

Actividad larvicida en plantas transgénicas de tabaco

P. MOLINA, B. GOYENCHEA, R. MORÁN, A. ABAD, L. ROMERO, G. DE LA RIVA y S. PÉREZ

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en enero de 1989

Aprobado en mayo de 1989

RESUMEN

La *delta*-endotoxina producida por el *Bacillus thuringiensis* variedades berliner y kurstaki durante la esporulación, muestra una potente actividad larvicida en varias familias de lepidópteros.

Los genes que codifican para esta toxina han sido clonados y expresados en plantas, y estas plantas transgénicas han mostrado ser tóxicas a las larvas de lepidópteros.

El trabajo describe la obtención de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* var. Petit Havana (SR1), a las cuales se les ha incorporado de forma estable en su genoma el gen de la toxina de *B. thuringiensis* var. kurstaki empleando el *Agrobacterium tumefaciens*. Se evaluó la expresión por actividad biológica enfrentando las plantas a una infección con larvas de *Heliothis virescens*.

SUMMARY

The *delta*-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. berliner and kurstaki during sporulation shows a very strong larvicidal activity against several families of Lepidoptera. Transgenic plants expressing this gene are protected from larvae attack.

In this paper we describe incorporation of the gene codifying for *delta*-endotoxin of B.t. var kurstaki into the genome of *Nicotiana tabacum* var. Petit Havana (SR1) using *Agrobacterium tumefaciens* system. The inheritance of this gene was analysed evaluating biological activity of transgenic plants and their progeny by means of infection with *Heliothis virescens* larvae.

INTRODUCCION

En la agricultura moderna se emplean gran variedad de insecticidas químicos en el control de plagas, a pesar de las consecuencias negativas que el uso indiscriminado de estos produce en el ecosistema en general, y particularmente en el hombre. Es por esta razón que el uso de controles biológicos se hace cada día más necesario.

Actualmente, en la agricultura se ha introducido cada vez con mayor profusión el uso de un bioinsecticida: el *Bacillus thuringiensis*. Durante la esporulación esta bacteria produce cuerpos cristalinos de inclusión formados por proteínas tóxicas a diferentes tipos de insectos (Whitley y Schnepf, 1986). Las cepas de *Bacillus thuringiensis* difieren en su espectro de actividad insecticida: muchas de ellas son activas contra lepidópteros (Held *et al.*, 1982; Hofte *et al.*, 1988, otras son activas contra dípteros (Yamamoto y McLaughlin, 1981; Samanti *et al.*, 1983; Angsuthanasombat *et al.*, 1987) y recientemente se han encontrado otras activas contra coleópteros (Herrnstadt *et al.*, 1986; McPherson *et al.*, 1988). La ingestión de la toxina por las larvas

de los insectos susceptibles provoca daños en el epitelio intestinal, seguido de una disminución de la voracidad, y por último, la muerte de las larvas (Aronson *et al.*, 1986; Tojo, 1976).

Formulaciones de bioinsecticidas a base de preparados de la bacteria esporulada se han aplicado con éxito en el control de plagas de lepidópteros a un gran número de cultivos de interés económico, pero tienen el inconveniente de su baja persistencia a causa de que se lava muy fácilmente por la lluvia y el rocío, y además la activación de la toxina por las radiaciones ultravioletas (Sneh *et al.*, 1983).

Actualmente existen metodologías de ingeniería genética en plantas mediante las cuales es posible introducir genes exógenos de forma estable en el cromosoma de estas. El uso del *A. tumefaciens* portando plasmidios Ti desarmados ha demostrado ser un método muy eficiente para la transferencia de genes de utilidad económica, de forma específica en plantas.

El gen que codifica para la *delta*-endotoxina ha sido aislado a partir del ADN genómico de algunas cepas de *B. thuringiensis* y clonado en *E. coli* (Schnepf y Whitley, 1981; Held *et al.*, 1982; Klier *et al.*, 1982; Vaithilingam *et al.*, 1987) para su estudio, lo que unido al uso del *A. tumefaciens* ha posibilitado la obtención de plantas transgénicas de tabaco resistentes a lepidópteros (Vaughan *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987; Barton *et al.*, 1987).

