

**EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba Y Cry1Ca
DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE LARVAS DE *Copitarsia decolora* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

JULIETH ALEXANDRA MENA GUERRERO

Trabajo de grado como requisito para optar al título de:

Biólogo Ambiental

Director

JAVIER ADOLFO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

Profesor asociado II

UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

PROGRAMA DE BIOLOGÍA AMBIENTAL

BOGOTÁ D.C.

2018

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de grado a mi madre Amanda, a mi padre Luis y a mi hermana Carolina por apoyarme, animarme y acompañarme durante todo mi proceso académico. A mis tías Amparo y Janeth por su cariño desde la distancia. A mis abuelos Úrsula y Víctor que desde siempre creyeron en mí y en mis capacidades.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a cada una de las personas que estuvieron a mi lado y que permitieron la culminación de este proyecto. Al profesor Javier Hernández Fernández por brindarme su apoyo, orientación y confianza desde el día cero. A los profesores María del Pilar Rodríguez y Luis Alejandro Arias por su apoyo en las correcciones y comentarios del proyecto. A David Delgado por su apoyo, cariño y acompañamiento constante. A mis amigos por sus palabras de aliento, consejos y experiencias vividas. Todos hacen y harán parte de mi corazón desde donde sea que yo me encuentre.

A la Oficina de Investigación de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, Sede Tibaitatá, Mosquera) y a la Dra. Gloria Vidal Córdoba por realizar la cría en laboratorio de *Copitarsia decolora*. Los autores agradecen al Dr. Daniel R Zeigler del Bacillus Genetic Stock Center (Universidad del estado de Ohio, Ohio) por proporcionar las cepas recombinantes de *Escherichia coli*.

EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba Y Cry1Ca DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE LARVAS DE *Copitarsia decolora* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Julieth Mena Guerrero¹ y Javier Hernández Fernández²

Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de Investigación en Genética, Biología Molecular y Bioinformática (GENBIMOL). Carrera 4 No. 22-61. Bogotá, D.C., Colombia.

¹julietha.menag@utadeo.edu.co, ²genetica0106@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue expresar y purificar las proteínas recombinantes (pR) Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ca a partir de cepas recombinantes de *Escherichia coli* y evaluar su efecto sobre larvas de primer instar de *Copitarsia decolora*. Las pRs se evaluaron en un bioensayo preliminar sobre larvas de *C. decolora* a una concentración de 4,8 µg de pR/ml. Se utilizó el método de contaminación superficial sobre hojas de astromelia (*Alstromelia* spp). En cada tratamiento se evaluó la mortalidad y la inhibición de crecimiento basado en la longitud y peso promedio larval. La electroforesis SDS-PAGE reveló bandas de proteínas con pesos moleculares esperados para las proteínas Cry1 de aproximadamente 135 kDa. La mortalidad larval no fue considerada como variable afectada por los tratamientos debido a que fue baja (entre 0 y 10%). La pRCry1Ab mostró el mayor efecto tóxico sobre la reducción en longitud (27%) y peso (40%) promedio larval (8,90 ± 1,88 mm y 10,23 mg) comparado con los controles negativos (agua: 12,27 ± 2,68 mm y 17,90 mg; y buffer: 12,10 ± 2,66 mm y 16,40 mg). Las pRCry1Aa y pRCry1Ca fueron moderadamente tóxicas y produjeron significativa inhibición del crecimiento en larvas de *C. decolora* (P<0,05). El menor efecto tóxico se observó con la pRCry1Ba (12,04 ± 2,25 mm y 15,96 mg) con un 1,19 y 7% de inhibición en longitud y peso, respectivamente. Un segundo bioensayo se realizó utilizando la pRCry1Ab y evaluando cinco concentraciones. Se observó inhibición de crecimiento en la longitud (de 18,6 a 6,70%) y en el peso larval (48 a 19,8%) a medida que se aumentó la concentración de cada tratamiento (P<0,05). El porcentaje de inhibición larval en las diferentes concentraciones empleadas con *Bt.* HD1 y pRCry1Ab fueron estadísticamente similares (P>0,05) ya que los valores de longitud y peso se traslaparon entre los tratamientos. Es importante evaluar el efecto de las proteínas Cry recombinantes empleadas en este estudio en concentraciones superiores a 307,2 µg/ml, y otras toxinas clivadas y activadas contra larvas de *C. decolora*.

Palabras clave

Copitarsia decolora, *Bacillus thuringiensis*, cepa recombinante, primer instar, Cry1Ab.

EFFECT OF RECOMBINANT PROTEINS Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba AND Cry1Ca FROM *Bacillus thuringiensis* AGAINST *Copitarsia decolora* LARVAE (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT

The objective of this study was to express and purify the recombinant proteins (pR) Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba and Cry1Ca from recombinant strains of *Escherichia coli* and evaluate their effect against first instar larvae of *Copitarsia decolora*. The pRs were evaluated in a preliminary bioassay against *C. decolora* larvae at a concentration of 4.8 µg/ml. Surface contamination method on leaves of astromelia (*Alstromelia* spp) was used for the bioassay. In each treatment, mortality and growth inhibition were evaluated based on the length and weight of the larva. The SDS-PAGE electrophoresis revealed protein bands with approximate molecular weights of 135 kDa. Larval mortality was not considered as an affected variable by the treatments because it was low (between 0 and 10%). The pRCry1Ab showed the greatest toxic effect on the reduction in length (27%) and weight (40%) of the larva (8,90 ± 1,88 mm and 10,23 mg) compared to the negative controls (water: 12,27 ± 2,68 mm and 17,90 mg; and buffer: 12,10 ± 2,66 mm and 16,40 mg). The pRCry1Aa and pRCry1Ca were moderately toxic and produced significant growth inhibition in *C. decolora* larvae (P<0,05). The lowest toxic effect on growth it was observed with the crude extract of pRCry1Ba (12,04 ± 2,25 mm and 15,96 mg) with an inhibition in length and weight of 1,19 and 7%, respectively. A second bioassay was performed evaluating five concentrations and using the crude extract of pRCry1Ab. Inhibition of larval growth in length (from 18,6 to 6,70%) and weight (from 48 to 19,8%) was observed as the concentration of each treatment was increased (P <0.05). The larval growth in different concentrations used for both *Bt*. HD1 and the crude extract of pRCry1Ab were statistically similar (P> 0.05) since the values of length and weight overlapped between treatments. The crude extracts of pRCry1Aa, pRCry1Ab and pRCry1Ca of *Bt* produced a significant inhibition of growth in larvae of *C. decolora*. It is important to evaluate the effect of the extracts of Cry proteins used in this study in concentrations higher than 307,2 µg/ml, also, it is recommended to determine the effect of these and other toxins cleaved and activated against *C. decolora* larvae.

Keywords

Copitarsia decolora, *Bacillus thuringiensis*, recombinant strain, first instar, Cry1Ab.

1. INTRODUCCIÓN

El gusano cortador *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) es una especie polífaga que representa un problema para la agricultura debido al ataque directo sobre varios cultivos de importancia económica, además, se ha visto el rechazo de lotes de productos

