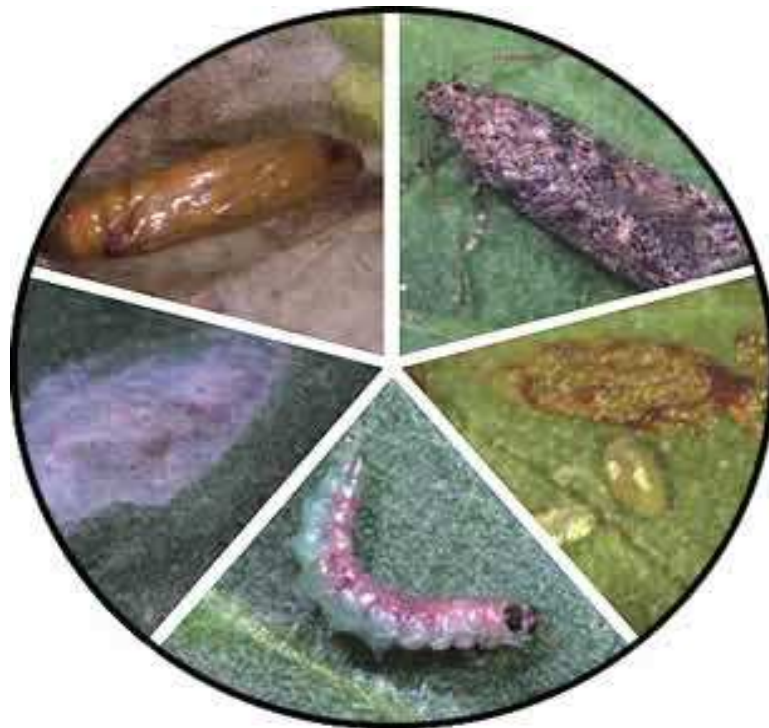


**Actividad de las toxinas de
Bacillus thuringiensis para el
control de *Tuta absoluta*.**



**Máster en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas**

2011

LUCÍA IZQUIERDO RUBIO.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCIÓN	1 – 25
1.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>, Productor de Toxinas	2 – 5
1.1.1. Ciclo Infeccioso de <i>B. thuringiensis</i> en Larvas de Lepidópteros	3 – 5
1.2. Proteínas Cry	5 – 14
1.2.1. Clasificación	5 – 7
1.2.2. Estructura de las Toxinas	7 – 9
1.2.3. Modo de Acción	9 – 14
1.2.3.1. Unión a Receptor en Larvas de Lepidóptero	10 – 11
1.2.3.2. Formación del Poro	11 – 12
1.2.3.3. Inserción en Membrana	12 – 14
1.3. Biotecnología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14 – 16
1.4. <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick), Insecto plaga de <i>Solanum lycopersicum</i>	17 – 24
1.4.1. Localización	17 – 19
1.4.2. Plantas Hospedadoras	20
1.4.3. Características Morfológicas y Biológicas	20 – 21
1.4.4. Importancia Económica en Tomate	21 – 22
1.4.5. Estrategias de Control	22 – 24
1.5. Planteamiento del Trabajo	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26 – 32
2.1. Purificación de Proteínas	27 – 31
2.1.1. Cultivo	27 – 28
2.1.2. Lisis Celular	28 – 29
2.1.3. Lavados	29
2.1.4. Solubilización	29 – 30
2.1.5. Medida de la Concentración de Proteína	30 – 31

2.2. Bioensayo Específico para <i>Tuta absoluta</i>	31 – 32
2.2.1. Desarrollo Experimental	31 – 32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33 – 45
3.1. Estandarización de un Bioensayo para <i>Tuta absoluta</i>	34 – 42
3.1.1. Puesta a punto del Bioensayo	34 – 39
3.1.2. Análisis estadístico Probit para Cry1Ab	39 – 42
3.2. Discusión	43 – 46
CONCLUSIONES	48

INTRODUCCIÓN

1.1. ***Bacillus thuringiensis*, PRODUCTOR DE TOXINAS.**

Existe un gran número de insectos que se consideran plaga para un gran número de especies vegetales de interés agronómico. El control de estas plagas que se viene haciendo hasta el momento, es usando insecticidas químicos. No obstante, este tipo de insecticidas ha traído numerosos problemas, tanto ambientales como incluso la muerte en el ser humano.

Por todo esto, se buscó una alternativa que no fuera tóxica para el medio y que fuera específica de cada plaga. Estos dos factores los cumple *Bacillus thuringiensis* y, actualmente es el bioinsecticida más utilizado a nivel comercial.

Bacillus thuringiensis, es una bacteria de un tamaño de entre 1,0-1,2 μm de ancho y de 3- 5 μm de largo, perteneciente a la familia Bacillaceae (Stahly *et al.* 1978). Las características generales de la bacteria son: Gram- positiva, anaerobia facultativa, quimiorganotrofa y con actividad catalasa positiva (Sneath 1986). Su morfología es de bacilo flagelado (flagelación peritrica) y entre sus características se puede destacar la formación de esporas; esto hace que su ciclo biológico tenga dos fases principales: fase vegetativa, donde las bacterias se duplican por bipartición y que se produce cuando las condiciones de su entorno son las óptimas, y fase de esporulación, cuando la bacteria pasa a un estado de latencia, y es en esta fase, cuando se produce la formación del cuerpo paraesporal también conocido como cristal (Schnepf *et al.* 1998) y que está compuesto mayoritariamente por δ -endotoxinas (Feitelson 1993), donde se incluyen las proteínas Cry de forma mayoritaria y en menor medida las proteínas Cyt. Independientemente a estos cristales, *B. thuringiensis* también ha desarrollado otros factores de virulencia capaces de infectar a diferentes organismos, como son: las fosfolipasas (Zhang *et al.* 1993), proteasas (Lövgren *et al.* 1990), quitinasas, α -exotoxinas o exotoxinas termolábiles (Schnepf y Whiteley 1985), proteínas VIP (Estruch *et al.* 1995) y β -endotoxinas (Schnepf *et al.* 1998).

Inicialmente, *B. thuringiensis* fue caracterizado como patógeno de insectos, lo que desembocó en el desarrollo de bioinsecticidas para ciertas especies de lepidópteros, dípteros y coleópteros (Beegle y Yamamoto 1992). Ya en trabajos más recientes, se vio que también actúa frente a otros insectos (Himenópteros, Ortópteros), nematodos, ácaros y protozoos (Feitelson 1992 y 1993).

1.1.1. CICLO INFECTIVO DE *B. thuringiensis* EN LARVAS DE LEPIDÓPTEROS.

El ciclo infectivo se puede dividir en las siguientes etapas:

1. Primero, una larva ingiere las esporas y los cristales de *B. thuringiensis* que se encuentran presentes en su alimento habitual.
2. A continuación, las esporas y cristales viajan a lo largo del aparato digestivo de la larva, hasta llegar al intestino medio. Allí, los cristales se disuelven a causa del pH del medio, que se caracteriza por ser alcalino en los lepidópteros, en torno a $\text{pH} = 10$. A veces, las diferencias en el grado de solubilización de este tipo de proteínas puede explicar el grado de toxicidad de cada una de las toxinas Cry en cada especie de insecto (Schnepf *et al.* 1998).
3. En este momento, las pro-toxinas están de forma soluble en el medio y hace que, por digestión proteolítica mediante la acción de proteasas del intestino del tipo tripsina y quimiotripsina, se active la proteína y pase a ser la toxina activada. Para que esto suceda, los enzimas deben cortar unos 30 aminoácidos del amino-terminal y una parte variable del extremo carboxi-terminal de la protoxina, lo cual normalmente ocurre de forma progresiva, cortando fragmentos de unos 10 kDa (Schnepf *et al.* 1998).
4. La toxina activa, se une a los receptores de naturaleza glicoproteína (cuyo peso está en torno a 120- 180 kDa) presentes en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio.
 - 4.1. El primer receptor (ej: Cadherina), se encarga de realizar un corte proteolítico a la toxina eliminando una hélice α . Esta

característica hace que esta proteína se una con mucha afinidad al siguiente receptor.

4.2. La unión de la toxina a un segundo receptor, hace que se formen poros de unos 0,6 nm de radio en las células epiteliales de las microvellosidades que hace que éstas rápidamente se hinchen y pierdan funcionalidad debido a que se produce un intercambio de fluidos entre la luz intestinal y la cavidad hemocélica, que produce un choque osmótico.

Estos receptores son claves para la actividad de las proteínas Cry, ya que son específicos de cada toxina y el número de ellos en el epitelio es importante para la acción de las mismas.

5. La lisis celular producida por estas toxinas puede ser suficiente para matar a la larva. Aun así, las esporas pasan a la hemolinfa aprovechando las lesiones que ocasiona la toxina, produciéndose así septicemia debido a que se produce la germinación de las esporas en esta zona y además, ya en forma de bacteria, se puede reproducir de manera muy activa en este fluido (van Frankenhuyzen 1993), debido a que se encuentra en un ambiente lo suficientemente favorable como para germinar. A nivel de microscopía, se puede diferenciar la fase de espora a la de bacteria porque esta última pierde la refringencia. Finalmente, estas bacterias vuelven al medio exterior, donde comenzará de nuevo el ciclo infeccioso.

Síntomas de la Larva Infeccionada: El primer síntoma detectado es la parálisis muscular del intestino, esto desemboca en que la larva deja de alimentarse. A continuación, se produce un rápido aumento del pH y de la concentración de K^+ en la hemolinfa, que hace que la larva ralente todos sus movimientos. En este momento es cuando empieza un transcurso de vómitos, diarrea y después la parálisis intestinal se convierte en generalizada. Además, desaparecen los movimientos reflejos y la larva finalmente muere, originándose unas manchas oscuras en el tegumento (Nishiitsutsuji- Uwo y Endo 1980). Si la concentración de toxina no es lo suficientemente elevada como para matar a la larva, pero

la dosis subletal es continua en el tiempo, se verá afectada tanto en la fertilidad como en la fecundidad (Dulmage y Martínez 1973).

1.2. PROTEÍNAS Cry.

Las proteínas Cry son un grupo de proteínas de inclusión paraesporal de *B. thuringiensis* que manifiestan una función tóxica frente a diferentes organismos. Estas proteínas pertenecen al grupo de δ -endotoxinas, cuya característica general es que son toxinas formadoras de poro (PFT), cuyo foco de acción es la membrana de células epiteliales del intestino medio de insectos.

Son toxinas muy específicas de especie, por lo que no todos los insectos son blanco para alguna de ellas. Además, se ha comprobado que son inocuas para vertebrados.

Asimismo, con el fin de agrupar a esta familia de proteínas e introducir nuevos miembros que se descubran en un futuro, las proteínas Cry se han definido como: “cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry”. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias, como *Clostridium bifermentans* (clasificadas como Cry16A y Cry17A), con actividad frente a mosquitos.

Por todas estas características, las proteínas Cry se han venido utilizando como bioinsecticidas para especies plaga y, además, se han usado para obtener plantas transgénicas resistentes a la especie que las ataca.

1.2.1. CLASIFICACIÓN.

Una primera clasificación de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* fue propuesta por Höfte y Whiteley en 1989, que se basó en el espectro insecticida de estas proteínas. Los genes conocidos hasta entonces se agruparon en cuatro clases: *cryI* (toxinas frente a lepidópteros), *cryII* (toxinas frente a lepidópteros y dípteros), *cryIII* (toxinas frente a coleópteros) y *cryIV* (toxinas frente a dípteros). Más tarde se

encontraron nuevos genes que codificaban nuevas proteínas insecticidas frente a lepidópteros, coleópteros y nematodos y se incluyeron en esta clasificación como clases *cryV* y *cryVI* (Tailor *et al.* y Feitelson *et al.* 1992).

Hasta ahora, se han clonado y secuenciado más de 200 genes *cry*, cuyas proteínas Cry se han distribuido en 50 grupos y varios subgrupos. Cada uno de estos grupos presenta una toxicidad muy concreta a un determinado tipo de insecto, por lo que la clasificación de este tipo de proteínas está muy relacionada con su toxicidad.