En nuestro trabajo describimos el procedimiento para la obtención de plantas transgénicas de tabaco empleando un *A. tumefaciens* al cual le fue incorporado el gen de la toxina del *B. thuringiensis* var. kurstaki HD1, bajo el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor, así como la determinación de la actividad larvicida de las plantas obtenidas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de material vegetal estéril

Semillas de *Nicotiana tabacum* var. Petit Havana SR1 fueron esterilizadas por inmersión en hipoclorito de sodio (5 %) durante 20 minutos y lavadas cuatro veces con abundante agua destilada estéril.

Las semillas se sembraron asépticamente en medio Murashige-Skoog sólido (Murashige y Skoog, 1962)

Transformación de plantas

Se realizó por el método de infección de discos de hojas (Horsch *et al.*, 1985).

Discos de aproximadamente 1 cm² de diámetro son obtenidos a partir de las hojas de plantas crecidas *in vitro* con 8-10 cm de altura aproximadamente. Los discos son incubados en medio K3 (Nagy y Maliga, 1976) inoculándose con un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un vector integrativo con el gen de la toxina de *B. thuringiensis* bajo el promotor 35 S del CaMV y el gen NPT-II como marcador de selección.

Los discos se colocan a baja intensidad luminosa durante 2 días y se observan al microscopio para determinar el grado de infección. Al cabo de ese tiempo se lavan en medio K3 durante 5-10 minutos y se pasan a medio de inducción de brotes (SI: sales de Murashige-Skoog, 2 % de sacarosa, 100 mg/l de inositol, 1 mg/l de bencilaminopurina) suplementado con 100 mg/l de kanamicina y 500 mg/l de claforan (Roussel) a una intensidad luminosa de 2 000-3 000 lux y 25°C durante cuatro semanas.

Los brotes obtenidos se ponen a crecer en medio Murashige-Skoog suplementado con 100 mg/l de sulfato de kanamicina y 250 mg/l de claforan (Roussel).

Las plantas transformadas se seleccionaron por subcultivos en medio Murashige-Skoog con dosis de 100, 150 y 300 mg/l de sulfato de kanamicina.

Ensayo de actividad de neomicina fosfotransferasa

Se realizó en los transformantes obtenidos resistentes a 150 y 300 mg/l de kanamicina.

En un tubo Eppendorff se colocaron 150 mg de hojas de plantas crecidas *in vitro* con un tamaño de 8 cm aproximadamente, y se maceraron en nitrógeno líquido empleando una varilla de vidrio hasta obtener un polvo fino, se añadieron 150 µl de buffer de extracción (37 mM Na₂EDTA, 126 mM NaCl, 83 mM NH₄Cl, 7,7 mM Tris, 15 mM DTT, 0,6 mg/ml Leupectin, 5 mg/ml Albúmina de suero bovino y se mezcló en frío.

Para separar el sobrenadante a otro tubo, la muestra fue centrifugada a 12 000 rpm, 1 minuto a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada según Bradford (1976).

A un volumen del extracto conteniendo 25 µg de proteínas totales se añadió 120 µl de la mezcla de reacción (67 mM Tris, 42 mM MgCl₂, 400 mM NH₄Cl, 45 µg/ml Neomicina y 1 µCi de *gamma*-dATP-³²P) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Las muestras se aplicaron en papel WhatmanTM P-81. Se dejó filtrar por gravedad 30 minutos y luego se aplicó succión suave con jeringuilla al equipo de *dot blot*. Se lavaron las aplicaciones tres veces con 500 µl de agua destilada, y una vez desmontada la unidad de filtración, el papel P-81 se lavó con buffer fosfato 10 mM a temperatura ambiente 10 minutos y 2-3 veces a 60°C. Se dejó secar al aire y se expuso con una película de rayos X durante 48 horas.

Diagnóstico del gen por PCR

El ADN de las plantas transgénicas Km^r fue obtenido según Dellaporta *et al.*, 1983.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó automáticamente según el método de Saiki *et al.*, 1988, con algunas modificaciones.

