

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**‘EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA CRY1 DE *Bacillus thuringiensis* EN LA LEVADURA
Yarrowia lipolytica’**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

P R E S E N T A

CRISTIAN PATRICIA CABRALES ARELLANO

REYNOSA, TAMPS.

Diciembre, 2012

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA



**‘EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA CRY1 DE *Bacillus thuringiensis* EN LA LEVADURA
Yarrowia lipolytica’**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

P R E S E N T A

CRISTIAN PATRICIA CABRALES ARELLANO

REYNOSA, TAMPS.

Diciembre, 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa siendo las 12:00 horas del día 14 del mes de Diciembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:
Expresión de una proteína Cry1 de Bacillus thuringiensis en la levadura Yarrowia lipolytica.

Presentada por el alumno:

Cabrales
Apellido paterno

Arellano
Apellido materno

Cristian Patricia
Nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	5	2	8
---	---	---	---	---	---	---


aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis


Dr. Raymundo Rosas Quijano


Dr. Juan Manuel González Prieto



Dr. José Luis Hernández Mendoza

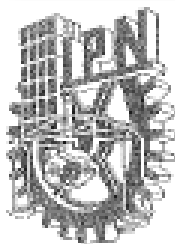

M.C. Erick de Jesús De Luna Santillana


Dr. Xianwu Guo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dra. Ninfa María Rosas García


INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA
GENÓMICA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. el día 18 del mes Diciembre del año 2012, el (la) que suscribe Cristian Patricia Cabrales Arellano, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B101528, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Raymundo Rosas Quijano, y cede los derechos del trabajo intitulado "Expresión de una proteína *Cry1* de *Bacillus thuringiensis* en la levadura *Yarrowia lipolytica*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Bldv. del Maestro esq. con Elias Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Cristian Patricia Cabrales Arellano
Nombre y firma

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Raymundo Rosas Quijano y M.C. Erick de Jesús De Luna Santillana.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro de Biotecnología Genómica.

Al Dr. Raymundo Rosas por toda la tolerancia, respeto y sobre todo su valiosa amistad así como al M.C. Erick por escuchar cada una de mis inquietudes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca posgrado.

Al Programa Institucional de Formación de Investigación PIFI, por el apoyo de beca, durante mi periodo de maestría.

A mis amigos del CBG: (por orden alfabético) Brendis, Betito, Cecilio, Facundo, Gaby, Gisela, Irais, Juanjo, Leslie, Lola, Madai, Mago, Mary, Nadia, Niver, Paz, así como a Regulo y su linda esposa Juanis.

A la Maestra Sanjuana Hernández Delgado, Dra. Ana María Sifuentes Rincón por su apoyo así como al M.C. Aldo Segura Cabrera y al M.C. Carlos García Pérez por su ayuda en la parte Bioinformática, además de la Maestra Toñita y Susy y Dr. José Alberto Mendoza (Interacción planta- microorganismo), Wendy y Miguel Ángel (Biomedicina), a la Maestra Maribel Mireles.

Al personal del 'Laboratorio de Biotecnología Vegetal' por su colaboración apoyo y consejos.

Así como a todo el personal tanto docente como administrativo del CBG que directa e indirectamente contribuyeron en el desarrollo de mi trabajo y estancia en el instituto.

DEDICATORIA

A DIOS por todas las hermosas bendiciones que me ha dado, y quien nunca me ha abandonado.

A mis PADRES y mis ABUELITAS por todo su amor incondicional.

A mis HERMANOS Rosy y Luis; pero en especial a mi querido HERMANITO LEO porque él, siendo tan pequeño me ha enseñado tantas cosas, y ha hecho de mi una persona más feliz con solo escuchar su tierna voz.

A mi NOVIO que me ha apoyado en todo momento, contagiándome de positivismo.

ÍNDICE

Contenido	
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
LISTA DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. Introducción	1
2. Antecedentes <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.1. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.4 Clasificación científica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.5 Genética molecular de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.6 Proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.7 Proteínas Cry	7
2.8 Estructura terciaria de las proteínas Cry	8
2.9 Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.10 Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.11 Expresión heteróloga de las proteínas Cry	12
2.12 Cultivos Transgénicos	14
2.13 Inocuidad de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.14 Antecedentes <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
2.15 Antecedentes de <i>Yarrowia lipolytica</i>	17
2.16 Generalidades de <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
2.17 Relación Filogenética de <i>Yarrowia lipolytica</i>	18
2.18 Ciclo celular de <i>Yarrowia lipolytica</i>	19
2.19 Dimorfismo en <i>Yarrowia lipolytica</i>	19
2.20 Genómica de <i>Yarrowia lipolytica</i>	20

2.21	Vectores en <i>Yarrowia lipolytica</i>	21
2.22	Promotores en <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
2.23	Marcadores de selección en <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
2.24	Técnicas de Transformación en <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
2.25	Proteínas heterólogas expresadas <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
2.26	Glicosilación.....	25
2.27	Aplicaciones potenciales de <i>Yarrowia lipolytica</i>	26
2.28	Asimilación de Lípidos	26
3.	JUSTIFICACION	28
4.	OBJETIVO GENERAL	29
4.1	OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
5.	HIPÓTESIS	31
6.	ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	32
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
7.1	Material Biológico:	34
7.1.1	Plásmidos:.....	35
7.1.2	Medios de cultivo	39
7.1.3	Condiciones de cultivo	39
7.2	Visualización de morfología microscópica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
7.2.1	Extracción de ADN plasmídico.....	40
7.2.2	Visualización de ácidos nucleicos.....	40
7.3	Diseño de oligonucleótidos	41
7.4	Identificación de los genes <i>cryI</i> específicos mediante PCR.....	42
7.4.1	Purificación de ADN amplificado	43
7.5	Clonación de los genes de interés	44
7.5.1	Construcción del vector de expresión.....	44
7.5.2	Digestiones enzimáticas	44
7.5.3	Desfosforilación del Vector.....	45
7.5.4	Rellenado de los extremos 3'.....	45
7.5.5	Rasurado de los extremos 5' con S1 Nucleasa.....	46
7.6	Transformación genética de los organismos	46

7.7	Secuenciación.....	46
7.7.1	Análisis de las secuencias.....	47
7.8	Expresión de las proteínas.....	47
8.	RESULTADOS	51
8.1	Caracterización de Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Yarrowia lipolytica</i>	51
8.2	Caracterización molecular de <i>Bacillus thuringiensis</i>	52
8.3	Confirmación del gen <i>cry</i> por Secuenciación	56
8.4	Clonación de los insertos del gen <i>cry</i>	58
8.5.	Subclonación del gen <i>cryI</i> en el vector de expresión	59
8.6	Preparación de los vectores de expresión.....	60
8.7	Plásmidos recombinantes obtenidos en este trabajo	61
8.8.	Análisis de las clonas recombinantes en los plásmidos de expresión	65
8.9	Verificación de la orientación del inserto	67
8.10	Análisis de la expresión en Gel SDS-PAGE.....	69
8.11	Detección de proteína CryI en <i>Yarrowia lipolytica</i>	70
9.	DISCUSIÓN	72
10.	CONCLUSIONES	77
11.	RECOMENDACIONES O PERSPECTIVAS	78
12.	BIBLIOGRAFÍA	79
13.	APENDICES	96
13.1	Secuencia del gen <i>cry1Ac</i> clonado en los vectores de expresión <i>pYLEXI</i> y <i>pRRQ1</i> , señalando los dominios de la proteína.....	96
14.	GLOSARIO	100

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Organismos en los cuales se han expresado las proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2	Comparación de las enterotoxinas producidas por especies del grupo de <i>Bacillus</i>	16
3	Comparación de las diferentes proteínas expresadas en <i>Yarrowia lipolytica</i>	25
4	Material biológico utilizado en el desarrollo de este trabajo.....	34
5	Plásmidos de clonación/expresión empleados en este trabajo.....	36
6	Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo experimental.....	42
7	Condiciones de amplificación para los diferentes genes <i>cry</i>	43
8	Componentes usados para la reacción de secuenciación.....	47
9	Reactivos para la preparación de gel SDS-PAGE fase de resolución.....	49
10	Reactivos para la preparación de gel SDS-PAGE fase de apilamiento...	50
11	Amplificación de los diferentes genes <i>cry</i> mediante PCR en las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> empleadas en este trabajo.....	54
12	Resultado de las secuencias con mayor homología en el gen <i>cryI</i> amplificado mediante análisis tipo Blastn.....	57
13	Construcciones desarrolladas durante este trabajo.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Micrografía electrónica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2	Fases de esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fermentador a las 14, 23 y 48 horas.....	5
3	Modo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
4	Filogenia de las levaduras pertenecientes al grupo de Hemiascomicetos.....	19
5	Morfología macroscópica de <i>Yarrowia lipolytica</i>	20
6	Vectores replicativos en <i>Yarrowia lipolytica</i>	22
7	Vectores integrativos en <i>Yarrowia lipolytica</i>	22
8	Morfología macroscópica y microscópica de Bt.....	51
9	Morfología macroscópica y microscópica de <i>Yarrowia lipolytica</i> cepa Po1g cultivada en medio rico.....	52
10	Morfología de <i>Yarrowia lipolytica</i> cepa Po1g cultivada en medio minimo.....	52
11	ADN plasmídico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	53
12	Alineamiento múltiple para el diseño de los oligonucleótidos ATG y STOP.....	55
13	Amplificación de ORF <i>cry1</i> de las diferentes clonas de Bt.....	56
14	Amplificación de la toxina Thuricide® de Bt.....	58
15	Digestión con <i>PmlI</i> a plásmido pC-Tox1.....	59
16	Digestión a clona pC-ORF <i>cry1</i> con la endonucleasa <i>PmlI</i>	60
17 (A)	Digestión del plásmido comercial <i>pYLEX1</i> con <i>PmlI</i>	61
17 (B)	Digestión del vector de expresión pRRQ1 con <i>PmlI</i>	61
18	PCR diagnóstico a transformantes con vectores pEI-Tox1 y pER- Tox1.....	65
19	PCR diagnóstico a transformantes con vector pEI-ORF <i>cry1</i>	66
20	PCR diagnóstico a transformantes con vector pER-BtCry1Ac...	67
21	Determinación de la orientación de transformantes pER- BtCry1Ac.....	58
22	Determinación de la orientación de transformantes pER-Tox1.....	59
23	Gel SDS-PAGE con las transformantes.....	69

24	Análisis de inmunodetección de la proteína Cry1Ac mediante tiras reactivas.....	70
25	Análisis de inmunodetección de la proteína Cry9 mediante tiras reactivas.....	71

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Acido desoxirribonucleico
δ	delta
dNTP's	Desoxinucleotidos trifosfato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora
HPLC	Cromatografia Liquida de Alta Eficiencia
Kb	kilo bases
kDa	KiloDalton
mM	Mili Molar
mL	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
μM	Micromolar
μl	Microlitro
Mb	Mega bases
min	Minuto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sodico
<i>Taq</i>	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
™	Marca Registrada
®	Marca Registrada
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

La expresión de proteínas en sistemas eucariotas es una necesidad, las levaduras son los sistemas preferidos por sus propiedades únicas. La levadura *Yarrowia lipolytica* es muy utilizada, se reportan más de 42 proteínas expresadas/secretadas en *Y. lipolytica*, su producción a gran escala es muy eficiente, se conoce ampliamente su genética y su genoma. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria con gran interés biotecnológico debido a su acción insecticida, esta propiedad es gracias a las proteínas producidas durante su etapa de esporulación, denominadas proteínas cry, estas últimas han sido expresadas en diferentes sistemas tales como *E. coli*, así como en plantas, sin embargo, la expresión de las proteínas cry en levaduras es escaso.

El trabajo se basó en la clonación de la proteína Cry1Ac así como la toxina de *Bacillus thuringiensis* en dos vectores de expresión propios para la levadura *Y. lipolytica*, siendo el vector pRRQ1 de tipo replicativo y el vector comercial pYLEX1 de tipo integrativo, para de esta forma expresar la proteína Cry1. Primeramente se diseñó un par de oligonucleótidos que permitieran recuperar la toxina y el ORF del gen que codifica para la proteína Cry, los cuales se amplificaron por PCR, usando como ADN molde, el ADN plasmídico de *B. thuringiensis*, el producto se clonó en los vectores de expresión y con ellos, se transformó la cepa receptora Polg de *Y. lipolytica*.

La expresión de la proteína heteróloga Cry1Ac en las clonas recombinantes de *Y. lipolytica* se evaluó mediante análisis comparativos en geles SDS-PAGE. La verificación de la expresión de la proteína Cry1Ac se comprobó por medio de tiras reactivas comerciales que detectan dicha proteína. Este constituye el primer acercamiento de la expresión de alguna proteína Cry1 en levaduras y revalidando a *Y. lipolytica* como un sistema noble en cuanto a expresión de proteínas se refiere.

ABSTRACT

The expression of proteins in eukaryotes systems is a need, the yeast are the most systems preferred by their unique properties. The yeast *Yarrowia lipolytica* is widely used, there're more than 42 proteins expressed/secreted reported. *Y. lipolytica* its large scale production is highly efficient, widely know it's genetic and genome. *Bacillus thuringiensis* is a bacterium with great biotechnological interest due to its insecticide action, this property is due to the proteins produced during the sporulation, called cry proteins, the last ones have been expressed in various systems such as E. coli and in plants, however, the expression of the cry proteins in yeast is low.

This work was based in the cloning the protein Cry1Ac and toxin of *Bacillus thuringiensis*, in two own expression vectors of yeast *Y. lipolytica*, being the vector pRRQ1 replicative vector and the commercial vector pYLEX1 integrative vector thereby to express the Cry1 protein. Firstly, it was design a pair of oligonucleotides that can recuper the toxin and the ORF gene encoding the cry protein, which were amplified by PCR, using DNA as template, the DNA plasmidic of *Bacillus thuringiensis*, the product was cloned in the expression vectors and transform them la strain receptore Po1g of *Y. lipolytica*.

The expression of heterologous protein Cry1Ac in recombinant clones *Y. lipolytica* was evaluated by comparative analysis on SDS-PAGE gels. The verification of the Cry1Ac protein expression was verified by commercial reagent strips which detect the protein. This represents the first expression of a protein Cry1 in yeast and revalidating *Y. lipolytica* as a noble system in terms of protein expression is concerned.

1. Introducción

Las proteínas son las moléculas más abundantes de las células. Estas cuales constituyen los bloques para el ensamblaje de la misma, determinan la forma y la estructura celular; además, cada proteína lleva a cabo una función específica y en su conjunto da como resultado el óptimo funcionamiento y desarrollo celular (Alberts *et al.*, 2004). El mal funcionamiento o la falta de algún elemento proteico resultan en un rompimiento de la homeostasis y desembocaría en enfermedades e incluso la muerte del organismo carente. De manera general, los organismos se han valido de múltiples estrategias para suplir todos sus requerimientos nutricionales, en este caso el hombre ha complementado su nutrición, incluyendo aditivos proteicos para suplir alguna carencia. Hasta 1982, algunas proteínas terapéuticas eran obtenidas de fuentes animales tales como el cerdo (Glazer, 2007), así como de cadáveres humanos (Drago, 2006); teniendo como consecuencias otras enfermedades como la hepatitis C e infecciones, además de su alto costo al mercado.

Debido al incremento en la demanda de proteínas terapéuticas, fue necesario buscar otras fuentes para la obtención de proteínas a gran escala, siendo las bacterias como *Escherichia. coli* una de las principales candidatas para lograr este propósito. Debido al amplio conocimiento, que se tiene de su genética, su rápido período de crecimiento además de su facilidad de manipulación, teniendo la capacidad de acumular proteínas heterológicas hasta en un 20 % de su peso total (Schmidt, 2004).

En 1977, Itakura *et al.* fueron los pioneros en cuanto a la expresión heteróloga de proteínas se refiere, eligiendo a *E. coli* como sistema de expresión y a la somatostatina la proteína a expresar. Sin embargo las bacterias presentan algunos inconvenientes para propósitos de expresión heterologa, entre los cuales destacan la acumulación de endotoxinas, la formación de cuerpos de inclusión, diferencias en la vías de codones (donde algunas veces resulta en una proteína no deseada o no funcional), además que ciertas proteínas son expresadas sin modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación (Terpe, 2006). Debido a estas desventajas se han buscado sistemas alternativos para la expresión de proteínas. Las levaduras ofrecen al igual que las bacterias la facilidad de manipulación, así como de un rápido crecimiento, y las ventajas que proporcionan en cuanto al procesamiento de un sistema eucariota, por ejemplo: plegamiento de

proteínas, ensamblaje y capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales, la ausencia de endotoxinas y ADN viral u oncogénico, dando rendimientos en rangos de multigramos (Porro *et al.*, 2012).

Entre las levaduras comúnmente empleadas para la expresión de proteínas, se encuentra la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* entre otras (Domínguez *et al.*, 1998). Pero sin duda el sistema que ha llamado la atención en los últimos 20 años como un atractivo hospedero para la expresión de proteínas heterólogas, es la levadura no convencional *Yarrowia lipolytica*. Donde más de 40 proteínas de diversos organismos (bacterias, hongos, virus y humano) y rango de tamaño (6 a 116 kDa) han sido satisfactoriamente expresadas (Duquesne *et al.*, 2012), sin embargo a pesar de esto aún faltan un sin número de proteínas de diversas fuentes, las cuales pueden ser expresadas en esta levadura.

Algunas de las proteínas que han sido explotadas a nivel biotecnológico son las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, esto debido a su acción insecticida, representando una alternativa útil para el control de plagas agrícolas, forestales así como el control de insectos de importancia en la salud humana (Cabrera y Rodríguez, 2009).

Desde el punto de vista biotecnológico, la proteína Cry ha sido foco de atención para la expresión en diferentes sistemas.

2. Antecedentes *Bacillus thuringiensis*

2.1. Historia de *Bacillus thuringiensis*

Esta bacteria patógena de insectos ha sido ampliamente utilizada como un agente eficaz para el control biológico de plagas por más de 100 años, comenzando desde 1901 en Japón, cuando Shigetane Ishiwata descubrió que la enfermedad del gusano de seda '*Bombyx mori*' estaba relacionada con bacterias, las cuales no habían sido anteriormente descritas, llamando a esta bacteria *Bacillus sotto*. (Sansinenea, 2012). 10 años después Ernest Berliner aisló nuevamente esta bacteria de larvas de la harina, y la nombró *Bacillus thuringiensis* (Bt) en honor a Thuringia, Alemania, lugar donde se llevó a cabo el aislamiento. Además concluyó que esta bacteria era el agente causal de la muerte del gusano (Galán *et al.*, 1996). Posteriormente Hannay en 1953, mediante micrografías electrónicas notó la presencia de un segundo cuerpo en la bacteria, junto a la espora, ambas estructuras estaban dentro del esporangio, a este cuerpo lo describió como un cristal en forma de diamante (Figura 1); así mismo determinó la composición química del cuerpo cristalífero, llegando a la conclusión de que esta estructura era de naturaleza proteica. Y mediante los experimentos de separación de esporas y cristal de Heimpel y Angus en 1960, demostraron que las proteínas cristal son las causantes de la acción insecticida, y que la secuencia codificante para estas proteínas se encontraba en los plásmidos (Nester *et al.*, 2002). Otro acontecimiento relevante en la historia de Bt, ha sido la creación de plantas transgénicas protegidas contra insectos (Barton *et al.*, 1987).

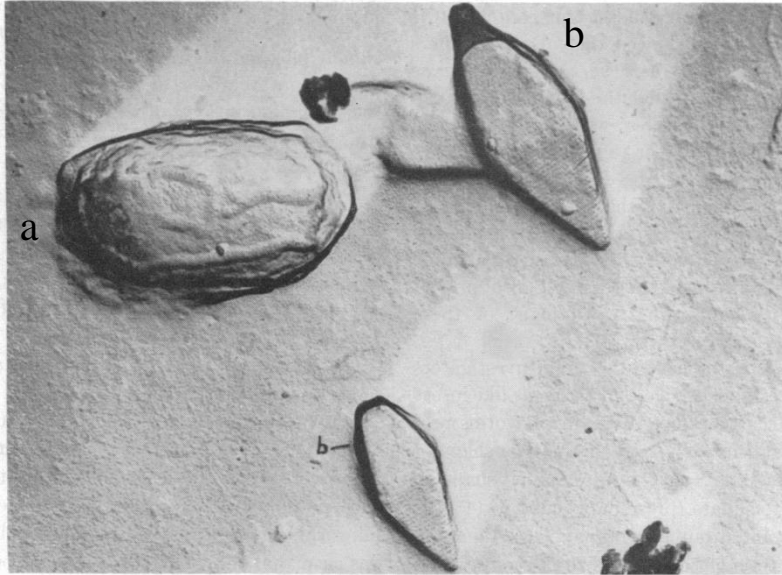


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido, con aumento de 1250 X, donde se observa la espora (a), así como el cristal (b) en forma de diamante (bipiramidal) de *Bacillus thuringiensis* var. *Thuringiensis*, tomado de Heimpel y Angus, 1960.

2.2 Generalidades de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt), es una bacteria ubicua la cual se ha aislado de suelos, agua, insectos muertos, granos, telarañas y hojas de plantas (Soberón y Bravo, 2008). La morfología macroscópica de Bt en medio rico, se distinguen colonias cuyo tamaño varía de 1 a 1.5 cm de diámetro, color blanco-grisáceo, planas, opacas, de consistencia ligeramente costrosa, con bordes irregulares ya sean ramificados o lobulados (Cabrera, 2009).

En tanto su morfología bajo microscopio se observa su forma bacilar, Gram positiva, formadora de esporas, con flagelación peritrica, su longitud oscila entre 3 a 5 μm . Es un organismo aerobio facultativo, quimiótrofo el cual posee capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa, ribosa. Además hidrolizar varios compuestos tales como: gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka y Benintende, 2008).

2.3 Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*

Durante su ciclo de vida Bt presenta dos fases, la primera llamada vegetativa, se da cuando los nutrientes y el medio ambiente son favorables, bajo estas condiciones la bacteria crece y la espora germina produciendo una célula, que posteriormente se divide por fisión binaria. La segunda fase denominada de esporulación, se lleva a cabo cuando algún nutriente (azúcares, aminoácidos u oxígeno) llegan a ser insuficientes para realizar el crecimiento vegetativo, por lo tanto, la célula forma una espora (Federici *et al.*, 2010). Además de los característicos cuerpos de inclusión, también denominados δ -endotoxinas, los cuales son visibles bajo microscopía de contraste de fases (Carmona, 2002, Bechtel y Bulla, 1976) (Figura 2), llegando estos cristales a constituir del 25 al 30 % del peso total seco de la célula (Agaisse y Lereclus, 1995).

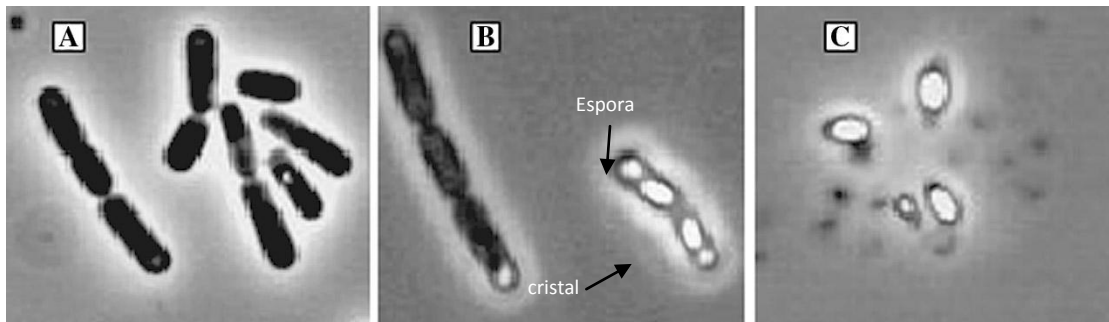


Figura 2. Fase de esporulación en un fermentador visualizado en microscopio electrónico 1000X A) durante las primeras 14 horas de incubación pequeños gránulos son visibles. B) a las 23 horas se observa la espora y el cristal C) a las 48 horas tanto la espora como el cristal son liberados de la célula madre (Sarrafzadeh *et al.*, 2005).

2.4 Clasificación científica de *Bacillus thuringiensis*

La bacteria Bt pertenece al género *Bacillus* junto con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, ambas bacterias causantes de enfermedades. La primera provoca envenenamiento por el consumo de comida contaminada, infecciones en los ojos y enfermedades periodontales, mientras que la segunda, es el agente causal del ántrax, una enfermedad letal en humanos y animales. Para distinguir entre Bt y sus especies relacionadas se toman en cuenta algunas de estas características como: la habilidad para vivir en el medio ambiente, la producción de cristales los cuales tienen acción insecticida y la sobrevivencia dentro del intestino medio o hemocele de insectos (Ibrahim *et al.*, 2010). Bajo diversos marcadores moleculares tales como la tipificación de secuencia en múltiples locus (MLST), polimorfismos en la longitud de los

fragmentos amplificados (AFLP), electroforesis enzimática de múltiples locus (MLEE), se ha observado una estrecha relación filogenética entre *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus* (<http://mlstoslo.uio.no/>).

2.5 Genética molecular de *Bacillus thuringiensis*

Diversos genomas de Bt han sido secuenciados a la fecha, entre ellos el correspondiente a la cepa Al Hakam que consta de 5.31 Mb distribuido entre sus dos replicones, el cromosomal de 5.26 Mb y un fago circular (Challacombe *et al.*, 2007). En tanto el genoma de la subesp. chinensis (cepa CT-43) consta de 6.15 Mb contiene 11 replicones, un cromosoma circular de 5.5 Mb que codifica 5 596 ORFs, 10 plásmidos cuyo tamaño varían entre 6.6 Kb el más pequeño y de 281 Kb el de mayor tamaño (He *et al.*, 2011). Otra cepa es la serovar *finitimus* (YBT-020), la cual consta de 3 replicones, donde el cromosoma circular posee un tamaño de 5.4 Mb, los otros dos plásmidos cuyo tamaño es de 187 Kb y 139 Kb (Zhu *et al.*, 2011).

En la cepa YBT-520 se ha determinado que el tamaño del ADN plasmídico oscila entre los 8.7 Mb, el cual está comprendido en 11 plásmidos, este tamaño es 1.6 veces mayor que el ADN cromosomal, donde se reporta que es de aproximadamente entre 5.4 Mb (Zhong *et al.*, 2011).

Actualmente diversas cepas de Bt se continúan secuenciando, o ya se han secuenciado completamente, una guía completa de este status se encuentran disponible en la página web <http://www.genomesonline.org>

2.6 Proteínas de *Bacillus thuringiensis*

Esta bacteria produce una gran variedad de proteínas durante la etapa de esporulación, entre ellas las parasporinas, las cuales han demostrado un efecto citocida hacia células de cáncer uterino, así como contra células leucémicas humanas (Mizuki *et al.*, 2000). Otras proteínas producidas por Bt, son las proteínas insecticidas vegetativas (Vip), que son secretadas y tienen un efecto tóxico hacia insectos plaga aun sin tener similitud con las proteínas Cry, ni Cyt (Rang, 2005), estas últimas exhiben una actividad hemolítica (Bravo *et al.*, 2008) y finalmente las proteínas Cry.

