

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Estrategias para la utilización de la bacteria
entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en el
control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ CRISTIAN VIDAL QUIST

Ingeniero Agrónomo

2010

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Estrategias para la utilización de la bacteria
entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en el
control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**

Memoria presentada por José Cristian Vidal Quist
Para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Vº Bº de los directores

Dr. Pedro Castañera Domínguez

Dr. Joel González Cabrera

Valencia, 2010

Agradecimientos

El trabajo que aquí se presenta ha sido desarrollado en la Unidad Asociada de Entomología IVIA-CIB, gracias a la concesión de una beca/contrato predoctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y a la financiación del proyecto de investigación CICYT-AGL2006 3346/AGR.

Ante todo, quiero agradecer muy sinceramente el apoyo recibido de mis dos directores de tesis, Pedro Castañera y Joel González. Pedro, gracias por haber hecho posible esta oportunidad de sumergirme en el campo de la entomología agrícola, en todo momento me has facilitado mucho las cosas y has sabido orientar cabalmente el curso de esta investigación (una tesis “de riesgo”, como hábilmente calificaste). Joel, agradezco profundamente tu forma de haber dirigido mi trabajo. Como tú bien me hiciste ver desde el primer momento, ha parecido más una colaboración que una dirección. Hemos trabajado codo con codo y compartido el día a día, has sido un sabio mentor y me has abierto los ojos al mundo de esta curiosa bacteria, *Bacillus thuringiensis*, que, sin que sepamos exactamente por qué, destina gran parte de sus recursos a producir proteínas que matan insectos. Bueno, nosotros también hemos destinado gran parte de nuestros recursos a producir este trabajo, valoro mucho tu implicación y espero que tú lo hayas vivido de una forma tan provechosa como yo mismo.

Agradezco también a los doctores Alberto Urbaneja, Félix Ortego y Salvador Herrero su excelente y altruista revisión de esta tesis. Vuestros comentarios han permitido enriquecer sustancialmente este documento.

Quiero expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que han participado directamente en esta tesis: Bea, Inma, Helga, Nacho, Vicky, Sandra, Marta, Francesc y Houda, que me han ayudado a nivel técnico en el IVIA; y Ángel, Nathalie, Bea, Marisa, Carolina y Lola que hicieron lo propio en el CIB. Agradezco también los consejos, el apoyo o simplemente la compañía que me han brindado todos los miembros de las instituciones vinculadas a este trabajo: la unidad de entomología del IVIA y el laboratorio de interacción planta-insecto del CIB, así como el laboratorio de Lucas Sánchez y los

servicios de proteómica y microscopía de dicho centro. Sin ánimo de pareceros un tanto escueto en agradecimientos “personalizados”, os considero, uno a uno, de un capital humano incalculable y espero que nuestros caminos se crucen a menudo en el futuro.

Por último, a mi familia y amigos, y en especial a Daph, por estar siempre en la primera línea...muchas gracias!

RESÚMENES

La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae), es considerada la principal plaga de la fruticultura a nivel mundial. Actualmente, la vigencia del control químico como medida prioritaria en el manejo de esta plaga está seriamente comprometida, tanto por restricciones legales (prohibición de materias activas) y sociales (tendencias de consumo) como por limitaciones intrínsecas del método (resistencias). Por ello, el desarrollo e implementación de métodos alternativos de control que sean respetuosos con el medio ambiente adquiere cada vez más importancia.

Los productos derivados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) llevan utilizándose con éxito en el control de insectos durante más de medio siglo. El poder insecticida de esta bacteria reside fundamentalmente en un grupo diverso de proteínas denominadas δ -endotoxinas. Existen más de 3000 insectos susceptibles a alguna de estas toxinas, además los productos Bt son altamente selectivos y respetuosos con el medio ambiente. No obstante, hasta el momento no se ha identificado ninguna δ -endotoxina altamente insecticida sobre *C. capitata* ni sobre otras moscas de la fruta (Tephritidae).

La presente tesis doctoral tiene por objeto la evaluación de *B. thuringiensis* y sus δ -endotoxinas como posibles agentes de control de *C. capitata*. Para ello, se ha realizado un análisis exhaustivo de la biodiversidad de *B. thuringiensis* en el agroecosistema cítrico, un hábitat en el que el insecto diana (*C. capitata*) y el entomopatógeno (*B. thuringiensis*) han coexistido de forma continuada. La aplicación de diversas técnicas (microscopía, electroforesis de proteínas, detección de genes de δ -endotoxinas) ha demostrado que este agroecosistema es un importante reservorio de *B. thuringiensis*, tanto por su abundancia como por su diversidad. Sin embargo, ninguno de los aislados de esta colección ni de otras colecciones (en total 905 cepas) muestra alta actividad insecticida sobre *C. capitata* cuando extractos crudos de su cultivo (esporas y cristales o sobrenadantes) son ensayados.

El mecanismo por el cual las δ -endotoxinas son tóxicas sobre las especies susceptibles es complejo y comprende varias etapas: en síntesis, los cristales de δ -endotoxinas tras ser ingeridos se solubilizan en el tracto intestinal dando lugar a protoxinas solubles que son procesadas proteolíticamente por los enzimas digestivos a toxinas activas que, tras atravesar la membrana peritrófica, interactúan con la membrana epitelial desencadenando

una serie de eventos que conducen a la muerte final del insecto. Limitaciones o alteraciones en cada una de estas etapas pueden explicar que una δ -endotoxina particular posea o no propiedades insecticidas sobre una determinada especie de insecto. En este sentido, como reacción a la aparente insensibilidad que muestra *C. capitata* hacia los cristales de δ -endotoxinas, se ha abordado el tratamiento *in vitro* de dichos cristales emulando algunos pasos del citado mecanismo de acción así como la evaluación de su actividad biológica sobre *C. capitata*. Así, la presolubilización de las protoxinas de una selección de 41 cepas de *B. thuringiensis* y una cepa de *Bacillus sphaericus* (Meyer y Neide) ha mostrado que para las cepas de una de las subespecies, subsp. *israelensis* (Bti), este tratamiento produce una ganancia de función biológica sobre las larvas de *C. capitata*. Es decir, al menos para esta subespecie, la falta de actividad de los cristales de δ -endotoxinas se debe a su insuficiente solubilización en el tracto intestinal, posiblemente debido a la baja alcalinidad del mismo. Adicionalmente, la predigestión de dichas protoxinas con una fuente exógena de proteasas (extractos de *Culex pipiens* L., especie susceptible a Bti de forma natural) produce un aumento significativo de su actividad insecticida (CL_{50} 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Esto sugiere que el procesamiento que sufren las protoxinas de Bti en el intestino de *C. capitata* tampoco es el adecuado para promover su acción citotóxica.

Bti produce una mezcla de 4 protoxinas mayoritarias: Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A. La utilización de una cepa recombinante que produce la protoxina Cyt1Aa individual ha demostrado que esta protoxina es el factor determinante de la actividad que exhibe Bti sobre *C. capitata*; siendo ésta la primera vez que se identifica una δ -endotoxina única que sea tóxica sobre esta especie. La actividad de Cyt1Aa es la más alta registrada en este estudio (CL_{50} 4.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), aunque solo cuando sus cristales son previamente solubilizados y únicamente sobre larvas (sobre adultos produce efectos subletales). Esta circunstancia restringe su uso potencial en el control de la plaga.

Las toxinas Cyt interactúan directamente con ciertos fosfolípidos de membrana, en cambio las toxinas Cry precisan de receptores específicos en el epitelio intestinal para resultar citotóxicas. Los resultados obtenidos con cepas nativas de *B. thuringiensis* sugieren que *C. capitata* carece de los receptores adecuados, al menos para las proteínas Cry ensayadas. Con objeto de salvar esta limitación, esta tesis propone un nuevo método

basado en el desarrollo de toxinas de fusión en las que la afinidad que de forma natural muestran las toxinas Cry hacia su receptor se sustituya por la fusión a las mismas de anticuerpos que se unan específicamente a proteínas de membrana de *C. capitata*. Como este método exigiría una intensa labor y supondría un elevado coste económico antes de poder confirmar su viabilidad, se ha puesto en práctica un sistema modelo para evaluar la estrategia propuesta. Los dos elementos clave del sistema modelo son: larvas transgénicas de *Drosophila melanogaster* (Meigen) que expresan GFP en el epitelio intestinal y proteínas de fusión entre diferentes secciones de la protoxina Cry1Ab y la región variable de un anticuerpo de cadena pesada específico contra GFP (V_{HH} anti-GFP). Se han desarrollado 4 variantes proteicas y se ha determinado el patrón de expresión de GFP en la línea de *D. melanogaster*; sin embargo, deficiencias en la unión de las toxinas de fusión a su antígeno (GFP) han impedido confirmar por el momento la validez de esta estrategia. Adicionalmente, y en previsión de la potencial aplicación de esta técnica a *C. capitata*, se ha efectuado una primera prospección de posibles proteínas de membrana candidatas para ser receptores de proteínas de fusión. Existen al menos 160 polipéptidos en la membrana en borde de cepillo del epitelio intestinal de adultos de *C. capitata* y de las 11 proteínas estudiadas se han identificado al menos 3, V-ATPasa subunidades A y B, y α -tubulina. La idoneidad de éstas u otras proteínas como candidatos para la nueva estrategia deberían evaluarse en futuros estudios.

Como conclusión, este trabajo ha identificado una δ -endotoxina de *B. thuringiensis*, Cyt1Aa, activa contra *C. capitata*, aunque es necesario valorar su potencial aplicación en el control de esta plaga. Por otro lado, se ha elaborado y caracterizado exhaustivamente una colección de cepas de *B. thuringiensis* que, si bien muestran poca o ninguna actividad contra la especie diana, poseen un elevado potencial en el control de otras plagas. Por último, a pesar de que la estrategia todavía no ha sido validada, se ha abierto una nueva vía en el desarrollo de toxinas recombinantes para el control de *C. capitata* u otras plagas de importancia agrícola.

La mosca mediterrània de la fruita, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae), és considerada la principal plaga dels cultius fruiters a nivell mundial. Actualment, la vigència del control químic com mesura prioritària en el maneig d'aquesta plaga està seriosament compromesa, tant per restriccions legals (prohibició de matèries actives) i socials (tendències de consum) com per limitacions intrínseques del mètode (resistències). Per tant, el desenvolupament i implementació de mètodes alternatius de control que siguin respectuosos amb el medi ambient és cada vegada més important.

Els productes derivats de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt) han sigut utilitzats amb èxit en el control de plagues durant més de mig segle. El poder insecticida d'aquest bacteri resideix fonamentalment en un grup divers de proteïnes denominades δ -endotoxines. Existeixen més de 3000 insectes susceptibles a alguna d'aquestes toxines, a més els productes Bt són altament selectius i respectuosos amb el medi ambient. No obstant això, fins al moment no s'ha identificat cap δ -endotoxina altament insecticida sobre *C. capitata* ni sobre altres mosques de la fruita (Tephritidae).

La present tesi doctoral té per objecte l'avaluació de *B. thuringiensis* i les seues δ -endotoxines com possibles agents de control de *C. capitata*. Per a això, s'ha realitzat una anàlisi exhaustiva de la biodiversitat de *B. thuringiensis* en l'agroecosistema dels cítrics, un hàbitat en el qual l'insecte diana (*C. capitata*) i l'entomopatogen (*B. thuringiensis*) han coexistit de forma continuada. L'aplicació de diverses tècniques (microscopia, electroforesi de proteïnes, detecció de gens de δ -endotoxines) ha demostrat que aquest agroecosistema és un important reservori de *B. thuringiensis*, tant per la seua abundància com per la seua diversitat. No obstant això, cap dels aïllats d'aquesta col·lecció ni d'altres col·leccions (en total 905 soques) mostra una alta activitat insecticida sobre *C. capitata* quan extractes crus del seu cultiu (espores i cristalls o sobrenadant) són assajats.

El mecanisme pel qual les δ -endotoxines són tòxiques sobre les espècies susceptibles és complex i comprèn diverses etapes: en síntesi, els cristalls de δ -endotoxines són ingerits i es solubilitzen en el tracte intestinal donant lloc a protoxines solubles que són processades proteolíticament pels enzims digestius a toxines actives que, després de travessar la membrana peritròfica, interactuen amb la membrana epitelial desencadenant

una sèrie d'esdeveniments que condueixen a la mort de l'insecte. Limitacions o alteracions en cadascuna d'aquestes etapes poden explicar que una δ -endotoxina particular tinga o no propietats insecticides sobre una determinada espècie d'insecte. En aquest sentit, com reacció a l'aparent insensibilitat que mostra *C. capitata* cap als cristalls de δ -endotoxines, s'ha abordat el tractament *in vitro* d'aquests cristalls emulant alguns passos del citat mecanisme d'acció així com l'avaluació de la seua activitat biològica sobre *C. capitata*. Així, la pressolubilització de les protoxines d'una selecció de 41 soques de *B. thuringiensis* i una soca de *Bacillus sphaericus* (Meyer i Neide) ha mostrat que per a les soques d'una de les subespècies, subsp. *israelensis* (Bti), aquest tractament produeix un guany de funció biològica sobre les larves de *C. capitata*. És a dir, almenys per a aquesta subespècie, la falta d'activitat dels cristalls de δ -endotoxines es deu a la insuficient solubilització en el tracte intestinal, possiblement a causa de la baixa alcalinitat d'aquest. Addicionalment, la predigestió d'aquestes protoxines amb una font exògena de proteases (extractes de *Culex pipiens* L., espècie susceptible a Bti de forma natural) produeix un augment significatiu de la seua activitat insecticida (CL_{50} 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Aquest fet suggereix que el processament que pateixen les protoxines de Bti a l'intestí de *C. capitata* tampoc és l'adequat per a promoure la seua acció citotòxica.

Bti produeix una barreja de 4 protoxines majoritàries: Cry4A, Cry4B, Cry11A i Cyt1A. La utilització d'una soca recombinant que produeix la protoxina Cyt1Aa individual ha demostrat que aquesta protoxina és el factor determinant de l'activitat que exhibeix Bti sobre *C. capitata*. A més, aquesta és la primera vegada en la qual s'identifica una δ -endotoxina única que siga tòxica sobre aquesta espècie. L'activitat de Cyt1Aa és la més alta registrada en aquest estudi (CL_{50} 4.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), encara que tan sols quan els seus cristalls són prèviament solubilitzats i únicament sobre larves (sobre adults produeix efectes subletals). Aquesta circumstància restringeix el seu ús potencial en el control de la plaga.

Les toxines Cyt interactuen directament amb certs fosfolípids de membrana, en canvi les toxines Cry precisen de receptors específics a l'epiteli intestinal per a resultar citotòxiques. Els resultats obtinguts amb soques nadiues de *B. thuringiensis* suggereixen que *C. capitata* manca dels receptors adequats, almenys per a les proteïnes Cry assajades. A fi de salvar aquesta limitació, aquesta tesi proposa un nou mètode basat en el

desenvolupament de toxines de fusió per a les quals l'afinitat que de forma natural mostren les toxines Cry cap al seu receptor és substituïda per la fusió a les mateixes d'anticossos amb capacitat d'unió específica a proteïnes de membrana de *C.capitata*. Com aquest mètode exigiria una intensa labor i suposaria un elevat cost econòmic abans de poder confirmar la seua viabilitat, s'ha posat en pràctica un sistema model per a avaluar l'estratègia proposada. Els dos elements clau del sistema model són: larves transgèniques de *Drosophila melanogaster* (Meigen) que expressen GFP a l'epiteli intestinal i proteïnes de fusió entre diferents seccions de la protoxina Cry1Ab i la regió variable d'un anticòs de cadena pesada específic contra GFP (V_{HH} anti-GFP). S'han desenvolupat 4 variants proteïques i s'ha determinat el patró d'expressió de GFP en la línia de *D. melanogaster*; no obstant això, deficiències en la unió de les toxines de fusió al seu antigen (GFP) han impedit confirmar de moment la validesa d'aquesta estratègia. Addicionalment, i en previsió de la potencial aplicació d'aquesta tècnica a *C.capitata*, s'ha efectuat una primera prospecció de possibles proteïnes de membrana candidates per a ser receptors de proteïnes de fusió. Existeixen almenys 160 polipèptids en la membrana “en vora de raspall” de l'epiteli intestinal d'adults de *C. capitata* i de les 11 proteïnes estudiades s'han identificat almenys 3, V-ATPasa / subunitats A i B, i α -tubulina. La idoneïtat d'aquestes o altres proteïnes com candidates per a la nova estratègia hauria de ser avaluada en futurs estudis.

Com a conclusió, aquest treball ha identificat una δ -endotoxina de *B. thuringiensis*, Cyt1Aa, activa contra *C. capitata*, encara que és necessari valorar la seua potencial aplicació en el control d'aquesta plaga. D'altra banda, s'ha elaborat i caracteritzat exhaustivament una col·lecció de soques de *B. thuringiensis* que, si bé mostren poca o cap activitat contra l'espècie diana, posseeixen un elevat potencial en el control d'altres plagues. Finalment, malgrat que l'estratègia encara no ha estat validada, s'ha obert una nova via en el desenvolupament de toxines recombinants per al control de *C. capitata* o altres plagues d'importància agrícola.

Summary

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae), is considered the world's most important fruit pest. Currently, the suitability of chemical control as the main tool to manage this pest is seriously threatened, for legal (prohibition of active materials), social (consumption trends) restrictions and also for intrinsic method limitations (resistance). Therefore, development and implementation of environmental friendly alternative methods is more and more important.

Bacillus thuringiensis (Berliner) (Bt) products have been successfully used in insect control for more than 50 years. The insecticidal activity of this bacterium primary lies on a diverse group of toxins known as δ -endotoxins. More than 3000 insect species have been found to be susceptible to at least one of these toxins. Moreover, Bt-products are highly selective and environmentally safe. Nevertheless, for the moment, no δ -endotoxin has been identified with high insecticidal activity towards *C. capitata* or other fruit flies (Tephritidae).

The goal of this doctoral thesis is the evaluation of *B. thuringiensis* and its toxins as potential *C. capitata* control agents. To that end, an exhaustive biodiversity analysis has been conducted on the citrus agro-ecosystem, a habitat in which the target insect (*C. capitata*) and the entomopathogen (*B. thuringiensis*) have coexisted for a long period. The application of different techniques (microscopy, protein electrophoresis, δ -endotoxin gene detection) has shown that this agro-ecosystem is an important *B. thuringiensis* reservoir, regarding both abundance and diversity. However, none of the strains from this and other collections (905 strains in total) showed high insecticidal activity towards *C. capitata* when culture crude extracts (spores and crystals or supernatants) were assayed.

The mode of action of δ -endotoxins is complex and includes several steps: in summary, after ingestion, δ -endotoxin crystals are solubilized in the insects's midgut to release soluble protoxins that are proteolytically processed by digestive enzymes to produce active toxins that, after crossing the peritrophic membrane, interact with the epithelial membrane triggering a series of events that finally cause insect death. Limitations or alterations of any of these steps may explain that a particular δ -endotoxin is or is not toxic to a certain insect species. Accordingly, as a reaction to the lack of sensitivity of *C. capitata* towards δ -endotoxin crystals, *in vitro* treatment of these crystals has been

Summary

performed emulating some steps of the mode of action mentioned above, as well as the evaluation of their insecticidal activity against *C. capitata*. Thus, presolubilization of the protoxins from 41 selected *B. thuringiensis* strains and one *Bacillus sphaericus* (Meyer and Neide) strain has shown that, only for the strains belonging to the subspecies *israelensis* (Bti), this treatment causes a gain of biological function over *C. capitata* larvae. Namely, at least for this subspecies, lack of activity of δ -endotoxins crystals is dependent on an insufficient solubilization in the insect's gut, probably due to its slight alkalinity. Additionally, predigestion of Bti protoxins with an exogenous protease source (*Culex pipiens* L. extracts, a species that is naturally susceptible to Bti) causes a significant increase of its insecticidal activity (LC_{50} 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). This fact suggests that the processing of Bti protoxins in *C. capitata* midgut is not appropriate to promote their cytotoxic action.

Bti produces a mixture of 4 major protoxins: Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A. The use of a recombinant strain only producing Cyt1Aa has shown that this protoxin is the determinant factor of Bti's activity towards *C. capitata*. This study identifies, for the first time, a single δ -endotoxin that is toxic against this insect species. Cyt1Aa showed the highest activity reported in this study (LC_{50} 4.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), although only when their crystals are previously solubilized and exclusively against larvae (it causes sublethal effects on adults). To a certain extent, this issue restricts the potential use of this protein to control this pest.

Cyt toxins directly interact with certain membrane phospholipids; Cry toxins however, need specific receptors in the gut epithelium to be toxic. The results with native *B. thuringiensis* strains suggest that *C. capitata* lacks the appropriate receptors, at least for the array of Cry toxins that has been assayed. To overcome this limitation, this thesis proposes a new method based on the development of fusion proteins for which the conjugation to antibodies specifically raised against *C. capitata* membrane proteins emulates the affinity that Cry toxins show to their natural receptors. This method would require an intensive work and an important economic expense before confirming its viability; as a result, a model system has been put into practice to evaluate the strategy. The key elements of this model system are: *Drosophila melanogaster* (Meigen) transgenic larvae that express GFP in the gut epithelium and fusion proteins that

Summary

conjugate different sections of Cry1Ab protoxin and the variable region of a heavy chain antibody specific to GFP (V_{HH} anti-GFP). Four protein variants have been developed and GFP expression pattern has been determined in the *D. melanogaster* genetic line. However, deficiencies in binding of the fusion proteins to their antigen (GFP) have prevented, for the moment, the confirmation of this strategy. Additionally, regarding the potential application of this technique to *C. capitata*, an initial prospection has been conducted to detect membrane proteins that could be candidates for receptors of future fusion proteins. At least 160 different polypeptides have been found in the brush border membrane from the gut epithelium of *C. capitata* adults; and, after studying 11 proteins, at least 3 have been identified: V-ATPase subunits A and B, and α -tubuline. Future studies should address the suitability of this or other proteins as candidates for the new strategy.

In summary, this work has identified a single *B. thuringiensis* δ -endotoxin, Cyt1Aa, which is active towards *C. capitata*, although it is necessary to assess its potential to control this pest. Additionally, a *B. thuringiensis* strain collection has been developed and characterized and, although it does not show sufficient activity to the target insect, it has a great potential to control other pests. Finally, even if confirmation is still necessary, a new method has been set for developing of recombinant toxins to control *C. capitata* or any other important pest.

×g	fuerza relativa de centrifugación, del inglés <i>Relative Centrifugal Force</i> (RCF)
aa	aminoácido
AC	adenilato ciclasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALP	fosfatasa alcalina
AMP	adenosín monofosfato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
APN	aminopeptidasa N
ATP	adenosín trifosfato
BAPNa	N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida
BBMV	vesícula de membrana en borde de cepillo (del inglés <i>Brush Border Membrane Vesicle</i>)
Bs	<i>Bacillus sphaericus</i>
BSA	albúmina de suero bovino
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
Btjeg	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
Btmed	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>
Btt	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> var. <i>tenebrionis</i>
CAPS	ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico
Cbm	<i>Clostridium bif fermentans</i> serovar <i>malaysia</i>
CCY	medio de cultivo, del inglés <i>Casein Casein Yeast</i>
CHAPS	detergente 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfonato
CL ₅₀	Concentración Letal 50
Cry	proteína formadora de cristal (del inglés <i>Crystal protein</i>)
Cyt	proteína citolítica (del inglés <i>Cytolytic protein</i>)
DDVP	fosfato de 2,2-diclorovinildimetilo (diclorvos)
DNA _{sa} I	desoxirribonucleasa I
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO _{xnm}	Densidad Óptica a "x" nm
DTT	DL-ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los EEUU
GFP	proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPI	glicofosfatidil inositol
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
kDa	kilo Dalton
LTE	tampón, del inglés <i>Low Tris EDTA</i>
Mb	Mega bases
MP	membrana peritrófica
MS-MS	Método de fragmentación de péptidos en espectrometría de masas

OGM	Organismo Genéticamente Modificado
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PBST	tampón fosfato salino suplementado con Tween-20
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Electroforesis de Campo Pulsado
pI	punto isoeléctrico
PKA	proteína quinasa A
PMF	huella peptídica (del inglés <i>Peptide Mass Fingerprint</i>)
RAPD	Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (del inglés <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (del inglés <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNasaA	ribonucleasa A
rpm	revoluciones por minuto
SDS	sodio dodecilo sulfato
SDS-PAGE	electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TA	temperatura ambiente
TB	Medio de cultivo <i>Terrific Broth</i>
TIE	Técnica del Insecto Estéril
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidad de actividad de una polimerasa de ADN
UA	Unidad de Absorbancia
UT	Unidad Tróptica
UV	luz ultravioleta

ÍNDICES

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae)	3
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	4
1.1.2 Origen y distribución geográfica.....	4
1.1.3 Descripción.....	5
1.1.4 Ciclo biológico y ecología	6
1.1.5 Fisiología digestiva.....	7
1.1.6 Daños e importancia económica	8
1.1.7 Métodos de control	9
1.1.7.1 Control químico	9
1.1.7.2 Medidas culturales	10
1.1.7.3 Trampeo masivo.....	10
1.1.7.4 Control autocida.....	11
1.1.7.5 Quimioesterilización	11
1.1.7.6 Control biológico	12
1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	15
1.2.1 Aspectos generales.....	15
1.2.1.1 Taxonomía y ecología.....	16
1.2.1.2 Biología.....	18
1.2.1.3 Factores tóxicos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
1.2.1.3.1 Las δ -endotoxinas.....	21
1.2.1.3.2 Otros factores de virulencia.....	27
1.2.1.4 Aplicaciones biotecnológicas.....	28
1.2.2 Modo de acción de las δ -endotoxinas	31
1.2.2.1 Modo de acción de las toxinas Cry	31
1.2.2.1.1 Primera fase.....	32
1.2.2.1.2 Segunda fase.....	34
1.2.2.2 Modo de acción de las toxinas Cyt.....	40
1.2.3 <i>Bacillus</i> sp. en el control de dípteros	41
1.2.3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	41
1.2.3.2 Otras cepas y especies mosquitocidas	42
1.2.3.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> y moscas de la fruta (Tephritidae).....	43
2. OBJETIVOS	45
3. Prospección de la biodiversidad natural de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de <i>Ceratitis capitata</i>.....	49
3.1 Introducción.....	51
3.2 Material y métodos	53
3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	53
3.2.2 Muestreo, aislamiento y conservación de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	54
3.2.3 Preparación de extractos de <i>Bacillus thuringiensis</i> para bioensayos	55
3.2.4 Caracterización de los cristales paraesporales	55
3.2.5 Electroforesis de proteínas.....	56
3.2.6 Identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i>	56
3.2.6.1 Diseño de cebadores.....	56
3.2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
3.2.7 Bioensayos sobre <i>Ceratitis capitata</i>	59
3.2.7.1 Bioensayos sobre adultos	60
3.2.7.2 Bioensayos sobre larvas	61

3.3 Resultados.....	62
3.3.1 Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> del agroecosistema cítrico.....	62
3.3.2 Caracterización molecular.....	63
3.3.2.1 Electroforesis de proteínas.....	64
3.3.2.2 Genes <i>cry</i> y <i>cyt</i>	65
3.3.3 Integración de los parámetros de caracterización.....	68
3.3.4 Bioensayos sobre <i>Ceratitidis capitata</i>	69
3.3.4.1 Bioensayos sobre adultos.....	69
3.3.4.2 Bioensayos sobre larvas.....	71
3.4 Discusión.....	71
4. Efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Ceratitidis capitata</i>.....	79
4.1 Introducción.....	81
4.2 Material y métodos.....	82
4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	82
4.2.2 Purificación y solubilización de protoxinas de <i>Bacillus</i> sp.	84
4.2.3 Procesamiento proteolítico de las δ -endotoxinas.....	85
4.2.3.1 Obtención de extractos intestinales de insectos.....	85
4.2.3.2 Determinación de la actividad enzimática.....	85
4.2.3.3 Incubación de las δ -endotoxinas.....	86
4.2.4 Electroforesis de proteínas y densitometría.....	86
4.2.5 Bioensayos sobre <i>Ceratitidis capitata</i>	86
4.2.5.1 Bioensayos sobre larvas.....	86
4.2.5.2 Bioensayos sobre adultos.....	88
4.2.6 Análisis de datos.....	89
4.3 Resultados.....	90
4.3.1 Efecto de la presolubilización de cristales de <i>Bacillus</i> sp. sobre <i>Ceratitidis capitata</i>	90
4.3.2 Efecto de la digestión de las δ -endotoxinas sobre <i>Ceratitidis capitata</i>	94
4.3.2.1 Activación de las protoxinas según la fuente de proteasas.....	94
4.3.2.2 Actividad de las δ -endotoxinas predigeridas con jugos digestivos de insectos.....	96
4.3.2.2.1 Actividad sobre larvas.....	96
4.3.2.2.2 Actividad sobre adultos.....	98
4.3.3 Actividad de las toxinas Cyt de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> sobre <i>Ceratitidis capitata</i>	99
4.3.3.1 Efecto de la presolubilización de cristales Cyt1Aa.....	99
4.3.3.1.1 Actividad sobre larvas.....	100
4.3.3.1.2 Actividad sobre adultos.....	103
4.3.3.2 Efecto de la predigestión de Cyt1Aa con jugos digestivos de insectos.....	104
4.4 Discusión.....	105
5. Bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas.....	111
5.1 Introducción.....	113
5.2 Material y métodos.....	117
5.2.1 Caracterización del proteoma intestinal de adultos de <i>Ceratitidis capitata</i>	117
5.2.1.1 Obtención de vesículas de membrana en borde de cepillo (BBMV) ..	117

5.2.1.2 Electroforesis de proteínas	117
5.2.1.2.1 Electroforesis 1D	117
5.2.1.2.1 Electroforesis 2D	118
5.2.1.3 Identificación de polipéptidos	119
5.2.1.3.1 Análisis de huella peptídica y fragmentación	119
5.2.1.3.2 Bases de datos	119
5.2.2 Líneas genéticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	120
5.2.2.1 Líneas UAS/GAL4	120
5.2.2.2 Cría	120
5.2.2.3 Cruces	121
5.2.2.4 Caracterización de la expresión de GFP	122
5.2.3 Producción y análisis de proteínas recombinantes	123
5.2.3.1 Diseño de genes recombinantes y clonación	123
5.2.3.2 Expresión de toxinas	126
5.2.3.2.1 Condiciones de cultivo	126
5.2.3.2.1 Purificación de cuerpos de inclusión, solubilización y renaturalización	126
5.2.3.3 Electroforesis y Western-Blot	129
5.2.3.4 Procesamiento proteolítico	130
5.2.4 Ensayos de unión de toxinas recombinantes	130
5.2.4.1 Unión de GFP a proteínas recombinantes	130
5.2.4.2 Unión de proteínas recombinantes a BBMV's de <i>Drosophila melanogaster</i>	131
5.2.5 Bioensayos con toxinas recombinantes	132
5.2.5.1 Bioensayos sobre <i>Drosophila melanogaster</i>	132
5.2.5.2 Bioensayos sobre <i>Sesamia nonagrioides</i>	132
5.2.6 Análisis de datos	133
5.3 Resultados	134
5.3.1 Caracterización del proteoma intestinal de <i>Ceratitidis capitata</i>	134
5.3.2 Caracterización del patrón de expresión de GFP en <i>Drosophila melanogaster</i>	141
5.3.3 Producción de toxinas recombinantes	143
5.3.4 Bioensayos con toxinas recombinantes	150
5.3.4.1 Bioensayos sobre <i>Drosophila melanogaster</i>	150
5.3.4.1 Bioensayos sobre <i>Sesamia nonagrioides</i>	150
5.3.5 Propiedades de unión de toxinas recombinantes	151
5.3.6 Procesamiento proteolítico de la proteína α -gfp-Cry1Ab_28	154
5.4 Discusión	156
6. DISCUSIÓN GENERAL	161
7. CONCLUSIONES	169
8. BIBLIOGRAFÍA	175
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	207

1	Introducción	1
1.1	Mapa de distribución mundial de <i>C. capitata</i> .	4
1.2	Estado adulto de <i>Ceratitis capitata</i> .	6
1.3	Cultivo de <i>B. thuringiensis</i> . V) célula en crecimiento vegetativo; En) endospora; Ex) exospora; C) cristal paraesporal.	18
1.4	Micrografías electrónicas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i> (Wasano et al., 2000) (A), subsp. <i>sumiyoshiensis</i> (Wasano et al., 2000) (B), subsp. <i>morrisoni</i> (Baum y Malvar, 1995) (C) y una cepa de serotipo no identificado (de Maagd et al., 2001) (D).	19
1.5	Cristales paraesporales con diferentes morfologías: bipiramidal (A) (Imagen original: Y. Bel, Universidad de Valencia), cúbico y esporas (B) (Ito et al., 2006b), redondeado y esporas (C) (Saitoh et al., 1998), irregular y esporas (D) (Kaelin et al., 1994), poliédrico (E y F) (Itoua-Apoyolo et al., 1995). La flecha de la figura F indica la membrana envolvente del cristal.	20
1.6	Dendrograma de las δ -endotoxinas Cry (arriba, actualizado el 28.11.08) y Cyt (abajo, actualizado el 13.12.01).	23
1.7	Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. (a) Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry, posición de los cinco bloques conservados (si están presentes) y correspondencia con los dominios I, II y III. (b) Estructura tridimensional de la toxina activada Cry1Aa, donde se muestran los 3 dominios que la componen: I (azul), II (verde), III (amarillo-rojo) (de Maagd et al., 2001).	24
1.8	Estructura terciaria de la toxina Cyt2Ba.	26
1.9	Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry y sitio de corte por proteasas.	32
1.10	Esquema de 2 modelos de acción de las toxinas Cry: A. Modelo de formación de poro (arriba) y B. Modelo de transducción de la señal (abajo).	38
1.11	Esquema del modelo de acción de Cry1Ac sobre <i>Heliothis virescens</i> (Jurat-Fuentes y Adang, 2006).	39
1.12	Funcionamiento de Cyt1Aa como receptor de membrana de Cry11Aa (Soberón et al., 2007a)	41
1.13	Esporangio de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (izquierda) y cuerpo paraesporal con inclusiones individuales correspondientes a cada toxina de esta subespecie (derecha).	42
3	Prospección de la biodiversidad natural de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de <i>Ceratitis capitata</i>	49
3.1	Metodología para la detección de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en grandes colecciones de <i>B. thuringiensis</i> .	57
3.2	Placas de bioensayo de adultos de <i>C. capitata</i>	60
3.3	Microscopía de contraste de fase de cultivos esporulados de 8 aislados de <i>B. thuringiensis</i> mostrando diferentes morfologías de los cristales paraesporales. A: bipiramidal; B: redondeado; C: pequeño; D: Irregular; E,F,G,H: cristales adheridos a la espora. Barra = 5 μ m.	63

3.4	Perfiles SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales de cepas de <i>B. thuringiensis</i> que contienen al menos uno de los genes <i>cry</i> o <i>cyt</i> analizados en este estudio (en total 267 aislados).	65
3.5	Composición de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i> en las cepas de la colección IVIA (376 aislados), identificada mediante análisis PCR.	66
3.6	Perfiles SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales de algunas de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> que no contienen ninguno de los genes <i>cry</i> o <i>cyt</i> analizados en este estudio.	69
3.7	Porcentaje de aislados de <i>B. thuringiensis</i> que producen diferentes niveles de mortalidad (0, 10, 20, 30%) sobre adultos de <i>C. capitata</i> en 3 colecciones de cepas. Colección IVIA (376 cepas), Colección Universidad de Valencia (509), cepas de referencia (18). E+C: esporas y cristales. S: sobrenadantes.	70
3.8	Mortalidad (media \pm ES) de 3 aislados de <i>B. thuringiensis</i> sobre adultos de <i>C. capitata</i> .	70
3.9	Actividad de mezclas de esporas y cristales de 9 cepas de <i>B. thuringiensis</i> sobre larvas neonatas de <i>C. capitata</i> . Se muestran el porcentaje de pupación ("P", media \pm error estándar) y de emergencia ("E", media \pm ES) tras 18 días de ensayo, corregidos respecto al control por la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).	71
4	Efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Ceratitis capitata</i>	79
4.1	Bandeja de bioensayo de larvas, junto con dispensador de dieta y taco alisador.	87
4.2	Estados/ios de las larvas neonatas de <i>C. capitata</i> tras 7 días de bioensayo.	87
4.3	Bioensayo de supervivencia, fecundidad y fertilidad de adultos de <i>C. capitata</i>	89
4.4	Rendimiento de solubilización de 42 cepas de <i>Bacillus</i> sp. expresado como la cantidad de protoxina solubilizada por volumen de cultivo bacteriano.	90
4.5	Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas solubilizadas de 42 cepas <i>Bacillus</i> sp.	91
4.6	Efecto de la solubilización de los cristales proteicos de 42 cepas <i>Bacillus</i> sp. sobre la supervivencia y desarrollo tras 7 días de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> .	91
4.7	Solubilización de cristales paraesporales de diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (Bti). (A) Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas solubilizadas de 3 cepas Bti, (B) Efecto sobre la supervivencia y desarrollo tras 7 días de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> .	92
4.8	Actividad sobre <i>C. capitata</i> de cristales paraesporales y protoxinas solubilizadas de la cepa 4Q1 de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> .	93
4.9	Electroforesis SDS-PAGE de extractos digestivos solubles de insectos. Extractos de adultos (1) y larvas (3) de <i>C. capitata</i> , larvas de <i>S. nonagrioides</i> (5) y larvas completas de <i>C. pipiens</i> (7).	94
4.10	Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> digeridas con diferentes fuentes de proteasas.	95

4.11	Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i> (A) y de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (B) digeridas con diferentes fuentes de proteasas.	95
4.12	Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> 4B1 (subsp. <i>finitimus</i>) y 4D4 (subsp. <i>kurstaki</i>) sobre su actividad biológica contra larvas neonatas de <i>C. capitata</i> .	96
4.13	Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de la cepa de <i>B. thuringiensis</i> 4Q1 (subsp. <i>israelensis</i>) en el desarrollo y supervivencia de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> tras 7 días de ensayo. (A) Larvas en 3 ^{er} estadio larvario o superior, (B) mortalidad.	97
4.14	Actividad insecticida de protoxinas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> con 2 tipos de tratamiento: solubilización <i>in vitro</i> y predigestión con extractos intestinales de <i>C. pipiens</i> .	97
4.15	Efecto sobre el desarrollo y la supervivencia de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> de dos grados de procesamiento proteolítico de protoxinas de la cepa <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> por proteasas digestivas de <i>S. nonagrioides</i> .	99
4.16	Electroforesis SDS-PAGE de cristales de la cepa 4Q1 (1) y la cepa 4Q7-pWF45 (2).	99
4.17	Electroforesis SDS-PAGE de diferentes condiciones de solubilización de cristales paraesporales de la cepa 4Q7-pWF45.	100
4.18	Actividad insecticida de protoxinas de <i>B. thuringiensis</i> de la cepa 4Q7-pWF45 previamente solubilizadas y de la cepa <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> 4Q1 sometidas a 2 tipos de tratamiento: solubilización <i>in vitro</i> y solubilización seguida de predigestión con extractos intestinales de <i>C. pipiens</i> .	101
4.19	Actividad insecticida esperada para las protoxinas solubilizadas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (4Q1).	102
4.20	Efecto de la solubilización de las protoxinas de la cepa de <i>B. thuringiensis</i> 4Q1 (subsp. <i>israelensis</i>) y la cepa 4Q7-pWF45 (Cyt1Aa) en el desarrollo de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> tras 7 días de ensayo. (A) Porcentaje de larvas que alcanzaron el 3 ^{er} estadio larvario o superior. (B) Porcentaje de larvas que alcanzaron el 2 ^o estadio larvario o superior.	103
4.21	Actividad insecticida sobre adultos de <i>C. capitata</i> de protoxinas Cyt1Aa solubilizadas (cepa 4Q7-pWF45).	103
4.22	Tasa de puesta diaria (A) y fertilidad (B) de adultos de <i>C. capitata</i> sometidos a tratamiento con la protoxina solubilizada Cyt1Aa (cepa 4Q7-pWF45).	104
4.23	Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de la cepa de <i>B. thuringiensis</i> 4Q7-pWF45 (Cyt1Aa) en el desarrollo y supervivencia de larvas neonatas de <i>C. capitata</i> tras 7 días de ensayo. Arriba: electroforesis SDS-PAGE de los diferentes tratamientos, se cargó 1 µg de proteína por pocillo. Abajo: Porcentaje corregido de larvas muertas y larvas de 1er estadio.	105
5	Bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas	111
5.1	Sistema Gal4-UAS. Imagen adaptada de (Miratul et al., 2002).	116

5.2	Unidad de puesta de <i>D. melanogaster</i>	122
5.3	Esquema de construcción de los genes recombinantes α -gfp-Cry1Ab_28, α -gfp-Cry1Ab_57 y α -gfp-Cry1Ab_28-trunc.	123
5.4	Esquema de construcción del gen recombinante <i>Cry1Ab-trunc-α-gfp</i> .	124
5.5	Protocolos de purificación de cuerpos de inclusión de proteínas recombinantes producidas en <i>E. coli</i> (A y B).	127
5.6	Geles de electroforesis 1D (izquierda) y 2D (derecha) de separación de proteínas de BBMV de adultos de <i>C. capitata</i> (25 μ g).	134
5.7	Puntos de corte para la identificación de proteínas de BBMV de adultos de <i>C. capitata</i> (25 μ g) resueltas en geles de electroforesis 2D.	135
5.8	Expresión de GFP en cruces F1 de las líneas <i>GAL4-ENDO</i> \times <i>UAS-GFP</i> . Se muestran diferentes estados de desarrollo: huevo (A); 1 ^{er} estadio larvario (B); 2 ^o -3 ^{er} estadio larvario (C); 3 ^{er} estadio larvario avanzado, prepupa (D); pupa (E); adulto diseccionado en campo claro (F) y con fluorescencia (G).	141
5.9	Detección de GFP en disecciones del tracto intestinal de larvas de 2 ^o estadio procedentes del cruce de las líneas <i>GAL4-ENDO</i> \times <i>UAS-GFP</i> . Anatomía del tubo digestivo de <i>D. melanogaster</i> (A); disecciones en campo claro (B, D, F) y con fluorescencia (C,E,G, respectivamente).	142
5.10	Figura 5.10 Longitud relativa de proteínas recombinantes en relación a la protoxina nativa Cry1Ab.	144
5.11	Electroforesis SDS-PAGE de la solubilización de las proteínas Cry1Ab, α -gfp-Cry1Ab_28 y α -gfp-Cry1Ab_57.	145
5.12	Electroforesis SDS-PAGE (A) y Western-Blot (B) de cultivos de las cepas recombinantes de <i>E. coli</i> p- α -gfp-Cry1Ab_28 (28), p- α -gfp-Cry1Ab_28-trunc (28-T) y p-Cry1Ab-trunc- α -gfp (INV) suplementados con dosis crecientes de IPTG.	146
5.13	Electroforesis SDS-PAGE de la solubilización de las proteínas recombinantes α -gfp-Cry1Ab_28, α -gfp-Cry1Ab_28-trunc y Cry1Ab-trunc- α -gfp a diferentes pHs.	147
5.14	Microscopía de contraste de fase del cultivo de la cepa p-Cry1Ab-trunc- α -gfp de <i>E. coli</i> .	147
5.15	Ensayos de optimización de la producción y solubilización de la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28-trunc.	148
5.16	Ensayos de optimización de la solubilización de la proteína recombinante Cry1Ab-trunc- α -gfp.	149
5.17	Actividad de proteínas recombinantes sobre larvas neonatas de <i>D. melanogaster</i> .	150
5.18	Actividad de proteínas recombinantes solubilizadas sobre larvas neonatas de <i>S. nonagrioides</i> .	151
5.19	Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de BBMV de <i>D. melanogaster</i> y un extracto celular con GFP.	151
5.20	Análisis Western-Blot de detección de la unión de GFP a proteínas recombinantes y presencia de GFP en extractos intestinales (BBMV) de <i>D. melanogaster</i> .	152
5.21	Análisis Western-Blot de detección de la unión de las proteínas recombinantes α -gfp-Cry1Ab_28 (28) y Cry1Ab-trunc- α -gfp (INV) a BBMV de <i>D. melanogaster</i> .	153

5.22	Degradación proteolítica de la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28 y la protoxina Cry1Ab.	154
5.23	Análisis Western-Blot de detección de la unión de GFP a la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28 (28) y al producto de su digestión con tripsina.	156

1	Introducción	1
1.1	Productos comerciales basados en <i>B. thuringiensis</i> registrados en España.	29
3	Prospección de la biodiversidad natural de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de <i>Ceratitis capitata</i>	49
3.1	Cepas <i>B. thuringiensis</i> de referencia utilizadas	54
3.2	Cebadores de PCR para la identificación de genes <i>cry</i> y <i>cyt</i>	58
3.3	Distribución de muestras y recuperación de <i>B. thuringiensis</i> (Bt)	62
3.4	Distribución de cepas de <i>B. thuringiensis</i> en relación a la composición proteica de sus mezclas de esporas y cristales determinada mediante SDS-PAGE.	64
3.5	Homología con la secuencia proteica inferida de la secuencia del producto de PCR de la cepa I-BE15.1 con los cebadores "cry17+27".	67
4	Efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Ceratitis capitata</i>	79
4.1	Cepas <i>B. thuringiensis</i> de la colección IVIA seleccionadas para ensayos de solubilización.	83
4.2	Toxicidad de toxinas de <i>B. thuringiensis</i> tratadas <i>in vitro</i> sobre larvas de <i>C. capitata</i>	101
5	Bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas	111
5.1	Cebadores de PCR utilizados en la construcción de genes recombinantes <i>CryIAb-antiGFP</i> .	125
5.2	Peso molecular y punto isoelectrico de receptores potenciales de toxinas Cry	136
5.3	Resultados de las búsquedas en bases de datos utilizando los programas Mascot y Aldente a partir de los espectros obtenidos por análisis de Huella Peptídica (PMF) y Fragmentación Iónica (MS-MS) de proteínas de BBMV de adultos de <i>C. capitata</i> .	139
5.4	Péptidos de tripsinización deducidos mediante el programa Mascot a partir de espectros de fragmentación iónica (MS-MS) y comparación con una base de datos local (blastp) construída con secuencias homólogas a proteínas de membrana intestinal de insectos.	140
5.5	Expresión de GFP de <i>GAL4-ENDO×UAS-GFP</i> a lo largo del desarrollo.	143
5.6	Proteínas recombinantes, tamaño de la protoxina y la toxina activada esperada.	144

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae)

La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), es una de las plagas con mayor repercusión económica sobre la fruticultura a nivel mundial (Davies et al., 1999). El impacto global que ejerce esta especie radica en su amplia distribución geográfica y en el vasto rango de huéspedes sobre los que se desarrolla. Debido a la importancia de su sector cítrico, la plaga es especialmente importante en España, y en particular en la Comunidad Valenciana.

Tradicionalmente, el control de esta plaga ha sido llevado a cabo mediante tratamientos con insecticidas sintéticos. El impacto que estos tratamientos tienen sobre el medio ambiente y la salud humana ha generado una creciente concienciación de la opinión pública hacia el consumo de productos libres de residuos químicos. En la Unión Europea esto ha repercutido en la implantación de regulaciones cada vez más restrictivas sobre el abanico de materias activas disponibles para usos agrícolas. Por otro lado, la viabilidad económica de estas prácticas se ha visto seriamente comprometida, ya que en las últimas décadas el control de la plaga ha exigido realizar tratamientos químicos cada vez más frecuentes. Esta situación se ha visto agravada por el desarrollo de resistencias a insecticidas en poblaciones de la mosca (Magaña et al., 2007; Magaña et al., 2008; Ortego et al., 2005), fenómeno que repercute en una disminución de la eficacia de los tratamientos. Como consecuencia, la tendencia actual en el manejo de la plaga es la integración armónica de un complejo de métodos, tanto tradicionales como biotecnológicos, que permitan un control rentable y ambientalmente seguro de la mosca de la fruta.

El conjunto de medidas que se están desarrollando comprende la optimización del control tradicional mediante la utilización de materias activas más selectivas, en combinación con métodos alternativos como la técnica del insecto estéril (TIE), el trampeo masivo y la utilización de agentes de control biológico. En este contexto, la incorporación de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) a este sistema integrado tiene un gran potencial, dada la conocida eficacia de este agente en el control de otras plagas y su alta seguridad medioambiental.

1.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie es la siguiente (Richards y Davies, 1984):

- Clase: Insecta
- Orden: Diptera
- Suborden: Brachycera
- Familia: Tephritidae (= Trypetidae)
- Género: *Ceratitis*
- Especie: *C. capitata*

1.1.2 Origen y distribución geográfica

Ceratitis capitata es de origen africano, aunque se han propuesto diferentes regiones del continente como centro de origen de la especie. Estudios de genética poblacional sugieren que el centro de origen se halla en el zonas tropicales del este sub-sahariano, en concreto en Kenia (Malacrida et al., 1998). Desde África se ha extendido a otras zonas templadas, subtropicales y tropicales de ambos hemisferios. A pesar de no ser originaria del Mediterráneo, se la conoce como mosca mediterránea de la fruta, ya que la colonización de esta región es muy antigua y que es en estos países donde su incidencia económica se ha hecho más patente.

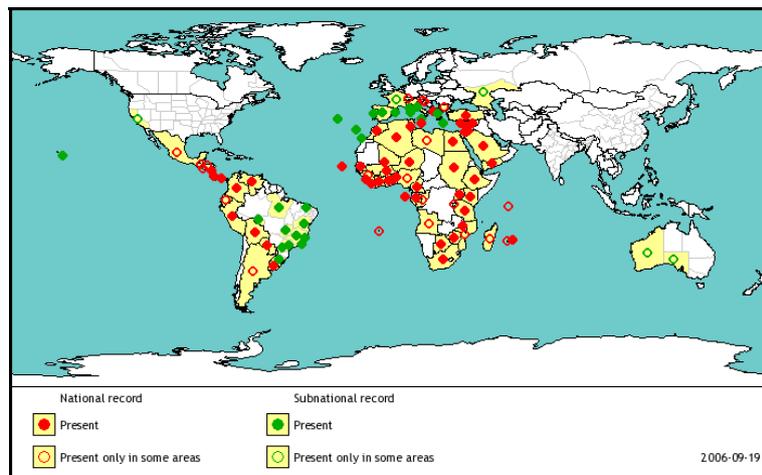


Figura 1.1 Mapa de distribución mundial de *C. capitata*. Fuente: EPPO 2006 (http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis_capitata/CERTCA_map.htm).

La mosca mediterránea de la fruta destaca por su gran polifagia, atacando a más de 250 especies de frutales y hortícolas, siendo especialmente importante el daño causado en frutales de hueso y de pepita, y en cítricos (Liquido et al., 1991). Su gran polifagia y alta adaptabilidad explican el que haya colonizado con tanto éxito diversas regiones templadas del planeta (Papadopoulos et al., 1996), habiéndose convertido en una plaga de gran importancia en las zonas tropicales, subtropicales y mediterráneas. De hecho, afecta a todos los países de la franja mediterránea y está extendida en Asia, Sudáfrica, América e incluso en Australia (Davies et al., 1999; Fletcher, 1989; Malacrida et al., 1998). El área de distribución mundial se refleja en la figura 1.1.

1.1.3 Descripción

Ceratitis capitata presenta una metamorfosis completa u holometábola. Su ciclo biológico consta de cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. El huevo es blanco, alargado y ligeramente curvado, con un tamaño medio de 1×0.2 mm. La larva es de color blanco amarillento, alargada, ápada, afilada en la parte anterior y truncada posteriormente. Ésta pasa por tres estadios larvarios diferenciados entre sí por el tamaño y el grado de desarrollo del aparato bucal. La vida larvaria se prolonga durante 6-11 días en condiciones favorables.

La pupa tiene forma cilíndrica fusiforme con la superficie lisa y vira de color blanco a marrón. Cuando el imago del interior del pupario está listo para emerger (a los 6-15 días, en función de las condiciones ambientales), evagina y distiende el ptilino, empujando el extremo anterior del pupario que se abre transversalmente por uno de los extremos, permitiendo así su emergencia (Richards y Davies, 1984). El adulto tiene un tamaño de 4-5 mm de longitud (Figura 1.2). Su cabeza es de color amarillo con una franja parduzca entre los ojos. Los ojos son rojo púrpura con irisaciones verde-azuladas. La zona dorsal del tórax es de color gris plateado con manchas negras irregulares y con largos pelos laterales y posteriores, mientras que la parte ventral y lateral son amarillentas. Las alas son irisadas, con varias manchas grisáceas, amarillas y negras. El abdomen, también con un color amarillo parduzco, presenta dos franjas transversales grises en la zona dorsal. Las hembras poseen un oviscapto muy puntiagudo y retráctil. Los machos se diferencian muy bien de las hembras por la forma más redondeada del abdomen, y por la presencia en la cabeza de dos quetas orbitales que terminan en una maza romboide de color negro,

carácter que los diferencia del resto de las especies de tefrítidos de importancia agrícola y que le da nombre a la especie (Figura 1.2).



Figura 1.2 Estado adulto de *Ceratitis capitata*. Fuente: (San Andrés, 2008).

1.1.4 Ciclo biológico y ecología

El ciclo biológico de esta especie puede durar desde menos de un mes hasta 3 meses en función de las condiciones ambientales (Christenson y Foote, 1960). En la región mediterránea, su actividad queda reducida en invierno, ya que por debajo de 12.5°C no realiza la puesta, además el desarrollo de huevos, larvas y pupas se detiene por debajo de los 10°C (Bodenheimer, 1951). Aunque la reinvasión anual desde regiones con inviernos menos fríos es un hecho constatado (Israely y Oman, 2005), *C. capitata* está establecida de forma permanente en muchas de las áreas templadas, superando las temperaturas más extremas del invierno como larva protegida dentro de los frutos que permanecen o bien en los árboles o en el suelo (Papadopoulos et al., 1996), como pupas en el suelo o en estado adulto (Del Pino, 2000).

La hembra de *C. capitata* puede poner unos 22 huevos por día y entre 300 y 800 en todo el periodo reproductivo (Aluja, 1993; Weems, 1981). La puesta se realiza en grupos de 1 a 9 huevos bajo la superficie del fruto en las cavidades producidas por el oviscapto, a una profundidad de 1 a 4 mm (Bodenheimer, 1951). Tras la eclosión del huevo, las larvas empiezan a alimentarse dentro de la fruta. Una vez alcanzado el tercer estadio, la larva abandona la fruta para saltar y pupar enterrada en el suelo a una profundidad de unos pocos centímetros. En estado adulto, *C. capitata* se alimenta de melaza secretada por insectos homópteros y también de secreciones glandulares de las plantas, néctar y savia

exudada por frutos, hojas o heridas de brotes; ya que necesitan una dieta rica en aminoácidos para alcanzar la madurez sexual (Christenson y Foote, 1960).

El número de generaciones alcanzadas por año varía de acuerdo a factores ambientales como la temperatura, la humedad y disponibilidad del huésped. Así, en zonas templadas con inviernos fríos y sin presencia de frutos desde otoño a primavera, *C. capitata* presenta de 3 a 4 generaciones anuales. El número de generaciones se incrementa a 7 u 8 cuando las temperaturas mínimas invernales no bajan de los 0°C y es capaz de superar las 12 generaciones en las condiciones ambientales más óptimas (Aluja, 1993). En la Comunidad Valenciana, *C. capitata* se desarrolla sobre distintos huéspedes en función de su época de maduración, una secuencia posible es: naranjas tardías, albaricoques, melocotones, peras, manzanas, higos y por último, mandarinas y naranjas tempranas (Gómez-Clemente, 1948). Este esquema se vuelve a repetir en otras zonas mediterráneas, sirviendo los frutales de hueso y pepita como eslabón entre las infestaciones de primavera y las de otoño, y también como refugio de las larvas invernantes (Papadopoulos et al., 2001).

1.1.5 Fisiología digestiva

El tubo digestivo de los adultos de *C. capitata* está compuesto de tres partes, como en el resto de miembros del suborden Brachycera: el tubo digestivo anterior, que forma un buche y que tiene función de reservorio de alimento e inicio de la digestión; el tubo digestivo medio, donde la mayoría de las enzimas digestivas son sintetizadas y secretadas, y donde se produce la mayor parte de la digestión y absorción de nutrientes; y el tubo digestivo posterior, donde se produce la eliminación y reabsorción de agua y solutos (Terra et al., 1996). La organización espacial del sistema digestivo en las larvas de *C. capitata* es muy similar a la de los adultos, a diferencia de que las larvas no poseen buche.

Estudios previos han demostrado que el sistema digestivo de *C. capitata* dispone de un amplio repertorio de enzimas para hidrolizar las proteínas consumidas (proteasas). Larvas y adultos presentan un perfil proteolítico similar; estudios bioquímicos con sustratos e inhibidores específicos han detectado actividades enzimáticas correspondientes tanto a endoproteasas (catepsina D, tripsina y quimotripsina) como a exoproteasas (leucín

aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y B) (San Andrés et al., 2007; Silva et al., 2006). El proceso digestivo en los adultos de *C. capitata* parece estar compartimentado, la principal actividad enzimática descrita en el buche es del tipo endoproteasa ácida (catepsina D) mientras que en el intestino medio se detecta una mayor carga enzimática, con endoproteasas básicas (tripsina y quimotripsina) y exoproteasas (San Andrés et al., 2007).

1.1.6 Daños e importancia económica

El daño directo se produce sobre frutos; la hembra selecciona frutos maduros o que inician el cambio de color para la puesta. La picadura causa un pequeño orificio en la superficie del fruto que desencadena una reacción necrótica a su alrededor, manifestándose en forma de una mácula amarilla en el caso de los cítricos. La herida producida es vía de entrada de microorganismos que provocan la podredumbre del fruto. Las larvas se alimentan formando galerías en la pulpa, ésta se ablanda y el fruto exteriormente toma una coloración más anaranjada, que indica el inicio de la putrefacción. Al cabo del tiempo suelen observarse los orificios de salida de las larvas de tercer estadio. En último término, estas circunstancias provocan una serie de reacciones que favorecen los procesos de oxidación y maduración prematura del fruto dando lugar a su caída.

La enorme importancia económica y social de la mosca mediterránea de la fruta en España radica en el gran impacto socio-económico de su sector cítrico. España es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea con una producción anual superior a 5 millones de Tm durante la última década, en aproximadamente 315000 ha de cultivo (MARM, 2009a), y el primer país exportador a nivel mundial, con más de la mitad de la producción destinada a la exportación, principalmente en forma de fruta fresca (FAO, 2010). La incidencia de esta plaga se ha agravado más en la última década como consecuencia de la expansión de variedades extratempranas de cítricos, particularmente de la clementina “Marisol”, que se manifiestan extremadamente sensibles al ataque de la mosca de la fruta al producirse su plena maduración a principios del otoño, cuando las poblaciones de la mosca son normalmente muy elevadas (Primo-Millo et al., 2003). A las pérdidas económicas de tipo directo se añaden las cuantiosas pérdidas derivadas de la imposición de periodos de cuarentena y protocolos de exportación muy restrictivos. En este sentido, cabe señalar por su gravedad, el bloqueo a la exportación de clementinas

españolas por parte de Estados Unidos en 2001, cuyas pérdidas se cifraron en unos 300 millones de euros (Castañera, 2003).

1.1.7 Métodos de control

Como se ha mencionado anteriormente, las estrategias actuales puestas en práctica para el control de la mosca mediterránea de la fruta tienden a la aplicación de un complejo de métodos combinados eficientes en el manejo de la plaga y ambientalmente seguros. A continuación se citan los principales métodos que se están aplicando y/o experimentando en la actualidad.

1.1.7.1 Control químico

El método tradicional de control de *C. capitata* en España ha consistido en la monitorización de las poblaciones del insecto y en aplicaciones contra el estado adulto por pulverización-cebo con gota gruesa de insecticidas organofosforados mezclados con proteína hidrolizada como atrayente alimenticio (Primo-Millo et al., 2003). La última década esto se ha producido mayoritariamente con un único producto, el malatión. En la Comunidad Valenciana, de acuerdo a un plan de actuación regional contra esta plaga, conjuntamente a las aplicaciones terrestres se han llevado a cabo aplicaciones aéreas con malatión-cebo. La elevada frecuencia de estos tratamientos ha originado la aparición de poblaciones de mosca de la fruta resistentes a este producto (Magaña et al., 2007; Magaña et al., 2008; Ortego et al., 2005).

Los efectos nocivos del malatión sobre la salud humana (Brenner, 1992) y el medio ambiente (Burns et al., 2001), así como su falta de selectividad sobre la fauna útil presente en el cultivo (Urbaneja et al., 2004) han llevado a su exclusión del Anexo I del Registro Único Europeo (Directiva 91/414) desde enero de 2009. La enorme dependencia que se tenía por este producto y su reciente exclusión han obligado a la búsqueda de materias activas alternativas con una eficacia comparable y de mayor selectividad. El mejor candidato hasta la fecha parece ser el insecticida de origen microbiológico spinosad (producido por la fermentación de la bacteria del suelo *Saccharopolyspora spinosa*) (Urbaneja et al., 2009). Otras materias activas autorizadas actualmente para el control de *C. capitata* en España son: lambda-cihalotrin, etofenprox, fosmet, metil-clorpirifos, imidacloprid, deltametrina y azadiractina (MARM, 2009b).

1.1.7.2 Medidas culturales

El control de puntos que sirven de reservorio y son focos de contaminación y extensión es fundamental para poder disminuir las poblaciones de esta plaga a un nivel regional (Primo-Millo et al., 2003). Existen numerosas medidas a este respecto como la eliminación de frutos infestados, la recolección y posterior enterrado de fruta no cosechada, el arranque o tratamiento de frutales aislados o abandonados que se encuentran dentro del área de cultivo y el tratamiento químico de vertederos y secaderos de fruta. Este tipo de medidas se conocen y vienen siendo practicadas de manera tradicional, sin embargo, su éxito es muy complicado ya que su aplicación debe ser emprendida a gran escala (Chueca, 2007) y la estructura propia del sistema productivo (división de la propiedad, profesionalización, rentabilidad, urbanización de zonas rurales, etc.) lo imposibilita, al menos en el contexto de la Comunidad Valenciana. De hecho, en los últimos años se han observado fuertes aumentos de población de la plaga a consecuencia del creciente abandono de huertos, debido a la caída de precios de los cítricos (Castañera, 2003).

1.1.7.3 Trampeo masivo

El trampeo masivo consiste en la captura de adultos mediante la utilización de trampas con distintos tipos de atrayentes mezclados con insecticida, dispuestas en una densidad adecuada dentro de la zona de cultivo. Existen una gran cantidad de trampas y atrayentes diferentes en el mercado y su selección puede tener una alta repercusión en el grado de eficacia de la técnica (Escudero et al., 2009; Navarro-Llopis et al., 2008). Uno de los sistemas más utilizados es la trampa Tephri-trap® (Sorygar S.L., España) combinada con el atrayente alimenticio Tripack® (Kenogard S.L., España), formado por la mezcla de tres componentes en seco (acetato amónico, putrescina y trimetilamina). Adicionalmente, se añade una pastilla insecticida; hasta hace poco el insecticida más utilizado era el diclorvos (DDVP), sin embargo la aplicación de la directiva 91/414 ha supuesto la retirada de este producto del mercado. Actualmente se han puesto en marcha trabajos para la búsqueda del mejor insecticida de reemplazo (Escudero et al., 2009).

Las trampas utilizadas en este método de control se suelen disponer de manera homogénea a razón de unas 45-75 mosqueros por ha (Alonso y Garcia Marí, 2004; Fibla et al., 2007). Por lo general, el método de trampeo masivo solo consigue una protección

adecuada cuando las poblaciones son bajas o moderadas (0.5-2 hembras por trampa y día) (Alonso y Garcia Marí, 2004; Fibla et al., 2007). En la Comunidad Valenciana, se está utilizando únicamente en áreas cítricas que requieren una especial protección (Primo-Millo et al., 2003) ya que el principal factor limitante de la aplicación de este método a gran escala es su elevado coste (Castañera, 2003).

1.1.7.4 Control autocida

El control autocida o Técnica del Insecto Estéril (TIE) se basa en la liberación en la naturaleza de machos estériles que se acoplan con las hembras salvajes de la especie que se quiere combatir; estos cruces dan lugar a progenie no viable y en consecuencia se produce un impacto negativo sobre la población salvaje. Las bases conceptuales de la TIE se desarrollaron en los años 30 del pasado siglo, aunque no se aplicaron a una escala significativa hasta los 50 (Knipling, 1955). A raíz de los primeros éxitos durante esta década, la técnica fue aplicada a distintas especies en diversas zonas geográficas del planeta (Dyck et al., 2005). En España, la lucha autocida contra *C. capitata* se utilizó por primera vez en Tenerife, Murcia y Granada durante la década de los 60 y principios de los 70 (Mellado et al., 1974), aunque los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios (Domínguez, 1989; Moner et al., 1988). En el año 2003 se puso en marcha en la Comunidad Valenciana un programa piloto de lucha autocida contra *C. capitata* (Primo-Millo et al., 2003), con la importación de pupas estériles de *C. capitata* en una primera fase y, desde 2007, con producción propia en una biofábrica situada en Caudete de las Fuentes (Valencia). El plan de actuación contra la mosca de la fruta 2009-2010 en esta Comunidad dispone la liberación de 280 millones de machos estériles por semana en 150000 ha de cultivo (Conselleria d'Agricultura Pesca i Alimentació, 2009). La eficacia de esta técnica es mucho mayor cuando las poblaciones salvajes de la mosca son bajas, por lo que su utilización ha de ser complementada con otros métodos de control (Argilés y Tejedo, 2007).

1.1.7.5 Quimioesterilización

El fundamento de esta técnica es la disminución de las poblaciones del insecto plaga a través de la bajada de fertilidad o fecundidad de sus individuos a causa del contacto con una sustancia quimioesterilizante. Se ha observado que el regulador del crecimiento registrado como lufenuron (MARM, 2009b), un inhibidor de la síntesis de quitina, anula

la eclosión de los huevos puestos por hembras de *C. capitata* que han sido expuestas directamente al mismo o que han sido copuladas por machos previamente tratados (Casaña-Giner et al., 1999). En un programa piloto desarrollado durante 4 años en Valencia se demostró que la aplicación de este quimioesterilizante, incorporado a una sustancia fagoestimulante y acompañado de atrayente, reducía la población de *C. capitata* hasta un 85% respecto al tratamiento con insecticidas organofosforados (Navarro-Llopis et al., 2004; Navarro-Llopis et al., 2007b). En la actualidad, este sistema está siendo comercializado por la empresa Syngenta con la denominada unidad de control Address®. Esta técnica tiene varias ventajas: no deja residuo en la fruta; es perfectamente compatible con la técnica del insecto estéril ya que los machos liberados no quedan atrapados en la unidad; además, gracias a la transmisión horizontal de machos a hembras, el lufenuron puede actuar efectivamente sobre un alto porcentaje de la población, obteniéndose así buenos resultados con densidades poblacionales de mosca elevadas (Navarro-Llopis et al., 2007a). Hasta la fecha no se ha observado ningún efecto perjudicial sobre la fauna útil (Navarro-Llopis et al., 2007a).

1.1.7.6 Control biológico

El control biológico de esta plaga ha consistido principalmente en sueltas inundativas de parasitoides, aplicándose en campos de varios países con diferentes grados de éxito. El primer programa de control biológico utilizando parasitoides exóticos fue aplicado en 1902 en Australia. Los mayores éxitos se lograron en Hawai en los años 50 (siglo XX) con la introducción de los himenópteros braconidos *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) y *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Wong et al., 1991). En España, a comienzos de los años 30 se intentó la cría y establecimiento de los también braconidos, *Opius humilis* (Silvestri) y *D. tryoni*, pero no tuvo éxito (Gómez-Clemente, 1932; Gómez-Clemente, 1934). Con el auge del control químico en la agricultura, el control biológico de esta plaga quedó relegado a un segundo plano. No obstante, en los años 60 y 70 se introdujeron nuevos himenópteros parasitoides en España: *Tetrastichus giffardianus* (Silvestri) en Tenerife, y *Opius concolor* (Szepligeti) y *D. longicaudata* en Madrid, sin embargo su efectividad sobre *C. capitata* en campo fue insuficiente o bien no llegó a ser evaluada (Domínguez, 1989; Moner et al., 1988).

