

TESIS DE MÁSTER

“Identificación y producción de proteínas
de *Bacillus thuringiensis*: evaluación de
su actividad insecticida”

Javier Caballero Sánchez

Curso 2013-14

Directores: Dr. Leopoldo Palma Dovis
Dra. Isabel María Matas Casado

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | 3 |
| 1. RESUMEN | 4 |
| 2. ABSTRACT | 5 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 4. OBJETIVOS..... | 13 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 5.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados..... | 14 |
| 5.2 Producción de cristales paraesporales de la cepa Btib-L60 | 14 |
| 5.3 Aislamiento del ADN genómico, secuenciación y análisis bioinformático de la cepa Btib-L60. | 15 |
| 5.4 Diseño de cebadores y reacción PCR | 16 |
| 5.5 Clonación en el vector de clonado pJET | 17 |
| 5.6 Clonación y transformación en el vector de expresión pET28b(+) en <i>E. coli</i> ... | 18 |
| 5.7 Producción de proteínas | 19 |
| 5.8 Cuantificación de la proteína purificada | 20 |
| 5.9 Bioensayos con lepidópteros..... | 20 |
| 5.10 Bioensayos con coleópteros | 21 |
| 5.11 Bioensayos con dípteros..... | 21 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 6.1. Secuenciación y análisis bioinformático | 23 |
| 6.2 Amplificación y clonación de los genes candidatos | 24 |
| 6.3 Producción de cristales paraesporales y proteínas de la cepa L60..... | 26 |
| 6.4 Cuantificación de las proteínas problema | 31 |
| 6.5 Evaluación de la actividad insecticida frente a lepidópteros | 31 |
| 6.6 Evaluación de la actividad insecticida frente a coleópteros..... | 33 |
| 6.6 Evaluación de la actividad insecticida frente a dípteros..... | 34 |
| 7. CONCLUSIONES | 35 |
| 8. Bibliografía | 36 |

1. RESUMEN

La bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el microorganismo más empleado actualmente como materia activa en el desarrollo de bioinsecticidas y la construcción de plantas transgénicas (planta Bt) resistentes a los insectos. Todo ello se debe a su gran capacidad para producir una enorme variedad de proteínas con elevada toxicidad contra un amplio número de especies de insectos que suelen originar importantes plagas agrícolas-forestales o de interés médico-veterinario. En este trabajo se ha analizado el genoma de la cepa L60 de *B. thuringiensis* serovar ibérica (Btib-L60) con el objetivo de identificar genes que codifiquen para nuevas proteínas con potencial actividad insecticida por si mismas o una posible acción sinérgica para otras proteínas insecticidas ya descritas. El resultado más relevante ha sido la identificación de 5 nuevos genes que codifican para proteínas con similitudes del 99 %, 56 %, 44 % y 51 % a las proteínas Bel_Enhancin, Cry32Ba1, Cry66Aa2 y Vip4Aa1, previamente descritas y, en virtud de lo cual, se prevé que puedan tener actividad insecticida. Todos estos genes, excepto uno (el homólogo a *vip4Aa1*), se han logrado expresar, pero sólo en uno de estos casos (el homólogo a *cry32Ba1*) se ha conseguido obtener la proteína en fase soluble. La proteína soluble Cry32Ba1, así como las proteínas solubles que componen el cristal Btib-L60 y las que se encuentran en el sobrenadante de la fermentación de esta cepa, han sido caracterizadas mediante bioensayos para determinar su actividad insecticida. Los bioensayos cualitativos realizados contra 7 especies del orden Lepidoptera (*Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Chrysodeixis chalcites*, *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* y *Lobesia botrana*), una especie de Coleoptera (*Leptinotarsa decemlineata*) y una especie de Diptera (*Ceratitis capitata*) han revelado que ninguna de estas especies de insectos son susceptibles a ninguna de las proteínas evaluadas, excepto la moderada susceptibilidad mostrada por *C. chalcites* a la proteína Cry32Ba1 y por *C. capitata* a las proteínas del cristal de Btib-L60. Se discute el interés práctico y el alcance del estudio realizado dentro del campo de los bioinsecticidas microbianos.

2. ABSTRACT

The most successful insect pathogen used for insect control is the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt), which represents most of the microorganisms used in biological control of agricultural pests in different cultures. This bacterium is the most promising bacterium for the production of bioinsecticides as well as plant resistant to insects associated with environmental preservation. All this is due to its capacity to produce a high variety of crystalline protein inclusions, upon sporulation, which are toxic to a large group of insects responsible for important pests worldwide. In the present study we analysed the genome of the strain L60 of *Bacillus thuringiensis* serovar iberica (Btib-L60) with the aim of identifying genes that encode for novel proteins with insecticidal properties or synergistic activity with other insecticidal proteins already catalogued. The most relevant result was the identification of 5 novel genes encoding for proteins with a percentage of similarity of 99 %, 56 %, 44 % and 51 % with Bel_Enhancin, Cry32Ba1, Cry66Aa2 and Vip4Aa1, respectively, that had been previously described as proteins with insecticidal properties. All these genes have been expressed, except the *vip4Aa1* homolog, but only one of the proteins (the Cry32Ba1 homolog) was obtained in the soluble fraction. This protein, as well as the soluble crystalline protein inclusions, that compose the crystal itself, and the supernatant obtained in the fermentation process of this *Bt* strain, have been characterized by bioassays in order to determine their insecticidal activity. These qualitative bioassays were tested against 7 different species of Lepidopteran genre (*Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Chrysodeixis chalcites*, *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* y *Lobesia botrana*), one species of Coleopteran genre (*Leptinotarsa decemlineata*) and one species of Dipteran genre (*Ceratitis capitata*), but no relevant toxicity results were obtained, except for a moderate susceptibility shown by *C. chalcites* to Cry32Ba1, on the one hand, and *C. capitata* to crystalline protein inclusions of Btib-L60, on the other hand. A further discussion of the relevance of these results as well as their future application is covered in this work.

3. INTRODUCCIÓN

Los insecticidas químicos de síntesis desempeñan un papel fundamental en la agricultura (entre otros agroquímicos) para el control de insectos que causan plagas en los cultivos, los cuales producen grandes pérdidas económicas cada año en Europa y el mundo. Sin embargo, el empleo de estos productos fitosanitarios posee varias desventajas, siendo la más preocupante la acumulación de residuos tóxicos en las cadenas tróficas y los ecosistemas, así como la repercusión que éstos puedan tener tanto para la salud humana, como para el medio ambiente en general (Devine and Furlong, 2007). Además, el aumento poblacional de las últimas décadas ha dado lugar a un incremento de las áreas cultivadas, intensificándose el empleo de estos productos químicos, la aparición de insectos resistentes a los mismos, la emergencia de plagas secundarias y la eliminación de enemigos naturales (Devine and Furlong, 2007). Consecuentemente, la búsqueda de insecticidas respetuosos con el medioambiente y la salud humana ha tenido un creciente interés en los últimos años, siendo los insecticidas basados en microorganismos entomopatógenos (insecticidas microbianos) una de las herramientas más efectivas y utilizadas para la protección de cultivos frente a insectos plaga (Bravo et al., 2011). En la actualidad, los bioinsecticidas se perfilan como una alternativa importante para el reemplazo total o parcial de los productos fitosanitarios químicos de síntesis.

Los insecticidas microbianos, y en especial aquellos producidos en base a cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) constituyen una clara alternativa a la utilización de insecticidas químicos de síntesis. Los bioinsecticidas Bt han sido utilizados eficazmente durante las tres últimas décadas para el control de plagas ocasionadas por diversas especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros (Schnepf et al., 1998). *B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, aerobia o anaeróbica facultativa, de forma bacilar y esporulante. Esta bacteria es capaz de mantenerse en el medio ambiente incluso en condiciones adversas gracias a su capacidad para producir esporas de resistencia, pudiéndose encontrar prácticamente de manera ubicua en cualquier hábitat del planeta, como: suelos cultivados y no cultivados, insectos muertos, crustáceos, anélidos, mamíferos insectívoros, productos agrícolas almacenados, polvo de silos, plantas (filoplano y rizosfera) y medios acuáticos (Schunemann et al., 2014). Entre sus principales ventajas podemos mencionar que: 1) son altamente específicos (Pigott and Ellar, 2007) ya que no afectan a otras especies de insectos beneficiosos (ej. depredadores y parasitoides naturales, polinizadores, etc.), 2) no generan residuos tóxicos, y 3) no están sujetos a plazos de seguridad, es decir, no hay que esperar un tiempo entre el momento en que se realiza la aplicación del tratamiento fitosanitario y el momento en que se recoge la cosecha. Estas cualidades han favorecido que Bt sea el agente de control biológico más utilizado para el control y manejo integrado de plagas de los cultivos. De hecho, Bt constituye la materia activa de aproximadamente el 95 % de todos los bioinsecticidas comercializados a nivel mundial (Lambert et al., 1992). Bt es también la bacteria entomopatógena más estudiada lo cual ha resultado en la descripción de una gran variedad de diferentes cepas naturales las cuales son portadoras de una amplia diversidad de

genes con interesantes propiedades insecticidas (Bravo et al., 2007). Los genes insecticidas se encuentran localizados principalmente en megaplásmidos y menos frecuentemente en el cromosoma de la célula bacteriana (Gonzalez et al., 1981). *Bt* se diferencia también de otras especies de bacterias estrechamente relacionadas, como es el caso de *Bacillus cereus*, debido a su capacidad de sintetizar cristales proteicos, comúnmente conocidos como cristales paraesporales, los cuales son producidos durante la fase de esporulación de la bacteria (Figura 1). Estos cristales están compuestos por mezclas de varias proteínas que suelen ser altamente tóxicas contra una amplia variedad de insectos de interés agrícola (Schnepf et al., 1998) así como también contra especies de mosquitos que son transmisores de enfermedades del hombre (Bravo et al., 2011).

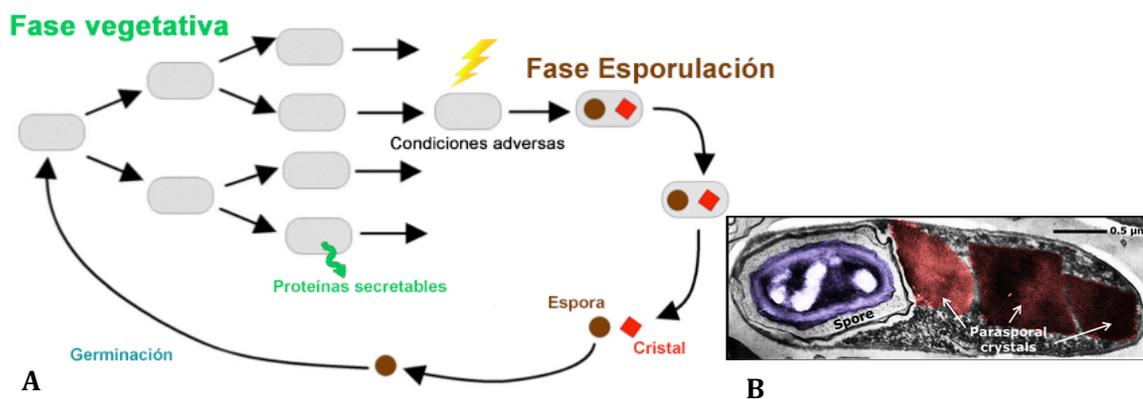


Figura 1. A) Diagrama del ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* en el cual se diferencian la fase vegetativa, la fase de esporulación y las proteínas sintetizadas en cada una de las fases, imagen modificada de Martínez, 2002. B) Bacteria de *Bt* en fase de esporulación en la cual se diferencian perfectamente la espora (morado) y los cristales (rojo), modificada de Ibrahim et al., 2010.

