

TD-B  
00729



50001417398  
Biblioteca de Ciències

R. 22186



# Respuesta de Tres Especies de Lepidópteros a las Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*: Análisis Genético y Bioquímico



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
REGISTRE GENERAL  
ENTRADA

17 NOV. 2003

N.º 168607

HORA 12.59

OFICINA AUXILIAR NÚM. 14

UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 22186

DATA 6-II-04

SIGNATURA  
TD-B 00729

Nº LIBIS: 1417398

*Tesis Doctoral*  
*Joel González Cabrera*  
*Valencia, 2003*

*24 cm.*

UMI Number: U607704

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607704

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



Dr. D. Juan Ferré Manzanero, Catedrático del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Certifica: Que D. Joel González Cabrera, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria y que lleva por título: **"Respuesta de Tres Especies de Lepidópteros a las Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*: Análisis Genético y Bioquímico"**, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, expido el presente certificado en Burjassot, a 30 de octubre de 2003.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J Ferré', written over a horizontal line.

Fdo. Dr. D. Juan Ferré Manzanero



**A mi familia  
A Sonia  
A Sergio**







## AGRADECIMIENTOS

Soy consciente de que este apartado será uno de los más leídos de toda la Tesis, por eso ha sido el primero en empezarse y el último en terminarse, lo que no quiere decir que esté muy bien escrito. En él quisiera agradecer a todos aquellos que han hecho posible que este trabajo pudiese ver la luz. También me gustaría expresar mi agradecimiento a los que con su apoyo y solidaridad han permitido que me sienta como en una gran familia.

Juan, gracias por la confianza depositada, gracias por todo el trabajo y las horas que ha invertido en hacer que la ciencia sea un camino, gracias, muchas gracias por aquel madroño.

Salva, arrimar el hombro contigo es una de las mejores cosas que me ha pasado. Este trabajo es tuyo a medias, lo hemos sufrido y disfrutado juntos, no hay más que buscar tu nombre por ahí dentro. Espero que no se haya cortado la senda, sería un placer. Muchas gracias compañero.

Sara, creo que en todo este tiempo has sido quien más ha sufrido mi terquedad, pero lo que más mérito tiene es que creo que a pesar de eso hemos construido una amistad que espero dure muchos años y no tantas discusiones. Gracias a ti también, compañera.

Mi agradecimiento más profundo para el resto de mis compañeros de laboratorio, desde los más antiguos hasta los últimos en llegar: Balta, Sales, Ana Estela, Ana Rodrigo, Sabrina, Paloma, Yolanda y los colaboradores Salva y Patricia. Todos habéis puesto al menos un granito de arena para que esto saliera adelante, además de soportar mis interminables horas en el ordenador. También a los genéticos que aun están en la brecha: Juanan, Josep, Isabel, Silvia, Maya, Verónica y Lidón y a los que siguen en otros sitios: Santi, Rafa, Pili y Jose Blanca.

A Jose y Manoli por integrarme en su grupo de cinéfilos y tertulias nocturnas, que vienen muy bien para acumular más sueño, si cabe.

A Carmen y Paco por su entrañable amistad, por no irse nunca del todo.

A todos los amigos que a pesar del tiempo y la distancia aun están ahí, al otro lado de la línea.

A Juan, Gloria y Diana por acogerme en su familia como uno más, por enseñarme que beber de las tradiciones hace que la vida tenga un aroma especial.

A mis padres y hermanos, sin ellos nada de esto hubiese sido posible, su aliento y apoyo incondicionales han sido decisivos en momentos en que las cosas parecían no tener solución. Su amor y entereza me han permitido aguantar y seguir adelante.

A Sonia, por permitirme compartir su vida y sus sueños, por estar a mi lado en los malos y buenos momentos, por hacerlo todo más sencillo, por confiar en mi como profesional y como persona.

Muchas gracias a todos, esta Tesis es también de ustedes.



# ÍNDICE

APUNTE INICIAL.....	11
INTRODUCCIÓN.....	15
1. <i>Bacillus thuringiensis</i> : ASPECTOS GENERALES.....	15
1.1 Ecología y clasificación .....	15
1.2 Biología de <i>B. thuringiensis</i> .....	17
1.3 Toxinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	19
1.4 Clasificación y estructura de las $\delta$ -endotoxinas .....	21
1.5 Biotecnología basada en <i>B. thuringiensis</i> .....	24
2. MODO DE ACCIÓN.....	28
2.1 Ingestión.....	29
2.2 Solubilización.....	30
2.3 Activación .....	30
2.4 Paso a través de la membrana peritrófica .....	31
2.5 Unión a los receptores de membrana .....	31
2.6 Formación de poro .....	33
2.7 Lisis celular y muerte .....	34
3. RESISTENCIA A LAS TOXINAS DE <i>B. thuringiensis</i> .....	35
3.1 Aspectos generales .....	35
3.2 Mecanismos de resistencia.....	36
3.2.1 Alteración de la actividad proteolítica .....	37
3.2.2 Alteración de la unión de las toxinas al intestino .....	37
3.2.3 Mecanismos de resistencia en <i>P. xylostella</i> .....	38
3.3 Genética de la resistencia.....	39
3.3.1 Variabilidad genética .....	39
3.3.2 Frecuencia inicial de genes de resistencia .....	39
3.3.3 Dominancia .....	40
3.3.4 Estabilidad de la resistencia .....	41
4. "RECEPTORES" DE LAS PROTEÍNAS CRY .....	41
5. ESPECIES DE INSECTOS OBJETO DE ESTUDIO.....	43
5.1 <i>Plutella xylostella</i> (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) .....	43
5.1.1 Tipo de alimentación y daño .....	43
5.1.2 Ciclo biológico .....	43
5.1.3 Resistencia .....	43
5.1.4 Colonia PHI.....	44
5.2 <i>Pectinophora gossypiella</i> (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae).....	45

5.2.1 Tipo de alimentación y daño .....	45
5.2.2 Ciclo biológico .....	45
5.2.3 Resistencia .....	46
5.2.4 Colonia AZP-R.....	46
5.3 <i>Ostrinia nubilalis</i> (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae)....	47
5.3.1 Tipo de alimentación y daño .....	47
5.3.2 Ciclo biológico .....	47
5.3.3 Resistencia .....	48
5.3.4 Colonia KS-SC-R .....	48
OBJETIVOS.....	53
RESUMEN GENERAL .....	57
CONCLUSIONES .....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	71
PUBLICACIONES.....	93

*APUNTE INICIAL*



Dar el paso es lo verdaderamente importante

## **APUNTE INICIAL**

La capacidad de modificar el entorno en beneficio propio no es exclusiva del hombre. Sin embargo, hacerlo de forma calculada, egoísta y a escala global sí es una constante que convierte a nuestra especie en un peligro para el sostén del planeta.

El desarrollo humano está íntimamente ligado a la forma en que se han obtenido los alimentos. Primero, por simple recolección y distribución de frutos, caza y pesca, que permitía la subsistencia de unas pocas decenas o centenas de individuos y posteriormente, por la producción de éstos de forma planificada y a escalas cada vez mayores de forma que en la actualidad sería posible alimentar a los seis mil millones de personas que pueblan el planeta y quizás podrían quedar excedentes.

El desarrollo de la agricultura fue el salto cualitativo que dio al hombre la posibilidad de producir lo que antes tenía que recolectar. Este proceso estuvo acompañado paralelamente por otro muy peligroso. Los insectos, que antes se alimentaban de plantas silvestres, comenzaron a alimentarse de forma selectiva de esas otras plantas que producían más y mejores frutos, hojas más grandes, mayor cantidad de azúcares, etc. Grandes éxodos, hambrunas y calamidades se relacionan con este fenómeno. El uso de compuestos químicos para combatir las plagas permitió su control hasta que el desarrollo de resistencias provocó una secuencia de eventos donde los compuestos químicos eran cada vez más potentes y dañinos para el medio ambiente y las plagas cada vez más resistentes.

Actualmente el reto está en encontrar el sistema que nos permita seguir produciendo más y mejores alimentos sin comprometer con ello a todo el ecosistema. La utilización racional de métodos de control biológico en conjunto con el manejo integrado de plagas podría ser la clave de un desarrollo ecológico y sostenible de la agricultura.





# *INTRODUCCIÓN*



# INTRODUCCIÓN

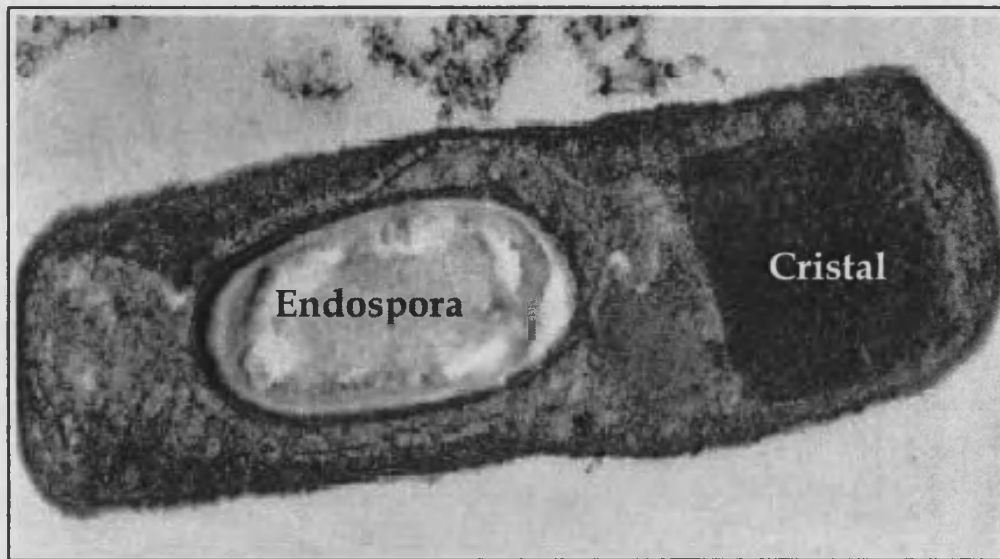
## 1. *Bacillus thuringiensis*: ASPECTOS GENERALES

La primera mención conocida de *Bacillus thuringiensis* data del año 1901 cuando el biólogo japonés S. Ishiwata la aisló como el agente causante de la enfermedad de "Sotto" (Suden-collapse bacillus) en larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*) (Ishiwata, 1901). En el año 1908, Iwabuchi la llamó *Bacillus sotto* Ishiwata, nombre que quedó en desuso posteriormente (Tanada y Kaya, 1993). La denominación actual de *Bacillus thuringiensis* le fue dada en el año 1915 cuando el científico alemán Berliner nombró así a una bacteria cuyos aislados había obtenido 4 años antes en la región alemana de Turingia a partir de larvas infestadas de la polilla gris de la harina (*Anagasta kuehniella*) (Berliner, 1911, 1915).

En el año 1928 se realizaron las primeras aspersiones en el campo con formulados basados en esta bacteria en el marco de un proyecto para controlar al barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*). El primer producto comercial, Sporeine, se fabricó en Francia en el año 1938. En los Estados Unidos, se realizaron varios formulados de prueba que comenzaron a emplearse en 1958, el primer registro realizado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) data de 1961. La creencia de que *B. thuringiensis* era activo sólo contra lepidópteros se disipó cuando se aislaron cepas con actividad contra dípteros y coleópteros en los años 1977 y 1983, respectivamente. El hecho de que los aislados de *B. thuringiensis* tuviesen una actividad específica contra dianas determinadas permitió que se considerara ideal para el control integrado de plagas (Glare y O'Callaghan, 2000).

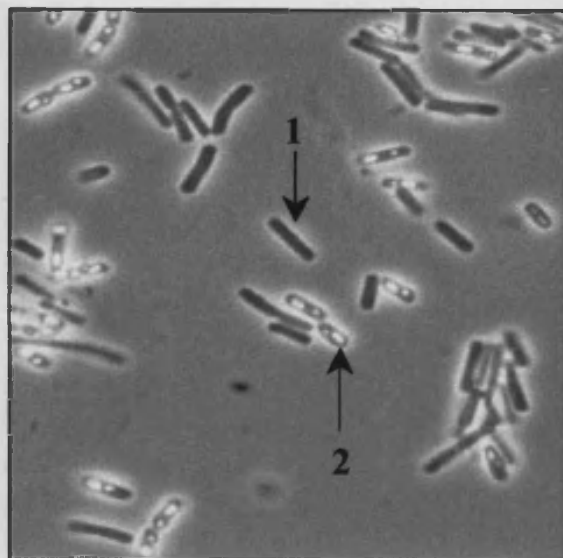
### 1.1 Ecología y clasificación

En los últimos años se ha conseguido aislar cepas de *B. thuringiensis* de casi todos los hábitats, incluyendo suelo, agua, insectos muertos, excrementos, granos almacenados y plantas (Schnepf et al., 1998), por lo que se le considera como una bacteria ubicua, en detrimento del criterio anterior que la incluía sólo dentro de las bacterias que habitaban en el suelo. Está incluida dentro del grupo de los bacilos Gram positivos formadores de endosporas. Su tamaño oscila entre 1,0-1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y 3-5  $\mu\text{m}$  de largo (Iriarte y Caballero, 2001) (Fig. 1).



**Figura 1.** Micrografía electrónica de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* berliner 1715. Tomado de Agaisse y Lereclus (1995).

La designación de *B. thuringiensis* como especie individual es muy discutida. Es casi imposible diferenciarlo morfológica y bioquímicamente de *Bacillus cereus* y tiene también una relación muy estrecha con *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoides*. Multitud de ensayos de biología molecular realizados con el fin de separar estas especies no han proporcionado pruebas concluyentes (Schnepf et al., 1998). Sin embargo, hay una diferencia que hasta el momento ha permitido realizar satisfactoriamente esta diferenciación. La mayoría de las cepas clasificadas dentro de *B. thuringiensis* producen inclusiones cristalinas durante la fase de esporulación que son fácilmente detectables por microscopía de contraste de fase (Iriarte y Caballero, 2001). No obstante este criterio no parece suficiente en algunos casos si tenemos en cuenta que existen cepas clasificadas como *B. thuringiensis* que no producen el citado cristal (llamadas acristalóforas) y que algunas cepas de *B. cereus* son capaces de hibridar con sondas del gen que codifica para *cry1Aa*, que es a su vez característico de *B. thuringiensis* (ver genes más adelante) (Schnepf et al., 1998).



**Figura 2.** Cultivo de *B. thuringiensis*. 1-Célula en crecimiento vegetativo. 2-Célula en fase de esporulación.

Los aislados de *B. thuringiensis* se clasificaron primeramente atendiendo a sus características morfológicas y bioquímicas (Heimpel y Angus, 1958), pero estas técnicas no eran suficientes para discriminar de forma eficiente entre las distintas cepas. El método más empleado en la actualidad, por su sensibilidad, reproducibilidad y fiabilidad, es la identificación serológica del antígeno flagelar (antígeno H). Se han identificado 69 serotipos y 13 subgrupos antigénicos que conforman los 82 serovares representados en los 3500 aislados de *B. thuringiensis* de la colección del Instituto Pasteur (Lecadet et al., 1999).