En la Comunidad Valenciana, en el año 2002, el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) importó dos especies de parasitoides desde Hawaii: *D. tryoni*, endoparasitoide de larvas y nativo de Australia; y *Fopius arisanus* (Sonan), parasitoide de huevos y nativo del Sur de Asia (Castañera, 2003). En el año 2008, el IVIA incorporó una nueva especie de endoparasitoide de larvas procedente del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), *D. longicaudata*, una especie nativa del sudeste asiático. En la actualidad se están llevando a cabo ensayos en laboratorio, semi-campo y campo para determinar el potencial de estas tres especies como agentes de control en España; adicionalmente, se está evaluando la posibilidad de su liberación en combinación con la de machos estériles (Francisco Beitia, IVIA, comunicación personal). En algunos países como México, Guatemala o Costa Rica, el uso conjunto de parasitoides y machos estériles ya está siendo aplicado con éxito (Gurr y Kvedaras, 2009).

Otros artrópodos con potencial para el control biológico de *C. capitata* son los depredadores polífagos presentes en el suelo del cultivo. Como ya se ha comentado, la mosca mediterránea de la fruta desarrolla parte de su ciclo en el suelo. Así, tanto larvas de tercer estadio, como pupas y adultos recién emergidos son sensibles a la acción de estos depredadores. Existen varios estudios que demuestran la capacidad depredadora de hormigas, coleópteros carábidos y estafilínidos, y arañas sobre larvas, pupas y adultos recién emergidos de moscas de la fruta (Eskafi y Kolbe, 1990; Galli y Rampazzo, 1996; Monzó et al., 2009; Monzó et al., 2010; Urbaneja et al., 2006). En un estudio reciente, se demostró que algunos de los principales depredadores presentes en el suelo de cítricos muestran preferencias alimenticias por distintos estados de desarrollo de la mosca en condiciones de laboratorio: así, la araña *Pardosa cribata* (Simon) muestra preferencia por adultos recién emergidos; el carábido *Pseudoophonus rufipes* (De Geer), por pupas; y el dermáptero *Forficula auricularia* (Linnaeus), por larvas de tercer estadio. El aprovechamiento del papel que juegan estos enemigos naturales en los agroecosistemas debería pasar por el manejo y conservación de sus poblaciones, principalmente a través de la manipulación de su hábitat (Barbosa, 1998).

Otro tipo de agentes de control biológico de la mosca de la fruta son los microorganismos entomopatógenos, como los hongos. Diversos estudios de laboratorio han demostrado que determinados aislados de las especies *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff),

Beauveria bassiana (Balsamo) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) presentan actividad entomopatógena sobre larvas, pupas y/o adultos de *C. capitata* (Castillo et al., 2000; Dimbi et al., 2003; Ekesi et al., 2003; Quesada-Moraga et al., 2006). Estos agentes tienen un elevado potencial por sus efectos directos (micosis) sobre larvas, pupas y adultos recién emergidos tras pulverizaciones de conidias sobre el suelo (Mochi et al., 2006) o sobre adultos mediante el uso trampas selectivas atrayente-contaminante. La aplicación de este último método ha sido ensayada en campo con resultados muy satisfactorios; un experimento llevado a cabo en una explotación de cítricos logró una reducción de la población de mosca en seis veces respecto a la población natural con una densidad de 30 trampas por ha y realizando un único cambio durante toda la campaña (Moya, 2003). Además de sus efectos directos, se ha observado que la infección con estos hongos produce efectos reproductivos subletales que pueden incidir en la dinámica poblacional de la plaga (Castillo et al., 2000; Quesada-Moraga et al., 2006). Otro elemento muy interesante de esta técnica es la posibilidad de transmisión horizontal o autodiseminación del hongo desde adultos contaminados a adultos sanos en campo (por ejemplo, durante el acoplamiento), extendiendo así la enfermedad (Quesada-Moraga et al., 2008). Este atributo abre la posibilidad de integrar esta técnica con la liberación de machos estériles, de forma que éstos sirvan de vectores iniciales del hongo hacia las poblaciones de mosca en el campo. Existen trabajos de laboratorio y semicampo que apoyan esta posibilidad al determinar que durante el proceso infectivo del hongo el macho estéril es capaz de llevar a cabo su función, que a nivel práctico dura unos pocos días (San Andrés et al., 2009; Toledo et al., 2007; Toledo et al., 2006). La integración de ambos métodos todavía no ha sido llevada a la práctica.

El agente microbiológico que históricamente se ha mostrado más efectivo en el control de plagas es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner); sin embargo, como se detallará más adelante en el texto, los intentos de aprovechamiento de este agente para el control de *C. capitata* han sido muy escasos. En consecuencia, la presente tesis doctoral abordará las posibilidades de control de esta plaga con dicho entomopatógeno.

1.2 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

1.2.1 Aspectos generales

El control microbiológico de plagas se ha desarrollado a partir del conocimiento de las enfermedades que éstas sufren de forma natural. Las primeras citas al respecto datan de la Antigüedad y afectan a insectos beneficiosos domesticados por el hombre, como los gusanos de seda (2700 AC, en China) o las abejas (335 AC, por Aristóteles) (Joung y Côté, 2000). Los primeros autores que sugirieron la posibilidad de utilizar los microorganismos como agentes de control de plagas fueron Agostino Bassi y Louis Pasteur en el siglo XIX (Lord, 2005). No obstante, no fue hasta mediados del siglo XX, con el desarrollo y posterior comercialización de los productos derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (productos-Bt) que el control microbiológico de plagas alcanzó un éxito a gran escala. Se estima que los productos-Bt ocupan alrededor de un 80% del mercado mundial de los bioinsecticidas, aunque este tipo de productos todavía supone menos del 2% del mercado total de los insecticidas (Roh et al., 2007); los porcentajes de mercado en España son similares (González-Cabrera y Ferré, 2008).

Bacillus thuringiensis fue aislado por primera vez a partir de larvas enfermas del lepidóptero *Bombyx mori* (Linnaeus) por el bacteriólogo japonés Shigetane Ishiwata en 1901, quien denominó “sotto” a la enfermedad identificada (Ishiwata, 1901); sin embargo este trabajo, escrito en japonés, tuvo poca repercusión internacional. Algo más de una década después, el alemán Ernst Berliner (1915) publicó la descripción de una bacteria similar aislada 4 años antes en la región alemana de Turingia a partir de larvas enfermas de la polilla mediterránea de la harina, *Ephestia kuehniella* (Zeller), y la nombró *Bacillus thuringiensis*, en honor a su procedencia (Berliner, 1915). Los primeros ensayos de campo fueron llevados a cabo en Hungría y Yugoslavia, en los años 20 y 30, respectivamente. El primer producto-Bt comercial fue desarrollado en Francia por los Laboratorios Limbec bajo el nombre de Sporeine y salió al mercado en 1938, no obstante su producción fue muy corta a consecuencia del advenimiento de la Segunda Guerra Mundial (Lord, 2005). Tras la guerra, los mayores progresos y aplicaciones de *B. thuringiensis* se realizaron al otro lado del Atlántico, en Norte América, gracias a las investigaciones de científicos como Steinhaus o Dulmage (Federici, 2005). El primer registro de un producto-Bt por la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA)

se produjo en 1961, y se le llamó Thuricide, nombre comercial que todavía existe en el mercado. A partir de entonces se registraron una gran cantidad de productos, aunque en su mayoría eran derivados de un único aislado, la cepa HD-1 del serovar *kurstaki* (Btk), utilizado con mucho éxito en el control de lepidópteros plaga en agricultura y silvicultura. En aquella época existía un consenso general acerca de que la acción de *B. thuringiensis* era específica de insectos del orden Lepidoptera, exclusivamente. Esta creencia desapareció con el descubrimiento de cepas con nuevos espectros insecticidas: la subespecie *israelensis* (Bti), descubierta en Israel, que es activa contra varias especies de dípteros (Goldberg y Margalit, 1977) y la subespecie *morrisoni* (variedad *tenebrionis*, Btt), descubierta en Alemania, que es tóxica sobre algunas especies de coleópteros (Krieg et al., 1983). El descubrimiento y comercialización de estas subespecies intensificó la búsqueda de nuevos aislados tanto por parte de instituciones públicas como privadas. Se estima que actualmente que existen más de 100000 aislados distribuidos en colecciones de todo el mundo (Hammond, 2007).

1.2.1.1 Taxonomía y ecología

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia, anaerobia facultativa, gram-positiva y formadora de endosporas. Su tamaño es aproximadamente de 1 µm de ancho por 5 µm de largo, y poseen flagelos cortos peritricos (Joung y Côté, 2000). La clasificación taxonómica de la especie es la siguiente:

- Clase: Bacilli
- Orden: Bacillales
- Familia: Bacillaceae
- Género: *Bacillus*
- Especie: *B. thuringiensis*

Bacillus thuringiensis ha sido considerado un microorganismo del suelo ya que éste era el medio más frecuente a partir del cual se aisló en los estudios iniciales. Sin embargo, los numerosos programas de búsqueda de cepas emprendidos desde entonces han podido aislar esta especie de casi cualquier hábitat, como el suelo, excrementos, superficies vegetales, agua, cadáveres de insectos, granos almacenados (Schnepf et al., 1998), e incluso en ambientes marinos (Baig y Mehnaz, 2009). Por ello, en la actualidad *B. thuringiensis* se considera una especie ubicua. La distribución de *B. thuringiensis* en el

medio ambiente también es muy amplia. Un estudio llevado a cabo con muestras de suelos tomadas a escala mundial mostró una elevada frecuencia de detección de la especie, de un 56% de las muestras tomadas en Nueva Zelanda a un 98% en los suelos de Asia y África Central y del Sur (Meadows, 1993). El papel real que juega esta bacteria en el medio ambiente no es del todo conocido, precisamente debido a la diversidad de nichos ecológicos en los que ha sido hallada. Si bien la capacidad entomopatógena de esta especie le permite colonizar insectos susceptibles y multiplicarse en un medio rico en nutrientes como es el hemocele de los mismos, la aparición de este fenómeno a escala de epizootia es poco habitual en la naturaleza (Schnepf et al., 1998). Además, se ha visto que en condiciones favorables sus esporas también pueden germinar en otros medios como el suelo y las superficies foliares (de Maagd et al., 2003; WHO, 1999).

Esta bacteria está filogenéticamente muy relacionada con otras especies del género *Bacillus*: *B. cereus* (Frankland and Frankland), *B. anthracis* (Cohn) y *B. mycoides* (Flügge) (el “grupo *B. cereus*”). Tanto es así que ha llegado a proponerse integrarlos en una única especie (Helgason et al., 2000). Existe una enorme variabilidad dentro de la especie *B. thuringiensis*, el tamaño de su genoma puede variar de 2.4 a 5.7 Mb (Carlson et al., 1994). El método más empleado para la clasificación de aislados de *B. thuringiensis* es la identificación serológica del antígeno flagelar o antígeno H, desarrollado en los años 60 en el Instituto Pasteur (de Barjac y Bonnefoi, 1968). En la actualidad se han identificado 69 serotipos diferentes y 13 grupos sub-antigénicos, en total 82 serovares, que han sido clasificados en subespecies (Lecadet et al., 1999). Aunque éste es un método sólido y fácil de aplicar, tiene sus limitaciones ya que clasifica las cepas en base a un parámetro muy concreto, que es la composición proteica de sus flagelos, y por lo tanto no incide en otros factores que determinan la variabilidad de la especie. Esto repercute en que cepas de un mismo serovar puedan presentar espectros insecticidas muy dispares, por ejemplo existen cepas de la subespecie *morrisoni* que presentan actividad sobre lepidópteros, coleópteros, dípteros, o ninguno de ellos (Roh et al., 2007). Además, existen ciertas cepas para las cuales no se puede determinar el serotipo-H, bien porque no poseen flagelos o porque son autoaglutinantes (Jensen et al., 1995).

Como complemento a esta técnica, existe un amplio abanico de métodos que se han adaptado para la caracterización de cepas de *B. thuringiensis*; como son la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Carozzi et al., 1991), la determinación del perfil de expresión proteica por separación en geles de poliacrilamida mediante electroforesis SDS-PAGE (Chilcott y Wigley, 1993) o por electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Gaviria Rivera y Priest, 2003), la hibridación ADN-ADN (Hansen et al., 1998), el análisis del perfil plasmídico (Cinar et al., 2008), la utilización de marcadores moleculares como RFLPs (Kuo y Chak, 1996) y RAPDs (Hansen et al., 1998), o la determinación de la huella genética por Rep-PCR (Zara et al., 2006).

1.2.1.2 Biología

El ciclo biológico de *B. thuringiensis* se inicia con la germinación de las esporas. En la naturaleza esto se produce cuando las condiciones ambientales y nutricionales son favorables, generalmente en el hemocele del insecto contaminado y con menor probabilidad en otro tipo de sustratos como en el suelo. La célula crece y se multiplica activamente en condiciones aerobias, aunque es anaerobia facultativa. En condiciones de laboratorio, la bacteria crece convenientemente en diversos medios de cultivo, las condiciones óptimas son 26-30°C de temperatura y pH neutro (Iriarte y Caballero, 2001).

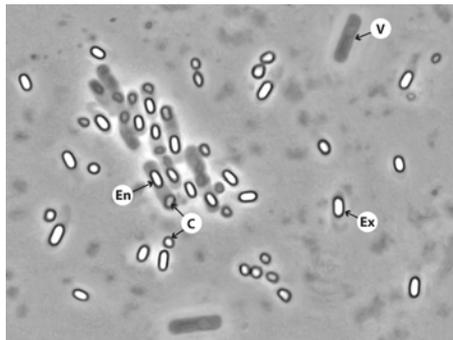


Figura 1.3 Cultivo de *B. thuringiensis*. V) célula en crecimiento vegetativo; En) endospora; Ex) exospora; C) cristal paraesporal.

La fase vegetativa de crecimiento finaliza con el empobrecimiento de nutrientes en el medio que da paso a la fase estacionaria de crecimiento en la que se forma la endospora y las inclusiones cristalinas paraesporales características de la especie (Figura 1.3); en esta fase la célula es denominada esporangio y está compuesta de dos compartimentos: la

célula madre y la forespora (Agaisse y Lereclus, 1995), que durante el proceso de maduración se envuelve de dos capas, el córtex al interior y la cubierta al exterior (Ball et al., 2008) (Figura 1.4). La esporulación y la formación del cristal son favorecidos por la presencia de sales de calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc (Stewart et al., 1981). El ciclo se cierra con la fase lítica, en la que la exospora y los cristales se liberan al medio.

Las esporas son estructuras que pueden sobrevivir en un estado metabólicamente inactivo durante largos periodos de tiempo hasta encontrar las condiciones adecuadas para la germinación. Son muy resistentes a condiciones ambientales extremas (deshidratación, altas y bajas temperaturas), aunque son altamente sensibles a la luz ultravioleta, pudiendo perder la viabilidad en muy poco tiempo (Joung y Côté, 2000; Krieg, 1975). A pesar de su relativamente baja estabilidad en el ambiente, las esporas de *B. thuringiensis* pueden persistir a niveles muy bajos durante largos periodos de tiempo después de una pulverización. Un experimento realizado en China demostró la persistencia de *B. thuringiensis* e incluso su actividad sobre orugas de lepidópteros en un campo de cítricos 2 años después de su aplicación (Huang et al., 1990).

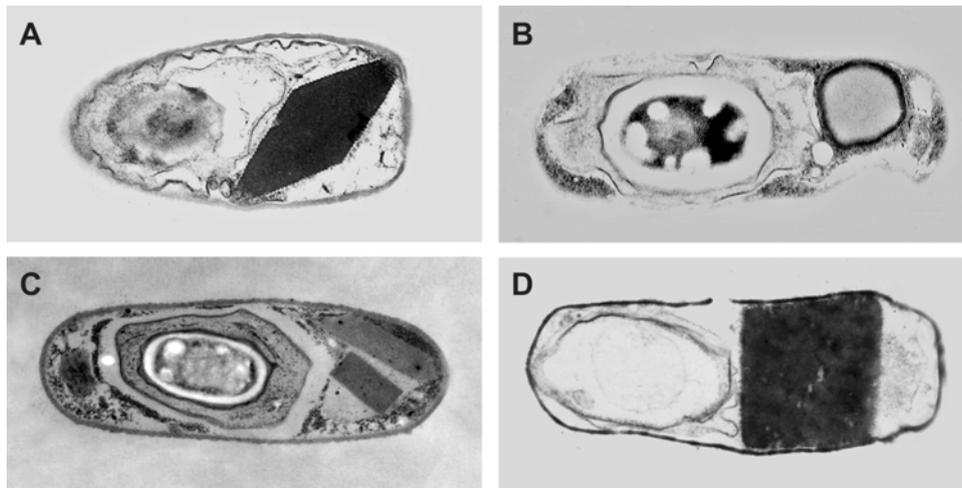


Figura 1.4 Micrografías electrónicas de *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (Wasano et al., 2000) (A), subsp. *sumiyoshiensis* (Wasano et al., 2000) (B), subsp. *morrisoni* (Baum y Malvar, 1995) (C) y una cepa de serotipo no identificado (de Maagd et al., 2001) (D). En todas estas imágenes la endoespora está situada al lado izquierdo del esporangio y el cristal paraesporal al derecho.

Los cristales paraesporales están constituidos fundamentalmente de proteínas llamadas δ -endotoxinas. La gran capacidad de producción de estas proteínas durante la fase estacionaria de crecimiento tiene pocos precedentes en la naturaleza, se estima que estos cristales llegan a suponer hasta un 20-30% del peso seco del esporangio (Baum y Malvar, 1995) y que en laboratorio se puede obtener un rendimiento de 0.5 mg por ml de cultivo (Agaisse y Lereclus, 1995). Esta característica depende en gran medida de la capacidad de estas proteínas para formar inclusiones cristalinas. En este estado insoluble, las proteínas son menos sensibles a la degradación proteolítica y pueden así acumularse en la célula madre (Baum y Malvar, 1995). Existen varios factores condicionantes de la cristalización de las δ -endotoxinas, como son su estructura secundaria, la formación de puentes disulfuro entre residuos cisteína y la presencia de componentes adicionales en el cristal. Además, los mecanismos de cristalización pueden variar entre las distintas δ -endotoxinas (Agaisse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995).

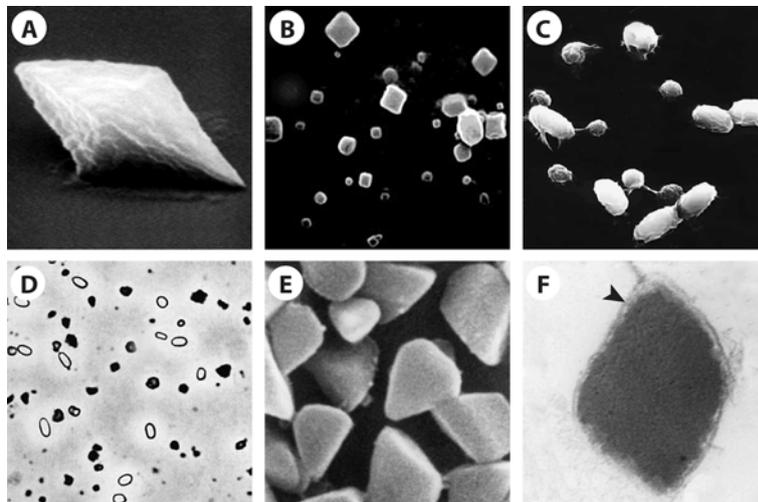


Figura 1.5 Cristales paraesporales con diferentes morfologías: bipiramidal (A) (Imagen original: Y. Bel, Universidad de Valencia), cúbico y esporas (B) (Ito et al., 2006b), redondeado y esporas (C) (Saitoh et al., 1998), irregular y esporas (D) (Kaelin et al., 1994), poliédrico (E y F) (Itoua-Apoyolo et al., 1995). La flecha de la figura F indica la membrana envolvente del cristal.

La morfología que adquieren los cristales puede ser muy diversa y normalmente está directamente relacionada con el tipo de δ -endotoxinas que lo componen. Así, los cristales compuestos de Cry1 son bipiramidales (Figuras 1.4 A, 1.5 A), de Cry2 son cúbicos (Figura 1.5 B), de Cry3A son planos-rectangulares (Figura 1.4 C) y de cry4 son esféricos

u ovoides (Figuras 1.4 B, 1.5 C). También existen cristales poliédricos (Figura 1.5 E) e irregulares (Figura 1.5 D). Otro rasgo morfológico asociado a los cristales paraesporales es la existencia de una membrana que envuelve a la inclusión a modo de funda; su presencia o ausencia y su grosor es dependiente de la cepa (Wasano et al., 2000) (Figuras 1.4 B, 1.5 F). Como ocurre con las esporas, e incluso de forma más acentuada, los cristales paraesporales son muy sensibles a la radiación UV.

1.2.1.3 Factores tóxicos de *Bacillus thuringiensis*

1.2.1.3.1 Las δ -endotoxinas

Las δ -endotoxinas, como se ya se ha indicado, son los componentes mayoritarios de los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*, además son los principales factores insecticidas de esta especie. Estas proteínas también son denominadas ICPs, por sus siglas del inglés “Insecticidal Crystal Proteins”. Existe una gran diversidad de δ -endotoxinas y, en conjunto, se ha identificado un gran número de especies de insectos susceptibles a su acción, pertenecientes a diversos órdenes (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera y Mallophaga), además de otros invertebrados como nematodos, ácaros y protozoos (de Maagd et al., 2003). Sin embargo, cada δ -endotoxina presenta un espectro de actividad insecticida característico, con un rango de acción limitado a pocas especies, normalmente pertenecientes al mismo orden. Este es el fundamento de la gran especificidad que muestran los productos-Bt hacia su diana y por lo tanto de su seguridad medioambiental, tanto para la fauna auxiliar, enemigos naturales, animales superiores y el hombre. El espectro de actividad de una cepa concreta depende en último término de la combinación de δ -endotoxinas que ésta produzca. En este sentido, se han descrito una gran cantidad de combinaciones de genes de δ -endotoxinas presentes en cepas de *B. thuringiensis*, aunque ciertas combinaciones son más comunes que otras, como la de los genes de la familia *cry1* y *cry2* (Porcar y Juárez-Pérez, 2003) o la combinación *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* y *cyt2* (Berry et al., 2002). La gran diversidad de combinaciones de genes de δ -endotoxinas existentes se debe principalmente a que éstos están normalmente situados en plásmidos transmisibles por conjugación entre cepas y su secuencia está a menudo flanqueada de elementos transponibles, lo que posibilita su transmisión horizontal (de Maagd et al., 2001; Schnepf et al., 1998). Se ha observado que para muchas cepas no existe una correspondencia entre su serotipo y su composición génica (van Frankenhuyzen, 2009).

Las δ -endotoxinas están compuestas por dos grupos de proteínas que no presentan homología de secuencia ni de estructura terciaria entre sí, aunque comparten muchas propiedades bioquímicas: las proteínas **Cry** (del inglés “Crystal”) y las proteínas **Cyt** (del inglés “Cytolytic”). Inicialmente no existía un criterio universal de clasificación de las δ -endotoxinas. La clonación y secuenciación de los primeros genes en los años 80 (Schnepf y Whiteley, 1981) sentó las bases para establecer en 1989 un primer sistema de clasificación (Höfte y Whiteley, 1989). Este sistema atendía a la secuencia de la proteína y a su espectro de actividad insecticida, asignando números romanos para diferenciar entre los diferentes grupos. Así, el primer grupo, CryI, contenía proteínas de un peso molecular aproximado de 130 kDa y con actividad sobre lepidópteros; el segundo, CryII, se refería a protoxinas de 70 kDa con actividad dual frente a lepidópteros y dípteros; el tercero, CryIII, a proteínas de 70-130 kDa con actividad sobre coleópteros; y un cuarto grupo, CryIV, de proteínas de 70-130 kDa que eran tóxicas para dípteros. Este sistema permitió sistematizar la creciente diversidad de δ -endotoxinas pero pronto quedó obsoleto, ya que la clasificación en base al espectro insecticida resultaba en muchos casos inconsistente. En primer lugar, existen muchas δ -endotoxinas para las cuales no se conoce su actividad insecticida; se estima que casi un tercio de las mismas todavía no han sido ensayadas individualmente sobre ninguna especie (van Frankenhuyzen, 2009), mientras que los bioensayos de las δ -endotoxinas restantes se han limitado a un grupo restringido de especies. En segundo lugar, se ha observado que el espectro de acción de muchas δ -endotoxinas es más amplio que el que proponía esta primera clasificación. Las toxinas CryIC y CryIB además de para lepidópteros también han mostrado actividad sobre dípteros (Smith y Ellar, 1994) y coleópteros (Bradley et al., 1995), respectivamente. Las toxinas de la subespecie israelensis (CryIVA, CryIVB, CryIVC, CryIVD, CytA, CytB; de acuerdo a la primera clasificación) eran consideradas específicas contra dípteros, pero varios trabajos han demostrado que su espectro se amplía a algunos lepidópteros (de Souza et al., 2009; Ignoffo et al., 1981; Sayyed et al., 2001; Vassal et al., 1993) y coleópteros (Federici y Bauer, 1998; Martins et al., 2007; Méndez-López et al., 2003). Esta circunstancia, sumada al descubrimiento de nuevas δ -endotoxinas con espectros de toxicidad diferentes, provocó que se propusiera una revisión de la nomenclatura de Höfte y Whiteley.

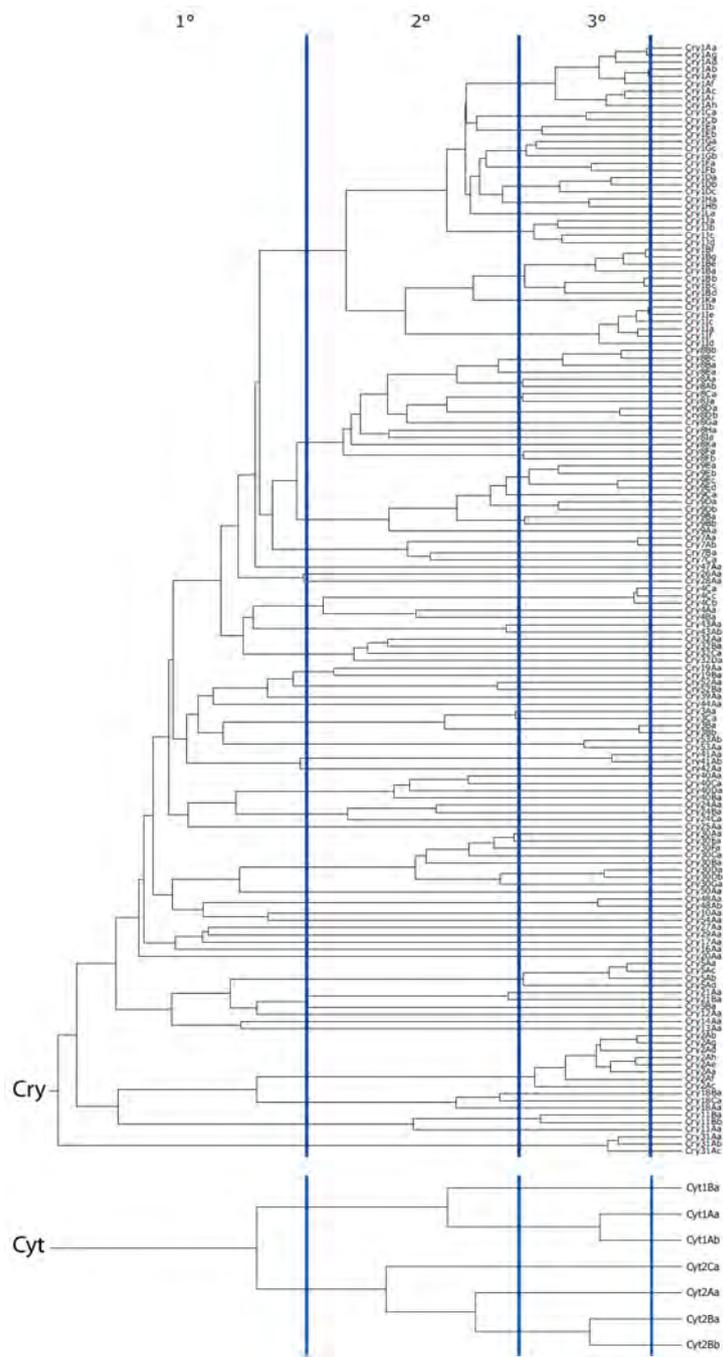


Figura 1.6 Dendrograma de las δ -endotoxinas Cry (arriba, actualizado el 28.11.08) y Cyt (abajo, actualizado el 13.12.01). Las líneas verticales indican los límites al 45%, 78% y 95% de homología. Fuente: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

El nuevo sistema se desarrolló en base a la homología de la secuencia proteica, exclusivamente (Crickmore et al., 1998), y establece toxinas holotipo únicas que se ordenan mediante 3 rangos basados en el grado de divergencia de su secuencia; con los límites entre el primero (número arábigo, familia; ej. Cry11), el segundo (letra mayúscula; ej: Cry11A) y el tercero (letra minúscula; ej: Cry11Aa) de un 45%, 78% y 95% de identidad, respectivamente (Figura 1.6). Adicionalmente, se incorpora un cuarto rango (otro número arábigo; ej: Cry11Aa1) para indicar aislamientos independientes de un gen holotipo cuyas secuencias son idénticas o difieren ligeramente. Según este criterio, este sistema permite la inclusión de nuevas δ -endotoxinas así como de proteínas cristalinas de alta homología pero que son producidas por especies diferentes a *B. thuringiensis*, como son: Cry16 y Cry17, producidas por *Clostridium bifermentans* (Weinberg y Séguin) (Barloy et al., 1998) y Cry18, por *Bacillus popilliae* (Dutki) (Zhang et al., 1997).

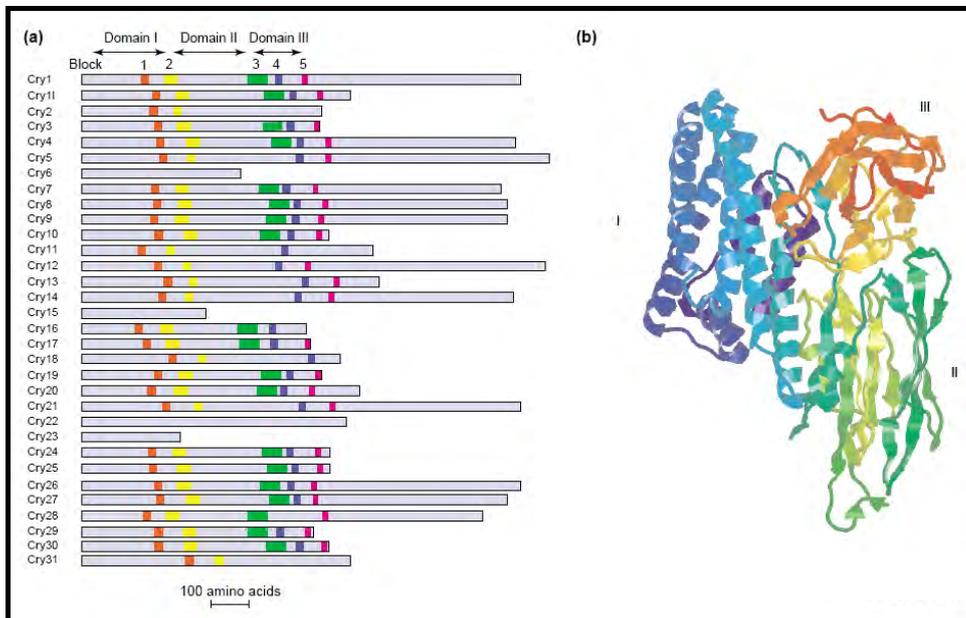


Figura 1.7 Estructura primaria y terciaria de las toxinas Cry. (a) Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry, posición de los cinco bloques conservados (si están presentes) y correspondencia con los dominios I, II y III. (b) Estructura tridimensional de la toxina activada Cry1Aa, donde se muestran los 3 dominios que la componen: I (azul), II (verde), III (amarillo-rojo) (de Maagd et al., 2001).

El sistema propuesto es aplicable tanto a la clasificación de las proteínas Cry como de las Cyt. En la actualidad, se conocen 462 genes de proteínas Cry distribuidos en 187 holotipos y 59 familias; y 27 genes de proteínas Cyt, con 9 holotipos y 2 familias (“*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature” http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, revisado el 17.09.09).

Las δ -endotoxinas tipo **Cry** son proteínas globulares formadas por 3 dominios estructurales (Bravo et al., 2007). El alineamiento de su estructura primaria (secuencia aminoacídica) ha permitido determinar la existencia de dos grandes grupos en cuanto a tamaño; siendo las protoxinas de mayor tamaño (aproximadamente 130 kDa) en torno a dos veces mayores que el resto (aproximadamente 70 kDa) (Figura 1.7 a). La mitad C-terminal de las protoxinas de mayor tamaño no forma parte de la toxina activa (ya que es digerida por las proteasas del insecto, ver sección 1.2.2). Es una zona muy rica en aminoácidos cisteína que forman de puentes disulfuro intermoleculares y, por ello, esta región tiene un papel clave en la cristalización y solubilización de estas protoxinas (Agaisse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995). La activación de las proteínas Cry también conlleva la digestión de una pequeña porción del extremo N-terminal de la protoxina, evento fundamental para permitir su función tóxica (de Maagd et al., 2003). El alineamiento de las toxinas activas ha revelado la presencia de hasta 5 bloques altamente conservados a lo largo de la secuencia de la gran mayoría de las toxinas Cry (Höfte y Whiteley, 1989) (Figura 1.7 a). Estas regiones parecen ser determinantes del plegamiento de la proteína, además su alto grado de conservación entre las toxinas Cry se corresponde con la similitud de su estructura tridimensional y su modo de acción (de Maagd et al., 2003; Schnepf et al., 1998).

Hasta la fecha se ha determinado la estructura terciaria de siete toxinas Cry (activas) por cristalografía de rayos-X: Cry1Aa (Grochulski et al., 1995) (Figura 1.7 b), Cry1Ac (Derbyshire et al., 2001; Li et al., 2001), Cry2Aa (Morse et al., 2001), Cry3Aa (Li et al., 1991), Cry3Bb (Galitsky et al., 2001), Cry4Aa (Boonserm et al., 2006) y Cry4Ba (Boonserm et al., 2005). A pesar de que estas toxinas presentan una homología de secuencia de baja a moderada (17%-40%), la similitud de su estructura tridimensional es muy elevada, con 3 dominios que prácticamente pueden superponerse (Bravo et al., 2007). El dominio situado en el extremo N-terminal, dominio I, está formado por 7

hélices- α antiparalelas (6 hélices anfipáticas rodeando a una hélice central hidrofóbica). El dominio II consiste en 3 láminas- β antiparalelas dispuestas en la conformación denominada prima- β . El dominio III, en el extremo C-terminal, forma un “sándwich” de dos láminas- β antiparalelas (Bravo et al., 2007; de Maagd et al., 2001; de Maagd et al., 2003; Schnepf et al., 1998) (Figura 1.7 b). El dominio I está involucrado en la inserción a la membrana y la formación del poro, mientras que los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión a los receptores de membrana. Estos aspectos serán tratados con mayor profundidad en el apartado 1.2.2, modo de acción de las δ -endotoxinas.

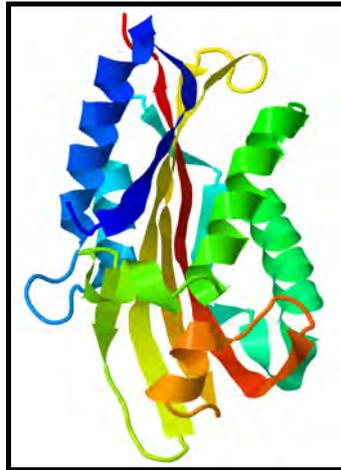


Figura 1.8 Estructura terciaria de la toxina Cyt2Ba. Fuente: <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Cyt2Ba>

Las δ -endotoxinas tipo **Cyt** son exclusivas de algunas cepas de *B. thuringiensis*, sobre todo de subespecies que son activas contra dípteros (Promdonkoy et al., 2008), y se componen de dos familias altamente relacionadas, Cyt1 y Cyt2 (Crickmore et al., 1998) (Figura 1.6). El alineamiento de la estructura primaria de las toxinas Cyt refleja 4 bloques conservados que son clave en la determinación de la estructura y la función de la toxina (Butko, 2003). Hasta el momento se ha obtenido la estructura tridimensional de 2 toxinas Cyt: Cyt2Aa (Li et al., 1996) y Cyt2Ba (Cohen et al., 2008). La relativamente alta homología de secuencia entre ambas (67%) se refleja en una gran similitud estructural, con un único dominio compuesto de dos horquillas de hélices- α envolviendo una lámina- β mixta central (Figura 1.8).

1.2.1.3.2 Otros factores de virulencia

Bacillus thuringiensis, al igual que otras especies del grupo *B. cereus*, ha desarrollado un amplio arsenal de compuestos tóxicos, algunos específicos contra insectos e invertebrados, como las δ -endotoxinas, pero también otros menos selectivos. La presencia de estos factores de virulencia es dependiente de la cepa y debe ser tenida en consideración en la producción de cualquier producto basado en *B. thuringiensis*. A continuación se describen algunos de estos factores.

Existen varios trabajos que demuestran que para ciertas cepas e insectos diana, las **esporas** de *B. thuringiensis* muestran un efecto sinérgico con la actividad de las δ -endotoxinas de los cristales paraesporales (Dubois y Dean, 1995; Johnson y McGaughey, 1996; Miyasono et al., 1994), aunque este efecto no parece ser universal (Liu et al., 1998). El mecanismo por el cual la espora tiene este efecto potenciador no es bien conocido. Si bien la germinación de la espora en el hemocele del insecto y su posterior multiplicación (septicemia) explicaría la adaptación de *B. thuringiensis* como especie entomopatógena, recientemente se han publicado trabajos en los que se sugiere que el efecto patógeno de *B. thuringiensis* en algunas especies de lepidópteros depende en último término de la proliferación de las bacterias nativas de la flora intestinal del insecto más que de la del mismo *B. thuringiensis* (Broderick et al., 2006; Broderick et al., 2009). La validez e implicaciones de estos estudios son actualmente fruto de un intenso debate (Johnston y Crickmore, 2009; Raymond et al., 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que el efecto sinérgico de las esporas en la actividad de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* y *entomocidus* sobre el lepidóptero *Plodia interpunctella* (Hübner) no solo depende de la germinación de las mismas sino que también reside en las proteínas presentes en su cubierta (Johnson et al., 1998).

A diferencia las δ -endotoxinas, que se acumulan en inclusiones insolubles dentro de la célula madre durante la fase estacionaria de crecimiento, existen otros compuestos extracelulares tóxicos que pueden ser producidos previamente a la esporulación:

β -exotoxina, también conocida como thuringiensina, se produce y se excreta al medio durante la fase de crecimiento vegetativo (WHO, 1999). Su gran similitud estructural con el AMP hace que esta toxina muestre propiedades tóxicas de amplio espectro, incluso

sobre el hombre (Glare y O'Callaghan, 2000). Por este motivo, el uso de productos basados en cepas productoras de β -exotoxina está prohibido en la mayoría de los países (Joung y Côté, 2000).

Las proteínas Vip, del inglés “vegetative insecticidal proteins”, son sintetizadas y secretadas al medio principalmente durante la fase de crecimiento vegetativo (Estruch et al., 1996). Se han detectado 3 grupos, Vip1, Vip2 y Vip3; que muestran actividad sobre algunos lepidópteros y coleópteros (de Maagd et al., 2003).

Otros factores tóxicos que han sido identificados en sobrenadantes de cultivos de algunas cepas de *B. thuringiensis* son las enterotoxinas, similares a las de *B. cereus* (Perani et al., 1998). Algunas cepas de *B. thuringiensis* pueden expresar hemolisinas (Honda et al., 1991) y también existen cepas que excretan enzimas hidrolíticas como fosfolipasas, quitinasas y proteasas (Glare y O'Callaghan, 2000).

1.2.1.4 Aplicaciones biotecnológicas

El éxito logrado por los productos-Bt radica en que son altamente efectivos sobre numerosos insectos diana (a un nivel comparable al de los insecticidas sintéticos), son muy específicos y por tanto medioambientalmente seguros tanto para fauna auxiliar, enemigos naturales, vertebrados y plantas (Schnepf et al., 1998; WHO, 1999). Además, su producción es económicamente competitiva gracias al desarrollo de sistemas de fermentación a gran escala y su aplicación en campo se adapta perfectamente a los equipos convencionales de pulverización (Escriche et al., 2001).

El uso inicial y más extendido de *B. thuringiensis* es la utilización de formulaciones basadas en esporas y cristales de una cepa nativa de la especie, a una concentración aproximada de 2.5×10^{11} esporas viables por gramo (EXTOXNET, 2009). Actualmente, existen más de 120 tipos de formulaciones comerciales registradas en más de 60 países, principalmente para el control de lepidópteros, coleópteros y dípteros en agricultura, manejo forestal y control sanitario (Zhou et al., 2005). En España, actualmente existen 53 productos-Bt registrados (Tabla 1.1). El espectro de actividad de los productos-Bt depende fundamentalmente de la δ -endotoxina particular, o combinación de ellas, producida por la cepa de *B. thuringiensis* a partir de la cual se han desarrollado. Otro

factor determinante de su actividad y también de su persistencia en el medio es el tipo de formulación utilizada. *Bacillus thuringiensis* (esporas y cristales) es insoluble en agua y se mezcla por emulsión o suspensión. Existen diversos tipos de formulados, como: polvos mojables, concentrados líquidos emulsionables, granulados, “pellets” y “briquettes”, concentrados en spray, cebos y anillos de liberación lenta (EXTOXNET, 2009; Glare y O’Callaghan, 1998). Estos productos pueden incorporar coadyuvantes comunes a insecticidas de síntesis como surfactantes, adherentes, espesantes y ligantes, o productos más específicos como estimulantes alimenticios o protectores de UV.

Tabla 1.1 Productos comerciales basados en *B. thuringiensis* registrados en España.

Registro	Nombre	Formulado	Titular
19692	XENTARI GD	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
24519	FLORBAC	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
24909	TRON	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
25048	SLOGAN	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	EXCLUSIVAS SARABIA, S.A.
25260	BOSS WDG	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	CEQUISA, S.A.
25332	XTREEM	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 15% (15 MILL. DE U.L/G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
19430	TUREX	BACILLUS THURINGIENSIS AIZAWAI 2.5% (25 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	MITSUMI AGRISCIENCE INTERNATIONAL S.A./N.V.
17653	SKEETAL	BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS 0.6% (0.6 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
19226	VECTOBAC 12 AS	BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS 1.2% (1.2 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
19121	NOVODOR	BACILLUS THURINGIENSIS TENEBRIONIS 0.01% (0.01 MILL. DE UTBT/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
24845	BELTHIRUL-S	AZUFRE 60% + BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 1.43% (1X10E6 U/G) [DP] P/P	PROBELTE, S.A.
19860	ECOTECH BIO	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 10% (10 MILL. DE U.L/G) [WP] P/P	MITSUMI AGRISCIENCE INTERNATIONAL S.A./N.V.
18682	FORAY 48 B	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 11.8% (11.8 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
19158	BIOBIT-XL	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 11.8% (11.8 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
25313	BELTHIRUL 16 SC	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	PROBELTE, S.A.
13951	DIPEL X	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
17654	NOVO BIOBIT	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
22954	PRESA 16	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	INDUSTRIAS AFRASA, S.A.
23601	KRAKEN	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
23643	LABICILLUS	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
25258	BIOSCROP BT 16	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	LABORATORIOS ECONATUR S.L.
25314	BELTHIRUL 16 WP	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.L/G) [SC] P/V	PROBELTE, S.A.

Bacillus thuringiensis

24142	BELTHIRUL-PLUS	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.I./G) + TEBUFENOCIDA 18% [WP] P/P	PROBELTE, S.A.
24160	ORIXA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 16% (16 MILL. DE U.I./G) + TEBUFENOCIDA 18% [WP] P/P	DOW AGROSCIENCES IBERICA, S.A.
19776	DIPEL ES	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 17.6% (17.6 MILL. DE U.I./G) [EC] P/V	KENOGARD, S.A.
17545	DIPEL-LA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 17.6% (17.6 MILL. DE U.I./G) [EC] P/V	KENOGARD, S.A.
21958	BACTUR 2X SC	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 17.6% (17.6 MILL. DE U.I./G) [EC] P/V	KENOGARD, S.A.
25336	BELTHIRUL-F	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 17.6% (17.6 MILL. DE U.I./G) [EC] P/V	PROBELTE, S.A.
22060	COSTAR	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 18% [WG] P/P	mitsui agriscience INTERNATIONAL S.A./N.V.
19848	CORDALENE	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 24% [SC] P/V	AGRICHEM, S.A.
19849	LEPINOX	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 24% [WP] P/P	AGRICHEM, S.A.
23737	FORAY 96 B	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 24.6% (21.2 MILL. DE U.I./G) [SC] P/V	KENOGARD, S.A.
21072	BACTUR 2X WG	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
23738	DIPEL DF	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
24520	BIOBIT 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
25042	SEQURA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
25342	BACTOSPEINE	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
18234	SEQURA 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
19856	BACTUR 2X	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
21056	GEODA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	KENOGARD, S.A.
22423	BELTHIRUL	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	PROBELTE, S.A.
23604	MERGER	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	DOW AGROSCIENCES IBERICA, S.A.
23976	BAZTHU-32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	LAINCO, S.A.
24096	EPSILON	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	TOMCATO, S.A.
25060	TALIA 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	SAPEC AGRO S.A.U.
25155	VOLTEO	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	FITOVAL S.L.
25194	BT-MERISTEM	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	QUIMICAS MERISTEM, S.L.
25195	B.T. 32 SEIPASA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	SEIPASA S.A.
25257	BIOSCROP BT 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	LABORATORIOS ECONATUR S.L.
25318	BATHUR	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	PORPORAS, S.A.
25325	B-TEC 32	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	IBERFOL S.L.
19159	DELFIN	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 32% (KURSTAKI 30.36, CEPA SA-11; 32 MILL. DE U.I./G) [WG] P/P	mitsui agriscience INTERNATIONAL S.A./N.V.
19862	ECOTECH EXTRA	BACILLUS THURINGIENSIS KURSTAKI 7.5% (7.5 MILL. DE U.I./G) [OF] P/P	mitsui agriscience INTERNATIONAL S.A./N.V.

Fuente: <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp#art3> (29-12-09)

El conocimiento de las bases genéticas de la toxicidad de *B. thuringiensis* así como de diferentes técnicas de transformación genética han permitido el desarrollo de los denominados productos-Bt de segunda y tercera generación. Estos productos, en lugar de basarse en esporas y cristales de cepas nativas, se obtienen a partir de cepas de *B. thuringiensis*, u otras especies de bacterias, que han sido modificadas genéticamente. Para una revisión en profundidad de este tipo de productos consultar Schnepf et al. (1998) y Federici et al. (2005).

El desarrollo de plantas transgénicas ha supuesto un punto de inflexión en la aplicación de las toxinas de *B. thuringiensis* en el control de plagas. La expresión de δ -endotoxinas *in planta* soluciona el problema de su baja persistencia en el medio ambiente y permite localizar su expresión de forma dirigida en diferentes órganos de la planta y/o estados de desarrollo. La primera vez que se aplicó la transgénesis para obtener plantas productoras de toxinas de *B. thuringiensis* fue en 1987 (Vaeck et al., 1987), y en 1996 se autorizaron los primeros cultivos-Bt para uso comercial en EEUU (Schnepf et al., 1998). En España, el único cultivo-Bt autorizado es el maíz-Bt, desde 1998 (Eizaguirre et al., 2006). Actualmente, España es el país de la Unión Europea con más superficie plantada, con aproximadamente 80000 ha (MARM, 2009a).

1.2.2 Modo de acción de las δ -endotoxinas

1.2.2.1 Modo de acción de las toxinas Cry

La transformación de las proteínas Cry de protoxinas cristalizadas relativamente inertes a formas citotóxicas en un proceso complejo que consta de varias etapas (Schnepf et al., 1998). Las particularidades ligadas a cada una de estas etapas determinarán en último término la especificidad de cada toxina o combinación de ellas.

Si bien las fases iniciales del proceso son bien conocidas y existe cierto consenso al respecto en la comunidad científica, las fases posteriores (interacción de la proteínas activadas con la membrana intestinal y el desencadenamiento de la respuesta patogénica) son fruto de un intenso debate y se han propuesto varios modelos de acción (Pigott y Ellar, 2007). En consecuencia, ambas fases serán tratadas en apartados diferentes.

1.2.2.1.1 Primera fase

Los cristales de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* deben ser ingeridos por el insecto para ser efectivos. El cristal permanece prácticamente intacto hasta llegar al intestino medio, donde ejercerá su actividad. Allí las condiciones del medio posibilitan la solubilización del cristal y la liberación de las protoxinas. El factor determinante en este proceso es el pH; si el pH del lumen intestinal no es el adecuado, los cristales no se solubilizarán y por lo tanto no ejercerán su actividad. El pH óptimo de solubilización depende la composición del cristal. La gran mayoría de las protoxinas Cry se solubilizan eficientemente a pH alcalino, como el existente en el tracto intestinal de lepidópteros y la mayoría de dípteros susceptibles a Bt (Bravo et al., 2007). Sin embargo, los cristales compuestos de protoxinas de la familia Cry3 se solubilizan mejor a pH neutro o ligeramente ácido, condiciones que coinciden con las existentes en el intestino medio de los coleópteros, los insectos susceptibles a este tipo de toxinas (Aronson et al., 1991; Oppert, 1999).

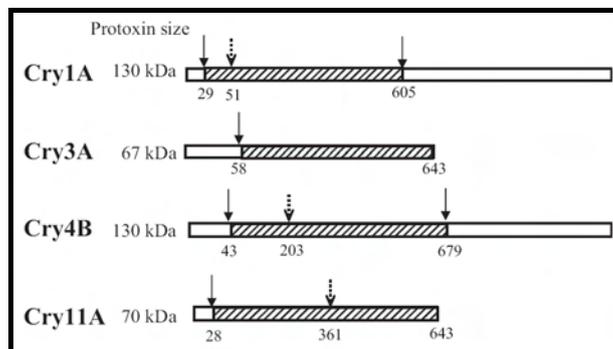


Figura 1.9 Longitud relativa de diferentes protoxinas Cry y sitio de corte por proteasas.

Los cuadros blancos representan la protoxina mientras que los cuadros a rayas indican la longitud de la toxina activada. Las flechas enteras muestran los sitios de corte en los extremos N-terminal (izquierda) y C-terminal (derecha) que dan lugar a la toxina activada. Las flechas punteadas indican sitios de corte intramoleculares en la toxina activada. Fuente: (Bravo et al., 2007).

Las protoxinas liberadas al lumen intestinal no son tóxicas por sí mismas, deben ser activadas por la acción de los enzimas proteolíticos (proteasas) del insecto. Las proteasas mayoritarias en el intestino de lepidópteros y dípteros son del tipo serín proteasas (tripsinas y quimotripsinas) y aunque existen otros tipos de proteasas que pueden

participar en la activación de las protoxinas Cry, éstas son las determinantes (de Maagd et al., 2001; Díaz-Mendoza et al., 2007). El proceso de activación es secuencial, de forma que se producen una serie de polipéptidos intermedios hasta obtenerse la toxina activa resistente a proteasas, este proceso es dependiente del tipo de protoxina y del complejo de proteasas presente. En el caso de las protoxinas de 130-140 kDa, la digestión comienza en el extremo C-terminal y progresa en varios pasos hasta degradar la mitad C-terminal de la protoxina (unos 500 aa), dando lugar a un polipéptido de 60-70 kDa (Figura 1.9). Las toxinas cortas, como Cry2, Cry3 y Cry11, en cambio, no son procesadas en su extremo C-terminal, por ello han sido consideradas productos truncados naturales de las toxinas de mayor tamaño (Höfte y Whiteley, 1989). Por otra parte, todas las protoxinas estudiadas sufren degradación proteolítica en su extremo N-terminal, liberando normalmente un pequeño péptido de no más de 60 aa, dependiendo de la protoxina (Figura 1.9). Se ha demostrado que el procesamiento en este extremo es esencial para que la toxina sea activa, ya que permite la exposición de una parte del dominio II que es fundamental en pasos posteriores del mecanismo de acción (Bravo et al., 2002).

Al menos en el caso de las toxinas Cry1A, la toxina activada (60-65 kDa) sufre un segundo paso de procesamiento en el extremo N-terminal una vez unida al receptor primario de la pared intestinal (Bravo et al., 2002; Gómez et al., 2002) (Figura 1.9). De esta forma se libera la hélice α -1 del dominio I, porción que se ha demostrado dispensable para la toxicidad (Miranda et al., 2001). Varios estudios han mostrado que la toxina Cry1Ab digerida con jugos intestinales de insectos puede dar lugar a toxinas activas de menor tamaño a aquella obtenida por digestión con tripsina comercial (58 kDa frente a 60-65 kDa) (Li et al., 2004; Miranda et al., 2001; Mohan y Gujar, 2003). Estas toxinas no incorporan la citada hélice α -1 y siguen manteniendo su actividad, sugiriéndose por ello que este polipéptido es la hipotética toxina mínima. Recientemente, sin embargo, se ha descrito que el procesamiento de esta protoxina con extractos del lepidóptero *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) da lugar a toxinas menores, de hasta 43 kDa, que continúan manteniendo la actividad sobre esta especie (Díaz-Mendoza et al., 2007). Adicionalmente, se ha observado que las toxinas mosquitocidas Cry11 y Cry4 activadas sufren un último corte intramolecular que libera dos fragmentos activos que permanecen asociados (Angsuthanasombat et al., 1993; Dai y Gill, 1993; de Barros Moreira y Silva-Filha, 2007; Segura et al., 2000; Yamagiwa et al., 2004) (Figura 1.9).

Bacillus thuringiensis produce proteasas intracelulares endógenas, especialmente al inicio de la fase de esporulación y formación del cristal (Oppert, 1999). Estas proteasas pueden hidrolizar parcialmente las protoxinas recién sintetizadas (Rukmini et al., 2000) o incluso procesarlas ya en el cristal (Dai y Gill, 1993). Es más, en algunos casos se ha descrito la presencia de proteasas en el cristal paraesporal (Kumar y Venkateswerlu, 1997). Además, se ha demostrado que el preprocesamiento de las protoxinas mediante proteasas endógenas puede tener implicaciones en la especificidad de la toxina (Kumar y Venkateswerlu, 1998).

Como se ha mencionado, la activación proteolítica es un proceso que depende de la fuente de proteasas. Algunas proteasas comerciales, así como extractos intestinales de diferentes especies de insectos (Lightwood et al., 2000; Ogiwara et al., 1992) e incluso extractos de larvas en diferentes estadios de desarrollo (Keller et al., 1996) pueden dar lugar a patrones de degradación y a toxinas activadas diferentes, y esto puede repercutir en la toxicidad y especificidad de las mismas (Haider et al., 1986). De hecho, uno de los mecanismos de resistencia que desarrollan los insectos frente a *B. thuringiensis* consiste en alterar la activación de sus protoxinas (Ferré y Van Rie, 2002; Forcada et al., 1996; Oppert et al., 1997).

Para ejercer su función en la pared del epitelio intestinal, las toxinas activas deben atravesar la membrana (o matriz) peritrófica (MP), que se localiza entre el lumen intestinal y la membrana apical de las células epiteliales y está compuesta por un entramado de fibras de quitina en capas unidas por glicoproteínas (Hegedus et al., 2009). Se ha demostrado que las toxinas activadas pueden ser interceptadas al interactuar con los residuos azucarados de las glicoproteínas de la MP (Campbell et al., 2008; Hayakawa et al., 2004). La estructura y composición de la MP puede variar mucho entre especies de un mismo orden de insectos y se ha planteado que éste puede ser un factor a tener en cuenta en la resistencia a las toxinas Cry (Rees et al., 2009).

1.2.2.1.2 Segunda fase

Tras atravesar la membrana peritrófica las toxinas se unen específicamente a moléculas situadas en la cara apical de las microvellosidades del epitelio intestinal, en concreto a las membranas en borde de cepillo de las células epiteliales (Schnepf et al., 1998). La

correlación existente entre esta unión y la toxicidad fue demostrada por primera vez utilizando vesículas obtenidas a partir de estas membranas, las conocidas BBMV's (del inglés "brush border membrane vesicles"), y aplicando la técnica desarrollada por Wolfersberger (Wolfersberger et al., 1987). Posteriores ensayos con diferentes toxinas y membranas obtenidas de varios insectos reflejaron que no existía tal correlación (Pigott y Ellar, 2007). Estudios llevados a cabo sobre la cinética de la unión toxina-membrana permitieron determinar que existen dos fases en este proceso, la primera en la que la unión era reversible y la segunda, irreversible (Liang et al., 1995). La visión actual del fenómeno establece que la fase reversible se correlaciona con la unión a la membrana, mientras que la irreversible se corresponde directamente a la inserción de la toxina en la membrana, y por tanto a la toxicidad (Pigott y Ellar, 2007). Este tipo de estudios han mostrado que en el intestino del insecto susceptible existen sitios de unión de la toxina altamente específicos. Dichos sitios de unión son principalmente proteínas de membrana, con funciones celulares concretas independientes del proceso patogénico, para las cuales *B. thuringiensis* ha evolucionado produciendo toxinas de alta afinidad. Por ello, estas moléculas son conocidas como "receptores".

En la actualidad se conocen varios tipos de receptores potenciales de toxinas Cry, sobre todo en las especies susceptibles más estudiadas de lepidópteros y, en menor medida, de dípteros. A continuación se describen brevemente:

Las **cadherinas** constituyen una superfamilia de glicoproteínas muy diversa y para la cual se han descrito numerosas funciones biológicas (Angst et al., 2001). Las cadherinas fueron las primeras moléculas sobre las cuales se detectó afinidad con las toxinas Cry (Vadlamudi et al., 1993). Se han identificado cadherinas con capacidad de unión a toxinas Cry en varias especies de lepidópteros (Bel y Escrache, 2006; Ihara et al., 1998; Jurat-Fuentes et al., 2004; Morin et al., 2003; Wang et al., 2005a) y en un díptero culícido, *Anopheles gambiae* (Giles) (Hua et al., 2008).

Las **aminopeptidasas N** (APNs) son una familia de enzimas proteolíticas que participan en el proceso digestivo (Wang et al., 2005b). Su tamaño varía de 90-170 kDa y están unidas a la membrana celular, en concreto a las regiones denominadas "balsas lipídicas", mediante anclajes de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Pigott y Ellar, 2007). Las APNs

han sido identificadas como sitios de unión de toxinas Cry en varias especies de lepidópteros (Candas et al., 2003; Jenkins et al., 2000; Knight et al., 1994; Luo et al., 1997; McNall y Adang, 2003; Yaoi et al., 1997) y dípteros culícidos (Abdullah et al., 2006; Bayyareddy et al., 2009).

Las **fosfatasas alcalinas** (ALPs) son enzimas hidrolíticas encargadas de la defosforilación de proteínas, nucleótidos y otras moléculas (Coleman, 1992). Se ha demostrado pueden actuar como receptores de toxinas Cry en varias especies de lepidópteros (Jurat-Fuentes y Adang, 2004; Krishnamoorthy et al., 2007; McNall y Adang, 2003; Sarkar et al., 2009) y dípteros culícidos (Bayyareddy et al., 2009; Fernández et al., 2006; Hua et al., 2009). Al igual que las APNs, las APLs poseen anclajes de GPI en su estructura.

Otros candidatos a receptores de toxinas Cry son los glicolípidos, cuyo papel como receptores ha sido demostrado únicamente en nemátodos, aunque se ha sugerido que también pudieran serlo en insectos (Griffitts et al., 2005). Otros receptores que han sido descritos son el glicoconjugado BTR-270 (Valaitis et al., 2001) y la proteína P252 (Hossain et al., 2004). Estudios recientes de proteómica han detectado nuevos receptores potenciales: las actinas (Bayyareddy et al., 2009; Krishnamoorthy et al., 2007; McNall y Adang, 2003); las subunidades A, B y D de la V-ATPasa (Bayyareddy et al., 2009; Krishnamoorthy et al., 2007); las subunidades α y β de la V-ATP sintasa mitocondrial (Bayyareddy et al., 2009); una proteína tipo desmocolina (Krishnamoorthy et al., 2007); y las proteínas prohibitina y flotilina-1 (Bayyareddy et al., 2009).

El conocimiento de la secuencia y la estructura de algunas proteínas Cry (ver apartado 1.2.1.3) ha permitido adquirir mucha información acerca de la participación de cada uno de los dominios en el mecanismo de acción. El dominio II es el dominio estructuralmente más variable en las toxinas estudiadas (Boonserm et al., 2005), por ello es considerado un factor determinante de la especificidad de las toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007). Esta variabilidad se refleja especialmente en los lazos apicales del dominio II. De la estructura globular de este dominio sobresalen 3 lazos, que son las uniones entre los plegamientos β (Figura 1.7). Existen estudios en los que la alteración de estas zonas por mutagénesis dirigida ha producido una pérdida drástica de la capacidad de unión y la toxicidad de las

toxinas (de Maagd et al., 2003; Schnepf et al., 1998). Esto pone de manifiesto el papel de estas regiones en la interacción con los receptores y por tanto en la especificidad. El dominio III es estructuralmente menos diverso que el II e inicialmente se consideró que su papel era dar estabilidad a la toxina y protegerla frente a proteasas (Li et al., 1991). Sin embargo, el intercambio de este dominio entre varias toxinas ha demostrado su papel en el reconocimiento de los receptores y en la especificidad (Pardo-López et al., 2009). Por otro lado, también se ha propuesto que el dominio II interviene en la oligomerización de la toxina activa (Herrero et al., 2004), uno de los pasos del “modelo de formación de poro” que se expondrá más adelante. De hecho, se especula que el intercambio del dominio III podría haberse producido de forma natural, contribuyendo a la evolución de toxinas Cry con nuevos espectros insecticidas (Pigott y Ellar, 2007). Finalmente, el dominio I es el más conservado entre las toxinas Cry y no interviene en el reconocimiento de receptores, ni en la especificidad, sino que, por sus propiedades físicas y similitud a otras toxinas formadoras de poro, parece estar implicado en la inserción a la membrana (de Maagd et al., 2003).

Como se ha mencionado, no existe consenso sobre los pasos finales del mecanismo de acción relativos a la interacción de la toxina activa con los receptores intestinales y la ejecución de su efecto citotóxico. A continuación se presentarán sintéticamente los 3 modelos que se han planteado en la actualidad:

A. Modelo de formación de poro y acción secuencial

Este modelo ha sido propuesto por la Dr. Alejandra Bravo (UNAM, México) (Bravo et al., 2004; Bravo et al., 2007; Soberón et al., 2009) y es una actualización del modelo propuesto por Knowles y Ellar (Knowles y Ellar, 1987). El modelo propone que tanto los receptores de tipo cadherina como la APN (o ALP) son necesarios para la toxicidad plena de la toxina, de forma que el proceso sería secuencial (Figura 1.10): A) los monómeros de la toxina activa se unen inicialmente a cadherinas (unión reversible), esta interacción conduce a un cambio conformacional de la toxina que facilita el corte de la hélice α -1 por proteasas situadas en la membrana; B) en este estado la toxina se oligomeriza formando un tetrámero, la estructura “pre-poro”, que muestra alta afinidad por las APNs (unión irreversible), entonces la APN conduce el pre-poro a las regiones de membrana denominadas balsas lipídicas, que facilitan la inserción del oligómero en la membrana,

mediada por la acción de los dominios I, y la formación del poro. C) La acumulación de estos poros en la membrana apical del epitelio provoca una alteración drástica del potencial de membrana y el equilibrio osmótico, que fuerza la entrada de agua en la célula, ésta se hincha y se lisa.

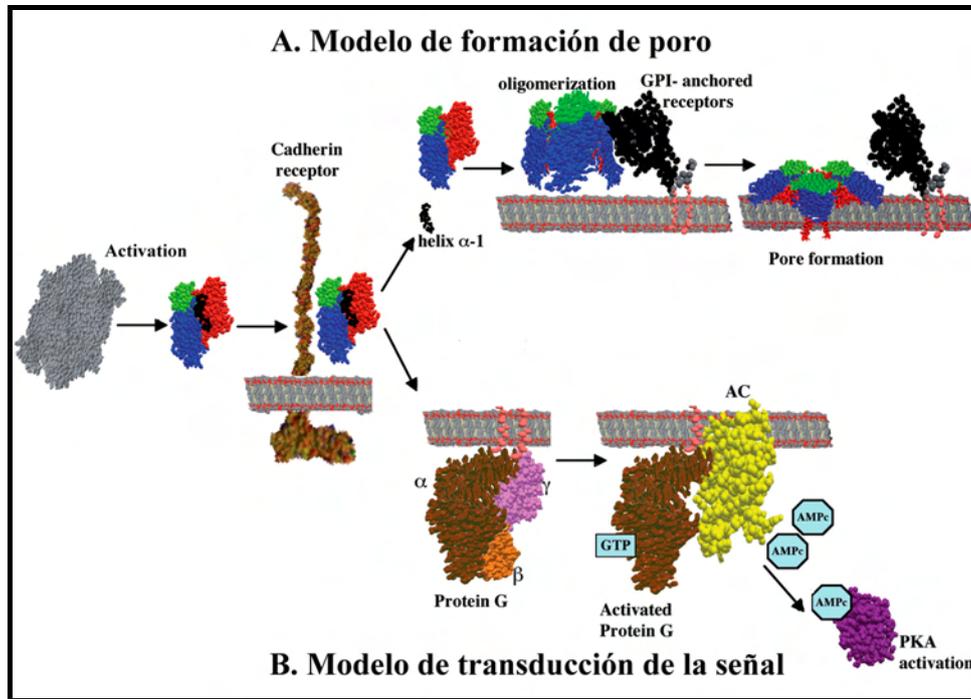


Figura 1.10 Esquema de 2 modelos de acción de las toxinas Cry: A. Modelo de formación de poro (arriba) y B. Modelo de transducción de la señal (abajo). Ambos modelos comparten las fases iniciales: solubilización de las protoxinas (no ilustrada), activación y unión a receptores tipo cadherina en membrana. Fuente: (Soberón et al., 2009).

B. Modelo de transducción de la señal

Este modelo ha sido propuesto por el Dr. Xuebin Zhang del grupo del Dr. L.A. Bulla (University of Texas, EEUU) (Zhang et al., 2005; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2008b). Según este modelo, la unión de la toxina monomérica a cadherinas en la membrana iniciaría una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} que culmina en la muerte celular (Figura 1.10). La ruta de señalización sería un proceso de múltiples pasos que comprendería la estimulación de una proteína de unión a guanina (proteína G), que a su vez activa la adenilil ciclasa (AC), y en consecuencia se produce un aumento del

adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y que activa la proteína quinasa A (PKA) provocando la desestabilización del citoesqueleto, la formación de canales iónicos y finalmente la muerte celular. Este modelo incorpora como único receptor a las cadherinas y no prevé la formación de oligómeros de toxinas.

C. Modelo mixto

Este modelo fue desarrollado sobre el lepidótero *Heliothis virescens* (Fabricius) con la toxina Cry1Ac por el Dr. J. Luis Jurat Fuentes del grupo del Dr. M. Adang (University of Georgia, EEUU) (Jurat-Fuentes y Adang, 2006), y sugiere que la citotoxicidad de las toxinas Cry es debida al efecto combinado de lisis osmótica y señalización celular, combinando por tanto elementos de los modelos anteriores. La unión del monómero de toxina activa a la cadherina tendría un doble efecto: A) la activación de una ruta de señalización intracelular regulada por fosfatasa que induce la muerte celular junto con una posible interacción de la toxina directamente con fosfatasa intracelulares y actinas. B) Por otro lado, la unión a cadherinas permite la oligomerización de las toxinas y su unión a proteínas con anclaje de GPI (APN y ALP), que dirigen al oligómero a las regiones tipo balsa lipídica donde se formará el poro, provocando lisis osmótica y la activación de la ruta de señalización que conduce a la muerte celular (Figura 1.11).