El aumento en el número de nuevos genes *cry* descubiertos hizo que la clasificación vigente hasta ese momento se quedara obsoleta. Esto desencadenó el diseño una nueva nomenclatura propuesta por Crickmore *et al.* en 1998, donde se utilizan nuevos criterios para este tipo de toxinas (Neil Crickmore, 2011): nombre genérico de la familia (Cry), seguido de un número arábigo que agrupa a las que comparten el 45% de identidad (Cry1, 2, 3, etc), a continuación le sigue una letra mayúscula donde aumenta la identidad entre 45 – 78% (Cry1A, Cry1B, etc), en tercer lugar se asigna una letra minúscula que corresponde a identidades de entre 78 - 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, etc) y finalmente se utiliza de nuevo un número arábigo para identidades superiores al 95% (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc).

La extraordinaria diversidad de estas proteínas insecticidas se cree que es debido a un alto grado de plasticidad genética. Muchos de estos genes están asociados a elementos transponibles que puede facilitar la amplificación del gen, lo que lleva a la evolución de nuevas toxinas (de Maagd, Bravo y Crickmore 2001).

Este número elevado de proteínas Cry ha permitido el análisis comparativo de secuencias y ha contribuido a esclarecer elementos importantes para la función básica y la especificidad de la toxina al insecto. Ya en 1989, Höfte y Whiteley llevaron a cabo el primer análisis detallado de la secuencia de las proteínas Cry. El alineamiento de secuencias mostró un alto grado de diversidad entre estas proteínas. Aun así, se identificaron cinco bloques de aminoácidos altamente

conservados que se encontraron en la mayoría de las secuencias. El descubrimiento de nuevas proteínas Cry dio pie a más análisis, en primer lugar por Bravo en 1997 y luego por de Maagd *et al.* en 2001. Trabajos más recientes, han analizado las secuencias de proteínas de Cry1 a Cry31. En estos análisis se pudo comprobar que la mayoría de las toxinas contenían algunos o todos los bloques altamente conservados, identificados por Höfte y Whiteley (1989), lo que sugiere que estas regiones pueden ser importantes para algunos aspectos en la estabilidad y función de la toxina. Asimismo, se pudo ver que la localización de estos bloques que se encontraba en la mitad N-terminal de las toxinas, mientras que el extremo C-terminal constituye un dominio pro-toxina, especialmente grande en las de mayor peso molecular (130-140 KDa). Más tarde, al comparar, secuencias C-terminal de 1000 residuos de longitud de estas proteínas insecticidas, se localizaron tres nuevos bloques, pero estos no estaban dentro del núcleo tóxico activo como los otros cinco.

1.2.2. ESTRUCTURA DE LAS TOXINAS.

Para el estudio de la estructura tridimensional de estas proteínas insecticidas, se han aplicado estudios de cristalografía de rayos X. Para ello, se compararon las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac (específicas de lepidópteros), Cry3Aa y Cry3Bb (específicas de coleópteros), Cry2Aa (cuya toxicidad influye en dos tipos de insectos, lepidópteros y dípteros) y Cry4Aa y Cry4Ba (tóxicas para dípteros) (Boonserm 2005 y 2006; Derbyshire 2001; Galitsky 2001; Grochulsky 1995; Li 1991 y 2001; Morse 2001). A partir de estos trabajos se pudo ver que, aunque son proteínas con secuencias bastante diferentes y con un espectro de acción distinto, tienen en común tres dominios en su estructura. El dominio I se caracteriza porque está formado por siete α -hélices antiparalelas, donde la α -hélice número cinco es la central y las otras seis restantes la rodean. Estas hélices exteriores son de carácter anfipático y aromático. La mayoría de estas hélices son mayores a 30 Å, y les hace ser capaces de atravesar membranas hidrofóbicas. Por este motivo, y al asemejarse

a dominios de formación de poro de la toxina colicina A o de la toxina de la difteria, llevó a formularse la hipótesis de que este dominio estaba implicado en la formación de poro de las proteínas Cry (Boonserm, Davis, Ellar y Li 2005; Pardo-López, Gómez, Muñoz-Garay, Jiménez-Juarez, Soberón, y Bravo 2006; Rajamohan, Lee y Dean 1998). El dominio II está formado por tres hojas- β antiparalelas que forman un prisma- β con pseudo-triple-simetría (Li, Carroll y Ellar 1991). Dos de las hojas- β están compuestas por cuatro filamentos y están unidas formando una topología típica de “llave griega”. Por otro lado, la tercera hoja- β se localiza frente al dominio I. Estructuralmente, el dominio II es el más variable de los tres dominios de la toxina (Boonserm P., Davis P., Ellar y Li 2005). Teniendo en cuenta esta variabilidad, el dominio II se cree que es un determinante importante de su especificidad. Similitudes entre el ápice del dominio II y la complementariedad de la región determinante de las inmunoglobulinas, sugiere que este dominio tiene un papel en la unión al receptor (Li, Carroll y Ellar 1991), que se ha confirmado por estudios de mutagénesis (Rajamohan, Lee y Dean 1998). El dominio III es un β -sándwich antiparalelo con una topología de “rollo de gelatina”. Cada hoja del sándwich está compuesta por cinco filamentos. Este dominio muestra una menor variabilidad que el dominio II y las pequeñas diferencias encontradas en él, se encuentran en la longitud, orientación y secuencia de los bucles. Este dominio se considera importante en la estabilidad de la toxina (Li, Carroll, Ellar, 1991; Masson, Tabashnik, Mazza, Préfontaine, Potvin, Brousseau *et al.* 2002), así como para su especificidad (Burton, Ellar, Li, Derbyshire 1992; de Maagd, Kwa, van der Klei, Yamamoto, Schipper, Vlak *et al.* 1996; Gómez, Arenas, Benítez, Miranda-Ríos, Becerril y Grande *et al.* 2006; Herrero, González-Cabrera, Ferré, Bakker y de Maagd 2004; Li, Derbyshire, Promdonkoy y Ellar 2001) y en la modulación de la actividad de canales iónicos en el intestino medio de los insectos susceptibles (Chen, Lee y Dean 1993; Tiedje, Colwell, Grossman, Hodson, Lenski y Mack *et al.* 1989).

Al hacer análisis comparativos entre los bloques mencionados en el apartado 1.2.1., con los dominios descritos en éste, se ha podido comprobar que las secuencias de los bloques descritos están presentes en puntos clave de los dominios estructurales de las proteínas. Por tanto, el bloque 1 abarca por completo la α -hélice 5 del dominio I, cuya función está relacionada con la formación del poro, un papel que podría explicar el alto nivel de conservación natural. Por otro lado, el bloque 2 está incluido en la α -hélice 7 del dominio I y en la 1ª lámina- β del dominio II. Esto se debe a que ambas estructuras están en contacto para la unión de los dos dominios a través de tres puentes salinos estructuralmente equivalentes. En cuanto a los bloques 3, 4 y 5 se encuentran en tres filamentos interiores del dominio III. El bloque tres contiene láminas- β del dominio II y están implicadas en la interacción del dominio I con el dominio III. En el bloque 4, se localizan dos argininas centrales que podrían estar implicadas en puentes salinos intermoleculares que afectan al cristal o a la agregación oligomérica necesaria para unirse al segundo receptor.

1.2.3. **MODO DE ACCIÓN.**

Las proteínas cristalinas se consideran de un gran interés teórico y práctico por la comunidad científica, por lo que es necesario conocer el efecto tóxico de las mismas, con el fin de poder realizar un correcto control de plagas y prevenir la aparición de insectos resistentes. El modo de acción de estas proteínas insecticidas ha sido principalmente caracterizado en lepidópteros. Según lo mencionado en apartados anteriores (1.2.1., 1.2.2.), la principal acción de estas toxinas es lisar células epiteliales del intestino medio del insecto diana a partir de la formación de poros en la membrana apical de las microvellosidades de estas células (Aronson y Shai 2001; de Maagd *et al.* 2001, Bravo *et al.* 2005). Por tanto, las proteínas Cry deben pasar de estar en forma de protoxina en el cristal de inclusión (que se disuelve por el pH alcalino del intestino medio), a toxina activada para unirse a receptores específicos de la misma y posteriormente insertarse en la membrana. Esto sucede

una vez que la protoxina ha sido procesada por proteasas del intestino medio. De este modo se forman canales iónicos en las microvellosidades, la posterior formación del poro y finalmente se produce un desequilibrio osmótico y lisis celular.

Durante la activación proteolítica, las protoxinas de alto peso molecular, entre 130- 140 kDa (ej: Grupo Cry1), son ampliamente procesadas en su extremo carboxi-terminal (1.2.1), obteniéndose una proteína activa final de un peso molecular de entre 60-70 kDa. En cuanto a las proteínas de bajo peso molecular, de unos 70 kDa (ej: grupos Cry2 y Cry3), el tamaño de la proteína cristalina activada es de un tamaño muy similar al de la protoxina.

1.2.3.1. UNIÓN A RECEPTOR EN LARVAS DE LEPIDÓPTERO.

Una vez que las toxinas están en su forma activada, éstas atraviesan la membrana peritrófica, que es una membrana que protege el epitelio pero permite el paso de moléculas de un tamaño menor o igual a 60 kDa (Adang Y Spence 1982) hacia la membrana de las células epiteliales.

El estudio de la unión de estas toxinas con las células del epitelio se ha realizado a partir del uso de técnicas histoquímicas, que utilizan anticuerpos frente a ellas o bien se las marca con biotina. A continuación, en preparaciones del intestino medio de larvas de insectos, incubadas *in vitro* con una proteína Cry, muestran la unión específica de éstas al borde en cepillo de las células epiteliales (Bravo *et al.* 1992; Estada y Ferré 1994). Técnicas bioquímicas de ensayos de unión ligando-receptor, han permitido una mayor caracterización de la unión a la membrana celular (van Rie *et al.* 1989; Escriche *et al.* 1997). Cada una de las proteínas cristalinas se une a sitios de unión específicos en moléculas de membrana y, por este motivo, a estas moléculas se las denominó receptores.

Por ejemplo, para las toxinas Cry1A, se han encontrado diferentes receptores en distintas especies de lepidópteros, como son: proteínas de tipo cadherina (CADR), aminopeptidasa- N (APN), fosfatasa alcalina

(ALP) y un glicoconjugado de 270 kDa (Vadlamudi *et al.* 1995; Knight *et al.* 1994; Jurat- Fuentes y Adang 2004; Valaitis *et al.* 2001).

El rol de la interacción toxina-receptor ha sido muy bien estudiado en *M. sexta*. En esta especie se han encontrado dos de los cuatro tipos de receptores nombrados anteriormente: CADR y APN. Las cadherinas son receptores transmembrana, con un dominio citoplásmico y un ectodominio extracelular con varias repeticiones de cadherina. El ectodominio tiene sitios de unión a calcio, secuencias de interacción a integrina y secuencias de unión a cadherina. Por otro lado, se comprobó el grado de afinidad de la toxina Cry1A a ambos receptores y los resultados obtenidos fueron que, para la unión a cadherina, la constante de disociación estaba en el rango de 1 nM (Vadlamudi *et al.* 1995), mientras que para el receptor APN era de 100 nM (Jenkins y Dean 2000).

1.2.3.2. FORMACIÓN DEL PORO.

En este paso de toxicidad, el modelo aceptado ha sido el de lisis coloideosmótica propuesto por Knowles y Ellar en 1987. Este modelo propone que las proteínas Cry producen pequeños poros en la membrana apical de las células columnares del intestino.

Al formarse los poros en la membrana, se ve alterado el gradiente Na⁺ y K⁺ hacia el exterior, permitiendo su libre movimiento. Además, las células, al ser de naturaleza hipertónica respecto a la luz intestinal, los poros formados permiten la entrada de agua al interior con el fin de producir un equilibrio osmótico con el exterior. Esto provoca un hinchamiento de la célula que desencadena la lisis celular (Worfersberger 1992).

