

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
E INMUNOLOGIA



EVALUACION DEL MARCADOR GENETICO
EaaMcta-04.70 EN *Plutella xylostella* SENSIBLE Y
RESISTENTE A TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA

JONATAN ARTURO MARROQUIN ORTEGA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MARZO DEL 2006

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY
130 St. George Street, 4th Floor
Toronto, Ontario M5S 1A5
Canada
416-978-2010
www.library.utoronto.ca

TL
SB945
.P648
M3
2006
c.1

2006

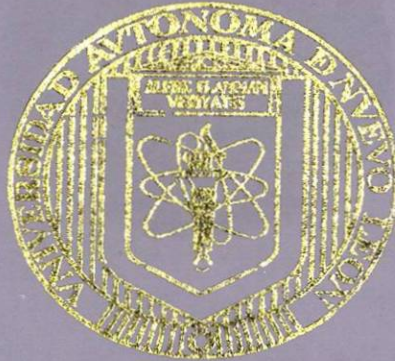


1080092005

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
E INMUNOLOGÍA



EVALUACION DEL MARCADOR GENETICO
EaaMcia-04.70 EN *Plutella xylostella* SENSIBLE Y
RESISTENTE A TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

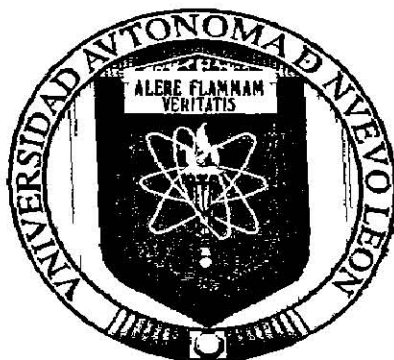
TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE BIÓLOGO

PRESENTA

JONATAN ARTURO MARROQUIN ORTEGA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., MARZO DEL 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**EVALUACIÓN DEL MARCADOR GENÉTICO EaaMcta-04.70
EN *Plutella xylostella* SENSIBLE Y RESISTENTE A TOXINAS
DE *Bacillus thuringiensis*.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE BIÓLOGO**

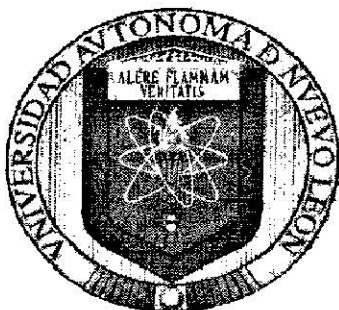
PRESENTA

JONATAN ARTURO MARROQUÍN ORTEGA

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA. N. L.

MARZO DEL 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología



Evaluación del marcador genético EaaMcta-04.70 en *Plutella xylostella* sensible y resistente a toxinas de *Bacillus thuringiensis*.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de Biólogo

Presenta

Jonatan Arturo Marroquín Ortega

Comisión de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez.

Presidente

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas.

Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong.

Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera.

Suplente

San Nicolás de los Garza. N. L. Marzo de 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología e Inmunología



Evaluación del marcador genético EaaMcta-04.70 en *Plutella xylostella* sensible y resistente a toxinas de *Bacillus thuringiensis*.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el título de Biólogo

Presenta

Jonatan Arturo Marroquín Ortega

Asesores

Interno

Dr. Benito Pereyra Alférez.

Externo

M.C. Víctor Ricardo Moreno Medina.

San Nicolás de los Garza. N. L. Marzo de 2006

No olvidar joven guerrero:

*Alguien dijo sin prisa
que los hombres no lloran
yo no se quien lo dijo
pero quiero advertir,
que el que siente en su pecho
que las penas afloran
tiene todo el derecho
de llorar y sufrir*

*El que calla su llanto
callara su alegría,
como simétrico de opuesto
de reír es llorar, como el sol
y la luna es la noche y el día,
cuando mas has sufrido más
Aprendes a amar.*

*Si contara los golpes
que me ha dado la vida
y las puertas que nunca
me quisieron abrir,
seria enorme la suma
de la inmensa medida
de castigos y engaños
que aprendí a resistir.*

*Cada no que escuchaba
se creció en mi memoria
y jamás el orgullo me dejó
claudicar, si al final del
camino encontré la victoria,
se lo debo a una cosa
la palabra ("intentar")*

¿.....?

Dedicatoria.

A DIOS quien siempre me da esperanza aun cuando la luz desaparezca en mis tormentas.

A mis Padres:

**Arturo Marroquín Marroquín.
Nidia Concepción Ortega Suárez.**

La vida, libertad, valor, honor, honestidad, lealtad y otros valores existentes, ellos los moldearon en mí a través de la vida y de los golpes que de ésta presenta una variedad inconspicua de sucesos trascendentales que forjan a un hombre.

“El mundo es de los triunfadores”

“El que no arriesga no gana”

A mi hermano:

Adrián Gerardo Marroquín Ortega.

(Por despertarme y obligarme a escribir la tesis en la casa cuando dormía)

A mis hermanas:

Cynthia Iliana Marroquín Ortega.

Nidia Zaide Marroquín Ortega.

Director de tesis:

Dr. Benito Pereyra Alférez.

Por brindarme valores tan importantes en la vida.

(La independecia y el trabajo en equipo)

“El mundo es de los más preparados”

Somos como el aire que nos lleva: violentos pero delicados, fugaces pero siempre presentes. Juntos volaremos más allá de la imaginación.

Agradecimientos.

Facultad de Ciencias Biológicas U. A. N. L.: Por impartirnos el conocimiento de los seres vivos y la necesidad de convivir sustentablemente con la naturaleza preservando y adquiriendo nuevos conocimientos para las futuras generaciones. (Mejores amigos)

Al Instituto de Biotecnología (Pentágono): Por brindarme la oportunidad de forjarme ante los mejores maestros y observar el trabajo en equipo de cada uno de estos para seguir adelante los inicios de esta gran institución. (Espero algún día regresar a impartir y compartir los conocimientos del transcurso de mi vida)

Dr. Víctor Ricardo Moreno Medina: Director externo. Por demostrarme que el trabajo a veces está lejos de casa y de la familia. Gracias por enseñarme a utilizar el secuenciador del Centro de Biotecnología de Reynosa.

Dr. Bujanos: Por aportar material biológico (larvas de *Plutella xylostella* S y R) y permitirnos realizar los bioensayos en las instalaciones del INIFAP Celaya.

Dr. Juan Ferré: Por aportar material biológico al proyecto. (Cepas *Bacillus thuringiensis*)

Al laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo (F.C.B.): Por proporcionarnos material biológico (*Bacillus thuringiensis*).

Al CONACYT por la beca y materiales otorgados en el proyecto **38040-N** "Análisis bioquímico y genético de la resistencia de *Plutella xylostella* a las toxinas de *Bacillus thuringiensis*".

Agradecimientos especiales

Dr. Benito Pereyra Alférez: Director interno. Responsable del laboratorio 4 BIOLOGIA MOLECULAR Y GENETICA del instituto de biotecnología, F.C.B. U.A.N.L. por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio.

M.C. Víctor E. Aguirre Arzola.

M.C. Andrea G. Alcázar Pizaña.

Biol. Roberto Jesús de la Garza Ortiz.

Por dedicarme apoyo, tiempo y lo más importante conocimiento.

Biol. Arturo Almanza Escalante.

Biol. Jesús Rodolfo Ambriz Zavaleta.

Biol. Cynthia López Montoya.

A mis mejores amigos por apoyarme en el transcurso de este proyecto.

(Son como mis hermanos)

A mi madre: Nidia Concepción Ortega Suárez. Por brindarnos apoyo en tiempos difíciles de la vida.

A mi padre: Por que siempre estas a mi lado.

A todos ustedes..... muchas gracias.

Jonatan Arturo Marroquín Ortega



Este estudio se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. en conjunto con las Instalaciones del INIFAP Celaya y del Instituto de Biotecnología de Reynosa, Instituto Politécnico Nacional.

Parte de este trabajo fue presentado en el ^congreso Internacional de Biotecnología "Habana 2005" en la Habana, Cuba.

Índice

Resumen	v
1.0 Introducción	1
2.0 Hipótesis y objetivos	3
2.1 Hipótesis.....	3
2.2 Objetivo general.....	3
2.2.1 Objetivos particulares.....	3
3.0 Antecedentes	4
3.1 Generalidades.....	4
3.2 Resistencia.....	6
3.2.1 Resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
3.2.1.1 Casos de resistencia de <i>Plutella xylostella</i>	7
3.2.2 Mecanismos de resistencia.....	7
3.2.3 Marcadores genéticos.....	8
4.0 Materiales	9
4.1 Material biológico.....	9
4.1.1 Insectos.....	9
4.1.2 Cepas bacterianas.....	9
4.1.3 Formulado a base de Bt.....	9
5.0 Métodos	10
5.1 Bioensayos.....	10
5.2 Extracción de DNA.....	10
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
5.4 Amplificación aleatoria de DNA (RAPD's).....	12

5.5 Electroforesis.....	14
5.6 Clonación.....	15
5.6.1 Transformación.....	15
5.7 Selección de colonias transformadas.....	15
5.8 Método de lisis alcalina.....	16
5.9 Secuenciación.....	16
5.10 Comparación de secuencias.....	16
6.0 Resultados.....	17
6.1 Insectos.....	17
6.2 Extracción de DNA.....	18
6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
6.4 Clonación y transformación.....	22
6.5 Extracción de DNA plasmídico y PCR.....	22
6.6 Secuenciación.....	24
6.7 Amplificación aleatoria de DNA (RAPD's).....	27
7.0 Discusión.....	30
8.0 Conclusión.....	32
9.0 Análisis y perspectivas de investigación.....	33
10.0 Literatura citada.....	34
Apéndice de abreviaturas.....	I
Apéndice de instrumental, reactivos y soluciones.....	IV
Apéndice de <i>Plutella xylostella</i>	VII
Apéndice de la familia de las Crucíferas.....	XIII

Índice de tablas y figuras

Tablas.

I	Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	9
II	Iniciadores. (PCR).....	11
III	Mezcla de reacción. (PCR).....	12
IV	Iniciadores de la serie OPA.....	13
V	Mezcla de reacción. (OPA).....	13
VI	Gel de poliacrilamida. (5 %).....	14
VII	Mezcla de clonación.....	15
VIII	Concentración letal media de colonias de <i>P. xylostella</i>	17
IX	Presión selectiva a larvas resistentes. (Xentari™).....	17

Figuras

1	Modo de acción de las toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	5
2	Localización del marcador genético EaaMcta-4.70.....	8
3	Programa de amplificación. (PCR).....	12
4	Programa de amplificación. (RAPD's).....	13
5	Purificación de DNA de Insecto. (<i>Spodoptera exigua</i>).....	18
6	PCR a partir de DNA de insectos: <i>P. xylostella</i> , <i>S. exigua</i>	19
7	PCR a partir de DNA de insectos: <i>P. xylostella</i> , <i>S. exigua</i> , <i>Trichoplusia ni</i>	20
8	PCR a partir de DNA de insectos: <i>P. xylostella</i> , <i>Trichoplusia ni</i>	21
9	Repetición: PCR a partir de DNA de <i>P. xylostella</i> positiva.....	21

10	Cepa Top10 de <i>E. coli</i> transformadas con el vector TOPO / TA.....	22
11	Extracción de DNA plasmídico.....	23
12	PCR a partir de DNA plasmídico.....	23
13	DNA plasmídico digerido con EcoRI.....	24
14	Secuencia consenso de 330 pb.....	24
15	Mapa de restricción de secuencia consenso 330 pb.....	25
16	Mapa de restricción de la secuencia reportada 320 pb.....	25
17	Comparación de secuencias de 330 pb vs. reportada 320 pb en BLAST.....	26
18	Análisis de secuencias de 2 colonias (Clustal X 1.04).....	27
19	PCR de diversos iniciadores OPA.....	28
20	PCR de iniciador OPA 09.....	28
21	PCR de iniciador OPA 010.....	29

Resumen.

En el presente estudio analizamos la caracterización genética de colonias de *P. xylostella* resistentes a diversos formulados de Bt por medio del marcador genético EaaMcta-04.70 en el período 2002 - 2005.

Una herramienta indispensable para este proyecto es el empleo del bioensayo, importante para determinar la dosis letal media (LC₅₀) de las colonias seleccionadas y conocer con exactitud la cuantía de insecticida a emplear, en caso de contingencia para una posterior merma de poblaciones. Los valores de LC₅₀ obtenidos de las 3 poblaciones de *P. xylostella* (Tabla VIII) demuestran susceptibilidad al formulado comercial Xentari™ y las sobrevivientes, fueron sometidas a tratamiento bajo presión selectiva (Tabla IX) mediante el uso del mismo formulado, demostrando un incremento significativo en el valor de la LC₅₀, disminuyendo la susceptibilidad (aumento en la resistencia) de la población norte hasta llegar a una concentración de 200 X. (Bujanos *et al.*, 2000)

Los resultados de la extracción a partir del DNA de *P. xylostella*, *T. ni* y *S. exigua*, nos muestran, que en presencia de RNasa se obtenía un DNA más integro y puro, eliminando así el RNA (Waldschmith *et al.*, 1997).

Después de comprobar la presencia del DNA, se prosiguió a buscar el marcador de resistencia EaaMcta-4.70 por medio de la PCR. (Heckel *et al.*, 1999) Los resultados de las larvas de *P. xylostella* sensible, *S. exigua* y *T. ni*, no presentaron el fragmento esperado de 320 pb a diferencia de *P. xylostella* resistente. Identificado el marcador de resistencia, se analizó el DNA de larvas obtenidas bajo presión selectiva, obteniendo la banda de 320 pb en estas. Este resultado fue consistente en otra repetición, de igual forma obtuvimos una larva resistente que no presentó el marcador.

Una vez comprobada la presencia del marcador genético por medio de la PCR, se escogió una alícuota de DNA de *P. xylostella* obtenida bajo presión selectiva procediendo a clonarlo en el vector TOPO TA pCR4. Obtenidas las clonas transformadas, se procedió a extraer DNA plasmídico, para posteriormente realizar la comprobación del fragmento de 320 pb mediante la técnica de la PCR y ensayos de restricción con la enzima EcoRI.

Confirmada la presencia del fragmento se procedió a extraer DNA plasmídico de colonias transformadas, para secuenciarlo en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. La secuencia obtenida fue analizada y comparada con la base de datos existente (GI: 5596527) por medio de los programas computacionales DNASTAR ver 4.05, BLAST (NCBI), Clustal X 1.04. Los resultados de la secuenciación obtenida de 330 pb se comparó con la reportada por Heckel y Cols de 320 pb. Después procedimos a comparar ambas secuencias para obtener una mejor diferenciación, encontrando homología de 94 % con la secuencia reportada. Además analizamos y comparamos los sitios de restricción de las secuencias encontrando homología en 32 sitios de restricción, 12 nuevos no presentes en la reportada y 10 sitios carecientes que en la reportada están presentes. (Heckel *et al.*, 1999)

Por otra parte tratamos de encontrar nuevos marcadores genéticos en *P. xylostella* mediante la amplificación aleatoria de DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990), por medio de los iniciadores OPA. Presentando resultados negativos en esta búsqueda, debido a la presencia de bandeo común en larvas susceptibles y resistentes.

1.0 Introducción

El fenómeno de resistencia a los insecticidas químicos y biológicos reviste una gran importancia para el control de plagas de interés agrícola y salud pública. Los insectos han desarrollado resistencia contra los principales grupos de insecticidas químicos, (fosforados, carbamatos y clorinados) estimándose que más de 500 especies de insectos son resistentes a algún tipo de insecticida químico y al parecer, ésta continuará incrementándose (Georgiou y Lagunes, 1991; Gould *et al.*, 1992). Una de las alternativas para el adecuado control de insectos plaga, es el uso de bioinsecticidas, especialmente *Bacillus thuringiensis* (Bt). El éxito de esta bacteria se debe a la acción insecticida del cristal parasporal, el cual está formado por una o varias proteínas llamadas delta-endotoxina (Cry). Estas proteínas son tóxicas a diferentes órdenes de insectos principalmente: lepidópteros, dípteros, coleópteros (Aronson *et al.*, 1986) además de ciertos nemátodos y protozoarios (Feitelson *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998). El modo de acción de las toxinas de Bt en el intestino medio del insecto incluye los siguientes pasos: a) Solubilización alcalina del cristal; b) Procesamiento proteolítico de la protoxina para generar el fragmento tóxico; c) Unión de la toxina a receptores de membrana celular y d) Formación del poro en la membrana celular (Schnepf *et al.*, 1998). La aplicación de productos a base de Bt se incrementó de manera importante entre los años de 1970 y 1990 debido a su seguridad ambiental y alta especificidad y más recientemente, con la introducción de plantas transgénicas con los genes *cry1Ab*, *1Ac* y *9C*, principalmente algodón y maíz (Tabashnik *et al.*, 2000).

La aparición y evolución de la resistencia a Bt, reviste uno de los eventos más importantes en el campo del control biológico, ya sea por el uso de los compuestos tradicionales (Xentari[®], Dipel[®], Javelin[®]) o plantas transgénicas (Heckel *et al.*, 1999). La resistencia a Bt ha sido demostrada en diversos insectos a nivel de laboratorio como *Plodia interpunctella* (Oppert *et al.*, 1997), *Heliothis virescens* (Gould *et al.*, 1992), *Trichoplusia ni* (Estrada *et al.*, 1994) y solamente *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante) ha desarrollado resistencia en campo (Ballester *et al.*, 1999; Heckel *et al.*, 1999; Tang *et al.*,

1996). La aparición de resistencia en *P. xylostella* se demostró en campos agrícolas donde se han aplicado productos a base de Bt, especialmente Dipel[®] y Javelin[®] por más de 20 años. En Estados Unidos (Hawaii, Pensilvania y Florida), Filipinas, Malasia y Japón (Ferré, 2000). A la fecha, solo existe un mecanismo bien documentado sobre la resistencia de *P. xylostella*. El análisis integral de resistencia en las colonias de Hawaii, Pensilvania y Filipinas, demostró lo siguiente: en colonias susceptibles existen dos sitios de unión para Cry1Aa, uno de los cuales es compartido con Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F; y en colonias resistentes a Bt se alteró la unión de Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F al sitio común. Sin embargo, esta alteración no fue la misma para las tres colonias. En la colonia de Filipinas, la alteración redujo la unión solamente para Cry1Ab sin afectar la unión del resto. Mientras que en Hawaii y Pensilvania si fueron afectadas. Estos resultados sugieren la presencia de otros mecanismos asociados a la resistencia y no solo a la reducción en la afinidad por el receptor. (Ballester *et al.*, 1999; Ferré *et al.*, 1991).

Se han descrito marcadores genéticos como el EaaMcta-04.70 que flanquean secuencias de DNA presentes solo en colonias resistentes (Heckel *et al.*, 1999), dichos marcadores pueden ser de gran utilidad en el rastreo e identificación de nuevas cepas de insectos resistentes a los formulados existentes de Bt.

En el presente trabajo se buscará el marcador genético en colonias de *P. xylostella* obtenidas en laboratorio y campo.

2.0 Hipótesis y objetivos.

2.1 Hipótesis.

El marcador genético EaaMcta-04.70 podría estar asociado a la resistencia de *P. xylostella* a diversos formulados de *B. thuringiensis*.

2.2 Objetivo general.

Caracterizar genéticamente cepas de *P. xylostella* resistentes a diversos formulados de *B. thuringiensis* por medio del marcador genético EaaMcta-04.70.

2.2.1 Objetivos particulares.

1. Identificar las especies de insectos resistentes a formulados de *B. thuringiensis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Clonar el fragmento obtenido en el vector TOPO TA.
3. Determinar la secuencia nucleotídica.
4. Caracterizar las cepas de *P. xylostella* resistentes por medio de polimorfismos aleatorios de fragmentos amplificados (RAPD).

3.0 Antecedentes.

3.1 Generalidades.

La clase de los insectos es el grupo taxonómico más numeroso del Reino Animal y uno de los más diversificados, dentro de este grupo se encuentra una fracción señalada como vectores y plagas; dañinos de alguna manera, a los intereses del hombre. Por esto se ha buscado mermar sus poblaciones, aplicando diversas técnicas como insecticidas químicos, biológicos o induciendo la invasión de depredadores naturales. De los medios anteriores, los insecticidas han sido los más utilizados, no obstante algunos formulados químicos han fracasado por su persistencia, aparición de resistencia, residualidad, toxicidad inespecífica o bioacumulación, entre otros; por lo anterior el uso de controles biológicos para mitigar poblaciones de insectos dañinos ha cobrado una importancia y un interés mundial. Bajo la sombra de lo antepuesto, Bt es una alternativa para el control de insectos fitófagos y vectores, ya que su espectro de toxicidad no afecta a insectos benéficos, plantas u otros seres no dañinos; siendo inocuo al ser humano (Estrada y Ferré, 1994), aunando a esto su alta eficacia y especificidad (Bulla *et al.*, 1985).

Bt es una bacteria situada dentro de los bacilos Gram positivos formadores de endosporas, cuya principal característica es que durante la esporulación se encuentran uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la spora. Cada inclusión cristalina está constituida por proteínas de una o varias clases, también conocidas como δ -endotoxinas (Lecadet y Lereclus, 1984; Schnepf *et al.*, 1998). Estas endotoxinas son las que presentan la actividad insecticida.

La actividad tóxica letal de Bt ha sido comprobada en lepidópteros (Krieg y Langenbruch, 1981; Navon, 1993), dípteros (Gingrich, 1987; Goldber y Margalit, 1977; Hodgman *et al.*, 1993; Krieg y Langenbruch, 1981; Waalwijk *et al.*, 1992), coleópteros (Séller y Langenbruch, 1993; Suzuki *et al.*, 1992), himenópteros (Payne *et al.*, 1993), hemípteros (Walters y English, 1995) y neurópteros (Hillbeck *et al.*, 1998) de la clase Insecta, pero también presentan

actividad contra nematodos, protozoos, trematodos y ácaros (Feitelson *et al.*, 1992; Addison, 1993).

La acción tóxica de las δ -endotoxinas se desencadena en el mesenterón de los insectos susceptibles donde primero, por disolución, se desprenden péptidos atóxicos, protoxinas, que por acción proteolítica de enzimas se degradan a toxinas, las cuales, unidas a receptores de membrana específicos, inducen la formación de poros, por los cuales penetran cationes seguidos de agua. El exceso de agua en el citoplasma de las células epiteliales provoca una distensión excesiva, hasta que estas estallan (Matharan *et al.*, 1989; Bauer y Pankratz, 1992; Forcada *et al.*, 1999; Martínez-Ramírez *et al.*, 1999), esto origina la lisis de las células columnares que tapizan la superficie intestinal, por estas rupturas pasa el contenido altamente alcalino del mesenterón hacia la hemolinfa causando desarreglos bioquímicos y fisiológicos, con resultado final de la muerte larvaria (Pietrantonio *et al.*, 1993).

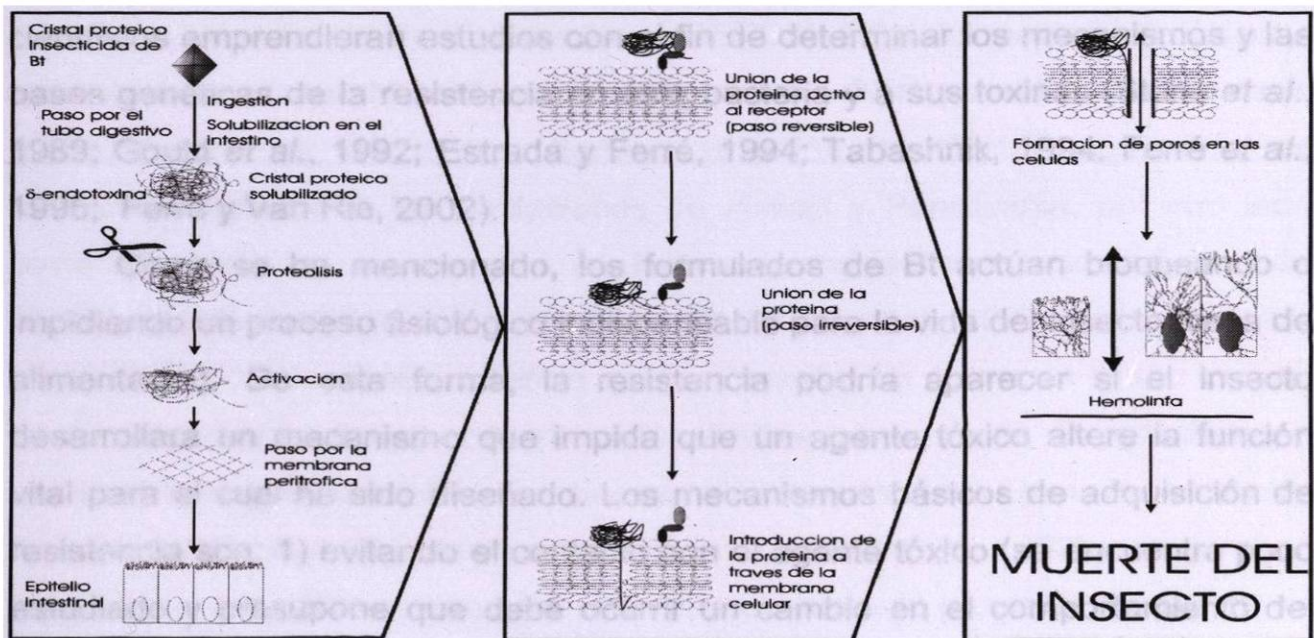


Figura 1. Diagrama general del modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*. **Panel A:** Eventos de procesamiento de los cristales de *B. thuringiensis*. **Panel B:** Mecanismo de unión al receptor en el intestino medio de la larva susceptible. **Panel C:** Integración a la membrana y formación de poro.

3.2 Resistencia.

La resistencia es definida como un cambio genético, en una población de una especie, en respuesta a la selección con tóxicos, que disminuyen el control en campo (Sawicki, 1987) a dosis recomendadas. (Moberg, 1990)

3.2.1 Resistencia a Bt.

Los productos comerciales basados en Bt han sido aplicados en los cultivos desde su aparición en 1957, especialmente en las zonas donde se habían detectado casos de resistencia a los insecticidas químicos. Sin embargo hasta 1985 no se describieron casos de resistencia a productos basados en Bt. El primer caso descrito fue una población de *Plodia interpunctella* en los Estados Unidos, plaga de almacenes de grano, luego de haberla sometido a una selección en el laboratorio (McGaughey, 1985).

El descubrimiento de que un insecto podía desarrollar resistencia frente a un patógeno natural con un modo de acción complejo, dio pie a que numerosos científicos emprendieran estudios con el fin de determinar los mecanismos y las bases genéticas de la resistencia en esta bacteria y a sus toxinas (Stone *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1992; Estrada y Ferré, 1994; Tabashnik, 1994; Ferré *et al.*, 1995; Ferré y Van Rie, 2002).

Como se ha mencionado, los formulados de Bt actúan bloqueando o impidiendo un proceso fisiológico indispensable para la vida del insecto (cesa de alimentarse). De esta forma, la resistencia podría aparecer si el insecto desarrollara un mecanismo que impida que un agente tóxico altere la función vital para el cual ha sido diseñado. Los mecanismos básicos de adquisición de resistencia son: 1) evitando el contacto con el agente tóxico (se encuentra poco estudiado y presupone que debe ocurrir un cambio en el comportamiento del insecto); 2) disminuyendo la penetración del agente tóxico, ya sea impidiendo su ingestión o disminuyendo la permeabilidad a dicho agente; 3) aumentando la velocidad de degradación del agente tóxico; 4) modificando la diana fisiológica sobre la que actúa el agente tóxico, de forma que no sea reconocido por este y la modificación no altere su función biológica normal; y 5) el efecto tóxico

originado por el agente puede neutralizarse mediante un cambio metabólico que lo contrarreste.

3.2.1.1 Casos de resistencia de *P. xylostella*.

Numerosos estudios se han desarrollado para encontrar cuál de los anteriores mecanismos es el que utiliza *P. xylostella*: en una cepa de *P. xylostella* procedente de Filipinas (cepa BL) la cual presenta resistencia a la toxina Cry1Ab, se encontró una nula o escasa unión de dicha proteína a preparaciones de vesículas intestinales (Ferré *et al.*, 1991). En otras poblaciones naturales de *P. xylostella*, procedentes de Hawaii y Florida, se demostró que la unión de la toxina Cry1Ac y Cry1Ab, respectivamente, se hallaba fuertemente disminuida (Tabashnik *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1996). A su vez, no se encontraron alteraciones significativas en el proceso de proteólisis de las δ -endotoxinas entre una cepa resistente y una susceptible (Tabashnik *et al.*, 1992). Se ha observado en cuatro poblaciones naturales resistentes de *P. xylostella*, procedentes de Malasia (cepa SERD3), Filipinas (cepa PHI), Estados Unidos: Hawaii (cepa NO-QA) y Pensilvania (cepa PEN), el sitio de unión de la toxina Cry1Ab se encuentra alterado; la unión de Cry1Ac solamente se encuentra alterada en las poblaciones de Hawaii y Pensilvania, por otro lado dicha alteración no se encontró en las mencionadas cepas procedentes de Malasia y Filipinas (Tabashnik *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1997; Ballester *et al.*, 1999). Un gen autosómico recesivo confiere resistencia al menos cuatro toxinas de Bt permitiendo la supervivencia sin efectos adversos en *P. xylostella* en plantas transgénicas. Las variaciones alélicas de este gen le confieren resistencia a las colonias antes mencionadas. (Heckel *et al.*, 1999).

En el año 2004 se encontró que el procesamiento proteolítico de la toxina es un mecanismo implicado en la resistencia de *P. xylostella*. (Pereyra, 2005)

3.2.2 Mecanismos de resistencia.

Muchos de los mecanismos de resistencia a Bt pueden ser específicos de cada especie, sin embargo un patrón general sugiere un mecanismo común para

varias especies que están comenzando a aparecer (Heckel *et al.*, 1999). Muchas poblaciones de *P. xylostella*, algunas de *H. virescens*, y otra mas, mostraron una resistencia por lo menos a una proteína Cry1A. Si los desarrollos genéticos revelan que este modo de acción tiene una misma base genética en diferentes insectos, se podrían fortalecer los programas de monitoreo y manejo de muchas plagas que afectan los campos de cultivo (Heckel *et al.*, 1999).

3.2.3 Marcadores genéticos.

Se conoce que un gen autosómico recesivo (*BtR-1*) confiere resistencia al menos 4 toxinas de Bt (Tabashnik *et al.* 1997) y que variantes alélicas de este gen confiere resistencia a colonias de Hawaii, Florida, Pensilvania y Filipinas. El monitoreo de la resistencia conferida por este gen puede entonces ser llevada a cabo por marcadores genéticos que flanquean este gen. Uno de estos marcadores es el EaaMcta-4.70, localizado aproximadamente a 2000 pb (Fig.2) arriba del gen *BtR-1*, dicho marcador fue descrito en 1999 (Heckel *et al.*) en larvas de *P. xylostella* a las cuales les fue inducida experimentalmente la resistencia y hasta el presente trabajo, no había sido descrito en larvas de campo.

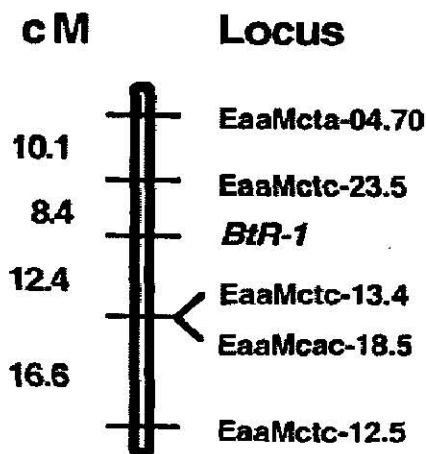


Figura 2. Localización del marcador genético EaaMcta-4.70 con respecto al gen *BtR-1*.

Fundados en lo expuesto anteriormente, este trabajo se centra en la búsqueda, por medio de marcador genético EaaMcta-4.70, en larvas de *P. xylostella* resistentes ante las δ -endotoxinas de Bt.

4.0 Materiales.

4.1 Material biológico:

4.1.1 Insectos. Las larvas de *P. xylostella* utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de tres fuentes distintas:

- Susceptible, fue proporcionada por el Dr. Rafael Bujanos M (CINVESTAV-Celaya).
- Resistente laboratorio, fue obtenida por medio de presión selectiva.
- Campo, estas larvas fueron colectadas en el verano de 2005 en campos cultivados con brócoli en dos puntos: Celaya y San Francisco del Rincón.
- Las larvas de *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua* fueron proporcionadas por el laboratorio de cría de insectos del Instituto de Biotecnología de la U. A. N. L.

4.1.2 Cepas bacterianas. Las muestras biológicas de Bt utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología Industrial y de Suelo, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U. A. N. L. ubicada en San Nicolás de los Garza N. L. y del Laboratorio del Dr. Juan Ferré (Universidad de Valencia, Valencia, España); las toxinas fueron purificadas y enviadas a partir de cepas silvestres y recombinantes que expresan un solo tipo de toxina. (Tabla I)

Tabla I. Cepas de Bt.

Toxina	Cepa	Marcador	Fuente
Cry1Aa	EG 1273	Tetraciclina, 10 µg / ml	Dr. Juan Ferré
Cry1Ab	EG 7077	Tetraciclina, 10 µg / ml	Dr. Juan Ferré
Cry1Ac	HD -73	Ninguno	FCB / UANL

E. coli.

- Top10. (TOPO TA. Cloning System Version pCR4.0.)

4.1.3 Formulado a base de Bt.

- Xentari™.

5.0 Métodos.

5.1 Bioensayos.

La primera etapa de los bioensayos fue realizada por la alumna Artemisa Perea en las instalaciones del INIFAP Celaya. Los bioensayos fueron realizados esencialmente de acuerdo a lo reportado por Bujanos y col (2000), y fueron utilizados, además del producto comercial (Xentari TM), las toxinas puras y activadas. Tanto el producto comercial como de las toxinas puras fueron preparadas para tener una concentración final de 100, 30, 10, 1 y 0.3 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Estas fueron preparadas en buffer de PBS + triton X - 100 al 0.2 %. En esta suspensión se depositaron hojas de brócoli, en forma de círculos de 6.2 cm de diámetro (30 cm^2), posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y sobre éstas se depositaron 12 larvas del tercer instar de *P. xylostella*. El porcentaje de mortalidad fue registrado después de 72 hr. Con estos datos seleccionamos 9 concentraciones, incluyendo las correspondientes al 100 y 0 % de mortalidad. La LC_{50} fue determinada mediante el análisis probit usando el programa Polo - PC. Para cada dilución se realizaron tres repeticiones con 12 larvas e igual número de experimentos se llevaron a cabo usando PBS - BSA 0.1 % como control negativo. Los bioensayos fueron realizados en una cámara a 25° C y 80 % de humedad relativa, con un fotoperíodo de 16 hr luz / 8 hr oscuridad, en estas condiciones las colonias de insectos podrían cumplir ciclos completos (huevecillo - adulto) cada 25 - 27 días. Una vez conocidas las LC_{50} y seleccionadas las colonias resistentes y la colonia susceptible fueron transportadas a la Facultad de Biología de la U. A. N. L donde se siguió con la selección a dosis subletales hasta llegar a una concentración de 200 X.

5.2 Extracción de DNA.

A partir de un total de 18 larvas del tercer instar de *P. xylostella*, 1 de *T. ni* y 2 de *S. exigua* fueron molidas individualmente en tubos de 2 ml mediante un palillo de madera y homogenizadas con 1.5 ml de buffer de extracción (Tris - HCl 50 mM, pH 8.0, SDS 2 %, NaCl 0.75 M, EDTA 10 mM, proteinasa K 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$), seguida por una incubación a 65° C por 30 min. Transcurrida la incubación

el sobrenadante de cada alícuota fue recuperado y transferido a tubos de 1.5 ml, adicionando un volumen igual de cloroformo seguida de una centrifugación a 14,000 rpm por 2 min. Se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen igual de una solución de fenol - cloroformo (1:2). La fase acuosa fue transferida a tubos de 1.5 ml donde el DNA fue precipitado con aproximadamente un 60 % del volumen total de isopropanol a -20° C por 12 hr. Transcurrido el tiempo de precipitación el DNA fue lavado en etanol al 70 % y finalmente fue secado y resuspendido con 100 µl de agua mili Q. El DNA extraído posteriormente fue tratado con 2.5 U / ml de RNasa.

La integridad del DNA fue verificada en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio y la concentración fue determinada en el espectrofotómetro a una absorbancia de 260 nm. (Waldschmith *et al.*, 1997)

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)

Se aplicaron los iniciadores específicos c39-451p1 y c39-451p2 (Tabla II) que amplifican la secuencia del marcador EaaMcta-04.70 (320 pb) (Heckel *et al.*, 1999) y se efectuó lo siguiente, a partir de 10 ng de DNA genómico, con una mezcla de reacción (Tabla III) que incluye Tris - HCl 10 mM, pH 8.5, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 200 µM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 nM de cada iniciador y 0.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega) por reacción.

Tabla II. Iniciadores. (PCR)

Nombre	Secuencia 5' - 3'	Posición	Producto (pb)	Genbank
c39-451p1	ccgtgctgag cattggacag tgag	451 - 474	325	AF149306
c39-451p2	ttaactatat ttgttgacg ataaggtg	747 - 776		

Tabla III. Mezcla de reacción. (PCR)

	Stock	[] Final	Vol.
Agua MQ			Cbp 33.5 μ l
Buffer / MgCl ₂	10 X	1 X	5 μ l
dNTPs	10 mM	200 μ M	1 μ l
Iniciador	200 μ M	100 nM	2.5 μ l c / p: 5 μ l
DNA		10 ng	5 μ l
Taq	5U / ml	0.5 U	0.5 μ l
Total			50 μ l

La mezcla de reacción fue amplificada en el termociclador, Perkin - Elmer Geneamp 2400, de la siguiente manera: 5 min de desnaturalización inicial a 94° C seguida de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94° C, 1 min de alineación a 55° C y 2 min de extensión a 72° C, finalmente 5 min de extensión final a 72° C. (Fig. 3). Los productos se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, teñido con bromuro de etidio. (Heckel et al., 1999)

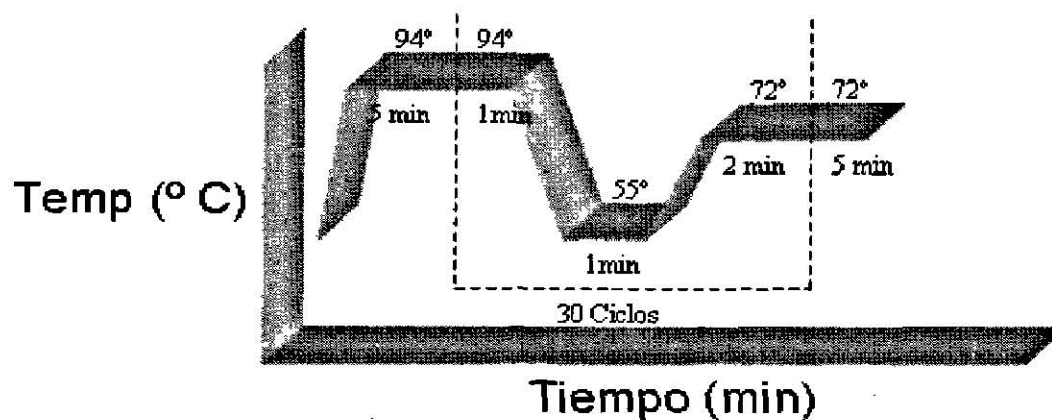


Figura 3. Programa de amplificación (PCR)

5.4 Amplificación aleatoria de DNA. (RAPD's)

Para buscar y encontrar un nuevo marcador genético de resistencia en *P. xylostella*, se utilizaron los iniciadores de la serie OPA (Tabla IV) y una mezcla de reacción consistente en lo descrito en la tabla V.

Los resultados fueron analizados con el paquete de análisis de imagen del Quantity one de Biorad.

5.5 Electroforesis.

Los geles de agarosa se prepararon a una concentración de 1.5 %. Con un espesor de 5 mm aproximadamente, utilizando como buffer de corrimiento tris-borato-EDTA o TBE al 1 X, el volumen de reacción por carril es de 10 μ l de muestra y 3 μ l del colorante Azul – Naranja, como indicador. Las electroforesis se efectuaron a un voltaje de 100 volts por aproximadamente 2 horas, γ teñidos con bromuro de etidio durante 5 minutos.

Los geles de poliacrilamida se prepararon a una concentración de 5 %, como se muestra en la tabla VI a un espesor de 1.5 mm. Aplicando como buffer de corrimiento TBE al 1 X, el volumen de reacción por carril es de 10 μ l de muestra y 3 μ l del colorante Azul – Naranja, como indicador. Las electroforesis se llevaron a acabo en la cámara: SE 600. Ruby. Estándar vertical electrophoresis unit de Amersham Bioscience a un voltaje constante de 100 volts por 6 horas, γ teñidos con bromuro de etidio por 5 minutos para la interpretación de resultados. Los vidrios fueron tratados con BindSilane y Sigmacote para adherir y evitar la adherencia del gel.

Tabla VI. Gel de poliacrilamida 5 %

Mezcla de Reactivos	
Acilamida	6.64 ml
Agua	25 ml
5 X TBE	8 ml
10 % Persulfato de Amonio	0.280 ml
Temed 35 μ l	0.014 ml
Volumen final	40 ml

5.6 Clonación.

En la clonación del fragmento se utilizó una mezcla de reacción consistente en lo descrito en la tabla VII que pertenece al protocolo de Invitrogen Instruments Manual. (TOPO TA. Cloning System Version pCR4.0.)

Tabla VII. Mezcla de clonación.

Mezcla de Reactivos	Vol.
Producto PCR fresco	0.5 a 4 μ l
Solución salina	1 μ l
Agua estéril	Completar a vol. final
Topo vector	1 μ l
Volumen final	6 μ l

5.6.1 Transformación.

Se agregaron 2 μ l de mezcla de reacción de clonación a células quimiocompetentes de *E.coli* cepa top 10 (Promega), seguido por una incubación en hielo por 30 min. Posteriormente se efectuó un shock térmico a 42° C en baño metabólico y nuevamente se pasó a hielo para agregar 250 μ l de medio S. O. C. para la reactivación celular. Después de la incubación a 37° C por 1 hr a 300 rpm se inoculó en cajas con medio LB en presencia de ampicilina (100 μ g / ml), incubando a 37° C toda la noche y al día siguiente se observó el crecimiento colonial de *E.coli* transformada.

5.7 Selección de colonias transformadas.

A partir de 4 cajas de colonias transformadas (A, B, C, D) se escogieron, individualizaron y duplicaron colonias por medio de punción en cajas (cuadrículadas) en medio LB en presencia de ampicilina (100 μ g / ml), y se incubaron a 37° C para realizar la purificación de DNA por medio de lisis alcalina.

5.8 Método de lisis alcalina.

Individualizadas las colonias transformadas (*E.coli*), se inocularon en 3 ml de caldo LB en presencia de ampicilina (100 µg / ml) y se incubó por 12 hr a 37° C. Transcurrido el tiempo de incubación se concentró el paquete célula por centrifugación y se le adicionó 1 ml de la solución 1 fría. El paquete fue resuspendido por vortex y centrifugado a 10,000 rpm durante 1 min. Posteriormente se adicionaron 200 µl de solución 2 y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de esto se adicionaron 200 µl de la solución 3, se incubó en hielo por 20 min y se centrifugó 10 min a 12,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

El DNA fue precipitado con 0.6 volúmenes de isopropanol a partir del sobrenadante, lavado con etanol al 70 % y tratado con 2.5 U de RNAsa.

5.9 Secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología Genómica del IPN, Reynosa, Tamaulipas. Amplificando 8 muestras (A5, A6, A11, B3, B4, C2, C3, C14) de DNA plasmídico por separado, uno de cada ddNTP, utilizando iniciadores marcados M₁₃F*⁷⁰⁰ y M₁₃R*⁸⁰⁰ con una excitación de luz infrarroja de 700 y 800 nm y posteriormente realizar un gel de poliacrilamida al 5 % (20 X 45) para introducirlo y correrlo en el secuenciador Li-cor IR2 en un tiempo de 9 hr (Protocolo Li-cor IR2)

5.10 Comparación de secuencias.

La secuencia obtenida de la secuenciación (330 pb) se comparó con la secuencia reportada de 320 pb (GI: 5596527) por Heckel y cols (1999) mediante los programas computacionales DNASTAR ver 4.05, BLAST (NCBI. 2005) y Clustal X 1.04 para observar las diferencias entre las secuencias.

6.0 Resultados.

6.1 Insectos

La F1 de *P. xylostella* (tercer estadio) de las tres poblaciones fueron sometidas a bioensayos con el formulado comercial Xentari™ hasta que se obtuvieron las LC₅₀. Los valores obtenidos de la LC₅₀ de las poblaciones demostraron susceptibilidad al formulado comercial como se muestra en la tabla VIII y las sobrevivientes fueron sometidas bajo presión selectiva con el mismo formulado hasta obtener una concentración de 200 X. Los valores obtenidos de LC₅₀ de la tabla IX muestran un incremento significativo en la colonia de la zona Norte haciéndose menos susceptible al formulado comercial.

Tabla VIII. Concentración letal media en colonias de *P. xylostella*.

	Producto	LC ₅₀ (mg / L)	Pendiente	Límites
Susceptible	Xentari	0.184	1.893	0.138 - 0.237
Zona Norte	Xentari	0.294	1.530	0.216 - 0.406
		0.196	1.500	0.124 - 0.286
Zona Este	Xentari	0.235	1.564	0.196 - 0.279

Tabla IX. Presión selectiva a larvas resistentes. (Xentari™)

	Producto	LC ₅₀ (mg / L)	Pendiente	Límites
Susceptible	Xentari	0.184	1.893	0.138-0.237
Zona Norte	Xentari	0.294	1.530	0.216-0.406
		0.196	1.500	0.124-0.286
		16.43(83)	1.820	14.527-24.06
Zona Este	Xentari	0.235	1.564	0.196-0.279

6.2 Extracción de DNA.

Con la finalidad de obtener DNA de insecto, fueron probadas 2 larvas de *S. exigua* donde solo un extracto fue sometido a un tratamiento con RNasa (Fig. 5), siendo este el mejor método. Posteriormente se efectuaron extracciones de DNA de los diferentes insectos a estudiar (*P. xylostella*, *T. ni.*)

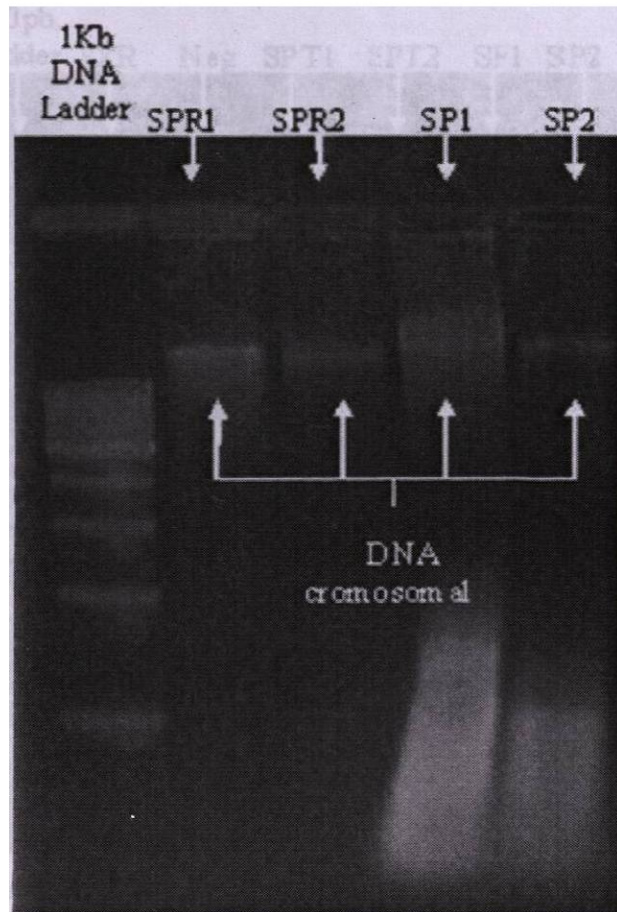


Figura 5. Purificación de DNA de Insecto (*S. exigua*). Ladder 1 Kb. DNA de *S. exigua* sensible a formulados de proteínas Cry, tratados con 2.5 U / ml de RNasa: SPR1 y SPR2 y en ausencia de RNasa: SP1 y SP2. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Comprobada la presencia del DNA integro y puro, buscamos el marcador de resistencia EaaMcta-4.70 mediante la PCR como se observa en las figuras 6 y 7. Las cepas de *P. xylostella* sensible, *S. exigua* y *T. ni*, no mostraron la banda del fragmento de 320 pb a diferencia de *P. xylostella* resistente.

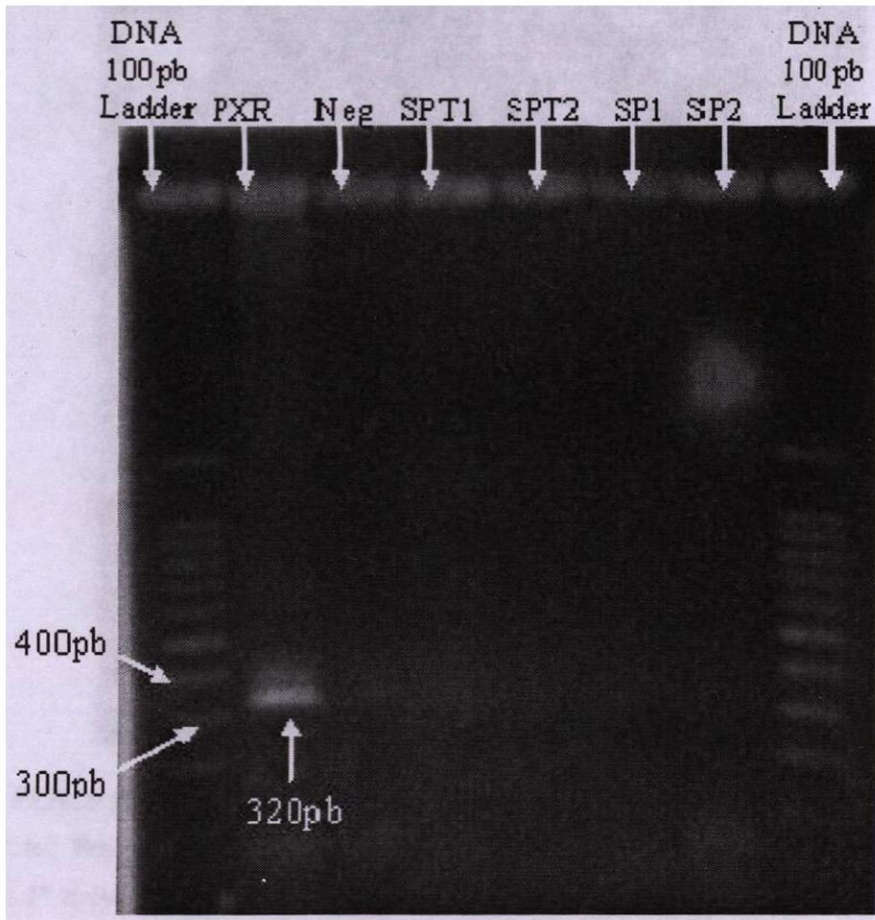


Figura 6. PCR a partir de DNA de insectos. Ladder 100 pb. PXR: *P. xylostella*, resistente a formulados de proteínas Cry. SPT1 y SPT2: DNA de *S. exigua* sensible, tratados con 2.5 U / ml de RNasa. SP1 y SP2: DNA de *S. exigua* sensible sin en ausencia de RNasa. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

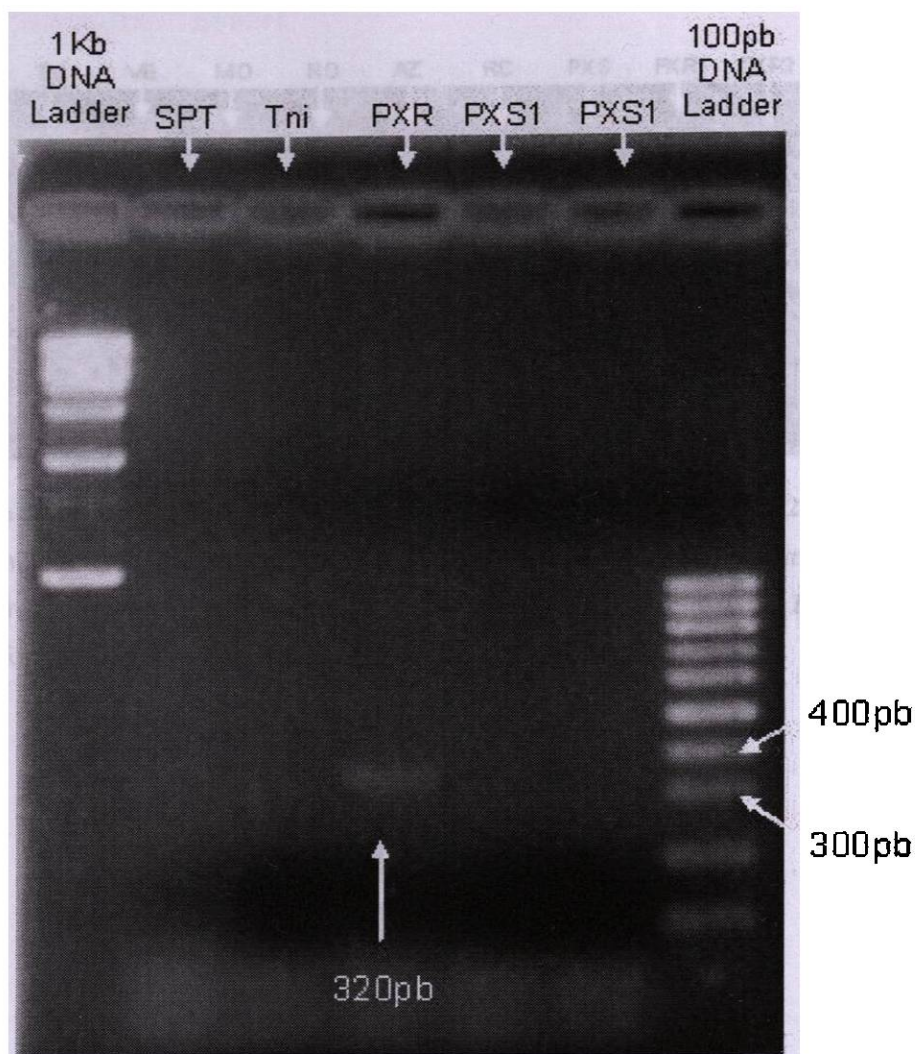


Figura 7. PCR a partir de DNA de insectos. Ladder 1 Kb, 100 pb. SPT: DNA de *S. exigua* sensible; *T. ni*: *Trichoplusia ni* sensible; PXR: *P. xylostella*, resistente a formulados de proteínas Cry; PXS1: *P. xylostella*, sensible. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

Identificado el marcador de resistencia, procedimos a analizar el DNA de las larvas obtenidas bajo presión selectiva, obteniendo la banda esperada en todas estas (Fig. 8). Dicho resultado fue consistente en una posterior repetición (Fig. 9). De igual forma obtuvimos una larva resistente que no presentó el marcador como se observa en las figuras 8 y 9.

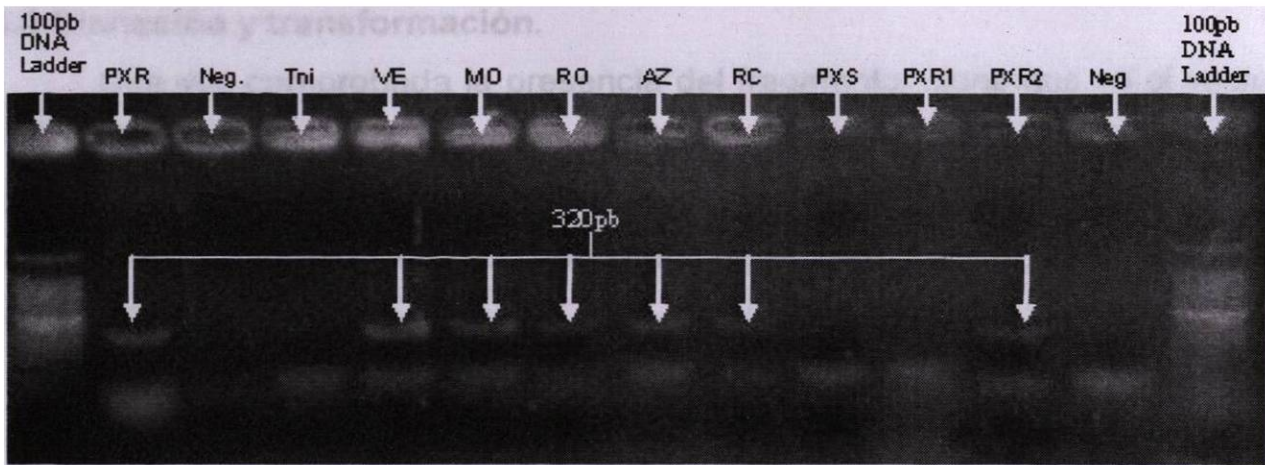


Figura 8. PCR a partir de DNA de insectos. Ladder 100 pb. PXR, PXR1, PXR2: *P. xylostella*, resistente a formulados de proteínas Cry. VE, MO, RO, AZ, RC: *P. xylostella* de campo sometidas bajo presión selectiva (Resistente). PXS: *P. xylostella*, sensible. T ni: *Trichoplusia ni* sensible. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

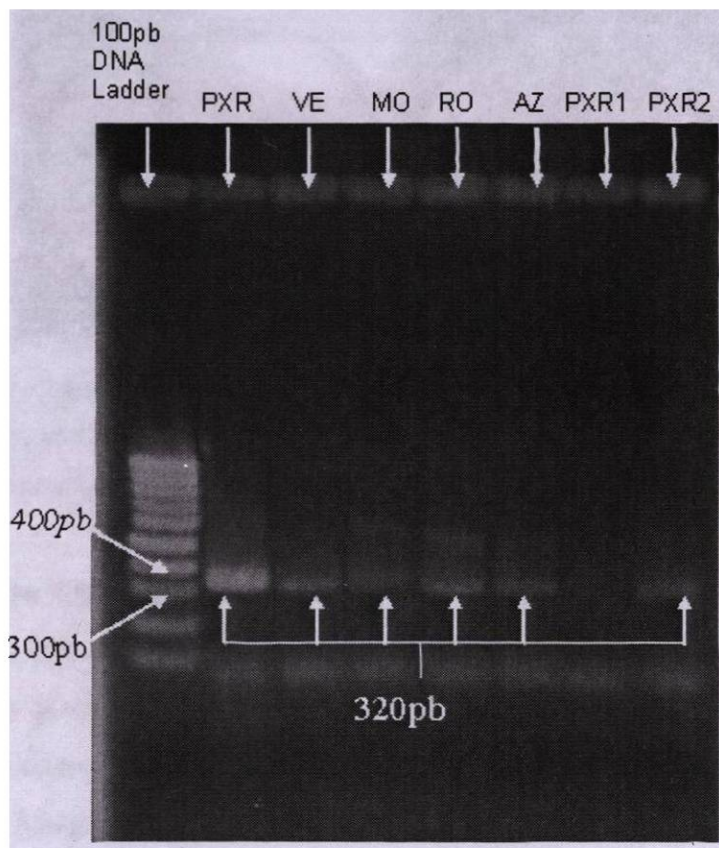


Figura 9. Repetición de PCR a partir de DNA de insectos. Ladder 100 pb. PXR, PXR2, VE, MO, RO, AZ, RC: *P. xylostella*, resistente a formulados de proteínas Cry. PXR1: *P. xylostella*, susceptible. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

6.4 Clonación y transformación.

Una vez comprobada la presencia del fragmento, clonamos en el vector TOPO TA pCR4, transformando en células quimiocompetentes de *E. coli* cepa top 10, utilizando ampicilina como marcador (Fig. 10), transcurrido el tiempo de incubación y observado el crecimiento colonial se realizó la extracción de DNA plasmídico.

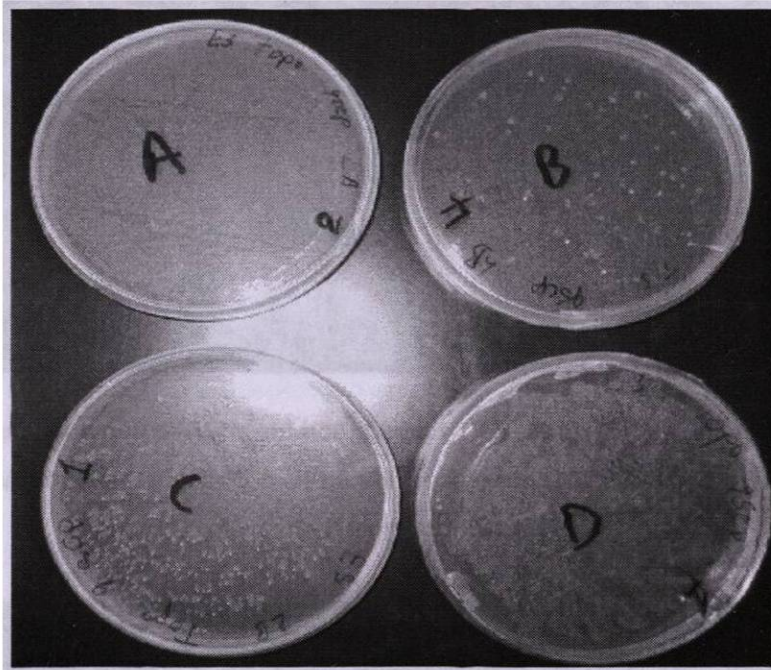


Figura 10. Cepa Top 10 de *E. coli* transformadas con el vector TOPO / TA conteniendo un fragmento de 320 pb del marcador EaaMcta-4.70. Crecimiento a las 12 hr de incubación a 37° C en agar Luria Bertani con 50 mg / ml de ampicilina.

6.5 Extracción de DNA plasmídico y PCR.

Obtenidas las clonas, se extrajo el DNA plasmídico (Fig. 11), el cual, fue utilizado para comprobar la presencia del fragmento contenido en las células de *E. coli* transformadas. Dicha comprobación fue efectuada a través de la PCR amplificando el fragmento de 320 pb en el genoma bacteriano (Fig. 12) y corroborando la presencia del fragmento mediante el ensayo de restricción con la enzima EcoRI. (Fig. 13)

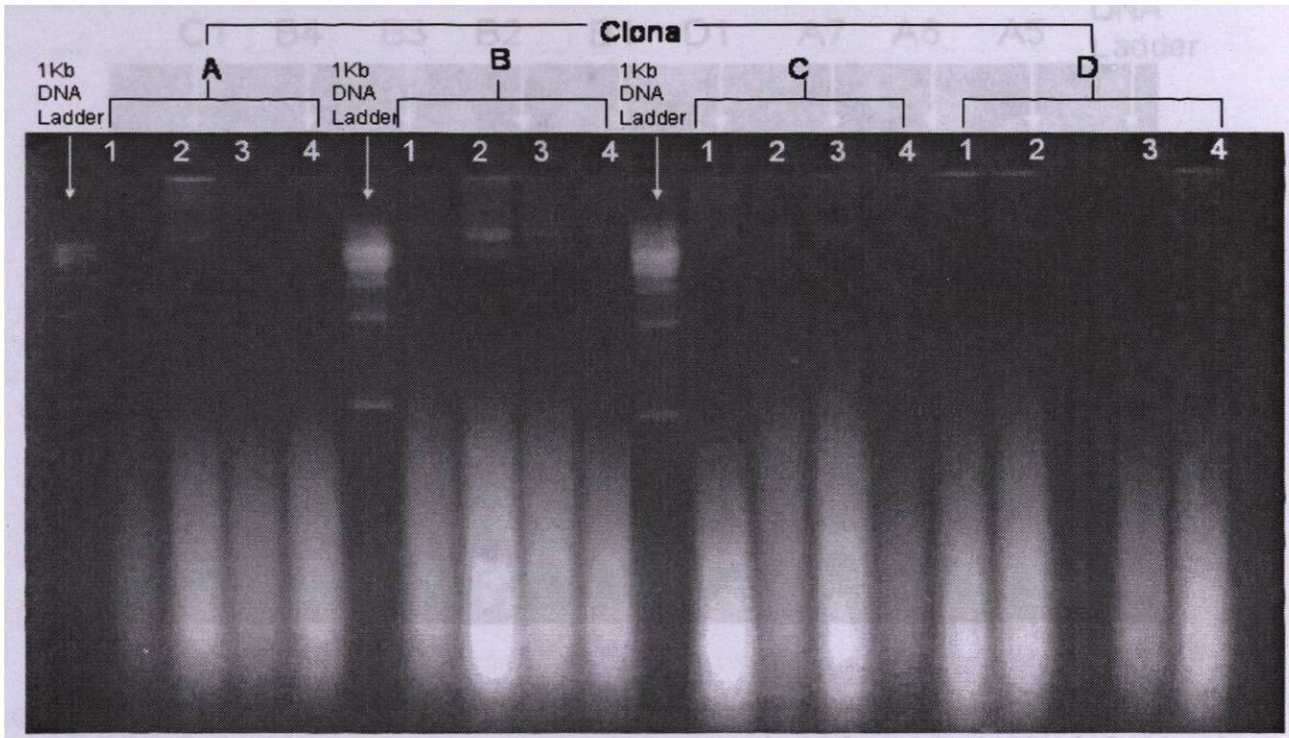


Figura 11. Extracción de DNA Plasmídico. Ladder 1Kb. A, B, C, D: Clonas a partir de las cajas de colonias transformadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

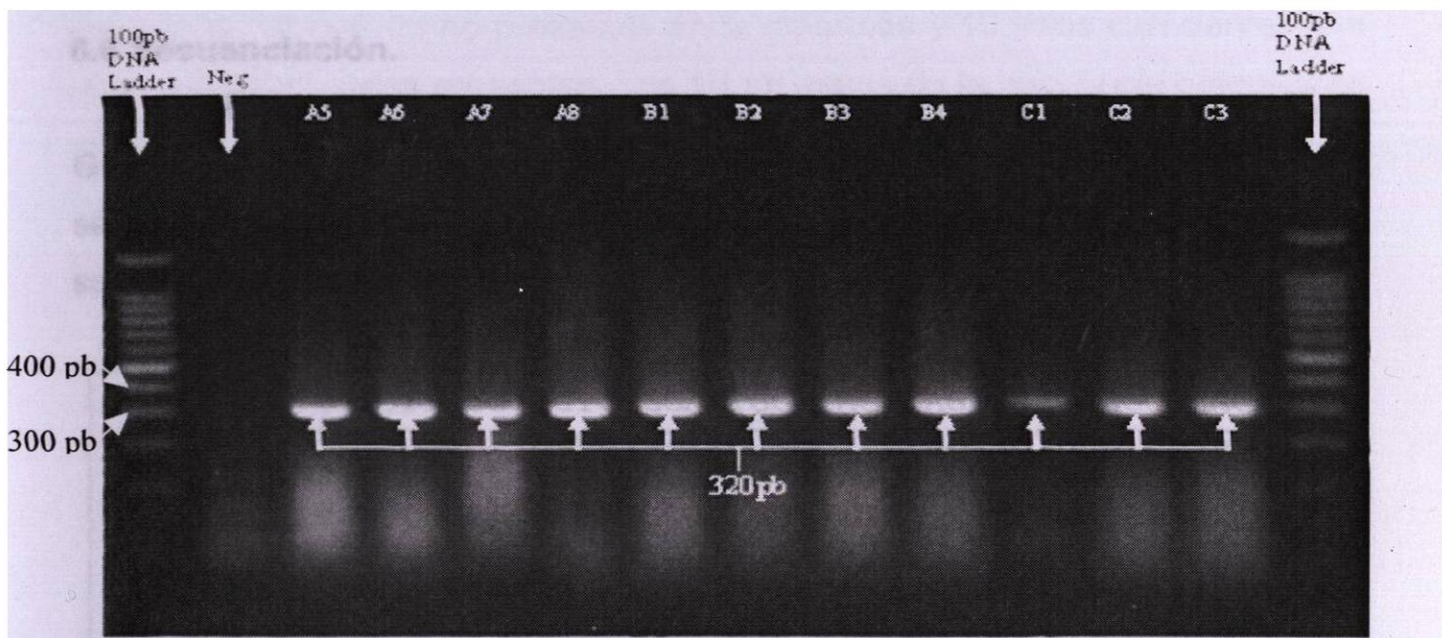


Figura 12. PCR a partir de DNA plasmídico de *E. coli* Cepas Top 10 transformadas. Ladder 100 pb. Colonias individuales (A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B4, C1, C2, C3,) conteniendo el fragmento de 320 pb del marcador genético EaaMcta-4.70. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

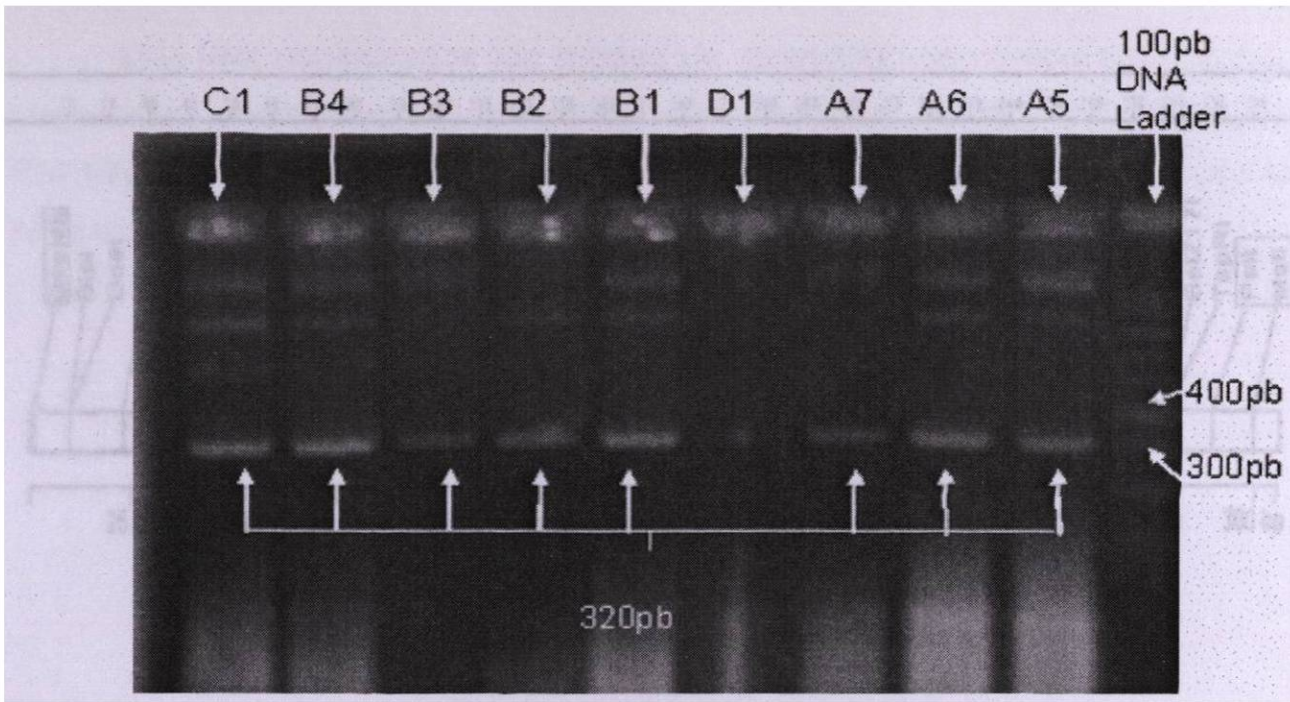


Figura 13. DNA plasmídico de Cepas Top 10 de *E. coli* transformadas (C1, B4, B3, B2, B1, D1, A7, A6, A5) digeridas con EcoRI comprobando la presencia del fragmento de 320 pb. Ladder 100 pb. Electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

6.6 Secuenciación.

El DNA plasmídico fue cuantificado y enviado al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional para su secuenciación. La secuencia obtenida (Fig. 14) fue analizada y comparada (Fig.15 - 18) con la secuencia reportada por Heckel y Cols. (1999) (GI: 5596527)

```

5´ -GAATTCGCCCTTCCGTGCTGAGCATTGGACAGTGAGTGACGAAGGCAAGAGC
TATTAGATTACTAGACAATAGGCTGGTTAGCAATTATAATTATACATAGCGGGAT
GTGTCCAAGTGTCAGTTG-TAAGCAGTGGGCTTAGCGGCTGGAATGTGCTTTATT
TGTTTATTTTTGGTGGGATAGAAGGGGGTGGTATGAAGTTTTTCCGAAAAGTCAT
AATTTGATTGATGACTTCGGTGTAGGGTATATTATTTGTAAGAGAATGACATATT
GTAATTCACTGTATACTAACTTATAATTCACCTTATCGTCACCAACAAATATAG
TTAA-3´

```

Figura 14. Secuencia consenso (330 pb) de DNA del marcador EaaMcta-4.70 a partir de larvas resistentes obtenidas bajo presión selectiva.

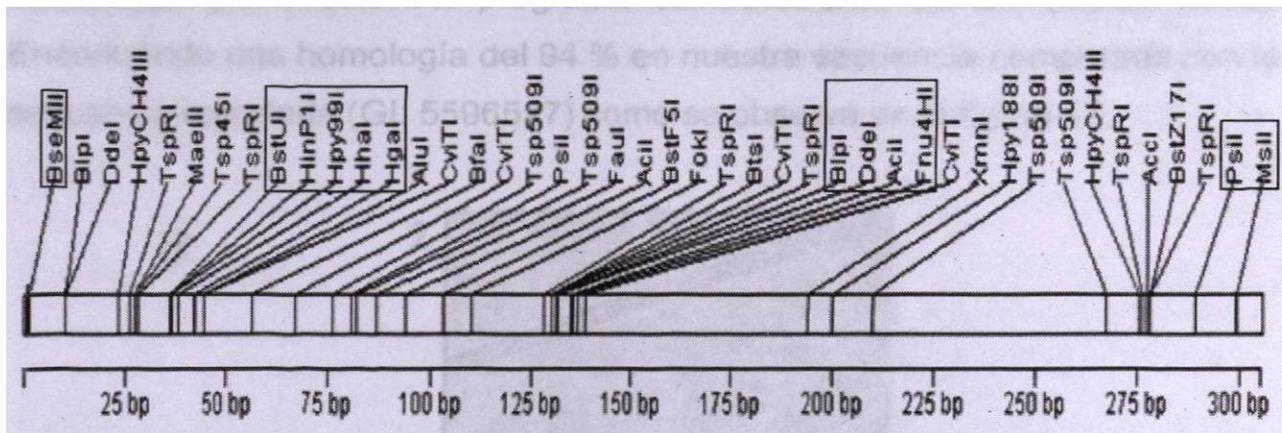


Figura 15. Mapa de restricción de la secuencia consenso de 330 pb analizado con el programa computacional DNASTAR ver 4.05.

La secuencia obtenida de 330 pb y la reportada de 320 pb (GI: 5596527) (Heckel *et al.*, 1999) fueron analizadas mediante el programa computacional DNASTAR ver 4.05 obteniendo los mapas de restricción de ambas secuencias para su comparación (Fig. 15 y fig. 16). Encontrando homología en 32 sitios de restricción, 12 nuevos no presentes en la reportada y 10 sitios carecientes que en la reportada están presentes. Las 10 pb extras de la secuencia obtenida se encuentran en el extremo 5' corroborando con el sitio de restricción BseMII localizado al principio de la secuencia. Estas diferencias son causadas por deleciones presentes en la secuencia obtenida. (Fig. 17, fig. 18)

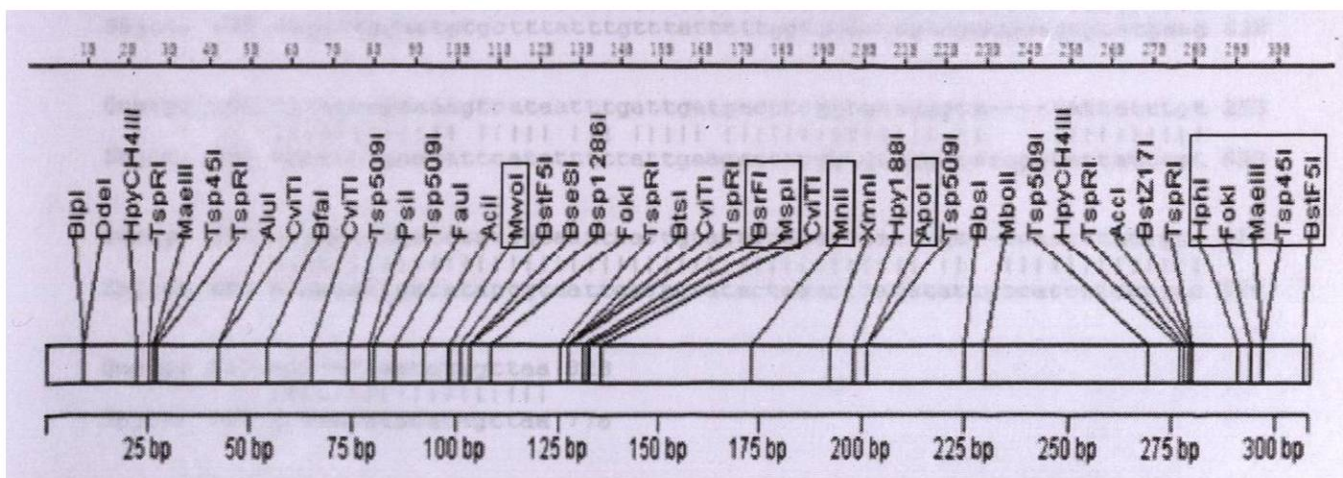


Figura 16. Mapa de restricción de la secuencia reportada 320 pb (GI: 5596527) analizada con el software computacional DNASTAR ver 4.05.

Una vez comparados los mapas de restricción se compararon ambas secuencias por medio del programa computacional BLAST (NCBI. 2005). Encontrando una homología del 94 % en nuestra secuencia comparada con la secuencia reportada (GI: 5596527) como se observa en la figura 17.

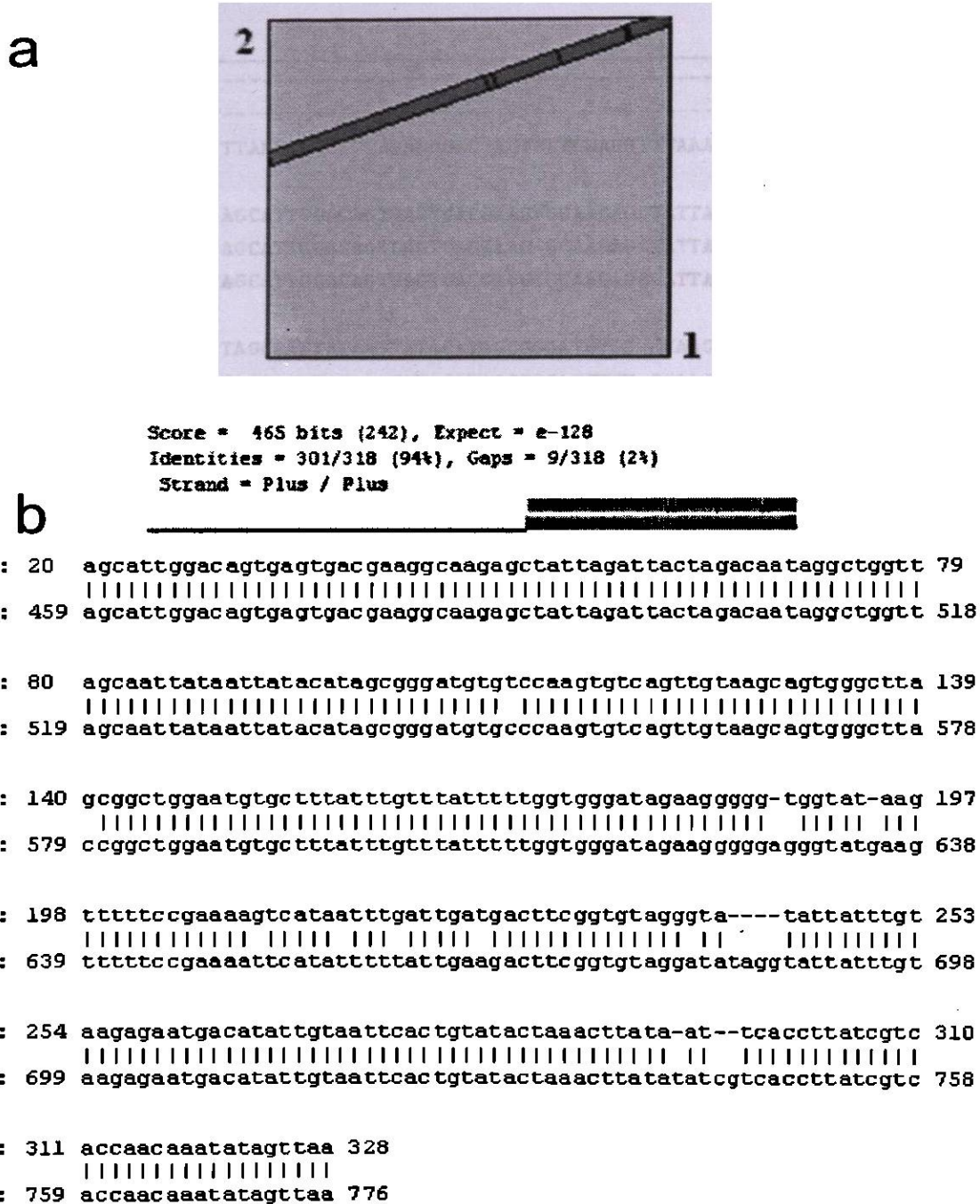


Figura 17. Comparación de la secuencia de 330 pb con la base de datos de Blast (GI: 5596527):

Panel a: grafico de identidades con la secuencia reportada.

Panel b: Comparación base a base con la secuencia reportada.

Comparada la secuencia, (BLAST) se realizó una última comparación por medio del programa computacional Clustal X 1.04. (Fig. 18). El análisis muestra la homología y las diferencias existentes entre las secuencias en este caso las nuestras (A11, C14) contra reportada (GI: 5596527) por Heckel y cols. (1999)

SECPLUTELLA451-779	-----AT- CCCGTGCTG
A11	-----GAATTCCGCCCT- TCCGTGCTG
C14	TTANCCCTCACTANNGGGACTAGTNNTGNAGGTTTAAACGAATTCCGCCCTTCNCGTGCTG
SECPLUTELLA451-779	AGCATTGGACAGTGAGTGACGAAG-GCAAGAGCTATTAGATTACTAGACAATAGGCTGGT
A11	AGCATTGGACAGTGAGTGACGAAG-GCAAGAGCTATTAGATTACTAGACAATAGGCTGGT
C14	AGCATTGGACAGTGAGTGACGACCGCGCAAGAGCTATTAGATTACTAGACAATAGGCTGGT
SECPLUTELLA451-779	TAGCAATTATAATTATACATAGCGGGATGTGC-CCAAGTGT CAGTTG-TAAGCAGTGGGC
A11	TAGCAATTATAATTATACATAGCGGGATGTGT-CCAAGTGT CAGTTG-TAAGCAGTGGGC
C14	TAGCAATTATAATTATACATAGCGGGATGTGTGCCAAGTGT CAGTTG-TAAGCAGTGGGC
SECPLUTELLA451-779	TTACCGGCTGGAATGTGCTTTATTTGTTTATTTTGGTGGGATAGAAGGGGGAGGGTATG
A11	TTACCGGCTGGAATGTGCTTTATTTGTTTATTTTGGTGGGATAGAAGGGGGTGG-TATG
C14	TTACCGGCTGGAATGTGCTTTATTTGTTTATTTTGGTGGGATAGAAGGGGGTGG-TATG
SECPLUTELLA451-779	AAGTTTTCCGAAAATTCATATTTTTATTGAAACTTCCGGTGTAGGATATAGGTATTATT
A11	AAGTTTTCCGAAAAGTCATAATTTGATTGATGACTTCCGGTGTAGGGTATA----TTATT
C14	AAGTTTTCCGAAAAGTCATAATTTGATTGATGACTTCCGGTGTAGGGTATA----TTATT
SECPLUTELLA451-779	TGTAAGAGAATGACATATTGTAATTCACCTGTATACTAAACTTATATATCGTCCACCTTATC
A11	TGTAAGAGAATGACATATTGTAATTCACCTGTATACTAAACTTATA-AT--TCACCTTATC
C14	TGTAAGAGAATGACATATTGTAATTCACCTGTATACTAAACTTATAAATC-ACGCTTATGC

Figura 18. Comparación de secuencias obtenidas de dos clones (A11 y C14), contra la secuencia reportada (GI: 5596527) con el programa Clustal X 1.04. (Heckel *et al.* 1999)

6.7 Amplificación aleatoria de DNA (RAPD's)

Los análisis de las figuras 19, 20 y 21 fueron utilizados para tratar de encontrar un nuevo marcador genético de *P. xylostella* resistente por medio de iniciadores OPA.

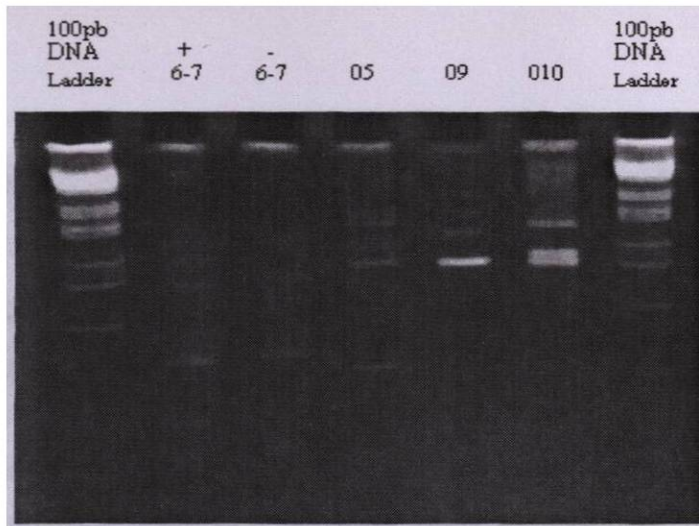
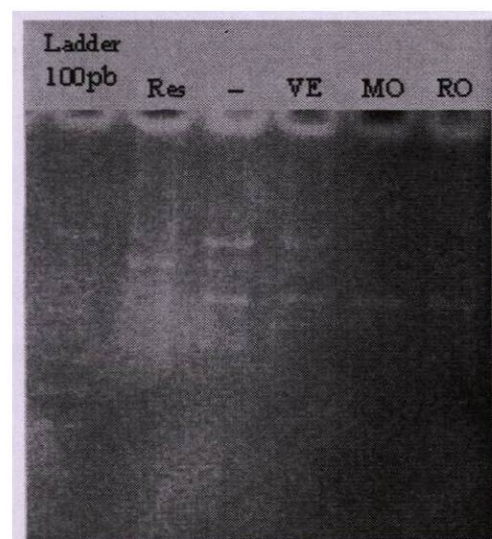


Figura 19. PCR de iniciadores OPA 6-7 +, 6-7-, 05, 09, 010 basadas en DNA de insecto resistente (VE) en presencia de un control negativo (susceptible).

La figura 19 muestra diversos iniciadores OPA. Los iniciadores 06 y 07 fueron combinados debido a la ausencia de bandeo al amplificarlos individualmente causado por la amplificación de fragmentos de mayor tamaño; al combinar estos iniciadores exhibió bandeo semejante en la muestra resistente y susceptible, como resultado no es posible la búsqueda de un nuevo marcador genético con estos dos iniciadores. Los iniciadores 05, 09 y 010 presentan un bandeo mas destacado, amplificando individualmente, a una concentración de DNA de 500 ng en la reacción total. Como se observa en las figuras 20 y 21 los iniciadores 09 y 010, la presencia de bandas es en común para larvas susceptibles y resistentes, por lo tanto la búsqueda de un nuevo marcador genético no es posible con estos iniciadores.

Figura 20. PCR de iniciador OPA 09 basadas en DNA de insectos resistentes (Res, VE, MO, RO) en presencia de un control negativo (susceptibles) analizado por el programa de imágenes del Quantity one de Biorad. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % teñido con bromuro de etidio.

OPA 09



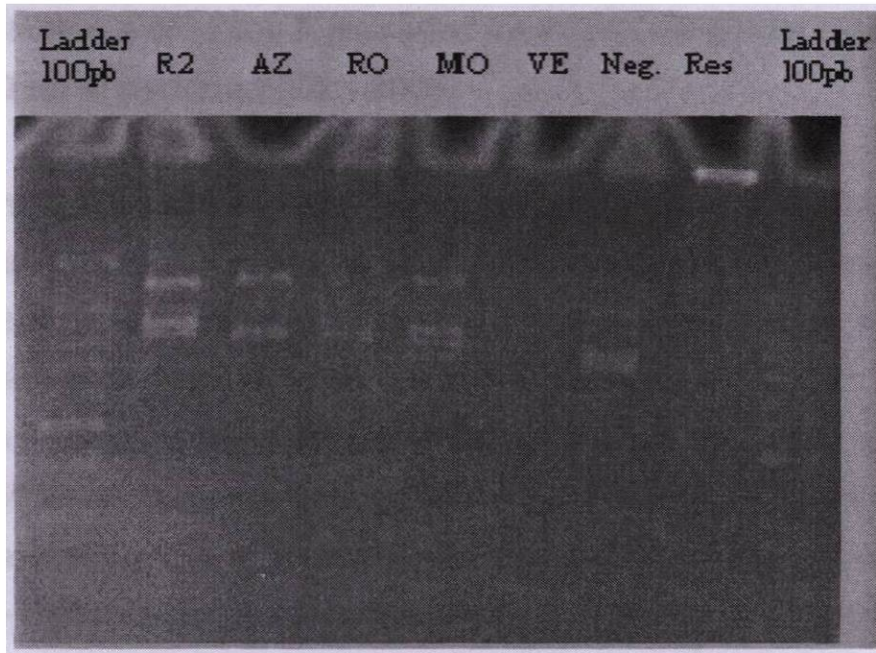
OPA 010

Figura 21. PCR de iniciador OPA 010 basadas en DNA de insectos resistentes (Res, VE, MO, RO, AZ, R2) control negativo (susceptibles) analizado por el programa de imágenes del Quantity one de Biorad. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % teñido con bromuro de etidio.

7.0 Discusión.

En el presente estudio caracterizamos genéticamente colonias de *P. xylostella* resistentes a diversos formulados de Bt por medio del marcador genético EaaMcta-04.70 en el período 2002 - 2005.

Las larvas utilizadas en este proyecto fueron de de 3 localidades distintas de Guanajuato. Los bioensayos de las poblaciones de *P. xylostella* de las 3 localidades, demostraron susceptibilidad al formulado comercial Xentari[®] (Tabla VIII) y el tratamiento bajo presión selectiva (Tabla IX), reveló un incremento significativo en la pérdida de susceptibilidad ($\alpha=0.01$) 83 veces mayor comparada con la susceptible al llegar a una concentración de 200 X, esto nos indica la aparición de la resistencia al formulado comercial Xentari[®], en una de las tres localidades de Guanajuato. En trabajos similares, se ha observado la pérdida de susceptibilidad (Aumento en la resistencia) al formulado comercial Dipel[®], a una resistencia 200 veces mayor que la población susceptible (Ferré *et al.*, 1991), además también se ha encontrado resistencia > 3000 veces más que la población susceptible obtenida en laboratorio (Tabashnik *et al.*, 1997).

Otros autores afirman, que la constante aplicación de formulados Bt a *P. xylostella* en laboratorio y en campo, disminuía la susceptibilidad hasta perderla completamente, tras aplicar a varias generaciones, debido a la pérdida de la afinidad de las toxinas a los sitios de unión en el mesenterio de los insectos. (Ferré *et al.*, 1991; Tabashnik *et al.*, 1992, 1994, 1997; Wright *et al.*, 1997; Ballester *et al.*, 1999; Heckel *et al.*, 1999; Ferré y Van Rie, 2002).

Por medio de la PCR (Heckel *et al.*, 1999) encontramos un fragmento de 320pb correspondiente al marcador genético EaaMcta-4.70 en larvas de *P. xylostella*. Los resultados revelaron la amplificación del fragmento únicamente en larvas *P. xylostella* resistente como se demuestra en previos estudios (Heckel *et al.*, 1999).

Cabe destacar que, el fragmento obtenido en el presente trabajo, fue amplificado en poblaciones de campo y sometidas bajo el tratamiento de presión selectiva, a diferencia de la obtenida por Heckel y colaboradores, la cual fue amplificada de cruas entre poblaciones susceptibles y resistentes.

El hallazgo del fragmento en nuestros resultados indican que el marcador genético puede entonces ser utilizado para monitorear la resistencia de *P. xylostella* a nivel de campo.

La comparación de la secuencias obtenidas de 330 pb con la reportada de 320 pb (Heckel *et al.*, 1999) (GI: 5596527), reveló una homología del 94 %, además se encontraron diferencias en el mapa de restricción en ambas secuencias. Estas diferencias pueden estar relacionadas a las variantes alélicas del gen BtR-1 que confiere la resistencia a diversas poblaciones resistentes de *P. xylostella* del mundo. (Tabashnik *et al.*, 1997; Heckel *et al.*, 1999).

Por otra parte, uno de los objetivos de éste trabajo era encontrar un nuevo marcador de resistencia por medio de la amplificación aleatoria de DNA; sin embargo, todos los iniciadores probados, no mostraron una banda única para las cepas resistentes, por lo cual, dicho marcador genético no fue posible encontrarlo. No descartamos que en futuros trabajos, se pueda encontrar, ya que el número de iniciadores probados fue muy limitado, creemos que una mayor cantidad de éstos pueda dar como resultado un nuevo marcador de resistencia. Ahora el marcador genético EaaMcta-4.70 fue obtenido a través de fragmentos largos de amplificación aleatoria (AFLP). Esta técnica consiste en amplificar y cortar con enzimas de restricción fragmentos largos para detectar bandas comunes en poblaciones de la misma especie. (Heckel *et al.*, 1999), una clara alternativa para la búsqueda de marcadores genéticos sería el uso de nuevos iniciadores de amplificación aleatoria de DNA., y ésta se llevará a cabo en futuras investigaciones.

8.0 Conclusión.

1. El marcador genético EaaMcta-04.70 fue encontrado en colonias de *P. xylostella* resistentes a diversos formulados de *B. thuringiensis*.
2. El nivel de susceptibilidad de las colonias resistentes a las toxinas de *B. thuringiensis* presentes en el formulado comercial Xentari™, fue menor en la colonia norte.
3. Identificamos a *P. xylostella* resistente a formulados de *B. thuringiensis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Clonamos y determinamos la secuencia nucleotídica del fragmento.
5. El análisis de la secuencia nucleotídica reveló diferencias comparada con la reportada.
6. La caracterización genética de las colonias resistentes deberá ser abordada con un mayor número de iniciadores para tener un perfil genético más confiable.
7. Sí es posible monitorear la resistencia de *P. xylostella* en campo mediante el marcador genético EaaMcta-04.70.

9.0 Análisis y perspectivas de investigación.

Al encontrar que la susceptibilidad de *P. xylostella* se ha visto disminuida de manera alarmante en el tratamiento bajo presión selectiva en una de las poblaciones de Guanajuato. Se recomienda realizar estudios de afinidad de los sitios de unión para observar que proteínas presentan la pérdida de afinidad a los sitios de unión.

Al saber que el marcador genético se identificó en larvas resistentes de campo y bajo el tratamiento de presión selectiva, sería formidable probar el marcador directamente en poblaciones resistentes de *P. xylostella* de diversas partes del mundo para corroborar el monitoreo de resistencia por medio de este marcador.

10.0 Literatura citada.

1. Addison, J.A. 1993. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. *Can. J. For Res.* 23:2329-2443.
2. Aronson, A. L., W. Beckman y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50:1-24.
3. Ballester, V., F. Granero., B. E. Tabashnik., T. Malavar y J. Ferré. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1413-1419.
4. Ballester, V., F. Granero, B. E. Tabashnik, T. Malvar y J. Ferré. 1999. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to Cry1A (b). *Biocontr. Sci. Technol.* 4:437-443.
5. Bauer, L. y H.S. Pankratz. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego on midgut cells of cottonwood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* 60:15-25.
6. Bujanos-M R., Díaz-Gomes O., Rodriguez J.C., Shelton A.M., Lagunes-T A. 2000. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae) populations in Mexico to commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Econo. Entomol.* Vol. 93. No. 3. pp 963- 970 (8).
7. Bulla, L.A., Jr., K.J. Kramer, D.J. Cox, B.L. Jones y N. Goodman. 1985. Insecticidal *bacilli*, p. 185-209. En: D.A. Dubnau (ed.). *The molecular biology of the bacilli*. Academic Press, New York.
8. Estrada, U. y J. Ferré. 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.* 60:3840-3846.
9. Feitelson, J.S., J. Payne y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio-Technol.* 10:271-275.

10. Ferré, J., M.D. Real, J. Van Rie, S. Jansens y M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:5119-5123.
11. Ferré, J., B. Eschriche, Y. Bel y J. Van Rie. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. FEMS Microbiol. Lett. 132: 1-7.
12. Ferré, J., Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual. Rev. Entomol. 47:501-33
13. Ferré, J. 2000. Comunicación personal.
14. Forcada, C., E. Alcacer, M.D. Garcera Tato y R. Martínez. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in three strains of *Heliothis virescens*: Protolytic and SEM study of the larval midgut. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 31:257-272.
15. Georgiou. G.P. y A. Lagunes-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 318 p.
16. Gingrich, R.E. 1987. Demonstrations of *Bacillus thuringiensis* as a potential control agent for the adult Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* Wied. J. App. Entomol. 104:378-385.
17. Goldberg, L.J. y J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Unanotaenic unguiculara*, *Culex univiattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News 37:355-358.
18. Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, A. Anderson, J. Ferré, F.J. Silva y W.J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:7986-7990.
19. Granero, F., V. Ballester y J. Ferré. 1996. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry 1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). Biochem. Biophys. Res. Comm. 224:779-783

20. Heckel, D. G., L. J. Gahan., Y-B. Liu., B. E. Tabashnik. 1999. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8373-8377.
21. Herrero, S., B. Oppert, y Juan Ferré. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
22. Hillbeck, A., W.J. Moar, M. Pusztai-Carey, A. Filippini y F. Beigler. 1998. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea*. *Neuroptera: Chrysopidae. Environ. Entomol.* 27:1255-1263.
23. Hodgman, T.C., Y. Ziniu, S. Ming, T. Sawyer, C.M. Nicholls y D.J. Ellar. 1993. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain wich is toxic to the housefly *Musca domestica*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:17-22.
24. Keller, B. y G.A. Langenbruch. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*, p. 171-191. En: P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs, (ed.), *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
25. Krieg, A. y G.A. Langenbruch. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*, p. 293-321. En: H.D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
26. Lecadet, M.M. y D. Lereclus. 1984. Structure and activity of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin recent development in genetics, p 147-154. En: J.E. Alouf, F.J. Fehrenbach, J.H. Freer y J. Jeljaszewicz, (ed.), *Bacterial protein toxins*. Academic Press, London.
27. Maniatis. T., Fritsch. E.F., Sambrook. J. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
28. Martínez-Ramírez, A.C., F.Gould y J. Ferré. 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol. Sci. Technol.* 9:239-246.

29. Matharan, S., P.M. Sudha y Pechimuthu. 1989. Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombix mori* larvae: A histopathological and histochemical study. *J. Invertebr. Pathol.* 53:217-227.
30. McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229:193-195.
31. McGaughey, W. H y D. E. Johnson. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strain on cross-resistance in Indian-meal moths (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 80:535-540.
32. Moberg. W.K. 1990. Understanding and combating agrochemical resistance. In: *Managing resistance to agrochemicals*; Green. M.B., LeBaron. H.M. y W.K. Moberg. American Chemical Society. Washington. D.C. 1990. p. H5.
33. Navon, A. 1993. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, (P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs, Editors). pp. 125-146. John Wiley & Sons, New York.
34. Nei M, Li WH: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 1979, 76:5269-5273.
35. Oppert, B., K. Kramer, R. W. Beeman, D. Johnson, y W. H. MacGaughey. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272:23473-23476.
36. Payne, J.M., M.K. Kennedy, J.B. Randall y H. Meier. 1993. US patent No. 5,262,159.
37. Pereyra, B.; 2005; Comunicación Personal
38. Pietrantonio, P.V., B.A. Federici y S.S. Gill. 1993. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium, p. 55-79. En: E.E. Beakage, S.N. Thompson y B.A. Federici (ed.), *Parasites and pathogens of insects*, Vol. 2. Academic Press, San Diego.
39. Sawicki, R.M. 1987. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. En: *Combating resistance to xenobiotics; biological and*

chemical approaches, p. 105-117. En: M.G. Ford, D.W. Holloman, B.P.S. Khambay y R.M. Sawicki (ed.), Ellis Horwood. Chichester, England.

40. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lerecluse, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, y D. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
41. Stone, T.B., R.S. Sims y P.G. Marrone. 1989. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Invert. Pathol.* 53:228-234.
42. Suzuki, N., H. Hori, K. Ogiwara, S. Asano, R. Sato, M. Ohba y H. Iwahana. 1992. Insecticidal spectrum of a novel isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis*. *Biol. Control*, 2:138-142.
43. Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N. Finson y M.W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *J. Econ. Entomol.* 83:1671-1676.
44. Tabashnik, B.E., N. Finson y M.W. Johnson. 1992. Two protease inhibitors fail to synergize *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 85:2082-2087.
45. Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47-79.
46. Tabashnik, B.E., N. Finson, F.R. Groeters, W.J. Moar, M.W. Johnson, K. Luo y M.J. Adang. 1994a. Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4120-4124.
47. Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, T. Malvaer, D.G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J.L. Ménsua y J. Ferré. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12780-12785.
48. Tabashnik, B. E., A. L. Patin, T. J. Dennehy, Y-B. Liu, Y. Carrière, M. A. Sims y L. Antilla. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field population of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 12980-12984.

49. Tang, J.D., A.M. Shelton, J. Van Rie, S. De Roeck, W.J. Moar, R.T. Roush y M. Peferoen. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:564-569.
50. Waalwijk, C., A. Dullemans, G. Wieggers y P. Smits. 1992. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis* against tipulid larvae. *J. Appl. Entomol.* 114:415-420.
51. Waldschmidt, A., Salomao, T., Barros, E. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apiadae, Meliponinae). *Braz. J. Genet.*, vol. 20, no.3. ISSN 0100-8455.
52. Walters, F.S. y L.H. English. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Exp. Appl.* 77:211-216.
53. John G.K.Williams, Anne R.Kubelik, Kenneth J.Livak, J.Antoni Rafalski and Scott V.Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 22 6531.
54. Wirth, M. C., A. Dele'Cluse, B. A. Federici, W. E. Walton. 1998. Variable Cross-Resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Resistant to Single or Multiple Toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4174-4179.
55. Wirth, M.C., A. Dele'Cluse, W. E. Walton. 2001. Cyt1Ab1 and Cyt2Ba1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* Synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and Resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3280-3284.
56. Wirth, M.C., Park, H-W., Walton, W.E., and Federici, B.A. 2005. Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* Delays Evolution of Resistance toCry11A in the Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128 / AEM.71.1.185 –189.

57. Wright, D.J., F. Granero y J. Ferré. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1814-1819.

Apéndice de abreviaturas.

μ l	Microlitro.
μ M	Micromolar.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
c / p	Cada iniciador. (primer)
cbp	Como le venga y plazca.
ddNTP	Mezcla de di-desoxirribunucleótidos Trifosfatados.
DNA	Acido Desoxirribunucleico.
dNTP's	Mezcla de Desoxirribunucleótidos Trifosfatados.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EaaMcta-04.70	Marcador Genético.
EcoR1	Enzima de corte.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracetico.
F. C. B.	Facultad de Ciencias Biológicas.
Fig.	Figura.
gr	Gramo.
hr	Hora.
INIFAP	Instituto Nacional de Información Agropecuaria y Pesquera.
L	Litro.
LB	Luria Bertani.
LC ₅₀	Dosis letal media.
M	Concentración Molar.
mg	Miligramo.

min	Minutos.
ml	Mililitro.
mM	Concentración Milimolar.
MQ	mili Q.
N	Concentración Normal.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
° C	Grados Celsius.
OPA	Clase de Iniciador.
<i>P. xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i> .
pb	Pares de bases.
PBS	Buffer de fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Potencial de Hidrogeno.
PXR	<i>P. xylostella</i> resistente.
PXS	<i>P. xylostella</i> susceptible.
RAPD's	Polimorfismos aleatorios de fragmentos amplificados.
RNA	Acido ribonucléico.
RNasa	Enzima digestiva de RNA.
rpm	Revoluciones por minuto.
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i> .
S.O.C	Medio de azúcar-triptona-sal.
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
seg	Segundos.

<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni.</i>
<i>Taq</i>	DNA Polimerasa.
TBE	Tris-borato-EDTA. (Buffer de corrimiento)
U	Unidades.
U. A. N. L.	Universidad Autónoma de Nuevo León.
δ	Delta.

Apéndice de abreviaturas.

μ l	Microlitro.
μ M	Micromolar.
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .
c / p	Cada iniciador. (primer)
cbp	Como le venga y plazca.
ddNTP	Mezcla de di-desoxirribunucleótidos Trifosfatados.
DNA	Acido Desoxirribunucleico.
dNTP's	Mezcla de Desoxirribunucleótidos Trifosfatados.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EaaMcta-04.70	Marcador Genético.
EcoR1	Enzima de corte.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracetico.
F. C. B.	Facultad de Ciencias Biológicas.
Fig.	Figura.
gr	Gramo.
hr	Hora.
INIFAP	Instituto Nacional de Información Agropecuaria y Pesquera.
L	Litro.
LB	Luria Bertani.
LC ₅₀	Dosis letal media.
M	Concentración Molar.
mg	Miligramo.

min	Minutos.
ml	Mililitro.
mM	Concentración Milimolar.
MQ	mili Q.
N	Concentración Normal.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
° C	Grados Celsius.
OPA	Clase de Iniciador.
<i>P. xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i> .
pb	Pares de bases.
PBS	Buffer de fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Potencial de Hidrogeno.
PXR	<i>P. xylostella</i> resistente.
PXS	<i>P. xylostella</i> susceptible.
RAPD's	Polimorfismos aleatorios de fragmentos amplificados.
RNA	Acido ribonucléico.
RNasa	Enzima digestiva de RNA.
rpm	Revoluciones por minuto.
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i> .
S.O.C	Medio de azúcar-triptona-sal.
SDS	Duodecil sulfato de sodio.
seg	Segundos.

<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni.</i>
<i>Taq</i>	DNA Polimerasa.
TBE	Tris-borato-EDTA. (Buffer de corrimiento)
U	Unidades.
U. A. N. L.	Universidad Autónoma de Nuevo León.
δ	Delta.

Apéndice de instrumental, reactivos y soluciones.

Instrumental.

- Agitador de temperatura constante Lab Line.
- Baño metabólico: Precisión.
- Cámara de bioseguridad nivel II Labconco.
- Cámara de electroforesis horizontal HE33 HOEFER.
- Cámara de electroforesis horizontal SUB-CELL® GT BIORAD.
- Cámara de electroforesis vertical SE 600 Ruby, Amersham Bioscience.
- Centrifuga: Eppendorf 5415.
- Espectrofotometro.
- Fuente de poder: Thermo EC; Hoefer.
- Incubadora: Precision.
- Olla de presión digital: Yamato.
- Pipetas 1 ml, 200 µl, 20 µl, 10 µl: Eppendorf.
- Termoblock: Thermolyne DRI- BATH.
- Termociclador, Perkin-Elmer Geneamp 2400.

Reactivos.

Archilamida.	Proteinasa K.
BlindSilane.	Sigmacote.
Bromuro de etidio.	Triton X - 100.
Cloroformo.	Trizma Base.
Cloruro de Magnesio.	Agua miliQ esteril.
Cloruro de potasio.	Glucosa.
Cloruro de sodio.	Hidroxido de sodio. (NaOH)
Duodecil sulfato de sodio.	Acetato de potasio.
Etanol al 70 %.	Acido acético Glacial.
Etilen diamino tetraacetato disodico. (EDTA)	Colorante de corrida Azul-Naranja.
Fenol.	(azul de bromofenol, XilenCianol,
Fosfato de sodio.	naranja G)
Fosfato de potasio monobasico.	
Isopropanol.	

Medios de cultivo:

- Luria Bertani. (LB) adicionado con ampicilina (100 μg / ml)
- Caldo S. O. C. Invitrogen. (listo para usar)

Buffers y soluciones comunes:

Buffer de PBS tratamiento de hojas.

- NaCl 8 gr.
- KCl 0.2 gr.
- KH_2PO_4 anhidro 0.2 gr.
- Na_2HPO_4 1.5 gr.
- Se aforo a 100 ml de agua bidestilsada

Buffer de extracción de DNA.

- Tris - HCl 50 mM, pH 8.0 1.5 gr.
- SDS 2 % 5 gr.
- NaCl 0.75 M 10.95 gr.
- EDTA 10 mM 0.93 gr.
- proteinasa K 100 μg / ml.
- Se aforo a 250 ml de agua bidestilada y se esterilizo a 121° C por 15 min.

Solución fenol - cloroformo. (1:2)

- Fenol 25 ml.
- Cloroformo 25 ml.

Buffer de corrimiento TBE.

- Trizma Base 54 gr.
- Acido bórico 27.5 gr.
- EDTA 0.5 M pH 8 20 ml.
- Se afora a 1 L de agua bidestilada.

Buffers para extracción de DNA plasmídico.

Solución 1.

- Glucosa 50 mM.
- Buffer Tris pH 8.0 25 mM.
- EDTA 10 mM.

Se preparo al momento de usarse.

Solución 2.

- Se prepararon dos soluciones madre de NaOH 5 M y SDS 10 %.
- La solución se preparo al momento de usarse:
 - NaOH 0.2 N.
 - SDS 1 %.

Solución 3.

- Acetato de Potasio 5 M: 60 ml.
- Acido acético glacial: 11.5 ml.
- Agua MQ estéril: 28.5 ml.

Se almaceno a 4° C hasta el momento en que se uso.

Equipos de reactivos comerciales:

Purificación de productos de PCR.

- Wizard© PCR Preps DNA Purification System. (PROMEGA)

Purificación de DNA Plasmídico.

- Wizard© Plus SV Minipreps. DNA Purification System. (PROMEGA)

Clonación de productos de PCR.

- TOPO TA Cloning System Version pCR4.0.

Apéndice de *Plutella xylostella*.

Distribución.

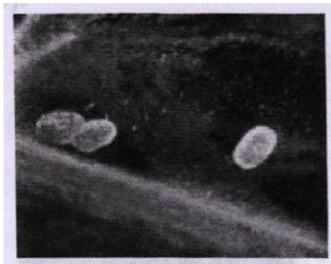
La palomilla dorso de diamante (*P. xylostella*) es un insecto cosmopolita originado de Europa y actualmente se encuentra distribuido en todo el mundo, a una distinción a tierras bajas, trópicos, sub-trópicos y zonas templadas.

Clasificación.

1. Reino: Animal.
2. Phylum: Artropoda.
3. Clase: Insecta.
4. Orden: Lepidoptera.
5. Familia: Plutellidae.
6. Genero: plutella.
7. Especie: *Plutella xylostella*.
8. Nombre común: palomilla dorso de diamante.

Reconocimiento y Diagnóstico:

La identificación de los huevos de *P. xylostella* presentan un tamaño menor a 1 mm (0.44 mm de longitud y 0.26 mm de ancho) con una coloración verde - amarilla. La ovoposición se muestra en grupos (2 a 8 huevos) localizados debajo de las hojas cerca del haz vascular central. Las hembras pueden depositar de 250 a 300 huevecillos y un probable promedio de producción total de 150 huevos.



Huevos de *P. xylostella*.

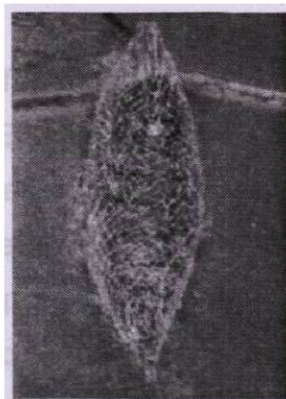
Las larvas de *P. xylostella* presentan 4 estadios larvarios. El promedio y la gama del tiempo de desarrollo son cerca de 4.5, 4, 4, y 5 días, respectivamente. A través de su desarrollo larvario siguen siendo absolutamente pequeñas y activas. Si son perturbadas, culebrean a

menudo violentamente, se mueven al revés y se dejan caer de la hoja manteniéndose en un filamento de seda. El largo total de cada instar excede raramente 1.7, 3.5, 7.0, y 11.2 mm, respectivamente, para los instars del 1 a 4. El ancho principal de la cápsula de la cabeza para estos instars son cerca de 0.16, 0.25, 0.37, y 0.61 mm. La forma larval del cuerpo afila en ambos extremos, con coloración variante entre amarillo claro y verde oscuro. El hábito de alimentación del primer instar larvario es de explotación minera de la hoja, aunque son tan pequeños que las minas son difíciles de notar. Las larvas emergen de sus minas en la conclusión del primer instar, mudan debajo de la hoja, y se alimentan después del envés de la hoja dejando la superficie foliar intacta, además de los puntos de crecimiento de la hoja impidiendo la correcta formación de la planta. .



Larva de *P. xylostella*.

Las pupas presentan un tamaño de 10 a 12 mm de longitud, con una coloración verde oscuro dentro de un capullo de seda blanco adherido a la hoja haciendo difícil removerlos. La duración del capullo hace un promedio de cerca de 8.5 días (gama 5 a 15 días).



Pupa de *P. xylostella*.

La palomilla muestran un tamaño de 8 a 10 mm de longitud, con una coloración grisáceo-marrón, las palomillas son reconocidas por tener tres marcas triangulares a lo largo del margen interno de las alas. Cuando la palomilla esta en posición de descanso estas marcas se juntan formando tres diamantes a lo largo del torso de la palomilla. Se localizan en el envés de la hoja para protegerse. Los varones y las hembras del adulto viven cerca de 12 y 16 días, respectivamente, y las hembras depositan los huevos por cerca de 10 días. El comportamiento es más activo y visible al atardecer volando alrededor de la planta buscando compañeros para cruzarse y ovopositar posteriormente. Los machos son atraídos por las hembras por medio de ferormonas.



P. xylostella adulto.

Hospederos:

La palomilla dorso de diamante puede completar su ciclo de vida en plantas de la familia cruciferae. Como plaga es más importante en repollo, brócoli, coliflor y rábano. Para el control de la palomilla es importante recordar que la mostaza y otras malezas de la misma familia son hospederos alternos de esta plaga.

Biología y Ecología:

La temperatura es un factor dominante en la palomilla alterando el ciclo vital en una a dos semanas. En los trópicos el ciclo de vida es mucho más cortó en zonas costeras que en las montañas. La palomilla es más problemática como plaga en la época seca. En la temporada de lluvias las larvas son removidas de las plantas por fuertes aguaceros. En algunos países no recomiendan sembrar repollo en la época seca ya que la incidencia de la palomilla dorso de diamante es tan alta que es muy difícil de controlar.

Daño e Importancia.

Las larvas de *P. xylostella* se alimentan del envés de la hoja sin tocar los tejidos vasculares de repollo, rábano, brócoli etc. (Crucíferas) incluyendo a plantas jóvenes limitando el crecimiento de estas. A medida que la superficie foliar de la hoja crece los pequeños hoyos se agrandan, dejando a la planta llena de agujeros. En el caso de brócoli y coliflor el daño es indirecto ya que se alimentan de las hojas y no de las cabezas florales que son comerciales. Algunas veces los gusanos y capullos se esconden en las cabezas de brócoli ocasionando el descarte del mercado de exportación.

Muestreo y Niveles Críticos.

La detección de las larvas de *P. xylostella* se hace visiblemente mediante la observación de la planta y los adultos se detectan por medio de trampas con feromonas para su atracción.

El muestreo es realizado en plantaciones donde cada planta debe ser examinada con atención sobretodo a los gusanos pequeños ocultos debajo de las hojas y en la parte basal de la plantas. Los hoyos y daño producido por los gusanos no son buenos indicadores del número de gusanos en el campo.

El nivel crítico en plantaciones es de 1 gusano por planta y es recomendable observar por lo menos 60 plantas y un máximo de 150. En el caso del brócoli y coliflor (Crucíferas) en la etapa vegetativa, las plantas pueden soportar hasta un 30% de defoliación sin tener mermas en el rendimiento.

Estrategias de control.

Control biológico.

Hay muchos enemigos naturales que ayudan en el control de *P. xylostella*. Por ejemplo la avispa parasitoide *Diadegma insularis* (Hymenoptera: Chalcididae), *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Microplitis plutellae* (Hymenoptera: Braconidae), *Diadromus subtilicornis* (Hymenoptera:

Ichneumonidae). Algunos usados de manera semicomercial como base del control de las larvas de la palomilla dorso de diamante.

Problemas de resistencia.

En algunos lugares donde se a usado intensamente el insecticida bacterial *Bacillus thuringiensis*, var. *kurstaki*, *P. xylostella* ha desarrollado resistencia a este producto, dejando a los agricultores con una alternativa menos en el control de insectos.

Manejo integrado de plagas. (MIP)

Estación de siembra: es preferible sembrar en la estación de lluvias cuando la población de *P. xylostella* es controlada por la lluvia.

La irrigación aérea puede reducir el número de gusanos en el campo. Además, si el riego es al atardecer puede limitar la actividad de los adultos.

El trasplante: Los semilleros deben sembrarse lejos de cultivos viejos y del lugar de siembra del cultivo. Es muy importante que los trasplantes lleguen limpios de gusanos al campo.

Es muy importante destruir los desechos de cosecha y si es posible, remover del campo las partes de la planta que no se cosecharon.

Los cultivo trampa son utilizados en algunos lugares por agricultores, intercalando plantas de la misma familia que son mas atractivas al insecto. Estos cultivos trampa deben ser monitoreados más frecuentemente que el mismo cultivo controlando al insecto antes que pasen al cultivo principal. Cultivos trampa que no son debidamente manejados pueden generar in incremento en las poblaciones de los insectos.

Control químico.

Recomendación de insecticidas.

Debido a la larga historia de desarrollo de resistencia a plaguicidas en esta plaga alrededor del mundo se debe disminuir el uso de insecticidas en los programas de MIP. Para las recomendaciones específicas de insecticidas a usar se debe contactar a las autoridades locales. Es muy recomendable que se realicen pruebas de resistencia a insecticidas para poder dar las mejores recomendaciones y usar los mejores productos en forma de rotación entre las

diferentes familias de insecticidas. Debe acordarse que solo se pueden usar aquéllos productos que están registrados en el país para el cultivo y la plaga.

Técnicas de Aplicación.

Con boquillas hidráulicas en bombas de mochila y de motor se tienen buenos resultados. Las fumigadoras electrostáticas aumentan la cobertura del plaguicida al mismo tiempo que disminuyen las cantidades de insecticida usado.

Literatura citada de páginas Web:

Rueda A., Shelton A.M. "Identification and information". Cornell international institute for food, Global crop pests; Developed by Alfredo Rueda and Anthony M. Shelton

Página Web:

<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/dbm.html#common>

Fecha de consulta: Noviembre 2005

Fecha de última actualización: 12 / Abril / 2006

Capinera John L. University of Florida Institute of Food and Agricultural Science. Department of Entomology and Nematology. Publication Number: EENY-119. Copyright 2000-2005.

Página Web:

http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/diamondback_moth.htm

Fecha de consulta: Noviembre del 2005.

Fecha de última actualización: Noviembre del 2005.

Apéndice de la familia Crucíferas (Cruciferae).

Distribución.

Principalmente en regiones templadas de los Hemisferios Norte y Sur, la mayor concentración aparece en la Región Mediterránea y Asia Central.

Clasificación.

Ubicación taxonómica:

1. Reino: Plantae.
2. Phylum: Magnolophyta.
3. Clase: Dilleniidae.
4. Orden: Caparales.
5. Familia: Cruciferae o Brassicáceas.

Caracteres diagnósticos de la familia.

Hierbas anuales o perennes, rara vez arbustos, producen glucósinolatos.

Hojas: alternas, generalmente opuestas, a menudo lobuladas, incisas o profundamente divididas y sin estípulas, simples o bipinnadas pero rara vez con folíolos diferenciados, con muchos tipos de pelos según la especie.

Inflorescencias: en corimbo o en racimo generalmente ebracteados, rara vez terminales sobre escapos.

Flores: regulares, bisexuales, e hipoginas, receptáculo a menudo con nectarios, a veces unidos en anillo por fuera de los estambres.

Cáliz: 4 sépalos, libres, en 2 pares decusados, el par externo giboso.

Corola: 4 pétalos libres dispuestos en forma de cruz, generalmente unguiculados, con lámina extendiéndose por encima de los sépalos, rara vez ausentes.

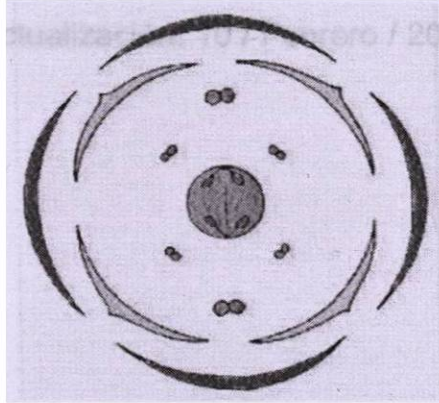
Androceo: 6 estambres, los dos externos más cortos que los 4 internos (4 en *Lepidium*, hasta 16 en *Megacarpa*) (tetradínamos).

Gineceo: ovario súpero con dos carpelos soldados y varios óvulos, con o sin estilo; estigma seco. Ovario dividido en dos cámaras por medio de una partición delgada no vascularizada conectando las dos placentas (falso tabique placentario); primordios seminales en 2 filas, en cada partición.

Fruto: Silicua o silícula, generalmente dehiscentes, con valvas caducas, a veces lomentáceo. Semillas en una o dos hileras.

Formula floral:

☞ ⊕ ♀ K4 C4 A 4+2 G(2)



Familia cosmopolita que consta de 350 - 381 géneros y más de 3000 especies a continuación se presentan algunos de los géneros más importantes.

- **Género *Brassica*:**

- *Brassica oleracea*: coliflor, repollos, brócoli y Alcauciles
- *Brassica napus subsp rapifera*: nabo o colinabo.
- *Brassica napus subsp rapa*: colza común.
- *Brassica nigra*: mostaza negra.

- **Género *Raphanus*:**

- *Raphanus sativus*: rábano.

- **Género *Sinapis*:**

- *Sinapis alba*: mostaza blanca.

Del cual destaca como hospedero de *P. xylostella* el genero *Brassica*. Las familias de mayor importancia son *Brassica oleracea* y *Brassica napus subsp rapifera*, también es importante recordar que la mostaza y otras malezas de la familia *Cruciferae* son hospederos alternos de esta plaga.

Literatura citada de página Web.

Prof. García Breijo, F. J. Botánica. Unidad docente de la ETSMRE;
Universidad Politécnica de Valencia.

Página Web:

<http://www.euita.upv.es/variados/biologia/Temas%20Angiospermas/DII%C3%A9nidas/Crucíferas/Crucíferas.htm>

Fecha de consulta: Noviembre 2005

Fecha de última actualización: 10 / Febrero / 2006

