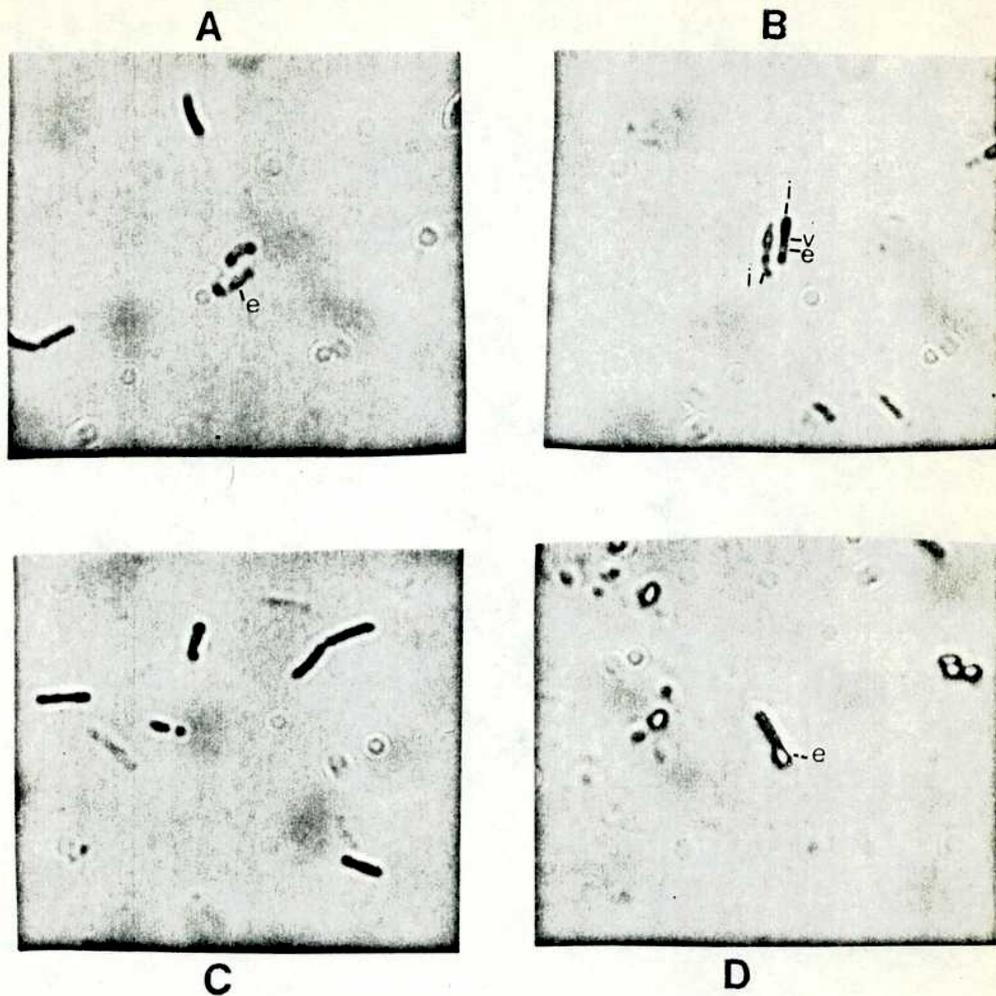


Figura III.14.

Pre-esporas recombinantes de IA510

El clon 6 aislado luego de la transformación de IA510 (estrategia III), fue crecido en medio nutritivo de Schaeffer en ausencia de antibiótico a 30°C durante 72 horas y sus pre-esporas fueron coloreadas según SMIRNOFF. Las fotografías se tomaron con filtro amarillo según lo descrito en Materiales y Métodos. 100x.

A,B y C = clon 6; D = pre-espora de IA510 transformada con el vector pEB111; e = espora; v = célula vegetativa; i = inclusión.

En el caso del clon recombinante, es posible apreciar las diferentes coloraciones en preesporas que presentan diferentes "zonas" o inclusiones. Dichas inclusiones toman la coloración del mismo modo en que lo hacen los cristales de *Bacillus thuringiensis israelensis* salvaje.

Si bien es prematuro afirmar que se trata de inclusiones cristalinas específicas, estas observaciones indicarían que el sistema de clonado (en cuanto a vector elegido, sitios utilizados para subclonar, etc.) funciona, que el receptor utilizado permite el establecimiento y mantenimiento de los plásmidos recombinantes (aún con insertos de tamaño considerable), y que también permitiría la expresión eficiente de los genes incluidos en dichos plásmidos.