En el caso de la toxina Cry1Ab, la unión de ésta con su receptor en *M. sexta*, provoca un corte en el extremo N-terminal de la proteína, concretamente la α -hélice 1 del dominio I, lo que facilita la formación de la estructura oligomérica llamada pre-poro, importante para la inserción en membrana y para la toxicidad (Gómez *et al.* 2002b; Rausell *et al.* 2004a). Se han realizado numerosos trabajos para confirmar que la estructura oligomérica es importante en la formación del poro, como el

uso de anticuerpos tipo scFv73, que imitan al receptor cadherina, o tratamientos con jugo de intestino medio de *M. sexta* (Gómez *et al.* 2002b, 2003). Además, las estructuras oligoméricas de Cry1Ab y Cry1Ac aumentan de 100 a 200 veces su afinidad de unión al receptor secundario APN, mostrando una constante de disociación de entre 0,75 - 1nM (Gómez *et al.* 2003; Pardo- López *et al.* 2006).

Se ha demostrado la formación de estructuras oligoméricas en las toxinas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa y Cry3 (Gómez *et al.* 2002b; Rausell *et al.* 2004a, 2004b; Muñoz-Garay *et al.* 2006). En todos estos casos, las toxinas que contienen estas estructuras muestran una alta correlación con la actividad formadora de poros, frente a estructuras monoméricas, que presentan niveles marginales de actividad de formación de poro. Todos estos trabajos apoyan la hipótesis de que la formación de un oligómero es un paso necesario para la actuación de estas proteínas insecticidas.

1.2.3.3. INSERCIÓN EN MEMBRANA.

El modelo de inserción en membrana no está del todo claro. Li *et al.* en 1991 propuso que las α -hélices 4 y 5 penetran en la membrana lipídica de las células epiteliales, mientras que el resto de las α -hélices permanecen en la superficie. A este modelo se le denominó “Modelo Paraguas”. Por otro lado, Hodgman y Ellar en 1990, formulan otro modelo, el “Modelo Navaja”, donde las α -hélices 5 y 6 sobresalen del dominio I y son las que penetran la membrana. Finalmente, Dean *et al.* en 1996, propuso que el dominio I se insertaba completamente. Se ha observado que el dominio I de estas proteínas Cry, es similar a otro de otras proteínas formadoras de poro, colicina A, toxina diftérica, o exotoxina de *Pseudomonas*, de hecho, los dos primeros modelos se basan en estas toxinas formadoras de poro.

Todas estas toxinas bacterianas tienen en común el tipo de poro que forman, poro tipo α , que forma 3 capas de α -hélices; las α -hélices formadoras de un poro capilar hidrofóbico de forma helicoidal estarían protegidas en el centro y el poro se alinearía atravesando la membrana.

Ya en una revisión más reciente realizada por Pigott y Ellar en 2007, se recopilaron los siguientes tres modelos:

- **Modelo de Bravo:** Este modelo es una actualización del modelo de lisis osmótica coloidal propuesto por Knowles y Ellar (1987), que propone que los receptores APN y cadherina se requieren para una toxicidad plena en *M. sexta*. Este modelo está basado en experimentos realizados con Cry1Ab, que determinan que la unión de la toxina al receptor es secuencial. Después de producirse la unión a la cadherina, se propuso que la toxina sufre un cambio conformacional que facilita la eliminación de la α -hélice 1 por proteasas de membrana (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón 2002). Esto desencadena el que se forme el oligómero, que preferentemente se une al receptor APN, como resultado de un aumento de la afinidad de unión (Bravo, Gómez, Conde, Muñoz-Garay, Sánchez, Miranda, Zhuang, Gill y Soberón 2004). A continuación, el receptor APN dirige al prepore a las “balsas lipídicas”, lugar donde se produce la inserción en la membrana para la formación del poro lítico. La generación de tan sólo 200 copias de este poro, con un radio de entre 0.5- 1.0 nm en las membranas de las células epiteliales, produce cambios en el potencial electroquímico, equilibrio de iones a través de la membrana, entrada de agua, hinchazón celular y eventual lisis celular (Knowles y Dow 1993).

- **Modelo de Zhang y Bulla:** Propone una alternativa frente a la lisis osmótica, propuesta en el modelo anterior. En este modelo se describe que la unión monomérica de Cry1Ab a cadherina inicia una cascada de señalización de Mg^{2+} que promueve la muerte celular. Además, en este trabajo, indican que la unión a receptor activa la vía de señalización implicada en la estimulación de la proteína G y de la adenilil ciclasa (AC), incrementando los niveles de AMP cíclico (cAMP), activando la proteína kinasa A (PKA), que desencadena la desestabilización del citoesqueleto y canales iónicos. Todo ello hace en que se desemboque en muerte celular.

- **Modelo de Jurat-Fuentes:** Es el modelo propuesto más reciente. Describe la toxicidad de Cry1Ac frente a *H. virescens* (Jurat-Fuentes y

Adang 2006). Este modelo sugiere que la citotoxicidad producida en las células epiteliales se produce por combinación de la lisis osmótica y la señalización celular. Primero se activa una unión monomérica de Cry1Ac al receptor cadherina, que desencadena la activación de una vía intracelular regulada por fosfatasa (estudiado por análisis proteómicos con diferentes cepas de *H. virescens*). Además, la señalización puede ser dependiente de una interacción entre esta toxina y la actina, proteína del citoesqueleto que interacciona con un dominio del receptor cadherina a través de tirosina fosfatasa, catenina y actinina (Lilien y Balsamo 2005). Después de la unión a HevCaLP, la toxina Cry1Ac monomérica oligomerizada, se une a proteínas APN. Por tanto, los oligómeros de Cry1Ac dentro de DRMs, en la formación de poros desencadena un choque osmótico y la activación de las vías señalización que conducen a la muerte celular.

1.3. BIOTECNOLOGÍA DE *Bacillus thuringiensis*.

Se han descrito varias aplicaciones biotecnológicas para el uso de las toxinas *B. thuringiensis*, entre las que destacan:

- **Control de plagas de defoliadores en el sector forestal:** Es una de las aplicaciones más exitosas de *B. thuringiensis*, cuyo trabajo más destacado se ha realizado en el control de lepidópteros defoliadores, que son plagas de bosques de coníferas, principalmente de Canadá y EEUU. En ambos países, el control de estos lepidópteros defoliadores en los bosques, se basa principalmente en el uso de *B. thuringiensis*, cepa HD-1, que produce las toxinas Cry1Aa, Cy1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa (van Frankenhuyzen 2000; Bauce *et al.* 2004). Para una aplicación exitosa de *B. thuringiensis* no sólo es importante la toxicidad de las proteínas Cry, sino que también depende en gran medida del momento adecuado, las condiciones meteorológicas y altas dosis de aplicaciones de pulverización. Estos factores se combinan para determinar la probabilidad de las larvas de ingerir una dosis letal (van Frankenhuyzen, 2000; Bauce *et al.* 2004). El uso de *B. thuringiensis* en el control de los

defoliadores se ha traducido en una reducción significativa en el uso de insecticidas químicos para el control plagas en los bosques.

- **Control de mosquitos, vectores de enfermedades humanas:** Algunos ejemplos de este tipo de vectores de enfermedades humanas son: *Aedes aegypti* (vector del dengue), *Simulium damnosum* (vector de la oncocercosis) y ciertas especies de *Anopheles* (vectores de la malaria). Su alta actividad insecticida, la ausencia de resistencia en mosquitos a *B. thurigiensis*, la falta de toxicidad para los organismos no diana y la existencia de poblaciones de insectos resistentes a insecticidas químicos, llevó a una adopción rápida de *B. thurigiensis* como un método alternativo de control de mosquitos y poblaciones de mosca negra (Becker 2000). En 1983, un programa de control para la erradicación de la oncocercosis se puso en marcha en once países de África Occidental con uso de *B. thurigiensis*, ya que las poblaciones de *Simulium damnosum* habían desarrollado resistencia a larvicidas organofosforados (Guillet *et al.* 1990). En la actualidad, más del 80% de esta región está protegida por la aplicación de *B. thurigiensis* y tan solo el 20% con el producto químico larvicida temefós. Este éxito de la lucha antivectorial con *B. thurigiensis* sin duda aumentará su uso en todo el mundo. Sin embargo, la baja actividad de *B. thurigiensis* a determinados mosquitos vectores, principalmente anofelinos, requiere del aislamiento de otras cepas de *B. thurigiensis* con nuevos genes *cry* más eficaces contra estas importantes enfermedades.

- **Desarrollo de Biopesticidas:** Los productos insecticidas desarrollados con *B. thurigiensis* fueron comercializados por primera vez en Francia en 1930. Durante los sesenta años posteriores, se ha venido utilizando en forma de spray que contiene una mezcla de esporas y cristales. Ya en 1995, se registraron en la “U.S. Environmental Protection Agency” (EPA), 182 productos basados en *B. thurigiensis* y posteriormente, en 1999, se comprobó que el número de ventas de este tipo de productos era del 2% respecto a conjunto global de ventas de insecticidas, pero aun así, del conjunto global de bioinsecticidas, el 80% de las ventas estaban relacionadas con productos de *B. thurigiensis*

(Carpenter y Gianessi 2001; EPA 2001). El uso de este tipo de biopesticidas viene dado inicialmente por la resistencia de ciertas especies de insectos a los insecticidas químicos habituales. Aun así, las ventas de este producto han rondado los 100 millones de dólares, aunque con la llegada de la ingeniería genética de plantas obtenidas por transformación con genes *cry*, actualmente las ventas han disminuido a 40 millones de dólares. La OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), predice que estos bioplaguicidas pueden crecer en el mercado mundial alrededor de un 20% para el 2020 (Whalon y Wingerd 2003).

- **Desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos:** El desarrollo de los cultivos transgénicos que producen proteínas Cry (cultivos Bt) ha sido un paso importante en la sustitución de insecticidas químicos y representa una de las alternativas más respetuosas con el medio ambiente. Las plantas transgénicas expresan la proteína insecticida de forma constitutiva y, de este modo, la toxina confiere protección permanente frente al ataque de los insectos. La expresión de estas proteínas bioinsecticidas en plantas ha sido mejorada mediante la ingeniería genética de los genes *cry*, por ej. por el cambio del uso de codones, por la eliminación de secuencias señal de corte y empalme del RNA, y la supresión de la región carboxi-terminal de la protoxina (Schuler *et al.* 1998). El uso de cultivos resistentes a insectos ha disminuido considerablemente el uso de pesticidas químicos en las zonas donde se plantan estos cultivos transgénicos (Qaim y Zilberman 2003). Curiosamente, el uso de algodón Bt en países como China, Méjico e India mostró que la utilización de este tipo de cultivos Bt tuvo un efecto significativamente positivo sobre el rendimiento final y una reducción en el uso de pesticidas químicos, ya que en estos países la pérdida de rendimiento se debe principalmente a las restricciones técnicas y económicas, que se superan en parte al uso de cultivos resistentes a insectos (Qaim y Zilberman 2003; Toenniessen *et al.* 2003).

1.4. Tuta absoluta (Meyrick), INSECTO PLAGA DE Solanum lycopersicum.

Tuta absoluta, o polilla del tomate, es un lepidóptero de la familia Gelechiidae, que se describió por primera vez en 1917 por Meyrick con el nombre de *Phthorimaea absoluta*, sobre la base de especímenes recolectados de Huancayo (Perú). Más tarde, a esta plaga se la denominó *Gnorimoschema absoluta* (Clarke 1962), *Scrobipalpula absoluta* (Povolny), o *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny), pero finalmente fue descrita en el género *Tuta* como *T. absoluta* por Povolny en 1994 (Barrientos *et al.* 1998).

La polilla del tomate es un pequeño lepidóptero, minador de hojas, brotes y frutos. Se le conoce también como polilla perforadora o gusano minador del tomate. Este lepidóptero produce grandes pérdidas en los cultivos de tomate por una bajada en el rendimiento debida a la destrucción de las hojas y flores y por el daño producido en los frutos, que disminuye su valor comercial (Colomo y Berta 1995).

También se ha comprobado que esta plaga tiene un alto potencial reproductivo, pudiendo alcanzar entre 10 y 12 generaciones en un año y cuyo ciclo biológico tiene una duración que puede oscilar entre 29 y 38 días e incluso periodos más largos de tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales que se den en ese momento (Barrientos *et al.* 1997; Vélez 1997).

