

TRABAJO FIN DE MÁSTER

“Potencia insecticida de dos cepas de
Bacillus thuringiensis frente a especies
de lepidópteros de importancia agrícola”

Maite Zarranz Elso

Curso 2014-15

Directores: Dra. Isabel María Matas Casado

Dr. Primitivo Caballero Murillo

La **Dra. ISABEL MARIA MATAS CASADO** Investigadora Contrtada Doctora del Instituto de Agrobiotecnología y el **Prof. Dr. PRIMITIVO CABALLERO MURILLO**, Catedrático del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, como directores de D^a. Maite Zarranz Elso

INFORMA

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master “Potencia insecticida de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* frente a especies de lepidópteros de importancia agrícola” elaborada por D^a. Maite Zarranz Elso, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a diez de septiembre de 2015.



Dr. PRIMITIVO CABALLERO MURILLO



Dra. ISABEL M. MATAS CASADO

INDICE

1. RESUMEN	3
2. ABSTRACT	4
3. INTRODUCCIÓN	5
4. OBJETIVOS	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS	15
5.1 Clonación de genes <i>cry9</i> a partir de cepas Bt	15
5.1.1. <i>Material de partida y cepas bacterianas empleadas</i>	15
5.1.2. <i>Aislamiento y amplificación de genes</i>	15
5.1.3. <i>Clonación de los genes de interés en vector de clonación pJET</i>	16
5.1.4. <i>Clonación de los genes de interés en vector de expresión pC-His1622</i>	18
5.2. Expresión y producción de proteínas Cry9	20
5.3. Expresión y producción de la proteína Cry1Ab	22
5.4. Cuantificación de proteínas Cry	23
5.5. Evaluación de la actividad insecticida de cepas Bt y proteínas purificadas mediante bioensayos	24
6. RESULTADOS	28
6.1. Amplificación y clonación de genes <i>cry9</i>	28
6.2. Producción y cuantificación de la proteína Cry1Ab	31
6.3. Producción y cuantificación de proteínas presentes en las cepas Bt de interés	32
6.4. Evaluación de la actividad insecticida frente a lepidópteros	32
7. DISCUSIÓN	35
8. CONCLUSION	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41
10. ANEXO	45

1. RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatógena que produce cristales durante la fase de esporulación compuestos por una mezcla de δ -endotoxinas (proteínas Cry y Cyt) empleadas como materia activa en insecticidas biológicos debido a su alta selectividad y a su modo de acción. Los bioinsecticidas tipo Bt son una alternativa a los insecticidas químicos tradicionales, empleándose satisfactoriamente en el control biológico de distintas plagas. Sin embargo, a pesar de que continuamente se aíslan y caracterizan nuevas cepas Bt, la mayoría de los bioinsecticidas se basan en preparaciones derivadas de unas pocas cepas, con el consiguiente riesgo de desarrollo de resistencias.

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la actividad insecticida de 2 nuevas cepas de Bt (Bt1 y Bt2). Para ello, mediante bioensayos controlados de laboratorio, se calculará la concentración letal media (CL₅₀) frente a tres especies de lepidópteros causantes de plagas: *Spodoptera littoralis*, *Lobesia botrana* y *Ostrinia nubilalis*. La potencia insecticida de ambas cepas se comparará con las cepas comerciales Dipel y Xentari, y con la proteína purificada Cry1Ab, con el fin de determinar su potencial para ser empleadas como principio activo de nuevos insecticidas biológicos. Simultáneamente, se ha comenzado a desarrollar un sistema de clonación y expresión de genes *cry9* en *B. subtilis* que permitirá obtener, en un futuro, las proteínas Cry9 producidas en Bt1.

Los resultados obtenidos han revelado que las cepas Bt1 y Bt2 tienen una potencia insecticida igual o superior a las cepas Dipel y Xentari, dependiendo del insecto huésped. La actividad de Bt2 para *S. littoralis* (CL₅₀=53 ng/cm²) fue 13 y 2.5 veces mayor que la de las cepas Dipel y Xentari, respectivamente. Por su parte, Bt1 resultó 2 veces más tóxica que Dipel y Xentari frente a *O. nubilalis* (CL₅₀=605 ng/cm²). Tanto la cepa Bt1 (11 ng/cm²) como Bt2 (21 ng/cm²) resultaron ser altamente tóxicas para larvas de *L. botrana*, al igual que Dipel y Xentari. A la vista de estos resultados se concluye que ambas cepas Bt (Bt1 y Bt2) son buenas candidatas para su empleo en el desarrollo nuevos bioinsecticidas frente a estas especies de insecto plaga. Interesantemente, los factores de toxicidad producidos por Bt1 y Bt2 son distintos a los producidos por las cepas comerciales Dipel y Xentari.

2. ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is an entomopathogenic bacterium that produces crystals during sporulation phase composed of a mixture of δ -endotoxins (Cry and Cyt proteins), some of them being used as active material in biological insecticides due to their high selectivity and their mode of action. Bt bio-insecticides are an alternative to traditional chemical insecticides that have been used successfully in biological control of many pests. However, although new Bt strains are being continually isolated and characterized, most bioinsecticides are based on preparations derived from a few strains, with the subsequent risk of resistance development.

The aim of this study was to determine the insecticidal activity of 2 new Bt strains (Bt1 and Bt2). Using controlled laboratory bioassays, the lethal concentration (CL_{50}) was calculated against three species of lepidopteran pests: *Spodoptera littoralis*, *Lobesia botrana* and *Ostrinia nubilalis*. The insecticidal potency of both strains was compared with the commercial strains Dipel and Xentari, and the purified protein Cry1Ab, in order to determine their potential as active material of new biological insecticides. Simultaneously, a cloning system and expression of *cry9* genes in *B. subtilis* has begun to be developed, which will produce Cry9 proteins produced in Bt1.

The results have revealed that Bt1 and Bt2 strains have an insecticidal activity equal or higher than the commercial strains Xentari and Dipel, depending upon the host insect. Bt2 activity for *S. littoralis* ($CL_{50} = 53 \text{ ng/cm}^2$) was 13 and 2.5-fold more active than Dipel and Xentari, respectively. Meanwhile, Bt1 was 2-fold more toxic against *O. nubilalis* ($CL_{50}=605 \text{ ng/cm}^2$) than Dipel and Xentari. Both Bt1 (11 ng/cm^2) and Bt2 (21 ng/cm^2) strains proved to be extremely toxic against *L. botrana*, as Dipel and Xentari. It is concluded that both Bt strains (Bt1 and Bt2) are good candidates for developing new bio-insecticides against these species of insect pest. Interestingly, toxicity factors produced by Bt1 and Bt2 are different from those produced by the commercial strains Dipel and Xentari.

3. INTRODUCCIÓN

Control de plagas: Pesticidas químicos vs Bioinsecticidas. De forma tradicional, las plagas de insectos que afectan a la agricultura han sido controladas mayoritariamente con la aplicación de insecticidas químicos (Gray et al. 2009). Sin embargo, el uso indiscriminado de plaguicidas ha generado diversos problemas de contaminación ambiental por la presencia de residuos químicos, de muerte de insectos beneficiosos y de riesgo de intoxicaciones y problemas en la salud humana (Jepson 2009). Por otra parte, los insecticidas químicos han perdido parte de su eficacia en el control de plagas ya que su aplicación masiva ha generado la aparición de poblaciones de insectos resistentes (Hoy 2009). Debido al rápido crecimiento de la población a nivel mundial y a una mayor conciencia pública respecto a los efectos adversos del uso masivo de pesticidas químicos, se hace necesario adoptar nuevas estrategias dirigidas hacia una Gestión Integrada de Plagas (GIP) con el fin de proteger los cultivos y evitar la degradación de los ecosistemas agrícolas, reduciendo además los efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana (Gray et al. 2009). Una alternativa prometedora en el manejo integrado de plagas ha sido el empleo de agentes de control biológico, como biopesticidas y microorganismos entomopatógenos (i.e. bacterias, virus, protozoos u hongos), cuyo empleo presenta un menor impacto ecológico respecto a los plaguicidas químicos (Wraight & Hajek 2009).

***Bacillus thuringiensis*: agente de control biológico.** *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) es el insecticida biológico más utilizado comercialmente en el control biológico de plagas, el cual representa un 2% del mercado insecticida total (Sanchis 2011). Su valor insecticida radica en su capacidad de producir proteínas en forma de cristales durante la fase de esporulación, las cuales son conocidas como δ -endotoxinas o toxinas Cry y Cyt (Schnepf et al. 1998). La toxicidad de estas proteínas ha sido comprobada frente a especies de insectos de los ordenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, algunos de las cuales son causante de importantes plagas de interés agrícola, forestal y médico-veterinario (Bravo et al. 2013; Bravo et al. 2011). Una característica importante de las δ -endotoxinas producidas por Bt durante su desarrollo es que son altamente específicas,

biodegradables y no tienen efectos adversos sobre otros insectos beneficiosos, ni sobre vertebrados y plantas (Radcliffe et al. 2008). Por todo ello, y a pesar de que aún existen una serie de aspectos que pueden ser mejorados en el empleo de *B. thuringiensis* como agente de control biológico (como es el caso de su baja persistencia en el ambiente y su sensibilidad a la radiación), los bioinsecticidas basados en Bt pueden ser considerados una alternativa viable al empleo de insecticidas químicos para el control de insectos plaga en agricultura y de vectores de transmisión de enfermedades en humanos.

***Bacillus thuringiensis*: biología y ecología.** *Bacillus thuringiensis* es una bacteria de la familia Bacillaceae, gram-positiva, aerobia estricta, esporulante y bacilar, pudiendo producir un flagelo que le ayuda a desplazarse (Jurat-Fuentes & Jackson 2012). *B. thuringiensis* se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H, sin que exista una correlación entre serovar y toxicidad frente a insectos (Lecadet et al. 1999). Esta bacteria presenta una amplia distribución mundial y puede ser aislada de diversos ambientes como suelos, agua, hojas, insectos muertos, telarañas, etc. (Jurat-Fuentes & Jackson 2012).

El ciclo de vida de Bt está caracterizado por dos fases principales: i) la *fase vegetativa*, donde las bacterias se duplican por bipartición mediante la formación de un septo divisor que se inicia en medio de la membrana plasmática (Ibrahim et al. 2010)(Figura 1). En esta fase se producen una serie de proteínas solubles con potencial insecticida, las toxinas Sip (*secreted insecticidal protein*) y las toxinas Vip (*vegetative insecticidal proteins*), que son excretadas al medio durante el crecimiento celular (Palma et al. 2014), y ii) la *fase esporulante*, durante la cual la bacteria forma una espora de resistencia y, al mismo tiempo, un cristal paraesporal compuesto de δ -endotoxinas (proteínas Cry y, a veces, proteínas Cyt) en un proceso que ocurre principalmente cuando las condiciones del medio son adversas (Ibrahim et al. 2010). Las proteínas Cry tienen actividad insecticida específica mientras que las proteínas Cyt presentan actividad citolítica y pueden interaccionar con las proteínas Cry para potenciar sus efectos de manera sinérgica contra ciertas especies de insectos plaga (Vachon et al. 2012). En este momento de su ciclo vital, la pared celular de Bt se rompe para liberar el cristal y la espora, la cual puede permanecer en forma latente o germinar si las condiciones son adecuadas (Figura 1).

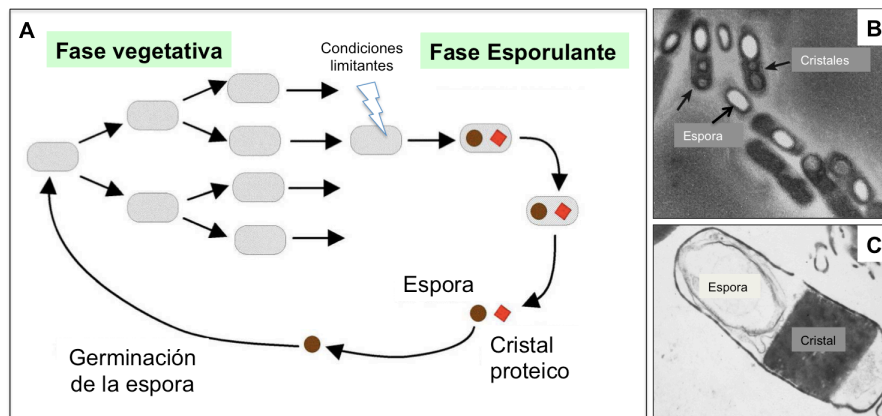


Figura 1. *Bacillus thuringiensis*. A. Ciclo de vida donde se diferencian la fase vegetativa y la fase de esporulación (imagen modificada de Martínez 2002). B. Bacterias en fase de esporulación, donde se observan las esporas (refringentes) y los cristales (imagen de Park et al. 2000). C. Detalle de una célula esporulante. Se muestra el cristal proteínico junto a una espora (imagen de de Maagd et al. 2001).