agrícolas para exportación por la presencia de cualquiera de sus estadios de desarrollo. *C. decolora* es una plaga cuarentenaria en el mercado de los Estados Unidos. El Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS), realiza interceptaciones a los productos agrícolas que entran a este país, controlando la presencia de *C. decolora* ya sea fumigando o en última instancia incinerando los contenedores con el fin de evitar su entrada. Esto representa cuantiosas pérdidas para los exportadores (Guerra y Forero 2002; Moreno y Serna, 2006; Puentes, 2015; FIA, 2010). *C. decolora* es una especie con amplia distribución en Centro y Sur América, se destacan registros en Argentina, Chile, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Perú, Uruguay, Venezuela y Colombia (Angulo y Olivares 2003). *C. decolora* se ha identificado como plaga en cultivos de flores como: astromelias (*Alstromelia* spp), rosas (*Rosa* sp.), crisantemos (*Chrysanthemum* sp.) (Moreno y Serna, 2006; Quimbayo *et al.*, 2010), como también en cultivos de uva (*Vitis* spp.), alfalfa (*Medicago sativa*), alcachofa (*Cynara scolymus*), frambuesa (*Rubus idaeus*), espárrago (*Asparagus officinalis*), maíz (*Zea mays*), manzana (*Malus domestica*), remolacha (*Beta vulgaris*), col (*Brassica oleracea*), ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa*), kiwi (*Actinidia chinensis*), espinaca (*Spinacia oleracea*), fresa (*Fragaria chiloensis*), (Castillo y Angulo 1991, Angulo y Olivares 2003), quinua, (*Chenopodium quinoa*), apio (*Apium graveolens*), entre otras especies de plantas (Gould *et al.*, 2013). La información sobre pérdidas económicas en los cultivos causados por *Copitarsia* spp. es escasa. Gould *et al.* (2013) y FIA (2010) describen que especies de este género reducen la comercialización y crecimiento de cultivos de alcachofa en un 54% durante la temporada de cosecha, causan daño entre un 80 y 90% en la etapa de germinación e inflorescencia de los cultivos de quinua (si no se aplican pesticidas), y produce pérdidas del 10 y 45% en todas las etapas fenológicas y en lotes de exportación de los cultivos de repollo y espárrago durante todo el año. Los cultivos disminuyen su potencial productivo debido a que son atacados ávidamente por todos los instar larvales de *C. decolora*. Mientras que los primeros instar se alimentan de las hojas frescas (Gould *et al.*, 2013), los instar cuatro y cinco tienen predilección por los brotes tiernos o cogollos de la planta, el follaje y otras estructuras de interés para la comercialización (FIA, 2010; Quimbayo *et al.*, 2010).

En Colombia se cultivaron cerca de 7.290 hectáreas de flores durante el año 2010 (DANE, 2010). Los costos de producción en astromelia debido a *C. decolora* ascendieron en el año 2004 a 2,5 millones COP/ha/año, convirtiéndose en uno de los mayores costos en cuanto a la producción de flores (Moreno y Serna, 2006). El manejo de esta plaga en los cultivos de astromelia, por lo general, se realiza aplicando directamente productos químicos (Moreno y Serna, 2006) como organofosforados, piretroides y carbamatos (Hernández, 2013), impidiendo así que los huevos y larvas lleguen a poscosecha. Adicionalmente, este tipo de manejo genera daños en el medio ambiente y a la salud humana (Oerke y Dehne, 2004; Paz *et al.*, 2008), que incluye, la eliminación de insectos benéficos, la contaminación de suelos y aguas superficiales y subterráneas, y los riesgos de toxicidad hacia el agricultor o consumidor debido la presencia de residuos tóxicos en alimentos (Hernández, 2013).

Para el control de *C. decolora* actualmente se utilizan métodos biológicos, tales como: insectos predadores (coleópteros y neurópteros), parasitoides (como algunos taquínidos) y hongos patógenos (*Beauveria bassiana* y *Entomophthora sphaerosperma*) (Venette y Gould, 2006; Gould *et al.*, 2013). Asimismo, se conoce el control etológico en *C. decolora* usando trampas de semioquímicos como feromonas sexuales de hembras de *C. decolora* (Muñiz-Reyes *et al.*, 2007, Barrientos-Hernández *et al.*, 2011; Díaz-Gómez *et al.*, 2012), el control botánico mediante el uso de extractos vegetales (Vázquez, 2012; Hernández, 2013; Vázquez-Covarrubias *et al.*, 2015) y el control mecánico utilizando ecolocación de murciélagos en salas de poscosecha (Paz *et al.*, 2008). Para el control de otras plagas de importancia económica en cultivos como algodón, maíz, soya, tomate, lechuga, fresa, uva, durazno, brócoli, col, papa, entre otros, se ha propiciado el uso de bioplaguicidas, principalmente formulaciones con la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como una alternativa efectiva y con menor impacto ambiental al uso de plaguicidas de síntesis química, que permite la producción sostenible de estos cultivos (Carrera, 2009; Hernández y López, 2011; Rosas-García, 2009; Sauka y Benintende, 2008; Portela-Dussán *et al.*, 2013; Schnepf *et al.*, 1998). Estas formulaciones están compuestas principalmente de mezclas de esporas y cristales derivados de la actividad biológica específica de *Bt* var. *aizawai* HD137 (XenTari ® WG) (que sintetiza las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A y Cry2B) y *Bt* var. *kurstaki* HD1 (Dipel ®) (que sintetiza las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C y Cry1D y Cry2B) (Mena y Hernández, 2017).

Las toxinas o proteínas recombinantes de *Bt* se han empleado con éxito para controlar diversas plagas agrícolas. Actualmente, *Bt* representa aproximadamente el 90% del mercado de biopesticidas a nivel mundial, cuyo valor asciende a 600 millones de dólares anuales (Sanchis y Bourguet, 2008; Ibiza-Palacios, 2015; Hernández, 2016), gracias a las ventajas que posee como la alta especificidad sobre insectos de los órdenes lepidóptera, díptera y coleóptera, su bajo impacto ambiental, no perjudica a organismos benéficos como los microorganismos, insectos y demás organismos vivos, incluyendo el hombre (López y Cerón, 2010; Hernández, 2016). Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ca muestran actividad específica contra insectos lepidópteros (van Frankenhuyzen, 2009).

Si bien el conocimiento científico sobre *Bt* es diverso, especialmente en lo concerniente a su toxicidad, es necesario evaluar en Colombia al insecto *C. decolora* con las proteínas Cry, debido a que esta plaga cuarentenaria actualmente es de importancia económica (FAO, 2002) y hasta hoy no existen registros de trabajos experimentales o evaluaciones en campo relacionadas con el uso de *Bt* para su control. El objetivo de este estudio fue expresar y purificar parcialmente las proteínas recombinantes (pR) Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ca a partir de cepas recombinantes de *E. coli* y evaluar su efecto sobre larvas de primer instar de *Copitarsia decolora*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Células bacterianas y plásmidos. Se utilizaron las cepas recombinantes ECE52 (gen *cry1Aa* clonado en el plásmido pKK223-3 en *E. coli* JM103), ECE54 (gen *cry1Ab* clonado en el plásmido pKK223-3 en *E. coli* JM103), ECE125 (gen *cry1Ca* clonado en el plásmido pTZ19R en *E. coli* DH5a) y ECE128 (gen *cry1Ba* clonado en el plásmido pTZ19R en *E. coli* DH5a). Estas cepas fueron cedidas gentilmente por el Dr. Daniel R. Zeigler del Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University, EEUU). Adicionalmente, se incluyeron la cepa control positivo *Bt.* HD1 (producto comercial Dipel® que presenta las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C y Cry1D y Cry2B). Cada cepa se mantuvo en glicerol a -80°C para análisis posteriores.

2.2 Expresión y purificación parcial de las proteínas recombinantes. La expresión y purificación parcial de las proteínas recombinantes Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Ba, se realizó a partir de las cepas recombinantes de *E. coli* JM103 y DH5a siguiendo el método modificado de Izquierdo (2011). Las cepas ECE52 (Cry1Aa), ECE54 (Cry1Ab), ECE125 (Cry1Ca), ECE128 (Cry1Ba) y *Bt.* HD1 se sembraron en cajas de Petri en medio Luria Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 13 g/L de agar y 10 g/L de NaCl, pH= 7,5), 75 µl de ampicilina (100 mg/ml) y glucosa al 2%. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se inocularon cinco colonias aisladas de cada cepa sembrada, en pre-cultivos de 50 ml de medio Terrific Broth (TB) (0,6 g de triptona, 1,2 g de extracto de levadura, 0,47 g de K₂HPO₄, 0,11 g de KH₂PO₄ y 0,5 ml de glicerol), 3,72 ml de ampicilina (100 mg/ml) y glucosa al 2%. Se incubaron a 37°C durante 24 horas a 200 rpm. Luego se inoculó 2,5 ml de este pre-cultivo a un nuevo medio principal TB con 250 ml de volumen final y 18,6 µl de ampicilina (100 mg/ml). Cada medio se incubó a 28°C durante cuatro días a 200 rpm. Para la lisis celular, se colectaron las células del cultivo principal TB de cada tratamiento usando el rotor Swinging Bucket TX-200 (EE.UU) a 5.500 g a 4°C durante diez minutos y se congelaron a -20°C durante 24 horas. Por cada gramo de sedimento recolectado se agregó 3 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH= 8,0, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM) y se homogeneizó la solución. Seguidamente se adicionó lentamente 80 µl de solución de lisozima en tampón de lisis (10 mg de lisozima/ml de tampón de lisis) por gramo de sedimento recolectado. La solución de cada tratamiento se agitó a temperatura ambiente durante veinte minutos y luego se incubó a 37°C durante cuarenta minutos. Se recolectó el sedimento por centrifugación a 5.500 g a 4°C durante treinta minutos. Para los lavados se realizó una resuspensión del sedimento de cada tratamiento en 20 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 20mM, pH 7.5, NaCl 1M y Nonidet P40 1%), luego se recolectó el sedimento a 5.500 g a 4°C durante diez minutos. Posteriormente se resuspendió el sedimento de cada tratamiento en 20 ml de PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, pH= 7.4 y NaCl 0,8%) a 5.500 g a 4°C durante diez minutos. Ambos lavados se realizaron por triplicado. Las proteínas recombinantes se solubilizaron en 2,5 ml de tampón de solubilización (NaHCO₃ 50 mM pH= 10,5, NaCl 100 mM, DTT 10

