

CLONACION Y EXPRESION DE UN GEN DE QUITINASA DE *Bacillus thuringiensis*

J. Eleazar Barboza-Corona^{1*}, Rocio Velázquez¹, Elizabeth Nieto¹, Mayela Bautista¹, Rubén Salcedo¹ y Jorge Ibarra.²

¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, Carretera Irapuato-Silao Km 9, Apdo. postal 311, 36500, Irapuato, Gto., México. Fax. 01 462 4 24 84. E-mail: josebar@dulcinea.ugto.mx. ²CINVESTAV-Irapuato.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, gen, quitinasa

Introducción. Las proteínas Cry son las principales responsables de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* (Bt) hacia lepidópteros, dípteros y coleópteros. Sin embargo, hay insectos poco susceptibles y se ha reportado la existencia de plagas resistentes, lo cual ha estimulado el interés de varios grupos por encontrar nuevas proteínas Cry, manipularlas genéticamente o hacer nuevas combinaciones de toxinas para aumentar su toxicidad (1). Una estrategia interesante, es el uso de quitinasas (Chi) producidas por el mismo Bt, como un agente sinérgico de Cry (2). Se ha reportado que quitinasas secretadas por Bt aumentan la capacidad insecticida de Cry hacia *Plutella xylostella* (3). Sin embargo, los resultados son poco claros, y se desconoce si el efecto sinérgico fue ocasionado sólo por las quitinasas o bien por otras biomoléculas (proteínas Vip, proteasas).

Ya que Bt produce bajos niveles de quitinasas y no se ha demostrado su efecto sinérgico usando la enzima pura, nuestro objetivo ha sido clonar un gen *chi* de Bt que permita aumentar la expresión de la quitinasa, y facilite la purificación y posterior evaluación con las proteínas Cry.

Metodología. El DNA total Bt LBIT-82 fue digerido parcialmente con *HindIII*, se ligó en el pBSKS(+) y se preparó un banco genómico en *Ec* DH5 α F'. A las proteínas de aproximadamente 1000 colonias, se les analizó la actividad de quitinasa usando un derivado fluorescente [4-MU-(GlcNAc)₃]. Una Unidad fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μ mol de 4-metilumbeliferona en 1 h. Se seleccionó una clona de *Ec* con actividad de quitinasa. Se determinó el tamaño del inserto clonado, se elaboró el mapa de restricción, la ubicación de *chiBt*, y se determinó su localización en el cromosoma de Bt. Se evaluó la actividad en un rango de pH de 5 a 11, y el peso molecular de la quitinasa sintetizada fue detectada en zimogramas usando el sustrato arriba mencionado (2).

Resultados y discusión. Hasta ahora, no se ha reportado la clonación de un gen *chi* de Bt, ni el efecto de una quitinasa pura producida por el mismo Bt. En este trabajo un fragmento cromosómico de Bt LBIT82 que contiene un gen *chi* fue clonado en *Ec* (*Ec*-ChiBt). Esta presentó una actividad de quitinasa de 39.80 ± 0.455 y 40.52 ± 1.575 U/mg de proteína, con o sin IPTG respectivamente; la cual fue casi la mitad de la encontrada para ChiA de *E. agglomerans* con inductor (82 ± 1.605 U/mg). Las actividades de ChiBt con o sin inductor son casi idénticas y no presentaron diferencia significativa, lo cual implica que el gen clonado está bajo el control de su propio promotor. ChiBt presentó

mayor actividad a valores de pH entre 6 y 7, sin embargo tiene actividad desde pH 5 hasta 11. Los zimogramas demostraron que *Ec*-ChiBt produce una proteína recombinante, con masa molecular cercana a 73 Kda, con actividad de endoquitinasa en presencia o ausencia del β -mercaptoetanol (β M). Usando un fragmento de *chiBt* como sonda, se demostró que *chiBt* estaba localizado en el

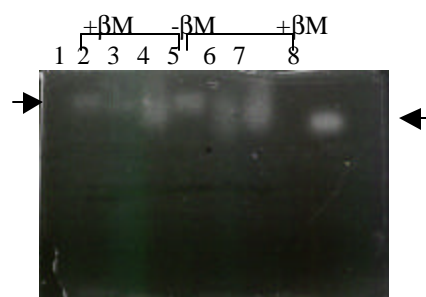


Fig. 1. Actividad de quitinasa de *Ec* ChiBt en SDS-PAGE. 1, marcador de peso molecular; 2 a 7 proteínas de *Ec* ChiBt. 8, ChiA.

cromosoma, lo cual difiere de los genes *cry*, que por lo general están localizados en megaplásmidos.

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que se ha clonado un gen *chi* de una cepa mexicana de Bt que codifica una proteína con actividad de quitinasa. La enzima producida presenta actividad en estado alcalino y reductor, condición normalmente encontrado en el intestino medio de insectos susceptibles a Bt. Ya que esos factores son requisitos importantes para la solubilización y activación de las proteínas Cry, consideramos que ChiBt pura, puede actuar de manera sinérgicas con Cry, al degradar la membrana peritrófica y permitir el libre acceso de las δ -endotoxinas.

Agradecimientos. Apoyo financiero de la Fundación Guanajuato Produce (proyecto 03/98) y CONACYT (proyecto J35306-B).

Bibliografía.

- Granados R, Fu Y, Corsaro E, y Hughes R. (2001). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancer from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biol. Control*. 20: 153-159.
- Barboza-Corona JE, Contreras JC, Velázquez-Robledo R, Bautista-Justo M, Gómez-Ramírez M, Cruz-Camarillo R, e Ibarra JE (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. Lett.* 21 (12):1125-1129.
- Wiwat C, Thaithanum S, Pantuwatana S y Bhumiratana A. (2000). Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 (G) toward *Plutella xylostella*. *J. Invertebrate Pathol.* 76: 270-277