***Bacillus thuringiensis*: clasificación de proteínas insecticidas.**

Actualmente, tanto las proteínas del cristal como las proteínas secretadas por Bt se clasifican exclusivamente de acuerdo a la similitud de su secuencia primaria de aminoácidos y reciben un nombre consistente en 3 letras que definen el grupo al que pertenecen (Cry, Cyt, Vip o Sip), seguido de 4 caracteres jerárquicos (números árabes y letras) que reflejan el nivel de homología entre las distintas proteínas dentro de cada grupo de acuerdo a su posición en el árbol filogenético (Crickmore et al. 2014). Así, el primer carácter consiste en un número arábigo que agrupa las proteínas que conservan hasta un 45% de similitud (*e.g.* Cry1, Cry2). El segundo carácter es una letra mayúscula que agrupa las proteínas con un nivel de similitud de hasta un 78% (*e.g.* Cry1A, Cry1B). El tercer carácter se corresponde con una letra minúscula que incluye proteínas con hasta un 95% de identidad (*e.g.* Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac). Por último, el cuarto carácter, representado con un número arábigo, incluye toxinas con un nivel de identidad superior al 95% (*e.g.* Cry1Aa1, Cry1Aa2) (Crickmore et al. 2014). Todas las proteínas de *B. thuringiensis* conocidas en los cuatro grupos han sido clasificadas por un Comité Internacional que se encarga de mantener actualizada la lista completa a medida que se van describiendo nuevas proteínas (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Las proteínas Cry son las proteínas de Bt más ampliamente estudiadas debido a su actividad insecticida. Las cepas de Bt pueden albergar varios genes *cry*, los cuales codifican distintas proteínas Cry, localizados normalmente en plásmidos o, con menor frecuencia, insertados en

el genoma bacteriano (Jurat-Fuentes & Jackson 2012). Hasta la fecha, se han clonado y secuenciado más de 700 secuencias de genes *cry*, las cuales han sido clasificadas en base a su homología en hasta 74 clases distintas (*cry1-cry74*) (<http://www.btnomenclature.info>, agosto 2015). En esta clasificación están incluidas proteínas del cristal no relacionadas filogenéticamente y que presentan mecanismos de acción potencialmente diferentes, pudiéndose diferenciar entre: 1) toxinas Cry de tres dominios (*3D-Cry toxins*); 2) las toxinas Cry mosquiticidas (*Mtx-like Cry toxins*); y 3) las toxinas Cry binarias (*Bin-like Cry toxins*) (Bravo et al. 2011). Entre estas toxinas, el grupo de toxinas Cry 3-D representa el grupo más grande, con más de 53 subgrupos diferentes (Pardo-Lopez et al. 2013)

Proteínas Cry 3-D: estructura tridimensional. Las proteínas Cry son producidas como protoxinas, las cuales se solubilizan en el lumen del intestino medio del insecto y son procesadas en toxinas activas mediante la digestión del extremo C-terminal por las proteasas del intestino medio (Bravo et al. 2007). Las protoxinas se clasifican en dos grupos en función de la longitud de la proteína: protoxinas de 130-140 kDa (p.e. Cry1, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry12) y protoxinas de 65-70 kDa (p.e. Cry2, Cry3, Cry10, Cry11) (Bravo et al. 2011). Independientemente del grupo al que pertenezcan, tras el procesamiento, las toxinas Cry 3-D en su forma activa, formadas por el extremo N terminal de la protoxina (~60 kDa), se componen de tres dominios estructurales y con funciones específicas: i) el **Dominio I** (dominio de perforación), localizado en posición N terminal, está constituido por siete hélices α (seis hélices anfipáticas en torno a una hélice central) (de Maagd et al. 2001). Este dominio está implicado en la inserción de la toxina en la membrana y en la formación del poro iónico (Bravo et al. 2011); ii) el **Dominio II** (dominio intermedio o central), está compuesto por 3 láminas β antiparalelas y tres asas. Este dominio juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, ya que las asas interaccionan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio del insecto (Soberón & Bravo 2008); y iii) el **Dominio III** (dominio de unión a galactosa), formado por dos laminas β antiparalelas, está también implicado en la interacción con receptores y en la formación de poros (Soberón & Bravo 2008). La estructura tridimensional de varias de estas toxinas Cry-3D se ha resuelto mediante cristalografía (Figura 2), estando muy conservada entre los miembros de la familia Cry 3-D, lo que sugiere que las proteínas de esta familia pueden compartir un

mecanismo de acción similar a pesar de que muestran muy baja similitud de secuencia de aminoácidos (Bravo et al. 2011).

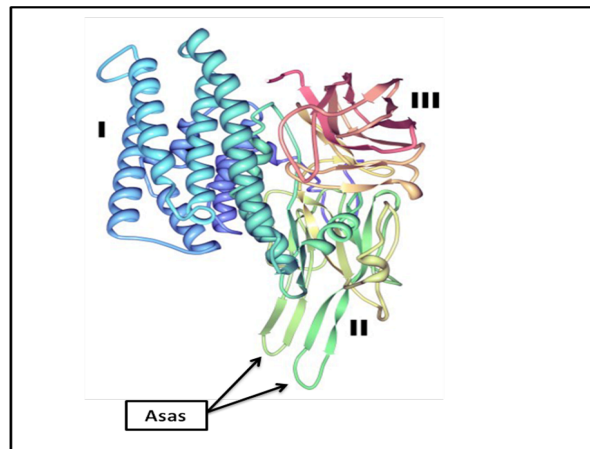


Figura 2. Proteínas Cry 3-D. Estructura tridimensional. Los números romanos indican los 3 dominios: I- Dominio de perforación; II- Dominio central; y III- Dominio de unión a galactosa. Se muestran también las asas del Dominio II responsables de la interacción con el receptor (modificado de Palma et al. 2014).

Proteínas Cry 3-D: modo de acción. Varios trabajos se han centrado en los últimos años en estudiar el modo de acción de las proteínas Cry 3-D, el cual se ha estudiado principalmente en lepidópteros (Crickmore 2005; de Maagd et al. 2001; Gill et al. 1992; Schnepf et al. 1998). De manera general, se acepta que las toxinas Cry 3-D son toxinas formadoras de poro. Su función principal consiste en lisar las células epiteliales del intestino medio del insecto mediante un desequilibrio osmótico provocado por la formación de poros en la membrana apical de las microvellosidades de las células donde se inserta (Bravo et al. 2007; de Maagd et al. 2001; Jurat-Fuentes & Adang 2006; Roh et al. 2007; Soberón & Bravo 2008). Recientemente se han propuesto tres nuevos modelos para explicar el modo de acción, como son: 1) el modelo de unión secuencial (*sequential binding model*) (Bravo et al. 2007; Pardo-Lopez et al. 2013; Soberón & Bravo 2008), 2) el modelo de señalización de la vía (*signaling pathway model*) (Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2006), y 3) una combinación de los dos modelos anteriores (Jurat-Fuentes & Adang 2006). Sin embargo, el modelo clásico es el que más evidencias contrastadas presenta (Vachon et al. 2012).

Según el modelo clásico (Figura 3), los cristales de *B. thuringiensis* son primero ingeridos y luego solubilizados en el ambiente alcalino del intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas del cristal en forma de protoxinas. Estas deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar toxinas

activas (60-70 kDa). Según varios autores (Bravo et al. 2007; Roh et al. 2007; Soberón & Bravo 2008), la activación de la toxina implica la eliminación proteolítica de diversos péptidos desde ambos extremos amino y carboxilo-terminal de la protoxinas. Las toxinas activadas son capaces de atravesar la barrera peritrófica y de unirse a receptores específicos localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino (Bravo et al. 2007; Nielsen-LeRoux et al. 2012). Las proteínas que se han propuesto como posibles receptores de las toxinas Cry en insectos lepidópteros son la aminopeptidasa N (APN) y una proteína de la familia de las caderinas (BtR), entre otras (Roh et al. 2007; Soberón & Bravo 2008). Esto resulta en la formación de poros no selectivos en las células epiteliales del intestino que son permeables a moléculas pequeñas, como iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares, conduciendo a una lisis osmótica celular debido a la entrada masiva de solutos desde el lumen del intestino medio. Como consecuencia, se produce la parálisis intestinal, impidiendo la asimilación de alimentos y provocando la muerte del insecto por inanición (Jurat-Fuentes & Jackson 2012). Los cambios en las condiciones fisicoquímicas que se producen durante la lisis del epitelio intestinal resultan en un medio favorable para la germinación y multiplicación de las esporas de Bt, las cuales producen diversos factores de virulencia para combatir las defensas del huésped, permitiendo el acceso de las células vegetativas al hemocele. Éste hecho contribuye a la mortalidad del insecto mediante la producción de una septicemia generalizada (Bravo et al. 2007). Así, las células de Bt completan su desarrollo, produciendo esporas resistentes y cristales de toxinas Cry capaces de difundirse en el entorno para iniciar un nuevo ciclo de infección en otro anfitrión.

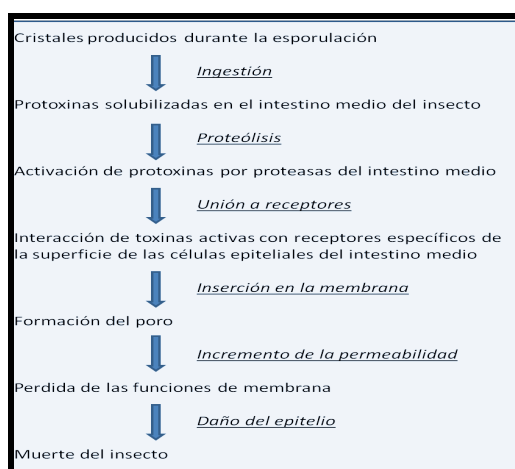


Figura 3. Proteínas Cry 3-D: modo de acción. Representación esquemática de los pasos que conducen a la formación de poros y la muerte de insectos de acuerdo con el 'modelo clásico' del modo de acción de Bt (modificado de Vachon et al. 2012).

Bioinsecticidas comerciales tipo Bt. Desde la última mitad del siglo pasado se han comercializado como bioinsecticidas productos que contienen mezclas de esporas y cristales de Bt para controlar una amplia gama de insectos plaga, incluyendo especies de lepidópteros, coleópteros y dípteros (Bravo et al. 2007). Normalmente, los productos derivados de Bt para su empleo como agentes de control biológico han sido formulados para ser aplicados en forma de sprays (George & Crickmore 2012). La toxicidad y efectividad insecticida de una cepa de Bt viene determinada tanto por la combinación de δ -endotoxinas como por la proporción relativa de las mismas y las interacciones que se puedan producir entre ellas (actividad sinérgica, antagónica o simplemente aditiva) (Porcar & Juarez-Perez 2003).

Hasta hace pocos años, casi todos los bioinsecticidas basados en Bt han venido utilizando como principio activo la mezcla de cristales y esporas de la cepa HD1 del serovar *kurstaki* (Btk) por su amplio espectro de huéspedes y elevada efectividad contra plagas de lepidópteros. Esta cepa, distribuida bajo la marca comercial **Dipel®**, sintetiza una mezcla de proteínas Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac) y Cry2A (Cry2Aa y Cry2Ab) (ver Tabla 1), y se recomienda contra un buen número de plagas importantes, entre las que cabe incluir *Helicoverpa armigera*, *Plutella xylostella* y *Lobesia botrana*. Sin embargo, las especies del género *Spodoptera*, no son controladas eficientemente con HD-1 (Porcar & Juarez-Perez 2003). Para estas especies se han seleccionado y comercializado en los últimos años algunas cepas del ser. *aizawai* que, además de las proteínas Cry1A, también producen las proteínas Cry1C y Cry1D (Porcar & Caballero 2000). Los bioinsecticidas de la cepa *Bacillus thuringiensis* ser. *aizawai* (Bta) ABTS1857, que se distribuyen bajo la marca comercial **Xentari®** (cuyos cristales incluyen las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C y Cry1D) (ver Tabla 1), resultan altamente eficientes contra insectos plaga del género *Spodoptera* (Porcar & Caballero 2000). Sin embargo, estos productos no resultan del todo adecuados para el control de otras especies como *Heliothis*, *Plutella* o *Lobesia* (Caballero & Ferre 2001). Por lo tanto, los esfuerzos de la industria biotecnológica relacionada con la producción y comercialización de productos derivados de Bt para su empleo en el control integrado de plagas deben dirigirse hacia el desarrollo de una mayor diversidad de productos basados en nuevas cepas de Bt que sean específicas para el control de una plaga o grupo de plagas en un cultivo concreto. El desarrollo de tales cepas implica, además de su caracterización genética y bioquímica, llevar a cabo su caracterización insecticida para demostrar su utilidad en el control de determinadas plagas.