mM). Se incubó el sedimento de cada tratamiento a 37°C durante dos horas a 200 rpm, seguido del mismo tiempo y rpm a temperatura ambiente. Finalmente se recolectó el sobrenadante que contiene cada una de las proteínas Cry recombinantes centrifugando la solución a 5.500 g durante veinte minutos a 4°C. Las proteínas recombinantes expresadas y parcialmente purificadas, se conservaron a 4°C para los análisis posteriores.

2.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La presencia de las proteínas parcialmente purificadas se confirmó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta se realizó empleando el método de Laemmli (1970). Los geles se prepararon al 8 y 4% en Bis/acrilamida. Se preparó una mezcla 40% de extracto de cada proteína y 60% de tampón de carga (1,0 ml de 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8, 0,8 ml de glicerol, 1,6 ml de SDS al 10% (p/v), 0,4 ml de 2-mercaptoetanol y 0,4 ml de azul de bromofenol al 10% (p/v)). La mezcla se calentó en baño de agua a 95°C por cinco minutos y se sirvieron alícuotas de 15 µl en cada pozo. Los corridos electroforéticos se llevaron a cabo a 200 voltios en una cámara Mini-protean II Electrophoresis Cell BIO-RAD (EE.UU). Se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas Opti-Protein XL Marker (abm, Canadá). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 durante cuatro horas a 150 rpm y fueron decolorados con una solución de ácido acético-metanol-agua (10-40-50) a 150 rpm, hasta la aparición de las bandas. Una vez decolorados los geles, se determinó el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en cada muestra en el transiluminador UV-20 MacroVue marca Hoefer (EE.UU).

2.4 Cuantificación de las proteínas aisladas y purificadas parcialmente. La concentración de las proteínas purificadas parcialmente se determinó por el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 100 hasta 1000 µg/ml como estándar (seis diluciones). Para la cuantificación de las pRs se transfirieron 0,1 ml de cada pR a tubos de 16 x 100 mm. Cada muestra se midió por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis Evolution™ 300 marca Thermo Fisher Scientific™ (EE.UU).

2.5 Cría del insecto *Copitarsia decolora*. Se colectaron larvas de primer y segundo instar de *C. decolora* en plantas de astromelia (*Alstromelia* spp) bajo condiciones de invernadero en una finca productora de flores de corte localizada en el municipio de Facatativá (Cundinamarca) a una altitud de 2590 msnm, humedad relativa del 82% y temperatura de 20.0 ± 7.0°C. Las larvas de *C. decolora* fueron mantenidas y criadas en el Laboratorio de cría de insectos plaga de importancia económica, en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, Sede Tibaitatá, Mosquera) a una temperatura de 20.0 ± 4.25°C y una humedad relativa de 61.4 ± 24.9%. Cada larva se colocó en un vaso plástico con tapa de ½ onza y se alimentaron con hojas de astromelia. De acuerdo con los instar larvales de *C. decolora*, cada larva se cambió individualmente a un vaso

plástico de 14 onzas con tapa hasta que se obtuvo el quinto instar larval. Posteriormente, cada larva se dispuso en un recipiente con vermiculita para facilitar la formación del estado de pupa. La diferenciación de los sexos se determinó observando la abertura genital del octavo segmento para machos y octavo y noveno segmento para hembras (Moreno y Serna 2006). Parejas de pupas de distintos sexos próximas a emergencia de adulto se colocaron en vasos plásticos de un galón. En su interior se instalaron tiras de servilletas plegadas, con el fin de recolectar las posturas. Una vez obtenidos los huevos, se colocaron en vasos plásticos transparentes de 14 onzas hasta su eclosión. Las larvas emergidas se ubicaron individualmente en vasos de ½ onza y se alimentaron con dieta natural de astromelia. Los adultos se alimentaron cada 24 horas con una mezcla de miel y agua en una proporción de 1:10 hasta la muerte de todos los individuos. Paralelamente, se analizó la fertilidad de los parentales en condiciones de laboratorio. Para ello, se tomaron 300 huevos distribuidos en 3 cajas Petri (100 huevos por caja) y se cuantificó diariamente el número de larvas, obteniendo una eclosión del 98%. Con estas larvas se inició el presente estudio.

2.6 Bioensayo. Se utilizaron larvas de una misma cohorte de primer instar de *C. decolora* criadas y monitoreadas en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, Sede Tibaitatá, Mosquera). Además, se utilizaron hojas de astromelia morfológicamente similares y libres de insecticidas, hongos y otros insectos. Los bioensayos se realizaron en una incubadora BINDER modelo BD 115 (Alemania) con condiciones controladas de humedad relativa ($80\% \pm 0,7$) y temperatura ($23,7^{\circ}\text{C} \pm 0,7$).

Con el fin de determinar el efecto de las proteínas recombinantes (pR), se empleó el método de contaminación superficial barnizando con un pincel las hojas de astromelia por el haz y el envés con una dosis única (4,8 μg) de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba, *Bt.* HD1 (control positivo) y los controles negativos: agua y buffer de solubilización.

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con treinta repeticiones. Cada una unidad experimental constó de un envase plástico con tapa de ½ onza, papel absorbente, dos hojas de astromelia con el tratamiento aplicado y una larva de primer instar *C. decolora* (Figura 1). En total se evaluaron 210 larvas de *C. decolora* sobre 420 hojas de astromelia. La lectura de los resultados se realizó durante siete días contando diariamente el número de larvas muertas (mortalidad), y al final de los siete días se midió la longitud de cada larva y el peso promedio de las larvas vivas de cada tratamiento.



Figura 1. Unidad experimental utilizada en este estudio compuesta por un envase plástico de ½ onza, un trozo de papel absorbente, dos hojas de astromelia y una larva en primer instar de *C. decolora* (dentro del círculo).

Con los resultados preliminares obtenidos se seleccionó la pR con mayor efecto sobre las larvas de *C. decolora* para ser utilizado en la determinación de la concentración con el mayor efecto subletal: longitud y peso sobre larvas de primer instar de *C. decolora*. Se evaluaron cinco diluciones seriadas de pR (307,2, 153,6, 76,8, 38,4 y 19,2 µg/ml). Se utilizó *Bt.* HD1 en las mismas concentraciones, y los controles buffer de solubilización y agua (hojas limpias, larvas y agua). En total fueron diez tratamientos y dos controles. Se evaluaron 360 larvas de *C. decolora* sobre 720 hojas de astromelia. El bioensayo fue evaluado diariamente durante siete días.

2.7 Análisis estadístico. Se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. Los datos obtenidos fueron analizados con: i) la prueba de normalidad W de Shapiro-Wilk y ii) la prueba de homogeneidad de varianza de Levene. Posteriormente, se efectuó un análisis de varianza ANOVA para contrastar las medias de la longitud larval de los diferentes tratamientos. Para determinar las diferencias significativas entre los pares de medias, se utilizó la comparación de rangos múltiples de Duncan. Para todas las pruebas se utilizó un porcentaje del 95% de confianza.

3. RESULTADOS

3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cuantificación de las proteínas recombinantes.