Las técnicas de secuenciación del DNA han permitido identificar un gran número de genes insecticidas los cuales han sido agrupados, en base a su homología en hasta 73 clases distintas de genes *cry* (*cry1-cry73*), 3 clases de genes *cyt* (*cyt1* a *cyt3*) y 4 clases de genes *vip* (*vip1* a *vip4*) (Crickmore et al., 2014). Las proteínas Cry, para las que codifican los genes *cry*, pueden a su vez sub-agruparse básicamente en dos tipos distintos los cuales están relacionados con mecanismos de acción potencialmente diferentes. Por una parte, se encuentran las toxinas Cry de tres dominios, las cuales reciben esta denominación por poseer tres dominios conservados típicos (Bravo et al., 2011) con funciones específicas: 1) el dominio I, compuesto por 7 hélices alfa, está implicado en la inserción en la membrana y en la formación del poro; 2) el dominio II, compuesto por láminas beta, está relacionado con el reconocimiento de receptores específicos localizados en las células epiteliales del intestino del insecto; y 3) el dominio III, compuesto por dos láminas β antiparalelas, que es el que otorga especificidad a la proteína al estar involucrado en interacciones específicas con proteínas del intestino del insecto (Bravo et al., 2007). Por otra parte, tenemos las proteínas Cry que carecen de estos tres dominios, tales como las toxinas Cry mosquiticidas, similares a las toxinas Mtx (Wirth et al., 2007), y otras relacionadas con las toxinas binarias Bin producidas por *Lysinibacillus sphaericus* (Berry, 2012). Adicionalmente, algunas cepas *Bt* son capaces de producir también una serie de toxinas durante la fase vegetativa de la

bacteria y que son posteriormente secretadas al medio externo. Estas proteínas son comúnmente conocidas como proteínas Vip (*vegetative insecticidal proteins*) y han sido clasificadas, en base al porcentaje de identidad de su secuencia de aminoácidos, en cuatro tipos: las toxinas binarias constituidas por las proteínas Vip1 y Vip2, con actividad tóxica contra coleópteros (Warren et al., 1998) y homópteros (Sattar and Maiti, 2011); las toxinas Vip3, exclusivamente tóxicas para especies de lepidópteros (Estruch et al., 1996); y, por último, la recientemente descubierta proteína Vip4, cuya actividad insecticida y espectro de huéspedes se desconocen todavía (no publicados). Finalmente, también se han descrito las toxinas Sip (*secreted insecticidal protein*), las cuales son producidas y secretadas durante la fase vegetativa de la bacteria, al igual que ocurre con las proteínas Vip, aunque no guardan relación alguna con éstas en su secuencia de aminoácidos. Las toxinas Sip tienen toxicidad demostrada para algunas especies de coleópteros plaga (Donovan et al., 2006).

Adicionalmente, Bt es también capaz de sintetizar otra serie de factores de virulencia que contribuyen a su patogenicidad frente a los insectos (Schnepf et al., 1998). Entre ellos podemos mencionar el regulador pleiotrópico, PlcR, el cual se encuentra bien conservado tanto en *B. cereus* como en *B. thuringiensis* (Lereclus et al., 2000). Este regulador es el encargado de modular la expresión de factores tales como fosfolipasas, proteasas, quitinasas y bacteriocinas además de otros compuestos antimicrobianos (AMPs) y de enhancinas (Fang et al., 2009). Las enhancinas son unas enzimas metaloproteasas que contribuyen a la destrucción de la membrana peritrófica (primera barrera protectora del epitelio intestinal), facilitando el acceso de las proteínas insecticidas a las células epiteliales del mesénteron para llevar a cabo su unión con los receptores de membrana y posteriormente la formación del poro lítico.

Desde que el primer gen insecticida Bt fue descubierto (*cry1Ac*) (Schnepf and Whiteley, 1981) muchos otros han sido identificados, generándose la necesidad de contar con un sistema de nomenclatura que permita organizar tanto los genes como las proteínas para las que codifican. La nomenclatura empleada para definir cada una de las proteínas de Bt se rige por el empleo de 3 letras que definen el grupo o tipo al que pertenecen (Cry, Cyt, Vip y Sip), seguido de 4 caracteres que reflejan el nivel de homología entre toxinas dentro de cada uno de estos cuatro grupos. El primer carácter se corresponde con un número arábigo, que agrupa las proteínas que conservan hasta un 45% de identidad en base a su secuencia de aminoácidos. El segundo carácter se corresponde con una letra mayúscula, que agrupa proteínas con un nivel de similitud de hasta el 78%. El tercer carácter se corresponde nuevamente con una letra, esta vez en minúscula, que incluye las proteínas que conservan hasta un 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Por último, el cuarto carácter, representado con un número arábigo, incluye las toxinas con un nivel de identidad superior al 95% (Crickmore et al., 2014) (Figura 2). Así por ejemplo, una proteína Cry con un 80 % de identidad comparada con la Cry1Ac2 de la figura, sería incluida en la base de datos del Comité Internacional de Nomenclatura de toxinas Bt como Cry1Ac1.

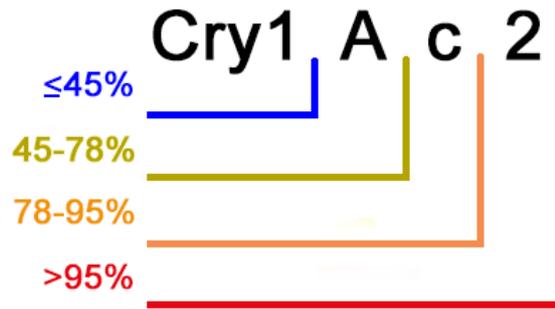


Figura 2. Representación de un ejemplo de nomenclatura de una proteína Cry de Bt siguiendo los criterios de clasificación establecidos por el Comité Internacional de Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Crickmore et al., 2014).

Las proteínas formadoras de los cristales paraesporales (Cry y Cyt) se acumulan dentro de la célula bacteriana llegando a representar hasta un 25 % del peso seco de la bacteria en forma de protoxinas inactivas. Estas protoxinas son sometidas a una digestión parcial por parte de proteasas presentes en el intestino de los insectos susceptibles generando péptidos activos (toxina) de menor tamaño, generalmente de unos 60 kDa, con toxicidad específica contra diversas especies de insectos (Hofte and Whiteley, 1989).

El mecanismo de acción de las proteínas insecticidas Cry ha sido el más estudiado entre las diversas toxinas producidas por Bt. Tras la ingestión de la mezcla de cristales y esporas, se genera en el intestino de la larva un medio hostil, en el cual la bacteria debe sobrevivir, superando a los diferentes sistemas de defensas del hospedador y compitiendo contra el resto de la flora bacteriana que se encuentra en este medio (Abi Khattar et al., 2009). Para ello Bt es capaz de sintetizar otros factores de virulencia, tales como las bacteriocinas u otros compuestos antibacterianos a AMPs, los cuales facilitan la eliminación de la flora bacteriana competente y oportunista invasiva. Por otra parte, y como resultado del pH alcalino del intestino, se produce la solubilización de las protoxinas cristalinas y su activación posterior mediante la acción de proteasas específicas presentes en el intestino del insecto (Bravo et al., 2007). La toxina activada debe ahora atravesar la membrana peritrófica del insecto (Terra, 2001), una membrana compuesta de quitina y proteínas que recubre y protege las células epiteliales del intestino, acción que se ve facilitada gracias a la degradación parcial de la misma producida por quitinasas y enancinas (metaloproteasas) secretadas por la bacteria (Fang et al., 2009; Liu et al., 2009). Una vez superada esta barrera, la toxina entra en contacto con receptores específicos localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino, donde la adhesión a los mismos y la posterior oligomerización de la toxina, genera la formación de un poro (Bravo et al., 2007) que produce la pérdida de líquido y electrolitos del citoplasma celular. Como consecuencia, se produce la parálisis intestinal, impidiendo la asimilación de alimentos y provocando la muerte del insecto por inanición. Adicionalmente, las esporas pueden germinar en este medio propicio, produciéndose la entrada de las células vegetativas al hemocele, las cuales contribuyen a la mortalidad producida por la toxina mediante la producción de una septicemia generalizada (Raymond et al., 2010) (Figura 3).

Respecto a las proteínas Vip3, existen evidencias de que su acción tóxica es ejercida por un mecanismo distinto, esto es, mediante el reconocimiento de receptores específicos distintos al de las toxinas Cry (Gouffon et al., 2011; Lee et al., 2003; Sena et al., 2009). De esta manera, las toxinas Vip3 no supondrían una competencia frente estas toxinas, no reduciendo su efecto tóxico (antagonismo) y permitiendo su utilización para el desarrollo de nuevos bioinsecticidas mejorados, como por ejemplo plantas transgénicas expresando ambas proteínas (Ej. Algodón VipCot) (Kurtz et al., 2007), tóxicas para especies de insectos no susceptibles o resistentes a la acción de las proteínas Cry (Bravo et al., 2011; Mehlo et al., 2005).

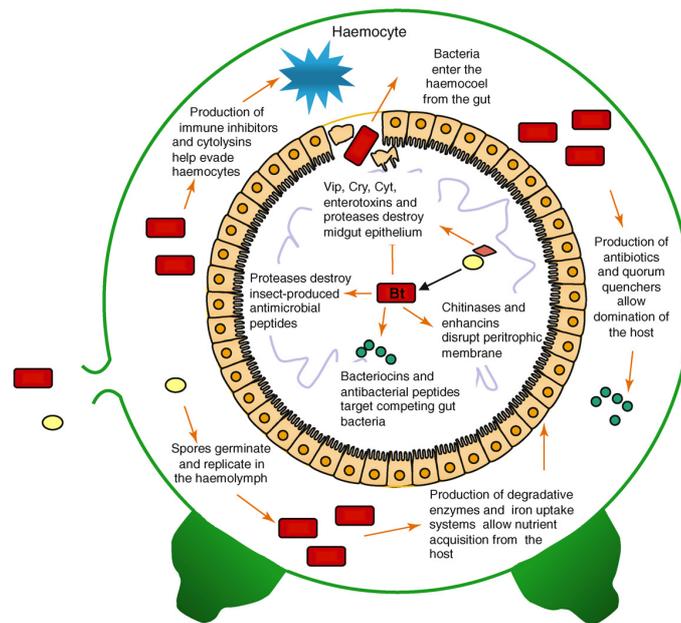


Figura 3. Interacción entre Bt (protoxina y esporas) y el insecto susceptible después de la ingestión. Las distintas barreras y defensas a las que tiene que hacer frente la bacteria se muestran en la imagen, la cual representa el interior de la larva en corte transversal. Desde dentro hacia fuera se muestra la luz intestinal, la membrana peritrófica esquematizada con una línea azul discontinua, las células epiteliales intestinales, el hemocele y finalmente la cutícula del insecto representada por la línea verde (contorno). Bt se representa tanto en forma vegetativa (rectángulo rojo), como en forma de espora (óvalos amarillos) y cristales paraesporales (rombo anaranjado) (Raymond et al., 2010).

Debido a las propiedades insecticidas de las toxinas de Bt, este ha sido empleado como materia activa de formulados bioinsecticidas durante al menos los últimos 40 años (Raymond et al., 2010). Sin embargo, en la actualidad puede llevarse a cabo una clasificación que diferencia tres generaciones de bioinsecticidas basados en Bt teniendo en cuenta las distintas composiciones de los mismos: i) los bioinsecticidas de primera generación, aquellos cuya materia activa esta compuesta exclusivamente de una mezclas de esporas y cristales de una cepa nativa, (ej. *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* comercializados en diversos formulados insecticidas tales como DiPel®); ii) los bioinsecticidas de segunda generación, en los que se utiliza una cepa Bt modificada para mejorar propiedades insecticidas tales como su virulencia o patogenicidad, ampliar su espectro de

huésped, aumentar el rendimiento de proteína insecticida, etc. La expresión de toxinas Bt en otros sistemas bacterianos, como por ejemplo en bacterias del género *Pseudomonas* (sistema CellCap) permite aumentar la persistencia del bioinsecticida sobre el filoplano mediante la obtención de proteínas microencapsuladas en células bacterianas muertas (Schnepf et al., 1998). Adicionalmente, aunque ya fuera del ámbito de los bioinsecticidas, conviene considerar la extensión de la utilidad de las proteínas Bt para la construcción de plantas transgénicas con la capacidad insecticida de Bt (plantas Bt) y, por tanto, resistentes a los insectos (Gatehouse, 2008). Actualmente, se utilizan a nivel comercial plantas Bt de diversos cultivos extensivos (maíz, algodón, etc). La superficie dedicada a estos cultivos ha aumentado progresivamente en los últimos años a nivel mundial, lo cual ha dado lugar a la reducción de las cantidades de insecticidas químicos utilizados en dichas superficies agrícolas (Gatehouse, 2008).