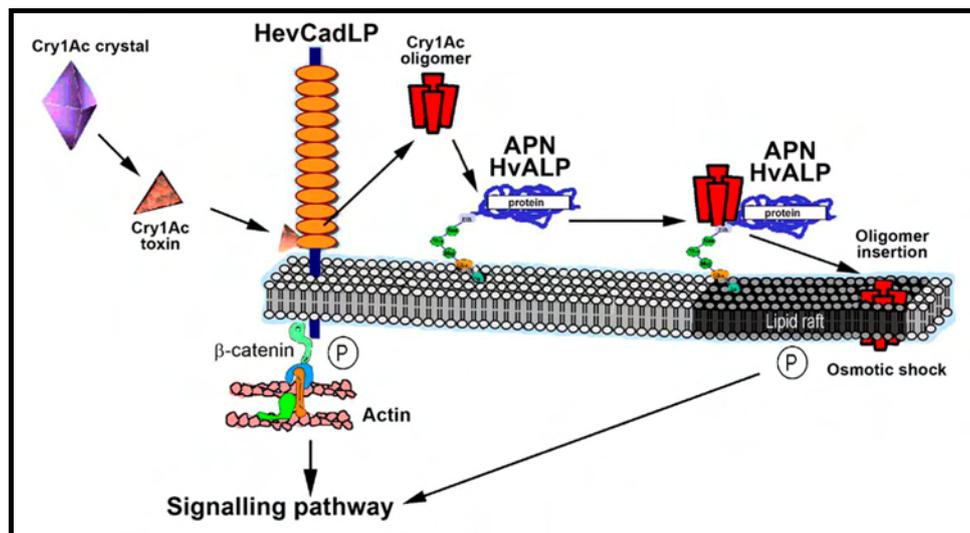


Figura 1.11 Esquema del modelo de acción de Cry1Ac sobre *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes y Adang, 2006).

En definitiva, la alteración fisiológica en la pared intestinal (ya sea por lisis osmótica, muerte celular o ambas) hace que el tejido del intestino medio pierda integridad (Zalunin et al., 2002) y permite la entrada de patógenos, y del propio *B. thuringiensis*. La muerte del insecto se produce por septicemia e inanición (Schnepf et al., 1998).

1.2.2.2 Modo de acción de las toxinas Cyt

Las proteínas Cyt comparten las fases iniciales de su mecanismo de acción con las proteínas Cry; al igual que éstas, se sintetizan y cristalizan en forma de protoxinas (de un tamaño de 24-27 kDa) y para adquirir su forma activa (22-25 kDa) deben ser solubilizadas bajo las condiciones de alcalinidad del tracto intestinal del insecto y sufrir la proteólisis de pequeños péptidos a ambos extremos de la protoxina (Al-yahyaee y Ellar, 1995; Cohen et al., 2008). Como las toxinas Cry, las toxinas Cyt activadas atraviesan la membrana peritrófica y alcanzan la pared intestinal donde causarán la lisis osmótica de las células epiteliales. No obstante, el mecanismo por el cual lo hacen es completamente diferente, ya que las toxinas Cyt no precisan de receptores proteicos sino que interactúan directamente y de una forma poco específica con la fracción lipídica de la membrana, en concreto con fosfolípidos cuya cabeza polar es de tipo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o esfingomielina y que tienen cadenas de ácidos grasos insaturados (Thomas y Ellar, 1983). El conocimiento del mecanismo no es completo y se han propuesto dos modos de acción: A) el “modelo de formación de poro”, que sugiere que las toxinas Cyt se insertan en la membrana como monómeros y cuando se alcanza una cierta densidad, éstos se oligomerizan conformando poros de membrana (Promdonkoy et al., 2008; Promdonkoy y Ellar, 2003); y B) el “modelo de acción tipo detergente”, según el cual las toxinas Cyt se agregan de forma poco específica sobre la superficie de la membrana plasmática alterando su estructura o incluso destruyéndola, de forma similar a un detergente (Butko, 2003; Manceva et al., 2005).

El espectro de actividad de las toxinas Cyt *in vivo* está restringido principalmente a dípteros (Bravo et al., 2007), aunque bajo ciertas condiciones también han mostrado actividad sobre alguna especie de coleóptero (Federici y Bauer, 1998) y lepidóptero (Sayyed et al., 2001). Sin embargo, en condiciones *in vitro* Cyt muestra actividad citolítica sobre muchos tipos de células de insectos y mamíferos; incluyendo eritrocitos,

linfocitos y fibroblastos (Butko, 2003). Como ocurre con su mecanismo de acción, los factores determinantes de la especificidad que Cyt muestra *in vivo* no son bien conocidos.

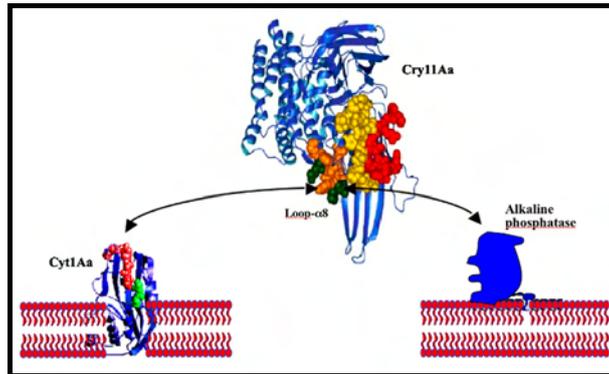


Figura 1.12 Funcionamiento de Cyt1Aa como receptor de membrana de Cry11Aa (Soberón et al., 2007a)

Uno de los aspectos más estudiados de las toxinas Cyt es su capacidad sinérgica al combinarlas con otras toxinas Cry, en especial con las toxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) sobre mosquitos (Federici et al., 2003; Sayyed et al., 2001; Wirth et al., 2007). Recientemente se ha descrito un mecanismo que explicaría la sinergia de Cyt con las toxinas Cry de Bti: las toxinas Cyt1Aa unidas a la membrana podrían actuar como segundos receptores para la toxina Cry11A, que interaccionaría con ellos exactamente en las mismas regiones de su estructura donde lo hace con los receptores del insecto, como ALP, favoreciendo así la formación del poro (Figura 1.12) (Pérez et al., 2005; Soberón et al., 2007a).

1.2.3 *Bacillus* sp. en el control de dípteros

1.2.3.1 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

La subespecie *israelensis* de *B. thuringiensis* (Bti) fue descubierta en 1976 a partir de mosquitos de una poza del desierto del Negev en Israel (Goldberg y Margalit, 1977). Bti muestra una elevada actividad insecticida sobre larvas de dípteros, en particular de mosquitos (Culicidae) y moscas negras (Simuliidae); entre los mosquitos, es activo sobre los 3 géneros más importantes: *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, en orden de susceptibilidad (Charles y Nielsen-LeRoux, 2000). El rango de concentración letal 50 (CL₅₀) sobre larvas de cuarto estadio de muchas especies de mosquitos es 10-13 ng/ml (Federici et al., 2003).

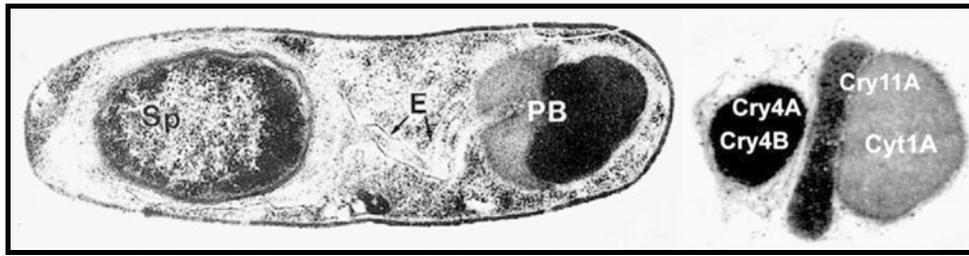


Figura 1.13 Esporangio de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (izquierda) y cuerpo paraesporal con inclusiones individuales correspondientes a cada toxina de esta subespecie (derecha). Sp, espora; E, exosporio; PB, cuerpo paraesporal. Fuente: (Federici et al., 2003).

Bti produce 4 δ -endotoxinas mayoritarias, Cyt1A (27 kDa), Cry4A (128 kDa), Cry4B (134 kDa) y Cry11A (72 kDa); que se ensamblan en 3 tipos de inclusiones diferentes integradas en un único cuerpo paraesporal mediante una membrana envolvente (Ibarra y Federici, 1986) (Figura 1.13).

Los productos-Bt basados en esta subespecie han logrado un gran éxito y son el principal insecticida microbiológico utilizado en el control de vectores de enfermedades, especialmente en países en desarrollo. Existen diversos formulados comerciales, los más utilizados son VectoBac® y Teknac® (Federici et al., 2003). Aunque el espectro insecticida de Bti abarca principalmente especies de dípteros, algunos insectos de otros órdenes, como lepidópteros y coleópteros, también han mostrado cierto grado de susceptibilidad (de Souza et al., 2009; Ignoffo et al., 1981; Martins et al., 2007; Méndez-López et al., 2003; Vassal et al., 1993).

1.2.3.2 Otras cepas y especies mosquitocidas

El éxito experimentado con la cepa Bti estimuló en todo el mundo el desarrollo de programas de búsqueda de nuevas bacterias y cepas de *B. thuringiensis* con propiedades mosquitocidas. Hasta la fecha, se han descubierto numerosos aislados activos, aunque su efectividad nunca ha superado la de Bti (Federici et al., 2003). Un aspecto común en la mayoría de aislados mosquitocidas encontrados es que muestran propiedades citolíticas sobre cultivos celulares, ya que producen, en mayor o menor medida, proteínas Cyt (Güerchicoff et al., 2001; Ragni et al., 1996).

La lista de subespecies en las que se ha hallado algún aislado mosquitocida es muy amplia: *jegathesan* (Btjeg) (Seleena et al., 1995); *medellin* (Btmed) (Orduz et al., 1992); *morrisoni* (Gill et al., 1987); *higo* (Hwang et al., 1998; Saitoh et al., 2000); *aizawai* (Ito et al., 2006a); *entomocidus* (Ito et al., 2006b); *sotto* (Ohgushi et al., 2003); *mogi* (Roh et al., 2009); *fukuokaensis* (Yu et al., 1991); *darmstadiensis*, *kyushuensis*, *leesis*, *thompsoni*, *malaysiensis*, *canadensis* (Güerchicoff et al., 2001; Ragni et al., 1996).

Otras especies bacterianas para las que se han descrito cepas mosquitocidas son: *Bacillus sphaericus* (Meyer y Neide) (Bs), que produce de las toxinas Bin y Mtx (Charles y Nielsen-LeRoux, 2000; Singer, 1974); *Brevibacillus laterosporus* (Laubagh) (Orlova et al., 1998); y *Clostridium bifermentans* (Cbm) (de Barjac et al., 1990), que produce proteínas de la familia Cry, Cry16 y Cry17 (Barloy et al., 1998).

1.2.3.3 *Bacillus thuringiensis* y moscas de la fruta (Tephritidae)

Hasta el momento, se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* con actividad insecticida sobre muchas especies del orden Diptera, pertenecientes a familias muy diversas: Culicidae (Goldberg y Margalit, 1977), Simuliidae (Cavados et al., 2001), Chironomidae (Hughes et al., 2005), Tipulidae (Oestergaard et al., 2007), Muscidae (Hodgman et al., 1993; Oh et al., 2004), Calliphoridae (Chilcott et al., 1998; Gough et al., 2005), Sciaridae (Choi et al., 2004) y Drosophilidae (Saadoun et al., 2001).

Igualmente, algunas especies de moscas de la fruta (familia Tephritidae) han mostrado cierta susceptibilidad a algún aislado de *B. thuringiensis* (Alberola et al., 1999; Bel et al., 1997; Karamanlidou et al., 1991; Robacker et al., 1996). En cuanto a *C. capitata*, existe un trabajo precedente donde se evaluó la eficacia de fracciones de cultivo de 94 aislados de *B. thuringiensis*, determinando niveles de mortalidad superiores al 80% con 15 de ellos (Gingrich, 1987). Sin embargo, el autor del estudio atribuyó la toxicidad principalmente a la presencia de β -exotoxina en los extractos. Este metabolito ha mostrado su eficacia en el control de otras moscas de la fruta (Toledo et al., 1999), aunque, como se ha mencionado previamente, es un factor indeseable en cepas de *B. thuringiensis* debido a su baja selectividad biológica.

Por otro lado, otros estudios efectuados sobre *Anastrepha ludens* (Loew) (la mosca mexicana de la fruta) detectaron hasta 7 aislados de *B. thuringiensis* con actividad sobre larvas y adultos de la especie (mortalidad máxima del 80%) (Robacker et al., 1996; Toledo et al., 1999). En estos trabajos, la toxicidad se atribuyó a las mezclas de esporas y cristales de δ -endotoxinas, sin embargo no se identificó la naturaleza de éstas ni se cuantificó su concentración letal 50. La segunda especie que ha mostrado susceptibilidad a preparados de *B. thuringiensis* es la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi). Karamanlidou et al. evaluaron 24 cepas aisladas del agroecosistema del olivar registrando máximos de mortalidad próximos al 90% en larvas alimentadas sobre dietas a base de esporas y cristales; no obstante, no se detectó actividad sobre adultos (Karamanlidou et al., 1991). En este estudio, al menos para una cepa, se determinó que las esporas de *B. thuringiensis* eran larvicidas sobre *B. oleae* por sí solas. En un trabajo similar, realizado a mayor escala, se identificaron aislados activos sobre la mosca del olivo tanto en estado de larva como de adulto (80% de mortalidad máxima) (Alberola et al., 1999); sin embargo, a pesar de haber realizado análisis genéticos relativos a las δ -endotoxinas, no pudo establecerse una clara correlación entre la composición de los cristales y su actividad. En un trabajo posterior, la aplicación en campo de preparados de esporas y cristales de uno de estos aislados (114A), 4-6 pulverizaciones anuales durante tres años sucesivos, logró niveles de control de la mosca del olivo satisfactorios (Navrozidis et al., 2000).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es la obtención de cepas y/o toxinas de *Bacillus thuringiensis* (nativas o modificadas) con propiedades insecticidas sobre la mosca mediterránea de la fruta y que puedan contribuir a su control como plaga. Los objetivos particulares son:

1. Prospección de la biodiversidad natural de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para la identificación de cepas activas sobre *Ceratitis capitata*:

- 1.1 Elaboración de una colección de cepas Bt aisladas del agroecosistema cítrica
- 1.2 Caracterización de dicha colección por parámetros morfológicos y moleculares
- 1.3 Determinación de la toxicidad sobre *C. capitata* de mezclas de esporas y cristales y de sobrenadantes producidos por el cultivo de cepas de ésta y otras colecciones

2. Evaluación del efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de Bt sobre *C. capitata*

- 2.1 Solubilización de las protoxinas de una selección de cepas y evaluación de su actividad biológica sobre *C. capitata*
- 2.2 Digestión con diferentes fuentes de proteasas de las protoxinas solubilizadas de una selección de cepas y evaluación de la actividad biológica de los productos de digestión sobre *C. capitata*
- 2.3 Caracterización de la toxicidad de la(s) cepa(s) y toxina(s) más interesante(s)

3. Establecimiento de las bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas

- 3.1 Caracterización preliminar del proteoma intestinal (BBMVs) de *C. capitata*
- 3.2 Puesta a punto de un sistema modelo:
 - 3.2.1 Caracterización de la expresión de GFP de una línea transgénica GAL4-UAS de *Drosophila melanogaster*
 - 3.2.2 Producción de proteínas de fusión Cry-anticuerpo (anti-GFP)
 - 3.2.3 Análisis de las propiedades de unión y estabilidad de las proteínas de fusión obtenidas
 - 3.2.3 Evaluación de la actividad biológica de dichas proteínas sobre líneas transgénicas de *D. melanogaster*

3. Prospección de la biodiversidad natural de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Ceratitis capitata*

Los resultados recogidos en este apartado se han publicado en:

Vidal-Quist, J.C., Castañera, P., González-Cabrera, J., 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. J. Microbiol. Biotechnol. 19, 749-759.

Vidal-Quist, J.C., Castañera, P., González-Cabrera, J., 2009. Simple and rapid method for PCR characterization of large *Bacillus thuringiensis* strain collections. Curr. Microbiol. 58, 421-425.

3.1 Introducción

El control de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*, es imprescindible para asegurar la productividad de la fruticultura española y, en particular, de la citricultura en la Comunidad Valenciana. Como se ha mencionado en apartados anteriores, el tratamiento con insecticidas organofosforados, se está viendo seriamente comprometido tanto por la existencia de restricciones de tipo legal (prohibición del uso de varias materias activas) como por la disminución de su efectividad (desarrollo de resistencias). La utilización de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* y sus productos derivados, supondría un sólido complemento al manejo de esta importante plaga.

La primera fase de la evaluación del potencial de *B. thuringiensis* para el control de un insecto diana, como es *C. capitata* en este trabajo, es la explotación de la biodiversidad natural de la especie mediante la búsqueda de cepas nativas que exhiban propiedades insecticidas sobre dicha especie. Desde su descubrimiento en 1901 (Ishiwata, 1901) la identificación de nuevas cepas de *B. thuringiensis* con propiedades entomopatógenas así como de nuevos espectros insecticidas para cepas ya conocidas ha seguido un crecimiento considerable. En la actualidad se han descrito más de 3000 especies de insectos susceptibles a alguna cepa de *B. thuringiensis* (Huang et al., 2004). Sin embargo, para muchas de las cepas productoras de cristales conservadas en colecciones de todo el mundo todavía no se ha descrito ninguna actividad tóxica (Schnepf et al., 1998). En las últimas décadas se ha producido un interés creciente en el desarrollo y evaluación de colecciones de *B. thuringiensis* en busca de aislados que proporcionen nuevas aplicaciones agrícolas, forestales y sanitarias (Bel et al., 1997; Bernhard et al., 1997; Bravo et al., 1998; Chak et al., 1994; Hernández et al., 2005; Ibarra et al., 2003; Mohan et al., 2008; Monnerat et al., 2007; Quesada-Moraga et al., 2004).

Bacillus thuringiensis es considerada una especie ubicua y no existe consenso acerca del papel que juega en los ecosistemas. Aún así, por lo general ha sido aislado de una forma más directa en cadáveres de insectos que en otro tipo de sustratos como el suelo o superficies vegetales (Schnepf et al., 1998). La aparición de epizootias en insectos a causa de *B. thuringiensis* es muy poco frecuente en la naturaleza (Aronson, 1993), por este motivo la especie es considerada un entomopatógeno oportunista. Adicionalmente,

se ha propuesto la existencia de un proceso de coevolución entre *B. thuringiensis* y el insecto huésped (Itoua-Apoyolo et al., 1995), mediado por la remarcable plasticidad genética de la especie que se manifiesta en una enorme diversidad de cepas y toxinas. Por los motivos citados, muchos de los programas de prospección de cepas de *B. thuringiensis* han sido desarrollados a partir de muestras tomadas en el hábitat en el que el insecto diana se desarrolla o incluso a partir de los insectos directamente (Aizawa et al., 1961; Cavados et al., 2001; Chilcott y Wigley, 1993; Goldberg y Margalit, 1977; Itoua-Apoyolo et al., 1995; Kaelin et al., 1994; Karamanlidou et al., 1991).

La identificación de genes de δ -endotoxinas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método muy útil y muy sólido para la caracterización de aislados de una colección de *B. thuringiensis* y, hasta cierto punto, esta técnica permite la predicción de la actividad insecticida de una cepa determinada. Aún así, la PCR es utilizada generalmente como un primer paso para seleccionar cepas potencialmente interesantes de una colección, la evaluación del potencial tóxico de una cepa deben realizarse en último término mediante la realización de bioensayos (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). En este sentido, teniendo en cuenta el insecto plaga estudiado, *C. capitata*, la identificación de genes *cry* y *cyt* relacionados con la actividad insecticida sobre alguna especie de díptero resulta de gran interés. Hasta la fecha, genes con estas propiedades han sido detectados en las siguientes subfamilias: *cry1* y *cry2* (Hodgman et al., 1993; Iriarte et al., 2000), *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* y *cyt2* (Berry et al., 2002; Delecluse et al., 1995; Orduz et al., 1998), *cry17* (Barloy et al., 1998), *cry19* y *cry25* (Hwang et al., 1998; Rosso y Delecluse, 1997), *cry21* (Bravo et al., 1998), *cry27* (Saitoh et al., 2000), *cry39* y *cry44* (Ito et al., 2006a; Ito et al., 2006b).

Las técnicas más comúnmente utilizadas para la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* son la determinación de la morfología de los cristales paraesporales, la electroforesis de proteínas de suspensiones de esporas y cristales, la PCR de genes *cry* y *cyt*, la determinación de patrones plasmídicos y el serotipado flagelar por aglutinación del antígeno H (Lecadet et al., 1999). La mayoría de los estudios que aplican este tipo de técnicas han presentado los resultados para cada una de ellas de forma independiente o solamente para algunas cepas representativas de la colección. Pocos estudios han establecido correlaciones de todos los datos en su conjunto, por ejemplo Quesada-Moraga

et al. (2004) clasificaron las cepas de una colección aislada a partir de muestras obtenidas del territorio español en relación a su perfil de electroforesis, serotipo y origen geográfico, aunque no aportaron información sobre su contenido génico.

El primer objetivo de este capítulo fue obtener una colección de cepas de *B. thuringiensis* aisladas del agroecosistema citrícola, en el que se desarrolla el insecto diana, *C. capitata*. Segundo, caracterizar y seleccionar las cepas de dicha colección en base a parámetros morfológicos y moleculares. Para ello se pusieron a punto nuevos métodos de PCR adaptados a la prospección de grandes cantidades de cepas y genes, así como nuevas metodologías de análisis de datos con el fin de integrar la información obtenida por las distintas técnicas. Por último, se evaluó la actividad sobre adultos (principalmente) y larvas de *C. capitata* de mezclas de esporas y cristales y sobrenadantes de los cultivos de las cepas de *B. thuringiensis* provenientes de la colección obtenida (colección IVIA) así como de otras colecciones nacionales e internacionales.

3.2 Material y métodos

3.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Dr. D.R. Zeigler (Bacillus Genetic Stock Center, B.G.S.C., Ohio State University, EEUU) y el Dr. J. Ferré (Universidad de Valencia). El listado completo de las cepas de referencia seleccionadas así como aquellas cuya actividad sobre dípteros ha sido documentada en estudios previos se indica en la Tabla 3.1. Adicionalmente, se analizó una colección de 847 aislados nativos cedidos por el Dr. J. Ferré (Colección UV, Universidad de Valencia). La cepa mosquitocida de *Bacillus sphaericus* WHO2297 (13A4) también fue ensayada, así como el producto comercial basado en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Skeetal (Valent Biosciences Corporation, EEUU). Las bacterias fueron cultivadas en medio CCY (13 mM KH_2PO_4 , 26 mM K_2HPO_4 , 0.14 μM L-Glutamina, 1‰ (p/v) hidrolizado ácido de caseína, 1‰ (p/v) hidrolizado pancreático de caseína, 0.4‰ (p/v) extracto de levadura, 0.6‰ (p/v) glicerol, 50 μM ZnCl_2 , 500 μM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10 μM $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 200 μM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 50 μM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 125 μM HCl) (Stewart et al., 1981) a 28°C durante 48 horas.

Tabla 3.1 Cepas *B. thuringiensis* de referencia utilizadas

Código original	Nº BGSC ^a	Serotipo	Referencia ^b
HD567	4Q1	<i>israelensis</i>	Goldberg y Margalit, 1977
HD500	4Q2	<i>israelensis</i>	Goldberg y Margalit, 1977
IPS 70	4Q3	<i>israelensis</i>	Goldberg y Margalit, 1977
4Q2-72	4Q5	<i>israelensis</i>	Guerchicoff et al., 1997
74-F-6-18	4U1	<i>kyushuensis</i>	Guerchicoff et al., 2001
HD12	4K1	<i>morrisoni</i>	Guerchicoff et al., 2001
HD518	4K3	<i>morrisoni</i>	Guerchicoff et al., 2001
T03C001	4AP1	<i>fukuokaensis</i>	Guerchicoff et al., 1997
HL51	4AK1	<i>leesis</i>	Guerchicoff et al., 2001
HD146	4M1	<i>darmstadiensis</i>	Guerchicoff et al., 1997
HD19	4B1	<i>finitimus</i>	
san diego	4AB1	<i>morrisoni</i>	
tenebrionis	4AA1	<i>morrisoni</i>	
HD73	4D4	<i>kurstaki</i>	
HD1		<i>kurstaki</i>	
HD12		<i>kurstaki</i>	
HD2		<i>thuringiensis</i>	
Bta		<i>aizawai</i>	

^a solo si fueron proporcionadas por el B.G.S.C.

^b solo si se ha documentado su actividad mosquitocida

3.2.2 Muestreo, aislamiento y conservación de cepas de *Bacillus thuringiensis*

Las muestras fueron recogidas en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia: en los términos municipales de Olocau (con Manejo Integrado de Plagas y con clementinos variedad Clemenules), Bétera (plantación joven de clementino variedad Orogrande, con manejo de plagas convencional) y Alcudia (finca ecológica con clementino variedad Clemenpons, no se realizó ningún tratamiento con *B. thuringiensis* al menos en los 2 últimos años antes del muestreo). Los sustratos sobre los que se realizó el muestro fueron muy heterogéneos: suelo (tomado unos centímetros por debajo de la superficie para evitar la inactivación de las esporas por la radiación UV), filoplano (material vegetal de cítricos y cubierta vegetal), frutos caídos dañados, cadáveres de artrópodos y gasterópodos, estiércol y agua estancada en acequias. Las muestras fueron recogidas en tubos de plástico estériles de 5 ml y fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

El aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* a partir de las muestras fue llevado a cabo como se ha descrito anteriormente (Bel et al., 1997). Aquellas colonias que presentaron la

morfología característica de *B. thuringiensis* (colonia blanquecina con bordes irregulares y difusos) así como la presencia de cristales paraesporales en el esporangio fueron seleccionadas y sembradas en placa con medio sólido CCY para su individualización. Después de una segunda comprobación al microscopio de la presencia de cristales paraesporales, las cepas fueron cultivadas en medio CCY líquido, a 28°C durante 48 horas, hasta esporulación. Las células vegetativas fueron eliminadas por tratamiento térmico en baño de María a 70°C durante 20 min. Se tomaron alícuotas y se almacenaron a -80°C con un 15% de glicerol como agente crioprotector.

3.2.3 Preparación de extractos de *Bacillus thuringiensis* para bioensayos

De cada una de las cepas se tomó una asada de una colonia aislada que se utilizó para inocular 4.5 ml de medio CCY líquido (precultivo) y se incubó durante 48 h a 28°C con agitación a 200 rpm. Se tomó una alícuota para verificar la formación de esporas y cristales (el óptimo es de un 90% de esporulación) y el precultivo se incubó a 70°C durante 20 min para eliminar las células vegetativas (sincronización). El precultivo sincronizado fue utilizado para inocular (1/1000 volúmenes) un matraz Erlenmeyer con 40 ml de medio CCY que fue incubado como ya se ha descrito anteriormente. Una vez verificada la producción de esporas y cristales el cultivo principal fue centrifugado a 9000×g durante 10 min a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante (1 ml) y se conservó a -20°C para futuros bioensayos. El sedimento fue lavado una vez con una solución fría de NaCl 1 M y EDTA 10 mM para eliminar los restos celulares y para limitar la acción de las proteasas presentes en *B. thuringiensis* y que podrían degradar las protoxinas. Finalmente, el sedimento de esporas y cristales se resuspendió en 1 ml de una solución fría de KCl 10 mM, se midió la DO_{600nm} mediante espectrofotómetro y se conservó a -20°C hasta su uso. Todos los pasos tras la sedimentación del cultivo se realizaron en hielo para minimizar la proteólisis.

3.2.4 Caracterización de los cristales paraesporales

Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* fueron examinados antes de la lisis celular por microscopía de contraste de fase a 1000× aumentos bajo microscopio binocular (DM2500, Leica Microsystems, Alemania). Se registraron dos tipos de características de

cada cepa: la morfología del cristal y el número de cristales por célula (cristal único o cristales múltiples).

3.2.5 Electroforesis de proteínas

La composición proteica de las mezclas de esporas y cristales fue analizada por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como ya ha sido descrito (Laemmli, 1970). Las muestras se prepararon a partir del sedimento de 1 ml de cultivo esporulado, resuspendido en 20 µl de agua Mili-Q (Millipore, EEUU) y mezclado con 10 µl de tampón de carga de electroforesis TESADS (0.075% de Azul de Bromofenol, 3.75 mM EDTA, 150 mM Tris-HCl pH=6.8, 0.75 M sacarosa, 2.5% SDS, 1% β-mercaptoetanol). La mezcla se incubó a 95°C durante 8 min y se cargó en el gel una vez alcanzada la temperatura ambiente. El análisis SDS-PAGE de las cepas tuvo dos propósitos: en primer lugar, para apoyar la selección de cepas en el protocolo de aislamiento (de una misma muestra, solo se seleccionaron aquellas cepas que mostraron perfiles de electroforesis diferentes, reduciendo así la redundancia en la colección) y en segundo lugar, para la caracterización molecular de las cepas.

3.2.6 Identificación de genes *cry* y *cyt*

3.2.6.1 Diseño de cebadores

Las secuencias de los pares de cebadores utilizados para la detección de las subfamilias de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9A*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21A*, *cry27*, *cry39*, *cyt1A* y *cyt2* han sido ya documentadas (Ben-Dov et al., 1997; Bravo et al., 1998; Güerchicoff et al., 1997; Ibarra et al., 2003). Un nuevo par de cebadores específicos fue diseñado para la detección del gen *cry44Aa* (No. Genbank BAD08532), utilizando la aplicación online “Primer 3: WWW Primer Tool” (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Los cebadores fueron sintetizados en un sintetizador de DNA según las especificaciones del productor (Microsynth, Suiza). La Tabla 3.2 muestra las secuencias de todos los cebadores utilizados, los tamaños esperados de los productos de PCR y la temperatura óptima de hibridación.

3.2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las cepas de *B. thuringiensis* fueron cultivadas individualmente en placas de 96 pocillos de fondo cónico (96-well vee-bottom plate, Sarstedt, EEUU). Cada pocillo contenía 150 μ l de medio CCY sin sales (Stewart et al., 1981) suplementado con glicerol al 5%. Los cultivos fueron inoculados en cada pocillo con palillos estériles a partir de las muestras conservadas en glicerol al 15% (a -80°C). Las placas así preparadas fueron incubadas a 28°C durante 24 h sin agitación. El crecimiento bacteriano fue supervisado por medición de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ con un espectrofotómetro de placa, estableciendo el óptimo en 0.25 UA. Se utilizó un replicador de placas de 96 puntas (Boekel Scientific, EEUU) para transferir un pequeño volumen de cada cultivo (aproximadamente 2 μ l) a una placa de PCR de policarbonato (96-well ThermoQuick PCR plate Type 4, Greiner bio-one, Reino Unido) a la que previamente se añadieron 5 μ l de agua Mili-Q estéril por pocillo.

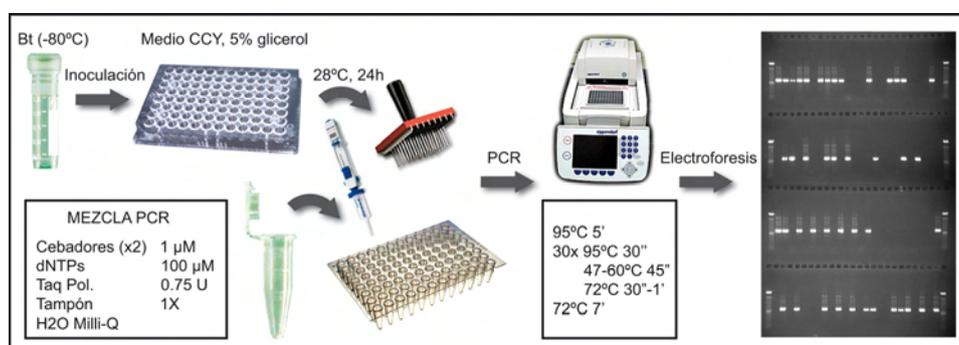


Figura 3.1 Metodología para la detección de genes *cry* y *cyt* en grandes colecciones de *B. thuringiensis*.

Las mezclas de reactivos para la PCR (15 μ l) fueron dispensadas mediante una multipipeta (Eppendorf Multipette_plus, Eppendorf AG, Alemania) hasta un volumen final de reacción de 20 μ l por pocillo. La composición de las mezclas de reactivos fue la siguiente: dNTPs 100 μM , cebador directo y reverso correspondiente a 1 μM (Tabla 3.2) y 0.75 U de ADN Taq polimerasa con el tampón correspondiente (Biotools, España). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler_ep (Eppendorf AG, Alemania). Las condiciones de reacción programadas fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C seguido de 30 ciclos de tres fases, desnaturalización de 30 s a 95°C , hibridación de 45 s a la temperatura óptima de cada par de cebadores (Tabla 3.2) y extensión de 30 s a 1 min (dependiendo del tamaño esperado del amplicón) a 72°C , y finalmente un paso final de extensión de 7

min a 72°C. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con un baño de bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador UV. La figura 3.1 muestra esquemáticamente la metodología descrita.

Tabla 3.2 Cebadores de PCR para la identificación de genes *cry* y *cyt*

Nombre	Gene(s)	Producto (pb)	T. H. (°C) ^a	Secuencia ^b	Referencia
Un1	<i>cry1</i>	277	50	5' CATGATTCATGCGGAGATAAAC 5' TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT	Ben-Dov et al., 1997
Un2	<i>cry2</i>	689-701	50	5' GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG 5' CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT	Ben-Dov et al., 1997
Un3	<i>cry3</i>	589-604	50	5' CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC 5' CATCTGTGTTTCTGGAGGCAAT	Ben-Dov et al., 1997
Un4	<i>cry4</i>	439	50	5' GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC 5' GCGTGACATACCCATTTCAGGTCC	Ben-Dov et al., 1997
Un7/8	<i>cry7</i> <i>cry8</i>	420 423	50	5' AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC 5' CTTCTAAACCTTGACTACTT	Ben-Dov et al., 1997
spe-cry9A	<i>cry9A</i>	571	51	5' GTTGATACCCGAGGCACA 5' CCGCTTCCAATAACATCTTTT	Bravo et al., 1998
cry10spe	<i>cry10</i>	348	51	5' TCAATGCTCCATCCAATG 5' CTTGTATAGGCCTTCTCCG	Ibarra et al., 2003
cry11spe	<i>cry11</i>	305	51	5' TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC 5' CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC	Bravo et al., 1998
gral_nem	<i>cry5</i> <i>cry12</i> <i>cry14</i> <i>cry21A</i>	474 477 483 489	50	5' TTACGTAATGIGCAATCAAGCAAA 5' AAGACCAAATCAATACCAGGGTT	Bravo et al., 1998
cry17 + 27	<i>cry17Aa</i> <i>cry27Aa</i>	832 895	47	5' CATTGTTCTACTTGGTATAA 5' GATACAATTACATCTCCTCTGTA	Ibarra et al., 2003
cry19 + 39	<i>cry19</i> <i>cry39Aa</i>	616-631 619	51	5' AAGCTGCGAATCTGCATTTACTTTT 5' CTCATAATTTCCGTCCATAAAT	Ibarra et al., 2003
cry44Aa	<i>cry44Aa</i>	444	60	5' CATTACACGGGGTGCGTTAT 5' CCGCACTTACATGTGTCCAA	Diseño propio
gral-cyt	<i>cyt1A</i>	522-525	51	5' AACCCCTCAATCAACAGCAAGG 5' GGTACACAATACATAACGCCACC	Bravo et al., 1998
cyt2	<i>cyt2</i>	469	42	5' AATACATTTCAAGGAGCTA 5' TTTCATTTTAACTTCATATC	Güerchicoff et al., 1997

^a Temperatura óptima de hibridación de la PCR

^b Cebador directo (superior) y reverso (inferior)

En los casos en que la verificación de los resultados obtenidos fue necesaria, se aplicó un protocolo de minipreparación de ADN plasmídico por lisis alcalina, descrito anteriormente (Birnboim, 1983). Para ello las cepas fueron cultivadas en 600 µl de medio CCY sin sales durante 24 h a 28°C, el DNA extraído fue resuspendido en 20 µl de tampón LTE (Tris-HCl pH = 8.0 10 mM, EDTA 0.1 mM, 1 µg/mL de RNasaA). Las

condiciones de PCR fueron las mismas que han sido descritas arriba, pero utilizando 1 μ l de minipreparación (100-500 ng de ADN) como molde para la PCR.

La secuenciación de los productos de PCR, cuando fue necesaria, se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad Politécnica de Valencia - CSIC. Para ello las condiciones de PCR se mantuvieron a excepción de la ADN polimerasa utilizada, se utilizó el enzima de alta fidelidad de copia VentR[®] DNA Polymerase (New England BioLabs, EEUU) a 0.5 U por cada volumen reacción y con su correspondiente tampón. Los productos de amplificación fueron purificados aplicando el Kit “Illustra[™] DNA and GEL Band Purification Kit” (GE Healthcare, EEUU) y eluidos con agua Milli-Q a una concentración de 25-30 ng/ μ l. Los cromatogramas recibidos del servicio de secuenciación fueron analizados y editados mediante los programas BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 (Hall, 1999) y ClustalX v1.81 (Thomson et al., 1997). La información de secuencia de ADN y de proteínas fue comparada con bases de datos: “Nucleotide Collection nr/nt” del NCBI con la aplicación BLASN (Zhang et al., 2000) y “Non-Redundant Protein Sequences nr” del NCBI mediante la aplicación BLASP (Altschul et al., 1997), respectivamente.

3.2.7 Bioensayos sobre *Ceratitidis capitata*

Las larvas y adultos de *C. capitata* utilizados en los ensayos se obtuvieron de la cría establecida y mantenida en las instalaciones del IVIA desde el año 2002. Los huevos (menos 12 horas tras la puesta) eran recogidos de las cajas de puesta (las hembras de esta línea están adaptadas a la puesta en malla) y sembrados en bandejas a una densidad aproximada de 2 huevos por gramo de dieta de larvas. La dieta estaba compuesta por salvado de trigo (Belenguer S. A, España), azúcar (Azucarera Española, España), levadura de cerveza (Sorribas, España), ácido benzoico (Panreac, España), metil 4-hidroxibenzoato (Panreac, España), propil 4-hidroxibenzoato (Panreac, España) y agua (Albajes y Santiago-Álvarez, 1980). Las bandejas se cubrieron con papel de aluminio para simular el desarrollo de las larvas en los frutos (en oscuridad) y evitar contaminaciones. Las larvas neonatas completaban los tres estadios larvarios en 7-9 días en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($60 \pm 5\%$) y fotoperiodo (16:8 horas, luz:oscuridad). Llegado este momento, se producía el salto de las larvas L3 de la dieta para realizar la pupación. Justo antes de la emergencia (6-7 días), las pupas se

introducían en una jaula transparente de metacrilato (20 x 40 x 20 cm). Estas jaulas tenían en una de las caras uno o dos orificios de 15 cm de diámetro, cubierto por una manga de muselina por donde se aspiraban los adultos y otra de las caras sellada con muselina como sistema de ventilación. Los adultos se alimentaban con una dieta a base de azúcar y extracto de levadura hidrolizada (Biokar Diagnostics Co., Francia) a una proporción 4:1 (p:p) y con suministro de agua mediante frascos lavadores con una mecha absorbente. Las condiciones climáticas fueron las mismas que las descritas para larvas.

3.2.7.1 Bioensayos sobre adultos

El ensayo de cada cepa de *B. thuringiensis* (905 en total) sobre *C. capitata* se llevó a cabo siguiendo una metodología que trata de emular las condiciones de exposición en campo, como sigue: 10 adultos (1-2 días tras emergencia y sin sexado previo) se colocaron en placas Petri ventiladas de 15 cm de diámetro junto con sacarosa al 30% en tubos de 5 ml con mecha absorbente y el material de ensayo (Figura 3.2).

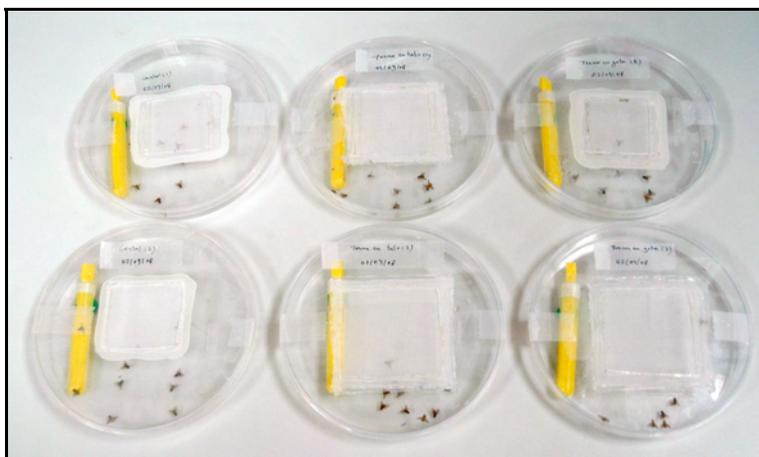


Figura 3.2 Placas de bioensayo de adultos de *C. capitata*

Se ensayaron dos tipos de materias por cada cepa: la suspensión de esporas y cristales (DO_{600nm} entre 50 y 100) y los sobrenadantes de cultivo (fracción soluble). Estas materias se administraron añadiendo 5 gotas (5 μ l por gota) sobre un fragmento rectangular de Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, EEUU) dentro de la placa. La composición de la gota fue una mezcla 1:1 (v:v) del material de ensayo y cebo de proteína hidrolizada al 1% (Biocebo, España) o solo cebo al 0.5% en los controles. Las mezclas de esporas y

cristales se aplicaron a una concentración estimada entre 5 y 50 μg de proteína bacteriana (dependiendo de la cepa) por unidad experimental. El régimen climático fue de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ de humedad relativa y fotoperiodo 16:8 (horas luz:oscuridad). La mortalidad se registró a los 7 días. Dado el volumen de cepas a ensayar, inicialmente se realizó una repetición por tratamiento, que se extendió a 3 repeticiones, 2 ensayos independientes y 20 moscas por placa con las cepas seleccionadas.

El producto comercial Skeetal fue ensayado de acuerdo a la metodología descrita y por otro método que consistió en la aplicación del producto en forma liofilizada (originalmente líquido) en una placa Petri abierta de 6 cm de diámetro dentro de la placa de ensayo. Se administraron 3 g de una mezcla 2:4:1, Skeetal liofilizado: azúcar: extracto de levadura (p:p:p), junto a tubos de 5 ml que contenían agua destilada.

3.2.7.2 Bioensayos sobre larvas

Las suspensiones de esporas y cristales de algunas cepas de *B. thuringiensis* (9 cepas) se ensayaron sobre larvas neonatas de *C. capitata* en contenedores plásticos de 100 ml (J.D. Catalán, España) con 30 ml de dieta sólida de larvas. La dieta de bioensayo se adaptó a partir de la dieta estándar de cría (Albajes y Santiago-Álvarez, 1980) y se preparó como sigue: 1 l de solución de ácido benzoico al 0.4% (p/v) (Panreac, España) se llevó a ebullición con 24 g de agar-agar (Prolabo, Francia). El resto de los componentes se añadieron cuando la temperatura bajó a 60°C : 60 g de azúcar, 30 g de copos de levadura de cerveza (Sorribas, España), 2.4 g de metil 4-hidroxibenzoato (Panreac, España), 2.4 g de propil 4-hidroxibenzoato (Panreac, España) y 200 g de salvado de trigo molido (Santiveri, España). Los componentes se mezclaron vigorosamente con batidora eléctrica, la mezcla se vertió dentro de un recipiente y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta su solidificación. La dieta se conservó a 4°C , nunca más de 4 días. Para el montaje de las unidades de ensayo, se fundieron porciones de dieta por calentamiento en horno de microondas y se vertieron directamente dentro de los contenedores. Una vez solidificada la dieta la superficie de ésta fue esterilizada bajo luz UV durante 15 min. Las suspensiones de esporas y cristales obtenidas de acuerdo al apartado 3.2.3, el producto comercial Skeetal (sin diluir) o agua destilada (en los controles) se aplicaron en superficie (150 μl) y se dejaron secar bajo campana de flujo laminar (AH-100, Telstar S.A., España). Las larvas se separaron directamente de la dieta de cría con ayuda de un pincel,

72 h después de la siembra, y se añadieron 10 larvas por contenedor. El tiempo de ensayo fue de 18 días bajo el mismo régimen climático que en ensayos anteriores. Tras ese tiempo se anotó el número de larvas que llegaron a pupa y los adultos emergidos. Se hicieron 2 repeticiones por tratamiento.

3.3 Resultados

3.3.1 Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* del agroecosistema cítrico

Se analizaron un total de 150 muestras de suelo, hojas de cítricos, cubierta vegetal, frutos caídos, cadáveres de artrópodos y gasterópodos, estiércol y agua estancada (Tabla 3.3). Tomando como criterio de identificación de *B. thuringiensis* la capacidad de producción de cristales paraesporales, en el 78.7% de las muestras se aisló *B. thuringiensis* (896 colonias en total). Este parámetro difirió considerablemente entre las parcelas de cítricos (72.1% a 91.2%) y los sustratos muestreados (69.9% a 100%). En todos los tipos de sustratos muestreados se pudo aislar *B. thuringiensis*, la mayor recuperación de *B. thuringiensis* se produjo en muestras de agua y artrópodos, y menor en muestras de frutos y suelo. El índice Bt global fue de 0.52 (índice Bt: ratio entre el número de colonias *B. thuringiensis* y el número total de colonias esporulantes analizadas). Las muestras de suelo mostraron el índice Bt más bajo (0.34) mientras que para el resto de muestras estuvo siempre por encima de 0.6.

Tabla 3.3 Distribución de muestras y recuperación de *B. thuringiensis* (Bt)

		Nº muestras examinadas	Muestras con Bt (%)	Nº colonias analizadas	Nº colonias con cristales	Nº cepas seleccionadas ^a	Índice Bt ^b
Parcela	Olocau	61	72.1	584	211	126	0.36
	Bétera	34	91.2	507	297	121	0.59
	Alcudia	55	78.2	631	388	129	0.61
	TOTAL	150	78.7	1722	896	376	0.52
Sustrato	Suelo	46	69.6	896	303	114	0.34
	Filoplano	63	85.7	433	313	162	0.72
	Frutos	27	70.4	232	140	56	0.60
	Artrópodos	7	100.0	90	73	28	0.81
	Estiércol	5	80.0	27	23	8	0.85
	Agua	2	100.0	44	44	8	1.00

^a Solo se seleccionaron cepas de *B. thuringiensis* con perfiles SDS-PAGE diferentes en una misma muestra

^b Relación entre el nº de colonias de *B. thuringiensis* y el nº total de colonias analizadas

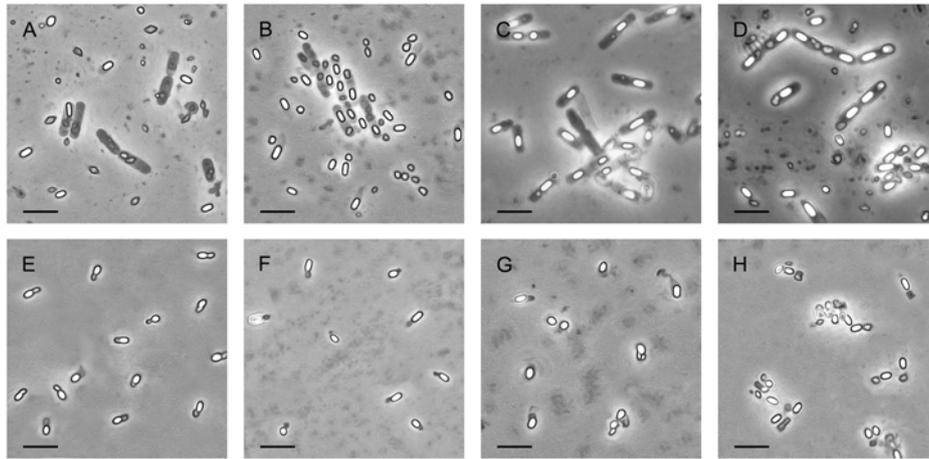


Figura 3.3 Microscopía de contraste de fase de cultivos esporulados de 8 aislados de *B. thuringiensis* mostrando diferentes morfologías de los cristales paraesporales. A: bipyramidal; B: redondeado; C: pequeño; D: Irregular; E,F,G,H: cristales adheridos a la espora. Barra = 5 μ m.

La observación microscópica permitió establecer 5 tipos morfológicos de cristales paraesporales (Figura 3.3); por orden de frecuencia: bipyramidales (45% de la colección), redondeados (40%), adheridos a la espora (7%), pequeños (5%) e irregulares (3%). Los cristales fueron clasificados como “pequeños” cuando no fueron lo suficientemente grandes para determinar su forma a 1000 \times aumentos. En torno al 32% de las cepas de la colección produjeron más de 1 cristal por esporangio. Casi la mitad de las cepas con cristales bipyramidales produjeron múltiples cristales por célula, mientras que solo sucedió en el 17% de las cepas con cristales redondeados. Veinticinco cepas produjeron cristales que permanecían adheridos a la espora tras la lisis celular, y entre ellas se observaron 4 tipos morfológicos (Figura 3.3).

3.3.2 Caracterización molecular

Se utilizaron dos métodos moleculares para seleccionar y caracterizar la colección de *B. thuringiensis*: la electroforesis de proteínas SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales para determinar el número y tamaño de polipéptidos Cry o Cyt de las cepas, y la determinación de la composición génica de las cepas por PCR. Con el fin de ilustrar la diversidad de la colección que ha sido desarrollada se confeccionó una serie de “fichas de

caracterización” donde se relacionan los diferentes parámetros estudiados y que abarca el total de las cepas seleccionadas (ver el apartado de Material Suplementario).

3.3.2.1 Electroforesis de proteínas

En un primer paso, todas las cepas aisladas que mostraron producción de cristales paraesporales fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE. Se observó una gran diversidad de patrones, tanto por el número de bandas como por su tamaño, incluso entre cepas aisladas de una misma muestra. Sin embargo, fue muy frecuente que varios aislados de una misma muestra mostraran un patrón electroforético idéntico. En esos casos, con objeto de minimizar la redundancia en la colección, las cepas fueron consideradas duplicados y solo una cepa por patrón electroforético y muestra fue seleccionada. De acuerdo a este criterio de selección, se escogieron 376 cepas de un total de 896 aislados tipo *B. thuringiensis*, conformando así la colección IVIA (Tabla 3.3).

Tabla 3.4 Distribución de cepas de *B. thuringiensis* en relación a la composición proteica de sus mezclas de esporas y cristales determinada mediante SDS-PAGE

Composición (kDa)	Frecuencia (%)	Perfil SDS-PAGE
140-50 ^a	20.5	13
130-140, 60-65	15.7	1
130-140	9.8	1
98, 45, 41, 25	8.2	23
140, 65-70, 24	6.6	16
190, 80, 55	4.8	8
110, 40-50	4.5	6
100, 75, 45-50, 38, 25-30	4.0	32
140, 75, 45, 22	2.9	19
140, 60	2.1	34
190, 110, 90, 85	1.6	9
100, 70, 25	1.6	33
30	1.6	17
150	1.3	2
120, 44, 25	1.3	22
80, 60, 40-45, 20-25	1.1	36
80, 40-45, 20-25	1.1	37
Otros ^b	11.2	-

^a Numerosos polipéptidos entre 140 kDa (max) y 50 kDa (min)

^b Perfiles SDS-PAGE representando menos del 1% de la colección (376 cepas), ver material suplementario

Se identificaron un total de 39 perfiles por SDS-PAGE. La tabla 3.4 muestra los perfiles más frecuentes identificados en la colección. El perfil más común encontrado (20.5%) consistió en un grupo numeroso de polipéptidos de tamaños comprendidos entre 140 kDa hasta aproximadamente 50 kDa (Figura 3.4, 13). El perfil de electroforesis de un importante número de cepas (15.7%) mostró una composición proteica correspondiente al perfil de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Berón y Salerno, 2006), con dos polipéptidos principales en el rango de 130-140 kDa y 60-65 kDa, respectivamente (Figura 3.4, 1, carriles 1 y 3). Casi un 10% de la colección mostró un único polipéptido de 130-140 kDa (Figura 3.4, 1, carril 2), otro perfil usual en cepas de esta subespecie. Adicionalmente, también se encontraron cepas (6.6%) con un perfil correspondiente al del serovar *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Chak et al., 1994), mostrando un complejo de polipéptidos de aproximadamente 140, 65-70 y 24 kDa (Figura 3.4, 16).

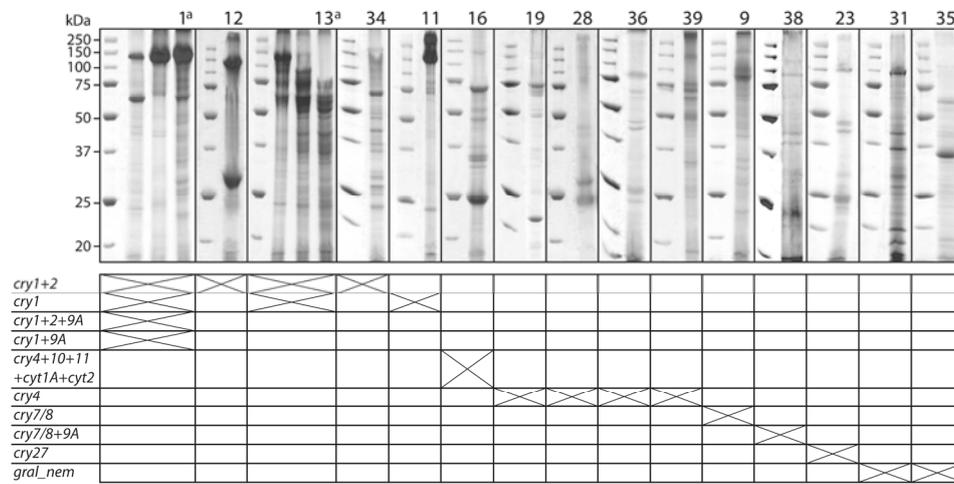


Figura 3.4 Perfiles SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales de cepas de *B. thuringiensis* que contienen al menos uno de los genes *cry* o *cyt* analizados en este estudio (en total 267 aislados). Se representan 15 perfiles SDS-PAGE con su correspondiente código numérico (ver material suplementario), cada perfil está acompañado del marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU). ^a, perfiles SDS-PAGE representados por más de un patrón específico. La tabla inferior relaciona los distintos perfiles génicos identificados para cada uno de los perfiles SDS-PAGE.

3.3.2.2 Genes *cry* y *cyt*

La técnica PCR fue empleada a partir de 14 pares de cebadores capaces de detectar potencialmente 18 familias de genes *cry* y 2 familias de genes *cyt* (Tabla 3.2). Las cepas

con los genes *cry1* y *cry2* fueron las más abundantes de la colección (48.7% y 46%, respectivamente), seguidas de aquellas con *cry4* (11.2%), *cry27* (8.2%), *cry10* (6.6%), *cry11* (6.6%), *cyt1A* (6.6%), *cyt2* (6.6%), *cry7* y/o *cry8* (2.1%), *cry9A* (1.1%) y por último el grupo de genes de toxinas nematocidas *cry5*, *cry12*, *cry14* y/o *cry21A* (0.8%), detectadas con el par de cebadores “*gral_nem*”. Ninguna de las cepas aisladas fue positiva para los genes *cry3*, *cry19*, *cry39* y *cry44*.

El análisis detectó hasta 10 combinaciones diferentes de genes *cry/cyt* (Figura 3.5). Las cepas que contenían en su genoma tanto genes *cry1* como *cry2* fueron las más abundantes de la colección (171 cepas, representando el 45.5%). Otros perfiles génicos bastante frecuentes fueron: el gen *cry27* exclusivamente o la combinación *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1A* y *cyt2* (8.3% y 6.7%, respectivamente). Adicionalmente, el 4.5% de las cepas contenían el gen *cry4* exclusivamente, y un 2.4% el gen *cry1*. Ciento nueve cepas (29%) no dieron ningún producto de PCR cuando fueron ensayadas con los cebadores usados en este estudio, sin embargo la inspección microscópica de estas cepas mostró que sí producían cristales paraesporales. Esto sugiere que o bien contenían genes de toxinas conocidas no abarcados en este estudio o genes *cry/cyt* todavía no descritos.

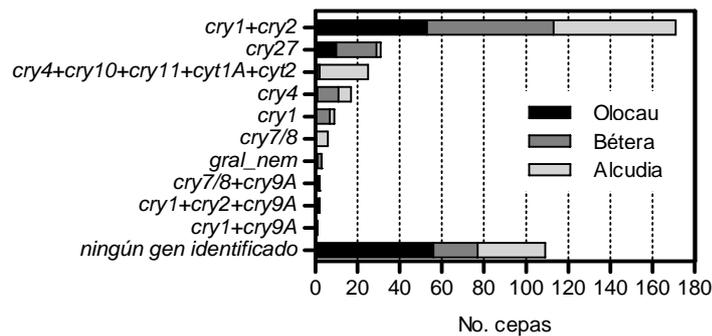


Figura 3.5 Composición de genes *cry* y *cyt* en las cepas de la colección IVIA (376 aislados), identificada mediante análisis PCR.

Cabe destacar que el análisis PCR de 31 cepas de la colección fue positivo utilizando los cebadores “*cry17+27*” (Tabla 3.2). En todos los casos los genes fueron identificados como *cry27* y no *cry17*, en base a diferentes evidencias: primero, el tamaño del producto de PCR con estos cebadores se correspondió al tamaño esperado para el gen *cry27Aa* (896 pb frente a 832 pb con *cry17Aa*); segundo, el gen *cry17Aa* ha sido descrito

únicamente en la bacteria mosquitocida *Clostridium bifermentans* (Barloy et al., 1998); y tercero, el peso molecular teórico de la protoxina codificada por *cry27Aa* se corresponde con el tamaño de uno de los polipéptidos detectados por electroforesis en todas las cepas que dieron positivo para este gen (98 kDa en lugar de 72 kDa para *Cry17Aa*) (Figura 3.4, 23).

Tabla 3.5 Homología con la secuencia proteica inferida de la secuencia del producto de PCR de la cepa I-BE15.1 con los cebadores "cry17+27". Los datos se obtuvieron por comparación con la base de datos "Non-Redundant Protein Sequences nr" del NCBI mediante la aplicación BLASTP (Altschul et al., 1997)

Nº Accesión	δ-endotoxina	Organismo ^a	Valor E ^c	Identidad (%)	Positivos (%) ^b	Huecos (%)
Q9S597	Cry27Aa1	Bt subsp. <i>higo</i>	5×10^{-109}	77	85	1
BA B72016	Cry39Aa1	Bt subsp. <i>aizawai</i>	1×10^{-13}	30	43	17
O05102	Cry17Aa1	Cb	1×10^{-9}	27	44	19
ZP_04099945	no identificado	Bt subsp. <i>andalousiensis</i>	2×10^{-9}	24	42	21
AAG36711	Cry32Aa1	Bt subsp. <i>yunnanensis</i>	3×10^{-9}	26	43	19
CAC80985	Cry29Aa1	Bt subsp. <i>medellin</i>	4×10^{-9}	28	43	25
O32307	Cry19Aa1	Bt subsp. <i>jegathesan</i>	7×10^{-9}	28	41	23
ZP_04099652	no identificado	Bt subsp. <i>andalousiensis</i>	3×10^{-6}	24	37	21
AA560191	Cry1La1	Bt subsp. <i>kurstaki</i>	2×10^{-5}	24	40	15
Q45882	Cry16Aa1	Cb	3×10^{-5}	27	44	18

^a Bt= *Bacillus thuringiensis*, Cb=*Clostridium bifermentans*

^b Aminoácidos idénticos o similares funcionalmente (Altschul et al., 1997)

^c Número de falsos positivos esperado por azar. Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial/Altschul-1.html> para más información

El gen *cry27Aa* es el único representante de su familia y solamente ha sido descrito en una ocasión (Saitoh et al., 2000). Por este motivo, para determinar si el gen que había sido detectado con tanta frecuencia en la colección era idéntico a *cry27Aa*, se analizó la secuencia del producto de PCR de tres cepas que dieron positivo con el par de cebadores cry17+27: I-OL45.10, I-OL56.2 e I-BE15.1. La comparación de la información de secuencia producida a partir de los productos de PCR de las tres cepas mostró que ésta era idéntica en los tres casos pero diferente a la secuencia conocida del gen *cry27Aa* (GenBank BAA82796) (ver material suplementario). La comparación de la secuencia de ADN obtenida (747 nucleótidos) con la base de datos general del NCBI mostró que la única secuencia con un grado significativo de homología fue la del gen *cry27Aa*, confirmando nuestros resultados. La identidad entre ambas secuencias fue del 84%. La traducción de la secuencia de nucleótidos obtenida a secuencia de aminoácidos se efectuó conservando el marco de lectura conocido para *cry27Aa* (249 aa, un 30% del tamaño de

Cry27Aa) y fue comparada con la base de datos de proteínas del NCBI (Tabla 3.5). De nuevo, la proteína conocida con mayor homología fue Cry27Aa (77% identidad) pero también existió homología con otras δ -endotoxinas, aunque siempre con una identidad de secuencia inferior al 30%.

3.3.3 Integración de los parámetros de caracterización

El análisis de los datos arrojados por las diferentes metodologías permitió establecer varias correlaciones entre parámetros tanto morfológicos como moleculares. Las cepas que contenían los genes *cry1* y/o *cry2* (183) produjeron principalmente cristales bipiramidales (93.4%) y, en menor proporción, cristales irregulares o pequeños (4.4% y 2.2%, respectivamente), pero en ningún caso cristales redondeados. Es más, ninguna cepa que no contuviera *cry1* produjo cristales bipiramidales, a excepción de dos cepas que fueron positivas para los cebadores “gral_nem” en la PCR (Figura 3.4, 31 y 35). La figura 3.4 muestra los perfiles electroforéticos de aquellas cepas de la colección que contenían al menos uno de los genes analizados en este estudio. La mayoría de las cepas que producían cada uno de estos perfiles presentaron a su vez una única combinación de genes *cry/cyt*, a excepción de las cepas con los perfiles SDS-PAGE 1 y 13 (Fig 3.4). En cambio, se pudo detectar el mismo perfil de genes en cepas con perfiles electroforéticos muy diferentes.

Los aislados de *B. thuringiensis* que no dieron positivo en la PCR para ninguno de los cebadores utilizados fueron muy diversos en cuanto a su expresión de proteínas, se pudieron detectar hasta 24 perfiles SDS-PAGE diferentes en este grupo de cepas. La figura 3.6 muestra algunos de estos perfiles, que en algunos casos mostraron un nivel de expresión proteica muy elevado, a pesar de no haber identificado ninguno de los genes analizados. La morfología de los cristales paraesporales de este grupo de cepas (109) fue mayoritariamente de tipo redondeado (67.9%) y, en menor medida, de tipo pequeño o irregular (7.3% y 1.8%, respectivamente). Una importante proporción de estos aislados (22.9%) produjo inclusiones cristalinas que permanecían adheridas a la espora incluso tras la lisis celular; se identificaron 4 tipos morfológicos entre estas cepas (Figura 3.3: E,F,G,H) que se correspondieron con 4 perfiles SDS-PAGE diferentes (Figura 3.6: 8, 10, 22 y 24).

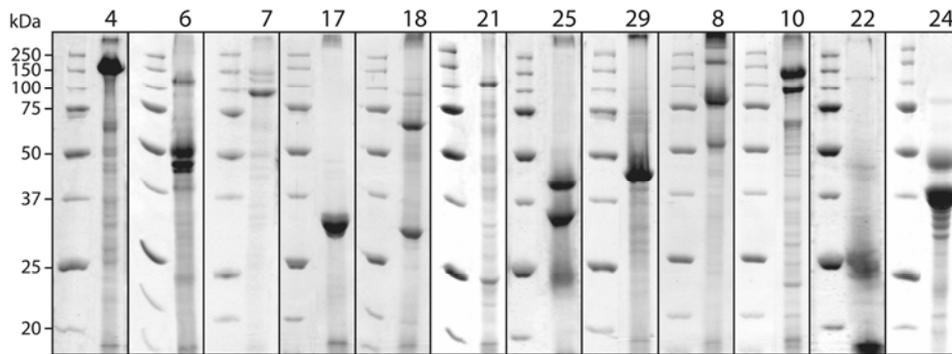


Figura 3.6 Perfiles SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales de algunas de las cepas de *B. thuringiensis* que no contienen ninguno de los genes *cry* o *cyt* analizados en este estudio. Se representan 12 perfiles SDS-PAGE con su correspondiente código numérico (ver material suplementario), cada perfil está acompañado del marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

3.3.4 Bioensayos sobre *Ceratitis capitata*

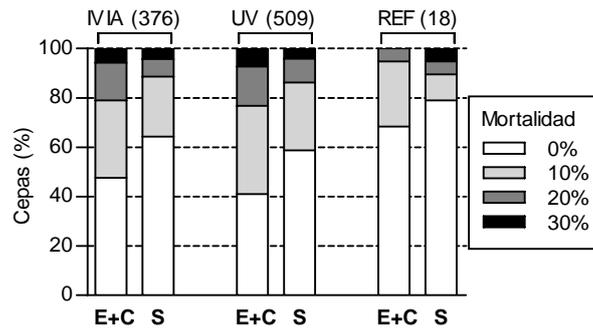
3.3.4.1 Bioensayos sobre adultos

Los bioensayos de toxicidad sobre adultos de *C. capitata* con los extractos solubles (sobrenadantes de cultivo, potencialmente contenedores de factores virulentos extracelulares) e insolubles (esporas y cristales) de *B. thuringiensis* fueron llevados a cabo en paralelo al aislamiento, selección y procesamiento de las cepas de la colección IVIA, por lo tanto se analizaron todos sus aislados, 376. Adicionalmente, se ensayaron cepas provenientes de otras colecciones: la colección UV de 847 aislados y una selección de 18 cepas de referencia de diferentes orígenes, muchas de ellas con propiedades mosquitocidas documentadas (Tabla 3.1). Las cepas de la colección UV fueron cultivadas en placa para confirmar la producción de cristales paraesporales, observando que un elevado porcentaje de las mismas (40%) no eran viables o habían perdido la capacidad de expresión de cristales, finalmente se seleccionaron 509 cepas para proceder a los bioensayos.

Los resultados de los bioensayos se sintetizan en la figura 3.7. Ninguna de las cepas de las 3 colecciones mostró actividad insecticida sobre adultos superior al 30% en las condiciones de ensayo, siendo más abundantes las cepas que no causaron mortalidad. Por lo general, el porcentaje de cepas que produjo cierta mortalidad (10-30%) fue superior

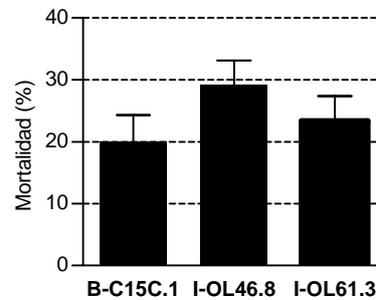
cuando se ensayaron los extractos de esporas y cristales que cuando se probaron los sobrenadantes de cultivo.

Figura 3.7 Porcentaje de aislados de *B. thuringiensis* que producen diferentes niveles de mortalidad (0, 10, 20, 30%) sobre adultos de *C. capitata* en 3 colecciones de cepas. Colección IVIA (376 cepas), Colección Universidad de Valencia (509), cepas de referencia (18). E+C: esporas y cristales. S: sobrenadantes.



En los casos en lo que la mortalidad inicial registrada superó el 30%, se realizaron ensayos más amplios (consultar materiales y métodos), confirmando niveles moderados de mortalidad (Figura 3.8).

Figura 3.8 Mortalidad (media \pm ES) de 3 aislados de *B. thuringiensis* sobre adultos de *C. capitata*. Las mortalidades fueron corregidas respecto al control por la fórmula de Abbott (Abbott, 1925) y se calcularon a partir de 2 ensayos independientes con 3 repeticiones por ensayo.



La actividad de la cepa mosquitocida de *Bacillus sphaericus* WHO2297 fue evaluada siguiendo la metodología arriba descrita. La mortalidad causada por la mezcla de esporas-cristales y la fracción soluble fue inferior al 20% ($6.6 \pm 2.1\%$, $11.6 \pm 7.5\%$, media \pm error estándar, respectivamente).

El producto comercial Skeetal, basado en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, fue ensayado utilizando dos métodos diferentes (ver sección 3.2.7.2) y con 5 repeticiones por método. En ambos casos la mortalidad registrada fue inferior al 20%.

3.3.4.2 Bioensayos sobre larvas

La actividad de los extractos de 9 cepas de *B. thuringiensis* fue evaluada sobre larvas neonatas de *C. capitata*. La mayoría de las cepas seleccionadas presentaron el perfil de la subespecie *israelensis* (Bti): 4Q1, 4Q2, 4Q3, 4Q5 (cepas Bti de referencia); I-BE26.15, I-AL15.7 (aislados de la colección IVIA tipo Bti); y el producto comercial Skeetal. Adicionalmente se ensayaron 2 cepas de la colección IVIA que habían presentado actividad sobre adultos, I-OL46.8 e I-OL61.3 (Figura 3.8). Se evaluaron dos parámetros, la pupación y la emergencia de adultos tras 18 días de ensayo (Figura 3.9). Más del 85% de las larvas alcanzaron el estado de pupa en todos los tratamientos y en cuanto a la tasa de emergencia, se observó una ligera reducción de la misma mediante el tratamiento con las cepas I-AL15.7 e I-OL61.3 (reducción de un 31.5% y 26% respecto al control, respectivamente).