A la mezcla de reacción de 100 µl conteniendo 2,5 µg de ADN genómico disuelto en KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, CaCl₂ 2,5 mM, gelatina a 200 µg/ml, 250 mM de cada dNTP y 0,5 µM de cada uno de los oligos cebadores (PF-476 y PF-477) se añadió 2,5 U de Taq polimerasa Enzibiot. Las muestras fueron cubiertas con 50 µl de parafina líquida para evitar la condensación y fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación:

1er. ciclo: 3 minutos a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C.

2do. al 29no. ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C.

Ultimo ciclo: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 7 minutos a 72°C.

Después del proceso de amplificación, las muestras fueron precipitadas con etanol, resuspendidas en 20 µl de agua y caracterizadas por electroforesis en gel de agarosa 0,8 % en buffer Tris-Borato.

Para comprobar la especificidad de la banda amplificada, se realizó el Southern blot a membrana de nitrocelulosa (Southern, 1975) y se hibridó con un oligonucleótido de 28 pares de bases, específico para un fragmento interno del gen de la endotoxina marcado con ³²P en el fosfato 5' según Maxam y Gilbert (1980).

Experimentos de actividad biológica

Se obtuvieron semillas de la progenie R1, las cuales se sembraron asépticamente en medio Murashige-Skoog suplementado con una dosis de 150 mg/l de sulfato de kanamicina. A las 3-4 semanas, las plantas resistentes se pasaron a macetas con tierra hasta su adaptación en condiciones de invernadero.

Para los experimentos se escogieron entre 10 y 16 plantas de cada clon, con una talla entre 6 y 10 cm después de cuatro semanas de haber pasado a los invernaderos y se distribuyeron aleatoriamente antes de iniciar el experimento. A cada planta se le colocaron dos larvas de *Heliothis virescens* con una edad de 72 horas después de la eclosión, criadas con dieta artificial en nuestro laboratorio.

Al cabo de los ocho días se determinó el daño foliar ocasionado, la mortalidad de las larvas y el incremento de peso y tamaño de las larvas sobrevivientes. Para el procesamiento estadístico utilizamos el test Anova para datos desbalanceados y el test Duncan empleando el software NCSS.

RESULTADOS Y DISCUSION

Después de la individualización de los brotes en medio con sulfato de kanamicina se seleccionaron 16 clones transformados. Los resultados del ensayo de actividad de neomicina fosfotransferasa en extractos de hojas para algunos de los clones aparecen en la figura 1. En todos los clones testados se aprecia fosforilación de la neomicina usada como sustrato en la reacción enzimática.

Se empleó como control positivo una planta de tabaco de la variedad SR1, portando el gen de la neomicina fosfotransferasa bajo el promotor P2 del TDNA y como control negativo una planta de la misma variedad no transformada.

Los resultados del ensayo muestran que aunque hay fosforilación en todos los clones testados, los niveles de expresión del gen no son iguales en todos ellos, dado que se aplicó igual concentración de proteínas totales, destacándose los clones 9, 10, 11 y 16,

RESULTADOS DEL ENSAYO DE EXPRESION NPT-II. VARIEDAD DE TABACO: **PETTIT HAVANA (SR1)**



FIG. 1. Ensayo de Neomicina fosfotransferasa en las plantas transgénicas. En todos los puntos se aplicaron 25 µg de proteínas totales.

C-: planta control no transformada.

C+: planta transgénica expresando la Neomicina fosfotransferasa bajo el promotor P2 del TDNA.

2,4,8,9,10,11,15,16: diferentes clones testados.

en los cuales la intensidad de la señal obtenida en la radiografía es comparable a la del control positivo.

La presencia del gen en las plantas se determinó mediante la técnica de PCR, diagnóstico que permite analizar un gran número de muestras en poco tiempo,

mostrándose los resultados en la figura 2. En esta autorradiografía aparece una banda con una talla de 716 pares de bases correspondiente al fragmento amplificado por la polimerasa en el control (ADN genómico de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*) y en los clones testados 9 y 16.

