



## CONSTRUCCIÓN QUIMÉRICA ENTRE LOS GENES *chiA74* y *cry1Ac* DE *Bacillus thuringiensis* PARA MEJORAR SU ACTIVIDAD INSECTICIDA

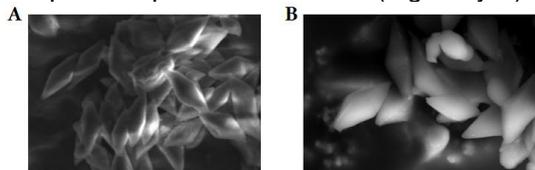
González-Ponce Karen Stephania, Barboza-Corona José Eleazar, Casados-Vázquez Luz Edith, Méndez-Gómez Sandra Tanya. División Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, 36500, Irapuato, Gto, México. E-mail: [josebar@ugto.mx](mailto:josebar@ugto.mx)

**Palabras clave:** endoquitinasa *chiA74*, co-cristalización, proteínas *cry*.

**Introducción.** Las quitinasas pueden actuar como agentes sinérgicos con las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), pero su desventaja es que son proteínas de secreción y es necesario mezclarlas con los cristales insecticidas para realizar los bioensayos (1,2). Recientemente ha logrado expresar el gen *cry1Ac* junto con una quitinasa de *Nicotiana tabacum* (3). También se ha generado una proteína de fusión entre la quitinasa Chi255 y el C-terminal de *cry1Ac*, aunque la proteína no fue estable (4). La construcción que se realizará consiste en la fusión del gen *chiA74Δsp* unido a la región que codifica al C-terminal de una proteína Cry1Ac. En este trabajo nuestro objetivo es hacer una construcción que permita la co-cristalización de la endoquitinasa ChiA74 con la proteína Cry1Ac tóxica para lepidópteros.

**Metodología.** La construcción *pEBchiA74ΔpsΔtt-ctcry1Ac* fue introducida por medio de electroporación en a la cepa de *B. thuringiensis* (HD73), se seleccionaron las transformantes cuya identidad fue corroborada mediante PCR. Las transformantes fueron cultivadas en medio NB y se dejaron crecer hasta que esporularon para llevar a cabo las siguientes pruebas. Se tomaron muestras para realizar la solubilización de los cuerpos de inclusión para demostrar la actividad de la endoquitinasa mediante la prueba de fluorescencia utilizando un compuesto sintético derivado de quitina. Para determinar si existe algún efecto en la esporulación, un volumen determinado de los cultivos esporulados serán incubados a 60 °C durante 20 min, y se hicieron diluciones las cuales fueron sembradas en agar nutritivo para determinar las unidades formadoras de colonias. La estabilidad de las proteínas se determinó con el peso molecular de las quitinasas y la proteína Cry1Ac mediante geles de poliacrilamida y zimogramas (quitinasas) usando 4-MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> para detectar la actividad de la endoquitinasa.

**Resultados.** Mediante microscopía electrónica de barrido se observó la construcción *Bt*HD73-*pEBchiA74ΔpsΔtt-ctcry1Ac* formó cristales pequeños y con la punta aplanada, diferentes a los cristales bipiramidales formados por la cepa silvestre HD73 (Fig. 1A y B).



**Fig. 1.** Microscopía electrónica de barrido (A) *Bt* HD-73, (B) *Bt* HD-73-*pEBchiA74ΔpsΔtt-ctcry1Ac*.

**Tabla 1.** Resultados de las unidades de fluorescencia, el área del cristal y el número esporas de las cepas recombinantes realizadas.

	<i>Bt</i> 4Q7- <i>pEBchiA74Δsp</i>	HD-73 <i>pEBchiA74ΔpsΔtt-ctcry1Ac</i>	HD-73
mU/mL * (±SD)	126.8(±3.7) <sup>c</sup>	196.2 (±3.0) <sup>c***</sup>	2.6(±0.61) <sup>a</sup>
Relación***	55.658	74.850	1
Área cristal (μm <sup>2</sup> ) (±SD)	-	0.8(±0.2) <sup>a</sup>	1.2(±0.1) <sup>b</sup>
Relación	-	0.642	1
Esporas/mL x 10 <sup>7</sup> (±SD)	7.5(±2.5) <sup>b</sup>	7.3(±0.94) <sup>b</sup>	2.6(±1) <sup>a</sup>
Relación	2.142	2.727	1

\*Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de 4-metilumbeliferona en 1 h. \*\*Diferente letra en el mismo renglón indica diferencia significativa determinada por medio de una comparación múltiple de medias por Tukey ( $P < 0.05$ ). \*\*\*La relación fue obtenida al dividir las actividades mayores entre las menores.

**Conclusiones.** Cuando la endoquitinasa ChiA74 se fusionó a la mitad C-terminal de Cry1Ac y se transformó una cepa que producía cristales, la endoquitinasa fue capaz de integrarse en los cuerpos parasporales (Cry). Sin embargo, ocasionó una disminución del tamaño y ligero cambio en la morfología del cristal. La proteína de fusión (ChiA74ΔpsΔtt-CtCry1Ac) es inestable y será necesario buscar alguna estrategia para aumentar su estabilidad. Es necesario realizar bioensayos para demostrar el efecto sinérgico de ChiA74Δsp con la proteína Cry1Ac en las cepas recombinantes

**Agradecimiento.** A la Universidad de Guanajuato y a CONACYT por haberme otorgado la beca 495476 para mis estudios.

### Bibliografía.

1. Arora N, Selvapandiyar A, Agrawal N, Bhatnagar RK (2003) Relocating expresión de vegetative insecticidal protein in mother cell of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophys Res Commun 310: 158-162.
2. Barboza-Corona JE, Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernández R, Bideshi D (2008) Molecular and Biochemical Characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. MolBiotechnol. 39: 29-37.
3. Ding X, Luo Z, Xia L, 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.
4. Driss F, Rouis S, Azzouz H, Tounsi S., Zouari N, Jaoua S (2010). Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal Crystal. Curr Microbiol.