EVALUACION DE LA UNION DE DELTA ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* A VESICULAS DE LAS MICROVELLOSIDADES DEL INTESTINO DEL GUSANO BLANCO DE LA PAPA

JOHN WILSON MARTINEZ OSORIO

19665

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
BOGOTA D.C.
2000

EVALUACION DE LA UNION DE DELTA ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* A VESICULAS DE LAS MICROVELLOSIDADES DEL INTESTINO DEL GUSANO BLANCO DE LA PAPA

JOHN WILSON MARTINEZ OSORIO

Trabajo de tesis para optar por el título de

Maestro en Ciencias Agrícolas con énfasis en Entomología

Director

JAIRO CERON S.

Q.F. PhD Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

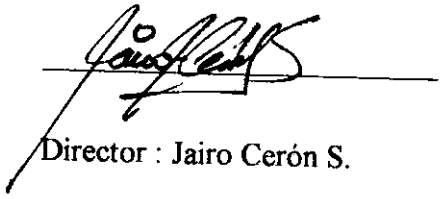
FACULTAD DE AGRONOMIA

BOGOTA D.C.

2000

Este trabajo hace parte de las investigaciones realizadas en la facultad de agronomía Bogotá, de la Universidad Nacional de Colombia, sin embargo, las ideas emitidas por los autores son de su exclusiva responsabilidad y no expresan necesariamente las opiniones de la universidad

Artículo 14 de la resoluciónNo 0047 de 1981



Director : Jairo Cerón S.

Presidente del jurado: Dario Corredor

Dedico este trabajo a mi GRAN familia :
Mi esposa, Gigiola,
por el amor que me ha ofrecido desde siempre
y a mi hijo, David,
un regalo de Dios para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

JAIRO CERON S., Director del laboratorio de Biopesticidas, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo y amistad incondicional.

MARIA VICTORIA GROSSO, Coordinadora del laboratorio de biopesticidas, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, por su amistad y colaboración.

EL GRUPO DE BIOPESTICIDAS (antes y ahora), porque me permitieron ser amigo, profesor y estudiante.

TODO EL PERSONAL DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, por su colaboración.

LA FACULTAD DE AGRONOMIA, por permitirme nuevamente crecer intelectualmente en su interior.

MI FAMILIA, por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
SUMMARY	viii
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	3
2. MARCO TEORICO	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Caracterización	5
2.3 Mecanismo de acción	6
2.3.1 Procesamiento proteolítico y activación	7
2.3.2 Unión de la toxina al receptor	8
2.3.3 Formación de poro	10
2.3.4 Septicemia	12

3. MATERIALES Y METODOS 13

3.1 Ubicación geográfica 13
3.2 Material entomológico 13
3.3 Purificación de vesículas 13
3.4 Purificación de proteínas 16
3.5 Marcaje de toxinas 18
3.6 Ensayos de unión proteínas vesículas 18
3.7 Análisis de proteínas por blotting 19
3.8 Bioensayos 19

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 22

4.1 Purificación de vesículas 22
4.2 Purificación de proteínas 26
4.3 Marcaje de las toxinas 30
4.4 Unión vesículas proteínas 30
4.5 Análisis de proteínas por blotting 36
4.6 Bioensayos 38

CONCLUSIONES 44

BIBLIOGRAFIA 46

ANEXOS 54

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Características generales de las cepas de *B. thuringiensis* empleadas en las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* . 17

TABLA 2. Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax*.. empleando harina de papa. 39

TABLA 3. Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax*.. empleando cubos de papa. 41

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Larva de último instar y adulto de *Premnotrypes vorax* Hustache (Coleoptera : Curculionidae). 14

FIGURA 2. Caracterización por microscopía electrónica de transferencia del purificado de las BBMV de *P. vorax*. 23

FIGURA 3. Analisis por SDS-PAGE del purificado de las BBMV del epitelio intestinal de P. vorax. 25

FIGURA 4. SDS-PAGE de la Cinética del procesamiento de la proteína Cry3Aa con tripsina y quimiotripsina en una proporción enzima: proteína 2:1. 27

FIGURA 5. SDS-PAGE del procesamiento de proteínas de Bt con tripsina con exposición por 8 horas. 29

FIGURA 6. Ejemplo de los resultados de análisis por dot blot de las fracciones recolectadas durante el filtrado por columna Sephadex G25 de las proteínas marcadas con biotina. 31

FIGURA 7. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión entre la proteína Cry3Aa y el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. 33

BIBLIOTECA AGROPECUARIA EN COLOMBIA

FIGURA 8. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión de las proteínas Cry3Ca y Cry3Bb con el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. 34

FIGURA 9. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión de las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa con el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. 35

FIGURA 10. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el análisis de proteínas mediante la técnica de blotting. 37

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con las proteínas de Bt solubilizadas a pH ácido (4,1). 54

ANEXO 2. Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con proteína de Bt solubilizada a pH alcalino (10). 55

ANEXO 3. Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con proteína de Bt suspendida. 56

ANEXO 4. Número de larvas muertas y porcentaje de mortalidad obtenidos en los bioensayos en cubos de papa con proteína de Bt solubilizada en dos condiciones de pH. 57

ANEXO 5. Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en cubos de papa con proteína de Bt en suspensión y tripsinada. 58

ANEXO 6. Análisis de varianza y coeficientes de variación del bioensayo en harina de papa realizado con proteína de Bt suspendida y larvas de primer instar de *P. vorax*. 59

ANEXO 7. Análisis de varianza y coeficientes de variación de los bioensayos r ealizados en cubos de papa con proteína de Bt suspendida (arriba) y soluble a pH 10 (abajo) y larvas de primer instar de *P. vorax* 60

RESUMEN

El control biológico de insectos plaga de importancia agrícola se ha constituido en una herramienta de gran valor en los programas de manejo integrado de plagas (MIP); debido a esto, en la actualidad se hace necesario el desarrollo de metodologías de caracterización de proteínas de *B. thuringiensis*, microorganismo usado mundialmente como agente de control biológico, tanto a nivel de actividad tóxica como del mecanismo de acción sobre diferentes insectos blanco.

En el presente trabajo se desarrolló una estrategia para la caracterización de proteínas Cry3 y Cry7 de *B. thuringiensis* respecto de su mecanismo de acción *in vitro* en vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades epiteliales del intestino (BBMV) del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache y su actividad tóxica *in vivo* en larvas del mismo insecto.

Los resultados indicaron que la metodología de purificación de las vesículas y de las proteínas permitió obtener material con características adecuadas para la realización de ensayos de unión con proteínas Cry de *B. thuringiensis*. En los ensayos de unión se determinó que mientras las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca se unieron al purificado de las BBMV de *P. vorax*, las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa no lo hicieron; así mismo, se determinó la presencia de dos posibles proteínas receptoras para las proteínas que se unieron. Finalmente, los bioensayos *in vivo* con larvas de primer instar de *P. vorax* mostraron que la actividad tóxica de todas las proteínas es muy baja, descartándose su empleo en el control biológico del gusano blanco de la papa.

SUMMARY

Nowadays biological control of agricultural pests has become an useful element in integrated pest management (IPM) programs. So It is necesary to develop characterization methods of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins, due touse as a biological control agent worldwide. That characterization sould involve biopesticide activity and mechanism of action evaluation in different targets.

In the present work a Cry3 and Cry7 Bt proteins characterization strategy was developed. Mechanism of action in *in vitro* conditions using brush border membrane vesicles (BBMV's) of the Andean Potatoe Weevil (*Premnotrypes vorax* Hustache) larvae and toicity of Bt proteins *in vivo* bioassays were evaluated.

Purification methods let to obtain BBMV´s and Bt toxins with optimum characteristics to be used in binding assays.

Binding assays showed that Cry3Aa, Cry3Bb and Cry3Ca bound and Cry3Ba and Cry7Aa didn`t bind to *P. Vorax* BBMV`s; also two possible BBMV`s binding proteins to Cry3Aa, Cry3Bb and Cry3Ca were found by protein blott analysis.

In vivio bioassays showed no toxicity of Bt proteins to *P. Vorax* larvae, so they could not be used as an Andean Potatoe Weevil biological control agent.

INTRODUCCION

El control biológico de los organismos que afectan la producción agrícola mundial (hongos, insectos, malezas, entre otros) ha tenido en los últimos años gran auge a causa de la nueva orientación ecológica y sustentable de la agricultura. De esta forma, herramientas como los insecticidas de origen microbiano han sido involucrados como un elemento valioso dentro de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) en diferentes cultivos. Los bioplaguicidas por lo tanto, se han convertido en una alternativa ecológicamente compatible que complementa otras estrategias alternas de control de plagas como el control cultural, químico y genético.

Las bacterias constituyen uno de los grupos mas estudiados como agentes de control de plagas a nivel mundial, siendo *Bacillus thuringiensis* (Bt) la más representativa por sus características de alta especificidad hacia insectos plaga de diferentes ordenes taxonómicos en cultivos de importancia económica como algodón, arroz, maíz, papa, forestales etc. Los productos desarrollados a base de Bt representan entre el 80-90% del mercado internacional de bioplaguicidas (Van Frankenhuyzen, 1993) y se espera que alcancen los 272 millones de dólares en el año 2000 (Galán et al, 1995).

La mayoría de estudios con B.t se enfocan al control de plagas del orden lepidoptera en la agricultura mundial; sin embargo, en los últimos años se han desarrollado trabajos que buscan controlar insectos del orden Coleoptera, lo cual ha ampliado las perspectivas de investigación y explotación comercial de esta bacteria. A este respecto, dentro de los desarrollos tecnológico a nivel industrial se destacan productos desarrollados por compañías multinacionales basados en la variedad *tenebrionis* con actividad reconocida

en insectos del orden Coleoptera; estos productos aun no están disponibles en el mercado colombiano. Así mismo, se han presentado avances en ingenieria genética clonando en plantas genes de Bt que expresan proteínas con actividad contra insectos del orden Coleoptera (McPherson et al.,1988).

La implementación de Bt en programas MIP debe involucrar grandes esfuerzos en investigación básica que permitan identificar la actividad de diferentes cepas patrón o aislamientos nativos, sobre el insecto de interés. En Colombia existen actualmente diferentes grupos de investigación orientados hacia la búsqueda de aislamientos nativos que presenten actividad contra insectos plaga de importancia en la agricultura colombiana. La mayoría han recurrido a bioensayos *in vivo* como estrategia principal para lograr este fin, sin embargo, esta sigue siendo una técnica dispendiosa, larga y costosa y se hace necesario complementarla con otras técnicas para dilucidar cual es el mecanismo de acción real de una proteína de Bt en un insecto dado (Aranda, 1996b).

En la búsqueda de metodologías rápidas y complementarias a los bioensayos para la evaluación del potencial de uso de aislamientos de Bt, para el control de plagas agrícolas, el presente trabajo pretende la adaptación y análisis de una metodología de ensayo de unión *in vitro*, de proteínas Cry de Bt con vesiculas del intestino de *Premnotrypes vorax* Hustache y un método de bioensayo con larvas del mismo insecto. *P. vorax* es conocido como gusano blanco de la papa y es una plaga de gran importancia en Colombia, debido a su permanencia como plaga principal de la papa desde hace más de 50 años y a que puede causar pérdidas en la producción de papa hasta de un 90% (Velez, 1997). Los resultados obtenidos permitirán desarrollar un esquema de trabajo para la evaluación de la actividad de aislamientos nativos de Bt en insectos del orden coleoptera, dilucidar algunos aspectos del mecanismo de acción de la proteínas Cry de Bt en el intestino de *P. vorax* y determinar el potencial de algunas proteínas Cry de Bt, con actividad conocida hacia insectos del orden coleoptera, para ser incluidas como un nuevo elemento de control biológico dentro de los programas de manejo integrado del gusano blanco de la papa.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Implementar una metodología para la evaluación de la actividad tóxica de δ-endotoxinas Cry3 y Cry7 de *B. thuringiensis* sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache.