## 1.2 Biología de *B. thuringiensis*

El ciclo de crecimiento de *B. thuringiensis* comienza cuando la espora de resistencia germina, proceso que en condiciones favorables tarda sólo unos minutos. La célula vegetativa resultante crece y se multiplica activamente en condiciones aeróbicas, aunque es anaeróbica facultativa (Fig. 2). El crecimiento es adecuado en una gran variedad de medios de cultivo, así como en la hemolinfa de los insectos. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 26 y los 30° C, el pH óptimo está entre 6,5 y 7,5 (Iriarte y Caballero, 2001).

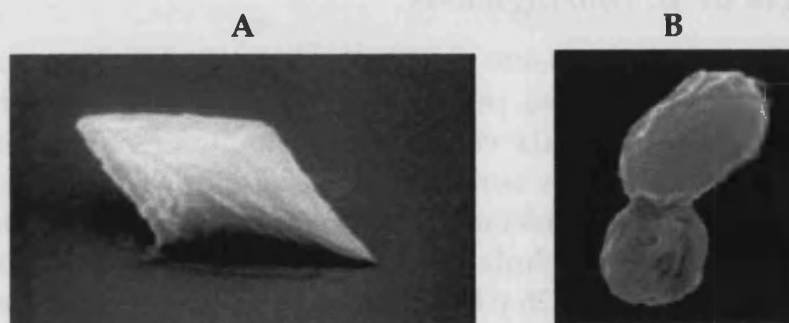
El empobrecimiento de los nutrientes en el medio de cultivo provoca el paso a la fase estacionaria de crecimiento que coincide con la formación de la endospora de resistencia y de las inclusiones cristalinas paraesporales que caracterizan a esta bacteria. Este fenómeno es favorecido por la presencia en el medio de sales de calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc (Stewart et al., 1981). Condiciones de baja presión de oxígeno o

### Introducción

altos niveles de nitrógeno orgánico en el medio pueden llegar a inhibir completamente la esporulación (Iriarte y Caballero, 2001). Las esporas son muy resistentes a las altas y bajas temperaturas y a la desecación y son capaces de sobrevivir en etanol 95% durante largos períodos de tiempo (Sneath, 1986). Son muy sensibles a la luz ultravioleta y pierden la viabilidad en menos de 24 horas cuando son expuestas a la luz solar (Ignoffo et al., 1981).

Las inclusiones cristalinas paraesporales que se producen durante la esporulación están formadas fundamentalmente por proteínas llamadas  $\delta$ -endotoxinas, que pueden ser una o varias dependiendo de la cepa; además, están presentes proteasas que podrían actuar como complemento a las enzimas del insecto en el proceso de activación (McPherson et al., 1988). Un hallazgo sorprendente es la presencia de DNA íntimamente asociado al cristal que podría estar involucrado en el proceso de activación proteolítica (Schnepf et al., 1998). También se ha descrito la existencia de chaperoninas que garantizarían la estabilización de la estructura del cristal e impedirían la degradación de éste por las proteasas celulares (Crickmore y Ellar, 1992). Estos cristales proteicos representan entre el 20 y el 30% del peso seco del esporangio (Bulla, Jr. et al., 1980), aproximadamente 0,5 mg de proteína por ml de cultivo en condiciones de laboratorio (Agaisse y Lereclus, 1995).

La morfología del cristal puede ser muy variada y normalmente está relacionada con el tipo de proteínas que contiene. Así, los bipiramidales están formados por las proteínas del tipo Cry1, los cúbicos por las Cry2, los planos por las Cry3 y los esféricos por las Cry4. Además, existen cristales con formas poliédricas e irregulares (Höfte y Whiteley, 1989) (Fig. 3). La integridad del cristal está garantizada por la gran cantidad de puentes disulfuro que se establecen entre las proteínas, fundamentalmente en la mitad C-terminal de éstas (Schnepf et al., 1998).



**Figura 3.** Micrografía electrónica de barrido de un cristal bipiramidal (A) y de un cristal irregular unido a la espora (B).

### 1.3 Toxinas de *B. thuringiensis*

El principal factor tóxico de esta bacteria radica en las  $\delta$ -endotoxinas que componen los cristales paraesporales, también conocidas como proteínas Cry (Crystal proteins) o ICPs (Insecticidal Crystal Proteins), términos provenientes del inglés. Se ha identificado un gran número de especies de invertebrados que son susceptibles a la acción de las proteínas Cry. Entre los insectos, especies pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga; también se ha descrito su efecto contra nematodos, ácaros y protozoos (Schnepf et al., 1998). Una de las propiedades fundamentales de cada proteína Cry es la especificidad para con su diana. Sólo son tóxicas para un número muy reducido de especies, incluso se han aislado cepas de *B. thuringiensis* cuyas toxinas no han mostrado toxicidad para ninguna de las dianas contra las que se han probado, aunque no se descarta que puedan serlo para alguna no probada aún. Como consecuencia de lo anterior, el efecto de estas toxinas sobre la fauna auxiliar, los enemigos naturales, los animales superiores y el hombre es casi nulo. Estas características permitieron que a finales de los años 30 del siglo pasado se comenzaran a comercializar formulados insecticidas que utilizaban como principio activo mezclas de esporas y cristales de esta bacteria. (Lambert y Peferoen, 1992; Schnepf et al., 1998; Glare y O'Callaghan, 2000).

Se han realizado varios estudios sobre el papel que juega la espora en la toxicidad de las cepas de *B. thuringiensis* y se llegó a establecer que no era muy importante (Glare y O'Callaghan, 2000). Sin embargo, hay ejemplos en los que se ha demostrado que la espora puede actuar de forma sinérgica con las proteínas Cry de tal forma que la toxicidad de las toxinas puras contra larvas de *Plutella xylostella* podía aumentar hasta un 146% (Miyasono et al., 1994). De igual forma, las esporas aumentaron el efecto de las proteínas Cry contra las larvas de *Plodia interpunctella* (Johnson y McGaughey, 1996).

Dentro de las  $\delta$ -endotoxinas se encuentran también unas proteínas que no presentan homología de secuencia ni de estructura terciaria con las proteínas Cry. Son conocidas como proteínas Cyt por la acción citolítica que las caracteriza. Forman un cristal redondeado o poliédrico que contiene proteínas de alrededor de 27 kDa (Höfte y Whiteley, 1989). No se ha establecido con claridad su mecanismo de acción, pero existen datos que indican que afectan la permeabilidad de la membrana plasmática de las células del intestino. El cristal de la CytA se disuelve a pH por encima de 8 (Federici y Bauer, 1998) y es necesaria una activación proteolítica en el intestino de la larva para que pueda ejercer su acción tóxica (Thomas y Ellar, 1983; Koni y Ellar, 1994).

Cuando las toxinas Cyt se expresan aisladamente, su toxicidad para las larvas de dípteros es muy baja. Sin embargo, se ha encontrado que



## Introducción

actúan de forma sinérgica con las proteínas Cry presentes en los cristales producidos por *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Wirth et al., 1997; Federici y Bauer, 1998). Ensayos de toxicidad realizados en condiciones de experimentación homogéneas mostraron que cualquier combinación entre las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11A con la CytA tenía efectos sinérgicos contra larvas de *Aedes aegypti* (Crickmore et al., 1995). Se propone que la alta efectividad contra mosquitos que tienen los formulados de *B. thuringiensis* var. *israelensis* se debe a que expresan conjuntamente ambos tipos de toxinas. Además, se especula que la ausencia de resistencia a estos formulados se debe también al sinergismo entre ellas (Schnepf et al., 1998; Bravo, 2001).

Aunque las  $\delta$ -endotoxinas se producen en la fase de esporulación, durante la fase vegetativa del crecimiento se produce también una cantidad considerable de factores tóxicos, entre los cuales se encuentran:

**$\beta$ -exotoxina.** Esta toxina, conocida como thuringiensina por haber sido detectada por primera vez en el serovar *thuringiensis*, también se ha encontrado en los serovares *kurstaki*, *sotto*, *kenyae*, *galleriae*, *aizawai*, *morrisoni*, *tolworthi*, *darmastadiensis*, *toumanoffi*, *thompsoni* y *kumamotoensis* (Sebesta et al., 1981; Levinson et al., 1990; Tanada y Kaya, 1993; Horák et al., 1996; Hernández et al., 2003). Es una molécula de bajo peso molecular, termoestable (70°C, 15 minutos), análogo estructural de los nucleótidos de adenina, que se expresa en la fase vegetativa del crecimiento y se excreta al medio en forma soluble. Su efecto tóxico parece radicar en su capacidad para inhibir a las RNA polimerasas dependientes de DNA (Sebesta y Horská, 1970).

Se ha descrito su toxicidad frente a un amplio espectro de organismos: lepidópteros, dípteros, himenópteros, hemípteros, isópteros, ortópteros, nematodos y ácaros. Se ha demostrado que posee efectos tóxicos sobre los órganos de los vertebrados, particularmente en el hígado, los riñones y las glándulas suprarrenales. En humanos, provoca un incremento en el número de aberraciones cromosómicas en cultivos de células de la sangre.

Esta toxina actúa de forma sinérgica con las  $\delta$ -endotoxinas en insectos resistentes a estas últimas. Este efecto puede deberse a la inhibición que ejerce la  $\beta$ -exotoxina sobre la regeneración del tejido del intestino medio en insectos afectados por las  $\delta$ -endotoxinas (Glare y O'Callaghan, 2000).

Varios países incluyen como requisito para el registro de productos basados en cepas de *B. thuringiensis* la ausencia de  $\beta$ -exotoxina (McClintock et al., 1995). No obstante, su efectividad para controlar plagas de mosquitos y moscas hace que en algunos países del este de Europa y en África se

## Introducción

comercialicen productos que contienen esta toxina (Carlberg et al., 1985, 1995; Carlberg, 1986).

**Proteínas insecticidas vegetativas.** Estas proteínas conocidas por sus siglas en inglés (Vip) se expresan a partir de la segunda mitad de la fase logarítmica del crecimiento y continúan expresándose en la fase de esporulación de *B. thuringiensis*. No forman cristal y se excretan al medio de cultivo. La proteína Vip3A es tóxica para *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*. Aproximadamente el 15% de las cepas *B. thuringiensis* examinadas tenían homólogos a esta proteína. Vip3A tiene 791 aminoácidos (88,5 kDa) y no presenta homología con ninguna proteína conocida (Estruch et al., 1996). El modo de acción de las proteínas Vip es similar al de las proteínas Cry, ya que se unen a las células epiteliales del intestino medio del insecto provocando su posterior lisis, que sería la causa de su muerte (Yu et al., 1997; Lee et al., 2003).

**Otros factores tóxicos.** Se han identificado cepas de *B. thuringiensis* que expresan hemolisinas y enterotoxinas similares a las de *B. cereus* y además, se ha propuesto que exoenzimas como las quitinasas, proteasas y fosfolipasas participan activamente en la toxicidad (Glare y O'Callaghan, 2000).

A pesar de producir tal cantidad de factores tóxicos, el efecto de la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* sobre los mamíferos es prácticamente nulo. Las pruebas realizadas demuestran que *B. thuringiensis* no presenta toxicidad aguda, ni crónica; tampoco se observan efectos mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos, ni sobre la capacidad reproductiva de diferentes animales (para una revisión más completa véase <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/bacillus.htm>).

## 1.4 Clasificación y estructura de las $\delta$ -endotoxinas

Antes del año 1989 no existía una clasificación sistemática de las proteínas Cry. Éstas se nombraban arbitrariamente por el autor del aislamiento. Ese año, Höfte y Whiteley propusieron un sistema que agrupaba las proteínas Cry de acuerdo con su toxicidad y similitud de secuencia, asignando números romanos para diferenciar los diferentes grupos. Así, las que eran tóxicas para lepidópteros se nombraban CryI; las tóxicas para dípteros y lepidópteros, CryII; las tóxicas para coleópteros, CryIII y las que sólo presentaban toxicidad para los dípteros, CryIV (Höfte y Whiteley, 1989). Este sistema fue de gran utilidad durante varios años, pero se mostró inconsistente en algunos casos. La toxina CryIIB estaba en el grupo de las tóxicas para dípteros y lepidópteros y sólo era tóxica para los segundos (Crickmore et al., 1998); la CryIC resultó ser tóxica para dípteros y lepidópteros (Smith y Ellar, 1994) y la CryIB lo era para lepidópteros y coleópteros (Bradley et al., 1995).

## *Introducción*

La nomenclatura de Höfte y Whiteley se revisó para resolver estas inconsistencias y se propuso un nuevo sistema basado en la asignación de nombres a los genes miembros de distintas familias de acuerdo con su divergencia evolutiva estimada por algoritmos de árboles filogenéticos (Crickmore et al., 1998). Según lo anterior, la clasificación se haría teniendo en cuenta la homología de secuencia de los distintos genes. Se sustituyeron los números romanos por arábigos en el primer rango de separación para dar entrada al gran número de genes que se esperaba descubrir en el futuro. Se establecieron tres rangos para catalogar las toxinas, los límites estarían en el 45, 78 y 95 % de identidad, respectivamente (Crickmore et al., 1998). Las toxinas que tuviesen hasta el 45% de homología serían incluidas en el primer rango y se les asignaría el mismo número (Ej. Cry1). Las que tuviesen entre el 45 y el 78% entrarían en el segundo rango y se designarían con una letra mayúscula adyacente al número (Ej. Cry1A). Entre el 78 y el 95% se cubriría el tercer rango y sería designado con una letra minúscula adyacente a la mayúscula (Ej. Cry1Aa). Las secuencias que tuviesen una homología por encima del 95% serían consideradas como alelos del mismo gen y se les agregaría un número arábigo al final (Ej. Cry1Aa1) (Crickmore et al., 1998).

Actualmente ya han sido clasificados 118 holotipos correspondientes a las proteínas Cry y 8 a las Cyt. Esta lista es revisada periódicamente por un comité que se encarga de incluir los genes nuevos que se describen (Fig. 4).

La estructura tridimensional de varias  $\delta$ -endotoxinas ya ha sido determinada por difracción de rayos X: Cry3Aa (Li et al., 1991), Cry1Aa (Grochulski et al., 1995), Cyt2Aa (Li et al., 1996), Cry2Aa (Morse et al., 2001) y Cry3Bb (Galitsky et al., 2001) (Fig. 5). A pesar de que las proteínas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa y Cry3Bb son tóxicas para diferentes órdenes de insectos y su homología de secuencia no rebasa en algunos casos el 17% (Morse et al., 2001), la estructura de todas ellas es muy similar, lo que podría ser la causa de que el modo de acción de todas ellas fuese muy similar. La estructura se compone de tres dominios claramente definidos. El dominio I está compuesto por 7 hélices  $\alpha$ , anfipáticas y antiparalelas. Las hélices se disponen en una conformación similar a un anillo tomando a la hélice 5 como centro y el resto alrededor. Los dominios II y III se componen de plegamientos  $\beta$ . Los del dominio II tienen una topología en "Greca" y los del dominio III forman un "sándwich" (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995; Morse et al., 2001). Las hipótesis sobre la implicación de cada dominio en el modo de acción de las proteínas Cry se tratará más adelante.