### III.3. DISCUSION

La estabilidad segregacional (mantenimiento del plásmido en ausencia de presión de selección) y estructural (mantenimiento de la integridad del plásmido sin rearrreglos) de los vectores que llevan genes clonados, es una condición esencial para el desarrollo de cualquier sistema de clonado, y en particular de sistemas que serán aplicados industrialmente.

En efecto, no es posible pensar en mantener una presión de selección por el agregado de antibióticos, ya que esto elevaría enormemente los costos de producción (por el antibiótico mismo y su remoción posterior). Por otro lado, en el caso de *B. subtilis* y otros bacilos esporulantes, la presencia de antibióticos interfiere con los procesos de esporulación.

Algunas soluciones se han propuesto al problema de la inestabilidad de plásmidos recombinantes en *B. subtilis*. Una de las más ingeniosas consiste en la propuesta de Novo Industries de Dinamarca. La pared de *B. subtilis* contiene una capa de peptidoglicanos que presentan moléculas de D-alanina en su composición. Este isómero inhabitual, deriva de la L-alanina por acción de una racemasa codificada por el gen dal; este gen ha sido clonado en un plásmido e introducido en una cepa de *B. subtilis* que lleva una delección en dicho gen. En un medio de cultivo que no contenga D-alanina (la gran mayoría son de este tipo), sólo las bacterias que hayan conservado el plásmido serán capaces de sintetizar pared y sobrevivir. De este modo, la población se mantiene homogénea y se observa una estabilidad segregacional perfecta a lo largo de 85 generaciones (HESLOT *et.al.*, 1985).

Otra propuesta interesante, consiste en el uso de vectores que permitan la integración al cromosoma de genes clonados. Estos vectores contienen regiones de homología con el cromosoma de manera que se produzca recombinación con alta frecuencia y, en consecuencia, integración. Los eventos de recombinación se producen con una frecuencia mayor si los segmentos homólogos se encuentran cerca de un origen de replicación. Plásmidos tales como

## Resultados

pC194 o pE194, de los cuales derivan numerosos vectores de *B. subtilis*, producen formas circulares de simple cadena durante la replicación (VIRET y ALONSO, 1987), fenómeno que puede ser responsable de la alta frecuencia de recombinación observadas.

Estos mismos fenómenos derivados del mecanismo de replicación plasmídico, podrían tener importantes consecuencias en la estabilidad general de los vectores comúnmente usados en *B. subtilis* (VIRET y ALONSO, 1987).

A pesar de las alternativas propuestas (uso de presión selectiva no mediada por antibióticos, o integración al cromosoma), el desarrollo de un sistema de clonado que permita la estabilidad plasmídica continúa siendo un requisito indispensable.

Es por esto que se ha considerado importante la puesta a punto de diversos parámetros, así como la elección de las cepas receptoras y los vectores utilizados. En este sentido, los vectores pPL608 y pEB111 poseen orígenes de replicación provenientes de pUB110, un plásmido que es establemente mantenido y no interfiere con la fisiología celular de *B. subtilis* o sus mutantes Rec<sup>-</sup> (VIRET y ALONSO, 1987).

En cuanto a las cepas receptoras, es notable la diferencia observada en la estabilidad de los plásmidos recombinantes entre GSY1104 (<1%) y la cepa IA510 (>95% ya que aparecen algunas formas con deleciones).

Ya hemos mencionado que la inestabilidad estructural observada en *B. subtilis* se explica por mecanismos de restricción activos en esta especie (OSTROFF y PENE, 1983). La cepa IA510 (o-

## Resultados

originalmente PSL1) fue aislada luego de la transformación de células competentes de la cepa MI112 recE4 (TANAKA, T., 1979) con plásmidos recombinantes propagados en *E. coli*. Uno de los raros transformantes que contenía el plásmido intacto fue re-aislado y denominado PSL1 por los autores (OSTROFF y PENE, 1983).

Experimentos de transformación con genes clonados en vectores bifuncionales, mostraron que si bien la eficiencia de transformación de IA510 era alta para plásmidos con insertos de 1,7 a 4,2 Kb, ésta se veía reducida en un 75% con plásmidos que llevaran insertos mayores. Dichos experimentos se llevaron a cabo utilizando células competentes para la transformación y probablemente se deba a ello la gran disminución en las eficiencias obtenidas con insertos mayores que 4 Kb. Los mismos autores mencionan que la transformación de células competentes de MI112 con plásmidos recombinantes es entre 0,1 y 1% de la obtenida con el vector nativo (OSTROFF y PENE, 1983). La transformación de protoplastos de GSY1104, por el contrario, resultó un 26% de la eficiencia obtenida con el vector nativo cuando se introdujeron moléculas recombinantes con insertos de 6 Kb.