1.2 ESPECIFICOS

Adaptar una metodología para la purificación de vesículas de las microvellosidades del epitelio intestinal de *P. vorax*.

Purificar los fragmentos tóxicos de las proteínas Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca y Cry7Aa de *B. thuringiensis* para emplearlos en ensayos de unión toxina-receptor *in vitro*.

Evaluar mediante una metodología *in vitro* la unión de las toxinas Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca y Cry7Aa de *B. thuringiensis* con vesículas de las microvellosidades del epitelio intestinal de *P. vorax*.

Proponer una metodología de bioensayos *in vivo* para determinar la actividad tóxica de las proteínas mencionadas contra larvas de primer instar de *P. vorax*.

2. MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria que durante su esporulación produce una estructura cristalina compuesta por proteínas denominadas δ-endotoxinas que poseen características insecticidas. Hofte y Witheley (1989) propusieron un sistema de nomenclatura que clasifica las proteínas de Bt asociadas al cristal de acuerdo con su actividad contra insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera. En 1995 se propuso una modificación y en la actualidad, existe un nuevo sistema de clasificación de las proteínas de acuerdo con la homología entre las secuencias nucleotídicas básicas de los genes *Cry* (Crickmore *et al*, 1998).

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

Hasta principios de la década de los ochenta, el espectro de acción de Bt involucraba únicamente insectos correspondientes a los ordenes lepidoptera y diptera; sin embargo, Krieg *et al.* (1983) reportaron en Alemania una subespecie de Bt denominada *tenebrionis*, que presentaba actividad insecticida contra el Escarabajo Colorado de la Papa *Leptinotarsa decemlineata.* Este hallazgo influyo mucho en los descubrimientos posteriores de cepas con actividad contra plagas del orden Coleoptera.

Herrnstadt *et al.* (1986), reportaron el aislamiento de una cepa designada como M7 de Bt subsp *San diego* activa contra coleópteros. Posteriormente se continuaron presentando nuevos reportes de cepas con actividad tóxica contra coleópteros como las cepas EG 2158 (Donovan *et al.*, 1988), EG 2838 y EG 4921 (Rupar *et al.*, 1991), Bt *japonensis* Subsp *buibui* (Hori *et al.*, 1992), Bt Subsp *donegani* (Cidaria *et al.*, 1990).

Algunas subespecies de Bt como *thuringiensis*, *morrisoni*, *tolworthi*, *darmstadiensis* y *kumamotoensis* son activas contra insectos coleópteros debido al efecto de la β exotoxina que producen (Keller y Langenbruch, 1993), sin embargo, estos resultados pueden no ser importantes a nivel comercial por el efecto que puede causar esta toxina altamente estable, sobre otros organismos incluyendo el hombre.

El grupo de proteínas de *B. thuringiensis* activas contra coleópteros posee un rango de especies de insectos susceptibles bastante amplio, encontrándose especies pertenecientes a las familias Chrysomelidae, coccinellidae, scolytidae, tenebrionidae, scarabaeidae y Curculionidae, principalmente (Glare y O`callaghan, 2000).

2.2 CARACTERIZACION

Dentro de las subespecies de Bt tóxicas hacia coleópteros la mas estudiada ha sido la subespecie *tenebrionis* con la cual se han realizado trabajos de caracterización morfológica, estructural, serológica, bioquímica y genética (Keller y Langenbruch, 1993).

La primera caracterización de la estructura de una proteína del cristal insecticida de Bt se desarrolló en la subespecie *tenebrionis*, determinándose que la proteína Cry3A posee en su estructura tridimensional tres dominios estructurales con funciones específicas dentro del mecanismo de acción de dicha proteína (Li *et al.*, 1991).

Medrano y Quintero (1996), hacen un listado de las diferentes proteínas de Bt reportadas con actividad contra insectos coleópteros. Las proteínas Cry3, que poseen 4 holotipos diferentes Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb y Cry3Ca, producen protoxinas con pesos de 70 a 75 KDa y son procesadas a toxinas con pesos cercanos a 66 KDa. Las proteínas Cry7, con dos holotipos, Cry7Aa y Cry7Ab, con protoxinas de casi 130 KDa que son procesadas a toxinas de casi 66 KDa. Finalmente, mencionan las proteínas Cry8, con tres

holotipos Cry8Aa, Cry8Ba y Cry8Ca. Estas últimas tienen un peso de 130 a 134 KDa como protoxinas.

Las proteínas Cry3 y Cry7 se han empleado básicamente para el control de coleópteros comedores de follaje, pero aquellos insectos que tienen otro tipo de hábitos también pueden ser controlados.

Suzuki *et al.* (1994), evaluaron la eficacia de la toxina de Bt *Japonensis* Subsp. *buibui*, encontrando una reducción del 50% en el daño causado por larvas de *Anomala cuprea* en patata dulce; en condiciones de campo, ellos plantean un control eficiente de este insecto con aplicaciones de 100 mg de proteina/m2.

Tapp y Stotzky (1995) observaron que las toxinas de Bt subsp *tenebrionis*, adsorbidas por arcillas, incrementan su actividad, evidenciando que Bt presente en la fracción coloidal del suelo puede ejercer algún control sobre plagas que normalmente tienen hábitos subterráneos.

2.3 MECANISMO DE ACCION

Los modelos de mecanismo de acción de Bt han sido desarrollados utilizando diversas metodológicas, principalmente estudios *in vitro*, para determinar cada uno de los pasos que siguen las proteínas del cristal desde su ingestión hasta causar la muerte del insecto. Las metodológicas para conocer el mecanismo de acción de esta bacteria son de diferente índole. Se han desarrollado estrategias como el empleo de intestinos aislados de insectos, que permite un sistema modelo para investigar la bioquímica del proceso de intoxicación en mas detalle, separándolo de las complejidades presentes en el insecto intacto. (Bravo *et al.*, 1992a,b).

De otra parte, se han generado líneas celulares de insectos, principalmente lepidópteros, lo cual permite identificar los efectos moleculares primarios que conducen a la toxicidad

de las proteínas de Bt como unión a las proteínas receptoras y respuestas citotóxicas; así mismo, se han empleado vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino del insecto, que corresponden a las membranas plasmáticas de las microvellosidades del lumen conocidas como BBMV, para estudios electro y quimicofísicos como transporte de iones y unión de las toxinas a las proteínas receptoras (Schwab y Culver, 1990).

A pesar que existen algunos inconvenientes en el uso de modelos *in vitro*, relacionados con modificaciones de las condiciones reales en las que actúan las δ endotoxinas de Bt, dichas metodológicas son herramientas importantes para un acercamiento al mecanismo de acción de tales proteínas, y específicamente el uso de las BBMV, se ha constituido en una de las técnicas más empleadas para estudios de unión toxina-receptor (Schnepf *et al*, 1998).

El mecanismo de acción de las proteínas presentes en los cristales de *B. thuringiensis* involucra varios pasos: solubilización del cristal, activación de la protoxina, unión de la toxina al receptor, inserción en la membrana del intestino y formación de poros (Bauer,1995). Estos pasos son descritos a continuación.

2. 3.1 Procesamiento proteolítico y activación

Las δ de *B. thuringiensis* son en realidad protoxinas que requieren ser activadas para ejercer su actividad insecticida. Dicha activación esta dada por enzimas proteolíticas (proteasas) en un medio con pH generalmente básico. En el caso de ciertas proteínas como la Cry3A estas no sufren un clivaje considerable porque parecen estar truncadas en forma natural semejantes a formas cortas (entre 50-70 KDa) de las proteínas Cry más grandes (130-140 KDa), sin embargo, sí sufren un clivaje mínimo en el extremo amino-terminal de la proteína (Gill y Pietrantonio, 1995).

El pH del intestino medio es un factor importante en la activación de las protoxinas de Bt. Generalmente se considera que es necesario un pH mayor de 9 para que se presente la activación; sin embargo, en el caso de los cristales de la variedad *San Diego*, se ha encontrado que es posible solubilizarlos a un pH por debajo de 4, aunque la rata de solubilización es substancialmente menor que la obtenida con pH mayor de 10 (Koller *et al.*,1992).

La importancia del pH como factor intermediario que afecta la toxicidad de las proteínas, se observo en forma clara con la proteína Cry7Aa, la cual presenta una actividad tóxica silenciosa hacia coleópteros.

Lambert *et al.*(1992), determinaron que la proteína Cry7Aa no presenta toxicidad hacia el Escarabajo Colorado de la Papa *Leptinotarsa decemlineata*, atribuyéndole esto al pH ácido que posee este insecto en su intestino. Ellos realizaron un proceso de solubilizaron previa de la proteína en pH básico y le proporcionaron la proteína soluble en el alimento del insecto mencionado. Los resultados indicaron que de esta forma la proteína si ejercía un efecto tóxico sobre este escarabajo; este fenómeno también se ha encontrado en proteínas no solubilizadas en el intestino de ciertos lepidópteros.

Bravo *et al.* (1999), realizando ensayos de formación de poro con membranas intestinales aisladas de diferentes ordenes de insectos y diferentes proteínas Cry, proponen que el pH tiene un papel crítico en la actividad de formación de poro de dichas proteínas, ya que si las condiciones de pH son diferentes, tanto las proteínas como los componentes fosfolipídicos de la membrana del intestino de los insectos también lo serán, seleccionándose tipos especiales de canales iónicos para cada insecto blanco.

2. 3.2 Unión de la toxina al receptor

La unión de la toxina a receptores presentes en la membrana epitelial del intestino de los

insectos, constituye uno de los pasos escenciales en el mecanismo de acción de Bt. Dicha unión se desarrolla específicamente entre las toxinas y las microvellosidades apicales de las células columnares y caliciformes presentes en la membrana intestinal de la mayoría de insectos; aunque en el ultimo, caso no es muy clara la unión, se sabe que al menos la toxina parece no penetrar en la cavidad central de la célula caliciforme. Así mismo, parece haber una distribución no homogénea de sitios de unión a través de todo el intestino de los insectos, ya que las toxinas se unen de forma heterogénea a lo largo del mismo en diferentes insectos de los ordenes lepidoptera, coleoptera y diptera (Bravo *et al*, 1992).

El nivel de unión de las proteínas con los receptores se determina por una constante de afinidad (Kd) que varia según las características del receptor y de la toxina (Van Rie, 1995). Estos valores de afinidad son importantes cuando se estudian niveles de resistencia a las proteínas del Bt; por ejemplo en el caso de *P. xylostella* , se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la actividad de las proteínas Cry y su habilidad de unión con los receptores presentes en las BBMV de las larvas; así como se ha demostrado el hecho que las células epiteliales del intestino pueden poseer múltiples receptores de proteínas Cry (Ferre *et al.*,1988; Van Rie *et al.*,1989,1990).

