

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“MODIFICACIÓN GENÉTICA DE UNA
CIANOBACTERIA, FUENTE DE ALIMENTO
DE LARVAS DE MOSQUITOS, PARA EL
CONTROL DE *Anopheles albimanus*, VECTOR
DEL PALUDISMO EN MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARIA GUADALUPE VÁZQUEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO H. RODRÍGUEZ LÓPEZ

MÉXICO, D.F.



NOVIEMBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna VÁZQUEZ MARTÍNEZ MARÍA GUADALUPE con número de cuenta 95808316 y número de expediente 3951025, con la tesis titulada: "Modificación Genética de una Cianobacteria, Fuente de alimento de larvas de mosquitos, para el control de Anopheles Albimanus, vector del paludismo en México", bajo la dirección del Dr. Mario H. Rodríguez.

Presidente:	Dra. Valeria F. Souza Saldivar
Vocal:	Dr. Mario Soberón Chávez
Vocal:	Dra. Martha Legoreta Herrera
Vocal:	Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón
Secretario:	Dr. Mario H. Rodríguez
Suplente:	Dr. Fidel de la Cruz Hernández H
Suplente:	Dr. Gustavo Montejano Zurita

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de noviembre del 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyarme con una beca durante mis estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigación de Paludismo del Instituto Nacional de Salud Pública, por darme la oportunidad de superación y permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, por brindar las facilidades para realizar este proyecto; especialmente al laboratorio de Bioinsecticidas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Ciencias en donde obtuve mis estudios de Doctorado.

A mi comité de tutores, Dr. Mario H. Rodríguez, Dr. Jorge E. Ibarra y Dr. Fidel de la Cruz Hernández; por toda la disponibilidad para apoyarme, por todas sus sugerencias y por que gracias a Ustedes este trabajo fue llevado a cabo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto 31609-M de CONACYT.

El presente trabajo fue llevado a cabo en su totalidad en las instalaciones de la Unidad Irapuato del CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. Jorge E. Ibarra, Jefe del Laboratorio de Bioinsecticidas.

DEDICATORIA

A mis Padres: Alberto y Margarita

Por todo el amor que siempre me han dado,
por su apoyo para seguir adelante,
y porque gracias a sus esfuerzos he logrado llegar a esta etapa del camino.

A mis hermanos: Luis e Isabel

Por todo su amor y apoyo incondicional,
que ni la distancia, ni el tiempo, han logrado minimizar.

A todas aquellas personas que se han cruzado en mi vida,
llenándome de enseñanzas, de amistad y de amor.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón, por todo su apoyo para que este trabajo pudiera realizarse y al cual agradezco, de manera especial, por recibirme en su laboratorio.

Al Dr. Mario H. Rodríguez López, por que siempre ha sido una autoridad y ejemplo a seguir, gracias por su valioso apoyo durante este proyecto y en general, a través de este camino de la investigación.

Al Dr. José Luis Cabrera, por su participación, dirección y sabios consejos durante este proyecto.

Al Dr. Juan I. Arredondo, por su visión para este trabajo.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández, por todas sus críticas y preguntas que despertaban mi deseo de conocimiento.

A mis revisores de tesis, Dra. Valeria Souza, Dra. Martha Legorreta, Dr. Mario Soberón y Dr. Gustavo Montejano, por sus correcciones y sugerencias que enriquecieron este documento.

A la Dra. Gabriela Castaño, por su amistad y por todo su apoyo incondicional que facilitó mi paso por la UNAM.

A Lilia Espinosa Sánchez, de la coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas, por toda su invaluable ayuda.

A la M. en C. Regina Basurto, por toda su colaboración durante este trabajo de investigación, por sus enseñanzas y principalmente, su amistad.

Al Ing. Javier Luévano Borroel y la Téc. Katia Flores, por su ayuda en los bioensayos con larvas de mosquitos efectuados en este proyecto.

A Guadalupe Mireles y Karen Mendoza, por toda su ayuda durante este trabajo.

A todas aquellas personas que me ayudaron a resolver problemas, a adecuar técnicas y con sus consejos: Laura Aguilar, Alejandro Bravo, Martha Betancour, Aurora, Berenice, MariChuy, Eugenio Reynoso, Dra. Magdalena Segura, Dra. Cristina del Rincón, Dr. Luis González, Dr. Eleazar Barboza, Dr. Andrés Cruz, Dra. Leonor Valderrama,...

A mis compañeros y amigos: Regis, Vero, Katy, Karen, Lupis, Cris, Ismael, Arturo, Javier, Germán, Pedro, Sergio, Ramón, Quique, Alex; por todo su apoyo, sugerencias, por las charlas y por hacer más placentera mi estancia.

A las queridas secretarias, Mary, Sarita y Bety del CINVESTAV, U. Irapuato; y Lichita y Martha del CISEI, en Cuernavaca.

Al Ing. Salvador Partida, Jefe del Depto. Administrativo del CIP, y al Contador Carlos Chamlati, por toda su disposición para agilizar los trámites derivados de este trabajo.

A las personas que a través de la distancia me apoyaron y me han dado su amistad, a Olga Palomeque, Carlos Marina, José Domingo, a todos mis amigos del CIP.

A mis grandes amigos, los que se han fortalecido con el tiempo: Alejandro Martínez, Miguel Angel Pérez y José Juan Morales.

A todos los compañeros y amigos que no alcanzo a mencionar, gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	6
2.1 EL PALUDISMO	6
2.1.1 Importancia del paludismo	6
2.1.1.1 El paludismo en el Mundo	7
2.1.1.2 El paludismo en México	8
2.1.2 Control de la enfermedad	10
2.1.2.1 Manejo de casos	11
2.1.2.2 Prevención de la infección	11
2.1.2.3 Prevención de la enfermedad	11
2.2 MOSQUITOS <i>Anopheles</i>	13
2.2.1 Métodos de control más utilizados y su eficiencia	14
2.2.1.1 Control larval	14
a) Control mecánico	14
b) Control químico	15
c) Control biológico	16
2.2.1.2 Control de mosquitos adultos	20
a) Rociado residual de casas	20
b) Pabellones tratados con insecticidas	21
c) Rociado espacial o nebulización	21
d) Otros tipos de control novedosos	21
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.3.1 Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.3.2 Aspectos generales	23
2.3.3 Proteínas Cry	25
2.3.4 Mecanismo de acción de las proteínas Cry	26
2.3.5 Manipulación genética	28
2.3.6 Desarrollo industrial	29
2.4 LAS CIANOBACTERIAS	30
2.4.1 Manipulación genética	31
2.4.1.1 Vectores de clonación	31
2.4.1.2 Métodos de transformación	34
a) Conjugación	34
b) Transformación	35
c) Transducción	37

2.4.1.3	Ejemplos de cianobacterias transgénicas	38
2.4.2	Cianobacterias transgénicas con genes <i>cry</i>	39
2.4.2.1	Ventajas	40
2.4.2.2	Desventajas	40
2.4.3	<i>Phormidium animalis</i>	41
2.4.3.1	Taxonomía	41
2.4.3.2	Pigmentos	42
2.4.3.3	Morfología	42
2.4.3.4	Potencial como agente de control	43
3	HIPÓTESIS	44
4	OBJETIVOS	45
4.1	OBJETIVO GENERAL	
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
5	METODOLOGÍA	46
5.1	CONDICIONES DE CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA <i>P. animalis</i>	46
5.2	OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS DE LA CIANOBACTERIA	46
5.2.1	Eliminación de contaminantes por medio de lavados por centrifugación	46
5.2.2	Fragmentación de los filamentos por sonicación	46
5.2.3	Limpieza por filtración de los filamentos fragmentados	47
5.2.4	Tratamiento con antibióticos	47
5.2.5	Aislamiento de fragmentos individuales	48
5.3	TRANSFORMACIÓN BIOBALÍSTICA DE <i>P. animalis</i> CON VECTORES DE CLONACIÓN DE PLANTAS	49
5.3.1	Preparación del cultivo de cianobacterias para el bombardeo	49
5.3.2	Vectores de expresión	49
5.3.3	Preparación de las micropartículas de tungsteno	50
5.3.3.1	Limpieza de las micropartículas	50
5.3.3.2	Recubrimiento de las micropartículas con DNA	50
5.3.4	Bombardeo de micropartículas	50
5.3.5	Pruebas de selección de los transformantes	51
5.3.6	Ensayo de la expresión transitoria de β -glucoronidasa (<i>gusA</i>)	51
5.3.7	Aislamiento del DNA genómico de <i>P. animalis</i>	52
5.3.8	Análisis de restricción del DNA	52
5.3.9	Análisis del DNA mediante PCR	52
5.3.10	Análisis del DNA mediante la técnica del Southern blot	53
5.4	TRANSFORMACIÓN DE <i>P. animalis</i> CON EL GEN MOSQUITOCIDA <i>cry4A</i>	54
5.4.1	Plásmido pHT606	54
5.4.2	Aislamiento de plásmidos de Bti	54
5.4.3	Clonación del gen mosquitocida <i>cry4A</i> en el vector pCAMBIA1301	55
5.4.4	Transformación por electroporación de <i>E. coli</i> con la ligación 1301-4A	57
5.4.4.1	Extracción de DNA de células recombinantes de <i>E. coli</i>	58
5.4.4.2	Análisis de restricción y electroforético del DNA de células recombinantes de <i>E. coli</i>	59
5.4.4.3	Identificación de células recombinantes de <i>E. coli</i> por análisis PCR	59
5.4.4.4	Midi-preparación de plásmidos de células recombinantes de <i>E. coli</i>	60

5.4.5	Transformación por Biobalística de <i>P. animalis</i> con la construcción p1301-4A	61
5.4.5.1	Bombardeo con micropartículas	61
5.4.5.2	Pruebas de selección de la cianobacteria bombardeada	61
5.4.5.3	Aislamiento de DNA genómico de la cianobacteria bombardeada	61
5.4.5.4	Identificación de las cianobacterias transgénicas por análisis PCR	62
5.4.5.5	Pruebas de toxicidad de la cianobacteria con el gen <i>cry4A</i>	62
	a) Experimento de ventana biológica	62
	b) Pruebas de susceptibilidad con larvas de <i>Aedes aegypti</i>	62
5.5	TRANSFORMACIÓN DE <i>P. animalis</i> CON LOS GENES MOSQUITOCIDAS <i>cry4A</i> Y <i>cry4B</i>	63
5.5.1	Plásmido pHT652	63
5.5.2	Pruebas de viabilidad y toxicidad de pHT652	64
5.5.3	Aislamiento de plásmidos	64
5.5.4	Clonación de los genes mosquitocidas <i>cry4A</i> y <i>cry4B</i> en el vector pCAMBIA1301	64
5.5.5	Transformación por electroporación de <i>E. coli</i> con la ligación 1301-4A-4B	65
5.5.5.1	Extracción de DNA de células recombinantes de <i>E. coli</i>	65
5.5.5.2	Análisis de restricción	65
5.5.5.3	Análisis por PCR para el escrutinio de las construcciones	66
5.5.5.4	Midi-preps del recombinante	66
5.5.6	Transformación por biobalística de <i>P. animalis</i> con la construcción p1301-4A-4B	67
5.5.6.1	Bombardeo con micropartículas	67
5.5.6.2	Pruebas de selección de los transformantes	67
5.5.6.3	Aislamiento de DNA genómico	68
5.5.6.4	Identificación de los clones transgénicos por análisis PCR	68
5.5.6.5	Análisis tipo "Southern blot"	68
5.5.6.6	Pruebas de toxicidad con larvas de <i>Ae. aegypti</i>	68
5.5.6.7	Pruebas de susceptibilidad con larvas de <i>Anopheles albimanus</i>	69
5.5.6.8	Cortes histológicos con larvas de mosquitos	69
6	RESULTADOS	71
6.1	OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS	71
6.1.1	Eliminación de contaminantes	71
6.1.2	Pruebas de fragmentación de los filamentos	71
6.1.3	Lavados por filtración de los filamentos fragmentados	72
6.1.4	Tratamiento con antibióticos	72
6.1.5	Aislamiento de fragmentos individuales	72
6.2	TRANSFORMACIÓN BIOBALÍSTICA DE <i>P. animalis</i> CON VECTORES DE CLONACIÓN DE PLANTAS	75
6.2.1	Transformación y selección de los recombinantes	75
6.2.2	Análisis por PCR de de las cianobacterias recombinantes	77
6.2.3	Análisis tipo Southern de las cianobacterias recombinantes	78
6.3	TRANSFORMACIÓN BIOBALÍSTICA DE <i>P. animalis</i> CON EL GEN MOSQUITOCIDA <i>cry4A</i>	79
6.3.1	Transformación y selección de las células recombinantes de <i>E. coli</i>	79
6.3.2	Transformación por biobalística de <i>P. animalis</i> con la	

construcción p1301-4A	81
6.3.3 Identificación de las cianobacterias transgénicas por PCR	82
6.3.4 Pruebas de toxicidad de la cianobacteria transgénica con larvas de <i>Ae. aegypti</i>	84
6.4 TRANSFORMACIÓN DE <i>P. animalis</i> CON LOS GENES <i>cry4A</i> Y <i>cry4B</i>	86
6.4.1 Pruebas de viabilidad y toxicidad de pHT652	86
6.4.2 Clonación de los genes <i>cry4A</i> y <i>cry4B</i> en el vector pCAMBIA1301	86
6.4.3 Transformación por biobalística de <i>P. animalis</i> con la construcción p1301-4A-4B	89
6.4.4 Identificación de los clones transgénicos por PCR	91
6.4.5 Análisis tipo Southern blot	94
6.4.6 Pruebas de toxicidad con larvas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> y <i>Anopheles albimanus</i>	95
6.4.7 Histopatología de las larvas afectadas por <i>P. animalis</i> transgénica	97
7 DISCUSIÓN	101
8 CONCLUSIONES	118
9 BIBLIOGRAFÍA	120
10 ANEXOS	142

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Fig. 1 Cianobacterias del grupo LPP, con vaina mucilaginosa marcada y tricomas rectos. Comprende los géneros <i>Lyngbya</i> , <i>Plectonema</i> y <i>Phormidium</i> , y son identificadas como especies homólogas basándose en análisis genéticos y bioquímicos (Rippka y cols. 1979).	42
Fig. 2 Vector de transformación para plantas pCAMBIA1301, desarrollado por el Centro para la aplicación de Biología Molecular para la Agricultura Internacional (CAMBIA). Contiene el gen <i>gusA</i> como reportero para conocer la eficiencia de transformación, el gen que codifica para la resistencia a kanamicina para su amplificación en bacterias, el gen que codifica para la resistencia a higromicina para su selección en plantas y una región de clonación múltiple para los sitios EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PstI y HindIII. www.cambia.org/main/r_et_1300_1301_b.htm	56
Fig. 3 Fragmento del mapa de restricción del plásmido pHT606 que contiene al gen <i>cry4A</i> , en un fragmento SstI-SphI de 4.3 kb (Delécluse <i>et al.</i> 1993).	57
Fig. 4 Fragmento del mapa de restricción del plásmido pHT652 el cual contiene un fragmento de 4.3 kb que contiene al gen <i>cry4A</i> , y un fragmento de 4.1 kb que contiene al gen <i>cry4B</i> (Delécluse <i>et al.</i> 1993).	63
Fig. 5 Pruebas de susceptibilidad de <i>Phormidium animalis</i> al tratamiento con cinco antibióticos. Cultivos mantenidos en medio ASN-10 sólido durante un periodo de 22 días. El crecimiento fue registrado como el porcentaje de cobertura de los filamentos sobre la superficie de la caja petri.	73
Fig. 6 Estrategia de aislamiento para la obtención de cultivos axénicos de <i>P. animalis</i> .	74
Fig. 7 Cultivo transformado y testigo negativo de <i>P. animalis</i> . a) cultivo transformado con pCAMBIA1301, usando micropartículas de tungsteno M-5; b) cultivo silvestre bombardeado con micropartículas M-5 sin el vector. Ambos fueron seleccionados en 25 mg/l higromicina.	75
Fig. 8 Producto de la amplificación por PCR del gen <i>gusA</i> utilizando como molde DNA proveniente de clones transformados con pCAMBIA1301. Carril 1, plásmido pCAMBIA1301 (testigo positivo); carriles 2 a 7, clones transgénicos; carril 8, testigo negativo (cepa silvestre); carril 9, testigo negativo (agua); y carril 10, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).	77

- Fig. 9 Análisis tipo Southern blot de cepas de *P. animalis* transformadas con el plásmido pCAMBIA1301, usando como sonda el gen *hptII* (Hig^R). a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% del DNA genómico digerido con XhoI; b) análisis Southern conteniendo el fragmento de 1,094 pb del gen *hptII*. Carriles 1 a 5 y 7, colonias transformadas; carril 6, DNA de la cepa silvestre (testigo negativo); carril 8, pCAMBIA1301 digerido con XhoI (testigo positivo). 79
- Fig. 10 Fragmento del Mapa simplificado de la construcción p1301-4A de 16.104 kb, conteniendo el fragmento SstI-PstI de 4.3 kb que codifica para el gen *cry4A* insertado en pCAMBIA1301. 80
- Fig. 11 Análisis por PCR de la construcción p1301-4A con iniciadores para el gen *cry4A*, mostrando amplificación a la altura de 1,529 pb. Carril 1, p1301-4A; carril 2, testigo negativo (cepa silvestre); carriles 3-4, pHT606 (testigo positivo); carril 5, testigo negativo (agua); y carril 6, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). 81
- Fig. 12 Análisis por PCR con iniciadores para el gen *cry4A* en colonias transformadas de *P. animalis*. El carril 1, construcción p1301-4A (testigo positivo) mostró amplificación a la altura esperada de 1,529 pb. Los carriles 2-6, clones transformados con p1301-4A, amplificaron aproximadamente a los 750 pb. Carril 7, testigo negativo (cepa silvestre); carril 8, testigo negativo (agua); y carril 9, testigo negativo (pCAMBIA1301), y carril 10, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). 83
- Fig. 13 Fragmento del mapa de la construcción p1301-4A-4B de 16.98 kb, conteniendo el fragmento SstI-SphI de 8.4 kb que codifica para el gen *cry4A* y *4B* insertado en pCAMBIA1301. 87
- Fig. 14 Fragmento del mapa de la construcción p1301-4A-4B de 20.19 kb, conteniendo el fragmento HindIII-SstI de 8.4 kb que codifica para el gen *cry4A* y *4B* insertado en pCAMBIA1301. 87
- Fig. 15 Análisis de restricción de las células recombinantes de *E. coli* con la enzima XhoI. Carril 1, colonia recombinante que lleva la construcción 1 (p1301-4A-4B-1); Carril 2, colonia recombinante que lleva la construcción 2 (p1301-4A-4B-2); ambas construcciones muestran la presencia del fragmento de 1,094 pb que codifica para la resistencia a higromicina. Carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). 88
- Fig. 16 Análisis por PCR de las construcciones 1 (p1301-4A-4B-1) y 2 (p1301-4A-4B-2). Carril 1, construcción 1 y carril 2, construcción 2; ambos muestran amplificación a la altura de 1,529 pb con los iniciadores específicos para el gen *cry4A*. Carril 3, construcción 1 y 89

carril 4, construcción 2; mostrando amplificación con los iniciadores específicos para el gen *cry4B* a la altura de 1,951 pb. Carril 5, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

- Fig. 17 Análisis por PCR de un clon transgénico en el que se demuestra la amplificación para el gen *gusA* (1,200 pb), la amplificación para el gen *cry4A* (1,529 pb) y, amplificación para el gen *cry4B* (1,951 pb). Carril 1, DNA de la construcción p1301-4A-4B-2 (testigo positivo). Carril 2, DNA de la cianobacteria bombardeada con la estrategia 3.2. Los testigos negativos fueron: carril 3, DNA de la cianobacteria que porta el vector pCAMBIA1301 y carril 4, DNA de una cianobacteria silvestre. 92
- Fig. 18 Análisis tipo Southern blot de *P. animalis* transformados, usando como sonda los productos de amplificación para los genes *cry4A* y *cry4B*. Carril 1, cianobacteria silvestre. Carriles 2 a 8, colonias transformadas. Carril 9, DNA de la construcción p1301-4A-4B (testigo positivo). 94
- Fig. 19 Larvas de *Aedes aegypti* durante las pruebas de susceptibilidad y expuestas por 24 h a la cianobacteria transgénica 1301-4A-4B. 95
- Fig. 20 Corte transversal del intestino medio de una larva de *Aedes aegypti* sana. Se observa a las células columnares de tamaño normal y las microvellosidades intactas. 98
- Fig. 21 Corte transversal de una larva de *Aedes aegypti* alimentada con la cianobacteria transgénica. Se observan células epiteliales del intestino, grandes y algunas hinchadas 98
- Fig. 22 Corte transversal del intestino medio de una larva de *Aedes aegypti* alimentada de la cianobacteria transgénica. Se observan las células hinchadas con núcleos grandes. 99
- Fig. 23 Células columnares hinchadas y sin microvellosidades 99
- Fig. 24 Larva de *Aedes aegypti* colectada muerta de las pruebas de susceptibilidad con la cianobacteria 1301-4A-4B. Se observa el intestino medio muy dañado, con células columnares destrozadas. 100

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1 Algunos vectores de clonación para cianobacterias, desarrollados a la fecha.	32
Tabla 2 Cianobacterias transformadas por biobalística con los plásmidos pCAMBIA1301 y pWRG1515, y número de muestras positivas por el análisis de PCR a la presencia del gen <i>gusA</i> .	76
Tabla 3 Cianobacterias bombardeadas por el método de biobalística con la construcción p1301-4A. Resultados del número de muestras obtenidas en la selección, y número de clones positivos por el análisis de PCR para la presencia del gen <i>cry4A</i> .	84
Tabla 4 Pruebas de susceptibilidad de larvas de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> a las cianobacterias que portan el gen <i>cry4A</i> de <i>Bti</i> . Se muestran los tratamientos aplicados y los porcentajes de mortalidad para los dos bioensayos.	86
Tabla 5 Cianobacterias bombardeadas con las construcciones p1301-4A-4B-1 y p1301-4A-4B-2, número de muestras obtenidas en la selección y número de clones positivos por el análisis PCR para la presencia de los genes mosquitocidas.	93
Tabla 6a Pruebas de susceptibilidad de larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> a las cianobacterias que portan los genes <i>cry4A</i> y <i>4B</i> de <i>Bti</i> . Resultados expresados como porcentajes de mortalidad larvaria acumulada por día.	96
Tabla 6b Pruebas de susceptibilidad de larvas del mosquito <i>Anopheles albimanus</i> a las cianobacterias que portan los genes <i>cry4A</i> y <i>4B</i> de <i>Bti</i> . Resultados expresados como porcentajes de mortalidad larvaria acumulada por día.	96

RESUMEN

Debido a que la cianobacteria filamentosa *Phormidium animalis* es un alimento natural de larvas de *Anopheles albimanus*, ésta se constituye en un excelente candidato transgénico para el control de mosquitos vectores del paludismo. El objetivo de este trabajo fue transformar genéticamente a *P. animalis* con uno y dos genes que expresen proteínas mosquitocidas de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis*, para su uso en el control de larvas de *An. albimanus*.

Primeramente se obtuvieron cultivos axénicos de la cianobacteria *P. animalis* que se usaron para la transformación por biobalística con vectores de clonación de plantas. Se obtuvo transformación con los vectores pWRG1515 y pCAMBIA1301, seleccionando a éste último por su eficiencia. Posteriormente, se obtuvo una construcción con el gen *cry4A* de *Bti* en pCAMBIA1301 y se transformó a la cianobacteria, obteniéndose clones que portaban una región del gen *cry4A*, según se demostró por PCR. Los bioensayos con *Aedes aegypti* demostraron actividad larvicida de las cianobacterias, con mortalidades moderadas (hasta 45.83%).

Se realizó otro experimento de transformación con dos construcciones de los genes *cry4A* y *cry4B* de *Bti*, en pCAMBIA1301. Mediante PCR y análisis Southern se demostró que las cianobacterias transgénicas portaban ambos genes. Varias de las cepas transformadas mostraron toxicidad del 100% contra larvas de *Ae. aegypti* y *An. albimanus*. Cortes histológicos de estas larvas mostraron deterioro del intestino medio, en comparación a larvas testigos que mantenían las células intactas.

P. animalis mostró su potencial como un receptor de genes mosquitocidas y un agente de control biológico de mosquitos.

ABSTRACT

The filamentous cyanobacterium *Phormidium animalis* is a natural food source of *Anopheles albimanus* larvae, which makes it a potential transgenic candidate to be used as a control agent. During this research, *P. animalis* was genetically transformed with one and two genes from *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* expressing biologically active mosquitocidal proteins.

First, axenic cultures of the cyanobacterium *P. animalis* were obtained in order to be later transformed by particle bombardment, using plant cloning vectors. Transformants were obtained with vectors pWRG1515 and pCAMBIA1301, selecting the later for further transformations. Then, a construct of pCAMBIA1301 with the *cry4A* gene from *Bti* was obtained, which was used to transform *P. animalis*. Some clones carried a fragment of the *cry4A* gene, as shown by PCR amplification. Still, bioassays against *Aedes aegypti* larvae showed moderate toxicity (up to 45.83%) of transformants.

Additionally, another construct was obtained with genes *cry4A* and *cry4B* from *Bti* in pCAMBIA1301. Many transformants carried both genes, as shown by PCR specific amplification and Southern blot analysis. When bioassayed, several transformants showed 100% mortality against *Ae. aegypti* and *An. albimanus* larvae. Histopathology analysis of midguts showed swelling and burst of epithelial cells, as compared with normal cells of control larvae.

These results indicate that *P. animalis* is able to properly express biologically active mosquitocidal proteins from *Bti*, becoming a potential control agent for mosquito natural populations.

1. INTRODUCCIÓN

El paludismo es una de las principales enfermedades transmitidas por insectos vectores. Esta enfermedad es responsable de 500 millones de casos clínicos y constituye un problema de salud pública para 2,400 millones de personas, representando más del 40% de la población mundial en más de 90 países (Malaria Foundation Internacional 2003, <http://www.malaria.org>).

El paludismo es causado por protozoarios del género *Plasmodium*. En México, el principal agente causal de esta enfermedad es *Plasmodium vivax*, responsable de más del 98% de los casos notificados al año, mientras que los casos producidos por *P. falciparum* se encuentran principalmente en zonas de los estados de Chiapas y Tabasco que son frontera con Guatemala (Rodríguez 1994).

Los vectores del paludismo son mosquitos del género *Anopheles* de los cuales al menos 20 especies son transmisores de los parásitos del paludismo (Collins y Paskewitz 1995). Los principales vectores de paludismo en México son *An. albimanus* Wiedemann y *An. pseudopunctipennis* Theobald (Rodríguez 1994). *An. pseudopunctipennis* se encuentra en casi tres cuartas partes de las áreas palúdicas, en áreas montañosas con elevaciones de hasta 2,000 msnm. *An. albimanus* se localiza en las planicies costeras del Golfo de México, en la península de Yucatán, en áreas selváticas del sureste del país y en la mayor parte del plano costero del Océano Pacífico, hasta altitudes de 600 msnm (Wilkerson y Strickman 1990, Rodríguez 1994).

El panorama actual del paludismo en México refleja un control adecuado en la mayor parte del área endémica, con focalización del problema en zonas que tradicionalmente han sido de difícil control. Esto es debido a que los esfuerzos de las campañas antipalúdicas han logrado buenos resultados de control con actividades intensivas, en áreas donde las condiciones climáticas y geográficas son menos propicias para el desarrollo de mosquitos vectores. Desafortunadamente, en el estado de Chiapas, en la costa del Océano Pacífico cercano a la frontera con Guatemala, se ubican focos

residuales de gran importancia en donde persisten los mosquitos *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* los cuales, por encontrarse en áreas de multirresistencia a los insecticidas (como es el caso de gran parte del sur de Chiapas), han presentado dificultades para su control (Fuentes 1992, Rodríguez 1994).

El programa de control del paludismo en México se ha enfocado principalmente en controlar las poblaciones de mosquitos con insecticidas químicos, lo cual incluye aplicaciones intradomiciliares de DDT para el control de mosquitos adultos, y el tratamiento de criaderos larvarios, mediante la aplicación del larvicida químico Temefós (Méndez *et al.* 1984), además de la administración de medicamentos antipalúdicos (cloroquina y primaquina). El uso de insecticidas como medida de control de mosquitos adultos, enfrenta varios problemas. Sin duda, uno de los más importantes es el desarrollo de resistencia de los anofelinos a los insecticidas sintéticos, como resultado de su uso en la agricultura y en programas de salud pública (Knell 1991), además de la acumulación de éstos en las cadenas alimenticias y en el ambiente. Aunado a lo anterior, en otras partes del mundo, algunas poblaciones de *Plasmodium* han desarrollado resistencia a las drogas antipalúdicas, lo cual dificulta el control de esta enfermedad (Collins y Paskewitz 1995).

Es así que en el nuevo milenio, el paludismo continúa siendo un importante problema de salud pública, sin señales aparentes de ser abatido, por lo que la situación actual del paludismo en el mundo es, probablemente, no mejor de lo que fue hace 30 años cuando el énfasis sobre su erradicación fue reemplazado por un programa de control (Shiff 2002). De tal forma que donde no hace mucho el paludismo había sido reducido, incluso casi hasta el punto de la extinción, se han presentado nuevos brotes (Shiff 2002). Otro aspecto importante a considerar es el impacto del calentamiento global sobre la transmisión del paludismo, ya que los pequeños incrementos de temperatura que se están presentando en áreas templadas y subtropicales, donde el paludismo es inestable o normalmente ausente, podría incrementar marcadamente la transmisión, mientras que las áreas de transmisión estable serían poco afectadas por un aumento en la temperatura (Lindsay y Birley 1996).

En el futuro, el control del paludismo debe lograrse con nuevas herramientas, entre las que se incluyen vacunas y mosquitos transgénicos refractarios a la enfermedad. Por ejemplo, se están desarrollando estrategias que permitan la manipulación genética de mosquitos resistentes a la infección con plasmodios (Carlson *et al.* 1995, Possani *et al.* 1998). Sin embargo, estas estrategias todavía requieren de más investigación básica. También se ha dado atención al desarrollo de vacunas antipalúdicas, pero falta mucho tiempo antes de que estas vacunas puedan estar disponibles, ya que las vacunas probadas han tenido un efecto protector limitado (Maurice 1995, Shi *et al.* 2000). Es así que para un futuro cercano, los esfuerzos de control continúan enfocándose hacia los insecticidas (Federici *et al.* 2003). Sin embargo, el uso de los insecticidas químicos está restringido en muchos países debido a los problemas de resistencia, sus efectos sobre el medioambiente, sobre organismos no blanco, y especialmente sobre vertebrados a través de la contaminación de alimentos y del agua. Como resultado de esto, la Organización Mundial de la Salud (1999) está promoviendo la sustitución de estos químicos por insecticidas bacterianos. Estos productos han logrado un moderado éxito comercial en países desarrollados, pero su uso en países en desarrollo, como México, es reducido por sus altos costos (Porter *et al.* 1993).

Algunas bacterias entomopatógenas han alcanzado un importante éxito comercial y han demostrado ser altamente eficientes en el control de plagas. Dentro de estos productos, aquellos derivados de bacterias como por ejemplo *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis*, son los que han presentado un mayor impacto. No obstante, se ha observado una disminución en el uso de estos bioinsecticidas, específicamente en el control de mosquitos (Hougard y Back 1992, Priest 1992, Porter *et al.* 1993, Porter 1996). Lo anterior es debido, en parte, a que las formulaciones basadas en *B. thuringiensis* han presentado el producto en forma de complejos espóra-cristal, como polvos humectables o solubles, los cuales al aplicarse en campo provocan que el ingrediente activo del bioinsecticida se precipite rápidamente y no sea accesible para el consumo por parte de las larvas de mosquitos (Margalit y Ben-Dov 2000), ya que las larvas de *Anopheles* se alimentan en las capas superficiales de los cuerpos de agua. Aun así, estas bacterias poseen muchos atributos positivos comparados con los insecticidas químicos, particularmente en términos de su

seguridad ambiental (Porter 1996). Para competir con los insecticidas químicos, los inconvenientes de las bacterias mosquitocidas deben ser superados, y una solución para esto es el desarrollo de toxinas mosquitocidas en hospederos heterólogos que coexistan en los cuerpos de agua con las larvas de mosquitos y que además sean una fuente probada de alimento.

La gran diversidad de hábitats en donde las fases larvarias de los mosquitos anofelinos pueden desarrollarse, permite que exista una gran variabilidad de fuentes naturales de alimento, tales como cianobacterias, bacterias, algas y protozoarios (Thiery *et al.* 1991, Sangthongpitag *et al.* 1996, Vázquez-Martínez *et al.* 1996). Esto amplía la posibilidad de usar estas fuentes naturales de alimento para el control larvario de mosquitos, ya que tienen la ventaja de propagarse competitivamente en los hábitats larvarios y son una fuente probada de alimento (Liu *et al.* 1996, Porter 1996). Es por eso que se ha propuesto la introducción de genes que codifiquen las toxinas de algunas bacterias en algunos de estos organismos. Las cianobacterias son los candidatos más adecuados para este propósito, ya que son organismos fotoautótrofos que se encuentran distribuidos ampliamente en los hábitats larvarios de mosquitos dentro de su zona de alimentación, y la mayoría de ellas crecen en diferentes condiciones fisicoquímicas presentes en los cuerpos de agua (Sangthongpitag *et al.* 1996, Vázquez-Martínez *et al.* 2002). Además, se ha demostrado tanto la presencia de cianobacterias en contenidos intestinales de larvas de mosquitos, como su importancia como fuente de alimento para larvas de *Aedes*, *Anopheles*, y *Culex* (Merritt *et al.* 1992, Vázquez-Martínez *et al.* 2003).

Las cianobacterias ocupan una posición importante en los cuerpos de agua como base de las cadenas alimenticias, e incluso especies de tipo filamentoso pueden ser fácilmente ingeridas y digeridas por las larvas de mosquitos. En muestras de criaderos naturales, productores del mosquito *An. albimanus* en el sur de Chiapas, México, se aislaron 19 especies de cianobacterias. Una especie filamentosa, *Phormidium animalis* (Agardh. ex Gomont), encontrada en hábitats larvarios de mosquitos, demostró su capacidad para crecer bajo condiciones de laboratorio (Vázquez-Martínez *et al.* 2002). Además, fue usada en pruebas de alimentación larvaria, en donde se confirmó el potencial

de esta cianobacteria como fuente de alimento para larvas de este mosquito. Las larvas fueron capaces de crecer y alcanzar el estado adulto con una alimentación exclusivamente basada en *P. animalis*, obteniéndose mosquitos de tallas similares con respecto a los obtenidos con una dieta testigo (alimento normal de insectario) (Vázquez-Martínez *et al.* 2003). El éxito en la cría de mosquitos *An. albimanus* con una alimentación basada en *P. animalis*, como dieta única, aunado a la presencia de esta cianobacteria en diversos cuerpos de crianza larvaria, indican la posibilidad del uso de esta cianobacteria como portadora de toxinas mosquitocidas y de su posible introducción con éxito a los criaderos larvarios como forma de control biológico.

2. ANTECEDENTES

2.1 EL PALUDISMO

El paludismo, malaria o fiebre palúdica, son diferentes nombres que se dan para una misma enfermedad. El nombre de malaria fue dado en Italia en 1847 por Torti, porque se creía que era causada por un “aire malo” (en italiano, mal aria) que se desprendía de las aguas estancadas y de los terrenos pantanosos; y el de paludismo o fiebre palúdica, porque las fiebres predominaban entre los pobladores de las zonas cercanas a pantanos, cuyo nombre en italiano es “palude” y en latín “palus” (Bruce-Chwatt 1988).

Hipócrates se refiere en sus escritos a las fiebres palúdicas (aunque aún no se le conocían con este nombre) y reconoce la influencia de las estaciones, las lluvias y las aguas estancadas en la proximidad de los pueblos. Platón, 184 años A.C., hace referencia del bazo abultado de los enfermos de malaria. El parásito productor del paludismo fue descubierto por el médico francés Charles Louis Alphonse Laverán en 1880, quién al principio creyó que se trataba de un alga a la que llamó *Oscillaria malariae*, sin embargo rectificó luego denominando al parásito hematozoario. Laverán se fue a Italia y convenció de su descubrimiento a los malariólogos Marchiafava y Celli, quienes erigieron el género *Plasmodium* (Bruce-Chwatt 1988, Carter y Mendis 2002).

En 1898 Sir Ronald Ross, médico inglés, demostró el papel del mosquito intermediario en el ciclo del paludismo en aves (gorriones y alondras). Sin embargo no lo ubicó taxonómicamente y fue el zoólogo italiano Gian Batista Grassi quien demostró el papel del mosquito como transmisor del paludismo en humanos, señalando que el insecto del género *Anopheles* es el único vector del paludismo (Bruce-Chwatt 1988).

2.1.1 Importancia del paludismo

El paludismo es uno de los problemas de salud pública más severos y constituye una de las causas principales de muerte y enfermedad en muchos de los países en desarrollo (Malaria Foundation Internacional 2003, <http://www.malaria.org>). Cerca de un tercio de los

6,000 millones de habitantes en la tierra viven en un riesgo serio de contraer paludismo (Anónimo 2000), de los cuales los niños y las mujeres embarazadas son el grupo más afectado (Malaria Foundation Internacional 2003, <http://www.malaria.org>).

2.1.1.1 El paludismo en el Mundo. La organización mundial de la salud considera que el 41% de la población del mundo está expuesta al paludismo, reportándose más de 500 millones de infecciones cada año, y al menos 1 millón de muertes (WHO 2003, <http://rbm.who.int>). Se estima que cada día 3,000 niños mueren por esta enfermedad (Anónimo 2000). Aproximadamente el 10% de la población mundial puede sufrir un ataque clínico de paludismo cada año. Afortunadamente, la mayoría podrá sobrevivir después de un período de enfermedad de 10 a 20 días, pero durante la enfermedad estarán incapacitados para asistir a la escuela o al trabajo, disminuyendo de esta forma el aprovechamiento educacional y la productividad (Malaria Foundation Internacional 2003, <http://www.malaria.org>).

En 1993 la organización Mundial de la Salud dividió en tres categorías la situación del paludismo en el mundo: 1) Áreas donde la transmisión de paludismo es intensa y las cuales no han sido afectadas por los programas de control de vectores, tales como África Tropical; 2) La mayoría de los países de Asia y América, donde los programas de control a gran escala del vector están o estuvieron operando; 3) Áreas de rápido desarrollo económico y países seriamente afectados por problemas sociales, los cuales han ocasionado perturbaciones ambientales, movimientos de población y la ausencia de infraestructura para el cuidado de la salud.

El paludismo es una enfermedad focal, la cual difiere en sus características de país a país e incluso dentro del mismo país y existen una variedad de factores que deben tomarse en cuenta para conocer la situación del paludismo en cada región (Phillips 2001):

1) Las características biológicas, antropológicas, culturales y sociales de la población,

2) La intensidad y periodicidad de la transmisión,

- 3) Las especies de parásitos de paludismo y su sensibilidad a los medicamentos antipalúdicos,
- 4) Las especies del mosquito vector, su conducta y su susceptibilidad a los insecticidas (casi 70 especies diferentes de mosquitos son capaces de transmitir paludismo, cada uno con sus propios requerimientos ecológicos y características conductuales),
- 5) La presencia de cambios sociales y ecológicos, y
- 6) Las características de los servicios de salud existentes.