Pese al gran impulso que han recibido los cultivos Bt, la mayor preocupación en relación a esta nueva tecnología y su sostenibilidad reside en la certeza de que, debido a la enorme presión de selección que ejerce esta tecnología sobre las poblaciones naturales de insectos, finalmente se seleccionen biotipos de resistentes capaces de producir daños en las plantas Bt. En este contexto, se enmarca el desarrollo de resistencia de *Helicoverpa armígera* frente a Cry1Ac (Bravo and Soberón, 2008). El desarrollo de resistencia por parte del insecto puede producirse en cualquiera de los pasos claves del modo de acción de la toxina como, por ejemplo, en la solubilización de la proteína en el intestino, su proteólisis, el trayecto a través de la membrana peritrófica, el reconocimiento de receptores específicos en las microvellosidades del intestino del hospedador, la inserción en la membrana, la formación del poro o la lisis de las células epiteliales (Ferré and Van Rie, 2002). Los estudios llevados a cabo en laboratorio son sólo una leve aproximación de lo que ocurre en campo, donde la variedad de genes susceptibles a resistencias podría ser muy superior. La investigación acerca de la transmisión de genes que confieren resistencia, sumado a la identificación de nuevos genes potencialmente insecticidas y al mayor conocimiento que se va adquiriendo respecto a su modo de acción, proporcionan información muy valiosa para el desarrollo de estrategias para lograr una protección de los cultivos eficiente frente a las plagas actuales y emergentes.

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos programas de muestreo masivo que han dado como resultado la identificación de un gran número de cepas Bt, las cuales contienen una gran diversidad de genes insecticidas que amplían enormemente el potencial insecticida de Bt (Peña et al., 2006). La caracterización de estos genes mediante amplificación por PCR seguido del análisis de los perfiles de restricción de los correspondientes amplicones (PCR-RFLP), ha permitido aumentar mucho la diversidad molecular e insecticida de genes *cry* (Porcar and Juárez-Pérez, 2003; Tan et al., 2009) y *vip* (Hernández-Rodríguez et al., 2009; Palma et al., 2012; Palma et al., 2013). Sin embargo, este proceso ha resultado ser muy lento, poco efectivo y costoso. Actualmente, debido a la reducción de los costes de la secuenciación de genomas completos, es posible plantear, como estrategia general para la identificación de genes insecticidas en cromosomas bacterianos, las tecnologías de secuenciación de próxima generación (ej. 454, Illumina, Ion torrent, etc.) que son rápidas, fiables y muy efectivas

(Metzker, 2010). El análisis del genoma de una cepa Bt permite identificar una variedad de genes potencialmente insecticida mayor de lo que cabría esperar mediante cualquier otra estrategia de búsqueda (Palma et al., 2014a; Palma et al., 2014b).

En este trabajo nos planteamos la búsqueda de nuevos genes insecticidas mediante el análisis bioinformático de la secuencia del genoma de la cepa L60 de *B. thuringiensis* ser. ibérica y la producción y caracterización insecticida de las correspondientes proteínas. Con ello, se pretende aumentar el arsenal de toxinas Bt insecticidas disponibles con un doble objetivo: 1) poder hacer frente a la posible aparición de resistencias a las toxinas Bt en las poblaciones de las especies sometidas a una determinada presión de selección y, 2) ampliar el espectro de huéspedes de las toxinas de Bt a otras especies de insectos contra las que actualmente no se conocen toxinas efectivas.

4. OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon en este trabajo fueron los siguientes:

- 1) Identificar genes novedales con potencial actividad insecticida, mediante el análisis del genoma de la cepa L60 de *Bacillus thuringiensis* serovar ibérica (Btib-L60) y la utilización de diversas herramientas bioinformáticas.
- 2) Producir las nuevas proteínas identificadas y hacer una caracterización parcial de su actividad insecticida para especies de insectos de interés agrícola por ocasionar plagas en los cultivos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

La cepa L60 de *B. thuringiensis* ser. ibérica (Btib-L60, aislada originariamente a partir de una muestra de suelo procedente de la provincia de Lérida) se obtuvo de la colección de la Universidad Pública de Navarra (grupo de Bioinsecticidas Microbianos). Las cepas Btib-L60 y *Escherichia coli* DH5 α , se cultivaron en medio Luria-Bertani sólido (LB) (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 15 g de Agar, en un volumen final de 1 litro de H₂O destilada y a pH 7) a 28 °C y 37 °C, respectivamente, durante toda la noche. Por otro lado se crecieron células de *E. coli* BL21(DE3) en medio 2 \times TY (16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, en un volumen final de 1 litro de H₂O destilada y a pH7) también a 37 °C. Los vectores de clonación, pJET (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), y de expresión, pET28b(+) (Novagen, Alemania) se utilizaron para llevar a cabo la clonación de los amplicones de PCR y la expresión de proteínas recombinantes, respectivamente.

5.2 Producción de cristales paraesporales de la cepa L60

La cepa Btib-L60 se creció en una placa de LB durante toda la noche, a 28 °C, y se hicieron preparaciones de colonias individuales en fresco (una porción de la colonia disgregada en una gota de agua destilada estéril) para su observación al microscopio óptico. Las colonias seleccionadas se fermentaron en 750 ml de medio CCY (Stewart et al., 1981) durante de 4-5 días, a 28 °C, en agitación continua a 220 rpm. A intervalos de tiempo, se fueron haciendo 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 procedió a la centrifugación del caldo fermentado durante 15 minutos, 4 °C, y a 11.000 rpm. Del producto de la centrifugación se recuperaron, por separado, la fase líquida o el sobrenadante, que contenía los restos celulares, y la fase sólida o el precipitado que contenía la mezcla de cristales y esporas.

El sobrenadante, en el cual se encontraban las proteínas secretadas durante la fase de crecimiento vegetativo de la bacteria, se sometió a un proceso de precipitación con una solución sobresaturada (70%) de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). Esta solución fue añadiéndose gota a gota al sobrenadante en frío (4 °C) y en agitación constante. El producto de la precipitación se almacenó durante toda la noche, a 4 °C, y posteriormente se centrifugó a 11.000 rpm y 4 °C, durante 30 minutos. El precipitado recuperado se resuspendió en 1 ml de tampón de resuspensión (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8).

El precipitado, que contenía la mezcla de cristales y esporas, se resuspendió en 20 ml de 1 M NaCl y se volvió a centrifugar, a 10.000 rpm y 4 °C, durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 20 ml de H₂O MiliQ y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Este paso de lavado se realizó una vez más y el precipitado, conteniendo la mezclas de esporas y cristales, finalmente se resuspendió en 20 ml de H₂O MiliQ. La separación de cristales y esporas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación en gradiente discontinuo (67-79%) de sacarosa, a 24.000 rpm, durante 16 horas. Los cristales se recuperaron de la interfase de las dos concentraciones de sacarosa mientras que las esporas quedaron en el fondo del tubo. Los cristales recuperados de la interfase se resuspendieron en 45 ml de H₂O miliQ y se centrifugaron una vez más a 10.000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Este lavado se repitió 5 veces para finalmente solubilizar el precipitado final en tampón carbonato (Na₂CO₃ 50 mM, NaCl 100 mM, pH 11) y DTT (dithiothreitol) a una concentración final 10 mM.

5.3 Aislamiento del ADN genómico, secuenciación y análisis bioinformático de la cepa Btib-L60

El ADN total (cromosómico más el ADN extracromosómico o plasmídico) de la cepa Btib-L60 se obtuvo empleando el kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) para bacterias Gram positivas.

La secuencia borrador del genoma de la cepa Btib-L60 se obtuvo, mediante secuenciación masiva de próxima generación (Illumina), a través del servicio de secuenciación del Beijing Genomics Institute (BGI, China). Partiendo desde las lecturas cortas obtenidas (90 bp), se llevo a cabo el ensamblaje en *contigs* empleando el programa bioinformático CLC Genomics Workbench 7 (CLC Bio, Dinamarca). Utilizando los *contigs* ensamblados, se procedió a la identificación y anotación de los genes insecticidas hipotéticos mediante Blast (Altschul et al., 1990). Para ello, se hizo uso de una base de datos personalizada, construida exclusivamente con secuencias de proteínas insecticidas Bt, ya descritas. Estas secuencias fueron obtenidas desde bases de datos públicas, tales como Genbank (Benson et al., 2005), obteniendo los porcentajes de identidad correspondientes a proteínas incluidas en las bases de datos *nr* (secuencias de proteínas no redundantes) y *pat* (secuencias de proteínas incluidas en patentes de invención). Posteriormente, se analizaron manualmente cada uno de los *contigs* candidatos empleando la suite bioinformática Geneious Pro versión R7.1.2 (Drummond et al., 2014). La información obtenida además se analizó utilizando el servidor de anotación genómica bacteriana RAST (Aziz et al., 2008).

El análisis de los dominios conservados y péptidos señal de las secuencias de aminoácidos de cada hipotético gen insecticida se hizo utilizando la herramienta InterProScan (Hunter et al., 2012), incluida en Geneious Pro. Para rentabilizar el análisis, se seleccionaron exclusivamente como genes candidatos (potencialmente insecticidas) aquellos que mostraban grados significativos de homología respecto a los genes insecticidas ya descritos y publicados en bases de datos públicas (GenBank) y la base de datos de proteínas insecticidas de la herramienta de predicción de toxinas Bt, BtToxin_Scanner (Weixing Ye et al., 2012).

5.4 Diseño de cebadores y reacción PCR

La amplificación mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los genes insecticidas candidatos se obtuvo empleando cebadores específicos para cada uno de ellos, diseñados con la herramienta Primer3 (Koressaar and Remm, 2007) incluida en Geneious Pro. Adicionalmente, se diseñaron y añadieron dianas específicas para enzimas de restricción de interés en los extremos 5' y 3' para la posterior clonación dirigida de los genes, en marco de lectura abierto, en el vector de expresión pET28b(+) (Novagen, Alemania) (Tabla 1). El diseño de estos cebadores permitió la inserción en marco de lectura abierto del gen insecticida y la cola de 6 histidinas codificada en el vector pET28b(+) para la generación de una proteína de fusión marcada con 6 histidinas en el extremo amino terminal (extremo 5' de cada gen). Así mismo, se excluyó la fusión de las 6 histidinas codificadas en el vector hacia en el extremo carboxilo terminal de cada proteína recombinante (extremo 3' de cada gen) colocando el codón de stop inmediatamente antes de la correspondiente diana de restricción.

Tabla 1. Cebadores específicos diseñados para la amplificación de los genes insecticidas homólogos a *bel*, *cry32*, *cry66*, *vip4* y *vip4-SP*.

| Gen | Cebador | Secuencia *(5'→3') | Tm (°C) | Amplificación (pb) |
|------------------|---------|---|---------|--------------------|
| <i>bel</i> | Forward | GGATCC ¹ TATGAAAAGGCTACTTGTATAG | 55,2 | 2226 |
| | Reverse | CAGCTG ² AATGAGTAATATATTCGATAG | 47,3 | |
| <i>cry32</i> | Forward | GTCGAC ² ATGAATCAATATGTTACAACAGTG | 58,1 | 3639 |
| | Reverse | CGCCGGCG ³ AATATGTGATTTTTAAAAATATCCTTG | 63 | |
| <i>cry66</i> | Forward | GTCGAC ² ATGAGTCTTCCATCAGGGCTAG | 63,1 | 2184 |
| | Reverse | CGCCGGCG ³ AATTGAAGCGAATCTTTTGAAAC | 68,7 | |
| <i>vip4</i> | Forward | GGATCC ¹ GATGAAAGTAAAGAATTTCTATAAATG | 59,5 | 3183 |
| | Reverse | CAGCTG ² AATAAGCAATAAGTACAACCTTAAAAG | 62,1 | |
| <i>vip4-SP**</i> | Forward | GGATCC ¹ GCTACAAAAAAAACCTACAGATACG | 59,9 | 3106 |
| | Reverse | CAGCTG ² AATAAGCAATAAGTACAACCTTAAAAG | 62,1 | |

*las secuencias incluyen dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI (1), *Sal*I (2) y *Not*I (3). ** Gen *vip4* con delección de la secuencia correspondiente al péptido señal.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl con la enzima *Taq* polimerasa a prueba de errores PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Japan). Cada reacción incluía 5 µl de tampón PrimeSTAR 5×, 2 µl de dNTPs (desoxinucleótidos), 0,2 µl (2,5 U/µL) de PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 0,5 µl (12,5 µM) de cada uno de los cebadores específicos de cada gen, 5 µl de ADN total extraído y 11,8 µl de H₂O, siguiendo la metodología descrita por Ruiz de Escudero (Ruiz de Escudero et al., 2006). Las condiciones de reacción

fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, 34 ciclos de amplificación compuestos por: un ciclo de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, 30 segundos de anillamiento a una temperatura de 51 °C, 62 °C, 62 °C, 61 °C y 61 °C para los genes *bel_enhancin*, *cry32Ba1*, *cry66Aa2*, *vip4Aa1* y *vip4Aa1-SP*, respectivamente, seguido un tiempo de elongación a 72 °C de 2 minutos y medio (para el gen *bel_enhancin*), 4 minutos (para los genes *cry32Ba1* y *cry66Aa2*) y 3 minutos y medio (para los genes *vip4Aa1* y *vip4Aa1-SP*), para acabar con una elongación final de 10 minutos a una temperatura de 72 °C.