Mediante la SDS-PAGE, se confirmó la presencia de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba expresadas y purificadas parcialmente a partir cada cepa recombinante de *E. coli*. Se revelaron bandas electroforéticas del peso esperado (Figura 2). En todos los carriles (2, 3, 4 y 5) se identificó una banda aproximada de 135 kDa, que también reveló *Bt.* HD1 (carril 1). Adicionalmente, se detectaron bandas de pesos moleculares menores a los esperados, cercanos a los 75 y 50 kDa en los carriles 2, 3, 4 y 5, lo que sugiere una purificación parcial de las proteínas.

Las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca, pRCry1Ba parcialmente purificadas fueron cuantificadas por el método de Bradford (1987) obteniéndose concentraciones de proteína total de 2156,96, 2016,67, 437,41 y 2573,88 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La cepa bacteriana *Bt.* HD1 utilizada como control positivo presentó concentraciones de proteína total de 1603,02. Concentraciones suficientes para realizar bioensayos.

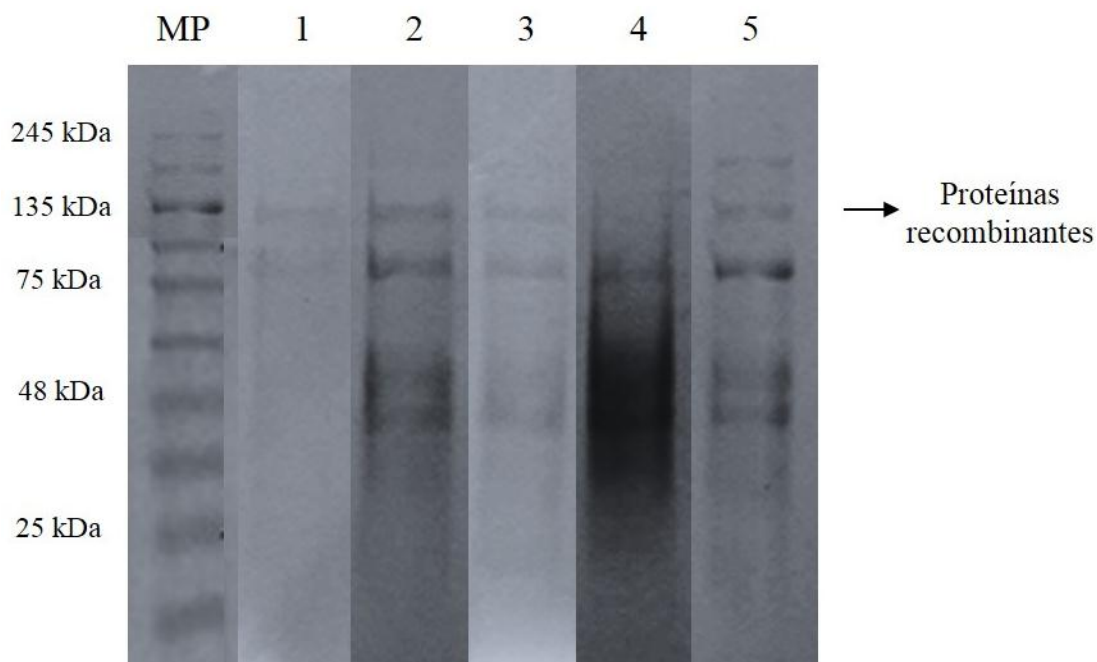


Figura 2. Perfil electroforético de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba (carriles 2, 3, 4, 5, respectivamente); *Bt.* HD1 (carril 1). Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8%, teñido con azul de Coomassie. MP) Marcador de peso molecular de proteínas Opti-Protein XL Marker marca abm (Canadá).

3.2 Efecto de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca, pRCry1Ba sobre la longitud y peso de larvas de primer instar de *C. decolora*.

El mayor efecto inhibitorio sobre la longitud y el peso medio larval lo produjo la pRCry1Ab. La longitud y peso larval en este tratamiento ($8,90 \pm 2,59$ mm y $10,23$ mg) fue inhibido en un 26,9% y 40,35%, respectivamente, comparado con los grupos control agua ($12,27 \pm 2,68$ mm y $17,90$ mg) y buffer ($12,10 \pm 2,66$ mm y $16,40$ mg) (Figura 3). La pRCry1Ab produjo el mayor porcentaje de mortalidad en larvas de *C. decolora* (10%). Las pRCry1Aa y pRCry1Ca mostraron una inhibición significativa en la longitud promedio larval ($9,52 \pm 2,59$ y $10,36 \pm 1,66$ mm, respectivamente) de 21,87% y 14,98% comparado con los controles ($P < 0,05$). Del mismo modo, la inhibición en el peso promedio fue del 37,37% y 32,71% correspondientemente. La pRCry1Ba no presentó diferencias significativas en la longitud y peso promedio larval ($12,04 \pm 2,25$ mm y $15,96$ mg, respectivamente), ya que la inhibición

en longitud y peso fue de 1,19% y 6,9%, respectivamente, respecto a los controles ($P>0,05$) (Figura 3). Los tratamientos de proteínas recombinantes Cry1Ca y Cry1Ba presentaron mortalidad del 7%, a diferencia de la pRCry1Aa que no tuvo efecto sobre esta variable.

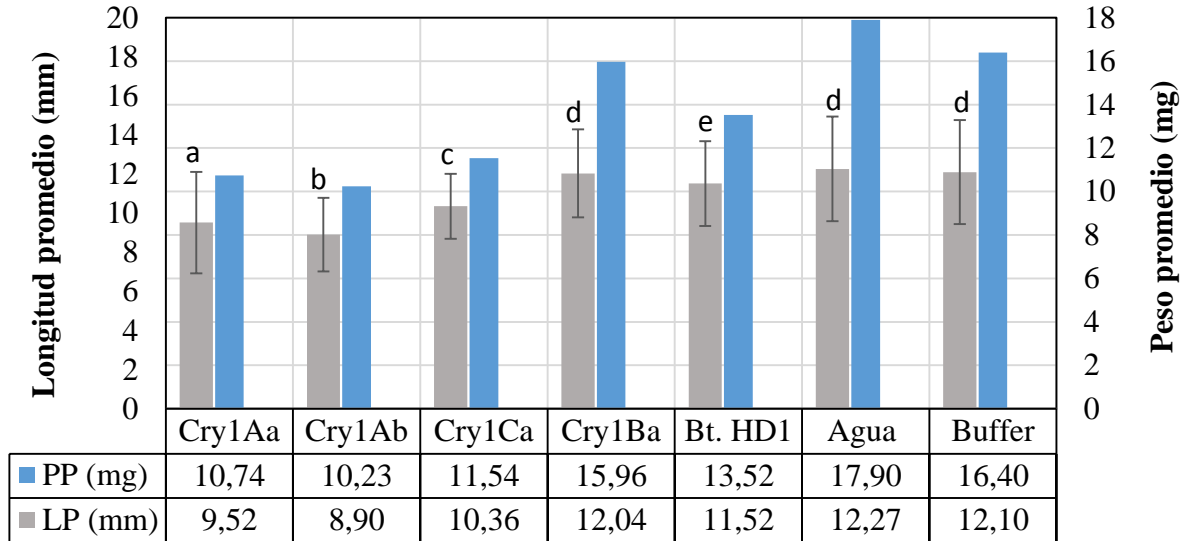


Figura 3. Longitud y peso promedio en larvas de primer instar de *C. decolora* observadas después de siete días de evaluación con los tratamientos de proteínas recombinantes, *Bt.* HD1 y controles agua y buffer. Valores de longitud con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $P>0,05$). (Shapiro-Wilk, $P>0,05$; Levene, $P>0,05$; ANOVA, $P<0,05$). La desviación estándar de la longitud promedio fue tomada de las mediciones larvales individuales de cada tratamiento, mientras que el peso promedio fue tomado del conjunto de larvas de cada tratamiento.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la pRCry1Ab para realizar un segundo bioensayo utilizando cinco concentraciones diferentes de la toxina y conocer específicamente su efecto sobre la mortalidad, la longitud y el peso en larvas de primer instar de *C. decolora*.

3.3 Efecto de la pRCry1Ab sobre la longitud y el peso de larvas de primer instar de *C. decolora* a diferentes concentraciones de la proteína.

