

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CRY2Aa Y CRY2Ab DE
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE LARVAS
DE PRIMER INSTAR DE *Tecia solanivora***

LINDA YHISSET GÓMEZ ARIAS

ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**Bogotá, D. C., Colombia
Junio 2011**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CRY2Aa Y CRY2Ab DE
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE LARVAS
DE PRIMER INSTAR DE *Tecia solanivora***

LINDA YHISSET GÓMEZ ARIAS

Directores:
SILVIA ROSSY GÓMEZ DAZA
MSc. Microbiología
VÍCTOR MANUEL NÚÑEZ ZARANTES
PhD. Genética Molecular Vegetal

**Trabajo de Grado Presentado como requisito parcial
Para optar al título de:**

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Énfasis en Biotecnología Vegetal**

**Bogotá, D. C., Colombia
Junio 2011**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Pontificia Universidad Javeriana no se hace responsable por los conceptos, criterios, opiniones y conclusiones expresados por sus alumnos, solo velará por que el trabajo no tenga ataques personales y únicamente se vea en él, el anhelo de buscar la verdad y justicia”.

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1996.

**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CRY2Aa Y CRY2Ab DE
Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* Y SU EVALUACIÓN BIOLÓGICA SOBRE LARVAS
DE PRIMER INSTAR DE *Tecia solanivora***

Linda Yhiset Gómez Arias

Dra. Ingrid Schuler PhD.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dr. Manuel Franco PhD.
Director de Posgrados
Facultad de Ciencias

A tí mamá

A la vida y todas sus grandes maravillas...

AGRADECIMIENTOS

MSc. Silvia Rosy Gómez Daza, directora y orientadora de este proyecto, por su constante apoyo y seguimiento de este estudio, por su paciencia y amistad.

Doctor Vítor Manuel Núñez Zarantes, director y orientador de este proyecto, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su confianza en el trabajo.

Doctor Leonardo Mariño Ramírez asesor de este trabajo, por su apoyo incondicional.

Doctora Laura Villamizar, por el suministro de *Tecia solanivora* para el desarrollo de los bioensayos.

c.MSc. Felix Enciso por su colaboración en el análisis de datos y revisión de estilo, en la parte final de este proyecto.

Doctor Jorge Arguelles, por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

Laboratorio de Microbiología Molecular, por el prestamo de equipos.

Mis compañeros de laboratorio presentes y ya ausentes, en especial a Ivan Calixto, Girley Collazos, Zulma Cardenas, Carolina Ospina, Marcela Castañeda, Luis Miguel Solano, por todos sus aportes y apoyo permanente pero sobre todo por su amistad y constante preocupación que hicieron posible el éxito de esta investigación.

Aura Yaneth Camargo por su colaboración y permanente apoyo en la asistencia técnica y logística.

MSc. Mauricio Pulido, por su colaboración en el análisis crítico de los resultados.

A Yeison Callejas por su constante apoyo, paciencia y sobre todo, mucho amor.

Mi familia, por su confianza.

Compañeros de estudio, Alexandra Vasquez, Guillermo Buraglia y Claudia Mendez, por hacer de esta maestría algo super agradable.

COLCIENCIAS con su programa Jóvenes Investigadores y a CORPOICA por facilitar las instalaciones de laboratorio.

A Sonny, por su compañía y por hacer de la escritura de este documento un constante juego.

Laboratorio de Genética Molecular Vegetal y micropropagación, por su colaboración y buenos momentos.

Pontificia Universidad Javeriana, por su formación, en especial a los profesores Wilson Teran, Claudia Hernandez y Ricardo Martinez, por hacer de mi una mejor investigadora.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al buen término de este trabajo, a todos gracias.

INDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	6
2.1 La papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	6
2.1.1 Origen y distribución de la papa	6
2.1.2 Taxonomía y Morfología	7
2.1.3 Composición nutricional y uso de la papa	8
2.2 La polilla guatemalteca: <i>Tecia solanivora</i>	10
2.2.1 Generalidades y origen.....	10
2.2.2 Biología y comportamiento de <i>T. solanivora</i>	12
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.3.1 Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.3.3 Proteínas Cry	18
2.3.4 Modo de acción de las ICPs de <i>B. thuringiensis</i>	20
2.3.5 Genes con actividad contra insectos lepidópteros	20
2.3.6 Genes <i>cry2A</i>	22
2.4 Proteínas recombinantes.....	23
2.4.1 Generalidades.....	23
2.4.2 Empleo de proteínas Cry recombinantes.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Localización	26
3.2 Material Biológico	26
3.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	26
3.2.2 Material Entomológico.....	27
3.3 Diseño de cebadores.....	28
3.4 Aislamiento y cuantificación del ADN plasmídico de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	28

3.5 Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> y purificación de los productos.....	28
3.6 Ligación y transformación de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i> al vector pET151	29
3.7 Confirmación de clones recombinantes por PCR y enzimas de restricción.....	29
3.8 Secuenciación.....	30
3.9 Inducción y solubilización de la expresión de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab	30
3.10 Detección de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab mediante inmuntiras de flujo transversal	30
3.11 Evaluación de la actividad insecticida del lisado <i>E. coli</i> cepa B121 pET151- <i>cry2Aa</i> y pET151- <i>cry2Ab</i> sobre larvas de primer instar de <i>T. solanivora</i>	31
3.12 Diseño experimental	31
3.13 Análisis de resultados.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Diseño de cebadores para los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i>	33
4.2 Extracción de ADN plasmídico y cuantificación.....	34
4.3 Amplificación de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i>	35
4.4 Clonación de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i> en el vector de expresión pET151/D-TOPO®	37
4.5 Análisis de la secuencia obtenida para los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i>	40
4.6 Predicción de la Estructura y función de las proteínas putativas Cry2A y Cry2Ab ..	44
4.7 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes	46
4.8 Actividad biológica de Cry2Aa y Cry2Ab.....	50
5. CONCLUSIONES.....	54
6. RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
ANEXOS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición química de la papa <i>S. tuberosum</i> (Contenido en 100 gr de parte comestible)	9
Tabla 2: Iniciadores diseñados para la amplificación de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	33
Tabla 3: Secuencia de los iniciadores internos diseñados para la secuenciación de los genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i>	34
Tabla 4: Condiciones de amplificación del genes <i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	355
Tabla 5: Programa para la amplificación del gen <i>cry2Aa</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	366
Tabla 6: Programa para la amplificación del gen <i>cry2Ab</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	366
Tabla 7: Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada como <i>cry2Aa</i> en <i>B. thuringiensis</i> y genes reportados.	41
Tabla 8: Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada como <i>cry2Ab</i> en <i>B. thuringiensis</i> y genes reportados.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Planta de papa, representada por sus diferentes estructuras.	8
Figura 2: Ciclo biológico de <i>T. solanivora</i>	12
Figura 3: Microfotografía de <i>B. thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión.	15
Figura 4: Dendograma de toxinas Cry	17
Figura 5: Estructuras tridimensionales de las toxinas insecticidas producidas por <i>B. thuringiensis</i> Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Bb.	199
Figura 6: Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	20
Figura 7: Mapa del vector pET151/D-TOPO® utilizado para la clonación y expresión de los genes cry2Aa y cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	27
Figura 8: Perfil electroforético del ADN plasmídico de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	34
Figura 9: Perfil electroforético de los genes cry2Aa y cry2Ab.	37
Figura 10: Perfil electroforético del producto de PCR y análisis de restricción del gen cry2Aa.	38
Figura 11: Perfil electroforético del producto de PCR y análisis de restricción del gen cry2Ab.	388
Figura 12: Perfil electroforético de los constructos pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab digeridos con enzimas de restricción.	39
Figura 13: Secuencia de nucleótidos correspondiente al gen cry2Aa de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (iniciadores directo y reverso son resaltados).	42
Figura 14: Secuencia de nucleótidos correspondiente al gen cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (iniciadores directo y reverso son resaltados).	43
Figura 15: Dominios reportados por Pfam para las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	45
Figura 16: Estructura tridimensional de la proteína cry2Aa de <i>B. thuringiensis</i>	46

Figura 17: Perfil electroforético del extracto crudo de proteínas totales de <i>E. coli</i> pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab.1.	48
Figura 18: Perfil electroforético del extracto crudo de proteínas totales de <i>E. coli</i> pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab solubilizadas con carbonato de sodio 0.1mM pH 11.	49
Figura 19: Detección de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab por inmunodetección.	500
Figura 20: Resultados del porcentaje de mortalidad de los diferentes tratamientos	52

LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN plasmidico.</i>	65
<i>Anexo 2. Protocolo de transformación de Escherichia coli cepa TOP10 y BL21</i>	66
<i>Anexo 3. Buffer de lisis.....</i>	66
<i>Anexo 4. Protocolo para la electroforesis de proteínas empleando el tampón de Laemmli.</i>	67
<i>Anexo 5. Secuencia aminoacídica de la proteína putativa Cry2Aa</i>	70
<i>Anexo 6. Secuencia aminoacídica de la proteína putativa Cry2Ab</i>	70
<i>Anexo 7. Secuencia aminoacídica de la proteína Cry2Aa, encontrada en PDB</i>	70
<i>Anexo 8. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas putativas Cry2Aa y Cry2Ab</i>	71
<i>Anexo 9. Análisis estadístico de los tratamientos</i>	70



RESUMEN

La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) constituye uno de los problemas más severos que afectan al cultivo de la papa en Colombia, una alternativa de control es el empleo de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* las cuales han demostrado tener un gran potencial tóxico frente a insectos del orden de los lepidópteros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad tóxica de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*. Para alcanzar este objetivo, fue necesario diseñar para cada gen dos parejas de iniciadores, los cuales permitieron amplificar mediante PCR los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* cada uno de 1902 pb, a partir de ADN plasmídico *B. thuringiensis* var *kurstaki*, estos fueron ligados de manera independiente al vector de expresión pET151/D-TOPO® y transformados en *Escherichia coli* cepa TOP10, su confirmación se realizó por PCR y cortes con enzimas de restricción. Los clones recombinantes, fueron secuenciados y ensamblados para obtener una secuencia final de 1902 pb que presentaron valores de identidad del 100% con los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* de *B. thuringiensis* reportados en la base de datos de GenBank. Se encontró un contenido de guaninas-citosinas del 34.1 y 34.9% respectivamente, estos valores se encuentran dentro de los rangos determinados para los mismos. Posteriormente, el ADN plasmídico recombinante se transformó en *E. coli* cepa BL21, donde fueron expresados empleando como inductor de expresión 1 mM de IPTG, la presencia de las proteínas recombinantes se detectó usando tiras de inmunodetección que contienen un anticuerpo específico para *cry2A* y con geles de SDS PAGE al 8%. Finalmente se evaluó la eficacia de las proteínas recombinantes presentes en el lisado total de *E. coli* BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*, encontrándose eficacias de 71.26 y 36.78% respectivamente. Para el caso de *E. coli* BL21 pET151-cry2Aa se presentaron diferencias significativas con los controles absoluto y negativo, pero no con el control positivo, lo que indica que la proteína Cry2Aa, presenta actividad tóxica contra esta plaga. *E. coli* BL21 pET151-cry2Ab no presentó diferencias significativas con los controles absoluto y negativo, lo que en este caso demuestra la poca toxicidad de esta proteína contra *T. solanivora*. Estos resultados permite postular a la proteína Cry 2Aa como promisoría para ser incluida en programas de control de *T. solanivora*.



ABSTRACT

The Guatemalan potato moth (*Tecia solanivora*), is one of the main problems affecting potato crop in Colombia. An alternative for its control is the use of Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*, which have shown a high toxic potential against Lepidopteran insects. The aim of this work was to evaluate the toxic activity from Cry2Aa and Cry2Ab recombinant proteins on *T. solanivora* first-instar larvae. Two specific pair of primers were designed for the amplification of Cry2Aa and Cry2Ab genes from *B. thuringiensis* var *kurstaki* plasmid DNA, obtaining weight of 1902 bp from each. These genes were ligated to pET151/D-TOPO[®] expression vector and cloned in *Escherichia coli*, strain TOP10 and confirmed with PCR and restriction enzyme analysis. The recombinant clones were sequenced and compared with the GenBank database, finding similar sequences with identity values of 100% for each gene. Subsequently, the recombinant plasmid DNA was transformed in *E. coli*, strain BL21, expressed with IPTG 1 mM and detected by immunodetection strips, with the specific Cry2A antibody and by 8% SDS PAGE. Finally, the efficacy of the recombinant proteins present in the total lysate from *E. coli* BL21-cry2Aa pET151 pET151-Cry2Ab was evaluated on *T. solanivora* first-instar larvae, finding control efficiencies of 36.78% and 71.26% respectively. For *E. coli* BL21 pET151-Cry2Aa, there were significant differences with the negative control, but no with the positive control, showing that the Cry2Aa protein has a toxic activity against this pest. On the other hand, *E. coli* BL21 pET151-Cry2Ab had not significant differences with the negative control, which in this case, demonstrates the low toxicity of this protein against *T. solanivora*. This result suggests that Cry2Aa can be used as a promising protein to be included in control programs against this insect.



1. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum sp.*), es el cuarto cultivo alimenticio en el mundo después del maíz, el arroz y el trigo. Es considerada parte importante del sistema alimentario mundial, principalmente por su rápido crecimiento y por las altas cantidades de vitaminas, proteínas y carbohidratos encontradas en sus tubérculos. A nivel mundial, es el producto no cerealero número 1 y para el año 2009 alcanzó una producción de 327.682.537 toneladas (Faostat 2011). Este cultivo se encuentra distribuido por todo el mundo, siendo Asia el continente que presenta la mayor producción con 146.014.666 toneladas para el año 2009, se estima que alrededor de 193.000 kilómetros cuadrados de tierras agrícolas en el mundo, son destinadas para su explotación (Fao, 2009).

En Colombia este tubérculo es uno de los principales componentes de la canasta familiar y su cultivo representa una gran fuente de trabajo por la exigencia de uso de mano de obra para diferentes labores, se considera que el sistema productivo demanda 20 millones de jornales al año, vinculando de forma directa más de 110.000 familias (Osorio *et al.*, 2001). En el año 2009 se reportó una producción de 2.272.770 toneladas, ubicándolo en el quinto lugar de la producción agropecuaria nacional, con una extensión de 123.659 ha y un rendimiento de 18.37 t/ha, (faostat 2009).

El cultivo de papa en Colombia es atacado por un gran número de insectos plaga y enfermedades que afectan la producción, dañan la calidad y demeritan el producto. Entre los organismos plaga de mayor importancia económica en este cultivo sobresalen el gusano blanco, *Premnotrypes vorax* y la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (López y Espitia, 2000). Esta última fue reportada por primera vez en centro América en 1973 y ha sido considerada la plaga más dañina y con mayor impacto negativo para el cultivo de papa (Herrera, 1998). En Colombia este insecto está presente en más del 80% de las zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia, provocando pérdidas significativas en la cadena de producción de papa con una disminución en los rendimientos anuales superiores al 30% (Bosa *et al.*, 2005). Esta polilla en su estado larval se alimenta exclusivamente de la pulpa del tubérculo, a su paso va formando galerías profundas y dejando excremento, lo que genera una reducción o pérdida de calidad del producto (EPPO 2005). Desde su irrupción al país ha tenido un fuerte impacto económico en cada región productora; en Norte de Santander, Boyacá y Cundinamarca, la polilla generó pérdidas superiores a 50%. Tan sólo en Boyacá, hacia 1996, los daños ascendieron a 6.720 millones de pesos (Osorio *et al.*, 2001).



Para su control los agricultores realizan una integración de diferentes métodos: cultural, etológico, biológico y químico. Este último es empleado con demasiada frecuencia mediante la modalidad calendario, en la mayoría de los casos sin justificación técnica (López y Espitia, 2000). Considerando que la papa es el producto de origen agrícola que posee la mayor demanda por fungicidas e insecticidas y la segunda de fertilizantes químicos, después del café (Espinal *et al.*, 2005) y que esta demanda de controles químicos ha generado una dependencia altamente perjudicial para el medio ambiente, con drásticos efectos sobre la atmósfera y la biota del suelo, a la vez que representa un riesgo para la salud humana por los efectos tóxicos y mutagénicos característicos de estos agentes (Huang 2005), es necesaria la búsqueda de alternativas de control, eficientes y con un bajo impacto ambiental. La FAO en el 2009 reafirma esta necesidad, al resaltar la importancia de promover la creación de sistemas sostenibles basados en la producción de papa, que aumenten el bienestar de los productores y los consumidores y contribuyan a realizar el pleno potencial de la papa como “alimento del futuro” y proponen como solución, la generación de nuevas variedades, que permitan mejorar los sistemas agrícolas productores.

En relación con el control de esta plaga, se han realizado esfuerzos en diferentes áreas, es así como Corpoica desarrolló un bioplaguicida a base de un virus de la granulosis aislado de *Phthorimaea operculella* para su utilización en condiciones de almacenamiento; este producto reporta una eficacia superior al 90% (Espinel *et al.*, 2009). También se han realizado trabajos usando trampas con feromona comercial (Corredor y Florez, 2003, Bosa *et al.*, 2005), y búsqueda de variedades mejoradas genéticamente expresando el gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* (Universidad Nacional de Colombia sede Medellín y Corporación para las investigaciones biológicas). Este último estudio ha reportado mortalidades hasta del 100% en larvas de *T. solanivora* (Valderrama *et al.*, 2007), otras investigaciones realizadas por Martínez *et al.*, (2003), Pitre *et al.*, (2008) y Grijalba *et al.*, (2011), han demostrado el potencial que pueden llegar a tener las proteínas Cry para el control de *T. solanivora*.

Las proteínas Cry producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, son ampliamente conocidas por presentar actividad tóxica contra distintos invertebrados, especialmente contra larvas de insectos (Schnept *et al.*, 1998). Esta característica, su alta especificidad hacia el insecto blanco, su inocuidad para mamíferos y otros vertebrados y el generar en el ambiente un impacto muy bajo, ha ubicado a *B. thuringiensis* como el biocontrolador más exitoso a nivel mundial (Romeis *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2007, Sauka y Benintende, 2008). Sin embargo se ha reportado la aparición de resistencia por parte de los insectos blanco a la proteína Cry1Ac (Akhurs *et al.*, 2003, Shelton *et al.*, 2002) principalmente por la continua exposición a una sola toxina, como respuesta a esta amenaza surgió una respuesta técnica conocida con el nombre de piramidación de genes, esta se basa en la



expresión simultánea de más de una toxina en una planta transgénica, lo que permite retardar la aparición de la resistencia (Shelton *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de nuevas proteínas Cry, que puedan tener potencial tóxico contra *T. solanivora*. Teniendo en cuenta que las proteínas de la familia Cry2A han demostrado actividad insecticida contra otros lepidópteros considerados plagas (Kumar *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2008) y que no existen estudios de la actividad biológica de las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* contra la población de *T. solanivora*, este trabajo propone el siguiente objetivo general: evaluar la actividad tóxica de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* expresadas en *E. coli* BL21 sobre larvas de primer instar de *Tecia solanivora*.

1. Aislar los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* a partir de ADN plasmídico de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*.
2. Obtener la expresión de las proteínas codificadas por los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* en el sistema pET151/D-TOPO®.
3. Evaluar la actividad tóxica de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab sobre larvas de primer instar de *Tecia solanivora*.

Este estudio permitió, el aislamiento de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* y la expresión de las proteínas que estos codifican en *E. coli* cepa BL21. Se evaluó la actividad tóxica de las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab contra *T. solanivora*, presentes en el lisado total de las bacterias recombinantes y se determinó la eficacia biocontroladora, encontrándose un 71.26 y 36.78% respectivamente y se calculó la CL₅₀ de la proteína *cry2Aa* (167.74 µg/ml). Con estos resultados, se busca apoyar los programas de control que se adelantan con miras a combatir esta plaga.



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 La papa (*Solanum tuberosum*)

2.1.1 Origen y distribución de la papa

La papa, *S. tuberosum*, tubérculo que crece entre los 2.000 y 3.500 msnm, originaria de la cordillera andina, pertenece a la familia de las solanáceas, se reporta que la papa se domesticó en Sudamérica, específicamente en Bolivia, entre los lagos Titicaca y Poopó hace unos 10.000 a 7.000 años (Hawkes, 1994), aunque los primeros vestigios se encontraron en el cañón de Chilca, al sur de Lima en Perú que datan de una antigüedad de hace 10.500 años. Según Hawkes (1994) *S. leptophyes* dio origen a la primera especie domesticada, *S. stenotomum*, la cual fué cruzada por los pobladores indígenas de los Andes con otras plantas silvestres del mismo género. A partir de este hecho, y sumado a las fuerzas evolutivas de selección, migración, mutación, hibridación, poliploidización e introgresión, se puede explicar la gran variabilidad genética presente en las especies tuberíferas silvestres y cultivadas con la que se cuenta en la actualidad (Hernández y Pineda 1996), sin embargo un reciente trabajo realizado a partir de 362 variedades (261 silvestres y 98 cultivadas), revelo un origen monofilético de la papa, a partir de miembros del complejo norte de *S. brevicaulle*, ubicado en la región central o sur del Perú (Spooner *et al.*, 2005).

Los conquistadores encontraron papa cultivada en toda la cordillera andina, debido a la intercomunicación de los pueblos de clima frío (Luján, 1990). La papa llegó a Europa por España hacia 1570 y por las Islas Británicas entre 1588 y 1593, desde donde se expandió por toda Europa. El desarrollo de su cultivo comenzó en el siglo XVIII, a partir de producciones marginales y progresivamente fue adquiriendo cierta importancia (Luján, 1996; Hawkes, 1994). Actualmente, las distintas variedades cultivadas se encuentran agrupadas dentro de la especie *Solanum tuberosum* L. (Sponner *et al.*, 2007); estas se cultivan en los cinco continentes del planeta, desde la planicie de Yunnan en China hasta las tierras bajas subtropicales de la India, a las montañas ecuatoriales de Java y las estepas de Ucrania (Fao, 2009). En el continente Americano se distribuyen desde el sureste de Norteamérica, pasando por toda América Central y Sur; a lo largo de toda la cordillera andina se encuentra una gran variabilidad de especies, de las cuales 176 son silvestres y solo siete cultivadas (Contreras, 2006).