En el caso de IA510, esta proporción se mantuvo, si bien se observó una caída en la recuperación de clones transformantes cuando se subclonó el inserto de 9,6 Kb (de un 40 a un 60%). La razón para la limitación en el tamaño de las moléculas híbridas transferidas a *B. subtilis* (observada por nosotros y estos autores) no es conocida. Sin embargo, el hecho de que las frecuencias de transformación de protoplastos sean mucho mayores que las ob-

## Resultados

tenidas con células competentes (dos órdenes de magnitud, aproximadamente), hace que este inconveniente pueda ser en parte superado por el alto número de clones que se puede recuperar.

En cuanto a la expresión de los genes clonados en este sistema, las observaciones realizadas con los clones que llevan la información completa para dos de los tres polipéptidos componentes del cristal paraesporal, indican que esto es posible y probablemente, en altos niveles (Ver Figura III.14). Si bien estas son observaciones preliminares, serán efectuados los ensayos biológicos para determinar la actividad tóxica de estos clones.

De esta forma, eligiendo cuidadosamente vectores y receptores de clonado, así como las técnicas de transformación y selección de los clones transformantes, ha sido posible desarrollar un sistema que presenta gran estabilidad, tanto segregacional como estructural de los plásmidos recombinantes introducidos.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 1. CONCLUSIONES

Las posibilidades que brinda la utilización de *Bacillus thuringiensis* en el marco de la lucha biológica contra insectos, han generado un número de trabajos enfocados al estudio de la síntesis de la  $\delta$ -endotoxina así como del determinismo genético de su regulación.

El conjunto de los trabajos aquí presentados intenta aportar, en este sentido, distintas herramientas que servirán como punto de partida para estudios más profundos acerca de la regulación genética en estos microorganismos.

Este objetivo constituyó el hilo conductor de estos estudios, que han posibilitado a través de las diferentes manipulaciones, el conocimiento de los aspectos fisiológicos y genéticos de *Bacillus thuringiensis*.

De ellos, asimismo, se desprende la gran complejidad de los sistemas regulatorios coincidiendo con la observada en cuanto a estructura, localización de los genes y espectro de acción de las  $\delta$ -endotoxinas.

Desde el punto de vista aplicado, el hecho de contar con mutantes hiperproductores de toxina presenta un gran potencial, así como poder utilizar un sistema de clonado eficiente en *Bacillus subtilis* para estos u otros genes de interés.

### 2. PERSPECTIVAS

Las líneas de trabajo que se desprenden de las aquí presentadas, incluyen los tres aspectos encarados:

- I) Transformación de protoplastos: Se continuarán los experimentos en este sentido, intentando mejorar fundamentalmente las eficiencias de regeneración en medios sólidos, con el objeto de obtener mayores rendimientos en transformación y llevar adelante experimentos de fusión intra-específica. Este tipo de experimento permitirá llevar a cabo estudios de complementación entre mutantes y la construcción de cepas con múltiples espectros de acción.

En cuanto a la inestabilidad de ciertos plásmidos, es posible que se trate de mecanismos relacionados con la incompatibilidad o su modo de replicación particular. Se sabe que ciertos plásmidos son incapaces de replicarse en forma de monómeros circulares en cepas de *B. subtilis* deficientes en recombinación (ALONSO *et al*, 1987). Es decir, que el contexto genético de *B. thuringiensis* podría no ser el adecuado para el establecimiento de ciertos replicones. Es por esto, que se intentará la construcción de plásmidos que lleven orígenes de replicación propios de *B. thuringiensis* con marcadores de resistencia a antibióticos adecuados para este sistema. De esta forma, contaremos con vectores potenciales para el desarrollo de un sistema de clonado en estos bacilos.

## Conclusiones y Perspectivas

II) Mutantes regulatorios: Se continuará la caracterización de los mutantes obtenidos, de los cuales se posee información preliminar. El estudio de estas cepas aportará valiosos datos concernientes a la regulación de la síntesis de la  $\delta$ -endotoxina.

III) Finalmente, y con el objeto de continuar con la puesta a punto del sistema de clonado en *B. subtilis*, se efectuarán experimentos de clonado de fragmentos heterogéneos (*shot gun cloning*), partiendo de ADN del megaplásmido de 72 Md de *B. thuringiensis israelensis* o bien de ADN cromosómico, para construir genotecas en *B. subtilis*. Estos experimentos permitirán saber si el sistema soporta la introducción y el mantenimiento de grandes fragmentos de ADN exógeno.

Asimismo, se llevarán a cabo ensayos tendientes a analizar la expresión de los plásmidos recombinantes obtenidos por subclonado, utilizando técnicas de inmunodetección y ensayos biológicos sobre larvas de *Aedes* sp.