Los amplicones obtenidos de la reacción anterior se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La tinción con bromuro de etidio permitió visualizar cada amplicón en un transiluminador de luz ultravioleta (G:BOX, Syngene, Cambridge, Reino Unido).

5.5 Clonación en el vector de clonado pJET

Las bandas resueltas mediante electroforesis se purificaron del gel de agarosa mediante la utilización del kit comercial NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemania) eluyendo las muestras en un volumen final de 25 µl. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector de clonación pJET incluido en un kit comercial (CloneJET PCR Cloning Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl que incluía 5 µl de tampón 2× de ADN ligasa T4, 1 µl de ADN ligasa T4, 1 µl del vector de clonación pJET y 3 µl de DNA del amplicón purificado en el paso anterior. Las reacciones de ligación se incubaron a una temperatura de 4 °C durante toda la noche.

El producto de la ligación se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α mediante choque térmico. Cada mezcla de ligación se diluyó en 100 µl de células quimiocompetentes y se incubó, durante 30 minutos, en hielo. Seguidamente, se sometieron a un choque térmico en baño de agua a 42 °C, durante 90 segundos, y se incubó cada una de ellas durante 2 minutos en hielo. Cada mezcla de transformación se recuperó con 900 µl de medio SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 4,8 g/L MgSO₄, 3,603 g/L dextrosa, 0,5 g/L NaCl, 0,186 g/L KCl) y fue incubada durante 1 hora en un agitador orbital, a 200 rpm, a la temperatura de 37 °C. Del producto de cada transformación, se utilizaron 100 µl para inocular placas de LB sólido (medio LB mas agar al 2 %), que contenían ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 16h. De cada placa, se seleccionaron 4 colonias distintas para su posterior análisis mediante PCR siguiendo la metodología y condiciones descritas anteriormente. El aislamiento y la purificación del ADN plasmídico de cada clon positivo de las reacciones de PCR se realizó mediante la utilización del kit comercial NucleoSpin Plasmid siguiendo las instrucciones del fabricante (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemania) y se analizó mediante digestión con las enzimas de restricción correspondientes a las dianas añadidas por mutación dirigida por PCR. Cada reacción de digestión doble se llevó a cabo simultáneamente en un volumen final de 20 µl (3 µl de Buffer 10×, 2 µl de BSA (Bovine Serum Albumin), 1 µl de cada enzima correspondiente, 5 µl de muestra y

8 μ l de H₂O ultrapura (MiliQ), a una temperatura de 37 °C, durante al menos 4 horas.

Los amplicones obtenidos y las reacciones de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. A su vez, los insertos correspondientes a cada clon, fueron purificados del gel de agarosa para su posterior clonación en el vector de expresión pET28b(+).

5.6 Clonación y transformación en el vector de expresión pET28b(+) en *E. coli*

La reacción de ligación de cada inserto obtenido en el paso anterior se llevó a cabo empleando 8 μ l de inserto purificado, 10 μ l del vector de expresión pET28b(+) previamente digerido (linearizado) y purificado de geles de agarosa, 1 μ l de ADN ligasa T4 (New England Biolabs Inc., Massachusetts, Estados Unidos) y 2 μ l de tampón 10 \times de ADN ligasa T4. Posteriormente, cada mezcla de ligación se incubó durante toda la noche, a una temperatura de 16 °C, en termociclador (BioRad, California, Estados Unidos).

Cada construcción se transformó entonces en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α según se ha descrito anteriormente. Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR para verificar la presencia correcta de cada uno de los insertos. Cada reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, incluyendo 2,5 μ l de tampón 10 \times , 1 μ l de Cl₂Mg 50 mM, 0,3 μ l de dNTPs, 0,2 μ l (5 U/ μ l) de BioTaq polimerasa (Bioline Reagents, Reino Unido), 0,5 μ l (12,5 μ M) de cada cebador, una colonia resuspendida (previamente sembrada en medio LB agar) en la mezcla de reacción, y se añadió H₂O MiliQ hasta el volumen deseado. Las condiciones de cada reacción de amplificación fueron las mismas descritas anteriormente para cada uno de los genes insecticidas. Los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y las colonias amplificadas positivamente se incubaron en LB líquido con kanamicina (a una concentración final de 50 μ g/ml), a 37 °C y 200 rpm, durante toda la noche. El aislamiento y purificación del ADN plasmídico, de cada construcción, se llevó a cabo mediante el kit comercial NucleoSpin Plasmid siguiendo las instrucciones del fabricante (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemania).

Cada construcción fue analizada nuevamente por digestión doble simultánea y secuenciación Sanger (StabVida, Portugal) de sus extremos 5' y 3' para asegurar la inserción en marco de lectura abierta, la correcta fusión de la secuencia codificante de cada gen y la presencia de la cola de 6 histidinas localizadas en el vector de expresión. Finalmente, las construcciones se transformaron en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) mediante choque térmico como se ha descrito anteriormente.

5.7 Producción de proteínas

Para cada una de las construcciones, se seleccionó una colonia de *E. coli* BL21(DE3) con la que inocularon 20 ml de 2× TY, que contenía kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml, y el cultivo de este preinóculo fue incubado, a 37 °C y 200 rpm, durante toda la noche. De este preinóculo, se tomaron 10 ml para inocular 250 ml de medio 2× TY, con kanamicina (50 µg/ml), y se fermentó, a 37 °C y 200 rpm, durante 8 horas. Para inducir la expresión de la proteína, se añadió IPTG 1mM y el proceso de fermentación se continuó por otras 5-8 h. El producto de la fermentación se centrifugó a 6.000 rpm, durante 10 minutos, a una temperatura de 4 °C. El pellet fue resuspendido en 3 ml/g de Lew Buffer 1× (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8), 10 mg/ml lisozima, 1 µl bensonaza (25 U/µl) y 1 µl PMSF (10 mM) y se incubó, a 37 °C y 200 rpm, durante 1 hora. Las células se lisaron por sonicación con ultrasonidos (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Estados Unidos), mediante tres pulsos de 60 segundos cada uno, a una potencia constante del 40 %, haciendo un reposo en hielo de 60 segundos entre cada pulso. Tras una incubación de solubilización proteica en hielo con agitación durante 1 hora, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, durante 30 minutos a 4 °C, recuperándose dos fases: el sobrenadante (Fase I) y el precipitado de restos celulares. El precipitado fue resuspendido en 2 ml de tampón carbonato con DDT y se incubó en hielo durante 2 horas en agitador de vaivén, para solubilizar los posibles cuerpos de inclusión formados de proteína insoluble. Seguidamente, se centrifugó a 10.000 rpm y 4 °C, durante 45 minutos, recuperándose por un lado el sobrenadante de solubilización (Fase II), el cual podría contener proteína soluble y, por otro, el precipitado que fue resuspendido en un volumen equitativo de H₂O MiliQ.

El sobrenadante (Fase I) fue sometido a dos filtraciones secuenciales, utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm y 0,2 µm, y se ajustó el pH a 8,5 empleando una solución tampón Lew 1× y HCl diluido. Las proteínas fueron purificadas en columnas de afinidad Niquel-Histidina (Protino Ni-TED 2000, Macherey-Nagel, Alemania), procediendo según el protocolo descrito por el fabricante, obteniéndose una primera alícuota de elución (E1). Esta, a su vez, se eluyó por columnas de desalado (SephadexTH G-25M, GE HealthCare) recuperándose con 3,5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM. Las proteínas se separaron por peso molecular en un gel de acrilamida (SDS-PAGE), al 11 %, en el cual se empleó el marcador molecular Precision Plus Protein™. Standards-Dual color (BioRad, California, Estados Unidos), y fueron visualizadas mediante la tinción de azul de Coomassie.

Por último, para verificar la expresión de las proteínas y su localización en cada una de las fases obtenidas (Fases I, II y precipitado), se procedió a realizar un Western Blot, empleando anticuerpos anti cola de 6 histidinas (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Para ello, se recortaron las membranas de nylon y los correspondientes papeles Whatman equiparables al tamaño de cada gel SDS-PAGE equilibrándose juntos en tampón de transferencia semiseca (10 ml de buffer de transferencia 10× (29,3 g/L Glicina, 58,1 g/L Tris, 35 ml/L SDS 10 %), 20 ml de

etanol al 100 % y 70 ml de agua destilada) durante al menos 10 minutos. La transferencia se realizó en el casset de Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, colocando la membrana de nylon sobre un papel Whatman, y sobre esta el gel de proteínas (Sambrook and Russell, 2001)). El segundo recorte de papel Whatman se colocó sobre el gel y se realizó la transferencia, durante 1 hora a 50 mA, en una fuente de electroforesis Power Pac Basic™ (Biorad, Hercules, California, Estados Unidos). Una vez finalizada la transferencia, se colocó la membrana de nylon en un recipiente con tampón de bloqueo (1× PBS, 0,1 % Tween 20 y 5 % de leche desnatada en un volumen final de 30 ml), en agitación y a 4 °C, durante toda la noche. A continuación se realizaron 5 lavados con la solución de lavado (1× PBS y 0,1 % Tween 20), a temperatura ambiente y en agitación, de 5 minutos cada uno. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo anti colas de histidina diluido 1/10000 en 1× PBS con Tween 20 (0,1 %) y 2 % de leche semidesnatada, en un volumen final de 30 ml. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron 5 veces con solución de lavado en las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente, cada reacción se reveló empleando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). El resultado fue visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta SinGen (G:BOX, Syngene, Reino Unido) configurado para el revelado de reacciones quimioluminiscentes.

5.8 Cuantificación de la proteína purificada

La cuantificación de la proteína similar a Cry32Ba1 soluble se llevó a cabo por densitometría, mediante electroforesis en un gel de acrilamida, en el cual se visualizó dicha proteína junto con un patrón de Albúmina del Suero Bovino (BSA). Para llevar a cabo la cuantificación de la mezcla de cristales, el sobrenadante de la cepa Btib-L60 y el control positivo (Vip3Ag4) se construyó una recta patrón empleando un espectrofotómetro (Bradford, 1976).

5.9 Bioensayos con lepidópteros

Las especies evaluadas fueron: *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassicae*, *Chrysodeixis chalcites*, *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis*, y *Lobesia botrana*. Los bioensayos se llevaron a cabo mediante contaminación superficial de la dieta artificial para lepidópteros con la proteína de interés, salvo en el caso de *L. botrana* donde la proteína fue incorporada en la dieta. Para las especies de *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *O. nubilalis*, *M. brassicae* y *H. armigera* se empleó una dieta general de lepidópteros (Greene et al., 1976) que fue distribuída en cajas de 24 pocillos. Una vez enfriada y solidificada se procedió a la contaminación superficial de la dieta con 40 µl de la suspensión proteica a evaluar y se dejó secar en la campana de flujo laminar durante 30-45 minutos. En cada pocillo se colocó una larva neonata (L₁) y se cerró la caja, colocando laminas de papel absorbente, favoreciendo el sellado de la misma y evitando el exceso de humedad. En el caso de *C. chalcites* se empleó una dieta distinta (Ruiz de Escudero, 2006) y se procedió de la misma manera anteriormente descrita. Para *L. botrana* se utilizó también una dieta específica para esta especie (Guennelon, 1975)

cortada en cubos de dieta que fueron colocados en placas individuales junto con una larva neonata. 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 %). Los resultados de los bioensayos se registraron entre 5-7 días después de haberse realizado los tratamientos.

Para determinar la susceptibilidad de las distintas especies a la proteína evaluada, en todos los casos se utilizó una sola concentración de proteína ($2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta, que a efectos práctico recibe la consideración de elevada), excepto en el caso de *L. botrana* para que se utilizó una concentración de $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de dieta. Como control positivo se empleó la toxina Vip3Ag4 (Palma et al., 2013) a la concentración de $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de dieta, para *L. botrana*, y de $1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta, para el resto de las especies. Como control negativo se empleó el mismo tampón utilizado para resuspender las proteínas (tampón carbonato en el caso de las proteínas problema y H_2O en el caso del control positivo). Adicionalmente, se realizaron bioensayos empleando los cristales nativos producidos y solubilizados de la cepa Btib-L60 así como del sobrenadante precipitado con sulfato de amonio, ambos a una concentración de $2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de dieta para todas las especies, excepto para *L. botrana* que se utilizó $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de dieta.