1.4.1. LOCALIZACIÓN.

Tuta es una de las principales plagas de América del Sur (Suinaga *et al.* 1999; Torres *et al.* 2001) y se encuentra en países como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Maluf *et al.* 1997). No hace mucho tiempo, se ha localizado a *T. absoluta* en varios lugares europeos y de la cuenca mediterránea, donde ha causado importantes daños en cultivos de tomate. En España, posiblemente se introdujo a través de material vegetal infectado. Los primeros ejemplares de *Tuta absoluta* encontrados en nuestro país, se

localizaron en los cultivos de tomate de la provincia de Castellón a finales de 2006. En 2007, se identificaron más ejemplares de *Tuta absoluta* en varios lugares de la costa mediterránea de la provincia de Valencia, donde causó daños considerables. De hecho, en las cosechas de tomate que se plantaron durante el invierno en la provincia de Valencia, se han observado pérdidas de hasta el 100%. La gravedad de las pérdidas y la propagación de la plaga están constituyendo un gran motivo de preocupación para los agricultores de tomate en España (Red de Información de *Tuta absoluta*, 2011).

Al mismo tiempo, el servicio de información de la OEPP (European and Mediterranean Plant Protection Organization), identificó la presencia de la *Tuta absoluta* en Argelia en el año 2008. Recientemente, la ONPP de Argelia informó al Secretariado de la OEPP del hallazgo del primer caso de *Tuta absoluta* (Lista A1 de la OEPP) en su territorio. En este país, *T. absoluta* se encontraba en los cultivos protegidos de tomate en la zona costera (oeste, centro y parte de la costa este). Los primeros casos observados se produjeron en los invernaderos de tomate de la comuna de Mazagran (cerca de Mostaganem) y pronto se extendieron a las comunas vecinas. Además, también se ha informado de otros casos en la comuna de Hassi Bounif (cerca de Oran). De momento, en este país, los daños producidos por este insecto plaga, se han limitado a los cultivos de tomate de invernadero, pero se teme que *T. absoluta* se extienda y llegue a afectar a los cultivos de tomate al aire libre e incluso a otros vegetales, como berenjenas (*Solanum melongena*) y pimientos (*Capsicum annuum*). También se ha identificado la presencia de la *Tuta absoluta* en otro país mediterráneo, Marruecos, donde se estima que unas 526 hectáreas están en peligro (275 en Nador, 216 en Berkane y 35 en Taourirt), además de otras 65 hectáreas de invernadero. En 2008, también se informó de la presencia de este insecto en el país vecino, Túnez (Red de Información de *Tuta absoluta*, 2011).

En enero de 2009, se observó la presencia de esta plaga en Francia. La ONPP francesa informó al Secretariado de la OEPP del primer caso de *Tuta absoluta* en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en

1.4.2. PLANTAS HOSPEDADORAS.

Tuta absoluta es un insecto oligófago que se alimenta de diferentes especies de solanáceas (Siqueira *et al.* 2000). Además de la planta de tomate (Vargas 1970, Mallea *et al.* 1972, Campos 1976), existen otras especies hospedadoras para este insecto, como la patata, *Solanum tuberosum* L., berenjena, *Solanum melongena* L. y tabaco, *Nicotiana tabacum* L. Entre las plantas silvestres, son hospedadoras de esta polilla, *Solanum nigrum* L., *Solanum eleagnifolium* L., *Solanum bonariense* L., *Solanum sisymbriifolium* Lam., *Solanum saponaceum*, *Lycopersicum puberulum* Ph., *Datura ferox* L., *D. stramonium* L. y *Nicotiana glauca* (García y Espul 1982).

1.4.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y BIOLÓGICAS.

El ciclo vital de este lepidóptero minador comprende cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Opennatur SL, 2011).

Los **huevos** se caracterizan por ser cilíndricos de un color blanco crema a amarillo y cuyo tamaño comprende los 0,4 mm de largo por 0,2 mm de ancho. La hembra puede depositar, a lo largo de su vida, alrededor de 260 huevos, y la puesta suele ser aislada aunque en ocasiones se pueden encontrar los huevos en pequeños grupos.

Después de la eclosión de los huevos, le siguen **cuatro estadios larvarios**, donde en el último llega a alcanzar una longitud de 7,5 mm y tiene un color verdoso con manchas rosadas. La tonalidad de los tres primeros estadios corresponde a un color crema con la cabeza y escudo pro-torácico de color oscuro (marrón oscuro-negro).

A continuación, la larva de estadio 4 se encarga de pupar. Esta fase ocurre principalmente en el suelo, aunque también puede ocurrir en la superficie de la hoja e incluso en las galerías que forman en ellas durante los estadios de la larva.

Las **pupas** son de color marrón y de forma cilíndrica, de 4,5 mm de largo por 1,1 mm de ancho. Cuando la larva se prepara para pupar, ésta deja de comer y forma un capullo en la región de la planta donde se

localice o se deja caer al suelo a través de un hilo de seda. En la mayoría de las ocasiones suele estar cubierta por un capullo blanco sedoso.

En cuanto al **adulto**, tienen una longitud de unos 10 mm. Son de hábitos nocturnos y permanecen escondidos entre las hojas durante el día. En ambos sexos, sus alas anteriores tienen una tonalidad tipo cenicienta, con matices que varían de marrón oscuro a gris. La cabeza, tórax y palpos son de color gris ceniza con pinceladas oscuras. Las hembras presentan el abdomen de color café y además es más ancho y voluminoso que en el caso de los machos.

En relación a la vida de los adultos, se ha observado que las hembras son más longevas que los machos, su vida media es de entre 10 y 15 días, mientras que la de los machos es de tan solo 6 ó 7 días.

1.4.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA EN TOMATE.

Las plantas de tomate pueden ser atacadas en cualquier etapa del desarrollo, con la puesta de huevos por parte de las hembras preferentemente en las hojas (73 %), y en menor medida en las venas de la hoja, márgenes del tallo (21 %), sépalos (5 %) o frutos verdes (1 %) (Estay 2000). Después de la eclosión, las larvas jóvenes penetran en las hojas, tallos o frutos de tomate donde se alimentan y se desarrollan y crean minas visibles y galerías. En las hojas de tomate, los daños son causados por las minas que se localizan dentro del mesófilo donde se alimentan las larvas, lo que afecta a la planta en cuanto a su capacidad fotosintética y, por consiguiente, se produce una reducción del rendimiento de la planta de tomate. Por otro lado, las galerías localizadas en tallo alteran el desarrollo general de la planta y pueden causar necrosis. En el caso del fruto, éstos pueden ser atacados tan pronto como se forman, y las galerías formadas en el interior de ellos pueden ser invadidas por patógenos secundarios que conducen a la putrefacción del fruto. Por último, otro problema importante es que esta plaga se alimenta directamente de la zona en crecimiento de la planta, por lo que detiene el desarrollo de la misma.

Tuta absoluta afecta a los tomates destinados al mercado de productos frescos, así como a su tratamiento, con larvas que causan pérdidas en su zona de origen de hasta el 80-100% (Apablaza 1992; López 1991).

1.4.5. ESTRATEGIAS DE CONTROL.

Se ha podido observar que el empleo de combinaciones de insecticidas, y en dosis cada vez más crecientes, estaría provocando un incremento de la tasa de aparición de insectos resistentes (Niedmann y Meza-Basso 2006). Existen antecedentes de otras plagas acerca del desarrollo de resistencia a insecticidas clorados y fosforados, e incluso hacia los piretroides deltametrina y esfenvalerato (Salazar y Araya 1997).

Un ejemplo de este problema se ha venido detectando en países de Latinoamérica. Desde que se detectó por primera vez este lepidóptero en Argentina, el control químico ha sido el principal método de control utilizado en todas sus regiones productoras. El tratamiento realizado por los agricultores de la zona fue aplicar dos veces a la semana insecticidas químicos durante un período de cultivo único. Los primeros insecticidas utilizados frente a *T. absoluta* en Argentina fueron los organofosforados, que fueron poco a poco sustituidos por piretroides durante la década de 1970. En 1980, cartap, compuesto alternado con piretroides, y tiociclam, se introdujeron con una proyección de excelente eficacia en esa década, frente a los insecticidas químicos que se habían venido utilizando hasta el momento. Ya en los 90, se introdujeron insecticidas con nuevos sitios de acción, como abamectina y reguladores del crecimiento de insectos como, acilurea, tebufenozide, spinosad, y clorfenapir (Galarza y Larroque 1984; Polack de 1999; Cáceres 2000). Se han realizado escasos informes del desarrollo de resistencia a insecticidas en poblaciones de *T. absoluta*. También se observó una disminución del control de la eficacia de los insecticidas organofosforados en Bolivia y Chile, los cuales fueron sustituidos por piretroides, al controlar a este insecto minador del tomate de forma satisfactoria (Moore 1983; Larraín 1986), aunque recientemente ya se ha

detectado resistencia a piretroides en Chile (Salazar y Araya 1997, 2001). En Brasil también se ha detectado resistencia a insecticidas químicos, como la abamectina, cartap, metamidofos y permetrina (Siqueira *et al.* 2000, 2001).

Además, existe la sospecha sobre el desarrollo de resistencia en ciertas poblaciones de *T. absoluta* a algunos de los compuestos recomendados para su control biológico, por lo que estos compuestos fueron perdiendo su eficacia en campo. Aun así, la pérdida de eficacia no se ha producido a una misma intensidad, y con los mismos compuestos, en todas las regiones productoras de tomate.

Como alternativa al empleo de plaguicidas sintéticos, se ha dirigido la atención a las propiedades insecticidas de ciertos microorganismos o productos microbianos secundarios, especialmente a *B. thuringiensis* (Theoduloz *et al.* 2003). El éxito de las formulaciones basadas en esta bacteria se ha visto reflejado en diferentes productos comerciales existentes como: Dipel®, XenTari® y Turilav®. Aunque no ha sido fácil su introducción en el mundo de la agricultura, la aplicación en los cultivos con formulaciones tradicionales de *B. thuringiensis*, está constituyendo la estrategia de elección de los agricultores orgánicos, ya que se utilizan para una producción agrícola más sana, limpia y de mayor calidad. La gestión actual que se viene haciendo de *T. absoluta* en la cuenca mediterránea se basa principalmente en los tratamientos con insecticidas químicos. Sin embargo, no hay muchos de estos insecticidas sintéticos que sean eficaces frente a *T. absoluta* y al mismo tiempo inocuos para otros organismos y polinizadores que no interese eliminar. Por tanto, es necesario la integración de otros métodos de control (métodos culturales, biológicos y biotecnológicos), ya que el uso continuado de sustancias químicas insecticidas podría perjudicar a los organismos no diana (Weisenburger 1993; Desneux *et al.* 2007; Landgren *et al.* 2009) y al medio ambiente.

Desde que se detectó *T. absoluta* en la Cuenca Mediterránea, se han identificado algunos parasitoides y depredadores indígenas que son capaces de alimentarse de esta plaga exótica, produciendo un control

biológico fortuito (Urbaneja *et al.* 2008a.; al Arno *et al.* 2009a, b; Cabello *et al.* 2009a; Molla *et al.* 2009). Actualmente, se están llevando a cabo ensayos donde se están utilizando estos depredadores naturales en programas de control biológico de *T. absoluta* (al Arno *et al.* 2009b; Cabello *et al.* 2009b; Molla *et al.* 2009).

Aun así, pocos estudios han evaluado la eficacia de *B. thuringiensis* sobre *T. absoluta*, a pesar de que en 3.000 especies de insectos (pertenecientes a 16 órdenes), se han encontrado susceptibilidad a esta bacteria (Huang *et al.* 2004).

La mayoría de los estudios que se centraron en el efecto de *B. thuringiensis* frente a *T. absoluta* se han realizado en su región de origen (Giustolin *et al.* 2001; Theoduloz *et al.* 2003; Niedmann y Meza-Basso 2006). Giustolin *et al.* en 2001, encontró que *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), puede causar mortalidad en todos los estadios de *T. absoluta* y que el uso de Btk produce efectos sinérgicos o aditivos cuando se aplica a genotipos resistentes de tomate. Por otra parte, Niedmann y Meza-Basso en 2006 realizaron bioensayos de selección de cepas de *B. thuringiensis* nativas de Chile y encontraron que dos de ellas eran aún más tóxicas para *T. absoluta* que la cepa aislada del bioinsecticida Dipel® (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EE.UU.). Por otra parte, Theoduloz *et al.* en 2003 expresó una toxina de *B. thuringiensis* en otras especies de *Bacillus* que colonizan de forma natural la superficie foliar de plantas de tomate, y que podría ser útil como sistema de suministro de toxinas de *B. thuringiensis*.