RESULTADOS DEL PCR EN PLANTAS TRANSGENICAS VARIEDAD DE TABACO: **PETTIT HAVANA (SR1)**

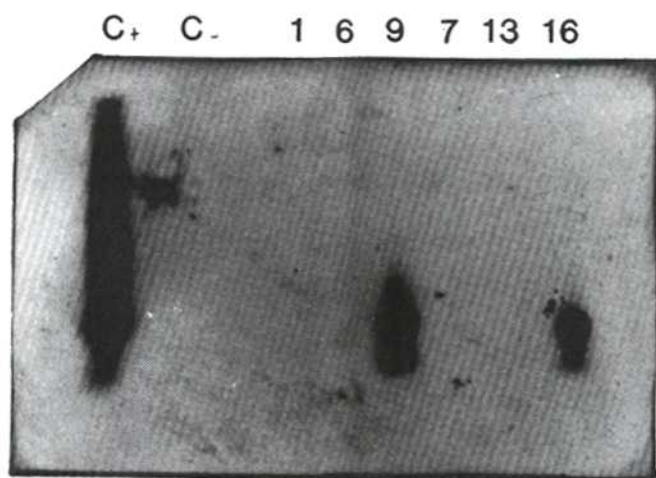


FIG. 2. PCR diagnóstico en plantas transformadas. Autorradiografía del Southern a las 24 horas.

C-: Control negativo, ADN de planta control no transformada.

C+: Control positivo, ADN de *B. thuringiensis* var *kurstaki*.

1,6,7,9,13,16: diferentes clones testados.

En los experimentos de actividad biológica se midieron diferentes parámetros: daño foliar causado a las plantas, mortalidad de las larvas y el incremento en peso y tamaño de las larvas sobrevivientes.

El daño foliar se refiere al área foliar dañada respecto al área foliar total de la planta expresado en porcentaje. En la figura 3 se muestra el daño foliar producido por las larvas, siendo mucho más intenso en

Cuando las larvas ingieren la toxina, uno de los síntomas que aparece es la disminución de la voracidad, por lo cual es interesante la medición del peso y tamaño alcanzado por las sobrevivientes. Estos resultados aparecen en la figura 5 y como se esperaba, en aquellas larvas enfrentadas a las plantas transgénicas hay una menor ganancia en peso y talla con respecto a las enfrentadas a las plantas

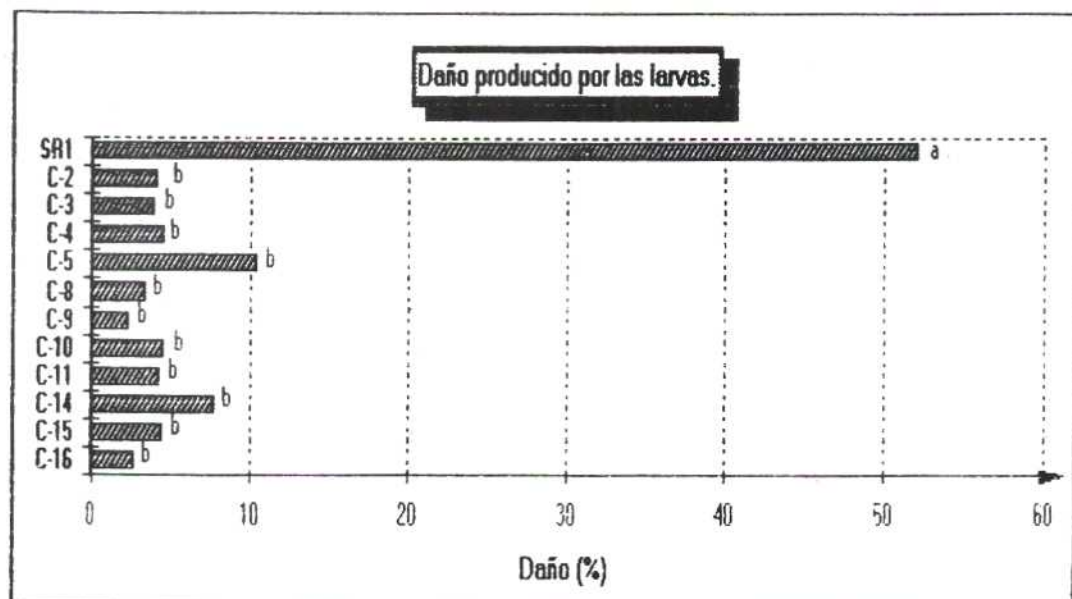


FIG. 3. Daño foliar provocado por las larvas a los 8 días de iniciado el experimento. Valores de la media obtenida en cada clon. SR1: planta control no transformada.