1°

2°

3°

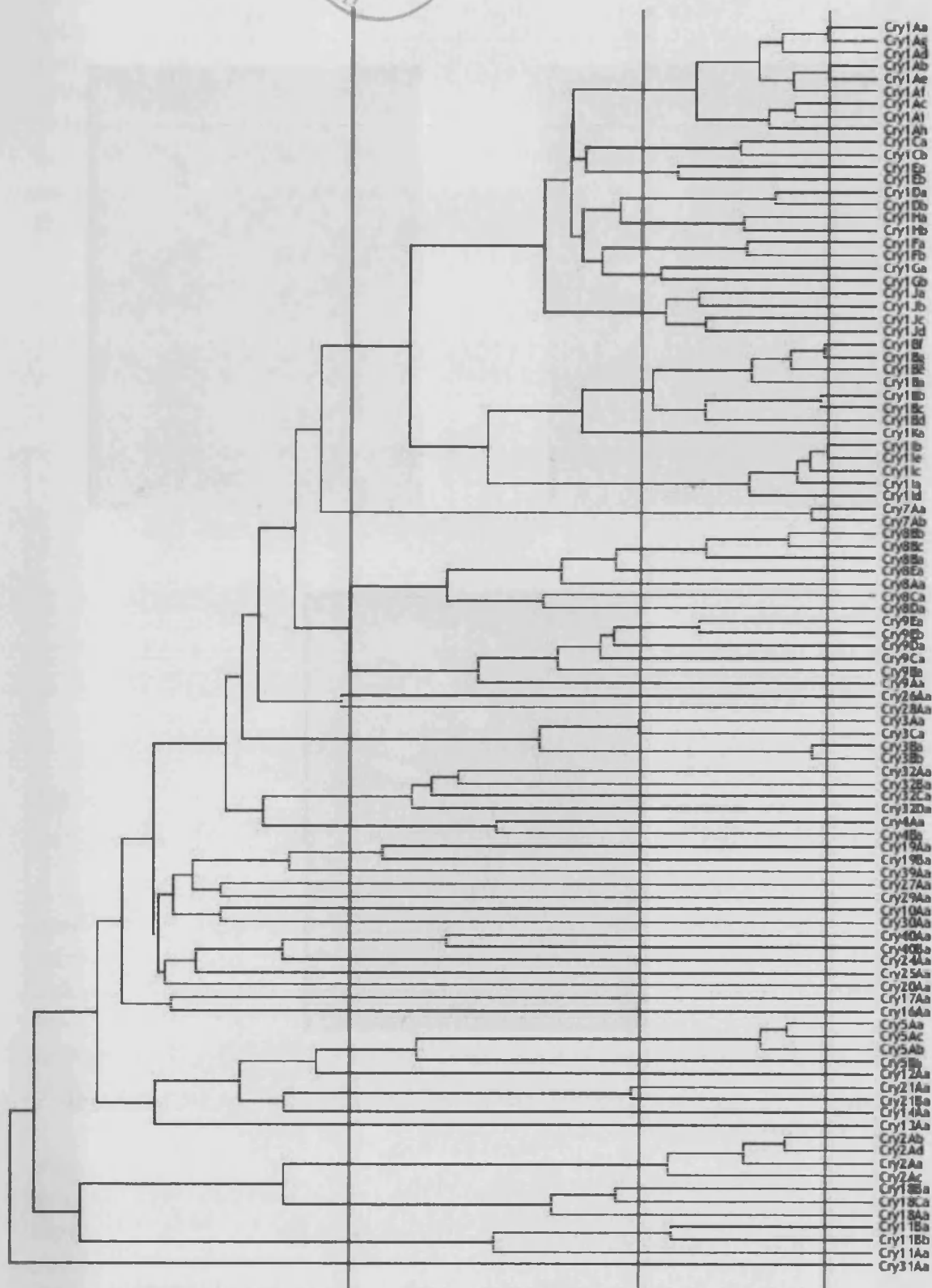


Figura 4. Árbol filogenético de la familia de las proteínas Cry.

Tomado de: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)



**Figura 5.** Estructura tridimensional de varias proteínas Cry. I-Cry1Aa; II-Cry2Aa y III-Cry3Aa.

### 1.5 Biotecnología basada en *B. thuringiensis*

Aunque en los primeros años después de su descubrimiento no se dio la debida importancia al posible uso de esta bacteria como insecticida biológico (Glare y O'Callaghan, 2000), en la actualidad los productos basados en el *Bacillus thuringiensis* representan más del 90% del mercado de

biopesticidas (Swadener, 1994). En 1990, 110 de los 120 millones de dólares de las ventas de biopesticidas correspondieron a estos productos (Powell y Jutsum, 1993). El espectro cubierto por los más de 100 productos del mercado abarca varias de las plagas más importantes. Aunque se han utilizado más de 10 serotipos diferentes, el más común en los formulados es el *kurstaki* (Glare y O'Callaghan, 2000), fundamentalmente la cepa HD-1 de la colección de Dulmage (Nakamura y Dulmage, 1988), que ha demostrado ser efectiva contra 167 especies de lepidópteros (Glare y O'Callaghan, 2000) (Fig.6).



Figura 6. Algunos productos comerciales basados en *B. thuringiensis*.

Uno de los principales problemas de los formulados basados en *B. thuringiensis* es su poca persistencia en campo, debida a la labilidad de los cristales paraesporales ante los rayos ultravioletas del sol y a que son fácilmente lavables por la lluvia. Existen algunos productos comerciales en los que se ha salvado este obstáculo expresando genes *cry* en bacterias como la *Pseudomonas fluorescens*, que ha mostrado mayor persistencia en campo que *B. thuringiensis* (Schnepf et al., 1998).

La expresión de los genes *cry* en plantas transgénicas es el modo más eficaz de alargar la permanencia de las toxinas en la planta tanto como se desee; desde su expresión puntual en algunas etapas del desarrollo o en algunas partes de la planta, hasta su expresión en todo en ciclo de vida del cultivo y de forma sistémica en todos los tejidos vegetales (Fig. 7).

En los experimentos iniciales se probó la expresión de los genes *cry* completos y la cantidad de proteína obtenida era mínima. Seguidamente, se introdujo en la planta sólo la mitad amino terminal de las proteínas (que se

### Introducción

corresponde con la parte activa) y se lograron expresiones del orden de unos pocos nanogramos de toxina, que si bien eran suficientes para matar los insectos en el laboratorio no podían controlarlos en el campo (Barton et al., 1987; Vaeck et al., 1987; Fischhoff et al., 1987).



**Figura 7.** Eficacia de las plantas transgénicas en el control de plagas. Derecha, algodón transgénico de Monsanto. Izquierda, variedad no transgénica. Foto cedida por Monsanto-España.

La baja producción de toxina se achacó a los bajos niveles de RNA mensajero que se obtenía en las plantas (por degradación o procesamiento incorrecto), aun cuando los genes estuviesen bajo el control de promotores considerados fuertes (Diehn et al., 1996). El análisis de la secuencia de los genes *cry* mostró que en las secuencias codificantes existían fragmentos que ya habían sido descritos como señales de procesamiento en los genes eucariotas. Por ejemplo: señales de poliadenilación, de terminación de la transcripción, de formación de estructuras secundarias y de reconocimiento de sitios de procesamiento por corte-empalme (Adang et al., 1993; De Rocher et al., 1998; Diehn et al., 1998). Además, las diferencias en los porcentajes de A/T y G/C entre los genes *cry* y los de plantas y las variaciones en el uso de codones entre ellos son también factores importantes que pueden determinar los bajos niveles de expresión obtenidos con los genes en su estado nativo (Adang et al., 1993; van Hoof y Green, 1997).

Teniendo en cuenta todos los factores que disminuían la expresión de los genes *cry*, se rediseñó su secuencia para hacerlos más parecidos a los de plantas, afectando en la menor medida posible la secuencia de aminoácidos. Los resultados demostraron que la expresión aumentaba

### Introducción

entre 5 y 100 veces modificando parcialmente la secuencia de los genes y llegaba a ser hasta más de 1000 veces mayor si la modificación era total, lo que permitía en muchos de esos casos el control total de los insectos en el campo (González-Cabrera, 2001). Aunque la modificación de los genes permitía lograr expresiones considerables de las toxinas, las cantidades más altas se han obtenido cuando se han expresado los genes nativos en los cloroplastos de las plantas: hasta 50 µg/mg de las proteínas totales de la planta (McBride et al., 1995; Kota et al., 1999) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Plantas transgénicas que expresan toxinas de *B. thuringiensis*. Modificada de González-Cabrera (2001).

Cultivo	Gen	Expresión (ng/mg prot. total)	Referencias
Tabaco	<i>cry1Ab</i> (t)	2	(Vaeck et al., 1987)
	<i>cry1Ab</i> (t)	6	(Barton et al., 1987)
	<i>cry1Ab</i> (t)	1	(Carozzi et al., 1992)
	<i>cry1Ab</i> (PM) <i>cry1Ac</i> (PM)	600	(Perlak et al., 1991)
	<i>cry1Ab</i> (TM) <i>cry1Ac</i> (TM)	600-2000	
	<i>cry1Ab</i> (t) <i>cry1Ca</i> (t)	No determinado	(van der Salm et al., 1994)
Cloroplastos de tabaco	<i>cry1Ac</i> (w)	50000	(McBride et al., 1995)
	<i>cry2A</i> (w)	20000-30000	(Kota et al., 1999)
Tomate	<i>cry1Ab</i> (t)	Se estima entre 1-2	(Fischhoff et al., 1987)
	<i>cry1Ab</i> (PM) <i>cry1Ac</i> (PM)	600	(Perlak et al., 1991)
	<i>cry1Ab</i> (TM) <i>cry1Ac</i> (TM)	600-2000	
	<i>cry1Ab</i> (t) <i>cry1Ca</i> (t)	No determinado	(van der Salm et al., 1994)
	<i>cry1Ab</i> (t)	1-3	(Parrott et al., 1994)
Caña de Azúcar	<i>cry1Ab</i> (t)	2	(Arencibia et al., 1997)



## Introducción

Patata	<i>cry1Ac</i> (t)	No detectable	(Cheng et al., 1992)
	<i>cry3A</i> (TM)	250	(Adang et al., 1993)
	<i>cry3A</i> (PM)	1000	(Perlak et al., 1993)
Maíz	<i>cry1Ab</i> (TM)	12750	(Koziel et al., 1993)
	<i>cry9C</i> (TM)	17400-84800	(Jansens et al., 1997)
Brécol	<i>cry1C</i> (TM)	4000	(Cao et al., 1999)
Nogal	<i>cry1Ac</i> (TM)	200	(Dandekar et al., 1998)
Arroz	<i>cry1Ab</i> (TM)	500	(Fujimoto et al., 1993)
	<i>cry1Ab</i> (TM)	84	(Wünn et al., 1996)
	<i>cry1Ab</i> (TM)	100-1000	(Firoz Alam et al., 1998)

### Leyenda:

- w-gen nativo.
- t- gen nativo truncado.
- PM-gen parcialmente modificado.
- TM-gen totalmente modificado.

Se han esbozado otras aplicaciones biotecnológicas de las toxinas de *B. thuringiensis*, pero no han tenido un seguimiento que haga pensar en su utilización a corto plazo. Por ejemplo, se ha estudiado la capacidad antitumoral de proteínas quiméricas que poseen una proteína Cry como vehículo de inserción en las células tumorales (al yahyae y Ellar, 1996). Además, se han hecho pruebas para el uso de proteínas Cry como adyuvante o transportador de epitopos en preparados de vacunas (Vázquez-Padrón et al., 2000).

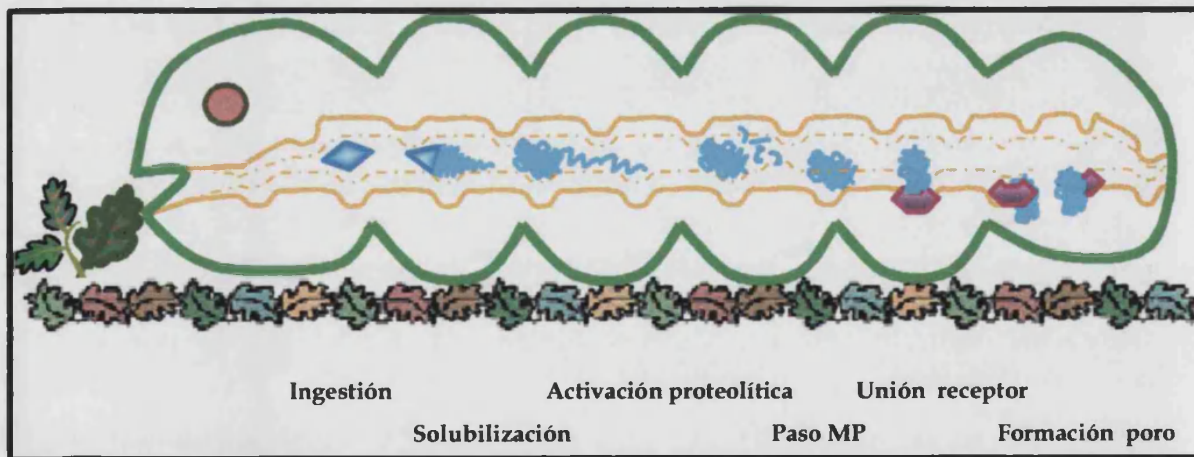
## 2. MODO DE ACCIÓN

El análisis de los fenómenos que ocurren durante la interacción de las proteínas Cry con el insecto ha permitido la comprensión de los mecanismos que han provocado o que podrían provocar el desarrollo de resistencia en los insectos diana. Además, dicha comprensión es determinante para el diseño de estrategias de control que favorezcan un uso prolongado y efectivo de las toxinas de *B. thuringiensis*.

La mayoría de los estudios sobre el modo en que actúan las proteínas Cry en el intestino de los insectos se han realizado con larvas de lepidópteros (Schnepf et al., 1998), por tanto, algunas de las especificidades aquí planteadas pueden ser sólo atribuibles a su comportamiento en este orden de insectos.

Las observaciones realizadas en larvas atacadas por las toxinas indican que el primer síntoma de su efecto es la parada de la alimentación dentro de la primera hora después de ingerir la toxina. El insecto va reduciendo su movilidad llegando a la parálisis a las 6 horas aproximadamente, dependiendo de la cantidad de toxina ingerida. Finalmente el insecto muere por inanición o septicemia (Escriche y Ferré, 2001). En el ámbito microscópico, las microvellosidades intestinales desaparecen y el retículo endoplasmático y las mitocondrias se desintegran gradualmente. Las células afectadas se vacuolizan e hinchan y algunas se desprenden de la membrana basal. Finalmente se produce la lisis celular y muerte del tejido (Martínez-Ramírez et al., 1999; Forcada et al., 1999; Escriche y Ferré, 2001).