Por todo ello se abre un nuevo camino con un amplio abanico de posibilidades relacionadas con el control biológico de este lepidóptero, a partir de *B. thuringiensis*.

1.5. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.

Hasta ahora no se ha venido utilizado *B. thuringiensis* en el control de *Tuta absoluta* en la Cuenca Mediterránea. Sin embargo, la utilización de esta bacteria comienza a alcanzar una consideración importante como elemento de control de esta plaga.

Por este motivo, el objetivo del presente trabajo es la obtención de información sobre el efecto de proteínas insecticidas individuales de *B. thuringiensis* sobre *T. absoluta*, usando como material vegetal *Solanum lycopersicum* var. *valenciana* de la familia de las Solanaceae.

Para desarrollar este trabajo se han aislado proteínas Cry en forma de protoxina, para las que se conoce una actividad insecticida clara frente a otros lepidópteros, como son Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. Una vez obtenidas a gran escala y purificadas, se usaron para el desarrollo de bioensayos diseñados de manera específica para esta plaga.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para la purificación de las proteínas Cry se parte de cepas de *Escherichia coli* que han sido transformadas con diferentes plásmidos: pPB08 (Cry1Aa), pBD140 (Cry1Ab), pB03 (Cry1Ac), pMH19 (Cry1Ba), pBd150 (Cry1Ca), pBD160 (Cry1Ea), pMH21 (Cry1Fa), pBD172 (Cry1Ia)(donados por Ruud A. de Maagd). Esto permite la obtención de estas proteínas individualizadas a gran escala, para su posterior uso en bioensayos.

Los pasos para la purificación a gran escala de las proteínas Cry se describen en los siguientes subapartados.

2.1.1. CULTIVO.

- A partir de un glicerinado de -80°C de una de las cepas recombinantes de *E. coli*, sembrar una placa de LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro de medio, pH= 7.5) más ampicilina 50 µg/ml y glucosa al 2%, en condiciones de esterilidad e **incubar** a 37°C durante la noche.

- **Inocular un precultivo**, en un volumen final de 5 ml de medio Terrific Broth líquido (TB) (50,8 g/L y 1 ml de glicerol), ampicilina a 50 µg/ml y glucosa al 2%. Inocular el medio con una colonia aislada procedente de la placa anterior.

- **Incubar a 37°C en agitación** (180- 200 rpm) durante la noche.

- **Inocular el Cultivo Principal.** Para ello se necesita preparar 500 ml de TB más ampicilina 50 µg/ml en un matraz de 1 - 2 litros para obtener una buena aireación del medio. Se inocula con el precultivo en una proporción 1/100 (5 ml).

En este cultivo no se añade glucosa, ya que el efecto que produce es reprimir la expresión del gen de interés. Sólo se añade en el precultivo porque en este paso el interés es que se produzca un crecimiento celular exponencial, no la expresión del transgen.

- **Incubar el Cultivo Principal a 28°C en agitación (180- 200 rpm) durante 3 - 4 días, así se garantiza un buen crecimiento exponencial del cultivo.**

Es recomendable que durante este periodo se compruebe, mediante microscopía óptica, el cultivo para garantizar que las bacterias contienen el cuerpo de inclusión correspondiente a la proteína de interés y, por tanto, no han perdido el plásmido que contiene el transgen.

2.1.2. LISIS CELULAR.

- **Colectar las células del Cultivo Principal.** Para ello se centrifuga usando el rotor JLA- 8.100 a 9800 *g* a 4°C. Previamente se ha de pesar los tubos a usar en este proceso, ya que para continuar el protocolo de purificación es necesario saber el peso del sedimento.

- **Congelar a -20°C el sedimento** durante al menos 1 hora, aunque es más conveniente continuar con el protocolo al día siguiente.

- **Añadir 3 ml de Tampón de Lisis (Tris - HCl 50 mM, pH= 8.0, EDTA 5 mM y NaCl 100 mM.) por cada gramo de sedimento.** Es importante resuspender muy bien el sedimento en este tampón, para una completa homogeneización.

- **Añadir lisozima, 800 µg/g de sedimento e incubar a Temperatura Ambiente durante 20 minutos en Agitación.** Normalmente la lisozima no se añade directamente a la muestra, sino que se recomienda preparar una solución a una concentración de 10 mg/ml en tampón de lisis. Es importante disolver este enzima en el tampón de lisis lentamente para que esta no se desnaturalice. Con esta solución usaríamos 80 µl/g de sedimento.

En este paso se ha de observar un aumento de la viscosidad en el medio.

- **Añadir Deoxicolato de sodio (sal soluble en agua que actúa frente a microorganismos formadores de esporas), 4 mg/g de sedimento. Agitar vigorosamente, e incubar a 37°C en agitación durante 10 minutos.** Es recomendable disolver bien el Deoxicolato en un volumen ~1 ml de Tampón de Lisis.

En este paso, se ha de observar de una manera mucho más acusada la viscosidad, producida por la liberación del DNA procedente de interior de las células bacterianas.

- **Añadir 200 µl de DNAsa I ([1mg/ml]) por gramo de sedimento. Agitar vigorosamente. A continuación, Incubar a 37°C en agitación durante 30 minutos.**

- **Colectar los Cuerpos de Inclusión por centrifugación.** Para ello se usa el rotor JA-20 a 33880 g (14000 rpm) durante 20 minutos a 4°C y se rescata el sedimento para continuar con el protocolo.

NOTA: Tanto en este apartado como en el posterior, el pH de los tampones utilizados oscila entre 7.4 y 8 (~ neutro) porque interesa que el cuerpo de inclusión se mantenga intacto.

2.1.3. LAVADOS.

- **Resuspender el sedimento en 20 ml de Tampón de Lavado (Tris-HCl 20mM, pH 7.5, NaCl 1M y Tritón X-100 1%).**

- **Colectar los Cuerpos de Inclusión por centrifugación.** Para ello se usa el rotor JA-20 a 33880 g (14000 rpm) durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sedimento.

- **Repetir los dos pasos anteriores dos veces más.**

- **Resuspender el sedimento en 20 ml de PBS** (tanto el comercial como el preparado a partir de Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM, pH= 7.4 y NaCl 0,8%), como en pasos anteriores.

- **Colectar los Cuerpos de Inclusión por centrifugación.** Para ello se usa el rotor JA-20 a 33880 g (14000 rpm) durante 10 minutos a 4°C y se recoge el sedimento.

Repetir los dos pasos anteriores dos veces más.

2.1.4. SOLUBILIZACIÓN.

- **Resuspender el sedimento ya lavado, en un volumen 1/100 respecto al volumen de cultivo principal inicial, en Tampón de Solubilización (NaHCO₃ 50 mM pH= 10.5, NaCl 100 mM, DTT 10 mM) previamente preparado.**

Este tampón se encarga de romper los puentes disulfuro de la estructura cuaternaria de nuestra proteína de interés y de eliminar la organización del cuerpo de inclusión y obtener la proteína en forma libre y soluble.

- **Incubar a 37°C en agitación lenta durante dos horas, seguido del mismo tiempo aproximadamente a Temperatura Ambiente, también en agitación lenta.**

- **Centrifugar usando el rotor JA-20 a 33880 g (14000 rpm), durante 10-15 minutos a 4°C.**

En este paso se debe recoger el sobrenadante, el cual contiene la proteína Cry. Además, se recomienda congelar el sedimento para posibles futuras re-solubilizaciones.

- **Añadir Estreptomicina al 0,5% e incubar en hielo durante 1 hora.**

Este antibiótico permite quitar las pequeñas impurezas de la muestra, en caso de que las hubiera.

- **Finalmente, Centrifugar durante 20 minutos a 33880 g (14000 rpm), rotor JA-20, a 4°C. Recuperar el Sobrenadante.**

- Para confirmar que hemos obtenido la proteína Cry el sobrenadante, se realiza una electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12% y se comprueba que está presente la banda de interés.

- Para conservar la proteína se recomienda congelarla en pequeñas alícuotas, aunque también se conserva bastante bien a 4°C.

2.1.5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

Para conocer la concentración final a la que se ha obtenido la proteína durante el proceso de producción a gran escala y posterior purificación, se ha aplicado la Reacción de Bradford. Pasos a seguir:

1. Realizar una dilución 1/10 de la muestra de proteína obtenida tras la purificación (volumen final 100 µl).

2. De la dilución 1/10 se obtienen tres volúmenes diferentes: 10, 15 y 20 µl. A cada uno de ellos, se le añade 1 ml de Reactivo de Bradford.

3. Medir por espectrometría las tres concentraciones a una $\lambda = 595$ nm y obtener sus absorbancias.

4. Para obtener la concentración (mg/ml) de las tres muestras, comparar las absorbancias obtenidas con las de un patrón de seroalbúmina bovina (BSA). Finalmente hacer una media de las tres para obtener la concentración final de las proteínas purificadas.

2.2. BIOENSAYO ESPECÍFICO PARA *Tuta absoluta*.

Para realizar los bioensayos se parte de: plantas de *Solanum lycopersicum* L. var. *valenciano*, huevos de 24 horas de edad de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) y la protoxina con la que se va a hacer el estudio.

2.2.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

En estos ensayos utilizamos plantas de tomate sanas (se debe evitar presencia de otros insectos plaga y de hongos), cultivadas en condiciones de invernadero a 25 °C y 60 % de humedad relativa. Además, se utilizaron insectos de la colonia de *T. absoluta*, que se mantiene, en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), a 25 °C, 60 % de humedad relativa y un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas.

DÍA 1: Se introducen plantas de tomate (~ 6-12 plantas según el tamaño) en las jaulas de mantenimiento de *T. absoluta* a primera hora de la mañana.

DÍA 2: Se recogen las plantas introducidas el día anterior en las jaulas. A continuación, con la ayuda de una lupa y un alfiler entomológico, se recogen uno a uno los huevos procurando que no se pinchen. Estos huevos se depositan en placas estériles que contienen agar al 2 %.

Se dejan madurar los huevos en condiciones de 16/8 horas luz/oscuridad a 25 °C durante 4 días.

DÍA 3: Pasados los 4 días se monta el bioensayo. Pasos a seguir:

1. Diseñar las concentraciones de protoxina respecto de la concentración original obtenida tras la purificación. Plantear el bioensayo en función de los huevos obtenidos el Día 2.

2. En 20 ml de una solución carbonato 50 mM a pH= 10.5 y Tritón X-100 al 0,2 %, se añade el volumen correspondiente de protoxina purificada con el fin de obtener cada una de las concentraciones diseñadas para el ensayo.

3. A continuación, se sumergen foliolos de tomate limpios (uno a uno), en las diferentes concentraciones de la protoxina y además también se mojan hojas en la solución de carbonato más Tritón X- 100 para obtener un control. Cada hoja se sumerge durante un minuto aproximadamente agitando suavemente en horizontal de forma manual para que se impregne bien cada hoja. Posteriormente, se dejan secar las hojas al aire.

4. Una vez secas las hojas, se introducen en placas con agar 2 % estériles, de manera que el envés este hacia arriba y el haz en contacto con el agar.

5. Después, depositar diez larvas de primer estadio encima de cada hoja o en su defecto, huevos muy maduros (a punto de eclosionar).

6. Mantener las placas del ensayo en una cámara con condiciones controladas, 16/8 horas de luz/oscuridad a 25°C durante tres días.

7. Pasados los tres días, se realiza la lectura del ensayo. Para ello, se procederá a contar el número de larvas vivas por placa y por concentración de toxina, así como otras características que se pudieran observar.

8. Finalmente, se realiza el análisis de resultados del bioensayo con la ayuda de los programas informáticos: MS Excel y Polo PC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE UN BIOENSAYO PARA *Tuta absoluta*.