C-2 . . . C-16: diferentes clones testados.

(letras iguales implican que no existen diferencias significativas; letras diferentes implican diferencias significativas; $\alpha = 0,05$)

el control no transformado, donde alcanza valores de 50 %, los cuales difieren estadísticamente de los valores observados en las plantas transgénicas, donde se mantienen por debajo del 10 %, sin encontrarse diferencias entre clones para este parámetro. Este resultado puede apreciarse mucho mejor en la figura 4.

controles, no siendo muy marcada la diferencia entre los clones.

Los resultados obtenidos al cuantificar la mortalidad de las larvas aparecen en la figura 6. Se aprecia en los controles un cero por ciento de mortalidad como era de esperar, mientras en las plantas transgénicas los valores de mortalidad

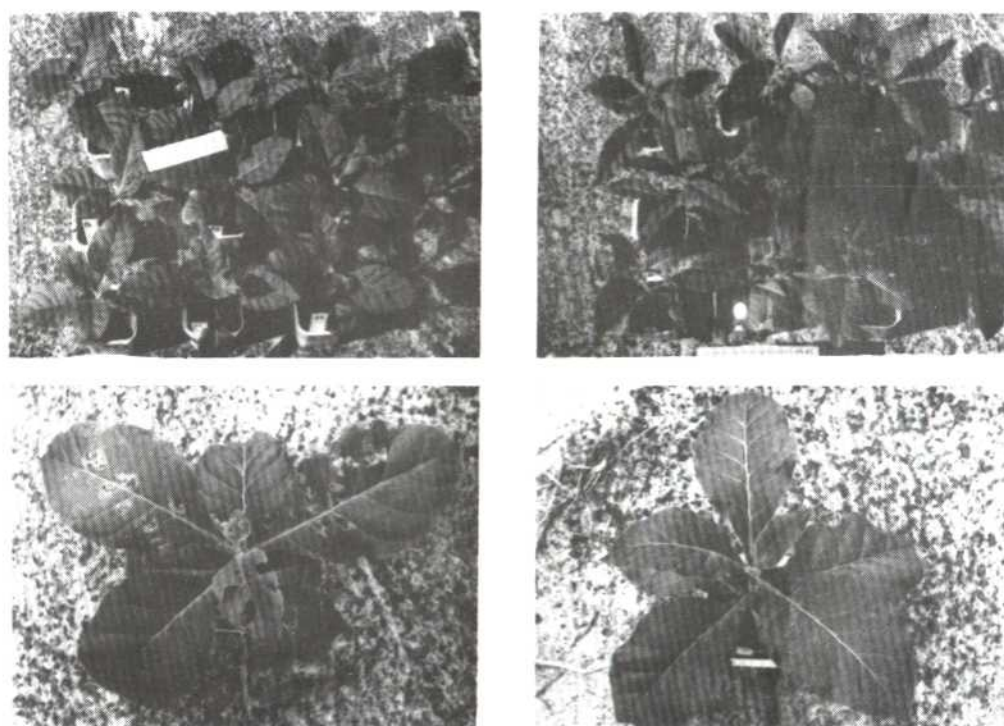


FIG. 4. Muestra del daño foliar producido por las larvas en las plantas.

A) Plantas controles no transformadas; B) Plantas transgénicas.