Aún en el siglo 21 resulta difícil entender cómo ha ocurrido la distribución global del paludismo y cómo ha disminuído durante los pasados 150 años. Históricamente, el paludismo fue reportado de una forma u otra en diferentes partes de Inglaterra, Holanda, Alemania, otros países de Europa, la mayor parte de Asia, incluyendo principalmente a India y China, en casi toda América, y por supuesto en la mayoría de las regiones tropicales (Bruce-Chwatt 1988). En Norte América la enfermedad existió en grandes regiones, extendiéndose tan al norte como Nueva York e incluso Montreal (Barber 1929). Sin embargo, la transmisión del paludismo ha sido eliminada en muchos países del mundo, incluyendo los Estados Unidos y países del oeste de Europa. Aunque los casos de paludismo todavía se presentan en estos países, principalmente en viajeros regresando a sus hogares y en inmigrantes (malaria importada) (Carter y Mendis 2002).

El paludismo ocurre principalmente en áreas pobres de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El continente más afectado es África, donde se estima un 90% de muertes debidas al paludismo. En otras áreas del mundo el paludismo causa menos estragos, pero puede causar enfermedades considerables e incapacitación, especialmente en áreas rurales de algunos países de Sur América y Sureste de Asia (Suh *et al.* 2004).

2.1.1.2 El paludismo en México. Durante más de 30 años, la Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP) logró abatir el padecimiento y eliminarlo como una de las principales causas de muerte, habiendo permitido la apertura de vastas áreas para la agricultura, ganadería, turismo, etc. y facilitando el desarrollo económico de regiones donde era endémico (Rodríguez y Loyola 1989, Rodríguez 1994). Aún así, la persistencia

de paludismo plantea un serio problema. Los niños son particularmente vulnerables, lo que ocasiona deserción en los escolares. La enfermedad origina anemia severa en niños y mujeres embarazadas. Afecta sobre todo a los pobres y a los desfavorecidos (áreas marginadas y grupos indígenas); en el adulto merma la productividad ocasionando ausentismo laboral. En fin, las consecuencias socio-económicas son enormes.

El problema fundamental para eliminar la persistencia de la enfermedad obedece a múltiples factores, varios aún no explicados, entre los que destacan:

Factores Biológico-Cíclicos: se presentan repuntes de la enfermedad en ciclos paraquinquenales (D.G.E., www.dgepi.salud.gob.mx).

Factores Parasitológicos: el paludismo en la costa está sujeto al problema de renovación del parásito mediante movimientos migratorios internos, regionales y externos (casos importados de Centroamérica, principalmente), lo cual constituye un serio obstáculo para el control del área (Thalmann 1984). En México, el *Plasmodium vivax* es el causante de casi el 100% de los casos, aunque esporádicamente se reportan casos por *P. falciparum* (D.G.E., www.dgepi.salud.gob.mx).

Factores Entomológicos: los principales vectores involucrados en la transmisión de la enfermedad son *Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis*. El vector principal en el plano costero es *An. albimanus* y sus criaderos típicos están en las márgenes de los lagos, lagunas y pequeños arroyos, así como en zanjas, huellas de animales y pequeñas depresiones de terreno. La reproducción ocurre tanto en aguas salobres de las costas como en aguas contaminadas; las larvas prefieren áreas bien expuestas al sol (Rejmankova *et al.* 1992, Rejmankova *et al.* 1996). *An. pseudopunctipennis* se caracteriza por ser una especie de áreas montañosas, por abajo de los 1,800 msnm. Sus criaderos se encuentran en los cauces de los arroyos poco profundos, bien expuestos al sol y generalmente asociados a algas verdes abundantes; también se les encuentra en charcos (Rejmankova *et al.* 1991, Savage *et al.* 1990).

Factores Antropológicos: éstos son el reflejo de los factores relacionados en la ecología y la etiología humana. El patrón cultural y los movimientos migratorios hacen difícil las medidas de ataque. La colonización de vastas áreas (industria hotelera, apertura de carreteras, etc.), las diferencias socioeconómicas y los movimientos sociales, mantienen una constante migración dentro y fuera de la región, contribuyendo no solamente a la diseminación del parásito, sino escapando a las medidas protectoras de los programas de control. Finalmente, es común que la población rural permanezca durante las primeras horas de la noche en el peridomicilio, poco o nada protegido contra los vectores, y cuando son horas de mayor actividad de los mosquitos. Esta costumbre favorece la transmisión; agregándose además el tipo de ropa utilizada, adecuada al clima pero poco protectora para evitar la picadura de los vectores (Thalman 1984).

Factores Climáticos: las condiciones climáticas son particularmente importantes porque influyen sobre los vectores de la enfermedad, alargando o acortando el ciclo vital y también sobre el parásito albergado en tales hospederos. El paludismo se transmite con mayor rapidez durante los meses cálidos que coinciden con los de mayor densidad de mosquitos. Influyen también de manera importante en la transmisión palúdica, la precipitación pluvial y la humedad relativa.

Otros problemas: los programas de control del paludismo han presentado dificultades operacionales relacionadas con actividades de orden técnico que no garantizan la calidad de las acciones, aunado a las dificultades administrativas, reducción en los presupuestos del programa, etc. (Rodríguez 1994).

2.1.2 Control de la enfermedad

A pesar de 4 décadas de investigación en vacunas, nuevos medicamentos y métodos alternativos de control, el paludismo continúa causando enfermedad y muerte en millones de personas que viven en áreas del mundo donde es endémico (Roberts *et al.* 2004). El objetivo del control del paludismo en los países endémicos es reducir tanto como sea posible el impacto en la salud de la población, ya que aunque la erradicación del paludismo sería lo más deseable, no parece ser posible.

El control del paludismo es llevado a cabo a través de las siguientes intervenciones, las cuales con frecuencia son aplicadas en forma combinada, debido a que se ha visto que una estrategia aplicada individualmente, no es suficiente (Carter y Mendis 2002):

- Manejo de casos (diagnóstico y tratamiento) de pacientes con paludismo
- Prevención de la infección por medio del control del vector
- Prevención de la enfermedad por la administración de medicamentos

2.1.2.1 Manejo de Casos. Las personas enfermas de paludismo deben ser tratadas rápida y adecuadamente dentro de las primeras 24 h del inicio de los síntomas (Nabarro y Mendis 2000). El paludismo es con frecuencia una enfermedad debilitante pero cuando es causada por *P. falciparum*, puede ser mortal. El tratamiento de la enfermedad elimina un componente esencial del ciclo (el parásito) e interrumpe así el ciclo de transmisión.

2.1.2.2 Prevención de la Infección. La infección es prevenida cuando se evita que el mosquito *Anopheles* (que lleva los parásitos del paludismo) se acerque a picar a los humanos (WHO 1993). Para reducir el contacto entre los mosquitos y los humanos se dirigen las medidas hacia el control del vector, lo cual implica acciones (por ejemplo la destrucción de los sitios de crianza larvaria y el rociado de insecticida dentro de las casas) que requieren de grupos organizados y de recursos que no siempre están disponibles. Una medida alternativa que combina el control del vector y la protección personal es el uso de pabellones tratados con insecticidas, lo cual proporciona tanto una barrera mecánica como repelente (Guillet *et al.* 2001). Esta medida se lleva a cabo por las mismas comunidades y se ha convertido en una de las principales intervenciones en el control del paludismo.

2.1.2.3 Prevención de la enfermedad. Para prevenir la enfermedad se administran medicamentos antipalúdicos a los grupos de población más vulnerables, tales como mujeres embarazadas y niños. Estos medicamentos tienen como efecto la eliminación de los parásitos que están en la sangre. Entre los medicamentos antipalúdicos utilizados con fines

profilácticos están la cloroquina, quinina, mefloquina (Lariam®), doxyciclina, sulfadoxina-pyrimetamina (Fansidar®), y derivados de artemisina, entre otros. Además, la primaquina es administrada contra las formas del parásito latentes en el hígado (hipnozoitos) y previene recaídas (Suh *et al.* 2004).

En México, debido a un acelerado incremento de la transmisión de la enfermedad, las autoridades de salud implementaron, a partir de 1990, el *Plan de Acciones Intensivas Simultáneas* (P.A.I.S.). Para 1998 se registraron 116,238 casos de paludismo en todo el país (D.G.E., www.dgepi.salud.gob.mx), por lo que a partir del segundo semestre de 1998 se aprobó el fortalecimiento del programa. El P.A.I.S. fue instalado en las áreas con mayores niveles de endemividad, con miras a detener el crecimiento acelerado del número de casos y posteriormente abatir el paludismo hasta lograr el control epidemiológico. El P.A.I.S. se puede resumir en trece aspectos fundamentales: selección y capacitación del personal; promoción del programa en la comunidad; estudios hidro-entomológicos; promoción de la notificación de casos; pesquisa domiciliaria; examen de muestras de sangre (gota gruesa); acciones contra el parásito en humanos (tratamientos); acciones contra el vector (rociado domiciliario, nebulizaciones, uso de Temefós); investigación epidemiológica de casos; control operativo de las acciones; apoyos técnicos y administrativos; análisis de resultados y estudios para mejorar el Plan.

El paludismo en México se encuentra cada vez más focalizado, pero, además, con algunas diferencias que permiten establecer adecuaciones a los esquemas de prevención y control entre las diferentes regiones del país, épocas climáticas y vectores principales. La focalización de áreas de riesgo de paludismo es una prioridad para las autoridades de Salud y por este motivo se creó el Programa de Acción de Enfermedades Transmitidas por Vector 2001-2006. Además, a inicios del 2004 se generó un acuerdo de la Secretaría de Salud con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal y de la Ley General de Salud, en el que se propone certificar las localidades donde se ha logrado la eliminación de la transmisión de paludismo. El Certificado expedido por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades hará constar que en un determinado espacio geográfico se han aplicado adecuadamente las estrategias de

prevención, vigilancia, monitoreo y control, señaladas por la Secretaría de Salud y que se ha confirmado la ausencia, en los tres años previos a la expedición del certificado, de casos autóctonos de paludismo en el humano (D.G.E., www.dgepi.salud.gob.mx).

2.2 MOSQUITOS *Anopheles*

Las especies de *Anopheles* que se encuentran presentes en un área y tiempo dado influyen sobre la intensidad de transmisión de la enfermedad. No todas las especies de *Anopheles* son vectores de paludismo, ya que algunas especies son biológicamente incapaces de infectarse con los parásitos de paludismo humano, mientras que otras son rápidamente infectadas y producen grandes números de esporozoitos (el estado infectivo para los humanos).

Las diferentes especies de *Anopheles* pueden diferir en sus características conductuales lo cual influye en sus capacidades como vectores de paludismo. En algunas especies las hembras prefieren obtener su alimentación de sangre de humanos ("antropofílicos"), mientras que otros prefieren alimentarse de sangre de animales ("zoofílicos"). Algunas especies prefieren picar dentro de las casa ("endofágicos") y otros prefieren picar fuera ("exofágicos"). De tal manera que las especies antropofílicas y endofágicas, tendrán contactos más frecuentes con los humanos y serán vectores de paludismo más efectivos (Sithiprasasna *et al.* 2003).

De igual manera, conocer las conductas de reposo que tienen algunas especies de mosquitos será muy importante y útil al momento de aplicar las medidas de control (Hemingway *et al.* 1997). Algunas especies prefieren reposar en las paredes dentro de las casas en donde han obtenido su alimentación de sangre ("endofílicos") mientras que otros prefieren reposar fuera ("exofílicos"). Las especies endofílicas tienen mayor probabilidad de adquirir dosis letales de insecticidas rociados sobre las paredes de las viviendas (Rodríguez *et al.* 2003, Shililu *et al.* 2004).

Anopheles albimanus es generalmente zoofílico, sólo el 15-20% se alimenta del hombre. Pica durante toda la noche, pero su mayor actividad ocurre al anochecer y al amanecer. Reposa dentro de la casa después de picar o en el peridomicilio (vegetación) (Arredondo-Jiménez *et al.* 1997). *An. pseudopunctipennis* es picador intra y extradomiciliario; antropofílico en un 50% o más, aunque en muchas áreas los animales son los hospederos predilectos.

2.2.1 Métodos de control más utilizados y su eficiencia

Las medidas de control más empleadas para el combate de los mosquitos pueden ser dirigidas hacia la fase de larvas o de adultos.

2.2.1.1 Control Larval. Las medidas de control de larvas de mosquitos pueden ser divididas en tres categorías: a) métodos físicos, mecánicos o ambientales; b) métodos químicos y c) métodos biológicos (Youdeowei y Service 1983). Estas medidas pueden involucrar la eliminación o modificación de los hábitats larvales o pueden involucrar el tratamiento del hábitat con insecticidas químicos o biológicos (Borror *et al.* 1989, Collins y Paskewitz 1995).

a) Control Mecánico: involucra la eliminación o modificación de los hábitats naturales de las larvas (Knell 1991), conlleva una alteración del ecosistema y un disturbio que repercute en los demás organismos que co-existen en este hábitat, y que incluso puede ocasionar la eliminación de algunas especies. Por ejemplo, los estados larvales de la mayoría de las especies de mosquitos dependen de la vegetación acuática para su protección de enemigos naturales, y para la obtención de organismos que constituyen su fuente de alimento. Se ha observado que las poblaciones de mosquitos están relacionadas directamente con la presencia de cierta vegetación, incluso, un tipo de vegetación puede ser indicadora de la productividad larvaria de un cuerpo de agua (Vázquez 1991, Rejmankova *et al.* 1992, Rodríguez *et al.* 1993). Es así que para el control de las fases larvarias de los mosquitos, una de las medidas que se han empleado consiste en eliminar la vegetación y dejar libre la superficie de agua, para evitar el establecimiento de poblaciones de mosquitos (Metcalf y Metcalf 1994). Con esta medida se destruye el hábitat natural de los mosquitos,

y cuando las hembras llegan a oviponer, no encuentran el sitio adecuado para depositar sus huevecillos. En el caso que las hembras decidan depositar los huevecillos, éstos son presa fácil de depredadores. A pesar de los beneficios que la remoción de la vegetación puede tener para controlar las poblaciones de mosquitos y evitar el establecimiento de nuevas poblaciones, los efectos perjudiciales pueden ser mayores. Se puede llegar a perder mucha de la fauna y flora nativas de este ecosistema, además de que se induce a una sucesión de especies (Metcalf y Metcalf 1994).

Para algunas especies de mosquitos que no se encuentran concentradas en un número pequeño de hábitats, no es posible utilizar el control mecánico y para estas especies es necesario aplicar insecticidas químicos directamente sobre los cuerpos de agua.

b) Control Químico: el control tradicional de mosquitos, después de la Segunda Guerra Mundial, se realizó principalmente con insecticidas organoclorados y organofosforados, los cuales tuvieron éxito en el control de las poblaciones, pero por su acción residual generaron problemas de resistencia, contaminación y alteraciones en las cadenas tróficas. El método químico usado actualmente se basa en el uso del larvicida Temefós para el tratamiento de los cuerpos de agua con larvas de mosquitos. Sin embargo, este proceso es ineficiente, ya que mucho menos del 0.1% de la cantidad aplicada es utilizada para matar a los mosquitos. El 99.9% restante ingresa al ambiente, y representa un riesgo para la calidad ambiental total en la forma de toxicidad intrínseca para humanos, animales domésticos y otros organismos no blanco (Margaletf 1983). Los insecticidas pueden ingresar a la dieta humana como residuos sobre los alimentos, como contaminante del suelo y de fuentes de agua (Knell 1991, WHO 1982). Los insecticidas tienen muy baja solubilidad en el agua y como resultado de esto, se bioconcentran en organismos vivos. Por ejemplo, en una aplicación de insecticidas sobre cuerpos de agua, este puede concentrarse en los organismos vivos que co-existen junto con las larvas de mosquitos por factores de 10^3 a 10^6 y pasar a peces y animales terrestres, hasta lo más alto de la cadena alimenticia. Los residuos de insecticidas en la dieta humana son absorbidos rápidamente, almacenados en los tejidos adiposos de los humanos y secretados en los fluidos tales como la leche y el esperma (Metcalf y Metcalf 1994). El uso de métodos químicos para el control de

mosquitos, consiste en el uso de moléculas ajenas a los sistemas vivos, no identificadas ni asimiladas por la evolución, pero lo bastante compatibles con la vida para infiltrarse en las estructuras orgánicas y muy poco compatibles con ella para perturbar su funcionamiento (Margaletf 1983).

Otras sustancias químicas usadas para controlar a los mosquitos y que son menos perturbadoras del ambiente incluyen, por ejemplo:

- ❖ Aceites, los cuales pueden ser aplicados sobre la superficie del agua, y de esta manera sofocan a las larvas y pupas. La mayoría de los aceites en uso en la actualidad son rápidamente biodegradados.
- ❖ Reguladores del crecimiento de insectos, tales como metopreno, el cual afecta específicamente a mosquitos y se aplica en la misma forma que los insecticidas químicos.

c) Control biológico: es una herramienta que surgió inicialmente para problemas de insectos plagas en la agricultura (Quiroz *et al.* 2000). Esta estrategia de control ha incrementado su uso e importancia en años recientes debido al interés en el desarrollo de métodos de control más amigables al medio ambiente. Ejemplo de ésta son los siguientes:

Entomófagos: Los principales entomófagos acuáticos de larvas de mosquitos son insectos, arañas, hidras, planarias, copépodos y peces (Lacey y Lacey 1990). Algunos de los organismos acuáticos que han sido probados en México, son por ejemplo:

- ❖ Peces larvívoros. La introducción de peces para el control de larvas de mosquitos ha sido usada desde los inicios de 1900. Los guppies *Poecilia reticulata* han sido útiles, especialmente debido a que toleran contaminación orgánica, y por tal motivo pueden usarse para el control del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La especie de peces más ampliamente usada con fines de control larvario de mosquitos pertenece al subgrupo *Gambusia affinis*, la cual

ha sido efectiva en controlar mosquitos en grandes cuerpos de agua. Dentro de las principales desventajas de los *Gambusia* es que son agresivos y pueden matar a los peces nativos más pequeños y a los estados inmaduros de los peces grandes. *Gambusia* también depreda a una gran variedad de invertebrados acuáticos, incluyendo a especies que se alimentan del fitoplancton (Service 1981, Bence 1988). En México no existen reportes del control de mosquitos por peces larvívoros, pero se tiene conocimiento que, de manera empírica, varias especies nativas de peces son usadas por los habitantes de algunas poblaciones para el control del mosquito *Aedes aegypti*. Martínez-Ibarra y cols. (2002) probaron que cinco especies nativas de peces (*Lepisosteus tropicus*, *Astyanax fasciatus*, *Brycon guatemalensis*, *Ictalurus meridionalis* y *Poecilia sphenops*) pueden ser consideradas como buenos agentes de control de *Aedes aegypti* en el sur de México.

- ❖ Copépodos *Macrocyclus albidus* y *Mesocyclops longisetus*. Los resultados del uso de copépodos son muy inconsistentes en las evaluaciones de su capacidad depredadora, ya que esta varía de acuerdo a la disponibilidad de alimento en sus etapas juveniles (Lardeux 1992). Estos organismos son buenos entomófagos en cuerpos de agua cerrados y reducidos que sirven como hábitats para las larvas del mosquito *Aedes aegypti* y se ha demostrado su capacidad para controlar poblaciones de este mosquito (Magallón-Gastelum *et al.* 1997).
- ❖ Nadadores de dorso *Buena scimitra* y *Notonecta irrorata*. En estudios en laboratorio y a pequeña escala se ha observado que poseen una alta capacidad de búsqueda, por lo que pueden considerarse como buenos prospectos para su uso en el control de mosquitos (Pérez-Serna 1996, Cheesson 1984).

Entomopatógenos: Entre los entomopatógenos existen cinco grupos de microorganismos que presentan mayor potencial como agentes de control biológico: virus, bacterias, hongos, nemátodos y protozoarios. Muchos de estos microorganismos pueden ser

usados para el control de larvas de mosquitos y aplicados en la misma forma que los insecticidas químicos.

Los insecticidas biológicos o microorganismos entomopatógenos penetran en el insecto plaga por ingestión, y también por contacto en el caso de los hongos. Entre estos entomopatógenos, las toxinas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) son las más ampliamente desarrolladas y utilizadas. Otros agentes menos eficientes para el control de mosquitos, y que no son tan usados, pueden ser los hongos (*Lagenidium giganteum*) o los nemátodos (*Romanomermis culicivorax*).

- ❖ Protozoarios. Existen especies con ciclos de vida muy complejos y que pueden ser desde comensales hasta patógenos. Hay protozoarios patógenos de personas y otros sólo de plantas o insectos. Los microsporidios son los protozoarios más numerosos e importantes patógenos de insectos. Pero en general, los protozoarios no se emplean mucho en el control de insectos debido a su baja virulencia. Sólo hay un producto registrado comercialmente (Flexner y Belnavis 2000).
- ❖ Virus. Dentro de los virus entomopatógenos, los más estudiados y utilizados como agentes de control se encuentran en cuatro familias: Baculoviridae, Poxviridae, Reoviridae e Iridoviridae. Los virus penetran al hospedero principalmente por ingestión oral aunque también pueden hacerlo por medio de la contaminación de la superficie del huevo (ruta *transovum*), transmisión dentro del huevo (ruta transovárica) y la infección por medio de parasitoides durante la oviposición (Granados 1980, Mazzone 1985). Los virus requieren de células vivas para replicarse, lo cual implica que para una producción masiva se requiera de grandes cantidades de larvas o del desarrollo de tecnologías para su producción en cultivos *in vitro* de células de insecto (Tanada y Kaya 1993). Existen registrados más de 20 productos, algunos de los cuales ya han sido producidos comercialmente, pero se caracterizan por degradarse fácilmente con el sol, por lo que van provistos de protectores

solares. Todos los productos son dirigidos hacia plagas forestales y agrícolas (Carter 1984, Huber 1986).

- ❖ Nemátodos. Hace más de 60 años que fueron reportados nemátodos entomopatógenos, pero no fue sino hasta los 90 que se produjeron masivamente, especialmente los dos géneros de nemátodos más efectivos: *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Los biolarvicidas a base de nemátodos parásitos *Romanomermis culicivorax* y *Romanomermis iyengari*, se caracterizan por ser específicos para larvas de mosquitos y no afectan ni a la flora, ni a la fauna, incluyendo al hombre mismo. Otra característica de estos biolarvicidas es que se establecen en los criaderos tratados debido a que se reciclan, manteniendo un control biológico a mediano plazo. La vida de los nemátodos depende de las larvas de mosquitos, ya que como parásitos obligados, necesitan encontrar larvas en menos de 72 horas, y si no logran hacerlo mueren. Sin embargo, los factores como la salinidad y el pH, son una limitante para su uso en los diferentes hábitats en donde se crían los mosquitos (Pérez *et al.* 1998).

- ❖ Hongos. A pesar de que se conocen a más de 750 especies de hongos que infectan a insectos, sólo algunas especies han sido desarrolladas comercialmente en Estados Unidos, Europa Occidental, América Latina, China y Europa Oriental. Normalmente, los hongos son entomopatógenos de acción lenta. De los hongos bioinsecticidas, sólo dos géneros de hongos acuáticos *Lagenidium* y *Coelomomyces* son parásitos de larvas de mosquitos. El hongo *L. giganteum* Couch, ha sido desarrollado comercialmente y es un bioinsecticida que está registrado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos para su uso como agente de control de mosquitos (Kerwin *et al.* 1994, Kerwin y Petersen 1997). Actualmente es el único hongo disponible en el comercio para el control de mosquitos y está disponible con la marca LAGINEX® (AgraQuest, Inc). *L. giganteum*, además de su

especificidad, tiene la capacidad de reciclarse por semanas, meses o incluso años, dentro del hábitat en que fue aplicado (Flexner y Belnavis 2000).

- ❖ Bacterias. Varias especies de bacterias han sido desarrolladas como bioinsecticidas para el control de plagas. La bacteria más destacada es *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuyo serovar *israelensis* presenta actividad contra larvas de mosquitos y jejenes. Las propiedades bioinsecticidas de Bti son debidas a la presencia en la célula de plásmidos extra-cromosómicos que llevan genes conocidos como *cry*. Los genes *cry* codifican a proteínas que forman cuerpos de inclusión cristalinos las cuales son tóxicas a insectos (Crickmore *et al.* 1998). Debido a que los cristales tienen que ser ingeridos y luego procesados dentro del intestino del insecto, en donde causan la destrucción parcial de intestino medio y luego sobreviene una septicemia (Ibarra y López-Meza 2000), su acción es lenta (2-48 h) en comparación con los insecticidas químicos convencionales. Por la naturaleza patogénica de esta bacteria, el control biológico es dirigido a los estados larvales de mosquitos y la diversidad de hábitats y hábitos de alimentación es muy importante para considerar en la formulación y aplicación del agente de control (Priest 1992). Más del 90% de los productos comerciales de bioinsecticidas son a base de esta bacteria (Ibarra y López-Meza 2000). Los productos de Bti han probado ser efectivos en el control de mosquitos (Becker y Margalit 1993) y algunos ejemplos son Vectobac® (Abbott), Bactimos® (Solvay/Duphar), Teknar® (Thermo Triology) y Skeetal® (Abbott).

2.2.1.2 Control de mosquitos adultos

a) Rociado residual de casas. Muchos de los vectores de paludismo son endofílicos y descansan dentro de las casas después de alimentarse de sangre, lo cual hace a estos mosquitos susceptibles para esta estrategia de control. Esta medida involucra el rociado de las paredes y otras superficies de la casa con un insecticida residual que permanecerá por varios meses matando a los mosquitos que tengan contacto con las superficies rociadas. Durante la campaña de erradicación del paludismo (1955-1969) el método de control se

basó en el uso de DDT y dieldrín, y aunque no alcanzó su objetivo, logró eliminar el paludismo de varias áreas y reducirlo en otras. La resistencia al DDT y al dieldrín, además del daño ambiental, propició la introducción de otros insecticidas más caros. Como resultado de los altos costos para sostener la campaña y de la publicidad negativa por la falla en la erradicación y lo concerniente a los daños ambientales, es que este tipo de rociado es poco aplicado actualmente, y sólo se emplea para el control focal (Bouwman *et al.* 1990).

b) Pabellones tratados con insecticidas. Esta es una forma de protección personal que se ha demostrado que reduce significativamente la mortalidad debida al paludismo en las regiones endémicas. Esta estrategia ha sido probada en varias comunidades de África y demostró que reduce en un 20% la mortalidad, ya que puede matar al mosquito que intente picar y tenga contacto con el pabellón, además de funcionar como repelente. Existen varios tipos de pabellones disponibles que varían en el tamaño, material y tratamiento. La mayoría de los pabellones son de poliéster, pero también hay de algodón, polietileno o polipropileno. Actualmente sólo los insecticidas piretroides están aprobados para su uso en pabellones por su baja toxicidad a mamíferos, pero alta hacia insectos (Curtis y Mnzava 2000).

c) Rociado espacial o nebulización. Esta estrategia es reservada para situaciones de emergencia durante epidemias. La nebulización debe aplicarse en el tiempo apropiado que coincida con el pico de actividad del mosquito adulto.

d) Otros tipos de control novedosos:

- ❖ *Liberación de machos estériles*: la técnica se basa en la liberación en la naturaleza de machos estériles de la especie que se quiere combatir, con el objeto de disminuir su descendencia. Esta técnica ya es utilizada con mucho éxito en la lucha contra un buen número de plagas, por ejemplo: la mosca Tsé-tsé, el barrenador del ganado, o en el caso de la mosca mediterránea de la fruta. En el control de mosquitos, esta estrategia ha sido exitosamente aplicada

en pruebas de campo a pequeña escala. Sin embargo la necesidad de un gran número de mosquitos a liberar hace impráctica esta estrategia (Phillips 2001).

- ❖ *Modificación genética del mosquito:* consiste en desarrollar mosquitos modificados genéticamente y que sean resistentes al parásito del paludismo, los cuales serían liberados dentro de poblaciones naturales, para disminuir o eliminar la transmisión del paludismo a los seres humanos (Carlson *et al.* 1995). Para que esta estrategia pueda ser aplicada en campo todavía faltan algunos años de investigación (Phillips 2001), ya que se ha logrado bloquear el desarrollo del parásito en el laboratorio, pero quedan muchos problemas que tienen que ser resueltos para que esta estrategia pueda ser llevada a campo (WHO 2002, www.who.int/tdr).

2.3 *Bacillus thuringiensis*

2.3.1 Historia de *Bacillus thuringiensis*

El descubrimiento de *Bacillus thuringiensis* Berliner ocurrió en 1901, por el bacteriólogo japonés Shigetane Ishiwata quien aisló el *Bacillus* de una larva enferma de *Bombyx mori* (L.). Una década después, Ernst Berliner aisló a un organismo similar en poblaciones de larvas enfermas de *Anagasta kuehniella* (Zeller) provenientes de Thuringen (Thuringia), Alemania (1911). Debido a que Ishiwata no describió formalmente a esta bacteria, Berliner tiene el crédito y cuatro años más tarde (1915) nombró a esta bacteria como *Bacillus thuringiensis* (Bt). El aislado de Berliner se perdió, pero en 1927 Mattes re-aisló este mismo organismo de un hospedero similar y fue de esta cepa que surgieron la mayoría de los primeros productos basados en Bt. Debido a que las pruebas en campo con Bt eran prometedoras, los laboratorios Libec en Francia, iniciaron la producción comercial de Bt y en 1938 se comercializó el primer producto con el nombre de Sporeine (Beegle y Yamamoto 1992).

Durante los primeros 10 años de la producción comercial de Bt, el uso de sus productos fue limitado debido a la baja potencia en las cepas y a lo inadecuado de las

técnicas de estandarización. Hasta antes de 1970, la mayoría de los productos comerciales de Bt fueron basados en la subespecie *thuringiensis*, y fueron productos con baja actividad por lo que no pudieron competir con los insecticidas químicos, tanto en eficiencia como en costo. En los 70, con el descubrimiento de la subespecie *kurstaki* se hace posible que los productos basados en Bt compitan con los insecticidas químicos en eficacia y costos, ya que estas cepas fueron de 20 a 200 veces más potentes que los productos comerciales existentes. Es así que en 1970, los laboratorios Abbott sacaron al mercado el producto Dipel (Beegle y Yamamoto 1992).

En 1976, Goldberg y Margalit aislaron, en muestras de suelos colectadas en criaderos de mosquitos en Israel, cepas de bacterias con actividad tóxica hacia larvas de mosquitos. Uno de los aislados mostró una actividad larvicida extremadamente alta, y fue clasificado como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Goldberg obtuvo la patente sobre este organismo y hasta la fecha tanto las compañías de Estados Unidos como de Europa producen productos basados en *Bt israelensis* (Goldberg y Margalit 1997). Posteriormente, el hallazgo de Krieg de una nueva subespecie de Bt denominada *tenebrionis*, y con actividad hacia algunos coleópteros, fue el siguiente producto que tuvo éxito comercial (Beegle y Yamamoto 1992).

Los problemas de resistencia a insecticidas derivados de la aplicación del control químico, así como el descubrimiento de nuevas cepas de Bt con un diverso rango de acción contra insectos, no sólo para lepidópteros, sino también para dípteros y luego para coleópteros, propició un renovado interés en el desarrollo comercial de bioinsecticidas basados en esta bacteria.

2.3.2 Aspectos Generales

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, patógena de estadios larvales de insectos, que durante el proceso de esporulación produce inclusiones parasporales. Las inclusiones están compuestas de cristales proteicos que son tóxicos para una amplia variedad de insectos (Shieh 1988). Para ser tóxicos, los cristales proteicos deben ser ingeridos por el organismo blanco, y no se ha demostrado actividad por contacto. La

mayoría de los genes tóxicos de Bt parecen encontrarse en plásmidos cuyo tamaño oscila entre 2 Kb y varios cientos de Kb (González y Carlton 1980). Muchos de estos plásmidos parecen ser conjugativos por naturaleza.

B. thuringiensis es una bacteria cosmopolita, pues sus esporas se han aislado de suelo (Meadows *et al.* 1992), de larvas de insectos enfermos (Kaelin *et al.* 1994), de productos almacenados (Karamanlidou *et al.* 1991) y hojas de árboles (Meadows *et al.* 1992), incluyendo la rizósfera de plantas, aunque es más frecuente aislarla de productos almacenados, pues las condiciones ambientales del almacén permiten la persistencia de sus esporas (Martínez y Sánchez- Yáñez 1998).

Dentro de las ventajas de Bt se incluye su alta especificidad, lo que hace que sus productos comerciales sean de gran importancia ecológica, en comparación con los insecticidas químicos. Este rango de actividad estrecho también puede ser una limitante para muchas situaciones de control de plagas agrícolas, ya que los cultivos con frecuencia tienen varias especies de plagas atacando simultáneamente, por lo que los agricultores prefieren usar insecticidas químicos que maten a todos los insectos presentes. Otra desventaja es que la mayoría de los productos comerciales emplean preparaciones de espora-cristal que son de poca persistencia en campo. La vida media del complejo espora-cristal sobre la superficie de las hojas es con frecuencia de menos de un día (Beegle *et al.* 1981, Ragaei 1999), por lo que se requiere de aplicaciones frecuentes para lograr una eficacia aceptable. La corta persistencia en campo es debido a que Bt es susceptible a la radiación ultravioleta (UV) (Morris 1983). En el caso de aplicaciones de Bti en cuerpos de agua para el control de mosquitos se presenta el mismo problema de persistencia, debido a una rápida sedimentación del complejo espora-cristal hacia el fondo de los cuerpos de agua, quedando fuera del alcance de las larvas de mosquitos, especialmente anofelinos que se alimentan en la superficie de los cuerpos de agua. Para resolver estos problemas, se está trabajando en la expresión de los genes tóxicos de Bt en hospederos alternativos, tales como plantas (para el control de plagas agrícolas) y otras bacterias (que coexistan en los cuerpos de agua para el control de larvas de mosquitos).

2.3.3 Proteínas Cry

La actividad tóxica de Bt se encuentra en el cristal parasporal, el cual está compuesto por endotoxinas denominadas Cry. Se han descrito proteínas Cry que son tóxicas a lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros y homópteros, así como contra ácaros y otros invertebrados como nematelmintos y platelmintos (Feitelson 1993).

En 1989, Höfte y Whiteley propusieron una clasificación para las proteínas Cry, agrupándolas en base a sus propiedades moleculares e insecticidas en 4 clases principales: Cry I, II, III y IV, y las citolisinas (Cyt). Las proteínas CryI son tóxicas a lepidópteros, CryII a lepidópteros y dípteros, CryIII a coleópteros y CryIV a dípteros. Debido al aumento en el número de genes *cry*, surgió la necesidad de una nueva nomenclatura y en 1998 Crickmore y colaboradores propusieron una nomenclatura basada en la similitud de la secuencia primaria de aminoácidos.

En la más reciente nomenclatura (Crickmore *et al.* 1998) existen dos tipos de endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. La definición de proteína Cry es muy amplia, ya que incluye a cualquier proteína parasporal de *B. thuringiensis* que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos, o cualquier proteína que muestre similitud con las actuales proteínas Cry. Las proteínas Cyt representan al grupo de proteínas parasporales que muestran actividad hemolítica o tienen similitud con la secuencia de las proteínas Cyt (Bravo 2001). Hasta la fecha las proteínas Cry se agrupan en 46 grupos y varios subgrupos, y algunas siguen conservando los nombres que recibieron en la clasificación de Höfte y Whiteley, cambiando sólo el número romano por un número arábigo.

Si bien las proteínas Cry tienen elevada toxicidad y especificidad, ya que son tóxicas a un reducido número de especies de insectos, las proteínas Cyt muestran una menor toxicidad y mayor inespecificidad. Es así que en términos de su uso como bioinsecticidas, las proteínas Cry son de mayor interés.

Las endotoxinas responsables de la toxicidad contra dípteros son los Cry4Aa (134 kDa), Cry4Ba (128 kDa), Cry10Aa (78 kDa), Cry11Aa (72 kDa), Cyt1Aa (27 kDa) y Cyt2Ba (29 kDa) y sus genes se encuentran dentro de un plásmido de 137 kb (Ben-Dov *et al.* 1996, 1999). Los genes *cyt* tienen una alta actividad hemolítica y citolítica *in vitro* (Thomas y Ellar 1983), y no guardan relación genética con los genes *cry*. Los genes *cyt* sinergizan la toxicidad frente a mosquitos, ya que las dos toxinas juntas aumentan su actividad (Wu y Chang 1985).

2.3.4 Mecanismo de acción de las proteínas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* involucra la solubilización del cristal en el intestino medio del insecto, un procesamiento proteolítico de la protoxina por las proteasas digestivas, adherencia de la toxina activa o δ -endotoxina a receptores de intestino, y la inserción de la toxina en la membrana apical para crear canales o poros de iones. Para que las protoxinas se activen, deben ser ingeridas por un insecto susceptible, por lo que la actividad alimenticia es un prerequisite para su acción insecticida (Andrews *et al.* 1987, Thompson *et al.* 1995, Schnepf *et al.* 1998).

El intestino medio de muchas larvas de insectos tiene un pH alcalino que varía de 8 a 12, mientras que la hemolinfa tiene un pH cercano a la neutralidad. El pH alcalino del intestino solubiliza el cristal parasporal y libera las protoxinas, las cuales son digeridas parcialmente a su vez por proteasas del insecto para producir la toxina activa o δ -endotoxina. Estas toxinas se unen a receptores específicos de la membrana peritrófica de las células epiteliales, lo cual provoca un desequilibrio en la integridad de la membrana y se forman poros catiónicos, a través de los cuales entran principalmente K^+ y Na^+ . Esto desestabiliza el equilibrio osmótico de la célula, por lo que ésta tiende a absorber agua. Las células se hinchan hasta que estallan y esto provoca que se formen hoyos en el intestino del insecto por donde penetra el contenido neutro de la hemolinfa hacia el mesenterón. A su vez, el contenido alcalino del mesenterón pasa a la hemolinfa. Esto último, provoca que al incrementarse el pH de la hemolinfa, la conducción nerviosa del insecto cese y el insecto se paralice y deje de comer, pudiendo morir de inanición en días posteriores. A su vez, al

disminuir el pH del mesenterón, se crea un ambiente propicio para que la bacteria se desarrolle y pueda causar una septicemia en el insecto infectado (Tanada y Kaya 1993).

A nivel citológico, es posible observar la aparición de vacuolas por la distensión del retículo endoplásmico y la desintegración de las mitocondrias en las células columnares del epitelio intestinal. Después de las primeras cuatro horas de la ingestión del cristal, las micro-vellosidades del intestino se destruyen y las células columnares y caliciformes se deterioran, de esta manera los tejidos epiteliales quedan sujetos a daño mecánico causado por el contenido intestinal. Los efectos histológicos parecen estar confinados al epitelio del intestino medio. Estos cambios son acompañados por una serie de cambios fisiológicos en la larva. Además del daño a las membranas del epitelio del intestino medio, se presenta una severa restricción en el transporte de potasio, el cual es el responsable de mantener el pH alto en el intestino. Después de varias horas, todos los transportes activos se abaten (Percy y Fast 1983).