2.1.2 Taxonomía y Morfología

La papa (*S. tuberosum*) presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Solanum</i> L.
Especie:	<i>Solanum tuberosum</i> L.

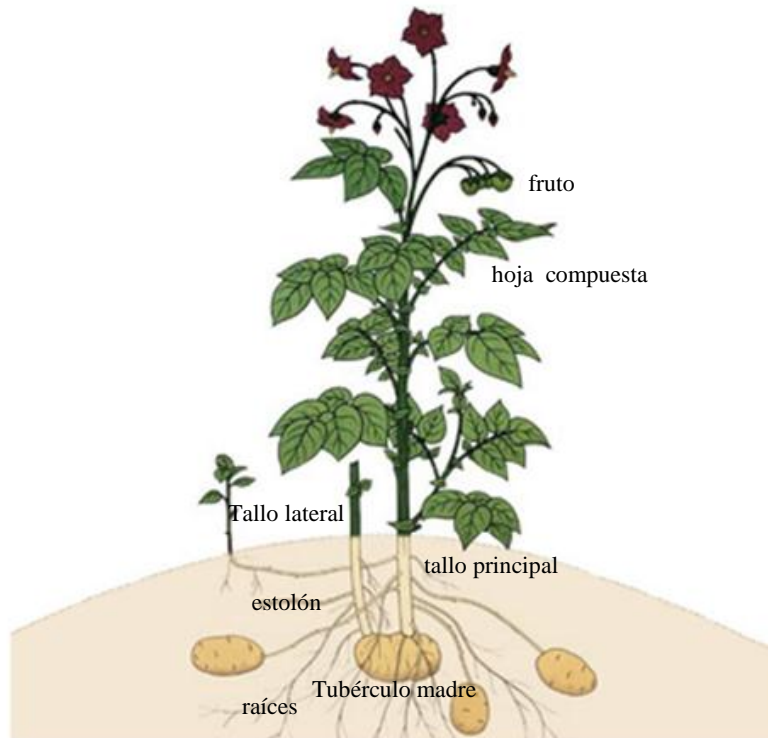
Fuente: Stevens, 2011.

La papa, es una planta herbácea anual, dicotiledónea y se reproduce preferentemente por vía asexual. Presenta tallos subterráneos y allí donde se producen los tubérculos, estos pueden presentar forma oval, redondeada, recta o claviforme. La parte principal comestible la constituye el tallo subterráneo, reservorio, llamado tubérculo, este presenta un contenido alto de almidón, que permite ubicar a este cultivo en el cuarto lugar de importancia a nivel mundial en importancia como alimento, después de maíz, el trigo y el arroz (FAO, 2009).

De la parte que crece sobre el suelo, se destacan tallos, hojas, flores y frutos (figura 1), es una especie predominantemente autógena pese a que posee individuos altamente heterocigotos. Esta planta presenta tallos que puede variar desde los 50 cm hasta los 100 cm de altura, sus hojas son compuestas y es allí donde se produce el almidón, consta de nueve o más folíolos, cuyo tamaño se incrementa a medida que se aleja del nudo de inserción. Su fruto es una baya redonda de color verde, que al madurar cambia a color amarillo y sus tubérculos pueden presentar tamaños desde pocos milímetros, hasta varios centímetros dependiendo de la variedad, sus raíces se caracterizan por ser muy ramificadas, finas y largas.

Al crecer las hojas compuestas de la planta producen almidón, este se desplaza hacia los estolones, como consecuencia estos sufren un engrosamiento y así se producen los tubérculos, pueden llegar a producirse un gran número de estos por planta, el periodo de maduración depende de la disponibilidad de nutrientes y el porcentaje de humedad presente en el suelo. Cuando culmina su crecimiento se desprenden de los estolones y nuevamente reverdecen y se convierten en planta cuando las condiciones ambientales son favorables (FAO 2009).

Figura 1: Planta de papa, representada por sus diferentes estructuras.



Fuente: FAO 2009

2.1.3 Composición nutricional y uso de la papa

Las características más sobresalientes de la papa, son su rico sabor, fácil preparación y su contenido nutricional, donde se destaca la gran cantidad de potasio y vitamina C. Este tubérculo se emplea para la preparación de diferentes recetas culinarias: papas en puré, a la francesa, en sopas, ensaladas, entre otros. La papa es una buena fuente de calorías, también tiene algunos micronutrientes, así como un gran contenido de proteínas en comparación con otras raíces y tubérculos, además tiene poca grasa (tabla 1), (Prokop y Albert, 2008). Se considera que el sumo de papa crudo tiene propiedades que ayudan a mejorar la acidez estomacal, reduce el estreñimiento y ayuda a perder peso.

Tabla 1: Composición química de la papa *S. tuberosum* (Contenido en 100 gr de parte comestible).

Nutriente	Unidad	Valor (100 gr)	Nutriente	Unidad	Valor por 100 gramos
Agua	g	79.34	Sucrosa	G	0.17
Calorías	kcal	77	azúcar, total	G	0.78
Calorías	kJ	321	Sucrosa	G	0.17
Proteína	g	2.02	Glucosa (dextrosa)	G	0.33
Lípidos totales	g	0.09	Fructosa	G	0.27
Ash	g	1.08	Lactosa	G	0.00
Carbohidratos, por diferencia	g	17.47	Maltosa	G	0.00
Fibra dietética total	g	2.2	Galactosa	G	0.00
azúcar, total	g	0.78	Almidón	G	15.44

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 (2010)

2.1.4 Importancia mundial y nacional

La papa es el cuarto cultivo alimenticio a nivel mundial y a diferencia de los principales cereales, sólo una parte del total de la producción de la papa entra en el comercio internacional y los precios por lo general se determinan por los costos locales de producción y no por las fluctuaciones del mercado mundial. Por lo tanto, su cultivo ha sido recomendado para la seguridad alimentaria, ya que puede ayudar a los agricultores de bajos ingresos y a los consumidores vulnerables a atravesar el momento de inestabilidad que experimentan hoy con el suministro y la demanda mundial de alimentos (Fao, 2009). Este cultivo es considerado parte importante del sistema alimentario mundial.

A nivel mundial la China es el país con mayor producción, para el año 2008 alcanzó las 73.281.890 toneladas, seguida por la India con 34.391.000 toneladas y por la Federación de Rusia con 28.874.200 toneladas. Colombia ocupa el tercer lugar en la producción Sur Americana con 2.272.770 ta, después de Perú y Brasil (Faostat, 2011). A nivel nacional la producción de papa comercial se realiza entre los 2.000 y 3.000 m.s.n.m, para el año 2009



ocupó el quinto lugar en la producción agropecuaria nacional, con un área sembrada de 123.659 ha, y un rendimiento de 18.37 ton/ha (Faostat, 2011). Este cultivo constituye la principal actividad económica primaria del piso térmico frío, siendo fundamental para la nutrición de la población. Adicionalmente, este cultivo representa una gran fuente de trabajo por la exigencia de uso de mano de obra para diferentes labores, se estima que el sistema productivo demanda 20 millones de jornales al año, vinculando de forma directa más de 110.000 familias (Osorio *et al.*, 2001).

La papa es el producto de origen agrícola que posee la mayor demanda de servicios de transporte terrestre, siendo los principales departamentos productores, Cundinamarca, Boyacá y Nariño donde este cultivo es la principal actividad agropecuaria y el que más empleo e ingresos genera, constituyéndose en eje fundamental de la economía regional en estos departamentos (Espinal *et al.*, 2005). Por ser un producto de alto consumo, la papa tiene un peso importante sobre la canasta familiar, lo que se traduce en un papel importante en la definición del índice general de precios de la economía y en una gran incidencia en el presupuesto de las familias colombianas. Sin embargo, este cultivo presenta problemas de orden ambiental y fitosanitario, donde este último, se centra principalmente en la incidencia de insectos como *Premnotrypes vorax* y *Tecia solanivora* (López y Espitia, 2000) y hongos como *Phytophthora infestans* (Ramírez *et al.*, 2009) y *Rhizoctonia solani* (Beltrán y Garcés, 2005).

2.2 La polilla guatemalteca: *Tecia solanivora*

2.2.1 Generalidades y origen

La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora* Povolny), es un insecto lepidóptero, con origen en Centro América, específicamente Guatemala, donde fue descrita por primera vez por Povolny en 1973, esta polilla se alimenta en su estado larval exclusivamente de tubérculos de papa, tanto en campo como en almacenamiento. En Sur América se reportó por primera vez en Venezuela en 1983, dos años después, en 1985, se confirmó su presencia en Colombia y en 1996 llegó a las zonas paperas del Ecuador (Herrera, 2005). En este último, esta plaga ha ampliado su distribución, llegando a la zona sur del país cerca de la frontera del Perú, causando gran preocupación por su acercamiento al centro de origen del cultivo, lo cual podría implicar pérdida de diversidad; su rápida distribución y difícil control se debe a la importación de semilla y a la reutilización empaques contaminados con huevos.



El Ingreso a Colombia lo hizo por la zona fronteriza con Venezuela, en el departamento de Norte de Santander en 1985, de donde se diseminó al resto de las zonas paperas del país donde las pérdidas ocasionadas en campo y almacén superaron el 50% de la producción a finales de la década de los 80 (Rincón y López, 2004). Una hembra puede depositar de 150 a 300 huevos, en condiciones de almacenamiento estos suelen ser depositados en sacos y paredes, en campo son preferiblemente ovopositados sobre tubérculos que se van a ser utilizados como semilla, en el suelo o en la parte baja de la planta (hojas y tallos), cuando nace la larva se dirige al tubérculo, con su mandíbula realiza un orificio por el cual ingresa y pasa su estado larval alimentándose dentro de este, formando a su paso galerías donde deposita su excremento, al mismo tiempo estos orificios sirven de entrada a hongos y bacterias, los cuales aceleran e incrementan la intensidad de daño al tubérculo. La duración del ciclo de vida de *T. solanivora* varía entre 65 y 93 días, dependiendo principalmente de la temperatura ambiental, el estado de huevo dura de 8 a 15 días, la larva de 15 a 23 días, la pupa de 20 a 30 días y el adulto de 21 a 26 días (Rincón y López, 2004).

Según EPPO (2005) *Tecia solanivora* presenta la siguiente clasificación taxonómica:

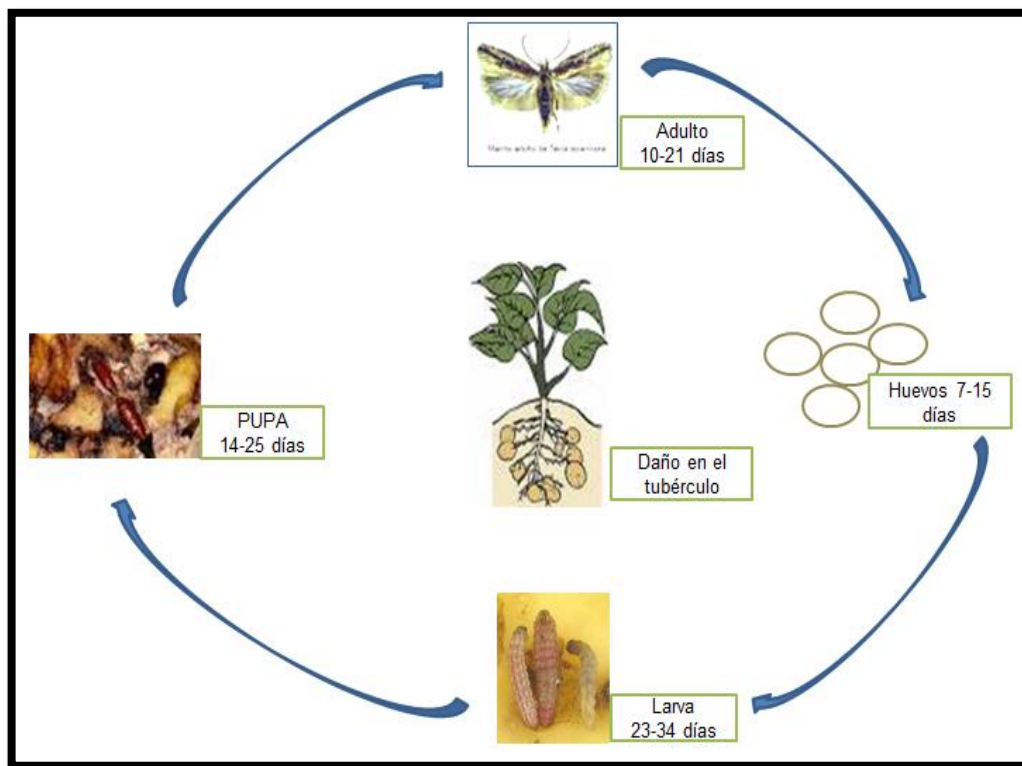
Clase:	Isecta
Orden:	Lepidóptera
Suborden:	Dytrisia
Familia:	Gelichiidae
Superfamilia:	Tincoidea
Género:	<i>Tecia</i>
Especie:	<i>Tecia solanivora</i>

Debido a la gran voracidad que presenta *T. solanivora* y a los graves daños económicos que causa, diferentes grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos a combatir esta plaga, considerada por algunos como la principal plaga entomológica que afecta el cultivo de papa (Espinel *et al.*, 2009), se considera que los estados del ciclo de vida más susceptibles y temporalmente expuestos ante agentes bióticos y abióticos de mortalidad, son los huevos y las larvas de primer instar, hacia dichos estadios apuntan las expectativas de control biológico por parte de enemigos naturales que reduzcan el daño ejercido por la plaga (Osorio *et al.*, 2001).

2.2.2 Biología y comportamiento de *T. solanivora*

La polilla guatemalteca, es un lepidóptero de ciclo completo (Figura 2), tiene un periodo de vida promedio de 90 días, lo que puede variar según las condiciones ambientales. Produce de 4 a 6 generaciones por año, dependiendo principalmente de la temperatura. Sus huevos son ovalados y miden alrededor de 0.5 mm de diámetro, inicialmente son de color blanco y luego se tornan amarillos conforme se desarrollan, después de emerger del huevo, las larvas pasan por cuatro instares o estadios intermedios, observándose de forma alargada, poseen tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas abdominales y un par de pseudopatas anales, las larvas de primer instar miden alrededor de 1.3 mm de largo y las del último estadio 14 mm (Herrera, 2005).

Figura 2: Ciclo biológico de *T. solanivora*



Fuente: Gómez, 2010.

Cuando la larva completa su último estadio, abandona el tubérculo para convertirse en pupa, esto lo hace gracias a la producción de un capullo, dentro del cual ocurre la metamorfosis de larva a pupa y de pupa a adulto. La pupa es de tipo momificada, inicialmente presenta una coloración café que va oscureciendo a medida que madura. En



promedio, la pupa hembra mide 8.5 mm de largo por 2.9 mm de ancho, mientras que la pupa macho mide 7.8 de largo por 2.4 mm de ancho, generalmente se forman fuera del tubérculo, aunque también se pueden desarrollar dentro de él (Herrera, 2005). Cuando la polilla es adulta son polillas que miden aproximadamente 12 mm de longitud, presentan dimorfismo sexual en tamaño y coloración; los machos son color marrón oscuro, generalmente con dos manchas casi circulares en el ala anterior y una línea longitudinal oscura no muy notoria, las hembras son más grandes, de color marrón brillante, con tres manchas y una línea longitudinal muy notoria en el ala anterior (Sandoval y Vilatuña, 2010). Las pérdidas económicas que se derivan del daño ocasionado a los tubérculos, ocurren únicamente durante la fase de larva, donde puede alcanzar daños del 100% de la producción.

El control de *T. solanivora* comúnmente se realiza, empleando plaguicidas químicos pertenecientes a los grupos organofosforados y piretroides. El primer grupo pertenece a la categoría toxicológica I (extremadamente tóxico), son ésteres del ácido fosfórico, generalmente liposolubles, lo que facilita su ingreso a sistemas biológicos. En humanos inhibe la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa, esta enzima es responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina, que se acumula en el espacio sináptico alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso, provocando intoxicación aguda, síndrome intermedio y neurotoxicidad tardía al ser absorbidos vía cutánea, respiratoria y digestiva, con serias afectaciones al sistema nervioso central (Marín y Lozano, 2001) y el segundo de categoría toxicología II (medianamente tóxico), tiene como sustancia activa la teflutrina, que a niveles altos puede causar mareo, dolor de cabeza, náuseas, espasmos musculares, falta de energía, alteraciones de la conciencia, convulsiones y pérdida del conocimiento. Los principales inconvenientes de la aplicación de estos productos es la falta de especificidad, la frecuencia de aplicación, en la mayoría de los casos sin justificación técnica y la generación de problemas ambientales, por acumulación de residuos o metabolitos tóxicos en el suelo, agua, aire y en productos agrícolas, también pueden generar alteraciones negativas a la fauna benéfica y afectaciones a mamíferos y peces.

Ante esta situación es necesario buscar estrategias de control sostenibles para proteger al cultivo de papa frente al ataque de *T. solanivora*, la FAO en el 2009 declaró la necesidad de promover la creación de sistemas sostenibles basados en la producción de papa, que aumenten el bienestar de los productores y los consumidores y contribuyan a realizar el pleno potencial de la papa como «alimento del futuro», una alternativa promisoriosa de control es el uso de organismos entomopatógenos como *B. thuringiensis*, que con sus proteínas tóxicas inocuas para mamíferos e invertebrados y con alta especificidad hacia el insecto blanco se ha convertido en la bacteria con más éxito utilizada a nivel mundial.



2.3 *Bacillus thuringiensis*

2.3.1 Características generales de *Bacillus thuringiensis*

El nombre de *Bacillus thuringiensis* fue introducido por primera vez por el biólogo alemán E. Berliner (1911), quien la describe como una bacteria patógena que se encuentra en pupas de la palomilla de la harina del mediterráneo (*Ephestia kuhniella*), sin embargo esta bacteria había sido previamente reconocida por el biólogo japonés S. Ishiwata (1901) como el agente causal de la enfermedad de sotto del gusano de seda, quien fue el primero en realizar una descripción formal de la bacteria (Lambert y Peferoen, 1992), en ese momento nadie sospechaba las propiedades que tenía y el desarrollo que generaría, este acontecimiento marcaría el inicio de lo que hoy se conoce con el nombre de control biológico y de toda la tecnología que se ha desarrollado alrededor de esta bacteria entomopatógena.

Esta bacteria presenta la siguiente clasificación taxonómica:

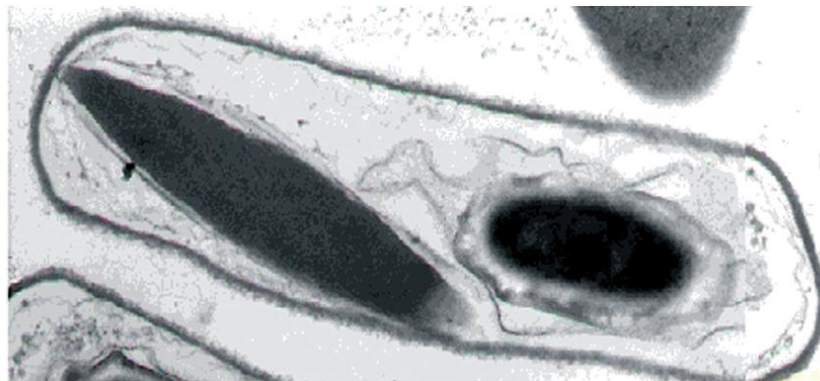
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	Bacillus
Especie:	thuringiensis

B. thuringiensis es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1.2 μm de ancho, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: *crecimiento vegetativo*, donde las bacterias se duplican por bipartición y *esporulación*, un programa de diferenciación de bacteria a esporaque se genera cuando las condiciones ambientales se tornan adversas, (Figura 3). *B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. (Soberón y Bravo,2007). Sus diferentes aislamientos presentan en general características bioquímicas comunes, mostrando capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetilglucosamina; también desarrolla esporas de resistencia elipsoidales sin provocar el

hinchamiento del perfil bacilar, esta bacteria pertenece al orden Eubacteriales, familia Bacillaceae y se ubica dentro del grupo 1 del género *Bacillus*, dentro del cual se encuentra formando parte del grupo *Bacillus cereus*, el que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, y *B. mycoides*, (Sauka y Benintende 2008).

Esta bacteria es un bacilo que se caracteriza por producir durante su esporulación inclusiones paraesporales de constitución proteica (ICP), también denominadas δ -endotoxinas (Feitelson *et al.*, 1992). La estructura de esta inclusión paraesporal es el resultado de la unión de varios polipéptidos de masas moleculares que oscilan entre 27 y 140 kDa (Hofte y Whiteley, 1989). Actualmente se conocen δ -endotoxinas con actividad tóxica sobre algunas especies de insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera Hymenóptera, Homóptera, Orthoptera y Mallophaga y contra otros organismos, como ácaros, nemátodos y platelmintos (Feitelson *et al.*, 1992). Estas proteínas también han demostrado actividad sobre células cancerígenas, leucémicas y contra protozoos de importancia médica como *Giardia lamblia* y *Plasmodium berghe* (Xu *et al.*, 2004), son consideradas altamente específicas al insecto blanco e inocuas para humanos, vertebrados, plantas y son completamente biodegradables (Bravo *et al.*, 2006). Estas característica propias de *B. thuringiensis*, lo han posicionado como el agente de biocontrol más exitoso a nivel mundial, sin contar el uso que se le ha dado a sus proteínas tóxicas para la generación de plantas mejoradas genéticamente con resistencia a diferentes insectos plaga.