5.10 Bioensayos con coleópteros

La especie evaluada fue *Leptinotarsa decemlineata*, conocida comúnmente como el escarabajo de la patata. La dieta empleada en el bioensayo constaba de discos de hoja de patata cortados con un sacabocados de 8 mm de diámetro, los cuales se colocaron en hielo para evitar su deshidratación temprana. Estos discos fueron sumergidos en las soluciones de proteínas por evaluar, a las cuales se les había añadido Tween 20, con el objetivo de romper la tensión superficial de la solución y conseguir un buen mojado del disco de hoja. Como control negativo se empleó tampón carbonato. Los discos de hoja tratados fueron distribuidos individualmente en pocillos donde previamente se había dispensado 1ml de agar fundido (3 %) con el objetivo de mantener la turgencia de los discos de hoja. En cada pocillo se colocó una larva neonata y las placas fueron selladas con papel absorbente y mantenidas en condiciones ambientales controladas (fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad), temperatura de 25 ± 1 °C y humedad relativa de 70 ± 5 %). Los datos de mortalidad se recogieron registrándose a los 3 días de haberse realizado los tratamientos.

5.11 Bioensayos con dípteros

La especie evaluada fue *Ceratitis capitata*, conocida comúnmente como la mosca de las frutas. Para realizar los bioensayos se individualizaron 30 pupas, cedidas por la Doctora Pilar Medina (Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid), en cajas de $800\ \text{cm}^3$ de plástico

con la tapa agujereada. En cada uno de estos envases se colocó un recipiente de dieta sólida artificial (proteína hidrolizada de soja y azúcar en una proporción 1:4) en una placa de 25 mm de diámetro la cual se fijó a la base del recipiente plástico, y se le añadieron esferas de vidrio en su superficie. Por otro lado se colocó en cada recipiente un bebedero formado por una esponja conectada a un pequeño contenedor y sellada con parafilm, a través de la cual se dosificaría la toxina a los adultos (Figura 4). Cuando emergió el primer adulto de la pupa, se añadió 1 ml de toxina a una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al bebedero, el cual fue rellenado con 0,5 ml de agua cada 48 horas para evitar su desecación. Como controles en este caso se emplearon: agua, tampón carbonato al 50 % y tampón PBK al 50 %. Cada tratamiento se realizó por triplicado manteniendo unas condiciones ambientales controladas con un fotoperiodo de 12:12 horas de luz:oscuridad, temperatura de 25 ± 1 °C y humedad relativa de 70 ± 5 %. Los bioensayos se revisaron a diario durante los siguientes 7 días, registrándose de este modo la mortalidad.

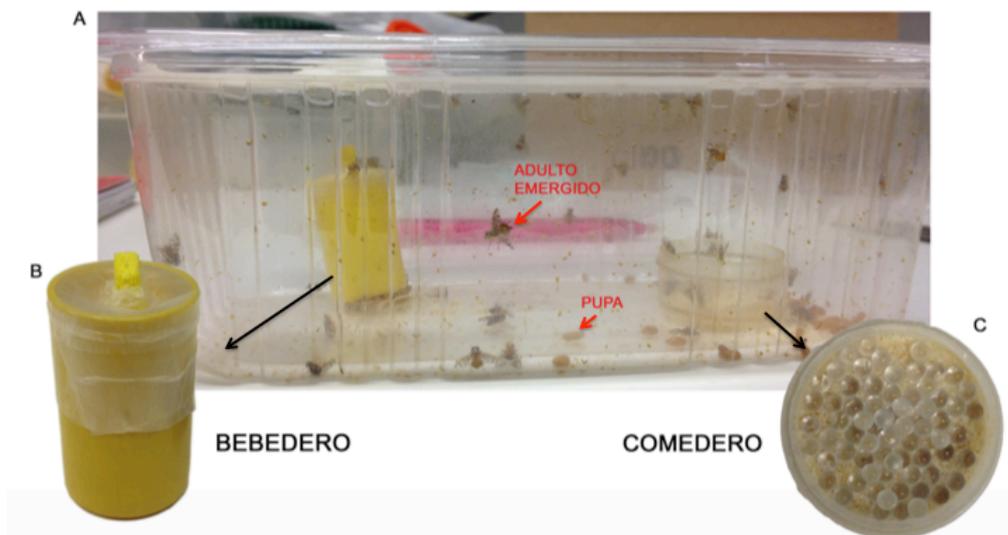


Figura 4. Caja empleada para el bioensayo con *C. capitata*. A) Caja empleada para realizar el bioensayo. B) Bebedero en el cual se incorpora la toxina problema. C) Placa donde se dispensa la dieta sólida acompañada de bolas de vidrio.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Secuenciación y análisis bioinformático

El ensamblaje de las lecturas de Illumina proporcionó un total de 498 fragmentos de tamaño variable o *contigs*. La comparación de estos *contigs* mediante Blastx con la base de datos personalizada, produjeron como resultado la identificación de 23 regiones con cierto grado de homología a la secuencia de genes insecticidas ya descritos en bases de datos públicas como, por ejemplo, GenBank. Mediante un análisis manual de cada una de las anotaciones, se eliminaron todas las secuencias presumiblemente incompletas o parciales, como por ejemplo, *contigs* interrumpidos por *gaps*. A partir de esta información, y con la finalidad de seleccionar hipotéticos genes insecticidas (candidatos), se utilizó como primer filtro el resultado del porcentaje de identidad con las proteínas almacenadas en las bases de datos. Ello nos permitió eliminar otros genes hipotéticos que no tuvieran relación con genes codificantes para proteínas insecticidas tipo Cry, Vip, Cyt, Sip u otras proteínas sinérgicas de la actividad insecticida, tales como la enhancina Bel de Bt (Fang et al., 2009). En la tabla 2 se muestran los cuatro genes candidatos de interés seleccionados en base a su porcentaje de identidad (base de datos *nr*) y su tamaño en pares de bases (pb) (Bravo et al., 2013).

Tabla 2. Genes identificados en la cepa Btib-L60 como hipotéticos genes insecticidas

| Homólogo más cercano* | <i>nr</i> (% identidad) | <i>pat</i> (% identidad) | <i>Contig</i> | Tamaño (pb) |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------|-------------|
| Bel_Enhancin | 99 % | 97 % | 91 | 2225 pb |
| Cry32Ba1 | 56 % | 36 % | 72 | 3642 pb |
| Cry66Aa2 | 44 % | 26 % | 287 | 2184 pb |
| Vip4Aa1 | 50 % | 32 % | 37 | 3183 pb |

* Blastx (*nr*)

El análisis bioinformático de las secuencias de la cepa Btib-L60 reveló la identificación de los marcos de lectura abiertos completos (ORF, *open reading frames*) de cuatro genes candidatos, cuyos homólogos más cercanos son los genes *bel_Enhancin* (enhancina), *cry32Ba1*, *cry66Aa2* y *vip4Aa1*. Los tamaños correspondientes a estos ORFs fue de 2225 pb, 3642 pb, 2184 pb y 3183 pb, respectivamente, los cuales codifican para proteínas de aproximadamente 85 kDa, 137 kDa, 82 kDa y 115 kDa (Tabla 2). Las proteínas codificadas por los genes candidatos presentaron unos tamaños acordes a los esperados en el caso de las proteínas de Cry de tres dominios, las cuales pueden llegar a tener tamaños de hasta 130 kDa (protoxina inactiva) y que posteriormente se procesa hasta un péptido de un peso molecular aproximado a los 60 kDa (toxina activa) tras la acción de las correspondientes proteasas del intestino del insecto susceptible (Bravo et al., 2013).

Adicionalmente, se procedió a la búsqueda de dominios conservados en las secuencias de aminoácido codificadas por los genes candidatos con la herramienta

InterproScan. La proteína similar a Bel_Enhancin (enhancina Bt) con un 99% de identidad, presentaba un dominio conservado abarcando prácticamente la totalidad de la proteína, correspondiente a la peptidasa M60 (InterPro ID: IPR004954). Esta peptidasa, está descrita como una metaloproteasa de virus entomopatógenos y cuya función es la degradación de la membrana peritrófica (de una enhancina viral) (Fang et al., 2009). De esta manera y en base a su homología, se pensó que Bt también podría producir alguna clase de *enhancin factors* o factores sinérgicos de función similar, describiéndose en el año 2009, la enhancina Bel de Bt (Fang et al., 2009). En el gen candidato cuya secuencia proteica traducida posee hasta un 56 % de identidad con la toxina Cry32Ba1, resulta peculiarmente interesante la ausencia de los 3 dominios conservados típicos de toxinas Cry de 3 dominios. Sin embargo, se encuentran otros tales como un dominio ricina (IPR000772), presente excepcionalmente en algunas toxinas Cry (Ej.: Cry41Aa1, Cry41Ba1 o Cry32Wa1), y también dominios conservados, atípicos en toxinas Bt, tales como un dominio de unión a galactosa (IPR008979) y un dominio fosfolipasa C (IPR000909). Esto sugiere que podría tratarse de una proteína Cry novel atípica y no descrita debido a que su porcentaje de identidad es inferior al 78 %. En la secuencia de aminoácidos homóloga a Cry66Aa2, se encontraron los 3 dominios endotoxina típicos (N, M y C) así como un dominio ricina adicional hacia el extremo carboxilo. Esto refuerza la hipótesis de que podría tratarse de una proteína Cry novel, no descrita hasta la fecha, debido a su bajo porcentaje de identidad (44 %). Finalmente, la secuencia proteica que mostraba un 50 % de identidad con la proteína Vip4Aa1 presentaba los dominios típicos de este tipo de proteínas secretables, como los dominios PA14 (IPR011658), el dominio inmunomodulador de hongos, Fve (IPR015339), un dominio antigénico de la toxina de anthrax o un dominio conservado de proteínas binarias (IPR003896). Además, presentaba cierto grado de similitud (35 %) con las proteínas VIP1, las cuales conforman una toxina binaria, compuesta por dos componentes codificados en un operón de 4 kb, donde la proteína Vip1 (componente B) favorece la entrada de la toxina Vip2 (componente A) al citoplasma celular, ejerciendo allí su efecto tóxico, desestabilizando el citoesqueleto y produciendo la muerte celular (Barth et al., 2004). En nuestro caso, no se ha detectado en el genoma ningún gen codificante de proteínas homólogas a Vip2. Esto, y teniendo en cuenta el porcentaje de homología encontrado, sugiere que podría tratarse de una proteína o toxina simple tipo Vip4. Estas toxinas Vip4 están filogenéticamente relacionadas con las proteínas Vip1 (Crickmore et al., 2014), actuando presumiblemente como toxina única (no binaria); sin embargo, actualmente no se dispone información sobre su espectro de huéspedes y menos aún acerca de su modo de acción.

6.2 Amplificación y clonación de los genes candidatos

Las reacciones de PCR generaron amplicones para los genes *bel_enh*, *cry32*, *cry66*, *vip4* y *vip4-SP* (*vip4* sin el péptido señal) de un tamaño de 2225 pb, 3642 pb, 2184 pb, 3183 pb y 3115pb, respectivamente, los cuales correspondían al tamaño esperado (Figura 5).

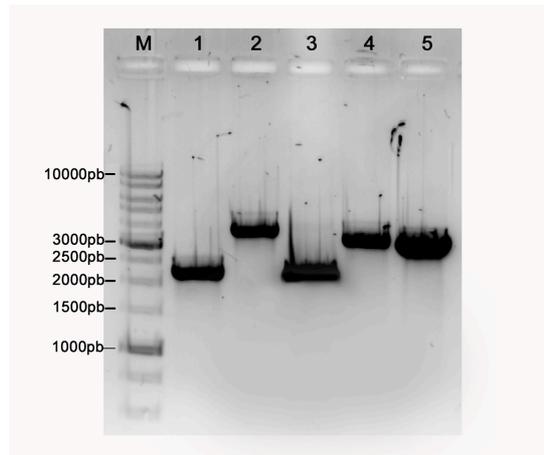


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: marcador molecular 1Kb; 1: amplicón *bel_enh*; 2: amplicón de *cry32*; 3: amplicón *cry66*; 4: amplicón *vip4*; 5: amplicón *vip4*-SP.

La clonación de dichos amplicones en el vector pJET y su posterior transformación fue verificada mediante digestión empleando las enzimas de restricción correspondientes (Figura 6).