En el caso especifico de la proteína Cry3Aa, se ha encontrado una baja toxicidad hacia *Diabrotica undecimpunctata* Howardi Barber que corresponde a una afinidad reducida de la toxina hacia las microvellosidades de la membrana intestinal del insecto, así como a un cambio mínimo en la permeabilidad de la membrana epitelial, inducido por dicha toxina. Del mismo modo a pesar de existir una baja afinidad de la toxina por los receptores, la gran cantidad de receptores presentes compensa esto y se presenta entonces la muerte del insecto con altas concentraciones de la toxina (Slaney *et al.*,1991).

Por otro lado respecto de la caracterización de las proteínas receptoras o sitios de unión en la membrana intestinal de los insectos, Belfiore *et al.* (1994), encontraron que una proteína de 144 KDa presente en las microvellosidades del intestino medio de *T. molitor*,

se unía con la toxina Cry 3A, siendo este el primer receptor reportado para un insecto del orden coleoptera.

De los tres dominios identificados en la proteína Cry3A, el dominio involucrado en la unión de la toxina al receptor es el dominio II ubicado en la llamada región amino-terminal y que consta básicamente de tres ß-plegadas (dos de las cuales son estructuralmente homólogas) y cuatro cadenas ß-antiparalelas.

2.3.3 Formación de poro.

Los dominios restantes, presentes en la proteína Cry3A, ejercen dos funciones de gran importancia. El dominio III es clave en la integridad estructural de las proteínas aunque puede tener múltiples funciones como la formación del canal iónico o modulación. Este dominio presente en la región carboxilo-terminal de la proteína, contiene dos ß-plegadas formando un ß-sandwich. Esta región es variable en cuanto al contenido de aminoácidos, siendo la que presenta las mayores diferencias (Van Rie,1995).

El dominio I por su parte, contiene siete α-helices, seis de las cuales rodean a una central y por lo menos de la tres a la siete son suficientemente largas para atravesar una bicapa membranosa. La capacidad del dominio I para formar poros se apoya en varias investigaciones como la realizada con la proteína Cry3Bb la cual forma canales iónicos en membranas lipídicas (Van Rie, 1995).

La estructura de la proteína Cry3A desarrolla un mecanismo, para la formación del poro, en las largas hélices hidrofóbicas del dominio I, el cual puede penetrar en la membrana. Se ha propuesto que el dominio II puede ejercer una acción iniciadora de la penetración en la membrana, formando un gancho que crea un defecto en la misma, permitiendo que el resto del dominio I participe en la formación del poro en forma cooperativa (Knowles y Dow, 1993).

Se estima que los poros formados por las proteínas de Bt, en la membrana intestinal del insecto susceptible, tienen un diámetro de uno a dos nanómetros, interrumpiendo el balance osmótico activo, originando que las células se hinchen y se revienten por un proceso denominado lísis coloide-osmótica (Bauer, 1995).

La patología total del intestino medio por toxicidad a Bt, muestra una pérdida de involuciones basales en las células columnares, hinchazón en la microvellosidad apical, vesiculación del retículo endoplasmático, pérdida de ribosomas, hinchazón de las mitocondrias, hinchazón de la célula y el núcleo y subsecuente ruptura del mismo junto con los demás organelos y la membrana plasmática; finalmente hay liberación del contenido celular en el lumen con desprendimiento de las células presentes en las microvellosidades del intestino (Gill, 1995).

Se plantea que los síntomas de hinchazón y lísis celular presentes en el intestino de larvas de *Chrysomela scripta* F. afectadas por Bt var *San Diego*, son similares a los descritos con Bt var *thuringiensis* en varios lepidópteros; Sin embargo, también se evidencian algunas diferencias: hay una respuesta celular inicial luego de 2 horas de tratamiento lo cual se presentan en solo 15 minutos en lepidópteros, hay respuestas iniciales en la región basal de las células y no en la apical como en lepidópteros y finalmente, las microvellosidades no se afectan hasta que se presenta la lísis celular, opuesto a lo observado en lepidópteros. Estas diferencias observadas pueden deberse a múltiples factores como variaciones en el ambiente del intestino del hospedero, en la solubilidad de los cristales, en la bioquímica de la toxina y en las interacciones de la toxina con las bicapas lipídicas o los receptores presentes en la membrana intestinal del insecto (Bauer, 1992).

2.3.4 Septicemia

El efecto sinergístico de las esporas ha sido planteado como un factor importante en el incremento de la mortalidad causada por la ingestión de las toxinas de Bt. Insectos como *Anagasta kuehniella* y *Lymantria dispar* han sido identificados como insectos que requieren la presencia de esporas junto con los cristales proteicos para el desarrollo de la patogénesis (Milne *et al*, 1990).

La muerte por septicemia se presenta cuando una vez ocurrido el daño en la membrana celular del intestino medio, el hemocele del insecto es invadido por bacterias que encuentran un medio propicio para su crecimiento y proliferación. Esta muerte generalmente se presenta dos a tres días después de la ingestión de los cristales de Bt por el insecto, aunque la inapetencia se presenta pocos minutos después del consumo de la bacteria por el mismo (Bauer, 1995).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación geográfica

El presente trabajo fué desarrollado en los laboratorios de entomología y biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

3.2 Material entomológico

El material biológico para llevar acabo los diferentes ensayos se obtuvo mediante cría del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache (Figura 1), bajo condiciones de laboratorio (15 °C y 60% HR). La alimentación del insecto se hizo con dieta natural consistente en plantas y tubérculos de papa. Los insectos adultos se mantuvieron en recipientes plásticos y se alimentaron con hojas y tubérculos de papa. Se colocaron tallos secos de gramíneas dentro de los recipientes para proporcionar sitios de oviposición a las hembras (Valencia y Bohorquez, 1994). Los trozos de tallo con los huevos se ubicaron en recipientes plásticos con papel absorbente humedecido. Una vez obtenidas las larvas de primer instar, una parte se utilizó para el mantenimiento del pie de cría y otra parte para la realización de los bioensayos.

3.3 Purificación de vesículas

La preparación de las vesículas de las microvellosidades de células epiteliales del intestino de *P. vorax* (BBMV) se realizó combinando varias metodologías (Wolfersberger *et al.*, 1987; MaCInstosh *et al.*,1994; Escriche *et al.*,1995) con algunas modificaciones según

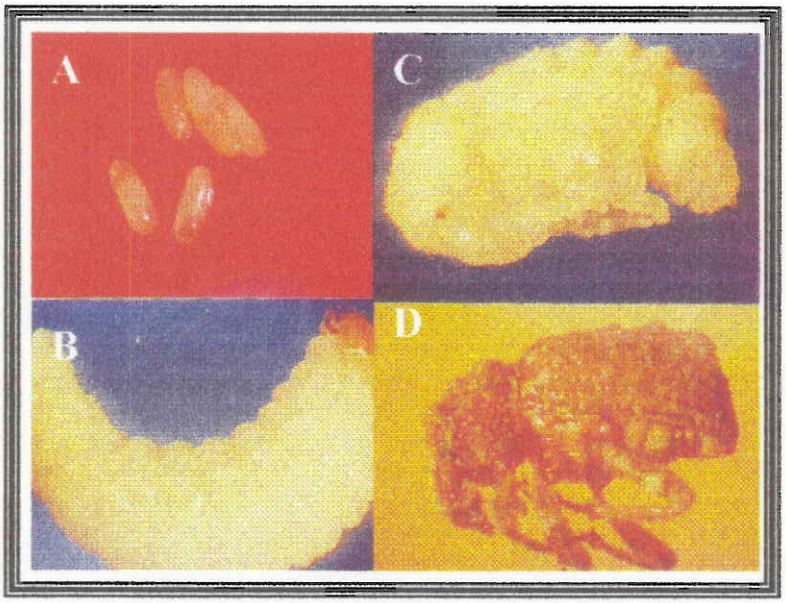


FIGURA 1. Estados de desarrollo de *Premnotrypes vorax* Hustache (Coleoptera: Curculionidae). A, huevos; B, larva último instar; C, pupa; D, adulto.

las características del material utilizado y los recursos disponibles. En general este es un método de centrifugación diferencial que hace uso de la mayor densidad de cargas electrostáticas negativas de la membrana luminal en comparación con la membrana basolateral del intestino de los insectos para separar estas fracciones (Van Rie *et al.*,1989).

Se pesaron 20 gramos de larvas de último instar de *P. vorax* (300 larvas) las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, lavadas con agua destilada estéril y maceradas en mortero adicionando solución buffer MET pH 7.5 (Manitol 300 mM, Tris 17 mm, EGTA 5mM, DTT 2mM, PMFS 0.5 mM, Hepes 10 mM, EDTA 1mM, SBT y neomicina sulfato 1 ug/ml). El material obtenido fué centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos y filtrado. La pastilla obtenida se resuspendió en buffer MET y se homogenizó empleando un macerador de tejidos Potter-Elvehjem (Wheaton) adaptado a un motor a 2000 rpm. El homogenizado se mezcló con MgCl2 24 mM y se dejo en hielo por 15 minutos. Se realizó centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 16000 rpm por 30 minutos. La pastilla obtenida se suspendió nuevamente en buffer MET y se repitió el proceso. La pastilla se suspendió en buffer MET y se alicuotó en tubos eppendorf marcados y almacenados a -70°C. Se realizó cuantificación de la proteína presente en el purificado de las BBMV obtenido empleando la metodología de Bradford para cuantificación de proteína total (Bollag y Edelstein,1991).

El purificado de las BBMV también fué caracterizado mediante microscopia electrónica de transmisión, empleando en la preparación de las muestras un proceso de tinción negativa (Kessler *et al.*,1978) para corroborar la presencia, características y abundancia de las vesículas de la membrana epitelial del intestino de *P. vorax* .

3.4 Purificación de proteínas

Las proteínas Cry evaluadas se obtuvieron de cepas patrón de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Las características de las cepas evaluadas se presentan en la tabla 1.

Las cepas fueron cultivadas en medio agar LB a 37°C hasta alcanzar un porcentaje de esporulación superior al 90%. La biomasa se recolectó y lavó con agua destilada-desionizada estéril y subsecuentes centrifugaciones para eliminar residuos del medio de cultivo. El material obtenido fué posteriormente liofilizado y almacenado hasta su uso.

Se realizó purificación de las proteínas mediante solubilización de los cristales en solución buffer de carbonato de sodio pH10 (Na2CO3 100 mM, PMFS 100 mM, DTT 2 mM, EDTA 1mM) por 2 horas a 37°C, centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos y filtrado del sobrenadante con membrana de 0.22 μ. Se hizo análisis microscópico para corroborar la no presencia de esporas en las muestras.

El fragmento tóxico de la proteína fué obtenido mediante procesamiento de la misma evaluando para tal fin las enzimas Tripsina (Tipo II de pancreas porcino) y α quimiotripsina (Tipo II de pancreas bovino), mediante la observación previa de la cinética del procesamiento para cada una de ellas. Se empleó una proporción enzima:protoxina que oscilo entre 2:1 y 10:1 con incubación por 12 horas a 37°C. Se corroboró el procesamiento de las proteínas mediante electroforésis en gel de poliacrilamida(SDS-PAGE). La toxina en forma soluble fué dializada posteriormente contra Buffer Borato pH 8.6 durante una noche. La proteína purificada se utilizó posteriormente para el proceso de marcaje.