2.7 Proteínas Cry

La principal característica de las proteínas Cry de ‘cristal’ es la actividad toxica de estas hacia insectos, mediante la formación de poros en el intestino del insecto (Soberón y Bravo, 2007). En 1998, Crickmore definió que una proteína Cry es una inclusión paraesporal de Bt, la cual exhibe algunos efectos tóxicos verificables experimentalmente a un organismo blanco, o cualquier proteína la cual tiene similitud a alguna secuencia *cry* conocida como tal.

Existe una amplia variedad de proteínas Cry (más de 143), siendo las del tipo CryI las más abundantes, presentándose al menos en el 75% de las cepas de Bt (Gillis y Santana, 2008). En una bacteria pueden coexistir dos o más tipos de proteínas Cry. Un ejemplo de esto es la cepa HD-133, por medio de análisis HPLC se mostró que esta cepa contiene 3 genes en diferentes proporciones, Cry1Ab en un 60 %, Cry1C en un 37 %, así como 3 % de toxina CryD (Masson *et al.*, 1998). Debido a esto se han llevado a cabo diversas clasificaciones, la primera se realizó con base al insecto blanco susceptible, se sabe que los genes que codifican proteínas CryI tienen acción toxica contra insectos del orden Lepidóptera, CryII tiene un doble espectro contra Lepidópteros y Dípteros, mientras que los coleópteros son susceptibles a las proteínas CryIII, en tanto las CryIV su insecto blanco son aquellos del orden Díptera, CryV y CryVI tienen acción nematicida (Roh *et al.*, 2007) así como la Cry21A (Wei *et al.*, 2003).

Otro método de identificación de las cepas de Bt, es por medio del antígeno flagelar (flagelina), donde más de 69 serotipos H han sido clasificados a la fecha (Xu y Côté, 2008).

La actual nomenclatura de los genes *cry* se basa en un alineamiento múltiple a nivel aminoacido de la proteína completa, mediante el programa ClustalW, se calculó el porcentaje de identidad entre cada par de toxinas, dando como resultado una matriz (Crickmore *et al.*, 1998).

El conjunto de las proteínas generaron un árbol filogenético, a partir de este árbol se establecieron los límites de identidad, definiendo cuatro categorías (Crickmore *et al.*, 1998). La primer categoría corresponde a un numero arábigo, el cual fue sustituido por el numero romano (p. ej. Cry1, Cry2), este nivel representa un 46% de similitud, el segundo nivel consta de una letra mayúscula (p. ej. Cry1A, Cry2B), con un 78% de similitud, el tercer nivel engloba las

secuencias con un 96% de similitud, y se simboliza con una letra minúscula (p. ej. Cry1Aa, Cry1Ac), y finalmente el cuarto nivel se designa de acuerdo al orden cronológico de publicación de la secuencia (p. ej. Cry1Aa1, Cry1Aa2) (Lorence y Quintero, 1996).

Actualmente existen 143 toxinas Cry únicas reportadas las cuales se encuentran depositadas en un banco de datos electrónico: Nomenclature Toxic of *Bacillus thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/), sitio que se actualiza frecuentemente.

Algunos métodos en biología molecular utilizados para identificar los genes *cry* contenidos en una cepa son: hibridación de anticuerpos mono y policlonales, así como la detección mediante PCR, ya sea para identificar genes *cry* generales, donde los oligonucleótidos están diseñados en regiones conservadas, así como específicos y degenerados, la recopilación del diseño de 52 oligonucleótidos tanto generales como específicos ha sido publicada por (Porcar y Jua, 2003; Juarez-Peréz, 1997)

Algunas estrategias para mejorar la acción insecticida de las proteínas Cry incluyen: inhibidores de la actividad proteolítica protein-serina, adición de quitinasas, toxinas híbridas, mutagénesis sitio dirigida hacia los dominios II y III, la eliminación de pequeñas regiones de la toxina y la introducción de sitios proteolíticos corte específicos (Pardo-López *et al.*, 2010).

2.8 Estructura terciaria de las proteínas Cry

A pesar de su diversidad, las proteínas Cry presentan una estructura terciaria muy similar entre ellas, esto se ha evidenciado mediante análisis de cristalografía de rayos X, en las secuencias de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba (Pigott y Ellar, 2007). Su estructura consiste básicamente de una porción C-terminal, la cual está involucrada en la formación del cristal y la porción N-terminal que se compone de tres dominios que conforman la toxina. El dominio uno está conformado por siete alfa hélices, de las cuales seis son anfipáticas ubicado entre los aminoácidos 18 hasta el 254; este dominio es el responsable de la inserción en las células del intestino y de la formación del poro. El segundo dominio el cual inicia en el aminoácido 259 hasta el 461, está conformado de tres láminas β plegadas antiparalelas, mientras que el dominio tres es una estructura de láminas β en sándwich,

correspondiente en los residuos 464 y finaliza en el residuo 608. Estos dos últimos dominios son los responsables de la especificidad al sitio de unión hacia los receptores del insecto (Sanahuja *et al.*, 2011).

2.9 Modo de acción de *Bacillus thuringiensis*

Debido a su acción insecticida, Bt ha sido ampliamente utilizada para el control de plagas agrícolas y forestales, así como en el control de vectores de importancia en la salud pública, ambos de la clase Insecta.

De manera general, el modo de acción de esta toxina es relativamente simple. El cristal producido por la bacteria durante la fase de esporulación, se genera como protoxina de un tamaño de aproximadamente 65 a 140 kDa, dependiendo del tipo de gen expresado (Ruiz de Escudero *et al.*, 2006). Posteriormente la protoxina es solubilizada, y digerida por la acción de proteasas del intestino medio del insecto, esta proteólisis genera la toxina, la cual se unirá a los receptores específicos en la membrana apical del intestino medio, teniendo como resultado la formación de un poro, el cual hace que la membrana sea permeable a moléculas como iones inorgánicos y aminoácidos; provocando que se pierda el equilibrio osmótico y se dañe severamente la homeostasis celular hasta provocar la muerte (Vachon *et al.*, 2012), además que puede ocurrir una septicemia por enterobacterias (Broderick *et al.*, 2006).

A la fecha se han descrito profundamente tres modelos de acción de las proteínas Cry, aunque estos no están completamente bien definidos. El primero fue propuesto por Bravo y colaboradores, cuyo modelo fue llamado ‘Modelo formador de poro’, en el cual propone que una vez que el insecto ingiere la proteína, esta tiene contacto con las proteasas del intestino medio del insecto en pH alcalino de 9 a 10, estas proteasas cortan a la protoxina, generando el segmento toxico, el cual se une a receptores específicos como las cadherinas. Esta interacción rompe el extremo N-terminal de la toxina, eliminando la α -hélice 1, teniendo como consecuencia la formación de una estructura oligomérica denominada ‘pre-poro’ la cual a su vez se une a un segundo receptor, los cuales son proteínas de unión al glucosilfosfatidilinositol (GPI) tales como la aminopeptidasa N (APN) o la fosfatasa alcalina (Muñoz-Garay *et al.*, 2009) facilitando

la inserción del oligómero dentro de las balsas de la membrana lipídica, formándose de esta manera el poro (Figura 3) (Jimenez-Juarez *et al.*, 2009).

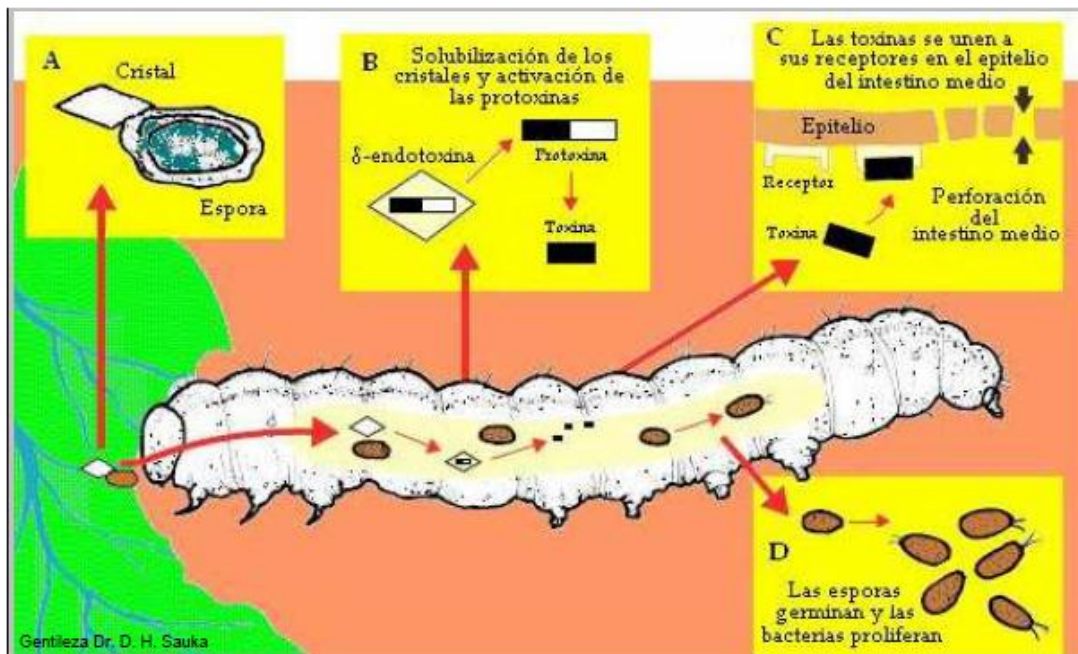


Figura 3. Modo de acción de la toxina de Bt. A) La espora y el cristal se encuentran en la superficie foliar, B) tras ser ingerida por el insecto la protoxina es solubilizada, posteriormente las proteasas del intestino medio del insecto cortan el extremo C-terminal dando como resultado la toxina activa. C) esta última se une a los receptores específicos de la superficie intestinal teniendo como resultado la formación del poro, D) finalmente la espora germina y el insecto muere por septicemia. Tomado de Sauka *et al.*, 2011.

En el segundo modelo, se señala que existen dos tipos de rutas de interacción entre la toxina y la célula, la primera es una unión no específica dando como resultado un complejo de unión membrana-toxina la cual no forma poros ni provoca la muerte celular, mientras el segundo tipo de ruta es una integración específica entre la toxina Cry y el receptor, dando como resultado la muerte celular debida a la iniciación de la ruta de señalización dependiente de magnesio (Mg^{+2}) que induce la citotoxicidad en la células huésped (Zhang *et al.*, 2005).

El tercer modelo, sugiere que una vez ingerido el cristal, este es solubilizado para activarlo como monómero para unirse al receptor HelCaLP (proteína con función de cadherina en *Heliotis vicerans*), activando una ruta de señalización intracelular regulada por fosfatasa, posteriormente a la unión con HelCaLP los monómeros tóxicos son procesados para formar oligómeros, los cuales se unen a proteínas de unión a GPI (HvALP, APN). Estas proteínas están concentradas en

las balsas lipídicas donde se llevan a cabo dos fenómenos: la formación del poro y la activación de la ruta de señalización, estos dos procesos activan la respuesta apoptótica y el estrés osmótico, el cual es inducido por la formación del poro, provocando la muerte celular (Jurat-Fuentes y Adang, 2006).

2.10 Uso de *Bacillus thuringiensis*

En los últimos años, la industria del biocontrol ha tenido un aumento del 2 % anual (Hunter, 2009); siendo los bioinsecticidas a base de Bt los más utilizados alrededor del mundo. Se calcula que aproximadamente 90 % de los productos en el mercado son a base de esta bacteria (Márquez y Fernández, 2006). Los principales efectos tras la exposición ya sea crónica o aguda a algún producto a base de Bt se observa el cese de la alimentación de la larva, disminuye la longevidad y además se reduce a un 45 % la producción de huevecillos (Costa *et al.*, 2000).

Desde la aparición en 1930 del primer bioinsecticida comercial, llamado Sporaine, la clasificación de los bioinsecticidas se ha identificado y ordenado según su composición, en tres categorías:

Los bioinsecticidas de primera generación (BPG), constituidos a base de una mezcla de cristales y esporas, donde la cepa HD-1 Bt var *kurstaki* es el ingrediente principal de los formulados comerciales (Dipel®, Thuricide®) (Orrieta y Larrea, 2002).

A través de la transformación o conjugación genética de Bt se dio inicio a los bioinsecticidas de segunda generación (BSG), a una cepa nativa se le transfieren uno o más genes *cry* ó *vip* para obtener un mayor potencial insecticida o ampliar el espectro (Caballero, 2006), por ejemplo la cepa Bt subsp. *tenebrionis* se le ha añadido el gen *cry3A* que afecta al género Coleóptera, así como el gen *cryIAa* específico para insectos lepidópteros (Lecadet *et al.*, 1992).

Los bioinsecticidas de tercera generación (BTG), son aquellos organismos que han sido modificados genéticamente por la incorporación de algún gen *cry*, hecho que le da mayor estabilidad y eficacia a la acción de las toxinas, por ejemplo, la clonación del gen *cry* en *Pseudomonas fluorescens*, esta tecnología fue denominada Cell Cap® y su principal objetivo consistió en proteger la proteína recombinante Cry de la radiación ultravioleta, el calor o los exudados de la planta, incrementando la estabilidad de las proteínas (Peng *et al.*, 2003). Otro

ejemplo de este tipo de productos se llevó a cabo mediante la integración del gen *cryIAc* en la bacteria fijadora de nitrógeno *Bacillus polymyxa*, obteniendo un híbrido con acción nitrificante e insecticida (Sudha *et al.*, 1999). Actualmente las investigaciones se encuentran enfocadas a la generación de bioinsecticidas de tercera generación.

2.11 Expresión heteróloga de las proteínas Cry

Diversas proteínas Cry se han expresado en distintos organismos, esto debido a la importancia que representan los insecticidas dentro del control biológico de insectos plaga. Basado en ello, las proteínas Cry se han expresado en bacterias, así como en organismos superiores, incrementando con ello el rango de hospederos susceptibles y la eficiencia de los mismos. En el siguiente cuadro se hace un recuento de algunos ejemplos de la expresión heteróloga de estas proteínas.

Cuadro 1. Organismos en los cuales se ha expresado las proteínas *cry* de

Bacillus thuringiensis.

Organismo Hospedero	Proteína	Método de Transformación	Insecto Blanco	Referencia
<i>E. coli</i>	Cry	Choque térmico	<i>Manduca sexta</i> Lepidóptera	(Schnepf y Whiteley, 1981)
<i>E. coli</i>	Cry1Ac22	Choque térmico	<i>Plutella xylostella</i> Lepidóptera	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
Plástidos de algodón	Cry1Ac	Biobalística	<i>Heliotis virescens</i> Lepidóptero	(McBride y Maliga, 1996)
Raíces de tomate	Cry5B	<i>Agrobacterium</i>	<i>Meloidogyne incognita</i> Nematoda	(Li <i>et al.</i> , 2008)
Embriones de Palma	Cry1Ab	Biobalística		(Lee <i>et al.</i> , 2006)
Plantas de Arroz	Cry1Ab	Biobalística	<i>Diatraea saccharalis</i> Lepidóptera	(Tu <i>et al.</i> , 2000)
Plantas de Tabaco	Cry1Ac	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Manduca sexta</i> Lepidóptera	(Barton <i>et al.</i> , 1987)
Embriones de Nogal	Cry1Ac	<i>Agrobacterium</i>	<i>Cydia pomonella</i> Lepidóptera	(Dandekar <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pichia Pastoris</i>	Cry2	Electroporación		(Ogunjimi <i>et al.</i> , 2002)
Pino	Cry1Ac	Biobalística	<i>Teia anartoides</i> Lepidóptera	(Grace <i>et al.</i> , 2005)
Papa	Cry3A	Electroporación	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Coleóptera	(Adang <i>et al.</i> , 1993)

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cry1Ac	Electroporación	<i>Pieris brassicae</i> Lepidoptera	(Peng <i>et al.</i> , 2003)
--------------------------------	--------	-----------------	--	--------------------------------

2.12 Cultivos Transgénicos

La generación de vegetales transgénicos se siguen incrementando por la necesidad que existe de obtener una mayor producción, la mayoría de los vegetales transgénicos han sido perfilados hacia la resistencia a los insectos a través de la incorporación de genes *cry*. Los principales beneficios de estos cultivos es obtener mayor rendimiento. En este caso la siembra de algodón Bt, efectuado en países en desarrollo, como Argentina, China, India, México y Sudáfrica, indican mayores rendimientos promedio, reducción en el uso de plaguicidas y beneficios netos superiores en relación con sus homólogos convencionales. (Castro, 2005).

Los principales cultivos que se han modificados con algún gen *cry* de Bt son: maíz, arroz, trigo, soya, algodón, canola y hortalizas. El país que sobresale en el uso de semillas de este tipo es Estados Unidos, donde se cultivan alrededor de 67 millones de Has, le siguen Brasil, Argentina, India, Canadá y China con 25.5, 23, 10, 9 y 3.5 millones de Has respectivamente. Se prevé que el cultivo de plantas transgénicas irá en aumento a corto plazo con la introducción de nuevas variedades de arroz. En otros países como Pakistán, Suecia y Alemania, esta tecnología se está implementando. Para nuestro caso, en México los primeros cultivos de maíz transgénico están en proceso de evaluación (FAO, 2011).

Actualmente el mercado de las semillas transgénicas que expresan la toxinas Cry de Bt es dominado por la empresa Monsanto™, con una cobertura del 80 % en las ventas, seguido por Aventis™ con un 7 %, mientras Syngenta™ y Dow™ con el 3 % cada una respectivamente (Santamarta, 2004).

2.13 Inocuidad de *Bacillus thuringiensis*

Aunque se ha señalado que Bt es una bacteria inócua para mamíferos, debido a que estos últimos carecen de receptores específicos en el intestino, esta afirmación se ha confirmado experimentalmente con ratas alimentadas con la proteína Cry1Ia12, donde no se observó alguna

alteración fisiológica o etológica (Guimarães *et al.*, 2010). En otros estudios se confirmó que cerdos alimentados con maíz transgénico (Cry1Ab) no presentaron respuesta alérgica, ni inflamatoria (Walsh *et al.*, 2012). Estas evidencias confirman por qué Bt se le ha catalogado como una bacteria con alta especificidad. Por otro lado, con la finalidad de evitar la transferencia vertical de genes foráneos, vía polen, grupos de investigación han integrado el gen *cry2Aa2* en el genoma del cloroplasto, lo que resulta en la falta de expresión de la toxina en el polen, y se ha demostrado su inocuidad hacia la mariposa monarca (De Cosa *et al.*, 2001).

Sin embargo, en la literatura existen algunos reportes sobre la resistencia a los productos de Bt, y aunque la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) publica sus lineamientos en cuanto al registro de cepas de Bt así como su uso y liberación al medio ambiente para controlar insectos plaga, esta agencia realiza pruebas de bioseguridad, entre las que se incluyen algunas reacciones fisio-metabólicas. Así como la inyección subcutánea de esporas en ratones (Tamez-Guerra *et al.*, 2005). Aunque estos controles son realizados previo a la liberación de productos agrícolas al medio ambiente algunos grupos ambientalistas realizan cuestionamientos dentro del tema de la salud humana con respecto al uso de Bt argumentando que algunas cepas son capaces de producir toxinas que afectan al ser humano (Frederiksen *et al.*, 2006), algunas de estas toxinas provocarían diarrea y envenenamiento (Han *et al.*, 2006, Økstad *et al.*, 2011) (Cuadro 2). Otros grupos mencionan que la exposición prolongada a bioinsecticidas a base de esporas de Bt causan inflamación sub-crónica del pulmón (Barfod *et al.*, 2010), incluso dosis de 10^4 UFC afectan los testículos de rata provocando severas erosiones germinales (Adetunji y Anyanwu, 2011); así Hernandez *et al.* (1998) menciona que la inyección intravenosa de 10^7 UFC de var. *konkukian* en ratón produce infección y necrosis cuando está inmunodeprimido.

Cuadro 2. Comparación de las enterotoxinas producidas por especies del grupo *Bacillus*

Enterotoxina	Especie de <i>Bacillus</i>				
	<i>B. anthracis</i> Ames	<i>B. cereus</i> 10987	<i>B. cereus</i> 14759	B. t. 97-27	<i>B. cereus</i> E33L
hemolítica <i>HBL</i>	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
No hemolítica <i>NHE</i>	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
diarreica BceT	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
Genes cry	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

(Han *et al.*, 2006)

Por otro lado, dentro del marco ambiental se habla que los cultivos transgénicos podrían representar un riesgo medio-ambiental, debido al autocruzamiento de plantas no transgénicas por medio del polen, además de presentarse la transferencia horizontal de transgenes a organismos no relacionados, así como la pérdida en susceptibilidad a insectos plaga blanco, y otros efectos sobre la biodiversidad (Naranjo *et al.*, 2005). Pocos reportes describen algún tipo de resistencia generada hacia las proteínas Cry; sin embargo en algunos organismos, como en el caso del gusano rosado *Pectinophora gossypiella*, en el cual se observa una modificación a nivel de los receptores del intestino (Morin *et al.*, 2003); por otro lado, en un análisis del proteoma del intestino medio de *Plodia interpunctella*, se muestran diferencias en los niveles de proteínas del intestino medio expresadas en insectos resistentes, comparado con los niveles detectados en los insectos susceptibles (Candas, 2002). De igual manera *Caenorabditis elegans* presenta algún tipo de resistencia a la toxina Cry5B (Barrows *et al.*, 2007). Pese a estas evidencias aun queda en duda la toxicidad y resistencia no blanco de Bt.

2.14 Antecedentes *Yarrowia lipolytica*

Como organismos unicelulares las levaduras cuentan con diversas ventajas tales como: la fácil manipulación durante su aislamiento, presentan una tasa de crecimiento alta con

requerimientos nutricionales mínimos, tienen la capacidad para producir proteínas N-glicosiladas, y de añadir puentes disulfuro, además de no ser susceptibles a las infecciones virales. Estas propiedades le otorgan grandes beneficios, lo cual se ve reflejado en que la célula sea capaz de generar altos rendimientos en la producción de proteínas (Jeffries y Cregg, 2010). Dentro de las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la levadura mas estudiada en cuando a la expresión de proteínas heterólogas se refiere; sin embargo esta tiende a hiperglicosilar las proteínas, además de que no posee una ruta de secreción fuerte; por esta razón, se han buscado sistemas alternos, denominadas ‘levaduras no convencionales’ entre las que se encuentran: *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* y *Yarrowia lipolytica*. Esta última llama la atención por diversas características específicas que posee, tales como: alta capacidad de expresión y secreción de proteínas, resultando con rendimientos de 4.5 veces superior en comparación con lo generado por *S. cerevisiae*, como se evidencio en la expresión de diversas enzimas como: celulasa I, xilanasa I, lipasa I, y la poligalacturonasa I (Muller, 1998). Otra ventaja que presenta *Y. lipolytica* es sin duda la capacidad de realizar las modificaciones de maduración, de manera co-traducciona, siendo este tipo de modificaciones las que realizan las células de mamíferos a diferencia de *S. cerevisiae* donde sus modificaciones las lleva a cabo de manera post-transducciona (Boisramé *et al.*, 1998).

2.15 Antecedentes de *Yarrowia lipolytica*

La levadura no convencional *Y. lipolytica* primeramente fue clasificado como *Candida lipolytica* debido a que su ciclo sexual no había sido descrito, posteriormente la forma perfecta de *C. lipolytica* fue identificada a finales de 1960 por Wickerham, este aislado encontrado en residuos de fibra de una planta procesadora de maíz contenía ascos unidos a la hifa, esta forma perfecta fue reclasificada primeramente como *Endomycopsis lipolytica*, luego como *Saccharomycopsis lipolytica* debido a que exhibía esporulación y finalmente como *Yarrowia lipolytica* en honor a David Yarrow por sus contribuciones en la sistemática de hongos (Walt y Arx, 1980).

2.16 Generalidades de *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica es un ascomiceto de gran interés biotecnológico, ya que esta levadura es clasificada como GRAS (Generalmente Reconocida como Segura) por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos), además, no tiene la capacidad de fermentar azúcares y el nitrato no es asimilable. Para su identificación bioquímica se utilizan diversas pruebas, entre ellas la asimilación de glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, eritrol y otros azúcares (Kurtzman, 1998). *Y. lipolytica* es un excelente modelo de estudio en diversos campos de investigación como lo es la secreción de proteínas, biogénesis de peroxisomas, dimorfismo, degradación de sustratos hidrofóbicos (Fickers *et al.*, 2005).

Debido a su naturaleza aerobia estricta, esta levadura comúnmente se encuentra creciendo como contaminante en los alimentos ricos en lípidos y proteínas que habitualmente consumimos, por ejemplo: queso, yogurt, salchicha o ensaladas que contengan camarón o carnes, además, en sustratos como los alcoholes y los acetatos. Esta levadura también es comúnmente encontrada en sustratos hidrofóbicos, tales como los ácidos grasos, alcanos y parafinas, sin embargo no es capaz de crecer en sacarosa como única fuente de carbono (Barth y Gaillardin, 1997). Con relación a hábitats no convencionales, esta levadura ha sido aislada de suelo y aguas residuales, así como en microambientes contaminados con aceite. El rango de pH de donde ha sido aislada, es neutro tendiendo a lo alcalino, y la temperatura de crecimiento oscila desde los 28 °C hasta los 34 °C (Kim *et al.*, 1999).

2.17 Relación Filogenética de *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica diverge de otras levaduras pertenecientes al grupo de los ascomicetos (Figura 4) debido a ciertas características típicas, como lo es: a) el alto contenido de GC, b) la alta frecuencia de intrones, donde el 13% de los genes tienen uno o más intrones de tamaño relativamente grande, c) presenta una estructura inusual en sus genes ribosomales, d) presenta un bajo nivel de similitud con genes de otras levaduras a nivel aminoacídico, e) contenido de elementos transponibles (Madzak *et al.*, 2005).

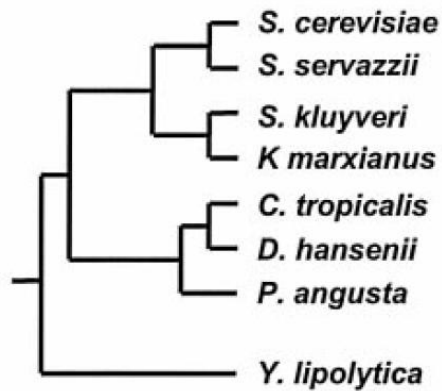


Figura 4. Filogenia de levaduras pertenecientes al grupo de Hemiascomicetos, a partir del 18S (Bon *et al.*, 2003).

2.18 Ciclo celular de *Yarrowia lipolytica*

Gran parte de los aislados de *Y. lipolytica* son haploides, es una levadura heterotálica con una reproducción sexual de tipo A ó B. Aunque la reproducción sexual es poco común, (de un 10 al 20%) (Kurischko *et al.*, 1992), sin embargo cuando esta se realiza, se genera una célula diploide estable, la cual forma de 1 a 4 esporas haploides por asca, de forma muy diversa, esféricas, o en forma de sombrero (Figura 5) (Barth y Weber, 1985). Macroscópicamente las colonias cambian su coloración de blanco a un tono café ligero cuando ya han formado las esporas.