Se evaluaron las concentraciones 19,2, 38,4, 76,8, 153,6 y 307,2 $\mu\text{g/ml}$ de la pRCry1Ab. Se utilizó la cepa *Bt.* HD1 como control positivo en las mismas concentraciones y los controles agua y buffer de solubilización (Figura 4). La pRCry1Ab y el control *Bt.* HD1 produjeron una inhibición larval significativa en la longitud y el peso de *C. decolora* a medida que se aumentó la concentración de cada tratamiento al final del séptimo día comparado con los controles agua y buffer ($P<0,05$) (Figura 4). Se observó que el efecto inhibitorio en

la longitud promedio con la pRCry1Ab a la mayor concentración (307,2 µg/ml) fue significativamente menor ($10,82 \pm 1,61$ mm) a los controles agua ($13,27 \pm 2,16$ mm) y buffer ($13,31 \pm 1,92$ mm) en un 19,85% ($P < 0,05$). No obstante, el porcentaje de inhibición en la longitud larval con la pRCry1Ab a la menor concentración (19,2 µg/ml) fue únicamente del 6,7% ($12,40 \pm 2,10$ mm) respecto a los controles agua y buffer (Figura 4). La mayor inhibición de la longitud larval en *C. decolora* con las cepas *Bt.* HD1, también se observó con las mayores concentraciones evaluadas (153,6 µg/ml) y (307,2 µg/ml), mostrando una inhibición significativa aproximada del 26% respecto a los controles agua y buffer ($P < 0,05$). La mortalidad de las larvas de *C. decolora* con la pRCry1Ab y la cepa *Bt.* HD1 no fue considerada como variable afectada por los tratamientos debido a que fue baja (entre 0 y 10%).

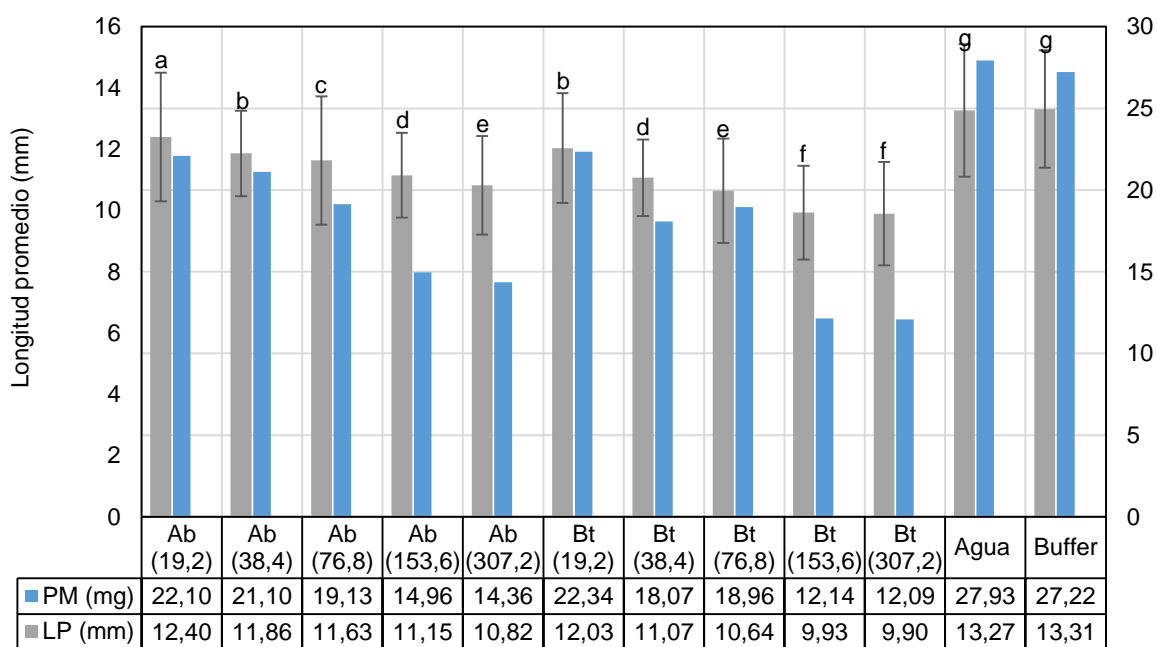


Figura 4. Longitud y peso promedio en larvas de primer instar de *C. decolora* observadas después de siete días de evaluación con los tratamientos de las pRCry1Ab y *Bt.* HD1 y controles agua y buffer. Valores de longitud con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas (Duncan, $P > 0,05$). (Shapiro-Wilk, $P > 0,05$; Levene, $P > 0,05$; ANOVA, $P < 0,05$). La desviación estándar de la longitud promedio fue tomada de las mediciones larvales individuales de cada tratamiento, mientras que el peso promedio fue tomado del conjunto de larvas de cada tratamiento.

La figura 5 representa la comparación en el crecimiento larval de *C. decolora* después de siete días de evaluación con los tratamientos de la pRCry1Ab y los controles *Bt.* HD1 y agua. Se observó una reducción significativa en la longitud y peso larval de la pRCry1Ab y en *Bt.* HD1 comparado con el control agua a medida que se aumentó la concentración de la proteína recombinante y de la cepa control positivo ($P < 0,05$). Hubo pérdida de peso y

longitud significativa con el tratamiento pRCry1Ab, pasó de 19,8 a 6,7% en peso y de 47,9 a 18,6% en longitud respecto a los controles agua y buffer ($p < 0,05$). También se identificaron coloraciones larvales verdes claras y oscuras, franjas longitudinales blancas y cápsulas cefálicas de color café-amarillento con manchas cafés. Esta identificación morfológica concuerda con lo reportado por Moreno y Serna (2006) donde describen los diferentes estadios de desarrollo de *C. decolora*.
















Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/ml}$ de extracto de proteína)				
	19,2	38,4	76,8	153,6	307,2
pRCry1Ab					
	$12,40 \pm 2,10 \text{ mm}$	$11,86 \pm 1,39 \text{ mm}$	$11,63 \pm 2,09 \text{ mm}$	$11,15 \pm 1,38 \text{ mm}$	$10,82 \pm 1,61 \text{ mm}$
<i>Bt.</i> HD1					
	$12,03 \pm 1,79 \text{ mm}$	$11,07 \pm 1,25 \text{ mm}$	$10,64 \pm 1,70 \text{ mm}$	$9,93 \pm 1,53 \text{ mm}$	$9,90 \pm 1,68 \text{ mm}$
Agua					
	$13,27 \pm 2,16 \text{ mm}$				

Figura 5. Larvas de *C. decolora* a los siete días de evaluación con los diferentes tratamientos con la pRCry1Ab, *Bt.* HD1 y el control agua.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cuantificación de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca, pRCry1Ba.

Las bandas electroforéticas en todos los carriles corresponden al peso esperado ($\sim 135 \text{ kDa}$) para las proteínas recombinantes Cry. Dichas bandas se asocian al tamaño de las proteínas Cry1 que poseen actividad contra insectos lepidópteros (Hofte y Whiteley, 1989; Mohan y Gujar, 2003; Hernández, 2016).

La intensidad de las bandas electroforéticas se relacionan con las concentraciones de las proteínas recombinantes establecidas. La pRCry1Ba mostró una banda fuerte que corresponde a la mayor concentración señalada, seguido de las pRCry1Aa, pRCry1Ab y

pRCry1Ca con bandas más tenues y concentraciones menores. La visualización de las proteínas recombinantes y de otras proteínas con pesos moleculares menores (75 y 50 kDa aproximadamente), permitió evidenciar la pureza parcial realizada, ya que las proteínas de menor peso molecular se asociaron con la presencia de algunas proteínas que poseen las cepas *E. coli* DH5a y *E. coli* JM103.

4.2 Efecto de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca, pRCry1Ba sobre la longitud y peso de larvas de primer instar de *C. decolora*.