## **BIBLIOGRAFIA**

## Bibliografía

- Adang, M.; Stauer, M.J.; Rochelau, T.A.; Leighton, J.; Barker, R.F. y Thompson, D.V. (1985) *Gene* **36**, 289-300.
- Alikhanian, S.I.; Ryabchenko, N.F.; Bukanov, N.O. y Sakanyan, U.V. (1983) *J. Bacteriol.* **146**, 7-9.
- Alikhanian, S.I.; Ryabchenko, N.F.; Bukanov, N.O. y Sakanyan, V.A. (1981) *J. Bacteriol.* **146**, 7-9.
- Alonso, J.; Viret, J. y Tailor, R. (1987) *Mol. Gen. Genet.* **208**, 349-352.
- Amann, E. (1983) *Gene* **25**, 167-178.
- Andrews, R.; Iandolo, J.; Campbell, B.; Davidson, L. y Bulla, L. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 897-900.
- Angsuthanasombat, Ch.; Chungjatupornchai, W.; Kertbundit, S.; Luxanalil, P.; Settasatian, Ch.; Wilairat, P. y Panyim, S. (1987) *Mol. Gen. Genet.* **208**, 384-389.
- Aronson, A.; Beckman, W. y Dunn, P. (1986), *Microbiological Rev.* **50**, 1-24.
- Aronson, A.I. y Fitz-James, P.C. (1976) *Bacteriol. Rev.* **40**, 360-402.
- Aronson, A.I.; Tyrell, D.J.; Fitz-James, P.C. y Bulla, L.A., Jr. (1982), *J. Bacteriol.* **151**, 399-410.
- Barsomian, G.D.; Robillard, N.J. y Thorne, C.B. (1984) *J. Bacteriol.* **157**, 746-750.
- Bechtel, D.B. y Bulla, L.A. (1976) *J. Bacteriol.* **127**, 1472-1481.
- Bernhard, K. (1986), *FEMS Microbiol. Lett.* **33**, 261-265.
- Betley, M.J.; Miller, V.L. y Mekalanos, J.L. (1986) *Ann. Rev. Microbiol.* **40**, 577-605.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979) *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1516.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1517.
- Bourgouin, C.; Klier, A. y Rapoport, G. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **205**, 390-397.

## Bibliografía

- Bulla, L.A., Jr.; Bechtel, D.B.; Kramer, K.J.; Shetna, Y.I.; Aronson, A.I. y Fitz-James, P.C. (1980), *Crit. Rev. Microbiol.* **8**, 147-204.
- Bulla, L.A., Jr.; Davidson, L.I.; Kramer, K.J. y Jones, B.L. (1979), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **91**, 1123-1130.
- Bulla, L.A., Jr.; Kramer, K.J. y Davidson, L.T. (1977), *J. Bacteriol.* **130**, 373-383.
- Burgerjon, A. (1962), *L. Ann. Epiphyt.* **13**, 59-72.
- Burgerjon, A. y Dulmage, A.T. (1977), *Entomophaga* **22**, 121-129.
- Burges, H.D. (1982), *Parasitology* **84**, 79-117.
- Calabrese, D.M.; Nickerson, K.W. y Lane, L.C. (1980) *Can. J. Microbiol.* **26**, 1006-1010.
- Canosi, U.; Morelli, G. y Trautner, T.A (1978) *Mol.Gen.Genet.* **166**, 259-265.
- Carlton, B.C. y Gonzales, J.M., Jr. (1984) En: "The Molecular Biology of *Bacilli*", Vol.1. Academic Press NY.
- Chang, S. y Cohen, S.U. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111-115.
- Chestukhina, G.; Tyurin, S.A.; Osterman, A.; Khudova, O.P. y Stepanou, U.M. (1986) *FEBS Lett.* **198**, 283-286.
- Cheung, P.Y. y Hammock, B.D. (1985) *Current Microbiol.* **12**, 121-126.
- Cofre, G. y Sánchez-Rivas, C. (1983) *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 11-15.
- Crawford, I.; Greis, K.; Parks, C. y Streips, U. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5423-5428.
- Crawford, I.T.; Greis, K.D.; Parks, L. y Streips, U.N. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 5423-5428.
- de Barjac, H. y Bonnefor, A. (1973), *Entomophaga* **18**, 5-17.
- de Vos, W.; Venema, G.; Canosi, U. y Trautner, T.A. (1981) *Mol. Gen. Genet.* **181**, 424-433.