La especificidad de las proteínas insecticidas a los organismos susceptibles a *B. thuringiensis* depende, en gran medida, de la interacción específica de la proteína con una molécula receptora localizada en la membrana de las células del epitelio intestinal del insecto. Hasta el momento se han identificado dos clases de proteínas como receptores para las proteínas Cry, una proteína de 120 kDa que es una aminopeptidasa N, que se une a la proteína Cry1Ac, la cual se purificó a partir de vesículas de *Manduca sexta*, *Heliiothis virescens* y *Lymantria dispar* (Gill *et al.* 1992, Knight *et al.* 1994, Valaitis *et al.* 1995), y una glicoproteína de 210 kDa similar a las cadherinas, que se une a la toxina Cry1Ab purificada a partir de membranas de *M. sexta* (Vadlamudi *et al.* 1995). La unión específica involucra dos etapas, una que es reversible y la otra que es irreversible. Investigaciones recientes sugieren que la toxicidad se correlaciona con la unión irreversible (Liang *et al.* 1995), la cual se basa en la inserción de la toxina dentro de la membrana, pero también puede ser el reflejo de una unión muy fuerte de la toxina con el receptor (Rajamohan *et al.* 1995).

Las protoxinas de Bt de aproximadamente 130-140 kDa requieren de un procesamiento proteolítico para liberar las toxinas activas. Esta acción es mediada por el pH alcalino y proteasas del intestino medio del insecto, produciendo un fragmento tóxico de 60-70 kDa resistente a proteasas, derivado a partir de una degradación proteolítica, mayoritariamente del extremo carboxi-terminal (Höfte y Whiteley 1989). La estabilidad de este fragmento tóxico o δ -endotoxina varía de acuerdo a la cepa, por ejemplo, el fragmento resistente a proteasas de Bti es menos estable que el de las toxinas contra lepidópteros (Chungjatupornchai *et al.* 1988). Aunque de cualquier manera, todas las toxinas con procesamiento C-terminal son menos estables que las protoxinas no activadas (Aronson *et al.* 1986, Höfte y Whiteley 1989, Tanada y Kaya 1993).

2.3.5 Manipulación Genética

La manipulación genética de los genes *cry* de Bt ofrece un medio para el mejoramiento de la eficacia y de la relación costos-beneficios de los productos bioinsecticidas basados en Bt. Se ha reportado que ciertas combinaciones de proteínas Cry muestran toxicidad sinérgica hacia lepidópteros y dípteros (Lee *et al.* 1996, Wu *et al.* 1994). Además, la presencia de esporas también puede tener efecto sinérgico en la actividad de las proteínas Cry contra ciertos lepidópteros (Tang *et al.* 1996) y puede prevenir el desarrollo de resistencia en los insectos a las proteínas Cry (Moar *et al.* 1995). Es así que se pueden usar algunos factores para contribuir al mejoramiento de la toxicidad de Bt, ya sea eliminando o modificando genes presentes en Bt (Baum *et al.* 1999).

Los genes *cry* están casi exclusivamente localizados en plásmidos grandes, frecuentemente en varios plásmidos, algunos de los cuales pueden ser transferidos de una cepa de Bt a otra para mejorar sus propiedades insecticidas (González *et al.* 1982). Para transferir plásmidos de una cepa de Bt donadora a otra hospedera han sido usadas varias estrategias, como la conjugación y transformación (Baum *et al.* 1999). Se han elaborado varios bioinsecticidas basados en cepas que fueron modificadas genéticamente como Agree[®], Condor[®], Cutlas[®], Design[®] y Foil[®]. Por ejemplo, para la construcción de Condor y Cutlas se usó el plásmido que contiene al gen *cry1A* de una cepa *aizawai* que fue transferida por conjugación a una cepa *kurstaki* (Baum *et al.* 1999). Por otro lado, para el

control de mosquitos se insertaron los genes *cry* de *Bt* svar. *israelensis* en el cromosoma de *B. sphaericus*. La bacteria recombinante produjo altos niveles de expresión y fue tóxica a larvas de *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (Bar *et al.* 1998).

A pesar del modo de acción complejo de *Bt* y a que entre otras cosas, ha limitado su capacidad de competir con los insecticidas químicos, la manipulación genética de *Bt* y el mejoramiento en las formulaciones han hecho posible la comercialización de productos con mayor eficacia en el campo y que compiten con los insecticidas químicos, además de ser el método de control elegido en muchas partes de Norte América por su eficacia y compatibilidad ambiental (Baum *et al.* 1999).

2.3.6 Desarrollo industrial

Los productos bioinsecticidas a base de *Bt* pueden ser de primera, segunda o tercera generación (Cerón 2000). Los productos de primera generación son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de una cepa nativa de *Bt*. Estos bioinsecticidas son los más producidos y corresponden al 84% de los productos comerciales registrados. Los productos que utilizan *Bt* svar. *israelensis* para el control de mosquitos y jejenes son por ejemplo: Vectobac® y Skeetal® (Abbott), Bactimos® (Solvay/Duphar) y Teknar® (Thermo Trilogy).

Los productos de la segunda generación son aquellos formulados a partir de una mezcla de esporas y cristales provenientes de una cepa de *Bt* a la cual se le introdujo, por conjugación o transformación, los genes que codifican para las δ -endotoxinas de genes presentes en varias cepas, y que por lo tanto tienen un espectro de actividad más amplio hacia otros insectos plaga. El empleo de varios genes *cry* con diferentes modos de acción puede reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia (Tabashnik 1994), además de que ciertas combinaciones exhiben una actividad sinérgica hacia plagas de insectos lepidópteros (Lee *et al.* 1996) y dípteros (Crickmore *et al.* 1995). Estos productos corresponden al 12% de los producidos por las compañías Abbott, Ecogen y Thermo Trilogy Co.

Los productos de la tercera generación han sido desarrollados con el propósito de resolver las limitaciones de una inadecuada aplicación y de su corta toxicidad residual. Un ejemplo es la formulación que contiene bacterias recombinantes muertas de *Pseudomonas fluorescens* que han sido transformadas con genes que codifican δ -endotoxinas de Bt. Este sistema se denomina CellCap® y consiste en matar las células transformadas durante la fase estacionaria de crecimiento y así utilizar estos microorganismos recombinantes muertos para encapsular varias toxinas de Bt (Gaertner *et al.* 1993). Estos productos representan el 4% del total de la producción y son elaborados por la empresa Mycogen.

2.4 LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son un grupo diverso de microorganismos que tienen 2 características en común: son procariotas Gram-negativas y llevan a cabo fotosíntesis oxigénica como las plantas. Las cianobacterias filogenéticamente están relacionadas con las bacterias pero ecológicamente son más similares a las algas y han sido clasificadas también dentro de las algas verde-azules debido a su apariencia de algas. El hecho de que algunas cianobacterias sean capaces de fijar nitrógeno hace que la designación de alga sea menos apropiada (Rippka *et al.* 1979). Las cianobacterias presentan muchas variaciones, principalmente en cuanto a estructura y desarrollo, ejemplo de esto es que existen formas unicelulares y filamentosas, especies que habitan aguas dulces o saladas, etc. (Kuhlemeier y van Arkel 1987). En general, son más tolerantes a los ambientes extremos que las algas, ya que se les puede encontrar en lagos salinos y aguas termales, en la superficie de rocas y suelos. Es posible observar en los desiertos algunas capas secas de cianobacterias sobre la superficie del suelo, que son especies que permanecen en latencia durante la mayor parte del año y que se desarrollan al tener condiciones favorables, como las lluvias de primavera.

La mayoría de las cianobacterias contienen elementos extracromosómicos de DNA. En la mayoría de las cepas examinadas se han encontrado secuencias que codifican para endonucleasas específicas, por lo que al trabajar con cianobacterias es importante evitar la restricción del DNA cuando se introduce hacia cepas heterólogas.

Las cianobacterias han sido sujetas a diversos estudios fisiológicos, bioquímicos, dinámicas de crecimiento, de nutrientes y fotosíntesis. Recientemente se han desarrollado una serie de herramientas moleculares para la manipulación genética de estos procariontes fotosintéticos, lo cual podría rendir importantes beneficios científicos y tecnológicos (Koksharova y Wolk 2002).

2.4.1 Manipulación genética

En los pasados 50 años, el estudio de las cianobacterias se ha incrementado gradualmente (Koksharova y Wolk 2002), siendo estos estudios principalmente dirigidos hacia el aprovechamiento biotecnológico de estos microorganismos (Deng y Coleman 1999, Toyomizu *et al.* 2001, Shao *et al.* 2002). La disponibilidad de técnicas genéticas permite el mejoramiento biotecnológico de las cianobacterias para producir productos específicos (como pigmentos fotosintéticos), para su uso en la biodegradación de contaminantes orgánicos en la superficie del agua, para la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano (Koksharova y Wolk 2002, Dai *et al.* 2001) y para muchos otros propósitos. En fechas recientes se ha dirigido la atención hacia las cianobacterias que coexisten en los cuerpos de agua junto con las larvas de mosquitos, con el objeto de usarlas como vehículos para la liberación prolongada de toxinas insecticidas en la zona de alimentación larvaria de mosquitos (Tandeau de Marsac *et al.* 1987, Angsuthanasombat y Panyim 1989, Chungjatupornchai 1990, Murphy y Stevens Jr 1992, Xudong *et al.* 1993).

2.4.1.1 Vectores de clonación. Un vector es una molécula de DNA con un origen de replicación autónomo del DNA cromosómico y que posee zonas en su genoma que no son esenciales para su manipulación y que pueden usarse para introducir trozos de DNA exógeno. Los vectores funcionan como portadores de DNA y permiten la replicación de éste en forma de una molécula híbrida vector - DNA del inserto, dentro de la célula hospedera. Las características que debe presentar un buen vector son: que sea de fácil manipulación en *E. coli*, que tenga alta eficiencia de transformación y que se mantenga de forma estable en la cianobacteria. Se ha encontrado en muchas cianobacterias plásmidos que tienen un rango de tamaño de 2.3 a más de 100 kb (Kuhlemeier y van Arkel 1987).

Debido a que ninguno de estos plásmidos endógenos parecen codificar para alguna función común en un plásmido, como por ejemplo la resistencia a un antibiótico, se han tenido que desarrollar vectores de clonación para aquellas cepas que son capaces de recibir DNA ya sea por transformación o por conjugación. Algunos ejemplos son enlistados en la tabla 1 (Houmard y Tandeau de Marsac 1988):

Tabla 1. Algunos vectores de clonación para cianobacterias, desarrollados a la fecha.

Cianobacteria	Origen de rep. Cianobacterial	Origen de rep. <i>E. coli</i>	Vector
<i>Synechococcus</i> sp. PCC6301	pBAI	pBR322	pBAS18
<i>Synechococcus</i> sp. PCC6311	pDF3	pBR325	pDF30
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7002	pAQ1	pBR322	pAQE1 y 2
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	pUC1	pACYC184	pUC104, 105
	pUC13	pACYC184	pUC303
	pUH24	pBR328	pSG111
	pANS	pDPL13	pPLANB1 y 2
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	pUG1	pACYC177	pUF3
<i>Plectonema</i> sp. PCC6306	pGL3	pBR328	pGL5
<i>Nostoc</i> sp. PCC6705	pGL2	pBR328	pGL4
<i>Nostoc</i> sp. PCC7107	pDU1	pBR322	pRL5 y 6
<i>Nostoc</i> sp. PCC7524	pDU1	pBR322	pVW1

Estos plásmidos híbridos contienen tanto un origen de replicación para cianobacterias, así como para *E. coli*. Adicionalmente, *Anacystis nidulans* R2 contiene 2 plásmidos endógenos (pUH24 y pUH25), de los cuales el plásmido pequeño pUH24 (7,845pb) se ha secuenciado y usado para la construcción de la mayoría de los vectores híbridos. Este plásmido parece no ser esencial para la célula, ya que se le ha curado sin que presente algún efecto. En el caso del plásmido grande, pUH25 (50kb), han fallado todos los intentos para curar a la cepa.

También se han construido vectores para ciertas cepas de *Anabaena* y *Nostoc* a partir de los plásmidos pDU1 (6.3kb) de *Nostoc* PCC7524 y del plásmido pBR322 de *E. coli*, que pueden replicarse en varias cepas de cianobacterias que pertenecen a la sección II y IV, según la clasificación de Rippka y cols. (1979). No hay reportes de que puedan

replicarse en cepas de la sección I (Koksharova y Wolk 2002). Se ha observado una pobre transferencia en cepas de *Anabaena* y *Nostoc*, lo cual puede ser debido a la restricción del plásmido por endonucleasas específicas del hospedero. Además, este vector puede fallar para replicarse o incluso que no se exprese la resistencia a los antibióticos de selección.

Los plásmidos derivados de RSF1010 (un plásmido pequeño del grupo de Incompatibilidad Q) tienen la propiedad de replicarse en una amplia variedad de bacterias Gram-negativas e incluso Gram-positivas, como los actinomicetos (Gormley y Davies 1991). Los vectores basados en RSF1010 son capaces de replicarse en *Synechocystis* (Marraccini *et al.* 1993) así como en *Anabaena* 7120 (Thiel 1994), *Synechococcus* y *Pseudanabaena* (Sode *et al.* 1992).

A la fecha, se han desarrollado varios vectores para cianobacterias unicelulares (Buzby *et al.* 1983, Gendel *et al.* 1983, Golden y Sherman 1983, Kuhlemeier 1983, Yang y McFadden 1993), sin embargo, el número de vectores para la transformación de cianobacterias filamentosas es muy limitado (Kuhlemeier *et al.* 1981, Yang y McFadden 1993), principalmente debido a que las cianobacterias filamentosas son recalcitrantes a la manipulación genética (Elhai *et al.* 1997, Moser *et al.* 1993) y a la fecha se desconoce por qué no es posible llevar a cabo una transformación genética estable.

Si consideramos a las cianobacterias como un ancestro de los cloroplastos y que son procariontes que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, similar a los cloroplastos en las plantas superiores (Wallace *et al.* 1989); se podría pensar que las cianobacterias tengan una maquinaria molecular similar a la de las plantas superiores, por lo que se podrían probar para su transformación los vectores de clonación que han sido eficientemente expresados en plantas (Cabrera-Ponce *et al.* 1997, Hunold *et al.* 1994, Kohli *et al.* 1998). Los problemas de la disponibilidad de vectores para cianobacterias podrían ser superados si se emplean con éxito a vectores de plantas que lleven al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el cual se sabe que es funcional en una gran diversidad de organismos, además de plantas (http://profiler.bgu.ac.il/site/public_site/Show_User.cfm?user_id=698).

2.4.1.2 Métodos de transformación. La transferencia genética puede llevarse a cabo de tres formas: Conjugación, Transformación, y Transducción. Sin embargo, en el caso de las cianobacterias, los trabajos publicados a la fecha plantean que el único método práctico para la transferencia de genes en estas procariontas ha sido el de transformación (Grigorieva y Shestakov 1982, Koksharova y Wolk 2002, Kuhlemeier y van Arkel 1987). De cualquier manera, las herramientas de ingeniería genética disponibles sólo han probado ser reproducibles en cianobacterias unicelulares, y casi no existen para llevar a cabo la transformación genética de cianobacterias filamentosas. Una de las razones podrían ser las nucleasas extracelulares que se encuentran frecuentemente en especies filamentosas que forman heterocistos (Wolk y Kraus 1982). Otra posibilidad es que las especies recalcitrantes para la transformación pueden necesitar más de un paso de selección para obtener transformantes estables, como ocurre con algunos cereales y otras monocotiledoneas (Gordon-Kamm *et al.* 1990).

a) Conjugación. Es la transferencia directa de DNA entre dos bacterias que han tenido contacto físico temporal. La transferencia de DNA durante la conjugación es unidireccional, sólo se realiza de la bacteria donante hacia la receptora. Como esta clase de transferencia genética requiere un contacto físico entre las bacterias participantes, el proceso es conocido como conjugación (Old y Primrose 1994).

En la conjugación, parece ser que el medio más adecuado para introducir DNA de *E. coli* hacia las cianobacterias, es usando el aparato conjugativo de rango amplio de hospederos de un plásmido del grupo P de incompatibilidad (Inc-P), como RP4 (Thomas y Smith 1987). Este plásmido fue aislado de *Pseudomonas* y se ha demostrado que puede transferir DNA hacia un rango amplio de hospederos incluyendo organismos tan distantes como mixobacterias, thiobacilos, y cianobacterias unicelulares y filamentosas. Esta estrategia se basa en las propiedades conjugativas y las funciones de transferencia de plásmidos de ayuda. Es decir, se transfieren genes mediante vectores acarreadores de *E. coli*, aprovechando las propiedades conjugativas de amplio rango del plásmido RP-4 (Thomas y Smith 1987).

Muchas bacterias Gram-negativas pueden recibir plásmidos con rango amplio de hospederos que pertenecen al grupo P de incompatibilidad, por medio de la conjugación. La capacidad de recibir un plásmido conjugativo probablemente depende sólo de la estructura de la membrana celular exterior, la cual es muy similar entre las bacterias Gram-negativas.

El mantenimiento de un plásmido requiere tanto de que el plásmido escape de la restricción por endonucleasas en el nuevo hospedero como de que sea capaz de replicarse en ese hospedero. Si esta estrategia no funcionara, la alternativa puede ser el construir un plásmido quimérico. Un plásmido quimérico debe contener secuencias que son necesarias para la replicación en diferentes hospederos, esto es, que sean derivados de plásmidos endógenos de estos hospederos. El vector debe llevar uno o más marcadores que permitan la selección del plásmido en el hospedero de interés (Thomas y Smith 1987).

Se han construido vectores para ciertas cepas de *Anabaena* y *Nostoc* a partir de plásmidos pDU1 de *Nostoc* PCC7524 y del plásmido pBR322 de *E. coli*, pero se ha observado una pobre transferencia por conjugación en cepas de *Anabaena* y *Nostoc*, lo cual puede ser debido a la restricción del plásmido por endonucleasas específicas del hospedero. Además, este vector puede fallar en replicarse o incluso no expresar la resistencia a los antibióticos de selección.

b) Transformación. Es el proceso de transferencia genética mediante el cual una bacteria (receptora) incorpora un fragmento de DNA desnudo que se encuentra en el medio exterior en solución. Este fragmento se puede recombinar con el cromosoma receptor de una forma heredable mediante zonas de homología. Es un proceso aleatorio y puede transferirse cualquier porción del genoma entre bacterias. Se denomina transformación debido a que las células bacteriales son convertidas de un tipo a otro, por ejemplo células sensibles a la penicilina que se transforman a células resistentes a este antibiótico (Old y Primrose 1994).

Las bacterias capaces de incorporar fragmentos de DNA se denominan competentes. En estas células el DNA parece incorporarse en la bacteria por zonas en las

que se está sintetizando la pared celular (por lo que se dice que el DNA está desnudo). Es así que este proceso es dependiente de tratamientos que afecten a la pared celular.

Tras la transformación, la célula que ha recibido el DNA se suele denominar transformante. En cianobacterias se ha reportado tanto la transformación cromosómica como la plasmídica. La transformación cromosómica involucra la recombinación del DNA cromosómico de la cepa donadora con el DNA cromosómico en regiones homólogas en la cepa receptora. En el caso de la transformación plasmídica, ésta involucra la introducción de un plásmido replicativo en la célula receptora (Porter 1988). Algunas cianobacterias son naturalmente transformables por DNA exógeno, aunque los detalles moleculares de esta transformación no han sido aclarados. Las cepas de tipo silvestre de *Anacystis nidulans* R2 han mostrado que son naturalmente competentes y que pueden tomar DNA cromosómico aislado de mutantes que son resistentes a eritromicina y estreptomicina. Además de la transformación de *A. nidulans* R2, se conoce de trabajos de transformación de otras cepas unicelulares como *Synechococcus* PCC6301 y PCC7002, y *Synechocystis* PCC6308, PCC6714 y PCC6803. Algunas técnicas de transformación son las siguientes:

- Electroporación (Electrotransformación). Este es un método de transformación artificial. Por este método es posible introducir DNA en bacterias, células animales y también en vegetales. La electroporación consiste en la introducción de DNA foráneo a las bacterias sometiendo la mezcla de células y DNA a un pulso eléctrico intenso (12,000 volts/cm) pero muy breve (milisegundos). Este pulso convierte a la membrana celular en momentáneamente permeable, permitiendo la incorporación del DNA foráneo al interior de la bacteria. Esta técnica ha sido usada para transformar diversas cianobacterias (Boussiba *et al.* 2000). Para su uso con células animales y vegetales se deben de usar condiciones más suaves del campo eléctrico, además de que las células vegetales requieren de un tratamiento previo para convertirlas en protoplastos sin pared.

- Biobalística. La técnica de biobalística es una de las más exitosas para transformar células vegetales (Hamilton *et al.* 1992), y podría funcionar en las cianobacterias debido a varias razones; tales como: a) la técnica tiene un rango ilimitado de hospederos; b) no existe restricción de tejido o tipo de células para transformar; y c) ésta es la única técnica disponible donde la pared celular no es un obstáculo para la transformación (Hamilton *et al.* 1992). La biobalística o bombardeo con micropartículas es un proceso que permite introducir DNA a casi cualquier tipo de célula por medio de partículas microscópicas (tungsteno u oro) impulsadas por una descarga de helio a alta presión. Este método ha sido utilizado con éxito para producir plantas transgénicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre los que se incluyen hojas, meristemos, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, etc. Los principales logros en la obtención de plantas transgénicas por medio de este método, incluyen especies de gran interés económico como son la soya, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el tabaco, el trigo y el espárrago (Spencer *et al.* 1990, Kohli *et al.* 1998, Cabrera-Ponce *et al.* 1997, Klein *et al.* 1988, McCabe *et al.* 1988). La biobalística también se ha utilizado para transformar microorganismos como levaduras, hongos y el alga unicelular *Chlamydomonas*, (Gomes *et al.* 1998, Bailey *et al.* 1993, Takahashi *et al.* 1991). La biobalística parece ser, en el presente, el único medio de transformar de modo reproducible organelos celulares, como mitocondrias, y cloroplastos; y podría considerarse lo más cercano a un mecanismo "universal" de transferencia de genes, ya que por su naturaleza totalmente física, es independiente del tipo de célula blanco.

c) Trasducción. Este es un método de transferencia genética basado en un virus bacteriano (bacteriófago). El DNA bacteriano que se transfiere constituye una parte o todo el DNA contenido en el fago, el cual actúa como un vector genético (Old y Primrose 1994).

Aunque muchos cianófagos han sido aislados (Sarma y Kaur 1997), la transducción no ha sido reportada en cianobacterias (Thiel y Wolk 1987, Koksharova y Wolk 2002).

2.4.1.3 Ejemplos de cianobacterias transgénicas:

- *Anacystis nidulans* R2 fue manipulada genéticamente para conferirle resistencia a los herbicidas y prevenir la aniquilación de especies nativas por una alta aplicación de herbicidas en campos de arroz (Golden y Haselkorn 1985).
- También se han transformado genéticamente a cianobacterias para su empleo en la degradación de insecticidas residuales en cuerpos de agua (Kuritz y Wolk 1995).
- Mejoramiento de la resistencia a metales pesados en las cianobacterias *Anabaena* sp. PCC7120, *Synechocystis* sp. PCC6803 y *Synechococcus* sp. PCC7942 para su uso en la eliminación de metales pesados de aguas contaminadas (Chen *et al.* 1999).
- Sobre-expresión del gen *phrA* (principal factor de resistencia a la luz ultravioleta) en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 (Ng *et al.* 2000).
- Transferencia de genes para la tolerancia a la desecación en la cianobacteria *Chroococcidiopsis* (Billi *et al.* 2001).
- Expresión en *Synechococcus* sp PCC 7002 y *Anabaena* sp. PCC7120 del factor de crecimiento epidérmico humano para estimular la proliferación de muchos tipos de células, principalmente de tejido epidérmico y epitelial (Dai *et al.* 2001).

- Cianobacterias como sistemas para la liberación de genes que expresen toxinas mosquitocidas de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* para su uso en el control de mosquitos.

2.4.2 Cianobacterias transgénicas con genes *cry*

La expresión de genes bacterianos que codifican toxinas mosquitocidas de varias especies de *Bacillus* ha sido realizada tanto en especies de cianobacterias unicelulares como filamentosas. Inicialmente, los reportes sobre cianobacterias recombinantes fueron limitados a especies unicelulares tales como, *Anacystis nidulans* R2 y *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (*Synechococcus* PCC7002); y posteriormente se empezó a trabajar con una cianobacteria filamentosas, *Anabaena* PCC7120. En los experimentos realizados con estas cianobacterias recombinantes, se ha reportado la obtención de diferentes niveles de toxicidad contra larvas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (Tandeau de Marsac *et al.* 1987, Angsuthanasombat y Panyim 1989, Murphy y Stevens Jr 1992, Soltes-Rak *et al.* 1993), pero no hay reportes de que hayan sido probadas contra mosquitos del género *Anopheles*, que son los vectores de paludismo.

La obtención de cianobacterias recombinantes expresando genes que codifiquen para las proteínas mosquitocidas de *B. thuringiensis* svar. *israelensis*, se inició mediante la transformación genética de las mismas con un sólo gen mosquitocida (Angsuthanasombat y Panyim 1989, Murphy y Stevens Jr 1992, Soltes-Rak *et al.* 1993, Stevens Jr *et al.* 1994, Soltes-Rak *et al.* 1995, Murphy y Stevens Jr 1995). En estos trabajos, la expresión individual de genes mosquitocidas ha tenido cierto éxito; sin embargo, las células transformantes obtenidas han presentado niveles de actividad larvicida por debajo de los requeridos para su uso como bioinsecticidas.

En trabajos más recientes se ha comprobado la influencia que la exposición a una toxina individual, a diferencia de usar las toxinas múltiples de *B. thuringiensis*, puede tener sobre el desarrollo de resistencia en los mosquitos. Se ha demostrado que cuando se utilizan genes múltiples que codifican para diferentes δ -endotoxinas se disminuye el riesgo de generar resistencia en mosquitos, e incluso se obtienen niveles de toxicidad mucho más

elevados que los reportados previamente para cianobacterias transgénicas (Georghiou y Wirth 1997, Wu *et al.* 1997, Lluisma *et al.* 2001). El único reporte de transformación de una cianobacteria con una combinación de genes mosquitocidas de Bti es el de la cianobacteria *Anabaena* PCC7120, la cual demostró una actividad larvicida alta, producto del sinergismo entre los genes *cry4A* y *Cry11Aa* (Wu *et al.* 1997). Esto nos indica la necesidad de usar una combinación de genes mosquitocidas para ser introducidos en cianobacterias, con la intención de retardar el posible desarrollo de resistencia y obtener niveles de toxicidad adecuados.

2.4.2.1 Ventajas. Con la clonación de los genes mosquitocidas de Bti en cianobacterias se resolverían los problemas que limitan el uso de esta bacteria para el control de mosquitos, principalmente el que se refiere a la poca persistencia en los hábitats naturales de larvas de mosquitos. Estas cianobacterias tienen la ventaja de que son abundantes en la naturaleza, resisten un rango amplio de condiciones ambientales y algunas especies se ubican en las capas superficiales de los cuerpos de agua (Boussiba y Wu 1995, Vázquez-Martínez *et al.* 2002). Además, con ellas se resolvería el problema de la susceptibilidad a la radiación ultravioleta (UV) del complejo espora cristal, ya que los genes mosquitocidas estarían protegidos dentro de un hospedero. En el aspecto de seguridad, como los insecticidas de Bti no tienen un amplio espectro de actividad, esto es, que sólo tienen actividad sobre organismos específicos, no se afectaría a otros organismos que puedan alimentarse de las cianobacterias, ya que esta bacteria es inocua para organismos no blanco, incluyendo otros insectos, peces, ranas, crustáceos, y mamíferos (Margalit y Ben-Dov 2000). De igual manera, no se han reportado efectos dañinos para la cianobacteria por la expresión de genes mosquitocidas (Wu *et al.* 1997, Lluisma *et al.* 2001). Además, las cianobacterias permiten la posibilidad de hacer distintas manipulaciones para lograr formulaciones más potentes.

2.4.2.2 Desventajas. La principal desventaja de las cianobacterias transgénicas es que todos los trabajos de inserción de genes mosquitocidas han sido realizados usando cepas de cianobacterias adaptadas a laboratorio como *Agmenellum quadruplicatum* PR-6, *Synechococcus* PCC7942, *Synechocystis* PCC6301, y *Anabaena* PCC7120 (Murphy y

Stevens Jr 1992, Sangthongpitang *et al.* 1997, Xudong *et al.* 1993); las cuales no están adaptadas a ambientes naturales y al pretender liberarlas al campo no serían exitosas debido a que su capacidad adaptativa es baja comparada con las cepas silvestres (Wu *et al.* 1997). Para lograr la liberación al medio de cepas portadoras de Bt la solución sería la reintroducción de especies silvestres recombinantes a sus hábitats naturales (Boussiba *et al.* 2000). Lo anterior plantea también varios problemas ya que en primer lugar, las cepas silvestres (aisladas de sus hábitats naturales) son extremadamente difíciles de manipular y los problemas inician desde el aislamiento de los cultivos axénicos (Connell y Cattolico 1996, Bolch y Blackburn 1996, Choi *et al.* 2002, Cho *et al.* 2002), el establecimiento de una estrategia para la transformación, y la elección de los vectores de clonación adecuados que escapen de las actividades de las endonucleasas de restricción que se presentan de forma abundante en las cianobacterias y que son un fuerte obstáculo para lograr la transformación con varios vectores (Wolk y Kraus 1982, Koksharova y Wolk 2002). Una vez lograda la transformación, otro inconveniente a superar es que tendrá que demostrarse que las cepas de cianobacterias transgénicas serán adecuadas para un cultivo masivo y a largo plazo, sin que pierdan los genes *cry* o disminuya su toxicidad (Lluisma *et al.* 2001). Debido a que no es posible usar selección de antibióticos en cultivos a gran escala, será esencial obtener cepas que continúen siendo larvicidas en ausencia de selección, problema que ya se ha presentado con varias cianobacterias entre éstas, *Anabaena*, la cual perdió su toxicidad cuando se cultivó sin selección (Lluisma *et al.* 2001).

2.4.3 *Phormidium animalis*

2.4.3.1 Taxonomía. La filogenia de las cianobacterias es pobremente entendida. La mayoría de los esquemas de clasificación se basan en las formas de las células o de las colonias. Bourrely en 1970, clasificó al género *Phormidium* dentro de la Familia *Oscillatoriaceae*, y luego en la clasificación de Stainer (1977), *Phormidium* también quedó comprendido dentro del sub-grupo de las Oscillatoriales. Rippka y cols. (1979) dividieron a las cianobacterias en cinco secciones. Las secciones I y II son unicelulares, células individuales o formando agregados coloniales. Las secciones III a la V, son descritas como filamentosas, que forman un tricoma (cadena de células) el cual crece por división celular intercalada. En este esquema, *P. animalis* se encuentra ubicado dentro de la Sección III:

cianobacterias filamentosas que no forman heterocistos y que se dividen por fisión binaria en un plano (Fig. 1).



Fig. 1 Cianobacterias del grupo LPP, con vaina mucilaginosa marcada y tricomas rectos. Comprende los géneros *Lyngbya*, *Plectonema* y *Phormidium*, y son identificadas como especies homólogas basándose en análisis genéticos y bioquímicos (Rippka y cols. 1979).

2.4.3.2 Pigmentos. En general, las cianobacterias contienen los pigmentos ficocianina y aloficocianina organizados en complejos proteicos llamados ficobilisomas.

Las cianobacterias o algas verde-azules deben su nombre al pigmento que las tiñe, ficocianina. La ficocianina es un pigmento azul natural, adherido a la membrana fotosintética. Se le encuentra en cantidades de más del 20% de las proteínas de las cianobacterias y es una molécula de almacenamiento de nitrógeno. También contienen clorofila A, el mismo pigmento fotosintético que usan las plantas superiores. De hecho, el cloroplasto en las plantas es como una cianobacteria simbiótica. Sin embargo no todas las algas verde-azules son azules, algunas formas son rojas o rosas, debido a que muchas cianobacterias también producen un tercer pigmento, rojo, la ficoeritrina.

La absorción de energía radiante en el aparato fotosintético de las cianobacterias se hace a través de las moléculas de clorofila A y a los ficobilisomas. La clorofila se encuentra asociada a las proteínas constituyentes de las membranas. Los ficobilisomas están unidos hacia la parte exterior de la membrana y actúan en la transferencia de energía hacia el centro de reacción.

2.4.3.3 Morfología. Una característica de las cianobacterias de este género es la estructura compleja de su envoltura formada por múltiples capas, la cual se compone, iniciando desde dentro, de la membrana citoplásmica (aproximadamente de 6 nm) la cual

está cubierta por una capa de peptidoglicanos de grosor variable (más de 35 nm en *Phormidium uncinatum*) y una membrana exterior (cerca de 6 nm). La envoltura celular combina características Gram-positivas (capa de peptidoglicanos), así como Gram-negativas (membrana exterior) (Hoiczky y Baumeister 1995). Adherida a la compleja pared extracelular se encuentra la vaina, la cual consiste de una capa individual de un fino material fibrilar con un grosor total de más de 0.3 μm (Hoiczky 1998). Mientras se mueven, los filamentos secretan una mucosidad que parece ser un prerequisite para este tipo específico de movilidad. La mucosidad está compuesta de fibras de carbohidratos. Las cianobacterias filamentosas forman agregados muy apretados de los cuales no es fácil obtener filamentos individuales y esto dificulta la reducción del acarreo de bacterias contaminantes que pueden estar firmemente adheridas a la mucosidad secretada por los filamentos. Las propiedades adhesivas temporales que tiene esta mucosidad han sido demostradas a partir de aislados de *Flexibacter* y también puede explicar los movimientos observados de partículas adheridas al mucus (Knudsen *et al.* 1999).

2.4.3.4 Potencial como agente de control. La cianobacteria filamentosa *P. animalis* es una cianobacteria silvestre que fue aislada en el sureste de Chiapas, México; de cuerpos de agua que son hábitats permanentes de mosquitos *An. albimanus*, tales como canales de irrigación, estuarios, y lagunas de mangle (Vázquez-Martínez *et al.* 2002). *Phormidium animalis* ha sido encontrada no sólo coexistiendo con las larvas de uno de los principales vectores de paludismo en México (Vázquez-Martínez *et al.* 2002), sino que también constituye una fuente de alimento para el desarrollo larval de este mosquito (Vázquez-Martínez *et al.* 2003). Lo anterior hace a esta cianobacteria un candidato excelente para manipularla y probar su eficiencia como un posible agente de biocontrol de mosquitos vectores de paludismo.

3. HIPÓTESIS

La cianobacteria *Phormidium animalis* se encuentra presente en diversos criaderos de mosquitos constituyendo una fuente común de alimentación para las larvas de *Anopheles albimanus*. Además, el éxito reportado en la cría de mosquitos *An. albimanus* con una alimentación a base de *P. animalis* como dieta única, permite generar la hipótesis de que es factible usar a esta cianobacteria silvestre como portadora de genes mosquitocidas, y emplearla como agente biocontrolador de mosquitos. Debido a que la técnica de biobalística ha sido exitosa para transformar a diversos organismos, es posible emplearla para introducir en el genoma de la cianobacteria *P. animalis* una combinación de genes de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* con el propósito de obtener una cianobacteria recombinante con un alto potencial mosquitocida en comparación a una cianobacteria que lleve un solo gen mosquitocida.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Transformar genéticamente a la cianobacteria *Phormidium animalis* mediante la introducción de uno y dos genes que expresen proteínas mosquitocidas de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis*, para su uso en el control de larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Elaborar una estrategia para la obtención de cultivos axénicos de muestras de campo de la cianobacteria *Phormidium animalis*.
- Probar la eficiencia de transformación y la estabilidad de algunos vectores en pruebas de transformación de la cianobacteria filamentosa *P. animalis*.
- Elaborar construcciones genéticas que contengan uno y dos genes que codifiquen a toxinas de *B. thuringiensis* svar. *israelensis*.
- Evaluar la capacidad de transformación de las construcciones desarrolladas y su estabilidad en *P. animalis*.
- Realizar pruebas de transformación de la cianobacteria, bajo diferentes condiciones.
- Determinar la capacidad de la cianobacteria *P. animalis* como un receptor de genes de toxinas mosquitocidas de *B. thuringiensis* svar. *israelensis*.
- Demostrar la expresión de los genes mosquitocidas en la cianobacteria.
- Evaluar la actividad larvicida de las cianobacterias transgénicas, bajo condiciones de laboratorio, en larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

5. METODOLOGÍA

5.1 CONDICIONES DE CULTIVO DE LA CIANOBACTERIA *P. animalis*

Las muestras de *P. animalis* fueron colectadas en hábitats larvarios de *An. albimanus* ubicados sobre el plano costero del sureste del estado de Chiapas, México (Vázquez-Martínez et. al. 2002). Los filamentos de *P. animalis* fueron cultivados en medio ASN-10 (Ronald 1993), el cual se compone de una combinación del medio BG-11 (usado para el crecimiento de un rango amplio de cianobacterias del suelo y de aguas dulceacuícolas, Rippka et al. 1979) y del medio ASN-III (usado para el mantenimiento de cianobacterias de hábitats marinos y ambientes alcalinos, Ronald 1993) (Anexo 1). Los cultivos de la cianobacteria fueron mantenidos en un cuarto de crecimiento con exposición a luz fluorescente y a una temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y bajo un fotoperiodo de 12:12 h.

5.2 OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS DE LA CIANOBACTERIA

5.2.1 Eliminación de contaminantes por medio de lavados por centrifugación

Para la eliminación preliminar de contaminantes se usaron una serie de lavados por medio de centrifugación. Los filamentos de la cianobacteria que se cultivaron sobre placas de medio ASN-10 sólido, se colectaron y transfirieron a tubos para centrífuga de 30 ml. Los filamentos colectados se resuspendieron en medio líquido ASN-10 con ayuda de un vórtex y posteriormente fueron sometidos a un proceso de centrifugación de 10 min a una velocidad de 10,000 rpm (Biofuge Stratos Heraeus, rotor # 3335). La pastilla de filamentos fue resuspendida en medio líquido y el procedimiento de lavado fue repetido de 3 a 6 veces, hasta que el sobrenadante estuvo limpio a la vista.

5.2.2 Fragmentación de los filamentos por sonicación

Debido a que el aislamiento de filamentos cianobacteriales largos es sumamente difícil, se desarrolló un procedimiento para fragmentar los filamentos en pedazos cortos y más manejables. Una vez que se lavaron los filamentos, se llevaron a cabo ensayos de fragmentación en donde se probaron diferentes intensidades y tiempos de sonicación, así

como la frecuencia del proceso, con el objeto de obtener los fragmentos más cortos con el mínimo daño posible. Suspensiones de 5 ml de filamentos de la cianobacteria, se transfirieron a vasos de precipitado de 125 ml que contenían 45 ml de medio líquido ASN-10. Los vasos con los filamentos se conservaron sobre hielo y sobre los filamentos se aplicó un sonicador de pistilo (Lab-line Ultratip, Labsonic Systems). La eficiencia de cada ensayo fue constatada primero, por medio de observaciones al microscopio, para conocer el tamaño del filamento fragmentado; y segundo, por medio de la inoculación sobre placas de ASN-10, para verificar la viabilidad de los fragmentos. Una vez obtenidas las condiciones de fragmentación adecuadas, se realizaron varias repeticiones de esta prueba para constatar que la fragmentación de los filamentos se repetía en igual número y sin daño al tejido.

5.2.3 Limpieza por filtración de los filamentos fragmentados

Los filamentos fragmentados por sonicación se sometieron a una serie de lavados en un equipo de filtración (Millipore). Alícuotas de 5, 10 ó 15 ml de fragmentos de la cianobacteria se filtraron al vacío a través de filtros Millipore estériles (tamaño de poro de 8.0 μm , White SCWP, 47 mm).

