

NOTA TÉCNICA

Leonardo Mariño R.,
Javier A. Hernández F.,
Martha L. Orozco C. y
Javier Narváz V.¹

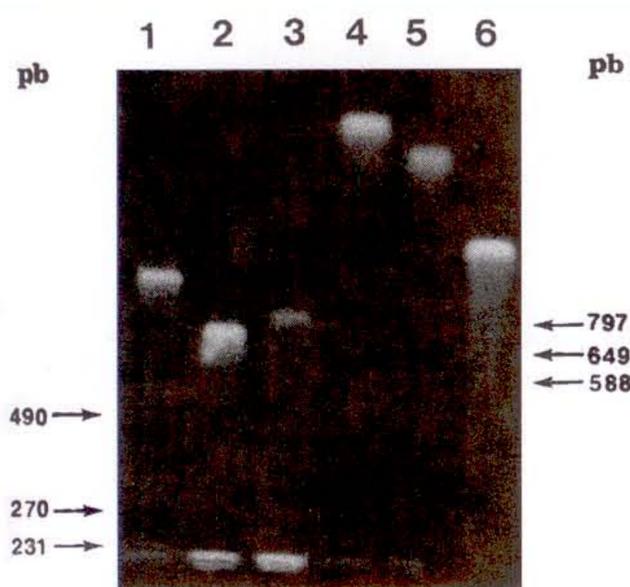


Figura 1. Productos de amplificación por PCR de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*. En los carriles 1 al 6 se muestran los productos de amplificación de los genes *cryIA*, *cryI*, *cryIIA*, *cryIIIA*, *cryIVA* y *cryV*, respectivamente. Las flechas indican el tamaño de cada fragmento amplificado en pares de bases (pb).

Caracterización Molecular de Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* Utilizando PCR Extra-Rápida

BACILLUS thuringiensis (Bt) es el microorganismo más utilizado para el control biológico de insectos plagas en la agricultura. Recientemente, se ha reportado el aislamiento de nuevas cepas de Bt con diferentes especificidades contra insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros, así como contra nemátodos, platelmintos y protozoarios (Schnepf, 1995). Con el objetivo de caracterizar molecularmente el banco de cepas nativas colombianas de *Bacillus thuringiensis* de CORPOICA (Resultados sin publicar), se estandarizó una metodología basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando un grupo de oligonucleótidos generales que reconocen genes de las familias *cryI*, *cryIIA*, *cryIIIA*, *cryIVA* y *cryV* en aislamientos de Bt. Esta metodología permite una rápida evaluación de cepas nativas de Bt y la predicción de su actividad biológica como un paso previo a los ensayos de toxicidad de insectos.

La PCR ha sido utilizada con éxito para la caracterización molecular de cepas nativas de Bt (Carozzi *et al.*, 1991; Bourque *et al.*, 1993; Gleave *et al.*, 1993; Cerón *et al.*, 1994), debido a su alta sensibilidad y especificidad. Generalmente, el tiempo requerido para una reacción de amplificación estándar de 30 ciclos es de aproximadamente 3 horas, con tiempos de denaturación, hibridación y extensión de 1 minuto cada uno. Tomando como base la experiencia reportada por Liu y Shearn (1995), se realizó un ensayo con el objetivo de disminuir estos tiempos a 1 segundo cada uno. Utilizando un termociclador de bloque (PTC-100, MJ Research, USA), se amplificaron los genes *cryI*, *cryIA*, *IIA*, *IIIA*, *IVA* y *V* de Bt, en mezclas de reacción que contenían 100 ng de DNA, 0.5 mM de cada oligonucleótido, 200 mM de cada dNTP (Amersham, UK), 1X PCR Buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mM MgCl₂) y 2.5 U de AmpliTaq DNA Polimerasa (Perkin Elmer, USA). Los parámetros para la amplificación consistieron en 1s a 94°C, 1s a 53°C y 1s a 72°C por 30 ciclos.

Los resultados muestran que es posible reducir a menos de la mitad el tiempo requerido para amplificar fragmentos por PCR, de 3 horas a 1 hora y 15 minutos. Utilizando esta PCR extra-rápida se han amplificado fragmentos de hasta 800 pares de bases (pb) (Figura 1). Una denaturación y una extensión de 1 segundo es suficiente para obtener un buen producto de amplificación. Esto es debido a que hay un tiempo de transición entre las temperaturas de denaturación, hibridación y extensión de aproximadamente 30 segundos, que es suficiente para una síntesis completa de los fragmentos de genes *cry* amplificados. Este novedoso avance tecnológico está siendo implementado para la caracterización molecular de cepas nativas de Bt y puede ser empleado para otros propósitos en donde se requiera amplificar por PCR fragmentos de DNA menores de 800 pb.

BIBLIOGRAFÍA

- Bourque, N., Valero, J.R., Mercier, J., Lavoie, M.C. and Koziel, M.G. 1991. Multiplex Polymerase Chain Reaction for detection and differentiation of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:523-527.
- Carozzi, N.B., Kranen, V.A., Warren, G.W., Evola, S. and Koziel, M.G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 3057-3061.
- Cerón, J., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. 1994. PCR Analysis of the *cryI* Insecticidal Family Genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:353-356.
- Gleave, P.A., Williams, R., and Hedges J.R. 1993. Screening by Polymerase Chain Reaction of *Bacillus thuringiensis* Serotypes for the Presence of *cryV*-Lyke Insecticidal Protein Genes and Characterization of a *cryV* Gene Cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1683-1687.
- Liu, L-Z and Shearn, A. 1995. Rapid PCR for RNA Differential Display in a conventional Heat Block Thermal Cycler. *BioTechniques*. 19:44-46
- Schnepf, H.E. 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins: Regulation, Activities and Structural Diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. 6: 305-312.

1. Programa Nacional de Biotecnología Agrícola CORPOICA, Apartado 240142 Las Palmas, Santafé de Bogotá, Colombia