Es conveniente destacar que el mecanismo de acción de las proteínas Cry ha estado y está sometido a un estudio muy intenso. Los pasos que se describen a continuación son los que están más aceptados y contrastados en el momento de escribir esta revisión. El orden en que suceden y los fenómenos que ocurren podrían no ser exactamente como aquí se describe. (Fig. 8)



**Figura 8.** Representación esquemática de los pasos del modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*.

## 2.1 Ingestión

El efecto de las proteínas Cry sobre las larvas de insectos está supeditado a la ingestión de éstas. Los cristales pasan a través del primer

## Introducción

tramo del intestino prácticamente intactos hasta que llegan al intestino medio que es donde tiene lugar su actividad.

## 2.2 Solubilización

Los cristales que contienen las toxinas no son tóxicos *per se*. Es necesario que se produzca la solubilización de estos. Este proceso es muy dependiente del pH, pero también influyen el tipo proteína Cry, la composición del cristal y el contenido intestinal (Aronson et al., 1991). El intestino de los lepidópteros presenta pH alcalino, que favorece la solubilización de la mayoría de las proteínas Cry. Sin embargo, los cristales que contienen proteínas del tipo Cry3, activas contra coleópteros, se disuelven con mayor facilidad a un pH más cercano a la neutralidad, que coincide con el pH intestinal de los insectos de ese orden (Koller et al., 1992). Se da el caso de la proteína Cry1Ba que ha mostrado toxicidad frente a larvas de coleópteros, pero sólo si se les suministra después de solubilizar el cristal (Bradley et al., 1995), hecho que pone de manifiesto la importancia que llega a tener la solubilización en el modo de acción de las toxinas.

## 2.3 Activación

En el paso de solubilización se liberan al lumen intestinal las proteínas Cry aun inactivas, estado en que son conocidas como protoxinas. Las protoxinas son activadas enzimáticamente por las proteasas del tipo tripsina y quimiotripsina mayoritarias en el intestino de los lepidópteros (Schnepf et al., 1998). Las protoxinas Cry1 son procesadas hasta obtenerse un núcleo tóxico de entre 55 y 65 kDa resistente a la acción de las proteasas (Choma et al., 1990a; Schnepf et al., 1998). La digestión comienza por el extremo C-terminal de la proteína, que se va cortando progresivamente en péptidos de aproximadamente 10 kDa hasta quedar un fragmento de más de 600 aminoácidos (Choma et al., 1990b). Las proteínas digeridas en su mitad C-terminal son entonces digeridas en su extremo N-terminal, pero en este caso sólo se trata de un péptido pequeño, de unos 30 aminoácidos en el caso de las Cry1A (Schnepf et al., 1998). Las protoxinas de menor tamaño, como las Cry2 y las Cry3, pueden ser consideradas como productos truncados naturales. Su activación se limita a la eliminación de algunos aminoácidos en sus extremos (Escríche y Ferré, 2001).

El modo en que son activadas las protoxinas puede determinar el espectro insecticida que tendrá la toxina activa. Así, las protoxinas producidas por una cepa de *B. thuringiensis* var. *colmeri*, que naturalmente eran tóxicas para larvas de lepidópteros y dípteros, mostraron una toxicidad diferencial cuando fueron activadas *in vitro* con jugos intestinales de insectos de uno y otro orden. Al ser activadas con jugo intestinal de dípteros fueron tóxicas para larvas de este orden y sólo para una de las especies de lepidópteros testadas. Cuando la activación se realizó con jugo

## Introducción

intestinal de lepidópteros sólo se encontró toxicidad para larvas de este orden (Haider et al., 1986).

El paso de la activación de la protoxina había sido considerado siempre como un paso previo a la unión de la toxina a los receptores (Schnepf et al., 1998). Sin embargo, se han realizado varios experimentos que muestran que es muy probable que se produzca efectivamente una activación de la protoxina antes de la unión, pero esta activación sería parcial (Gómez et al., 2002). La proteína activada parcialmente se uniría a sus sitios de unión en la membrana y sólo entonces se completaría la activación proteolítica de la proteína en la zona N-terminal eliminándose un fragmento que contendría hasta la hélice  $\alpha 1$  del dominio I, que ha demostrado ser prescindible para la toxicidad (Gómez et al., 2002; Bravo et al., 2002). La proteína activada formaría entonces un tetrámero, llamado pre-poro, que sería el que finalmente se insertaría en la membrana para formar el poro (Gómez et al., 2002).

### 2.4 Paso a través de la membrana peritrófica

Se le llama membrana peritrófica a la red de quitina y glicoproteínas que recubre la membrana apical de las células epiteliales. Actúa como una membrana de diálisis, que permite el paso de moléculas y además protege las células intestinales de los daños mecánicos y de posibles infecciones (Escriche y Ferré, 2001).

*B. thuringiensis* expresa exoquitinasas durante la esporulación que degradan la membrana peritrófica facilitando el paso de las toxinas (Sampson y Gooday, 1998). Se ha detectado que algunas proteínas Cry se unen a esta membrana (Bravo et al., 1992), posiblemente debido a que las proteínas que actúan como receptores en la membrana epitelial hayan perdido su anclaje glicosídico y se acumulen en la membrana peritrófica (Lu y Adang, 1996). No obstante, no se ha podido demostrar que exista una correlación entre esta interacción y la toxicidad (Bravo et al., 1992).

### 2.5 Unión a los receptores de membrana

Después de atravesar la membrana peritrófica, las toxinas se unen de forma específica a "receptores" situados en las células de la cara apical del borde en cepillo del intestino (Hofmann et al., 1988). Aunque en la mayoría de los casos se nombra como receptores a las moléculas o complejos de moléculas que permiten la unión de las proteínas Cry, se debe aclarar que no son receptores en el sentido estricto de la palabra porque su función celular no es la de servir de sitio de unión a un agente que provocará la muerte del individuo (Escriche y Ferré, 2001). Es más conveniente llamarlos, en algunos casos, "sitios de unión", porque de esa forma se evitan ambigüedades en la referencia a una molécula, conjunto de ellas o incluso a distintas zonas de una misma molécula.

## Introducción

Se reconocen dos etapas en la unión a los receptores, una de carácter reversible que ocurre en los primeros instantes después del “encuentro” entre la toxina y el receptor y la otra de carácter irreversible que contempla el momento en que se forma el complejo toxina-receptor y su posterior inserción en la membrana (Liang et al., 1995).

La unión de la toxina a sus receptores del intestino, que es uno de los pasos cruciales del modo de acción de *B. thuringiensis*, parece no ser suficiente para provocar efectos tóxicos en algunos casos. Las toxinas del tipo Cry1A se unen con una alta afinidad a las vesículas del borde en cepillo del intestino, BBMV (siglas del inglés “Brush Border Membrane Vesicles”), de *Spodoptera exigua* y no presentan toxicidad para este insecto (Luo et al., 1999). En *Lymantria dispar*, una toxina 400 veces más tóxica que otra fue a su vez menos afín que aquella por los sitios de unión del intestino (Wolfersberger, 1990). Este último caso, en primera instancia inexplicable, podría tener relación con la forma en que se llevaron a cabo los experimentos. Los bioensayos para determinar la toxicidad se realizaron en un estadio del desarrollo diferente al de las larvas que se utilizaron para los ensayos en que se determinó la afinidad por los sitios de unión (Wolfersberger, 1990). Posteriormente se demostró que el número y tipos de sitios de unión puede variar a lo largo del desarrollo de las larvas provocándose cambios en la susceptibilidad frente a determinadas toxinas (Rausell et al., 2000)

La estructura del dominio II revela la existencia de tres lazos que sobresalen de la conformación globular de la molécula y que se forman en las uniones entre los plegamientos  $\beta$  (Li et al., 1991; Grochulski et al., 1995). Estos lazos expuestos están muy relacionados con la unión a la membrana. Estudios exhaustivos de mutagénesis dirigida en esta zona han demostrado que, efectivamente, los cambios drásticos observados en la unión de una toxina mutada están directamente correlacionados con los cambios observados en la toxicidad. Mutaciones en los lazos del dominio II de la toxina Cry1C hacen que esta pierda su efecto sobre las larvas de los dípteros y sin embargo conserve el 80% de la actividad contra las células en cultivo procedentes de larvas de lepidópteros. Otras mutaciones hacen que la toxina pierda completamente su actividad tanto contra las células procedentes de lepidópteros como contra las larvas de dípteros (Smith y Ellar, 1994). Mutantes de la toxina Cry3A en ensayos con *Tenebrio molitor* mostraron que los lazos 1 y 3 del dominio II estaban involucrados directamente en la unión a la membrana e incluso que el lazo 3 jugaba un papel importante en la unión irreversible o en la inserción a la membrana (Wu y Dean, 1996). En resumen, todos los lazos del dominio II están involucrados en la unión, aunque no todos al mismo tiempo ni a todo tipo de receptor (Schnepf et al., 1998).

En un primer momento se pensó que la función del dominio III era la de dar estabilidad y protección a la molécula frente al ataque de las

## Introducción

enzimas proteolíticas (Li et al., 1991). Actualmente se reconoce que este dominio está involucrado activamente en el reconocimiento y unión a los receptores, así como en la formación del poro en algunos insectos (Dean et al., 1996). Ensayos con varios mutantes de la toxina Cry1Ac en el dominio III permitieron correlacionar la pérdida de afinidad en la unión con una disminución en la toxicidad frente a *Manduca sexta* y *Heliothis virescens* (Aronson et al., 1995). Mutaciones de la toxina Cry1Aa en regiones conservadas de este dominio mostraron que no se afectaba la unión, pero sí la toxicidad frente a *M. sexta* debido a alteraciones en la formación del poro (Chen et al., 1993). El intercambio de los dominios II y III entre varias proteínas Cry mostró que el dominio III juega un papel muy importante en la determinación de la especificidad por el insecto diana en *S. exigua* y *M. sexta*, lo que evidenciaba que además estaba involucrado en la unión al receptor en estos insectos (de Maagd et al., 1996, 2000). Sin embargo, este hecho no pudo ser corroborado en *P. xylostella*, donde los mismos híbridos mostraron que, en este insecto, era el dominio II y no el III el que determinaba la especificidad por la diana y la afinidad por los sitios de unión (Ballester et al., 1999a).

De lo anterior se puede concluir que el reconocimiento de los sitios de unión en la membrana es diferente para cada insecto y es muy probable que éste se produzca a través de los dominios II y III aunque el papel de cada uno de ellos en la unión sea específico para cada insecto en cuestión.

## 2.6 Formación de poro

Después de unirse a la membrana, la toxina se inserta en ella para formar un poro o canal iónico. En primer lugar se pensó que se insertaba la toxina en forma de monómero, pero posteriormente se han realizado experimentos que sugieren que se produce una oligomerización de la toxina, mediada por el receptor, y que esta estructura es la que se inserta en la membrana, muy probablemente a través del dominio I de los monómeros que la forman (Gómez et al., 2002). También se ha planteado que el dominio III puede estar involucrado en la formación de poros, aunque no está muy claro su papel en este proceso (Dean et al., 1996).

Mutaciones realizadas en el dominio I de las toxinas Cry1A redujeron drásticamente la toxicidad de éstas frente a *Manduca sexta* (Wu y Aronson, 1992; Chen et al., 1995). La unión reversible de estos mutantes no estaba afectada, pero sí se reducía considerablemente su unión irreversible (Chen et al., 1995). Experimentos realizados con vesículas lipídicas y con bicapas lipídicas planas permitieron observar cómo fragmentos proteicos formados por el dominio I o incluso por sólo alguna de las hélices  $\alpha$  que lo forman ( $\alpha 5$  y  $\alpha 5\text{-}\alpha 7$ ) eran capaces de insertarse y formar canales que permitían el paso de electrolitos (Schnepf et al., 1998). Los canales formados por la hélice  $\alpha 5$ , a diferencia de los formados por la toxina completa, eran pequeños, con propiedades hemolíticas (Gazit y Shai, 1993) y actuaban con

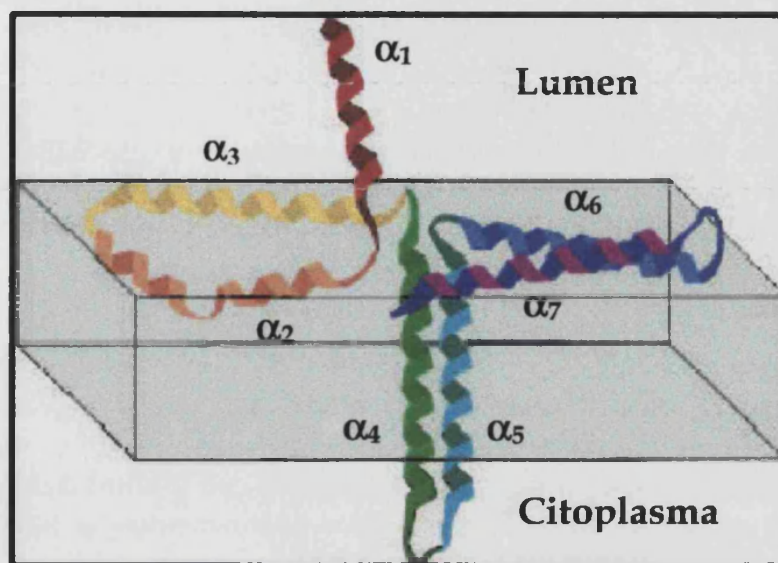
## Introducción

preferencia sobre vesículas preparadas con fosfolípidos ácidos (Gazit y Shai, 1993; Cummings et al., 1994).

La disposición espacial de las hélices del dominio I es muy semejante a la de otros dominios formadores de poro de toxinas bacterianas, tal es el caso de la Colicina A (Li et al., 1991). De acuerdo con esto se propuso que el mecanismo de inserción de las proteínas Cry en la membrana fuese como el “modelo de la navaja” que había sido descrito para la Colicina A (Hodgman y Ellar, 1990). Según este modelo las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  se abrirían como una navaja, darían un giro y se insertarían en la membrana, de forma tal que el resto de las hélices se quedarían unidas al receptor. Este modelo se basa en que las hélices del dominio I tienen una cara hidrofóbica y en que  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  están muy conservadas en todas las proteínas Cry (Knowles, 1994). Alternativamente se propuso también el “modelo del paraguas” (Li et al., 1991), que había sido propuesto para la toxina de la difteria y para la exotoxina A de *Pseudomonas* (Parker y Pattus, 1993). El modelo del paraguas conlleva la formación de una horquilla entre las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  en el centro del dominio I. Esta horquilla se insertaría en la membrana celular, quedando el resto de las hélices dispuestas de forma plana sobre la superficie de la célula (Li et al., 1991). Estudios de las interacciones entre las diferentes hélices realizados con bicapas lipídicas planas apoyan la inserción de las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  de forma antiparalela, así como la disposición en forma de paraguas del resto de las hélices (Gazit et al., 1998). Ensayos con mutantes en el dominio I mostraron que la hélice  $\alpha 4$  forma la cara luminal del canal iónico creado por las proteínas Cry y que mutaciones puntuales en esta hélice pueden eliminar completamente la toxicidad (Masson et al., 1999). La actividad permeabilizadora de las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  es mucho mayor que la de las otras hélices; además, el lazo que se forma entre ellas es necesario para que la inserción de las toxinas en las membranas sea eficiente (Gerber y Shai, 2000) (Fig. 9). Todos estos resultados apoyan el modelo del paraguas y además ponen de manifiesto la importancia que tiene la horquilla formada por las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  en la formación del poro de las proteínas Cry.