Este es el primer estudio realizado sobre los efectos de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba de *B. thuringiensis* en larvas de primer instar de *C. decolora*. Estas proteínas Cry fueron seleccionadas porque su actividad contra especies del orden Lepidóptera está bien establecida (Bravo, 1997; van Frankenhuyzen, 2009). La concentración utilizada en este bioensayo (4,8 µg/ml) se seleccionó teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Avilla *et al.* (2005), Pitre *et al.* (2008) y Ramírez *et al.* (2010), quienes determinaron la CL₅₀ para la cepa de referencia *Bt* var. *kurstaki* HD1 con valores menores a 6 µg de proteína/ml sobre larvas de *Tecia solanivora*, *Tuta absoluta* (Lepidóptera: Gelechiidae) y *Helicoverpa armigera* (Lepidóptera: Noctuidae).

En el bioensayo realizado, la mortalidad obtenida de las larvas de *C. decolora* fue despreciable (<10%), sin embargo, las pRCry1Ab, pRCry1Aa y pRCry1Ca presentaron efecto inhibitorio significativo en la longitud y el peso larval. Aunque la mortalidad no fue resultado suficiente para la estimación de la concentración letal 50 (LC₅₀), se infiere que hubo un comportamiento de alimentación reducido en las hojas de astromelia, que se asocia directamente con la reducción del crecimiento de los individuos de *C. decolora*, así como lo informan Ibargutzi *et al.* (2006) en *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae). En este sentido, Van Frankenhuyzen (2009) considera que efectos subletales como la inhibición de la alimentación y la reducción del crecimiento, son los indicadores más sensibles de la toxicidad de las proteínas Cry de *Bt*. Aunque el 95% de los bioensayos usa como variable de respuesta el porcentaje de mortalidad (van Frankenhuyzen, 2009), nuestros resultados concuerdan con dicho autor donde las pRCry1Aa, pRCry1Ab y pRCry1Ca, tuvieron mayor efecto sobre el crecimiento y desarrollo larval en comparación con la mortalidad obtenida en las larvas de *C. decolora* a los siete días de tratamiento. Demostrando que la actividad de las proteínas Cry sobre especies plaga va más allá de la mortalidad, y que la inhibición del crecimiento larval también es una variable sensible a tener en cuenta (Waquil *et al.*, 2004).

Otros autores también han utilizado la inhibición del crecimiento larval como variable sensible para determinar el efecto de las proteínas Cry individuales de *Bt* en especies plaga. Por ejemplo, Avilla *et al.* (2005) señalaron que de once proteínas Cry evaluadas, únicamente dos (Cry1Ac4 y Cry2Aa1 con concentraciones de 3,5 y 6,3 µg/ml

respectivamente) produjeron efectos significativos en la mortalidad larval de *Helicoverpa armígera*, y que el resto de las toxinas, mostraron únicamente inhibición en el crecimiento larval (entre 20 y 100%). Huang *et al.* (2006) determinaron que larvas en primer instar de *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea saccharalis* y *Diatraea grandiosella* en dietas de proteína Cry1Ab menores a 0,125 mg/kg presentaron baja mortalidad (<8%), mientras que la inhibición en el crecimiento larval a la misma concentración fue significativa para las tres especies (entre 38 y 100%). Siegfried *et al.* (2000), también describieron que la mortalidad larval de *Helicoverpa zea* a una concentración de 50 ng/ml de proteína Cry1Ab fue del 20% y el observado en la inhibición del crecimiento larval aproximadamente del 75%. Ayra-Pardo *et al.* (2006) mostraron que la toxina Cry1Ca no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad larval de *Spodoptera frugiperda* a una concentración superior a 3000 ng/ml, pero sí mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento larval a concentraciones superiores a 1 µg/ml. Liao *et al.* (2002) clasificaron a las proteínas Cry9Aa y Cry1B como no tóxicas debido a que causaron baja mortalidad (8%) a una concentración mayor a 4000 ng/ml en larvas de *H. armigera*, sin embargo, el 50% de la población presentó un efecto severo en su tasa de crecimiento. Por otro lado, autores como Marçon *et al.* (1999), Liao *et al.* (2002), Li *et al.* (2005) y Storer *et al.* (2010) observaron un efecto negativo severo (50%) de la toxina Cry1Ab sobre el crecimiento larval de *O. nubilalis*, *H. armigera* y *S. frugiperda* a concentraciones menores a 1,33, 16, 0,9 y 100 ng/ml de proteína respectivamente. Finalmente Waquil *et al.* (2004) predijeron la inhibición del crecimiento larval de *S. frugiperda* en un 91 y 89% con las proteínas Cry1Ab (689,81 ng/ml) y Cry1F (36,46 ng/ml) respectivamente, porcentajes mucho mayores a los que causaron la mortalidad del 50% de la población.

De acuerdo con lo observado en este primer bioensayo (dosis única: 4,8 µg/ml de pR), el tratamiento de la pRCry1Ab produjo el mayor efecto inhibitorio sobre la reducción en longitud y peso en las larvas de *C. decolora* a los siete días de tratamiento respecto a los controles agua y buffer, seguido de los tratamientos con las pRCry1Aa y pRCry1Ca. Entre tanto, la pRCry1Ba no presentó diferencias estadísticamente significativas en la longitud promedio larval respecto a los controles, clasificándose como el tratamiento que no causó efecto inhibitorio significativo en las larvas de primer instar de *C. decolora*. Este efecto diferencial visto entre las diferentes pRs se ha demostrado para otras plagas de insectos, incluyendo algunas especies de la familia Noctuidae. Un informe sobre la especie *Earias vitella* (Lepidoptera: Noctuidae) también indicó que la proteína Cry1Ab (0,47 ng/ml de proteína) fue más tóxica comparada con la proteína Cry1Aa (0,59 ng/ml de proteína) sobre larvas de dicha plaga (Kranthi *et al.*, 1999). Igualmente, Ibargutxi *et al.* (2006) encontraron que Cry1Ab (0,45 ng/ml de proteína) fue la proteína más tóxica entre proteínas de la familia Cry1A evaluadas sobre larvas de *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae). Este efecto evidentemente trae como consecuencia una disminución de la viabilidad de los individuos y un deterioro de la población del insecto para la próxima generación (Carmona, 2002). En cuanto a los resultados encontrados con la pRCry1Ba, la baja actividad contra *C. decolora* también se evidencia con lo descrito por otros autores para *Mamestra brassicae*,

Spodoptera exigua, *Agrotis ipsilon* (Gilliland *et al.*, 2002; Hernández-Martínez *et al.*, 2008), *Actebia fennica* (van Frankenhuyzen *et al.*, 1993), *H. armigera*, *Helicoverpa punctigera* (Liao *et al.*, 2002), *H. zea*, *H. virescens*, *S. frugiperda* y *Spodoptera littoralis* (van Frankenhuyzen, 2009), todas especies de la familia Noctuidae al igual que *C. decolora*.

Algunas de las proteínas que mostraron mayor efecto sobre las larvas de *C. decolora* (Cry1Aa y Cry1Ab) son sintetizadas por la cepa HD1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, utilizada como control positivo en los bioensayos, y que es el ingrediente activo de muchos bioinsecticidas formulados para el control de plagas (Venette y Gould, 2006). Evidentemente, en el primer bioensayo la actividad de la cepa *Bt.* HD1 contra *C. decolora* fue menor, comparada con dichas proteínas por separado, así que probablemente el bajo efecto es debido a la presencia simultánea de ambas proteínas de *Bt.*, como lo señalan Ibargutzi *et al.* (2006) con *E. insulana*. También Bohorova *et al.* (1997) determinaron que la proteína Cry1Ab fue más tóxica sobre larvas de *S. frugiperda* que el conjunto de las proteínas que contiene la cepa *Bt.* HD1 combinadas (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac), presentando un porcentaje de mortalidad del 40% y 15% respectivamente. De la misma forma, la proteína Cry1Ab causó mayor mortalidad sobre larvas de *H. zea* que el conjunto de proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac con un 50% y 13% de mortalidad respectivamente (Bohorova *et al.*, 1997). En ese sentido, la presencia de la proteína Cry1Ab pudo conducir a una disminución del efecto de las otras proteínas que componen a *Bt.* HD1.

4.3 Efecto de la pRCry1Ab sobre la longitud y el peso de larvas de primer instar de *C. decolora* a diferentes concentraciones de la proteína.

Las concentraciones establecidas para el segundo bioensayo (19,2, 38,4, 76,8, 153,6 y 307,2 µg/ml) fueron seleccionadas debido a que previamente (en el primer bioensayo) ningún tratamiento presentó mortalidad del 100% y éstas probablemente podrían mejorar las propiedades tóxicas generales de las proteínas Cry contra *C. decolora*.