Figura 3: Microfotografía de *B. thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal protéínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso.

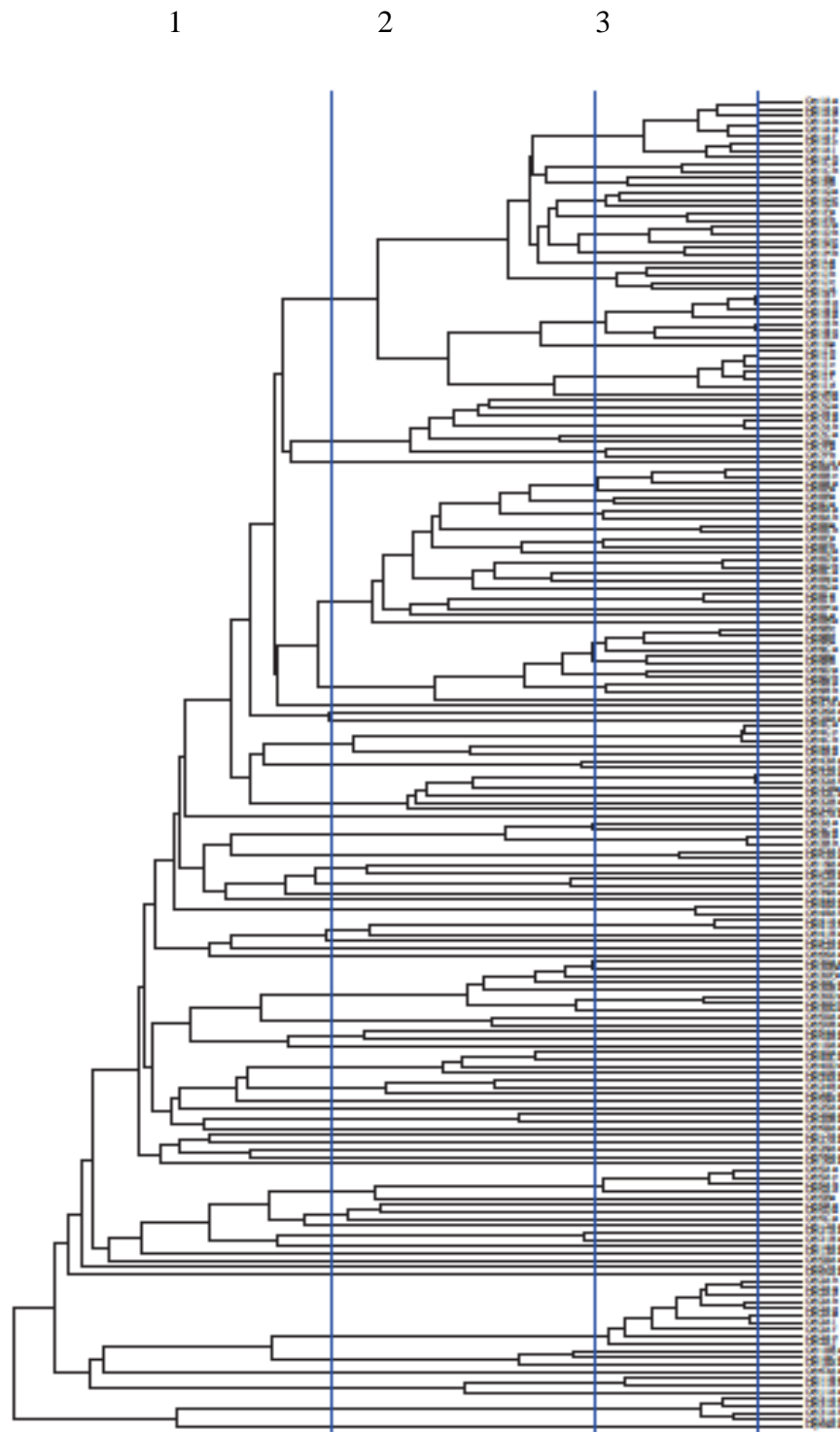


Fuente: Soberón y Bravo, 2007



Su clasificación puede realizarse de varias formas; una está basada en la serotipificación de acuerdo al antígeno H flagelar iniciada por Barjac y Bonnetoi (1962), sin embargo en ella no existe una relación estricta entre el serotipo de la cepa y el tipo de proteína cristalifera y por tanto de su actividad insecticida. Luego en 1989 Hofte y Whiteley, presentaron una clasificación con la secuencia de 14 genes *cry* que codifican proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*, dentro de 4 clases mayores. Las clases son: CryI (Lepidóptero-activas), CryII (Lepidóptero-díptero activas), CryIII (Coleóptero-activas) y Cry IV (Díptero-activas) y una clase no relacionada de proteínas Cyt con actividad mosquitocidal y citolítica. Sin embargo, el descubrimiento de 29 nuevos genes que codifican proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* originó la adición de las clases Cry V y CryVI (nematodo activos) (Fietelson *et al.*, 1992). En la actualidad la clasificación más empleada, está fundamentada exclusivamente en la homología de la secuencia aminocídica y patotipo particular, donde el nombre es asignado de acuerdo al grado de evolución estimado por un árbol filogenético (Crickmore *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo anterior las proteínas Cry están agrupadas en 30 grupos y varios subgrupos, donde cada uno muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos ó algún tipo específico. La figura 4 muestra un dendograma que incluye las toxinas Cry descritas a la fecha, este fue construido utilizando como base un alineamiento múltiple de todas las secuencias y posteriormente un estudio filogenético de estas. A cada nueva toxina se le asigna un nombre único que consta de cuatro filas; ejemplo, una toxina completamente nueva, podría ser asignada con el nombre Cry50Aa1, (Crickmore *et al.*, 2009). El número arábigo designado para la primera fila corresponde a una identidad no superior del 45% (por ejemplo: Cry1, Cry2, etc.). La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades comprendidas entre 45 y 78% (Cry1A, Cry1B, etc.). La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.). La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Soberón y Bravo, 2007), de esta forma las líneas verticales presentes en la figura, representan los límites en identidad que marcan las diferentes categorías en la nomenclatura.



Fuente: Crickmore et al., (2010) (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)



2.3.2 Localización de los genes cry

Cepas de *B. thuringiensis* tienen un genoma de tamaño aproximado de 2.4 a 5.7 millones de pares de bases, sin embargo, la mayoría de los aislamientos de *B. thuringiensis* presentan varios elementos extracromosómicos, algunos de ellos circulares y otros lineales (Carlson *et al.*, 1994). Lereclus *et al.*, (1982) caracterizaron los plásmidos de *B. thuringiensis* en función de la homología de secuencia, encontrando que pertenecen a dos grandes grupos y que existe relación entre plásmidos para diferentes serotipos. Sin embargo fue Gonzales *et al.*, (1981) quienes reportaron que un grupo de plásmidos de peso superior a 30 mDa estaban relacionados con la producción de ICPs.

La demostración definitiva de que los genes que codifican ICPs están ubicados en plásmidos fue dilucidada, a través de un experimento, donde se clonó y expresó un plásmido de 50 mDa de una cepa de *B. thuringiensis* de fenotipo Cry+ a una cepa receptora Cry-, obteniéndose producción de cristales por parte de la cepa receptora, similares a los producidos por la donadora (Gonzalez *et al.*, 1982). De esta manera queda claro que las proteínas Cry son de origen plasmídico. Sin embargo se ha informado de la existencia de genes cry insertados en el cromosoma de esta bacteria (Sanchis *et al.*, 1998).

2.3.3 Proteínas Cry

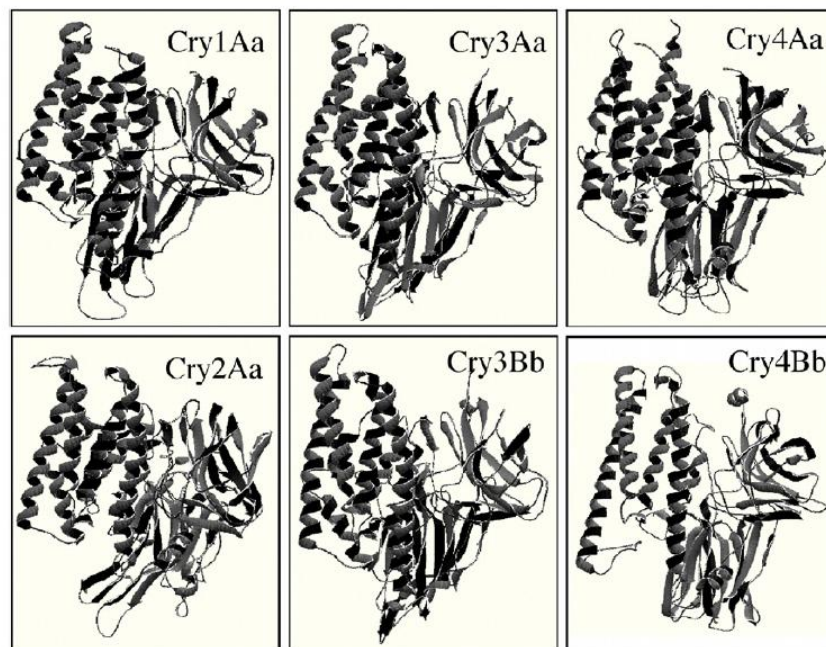
En la actualidad un gran número y variedad de proteínas Cry son conocidas, resultado de un continuo esfuerzo internacional para aislar y caracterizar nuevas cepas de *B. thuringiensis* con la esperanza de encontrar nuevas toxinas con propiedades adecuadas para el control de plagas importantes en el campo agronómico y médico, esta extraordinaria diversidad que presentan las toxinas Cry se cree que es debido a un alto grado de plasticidad genética (Pigott y Ellar, 2007). Debido a la gran importancia de estas proteínas en el control de plagas de interés, al presentar actividad tóxica contra diferentes organismos, principalmente insectos del orden lepidóptera, diversos estudios han permitido dilucidar la estructura tridimensional de algunas de estas proteínas, encontrándose que independientemente de la actividad tóxica, están constituidas por tres dominios estructurales, conocidos con el nombre de dominio I, II y III.

El dominio I consiste en un paquete de siete hélices antiparalelas, donde la hélice 5 está rodeada por las otras 6, el dominio II consta de tres láminas anti paralelas de estructura β que se unen en una típica topología “Greek key” y el dominio III se compone de dos cables, formando hojas β anti paralelas con topología de β -sándwich. El dominio I se encuentra involucrado con inserción a la membrana y formación del poro, mientras que los dominios

II y III se encargan del reconocimiento del receptor y de la estabilidad e integridad de la proteína, siendo decisivos para la especificidad hacia el insecto blanco (Schnepf *et al.*, 1998).

Gracias a la cristalografía de rayos X se ha podido conocer las estructuras tridimensionales de varias proteínas Cry, lo que ha permitido establecer similitud de secuencias y evidenciar la presencia de los tres dominios. Mediante cristalografía de rayos X, actualmente se conoce la estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac con actividad tóxicas para lepidópteros (Maagd *et al.*, 2001, Pardo *et al.*, 2006), Cry3Aa y Cry3Bb tóxicas para coleópteros (Derbyshire *et al.*, 2001, Galitsky *et al.*, 2001), Cry2Aa con toxicidad dual para lepidópteros y dípteros (Morse *et al.*, 2001) y Cry4Aa y Cry4Ba tóxicas para dípteros (Boonserm *et al.*, 2006, Boonserm *et al.*, 2005), en la figura 5 se observan dichas estructuras.

Figura 5: Estructuras tridimensionales de las toxinas insecticidas producidas por *B. thuringiensis* Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Bb.



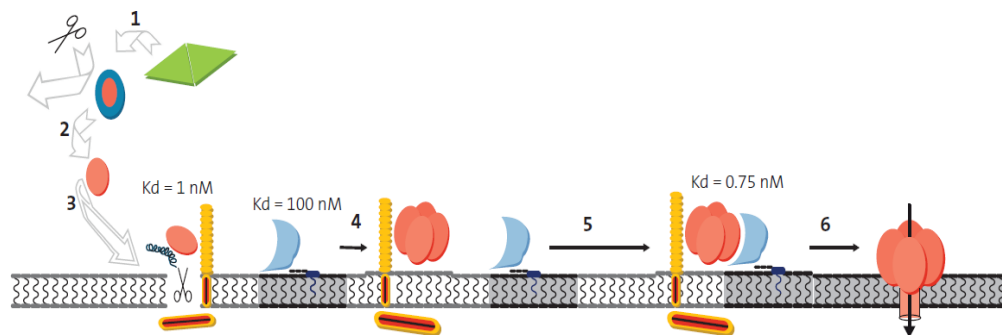
Fuente: Bravo *et al.*, 2007.

2.3.4 Modo de acción de las ICPs de *B. thuringiensis*

Una vez que larvas susceptibles ingieren cristales de *B. thuringiensis*, los primeros síntomas del envenenamiento con la toxina son el cese de la ingesta, y parálisis del tracto alimenticio, posteriormente se presenta vómito, diarrea y muerte. Estos cristales de naturaleza proteica son ingeridos por el insecto susceptible y luego solubilizado por el pH alcalino del intestino medio del insecto, tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas, estas son recortadas por proteasas intestinales convirtiéndose de esta forma en toxinas activas de 60 a 70 kDa aproximadamente (Schnepf *et al.*, 1998).

La activación de la toxina consiste en la eliminación proteolítica de un péptido N-terminal (25-30 aminoácidos para toxinas Cry1, de 58 para Cry3A y de 49 para cry2Aa) y aproximadamente la mitad de la proteína restante del C-terminal en el caso de protoxinas muy largas (Bravo *et al.*, 2006). La toxina activa interacciona con proteínas receptoras presentes en las membranas de las células epiteliales de intestino medio, posteriormente estas se insertan en la membrana formando un poro lítico, que genera un desequilibrio osmótico, pérdida del contenido celular, seguida de lisis y finalmente la muerte (Madigan *et al.*, 1999, Maagd *et al.*, 1999) (Figura 6). Sin embargo algunos trabajos han demostrado que la participación de bacterias entéricas nativas del intestino contribuyen a incrementar la susceptibilidad y a inducir de forma más rápida la muerte de la larva, esta coacción difiere entre especies (Broderich *et al.*, 2009); otros factores también pueden participar en la susceptibilidad de *B. thuringiensis*, como las condiciones medio ambientales (Mostafa *et al.*, 2005), el tipo de cepa (Slanti y Lereclus, 2002) y de hospedador (Suzuki *et al.*, 2004).

Figura 6: mecanismo de acción de las proteínas Cry. (1) Solubilización, (2) procesamiento, (3) unión al receptor de caderina, (4) formación del pre-poro, (5) inserción a la membrana.



Fuente: Soberón y Bravo, 2007.



2.3.5 Genes con actividad contra insectos lepidópteros

Los genes *cry1*, específicos contra insectos lepidópteros son indudablemente los más estudiados, estos codifican proteínas de masas moleculares que oscilan entre 130 y 140 kDa y se acumulan generalmente en inclusiones bipiramidales durante la esporulación de la bacteria (Hofte y Whiteley, 1990), solubilizándose en el ambiente alcalino del intestino medio del insecto susceptible, para convertirse proteolíticamente en fragmentos tóxicos de 60 a 70 kDa mediante proteasas asociadas al cristal o al intestino medio de la larva (Sauka y Benintende, 2008).

Se han informado hasta hoy 210 genes *cry1* distintivos (Crickmore *et al.*, 2011), muchos de los cuales han sido empleados para el control de insectos lepidópteros a nivel mundial. Tan *et al.*, (2011) evaluaron las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F contra tres especies barrenadoras del maíz, *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* y *Diatraea saccharalis*, donde todas mostraron susceptibilidad a las toxinas evaluadas, estos resultados indicaron que estas especies son similares en cuanto a sensibilidad a estas proteínas, sugiriendo que comparten los receptores de la toxina y los mecanismos de toxicidad. Xue *et al.*, (2008), clonaron y caracterizaron una nueva toxina Cry1A, la cual mostró una alta toxicidad contra larvas de lepidópteros de *Ostrinia furnacalis*, *Helicoverpa armigera*, *Suppressalis Chiloy* *Plutella xylostella*. Perez *et al* (1997) encontraron que el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* presentaba actividad biológica contra *T. solanivora*, más tarde Martínez *et al.*, (2003) evaluaron la actividad tóxica de diferentes proteínas Cry1A contra *T. solanivora*, encontrando altos porcentajes de mortalidad del insecto, un trabajo dirigido a esta misma plaga lo realizaron Pitre *et al.*, 2008, quienes demostraron la actividad biológica de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1B y Cry1C, contra *T. solanivora*

La familia de genes *cry2* de *B. thuringiensis* codifican proteínas cristalinas insecticidas de 65 a 71 kDa, estas han demostrado ser tóxicas contra insectos lepidópteros. Muchas investigaciones han arrojado evidencia contundente de la actividad biológica de estas proteínas contra diferentes insectos pertenecientes a este orden. Kumar *et al.*, (2004), demostraron que la proteína Cry2Aa, tiene actividad tóxica contra *Helicoverpa armigera*. Lin *et al.*, (2007), encontró que la proteína Cry2Ab expresada en *E. coli*, era altamente tóxica contra larvas de *Plutella xylostella*. Lima *et al.*, (2008), encontró que tanto la proteína Cry2Aa como Cry2Ab, aisladas de *B. thuringiensis* cepa Brazilian y expresadas en baculovirus *Autographa californicamultiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), presentan toxicidad contra larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Anticarsia gemmatilis*.



Otros genes menos estudiados que codifican proteínas tóxicas contra lepidópteros son los pertenecientes a los grupos *cry9* y *cry15*, este último grupo está formado por sólo un integrante que es el gen *cry15Aa*, el cual codifica para una protoxina de aproximadamente 40 kDa que se agrupa en una inclusión cristalina cuboidal, la cual resulta tóxica para *Manduca sexta* (Sauka y Benintende, 2008). Sin embargo, son considerados herramientas muy promisorias para el control eficiente y el manejo de la resistencia de muchas especies de lepidópteros que son importantes desde el punto de vista agronómico.

2.3.6 Genes *cry2A*

Los genes *cry2A* y las proteínas que codifican han sido ampliamente utilizados a nivel mundial, principalmente como principio activo de formulaciones de bioplaguicidas, material genético para la producción de proteínas recombinantes en plantas, virus y bacterias, estos se encuentran ordenados dentro del grupo *cry2* y se caracterizan por poseer marcos de lectura abiertos de unas 1900 pb promedio careciendo del fragmento C-terminal presente en otros genes *cry*; estos codifican proteínas promedio de 65 kDa y típicamente se agrupan en inclusiones cuboidales, están presentes en cepas de distintos serovares: *B.thuringiensis* svar. *kurstaki*HD-1, *B. thuringiensis*var. *thuringiensis* Berliner, *B.thuringiensis* svar. *kenyae*, *B. thuringiensis* svar. *tolworthi*, etc (Hofte y Whiteley, 1989, Sauka y Bennitende, 2008).

En la actualidad existen descritos 56 genes *cry2* clasificados en la clase A (Crickmore *et al.*, 2011). Los genes *cry2Aa*, han sido empleados principalmente para el control de insectos del orden lepidóptero, pertenecientes a diferentes familias, como son *Bombyx mori* (Sasaki, *et al.*, 1997) , *Marasmia patnalis* (Jurat *et al.*, 2003), *Pectinophora gossypiella* (Tabashnik, *et al.*, 2002), *Phthorimaea operculella* y *Spodoptera litura* (Misra *et al.*, 2002), *Helicoverpa armígera* (Gajendra *et al.*, 2002), *Spodoptera frugiperda* (Lima *et al.*, 2008).

Otros lepidópteros también han sido reportados susceptibles a esta proteína: *Cacyreus marshalli*, *Lymantria dispar*, *Actebia fennica*, *Anticarsia gemmatalis*, *Busseola fusca*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Pseudoplusia includens*, *Sesamia calamistis*, *Sesamia nonagrioides*, *Trichoplusia ni*, *Chilo suppressalis*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Eldana sacarina*, *Ephestia kuehniella*, *Maruca vitrata*, *Plodia interpunctella*, *Ostrinia nubilalis*, *Sciropophaga incertulas*, *Tryporyza incertulas*, *Manduca sexta*, *Cydia pomonella*, (Sauka y Benintende, 2008).

En el caso de la proteína Cry2Ab, se han encontrado reportes de toxicidad para insectos lepidópteros y coleópteros, como es el caso de *Plutella xylostella* (Lin *et al.*, 2008),



Pectinophora gossypiella (Tabashnik, *et al.*, 2002), *Lymantria dispar* (Ibargutxi, *et al.*, 2008), *Helicoverpa zea* (Aguilar *et al.*, 2007), entre otros.

Proteínas pertenecientes a la familia Cry2, aisladas de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, han sido clonadas y expresadas en *E. coli*. Zheng *et al.*, (2010) expresaron en *E. coli* cepa BL21 (DE3) una proteína Cry2Ag1 aislada de una capa nativa de *B. thuringiensis*, que resultó ser tóxica para dípteros (*Aedes aegypti*) y lepidópteros (*Plutella xylostella* y *Helicoverpa armigera*), Kumar *et al.*, (2004), expresaron las proteínas recombinantes Cry2A y Cry2Ab en *E. coli* cepa BL21, donde la primera demostró ser tóxica contra *H. zea*. Un trabajo similar fue realizado por Lin *et al.*, (2008), quienes expresaron la proteína Cry2Ab10 en *E. coli*, la cual fue altamente tóxica contra *Plutella xylostella*, esto demuestra la capacidad que presenta *E. coli* como sistema de expresión de proteínas heterólogas de tipo Cry.

2.4 Proteínas recombinantes

2.4.1 Generalidades

El advenimiento de la tecnología del ADN recombinante y la ingeniería genética, ha hecho posible el desarrollo de sofisticados procedimientos para el aislamiento, manipulación y expresión de material genético entre individuos de la misma o diferente especie.