Para poder ver el efecto que produce *B. thurigiensis* sobre insectos susceptibles, solo se puede medir cuantitativamente mediante bioensayo, bajo condiciones de laboratorio, o bien mediante diseños experimentales en parcelas de campo. En general, los bioensayos pueden perseguir tres tipos de objetivos diferentes:

a) Determinar el nivel de toxicidad de una cepa nueva o transformada, un producto formulado, o por cristales puros de alguna proteína específica (Davidson 1982).

b) Determinar la susceptibilidad o resistencia de diferentes razas o especies de insectos a una cepa determinada de *B. thurigiensis*.

c) Cuantificación de la actividad de los productos de fermentación de Bt, como método de estandarización de lotes comerciales.

Para el desarrollo del presente trabajo, el bioensayo diseñado se centra concretamente, en el primer objetivo, ya que se pretende determinar el nivel de toxicidad de ciertas proteínas insecticidas puras.

3.1.1. PUESTA A PUNTO DEL BIOENSAYO.

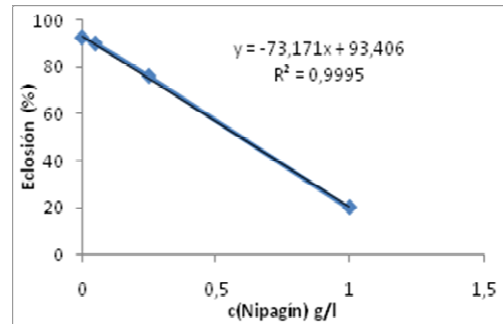
Inicialmente, el desarrollo del bioensayo partía de huevos de *Tuta absoluta* de 24 horas de edad, que se depositaban en placas de agar al 2% y nipagín 1g/L (antifúngico), en grupos de diez huevos. Cinco días después de aplicar el tratamiento (apartado 2.2.1 material y métodos), se procedió a la lectura, donde se pudo comprobar que un alto porcentaje de huevos no habían eclosionado y las hojas utilizadas para el ensayo contenían un alto grado de necrosis, lo que llevó a pensar que el Nipagín estaba actuando de manera nociva.

Para comprobar el efecto perjudicial de este compuesto sobre la eclosión de los huevos, se hizo un ensayo con diferentes concentraciones (en el agar) de este antifúngico: 1, 0.25, 0.05 y 0 g/L. Se pudo comprobar que, tan solo en la concentración más baja o en su

ausencia, era cuando se conseguía una viabilidad de los huevos igual o superior al 90%. Aun así, se pudo comprobar que la concentración de 0.05% no era capaz de hacer frente a la presencia de hongos en las placas con huevos (que se podían ver afectados por ellos).

c(Nipagin) (g/l)	% Eclosión	SD
0	92,5	5
0,05	90	10,69
0,25	76	20,74
1	20	14,14

Tabla 1: Porcentaje de Eclosión de Huevos frente a la Concentración de Nipagin



Gráfica 1: Representación gráfica de los datos de la Tabla 1.

Para confirmar estos resultados, se hizo un nuevo experimento utilizando larvas en lugar de huevos. Se impregnaron hojas de tomate en una solución de Nipagin y en ellas se depositaron 10 larvas de primer estadio. Al compararlo, con un control negativo, en ausencia de este antifúngico, se pudo confirmar que sí existía mayor mortalidad en presencia del nipagin, por lo que se decidió no seguir utilizando este compuesto en posteriores bioensayos.

Placa	Larvas	Vivas	% Mortalidad
Control 1	10	4	60
Control 2	10	8	20
Control 3	10	7	30
		Media	36,7
Nipagin 1	10	2	80
Nipagin 2	10	4	60
Nipagin 3	10	3	70
Nipagin 4	10	4	60
		Media	67,5

Tabla 2: Porcentaje de mortalidad medio de larvas de primer estadio para hojas no tratadas, frente a hojas tratadas con una solución de Nipagin 1g/L.

Una vez establecido este primer parámetro, se procedió a realizar bioensayos con nuestras toxinas de interés, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. Lo que se pretendía con estos primeros bioensayos, era delimitar la dosis necesaria de la misma en un rango de concentración que permitiera

calcular la concentración letal media (LC_{50}) de cada proteína insecticida. Esto se basa en el análisis estadístico Probit descrito en la ley de Weber-Fechner, que se define como: “el cambio en magnitud o intensidad de una respuesta biológica es proporcional no al cambio aritmético del estímulo, sino a su logaritmo”. De esta forma, la relación entre dosis y porcentaje de mortalidad se establece por una línea sigmoideal extendida; es decir, la selección de la curva correspondiente a las dosis máximas se extiende a la derecha, provocando que la curva se muestre asimétrica. A partir de esta información, las concentraciones seleccionadas, debían estar localizadas en la zona exponencial de la Figura 1 (Fase II), mientras que se descartaban las localizadas en la zona de saturación, por no dar información relevante.

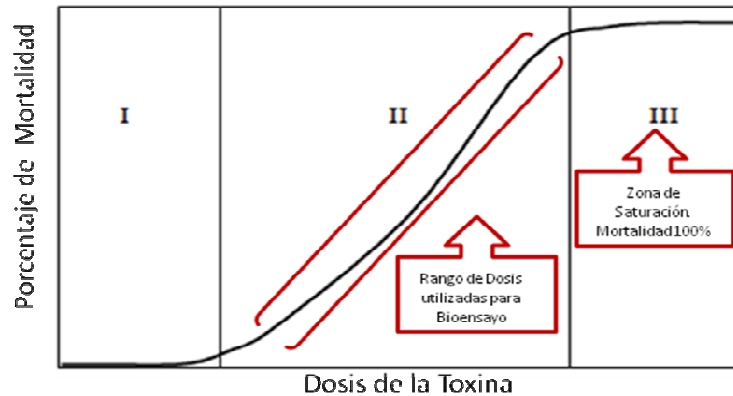
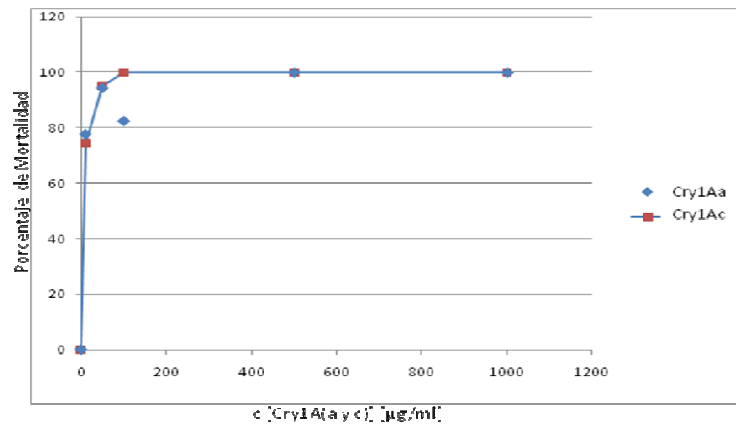


Figura 2: Representación gráfica de una curva sigmoideal general que relaciona el porcentaje de mortalidad frente a la dosis de la toxina establecida para un Bioensayo.

Un primer análisis se realizó con las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac. Se analizó el porcentaje de mortalidad que producían ambas protoxinas en un amplio rango de concentración (Tabla 3 y Gráfica 2). Con los resultados obtenidos, se estableció un máximo de concentración de toxina en 100 $\mu\text{g/ml}$.

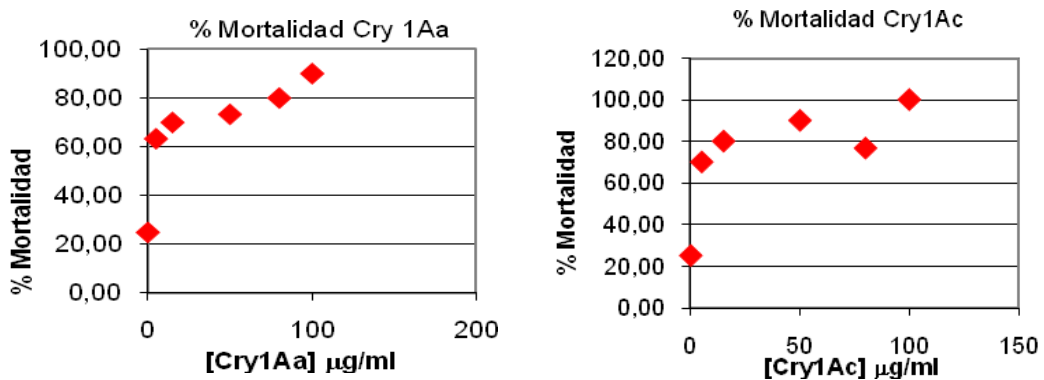
c (Proteínas)- [$\mu\text{g/ml}$]	% Mortalidad Cry 1Aa	SD Mortalidad Cry1Aa	% Mortalidad Cry1Ac	SD Mortalidad Cry1Ac
0	48,17	14,29	48,17	14,29
10	77,78	20,29	74,52	10,51
50	94,44	6,42	95,00	5,77
100	82,50	9,57	100,00	0
500	100,00	0,00	100,00	0
1000	100,00	0,00	100,00	0

Tabla 3:
Porcentaje de
Mortalidad de las
toxinas Cry1Aa y
Cry1Ac frente a
un amplio rango
de concentración
para cada toxina.



Gráfica 2: Representación gráfica que muestra el porcentaje de Mortalidad respecto a concentración de toxina (Cry1Aa y Cry1Ac), para establecer límites de toxicidad en bioensayos.

Una vez delimitada la concentración de toxina, se realizó un bioensayo para ambas toxinas utilizando un rango de concentración ascendente de las mismas: 0, 5, 15, 50, 80 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados (Gráficas 3 y 4) muestran que, a medida que la concentración de las proteínas Cry aumenta, ocurre lo mismo con el porcentaje de mortalidad, donde muestra una correlación entre porcentaje de mortalidad y concentración de toxina.



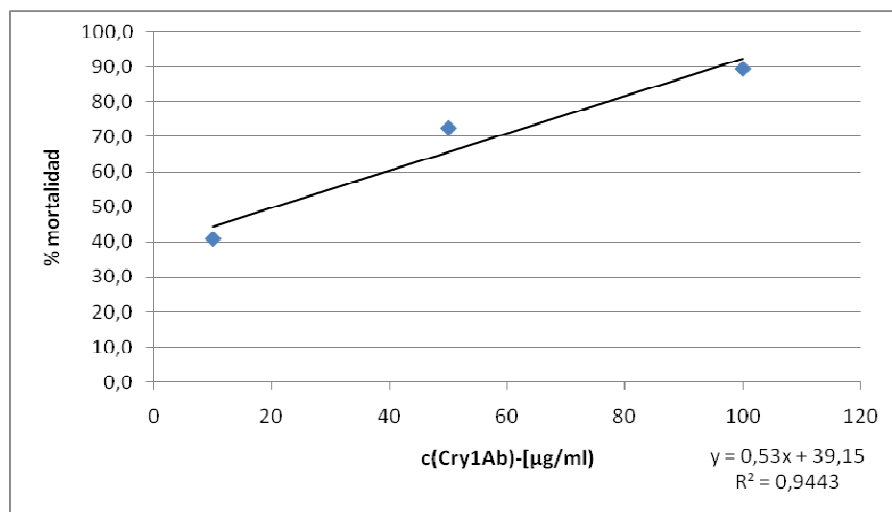
Gráficas 3 y 4: Representación gráfica del porcentaje de mortalidad respecto a toxina Cry1Aa y Cry1Ac, una vez establecido su límite máximo de concentración.

A continuación, se siguieron los pasos anteriores para una nueva protoxina, Cry1Ab. Los datos obtenidos (Tabla 3 y Gráfica 5), muestran una buena actividad de la toxina. Pese a que el porcentaje de mortalidad

en el control es excesivamente alto, este ensayo permitió descartar las concentraciones más altas.

c (Cry1Ab)- [µg/ml]	% mortalidad	SD del % Mortalidad
0	48,6	3,21
10	40,7	36,43
50	72,4	4,49
100	89,3	10
500	100,0	0
1000	100,0	0

Tabla 3: Porcentaje de mortalidad de *T. absoluta* frente a un amplio rango de concentración de protoxina Cry1Ab.