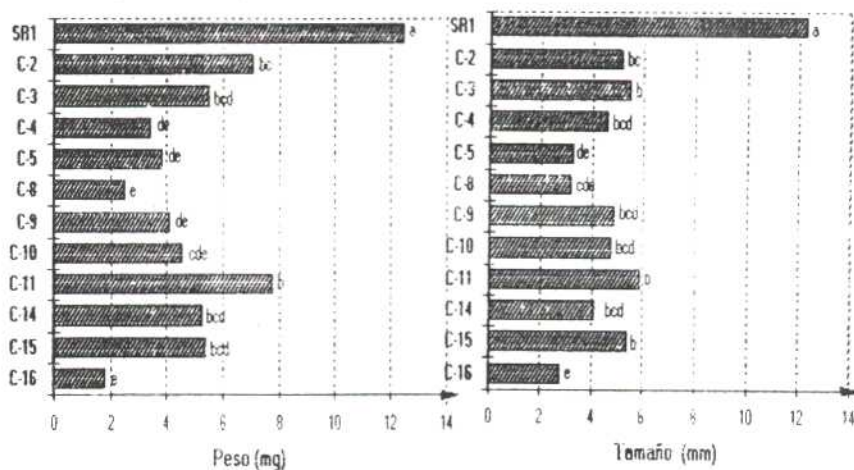


FIG. 5. Peso y tamaño de las larvas sobrevivientes a los tratamientos. Valores de la media obtenida en cada clon.

SR1: planta control no transformada.

C-2 . . . C-16: diferentes clones testados.

(letras iguales implican que no existen diferencias significativas; letras diferentes implican diferencias significativas; $\alpha = 0,05$)

obtenidos varían entre el 40 y el 88 %, siendo los mejores valores los obtenidos en el clon 16, donde se muere el 88 % de las larvas. Estos valores de mortalidad se corresponden con los reportados por otros autores empleando *Heliothis virescens* en los experimentos, pero pudieran variar si se emplearan otros lepidópteros como *Heliothis zea* y *Manduca sexta* (Herrnstadt *et al.*, 1986).

REFERENCIAS

- ARONSON, A. I.; W. BECKAM y P. DUNN (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- ANGSUTHANASOMBAT, C.; W. CHUNGJATUPORNCHAI; S. KERTBUNDIT; P. LUXANANIL; C. SETTASATIAN; P. WILAIRAT y S. PANYIM (1987). Cloning and expression of 130 Kd mosquito larvicidal delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet* 208: 384-389.

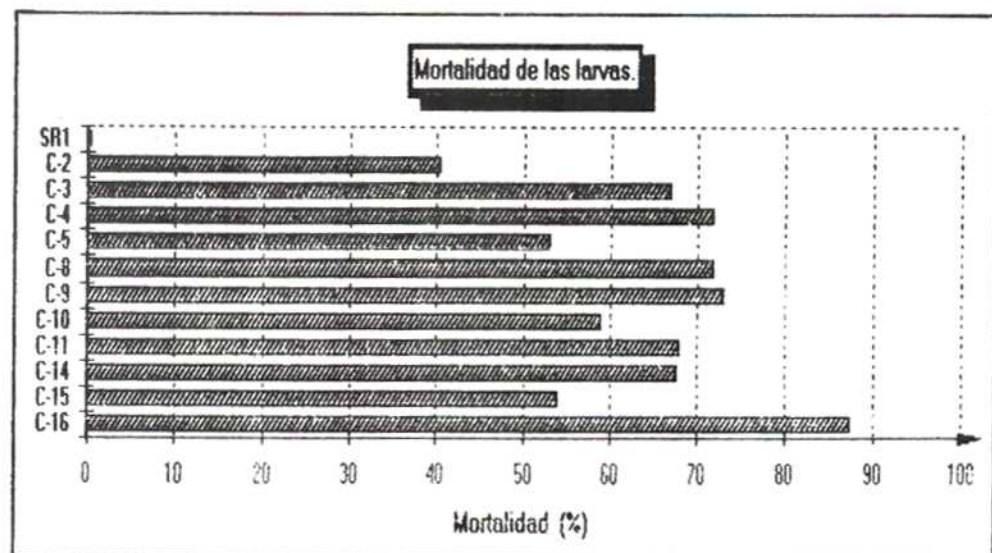


FIG. 6. Mortalidad de las larvas de *H. virescens* al cabo de los 8 días de iniciado el experimento.