El proceso comprende, primero, el aislamiento de la secuencia del gen que se desea clonar, la cual puede ser derivada de ADN o RNA. El ADN puede ser de origen plasmídico o genómico; para ambos casos la secuencia que se desea clonar se puede obtener mediante PCR y enzimas de restricción, para obtener la secuencia que posteriormente será clonada. Cuando se trata de una molécula de RNA, es necesario obtener un ADN complementario (cDNA) que se genera a partir de un molde de RNA, empleando la transcriptasa reversa (Madigan *et al.*, 1999).

Segundo, unir los fragmentos de ADN a un vector de clonación con ADN ligasa. Estos vectores están generalmente diseñados de forma que permiten la recombinación de ADN foráneo en un sitio de restricción que corta al vector sin afectar su replicación. Si el ADN del que se parte y el vector se cortan con la misma enzima de restricción, la unión se puede lograr por acoplamiento de las regiones monocatenarias llamadas “extremos cohesivos”. Los extremos romos generados por diferentes enzimas de restricción pueden también juntarse mediante la utilización de ADN adaptadores.



Tercero, introducción y mantenimiento en un organismo hospedero. La molécula de ADN recombinante sintetizada en un tubo de ensayo se introduce en un organismo hospedero en donde pueda replicarse, empleando diferentes técnicas de transformación, (electroporación, microinyección, microbombardeo, permeabilización de la membrana mediante iones de calcio y por transfección, (Madigan *et al.*, 1999). La transferencia del ADN al hospedero a menudo genera una mezcla de clones, algunas células contienen el gen deseado, mientras que otras no, producto de la unión de otros fragmentos de ADN con el vector.

Cuarto, detección y purificación del clon deseado; una de las tareas más difíciles que consiste en encontrar el clon de interés en una mezcla, que puede contener miles de ellos y para lo cual se emplean técnicas de PCR, enzimas de restricción, anticuerpos o sondas de ácidos nucleicos.

Quinto, producción de gran número de células o de bacteriófagos que contengan el clon deseado, para el aislamiento o estudio del gen clonado y sexto, expresión, de la proteína codificada por el fragmento de ADN insertado en el vector mediante una inducción. Cuando la bacteria *E. coli* es la célula hospedera, generalmente el inductor empleado es isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) que es un análogo de la lactosa, el cual se une al represor *lac* evitando que interactúe con el operador, permitiendo así la transcripción del gen que luego se traducirá en una proteína (Madigan *et al.*, 1999).

2.4.2 Empleo de proteínas Cry recombinantes

Diferentes proteínas Cry de *B. thuringiensis* han sido utilizadas como bioinsecticidas para controlar importantes plagas agrícolas. Sin embargo, la tecnología del ADN recombinante ha permitido el surgimiento de nuevas estrategias para proteger los cultivos de los daños que causan estos insectos. La Expresión exitosa de proteínas Cry tóxicas en diferentes sistemas de expresión (bacterias, bacteriófagos y plantas), ha generado grandes avances en el control eficiente y sostenible de insectos plagas a nivel mundial. Por medio de la tecnología del ADN recombinante, se han generado diferentes construcciones con base en las proteínas Cry, que permiten estudiar de forma independiente o en conjunto la actividad tóxica de las proteínas, dilucidar su forma de acción y generar individuos que las expresen en grandes cantidades para uso comercial (Madigan *et al.*, 1999).

Las proteínas Cry han sido expresadas en bacterias, principalmente en *E. coli*, bacteria Gram negativa de rápido y económico crecimiento, utilizada como organismo modelo para la expresión de muchas proteínas recombinantes de diferentes orígenes, que ha permitido realizar estudios de evaluación de promotores de expresión (Ge *et al* 1990), sinergismo entre proteínas (Promdonkoy *et al* 2005, Sharma *et al.*, 2010), análisis de dominios



(Chayaratanasin *et al.*, 2007) y toxicidad contra insectos (Ahmad *et al.*, 1997, Booserm *et al.*, 2004).

En plantas, las proteínas Cry han sido ampliamente utilizadas para la generación de plantas Bt. La primera planta reportada expresando una proteína Cry fue tabaco (*Nicotiana tabacum*) en 1987. A partir de ese momento varias proteínas Cry han sido expresadas en diferentes especies vegetales, tanto de interés agrícola como en especies modelos, mediante la inserción en la planta de un vector que contiene el gen *cry*, empleando diferentes técnicas, tales como biobalística, electroporación y *Agrobacterium tumefaciens*. Siendo ésta última, la más empleada. *Agrobacterium* es una bacteria Gram negativa que hoy en día se utiliza para transformar plantas y hongos (Soberón y Bravo, 2007).

Las plantas Bt que se han desarrollado para combatir diferentes plagas, representan ventajas a nivel económico y ambiental, observándose una reducción significativa de las aplicaciones de insecticidas químicos, reducción de costos de producción, incluyendo que la tecnología está diseñada para controlar solo la población objetivo. Sin embargo, la principal desventaja es la posible aparición de resistencia por parte del insecto al estar siempre expuesto a la misma proteína, causando una reducción de la unión de la toxina con los puntos receptores del intestino medio (Baxter *et al.*, 2008, Kumar *et al.*, 2004), la mayor resistencia evidenciada por parte de insectos lepidópteros ha sido hacia proteínas Cry1A (Heckel *et al.*, 2007). En la última década, la estrategia utilizada para retardar la aparición de resistencia por parte de los insectos es la introducción simultánea de varios genes insecticidas en las plantas (Maqdool *et al.*, 2001), en el caso de los genes *cry* la introducción de combinaciones de genes que se unan a diferentes receptores del mismo insecto, proporciona un mecanismo de defensa múltiple, requiriéndose múltiples mutaciones simultáneas para poder vencer la resistencia piramidal (Ordúz *et al.* 1997). Para esto es necesario disponer de un gran número de genes *cry* que afecten a los diferentes receptores que pueden coexistir en la misma plaga; puesto que un insecto puede ser sensible a diferentes toxinas, esto reduce la aparición de resistencia por parte de la plaga (Gill y Pietrantonio, 1995). Las toxinas que se utilizarían en el apilamiento de genes deben ser seleccionadas basándose en las diferencias que deben tener en su mecanismo de acción y el metabolismo en el insecto (Jurat *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante continuar con la búsqueda de nuevas toxinas Cry que reconozcan diferentes receptores proteínicos en los insectos objetivos, de manera que la resistencia a una toxina Cry por mutaciones en un receptor específico se pueda evitar con la aplicación conjunta de otra toxina Cry que reconozca otros receptores en ese insecto.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal, del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB), de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) sede Tibaitatá, kilómetro 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

3.2 Material Biológico

3.2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Se empleó la cepa de referencia *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* HD-1, como fuente de material genético para el aislamiento de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*. La bacteria fue crecida y mantenida en medio sólido Luria Bertani (LB) (10 g/L tryptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl), e incubada a 28°C por 24 horas.

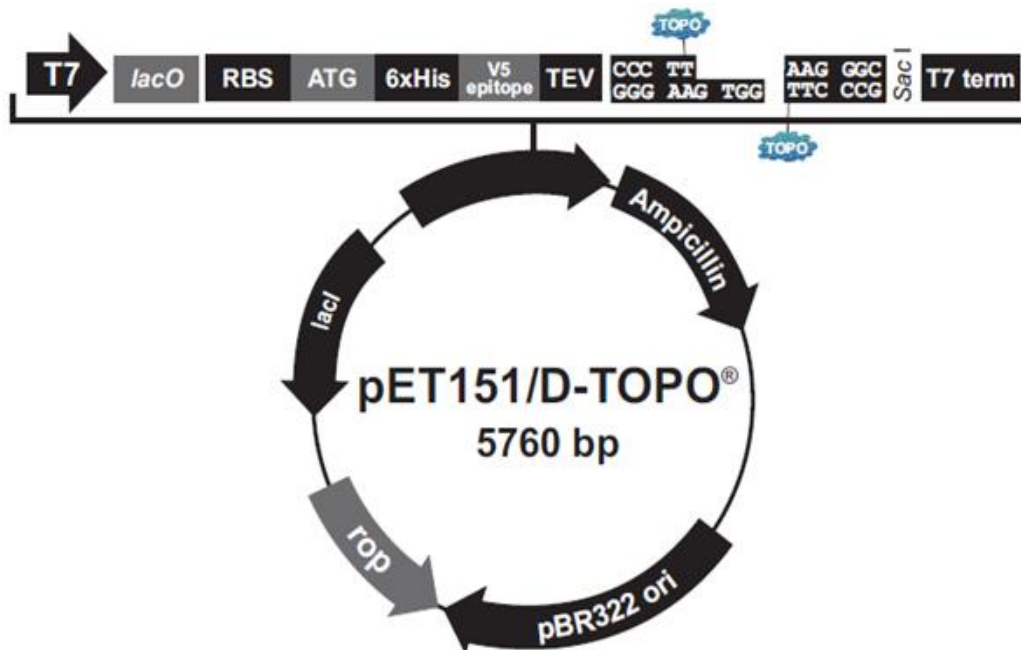
El plásmido pET151/D-TOPO®, (Invitrogen), se utilizó como vector de clonación y de expresión (Figura 7), el gen de interés se ligó al vector y se direcciono por hibridación de la secuencia de cuatro pares de bases (CACC) adicionada en el inicio de la secuencia del cebador forward (sentido 5' a 3') de cada gen, esta secuencia se une por complementariedad al extremo 3' libre del vector, el inserto es clonado con la dirección correcta, con una eficiencia igual o superior al 90%. Las proteínas recombinantes son expresadas en unión a una secuencia de polihistidina en el extremo amino-terminal, esta facilita su purificación, por afinidad.

La expresión de los genes insertados en el vector pET151/D-TOPO® se logra por la actividad del promotor T7, este promotor fuerte proviene de un bacteriófago que fue modificado para contener una secuencia del operador *Lac*. Para lograr el reconocimiento del promotor por parte de la polimerasa, es necesario transformarlo dentro de *E. coli* cepa BL21 Star™ (DE3), esta bacteria cuenta con el lisogen del bacteriófago λ DE3, el cual presenta las herramientas necesarias para alcanzar la expresión deseada, este lisogen λ DE3 contiene: el gen *lacI* que codifica el represor *lac*, el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5* y una pequeña porción del gen *lacZ*. Cuando se produce suficiente RNA polimerasa T7, esta se une al promotor T7 y se transcribe el gen de

interés, la cepa BL21 Star™(DE3) contiene otras características que facilitan el alto nivel expresión de los genes heterólogos (Invitrogen, 2006)

Como hospedero del plásmido, se utilizó *E. coli* cepa One Shot® TOP10 (Invitrogen), que no contiene RNA polimerasa T7, y por lo tanto garantiza la conservación y multiplicación estable del plásmido recombinante.

Figura 7: Mapa del vector pET151/D-TOPO® utilizado para la clonación y expresión de los genes cry2Aa y cry2Ab de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Manual de Invitrogen).



Fuente: Invitrogen, 2006.

3.2.2 Material Entomológico

Para la realización de los bioensayos, se emplearon larvas de primer instar de *T. solanivora*. Los huevos fueron proporcionados por el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica, estos fueron incubados dentro de una caja Petri de plástico a temperatura ambiente hasta su eclosión, luego se seleccionaron las larvas con mayor vigor para realizar los bioensayos.



3.3 Diseño de cebadores

Se diseñaron parejas de cebadores para la amplificación de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*, a partir de las secuencias descritas en el GenBank para estos genes, con código de acceso gi|47678764 y gi|11526736 respectivamente. Los cebadores se diseñaron teniendo en cuenta que el iniciador directo empezara con la secuencia CACC y que estos amplificaran los genes completos *cry2Aa* y *cry2Ab* cada uno de 1902 pb. También se diseñaron cebadores internos para cada gen, con el objetivo de realizar la secuenciación, ellos amplificaran fragmentos promedio de 550 pares de bases (pb). Todos los cebadores se diseñaron manualmente, para esto se emplearon los programas Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) y DNA calculator de Sigma (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>) para determinar que los cebadores no formaran estructuras secundarias, ni dímeros.

3.4 Aislamiento y cuantificación del ADN plasmídico de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*

La extracción de ADN plasmídico de *B. thuringiensis*, se realizó empleando el protocolo (Sambrook *et al.*, 2001) (Anexo 1). El ADN se cuantificó por espectrofotómetro (Beckman), puesto que los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN, siendo usada eficientemente para determinar su concentración. Este equipo también permite medir la relación 260/280 indicando el grado de pureza del ADN, por otra parte con el fin de verificar su integridad se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% (buffer TAE 1X, 85 voltios, 40 minutos).

3.5 Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* y purificación de los productos

Para lograr la amplificación por PCR de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* se probaron varias condiciones de ciclaje y concentración de reactivos. Los cuales fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (buffer TAE 1X, 90 voltios, 30 minutos), utilizando como marcador de peso 1 Kb plus Ladder,

Los genes amplificados fueron purificados empleando el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Por otra parte, para determinar la concentración de los DNAs, se cuantificaron empleando el marcador de masa molecular (High DNA Mass Ladder, Invitrogen, USA), todo se sometió a electroforesis en agarosa al 1%. El gel se



fotografió con el sistema de documentación de imágenes InGenius LHR (Syngene, USA) y la imagen se analizó con el programa GeneTools versión 4.01 (Syngene, USA).

3.6 Ligación y transformación de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* al vector pET151

Los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* se ligaron al vector pET151 y seguidamente se transformaron por choque térmico en *E. coli* quimiocompetente cepa TOP10, siguiendo las instrucciones del manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Introgen) (Anexo 2).

3.7 Confirmación de clones recombinantes por PCR y enzimas de restricción

Tres colonias transformantes de *E. coli* cepa TOP10, tomadas al azar, fueron cultivadas en 6 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L) durante 16 horas a 37 °C, del cultivo anterior se tomó 3 ml y se recolectó la biomasa, se extrajo ADN plasmídico utilizando el protocolo descrito por Sambrook y Russell, (2001). Este se visualizó en un gel de agarosa al 1%, y se cuantificó usando un espectrofotómetro Beckman DUR530, los clones recombinantes pET151-cry2Aa se identificaron por amplificación del gen *cry2Aa* con los cebadores previamente diseñados y por digestión con las enzimas de restricción *Bst* II, *Sac* I y *Pvu* II. Los recombinantes pET151-cry2Ab se confirmaron de forma similar, pero con los iniciadores diseñados para la amplificación de este gen, y para este caso se empleó la enzima *Ban* II. Las enzimas fueron seleccionadas empleando el programa Ncb cutter versión 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), que permite ubicar los sitios, determinar el número de cortes y calcular el tamaño de los fragmentos esperados.

Una vez confirmadas las correctas construcciones en *E. coli* cepa TOP10, se procedió a transformarlas en *E. coli* cepa BL21, recomendada por la casa comercial para expresar las proteínas recombinantes, lo anterior se realizó siguiendo las instrucciones del manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Introgen). Se midió eficiencia de transformación en ufc/μg para *E. coli* cepa TOP10 y BL21, por la fórmula descrita por Sambrook *et al.*, 2001:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{ufc transformadas}}{\text{DNA plasmídico } (\mu\text{g})}$$



3.8 Secuenciación

La secuenciación de los genes (Macrogen, USA), se realizó a partir de ADN plasmídico de los clones recombinantes *E. coli* cepa TOP10 pET151-cry2Aa y cepa TOP10 pET151-cry2Ab. Se empleó el sistema automatizado ABIPrism 310 (Applied Biosystems, USA) y el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). Para tal fin se emplearon los cebadores internos diseñados. Los fragmentos se secuenciaron por ambos extremos con el fin de corroborar las secuencias obtenidas.

3.9 Inducción y solubilización de la expresión de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab

La expresión de las proteínas recombinantes, se logró evaluando diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5, 0.75 y 1 mM), este reactivo no hidrolizable es empleado como análogo de la lactosa en el laboratorio. El sistema de expresión pET151/D-TOPO® cuenta con el control positivo (pET151-βgal) en *E. coli* cepa BL21, que expresa el gen de la β-galactosidasa, una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de β-galactósidos a monosacáridos. El control positivo (pET151-βgal), *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab, se incubaron en 10 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L) durante toda la noche a 37 °C a 200 r.p.m. De los cultivos anteriores se tomó una muestra de 1 ml y se inoculó en 4 erlenmeyer con 10 mL de medio LB fresco suplementado con ampicilina, todo se incubó a 37 °C a 200 r.p.m hasta alcanzar un OD₆₀₀ de 0.6-0.7, luego se le adicionó IPTG a las diferentes concentraciones y nuevamente se incubó a 37°C, 200 r.p.m por 5 horas. De cada cultivo se centrifugaron 5 mL, el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis (Anexo 3), todas las muestras se sometieron tres veces a choque térmico a 42 °C, luego se sonicaron durante 2 minutos, las muestras fueron mantenidas en hielo, para evitar su calentamiento. Para la solubilización de las muestras, estas se centrifugaron por 10 minutos a 14000 r.p.m y el pellet se resuspendió en 1 mL de carbonato de sodio 0.1 M pH 11 y se incubó 20 hr a 4 °C. Finalmente todas las muestras fueron observadas en un gel de poliacrilamida denaturante al 8% como lo describe Laemmli (1970) (Anexo 4). El marcador de peso Precision Plus Protein Standards (Bio Rad), fue empleado.

3.10 Detección de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab mediante inmuntiras de flujo transversal

La detección de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab, se realizó empleando inmuntiras de celulosa de flujo transversal (Cry2A) desarrolladas por Agdia. La prueba se le realizó por triplicado en *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab inducido



(IPTG) y solubilizado con carbonato de sodio 0.1 M pH 11, *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab si inducir y *E. coli* BL21 sin transformar, todo lo anterior siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.11 Evaluación de la actividad insecticida del lisado *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*

Para los ensayos biológicos se evaluaron 9 tratamientos por proteína, estos fueron: 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml de proteína total de *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab resuspendida en carbonato de sodio 0.1 mM pH 11, además se contemplaron los siguientes controles: control absoluto (tubérculo sin nebulizar), carbonato de sodio 0.1 M pH 11, control positivo (330 µg/ml de *B. thuringiensis* var *kurstaki*) y control negativo (330 µg/mL de *E. coli* BL21), para esto dos últimos tratamiento se tomó en cuenta la dosis letal media (DL₅₀) reportada por Grijalva *et al.*, (2010).

La variedad de papa evaluada fue Parda Pastusa, todos los tubérculos fueron nebulizados por ambas caras con 2 ml de cada tratamiento, se dejaron secar a ambiente durante 20 minutos y luego se depositaron en tarros de plástico que contenían arena estéril, la cual sirvió como soporte, finalmente cada tubérculo se infectó con 15 larvas de primer instar de *T. solanivora*, para esto fue necesario emplear un pincel de pelo de marta de 0.0 mm. Los tarros se cubrieron con tapas plásticas que tenían pequeños agujeros que permitían la aireación. Todos los tratamientos fueron incubados en oscuridad, temperatura 25+-30 °C, durante 20 días. La evaluación de la mortalidad de las larvas se midió contando el número de larvas vivas, versus el número de larvas iniciales.

La concentración de proteína total soluble se cuantificó por la técnica de Bradford en un nanodrop Thermo Scientific 1000, empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estandar (Ausubel *et al.*, 1995).

3.12 Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar, con tres repeticiones en el tiempo. El número total de tratamientos fue 9, para cada tratamiento se utilizaron 15 larvas de primer instar de *T. solanivora*.



3.13 Análisis de resultados

Para el análisis de resultados, se realizó un análisis de varianza (ANAVA), para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos y una prueba de Tukey, para observar diferencias entre los tratamientos, empleando el programa estadístico SAS versión 9.1.

Se determinó el porcentaje de eficacia para los tratamientos: *E. coli* cepa BL21 pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab a concentración de 300 µg/ml y control positivo (330 µg/ml de *B. thuringiensis* var *kurstaki*) empleando la fórmula de Schneider Orelli (Zar, 1999).

$$\% \text{ Eficacia} = (b - k/100 - k) * 100$$

Donde b: Individuos muertos en el tratamiento (%)

K: Individuos muertos en el control (%)

Adicionalmente se realizó un análisis probit, empleando el programa Biostat® 2007, el cual permitió determinar la dosis letal cincuenta (DL₅₀), utilizando las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml de proteína total de *E. coli* cepa BL21 pET151cry2Aa y pET151cry2Ab resuspendida en carbonato de sodio 0.1 M pH 11.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño de cebadores para los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*

Para amplificar los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*, se diseñaron los cebadores presentados en la tabla 2. Para el diseño de estos se tuvo en cuenta que partieran del codón de inicio y terminaran en el codón de parada de cada gen, lo que va a garantizar la amplificación del gen completo, que a futuro va a codificar una proteína funcional.

Tabla 2: Cebadores diseñados para la amplificación de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Gen / sentido del cebador	Secuencia del cebador diseñado
<i>cry2Aa</i> directo	5'- CACCATGAATAATGTATTGAATAGTG -3'
<i>cry2Ab</i> reverso	5'- TTAATAAAGTGGTGAAATATTAG -3'
<i>cry2Ab</i> directo	5'- CACCATGAATAGTGTATTGAATAGCG -3'
<i>cry2Aa</i> r reverso	5'- TTAATAAAGTGGTGGAAGATTAG -3'

Teniendo en cuenta que por lo general los extremos de las secuencias obtenidas por tecnología Sanger presentan ruido y mala calidad, se utilizaron los cebadores directo y reverso proporcionados por el kit Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits, T7 (directo) (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y T7 reverso (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'), para que la secuenciación inicie aguas arriba del codón de inicio del gen heterólogo y termine aguas debajo de su codón de parada, lográndose ensamblar la secuencia completa, sin perder información de los puntos de inicio y finales del gen.