## Bibliografía

- Dulmage, H.T. (1971), *J. Invertebr. Pathology* **18**, 355-358.
- Dulmage, H.T. (1973) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **217**, 187-199.
- Dulmage, H.T.; Boening, O.P.; Rehnberg, C.S. y Hansen, G.D. (1971), *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 240-245.
- Ebersold, H.R., Luthy, P. y Huber, H.E. (1980), *Experientia* **36**, 495-496.
- Eckhardt, T. (1978) *Plasmid* **1**, 584-588.
- Eckhardt, Th. (1978) *Plasmid* **1**, 584-587.
- Ehrlich, S.D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1680-1684.
- Ehrlich, S.D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1433-1436.
- Falcon, L.A. (1971). En "Microbial Control of Insects and Mites". Acad. Press N.Y., 67-95.
- Farkas, J.; Sebesta, K.; Horska, K.; Sauek, Z.; Doliss, J. y Sorm, F. (1969), *Collect. Czech. Chem. Commun.* **34**, 1118-1120.
- Fast, P.G.; Murphy, D.W. y Sohi, S.S. (1978), *Experientia* **34**, 762-763.
- Fischer, H.M.; Lüthy, P. y Schweitzer, S. (1984) *Arch. Microbiol.* **139**, 213-217.
- Fischer, H.M.; Luthy, P. y Schweitzer, S.C. (1984) *Arch. Microbiol.* **139**, 213-217.
- Fitz-James, P.C. (1960) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8**, 507-528.
- García Patrone, M.; Reboredo, J.C.; Torres, H.N.; Rubinstein, C.P. y Stoka, A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comun.* **135**, 902-908.
- Geiduschek, P. e Ito, J. (1982) en: *The Molecular Biology of The Bacilli* ". Dubnau Ed., 203.
- Gilman, M y Chamberlin, M (1983) *Cell* **35**, 285-293
- Goldberg, L.H. y Margalit, J. (1977) *Mosquito News* **37**, 355-358.

## Bibliografía

- Gonzales, J. y Carlton, B. (1983) *Plasmid* 11, 28-38.
- Gonzales, J.M., Jr. y Carlton (1982) En: "Genetic Exchange: a celebration and a new generation". Streips; Goodgal; Guild; Wilson. Dekker, N.Y., p. 85-95.
- Gonzales, J.M., Jr. y Carlton, B.C. (1980) *Plasmid* 3, 92-98.
- Gonzales, J.M., Jr. y Carlton, B.C. (1984) *Plasmid* 11, 28-38.
- Gonzales, J.M., Jr., Dulmage, H.T. y Carlton, B.C. (1981) *Plasmid* 5, 351-365.
- Gonzales, J.M., Jr.; Brown, B.S. y Carlton, B.C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79, 6951-6955.
- Griego, U.V. y Spence, K.D. (1978), *Appl. and Environ. Microbiol.* 35, 906-910.
- Grunstein, M. y Hogness, J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3966.
- Gryczan, T.; Contente, S. y Dubnau, D. (1980) *Mol.Gen.Genet.* 177, 459-467.
- Gryczan, T.J. y Dubnau, D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1428-1433.
- Gryczan, T.J.; Shivakumar, A.G. y Dubnau, D. (1980) *J.Bacteriol.* 141, 246-253.
- Hayashi, H.; Araki, Y. e Ito, E. (1973) *J. Bacteriol.* 113, 592-598.
- Heider, M.Z.; Ward, E.S. y Ellar, D.J. (1987), *Gene* 52, 285-290.
- Heierson, A.; Landen, R.; Lovgren, A.; Dachammar, G. y Boman, H. (1986) *J. Bacteriol.* 169, 1147-1152.
- Heierson, H.R.; Landen, R. y Boman, H.G. (1983) *Mol. Gen. Genet.* 192, 118-123.
- Held, G.; Huang, Y.S. y Kawanishi, C.Y. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 937-941.

## Bibliografía

- Hemphill, H.E y Whiteley, H.R. (1975) *Bacteriol. Rev.* **39**, 257-315.
- Henner, D.J. y Hoch, J.A. (1980) *Microbiol. Rev.* **44**, 57-82.
- Herrnstadt, C.; Soares, G.G.; Wilcox, E.R. y Edwards, D.C. (1986), *Biotechnology* **4**, 305-308.
- Heslot, H.; Joyet, P.; LeCoq, D. y Steinmetz, M. (1985) *Biofutur Dic.* 1985, 53-60.
- Horinuchi, S. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **157**, 175-182.
- Hoshino, T.; Uozumi, T.; Beppu, T. y Arima, K. (1980) *Agr. Biol. Chem.* **44**, 621-623.
- Huber, H.E.; Luthy, P.; Ebersold, H.R. y Cordier, J.C. (1981), *Arch. Microbiol.* **129**, 14-18.
- Hurley, J.M.; Lee, S.G.; Andrews, R.E.; Klowden, M.J. y Bulla, L.A. (1985) *Biochem. Biophys. Commun.* **126**, 961-965.
- Ibarra, J.E. y Federici, B.A. (1986) *J. Bacteriol.* **165**, 527-533.
- Itzuka, T. y Yamamoto, T. (1983) *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 187-192.
- Jarret, P. (1985) *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 437-448.
- Keggins, K.; Lovett, P. y Duvall, E. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1423-1427.
- Kim, K.H.; Ohba, M. y Aizawa, K. (1984), *J. Invertebr. Pathology* **44**, 214-219.
- Kingan, S.L. y Ensing, J.C. (1968) *J. Bacteriol.* **96**, 629-638.
- Klier, A.; Bourgovin, C. y Rapoport, G. (1983) *Mol. Gen. Genet.* **191**, 257-262.
- Klier, A.; Fargette, F.; Ribier, J. y Rapoport, G. (1982) *EMBO J.* **1**, 791-799.
- Klier, A.; Lecadet, M.M. y Rapoport, G. (1978). *En Spore VII*, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C., 201-211, Chambliss, G. y Vary, J.C. ed.