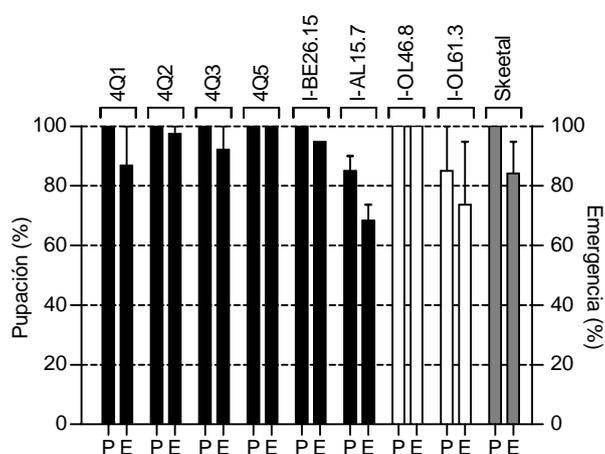


Figura 3.9 Actividad de mezclas de esporas y cristales de 9 cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas neonatas de *C. capitata*. Se muestran el porcentaje de pupación ("P", media \pm error estándar) y de emergencia ("E", media \pm ES) tras 18 días de ensayo, corregidos respecto al control por la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). Las barras negras corresponden a cepas con el perfil *israelensis* (Bti), las blancas a cepas no Bti y la barras grises al producto comercial Skeetal. Se ensayaron 10 larvas por unidad de ensayo con 2 repeticiones por tratamiento.

3.4 Discusión

Los datos presentados demuestran que el agroecosistema de cítricos es una importante fuente de *B. thuringiensis*, tanto por la riqueza como por la diversidad de cepas

encontradas. En prácticamente un 80% de las muestras analizadas se pudo detectar presencia de *B. thuringiensis*, un nivel comparable al de trabajos anteriores (Bel et al., 1997; Bravo et al., 1998; Valicente y Barreto, 2003) pero muy por encima de muchos estudios donde la tasa de recuperación no superó el 36% (Cinar et al., 2008; Ejiofor y Johnson, 2002; Iriarte et al., 1998; Karamanlidou et al., 1991; Quesada-Moraga et al., 2004; Salehi et al., 2008).

El índice Bt es una estimación del éxito del aislamiento de *B. thuringiensis* y depende tanto de los sustratos muestreados como del procedimiento seguido para su aislamiento. El índice Bt promedio obtenido en este estudio fue de 0.52, lo que significa que más de la mitad de las colonias esporulantes analizadas por microscopía contenían inclusiones cristalinas. Este nivel es muy elevado en comparación al obtenido en la mayoría de programas de aislamiento publicados hasta la fecha, con índices inferiores a 0.25 (Bel et al., 1997; Berón y Salerno, 2006; Bravo et al., 1998; Hernández et al., 2005; Quesada-Moraga et al., 2004; Salehi et al., 2008). En este trabajo como en los anteriormente citados, se siguió una metodología de aislamiento no selectiva. Ejiofor y Jhonson (2002), en un programa de aislamiento de *B. thuringiensis* en diferentes hábitats de EEUU, utilizaron un medio basado en acetato, que es conocido que puede incrementar en gran medida el rendimiento del aislamiento (Bel et al., 1997), aún así el índice Bt que registraron fue inferior al de este estudio (0.45). Otro factor determinante es el sustrato muestreado, en el presente trabajo el índice Bt más bajo fue obtenido en las muestras de suelo (0.34), mientras que para el resto de sustratos fue superior a 0.6. Esto pone de manifiesto la riqueza de bacterias esporulantes, diferentes a *B. thuringiensis*, presentes en el suelo de cítricos.

La morfología de los cristales paraesporales de la colección fue predominantemente bipiramidal o redondeada. Cabe destacar que en un porcentaje importante de las cepas (25 aislados) los cristales no se liberaban al medio de cultivo tras la fase lítica de crecimiento, como es habitual, sino que permanecían adheridos a la exospora (Figura 3.3, E-H). Este fenómeno es muy similar al que se produce en la especie *Bacillus sphaericus*, pero la morfología del esporangio es claramente diferente. Además se encontraron hasta 4 patrones diferentes, corroborados por análisis microscópico y electroforético.

Este estudio es una de las mayores prospecciones llevadas a cabo hasta la fecha a nivel de la identificación de genes *cry* y *cyt*, tanto por el número de aislados analizados como por la cantidad de genes inspeccionados. Por este motivo se ha desarrollado una nueva metodología de PCR a partir de cultivos en microplaca adaptada al análisis de grandes colecciones (ver apartado 3.2.6.2). La principal ventaja del nuevo método es que es más simple y rápido que los protocolos habitualmente utilizados (Ben-Dov et al., 1997; Bravo et al., 1998; Carozzi et al., 1991; Cerón et al., 1995; Juárez-Pérez et al., 1997), ya que la fase de extracción de ADN a partir de los cultivos (como molde para la PCR) es sustituida por la adición directa y de pequeños volúmenes de cultivo de microplaca a microplaca, además permite el manejo simultáneo (crecimiento bacteriano y PCR) de hasta 96 cepas por ronda.

Los genes de la familia *cry* que han sido encontrados con mayor frecuencia en la naturaleza son de la subfamilia *cry1*, con más de la mitad de las cepas analizadas (Porcar y Juárez-Pérez, 2003). Los genes *cry2* son también muy frecuentes, especialmente en cepas que también contienen algún gen *cry1*; nuestros resultados estuvieron totalmente de acuerdo con estos datos (Figura 3.5). Casi la mitad de las cepas de la colección contenían *cry1* (48.7%) y un 95% de las mismas portaban a su vez el gen *cry2*, mientras que todas las cepas con *cry2* fueron también positivas para *cry1*. La fuerte asociación entre estos dos grupos de genes ha sido previamente documentada (Ben-Dov et al., 1997). Por otro lado, ninguna de las cepas de la colección mostró genes de la familia *cry3*. Estos genes son considerados muy interesantes ya que codifican para proteínas Cry con propiedades insecticidas sobre muchos coleópteros (Schnepf et al., 1998). La frecuencia en la que los genes *cry3* han sido detectados en colecciones anteriores es muy variable; mientras que ciertos estudios han detectado estos genes en más de un 20% de las cepas analizadas (Arrieta et al., 2004; Bravo et al., 1998), otros, al igual que en el presente estudio, no detectaron ninguna cepa con estas características, a pesar de haber analizado colecciones muy numerosas (Ben-Dov et al., 1997; Chak et al., 1994; Jara et al., 2006).

La δ -endotoxina Cry27Aa es la única representante de la subfamilia Cry27 y fue detectada por primera vez en una cepa mosquitocida del serotipo *higo* (H44) (Saitoh et al., 2000). Sin embargo, los intentos de identificación de dicho gen en otras colecciones de cepas de *B. thuringiensis* han sido infructuosos (Ibarra et al., 2003). En el presente

trabajo no se han efectuado análisis serológicos para poder determinar si el serotipo correspondiente a las 31 cepas que dieron positivo con los cebadores de *cry27* era el mismo que en la cepa mencionada. Sin embargo, estas cepas no presentaron el mismo fenotipo ya que el patrón electroforético descrito para la cepa serovar *higo* (polipéptidos principales de 98, 91, 71, 63, 59, 50, 44 y 27 kDa) no se correspondió con el patrón único determinado para todas las cepas “*cry27*-positivas” identificadas (polipéptidos principales de 98, 45, 41 y 25 kDa) (Figura 3.4, 23). A nivel genotípico, la secuencia completa del nuevo gen todavía no ha sido obtenida, sin embargo, la secuenciación del producto de PCR obtenido a partir de la amplificación con los cebadores “*cry17+27*” ha permitido demostrar que este gen es diferente a *cry27Aa*, aunque con un alto grado de homología (84% de identidad). La secuencia de aminoácidos correspondiente a la fracción conocida del nuevo gen presentó similitud con varias δ -endotoxinas, muchas de ellas producidas por cepas con actividad mosquitocida (Tabla 3.5), aunque la toxina *Cry27Aa* fue la única que mostró un alto grado de homología (77% de identidad). En resumen, se han encontrado cepas de *B. thuringiensis* portadoras del gen de una nueva δ -endotoxina que, si el grado de homología detectado se extendiera a toda la toxina (se conoce aproximadamente un 30% de la secuencia de aminoácidos), podría ser nombrada *Cry27Ba*, de acuerdo a las actuales normas de nomenclatura (Crickmore et al., 1998).

El uso de cebadores generalistas en nuestro análisis PCR (Tabla 3.2) permite la identificación potencial de más del 70% de la variabilidad conocida en las familias génicas *cry* y *cyt* (387 de 489 secuencias conocidas, “*B. thuringiensis* toxin nomenclature” http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, revisión del 17.09.09). A pesar de ello, no se identificó ningún gen para casi el 30% de las cepas, siendo estas muy diversas fenotípicamente. Esto sugiere que existe una alta probabilidad de que existan nuevos genes *cry* o *cyt* en nuestra colección.

El análisis SDS-PAGE reveló la importante diversidad presente en la colección IVIA (39 perfiles en 376 aislados), similar a los niveles detectados en algunos trabajos (Iriarte et al., 1998; Quesada-Moraga et al., 2004) pero muy superior a la diversidad determinada en otros (Chak et al., 1994; Jara et al., 2006). La comparación de la expresión proteica y el contenido génico de muchas de las cepas ha aportado asociaciones directas, por ejemplo, los aislados que expresaron los 4 polipéptidos principales de la subespecie *Bti* (140, 65-

70 y 24 kDa; Figura 3.4, 16) tienen su correspondencia con los que genes detectados en estas cepas (*cry4*, *cry10*, *cry11*, *cyt1A* y *cyt2*). Sin embargo, la correspondencia entre los resultados de PCR y electroforesis SDS-PAGE no fue clara para todas las cepas, es decir, en muchos casos se observaron polipéptidos cuyo tamaño no podía ser explicado por los genes que las cepas portaban. Esto puede deberse a varias causas, primero podía tratarse de δ -endotoxinas cuyos genes no habían sido incorporados en el análisis; un ejemplo sería la cepa con el perfil electroforético nº 12 (Figura 3.4), que produce dos proteínas una de 130 kDa (posible expresión del gen detectado, *cry1*) y una segunda de 27 kDa, para la cual no se ha identificado el gen. Otra posible causa es que, dado que no se añadió ningún inhibidor de proteasas a las muestras, las bandas observadas en los geles SDS-PAGE pueden ser tanto protoxinas, toxinas activadas o intermediarios de la proteólisis. Es bien conocido que *B. thuringiensis* es capaz de producir proteasas endógenas y que la expresión de las mismas puede variar considerablemente entre cepas (Reddy y Venkateswerlu, 2002). Por ejemplo, se ha observado que las protoxinas Cry1Aa y Cry1Ab (133 kDa) sometidas a proteólisis *in vitro* producen hasta 7 proteínas intermediarias hasta dar lugar a la toxina activada (57 kDa) (Mohan y Gujar, 2003). Un ejemplo en la colección IVIA se produce en las cepas tipo Bti mencionadas anteriormente (Figura 3.4, 16), al margen de los polipéptidos cuyo tamaño se corresponde al esperado por su constitución génica aparecen otras bandas: los polipéptidos en un rango de 45-50 kDa se corresponden con los productos de digestión conocidos para Cry4A y Cry4B (de Barros Moreira y Silva-Filha, 2007), además los polipéptidos de 30-37 kDa se corresponde a los dos fragmentos que componen el heterodímero biológicamente activo derivado del procesamiento de Cry11A (Yamagiwa et al., 2002).

Como ya se ha mencionado, la técnica de la PCR puede ser, con ciertas limitaciones, una herramienta para la predicción de la actividad biológica de un aislado de *B. thuringiensis*. En la colección IVIA: los genes *cry1*, *cry2* y *cry9A* codifican para endotoxinas potencialmente activas contra lepidópteros; *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry21A*, *cry27*, *cyt1A* y *cyt2* producen toxinas potencialmente activas contra dípteros; *cry7* y *cry8* codifican para toxinas activas contra algunos coleópteros; *cry5*, *cry12* y *cry14* dan lugar a toxinas para las que se ha descrito actividad nematocida. Como resultado, 185 cepas de la colección son potencialmente activas contra lepidópteros, 76 contra dípteros, 8 contra coleópteros y 3 contra nemátodos. A pesar de disponer de esta información, la prospección de aislados

de *B. thuringiensis* para hallar actividad insecticida contra *C. capitata* no se restringió a aquellos que portaban genes relacionados con la toxicidad sobre dípteros, sino que se evaluó la colección IVIA completa (además de otras colecciones). Esta estrategia se justifica por varios motivos, como: la existencia de una gran cantidad de aislados con contenido génico desconocido (30%), es decir de actividad biológica impredecible; el hecho de trabajar con una especie diana sobre la cual nunca se habían efectuado ensayos similares; la detección de un gen o genes determinados no excluye la existencia de otros potencialmente interesantes; el espectro de toxicidad de algunas δ -entoxinas puede ser más amplio de lo comúnmente establecido, por ejemplo, se ha demostrado que Cry1 y Cry2 son moderadamente tóxicas contra algunas especies de dípteros (Hodgman et al., 1993; Iriarte et al., 2000); por último la contribución a la toxicidad de un aislado puede residir en agentes diferentes a los cristales de δ -endotoxinas, como toxinas solubles o la spora. En un estudio similar a éste, realizado sobre el también tefrítido *Bactrocera oleae*, se detectaron 23 aislados de *B. thuringiensis* con toxicidad moderada sobre larvas o adultos (Alberola et al., 1999). Sin embargo, el análisis de los mismos mediante PCR mostró que ninguno de ellos portaba genes típicamente anti-dípteros sino que 11 de ellos contenían genes *cry1* y/o *cry2* y para el resto no se detectó ninguno de los genes analizados.

A pesar de la amplitud de la prospección llevada a cabo (905 cepas ensayadas, entre las diferentes fuentes), no se detectó ninguna cepa con un efecto insecticida sobre adultos de *C. capitata* superior al 30% de mortalidad; una respuesta que resultó baja en relación a otros trabajos realizados con *B. thuringiensis* sobre tefrítidos (80% de mortalidad en 6 a 10 días) (Alberola et al., 1999; Robacker et al., 1996). Esta diferencia puede deberse a factores como la existencia de variaciones intrínsecas entre especies de tefrítidos, las cepas de *B. thuringiensis* probadas, las condiciones de bioensayo o una combinación de todos ellos. A pesar de ello, debe destacarse que la eficacia del mejor aislado de *B. thuringiensis* contra algún tefrítido descrita hasta la fecha es sustancialmente inferior a aquella descrita para especies relacionadas, como los mosquitos. El diseño experimental de este estudio tuvo como principal propósito identificar cepas de *B. thuringiensis* eficientes en el control de la mosca de la fruta en condiciones de campo, donde existen fuentes alternativas de alimento y donde la concentración de *B. thuringiensis* a la cual las moscas pudieran estar expuestas tras una pulverización fuera baja. De este modo, la

cantidad de material “tóxico” que fue proporcionado a los adultos en los bioensayos fue mucho más baja que en trabajos previos efectuados sobre tefrítidos; por ejemplo Robacker et al. (1996) en sus ensayos expusieron a adultos de *Anastrepha ludens* a la cantidad equivalente de 7.5 a 22.5 ml de cultivo esporulado de *B. thuringiensis* por unidad experimental, mientras que en el presente estudio esta cantidad fue de solo 0.5 ml. Otra variación importante es que, mientras que en algunos estudios la ingesta de *B. thuringiensis* fue forzada mediante la mezcla de sus extractos con una dieta completa (carbohidratos, proteínas y agua) (Alberola et al., 1999), en este estudio los extractos fueron mezclados únicamente con proteína hidrolizada como agente atrayente, el agua y el azúcar fueron añadidos de forma independiente. En todo caso, la cantidad total de toxina proporcionada en los ensayos (5-50 µg) fue considerablemente superior a lo necesario para matar insectos altamente sensibles, como los mosquitos (consultar la “Toxin Specificity Database” para más información, <http://www.glfsc.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus/BtSearch.cfm?lang=eng>). Por otro lado, el estado de desarrollo clave sobre el que se decidió incidir para el control de *C. capitata* fue el de adulto, ya que éste es el estado en el que la interacción insecto-*B. thuringiensis* (o sus toxinas) es más factible en condiciones de campo. Por este motivo, la prospección general se efectuó sobre adultos exclusivamente. Además, estudios previos han demostrado que la actividad de un aislado concreto de *B. thuringiensis* sobre larvas y adultos de tefrítidos no está forzosamente correlacionada (Alberola et al., 1999; Karamanlidou et al., 1991; Robacker et al., 1996).

En resumen, se ha desarrollado una colección de cepas de *B. thuringiensis* a partir de muestras recogidas en el agroecosistema de cítricos y su actividad (junto con la de cepas provenientes de otras colecciones) ha sido evaluada sobre *C. capitata*. La caracterización de la misma ha permitido reflejar la enorme diversidad de la especie existente en este agroecosistema y a su vez incidir en el gran potencial que las cepas seleccionadas pueden tener en el control de otras plagas. No obstante, a pesar de la intensa prospección efectuada, no se ha identificado ningún aislado con propiedades insecticidas contra *C. capitata*. En las condiciones de ensayo, es decir mediante el uso de extractos crudos de *B. thuringiensis*, la plaga puede ser considerada virtualmente insensible a *B. thuringiensis*. Por ello, se consideró la necesidad de explorar otros métodos para obtener un formulado con propiedades insecticidas sobre *C. capitata*.

4. Efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Ceratitis capitata*

Los resultados de este capítulo han sido aceptados para publicación en la revista *Pest Management Science*:

Vidal-Quist, J.C., Castañera, P., González-Cabrera, J. Cyt1Aa protein from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) subsp. *israelensis* is active against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). En prensa.

4.1 Introducción

Una de las propiedades más interesantes de los productos basados en *B. thuringiensis* es que existe una fuerte relación de especificidad entre cada toxina y una especie o grupo restringido de especies de insectos. La especificidad viene determinada por la complejidad del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas, siendo cada una de sus fases condicionante de la actividad entomopatógena. En este sentido, se ha demostrado que las fases iniciales del mecanismo de acción, la solubilización de los cristales paraesporales y la activación proteolítica de las protoxinas, son fundamentales para determinar la selectividad de un determinado aislado (Oppert, 1999). Del mismo modo, se ha observado que la alteración del procesamiento proteolítico de las protoxinas (por defecto o por exceso) es una de las bases bioquímicas de la resistencia desarrollada en colonias de insectos seleccionadas en condiciones de laboratorio (Ferré y Van Rie, 2002).

Por consiguiente, el tratamiento *in vitro* de extractos crudos (esporas y cristales) de una cepa de *B. thuringiensis* por solubilización y/o digestión puede potencialmente afectar su acción insecticida. Este fenómeno ha sido demostrado en varios trabajos previos. Por ejemplo, se han publicado varios estudios en los que la presolubilización en tampón alcalino de determinadas protoxinas produce un aumento drástico de su actividad sobre algunos coleópteros (Bradley et al., 1995; Federici y Bauer, 1998; Lambert et al., 1992). El pH del lumen intestinal de los coleópteros es por lo general ácido, sin embargo el pH óptimo para la solubilización de la mayoría de las protoxinas de *B. thuringiensis* es alcalino, por este motivo Bradley et. al (1995) observaron un aumento de al menos 30 veces en la toxicidad sobre larvas del escarabajo de la patata *Leptinotarsa decemlineata* (Say) cuando los cristales de la protoxina Cry1B fueron presolubilizados a pH alcalino. Algo similar fue observado por Lambert et al. (1992) con la protoxina Cry3C y el mismo coleóptero. En otro trabajo, Federici y Bauer (1998) reportaron un incremento superior a 50 veces en la toxicidad sobre *Chrysomela scripta* (Fabricius) con la presolubilización de la protoxina Cyt1Aa. La inducción de toxicidad por la solubilización de cristales paraesporales no es exclusiva de coleópteros, también ha sido descrita en diferentes especies de lepidópteros (Jaquet et al., 1987; Lecadet y Martouret, 1987) y dípteros (Chilcott et al., 1998).

Igualmente, se ha descrito que la activación de protoxinas solubles con fuentes de proteasas ajenas al insecto diana puede aumentar su actividad insecticida (Bradley et al., 1995; Jaquet et al., 1987). Es más, se ha demostrado que la activación proteolítica puede variar el espectro insecticida de una protoxina. En un trabajo clásico, se describió como cuando la protoxina de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* IC1, con actividad dual lepidópteros-dípteros, era predigerida con extractos digestivos del lepidóptero *Pieris brassicae* (Linnaeus) la toxina resultante mantuvo la actividad sobre esta especie y sobre el mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus), en cambio cuando la digestión se produjo con jugos del mosquito la actividad sobre *P. brassicae* se perdió completamente (Haider et al., 1986). Los autores relacionaron este efecto al hecho que la protoxina (130 kDa) sufría una digestión diferencial según la especie, siendo la toxina activada por *A. aegypti* la de menor tamaño (52 kDa frente a 55 kDa) y compartiendo el 100% de su secuencia con la toxina mayor. Es decir, la toxina digerida de 55 kDa podía ser posteriormente procesada a la toxina activa de 52 kDa en el tracto intestinal de la larva del mosquito, pero no a la inversa.

Así pues, el objetivo de este capítulo fue salvar la aparente insensibilidad de *C. capitata* a la aplicación de protoxinas cristalizadas de *B. thuringiensis* mediante el tratamiento *in vitro* de las mismas por solubilización alcalina y por procesamiento proteolítico con fuentes de proteasas exógenas. Para ello, la primera fase consistió en la prospección de la actividad sobre larvas de *C. capitata* de protoxinas solubilizadas a partir de una amplia selección de cepas. La segunda fase consistió en el estudio del efecto sobre la actividad biológica de la predigestión de algunas de estas protoxinas con diferentes fuentes de proteasas.

4.2 Material y métodos

4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia de *B. thuringiensis* utilizadas fueron: 4Q1 (subsp. *israelensis*), 4Q5 (subsp. *israelensis*), 4B1 (subsp. *finitimus*) y 4D4 (subsp. *kurstaki*) provenientes del Bacillus Genetic Stock Center (B.G.S.C., Ohio State University, EEUU); T30001 (subsp. *medellin*), T28A003 (subsp. *jegathesan*) y T44001 (subsp. *higo*) provenientes del

Instituto Pasteur (Paris, Francia). La cepa de referencia 2362 de *Bacillus sphaericus*, código S05036, fue obtenida igualmente del Instituto Pasteur.

Tabla 4.1 Cepas *B. thuringiensis* de la colección IVIA seleccionadas para ensayos de solubilización.

Código IVIA	Patrón génico ^a	Perfil de electroforesis ^c	Morfología del cristal	Cristales por esporangio
I-OL10.1	ninguno	6	redondeados	1
I-OL27.1	ninguno	7	redondeados	1
I-OL46.8	<i>cry1, cry2</i>	13	bipiramidales	1
I-OL48.2	ninguno	4	redondeados	1
I-OL51.4	ninguno	18	redondeados	1
I-OL61.3	<i>cry1, cry2</i>	13	bipiramidales	≥2
I-BE5.9	ninguno	17	redondeados	1
I-BE26.15	<i>cry4, cry10, cry11, cyt1A, cyt2</i>	16	redondeados	1
I-AL15.7	<i>cry4, cry10, cry11, cyt1A, cyt2</i>	16	redondeados	≥2
I-OL1.1	ninguno	25	irregulares	≥2
I-OL22.3	ninguno	22	Adheridos ^d	1
I-OL33.6	<i>cry1, cry2</i>	1	bipiramidales	≥2
I-OL37.1	<i>cry1, cry2, cry9A</i>	1	bipiramidales	1
I-BE14.1	ninguno	21	redondeados	1
I-BE17.1	<i>cry1, cry2</i>	1	bipiramidales	≥2
I-BE17.3	<i>cry1, cry2</i>	1	bipiramidales	1
I-BE22.3	<i>cry1, cry9A</i>	1	bipiramidales	1
I-BE23.2	ninguno	8	Adheridos ^d	1
I-BE23.6	<i>cry1</i>	1	bipiramidales	1
I-BE26.2	ninguno	24	Adheridos ^d	≥2
I-AL37.5	ninguno	10	Adheridos ^d	1
I-AL41.1	ninguno	29	redondeados	1
I-OL18.6	<i>cry5 y/o cry12 y/o cry14 y/o cry21A^b</i>	35	redondeados	≥2
I-OL20.5	<i>cry1, cry2</i>	12	bipiramidales	≥2
I-OL40.16	<i>cry4</i>	28	redondeados	1
I-OL57.1	<i>cry7 y/o cry8, cry9A</i>	38	redondeados	1
I-BE5.2	<i>cry4</i>	19	redondeados	1
I-BE25.13	<i>cry5 y/o cry12 y/o cry14 y/o cry21A^b</i>	31	bipiramidales	≥2
I-BE26.40	<i>cry1, cry2</i>	34	bipiramidales	1
I-BE33.9	<i>cry1</i>	13	pequeños	1
I-BE34.2	<i>cry27</i>	23	redondeados	1
I-AL2.6	<i>cry7 y/o cry8</i>	9	redondeados	1
I-AL5.9	<i>cry4</i>	39	bipiramidales	1
I-AL19.14	<i>cry4</i>	36	pequeños	1
I-AL53.7	<i>cry1</i>	11	bipiramidales	1

^a PCRs para detectar *cry1, cry2, cry3, cry4, cry5, cry7, cry8, cry9A, cry10, cry11, cry12, cry14, cry17, cry19, cry21A, cry27, cry39Aa, cry44Aa, cyt1A* y *cyt2*

^b Genes detectables mediante el par de cebadores *gral_nem*

^c Para más detalles consultar el material suplementario

^d Cristales adheridos a la espora después de la lisis celular

Para la obtención de la protoxina Cyt1Aa, se obtuvo la cepa recombinante 4Q7-pWF45 (cedida por Brian Federici, University of California, EEUU) (Wu y Federici, 1993). Adicionalmente se utilizaron 35 cepas nativas de la colección IVIA que fueron seleccionadas principalmente por su diferente perfil génico y/o electroforético (Tabla 4.1). Las bacterias fueron cultivadas en medio CCY (Stewart et al., 1981) a 28°C durante 48 horas.

4.2.2 Purificación y solubilización de protoxinas de *Bacillus* sp.

De cada una de las cepas se tomó una asada de una colonia aislada que se utilizó para inocular 4.5 ml de medio CCY líquido (precultivo) y se incubó durante 48 h a 28°C con agitación a 200 rpm. Se tomó una alícuota para verificar la formación de esporas y cristales (el óptimo es de un 90% de esporulación) y el precultivo se incubó a 70°C durante 20 min para eliminar las células vegetativas (sincronización). El cultivo principal se inoculó con 1/1000 volúmenes de precultivo sincronizado y se creció como ya se ha descrito. Una vez verificada la producción de esporas y cristales el cultivo principal fue centrifugado a 12000×g durante 10 min a 4°C. El sedimento fue lavado 5 veces con una solución fría de NaCl 1 M y EDTA 10 mM para eliminar restos celulares. Para la cepa recombinante 4Q7-pWF45 se añadió un paso adicional de incubación con el detergente deoxicolato sódico (6 mg por gramo de sedimento) a 37°C durante 15 minutos seguido por 2 lavados con NaCl 1 M y EDTA 10 mM. Finalmente, el sedimento de esporas y cristales se resuspendió en una solución fría de KCl 10 mM y se conservó a -20°C, cuando era necesario. Todos los pasos tras la sedimentación del cultivo se realizaron en hielo para minimizar la proteólisis.

Las protoxinas se solubilizaron mediante la suspensión del sedimento de esporas y cristales en tampón de solubilización a 1/200 volúmenes (tampón de solubilización/cultivo de partida) e incubación durante 2 h a temperatura ambiente con agitación lenta. La fracción soluble se recuperó tras centrifugación a 9000×g, 15 min a 4°C. El tampón de solubilización fue tampón carbonato, 50 mM Na₂CO₃ a pH=10 y 10 mM DTT excepto para las cepas 4Q7-pWF45 (50 mM Na₂CO₃ pH=10.5, 10 mM DTT) y *B. sphaericus* 2362 (solución acuosa ajustada a pH=12 con NaOH 10 M) (Baumann et al., 1985). La concentración de proteínas del solubilizado se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo BIO-RAD Protein Assay

(Bio-Rad, EEUU). La concentración de proteínas de las mezclas de esporas y cristales se estimó por densitometría utilizando albúmina de suero bovino (Sigma Chemical co., EEUU) como estándar.

4.2.3 Procesamiento proteolítico de las δ -endotoxinas

4.2.3.1 Obtención de extractos intestinales de insectos

Se obtuvieron extractos solubles del intestino medio de: adultos (2-3 días) y larvas de 3^{er} estadio de *C. capitata*, larvas del lepidóptero noctuido *Sesamia nonagrioides* (mezcla de larvas de 2^o, 3^{er} y 4^o estadio provenientes del Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Madrid) y larvas de 4^o estadio del díptero culícido *Culex pipiens* (Linnaeus) (adquiridas del *Servei de control de mosquits*, Sant Feliu de Llobregat). Los intestinos medios de larvas y adultos de *C. capitata* fueron cuidadosamente diseccionados bajo lupa binocular y agrupados en solución salina fría (NaCl 0.15 M) a razón de 50 y 100 intestinos por ml, respectivamente. Los intestinos medios de larvas de 2^o, 3^{er} y 4^o estadio de *S. nonagrioides* fueron extraídos y mezclados en solución NaCl 0.15 M fría a razón de 25, 25 y 12 intestinos por ml, respectivamente. Ochenta larvas completas de *C. pipiens* fueron agrupadas por ml de solución salina fría. Las muestras fueron homogeneizadas en microtubos de 1.5 ml utilizando un triturador eléctrico (Pellet Pestle Motor Micro Grinder, Kontes, EEUU), posteriormente se centrifugaron a 12000×g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se alicuotaron y transfirieron inmediatamente a -80°C, para limitar la proteolisis.

El pH del contenido intestinal de larvas y adultos de *C. capitata* se estimó de forma aproximada homogeneizando los intestinos directamente sobre tiras indicadoras de pH (Neutralit pH 5-10, Merck, Alemania).

4.2.3.2 Determinación de la actividad enzimática

La actividad tipo tripsina de los extractos intestinales fue estimada por ensayo colorimétrico utilizando el sustrato BApNa (N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida) (Sigma Chemical co., EEUU) como ya se ha descrito (San Andrés et al., 2007). El volumen de reacción fue de 1 ml en tampón 50 mM Na₂CO₃ pH=10. El sustrato a 0.25 mM fue incubado durante 30 min a 30°C con los extractos intestinales solubles al 4%, 1% y 1% vol/vol (*C. capitata*, *S. nonagrioides* y *C. pipiens*, respectivamente). La reacción se paró añadiendo 0.4 ml de ácido acético frío al 30%. Tras 10 minutos en hielo, la digestión

del sustrato fue evaluada mediante medición de la absorbancia a 410 nm con espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en Unidades Tríplicas (UT) tras comparar con una curva estándar obtenida con tripsina de bovino (Sigma Chemical co., EEUU), de acuerdo al método de Kunitz (Kunitz, 1947).

4.2.3.3 Incubación de las δ -endotoxinas

Las protoxinas presolubilizadas de *B. thuringiensis* fueron digeridas con extractos intestinales de insectos y tripsina comercial de bovino en tampón carbonato (50 mM Na₂CO₃ pH=10). La actividad tríplica de las diferentes fuentes de proteasas se estandarizó a 10⁻³ UT por 120 μ g de protoxina (relación equivalente a 1 μ g de tripsina de bovino por 250 μ g de protoxina o a un 5% (vol/vol) de extracto intestinal de larva de *C. capitata* en una solución de protoxina a 1 mg/ml). Las condiciones óptimas de digestión se establecieron a 4 mg/ml de protoxina de partida e incubación de 3 h a 37°C. Las digestiones se interrumpieron por congelación inmediata a -20°C. La concentración proteica tras proteólisis se determinó por el método de Bradford y se utilizó para estandarizar la cantidad de muestra para electroforesis y bioensayos.

4.2.4 Electroforesis de proteínas y densitometría

El tamaño y cantidad relativa de los polipéptidos que componían las muestras se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como ya ha sido descrito (Laemmli, 1970). El gel concentrador utilizado fue al 5% y el gel separador al 12%. El análisis de densitometría de los geles se llevó a cabo utilizando el software de análisis de imágenes TotalLab TL12 (Nonlinear Dynamics, Reino Unido).

4.2.5 Bioensayos sobre *Ceratitis capitata*

Las larvas y adultos de *C. capitata* utilizados en los bioensayos se obtuvieron de la cría establecida y mantenida en las instalaciones del IVIA desde el año 2002. El procedimiento de cría ya se ha descrito en el apartado 3.2.7.

4.2.5.1 Bioensayos sobre larvas

Los ensayos sobre larvas fueron realizados por contaminación superficial de dieta sólida. La dieta se preparó como se ha descrito en el apartado 3.2.7.2. Para el montaje de la

bandeja de ensayo Bio-Assay Tray BIO-BA-128 (C-D International Inc., EEUU), se fundieron porciones de dieta por calentamiento en horno de microondas y, con ayuda de un dispensador cilíndrico (Bernar, España), se administró la dieta aún caliente en cada uno de los pocillos, cubriéndolos inmediatamente con un taco de plástico diseñado al efecto (Figura 4.1). Una vez solidificada la dieta se quitaron los tacos y cuidadosamente se eliminaron imperfecciones hasta dejar una superficie circular plana de dieta de 1.8 cm². Antes de su uso, las bandejas de ensayo se “esterilizaron” bajo luz UV durante 15 minutos y cada una de las celdas se cubrió con su correspondiente tapa adhesiva.

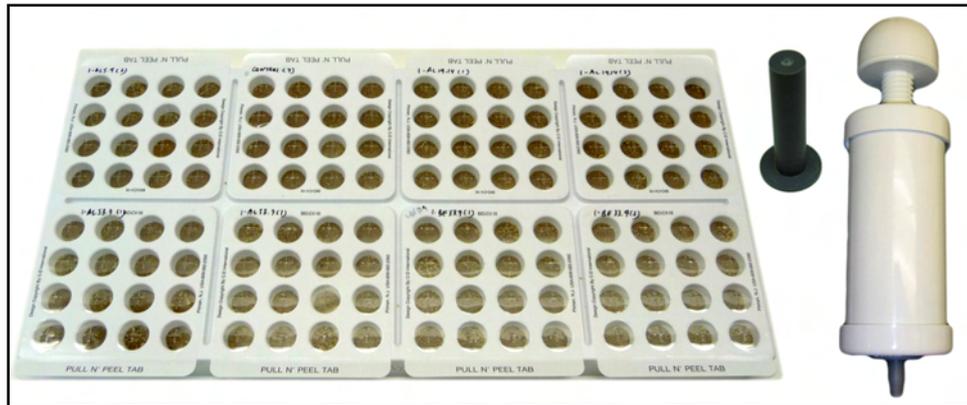


Figura 4.1 Bandeja de bioensayo de larvas, junto con dispensador de dieta y taco alisador.

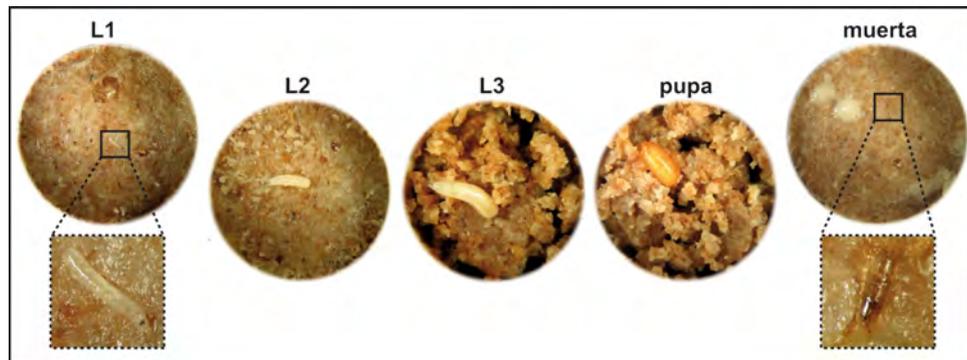


Figura 4.2 Estados/ios de las larvas neonatas de *C. capitata* tras 7 días de bioensayo.

Todos los tratamientos se prepararon en tampón carbonato (50 mM Na₂CO₃ pH=10) y se ajustaron a un volumen de 50 µl por pocillo, que se dejó secar bajo cabina de flujo laminar (AH-100, Telstar S.A., España). Se añadió una larva neonata por pocillo, con un

total de al menos 48 larvas por tratamiento. El régimen climático fue de 25°C en cámara oscura. La mortalidad y el estado de desarrollo se anotaron tras 7, 10 o 14 días según el ensayo. Los estados de desarrollo se determinaron en base al tamaño de la larva y la conformación del aparato bucal definiendo las siguientes categorías: L1 (larva de 1^{er} estadio), L2 (2^o estadio), L3 (3^{er} estadio) y pupa (Figura 4.2).

Las larvas neonatas se obtuvieron por medio del siguiente protocolo: se sembraron aproximadamente 4 huevos (de menos de 5 horas tras la puesta) por gramo de la dieta de cría general de larvas (muy similar a la dieta de bioensayo pero sin agar-agar y con el salvado de trigo en copos y no molido) y se dejaron eclosionar durante 72 horas a 25°C y en oscuridad. Transcurrido este tiempo las larvas neonatas (de longitud menor a 1.5 veces la longitud del huevo) se separaron de la dieta por flotación en una solución saturada de sacarosa (J. Jacas, Universitat Jaume I, comunicación personal). Las larvas se rescataron con la ayuda de un tamiz metálico entomológico y se sometieron a 2 lavados sucesivos con ácido benzoico al 0.4% y 3 lavados con una solución de NaCl 0.15 M, finalmente las larvas se transfirieron a una placa con un papel oscuro humedecido y de ahí se transfirieron mediante pincel a la bandeja de ensayo.

4.2.5.2 Bioensayos sobre adultos

Se llevaron a cabo dos tipos de bioensayo sobre adultos: el primero, por administración de las toxinas en gotas con atrayente alimenticio y el segundo, por contaminación superficial de dieta sólida. El primer tipo de ensayo se realizó como se ha descrito en el apartado 3.2.7.1, con modificaciones: la toxina se aplicó a dosis única (25 µg/placa) añadiendo en cada placa 5 gotas de 10 µl a 0.5 mg/ml de toxina y 1.5% de proteína hidrolizada como atrayente (Biocebo, Agrodan, España). Se utilizaron 10 moscas por placa y 5 repeticiones por tratamiento.

La unidad de ensayo en los bioensayos por contaminación de dieta sólida consistió en un recipiente compuesto en su parte inferior de una placa Petri de 6 cm de diámetro rellena de aproximadamente 12 ml de dieta solidificada y cubierta por un bote cilíndrico de plástico transparente de 120 ml cuya base se sustituyó por muselina sellada con cola termofusible para posibilitar la ventilación y la puesta (Figura 4.3). A cada unidad se le añadió un microtubo con agua desionizada sellado con algodón.

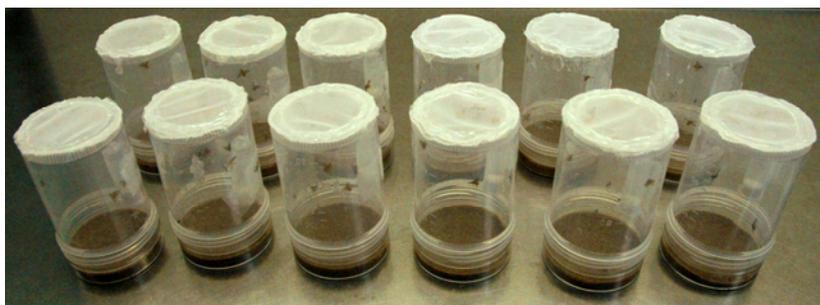


Figura 4.3 Bioensayo de supervivencia, fecundidad y fertilidad de adultos de *C. capitata*

Los tratamientos se ajustaron a un volumen de 0.5 ml con tampón carbonato (50 mM Na_2CO_3 pH=10.5) y tras ser administrados y homogeneizados en la superficie de la dieta sólida (misma composición que el apartado anterior) se dejaron secar en cabina de flujo laminar (AH-100, Telstar S.A., España). En cada unidad se añadieron 10 adultos de *C. capitata* (5 machos y 5 hembras) de 2 días de edad. Los parámetros de supervivencia y puesta fueron anotados diariamente durante 10 días. La fertilidad fue analizada al 4º y 7º día de ensayo transfiriendo 50 huevos desde la muselina a una placa Petri con un papel de filtro oscuro constantemente humedecido y registrando la eclosión tras 4 días. Se utilizaron 6 unidades de ensayo por tratamiento.

4.2.6 Análisis de datos

Los ensayos concentración-respuesta fueron analizados estadísticamente por regresión logística (Modelos Lineales Generalizados) para una distribución binomial con función de enlace tipo Logit, la comparación entre medias se efectuó aplicando la prueba de diferencias mínimas significativas (test LSD) con corrección por Bonferroni. Para ello se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., EEUU). El efecto del tratamiento sobre la fertilidad se analizó por análisis de varianza de 2 vías (de acuerdo al factor día de ensayo y al factor tratamiento) mediante el programa GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, EEUU); la tasa de puesta diaria acumulada durante el periodo de ensayo se comparó entre tratamientos por el test *t* de Student mediante el mismo programa estadístico. La CL_{50} (concentración requerida para matar el 50% de las larvas) se calculó mediante análisis Probit (Finney, 1971) utilizando el programa informático Polo-PC (LeOra Software, EEUU). La corrección de porcentajes respecto al control se efectuó aplicando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

La toxicidad esperada para una mezcla de toxinas se estimó por medio de la fórmula descrita por Tabashnik (Tabashnik, 1992):

$$CL_{50m} = \left(\frac{r_a}{CL_{50a}} + \frac{r_b}{CL_{50b}} \right)^{-1}$$

Donde, CL_{50m} es la CL_{50} esperada, que es la media armónica entre las CL_{50} s estimadas para las toxinas a y b actuando separadamente, siendo r_a y r_b las proporciones relativas de la toxina a y b en la mezcla, respectivamente.

4.3 Resultados

4.3.1 Efecto de la presolubilización de cristales de *Bacillus* sp. sobre *Ceratitis capitata*

Los cristales proteicos producidos por 5 cepas *B. thuringiensis* de referencia, 35 cepas *B. thuringiensis* nativas del agroecosistema citrícola (seleccionadas en base a su diversidad biológica, Tabla 4.1) y 1 cepa de la especie *B. sphaericus* fueron solubilizados (consultar el apartado 4.2.1 para más detalles). El rendimiento de solubilización varió de 1.5 a 95.8 μg de protoxina solubilizada por ml de cultivo de partida (Figura 4.4).

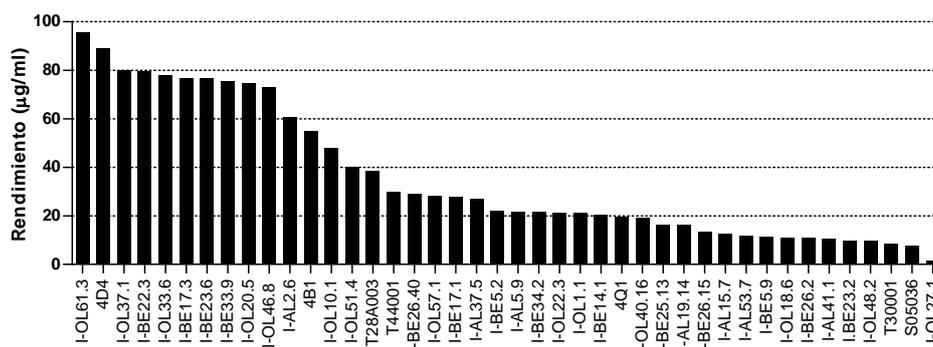


Figura 4.4 Rendimiento de solubilización de 42 cepas de *Bacillus* sp. expresado como la cantidad de protoxina solubilizada por volumen de cultivo bacteriano.

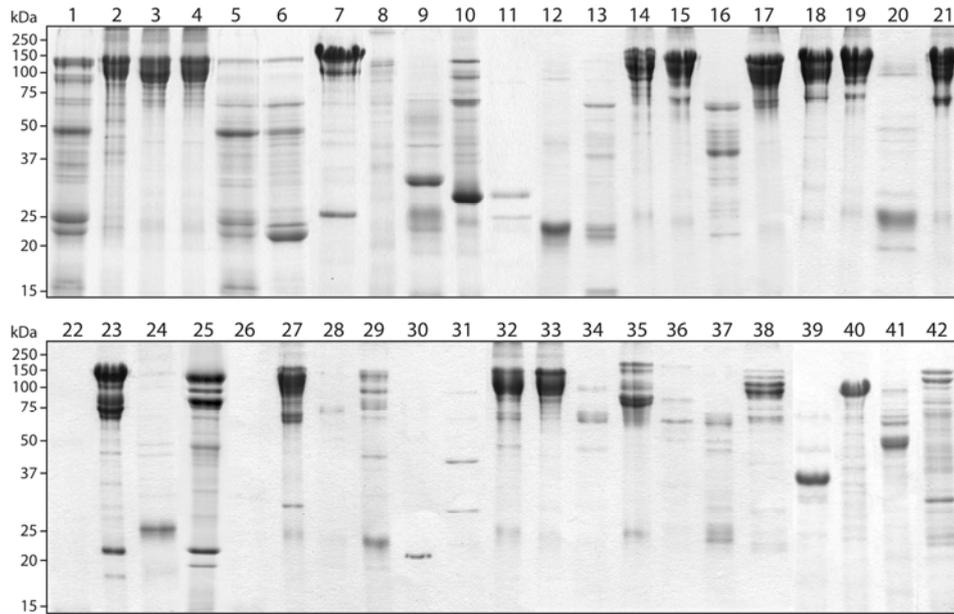


Figura 4.5 Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas solubilizadas de 42 cepas *Bacillus* sp.: 4Q1 (carril 1), 4D4 (2), I-OL46.8 (3), I-OL61.3 (4), I-BE26.15 (5), I-AL15.7 (6), I-OL48.2 (7), I-OL10.1 (8), I-BE5.9 (9), I-OL51.4 (10), I-OL27.1 (11), I-OL1.1 (12), I-OL22.3 (13), I-OL33.6 (14), I-OL37.1 (15), I-BE14.1 (16), I-BE17.1 (17), I-BE17.3 (18), I-BE22.3 (19), I-BE23.2 (20), I-BE23.6 (21), I-BE26.2 (22), I-AL37.5 (23), I-AL41.4 (24), 4B1 (25), I-OL18.6 (26), I-OL20.5 (27), I-OL40.16 (28), I-OL57.1 (29), I-BE5.2 (30), I-BE25.13 (31), I-BE26.40 (32), I-BE33.9 (33), I-BE34.2 (34), I-AL2.6 (35), I-AL5.9 (36), I-AL19.14 (37), I-AL53.7 (38), T30001 (39), T28A003 (40), T44001 (41), S05036 (42). Se cargaron 10 µg de proteína por pocillo, se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

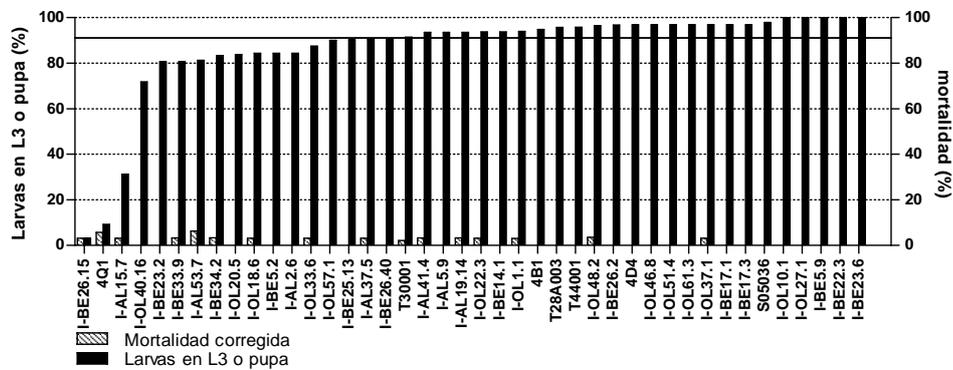


Figura 4.6 Efecto de la solubilización de los cristales proteicos de 42 cepas *Bacillus* sp. sobre la supervivencia y desarrollo de larvas neonatas de *C. capitata* tras 7 días. La concentración de ensayo fue de 20 µg/cm². Se ensayaron 48 larvas por cepa. Las columnas rayadas hacen referencia a la mortalidad corregida respecto al control mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). Las

columnas sólidas se refieren al porcentaje de larvas que alcanzaron el estadio L3 (o pupa) en el periodo de ensayo, la línea continua horizontal muestra dicho porcentaje para el control.

Los productos de solubilización fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE (Figura 4.5) mostrando una gran diversidad en la composición proteica de los aislados. Las protoxinas solubilizadas de todas las cepas fueron ensayadas sobre larvas de *C. capitata* a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 4.6). Aunque ninguna de las cepas produjo un incremento significativo ($P>0.05$) de la mortalidad a esa concentración, 3 de ellas causaron una reducción estadísticamente significativa ($P<0.05$) del desarrollo respecto al control, cuantificado como el porcentaje de larvas que alcanzaron el estadio L3 o superior en el periodo de ensayo, 7 días.

Las cepas que mostraron actividad sobre *C. capitata* fueron la cepa de referencia 4Q1 y las cepas nativas I-BE26.15 e I-AL15.7 (9.2%, 3.1% y 31.2% de las larvas en L3 o pupa, respectivamente). Todas ellas mostraron las características propias de la subespecie *israelensis* de *B. thuringiensis* (Bti) (Tabla 4.1; figura 4.5, carriles 1,5 y 6).

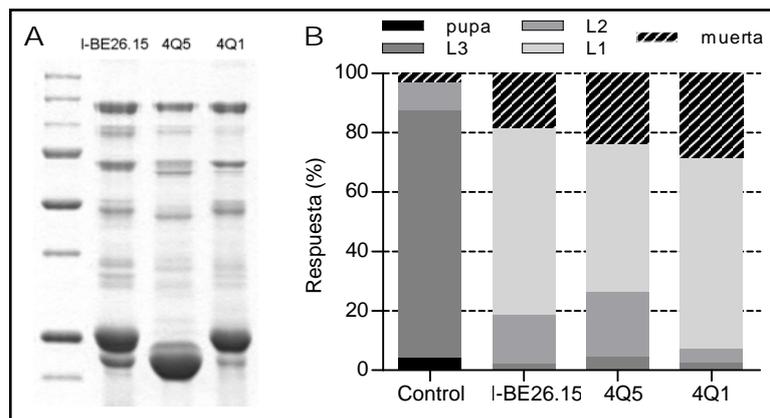


Figura 4.7 Solubilización de cristales paraesporales de diferentes cepas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti). (A) Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas solubilizadas de 3 cepas Bti, se cargaron 10 μg de proteína por pocillo junto con el marcador Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU). (B) Efecto sobre la supervivencia y desarrollo tras 7 días de larvas neonatas de *C. capitata*, la concentración de protoxina solubilizada ensayada fue de 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento.

A la vista de esta evidencia, se comparó la actividad sobre *C. capitata* de las protoxinas solubilizadas de tres cepas con perfil *israelensis*, incrementando la concentración de ensayo a $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las cepas evaluadas fueron las cepas de referencia 4Q1 y 4Q5, y la cepa nativa I-BE26.15. El perfil electroforético de los cristales solubilizados de las cepas 4Q1 e I-BE26.15 fue muy similar y distinto al observado para la cepa 4Q5 (Figura 4.7A). La actividad de las protoxinas de las tres cepas Bti sobre *C. capitata* fue muy similar (Figura 4.7B), siendo la cepa 4Q1 la más activa tanto a nivel de mortalidad como de reducción del desarrollo. En consecuencia, para los siguientes ensayos se seleccionó la cepa 4Q1 como representativa de la subespecie Bti, y que de ahora en adelante cualquier referencia a Bti en el texto se corresponderá a dicha cepa.

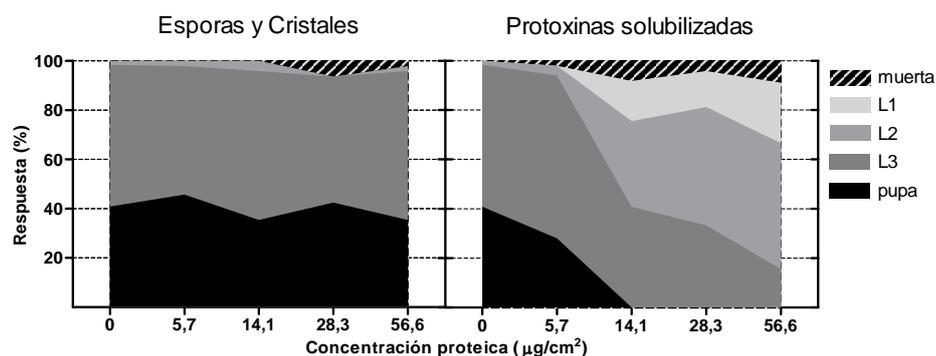


Figura 4.8 Actividad sobre *C. capitata* de cristales paraesporales y protoxinas solubilizadas de la cepa 4Q1 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Los diferentes tonos se refieren a estadios de desarrollo tras 7 días de ensayo, a concentraciones crecientes. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento.

Ensayos previos demostraron que las mezclas de esporas y cristales paraesporales de diferentes cepas Bti no mostraron actividad sobre larvas ni adultos de *C. capitata* (ver apartado 3.3.4). Con el propósito de ampliar la información a este respecto, se llevó a cabo un ensayo concentración-respuesta para comparar la actividad sobre *C. capitata* de los cristales paraesporales de la cepa Bti 4Q1 con la actividad de esas mismas protoxinas tras haber sufrido un protocolo de solubilización previo (Figura 4.8). La administración de esporas y cristales de la cepa 4Q1 no tuvo ningún efecto sobre larvas de *C. capitata* hasta una concentración de $56.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que la presolubilización de las protoxinas dio lugar a una ganancia de actividad biológica, fundamentalmente a modo de reducción del desarrollo larvario.

4.3.2 Efecto de la digestión de las δ -endotoxinas sobre *Ceratitis capitata*

4.3.2.1 Activación de las protoxinas según la fuente de proteasas

Con el fin de estudiar el efecto que la predigestión de las protoxinas de *B. thuringiensis* produce sobre su actividad contra *C. capitata*, se seleccionaron tres cepas de *B. thuringiensis* de distintos serovares: la cepa 4Q1 de Bti, único serovar con actividad sobre *C. capitata*, y las cepas 4B1 (subsp. *finitimus*) y 4D4 (subsp. *kurstaki*) que no habían resultado activas en ensayos previos.

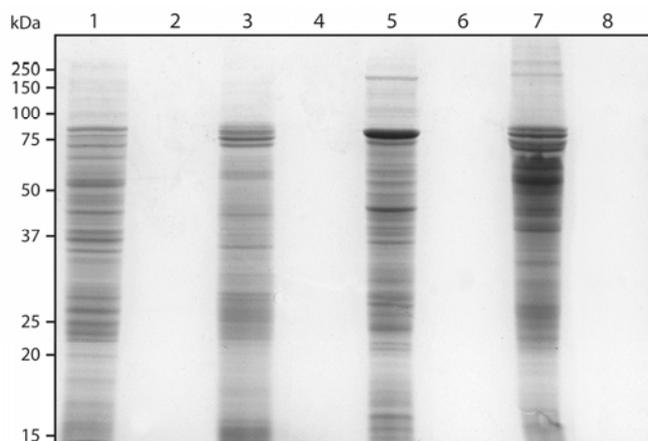


Figura 4.9 Electroforesis SDS-PAGE de extractos digestivos solubles de insectos. Extractos de adultos (1) y larvas (3) de *C. capitata*, larvas de *S. nonagrioides* (5) y larvas completas de *C. pipiens* (7). Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a los respectivos extractos autodigeridos durante 16 h a 37°C. Se cargaron 12 μ g de proteína antes de digestión por pocillo, con el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

Las protoxinas presolubilizados de cada cepa fueron incubadas con diferentes fuentes de proteasas: extractos digestivos de larvas de 3^{er} estadio y adultos de *C. capitata*, de larvas de 2^o a 4^o estadio de *S. nonagrioides* y de larvas completas de 4^o estadio de *C. pipiens* (Figura 4.9), así como con tripsina comercial de bovino. El análisis electroforético de los productos de digestión mostró que el procesamiento proteolítico fue claramente dependiente de la naturaleza de la fuente de proteasas utilizada, para las tres cepas ensayadas (Figura 4.10A, Figura 4.11). Sin embargo, la digestión de las protoxinas de las cepas 4B1 y 4Q1 con jugos intestinales de *C. capitata* fue muy similar para los dos estados, larva y adulto.

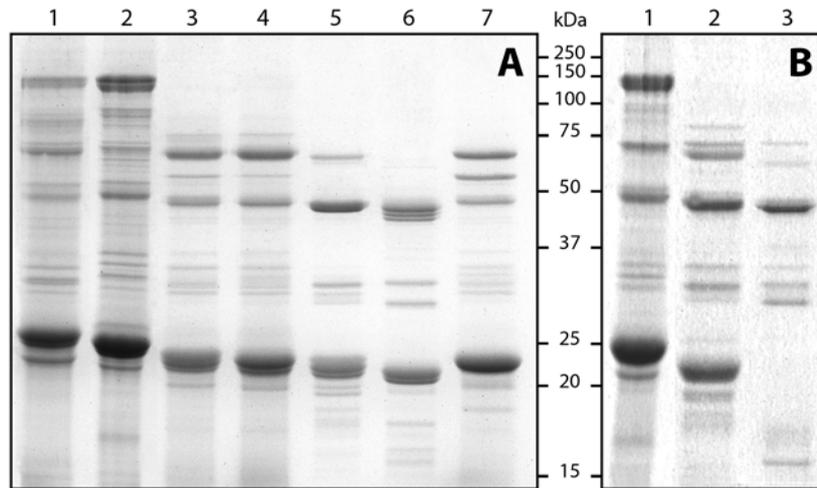


Figura 4.10 Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* digeridas con diferentes fuentes de proteasas. (A) mezcla de esporas y cristales (carril 1), protoxinas solubilizadas (2), toxinas digeridas con extractos intestinales de larvas de *C. capitata* (3), de adultos de *C. capitata* (4), de larvas de *S. nonagrioides* (5), de larvas de *C. pipiens* (6); con tripsina comercial de bovino (7). (B) protoxinas solubilizadas (carril 1), toxinas digeridas con extractos intestinales de *S. nonagrioides* durante 3 h (2), toxinas digeridas con extractos intestinales de *S. nonagrioides* durante 20 h (3). Se cargaron 10 μ g de proteína por pocillo, se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

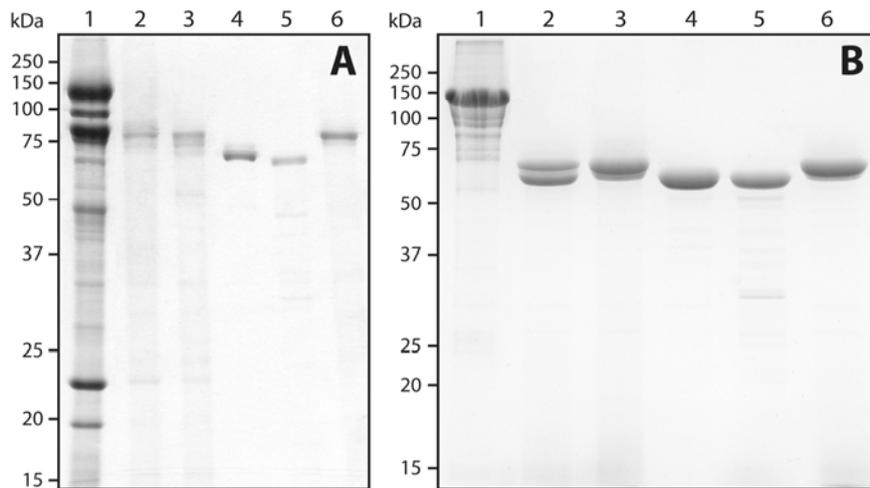


Figura 4.11 Electroforesis SDS-PAGE de protoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* (A) y de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B) digeridas con diferentes fuentes de proteasas. Protoxinas solubilizadas (carril 1), toxinas digeridas con extractos intestinales de larvas de *C. capitata* (2), de adultos de *C. capitata* (3), de larvas de *S. nonagrioides* (4), de larvas de *C. pipiens* (5); con

tripsina comercial de bovino (6). Se cargaron 10 µg de proteína por pocillo, se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

Adicionalmente, el pH del lumen intestinal de adultos y larvas de 3^{er} estadio de *C. capitata* se estimó en 7.5 y 8, respectivamente.

4.3.2.2 Actividad de las δ-endotoxinas predigeridas con jugos digestivos de insectos

4.3.2.2.1 Actividad sobre larvas

Las protoxinas digeridas de las cepas 4B1 (subsp. *finitimus*) y 4D4 (subsp. *kurstaki*) se ensayaron a dosis única (20 µg/cm²) sobre larvas neonatas de *C. capitata*. Ninguno de los tratamientos mostró actividad insecticida, no existieron diferencias significativas ($P>0.05$) en el desarrollo de larvas entre tratamientos ni respecto al control (Figura 4.12).

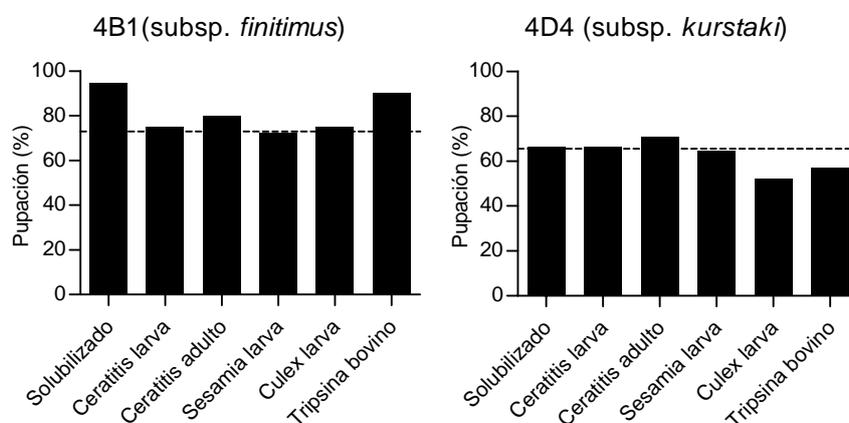


Figura 4.12 Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de las cepas de *B. thuringiensis* 4B1 (subsp. *finitimus*) y 4D4 (subsp. *kurstaki*) sobre su actividad biológica contra larvas neonatas de *C. capitata*. El eje de las ordenadas indica el porcentaje de larvas que alcanzaron el estadio de pupa tras 8 días. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento. La línea de puntos muestra el porcentaje de pupación alcanzado en el tratamiento control.

Para el estudio de la cepa Bti se llevó a cabo un ensayo concentración-respuesta con los diferentes niveles de tratamiento de las protoxinas a en un rango de dosis de 0 a 56.6 µg/cm² (Figura 4.13). Los tratamientos con toxinas solubles (digeridas o no) produjeron una reducción significativa ($P<0.05$) del desarrollo en relación a la mezcla de esporas y cristales, que como se ha mostrado previamente no resultó activa contra *C. capitata*. Las protoxinas solubilizadas y los diferentes digeridos de Bti causaron una fuerte reducción

del desarrollo a partir de una concentración de proteína de 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, sin existir diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos. Por otro lado, la mortalidad de las larvas aumentó cuando las protoxinas fueron previamente digeridas, sin embargo este aumento fue significativo ($P<0.05$) únicamente cuando las protoxinas fueron incubadas con extractos digestivos de larvas de *C. pipiens*.

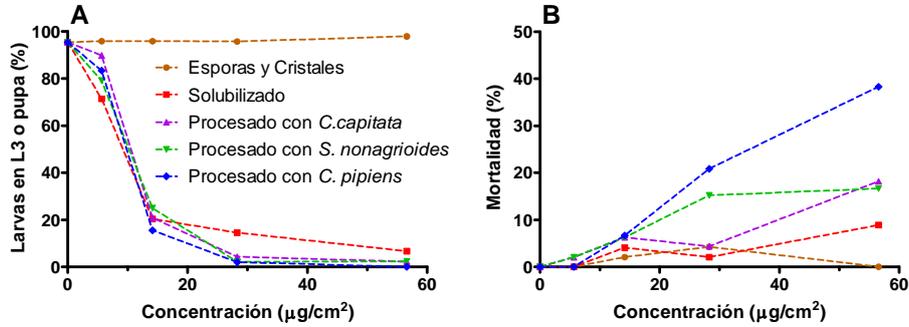


Figura 4.13 Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de la cepa de *B. thuringiensis* 4Q1 (subsp. *israelensis*) en el desarrollo y supervivencia de larvas neonatas de *C. capitata* tras 7 días de ensayo. (A) Larvas en 3^{er} estadio larvario o superior, (B) mortalidad; con 48 larvas por tratamiento.

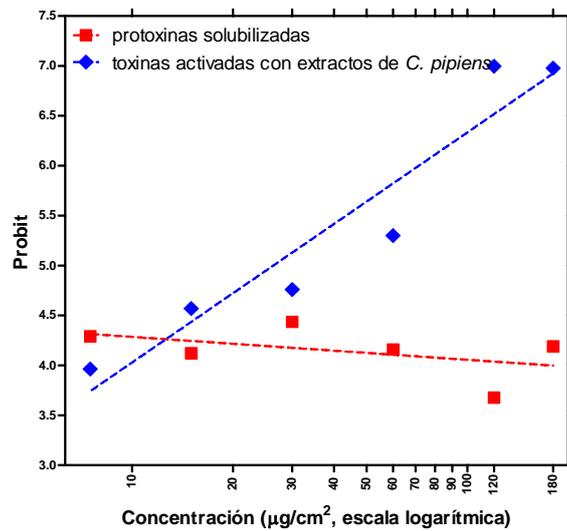


Figura 4.14 Actividad insecticida de protoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* con 2 tipos de tratamiento: solubilización *in vitro* y predigestión con extractos intestinales de *C. pipiens*. Los datos de concentración están representados en escala logarítmica. La mortalidad está expresada en unidades Probit (Finney, 1971).

Para ampliar esta información, se desarrolló un ensayo de concentración-respuesta más amplio exclusivamente con protoxinas solubilizadas de Bti y con toxinas activadas con extractos digestivos de *C. pipiens*. En este caso, la mortalidad producida por el tratamiento con protoxinas solubilizadas no superó un máximo del 30% en un rango de 7.5 a 180 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que las mismas protoxinas preincubadas con proteasas de *C. pipiens* mostraron una actividad insecticida muy superior, pudiendo estimar la CL_{50} mediante análisis Probit en 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (15.38-50.89, límites fiduciales al 95%) (Figura 4.14).

4.3.2.2.2 Actividad sobre adultos

La actividad de los diferentes niveles de tratamiento de las protoxinas de Bti sobre adultos de *C. capitata* fue evaluada mediante bioensayos con aplicación de toxinas en gotas con atrayente alimenticio (apartado 4.2.5.2). A la dosis ensayada (25 $\mu\text{g}/\text{placa}$) ninguno de los tratamientos (protoxina solubilizada, toxina digerida con extractos de larvas y adultos de *C. capitata*, larvas de *S. nonagrioides*, larvas de *C. pipiens* y tripsina comercial) produjo un incremento significativo ($P>0.05$) de mortalidad respecto al tratamiento control.

4.3.2.2.3 Efecto de la sobredigestión de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* con jugos digestivos de *Sesamia nonagrioides*

Una observación no programada durante el curso de la investigación proporcionó información muy valiosa acerca de la base de la toxicidad sobre larvas de *C. capitata* que se había encontrado para las toxinas de Bti. La sobredigestión de las protoxinas de Bti con proteasas digestivas de *S. nonagrioides* (incubación de 20 h a 37°C, en lugar de 3 h como en los ensayos anteriores) produjo una supresión total de su eficacia sobre *C. capitata*. La supervivencia y desarrollo de las larvas no se vieron afectados ni a la mayor concentración ensayada (56.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), mientras que las mismas protoxinas digeridas durante menos tiempo (3 h) produjeron los efectos deletéreos descritos anteriormente (Figura 4.15).