Como los genes amplificados tienen una longitud de 1902 pb se diseñaron un total de seis cebadores internos por cada uno, de esta forma se permitió la amplificación de secuencias no mayores de 600 pb, lo que ayudó a obtener secuencias de mejor calidad en la secuenciación por la tecnología Sanger (Tabla 3).

Tabla 3: Secuencia de los cebadores internos diseñados para la secuenciación de los genes cry2Aa y cry2Ab

Gen cry2Aa	Gen cry2Ab
Reverso 5'- GAAAGATGCATATTGGCTGCC -3'	Reverso 5'- AAAGATGTAAATTGGCTGCC -3'
Directo 5'- TCCAGATACAAGGATACCAG -3'	Directo 5'- ATTTCTAAATAGATTACCCC -3'
Reverso 5'- AATGAGTTGTAGTACTACCCG -3'	Reverso 5'- GTAAACCAACTATATTAGGG -3'
Directo 5'- TAGGCTTTCTATTACCTTCCC -3'	Directo 5'- TGGATTTAGTGGTGCTAGGC -3'
Reverso 5'- ACAGATACCAAATAGGCCCG -3'	Reverso 5'- ATCCTGTATAGTCATTGGC -3'
Directo 5'- AATATAGAAAGTCCTTCGGG -3'	Directo 5'- AATATAGCAAGTCCTTCAGG -3'

4.2 Extracción de ADN plasmídico y cuantificación

El protocolo para extracción de ADN plasmídico descrito por (Sambrook y Russell, 2001) permitió obtener un ADN de excelente calidad y buena concentración en *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Figura 8). Estos resultados son corroborados con la cuantificación por espectrofotómetro donde el radio o cociente de absorbancia de A260/280 se encontró en entre 1.84 y 182, con concentraciones de 1593 y 1344 µg/ml.

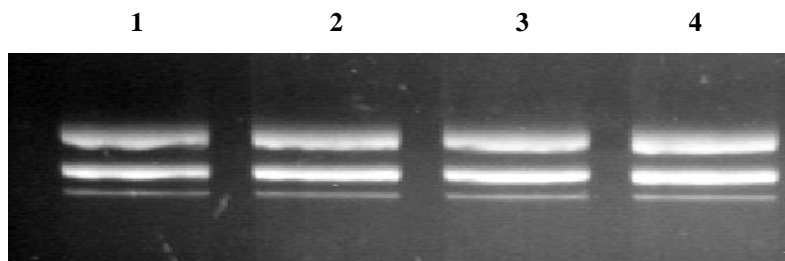


Figura 8: Perfil electroforético del ADN plasmídico de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Carril 1-4 ADN plasmídico de cuatro extracciones independientes de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

4.3 Amplificación de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*

Empleando los cebadores previamente diseñados y después de evaluar las concentraciones de 0.3 y 0.4 μM para los cebadores y de 1.5, 2 y 2.5 mM para el magnesio, se determinó que las mejores condiciones para ambos genes eran 0.4 μM y 2 mM respectivamente las cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de amplificación del genes *cry2Aa* y *cry2Ab* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (μL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
dNTP'S	10 mM	0.2 mM	0.5
Iniciador forward	10 μM	0.4 μM	1
Iniciador Reverse	10 μM	0.4 μM	1
MgCl₂	50 mM	2 mM	1
Taq polimerasa	500 U	1 U	0.2
ADN	-	100 ng	1
H₂O	-	-	17.8
Total	-	-	25

Las condiciones de ciclaje fueron ajustadas, se evaluaron temperaturas de hibridación entre 53 y 46 °C para los iniciadores pET-cry2AaF, pET-cry2AaR, pET-cry2AbF y pET-cry2AbR. Los mejores resultados se observaron con las temperaturas 49 y 47 °C respectivamente (Tablas 5 y 6).

Tabla 5: Programa para la amplificación del gen *cry2Aa* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° de Ciclos
Denaturación inicial	94	2	1
Denaturación	94	0.3	35
Alineamiento	49	0.3	35
Extensión	68	2	35
Extensión final	68	7	1

Tabla 6: Programa para la amplificación del gen *cry2Ab* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	N° de Ciclos
Denaturación inicial	94	2	1
Denaturación	94	0.3	35
Alineamiento	47	0.3	35
Extensión	68	2	35
Extensión final	68	7	1

En la figura 9 se observa la amplificación por PCR de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* a partir de ADN plasmídico de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*. Se puede observar que los productos de PCR presentan un tamaño 1902 pb, lo cual coincide con lo esperado en el análisis BLASTN hecho para las dos parejas de iniciadores. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por Kumar *et al.*, (2004), Tounsi y Jaoua, (2003) y Lin *et al.*, (2008), quienes amplificaron genes *cry2Aa* y *cry2Ab* de diferentes cepas de *B. thuringiensis* y obtuvieron bandas promedio de 1902 pb, en cada caso.

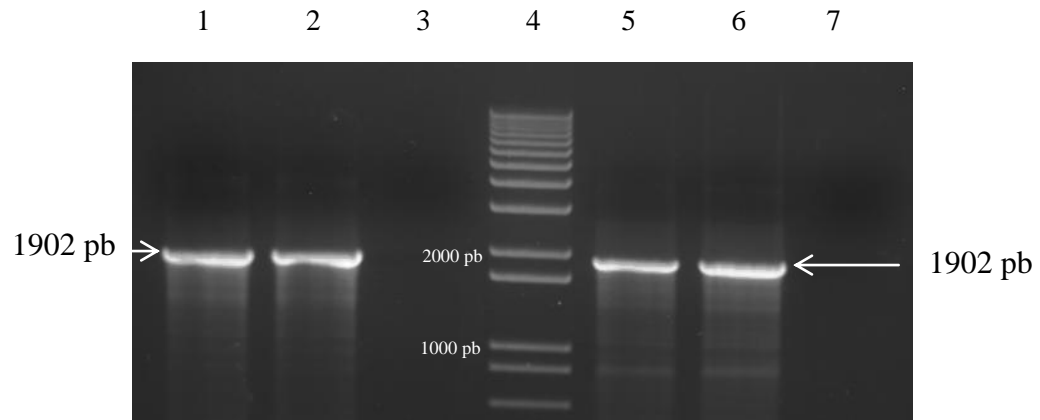


Figura 9: Perfil electroforético de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*. Carriles 1 y 2. Producto de amplificación del gen *cry2Aa*. Carril 3. Control absoluto (agua). Carril 4. Marcador de peso 1Kb plus. Carriles 5 y 6. Producto de amplificación del gen *cry2Ab*. Carril 7. Control absoluto (agua).

4.4 Clonación de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* en el vector de expresión pET151/D-TOPO®

Los productos de PCR fueron purificados y cuantificados, se obtuvieron concentraciones de 100 ng/ μ L para el gen *cry2Aa* y de 150 ng/ μ L para el gen *cry2Ab*. Luego estos fueron ligados al vector pET151 y las construcciones obtenidas fueron denominadas pET151-*cry2Aa* y pET151-*cry2Ab* estas se transformaron inicialmente en *E. coli* cepa TOP10, recomendada por Invitrogen para la conservación y multiplicación del plásmido, obteniéndose una eficiencia de transformación de 3×10^6 , esta eficiencia puede considerarse buena, si se tiene en cuenta que Sambrook y Russel (2001) consideran que eficiencias en el rango de 5×10^6 son altas. En la confirmación por PCR de la construcción pET151-*cry2Aa*, se observó la amplificación de un fragmento esperado de 1902 pb, para una mayor certeza de que no se presentaron errores humanos y que esta construcción contiene el gen *cry2Aa* y no el gen *cry2Ab*, al presentar tamaños iguales, el gen se sometió a una digestión con la enzima *Bgl II* y se pudo observar la presencia de los dos fragmentos esperados cada uno de 1308 y 594 pb (Figura 10). Esto confirma la presencia del gen *cry2Aa* dentro del constructo. Resultados similares se obtuvieron en confirmación de la construcción pET151-*cry2Ab*, donde se evidenció una banda esperada de 1902 pb. En este caso la enzima que se empleó para la digestión del gen fue *Ava II*, con la cual se pudo observar la presencia de los dos fragmentos esperados de 1061 y 841 pb (Figura 11).

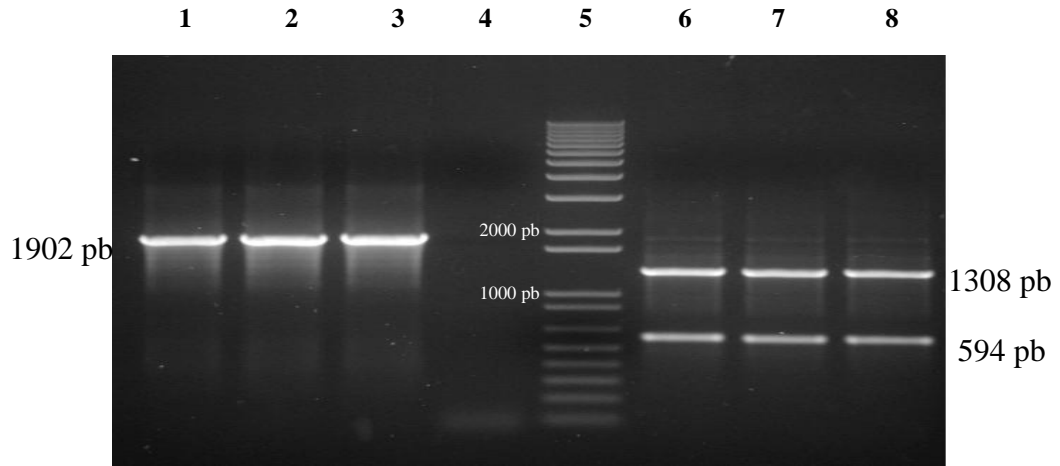


Figura 10: Perfil electroforético del producto de PCR y análisis de restricción del gen *cry2Aa*. Carriles 1, 2 y 3. Producto de amplificación del gen *cry2Aa*. Carril 4. Control absoluto (agua). Carril 5. Marcador de peso 1Kb plus. Carriles 6, 7 y 8. Análisis de restricción del gen *cry2A* con la enzima *Bgl II*.

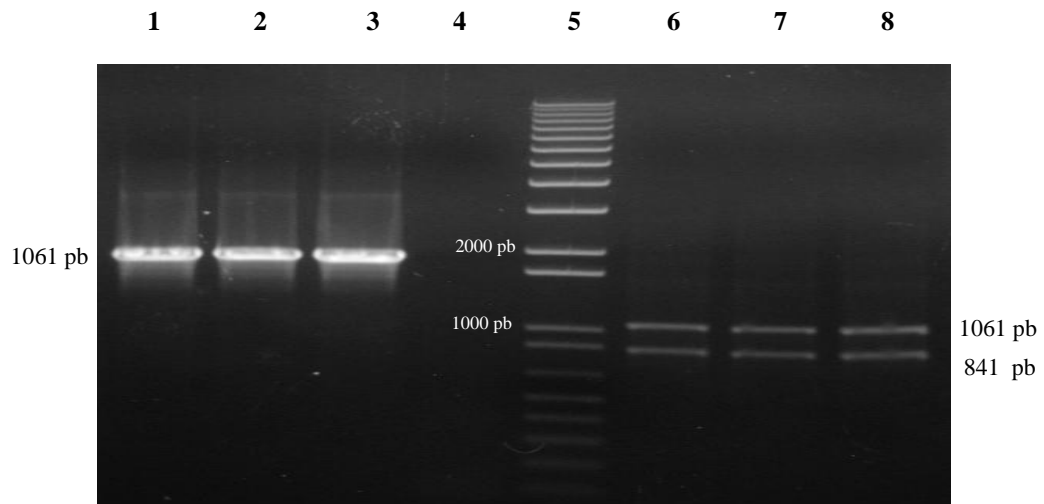


Figura 4: Perfil electroforético del producto de PCR y análisis de restricción del gen *cry2Ab*. Carriles 1, 2 y 3. Producto de amplificación del gen *cry2Ab*. Carril 4. Control absoluto (agua). Carril 5. Marcador de peso 1Kb plus. Carriles 6, 7 y 8. Análisis de restricción del gen *cry2Ab* con la enzima *Ava II*.

Ya verificada la presencia de los genes, se procedió a comprobar el correcto direccionamiento de los mismos, para esto se digirieron los constructos pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab con enzimas de restricción de único y múltiple corte. Para pET151-cry2Aa se empleó la enzima de único corte *Bste II*, que permitió linealizar el constructo generando una única banda esperada de 7662 pb, correspondiente a la suma del peso del vector (5760 pb) y del gen ligado (1902 pb) y las enzimas *Pvu II* y *Sac I*, que presentan diferentes puntos de corte, generando cinco fragmentos de 3279, 2630, 1502, 158 y 93 pb, donde los tres primeros se lograron evidenciar claramente en el gel de agarosa al 1% (Figura 12a).

Para la verificación del constructo pET151-cry2Ab, se utilizó la enzima *Ban II*, todos los clones sometidos a restricción con dicha enzima generaron fragmentos esperados con pesos de 4618, 2059, 736, 158 y 14 pb. *Ban II*, presenta múltiples sitios de reconocimiento dentro del constructo, incluyendo la secuencia del gen *cry2Ab*, lo que permitió asegurar el correcto direccionamiento de este último (Figura 12b).

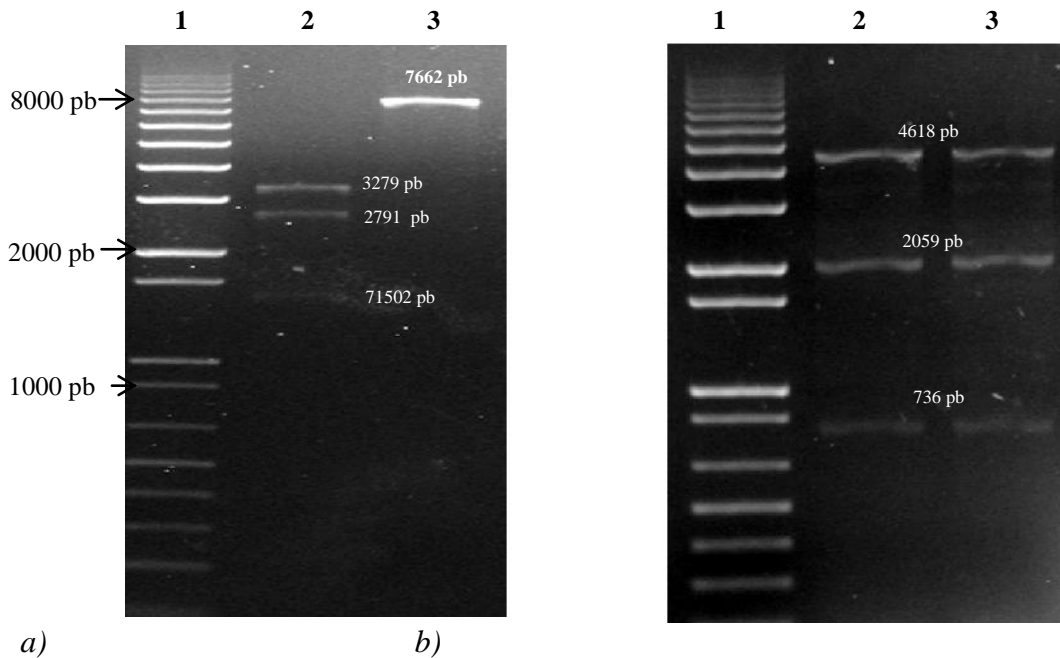


Figura 5: Perfil electroforético de los constructos pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab digeridos con enzimas de restricción. a) Carril 1. Marcador de peso 1Kb plus. Carril 2. pET151-cry2Aa digerido con las enzimas *Pvu II* y *Sac I*. Carril 3. pET151-cry2Aa linealizado con la enzima *Bste II*. b) Carril 1. Marcador de peso 1Kb plus. Carril 2 y 3. pET151-cry2Ab digerido con la enzima *BanII*.

Una vez confirmados los clones recombinantes de pET151-cry2Aa y pET151-cry2Ab en *E. coli* cepa TOP10, se transformaron en *E. coli* cepa BL21, obteniéndose plásmidos



recombinantes en esta cepa bacteriana. La eficiencia de transformación en esta cepa fue 4×10^6 . Se observa un incremento de esta eficiencia, comparada con la obtenida para *E. coli* TOP10, esto puede atribuirse al tipo de muestra empleada para la clonación, ya que en este caso se partió de ADN plasmídico y no de un producto de ligación, este último puede contener plásmido recombinante, plásmido recirculado, plásmido linealizado y otro tipo de sustancias pertenecientes a las requeridas en la reacción de ligación, que puede hacer que se reduzca la eficiencia de transformación.

4.5 Análisis de la secuencia obtenida para los genes *cry 2Aa* y *cry2Ab*

El ensamble de los fragmentos obtenidos para los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*, generó para cada uno de estos una secuencia de 1902 pb (Figura 13 y 14). El contenido de guaninas-citosinas (%GC) para estos fragmentos fué de 34.12 y 34.9% respectivamente. Estos valores se encuentra dentro del rango reportado para genes de este tipo, el cual oscila entre 32 y 35% (Berry *et al.*, 2002, Venter, 2009).

La comparación de las secuencias obtenidas en este estudio respecto a las reportadas en bases de datos, usando el programa BLAST web (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), reveló altos valores de identidad (100%), con genes pertenecientes a especies relacionadas (Tabla 7 y 8). El porcentaje de identidad que arroja el análisis BLAST, definido como el grado de invariabilidad que presentan dos secuencias (de nucleótidos o proteínas) al ser comparadas, puede ser asumido como una medida de la similitud existente entre las mismas (Altschul, *et al.*, 1997).

En la tabla 7 y 8, se observan valores E-value de 0.0, este resultado permite explicar la estrecha relación que presentan estos genes (Schnepf *et al.*, 1998) y la posible homología entre estos. El valor E representa el número de alineamientos que se puede esperar que ocurran por azar entre la secuencia en estudio y cualquiera otra de las existentes en una base de datos. Por lo tanto, entre más cercano a cero sea el valor E, más significativo es el alineamiento entre la secuencia que se analiza y la secuencia relacionada (Altschul, *et al.*, 1997). Todos los valores E arrojados en el análisis BLAST corresponden a alineamientos con genes de *B. thuringiensis* de diferentes cepas y serovares, explicando el alto porcentaje de identidad. Las secuencias nucleotídicas de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*, fueron alineadas entre sí, arrojando una identidad del 89% con un E-value de 0.0, indicando su estrecha relación.

Tabla 7: Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada como cry2Aa en *B. thuringiensis* y genes reportados.

Descripción del gen	Valor E	% Identidad
plasmido pCT281 (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>chinensis</i>)	0.0	100%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i> cepa Ly30)	0.0	100%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	100%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>tolworthi</i>)	0.0	100%
<i>cryB1</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	100%
<i>cryB1</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	100%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i> cepa 22-4)	0.0	99%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>)	0.0	99%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	99%
<i>cry2Aa</i> (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kenyae</i>)	0.0	99%

Tabla 8: Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada como cry2Ab en *B. thuringiensis* y genes reportados.