## Bibliografía

- Klier, A.; Lereclus, D.; Ribier, J.; Bourgovin, C.; Menou, G.; Lecadet, M. y Rapoport, G. (1985) En: "Molecular Biology of Microbial Differentiation". Am. Soc. Microbiol. WASH.DC, p. 217-224.
- Klier, A.; Parsot, C. y Rapoport, G. (1983) Nuçleic Acid Res. 11, 3973-3987.
- Knowles, B.H. y Ellar, D.J. (1987), Biochem. Biophys. Acta 924, 509-518.
- Knowles, B.H.; Thomas, W.E. y Ellar, D.J. (1984), FEBS Lett. 168, 197-202.
- Kreft, J.; Parrisius, J.; Burger, K. y Goebel, W. (1982) en: "Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli", Ganesan, Chang y Hoch Eds. Academic Press, 145-157.
- Krieg, A.; Huger, A.N.; Langenbrook, G.A. y Schnetter, W. (1983), Z Ang. Ent. 96, 500-508.
- Kronstad, J.W. y Whiteley, H.R. (1984) J. Bacteriol. 160, 95-102.
- Kronstad, J.W.; Schnepf, H.E. y Whiteley, H.R. (1983) J. Bacteriol. 154, 419-428.
- Krywienczyk, J.; Dulmage, H.T. y Fast, P.G. (1978), J. Invertebr. Pathology 31, 372-375.
- Landen, R.; Heierson, A. y Goman, H.G. (1981) J. Gen. Microbiol. 123, 49-59.
- Lecadet, M.M. y de Barjac, H. (1981). En "Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases". Davidson, F.W., 293-321.
- Lecadet, M.M. y Dedonder, R. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 282-294.
- Lecadet, M.M. y Martouret, D. (1962), C.R. Acad. Sci. Paris 5èr. D255, 2457-2460.
- Lecadet, M.M. y martouret, D. (1967) J. Invertebr. Pathol. 2, 322-330.
- Lecadet, M.M.; Blondel, M.O. y Ribier, J. (1980) J. Gen. Microbiol. 121, 203-212.

## Bibliografía

- Lee, S.G.; Eckblad, W. y Bulla, L.A. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 953-960.
- Lereclus, D.; Lecadet, M.M.; Ribier, J. y Dedonder, R. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **186**, 391-398.
- Lereclus, D.; Mahillon, J.; Menou, G. y Lecadet, M.M. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **204**, 52-57.
- Lereclus, D.; Menou, G. y Lecadet, M.M. (1983) *Mol. Gen. Genet.* **191**, 307-313.
- Lereclus, D.; Ribier, J.; Klier, A.; Menov, G. y Lecadet, M.M. (1984) *EMBO J.* **3**, 2561-2567.
- Losick, R. y Pero, J. (1981) *Cell* **25**, 582-584.
- Lovett, P.S y Bramucci, M.G. (1975) *J. Bacteriol.* **124**, 484-490.
- Mahillon, J.; Sevribek, J.; Rompuy, L.U.; Delcour, J. y Zabeau, M. (1986) *EMBO J.* **4**, 3895-3899.
- Mahillon, J.; Sevrinck, J.; Delcour, J. y Zabeau, M. (1987) *Gene* **51**, 187-196.
- Mahler, I. y Halvorson, H.O. (1977) *J. Bacteriol.* **131**, 374-377.
- Maniatis, T; Fritsch, E. y Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSH Press.
- Margalit, J. y Dean, D. (1985) *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1**, 1-7.
- Martin, P.A.; Lohr, J.R. y Dean, D.H. (1981) *J. Bacteriol.* **145**, 980-983.
- Mason, P. y Williams, J. (1985) en: *Nucleic Acids Hybridisation: a practical approach*". Hames y Higgins Eds. IRL Press, 113-160.
- McGaughey, W.H. (1985), *Science* **229**, 193,195.
- McLean, K.M. y Whiteley, H.R. (1987) *J. Bacteriol.* **169**, 1017-1023.