TABLA 1. Características generales de las cepas de *B. thuringiensis* empleadas en las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* .

CEPA	GENES	PROTEINA	PESO MOLECULAR (Kda)*	
			PROTOXINA	TOXINA
3Aa	cry3Aa	Cry3Aa	70 – 75	66
3Ba	cry3Ba	Cry3Ba	70 – 75	66
3Bb	cry3Bb	Cry3Bb	70 – 75	66
3Ca	cry3Ca	Cry3Ca	70 - 75	66
7Aa	cry7Aa	Cry7Aa	130	66

* Pesos aproximados según Quiñones y Quintero (1996).

3.5 Marcaje de toxinas

Las toxinas de *B. thuringiensis* a evaluar fueron marcadas siguiendo el protocolo de Denolf *et al.* (1993), con algunas modificaciones. Se realizo marcaje de las toxinas con biotina empleando un kit para marcaje de proteínas (ECL Protein Biotinilation Module, Amersham). El marcaje se realizo en proporción de 20 µl de biotina por cada 0.6 mg/ml de toxina. Se agito la mezcla y se dejo en incubación a temperatura ambiente por 1 hora. Se realizó filtrado en columna Sephadex G25 eluyendo la muestra con solución buffer de fosfatos pH 7.4 y recolectando alícuotas de 500 µl. Se comprobó el marcaje de la toxina mediante una prueba de dot-blot, empleando conjugado de Streptavidina-peroxidasa y revelando con solución de diaminobencidina. Así mismo se corroboró la no degradación de la proteína durante el proceso de marcaje mediante electroforésis en gel de poliacrilamida del 9%.

3.6 Ensayos de unión proteinas-vesículas

La unión de la toxina con las BBMV del insecto se evaluó mediante la metodología de Denolf *et al* (1993), modificada. Se descongelo lentamente una alícuota de vesículas y se centrifugo a 13000 rpm por 40 minutos. La pastilla se resuspendió en buffer PBS con BSA al 0.1%. Las vesículas se mezclaron con una cantidad adecuada de toxina marcada y se incubo por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó centrifugación a 13000 RPM por 40 minutos y se lavó el pellet con el buffer ya descrito. Se centrifugo nuevamente y se resuspendió la pastilla en buffer de carga para realizar posteriormente una electroforésis. Una vez separadas las proteínas se procedió a su transferencia a membrana de nitrocelulosa e incubación de la misma toda la noche en solución buffer de bloqueo pH 7.5 (Acido maleico 100mM, NaCl 150 mM, Reactivo de bloqueo 1%). Los geles obtenidos en la electroforésis se colorearon con azul de coomasie para corroborar el proceso de transferencia. La membrana bloqueada se lavó y se incubo 1 hora con el conjugado de streptavidina-peroxidasa 1:1000 en PBS. El revelado se realizó empleando

diaminobencidina dejando desarrollar el color de las bandas por 5 a 10 minutos. De acuerdo con las bandas obtenidas se determino si hubo o no unión entre las proteínas marcadas y las vesículas del intestino de *P. vorax*.

Cada ensayo se realizó por triplicado para corroborar los resultados obtenidos. Se emplearon como muestras control la toxina marcada sola y las vesículas solas procesadas de la misma forma que las muestras problema. En todos los ensayos de unión de vesículas con proteínas biotiniladas se empleó una concentración de purificado de vesículas de 1 mg/ml.

3.7 Análisis de proteínas por blotting

Las proteínas de Bt, que presentaron unión a las vesículas de *P. vorax* en los ensayos iniciales, fueron empleadas posteriormente para un análisis por blotting (Aranda *et al*, 1996); esto con el fin de identificar las posibles proteínas receptoras del purificado de las BBMV a las cuales se unieron.

Las proteínas se separaron mediante electroforésis del purificado de las BBMV en gel de poliacrilamida al 10-12%. Se realizó transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa durante 30 min a 20 V. La membrana obtenida se incubo toda la noche en solución buffer TBS (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) y luego se bloquearon los sitios de unión no especifica incubándola en buffer TBS + tween 20 0.5% + BSA 3%. Posteriormente, se incubó la membrana por 3 horas con la proteína marcada y luego se realizo el revelado incubando inicialmente con el conjugado streptavidin peroxidasa y luego con diaminobencidina en buffer TBS para obtener la señal.

3.8 Bioensayos

Los bioensayos se realizaron empleando dos metodologías diferentes. La primera

consistió en el empleo de trozos de tubérculos de papa de 0.25 Cm^3, a los cuales se les realizó la aplicación de la suspensión de espora-cristal de Bt sobre la superficie. Los cubos de papa se dejaron secar al ambiente y posteriormente se colocaron en placas para cultivo de células de 24 pozos. Se infestó cada cubo con una larva de primer instar de *P. vorax* . Las placas se sellaron, taparon y se incubaron por 7 días hasta la lectura del ensayo.

Se propuso una segunda metodología de bioensayo utilizando harina de papa. Se mezcló un gramo de harina de papa con 2 ml de la suspensión de esporas y cristales de Bt y se colocó en vasos desechables. Posteriormente se colocaron 24 larvas de primer instar de *P. vorax*.. Las larvas permanecieron por 24 horas en la dieta, tiempo en el cual fueron trasladadas a trozos de papa sin tratar. La lectura del bioensayo se realizó a los 7 días.

Los bioensayos se realizaron empleando tanto proteína en forma de cristales como proteína en forma soluble. Adicionalmente en el bioensayo con cubos de papa se empleo la proteína procesada con tripsina, para observar si existía algún efecto del procesamiento sobre la toxicidad de la misma.

Las proteínas empleadas en forma soluble se solubilizaron en dos condiciones diferentes, ácida (pH 4.1) y alcalina (pH10.0). Para la solubilización a pH 4.1 se empleó una solución buffer universal (H3PO4, CH3COOH, H3BO3, Agua dd, KCl, NaOH). Para la solubilización a pH alcalino se empleó una solución buffer de Na2CO3 (Na2CO3, DTT, PMFS). La solubilización se llevó a cabo para ambos tipos de buffer a 37 °C, durante 3 horas en agitación constante. Una vez solubilizado el material, se realizo una centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido se alicuotó y se cuantificó la proteína total presente en el mismo empleando la metodología de Lowry (Bollag,1991) expresándola en términos de mg/ml.

En los bioensayos se empleó una dosis de 10 ug de proteína/cm^2, para la primera

metodología y 500 ug de proteína/ml para la segunda. Se utilizó un testigo absoluto con el agua empleada en los tratamientos y testigos relativos con los buffer empleados en la solubilización de las proteínas. El diseño experimental empleado fué completamente al azar con tres repeticiones empleando 24 larvas por repetición. La variable respuesta fue el número de larvas muertas por tratamiento. Se realizó analisis de varianza de los datos obtenidos y se calculó el coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de unión y análisis por blotting se compararon con los resultados de los bioensayos, para determinar si existía relación entre el proceso de unión de las toxinas de Bt a los receptores del intestino de *P. vorax* y la actividad tóxica de las proteínas en los bioensayos *in vivo*.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 PURIFICACION DE VESICULAS

El canal alimenticio de los insectos consta de tres partes principales: estomodeo, mesenterón y proctodeo. Las células más características del mesenterón o intestino medio son alargadas y con microvellosidades regulares formando un borde estriado adyacente al lumen. Dichas células llamadas "columnares" están involucradas en secreciones enzimáticas y absorción de los productos de digestión en el intestino de los insectos; así mismo, tienen un papel importante en el mecanismo de acción de *B. thuringiensis*, ya que es en estas células donde están localizadas las proteínas receptoras a las cuales se unen las toxinas de esta bacteria. El protocolo de purificación de vesículas (BBMV) empleado en el presente trabajo, buscaba básicamente la obtención de la membrana plasmática de las células columnares presentes en el intestino de *P. vorax* para realizar ensayos de unión con proteínas de Bt.

La caracterización del purificado de las BBMV de *P. vorax* por microscopia electrónica de transmisión (Figura 2) indicó la presencia de vesículas de membrana epitelial. Se observaron múltiples vesículas ovoides de diferentes tamaños con contornos pilosos. Estas observaciones indicaron que el purificado de las BBMV obtenido presentó similitud en sus características con los purificados de membranas epiteliales de intestino reportados por Wolfersberger *et al.* (1987) y Abdul-Rauf y Ellar(1999) en insectos y Kessler *et al.* (1978) en roedores.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

FIGURA 2. Caracterización por microscopía electrónica de transferencia del purificado de las BBMV de *P. Vorax*. Como ejemplo se muestra un grupo de 4 vesículas (recuadro en rojo).

En la caracterización del purificado de las BBMV de *P. vorax* por electroforésis de proteínas (figura 3), se observó la presencia de un gran número de proteínas con un amplio rango de pesos moleculares oscilando entre 116 y 24 KDa. Se presentaron cuatro bandas sobresalientes de aproximadamente 97, 75, 60 y 45 KDa. Las bandas de proteínas del purificado de las BBMV observadas en el análisis SDS-PAGE, presentaron un patrón similar a los reportados por Wolfersberger *et al.* (1986) para purificados de vesículas de *P. brassicae* y Abdul-Rauf y Ellar(1999) para purificados de *A. aegypti*.

Por otro lado, en la obtención de purificados de vesículas de insectos con larvas pequeñas como *P. operculella* y *P. xylostella*, con concentraciones de proteína cercanas a 1mg/ml, se requieren hasta 1000 individuos. De acuerdo con esto, el protocolo de purificación de BBMV fué ajustado a las condiciones existentes en aspectos como la cantidad de material requerido y la forma de procesar y almacenar el purificado.

Los productos obtenidos en varias purificaciones mostraron como es lógico un incremento en la concentración de proteína a mayor número de larvas empleadas, aumentando desde 0.3 mg/ml con 100 larvas a 1.5 mg/ml con 300 larvas. Los valores de concentración de proteína de los últimos purificados empleando 300 larvas (20 gr aproximadamente) oscilaron entre 1.83 ug/ml y 1.52 mg/ml; de acuerdo con esto, en nuestro caso, la concentración de proteína requerida para ensayos de unión con proteínas de Bt (1mg/ml) se obtiene con solo 250 - 300 larvas de último instar de *P. vorax*, tal vez por tratarse de una especie de insecto diferente a las mencionadas anteriormente.