## 2.7 Lisis celular y muerte

Después de la formación de poros en la membrana de las células epiteliales del intestino se producen una serie de eventos que conducen a la entrada masiva de agua e iones a la célula provocando el hinchamiento y posterior lisis de ésta (Knowles, 1994). La lisis generalizada de las células del intestino hace que el tejido pierda su integridad y permite el ataque de patógenos, no sólo en el intestino sino en varios órganos de la larva (Salama y el Sharaby, 1985). La muerte del insecto se produce generalmente a causa de la septicemia e inanición (Knowles, 1994; Schnepf et al., 1998).



**Figura 9.** Representación esquemática de la interacción de las hélices del dominio I con la membrana según el "Modelo del paraguas". Modificada de Gazit et al. (1998).

### 3. RESISTENCIA A LAS TOXINAS DE *B. thuringiensis*

#### 3.1 Aspectos generales

El desarrollo de resistencia a los insecticidas en las poblaciones de insectos-plaga es un fenómeno que aparece como consecuencia de la gran plasticidad genética que poseen los insectos y del uso prolongado de determinados productos sobre las poblaciones. En el año 1991, más de 500 especies de insectos y ácaros habían desarrollado resistencia a diferentes preparaciones insecticidas (Georghiou y Lagunes-Tejeda, 1991).

El primer caso de resistencia a un producto basado en *B. thuringiensis* fue descrito en 1985, una colonia de *P. interpunctella* que había sido seleccionada en el laboratorio con el producto comercial Dipel® aumentó la  $LC_{50}$  (concentración de producto necesaria para matar al 50% de la población) 100 veces con relación a las poblaciones control (McGaughey, 1985). Posteriormente se ha publicado un gran número de trabajos que describen el desarrollo de resistencia a las proteínas Cry en varias especies de insectos (Ferré y Van Rie, 2002). En la mayoría de estos casos la resistencia se ha desarrollado después de selección en el laboratorio. Sólo una especie, *P. xylostella*, ha sido capaz de desarrollar resistencia a productos comerciales de *B. thuringiensis* en poblaciones de campo (Tabashnik et al., 1990; Ferré et al., 1991). Las colonias mantenidas largos periodos de tiempo en laboratorio no poseen una amplia variabilidad



## Introducción

genética y es muy probable que no tengan todos los genes de resistencia que podrían tener las poblaciones de campo, por tanto, los resultados obtenidos con ellas no son totalmente extrapolables y no pueden predecir si se desarrollará resistencia en campo, ni qué mecanismo sería seleccionado (Ferré y Van Rie, 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos pueden indicar el repertorio de mecanismos que podrían ser seleccionados en determinada población y, en consecuencia, poder diseñar, estrategias que permitan un mejor manejo (Georghiou, 1994).

Los experimentos de selección con *B. thuringiensis* se han llevado a cabo con colonias mantenidas en el laboratorio o con insectos colectados en el campo. Los agentes de selección utilizados han sido muy variados, por ejemplo: productos comerciales basados en esta bacteria, mezclas de esporas y cristales, protoxina, toxina activada y con plantas o derivados de plantas que expresan proteínas Cry. Estos experimentos se han llevado a cabo mayoritariamente en lepidópteros, aunque también hay ejemplos de altos niveles de resistencia obtenidos en coleópteros. En el caso de dípteros, el sinergismo entre las toxinas Cyt y las proteínas Cry presentes en los cristales de *B. thuringiensis* var. *israelensis* ha impedido que se obtengan niveles significativos de resistencia (para una revisión general ver Ferré y Van Rie (2002)). En los experimentos de selección comúnmente se ha encontrado que la colonia seleccionada, además de desarrollar resistencia a la proteína o proteínas Cry que componen el agente de selección, también desarrolla resistencia a otras toxinas que no están presentes en dicho agente. Este fenómeno, conocido como resistencia cruzada, es debido a la existencia de mecanismos de acción comunes para varias toxinas en el intestino de los insectos (véase más adelante).

### 3.2 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos generales básicos de adquisición de resistencia son: evitar el contacto con el agente tóxico; disminuir su penetración, bien impidiendo su ingestión o bien disminuyendo la permeabilidad a dicho agente; aumentar su velocidad de degradación; modificar la diana fisiológica de forma que no sea reconocida y neutralizar el efecto tóxico mediante un cambio metabólico (Ferré et al., 2001).

En el caso concreto de la resistencia a las proteínas Cry se han descrito mecanismos que afectan algunos de los pasos del modo de acción. La alteración de la actividad proteolítica del intestino (Oppert et al., 1994, 1996) y la modificación de los sitios de unión de la toxina son los dos mecanismos mejor caracterizados (Van Rie et al., 1990; Ferré et al., 1991), siendo este último el más común y el único que se ha encontrado como responsable de los niveles de resistencia a Dipel® mostrados por poblaciones de campo de *P. xylostella* (Ferré et al., 1991; Ballester et al., 1999b; Ferré y Van Rie, 2002). También se ha descrito un caso en que la resistencia de una colonia de *H. virescens* se debía al aumento en la

velocidad de recuperación o regeneración del tejido intestinal dañado por la acción de dosis subletales de toxina (Martínez-Ramírez et al., 1999).

### **3.2.1 Alteración de la actividad proteolítica**

Se describió en una colonia de *P. interpunctella* que había sido seleccionada en el laboratorio y mostró un aumento de la  $LC_{50}$  de Cry1Ac de 128 veces con respecto a la colonia control. Los jugos intestinales de esta colonia tenían una actividad proteolítica significativamente menor que la de la colonia control para diversos sustratos. Además, su capacidad para procesar la proteína Cry1Ac estaba también reducida (Oppert et al., 1996). En un estudio posterior se demostró que existía ligamiento entre la baja susceptibilidad a Cry1Ac y la ausencia de una de las proteasas más importantes del intestino (Oppert et al., 1997). Estudios posteriores realizados con esa misma colonia corroboraron la alteración de su capacidad proteolítica, la protoxina Cry1Ab era 11 veces menos tóxica que la toxina activada (Herrero et al., 2001b). Un efecto similar con la proteína Cry1Ab fue descrito en una colonia resistente de *H. virescens*, en este caso la protoxina se procesaba más lentamente y la toxina se degradaba más rápido que en la colonia sensible (Forcada et al., 1999). En *P. xylostella*, experimentos realizados con una colonia seleccionada con la toxina Cry1Ac, activada *in vitro*, mostraron que la  $LC_{50}$  de la protoxina era más de 10 veces menor que la  $LC_{50}$  de la toxina activada. Este resultado sugirió que las alteraciones en el proceso de activación de la protoxina eran las responsables del desarrollo de resistencia en esta colonia (Sayyed et al., 2001).

### **3.2.2 Alteración de la unión de las toxinas al intestino**

Se ha comentado anteriormente que la alteración de la unión de las toxinas al intestino es el más común de los mecanismos de resistencia encontrados hasta el momento. Ha sido descrito en *P. interpunctella* (Van Rie et al., 1990; Herrero et al., 2001b), *P. xylostella* (Ferré et al., 1991; Tang et al., 1997; Tabashnik et al., 1997b; Ballester et al., 1999b) y *H. virescens* (Lee et al., 1995; Jurat-Fuentes y Adang, 2001). Así como las alteraciones en la actividad proteolítica no provocan niveles de resistencia muy altos, las alteraciones en la unión de las toxinas a los sitios de unión en la membrana son responsables de la mayoría de los casos en que se ha descrito una alta resistencia a productos comerciales basados en *B. thuringiensis* o a toxinas individuales (Ferré y Van Rie, 2002). El análisis de la unión de las toxinas a BBMV de los insectos ha revelado casos en los que la toxina había perdido completamente la capacidad de unirse a los receptores de membrana (Ferré et al., 1991), en otros se describió una disminución drástica de la afinidad de la toxina por sus sitios de unión (Van Rie et al., 1990) y también existen colonias resistentes a varias toxinas a la vez en las que sólo estaba alterada la unión a una, pero no a todas (Lee et al., 1995; Ballester et al., 1999b).

## Introducción

Es necesario destacar que se han descrito casos en que los altos niveles de resistencia no han podido relacionarse con alteraciones de los sitios de unión en la membrana o las alteraciones encontradas eran realmente despreciables. Una colonia de *P. xylostella* seleccionada con Cry1Ca y con brécol transgénica que expresaba Cry1Ca, que había mostrado una resistencia de 63100 veces, apenas presentó diferencias en la afinidad por los sitios de unión y en la concentración de éstos en el intestino (Zhao et al., 2000). En otra colonia de *P. xylostella*, resistente también a Cry1Ca, tampoco fue posible relacionar la resistencia con alteraciones en la unión (Liu et al., 2000). En *S. exigua*, una colonia con una resistencia de 74 veces frente a Cry1Ca, casi no presentó diferencias de afinidad ni de concentración de sitios de unión en comparación con una colonia sensible (Moar et al., 1995). La posible influencia de la activación proteolítica en la resistencia, en las dos últimas, es descartable pues no se encontraron diferencias significativas en el procesamiento de la protoxina entre las colonias resistentes y las sensibles. La resistencia en estos casos se debe a la influencia de otro u otros mecanismos hasta ahora desconocidos.

### 3.2.3 Mecanismos de resistencia en *P. xylostella*

La resistencia en varias colonias de este insecto se debe a alteraciones de la unión de las toxinas a la membrana. Los resultados de ensayos de unión con BBMV de colonias sensibles indican la existencia de dos sitios de unión para las toxinas Cry1A. Un sitio al que se une sólo la toxina Cry1Aa y otro al que se unen Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa y Cry1Ja. Además, existen dos sitios adicionales para las toxinas Cry1B y Cry1C (Ballester et al., 1999b; Herrero et al., 2001a). Al analizar globalmente los resultados de toxicidad y unión a BBMV de intestino en varias colonias resistentes se concluyó que existían, al menos, dos tipos de modificaciones de los sitios de unión. En un caso, el sitio de unión común estaba modificado de forma que impedía la unión de las tres toxinas Cry1A y Cry1Fa y en el otro, la modificación sólo afectaba la unión de la toxina Cry1Ab (Ballester et al., 1999b). Las colonias NO-QA (Tabashnik et al., 1993b; Tabashnik et al., 1994; Tabashnik et al., 1996), PEN (Tabashnik et al., 1997b) y Loxa A (Tang et al., 1996), resistentes a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac (NO-QA presentaba también resistencia a Cry1Fa y Cry1Ja) tendrían una modificación del primer tipo y las colonias PHI y SERD3 del segundo tipo (Wright et al., 1997; Ballester et al., 1999b).

Hasta el momento sólo se ha descrito un caso en el que la resistencia en una colonia de *P. xylostella* estaba relacionada con alteraciones en la activación de la protoxina. La colonia SERD5, procedente de Malasia, era aproximadamente 10 veces más resistente frente a la protoxina que frente a la toxina activada *in vitro*. Aunque no se disponía de datos sobre la actividad proteolítica, las diferencias en la susceptibilidad fueron suficientes para establecer una relación directa entre la alteración de

la activación y el desarrollo de resistencia en esta colonia (Sayyed et al., 2001).

### 3.3 Genética de la resistencia

La variación intra- e interespecífica de la susceptibilidad a las toxinas de *B. thuringiensis* en cada población, la frecuencia de genes de resistencia, la relación de dominancia entre los alelos de resistencia y el alelo sensible y el efecto de la resistencia sobre la eficacia biológica de los individuos resistentes en las poblaciones, son los factores que determinarán el potencial para el desarrollo de resistencia que tendrá determinada población y su conocimiento permitirá el diseño de estrategias que, al menos, retrasen su desarrollo en poblaciones de campo.

#### 3.3.1 Variabilidad genética

La variación de la susceptibilidad frente a proteínas Cry individuales entre poblaciones de insectos ha sido determinada en varias ocasiones (Ferré y Van Rie, 2002), encontrándose casos en que la diferencia era de 441 veces entre 11 colonias de *Helicoverpa zea* y 554 veces entre 8 colonias de *S. exigua* (Luttrell et al., 1999). En los ensayos realizados con formulados insecticidas generalmente se obtienen diferencias menores que las que se obtienen con toxinas individuales. Esto se explica porque en los formulados la mezcla de varias toxinas puede enmascarar el efecto individual de cada una (Ferré y Van Rie, 2002). Aunque la variación en la susceptibilidad interpoblacional sea pequeña, el potencial para desarrollar resistencia puede ser alto si la variación intrapoblacional es elevada. Esta puede ser la causa de la rápida respuesta a la selección de 5 colonias de *Ostrinia nubilalis* que sólo tenían una variación interpoblacional de 1,9 veces (Huang et al., 1997). En dos estudios en los que se compararon ambos parámetros en 11 poblaciones de *Choristoneura fumiferana* y 4 de *L. dispar*, resultó que la variación intrapoblacional era mayor que la interpoblacional (van Frankenhuyzen et al., 1995).

#### 3.3.2 Frecuencia inicial de genes de resistencia

Hasta el momento se han realizado muy pocos estudios para estimar la frecuencia de genes de resistencia a las proteínas Cry en las poblaciones de campo. Mediciones indirectas a partir de los resultados de experimentos de selección con muestras relativamente pequeñas y asumiendo que no se habían producido mutaciones durante la selección, dieron como resultado que la frecuencia inicial de genes de resistencia estaba alrededor de  $10^{-3}$  (Ferré y Van Rie, 2002). En *H. virescens*, el análisis de la descendencia  $F_1$  y  $F_2$  de cruces individuales entre insectos resistentes homocigóticos e insectos colectados en el campo mostró que la frecuencia era de  $1,5 \times 10^{-3}$  (Gould et al., 1995). Este método tiene la desventaja que sólo se puede medir la frecuencia de alelos recesivos que se encuentren en el mismo locus del gen de resistencia de la colonia. De existir otros, escaparían

## Introducción

a la detección. La metodología más sensible propuesta para la estimación de las frecuencias de genes de resistencia se basa en el análisis de la descendencia en la F<sub>2</sub> de parejas capturadas en el campo (Andow y Alstad, 1998). En este caso no es necesaria una población resistente y es hasta 10 veces más sensible que los anteriores. Este método se ha aplicado en varias ocasiones resultando que las frecuencias de alelos de resistencia entre las distintas poblaciones de insectos oscilan entre 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-4</sup> (Ferré y Van Rie, 2002).