Para la filtración se usaron varios litros de agua desionizada estéril, los cuales se hicieron pasar por la muestra a través de la membrana. Los filamentos lavados se resuspendieron en 5 ml de medio ASN-10 y el procedimiento se repitió al menos dos veces más, con cambios constantes de filtro. La suspensión de filamentos recuperada al final, se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio líquido ASN-10.

5.2.4 Tratamiento con antibióticos

Los últimos contaminantes que todavía permanecían adheridos a los filamentos se sometieron a un tratamiento con antibióticos. Primero, un cultivo líquido de cianobacterias se expuso a un periodo de “ayuno” (mantenido en la oscuridad) por 24 h para que las células consumieran sus reservas de carbón endógeno. Luego, se llevaron a cabo una serie de pruebas de susceptibilidad de la cianobacteria *P. animalis* a 5 diferentes antibióticos: carbenicilina (Cb), cloramfenicol (Cm), eritromicina (Ery), kanamicina (Km) y estreptomycinina (Sm). Cada antibiótico se agregó a cajas con medio sólido ASN-10 en las

siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 100, 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$. Las pruebas se realizaron por triplicado y se compararon contra un grupo testigo (placas con medio ASN-10 sin antibiótico). Los resultados se expresaron como el porcentaje de crecimiento de los filamentos sobre la placa de medio de cultivo. El registro del crecimiento se inició aproximadamente a los 3 días post-inoculación, cuando se detectó el crecimiento de los filamentos. Los registros se concluyeron cuando el testigo negativo cubrió la placa (21 días post-inoculación). Los antibióticos que produjeron la mayor inhibición del crecimiento de la cianobacteria se descartaron y sólo los antibióticos más inocuos se usaron para el siguiente tratamiento.

Cada antibiótico se agregó en serie a manera de “cascada” (Connell y Cattolico 1996) a 100 ml de un cultivo líquido de filamentos (previamente procesados de la manera ya descrita en 5.2.1, 5.2.2 y 5.2.3). El tratamiento se inició con el antibiótico que produjo una inhibición media del crecimiento de la cianobacteria y se finalizó con el menos inhibitorio.

Los filamentos de la cianobacteria se expusieron por 24 h a cada antibiótico, y se incubaron bajo las condiciones ya descritas. Posteriormente, los fragmentos fueron concentrados por centrifugación, limpiados por filtración, y resuspendidos en 100 ml de medio líquido ASN-10 complementado con el siguiente antibiótico. Este procedimiento se repitió para cada antibiótico y al final del tratamiento los fragmentos se dejaron libres de antibióticos por medio de lavados por filtración, y luego se resuspendieron en medio líquido ASN-10.

5.2.5 Aislamiento de fragmentos individuales

Una muestra de filamentos tratados con antibióticos fue usada para realizar diluciones seriadas (1:19, 1:9, 1:3, 1:1 y 3:1), y éstas se agregaron a cada pozo de una caja de microtitulación de 96 pozos, a un volumen final de 200 μl . Las cajas se incubaron bajo las condiciones ya descritas, y el crecimiento cianobacterial se monitoreó bajo un microscopio invertido. Los pozos con crecimiento cianobacterial se examinaron microscópicamente para detectar la presencia de contaminación. De los pozos sin

contaminación visible se tomaron alícuotas de 20 µl para inocular a placas con medio Luria-Bertani (LB) GIBCO BRL (25 g de LB/1 l de agua desionizada) y se incubaron toda la noche a 37°C. El medio LB mostró el crecimiento de una mayor diversidad de contaminantes, en comparación a otros medios que se usaron en pruebas preliminares. El contenido de los pozos que no mostraron contaminación por estas revisiones se inoculó en matraces de 50 ml con medio líquido ASN-10 y se incubaron por varios días hasta que el desarrollo de la cianobacteria fue notorio. Se realizaron, nuevamente, pruebas de contaminación a estos cultivos y los que se encontraron axénicos se transfirieron a matraces de 250 ml con medio líquido, para permitir el desarrollo de la cianobacteria.

5.3. TRANSFORMACIÓN POR BIOBALÍSTICA DE *P. animalis* CON VECTORES DE CLONACIÓN DE PLANTAS

5.3.1 Preparación del cultivo de cianobacterias para el bombardeo

Un cultivo axénico de la cianobacteria *P. animalis* mantenido en medio ASN-10 líquido se utilizó para las pruebas de transformación. Cinco días antes de la transformación, alícuotas de 5 ml del cultivo se colocaron sobre filtros estériles de 8.0 µm de tamaño de poro (White SCWP, 47 mm, Millipore), en un equipo de filtración. Los filtros con cianobacterias se colocaron sobre placas con medio ASN-10, y se incubaron bajo las condiciones ya descritas, para que se estableciera el crecimiento sobre los filtros.

5.3.2 Vectores de expresión

Los siguientes vectores de expresión de plantas se usaron para la transformación genética de la cianobacteria: **pBarGus** (Monsanto), un plásmido conteniendo como marcador de selección al gen *bar*, el cual confiere resistencia a la fosfotricina (PPT) (la molécula activa en el herbicida Basta); **pWRG1515** (Agracetus) y **pCAMBIA1301** (Cambia, Camberra Act), ambos plásmidos llevan como marcador de selección el gen *hptII* que codifica para la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a la higromicina; y **pB1426** (Datla *et al.* 1991), un plásmido conteniendo el gen *nptII* (gen de la neomicina fosfotransferasa tipo II) que confiere resistencia a varios antibióticos aminoglicosados

como la kanamicina, paromomicina, etc. Todos los vectores contienen el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y al gen reportero de la β -glucoronidasa (gusA).

5.3.3 Preparación de las micropartículas de tungsteno

5.3.3.1 Limpieza de las micropartículas. La preparación de las micropartículas de tungsteno siguió básicamente la metodología reportada por Tomes y cols. (1995). Las micropartículas de tungsteno (60 g) se colocaron en tubos Córrex de vidrio con 2 ml de ácido nítrico 0.1 N. Las micropartículas se limpiaron sonicando por 20-30 min en un sonicador de baño de agua, moviendo constantemente. El contenido del tubo se transfirió a 2 tubos Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg. El sobrenadante se eliminó y se agregó 1 ml de etanol absoluto, mezclando el contenido por sonicación durante 5 seg. Se centrifugó de nuevo por 30 seg y el sobrenadante se eliminó. La pastilla final se resuspendió en 1 ml de agua desionizada estéril con ayuda de un vórtex y se sonicó por 5 seg. El contenido de un tubo eppendorf se dividió en 4 tubos en cantidades iguales y el volumen de cada tubo se ajustó a 1 ml, con agua desionizada estéril.

5.3.3.2 Recubrimiento de las micropartículas con DNA. Dos tamaños de micropartículas de tungsteno se probaron para el bombardeo: micropartículas M-5 de 0.4 μm y micropartículas M-10 de 0.7 μm . El DNA plasmídico de los vectores de transformación se usó para recubrir las micropartículas, para lo cual se siguió el protocolo descrito por Valdez y cols. (1998). La mezcla de precipitación se preparó en un tubo Eppendorf y constituyó de: 50 μl de la suspensión de micropartículas, 5 μl de la solución de DNA (a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 50 μl de CaCl_2 2.5 M estéril y 20 μl de espermidina 0.1 M. Posteriormente, la mezcla se sonicó por pulsos hasta homogeneizar (5-10 seg). Se centrifugó 10 seg a 10,000 rpm y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 70 μl de etanol absoluto.

5.3.4 Bombardeo de micropartículas

Para el proceso de transformación de *P. animalis* por medio de bombardeo con micropartículas, se siguió la metodología propuesta por Tomes y cols. (1995) y modificada por Cabrera-Ponce y cols. (1997). Los filtros con el crecimiento cianobacterial se

bombardearon usando el sistema PDS-1000He de Bio-Rad (Sanford *et al.* 1991). Sobre el área del centro de cada uno de los discos o membranas (macroacarreadores), se colocaron 10 µl de la mezcla DNA-tungsteno. El sistema de bombardeo se preparó limpiándolo muy bien con etanol, luego se colocaron todos los accesorios del sistema y finalmente, la caja petri con medio ASN-10 llevando un filtro con la cianobacteria, se introdujo al sistema. El disparo se realizó hasta obtener la ruptura de las membranas bajo una presión de helio de 800 psi, un vacío parcial de 0.07 atm y una distancia al blanco de 5.8 cm. La caja petri con el blanco de disparo se removió del sistema y el procedimiento se repitió con las siguientes muestras.

El experimento se realizó probando 2 tamaños de micropartículas para cada uno de los vectores y con 4 repeticiones para cada combinación. En cada estrategia de bombardeo se manejaron 3 placas testigo.

5.3.5 Pruebas de Selección de los transformantes

Después del bombardeo, las membranas con los filamentos se incubaron sobre placas de ASN-10 durante 2 días, y bajo las condiciones de cultivo ya descritas. Las pruebas de selección se iniciaron a los dos días del bombardeo, cambiando los filtros de las placas con medio ASN-10 a placas con medio complementado con el antibiótico correspondiente. La selección se realizó en medio ASN-10 complementado con PPT a una concentración de 5 µg/ml para el vector pBarGus, para los vectores pCAMBIA1301 y pWRG1515 se usó higromicina a 25 µg/ml; y paromomicina a 150 µg/ml para el vector pB1426. Las membranas se transfirieron cada semana hacia placas con medio fresco.

5.3.6 Ensayo de la expresión transitoria de β-glucoronidasa (gusA)

El ensayo se realizó a las 72 h después del experimento de transformación. Para esto, se colectó una muestra de 5-10 filamentos de cada uno de los filtros bombardeados y se transfirió a pozos de cajas de microtitulación (96 pozos) conteniendo 200 µl de X-GLUC (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido, US Biological, Swampscott, MA). Las cajas de microtitulación se incubaron a 37°C por 24 h para observar si aparecía el precipitado azul producido por la β-glucoronidasa en presencia del X-GLUC.

5.3.7 Aislamiento del DNA genómico de *P. animalis*

El aislamiento del DNA genómico de *P. animalis* se llevó a cabo usando el kit Plant DNAzol® (Invitrogen). Para la extracción se usó 0.1 g de tejido (peso fresco) de la cianobacteria, el cual se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó usando un mortero y pistilo. El polvo congelado se transfirió a un tubo para microcentrífuga de 2 ml con 0.3 ml de Plant DNAzol® Reagent, y mezclado por inversión varias veces. La mezcla se incubó a 25°C con agitación por 5 min, y luego se agregó 0.3 ml de cloroformo, mezclando vigorosamente. Se incubó a 25°C con agitación por 5 min. El extracto se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo. Para precipitar el DNA, la fase acuosa se mezcló con 0.225 ml de etanol absoluto, y se almacenó a temperatura ambiente por 5 min. El DNA precipitado se sedimentó por centrifugación a 5,000 rpm por 4 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó, mezclándola con ayuda de un vórtex con solución de lavado compuesta de 1 volumen de Plant DNAzol® Reagent y 0.75 volúmenes de etanol absoluto. La muestra se almacenó por 5 min y luego, se centrifugó a 5,000 rpm por 4 min. La solución de lavado se descartó y la pastilla se mezcló vigorosamente con 0.3 ml de etanol al 70%. Después se centrifugó a 5,000 rpm por 4 min. Se descartó el etanol por decantación y la pastilla se secó al aire, y luego se disolvió en 70 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 8).

5.3.8 Análisis de restricción del DNA

Los protocolos para la manipulación del DNA se siguieron de acuerdo a Sambrook y Russell (2001). Las enzimas de restricción provenían de los laboratorios Invitrogen y se usaron acorde a las recomendaciones de la compañía. La electroforesis para el DNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE, mientras que los plásmidos de Bti se observaron en geles de agarosa al 0.6% y utilizando amortiguador TBE 0.5%.

5.3.9 Análisis del DNA mediante PCR

La transformación e integración de los vectores en el genoma de *P. animalis* se monitoreó por la detección por PCR del gen de la β -glucuronidasa (*gusA*). Los DNA de los

transformantes putativos se sujetaron a la amplificación empleando un equipo para PCR (DNA thermal cycler. Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400) y un kit para la amplificación de DNA con Taq polimerasa (Invitrogen). La mezcla de reacción (volumen de 25 μ l) se preparó con: 100 ng de DNA, 200 μ M dNTP's, 5 mM MgCl₂, 100 ng de cada primer, y 3 U de Taq polimerasa. El programa de PCR consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos que incluían desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 59°C por 30 seg y síntesis a 72°C por 30 seg, y se finalizó con un paso de extensión de 7 min a 72°C. Los iniciadores que se emplearon para la amplificación del gen *gusA* fueron: iniciador directo 5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAA- 3' e iniciador reverso 5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA - 3'. El producto de amplificación esperado fue un fragmento de 1,200 pb.

5.3.10 Análisis del DNA mediante la técnica del Southern blot

El DNA genómico (100 μ g) se digirió con la enzima XhoI, se fraccionó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia biotech) usando amortiguador 2X SSC (20X SSC: 3M NaCl, 300mM NaCl pH 7) (Southern 1975). La transferencia se llevó a cabo durante 48 h por absorción capilar, dejando transferir el DNA del gel a la membrana mediante el flujo del amortiguador de transferencia, el cual se generó por cúmulos de papel filtro seco colocados sobre la membrana. El DNA se fijó a la membrana por medio de un Stratalinker (Stratalinker® 1800 UV Crosslinker, 100V. Stratagene). La hibridación se llevó a cabo usando un método de detección no-radioactivo DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science), y siguiendo las instrucciones de la compañía. La membrana se pre-hibridó a 45°C en la solución DIG Easy Hyb por 30 min con agitación suave. La hibridación de la membrana se realizó por aproximadamente 12 h a 45°C, con un fragmento XhoI de 1,094 pb del vector pCAMBIA1301, conteniendo el gen *hptII*, usado como sonda. La membrana se lavó, primero con 2X SSC, 0.1% SDS, dos veces por 5 min a 25°C bajo agitación constante; y segundo con 0.5X SSC, 0.1% SDS, dos veces por 5 min y con agitación. Posteriormente, la membrana se lavó por 5 min en amortiguador de lavado (ácido maléico 0.1 M, NaCl 0.15 M; pH 7.5; Tween 20 0.3% [v/v]), luego se incubó 30 min en

solución de bloqueo (agente de bloqueo 10%, botella 10 del kit de Detección Roche, [w/v] en ácido maléico), y 30 min en solución de anticuerpo (Anti-Digoxigenina-AP, vial 8 del kit Roche, 1:5000 [150mU/ml] en solución de bloqueo) y dos veces en amortiguador de lavado (15 min). La membrana se expuso a la reacción en un sustrato de color, que produjo señal en las zonas de hibridación de la sonda. Finalmente, se fotografió la membrana.

5.4 TRANSFORMACIÓN DE *P. animalis* CON EL GEN MOSQUITOCIDA *CRY4A*

5.4.1 Plásmido pHT606

El gen *cry4A* se obtuvo de la cepa 4Q2-81 (plásmido pHT606), con el gen en un fragmento SstI-SphI de 4.3 kb insertado en el vector pHT315 (Delécluse *et al.* 1993). El plásmido pHT606 se sembró en placas de agar para métodos estándares BD Bioxon (23.5g de medio/1 litro de agua desionizada) complementadas con eritromicina (25 µg/ml), que fue el antibiótico de selección para este plásmido.

5.4.2 Aislamiento de plásmidos de Bti

Para el aislamiento de plásmidos de las cepas de *B. thuringiensis*, se siguió básicamente el método de Jensen y cols. (1995). En 100 ml de medio Spizizen, complementado con glucosa y extracto de levadura (Anexo 2), se sembró un inóculo muy pequeño de las colonias del plásmido pHT606. Se dejó incubando durante la noche por aproximadamente 12 h a 30°C y con agitación de 340 rpm. Al día siguiente, el cultivo se monitoreó hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.8 - 1, y luego se concentró por centrifugación a 4,500 rpm durante 30 min a 4°C (Biofuge Stratos Heraeus). La pastilla se resuspendió en 2 ml de TES frío (Tris base 30 mM, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM pH 8.0) y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm a 4°C. La pastilla se resuspendió en 2 ml de TES-sacarosa-lisozima (sacarosa 20% en TES y 1 mg/ml de lisozima) y 1 µl/ml de RNAsa, y se incubó a 37°C hasta observar esferoplastos en el microscopio, y luego se dejó 10 min en hielo. Luego se adicionaron 4 ml de la solución II (SDS 1%, NaOH 0.2 N) y se mezcló por inversión del tubo hasta obtener una solución clara. Se incubó por 5 min en hielo. Transcurrido este

tiempo, se le adicionaron 3 ml de solución III (acetato de sodio 3 M pH 4.8), se mezcló suavemente y se incubó por 20 min a -20°C .

Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se filtró y se recuperó en un tubo limpio. Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó incubar por 30 min a -70°C . Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y se enjuagó una vez con etanol al 70%. La pastilla se secó al aire por 30 min y posteriormente se resuspendió en 375 μl de agua, se le agregaron 225 μl de acetato de amonio 7.5 M, y se mezcló bien. Se adicionaron 10 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml), y se mezcló bien. Luego se agregaron 600 μl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló con agitaciones muy suaves. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm y recolectó el sobrenadante. Se realizó una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó de nuevo a 12,000 rpm por 5 min y al final, se recuperó el sobrenadante. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, y se colocó a -70°C por 30 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se dejó secar. La pastilla se resuspendió en un volumen de 400 μl de agua y se le adicionó 0.1 volumen de NaCl 5 M. Se precipitó con 2 volúmenes de etanol y se dejó 30 min a -70°C . Se centrifugó y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 μl de amortiguador TE. Los plásmidos se visualizaron en un gel de agarosa 0.6% mediante electroforesis, utilizando amortiguador TBE 0.5% (Invitrogen), y dejando migrar las muestras por aproximadamente 12 h a 20 Volts.

5.4.3 Clonación del gen mosquitocida *cry4A* en el vector pCAMBIA1301

Una vez que se eligió a pCAMBIA1301 (Fig. 2) como un vector eficiente para la transformación de la cianobacteria *P. animalis*, se procedió a la clonación del gen que expresa la proteína mosquitocida Cry4A de *B. thuringiensis*, en este vector. El gen *cry4A* fue obtenido del plásmido pHT606 (Delécluse *et al.* 1993).

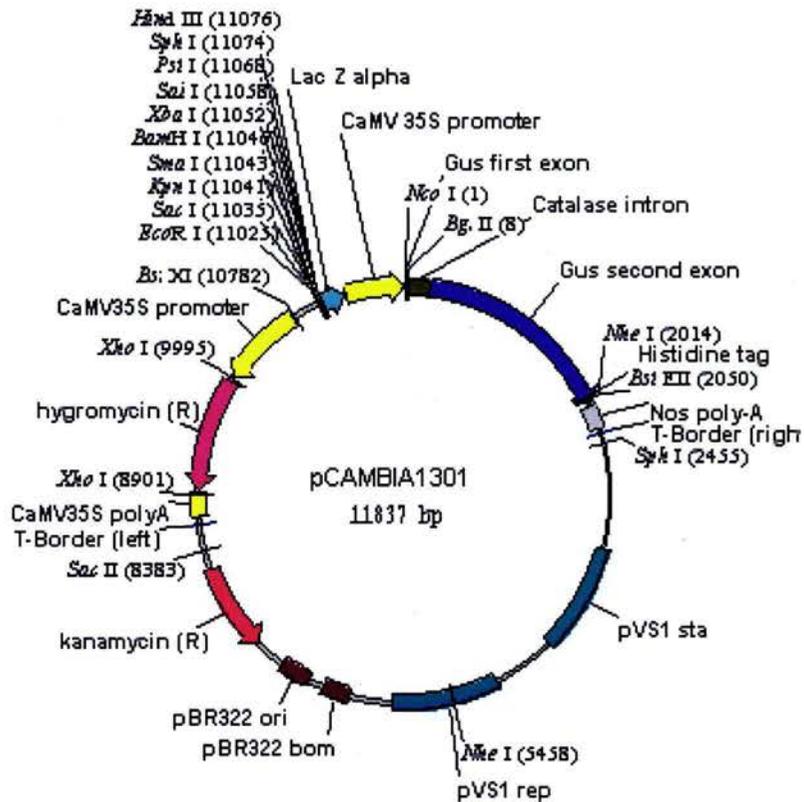


Fig. 2 Vector de transformación para plantas pCAMBIA1301, desarrollado por el Centro para la Aplicación de Biología Molecular para la Agricultura Internacional (CAMBIA). Contiene el gen *gusA* como reportero para conocer la eficiencia de transformación, el gen que codifica para la resistencia a kanamicina para su amplificación en bacterias, el gen que codifica para la resistencia a higromicina para su selección en plantas y una región de clonación múltiple para los sitios EcoRI, SacI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, Sall, PstI y HindIII.. www.cambia.org/main/r_et_1300_1301_b.htm

Se llevó a cabo una clonación direccional hacia el plásmido vector, para lo cual el DNA del vector (pCAMBIA1301, Fig. 2) y el inserto (gen *cry4A* en pHT606, Fig. 3) se digirieron con dos enzimas de restricción que reconocen secuencias en ambas moléculas. El gen mosquitocida se insertó en el sitio múltiple de clonación del vector pCAMBIA1301, en los sitios SstI – PstI. Para lograr lo anterior, el plásmido pHT606 se cortó con las enzimas de restricción SstI – PstI, para obtener un fragmento de aproximadamente 4.3 kb que codifica para el gen *cry4A*, bajo el control de su propio promotor. Posteriormente la digestión del DNA del inserto se purificó por extracción con fenol: cloroformo y precipitación con etanol. El DNA del vector digerido con las enzimas SstI – PstI fue

purificado por centrifugación en columnas MICROCON (Centrifugal Filtration Devices, Millipore), siguiendo las indicaciones de la compañía. La reacción de ligación se preparó en una relación de 3:1 con respecto al DNA del inserto y del vector, esto es, se usaron 750 ng del inserto y 250 ng del vector. La mezcla de reacción se incubó por aproximadamente 12 h a 16°C.

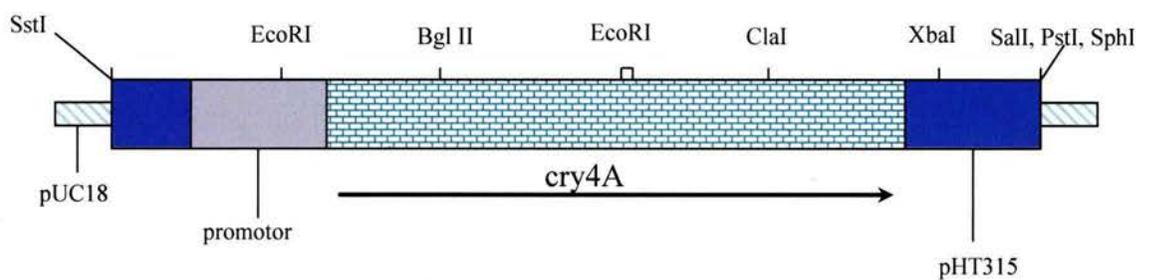


Fig. 3 Fragmento del mapa de restricción del plásmido pHT606 que contiene al gen *cry4A*, en un fragmento SstI-SphI de 4.3 kb (Delécluse *et al.* 1993).

5.4.4 Transformación por electroporación de *E. coli* con la ligación 1301-4A

Una vez que se obtuvo el DNA recombinante *in vitro*, se transfirió a células de *E. coli* para que pudiera replicarse, por lo que se realizó una electrotransformación de 50 µl de células competentes de *E. coli* cepa DH5α con 2 µl de la reacción de ligación, con el propósito de amplificar al plásmido transformante. Las células electrocompetentes de *E. coli* se descongelaron, colocándose sobre hielo. Se tomaron 50 µl de células en suspensión y se transfirieron a una celda para electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), inmediatamente se agregaron 2 µl de la reacción de ligación 1301-4A. La celda se tapó y se colocó en la cámara. La electroporación se llevó a cabo en un Electroporador Gene Pulser II with Pulse Controller Plus (Bio-Rad Laboratories) a 25 µF,

2.5 kV, 200 ohms. Antes de llevar a cabo la electroporación de las células, fue necesario descargar el electroporador sobre una celda blanco. La electroporación se realizó por duplicado usando una celda como testigo negativo (agua en lugar de DNA) y otra celda con el DNA plasmídico. Después de la descarga, la celda se removió y a la suspensión de células se adicionó 1 ml de medio LB (Broth Base. Gibco) sin antibiótico. La mezcla se transfirió a un tubo de polipropileno estéril de 15 ml y se incubó a 37°C con una agitación de 225 rpm durante 1 h. Posteriormente, se plaquearon muestras de 50 y 100 µl de la mezcla de electroporación en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina. Las cajas se incubaron a 37°C por aproximadamente 12 h. Las colonias que crecieron en las placas se sembraron en medio líquido LB complementado con Km (50 µg/ml) y luego se aisló el DNA plasmídico (sección 5.4.4.1).

Las células electrotransformadas se analizaron para detectar la presencia de los genes recombinantes, mediante la determinación de su tamaño y por los patrones de restricción (Sambrook y Russell 2001). Para corroborar la presencia del plásmido se usó una técnica rápida de extracción de DNA y para el análisis de restricción de los recombinantes se realizó una minipreparación de plásmidos (ver más adelante).

5.4.4.1 Extracción de DNA de células recombinantes de *E. coli*. La minipreparación de plásmidos de *E. coli* siguió esencialmente la metodología de Zhou (1990). De un cultivo que fue dejado en crecimiento durante la noche (12 h aproximadamente), se colectó una muestra de 1.5 ml, que se centrifugó a 14,000 rpm por 10 seg. El sobrenadante se decantó, conservando 50-100 µl, y la pastilla se resuspendió por agitación en vórtex. Se agregaron 300 µl de amortiguador TENS (amortiguador TE, NaOH 10M, SDS 10%) y se agitó en vórtex hasta que la muestra se tornó viscosa. Inmediatamente se colocó en hielo para evitar la degradación del DNA cromosómico. Se agregaron 50 µl de acetato de sodio 3 M, pH 4.8 y se agitó en vórtex hasta homogeneizar. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min para precipitar los restos de células y DNA cromosómico. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a -20°C por 20 min y posteriormente, se centrifugó a 14,000

rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con etanol frío al 70%. La pastilla se secó al aire y se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE.

5.4.4.2 Análisis de restricción y electroforético del DNA de células recombinantes de *E. coli*. El DNA de las colonias obtenidas por selección se sujetó a un análisis de restricción. El DNA plasmídico del recombinante se digirió con diferentes enzimas, de tal forma que se obtuviera un patrón de restricción esperado para los sitios conocidos. Se usaron las enzimas SstI y PstI que sirvieron para obtener el fragmento de aprox. 4.3 kb que codifica para el gen *cry4A* de la construcción pHT606. Además, se usó la enzima XhoI, para demostrar que los recombinantes presentaban el fragmento de 1,094 pb que codifica para la resistencia a higromicina, dicha región está flanqueada a sus extremos por sitios XhoI. Los resultados de las digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 1%, para comprobar la presencia de los genes *hptII* y *cry4A*.

5.4.4.3 Identificación de células recombinantes de *E. coli* por análisis PCR. La corroboración de la transformación se llevó a cabo también por PCR, usando iniciadores específicos para las secuencias de plásmidos que contenían al gen *gusA* y al gen *cry4A*. Los detalles del método de PCR se describieron en la sección 5.3.9.

El programa de PCR para la amplificación del gen *gusA* consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos que incluyeron la desnaturalización a 94°C por 30 seg, el alineamiento a 59°C por 30 seg y la síntesis a 72°C por 30 seg, y se finalizó con un paso de extensión de 7 min a 72°C. Los iniciadores empleados para la amplificación del gen *gusA* fueron: iniciador directo 5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAA- 3' e iniciador reverso 5'-GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA - 3'. El producto de amplificación esperado fue un fragmento de 1,200 pb.

El análisis de PCR para comprobar que las colonias portaran el gen mosquitocida se realizó usando oligonucleótidos iniciadores para la detección del gen *cry4A* (Zeigler 1999). Iniciador EE-4A (d) directo 5'-GGGTATGGCACTCAACCCCACTT- 3' y Un-4

(r) reverso 5'- GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC - 3' que amplificaron un producto de 1,529 pb. El programa de PCR consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos que incluyeron la desnaturalización a 94°C por 30 seg, el alineamiento a 56°C por 30 seg y la síntesis a 72°C por 30 seg, y se finalizó con un paso de extensión de 7 min a 72°C.

5.4.4.4 Midi-preparación de plásmidos de células recombinantes de *E. coli*. Una vez identificadas las colonias recombinantes, se realizó una midi-preparación de plásmidos empleando el Kit Plasmid Midi-Kit (QIAGEN). Una colonia de un cultivo selectivo en placa se inoculó en 25 ml de medio líquido LB complementado con Km (50 µg/ml) y se cultivó toda la noche (12 h aprox.) a 37°C, con una agitación de 300 rpm. El cultivo se centrifugó a 6,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1 del kit con la ayuda de un vórtex. Luego se agregaron 4 ml de amortiguador P2 y se mezcló invirtiendo 4-6 veces. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, se le agregaron 4 ml de amortiguador P3 (enfriado a 4°C) y se mezcló invirtiendo. Posteriormente se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó a 12,000 rpm, a 4°C por 30 min y se colectó el sobrenadante. Se centrifugó el sobrenadante a 12,000 rpm por 15 min a 4°C, y luego, se colectó el sobrenadante. Mientras tanto, una columna QIAGEN se equilibró con 4 ml de amortiguador QBT. El sobrenadante se agregó a la columna y se lavó 2 veces con 10 ml de amortiguador QC. El DNA se obtuvo agregando 5 ml de amortiguador QF a la columna y colectando el filtrado en un tubo limpio. Se precipitó el DNA al agregar 3.5 ml de isopropanol (a temperatura ambiente). Se mezcló y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min y a 4°C. La pastilla se lavó con 2 ml de etanol al 70% (a temperatura ambiente), luego se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se secó al aire por 5-10 min y se disolvió en 200 µl de amortiguador TE.

La construcción del vector pCAMBIA1301 conteniendo el gen *cry4A*, con la cual fue realizado el experimento de biobalística, fue nombrada como construcción p1301-4A, y tiene un peso molecular de aproximadamente 16.104 kb.

5.4.5 Transformación por Biobalística de *P. animalis* con la construcción p1301-4A

5.4.5.1 Bombardeo con micropartículas. La transformación por biobalística se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Tomes y cols. (1995) y utilizando los parámetros estandarizados por Cabrera-Ponce y cols. (1997). Para el bombardeo se aplicó una presión de Helio de 800 psi, un vacío parcial de 0.07 atm dentro de la cámara, y una distancia al blanco de 5.8 cm en el sistema biobalístico de helio PDS1000 de alta presión. En esta ocasión se usaron sólo micropartículas de tungsteno M-5, ya que en el experimento anterior se comprobó que no hubo diferencia aparente con respecto a las micropartículas M-10.

Se bombardearon 22 placas con cultivo de la cianobacteria *P. animalis* sobre filtros millipore; 16 de estas placas se bombardearon con la construcción p1301-4A, y 6 placas se bombardearon sólo con el vector pCAMBIA1301, que representó un testigo positivo. Seis placas de cultivo se usaron como testigo negativo, y se dejaron sin transformar. Durante el experimento se usaron 3 diferentes niveles de crecimiento de la cianobacteria: placas con poco crecimiento, mediano crecimiento y un abundante crecimiento de la cianobacteria.

5.4.5.2 Pruebas de selección de la cianobacteria bombardeada. Las pruebas de selección se iniciaron a los dos días después del bombardeo, transfiriendo los filtros millipore de las placas con medio ASN-10 a placas con medio complementado con higromicina a 25 µg/ml. Las membranas se sub-cultivaron cada semana en placas nuevas. La segunda etapa de selección en medio líquido se inició hasta que los testigos negativos (cianobacteria silvestre) se murieron en la primera etapa de selección en medio sólido.

5.4.5.3 Aislamiento de DNA genómico de la cianobacteria bombardeada. El DNA genómico de la cianobacteria se aisló con el kit Plant DNAzol® Reagent de Invitrogen, y siguiendo detalladamente las instrucciones de la compañía. El aislamiento se basó en tres pasos principales, 1) una extracción con 0.3 ml de Plant DNAzol® Reagent, 2) una precipitación de DNA con 0.225 ml de etanol absoluto, y 3) un lavado de la pastilla final de DNA con una solución de lavado compuesta de 1 volumen de Plant DNAzol® Reagent y

0.75 volúmenes de etanol absoluto. La pastilla final de DNA se resuspendió en un volumen de 70 µl de amortiguador TE.

5.4.5.4 Identificación de las cianobacterias transgénicas por análisis PCR. Para comprobar la transformación de las cianobacterias con la construcción p1301-4A se utilizó un análisis por PCR con los siguientes oligonucleótidos iniciadores específicos para la detección del gen *cry4A* (Zeigler 1999): EE-4A (d) directo 5'-GGGTATGGCACTCAACCCCACTT- 3' y Un-4 (r) reverso 5'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC - 3' que amplifican un producto de 1,529 pb. El programa de PCR consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos que incluyeron una desnaturalización a 94°C por 30 seg, un alineamiento a 56°C por 30 seg y una síntesis a 72°C por 30 seg, y finalizando con un paso de extensión de 7 min a 72°C.

También se realizó un análisis por PCR, usando oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar el gen de la β-glucoronidasa (gen *gusA*), presente en el vector pCAMBIA1301. El programa de PCR y los iniciadores, ya fueron descritos anteriormente. La técnica de PCR se detalló en sección 5.3.9.

5.4.5.5 Pruebas de toxicidad de la cianobacteria con el gen *cry4A*

a) Experimento de ventana biológica. Debido a que no se conocía la concentración de toxina contenida en la cianobacteria transgénica, no fue posible determinar las cantidades a usar en el bioensayo, por lo que se realizó un experimento de ventana biológica para elegir la dosis a emplear. Se probaron varias dosis entre las que se seleccionó la más adecuada. Se aplicaron volúmenes de 0.5, 1.0, 2.0, y 5.0 ml de un cultivo líquido de la cianobacteria transgénica en recipientes con 20 larvas de III estadio de *Ae. aegypti*, ajustando a un volumen final de 100 ml de agua. Transcurridas 24 h de iniciado el experimento, la mortalidad larvaria fue medida en los volúmenes probados.

b) Pruebas de susceptibilidad con larvas de *Aedes aegypti*. Se realizaron pruebas de la toxicidad del cultivo transgénico de *P. animalis* sobre grupos de 20 larvas de II

estadio de *Ae. aegypti*. La mortalidad larval se comparó contra testigos en donde se usó el cultivo silvestre de la cianobacteria. Los filamentos de la cianobacteria se agregaron a recipientes desechables de plástico conteniendo un volumen total de 100 ml de agua destilada y, transcurridos 20 min, se agregaron las larvas de mosquitos. La mortalidad se determinó después de las 24 h (WHO 1970).

5.5 TRANSFORMACIÓN DE *P. animalis* CON LOS GENES MOSQUITOCIDAS *cry4A* Y *cry4B*

5.5.1 plásmido pHT652

Los genes *cry4A* y *cry4B* están en un fragmento SstI-SphI de 8.4 kb insertado originalmente en el vector pHT315 (Fig. 4) y que dieron origen a la construcción pHT652, cepa 4Q2-81, (Delécluse *et al.* 1993). La cepa se cultivó en placas de agar para métodos estándar complementadas con eritromicina (25 µg/ml) que es el antibiótico de selección para este plásmido.

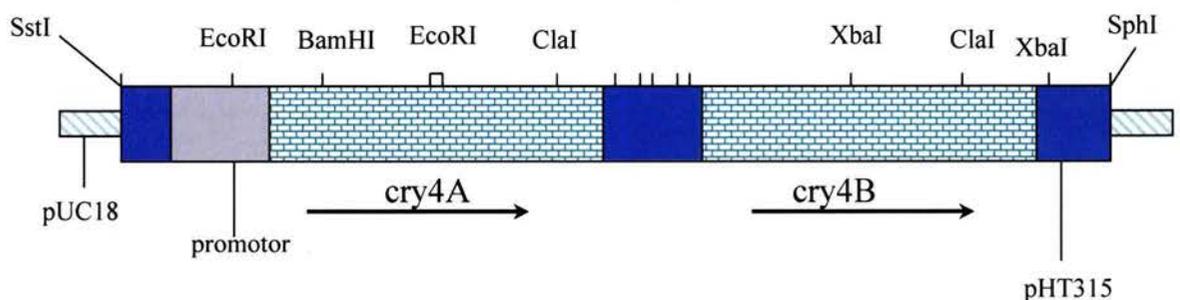


Fig. 4 Fragmento del mapa de restricción del plásmido pHT652 el cual contiene un fragmento de 4.3 kb que contiene al gen *cry4A*, y un fragmento de 4.1 kb que contiene al gen *cry4B* (Delécluse *et al.* 1993).

5.5.2 Pruebas de viabilidad y toxicidad de pHT652

Una vez obtenido el crecimiento de la cepa pHT652, se realizaron pruebas de susceptibilidad con larvas de mosquitos *Ae. aegypti* para comprobar la viabilidad y toxicidad de la cepa. Los bioensayos se llevaron a cabo con 20 larvas de III estadio de *Ae. aegypti* y el porcentaje de mortalidad se determinó a las 2 h de aplicado el tratamiento.

5.5.3 Aislamiento de plásmidos

Las colonias de *Bti* se cultivaron en medio líquido Spizizen (complementado con glucosa, extracto de levadura y eritromicina a una concentración de 25 µg/ml) y de este cultivo se realizó el aislamiento de los plásmidos de *Bti* (técnica ya descrita anteriormente).

5.5.4 Clonación de los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B* en el vector pCAMBIA1301

Para este experimento se diseñó una construcción que llevara 2 genes mosquitocidas de *Bti*, para ser insertados en el vector pCAMBIA1301. Los genes mosquitocidas se insertaron en el vector pCAMBIA1301, por medio de una estrategia de clonación direccional en el plásmido vector, cortando el DNA del vector (pCAMBIA1301) y del inserto (fragmento *cry4A-4B* en pHT652) con dos enzimas de restricción que reconocen secuencias en ambos DNA (ver más adelante).

Posteriormente se purificaron las digestiones, del DNA del inserto por extracción con fenol: cloroformo y precipitación con etanol, y del vector por centrifugación con columnas de MICROCON (Centrifugal Filtration Devices. Millipore). La mezcla de la reacción de ligación se preparó con una relación 3:1 con respecto al DNA del inserto y del vector (750 ng del inserto y 250 ng del vector) y se incubó a 16°C durante 12 h.

De las diversas estrategias probadas, se obtuvieron dos construcciones que produjeron colonias recombinantes, y que son las únicas que a continuación se describen:

Construcción 1. SstI-SphI

La construcción 1 se realizó utilizando el plásmido pCAMBIA1301 al que se le insertó un fragmento SstI-SphI de 8.4 kb de la construcción pHT652, que codifica para los genes *cry4A* y *cry4B*, bajo el control de su propio promotor. Se diseñó una construcción cuyo marcador de selección para bacterias es kanamicina y para plantas es higromicina.

Construcción 2. SstI-HindIII

La construcción 2 se realizó utilizando el plásmido pCAMBIA1301 al que se le insertó un fragmento SstI – HindIII de aproximadamente 8.4 kb de la construcción pHT652 que codifica para los genes *cry4A* y *cry4B*, bajo el control de su propio promotor. Se diseñó una construcción que tiene como marcador de selección a la kanamicina en bacterias, e higromicina para plantas.