2.19 Dimorfismo en *Yarrowia lipolytica*

El dimorfismo es la capacidad que disponen ciertos hongos para poder alternar su forma de crecimiento, de levadura a micelio y viceversa; *Y. lipolytica* presenta un crecimiento hifal o levaduriforme. Estos cambios fisiológicos y morfológicos son controlados por diversas condiciones del microambiente de crecimiento, como el pH, temperatura, estrés atmosférico o bien por componentes específicos en el medio de cultivo (Coehlo *et al.*, 2010); por ejemplo, se ha observado que el pH neutro se favorece el crecimiento micelial, mientras que un pH ácido (de 3 a 4) induce el desarrollo de células levaduriformes (Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002).

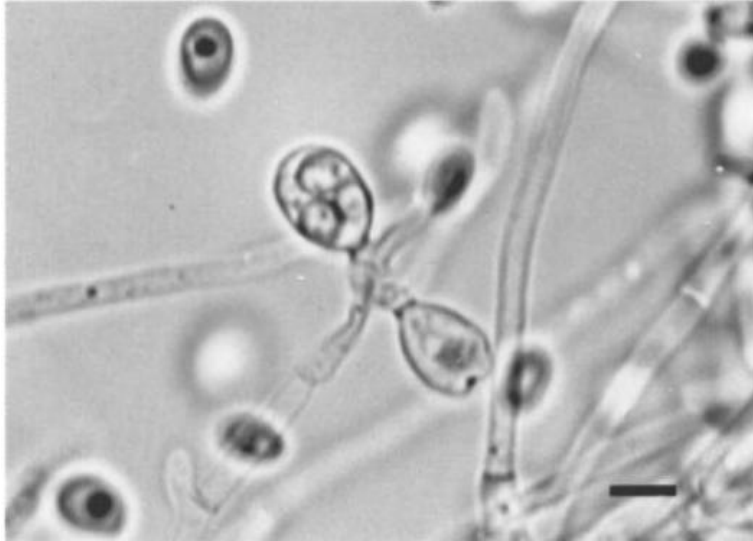


Figura 5. Morfología microscópica de *Y. lipolytica*, se observa el asco con ascosporas después de una semana de crecimiento en agar YM a 25 °C. (Kurtzman, 1999)

2.20 Genómica de *Yarrowia lipolytica*

A partir de 1997 se iniciaron los intentos por descifrar completamente la genómica de *Y. lipolytica*, a través de ensayos en electroforesis de cariotipos se calculaba que el genoma de esta levadura era de aproximadamente de 21 a 22 Mb (Barth y Gaillardin, 1997). Posteriormente el genoma de la cepa E150 fue determinado por el consorcio francés Genolevures, este determinó que el tamaño del genoma de esta levadura es de 20.5 Mb, el cual se encuentra distribuido en 6 cromosomas, presentando 6073 secuencias codificantes, encontrándose un gen cada 3 Kb aproximadamente, con un contenido de GC de 49% (Dujon *et al.*, 2004); mientras que su genoma mitocondrial consiste de una molécula circular de 47.9 Kb y un contenido de GC de 27% (Kerscher *et al.*, 2001).

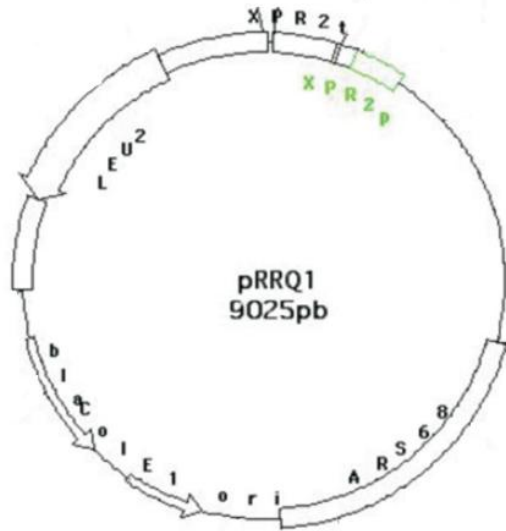
El transposón repetitivo de la familia Ty3 llamado Ylt1 de 9.4 kb se ha detectado en el genoma de *Y. lipolytica*, este elemento está rodeado por repeticiones largas terminales (LTR) denominados elementos zeta, los cuales son de aproximadamente 714 pb formando parte de este retrotransposón; el número de copias en el genoma varía entre cada cepa, teniendo como mínimo 30 o hasta 60 copias por célula. El análisis de secuencias de los motivos encontrados en estos LTR muestran similitud con señales para el inicio y terminación de la transcripción (Schmid-Berger *et al.*, 1994).

2.21 Vectores en *Yarrowia lipolytica*

Debido a su interés en la expresión heteróloga de proteínas, se han desarrollado distintas estrategias para una mayor explotación. Uno de los principales elementos como herramientas para la expresión de proteínas es sin duda la disponibilidad de los vectores. A la fecha no se ha encontrado ADN episomal en esta levadura, sin embargo, gracias a la descripción de las secuencias de replicación autónoma (ARS) ha sido posible mantener el ADN de manera extracromosomal, lo cual ha permitido el desarrollo de diversos tipos de vectores. Actualmente existen vectores replicativos que se encuentran de 1 a 3 copias por célula, los cuales poseen una secuencia de replicación autónoma, además de los vectores que contienen una secuencia centromérica (CEN) (Figura 6), los cuales se comportan como un mini cromosoma segregándose 2:2 durante la meiosis y pueden encontrarse de 2 a 3 copias por célula de manera estable. Cabe destacar que estas secuencias no muestran ninguna similitud con los centrómeros de otras levaduras como *S. cerevisiae* (Fournier *et al.*, 1993).

Los vectores integrativos se insertan en el genoma de la célula por recombinación ya sea dirigida o al azar, (Figura 7) por ejemplo: teniendo como blanco el ADN_r a donde se obtienen de 3 a 39 copias en el genoma, mientras que teniendo como blanco el locus *XPR2* se muestran de 3 a 19 copias por célula, sin embargo, se ha demostrado que un mayor número de copias integradas en el genoma disminuye la estabilidad del mismo (Juretzek *et al.*, 2000). Estos vectores, son híbridos entre secuencias bacterianas y de levaduras; las secuencias bacterianas están integradas por un origen de replicación (*ori*), un marcador de selección de *E. coli* el cual regularmente es un gen de resistencia a algún antibiótico, mientras que las secuencias correspondientes a levadura incluyen elementos para la selección de las transformantes, secuencias para el mantenimiento dentro de la célula, además, para dirigir la expresión de proteínas se añade una secuencia promotora regularmente derivada de un gen implicado en alguna ruta metabólica (Thevenieau *et al.*, 2009), así como una secuencia señal si es que se requiere secretar la proteína y finalmente una secuencia terminadora para permitir el correcto tamaño de dicha proteína (Böer *et al.*, 2007). Actualmente la compañía Taiwanese Yeastern® se ha dedicado a la comercialización de vectores de expresión-secreción para *Y. lipolytica*. <http://www.yeastern.com/>.

A



B

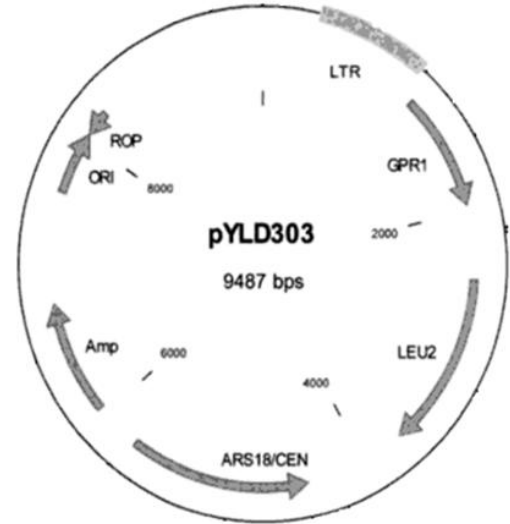
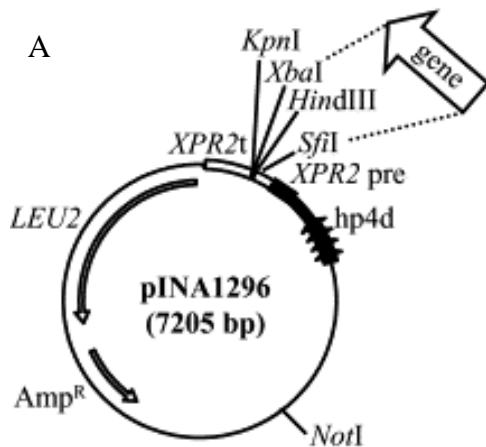


Figura 6. Vectores replicativos. pRRQ1 vector replicativo de *Y. lipolytica* (A) (Rosas y Gaillardin, 2011). Vector replicativo con región centromérica (B) (Senam y Barth, 2003). En ambos vectores se muestra la secuencia correspondiente al marcador de selección (*LEU2*), la secuencia de replicación autónoma (*ori/cen*), la región promotora en el vector A correspondiente al promotor XPR2, así como la secuencia terminadora.

A



B

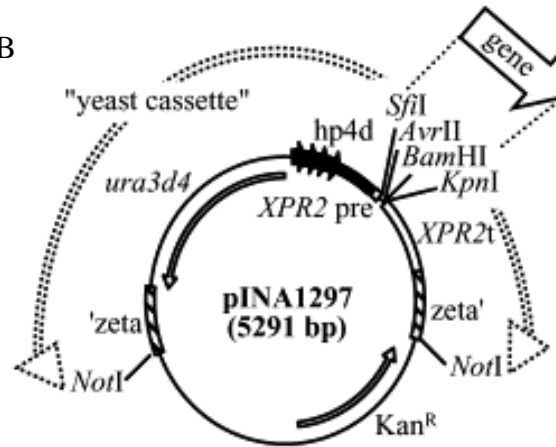


Figura 7. Vectores integrativos de *Y. lipolytica* los cuales se insertan en el genoma de la levadura (Madzak *et al.*, 2005), en la figura A se muestra un vector integrativo dirigido hacia el locus del gen XPR2, en tanto la figura B muestra el vector integrativo al azar ya que este contiene los elementos zeta.

2.22 Promotores en *Yarrowia lipolytica*

La expresión de alguna proteína es dirigida bajo una región 5' río arriba conocida como región promotora. Esta región tiene cierta peculiaridad en su distribución y organización, pero lo común es que son blanco para que elementos regulatorios de la transcripción sean ahí reclutados. El éxito de la expresión heteróloga dependerá mucho de la región promotora utilizada. Para el caso de *Y. lipolytica*, existen varios ejemplos de ellas, sin embargo, la secuencia de la proteasa extracelular alcalina codificada por el gen XPR2 (principal proteína secretada en esta levadura), ha sido ampliamente utilizado para la inducción de la expresión, con altos niveles de peptonas en medios cuyo pH sea superior a 5.5 (Madzak *et al.*, 2000). Sin embargo, esto podría ser una desventaja para la aplicación industrial, por lo tanto cuatro copias en tándem de una secuencia activadora río arriba (UAS) del promotor pXPR2 se unieron para formar el denominado promotor *hp4d* el cual actúa de manera independientemente de las condiciones ambientales tales como pH, fuentes de carbón, nitrógeno y peptonas (Blanchin-Roland *et al.*, 1994). Otros de los promotores estudiados son los genes que participan en la β -oxidación de los ácidos grasos, así como del metabolismo del glicerol, todos estos promotores son inducibles o reprimidos por diferentes fuentes de carbono, por ejemplo: la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (pG3P) y 3-oxo-acyl-CoA-thiolasa (pPOT1). Otro promotor comúnmente usado es el isocitrato liasa (pICLI) el cual es inducible con acetatos o etanol pero reprimido por la glucosa y el glicerol (Juretzek *et al.*, 2000). Mientras que el promotor acyl-CoA-oxidasa 2 (pPOX2) es inducible con alcanos y ácidos grasos (Shiningavamwe *et al.*, 2006), seleccionar uno u otro, dependerá en gran manera de los fines de la investigación o aplicación.

2.23 Marcadores de selección en *Yarrowia lipolytica*

Para seleccionar las transformantes generadas en *Y. lipolytica*, se ha preferido utilizar los marcadores de auxotrofia tales como el *leu2*, este participa en la ruta de la biosíntesis de la leucina (Davidow *et al.*, 1987), así también *ura2*, mientras que el alelo defectivo *ura3d4* es incapaz de conferir un fenotipo *ura+*, sin embargo alrededor de 10 copias permiten el crecimiento normal de la célula en un medio libre de uracilo, otros marcadores son los genes *lys1* y *lys5*, ambos codifican para la primera y última enzima de la ruta biosintética de la lisina (Xuan *et al.*, 1988). La inserción del gen *suc2* de *S. cerevisiae* le permite crecer en medios con sacarosa

(Nicaud *et al.*, 1989). Aunque *Y. lipolytica* es resistente a la mayoría de los antibióticos se ha encontrado su sensibilidad a la pleomicina, por lo tanto, este antibiótico también se ha utilizado como un marcador de selección (Davidow *et al.*, 1987). Actualmente se han desarrollado vectores a los cuales se les ha integrado la proteína mCherry, y la selección de las transformantes se realiza por medio de la visualización de la coloración en el medio de cultivo; esta tecnología facilita también la obtención de las proteínas expresadas (Bulani *et al.*, 2012).

2.24 Técnicas de Transformación en *Yarrowia lipolytica*

La transformación de *Y. lipolytica* se ha realizado mediante la aplicación de dos diferentes técnicas, la primera de ellas se realiza mediante un método químico que consta en utilizar acetato de litio, con este protocolo se obtiene alrededor de 10^4 a 10^5 transformantes por μg de DNA linealizado. Este método se elige cuando se hace una transformación con un vector integrativo (Xuan *et al.*, 1988). La segunda técnica empleada es la electroporación, la cual se aplica cuando se trabaja con vectores replicativos. La combinación de ambos tratamientos, una hora con 150 mM de LiAc antes de la electrotansformación con 1.5 kV tiene como resultado un rendimiento 30 veces superior al obtenido por los tratamientos individuales (Wang *et al.*, 2011).

2.25 Proteínas heterólogas expresadas *Yarrowia lipolytica*

Actualmente ha existido gran interés de utilizar esta levadura en la expresión no solo de proteínas, sino también otros compuestos de interés industrial tales como ácido cítrico, manitol y eritrol (Tomaszewska *et al.*, 2012). *Y. lipolytica* tiene la capacidad de secretar de manera natural varias enzimas entre las que destacan la proteasa extracelular alcalina (AEP), la proteasa extracelular ácida (AXP), lipasas, ARNsas, fosfatasas y una esterasa (Le Dall *et al.*, 1994). El aprovechamiento de estas herramientas ha dado como resultado que las proteínas expresadas en esta levadura vayan en aumento (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación de las diferentes proteínas expresadas en *Y. lipolytica*

Proteína	Fuente	Peso Molecular	Referencia
α -amilasa	<i>Oriza sativa</i>	45kDa	(Park <i>et al.</i> , 1997)
Factor de crecimiento epidermal	<i>Homo sapiens</i>	6.1 kDa	(Hamsa <i>et al.</i> , 1998)
Endoglucanasa I	<i>Trichoderma reesei</i>	45 kDa	(Park <i>et al.</i> , 2000)
Citocromo P450	<i>Homo sapiens</i>	54 kDa	(Nthangeni <i>et al.</i> , 2004)
Laccasa IIIb	<i>Trametes versicolor</i>	53 kDa	(Jolivalt <i>et al.</i> , 2005)
Laccasa I	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	70 kDa	(Madzak <i>et al.</i> , 2005)
Citoquinina oxidasa/ deshidrogenasa	<i>Zea mays</i>	69 kDa	(Kopečný <i>et al.</i> , 2005)
β -Mananasa	<i>Aspergillus aculeatus</i>	70 kDa	(Roth <i>et al.</i> , 2009)
Interferon alpha 2b	<i>Homo sapiens</i>	19 kDa	(Gasmi <i>et al.</i> , 2011)
Recombinasa Cre	Bacteriofago P1	41 kDa	(Rosas y Gaillardin, 2011)
Lipasa	<i>Rhizopus oryzae</i>	32.270 Da	(Yuzbashev <i>et al.</i> , 2012)

2.26 Glicosilación

La glicosilación es una modificación postraduccional la cual involucra la unión selectiva de moléculas de carbohidratos a las proteínas o a los lípidos (Mazola *et al.*, 2011). Las células de mamíferos generan tres tipos de glicosilación, las levaduras como eucariotes inferiores tan solo

son capaces de llevar a cabo N-glicosilación agregando residuos de manosa a las cadenas externas, siendo estas cadenas más largas comparadas con las de mamíferos, por ejemplo: en *S. cerevisiae* los residuos agregados son de 50 a 150 residuos de manosa, lo cual tiene como resultado una hiperglicosilación, mientras que otras levaduras tales como *P. pastoris* y *H. polymorpha* producen cadenas de 8 a 14 residuos de manosa. Se ha observado que *Y. lipolytica* solo añade de 8 a 10 residuos, cifra comparable con la glicosilación de las células de mamíferos (Mazdak *et al.*, 2005).

2.27 Aplicaciones potenciales de *Yarrowia lipolytica*

Y. lipolytica es un excelente modelo de estudio y aplicación en el ámbito industrial. En la industria alimenticia, la proteasa extracelular producida por *Y. lipolytica* es utilizada como agente coagulador de la leche, como una alternativa al uso de la renina bovina (Yu *et al.*, 2010). Dentro del área medio ambiental esta levadura tiene la capacidad de utilizar el agente toxico trinitrotolueno (TNT) y transformarlo por medio de la reducción de su anillo aromático (Jain *et al.*, 2004). Como un organismo bioremediador de ambientes marinos y terrestres, se ha observado que *Y. lipolytica* es capaz de degradar hasta un 68 % del contenido de aceites contaminantes presentes en derrames en tan solo 10 días (Margesin y Schinner, 1997). Por otro lado, debido a la tolerancia a diversos metales pesados, esta levadura podría ser un sistema eficiente para la bioabsorción de estos metales, los cuales están designados como contaminantes (Strouhal *et al.*, 2003). Finalmente, *Y. lipolytica* ha sido catalogado como un noble sistema para la expresión de proteínas heterólogas (Bankar *et al.*, 2009).

2.28 Asimilación de Lípidos

Una característica sobresaliente de esta levadura y de ahí su nombre, es la capacidad metabólica de almacenar, degradar y crecer sobre sustratos lipídicos. *Y. lipolytica* es considerada una levadura oleaginoso debido a esta capacidad, logrando almacenar hasta un 50 % de su peso seco (Beopoulos *et al.*, 2009). Para asimilar estos sustratos hidrofóbicos del medio, *Y. lipolytica* utiliza diversas rutas metabólicas las cuales se llevan a cabo en diferentes compartimentos celulares, produciendo surfactantes que ayudan a reducir los sustratos, uno de ellos es un emulsificador extracelular llamado liposan, así como una lipasa extracelular, que permite la

hidrólisis de los triglicéridos. Tanto el liposoma, como las lipasas reducen el tamaño del sustrato, una vez en la célula, diversas rutas catabólicas se involucran en la transformación de los lípidos. (Beopoulos *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACION

Actualmente el estudio sobre el control biológico de plagas va en aumento día con día y poco a poco va tomado fuerza a nivel mundial como un método para obtener el mantenimiento de los insectos a niveles no perjudiciales; anteriormente el control químico representaba el principal método de control, debido a su características: bajo costo, amplio espectro y facilidad de manejo; sin embargo diversos efectos adversos se han elucidado, entre ellos el daño a nivel del medio ambiental debido a su alta residualidad, se calcula que estos químicos pueden permanecer por más de 20 años sin alteración alguna, además de las consecuencias que estos insecticidas provocan a la salud humana ya que están considerados como agentes carcinogénicos y alérgicos; de hecho se calcula que 20 000 personas mueren al año por la exposición a algún tipo de insecticida, esto conjugado a la resistencia que ha presentado por algunos insectos, requiriendo el aumento en las dosis del insecticida, y en consecuencia la acumulación de los efectos nocivos. Por estos motivos, diferentes países han regulado el uso de estos compuestos químicos promoviendo el uso alternativo que es el control biológico, por los beneficios que este otorga; tales como: nula contaminación del medio ambiente así como su alta especificidad.

Hoy en día el organismo con mayor explotación en cuanto a biocontrol se refiere es sin duda la bacteria entomopatógena Bt ocupando el 90% de los bioinsecticidas. La expresión de las proteínas Cry en diferentes sistemas para producir las proteínas insecticidas es una tarea interesante.

4. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Expresión de una proteína Cry1 de *Bacillus thuringiensis* en la cepa Po1g de *Yarrowia lipolytica*

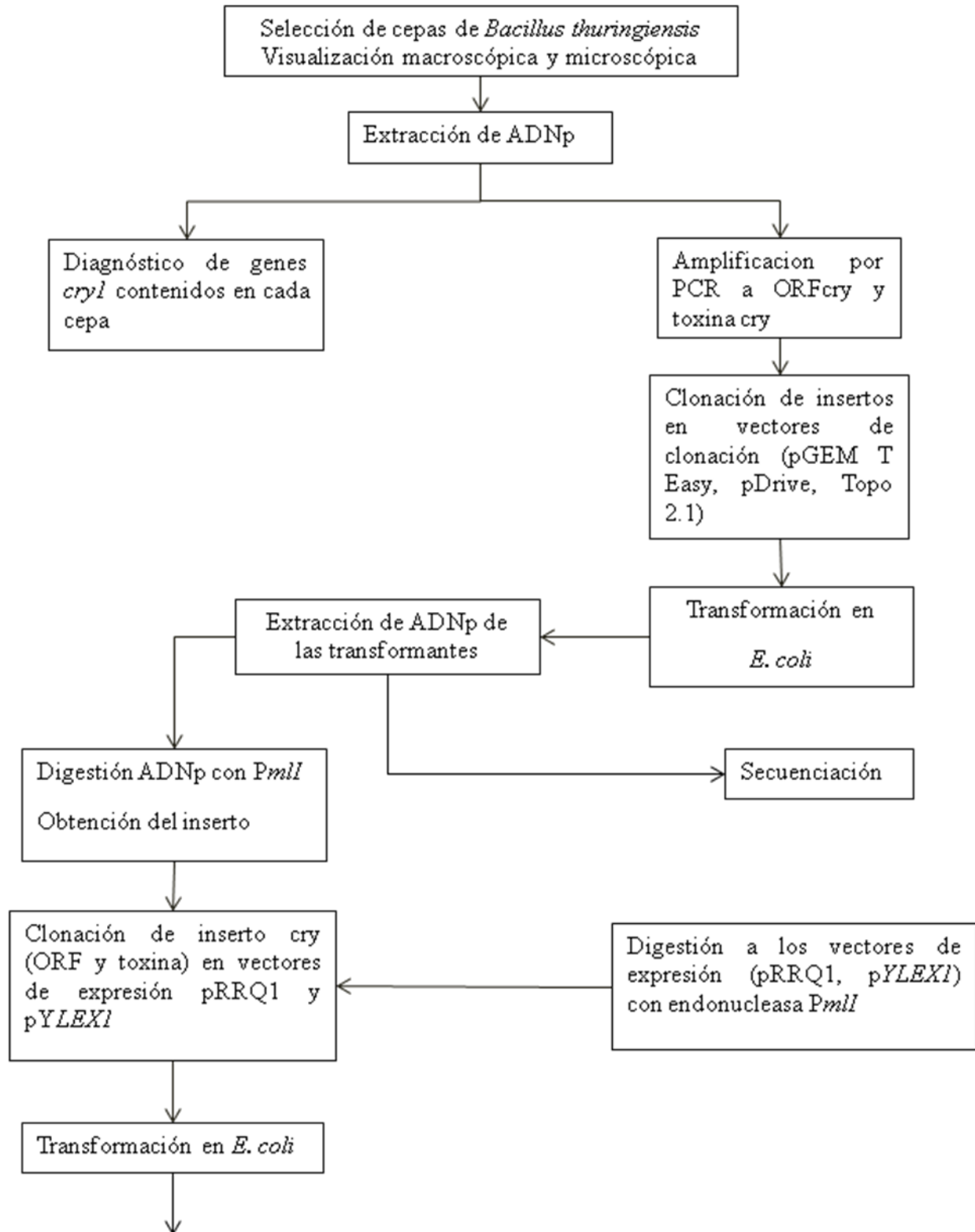
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

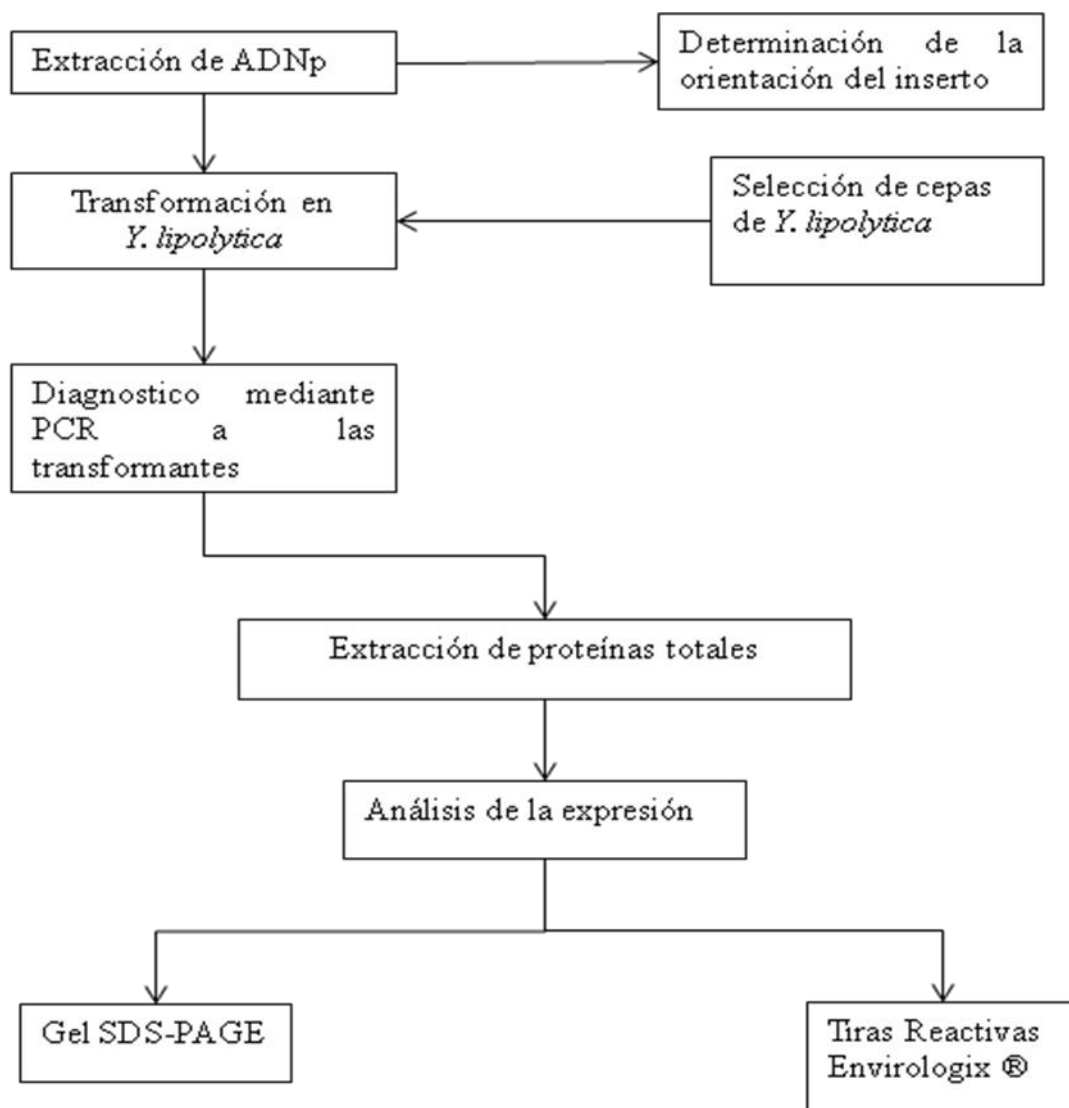
- ❖ Identificación y clonación un gen *cry1* de *Bacillus thuringiensis*.
- ❖ La construcción de un vector de expresión para el gen *cry1* de *Bacillus thuringiensis* en la cepa Po1g de *Yarrowia lipolytica*.
- ❖ Generación de la cepa Po1g de *Yarrowia lipolytica*, que produzca la proteína insecticida Cry1 de *Bacillus thuringiensis*.