Planteamiento del trabajo. En relación a lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo planteamos la determinación de la actividad insecticida de 2 cepas de Bt no comerciales **Bt1** y **Bt2** (disponibles en la colección del grupo de Bioinsecticidas Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología, UPNA-CSIC), frente a tres especies de lepidópteros plaga: *Spodoptera littoralis*, *Lobesia botrana* y *Ostrinia nubilalis*. La cepa **Bt1** es un aislado de Bt procedente de muestras de suelo de la isla del Hierro caracterizada por presentar las proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ae, Cry9A, Cry9C y Cry9E (Tabla 1), las cuales le confieren una elevada toxicidad frente a larvas del orden lepidóptera. La cepa **Bt2**, procedente de muestras de suelo de Navarra, presenta también una serie de proteínas en su cristal altamente tóxicas frente a lepidópteros, como son Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab, y Cry7 (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de la composición de proteína Cry de las cepas Bt estudiadas: Dipel, Xentari, Bt1 y Bt2.

	1Aa	1Ab	1Ac	1Ae	1C	1D	1Ia	2Aa	2Ab	7	9A	9C	9E
Dipel	+	+	+					+	+				
Xentari	+	+			+	+							
Bt1	+		+	+							+	+	+
Bt2	+	+			+	+	+	+	+	+			

Las tres especies de lepidópteros empleadas para ensayar la potencia insecticida de las distintas cepas se encuentran entre las plagas agrícolas de lepidópteros más destructivas a nivel mundial, pudiendo atacar a un gran número de cultivos de gran importancia económica. **La rosquilla negra** o *Spodoptera littoralis* (Boisduval) es una especie ampliamente extendida por el norte y centro de África, sur de Europa y Asia menor, y afecta principalmente a cultivos hortícolas, como el pimiento, la alfalfa, el maíz, el algodón, el tomate, etc. Los daños en los cultivos son causados principalmente por las orugas que se alimentan de cualquier parte verde de la planta y de los frutos, pudiendo atacar incluso a las raíces y los tallos. **La polilla del racimo** o *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller), está considerada como una plaga clave dentro del complejo de plagas de lepidópteros que afectan a los viñedos europeos (Moschos 2005, 2006). Actualmente, su límite de distribución se ha extendido a toda la cuenca mediterránea, además de EE.UU (California), Sudamérica (Chile y Argentina) y Japón. Las larvas de esta especie, la

cual necesita condiciones secas y altas temperaturas para vivir, se alimentan de todas las especies de uva cultivada, siendo sus principales hospedadores la vid europea (*Vitis vinifera*) y el racimo de uva americana (*V. labrusca*). Finalmente, el **taladro del maíz** o *Ostrinia nubilalis* (Hübner), es una plaga que afecta a una gran variedad de cultivos, siendo el maíz (*Zea mays*) su principal hospedador (Huang 1998). *O. nubilalis* se extiende por América del Norte, Europa, y norte de África. En las regiones más frías, esta especie suele tener una generación por año, incrementándose a dos en las regiones cálidas. El impacto en las cosechas de maíz es elevado ya que las orugas dañan las mazorcas y los tallos del maíz haciendo túneles para alimentarse (Huang 1998).

El estudio de la toxicidad de las cepas Bt1 y Bt2 frente a las tres especies de lepidópteros plaga descritas, y su comparación con las cepas comerciales Dipel y Xentari, así como la proteína aislada Cry1Ab, nos permitirá determinar su potencialidad como principio activo y valorar su posible desarrollo comercial como bioinsecticidas.

Al principio de este proyecto se planteó la posibilidad de amplificar, clonar y expresar los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E* mediante el sistema de expresión heterólogo de *Bacillus subtilis* con el vector de expresión pC-His1622 inducible por xilosa, el cual se estaba poniendo a punto en nuestro laboratorio, con el fin de producir las proteínas Cry9A, Cry9C y Cry9E (pertenecientes a la cepa Bt1) y evaluar su potencial insecticida de forma aislada. Sin embargo, en los meses de experimentación de este TFM, no han podido concluirse las construcciones de los genes *cry9* por un error detectado al final del proceso. Aún así, se presenta el proceso metodológico implementado y los resultados obtenidos durante todo el proceso.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la actividad insecticida de dos cepas de Bt no comerciales (**Bt1** y **Bt2**) frente a insectos plaga tipo lepidópteros (*Spodoptera littoralis*, *Ostrinia nubilalis*, *Lobesia botrana*), con el fin de determinar su potencia insecticida con respecto a las cepas Bt que sirven de principio activo de los bioinsecticidas comerciales Dipel y Xentari y a la proteína purificada Cry1Ab.

Objetivos concretos:

- Amplificación, clonación y expresión de los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E*.
- Purificación de proteínas Cry1Ab a partir de cepas de *E. coli*.
- Determinar la potencia relativa de varias cepas Bt (Bt1 y Bt2, y las aisladas a partir de Dipel y Xentari) y la proteína Cry1Ab, frente a larvas de *S. littoralis*, *O. nubilalis* y *L. Botrana*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Clonación de genes *cry9* a partir de cepas de Bt.

5.1.1. Material de partida y cepas bacterianas empleadas. Para el aislamiento y amplificación de los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E* se empleó ADN total de la cepa de **Bt1**, perteneciente a la colección de cepas del grupo de Bioinsecticidas Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología, la cual fue aislada en un estudio previo a partir de muestras de suelo procedentes de la isla del Hierro (Ruíz Escudero et al. 2004).

5.1.2. Aislamiento y amplificación de genes. Para la amplificación de los genes de interés se diseñaron cebadores específicos para las regiones 5' y 3' de cada uno de los genes seleccionados (Tabla 2), empleando las secuencias genómicas de la cepa Bt1 y el programa SnapGene® Viewer v2.8.1. En el extremo 5' de cada uno de los cebadores se añadió una secuencia de seis bases correspondiente con la diana de restricción de una enzima, para realizar posteriormente una clonación direccionada en marco de lectura abierto del vector de expresión pC-His1622 (MoBiTec, GmbH, Germany), el cual incluye una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal. Concretamente, se utilizaron las dianas *BglIII* (AGATCT) y *EagI* (CGGCCG) para los cebadores directos y reversos de los genes *cry9A* y *cry9E*, y las dianas *XmaI* (CCCGGG) y *SphI* (GCATGC) para los cebadores directos y reversos del gen *cry9C* (Tabla 1). En los tres casos se diseñaron los cebadores permitiendo la expresión de proteínas heterólogas marcadas con 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal (extremo 3' de cada gen). Cada pareja de enzimas actúan con el mismo tampón a una temperatura de 37°C

Tabla 2. Cebadores utilizados para llevar a cabo la amplificación de los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E*

Gen amplificado	Tipo de Cebador	Enzima de restricción	Secuencia (5'-3')	Tm	Amplicón (pb)
<i>cry9A</i>	Forward	<i>BglIII</i>	AGATCTCCAATCAAATAAACACGGAATTATTG	52°C	3479
	Reverse	<i>EagI</i>	CGGCCGCTTTCTGTTCACGAATCAATAC	54°C	
<i>cry9E</i>	Forward	<i>BglIII</i>	AGATCTCCAATCGAAATAATCCAAATGAATATG	51°C	3461
	Reverse	<i>EagI</i>	CGGCCGCTCTGTGTTCAATGAACTCAATG	55°C	
<i>cry9C</i>	Forward	<i>XmaI</i>	CCCGGGAATCGAAATAATCAAAATGAATATG	51°C	3479
	Reverse	<i>SphI</i>	GCATGCGGCTCTTGTGTTCAATAAACTCAAT	52°C	

*: En color rojo se señalan las secuencias de las distintas dianas de restricción *BglIII*, *EagI*, *XmaI* y *SphI*.

Los genes se amplificaron mediante PCR utilizando una enzima de alta fidelidad *PrimeStarHS DNA Polimerase* (TakaraBio Inc., Japan). Para llevar a cabo la reacción se emplearon 25 μ l de una mezcla que contenía 5 μ l de tampón PrimeSTAR (1x), 2 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM), 0.5 μ l de cada uno de los cebadores específicos de cada gen (10 μ M), 0.2 μ l de PrimeSTAR HS DNA Polymerase (5 u/ μ l), y 2 μ l del ADN molde a amplificar. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial del fragmento de ADN a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un anillamiento para la unión de los cebadores con el molde de ADN durante 40 segundos a 50°C, y un tiempo de polimerización de 4 min a 72°C de acuerdo al tamaño del fragmento amplificado (~3.4 Kb). La reacción finalizó con un paso extra de extensión a 72°C durante 7 min.

Los fragmentos amplificados por PCR se purificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (1%) en tampón tris-acetato-EDTA (TAE) teñido con Bromuro de Etidio. Una vez resuelto el gel se visualizó con un transiluminador de ultra violeta (G: box, Syngene, EEUU). Tras la electroforesis se extrajeron los fragmentos de ADN correspondientes con los genes amplificados y se purificaron utilizando el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.1.3. Clonación de los genes de interés en vector de clonación pJET. Para la clonación de los fragmentos amplificados se utilizó el vector de clonación comercial pJET (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas, Canada) con orígenes de replicación en la bacteria *Echerichia coli* (Figura 4). La mezcla para la reacción de ligación se compuso de 1 μ l de tampón T4 DNA Ligase 1x (NEB Inc., UK), 1 μ l de enzima T4 DNA Ligase (NEB Inc., UK), 0.25 μ l de vector pJET (15 ng) y, 7.75 μ l de inserto (50 ng). La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche.

El producto obtenido de la reacción de ligación se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico. Para ello, se mezclaron 50 μ l de células con 10 μ l de la mezcla de ligación. La reacción se mantuvo durante 30 min en hielo y, posteriormente, se dio un choque térmico a 42°C durante 45 seg. Tras el choque térmico se añadió 1 ml de medio Luria-Bertani líquido (LB) (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl, a pH 7) a cada una de las muestras y se incubaron a 37°C durante una hora en agitación (200 rpm). Finalmente, se sembraron en placas petri con medio LB sólido (LB líquido con 15 g/l

de los distintos genes *cry9* (Mañeru Oria 2013). Los fragmentos de ADN resultantes de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, en tampón TAE, durante 2 horas y 90 V, visualizándose después con un transiluminador de ultra violeta (G: box, Syngene, EEUU). Finalmente, los clones positivos se incubaron en LB líquido suplementado con ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche y, posteriormente, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany).

5.1.4. Clonación de los genes de interés en vector de expresión pC-His1622. El ADN plasmídico extraído de los clones positivos se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción *BglII* y *EagI* para los clones pJET::*cry9A* y pJET::*cry9E* (buffer 3.1), y con las enzimas *XmaI* y *SphI* para los clones pJET::*cry9C* (buffer cuttsmart), con el fin de obtener los fragmento de ADN correspondientes a cada gen flanqueados por las cicatrices de restricción. Cada reacción de digestión doble se llevó a cabo simultáneamente en un volumen final de 20 µl (2 µl del buffer correspondiente, 0.5 µl de cada enzima, 4 µl de ADN plasmídico y 13 µl de H₂O MiliQ), a una temperatura de 37 °C, durante al menos 4 horas. De la misma manera, el vector de expresión pC-His1622 (MoBiTec, GmbH, Germany) se digirió con las mismas parejas de enzimas de restricción (*BglII-EagI* y *XmaI-SphI*) para su posterior empleo en la clonación dirigida de los genes. Los productos generados de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN con los tamaños correspondientes a cada inserto (*cry9A*: 3479pb; *cry9C*: 3479 pb; y *cry9E*: 3461 pb) y al vector pC-His1622 (6547 pb) se extrajeron del gel y se purificaron utilizando el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany).

Posteriormente, cada inserto se ligó en el vector pC-His1622 (Figura 5) previamente digerido (linearizado) y purificado. La reacción de ligación de cada inserto se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl (1.5 µl de tampón de T4 DNA Ligasa 1x, 1.5 µl de T4 DNA Ligase, 100 ng de vector y 300 ng de inserto), y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Se seleccionaron los clones positivos de las distintas construcciones y se transformaron en células competentes de *Bacillus subtilis* mediante la adición de 0.1 M de EGTA. Para ello se realizó un pre-cultivo de células de *B. subtilis* en 10 ml de medio HS (Tabla 3) a 37°C y 220 rpm durante toda la noche. Se inocularon 30 ml de medio LS (Tabla 3) con 1.5 ml del pre-cultivo y se dejaron en agitación a 220 rpm durante 3 horas a 30°C. A continuación, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 1 ml de medio LS, al que se añadieron 10 µl de EGTA (0.1M), y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 2 µg de vector y se mantuvo la mezcla en agitación durante 2 h a 37°C. Tras recuperar las células transformadas se sembraron en placas con medio LB suplementado con tetraciclina (20 µg/ml). Se comprobó la presencia del gen de interés en el plásmido de expresión pC-His1622 mediante una reacción de PCR de colonias bacterianas (descrito en el apartado 5.1.3 de material y métodos).

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo empleados para el crecimiento y transformación de células competentes de *B. subtilis*.