5.5.5 Transformación por electroporación de *E. coli* con la ligación 1301-4A-4B

Se electroporaron 50 µl de células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5α con 2 µl de la reacción de ligación 1301-4A-4B. La electroporación se realizó por duplicado para cada construcción, usando una celda como testigo negativo (agua en lugar de DNA) y otra celda con el DNA de la construcción. Las colonias transformadas que crecieron en las placas se sembraron en medio líquido LB complementado con Km (50 µg/ml) para luego aislar el DNA plasmídico. Las cepas electrotransformadas se analizaron para detectar la presencia de los genes recombinantes, mediante la caracterización del tamaño del plásmido y sus patrones de restricción (Sambrook y Russell 2001).

5.5.5.1 Extracción de DNA de células recombinantes de *E. coli*. Para la extracción de DNA se empleó una técnica rápida de minipreparación de plásmidos (TENS, descrita anteriormente) de las células de *E. coli* transformantes que crecieron bajo la selección.

5.5.5.2 Análisis de restricción. El plásmido de las células de *E. coli* transformantes se sujetó a un análisis de restricción, para lo cual el DNA de *E. coli* fue digerido con la enzima XhoI para comprobar que la construcción llevara el fragmento que codifica para la resistencia a higromicina (antibiótico usado para la selección después del bombardeo).

5.5.5.3 Análisis por PCR para el escrutinio de las construcciones. Para comprobar que las construcciones contuvieran los genes *cry4A* y *cry4B* se utilizó un análisis por PCR (método detallado anteriormente en sección 5.3.9). Para lo anterior se usaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores para la detección de cada gen:

- gen *cry4B*: EE-4B (d) directo y Un-4 (r) reverso que amplifica un producto de 1,951 pb
- gen *cry4A*: EE-4A (d) directo y Un-4 (r) reverso que amplifica un producto de 1,529 pb

La secuencia de los iniciadores para la detección del gen *cry4B* (Zeigler 1999) es la siguiente: EE-4B (d) directo 5' - GAGAACACACCTAATCAACCAACT- 3' y Un-4 (r) reverso 5' - GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC - 3'.

El programa de PCR consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido de 25 ciclos que incluyeron una desnaturalización a 94°C por 30 seg, un alineamiento a 66°C por 30 seg y una síntesis a 72°C por 30 seg, y finalizando con un paso de extensión de 7 min a 72°C. Los datos del PCR para amplificar el gen *cry4A*, ya fueron proporcionados anteriormente en el texto.

La visualización del resultado del PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las muestras empleadas como testigos fueron DNA de una muestra de agua, y una muestra de *E. coli* transformada sólo con el vector pCAMBIA1301.

5.5.5.4 Midi-preps del recombinante. La midi-preparación de plásmidos se realizó con el Kit Plasmid Midi-Kit de QIAGEN, cuya técnica se describió anteriormente.

5.5.6 Transformación por biobalística de *P. animalis* con la construcción p1301-4A-4B

5.5.6.1 Bombardeo con micropartículas. Se bombardearon 30 placas con cultivo de la cianobacteria *P. animalis* creciendo sobre filtros Millipore además de 10 placas usadas como testigo negativo. Se usaron 3 estrategias para el bombardeo de la cianobacteria, destinándose 10 placas para cada estrategia de transformación. En todas se utilizó el Sistema Biobalístico de Helio, PDS1000 de alta presión.

Estrategia 1.

Se bombardearon 10 placas con el DNA de la construcción 1, obtenida al insertar los genes mosquitocidas en los sitios SstI-SphI de pCAMBIA1301.

Estrategia 2

Se bombardearon 10 placas con el DNA de la construcción 2, obtenida al insertar los genes mosquitocidas en los sitios HindIII - SstI de pCAMBIA1301.

Estrategia 3

3.1 Se bombardearon 5 placas con una mezcla del DNA de la construcción 1 más el plásmido pHT652.

3.2 Se bombardearon 5 placas con una mezcla del DNA de la construcción 2 más el plásmido pHT652.

5.5.6.2 Pruebas de selección de los transformantes. Las pruebas de selección de las cianobacterias transformantes se iniciaron a los dos días después del bombardeo, cambiando los filtros Millipore de las placas con medio ASN-10 a placas con medio complementado con el antibiótico para la selección (higromicina a 25 µg/ml). Las membranas se subcultivaron semanalmente en placas nuevas. Los filamentos que demostraban tener un mejor crecimiento, y que podían considerarse posibles clones transgénicos, se transfirieron individualmente a placas por separado. Luego de la etapa de selección en medio sólido, los cultivos más destacados en crecimiento se pasaron a la etapa de selección en medio líquido.

Para acelerar la obtención de clones transgénicos y la mortalidad de todo el material no transformado, se incrementó la presión de selección, probando diferentes concentraciones de higromicina (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml y 300 µg/ml) en uno de los posibles clones que mejor respondió a la primera etapa de selección. Una vez que se comprobó que los clones fueron capaces de sobrevivir a una mayor presión de selección, se transfirieron todas las cianobacterias que fueron bombardeadas a una mayor concentración de antibiótico.

5.5.6.3 Aislamiento de DNA genómico. El DNA genómico de las cianobacterias transformadas se aisló con el kit Plant DNAzol® Reagent de Invitrogen, de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

5.5.6.4 Identificación de los clones transgénicos por análisis PCR. Para comprobar que las cianobacterias bombardeadas que sobrevivieron a la etapa de selección contenían los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B*, se llevó a cabo un análisis por PCR, usando los iniciadores y las condiciones de amplificación antes mencionadas y siguiendo el método descrito en sección 5.3.9.

5.5.6.5 Análisis tipo "Southern blot". El DNA genómico (100 µg) de las cianobacterias bombardeadas se digirió con las enzimas SstI-HindIII, las enzimas que flanquean el fragmento que codifica para los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B*. El producto de la digestión se fraccionó en un gel de agarosa al 1% y luego se transfirió a una membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia biotech) usando amortiguador 2X SSC (20X SSC: 3M NaCl, 300mM NaCl pH 7) (Southern 1975). La transferencia, hibridación, revelado y registro de la imagen del patrón de hibridación se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.10.

5.5.6.6 Pruebas de toxicidad con larvas de *Ae. aegypti*. La cianobacteria transformante con ambos genes mosquitocidas se sujetó a bioensayos con larvas de II estadio de *Ae. aegypti* las cuales se agregaron a recipientes desechables de plástico conteniendo agua destilada en un volumen total de 100 ml. El cultivo de *P. animalis*

recombinante se usó a una D.O.₆₀₀ de 1.6 células en promedio para los cultivos probados. Los bioensayos se realizaron por triplicado, usando como testigos negativos un grupo alimentado con la cianobacteria silvestre y otro grupo alimentado con la cianobacteria que lleva sólo al vector pCAMBIA1301. La mortalidad se determinó cada 24 h.

5.5.6.7 Pruebas de susceptibilidad con larvas de *Anopheles albimanus*. Una prueba definitiva de la expresión de las proteínas tóxicas en las cianobacterias recombinantes, fue la realización de bioensayos con larvas del mosquito *An. albimanus*. Para esto, se realizaron pruebas con grupos de 20 larvas de II estadio de *An. albimanus* con el cultivo de *P. animalis* recombinante y se comparó la mortalidad larval contra dos testigos negativos, el cultivo silvestre de *P. animalis* y el cultivo de *P. animalis* que lleva el vector pCAMBIA1301. La cianobacteria se usó a una D.O.₆₀₀ de 1.6 células en promedio, y transcurridos 20 min, se adicionaron a recipientes desechables de plástico con agua destilada a un volumen total de 100 ml. La mortalidad se determinó cada 24 h.

5.5.6.8 Cortes histológicos con larvas de mosquitos. Con el objeto de corroborar el efecto que la cianobacteria conteniendo los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B* de *Bti* causó sobre el intestino medio de las larvas, se colectaron larvas de *Ae. aegypti* que fueron expuestas a la cianobacteria transgénica en las pruebas de susceptibilidad, así como larvas testigos (del insectario y sin exposición a la cianobacteria mosquitocida). Las larvas se colocaron en el líquido fijador AFATD (75 ml de etanol al 96%, 10 ml de formaldehído, 5 ml de ácido acético, 10 ml de dimetilsulfóxido, y 1g de ácido tricloroacético). La duración de la fijación fue de 24 a 72 h, al término de la fijación, el fijador se eliminó con varios lavados en etanol al 70%. Las larvas se lavaron dos veces en etanol al 96% por 30 min cada lavado, luego tres veces en etanol absoluto por 30 min cada uno. Posteriormente, las larvas se transfirieron a una solución compuesta de 2/3 de etanol absoluto y 1/3 de Hemo-De por 30 min, luego a una solución de 1/3 de etanol absoluto y 2/3 de Hemo-De por 30 min, y finalmente a Hemo-De por 24 h. Al finalizar se realizó la inclusión en parafina.

La inclusión en parafina consistió de tres cambios de parafina del mismo punto de fusión (de 58° a 60°C) de una hora cada uno, en una estufa a 60°C. Posteriormente se

realizó la inclusión, orientando cada larva de forma horizontal en moldes pequeños de microscopía electrónica conteniendo parafina del mismo punto de fusión, caliente y limpia. Este procedimiento se efectuó fuera de la estufa y con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los moldes con las larvas se transfirieron a los bloques con parafina caliente, y luego de enfriarse, se guardaron a 4°C para solidificarla.

Con un microtomo se realizaron cortes histológicos seriados, de diferentes grosores (20, 15, 12 μm). Los cortes histológicos se colocaron extendidos sobre un portaobjetos, después se desparafinaron en Hemo-De por 1 h, para al final ser montados en un portaobjetos con solución cytosil. Las observaciones se realizaron en un microscopio (Mod. DMRE, Marca Leika) y se tomaron fotos en contraste diferencial de interferencia (Nomarski) y contraste de fases a 20X y 40X.

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS

6.1.1 Eliminación de contaminantes

La estrategia de obtención de cultivos axénicos inició con una separación de los principales contaminantes del cultivo por medio de lavados por centrifugación. En una serie de pruebas preliminares se observó que a bajas fuerzas de centrifugación se formó una pastilla muy suave de filamentos, difícil de aislar por decantación. En cambio cuando se aplicó una fuerza mayor de centrifugación se precipitaron la mayoría de los contaminantes y se facilitó separar sólo los filamentos. Es así que las condiciones óptimas de centrifugación se establecieron a 10,000 rpm (11,963 g) por 10 min. Este procedimiento eliminó la mayoría de los contaminantes que no se encontraron suspendidos en el cultivo de la cianobacteria, cuando se repitió varias veces hasta que el sobrenadante apareció transparente. El proceso también ayudó a concentrar los cultivos para el siguiente paso.

6.1.2 Pruebas de fragmentación de los filamentos

Para fragmentar los filamentos de la cianobacteria se probó una serie de procedimientos dentro de los que se incluyen, la aplicación de vórtex a un cultivo adicionado con perlas de vidrio, aspersion con alta presión, gradientes de Percoll, sonicación en baño de agua, entre otros. El uso de un sonicador de pistilo resultó ser la técnica más eficiente para fragmentar los filamentos cianobacteriales. Con el sonicador de pistilo se probaron diferentes combinaciones de potencias, números de ciclos, longitudes de sonicación y periodos de descanso. Las condiciones de sonicación óptimas elegidas fueron aquellas en las que la mayoría de los filamentos mostraron de 1 a 3 células y sin que se presentara daño al filamento. La fragmentación por sonicación se estableció a un poder de 40 watts por dos periodos consecutivos de 30 seg, y con un intervalo intermedio de 10 seg. Durante todo el proceso de sonicación las muestras fueron mantenidas sobre hielo. Los fragmentos que fueron inoculados en medio ASN-10 sólido desarrollaron filamentos normales.

6.1.3 Lavados por filtración de los filamentos fragmentados

La mayoría de los contaminantes que estuvieron fuertemente adheridos a la envoltura de los filamentos, se eliminaron al realizar la filtración al vacío a través de filtros millipore de 8 μm de poro y pasando un exceso de agua desionizada estéril a través de la membrana. Aunque todavía se presentó contaminación en la muestra, el monitoreo de crecimiento bacterial en medio LB, indicó una reducción substancial de las bacterias asociadas.

6.1.4 Tratamiento con antibióticos

Los cultivos se sometieron a un tratamiento con antibióticos para eliminar los contaminantes que aún permanecían en los filamentos. De los 5 antibióticos probados, eritromicina causó la mayor inhibición de crecimiento de la cianobacteria, y kanamicina el más bajo (Fig. 5). La mayoría de los antibióticos mostró una relación inversa entre crecimiento y concentración de antibióticos (Fig. 5), observándose una decoloración de los filamentos (amarillamiento) en las 2 concentraciones más altas. De acuerdo a estos resultados, se llevó a cabo una estrategia de tratamiento serial con los antibióticos, de la cual se excluyó a la eritromicina. El tratamiento inició con una aplicación de carbenicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), seguida por estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$), luego cloranfenicol (100 $\mu\text{g/ml}$) y por último kanamicina (150 $\mu\text{g/ml}$). Cada antibiótico se dejó actuar por 24 h y luego se eliminó por filtración.

6.1.5 Aislamiento de fragmentos individuales

Después de seguir todos los procedimientos descritos anteriormente, los filamentos fragmentados aún mostraron una mínima presencia de contaminación bacterial. Por lo anterior, de una muestra tratada de la forma ya descrita, se tomaron fragmentos individuales (o los mínimos posibles), los cuales se aislaron por dilución serial y se cultivaron separadamente en pozos de cajas de microtitulación (96 pozos). Los mini-cultivos de las cajas de microtitulación se monitorearon y se encontró a casi la mitad de las muestras con contaminación bacterial visible por observación al microscopio de contraste de fases o por crecimiento bacterial en medio LB. Los filamentos de los pozos que se desarrollaron libres de bacterias se transfirieron a medio líquido ASN-10 y se monitoreó por 10 días para

detectar cualquier posible contaminación. Los cultivos axénicos obtenidos se mantuvieron creciendo bajo condiciones asépticas.

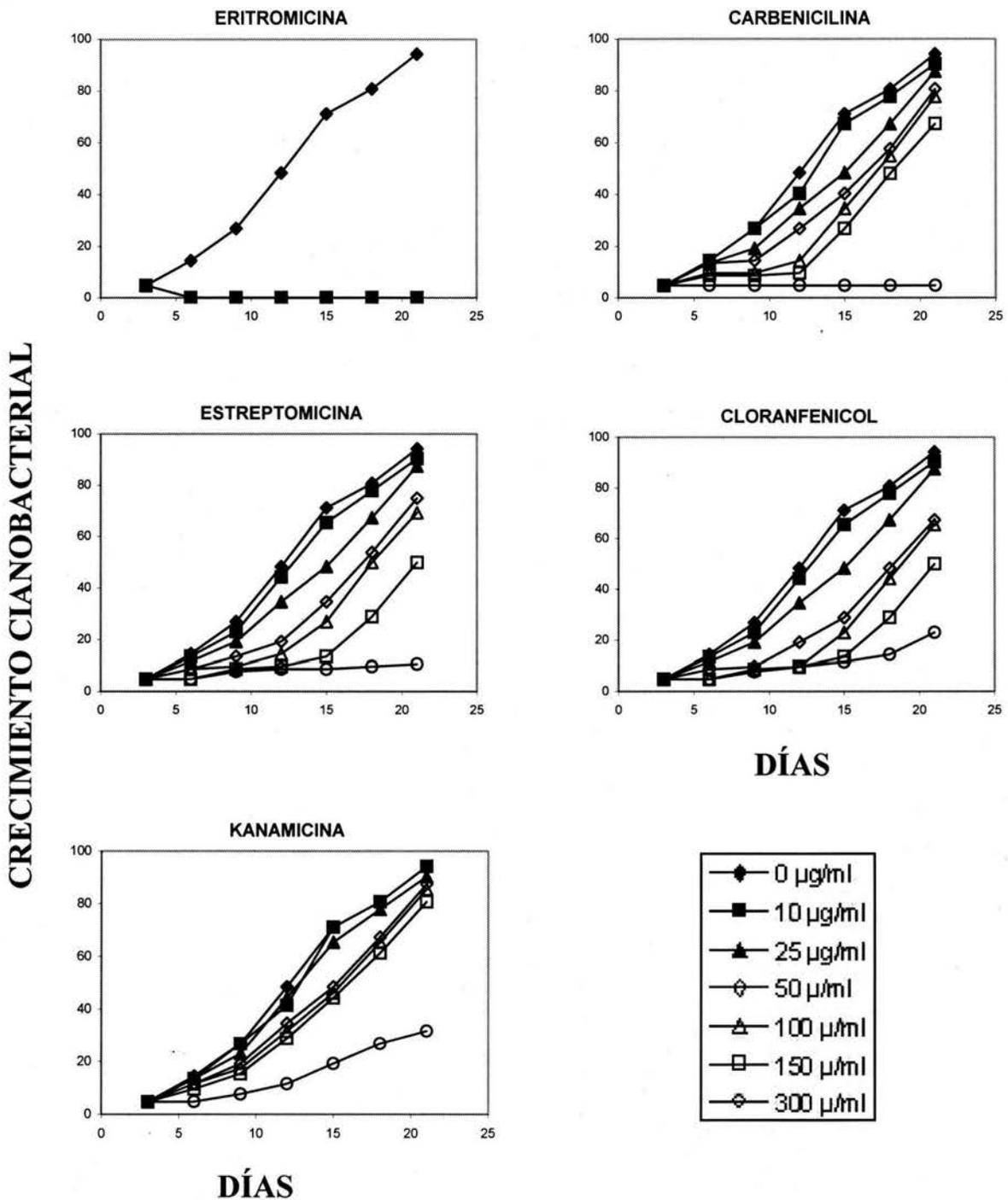


Fig. 5 Pruebas de susceptibilidad de *Phormidium animalis* al tratamiento con cinco antibióticos. Cultivos mantenidos en medio ASN-10 sólido durante un periodo de 22 días. El crecimiento fue registrado como el porcentaje de cobertura de los filamentos sobre la superficie de la caja petri.

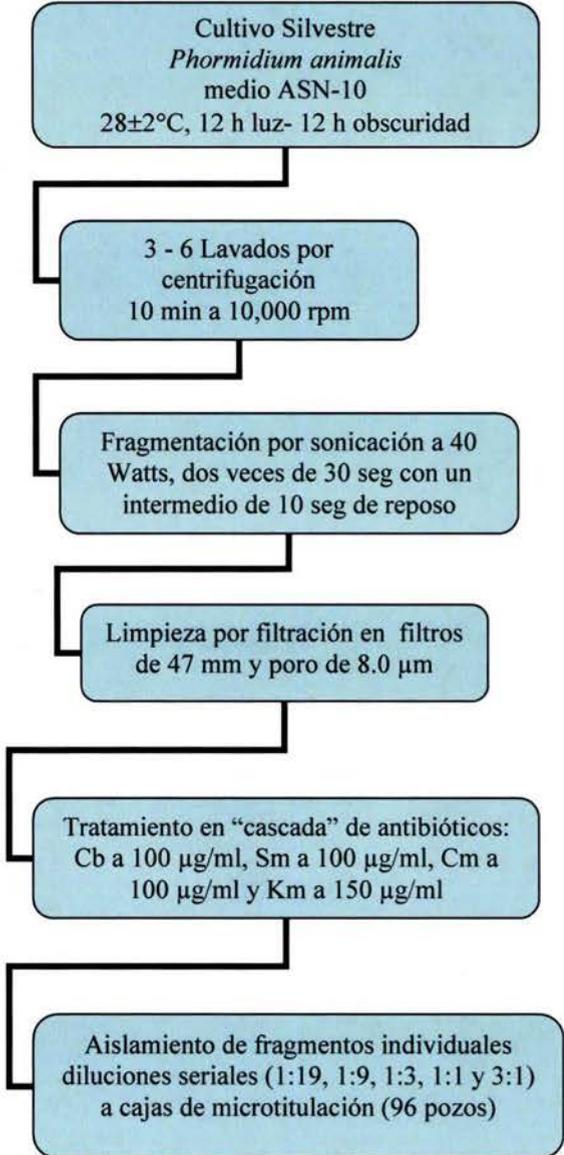


Fig. 6 Estrategia de aislamiento para la obtención de cultivos axénicos de *P. animalis*.

6.2 TRANSFORMACIÓN BIOBALÍSTICA DE *P. animalis* CON VECTORES DE CLONACIÓN DE PLANTAS

6.2.1 Transformación y selección de los recombinantes

A los 4 meses de la selección en placas de las transformantes, se observó un crecimiento notable de los cultivos bombardeados con los vectores pCAMBIA1301 y pWRG1515, resistentes a higromicina. No se observó crecimiento en los filamentos bombardeados con los vectores pBarGus y pB1426, ni tampoco en los cultivos de la cianobacteria silvestre usados como testigos (Fig. 7). Cuando los filamentos resistentes a higromicina se diferenciaron de la colonia original, varios de estos se seleccionaron individualmente y se cultivaron por separado en placas con medio ASN-10 complementado con antibiótico. Después de 12 a 14 subcultivos semanales se obtuvieron 60 colonias resistentes a la higromicina, las cuales se transfirieron a medio líquido con antibiótico para incrementar la población de la cianobacteria recombinante. La etapa de selección en medio líquido se mantuvo por un periodo de 2 meses (8 sub-cultivos) observándose que solamente 29 colonias bombardeadas sobrevivieron a esta selección adicional.

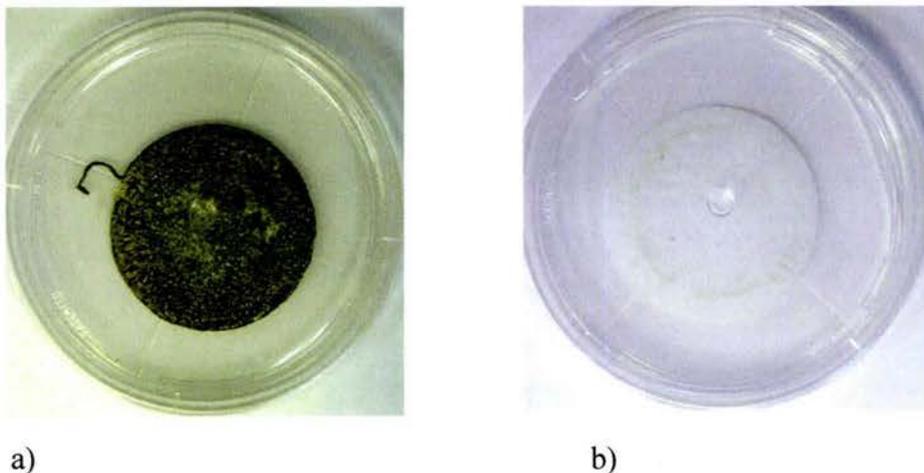


Fig. 7 Cultivo transformado y testigo negativo de *P. animalis*. a) cultivo transformado con pCAMBIA1301, usando micropartículas de tungsteno M-5; b) cultivo silvestre bombardeado con micropartículas M-5 sin el vector. Ambos fueron seleccionados en 25 mg/l higromicina.

Se detectó una diferencia con respecto al número de clones resistentes obtenidos entre los vectores pCAMBIA1301 y pWRG1515 (Tabla 2). Durante la primera etapa de selección en placa se obtuvieron 36 y 24 clones de los filamentos bombardeados con pCAMBIA1301 y pWRG1515, respectivamente. Para la segunda etapa de selección en medio líquido, sobrevivieron 22 clones del pCAMBIA1301 y 7 clones del pWRG1515. A pesar de estas diferencias obvias entre los vectores, no fue posible calcular la eficiencia de transformación, debido a que esta cianobacteria no forma colonias individuales definidas.

Tabla 2. Cianobacterias transformadas por biobalística con los plásmidos pCAMBIA1301 y pWRG1515, y número de muestras positivas por el análisis de PCR a la presencia del gen *gusA*.

Placa bombardeada	Vector	Tamaño de micropartícula	Muestras en selección	PCR positivas
1	pWRG1515	M-5	3	3
2	pWRG1515	M-5	3	0
3	pWRG1515	M-5	2	0
4	pWRG1515	M-5	3	X
5	pWRG1515	M-10	4	4
6	pWRG1515	M-10	3	X
7	pWRG1515	M-10	3	0
8	pWRG1515	M-10	3	0
		TOTAL	24	7
17	pCAMBIA1301	M-5	5	3
18	pCAMBIA1301	M-5	3	2
19	pCAMBIA1301	M-5	5	5
20	pCAMBIA1301	M-5	3	X
21	pCAMBIA1301	M-10	3	2
22	pCAMBIA1301	M-10	3	2
23	pCAMBIA1301	M-10	10	4
24	pCAMBIA1301	M-10	4	4
		TOTAL	36	22
		TOTAL GENERAL	60	29

Nota: X = eliminadas durante la selección

Con respecto al tipo de micropartículas de tungsteno usadas, no se observó diferencia entre los vectores y el tamaño de la micropartícula empleada, ya que con ambas se obtuvo un número similar de clones resistentes a la selección.

6.2.2 Análisis por PCR de las cianobacterias recombinantes

Este análisis se usó para monitorear durante el proceso de selección la presencia del plásmido. En la primera etapa de selección se obtuvo el DNA de 51 clones que se bombardearon con los vectores pCAMBIA1301 y pWRG1515, con el propósito de detectar la presencia del gen *gusA* por PCR. La electroforesis en gel de agarosa al 1% de la mezcla de reacción demostró la presencia de una banda a la altura esperada de 1,200 pb en 29 de los clones (Fig. 8). No se observó amplificación en la muestra de DNA de la cianobacteria silvestre usada como testigo.

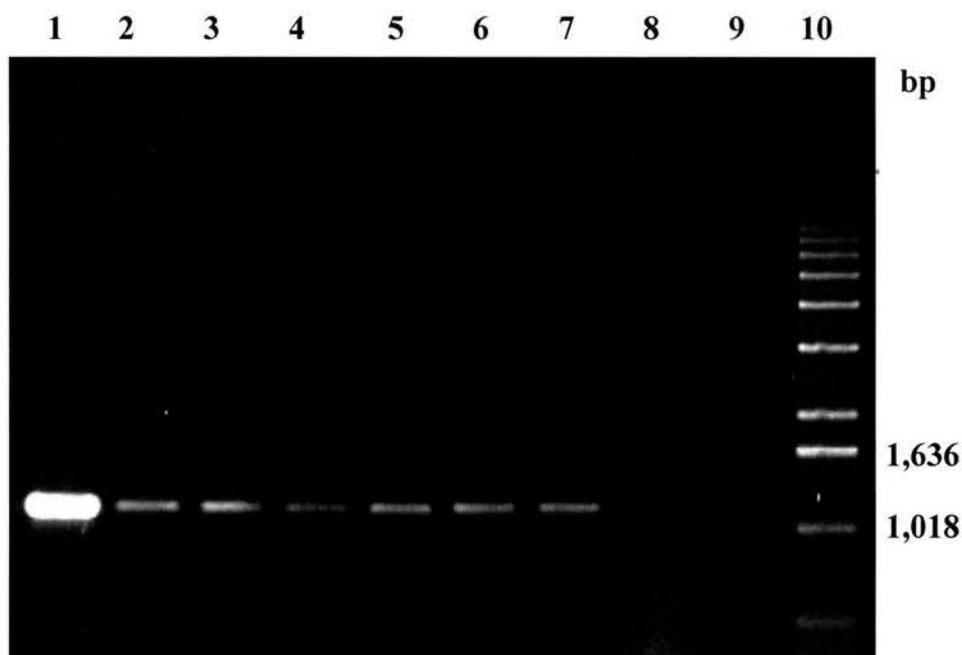


Fig. 8 Producto de la amplificación por PCR del gen *gusA* utilizando como molde DNA proveniente de clones transformados con pCAMBIA1301. Carril 1, plásmido pCAMBIA1301 (testigo positivo); carriles 2 a 7, clones transgénicos; carril 8, testigo negativo (cepa silvestre); carril 9, testigo negativo (agua); y carril 10, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

El análisis por PCR mostró amplificaciones positivas en 7 muestras bombardeadas con el vector pWRG1515 y en 22 bombardeadas con pCAMBIA1301 (Tabla 2). Concordantemente, todas las cianobacterias cuyas muestras de DNA no amplificaron por el análisis de PCR, fueron gradualmente perdidas durante la segunda etapa de selección. Los clones positivos por PCR mostraron un crecimiento estable y continuo bajo presión de selección.

La eficiencia de transformación en *P. animalis* no se pudo calcular, ya que la cianobacteria no forma colonias definidas, además, debido a que es una cianobacteria de tipo filamentoso, el número de células transformadas por filamento puede variar significativamente. Para propósitos prácticos, la eficiencia de transformación fue estimada en base al número de clones transgénicos estables derivados de una placa bombardeada (filamentos resistentes, aislados en medio selectivo, y clones positivos al escrutinio por PCR). Cuando se usó el vector pCAMBIA1301 se obtuvieron 2.5 y 3 clones por placa con micropartículas M-5 y M-10, respectivamente. Mientras que cuando se usó pWRG1515 sólo se obtuvieron 0.75 y 1 clon/caja para las micropartículas M-5 y M-10, respectivamente. No se observó una diferencia significativa entre las micropartículas M-5 y M-10, ya que ambas produjeron números similares de clones resistentes.

6.2.3 Análisis tipo Southern de las cianobacterias recombinantes

El análisis tipo Southern blot se realizó con el DNA de las cianobacterias bombardeadas con el vector pCAMBIA1301, debido a que este fue el vector que produjo el mayor número de eventos de transformación estables. Como sonda se usó un fragmento obtenido del vector que codifica para la resistencia a higromicina (gen *hptII*). La digestión del DNA se realizó con la enzima XhoI, que está flanqueando los extremos de la región Higromicina^R. La hibridación produjo una banda de 1,094 pb en las cianobacterias transformadas; sin embargo, algunos clones mostraron poca (Fig. 9, carril 7) o ninguna señal (Fig. 9, carril 5). No se detectó hibridación con el DNA de la cianobacteria silvestre usada como testigo negativo (Fig. 9). Todas las muestras que produjeron hibridación con el gen *hptII*, también mostraron una amplificación positiva con el gen *gusA*.

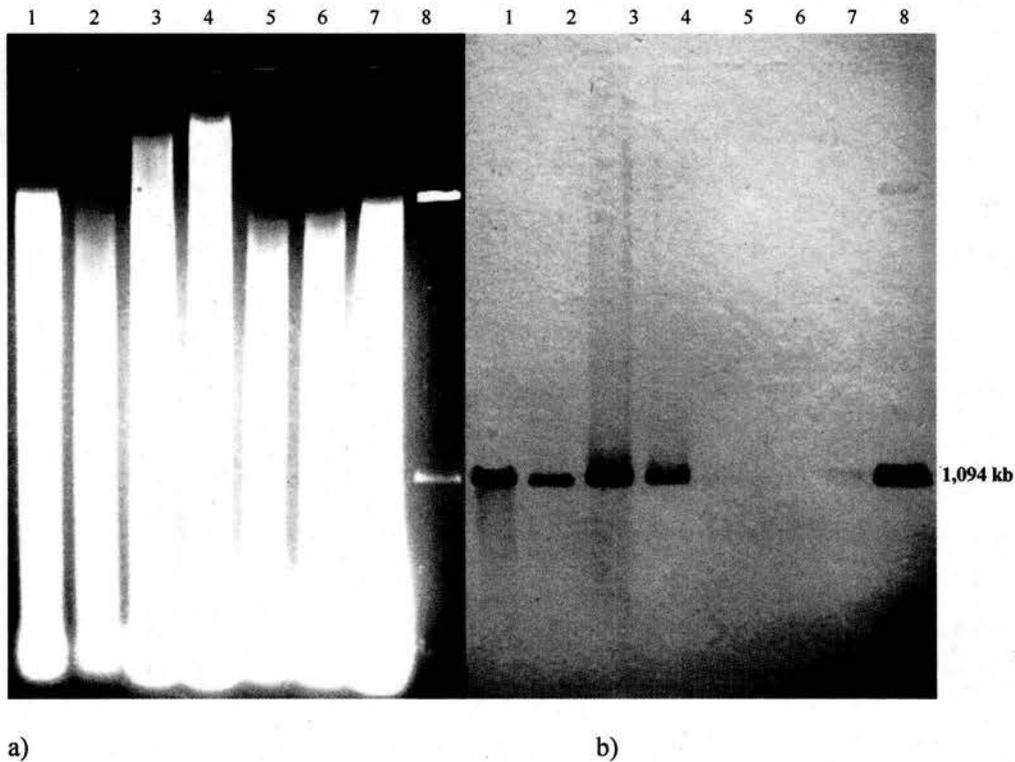


Fig. 9 Análisis tipo Southern blot de cepas de *P. animalis* transformadas con el plásmido pCAMBIA1301, usando como sonda el gen *hptII* (HigR). a) Electroforesis en gel de agarosa del DNA genómico digerido con XhoI; b) análisis Southern conteniendo el fragmento de 1,094 pb del gen *hptII*. Carriles 1 a 5 y 7, colonias transformadas; carril 6, DNA de la cepa silvestre (testigo negativo); carril 8, pCAMBIA1301 digerido con XhoI (testigo positivo).

6.3 TRANSFORMACIÓN BIOBALÍSTICA DE *P. animalis* CON EL GEN MOSQUITOCIDA *cry4A*

6.3.1 Transformación y selección de las células recombinantes de *E. coli*

Se diseñó una construcción de 16,104 pb utilizando el plásmido pCAMBIA1301 al que se le insertó un fragmento SstI – PstI de 4.3 kb que incluye al gen *cry4A*, bajo el control de su propio promotor (Fig. 10).

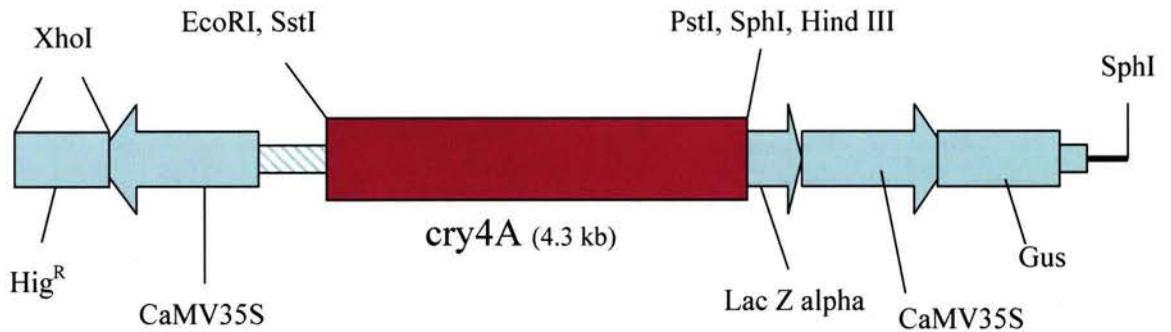


Fig. 10 Fragmento del mapa simplificado de la construcción p1301-4A de 16.104 kb, conteniendo el fragmento SstI-PstI de 4.3 kb que codifica para el gen *cry4A* insertado en pCAMBIA1301.

La amplificación de la construcción p1301-4A se realizó en células de *E. coli*. El DNA plasmídico, aislado de las células recombinantes que sobrevivieron a la selección, se sujetó a un análisis de restricción para verificar que el fragmento que codifica para el gen *cry4A* se insertó en el vector, y que además llevara el fragmento que codifica para la resistencia a higromicina, proveniente del vector. Se comprobó la presencia del fragmento que codifica para la resistencia a higromicina al digerir el DNA con la enzima XhoI y la presencia del gen *cry4A* al digerir con las enzimas SstI – PstI. El análisis de restricción de los plásmidos de las células recombinantes de *E. coli* se observó en un gel de agarosa al 1% y se corroboró la presencia de bandas a la altura de 1,094 pb que corresponde al gen *hptII* (resistencia a higromicina) y de 4.3 kb correspondiente al gen *cry4A*.

Adicionalmente, por medio de un análisis por PCR se corroboró que la construcción llevara el gen *cry4A*. En un gel de agarosa al 1% se demostró la amplificación de esta región (1,529 pb) en la construcción p1301-4A (Fig. 11), comprobando así que el

plásmido pCAMBIA1301 lleva el gen mosquitocida. Con esta construcción se llevó a cabo la transformación por biobalística de la cianobacteria.

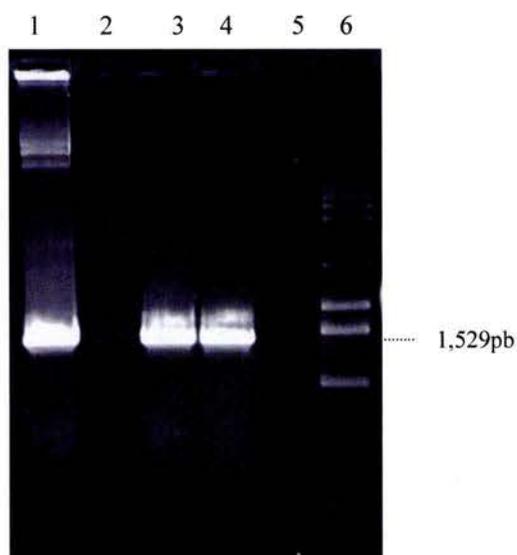


Fig. 11 Análisis por PCR de la construcción p1301-4A con iniciadores para el gen *cry4A*, mostrando amplificación a la altura de 1,529 pb. Carril 1, p1301-4A; carril 2, testigo negativo (cepa silvestre); carriles 3-4, pHT606 (testigo positivo); carril 5, testigo negativo (agua); y carril 6, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

6.3.2 Transformación por biobalística de *P. animalis* con la construcción p1301-4A

Para la transformación se probaron tres diferentes niveles de crecimiento del cultivo de la cianobacteria sobre los filtros: ligero, medio y abundante. Los filtros con las cianobacterias bombardeadas se transfirieron a los dos días del disparo a medio selectivo ASN-10 complementado con higromicina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los testigos negativos que no llevaban la construcción y por lo tanto no contenían el gen de resistencia a higromicina, se eliminaron en la primera etapa de selección en medio sólido. Las cianobacterias que se bombardearon con la construcción p1301-4A, y con el vector pCAMBIA1301 (testigo positivo), crecieron favorablemente en la selección en placa.

Conforme aumentó el crecimiento de las cianobacterias en selección, se aislaron y cultivaron de manera individual aquellos filamentos que demostraron tener un mejor crecimiento y que podían considerarse posibles clones transgénicos. Durante la etapa de selección en placa se obtuvieron 40 poblaciones que sobrevivieron al antibiótico. Se observó que entre mayor fue el crecimiento de la cianobacteria en el momento del bombardeo (ligero, medio y abundante), se obtuvo mayor sobrevivencia al antibiótico en las pruebas de selección con 10, 13 y 17 placas, respectivamente (Tabla 2). A los cultivos de las poblaciones que destacaron en la selección en placa, se les identificó como una población nueva y se pasaron a la etapa de selección en medio líquido en donde, al final, sólo sobrevivieron algunas de las cianobacterias que tuvieron un mayor crecimiento al momento del bombardeo.

6.3.3 Identificación de las cianobacterias transgénicas por PCR

Se llevó a cabo un escrutinio por PCR de las cianobacterias que se bombardearon con la construcción p1301-4A, y que sobrevivieron a la etapa de selección. El análisis por PCR con iniciadores específicos para la detección del gen *cry4A*, debe amplificar un producto de 1,529 pb. La visualización en geles de agarosa al 1% del resultado del PCR mostró, que las muestras analizadas de la cianobacteria *P. animalis* produjeron una amplificación pero no a la altura esperada, sino menor, aproximadamente de 750 pb (Fig. 12). No se produjo amplificación en las muestras que se usaron como testigos (DNA de cianobacterias silvestres sin transformar, una muestra de agua, y una muestra de DNA de una cianobacteria transformada sólo con el plásmido pCAMBIA1301), por lo que los oligonucleótidos amplificaron sólo en aquellas muestras que llevan al gen *cry4A*.