5. HIPÓTESIS

“La proteína Cry1 de *Bacillus thuringiensis* se expresa satisfactoriamente en la levadura
Yarrowia lipolytica”

6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO





7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico:

Se emplearon diversas cepas bacterianas de *B. thuringiensis* así como células competentes de *E.coli*, además de la levadura *Y. lipolytica*. (Cuadro 4)

Cuadro 4. **Material biológico utilizado en este trabajo.**

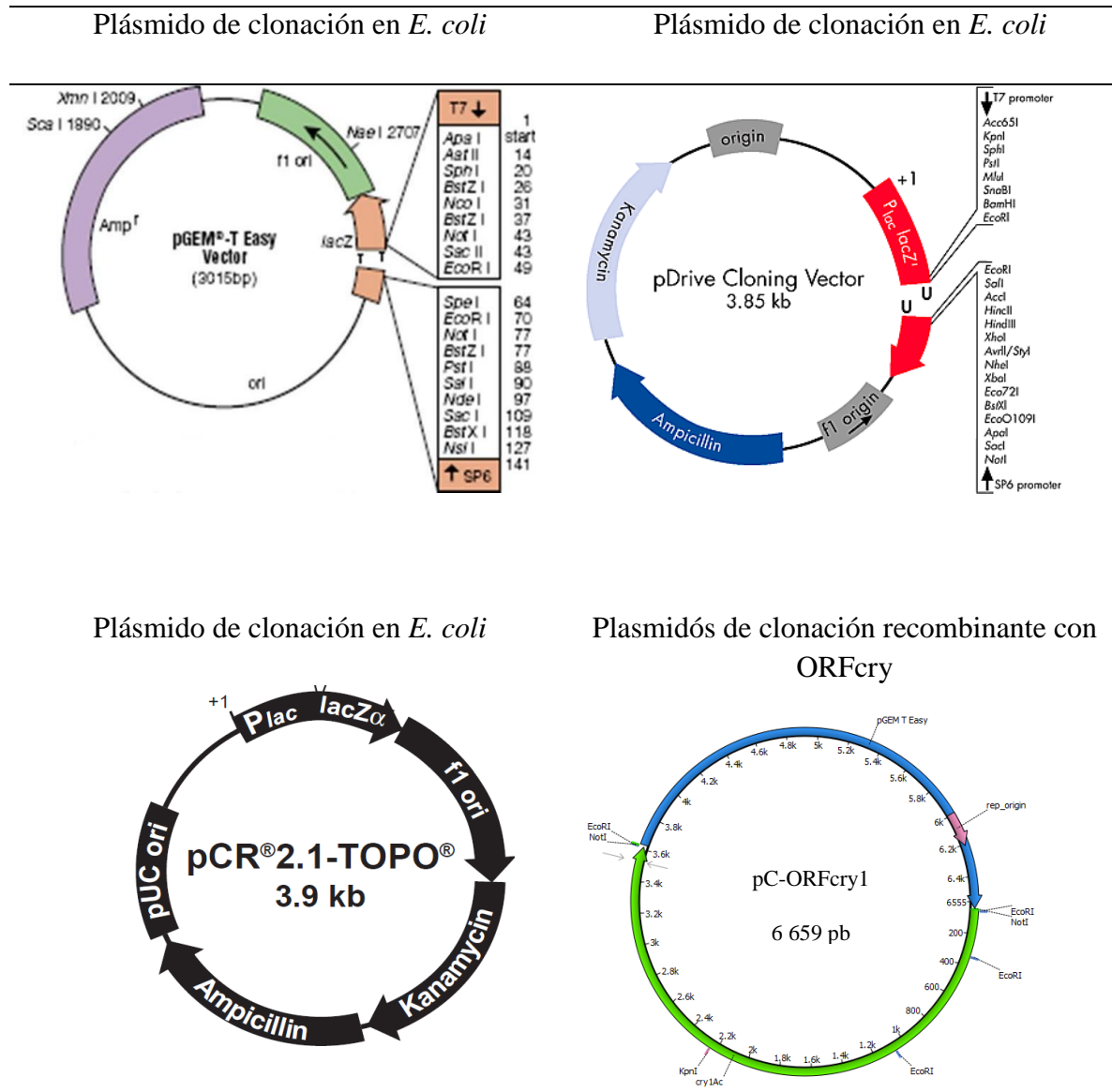
Microorganismo	Genotipo	Referencia	Uso
<i>Escherichia coli</i>			
HB101	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hdsS20</i> (r _B -m _B ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proa2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (str ^r), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>	Promega®	Transformación
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hshR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F ['] , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15].	Promega®	Transformación
Strataclone	<i>endA</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA</i> , <i>tonA</i> , F [']	Agilent Technologies®	Transformación
<i>Bacillus</i>			
<i>thuringiensis</i>			
GM7	<i>cryI</i>	Howard Dulmage	Amplificación genes cry
GM10	<i>cryI</i>	“	“
HD551	<i>cryI</i>	“	“
HD133	<i>cryI</i>	“	“
HD273	<i>cryI</i>	“	“
HD27	<i>cryI</i>	“	“
HD29	<i>cryI</i>	“	“
Dipel	<i>cryI</i>	“	“

Thuricide <i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>cryI</i>	“	“
Po1a	(<i>Mat A, Leu 2-270, Ura 3-302</i>)	INRA- Francia	Expresión proteína Cry
Po1g	<i>Mat-A, Leu 2-270, Ura 3-302::URA3, xpr2-332, axp-2.</i>	Yeastern Biotech, Co.®	“
Po1g Tox1(I)	<i>Mat-A, Leu 2-270, Ura 3-302::URA3, xpr2-332, axp-2. Tox1</i>	Este trabajo	Expresión de la toxina cry
Po1gBtORF(I)	<i>Mat-A, Leu 2-270, Ura 3-302::URA3, xpr2-332, axp-2. cry1Ac</i>	Este trabajo	Expresión de la proteína Cry1Ac
Po1gBtTox1(R)	<i>Mat-A, Leu 2-270, Ura 3-302::URA3, xpr2-332, axp-2. Tox1</i>	Este trabajo	Expresión de la toxina cry
Po1gBtCry1Ac(R)	<i>Mat-A, Leu 2-270, Ura 3-302::URA3, xpr2-332, axp-2. cry1Ac</i>	Este trabajo	Expresión de la proteína Cry1Ac

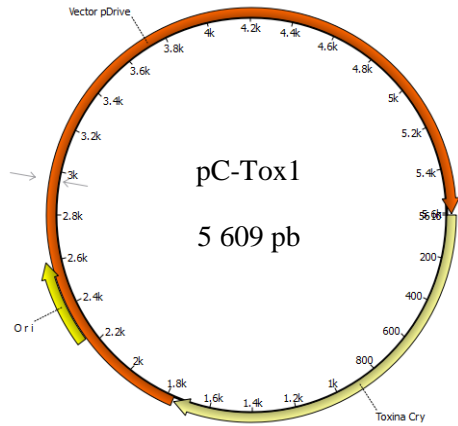
7.1.1 Plásmidos:

Se emplearon diversos plásmidos, unos para realizar la clonación de los segmentos y realizar las diversas manipulaciones y mantenimiento de los genes de interés y otros para la expresión de la proteína Cry1 de Bt en *Y. lipolytica*. (Cuadro 5).

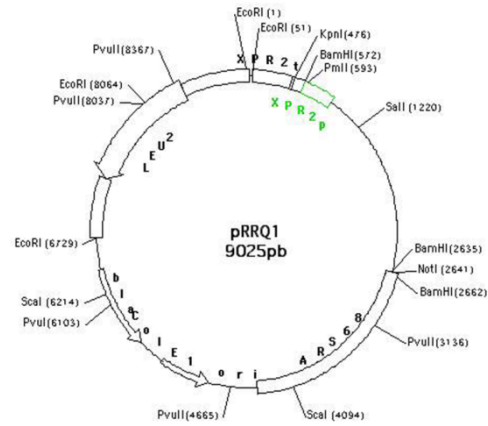
Cuadro 5. Plásmidos de clonación/expresión usados en el presenta trabajo



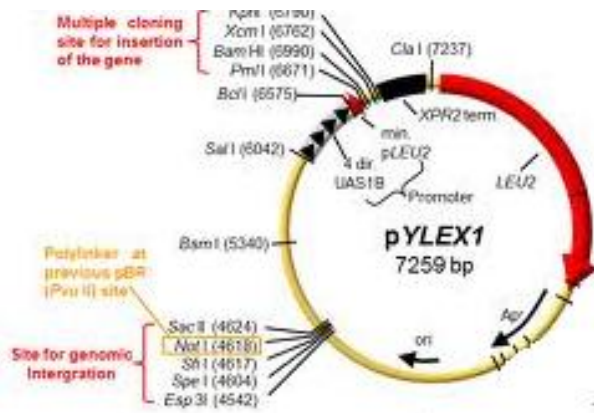
Plásmido de clonación recombinante con toxina cry



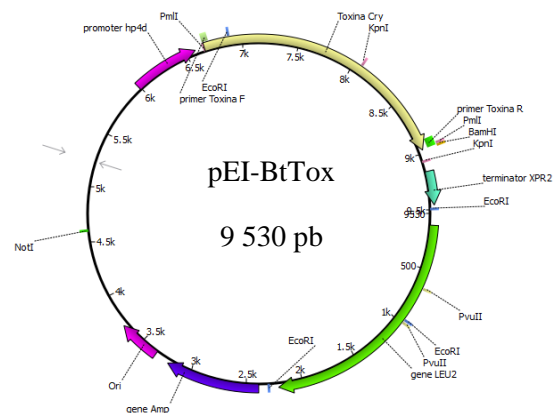
Plásmidos de expresión replicativo en *Y. lipolytica*



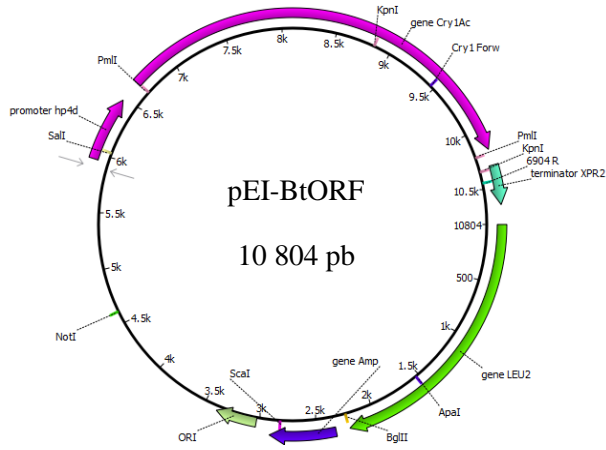
Plásmido de expresión integrativo en *Y. lipolytica*



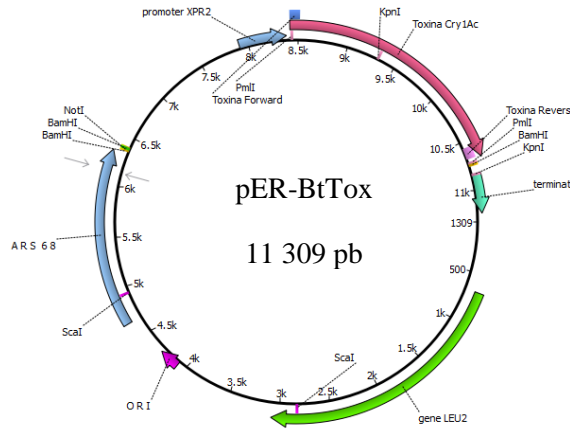
Plásmido de expresión recombinante integrativo con toxina cry



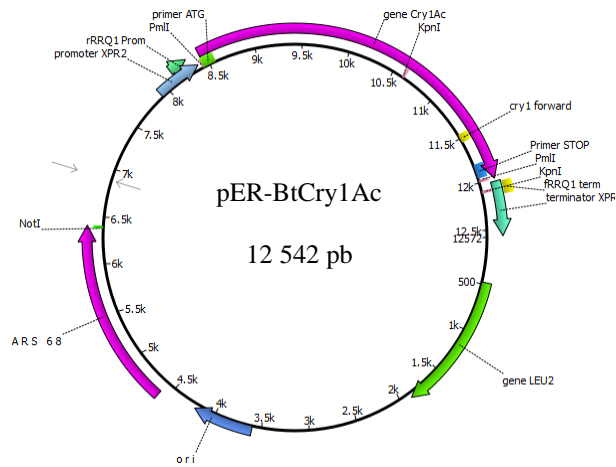
Plásmido de expresión recombinante integrativo con ORFcry



Plásmido de expresión recombinante replicativo con toxina cry



Plásmido de expresión replicativo recombinante con ORFcry



7.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron en el presente estudio se mencionan a continuación: Caldo Luria-Bertani: 10 g/l de Bactopeptona, 5 g/l Extracto de levadura, 10 g/l de Cloruro de Sodio (Ibi Scientific®).

Agar Luria Bertani: 10 g/l de Bactopeptona, 5 g/l Extracto de levadura, 10 g/l de Cloruro de Sodio y 15 g/l de agar agar (Ibi Scientific®) el cual fue suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (Excipin®), 500 µM de IPTG (Promega®) y 40 µg/mL de X-Gal (Promega®) cuando fue requerido.

Agar YNB: 1.7 g/l de la mezcla Base de Nitrogeno para Levaduras (YNB) (Difco®), 5 g/l de Sulfato de amonio (Reserch Organics®), 20 g/l de Dextrosa (Research Organics®), 20 g/l de agar agar (Research Organics®) suplementado con 0.01% de Uracilo (Sigma®).

Caldo YPD (Difco®): 10 g/l de extracto de Levadura, 10 g/l de peptona, 20 g/l dextrosa.

Agar PDA (Difco®).

7.1.3 Condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas de *E. coli*. fueron inoculadas en caldo LB. Para el caso de Bt estas cepas se activaron a 30°C en estufa de incubación durante 16 horas, mientras que las cepas de *E. coli* fueron propagadas a 37°C con una agitación constante a 200 rpm, durante 12 h.

La cepa de *Y. lipolytica* se activó en agar PDA, mientras que para su propagación se realizó un cultivo en medio YPD liquido y se incubó a 30°C con agitación constante a 300 rpm, durante 10 h.

Las transformantes de *Y. lipolytica* se distribuyeron en placas de YNB (Po1g), y las transformantes de la cepa Po1a a las placas se les adicionó uracilo, ambas cepas de incubaron a una temperatura de 30 °C durante 48 h.

7.2 Visualización de morfología microscópica de *Bacillus thuringiensis*

Las células de Bt se incubaron a 30°C durante 16 horas en agar LB. Transcurrido el periodo de la incubación, fue preparado un frotis del cultivo, colocándolo en un portaobjetos y exponiéndolo suavemente a la flama del mechero para su fijación por medio de calor. Las células bacterianas fueron teñidas mediante la técnica de Gram. La morfología fue observada empleando un microscopio de campo claro Olympus® modelo BX 41 con el objeto de inmersión de 100X.

7.2.1 Extracción de ADN plasmídico

La obtención del ADNp de las cepas de referencia de Bt se realizó siguiendo el protocolo descrito por Reyes e Ibarra (2008), con la siguiente modificación: la precipitación del ADN se realizó incubando el material a -80 °C durante una hora en lugar de -20°C durante toda la noche.

La extracción del ADNp de las clonas recombinantes de *E. coli* se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Birboim y Dolly (1979). En algunos casos fue utilizado el kit comercial Wizard SV Minipreps de Promega®, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7.2.2 Visualización de ácidos nucleicos

Para la visualización y verificación de los ácidos nucleicos, estos fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En cada pozo del gel se depositó una mezcla de los siguientes componentes: 1µL de Syber Gold 100 X (Invitrogen®), mas 2 µL de Orange G (Sigma®) y 1µL de TE 0.1X (10mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), adicionando el ADN cuyo volumen varía de acuerdo a su procedencia, tomando 3 µL cuando se trató de ADNp, 5 µL cuando se trató de un producto de PCR, y 10 µL si fue el producto de una reacción de restricción, empleando en cada separación un marcador de peso molecular de ADN (1Kb, Promega®) como referencia de la migración. Las corridas fueron realizadas empleando el amortiguador de corrida TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA), a 80 volts durante 1 hora. Las imágenes de los geles fueron visualizados y registrados mediante el uso del fotodocumentador Molecular Image® Gel Doc™ XR System, con el programa QualityOne® versión 4.6.7.

7.3 Diseño de oligonucleótidos

En el presente estudio, se utilizaron oligonucleótidos generales y específicos previamente reportados en la literatura para los genes *cryI*, *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc* y *cryIF* de Bt (Cuadro 6), mientras que otros fueron diseñados como los oligonucleótidos denominados ORF cry, así como los codificantes a la toxina Cry.

Para el diseño de los iniciadores ATG-STOP cry así, como los oligonucleótidos que amplifican la toxina, se descargaron las secuencias completas correspondiente a la proteína CryI de Bt, tomadas de la base de datos del NCBI. Estas secuencias fueron empleadas para realizar un alineamiento múltiple con el programa Unipro (UGENE versión 1.9.5). El diseño consideró el codón de inicio y de terminación del alineamiento consenso, mientras que para los oligonucleótidos que codifican únicamente la toxina, se consideraron la posición de los cortes proteolíticos que la generan en Ile²⁹ el extremo amino terminal, así como Lys⁶²³ en su extremo carboxilo terminal. Para facilitar la subclonación en el vector de expresión, a los oligonucleótidos diseñados se les adicionó el sitio de restricción que reconoce la endonucleasa *PmlI*.

Cuadro 6. Oligonucleótidos utilizados en el desarrollo experimental

Gen	Secuencia 5' 3'	Tamaño esperado	Referencia
CryI Gral.	TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT CATGATTCATGCGGCAGATAAAC	277 pb	(Ben-Dov <i>et al.</i> , 1997)
CryI Aa	MDATYTCTAKRTCTTGACTA TTCCCTTTATTTGGGAATGC	1283 pb	(Juarez-Perez, 1997)
CryIAb	MDATYTCTAKRTCTTGACTA CGGATGCTCATAGAGGAGAA	1371 pb	(Juarez-Perez, 1997)
CryIac	MDATYTCTAKRTCTTGACTA' GGAAADTTTCTTTTAATGG	844 pb	(Juarez-Perez, 1997)
CryIF	TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC CGGTTACCAGCCGTATTTTCG	177 pb	(Ceron, Ortíz, & Quintero, 1995)
ATG	ATTCACGTGATGGATAACAATCCGAACATC	3549 pb	Este trabajo
STOP	AATCACGTGCTATTCTCCATAAGGAGTAA		
Toxina F	ATCACGTGATGATCGATATTTCTTGTCGCTAAC	1780 pb	Este trabajo
Toxina R	ATCACGTGCTAAGTAACTGAATAAATTCAAATC		
M13 Forward	TGTAACGACGGCCAGT		
r-RRQ1 Prom.	ACAGATTTTCACTCCACACA		Este trabajo
f-RRQ1 Term..	TCATATCGGAGCCGGGGCA		Este trabajo
6560 F	GATCCGGCATGCACTGAT		YLEX Kit
6904 R	AACACCGGTGTTGGACTCAG		YLEX Kit

7.4 Identificación de los genes *cryI* específicos mediante PCR

Se llevó a cabo mediante PCR, la identificación de genes del tipo *cryI* en cada una de las cepas de Bt utilizadas en este estudio, donde se emplearon diferentes juegos de oligonucleótidos, descritos en la sección anterior.

Una mezcla de reacción típica de PCR se realizó siguiendo las proporciones de los siguientes reactivos: 100 µg de ADNp, 6 µL de amortiguador 5X, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTs, 0.2 mM oligonucleótido sentido, 0.2 mM oligonucleótido antisentido, 2 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega®), Agua MiliQ estéril para completar un volumen final de reacción de 30 µL. Finalmente la reacción de polimerización se realizó en un termociclador GeneAmp® PCR System 9600 PE de Applied Biosystems®.

Para la amplificación de la secuencias codificantes de los diferentes genes *cry* de las cepas de referencia, las condiciones se encuentran descritas en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Condiciones de amplificación para los diferentes genes *cry* de Bt.

Gene	Paso inicial	30 ciclos	Paso final
<i>CryI</i>	94 °C por 2 min	94 °C por 1 min, 56 °C por 35 s, 72 °C por 1 min	72 °C por 5 min
<i>CryIAa</i>	94 °C por 2 min	94 °C por 1 min, 45 °C por 45 s, 72 °C por 2 min	72 °C por 10 min
<i>CryIAb</i>			
<i>CryIAc</i>			
<i>CryIF</i>	94 °C por 2 min	95 °C por 1 min, 44 °C por 1 min, 72 °C por 1 min	72 °C por 5 min
Toxina cry	94 °C por 2 min	94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 min	72 °C por 5 min
ORF cry	94 °C por 2 min	94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 3 min	72 °C por 10 min

7.4.1 Purificación de ADN amplificado

Los productos de PCR, así como los fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas fueron separados en gel de agarosa al 1 %, durante 2 horas a 100 volts. La banda de interés fue rescatada y purificada con el kit Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo

las instrucciones del proveedor. El volumen final de resuspensión fue de 40 μL en todos los casos.

7.5 Clonación de los genes de interés

El producto de amplificación del gen *cryI* (ORF o toxina) purificado se ligó a un vector comercial de clonación (pGEM®-T Easy Vector System (Promega), o bien el TOPO 2.1 PCR® (Invitrogen) pDrive (Qiagen®) en una relación 2:1 inserto-vector utilizando 1 μL de vector bajo las siguientes condiciones: 50 μg del producto de PCR fresco, 5 μL de Buffer de ligasa 2X y 3 U de la enzima T4 Ligasa (Promega®) en un volumen final de 10 μL , esta reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente.

7.5.1 Construcción del vector de expresión

Los vectores utilizados para la expresión de la proteína CryI de Bt en *Y. lipolytica*, fueron el pRRQ1 de tipo replicativo, así como el vector comercial pYLEX1 de tipo integrativo, los cuales primeramente fueron preparados bajo los siguientes tratamientos:

7.5.2 Digestiones enzimáticas

Inicialmente el vector pRRQ1 fue digerido con diferentes enzimas para confirmar su identidad. Se realizaron diversas digestiones con las enzimas *PmlI* (Biolabs®), *EcoRI* (Promega®, Roche®), *BamHI* (Invitrogen®), *KpnI* (Promega®, Invitrogen®), *NcoI* (Invitrogen®), *PstI* (Invitrogen®), *PvuII* (Biolabs®) cada una de las enzimas empleadas fue según su disponibilidad. En tanto el vector comercial pYLEX1 se linearizó con la endonucleasa *PmlI*. Una reacción típica consistió en usar 10 μg de ADNp, 3 μL de amortiguador de reacción 10X, 1 μL de enzima equivalente a 5 U, H₂O estéril para un volumen final de 30 μL , en el caso específico de la enzima *PmlI* se agregó 0.3 μL de BSA. El período de incubación fue de 3 a 12 horas dependiendo de la enzima a una temperatura de 37 °C. Finalmente en cada una de las reacciones se llevó a cabo la inactivación de la actividad enzimática bajo el tratamiento de 65 °C por 15 min, en todos los casos.

El plásmido fue digerido con la enzima *PmlI* como se describió arriba, la digestión fue sometida a una separación en gel y se purificó la banda de interés (lineal aprox. 9 Kb en el caso

del vector pRRQ1 y de 7 259 para el vector pYLEX1) como se describió en la sección correspondiente.

7.5.3 Desfosforilación del Vector

Para aumentar la eficiencia de la reacción de ligación del inserto al vector de expresión, este último fue sujeto a una desfosforilación con la enzima TSAP de Promega®, en la cual se tomaron 10 µg del vector, 2µL de amortiguador MULTI-CORE™, 2 unidades de Enzima TSAP (Fosfatasa Alcalina TermoSensible) y 10 µL de H₂O para un volumen final de 20µL. Esta reacción se incubó por 15 min a 37 °C. Transcurrido este período se llevó a cabo la inactivación de la actividad enzimática a 74°C durante 15 min. Cuando se utilizó la enzima CIAP (Fosfatasa Alcalina Intestinal de Ternero), se utilizaron 15 µg del vector, 4 µL de Buffer CIAP, 1 µL de la enzima y H₂O estéril para tener un volumen final de 30 µL el cual se incubó a 50°C durante 1 hora para su óptima actividad. Finalmente se procedió a eliminar la enzima, por medio de la columna SV Clean Up Wizard de Promega®, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El inserto fue preparado de la siguiente manera: 1 µg producto amplificado y purificado bajo las condiciones mencionadas anteriormente fue digerido con la enzima *PmlI*, al final de la reacción el segmento fue purificado por columna SV Clean Up Wizard de Promega® y se verificó su integridad y la concentración por medio de un gel de agarosa.

Una vez preparado el vector y el inserto se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando 50 ng de vector con 50 ng de inserto esto da una proporción de 1:3 molar vector-inserto, utilizando 5 µL de buffer ligasa 2X y 3 U de T4 ligasa en un volumen de 10 µL, la reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente.

7.5.4 Rellenado de los extremos 3'

En algunos casos el vector y los extremos no fueron compatibles con los insertos; para lo cual fue necesario rellenar los extremos o bien rasurarlos. La reacción de relleno se realizó usando el Fragmento Largo de la Polimerasa Klenow (Invitrogen), en el cual se adicionó 10 ng de ADN, 0.5 mM de cada dNTPs, 3µL de buffer de reacción, 0.5 U de Polimerasa Klenow y H₂O mili Q estéril para tener un volumen final de 30 µL. Todos estos compuestos se homogenizaron por medio de pipeteo suave, posteriormente esta reacción se mantuvo en hielo

durante 20 min, en este periodo se llevo a cabo la incorporación de los nucleótidos a los extremos, finalmente la inactivación de esta enzima se realizó por medio de calor durante 10 min a una temperatura de 75 °C.