La prueba concluyente de que las plantas transformadas están produciendo la toxina y, por tanto, están protegidas frente al ataque de lepidópteros, es el resultado de los experimentos de actividad biológica. Según nuestros resultados, las plantas transgénicas obtenidas en nuestro laboratorio muestran estar protegidas frente al ataque de lepidópteros en condiciones controladas.

Se encuentran actualmente en curso experimentos de campo con la descendencia homocigótica de algunos de estos clones.

- BARTON, K. A.; H. R. WHITELEY y N. S. YANG (1987). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103-1109.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- DELLAPORTA, S. L.; J. WOOD y J. B. HICKS (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plan. Mol. Biol. Report.* 1: 19-21.
- HELD, G. A.; L. A. BULLA; E. FERRARI; J. HOCH; A. I. ARONSON y S. A. MINNICH (1982). Cloning and localization of the Lepidopteran protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 6065-6069.

- HERRNSTADT, C.; G. G. SOARES; E. R. WILCOX y D. L. EDWARDS (1986). A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran insects. *Biotechnology* 4: 305-308.
- HOFTE, H.; J. VANRIE; S. JANSSENS; A. VAN HOUTVEN; H. VANDERBRUGGEN y M. VAECK (1988). Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of Lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environmental Microb.* 54: 2010-2017.
- HORSCH, R. B.; J. E. FRY; N. L. HOFFMANN; M. WALLROTH; D. EICHHOLTZ; S. G. ROGERS y R. T. FRALEY (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
- KLIER, A.; F. FARGETTE; J. RIBIER y G. RAPOPORT (1982). Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715. *EMBO J.* 1: 791-799.
- MAXAM, A. y W. GILBERT (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-512.
- McPHERSON, S. A.; F. J. PERLAK; R. L. FUCHS; P. G. MARRONE; P. V. LAVRIK y D. A. FISCHHOFF (1988). Characterization of the Coleopteran-specific protein genes of *Bacillus thuringiensis* var tenebrionis. *Biotechnology* 6: 61-65.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-497.
- NAGY, J.I. y P. MALIGA (1976). Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplast of *Nicotiana glauca*. *Z. Pflanzenphysiol.* 78: 453-455.
- SAIKI, R. K.; H. D. GELFAND; S. STOFFEL; S. I. SCHARF; R. HIGUCHI; G. T. HORN; K. B. MULLIS y H. A. HERLICH (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMANTI, W.; A. TOJO y K. AIZAWA (1983). Insecticidal toxin produced by *Bacillus thuringiensis* for mosquito control. *Ann. Rep. ICME.* 6: 233-244.
- SCHNEPF, E. H. y H. R. WHITELEY (1981). Cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 2893-2897.
- SNEH, B.; S. SCHUSTER y S. GROSS (1983). Improve of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* var entomocidus on larvae of *Spodoptera litoralis* (Lepidoptera, Nocturdae) by addition of chitinolytic bacteria, a phago-stimulant and UV-protectant. *Z. Angew. Entomol.* 96: 77-83.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- TOJO, A. (1976). Mode of action of bipyramidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1. *Appl. Environm. Microbiol.* 51: 630-633.
- VAECK, M.; A. REYMERTS; H. HOFTE; S. JANSSENS; M. BEUCKELEER; C. DEAN; M. ZABEAU; M. VAN MONTAGU y J. LEEMANS (1987). Transgenic plant protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
- VAITHILINGAM, S.; D. V. THOMPSON; M. J. MARONEY; R. G. BOOKLAND y M. J. ADANG (1987). Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var tenebrionis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7036-7040.
- VAUGHAN, A. H.; A. M. R. GATEHOUSE; S. E. SHERMAN; R. F. BARKER y D. BOULTER (1987). A novel mechanism of insect resistance in genetic engineering into tobacco. *Nature* 330: 160-163.
- WHITLEY, J. R. y H. E. SCHNEPF (1986). The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 549-576.
- YAMAMOTO, T. y R. E. McLAUGHLIN (1981). Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var kurstaki toxic to the mosquito larva *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 103: 414-421.