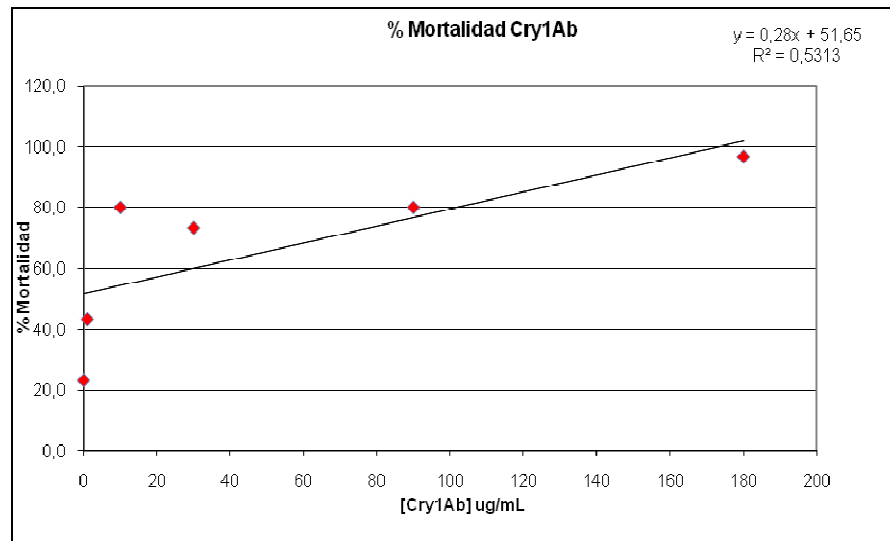


Gráfica 5: Representación gráfica de Cry1Ab para las concentraciones 10, 50 y 100 µg/ml.

A partir de este primer ensayo, se realizaron numerosos bioensayos con esta protoxina. Con este primer bioensayo se descartaron las concentraciones de 500 y 1000 µg/ml por dar un porcentaje de mortalidad del 100%. La siguiente concentración era de 100 µg/ml, que proporcionó un porcentaje de mortalidad del 89,3%. En base a este porcentaje, se quiso ajustar mejor la concentración superior para Cry1Ab. Se realizaron ensayos con dos concentraciones superiores diferentes, 150 y 180 µg/ml. Con la concentración de 150 µg/ml no se encontraron diferencias significativas respecto a 100 µg/ml, mientras que para 180 µg/ml se obtuvo un porcentaje de mortalidad mayor, de 96,7% (Tabla 4 y Gráfica 6).

c (proteínas) [µg/mL]	% Mortalidad Cry1Ab	SD del % Mortalidad
0	23,3	11,55
1	43,3	23,09
30	73,3	20,82
90	80,0	7,07
180	96,7	5,77

Tabla 4: Porcentaje de mortalidad frente a diferentes valores de concentración de toxina Cry1Ab.



Gráfica 6: Representación gráfica de los valores recopilados en la Tabla 4.

3.1.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PROBIT PARA Cry1Ab.

La regresión Probit consiste en un tipo particular de regresión lineal que se construye con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de tóxico) y una variable dependiente (la respuesta o mortalidad) para una especie y una exposición determinada. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma en unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual se puede interpolar el 50% de la respuesta y conocer qué concentración de tóxico causa esa respuesta (CL_{50}).

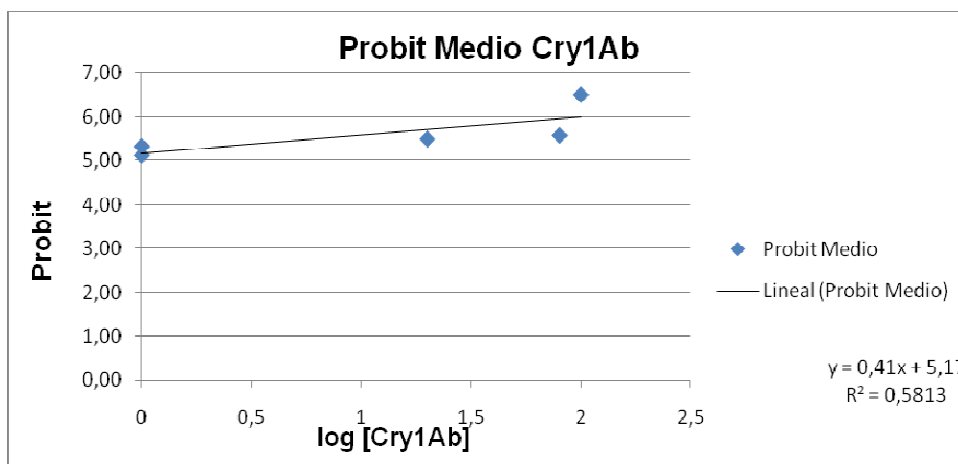
Para este estudio se seleccionaron tres bioensayos con un intervalo de concentración de protoxina diferente, para ver la respuesta de *T. absoluta* a la proteína tóxica de interés.

En un primer bioensayo, el límite de concentración de la toxina fue el más bajo de los tres, 100 µg/ml. Tras exponer durante 5 días a los huevos de *T. absoluta* a las diferentes concentraciones, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 5. El porcentaje de mortalidad para el control negativo fue muy elevado, 54,5%, que llevó a desconfiar del resto de los resultados obtenidos bajo los diferentes tratamientos de la toxina.

c (Cry1Ab)- [µg/ml]	% Mortalidad Medio	SD del % Mortalidad	log [Cry1Ab]	Probit Medio
0	54,5	11,0	-	-
1	62,0	14,9	0	5,32
20	67,5	18,9	1,30	5,49
80	71,1	9,4	1,90	5,57
100	83,2	11,4	2	6,50

Tabla 5: Relación de datos recopilados en el Bioensayo 1, tras 5 días de exposición de huevos de *T. absoluta* a diferentes concentraciones de la protoxina Cry1Ab.

Ya en la grafica 7, se pudo comprobar que no existía una buena correlación entre la dosis de la toxina, frente a la mortalidad obtenida ($R^2=0.5813$), por lo que, la $LC_{50}=0.38$ µg/ml obtenida no fue fiable en este estudio.



Grafica 7: Actividad insecticida de Cry1Ab sobre huevos de *T. absoluta* tras 5 días de exposición a diferentes concentraciones de la toxina (Tabla 5).

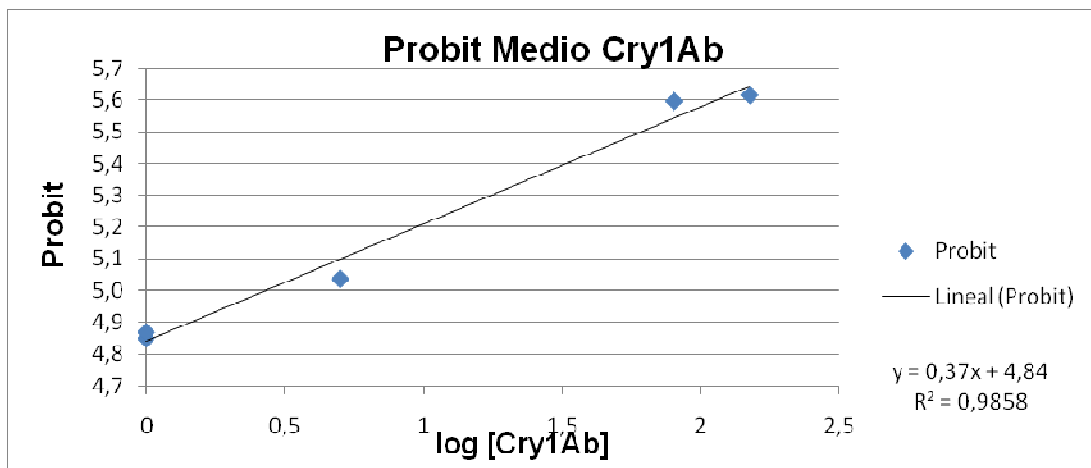
Para un segundo bioensayo, se aumentó la dosis máxima de la toxina a 150 µg/ml. Este ensayo se hizo bajo las mismas condiciones que en el bioensayo anterior. En este caso, se obtuvo una mortalidad menor en el control, que se debió posiblemente a un mejor estado de la muestra de

insectos, ya que no se añadió ningún cambio en el ensayo que pudiera afectar a esta variable.

c (Cry1Ab)- [µg/ml]	% Mortalidad Medio	SD del % Mortalidad	log [Cry1Ab]	Probit Medio
0	29.3	2,7	-	-
1	45.1	14,4	0	4,9
5	51.4	5,4	0,70	5,0
80	79.1	9,0	1,90	5,6
150	72.5	9,6	2,18	5,6

Tabla 6: Relación de datos recopilados en el Bioensayo 2, tras 5 días de exposición de huevos de *T. absoluta* a diferentes concentraciones de la protoxina Cry1Ab.

La gráfica 8, mostró que existía una buena correlación entre la dosis de la toxina, frente a la mortalidad obtenida ($R^2= 0.9858$), por lo que, la $LC_{50} = 2.72 \mu\text{g/ml}$ obtenida en este caso podría ser un dato aceptable.



Gráfica 8: Actividad insecticida de Cry1Ab sobre huevos de *T. absoluta* tras 5 días de exposición a diferentes concentraciones de la toxina (Tabla 6).

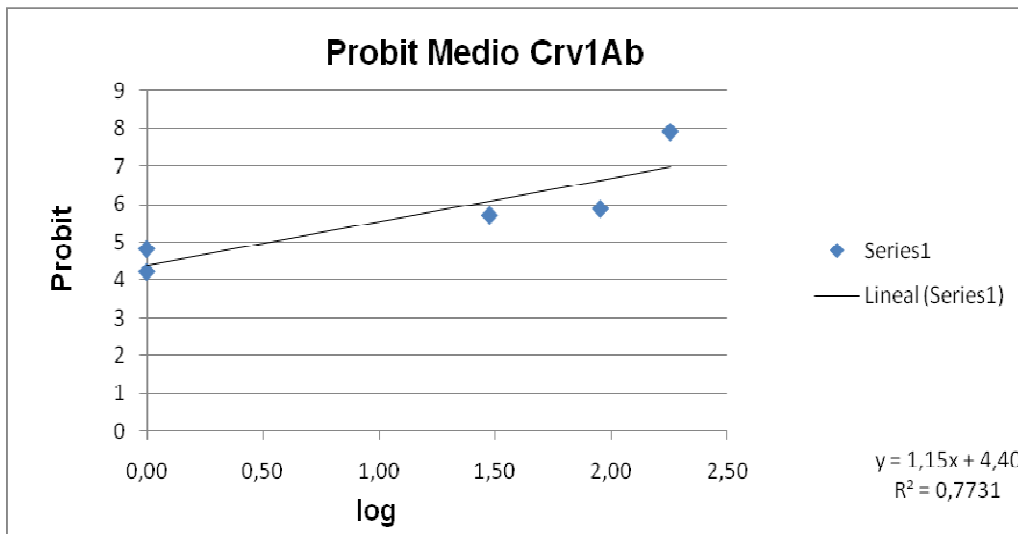
Finalmente, en un tercer bioensayo, se obtuvo, en el control negativo, la mortalidad mínima hasta ese momento. Esto se pudo ver influenciado al cambio que se realizó en el ensayo, ya que se parte de larvas de primer estadio en vez de huevos, como se ha descrito anteriormente. Además, para este bioensayo se usó la concentración máxima que se había fijado en ensayos anteriores. Por último, el tiempo de exposición a los diferentes tratamientos fue menor que en los dos casos anteriores, tres días, por ser larvas en vez de huevos, ya que estos últimos, necesitan un margen

mayor de tiempo para eclosionar e ingerir parte del material vegetal tratado con la toxina.

c (Cry1Ab)- [µg/ml]	% Mortalidad Medio	SD del % Mortalidad	log [Cry1Ab]	Probit Medio
0	23,33	11,55	-	-
1	43,33	23,09	0	4,82
30	73,33	20,82	1,48	5,71
90	75,00	7,07	1,95	5,88
180	96,67	5,77	2,26	7,91

Tabla 7: Relación de datos recopilados en el Bioensayo 3, tras 3 días de exposición de larvas de primer estadio de *T. absoluta* a diferentes concentraciones de la protoxina Cry1Ab.

