

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
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 $\delta$ -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 $\delta$ -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
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>3. Prospección de la biodiversidad natural de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de <i>Ceratitis capitata</i>.....</b>	<b>49</b>
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>Ceratitis capitata</i> .....	69
3.3.4.1 Bioensayos sobre adultos.....	69
3.3.4.2 Bioensayos sobre larvas.....	71
3.4 Discusión.....	71
<b>4. Efecto de la solubilización y digestión proteolítica en la actividad de las protoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Ceratitis capitata</i> .....</b>	<b>79</b>
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 $\delta$ -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 $\delta$ -endotoxinas.....	86
4.2.4 Electroforesis de proteínas y densitometría.....	86
4.2.5 Bioensayos sobre <i>Ceratitis 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>Ceratitis capitata</i> .....	90
4.3.2 Efecto de la digestión de las $\delta$ -endotoxinas sobre <i>Ceratitis capitata</i> .....	94
4.3.2.1 Activación de las protoxinas según la fuente de proteasas.....	94
4.3.2.2 Actividad de las $\delta$ -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>Ceratitis 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
<b>5. Bases para el desarrollo de un nuevo sistema de obtención de toxinas recombinantes insecticidas .....</b>	<b>111</b>
5.1 Introducción.....	113
5.2 Material y métodos.....	117
5.2.1 Caracterización del proteoma intestinal de adultos de <i>Ceratitis 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 $\alpha$ -gfp-Cry1Ab_28 .....	154
5.4 Discusión .....	156
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>161</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>175</b>
<b>9. MATERIAL SUPLEMENTARIO .....</b>	<b>207</b>