## Bibliografía

- Michel, B.; Niaudet, B. y Ehrlich, S.D. (1982) en: "Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli"; Ganesan, Chang y Hoch Eds. Academic Press, 73-81.
- Michel, B.; Palla, E.; Niaudet, B. y Ehrlich, S.D. (1980) *Gene* **12**, 147-152.
- Miller, L.K.; Lingg, A.K. y Bulla, L.A., Jr. (1983), *Science* **219**, 715-721.
- Minnich, S.A. y Aronson, A.I. (1984) *J. Bacteriol.* **158**, 447-454.
- Minnich, S.A. y Aronson, A.I. (1984) *J. Bacteriol.* **158**, 447-454.
- Miteva, V. y Grigorova, R. (1987) *Acta Microbiol. Bulg.* **21**, 3-9.
- Miteva, V.; Shivarova, N y Grigorova, R. (1981) *FEMS Microbiol. Lett.* **12**, 253-256
- Mottles, M.; Grandi, G.; Scaramella, V.; Canosi, U.; Morelli, G. y Trautner, T.A. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **174**, 281-287.
- Murphy, D.W.; Sohi, S.S. y Fast, P.G. (1976), *Science* **194**, 954-956.
- Nagamatsu, Y.; Itai, C.; Hatanaka, C.; Funatsu, G. y Hayashi, K. (1984), *Agric. Biol. Chem.* **48**, 611-619.
- Nagamatsu, Y.; Itai, Y.; Hatanaka, C.; Fumatsu, G. y Hayashi, K. (1984) *Agric. Biol. Chem.* **48**, 611-619.
- Niaudet, B. y Ehrlich, S.D. (1979) *Plasmid* **2**, 48-58.
- Novick, R. (1976) *J. Bacteriol.* **127**, 1177-1182.
- Obukowicz, M.G.; Perlak, F.K.; Bolten, S.L.; Kusano-Kretzner, K.; Mayer, D.J. y Watrud, L.S. (1987), *Gene* **52**, 285-290.
- Obukowicz, M.G.; Perlak, F.K.; Jusano-Kretzner, K.; Mayer, E.J. y Watrud, L.S. (1986), *Gene* **45**, 327-331.
- Ostroff, G. y Péne, J. (1983) *J. Bacteriol.* **156**, 934-936.
- Ozawa, K. e Iwahana, H. (1986) *Current Microbiol.* **13**, 337-340.

## Bibliografía

- Perlak, F.J.; Mendelsohn, C.L. y Thorne, C.B. (1979) *J. Bacteriol.* **140**, 699-706.
- Petit-Glatron, M.F. y Rapoport, G. (1976), *Biochimie* **58**, 119-129.
- Potter, H. y Dressler, D. (1977) *Proc. Acad. Sci. USA* **74**, 4168-4172.
- Rapoport, G.; Klier, A.; Billault, A.; Fargette, F y Dedonder, D. (1979) *Mol.Gen.Genet* **176**, 239-245.
- Rogers, J. y McConnel, M. (1970) **61**, 173-181.
- Rosenberg, M. y Court, D. (1979) *Ann. Rev. Genet.* **13**, 319-353.
- Sacchi, V.F.; Parenti, P; Hanozet, S.M.; Giurdana, B.; Luthy, P. y Wolfersberger, M.G. (1986), *FEBS Lett.* **204**, 213-218.
- Saito, H.; Shibata, T. y Ando, T. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **170**, 117-122.
- Sanchez-Rivas, C. (1982) *Mol. Gen. Genet.* **185**, 329-333.
- Schaeffer, P.; Cami, B. y Hotchkiss, R.D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2151-2155.
- Schaeffer, P.; Millet, J. y Aubert, J. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 704-711.
- Scherzinger, E.; Grieder-Lauppe, H.; Voll, N. y Wanke, M. (1980) *Nucleic Acids Res.* **8**, 1287-1305.
- Schnepf, H. y Whiteley, H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2893-2897.
- Schnepf, H.E. y Whiteley, H.R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 6273-6280.
- Schnepf, H.E.; Wong, H.C. y Whiteley, H.R. (1985) *J. Biol. chem.* **260**, 6264-6272.
- Schnepf, H.G. y Whiteley, H.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2893-2897.
- Sebesta, K. y Horska, K. (1970), *Biochem. Biophys. Acta* **209**, 357-376.