Descripción del gen	Valor E	% Identidad
plasmido pCT281 (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>chinensis</i>)	0.0	100%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	100%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>)	0.0	100%
<i>cryB2</i> (<i>B. thuringiensis</i> cepa LSZ9408)	0.0	100%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i> ly30)	0.0	99%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	99%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	99%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i> YY1)	0.0	99%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i>)	0.0	99%
<i>cry2Ab</i> (<i>B. thuringiensis</i> cepa 14-1)	0.0	99%



```

1      ggggtgacgg gaacaattcc cctctagaat aatTTTgTTT aactTTaaga aggagatata
61     catatgcatc atcaccatca ccatggtaag cctatcccta accctctcct cgggtctcgat
121    tctacggaaa acctgtatTT tCagggaaTT gatcccttca ccatgaataa tgtattgaat
181    agtggaagaa caactatTTg tGatgcgTat aatgtagtag cccatgatcc atTTtagTTTt
241    gaacataaat cattagatac catccaaaaa gaatggatgg agtggaaaag aacagatcat
301    agTTTtatatg tagctcctgt agtcggaact gtgtctagTT tTTTgctaaa gaaagtgggg
361    agtcttattg gaaaaaggat attgagtGaa tTatggggga taatatttcc tagtggtagt
421    acaaatctaa tgcaagatat tTTaagggag acagaacaat tcctaaatca aagacttaat
481    acagataccc ttgctcgtgt aaatgcagaa ttgatagggc tccaagcgaa tataagggag
541    tTTaatcaac aagtagataa tTTTttaaac cTactcaaa accctgttcc tTTatcaata
601    acttcttccg ttaatacaat gcagcaatta tTTctaaata gattaccca gttccagata
661    caaggatacc agTTgttatt attacTTtTt tTtgcacagg cagccaatat gcatctTTct
721    tTTattagag atgTTattct taatgcagat gaatggggta tTtcagcagc aacattacgt
781    acgtatcgag attacTTgag aaattataca agagattatt cTaattattg tataaatcag
841    tatcaaactg cgtTTtagag gTTaaacacc cgtTTacag atagTTtaga atTTagaaca
901    tatatgTTTT taaatgtatt tGaatatgta tccatttggT cattgTTtaa atatcagagt
961    cttatggTat cttctggcgc taatttataT gctagcggta gtggaccaca gcagacacaa
1021   tcatttacag cacaaaactg gccattTTtT tattctctTT tccaagttaa ttcgaattat
1081   atattatctg gtattagtgg tactaggcTT tctattacct tccctaatat tggTggTTtT
1141   cgggtagta ctacaactca ttcattgaat agtgccaggg ttaattatag cggaggagtt
1201   tcatctggTc tcataggggc gactaatctc aatcacaact ttaattgcag cacggTcctc
1261   cctcctTTtT caacaccatt tGttagaagt tggctggatt caggtacaga tcgagagggc
1321   gttgctacct ctacgaattg gcagacagaa tccTTtcaaa caactTTaag tTTaaggtgt
1381   ggtgctTTTT cagcccgtgg aaattcaaac tatttcccag attattTTtT ccgtaattat
1441   tctggggTtc cTTtagTTat tagaaacgaa gatctaaca gaccgttaca ctataacca
1501   ataagaaata tagaaagtcc ttcgggaaca cctggTggag cacgggccta tTTggTatct
1561   gtgcataaca gaaaaataa tatctatgcc gctaataGaa atggTactat gatccatttG
1621   gcgccagaag attatacagg atttactata tcgccaaTat atgccactca agtgaataat
1681   caaactcgaa catttatttT tgaaaaattt ggaaatcaag gtgattcctt aagatttgaa
1741   caaagcaaca cgacagctcg tTatacgctt agagggaaTg gaaatagTTa caatctTTtT
1801   ttaagagtat cttcaatagg aaattcaact attcGagTTa ctataaacgg tagagTTtT
1861   actgTTtTcaa atgTTaatac cactacaaat aacgatggag tTaatgataa tggagctcgt
1921   tTTtcagata tTaatatcgg taatatagta gcaagtGata atactaatgt aacgctagat
1981   ataaatgtga cattaaactc cggTactcca tTTgatctca tGaatattat gTTTgtgcca
2041   actaatcttc caccacttTt tTaaaagggc gagctcagat cgggctgcta acaaagcccG
2101   aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc
2161   ctctaaacgg gtcttgaggg gTTTTttgct gaaaggagga actatatccg gatatcccGc
2221   aagaggcccG gcagtaccgg cataaccaag cctatgccta cagcatccag ggtgacggTg
2281   ccgaggaaga cgatgagcgc attgttagat ttcatacacg gtgcctgaac tgcgtagcaa
2341   tttacctgtg ataaactacc gcattaaagc tagctaatcg atgataaact gtcaaaactg
2401   agaattaatt tctgaaaaac aaagggcctc gtgatacccc catttttata ggtaaaggct
2461   tggaataaaa gg

```

Figura 13: Secuencia de nucleótidos correspondiente al gen cry2Aa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (iniciadores directo y reverso son resaltados).



```

1      ggggtgacgg aacattcccc tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac
61     atatgcatca tcaccatcac cactgttaag cctatcccta accctctcct cgggtctcgat
121    tctacggaaa acctgtattt tcaggaatt gatcccttca ccatgaatag tgtattgaat
181    agcggaagaa ctactatttg tgatgcgat aatgtagcgg ctcatgatcc atttagtttt
241    caacacaaat cattagatac cgtacaaaag gaatggacgg agtggaaaaa aaataatcat
301    agttttatacc tagatcctat tgttggaact gtggctagtt ttctgttaaa gaaagtgggg
361    agtcttgttg gaaaaaggat actaagtgag ttacggaatt taatatttcc tagtggtagt
421    acaaatctaa tgcaagatat ttttaagagag acagaaaaat tcctgaatca aagacttaat
481    acagacactc ttgcccgtgt aaatgccgaa ttgacagggc tgcaagcaaa tgtagaagag
541    tttaatcgac aagtagataa ttttttgaac cctaaccgaa acgctgttcc tttatcaata
601    acttcttcag ttaatacaat gcaacaatta tttctaata gattaccca gttccagatg
661    caaggatacc aactgttatt attaccttta tttgcacagg cagccaattt acatctttct
721    tttattagag atgttattct aaatgcagat gaatggggaa tttcagcagc aacattacgt
781    acgtatcgag attacttgaa aaattataca agagattact ctaactattg tataaatcag
841    tatcaaagtg cgtttaaagg tttaaacact cgtttacacg atatgttaga atttagaaca
901    tatatgtttt taaatgtatt tgagtatgta tctatctggc cgttgtttaa atatcaaagt
961    cttctagtat cttccggtgc taatttataat gcaagtggta gtggaccaca gcagacccaa
1021   tcatttactt cacaagactg gccattttta tattctcttt tccaagttaa ttcaaattat
1081   gtgttaaagt gatttagtgg tgctaggcct tctaatacct tccctaatat agttggttta
1141   cctggttcta ctacaactca cgcattgctt gctgcaaggg ttaattacag tggaggaatt
1201   tCGTctggTg atataggTgc atctccgttt aatcaaaatt ttaattgtag cacatttctc
1261   cccccattgt taacgccatt tGttaggagt tggctagatt cagggttcaga tcgggagggc
1321   gttgccaccg ttacaaattg gcaaacagaa tcctttgaga caactttagg gttaaggagt
1381   ggtgctttta cagctcgcgg taattcaaac tatttcccag attattttat tcgtaatatt
1441   tctggagttc ctttagttgt tagaaatgaa gatttaagaa gaccgttaca ctataatgaa
1501   ataagaaata tagcaagtcc ttcaggaaca cctggtggag cacgagctta tatggtatct
1561   gtgcataaca gaaaaataa tatccatgct gttcatgaaa atggttctat gattcattta
1621   gcgccaaatg actatacagg atttactatt tcgccgatac atgcaactca agtgaataat
1681   caaacacgaa catttatttc tgaaaaattt ggaaatcaag gtgattcttt aaggtttgaa
1741   caaaacaaca cgacagctcg ttatacgtt agaggggaatg gaaatagtta caatctttat
1801   ttaagagttt cttcaatagg aaattccact attcaggtta ctataaacgg tagggatat
1861   actgctacaa atgttaatac tactacaaat aacgatggag ttaatgataa tggagctcgt
1921   ttttcagata ttaatatcgg taatgtagta gcaagtagta attctgatgt accattagat
1981   ataaatgtaa cattaaactc cgg tactcaa tttgatctta tgaatattat gcttgacca
2041   actaatattt caccacttta ttaaaagggc gagctcagat cgggctgcta acaaagcccg
2101   aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc
2161   ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct gaaaggagga actatatccg gatatcccgc
2221   aagaggcccg gcagtaccgg cataaccaag cctatgccta cagcatccag ggtgacggTg
2281   ccgaggatga cgatgagcgc attgttagat ttcatacacg gggcctgact gcgttagcaa
2341   tttactgtg ataaactacc gcattaaaac tagcttatcg atgataagct tggcaaaatg
2401   agaatttaat tcttgaaaac gaaaaggcct ccgtgaaacg cctattttta taggttaaag
2461   tcatgaaaaa aagggT

```

Figura 6: Secuencia de nucleótidos correspondiente al gen cry2Ab de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (iniciadores directo y reverso son resaltados).



4.6 Predicción de la estructura y función de las proteínas putativas Cry2A y Cry2Ab

En este estudio no se secuenciaron las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab, pero se realizó una predicción *in silico* a partir de la secuencia nucleotídica de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* usando la herramienta BLASTX (NCBI), de esta forma se logró evidenciar las proteínas putativas seleccionando el mejor marco abierto de lectura para estos genes, (Anexo 5 y 6). Usando las bases de datos de familias proteicas PFAM se identificaron los tres dominios característicos de este tipo de proteínas (Figura 15). Un dominio I (delta endotoxina, N-terminal), un dominio II (endotoxina media) y un dominio III (C-endotoxina).

El dominio I (delta endotoxina, N-terminal), comprendido entre el aminoácido 51 y 266; está constituido por un ramillete de siete α -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la α -hélice cinco (Soberón y Bravo, 2007), esta última ha sido implicada en la formación del poro, lo que podría explicar su naturaleza altamente conservada; la ubicación central de la hélice cinco también sugiere un papel esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del paquete helicoidal (Schnepf *et al.*, 2008). El dominio II, está formado por tres láminas de estructura β en antiparalelo, que terminan en asas en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas β -plegadas, arregladas en forma de sándwich una sobre otra (Soberón y Bravo, 2007). Estos dominios ya han sido reportados para otras proteínas Cry (Lin *et al.*, 2008, Grijalba, *et al.*, 2010).

El dominio II se encuentra asociado con la participación en la interacción con el receptor, por lo que sería determinante en la especificidad. Lin *et al.*, (2008), realizó un estudio de la comparación estructural entre Cry2Ab10 y las estructuras de proteínas Cry tóxicas reportadas, este mostro que estas estructuras son más divergentes en el dominio II, lo que indica que estas variaciones, determinan los cambios en la especificidad de la proteína hacia el insecto blanco. Aunque las proteínas putativas Cry2Aa y Cry2Ab de este estudio, hayan mostrado 100% de identidad con otras proteínas Cry ya reportadas, hay trabajos que indican claramente que todos los lazos del dominio II pueden participar en la unión del receptor, aunque tal vez no todos al mismo tiempo, esto dependerá del insecto o receptor dado. Diferentes toxinas pueden tener la misma secuencia de aminoácidos en los lazos de dominio II (ejemplo, Cry1Ab y Cry1Ac) sin embargo, se unen a receptores diferentes. La información parece indicar una similitud interesante entre los lazos de unión al receptor del dominio II y otros epítomos proteína-proteína conocidos, es decir, un residuo hidrofóbico es capaz de unirse estrechamente al receptor que está rodeado por residuos o cargas hidrofóbicas (Schnepf *et al.*, 1998). Otro estudio realizado por Smedley y Ellar (1996), muestra como cambios en un solo aminoácido, puede generar cambios importantes en la actividad tóxica de la proteína Cry, este resultado fue obtenido al realizar mutaciones conservadas en los aminoácidos G439, Y367, R368 y R369 del gen *cry1Ac* de *B.*

thuringiensis var. *kurstaki* HD-73, observando una reducción en la capacidad de la toxina para unirse de forma competitiva al receptor en *Manduca sexta*, estos resultados sugieren que estos cuatro aminoácidos desempeñan un papel específico en el paso inicial de unión del receptor en el mecanismo de acción de la toxina.

Usando la herramienta tblastp (NCBI), se halló un 88% de identidad entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas putativas Cry2Aa y Cry2Ab (Anexo 8) y al realizar una comparación entre los dominios I, II Y III reportados por Pfam para estas mismas proteínas, se encontraron porcentajes de identidad del 90%, 84% y 92% respectivamente, esto permitió observar que la mayor diferencia entre las secuencias aminoacídicas, se encuentra ubicada en el dominio II, estos cambios aminoacídicos podrían explicar las diferencias en la actividad tóxica presentadas por estas proteínas frente a *T. solanivora*.

El dominio III, está asociado con la función de mantener la estabilidad de la toxina, como también en la modulación de canales iónicos en el intestino medio de los insectos susceptibles (Sauka y Benintende, 2008), de hecho, existe al menos cierta evidencia que sugiere un papel para el dominio III en la unión al receptor en ciertos sistemas (Dean *et al.*, 1996). Otros trabajos lo asocian con el mantenimiento de la integridad estructural de la toxina (Li *et al.*, 1991). Esto puede explicar el alto grado de similitud que presentan estas proteínas entre los aminoácidos 494 y 628, que se reporta como el dominio III (endotoxina C).



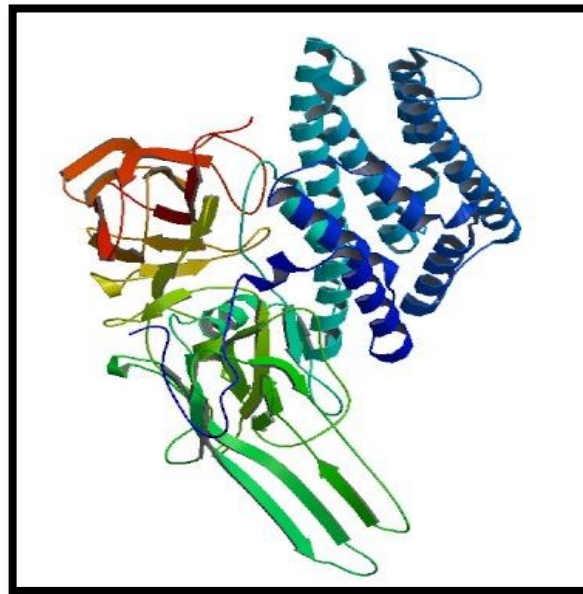
Fuente	Dominio	Aminoácido de Inicio	Aminoácido Final
Pfam A	N Endotoxina	51	266
Pfam A	Endotoxina media	267	472
Pfam A	C Endotoxina	494	628

Figura 15: Dominios reportados por Pfam para las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Adicionalmente usando la base de datos de proteína PDB, se predijo la estructura tridimensional de las proteínas putativas de los genes *cry2Aa* y *cry2Ab*, a partir de la estructura cristalográfica de una proteína homóloga (Figura 16), reportada en European Bioinformatics Institute (EBI) con código de acceso (>1I5P:A) (Anexo 7), la cual mostró un porcentaje de identidad del 100% y 95% respectivamente, usando la herramieta Blastp.

La función putativa de estas proteínas ha sido asignada usando ontologías génicas o vocabularios controlados para la clasificación de los genes, a partir de tres categorías principales; proceso biológico, función molecular y componente celular. Así las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab de este estudio se encuentran relacionadas para un vocabulario controlado de proceso biológico, con respuesta a defensa, patogénesis y esporulación. Para la función celular se encontraron asociadas con la unión al receptor y para componente celular no se encontró ningún tipo de asociación, según los datos reportados por PDB e InterProScan.

Figura 16: Estructura tridimensional de la proteína cry2Aa de *B. thuringiensis*.



Fuente: Morse *et al.*, 2001

4.7 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes

Con el fin de obtener una alta expresión de las proteínas recombinantes, se evaluaron diferentes concentraciones del inductor (IPTG), 0.2, 0.5, 0.75 y 1 mM, encontrándose que 1 mM era necesaria para producir la mayor expresión, lo cual se pudo evidenciar en los geles de poliacrilamida al 8% (datos no mostrados), trabajos realizados empleando este tipo de promotor reportan expresiones altas empleando esta misma concentración (1 mM) del inductor (Lin *et al.*, 2008, Gómez *et al.*, 2000, Kumar *et al.*, 2004, Grijalva *et al.*, 2010).



Sin embargo, otros autores reportan expresiones de proteínas Cry recombinantes, empleando concentraciones menores de IPTG (Chayaratanasin *et al.*, 2007, Boonsermet *et al.*, 2004), estas diferencias en las concentraciones requeridas de IPTG, pueden deberse al tipo de promotor empleado en cada estudio.

Las bacterias de *E. coli* BL21 portadoras de los plásmidos recombinantes pET151-cry2Aa, pET151-cry2Ab y del plásmido control de expresión inducidos con IPTG 1 mM, al ser visualizados en geles de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al 8% mostraron bandas de peso aproximado esperado de 66 kDa para las proteínas recombinantes y 120 kDa para la proteína β -galactosidasa (control positivo). La presencia esta última proteína, es un indicador del buen funcionamiento del sistema de expresión. (Figura 17)

Las secuencias de 1902 pb codifican para una proteína de 633 aminoácidos cuyo peso aproximado es de 62 kDa, sin embargo el vector pET151/D-TOPO® permite la expresión de proteínas recombinantes con un N-terminal etiquetado con el epítipo V5 y una cola de polihistidina (6x His), esta etiqueta también contiene un sitio de corte para la proteasa TEV, la cual permite la eliminación de la etiqueta después de la purificación de las proteínas. Por lo anterior es necesario sumar a la proteína recombinante (62 kDa) 4 kDa, dando como peso esperado final una proteína de 66 kDa. Pesos similares para estas proteínas Cry2A han sido encontrados en otros estudios similares. Kumar *et al.*, (2004) encontró un peso aproximado de 65 kDa para las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab, mientras que Lin *et al.*, (2008), encontró después de clonar y expresar el gen *cry2Ab* en *E. coli* una proteína de 60 kDa, esto resultados fueron obtenidos empleando diferentes tipo de vestores de expresión.

La clonación y expresión de genes *cry* de *B. thuringiensis* ha sido utilizado para aislar proteínas de forma individual, permitiendo evaluar su actividad tóxica de forma independiente en diferentes insectos plagas.

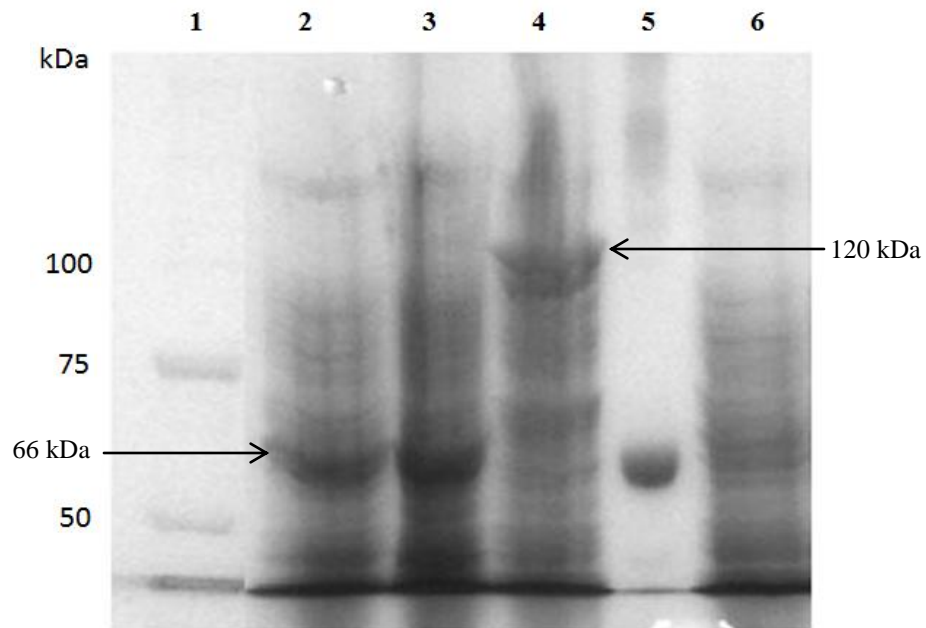


Figura 17: Perfil electroforético del extracto crudo de proteínas totales de *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab. Carril 1. Marcador de peso (Precision Plus Protein Standards). Carril 2. Proteína recombinante Cry2Aa. Carril 3. Proteína recombinante Cry2Ab. Carril 4. Control de expresión (proteína β -galactosidasa). Carril 5. Albumina bovina. Carril 6. Control de expresión sin inducir.

Con el fin de obtener las proteínas recombinantes en el medio de cultivo fue necesario emplear procesos mecánicos como sonicación y choque térmico puesto que el sistema de expresión utilizado no contiene secuencias que permitan liberar la proteína extracelularmente. Para poder realizar posteriormente los bioensayos se eliminaron proteínas que pudieran interferir con los resultados (Figura 18), empleando carbonato de sodio 0.1 M pH11, logrando obtener así una mayor cantidad de fracción de proteína soluble; proteínas de *B. thuringiensis* utilizadas con fines similares a estas han sido solubilizadas a diferentes pH alcalinos, pH 8.0 (Fang *et al.*, 2009), pH 10.5 (Promdokoy *et al.*, 2005) y pH 12 (Kumar *et al.*, 2004).

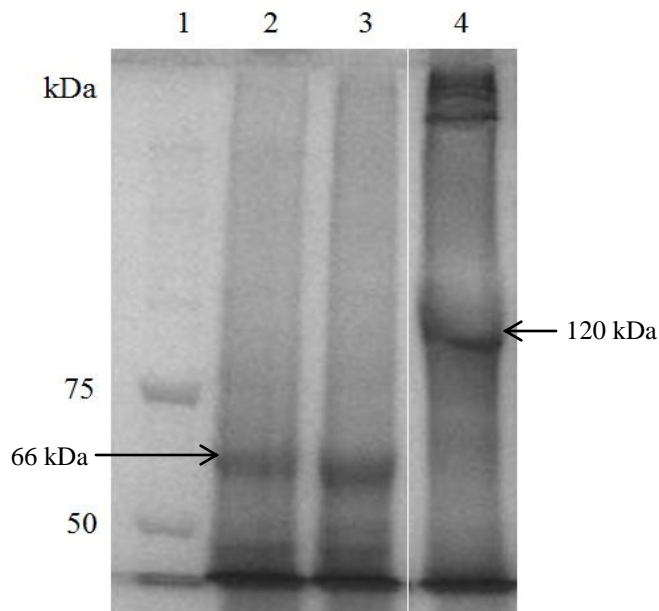


Figura 18: Perfil electroforético del extracto crudo de proteínas totales de *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab solubilizadas con carbonato de sodio 0.1mM pH 11. Carril 1. Marcador de peso (Precision Plus Protein Standards). Carril 2. *E. coli* pET151-Cry2Aa Carril 3. *E. coli* pET151-Cry2Ab. Carril 4. Control de expresión (proteína β -galactosidasa).

Se comprobó la presencia de la proteína Cry2Aa y Cry2Ab, en los extractos crudos de proteínas totales de *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab después de la solubilización, empleando inmunitiras de flujo transversal (Figura 19). Estas tiras presentan anticuerpos específicos inmovilizados en su superficie, que al reaccionar con el antígeno, se revelan por medio de una banda de color rojo. Se observó la presencia de dos bandas de color rojo, la primera pertenece al control, indicando el perfecto estado y funcionamiento de la prueba, la segunda corresponde a la detección de las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab por el anticuerpo Cry2A contenido en estas tiras. Clones de *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab sin inducir también fueron sometidos a esta prueba, observándose en estos la detección de las proteínas recombinantes, este resultado puede explicarse como una expresión basal de las proteínas, como consecuencia de fugas de RNA polimerasa T7 en el lisogen DE3, que va a reconocer el promotor T7 y empezar todo el proceso de transcripción (Invitrogen, 2006) y por el alto grado de sensibilidad que presenta esta prueba. Resultados similares fueron encontrados por Grijalba *et.*, (2010). La cepa *E. coli* B121 sin transformar, solo se evidenció la banda perteneciente al control, demostrándose de esta forma que la segunda banda observada en *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab pertenece a la proteína recombinante presente en estos clones.