MEDIO LS		MEDIO HS		10x S-base	
Agua Milli Q	80 ml	Agua Milli Q	66.5 ml	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
10x S-base	10 ml	10x S-base	10 ml	K ₂ HPO ₄	14 g
Glucosa 20% (w/v)	2.5 ml	Glucosa 20% (w/v)	2.5 ml	KH ₂ PO ₄	6 g
Triptófano 0.1% (w/v)	0.5 ml	Triptófano 0.1% (w/v)	5 ml	Citrato de sodio	1 g
Caseína 2% (w/v)	0.5 ml	Caseína 2% (w/v)	1 ml	Agua MilliQ	100 ml
Extracto de levadura 2% (w/v)	5 ml	Extracto de levadura 10% (w/v)	5 ml	MgSO ₄ 1M*	0.1 ml
MgCl ₂ 1M	0.25 ml	Arginina 8% (w/v), histidina 0.4%	10 ml		
CaCl ₂ 1M	0.05 ml				

- Todas las soluciones se autoclavan por separado
- La solución de triptófano se esteriliza mediante filtración.
- (*) añadir después de autoclavar

5.2. Expresión y producción de proteínas Cry9

Para expresar las proteínas Cry9, las cepas de *B. subtilis* que contenían el vector de expresión pC-His1622 con cada uno de los genes de interés se sembraron en placas de medio LB-agar suplementado con 20 µg/ml de tetraciclina y se incubaron toda la noche a 37°C. A partir de las colonias bacterianas se realizó un pre-cultivo en 3 ml de medio LB líquido más tetraciclina (20 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al día siguiente, 1.5 ml de pre-cultivo se utilizaron para inocular 150 ml de medio de cultivo 2xYT (16 g/l tryptona, 10 g/l extracto de

levadura, 5 g/l NaCl, pH 7), suplementado con 20 µg/ml de tetraciclina, durante 2-3 horas a 37°C y agitación. Una vez alcanzada una densidad óptica a 600 nm de entre 0.6 y 0.9, se separaron 15 ml de células como control de proteínas totales en células no inducidas. En el resto del cultivo se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de Xilosa (0.5%). Ambos cultivos (control e inducido) se incubaron a 37°C y agitación (200 rpm) durante toda la noche. Al día siguiente, ambos cultivos se precipitaron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado obtenido tras la centrifugación se resuspendió en un tampón de lisis a razón de 3 ml por gramo de pellet, en una mezcla que contenía: NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300mM, lisozima 3 mg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10mM y Benzonasa (0.3µl/ml). La reacción de lisis se mantuvo en agitación a 150 rpm durante una hora a 37°C. Seguidamente, las células se sometieron a pulsos de ultrasonidos (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, EEUU) para lisarlas completamente. Se aplicaron 3 pulsos de 60 segundos cada uno, a potencia constante del 40%, y con un periodo de descanso en hielo de 60 segundos entre pulsos. A continuación se mantuvieron las células lisadas en hielo durante 1 hora en agitación. Posteriormente, se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, correspondiente con la primera fracción de proteínas solubles (Fracción 1). El pellet fue resuspendido en 5 ml de tampón carbonato (Na₂CO₃ 50 mM, NaCl 100 mM, y pH 11.3) suplementado con DTT 10mM, e incubado durante 2 horas en agitación suave y hielo para solubilizar los cuerpos de inclusión formados de proteína insoluble. Finalmente, las células fueron centrifugadas durante 30 minutos a 10000 rpm y 4°C, para recuperar el sobrenadante correspondiente con la segunda fracción soluble (Fracción 2). El pellet se conservó como tercera fracción precipitada (Fracción 3). Se tomaron alícuotas de las distintas fracciones para ser cuantificadas y observadas en un gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 11% y poder identificar las distintas bandas de proteínas separadas por peso molecular, empleándose como marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Standars – Dual color (BioRad, EEUU). Los geles fueron teñidos mediante tinción de azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich, EEUU).

Finalmente, para detectar exactamente en que banda se encontraban nuestras proteínas separadas por peso molecular se realizó un *Western Blot* empleando anticuerpos anti-Histidina frente a nuestra proteína diana (Sigma-Aldrich, EEUU). Para ello, se equilibraron previamente dos papeles Whatman y una membrana de nylon en tampón de transferencia semiseca constituido por 10 ml de buffer de transferencia 10x (29.3 g/l glicina, 58.1 g/l Tris, 35 ml/l SDS 10%), 20 ml

de etanol absoluto y 70 ml de agua destilada durante 5 minutos. A continuación, se colocó el gel de proteínas sobre la membrana de nylon y ésta sobre el papel de whatman en un casset de transferencia Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, EEUU). El segundo papel Whatman se colocó sobre el gel y se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana de nylon mediante exposición durante una hora a 50 mA en una fuente de electroforesis Power Pac Basic™ (Biorad, Hercules, California, Estados Unidos). Una vez finalizada la transferencia, se incubó la membrana de nylon en 20 ml tampón de bloqueo (1x PBS, 0.1% Tween 20 y 5% leche) durante toda la noche a 4°C y agitación suave. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con un solución de lavado (1x PBS y 0.1% Tween 20), a temperatura ambiente y agitación suave. La membrana fue entonces incubada durante 1 hora a temperatura ambiente en 30 ml de solución anticuerpo (1x PBS, 0.1% Tween 20, 2% leche y anticuerpo diluido 1/1000), y lavada nuevamente con solución de lavado (5 repeticiones). Finalmente, las membranas se revelaron empleando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) y el resultado fue visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta SinGen (G:BOX, Syngene, Reino Unido) configurado para el revelado de reacciones quimioluminiscentes.

5.3. Expresión y producción de la proteína Cry1Ab

La producción de proteínas Cry1Ab se obtuvo a partir de cepas clonadas de *E. coli* (vector pBD140, ampicilina resistente 50 µg/ml), cedidas por el laboratorio del Prof. Juan Ferré (Dpto de Genética, Universidad de Valencia), cuya expresión esta reprimida por glucosa 2%. El protocolo de expresión, cedido por el mismo laboratorio, consistió en 4 etapas. Una primera etapa de cultivo, en la que se sembraron las células en medio TB-agar (12g/l triptona, 24g/l extracto de levadura, 4ml/l glicerol y 900 ml agua MilliQ; tras autoclavar, se añaden 100 ml de una solución esterilizada por filtración conteniendo 0.17 M de KH₂PO₄ y 0.72 M de K₂HPO₄) suplementado con 50 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa, y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se realizó un pre-cultivo inoculando una colonia en 5-10 ml de medio TB (con 50 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa) e incubándola toda la noche a 37°C y agitación (200 rpm). A continuación, se añadieron 5 ml de pre-cultivo a un erlenmeyer de 2 L conteniendo 500 ml de medio TB (con 50 µg/ml de ampicilina), y se incubó durante 3 días (28°C y 180 rpm). Las células se recuperaron mediante centrifugación (8 min, 12000 g y 4°C).

La segunda etapa del protocolo de expresión consistió en el lisado de las células. Para ello, manteniendo el pellet en hielo, se añadieron 3 ml de solución de lisis (50 mM Tris-HCl, 5Mm EDTA, 100 Mm NaCl, pH 8) por gramo de pellet y se resuspendió con vortex. Se añadieron 8 µl de PMSF (50 Mm) y 800 µg de lisozima por gramo de pellet, y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 4 mg de ácido desoxicólico por gramo de pellet y se incubó la mezcla a 37°C durante 10 min. Finalmente, se añadieron 200 µl de DNasa I (1mg/ml) por gramo de pellet (incubación durante 30 min a 37°C), y se centrifugó la mezcla a 11000g y 4°C durante 30 min. La tercera etapa consistió en un lavado del pellet resuspendiéndolo dos veces en 20 ml de solución de lavado (20mM Tris-HCl, 1M NaCl, 1% Triton X-100, pH 7.5) y centrifugándolo durante 20 min a 11000 rpm. Finalmente se resuspendió el pellet dos veces en 20 ml de medio PBS 1X, centrifugándolo durante 20 min a 11000 rpm. La última etapa consistió en una solubilización de las proteínas mediante resuspensión del pellet en 10-20 ml de solución de solubilización (50mM NaHCO₃, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, pH10), centrifugándolo durante 25 min a 11000 rpm. Finalmente, se transfirió el sobrenadante conteniendo la protoxina soluble a tubos limpios. Se guardaron alícuotas para identificar las distintas bandas de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE tal y como se ha descrito previamente, y proceder posteriormente a su cuantificación.

5.4. Cuantificación de proteínas Cry.

La cuantificación de proteínas obtenida en el proceso de purificación se llevó a cabo mediante dos técnicas compatibles. Por una parte, se resolvieron mediante electroforesis desnaturalizante en gel de acrilamida SDS-PAGE al 11% tanto las proteínas a cuantificar como un patrón de concentración conocida de Albúmina del Suero Bovino (BSA) y se calculó la concentración de proteína obtenida mediante **densitometría** utilizando el software Gene Tools (Syngene). Por otra parte, se determinó la cantidad de proteína total mediante el método de **Bradford** (Bradford 1976) empleando BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad, EEUU). Este método se basa en la unión a las proteínas a un colorante, Comassie Blue G-250, determinándose posteriormente la concentración mediante absorbancia a 595 nm y comparándose con un patrón de BSA de concentración conocida.

5.5. Evaluación de la actividad insecticida de cepas Bt y proteínas purificadas mediante bioensayos.

- *Producción de cristales paraesporales de las cepas Bt.* Las cepas Bt1, Bt2, Dipel y Xentari, empleadas para la realización de los bioensayos, se sometieron a una pasteurización previa en baño maría a 72°C durante 30 minutos. A continuación, se crecieron en 50 ml de medio LB a 28°C durante toda la noche. Al día siguiente, las cepas se fermentaron en 500 ml de medio CCY (Tabla 4), 28 °C y agitación continua (220 rpm) durante de 4 o 5 días. De forma periódica se hicieron observaciones al microscopio óptico de preparaciones en fresco hasta que al menos el 90% de las bacterias habían entrado en fase de esporulación y, además, podían observarse claramente los cristales paraesporales. En este momento se añadió NaCl 1M al medio y se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 10 min. El precipitado, que contenía la mezcla de cristales y esporas, se resuspendió en agua MilliQ, se lavó 3 veces, y finalmente se resuspendió en 5 ml de H₂O MilliQ.

Tabla 4. Composición del medio esporulante CCY empleado para la fermentación de cepas Bt y la producción de cristales parasporales (*).

Solución 1. Tampón del medio, pH 7 (500ml)	Concentración
KH ₂ PO ₄	0.026 M
K ₂ HPO ₄	0.052 M
Solución 2. Fuente de carbono (10 ml)	Cantidad (g)
L-glutamina	0,2
Caseína hidrolizada (ácida)	10
Bacto casitona	10
Extracto de levadura	4
Glicerina	6
Agua destilada	hasta 100 ml
Solución 3. Solución acuosa de sales (1ml)	Concentración
ZnCl ₂	0.05M
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.5M
MnCl ₂ 6H ₂ O	0.01M
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.2M
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.05M
HCl fumante	1%

(*). Mezclar la solución 1 y 2 y enrasar a 1 L con agua destilada. Tras autoclavar, añadir 1 ml de la solución 3, previa esterilización por filtración.

- *Cuantificación de la concentración de proteínas mediante solubilización de cepas (cristales y esporas) y Bradford.* Para realizar una cuantificación de la cantidad de proteínas presentes en la mezcla de esporas y cristales se recogió una alícuota de cada suspensión proteica, la cual fue solubilizada incubándose durante 2 horas en tampón carbonato (Na_2CO_3 50 mM, NaCl 100 mM, pH 11) y DTT 10mM a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación, fueron centrifugadas durante 5 minutos a 14000 rpm para recuperar el sobrenadante el cual contenía las proteínas solubles que fueron cuantificadas mediante el método Bradford (Bradford 1976).

- *Evaluación de la actividad insecticida.* La actividad insecticida de las distintas cepas formadas por mezcla de esporas y cristales (Bt1, Bt2, Dipel y Xentari) y de la proteína purificada (Cry1Ab) de *B. thuringiensis* fue evaluada mediante bioensayos sobre larvas neonatas de tres especies de lepidópteros: *Spodoptera littoralis*, *Ostrinia nubilalis* y *Lobesia botrana*, criadas en las instalaciones del Insectario de la Universidad Pública de Navarra bajo condiciones controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperiodo (16:8 h, luz:oscuridad) y humedad relativa (50%). Los bioensayos se llevaron a cabo mediante contaminación superficial de la dieta artificial con las cepas o proteína de interés. Para la especie *S. littoralis* se empleó una dieta general modificada de lepidópteros (Greene et al. 1976), mientras que para *L. botrana* y *O. nubilalis* se utilizó una dieta específica para estas especies (Guennelon et al. 1975). Ambas dietas fueron previamente esterilizadas en autoclave durante 20 min a 126°C (Tabla 5).