Por otro lado, el procesamiento de la muestra (larvas) que se realiza normalmente en una trituradora especial, se realizó manualmente en mortero con un paso de filtrado luego de la centrifugación y la conservación del purificado no se hizo en nitrógeno líquido sino directamente en nevera a -70 grados. Como las observaciones en microscopio electrónico se realizaron tanto para purificados de las BBMV frescos como almacenados y no se observaron diferencias entre ellos, se confirma que las condiciones de almacenamiento empleadas permitieron mantener las características morfológicas de las vesículas

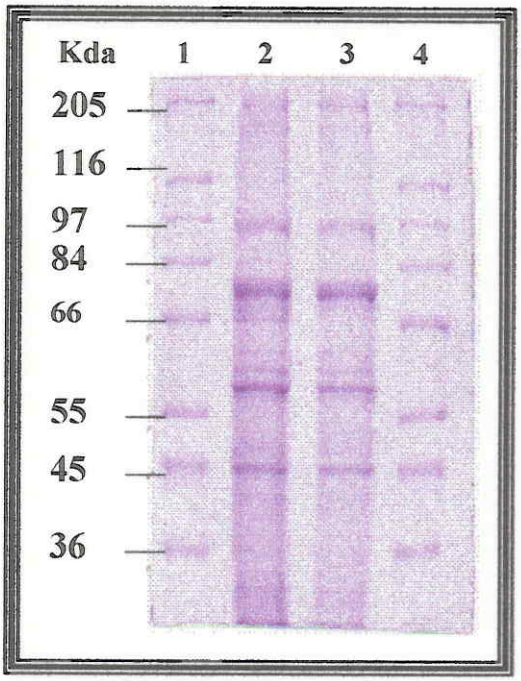


FIGURA 3. Analisis por SDS-PAGE del purificado de las BBMV del epitelio intestinal de *P. vorax*. Carriles 1 y 4, marcador de peso molecular; Carril 2, purificado fresco; Carril 3, purificado almacenado 6 meses a -70°C

purificadas, aun hasta 6 meses después de realizado dicho proceso.

De acuerdo con todas las observaciones anteriores, se puede afirmar que se logro la purificación de vesículas de la membrana epitelial del intestino de *P. vorax* con características óptimas para ser empleadas en ensayos de unión con toxinas de *B. thuringiensis*.

4.2 PURIFICACION DE PROTEINAS.

El procesamiento de la protoxina de Bt para generar el fragmento tóxico de la misma, se desarrolla en el intestino del insecto mediante las enzimas proteolíticas allí presentes. En ensayos *in vitro* el empleo de enzimas como tripsina y quimiotripsina garantizan la obtención de dicho fragmento para pruebas posteriores.

Los ensayos preliminares de procesamiento de las proteínas para la obtención del fragmento tóxico indicaron una susceptibilidad diferencial a las enzimas evaluadas. En general se observó una mayor susceptibilidad de las proteínas al procesamiento con tripsina que quimiotripsina. La figura 4 muestra el procesamiento de la proteína Cry3Aa con ambas enzimas. Se observa que empleando tripsina (carriles 3, 4, 5 y 6) el procesamiento de la proteína es casi completo desde los 30 minutos de exposición a la enzima, mientras tanto, empleando quimiotripsina (carriles 7, 8, 9 y 10) aún después de 8 horas de exposición la proteína no ha sido procesada. En el carril 2 se observa la proteína soluble sin procesar. El mismo patrón de procesamiento de la proteína Cry3Aa, se observó con las demás proteínas evaluadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió emplear la enzima tripsina en los sucesivos ensayos.

Una vez seleccionada la enzima a emplear, se realizaron ensayos para determinar el tiempo de exposición y la proporción más adecuada de enzima:proteina para el procesamiento de las proteínas.

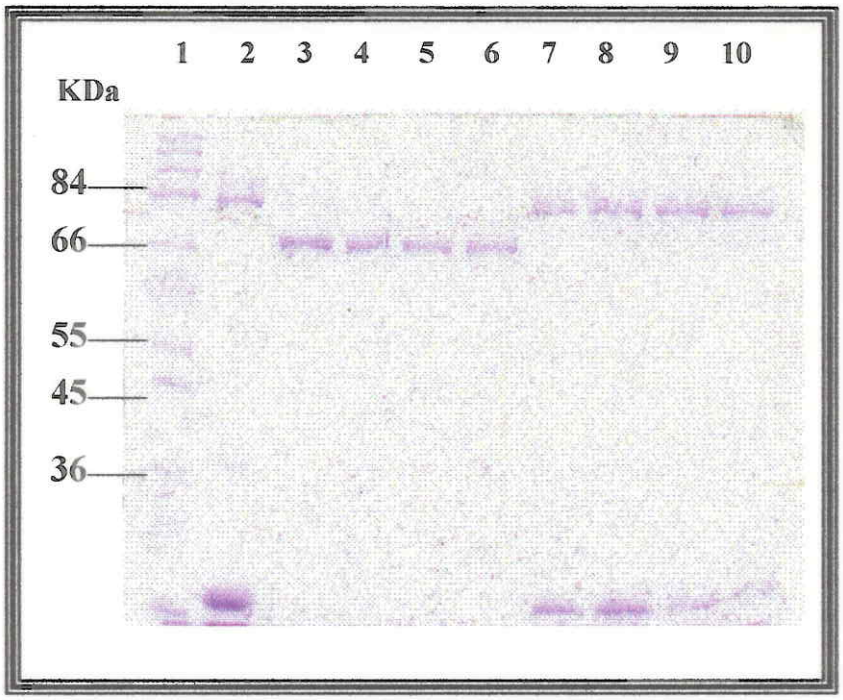


FIGURA 4. Analisis por SDS-PAGE de la cinética del procesamiento de la proteína Cry3Aa con tripsina (carriles 3,4,5,6) y quimiotripsina (carriles 7,8,9,10) en una proporción enzima: proteína 2:1. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, proteina Cry3Aa soluble.

En el caso de las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca se observo un procesamiento completo después de su exposición a tripsina en proporción 10:1. Las bandas iniciales de 73 y 67 KDa (Figura 5, carriles 2 y 6) que presentan las proteínas en solución, fueron digeridas por la enzima hasta obtenerse una única banda de aproximadamente 58 KDa (Figura 5, carriles 3 y 7). Para el caso particular de la proteína Cry3Aa, el procesamiento observado con la enzima tripsina fué similar al obtenido por Carrol *et al.* (1997), quienes obtuvieron un fragmento tóxico de 55 KDa y en este estudio se obtuvo uno de aproximadamente 58 KDa; sin embargo, los demás fragmentos de 11 y 8 KDa que ellos obtuvieron no fueron evidentes en el presente estudio. Esto se debió a que el marcador de peso molecular empleado en los análisis por electroforésis no involucraba proteínas de menos de 24 KDa.

Las proteínas Cry3Ba y Cry3Bb tuvieron un comportamiento similar siendo procesadas completamente cuando se expusieron a una proporción de tripsina:proteina de 8:1. En este caso, como en las proteínas anteriormente mencionadas, las bandas iniciales de 73 y 67 KDa, de las proteínas en solución fueron procesadas obteniéndose una banda estable de alrededor de 58 KDa (Figura 5, carriles 4 y 5) siendo un poco menores a los esperados según Medrano *et al.* (1996), es decir 66 KDa, para las tres proteínas mencionadas.

La proteína Cry7Aa por su lado, fue procesada completamente, con una proporción enzima: proteína de 5:1. Esta proteína que presenta en solución una única banda de aproximadamente130 KDa, fue procesada hasta obtenerse una banda de aproximadamente 75 KDa (Figura 5, carriles 8 y 9) que es similar a lo reportado por Lambert *et al*(1992), quienes obtuvieron un fragmento tóxico de 72KDa, empleando la misma enzima.

El procesamiento de todas las proteínas fué evaluado a las 4, 8 y 16 horas, de tal forma que se garantizara el completo procesamiento de las mismas. De acuerdo con esto se determinó que el tiempo optimo de dicho procesamiento es de 16 horas, para las proteínas Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb y Cry3Ca, mientras que para la proteína Cry7Aa es de solo 8 horas. De acuerdo con esto, se evidenció una mayor susceptibilidad de la

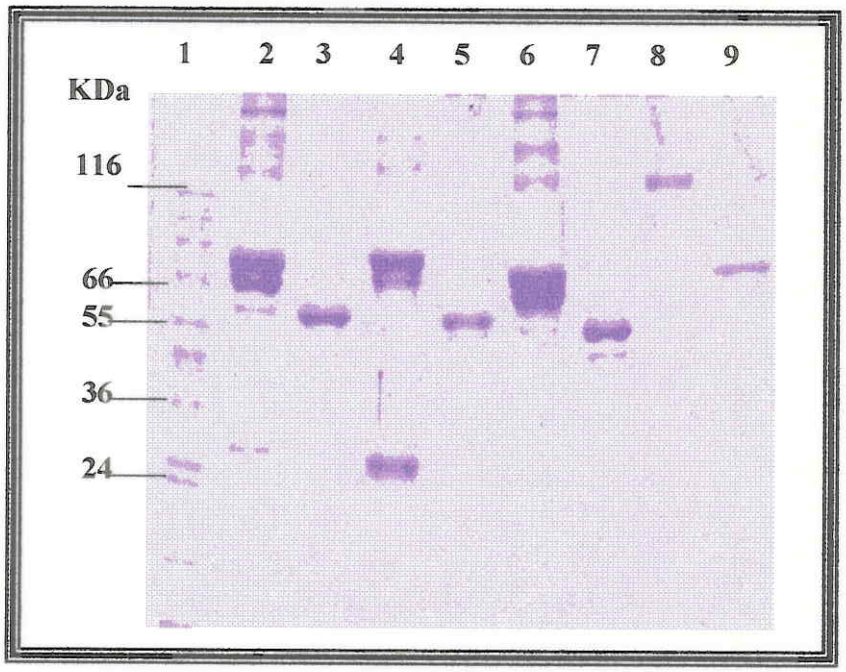


FIGURA 5. SDS-PAGE del procesamiento de proteínas de Bt con tripsina con exposición por 8 horas. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 y 3, Cry3Aa; carriles 4 y 5, Cry3Bb; carriles 6 y 7, Cry3Ca; carriles 8 y 9, Cry7Aa.

proteína Cry7Aa al procesamiento con la enzima tripsina que las demás proteínas evaluadas..

4.3 Marcaje de las toxinas

El análisis por dot-blot indicó que en general las fracciones 1 a 5 del eluido de la columna de filtrado fueron aquellas que presentaron la mayor cantidad de toxina marcada con biotina (Fig 6). Dichas fracciones fueron mezcladas y almacenadas para su posterior utilización en los ensayos de unión.

La cuantificación de proteína total de las fracciones mencionadas indicó concentraciones de proteína marcada de 100 ug/ml, que corresponden a los valores de proteína recomendada para trabajos de unión con BBMV de insectos (Denolf *et al*, 1993).

El análisis por electroforésis indicó que las proteínas no presentaron alteración o degradación alguna durante al proceso de marcaje, constituyéndose así el marcaje con biotina en una metodología adecuada para la posterior detección de las proteínas evaluadas.

4.4 Unión vesículas-proteínas

El mecanismo de acción de *B. thuringiensis* conlleva varios pasos entre los cuales la unión proteína receptor se considera como uno de los más cruciales para que se ejerza el efecto tóxico sobre un insecto blanco determinado.

La unión de proteínas de Bt se da de manera general con proteínas receptoras presentes en purificados de BBMV del intestino de diferentes insectos, como ha sido ampliamente reportado en la literatura internacional (Hofmann *et al.*,1988; Van Rie,1989-1990; Estada y Ferre,1994;, Bravo *et al.*,1992; Denolf *et al.*,1993 y Sakai *et al.*,2000).