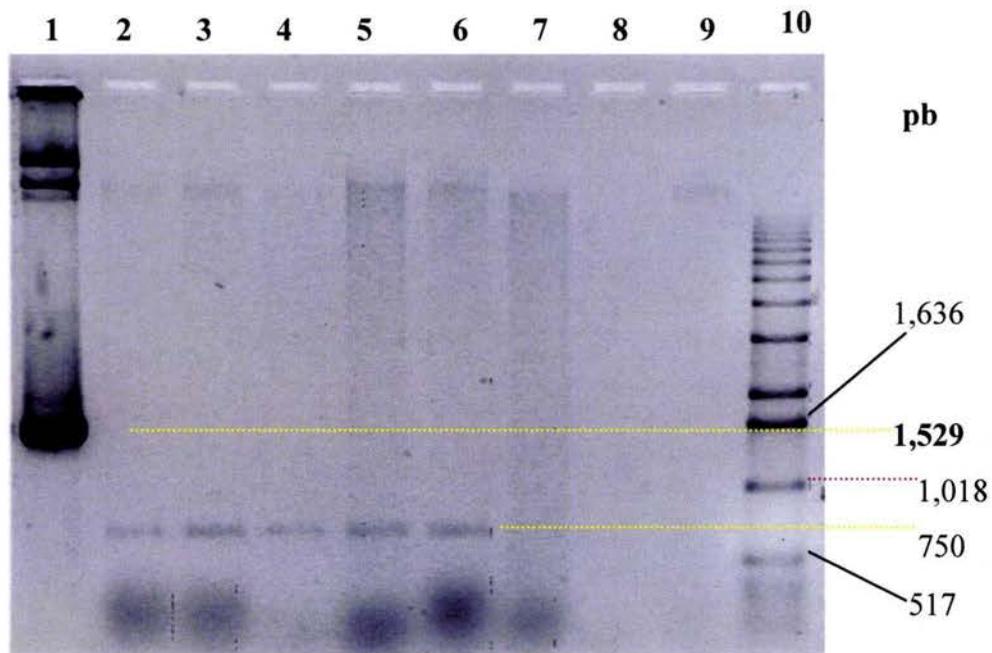


Fig. 12 Análisis por PCR con iniciadores para el gen *cry4A* en colonias transformadas de *P. animalis*. El carril 1, construcción p301-4A (testigo positivo) mostró amplificación a la altura esperada de 1,529 pb. Los carriles 2-6, clones transformados con p301-4A, amplificaron aproximadamente a los 750 pb. Carril 7, testigo negativo (cepa silvestre); carril 8, testigo negativo (agua); carril 9 testigo negativo (pCAMBIA1301), y carril 10, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

Al realizar la corroboración de la transformación por PCR de las 16 muestras originalmente bombardeadas con la construcción p301-4A, se observaron resultados diferentes a los obtenidos con las primeras poblaciones seleccionadas, ya que no se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras analizadas.

Fue notorio que las cajas con un crecimiento abundante de filamentos fueron las más exitosas en la transformación por biobalística y en las pruebas de selección, ya que el análisis por PCR mostró amplificación para el gen *cry4A* en 8 de las colonias analizadas, a diferencia de las cajas que tenían un crecimiento moderado y ligero de filamentos al momento del bombardeo, que tuvieron 3 y 1 colonias positivas por PCR, respectivamente (Tabla 3). La eficiencia de transformación en la cianobacteria con el gen mosquitocida

cry4A fue menor (0.75 clones/caja) que cuando se bombardeó a la cianobacteria sólo con el vector pCAMBIA1301 (2.5 clones/caja).

Tabla 3. Cianobacterias bombardeadas por el método de biobalística con la construcción p1301-4A. Resultados del número de muestras obtenidas en la selección, y número de clones positivos por el análisis de PCR para la presencia del gen *cry4A*.

Placa bombardeada	Nivel de Crecimiento	Muestras en selección	PCR positivas
7	Poco crecimiento	2	0
8	Poco	1	0
9	Poco	2	0
10	Poco	2	0
11	Poco	3	1
	TOTAL	10	1
12	Medio	2	0
13	Medio	2	0
14	Medio	3	1
15	Medio	2	1
16	Medio	2	1
17	Medio	2	0
	TOTAL	13	3
18	Abundante	3	1
19	Abundante	3	1
20	Abundante	4	2
21	Abundante	4	3
22	Abundante	3	1
	TOTAL	17	8
	TOTAL GENERAL	40	12

NOTA: Los números de placas 1 a 6, correspondieron a los testigos positivos transformados con pCAMBIA1301, y por lo tanto, no se efectuó PCR para identificar el gen *cry*. Las placas 23 a 28 fueron testigos negativos que murieron durante el proceso de selección. Todas estas placas fueron omitidas en la tabla.

6.3.4 Pruebas de toxicidad de la cianobacteria transgénica contra larvas de *Ae. aegypti*

Se realizó un experimento de ventana biológica con larvas de *Ae. aegypti* de III estadio a las cuales se les alimentó con diferentes volúmenes (0.5, 1.0, 2.0, y 5.0 ml) de un cultivo de la cianobacteria bombardeada. Después de una hora de exposición al cultivo, no se detectó ningún efecto sobre las larvas en ninguno de los volúmenes usados. Se repitió el

bioensayo con la cianobacteria, comparándolo contra un testigo positivo en el que se aplicó una muestra de Cry4A (cristal puro de la proteína a una concentración de 4 µg/µl). No se reportó mortalidad en ninguno de los tratamientos probados, y contrario a lo esperado, tampoco hubo mortalidad en el testigo positivo en el que se aplicó la proteína mosquitocida. Por lo anterior, se decidió llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad con larvas de estadios tempranos y no maduros, y además usando un volumen de 5 ml del cultivo de la cianobacteria, que fue el volumen más alto en el experimento antes mencionado.

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron con larvas de II estadio de mosquitos *Ae. aegypti* a las cuales se les permitió alimentarse con 0.20 g de peso húmedo de las cianobacterias bombardeadas que se adicionaron a un volumen total de 100 ml de agua destilada. El bioensayo mostró una baja toxicidad para las cepas probadas de la cianobacteria, obteniéndose un promedio de 15% de mortalidad larvaria para los clones probados (Tabla 4).

Debido a la poca toxicidad de la cianobacteria transgénica contra larvas de mosquitos, se decidió incrementar la presión de selección a los cultivos de las cianobacterias. Para lo anterior, se incrementó la concentración del antibiótico con el objeto de acelerar la selección total de los clones transgénicos y asegurar la eliminación (muerte) de todo el material no transformado. Esto es, que si en un filamento se encontraban varias células que no se transformaron, éstas se murieran y sólo quedaran las células transformadas y con actividad mosquitocida. Se realizaron de nuevo las pruebas de susceptibilidad, pero ahora con el material que sobrevivió a la etapa de mayor presión de selección. Los resultados obtenidos en este segundo bioensayo mostraron porcentajes de mortalidad larvaria más elevados que en el primer experimento, aún así, los porcentajes de mortalidad no fueron del 100%, sino de un promedio de 45.83% en los clones probados. No se observó mortalidad en los testigos que fueron alimentados con la cianobacteria silvestre, ni en los testigos alimentados con la cianobacteria que llevaba sólo al vector pCAMBIA1301, por lo que la mortalidad reportada durante los bioensayos sólo puede atribuirse a la presencia de la toxina Cry4A en las cianobacterias bombardeadas.

Tabla 4. Pruebas de susceptibilidad de larvas de mosquitos *Aedes aegypti* a las cianobacterias que portan el gen *cry4A* de *Bti*. Se muestran los tratamientos aplicados y los porcentajes de mortalidad para los dos bioensayos.

Tratamiento	Bioensayo No. 1	Bioensayo No. 2
Cianobacteria silvestre	0.00	0.00
Cianobacteria-1301	0.00	0.00
Transgénica 11	13.33	40.00
Transgénica 15	20.00	43.33
Transgénica 16	20.00	40.00
Transgénica 18	10.00	46.67
Transgénica 19	20.00	56.67
Transgénica 20	10.00	53.33
Transgénica 21	16.67	50.00
Transgénica 22	10.00	36.67
PROMEDIO	15.00%	45.83%

6.4 TRANSFORMACIÓN DE *P. animalis* CON LOS GENES *cry4A* y *cry4B*

6.4.1 Pruebas de viabilidad y toxicidad de pHT652

Con el objeto de comprobar la viabilidad y toxicidad de la cepa QHT-81 de *Bti* que lleva los genes *cry4A* y *cry4B*, se realizaron bioensayos con larvas de *Ae. aegypti*. Los bioensayos se llevaron a cabo con 20 larvas de III estadio de *Ae. aegypti* y se determinó el porcentaje de mortalidad a las 2 h de aplicado el tratamiento, encontrándose un 30% de mortalidad larvaria. El 100% de mortalidad se obtuvo a las 12 h de aplicado el tratamiento. Una vez verificada la toxicidad de la cepa, se trabajó con ella. Las colonias de *Bti* se cultivaron en medio líquido Spizizen (complementado con dextrosa al 50% y eritromicina a una concentración de 25 µg/ml) y de este cultivo se realizó el aislamiento de los plásmidos de *Bti*.

6.4.2 Clonación de los genes *cry4A* y *cry4B* en el vector pCAMBIA1301

Anteriormente, los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B* fueron subclonados en el vector pHT315, originando la construcción pHT652 (Delécluse *et al.* 1993). El gen *cry4A*

corresponde a un fragmento de 4.3 kb y el gen *cry4B* a un fragmento de 4.1 kb. Los genes *cry4A* y *cry4B* se insertaron como un solo fragmento, de aproximadamente 8.4 kb en el vector pCAMBIA1301, y como sitios de corte se usaron enzimas ubicadas a los extremos de este fragmento y que también se encontraron presentes en el vector.

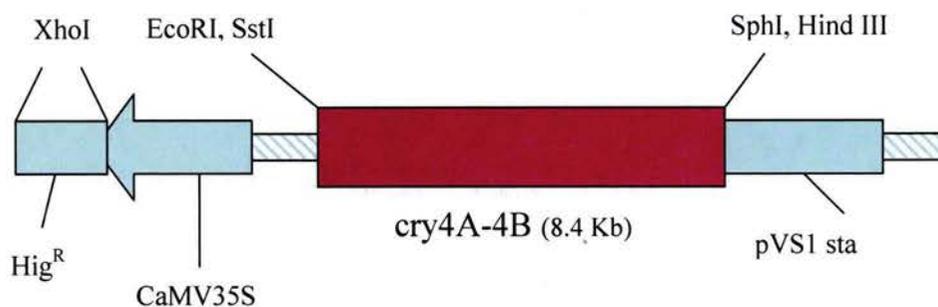


Fig. 13 Fragmento del mapa de la construcción p1301-4A-4B de 16.98 kb, conteniendo el fragmento SstI-SphI de 8.4 kb que codifica para el gen *cry4A* y *4B* insertado en pCAMBIA1301.

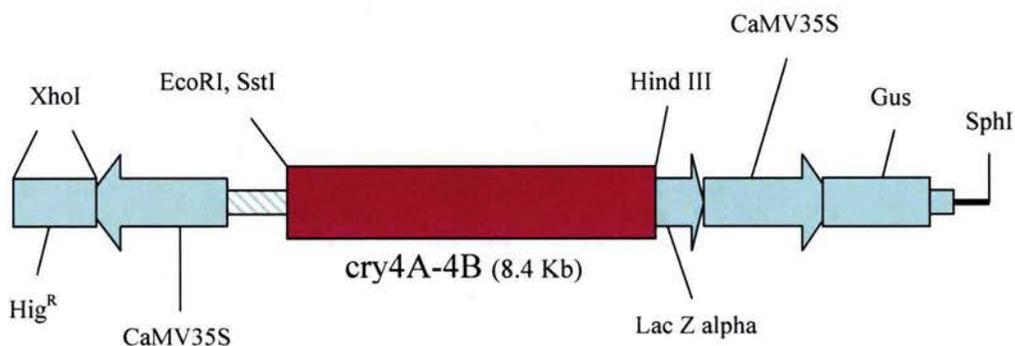


Fig. 14 Fragmento del mapa de la construcción p1301-4A-4B de 20.19 kb, conteniendo el fragmento HindIII-SstI de 8.4 kb que codifica para el gen *cry4A* y *4B* insertado en pCAMBIA1301.

De las diversas estrategias probadas para diseñar la construcción con los dos genes mosquitocidas de *Bti*, se obtuvieron dos construcciones que produjeron colonias recombinantes. La construcción 1 (p1301-4A-4B-1, Fig. 13) se obtuvo cortando el fragmento *cry4A-4B* con las enzimas SstI-SphI y ligándolo en los mismos sitios del vector pCAMBIA1301. La construcción 2 (p1301-4A-4B-2, Fig. 14) se obtuvo insertando el fragmento que contiene los dos genes mosquitocidas entre los sitios HindIII – SstI del sitio múltiple de clonación del vector pCAMBIA1301.

Las células de *E. coli* que se transformaron con el producto de la ligación se seleccionaron en Km. Posteriormente, se verificó que el fragmento que confiere la resistencia a higromicina se encontrara contenido en las construcciones, por medio de un análisis de restricción con el DNA plasmídico aislado de las células recombinantes que sobrevivieron a la selección. El patrón de bandeo de la digestión reveló una banda a la altura de 1,094 pb que corresponde al fragmento de resistencia a higromicina (Fig. 15).

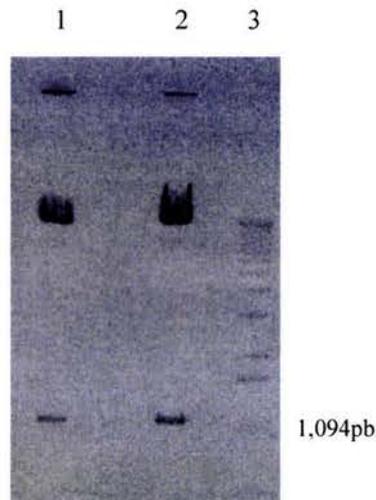


Fig. 15 Análisis de restricción de las células recombinantes de *E. coli* con la enzima XhoI. Carril 1, colonia recombinante que lleva la construcción 1 (p1301-4A-4B-1); Carril 2, colonia recombinante que lleva la construcción 2 (p1301-4A-4B-2); ambas construcciones muestran la presencia del fragmento de 1,094 pb que codifica para la resistencia a higromicina. Carril 3, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

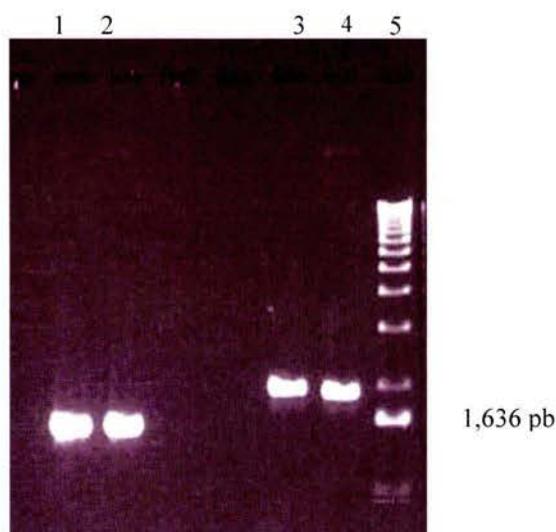


Fig. 16 Análisis por PCR de las construcciones 1 (p1301-4A-4B-1) y 2 (p1301-4A-4B-2). Carril 1, construcción 1 y carril 2, construcción 2; ambos muestran amplificación a la altura de 1,529 pb con los iniciadores específicos para el gen *cry4A*. Carril 3, construcción 1 y carril 4, construcción 2; mostrando amplificación con los iniciadores específicos para el gen *cry4B* a la altura de 1,951 pb. Carril 5, Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen).

La visualización en geles de agarosa al 1% del resultado del PCR, efectuado a las construcciones con la combinación de genes mosquitocidas, nos indicó que las muestras de DNA de las construcciones analizadas portan los genes *cry4A* y *cry4B* (Fig. 16).

6.4.3 Transformación por biobalística de *P. animalis* con la construcción p1301-4A-4B

Debido a que no se podía conocer cuál de las dos construcciones sería más eficiente para transformar a la cianobacteria, se realizó el bombardeo de la cianobacteria con las dos construcciones que llevan los genes *cry4A* y *cry4B*. Se planearon 3 estrategias para el bombardeo de la cianobacteria con las construcciones que portan los genes mosquitocidas, destinándose 10 placas para cada estrategia de transformación y 10 placas se usaron como testigo negativo.

Estrategia 1

Se bombardearon 10 placas con el DNA de la construcción p1301-4A-4B-1, obtenida al insertar los genes mosquitocidas en los sitios SstI-SphI de pCAMBIA1301.

Estrategia 2

Se bombardearon 10 placas con el DNA de la construcción p1301-4A-4B-2, obtenida al insertar los genes mosquitocidas en los sitios HindIII-SstI de pCAMBIA1301.

Estrategia 3

Estrategia 3.1. Se bombardearon 5 placas con una mezcla del DNA de la construcción p1301-4A-4B-1 más el DNA del plásmido pHT652.

Estrategia 3.2. Se bombardearon 5 placas con una mezcla del DNA de la construcción p1301-4A-4B-2 más el DNA del plásmido pHT652.

Las pruebas de selección se iniciaron a los dos días después del bombardeo, cambiando los filtros Millipore de las placas con medio ASN-10 a placas con medio complementado con higromicina a una concentración de 25 µg/ml. Los filamentos que demostraron tener un mejor crecimiento y que podían considerarse posibles clones transgénicos, se transfirieron a placas por separado.

A las cuatro semanas de iniciadas las pruebas de selección, los filamentos bombardeados con las construcciones se encontraron creciendo favorablemente en el medio selectivo, lo cual indicó que la construcción se insertó en la cianobacteria y que sobrevivió en el antibiótico por llevar el gen de resistencia que le confiere el vector pCAMBIA1301. Contrariamente, las muestras testigo empezaron a decolorarse por su exposición al antibiótico.

Se apreció cierta diferencia en crecimiento entre las cianobacterias que se bombardearon con las tres diferentes estrategias, siendo las cianobacterias de la estrategia 3 las que demostraron mejor crecimiento durante la selección en placa, con 62 cianobacterias bombardeadas que sobrevivieron a la selección, en contraste con 28 de la estrategia 2 y 26 de la estrategia 1.

Para acelerar la selección de clones transgénicos y la eliminación de todo el material no transformado, se pasó a la etapa de selección en medio líquido, pero con un incremento en la presión de selección, probando diferentes concentraciones de higromicina (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml y 300 µg/ml) en uno de los clones transgénicos que mejor respondió a la primera etapa de selección. Debido a que la transformante probada respondió favorablemente al incremento de selección, se decidió incrementar la concentración de higromicina a 100 µg/ml para los clones que mejor respondieron a la selección, que son las No. 21, 22, 25, 26, 29 y 30. Es necesario recalcar que estas son clones que se bombardearon con la estrategia 3, esto es, que se bombardearon con una combinación de la construcción p1301-4A-4B más la construcción pHT652.

Después de comprobar que los clones transgénicos, producto de la estrategia 3, sobrevivieron eficientemente a una alta concentración de higromicina, se incrementó a todos los cultivos en selección la concentración de higromicina a 100 µg/ml, para incrementar la presión de selección. En esta etapa de selección se reportó la muerte de los testigos negativos (cianobacteria silvestre), por lo que se esperaba que las cianobacterias que continuaron creciendo en selección llevaran la construcción que se les bombardeó.

6.4.4 Identificación de los clones transgénicos por PCR

Los clones transgénicos se analizaron por PCR para comprobar que contuvieran los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B*. Se observó que en 81 de los clones putativos se amplificó la región que codifica para los genes mosquitocidas *cry4B* y *cry4A*, de éstos, 17 correspondieron a los transformados con la estrategia 1, 15 con la estrategia 2 y, 49 con la estrategia 3 (Tabla 5). Lo anterior significa que en el experimento de biobalística se transformó con éxito a la cianobacteria *P. animalis*.

La confirmación de la presencia de los genes mosquitocidas en la cianobacteria *P. animalis* se demostró por PCR con el DNA de un clon de la estrategia 3.2. La figura 17 muestra el resultado del PCR, con el cual se obtuvo amplificación en el DNA del clon con los iniciadores específicos para el gen *gusA* a la altura de 1,200 pb, otro producto de amplificación de 1,529 pb con los iniciadores específicos para el gen *cry4A* y, otro

producto de amplificación de 1,951 pb con los iniciadores específicos para el gen *cry4B*. Las muestras que se usaron en el PCR como testigos negativos fueron: DNA de una cianobacteria silvestre y DNA de la cianobacteria que porta el vector pCAMBIA1301. No se observó amplificación en ningún testigo negativo cuando se usaron los iniciadores para los genes *cry*. En el DNA de la cianobacteria transformada con el vector pCAMBIA1301 se observó amplificación sólo con los iniciadores para el gen *gusA*. Como un testigo positivo se usó el DNA de la construcción p1301-4A-4B, el cual produjo una amplificación similar que el DNA de la cianobacteria bombardeada con la estrategia 3.2.

La eficiencia de transformación de la cianobacteria con una combinación de genes mosquitocidas (*cry4A* y *cry4B*) fue estimada en 2.7 clones/placa, lo cual es mayor que la eficiencia obtenida con la construcción p1301-4A (0.75 clones/placa) y también mayor que cuando se bombardeó a la cianobacteria sólo con el vector pCAMBIA1301 (2.5 clones/placa).

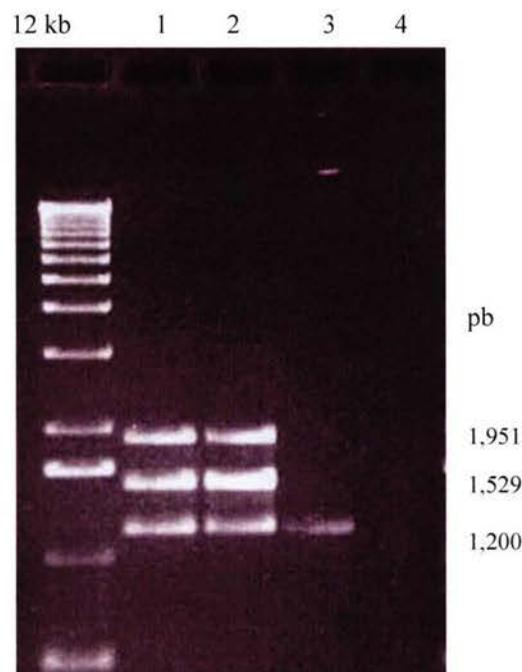


Fig. 17 Análisis por PCR de un clon transgénico en el que se demuestra la amplificación para el gen *gusA* (1,200 pb), la amplificación para el gen *cry4A* (1,529 pb) y, amplificación para el gen *cry4B* (1,951 pb). Carril 1, DNA de la construcción p1301-4A-4B-2 (testigo positivo). Carril 2, DNA de la cianobacteria bombardeada con la estrategia 3.2. Los testigos negativos fueron: carril 3, DNA de la cianobacteria que porta el vector pCAMBIA1301 y carril 4, DNA de una cianobacteria silvestre.

Tabla 5. Cianobacterias bombardeadas con las construcciones p1301-4A-4B-1 y p1301-4A-4B-2, número de muestras obtenidas en la selección y número de clones positivos por el análisis PCR para la presencia de los genes mosquitocidas.

Placa bombardeada	Construcción bombardeada	Muestras en selección	PCR Positivas
1	p1301-4A-4B 1	2	0
2	p1301-4A-4B 1	2	1
3	p1301-4A-4B 1	2	2
4	p1301-4A-4B 1	2	0
5	p1301-4A-4B 1	5	4
6	p1301-4A-4B 1	2	1
7	p1301-4A-4B 1	2	1
8	p1301-4A-4B 1	4	4
9	p1301-4A-4B 1	4	4
10	p1301-4A-4B 1	1	0
	TOTAL	26	17
11	p1301-4A-4B 2	2	0
12	p1301-4A-4B 2	2	0
13	p1301-4A-4B 2	3	1
14	p1301-4A-4B 2	2	1
15	p1301-4A-4B 2	2	1
16	p1301-4A-4B 2	2	1
17	p1301-4A-4B 2	3	1
18	p1301-4A-4B 2	6	6
19	p1301-4A-4B 2	3	3
20	p1301-4A-4B 2	3	1
	TOTAL	28	15
21	pHT652+ p1301-4A-4B 1	5	5
22	pHT652+ p1301-4A-4B 1	5	4
23	pHT652+ p1301-4A-4B 1	2	0
24	pHT652+ p1301-4A-4B 1	2	0
25	pHT652+ p1301-4A-4B 1	8	6
26	pHT652+ p1301-4A-4B 2	4	3
27	pHT652+ p1301-4A-4B 2	5	4
28	pHT652+ p1301-4A-4B 2	3	2
29	pHT652+ p1301-4A-4B 2	6	3
30	pHT652+ p1301-4A-4B 2	22	22
	TOTAL	62	49
	TOTAL GENERAL	116	81

NOTA: Las placas 31 a 40 fueron los testigos negativos y debido a que se eliminaron durante la selección, no son incluidos en la tabla.

6.4.5 Análisis tipo Southern blot

Se realizó un análisis Southern con el DNA de las cianobacterias que produjeron un mayor número de clones positivos por el análisis de PCR (cianobacterias que se bombardearon con la estrategia 3.2). En la membrana se observó señal en el carril del testigo positivo (construcción p1301-4A-4B) y en los carriles con DNA de las cianobacterias bombardeadas. No se observó señal en el carril con el DNA de la cianobacteria silvestre que se usó como testigo negativo, por lo que la sonda (productos de amplificación por PCR de los genes *cry4A* y *cry4B*) sólo mostró hibridación con el DNA de las cianobacterias que se bombardearon con los genes mosquitocidas (Fig. 18).

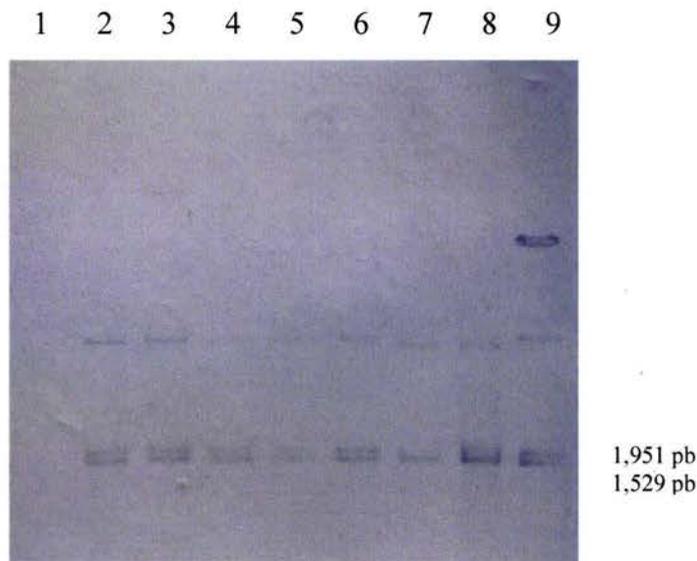


Fig. 18 Análisis tipo Southern blot de *P. animalis* transformados, usando como sonda los productos de amplificación para los genes *cry4A* y *cry4B*. Carril 1, cianobacteria silvestre. Carriles 2 a 8, colonias transformadas. Carril 9, DNA de la construcción p1301-4A-4B (testigo positivo).

El patrón de hibridación mostró un bandeo similar para el testigo positivo como para las cianobacterias transgénicas, con dos bandas inferiores cercanas entre sí que corresponden a los productos de amplificación del gen *cry4A* (1,529 pb) y, al gen *cry4B* (1,951 pb). Además se presentó una banda tenue ubicada por arriba de los 4 kb.

6.4.6 Pruebas de toxicidad con larvas de mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*

Con el objeto de determinar si las cianobacterias que contenían a los genes *cry4A* y *cry4B* son tóxicas, se llevaron a cabo pruebas de toxicidad con larvas de los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. albimanus*, como se describió en la metodología. Durante los bioensayos se observó que las larvas alimentadas con las cianobacterias mosquitocidas presentaron pérdida de movilidad y cambio de coloración, tornándose más oscuras entre las 24 y 48 h de exposición (Fig. 19). Todas las larvas de *Ae. aegypti* murieron a los 3 ó 4 días de iniciado el bioensayo (Tabla 6a), y las larvas de *An. albimanus* entre el 4° y 6° día de exposición (Tabla 6b). En contraste, las larvas testigo (alimentadas con la cianobacteria silvestre y con *P. animalis*-1301) permanecieron vivas, con movimiento continuo y vigoroso, y manteniendo su patrón de alimentación normal. Se permitió que las larvas testigo llegaran hasta el estado de pupa. Por medio del bioensayo se demostró la toxicidad de varias de las cepas transgénicas de la cianobacteria *P. animalis* que portaban los genes *cry4A* y *cry4B*, tanto sobre larvas de mosquitos *Ae. aegypti* (Tabla 6a) como con *An. albimanus* (Tabla 6b), reportándose el 100% de mortalidad durante los bioensayos.

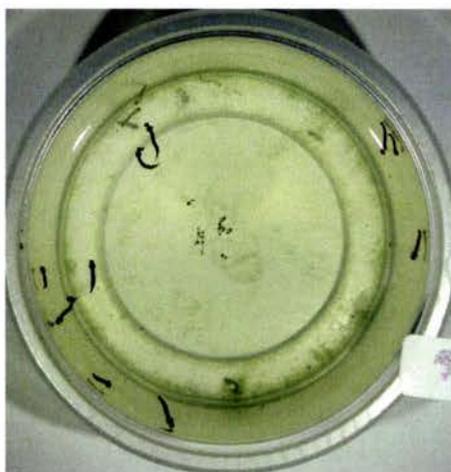


Fig. 19 Larvas de *Aedes aegypti* durante las pruebas de susceptibilidad y expuestas por 24 h a la cianobacteria transgénica 1301-4A-4B.

Tabla 6a. Pruebas de susceptibilidad de larvas del mosquito *Aedes aegypti* a las cianobacterias que portan los genes *cry4A* y *4B* de *Bti*. Resultados expresados como porcentajes de mortalidad larvaria acumulada por día.

<i>P. animalis</i>	Mortalidad (%)			
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Silvestre	0	0	0	0
<i>P.animalis</i> -1301	0	0	0	0
Clon 30-3	61.67	78.33	100	
Clon 30	23.33	60.00	100	
Clon 30 (1-2)	28.33	60.00	90.00	100
Clon 26	28.33	48.33	100	
Clon 25	1.67	20.00	63.33	100
Clon 22(2-1)	11.67	35.00	70.00	100
Clon 16	15.00	60.00	90.00	100
Clon 13	1.67	35.00	81.67	100
Clon 3	20.00	45.00	80.00	100
Clon 2	13.33	33.33	83.33	100

Tabla 6b. Pruebas de susceptibilidad de larvas del mosquito *Anopheles albimanus* a las cianobacterias que portan los genes *cry4A* y *4B* de *Bti*. Resultados expresados como porcentajes de mortalidad larvaria por día.

<i>P. animalis</i>	Mortalidad (%)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Silvestre	0	0	0	0	
<i>P.animalis</i> -1301	0	0	0	0	
Clon 30-3	28.33	81.67	96.67	100	
Clon 30	35.00	95.00	100		
Clon 30 (1-2)	16.67	35.00	86.67	100	
Clon 26	11.67	53.33	100		
Clon 25	1.67	28.33	73.33	96.67	100
Clon 22(2-1)	16.67	48.33	98.33	100	
Clon 16	1.67	23.33	93.33	100	
Clon 13	3.33	70.00	100		
Clon 3	8.33	35.00	81.67	98.33	100
Clon 2	8.33	33.33	93.33	100	

6.4.7 Histopatología de las larvas afectadas por *P. animalis* transgénica

En la figura 20 se muestra el aspecto del intestino medio de una larva sana, en la que es posible observar a las células columnares normales y con microvellosidades. En cortes de larvas de *Ae. aegypti* colectadas vivas, a las 12 horas de iniciado el bioensayo con la cianobacteria mosquitocida, se apreció el efecto de las toxinas recombinantes. El daño en el intestino medio de la larva se inició con un ensanchamiento de la célula, la cual se observó con forma de “pera” (Fig. 21). Conforme se avanzó en el tiempo de exposición de las larvas a la cianobacteria mosquitocida, se apreció que las células del intestino presentaron mayor tamaño, incluso con núcleos muy grandes (Fig. 22). En cortes de larvas moribundas se observó que algunas secciones del intestino presentaron células hinchadas y sin microvellosidades (Fig. 23), y en cortes de larvas muertas se apreció a las células reventadas y con el epitelio semidestruido (Fig. 24).

Los cortes histológicos de larvas usadas en las pruebas de susceptibilidad, y colectadas en diferentes tiempos de exposición a la cianobacteria mosquitocida, permitieron corroborar el efecto que la cianobacteria conteniendo los genes mosquitocidas *cry4A* y *cry4B* de *Bti* causó sobre el intestino medio al ser ingerida por las larvas. Se observó un deterioro progresivo de la región del intestino medio de las larvas que se alimentaron de las cianobacterias mosquitocidas, en comparación con lo observado en cortes de larvas testigo que mantuvieron las células en estado normal con las microvellosidades intactas (Fig. 20).

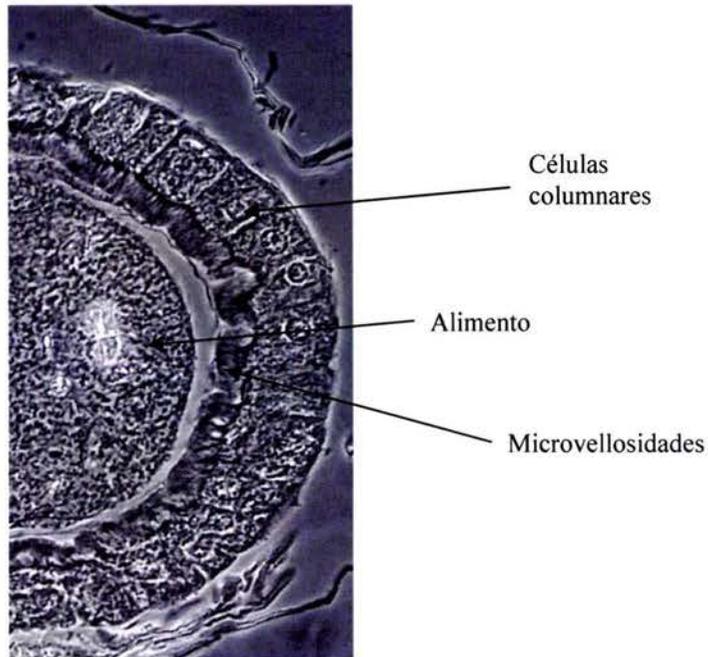


Fig. 20 Corte transversal del intestino medio de una larva de *Aedes aegypti* sana. Se observa a las células columnares de tamaño normal y las microvellosidades intactas.

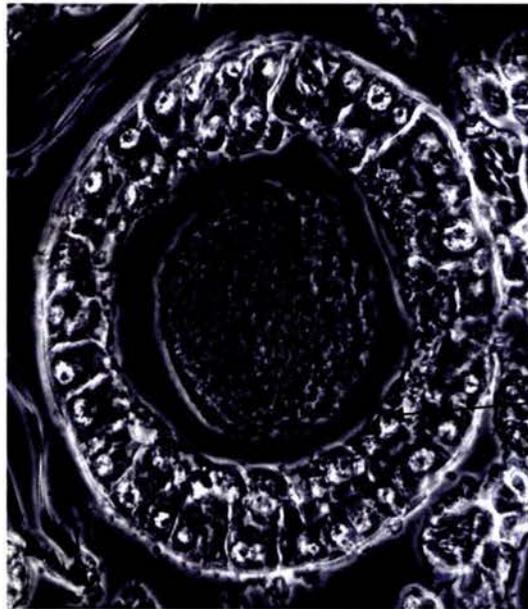


Fig. 21 Corte transversal de una larva de *Aedes aegypti* alimentada con la cianobacteria transgénica. Se observan células epiteliales del intestino, grandes y algunas hinchadas.



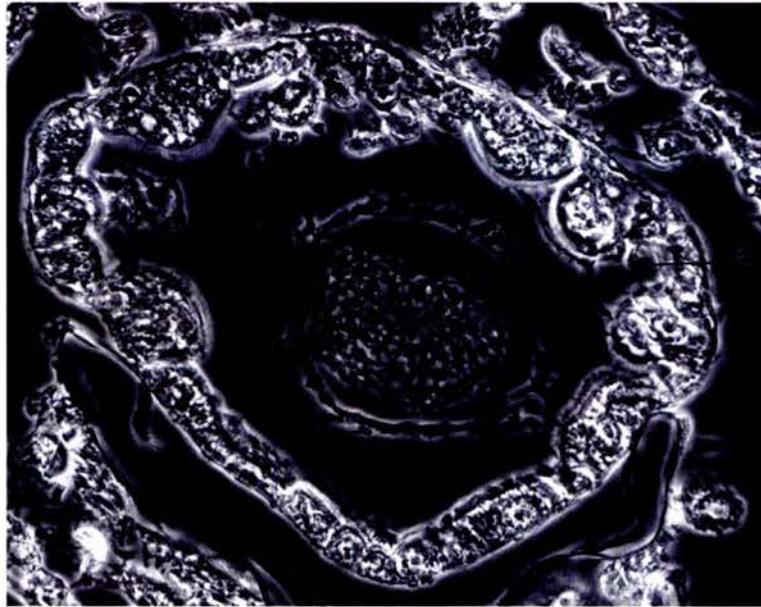
Células columnares

Fig. 22 Corte transversal del intestino medio de una larva de *Aedes aegypti* alimentada de la cianobacteria transgénica. Se observan las células hinchadas con núcleos grandes.



Células columnares

Fig. 23 Células columnares hinchadas y sin microvellosidades



Células
destrozadas

Fig. 24 Larva de *Aedes aegypti* colectada muerta de las pruebas de susceptibilidad con la cianobacteria 1301-4A-4B. Se observa el intestino medio muy dañado, con células columnares destrozadas.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló, inicialmente, una estrategia eficiente para obtener cultivos axénicos a partir de muestras colectadas en campo de la cianobacteria *P. animalis*. Los cultivos axénicos de la cianobacteria se transformaron por medio de biobalística y usando vectores de clonación que normalmente han sido empleados para la transformación genética de plantas (pBarGus, pWRG1515, pCAMBIA1301, y pB1426). La transformación más exitosa de la cianobacteria se logró con el vector pCAMBIA1301, por lo que se diseñaron en este vector las construcciones con uno y dos genes mosquitocidas provenientes de la bacteria *B. thuringiensis*. Las cianobacterias transformadas con la construcción p1301-4A demostraron poca actividad larvicida, con un porcentaje de mortalidad promedio de 45.83%, en bioensayos con larvas de *Ae. aegypti*. En otro experimento de transformación con construcciones que llevaban los genes *cry4A* y *cry4B*, se observó que varias de las cepas transgénicas de la cianobacteria *P. animalis* fueron tóxicas tanto contra larvas de mosquitos *Ae. aegypti* como de *An. albimanus*, observándose el 100% de mortalidad. Con este trabajo se demostró el potencial de la cianobacteria silvestre *P. animalis* como un receptor de genes de toxinas de *Bti* y como agente de control de mosquitos.