Una vez autoclavada, la dieta fue distribuida en cajas de 24 pocillos mientras permanecía líquida. Una vez enfriada y solidificada, se procedió a la contaminación superficial de la dieta con 35 μl de las suspensiones proteicas o de la mezcla de esporas y cristales, y se dejaron secar en la campana de flujo laminar durante 30-45 minutos hasta eliminar el agua por evaporación. Para cada mezcla de esporas y cristales o suspensión proteica se emplearon las mismas cinco concentraciones obtenidas por dilución (factor de dilución 3) (Tabla 6), las cuales variaron en función de la especie a tratar, con el objetivo de que la serie de concentraciones utilizadas para cada especie de insecto produjera mortalidades comprendidas entre un 10 y un 90%.

Tabla 5. Composición de la dieta artificial empleada para realizar los bioensayos con *S. littoralis*, *L. botrana* y *O. nubilalis*, en un volumen final de 1 litro. Se detallan las vitaminas y antibióticos empleados para completar la dieta de *S. littoralis*.

<i>Dieta S. Littoralis</i>		<i>Dieta L. botrana y O. nubilalis</i>		<i>Vitaminas</i>	
Germen de trigo	72	Germen de trigo	48 g	Ácido nicotínico	5 g
Proteína de soja	25 g	Levadura de cerveza	40 g	Pantotenato de calcio	5 g
Levadura de cerveza	14.25 g	Aceite de maíz	1.25 ml	Rivoflabina B2	2.5 g
Azúcar comercial	29.25 g	Nipagina	1 g	Tiamina B1	1.25 g
Mezcla sales Wesson	9.4 g	Agar industrial	18.5 g	Hidrocloruro de piridoxina	1.25 g
Colesterol	0.94 g	Ácido sórbico	1 g	Ácido fólico	1.25 g
Nipagina	0.94 g	Agua destilada	950 ml	<i>Antibióticos</i>	
Agar industrial	15 g	Ácido ascórbico*	4 g	Estreptomina	2 g
Agua destilada	700 ml	Ácido benzoico*	1.25 g	Chlortetraciclina	4.5 g
Ácido sorbico*	1.5 g	Harina de maíz*	40 g	Ácido ascórbico	40 g
Ácido benzoico*	1.5 g	Chlortetraciclina*	0.5 g		
Cloruro de colina*	0.94 g				
Vitaminas y antibióticos ^(a)	4.37 g				

(a) A partir de una mezcla de antibióticos y vitaminas conteniendo 1 g de vitaminas y 46.5 g de antibióticos

(*) Se añaden a la mezcla una vez esterilizado el medio en autoclave.

Tabla 6. Concentraciones empleadas de proteínas (ng/cm²) en los distintos bioensayos con suspensiones proteicas de Bt sobre 3 especies de lepidópteros.

Especie objetivo	C1	C2	C3	C4	C5
<i>S. littoralis</i>	2000	666	222	74	24
<i>O. nubilalis</i>	5000	1666	555	185	61
<i>L. botrana</i>	50	16.6	5.5	1.8	0.6

Una vez dispensadas las distintas toxinas, se colocó una larva neonata en cada pocillo y se cerró la caja, colocando láminas de papel absorbente, favoreciendo el sellado y evitando el exceso de humedad. Todas las larvas sometidas a bioensayo se mantuvieron en condiciones controladas de fotoperiodo (16:8 horas de luz:oscuridad), de temperatura (25±1°C) y de humedad relativa (70±5%). Se utilizaron cinco concentraciones en cada tratamiento (Bt1, Bt2, Dipel, Xentari y Cry1Ab) (Tabla 6) y se utilizaron 24 larvas por concentración. En cada bioensayo se incluyeron 2 placas control (larvas tratadas con agua MilliQ, 0 ng/cm² de toxina) y el bioensayo completo se repitió al menos tres veces.

Determinación de la CL₅₀. La mortalidad de los distintos tratamientos fue evaluada a los 7 días y los datos de concentración-mortalidad se analizaron mediante análisis de regresión Probit con el software Polo-Plus (Robertson et al. 2007), a través del cual se determinó la concentración letal media (**CL₅₀**) y noventa (**CL₉₀**) de cada tratamiento (*i.e.* concentración letal a la que muere el 50% y 90% de los animales bioensayados, respectivamente) y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Los datos de los bioensayos fueron empleados únicamente cuando la mortalidad de los controles fue menor al 8%. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos se estimó la potencia relativa de cada tratamiento, con respecto al tratamiento Cry1Ab, y los correspondientes límites confianza a un nivel de significación del 95%. Cuando los límites de confianza de dos tratamientos no incluyen el 1, significa que las CL₅₀ de los tratamientos son estadísticamente diferentes entre sí.

6. RESULTADOS

6. 1. Amplificación y clonación de genes *cry9*.

La amplificación mediante PCR de los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E* se realizó utilizando los cebadores diseñados en este trabajo (Tabla 1), obteniéndose amplicones de un tamaño aproximado de 3400 pb, los cuales correspondían al tamaño esperado (Figura 6).

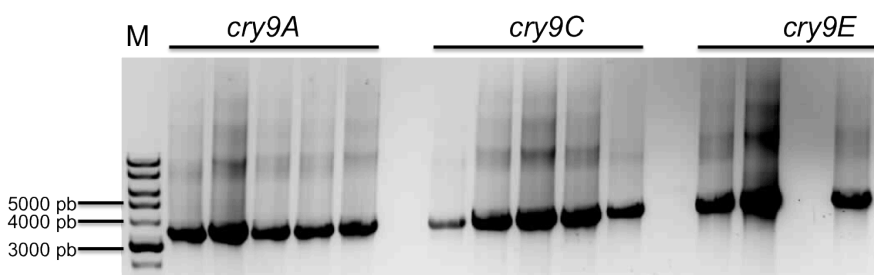


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1%). Amplicones correspondientes con los genes *cry9A*, *cry9C* y *cry9E*. M: marcador molecular 1Kb. Se especifican algunos de los tamaños del marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Posteriormente, los fragmentos de ADN amplificados correspondientes a los genes *cry9* fueron ligados en el vector pJET y, tras realizar la transformación en *E. coli* DH5 α , se comprobó la construcción mediante amplificación por PCR utilizando como molde biomasa de las colonias obtenidas en la transformación y cebadores específicos (Cry9-UF2255 y Cry9-UR3399) diseñados para la amplificación de una región concreta de 1100 pb dentro de los genes *cry9* (Mañeru Oria 2013) (Figura 7).

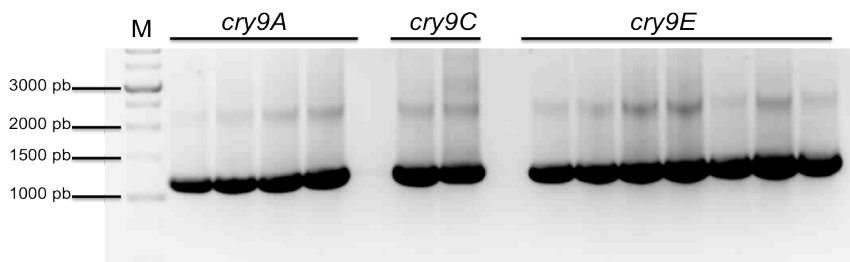


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (1%). Fragmentos amplificados de 1185 pb dentro de los genes *cry9* a partir de colonias transformadas. M: marcador molecular 1Kb.

Se realizó además una segunda comprobación mediante un análisis de restricción de los fragmentos de ADN amplificados con la enzima *Bfa*I, con el fin de obtener perfiles de PCR-RFLP de los distintos genes *cry9* (Mañeru Oria 2013). La digestión con la enzima *Bfa*I de los fragmentos amplificados de cada uno de los clones reveló la presencia de 3 perfiles de RFLP distintos correspondientes con los tres genes amplificados. En la Figura 8 se muestran los perfiles de cada gen, donde se observan los tamaños de los distintos fragmentos obtenidos: el perfil del gen *cry9A* formado por fragmentos de 495, 327, 291 y 72 pb; el perfil del gen *cry9C* por fragmentos de 330, 198, 168, 156, 145, 108, 42 y 38 pb; y el perfil del gen *cry9E* por fragmentos de 860, 168 y 156 pb (Figura 8). Todos los clones analizados mostraron el perfil de PCR-RFLP esperado.

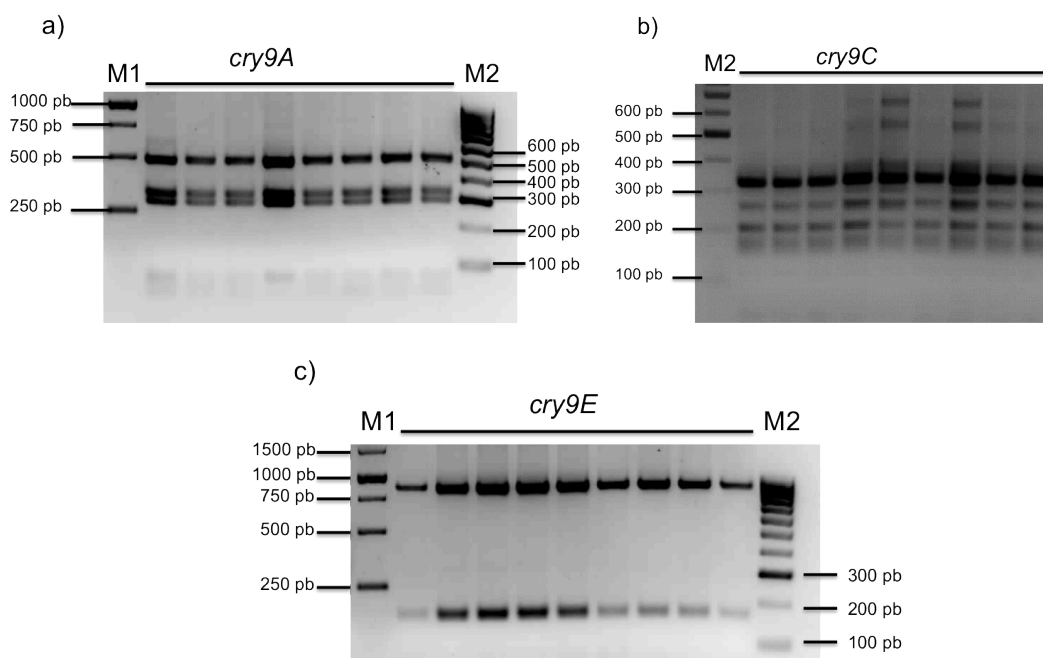


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de perfiles PCR-RFLP obtenidos a partir de la digestión con la enzima *Bfa*I del fragmento de 1.185 pb de cada uno de los genes amplificados: a) *cry9A*, b) *cry9C* y c) *cry9E*. M1: Marcador de 1 kb. M2: Marcador de 100 pb.

Para cada uno de los genes, se seleccionaron de 3 a 6 colonias positivas a las que se realizó una extracción de ADN plasmídico para digerirlas a continuación con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Eag*I para los clones pJET::*cry9A* y pJET::*cry9E*, y con las enzimas *Xma*I y *Sph*I para los clones pJET::*cry9C*, con el fin de verificar las construcciones y obtener los fragmento de ADN correspondientes a cada gen flanqueados por las cicatrices de restricción y clonarlos después de forma direccionada en el vector de expresión pC-His1622. La electroforesis en gel de

agarosa de los fragmentos digeridos reveló dos bandas principales, una banda correspondiente al vector pJET (2974 pb) y otra banda con el tamaño del gen correspondiente en cada caso (3400 pb) (Figura 9a, b). De la misma manera, el vector de expresión pC-His1622 se digirió con las mismas parejas de enzimas de restricción (*Bgl*III-*Eag*I y *Xma*I-*Sph*I) para su posterior empleo en la clonación dirigida de los genes, obteniéndose una banda de 6547 pb (Figura 9c)

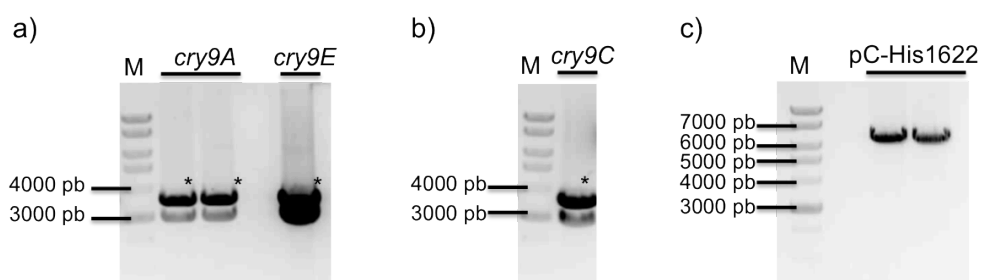


Figura 9. Geles de agarosa (1%). **a)** Bandas producto de la digestión con enzimas *Bgl*III-*Eag*I del vector pJET (2974 pb) y los genes *cry9A* y *cry9E* (3400 pb); **b)** Bandas producto de la digestión con enzimas *Xma*I-*Sph*I del vector pJET (2974 pb) y del gen *cry9C* (3400 pb). **c)** Bandas correspondientes a la digestión del vector pC-His1622 (6547 pb) con las enzimas *Bgl*III-*Eag*I y *Xma*I-*Sph*I. M: Marcador molecular de 1 Kb. (*) Bandas correspondientes a los insertos de interés

Los fragmentos de ADN correspondientes a cada inserto fueron extraídos del gel y purificados para ser clonados en el vector de expresión pC-His1622. Tras la transformación de la construcción en la cepa de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron colonias de cada una de las construcciones, a las cuales se extrajo el DNA plasmídico y se comprobó, mediante digestión con las enzimas *Bgl*III-*Eag*I y *Xma*I-*Sph*I, que contenían la construcción deseada. Tras analizar numerosas muestras, solamente se encontraron clones positivos de la construcción pC-His1622::*cry9C* (Figura 10).