### 3.3.3 Dominancia

La resistencia a las proteínas Cry es, mayoritariamente, un carácter autosómico y generalmente recesivo o parcialmente recesivo, aunque se han seleccionado colonias cuya resistencia es dominante o parcialmente dominante (Ferré y Van Rie, 2002). La estimación de la dominancia no se ha hecho de forma uniforme en el trabajo con poblaciones resistentes a las proteínas Cry. Bourguet et al (2000), clarificaron los conceptos existentes y propusieron la utilización de varios parámetros que permitían el cálculo de la dominancia en dependencia de las condiciones específicas de cada caso. Así, la dominancia obtenida teniendo en cuenta las LC<sub>50</sub> de los homocigotos resistentes, de los heterocigotos y de los homocigotos sensibles ( $D_{LC}$ ), relacionada con el parámetro D de Stone (Stone, 1968) según  $D_{LC} = (D+1)/2$  no tendría mucho valor práctico para el manejo de la resistencia (Curtis et al., 1978) debido a que las estrategias diseñadas se basan en el uso de dosis que eliminen el 100% de los individuos heterocigotos. De acuerdo con esto, se define el parámetro "dominancia efectiva" ( $D_{ML}$ ) estimada a partir de los valores de mortalidad que provoca una determinada dosis. Si bien este valor tiene una validez práctica mayor porque permite utilizar los valores de mortalidad que provoca determinada concentración de formulado o la que provocan las plantas transgénicas, no tiene en cuenta las variaciones de la eficacia biológica de los distintos genotipos frente al insecticida. Estas variaciones se tienen en cuenta en el parámetro "dominancia de la eficacia relativa en áreas tratadas" ( $D_{WT}$ ). Este parámetro es muy difícil de estimar en condiciones de campo porque es complicado controlar todos los factores que influyen en la eficacia biológica. La relación entre  $D_{ML}$  y  $D_{WT}$  no es obvia, sin embargo, cuando  $D_{ML}$  es cero entonces  $D_{WT}$  también lo es porque el 100% de los heterocigotos es eliminado por el insecticida. No obstante,  $D_{WT}$  puede seguir siendo 0 aun cuando  $D_{ML}$  sea mayor de 0, lo cual indicaría un éxito en el manejo de la resistencia (Bourguet et al., 2000). En todos los casos, los parámetros se estiman según:  $D_X = (X_{RS} - X_{SS}) / (X_{RR} - X_{SS})$ , donde  $X_{RR}$ ,  $X_{SS}$  y  $X_{RS}$  se corresponden con los valores cuantitativos del carácter para los homocigotos resistentes, sensibles y heterocigotos, respectivamente.

### 3.3.4 Estabilidad de la resistencia

La estabilidad de la resistencia en una población determinada dependerá en todo caso de la eficacia biológica que le confiera el gen/genes de resistencia (o aquellos relacionados) a los individuos de la población. Aunque se han descrito casos en los que colonias seleccionadas mantenían casi inalterables los niveles de resistencia después de varias generaciones sin presión de selección (McGaughey y Beeman, 1988; Tabashnik et al., 1995; Liu et al., 1996), en la mayoría de los casos la resistencia a las proteínas Cry es inestable y decae. Lo que supone un punto a favor de las estrategias de manejo basadas en la rotación de cultivos y en el uso de plantas que expresen toxinas diferentes (Ferré y Van Rie, 2002).



## 4. "RECEPTORES" DE LAS PROTEÍNAS CRY

La mayoría de los experimentos realizados para detectar e identificar las proteínas de membrana que actúan como receptores de las toxinas de *B. thuringiensis* están basados en la técnica del ligand-blot (Garczynski et al., 1991; Knowles et al., 1991; Martínez-Ramírez et al., 1994; Jurat-Fuentes y Adang, 2001). Los resultados obtenidos con esta técnica no siempre se correlacionan con los ensayos de unión realizados con BBMV (Lee y Dean, 1996), posiblemente debido a las condiciones desnaturalizantes en que se realizan los ensayos de ligand-blot que contrastan con el estado nativo en que se presentan las proteínas en los ensayos con BBMV (Daniel et al., 2002).

Proteínas de la familia de las aminopeptidasas N han sido detectadas en varios insectos como posibles receptores de las proteínas Cry. Han sido descritas en *M. sexta* (Sangadala et al., 1994; Knight et al., 1994; Masson et al., 1995; Denolf et al., 1997), *L. dispar* (Valaitis et al., 1995), *P. xylostella* (Denolf et al., 1997), *Trichoplusia ni* (Lorence et al., 1997), *Helicoverpa armigera* (Ingle et al., 2001) y *H. virescens* (Gill et al., 1995; Luo et al., 1997; Banks et al., 2001; Banks et al., 2003). En algunos casos se ha descrito que la unión a este tipo de proteínas no está relacionada con la actividad *in vivo* de la toxina (Jenkins et al., 1999; Burton et al., 1999; Simpson y Newcomb, 2000). Recientemente se han presentado dos trabajos que intentan dilucidar el papel que puede jugar *in vivo* la aminopeptidasa N. Para ello utilizaron el insecto modelo *Drosophila melanogaster*, díptero no susceptible a las proteínas Cry. Cuando se expresó la aminopeptidasa N de *M. sexta* en larvas de dicho insecto se logró inducir la susceptibilidad de éstos a la toxina Cry1Ac (Gill y Ellar, 2002). Sin embargo, cuando se expresó la aminopeptidasa N de *H. virescens* en células en cultivo S2 de *D. melanogaster* no se observó actividad citolítica de las toxinas Cry1Ac o Cry1Fa sobre estas células, con lo cual la aminopeptidasa N, que aparentemente actúa como proteína de unión a la membrana en *H.*

## Introducción

*virescens*, no puede inducir un fenotipo susceptible en células de *D. melanogaster* (Banks et al., 2003). Estos resultados indican que sería deseable una investigación más exhaustiva para dilucidar el verdadero papel que tienen las aminopeptidasas N en el modo de acción de las proteínas Cry.

Proteínas de la familia de las cadherinas también han sido detectadas como posibles receptores para las proteínas Cry. Estas proteínas han sido identificadas en *M. sexta* (Vadlamudi et al., 1993; Keeton y Bulla, Jr., 1997; Keeton et al., 1998), *B. mori* (Nagamatsu et al., 1998a,b), *H. virescens* (Gahan et al., 2001) y *P. gossypiella* (Morin et al., 2003). La proteína BTR175 de *B. mori* fue capaz de unirse con alta afinidad a la toxina Cry1Aa, que es tóxica para este insecto y no se unió a Cry1Ab o Cry1Ac, que no muestran toxicidad frente a *B. mori* (Jenkins y Dean, 2001). La expresión de BTR175 en células Sf9 procedentes de *Spodoptera frugiperda* indujo la toxicidad de Cry1Aa sobre las células (Nagamatsu et al., 1999). Anticuerpos cuyo sitio de reconocimiento mimetizaba la zona de unión a proteínas de la cadherina BTR1 de *M. sexta*, facilitaban la formación de los oligómeros de Cry1Ab, necesarios para la formación de poros en este insecto (Gómez et al., 2002). Recientemente se propuso que la inserción de un elemento transponible en el gen de la cadherina HevCadLP sea la responsable de los altos niveles de resistencia que presenta la colonia YHD2 de *H. virescens* (Gahan et al., 2001). Además, las mutaciones en 3 alelos de un gen de la cadherina están muy relacionadas con la resistencia en varias colonias de *P. gossypiella* (Morin et al., 2003).

La utilización de *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental permitió encontrar que la mutación de uno o varios genes de una misma ruta de glicosilación provoca la resistencia de este nematodo a las toxinas Cry5A y Cry14A, tóxicas para nematodos e insectos (Griffitts et al., 2001, 2003). Este hecho pone de manifiesto la importancia de los residuos de carbohidratos en el modo de acción de las toxinas, fundamentalmente en la interacción con la membrana epitelial del intestino. La influencia de la N-acetilgalactosamina (GalNAc) sobre la actividad de Cry1Ac está muy bien caracterizada. Este azúcar inhibe la actividad citolítica de Cry1Ac sobre las células CF1 procedentes de *C. fumiferana* (Knowles y Ellar, 1986), inhibe también unión de Cry1Ac a la aminopeptidasa N de *M. sexta* (Garczynski et al., 1991; Knowles et al., 1991) y de *H. virescens* (Luo et al., 1997), indicando que la unión de la toxina al receptor se realiza por intermedio de este azúcar. Lo anterior fue comprobado en el caso de *M. sexta* realizando ensayos con un mutante de Cry1Ac que tenía modificado el sitio de unión a este carbohidrato (Lee et al., 1999; Burton et al., 1999). Sin embargo, este mutante sí que se une a las aminopeptidasas N de *H. virescens* (Banks et al., 2001). Esto último, unido a que el mutante sólo tiene reducida su toxicidad entre 2 y 4 veces en ambos insectos, sugiere que la toxicidad no depende solamente de la unión mediada por la GalNAc (Carroll et al., 1997; Jenkins et al., 1999; Lee et al., 1999; Burton et al., 1999).

## **5. ESPECIES DE INSECTOS OBJETO DE ESTUDIO**

En este apartado se describen las especies de insectos y las colonias resistentes de cada una de ellas utilizadas en este trabajo.

### **5.1 *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)**

Es conocida como polilla de las crucíferas o del dorso de diamante por el tipo de alimentación y el dibujo característico que presenta el dorso de sus alas, respectivamente. Actualmente es la plaga más importante de las crucíferas a escala mundial y su control cuesta alrededor de 1 millardo de dólares al año. Originaria de la zona del Mediterráneo, en la actualidad está presente en cualquier sitio en el que se cultiven crucíferas. Es considerado el lepidóptero más ampliamente distribuido del mundo (Talekar y Shelton, 1993).

#### **5.1.1 Tipo de alimentación y daño**

Este insecto se alimenta sólo de miembros de la familia de las crucíferas, tanto de variedades cultivadas como de plantas silvestres. Estas últimas le sirven como refugio mientras empieza la época de plantación de variedades de cultivo. Las larvas de los primeros estadios minan el mesófilo de las hojas mientras que las de estadios posteriores comienzan a comer por el envés y consumen todo el tejido excepto la fina película de cera que recubre la superficie de la hoja (Talekar y Shelton, 1993).

#### **5.1.2 Ciclo biológico**

Los adultos son más activos a partir de la caída del Sol y permanecen así durante la noche. Beben pequeñas gotas de agua o de rocío. El apareamiento se produce al atardecer del primer día de la emergencia y las hembras comienzan a poner huevos rápidamente. Las puestas se realizan con cierta preferencia en el haz de las hojas, fundamentalmente en las concavidades de éstas. El periodo de incubación dura aproximadamente de 5 a 6 días. Nada más eclosionar las larvas comienzan a alimentarse de tejido foliar. Existen 4 estadios larvarios y la larva llega a alcanzar un tamaño de unos 7-8 mm. Una vez completados los 4 estadios la larva forma una pupa en la superficie de la hoja y permanece en ese estado entre 4 y 15 días hasta que se produce la emergencia de los adultos y comienza un nuevo ciclo. La duración de cada etapa del desarrollo es muy dependiente de la temperatura y también puede depender de la planta en cuestión que le sirva de alimento (Talekar y Shelton, 1993) (Fig. 10).

#### **5.1.3 Resistencia**

El gran potencial reproductivo de este insecto, el tiempo relativamente corto entre las generaciones, la duración de la estación de



## Introducción

cultivo y la frecuencia de las aplicaciones de insecticidas, son los factores que han contribuido al desarrollo de resistencia en *P. xylostella*. Fue el primer insecto en desarrollar resistencia al DDT (Ankersmit, 1953). Con posterioridad ha desarrollado resistencia a todos los insecticidas utilizados en la práctica agrícola (Talekar y Shelton, 1993). Hasta el momento ha sido el primer y único insecto capaz de desarrollar resistencia en campo a los insecticidas basados en *B. thuringiensis* (Ferré y Van Rie, 2002). Además, se han realizado experimentos de selección en laboratorio y se ha logrado obtener niveles muy altos de resistencia a productos comerciales y a toxinas individuales (Tabashnik et al., 1993b; Wright et al., 1997; Zhao et al., 2000). La resistencia es autosómica, recesiva en la mayoría de los casos y debida fundamentalmente a uno o muy pocos genes, coincidiendo con las características generales de la resistencia a *B. thuringiensis* (Ferré y Van Rie, 2002).

### 5.1.4 Colonia PHI

Esta colonia derivó de 130 pupas colectadas en Filipinas en el año 1993, en campos que habían sido tratados de forma extensiva con Dipel®. Después de ser seleccionada en el laboratorio con la toxina Cry1Ab pura, sólo mostró resistencia a esta toxina (Ballester et al., 1994). Con posterioridad fue re-seleccionada con el producto MYX 03604, basado en una protoxina quimera entre Cry1Ab y Cry1Ac expresada en *P. fluorescens* (Ballester, 1997). En esta ocasión la colonia mostró resistencia a Cry1Ab y resistencia cruzada a Cry1Aa y Cry1Ac (Ballester, 1997; Tabashnik et al., 1997b). Los ensayos de unión a BBMV dieron como resultado que la proteína Cry1Ab había perdido la capacidad de unión y las otras dos conservaban esta propiedad (Ballester et al., 1999b). Análisis genéticos mostraron que la resistencia era autosómica, parcialmente dominante para la toxina Cry1Aa ( $D_{ML}=0,70$ ), recesiva para Cry1Ab ( $D_{ML}=0,22$ ) y codominante para Cry1Ac ( $D_{ML}=0,48$ ) (Tabashnik et al., 1997b; Ferré y Van Rie, 2002). Además, se ha propuesto que en esta colonia, son necesarias mutaciones en, al menos, 3 genes diferentes para explicar la resistencia a las toxinas Cry1A y a Cry1Fa (Tabashnik et al., 1997b).

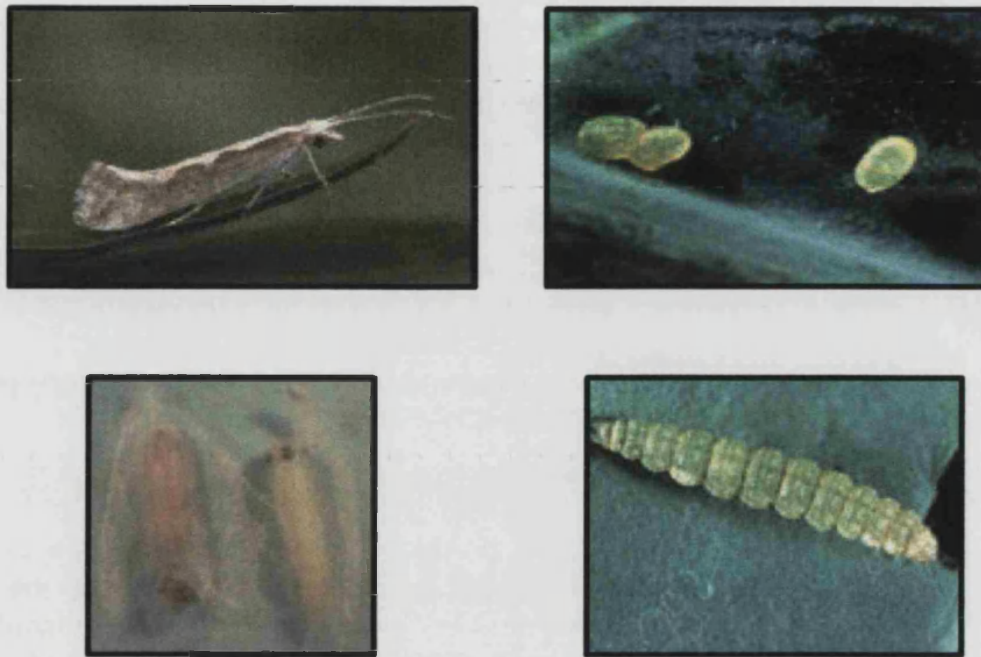


Figura 10. Etapas del ciclo de vida de *P. xylostella*.