Inicialmente, los cultivos de la cianobacteria *P. animalis* colectados en el campo presentaban altos niveles de contaminación con bacterias, protozoarios, levaduras, rotíferos, y otros microorganismos; incluso, en los cultivos *in vitro* de la cianobacteria en medio ASN-10, se desarrollaron pequeñas comunidades de microorganismos. Por lo anterior, se hizo necesario (aunque laborioso) obtener cultivos axénicos de la cianobacteria con los cuales trabajar en los experimentos de transformación. Los primeros intentos para obtener cultivos axénicos se basaron en experimentar con varios procedimientos ya establecidos para diferentes algas (Cottrell y Suttle 1993, Connell y Cattolico 1996, Kim *et al.* 1999), pero no se lograron resultados favorables con ninguno, por lo que se desarrolló una estrategia para obtener cultivos axénicos de la cianobacteria.

Algunos métodos reportados para obtener cultivos axénicos se han basado en el uso de una técnica individual que elimine a los microorganismos asociados a las algas (Rippka 1988a, Sevecke *et al.* 1997); sin embargo, el aislamiento de filamentos individuales de *P. animalis* requirió de una combinación de técnicas, así como el desarrollo de nuevas estrategias. Por ejemplo, la eliminación de microorganismos contaminantes por medio de lavados por centrifugación es uno de los métodos más comunes que eliminan la mayoría de los protozoarios y algunas bacterias, además de otras algas; pero en el caso de *P. animalis*, al emplearse este método, permanecieron en el cultivo muchas de las bacterias asociadas a los filamentos.

P. animalis presentó dos principales obstáculos para la eliminación de las bacterias asociadas: 1) sus filamentos largos hacían prácticamente imposible eliminar a todas las bacterias asociadas a lo largo de toda la extensión del filamento, y 2) la envoltura mucilaginosa de los filamentos, específicamente el mucus que secreta esta cianobacteria durante su movimiento, mantenía fuertemente adheridas a las bacterias (Lange 1976, Humphrey *et al.* 1979). Estos problemas se superaron cuando se llevó a cabo la fragmentación de los filamentos por medio de sonicación, y con una combinación de lavados por filtración y tratamiento con antibióticos. La fragmentación en baño de agua se empleó previamente para fragmentar los filamentos de la cianobacteria *Anabaena variabilis* (Currier *et al.* 1977); sin embargo, no fue efectiva para *P. animalis*, incluso cuando se sometió el cultivo a periodos de sonicación de hasta 15 min de duración. El sonicador de pistilo, aunque severo, fue muy eficiente para fragmentar los filamentos con un mínimo de daño celular. Necesariamente, los periodos de sonicación tuvieron que ser adecuados, restringiendo el tiempo de sonicación a sólo 30 seg, ya que periodos más prolongados destruían prácticamente todo el filamento.

Una vez que se obtuvieron filamentos pequeños y más manejables, se aplicó la fuerza del agua para remover las bacterias asociadas. Esto es, los filamentos fragmentados fueron depositados en un equipo de filtración al vacío y se pasó agua a través de los filamentos colocados sobre una membrana Millipore. La fuerza del agua removió la mayoría del mucus de los filamentos y con éste se llevó a las bacterias adheridas. Se

observó una reducción significativa de las bacterias asociadas a los filamentos, cuando se inocularon muestras del cultivo ya filtrado en medio LB.

El uso de antibióticos para eliminar a las bacterias asociadas a cianobacterias ha sido ampliamente reportado (Cottrell y Suttle 1993, Bolch y Blackburn 1996, Kim *et al.* 1999, Cho *et al.* 2002, Choi *et al.* 2002). Sin embargo, en este trabajo fue necesario realizar pruebas de susceptibilidad, ya que no existía información disponible acerca de la sensibilidad de *P. animalis* a los antibióticos. Estas pruebas indicaron que la eritromicina fue muy perjudicial para la cianobacteria, por lo que no se incluyó en el tratamiento, usándose sólo los antibióticos menos dañinos para la cianobacteria. Se siguió una estrategia reportada por Connell y Cattolico (1996), que se basó en la aplicación en “cascada” de los antibióticos. De acuerdo a los resultados preliminares, se inició con la aplicación del antibiótico en el que la cianobacteria reportó una susceptibilidad media (carbenicilina) y se finalizó con el antibiótico al que la cianobacteria fue menos susceptible (kanamicina). Esta estrategia no sólo logró optimizar el efecto de los antibióticos sobre las bacterias contaminantes, sino que también minimizó el efecto dañino de los antibióticos sobre la cianobacteria, en comparación al uso de un “cocktel” de antibióticos que en pruebas preliminares resultó ser muy nocivo para la cianobacteria.

Los cultivos axénicos se obtuvieron finalmente, después de diluciones seriales e incubaciones individuales de los filamentos tratados (Vázquez-Martínez *et al.* 2004). Esta estrategia, aunque laboriosa, probó ser eficiente y puede ser de utilidad para obtener cultivos axénicos de otras especies de cianobacterias, especialmente de cepas del grupo LPP (*Lyngbya*, *Plectonema* y *Phormidium*) (Rippka 1988b), que comparten características morfológicas, genéticas y bioquímicas (Tominaga *et al.* 1993).

Previo a la transformación de *P. animalis*, se vió la necesidad de conocer la presencia de plásmidos endógenos en la cianobacteria, que pudieran ser usados para la eventual construcción de un vector. Varios estudios han demostrado que muchas cepas de cianobacterias, genéticamente relacionadas, poseen plásmidos idénticos en tamaño, patrón de digestión y homología del DNA (Lau y Doolittle 1979, Lau *et al.* 1980, Felkner y

Barnum 1988). De hecho, se sabe que las cianobacterias filamentosas *Phormidium foveolarum*, *Plectonema boryanum* y *Lyngbya* sp., integrantes del grupo LPP, contienen dos plásmidos comunes de 1.5 y 17 Kb (Tominaga *et al.* 1993). El plásmido críptico de 1,509 pb de *P. foveolarum* presenta una homología del 97.8% en su secuencia nucleotídica con la del plásmido pequeño de *P. boryanum*, lo cual sugiere que tales plásmidos pequeños pueden ser estables y transferibles entre el grupo LPP de cianobacterias. A pesar de los esfuerzos que se realizaron con las técnicas probadas previamente (Kuhlemeier y van Arkel 1987, Porter 1987, Shure *et al.* 1983, Tominaga *et al.* 1993) y al tiempo consumido en esta labor, no se logró encontrar plásmidos endógenos en *P. animalis*. Esto indica que *P. animalis* no posee plásmidos, lo cual no sería el primer caso reportado, ya que a la fecha en *Phormidium lapideum* tampoco se han encontrado. Para la transformación de esta última cianobacteria se construyó un vector a partir de pPF1 de una cianobacteria y pBR322 de *E. coli* (Tominaga *et al.* 1993), por lo que una opción en este trabajo era la de conseguir éste o algún otro vector similar, para la transformación de *P. animalis*. Desafortunadamente no fue posible conseguir ningún vector cianobacterial para comprobar su funcionalidad en *P. animalis*. Es así que, con el objeto de obtener resultados más rápidamente, fue necesario iniciar con los preparativos requeridos para llevar a cabo la transformación de la cianobacteria por una estrategia alternativa: el empleo del Sistema Biobalístico de Helio PDS1000 de alta presión.

En este trabajo se describen, por primera vez, los métodos para la transformación de la cianobacteria filamentosa *P. animalis*, para lo cual fue necesario ajustar varios parámetros. Primero y lo más importante, fue la elección de los vectores de transformación adecuados. A continuación se necesitó elegir el tipo y la concentración de antibióticos necesarios para la selección de los transformantes, el sistema de entrega del material genético por medio de biobalística y, una vez hecha esta elección, se debieron probar micropartículas de varios tamaños para seleccionar el más apropiado para el bombardeo. Debido a la posible similitud en la maquinaria celular entre las cianobacterias y organismos fotosintéticos, para la transformación de *P. animalis* se eligieron cuatro vectores que se han usado con éxito para transformar plantas por medio del bombardeo de micropartículas (De Block *et al.* 1987, Desfeux *et al.* 2000, Hunold *et al.* 1994), y además han sido exitosos

para transformar otros organismos tales como los hongos (Bailey *et al.* 1993). En estos vectores se aprovecha la conocida funcionalidad del poderoso promotor CaMV35S, aislado del virus del mosaico de la coliflor, en una variedad de organismos que varían desde metazoarios complejos como ranas y células humanas (Ballas *et al.* 1989, Burke *et al.* 1990), eucariotes unicelulares tales como dinoflagelados y levaduras (Lohuis y Miller 1998, Hirt *et al.* 1990) y, principalmente para nuestro caso, en una serie de procariotes (Assaad y Signer 1990, Lewin *et al.* 1998, Jacob *et al.* 2002). Sin embargo, hasta ahora, no se había mostrado evidencia de la funcionalidad de este promotor en cianobacterias.

Con respecto a la concentración de antibióticos que se usó en el medio ASN-10, ésta se basó en experiencias previas con transformaciones estables de plantas (http://www.cambia.org/main/r_et_camvec.htm), en donde la concentración de higromicina varió entre plantas como maíz (50 µg/ml) y tabaco (25 µg/ml), por lo que para *P. animalis* se usó la concentración más baja.

La primer evidencia de la transformación exitosa de *P. animalis* fue el desarrollo de filamentos sobre medio ASN-10 complementado con higromicina en los filtros que se bombardearon con los vectores pWRG1515 y pCAMBIA1301. No se obtuvieron transformantes cuando se usaron para el bombardeo los vectores pB1426 y pBarGus, pero el éxito observado con pWRG1515 y pCAMBIA1301 indicó que el bombardeo resultó efectivo para introducir vectores genéticos hacia la cianobacteria filamentosa *P. animalis*. Aún cuando el desarrollo de los transformantes en la etapa de selección en medio sólido se llevó alrededor de cuatro meses para observar un desarrollo notable de los filamentos; la selección fue efectiva y consistente. No es posible realizar una comparación del tiempo que se requirió para la obtención de transformantes estables, ya que no hay trabajos similares en cianobacterias, pero en el caso de otros organismos como por ejemplo espárrago, se requirió de tres meses de selección para visualizar a los transformantes (Cabrera-Ponce *et al.* 1997), y para líneas celulares embriogénicas del pasto *Bouteloua gracilis* se mantuvo en selección por ocho meses antes de pasar al medio de regeneración (Aguado-Santacruz *et al.* 2002). El procedimiento de selección seguido con la cianobacteria *P. animalis* se basó en la

selección gradual de los transformantes, y aunque tomó cuatro meses para la obtención de éstos, el procedimiento fue exitoso.

El desarrollo de la cianobacteria varió significativamente entre los filamentos que fueron cultivados en forma individual. Esta variación pudo deberse tanto al número de vectores integrados en el genoma de la cianobacteria, como al número de células transformadas en cada filamento, o a ambos factores. Lo anterior puede explicar que algunos de los filamentos que se aislaron en las etapas iniciales de selección se perdieron gradualmente en la selección posterior, pasando por una pérdida de color, el amarillamiento del filamento, hasta la muerte. Por otra parte, algunos filamentos transformados sujetos a una selección posterior mantuvieron un crecimiento estable, incluso a una mayor presión de selección (100 µg/ml de higromicina).

Posteriormente, se obtuvieron evidencias de la transformación de *P. animalis* mediante los análisis por PCR y por Southern blot. Debido a que no se tenía experiencia previa sobre el tiempo y el número de subcultivos requeridos para obtener transformantes estables, se monitoreó el procedimiento de selección durante la primera etapa, amplificando por PCR un fragmento conteniendo el gen *gusA* en los DNAs de las cianobacterias bombardeadas. Concordantemente, los DNAs analizados que no mostraron amplificación correspondieron a cultivos que eventualmente se perdieron en la selección posterior. Aunado a esto, la hibridación con el gen *htpII* se usó para corroborar que los transformantes exitosos a la selección (positivos por PCR), llevaran el gen originalmente contenido en los vectores.

El monitoreo de la expresión transitoria del gen *gusA* fue intentado en filamentos bombardeados con los vectores pWRG1515 y pCAMBIA1301, lamentablemente, el color natural de *P. animalis* (así como el de muchas otras cianobacterias) enmascaró la detección de la reacción de color esperada de la β-glucoronidasa con el sustrato X-Gluc. El color característico de las algas verde-azules (cuyo nombre se debe precisamente a esta característica) es dado por la clorofila A y del pigmento azul ficocianina, el cual es producido por las especies de *Phormidium* en concentraciones significativas (Sekar y

Subramanian 1998). Los niveles normalmente altos de ficocianina en *P. animalis* hicieron que se tuvieran lecturas erróneas, positivas y negativas, en la reacción GUS.

Debido a que no se pudieron identificar colonias individuales en esta cianobacteria, no fue posible precisar la eficiencia de transformación de cada vector. Aún así, tomando en cuenta el número de placas bombardeadas y la cantidad de clones obtenidos por cada placa, fue posible tener una idea de la eficiencia de transformación de la cianobacteria. En la transformación de *P. animalis* con el vector pCAMBIA1301 se obtuvieron 2.5 y 3 clones por placa con micropartículas M-5 y M-10, respectivamente; mientras que cuando se usó pWRG1515 sólo se obtuvieron 0.75 y 1 clon por placa con micropartículas M-5 y M-10, respectivamente. La eficiencia de transformación del vector pCAMBIA1301 fue mayor que la obtenida en la transformación por biobalística del pasto *Lolium perenne* en la que se obtuvo 1.2 y 1.4 clones resistentes a higromicina por placa bombardeada (Spagenberg *et al.* 1995). Esta eficiencia en la cianobacteria fue similar a la observada con algunas especies de gramíneas y algunas otras monocotiledóneas (Gordon-Kamm *et al.* 1990). No es posible realizar una comparación de eficiencia de transformación con respecto a bacterias, donde la eficiencia en las transformaciones documentadas es mucho más alta. Sin embargo nuestros resultados son reproducibles y la técnica es eficiente para obtener transformantes estables. De cualquier manera, la transformación con pWRG1515 produjo varios recombinantes estables, por lo que no debería ser un problema el uso de este vector en el futuro, especialmente si se adecúan las condiciones de transformación para mejorar su eficiencia.

Por otra parte, el tamaño de micropartícula a emplear en el bombardeo fue un aspecto importante, ya que *Phormidium* tiene una pared celular compleja, formada por varias capas (Hoiczuk y Baumeister 1995, Hoiczuk 1998). Sin embargo, ambos tipos de micropartículas lograron penetrar la pared celular. Debido a que no se detectó gran diferencia en la eficiencia de transformación entre micropartículas de tipo M-5 y M-10, se decidió usar micropartículas de tungsteno M-5, ya que por su tamaño causan menos daño a las células que las micropartículas M-10, que son más grandes.

La transformación por biobalística de la cianobacteria, tuvo éxito en la transformación de una cianobacteria filamentosa de tipo silvestre por medio del bombardeo de micropartículas y con vectores de clonación que normalmente han sido empleados para la transformación de plantas. En base a estos resultados, el trabajo se enfocó en el uso del vector pCAMBIA1301 para portar los genes mosquitocidas de la bacteria *B. thuringiensis* *svar. israelensis* e introducirse a la cianobacteria *P. animalis* por medio de este método. Con el objeto de analizar las diferencias en toxicidad entre el uso de un solo gen y una combinación de genes de Bti, se realizó una primera construcción que portaba un solo gen mosquitocida, el *cry4A*.

En la transformación de *P. animalis* con la construcción p1301-4A se usaron las condiciones ya estandarizadas para la transformación con el vector pCAMBIA1301. El bombardeo produjo clones resistentes a la selección que portaron la región que codifica para la resistencia a higromicina, según se demostró mediante un análisis de PCR. Durante la etapa de selección no se apreció ninguna diferencia en crecimiento entre un cultivo transgénico que porta solamente al vector pCAMBIA1301 y las cianobacterias transgénicas con la construcción p1301-4A. Sin embargo, la eficiencia de transformación en este experimento fue menor (0.75 clones/placa) que cuando se bombardeó a la cianobacteria sólo con el vector (2.5 clones/placa).

En las primeras pruebas de actividad larvicida, de las cianobacterias transformadas con un gen mosquitocida, los niveles de toxicidad sobre larvas de *Ae. aegypti* fueron bajos. En el bioensayo con larvas alimentadas con la cianobacteria bombardeada con la construcción p1301-4A se reportaron mortalidades promedio del 15%. Para mejorar el rendimiento se recurrió a elevar la concentración del antibiótico para aumentar la presión de selección del material y asegurar la muerte de todas las células no transformadas que podían estar ocasionando una disminución de la toxicidad de la población de cianobacterias. Los resultados de un segundo bioensayo con la cianobacteria 1301-4A demostraron una mayor toxicidad (45.83% de mortalidad larvaria) que en el primer bioensayo, aunque no la suficiente para su pretendido uso como control de mosquitos. Aún así, la toxicidad de los clones 1301-4A fue mayor que la reportada en otros trabajos en

donde, por ejemplo, se realizó la transformación de *Synechocystis* PCC6803 con el gen *cry4B* sin que se obtuvieran células mosquitocidas (Chungjatuporchai *et al.* 1990). Cuando se transformó a la cianobacteria *Agmenellum quadruplicatum* con el gen *cry4B* hubo la necesidad de realizar las pruebas de susceptibilidad con células sonicadas para obtener mortalidades del 45%, ya que en células intactas no se pudo observar toxicidad (Angsuthanasombat y Panyim 1989). En nuestro trabajo, la cianobacteria *P. animalis* expresando el gen *cry4A* se usó completa en las pruebas de susceptibilidad, demostrando que se presentó actividad mosquitocida sin necesidad de sonicar las células como lo efectuado en trabajos previos (Angsuthanasombat y Panyim 1989, Chungjatupornchai 1990). Sin embargo, debido al nivel relativamente bajo de toxicidad de la cianobacteria, y a que en los análisis de PCR no se obtuvo una amplificación a la altura esperada para el gen *cry4A*, podría pensarse que la expresión del gen consistió en una proteína incompleta y por lo mismo la actividad tóxica fue menor a la esperada. En los dos estudios citados anteriormente de expresión del gen *cry4B*, los autores atribuyeron los resultados similares de baja toxicidad a una degradación *in vivo* de las proteínas mosquitocidas. De cualquier forma, la cianobacteria *P. animalis* 1301-4A, no tendría aplicación primaria como agente de control, sino sólo como agente complementario. Sin embargo, la estrategia de transformación fue exitosa, por lo que se bombardeó nuevamente a *P. animalis* pero en esta ocasión con una combinación de genes mosquitocidas con el objeto de obtener niveles de toxicidad más elevados.

La transformación por biobalística de la cianobacteria con construcciones llevando dos genes mosquitocidas generó el desarrollo y crecimiento de varios clones creciendo bajo selección en medio sólido. Al igual que lo observado en las transformantes con un solo gen mosquitocida y las que portaban sólo al vector, la selección resultó relativamente lenta, ya que al mes de selección aún no se reportaba la muerte de los testigos negativos. Como se tenía la experiencia previa que las cianobacterias transgénicas resistieron una presión de selección mayor, se aumentó la concentración a 100 µg/ml de higromicina. Los cambios se empezaron a observar a la semana de que se aumentó la presión de selección, ya que los testigos negativos iniciaron a decolorarse, y en menos de un mes todos los testigos negativos habían sido eliminados. El tiempo que se requirió para la obtención de

transformantes estables fue menor que para las anteriores transformaciones, ya que en este caso tomó dos meses para definir a los clones transgénicos en la etapa de selección en placa. La transformación de la cianobacteria fue comprobada, primeramente, por medio de análisis PCR y luego, por análisis Southern, mostrándose con estas evidencias la presencia de los genes mosquitocidas.

La transformación de *P. animalis* con los genes *cry4A* y *cry4B* mostró un alto nivel de transformación, con 81 cepas positivas por el análisis de PCR, en comparación con los resultados obtenidos con un sólo gen mosquitocida. La comparación de la eficiencia de transformación obtenida entre la cianobacteria con un gen mosquitocida (0.75 clones/placa) y la cianobacteria que portaba dos genes mosquitocidas (2.7 clones/placa), demostró una mayor eficiencia de transformación en la cianobacteria con dos genes, la cual incluso fue mayor que la obtenida con la cianobacteria que sólo contenía al vector (2.5 clones/placa). Al igual que la eficiencia de transformación, la toxicidad de la cianobacteria 1301-4A-4B fue mayor que la cianobacteria 1301-4A.

La evidencia más significativa de la transformación fueron las pruebas de toxicidad en donde se reportaron altos niveles de mortalidad con las cepas transgénicas hacia larvas de los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. albimanus*, con el 100% de mortalidad larvaria. De acuerdo a lo esperado, las larvas de *Ae. aegypti* fueron más susceptibles a la cianobacteria mosquitocida, que las larvas de *An. albimanus*; ya que se sabe que las proteínas mosquitocidas de Bti son más activas contra *Aedes* y menos tóxicas contra *Anopheles* (Aronson *et al.* 1986).

La actividad larvicida de las cianobacterias transgénicas fue comprobada no sólo por medio de las pruebas de toxicidad con larvas de mosquitos, sino que además se demostró el sitio de acción de las toxinas de Bti y el daño ocasionado sobre el intestino de las larvas por medio de cortes histológicos. Las preparaciones de cortes de larvas de *Ae. aegypti* alimentadas con las cianobacterias transgénicas, en donde las larvas fueron colectadas a diferentes tiempos de exposición a la cianobacteria (larvas vivas, moribundas y muertas), permitieron apreciar el efecto de la toxina y el sitio del daño en el intestino medio

de la larva. Las células dañadas pasaron por una etapa de agrandamiento, aumento de tamaño de los núcleos, pérdida de las microvellosidades y por último la lisis celular y destrucción del epitelio. La mayor parte de la información sobre la acción de las proteínas de Bt ha sido estudiada en larvas de lepidópteros (Schnepf *et al.* 1998), por lo que no es posible compararlo con nuestro trabajo ya que muchas características podrían ser específicas de este orden. Sin embargo, existen muchas semejanzas en lepidópteros, como que las microvellosidades desaparecen, las células se vacuolizan, se hinchan y finalmente se lisan (Bauer y Pankratz 1992). En las observaciones microscópicas entre las células de dípteros y las células de lepidópteros, se observa que por acción de las toxinas ambas van perdiendo su estructura progresivamente.

Los altos niveles de toxicidad encontrados en la cianobacteria *P. animalis* portando una combinación de genes en comparación con la cianobacteria que sólo lleva el gen *cry4A*, puede ser producto de una interacción sinérgica entre los genes *cry* (Ben-Dov *et al.* 1995). Este sinergismo fue observado por Poncet y cols. (1995) en clones que llevan los genes *cry4A* y *cry11A* que tuvieron mayor toxicidad que los clones expresando sólo al gen *cry4A*, y también fue reportado en la transformación de *Anabaena* sp con una combinación de genes mosquitocidas (Wu *et al.* 1997). Además del sinergismo, la alta toxicidad obtenida puede deberse a varios factores, como la estrategia de bombardear con una combinación de construcciones y al uso de dos promotores eficientes.

Al transformar a la cianobacteria con una combinación de genes mosquitocidas, los genes *cry4A* y *cry4B* en pCAMBIA1301 se insertaron llevando su propio promotor, además de que el vector contenía el promotor CaMV35S. Si bien no se determinó la actividad específica de ambos tipos de promotores por separado, los resultados de esta transformación y las anteriores con el gen de higromicina indicaron que el promotor CaMV35S contenido en pCAMBIA1301 funciona eficientemente en *P. animalis*. La eficiencia de este promotor se ha demostrado en una gran diversidad de organismos como ranas, dinoflagelados y levaduras, entre otros (Ballas *et al.* 1989, Burke *et al.* 1990, Lohuis y Miller 1998, Hirt *et al.* 1990, Assaad y Signer 1990, Lewin *et al.* 1998, Jacob *et al.* 2002) y ahora con este trabajo se demostró también su funcionalidad en una cianobacteria. Se

podría sugerir que en este trabajo la adición de un promotor incrementó la expresión de los genes *cry*, tal como lo sugieren otros estudios. Por ejemplo, cuando se transformó a la cianobacteria *Synechococcus* con una combinación de promotores (el promotor *lacZ* de *E. coli* y el promotor endógeno de *Bacillus*), se logró un incremento en la expresión del gen *cry4B* (Soltes-Rak *et al.* 1993). Por el contrario, con el uso de un promotor, la expresión obtenida ha sido baja, como en las transformaciones de *Agmenellum quadruplicatum* con el gen *cry4B* con un vector conteniendo el promotor de la ficocianina (Angsuthanasombat y Panyim 1989), y con *Synechocystis* sp. en donde se integró el gen *cry4B* bajo el control del promotor *psbA* de tabaco (Chugjatupornchai 1990).

Es interesante que la estrategia de bombardear a la cianobacteria con una combinación de genes fue más exitosa para producir clones recombinantes y con mayor nivel de toxicidad que las bombardeadas con la construcción que contenía sólo un gen. Sin embargo, la capacidad de crecimiento de las cianobacterias transformadas con la combinación de genes mosquitocidas no presentó cambios comparativos con las transformadas con un solo gen, ni con respecto a la cianobacteria silvestre. Esto contrasta con lo observado por Stevens Jr y cols. (1994) con *Synechococcus* PCC7002, en donde las células que contenían al gen *cry11Aa* crecieron más lentamente que las células que contenían sólo al vector. La capacidad de las cepas transformadas de *P. animalis* (cultivadas en la presencia de higromicina) para crecer sin cambio aparente que la cepa de tipo silvestre (cultivada sin antibiótico) es otro indicio de que esta cianobacteria tiene una gran capacidad para su explotación biotecnológica.

Se ha sugerido que la alta toxicidad reportada para la cianobacteria *Anabaena* hacia larvas de *Ae. aegypti*, es debida al carácter multicelular de su forma filamentosa (Boussiba *et al.* 2000), ya que al comparar la transformación de *Anabaena* (Xudong *et al.* 1993) con la de *Anacystis* (Tandeau de Marsac *et al.* 1987), se hace notoria la mayor toxicidad reportada en *Anabaena*. En los dos trabajos se usaron estrategias similares para insertar los genes que codifican para la toxina binaria de *B. sphaericus* 2297, pero la mayor toxicidad en los bioensayos con mosquitos se obtuvo con la cianobacteria filamentosa *Anabaena* y no en la unicelular *Anacystis*. Esta hipótesis es reforzada por los resultados de

alta toxicidad encontrados cuando se encapsuló Bti en el protozooario ciliado *Tetrahymena pyriformis* (Manasherob *et al.* 1994), en donde cada célula del protozooario formó más de 30 vacuolas alimenticias las cuales a su vez contuvieron un promedio de 8 esporas de Bti, entre 180 y 240 esporas y sus cristales asociados por célula (Manasherob *et al.* 1996). En el caso de una cianobacteria filamentosa, esta alta toxicidad se atribuye a que un filamento lleva muchas células que expresan a su vez mayor número de genes mosquitocidas y que por lo tanto causan mayor daño a las larvas que lo ingieren. Lo cual sería el caso también para *P. animalis* que es una cianobacteria filamentosa.

Una de las aportaciones más relevantes del presente trabajo es que, hasta la fecha, todos los trabajos de transformación de cianobacterias con genes mosquitocidas se han realizado en cepas de laboratorio (Tandeau de Marsac *et al.* 1987, Angsuthanasombat y Panyim 1989, Chungjatupornchai 1990, Murphy y Stevens Jr 1992, Xudong *et al.* 1993, Soltes-Rak *et al.* 1993, Stevens Jr *et al.* 1994, Soltes-Rak *et al.* 1995, Murphy y Stevens Jr 1995, Wu *et al.* 1997), por lo que tendrían éxito limitado al tratar de liberarlas a campo, ya que sus valores adaptativos son bajos en comparación al de una cepa silvestre (Wu *et al.* 1997). Por ello, *P. animalis* lleva una ventaja sobre todos los trabajos anteriores, por su naturaleza silvestre.

A pesar de la demostración de la transformación y expresión de genes en *P. animalis*, y de comprobar la toxicidad de la cianobacteria sobre larvas de mosquitos, los volúmenes usados de cultivo en los bioensayos fueron grandes por lo que la toxicidad de la cianobacteria transgénica puede considerarse muy baja para ser efectiva en la naturaleza. Por lo anterior, es necesario sugerir modificaciones a la estrategia de clonación, con el propósito de mejorar los clones en trabajos futuros.

En investigaciones realizadas con *E. coli* se han demostrado las posibles combinaciones sinérgicas que se presentan entre las toxinas de Bti (Ben-Dov *et al.* 1995, Vadim *et al.* 2001), por lo que se puede hacer uso de este conocimiento para mejorar substancialmente a la cianobacteria transgénica. Por ejemplo, se sabe que cuando más de un gen es usado para generar actividad larvicida, se disminuye el problema del posible

desarrollo de resistencia por parte de los mosquitos (Wu *et al.* 1997). Otro aspecto importante es la existencia de la proteína P20, que actúa como chaperona, elevando los niveles de expresión y la estabilidad de las toxinas Cyt1Aa, Cry11Aa y Cry4A (Yoshiue *et al.* 1992). Cuando la P20 es co-expresada con la Cyt1Aa, protege a las bacterias transgénicas de ser eliminadas por la acción de la Cyt que expresada separadamente presenta actividad citolítica para una gran variedad de cultivos celulares tanto de invertebrados como de vertebrados (Wu y Federici 1993, Manasherob *et al.* 2001, Thomas y Ellar 1983). La Cyt1Aa es menos tóxica que las proteínas Cry, pero es más sinérgica que cualquier combinación de las proteínas Cry (Wu *et al.* 1994, Crickmore *et al.* 1995). Además, se ha sugerido que la Cyt1Aa juega un papel importante al suprimir la resistencia a las toxinas Cry (Federici y Bauer 1998, Wirth *et al.* 2000). Tomando en cuenta todo lo anterior, una estrategia para un trabajo futuro podría basarse en la clonación de combinaciones de P20, Cyt1Aa y dos o tres proteínas Cry en *P. animalis*, tratando de superar de esa forma a las construcciones existentes.

Con el advenimiento de los organismos transgénicos, ya sean microorganismos, plantas o animales, una de las inquietudes en general es el peligro de la liberación de nuevos genes al medio ambiente. La comunidad científica, las agencias reguladoras y los grupos ambientalistas están enfocando la atención al impacto ecológico de la introducción de organismos modificados al ambiente.

En lo que respecta a *B. thuringiensis* *svar. israelensis* (Bti), esta es una bacteria entomocida que ofrece un método de control de insectos bastante seguro, teniendo muchos atributos positivos comparados con los insecticidas químicos, particularmente en términos de su seguridad ambiental (Porter 1996). Bti ha sido usada ampliamente por más de 30 años para el control de insectos en los Estados Unidos, Canadá y otras partes del mundo, sin tener ningún efecto nocivo y ha sido aprobada satisfactoriamente por la Agencia para la Protección Ambiental (EPA).

Bti presenta una alternativa de control biológico al uso indiscriminado de los insecticidas químicos que no altera el balance ecológico (Margalit y Ben-Dov 2000), ya que

es altamente específico y por lo tanto su rango de acción es muy limitado, por lo que los insectos benéficos no mueren por la aplicación de la toxina. Esto incluye a los enemigos naturales de los mosquitos (depredadores y parásitos), así como organismos benéficos polinizadores como las abejas. Quizás la mayor ventaja es que Bti no es tóxico para los humanos (WHO 1999).

Bti está siendo usada en ambientes acuáticos para el control de larvas de mosquitos y jejenes, para sustituir las aplicaciones de insecticidas químicos, que resultaban en la muerte de muchos organismos no blanco e incluso en su biomagnificación en las cadenas alimenticias (WHO 1999). La seguridad de Bti sobre una gran mayoría de insectos no blanco, otros invertebrados y vertebrados incluyendo a varios mamíferos, ha sido bien demostrada (Margalit y Ben-Dov 2000). El mecanismo por el cual actúa la bacteria, es a través de una proteína que provoca toxicidad en las larvas de los insectos blanco, (lepidópteros, coleópteros y dípteros) debido al pH alcalino que presentan en su intestino (Schnepf *et al.* 1998). Este pH alcalino es específico de estos organismos ya que ni los humanos ni otros animales lo presentan.

Las presentaciones comerciales de Bti han sido formuladas para usarse sobre larvas de mosquitos en sus hábitats acuáticos y aunque Bti es un organismo cosmopolita que se presenta de forma natural en muchos suelos de diferentes partes de mundo, no se le conoce como una bacteria acuática, por lo que no se espera que prolifere en hábitats acuáticos.

Una de las limitaciones de utilizar una preparación comercial de Bti es que tiene un tiempo de acción limitado. De ahí que una de las ventajas de utilizar los genes de Bt introducidos mediante biobalística en un organismo hospedero, es evitar la degradación de la toxina. En este trabajo, a la cianobacteria se introdujeron genes de Bti que no han sido alterados, por lo que su uso no debería ocasionar ningún efecto inocuo. No obstante, uno de los propósitos futuros será el evaluar la toxicidad de la cianobacteria transformada con el gen tóxico de Bti, sobre especies no blanco, antes de proponer el llevar a cabo una liberación de este microorganismo al ambiente.

La cianobacteria transgénica que se obtuvo no puede considerarse aún como una opción para llevarse a campo, debido a que su toxicidad se considera muy baja para ser efectiva en la naturaleza. En base a esto, se propone una continuación de este trabajo en el cual se mejore a las construcciones existentes por medio de la clonación de combinaciones de P20, Cyt1Aa y dos o tres proteínas Cry (detallado anteriormente).

De cualquier manera, si en trabajos futuros se pretende liberar la cianobacteria al ambiente, es necesario realizar una evaluación del posible riesgo ecológico que implicaría el uso de este organismo en programas de control. La evaluación de riesgo ecológico comprendería evaluaciones experimentales del destino y la supervivencia de la cianobacteria transgénica y los posibles efectos sobre las comunidades bióticas. Para lo anterior, es necesario probar primeramente su potencial de supervivencia y proliferación bajo condiciones controladas de laboratorio, usando un ecosistema simulado (microcosmos) que represente el ambiente al que se enfrentará la cianobacteria al introducirla a los hábitats naturales. Además se deben realizar evaluaciones del efecto que tendrá la cianobacteria transgénica en organismos no blanco (p. ej. insectos acuáticos y peces) que sean parte importante de las cadenas alimenticias presentes en los hábitats larvarios de mosquitos, e incluso se debe evaluar la capacidad competitiva de la cianobacteria transgénica y su posible efecto sobre la microflora nativa. Por último, se deben realizar pruebas para demostrar la inocuidad de esta cianobacteria hacia los mamíferos (p. ej. roedores). Una vez cumplidas satisfactoriamente las pruebas de laboratorio, el segundo paso debe incluir la realización de pruebas de campo a pequeña escala, usando para tal efecto, contenedores experimentales en donde se debe simular las condiciones naturales de un hábitat de mosquito, y se dejará que se establezcan poblaciones naturales de larvas sobre las cuales se deba evaluar a la cepa transgénica de *P. animalis*. Lo más importante es que *P. animalis* es una cianobacteria muy prometedora para su uso en el control de mosquitos, ya que es una cianobacteria silvestre que ha sido colectada de criaderos de mosquitos (Vázquez-Martínez *et al.* 2002), por lo que su re-introducción a los cuerpos de agua no debe causar ninguna alteración.

Este trabajo constituye el primer reporte de la transformación de una cianobacteria silvestre de tipo filamentoso con una combinación de genes mosquitocidas (*cry4A* y *cry4B*) que presentó alta actividad larvicida (100% mortalidad) tanto para larvas de *Ae. aegypti* como para el vector del paludismo *An. albimanus*. Este trabajo es el primero en lograr la transformación de una cianobacteria de tipo silvestre y de mostrar su potencial como portadora de genes mosquitocidas para su uso en el control de mosquitos. Aunado a lo anterior, *P. animalis* es una cianobacteria de tipo filamentoso, de la cual no existían reportes de transformación. La técnica de biobalística usada en este trabajo probó su efectividad para la transformación de una cianobacteria de tipo filamentoso, y resuelve también el problema de la falta de vectores adecuados, al demostrar que vectores para plantas pueden expresarse en cianobacterias. La aplicación de este procedimiento abre un rango amplio de posibilidades para el estudio de este importante grupo de organismos.

8. CONCLUSIONES

1. Este trabajo reporta la transformación exitosa por medio de biobalística de la cianobacteria *P. animalis* mediante la introducción de genes que expresan proteínas mosquitocidas de *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis*, para su uso en el control de larvas de *Anopheles albimanus* Wiedemann.
2. Para la realización del trabajo se diseñó una estrategia con la cual se obtuvieron cultivos axénicos de la cianobacteria silvestre *P. animalis*, y con los cuales se llevaron a cabo los experimentos de transformación.
3. Se implementó satisfactoriamente la técnica de biobalística para el bombardeo de vectores de transformación de plantas con resultados exitosos para transformar a *P. animalis*, y se probó la eficiencia de transformación de dos vectores: pWRG1515 y pCAMBIA1301, obteniéndose mayor número de clones transgénicos con el vector pCAMBIA1301.
4. Se elaboraron construcciones genéticas con el vector pCAMBIA1301 que contienen al gen *cry4A* y otras que llevan una combinación de dos genes (*cry4A* y *cry4B*) de *Bti*. Las construcciones se bombardearon en la cianobacteria y demostraron su capacidad de transformación en *P. animalis*.
5. Se obtuvieron varios clones transgénicos de la cianobacteria que portan los genes *cry4A* y *cry4B*, y que se encuentran creciendo en forma estable. Los clones transgénicos de la cianobacteria *P. animalis* llevando una combinación de genes mosquitocidas mostraron altos niveles de toxicidad contra larvas de los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. albimanus*, en pruebas de susceptibilidad. Con lo anterior, se demostró el potencial de la cianobacteria, *P. animalis* como un receptor de genes de toxinas de *Bti*.

6. La transformación exitosa de la cianobacteria filamentosa *P. animalis* con vectores de clonación de plantas y mediante el uso de biobalística plantea la posibilidad de usar a una cianobacteria silvestre como portadora de genes mosquitocidas de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* y usarla para el control biológico de mosquitos. Es una importante contribución al campo del control de insectos vectores de enfermedades, además de que los procedimientos desarrollados durante esta tesis abren un rango amplio de posibilidades para su uso en estudios genéticos básicos, y con enfoques biotecnológicos de este diverso grupo de bacterias.