Paralelamente, al comparar los productos de digestión de Bti a 3 h y 20 h de incubación con proteasas de *S. nonagrioides* se observó que tras 20 h los péptidos de 22 a 25 kDa propios de Bti (correspondientes a las toxinas Cyt) se degradaron completamente,

mientras que el resto del patrón peptídico apenas varió en cuanto a tamaño (Figura 4.10B).

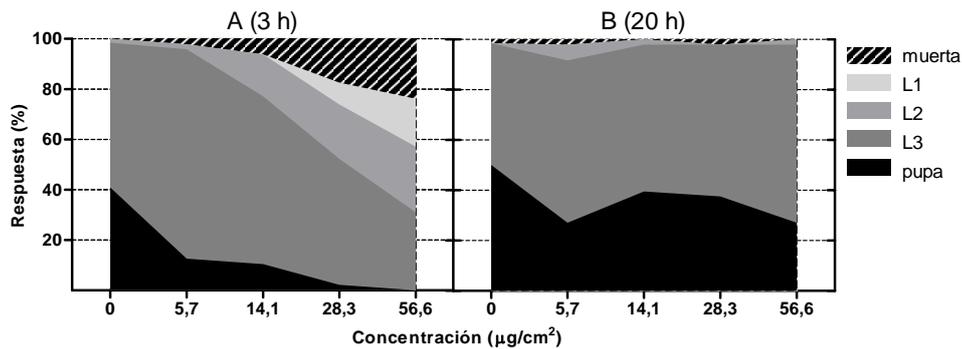


Figura 4.15 Efecto sobre el desarrollo y la supervivencia de larvas neonatas de *C. capitata* de dos grados de procesamiento proteolítico de protoxinas de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* por proteasas digestivas de *S. nonagrioides*. Las condiciones evaluadas fueron 3 h (A) y 20 h (B) de incubación. Los diferentes tonos se refieren a estadios de desarrollo tras 10 días de ensayo, a concentraciones crecientes. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento.

4.3.3 Actividad de las toxinas Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* sobre *Ceratitis capitata*

La observación descrita arriba puso de manifiesto el posible papel de las toxinas Cyt en la actividad biológica de Bti sobre *C. capitata*. Para profundizar en la implicación de este tipo de toxinas en la actividad insecticida de Bti obtuvimos una cepa recombinante de la subespecie *israelensis* que producía cristales compuestos exclusivamente de la protoxina Cyt1Aa, la principal toxina Cyt de Bti (Figura 4.16). La cepa, denominada 4Q7-pWF45, fue cedida por sus autores (Wu y Federici, 1993).

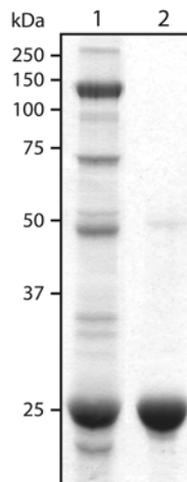


Figura 4.16 Electroforesis SDS-PAGE de cristales de la cepa 4Q1 (1) y la cepa 4Q7-pWF45 (2).

4.3.3.1 Efecto de la presolubilización de cristales Cyt1Aa

Inicialmente, el protocolo de procesamiento del cultivo y solubilización de los cristales paraesporales aplicado para la cepa 4Q7-pWF45 fue el mismo que había sido utilizado

para el resto de cepas (ver apartado 4.2.2). Sin embargo, tanto el grado de pureza de la mezcla de esporas y cristales como el rendimiento de la solubilización fueron insuficientes (Cyt1Aa fue aproximadamente el 17% de la proteína total; Figura 4.17, carriles 1 y 4). Para optimizar ambos parámetros se puso a punto una metodología específica. Las condiciones de solubilización se ajustaron probando el tampones carbonato (50 mM) a diferentes pHs (8, 10, 10.5 y 12), suplementados con 10 mM DTT como agente reductor. El pH óptimo fue de 10.5 (Figura 4.17, carril 6), con un rendimiento de solubilización de $10.5 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ de cultivo (media \pm error estándar). Por otro lado, la adición de un paso de tratamiento con el detergente deoxicolato sódico al protocolo estándar de purificación de esporas y cristales (ver apartado 4.2.2) permitió obtener un grado de pureza satisfactorio (90% de la proteína total; Figura 4.16, carril 2).

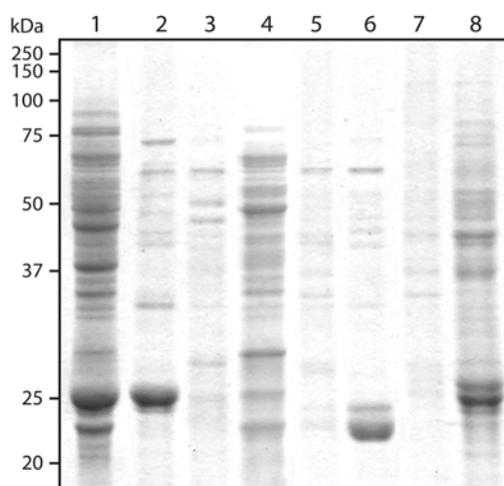


Figura 4.17 Electroforesis SDS-PAGE de diferentes condiciones de solubilización de cristales paraesporales de la cepa 4Q7-pWF45. Mezcla de esporas y cristales (carril 1), sedimento tras solubilización a pH=8 (2), producto de solubilización a pH=8 (3), producto de solubilización a pH=10 (4), sedimento tras solubilización a pH=10.5 (5), producto de solubilización a pH=10.5 (6), sedimento tras solubilización a pH=12 (7), producto de solubilización a pH=12 (8). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

4.3.3.1.1 Actividad sobre larvas

Como ocurrió con las protoxinas de Bti, la administración de una mezcla de esporas y cristales de la protoxina Cyt1Aa a elevada concentración ($60 \mu\text{g/cm}^2$) no tuvo ningún

efecto sobre larvas neonatas de *C. capitata* (el 100% de las larvas alcanzaron el 3^{er} estadio larvario o pupa en 7 días).

Tabla 4.2 Toxicidad de toxinas de *B. thuringiensis* tratadas *in vitro* sobre larvas de *C. capitata*

Cepa	Tratamiento	CL ₅₀ (μg/cm ²) ^b	Pendiente (±EE)	Límites fiduciales (95%)		χ ² (gl) ^e
				Inferior	Superior	
<i>Bt israelensis</i> 4Q1	Solubilizado	>180 ^c				
<i>Bt israelensis</i> 4Q1	<i>C. pipiens</i> - activado	31.26	2.26 (±0.28)	15.38	50.89	8.9 (4)
4Q7-pWF45 ^a	Solubilizado	4.93	1.66 (±0.18)	2.99	7.10	5.5 (4)

^a Cepa recombinante que produce la toxina Cyt1Aa (Wu y Federici, 1993)

^b Toxinas ensayadas por contaminación en superficie de dieta sólida con larvas neonatas, mortalidad registrada a los 7 días

^c Mortalidad por debajo del 50% a la mayor concentración ensayada

^e grados de libertad

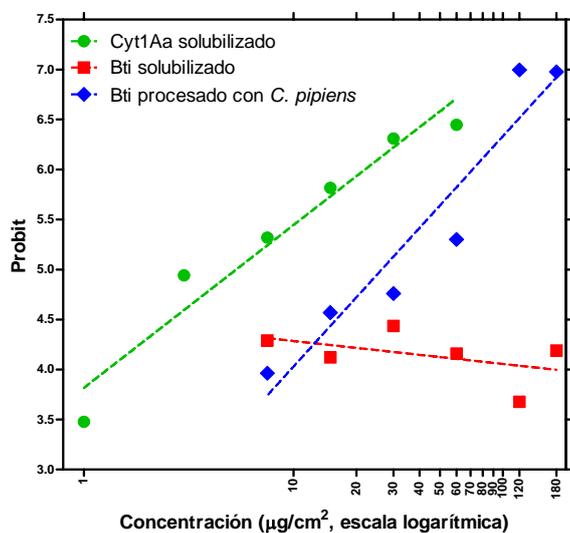


Figura 4.18 Actividad insecticida de protoxinas de *B. thuringiensis* de la cepa 4Q7-pWF45 previamente solubilizadas y de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q1 sometidas a 2 tipos de tratamiento: solubilización *in vitro* y solubilización seguida de predigestión con extractos intestinales de *C. pipiens*. Los datos de concentración están representados en escala logarítmica. La mortalidad está expresada en unidades Probit (Finney, 1971).

Sin embargo, la administración de protoxinas previamente solubilizadas mostró los niveles más altos de actividad insecticida sobre *C. capitata* descritos en este estudio: CL_{50} de $4.93 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (2.99-7.10, límites fiduciales al 95%) (Tabla 4.2, Figura 4.18).

La actividad insecticida de las protoxina solubilizada Cyt1Aa fue comparada con la actividad esperada del complejo de protoxinas de Bti por medio de la fórmula de Tabashnik (Tabashnik, 1992). Esta fórmula permite calcular la CL_{50} de una mezcla de toxinas en base a la toxicidad conocida de cada una de ellas. De esta forma, la CL_{50} esperada para el complejo de protoxinas solubilizadas de Bti se calculó a partir del valor CL_{50} conocido para la protoxina solubilizada Cyt1Aa y asumiendo que el resto de protoxinas (aparte de Cyt1Aa) no tenían actividad sobre *C. capitata*. Así mismo, se tuvo en cuenta que, de acuerdo al análisis de densitometría de las protoxinas de Bti, las toxinas Cyt (compuestas fundamentalmente de Cyt1Aa) suponían en torno al 47% del contenido proteico total. El valor CL_{50} de las protoxinas solubilizadas de Bti de acuerdo a estas premisas debía ser de $10.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Nuestros datos experimentales no avalan esta estimación, la mortalidad registrada fue inferior al 50% hasta la mayor concentración ensayada, $180 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Tabla 4.2). La representación gráfica de esta estimación puede verse en la figura 4.19.

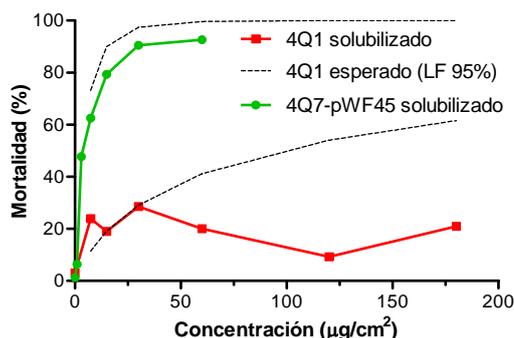


Figura 4.19 Actividad insecticida esperada para las protoxinas solubilizadas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (4Q1). El área entre las líneas de puntos corresponde a la relación concentración-mortalidad esperada con un grado de confianza del 95%, los límites fiduciales (LF) se calcularon a partir del ajuste lineal Probit representado en la figura 4.18 para el tratamiento "Cyt1Aa solubilizado", asumiendo que un 47% del contenido proteico de las protoxinas de Bti eran Cyt1Aa.

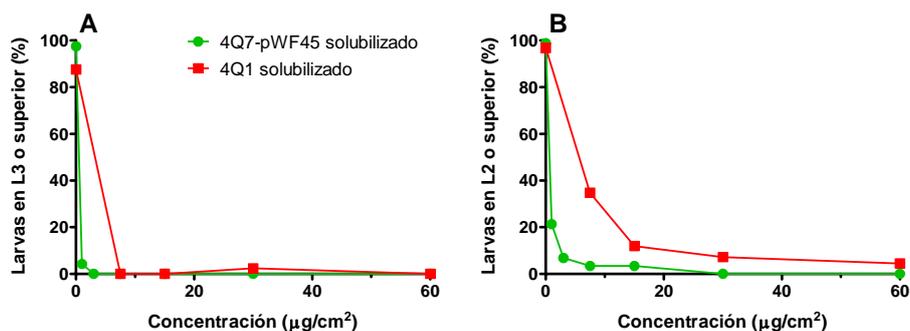


Figura 4.20 Efecto de la solubilización de las protoxinas de la cepa de *B. thuringiensis* 4Q1 (subsp. *israelensis*) y la cepa 4Q7-pWF45 (Cyt1Aa) en el desarrollo de larvas neonatas de *C. capitata* tras 7 días de ensayo. (A) Porcentaje de larvas que alcanzaron el 3^{er} estadio larvario o superior. (B) Porcentaje de larvas que alcanzaron el 2^o estadio larvario o superior. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento.

En los ensayos descritos, la actividad insecticida fue analizada tras 7 días. Como se ha mostrado anteriormente, todos los tratamientos con toxinas solubilizadas de Bti produjeron una elevada reducción del desarrollo larvario en ese periodo de tiempo. El tratamiento con protoxina Cyt1Aa solubilizada produjo una inhibición del crecimiento todavía mayor (Figura 4.20). Con el fin de estimar la evolución de la eficacia del tratamiento, la CL₅₀ se calculó pasado un mayor tiempo de ensayo, 2 semanas, observando un incremento de casi 5 veces en de la toxicidad: 1.25 µg/cm² (0.82-1.67, límites fiduciales al 95%).

4.3.3.1.2 Actividad sobre adultos

La actividad sobre adultos de *C. capitata* de la protoxina Cyt1Aa presolubilizada fue evaluada mediante bioensayos por contaminación superficial de dieta sólida (apartado 4.2.5.2) a 60 µg/cm².

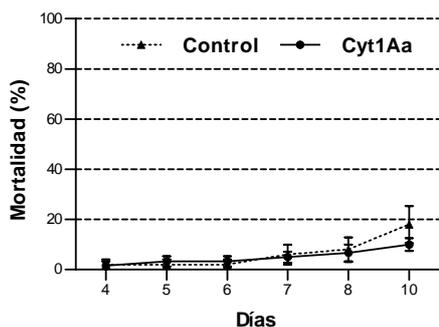


Figura 4.21 Actividad insecticida sobre adultos de *C. capitata* de protoxinas Cyt1Aa solubilizadas (cepa 4Q7-pWF45). La concentración aplicada fue de 60 µg/cm². La mortalidad se muestra como media ± error estándar de 6 repeticiones por tratamiento, con 10 adultos por repetición.

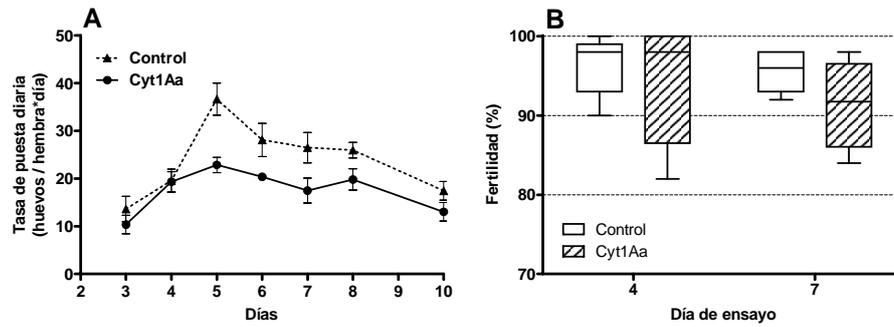


Figura 4.22 Tasa de puesta diaria (A) y fertilidad (B) de adultos de *C. capitata* sometidos a tratamiento con la protoxina solubilizada Cyt1Aa (cepa 4Q7-pWF45). La concentración de ensayo fue de 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los datos de tasa de puesta diaria se refieren al promedio \pm ES de 6 repeticiones por tratamiento, con 10 adultos (5 hembras) por repetición. Los datos de fertilidad se representan mediante diagrama de cajas (mediana y dos cuartiles) y bigotes (min-max), los datos se refieren a 5 repeticiones de 50 huevos.

La supervivencia de los adultos no se vio alterada con el tratamiento (Figura 4.21). Sin embargo, la aplicación de la protoxina Cyt1Aa produjo un descenso estadísticamente significativo ($t_9=2.871$, $P=0.018$) de la fecundidad de las hembras, medida como la tasa de puesta diaria (Figura 4.22 A), aunque no de la fertilidad de los huevos en ninguno de los momentos de ensayo analizados (efecto tratamiento: $F_{1,9}=1.713$, $P=0.223$; efecto día de ensayo: $F_{1,9}=0.642$, $P=0.444$) (Figura 4.22 B).

4.3.3.2 Efecto de la predigestión de Cyt1Aa con jugos digestivos de insectos

Tal y como se hizo para las protoxinas de Bti, se estudió el efecto de la predigestión de la protoxina Cyt1Aa con diferentes fuentes de proteasas: extractos intestinales de larvas de *C. capitata*, *S. nonagrioides* y *C. pipiens*. A diferencia de las protoxinas de Bti, no se observó un incremento de la actividad biológica sobre larvas de *C. capitata* tras la predigestión de la protoxina Cyt1Aa, es más su actividad biológica disminuyó ligeramente (Figura 4.23). Los diferentes tratamientos de las protoxinas se ensayaron a dos concentraciones, a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) de mortalidad entre tratamientos pero sí de desarrollo, ya que el porcentaje de larvas que no cambiaron de estadio larvario durante el periodo de ensayo fue significativamente superior ($P<0.05$) cuando se trató con la protoxina no digerida. A la mayor concentración, 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, la predigestión con proteasas de larvas de la propia *C.*

capitata produjo un descenso significativo ($P<0.05$) de la mortalidad respecto a la protoxina sin digerir.

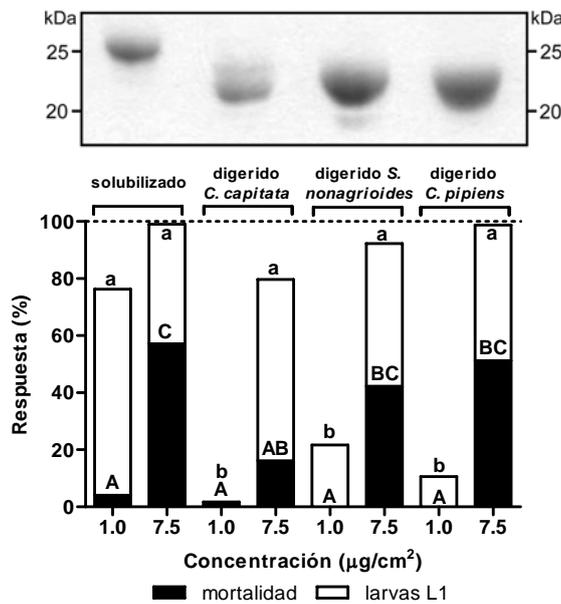


Figura 4.23 Efecto de la solubilización y digestión de las protoxinas de la cepa de *B. thuringiensis* 4Q7-pWF45 (Cyt1Aa) en el desarrollo y supervivencia de larvas neonatas de *C. capitata* tras 7 días de ensayo. Arriba: electroforesis SDS-PAGE de los diferentes tratamientos, se cargó 1 µg de proteína por pocillo. Abajo: Porcentaje corregido de larvas muertas y larvas de 1er estadio, sobre 48 larvas ensayadas. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) de mortalidad. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$) en la cantidad de larvas que no cambian de estadio en 7 días.

4.4 Discusión

El trabajo presentado muestra cómo determinadas cepas de *B. thuringiensis* cuyos extractos crudos, esporas y cristales, son inocuos sobre *C. capitata* pueden ser transformadas en cepas activas mediante la emulación *in vitro* de algunos de los eventos bioquímicos clave que ocurren de forma natural en los insectos susceptibles. En relación a la metodología aplicada, se ha desarrollado un nuevo sistema de bioensayo sobre dieta sólida que permite evaluar la respuesta de larvas de *C. capitata* a la ingesta de δ -endotoxinas, u otras sustancias.

Diferencias en el grado de solubilización a veces explican las diferencias de toxicidad observadas entre las δ -endotoxinas (Schnepf et al., 1998). Es bien sabido que la mayoría de cristales paraesporales de *B. thuringiensis* son solubilizados en condiciones de pH alcalino, como ocurre en el tracto intestinal de la mayoría de insectos de los órdenes Lepidoptera y Diptera (Dow, 1986). En este trabajo, la falta de actividad sobre *C. capitata* de los cristales paraesporales de las cepas 4Q1 (Bti) y 4Q7-pWF45 (Cyt1Aa)

puede ser debida a su insuficiente solubilización en el tracto intestinal de *C. capitata*. El pH del lumen intestinal de adultos y larvas de *C. capitata* es neutro o ligeramente básico, por el contrario se ha demostrado que los cristales de Bti se solubilizan de forma insuficiente a pHs inferiores a 9 (Orduz et al., 1996). Adicionalmente, como se ha descrito, el pH óptimo de solubilización de los cristales de la cepa 4Q7-pWF45 es 10.5, mientras que a pH=10 el rendimiento de solubilización es muy bajo y prácticamente nulo a pH=8. Un fenómeno muy similar fue descrito con cristales de la protoxina Cyt1Aa y larvas de tres especies de moscas de la familia Calliphoridae (Chilcott et al., 1998), los cristales resultaron inocuos mientras que la protoxina solubilizada fue larvicida y esto parecía estar asociado a la falta de alcalinidad en el intestino de estas especies.

El aumento de actividad insecticida sobre larvas observado cuando las protoxinas de Bti se digirieron con extractos digestivos no puede ser explicado por la falta de actividad proteolítica de *C. capitata*, ya que sus extractos intestinales fueron capaces de digerir las protoxinas de forma similar al tratamiento con tripsina comercial (Figura 4.3: carriles 3, 4 y 7). Es más, la actividad proteolítica de la larva *in vivo* debe ser presumiblemente superior, dado que las digestiones efectuadas *in vitro* se efectuaron en tampón a pH=10 mientras que el óptimo para la mayoría de las proteasas intestinales de *C. capitata* se sitúa en torno al pH fisiológico, es decir ligeramente alcalino (San Andrés et al., 2007). En cambio, la composición de los productos de digestión fue diferente según la fuente de proteasas utilizada, y es muy probable que estas diferencias provocaran las diferencias registradas en la actividad larvicida (Figura 4.13B). El único tratamiento que produjo un incremento significativo de la mortalidad respecto al tratamiento con protoxinas solubilizadas de Bti fue cuando éstas fueron procesadas con extractos de *C. pipiens*. Esto concuerda plenamente con la elevada actividad insecticida que las cepas Bti tienen sobre esta especie de mosquito (Goldberg y Margalit, 1977), sugiriendo así que la incubación de las protoxinas de Bti con proteasas de un insecto susceptible las digiere hasta tal punto que adquieren una mejor conformación para llevar a cabo su acción tóxica que cuando son digeridas por las proteasas del huésped, *C. capitata*. Algunos estudios han descrito la pérdida de toxicidad sobre el insecto susceptible cuando las protoxinas de determinadas cepas de *B. thuringiensis* fueron predigeridas con extractos digestivos de otras especies de insectos (Haider et al., 1986; Ogiwara et al., 1992). Sin embargo, según el conocimiento disponible, no se ha descrito ningún trabajo en el que una cepa de *B.*

thuringiensis adquiera una ganancia de actividad sobre una especie *a priori* moderadamente susceptible, como es *C. capitata*, cuando sus protoxinas son incubadas con proteasas de otro insecto altamente susceptible.

Del complejo de δ -endotoxinas producidas por la cepa Bti, Cyt1Aa es el componente mayoritario. Se estima que la protoxina Cyt1Aa representa un 45-50% del peso total del cristal paraesporal (Cahan et al., 2008), en este estudio se observó un ratio similar (47%). La toxina Cyt1Aa obtenida de la solubilización de los cristales de la cepa recombinante 4Q7-pWF45 mostró la mayor actividad larvicida sobre *C. capitata* encontrada en este estudio (Tabla 4.2). Como se ha mostrado anteriormente, de acuerdo a estos datos, la mortalidad esperada para los cristales solubilizados de la cepa 4Q1 (Bti) debería haber sido muy superior a lo que observamos en nuestros experimentos. Al margen del hecho que la fuente de Cyt1Aa era diferente en ambos casos (la cepa 4Q7-pWF45 o la cepa 4Q1), este resultado sugiere que existe una interacción antagónica entre la protoxina Cyt1Aa y el resto de componentes del cristal de Bti.

El papel de Cyt1Aa en la actividad mosquitocida de Bti ha sido muy estudiado. Se ha observado que, a pesar de que la actividad de la toxina Cyt1Aa por sí misma es comparativamente muy inferior a la del resto de toxinas Cry, ésta actúa sinérgicamente con ellas haciendo que la toxicidad del cristal completo de Bti sea muy superior a la de cualquiera de las δ -endotoxinas por separado (Bravo et al., 2007). Del mismo modo, las toxinas Cyt contribuyen evitando el desarrollo de resistencias de mosquitos a Bti (Wirth et al., 2007). Investigaciones recientes, sin embargo, han demostrado que este modelo no es aplicable a otras especies de dípteros también susceptibles a Bti. El análisis del efecto de toxinas individuales de Bti sobre *Tipula paludosa* (Meigen) mostró que Cyt1Aa era la toxina con más poder insecticida, mientras que las toxinas Cry fueron virtualmente no activas, además no existió sinergismo entre Cyt1Aa y Cry11Aa, como ocurre en mosquitos (Oestergaard et al., 2007). En un trabajo similar sobre otro díptero susceptible, *Chironomus tepperi* (Skuse), la combinación Cyt1Aa y Cry11Aa fue incluso moderadamente antagónica, aunque la toxicidad de la cepa Bti parental fue mayor que la de ninguna toxina individual (Hughes et al., 2005). Cyt1Aa también ha mostrado antagonismo sobre toxinas no presentes en los cristales de Bti. En un trabajo anterior, la administración de Cyt1Aa fue antagónica a la actividad insecticida de Cry1Ac sobre el

lepidóptero *Trichoplusia ni* (Hübner) (Rincón-Castro et al., 1999). Los autores de este estudio especularon que el antagonismo podía ser debido a la competición por el espacio, no por receptores (ya que Cyt se une directamente a fosfolípidos), en la membrana en borde de cepillo de las células epiteliales.

El presente trabajo no proporciona información sobre la susceptibilidad de *C. capitata* a toxinas individuales de Bti, aparte de Cyt1Aa, por este motivo la base bioquímica de una eventual interacción antagónica no puede ser dilucidada. Como se menciona arriba, una posibilidad para explicar este fenómeno es que la interacción de Cyt1Aa con las membranas celulares se vea alterada con la presencia de otras toxinas Cry, y por consiguiente también la toxicidad, especialmente a las concentraciones alcanzadas en este estudio. Como apoyo a esta idea, se ha descrito que el patrón de unión de la toxina Cyt1Aa a tejidos intestinales del mosquito *Anopheles gambiae* difiere cuando ésta se aplica sola o en combinación con el resto de toxinas de Bti (Ravoahangimalala y Charles, 1995).

Desde un punto de vista práctico estos hallazgos no proporcionan una aplicación directa en el control de *C. capitata*, por ejemplo mediante pulverizaciones o trampas cebo, ya que el estadio clave sobre el que se debe incidir para reducir el daño en el fruto es el de adulto y ni el complejo de toxinas de Bti ni la protoxina Cyt1Aa por separado mostraron propiedades insecticidas sobre adultos. Sin embargo, el descubrimiento de una δ -endotoxina individual, como es Cyt1Aa, que muestra una elevada actividad larvicida, abre las puertas al desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas para el control de esta importante plaga.

Por ejemplo, en el caso de los cítricos u otros frutales, una aproximación sería el desarrollo de plantas transgénicas con capacidad de expresión de protoxinas Cyt de forma específica en tejidos del fruto. En este sentido, la localización de la expresión de la toxina en el albedo del fruto cítrico sería de gran interés ya que éste es el tejido sobre el que se produce la puesta y eclosión de los huevos y donde se inicia del desarrollo larvario de *C. capitata*. En cítricos, durante esta fase y de forma natural se produce una elevada mortalidad de larvas (Papachristos et al., 2008), además, por norma general, la sensibilidad a las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* es máxima al inicio del desarrollo larvario. En la actualidad, la técnica de la transgénesis en cítricos está muy desarrollada y

se conocen promotores específicos que permiten la expresión de proteínas foráneas en tejidos del fruto (Shimada et al., 2005). En el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias se ha identificado el promotor de un precursor de la síntesis de carotenoides que dirige la expresión al fruto en la fase de cambio de color, el momento más atractivo al ataque de la mosca (Leandro Peña, IVIA, comunicación personal). Este sistema de expresión de la toxina no impediría el daño derivado de la picadura sobre el fruto pero sí contribuiría a la reducción de las poblaciones de la plaga y por lo tanto a su impacto económico global. El desarrollo de este tipo de estrategia de control requiere un estudio de viabilidad así como un análisis exhaustivo de los riesgos que pudieran derivarse para la salud humana y el medio ambiente.

5. Bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas

5.1 Introducción

Como se ha descrito en capítulos anteriores, a diferencia de las toxinas Cyt, la acción tóxica de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* precisa de la unión específica a determinados receptores en la pared intestinal del insecto susceptible. Este evento es un factor determinante de la gran especificidad que exhibe este tipo de δ -endotoxinas. Así, una vez completadas las primeras fases del mecanismo de acción, si la toxina activada que accede al epitelio intestinal no interactúa con receptores de membrana con alta afinidad, no se desencadenará el proceso que en último término conduce a la muerte del insecto. La unión a receptores de membrana es un requisito común en todos los modelos de acción propuestos en la actualidad (Bravo et al., 2007; Jurat-Fuentes y Adang, 2006; Zhang et al., 2006). Por otro lado, se sabe que los epitopos determinantes de la especificidad de las toxinas Cry se hallan en los dominios II y III de su estructura terciaria, siendo estas regiones las más variables a nivel de secuencia, especialmente en el dominio II (Schnepf et al., 1998). Existen varios estudios en los que modificaciones en regiones o aminoácidos concretos de estos dominios (mutagénesis dirigida, deleciones y/o sustituciones) han logrado cambios drásticos en su espectro insecticida (Herrero et al., 2004; Liu y Dean, 2006); es más, esto también se ha logrado con sustituciones completas del dominio III entre toxinas diferentes (de Maagd et al., 1996).

La secuencia del dominio I, sin embargo, está más conservada entre las toxinas Cry y su función no está relacionada con la especificidad sino con la inserción a la membrana y la formación de poros en las células epiteliales. Se han propuesto dos modelos para explicar cómo este dominio se inserta en las membranas celulares, el modelo de la “navaja” (Hodgman y Ellar, 1990) y del “paraguas” (Li et al., 1991). En todo caso, teniendo en cuenta que, como se ha mencionado, la modificación de las toxinas Cry en el dominio II y/o III puede dar lugar a nuevos espectros insecticidas, la acción del dominio I no es específica de la especie diana. Se ha demostrado, a partir de la expresión recombinante del dominio I exclusivamente, que éste es capaz de insertarse por sí solo en membranas lipídicas (Von Tersch et al., 1994); e incluso una fracción menor de este dominio (el segmento α -5) ha mostrado actividad citotóxica sobre cultivos celulares de insectos (Gazit et al., 1994).

En el caso de *C. capitata*, a pesar de la amplia prospección llevada a cabo en este estudio, no se ha detectado ninguna toxina Cry con actividad insecticida por encima del 30%. Entre otros factores, algunos de ellos estudiados en el presente trabajo como la solubilización y activación de las protoxinas, la falta de actividad observada sugiere que las membranas intestinales de *C. capitata* carecen de los receptores apropiados para la acción de las toxinas ensayadas. En este capítulo se presentarán las bases conceptuales y metodológicas de una nueva aproximación a la obtención de toxinas activas sobre especies que, como *C. capitata*, parecen recalcitrantes a la acción de las toxinas Cry nativas. La hipótesis de partida sobre la que se fundamenta esta aproximación, y que se pretende evaluar, es que la localización y concentración de toxinas Cry (o parte de ellas) en la pared exterior de la membrana epitelial, tal y como ocurre en los insectos susceptibles pero en ausencia de los receptores “naturales”, puede inducir su acción citotóxica y en definitiva conducir a la muerte del insecto.

Para salvar la aparente falta de afinidad de las toxinas Cry por las proteínas de membrana de *C. capitata*, esta estrategia plantea aprovechar la enorme afinidad y especificidad que muestran los anticuerpos por su antígeno. El sistema inmunitario de los vertebrados es virtualmente capaz de producir anticuerpos específicos para cualquier molécula exógena. Así, la obtención de anticuerpos específicos a determinadas proteínas de membrana de *C. capitata* y la fusión de éstos (o parte de los mismos) a toxinas Cry (o parte de ellas) permitiría cumplir el objeto de la hipótesis que se pretende evaluar. Es decir, las toxinas de fusión anticuerpo-Cry se unirían a la membrana epitelial de acuerdo al patrón de localización de la proteína antigénica, las fracciones Cry de las proteínas de fusión se acumularían y, formando o no oligómeros, los dominios I de las toxinas, que como se ha descrito son *a priori* poco específicos, se insertarían en la membrana dando lugar a poros que potencialmente provocarían la muerte del insecto (como ocurre en los insectos susceptibles). La fusión de anticuerpos y δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* no es nueva, se han llevado a cabo estudios con este tipo de fusiones para aprovechar las propiedades citolíticas de las toxinas Cyt1Aa y Cyt2Aa y dirigir las a células específicas en mamíferos, por ejemplo a células tumorales (Al-yahyaee y Ellar, 1996; Gurkan y Ellar, 2003a; Gurkan y Ellar, 2003b). El desarrollo del sistema propuesto comprendería la obtención y selección de una librería de anticuerpos a partir de extractos proteicos de la membrana epitelial de *C. capitata*. En este sentido, actualmente existen varias herramientas de

inmunología que facilitarían esta labor. En concreto la obtención de anticuerpos recombinantes y la técnica de “expresión en fago” (del inglés, “phage display”), que permitiría una mejor selección de los anticuerpos con la mayor afinidad-especificidad por la(s) proteína(s) de membrana seleccionada(s) (Hoogenboom, 2005). Por otro lado, existe un tipo de anticuerpos recombinantes especialmente idóneo para el desarrollo de proteínas de fusión, los denominados “V_{HH} camelbodies”, basados en la región variable de los anticuerpos de cadena pesada que se producen de forma natural en camélidos (Fernández, 2004; Muyldermans et al., 2001). Estos anticuerpos son muy estables, solubles, presentan una alta afinidad de unión (en un rango similar al que muestran las toxinas Cry por sus receptores naturales) y, lo más interesante, son mucho más pequeños que los anticuerpos “tradicionales”, lo cual disminuye el riesgo de alteración de la estructura terciaria de la proteína de fusión. Siguiendo la estrategia propuesta, a partir de los anticuerpos seleccionados se obtendrían proteínas de fusión con toxinas Cry y se evaluaría su actividad biológica sobre *C. capitata*.

Dado que este proceso supondría una extensa labor y un elevado coste económico antes de poder confirmar la hipótesis de partida, la presente tesis doctoral pretende poner en práctica un sistema modelo con el que probar la viabilidad de la aproximación. El sistema planteado utiliza, como insecto diana, una línea genética del también díptero y especie modelo *Drosophila melanogaster* (Meigen) que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en el epitelio intestinal y, como proteínas de fusión, proteínas quiméricas obtenidas a partir de un anticuerpo V_{HH} anti-GFP y fracciones de la protoxina Cry1Ab (toxina Cry no activa contra *D. melanogaster*). De esta forma el método se simplifica, al lograr la afinidad a una proteína exógena, la GFP expresada en el intestino, en lugar de a las proteínas de membrana intestinal propias de la especie, como sería necesario con *C. capitata*.

La expresión de GFP en intestinos de *D. melanogaster* fue posible gracias a la utilización del sistema GAL4-UAS. Este sistema fue ideado por Brand y Perrimon (1993) y permite la expresión de cualquier gen (previamente clonado) en células, tejidos y estados de desarrollo específicos de *D. melanogaster*. El sistema consiste en la utilización de dos líneas transgénicas: a) la línea “conductora,” que contiene la inserción genómica del gen *GAL4* controlada por un promotor carente de secuencias potenciadoras y cuya expresión

depende por lo tanto de la posición del genoma de *D. melanogaster* en la que se haya integrado; y b) la línea “respondedora”, que contiene una inserción genómica del *genX* (que se desea expresar) bajo el control de la secuencia de regulación *UAS* (del inglés “Upstream Activating Sequence”), que permite la activación de la transcripción del gen aguas abajo en presencia de GAL4 (Duffy, 2002) (Figura 5.1). De esta forma, el patrón de expresión del *genX* en la descendencia del cruce de estas dos líneas es idéntico al patrón de expresión de GAL4 en la línea conductora. La inserción del gen *GAL4* en el genoma de *D. melanogaster* se produce por microinyección y es un fenómeno al azar, de esta forma se generan librerías de líneas de expresión de GAL4 que están disponibles en bancos internacionales. El sistema de expresión GAL4-UAS fue adaptado a partir de la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) (Brand y Perrimon, 1993).

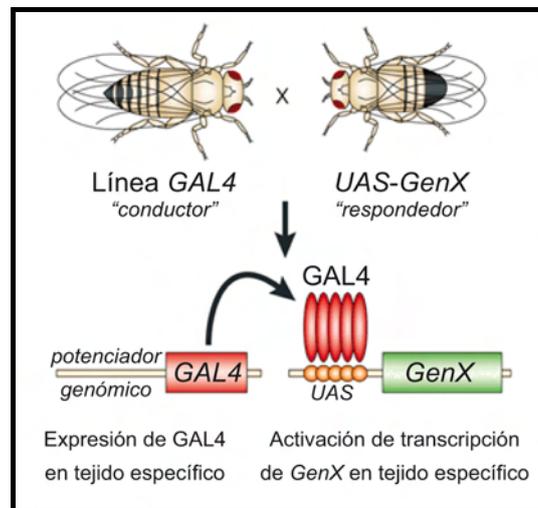


Figura 5.1 Sistema Gal4-UAS. Imagen adaptada de (Miratul et al., 2002).

Adicionalmente, y en previsión de la potencial aplicación de esta estrategia a *C. capitata*, se efectuó una primera prospección de posibles proteínas de membrana candidatas para ser antígenos de proteínas quiméricas Cry-anticuerpo. Por último, es necesario matizar un aspecto formal de la exposición de este capítulo; algunas de las valoraciones que se expondrán en la sección de resultados son más propias de una sección de discusión. Teniendo en consideración la compleja estructura de este capítulo se ha optado por esta licencia para agilizar el escrito.

5.2 Material y métodos

5.2.1 Caracterización del proteoma intestinal de adultos de

Ceratitis capitata

5.2.1.1 Obtención de vesículas de membrana en borde de cepillo (BBMVs)

Se adaptó el protocolo descrito por Wolfersberger (1987), con algunas modificaciones. Los intestinos medios de adultos de *C. capitata* (1-3 días tras emergencia) fueron cuidadosamente diseccionados bajo lupa binocular y agrupados en microtubos con tampón MET frío (manitol 0.3 M, EGTA 5 mM, Tris-HCl 17 mM. pH=7.5); se conservaron a -80°C hasta su uso. Las muestras fueron descongeladas sobre lecho de hielo, se decantó el tampón y se determinó el peso húmedo del tejido intestinal. Todos los pasos del protocolo fueron realizados sobre lecho de hielo. Posteriormente se añadió tampón MET frío recién preparado a razón de 9 ml por g de tejido y la muestra fue homogeneizada utilizando un homogeneizador de cuchillas Ultra Turrax T18 basic con vástago de 10 mm (IKA-Werke, Alemania), en dos pasos de 1 min a 7000 rpm/0.1 ml, separados por 1 min de reposo en hielo. El volumen de la mezcla (V) fue determinado con una probeta fría y se añadió el mismo volumen de una solución fría de MgCl₂ 24 mM. Tras mezclar bien, se mantuvo en reposo en hielo durante 15 min, entonces se centrifugó a 2500×g durante 15 min a 4°C con la centrifuga Avanti J-26 XP y el rotor JA-20 (Beckman Coulter, EEUU). El sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 31000×g durante 15 min a 4°C. El sedimento resultante fue cuidadosamente resuspendido en 0.5×V de MET frío utilizando un homogeneizador de teflón tipo Potter (Afora, España) y añadiendo a continuación 0.5×V de MgCl₂ frío. La mezcla se mantuvo en reposo 15 min y se centrifugó en dos pasos, como se ha descrito. El sedimento resultante se resuspendió suavemente con pipeta en un volumen aproximado de 1 ml de MET 0.5× por g de tejido original. La concentración de proteínas totales de la muestra se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) y se separó en alícuotas, que fueron congeladas de forma rápida con N₂ líquido y conservadas a -80°C hasta su uso.

5.2.1.2 Electroforesis de proteínas

5.2.1.2.1 Electroforesis 1D

El tamaño y cantidad relativa de los polipéptidos que componían las muestras se analizó mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como ya

ha sido descrito (Laemmli, 1970). El gel concentrador utilizado fue al 5% de poliacrilamida y el gel separador al 12%. Las muestras fueron preparadas a partir de las suspensiones de BBMV's por centrifugación a 14000×g durante 35 min a 4°C y resuspensión en tampón de carga de electroforesis. La mezcla se incubó a 95°C durante 8 min y la cantidad correspondiente se cargó en el gel una vez enfriada.

5.2.1.2.1 Electroforesis 2D

Las proteínas contenidas en las muestras de BBMV's fueron extraídas y purificadas utilizando el el paquete ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, EEUU). Aproximadamente 100 µg de proteína se resuspendieron en 300 µl de tampón de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 18.2 mM, azul de bromofenol 0.3% (p/v)). El procesamiento de las muestras por electroforesis bidimensional (2D-SDS-PAGE) fue realizado en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid). Para cada gel se separó una alícuota 75 µl (25 µg) y se llevó a 125 µl con tampón de rehidratación para efectuar la separación de la muestra en la primera dimensión, punto isoeléctrico (pI). Para ello se utilizó el equipo de isoelectroenfoque Protean IEF Cell System (Bio-Rad, EEUU) y las tiras IPG de 7 cm de gradiente de pH lineal 4-7 o no lineal 3-10 NL (Bio-Rad, EEUU), según el gel y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las tiras fueron rehidratadas con la muestra (125 µl) a 50 V durante 16 h a 20°C. Posteriormente, las tiras se cubrieron con aceite mineral ("Biotechnology Grade", Bio-Rad, EEUU) y se corrieron a 20°C hasta superar un mínimo de 8000 V*h, siguiendo el siguiente ciclo: 250 V, 15 min "rampa rápida"; 1000 V, 1 h "rampa rápida"; 8000 V, 1 h, "rampa rápida"; 500 V "rampa rápida" hasta un máximo de 50 µA/gel. Las tiras fueron entonces equilibradas en tampón de equilibrado (Tris-Acetato 62.72 mM pH=7, SDS 0.5%, urea 6 M, glicerol 30%) suplementado con DTT a 52 mM durante 15 min y posteriormente en tampón de equilibración con yodoacetamida a 130 mM durante 15 min. La separación de las proteínas en la segunda dimensión, peso molecular, se efectuó por electroforesis SDS-PAGE en minigeles al 8% o al 12% de poliacrilamida, según los casos. Los geles se polimerizaron utilizando el equipo Protean II xi Cell (Bio-Rad, EEUU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se conservaron a 4°C hasta el día siguiente. Las muestras contenidas en las tiras de isoelectroenfoque se separaron a 20 mA/gel en tampón Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%. Se utilizaron los marcadores de peso molecular

Precisión Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, EEUU). Una vez finalizada la electroforesis se retiraron los geles y se colocaron en una bandeja con solución de fijación para su posterior tinción. Se realizaron 2 tipos de tinción, según el caso: tinción con nitrato de plata, para ello se utilizó una solución de fijación compuesta de etanol al 40% y ácido acético al 10%, y se siguieron las instrucciones del fabricante (Amersham, EEUU); tinción fluorescente con Sypro-Ruby, con solución de fijación de metanol 40% y ácido acético 10%, de acuerdo al fabricante (Bio-Rad, EEUU). La captura de las imágenes tras la tinción y su análisis fue llevada a cabo mediante el programa informático PDQuest 2D analysis 7.4 software (Bio-Rad, EEUU).

5.2.1.3 Identificación de polipéptidos

5.2.1.3.1 Análisis de huella peptídica y fragmentación

Algunas de las proteínas resueltas por electroforesis bidimensional fueron extraídas del gel (picado de puntos) para su posterior identificación. El picado de puntos se llevó a cabo manualmente o con ayuda del programa informático Proteome Works Plus Spot Cutter y el equipo Spot Cutter (Bio-Rad). La identificación peptídica fue llevada a cabo en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid). Se emplearon dos técnicas: A) la identificación por análisis de huella peptídica (PMF), que consiste en la digestión por tripsinización del polipéptido a identificar (digestión tríptica) y la determinación del tamaño de los péptidos resultantes (espectro) por espectrometría de masas (MALDI-TOF); y B) la obtención del espectro de fragmentación de uno o varios de los péptidos obtenidos en el paso anterior (iones parentales) (técnica MS-MS) mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF). Para ello se emplearon los siguientes equipos: Digestor de Proteínas Intavis (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Alemania) y espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, EEUU).

5.2.1.3.2 Bases de datos

Los resultados obtenidos, es decir el espectro de péptidos de tripsinización (PMF) o el espectro de iones de fragmentación (MS-MS), fueron procesados en una primera fase utilizando el programa online Mascot (Matrix Science Inc., EEUU), que permite el análisis de ambos tipos de información simultáneamente y su comparación con la base de datos no redundante de proteínas de animales del NCBI (NCBIInr-Metazoa). En algunos

casos se realizaron búsquedas a partir de los espectros PMF obtenidos en otras bases de datos más restringidas como NCBIInr-Drosophila, o mediante otros programas como el Aldente (Swiss Institute of Bioinformatics, Suiza), que permiten la búsqueda en otras bases de datos (UniProtKB/Swiss-Prot, Metazoa o Insecta).

Adicionalmente, se elaboró una base de datos local de secuencias proteicas analizable con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 (Hall, 1999). La base de datos se compuso de 203 secuencias de proteínas que, de acuerdo a la literatura, presentan un alto grado de homología con proteínas intestinales de diferentes especies de insectos (Bayyareddy et al., 2009; Haddow et al., 2005; Kajiwara et al., 2005; Krishnamoorthy et al., 2007; Li et al., 2007; McNall y Adang, 2003).

5.2.2 Líneas genéticas de *Drosophila melanogaster*

5.2.2.1 Líneas UAS/GAL4

En este estudio se utilizaron dos líneas genéticas de *D. melanogaster*, aplicables al sistema de expresión génica GAL4/UAS:

- Línea “conductora”: *48Y*. Esta línea será referida en el texto como ***GAL4-ENDO***. Expresa el regulador génico GAL4 en el tejido embrionario tipo endodermo que dará lugar al sistema digestivo en la larva (<http://flybase.org/reports/FBti0004594.html>). La línea fue adquirida del banco de *D. melanogaster* “Bloomington Drosophila Stock Center” (Indiana University, EEUU), con referencia 4935.
- Línea “respondedora”: *UAS gapGFP*. Esta línea será referida en el texto como ***UAS-GFP***. Incorpora el gen *gapGFP* bajo el control de un promotor (UAS) que hace la expresión del gen dependiente del regulador GAL4. Este gen codifica para un tipo de proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) que incluye en su secuencia una señal de miristilación que hace que la proteína GFP recién sintetizada sufra una modificación que la direcciona a la membrana celular (<http://flybase.org/reports/FBti0010578.html>). La línea fue adquirida del “Bloomington Drosophila Stock Center”, con referencia 4522.

5.2.2.2 Cría

La cría se llevó a cabo en viales plásticos de 150 ml con dieta gelificada de la siguiente composición (para 1 l de dieta): 100 g de levadura de pan prensada (Levital, España), 70

g de azúcar moreno de caña de azúcar (Azucarera Española, España), 50 g de harina de trigo pura, 11.5 g de agar-agar (Prolabo, Francia) y 5 ml de ácido propiónico (Sigma Chemical Co., EEUU) y agua destilada estéril hasta 1 l. Para ello, en primer lugar se resuspendió la levadura en aproximadamente 300 ml de agua y se mantuvo al menos 30 min a 100°C para esterilizar la mezcla. Posteriormente se añadieron los componentes sólidos y se enrasó hasta 1 l con agua, se mezcló bien y se llevó a ebullición con agitación continua con espátula de madera hasta alcanzar la consistencia adecuada. Tras un tiempo de reposo a temperatura ambiente, cuando la temperatura bajó a 60°C se añadió el ácido propiónico, se mezcló bien y se sirvió en los viales de cría. Una vez gelificada la dieta, los viales se conservaron a 4°C hasta un periodo máximo de un mes. La cría se mantuvo en cámaras climáticas con el siguiente régimen: 25°C, humedad 50% y fotoperiodo 16:8 horas (luz:oscuridad). El refresco de la cría a nuevos viales de dieta se produjo semanalmente y por transferencia directa frasco a frasco.

5.2.2.3 Cruces

Los cruces se efectuaron en unidades de puesta, denominadas “ponederos”, que consistieron en un recipiente compuesto en su parte inferior de una placa Petri de 6 cm de diámetro rellena de aproximadamente 10 ml de dieta y cubierta por un bote cilíndrico de plástico transparente de 120 ml, cuya base se sustituyó por muselina sellada con cola termofusible para posibilitar la ventilación (Figura 5.2). La dieta se preparó como sigue (para 1 l): 500 ml de zumo de manzana comercial (clarificado) se mezclaron con 500 ml de agua, el pH se ajustó a 7 con NaOH 10 N y se añadieron 12 g de agar-agar (Prolabo, Francia). La mezcla se llevó a ebullición en horno de microondas en varias fases hasta la fusión completa del agar. Tras un tiempo de reposo a temperatura ambiente, cuando la temperatura bajó a 60°C se añadieron 5 ml de ácido propiónico, se mezcló bien y se sirvió en los viales de cría. Una vez gelificada, sobre su superficie se añadió levadura de pan prensada, como aditivo para estimular la puesta.

Los cruces se realizaron con moscas vírgenes que se mantuvieron en viales de cría hasta su plena madurez (3-7 días). El aislamiento y sexado de moscas vírgenes se efectuó anestesiando las moscas con éter etílico en un eterificador tipo embudo en rondas sucesivas, de forma que las moscas se aislaran como máximo 3 horas tras su emergencia y por tanto fueran vírgenes. Una vez reunido el número suficiente (mínimo 50 hembras y

50 machos), las moscas se transfirieron a los ponaderos donde se mantuvieron 24 h a 25°C, humedad de la cámara al 50% y fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad). Posteriormente, las moscas fueron retiradas y las placas Petri con la puesta fueron separadas y mantenidas bajo el mismo régimen climático hasta el día siguiente, momento en el que la eclosión de los huevos era casi total. Las larvas neonatas se recogieron cuidadosamente con una lanceta y se transfirieron a las bandejas de bioensayos, o bien se dejaron evolucionar en la placa para observarlas con lupa binocular de fluorescencia y comprobar la expresión de GFP.



Figura 5.2 Unidad de puesta de *D. melanogaster*

5.2.2.4 Caracterización de la expresión de GFP

La expresión de GFP en la descendencia del cruce de la línea conductora (*GAL4-ENDO*) y la línea respondedora (*UAS-GFP*) se estudió durante los diferentes estados de desarrollo mediante su inspección en lupa binocular de fluorescencia. Se utilizaron dos equipos diferentes: Leica MZ16FA (CIB-CSIC) y Leica MZ-16 con el módulo GFP plus *Fluorescence* y el sistema de captura de imágenes DFC490 (IVIA) (Leica Microsystems, Alemania). Antes de su observación y para facilitar la captura de imágenes las larvas fueron anestesiadas por inhalación de éter etílico.

5.2.3 Producción y análisis de proteínas recombinantes

5.2.3.1 Diseño de genes recombinantes y clonación

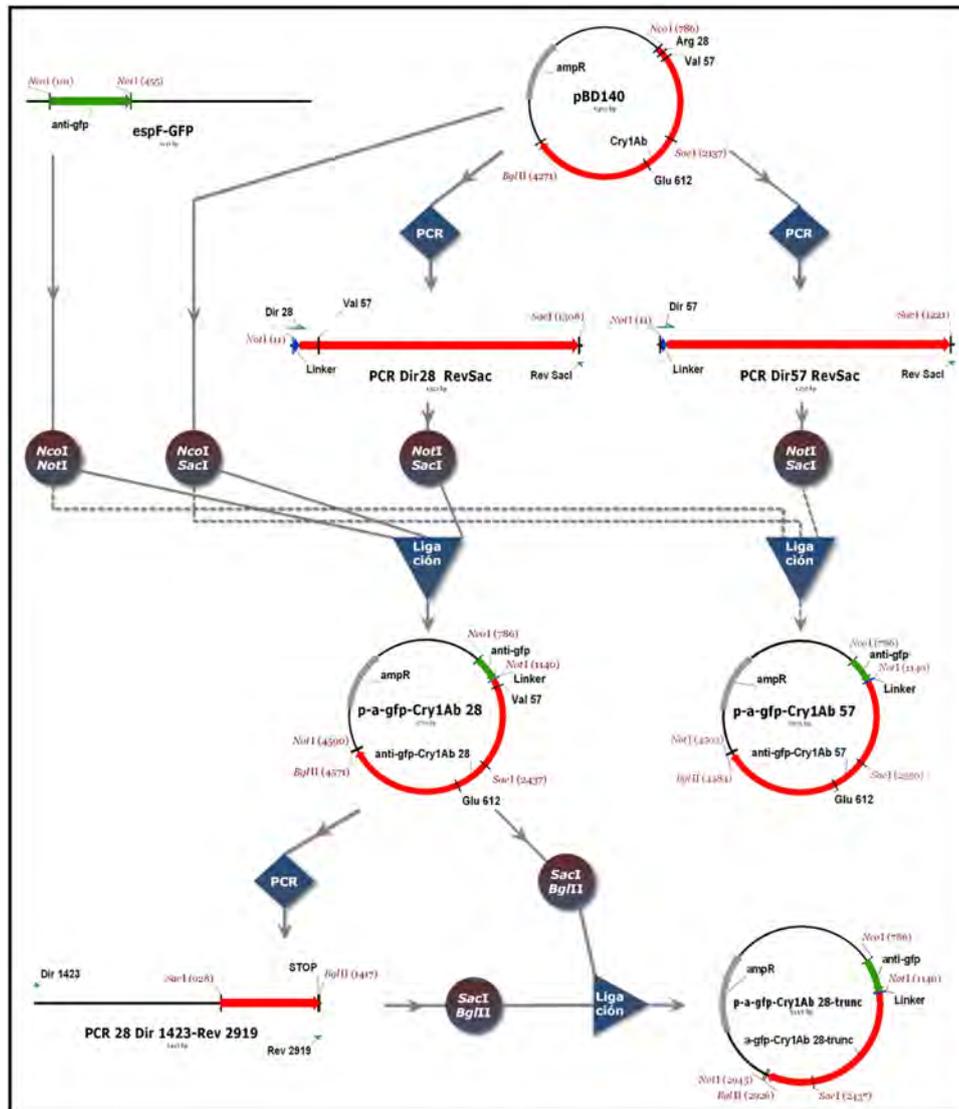


Figura 5.3 Esquema de construcción de los genes recombinantes *a-gfp-Cry1Ab_28*, *a-gfp-Cry1Ab_57* y *a-gfp-Cry1Ab_28-trunc*. Los conectores circulares indican digestión con los correspondientes enzimas de restricción.

Los genes recombinantes se obtuvieron a partir del gen *cry1Ab*, clonado en el plásmido pBD140 y cedido por Ruud de Maagd (Plant Research International, Países Bajos) (de Maagd et al., 1996), y el gen *esp-GFP* de un anticuerpo V_{HH} anti-GFP cedido para este

trabajo por Luís Angel Fernández (CNB-CSIC, Madrid). Las diferentes variantes fueron obtenidas aplicando técnicas estándar de biología molecular: diseño de cebadores y PCR, purificación de plásmidos, digestión con enzimas de restricción, extracción de bandas, ligación y transformación de células competentes de *Escherichia coli*. Los esquemas correspondientes se muestran en las figuras 5.3 y 5.4.

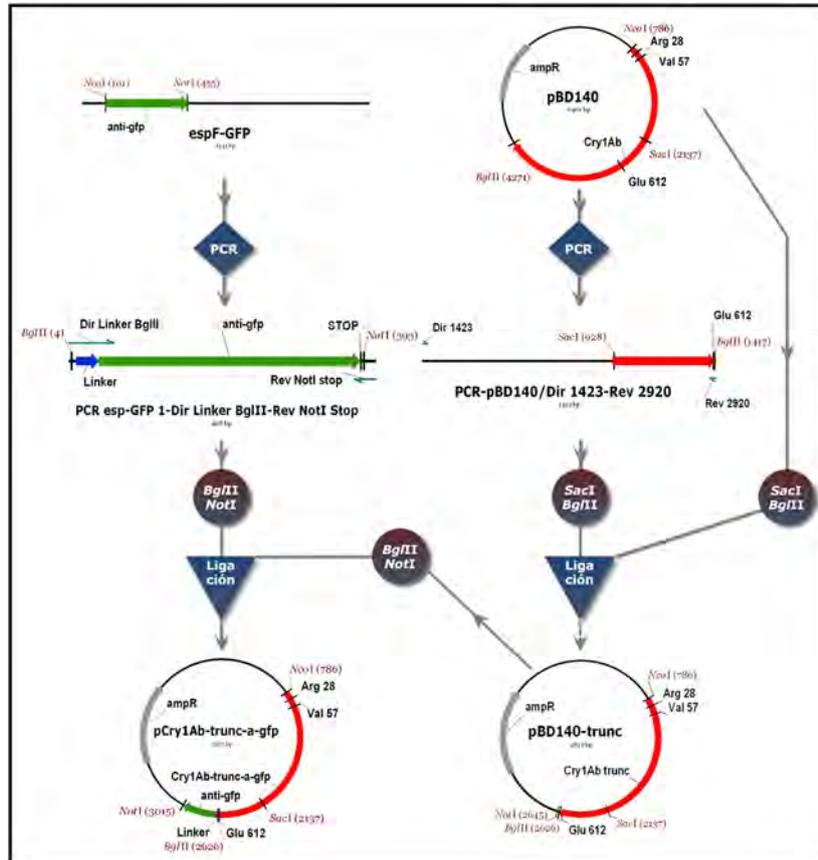


Figura 5.4 Esquema de construcción del gen recombinante *Cry1Ab-trunc-a-gfp*. Los conectores circulares indican digestión con los correspondientes enzimas de restricción.

La cepa de *E. coli* utilizada fue XL1-Blue (Stratagene, EEUU); la obtención de células competentes y su transformación por el método del cloruro de calcio se realizaron de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook et al., 1989). Para la extracción y purificación de plásmidos se aplicó el paquete comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Alemania). Los enzimas de restricción *NcoI*, *NotI*, *SacI* y *BglII* (Takara

Bio Inc., Japón) se utilizaron siguiendo las condiciones del fabricante. Los productos de digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos en baño de bromuro de etidio y las bandas de interés fueron purificadas aplicando el paquete Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, EEUU). Para la ligaciones se utilizó la ADN T4 ligasa (Promega, EEUU).

Tabla 5.1 Cebadores de PCR utilizados en la construcción de genes recombinantes *CryIAb-antiGFP*

Cebador	T.H. ^a (°C)	Secuencia ^b	Detalles ^c
Dir_28	51.5	5' ATAAGAATGCGGCCGCATCGGGTGG AGGTAGTGGTGGAGGAATAGAACTG GTTACACCCAATC (dir)	Incorpora secuencia del "Linker A" con sitio <i>NotI</i>
Rev_SacI	51.5	5' CCAAGAGAACATAGGAGCTC (rev)	
Dir_57	51.5	5' ATAAGAATGCGGCCGCATCGGGTGG AGGTAGTGGTGGAGGATTAGGACTAG TTGATATAATATGG (dir)	Incorpora secuencia del "Linker A" con sitio <i>NotI</i>
Dir_1423	51.8	5' ACAACCGCTATTCCTCTTTT (dir)	
Rev_2919	51.8	5' GAAGATCTGCCTAAAAGGTTACTTCT GC (rev)	Incorpora codón de parada y sitio <i>BglIII</i>
Rev_2920	51.8	5' GAAGATCTGCCTCAAAGGTTACTTCT GC (rev)	Incorpora sitio <i>BglIII</i>
Dir_Linkers_BglIII	64.3	5' GAAGATCTATCGGGAGGTGGAGGTAG TGGTGGTGGAGGAATGGCTCAGGTGCA GCTGGT (dir)	Incorpora secuencia del "Linker B" y sustituye el sitio <i>NcoI</i> por <i>BglIII</i>
Rev_NotI_Stop	64.3	5' GGCCCCGATGCGGCCGCTTAGGAGA CG (rev)	Incorpora codón de parada

^a Temperatura de hibridación

^b Cebador directo (dir) o reverso (rev)

^c Linker A (secuencia traducida): AAASGGGSGGGG; adaptado de (Vílchez et al., 2004)

Linker B: SGGGSGGGG

La composición de las mezclas de PCR fue la siguiente: dNTPs 100 μ M, cebador directo y reverso correspondiente a 1 μ M (Tabla 5.1) y 1 U de la ADN polimerasa de alta fidelidad de copia VentR[®] DNA Polymerase con el tampón correspondiente (New England BioLabs, EEUU). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler_ep (Eppendorf AG, Alemania). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C seguido de 30 ciclos de tres fases, desnaturalización de 30 s a 94°C, hibridación de 45 s a la temperatura óptima de cada par de cebadores (Tabla 5.1) y extensión de 1 min a 2 min (dependiendo del tamaño del producto de PCR) a 72°C; finalmente un paso de extensión de 7 min a 72°C. El diseño de la estrategia llevada a cabo así como de los cebadores empleados se realizó con el paquete informático Vector NTI versión 10.3.0 (Invitrogen,

EEUU). Como control de calidad, la secuencia de los genes recombinantes fue verificada por secuenciación. Ésta se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad Politécnica de Valencia – CSIC (ver materiales suplementarios).

5.2.3.2 Expresión de toxinas

5.2.3.2.1 Condiciones de cultivo

Las proteínas recombinantes se produjeron en *E. coli*, cepa XL1-Blue. Los cultivos se iniciaron a partir de inóculos conservados a -80°C en glicerol al 15% y en dos fases: 24 h de precultivo en medio TB suplementado con glucosa al 2% (p/v), ampicilina a 50 µg/ml y el inóculo al 1% (v/v), a 37°C con agitación (200 rpm); y una fase de cultivo durante 4 días en medio TB (Pronadisa, España) con ampicilina a 50 µg/ml y precultivo al 1% (v/v), a 28°C y con agitación (200 rpm). Como se indicará más adelante en el texto, para una de las variantes se introdujeron modificaciones de las condiciones de cultivo: extensión del tiempo de cultivo de 4 a 6 días y modificación de la temperatura de cultivo de 28°C a 37°C. Igualmente, durante el proceso de optimización del cultivo se evaluó el efecto de la adición de IPTG, como ya se ha descrito (Sambrook et al., 1989). En todos los casos, el crecimiento bacteriano y la formación de cuerpos de inclusión a partir de las proteínas expresadas fueron inspeccionados por microscopía de contraste de fase.

5.2.3.2.1 Purificación de cuerpos de inclusión, solubilización y renaturalización

Los cultivos se sedimentaron por centrifugación y sometidos a un protocolo de lisis y purificación de los cuerpos de inclusión adaptado a partir de un protocolo desarrollado por el grupo de Ruud de Maagd (Plant Research International, Países Bajos) (Figura 5.5). Todos los pasos a partir del primer lavado se llevaron a cabo en hielo para minimizar el procesamiento proteolítico de las proteínas. Con el objeto de trazar la eficacia del proceso se tomaron alícuotas en diversos pasos del protocolo para su posterior análisis por electroforesis SDS-PAGE y/o Western-Blot. La composición del tampón de lisis fue: Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM; y la del tampón de lavado: Tris-HCl 20 mM pH=7.5, NaCl 1 M, tritón X-100 1%.

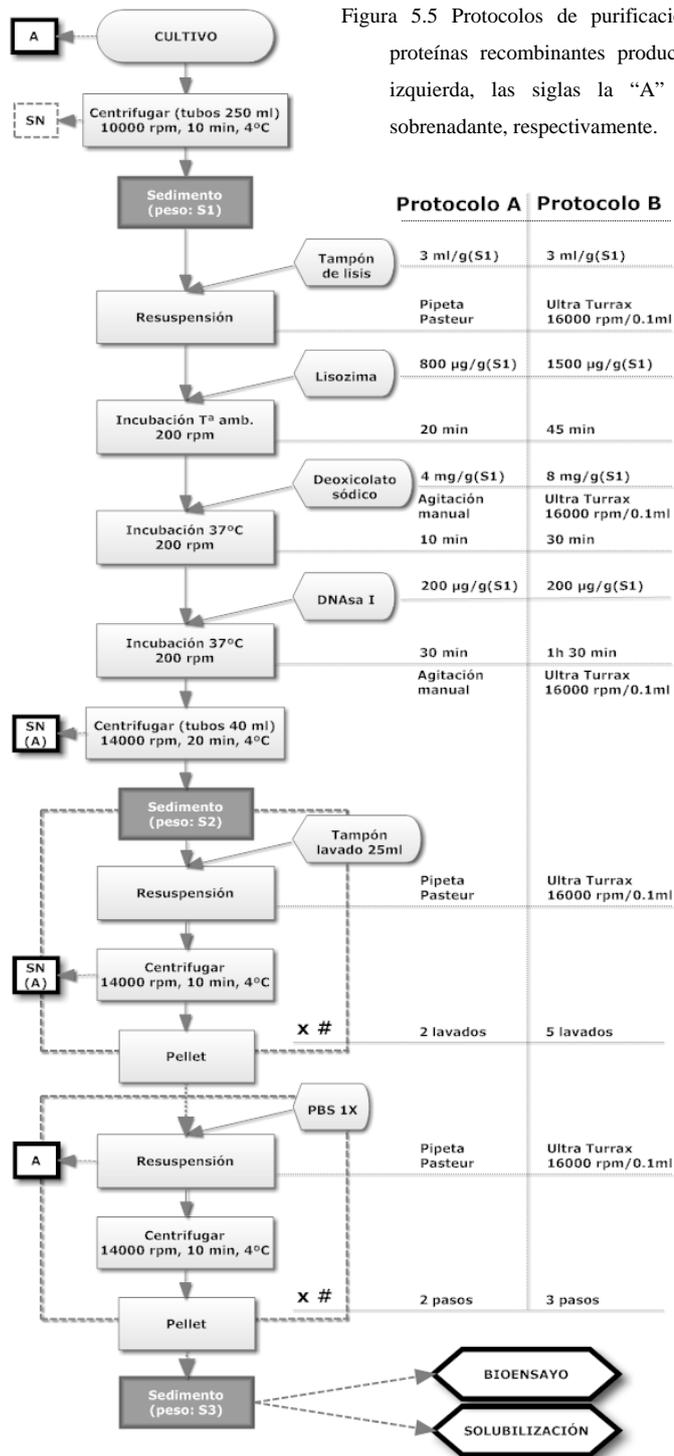


Figura 5.5 Protocolos de purificación de cuerpos de inclusión de proteínas recombinantes producidas en *E. coli* (A y B). A la izquierda, las siglas la “A” y “SN” significan alícuota y sobrenadante, respectivamente.

Como se indica en la figura 5.5, según los requerimientos, se aplicaron dos protocolos alternativos, el protocolo básico (A) y un segundo más intenso (B). El producto final consistió en un sedimento *a priori* compuesto mayoritariamente por proteína insoluble (cuerpos de inclusión). Este sedimento purificado tuvo dos tipos de uso: servir de material de bioensayo o bien ser sometido a un protocolo de solubilización.

En función de la proteína producida se aplicaron distintos protocolos de solubilización de los cuerpos de inclusión. El protocolo base consistió en la resuspensión del sedimento obtenido en aproximadamente 1/100 del volumen de cultivo de partida en tampón de solubilización. La suspensión se mantuvo en agitación lenta y a temperatura ambiente durante toda la noche y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Finalmente se recuperó el sobrenadante con la proteína solubilizada y se conservó a 4°C. Los tampones de solubilización empleados fueron fundamentalmente dos, según la proteína: tampón carbonato-NaCl (NaHCO₃ 50 mM pH=10, NaCl 100 mM y DTT 10 mM) o tampón carbonato-NaCl-urea (NaHCO₃ 50 mM pH=10.5, NaCl 100 mM, urea 8 M y 10 mM DTT), aunque se probaron otros tampones (a pHs y concentraciones diferentes) durante la puesta a punto del método.