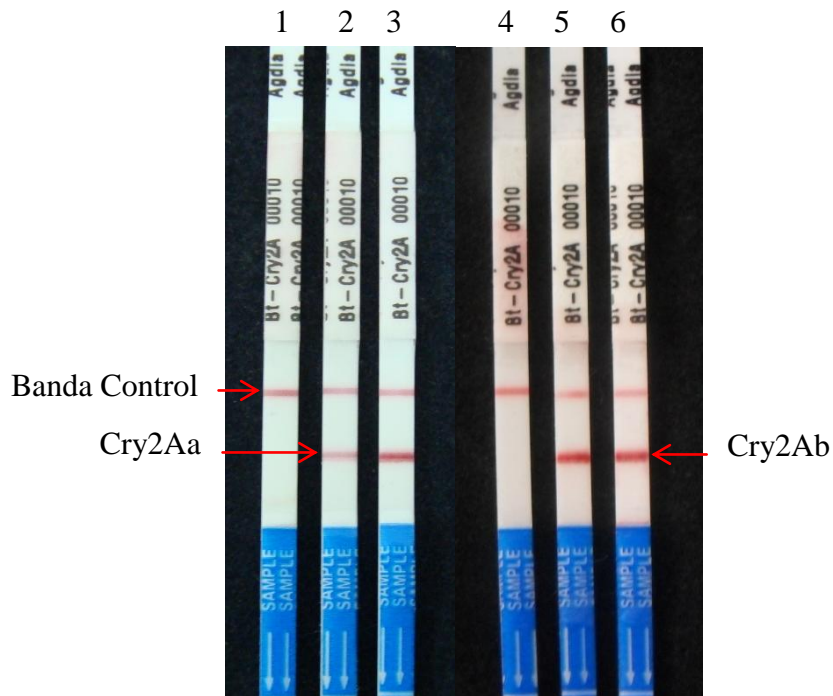


Figura 19: Detección de las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab por inmunodetección. Carril 1. *E. coli* cepa BL21 sin transformar. Carril 2. *E. coli* pET151-Cry2Aa sin inducir. Carril 3. *E. coli* pET151-Cry2Aa inducida (IPTG 1 mM). Carril 4. *E. coli* cepa BL21 sin transformar. Carril 5. *E. coli* pET151-Cry2Ab sin inducir. Carril 6. *E. coli* pET151-Cry2Ab inducida (IPTG 1 mM).

4.8 Actividad biológica de Cry2Aa y Cry2Ab

Se observaron porcentajes de mortalidad sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*, empleando extractos totales de proteínas de *E. coli* pET151-Cry2Aa y pET151-Cry2Ab, del 75.55 % y 44 % respectivamente. Cabe anotar que solo se conocía la concentración de proteína total del lisado y no de las proteínas recombinantes. El control con carbonato de sodio 1 mM pH11, reporto el menor porcentaje de mortalidad (13%), comparado con el control absoluto (tubérculo sin nebulizar) (17.77 %) y el control negativo (330 µg/ml de *E. coli* BL21) (17.17 %).

Teniendo en cuenta la CL₅₀ reportada por Grijalba *et al.*, (2010) de 332.67 µg/mL de proteína total de *E. coli* recombinante para Cry1Ac sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*, se decidió tomar esta concentración como punto de referencia de este trabajo, en donde el porcentaje de eficacia encontrado para los tratamientos de *E. coli* pET151-



Cry2Aa, *E. coli* pET151-Cry2Ab (300 µg/ml) y de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (330 µg/mL) (Control positivo) fueron de 71.26%, 36.78% y 74.44% respectivamente, todo lo anterior se calculó en base al control con carbonato de sodio, que fue el que presentó menor porcentaje de mortalidad (13%), sin embargo este no muestra diferencias significativas respecto a los controles que incluyen el lisado de *E. coli* BL21 sin transformar y el control absoluto (tubérculo sin nebulizar) (Figura 20).

El análisis de varianza de los datos obtenidos en los bioensayos con el lisado *E. coli* pET151-Cry2Aa, indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($P < 0,01$). El análisis de Duncan indicó que no existían diferencias entre los tratamientos *E. coli* pET151-Cry2Aa (200, 300, 400 y 500 µg/mL) y el control positivo (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki* 330 µg/mL), sin embargo si se presentaron diferencias entre estos y los tratamientos *E. coli* pET151-Cry2Aa (100µg/ml), control absoluto, control con carbonato de sodio pH 11 y control *E. coli* BL21.

Aunque no se presentaron diferencias significativas entre el extracto recombinante Cry2Aa y el control positivo, se observó un incremento en el porcentaje de eficiencia para este último, esto podría estar explicado, por la presencia de otras proteínas Cry (cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa y Cry2Ab) producidas por esta bacteria y por la presencia de esporas en el extracto. Se tiene reporte que proteínas Cry1 presentan actividad tóxica contra este *T. solanivora* (Pitre *et al.*, 2008) y su presencia en el lisado de *B. thuringiensis* muy probablemente ayudaría a incrementar el porcentaje de eficacia.

En la evaluación de la actividad tóxica del lisado de *E. coli* pET151-Cry2Ab, el análisis de varianza a partir de los datos obtenidos en los bioensayos, indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$), la prueba Duncan mostró que estas solo se presentaban entre el control positivo (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* 330 µg/ml) y el resto de los tratamientos (Figura 19). *E. coli* pET151-Cry2Ab (300 µg/ml), no presentó diferencias significativas con los controles absoluto, *E. coli* BL21 y control carbonato de sodio pH11, este resultado explica el bajo porcentaje de eficacia que presento esta proteína, contrastado con lo obtenido para *E. coli* pET151-Cry2Aa. Actualmente no se encuentran reportes donde se haya evaluado la actividad tóxica de esta proteína frente a *T. solanivora*, pero si se reporta actividad tóxica para otros insectos considerados plagas agrícolas. Lin *et al.*, (2008) encontró que la proteína Cry2Ab10 aislada *B. thuringiensis* cepa lyL y expresada en *E. coli* fue altamente tóxica contra *Plutella xylostella* al emplear una CL_{50} de 95 µg/ml.

La determinación de la CL_{50} , solo se realizó para el lisado de *E. coli* pET151-Cry2Aa, ya que los resultados obtenidos a partir de la evaluación de las diferentes concentraciones del lisado de *E. coli* pET151-Cry2Ab, no presentaron una relación entre el incremento de la

concentración y el número de larvas muertas por tratamiento. La CL₅₀ y CL₉₀ del lisado de *E. coli* pET151-Cry2Aa calculada utilizando el programa Biostat®2007 fué de 167,744 y 554,633 µg/ml, respectivamente.

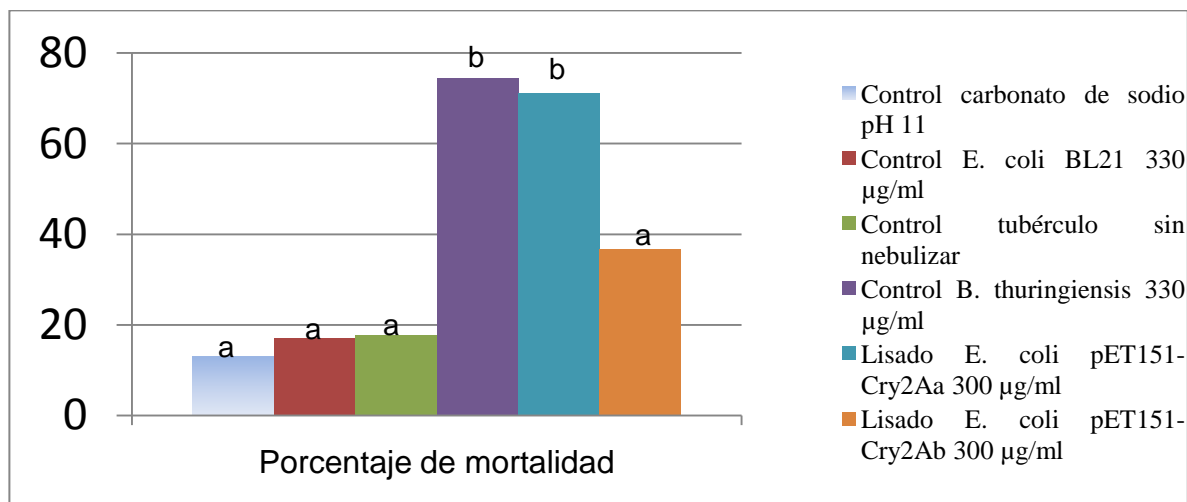


Figura 20: Resultados del porcentaje de mortalidad de los diferentes tratamientos, (desviaciones estandar, anexo 9).

Trabajos que evalúan la actividad tóxica de proteína Cry recombinante contra *T. solanivora* han sido desarrollados, Grijalba *et al.*, (2010), determinó que la CL₅₀ del lisado de *E. coli* recombinante expresando la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* era de 332.67 µg/mL, se observa que el resultado de esta CL₅₀ es superior al obtenido en este estudio, cabe realzar que para ninguno de los estudios se tenía certeza de la concentración real de proteína recombinante dentro de los lisados, lo cual no nos permite inferir de forma precisa cual de las dos proteínas presenta mayor actividad tóxica contra esta plaga.

Martínez *et al.*, (2003), reportan una CL₅₀ de 87.57 µg/ml del complejo espora cristal de *B. thuringiensis* cepa HD1, contra *T. solanivora* y porcentajes promedio de mortalidad de las proteínas recombinantes purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C y Cry1D de 6,24, 6,76, 19,26, 4,16 y 5,72, 1,56% respectivamente, empleando una concentración de 80 µg/ml de proteína por bioensayo. Pitre *et al.*, (2008) encontraron una CL₅₀ de 16.95 µg/mL para el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* HD1 contra *T. solanivora* y CL₅₀ de Cry1Aa de 2.06 µg/mL, para Cry1Ac de 2.14 µg/mL, para Cry1B de 1.70 µg/mL y para Cry1C 2.24 µg/mL, debe tenerse en cuenta que estas proteínas recombinantes purificadas y clivadas se evaluaron a una concentración promedio de 2 µg/mL, es posible que este estado



le confiera a las proteínas recombinantes una potencia tóxica mayor, ya que el proceso de proteólisis de la protoxina ya ha sido realizado favoreciendo la unión específica con el receptor. Las grandes diferencias presentadas en las CL_{50} encontradas para el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* HD1 de Martínez *et al.*, (2003) y Pitre *et al.*, (2008), puede deberse al tipo de montaje empleado en los bioensayos ó el tipo de presentación de la dieta suministrada al insecto.

La proteína Cry2Aa, ya ha sido reportada por su actividad tóxica contra insectos considerados plagas agrícolas. Kumar *et al.*, (2004) encontró que la proteína Cry2Aa era 100% mortal contra larvas de *Helicoverpa armigera* con una concentración de 650 y 100 ng/ml de extracto de proteína total de *E. coli* recombinante, después de 48 y 72 horas respectivamente, esta misma plaga mostró ser susceptible a la proteína Cry2Aa a una CL_{50} de 1570 ng/ml (Gajendra *et al.*, 2002). Martínez *et al.*, (2003) encontró un porcentaje de mortalidad inferior al 10% empleando la proteína recombinante purificada Cry2A expresada en *E. coli*, sin embargo este autor no especifica que tipo de proteína Cry2A emplea, lo que conduce a pensar que muy posiblemente se trate de Cry2Ab, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio.

La diferencia en el porcentaje de eficacia para el control de larvas de primer instar de *T. solanivora*, mostrada por las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab, puede estar dado por las variaciones que éstas presentan en el dominio II, se tiene conocimiento que diferencias menores en los aminoácidos de estas proteínas, puede conducir a cambios significativos en el nivel de toxicidad y en la actividad insecticida de la proteína (Sasaki *et al.*, 1997).



5. CONCLUSIONES

Las dos parejas de iniciadores para PCR diseñados en este estudio permitieron la amplificación de manera específica de dos fragmentos cada uno de 1902 pb correspondientes a los genes *cry2A* y *cry2Ab*, a partir de ADN plasmídico de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, estos fueron clonados en el vector de expresión pET151/D-TOPO®, codificando dos proteínas de 633 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 66 kDa.

Empleando electroforesis en geles de SDS PAGE al 8% e inmuntiras de flujo transversal, se pudo confirmar la expresión de las proteínas Cry2Aa y Cry2Ab en *E. coli* cepa BL21.

Las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab expresadas en *E. coli* cepa BL21, bajo la actividad del promotor T7, presentaron una eficacia de 71.26% y 36.78% respectivamente sobre larvas de primer instar de *T. solanivora*.

La CL50 presentada por el lisado de *E. coli* pET151-Cry2Aa frente a larvas de primer instar de *T. solanivora* fue de 167.744 µg/ml.

La proteína recombinante cry2Aa de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* expresada en *E. coli* cepa BL21, puede ser una candidata promisoriosa para contribuir en el desarrollo de nuevas estrategias biológicas para el control de *T. solanivora*, al encontrarse una eficacia del 71.26%, similar a la obtenida para el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, 74.44%.



6. RECOMENDACIONES

- Purificar las proteínas recombinantes Cry2Aa y Cry2Ab y evaluar nuevamente su actividad toxica contra *T. solanivora*.
- Evaluar posibles efectos sinérgicos que puedan presentarse entre estas proteínas.
- Realizar ensayos biológicos que permitan determinar la actividad tóxica de estas proteínas en otras plagas de interés agrícola.



BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, S., Rodríguez, C., Díaz, O., Martínez, J., López, J., Blanco, C, y Lagunes, A. 2007. Susceptibilidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) a la δ -endotoxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Agrociencia*. 41: pp. 653-662.
- Ahmad, S., Selvapandiyar, A, y Bhatnagar, R. 1997. Increased toxicity of modified mosquitocidal binary toxins of *Bacillus sphaericus* expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49(2): pp. 164-167.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: pp. 3389-3402.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.) 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Baró, Y., Fontana, D, y Dos Santos, R. 2009. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Fitosanidad*. 13(3).
- Baxter, S., Zhao, J., Shelton, A., Vogel, H, y Heckel, D. 2008. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(2): pp. 125-135.
- Beltrán, C y Garcés, E. 2005. Selección de aislamientos de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador de *Rhizoctonia solani* Kühn. en papa bajo condiciones de casa de malla. *Acta Biológica Colombiana*. 10(1).
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C, y Lescar, J. 2006. Structure of the Functional Form of the Mosquito Larvicidal Cry4Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom Resolution. *Journal of Bacteriology*. 188: pp. 3391-3401.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D, y Li, J. 2005. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *Journal of Molecular Biology*. 348(2): pp. 363-362.
- Boonserm, P., Pornwiroon, W., Katzenmeier, G., Panyim, S, y Angsuthanasombat, C. 2004. Protein Expression and Purification. 35(2): pp. 397-403.



- Bosa, F., Witzgall, P., Cotes, A., Fukumoto, T, y Barreto, N. 2005. Evaluación de la técnica de la interrupción de la copula de *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) Revista Colombiana de Entomología. 31(2).
- Bravo, A., Gillb, S, y Soberón, M. 2006. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49: pp. 423–435.
- Broderick, N., Robinson, C., McMahon, M., Holt, J., Handelsman, J, y Raffa, K. 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC Biology*. 7(11).
- Carlson, C., Caugant, D, y Kolsto, A. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(6): pp. 1719–1725.
- Chayaratanasin, P; Moonsom, S; Sakdee, S; Chair, U; Katzenmeier, G, y Angsuthanasomba, C. 2007. High Level of Soluble Expression in *Escherichia coli* and Characterisation of the Cloned *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba Domain III Fragment. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 40(1): pp. 58-64.
- Choi, Y., Gringorten, L., Be'anger, L., Morel, L., Bourque, D., Masson, L., Groleau, D, y Miguez, C. 2008. Production of an Insecticidal Crystal Protein from *Bacillus thuringiensis* by the Methylophile *Methylobacterium extorquens*. *Applied and Environmental Microbiology* 5178–5182.
- Contreras, A. 2006. Historia y origen de la papa cultivada-Influencia de la papa nativa del sur de Chile en el mejoramiento de la especie a nivel mundial. Lectura presentada en la XI reunión de la Asociación Chilena de la papa. Puerto Varas, Chile.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, y Dean, D. 2011. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, y Dean, D. 2010. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, y Dean, D. 2009. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Dean, D., Rajamohan, F., Lee, M., Wu, S., Chen, X., Alcantara, E, y Hussain, S. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site directed mutagenesis- a minireview. *Gene*, 179: pp. 111-117.



- Derbyshire, D., Ellar, D, y Li, J. 2001. Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor. *Acta Crystallog sect D*. 57: pp. 1938-1944.
- Donovan, W., Gonzalez, J., Gilbert, M, y Dankocsik, C. 2005. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. *Molecular and General Genetics*. 214(3): pp. 365-372.
- Dulmage, H. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Pp. 232-239.
- EPPO. 2005..Data sheets on quarantine pests: *Tecia solanivora*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 35: pp. 399–401.
- Espinal, C., Martínez, H., Pinzón, N, y Barrios, C. 2005. La cadena de la papa en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas Colombia.
- Espinal, C, y Martínez, H. 2003. La Cadena de papa en Cundinamarca frente a las negociaciones comerciales hemisféricas. Corporación Latinoamericana Misión Rural, Gobernación de Cundinamarca. Dirección de Planeación. Bogotá.
- Fang, S., Wang, L., Guo, W., Zhang, X., Peng, D., Luo, C., Yu, Z, y Sun, M. 2009. *Bacillus thuringiensis* Bel Protein Enhances the Toxicity of Cry1Ac Protein to *Helicoverpa armigera* Larvae by Degrading Insect Intestinal Mucin. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(16): pp. 5237–5243.
- FAO, 2009. Año internacional de la papa 2008, Nueva luz sobre un tesoro enterrado. Reseña de fin de año. Online: <http://www.potato2008.org/pdf/IYPbook-es.pdf> (Abril, 2011).
- Faostat. 2009. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Online. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. (Mayo, 2011).
- Feitelson, J., Payane, J, y Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology*. 10: pp. 271-275.
- Fernández, M., Luna, B., Tabashnik, H., Mendoza, L., Bravo, A., Soberón, M, y Miranda, J. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104(3): pp. 231-233.



- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J., Pangborn, W, y English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. 57*: Pp. 1101-1109.
- Gajendra. B., V. Udayasuriyan., M. Asia., N. C. Sivakumar., M. Bharathi y G. Balasubramanian. 2002. Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). *Crop Protection*. 21(9): pp. 817-822.
- Ge, A., Pfisterb, R, y Dean, D. 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: properties of the product. *Gene*. 93(1): pp. 49-54.
- Gill, S, y V, Pietrantonio. 1995. Mechanism of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Department of Entomology, University of California. Aug 19. pp.19.
- Gómez, S., Díaz, G, y Núñez, V. 2006. Evaluación de la toxicidad de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre el picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman. *Agronomía Colombiana*. 24(2): pp. 296-301.
- Gómez, S., Mateus, C., Hernandez, J, y Zimmerman, B. 2000. Recombinant Cry3Aa has insecticidal activity against the andean potato weevil, *Premnotrypes vorax*. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 279: pp. 653 – 656.
- Grijalba, E., Gómez, S., Núñez, V., Restrepo, S, y Cotes, A. 2010. Characterization of the active ingredient *E. coli*-Cry1Ac. Tesis de maestría U. andes.
- Haukes, J. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. *Potato Genetics*. Bradshaw, J. & Mackay, G., Editores. CAB International. pp. 3-42.
- Heckel, D., Gahanc, L., Baxtera, S., Zhaob, J., Sheltonb, A., Goulde, F, y Tabashnik, B. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 95(3): pp. 192-197.
- Hernández, E, y Pineda, R. 1996. Genética y mejoramiento de la papa. *Papas colombianas con el mejor entorno ambiental*. Fedepapa. Gabriel Robayo, recopilador. Bogotá. pp. 57-69.
- Herrera, F. 2005. Todo papa. Online: <http://www.todopapa.com.ar/pdf/polillaguatemalteca.pdf>. (Mayo, 2011).
- Hofte, H, y Whiteley, H. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53(2): pp. 242-255.



- Ibargutxi, M., Muñoz, D., Ruíz, I, y Caballero, P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control*. 48(1): pp. 89-96.
- Invitrogen. 2006. Manual User Champion pET Directional TOPOR expression kits. Pp. 5, 6 y 15.
- Jain, D., Udayasuriyan, V., Arulselvi, I., Dev, S, y Sangeetha, P. 2005. Cloning, Characterization and Expression of a New cry2Ab Gene From *Bacillus thuringiensis* Strain 14-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(16): pp. 5178–5182.
- Karim, S. 1998. Cloning and expression of bt δ -endotoxin gene, containing larvicidal activity against *Pectinophora gossypiella* (saunder), in *E. coli*. Pakistan Research Repository.
- Kumar, S., Udayasuriyan, V., Sangeetha, P., & Bharathi, M. (2004). Analysis of Cry2A proteins encoded by genes cloned from indigenous isolates of *Bacillus thuringiensis* for toxicity against *Helicoverpa armigera*. *Current Science*. Pp. 556-570.
- Lambert, B, y Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience*. 42(2).
- Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(680): pp. 680-685.
- Li, J., Carroll, J y Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. 353: pp. 815-821.
- Liao, C., Heckel, D, y Akhurst, R. 2002. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *Journal of Invertebrate Pathology*. 80(1): pp. 55-63.
- Lima, G., Aguiar, E., Correa, R., Martins, S., Gomes, C., Nagata, T., De-Souza, M., Monnerat, R, y Ribeiro, M. 2008. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(12): pp 2941-2948.
- Lin, Y., Fang, G, y Cai, F. 2008. The insecticidal crystal protein Cry2Ab10 from *Bacillus thuringiensis*: cloning, expression, and structure simulation. *Biotechnol Lett*. 30: pp. 513–519.
- Luján, C. 1996. Historia de la papa: origen culturas andinas. Esclarecimiento de tres hechos. Papas colombianas con el mejor entorno ambiental. Gabriel Robayo, recopilador. Bogotá. pp. 17-26c.
- Luján, C. 1990. Origen y evolución de la papa cultivada. Sexto curso de actualización de conocimientos en cultivo de la papa. Fedepapa. Quilian Riaño, recopilador y editor. Bogotá.



