



## MEJORAMIENTO DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* CONTRA MOSQUITOS USANDO LA ENDOQUITINASA ChiA74.

Estefanía O. Juárez Hernández, Luz Edith Casados Vázquez, Ma. Cristina del Rincón Castro, J. Eleazar Barboza-Corona\*. Posgrado en Biociencias, Departamento de Alimentos, División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, 36500, Irapuato, Gto, México. E-mail: fany\_j@hotmail.com, josebar@ugto.mx

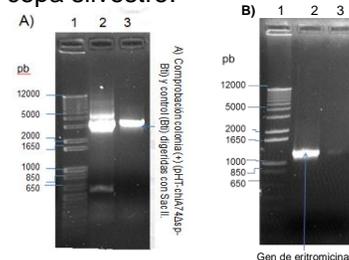
*Palabras clave:* ChiA74, *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*, mosquitos.

**Introducción.** Con el agravamiento de enfermedades transmitidas por vectores ha ido creciendo el interés de métodos de control biológico; sobre todo de insectos picadores debido a que transfieren enfermedades devastadoras. Una de las bacterias más usadas para su control es *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, obteniendo resultados satisfactorios<sup>1,2</sup>. *B. thuringiensis* produce concentraciones bajas de quitinasas, menores que los producidos por otras bacterias. En los insectos, las quitinasas actúan a nivel de membrana peritrófica, permitiendo que las proteínas Cry incrementen su actividad insecticida debido a que tienen mayor acceso a los receptores presentes en el intestino medio de las larvas, este incremento se ha logrado mezclando proteínas Cry con quitinasas producidas por cepas silvestres<sup>3</sup> o con quitinasas expresadas en cepas recombinantes de *B. thuringiensis*<sup>4,5</sup>. El objetivo del presente trabajo es obtener cepas recombinantes de Bti que sinteticen proteínas Cry mosquitocidas y la endoquitinasa ChiA74 como cuerpos de inclusión con el propósito de aumentar la capacidad insecticida de la bacteria.

**Metodología.** Se generó una cepa recombinante de *Bt israelensis* que expresa la endoquitinasa ChiA74Δps bajo el promotor silvestre, se cotejó usando oligonucleótidos específicos, y mediante enzimas de restricción. Colonias positivas se hicieron crecer en Agar nutritivo con eritromicina hasta la lisis celular, las muestras fueron lisadas y los cuerpos solubilizados para determinar la actividad de quitinasa, tamaño de cristal, número de espora, zimograma y bioensayos contra larvas de *Aedes aegypti*.

**Resultados.** Mediante PCR se demostró la generación de la cepa recombinante *Bt israelensis*/ChiA74 (Fig. 1). Esta tiene una actividad de 125.0027 mU/mL, 4.5 Esporas/mL\*10<sup>-7</sup>, mientras que la cepa silvestre Bti presentó 32.6566 mU/mL y 1.75 Esporas/mL\*10<sup>-7</sup>. Mediante SDS-PAGE y zimogramas se demostró que la Bti presenta el patrón de proteínas Cry característico de la cepa silvestre mientras que la recombinante tiene adicionalmente la quitinasa ChiA74. Con el gradiente continuo de sacarosa se pudo aislar y observar características ultra estructurales de las inclusiones en los cuerpos parasporales, para *Bt israelensis* la morfología de las inclusiones cristalinas era básicamente

esférico. En bioensayos contra mosquitos indicaron que la cepa recombinante presenta una CL<sub>50</sub> entre 2-3 veces mayor que la cepa silvestre.



**Figura 1.** A) 1: Marcador DNA (1 Kb, invitrogen); 2: colonia (+) con construcción pHT-chiA74Δsp-Bti 3: control *Bt israelensis*. B) 1: Marcador DNA (1 Kb, invitrogen); 2: colonia (+) con construcción pHT-chiA74Δsp-Bti. 3: control *Bt israelensis*

**Conclusiones.** Por el momento, no existe ningún reporte relacionado con la co-expresión de ChiA74Δps con proteínas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Los datos obtenidos indican que es posible formar cuerpos de inclusión de la endoquitinasa ChiA74Δsp aumentando tanto la actividad quitinolítica de Bti como su actividad contra mosquitos.

**Agradecimiento.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología SEP-CONACyT (proyecto 156682) por el apoyo financiero y por la beca de Doctorado.

### Bibliografía.

- Schaper, Stefan; Hernández, Francisco y Soto, Lisbeth (1998). La lucha contra el dengue: control biológico de larvas de *Aedes aegypti* empleando *Mesocyclops thermocyclopoides* (crustáceo). Rev. costarric. Cienc. Méd [online]. 1998, vol. 19, n.1-2 [citado 2012-01-24], pp. 119-125
- Menéndez Z, Reid JW, Fimia R. New records of species of the genus *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida) from Cuba. *Crustaceana* 2007; 80(9):1025-1031.
- Wiwat C, Thajthanun S, Pantuwata S, Bhumiratana A (2000) Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD-1 toward *Plutella xylostella*. *J Invertebr Pathol.* 76: 270-277.
- Okay S, Tefon BE, Ozkan M, Ozcengiz G (2008) Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol.* 104: 161-170.
- Ding X, Luo Z, Gao B, Sun Y, Zhang Y (2008) Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol* 56: 442-446.