El tratamiento con urea permite aumentar el rendimiento de la solubilización de algunas proteínas, sin embargo tiene un efecto desnaturalizante. Para renaturalizar la proteína se aplicó un protocolo adicional en 2 pasos en un incubador a 4°C:

- 1) Se cargó la muestra (2 ml) en una columna de cromatografía de exclusión molecular PD-10 (GE Healthcare, EEUU) pre-equilibrada en tampón urea 2 M (NaHCO₃ 50 mM pH=10.5, NaCl 100 mM, urea 2 M) y el eluato se recuperó aplicando el protocolo de elución por centrifugación detallado en el manual de la columna.
- 2) Se dejó incubar 30 min en hielo.
- 3) La muestra se cargó en una nueva columna PD-10 pre-equilibrada en tampón de renaturalización (NaHCO₃ 50 mM pH=10.5, NaCl 100 mM), completando el volumen de carga hasta 2.5 ml con tampón de renaturalización frío. Se aplicó el protocolo de elución por gravedad (detallado en el manual): en un primer paso se descartó la fracción no retenida, se cargaron 3.5 ml de tampón de renaturalización frío y se recuperó el eluato.
- 4) Se dejó incubar 30 min en hielo.

- 5) La toxina precipitada durante el cambio de tampón se sedimentó por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante que contenía la toxina renaturalizada se recuperó y se conservó a 4°C.

La concentración de proteínas de los solubilizados se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad, EEUU).

5.2.3.3 Electroforesis y Western-Blot

Las muestras se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como ya se ha descrito (Laemmli, 1970). El gel concentrador utilizado fue al 5% de poliacrilamida y el gel separador al 12%. Las muestras se prepararon en tampón de carga de electroforesis (Azul de Bromofenol 0.075%, EDTA 3.75 mM, Tris-HCl 150 mM pH=6.8, sacarosa 0.75 M, SDS 2.5%, β -mercaptoetanol 1%) por incubación a 95°C durante 8 min.

Para el análisis Western-Blot las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare, EEUU) mediante el equipo de transferencia semi-seco ECL Semi-dry Blotter TE70 (GE Healthcare, EEUU) a 45 mA durante 45 min con tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH=8.6, metanol 20%, glicina 192 mM). Para minimizar la unión inespecífica, la membrana se incubó (mínimo 1 h a temperatura ambiente [TA] y con agitación) con el agente de bloqueo “Western Blocking Reagent” (Roche Applied Science, Alemania) diluido en PBS (NaCl 137 mM, 2.7 mM KCl, Na_2HPO_4 100 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH=7.5). El anticuerpo primario se añadió directamente en esta mezcla y se incubó durante 1 h a TA con agitación. Posteriormente, se efectuaron varios lavados en PBS-Tween 20 0.1% (PBST). En todos los casos, el lavado consistió en 3 lavados de 10 minutos con agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario, anti-conejo o anti-ratón IgG-fosfatasa alcalina (Sigma Chemical co., EEUU) en PBST (1:5000; 1 h, TA, agitación). Tras lavar con PBST la membrana se equilibró 10 min en 10 ml de Genius 3 (Tris-HCl 0.1 M pH=9.5, 0.05 M MgCl_2 , NaCl 0.1 M) y se añadió el sustrato de revelado NBT-BCIP (Roche Applied Science, Alemania) al 2%. Así, la membrana se incubó unos minutos en oscuridad y sin agitación hasta alcanzar el grado de revelado deseado; entonces la

reacción se paró por lavado con PBST y finalmente con agua Mili-Q (Millipore, EEUU). Finalmente la membrana se secó con papel absorbente para su conservación.

El procesamiento informático de los geles y las membranas, relativo a este apartado y a los siguientes, fue llevado a cabo con el programa TotalLab TL12 (Nonlinear Dynamics, Reino Unido).

5.2.3.4 Procesamiento proteolítico

Los intestinos medios de larvas de 2º, 3º y 4º estadio de *S. nonagrioides* (provenientes del Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Madrid) se extrajeron y mezclaron en solución NaCl 0.15 M fría a razón de 25, 25 y 12 intestinos por ml, respectivamente. Aproximadamente 400 larvas de 2º y 3º estadio de *D. melanogaster* fueron agrupadas por ml de solución NaCl 0.15 M fría. Las muestras se homogeneizaron en microtubos de 1.5 ml utilizando un homogeneizador eléctrico (Pellet Pestle Motor Micro Grinder, Kontes, EEUU), posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se alicuotaron y transfirieron inmediatamente a -80°C, para limitar la proteólisis. Las proteínas a estudio se digirieron con estos extractos intestinales de insectos y con tripsina comercial de bovino (Sigma Chemical co., EEUU) en tampón carbonato (50 mM Na₂CO₃ pH=10.5) a razón de 2 µl de extracto intestinal y 0.1 mg de tripsina por mg de proteína. Las digestiones se realizaron ajustando la concentración de proteína de partida a 1.5 mg/ml y por incubación a 37°C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación que fueron inmediatamente mezcladas con tampón de carga de electroforesis y desnaturalizadas a 95°C durante 8 min, y conservadas a 4°C hasta su posterior análisis.

5.2.4 Ensayos de unión de toxinas recombinantes

5.2.4.1 Unión de GFP a proteínas recombinantes

El extracto de GFP se obtuvo a partir de un cultivo de células sf21 infectadas con un baculovirus recombinante que expresa GFP bajo el control del promotor p10 (Herrero et al., 2007; Jakubowska et al., 2009). Para ello, 48-72 h post-infección las células se sedimentaron por centrifugación y se sometieron a un tratamiento de lisis por resuspensión y agitación con vortex en PBS-Tritón X-100 0.1% a un volumen igual al del cultivo de partida. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada y se recuperó el

sobrenadante que, tras la determinación de su concentración proteica por el método de Bradford (Bradford, 1976), se conservó en alícuotas a -20°C .

La unión de GFP a proteínas recombinantes fijadas en membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo de acuerdo al protocolo Western-Blot descrito en el apartado 5.2.3.3, con algunas modificaciones:

1. Tras el bloqueo de la membrana, se efectuaron varios lavados con PBST y ésta se incubó con un extracto de GFP al 0.2% (v/v) en 10 ml de PBST (aproximadamente 3 μg de extracto por ml final), 1 h a TA, con agitación.
2. Posteriormente, se efectuaron 5 lavados con PBST y se incubó con el anticuerpo primario anti-GFP (anticuerpo monoclonal de ratón, Roche Applied Science, Alemania) en PBST (1:5000), como ya se ha indicado.

5.2.4.2 Unión de proteínas recombinantes a BBMV de *Drosophila melanogaster*

Las BBMV de larvas de *D. melanogaster* se obtuvieron como se ha descrito en el apartado 5.2.1.1 con las siguientes modificaciones: 1) el material de partida utilizado fueron larvas (completas) de 2^o y 3^{er} estadio; 2) la primera homogeneización se realizó con Ultra Turrax T18 basic (IKA-Werke, Alemania), en dos pasos de 1 min a 16000 rpm/0.1 ml, separados por 1 min de reposo en hielo, y posterior homogeneización con homogeneizador de teflón tipo Potter (Afora, España); 3) el volumen final de resuspensión fue de 1 ml de MET 0.5 \times por cada 2 g de tejido de partida.

Se llevaron a cabo dos tipos de ensayo:

A) Incubación de BBMV con toxinas recombinantes y detección inmunológica de éstas: las BBMV conservadas a -80°C se descongelaron sobre lecho de hielo, se sedimentaron por centrifugación a 14000 rpm durante 12 min a 4°C y se resuspendieron en 100 μl de tampón PBS suplementado con BSA al 0.1% (p/v) y la proteína recombinante correspondiente, a una concentración de proteínas totales de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BBMV y 0.05-0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de toxina. Tras un periodo de incubación de 1 h a TA sin agitación, las muestras se sedimentaron por centrifugación a 14000 rpm durante 12 min a 4°C y se lavaron con 500 μl de PBS-BSA 0.1%. Tras la centrifugación el sedimento fue resuspendido en tampón de carga de electroforesis e incubado a 95°C durante 8 min. Las

muestras se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y Western-Blot como ya se ha indicado. Como anticuerpo primario se utilizó anti-Cry1Ab (suero policlonal obtenido en conejo; cedido por J. Ferré, Universidad de Valencia) a 1:2000.

B) Incubación de proteínas desnaturalizadas de BBMV's fijadas en membrana de nitrocelulosa con toxinas recombinantes y detección inmunológica de éstas: las BBMV's conservadas a -80°C se descongelaron sobre lecho de hielo, se sedimentaron por centrifugación a 14000 rpm durante 12 min a 4°C y se resuspendieron inmediatamente en tampón de carga electroforesis, fueron entonces incubadas a 95°C durante 8 min. Las muestras se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y Western-Blot como ya se ha descrito, introduciendo las siguientes modificaciones: tras el bloqueo de la membrana, se añadió la proteína recombinante a una concentración de 10-25 µg/ml directamente sobre la solución de bloqueo, y se incubó 1 h a TA, con agitación. Después de 3 lavados con PBST, la membrana se incubó con anti-Cry1Ab en PBST (1:2000) y se completó el protocolo como ya ha sido descrito.

5.2.5 Bioensayos con toxinas recombinantes

5.2.5.1 Bioensayos sobre *Drosophila melanogaster*

Los bioensayos sobre *D. melanogaster* se efectuaron en bandeja de ensayo Bio-Assay Tray BIO-BA-128 (C-D International Inc., EEUU) de 128 alveolos. Los ingredientes activos (proteínas recombinantes o suspensión de lisados celulares en tampón carbonato-NaCl) y los controles (tampón carbonato-NaCl) se prepararon por incorporación en dieta de *D. melanogaster* (ver apartado 5.2.2.2) al 10% v/v. Para ello, se fundieron porciones gelificadas de dieta en horno de microondas; cuando la temperatura descendió a 50°C, los ingredientes activos se mezclaron vigorosa y rápidamente con una espátula metálica y la mezcla aún líquida se dispensó en las bandejas con pipeta estéril de 10 ml, a razón de 1-1.5 ml por alveolo. Una vez fría y endurecida la dieta, se transfirieron 3 larvas neonatas por alveolo, y se cubrieron con tapa adhesiva (C-D International Inc., EEUU). Las bandejas se incubaron a 25°C y los resultados se registraron a los 7 días.

5.2.5.2 Bioensayos sobre *Sesamia nonagrioides*

Los bioensayos sobre *S. nonagrioides* se realizaron por contaminación superficial de dieta sólida en bandejas de ensayo Bio-Assay Tray BIO-BA-128 (C-D International Inc.,

EEUU), como ya ha sido descrito (Farinós et al., 2004). Se ensayaron 32 larvas neonatas (<24 h) por tratamiento y los resultados del ensayo se registraron a los 7 días.

5.2.6 Análisis de datos

Los bioensayos sobre la especie *S. nonagrioides* fueron analizados estadísticamente por regresión logística (Modelos Lineales Generalizados) para una distribución binomial con función de enlace tipo Logit, la comparación entre medias se efectuó aplicando el test de Bonferroni. Para ello se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., EEUU). La corrección de porcentajes respecto al control se efectuó aplicando la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterización del proteoma intestinal de *Ceratitis capitata*

La aplicación de un protocolo específico permitió obtener vesículas de membrana epitelial en borde de cepillo (BBMVs) a partir de intestinos medios extraídos de adultos de *C. capitata* (ver apartado 5.2.1.1). El rendimiento de extracción fue de 0.25-0.35 μg de proteína de BBMVs por mosca. El perfil proteico de dichos extractos fue analizado por electroforesis monodimensional (1D) y bidimensional (2D) (Figura 5.6).

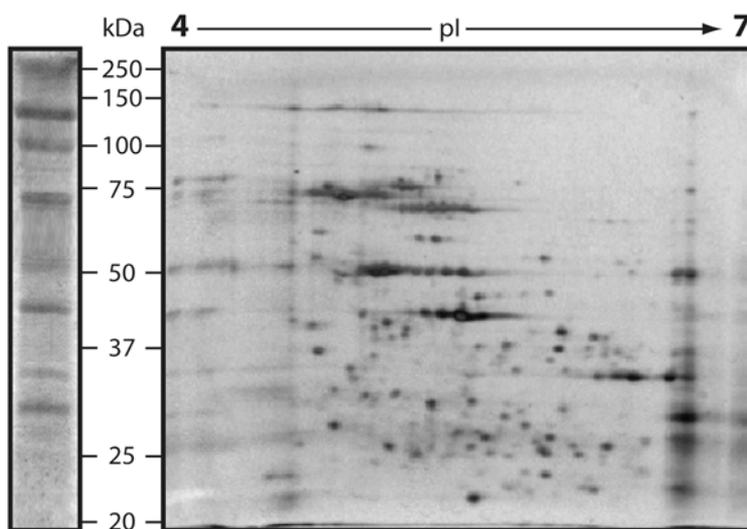


Figura 5.6 Geles de electroforesis 1D (izquierda) y 2D (derecha) de separación de proteínas de BBMVs de adultos de *C. capitata* (25 μg). La primera dimensión del gel 2D se realizó por isoelectroenfoque con gradiente inmovilizado de pH utilizando tiras IPG de gradiente lineal 4-7 de 7 cm (Bio-Rad, EEUU), la segunda dimensión se realizó por electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12%. El gel 1D se tiñó de acuerdo al protocolo estándar con azul de Coomassie (Laemmli, 1970), el gel 2D se tiñó con nitrato de plata. El peso molecular (kDa) en los geles 1D y 2D se estimó mediante los marcadores Precision Plus Protein Standards y Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, EEUU), respectivamente. El rango de pHs de isoelectroenfoque (pI) se indica en la parte superior.

De acuerdo a la electroforesis 2D la mayoría de las proteínas se encontraron en un rango de 100 a 25 kDa de peso molecular y 4.5 a 6.5 de punto isoeléctrico. Sin embargo, la electroforesis 1D mostró una mayor abundancia relativa de proteínas de peso molecular superior a 100 kDa; esta divergencia se puede deber tanto a las diferencias intrínsecas entre ambos tipos de electroforesis como al tipo de tinción empleada (azul de Coomassie

en el gel 1D frente a tinción con plata en el gel 2D) (Francisco García – CIB/CSIC, comunicación personal). El análisis informático del gel 2D detectó 187 puntos, que tras excluir “rosarios” (grupos de puntos con el mismo peso molecular pero diferentes pI aparentes que corresponden a una misma proteína con diferentes grados de modificación post-traduccional), permitió estimar la existencia de aproximadamente 160 proteínas diferentes en las BBMV.

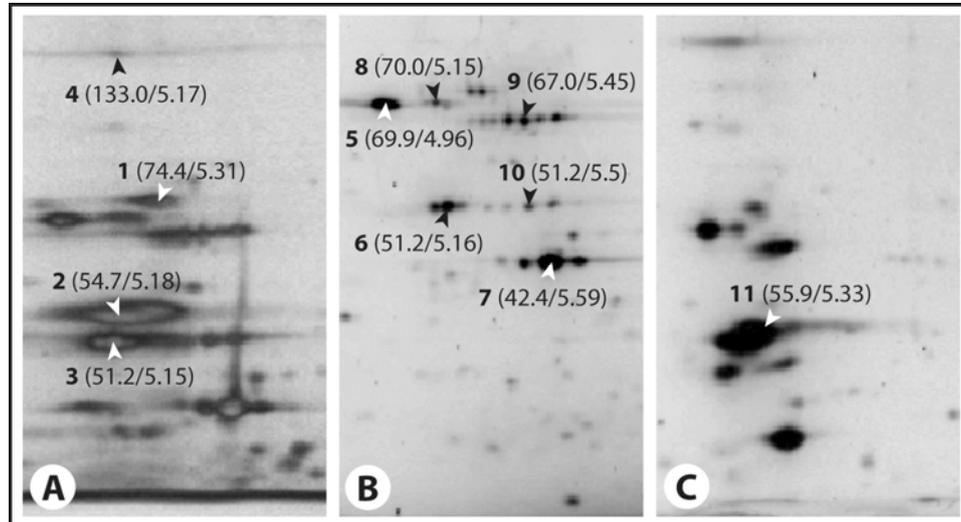


Figura 5.7 Puntos de corte para la identificación de proteínas de BBMV. de adultos de *C. capitata* (25 μ g) resueltas en geles de electroforesis 2D. Gel A: 8% de poliacrilamida, rango de pHs de 4-7, tinción con plata. Gel B: 8% de poliacrilamida, rango de pHs 3-10, tinción con Sypro-Ruby (Bio-Rad, EEUU). Gel C: 12% de poliacrilamida, rango de pHs 4-7, tinción con Sypro-Ruby. Los puntos se identifican mediante números arábigos; entre paréntesis se indican sus coordenadas: peso molecular (kDa) / punto isoeléctrico (unidades de pH). La primera dimensión se efectuó utilizando tiras IPG de gradiente lineal 4-7 o gradiente no lineal (NL) 3-10 de 7 cm (Bio-Rad, EEUU). El corte de los puntos y la determinación de sus coordenadas se efectuaron con apoyo de los programas Proteome Works Plus Spot Cutter y PDQuest 2D analysis 7.4 software (Bio-Rad, EEUU).

En la segunda fase se seleccionaron una serie de polipéptidos (11 puntos) para su identificación por espectrometría de masas (Figura 5.7). El objeto de dicha identificación fue realizar una prospección preliminar de potenciales proteínas diana que pudieran ser útiles para el desarrollo de toxinas recombinantes Cry-anticuerpo activas contra *C. capitata*, de acuerdo a la estrategia propuesta. El criterio de selección de los puntos fue, en primer lugar, que fueran proteínas con un nivel de expresión suficiente en BBMV. de

C. capitata, y en segundo lugar que mostraran propiedades físicas (peso molecular y punto isoeléctrico) en un rango similar a los receptores de membrana descritos previamente para las toxinas Cry (Tabla 5.2). El motivo de este criterio fue que, aunque la identificación de receptores Cry no es imperativa según la estrategia propuesta en este capítulo (la especificidad vendría determinada por el anticuerpo), la localización y orientación de este tipo de proteínas en la membrana epitelial es la idónea para la interacción con toxinas exógenas, como ocurre en las especies susceptibles.

Tabla 5.2 Peso molecular y punto isoeléctrico de receptores potenciales de toxinas Cry

Tipo	Tamaño (kDa)	pI ^a	Especie	Referencia ^b
Cadherinas	100	5.20	<i>Heliothis virescens</i>	(Krishnamoorthy et al., 2007)
	210	4.50*	<i>Manduca sexta</i>	(Vadlamudi et al., 1995)
	175	4.48*	<i>Bombyx mori</i>	(Nagamatsu et al., 1998)
	195	4.35*	<i>Heliothis virescens</i>	(Gahan et al., 2001)
	195	?	<i>Anopheles gambiae</i>	(Hua et al., 2008)
Aminopeptidasas N (APN)	120	5.96*	<i>Manduca sexta</i>	(Knight et al., 1995)
	110	5.12*	<i>Heliothis virescens</i>	(Banks et al., 2001)
	120	5.27*	<i>Bombyx mori</i>	(Yaoi et al., 1999)
	115	4.6	<i>Plodia interpunctella</i>	(Candas et al., 2003)
	106	5.48*	<i>Anopheles gambiae</i>	(Zhang et al., 2008a)
Alcalin fosfatasas (ALP)	65	5	<i>Heliothis virescens</i>	(Krishnamoorthy et al., 2007)
	58	5.9	<i>Bombyx mori</i>	(Kajiwara et al., 2005)
	65	6	<i>Manduca sexta</i>	(McNall y Adang, 2003)
	65	5.22*	<i>Aedes aegypti</i>	(Fernández et al., 2006)
Actina	42	5.3	<i>Manduca sexta</i>	(Candas et al., 2003)
	42	5.4	<i>Heliothis virescens</i>	(Krishnamoorthy et al., 2007)
	42	5.2	<i>Aedes aegypti</i>	(Bayyareddy et al., 2009)
V-ATPasa subunidad A	72	5.1	<i>Heliothis virescens</i>	(Krishnamoorthy et al., 2007)
V-ATPasa subunidad B	55	5.3	<i>Plodia interpunctella</i>	(Candas et al., 2003)
	55	5.25	<i>Aedes aegypti</i>	(Bayyareddy et al., 2009)
Flotilina-1	49	5.8	<i>Aedes aegypti</i>	(Bayyareddy et al., 2009)
Prohibitina	33	5.0	<i>Aedes aegypti</i>	(Bayyareddy et al., 2009)
Glicocnjugado	270	?	<i>Lymantria dispar</i>	(Valaitis et al., 2001)
P252	252	?	<i>Bombyx mori</i>	(Pandian et al., 2008)

^a pI, punto isoeléctrico estimado a partir de geles 2D o (*) a partir de su secuencia mediante la herramienta "Compute pI/Mw tool, ExPASy server" (Gasteiger et al., 2005)

^b Estudio donde se reporta la unión de alguna toxina Cry al potencial receptor, salvo en Candas et al. (2003), donde se reportan diferencias de expresión entre una colonia susceptible y otra resistente, y no directamente unión toxina-receptor

La revisión de la literatura permitió determinar que la gran mayoría de proteínas de membrana que son receptores potenciales de toxinas Cry tienen un tamaño entre 40 y 200 kDa, y un punto isoeléctrico entre 4 y 6 (Tabla 5.2). En consecuencia los puntos tomados

en los diferentes geles 2D realizados se seleccionaron en un rango similar: peso molecular de 42 a 133 kDa, y pI de 4.9 a 5.6 (Figura 5.7).

Los resultados de la identificación de los polipéptidos seleccionados (11) mediante el análisis de su huella peptídica (PMF), y en algunos casos el análisis de fragmentación MS-MS, y la posterior consulta en bases de datos de proteínas se indican en la tabla 5.3. Para 7 de los 11 polipéptidos analizados se detectaron proteínas con una fidelidad de identificación significativa. Cabe destacar los puntos 8 y 11, identificados como V-ATPasas putativas; el punto 11 como tubulina; y los puntos 6 y 8, en principio identificados como queratinas. Otras identificaciones que resultaron significativas, aunque a un nivel inferior, fueron las de los polipéptidos 7 y 5, que mostraron similitud con una proteína rica en leucina de humanos y una proteína de origen bacteriano encargada de la biosíntesis de un cofactor molibdeno-dependiente, respectivamente. Sin embargo, las características de estas 2 proteínas (kDa/pI) no se correspondieron con lo observado en el gel para estos dos puntos.

Como apoyo a estos resultados, algunos de los péptidos deducidos a partir de bases de datos por el programa Mascot y obtenidos a partir de los espectros de fragmentación MS-MS se analizaron independientemente. Se llevó a cabo la comparación de dichos péptidos sobre una base de datos local construida con secuencias homólogas a proteínas de membrana intestinal de insectos (ver apartado 5.2.1.3 para más detalles). Los resultados se muestran en la tabla 5.4; en el caso de los puntos 9, 10 y 11, la identificación confirma los resultados obtenidos en el primer análisis. En cambio, para las proteínas inicialmente identificadas como queratinas (puntos 6 y 8), éste análisis identificó otro tipo de polipéptidos, dos proteínas de función desconocida de *Anopheles gambiae* y *D. melanogaster*.

La identificación inicial de queratinas a partir de estas dos muestras (6 y 8) sugiere *a priori* que se produjo una contaminación durante su manipulación o análisis. Las queratinas son las proteínas mayoritarias en la piel y cabello, por este motivo son fuentes habituales de contaminación en proteómica. No obstante, en este estudio las características de esas proteínas, determinadas en los geles 2-D (peso molecular y punto isoeléctrico), no se corresponden con las propiedades de las queratinas que presentaron

mayor homología en las búsquedas (Tabla 5.3). Además, no todas las proteínas identificadas con un elevado nivel de significación fueron queratinas humanas (datos no presentados); hecho poco común cuando se produce una contaminación de la muestra (V. de los Ríos – CIB-CSIC, comunicación personal). Por otro lado, como se ha presentado, el análisis de péptidos individuales inferidos a partir de los espectros MS-MS de estas muestras determinó la existencia de homología con otras proteínas de insectos. Así, existe la posibilidad que estos polipéptidos no sean queratinas sino otras proteínas de insectos que comparten parte de su secuencia con ellas.

Tabla 5.3 Resultados de las búsquedas en bases de datos utilizando los programas Mascot y Aldente a partir de los espectros obtenidos por análisis de Huella Peptídica (PMF) y Fragmentación Iónica (MS-MS) de proteínas de BBMV de adultos de *C. capitata*.

Punto (nr)	Observado (kDa/pI) ^a	Predicción (kDa/pI) ^b	Proteína (nr. NCBI) ^c	Especie (<i>D. =Drosophila</i>)	Descripción	Análisis ^d	Base de datos	MS ^e	AS ^f
1	74.4/5.31	19.3/8.25	27652009	<i>D. funebris</i>	PLU - regulador del ciclo celular	PMF	NCBIInr (Metazoa)	35	
2	54.7/5.18	54.3/9.97	125978403	<i>D. pseudoobscura</i>	GA21167-PA - ortólogo putativo de Carboxi-Peptidasa A de <i>D. melanogaster</i> (CG8564)	PMF	NCBIInr (Drosophila)	55	
3	51.2/5.16	47.7/6.71	75055075	<i>Pongo abelii</i>	Flotillina-1	PMF	NCBIInr (Metazoa)	60	
4	133/5.17	29.5/7.96	170284570	<i>Xenopus tropicalis</i>	Proteína de función desconocida	PMF	NCBIInr (Metazoa)	52	
5	69.9/4.96	37.5/5.54	126727124	<i>Rhodobacteriales</i> HTCC2150	Proteína A de biosíntesis de cofactor molibdeno-dependiente	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	90*	
6	51.2/5.16	65.9/8.07	47132620	<i>Homo sapiens</i>	Queratina 2	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	393*	
7	42.4/5.59	151.6/8.02	74762279	<i>Homo sapiens</i>	Proteína 16A con repeticiones ricas en leucina	PMF	UniProtKB/Swiss-Prot (Metazoa)		16.4*
8	70/5.15	65.9/8.07	47132620	<i>Homo sapiens</i>	Queratina 2	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	290*	
9	67/5.45	68.3/5.23	24583984	<i>D. melanogaster</i>	Vha68-2 CG3762-PA (V-ATPasa subunidad A)	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	95*	
10	51.2/5.5	55.2/5.38	157111261	<i>Aedes aegypti</i>	ATP sintasa vacuolar subunidad B (V-ATPasa)	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	529*	
		54.5/5.31	125773061	<i>D. pseudoobscura</i>	GA14484 . V-type ATPase family	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	521*	
11	55.9/5.33	44.7/4.94	109096498	<i>Macaca mulatta</i>	Tubulina- α , ubicua, isoforma 19	PMF/MS-MS	NCBIInr (Metazoa)	910*	
		49.9/4.96	1729841	<i>Bombyx mori</i>	Tubulina cadena- α	PMF	UniProtKB/Swiss-Prot (Insecta)		58.6*

^a Coordenadas del punto de corte (peso molecular / punto isoelectrico), estimadas mediante el programa PDQuest 2D analysis 7.4 software (Bio-Rad, EEUU)

^b Peso molecular y punto isoelectrico de la proteína identificada; estimados mediante la herramienta "Compute pI/Mw tool" (Gasteiger et al., 2005) a partir de la secuencia

^c Proteína de mayor similitud, según el motor de búsqueda: Mascot (<http://www.matrixscience.com>) o Aldente (<http://www.expasy.ch/tools/aldente/>)

^d PMF: análisis de huella peptídica; MS-MS: análisis de fragmentación

^e Mascot Score (MS) se calcula como $MS = -10 \cdot \log(P)$; donde P es la probabilidad de que la identificación se produzca por azar. Es un indicador de la calidad de la identificación; un valor por debajo de 74 (NCBIInr Metazoa) o 60 (NCBIInr Drosophila) es considerado no significativo; (*) indica resultados significativos

^f Aldente Score (AS): valores por encima de 16.29 y 13.45 son significativos para búsquedas en la base de datos UniProt/Swiss-Prot (Metazoa) y UniProt/Swiss-Prot (Insecta), respectivamente; (*) indica resultados significativos. Para más información consultar: <http://www.expasy.org/tools/aldente/help.html>

Tabla 5.4 Péptidos de tripsinización deducidos mediante el programa Mascot a partir de espectros de fragmentación iónica (MS-MS) y comparación con una base de datos local (blastp) construída con secuencias homólogas a proteínas de membrana intestinal de insectos.

Punto (nr.)	Secuencia deducida ^a	Valor E ^b	Proteína (nr. NCBI)	Especie (<i>D.=Drosophila</i>)	Descripción
5	RGIDAALAGLRV (29)		ninguna		
6	KSISISVAGGGGFGAAGGFGGRG (138)	0.021	31196857	<i>Anopheles gambiae</i>	ENSANGP00000013737 (función desconocida)
	RGGGFGGGSSFGGGSGFSGGGFSGGGFSGGGF (50)	9.00E-07	31196857	<i>Anopheles gambiae</i>	ENSANGP00000013737 (función desconocida)
		2.00E-05	21358425	<i>D. melanogaster</i>	CG14355 (función desconocida)
8	KSISISVAGGGGFGAAGGFGGRG (107)	0.021	31196857	<i>Anopheles gambiae</i>	ENSANGP00000013737 (función desconocida)
	RGGGFGGGSSFGGGSGFSGGGFSGGGFSGGGF (144)	9.00E-07	31196857	<i>Anopheles gambiae</i>	ENSANGP00000013737 (función desconocida)
		2.00E-05	21358425	<i>D. melanogaster</i>	CG14355 (función desconocida)
9	RVGYEELVGEIIRL (26)	5.00E-04	24583992	<i>D. melanogaster</i>	Vha68-1 CG12403-PA (V-ATPasa sub. A isoforma 1)
		5.00E-04	24583984	<i>D. melanogaster</i>	Vha68-2 CG3762-PA (V-ATPasa sub. A isoforma 2)
		5.00E-04	19527547	<i>D. melanogaster</i>	RE30552p: actividad ATPasa
		5.00E-04	12643368	<i>D. melanogaster</i>	V-ATPasa subunidad A isoforma 2
		6.00E-03	11062	<i>Manduca sexta</i>	ATPasa, transportador H(+)-
10	KIPIFSAAGLPHNEIAAQICRQ (83)	6.00E-09	4680480	<i>Aedes aegypti</i>	ATPasa vacuolar subunidad B
		6.00E-09	17136796	<i>D. melanogaster</i>	H[+]-ATPasa vacuolar 55kD subunidad B, isoforma B
11	RFDGALNVDLTFQTNLVYPRI (140)	1.00E-09	17737821	<i>D. melanogaster</i>	α -Tubulina a 84D, isoforma A
		8.00E-04	24655737	<i>D. melanogaster</i>	β -Tubulina a 56D, isoforma B

^a Péptidos de tripsinización deducidos por Mascot a partir de espectros MS-MS seleccionados y la base de datos NCBI (Metazoa). Entre paréntesis, se indica la calidad de la identificación (ion score); valores por encima de 30 indican identidad o alta homología ($p < 0.05$)

^b Valor E de búsqueda blastp con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 (Hall, 1999) sobre base de datos local (203 secuencias). El valor E es un parámetro que describe el número de identificaciones esperadas por azar al buscar en una base de datos de un determinado tamaño. Cuanto más próximo a cero mayor es la significación de la identificación (Altschul et al., 1997).

5.3.2 Caracterización del patrón de expresión de GFP en *Drosophila melanogaster*

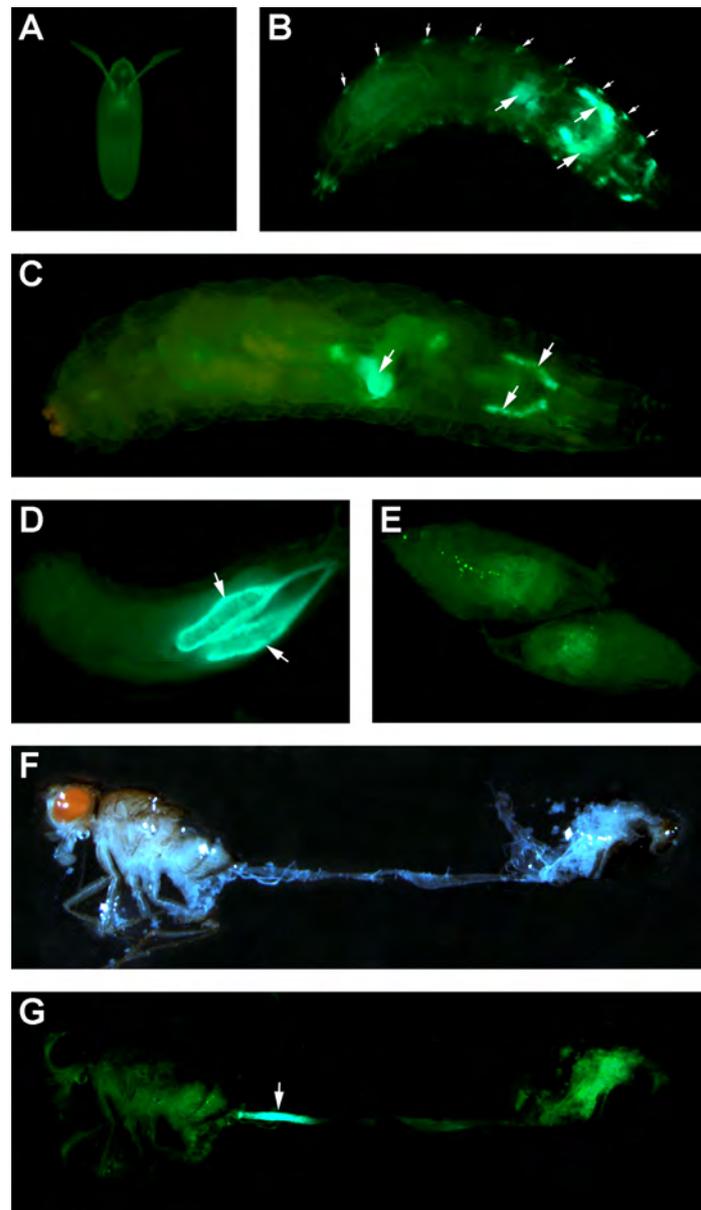


Figura 5.8 Expresión de GFP en cruces F1 de las líneas *GAL4-ENDO*×*UAS-GFP*. Se muestran diferentes estados de desarrollo: huevo (A); 1^{er} estadio larvario (B); 2^o-3^{er} estadio larvario (C); 3^{er} estadio larvario avanzado, prepupa (D); pupa (E); adulto diseccionado en campo claro (F) y con fluorescencia (G). Las imágenes no están a la misma escala. Las flechas indican expresión de GFP.

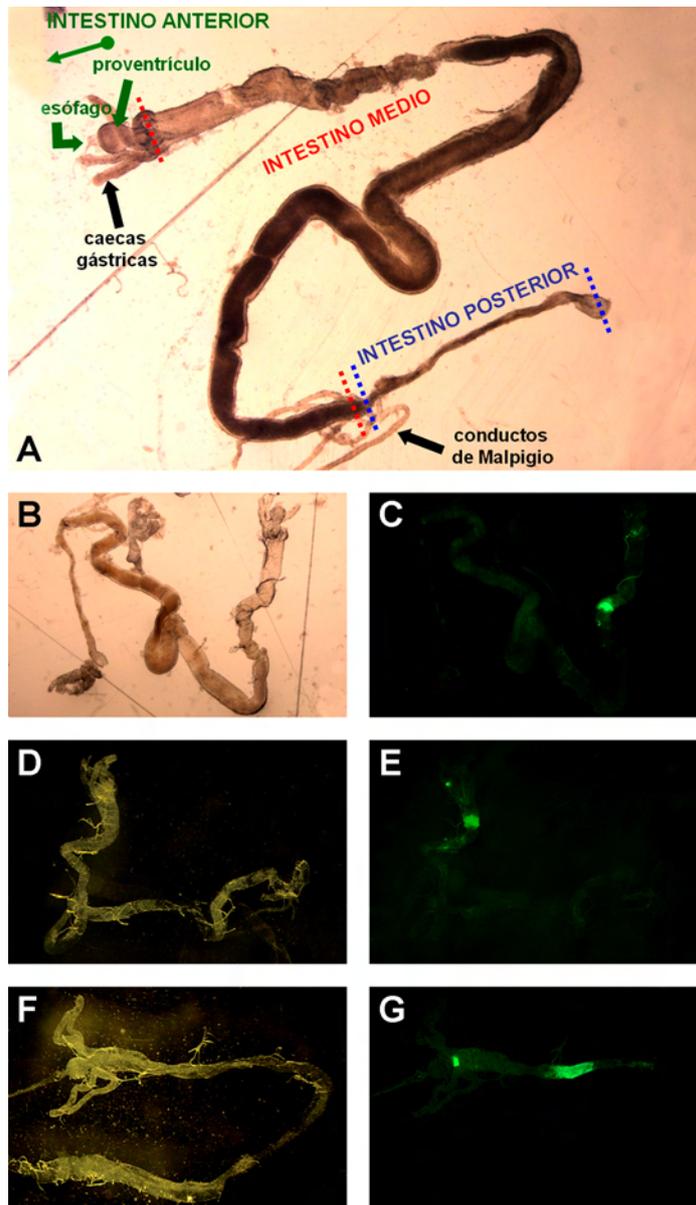


Figura 5.9 Detección de GFP en disecciones del tracto intestinal de larvas de 2º estadio procedentes del cruce de las líneas *GAL4-ENDO*×*UAS-GFP*. Anatomía del tubo digestivo de *D. melanogaster* (A); disecciones en campo claro (B, D, F) y con fluorescencia (C,E,G, respectivamente).

La expresión de GFP en la descendencia de los cruces de las líneas *GAL4-ENDO* y *UAS-GFP* se examinó por fluorescencia a lo largo de su ciclo de desarrollo, que se completó en 11-12 días en nuestras condiciones (Figura 5.8, Tabla 5.5). El patrón de expresión de

la línea “conductora” *GALA-ENDO* durante la fase embrionaria ha sido muy bien documentado (Hidalgo et al., 1995; Martín-Bermudo et al., 1997) y no es objeto del presente estudio, por lo tanto no fue caracterizado.

Tabla 5.5 Expresión de GFP de *GALA-ENDO*×*UAS-GFP* a lo largo del desarrollo.

Día	Estado/ío ^a	Patrón de expresión
0	huevo-puesta	
1	desarrollo embrionario	corion impide visión
2	L1	glándulas salivares inicio del intestino medio epidermis: patrón repetido en segmentos
3	L2	glándulas salivares inicio del intestino medio
4-5	L3	glándulas salivares inicio del intestino medio
5-6	prepupa	glándulas salivares (aumento de tamaño)
6-7	pupa	pupario impide visión
11-12	adulto	tras disección: inicio del intestino medio (poca expresión, no se observa en todos los individuos)

^a L1, L2 y L3: 1^{er}, 2^o y 3^{er} estadio larvario, respectivamente

El primer estadio larvario mostró un patrón muy característico que ha sido descrito previamente tanto para la línea *GALA-ENDO* (Martín-Bermudo et al., 1997) como para líneas similares (Yeh et al., 1995), y se diferencia de los estadios larvarios posteriores por la expresión de GFP en pares de células de la epidermis siguiendo un patrón longitudinal correspondiente a los segmentos (Figura 5.8 B). La expresión de GFP en el intestino medio (órgano de interés en este trabajo) fue detectada durante toda la fase larvaria, decreciendo al final del 3^{er} estadio y reapareciendo en el estado adulto, aunque de una forma débil y errática (no en todos los individuos). En todos los casos la expresión de GFP se localizó en porciones cortas del inicio del intestino medio y no en su totalidad, como quedó de manifiesto al realizar disecciones del tracto intestinal (Figura 5.9).

5.3.3 Producción de toxinas recombinantes

En total se produjeron 4 tipos de proteínas recombinantes por la fusión de parte de la protoxina Cry1Ab y el anticuerpo recombinante V_{HH} anti-GFP. La representación esquemática de cada una de las variantes y su peso molecular esperado se muestran en la figura 5.10 y la tabla 5.6, respectivamente.

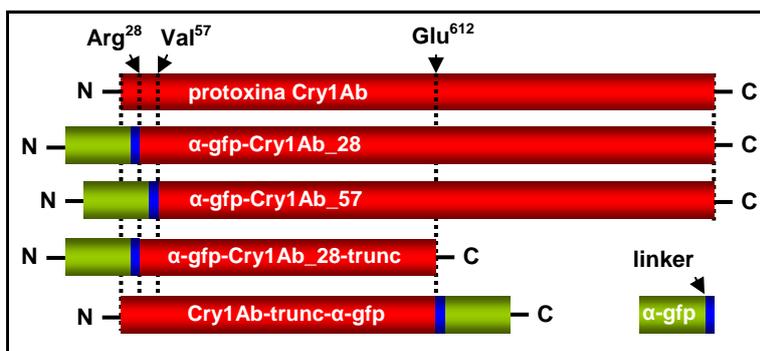


Figura 5.10 Longitud relativa de proteínas recombinantes en relación a la protoxina nativa Cry1Ab. Las líneas de puntos indican los aminoácidos a partir de los cuales se ha truncado la protoxina original; “α-gfp” se refiere a la región V_{HH} de un anticuerpo recombinante anti-GFP y se representa con un rectángulo verde; el rectángulo azul muestra el conector o “linker” entre Cry1Ab y el anticuerpo. N y C indican los extremos N- y C-terminal de la proteína, respectivamente.

Tabla 5.6 Proteínas recombinantes, tamaño de la protoxina y la toxina activada esperada.

Proteína	Peso molecular (kDa) ^a	Producto de tripsinización esperado (kDa) ^b
Cry1Ab	130.6	65
α-gfp-Cry1Ab_28	141.1	79
α-gfp-Cry1Ab_57	138.0	75
α-gfp-Cry1Ab_28-trunc	79.0	79
Cry1Ab-trunc-α-gfp	82.3	79

^a Calculado a partir de su secuencia mediante la herramienta "Compute pI/Mw tool, ExPASy server" (Gasteiger et al., 2005)

^b Cálculo aproximado, en relación a la literatura (Schnepf et al., 1998)

En una primera fase se diseñaron 2 de las proteínas recombinantes, las variantes α-gfp-Cry1Ab_28 (referida a partir de ahora en el texto como “variante 28”) y α-gfp-Cry1Ab_57 (o “variante 57”), y se produjeron al igual que la proteína Cry1Ab utilizando cultivos de *E. coli* de la cepa XL1-Blue transformada con el plásmido correspondiente. Ambas variantes se diseñaron de forma que fusionaran el anticuerpo V_{HH} anti-GFP en el extremo N-terminal de la proteína Cry1Ab (Figuras 5.3, 5.10). En la variante 28, la protoxina Cry1Ab fue truncada en el sitio conocido de activación por tripsinas del extremo N-terminal, el aminoácido arginina en la posición número 28 (Arg²⁸) (Schnepf et al., 1998). El sitio de truncado de Cry1Ab en la variante 57 fue el aa Val⁵⁷; el fundamento de este diseño fue que, como se ha descrito en la literatura, la toxina activada Cry1Ab sufre un segundo procesamiento del extremo N-terminal cuando interacciona con el

receptor primario (a la altura de la Phe⁵⁶) y se ha demostrado que las toxinas así truncadas conservan la actividad tóxica, incluso en colonias resistentes (Soberón et al., 2007b). El rendimiento de obtención de proteína solubilizada fue aproximadamente de 100 y 75 $\mu\text{g/ml}$ de cultivo inicial para las variantes 28 y 57, respectivamente; mientras que el rendimiento obtenido con la protoxina Cry1Ab fue de 200 $\mu\text{g/ml}$. El peso molecular observado para las dos variantes se correspondió con lo esperado (Tabla 5.6, Figura 5.11). Para su obtención se aplicó el protocolo lisado y purificación “tipo A” y solubilización con tampón carbonato-NaCl pH=10 (ver la sección de material y métodos).

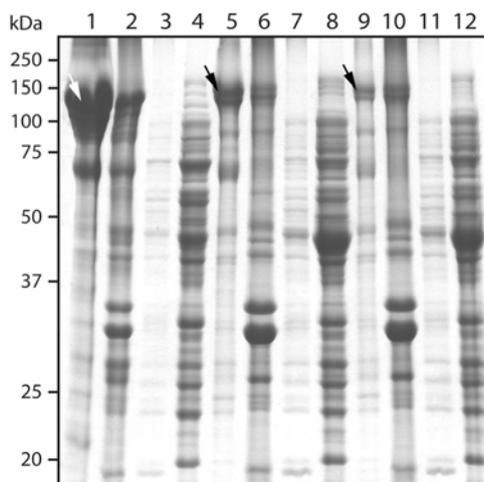


Figura 5.11 Electroforesis SDS-PAGE de la solubilización de las proteínas Cry1Ab, $\alpha\text{-gfp-Cry1Ab}_{28}$ y $\alpha\text{-gfp-Cry1Ab}_{57}$. Se muestran muestras tomadas durante el proceso de lisado y solubilización correspondientes a Cry1Ab (carriles 1-4), $\alpha\text{-gfp-Cry1Ab}_{28}$ (5-8) y $\alpha\text{-gfp-Cry1Ab}_{57}$ (9-12): proteína solubilizada (1,5,9), sedimento posterior a la solubilización (2,6,10), sobrenadante del primer lavado de los cuerpos de inclusión (3,7,11) y sobrenadante tras la lisis celular (4,8,12). Las flechas indican la proteína solubilizada correspondiente. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

Las siguientes variantes producidas fueron $\alpha\text{-gfp-Cry1Ab}_{28\text{-trunc}}$ (“variante 28-T”) y Cry1Ab-trunc- $\alpha\text{-gfp}$ (“variante INV”, de “inversa”, al disponer del anticuerpo V_{HH} anti-GFP en el extremo C-terminal, a diferencia de las variantes anteriores) (Figuras 5.3, 5.10). La variante 28-T se obtuvo a partir de la 28 por truncado del extremo C-terminal de Cry1Ab a la altura del aa Glu⁶¹², posición que corresponde aproximadamente al final del dominio III de la toxina activa (Grochulski et al., 1995; Schnepf et al., 1998). Los

análisis preliminares llevados a cabo con estas dos variantes mostraron una respuesta a la solubilización y/o al cultivo diferente con respecto a las proteínas anteriores (Cry1Ab, 28, 57). Por ello, se llevaron a cabo una serie de ensayos para optimizar estos parámetros. En primer lugar se analizó la inducción por IPTG de las proteínas recombinantes en *E. coli*. Como se muestra en la figura 5.12, el análisis por electroforesis y Western-Blot (detección del antígeno Cry1Ab) sugiere que la adición de IPTG no contribuyó significativamente a la producción de toxina recombinante. Por otro lado, este análisis permitió confirmar que el peso molecular observado de las variantes 28-T e INV se correspondió con lo esperado (Tabla 5.6), aunque para ambas variantes se detectaron polipéptidos adicionales de menor peso molecular (entre 50 y 75 kDa). Las bandas detectadas por debajo de 37 kD mediante el análisis Western-Bot corresponden a la unión inespecífica del anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab a proteínas de la cepa XL-1 Blue de *E. coli*, como se demuestra más adelante (Figura 5.15 C. carril 7).

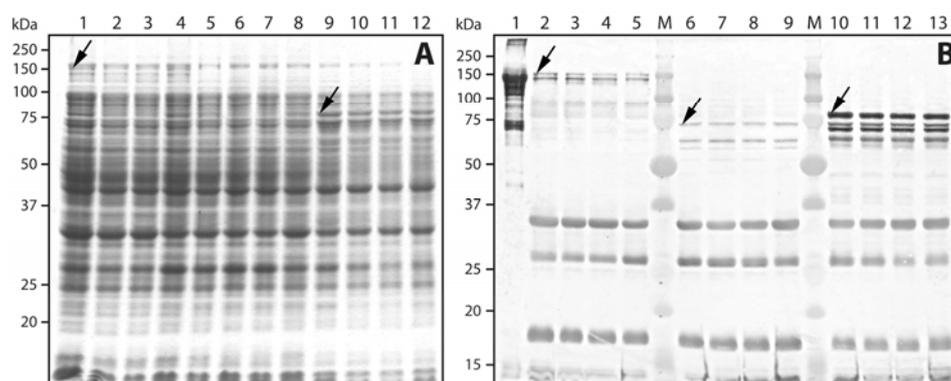


Figura 5.12 Electroforesis SDS-PAGE (A) y Western-Blot (B) de cultivos de las cepas recombinantes de *E. coli* p- α -gfp-Cry1Ab_28 (28), p- α -gfp-Cry1Ab_28-trunc (28-T) y p-Cry1Ab-trunc- α -gfp (INV) suplementados con dosis crecientes de IPTG. A) Electroforesis SDS-PAGE de sedimentos de cultivo de "28" (carriles 1-4), de "28-T" (5-8) e "INV" (9-12); sin IPTG (1,5,9) y con IPTG 0.1 mM (2,6,10), 0.5 mM (3,7,11) y 1 mM (4,8,12). B) Western-Blot anti-Cry1Ab de la proteína Cry1Ab solubilizada (1) y sedimentos de cultivo de "28" (carriles 2-5), "28-T" (6-9) e "INV" (10-13); sin IPTG (2,6,10) y con IPTG 0.1 mM (3,7,11), 0.5 mM (4,8,12) y 1 mM (5,9,13). Las flechas indican la proteína recombinante correspondiente. Se utilizaron los marcadores de peso molecular (M) Precision Plus Protein Standard (gel A) y Precision Plus Protein Standard Dual Color (gel B) (Bio-Rad, EEUU).

Paralelamente se efectuaron pruebas de solubilización con tampones a distintos pHs (pH=8, 10, 12) (Figura 5.13). La solubilización de la variante 28 fue óptima mediante los

tres tampones, aumentando el rendimiento con los pHs más altos. Para la variante 28-T, la producción de cuerpos de inclusión fue muy escasa, además los extractos solubles obtenidos con los tres tampones presentaron baja pureza y la proteína 28-T no pudo ser identificada en gel. En cuanto a la variante INV, si bien la producción de proteína recombinante agregada en forma de cuerpos de inclusión fue muy elevada (Figura 5.13 carriles 13, 15, 17; Figura 5.14), la solubilización fue insuficiente con los tres tampones.

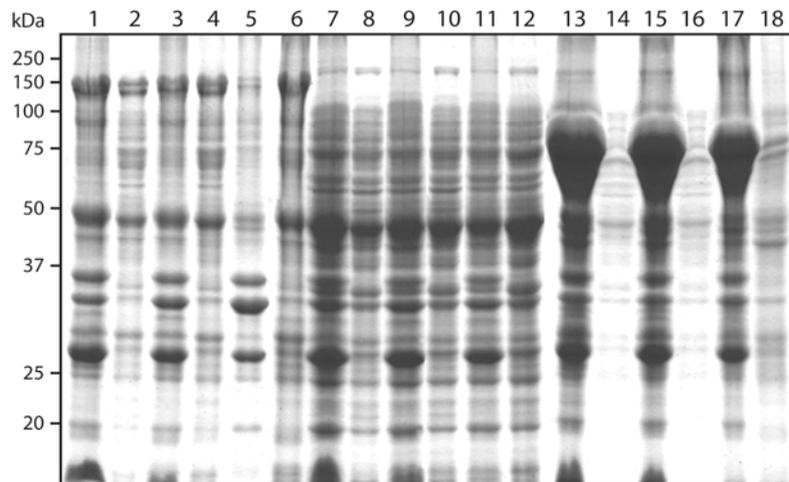


Figura 5.13 Electroforesis SDS-PAGE de la solubilización de las proteínas recombinantes α -gfp-Cry1Ab_28, α -gfp-Cry1Ab_28-trunc y Cry1Ab-trunc- α -gfp a diferentes pHs. Se utilizaron 3 tampones a pH=8 (NaHCO_3 50 mM, NaCl 100 mM y DTT 10 mM, pH ajustado con HCl) (carriles 1,2,6,7,13,14), pH=10 (NaHCO_3 50 mM, NaCl 100 mM y DTT 10 mM) (3, 4, 9, 10, 15, 16) y pH=12 (Na_2PHO_4 50 mM, pH ajustado con NaOH 10 N, DTT 10 mM) (5,6,11,12,17,18). Se muestran los sedimentos posteriores a la solubilización (carriles impares) junto con el producto de solubilización (pares) para cada una de las variantes, 28 (1-6), 28-T (7-12) e INV (13-18). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

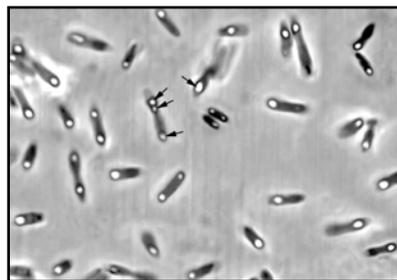


Figura 5.14 Microscopía de contraste de fase del cultivo de la cepa p-Cry1Ab-trunc- α -gfp de *E. coli*. Las flechas indican los cuerpos de inclusión de la proteína Cry1Ab-trunc- α -gfp.

En la siguiente fase, las variantes 28-T e INV, que hasta el momento no habían sido procesadas adecuadamente con el protocolo estándar, fueron analizadas independientemente. Los factores limitantes en la obtención de la variante **28-T** fueron la poca producción de cuerpos de inclusión y el bajo grado de purificación de éstos al aplicar el protocolo estándar (tipo A). Con respecto al cultivo, el incremento de la temperatura de incubación de 28°C a 37°C y la extensión de su duración de 4 a 6 días logró una ligera mejoría en la producción de cuerpos de inclusión (Figura 5.15 A). Así mismo, la aplicación de un nuevo protocolo (protocolo “tipo B”, ver sección material y métodos) mejoró la purificación de sus cuerpos de inclusión (Figura 5.15 B, carril 4).

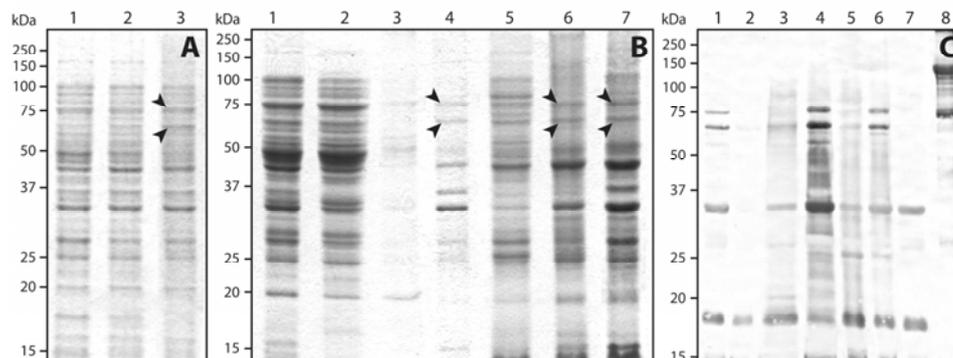


Figura 5.15 Ensayos de optimización de la producción y solubilización de la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28-trunc. A) Electroforesis SDS-PAGE de sedimentos de cultivo en obtenidos en diferentes condiciones: cultivo 6 días a 28°C (carril 1); 1 día a 37°C + 5 días a 28°C (2); 6 días a 37°C (3). B) Electroforesis SDS-PAGE de muestras tomadas durante el proceso de purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión: sedimento de cultivo durante 6 días a 37°C (1); sobrenadante tras la lisis celular (2); sobrenadante del primer lavado (3); sedimento previo a la solubilización (4); sobrenadante de solubilización con tampón NaHCO₃ 50 mM pH=10, NaCl 100 mM y DTT 10 mM (5); solubilizado con NaHCO₃ 50 mM pH=10.5, NaCl 100 mM, urea 8 M y DTT 10 mM (6); solubilizado con CAPS 50 mM pH=11, N-laurilsarcosina 0.3% y DTT 10 mM (7). C) Western-Blot anti-Cry1Ab de muestras tomadas durante el proceso de purificación y solubilización de los cuerpos de inclusión (las muestras de los carriles 1-6 son idénticas a las de los mismos carriles en la figura B); sedimento de cultivo de la cepa *E. coli* XL1-Blue (7); proteína Cry1Ab solubilizada (8). Las flechas indican los polipéptidos relativos a la proteína α -gfp-Cry1Ab_28-trunc. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standard (A, B) y Precision Plus Protein Standard Dual Color (C) (Bio-Rad, EEUU).

En estas condiciones, se evaluó la solubilización de los cuerpos de inclusión de 28-T con tres tampones, el tampón carbonato-NaCl (pH=10) y dos tampones desnaturalizantes (Figura 5.15; ver apartado 5.2.3.2.1). La solubilización de la proteína 28-T se produjo

únicamente con los tampones desnaturizantes; no obstante, la abundancia relativa de esta proteína con respecto al resto de proteínas de *E. coli* en dichos extractos fue muy baja y por ello éstos no fueron utilizados en ensayos posteriores.

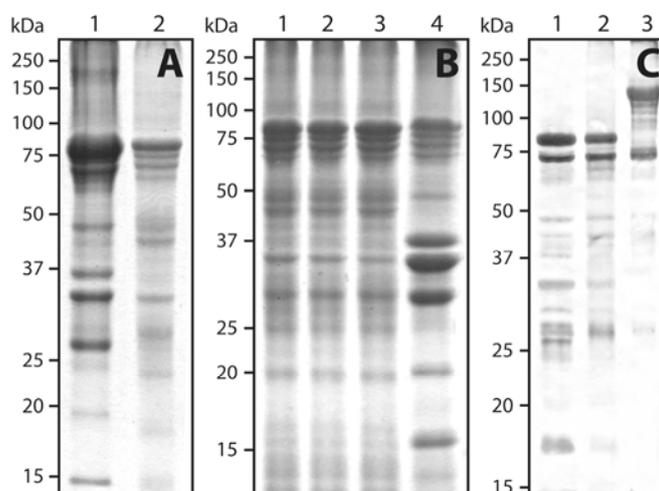


Figura 5.16 Ensayos de optimización de la solubilización de la proteína recombinante Cry1Ab-trunc- α -gfp.

A) Electroforesis SDS-PAGE del sedimento posterior a la solubilización con tampón carbonato-NaCl-urea 8 M (NaHCO_3 50 mM pH=10.5, NaCl 100 mM, urea 8 M y DTT 10 mM) (carril 1) y el sobrenadante de dicha solubilización (2). B) Electroforesis SDS-PAGE de muestras tomadas durante el proceso de renaturalización: proteína en tampón urea 8 M (1); en tampón urea 2 M (2); en tampón de renaturalización carbonato-NaCl (sin DTT) (3); sedimento precipitado tras la renaturalización (4). C) Western-Blot anti-Cry1Ab del sedimento de cultivo (1), la proteína renaturalizada (2) y la proteína Cry1Ab solubilizada (3). Se utilizaron los marcadores de peso molecular Precision Plus Protein Standard (A, B) y Precision Plus Protein Standard Dual Color (C) (Bio-Rad, EEUU).

Los factores limitantes en la obtención de la variante **INV** fueron el insuficiente grado de purificación de sus cuerpos de inclusión al aplicar el protocolo estándar (tipo A) y su baja solubilidad en tampones no desnaturizantes. Estos factores fueron optimizados con la aplicación del ya citado protocolo de lisado y purificación tipo B, y la solubilización con el tampón desnaturizante carbonato-NaCl-urea seguida de un protocolo de renaturalización de la proteína (ver sección 5.2.3.2.1) (Figura 5.16). Finalmente se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 50 μg de proteína renaturalizada por ml de cultivo de partida.

5.3.4 Bioensayos con toxinas recombinantes

5.3.4.1 Bioensayos sobre *Drosophila melanogaster*

Se ensayaron dos tipos de extractos de los cultivos de las cepas recombinantes así como de la cepa original productora de la protoxina Cry1Ab: proteínas solubilizadas y lisados celulares (ver apartado 5.2.3.2.1). Los porcentajes de pupación de larvas de *D. melanogaster* procedentes del cruce *GAL4-ENDO*×*UAS-GFP* (larvas productoras de GFP en el intestino) y de la línea *GAL4-ENDO* (control negativo) tratadas con extractos de toxinas recombinantes (en sus dos formas) fueron en todos los casos superiores al 80%, y muy similares a los controles (dieta + tampón o protoxina Cry1Ab) (Figura 5.17).

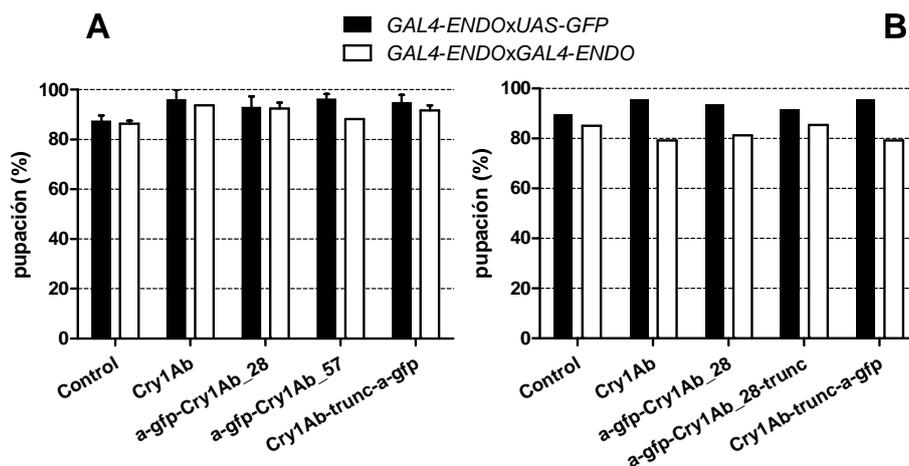


Figura 5.17 Actividad de proteínas recombinantes sobre larvas neonatas de *D. melanogaster*. Las proteínas fueron administradas como: A) proteína solubilizada (250 µg/ml de dieta); o B) cuerpos de inclusión (proteína insoluble y restos celulares obtenidos por lisado y purificación del cultivo; al 3% p/p, sedimento/dieta). El eje de las ordenadas indica el porcentaje de larvas que alcanzaron el estadio de pupa tras 7 días. Se ensayaron 48 larvas por tratamiento y por ensayo, en dos ensayos independientes (A, las barras de error indican el error estándar de la media) o en un único ensayo (B). Las barras llenas se refieren a larvas procedentes del cruce entre las líneas *GAL4-ENDO* y *UAS-GFP*; las barras vacías a larvas de la línea *GAL4-ENDO*.

5.3.4.1 Bioensayos sobre *Sesamia nonagrioides*

Las variantes 28 y 57, junto con la protoxina Cry1Ab fueron ensayadas contra larvas neonatas del lepidóptero *S. nonagrioides* a una dosis discriminante de 500 ng/cm². La mortalidad registrada para la proteína Cry1Ab (control positivo) y la proteína recombinante 28 fueron del 100% tras el periodo de ensayo (Figura 5.18). En cambio, el

tratamiento con la variante 57 (mortalidad corregida 5.3%) no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) respecto al tratamiento control. Igualmente, no se detectaron efectos significativos sobre el desarrollo de las larvas (datos no mostrados).

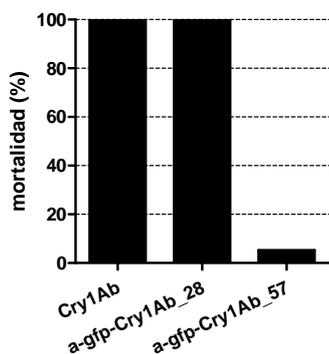


Figura 5.18 Actividad de proteínas recombinantes solubilizadas sobre larvas neonatas de *S. nonagrioides*. El eje de las ordenadas indica la mortalidad tras 7 días de ensayo, corregida por la fórmula de Abbott (Abbott, 1925). Se ensayaron 32 larvas por tratamiento. La concentración de proteína aplicada fue de 500 ng/cm².

5.3.5 Propiedades de unión de toxinas recombinantes

La unión de las proteínas recombinantes producidas a la membrana epitelial de *D. melanogaster* fue estudiada mediante una serie de ensayos *in vitro*. Para ello, se aplicó un protocolo específico para la obtención de BBMV de *D. melanogaster*, tanto de la línea *GAL4-ENDO* como de larvas procedentes del cruce *GAL4-ENDO*×*UAS-GFP* (Figura 5.19). El rendimiento de purificación de las BBMVs fue muy similar en ambas fuentes y aproximadamente de 350 µg de proteína por g de larva.

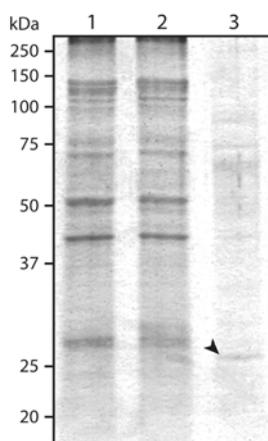


Figura 5.19 Electroforesis SDS-PAGE de proteínas de BBMVs de *D. melanogaster* y un extracto celular con GFP. BBMVs de larvas *GAL4-ENDO*×*UAS-GFP* (carril 1, 10 µg); BBMVs de larvas *GAL4-ENDO* (carril 2, 10 µg); extracto con GFP (carril 3, 1 µg). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína GFP. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU).

El primer tipo de ensayo llevado a cabo tuvo como objeto evaluar la capacidad de unión de las proteínas recombinantes desnaturalizadas e inmovilizadas en membrana a un extracto de GFP soluble (ver el apartado 5.2.4). En estas condiciones, todas las variantes producidas mostraron unión a GFP, como se reflejó en los análisis Western-Blot de detección de GFP realizados con un anticuerpo anti-GFP comercial (Figura 5.20). Por el contrario, como se esperaba, la proteína Cry1Ab nativa no mostró capacidad de unión. Adicionalmente, este ensayo permitió confirmar la presencia de la proteína GFP en BBMV de larvas *GALA-ENDO*×*UAS-GFP* y no en larvas *GALA-ENDO*; sin embargo, la señal detectada fue baja en relación con la del extracto soluble con GFP utilizado en los ensayos (Figura 5.20 B, carriles 6-8). El análisis densitométrico conjunto de los geles de electroforesis SDS-PAGE (Figura 5.19, carril 3) y el Western-Blot (Figura 5.20, 6 y 8) permitió estimar la abundancia relativa de la proteína GFP en el extracto proteico de BBMV de larvas *GALA-ENDO*×*UAS-GFP* en un 0.15 % (1.5 ng de GFP por µg de proteína total).

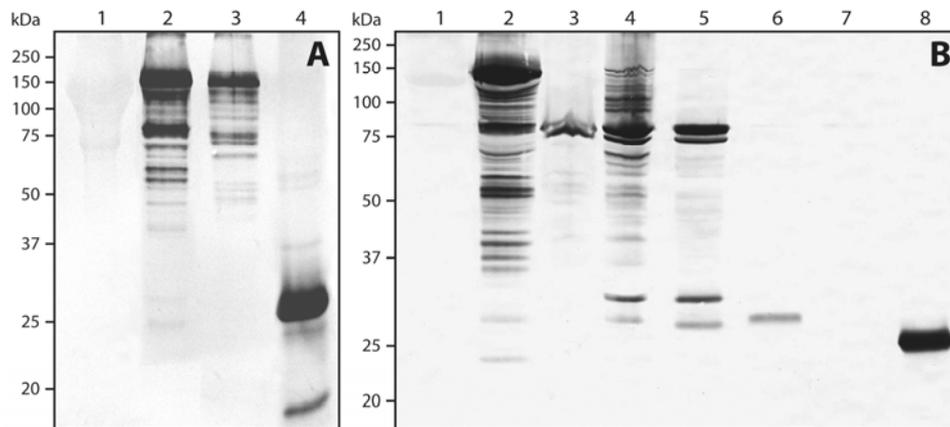


Figura 5.20 Análisis Western-Blot de detección de la unión de GFP a proteínas recombinantes y presencia de GFP en extractos intestinales (BBMVs) de *D. melanogaster*. A) protoxina solubilizada Cry1Ab (carril 1, 10 µg); α -gfp-Cry1Ab₂₈ solubilizada (2, 5 µg); α -gfp-Cry1Ab₅₇ solubilizada (3, 5 µg); extracto con GFP (4, 1.5 µg). B) protoxina solubilizada Cry1Ab (carril 1, 5 µg); α -gfp-Cry1Ab₂₈ solubilizada (2, 10 µg); sedimento de cuerpos de inclusión de Cry1Ab₂₈-trunc (3); sedimento de cuerpos de inclusión de Cry1Ab-trunc- α -gfp (4); Cry1Ab-trunc- α -gfp solubilizada y renaturalizada (5, 10 µg); proteína de BBMV de larvas *GALA-ENDO*×*UAS-GFP* (6, 10 µg); ; proteína de BBMV de larvas *GALA-ENDO* (7, 10 µg); extracto con GFP (8, 1 µg). El anticuerpo primario utilizado fue anti-GFP (Roche Applied Science, Alemania). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad, EEUU).