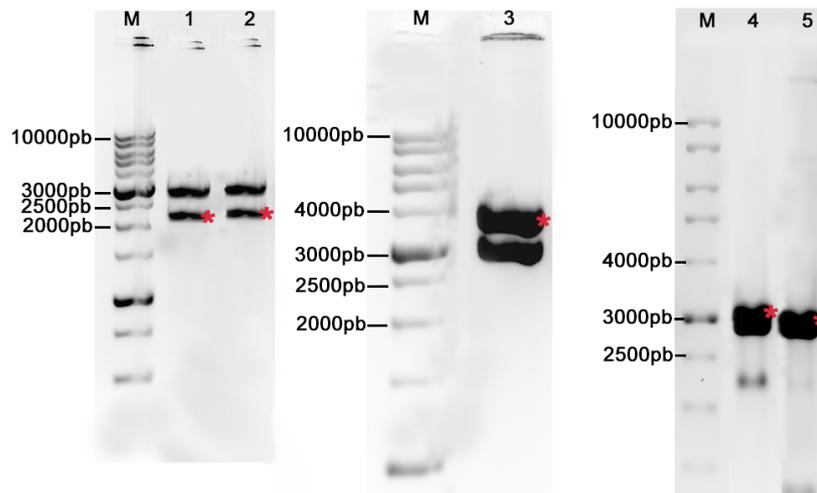


Figura 6. Geles de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción de los clones transformados con el producto de ligación con pJET (2974 pb). M: Marcador molecular de 1 Kb. Las calles (1-5) muestran el producto de digestión del vector pJET portando los insertos de los genes: 1) *bel_enh* con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sall*; 2) *cry66* con las enzimas de restricción *Sall* y *Not*I; 3) *cry32* con las enzimas de restricción *Sall* y *Not*I; 4) *vip4* con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sall*; y 5) *vip4*-SP con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sall*. Quedan marcadas (*) las bandas correspondientes a los insertos de interés.

A partir de estas digestiones, se purificó el ADN de los insertos desde el gel de agarosa para su ligación al vector de expresión pET28b(+) y su posterior transformación en células de *E. coli* cepa DH5 α . En el caso de los amplicones correspondientes a los genes *vip4* y *vip4*-SP, debido a su parecido tamaño con el vector pJET, resultó más costosa obtener una separación clara entre el correspondiente amplicón y el vector (Figura 6, carriles 4 y 5). Las construcciones producidas de las transformantes fueron también analizadas por digestión con las

enzimas de restricción (Figura 7) y por PCR con el objetivo de comprobar la correcta presencia del inserto en cada construcción. Los resultados obtenidos para los insertos de los genes *bel_enh*, *cry66*, *cry32* y *vip4-SP* fueron los esperados, no obteniéndose clones positivos para la construcción *vip4: pET28b(+)* (dato no mostrado), repitiéndose el proceso para la obtención de esta construcción ausente (en realización).

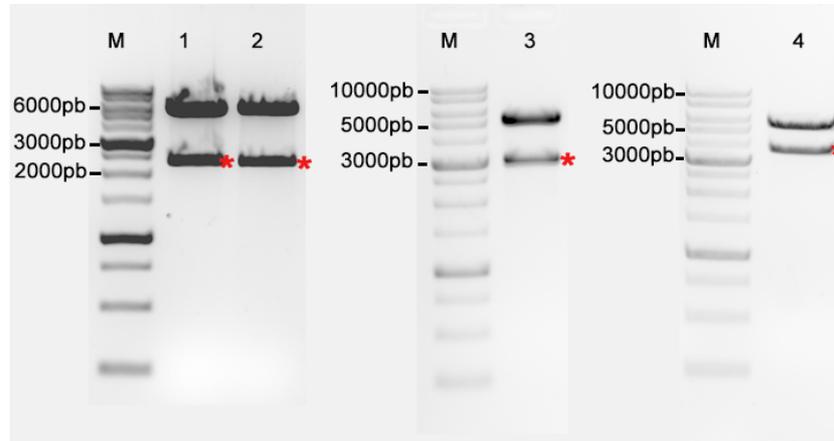


Figura 7. Geles de agarosa al 1 % de las digestiones con enzimas de restricción de los clones transformados con los productos de la ligación con pET28b(+) (5368pb). M: marcador de peso molecular de 1Kb; 1: producto de la digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall* del vector pET28b(+) y el inserto del gen *bel_enh*; 2: producto de la digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI* del vector pET28b(+) y el inserto del gen *cry66*; 3: producto de la digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *NotI* del vector pET28b(+) y el inserto del gen *cry32*; 4: producto de la digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall* del vector pET28b(+) y el inserto del gen *vip4-SP*. Las bandas de correspondientes a lo insertos en cada digestión quedan marcados (*).

Tras comprobarse la incorporación en fase de lectura abierta de los insertos de cada gen, mediante secuenciación, las construcciones fueron empleadas para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y llevar a cabo la expresión de proteínas recombinantes mediante inducción por IPTG. Los transformantes obtenidos fueron analizados por PCR para determinar la presencia de cada gen y los amplicones analizados en gel de agarosa al 1 %.

6.3 Producción de cristales paraesporales y proteínas de la cepa Btib- L60

El examen de la cepa Btib- L60 al microscopio óptico en contraste de fases, cultivada en medio líquido CCY, permitió observar el paso de las células no esporuladas (fase vegetativa) a células esporuladas (fase de esporulación), así como la evidente formación de los cristales paraesporales (Figura 8).



Figura 8 . Fotografía tomada al microscopio óptico (con el objetivo 100×) de la cepa cristalófora de *Bacillus thuringiensis* ser. ibérica L60 en fase esporulante.

La centrifugación del cultivo fermentado, que contenía las esporas y cristales, en un gradiente discontinuo de sacarosa nos permitió separar los cristales y esporas. Los cristales se localizaban en la interfase de sacarosa mientras que las esporas quedaron en el fondo del tubo de centrifugación (Figura 9).

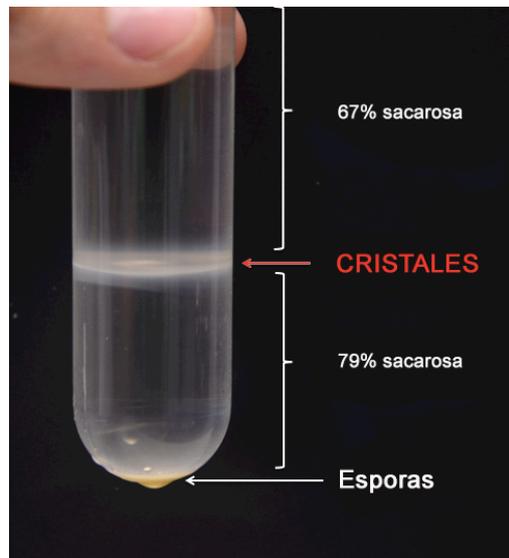


Figura 9 . Tubo mostrando el resultado de la ultracentrifugación, del producto de la fermentación de la cepa Btib-L60, en un gradiente discontinuo de sacarosa (67-79%). Los cristales proteicos se acumulan en la interfase del gradiente de sacarosa mientras que las esporas precipitan en el fondo del tubo.

Las proteínas codificadas por los genes *bel-enhancin*, *cry66*, *vip4-SP* y *cry32* presentan un tamaño de aproximadamente 85 kDa, 82 kDa, 115 kDa y 137 kDa, respectivamente. Se comprobó la producción de dichas proteínas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y mediante Western Blot con anticuerpos anti cola de histidinas. La expresión de la proteína Bel-Enhancin se indujo a 28 °C y 37 °C, para determinar el efecto de la temperatura en la producción de la proteína. En el primer caso se obtuvo como resultado una banda mayoritaria de un tamaño comprendido entre 75 y 100 kDa, en la fase del precipitado (Figura 10, carril 3). Dicho resultado se comprobó mediante Western Blot, el cual determinó la aparición de una banda probablemente auto-procesada y correspondientes a dos péptidos distintos con tamaños de 75 kDa y 50 kDa (datos

no mostrados). Sin embargo, a pesar de la elevada similitud (>90 %) de nuestra proteína con la previamente descrita de Bt (Bel), en esta proteína no se ha observado el auto procesamiento (Fang et al., 2009) que nosotros si vemos en nuestra proteína.

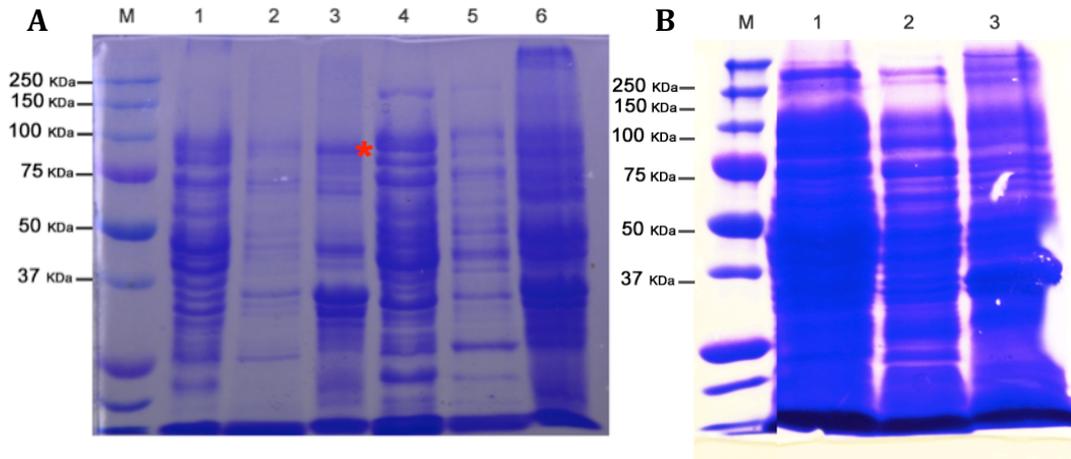


Figura 10. SDS-PAGE donde se muestran las distintas fases de la proteína. **A)** Proteína Bel-Enhancin producida a 28 °C y 37 °C. M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: fase I a 28 °C; 2: fase II a 28 °C; 3: fase del precipitado inducida a 28 °C, donde queda marcada (*) la banda de interés; 4: fase I a 37 °C; 5: fase II a 37 °C; 6: fase del precipitado a 37 °C. **B)** Proteína Cry66 producida a 23 °C. M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: Fase I; 2: Fase II; 3: Fase del precipitado.

El fenómeno de autoproteccionamiento consiste en que una proteína determinada se fragmenta, produciendo dos o más péptidos de menor tamaño. Al encontrarse la cola de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína recombinante, las bandas con señal que se visualizan en el Western Blot son aquellas que presentan dichas colas, indicando que se produciría una pérdida del extremo carboxilo terminal de la proteína para generar los tamaños resultantes. Los resultados obtenidos al llevar a cabo la inducción a 37 °C no mostraron dicho fenómeno de autoproteccionamiento, resultado comprobado también mediante Western Blot, indicando que dicho fenómeno podría ser dependiente de la temperatura utilizada en la fase de inducción. De esta manera y debido a que esta proteína no pudo ser recuperada de la fase insoluble del precipitado mediante el protocolo de solubilización, se decidió no incluirla en los bioensayos de toxicidad. Se sabe que las proteínas que se acumulan en cuerpos de inclusión sufren un incorrecto plegamiento en su estructura que provoca la pérdida de su solubilidad y actividad, incluso para los insectos más susceptibles.

Respecto a la proteína homóloga a la toxina Cry66Aa2, se llevó a cabo su inducción a temperaturas decrecientes hasta alcanzar temperaturas de 16 °C (datos no mostrados) y 23 °C, no obteniéndose una banda clara en el gel de acrilamida, con un tamaño cercano al esperado, es decir, superior a 75 kDa (Figura 10 B), a ninguna de las dos temperaturas. El análisis mediante Western Blot con anticuerpos anti cola de histidinas demostró la existencia de una banda en fase insoluble del precipitado correspondiente al tamaño esperado (aproximadamente

80 kDa), por lo que esta proteína tampoco se incluyó en los bioensayos de toxicidad (Figura 12, carril 6).

La proteína Vip4-SP (Vip4 sin el péptido señal) produjo unos resultados similares a los obtenidos para las otras proteínas a temperaturas de inducción de 28 °C y 37 °C. En un gel de poliacrilamida se obtuvo una banda mayoritaria muy evidente en la fase del precipitado, de un tamaño acorde al esperado, en torno a los 100 kDa (Figura 11 A). De igual modo, su difícil solubilización hizo imposible su recuperación en fase soluble, por lo que tampoco se incluyó en los bioensayos de toxicidad. Las proteínas Vip son toxinas producidas por algunas cepas de Bt y no comparten secuencias homólogas con las proteínas Cry. A diferencia de éstas, las proteínas Vip se producen durante la fase vegetativa de la bacteria y se secretan al medio de cultivo contribuyendo a la patogenicidad de esta bacteria contra insectos (Donovan et al., 2001; Zhu et al., 2006). El protocolo utilizado para la purificación de estas proteínas Vip, no dio los resultados descritos por Estruch et al., 1996, para la proteína Vip3 para la cual se consigue recuperar en fase soluble.