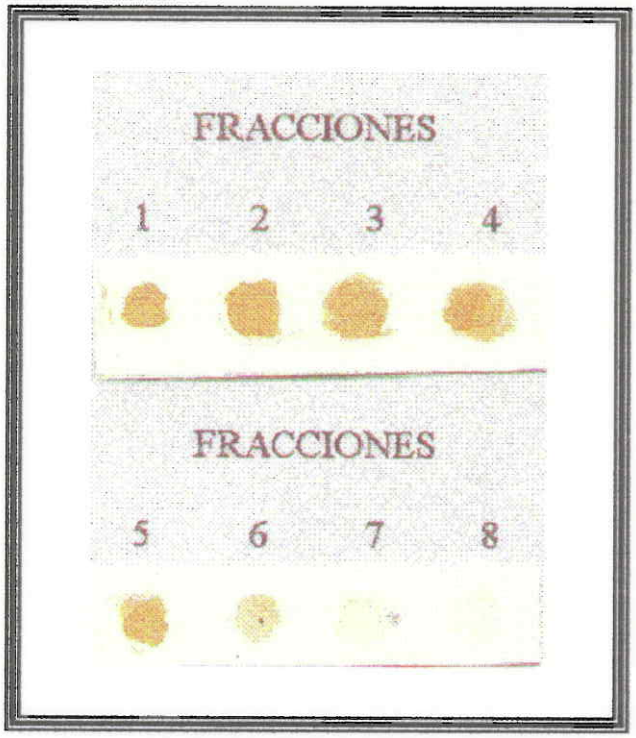


FIGURA 6. Ejemplo de los resultados de análisis por dot-blot de las fracciones recolectadas durante el filtrado por columna Sephadex G25 de las proteínas marcadas. Análisis de la proteína Cry3Aa; las fracciones 1 a 5 presentaron la mayor cantidad de proteína marcada con biotina.

En los ensayos con la proteína Cry3Aa, se observó la unión de dicha proteína con las proteínas presentes en el purificado de vesículas de *P. vorax*. Como se observa en la figura 7 se presentó una banda en el carril 3 correspondiente a la muestra de la proteína Cry3Aa biotinilada mezclada con las vesículas del insecto blanco, lo cual indico que hubo unión entre estas. Así mismo se observó la presencia de las bandas esperadas en el carril 1 que contiene la muestra de proteína marcada sola y la no presencia de bandas en el carril 2 que contiene solo muestra de BBMV. Estas dos ultimas muestras mencionadas fueron empleada como controles positivo y negativo, respectivamente.

En ensayos similares a los desarrollados en el presente trabajo, Garcia *et al.*(2000), empleando la proteína Cry3A y vesículas de *Leptinotarsa decemlineata* y *Tenebrio molitor*, observaron una unión especifica de dicha proteína con las proteínas receptoras del intestino de ambos insectos en forma similar a la unión observada con las vesículas de *P. vorax*.. De igual forma también se ha observado unión de la proteína Cry3Aa marcada con iodo radiactivo con vesículas de *Diabrotica undecimpunctata* .

Las proteínas Cry3Bb y Cry3Ca, en forma similar a la proteína Cry3Aa, se unieron a las proteínas de las vesículas de *P. vorax* (Figura 8, carriles 4 y 5). Igualmente se observaron las bandas correspondientes a las proteínas solas biotiniladas, en los carriles 1 y 2. No se observaron bandas en el carril 3 correspondiente a la muestra de purificado de vesículas.

En el caso de las proteínas Cry3Ba y Cry 7Aa (Fig 9), no se evidenció unión a las vesículas de *P. vorax*. Se observaron las bandas de las dos proteínas marcadas Cry3Ba y Cry7Aa (carriles 1 y 2, respectivamente). No se observaron bandas en el carril 3 correspondiente a las vesículas solas, como se esperaba. Por otro lado, tampoco se observaron bandas en los carriles 4 y 5, correspondientes a las vesículas mezcladas con las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa, respectivamente.

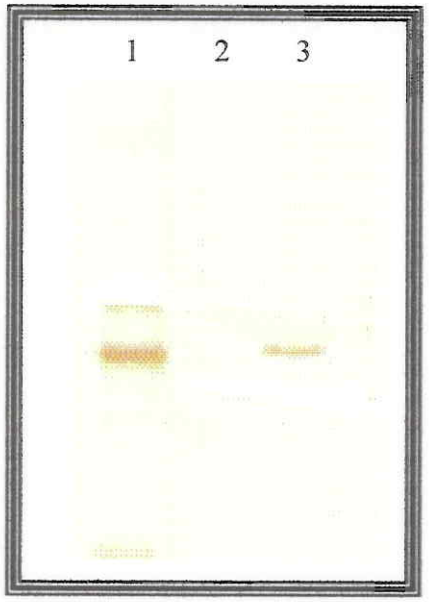


FIGURA 7. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión entre la proteína Cry3Aa y el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. Carril 1, proteína marcada con biotina; carril 2, purificado de las BBMV; carril 3, proteína Cry3Aa mezclada con el purificado de las BBMV.

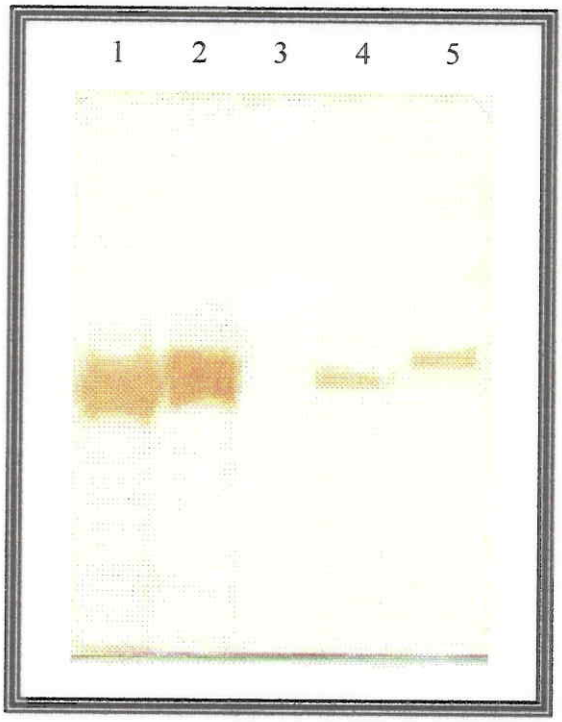


FIGURA 8. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión de las proteínas Cry3Ca y Cry3Bb con el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. Carril 1, proteína Cry3Ca biotinilada; carril 2, proteína Cry3Bb biotinilada; carril 3, purificado de las BBMV; carril 4, Proteína Cry3Ca mezclada con las BBMV; carril 5, proteína Cry3Bb mezclada con las BBMV.

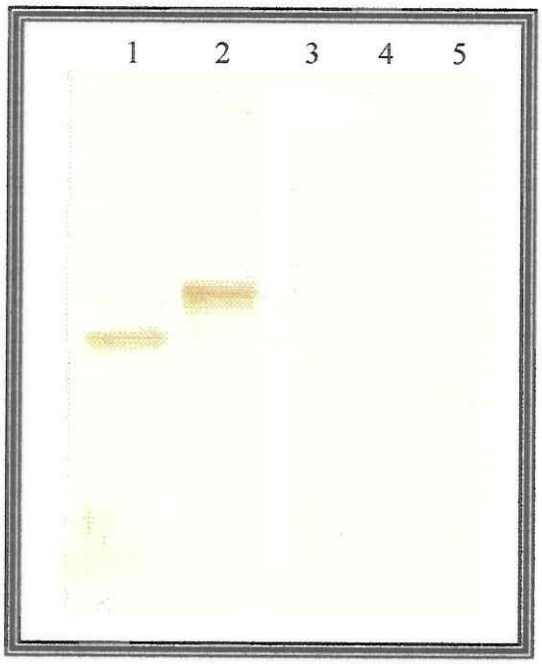


FIGURA 9. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el ensayo de unión de las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa con el purificado de vesículas del intestino de *P. vorax*. Carril 1, proteína Cry3Ba biotinilada; carril 2, proteína Cry7Aa biotinilada; carril 3, purificado de las BBMV; carril 4, Proteína Cry3Ba mezclada con las BBMV; carril 5, proteína Cry7Aa mezclada con las BBMV.

En la literatura no existen reportes de unión de las proteínas Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca o Cry7Aa a vesículas de insectos, por lo tanto los resultados obtenidos son el primer reporte que explora la de unión de dichas proteínas con el intestino de un insecto del orden coleoptera. De acuerdo con esto se hacen relevantes los dos tipos de comportamiento de unión observados entre las vesículas de *P. vorax* y las proteínas Cry evaluadas; por un lado la unión con las proteínas Cry3Aa, 3Bb y Cry3Ca y la no unión con las proteínas Cry3Ba y Cry7Aa.

Los dos comportamientos mencionados pueden deberse a una conformación distinta de la estructura de las proteínas, específicamente del dominio II y III involucrados en el reconocimiento y unión a los receptores del intestino de los insectos, que las hace expresar diferente afinidad a las vesículas de *P. vorax*. Vale la pena resaltar los comportamientos de unión de las proteínas Cry3Ba y Cry3Bb, que aunque son proteínas con una alta homología según el esquema de clasificación actual, presentan diferente afinidad por las vesículas del insecto blanco, lo cual concuerda con la alta especificidad de las proteínas de Bt por un insecto blanco dado.

En vista de los diferentes comportamientos de unión de las proteínas, se seleccionaron las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca para el análisis por blotting, las cuales fueron las únicas que se unieron al purificado de las BBMV de *P. vorax*.

4.5 Análisis de proteínas por blotting

Las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca que presentaron unión con las vesículas de *P. vorax*, fueron sometidas a análisis por blotting. Los resultados obtenidos en dicho análisis se observan en la Figura 10 en donde los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca, respectivamente.

Las tres proteínas evaluadas presentaron un patrón similar de unión a las proteínas del purificado de BBMV del insecto blanco; sin embargo, se observó que las tres proteínas se

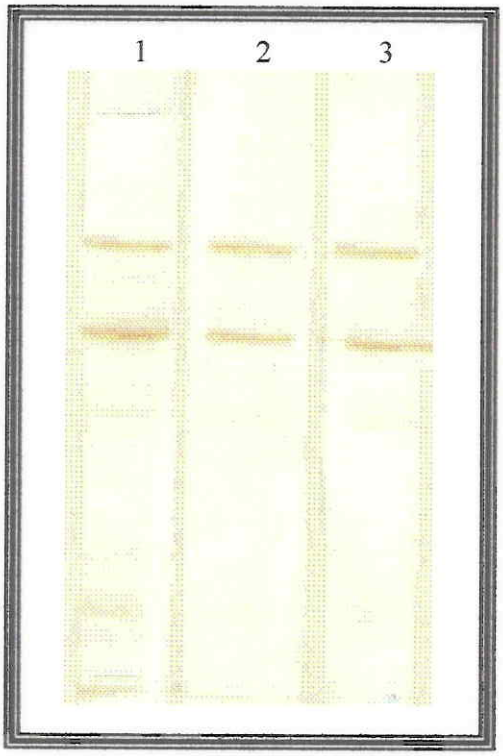


FIGURA 10. Membrana de nitrocelulosa coloreada que muestra el análisis de proteínas mediante la técnica de blotting. Carril 1, proteína Cry3Aa; carril 2, proteína Cry3Bb; carril 3, proteína Cry3Ca.

unieron en mayor proporción a dos proteínas de aproximadamente 97 y 70 KDa. De acuerdo con esto, dichas proteínas pueden constituirse en dos posibles proteínas receptoras de las proteínas Cry mencionadas. En la literatura, no son muchos los reportes de proteínas receptoras en insectos. Empleando la misma metodología de análisis de proteínas por blotting, Garczynski *et al* (1991), identificaron en BBMV de *Manduca sexta* una proteína de 120 KDa, que posteriormente fué identificada como un posible receptor para la proteína Cry1Ac (Chambers et al., 2000) y una proteína de 210 KDa como receptora de la proteína Cry1Ab. Para la proteína Cry1Ac en *S. frugiperda* ellos encontraron una posible proteína receptora de 148 KDa y en *H. virescens* y *H. zea* encontraron varias posibles proteínas receptoras de 155, 120, 103, 90 y 63 KDa. Así mismo se han descrito proteínas receptoras con función aminopeptidasa en *Heliothis virescens*, *Limantria dispar* y *Plutella xylostella* (Aranda,1996b).