Una vez demostrado que las proteínas recombinantes eran capaces de unirse al antígeno (GFP) en estado desnaturalizado (tras electroforesis SDS-PAGE y transferencia a membrana), el siguiente propósito fue evaluar su capacidad de unión en condiciones nativas (es decir, conservando su estructura terciaria). Para ello, se diseñaron dos experimentos: primero, la unión de las proteínas nativas a BBMV's de *D. melanogaster* en suspensión (Figura 5.21 A) y, segundo, la unión de las proteínas nativas a proteínas de BBMV's desnaturalizadas e inmovilizadas (Figura 5.21 B, C, D).

Ambos experimentos se llevaron a cabo como se detalla en el apartado 5.2.4.2. Los resultados del primer experimento mostraron que ninguna de las dos proteínas recombinantes ensayadas (α -gfp-Cry1Ab_28 y Cry1Ab-trunc- α -gfp) se unió específicamente a BBMV's de larvas *GAL4-ENDO* \times *UAS-GFP* (con GFP), en las condiciones de ensayo. La detección de proteína en las BBMV's (Figura 5.21 A, 4-6 y 8-10) se produjo tanto para las larvas que expresaban GFP como para aquellas que no lo hacían, y además para la protoxina Cry1Ab (sin anticuerpo). Esto sugiere que la detección registrada fue debida a la unión inespecífica de estas proteínas. Los resultados del segundo experimento mostraron que las proteínas recombinantes en estado nativo tampoco se unieron a la proteína GFP desnaturalizada contenida en las BBMV's de larvas *GAL4-ENDO* \times *UAS-GFP*, ni tampoco a aquella presente en los extractos solubles, en las condiciones de ensayo (Figura 5.21 C, D).

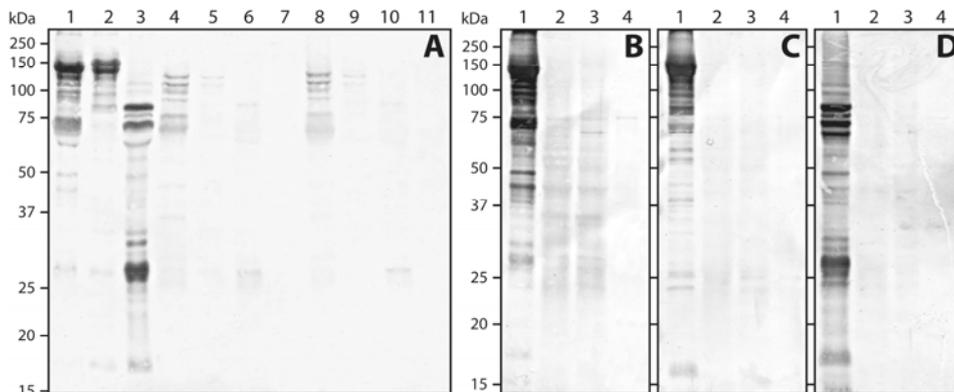


Figura 5.21 Análisis Western-Blot de detección de la unión de las proteínas recombinantes α -gfp-Cry1Ab_28 (28) y Cry1Ab-trunc- α -gfp (INV) a BBMV's de *D. melanogaster*. Se muestran dos experimentos independientes. A) Unión de las proteínas solubilizadas a BBMV's de *D. melanogaster* no desnaturalizadas y en suspensión: protoxina Cry1Ab (carril 1, 2 μ g); proteína α -gfp-Cry1Ab_28 (2, 2 μ g); proteína

renaturalizada Cry1Ab-trunc- α -gfp (3, 4 μ g); BBMV de *GALA-ENDO* \times *UAS-GFP* preincubadas con Cry1Ab (4, 20 μ g); idem con gfp-Cry1Ab_28 (5, 20 μ g); idem con Cry1Ab-trunc- α -gfp (6, 20 μ g); BBMV de *GALA-ENDO* \times *UAS-GFP* (7, 20 μ g); carriles 8, 9, 10, 11 con el mismo tratamiento que 5, 6, 7, 8, respectivamente, pero con BBMV de la línea *GALA-ENDO*. Imágenes B, C, D) Unión de las proteínas solubilizadas Cry1Ab (A), gfp-Cry1Ab_28 (B) y Cry1Ab-trunc- α -gfp (C) a muestras desnaturalizadas e inmovilizadas en membrana: proteína solubilizada (carril 1; 2 μ g en B,D; 4 μ g en C); BBMV de *GALA-ENDO* \times *UAS-GFP* (2, 20 μ g); BBMV de *GALA-ENDO* (3, 20 μ g); extracto soluble con GFP (4, 0.5 μ g). En todos los casos, la detección se realizó a partir del anticuerpo primario anti-Cry1Ab. Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad, EEUU).

5.3.6 Procesamiento proteolítico de la proteína α -gfp-Cry1Ab_28

El procesamiento proteolítico de la variante proteica 28 (α -gfp-Cry1Ab_28) se estudió en comparación a la protoxina Cry1Ab. Se utilizaron tres fuentes de proteasas diferentes: tripsina comercial, extractos intestinales solubles de larvas de *S. nonagrioides* y larvas de *D. melanogaster*.

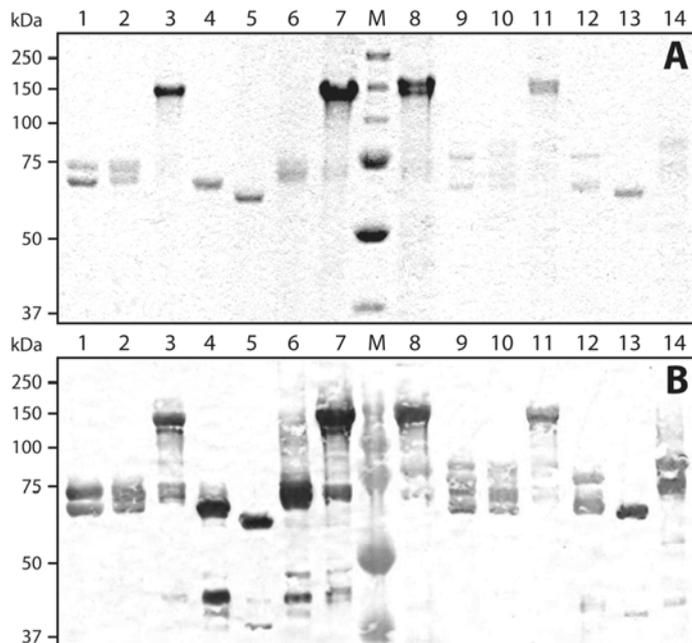


Figura 5.22 Degradación proteolítica de la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28 y la protoxina Cry1Ab. A) Electroforesis SDS-PAGE de: Cry1Ab, 5 min con tripsina (carril 1, 1.7 μ g antes de digestión [a.d.]); Cry1Ab, 5 min con extractos de *S. nonagrioides* (2, 1.7 μ g a.d.); Cry1Ab, 5 min con extractos de *D. melanogaster* (3, 1.7 μ g a.d.); Cry1Ab, 20 h con tripsina (4, 1.7 μ g a.d.); Cry1Ab, 20 h con extractos de *S. nonagrioides* (5, 1.7 μ g a.d.); Cry1Ab, 20 h con extractos de *D. melanogaster* (6, 1.7 μ g a.d.); protoxina

Cry1Ab (7, 3 μ g); proteína α -gfp-Cry1Ab_28 (8, 3 μ g); los carriles 9-14 presentan las mismas condiciones que los carriles 1-6, en ese orden, pero con la proteína α -gfp-Cry1Ab_28 como sustrato. B) Western-Blot anti-Cry1Ab de las muestras del gel A, en las mismas condiciones y el mismo orden. Se utilizaron los marcadores de peso molecular (M) Precision Plus Protein Standard (gel A) y Precision Plus Protein Standard Dual Color (gel B) (Bio-Rad, EEUU).

Proteínas y proteasas fueron incubadas durante 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h y 20 h. La electroforesis SDS-PAGE de los productos de digestión en las dos condiciones extremas, 5 min y 20 h, se muestra en la figura 5.22. La actividad enzimática de las diferentes fuentes de proteasas no fue normalizada en este ensayo, esto se refleja en que la proteólisis de las proteínas 28 y Cry1Ab fue mucho más lenta cuando éstas fueron expuestas a extractos de *D. melanogaster*. No obstante, tras 20 horas de digestión se apreció un notable procesamiento proteolítico en todos los casos. Cabe destacar que los productos de digestión de cada proteína fueron altamente dependientes de la fuente de proteasas. En el caso de la variante recombinante 28, la digestión (tras 20 h) con extractos de *S. nonagriodes* produjo un polipéptido mayoritario de aproximadamente 60 kDa, similar a la toxina Cry1Ab activada con los mismos extractos (Figura 5.22 A y B, carriles 5 y 13). El peso molecular de este polipéptido fue mucho menor que el producto de digestión esperado para esta proteína (79 kDa, Tabla 5.6), esto sugiere que este digerido podría haber perdido el anticuerpo V_{HH} anti-GFP. Algunos de los polipéptidos producto de la digestión con tripsina comercial y extractos de *D. melanogaster*, sin embargo, mostraron un peso molecular aparente en el rango esperado (79-85 kDa, Figura 5.22 A-B, 12 y 14).

Con objeto de determinar si la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28 una vez digerida mantenía la capacidad de unión a GFP *in vitro*, se llevó a cabo un ensayo Western-Blot (como se ha descrito en el apartado 5.2.4.1) con las proteínas Cry1Ab y 28, y sus respectivos productos de tripsinización (Figura 5.23). Como se esperaba, la protoxina y toxina Cry1Ab no mostraron unión específica anti-GFP, como sí ocurrió con la proteína 28. El producto de la digestión trípica de esta proteína consistió en dos polipéptidos de 79 y 64 kDa (Figura 5.23, carril 4), que coincidieron con los detectados en el ensayo anterior (Figura 5.22, carril 12), aunque con una abundancia relativa entre ambos diferente. Esta divergencia pudo ser debida a que, en este ensayo, la digestión se efectuó en otro tampón de reacción (Tris 20 mM, pH=8). El polipéptido mayoritario de 64 kDa

perdió la capacidad de unión a GFP (la señal detectada fue inespecífica), mientras que la proteína activada de 79 kDa sí la conservó, además su peso molecular aparente coincidió con lo esperado para esta variante (Tabla 5.6).

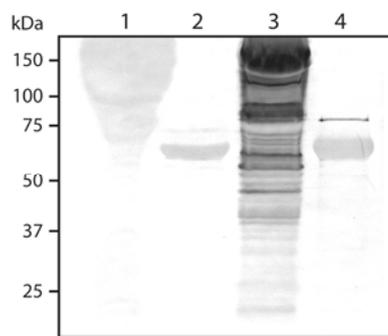


Figura 5.23 Análisis Western-Blot de detección de la unión de GFP a la proteína recombinante α -gfp-Cry1Ab_28 (28) y al producto de su digestión con tripsina. Protoxina Cry1Ab (carril 1, 15 μ g); toxina Cry1Ab (2, 15 μ g antes de digestión); proteína solubilizada 28 (3, 15 μ g); proteína digerida 28 (4, 15 μ g antes de digestión). Digestión: 2 mg/ml de proteína en tampón Tris 20 mM pH=8, tripsina 10 % (p/p), 2 h de incubación a 37°C. El anticuerpo primario utilizado fue anti-GFP (Roche Applied Science, Alemania). Se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad, EEUU).

5.4 Discusión

El estudio del proteoma intestinal de *C. capitata*, en concreto de BBMV de adultos de esta especie, ha permitido determinar que existe una considerable abundancia de proteínas en sus membranas epiteliales, se han detectado al menos 160 proteínas diferentes, mayoritariamente ácidas ($pI < 7$) y en un rango de 25-100 kDa. En este trabajo, de forma preliminar, se seleccionaron 11 de estos polipéptidos para proceder a su eventual identificación. Los métodos de identificación empleados, el análisis de la huella peptídica y la fragmentación MS-MS, se sustentan en la búsqueda de homología con otras proteínas existentes que ya han sido secuenciadas y publicadas en bases de datos. Este es un factor limitante en la identificación de proteínas de especies que, como *C. capitata* u otros tefrítidos, disponen de muy poca información en bases de datos. A excepción de unas pocas especies como *D. melanogaster* o *A. gambiae*, en general existe poca información acerca del proteoma de los insectos. Por este motivo, solo algunas de las proteínas analizadas pudieron ser identificadas con suficiente fidelidad. Cabe destacar la identificación de las V-ATPasas subunidades A y B (Tabla 5.3, puntos 9 y 10); estas proteínas han sido descritas como potenciales receptores a toxinas Cry en trabajos previos (Bayyareddy et al., 2009; Krishnamoorthy et al., 2007). Además, un estudio de proteómica describió que éstas se sobreexpresaron en una colonia de *P. interpunctella* resistente a Cry1Ac, en relación a la colonia susceptible (Candas et al., 2003). Las V-

ATPasas, o ATPasas tipo vacuolar, no son exclusivas de la vacuola sino que también se hallan en las membranas plasmáticas, donde ejercen un papel importante en el mantenimiento de los potenciales de membrana (Wieczorek et al., 1999). Otras proteínas identificadas en este estudio fueron las α -tubulinas (Tabla 5.3, punto 11), proteínas constituyentes de los microtúbulos del citoesqueleto que, como las actinas, pueden interactuar con la membrana plasmática (Sonesson y Widell, 1998). Es interesante mencionar que otro de los polipéptidos analizadas mostró similitud, aunque no significativa, con la flotilina-1 (Tabla 5.3, punto 3). Esta proteína es un elemento estructural de las regiones de la membrana denominadas balsas lipídicas y actúa anclando dichas regiones al citoesqueleto de actinas (Langhorst et al., 2007). Al igual que otras proteínas de función similar, las prohibitinas, estas proteínas han sido identificadas como potenciales receptores de toxinas Cry (Bayyareddy et al., 2009).

En el segundo gran apartado de este capítulo, se ha descrito la puesta en marcha de una aproximación que tiene como propósito último el control de plagas de gran importancia económica poco susceptibles a la acción de las proteínas Cry, en particular de *C. capitata*, o de plagas susceptibles que hayan desarrollado resistencia a alguna de estas toxinas. Se ha ideado y puesto en práctica un sistema modelo que, en síntesis, consta de dos elementos: larvas transgénicas de *D. melanogaster* que expresan GFP en el intestino y proteínas quiméricas obtenidas a partir del anticuerpo recombinante V_{HH} anti-GFP y la protoxina de *B. thuringiensis* Cry1Ab. En cuanto al primer elemento, el insecto diana, se ha caracterizado la expresión de GFP a lo largo de su desarrollo; la expresión de esta proteína en el intestino se produjo prácticamente durante toda la fase larvaria aunque estuvo únicamente localizada en pequeñas porciones de la parte inicial del intestino medio. En relación al segundo elemento del sistema, se obtuvieron 4 variantes proteicas por la fusión del anticuerpo recombinante V_{HH} anti-GFP y diferentes secciones de la protoxina Cry1Ab establecidas de acuerdo a los sitios clave del proceso de activación de esta protoxina, previamente descritos. Dos de las variantes obtenidas mostraron propiedades de solubilidad muy diferentes a las de la protoxina nativa Cry1Ab, α -gfp-Cry1Ab_28-trunc (“28-T”) y Cry1Ab-trunc- α -gfp (“INV”). Precisamente, en estas dos variantes la mitad C-terminal de la protoxina Cry1Ab fue truncada. Se sabe que esta parte de la proteína Cry1Ab no interviene en su toxicidad (ya que es procesada proteolíticamente de forma natural durante el mecanismo de acción) y es por ello que fue

truncada; sin embargo, como ya se ha mencionado en otros apartados, esta región cumple un papel fundamental en el proceso de cristalización y solubilización de la protoxina (Agaïsse y Lereclus, 1995; Baum y Malvar, 1995). En este trabajo, la eliminación del extremo C-terminal en las proteínas recombinantes afectó negativamente su solubilidad.

El bioensayo de las 4 proteínas recombinantes producidas, tanto en su forma soluble como insoluble, no detectó actividad insecticida sobre larvas transgénicas de *D. melanogaster* productoras de GFP y, por lo tanto, la hipótesis de partida de este trabajo no pudo ser demostrada. El primer factor limitante que se ha determinado es que, aunque la “componente” Cry de la estructura las proteínas de fusión mantuvo su actividad biológica sobre el insecto susceptible *S. nonagrioides* (al menos, en la variante α -gfp-Cry1Ab_28), de acuerdo a los análisis de unión efectuados, las proteínas recombinantes ensayadas en su estado nativo (estructura terciaria conservada) no fueron capaces de unirse al GFP presente en la membrana epitelial de *D. melanogaster* (tanto en su estado nativo como desnaturalizado), ni tampoco al GFP soluble desnaturalizado a partir de un extracto celular (Figura 5.21). Éste es un aspecto clave, ya que sin unión *in vivo*, la respuesta esperada (formación de poros y muerte) no podría producirse. En cambio, todas las proteínas recombinantes obtenidas sí mostraron capacidad de unión a GFP cuando fueron desnaturalizadas y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Figura 5.20). El análisis conjunto de estos resultados sugiere que la conformación nativa de las proteínas recombinantes producidas impide que el anticuerpo tenga acceso y pueda unirse al antígeno GFP, mientras que cuando se altera su estructura en condiciones desnaturalizantes éste sí ejerce su función.

Existen otros factores en el sistema que *a priori* podrían contribuir a la falta de actividad que se ha observado, aunque la influencia de todos ellos está supeditada al factor limitante arriba mencionado. Los ensayos de proteólisis efectuados con de la variante α -gfp-Cry1Ab_28 mostraron que, dependiendo de la fuente de proteasas, la proteína digerida podría perder el anticuerpo y por tanto su función potencial (Figura 5.22). Esto fue observado únicamente cuando se utilizaron extractos intestinales de *S. nonagrioides* y no cuando la proteína recombinante se incubó con los extractos de la especie diana, *D. melanogaster*, cuyos productos de digestión mostraron un tamaño próximo a lo esperado. La digestión de la proteína recombinante con tripsina comercial produjo dos poblaciones

de polipéptidos unos que conservaron la capacidad de unión a GFP *in vitro* y otros que la perdieron (Figura 5.23). En todo caso, sería necesario profundizar más en este aspecto, especialmente en condiciones *in vivo*. Otro factor a tener en cuenta es que la disponibilidad de antígeno (GFP) *in vivo* en los intestinos de larvas de *D. melanogaster* podría no ser suficiente. El rendimiento de extracción de GFP en BBMV's de estas larvas fue muy bajo, se estimó en 1.5 ng de GFP por μg de proteína total. Otra evidencia a este respecto fue que la expresión de GFP estuvo muy localizada en pequeñas secciones del intestino medio de la larva y esto podría limitar considerablemente el efecto tóxico deseado en este estudio. De hecho, un trabajo realizado con el sistema GAL4-UAS y la misma línea conductora que se utilizó en este estudio, la línea *GAL4-ENDO*, demostró que la expresión del gen insertado en la línea respondedora (el gen de una cadherina del lepidóptero *Manduca sexta* L.) fue baja y aunque se cumplió el objetivo del estudio (inducir la toxicidad de Cry1Ac sobre *D. melanogaster* por la expresión del receptor de cadherina exógeno), éste se logró únicamente a dosis muy por encima de las necesarias en las especies susceptibles ($> 50 \mu\text{g/ml}$) (Gill y Ellar, 2002).

Los resultados aquí presentados deben interpretarse como un primer paso hacia el desarrollo de un nuevo sistema de producción de toxinas insecticidas “a la carta”. La obtención de nuevas variantes quiméricas con una mejor capacidad de unión a GFP *in vivo*, el ensayo de otras líneas transgénicas de *D. melanogaster*, la profundización en el estudio de la estabilidad estas construcciones, etc., son aspectos que contribuirían a poner a punto el método con el que confirmar definitivamente la validez del sistema.

La aplicación del sistema propuesto supondría una herramienta muy poderosa en el control de plagas ya que permitiría el desarrollo de toxinas virtualmente específicas para cualquier plaga. Además, actualmente, según la legislación vigente en España (LEY 9/2003, REAL DECRETO 178/2004), el uso de estas proteínas de fusión purificadas no sería considerado OGM y por tanto el proceso de registro comercial sería relativamente rápido.

6. DISCUSIÓN GENERAL

La primera fase en cualquier programa que tenga como objetivo evaluar el potencial de *B. thuringiensis* para el control de un insecto plaga es la explotación de la biodiversidad natural mediante la búsqueda de cepas nativas con propiedades insecticidas sobre la especie diana (Alberola et al., 1999; Chak et al., 1994; Hernández et al., 2005; Ibarra et al., 2003; Itoua-Apoyolo et al., 1995; Karamanlidou et al., 1991; Mohan et al., 2008; Monnerat et al., 2007). En este trabajo se describe un esfuerzo sin precedentes en la prospección de cepas nativas de *B. thuringiensis* y la identificación de cepas con alto potencial insecticida sobre *C. capitata*, la mosca mediterránea de la fruta, la principal plaga de la fruticultura a nivel mundial (Davies et al., 1999). Sin embargo, en las condiciones de ensayo (extractos crudos de cultivo), a pesar de la enorme cantidad de cepas ensayadas (más de 900, de distintos orígenes) ninguna muestra una actividad insecticida suficiente para controlar a *C. capitata*.

A pesar de que la búsqueda de un agente de control biológico de *C. capitata* ha resultado infructuosa por esta primera vía, los trabajos derivados de esta aproximación han aportado resultados de notable relevancia científica. Esta investigación ha puesto de manifiesto que el agroecosistema de los cítricos es un importante reservorio de *B. thuringiensis*, tanto por la abundancia como por la diversidad de cepas presentes. Algunos de los índices que reflejan dicha riqueza, el porcentaje de muestras con presencia de *B. thuringiensis* o el índice Bt, han mostrado en este trabajo niveles muy por encima de lo reportado en la mayoría de estudios efectuados en este campo, con valores muy similares a los índices más altos registrados (Bravo et al., 1998; Ejiófor y Johnson, 2002). Al margen de sus implicaciones ecológicas, esta evidencia apunta a que dicho agroecosistema puede ser una fuente muy interesante de aislados de *B. thuringiensis* con potencial para el control de plagas, a nivel general, tanto mediante la explotación de la colección desarrollada en nuestro estudio (colección IVIA, de 376 cepas) como por el aislamiento de nuevas colecciones. La intensa caracterización molecular efectuada sobre la colección IVIA ha permitido identificar al menos 10 combinaciones de genes de δ -endotoxinas diferentes. Se obtuvo una elevada frecuencia de genes de las familias *cry1* y *cry2*, como es habitual en la mayoría de colecciones (Porcar y Juárez-Pérez, 2003), pero también se detectaron genes muy poco frecuentes en estudios anteriores, como un gen de la familia *cry27*, que, como se ha descrito, codifica para una nueva δ -endotoxina. Incluso más interesante, de los 39 perfiles electroforéticos identificados, es decir perfiles

asociados a la expresión de δ -endotoxinas, para más del 60% (24 perfiles) no se ha podido identificar ningún gen entre el amplio abanico de genes de δ -endotoxinas estudiados. Esta circunstancia refleja la posibilidad de que las cepas esta colección y, en extensión, de este agroecosistema muestren una gran diversidad de toxinas todavía no descritas, y por tanto, con nuevos espectros insecticidas.

Adicionalmente, desde el punto de vista experimental, este trabajo ha puesto a punto un nuevo método de caracterización genética de colecciones de *B. thuringiensis* por PCR. La principal ventaja esta aportación es que se trata de un método más simple y rápido que los protocolos habitualmente utilizados (Ben-Dov et al., 1997; Bravo et al., 1998; Carozzi et al., 1991; Cerón et al., 1995; Juárez-Pérez et al., 1997).

Con respecto al objetivo central de la tesis, la evaluación de *B. thuringiensis* como agente de control de *C. capitata*, en vista de que los extractos crudos de *B. thuringiensis* son virtualmente inocuos para la especie plaga, se consideró la necesidad de explorar otros métodos para inducir actividad insecticida a partir de preparados/derivados del entomopatógeno. La falta de actividad de dichos extractos crudos puede estar relacionada con diferentes fases del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas, que, como se sabe, es muy complejo (Schnepf et al., 1998). Los métodos propuestos en este estudio son pioneros en la búsqueda de estrategias biotecnológicas para el control de esta plaga y el abordaje se ha estructurado y aplicado siguiendo la secuencia de eventos asociados al mecanismo de acción de estas toxinas.

En una primera etapa, se incidió en la importancia de la solubilización de las protoxinas en el tracto intestinal de *C. capitata*. Se observó que de una selección de 41 cepas, las protoxinas de una de las subespecies, subsp. *israelensis*, muestran actividad biológica sobre larvas de *C. capitata* cuando éstas son previamente solubilizadas en condiciones *in vitro*. Esto sugiere que la solubilización de los cristales de estas cepas es pues insuficiente en el intestino de *C. capitata*, y que además, como ha ocurrido con otras especies de dípteros (Chilcott et al., 1998), esto parece estar relacionado con que el pH del tracto intestinal de *C. capitata* no es lo suficientemente alcalino.

La siguiente fase de estudio se centró en el papel de la activación proteolítica de las protoxinas. La predigestión de las protoxinas de Bti con distintas fuentes exógenas de proteasas da lugar a productos de digestión diferentes y a su vez produce un aumento de su actividad larvicida, siendo estadísticamente significativo (CL_{50} 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) cuando estas protoxinas son procesadas con extractos de *Culex pipiens*, una especie que de forma natural es susceptible a preparados de Bti (Goldberg y Margalit, 1977). Esto sugiere que el procesamiento que sufren las protoxinas de Bti en el intestino de *C. capitata* tampoco es el adecuado para promover su acción citotóxica, y que en cambio la incubación con proteasas del insecto susceptible sí que lo es, hasta cierto punto. En la literatura se han descrito varios casos en los que la predigestión de una(s) protoxina(s) con diferentes fuentes de proteasas altera su actividad sobre el huésped original (Haider et al., 1986; Ogiwara et al., 1992), sin embargo éste es el primer estudio en el que se demuestra que una cepa de *B. thuringiensis* adquiere una ganancia de actividad sobre una especie *a priori* moderadamente susceptible, como es *C. capitata*, cuando sus protoxinas son incubadas con proteasas del insecto diana de dicha cepa.

Del complejo de δ -endotoxinas producidas por las cepas Bti, Cyt1Aa es el componente mayoritario, y de acuerdo a los resultados presentados, una vez la protoxina es solubilizada, también es el factor determinante de la toxicidad observada con esta cepa sobre *C. capitata* (CL_{50} de la protoxina individual: 4.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Como se ha desarrollado en el capítulo correspondiente, de acuerdo a los datos obtenidos, la mortalidad esperada para los cristales solubilizados de la cepa 4Q1 (Bti) debería haber sido muy superior a lo que observamos en nuestros experimentos. Entre otros factores, este resultado sugiere que, contrariamente a lo que ocurre de forma natural en mosquitos (Bravo et al., 2007), en *C. capitata* puede producirse una interacción antagónica entre la protoxina Cyt1Aa y el resto de componentes del cristal de Bti. Sin embargo, dado que el presente trabajo no proporciona información sobre la susceptibilidad de *C. capitata* a otras protoxinas individuales de Bti, aparte de Cyt1Aa, la base bioquímica de una eventual interacción antagónica todavía no puede ser dilucidada. Desde el punto de vista de su aplicación, el descubrimiento más relevante de esta aproximación es haber identificado por primera vez una δ -endotoxina individual, Cyt1Aa, que presenta alta actividad larvicida sobre *C. capitata*. Sin embargo, las condiciones en las que ésta es activa (precisa de solubilización previa) y su limitada actividad biológica sobre adultos

(efectos subletales) restringen considerablemente su aplicación directa en campo, aunque se abre una vía para su eventual aplicación biotecnológica. El desarrollo de plantas transgénicas que expresen Cyt1Aa y contribuyan al control de *C. capitata* es técnicamente abordable, aunque la viabilidad económica y medioambiental de esta posibilidad debería ser fruto de un estudio específico.

De acuerdo al esquema sobre el que se ha articulado esta tesis, la siguiente etapa del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* sobre la cual se ha incidido a nivel experimental es la unión de las toxinas al epitelio intestinal. La única δ -endotoxina activa hallada contra *C. capitata* ha sido Cyt1Aa, este tipo de δ -endotoxina interactúa directamente con fosfolípidos de la membrana (Thomas y Ellar, 1983), a diferencia de las toxinas Cry que precisan de receptores específicos en el epitelio intestinal. Esta circunstancia sugiere que *C. capitata* carece de los receptores adecuados en su intestino, al menos para las proteínas Cry ensayadas. Por ello, este trabajo ha abordado esta fase del mecanismo de acción, la unión de las toxinas a receptores de membrana, mediante una estrategia alternativa consistente en desarrollar toxinas recombinantes cuya especificidad sobre la especie diana pueda ser inducida. Con objeto de validar esta estrategia se ha puesto a punto un sistema modelo con otra especie de insecto, *D. melanogaster*, modificada genéticamente para producir una proteína exógena en su epitelio intestinal, GFP. Paralelamente se han diseñado y producido 4 variantes proteicas recombinantes que conjugan en su estructura porciones de la protoxina Cry1Ab nativa con un anticuerpo de dominio único de tipo “camelbody”, específico contra GFP (V_{HH} anti-GFP). En esta fase de estudio, los bioensayos de estas proteínas sobre el organismo diana, *D. melanogaster GAL4-ENDO*×*UAS-GFP*, no han permitido confirmar la estrategia propuesta, ya que éstas no resultan tóxicas. La fracción Cry de alguna de las proteínas recombinantes desarrolladas sí mantiene su actividad biológica sobre un insecto susceptible, *S. nonagrioides*. En cambio, como se ha desarrollado en el capítulo correspondiente, la configuración espacial de estas proteínas de fusión parece impedir su unión efectiva al antígeno, GFP, y por lo tanto, la respuesta esperada, es decir, la formación de poros de membrana y la muerte del insecto, no se produjo.

Como se ha demostrado previamente, la fusión de toxinas Cry a otras proteínas, por ejemplo a la proteína D de la cabeza del fago λ , produce proteínas quiméricas que pueden

conservar la actividad biológica original de la toxina (Vílchez et al., 2004). Por otro lado, existen trabajos en los que la fusión de δ -endotoxinas, en concreto Cyt2Aa, a anticuerpos de cadena única (scFv) ha dado lugar a proteínas quiméricas que se unen específicamente a su antígeno, es decir, en las que la fracción anticuerpo conserva su actividad (Gurkan y Ellar, 2003a). Ambas evidencias, tomadas por separado, justifican la estrategia empleada en este estudio. La obtención de nuevas variantes quiméricas con una mejor capacidad de unión a GFP *in vivo*, el ensayo de otras líneas transgénicas de *D. melanogaster*, la profundización en el estudio de la estabilidad estas construcciones, etc., son aspectos que contribuirían a poner a punto el método con el que confirmar definitivamente la validez del sistema.

7. CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en el presente estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Prospección de la biodiversidad natural de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para la identificación de cepas activas sobre *Ceratitis capitata*:

- Se ha elaborado una colección de 376 cepas Bt aisladas y seleccionadas del agroecosistema de cítricos. Se aisló Bt a partir de aproximadamente el 80% de las muestras y se registró un índice Bt de 0.52
- Existe una gran diversidad de Bt en el agroecosistema cítrico. Se identificaron 5 tipos morfológicos de esporas y cristales; 39 perfiles SDS-PAGE; y genes de hasta 15 holotipos distintos de δ -endotoxinas en 10 combinaciones diferentes
- Los extractos de cultivo (esporas y cristales o sobrenadantes) de 905 cepas ensayadas han mostrado una actividad insecticida máxima sobre *C. capitata* del 30% de mortalidad
- Se ha descubierto un nuevo gen *cry*. El análisis parcial de su secuencia reflejó que dicho gen podría pertenecer a la familia *cry27*

2. Evaluación del efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de Bt sobre *C. capitata*:

- La solubilización de las protoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) induce su actividad biológica sobre larvas de *C. capitata*
- La incubación de las protoxinas solubilizadas de Bti con extractos intestinales del mosquito *Culex pipiens* aumenta significativamente su actividad insecticida sobre larvas de *C. capitata* (CL₅₀ 31.26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
- La protoxina Cyt1Aa (solubilizada) presenta la mayor actividad insecticida registrada en este estudio sobre larvas de *C. capitata* (CL₅₀ 4.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sobre adultos produce una reducción significativa de la fecundidad. Ésta es la primera vez que se identifica una δ -endotoxina única con toxicidad sobre *C. capitata*

3. Establecimiento de las bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas:

El estudio del proteoma intestinal de *C. capitata*, en concreto de BBMV de adultos de esta especie, ha permitido determinar que existe una considerable abundancia de proteínas en sus membranas epiteliales. Se han detectado al menos 160 proteínas diferentes, mayoritariamente ácidas ($pI < 7$) y en un rango de 25-100 kDa.

- El análisis de 11 de estos polipéptidos ha permitido identificar al menos 3 de ellos: V-ATPasa subunidades A y B, proteínas descritas como potenciales receptores a toxinas Cry, y α -tubulina.

La puesta a punto de un sistema modelo ha generado la información siguiente:

- La descendencia del cruce de las líneas transgénicas de *D. melanogaster* *GAL4-ENDO* y *UAS-GFP* expresa GFP en el intestino a lo largo de todo su desarrollo larvario aunque la expresión se localiza únicamente en porciones muy cortas de la parte inicial del intestino medio
- Se han producido 4 variantes proteicas a partir de la fusión de la región V_{HH} de un anticuerpo de cadena pesada específico contra GFP y de secciones de la protoxina Cry1Ab. La eliminación del extremo C-terminal de la protoxina en dos de estas variantes afectó negativamente su solubilidad
- La variante proteica α -gfp-Cry1Ab_28 conserva la actividad biológica de la protoxina Cry1Ab sobre el insecto susceptible *Sesamia nonagrioides*, sin embargo la variante α -gfp-Cry1Ab_57 la pierde
- Ninguna de las 4 proteínas recombinantes producidas muestra actividad insecticida sobre larvas transgénicas de *D. melanogaster* que expresan GFP en el intestino
- Las 4 proteínas recombinantes obtenidas muestran capacidad de unión a GFP cuando son desnaturizadas. En cambio, no muestran capacidad de unión en su estado nativo y ésta puede ser la causa de su falta de actividad biológica sobre el insecto diana

En conjunto, esta tesis abre una nueva vía para el control biológico de *C. capitata* mediante el entomopatógeno *B. thuringiensis*. Ésta es una plaga de enorme importancia agrícola, para la cual actualmente se está implantando una estrategia de control que auna diversos métodos, entre los cuales se podría integrar la vía que explora esta tesis. La prospección de aislados nativos de *B. thuringiensis* no ha permitido obtener un aislado apto para el control de la plaga por métodos tradicionales (pulverización cebo, trampeo, etc.). Sin embargo, ha puesto de manifiesto el enorme potencial del agroecosistema de los cítricos como fuente de aislados de *B. thuringiensis* activos contra otras plagas. Se ha desarrollado y caracterizado una colección de cepas que por su riqueza puede resultar muy interesante para futuros trabajos de control biológico. La presente tesis propone métodos pioneros en la búsqueda de estrategias de control de ésta y otras plagas. Así, la profundización en el modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis* sobre *C. capitata* ha permitido identificar una δ -endotoxina única, Cyt1Aa, que por su elevada actividad larvicida, y tras los estudios adecuados, podría dar lugar a herramientas biotecnológicas de control de la plaga. Adicionalmente, a pesar de que la estrategia todavía no ha sido validada, se ha abierto una nueva vía de desarrollo de toxinas recombinantes que supondría una herramienta muy poderosa en el control de plagas, ya que virtualmente permitiría el control de cualquier plaga de forma específica. Por último, cabe destacar que esta tesis ha realizado aportaciones metodológicas muy innovadoras en aspectos como la caracterización genética de cepas de *B. thuringiensis*, el bioensayo de *C. capitata* o el desarrollo y evaluación de proteínas recombinantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W.S.**, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Abdullah, M.A., Valaitis, A.P., Dean, D.H.**, 2006. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC. Biochem.* 7, 16.
- Agaisse, H., Lereclus, D.**, 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177, 6027-6032.
- Aizawa, K., Takasu, T., Kurata, K.**, 1961. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the dust of silkworm rearing houses of farmers. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 30, 451-455.
- Al-yahyaee, S., Ellar, D.J.**, 1996. Cell targeting of a pore-forming toxin, CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*, by conjugating CytA with anti-Thy 1 monoclonal antibodies and insulin. *Bioconjug. Chem.* 7, 451-460.
- Al-yahyaee, S.A.S., Ellar, D.J.**, 1995. Maximal toxicity of cloned CytA delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. *Microbiology* 141, 3141-3148.
- Albajes, R., Santiago-Álvarez, C.**, 1980. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae). *An. INIA Ser. Agríc.* 13, 175-182.
- Alberola, T.M., Aptosoglou, S., Arsenakis, M., Bel, Y., Delrio, G., Ellar, D.J., Ferré, J., Granero, F., Guttmann, D.M., Koliais, S., Martínez-Sebastián, M.J., Prota, R., Rubino, S., Satta, A., Scarpellini, G., Sivropoulou, A., Vasara, E.**, 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *J. Invertebr. Pathol.* 74, 127-136.
- Alonso, A., Garcia Marí, F.**, 2004. Control de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en cítricos utilizando trampeo masivo. *Phytoma España* 157, 28-37.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.**, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Aluja, M.** 1993. Manejo integrado de la mosca de la fruta. Ed. Trillas, México D.F. pp. 251
- Angst, B.D., Marcozzi, C., Magee, A.I.**, 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114, 629-641.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore, N., Ellar, D.J.**, 1993. Effects on toxicity of eliminating a cleavage site in a predicted interhelical loop in *Bacillus thuringiensis* CryIVB δ -endotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 255-261.

- Argilés, R., Tejedo, V., 2007.** La lucha de la mosca de la fruta mediante la técnica del insecto estéril en la Comunitat Valenciana. *Levante Agrícola* 385, 157-162.
- Aronson, A.I., 1993.** The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post- exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7, 489-496.
- Aronson, A.I., Han, E.S., McGaughey, W., Johnson, D., 1991.** The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 981-986.
- Arrieta, G., Hernández, A., Espinoza, A.M., 2004.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Rev. Biol. Trop.* 52, 757-764.
- Baig, D.N., Mehnaz, S., 2009.** Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiol. Res.* DOI 10.1016/j.micres.2009.08.003.
- Ball, D.A., Taylor, R., Todd, S.J., Redmond, C., Couture-Tosi, E., Sylvestre, P., Moir, A., Bullough, P.A., 2008.** Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol. Microbiol.* 68, 947-958.
- Banks, D.J., Jurat-Fuentes, J.L., Dean, D.H., Adang, M.J., 2001.** *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa δ -endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N- acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 909-918.
- Barbosa, P. 1998.** Conservation biological control. Academic Press, San Diego (EEUU). pp. 396
- Barloy, F., Lecadet, M.M., Delecluse, A., 1998.** Distribution of clostridial *cry*-like genes among *Bacillus thuringiensis* and *Clostridium* strains. *Curr. Microbiol.* 36, 232-237.
- Baum, J.A., Malvar, T., 1995.** Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18, 1-12.
- Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, H., Abbene, S.J., Bowditch, R.D., 1985.** Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *J. Bacteriol.* 163, 787-747.
- Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009.** Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 279-286.

- Bel, Y., Escrache, B.**, 2006. Common genomic structure for the Lepidoptera *cadherin-like* genes. *Gene* 381, 71-80.
- Bel, Y., Granero, F., Alberola, T.M., Martínez-Sebastián, M.J., Ferré, J.**, 1997. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 652-658.
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N., Margalith, Y.**, 1997. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4883-4890.
- Berliner, E.**, 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.). *Z. Angew. Entomol.* 2, 29-56.
- Bernhard, K., Jarrett, P., Meadows, M., Butt, J., Ellis, D.J., Roberts, G.M., Pauli, S., Rodgers, P., Burges, H.D.**, 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 59-68.
- Berón, C.M., Salerno, G.L.**, 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51, 779-794.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben Dov, E., Jones, A.F., Murphy, L., Quail, M.A., Holden, M.T., Harris, D., Zaritsky, A., Parkhill, J.**, 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5082-5095.
- Birnboim, H.C.**, 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.
- Bodenheimer, F. S.** 1951. *Citrus entomology in the Middle East*. W. Junk, The Hague, Netherlands. pp. 663
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J.**, 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363-382.
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J.**, 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188, 3391-3401.
- Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Bradley, D., Harkey, M.A., Kim, M.K., Biever, K.D., Bauer, L.S., 1995.** The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 162-173.
- Brand, A., Perrimon, N., 1993.** Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423-435.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004.** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667, 38-46.
- Bravo, A., Sánchez, J., Kouskoura, T., Crickmore, N., 2002.** N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* 277, 23985-23987.
- Bravo, A., Sarabia, S., López, L., Ontiveros, H., Abarca, C., Ortiz, A., Ortiz, M., Lina, L., Villalobos, F.J., Peña, G., Núñez-Valdez, M.E., Soberón, M., Quintero, R., 1998.** Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4965-4972.
- Brenner, L., 1992.** Malathion. *J. Pestic. Reform* 12, 14.
- Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006.** Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Broderick, N.A., Robinson, C.J., McMahon, M.D., Holt, J., Handelsman, J., Raffa, K.F., 2009.** Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC. Biol.* 7, 11.
- Burns, R.E., Harris, D.L., Moreno, D.S., Eger, J.E., 2001.** Efficacy of Spinosad bait sprays to control Mediterranean and Caribbean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial citrus in Florida. *Florida Entomologist* 84, 672-678.
- Butko, P., 2003.** Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2415-2422.
- Cahan, R., Friman, H., Nitzan, Y., 2008.** Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Microbiology* 154, 3529-3536.
- Campbell, P.M., Cao, A.T., Hines, E.R., East, P.D., Gordon, K.H., 2008.** Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 950-958.

- Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla, L.A., Jr., 2003.** Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the Indianmeal moth larval gut proteome. *Mol. Cell Proteomics*. 2, 19-28.
- Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolsto, A.B., 1994.** Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1719-1725.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S., Koziel, M.G., 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3057-3061.
- Casaña-Giner, V., Gandía-Balaguer, A., Mengod-Puerta, C., Primo-Millo, J., Primo-Yúfera, E., 1999.** Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 303-308.
- Castañera, P., 2003.** Control integrado de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. *Phytoma España* 153, 131-133.
- Castillo, M.A., Moya, P., Hernández, E., Primo-Yúfera, E., 2000.** Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol. Control* 19, 274-282.
- Cavados, C., Fonseca, R., Chaves, J., Rabinovitch, L., Araujo-Coutinho, C., 2001.** Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 1017-1021.
- Cerón, J., Ortiz, A., Quintero, R., Guereca, L., Bravo, A., 1995.** Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3826-3831.
- Chak, K.F., Chao, D.C., Tseng, M.Y., Kao, S.S., Tuan, S.J., Feng, T.Y., 1994.** Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2415-2420.
- Charles, J.F., Nielsen-LeRoux, C., 2000.** Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 201-206.
- Chilcott, C.N., Wigley, P.J., 1993.** Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 244-247.
- Chilcott, C.N., Wigley, P.J., Broadwell, A.H., Park, D.J., Ellar, D.J., 1998.** Activities of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins Cyt1Aa and Cyt2Aa against three species of sheep blowfly. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4060-4061.
- Choi, Y.S., Cho, E.S., Je, Y.H., Roh, J.Y., Chang, J.H., Li, M.S., Seo, S.J., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2004.** Isolation and characterization of a strain of *Bacillus*

- thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 encoding delta-endotoxin Cry1Ac. Curr. Microbiol. 48, 47-50.
- Christenson, L., Foote, R.**, 1960. Biology of fruit fly. Ann. Rev. Entomol. 5, 171-192.
- Chueca, P.** 2007. Tesis doctoral: Mecanización de métodos de control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en cítricos. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.
- Cinar, C., Apaydin, O., Yenidunya, A.F., Harsa, S., Gunes, H.**, 2008. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from olive-related habitats in Turkey. J. Appl. Microbiol. 104, 515-525.
- Cohen, S., Dym, O., Albeck, S., Ben-Dov, E., Cahan, R., Firer, M., Zaritsky, A.**, 2008. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Mol. Biol. 380, 820-827.
- Coleman, J.E.**, 1992. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 21, 441-483.
- Conselleria d'Agricultura Pesca i Alimentació.** 1-7-2009. Plan de actuación contra la mosca de la fruta 2009-2010. <http://www.agricultura.gva.es/noticias/noticias.php?noticia=1512&init=20>
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D.H.**, 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 807-813.
- Dai, S.M., Gill, S.S.**, 1993. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. Insect Biochem. Mol. Biol. 23, 273-283.
- Davies, N., Villablanca, F.X., Roderick, G.K.**, 1999. Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. Genetics 153, 351-360.
- de Barjac, H., Bonnefoi, A.**, 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. J. Invertebr. Pathol. 11, 335-347.
- de Barjac, H., Sebald, M., Charles, J.F., Cheong, W.H., Lee, H.L.**, 1990. *Clostridium bifermentans* serovar *malaysia*, a new anaerobic bacterium pathogen to mosquito and blackfly larvae. C. R. Acad. Sci. III 310, 383-387.
- de Barros Moreira, B.H., Silva-Filha, M.H.**, 2007. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. FEMS Microbiol. Lett. 266, 163-169.

- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E.**, 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37, 409-433.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N.**, 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193-199.
- de Maagd, R.A., Kwa, M.S., van der, K.H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J.M., Stiekema, W.J., Bosch, D.**, 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1537-1543.
- de Souza, J.D., Jain, S., de Oliveira, C., Ayres, C., Lucena, W.A.**, 2009. Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. *BioControl* 54, 467-473.
- Del Pino, A.** 2000. Tesis doctoral: Efecto de factores abióticos y edáficos naturales en el ciclo biológico de *Ceratitis capitata*, (Wiedemann), Diptera: Tephritidae. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA. pp. 118-120.
- Delecluse, A., Rosso, M.L., Ragni, A.**, 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4230-4235.
- Derbyshire, D.J., Ellar, D.J., Li, J.**, 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAc and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1938-1944.
- Díaz-Mendoza, M., Farinós, G.P., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., Ortego, F.**, 2007. Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.* 53, 428-435.
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., Ekesi, S., Mueke, J.K.**, 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* (Karsch) and *C. cosyra* (Walker) (Diptera :Tephritidae). *Mycopathologia* 156, 375-382.
- Domínguez, F.** 1989. Plagas y Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp. 821
- Dow, J.A.T.**, 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187-238.
- Dubois, N.R., Dean, D.H.**, 1995. Synergism between cry1A insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environ. Entomol.* 24, 1741-1747.

- Duffy, J.B.**, 2002. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 32, 1-15.
- Dyck, V. A., J. Hendrichs, y A. S. Robinson.** 2005. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht (The Netherlands). pp. 787
- Eizaguirre, M., Albajes, R., Lopez, C., Eras, J., Lumbierres, B., Pons, X.**, 2006. Six years after the commercial introduction of Bt maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. *Transgenic Res.* 15, 1-12.
- Ejiofor, A.O., Johnson, T.**, 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 284-290.
- Ekese, S., Maniania, N.K., Lux, S.A.**, 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 157-167.
- Escrive, B., González-Cabrera, J., Herrero, S., Ferré, J.**, 2001. La utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. *Phytoma España* 129, 40-44.
- Escudero, L. A., Vilajeliu, M., Peñarrubia, E., y Batllori, L.** 20-10-2009. Estudios comparativos de la capacidad de captura de difusores de atrayentes, modelos de mosqueros y diversos insecticidas para *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). En: VI Congreso Anual de Entomología Aplicada, Palma de Mallorca.
- Eskafi, F.M., Kolbe, M.**, 1990. Predation on Larval and Pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the Ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) and Other Predators in Guatemala. *Environ. Entomol.* 19, 148-153.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G.**, 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5389-5394.
- EXTOXNET.** 20-12-2009. Pesticide Information Profile: *Bacillus thuringiensis*. <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/24d-captan/bt-ext.html>.
- FAO.** 9-1-2010. Developments in international citrus trade in 2005-2006. http://www.fao.org/es/esc/en/15/238/highlight_241_p.html
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P.**, 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomol. Exp. Appl.* 110, 23-30.

- Federici, B.A.**, 2005. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 30-38.
- Federici, B.A., Bauer, L.S.**, 1998. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4368-4371.
- Federici, B.A., Park, H.W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J.**, 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *J. Exp. Biol.* 206, 3877-3885.
- Fernández, L.A.**, 2004. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 364-373.
- Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M.**, 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77-84.
- Ferré, J., Van Rie, J.**, 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Fibla, J.M., Martínez-Ferrer, M.T., Campos, J.M., Monfort, R., Colell, R.**, 2007. Control de *Ceratitidis capitata* Wied en variedades tempranas de cítricos y pequeñas superficies, mediante diferentes estrategias de trampeo masivo. *Levante Agrícola* 385, 126-134.
- Finney, D. J.** 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University, Cambridge, UK
- Fletcher, J.** 1989. Movements of Tephritidae fruit flies., pp. 209-217. En: A. S. Robinson y G. H. Hooper (eds.), *Fruit flies: Their biology, natural enemies and Control*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M.D., Martínez, R.**, 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 31, 257-272.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G.**, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857-860.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J.R., Pangborn, W., English, L.**, 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1101-1109.
- Galli, J.C., Rampazzo, E.F.**, 1996. Enemigos naturales predadores de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae) capturados con trampas de gravedad de suelo en huertos de *Psidium guajava* L. *Bol. San. Veg. Plagas* 22, 297-300.

- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, y A. Bairoch.** 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, pp. 571-607. En: J. M. Walker (ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Gaviria Rivera, A.M., Priest, F.G.,** 2003. Pulsed field gel electrophoresis of chromosomal DNA reveals a clonal population structure to *Bacillus thuringiensis* that relates in general to crystal protein gene content. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 61-66.
- Gazit, E., Bach, D., Kerr, I.D., Sansom, M.S., Chejanovsky, N., Shai, Y.,** 1994. The α -5 segment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J.* 304 (Pt 3), 895-902.
- Gill, M., Ellar, D.,** 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* 11, 619-625.
- Gill, S.S., Hornung, J.M., Ibarra, J.E., Singh, G.J., Federici, B.A.,** 1987. Cytolytic activity and immunological similarity of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* isolate PG-14 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1251-1256.
- Gingrich, R.E.,** 1987. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a potential control agent for the adult Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied.). *J. Appl. Entomol.* 104, 378-385.
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan.** 1998. Environmental and Health Impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Ministry of Health of New Zealand. pp. 13
- Glare, T. R. y M. O'Callaghan.** 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety, 1 ed. John Wiley & Sons, Ltd.,
- Goldberg, L.J., Margalit, J.,** 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* 37, 355-358.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M.,** 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242-246.
- Gómez-Clemente, F.,** 1932. Un ensayo de lucha biológica contra la *Ceratitis capitata* en Valencia. *Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr.* 6, 80-89.
- Gómez-Clemente, F.,** 1934. Los parásitos de la *Ceratitis capitata* Wied. Nuevos ensayos de importación y aclimatación. *Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr.* 7, 69-80.
- Gómez-Clemente, F.,** 1948. Experiencias sobre el empleo de DDT contra "mosca de las frutas" (*Ceratitis capitata*). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 16, 253.

- González-Cabrera, J. y J. Ferré.** 2008. Capítulo 6: Bacterias entomopatógenas, pp. 86-97. En: J. A. Jacas y A. Urbaneja (eds.), Control Biológico de Plagas Agrícolas. Phytoma España, España.
- Gough, J.M., Kemp, D.H., Akhurst, R.J., Pearson, R.D., Kongsuwan, K.,** 2005. Identification and characterization of proteins from *Bacillus thuringiensis* with high toxic activity against the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. J. Invertebr. Pathol. 90, 39-46.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J., Aroian, R.V.,** 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. Science 307, 922-925.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R., Cygler, M.,** 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 254, 447-464.
- Güerchicoff, A., Delecluse, A., Rubinstein, C.P.,** 2001. The *Bacillus thuringiensis* *cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1090-1096.
- Güerchicoff, A., Ugalde, R.A., Rubinstein, C.P.,** 1997. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2716-2721.
- Gurkan, C., Ellar, D.J.,** 2003a. Expression in *Pichia pastoris* and purification of a membrane-acting immunotoxin based on a synthetic gene coding for the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin. Protein Expr. Purif. 29, 103-116.
- Gurkan, C., Ellar, D.J.,** 2003b. Expression of the *Bacillus thuringiensis* Cyt2Aa1 toxin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. Biotechnol. Appl. Biochem.
- Gurr, G.M., Kvedaras, O.L.,** 2009. Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. Biol. Control 52, 198-207.
- Haddow, J.D., Haines, L.R., Gooding, R.H., Olafson, R.W., Pearson, T.W.,** 2005. Identification of midgut proteins that are differentially expressed in trypanosome-susceptible and normal tse-tse flies (*Glossina morsitans morsitans*). Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 425-433.
- Haider, M.Z., Knowles, B.H., Ellar, D.J.,** 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. Eur. J. Biochem. 156, 531-540.
- Hall, T.A.,** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. 41, 95-98.

- Hammond, B.** 2007. Food safety of proteins in agricultural biotechnology. CRC Press, Boca Raton (EEUU). pp. 51
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J., Pedersen, J.C.**, 1998. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 106-114.
- Hayakawa, T., Shitomi, Y., Miyamoto, K., Hori, H.**, 2004. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* 576, 331-335.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillot, C., Toprak, U.**, 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 285-302.
- Helgason, E., Okstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolsto**, 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.
- Hernández, C.S., Andrew, R., Bel, Y., Ferré, J.**, 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 8-16.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P.L., de Maagd, R.A.**, 2004. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384, 507-513.
- Herrero, S., Ansems, M., Van Oers, M.M., Vlak, J.M., Bakker, P.L., de Maagd, R.A.**, 2007. REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1109-1118.
- Hidalgo, A., Urban, J., Brand, A.H.**, 1995. Targeted ablation of glia disrupts axon tract formation in the *Drosophila* CNS. *Development* 121, 3702-3712.
- Hodgman, T.C., Ellar, D.J.**, 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by computational analysis. *DNA Seq.* 1, 97-106.
- Hodgman, T.C., Ziniu, Y., Ming, S., Sawyer, T., Nicholls, C.M., Ellar, D.J.**, 1993. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain which is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 17-22.
- Höfte, H., Whiteley, H.R.**, 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
- Honda, T., Shiba, A., Seo, S., Yamamoto, J., Matsuyama, J., Miwatani, T.**, 1991. Identity of hemolysins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 205-209.

- Hoogenboom, H.R.**, 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105-1116.
- Hossain, D.M., Shitomi, Y., Moriyama, K., Higuchi, M., Hayakawa, T., Mitsui, T., Sato, R., Hori, H.**, 2004. Characterization of a novel plasma membrane protein, expressed in the midgut epithelia of *Bombyx mori*, that binds to Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4604-4612.
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., Adang, M.J.**, 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47, 5101-5110.
- Hua, G., Zhang, R., Bayyareddy, K., Adang, M.J.**, 2009. *Anopheles gambiae* alkaline phosphatase is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis jegathasan* Cry11Ba toxin. *Biochemistry* 48, 9785-9793.
- Huang, Y., Huang, R., Li, K.**, 1990. A field study of the persisting effect of *Bacillus thuringiensis* in citrus groves. *Chinese J. Biological Control* 6, 131-133.
- Huang, Z., Guan, C., Guan, X.**, 2004. Cloning, characterization and expression of a new *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* WB9. *Biotechnol. Lett.* 26, 1557-1561.
- Hughes, P.A., Stevens, M.M., Park, H.W., Federici, B.A., Dennis, E.S., Akhurst, R.**, 2005. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 34-39.
- Hwang, S.H., Saitoh, H., Mizuki, E., Higuchi, K., Ohba, M.**, 1998. A novel class of mosquitocidal delta-endotoxin, Cry19B, encoded by a *Bacillus thuringiensis* serovar *higo* gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 179-184.
- Ibarra, J.E., Del Rincón, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A.**, 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269-5274.
- Ibarra, J.E., Federici, B.A.**, 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 165, 527-533.
- Ignoffo, C.M., Couch, T.L., Garcia, C., Kroha, M.J.**, 1981. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Heliothis virescens*. *J. Econ. Entomol.* 74, 218-222.
- Ihara, H., Uemura, T., Masuhara, M., Ikawa, S., Sugimoto, K., Wadano, A., Himeno, M.**, 1998. Purification and partial amino acid sequences of the binding

- protein from *Bombyx mori* for CryIAa δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol. 120, 197-204.
- Iriarte, J., Bel, Y., Ferrandis, M.D., Andrew, R., Murillo, J., Ferré, J., Caballero, P.,** 1998. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Syst. Appl. Microbiol. 21, 97-106.
- Iriarte, J. y P. Caballero.** 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, pp. 16-44. En: P. Caballero y J. Ferré (eds.), Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Phytoma España / Universidad Pública de Navarra.
- Iriarte, J., Porcar, M., Lecadet, M., Caballero, P.,** 2000. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. Curr. Microbiol. 40, 402-408.
- Ishiwata, S.,** 1901. On a severe flacherie (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 114, 1-5.
- Israely, N., Oman, S.D.,** 2005. Effect of combined insecticide sprays and sanitation techniques on population dynamics of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the central mountains of Israel. J. Econ. Entomol. 98, 739-748.
- Ito, T., Bando, H., Asano, S.,** 2006a. Activation process of the mosquitocidal delta-endotoxin Cry39A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* BUN1-14 and binding property to *Anopheles stephensi* BBMV. J Invertebr. Pathol. 93, 29-35.
- Ito, T., Ikeya, T., Sahara, K., Bando, H., Asano, S.,** 2006b. Cloning and expression of two crystal protein genes, *cry30Ba1* and *cry44Aa1*, obtained from a highly mosquitocidal strain, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* INA288. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5673-5676.
- Itoua-Apoyolo, C., Drif, L., Vassal, J.M., DeBarjac, H., Bossy, J.P., Leclant, F., Frutos, R.,** 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 4343-4347.
- Jakubowska, A., Ferré, J., Herrero, S.,** 2009. Enhancing the multiplication of nucleopolyhedrovirus in vitro by manipulation of the pH. J. Virol. Methods 161, 254-258.
- Jaquet, F., Hutter, R., Luthy, P.,** 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 53, 500-504.
- Jara, S., Maduell, P., Orduz, S.,** 2006. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. J Appl. Microbiol. 101, 117-124.

- Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A., Dean, D.H., 2000.** Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 14423-14431.
- Jensen, G.B., Wilcks, A., Petersen, S.S., Damgaard, J., Baum, J.A., Andrup, L., 1995.** The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. *J. Bacteriol.* 177, 2914-2917.
- Johnson, D.E., McGaughey, W.H., 1996.** Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Curr. Microbiol.* 33, 54-59.
- Johnson, D.E., Oppert, B., McGaughey, W.H., 1998.** Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the indianmeal moth. *Curr. Microbiol.* 36, 278-282.
- Johnston, P.R., Crickmore, N., 2009.** Gut bacteria are not required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity towards the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5094-5099.
- Joung, K. B. y J. C. Côté. 2000.** A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Technical bulletin no. 29. Agriculture and Agri-food Canada. Horticultural R & D Centre, Saint-Jean-sur-Richelieu (Canada)
- Juárez-Pérez, V.M., Ferrandis, M.D., Frutos, R., 1997.** PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2997-3002.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2004.** Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271, 3127-3135.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2006.** Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr. Pathol.* 92, 166-171.
- Jurat-Fuentes, J.L., Gahan, L.J., Gould, F.L., Heckel, D.G., Adang, M.J., 2004.** The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Biochemistry* 43, 14299-14305.
- Kaelin, P., Morel, P., Gadani, F., 1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 19-25.
- Kajiwara, H., Ito, Y., Imamaki, A., Nakamura, M., Mita, K., Ishikaza, M., 2005.** Protein profile of silkworm midgut of fifth-instar day-3 larvae. *J. Electrophoresis* 49, 61-69.

- Karamanlidou, G., Lambropoulos, A.F., Koliadis, S.I., Manousis, T., Ellar, D., Kastritsis, C.**, 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). Appl. Environ. Microbiol. 57, 2277-2282.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A.**, 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. Insect Biochem. Mol. Biol. 26, 365-373.
- Knight, P.J., Crickmore, N., Ellar, D.J.**, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) δ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. 11, 429-436.
- Knight, P.J., Knowles, B.H., Ellar, D.J.**, 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. J. Biol. Chem. 270, 17765-17770.
- Knipling, E.F.**, 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexual sterile males. J. Econ. Entomol. 48, 459-462.
- Knowles, B.H., Ellar, D.**, 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta 924, 509-518.
- Krieg, A.**, 1975. Photoprotection against inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet rays. J. Invertebr. Pathol. 25, 267-268.
- Krieg, A., Huger, A.M., Langenbruch, G.A., Schnetter, W.**, 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenuber Larven von Coleopteren wirksamer. Pathotyp. Z. Ang. Ent. 96, 500-508.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., McNall, R.J., Andacht, T., Adang, M.J.**, 2007. Identification of novel CryIAc binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. Insect Biochem. Mol. Biol. 37, 189-201.
- Kumar, N.S., Venkateswerlu, G.**, 1997. Involvement of an endogenous metalloprotease in the activation of protoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Biochem. Mol. Biol. Int. 42, 901-908.
- Kumar, N.S., Venkateswerlu, G.**, 1998. Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. FEMS Microbiol. Lett. 159, 113-120.
- Kunitz, M.**, 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol. 30, 291-310.

- Kuo, W.S., Chak, K.F.**, 1996. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1369-1377.
- Laemmli, U.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, B., Höfte, H., Annys, K., Jansens, S., Soetaert, P., Peferoen, M.**, 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2536-2542.
- Langhorst, M.F., Solis, G.P., Hannbeck, S., Plattner, H., Stuermer, C.A.**, 2007. Linking membrane microdomains to the cytoskeleton: regulation of the lateral mobility of reggie-1/flotillin-2 by interaction with actin. *FEBS Lett.* 581, 4697-4703.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thiery, I.**, 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 660-672.
- Lecadet, M.M., Martouret, D.**, 1987. Host specificity of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin toward Lepidopteran species: *Spodoptera littoralis* Bdv. and *Pieris brassicae* L. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 37-48.
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R.A., Huang, F., Zhu, K.Y., Buschman, L.L.**, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 753-762.
- Li, H.M., Margam, V., Muir, W.M., Murdock, L.L., Pittendrigh, B.R.**, 2007. Changes in *Drosophila melanogaster* midgut proteins in response to dietary Bowman-Birk inhibitor. *Insect Mol. Biol.* 16, 539-549.
- Li, J., Derbyshire, D.J., Promdonkoy, B., Ellar, D.J.**, 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 571-577.
- Li, J., Koni, P.A., Ellar, D.J.**, 1996. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257, 129-152.
- Li, J.D., Carroll, J., Ellar, D.J.**, 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
- Liang, Y., Patel, S.S., Dean, D.H.**, 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270, 24719-24724.

- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P.,** 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5174-5181.
- Liquido, N. J., L. A. Shinoda, y R. T. Cunningham.** 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae): an annotated world review. Miscellaneous Publication 77. Entomological Society of America, Lanham,M.D.
- Liu, X.S., Dean, D.H.,** 2006. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein. Eng. Des. Sel.* 19, 107-111.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Moar, W.J., Smith, R.A.,** 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1385-1389.
- Lord, J.C.,** 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 19-29.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R., Adang, M.J.,** 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 735-743.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Brun-Barale, A., Couso-Ferrer, F., Bride, J.M., Castañera, P., Feyereisen, R., Ortego, F.,** 2008. Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 756-762.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P.,** 2007. Resistance to Malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. *J. Econ. Entomol.* 100, 1836-1843.
- Malacrida, A.R., Marinoni, F., Torti, C., Gomulski, L.M., Sebastiani, F., Bonvicini, C., Gasperi, G., Guglielmino, C.R.,** 1998. Genetic aspects of the worldwide colonization process of *Ceratitis capitata*. *J. Hered.* 89, 501-507.
- Manceva, S.D., Pusztai-Carey, M., Russo, P.S., Butko, P.,** 2005. A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* 44, 589-597.
- MARM.** 15-12-2009a. Anuario de Estadística Agraria 2008. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/2008/indice.asp>
- MARM.** 5-12-2009b. Registro de Productos Fitosanitarios. <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/productos/forexi.asp?e=0&plagEfecto=46>

- Martin-Bermudo, M.D., Dunin-Borkowski, O.M., Brown, N.H.**, 1997. Specificity of PS integrin function during embryogenesis resides in the alpha subunit extracellular domain. *EMBO J.* 16, 4184-4193.
- Martins, E.S., Praça, L.B., Dumas, V.F., Silva-Werneck, J.O., Sone, E.H., Waga, I.C., Berry, C., Monnerat, R.G.**, 2007. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Biol. Control* 40, 65-68.
- McNall, R.J., Adang, M.J.**, 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 999-1010.
- Meadows, M. P.** 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and risk assessment., pp. 193-220. En: P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, y S. Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide; theory and practice. John Wiley, Chichester (England).
- Mellado, L., M. Arroyo, y P. Ros.** 1974. Control of *Ceratitis capitata* Wied. by the sterile-male technique in Spain., pp. 63-73. The Sterile-male technique and its field applications. International Atomic Energy Agency, Viena (Austria).
- Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R., Ibarra, J.E.**, 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 73-77.
- Miranda, R., Zamudio, F.Z., Bravo, A.**, 2001. Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1155-1163.
- Miratul, M., Muqit, K., Feany, M.B.**, 2002. Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 237-243.
- Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R., Hayashi, Y.**, 1994. Enhancement of δ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 111-112.
- Mochi, D.A., Monteiro, A.C., De Bortoli, S.A., Doria, H.O., Barbosa, J.C.**, 2006. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in soil with different pesticides. *Neotrop. Entomol.* 35, 382-389.
- Mohan, M., Gujar, G.T.**, 2003. Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 82, 1-11.
- Mohan, M., Sushil, S.N., Selvakumar, G., Bhatt, J.C., Gujar, G.T., Gupta, H.S.**, 2008. Differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and their crystal toxins

- against high-altitude Himalayan populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. Pest. Manag. Sci. 65, 27-33.
- Moner, J. P., V. R. Petit, y J. M. Bernat.** 1988. La mosca de las frutas (*Ceratitis capitata* Wied.). Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca, Servei de Protecció dels Vegetals. pp. 60
- Monnerat, R.G., Batista, A.C., de Medeiros, P.T., Martins, E.S., Melatti, V.M., Praca, L.B., Dumas, V.F., Morinaga, C., Demo, C., Gomes, A.C.M., Falcao, R., Siqueira, C.B., Silva-Werneek, J.O., Berry, C.,** 2007. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. Biol. Control 41, 291-295.
- Monzó, C., Mollá, O., Castañera, P., Urbaneja, A.,** 2009. Activity-density of *Pardosa cribata* in Spanish citrus orchards and its predatory capacity on *Ceratitis capitata* and *Myzus persicae*. BioControl 54, 393-402.
- Monzó, C., Sabater-Muñoz, B., Urbaneja, A., Castañera, P.,** 2010. Tracking medfly predation by the wolf spider, *Pardosa cribata* Simon, in citrus orchards using PCR-based gut-content analysis. Bull. Entomol. Res. 100, 145-152.
- Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Carrière, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E.,** 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 5004-5009.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M.,** 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure. (Camb.) 9, 409-417.
- Moya, P.,** 2003. Hongos patógenos en la lucha contra *Ceratitis capitata*. Horticultura 167, 24-31.
- Muyldermans, S., Cambillau, C., Wyns, L.,** 2001. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. Trends Biochem. Sci. 26, 230-235.
- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., Kogure, M.,** 1998. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 727-734.
- Navarro-Llopis, V., Alfaro, F., Domínguez, J., Sanchís, J., Primo-Millo, J.,** 2008. Evaluation of traps and lures for mass trapping of Mediterranean fruit fly in citrus groves. J. Econ. Entomol. 101, 126-131.
- Navarro-Llopis, V., Domínguez, J., Sanchís, J., Primo-Millo, J.,** 2007a. Aplicación del método quimioesterilizantes para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Levante Agrícola 385, 177-180.