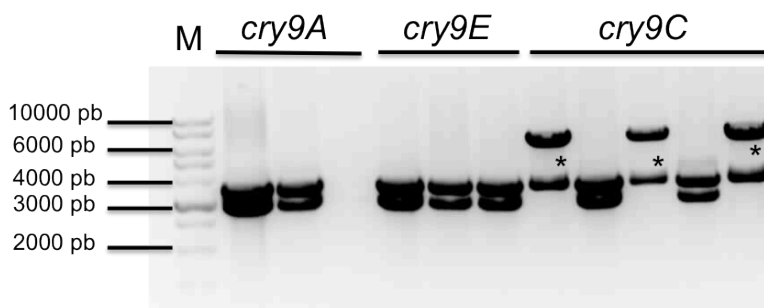


Figura 10. Gel de agarosa (1%). Digestión con enzimas *Bgl*III-*Eag*I de construcciones pC-His1622::*cry9A* y pC-His1622::*cry9E*, y con *Xma*I-*Sph*I para pC-His1622::*cry9C*. Se obtuvieron resultados positivos con la construcción pC-His1622::*cry9C*, observándose una banda correspondiente al gen *cry9C* (3400 pb) y otra al vector pC-His1622 (6547 pb) (*) Bandas correspondientes a los insertos de interés. M: marcador de peso molecular de 1Kb.

Estos clones se comprobaron mediante secuenciación y se transformaron en células competentes de *Bacillus subtilis* para proceder a la expresión de las proteínas. Los resultados de la secuenciación revelaron que en los tres clones seleccionados habían ocurrido diferentes errores en la inserción del extremo 5' del gen en el vector de expresión pC-His1622, y como consecuencia de esta inserción, se producía un triplete stop prematuro. Este resultado explica que no hayamos sido capaces de producir la proteína Cry9C (130kDa) a partir de los transformantes de *Bacillus subtilis* obtenidos para cada uno de los clones. Debido a diversas complicaciones técnicas, ha sido imposible terminar las construcciones de los vectores de expresión pC-His1622::*cry9A*, pC-His1622::*cry9E*, y pC-His1622::*cry9C* y la expresión de las tres proteínas (Cry9A, Cry9C y Cry9E) en el breve periodo de tiempo disponible para realizar este trabajo final de master.

6.2. Producción y cuantificación de la proteína Cry1Ab.

Tras llevar a cabo el protocolo de expresión y purificación de proteínas Cry1Ab (130 kDa) a partir de células transformadas de *E. coli* pBD140 cedidas por el laboratorio del Prof. Juan Ferré (Dpto de Genética, Universidad de Valencia), se procedió a su cuantificación mediante densitometría. Para ello, la proteína purificada se resolvió mediante electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida SDS-PAGE al 11% junto con un patrón de concentración conocida de BSA. La concentración de la proteína de interés se calculó con ayuda del programa GeneTools (Syngene) que interpola el valor de la densidad de su banda en una recta construida en base a los valores de concentración conocida de BSA (densidad versus concentración) (Figura 11).

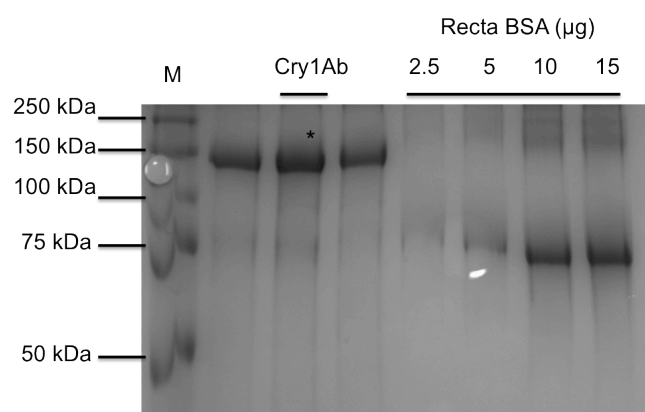


Figura 11. Cuantificación de la proteína Cry1Ab mediante densitometría. Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE. M: marcador Precision Plus Protein Standards; (*): banda de la proteína Cry1Ab en fase soluble (10 µl). Recta patrón de BSA con 2.5, 5, 10 y 15 µg de BSA.

Paralelamente, se determinó la concentración de proteína Cry1Ab mediante el método de Bradford (1976), comparándose la absorbancia a 595 nm con un patrón de BSA de concentración conocida (Figura 12). Finalmente, la concentración estimada de proteína Cry1Ab, la cual fue empleada para la realización de bioensayos, fue de 9500 ng/ μ l.

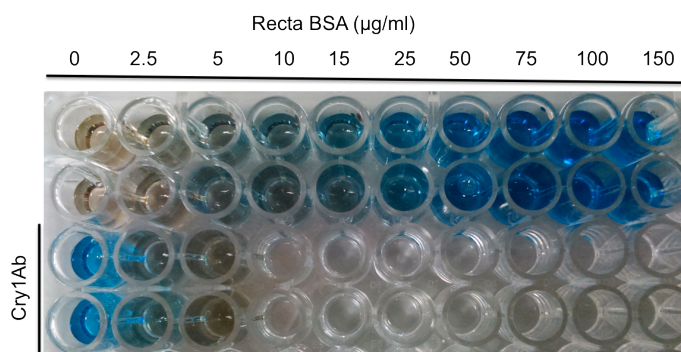


Figura 12. Cuantificación de la proteína Cry1Ab mediante método Bradford (1976). Recta patrón de BSA con 0, 2.5, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 y 150 μ g/ml de BSA. Distintas diluciones de la proteína Cry1Ab en fase soluble.

6.3. Producción y cuantificación de proteínas presentes en las cepas Bt de interés.

Tras fermentar cada una de las cepas de Bt (Bt1, Bt2, Dipel y Xentari) que vamos a utilizar en los ensayos de toxicidad, se obtuvieron suspensiones de esporas y cristales de cada una de estas cepas. Para realizar la cuantificación de las proteínas totales presentes en los cristales paraesporales, una pequeña fracción de la mezcla de esporas y cristales se solubilizó en tampón carbonato. La fracción soluble de cada suspensión proteica solubilizada se cuantificó mediante el método de Bradford (1976), obteniéndose unas concentraciones de 14500 ng/ μ l para Dipel; 8420 ng/ μ l para Bt1, 10550 ng/ μ l para Xentari y 5900 ng/ μ l para Bt2, las cuales fueron empleadas en la realización de los bioensayos.

6.4. Evaluación de la actividad insecticida frente a lepidópteros.

La actividad insecticida de las distintas mezclas de esporas y cristales de las cepas de *B. thuringiensis*: Bt1, Bt2, Dipel y Xentari, y de la proteína purificada Cry1Ab, fue evaluada mediante bioensayos sobre larvas neonatas de tres especies de lepidópteros: *Spodoptera littoralis*, *Ostrinia nubilalis* y *Lobesia botrana*. En la tabla

7 se muestran los resultados obtenidos del análisis probit: los valores de la concentración letal media (CL₅₀) y noventa (CL₉₀) para cada especie y tratamiento, la potencia relativa de CL₅₀ en relación al tratamiento Cry1Ab y sus límites de confianza (95%).

Tabla 7. Actividad insecticida. CL₅₀ y CL₉₀ (ng/cm²) de la proteína Cry1Ab y de las cepas Bt1, Bt2, Dipel y Xentari frente a larvas neonatas de *S. littoralis*, *L. botrana* y *O. nubilalis*, tras 7 días de bioensayo. Se muestra también la Potencia Relativa (PR) de la CL₅₀ (en relación al tratamiento Cry1Ab) y sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

	CL ₅₀ (ng/cm ²)	PR (CL ₅₀)	LC ₅₀ (95%)		CL ₉₀ (ng/cm ²)	LC ₉₀ (95%)	
			Inferior	Superior		Inferior	Superior
<i>Spodoptera littoralis</i>							
Cry1Ab	863 ^a	1	-	-	3011		
Dipel	736 ^a	1.17	0.631	1.153	2881	1.276	4.117
Bt1	370 ^b	2.3	0.317	0.581	1903	0.606	1.80
Xentari	129 ^c	6.68	0.114	0.198	446	0.948	2.64
Bt2	53 ^d	15.46	0.044	0.087	1314	4403	10.36
<i>Lobesia botrana</i>							
Cry1Ab	3 ^a	1	-	-	32		
Xentari	5 ^b	0.52	1.094	3.366	133	0.048	0.454
Bt1	11 ^c	0.24	2.489	6.783	108	0.117	0.748
Dipel	14 ^{c,d}	0.19	3.123	9.129	216	0.079	0.727
Bt2	21 ^d	0.13	4.603	13.5	231	0.043	0.450
<i>Ostrinia nubilalis</i>							
Cry1Ab	428 ^a	1	-	-	-		
Bt1	605 ^a	0.71	0.566	3.525	3630	0.243	3120
Dipel	1181 ^b	0.36	1.024	7.437	45357	3.55	33256
Xentari	1373 ^b	0.31	1.206	8.526	1373	0.332	3899
Bt2	5747 ^c	0.07	4.556	39.551	114294	0.091	1310

- CL₅₀ = Concentración de toxina letal para el 50% de los insectos testados (ng/cm² de dieta)
- CL₉₀ = Concentración de toxina letal para el 90% de los insectos testados (ng/cm² de dieta)
- ^{a-d}. Distinta letra significa que existen diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05)
- PR. Potencia Relativa
- LC₅₀ y LC₉₀. Límite de confianza de los ratios de CL₅₀ y de CL₉₀ (dato no mostrado).

Los valores de CL₅₀ obtenidos con larvas neonatas de *S. littoralis* tras 7 días de bioensayos variaron entre valores mínimos en la cepa Bt2 (53 ng/cm²) y máximos en la proteína soluble Cry1Ab (863 ng/cm²) (Tabla 7). La cepa Bt2 mostró una actividad insecticida 15 veces superior a Cry1Ab. El cálculo de las ratios de CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% permitió determinar las diferencias significativas entre tratamientos dos a dos (i.e. existen diferencias significativas entre

tratamientos si los límites inferior y superior no incluyen al 1, ver ANEXO), determinándose que todos los tratamientos muestran una respuesta diferenciada frente a las larvas neonatas de *S. littoralis*, excepto los tratamientos Dipel y Cry1Ab que no son significativamente diferentes (Tabla 7).

En los bioensayos llevados a cabo con larvas neonatas de *L. botrana*, se observan los valores mínimos de CL_{50} con la proteína soluble Cry1Ab (3 ng/cm²) y máximos con la cepa Bt2 (21 ng/cm²). Los tratamientos empleados sobre larvas de *L. botrana* resultaron ser diferentes significativamente, excepto el tratamiento con Dipel, que mostró una actividad insecticida similar a las cepas Bt1 y Bt2 (Tabla 7).

Al igual que con la especie *L. botrana*, los valores mínimos y máximos de CL_{50} frente a larvas neonatas de *O. nubilalis* se obtuvieron con la proteína soluble Cry1Ab (428 ng/cm²) y con la cepa Bt2 (5747 ng/cm²), respectivamente (Tabla 7). En esta ocasión, los tratamientos Cry1Ab y Bt1 mostraron una actividad insecticida similar ya que no se detectaron diferencias significativas entre ellos. Estos tratamientos mostraron niveles de toxicidad entre 2 y 3 veces superiores a los tratamientos con las cepas Dipel y Xentari, y estos, a su vez, 5 veces superiores a Bt2.