## 5.2 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Es la plaga más importante que afecta a las plantaciones de algodón situadas al sudoeste de los Estados Unidos. Comúnmente se le llama gusano rosado de la India haciendo alusión al color de las larvas y a que posiblemente sea originario de ese país. En la actualidad se encuentra distribuido por todas las áreas algodoneras del mundo.

### 5.2.1 Tipo de alimentación y daño

Se alimenta fundamentalmente de cápsulas maduras. Las larvas penetran las cápsulas casi al eclosionar sin producir un orificio aparente de entrada que permita visualizar sus daños en el campo. Al atacar las cápsulas ya maduras el daño económico es mayor. Se alimenta de las semillas comprometiendo las siembras futuras, afecta la cantidad y calidad del aceite y deteriora la calidad de la fibra.

### 5.2.2 Ciclo biológico

La mariposa es pequeña (20 mm de envergadura, de color marrón y 15 mm de largo) y tiene su mayor actividad durante la noche. Pueden vivir de 8 a 15 días. Las hembras realizan las puestas en el cáliz de las cápsulas maduras o en la superficie de los botones florales. Los huevos pueden aparecer aislados o en pequeños grupos. Eclosionan a los 4-5 días, son de

## Introducción

color blanco y se tornan rojizos cuando se acerca la eclosión. Las larvas empiezan a alimentarse inmediatamente después de la eclosión. Tiene 5 estadios del desarrollo y llega a medir entre 12-14 mm después de 15 a 21 días. La larva puede permanecer en diapausa dentro de la semilla todo el verano. La pupación, al igual que todo el periodo desde la eclosión del huevo, se realiza dentro de la cápsula madura; también puede pupar en el suelo o en la hojarasca. En el estado de prepupa, la larva abre un orificio en la superficie de la cápsula para facilitar la salida de los adultos. La emergencia de los adultos se produce a los 10 días aproximadamente (Fig. 11).

([http://www.artropodos.info.ve/artropodos/area\\_agricola/algodon/pectinophora\\_gossypiella.html](http://www.artropodos.info.ve/artropodos/area_agricola/algodon/pectinophora_gossypiella.html))

### 5.2.3 Resistencia

No se ha descrito ninguna población de este insecto que haya desarrollado resistencia en campo a los insecticidas basados en *B. thuringiensis*, ni a las plantas transgénicas que expresan Cry1Ac utilizadas se forma extensiva desde 1996 (James, 2002). Se ha demostrado su potencial para desarrollar resistencia a través de experimentos de selección en laboratorio (Tabashnik et al., 2000a). Las estimaciones de la frecuencia inicial de alelos de resistencia en las poblaciones de campo de *P. gossypiella* era de 0.16 en el año 1997. Sin embargo, estimaciones posteriores resultaron en una frecuencia  $<8 \times 10^{-4}$  (Tabashnik et al., 2000b). La resistencia es autosómica, recesiva y recientemente se han identificado tres alelos de un gen de la cadherina como responsables de la resistencia en este insecto (Morin et al., 2003).

### 5.2.4 Colonia AZP-R

Se deriva de 10 muestras colectadas originalmente en 1997 de diferentes plantaciones de algodón en Arizona. Fue seleccionada con el producto comercial MVP II, que contiene una protoxina híbrida Cry1Ac-Cry1Ab expresada en *P. fluorescens* (Tabashnik et al., 2000a). La porción correspondiente a Cry1Ab es digerida proteolíticamente durante el proceso de activación, por lo que la toxina activa resultante es sólo Cry1Ac (Gilroy y Wilcox, 1992). Esta colonia ha mostrado resistencia a Cry1Ac, resistencia cruzada a Cry1Ab y en menor medida a Cry1Aa y Cry1Bb (Tabashnik et al., 2000a). En ensayos posteriores, esta colonia ha mostrado niveles muy bajos de resistencia cruzada a Cry2Aa y muy poca o ninguna a Cry2Ab (Tabashnik et al., 2002a). El análisis genético mostró que la resistencia era autosómica, recesiva ( $D_{ML}=0,01$ ) y debida a uno o muy pocos genes (Ferré y Van Rie, 2002; Tabashnik et al., 2002b).



Figura 11. Etapas del ciclo de vida de *P. gossypiella*.

### 5.3 *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae)

Es uno de los barrenadores del maíz. Causa ingentes daños en las plantaciones de este cultivo en todo el mundo. Sólo en Estados Unidos, el coste anual debido a daños y gastos en control se cifra en 1 millardo de dólares. Se cree que fue introducida en ese país a principios del siglo pasado procedente de Hungría o Italia. Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo.

#### 5.3.1 Tipo de alimentación y daño

Sus hábitos polípagos hacen que, además del maíz, se alimente también de otros cultivos como el sorgo, algodón, pimiento y otros vegetales. Las larvas de primer y segundo estadios se alimentan del cogollo, posteriormente barrenan el tallo haciendo túneles. También se alimentan y hacen túneles dentro de la inflorescencia, mazorca y pedúnculo de la mazorca formando cavidades. Los túneles y cavidades en el tallo debilitan la planta y aumentan el riesgo de caída por efectos mecánicos. Los daños en las mazorcas provocan reducciones en el rendimiento.

#### 5.3.2 Ciclo biológico

Los adultos son pequeños (20-30 mm), tienen una coloración oscura, amarillo sucio con rayas onduladas (García Marí et al., 1994). Beben agua, normalmente en forma de gotas de rocío. Se aparean al atardecer. Ponen los huevos en grupos de 15 a 25, superpuestos como escamas de pescado en la vaina de las hojas por el envés (menos del 1% se deposita en

### *Introducción*

el resto de la planta). Los huevos eclosionan en 5 ó 6 días, dependiendo de la temperatura y las larvas neonatas se dispersan rápidamente para introducirse en el interior del tallo. El desarrollo de la larva consta de 5 ó 6 estadios y llega a medir 25 mm. A partir del tercer estadio las larvas barrenan el tallo y permanecen ahí hasta completar su desarrollo. Las larvas de último estadio preparan un orificio de salida para el adulto y pupan dentro de la galería del tallo. Ocasionalmente puede encontrarse alguna pupa sobre las hojas. Pasan el invierno en forma de larva desarrollada dentro de la caña de maíz. En mayo pupan y completan el ciclo (Fig. 12).

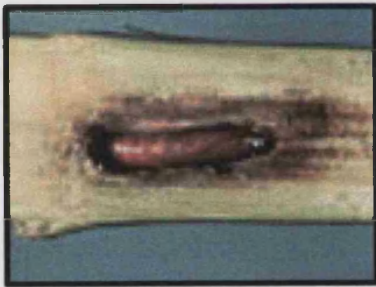
<http://www.ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/MaizeSP.htm#12>. Barrenador

### **5.3.3 Resistencia**

No se ha descrito resistencia en campo de las poblaciones de este insecto. Experimentos de selección con varias colonias colectadas en campo han logrado niveles de resistencia considerables en muy pocas generaciones (Huang et al., 1997). La resistencia es autosómica y en este caso se ha demostrado que, a determinadas dosis de toxina, es parcialmente dominante (Huang et al., 1999). Se ha estimado la frecuencia de genes de resistencia en las poblaciones de campo resultando que era menor que 0,013 en una población de Minnesota (Andow et al., 1998) y menor que  $4 \times 10^{-3}$  en una de Iowa (Andow et al., 2000). Estimaciones posteriores dieron como resultado que la frecuencia en las poblaciones francesas era menor que  $9,2 \times 10^{-4}$  y que en la zona del "Cinturón del maíz" de los Estados Unidos era menor que  $4,23 \times 10^{-4}$  (Bourguet et al., 2003).

### **5.3.4 Colonia KS-SC-R**

Derivada de huevos colectados en 1995 en la zona centro-sur del estado de Kansas en los Estados Unidos, donde no existían datos de aplicaciones recientes de formulados basados en *B. thuringiensis*. Fue seleccionada con Dipel ES®, formulado comercial que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa, aumentando su resistencia 73 veces en 7 generaciones de selección (Huang et al., 1997). Actualmente, después de más de 40 generaciones sometida a presión selectiva, la colonia posee una resistencia de 105, 206, 515, >631 y 72 veces para las protoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa y Cry1Ba, respectivamente (Huarong y Oppert, datos no publicados). La actividad de las proteasas del tipo tripsina y la activación de la protoxina Cry1Ab están reducidas en un 56% y un 32%, respectivamente (Huarong y Oppert, datos no publicados). Esto indicaría que la alteración de la actividad proteolítica es un factor que contribuye a la resistencia en esta colonia, pero parece no ser suficiente para explicar los niveles encontrados. La resistencia es autosómica, parcialmente dominante ( $D_{ML}=0,86$ ) y debida mayormente a un único gen (Huang et al., 1999; Ferré y Van Rie, 2002).



**Figura 12.** Etapas del ciclo de vida de *O. nubilalis*.



## *OBJETIVOS*





## **OBJETIVOS**

**Establecimiento de la base genética de la variación en la susceptibilidad y la resistencia a *B. thuringiensis* en varias colonias de *P. xylostella*.**

Análisis de la variabilidad natural respecto a la susceptibilidad frente a las toxinas de *B. thuringiensis* en varias colonias de laboratorio de *P. xylostella*.

Caracterización de las bases genéticas de la resistencia a *B. thuringiensis* presentes en una colonia de *P. xylostella*.

**Análisis de la unión al intestino de varias proteínas Cry y su implicación en el desarrollo de resistencia en dos especies de lepidópteros.**

Establecimiento del modelo de receptores en *P. gossypiella* y análisis bioquímico de la resistencia en una colonia resistente a varias toxinas de *B. thuringiensis*.

Empleo de tres métodos diferentes para analizar la unión a la membrana de las toxinas de *B. thuringiensis* en una colonia resistente de *O. nubilalis*.



# *RESUMEN GENERAL*





## RESUMEN GENERAL

**Establecimiento de la base genética de la variación en la susceptibilidad y la resistencia a *B. thuringiensis* en varias colonias de *P. xylostella*.**

**Análisis de la variabilidad natural frente a las toxinas de *B. thuringiensis* en varias colonias de laboratorio de *P. xylostella*.**

Los estudios realizados para determinar el nivel de resistencia en poblaciones de insectos y la determinación de la potencia de formulados insecticidas se basan en comparaciones con colonias de laboratorio que no han sido expuestas a las toxinas de *B. thuringiensis*. Se han descrito casos de variaciones considerables en la toxicidad de una proteína Cry determinada frente a varias colonias de laboratorio de *P. xylostella* (Ferré et al., 1991; Ballester et al., 1994; Monnerat et al., 1999; Liu et al., 2001). Dichas variaciones podrían deberse a diferencias en el método y los materiales utilizados en los bioensayos, a diferencias genéticas entre las colonias o a ambos factores en conjunto. En este estudio se emplearon 3 colonias no seleccionadas que han sido utilizadas como control sensible en tres laboratorios diferentes (Ballester et al., 1994; Wright et al., 1997; Liu et al., 1998). Con ellas se realizaron comparaciones simultáneas de la toxicidad de 5 proteínas Cry para determinar la posible base genética de las diferencias observadas y también para analizar el efecto de los métodos de bioensayo empleados.

Los resultados mostraron que las diferencias genéticas entre las colonias eran mayores que el efecto que podían ejercer las diferencias del método utilizado en cada laboratorio. Las colonias LAB-V (Holanda) y LAB-PS (Hawaii) tenían una diferencia de 8 y 13 veces en la susceptibilidad a Cry1Ab y Cry1Ca, respectivamente. Las diferencias fueron aún mayores entre LAB-V y ROTH (Reino Unido), presentando diferencias significativas en la susceptibilidad a todas las toxinas, que llegaron a ser de 170 veces para Cry1Ac.

La colonia LAB-V, analizada en dos laboratorios distintos con dos métodos de bioensayo diferentes apenas mostró variaciones en la susceptibilidad a las toxinas, sólo hubo diferencias significativas para la toxina Cry1Ab. Si tenemos en cuenta los valores absolutos de  $LC_{50}$ , a mayor tiempo de exposición a la toxina se produce un aumento en la susceptibilidad, lo cual confirma resultados anteriores obtenidos en esta especie (Tabashnik et al., 1993a; Liu et al., 1995).

El análisis de la potencia relativa de las toxinas para las tres colonias utilizadas en este trabajo mostró en todas un patrón similar. Las

### Resumen General

toxinas Cry1Ab y Cry1Ac eran las más tóxicas, seguidas por Cry1Ca, Cry1Aa y Cry1Da, respectivamente. Es destacable que, en la colonia LAB-V, este parámetro se haya mantenido aproximadamente igual después de 10 años y que prácticamente no esté afectado por los cambios en la fuente de toxinas y en el tipo de bioensayo.

Nuestros resultados indican que el componente genético es muy importante en las discrepancias en la susceptibilidad descritas para las colonias de laboratorio; como consecuencia, está afectado directamente el criterio de resistencia de las poblaciones tratadas o la estandarización de la potencia de los productos comerciales basados en *B. thuringiensis*. Es necesario que se realice un estudio riguroso de la susceptibilidad entre las poblaciones de campo y las colonias de laboratorio antes de seleccionar el control de referencia que se empleará en futuras comparaciones.

### **Caracterización del número de genes de resistencia a *B. thuringiensis* presentes en una colonia de *P. xylostella*.**

La colonia PHI, establecida a partir de 130 pupas colectadas en Filipinas, ha demostrado el enorme potencial que existe en las poblaciones de campo de *P. xylostella* para desarrollar resistencia frente a las toxinas de *B. thuringiensis*.