9. BIBLIOGRAFIA

- Aguado-Santacruz G.A., Rascón-Cruz Q., Cabrera-Ponce J.L., Martínez-Hernández A., Olalde-Portugal V. y L. Herrera-Estrella. 2002. Transgenic plants of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud., from microprojectile bombardment of highly chlorophyllous embryogenic cells. *Theor. Appl. Genet.* 104:763-771.
- Andrews Jr. R.E., Faust R.M., Wabiko H., Raymond K.C. y L.A. Bulla Jr. 1987. The Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 6:163-232.
- Angsuthanasombat Ch. y S. Panyim. 1989. Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2428-2430.
- Anónimo. 2000. Malaria: old challenge, new ideas. Editorial. *Nature Med.* 6:941
- Aronson A.I., Beckman W. y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect phatogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
- Arredondo-Jiménez J.I., Rodríguez M.H., Loyola E.G. y D.N. Bown. 1997. Behaviour of *Anopheles albimanus* in relation to pyrethroid-treated bednets. *Med. Vet. Entomol.* 11:87-94.
- Assaad F.F. y E.R. Signer. 1990. Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 223:517-20.
- Bailey A.M., Mena G.L. y L. Herrera-Estrella. 1993. Transformation of four pathogenic *Phytophthora spp.* by microprojectile bombardment of intact mycelia. *Curr. Genet.* 23:42-46.
- Ballas N., Broido S., Soreq H. y A. Loyter. 1989. Efficient functioning of plant promoters and poly (A) sites in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* 17:7891-903.
- Bar E., Sandler V., Makayoto M. y A. Kenyan. 1998. Expression of chromosomally inserted *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin genes in *Bacillus sphaericus*. *J. Invertebr. Pathol.* 72:206-213.
- Barber M. A. 1929. The history of malaria in the United States. USA Public Health Rep. 44:2575-2587.

- Bauer L. y H.S. Pankratz. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *sandiego* on midgut cells of cottonwood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* 60:15-25.
- Baum J.A., Johnson T.B. y B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*. Natural and recombinant bioinsecticide products. En: *Biopesticides: use and Delivery. Methods in Biotechnology*. Vol.5. (Eds.) Hall F.R. y J.J. Menn. Humana Press Inc, Totowa, N.J. Pp:189-209.
- Becker N. y J. Margalit. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. En: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide. Theory and Practice*. (Eds.) Entwistle, P.F., Cory J.S., Bailey M.J. y S. Higgs. Wiley, New York. Pp:255-267.
- Beegle C.C. y T. Yamamoto. 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Can. Entomol.* 124:587-616.
- Beegle C.C., Lewis L.C., Lynch R.E. y A. J. Martínez. 1981. Interaction of larval age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 37:143-153.
- Bence J.R. 1988. Indirect effects and biological control of mosquitoes by Mosquitofish. *J. Appl. Ecol.* 25:505-521.
- Ben-Dov E., Boussiba S. y A. Zaritsky. 1995. Mosquito larvicidal activity of *Escherichia coli* with combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 177:2851-2857.
- Ben-Dov E., Einav M., Peleg N., Boussiba S. y A. Zaritsky. 1996. Restriction map of the 125-kilobase of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3140-3145.
- Ben-Dov E., Nissan G., Peleg N., Manasherob R. Boussiba S. y A. Zaritsky. 1999. Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. *Plasmid.* 42:186-191.
- Billi D., Friedmann E.I., Helm R.F. y M. Potts. 2001. Gene transfer to the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococidiopsis*. *J. Bacteriol.* 183:2298-2305.
- Bolch C.J.S. y S.I. Blackburn. 1996. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kutz. *J. Appl. Phycol.* 8:5-13.

- Borror D.J., Triplehorn Ch.A. y N.F. Johnson. 1989. Study of Insects. 6a. ed. Saunders College Publishing. New York. 875p.
- Bourelly P. 1970. Les algues d'eau douce, Tome III. Les algues d'eau douce. Initiation a la systématique. Tome III. Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Boubée, Paris. 512p.
- Boussiba S. y X.Q. Wu. 1995. Genetically engineered cyanobacteria as a *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin genes delivery system: a biotechnological approach to the control of malaria mosquitoes. En: Combating Malaria Proc. UNESCO/WHO meeting of experts. UNESCO, Paris. Pp:49-64.
- Boussiba S., Wu X.Q., Ben-Dov E., Zarka A. y A. Zaritsky. 2000. Nitrogen-fixing cyanobacteria as gene delivery system for expressing mosquitocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis*. *J. Appl. Phycol.* 12:461-467.
- Bouwman H., Reinecke A.J., Cooppan R.M. y P.J.Becker. 1990. Factors affecting levels of DDT and metabolites in human breast milk from Kwazulu. *J. Toxicol. Environ. Health.* 31:93-115.
- Bravo A. 2001. Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. (Eds.). Caballero P. y J. Ferré. Ed. Phytoma. España. Pp:71-86.
- Bruce-Chwatt L.J. 1988. The history of malaria from prehistory to eradication. En: Malaria. (Eds.). Wernsdorfer W. y I. McGregor. Churchill Livingstone. Edinburgh, United Kingdom. Pp:1-60.
- Burke C., Yu X.B, Marchitelli L., Davis E.A. y S. Ackerman. 1990. Transcription factor IIA of wheat and human function similarly with plant and animal viral promoters. *Nucleic Acids. Res.* 18:3611-3620.
- Buzby J.S., Porter R.D. y S.E. Stevens. 1983. Plasmid transformation in *Agmenellum quadruplicatum* PR-6: construction of biphasic plasmids and characterization of their transformation properties. *J. Bacteriol.* 154:1446-1450.
- Cabrera-Ponce J.L., Lopez L., Assad-Garcia N., Medina-Arévalo C., Bailey-Moreno A.M. y L. Herrera-Estrella. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep.* 16:255-260.

- Carlson J., Olson K., Higgs S. y B. Beaty. 1995. Molecular genetic manipulation of mosquito vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 40:359-388.
- Carter J.B. 1984. Viruses as pest-control agents. En: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* (Ed.). Rusell R.D. Vol.I. New York. Pp:375-419.
- Carter R. y K.N. Mendis. 2002. Evolutionary and historical aspects of the burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:564-594.
- Cerón J.A. 2000. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas.* (Eds.). Caballero P. y J. Ferré. Ed. Phytoma. España. Pp:153-166.
- Chen Z., Ren L., Shao Q., Shi D. y B. Ru. 1999. Expression of Mammalian metallothionein-I Gene in Cyanobacteria to enhance heavy metal resistance. *Mar. Poll. Bull.* 39:155-158.
- Chesson J. 1984. Effects of notonectids (Hemiptera:Notonectidae) on mosquitoes (Diptera:Culicidae): Predation or selective oviposition. *Environ. Entomol.* 13:531-538.
- Cho J.Y., Choi J.S., Kong I.S., Park S.I., Kerr R.G. y Y.K. Hong. 2002. A procedure for axenic isolation of the marine microalga *Isochrysis galbana* from heavily contaminated mass cultures. *J. Appl. Phycol.* 14:385-390.
- Choi J.S., Cho J.Y., Jin L.G., Jin H.J. y Y.K. Hong. 2002. Procedures for the axenic isolation of conchocelis and monospores from the red seaweed *Porphyra yezoensis*. *J. Appl. Phycol.* 14:115-121.
- Chungjatupornchai W. 1990. Expression of the mosquitocidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide resistance gene bar in *Synechocystis* PCC6803. *Curr. Microbiol.* 21:283-288.
- Chungjatupornchai W., Höfte H., Seurinck J., Angsuthanasombat C. y M. Vaeck. 1988. Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* 173:9-16.
- Collins F.H. y S.M. Paskewitz. 1995. MALARIA: Current and future prospects for control. *Annu. Rev. Entomol.* 40:195-219.

- Connell L. y R.A. Cattolico. 1996. Fragile algae: axenic culture of field-collected samples of *Heterosigma carterae*. *Mar. Biol.* 125:421-426.
- Cottrell M.T. y C.A. Suttle. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J. Phycol.* 29:385-387.
- Crickmore N., Bone E.J., Williams J.A. y D.J. Ellar. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:249-254.
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J. y D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813.
- Currier T.C., Haury J.F. y C. P. Wolk. 1977. Isolation and preliminary characterization of auxotrophs of a filamentous cyanobacterium. *J. Bacteriol.* 129:1556-1562.
- Curtis C.F. y A.E.P. Mnzava. 2000. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bull. World Health Organ.* 78:1389-1400.
- Dai W., Shi D.J., Zhang H., Zhong H., Ran L., Peng G.H., Gan R.B., Chen S.J. y M.L. Lian. 2001. Expression of human epidermal growth factor gene in cyanobacteria. *Acta Bot. Sinica.* 43:1260-1264.
- De Block M., Botterman J., Vandiwiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Rao Movva N., Thompson C., Van Montagu M. y J. Leemans. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6:2513-2518.
- Delécluse A., Poncet S., Klier A. y G. Rapoport. 1993. Expression of *cryIVA* and *cryIVB* Genes, Independently or in Combination, in a Crystal-Negative Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3922-3927.
- Deng M-D. y J.R. Coleman. 1999. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:532-528.
- Desfeux Ch., Clough S.J. y A.F. Bent. 2000. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiol.* 3:895-904.
- Elhai J., Vepritskiy A., Muro-Pastor A.M., Flores E. y C.P. Wolk. 1997. Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179:1998-2005.

- Federici B.A. y L.S. Bauer. 1988. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta* and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4368-4371.
- Federici B.A., Park H.-W., Bideshi D.K., Wirth M.C. y J.J. Johnson. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Exp. Biol.* 206:3877-3885.
- Feitelson J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. En: Advanced engineered pesticides. (Ed.). L. Kim Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. Pp:63-71.
- Felkner R.H. y S.R. Barnum. 1988. Plasmid content and homology of 16 strains of filamentous, nonheterocystous cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* 17:37-41.
- Flexner J.L. y D.L. Belnavis. 2000. Microbial Insecticides. Cap.2. En: Biological and Biotechnological control of Insects pests. (Eds.). Rechcigl J.E. y N.A. Rechcigl. Ed. Agriculture and Environment series. Ed. Lewis Publishers. Boca Ratón London. Pp:35-62.
- Fuentes M.G. 1992. Niveles de susceptibilidad en adultos de *Anopheles albimanus* Wiedemann y *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera:Culicidae) a diferentes grupos toxicológicos de insecticidas en cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México Tesis. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Gaertner F.H., Quick T. y M.A. Thompson. 1993. CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. En:Advanced engineered pesticides. (Ed). L. Kim. Marcer Dekker, Inc. USA. Pp:73-83.
- Garczynski S.F., Crim J.W. y M.J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules especific to *Bacillus thuringiensis* endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2816-2820.
- Gendel S., Straus N., Pulleyblank D. y J. Williams. 1983. Shuttle Cloning vectors for the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 156:148-154.
- Georghiou G.P. y M.C. Wirth. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1095-1101.
- Gill S.S., Cowles E.A. y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-636.

- Goldberg L.J., y J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. *Mosq. News*. 37:355-358.
- Golden S. y R. Haselkorn. 1985. Mutation to herbicide resistance maps within the psbA gene of *Anacystis nidulans* R2. *Science*. 229:1104-1107.
- Golden S.S. y L.A. Sherman. 1983. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J. Bacteriol.* 155:966-972.
- Gomes B., Pelegrinelli F., Furlaneto M., Lejeune B., Pizzirani-Kleiner A. y J.L. de Azevedo. 1998. Genetic análisis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by the biolistic process. *Can. J. Microbiol.* 44:1137-1141.
- González Jr, J.M. y B.C. Carlton. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 3:92-98.
- González Jr. J.M., Brown B. J. y B. C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:6951-6955.
- Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P. y P.G. Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*. 2:603-618.
- Gormley E.P. y J. Davies. 1991. Transfer of plasmid RSF1010 by conjugation from *Escherichia coli* to *Streptomyces lividans* and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 173:6705-6708.
- Granados R.R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotech. Bioengineering*. 22:1377-1405.
- Grigorieva G. y S.V. Shestakov. 1982. Transformation in cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13:367-370.
- Guillet P., Alnwick D., Chan M.K., Neira M., Mukelabai K., Zaim M. y D. Heymann. 2001. Long lasting treated mosquito nets: a break through in malaria prevention. *Bull. W.H.O.* 79:998.

- Hamilton D.A., Roy M., Rueda J., Sindhu R.K., Sanford J. y J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Mol. Biol.* 18:211-218.
- Hemingway J., Penilla R.P., Rodríguez A.D., James B.M., Edge W., Rogers H. y M.H. Rodríguez. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large-scale field trial in Southern Mexico. *Pest. Sci.* 51:375-382.
- Hirt H., Kogl M., Murbacher T. y E. Heberle-Bors. 1990. Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeast and plants as shown by the efficient expression from CaMV 35S promoter and 35S terminator. *Curr. Genet.* 17:473-479.
- Höfte H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Hoiczuk E. 1998. Structural and Biochemical Analysis of the Sheath of *Phormidium uncinatum*. *J. Bacteriol.* 180:3923-3932.
- Hoiczuk E. y W. Baumeister. 1995. Envelope Structure of Four Gliding Filamentous Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 177:2387-2395.
- Hougard J.M. y C. Back. 1992. Perspectives on the bacterial control of insects in the tropics. *Parasitol. Today.* 8:364-366.
- Houmard J. y N. Tandeau de Marsac. 1988. Cyanobacterial genetic tools: current status. *Methods Enzymol.* 167:808-847.
- Huber J. 1986. Use of baculovirus in pest management programs. En: The biology of Baculovires. Vol. 2. (Eds.) Granados R.R. y B.A. Federici. CRC. Press. Boca Ratón, Florida. Pp:181-202.
- Humphrey B.A., Dickson M.R. y K.C. Marshall. 1979. Physicochemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces. *Arch. Microbiol.* 120:231-238.
- Hunold R., Bronner R. y G. Hahne. 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. Technical Advance. *Plant J.* 5:593-604.
- Ibarra J.E. y J.E. López-Meza. 2000. Bacterias entomopatógenas. En: Fundamentos y Perspectivas de control biológico. (Eds.) Badii M.H., Flores A.E. y L.J. Galán-Wong. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Pp:281-295.

- Jacob D., Lewin A., Meister B. y B. Appel. 2002. Plant-specific promoter sequences carry elements that are recognized by the eubacterial transcription machinery. *Transgenic Res.* 1:291-303.
- Jensen G.B., Wilcks A., Petersen S.S., Damgaard J., Baum J.A. y L. Andrup. 1995. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid *pX016*. *J. Bacteriol.* 177:2914-2917.
- Kaelin P., Morel P. y F. Gadani. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne*. *F. Appl. Environ. Microbiol.* 60:19-25.
- Karamanlidou G., Lambropoulos A.F., Kolais S.I., Manoisis T., Ellar D. y C. Kastritsis. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2277-2282.
- Kaur S. 2000. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:781-793.
- Kerwin J.L. y E.E. Petersen. 1997. Fungi: Oomycetes and Chytridiomycetes En: Manual of Techniques in Insect Pathology. (Ed.) L. A. Lacey. Academic Press, New York. Pp.251-268.
- Kerwin J.L., Dritz, D.D. y R.K. Washino. 1994. Pilot scale production and application in wildlife ponds of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10:451-455.
- Kim J.S., Park Y.H., Yoo B.D. y H.M. Oh. 1999. Establishment of axenic cultures of *Anabaena flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (Cyanobacteria) by lysozyme treatment. *J. Phycol.* 35:865-869.
- Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm M.E. y P. Maliga. 1988. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8502-8505.
- Knell A.J. 1991. Malaria. A publication of the tropical programme of the Wellcome Trust. Oxford University Press. 89p.
- Knight P.J.K., Crickmore N. y D.J. Ellar. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry 1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11:429-436.

- Knudsen G., Sùrum H., Press C McL y J. A. Olafsen. 1999. In situ adherence of *Vibrio* spp. to cryosections of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., tissue. *J. Fish Dis.* 22:409-418.
- Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A. y P. Christou. 1998. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:7203-7208.
- Koksharova O.A. y C.P. Wolk. 2002. Genetic tools for cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:123-137.
- Kuhlemeier C.J. y G.A. van Arkel. 1987. Host-vector systems for gene cloning in cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 153:199-215.
- Kuhlemeier C.J., Borrias W.E., Van den Hondel C.A.M.J.J. y G.A. van Arkel. 1981. Vectors for cloning in cyanobacteria: construction and characterization of two recombinant plasmids capable of transformation to *Escherichia coli* K-12 and *Anacystis nidulans* R2. *Mol. Gen. Genet.* 184:249-254.
- Kuhlemeier C.J., Thomas A.A.M., van der Ende A., van Leen R.W., Borrias W.E., van den Hondel C.A.M.J.J. y G.A. Arkel. 1983. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid.* 10:156-163.
- Kuritz T. y C. Wolk. 1995. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:234-268.
- Lacey L.A. y C.M. Lacey. 1990. The medical importance of Riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *Mosq. News.* 6:1-93.
- Lange W. 1976. Speculations on a possible essential function of the gelatinous sheath of blue-green algae. *Can. J. Microbiol.* 22:1181-1185.
- Lardeux F.J.R. 1992. Biological control of Culicidae with *Mesocyclops aspericornis* and larvivorous fish (Poecillidae) in a village of French Polynesia. *Med. Vet. Entomol.* 6:9-15.
- Lau R.H. y W.F. Doolittle. 1979. Covalently closed circular DNAs in closely related unicellular cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 137:648-652.
- Lau R.H., Sapienza C. y W.F. Doolittle. 1980. Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence, and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species. *Mol. Gen. Genet.* 178:203-211.

- Lee M.K., Curtiss A., Alcantara E. y D.H. Dean. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins cryIAa and cryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:583-586.
- Lewin A., Jacob D., Freytag B. y B. Appel. 1998 Gene Expression in Bacteria Directed by Plant-specific Regulatory Sequences. *Transgenic Res.* 7: 403-411.
- Liang Y., Patel S.S. y D.H. Dean. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicle is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270:24719-24724.
- Lindsay S.W. y M.H. Birley. 1996. Climate change and malaria transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90:573-588.
- Liu J.-W., Yap W.H., Thanabalu T. y A.G. Porter. 1996. Efficient Synthesis of Mosquitocidal Toxins in *Asticcacaulis excentricus* Demonstrates Potential of Gram-negative Bacteria in Mosquito Control. *Nat. Biotechnol.* 14:343-347.
- Lluisma A.O., Karmacharya N., Zarka A., Ben-Dov E., Zaritsky A. y S. Boussiba. 2001. Suitability of *Anabaena* PCC7120 expressing mosquitocidal toxin genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* for biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:161-166.
- Lohuis M.R. y D.J. Miller. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* 13:427-435.
- Magallón-Gastelum E., Fernández-Salas I., Rodríguez M.H., Gómez-Dantes H. y M.G. Vázquez-Martínez. 1997. Larval control of *Aedes aegypti* by *Mesocyclops longisetus* (copepoda:cyclopoidea) in cementeries from south of Chiapas, Mex. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13:124.
- Manasherob R., Ben-Dov E., Margalit J., Zaritsky A. y Z. Barak. 1996. Raising activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles stephensi* larvae by encapsulation in *Tetrahymena pyriformis* (Hymenostomatida: Tetrahymenidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12:627-631.
- Manasherob R., Ben-Dov E., Zaritsky A. y Z. Barak. 1994. Protozoan-enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* δ -endotoxin against *Aedes aegypti* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 63:244-248.

- Manasherob R., Zaritsky A., Ben-Dov E., Saxena D., Barak Z. y M. Einav. 2001. Effect of accessory proteins P19 and P20 on cytolytic activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 43:355-364.
- Margaletf R. 1983. Limnología. Ed. Omega. México. 1010p.
- Margalit J. y E. Ben-Dov. 2000. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. En: Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection. (Eds.) Rechcigal J.E. y N.A. Rechcigl. Lewis Publishers. New York, NY. Pp:243-301.
- Marraccini P., Bulteau S., Cassierchauvat C., Mermetbouvier P. y F. Chauvat. 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechochoccus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* 23:905-909.
- Martínez-Ibarra J.A., Grant-Guillén Y., Arredondo-Jiménez J.I. y M.H. Rodríguez-López. 2002. Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tanks in southern México. *Biocontrol.* 47:481-486.
- Maurice J. 1995. Malaria vaccine raises a dilemma. *Science.* 267:320-323.
- Mazzone H.M. 1985. Pathology associated with baculovirus infection. En: Viral insecticides for Biological Control. (Eds.) Maramorosh K. y K.E. Sherman. Academic Press. Orlando, Florida. Pp:81-120.
- McCabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J. y P. Cristou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technol.* 6:923-926.
- Meadows M.P., Ellis D.J., Jarret P. y H.D. Burges. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1344-1350.
- Méndez G.J., Guerrero A.J., Pérez M.M. y C.R. Quintero. 1984. Evaluación de un esquema alternativo de tratamiento para el control del paludismo. *Salud Pública de México.* 26:561-572.
- Merritt R.W., Craig D.A., Walker E.D., Vanderploeg H.A. y R.S. Wotton. 1992. Interfacial feeding behavior and particle flow patterns of *Anopheles quadrimaculatus* larvae (Diptera:Culicidae). *J. Insect. Behav.* 5:741-761.
- Metcalf R.L. y R.A. Metcalf. 1994. Destructive and useful insects. Their habits and control. McGraw-Hill, Inc. U.S.A. 156p.

- Mignone C.F. y G. Avignone-Rossa. 1996. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:78-84.
- Moar W.J., Pusztai-Carey M., Van Faassen H., Bosch D., Frutos R., Rang C., Luo K. y M.J. Adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2086-2092.
- Morris O.N. 1983. Protection of *B. thuringiensis* from inactivation by sunlight. *Can. Entomol.* 115:1215-1217.
- Moser D.P., Zarka D., y T. Kallas. 1993. Characterization of a restriction barrier and electrotransformation of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7121. *Arch. Microbiol.* 160: 229-237.
- Murphy R.C. y S.E. Stevens Jr. 1992. Cloning and Expression of the cryIVD Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1650-1655.
- Murphy R.C. y S.E. Stevens Jr. 1995. Development of a cyanobacterial biolarvicide. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90:109-113.
- Nabarro D.N. y K.N. Mendis. 2000. Roll back malaria is unarguably both necessary and possible. *Bull. WHO.* 78:1454-1455.
- Ng W.-O., Zentella R., Wang Y., Taylor J.-S.A. y H.B. Pakrasi. 2000. *phrA*, the major photoreactivating factor in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 codes for a cyclobutane-pyrimidine-dimer-specific DNA photolyase. *Arch. Microbiol.* 173:412-417.
- Old R.W. y Primrose S.B. 1994. Principles of gene manipulation. An introduction to Genetic Engineering. 5^a ed. Blackwell.
- Percy J. y P.G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41:86-98.
- Pérez P.R., Santamarian M.A., Honorio M.S. y G. Flores. 1998. Susceptibilidad de las larvas de *Anopheles pseudopunctipennis* al parasitismo del nemátodo *Romanormis iyengari* (Nematoda:Mermithidae), Estado de Oaxaca, México. *Rev. Cubana Med. Trop.* 50:199-202.

- Pérez-Serna S.M., Quiróz-Martínez H., Ornelas-Nava, N., Badii M.H., Suárez M.F. y M. L. Rodríguez-Tovar. 1996. Selectividad de presas de tres depredadores acuáticos de larvas de mosquitos. *Southwestern Entomol.* 21: 471-475.
- Phillips R.S. 2001. Current Status of Malaria and Potential for Control. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:208-226.
- Poncet S., Delécluse A., Klier A. y G. Rapoport. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 66:131-135.
- Porter A.G. 1996. Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. *Parasitol. Today.* 12:175-179.
- Porter A.G., Davidson E.W. y J. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 57:838-861.
- Porter R.D. 1987. Transformation of cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 13:111-132.
- Porter R.D. 1988. DNA transformation. *Methods Enzymol.* 167:703-712.
- Possani L.D., Zurita M., Delepierre M, Hernandez F.H. y M.H. Rodriguez. 1998. From noxiuxtotoxin to Shiva-3, a peptide toxic to the sporogonic development of *Plasmodium berghei*. *Toxicon.* 36:1683-1692.
- Priest F.G. 1992. Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72:357-369.
- Quiroz H., Rodríguez A., Badii M.H., Solís C., Flores A.E., Tejeda L.O. y J.K. Olson. 2000. Control Biológico de larvas de mosquitos. En: Fundamentos y Perspectivas de control biológico. (Eds.) Badii M.H., Flores A.E., y L.J. Galán-Wong. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Pp:243-254.
- Ragaei M. 1999. Radiation protection of microbial pesticides. *J. Appl. Entomol.* 123:381-384.
- Rajamohan F., Alcantara E., Lee M.K., Chen X.J., Curtiss A., y D.H. Dean. 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 177:2276-2282.

- Rejmankova E., Roberts D.R., Manguin S., Pope K., Komárek J. y R.A. Post. 1996. *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) and Cyanobacteria. An example of larval habitat selection. *Population Ecol.* 25:1058-1067.
- Rejmankova E., Savage H.M., Rejmanek M., Arredondo-Jiménez J.I. y D.R. Roberts. 1991. Multivariate analysis of relationships between habitats, environmental factors and occurrence of anopheline mosquito larvae *Anopheles albimanus* and *A. pseudopunctipennis* in southern Chiapas, México. *J. Appl. Ecol.* 28:827-841.
- Rejmankova E., Savage H.M., Rodríguez M.H., Roberts D.R. y M. Rejmanek. 1992. Aquatic vegetation as a basic for classification of *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera:Culicidae) larval habitats. *Environ. Entomol.* 21:598-603.
- Rippka R. 1988a. Isolation and Purification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:3-27.
- Rippka R. 1988b. Recognition and Identification of Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:28-67.
- Rippka R., Dervelles J., Waterbury J.B., Herdman M. y R.Y. Stainer. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- Roberts D. Curtis Ch., Tren R., Sharp B., Shiff C. y R. Bate. 2004. Malaria control and public health. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1170-1171.
- Rodríguez A.D., Penilla R.P., Henry-Rodríguez M., Hemingway J., Betanzos A.F., y J.E. Hernández-Avila. 2003. Knowledge and beliefs about malaria transmission and practices for vector control in Southern Mexico. *Salud Pùb. Méx.* 45:110-116.
- Rodríguez A.D., Rodríguez M.H., Meza R.A., Hernández J.E., Rejmankova E., Savage H.M., Roberts D.R., Pope K.O. y L. Legtergs. 1993. Dynamics of population densities and vegetation associations of *Anopheles albimanus* larvae in a coastal area of southern Chiapas, México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9:46-58.
- Rodríguez L.M.H. 1994. Paludismo y Dengue. 1a. Ed. Secretaría de Salud. México. Pp:1-53.
- Rodríguez M.H. y E.G. Loyola. 1989. Situación Epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica del paludismo en México. IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria. Memoria I. México. Pp:15-39.

- Ronald M. 1993. Atlas. Microbiological media. Laurence C. Parks. (Ed.), C.R.C. USA, Pp:129-130.
- Sambrook J. y D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. 3a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford J.C., DeVit M.J., Rusell J.A., Smith F.D., Harpending P.R., Roy M.K. y S.A. Johnston. 1991. An improved helium-driven biolistic device. *Technique*. 3:13-16.
- Sangthongpitag K., Delaney S.F. y P.L. Rogers. 1996. Evaluation of four fresh-water unicellular cyanobacteria as potential hosts for mosquitocidal toxins. *Biotechnol. Lett.* 18:175-180.
- Sarma T.A. y B. Kaur. 1997. Characterization of host-range mutants of cyanophage N-1. *Acta Virol.* 41:245-250.
- Savage H.M., Rejmankova E., Arredondo-Jiménez J.I., Roberts D.R. y M.H. Rodríguez. 1990. Limnological and botanical characterization of larval habitats of two primary malarial vectors *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis*, in coastal areas of Chiapas state, México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6:612-620.
- Schnepf E., Crickmore N., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R. y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Sekar S. y G. Subramanian. 1998. A method of mass cultivation of the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501 for the production of blue natural colourant 'Phycocyanin'. En: Cyanobacterial Biotechnology (Eds.) Subramanian G., Kaushik B. D. y G. S. Venkataraman, M/s Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. Pp:305-309.
- Service M.W. 1981. Ecological Considerations in Biocontrol Strategies against Mosquitoes. Pp:173-195. (Ed.) Laird M. En: Biocontrol of Medical and Veterinary Pests. Research Unit on Vector Pathology. Memorial Univ. of Newfoundland. Praeger Publishers. U.S.A. 235p.
- Sevecke S., Morawietz T., Krumbein W.E. y E. Rhiel. 1997. Use of Percoll gradient centrifugation for the isolation of diatoms from Wadden Sea sediments; diatom yields, species recoveries and populations diversity. *Microbiologia.* 13:173-184.

- Shao Q., Shi D-J., Hao F-Y., Ma L-N., Chen Z-J., Yu M-M. y B-G Ru. 2002. Cloning and Expression of metallothionein mutant α -KKS- α in *Anabaena* sp. PCC7120. *Mar. Poll. Bull.* 45:163-167.
- Shi Y.P., Das P., Holloway B., Udhayakumar V., Tongren J.E., Candal F., Biswas S., Ahmad R., Hasnain S.E. y A.A. Lal. 2000. Development, expression, and murine testing of a multistage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate. *Vaccine.* 18:2902-2914.
- Shieh T.R. 1988. Biological Insecticide and Biotechnology. *Am. Chem. Soc.* 17:207-216.
- Shiff C. 2002. Integrated Approach to malaria control. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:278-293.
- Shililu J., Ghebremeskel T., Seulu F., Mengistu S., Fekadu H., Zerom M., Asmelash G.E., Sintasath D., Mbogo C., Githure J., Brantly E., Beier J.C. y R.J. Novak. 2004. Seasonal abundance, vector behavior, and malaria parasite transmission in Eritrea. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20:155-164.
- Shure M., Wessler S. y N. Fedoroff. 1983. Molecular Identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell.* 35:225-233.
- Sisthiprasasna R., Linthicum K.J., Liu G.J., Jones J.W. y P. Singhasivanon. 2003. Some entomological observations on temporal and spatial distribution of malaria vectors in three villages in northwestern Thailand using a geographic information systems. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 34:505-516.
- Sode K., Tatara M., Ogawa S. y T. Matsunaga. 1992. Maintenance of broad host range vector pKT230 in marine unicellular cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 99:73-78.
- Soltes-Rak E., Kushner D.J., Williams D.D. y J.R. Coleman. 1993. Effect of promoter modification on mosquitoicidal *cryIVB* gene expression in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2404-2410.
- Soltes-Rak E., Kushner D.J., Williams D.D. y J.R. Coleman. 1995. Factors regulating *cryIVB* expression in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* 246:301-308.
- Southern E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 51:379-391.

- Spagenberg G., Wang Z.Y., Nagel J., Wu X.L. y I. Potrykus. 1995. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant. Sci.* 108:209-217.
- Spencer T.M., Gordon-Kamm W.J., Daines R.J., Start W.G. y P.G. Lemaux. 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.* 79:625-631.
- Stainer R.Y. y G. Cohen-Bazire. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:225-274.
- Stevens Jr. S.E., Murphy R.C., Lamoreaux W.J. y L.B. Coons. 1994. A genetically engineered mosquitocidal cyanobacterium. *J. Appl. Phycol.* 6:187-197.
- Suh K.N., Kain K.C. y J.S. Keystone. 2004. Malaria. *Can. Med. Assoc. or its licensors.* 170:1693-1702.
- Tabashnik B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47-79.
- Takahashi Y., Goldschmidt-Clermont M., Soen S.Y., Franzen L.G. y J.D. Rochaix. 1991. Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. *EMBO J.* 10:2033-2040.
- Tanada Y. y H.K. Kaya. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, California. 666p.
- Tandeau de Marsac N., De la Torre F. y J. Szulmajster. 1987. Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol. Gen. Genet.* 209:396-398.
- Tang J.D., Shelton A. M., Van Rie J., De Roeck S., Moar W. J., Roush R. T., y M. Peferoen. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:564-569.
- Thalman I. 1984. Aspectos demográficos, económicos y sociales en el área endémica de paludismo del Soconusco, Chiapas. Doc. Mimeografiado. Centro de Investigación de Paludismo. Tapachula, Chis.

- Thiel T. 1994. Genetic analysis of cyanobacteria. En: The Molecular Biology of Cyanobacteria. (Ed.) Bryant D.A. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Pp:581-611.
- Thiel T. y P. Wolk. 1987. Conjugal Transfer of Plasmids to Cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 153:232-243.
- Thierry I., Nicolas L., Rippka R. y N. Tandeau de Marsac. 1991. Selection of cyanobacterial isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1354-1359.
- Thomas C.M. y C.A. Smith. 1987. Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:77-101.
- Thomas W.E. y D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell. Sci.* 60:181-197.
- Thompson M.A., Schnepf H.E. y J.S. Feitelson. 1995. Estructure, function, and engineering of *Bacillus thuringiensis* toxins, En: Genetic engineering: principles and methods, vol.17. (Ed.) J.K. Setlow. Plenum Press, New York. N.Y. Pp:99-117.
- Tomes D.T., Ross M.C. y D.D.Songstad. 1995. Direct DNA transfer into intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods, Springer Lab. Manual. (Eds.) Gamborg O.L. y G.C. Phillips. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. Pp:197-213.
- Tominaga H., Hayashida Y., Hosoya V., Kurokawa M., Sawa Y. y H. Ochiai. 1993. Characterization of a small cryptic plasmid, pPF1, from *Phormidium foveolarum* and vector construction. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57:1795-1799.
- Toyomizu M., Suzuki K., Kawata Y., Kojima H. y Y. Akiba. 2001. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. *J. Appl. Phycol.* 13:209-214.
- Vadim K., Ben-Dov E., Manasherob R., Boussiba S. y A. Zaritsky. 2001. Toxicity and synergism in transgenic *Escherichia coli* expressing four genes from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Environ. Microbiol.* 3:798-806.

- Vadlamudi R.K., Weber E., Ji I., Ji T.H. y L.A. Bulla Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
- Valaitis A.P., Lee M.L., Rajamohan F. y D.H. Dean. 1995. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA (c) endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:1143-1151.
- Valdez M., Cabrera-Ponce J.L., Sudhakar D., Herrera-Estrella L. y P. Christou. 1998. Transgenic Central American, West African and asian elite rice varieties from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants. *Ann. Bot.* 82:795-801.
- Vázquez-Martínez M.G. 1991. Influencia de la estructura de la vegetación sobre las poblaciones larvarias de *An. albimanus* Wiedemann (Diptera:Culicidae) en el sur de Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Vázquez-Martínez M.G., Rodríguez M.H., Arredondo-Jiménez J.I., Méndez-Sánchez J.D., Bond-Compeán J.G. y M. Gold-Morgan. 2002. Cyanobacteria Associated with *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) larval habitats in Southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 39: 825-832.
- Vázquez-Martínez M.G., Rodríguez M.H., Arredondo-Jiménez J.I., Méndez-Sánchez J.D. 2003. *Phormidium animalis* (Cyanobacteria:Oscillatoriaceae) supports larval development of *Anopheles albimanus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19:155-158.
- Vázquez-Martínez M.G., Rodríguez M.H., Hernández-Hernández F. y J.E. Ibarra. 2004. Strategy to obtain axenic cultures from field-collected samples of the cyanobacterium *Phormidium animalis*. *J. Microbiol. Methods.* 57:115-121.
- Vázquez-Martínez M.G., Rodríguez M.H., Méndez-Sánchez J.D., Arredondo-Jiménez J.I. y J.G. Bond-Compeán. 1996. Identificación de cianobacterias que son fuente potencial de alimento para larvas de *Anopheles albimanus* en criaderos del sur de Chiapas, México. En: III Encuentro Nacional de Investigadores de la Secretaría de Salud. Huatulco, Oaxaca, México.

- Wallace T.P., Stewart A.C., Pappin D. y C.J. Howe. 1989. Gene sequence for the 9kDa component of Photosystem II from the cyanobacterium *Phormidium laminosum* indicates similarities between cyanobacterial and other leader sequences. *Mol. Gen. Genet.* 216:334-339.
- Wilkerson R.C. y D. Strickman. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6:7-34.
- Wirth M.C., Federici B.A. y W.E. Walton. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* Synergizes Activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1093-1097.
- Wolk C.P. y J. Kraus. 1982. Two approaches to obtaining low, extracellular deoxyribonuclease activity in cultures of heterocyst-forming cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 131:302-307.
- World Health Organization. 1970. Insecticide resistance and vector control. 17th report of WHO Expert Committee on insecticides. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 1982. Manual on environmental management for mosquito control with special emphasis on malaria vectors. WHO Offset Publication. 138p.
- World Health Organization. 1993. Implementation of the global malaria control strategy. Pp:1-56. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 1999. Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health use. WHO Document WHO/CDS/WHOPES/99.2. Geneva: World Health Organization.
- Wu D. y B.A. Federici. 1993. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 175:5276-5280.
- Wu D. y F.N. Chang. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* 190:232-236.
- Wu D., Johnson J.J. y B.A. Federici. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13:965-972.

- Wu X.Q., Vennison S.J., Huirong L., Bend-Dov E., Zaritsky A. y S. Boussiba. 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4971-4975.
- Xudong X., Renqui K. y H. Yuxiang. 1993. High larvicidal activity of intact recombinant cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 expressing gene 51 y gene 42 of *Bacillus sphaericus* sp. 2297. *FEMS Microbiol. Lett.* 107:247-250.
- Yang X. y B.A. McFadden. 1993. A small plasmid, pCA2.4, from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encodes a Rep protein and replicates by a rolling circle mechanism. *J. Bacteriol.* 175:3981-3991.
- Yoshiue H., Yoshida K.-I., Sen K., Sakai H. y T. Komano. 1992. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 20-kDa protein on production of the *Bti* 130 kDa crystal protein in *Escherichia coli*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 56:1429-1433.
- Youdeowei A. y M.W. Service. 1983. Pest and vector management in the tropics, with particular reference to insects, ticks, mites and snails. Longman. London.
- Zeigler D.R. 1999. *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, Seventh Edition. Part 2: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. The Ohio State University. Columbus, Ohio.
- Zhou Ch. 1990. Miniprep in Ten minutes. *Benchmarks, BioTechniques*: 8:172-173.

10. ANEXOS

Anexo1 Composición de los medios de cultivo para cianobacterias

Medio ASN-10

A base de medio BG-11 complementado con 10% de medio ASN-III (v1/v1):

a) Medio BG-11, pH 7.1± 0.2

Composición por litro:

Agar bacteriológico al 1%	10.0 g
NaNO ₃	1.5 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.075 g
K ₂ HPO ₄	0.04 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.036 g
Na ₂ CO ₃ • 10H ₂ O	0.02 g
Acido cítrico	6.0 mg
Citrato amoniacal férrico	6.0 mg
EDTA Sal disódica	1.0 mg
Mezcla A5 trazas de metales	1.0 ml

b) Medio ASN III, pH 7.3± 0.2

Composición por litro:

NaCl	25.0 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	3.5 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O	2.0 g
NaNO ₃	0.75 g
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	0.75 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Na ₂ CO ₃	0.02 g
Acido cítrico	3.0 mg
Citrato amoniacal férrico	3.0 mg
Mg EDTA	0.5 mg
Vit. B12	10.0 µg
Sol. Agar	100 ml
Mezcla A5 trazas de metales	1.0 ml

c) Mezcla A5 trazas de metales

Composición por litro:

H ₃ BO ₃	2.860 g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	1.810 g
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.390 g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.222 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.079 g
Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O	0.0494 g

Anexo 2 Caldo Spizizen para el cultivo de Bti (SCVG)

Composición por litro:

Sulfato de Amonio	2.00 g
K ₂ HPO ₄	14.00 g
KH ₂ 2PO ₄	6.00 g
Citrato de sodio	1.00 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g
Casaminoácidos	1.00 g
Glucosa	5.00 g*

NOTA:

Alicuotar en matraces de 500 ml con 100 ml de medio en c/matraz

*Preparar un Stock de Glucosa al 50 %, y esterilizar

Una vez esterilizado el medio agregar 1 ml de Glucosa a c/matraz