A pesar de que estos resultados no son satisfactorios, se sigue trabajando actualmente en variantes de expresión génica (celulares y plasmídicas) que faciliten la recuperación en fase soluble de cada una de estas proteínas, potencialmente insecticidas, para intentar determinar su espectro de huéspedes, así como su toxicidad.

La proteína homóloga a Cry32Ba1 produjo una banda del tamaño esperado (100-150 kDa) tanto en la Fase II (solubilizada en tampón carbonato pH 11), establecido por otros autores (Porcar et al., 2009) como en la fase del precipitado, al ser inducida a 16 °C y 23 °C (Figura 11 B). A partir de este resultado, se intentó su purificación en columnas de níquel, para su posterior cambio de tampón en columnas de desalado. Sin embargo, no se obtuvo proteína tanto en la fracción eluída de la columna de níquel como en la eluída de la columna de desalado. Esto podría haber ocurrido debido a que las columnas de níquel no son especialmente eficaces a pH elevados (Protino Ni-TED 2000, Macherey-Nagel, Alemania). De esta manera, fue necesario bajar el pH de la fracción II en tampón carbonato (pH 11) hasta un pH 8,5. A la vista de los resultados negativos en los geles de poliacrilamida, existe la posibilidad de que haya ocurrido un cambio conformacional o estructural en el plegamiento de la proteína por el descenso del pH debilitándose la unión de la cola de histidinas a la matriz de níquel de la columna y perdiéndose esta durante los lavados.

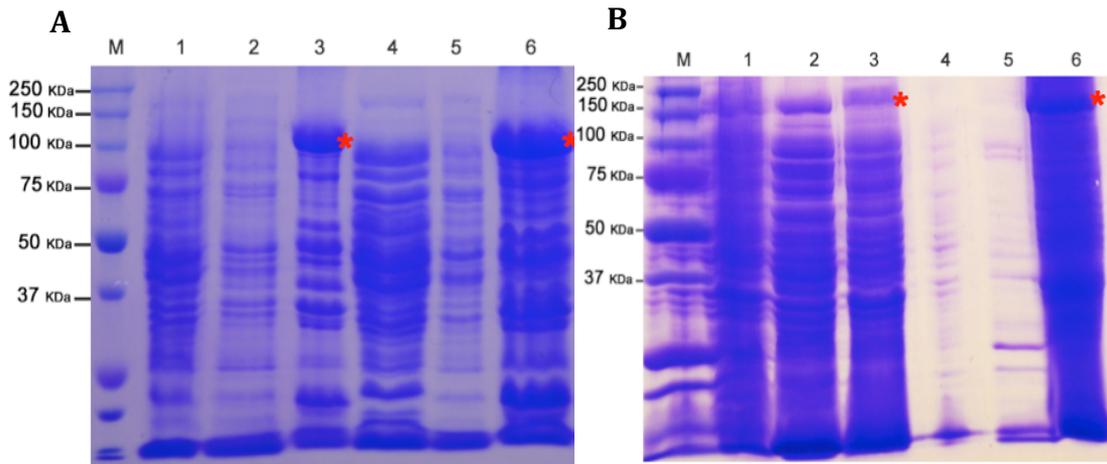


Figura 11. SDS-PAGE donde se muestran las distintas fases de las proteínas Vip4-SP y Cry32 **A.** M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: Fase I de Vip4-SP a 28 °C; 2: Fase II de Vip4-SP a 28 °C; 3: Fase del precipitado de Vip4-SP a 28 °C; 4: Fase I de Vip4-SP a 37 °C; 5: Fase II de Vip4-SP a 37 °C; 6: Fase del precipitado de Vip4-SP a 37 °C. **B.** M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: preinducción de Cry32 a 23 °C; 2: fase I de Cry32 inducida a 23 °C; 3: fase II inducida de Cry32 a 23 °C; 4: elución en columna de níquel de Cry32; 5: desalado de la fase de elución de Cry32; 6: fase de precipitado de Cry32 inducida a 23 °C.

Adicionalmente, se llevó a cabo una comprobación mediante Western Blot (Figura 12) observándose la existencia de una banda del tamaño esperado en las tres fases (I, II y precipitado) mediante la inducción de la expresión de la proteína a 16 °C. En la fase I esta banda es apenas perceptible, indicando una pobre producción directa de la proteína en forma soluble. En cambio, en las demás fases, la banda presente exhibe una señal significativamente mayor, siendo esta aún más intensa en el precipitado y sugiriendo su rápida producción y acumulación en forma insoluble en cuerpos de inclusión. Sin embargo, también se observó que al solubilizarla se obtiene una concentración adecuada para su empleo en bioensayos.

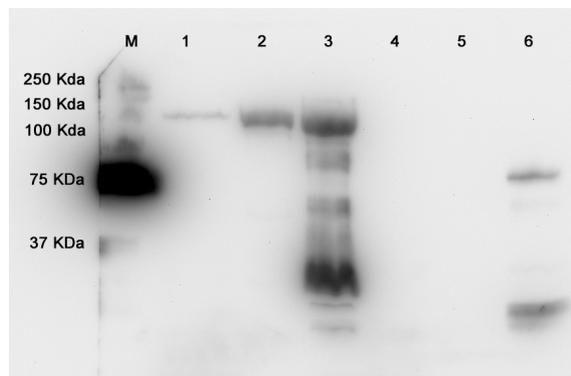


Figura 12. Western Blot del gel de poliacrilamida de Cry32 y Cry66. M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: fase I Cry 32 a 16 °C; 2: fase II Cry 32 a 16 °C; 3: fase de precipitado inducido de Cry 32 a 16 °C; 4: fase I Cry66 a 16 °C; 5: fase II Cry 66 a 16 °C; 6: fase de precipitado inducido de Cry66 a 16 °C.

6.4 Cuantificación de las proteínas problema

Debido a la imposibilidad de conseguir la proteína Cry32 aislada y purificada en fase soluble, la única manera de cuantificarla fue llevando a cabo una estimación de la concentración de la banda de interés comparándola con la de testigos proteicos de albúmina sérica bovina (BSA) de concentraciones conocidas en un gel de poliacrilamida mediante densitometría. La concentración obtenida fue de aproximadamente 800 ng/ μ l al interpolar el valor de la densidad de su banda en una recta (densidad versus concentración) construida en base a testigos de concentración conocida de albúmina sérica bovina (Figura 13).

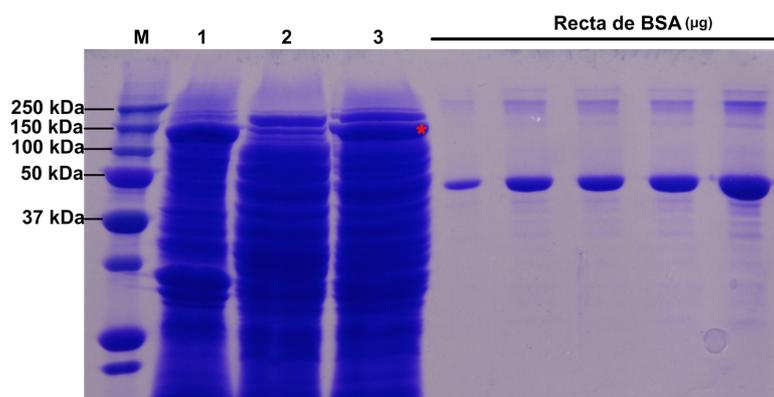


Figura 13. SDS-PAGE en el cual se muestra la cuantificación de la proteína Cry32 mediante densitometría. M: marcador Precision Plus Protein Standards; 1: fase de precipitado; 2: fase I de Cry32 a 16 °C; 3: 5 μ l de fase II de Cry32 a 16 °C; 4: 10 μ l de fase II de Cry32; Recta patrón de BSA con 0.5, 1, 2, 4 y 6 μ g de BSA. Queda marcada (*) la banda de interés.

Adicionalmente, se estimó la concentración mediante el método de Bradford de la mezcla de cristales solubilizados en tampón carbonato (490 μ g/ml), de las proteínas secretadas al medio de cultivo y precipitadas con sulfato de amonio (150 μ g/ml) y del control positivo, la toxina Vip3Ag4 (932 μ g/ml), para su utilización en los bioensayos de toxicidad.

6.5 Evaluación de la actividad insecticida frente a lepidópteros

Los bioensayos de toxicidad con la proteína homóloga a Cry32Ba1 mostraron que esta proteína no es activa para ninguna de las siete especies de lepidópteros contra las que fue evaluada (Tabla 3). Sin embargo, como sólo fue evaluada como protoxina, no se puede descartar la posibilidad de que una pre-activación con tripsina (u otra proteasa) pudiera hacer que esta proteína resultara tóxica para alguna de estas especies de insectos. Esta posibilidad se ha valorado y se encuentra actualmente en estudio.

Tabla 3. Actividad insecticida de las proteínas producidas por la cepa L60 de *B. thuringiensis* ser iberica para larvas neonatas de 7 especies de lepidópteros a la concentración de 100 µg/ml (para *L. botrana*) o 2 µg/cm² (para el resto de especies).

| Especie lepidóptero | n | Control Negativo | Control Positivo (Vip3Ag4) | Cry32 | Btib-L60 | |
|----------------------|----|------------------|----------------------------|-------|-----------|--------------|
| | | | | | Cristales | Sobrenadante |
| <i>S. littoralis</i> | 24 | - | ++ | - | - | N.D |
| <i>S. frugiperda</i> | 24 | - | ++ | - | - | N.D |
| <i>O. nubilalis</i> | 24 | - | ++ | - | - | N.D |
| <i>M. brassicae</i> | 24 | - | ++ | - | - | N.D |
| <i>C. chalcites</i> | 24 | - | ++++ | + | ++ | + |
| <i>H. armígera</i> | 24 | - | + | - | - | N.D |
| <i>L. botrana</i> | 20 | - | ++++ | - | - | N.D |

n: número de insectos ensayados; (-): ausencia de mortalidad; (+): mortalidad de entre el 0-25 % de los insectos analizados; (++): mortalidad de entre el 25-50 %; (+++): mortalidad de entre el 50-75 % y (++++): mortalidad de entre el 75-100 %; N.D: no determinado o analizado

La ausencia de mortalidad en el grupo de larvas tratadas con tampón carbonato (control negativo) nos indica, por un lado, el buen estado sanitario de las poblaciones de insectos utilizadas en los bioensayos y, por otro lado, la ausencia de contaminaciones cruzadas durante la realización del mismo. La proteína Vip3Ag4 (control positivo) produjo una mortalidad cercana al 100% para las larvas de *C. chalcites* y *L. botrana*, mientras que en otras especies evaluadas sólo produjo una mortalidad comprendida entre el 25-50 % (*S. littoralis*, *S. frugiperda*, *O. nubilalis* y *M. brassicae*) o incluso entre el 0-25 % (*H. armígera*). Ello indica que la elección de este control fue acertado en el caso de *C. chalcites* y *L. botrana*, pero para el resto de las especies hubiera sido deseable la elección de otras proteínas con mayor potencia insecticida para las mismas. La proteína homóloga a Cry32Ba1 sólo mostró una baja toxicidad (< 25 %) para las larvas de *C. chalcites* y otro tanto ocurrió con los cristales de la cepa Btib-L60. El precipitado con sulfato de amonio, del sobrenadante de la fermentación de esta cepa, produjo una baja mortalidad (< 25 %) en larvas de *C. chalcites* mientras que para el resto de las especies no fue determinada la toxicidad. Esta toxicidad se atribuye a la posible presencia de la proteína Vip4Aa1 en el sobrenadante. Como es bien conocido, las proteínas Vip son sintetizadas por la bacteria y secretadas al medio en el que crece durante la fase vegetativa de la misma (Estruch et al., 1996). Dentro de esta familia de proteínas, la proteína binaria Vip1 y Vip2 tiene buena actividad insecticida para especies de Coleoptera (Shi et al., 2006). En cambio las proteínas Vip3 son tóxicas para un amplio número de especies de Lepidoptera (Palma et al., 2012) entre las que cabe incluir algunas especies que tiene una baja susceptibilidad a la amplia familia de proteínas Cry (Bravo and Soberón, 2008). Las proteínas Vip4 han sido descritas muy recientemente y no se sabe nada sobre su espectro de huéspedes. Por tanto, la toxicidad encontrada en este trabajo para *C. chalcites* constituye la primera notificación a nivel mundial sobre el espectro de esta nueva clase de proteínas. Los resultados de estos ensayos preliminares constituyen un punto de partida para las futuras investigaciones y futuros bioensayos con el objetivo de encontrar las

condiciones idóneas para la expresión y/o acción de esta proteína y ampliar los conocimientos acerca de su modo de acción y espectro de huéspedes.