## Bibliografía

- Segall, J. y Losick, R. (1977) *Cell* **11**, 751-761.
- Sekar, U. (1987) *Current Microbiol.* **14**, 301-304.
- Sekar, V. y Carlton, B.C. (1985) *Gene* **33**, 151-158.
- Shibano, Y.; Yamagata, A.; Nakamura, N.; Iizuká, T.; Sugisaki, H. y Takanami, M. (1985) *Gene* **34**, 243-251.
- Smirnoff, W. (1962) *J. Insect. Pathol.* **394-38**
- Southern, E. (1975) *J. Mol. Biol.* **98**, 503-508.
- Spizizen, J. (1958) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 1072-1077.
- Stahly, D.P.; Dingman, D.W., Bucca, L.A., Jr. y Aronson, A.I. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 5810588.
- Taguchi, R.; Asami, Y.; Ikezawa, H. (1980), *Biochem. Biophys. Acta* **619**, 48-57.
- Takahashi, W; Yamagath, H.; Yamaguchi, K.; Tskukagoshi, N. y Udaka, S. (1983) *J. Bacteriol.* **140**, 699-706.
- Tanaka, T. (1979) *J. Bacteriol.* **139**, 775-782.
- Tanaka, T. (1979) *Mol. Gen. Genet.* **175**, 235-237.
- Temeyer, K. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 503-506.
- Temeyer, K. (1987) *J. Gen. Microbiol.* **133**, 503-506.
- Thomas, W.E. y Ellar, D.J. (1983), *FEBS Lett.* **154**, 361-368.
- Thomas, W.E.; Ellar, D.J. (1983)b, *J. Cell. Sci.* **60**, 181-197.
- Thorne, C.B. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1109-1115.
- Thorne, L.; Garduno, F.; Thompson, T.; Decker, D.; Zounes, M.; Wild, M.; Walfiedl, A. y Pollock, T.J. (1986) *J. Bacteriol.* **166**, 801-811.
- Trautner, T.A.; Pawlek, B.; Bron, S. y Anagnostopoulos, C. (1974) *Mol. Gen. Genet.* **131**, 181-191.

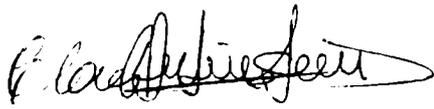
## Bibliografía

- Tyrrell, D.; Bulla, L.; Andrews, R.; Kramer, K.; Davidson, L. y Nordin, P. (1981) *J. Bacteriol.* **145**, 1052-1062.
- Uozumi, T.; Hishino, T.; Miwa, K.; Horinuchi, S.; Beppu, T. y Arima, K. (1977) *Mol. Gen. Genet.* **152**, 65-69.
- Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Hofte, H.; Jansens, S.; de Bevekeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Van Montagu, U. y Leemans, J. (1987), *Nature* **328**, 33-37.
- Vieira, J. y Messing, J. (1982) *Gene* **19**, 259-268.
- Viret, J.F. y Alonso, J.C. (1987) *Nucl. Acid. Res.* **15**, 6349-6367.
- Ward, E.S. y Ellar, D.J. (1986) *J. Mol. Biol.* **191**, 1-11.
- Ward, E.S. y Ellar, D.J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 727-735.
- Ward, E.S.; Ellar, D.J. y Todd, J.A. (1984) *FEBS Lett.* **175**, 377-382.
- Whiteley, H.R.; Kronstadt, J.W. y Schnepf, H.E. (1985) En: *Molecular Biology of Microbial Differentiation*. Am. Soc. for Microbiol.; Washington, D.C., p. 225-229. Hoch and Setlow (eds).
- Whiteley, H.R.; Schnepf, H.E.; Widner, W.R. y Wong, H.C. (1986) en: Ganesan and Hoch "Bacillus Molecular Genetics and Biotechnique Applications". Acad. Press NY, p. 377-385.
- WHO: Documento TDR/BCV/BTH 14/861/WHO/VBC/81828 (1981).
- Williams, D.; Duvall, E. y Lovett, P. (1981) *J. Bacteriol.* **146**, 1162-1166.
- Wong, H.C. y Chang, S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3233-3237.
- Wong, H.C.; Schnepf, H.E. y Whiteley, H.R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1960-1967.
- Wu, D. y Chang, F.N. (1985) *FEBS Lett.* **190**, 232-236.
- Yamamoto, T. y McLaughlin, R.E. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **103**, 414-421.

## **Bibliografía**

Youngman, P.; Perkins, J. y Losick, R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2305-2310.

Yousten, A. (1986), FEMS Microbiol. Lett. **33**, 59-63.



Lic. Clara P. Rubinstein  
Autor



Dra. Carmen Sánchez de Rivas  
Director