- Navarro-Llopis, V., Sanchís, J., Primo-Millo, J., Primo-Yúfera, E.,** 2007b. Chemosterilants as control agents of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field trials. *Bull. Entomol. Res.* 97, 359-368.
- Navarro-Llopis, V., Sanchís-Cabanes, J., Ayala, I., Casaña-Giner, V., Primo-Yúfera, E.,** 2004. Efficacy of lufenuron as chemosterilant against *Ceratitis capitata* in field trials. *Pest. Manag. Sci.* 60, 914-920.
- Navrozidis, E.I., Vasara, E., Karamanlidou, G., Salpiggidis, G.K., Koliais, S.I.,** 2000. Biological control of *Bactocera oleae* (Diptera: Tephritidae) using a Greek *Bacillus thuringiensis* isolate. *J. Econ. Entomol.* 93, 1657-1661.
- Oestergaard, J., Ehlers, R.U., Martínez-Ramírez, A., Real, M.D.,** 2007. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3623-3629.
- Ogiwara, K., Indrasith, L.S., Asano, S., Hori, H.,** 1992. Processing of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 121-126.
- Oh, S.T., Kim, J.K., Yang, S.Y., Song, M.D.,** 2004. Characterization of *Bacillus thuringiensis* having insecticidal effects against larvae of *Musca domestica*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 1057-1062.
- Ohgushi, A., Wasano, N., Shisa, N., Saitoh, H., Mizuki, E., Maeda, M., Ohba, M.,** 2003. Characterization of a mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto* strain isolated from Okinawa, Japan. *J. Appl. Microbiol.* 95, 982-989.
- Oppert, B.,** 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 42, 1-12.
- Oppert, B., Kramer, K.J., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H.,** 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272, 23473-23476.
- Orduz, S., Díaz, T., Restrepo, N., Patino, M.M., Tamayo, M.C.,** 1996. Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 231-237.
- Orduz, S., Realpe, M., Arango, R., Murillo, L.A., Delecluse, A.,** 1998. Sequence of the *cry11Bb11* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1388, 267-272.
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M.M., Montoya, A.E., de Barjac, H.,** 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 99-103.

- Orlova, M.V., Smirnova, T.A., Ganushkina, L.A., Yacubovich, V.Y., Azizbekian, R.R.**, 1998. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2723-2725.
- Ortego, F., Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Castañera, P.**, 2005. Detección de resistencia a insecticidas en *Ceratitis capitata*: bases bioquímicas y moleculares. Phytoma España 173, 63-66.
- Pandian, G.N., Ishikawa, T., Togashi, M., Shitomi, Y., Haginoya, K., Yamamoto, S., Nishiumi, T., Hori, H.**, 2008. *Bombyx mori* midgut membrane protein P252, which binds to *Bacillus thuringiensis* Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1324-1331.
- Papachristos, D.P., Papadopoulos, N.T., Nanos, G.D.**, 2008. Survival and development of immature stages of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in citrus fruit. J. Econ. Entomol. 101, 866-872.
- Papadopoulos, N.T., Carey, J.R., Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A.**, 1996. Overwintering of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. Ann. Entomol. Soc. Am. 89, 526-534.
- Papadopoulos, N.T., Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A., Hendrichs, J., Carey, J.R., Heath, R.R.**, 2001. Early detection and population monitoring of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in a mixed-fruit orchard in northern Greece. J. Econ. Entomol. 94, 971-978.
- Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Porta, H., Rodríguez-Almazán, C., Soberón, M., Bravo, A.**, 2009. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides 30, 589-595.
- Perani, M., Bishop, A.H., Vaid, A.**, 1998. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta- endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 160, 55-60.
- Pérez, C., Fernández, L.E., Sun, J., Folch, J.L., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A.**, 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102, 18303-18308.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J.**, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 255-281.
- Porcar, M., Juárez-Pérez, V.M.**, 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiol. Rev. 26, 419-432.
- Primo-Millo, J., Alfaro, F., Argilés, R.**, 2003. Plan de actuación contra la mosca de las frutas (*Ceratitis capitata*) en la Comunidad Valenciana. Phytoma España 153, 127-130.

- Promdonkoy, B., Ellar, D.J.**, 2003. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 374, 255-259.
- Promdonkoy, B., Rungrod, A., Promdonkoy, P., Pathaichindachote, W., Krittanai, C., Panyim, S.**, 2008. Amino acid substitutions in alphaA and alphaC of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. *J. Biotechnol.* 133, 287-293.
- Quesada-Moraga, E., García-Tovar, E., Valverde-García, P., Santiago-Álvarez, C.**, 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiol. Res.* 159, 59-71.
- Quesada-Moraga, E., Martín-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C.**, 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control* 47, 115-124.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Santiago-Álvarez, C.**, 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 1955-1966.
- Ragni, A., Thiery, I., Delecluse, A.**, 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. *Curr. Microbiol.* 32, 48-54.
- Ravoahangimalala, O., Charles, J.F.**, 1995. In vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *FEBS Lett.* 362, 111-115.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Wright, D.J., Ellis, R.J., Crickmore, N., Bonsall, M.B.**, 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environ. Microbiol.* 11, 2556-2563.
- Reddy, Y.C., Venkateswerlu, G.**, 2002. Intracellular proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a protease-deficient mutant Btk-q. *Curr. Microbiol.* 45, 405-409.
- Rees, J.S., Jarrett, P., Ellar, D.J.**, 2009. Peritrophic membrane contribution to Bt Cry delta-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 139-146.
- Richards, O. W. y R. G. Davies.** 1984. Tratado de Entomología Imms vol II. Clasificación y Biología. Ed. Omega S.A., Barcelona. pp. 998
- Rincón-Castro, M.C., Barajas-Huerta, J., Ibarra, J.E.**, 1999. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2049-2053.

- Robacker, D.C., Martínez, A.J., García, J.A., Díaz, M., Romero, C.,** 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 89, 104-110.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H.,** 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 547-559.
- Roh, J.Y., Liu, Q., Lee, D.W., Tao, X., Wang, Y., Shim, H.J., Choi, J.Y., Seo, J.B., Ohba, M., Mizuki, E., Je, Y.H.,** 2009. *Bacillus thuringiensis* serovar *mogi* (flagellar serotype 3a3b3d), a novel serogroup with a mosquitocidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 266-268.
- Rosso, M.L., Delecluse, A.,** 1997. Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene *cry19A* to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4449-4455.
- Rukmini, V., Reddy, C.Y., Venkateswerlu, G.,** 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* 82, 109-116.
- Saadoun, I., Al Momani, F., Obeidat, M., Meqdam, M., Elbetieha, A.,** 2001. Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). *J. Appl. Microbiol.* 90, 866-872.
- Saitoh, H., Higuchi, K., Mizuki, E., Hwang, S.H., Ohba, M.,** 1998. Characterization of mosquito larvicidal parasporal inclusions of a *Bacillus thuringiensis* serovar *higo* strain. *J. Appl. Microbiol.* 84, 883-888.
- Saitoh, H., Hwang, S.H., Park, Y.S., Higuchi, K., Mizuki, E., Ohba, M.,** 2000. Cloning and characterization of a *Bacillus thuringiensis* serovar *higo* gene encoding a novel class of the delta-endotoxin protein, *Cry27A*, specifically active on the *Anopheles* mosquito. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 25-30.
- Salehi, J.G., Pourjan, A.A., SeiWnejad, A., Marzban, R., Kariman, K., Maleki, B.,** 2008. Distribution and diversity of Dipteran-specific *cry* and *cyt* genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 94.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- San Andrés, V.** 2008. Tesis doctoral: Estrategias para la mejora del control autocida de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.
- San Andrés, V., Moya, P., Ayala, I., Abad, M., Primo, J., y Castañera, P.** 20-10-2009. Potencial del sistema de atracción-contaminación con *Metarhizium anisopliae*

(Metschnikoff) en el manejo integrado de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). En: VI Congreso Anual de Entomología Aplicada, Palma de Mallorca.

- San Andrés, V., Ortego, F., Castañera, P.**, 2007. Effects of gamma-irradiation on midgut proteolytic activity of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 65, 11-19.
- Sarkar, A., Hess, D., Mondal, H.A., Banerjee, S., Sharma, H.C., Das, S.**, 2009. Homodimeric alkaline phosphatase located at *Helicoverpa armigera* midgut, a putative receptor of Cry1Ac contains alpha-GalNAc in terminal glycan structure as interactive epitope. J. Proteome. Res. 8, 1838-1848.
- Sayed, A.H., Crickmore, N., Wright, D.J.**, 2001. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5859-5861.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H.**, 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. U. S. A 78, 2893-2897.
- Segura, C., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., Orduz, S.**, 2000. Activation pattern and toxicity of the Cry11Bb1 toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. J. Invertebr. Pathol. 76, 56-62.
- Seleena, P., Lee, H.L., Lecadet, M.M.**, 1995. A new serovar of *Bacillus thuringiensis* possessing 28a28c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* serovar *jegathesan*, selectively toxic against mosquito larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11, 471-473.
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Omura, M.**, 2005. Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. Sci. Hortic. 105, 507-512.
- Silva, F.C., Alcazar, A., Macedo, L.L., Oliveira, A.S., Macedo, F.P., Abreu, L.R., Santos, E.A., Sales, M.P.**, 2006. Digestive enzymes during development of *Ceratitidis capitata* (Diptera:Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 561-569.
- Singer, S.**, 1974. Entomogenous bacilli against mosquito larvae. Dev. Industr. Microbiol. 15, 187-194.

- Smith, G.P., Ellar, D.J.**, 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* 302 (Pt 2), 611-616.
- Soberón, M., Fernández, L.E., Pérez, C., Gill, S.S., Bravo, A.**, 2007a. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* 49, 597-600.
- Soberón, M., Gill, S.S., Bravo, A.**, 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol. Life Sci.* 66, 1337-1349.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B.E., Bravo, A.**, 2007b. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318, 1640-1642.
- Sonesson, A., Widell, S.**, 1998. The association of actin and tubulin with plasma membranes : Characterization using inside-out vesicles formed by Brij 58. *Phys. Plantarum* 103, 354-362.
- Stewart, G.S.A.B., Johnstone, K., Hagelberg, E., Ellar, D.J.**, 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem. J.* 198, 101-106.
- Tabashnik, B.E.**, 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3343-3346.
- Terra, W. R., C. Ferreira, y J. E. Baker.** 1996. Compartmentalization of digestion, pp. 206-235. En: M. J. Lehane y P. F. Billingsley (eds.), *Biology of the insect midgut*. Chapman & Hall, London.
- Thomas, W.E., Ellar, D.J.**, 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Lett.* 154, 362-368.
- Thomson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.**, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Toledo, J., Campos, S., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J.F., Villaseñor, A., Montoya, P.**, 2007. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *J Econ. Entomol* 100, 291-297.
- Toledo, J., Liedo, P., Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., y Montoya, P.** 10-9-2006. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: a novel approach. En: 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador (Brasil).

- Toledo, J., Liedo, P., Williams, T., Ibarra, J., 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 1052-1056.
- Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, O., Vanaclocha, P., Abad-Moyano, R., Pina, T., Castañera, P., 2009. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. *J. Econ. Entomol.* 102, 144-151.
- Urbaneja, A., Dembilio, O., Tortosa, D., Castañera, P., Viñuela, E., 2004. Efectos secundarios de tratamientos cebo usados para el control de *Ceratitis capitata*, sobre fauna útil. *Phytoma España* 159, 28-41.
- Urbaneja, A., Marí, F., Tortosa, D., Navarro, C., Vanaclocha, P., Bargues, L., Castañera, P., 2006. Influence of ground predators on the survival of the Mediterranean fruit fly pupae, *Ceratitis capitata*, in Spanish citrus orchards. *BioControl* 51, 611-626.
- Vadlamudi, R.K., Ji, T.H., Bulla, L.A., Jr., 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268, 12334-12340.
- Vadlamudi, R.K., Weber, E., Ji, I., Ji, T.H., Bulla, L.A., Jr., 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270, 5490-5494.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beukeleer, C., Dean, C., Zabeau, M., van Montagu, M., Leemans, J., 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- Valaitis, A.P., Jenkins, J.L., Lee, M.K., Dean, D.H., Garner, K.J., 2001. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch. Insect Biochem. Physiol* 46, 186-200.
- Valicente, F.H., Barreto, M.L., 2003. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 639-644.
- van Frankenhuyzen, K., 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 1-16.
- Vassal, J.M., de Barjac, H., Frutos, R., Federici, B.A., 1993. Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from diseased field-collected larvae of the saturniid moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana. *FEMS Microbiology Letters* 107, 199-203.
- Vílchez, S., Jacoby, J., Ellar, D.J., 2004. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of lambda phage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6587-6594.

- Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A., English, L.H.**, 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIIB2 and CryIIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.
- Wang, G., Wu, K., Liang, G., Guo, Y.**, 2005a. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. *Sci. China C. Life Sci.* 48, 346-356.
- Wang, P., Zhang, X., Zhang, J.**, 2005b. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 611-620.
- Wasano, N., Yasunaga-Aoki, C., Sato, R., Ohba, M., Kawarabata, T., Iwahana, H.**, 2000. Spherical parasporal inclusions of the lepidoptera-specific and coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains: a comparative electron microscopic study. *Curr. Microbiol.* 40, 128-131.
- Weems, H.V.**, 1981. Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Entomol. Circ.* 230, Flo. Dept. Agric. Consum. Serv., Div. Plant Indus.8.
- WHO.** 1999. International Programme on Chemical Safety (IPCS) - Environmental Health Criteria 217: *Bacillus thuringiensis*. pp. 28
- Wieczorek, H., Brown, D., Grinstein, S., Ehrenfeld, J., Harvey, W.R.**, 1999. Animal plasma membrane energization by proton-motove V-ATPases. *Bioessays* 21, 637-648.
- Wirth, M.C., Zaritsky, A., Ben-Dov, E., Manasherob, R., Khasdan, V., Boussiba, S., Walton, W.E.**, 2007. Cross-resistance spectra of *Culex quinquefasciatus* resistant to mosquitocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* towards recombinant *Escherichia coli* expressing genes from *B. thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environ. Microbiol.* 9, 1393-1401.
- Wolfersberger, M.G., Luethy, P., Maurer, P., Parenti, P., Sacchi, V.F., Giordana, B., Hanozet, G.M.**, 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem. Physiol.* 86A, 301-308.
- Wong, T.T.Y., Ramadan, M.M., McInnis, D.O., Mochizuki, N., Nishimoto, J.I., Herre, J.C.**, 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biol. Control* 1, 2-7.
- Wu, D., Federici, B.A.**, 1993. A 20-kilodalton protein preserves cell viability and promotes CytA crystal formation during sporulation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 175, 5276-5280.

- Yamagiwa, M., Ogawa, R., Yasuda, K., Natsuyama, H., Sen, K., Sakai, H., 2002.** Active form of dipteran-specific insecticidal protein CryIIA produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 516-522.
- Yamagiwa, M., Sakagawa, K., Sakai, H., 2004.** Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* CryIIA toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 523-528.
- Yaoi, K., Kadotani, T., Kuwana, H., Shinkawa, A., Takahashi, T., Iwahana, H., Sato, R., 1997.** Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin. *Eur. J. Biochem.* 246, 652-657.
- Yaoi, K., Nakanishi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H., Sato, R., 1999.** cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin binding 120 kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1444, 131-137.
- Yeh, E., Gustafson, K., Boulianne, G.L., 1995.** Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Genetics* 92, 7036-7040.
- Yu, Y.M., Ohba, M., Gill, S.S., 1991.** Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1075-1081.
- Zalunin, I.A., Chaika, S.I., Dronina, M.A., Revina, L.P., 2002.** Cytopathological effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* endotoxins on the intestines of *Aedes aegypti* mosquito larvae. *Parazitologiya* 36, 337-344.
- Zara, G., Zara, S., Mangia, N.P., Garau, G., Pinna, C.L.G., Budroni, M., 2006.** PCR-methods to discriminate *Bacillus thuringiensis* strains. *Ann. Microbiol.* 56, 71-76.
- Zhang, J., Hodgman, T.C., Krieger, L., Schnetter, W., Schairer, H.U., 1997.** Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179, 4336-4341.
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T.M., Adang, M.J., 2008a.** A 106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIIa toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* 47, 11263-11272.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Rose-Young, L., Bulla, L.A., 2005.** Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R(1) expressed in insect cells. *Cell Death. Differ.* 1-10.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla, L.A., Jr., 2006.** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the CryIAb toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9897-9902.
- Zhang, X., Griko, N.B., Corona, S.K., Bulla, L.A., Jr., 2008b.** Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the CryIAb toxin of *Bacillus thuringiensis* directly

correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 581-588.

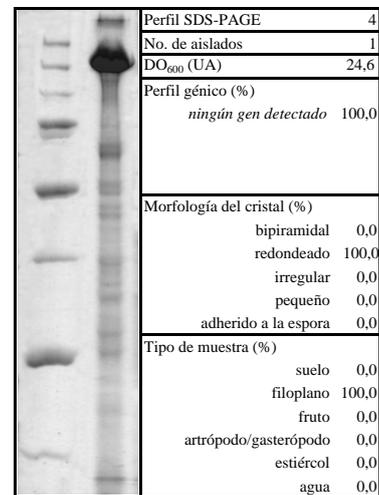
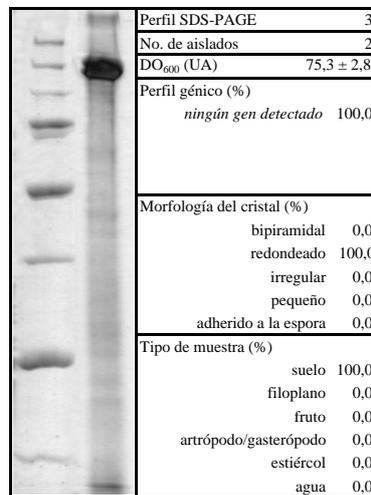
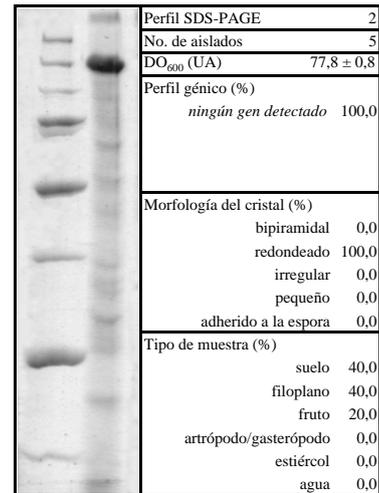
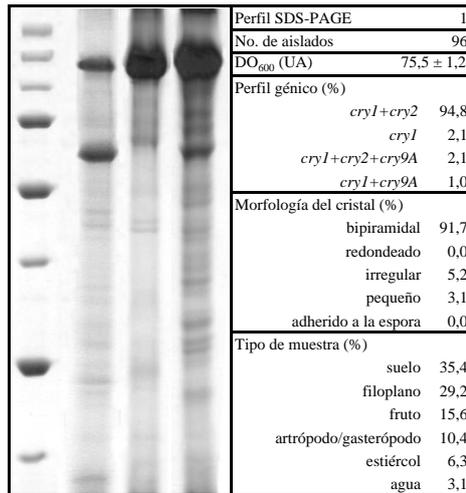
Zhang, Z., Schwartz, L., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol* 7, 203-14.

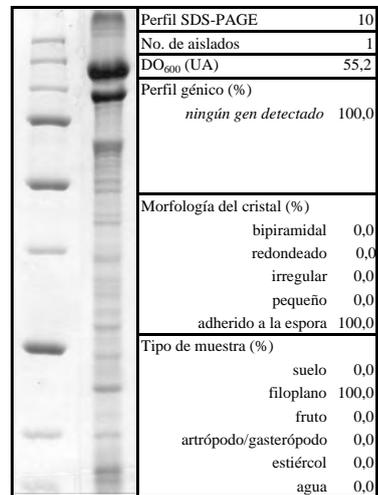
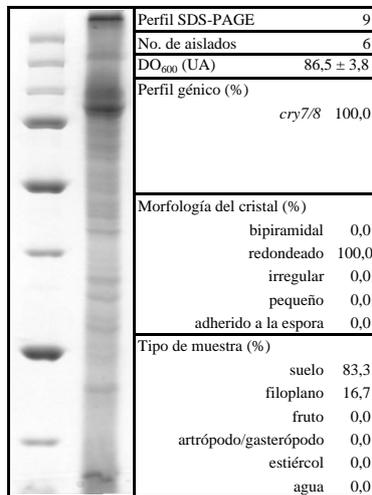
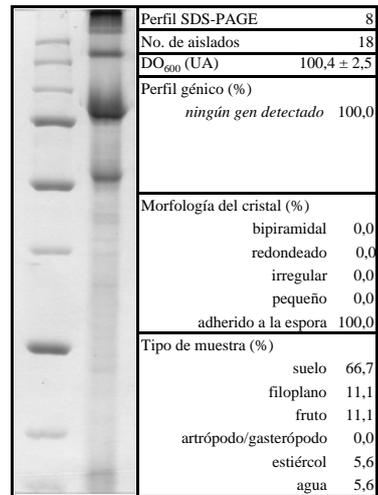
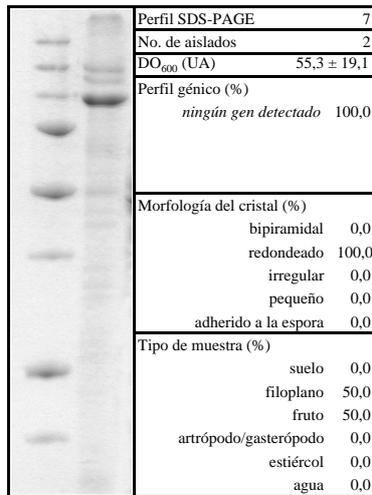
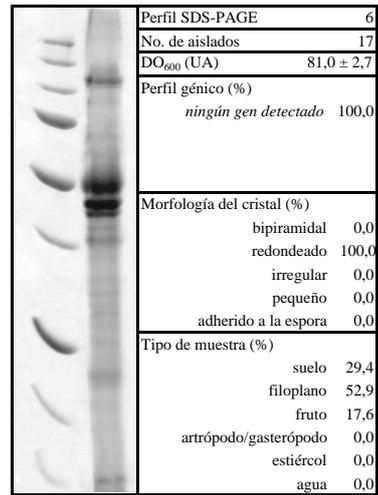
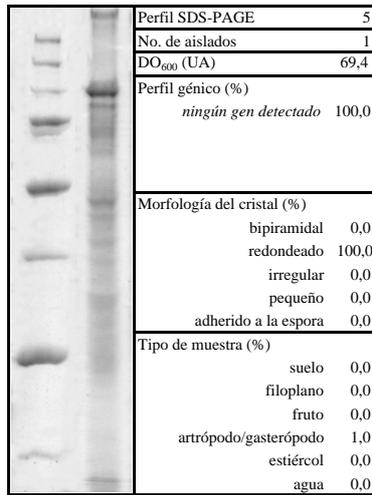
Zhou, X., Huang, Q., Chen, S., Yu, Z., 2005. Adsorption of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* on montmorillonite, kaolinite, silica, goethite and Red soil. *Appl. Clay Sci.* 30, 87-93.

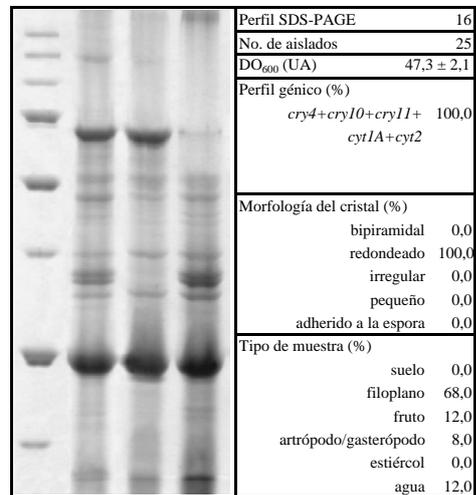
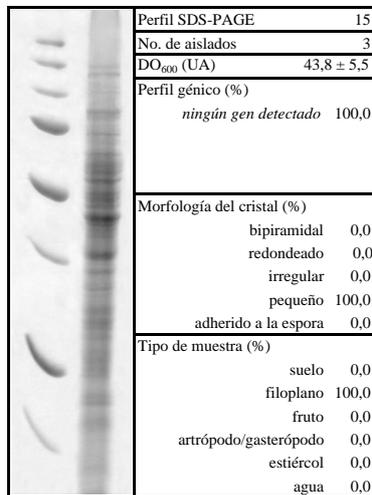
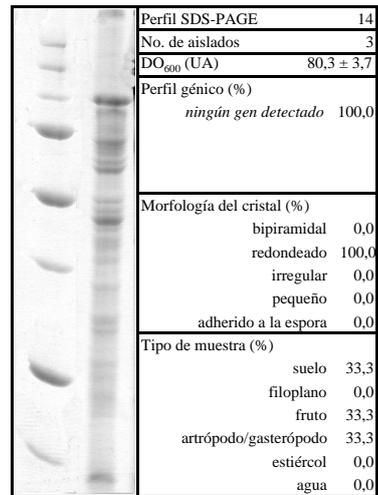
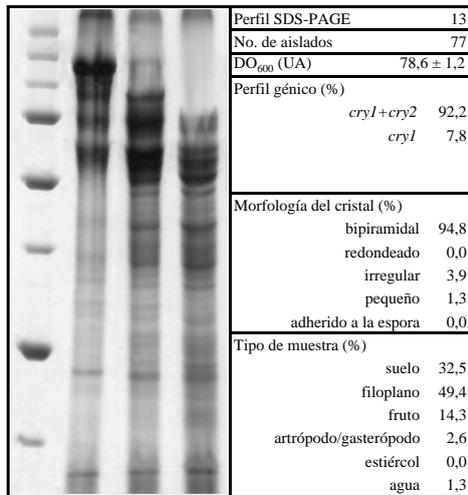
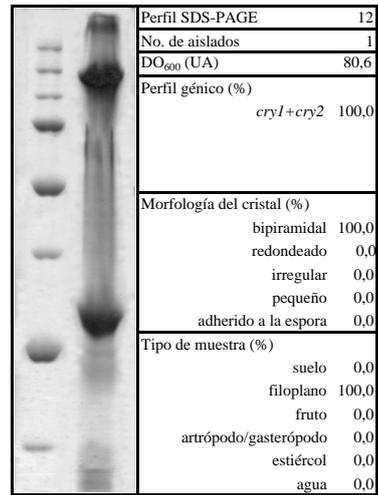
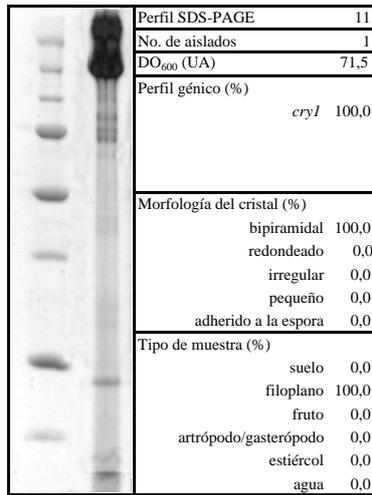
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

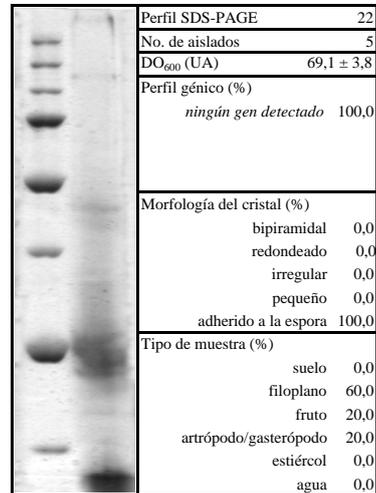
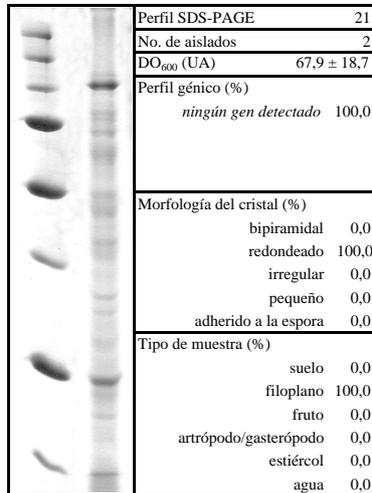
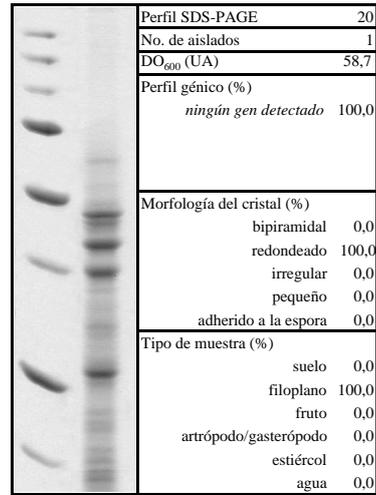
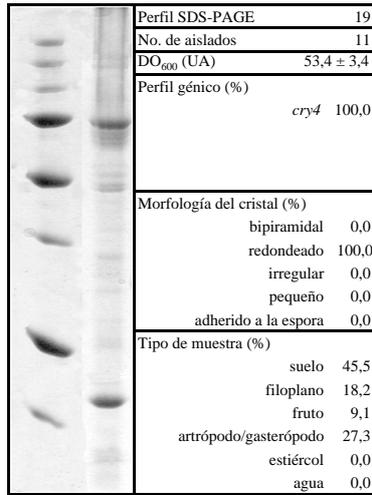
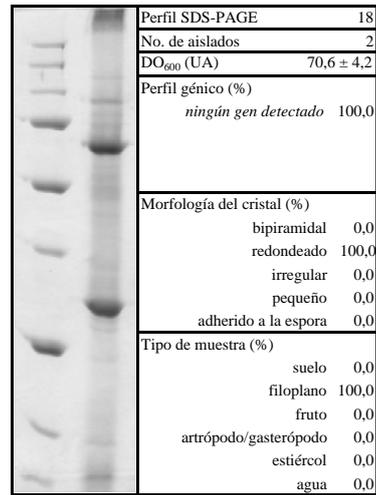
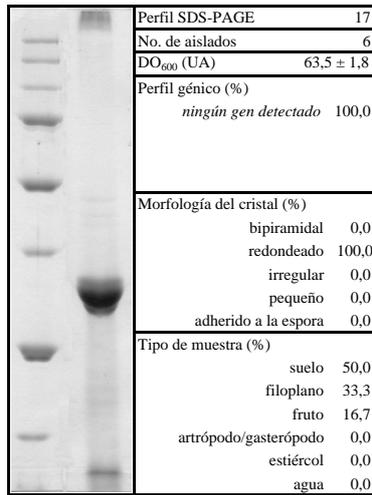
Material suplementario 1: Fichas de caracterización de la colección IVIA

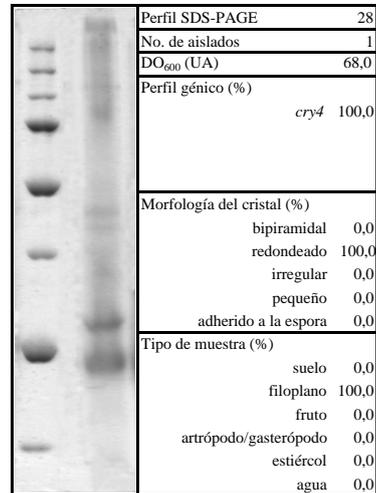
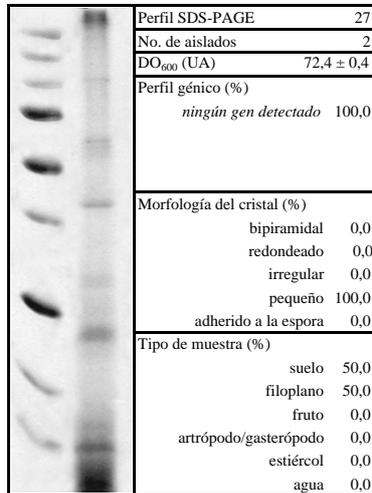
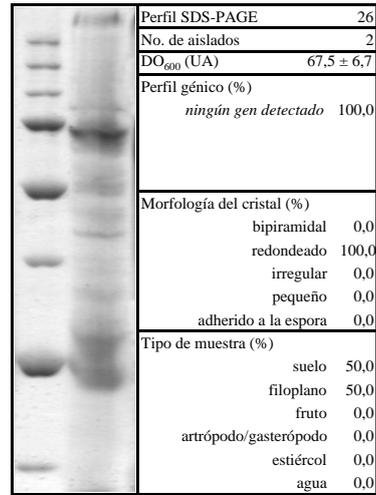
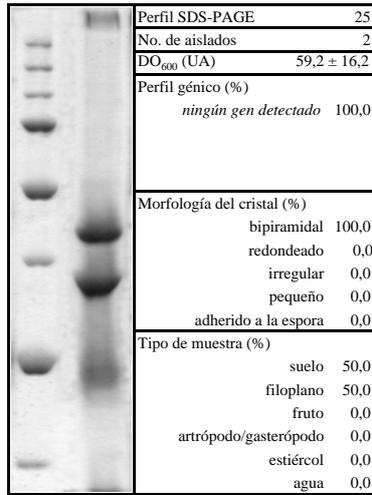
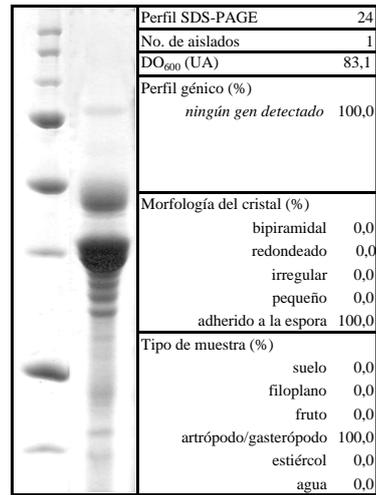
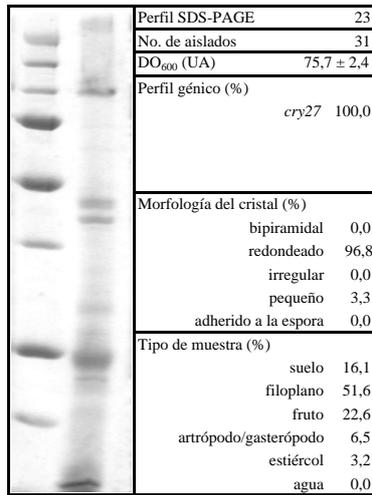
Perfiles SDS-PAGE de suspensiones de esporas y cristales cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en tres plantaciones de cítricos de la Comunidad Valenciana (un total de 376 aislados). Junto a la imagen de cada perfil SDS-PAGE se aportan datos relativos a las cepas con ese perfil SDS-PAGE: cantidad en la colección, la DO₆₀₀ (media ± error estándar) de su cultivo en medio CCY (ver apartado 3.2.3), su contenido génico *cry/cyt*, la morfología del cristal paraesporal y el tipo de sustrato del cual fueron aisladas. Cada perfil SDS-PAGE está acompañando del marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, EEUU). El contenido de genes *cry* y *cyt* de las cepas fue determinado por análisis PCR para detectar: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9A*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry27*, *cry39*, *cry4*, *cyt1A* y *cyt2*.

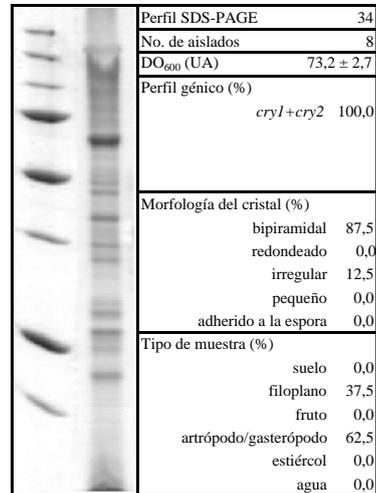
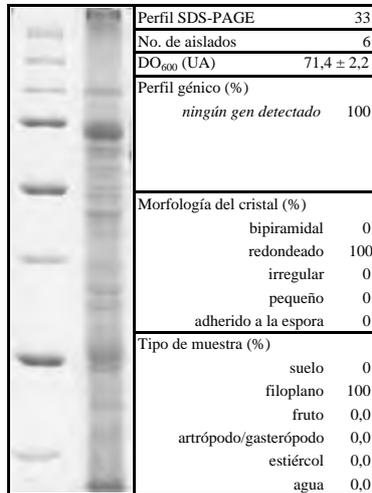
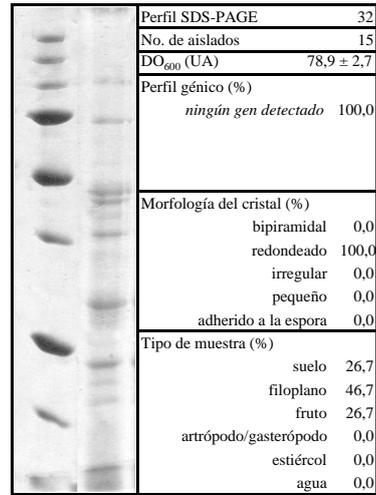
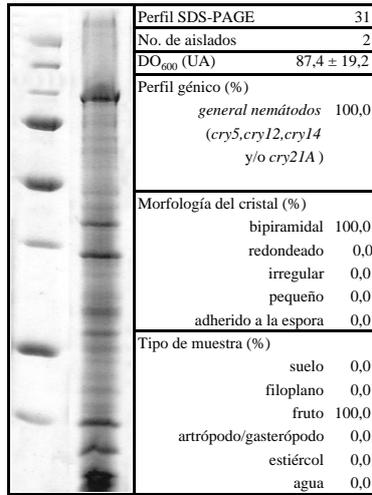
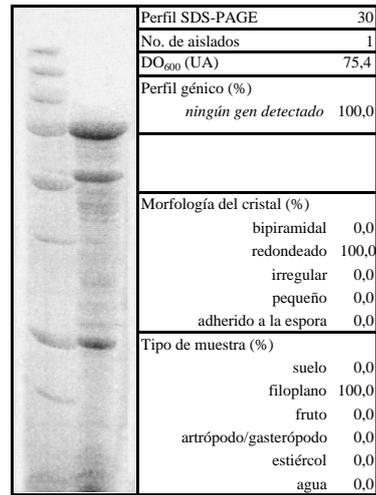
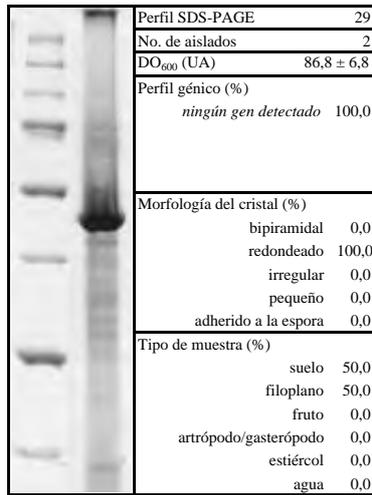


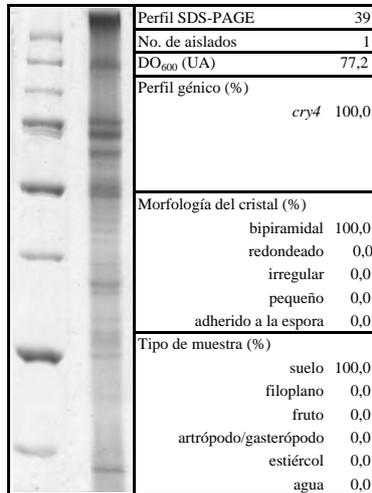
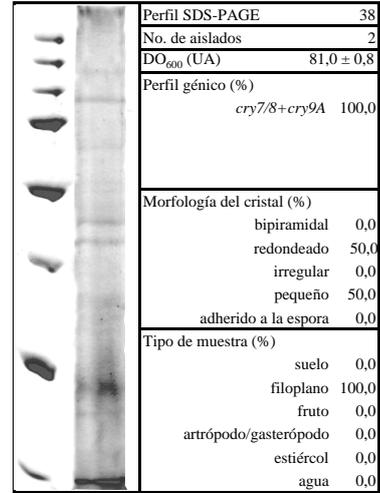
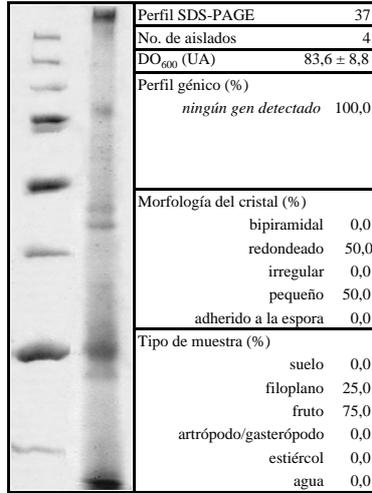
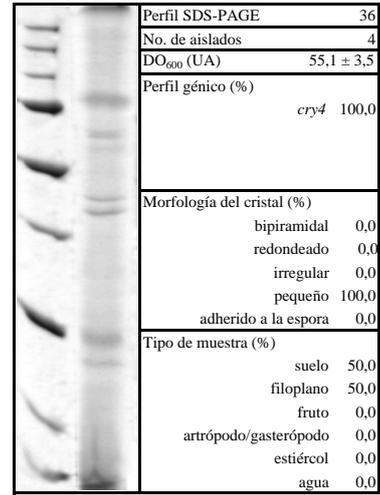
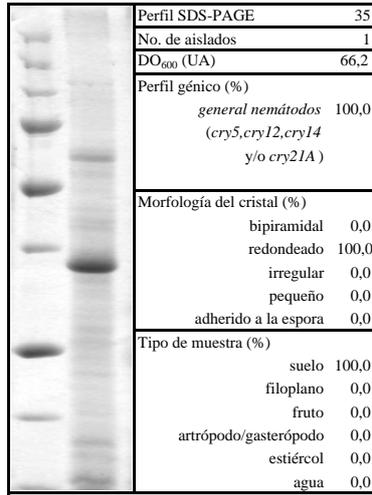












Material suplementario 2:

Alineamiento del gen *cry27Aa* (GenBank BAA82796) y la secuencia amplificada por los cebadores “*cry17+27*” directo y reverso sobre la cepa de *B. thuringiensis* I-BE15.1, de la colección IVIA. En la secuencia: **cry17+27 dir** indica la posición de hibridación del cebador directo; y **cry17+27 rev** la posición de hibridación del cebador reverso. Se utilizaron los programas BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0 (Hall, 1999) y ClustalX v1.81 (Thomson et al., 1997).

```

cry27Aa1      ATGAATCCTTATCAGAATAAGAATGAATATGAAATCTTAGATGCTAAACGAAATAATGT
BE15.1      -----

cry27Aa1      CACATGTCCAATGGTTATCCAAGCACCCATTGGCAAATGATCCTCAGATGTATTGCGT
BE15.1      -----

cry27Aa1      AATGCACATTATAAAGATTGGCTATCTATGTGTAATAAAAAACAATCCCGTAGGGTTAATT
BE15.1      -----

cry27Aa1      CCGCCGGAAAGTTTGAATGGACCTGGCTAAATGGAACAGTAGCTGCACTCACTATCGTT
BE15.1      -----

cry27Aa1      AGTGTAAATCGCAGGTATATTAGTAACAGCACCGGTGTCTGTAACCGCTGGACTCATTACA
BE15.1      -----

cry27Aa1      GTTCTAGGTGCTGGAGCTGCCCTTTTAGCGGGGATAACACCTCTTATATGGCCTGCAACT
BE15.1      -----

cry27Aa1      ACCGATAATACGTTTAATAAAAATTACGGATGCAACAGAAGTCCTACTTAATAAAGAAATA
BE15.1      -----

cry27Aa1      TCTGAATTCGTTAGAAAAACAGCCAATACCAAAATTGATAGTTTACAACAATTAATATAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      TATTATCAAAATGCTTTAGAAAATTGGAAGAAAAATCCCAATGATTGAGCCGCGAGAAAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      ACTGTAAGTACCAGGTTTCAAATTGTGAACGCTTTTTTTGTGGAGGCTATGCCAGCTCTT
BE15.1      -----

cry27Aa1      TCTATGCCAGGATATGAAGTAGTACAATTAGGTGCGTATGCACAAGCTGCCAATTTACAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      TTAATACTTCTACGGGAAGGGATTGCATATGCTGATCAGTGAATTTAGCTAGAGATCCT
BE15.1      -----

cry27Aa1      ATGCATGCCGAGGAGATCTACATTATAAAGAATTTCTAGATTATAGAAATCAATATATT
BE15.1      -----

cry27Aa1      AAC CATTGTTCACTTGGTATACGAAGGACAAAATGAGGCAAATCTGAAAAATAATGGA
BE15.1      -----

cry27Aa1      CTTGTATATCAAAGAACTATGACACTTTTCGTAAGATTTAATTGCAATGTTTCAACA
BE15.1      -----GTATTAGATTTAATTGCAATGTTTCAACA
                    *** *****

cry27Aa1      TACGATCCGCGCTTATATACGATGCCATTAAAACCGAAATCTTAACAAGAACAATTTAT
BE15.1      TACGATCCCGCTTATATACGATGCCATTAAAGACTGAAATTTTAACAAGAACAATTTAT
                    ***** *****

```

```

cry27Aa1      ACAGATGGAGTAAATAGAAATGAACCTAAATCTATACACAATCCAGGTTTATTCCGACGG
BE15.1      ACAGATGGAGTAAATAGAAATCAAACCTCGCTCTATATACAATCCAAGTTTATTCCGACGG
*****
cry27Aa1      TTAGAACAAATGAAATTACACATTTATGAATATCAGGGTGCGCAGTTTTTAAGTGGGCAC
BE15.1      TTAGAACAAATGAAATCCCATATTTATGACTATCAAGGTGCGCAGTTTTTAAGCGGGCAC
*****
cry27Aa1      CAAAATATATTTAGAAGCATGAATTATAATCATCCTCTAATTTACGGTCCCGTACAAGGG
BE15.1      CAAAATGTATTTAGAAGCATGAATTATACTCATCCTCTAATTTATGGTCCCCTACAAGGG
*****
cry27Aa1      TATAGTTCATCGAATATAAATAAAAATAACAACCTATTAATCTAGGTGATTATGATAAAATT
BE15.1      TATGGATCATCGAATATAAATAAAAATAACAACCTATTAATCTAGGTGATTATGATAAAATT
***
cry27Aa1      TATAGTATTAATACAGAAAGCAGAAATCGT----TTAGTTCAGGGATCAA----CTACA
BE15.1      TATAGCATTAAAACAGAAAGTTATAGTCGCGATATTACTTCTCTATAAAAAACCTTTAAT
****
cry27Aa1      TTTGATAAAATTAATTTCTATGGGGCATTAAATGAAAATTGGCTATTTTCTGTGTATAAT
BE15.1      TTTCAAAGAATTTACTTCTATGGAGCATTAAATAGAAATTTGGCAATTTTCGATTTATAAT
***
cry27Aa1      CAGAACGGTCCAATTATAAAACACAGTAATATACCAGGTATTGATGCGCCTTCAACAGGT
BE15.1      TCGGGAGTCCGCTTATAGAGCATAGAAATATACCTGGTGTGGAGGCACCTTCAACACAG
*
cry27Aa1      TTAATTACAGCACTATACTCATTATTTATCAAATTTGTATCTTCCAATCAAACCGAAAT
BE15.1      TTAGATTACAGCACTATACTCATTATTTGTGAGATTGCATGTTGATTTCCA---GAACT
***
cry27Aa1      GGAGGATCTGCACCAGATTACAACACCAATCATATGTATTTGGTTGGAATCACTATACT
BE15.1      ATTACGGTAACTAGAAGACAATAGTCAATCATATATATTTGGATGGAATCACTATACT
*
cry27Aa1      ATTGATCCACAGGGAATTATGTAACAGATGCATTTGAGGTAAATAAAAACCTACCTGAA
BE15.1      ATTGACCCACAGGGAATTATGTAACAGATGCAAGTTGGGTAGATAACAACCTACCTGAA
*****
cry27Aa1      AGCCGCTATGTACCCCAAATTTACAAGTACCCGCTGTAAAAGCTAGTGATATATCAAC
BE15.1      GGACGATATGTACCCCAAATTTACAAGTGCCCGCTGTAAAAGCTAGTGATATATCAAC
*
cry27Aa1      CCAGGTCGTGTAGTTAATGCAAAAGTTGAATCTGGACCATATTT TACAGGCGGAGATGTT
BE15.1      -----
cry27Aa1      ATTGTATC GAAAGCTCAATTAGATGGATCAGGTCTAGCCAGAACCTTATAACCTTCCTT
BE15.1      -----
cry27Aa1      ATTATACCGAAAAGATATCGAGCAAGCGGATTTTCGTGTACGTATGTACTATGCTGCTAAT
BE15.1      -----
cry27Aa1      CATA CGGACAAGTGAGTTATGGTGTAGCAAATATTAACACAACAGGTTATGCAAATTTT
BE15.1      -----
cry27Aa1      CAAAAACGTTTGATGGTTGGGAATATTTTAGAGCGGCACACGAACATTTTAAATATATA
BE15.1      -----
cry27Aa1      GAATTTGATACGACATTTAGCTTGCAGAAATTCAGGTCAATTAGAGGAGCATCTATTGCAT
BE15.1      -----
cry27Aa1      ATTTATTATCCAAATACTACAAAATATCTGGCGATCAATTATTAATTATAGACAAAATT
BE15.1      -----
cry27Aa1      GAATTTATACCGGTGGGTATTCCACTAAATCAAACATCAGAAGGATATAATACGTACGAT
BE15.1      -----
cry27Aa1      CAGAATACTAATAGCTATAATCAAACCTATAACAATTACAACCAAACATGGATACTACA
BE15.1      -----

```

Material suplementario

```
cry27Aa1      TATCAACCAAACCTATGACAATTATAAGCAGAATTCAGTGGTATGTATGACAATCCCTAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      AACCAAAATCCAAGGATAGTTATAATCAAAATTATACCGATACGTATGATTCAGGATAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      AATAACAGCCAGAACGTTGGCTCTAATTATAATCAAGAATACAATACTTATAACCAAGAT
BE15.1      -----

cry27Aa1      ACGGAAAATATGTATAACCAATCGTATAACAATATAATTCTGACAACAACAATTACAAC
BE15.1      -----

cry27Aa1      CAGAATTCGATTGCATGTGTAGTCCAGGATATAATGGTAACTATGAATGTAGATGTAAC
BE15.1      -----

cry27Aa1      CAAAGGGCTAACGGTAATTATCCTAAATAA
BE15.1      -----
```

Material suplementario 3:

Secuencia de los genes recombinantes desarrollados en este estudio. Las secuencias se muestran en formato FASTA. La secuencia de los “Linkers” entre el anticuerpo y la toxina Cry1Ab (o viceversa) está subrayada en cada gen.

> α -gfp-Cry1Ab_28

```

atggctcaggtgcagctggtggagctctgggggagccttgggtgcagccgggggggtctctgagactctcctgtgc
agcctctggattccccgtcaatcgctatagtatgaggtggtaccgccaggctccagggaggagcgcgagtgagg
tcgcggggatgagtagtgctggtgatcgttcaagttagaagactccgtgaagggccgattcaccatctccaga
gacgacgccaggaatacgggtgatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtgtattactgtaa
tgtcaatgtgggctttgagtagctggggccaggggaccaggtcacctctcctcagcggccgcacgggtggag
gtagtggtggaggaatagaaactgggttacacccaatcgatatttctctgtcgctaacgcaatttcttttgagt
gaatttggtccgggtgctggatttggttaggactagttgatataatgggggaatttttggtccctctcaatg
ggacgcatttctgtacaaattgaacagttaattaaccaaagaatagaagaattcgctaggaaccaagcattt
ctagattagaaggactaagcaatctttatcaaatttacgcagaatcttttagagagtgggaagcagatcctact
aatccagcattaagagaagagatgctgattcaattcaatgacatgaacagtgcccttacaaccgctattcctct
ttttgcagttcaaaattatcaagttcctctttatcagtatatggtcaagctgcaaaatttacatttatcagttt
tgagagatggttcagtggttgacaaaggtggggatttgatgccgcgactatcaatagtcgttataatgattta
actaggcttattggcaactatacagatcatgctgtacgctggtacaatacgggattagagcgtgtatggggacc
ggattctagagattggataagataatcaatttagaagagaattaacactaactgtattagatatcgtttctc
tatttccgaactatgatagtagaacgtatccaattcgaacagtttccaattaacaagagaatttatacaaac
ccagtagtagaaaattttgatggtagttttcgaggctcggctcagggcatagaaggaagtagtaggagtcacaca
tttgatggatatacttaacagtataaccatctatacggatgctcatagaggagaatattatggtcagggcatc
aaataatggcttctcctgtagggttttcggggccagaattcacttttcgctatattggaactatgggaaatgca
gctccacaacaacgtattgttgctcaactaggtcagggcgtgtatagaacattatcgctccactttatatagaag
accttttaatatagggataaataatcaacaactatctggtcttgacgggacagaatttgcttatggaacctcct
caaatttgccatccgctgtatacagaaaaagcggaaacggtagattcgctggatgaaataccgccacagaataac
aacgtgccacctaggcaaggatttagtcatcgattaagccatggttcaatgtttcgttcaggctttagtaatag
tagtgtaagtataataagagctcctatggtctcctggatacatcgtagtgctgaatttaataatataatcctt
catcacaattacacaaatacctttaacaaaatctactaatcttggtctggaactctgtcgttaaaggacca
ggatttacaggaggagatattcttcgaagaacttcacctggccagatttcaaccttaagagtaaataattactgc
accattatcacaagatattcgggtaagaattcgctacgcttctaccacaaatttacaattccatacatcaattg
acggaagacctattaatcaggggaattttcagcaactatgagtagtgggagtaatttacagtcgggaagcttt
aggactgtagggtttactactccgtttaacttttcaaattggatcaagtgtatttacgttaagtgctcatgtcctt
caattcaggcaatgaagtttatatagatcgaattgaatttggtccggcagaagtaacctttgaggcagaatag
atthagaaagagcacaaaaggcgggtgaatgagctgttacttcttccaatcaaatcgggttaaaaacagatgtg
acggattatcatattgatcaagatccaatttagttgagtggttatctgatgaattttgtctggatgaaaaaaa
agaattgtccgagaaagtcaacatgcgaagcgacttagtgatgagcggaaatttacttcaagatccaaacttta
gagggatcaatagacaactagaccgtggctggagaggaagtagcggatattaccatccaaggaggcgtgacgta

```

ttcaaagagaattacgttacgctattgggtacctttgatgagtgctatccaacgtatttatatcaaaaaataga
tgagtcgaaatataaagcctatacccgttaccaattaagagggtatatcgaagatagtcgaagacttagaaatct
atftaatcgcgtacaatgccaaacacgaacagtaaatgtgccagggtacgggttccttatggccgctttcagcc
ccaagtcgaatcggaataatgtgccatcatcccatcatttctccttgacattgatgtggatgtacagactt
aaatgaggacttaggtgatgggtgatattcaagattaagacgcaagatggccatgcaagactaggaatctag
aatttctcgaagagaaccatttagtaggagaagcactagctcgtgtgaaaagagcggagaaaaatggagagac
aaacgtgaaaaatggaatgggaacaaaatattgtttataaagaggcaaaagaatctgtagatgctttatttgt
aaactctcaatgatagattacaagcggataccaacatcgcgatgattcatgcccagataaaacgcgttcata
gcatcgcagaagcttatctgcctgagctgtcgtgattccgggtgtcaatgcccgtatTTTTGAGAATAGAA
ggcgtatTTTTcactgcattctccctatatgatgcgagaatgtcattaaaaatggtagtttaataatggctt
atcctgctggaacgtgaaagggcatgtagatgtagaagaacaaaacaccacgttcggctcctgtgtgtccgg
aatgggaagcagaagtgtcacaagaagtctgtgtcgtccgggtcgtggctatatcctcgtgtcacagcgtac
aaggaggatattggagaaggttgcgtaaccattcatgagatcgagaacaatacagacgaactgaagtttagcaa
ctgtgtagaagaggaagtatatccaaacaacacggttaactgtaattgattatactgcgactcaagaagaatatg
agggtacgtacattctcgtaatcgaggatgacggagcctatgaaagcaattcttctgtaccagctgattat
gcatcagcctatgaagaaaagcatatacagatggacgaagagacaatccttgtgaatctaacagaggataggg
ggattacacaccactaccagctggctatgtgacaaaagaattagagtaactcccagaaaccgataaggtatgga
ttgagatcgggagaacggaaggaacattcatcgtggacagcgtggaattacttcttatggaggaa

>*α-gfp-Cry1ab_57*

atggctcagggtgcagctggtggagctcggggagccttgggtgcagcgggggggtcctcagactcctcctgtgc
agcctcggattccccgtcaatcgcctatagtagaggtggtacgccaggctccaggaaggagcgcgagtggg
tcgcgggtatgagtagtgctggtgatcgttcaagttatgaagactccgtgaaggccgatccacatctccaga
gacgacgccaggaatacgggtgatctgcgaatgaacagcctgaaacctgaggacacggccgtgtattactgtaa
tgtcaatgtgggctttgagtaactggggccaggggacccagggtcacctcctcagcggccgcatcgggtggag
gtagtgggtggaggaattaggactagttgatataatattgggaatttttggctccctcctcaatgggacgcatctctt
gtacaaattgaacagtttaattaaccaaagaatagaagaattcgcctaggaaccaagccatttctagattagaagg
actaagcaatctttatcaaatcagcagaatcttttagagagtggaagcagatcctactaatccagcattaa
gagaagagatgcttattcaattcaatgacatgaacagtgcccttacaaccgctattcctcttttgcagttcaa
aattatcaagttcctctttatcagtatatgttcaagctgcaaatttacatttatcagttttgagagatgtttc
agtgtttggacaaaggtggggatttgatgcccgcactatcaatagtcgttataatgatttaactaggcttatg
gcaactatacagatcatgctgtacgctggtacaatacgggattagagcgtgtatggggaccggattctagagat
tggataagataatcaatttagaagagaattaacactaactgtattagatatcgtttctctatttccgaacta
tgatagtagaacgtatccaattcgaacagtttccaattaacaagagaaatttatacaaaaccagatttagaaa
atfttgatggtagtttctcagggctcggctcagggcatagaaggaagtattaggagtcacatttgatggatata
cttaacagtataaccatctatacggatgctcatagaggagaatattatgggtcagggcatcaaaataatggcttc
tctgtagggttttcggggccagaattcacttttccgctatatggaactatgggaaatgcagctccacaacaac
gtattgttgctcaactaggctcagggcgtgtatagaacattatcgtccactttatagaagaccttttaataata
gggataaataatcaacaactatctgttcttgacgggacagaatttgcttatggaacctcctcaaatggccatc
cgctgtatacagaaaaagcggaaacggtagattcgcctggatgaaataccgccacagaataacaacgtgccacct
ggcaaggatttagtcatcgattaagccatgtttcaatgtttcgttcaggcttttagtaatagtagtgaagtata
ataagagctcctatgttctcctggatcacatcgtagtgctgaatttaataatataattccttcatcaaaaattac

acaaatacctttaacaaaatctactaatcttggtctggaacttctgtcgttaaaggaccaggatttacaggag
 gagatattcttcogaagaacttcacctggccagatttcaaccttaagagtaaatattactgcaccattatcacia
 agatattcgggtaagaattcgcctacgcttctaccacaaatttacaattccatacatcaattgacggaagacctat
 taatcaggggaattttcagcaactatgagtagtgggagtaatttacagtcggaagctttaggactgtaggtt
 ttactactccgtttaacttttcaaatggatcaagtgtatttacgttaagtgtcatgtcttcaattcaggcaat
 gaagtttatatagatcgaattgaatttggttccggcagaagtaacctttgaggcagaatatgatttagaaagac
 acaaaaggcggatgaatgagctgttacttctccaatcaaatcgggttaaaaacagatgtgacggattatcata
 ttgatcaagatccaatttagttgagtggttctctgatgaattttgtctggatgaaaaaaaaagaattgtccgag
 aaagtcacaacatgcgaagcgcacttagtgatgagcggaaatttacttcaagatccaaacttttagagggatcaatag
 acaactagaccgtggctgggagaggaagtagcagatattaccatccaaggaggcagatgacgtattcaaagagaatt
 acggtacgctattgggtacctttgatgagtgctatccaactgatttatatcaaaaaatagatgagtcgaattta
 aaagcctatacccggtaccaattaagaggggtatatacgaagatagtagcaagacttagaaatctatttaattcgcta
 caatgccaaaacgaaacagtaaatgtgccaggtagcgggttcccttagggcggctttcagcccaagtcgaatcg
 gaaaaatgtgcccatcattcccatcatttctccttgacattgatgtggatgtacagacttaaatgaggactta
 ggtgtatgggtgatattcaagattaagacgcaagatggccatgcaagactaggaaatctagaatttctcgaaga
 gaaaccattagtaggagaagcactagctcgtgtgaaaagagcgggagaaaaatggagagacaaacgtgaaaaat
 tggaaatgggaaacaaatattgtttataaagaggcaaaagaatctgtagatgctttatttgaactctcaatat
 gatagattacaagcggataccaacatcgcgatgattcatgcccagataaaacgcggtcatagcattcgagaagc
 ttatctgcctgagctgtctgtgattccgggtgtcaatgcccgtatttttgaagaattagaagggcgtattttca
 ctgcatctccctatatgatgaggaagaatgtcattaaaaatgggtgatttataaatggcttatcctgctggaac
 gtgaaagggcatgtagatgtagaagaacaaaacaccacggtcggctcctgtgttccggaatgggagcaga
 agtgtcacaagaagtctgtgtctgtccgggtcgtggctatatcctcgtgtcacagcgtacaaggaggatag
 gagaaggttgcgtaaccattcatgagatcgagaacaatacagacgaactgaagtttagcaactgtgtagaagag
 gaagtatatccaaacaacacggtaacgtgtaattatactgagcactcaagaagaatatgagggtagctacac
 ttctcgtaatcgaggatagtagcggagcctatgaaagcaattctctgtaccagctgattatgcatcagcctatg
 aagaaaaagcatatacagatggacgaagagacaatccttgtgaatctaacagaggataggggattacacacca
 ctaccagctggctatgtgacaaaagaattagagtacttcccagaaacgataaggtatggatgagatcgggaga
 aacggaaggaacattcatcgtggacagcgtggaattacttcttatggaggaa

> α -gfp-Cry1Ab_28-trunc

atggctcaggtgcagctgggtggagtctgggggagccttgggtgcagccgggggggtctctgagactctcctgtgc
 agcctctggattccccgtcaatcgctatagatgaggtggtagccgaggtccagggaaggagcgcgagtggtg
 tcgagggtatgagtagtgctggatcgttcaagttatgaagactccgtgaagggccgattcaccatctccaga
 gacgagccaggaatacgggtgatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacacggcctgtattactgtaa
 tgtcaatgtgggctttgagtagtggggccaggggaccaggtcaccgtctcctcagcggccgcacgggtggag
gtagtggtggaggaaatagaaactggttacaccccaatcgatatttctctgtcgttaacgcaatttctttgagt
 gaatttgttcccggtgctggatttgtgttaggactagttgatataataggggaatttttggctccctctcaatg
 ggacgcatctctgtacaaattgaacagtttaattaacaaagaatagaagaattcgttaggaaccaagcattt
 ctgatttagaaggactaagcaatctttatcaaatcgcgagaatcttttagagagtggggaagcagatcctact
 aatccagcattaagagaagagatgctattcaattcaatgacatgaacagtgcccttacaaccgctattcctct
 ttttcagttcaaaattatcaagttcctcttttatcagtatatgttcaagctgcaaaatttacatttatcagttt
 tgagagatgtttcagtggttgacaaggtggggtttgatgcccgcgactatcaatagtcgtataatgatatta

actaggcttattggcaactatacagatcatgctgtacgctggtacaatacgggat tagagcgtgtatggggacc
ggattctagagattggataagataataatcaattagaagagaattaacactaactgtattagatatcgtttctc
tatttccgaactatgatagtagaacgtatccaattcgaacagtttccaattaacaagagaatttatacaaac
ccagtattagaaaattttagtgtagttttagaggctcggctcagggcatagaaggaagtattaggagtccaca
tttgatggatatacttaacagtataacctctatacggatgctcatagaggagaatattattggtcagggcatc
aaataatggcttctcctgtagggttttggggccagaattcacttttccgctatatggaactatgggaaatgca
gctccacaacaacgtattgttgctcaactagggtcagggcgtgtatagaacattatcgctccactttatatagaag
accttttaatataggataaataatcaacaactatctgttcttgacgggacagaatttgcttatggaacctcct
caaatggccatccgctgtatacagaaaaagcggaacggtagattcgctggatgaaataccgccacagaataac
aacgtgccacctaggcaaggatttagtcatcgattagccatgtttcaatggttcggtcagggcttagtaatag
tagtgtaagtataataagagctcctatgttctctggatacatcgtagtgctgaatttaataatataatcctt
catcacaattacacaaatcctttaacaaaatctactaatcttggtctggaacttctgtcgttaaaggacca
ggatttacaggaggagatattctcgaagaacttcacctggccagatttcaaccttaagagtaaatattactgc
accattatcacaagatatcgggtaagaattcgctacgcttctaccacaaatttacaattccatacatcaattg
acggaagacctatataacaggggaattttcagcaactatgagtagtgaggtaatttacagtcggaagcttt
aggactgtagggtttactactccgtttaactttcaaatggatcaagtgatttacggttaagtgctcatgtctt
caattcaggcaatgaagtttatatagatcgaattgaatttggtcggcagaagtaaaccttt

>Cry1Ab-trunc- α -gfp

atggataacaatccgaacatcaatgaatgcattccttataattgtttaagtaacctgaagtagaagtattagg
tgagaaagaatagaaactgggtacacccaatcgatattccttgctcgaacgaatttcttttgatggaat
ttgttccgggtgctggattttgtgttaggactagttgatataataggggaatttttggtccctctcaatgggac
gcatttcttgtaacaaatgaacagtttaataaccaaagaatagaagaattcgctaggaaccaagcatttctag
attagaaggactaagcaatctttatcaaatttacgcagaatcttttagagagtggaagcagatcctactaatc
cagcattaagagaagagatgcgtattcaattcaatgacatgaacagtgcccttacaaccgctattcctctttt
gcagttcaaaatatacaagttcctcttttatcagtatatgttcaagctgcaaaattacatttatcagttttgag
agatgttctcagtggttgacaaaaggtggggatttgatgcccgcactatcaatagtcgttataatgatthaacta
ggcttattggcaactatacagatcatgctgtacgctggtacaatacgggat tagagcgtgtatggggaccggat
tctagagattggataagataataatcaatttagaagagaattaacactaactgtattagatatcgtttctctatt
tccgaactatgatagtagaacgtatccaattcgaacagtttccaattaacaagagaatttatacaaacccag
tattagaaaatttttagtgtagttttagaggctcggctcagggcatagaaggaagtattaggagtccacatttg
atggatatacttaacagatataacctctatacggatgctcatagaggagaatattattggtcagggcatcaaat
aatggcttctcctgtagggttttggggccagaattcacttttccgctatatggaactatgggaaatgcagctc
cacaacaacgtattgttgctcaactagggtcagggcgtgtatagaacattatcgctccactttatatagaagacct
tttaatatagggataaataatcaacaactatctgttcttgacgggacagaatttgcttatggaacctcctcaaa
tttgccatccgctgtatacagaaaaagcggaacggtagattcgctggatgaaataccgccacagaataacaacg
tgccacctaggcaaggatttagtcatcgattagccatgtttcaatggttcggtcagggcttagtaatagtagt
gtaagtataataagagctcctatgttctctggatacatcgtagtgctgaatttaataatataatccttcatc
acaaattacacaaatcctttaacaaaatctactaatcttggtctggaacttctgtcgttaaaggaccaggat
ttacaggaggagatattctcgaagaacttcacctggccagatttcaaccttaagagtaaatattactgcacca
ttatcacaagatatcgggtaagaattcgcctacgcttctaccacaaatttacaattccatacatcaattgacgg
aagacctattaacaggggaattttcagcaactatgagtagtgaggtaatttacagtcggaagcttttagga

ctgtaggttttactactccgtttaacttttcaaattggatcaagtgtatttacgttaagtgtcatgtcttcaat
tcaggcaatgaagtttatatagatcgaattgaatttgttccggcagaagtaacctttgaggcagatctattcggg
aggtggaggtagtgggtggagggaatggctcaggtgcagctggtggagtctgggggagccttgggtgcagccgg
gggggtctctgagactctcctgtgcagcctctggattccccgtcaatcgctatagtatgaggtggtaccgccag
gctccaggaaggagcgcgagtgggtcgcgggtatgagtagtgctggtgatcgttcaagttatgaagactccgt
gaaggccgattcacatctccagagacgacgccaggaatacgggtgatctgcaaatgaacagcctgaaacctg
aggacacggccgtgtattactgtaatgtcaatgtgggctttgagtactggggccaggggaccaggtcaccgtc
tcc