- Jurat, J., Gould, F, y Adang, M. 2003. Dual Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa Toxins in *Heliothis virescens* Suggests Multiple Mechanisms of Resistance. *Applied and environmental microbiology*. 69(10): pp. 5898–5906.
- Maagd, R., Bosch, D, y and Stiekema, S. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Elsevier Science January*. 4(1): pp.9-13.
- Maagd, R., Bravo, A, y Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17(4): pp. 193-199.
- Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall Iberia. Madrid.
- Maqbool, SB., Riazuddin, S., Thi, N, y Gatehouse, A. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breed*. 7: pp. 85-93.
- Marín, J, y Lozano, L. 2001. Centro de Información Vigilancia y Asesoramiento Toxicológico. Online: <http://www.civatox.com/Plaguicidas/fosforadofinal.pdf>. (Mayo, 2011).
- Martins, E., Aguiar, R., Martins, N., Melatti, V., Falca, R., Gomes, M., Ribeiro, B, y Monnerat, R. 2008. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Journal of Applied Microbiology*. 104(5): pp. 1364-5072.
- Misra, H., Khairnar, N., Mathur, M., Vijayalakshmi, N., Hire R., Dongre, T, y Mahajan, S. 2002. Cloning and characterization of an insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*. *Journal of Genetics*. 81(1): pp. 5–11.
- Morse, R., Yamamoto, T, y Stroud, R. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure*. 9(5): pp. 409-17.
- Orduz, S., Restrepo, N, y Vallejo, F. 1997. Importancia del *Bacillus thuringiensis* en el control de insectos. *Innovacion y ciencia*. 4 : pp. 45-52.
- Osorio, P., Espitia, E, y Luque, E. 2001. Reconocimiento de enemigos naturales de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en localidades productoras de papa en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 27(3-4): pp. 177 -185.
- Pardo, L., Gómez, L., Rausell, C., Sanchez, J., Soberón, M, y Bravo, A. 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry*. 45(34): pp. 10329-10336.



- Pigott, C, y Ellar, D. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71(2): pp. 255-281.
- Pitre, L., Hernández, J, y Bernal, J. 2008. Toxicidad de δ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 10(2): pp. 85-96.
- Prokop, S, y Albert, J. 2008. Año Internacional de la papa 2008. Online: <http://www.potato2008.org/es/lapapa/hojas.html>.(Mayo, 2011).
- Promdonkoy, B., Promdonkoy, P, y Panyim, S. 2005. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *FEMS Microbiology Letters*. 2252: pp. 121-126.
- Ramírez, M., Marín, M., Jaramillo, S, y Cotes, J. 2009. Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI – Fenamidone: caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Facultad nacional de agronomía, Medellín*. 62(1): pp. 4773-4782.
- Rincón, F, y López, A. 2004. Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora* (Povolný) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Corpoica*. 5(1): pp 41-42.
- Romeis, J., Meissle, M, y Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*. 24: pp. 63–71.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, DR, y Dean, DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 775-806.
- Sandoval, D, y Vilatuña, J. 2011. Servicio de información agropecuaria del ministerio de agricultura y ganadería del ecuador. Online: http://www.infoagro.net/shared/docs/a3/sesa_polilla_guatemalteca_dela_papa.html (Mayo 2011).
- Sambrook, J, y Russell, D. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Third edition. New York.
- Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J, y Lecadet, M. 1998. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* aizawai 7.29. *Molecular Microbiology*. 2(3): pp. 393-404.
- Sasaki, J., Asano, S., Hashimoto, N., Lay, B., Hastowo, S, y Iizuka, T. 1997. Characterization of a cry2A gene cloned from an isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar sotto. *Current Microbiology*. 35(1): pp. 1–8.



Sauka, D, y Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: pp.124-140.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D, y Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): pp. 775–806.

Sharma, P., Nain, V., Lakhanpaul, S, y Kumar, P. 2010. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Letters in Applied Microbiology*. 51(1): pp. 42-47.

Shim, H., Choi, J., Li, M., Wang, Y., Roh, J., Woo, S., Jin, B, y Je, B. 2009A novel recombinant baculovirus expressing insect neurotoxin and producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* Cry toxin. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 12: pp. 217–220.

Slamti, L, y Lereclus, D. 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J*. 21(17): pp. 4550-4559.

Soberon, M, y Bravo, A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 14 (3): pp. 303-313.

Solís, B, y Rodríguez, D. 2009. Evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Drosophila melanogaster* maengi. *Fitosanidad*. 13(2).

Spooner, D., McLean, K., Ramsay, D., Waugh, R, y Bryan, G. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(41): pp. 14694–14699.

Stevens, P. 2011. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Suzuki, MT., Lereclus, D, y Arantes, OM. 2004. Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. *Can J Microbiol*. 50(11): pp. 973-975.

Tan, S., Cayabyab, B., Alcantara, E., Ibrahim, Y., Huang, F., Blankenship, E, y Siegfried, B. 2011. Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. *Crop Protection*. 30 (9): pp. 1184-1189.

Tabashnik, B., Dennehy, T., Sims, M., Larkin, K., Head, G., Moar, W, y Carrière, Y. 2002. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(8): pp. 3790-3794.



- Thermo Fisher Scientific. 2008. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. pp. 10.1-10.6.
- USDA. 2010. National Nutrient Database for Standard Reference.(Online) .http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. (27 Mayo 2011).
- Vessoni, T., Ishii, M., Cambricoli de Souza, L, y Cholewa, O. 2003. Expression of green fluorescent protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5- α , under different growth conditions. African Journal of Biotechnology. 3(1): pp. 105-111.
- Xu, Z., Yao, B., Sun, M, y Yu, Z. 2004. Protection of mice infected with Plasmodium berghei by Bacillus thuringiensis crystal proteins. Parasitol. 92: pp.53-57.
- Xue, J., Liang, G., Crickmore, N., Li, H., He, K., Song, F., Feng, X., Huang, D, y Zhang, J.2008. Cloning and characterization of a novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. FEMS Microbiology Letters, 280: 95–101.
- Zar, J. (1999). Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall.
- Zheng, A., Zhu, J., Tan, F., Guan, P., Yu, X., Wang, S., Deng, Q., Li, S., Liu, H, y Li, P. 2010. Characterisation and expression of a novel haplotype cry2A-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. Annals of Microbiology.60(1): pp. 129-134.



ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN plasmídico.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó la técnica de mini-prep de lisis alcalina descrita por Sambrook y Russell (2001), cuyos pasos son los siguientes:

1. Incubar la bacteria en medio líquido LB suplementado con ampicilina durante toda la noche a 37°C, 150 r.p.m.
2. Tomar 3 ml del cultivo anterior y centrifugar por 5 minutos a 14000 r.p.m y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 100 µl de la solución 1 (50mM de glucosa, 10mM EDTA, 25mM y Tris-HCl pH 8.0) (debe encontrarse fría) e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Adicionar 200 µl de la solución 2 (0,2N NaOH, 1% SDS) (fría) y recién preparada. Mezclar bien por inmersión e incubar por 5 minutos en hielo.
5. Adicionar 150 µl de la solución 3 (a 60 ml de 3M acetato de sodio se le adiciona 11.5 ml ácido acético glacial 28.5 ml de agua fría) mezclar por inmersión e incubar por 5 minutos en hielo.
6. Centrifugar durante 10 minutos, 4°C, 14000 r.p.m. Cuidadosamente transferir el sobrenadante a otro tubo.
7. Adicionar etanol al 95% al sobrenadante e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar por 30 minutos y descartar el sobrenadante. Adicionar etanol al 70% y centrifugar por 30 minutos, 4 °C, 14000 r.p.m.
9. Por último se re suspende el pellet en 50 µl de TE-RNA (TE: 10 mM Tris HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0, RNasa 4 mg/ml), guardar a -20 °C hasta su uso.



Anexo 2. Protocolo de transformación de *Escherichia coli* cepa TOP10 y BL21, según el manual de Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Introgen, 2006).

Añadir 3 µl de la reacción de clonación TOPO® en un vial de células de *E. coli* One Shot® TOP10 químicamente competentes y mezclar suavemente. No mezcle por pipeteo.

Incubar en hielo de 5 a 30 minutos.

Realizar choque térmico a las células durante 30 segundos a 42 °C sin agitación.

Inmediatamente transferir el tubo a hielo.

Añadir 250 µl de medio LB, el cual debe encontrarse a temperatura ambiente.

Tapar el tubo herméticamente e incubar horizontalmente a 37 °C, por 1 hora a 200 rpm.

Sembrar 100 a 200 µl de cada reacción de transformación en una caja Petri, que contiene medio LB sólido suplementado con ampicilina 100 mg/L, este debe encontrarse a temperatura ambiente.

Incubar durante toda la noche a 37 °C.

Observar colonias transformantes creciendo sobre el medio de selección. Guardar a 4 °C hasta su uso.

Anexo 3. Buffer de lisis (Introgen, 2006)

50 mM fosfato de potasio, pH 7.8

400 mM NaCl

100 mM KCl

10% glicerol

0.5% Triton X-100

10 mM imidazol

Preparar una stock de 1 M de las soluciones KH₂PO₄ y K₂HPO₄.



Por cada 100 ml, disolver los siguientes reactivos en 90 ml de agua desionizada:

0.3 ml KH₂PO₄

4.7ml K₂HPO₄

2.3 g NaCl

0.75 gKCl

10 ml glicerol

0.5 ml Triton X-100

68 mg imidazol

Mezclar bien y ajustar el pH a 7.8 con HCl. Aforar a 100 ml.

Almacenar a 4°C.

Anexo 4. Protocolo para la electroforesis de proteínas empleando el tampón de Laemmli.

1. REACTIVOS EMPLEADOS PARA LA PREPARACIÓN DEL LA ELECTROFERESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y DODECILSULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) (Laemmli,1970)

Inventario de soluciones

Bis/acrilamida (30%T, 2,67% C)

Acrilamida 146 g

N,N-Metilén-Bis acrilamida 4 g

Se lleva a 500 ml con agua destilada. Se filtra y almacena a 4°C en oscuridad.

1.5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris-Base 54.45 g

Agua destilada 150 ml

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 10N. Llevar a 300 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

0,5M de Tris-HCl pH 6,8

Tris-Base 6 g

Agua destilada 60 ml

Ajustar el pH con CHI 10 N. Llevar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

10%(p/v) SDS (Dodecilsulfato de sodio)

SDS 10 g

Agua destilada60 ml

Llevar 100 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Persulfato de Amonio al 10% (p/v)

Persulfato de amonio	100 mg
Agua destilada	100 mg

Tampón de reducción

Agua destilada	0,08 ml	
0.5 M Tris-HCl pH 6,8		0,16 ml
Glicerol	0,4 ml	
SDS 10%	0,16 ml	
2-mercaptoetanol	80 µl	
1% (p/v azul de bromofenol)		0,2 ml

Tampón de corrido 5X pH 8,3

Tris-base	45 g
Glicina	72 g
SDS	15 g

Llevar a 3 litros con agua destilada. Diluir 300 ml del tampón 5X en 1,2 litros de agua destilada para una corrida. Almacenar a temperatura ambiente.

2 PREPARACIÓN Y TINCION DE LOS GELES (SDS-PAGE)

Preparación del gel de separación al 8 %

Agua des ionizada	2,692 ml	
1,5M Tris-HCl pH 8,8		1,25 ml
10% (p/v) SDS-stock		50 µl
Acilamida/bis (stock 30%)		1.005 ml
Persulfato de amonio ¹ (PSA) al 10%		25 µl
TEMED (N, N, N-Tetrametilendiamina)		5 µl

¹ Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada para la cantidad del día. Mezclar todos los reactivos, excepto el TEMED y el PSA, para iniciar la polimerización. Luego de 10 minutos, adicionar el PSA, y el TEMED, mezclar suavemente y servir.

Preparación de gel de concentración (stacking) 4,0 %.

Agua des ionizada	3,05 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% (p/v) SDS	50 µl
Acilamida/bis (stock 30%)	660 µl
Persulfato de amonio ¹ (PSA) al 10%	25 µl



TEMED (N, N, N-Tetrametilendiamina) 5 μ l

¹ Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua des ionizada para la cantidad del día. Mezclar todos los reactivos, excepto el TEMED y el PSA, para iniciar la polimerización. Luego de 10 minutos, adicionar el PSA el TEMED, mezclar suave mente y servir.

Preparación de Reactivo para la Tinción de proteínas totales (Tinción con Azul brillante de coomassie R-250)

Azul brillante de Coomassie R-250	1 g
Metanol	40 ml
Acido acético	10 ml
Agua des ionizada	50 ml

Disolver completamente el colorante en metanol antes de adicionar el acido acético y llevar al volumen final deseado. Teñir durante 2 horas. Decolorar los geles con solución decolorante (40: 10: 50: metanol: acido acético: agua) durante 1 a 3 horas.



Anexo 5. Secuencia aminoacídica de la proteína putativa Cry2Aa

MNNVLNSGRITTCDAYNVVAHDPFSFEHKSLDTIQKEWMEWKRTDHSLYVAPVVGTVSSF
LLKKVGSLLIGKRILSELWGIIFPSGSTNLMQDILRETEQFLNQRLNTDTLARVNAELIGLQAN
IREFNQQVDNFLNPTQNPVPLSITSSVNTMQQFLNRLPQFQIQGYQLLLLPLFAQAANMHL
SFIRDVILNADEWGISAATLRTYRDYLRNYTRDYSNYCINTYQTAFRGLNTRLHDMLEFRT
YMFLNVFEYVSIWLSLFKYQSLMVSSGANLYASGSGPQQTQSFTAQNWPFYLSLFQVNSNYI
LSGISGTRLSITFPNIGGLPGSTTTTHSLNSARVYSGGVSSGLIGATNLNHNFNCSSTVLPPLSTP
FVRSWLDSGTDREGVATSTNWQTESFQTTLRLRCGAFSARGNSNYFPDYFIRNISGVPLVIR
NEDLTRPLHYNQIRNIESPSGTPGGARAYLVSVHNRKNNIYAANENGTMIHLAPEDYTGTI
SPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQSNTTARYTLRGNGNSYNLYLRVSSIGNSTIRV
TINGRVYTVSNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNIVASDNTNVTLNINVTLSGTPFDLM
NIMFVPTNLPLLYKDEL

Anexo 6. Secuencia aminoacídica de la proteína putativa Cry2Ab

MNSVLNSGRITTCDAYNVAAHDPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF
LLKKVGSLLV GKRI SELRNLIIFPSGSTNLMQDILRETEKFLNQRLNTDTLARVNAELTGLQA
NVEEFNRQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQFLNRLPQFQMGGYQLLLLPLFAQAANL
HLSFIRDVILNADEWGISAATLRTYRDYLRNYTRDYSNYCINTYQSAFKGLNTRLHDMLEF
RTYMFLNVFEYVSIWLSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYLSLFQVNSN
YVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTTHALLAARVNYSGGISSGDIGASPFNQNFNCSTFLPP
LLTPFVRSWLDSGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGNSNYFPDYFIRNISGVPL
LVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHENGSMIHLAPND
YTGTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNNTTARYTLRGNGNSYNLYLRVSSI
GNSTIRVTINGRVYATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVVASSNSDVPLDINVTLS
GTQFDLMNIMLVPTNISPLY

Anexo 7. Secuencia aminoacídica de la proteína Cry2Aa, encontrada en PDB

>1I5P:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MNNVLNSGRITTCDAYNVVAHDPFSFEHKSLDTIQKEWMEWKRTDHSLYVAPVVGTVSSF
LLKKVGSLLIGKRILSELWGIIFPSGSTNLMQDILRETEQFLNQRLNTDTLARVNAELIGLQAN
IREFNQQVDNFLNPTQNPVPLSITSSVNTMQQFLNRLPQFQIQGYQLLLLPLFAQAANMHL
SFIRDVILNADEWGISAATLRTYRDYLRNYTRDYSNYCINTYQTAFRGLNTRLHDMLEFRTY
MFLNVFEYVSIWLSLFKYQSLMVSSGANLYASGSGPQQTQSFTAQNWPFYLSLFQVNSNYI
LSGISGTRLSITFPNIGGLPGSTTTTHSLNSARVNYSGGVSSGLIGATNLNHNFNCSSTVLPPLSTP
FVRSWLDSGTDREGVATSTNWQTESFQTTLRLRCGAFSARGNSNYFPDYFIRNISGVPLVIR
NEDLTRPLHYNQIRNIESPSGTPGGARAYLVSVHNRKNNIYAANENGTMIHLAPEDYTGTI
SPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQSNTTARYTLRGNGNSYNLYLRVSSIGNSTIRV
T



Anexo 8. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas putativas Cry2Aa y Cry2Ab. Se resaltan los dominios Pfam: verde (I), rojo (II) y azul(III).

>Icl|60983 Cry2Ab

Length=633

Score = 1130 bits (2924), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.

Identities = 555/633 (88%), Positives = 598/633 (94%), Gaps = 1/633 (0%)

```

Query 1 MNNVLNSGRITTCDAYNVVAHDFPFSFEHKSLDTIQKEWMEWKRTDHSLYVAPVVGTVSSSF 60
MN+VLNSGRITTCDAYNV AHDFPFSF+HKSLDT+QKEW EWK+ +HSLY+ P+VGTV+SF
Sbjct 1 MNSVLNSGRITTCDAYNVAHDFPFSFQHKSLDTVQKEWTEWKKNNHSLYLDPIVGTVASF 60

Query 61 LLKKVGSLLIGKRILSELWGIIFPSGSTNLMQDILRETEQFLNQLRNTDTLARVNAELIGL 120
LLKKVGSLL+GKRILSEL +IFPSGSTNLMQDILRETE+FLNQLRNTDTLARVNAEL GL
Sbjct 61 LLKKVGSLLVGRILSELRLNLIIFPSGSTNLMQDILRETEKFLNQLRNTDTLARVNAELTGL 120

Query 121 QANIREFNQQVDNFLNPTQNVPVLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQIQGYQLLLLPLFAQA 180
QAN+ EFN+QVDNFLNP +N VPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQ+QGYQLLLLPLFAQA
Sbjct 121 QANVEEFNRQVDNFLNPNRNVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFMQGYQLLLLPLFAQA 180

Query 181 ANMHLSFIRDVILNADEWGISAATLRITYRDYLRNYTRDYSNYCINTYQTAFRGLNTRLHD 240
AN+HLSFIRDVILNADEWGISAATLRITYRDYL+NYTRDYSNYCINTYQ+AF+GLNTRLHD
Sbjct 181 ANLHLSFIRDVILNADEWGISAATLRITYRDYLKNYTRDYSNYCINTYQSAFKGLNTRLHD 240

Query 241 MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLMVSSGANLYASGSGPQQTQSFTAQNWPFYLSLF 300
MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSL+VSSGANLYASGSGPQQTQSFT+Q+WPFLYLSLF
Sbjct 241 MLEFRTYMFLNVFEYVSIWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYLSLF 300

Query 301 QVNSNYILSGISGTRLSITFPNIGLPGSTTTHSLNSARV-YSGGVSSGLIGATNLNHNF 359
QVNSNY+L+G SG RLS TFPNI GLPGSTTTH+L +ARV YSGG+SSG IGA+ N NF
Sbjct 301 QVNSNYVLNGFSGARLSNTFPNIVGLPGSTTTHALLAARVNYSGGISGDIASPFNQNF 360

Query 360 NCSTVLPPLSTPFVRSWLDSGTDREGVATSTNWQTESFQTTLRLCGAFSARGNSNYFPD 419
NCST LPPL TPFVRSWLDSG+DREGVAT TNWQTESF+TTL LR GAF+ARGNSNYFPD
Sbjct 361 NCSTFLPPLLPFVRSWLDSGSDREGVATVTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGNSNYFPD 420

Query 420 YFIRNISGVPLVIRNEDLRLPLHYNQIRNIESPSGTPGGARAYLVSVHNRKNNIYAANEN 479
YFIRNISGVPLV+RNEDL RPLHYN+IRNI SPSGTPGGARAY+VSVHNRKNNI+A +EN
Sbjct 421 YFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNEIRNIASPSGTPGGARAYMVSVHNRKNNIHAVHEN 480

Query 480 GTMIHLAPEDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQSNTTARYTLRGNG 539
G+MIHLAP DYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQ+NTTARYTLRGNG
Sbjct 481 GSMIHLAPNDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQGDSLRFEQNTTARYTLRGNG 540

Query 540 NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTVSNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNIVASDN 599
NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYT +NVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGN+VAS N
Sbjct 541 NSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTATNVNTTTNNDGVNDNGARFSDINIGNVASSN 600

Query 600 TNVTLDINVTLNSGTPFDLMNIMFVPTNLPPLY 632
++V LDINVTLNSGT FDLMNIM VPTN+ PLY
Sbjct 601 SDVPLDINVTLNSGTQFDLMNIMLVPTNISPLY 633

```

Anexo 9. Análisis estadístico de los tratamientos

Tratamiento	% de mortalidad	Promedio de larvas muertas	Desviación estandar
E. coli pET151-Cry2Aa 300 µg/ml	75.55	10.66	0.94
E. coli pET151-Cry2Ab 300 µg/ml	44	6.66	1.7
B. thuringiensis var. kurstaki 330 µg/ml	77.77	11.66	2.05
Control absoluto	17.77	3	0.81
Carbonato de sodio pH 11	13	2	1
E. coli BL21 330 µg/ml	17.17	3	0.81