Los cristales de la cepa Btib-L60 solubilizados sí fueron evaluados contra todas las siete especies de lepidópteros, pero sólo mostró una toxicidad moderada (25-50%) contra las larvas neonatas de *C. chalcites*. Los cristales de la cepa Btib-L60 están compuestos por al menos 4 proteínas con pesos moleculares cercanos a 150 kDa, 140 kDa, 100 kDa y 80 kDa, respectivamente (datos no mostrados). Se puede determinar que la segunda banda en tamaño se correspondería con la proteína similar a Cry32Ba1 y la banda de menor tamaño con la proteína similar a Cry66Aa2. En vista a la mortalidad registrada al aplicar el tratamiento con la proteína homóloga a Cry32Ba1 y los cristales de la cepa Btib-L60, se estima que la toxicidad observada en esta especie de lepidóptero es producida probablemente por el homólogo a la toxina Cry32Ba1, no descartándose por supuesto, la posible actividad sinérgica de las otras fracciones proteicas presentes en el cristal. Sin embargo existen dos bandas que no se corresponden con ninguna otra proteína formadora de cristal encontradas en el análisis bioinformático, posiblemente por la incapacidad del programa empleado para llevar a cabo el ensamblaje correcto de todas las lecturas, bien por falta de ellas y/o su baja calidad. Ello sugiere la necesidad de llevar a cabo un análisis más específico de los *contigs* en busca de todos los genes (o fracciones de genes) responsables de la producción de las proteínas que podrían generar una banda en el perfil proteico de la mezcla de cristales de la cepa de estudio, objetivos sobre los cuales ya se están trabajando.

Debido al bajo número de insectos empleados en los bioensayos (sujeto a disponibilidad desde el insectario), ya se están diseñando experimentos futuros con el objeto de llevar a cabo bioensayos con especies de insectos diferentes y determinar de una manera más fehaciente, el espectro de huéspedes de cada proteína. Así mismo, se están planteando estrategias de producción que faciliten y maximicen la obtención de proteínas recombinantes con actividad tóxica descritas en este trabajo.

6.6 Evaluación de la actividad insecticida frente a coleópteros

Los resultados de toxicidad cualitativa de algunas de las proteínas insecticidas producidas por la cepa Bt (Cry32, proteínas del cristal y proteínas secretadas al medio) muestran que ninguna de ellas resultó ser activa para las larvas de *L. decemlineata*. La falta de toxicidad para insectos es un fenómeno bastante frecuente entre las proteínas clasificadas dentro de las tres grandes familias de proteínas insecticidas producidas Bt (Cry, Cyt y Vip) (Hofte and Whiteley, 1989; van Frankenhuyzen, 2009). Esto, ha hecho que se llegue a cuestionar cual es el verdadero significado ecológico de los cristales proteicos en cuya producción invierte la bacteria *B. thuringiensis* una gran parte de su energía (Raymond et al., 2010). Por otra parte, se piensa que la falta de toxicidad asociada a los cristales producidos por algunas cepa Bt es sólo debido al limitado número de especies de insectos y otros artrópodos que normalmente son incluidos en los estudios de espectro de huéspedes (van Frankenhuyzen, 2009).

6.6 Evaluación de la actividad insecticida frente a dípteros

Los resultados de toxicidad de los cristales de la cepa Btib-L60 llevados a cabo con adultos de *Ceratitis capitata* registraron una mortalidad cercana al 42%. Sin embargo, un mayor número de repeticiones serían necesarias para corroborar los resultados preliminares obtenidos, teniendo en cuenta que se ha utilizado una concentración muy elevada de proteínas de cristal obteniéndose datos de mortalidad, en un principio reducida, para lo esperado a concentraciones tan altas. Nuevos bioensayos utilizando las proteínas purificadas y similares a Cry32Ba1 y Vip4Aa1 se encuentran actualmente en fase de desarrollo.

Los datos preliminares obtenidos aportan información interesante en cuanto al control biológico de plagas de dípteros se refiere, ya que actualmente, existe un reducido número de proteínas con actividad tóxica frente a las especies de este orden de insectos. En su mayoría, las proteínas ya descritas poseen actividad tóxica frente a diversas especies de mosquitos como *Anopheles albimanus* (Ibarra et al., 2003), describiéndose en escasas ocasiones, eventos de actividad insecticida frente a moscas donde la actividad tóxica es más reducida y la concentración de proteína requerida para registrar mortalidad suele ser mucho más elevada que la necesaria frente a mosquitos (Vidal-Quist et al., 2009). Esta baja toxicidad se ha observado también en otros tipos de insectos no relacionados como los pulgones (Hemiptera), donde factores clave como el pH del intestino, la presencia o ausencia de receptores específicos a las toxinas Bt y las proteasas específicas capaces de activar las toxinas son muy diferentes y muy posiblemente, los causantes de la falta de actividad o de toxicidades moderadas (Chougule and Bonning, 2012).

La búsqueda de nuevas cepas Bt con actividad tóxica contra dípteros está adquiriendo un creciente interés en los últimos años debido a que supondría ampliar la utilidad de Bt y el disponer de una nueva herramienta de control biológico para el manejo de diversos mosquitos, vectores de diferentes enfermedades humanas (Ej. el dengue y la malaria), así como el control de las moscas de la fruta, causantes de grandes pérdidas económicas en cultivos de cítricos en España (Vidal-Quist et al., 2009).

7. CONCLUSIONES

- En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis de la secuencia completa borrador del genoma de la cepa L60 de *B. thuringiensis* en el cual se han identificado 4 genes: *bel-enhancin*, *cry32Ba1*, *cry66Aa2* y *vip4Aa1-SP*, aparentemente noveles con posibles propiedades insecticidas.
- Los resultados preliminares de toxicidad no determinaron una elevada toxicidad en las especies de lepidópteros y coleópteros testadas. Sin embargo, sí se obtuvo una actividad notoria de la mezcla de cristales de la cepa Btib-L60 frente a *Ceratitis capitata*, resultado interesante en la búsqueda de métodos biológicos para el control de esta plaga.
- El sobrenadante, presumiblemente con la hipotética proteína Vip4, presentó cierto nivel tóxico frente a *Chrysodeixis chalcites*, siendo la primera notificación a nivel mundial de huésped susceptible para este tipo de proteína, no descrita hasta la fecha.
- La realización de nuevos bioensayos, incluyendo nuevas especies, sería altamente recomendable, con el objeto de encontrar huéspedes potencialmente susceptibles a la actividad de alguna de las proteínas producidas por la cepa Bt L60.

8. Bibliografía

- Abi Khattar, Z., et al., 2009. The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J Bacteriol.* 191, 7063-73.
- Altschul, S. F., et al., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-10.
- Aziz, R. K., et al., 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9, 1-15.
- Barth, H., et al., 2004. Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68, 373-402.
- Benson, D. A., et al., 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 33, D34-8.
- Berry, C., 2012. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J Invertebr Pathol.* 109, 1-10.
- Bravo, A., et al., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49, 423-35.
- Bravo, A., et al., 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microb Biotechnol.* 6, 17-26.
- Bravo, A., et al., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol.* 41, 423-31.
- Bravo, A., Soberón, M., 2008. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573-9.
- Chougule, N. P., Bonning, B. C., 2012. Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins* 4, 405-29.
- Crickmore, N., et al., *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Vol. 2014. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ 2014.
- Devine, G. J., Furlong, M. J., 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values.* 24, 281-306.
- Donovan, W. P., et al., 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *J Invertebr Pathol.* 78, 45-51.
- Donovan, W. P., et al., 2006. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72, 713-9.
- Drummond, A. J., et al., 2014. Geneious Pro vR7.1.2 [Online.]. <http://www.geneious.com/>. 2014.
- Estruch, J. J., et al., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 5389-94.
- Fang, S. L., et al., 2009. *Bacillus thuringiensis* Bel protein enhances the toxicity of Cry1Ac protein to *Helicoverpa armigera* larvae by degrading insect intestinal mucin. *Appl Environ Microbiol.* 75, 5237-5243.
- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.* 47, 501-33.
- Gatehouse, J. A., 2008. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. *Plant Physiol.* 146, 881-7.

- Gonzalez, J. M., Jr., et al., 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 5, 352-65.
- Gouffon, C., et al., 2011. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. *Appl Environ Microbiol*. 77, 3182-8.
- Greene, G. L., et al., 1976. The velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol*. 69(4), 487-8.
- Guennelon, G., F. 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). *Ann. Zool. Ecol. Anim*. 7(3), 295-309.
- Hernández-Rodríguez, C. S., et al., 2009. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *J Appl Microbiol*. 107, 219-25.
- Hofte, H., Whiteley, H. R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev*. 53, 242-55.
- Hunter, S., et al., 2012. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res*. 40, D306-12.
- Ibarra, J. E., et al., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5269-74.
- Ibrahim, M. A., et al., 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs*. 1, 31-50.
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 23, 1289-91.
- Kurtz, R. W., et al., 2007. Insect resistance management for Syngenta's VipCot transgenic cotton. *J Invertebr Pathol*. 95, 227-30.
- Lambert, B., et al., 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl Environ Microbiol*. 58, 2536-42.
- Lee, M. K., et al., 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol*. 69, 4648-57.
- Lereclus, D., et al., 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol*. 290, 295-9.
- Liu, D., et al., 2009. Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* enhancing potential and its antagonism and insecticidal. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 49, 180-5.
- Martínez, C., 2002. Biological and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* strain toxins against *Helicoverpa armigera*. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Mehlo, L., et al., 2005. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7812-6.
- Metzker, M. L., 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 11, 31-46.
- Palma, L., et al., 2012. Vip3C, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*. 78, 7163-5.
- Palma, L., et al., 2014a. Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins (Basel)*. 6, 1490-504.

- Palma, L., et al., 2014b. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *tolworthi* strain Na205-3, an isolate toxic for *Helicoverpa armigera*. *Genome Announc.* 2.
- Palma, L., et al., 2013. Screening of *vip* genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two novel Vip3 proteins highly-toxic to five lepidopteran crop pests. *Biol control.* 66, 141-9.
- Peña, G., et al., 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl Environ Microbiol.* 72, 353-60.
- Pigott, C. R., Ellar, D. J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71, 255-81.
- Porcar, M., et al., 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl Environ Microbiol.* 75, 4897-900.
- Porcar, M., Juárez-Pérez, V., 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 419-32.
- Raymond, B., et al., 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 18, 189-94.
- Ruiz de Escudero, I., 2006. *Bacillus thuringiensis* (Berliner) toxins for the control of lepidopteran pests. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Ruiz de Escudero, I., et al., 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl Environ Microbiol.* 72, 4796-804.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sattar, S., Maiti, M. K., 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol.* 21, 937-46.
- Schnepf, E., et al., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 775-806.
- Schnepf, H. E., Whiteley, H. R., 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78, 2893-7.
- Schunemann, R., et al., 2014. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiol.* 2014, Art. ID 135675.
- Sena, J. A. D., et al., 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl Environ Microbiol.* 75, 2236-7.
- Shi, Y., et al., 2006. Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. *World J Microbiol Biotechnol.* 501-7.
- Stewart, G. S., et al., 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. *Biochem J.* 198, 101-6.
- Tan, F. R., et al., 2009. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, *cry54Aa1* and *cry30Fa1*, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. *Curr. Microbiol.* 58, 654-9.
- Terra, W. R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch Insect Biochem Physiol.* 47, 47-61.
- van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 101, 1-16.

- Vidal-Quist, J. C., et al., 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19, 749-59.
- Warren, G. W., et al., 1998. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. US patent 5770696.
- Weixing Ye, et al., 2012. Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* based on mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline. *Appl Environ Microbiol*. 78, 4795-801.
- Wirth, M. C., et al., 2007. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant larvae. *Appl Environ Microbiol*. 73, 6066-71.
- Zhu, C., et al., 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett Appl Microbiol*. 42, 109-14.