7.5.5 Rasurado de los extremos 5' con S1 Nucleasa

Para la reacciones de rasurado de los extremos cohesivos se preparó el buffer de reacción específico para la nucleasa S1 el cual contiene: 0.28 M NaCl, 0.05 M de acetato de sodio pH 4.5, 4.5 mM ZnSO₄ · 7H₂O. Se agregó la enzima S1 a una concentración de 500 U/ mL. Según Sambrook y Rusell en 2001, de esta mezcla se tomaron 5 µL mas 10 µg de ADN aforando con agua miliQ para un volumen de 50 µL, durante un período de incubación de 15 min a 37°C, se llevó a cabo la actividad enzimática, esta enzima se eliminó por medio de una purificación en columna SV Clean Up Wizard de Promega®.

7.6 Transformación genética de los organismos

Los diversos productos de las ligaciones se utilizaron para transformar células químico competentes de *E.coli* de acuerdo a Sambrook y Rusell en 2001. El fundamento básico de la incorporación del ADN exógeno se realizó a través de un choque térmico a 42°C durante 50 seg. Posteriormente, la selección de las clonas recombinantes se observó por su resistencia a ampicilina y por la alfa-complementación utilizando 500 µM de IPTG y 40 µg/mL de X-Gal, después de un periodo de incubación a 37°C durante 16 horas.

La transformación genética de las cepas Po1g y Po1a de *Y. lipolytica*, fue desarrollada utilizando el protocolo de transformación descrito por Xuan *et al.* en 1988, con una modificación en la concentración del acetato de litio ajustando a 1 M en lugar de 0.1 M que normalmente es utilizado en el protocolo base. La selección de las transformantes se realizó por su auxotrofia a leucina.

7.7 Secuenciación

Algunos productos de amplificación así como clonas recombinantes fueron sujetos a una reacción de secuenciación, utilizando el oligonucleótido Cry1 general forward. y el oligonucleótido M13 forward. Bajo las condiciones de reacción descritas en el cuadro 8.

Cuadro 8. Componentes usados para la reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen
Buffer Big Bye 5X	4 μ L
Big Dye 3.1 ReadyMix	4 μ L
Oligonucleotido	1 μ L (0.5 μ M)
ADN	1-3 μ L (20 ng)
H ₂ O	9 μ L
Volumen Final	20 μ L

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer® bajo las siguientes condiciones: Un ciclo de 96 °C por 1 min, 25 ciclos de 96 °C por 10 s., 50 °C por 5 s., 60 °C por 4 min.

Al final de la reacción de amplificación el producto se purificó utilizando el reactivo Xterminador, para lo cual se utilizaron 10 μ L de la reacción de amplificación y 45 μ L de la solución SAM. La mezcla se incubó a 25 °C por 30 min a 14 000 rpm en el agitador térmico, se tomaron 10 μ L de la reacción de secuenciación la cual fue depositada en equipo capilar modelo ABI PRISM 3130 de Applied by Systems™.

7.7.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias generadas fueron analizadas y editadas en los programas Chromas Lite 2.01, o UniproUGene versión 1.10.3. Finalmente, la secuencia editada se comparó con la base de datos del NCBI, para determinar la identidad de dicha secuencia a través de un análisis tipo BLAST N.

7.8 Expresión de las proteínas

La detección de la expresión de la proteína recombinante Cry1 de Bt en *Y. lipolytica*, por un lado, se realizó mediante una separación en gel de poliacrilamida y se reveló con el reactivo azul de Coomasie y de esta manera se comparó el perfil proteico entre las diferentes cepas utilizadas,

por otro, fue necesario utilizar la detección específica mediante anticuerpos, utilizando tiras reactivas QuickComb™ de Enviroligix® específicos para las proteínas Cry1Ab/Ac.

Las muestras de la levadura recombinante, se prepararon de la siguiente manera: Las proteínas son obtenidas de extractos crudos del crecimiento de la levadura, el cual ha sido crecido toda la noche en medio YNB a una temperatura de 30 °C, con una agitación de 300 rpm. Este cultivo se centrifugó a 3500 rpm y se descartó el sobrenadante, se adicionaron 25 µL de buffer de carga, se agitó en vortex hasta homogenizar el sedimento con el buffer y se calentó a 99 °C por 20 min en agitador térmico, posteriormente se centrifugó por 2 min a 5000 rpm y se colocó en hielo, del sobrenadante se depositan los 20 µL en el pocillo del gel.

Sin embargo, para incrementar la calidad y concentración de las proteínas, las transformantes del plásmido integrativo se crecieron en medio YPD, mientras que las transformantes con el vector replicativo se crecieron en medio YNB, donde una colonia se tomó e inoculó en un matraz de 250 mL a 30 °C con agitación de 300 rpm por un periodo de 5 días, posteriormente 50 mL del cultivo se centrifugó para la obtención de las proteínas totales donde se empleo el kit Red Protein Yeast de MP Biomedicals™. Así como del homogenizador Sigma Aldrich® durante 2 min a una velocidad máxima para la completa lisis celular, esta columna se centrifugó a 1 200 rpm y el sobrenadante se tomó como muestra para la detección de la proteína Cry1.

Los geles de poliacrilamida fueron preparados siguiendo las instrucciones de los protocolos descritos en Sambrook y Rusell en 2001. Primeramente, se realizó la preparación de Bis/Acrilamida así como de los buffers de carga, de corrida, soluciones de tinción y de lavado.

La preparación de los siguientes buffers se realizo como se describe a continuación:

Bis/Acrilamida: la preparación de este reactivo se realizó pesando 38.93 g. de Acrilamida, 1.07 g. de Bis-Acrilamida y se aforó a 100 mL con H₂O estéril, se filtró y se desgasificó; este buffer se mantuvo a 4 °C en un frasco ámbar o cubierto con aluminio.

El buffer de corrida tris-glicina: Se preparó a partir de una solución madre o Stock 5X (15.1 g de Tris base, 94 g de glicina grado electroforesis, 50 mL de SDS 10 % grado electroforesis), posteriormente se hace la dilución de trabajo correspondiente 1X.

El amortiguador de carga se preparó bajo las siguientes concentraciones: 50mM de Tris-Cl pH 6.8, 100 mM de Ditioneitol (DTT), 2 % de SDS grado electroforesis, 0.1 Azul de Bromofenol, y 10% glicerol, este buffer se almacenó a 4 °C, siendo el DTT el reactivo que se adiciono antes de ser usado el buffer de carga.

Las proteínas en el gel de acrilamida fueron reveladas a través de la tinción con el reactivo azul de Coomasie, para preparar la solución, se disolvió 0.25 g de azul de Coomasie en 90 mL de metanol: H₂O (1:1 v/v) y se agregó 10 mL de ácido acético glacial, finalmente se filtró y se mantuvo a temperatura ambiente. Una vez corrido el gel este se separó del dispositivo y fue colocado en un recipiente con 250 mL del reactivo de Coomasie, posteriormente se puso en contacto con el reactivo durante 5 horas en agitación constante a 50 rpm, durante este periodo se llevaron a cabo diversos lavados para eliminar el exceso de tinción en el gel con una solución de lavado la cual incluye 500 mL de metanol, 400 mL de H₂O estéril y 100 mL de ácido acético glacial hasta la aparición de bandas discretas.

El gel SDS-PAGE contiene dos fases. Una resolutive que es la que lleva una concentración del 8 % de acrilamida la cual, una vez polimerizada, se forma la segunda fase que se denomina de apilamiento o concentradora, esta consiste en poliacrilamida al 5 %. La preparación del gel se realizó de acuerdo a los componentes del cuadro 9 y 10, el reactivo Temed se agrega al final ya que este inicia la polimerización.

Cuadro 9. Reactivos usados para la preparación del gel SDS-PAGE al 8 %

Reactivo	Volumen
Acrilamida 30%	2.7 mL
1 M Tris pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
PSA 10%	100 µL
Temed	6 µL
H ₂ O	4.6 mL
Volumen Final	10 mL

Se mezcló por pipeteo, y al final se añadió el isopropanol, hasta la polimerización del gel.

Cuadro 10. Reactivos usados para la preparación del gel SDS-PAGE al 5 %

Reactivo	Volumen
Acrilamida 30%	830 μ L
1 M Tris pH 6.8	630 μ L
SDS 10%	50 μ L
PSA 10%	50 μ L
Temed	5 μ L
H ₂ O	3.4 mL
Volumen Final	5 mL

La separación de las proteínas en los geles de corrida, se realizó a 100 volts en la fase de apilamiento, después se aumentó a 180 volts en la fase de separación, la corrida se realizó por 5 horas a temperatura ambiente, se utilizó como referencia de la migración el marcador de peso molecular Color Plus Prestained Protein Ladder 10-230 kDa (Biolabs). La imagen del gel fue registrado en el fotodocumentador de geles y la imagen se analizó con el programa Quantity One versión 4.6.7., para un análisis comparativo en el patrón de bandeo.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización de Cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Yarrowia lipolytica*

En el presente trabajo fueron utilizadas nueve cepas de Bt. Las cepas de Bt, fueron seleccionadas por su morfología en agar LB, en un período de 12 horas y a una temperatura de 30 °C [Figura 8(A)], todas las cepas mostraron una morfología macroscópica similar, registrando las colonias de aproximadamente 1 cm de diámetro, coloración blanca, opacas, con bordes irregulares; posteriormente mediante el análisis de microscopia de contraste de fases las cepas GM7, GM10, HD29, HD27, Dipel y Thuricide mostraron los cristales bipiramidales, estos cristales son típicos de las cepas que contienen al menos un gen *cryI* [Figura 8 (B)], sin embargo, en las cepas HD133, HD551 no fue posible localizar alguna estructura de tipo cristal bajo estas condiciones de microscopia.

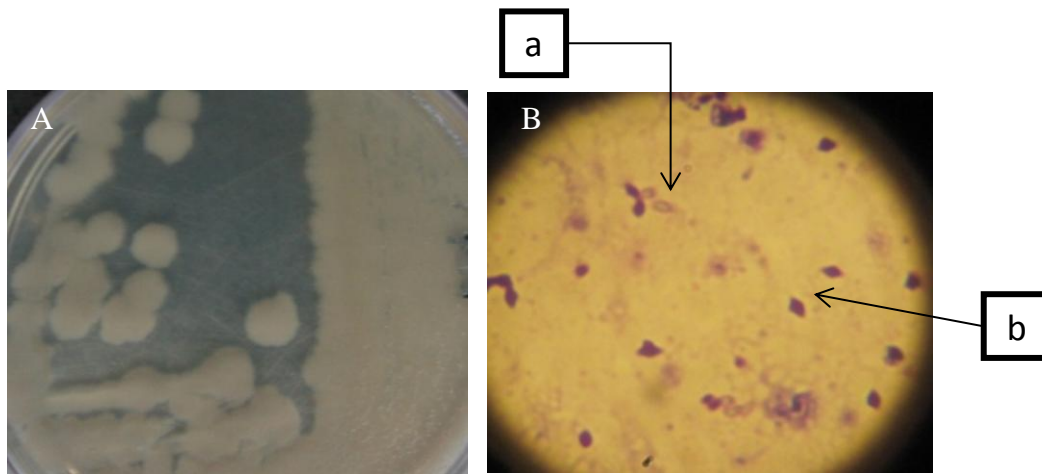


Figura 8. A) Morfología macroscópica de Bt después del crecimiento en agar LB por un periodo de 12 horas y una temperatura de 30°C B) Morfología microscópica proveniente de un frotis bacteriano de Bt donde se observa: a) la espora así como cristales bipiramidales típicos del producto génico *cryI* de esta bacteria (b). Observación al microscopio 100X.

Mientras tanto las cepas Po1g y Po1a de *Y. lipolytica* que se utilizarón, se crecieron en agar PDA durante 48 horas, para la visualización macroscópica [Figura 9 (A)], observándose colonias blancas, opacas, de consistencia cremosa y bordes lisos. Posteriormente la colonia se observó bajo el microscopio con un aumento de 100X [Figura 9 (B)], mostrando el crecimiento

típico levaduriforme con forma ovoide. En la Figura 10 (A), se muestra la morfología macroscópica de crecimiento de *Y. lipolytica* en un medio mínimo (YNB), observándose la producción de micelio, además en la visualización microscópica [Figura 10 (B)] se logran observar las hifas.



Figura 9. A) Morfología macroscópica típica de *Y. lipolytica* crecida en medio PDA. B) El crecimiento de la levadura es mayoritariamente levaduriforme, aumento 100X.

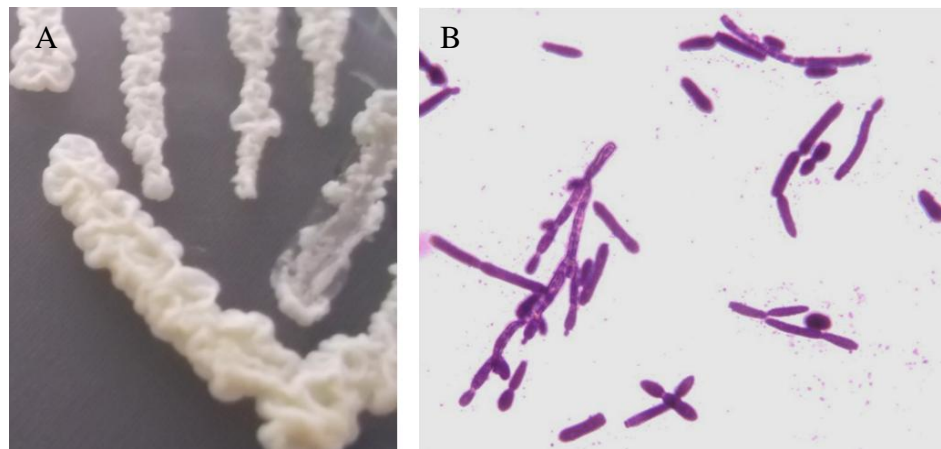


Figura 10. A) Morfología macroscópica de *Y. lipolytica* crecida en medio mínimo YNB. B) Morfología microscópica bajo un aumento 100X donde se observa una morfología aparente de crecimiento micelial.

8.2 Caracterización molecular de *Bacillus thuringiensis*

Debido a que la secuencia codificante de los genes *cry* se encuentran principalmente en los plásmidos, la extracción se realizó de acuerdo a lo señalado en materiales y métodos, obteniendo ADN de calidad y cantidad, el cual constituyó el molde para las diversas reacciones de amplificación (Figura 11).

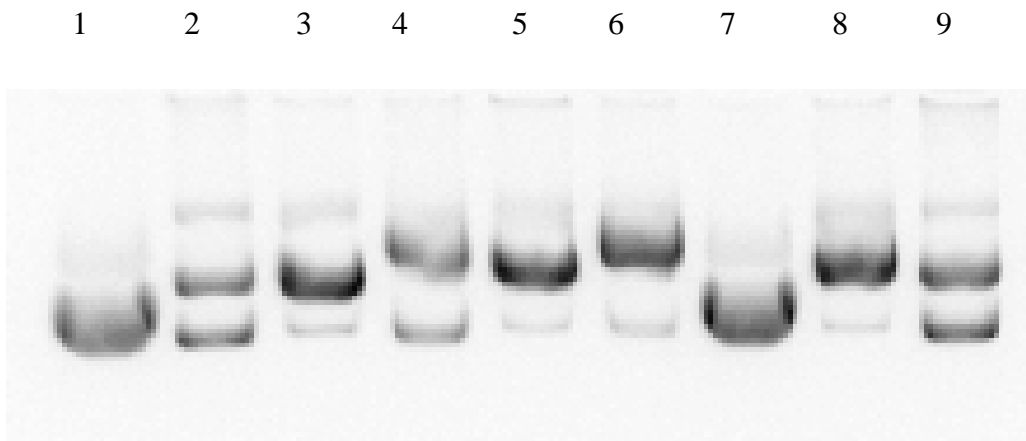


Figura 11. Perfil plasmídico de las diferentes cepas de Bt utilizadas, el corrimiento se realizó en agarosa al 0.8 %, las muestras han sido depositadas en el siguiente orden. Carril 1) GM7, 2) GM10, 3) HD27, 4) HD29, 5) HD133, 6) HD277, 7) HD551, 8) Dipel, 9) Thuricide.

A partir del ADN plasmídico de las cepas de Bt anteriormente descritas en la sección de materiales y metodos, se realizaron diversas amplificaciones con oligonucleotidos tanto generales como específicos para determinar el contenido de genes del tipo *cryI* en cada cepa, estos datos se encuentran condensados en el Cuadro 11. Aquí se observa que en todas las cepas, se logra la detección de al menos un gen *cryI* y en consecuencia, con los oligonucleótidos generales debería de ser positiva la reacción. Sin embargo destaca la cepa HD27 en la cual la reacción fue negativa.

Cuadro 11. Amplificaciones de los diferentes genes *cry* mediante PCR en las cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genes				
	CryI general	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1F
GM7	Si	No	No	No	No
GM10	Si	No	No	Si	No
HD27	No	No	No	Si	No
HD29	Si	No	No	No	Si
HD133	Si	No	No	No	Si
HD273	Si	No	No	No	No
HD551	Si	No	Si	Si	No
Dipel	Si	No	No	Si	Si
Thuricide	Si	No	No	Si	No

Una vez realizada la caracterización de las cepas, se diseñaron los oligonucleótidos que amplifican el ORF del gen *cryI*, esto mediante un alineamiento múltiple de diferentes secuencias descargadas del Gene Bank. En la Figura 12 se muestra el alineamiento múltiple en el programa U Gene, en el cual se diseñó el oligonucleótido ATG, así como el oligonucleótido denominado STOP. Las flechas negras indican los nucleótidos tomados para la síntesis de estos oligonucleótidos. Ambos corresponden al inicio y el final del gen *cryI* respectivamente.



Figura 12. Alineamiento múltiple de la secuencia de genes *cryI*, la flecha indica la zona seleccionada para el diseño del oligonucleótido.

Cada una de las cepas referenciadas en materiales y métodos, se le realizó la amplificación para generar el marco de lectura abierto (ORF) completo, y el resultado, indica una amplificación positiva prácticamente en todas las muestras a excepción de la cepa HD27. El fragmento amplificado fue de una talla aparentemente constante de aproximadamente 3.5 Kb (Figura 13).

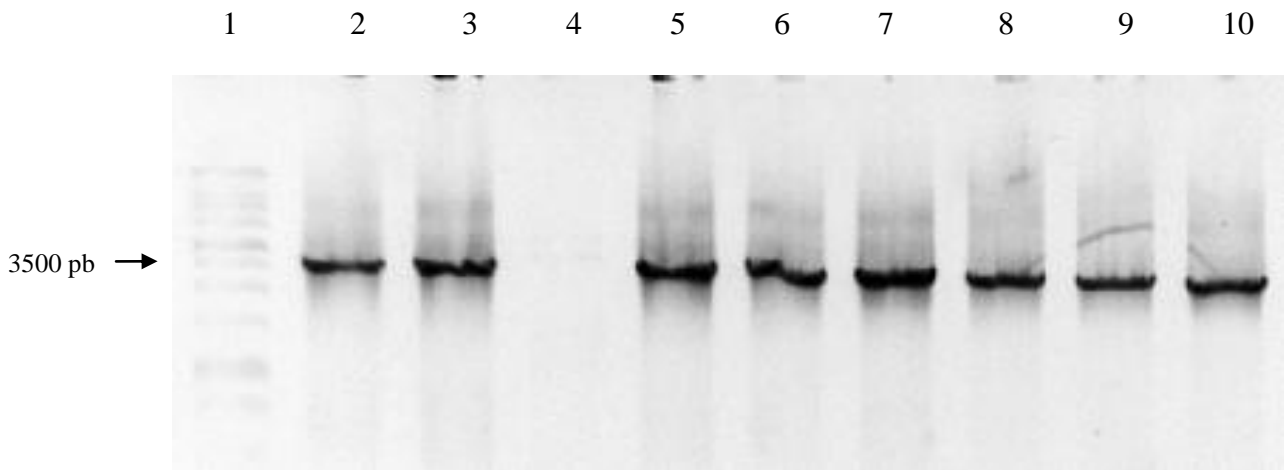


Figura 13. Amplificación del ORF *cryI* en las diferentes cepas utilizadas en este trabajo, se observa una banda única de aproximadamente 3500 pb en gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1) Marcador de peso molecular 1 Kb Promega® 2) cepa GM7 3) GM10 4) HD27 5) HD29 6) HD133 7) HD273 8) HD551 9) Dipel® 10) Thuricide®.

8.3 Confirmación del gen *cry* por Secuenciación

A partir del ADN plasmídico de las clonas recombinantes *cry*, la reacción de secuenciación con un juego de oligonucleótidos ver Cuadro 6, el cual dio como resultado la secuencia del gene clonado. Estos valores obtenidos confirman que dicha amplificación se trata de un gen del tipo *cryIAc*, el cual es proveniente de la cepa GM7. En el Cuadro 12 se muestra los cinco primeros valores arrojados en el análisis tipo Blastn, este segmento consta de 3 546 pb desde al codón ATG hasta el codón STOP.

Cuadro 12. Análisis tipo Blastn del gen *cryI* amplificado mediante PCR de la cepa GM7

Accesión	Descripción	Resultado máximo	Resultado Total	Cobertura	Valor E	Identidad máxima
<u>AJ130970.1</u>	Gene codificante proteína cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6510	6510	99%	0.0	99%
<u>AY925090.2</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar kenya cepa HD-549 <i>CryIAc</i>	6501	6501	99%	0.0	99 %
<u>M73248.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> gene <i>cryIA(c)</i>	6501	6501	99%	0.0	99 %
<u>HM061081.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ZQ-89 proteína cristal insecticida, gene <i>CryIAc</i>	6945	6945	99%	0.0	99 %
<u>DQ285666.1</u>	<i>Bacillus thuringiensis</i> delta-endotoxina gene (<i>cryIAc</i>)	6484	6484	99%	0.0	99 %

Para realizar la amplificación de la toxina, únicamente la cepa comercial Thuricide® se utilizó como templado para la amplificación, debido a que ya se ha reportado la toxicidad de esta cepa. El producto de amplificación resultante fue de aproximadamente 1700 pb. En este caso, al emplear las condiciones descritas en materiales y métodos, la amplificación no fue clara por lo que fue necesario estandarizar las condiciones de amplificación específicas. En ellos se probaron diferentes temperaturas de alineamiento donde 60 °C muestra ser la temperatura óptima. Esta amplificación se muestra en la Figura 14.

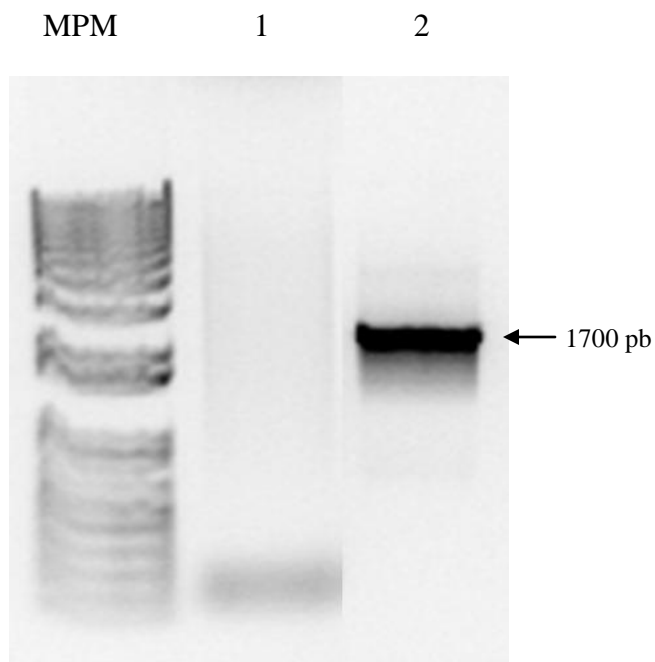


Figura 14. Temperaturas de alineamiento para la amplificación de la toxina *cry*, en gel de agarosa al 0.8%, usando como molde ADN plasmídico del producto comercial Thuricide®. MPM) Marcador de peso molecular 1Kb Promega® 2) Temperatura de alineamiento con 63 °C 3) Amplificación con temperatura de alineamiento a 60 °C, siendo esta última la temperatura óptima de amplificación, ya que no presenta bandas inespecíficas y corresponde al tamaño esperado.

8.4 Clonación de los insertos del gen *cry*

Cada uno de los fragmentos amplificados se ligó al vector de clonación disponible (pGEM®-T Easy, Topo 2.1, pDrive), obteniendo transformantes con insertos provenientes de las cepas GM7, H29, HD133, HD277, Dipel® y Thuricide®.

De cada transformación se seleccionaron 10 clonas, las cuales dieron un resultado positivo en la PCR en colonia diagnóstico, utilizando los oligonucleótidos que amplifican el gen *cryI* generales; sin embargo al poner a crecer las clonas correspondientes a la cepa HD133 en caldo LB con antibiótico para su posterior extracción de ADN plasmídico, no se observó turbidez lo que indicaba que no había crecimiento bacteriano, por lo tanto fue descartada del presente trabajo; así como las otras cepas en las cuales no se obtuvieron transformantes. Al final, la obtención del ADN plasmídico de las clonas recombinantes, se llevó a cabo con 10 clonas de la

cepa GM7, 10 clonas cepa HD29, 5 clonas cepa HD277, 10 clonas de cepa Dipel®, 10 clonas cepa Thuricide® ORF, y finalmente 10 clonas de Thuricide® toxina.

Por conveniencia, se decidió tomar únicamente un plásmido de clonación recombinante que contuviera el ORF cry, este inserto es proveniente de la cepa GM7 y fue denominado pC-ORFcry1, en tanto el plasmido de clonación recombinante con la toxina fue nombrado como pC-Tox1, siendo la toxina clonada la amplificación proveniente de la cepa Thuricide®.

8.5. Subclonación del gen *cryI* en el vector de expresión

Posterior a la extracción del ADN plasmídico, de estas clonas recombinantes las cuales contenían los plásmidos pC-Tox1 y pC-ORFcry1. Se llevó a cabo la digestión con la endonucleasa *PmlI*, para liberar el inserto correspondiente a la toxina del plásmido pC-Tox1 el cual consta de 5 609 pb., correspondiendo a 3850 pb del vector de clonación pDrive, así como un fragmento de 1 759 pb afin al inserto de la toxina (Figura 15). Además en la Figura 16, se muestra la digestión entre el vector pC-ORFcry1 (6 659 pb), dando lugar a dos fragmentos, siendo el vector de clonación pGEM T-Easy (3 015 pb) y el ORFcry (3 546 pb). Observándose en ambos casos una digestión exitosa.

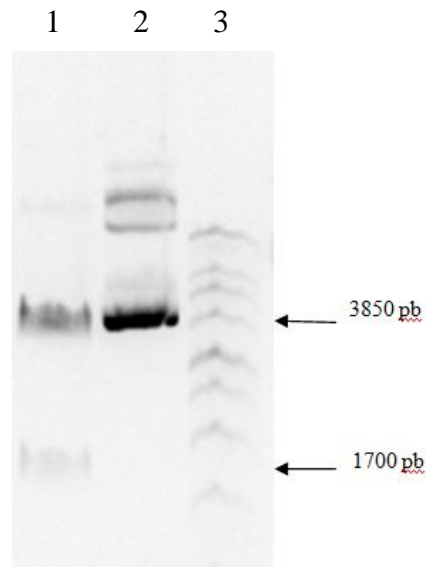


Figura 15. Digestión de la clona pC-Tox1 con la endonucleasa *PmlI*. Donde se muestra en el carril 1) Digestión de la clona recombinante, liberando el inserto de 1.7 pb. Así como el vector pDrive de 3.85 pb, y en el carril 2) muestra la clona recombinante sin ser sometida a digestión, carril 3) Marcador de peso molecular 1 Kb.