7. DISCUSIÓN

El **control integrado de plagas (CIP)** es un concepto surgido en los años 70 que combina diferentes estrategias de gestión para incrementar la producción y protección de cultivos, minimizando el uso de pesticidas y el impacto sobre el medio ambiente (Norris et al. 2003). El CIP incluye diferentes prácticas como son, entre otras, el conocimiento sobre los ciclos de vida de los insectos plaga y su interacción con el ambiente, el uso racional de pesticidas o el **control biológico de plagas**, consistente en el empleo de organismos vivos para disminuir la densidad de los insectos plaga (Radcliffe et al. 2008). La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* es el agente de control biológico de plagas agrícolas y forestales más importantes en todo el mundo, y ha sido legalmente aceptado para su uso en el control integrado de plagas y en la agricultura orgánica (Caballero & Ferre 2001). Debido a su alta selectividad y a su modo de acción se ha convertido en una alternativa a los insecticidas químicos tradicionales, por lo que muchos programas de CIP incluyen a Bt para su empleo en la protección de determinados cultivos (Caballero & Ferre 2001).

Las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas pueden fluctuar entre un 20% y un 40% en función de la región, el año, el tipo de cultivo o la plaga, provocando grandes pérdidas económicas a nivel mundial (<http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>). Las plagas de lepidópteros, entre las que se encuentran las especies *Spodoptera littoralis*, *Lobesia botrana* y *Ostrinia nubilalis* estudiadas en este trabajo, están incluidas entre las plagas más importantes, las cuales afectan a cultivos como la vid, el maíz o diferentes especies hortícolas (García Marí et al. 1994). Desde su descubrimiento, los bioinsecticidas microbianos tipo Bt han sido empleado satisfactoriamente en el control biológico de este tipo de plagas en distintos cultivos a lo largo de todo el mundo (Ifoulis & Savopoulou-Soultani 2004; Walker et al. 2003). Sin embargo, a pesar de que continuamente se están aislando y caracterizando nuevas cepas Bt con distintos potenciales insecticidas (Rosas-García 2009), la mayor parte de los bioinsecticidas comercializados para el control de lepidópteros se basan en preparaciones de esporas-cristales derivados de unas pocas cepas silvestres como son *B. thuringiensis ser. kurstaki (Btk) HD1 (DiPel®)* o *B. thuringiensis ser. aizawai (Bta) ABTS1857*

(Xentari®) (Bravo et al. 2011). Uno de los riesgos asociados al empleo continuado de un número reducido de cepas y formulados Bt es el desarrollo de resistencias por parte de los insectos plaga (Bravo et al. 2011), tal y como se ha señalado para varias poblaciones de lepidópteros frente a varios formulados Bt (i.e. *O. nubilalis*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* o *Trichoplusia ni*) (Bravo et al. 2011; Huang et al. 2001; Schnepf et al. 1998). La resistencia a las toxinas Cry puede desarrollarse por mutaciones en los insectos plaga que afectan a cualquiera de los pasos del modo de acción de las toxinas Cry, siendo el mecanismo de resistencia más común la alteración o mutación de los receptores (caderina, ALP o APN), resultando en una disminución de la unión de la toxina a las membranas del intestino (Bravo et al. 2011). El fenotipo más frecuente de resistencia en lepidópteros está ligado a mutaciones en el gen de la caderina y se caracteriza por una reducción de la unión a la toxina Cry1A, con resistencia transversal a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (debido a los sitios de unión compartidos), y la falta de resistencia a Cry1B, Cry1C o Cry1D (Bravo et al. 2011; Schnepf et al. 1998). Se han establecido, por tanto, diferentes estrategias de gestión para evitar o disminuir las resistencias desarrolladas por los insectos, entre las que destaca la incorporación de múltiples toxinas en los principios activos de los bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis*, procurando que estas toxinas reconozcan diferentes receptores en la misma especie objetivo (Bravo et al. 2011; Schnepf et al. 1998).

Es por ello que en este trabajo hemos seleccionado dos cepas de Bt, **Bt1** y **Bt2**, caracterizadas por presentar una mezcla de múltiples toxinas con elevada capacidad insecticida y con modos de acción diferentes, de forma que pueda minimizarse el riesgo de aparición de resistencias por parte de los insectos plaga. En concreto, la cepa **Bt2** presenta una combinación de las toxinas más activas producidas por Dipel y Xentari (ver resumen en Tabla 1). Tanto las proteínas Cry1 como las Cry2 presentes en esta cepa se han descrito como dos grupos de toxinas muy activas frente a insectos lepidópteros, además de no compartir sitios de unión (Bravo et al. 2011; de Maagd et al. 2001; Ibrahim et al. 2010; Ruiz de Escudero et al. 2007). La segunda cepa elegida, **Bt1**, se caracteriza por presentar un grupo nuevo de toxinas que no aparecen en las cepas comerciales Dipel y Xentari (i.e. proteínas Cry9), además de por las toxinas Cry1 (Tabla 1). Las proteínas Cry9 presentes en **Bt1** forman también un clúster muy activo frente a lepidópteros (de Maagd et al. 2001; Ibrahim et al. 2010), además de que no compiten por el mismo sitio de unión con las proteínas Cry1 (Hua et al. 2001; Lambert et al. 1996; Ruiz de Escudero et al. 2007). Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido la clonación de los genes

cry9 presentes en la cepa **Bt1**, con el fin de evaluar su actividad de forma aislada y establecer cuál es su papel en la capacidad insecticida de **Bt1**. Finalmente, tal y como se ha mostrado en los resultados, no se ha conseguido la producción de las proteínas Cry9 por un fallo al final del proceso de clonación y por falta de tiempo disponible. Aun y todo, los genes *cry9* fueron correctamente amplificados con los cebadores diseñados (Figura 7), y los amplicones correctamente clonados en los respectivos vectores de clonación (pJET, Figura 9) y expresión (pC-His1622, Figura 10), obteniéndose finalmente una transformación positiva de las construcciones pC-His1622::*cry9C* en cepas de *B. subtilis*. Por tanto, consideramos que en un futuro podrán obtenerse las proteínas Cry9 mediante la repetición del proceso de clonación establecido. Además, el sistema de expresión establecido con el vector pC-His1622 permitirá la inducción proteica con Xilosa, inductor mucho más barato que otros inductores tradicionalmente empleados como el IPTG, lo cual permitirá reducir el coste total de producción de proteínas.

En este trabajo, se han llevado a cabo ensayos de toxicidad con cepas comerciales de *B. thuringiensis* (Dipel y Xentari), cepas de Bt no caracterizadas (Bt1 y Bt2) y con la proteína Cry1Ab, frente a tres especies de lepidópteros plaga (*Spodoptera littoralis*, *Lobesia botrana* y *Ostrinia nubilalis*). Estos bioensayos han revelado una alta capacidad insecticida de las cepas **Bt1** y **Bt2**, siendo igual o superior a las cepas comerciales Dipel y Xentari, según el caso concreto de cada especie de insecto analizada (Tabla 7).

Frente a la especie *S. littoralis*, la cepa más activa resultó ser **Bt2** ($CL_{50}=53$ ng/cm²), con una actividad tóxica 13 y 2.5 veces superior a Dipel y Xentari respectivamente (Tabla 7). Además, la proteína soluble Cry1Ab resultó ser la menos activa (CL_{50} de 863 ng/cm²). Debido a que la proteína Cry1Ab está presente en la cepa más activa **Bt2**, la elevada actividad insecticida de esta cepa debe deberse a la actividad de otras proteínas paraesporales de **Bt2** (Tabla 1). La cepa **Bt2** contiene los genes que podrían expresar las proteínas Cry1Aa y Cry1D, las cuales, según varios estudios previos, no son activas frente a esta *S. littoralis* (Höfte & Whiteley 1989; Van Rie et al. 1990). Sin embargo, la proteína Cry1C resulta altamente tóxica frente a larvas neonatas de esta especie, con valores de CL_{50} en torno a 100 ng/cm² (Höfte & Whiteley 1989; Smith et al. 1996; Van Rie et al. 1990), pudiendo ser la responsable de la elevada actividad insecticida de Bt2. Las diferencias de actividad observadas entre **Bt2** y Xentari (Tabla 7), cepas productoras de Cry1C, podría deberse tanto a la proporción relativa de esta proteína en el cristal paraesporal

como a la presencia de proteínas Cry1Ia y Cry2 en **Bt2**. Por tanto, sería conveniente determinar el papel que las proteínas Cry1Ia y Cry2 están ejerciendo de forma individual en *S. littoralis*, ya que, además, son las únicas dos proteínas que diferencian **Bt2** de Xentari y podrían tener un papel importante en el conjunto tóxico final. La actividad insecticida de **Bt1** frente a *S. littoralis* fue también elevada ($CL_{50}=370$ ng/cm²), siendo significativamente mayor que la de Dipel (1.2 veces) aunque menor que la de Xentari (2.8 veces). Al menos dos de las proteínas que produce la cepa **Bt1** (Cry1Aa y Cry1Ac) no han mostrado actividad frente a *S. littoralis* en estudios previos (Höfte & Whiteley 1989; Van Rie et al. 1990). Por ello, consideramos que las proteínas Cry1Ae y Cry9 pueden ser las responsables del nivel de toxicidad elevado en **Bt1**. Estudios previos han demostrado que la proteína Cry9Ca presenta una actividad elevada frente a *S. littoralis*, con valores de CL_{50} de 65.5 ng/cm² (Lambert et al. 1996). Consideramos por tanto, que estas proteínas deben de ser estudiadas de forma aislada para poder concluir sobre su papel específico en la toxicidad de **Bt1** sobre *S. littoralis*.

En los bioensayos llevados a cabo con la especie *L. botrana*, todos los tratamientos resultaron ser muy eficientes con valores de CL_{50} muy bajos, siendo mínimos con la proteína soluble Cry1Ab (3 ng/cm²) y máximos con la cepa Bt2 (21 ng/cm²) (Tabla 7). En un trabajo previo sobre la toxicidad de proteínas aisladas frente a *L. botrana*, Cry9Ca y Cry2Ab fueron las toxinas más activas, seguidas por Cry1Ab, Cry2Aa y Cry1Ia7 (Ruiz de Escudero et al. 2007). Estos autores concluyeron también que Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab, y Cry9Ca no comparten sitios de unión con Cry1Ab en esta especie (Ruiz de Escudero et al. 2007). Por tanto, podemos concluir que tanto **Bt1** como **Bt2** resultan adecuadas para combatir plagas de *L. botrana* (siendo Bt1 dos veces más eficiente que Bt2) ya que, además de presentar una mezcla de proteínas que no comparten sitios de unión en *L. botrana*, resultan altamente tóxicas para esta especie con valores de CL_{50} de 11 ng/cm² en **Bt1** y 21 ng/cm² en **Bt2**. El hecho de que **Bt1** sea el doble de eficiente que **Bt2**, a pesar de carecer de la proteína Cry1Ab, parece indicar nuevamente el papel de las proteínas Cry9 en la toxicidad relativa de esta cepa, lo cual podrá ser elucidado cuando las proteínas Cry9 sean clonadas.

Finalmente, en los bioensayos llevados a cabo con la especie *O. nubilalis*, los valores mínimos y máximos de CL_{50} se obtuvieron con la proteína soluble Cry1Ab (428 ng/cm²) y con la cepa Bt2 (5747 ng/cm²), respectivamente (Tabla 7). Estudios previos ya mostraron que la proteína Cry1Ab es muy eficiente frente a esta especie,

con valores de CL_{50} de 27 y 50 ng/cm² (Chambers et al. 1991; Denolf et al. 1993). Sin embargo, la cepa **Bt1** ($CL_{50}=605$ ng/cm²), que resultó la cepa más eficiente de nuestro estudio (casi 10 veces más eficiente que Bt2, y 2 veces más que las cepas comerciales Dipel y Xentari) no presenta la proteína Cry1Ab, la cual está presente en las otras 3 cepas. De las proteínas presentes en **Bt1**, existen estudios previos que han mostrado una toxicidad elevada en *O. nubilalis* con Cry1Ac, Cry9C y Cry9E (Chambers et al. 1991; Hua et al. 2001; Lambert et al. 1996; Reed & Halliday 2001; Von Tersch et al. 1991) y menor con Cry1Aa (Denolf et al. 1993), esta última también presente en las demás cepas. Sería conveniente, por tanto, clonar las proteínas Cry1Ae y Cry9A para identificar el papel relativo de estas proteínas en la mezcla proteica final. Podemos concluir que la cepa **Bt1** es una buena candidata para ser empleada en el control integrado de *O. nubilalis* ya que, además de ser 2 veces más eficiente que las cepas comerciales Dipel y Xentari, la mezcla de proteínas Cry1 y Cry9 presentes en su cristal no comparten sitios de unión en las células del intestino de *O. nubilalis* (Lambert et al. 1996), reduciendo así las posibilidades de crear resistencias.