En la gráfica 9, se vio que existía una correlación relativamente aceptable entre la dosis de la toxina y la mortalidad obtenida ($R^2 = 0.7731$), por lo que, la $LC_{50} = 3.32 \mu\text{g/ml}$ obtenida en este tercer bioensayo, podría ser un dato fiable.



Gráfica 9: Actividad insecticida de Cry1Ab sobre larvas de primer estadio de *T. absoluta* tras 5 días de exposición a diferentes concentraciones de la toxina (Tabla 7).

3.2. DISCUSIÓN.

Hasta ahora, *Tuta absoluta* se ha venido controlando por diferentes insecticidas químicos, principalmente en los países de Latinoamérica, de donde es originario este insecto minador. Por este motivo, no existen muchos trabajos donde a partir de bioensayos y bajo condiciones controladas (invernadero) se haya hecho frente a este insecto plaga.

Una de estas publicaciones fue realizada a partir de imidacloprid (Marcelo Dante Collavino 2006), insecticida neuroactivo desarrollado a partir de la nicotina. En este trabajo quisieron comprobar el efecto de este compuesto a partir de dos tratamientos realizados en la planta de tomate, riego e inmersión de raíz, y a dos concentraciones diferentes, 3.5% y 7%. El efecto que producía este producto lo analizaron en función del daño realizado a la planta (número de folíolos dañados por planta y lesiones encontradas en cada uno de ellos) por tuta. Comprobaron que este compuesto tenía efectos positivos de control a esta plaga, a la concentración de 3.5% mediante riego y al 7% mediante inmersión de raíz, aunque a medida que iba aumentando el tiempo (a partir de 41 días) desde que se aplicaba el tratamiento, disminuía la efectividad del mismo. Trabajos realizados con *B. thuringiensis* frente a *Tuta absoluta* son los descritos por L. Ramírez (2010) y C. Theoduloz (2003).

En el primero se realizan bioensayos (a partir de cinco métodos: 1. inmersión de folíolos, 2. aspersion foliar por aerógrafo, 3. frascos con folíolos de tomate con pecíolo sumergido, 4. medio de cultivo extracto de folíolos de tomate, 5. recipientes plásticos como unidades experimentales), mediante el uso de productos comerciales cuyo ingrediente activo procede de esporas y cristales de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, como son: Dipel®, XenTari® y Turilav®. Con este trabajo confirmaron que *T. absoluta* es susceptible frente a algunas de las proteínas insecticidas presentes en los bioinsecticidas utilizados, ya que el uso de estos a una concentración de 1,25 g/L causó una mortalidad de entre el 80- 100% en larvas de 2º estadio de *T. absoluta*, entre 2- 8 días después de la aplicación del bioinsecticida y por el uso de los métodos 1, 2 y 5.

Por último, en el trabajo publicado por C. Theoduloz en 2003, se identifican cepas bacterianas de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, capaces de infectar la superficie foliar de hojas de tomate. A estas cepas se las transformó con el gen *cry1Ab* procedente de una cepa nativa de *B. thuringiensis*. Mediante bioensayos, compararon la toxicidad que producían las proteínas recombinantes de ambas cepas transformadas, frente a la proteína obtenida a partir de la cepa nativa y observaron que la actividad insecticida era estadísticamente similar, por lo que la bacteria hospedadora no alteraba a la proteína recombinante. Esto les llevó a proponer que *B. subtilis* y *B. licheniformis*, buenos colonizadores de la superficie foliar, son capaces de llevar δ -endotoxinas que actúen como bioinsecticidas frente a *T. absoluta*. Además, presentaron este trabajo como una alternativa clara a la producción de plantas transgénicas.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo frente a lo descrito en los trabajos comentados anteriormente, han mostrado un punto de vista diferente, ya que para estos bioensayos se partió directamente de toxinas purificadas de *B. thuringiensis*. En antiguos trabajos se estableció que la supervivencia de un determinado insecto, en el control negativo, es un parámetro fundamental a tener en cuenta en el desarrollo de un bioensayo bajo condiciones controladas, ya que permite evaluar uno o varios factores de mortalidad sobre una especie concreta. Por tanto, si la mortalidad en el control negativo alcanza un nivel superior al 10% (límite fijado como aceptable), los resultados no pueden tenerse en cuenta (Beegle 1990). A partir de estos parámetros fijados y comparando los resultados obtenidos en los ensayos realizados para este trabajo, no se consiguió obtener estos índices tan bajos de mortalidad en el control, establecidos por Beegle. No se ha identificado la causa responsable de estos valores tan altos en el control, ya que se eliminó elementos tóxicos como el Nipagin y se redujo el porcentaje de Tritón X- 100 de los ensayos, tanto para huevos como para larvas de primer estadio de Tuta, utilizados en los mismos. Además, la aparición de hongos, que también se vio que afectaban la eclosión de los huevos de este insecto, se disminuyó mediante el uso del mechero de alcohol y manteniendo el menor tiempo

posible la placa de huevos abierta. Otros parámetros, como el agar y el carbonato usado en las soluciones del bioensayo, no fueron modificados ya que deberían ser productos inertes, que no tendrían por qué afectar a la viabilidad del insecto.

En cuanto a las toxinas utilizadas para este trabajo, muestran una toxicidad frente a este lepidóptero, lo que indica la presencia de receptores específicos para estas proteínas. Esto se ve gracias a un aumento de la mortalidad a medida que se incrementa la concentración de la toxina, obteniéndose un máximo de concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ para Cry1Aa y Cry1Ac (82,5% y 100% de mortalidad respectivamente) y de 180 $\mu\text{g/ml}$ para Cry1Ab (96,67% de mortalidad). Además para esta última toxina se hicieron tres bioensayos y con los resultados obtenidos se realizó el cálculo de la LC_{50} (concentración letal al 50%), donde dos de ellos presentaban un valor similar, en torno a los 3 $\mu\text{g/ml}$. Por tanto, los resultados obtenidos para Cry1Ab para este parámetro y comparando ambas concentraciones finales comentadas anteriormente, nos hace pensar que para las otras dos toxinas, Cry1Aa y Cry1Ac, se obtendrían unos valores parecidos.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos con estas toxinas en otros trabajos y para otras especies, se pueden apreciar diferencias. En bioensayos realizados con *Spodoptera exigua* (Hübner) de 48 horas de edad para las toxinas activadas Cry1Ab (3,75 $\mu\text{g/cm}^2$) y Cry1Ac (2,5 $\mu\text{g/cm}^2$), no consiguieron altos niveles de mortalidad, tan solo alcanzaron un 36% para Cry1Ab y 42% para Cry1Ac (Hernandez-Martínez y Escriche 2008). Por el contrario, en bioensayos realizados usando las toxinas activadas Cry1Aa y Cry1Ac (procedentes de proteínas recombinantes) frente a larvas de primer estadio de *Tecia solanivora* (Lepidoptera Gelechiidae), muestran un resultado totalmente diferente a los del trabajo anterior. Estas toxinas muestran una LC_{50} de 0,103 $\mu\text{g/cm}^2$ para Cry1Aa y de 0,107 $\mu\text{g/cm}^2$, que indica una alta susceptibilidad de este lepidóptero a ambas toxinas (Pitre Ruíz *et al.* 2008). Otro ejemplo que se encuentra en la literatura, es el trabajo realizado frente a *Trichoplusia ni* (Iracheta Cárdenas *et al.* 2001) a partir de diferentes bioensayos realizados con

larvas de primer estadio de esta especie y con distintas proteínas Cry activadas. De todas las que hacen referencia destacamos los resultados referentes a las toxinas utilizadas para el presente trabajo. Tanto Cry1Ab y Cry1Ac (procedentes de cepas de Ecogen y cepas de Plant Genetic Systems) resultaron ser altamente tóxicas, con valores de LC_{50} menores a 100 ng/cm^2 , mientras que para Cry1Aa existían diferencias muy significativas entre ambas cepas. La cepa de Ecogen resultó ser no tóxica mientras que la cepa de Plant Genetic Systems resultó 20 veces más tóxica para *T. ni* respecto a la cepa anterior.

Comparando los valores obtenidos para las tres toxinas en los trabajos comentados respecto a lo conseguido en este trabajo, parece indicar que, se conseguiría una mortalidad elevada para *T. absoluta* con unos valores de concentración intermedios, ya que como se ha visto, para especies *Tecia solanivora* y *Trichoplusia ni*, se ha conseguido un nivel alto de mortalidad a concentraciones mucho menores. Esto podría indicar, que estas toxinas tendrían una toxicidad intermedia frente a *T. absoluta*.

CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo podemos concluir que:

1. Para poder determinar la contribución individual de los componentes de los productos comerciales de *B. thuringiensis* a la toxicidad sobre *T. absoluta*, se han obtenido, en forma pura, tres de los más comunes (Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1Ab).

2. Se ha diseñado y puesto a punto un bioensayo para determinar la toxicidad de dichas toxinas sobre *T. absoluta*, aunque todavía sería deseable seguir optimizando el bioensayo para disminuir la mortalidad en los controles negativos.

3. Se ha demostrado que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1Ab tienen un efecto tóxico en larvas de primer estadio de *T. absoluta*.

4. Debido a la mortalidad elevada encontrada en el control negativo, no se han podido obtener valores totalmente fiables de LC_{50} , aunque los resultados sugieren que dicho valor está alrededor de 3 $\mu\text{g/ml}$ para Cry1Ab.

BIBLIOGRAFÍA.

Bibliografía

Referencias Bibliográficas:

- Bravo A. *et al.* (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423- 435.
- Bravo A. *et al.* (2009). Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 30: 589- 595.
- Caballero P.; Ferré J. (2001). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thurigiensis* en el Control de Plagas. Cap 2: 45 - 69.
- Caballero P.; Ferré J. (2001). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thurigiensis* en el Control de Plagas. Cap 3: 71- 86.
- Caballero P.; Ferré J. (2001). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thurigiensis* en el Control de Plagas. Cap 4: 87- 108.
- Caballero P.; Ferré J. (2001). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thurigiensis* en el Control de Plagas. Cap 6: 133 - 152.
- Dante Collavino M. y Giménez R. A. (2008). Efecto del Imidacloprid en el control de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick). *IDESIA* 26 (1): 65- 72.
- Desneux N. *et al.* (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J Pest Sci* (2010) 83:197- 215.
- Gilardón *et al.* (1998). Evaluación del nivel de resistencia de plantas de tomate a la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) mediante un bioensayo simple. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 103 (2):173- 176.

Bibliografía

- Giustolin T.A. *et al.* (2001). Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *J. Appl. Ent.* 125: 551- 556.
- González- Cabrera J. *et al.* (2010). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 56: 71- 80.
- Hernández- Martínez P. y Escriche B. (2008). Estudio de la actividad de cinco proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en una población española de *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas* 34: 45- 51.
- Iracheta M. *et al.* (2001). Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. CIENCIA UANL, VOL. IV, N°1.
- Lietti *et al.* (2005). Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 34 (1).
- Niedmann L. L. y Meza- Basso L. (2006). Evaluation of native strains of *Bacillus thuringiensis* as an alternative of integrated management of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) in Chile. *AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE)* 66(3): 235- 246.
- Pigott y Ellar (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 255- 281.
- Pitre L. (2008). Toxicidad de δ - endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera Gelechiidae). *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol X, N°2.
- Ramírez L. *et al.* (2010). Standardising a bioassay for the preliminary evaluation of three commercial *Bacillus thuringiensis*

Bibliografía

- formulations against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XII (1): 12- 21.
- Sauka D.H. y Benintende G.B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Revista Argentina de Microbiología 40: 124-140.
- Soberón M. *et al.* (2008). Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. Peptides 29: 324- 329.
- Soberón M. y Bravo A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Biotecnología V14 CS3.indd.
- Theoduloz C. *et al.* (2003). Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). Journal of Applied Microbiology 94: 375- 381.
- YEON HO JE *et al.* (2007). *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. J. Microbiol. Biotechnol. 17(4): 547- 559.

Referencias de Links:

Opennnatur SL, 2011: http://www.opennatur.com/es_tuta.html

Red de Información de *Tuta absoluta*: <http://www.tutaabsoluta.es/insectprofile.php>

Neil Crickmore, 2011: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/