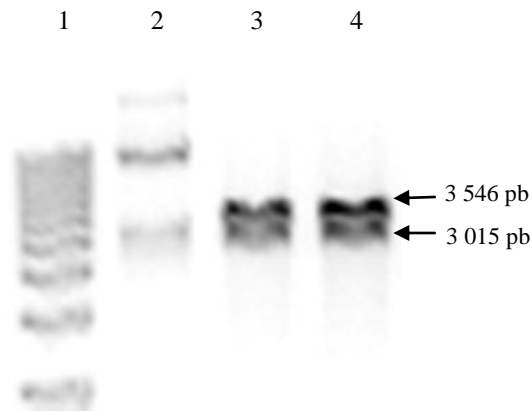


Figura 16. Digestión del plásmido recombinante pC-ORFcry1, digeridas con la enzima *PmlI*, en el carril 1 se encuentra depositado el marcador de peso molecular 1 Kb Promega®. El carril 2 representa el ADNp sin ser sometido a algún tratamiento de digestión y los carriles 3 y 4 corresponden a la digestión del plásmido pC-ORFcry1 con la endonucleasa *PmlI*.

8.6 Preparación de los vectores de expresión

Los vectores de expresión aquí empleados pRRQ1 así como pYLEXI® se sometieron a una digestión con la enzima *PmlI*, obteniendo la linealización del vector pYLEX a las 5 horas en termociclador [Figura 17 (A)], mientras que el vector pRRQ1 no se alcanzaba su completa digestión independientemente del tiempo sometido a digestión, este período de incubación varió entre 2 a 16 horas en incubadora [Figura 17 (B)]. Esta digestión tuvo como resultado facilitar la subclonación, linealizando el vector y posteriormente ligarlo al inserto cry (ORF o toxina), sin embargo en el caso del plásmido pRRQ1 dicha reacción solo se produjo de manera parcial; obteniéndose como fondo una forma sin cortar del plásmido.

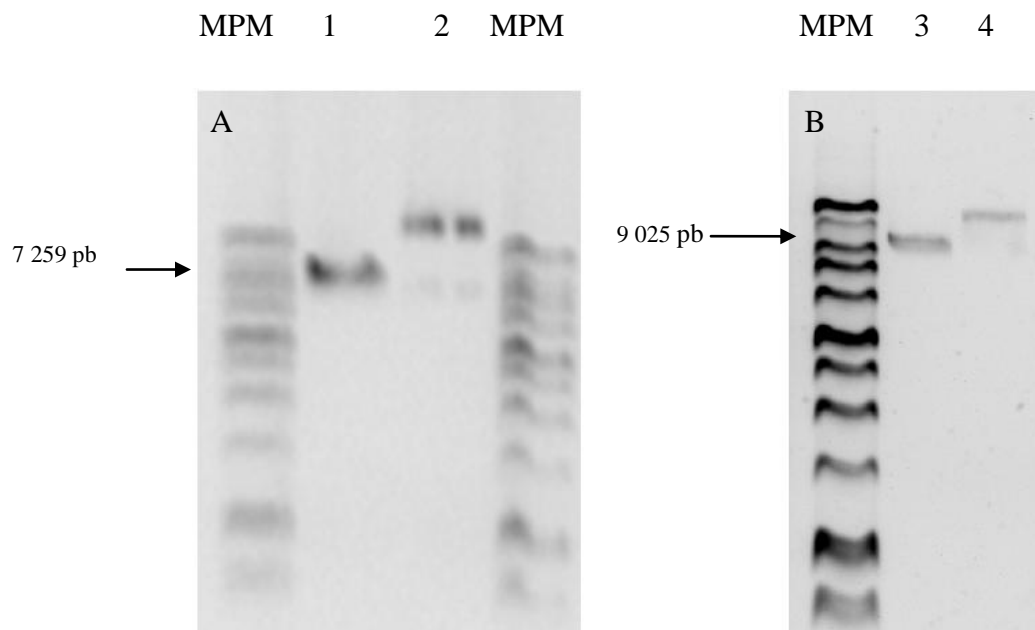


Figura 17. (A) Digestión del plásmido de expresión integrativo (pYLEXI) con la enzima *PmlI* en un periodo de 5 horas a 37 °C, carril 1) Plasmido pYLEXI linearizado y en el carril 2 se muestra el plásmido pYLEX sin ser sometido a algún proceso de digestión como control, teniendo como marcador de referencia 1 kb de Promega®.

Figura 17. (B) Carril 3) Digestión del plásmido de expresión replicativo (pRRQ1) con la enzima *PmlI* durante 13 horas a 37 °C. el carril 4 muestra el vector pRRQ1 sin someterse a algún corte con la enzima.

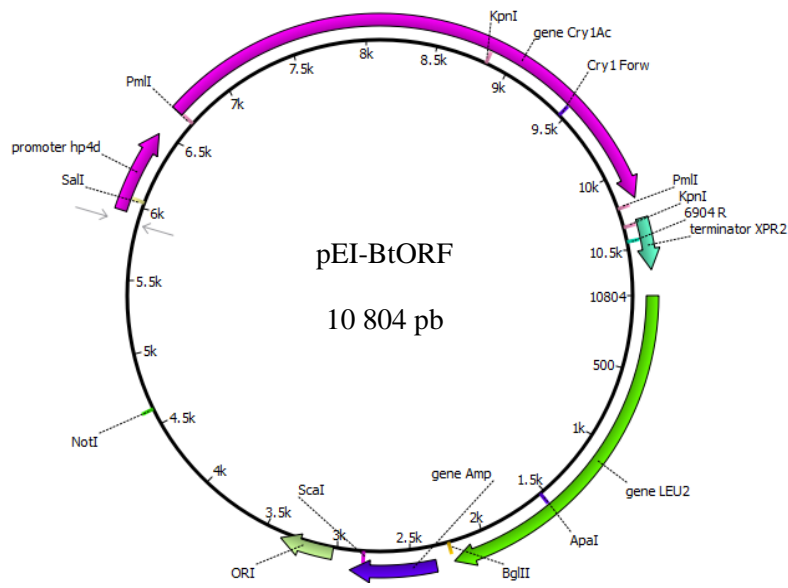
Los segmentos lineales, tanto de vector como de inserto, se recuperaron a través de gel y posteriormente se realizó una transformación para valorar el fondo de cada uno, antes de realizar la ligación.

8.7 Plásmidos recombinantes obtenidos en este trabajo

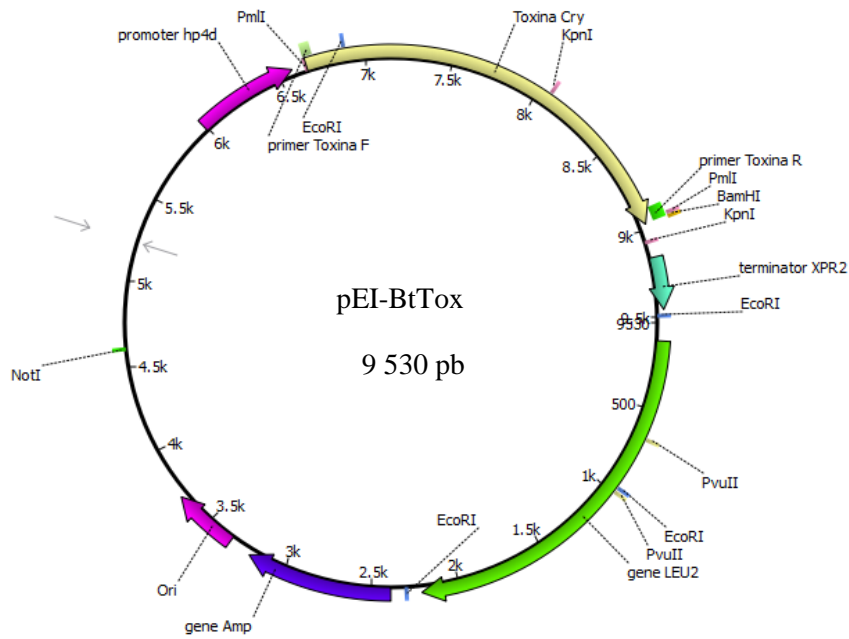
Finalmente en las clonaciones se obtuvieron plásmidos recombinantes con el ORF *cry* y la toxina en plásmidos de clonación, así como en los plásmidos de expresión (pRRQ1 y pYLEXI). En el Cuadro 13 se señala cada uno de los plásmidos recombinantes obtenidos.

Cuadro 13. Construcciones recombinantes desarrolladas en este trabajo.

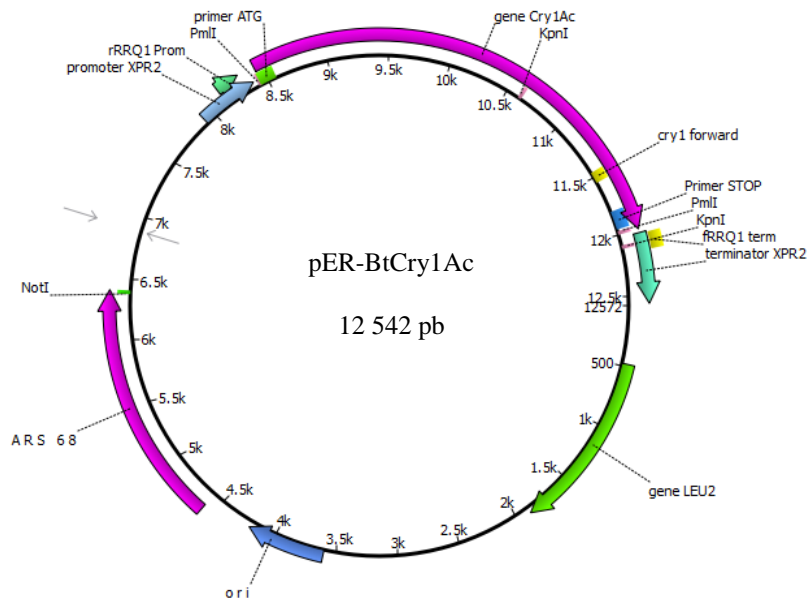
Esquema de plásmidos recombinantes	Descripción
<p data-bbox="444 554 599 663">pC-ORFcry1 (6 561 pb)</p>	<p data-bbox="1094 495 1398 583">Plásmido de Clonación recombinante</p> <p data-bbox="1094 653 1398 684">pC-ORFcry1 (6 561 pb)</p> <p data-bbox="1151 758 1341 793">Amp^r, Cry1Ac</p>
<p data-bbox="558 1318 656 1415">pC-Tox1 5 609 pb</p>	<p data-bbox="1094 1283 1398 1371">Plásmido de Clonación recombinante</p> <p data-bbox="1094 1440 1398 1472">pC-Tox1 (5 609 pb)</p> <p data-bbox="1094 1545 1398 1581">Amp^r, Kan^r, Toxina cry1</p>



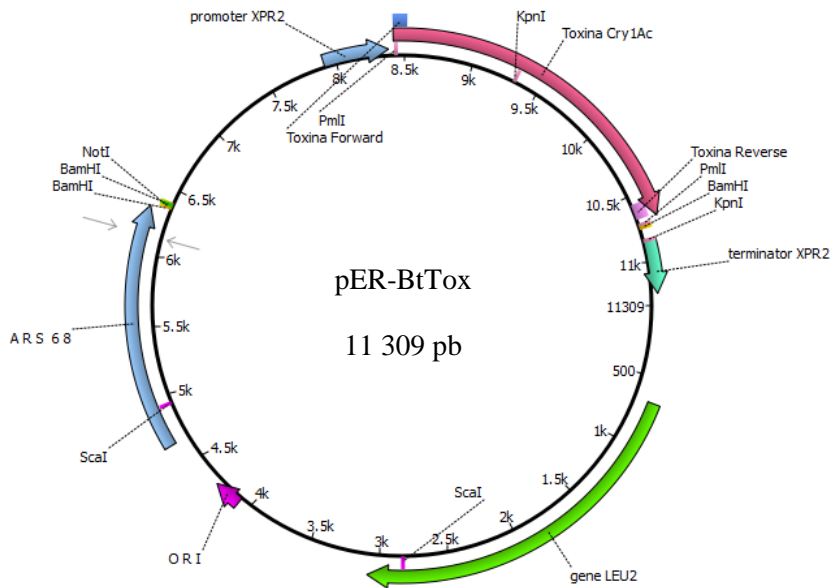
Plásmido de expresión
integrativo
pEI-BtORF (10 804 pb)
LEU2, *Amp^r*, *Cry1Ac*



Plásmido de expresión
integrativo
pEI-BtTox (9 530 pb)
LEU2, *Amp^r*, Toxina cry



Plásmido de expresión
 replicativo
 pER-BtCry1Ac (12 542 pb)
LEU2, Amp^r, *Cry1Ac*



Plásmido de expresión
 replicativo
 pER-BtTox (11 309 pb)
LEU2, Amp^r, Toxina cry

8.8. Análisis de las clonas recombinantes en los plásmidos de expresión

En la transformación de la levadura mediante el protocolo de Acetato de Litio se obtuvieron 18×10^3 transformantes en el caso de la transformación con el vector replicativo, mientras que con el vector integrativo resultaron 3×10^1 transformantes.

Al igual que las clonas recombinantes de *E. coli*, las clonas recombinantes de *Y. lipolytica*, fueron analizadas por medio de PCR en colonia.

En el caso de las clonas donde se integraron los plásmidos pEI-BtTox y pER-BtTox, el diagnóstico se realizó con los oligonucleótidos que amplifican la toxina, Ver cuadro 6, donde se observa una amplificación evidente en todas las clonas, con una banda única de 1700 pb (Figura 18), evidenciando la inserción de la parte toxica en las clonas de *Y. lipolytica*.

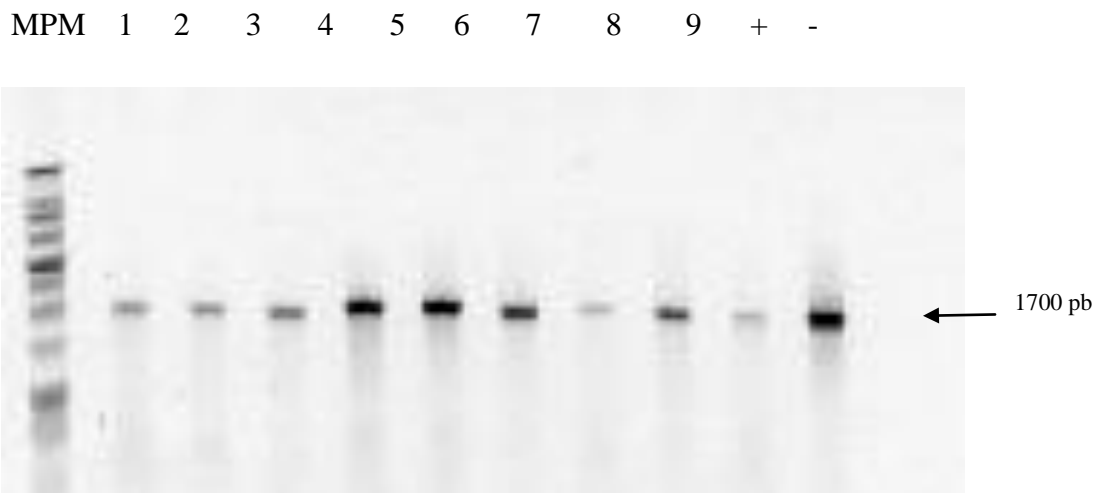


Figura 18. PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos que amplifican la toxina cry, donde se muestra en todos los carriles una señal positiva de amplificación siendo el carril 10 y 11 los controles en la reacción de amplificación positivo (+) y negativo (-). Teniendo como marcador de peso molecular 1 Kb Promega®.

Para el diagnóstico de las transformantes obtenidas con el vector pEI-BtORF, se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican el gen *cryI* general como diagnóstico, en dicha amplificación se obtuvo una banda única y del tamaño esperado (277 pb) (Figura 19).

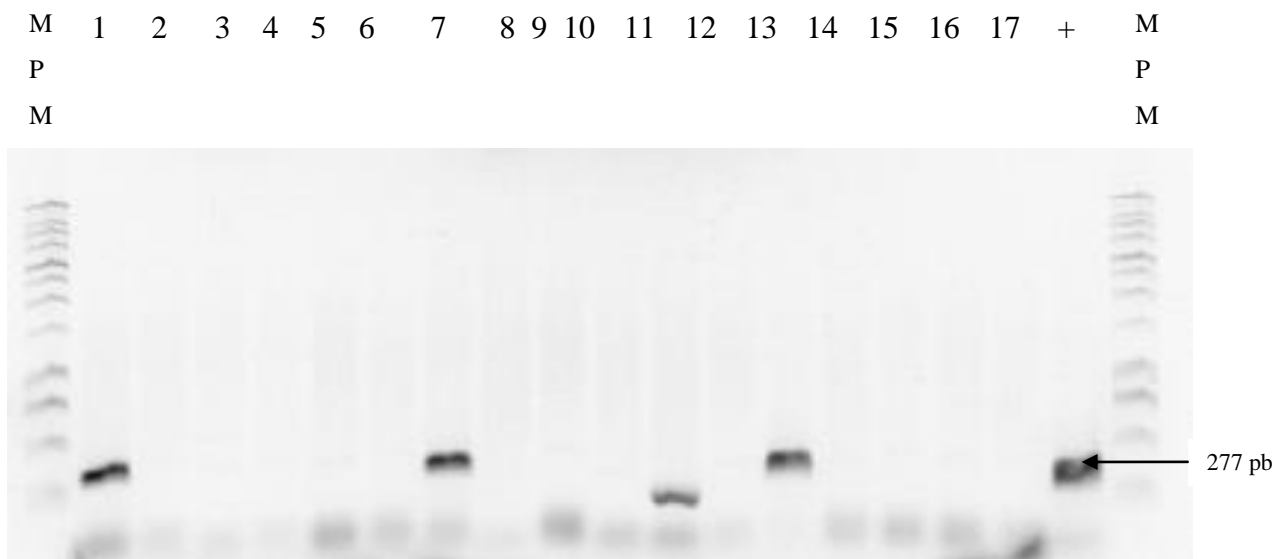


Figura 19. PCR en colonia para el diagnóstico a las transformantes con el plásmido de expresión pEI-BtORF, utilizando los oligonucleótidos *cry1* generales. En los carriles 1, 7, 11, 13 se observa una señal de amplificación de tamaño esperado 277 pb, el cual corresponde en tamaño a la banda de amplificación del control positivo (+) y teniendo como referencia de peso el marcador 1 kb.

El diagnóstico con las transformantes obtenidas con el plásmido pER-BtCry1Ac, se emplearon los oligonucleótidos ORF *cry* (Figura 20), en estas clonas el análisis no pudo ser realizado con los oligonucleótidos *cry1* generales, ya que estos últimos tienen cierta homología con el plásmido de expresión pRRQ1, observándose una amplificación de aproximadamente 300 pb en clonas que no contenían el inserto *cry*, por lo tanto en el caso de esta construcción el diagnóstico se hizo por medio de los oligonucleótidos ATG y STOP.

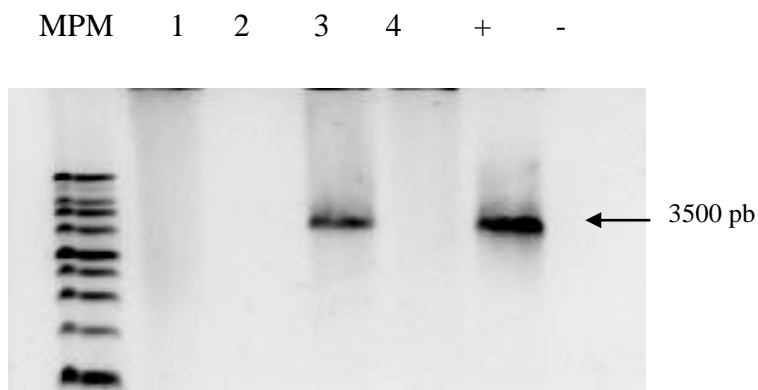


Figura 20. Diagnóstico en transformantes con el plásmido pER-BtCry1Ac utilizando los oligonucleótidos ATG-STOP, donde se observa en el carril 3 la amplificación del tamaño esperado, y los controles de la reacción positivos (+) y negativo (-).

8.9 Verificación de la orientación del inserto

La verificación de la orientación de los plásmidos recombinantes integrativos (pEI-BtTox y pEI-BtORF) se realizó por medio de secuenciación con el oligonucleótido 6904 R (Ver cuadro 6). Obteniéndose en cada caso 2 clonas de *Y. lipolytica* con la orientación correcta. Denominándolas Po1gTox1(I) las que contenían la toxina, y dos clonas con el vector pEI-BtORF, dichas transformantes se nombraron Po1gBtORF(I).

En el caso de la clona obtenida con el plásmido de expresión pER-BtCry1Ac, la orientación se determinó por medio de una reacción de PCR con el oligonucleótido cry1 general sentido y los oligonucleótidos rRRQ1 Prom y fRRQ1 Term. (Cuadro 6), en la siguiente imagen (Figura 21) se evidencia la conjugación de los oligonucleótidos cry1 general sentido con el oligonucleótido rRRQ1 Prom. (carril 1), aquí únicamente se observa un fondo correspondiente al ADN plasmídico, en tanto la mezcla con los oligonucleótidos cry1 general sentido y el oligonucleótido fRRQ1 Term (carril 2), claramente se evidencia una amplificación de aproximadamente 400 pb.

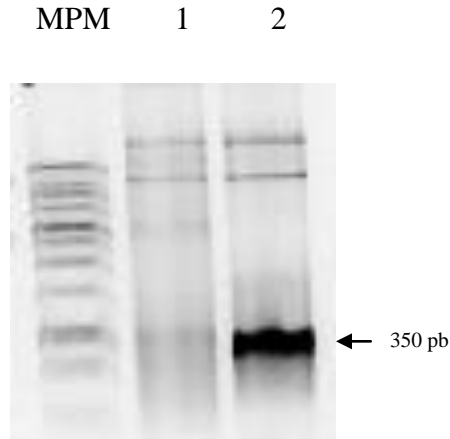


Figura 21. Amplificación con oligonucleótidos 1) cry1 general forward y r-RRQ1 prom. 2) cry1 general forward con f-RRQ1 term., donde se observa una evidente amplificación, teniendo como marcador 1 Kb de referencia (Promega).

Posteriormente, la determinación de la orientación del inserto en el caso de las clonas recombinantes del plásmido pER-BtCry1Ac se realizó por medio de una reacción de PCR con los oligonucleótidos toxina forward en ambos casos, y cambiando los oligonucleótidos rRRQ1 prom. y fRRQ1 term., donde las clonas que estuviesen en la orientación correcta tendrían un producto de amplificación. En la Figura 22 se muestra la amplificación, usando el juego de oligonucleótidos, se muestra que las clonas 1 y 2, tienen el inserto en el sentido no deseado, mientras que la clona numero 3 tiene el inserto en la orientación correcta.

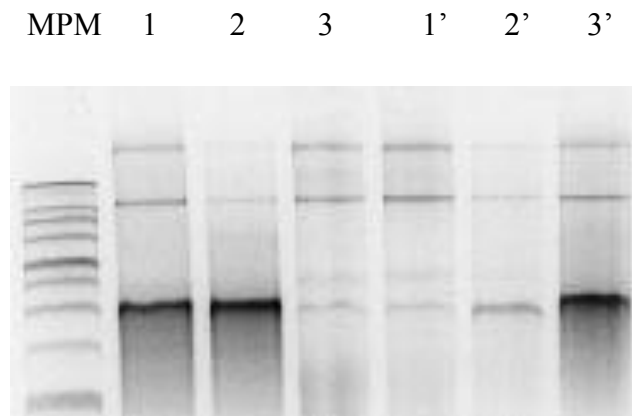


Figura 22. Reacción de PCR amplificando 3 clonas positivas con el vector de expresión pER-BtTox, para la determinación de la orientación del inserto, en los primeros 3 carriles se muestra las clonas con el mix de oligonucleótidos toxina forward y rRRQ1 prom., mientras que los siguientes carriles muestran las mismas clonas

con el mix de oligonucleótidos toxina forward y fRRQ1 term. Teniendo en marcador de peso molecular 1 Kb de referencia.

8.10 Análisis de la expresión en Gel SDS-PAGE

La extracción de las proteínas totales de las clonas recombinantes, (Po1gTox (I), Po1gBtORF(I), Po1gBtCry1Ac(R) y Po1gBtTox1(R), así como de la cepa Polg, se corrieron en un gel SDS-PAGE, el cual se muestra el patrón proteico en la Figura 23, y se muestra con una flecha roja el tamaño esperado del la proteína completa ORF cry, y con flecha negra se señala el tamaño en que se esperaba la toxina; sin embargo bajo estas condiciones, no se observa un patrón evidente de expresión debido a la actividad del gen heterólogo, por lo que se propuso hacer una determinación inmunológica.

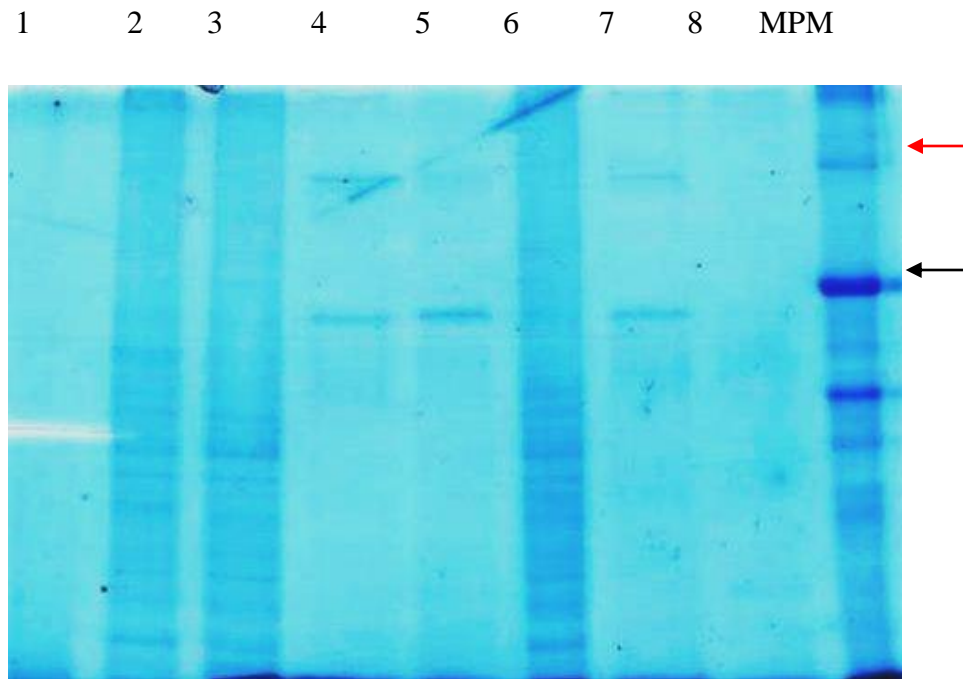


Figura 23. Gel SDS-PAGE de las proteínas totales de las clonas recombinantes; carril 1. Cepa Po1g, carriles 2 y 3 Po1gBtTox1(R), carril 4 clona Po1gBtCry1Ac(R) Carriles 5 y 6 Transformantes Po1gBtTox1(I) y carril 7 y 8 Po1gBtORF(I). Teniendo como marcador de peso molecular Prestained Protein Broad Range, Biolabs®.