8. CONCLUSIÓN

1. El sistema de clonación establecido para la producción de proteínas Cry9 (amplificación de genes, clonación en vectores de clonación pJET y expresión pC-His1622, y transformación de las construcciones en cepas de *B. subtilis*) resultó adecuado, por lo que la repetición del proceso permitirá obtener proteínas Cry9.
2. La cepa **Bt2** resultó ser la cepa más activa frente a *S. littoralis* ($CL_{50}=53$ ng/cm²), con una actividad 13 y 2.5 veces superior a Dipel y Xentari respectivamente. Esta cepa se caracteriza por presentar una mezcla de múltiples toxinas del grupo Cry1 y Cry2 con elevada capacidad insecticida y modos de acción diferentes (Bravo et al. 2011), por lo que **Bt2** puede ser considerada como una buena opción para su comercialización en el control biológico de *S. littoralis*.
3. Tanto la cepa **Bt1** como **Bt2** resultaron altamente tóxicas frente a la especie *L. botrana* con valores de CL_{50} de 11 ng/cm² y 21 ng/cm² respectivamente. Además, ambas cepas presentan una mezcla de proteínas que no comparten sitios de unión en *L. botrana* (Ruiz de Escudero et al. 2007), por lo que, tanto Bt1 como Bt2, resultan adecuadas para su comercialización en el control biológico de *L. botrana*.
4. La cepa **Bt1** resultó 2 veces más eficiente que las cepas comerciales Dipel y Xentari frente a la especie *O. nubilalis*, con valores de CL_{50} de 605 ng/cm². Además, la mezcla de proteínas Cry1 y Cry9 presentes en su cristal no comparten sitios de unión (Lambert et al. 1996), por lo que la cepa **Bt1** es una buena candidata para ser empleada en el control integrado de *O. nubilalis*.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7**:72:248-254.
- Bravo, A., S. S. Gill, and M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**:423-435.
- Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B. I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo, and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial biotechnology* **6**:17-26.
- Bravo, A., S. Likitvivanavong, S. S. Gill, and M. Soberón. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**:423-431.
- Caballero, P., and J. Ferre. 2001. *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. Universidad Publica de Navarra, PHYTOMA-España, Valencia, 2001 ISBN 84-932056-1-3. pp.318.
- Chambers, J. A., A. Jelen, M. P. Gilbert, C. S. Jany, T. B. Johnson, and C. Gawron-Burke. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai. *Journal of Bacteriology* **173**:3966-3976.
- Crickmore, N. 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends in Microbiology* **13**:347-350.
- Crickmore, N., J. Baum, A. Bravo, D. Lereclus, K. Narva, K. Sampson, E. Schnepf, M. Sun, and D. R. Zeigler. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.btnomenclature.info/>.
- de Maagd, R. A., A. Bravo, and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* **17**:193-199.
- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele, and J. Van Rie. 1993. Two Different *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Receptors in the Midgut Brush Border Membrane of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied and Environmental Microbiology* **59**:1828-1837.
- García Marí, F., J. Costa Comelles, and F. Ferragut Perez. 1994. *Plagas Agrícolas*. Phytoma. España. pp 115-125.
- George, Z., and N. Crickmore. 2012. *Bacillus thuringiensis* applications in agriculture. In: *Bacillus thuringiensis Biotechnology* ed. Sansinenea E., editor. (Berlin: Springer Science+Business Media B.V.) 19-39.
- Gill, S. S., E. A. Cowles, and P. V. Pietrantonio. 1992. The Mode of Action of *Bacillus Thuringiensis* Endotoxins. *Annual Review of Entomology* **37**:615-634.
- Gray, M. E., S. T. Ratcliffe, and M. E. Rice. 2009. The IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. In: *Integrated Pest Management: concepts, tactics, strategies and case*

- studies, pp 1-13. E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, and R. E. Cancelado (eds), Cambridge University Press, Cambridge CB2 8BS, UK.
- Greene, G. L., N. C. Leppla, and W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* **69**:487-488.
- Guennelon, G., F. Faivre d'Arcier, and J. Trincal. 1975. Description d'une production massive de l'Eudemis de la vigne sur milieu artificiel (*Lobesia Botrana* Schiff, Lepidoptera Tortricidae) *Annales de Zoologie Ecologie Animale* **7 (3)**:295-309
- Höfte, H., and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* **53**:242-255.
- Hoy, C. W. 2009. Pesticide resistance management. In: *Integrated Pest Management: concepts, tactics, strategies and case studies*, pp 192-204. E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, and R. E. Cancelado (eds), Cambridge University Press, Cambridge CB2 8BS, UK.
- Hua, G., L. Masson, J. L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M. J. Adang. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:872-879.
- Huang, F. 1998. European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner), resistance to *Bacillus thuringiensis* Berliner formulated as Dipel(TM). ProQuest, UMI Dissertations Publishing.
- Huang, F., L. L. Buschman, and R. A. Higgins. 2001. Larval feeding behavior of Dipel - resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* on diet containing *Bacillus thuringiensis* (Dipel ES™). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98**:141-148.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, M. Junker, and L. A. Bulla. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs* **1**:31-50.
- Ifoulis, A. A., and M. Savopoulou-Soultani 2004. Biological Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae by Using Different Formulations of *Bacillus thuringiensis* in 11 Vine Cultivars Under Field Conditions.
- Jepson, P. G. 2009. Assessing environmental risks of pesticides. In: *Integrated Pest Management: concepts, tactics, strategies and case studies*, pp 205-219. E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, and R. E. Cancelado (eds), Cambridge University Press, Cambridge CB2 8BS, UK.
- Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**:166-171.
- Jurat-Fuentes, J. L., and T. A. Jackson. 2012. Chapter 8 - Bacterial Entomopathogens. Pages 265-349 in F. E. V. K. Kaya, editor. *Insect Pathology (Second Edition)*. Academic Press, San Diego.
- Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet, and M. Peferoen. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:80-86.
- Lecadet, M. M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent, and I. Thiéry. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* **86**:660-672.

- Mañeru Oria, F. J. 2013. Identificación de genes de la familia *cry9* en una colección de aislados de *Bacillus thuringiensis*. Trabajo fin de carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. pp 28.
- Martínez, C. 2002. Biological and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* strain toxins against *Helicoverpa armigera*. . Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Moschos, T. 2005. Yield loss quantification and assessment of economic injury level for the anthrophagous generation of the European grapevine moth *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Pest Management* **51**:81-89.
- Moschos, T. 2006. Yield loss quantification and economic injury level estimation for the carpophagous generations of the European grapevine moth *Lobesia botrana* Den. et Schiff. (Lepidoptera: Tortricidae). *International Journal of Pest Management* **52**:141-147.
- Nielsen-LeRoux, C., S. Gaudriault, N. Ramarao, D. Lereclus, and A. Givaudan. 2012. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Current Opinion in Microbiology* **15**:220-231.
- Norris, R. F., E. P. Caswell-Chen, and M. Kogan 2003. *Concepts in Integrated Pest Management*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Palma, L., D. Muñoz, C. Berry, J. Murillo, and P. Caballero. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins* **6**:3296.
- Pardo-Lopez, L., M. Soberon, and A. Bravo. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* **37**:3-22.
- Park, H.-W., D. K. Bideshi, and B. A. Federici. 2000. Molecular Genetic Manipulation of Truncated Cry1C Protein Synthesis in *Bacillus thuringiensis* To Improve Stability and Yield. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:4449-4455.
- Porcar, M., and P. Caballero. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *Journal of Applied Microbiology* **89**:309-316.
- Porcar, M., and V. Juarez-Perez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev* **26**:419-432.
- Radcliffe, E. B., W. D. Hutchison, and R. E. Cancelado 2008. *Integrated Pest Management: Concepts, Tactics, Strategies and Case Studies*. Cambridge University Press.
- Reed, J. P., and W. R. Halliday 2001. Establishment of Cry9C Susceptibility Baselines for European Corn Borer and Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae).
- Robertson, J. L., H. K. Preisler, and R. M. Russell. 2007. *PoloPlus: Probit and logit analysis user's guide*. LeOra Software, Petaluna, CA, USA.
- Roh, J. Y., J. Y. Choi, M. S. Li, B. R. Jin, and Y. H. Je. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* **17**:547-559.
- Rosas-Garcia, N. M. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology* **3(1)**:28-36.

- Ruiz de Escudero, I., A. Estela, B. Escriche, and P. Caballero. 2007. Potential of the *Bacillus thuringiensis* Toxin Reservoir for the Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a Major Pest of Grape Plants. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:337-340.
- Ruíz Escudero, I., I. Ibañez, M. A. Padilla, A. Carnero, and P. Caballero. 2004. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. *Bol. San. Veg.* **30 (4)**:703-713.
- Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **31**:217-231.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:775-806.
- Smith, G. P., J. D. Merrick, E. J. Bone, and D. J. Ellar. 1996. Mosquitocidal activity of the CryIC delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:680-684.
- Soberón, M., and A. Bravo. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: Lopez-Munguia, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25º aniversario, capítulo 27. México, D.F. UNAM. pp. 303-314.
- Vachon, V., R. Laprade, and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**:1-12.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:1378-1385.
- Von Tersch, M. A., H. L. Robbins, C. S. Jany, and T. B. Johnson. 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c) toxins. *Appl Environ Microbiol.* **57**:349-358.
- Walker, K., M. Mendelsohn, S. Matten, M. Alphin, and D. Ave. 2003. The Role of Microbial Bt Products in U.S. Crop Protection. *Journal of New Seeds* **5**:31-51.
- Wraight, S. P., and A. E. Hajek. 2009. Manipulation of arthropods pathogens for IPM. IPM paradigm: concepts, strategies and tactics. In: *Integrated Pest Management: concepts, tactics, strategies and case studies*, pp 131-150. E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison, and R. E. Cancelado (eds), Cambridge University Press, Cambridge CB2 8BS, UK.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, L. Rose-Young, and L. A. Bulla. 2005. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ* **12**:1407-1416.
- Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig, and L. A. Bulla. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:9897-9902.

10. ANEXO

En la siguientes tablas se muestran las Potencias Relativas (PR) de CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% entre los tratamientos dos a dos frente a larvas neonatas de *S. littoralis* (Tabla 8), *L. botrana* (Tabla 9) y *O. nubilalis* (Tabla 10). Se indican con un asterisco los tratamientos que son significativamente diferentes dos a dos (cuando los límites inferior y superior no incluyen al 1).

Tabla 8. Potencia Relativa de CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% entre tratamientos dos a dos frente a larvas neonatas de *S. littoralis*. Existen diferencias significativas entre los tratamientos si los límites inferior y superior no incluyen al 1.

	Bt1	Xentari	Bt2	Cry1Ab
Dipel	PR = 1.987* LC = 1.433-2.755	PR = 5.693* LC = 4.206-7.704	PR = 13.772* LC = 9.625-19.705	PR = 0.853 LC = 0.631-1.153
Bt1		PR = 2.865* LC = 2.113 - 3.885	PR = 6.932* LC = 4.837 -9.934	PR = 0.429* LC = 0.317-0.581
Xentari			PR = 2.419* LC = 1.725-3.392	PR = 0.150* LC = 0.114-0.198
Bt2				PR = 0.062* LC = 0.044-0.087

- (*) Diferencias significativas entre tratamientos.
- LC: límites de confianza al 95%
- PR: Potencia Relativa

Tabla 9. Potencia Relativa de CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% entre tratamientos dos a dos frente a larvas neonatas de *L. botrana*. Existen diferencias significativas entre tratamientos si los límites inferior y superior no incluyen al 1

	Bt1	Xentari	Bt2	Cry1Ab
Dipel	PR= 1.299 LC = 0.787-2.145	PR = 2.782* LC = 1.586-4.881	PR = 0.677 LC = 0.395-1.160	PR = 5.340* LC = 3.123-9.129
Bt1		PR = 2.141* LC = 1.262-3.632	PR = 0.521* LC = 0.315-0.862	PR = 4.109* LC = 2.489-6.783
Xentari			PR = 0.243* LC = 0.139-0,428	PR = 1.919* LC = 1.094-3.366
Bt2				PR = 7.883* LC = 4.603-13.500

- (*) Diferencias significativas entre tratamientos.
- LC: límites de confianza al 95%
- PR: Potencia Relativa

Tabla 10. Potencia Relativa de CL₅₀ y sus límites de confianza al 95% entre los tratamientos dos a dos frente a larvas neonatas de *O. nubilalis*. Existen diferencias significativas entre los tratamientos si los límites inferior y superior no incluyen al 1.

	Bt1	Xentari	Bt2	Cry1Ab
Dipel	PR= 1.954* LC = 1.172-3.257	PR = 0.860 LC = 0.464-1.595	PR = 0.206* LC = 0.095-0.444	PR = 2.759* LC = 1.024-7.437
Bt1		PR = 0.440* LC = 0.271-0.715	PR = 0.105* LC = 0.054-0.205	PR =1.412 LC = 0.566-3.525
Xentari			PR = 0.239* LC = 0.113-0.507	PR =3.207* LC = 1.206-8.526
Bt2				PR = 13.423* LC = 4.556-39.551

- (*) Diferencias significativas entre tratamientos.
- LC: límites de confianza al 95%
- PR: Potencia Relativa