En insectos del orden Coleoptera, Belfiore *et al.* (1994) registraron por primera vez una proteína receptora de 144 KDa, presente en el intestino de *T. molitor* , a la cual se une la proteína Cry3A.

De acuerdo con lo anterior, el presente sería el primer reporte que se hace de posibles proteínas receptoras de las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca de Bt en el intestino de *P. vorax*, las cuales merecerían una caracterización posterior más detallada.

4.6 Bioensayos

En los bioensayos con proteína en suspensión empleando harina de papa (Tabla 2), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 6). Se observó mortalidad de algunas larvas de *P. vorax* con las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca, con una dosis de 500 ug de proteína/ml de suspensión.. El resto de las proteínas no presentaron actividad tóxica y el testigo tampoco presentó mortalidad.

Cuando se emplearon las proteínas en forma soluble para el bioensayo, el buffer empleado en el proceso de solubilización de las mismas, causó alteración de las

TABLA 2. Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax*.. empleando harina de papa (Ver anexos 1,2 y 3). Concentración de proteína total 500 ug/ml.

	Proteína soluble		Proteína suspendida
	pH 4.1	**pH 10**	
Testigo	41.66	47.22	0.00
Cry3Aa	59.72	26.38	6.94
Cry3Ba	59.72	6.94	0.00
Cry3Bb	45.83	41.66	0.00
Cry3Ca	56.94	38.88	6.94
Cry7Aa	61.11	62.50	0.00

características físicas de la dieta, originando mortalidades altas en todos los tratamientos incluyendo el testigo, por lo cual los datos de mortalidad obtenidos en dicho bioensayo no se tuvieron en cuenta para los análisis de toxicidad.

Respecto de los bioensayos empleando cubos de tubérculo de papa (Tabla 3), se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos cuando se empleó la proteína suspendida y diferencias significativas cuando se empleó soluble a pH 10 (Anexo7). A pesar de esto, los porcentajes de mortalidad fueron muy bajos en todos los casos.

Cuando las proteínas fueron solubilizadas a pH 4.1 la actividad tóxica fué nula para todas ellas, al igual que cuando fueron procesadas con tripsina.

De acuerdo con las observaciones anteriores, se plantea que las proteínas evaluadas no presentan actividad tóxica contra larvas de primer instar de *P. vorax* , ya que a pesar de haberse empleado dosis altas (10 µg/cm2 y 500 µg/ml) los valores de porcentaje de mortalidad no superaron el 10%.

Por otro lado, debido a los coeficientes de variación obtenidos en los bioensayos evaluados estadísticamente, el bioensayo empleando harina de papa (C.V. : 21.08 %) sería descartado ya que no garantiza una homogeneidad en el ensayo, tal vez debida a una distribución heterogénea de la proteína en la dieta; mientras tanto los bioensayos empleando cubos de papa permiten una mayor homogeneidad en el ensayo (C.V : 10.6 y 9.0). De acuerdo con lo anterior y ya que además se presentan interferencias con la dieta, especialmente cuando la proteína se ha solubilizado en algún tipo de solución buffer, es aconsejable realizar los bioensayos empleando la papa como tubérculo y no como harina, lo cual permite una evaluación mas confiable de la actividad tóxica de proteínas de Bt en larvas de *P. vorax*.

Analizando la actividad tóxica obtenida con las proteínas evaluadas y las características de unión a las vesículas del insecto blanco, se observó un aspecto interesante : aunque las

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

TABLA 3. Porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax*.. empleando cubos de papa (ver anexos 4 y 5).. Concentración de proteína total 10 ug/cm2.

	Proteína soluble		Proteína suspendida	Proteína Tripsinada
	pH 4.1	**pH 10**		
Testigo	0.00	4.16	0.00	0.00
Cry3Aa	0.00	9.72	5.55	0.00
Cry3Ba	0.00	8.33	4.16	0.00
Cry3Bb	0.00	8.33	4.16	0.00
Cry3Ca	0.00	4.16	5.55	0.00
Cry7Aa	0.00	9.72	2.77	0.00

proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca se unieron al purificado de vesículas de *P. vorax*, no ejercieron un efecto tóxico marcado sobre las larvas de primer instar del mismo insecto empleadas en los bioensayos.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo obtenido por Slaney *et al* (1992), quienes encontraron una baja actividad tóxica (9 % de mortalidad) de la proteína Cry3A en larvas de *D. undecimpunctata* a pesar de que observaron unión de dicha proteína con las BBMV de dicho insecto. Ellos atribuyen este comportamiento a una afinidad reducida de la proteína por los sitios de unión en la membrana intestinal del insecto y a un cambio muy leve en la permeabilidad de la misma. Lo anterior puede también ser valido para explicar la muy baja actividad tóxica de las proteínas Cry3A y Cry3Ca, a pesar de que se trata de un insecto diferente.

Los resultados obtenidos, por lo tanto, muestran que independientemente de su comportamiento de unión, ninguna de las proteínas evaluadas tuvo un efecto tóxico marcado sobre larvas de primer instar de *P. vorax*..

Estos resultados confirman que a pesar de que el proceso de unión entre las proteínas y los receptores se dé, la capacidad de causar la muerte al insecto estará determinada por una unión especifica saturable y la consiguiente inserción de la toxina en la membrana intestinal del insecto para la formación del poro (Aranda et al.,1996) o una unión reversible seguida de una irreversible. Lo anterior permitiría plantear que la unión establecida entre las proteínas Cry evaluadas y las proteínas receptoras del purificado de las BBMV fue de carácter reversible únicamente, de tal forma que el dominio II (y/o III) pudo unirse a los receptores presentes en las BBMV pero no se permitió la inserción del dominio I en la membrana intestinal de *P. vorax* para la consiguiente formación del poro. Es claro entonces que los componentes reversible e irreversible de la unión juegan un papel importante en la toxicidad o no toxicidad de una proteína Cry dada, siendo el componente irreversible más clave en este aspecto.

De acuerdo con ensayos sobre formación de poro con la proteína Cry3Aa, en membranas de coleópteros, los cuales han determinado que el pH y la activación de la toxina tienen un papel crítico en su formación (García *et al.*,2000) y después de haber realizado los bioensayos con las proteínas Cry en diferentes presentaciones (suspendidas, solubles a dos pH diferentes y tripsinadas), se corrobora entonces el planteamiento que las proteínas evaluadas que se unieron con las vesículas de *P. vorax*, no tuvieron la capacidad de internalizarse en la membrana y generar el poro, ya que se descarta cualquier otro tipo de factor diferente a la interacción proteína-receptor que pueda interferir en la toxicidad de las mismas.

CONCLUSIONES

La metodología implementada para la obtención de vesículas a partir de las microvellosidades epiteliales del intestino de *P. vorax*, permitió lograr un purificado de vesículas con características óptimas para la realización de ensayos de unión *in vitro* con proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

Las proteínas de *B. thuringiensis* Cry3Ba y Cry7Aa no presentaron actividad tóxica hacia larvas de primer instar de *P. vorax*; según los resultados obtenidos en los ensayos de unión, esto se debió a que el insecto no presenta en su epitelio intestinal proteínas receptoras para dichas proteínas Cry.

Las proteínas de *B. thuringiensis* Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca, no presentaron actividad tóxica hacia larvas de primer instar de *P. vorax*, a pesar de que se observó la existencia de proteínas receptoras para ellas en el purificado de las BBMV del insecto; los resultados indicaron que al parecer esto fué debido a que la unión vesiculas-proteinas fué únicamente de carácter reversible sin lograrse la internalización de la toxina en la membrana epitelial del intestino del insecto.

La evaluación de las proteínas de *B. thuringiensis* por blotting permitió identificar dos posibles proteínas receptoras para las proteínas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry3Ca en las células epiteliales del intestino de *P. vorax*, siendo este el primer reporte que se hace para un insecto coleóptero endémico de la región andina.

La metodología de bioensayo propuesta en este trabajo, que emplea cubos de papa, permitió observar la no toxicidad de proteínas Cry3 y Cry7 de *B. thuringiensis* y relacionarla con características propias del mecanismo de acción de las mismas en el intestino del gusano blanco de la papa.

Las proteínas Cry evaluadas por no poseer actividad tóxica significativa sobre larvas de *P. vorax*, presentan poco potencial para ser consideradas como una alternativa viable para ser incluida en programas de manejo integrado de este insecto.

BIBLIOGRAFIA

ARANDA, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., Bravo, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : noctuidae). J. invertebr. pathol. 68 : 203-212.

ARANDA, E. 1996b. Análisis de las interacciones *in vitro* e *in vivo* de las δ endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* con el epitelio intestinal de diferentes insectos plaga. Tesis PhD en Biotecnología. Universidad autónoma del estado de Morelos. Cuernavaca, México.

ABDUL-RAUF, M., Ellar, D. 1999. Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from *Aedes aegypti* larvae. J. Invertebr. Pathol. 73, 45-51.

BAUER L. 1995. Resistance: A threat to the insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. En: Symposium on pesticide resistance. Fld. Entomol. 78 (3). 1995. pp 414-443.

BAUER L.1992. Ultraestructural effects of *B. thuringiensis* Var. *san diego* on midgut cells of cotton wood leaf beetle. J. Invertebr. Pathol. 60, 15-25 (1992).

BELFIORE C. J., Vadlamudi R. K., Osman Y. A., Bulla L.E. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 200, No 1. pp 359-364.

BOLLAG, D., Edelstein, S. 1991. Protein Methods. Wiley and Sons Inc. New York, USA. 250 p.

BRAVO, A., Jansens, S., Peferoen, M. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal cristal proteins in intoxicated insects. J. Invertebr. Pathol. 60 : 237-246.

BRAVO, A., Hendrickx, K., Jansens, S., Peferoen, M. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal cristal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. 60 : 247-253.

BRAVO, A., Tenorio, S., Sanchez, J., Darszon, A., Garcia, I., Rausell, C. 1999. Pore formation activity of Cry toxins in membranes isolated from different insect orders. En: Society for invertebrate pathology XXXII Meeting Program and abstracts. August 22-27. California, USA.

CHAMBERS, C., Carroll, J., Ellar, D. 2000. Characterization of the Cry1Ac-binding carbohydrate epitopes on *Manduca sexta* 120 KDa aminopeptidase. En: Society for invertebrate pathology XXXIII Meeting Program and abstracts. August 13-18. Guanajusto, Mexico. Pg. 33.

CIDARIA, D., Cappai, A., Caprioli, V., Pirali, G. 1990. *Bacillus thiringiensis* Var. *donegani* and preparation or toxin obtained therefrom, endowed with insecticidal activity against coleoptera. European Patent Application No 901147708.2.