La inhibición de la longitud y peso de las larvas de *C. decolora* entre la pRCry1Ab y *Bt.* HD1 en la segunda evaluación no fue significativamente diferente ya que los valores de longitud y peso se traslaparon entre los tratamientos. Así que es posible que tanto el tratamiento de la pRCry1Ab como la cepa *Bt.* HD1 presenten igual afinidad hacia el efecto causado en *C. decolora* a medida que se incrementa la concentración de la proteína recombinante. Por ejemplo, Liao *et al.* (2002) determinaron que las proteínas contenidas en *Bt.* HD1 no tuvieron resultados significativamente diferentes respecto a las proteínas evaluadas Cry1B, Cry1C y Cry1E sobre *H. armigera*.

Se debe tener en cuenta que la masa de la dieta total consumida con una metodología de aplicación específica de la proteína Cry, puede interferir en el acceso de la proteína insecticida al epitelio intestinal del insecto (Liao *et al.*, 2002). Es por esto que el tipo de

bioensayo utilizado en este estudio pudo variar en su precisión y reproducibilidad. Con el método de aplicación de la contaminación superficial, *C. decolora* probablemente pudo evitar la ingestión de la proteína recombinante aplicado en la superficie de las hojas de astromelia y pudo haber consumido a través de la superficie directamente del parénquima de las hojas (Liao *et al.*, 2002). Sin embargo, Liao *et al.* (2002) utilizaron este método para *H. armígera* y *H. punctigera* (Lepidóptera: Noctuidae) y estuvo dentro de los límites aceptables. No obstante, el método de la incorporación directa a la dieta podría presentar mejores resultados sobre larvas de *C. decolora* como lo describe van Frankenhuyzen (2009) para diversas familias de lepidópteros. Van Frankenhuyzen (2009) también señala que el proceso proteolítico del intestino medio de un insecto puede afectar la especificidad de las proteínas Cry y que la solubilización y activación de las proteínas antes de la ingestión, puede tener efectos positivos sobre la toxicidad, como por ejemplo daños histopatológicos en las células columnares del epitelio intestinal del insecto (Herrero *et al.*, 2001). Probablemente si se hubiera realizado la activación de las proteínas Cry previamente al bioensayo, los resultados de la mortalidad larval de *C. decolora* hubieran aumentado.

Varios autores destacan que la variabilidad y origen de las poblaciones de las especies de insectos, las proteínas utilizadas, la naturaleza de las proteínas, el protocolo usado, la pureza de las proteínas y el método para estimar la concentración de las proteínas, son características importantes para determinar el efecto de las toxinas Cry en un insecto plaga (González-Cabrera *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2002; Avilla *et al.*, 2005; Monnerat *et al.*, 2006; dos Santos *et al.*, 2009; van Frankenhuyzen, 2009; Pérez-Guerrero *et al.*, 2011). Con el fin de evitar variabilidad y errores en los resultados, Ibargutxi *et al.* (2006) y Liao *et al.* (2002) proponen evaluar varias poblaciones del insecto plaga con los mismos parámetros, ya que por ejemplo, Wu *et al.* (1999) y Liao *et al.* (2002) encontraron diferencias significativas en la toxicidad de la proteína Cry1Ac sobre varias poblaciones de *H. armígera*. De acuerdo con lo dicho por estos autores, se recomienda para este y próximos estudios, determinar con los mismos parámetros la toxicidad de las proteínas Cry sobre varias poblaciones de *C. decolora*.

A parte de las proteínas usadas en este estudio, otras toxinas han sido identificadas como eficaces para controlar a diversos lepidópteros plaga. Se destacan las toxinas Cry1AK, Cry1Bd1, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Ea2, Cry1Ea4, Cry1Fa, Cry1Gb1, Cry1Ia1, Cry1Ja, Cry1Ka1, Cry2Aa1, Cry2Aa2, Cry2Ab1, Cry2Ab2, Cry2Ac1, Cry7B, Cry8D, Cry9Aa1, Cry15Aa1, Cry22A, Cry32A, Cry51A, entre otras (Hernández y López, 2011; Palma *et al.*, 2014; van Frankenhuyzen, 2009). Debido a que, en los bioensayos realizados previamente, la mortalidad obtenida en las larvas de *C. decolora* no fue significativa, se propone evaluar la mortalidad e inhibición del crecimiento larval con alguna de las proteínas descritas, con el fin de potencialmente seleccionarlas y clasificarlas según su capacidad de producir un efecto letal o subletal sobre *C. decolora*.

5. CONCLUSIONES

Se realizó la expresión y purificación parcial de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba a partir de las cepas recombinantes de *E. coli* según lo observado en la SDS-PAGE. La presencia de bandas electroforéticas de 135 kDa coinciden con la banda típica que presenta la familia Cry1 del control positivo *Bt.* HD1.

C. decolora es susceptible por su inhibición en el crecimiento de peso y longitud a las proteínas recombinantes Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ca a una concentración de 4,8 ug/ml. La pRCry1Ab fue significativamente más activa que todas las demás (pRCry1Aa, pRCry1Ca y pRCry1Ba) incluyendo el control *Bt.* HD1. No obstante, cuando se aumentó la concentración de la pRCry1Ab y *Bt.* HD1, ambas presentaron efecto inhibitorio sobre la longitud y peso larval de *C. decolora* después de siete días de tratamiento.

Se recomienda realizar estudios del efecto de las proteínas Cry evaluadas empleando concentraciones superiores a 307,2 ug/ml que permitan definir la CL₅₀, con el fin de apoyar acciones de manejo integrado para el control de *C. decolora* y que brinden una posible solución ante el uso de insecticidas de origen químico.

Este es el primer estudio que evalúa el efecto de las pRCry1Aa, pRCry1Ab, pRCry1Ca y pRCry1Ba de *Bt* contra larvas de primer instar de *C. decolora* y dicha información servirá como punto de referencia para el despliegue de conocimiento hacia la actividad bioinsecticida de otras proteínas Cry contra esta plaga.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Oficina de Investigación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Agradecemos al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, Sede Tibaitatá, Mosquera) y a la Dra. Gloria Vidal Córdoba por realizar la cría en laboratorio de *C. decolora*. Los autores agradecen al Dr. Daniel R Zeigler del Bacillus Genetic Stock Center (Universidad del Estado de Ohio, Ohio) por proporcionar las cepas recombinantes de *E. coli*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Angulo, A. y Olivares, T. 2003. Taxonomic update of the species of *Copitarsia* Hampson 1906. (Lepidoptera: Noctuidae: Cuculliinae). En: *Gayana Zoologica*. 67(1): 33-38.

Avilla, C., Vargas-Osuna, E., González-Cabrera, J., Ferré, J. y Gonzalez-Zamora, J. 2005. Toxicity of several delta endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90: 51–54.

Ayra-Pardo, C., Rodríguez-Cabrera, L., Fernández, Parlá, Y. y Téllez-Rodríguez, P. 2006. Increased activity of a hybrid *Bt* toxin against *Spodoptera frugiperda* larvae from a maize field in Cuba. *Biotecnología Aplicada*. 23:236-239

Barrientos-Hernández, I., Hernández, R. y Cibrián-Tovar, J. 2011. Tasa de liberación de la feromona sexual de *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) y capturas de machos con trampas en brócoli. *Entomotropica*. 26:47-58.

Bohorova, N., Cabrera, M., Abarca, C., Quintero, R., Maciel, A., Brito, R., Hoisington, D. y Bravo, A. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *Journal of Economic Entomology*. 90: 412–415.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemichal*. 72: 248-254.

Bravo, A. 1997. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* d-Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. *Journal of Bacteriology*. 179(9): 2793-2801.

Cabrera, L., Sánchez, J., Soberón, M. y Bravo, A. 2006. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(11): 7029-7035.

Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro*. 14(1): 3-10.

Carrera, M. 2009. Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio. Tesis de doctorado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

Castillo, E. y Angulo, A. 1991. Contribution to the knowledgment of the genus *Copitarsia* Hampson, 1906 (Lepidoptera: Glossata: Cuculliinae). En: *Gayana Zoologica*. 55(3): 227-246.