8.11 Detección de proteína Cry1 en *Yarrowia lipolytica*

La prueba QuickComb™ realizada tiene 3 posibles lecturas del resultado, la aparición de una banda superior señala que la tira reactiva es útil pero es una reacción negativa a la detección de la proteína, dos bandas es el resultado de la detección de la proteína, es decir es positiva; ninguna banda, la tira reactiva no es funcional, por lo que la reacción se invalida. El resultado de las 8 reacciones de las transformantes, se observó la aparición de 2 bandas, las cuales son evidentes, como un control positivo a la reacción, se utilizó el lisado proteico de la cepa de Bt Dipel, bien caracterizada y que contiene un gen *cry1* y produce cristales bipiramidales, esta arrojó el resultado positivo al mostrar las 2 bandas típicas de la reacción, mientras que en la cepa Po1g (cepa parental), se muestra únicamente la banda superior, considerada como una reacción negativa (Figura 24).

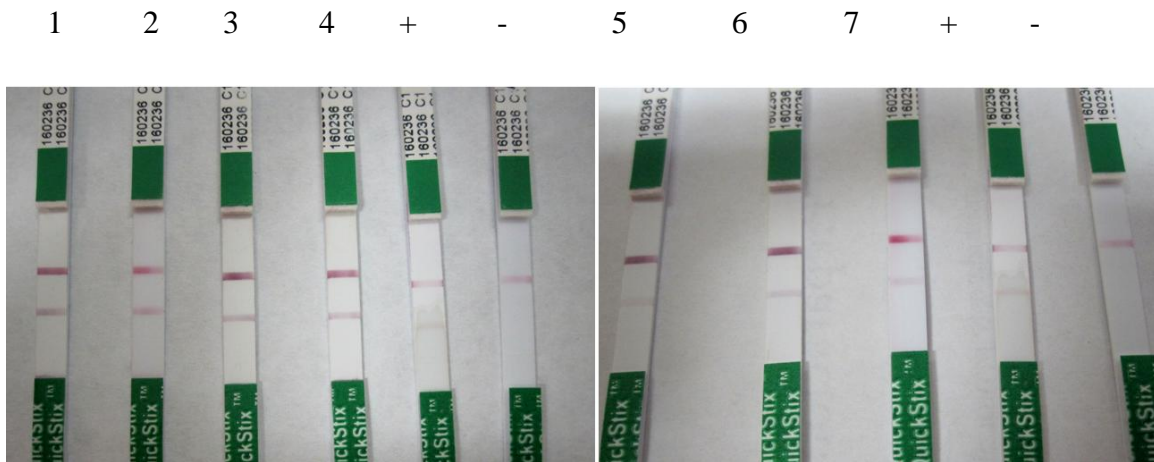


Figura 24. Tiras reactivas a la proteína Cry1 en *Y. lipolytica* en el siguiente orden: tiras 1 y 2 corresponden a las transformantes Po1gTox1(I), 3 y 4 Po1gBtORF(I), en tanto la tira 5 representa las proteínas de la clona Po1gBtCry1Ac(R), mientras que las tiras 6 y 7 corresponden a Po1gBtTox1(R). Teniendo en como controles de reacción la tira positiva correspondiente a la cepa Dipel® de Bt, además teniendo como control negativo la cepa silvestres Po1g de la levadura *Y. lipolytica*.

Para verificar le especificidad de las ritas reactivas hacia la proteína Cry1Ac, se tomaron como contro, negativo las tiras reactivas hacia la proteína Cry9, obteniendo en todos los casos una reacción negativa, corroborando que estas tiras únicamente reaccionan hacia la proteína del tipo Cry1Ac (Figura 25).

1 2 3



Figura 25. Tiras reactivas a la proteína Cry9, donde se muestra una banda única, demostrando la nula detección de esta proteína, siendo la tira 1. La muestra correspondiente a la cepa nativa de *Y. lipolytica*. Tira 2. Transformante Po1gBtCry1A(R), tira 3. Transformante Po1gTox1(I).

9. DISCUSIÓN

Bt se caracteriza por ser una bacteria ubicua, con una gama amplia de contenido en genes *cry*, de los cuales, destacan los de la familia *cryI* debido a su abundancia en las cepas nativas. Diferentes cepas aisladas muestran que todas tienen por lo menos un gen del tipo *cryI* (Ramírez *et al.*, 2010). El amplio rango de insectos plaga lepidópteros los cuales son susceptibles a estos genes, representan aproximadamente el 70% de los insectos plaga de interés agrícola, por lo que la relevancia a proponer formulaciones basados en derivados de los genes *cryI* son atractivos para aplicaciones biotecnológicas.

En este estudio se trabajo con 9 diferentes cepas de Bt, las cuales fueron seleccionadas con base a reportes que indican que son toxicas contra insectos del orden lepidóptera (Tamez *et al.*, 2005). Durante la caracterización de estas cepas, se realizó la observación de la morfología tanto macroscópica como microscópica. La morfología macroscópica de las nueve cepas en estudio presentaron la forma típica de Bt (Cabreras, 2009); únicamente en 7 de ellas se observó la formación de cristales bipiramidales mediante microscopía de contraste, este tipo de morfología está íntimamente relacionada con la presencia de genes del tipo *cryI* (Baró *et al.*, 2009), por lo que su selección perfilaba a que ellas contienen algún gen de este tipo. Las cepas HD133 y HD551 en las cuales no fue posible observar el cuerpo paraesporal, pudo deberse a que estas cepas se transformaran acristalíferas. De la Torre y Fabrer en 1997 mencionan que la aparición de cepas acristalíferas se relaciona cuando el cultivo de Bt se desarrolla a temperaturas por arriba de los 30 °C, o bien, cuando el cultivo ha sido frecuentemente sembrado; dichas acciones provocan que la cepa pierda los plásmidos en los cuales se codifican las proteínas y la acumulación de estas formen los cristales.

A estas 9 cepas se les realizó la caracterización molecular con los oligonucleótidos descritos en la sección de materiales y métodos. El resultado señaló que 8 de las 9 cepas dieron positivo a la reacción de amplificación con los oligonucleótidos *cryI* generales, este resultado confirma que las cepas que contienen genes de la familia *cryI* son abundantes, en las cepas nativas que hasta ahora han sido analizadas. En México, las diferentes cepas aisladas hasta ahora, muestran que todas tienen por lo menos un gen del tipo *cryI* (Bravo *et al.*, 1998). En este análisis, se destaca la cepa HD27 en la cual, específicamente la amplificación por los oligonucleótidos generales *cryI* fue negativa, mientras que la amplificación con los oligonucleótidos *cryI*Ac en esta misma cepa

fue positiva. Dicho resultado podría deberse a algún problema en la reacción de PCR, debido a que una señal positiva con los oligonucleótidos *cryIAc*, necesariamente debe de ser positiva a la reacción general.

En el análisis con los oligonucleótidos específicos se observa también que, en el 33% de las cepas, el gen *cryIAc* fue el más representado, se conoce a la fecha que esta proteína es específica hacia el control de insectos del orden lepidóptera (Sanahuja *et al.*, 2011); además, se puede observar que en algunas de estas cepas se logró la identificación de más de un gen *cryI*, propiedad descrita por Rosales-Reyes *et al.*, 2003, quienes señalan que dentro de una misma cepa pueden existir más de dos genes *cry*, inclusive de la misma familia. Esta frecuencia se había predicho en el registro de la morfología microscópica, debido a que prácticamente en los casos en donde se observa la presencia de cuerpos cristalinos, estos mostraron una forma bipiramidal, que como se discutió anteriormente, es el resultado de la actividad transcripcional de al menos un gen *cryI*.

Los genes *cry* son secuencias conservadas, en estudios anteriores como los de Rukmini *et al.*, 2000 señala que los genes *cryIAa*, *cryIAb* y *cryIAc* muestran más del 80% de similitud a nivel de residuos aminoacídicos, en este estudio se realizó un alineamiento múltiple de los genes completos que a esta fecha (2011) habían sido reportados, corroborando que efectivamente la similitud anteriormente descrita se cumple. Sin embargo es a un nivel del 95 al 91% hacia la región amino terminal y del 68 % hacia la región carboxilo terminal, dato que a la fecha no había sido reportado.

Con los oligonucleótidos diseñados ATG y STOP se generó un producto de amplificación de un tamaño de aproximada a 3500 pb, este tamaño fue homogéneo en todos los casos positivos a la reacción; Sauka, *et al* (2007) reportan que el tamaño de los genes *cryI* es de 3489 pb para caso del gen *cryIAa*, de 3465 pb para el gen *cryIAb*, y de 3492 pb para el gen *cryIAc* y debido a que este rango es tan estrecho, no era aun posible determinar el tipo de gen *cryI* específico estudiado, sin embargo por el tamaño se perfilaba a ser un gen *cryIA*. Para identificar dicho gen fue necesario llevar a cabo la secuenciación del segmento.

El análisis de la secuencia del gen seleccionado identificó al gen *cryIAc*. Este es uno de los genes más representativos y ampliamente explotados en cuanto a expresión heteróloga se

refiere, se ha expresado en nogal (Dandekar *et al.*, 1998), arroz (Tu *et al.*, 2000), pino (Grace *et al.*, 2005) y *Pseudomonas flourecens* (Peng *et al.*, 2003) entre otros, en cada uno de los casos en los que ha sido expresado, su explotación siempre ha sido exitosa. Y ahora en este trabajo se describe la expresión de esta proteína en la levadura no convencional *Y. lipolytica*.

La estrategia planteada en el presente estudio fue inicialmente el experimento considerando la clonación del ORF completo del gen *cryI*, ya que se ha propuesto que la integración del transgen maduro podría tener acción contra insectos no blanco debido a que pierde la especificidad como lo ha reportado Jabeen *et al.*, 2010, sin embargo en la mayor parte de los cultivos transgénicos, únicamente se ha integrado la toxina, por lo que también se decidió expresar este fragmento como estrategia alterna. Para la amplificación de la región toxica únicamente se tomo como molde el producto comercial Thuricide®, un producto el cual está basado a partir de la cepa Bt var. *kurstaki*, la cual se conoce que presenta una toxicidad alta hacia insectos del orden lepidóptera (Ruiz y Montiel, 2005). Un dato adicional a la estrategia aquí planteada consiste en utilizar a la levadura como el agente transportador de la proteína. Se conoce actualmente que la proteína insecticida debe de protegerse de las condiciones ambientales como es la luz ultravioleta o la misma desecación. Por tanto, producirla dentro de la levadura en la forma inmadura se protegería de estos factores medio ambientales y tener el mismo comportamiento que la proteína nativa.

La expresión heteróloga de las proteínas Cry en otros sistemas han sufrido modificaciones en el contenido de GC para ofrecer una mayor estabilidad de la misma (Maagd *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2003), sin embargo en este trabajo no se llevó a cabo ningún tipo de modificación, debido a que en principio no existe algún reporte sobre la expresión de esta proteína en *Y. lipolytica*, además que, al analizar la secuencia se pudo observar que el gen clonado posee un alto contenido de GC (47 %) en comparación de la mayor parte de los genes *cry* reportados, donde este valor se presenta alrededor del 30 al 40% en contenido GC. Además, las diferentes proteínas expresadas en *Y. lipolytica*, hasta ahora, en ningún caso se les ha modificado la vía de uso de codones, evidentemente este trabajo representa la primera aproximación referente a este tópico.

Se utilizaron dos fuentes de vector de expresión, uno de ellos disponible de manera comercial. Esto nos permitió tener dos estrategias de expresión, una integrativa y otra replicativa. El mayor

porcentaje de proteínas han sido expresadas en los vectores de tipo integrativos, este tipo de vectores garantizan que en cada división celular en cada genoma exista una copia del gen de interés, por otro lado, se ha demostrado que si la integración ocurre en el promotor XPR2 en *Y. lipolytica* se pueden tener de 3 a 19 copias por célula (Juretzek *et al.*, 2000). Ejemplos de proteínas expresadas bajo este esquema son: hINF alpha 2b (Gasmi *et al.*, 2011) Laccasa III (Jolivat *et al.*, 2004), alpha amilasa (Park *et al.*, 1998). En tanto que la expresión de proteínas con vectores replicativos se ha reportado que pueden existir de 1 a 3 copias por célula. Ejemplos de expresión de proteínas bajo este modelo son: la Recombinasa Cre del fago P1 (Rosas y Gaillardin en 2011), la Higromicina B (Cordero Otero y Gaillardin, 1996), y el citocromo bovino p450 (Juretzek *et al.*, 1995). En cualquier caso, replicativo o integrativo, se tiene como resultado una sobreexpresión de la proteína de interés.

La fuerza de la expresión de las proteínas está garantizada por el tipo de promotor utilizado, en este caso, para ambos tipos de vector la expresión es dirigida de manera constitutiva y fuerte debido justamente al tipo de promotor empleado (Hp4d) el cual, es un promotor híbrido originario de un promotor inducible de la proteasa alcalina (XPR2). Madzak *et al.* (2000) describieron que el promotor Hp4d es constitutivo y dirige la expresión de manera fuerte. Existen varios ejemplos de proteínas expresadas bajo este tipo de promotor, y en todos ellos siempre ha sido una sobreexpresión. Entre ellas está la glucoamilasa (Sneween *et al.*, 2002), leucina aminopeptidasa (Nicaud *et al.*, 2002), citoquinina (Mazdak *et al.*, 2001), Alpha amilasa (Park *et al.*, 1997), interferon alfa bovino (Nicaud *et al.*, 1991), factor de crecimiento epidermal (Hamsa *et al.*, 1991).

En el presente estudio se utilizó como referencia de la expresión, las tiras reactivas Quick Comb de Envirologix®, las cuales detectan la presencia o ausencia de la proteína Cry1 específica por medio de anticuerpos, estas tiras son fáciles y rápidas de emplear, siendo este tipo de kits los empleados en la detección rápida de cultivos transgénicos a nivel cualitativo, el uso de estas tiras ha sido empleado por diversos grupos de investigación entre ellos, Saxena *et al.*, 2002, Darsi *et al.*, 2010 y Ho *et al.*, 2006, sin embargo este último grupo de trabajo también ha cuantificado la expresión mediante pruebas de tipo ELISA. Székacs *et al.*, 2010 señala que la cuantificación por medio de pruebas ELISA, demuestra si se tratase de una sobreexpresión de la proteína.

En este trabajo se evidencian las bondades que proporcionan las levaduras como un sistema para la expresión heteróloga de proteínas; como lo mencionan Celik y Calik en 2011, Demain y Vaishnav en 2009, Romanos *et al.*, 1992. La levadura *Y. lipolytica* muestra una facilidad de manipulación, el diagnóstico de las transformantes se facilita debido a que se pueden llevar a cabo por medio de PCR en colonia, su crecimiento en placa aun bajo condiciones de selección no es superior a tres días, lo que garantiza que en un muy corto tiempo, se obtengan el análisis de los resultados.

Algunas proteínas de Bt anteriormente ya han sido expresadas en levaduras tal es el caso de la proteína Cyt2AaI (Gurkan y Ellar, 2003), así como la proteína Cry2 en la levadura *Pichia pastoris* (Ogunjimi *et al.*, 2002), además de la proteína Cry11A en *Saccharomyces cerevisiae* (Quintana Castro *et al.*, 2005), todas estas, utilizadas para el control de mosquitos, debido a que estas, son proteínas específicas para este tipo de orden de insecto (Schnepf *et al.*, 1998); sin embargo, las proteínas específicas para el control de Lepidopteros (Cry1), no han sido ampliamente estudiadas en sistemas levaduriformes, salvo el caso específico de la proteína Cry1Aa que únicamente han sido expresada de manera heteróloga en *S. cerevisiae* (Watanabe *et al.*, 1996), y que similar a este caso de estudio, los autores no pudieron demostrar la expresión aun por medio de análisis de tipo Western blot, sino que la expresión quedó demostrada por medio de bioensayos en contra de *Plutella xylostella*. Este dato, puede proponer el diseño de un bioensayo que confirme fielmente la expresión heteróloga de la proteína Cry1Ac de Bt en la levadura *Y. lipolytica*.

Estos resultados muestran que *Y. lipolytica* es un sistema noble para la expresión de proteínas heterólogas, incluyendo ahora entre sus expresiones a la proteína Cry1Ac de Bt, independientemente de los tipos de vectores empleados (replicativo o integrativo); así como de la secuencia clonada (toxina o ORF cry), obteniéndose en ambos casos una clara señal de expresión de la proteína.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se obtuvieron 2 plásmidos de clonación recombinantes: pC-ORFcry1 y pC-Tox1, además de 4 plásmidos de expresión recombinantes; pEI-BtORF, pEI-BtTox, pER-BtCry1Ac y pER-BtTox.

Se secuenció el gen completo del inserto clonado y correspondiente al gen *cry1Ac*.

La proteína Cry, no se ha logrado evidenciar por medio de geles SDS-PAGE, sin embargo, por medio de tiras reactivas específicas de genes *cry1*, se ha comprobado la expresión heteróloga de la proteína Cry1Ac en la levadura *Y. lipolytica*.

11. RECOMENDACIONES O PERSPECTIVAS

El análisis de la expresión de la proteína podría también determinarse por medio de anticuerpos mono o policlonales específicos hacia las proteínas Cry, en ensayos tipo ELISA o bien tipo Western blot.

La purificación y cuantificación de la proteína recombinante; así como la verificación de la actividad biológica mediante bioensayos hacia insectos lepidópteros.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adang M., Brody M., Cardineau G., Eagan N., Roush R., Shewmaker K. C., Jones A., Oakes V. J., McBride E. K., 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII_A gene in protoplasts and potato plants. *Plant Molecular Biology*, 21(6), pp. 1131–1145.
- Adetunji V. O. y Anyanwu S. C., 2011. Clinico-Pathological Changes in Wistar Rats Administered *Bacillus thuringiensis* Isolate from Soft Cheese “Wara”. *Advances in Biological Research*, 5(4), pp. 206–214.
- Agaisse H. y Lereclus D., 1995. How Does *Bacillus thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein? *Journal of Bacteriology* 177(21), pp. 6027–6032.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., 2004. Funciones de las proteínas. En: Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (Eds.) *Biología Molecular de la Célula*. pp. 207-220.
- Bankar A. V., Kumar A. R. y Zinjarde S., 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(5), pp. 847–865.
- Barfod K. K., Poulsen S. S., Hammer M., Larsen T. S., 2010. Sub-chronic lung inflammation after airway exposures to *Bacillus thuringiensis* biopesticides in mice. *BMC Microbiology*, 10, p. 233.
- Baró R. Y., Fontana C. D., Dos Santos N. R., Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepodoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Fitosanidad*, 13(3), pp. 187-190.
- Barrows B. D., Griffiths J. S. y Aroian R. V., 2007. Resistance is non-futile: resistance to Cry5B in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3), pp. 198–200.

- Barth G. y Gaillardin C. 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19, pp. 219–237.
- Barth G. y Weber H. 1985. Improvement of sporulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51(2), pp. 167–77.
- Barton K., Whiteley H. R. y Yang N. S., 1987. *Bacillus thuringiensis* section sign-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, 85(4), pp. 1103-1109.
- Bechtel D. B. y Bulla L., 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), pp.1472–1481.
- Beopoulos A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J. L., Molina-Jouve C., Nicaud J- M., 2009. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6), pp. 375–387.
- Beopoulos A., Chardot T. y Nicaud J-M., 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91(6), pp. 692–696.
- Blanchin-Roland S., Cordero Otero R. R. y Gaillardin C., 1994. Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), pp. 327–38.
- Boisramé A., Beckerich J. M y Gaillardin C., 1998. Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), pp. 30903-30908.
- Bon E., Casaregola S., Blandin G., Llorente, Bertrand L., Neuveglise C., Munsterkotter M., Guldener U., Mewes H-W., Van Helden J., Dujon B., Gaillardin C., 2003. Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic Acids Research*, 31(4), pp. 1121–1135.

- Bravo A., Sarabia S., López L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Ortiz M., Lina L., Villalobos J., Peña G., Nuñez-Valdez M., Soberón M., Quintero R., 1998. Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12) pp. 4965-4972.
- Bravo A., Gill S. S., y Soberon M., 2008. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), pp. 423–435.
- Broderick N., Raffa K. F. y Handelsman J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), pp. 15196–9.
- Bulani S. I., Moleleky L., Albertyn J., Moleleky N., 2012. Development of a novel rDNA based plasmid for enhanced cell surface display on *Yarrowia lipolytica*. *AMB Express*, 2(1), p. 27.
- Böer, E., Steinborn G., Kunze G., Gellissen G., 2007. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(3), pp. 513–523.
- Cabrera B. y Rodríguez B. D., 2009. Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Drosophila melanogaster*. *Fitosanidad*, 13(2), pp. 83–87.
- Cabrera-Solís B., 2009. Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de cuba. *Fitosanidad*, 13(2), pp. 109–115.
- Candas M., Loseva O., Oppert B., Kosaraju P., Bulla L. A., 2002. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the Indianmeal Moth Larval Gut Proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2(1), pp. 19–28.
- Carmona A., 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera Noctuidae). *Bioagro*, 14(1), pp. 3–10.
- Castro C. S., 2005. Algodón genéticamente modificado. *Agrobio*, pp. 2–17.

- Challacombe, J. F., Altherr M. R., Xie G., Bothika S. S., Brown N., Bruce D., Campbell S., Chen J., Chertkov O., Cleland C., 2007. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *Journal of Bacteriology*, 189(9), pp. 3680–3681.
- Celik E., Calik P., 2012. Production of recombinant by yeast cells. *Biotechnology advances*, 30, pp. 1108-1110.
- Coelho M., Amaral P. y Belo I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. *Current Research*, 10 pp. 930–944.
- Costa S. D., Barbercheck M. E. y Kennedy G. G., 2000. Sublethal acute and chronic exposure of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 93(3), pp.680-689.
- Dandekar A. M., McGranaham H., Vail V. P., Uratsu L. S., Tebbets S., 1998. *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Science*, 131, pp.181-193.
- Darsi S., Prakash D. G., Udayasuriyan V., 2010. Cloning and characterization of truncated *cry1Ab* gene from a new indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Letters*, 32, pp. 1311-1314.
- Davidow, L. S., Kaczmarek S. F., DeZeeuw R. J., Conlon W. S., Lauth R. M., Pereira A. D., Franke E. A., 1987. The *Yarrowia lipolytica* LEU2 gene. *Current Genetics*, 11(5), pp. 377–83.
- De Cosa B., Moar W., Lee S-B., Miller M., Daniel H., 2001. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*, 19(1), pp. 71-74.
- Demain A. L., Vaishnav P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organism. *Biothechnology Advances*, 27, pp. 297-305.
- Domínguez A., Fermiñan E., Sanchez M., Gonzalez J. M., Perez-Campo F., Garcia S., Herrero B. A., San Vicente A., Cabello J., Prado M., Iglesias F., Choupina A., Burguillo J. F.,

- Fernández-Lago L., López C., 1998. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology : The official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(2), pp. 131-142.
- Drago S. M. E., Sainz E. T. R., 2006. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias*. 37, pp. 38–44.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J. M., Beyne E., Bleykasten C., Boisramé A., Boyer J., Cattolico L., 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), pp. 35–44.
- Duquesne S., Bordes F., Fudalej F., Nicaud J-M., Marty A., 2012. The yeast *Yarrowia lipolytica* as a Generic Tool for Molecular Evolution of Enzymes. In G. Sandoval, ed. *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 301.
- Federici B. A., Park H. y Bideshi D. K., 2010. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. *The Open Toxinology Journal*, 1 pp. 83–100.
- Fickers P., Benneti H., Wache Y., Marthy A., Mauersberguer M. S., Nicaud J-M., 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), pp. 527-543.
- Fournier P., Abbas A., Chasles M., Kudla B., Ogridziak D. M., Yaver D., Xuan J-M., Peito A., Ribet A-M., Feynerol C., He F., Gaillardin C., 1993. Colocalization of centromeric and replicative functions on autonomously replicating sequences isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11), pp. 4912-4916.
- Frederiksen K., Rosenquist H., Jorgensen K., Wilcks A., 2006. Occurrence of Natural *Bacillus thuringiensis* Contaminants and Residues of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides on

- Fresh Fruits and Vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3435–3440.
- Galán W. L. J., Garcia-Salas J. A., Luna-Olvera H. A., Quintero-Zapata I., Elias-Santos M., 1996. Producción de *Bacillus thuringiensis*. En: Galán Wong L. J., Rodríguez P. C., Luna O. H. A., (Eds.) Avances Recientes en la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. pp. 139-145.
- Gasmi N., Fudalej F., Kallel H., Nicaud J-M., 2011. A molecular approach to optimize hIFN α 2b expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), pp. 109–119.
- Gillis A., y Santana M. A., 2007. Detección de genes cry1 y cry2 en cepas venezolanas de *Bacillus thuringiensis* y sus posibles aplicaciones en el campo de la Biotecnología Agrícola. *IFMBE Proceedings*, 18, pp. 975-978.
- Glazer A. N., Hiroshi N., 2007. Production of proteins in Bacteria and Yeast. in *Microbial Biotechnology* 2da edition pp. 90-125.
- Grace L., 2005. Insect-resistant transgenic *Pinus radiata*. *Plant Cell Reports*, 24(2), pp. 103–111.
- Guimarães L. M., Farias F., Campos C. R., Quezado de Magallanes M., Cabral C., Lima R., Vasconcelos M., Fontanele A., Mulinari A., Grossi de Sa F., 2010. Short-term evaluation in growing rats of diet containing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia12 entomotoxin: nutritional responses and some safety aspects. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1 pp. 1-8.
- Gurkan C., Ellar D. J., 2003. Expression of the *Bacillus thuringiensis* Cyt2AaI toxin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. *Biotechnology Appl. Biochem*, 38, pp. 25-33.
- Hamsa P. V., Kachroo P., y Chattoo B. B., 1998. Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 33(3), pp. 231–237.
- Han C. S., Xie G., Challacombe F., Altherr R., Bhotika S. S., Bruce D., Campbell S., Chen J., Chertkov O., Cleland C., 2006. Pathogenomic Sequence Analysis of *Bacillus cereus* and

- Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 188(9), pp. 3382-3390.
- He J., 2011. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. *Journal of bacteriology*, 193(13), pp.3407–8.
- Heimpel A. M., y Angus T. A., 1960. Bacterial Insecticides. *Insect Pathology*, 24, pp. 267-279.
- Hernandez, E., Ramisse F., Ducoureau J-P., Cruel T., Cavallo J-D., 1998. *Bacillus thuringiensis* subs. *konkukian* (serotipo H34) Superinfection: Case Report and Experimental Evidence of Pathogenicity in Immunosuppressed Mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), pp. 2138-2139.
- Ho N. H., Baisakh N., Oliva N., Datta K., Frutos R., Datta S. K., 2006. Translational Fusion Hybrid Bt Genes Confer Resistance against Yellow Stem Borer in Transgenic Elite Vietnamese Rice (*Oriza sativa* L.) Cultivars. *Crop Science*, 46, pp. 781-787.
- Hunter P., 2009. Fight fire with fire. *Science (New York, N.Y.)*, 166(3908), pp. 945–947.
- Ibrahim M. A., Griko N., Junker M., Bulla L., 2010. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, pp. 31–50.
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A., Heyneker H., Bolivar F., y Boyer H. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically sintetized gene for the hormone somatostatin. *Science (New York, N.Y.)*, 198, pp. 1056-1060.
- Jabeen R., Sarwar Khan M., Zafar Y., Anjum T., 2011. Codon optimization of cry1Ab gene for hyper expression in plant organeles. *Mol. Biol. Rep.*, 37, pp. 1011-1017.
- Jain M. R., Zinjarde S. S., Deobagkar D. D., Deobagkar D. N., 2004. 2,4,6-trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9-10), pp. 783-788.