CRICKMORE, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schneph, Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Dean, D. 1998. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3) : 807-813.

DE BARJAC, H. 1981. Identification of H serotypes of *Bacillus thuringiensis*. En: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press . pp 35-43. London.

DE BARJAC H., Frachon E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomoph. 35, 233-240.

DENOLF, P., Jansens, S., Van Houdt, S., Peferoen, M., Degheele, D.,Van Rie, J. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins. Appl. Environ. Microbiol. 59(6):1821-1827.

DENOLF, P., Jansen, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera : Pyralidae). Appl. Envoron. Microbiol. 59 : 1828-1837.

DONOVAN W. P., Gonzalez J. M., Gilbert M.P., Dankocsik C. 1988. Isolation and caracterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet. 214, 365-372.

ESTADA, U., Ferre, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the Cabbage looper Trichoplusia ni (Hübner) (Lepidoptera : noctuidae) and selection for resistance to one of the crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 60(10) : 3840-3846.

GALAN, L., Luna, A., Medrano, H. 1995. Tendencias mundiales en el uso de biopesticidas. Memorias del I Curso taller internacional: aislamiento, caracterización y producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas. Santafe de Bogotá (22 Ag-1 Sep 1995).

GARCIA, I., Sanchez, J., Rausell, C., Martinez, A., de Maag, R., Real, M., Bravo, A. 2000. Specific binding and pore formation activity of Cry3A toxin in membranes isolated from *Leptinotarsa decemlineata* and *Tenebrio molitor* . En: Society for invertebrate pathology XXXIII Meeting Program and abstracts. August 13-18. Guanajusto, Mexico. Pg. 33.

GILL, S., Cowles, E., Pietrantonio, P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37 : 615-636.

GILL, S., Pietrantonio, V. 1995. Mechanism of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* endotoxins. En: Curso taller Internacional: aislamiento, caracterizacion y produccion de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas. Instituto de Biotecnologia. Universidad Nacional de Colombia - CORPOICA. Ag 22 - 1 de Sept. Santafe de Bogota.

GLARE, T., O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thurigiensis* : Biology, ecology and safety. John Wiley and Sons editores. West Sussex, UK. p. 211.

HERRNSTADT, C., Soares, G., Wilcox, E., Edwards, D. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* toxin with activity against coleopteran insects. Bio/Technol. 4, 305-308.

HOFMANN, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxinsis correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 7844-7848.

HOFTE, H., Whiteley, H. 1989. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 56: 242-255.

HORI, H., Suzuki, K., Oginara, M., Himejima, M., Indrasith, L., Minami, M., Asano, S., Sato, R., Ohba, M., Iwahana, H. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. J. Appl. Bacteriol. 76, 307-313.

KELLER, B., Langenbrunch, G. 1993. Control of coleopteran pests by Bacillus thuringiensis. En: *Bacillus thuringiensis* An environmetal biopesticide: Theory and Practice. Wiley and sons publishers. England.

KESSLER, M., Acuto, O.,Storelli, C., Murer, H., Muller, M., Semenza, G. 1978. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. Biochim. Biophys. Acta. 506, 136-154.

KOLLER, C., Bauer, L., Hollingworth, R. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* Native delta-endotoxin crystals. Bioch. and Biophys. Research Comm. 84 (2), 692- 699.

KRIEG, V., Huger, A., Langenbruch, G, Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* Var. *tenebrionis*, a new patothype effective against larvae of coleoptera. Z. Angew. Entomol. 96, 500-508.

LAMBERT, B., Hofte, H., Annys, K., Jansen, S., Soetaert, J., Perferoen, M. 1992. Novel *B. thuringiensis* insecticidal cristal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 58 (8), 2536- 2542.

LI, J.,Carrol, J., Ellar, D. 1991. Crystal estructure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 angstrom resolution. Nature, vol 353.

McPEARSON, S., Perlak, F., Fuchs, R., Marrone, P., Lavrik, P., Fischhoff, D. 1988. characterization of the coleopteran especific protein gene of *B. thuringiensis* Var. *tenebrionis*. Bio/Technol. 6 (1).

MEDRANO, L., Quintero, R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* . *En:* Avances recientes en la biotecnologia de *Bacillus thuringiensis* . Universidad Autonoma de Nuevo León. Monterrey, Mexico. Pgs 63-112.

RUPAR, M., Donovan, W., Gene, R., Slaney, A., Mattison, J., Johnson, T., Charles, J., Cosmao, V., De Barjc, H. 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. Appl. Environ. Microbiol. 57(11), 3337-3344.

SAKAI, H., Otake, K., Esaki, M., Komano, T., Yamagiwa, M. 2000. Binding of ICP to the BBMV's and midgut epithelia of *Culex pipiens* and *Bombyx mori* larvae. En: Society of Invertebrate pathology XXXIII meeting program and abstracs. August 12-18. Guanajuato, Mexico. pg 85.

SCHNEPF, E., Crickmore, N., VanRie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler D., Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 775-805.

SCHWAB, G., Culver, P. 1990. In vitro analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action. En: Analytical chemistry of *Bacillus thuringiensis.* American chemical society. USA.

SLANEY, A., Robbins, H., Leigh, E. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry IIIA: an analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (say) and *Diabrotica undecimpunctata* Howardi Barber. Insect. Biochem. Molec 22(1):9-18.

SUZUKI, N., Hori, H., Tachibana, M., Asano, S. 1994. *Bacillus thuringiensis* strain Buibui for control of cupreous chafer *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in turfgrass and sweet potato. Biological Control: Theory and Applications in Pest Management 4(4): 361-365.

TAPP, H., Stotzky, G. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bounded on pure and soil clays. Appl. Environ. Microbiol. 61(5):1786-1790.

VALENCIA, L., Bohorquez, C. 1994. Oviposición del gusano blanco de la papa, Premnotrypes vorax (Hustache) (Coleoptera:curculionidae). Rev. Col. Entom. 20(3):165-167.

VAN FRANKENHUYZEN, K. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus thuringiensis* An Environmetal Biopesticide: Theory and Practice. Entwistle, P., Cory, J., Bailey, M., Higgs, S., Eds. John wiley and sons Ltd, Inglaterra. Páginas 1-35.

VAN RIE, J., Jansen, S., Hofte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem. 186: 239-247.

VAN RIE, J., Jansen, S., Hofte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H, 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the especificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56(5): 1378-1385.

VAN RIE, Jeroen. 1995. Biochemical aspects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal cristal proteins. En: Curso taller Internacional: aislamiento, caracterización y producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia - CORPOICA. Ag 22 - 1 de Sept. Santa Fe de Bogota.

VAN RIE, J. 1995. Methods to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal cristal proteins. En: Curso taller Internacional: aislamiento, caracterización y producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia - CORPOICA. Ag 22 - 1 de Sept. Santa Fe de Bogota.

VELEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia : bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 482 p.

WOLFERSBERGER, M., Luthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, V., Giordana, B., Hanozet, G. 1987. Preparation and Partial Characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (P. brassicae). Comp. Biochem. Physiol. 86:301-308.

ANEXO 1

Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con las proteínas de Bt solubilizadas a pH ácido (4,1). Cada bioensayo se realizó con 24 larvas de *P. vorax* de primer instar.

Proteínas	Bioensayos			Total	% Mortalidad
	I	II	III		
Testigo	10	12	8	30	41.66
Cry3Aa	19	13	11	43	59.72
Cry3Ba	21	12	10	43	59.72
Cry3Bb	15	13	7	33	45.83
Cry3Ca	22	9	10	41	56.94
Cry7Aa	13	18	13	44	61.11

ANEXO 2

Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con proteína de Bt solubilizada a pH alcalino (10). Cada bioensayo se realizó con 24 larvas de *P. vorax* de primer instar.

Proteínas	Bioensayos			Total	% Mortalidad
	I	II	III		
Testigo	16	11	7	34	47.22
Cry3Aa	6	3	10	19	26.38
Cry3Ba	3	0	2	5	6.94
Cry3Bb	8	9	13	30	41.66
Cry3Ca	19	4	5	28	38.88
Cry7Aa	15	20	10	45	62.5

ANEXO 3

Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en harina de papa con proteína de Bt suspendida. Cada bioensayo se realizó con 24 larvas de *P. vorax* de primer instar.

Proteínas	Bioensayos			Total	% Mortalidad
	I	II	III		
Testigo	0	0	0	0	0.00
Cry3Aa	0	3	2	5	6.94
Cry3Ba	0	0	0	0	0.00
Cry3Bb	0	0	0	0	0.00
Cry3Ca	1	1	3	5	6.94
Cry7Aa	0	0	0	0	0.00

ANEXO 4

Número de larvas muertas y porcentaje de mortalidad obtenidos en los bioensayos en cubos de papa con proteína de Bt solubilizada en dos condiciones de pH. Cada bioensayo se realizó con 24 larvas de *P. vorax* de primer instar.

	Bioensayos pH 4.1			Total	% M	Bioensayos PH 10			Total	% M
	I	II	III			I	II	III		
Testigo	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4.16
Cry3Aa	0	0	0	0	0	2	2	3	7	9.72
Cry3Ba	0	0	0	0	0	2	2	2	6	8.33
Cry3Bb	0	0	0	0	0	1	3	2	6	8.33
Cry3Ca	0	0	0	0	0	1	1	1	3	4.16
Cry7Aa	0	0	0	0	0	3	2	2	7	9.72

ANEXO 5

Número de larvas muertas y porcentajes de mortalidad obtenidos en los bioensayos en cubos de papa con proteína de Bt en suspensión y tripsinada. Cada bioensayo se realizó con 24 larvas de *P. vorax* de primer instar.

	Proteína Suspensión			Total	% M	Proteína Tripsinada			Total	% M
	I	II	III			I	II	III		
Testigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00
Cry3Aa	1	2	1	4	5.55	0	0	0	0	0.00
Cry3Ba	1	1	1	3	4.16	0	0	0	0	0.00
Cry3Bb	1	1	1	3	4.16	0	0	0	0	0.00
Cry3Ca	2	1	1	4	5.55	0	0	0	0	0.00
Cry7Aa	1	1	0	2	2.77	0	0	0	0	0.00

ANEXO 6

Análisis de varianza y coeficientes de variación de los bioensayos en harina de papa realizados con proteína de Bt suspendida y larvas de primer instar de *P. vorax*.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (% conf.)
Tratamientos	5	1.4097	0.2819	4.4236	3.11 (0.05)
Error	12	0.7648	0.0637		5.06 (0.01)
Total	17	2.1745			

CV : 21.08 %

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

ANEXO 7

Análisis de varianza y coeficientes de variación de los bioensayos en cubos de papa realizados con proteína de Bt suspendida (arriba) y soluble a pH 10 (abajoa) y larvas de primer instar de *P. vorax*.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (% conf.)
Tratamientos	5	0.5809	0.1161	5.5990	3.11 (0.05)
Error	12	0.2490	0.0207		5.06 (0.01)
Total	17	0.8300			

CV : 10.61 %

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft (% conf.)
Tratamientos	5	0.5431	0.1086	4.8664	3.11 (0.05)
Error	12	0.2678	0.0223		5.06 (0.01)
Total	17	0.8110			

CV : 9.03 %