DANE. 2010. Informe de resultados, Censo de Fincas Productoras de Flores en 28 municipios de la Sabana de Bogotá y Cundinamarca 2009. Bogotá, Colombia: Recuperado del 18 de enero del 2018 de https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/flores/Informe_resultados_2009.pdf

Díaz-Gómez, O., Malo, E., Patiño-Arellano, S. y Rojas, J. 2012. Pheromone trap for monitoring *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) activity in cruciferous crops in México. *Florida Entomologist*. 95(3): 602-609.

dos Santos, K., Nieves, P., Meneguim, A., dos Santos, R., dos Santos, W., Boas, G., Dumas, V., Martins, E., Praça, L., Queiroz, P., Berry, C. y Monnerat, R. 2009. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*. 50: 157–163.

FAO. 2002. Glosario de términos fitosanitarios. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 20 de enero del 2018 de: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2016/06/ISPM_05_2016_Es_2016-06-23_FullReviewLRG-CPAM.pdf.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria). 2010. Resultados y Lecciones en Uso de Semioquímicos en el Control de la Cuncunilla de las Hortalizas (*Copitarsia decolora*). Recuperado del 15 de marzo del 2018 de https://www.opia.cl/static/website/601/articles-75510_archivo_01.pdf.

Gilliland, A., Chambers, C., Bone, E. y Ellar, D. 2002. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 1509–1515.

González-Cabrera, J., Herrero, S., Sayyed, A., Escriche, B., Liu, Y., Meyer, S., Wright, D., Tabashnik, B. y Ferré, J. 2001. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Applied Environmental Microbiology*. 67(10): 4610–4613.

Gould, J., Simmons, R. y Venette, R. 2013. *Copitarsia* spp.: Biology and Risk Posed by Potentially Invasive Lepidoptera from South and Central America. En: Peña, J. (Ed.), Potential invasive pests of agricultural crops (pp.160-182). Florida, USA: CABI.

Hernández, J. y López, S. 2011. *Bacillus thuringiensis*: soil microbial insecticide, diversity and their relationship with the entomopathogenic activity. En: Miransari, M. (ed.) Soil Microbes and Environmental Health. Nova Science Publishers, Bogotá, Colombia, pp. 59-80.

Hernández, J. 2016. *Bacillus thuringiensis*: a natural tool in Insect Pest Control. En: Gupta *et al.* (ed.). The Handbook of Microbial Bioresources. CABI publishers, UK.

Hernández-Martínez, P., Ferré, J., Escriche, B. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 245–250.

Hernández, E. 2013. Actividad biológica de cinco especies vegetales sobre *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.

- Herrero, S., Oppert, B. y Ferré, J. 2001. Different mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1085-1089.
- Huang, F., Leonard, R. y Gable, R. 2006. Comparative Susceptibility of European Corn Borer, Southwestern Corn Borer, and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab Protein in a Commercial *Bacillus thuringiensis* Corn Hybrid. *Journal of Economic Entomology*. 99(1): 194-202.
- Ibargutxi, M., Estela, A., Ferré, J. y Caballero, P. 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxins for Control of the Cotton Pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1): 437-442.
- Ibiza-Palacios, M. 2015. Bases de la resistencia a preparados bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* en diferentes especies de insectos (tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Izquierdo, L. 2011. Actividad de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tuta absoluta*. (Tesis de maestría). Universidad de Valencia. Valencia, España.
- Kranthi, S., Kranthi, K. y Lavhe, N. 1999. Baseline toxicity of Cry1A toxins to the spotted bollworm, *Earias vitella*. *Crop Protection*. 18(9): 551–555.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R. Huang, F., Buschman, L. y Zhu, K. 2005. Susceptibility of Dipel-Resistant and -Susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Individual *Bacillus thuringiensis* Protoxins. *Journal of Economic Entomology*, 98(4):1333-1340.
- 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): 55-63.
- López, S. y Cerón, J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA*. 8(14): 121-240.
- Marçon, P., Yong, L., Steffely, K. y Siegfried, B. 1999. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*. 92(2): 279-285
- Mena, J. y Hernández, J. 2017. Brasicáceas y perspectivas de control biológico del insecto plaga *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) utilizando *Bacillus thuringiensis*. *Revista Mutis*. 7(2): 7-22.

- Mohan, M. y Gujar, G. 2003. Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 1-11.
- Moreno, O. y Serna, F. 2006. Biología de *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae: Cuculliinae), en flores cultivadas del híbrido comercial de *Alstroemeria spp.* *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 59 (1): 3257-3270.
- Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Ordúz, S., Jarmacinamillo, G., Benintende, G., Cozzi, J., Dolores-Real, M., Martínez-Ramírez, A., Rausell, C., Cerón, J., Ibarra, J., Del Rincón-Castro M., Espinoza, A., Meza-Basso, L.,
- Muñiz-Reyes, E., Cibrián-Tovar, J., Rojas-León, J., Diaz-Gomez, O., Valdés-Carrasco, J. y Bautista-Martinez, N. 2007. Captures of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae) with traps baited with varying ratios of sex pheromones. *Agrociencia*. 41:575-581.
- Oerke, C. y Dehne, H. 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*. 23: 275-285.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C, Murillo, J. y Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. 6(12): 3296-3325
- Paz, H., Rodríguez, M., González, D., Galarza, C. y Torrado-León, E. 2008. Control de *Copitarsia decolora* en cultivos de flores mediante la emisión de frecuencias. *Revista de Ingeniería*. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia 27:17-26.
- Pérez-Guerrero, S., Aldebis, H. y Vargas-Ozuna, E. 2011. Toxicity of several d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against the cotton pest *Earias insulana* (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Protection*. 30: 1024-1027.
- Pitre, L., Hernández-Fernández, 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 Biotecnología*. 10(2): 85-96.
- Portela-Dussán, D., Chaparro-Giraldo, A. y López-Pazos, S. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 11(20): 87-96.
- Puentes, D. 2015. Prácticas de monitoreo de plagas y enfermedades en finca productora de alstroemeria. (Tesis de tecnología). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
- Quimbayo, N., Serna, F., Olivares, T. y Angulo, A. 2010. Nóctuidos (Lepidoptera) en cultivos de flores colombianas. *Revista Colombiana de Entomología*. 36 (1): 38-46.

- Ramírez, L., Ramírez, N., Fuentes, L., Jiménez, J. y Hernández, J. 2010. Aislamiento y caracterización molecular y biológica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tuta absoluta* (Meyrick: Lepidoptera: Gelechiidae), insecto plaga del tomate. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. 22: 73-96.
- Rosas-García, N. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology*. 3(1):28-36.
- Sanchis, V. y Bourguet, D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. *Agronomy for Sustainable Development*. 28(1): 11-20.
- 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: 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 postcidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 775–806.
- Siegfried, B., Spencer, T. y Nearman, J. 2000. Baseline susceptibility of Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. 93: 1265–1268.
- Storer, P., Babcock, J., Schlenz, M. Meade, T., Thompson, G., Bing, J. y Huckaba, R. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to *Bt* Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*. 103(4): 1031-1038.
- van Frankenhuyzen, K., Gringorten, J., Gauthier, D., Milne, R., Masson, L. y Peferoen, M. 1993. Toxicity of activated CryI proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest lepidoptera and *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 62: 295–301.
- van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101 (1): 1-16.
- Vázquez, D. 2012. Actividad biológica de cinco especies de la familia Chenopodiaceae sobre *Fusarium* spp. y *Copitarsia decolora*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.
- Vázquez-Covarrubias, D., Jiménez-Pérez, A., Castrejón-Ayala, F., Figueroa-Brito, R. y Montes, R. 2015. Effects of five species of Chenopodiaceae on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 98(1): 80-85.

Venette, R. y Gould, J. 2006. A pest risk assessment for *Copitarsia* spp., Insects associated with importation of commodities into the United States. *Euphytica*. 148: 165–183.

Waquil, J., Vilella, F., Siegfried, B. y Foster, J. 2004. Atividade Biológica das toxinas do *Bt*, Cry1A(b) e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 3(2): 161-171.

Wu, K., Guo, Y. y Nan, L. 1999. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. *Journal of Economic Entomology*. 92: 273–278.