- Jeffries T. y Cregg J., 2010. Protein expression in nonconventional yeasts., in Genetics, Strain improvement and Recombinant Proteins. Second edition. pp.64.
- Jiménez-Juárez N., Muñoz-Garay C., Gómez I., Gill S. S., Soberón M., Bravo A., 2009. The prepore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides*, 29(2), pp. 318–323.
- Jolivalt C., Madzak C., Brault A., Caminade E., Malosse C., Mougin C., 2005. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), pp. 450-456.
- Juarez-Perez V. M., Ferrandis M. D., Frutos R., 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(8), pp. 2997–3001.
- Jurat-Fuentes J. L., Adang M. J., 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), pp. 166-171.
- Juretzek T., Wang H., Nicaud J-M., Mauersberguer S., Barth G., 2000. Comparison of Promoters Suitable for Regulated Overexpression of β -Galactosidase in the Alkane-Utilizing Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, pp. 320-326.
- Juretzek T., Dall M. L., Mauersberger S., 2000. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 18, pp. 97–113.
- Kurtzman C. P., 1998. *Yarrowia* van der Walt & von Arx. En Kurtzman C. P., Fell J. W. (Eds.): *The Yeast- a Taxonomic study*. Elsevier Science. pp. 420-421.
- Kerscher S., Durstewitz G., Casaregola S., Gaillardin C., Brandt U., 2001. The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comparative and Functional Genomics*. 2, pp. 80-90.

- Kim T., Lee J. H., Oh Y-S., Bae S. K., Kim S-J., 1999. Identification and characterization of an oil-degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180. *Journal of Microbiology*, 37(3), pp. 128–135.
- Kopecný D., Pethe C., Sebela M., Houba-Hérin N., Madzak C., Majira A., Laloue M., 2005. High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie*, 87(11), pp. 1011-1022.
- Kurischko C., Fournier P., Chasles M., Weber H., Gaillardin C., 1992. Cloning of the mating-type gene MATA of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Gen. Genet.* 354, pp. 423-426.
- Le Dall M. T., Nicaud J. M. y Gaillardin C., 1994. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 26(1), pp. 38-44.
- Lecadet M. M., Chaufaux J., Ribier J., Lereclus D., 1992. Construction of Novel *Bacillus thuringiensis* Strains with Different Insecticidal Activities by Transduction and Transformation. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3) pp. 840-849.
- Lee M-P., Yeun L-H. y Abdullah R., 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic oil palm. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(2), pp. 117-126.
- Li X-Q., Tan A., Voegtline M., Bekele S., Chen C-H., Aroian R. V., 2008. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. *Biological Control*, 47(1), pp. 97-102.
- Liu Z. M., Liu S., Li Y., Fang X., 2010. Heterologous Expression and Purification of Cry1Ac22 Toxin from *Bacillus thuringiensis* W015-1. *Bioscience Methods*, 1(2), pp. 9-14.
- Lorence Q. A. y Quintero R. R., 1996. Mecanismo molecular de accion de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En Avances recientes de la biotecnología en *Bacillus thuringiensis*. Ed. Galan W. J. L., Rodrigues P. C., y Luna o. H. U.A.N.L. Monterey, México.
- Maagd R. A., Bosch D., Stiekema W., 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plants Science*, 4(1), pp. 8-12.

- Madzak C., Tréton B., y Blanchin-Roland S., 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2), pp. 207-216.
- Madzak C., Otterbein L., Chamkha M., Moukha S., Asther M., Gaillardin C., Beckerich J-M., 2005. Heterologous production of a laccase from the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), pp. 635-646.
- Margesin R., y Schinner F., 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), pp. 2660-2664.
- Marquez M. E. y Fernandez E., 2006. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 78(514), pp. 63–68.
- Masson L., Erlandson M., Puzstai-Carey M., Brousseau R., Juarez-Perez V., Frutos R., 1998. A Holistic Approach for Determining the Entomopathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 23. pp. 220-228.
- Mazola Y., China G. y Musacchio A., 2011. Glycosylation and Bioinformatics: current status for glycosylation prediction tools. *Biotechnologia Aplicada*, 28, pp. 6-10.
- McBride K. y Maliga, P., 1996. Expression of *Bacillus thuringiensis* cry proteins in plant plastids. *US Patent 5,545,818*.
- Mizuki E., Shin Park Y., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M., 2000. Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*.4 (4) pp. 625-631.
- Morin S., Biggs R. W., Sisterson M. S., Shriver L., Eilers-Kirk C., Higginson D., Holley D., Gahan L. J., Heckel D. G., Carriere Y., Dennehy T. J., Brown J. K., Tabashnick B. E.,

2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *PNAS*, 100(9), pp. 5004-5009.
- Muller S. S.T., 1998. Comparison of Expression Systems in the Yeasts *Yarrowia lipolytica*. Cloning of Two Novel Promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 14(June), pp. 1267-1283.
- Muñoz-Garay C., Portugal L., Pardo-López L., Jiménez-Juárez N., Arenas I., Gómez I., Sánchez-López R., Arroyo R., Holzenburg A., Savva C. G., Sobéron M., Bravo A., 2009. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(10), pp. 2229-2237.
- Naranjo S. E., Head G. y Dively G. P., 2005. Field Studies Assessing Arthropod Nontarget Effects in Bt Transgenic Crops, 34(5), pp. 1178-1180.
- Nester, E., Thomashow L. S., Metz M., Gordon M., 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A Critical Scientific Assessment. *American Academy of Microbiology*, 1, pp. 3-15.
- Nicaud J., Fabre E. y Gaillardin C., 1989. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Current Genetics*, 16, pp. 253-260.
- Nthangeni M. B., Urban P., Pompon D., Nicaud J-M., 2004. The use of *Yarrowia lipolytica* for the expression of human cytochrome P450 CYP1A1. *Yeast (Chichester, England)*, 21(7), pp. 583-592.
- Ogunjimi, A. A., Chandler J. M., Gbenle G. O., Olukoya D. K., Akinrimisi E. O., 2002. Heterologous expression of cry2 gene from a local strain of *Bacillus thuringiensis* isolated in Nigeria. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36(3), pp. 241-246.
- Orrieta F. y Larrea V., 2002. Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 64(64), pp. 110–115.

- Pardo-López L., Muñoz-Garay C., Porta H., Rodríguez-Almazán C., Soberón M., Bravo A., 2010. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 30(3), pp. 589-595.
- Park C. S., Chuan-Chang C., Kim J-K., Ogrydziak D. M., Ryu D. D. Y., 1997. Expression, secretion, and processing of rice alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(11), pp. 6876-6881.
- Park C. S., Chang C. C. y Ryu D. D., 2000. Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 87(1), pp. 1-15.
- Peng R., Xiong A., Li X., Fuan H., Yao Q., 2003. A delta-endotoxin encoded in *Pseudomonas fluorescens* displays a high degree of insecticidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), pp. 300-306.
- Pigott C. R. y Ellar D. J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 71(2), pp. 255-281.
- Porcar M. y Jua V., 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 pp. 419-432.
- Porro D. y Matanovich D., 2012. *Recombinant protein production in yeasts*. en *Methods in biology molecular* Ed. Balbas P. y Lorence A. Second edition pp. 241-253.
- Quintana-Castro R., Ramirez S. M., Moreno-Sainz F., Ramirez-Lepe M., 2005. Expression of the cry11A gene of *Bacillus thuringiensis* spp. *israeliensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *C. J. Microbiol*, 51, pp. 165-170.
- Ramirez L., Ramirez N., Fuentes S. L., Jimenez J., Hernandez J., 2010. Aislamiento y Caracterización Molecular y Biológica de Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el Control de Tuta absoluta (*Meyrick: Lepidóptera: Geleccidae*), Insecto Plaga del Tomate (*Lycopersicon esculentum*). *Revista de la Asociación Mexicana de Ciencias Biológicas*, 22, pp. 73-90.

- Rang C., Gil P., Neinsner N., Van Rie J., Frutos R., 2005. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), pp. 6276-6280.
- Roh., Yul J., Choi J. Y., Li M. S., Jin B. R., Je Y. H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), pp. 547-559.
- Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J., 1992. Foreign Gene Expression in Yeast: a Review. *Yeast*, 8, pp. 423-458.
- Rosas Q. R. y Gaillardin C. 2011. El sistema Cre/loxP1 como una herramienta genética en *Yarrowia lipolytica*. *Revista Mexicana de Micología*, 33, pp. 17-25.
- Rosales-Reyes T., Salcedo-Hernández R., Ibarra J. E., Barboza-Corona J. E., Identificación de los genes *cry* en cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial insecticida. *Acta Universitaria*, 13(2), pp. 39-44.
- Roth R., Moodley V. y Zyl P., 2009. Heterologous expression and optimized production of an *Aspergillus aculeatus* endo-1,4-beta-mannanase in *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Biotechnology*, 43(2), pp. 112-120.
- Ruiz de Escudero I., Estela A., Porcar M., Martínez C., Oguiza J. A., Escriche B., Ferre J., Caballero P., 2006. Molecular and insecticidal characterization of a CryII protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), pp. 4796-4804.
- Ruiz-Herrera J. y Sentandreu R., 2002. Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178(6), pp. 477-483.
- Rukmini V., Reddy Y. C., Venkateswerlu G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie*, 82, pp. 109-114.

- Sanahuja G., Banakar R., Twyman R. M., Capell T., Christou P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), pp. 283–300.
- Santamarta J., 2004. Los transgénicos en el mundo. *World Watch*. 10(2) pp. 1-5.
- Sarrafzadeh M. H., Guiraud J. P., Lagneau C., Gaven B., Carron A., Navarro J-M., 2005. Growth, sporulation, delta-endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14. *Current Microbiology*, 51(2), pp. 75–81.
- Sauka D., Amadio F., Zandomeni R., Benintende G., 2007. Strategy for amplification and sequencing of insecticidal cry1A genes from *Bacillus thuringiensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91 pp. 423-430.
- Sauka D. y Benintende G., 2008. *Bacillus thuringiensis*: Generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40 pp.124–140
- Saxena D., Ben-Dov E., Manasherob R., Barak Z., Boussiba S., Zaratsky A., 2002. A UV Tolerant Mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Producing Melanin. *Current Microbiology*, 44, pp. 25-30.
- Schmid-Berger N., Schmid B., y Barth G., 1994. Ylt1, a highly repetitive retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 176(9), pp. 2477-2482.
- Schmidt F. R., 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), pp. 363-372.
- Schnepf, E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), pp. 775–806.

- Schnepf H. y Whiteley H., 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(5), pp. 2893-2897.
- Shiningavamwe, A., Obiero G., Albertyn J., Nicaud J-M., Smit M., 2006. Heterologous expression of the benzoate para-hydroxylase encoding gene (CYP53B1) from *Rhodotorula minuta* by *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), pp. 323-329.
- Soberon M. y Bravo A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: Modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14, pp. 303-313.
- Strouhal M., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Nemeč M., 2003. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*, 60(1-2), pp. 29-36.
- Sudha S. N., Jayakumar R. y Sekar V., 1999. Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. *Current Microbiology*, 38(3), pp. 163-167.
- Szédkács A., Lauber E., Juracsek J., Darvas B., 2009. CRY1Ab Toxin Production of *MON 810* Transgenic Maize. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), pp. 182-190.
- Tamez-G P., Iracheta M. M., Pereyra A. B., Galán W. L. J., Gómez F. R., Tamez G. S., Rodríguez P. C., 2005. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. *Ciencia UANL*, VIII (4), pp. 477-482.
- Terpe K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), pp. 211-222.
- Thevenieau F., Nicaud J-M., Gaillardin C., 2009. Applications of the Non-Conventional Yeast *Yarrowia lipolytica*. En Satyanarayana G., Kunze G. (Eds.): *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. pp. 589- 600.

- Tomaszewska L., Rywinska A., Gladkowski W., 2012. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, pp. 1333-1343.
- Tu J., Zhang G., Datta K., Xu C., He Y., Zhang Q., Khush G. S., Datta S. K., 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nature Biotechnology*, 18(10), pp. 1101-1104.
- Vachon V., Laprade R. y Schwartz J-L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), pp. 1-12.
- Walt J. y Arx J., 1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46. pp. 517-521.
- Walsh M. C., Buzoianu S. G., Rea M. C., O'Donovan O., Gelencsér E., Ujhelyi G., Paul Ross R., Gardiner G. E., Lawlor P. G., 2012. Effects of Feeding Bt MON810 Maize to Pigs for 110 Days on Peripheral Immune Response and Digestive Fate of the cry1Ab Gene and Truncated Bt Toxin. *PLoS ONE*, 7(5), pp. 141-171.
- Wang J.-H., Hung W. y Tsai S., 2011. High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 49(3), pp. 469-472.
- Watanabe K., Toyoda M., Hashimoto H., Nakagawa K., Nakamura K., Yabusaki Y., Tanimura A., Saito Y., 1996. Expression of 135 kDa Insecticidal protein Gene from *Bacillus thuringiensis* in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BioSci. Biotech. Biochem*, 60(9), pp. 1483-1485.
- Wei J-Z., Hale K., Carta L., Platzer E., Wong C., Fang S-C., Aroian R. V., 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), pp. 2760-2765.

- Xu D. y Côté J-C., 2008. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), pp. 5524-5532.
- Xuan J-W., Fournier P., y Gaillardin C., 1988. Cloning of the LYS5 gene encoding saccharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration. *Current Genetics*, 14, pp. 15–21.
- Yu X-J., Madzak C., Li H-J., Chi Z-M., Li J., et al., 2010. Surface display of acid protease on the cells of *Yarrowia lipolytica* for milk clotting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), pp. 669-677.
- Yuzbashev T. V., Yuzbasheva E. Y., Vibornaya T. V., Sobolevskaya T. I., Laptev I. A., Gavrikov A. V., Sineoky S. P., 2012. Production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by the yeast *Yarrowia lipolytica* results in increased enzymatic thermostability. *Protein Expression and Purification*, 82(1), pp. 83-89.
- Zhang X., Candas M., Griko N. B., Rose-Young L., Bulla L. A., 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(11), pp. 1407-1416.
- Zhong C., Peng D., Ye W., Chai L., Qi J., Yu Z., Ruan L., Sun M., 2011. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. *PloS One*, 6(1), pp.16025.
- Zhu Y., Shang H., Zhu Q., Ji F., Wang P., Fu J., Deng Y., Xu C., Ye W., Zheng J., Zhu L., Ruan L., Peng D., Sun M., 2011. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar finitimus strain YBT-020. *Journal of bacteriology*, 193(9), pp.2379–80.
- Økstad O. A., Kolstø A., 2011. Genomics in the *Bacillus* species en Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens. Ed. Wiedmann M. y Zhang W., pp. 29–54.

13. APENDICES

12.1 Secuencia del gen cry1Ac clonado en los vectores de expresión pYLEXI y pRRQ1, señalando los dominios de la proteína.

	Dominio I,	Dominio II,	Dominio III	
1	cacgtgatggataacaatccgaacatcaatgaatgcattccttataattgtttaagtaac			60
1	H V M D N N P N I N E C I P Y N C L S N			20
61	cctgaagtagaagtagtattaggtggagaaagaatagaaactggttacaccccacatcgatatt			120
21	P E V E V L G G E R I E T G Y T P I D I			40
121	tccttgctcgetaacgcaatttcttttgagtgaatttgttcccgggtgctggatttgtgtta			180
41	S L S L T Q F L L S E F V P G A G F V L			60
181	ggactagttgatataatattgggaatttttggctccctctcaatgggacgcatttcttga			240
61	G L V D I I W G I F G P S Q W D A F L V			80
241	caaattgaacagttaattaaccaagaatagaagaattcgctaggaaccaagccatttct			300
81	Q I E Q L I N Q R I E E F A R N Q A I S			100
301	agattagaaggactaagcaatctttatcaaatttacgcagaatcttttagagagtgggaa			360
101	R L E G L S N L Y Q I Y A E S F R E W E			120
361	gcagatcctactaatccagcattaagagaagagatgcgtattcaattcaatgacatgaac			420
121	A D P T N P A L R E E M R I Q F N D M N			140
421	agtgcccttacaaccgctattcctcttttggcagttcaaaaattatcaagttcctctttta			480
141	S A L T T A I P L L A V Q N Y Q V P L L			160
481	tcagtatatgttcaagctgcaaatttacatttatcagtttgagagatgtttcagtgttt			540
161	S V Y V Q A A N L H L S V L R D V S V F			180
541	ggacaaaaggtggggatttggatgccgcgactatcaatagtcgttataatgatttaactagg			600
181	G Q R W G F D A A T I N S R Y N D L T R			200
601	cttattggcaactatacagattatgctgtacgctgtgacaatacgggattagaacgtgta			660
201	L I G N Y T D Y A V R W Y N T G L E R V			220
661	tggggaccggattctagagattgggtaaggtataatcaatttagaagagaattaacacta			720
221	W G P D S R D W V R Y N Q F R R E L T L			240
721	actgtattagatatacgttgctctgttcccgaattatgatagtagaagatatccaattcga			780
241	T V L D I V A L F P N Y D S R R Y P I R			258
781	acagtttcccaattaacaagagaattttatacaaacccagttattagaaaattttgatggt			840
259	T V S Q L T R E I Y T N P V L E N F D G			280
841	agttttcgaggctcggctcagggcatagaaagaagtattaggagtcacatttgatggat			900
281	S F R G S A Q G I E R S I R S P H L M D			300
901	atacttaacagtataaccatctatacggatgctcataggggttattatttggtcaggg			960
301	I L N S I T I Y T D A H R G Y Y Y W S G			320
961	catcaaaataatggcttctcctgtcggtttttcggggccagaattcacgtttccgctatat			1020
321	H Q I M A S P V G F S G P E F T F P L Y			340

1021 ggaaccatgggaaatgcagctccacaacaacgtattgttgctcaactaggtcagggcgtg 1080
341 G T M G N A A P Q Q R I V A Q L G Q G V 360
1081 tatagaacattatcctctactttttatagaagaccttttaatatagggataaataatcaa 1140
361 Y R T L S S T F Y R R P F N I G I N N Q 380
1141 caactatctgttcttgacgggacagaatttgcttatggaacctcctcaaatttgccatcc 1200
381 Q L S V L D G T E F A Y G T S S N L P S 400
1201 gctgtatacagaaaaagcggaacggtagattcgctggatgaaataccaccacagaataac 1260
401 A V Y R K S G T V D S L D E I P P Q N N 420
1261 aacgtgccacctaggcaaggatttagtcatcgattaagccatgtttcaatgtttcgttca 1320
421 N V P P R Q G F S H R L S H V S M F R S 440
1321 ggctctagtagtagtagtataagtataataagagctcctatgttctcttggatacatcgt 1380
441 G S S S S S I S I I R A P M F S W I H R 458
1381 agtgctgaa ttttaataatataattgcatcggatagtagtattactcaaatccctgcagtgaag 1420
459 S A E F N N I I A S D S I T Q I P A V K 480
1421 ggaaactttctttttatggttctgtaatttcaggaccaggatttactgggtggggactta 1480
481 G N F L F N G S V I S G P G F T G G D L 500
1481 gttagattaaatagtagtggaataaacattcagaatagaggggtatattgaagttccaatt 1540
501 V R L N S S G N N I Q N R G Y I E V P I 520
1541 cacttcccatcgacatctaccagatatcgagttcgtgtacgggtatgcttctgtaaccccg 1600
521 H F P S T S T R Y R V R V R Y A S V T P 540
1601 attcacctcaacgtaattgggggtaattcatccatttttccaatacagtaccagctaca 1660
541 I H L N V N W G N S S I F S N T V P A T 560
1661 gctacgtcattagataatctacaatcaagtgattttgggtattttgaaagtgccaatgct 1720
561 A T S L D N L Q S S D F G Y F E S A N A 580
1721 ttacatcttcattaggtaatatagtaggtgttagaaattttagtgggactgcaggagtg 1780
581 F T S S L G N I V G V R N F S G T A G V 600
1781 ataatagacagatttgaattttaccagttactgcaccactcgaggctgaatataatctg 1840
601 I I D R F E F I P V T A P L E A E Y N L 620
1841 gaaagagcgcagatggcgggtgaatgcgctgtttacgtctacaaaccaactagggctaaaa 1900
621 E R A Q M A V N A L F T S T N Q L G L K 640
1901 acaaatgtaacggattatcatattgatcaagtgtccaatttagttacgtatttatcggat 1960
641 T N V T D Y H I D Q V S N L V T Y L S D 660
1961 gaatthtgtctggatgaaaagcggagaattgtccgagaaagtcaaacatgcgaagcgcactc 2020
661 E F C L D E K R E L S E K V K H A K R L 680
2021 agtgatgaacgcaatttactccaagattcaaatttcaaagacattaataggcaaccagaa 2080
681 S D E R N L L Q D S N F K D I N R Q P E 700
2081 cgtgggtggggcggaagtacagggattaccatccaaggaggggatgacgtatttaaaagaa 2140
701 R G W G G S T G I T I Q G G D D V F K E 720
2141 aattacgtcacactatcaggtacctttgatgagtgctatccaacatatttggatcaaaaa 2200
721 N Y V T L S G T F D E C Y P T Y L Y Q K 740
2201 atcgatgaatcaaaattaaaagcctttaccggttatcaattaagaggggtatcgaagat 2260

741 I D E S K L K A F T R Y Q L R G Y I E D 760
2261 agtcaagacttagaaatctatTTAATTCgctacaatgcaaaacatgaaacagtaaattgtg 2320
761 S Q D L E I Y L I R Y N A K H E T V N V 780
2321 ccaggtaagggttccttatggccgctttcagcccaaaagtccaatcggaaagtgtggagag 2380
781 P G T G S L W P L S A Q S P I G K C G E 800
2381 ccgaatcgatgcgcgccacaccttgaatggaatcctgacttagattgttcgtgtagggat 2440
801 P N R C A P H L E W N P D L D C S C R D 820
2441 ggagaaaagtgtgcccattcattcgcattcatttctccttagacattgatgtaggatgtaca 2500
821 G E K C A H H S H H F S L D I D V G C T 840
2501 gacttaaatgaggacctaggtgtatgggtgatctttaagattaagacgcaagatgggcac 2560
841 D L N E D L G V W V I F K I K T Q D G H 860
2561 gcaagactaggaatctagagtttctcgaagagaaaccattagtaggagaagcgctagct 2620
861 A R L G N L E F L E E K P L V G E A L A 880
2621 cgtgtgaaaagagcggagaaaaaatggagagacaaacgtgaaaaattggaatgggaaaca 2680
881 R V K R A E K K W R D K R E K L E W E T 900
2681 aatatcgtttataaagaggcaaaagaatctgtagatgctttatttgtaaactctcaatat 2740
901 N I V Y K E A K E S V D A L F V N S Q Y 920
2741 gatcaattacaagcggatacgaatattgccatgattcatgcggcagataaacgtgttcat 2800
921 D Q L Q A D T N I A M I H A A D K R V H 940
2801 agcattcagagaagccttatctgcctgagctgtctgtgattccgggtgtcaatgcggctatt 2860
941 S I R E A Y L P E L S V I P G V N A A I 960
2861 tttgaagaattagaaggcgtattttcactgcattctccctatatgatgcgagaaatgtc 2920
961 F E E L E G R I F T A F S L Y D A R N V 980
2921 attaaaaatgggtgattttaataatggccttatcctgctggaacgtgaaagggcatgtagat 2980
981 I K N G D F N N G L S C W N V K G H V D 1000
2981 gtagaagaacaaaacaaccaacgttcggctccttgttgtccggaatgggaagcagaagtg 3040
1001 V E E Q N N Q R S V L V V P E W E A E V 1020
3041 tcacaagaagttcgtgtctgtccgggtcgtggctatatccttcgtgtcacagcgtacaag 3100
1021 S Q E V R V C P G R G Y I L R V T A Y K 1040
3101 gagggatattggagaagggttgcgtaaccattcatgagatcgagaacaatacagacgaactg 3160
1041 E G Y G E G C V T I H E I E N N T D E L 1060
3161 aagtttagcaactgcgtagaagaggaaatctatccaataaacacggtaacgtgtaatgat 3220

1061	K F S N C V E E E I Y P N N T V T C N D	1080
3221	tatactgtaaatcaagaagaatacggagggtgcgtacacttctcgtaatcgaggatataac	3300
1081	Y T V N Q E E Y G G A Y T S R N R G Y N	1100
3301	gaagctccttccgtaccagctgattatgcgtcagtcctatgaagaaaaatcgatacagat	3360
1101	E A P S V P A D Y A S V Y E E K S Y T D	1120
3361	ggacgaagagagaatccttgtgaatttaacagagggtatagggattacacgccactacca	3420
1121	G R R E N P C E F N R G Y R D Y T P L P	1140
3421	gttggttatgtgacaaaagaattagaatacttcccagaaaccgataaggtatggattgag	3480
1141	V G Y V T K E L E Y F P E T D K V W I E	1160
3481	attggagaaacggaaggaacatttatcgtggacagcgtggaattactccttatggaggaa	3540
1161	I G E T E G T F I V D S V E L L L M E E	1180
3541	tagcacgtg	
1181	* H V	1183

14. GLOSARIO

Acido desoxirribonucleico.- Polímero lineal integrado por unidades repetidas de desoxirribonucleótidos (compuestos de azúcar 2-desoxirribosa, fosfato y una base púrica o pirimídica) enlazados por el grupo fosfato que une la posición 3' de un azúcar con la 5' de la siguiente azúcar.

Oligonucleótidos.- Secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos. Tienen distintas funciones: se utilizan como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación y en bloqueos específicos de ARN mensajero.

Polimerasa.- Enzima que enlaza nucleótidos entre sí para formar cadenas polinucleótidas.

Plásmido.- Moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras.

Proteína.- Moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa.- Técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

Replicón.- Molécula circular de ADN, que inicia el ciclo de replicación, controla la frecuencia de eventos de iniciación de la replicación y ordena la producción de componentes estructurales de la célula.

SDS-PAGE.- Técnica ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética.