

ÍNDICE

1.0 Introducción	2
1.1 La polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i> , M)	5
1.1.1 Antecedentes del control	6
1.1.2 Resistencia a los insecticidas	7
1.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>).....	8
1.2.1 Modo de acción de la toxina <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
1.2.2 Antecedentes sobre resistencia hacia plantas transgénicas con genes <i>Bt</i>	11
1.3 Generalidades de las quitinasas	12
1.3.1 Las plantas y sus quitinasas	13
1.3.2 Clasificación de las quitinasas	13
1.3.3 Características de las quitinasas de hongos	14
1.3.4 Estructura de las quitinasas de hongos	15
1.4 Efecto sinérgico entre una δ -endotoxina y una quitinasa	16
1.5 Generalidades de <i>Botrytis cinerea</i>	18
1.6 Generalidades de <i>Alternaria alternata</i>	19
1.7 Solución biotecnológica al problema planteado	20
1.7.1 Plantas transgénicas	20
1.7.2 Promotor tejido específico (<i>rbcS1A</i>)	21
1.8 Hipótesis de trabajo y objetivos	22
1.8.1 Hipótesis de trabajo	22
1.9 Objetivo General	22
1.9.1 Objetivos específicos	22
1.9.1.1 Evaluar el efecto de la expresión del gen <i>cry</i> en hojas de tabaco sobre el control de la polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>)	22

1.9.1.2 Determinar la actividad de la quitinasa en las plantas transgénicas utilizando para ello dos hongos de importancia agrícola (<i>Alternaria alternata</i> y <i>Botrytis cinerea</i>).....	22
1.9.1.3 Evaluar el efecto de la sobreexpresión del gen quitinasa (<i>chit33</i>) sobre el control de la polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>)	22
1.9.1.4 Evaluar el efecto sinérgico utilizando ambas proteínas simultáneamente en plantas de tabaco.....	22
2.0 Materiales y Métodos	23
2.1 Electroforesis de ADN	24
2.1.1 Electroforesis en el gel de agarosa	24
2.1.2 Recuperación desde geles de agarosa	24
2.1.3 Digestiones de ADN con enzimas de restricción	25
2.1.4 Reacción de ligación.....	25
2.1.5 Preparación antibióticos	25
2.2 Promotor tejido específico <i>rbcS1A</i>	25
2.3 Origen de la cepa de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
2.4 Clonación gen completo <i>cry1Ab</i> en el vector pGem-T	26
2.4.1 Extracción de ADN plasmidial desde células <i>E.coli</i>	27
2.4.2 Secuenciación del gen completo <i>cry1Ab</i>	27
2.4.3 Expresión del gen <i>cry1Ab</i> en el vector pHT315	27
2.4.4 Aislación de la secuencia codificante para la porción N-terminal tóxica de la proteína Cry1Ab	28
2.5 Clonación de fragmentos de PCR y transformación de células competentes	29
2.6 Gen quitinasa (<i>chit33</i>)	30
2.6.1 Determinación actividad quitinásica.....	30
2.6.1.1 Clonación y expresión del gen <i>chit33</i> en <i>E.coli</i>	30
2.6.1.2 Purificación de la proteína recombinante	31

2.6.1.3 Electroforesis de las proteínas recombinantes	31
2.6.1.4 Análisis del extracto proteico sobre la velocidad de crecimiento de <i>Botrytis cinerea in vitro</i>	32
2.6.1.5 Análisis bajo microscopio del crecimiento micelial tanto de <i>Botrytis cinerea</i> como de <i>Alternaria alternata</i> bajo el efecto del extracto proteico	33
2.6.1.6 Comprobación de la actividad quitinasica de las plantas transgénicas portando la construcción pCambia- <i>chit33</i> medida sobre el hongo <i>Botrytis cinerea</i>	33
2.7 Construcción de vectores para la expresión del gen truncado <i>cry1Ab</i> y del gen quitinasa (<i>chit-33</i>) en tabaco cultivar <i>Xanthy</i>	34
2.7.1 Vector de expresión pBin19- <i>chit33</i>	34
2.7.2 Vector de expresión pBin19- <i>Gus</i>	34
2.7.3 Vector de expresión pBin19- <i>cry1Ab</i>	35
2.7.4 Vector de expresión pCambia1380- <i>chit33</i>	36
2.7.5 Protocolo de electroporación para células <i>A. tumefaciens</i>	36
2.7.6 Ensayo histoquímico	37
2.8 Material Vegetal	37
2.8.1 Población de la polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i> , Meyrick)	38
2.8.2 Plantas transgénicas	38
2.8.2.1. Transformación de Tabaco	39
2.8.3 Análisis de la proteína Cry en las plantas transformada	40
2.8.4 Determinación proteica Cry1Ab truncada en las plantas transgénicas	40
2.8.5 Análisis de la proteína quitinasa en las plantas transformadas	40
2.8.6 Actividad peroxidada en las líneas transformantes	41

2.8.7 Selección de las líneas transformantes	41
2.8.8 Bioensayos	41
3.0. Resultados y Discusión	43
3.1 Generación de las construcciones	44
3.1.1 Clonación del promotor tejido específico <i>rbcS1At</i> en el vector pBin-19	44
3.1.2 Ensayo histoquímico usando el vector de expresión pBIN-19 expresando el gen <i>GUS</i> (<i>b-glucuronidasa</i>) junto al promotor tejido específico <i>rbcS1At</i>	46
3.2 Elección de la cepa portadora del gen <i>cry</i> a ser utilizado en la transformación de plantas	46
3.2.1 Identificación y secuenciación gen <i>cry</i> desde cepa LM-12.....	47
3.3 Clonación en el vector bifuncional pHT315 del gen <i>cry1Ab</i> para su expresión en <i>Bacillus thuringiensis</i>	50
3.4 Amplificación gen truncado <i>cry1Ab</i>	50
3.4.1 Clonación del gen <i>cry1Ab</i> truncado en vector pBin19	51
3.5 Secuenciación parcial gen quitinasa (<i>chit33</i>)	53
3.5.1 Clonación y expresión del gen <i>chit33</i> en <i>E.coli</i>	54
3.5.2 Generación de la quitinasa recombinante	55
3.6 Ensayo proteína recombinante <i>chit33</i> contra los hongos <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	56
3.7 Generación de cepas <i>Agrobacterium</i> LB4404 portadoras gen <i>chit33</i>	62
3.8 Generación de las plantas transgénicas portadoras del gen <i>cry1Ab</i> truncado y gen <i>chit33</i>	64
3.9 Comprobación de la presencia del transgen en las líneas transgénicas	65

3.9.1 Actividad peroxidasa y quitinasa de diferentes líneas transgénicas.....	68
3.9.2 Ensayo plantas transgénicas que expresan el gen <i>chit33</i> contra <i>Botrytis cinerea</i>	71
3.9.3 Caracterización plantas transgénicas portadoras del gen <i>cry1Ab</i> truncado	72
3.9.4 Expresión proteína truncada Cry1Ab en plantas de tabaco var <i>Xanthy</i>	73
3.9.5 Bioensayos con larvas neonatas de <i>Tuta absoluta</i>	75
3.9.6 Heredabilidad del transgen <i>cry1Ab</i> truncado y <i>chit33</i>	79
4.0. Conclusiones.....	81
4.0.1 Efecto de la quitinasa sobre <i>Alternaria alternata</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	81
4.0.2 Plantas transgénicas expresando el gen <i>cry</i> truncado y el gen de quitinasa <i>chit33</i>	81
5.0. Bibliografía	82
6.0 Anexos	95
6.1 Bioensayo con Mosca blanca (<i>Trialeurodes vaporariorum</i> Westwood)	95
6.2 Esquema explicativo de la transformación de los explantes de tabaco usando una cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	96
6.3 Tratamiento químico	97
6.4 Artículos publicados	97

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1 Polilla del tomate, <i>Tuta absoluta</i>	6
Figura 2 Ordenes de insectos susceptibles a la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
Figura 3 Mecanismo de acción de la proteína Cry al interior de la larva	10
Figura 4 Quitina: polímero de unidades de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlace $\beta(1-4)$	12
Figura 5 Estructura de quitinasas de hongos perteneciente a la familia 18.....	15
Figura 6 Esquema representativo del accionar de la proteína Cry y la quitinasa en el mesenterón de la larva (<i>Tuta absoluta</i>). MP, membrana peritrófica	17
Figura 7 <i>Botrytis cinerea</i> (A) Observación bajo microscopio óptico de hifas y conidias de <i>Botrytis cinerea</i> (B) Crecimiento normal del hongo en medio de cultivo agar papa dextrosa	19
Figura 8 <i>Alternaria alternata</i> (A) Crecimiento normal del hongo en medio de cultivo agar papa dextrosa (B) Observación bajo microscopio óptico de hifas y conidias de <i>Alternaria alternata</i>	20
Figura 9 Esquema gen <i>cry1Ab</i> con algunos de los partidores utilizados	27
Figura 10 <i>Botrytis cinerea</i> utilizada en el ensayo en las plantas transgénicas.....	33
Figura 11 Inoculación de las plantas transgénicas con el hongo <i>Botrytis cinerea</i>	34
Figura 12 Construcciones con el gen <i>cry1Ab</i> y gen <i>chit33</i>	38
Figura 13 Forma de inoculación plantas del tipo silvestre y transgénicas con las larvas neonatas de <i>Tuta absoluta</i>	42
Figura 14 Liberación del promotor <i>rbcS1At</i> desde el vector pBin-19.....	44
Figura 15 Secuenciación parcial promotor <i>rbcS1At</i>	45
Figura 16 Expresión transitoria del gen <i>GUS</i> en hojas de tabaco.....	46
Figura 17 Análisis de amplificación mediante PCR con los partidores P-180a y P-182a gen completo <i>cry1</i>	47
	VI

Figura 18 Secuencia completa del gen <i>cry1</i> amplificado con los partidores 1Ab directo e inverso.....	48
Figura 19 Árbol filogenético con las secuencias <i>cry</i>	49
Figura 20 (A) Análisis de restricción del clon pHT315 más gen <i>cry1Ab</i> con sitios de restricción <i>SphI</i> y <i>Sall</i>	50
Figura 21 Amplificación del gen truncado con sitios de restricción <i>BamHI</i> y <i>Sall</i> con los partidores Trun5/Trun3	51
Figura 22 Análisis de amplificación mediante PCR con los partidores Trun5/Trun3	51
Figura 23 Secuenciación del gen <i>cry1Ab</i> truncado.....	52
Figura 24 Secuencia aminoacídica de la proteína truncada Cry1Ab.....	52
Figura 25 Dominios conservados proteína Cry1Ab truncada	53
Figura 26 Secuenciación parcial del gen <i>chit33</i> usando partidores del vector pCambia230	53
Figura 27 Homología del gen <i>chit33</i> detectada en la base de datos del GenBank ...	54
Figura 28 Análisis de restricción de los clones pBluescript- <i>chit33</i> , pCambia- <i>chit33</i> y pBin19- <i>chit33</i>	54
Figura 29 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes	55
Figura 30 Efecto inhibitorio del extracto proteico (quitinasa) sobre <i>B.cinerea</i>	58
Figura 31 Efecto inhibitorio del extracto proteico sobre <i>Alternaria alternata</i>	59
Figura 32 Efecto de la actividad del extracto proteico (quitinasa) sobre <i>B.cinerea</i> a igual dosis y con tres repeticiones	59
Figura 33 Efecto de la actividad del extracto proteico (quitinasa) sobre <i>A.alternata</i>	60
Figura 34 Observación bajo microscopio óptico (400X) de las hifas de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Alternaria alternata</i>	61
Figura 35 Análisis de restricción cepa pCambia-1380 portando promotor <i>rbcS1At</i> y	

gen <i>chit-33</i>	62
Figura 36 Análisis de restricción cepa 1 pBin- <i>chit33</i>	63
Figura 37 Análisis de restricción cepa 2 pBIN- <i>chit33</i>	63
Figura 38 Proceso de transformación y regeneración de plantas transgénicas de tabaco	64
Figura 39 Análisis de amplificación de diversas líneas transgénicas mediante PCR....	65
Figura 40 Análisis de amplificación mediante PCR de diversas líneas transgénicas....	66
Figura 41 Análisis de amplificación mediante PCR de diversas líneas transgénicas, gen <i>chit33</i>	67
Figura 42 Análisis de amplificación mediante PCR de las diversas líneas transgénicas.	68
Figura 43 Ensayo de la actividad quitinasa y peroxidasa en diversas líneas transgénicas de tabaco	70
Figura 44 Ensayo de la actividad quitinasa diversas líneas transgénicas	71
Figura 45 Ensayo líneas transgénicas de tabaco expresando pCambia2300- <i>chit33</i>	72
Figura 46 Análisis de amplificación mediante PCR de diversas líneas transgénicas portadoras del gen <i>cry</i> truncado	73
Figura 47 Ensayo de inmunocaptura Dot blot.....	74
Figura 48 Ensayo de líneas transgénicas con la polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>) al cabo de 6 días posteriores a la inoculación	76
Figura 49 Ensayo de líneas transgénicas portadoras del gen <i>cry1Ab</i> truncado y línea pBin- <i>chit33</i> asperjarda con <i>Bacillus thuringiensis</i> (2,56 mg <i>Bt</i> /planta)	77
Figura 50 Ensayo líneas transgénicas portadoras del gen <i>cry1Ab</i> truncado y línea pBin-33 asperjarda con <i>Bacillus thuringiensis</i> (2,56 mg <i>Bt</i> /planta)	78
Figura 51 Larvas de la polilla del tomate (<i>Tuta absoluta</i>) extraídas desde las distintas líneas transgénicas	78
Figura 52 Plantas de tabaco transgénicas creciendo en medio con antibiótico, generación F ₁	80

Figura 53 Bioensayo mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>) a los 15 días. (A) Plantas transgénicas portadoras del gen <i>cry</i> o del gen de la quitinasa. (B) Brote línea pBin- <i>chit33</i>	96
---	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.0 Efecto del empleo de quitinasas sobre la Dosis Letal 50 (DL ₅₀) sobre la larva <i>S. littoralis</i>	18
Cuadro 2.1 Partidores internos para la amplificación completa del gen <i>cry1Ab</i>	27
Cuadro 2.2 Partidores internos para la amplificación parcial del gen <i>chit33</i>	31
Cuadro 2.3 Escala visual de grado de daño sobre el follaje de un insecto minador	42
Cuadro 2.4 Cuantificación de los daños ocasionados por la larva neonata de la <i>Tuta absoluta</i> sobre diversas líneas transgénica	79