La zona donde fueron colectadas las pupas había sido tratada reiteradamente con formulados basados en *B. thuringiensis* por lo que la población de insectos estaba sometida a una gran presión de selección. Los primeros bioensayos realizados con esta colonia después de comenzar la selección en el laboratorio con Cry1Ab, mostraron que era resistente a esta toxina y que mantenía la susceptibilidad a Cry1Aa y Cry1Ac (Ballester et al., 1994), toxinas con una alta homología de secuencia con Cry1Ab (Schnepf et al., 1998). La selección posterior con un producto comercial que contenía una proteína quimérica Cry1Ab-Cry1Ac dio como resultado resistencia a las 3 toxinas, Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Ballester, 1997). La colonia se mantuvo en el laboratorio varios años sin presión de selección. En el momento de comenzar el presente estudio, la resistencia había revertido y la colonia tenía unos niveles de susceptibilidad muy similares a la colonia LAB-V, que no había estado expuesta a las proteínas Cry y es usada en este estudio como colonia susceptible de referencia.

Se tomaron dos muestras de la colonia y fueron seleccionadas independientemente. Una muestra, con mezcla de esporas y cristales de una cepa de *B. thuringiensis* que expresaba únicamente la toxina Cry1Aa (línea Sel-A) y la otra, con toxina Cry1Ab activada (línea Sel-B). Después de terminado el proceso de selección se realizó la caracterización de la resistencia a través de análisis genéticos y bioquímicos.

La respuesta a la selección fue diferente en ambas líneas. Sel-A, apenas presentaba resistencia a Cry1Aa después de 10 generaciones con presión de selección y Sel-B disminuyó su susceptibilidad más de 200 veces

### *Resumen General*

frente a Cry1Ab en sólo 3 generaciones. No obstante, el perfil general de resistencia en las dos líneas seleccionadas fue similar para las toxinas Cry1A. En ambos casos disminuyó la susceptibilidad a Cry1Ab y Cry1Ac y no se produjeron variaciones significativas en la susceptibilidad a Cry1Aa. También se encontraron diferencias en el comportamiento de ambas líneas frente a otras toxinas. Sel-B presentó resistencia cruzada a Cry1Fa, en cambio, Sel-A fue aún más susceptible frente a esta toxina que la colonia LAB-V, utilizada como control. Las líneas Sel-B y LAB-V no presentaron diferencias significativas en la susceptibilidad frente a Cry1Ja, mientras que Sel-A fue más susceptible que la colonia control.

La resistencia a Cry1Ab, en la línea Sel-A, era debida a un gen autosómico y dominante para una concentración de 50 mg/l de toxina. No fue posible establecer si la dominancia era completa o no, por no contar con los datos de susceptibilidad inicial frente a Cry1Ab de los parentales. En la línea Sel-B, la resistencia se heredaba de forma autosómica y parcialmente recesiva.

El análisis bioquímico reveló que, en ambas líneas seleccionadas, el mecanismo de resistencia a la toxina Cry1Ab involucraba la alteración de los sitios de unión en el intestino para esta toxina. El análisis de la unión de Cry1Ac sólo pudo ser realizado con la línea Sel-B y también se encontró que los sitios de unión para esta toxina estaban alterados. Los mecanismos que involucran alteraciones en el procesamiento proteolítico de las proteínas Cry son descartables en este caso porque los bioensayos fueron realizados con toxina activada.

Tomando conjuntamente los datos disponibles, se pudo establecer la existencia de, al menos, 4 genes (alélicos o no) de resistencia en la colonia PHI. Uno que le confiere resistencia exclusivamente a Cry1Aa (Tabashnik et al., 1997b), otro sólo a Cry1Ab (Ballester et al., 1994), otro a Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa con pérdida de unión a Cry1Ab y Cry1Ac, que se corresponde con el descrito para la línea Sel-B en este estudio y por último, un gen que confiere resistencia a Cry1Ab, Cry1Ac, pero no a Cry1Fa, con pérdida de unión a Cry1Ab, pero no a Cry1Ac (Tabashnik et al., 1997b), que muy probablemente sea el responsable de la resistencia en la línea Sel-A. Experimentos posteriores y no publicados aún, mostraron que la unión a Cry1Ac no estaba alterada en la línea Sel-A.

Los resultados de este trabajo plantean la importancia que tienen el tipo de agente empleado para seleccionar (esporas y cristales o toxina activada) y el estadio del desarrollo larvario en que se realice ésta (neonatos o tercer estadio) en la determinación del tipo de resistencia que se desarrollará finalmente. Además, demuestran la existencia de más de un gen que confiere resistencia a una misma toxina de *B. thuringiensis* en una población de insectos. Esto, aunque ya había sido apuntado con anterioridad (Tabashnik et al., 1997a,b; Sayyed et al., 2000; Herrero et al., 2001b), nunca se habían encontrado pruebas tan directas como en este trabajo.



## *Resumen General*

Nuestros resultados deben hacer reflexionar sobre las premisas en que se basa el manejo de la resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* y muy especialmente a las plantas transgénicas que las expresan. Estas premisas son: resistencia debida a un único gen, que ésta se herede de forma recesiva, que la frecuencia de genes de resistencia en la población sea baja y que el apareamiento entre los individuos sensibles y resistentes sea aleatorio (Mellon y Rissler, 1998). Nosotros hemos encontrado que las poblaciones de insectos contienen, con más frecuencia de la asumida, más de un gen que confiere resistencia a una o varias toxinas y que a determinadas concentraciones puede heredarse de forma dominante. A la luz de estos resultados se debe realizar un análisis profundo de las estrategias diseñadas para adecuarlas a un entorno mucho más variable del asumido.

### **Análisis de la unión al intestino de varias proteínas Cry y su implicación en el desarrollo de resistencia en dos especies de lepidópteros.**

### **Establecimiento del modelo de receptores en *P. gossypiella* y análisis bioquímico de la resistencia en una colonia resistente a varias toxinas de *B. thuringiensis*.**

La alteración de la unión a la membrana epitelial del intestino de las larvas es el mecanismo de resistencia más común a las toxinas de *B. thuringiensis* (Ferré y Van Rie, 2002). En el presente trabajo se determinó la posible influencia de este mecanismo en la resistencia de una colonia (AZP-R) de *P. gossypiella*, la plaga más importante del cultivo del algodón a nivel mundial (Ingram, 1994). Además, nuestro trabajo permitiría incluir o no a esta colonia dentro del "modo 1" de resistencia, el más común de los patrones de resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* en lepidópteros. Este patrón incluye a las colonias que muestran resistencia, al menos, a una de las toxinas Cry1A, que no presentan resistencia cruzada a Cry1Ca, donde la resistencia es recesiva y la unión, al menos, de una de las toxinas Cry1A se encuentra alterada (Tabashnik et al., 1998). En estudios realizados con anterioridad se había descrito que la colonia AZP-R era resistente a Cry1Ac y no presentaba resistencia cruzada a Cry1Ca (Tabashnik et al., 2000a) y que la resistencia a altas concentraciones de Cry1Ac se heredaba de forma recesiva (Tabashnik et al., 2002b). Por tanto, nosotros determinaríamos si se cumplía o no el cuarto criterio para incluir a la colonia AZP-R dentro del modo 1 de resistencia.

Se encontró que la unión de la toxina Cry1Ab estaba reducida drásticamente, por lo que la colonia AZP-R podía incluirse, efectivamente, dentro del modo 1 de resistencia y también demostramos que el alto nivel

### Resumen General

de resistencia cruzada a Cry1Ab se debía a alteraciones en el sitio de unión de esta toxina en el intestino.

De acuerdo con estudios previos (Karim et al., 2000; Herrero et al., 2001a), determinamos que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ja compartían el mismo sitio de unión en el intestino de las larvas de *P. gossypiella* y que este sitio no era compartido por Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa o Cry9Ca. Según observaciones realizadas en otros insectos, la modificación de un sitio de unión compartido por varias toxinas puede provocar el desarrollo de resistencia a todas ellas a la vez (Lee et al., 1995; Tabashnik et al., 1997b; Sayyed et al., 2000; Herrero et al., 2001b). Nuestros resultados se correlacionan con los datos de toxicidad ya publicados donde la colonia AZP-R presentaba resistencia cruzada a Cry1Aa y Cry1Ab (Tabashnik et al., 2000a). Nuestros datos también predicen la resistencia cruzada a Cry1Ja, lo que ha sido ya descrito en otra colonia resistente de este insecto (Tabashnik et al., 2000a), pero desgraciadamente ese ensayo no fue realizado con la colonia AZP-R por lo que no disponemos de datos que permitan comprobar la predicción.

Los resultados de los experimentos de unión son de gran utilidad en la predicción del posible desarrollo de resistencia cruzada y correlacionan generalmente bien con los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad con colonias resistentes. Sin embargo, es conveniente aclarar que la única forma de comprobar directamente el desarrollo de resistencia cruzada es a través de bioensayos con poblaciones resistentes, pero en ese caso cualquier método que se haya escogido para el manejo de la resistencia ya habría fracasado.

Podría parecer sorprendente que los altos niveles de resistencia a la toxina Cry1Ac no se correlacionen con la reducción de la unión de esta toxina al intestino. Sin embargo, se han publicado varios casos similares utilizando colonias de otras especies que eran resistentes a las tres proteínas Cry1A. La colonia PHI, de *P. xylostella* y Dpl<sup>r</sup> de *P. interpunctella* tenían alterada la unión de Cry1Ab, pero no de Cry1Ac (Tabashnik et al., 1997b; Herrero et al., 2001b) y la colonia YHD2, de *H. virescens* que tenía reducida la unión de Cry1Aa, pero no de Cry1Ab o Cry1Ac (Lee et al., 1995).

Nosotros proponemos que, en la colonia AZP-R, la alteración del sitio de unión común para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ja, además de provocar la reducción de la unión de Cry1Ab, interfiere en los pasos del modo de acción posteriores a la unión de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1Ja. Esta hipótesis se apoya en que dos de las mutaciones encontradas en el gen de la cadherina, en varias poblaciones resistentes de *P. gossypiella*, incluida AZP-R, son deleciones en la zona de aguas arriba del sitio propuesto para la unión de las toxinas (Morin et al., 2003). De acuerdo con esto, podría no verse afectada la unión pero sí estar afectado el desplegamiento de la proteína Cry, la oligomerización, la inserción en la membrana o la formación de poros (Schnepf et al., 1998; Gómez et al., 2002). Es muy probable que si en esta colonia se realizaran estudios de la relación

### *Resumen General*

entre las mutaciones encontradas en el gen de la cadherina y los pasos posteriores a la unión, se podría encontrar un nuevo mecanismo que contribuiría de forma directa a la resistencia en este caso y probablemente en otros casos inexplicables hasta el momento.

### **Empleo de tres métodos diferentes para analizar la unión a la membrana de las toxinas de *B. thuringiensis* en una colonia resistente de *O. nubilalis*.**

La colonia KS-SC-R ha sido seleccionada en el laboratorio con Dipel ES® y ha desarrollado resistencia a Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa, todas ellas presentes en este formulado comercial y además ha desarrollado resistencia cruzada a Cry1Ba. Análisis genéticos publicados en 1999 describían que la resistencia era autosómica, parcialmente dominante y debida a un único gen (Huang et al., 1999).

Con el objetivo de determinar si el mecanismo que causaba la resistencia en esta colonia tenía relación con la alteración de la activación proteolítica de las proteínas Cry, se realizaron experimentos de medición de la actividad enzimática en el intestino y de la capacidad de activación proteolítica de las proteínas Cry por los jugos intestinales. Se encontró que la actividad de las enzimas del tipo tripsina, involucradas directamente en la activación de las proteínas Cry, se encontraba reducida en un 56% y que la activación proteolítica de la toxina Cry1Ab era un 32% menor que en la colonia susceptible utilizada como control (Huarong y Oppert datos no publicados). Es evidente, por tanto, que la activación de las toxinas está alterada en esta colonia y contribuye a la resistencia; no obstante, los altos niveles de resistencia descritos para algunas toxinas hicieron pensar que estaba involucrado más de un mecanismo. En el presente estudio se analizó la posible implicación de la alteración de la unión de las toxinas al intestino como mecanismo adicional de resistencia.

Los ensayos de ligand blot mostraron que no existían diferencias apreciables entre las colonias sensible y resistente en cuanto al número o tipo de proteínas que eran reconocidas por Cry1Ab o Cry1Ac. Las BBMV de intestino de ambas colonias se comportaron de forma similar en ensayos de unión a la toxina Cry1Ab realizados por la técnica de Surface Plasmon Resonance. Las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac marcadas con <sup>125</sup>I se unieron específicamente a las BBMV de ambas colonias y no se detectaron diferencias significativas en la afinidad de las toxinas ni en la concentración de sitios de unión en la membrana. Además, encontramos que las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac comparten sus sitios de unión a la membrana, lo cual corrobora resultados anteriores obtenidos con este insecto (Denolf et al., 1993; Hua et al., 2001). El análisis global de los resultados indica que no hay alteración de la unión de las toxinas a la membrana intestinal de las larvas resistentes. No obstante, no es posible descartar la combinación de este mecanismo con otros desconocidos aún y que involucren otros pasos del

*Resumen General*

modo de acción posteriores a la unión, hipótesis planteada con anterioridad en este trabajo.



## *CONCLUSIONES*



## CONCLUSIONES

1. El estudio de tres colonias de *Plutella xylostella* ha permitido demostrar que las variaciones en la susceptibilidad frente a las toxinas de *B. thuringiensis*, observadas en colonias de laboratorio no seleccionadas, tienen una base genética. Los métodos de bioensayo empleados comúnmente y la fuente de toxina tienen un efecto casi despreciable en la determinación de la toxicidad de las proteínas Cry de *B. thuringiensis*.
2. La selección de dos muestras de la colonia PHI, de *P. xylostella*, con mezcla de esporas y cristales de Cry1Aa y toxina Cry1Ab activada, respectivamente; resultó en la obtención de dos líneas seleccionadas con marcadas diferencias en el perfil de resistencia de cada una.
3. El análisis de la resistencia en las dos líneas seleccionadas a partir de la colonia PHI, muestra la existencia de al menos dos genes que confieren resistencia a una misma toxina de *B. thuringiensis* en una misma población de insectos, siendo la primera vez que esto se demuestra de forma tan directa. Nuestros datos conjuntamente con otros ya publicados revelan que la muestra original colectada en el campo contenía, al menos, 4 genes (alélicos o no) que confieren resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis*.
4. En *Pectinophora gossypiella*, el alto nivel de resistencia cruzada a Cry1Ab, en la colonia AZP-R, se debe a la alteración de su sitio de unión en la membrana.
5. La alteración de la unión de la toxina Cry1Ab a las BBMV del intestino de las larvas de la colonia AZP-R, conjuntamente con datos publicados con anterioridad, permite incluirla dentro del modo 1 de resistencia.
6. En *P. gossypiella*, existe un sitio de unión común para Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Ja, que no es compartido por Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa y Cry9Ca.
7. En *Ostrinia nubilalis*, la resistencia de la primera colonia resistente obtenida en laboratorio (KS-SC-R), no está relacionada directamente con la alteración de la unión de las toxinas al intestino.





## *BIBLIOGRAFÍA*



## BIBLIOGRAFÍA

- Adang, M. J., Brody, M. S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R. T., Shewmaker, C. K., Jones, A., Oakes, J. V. y McBride, K. E. 1993. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.* 21: 1131-1145.
- Agaisse, H. y Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.
- al yahyaee, S. A. y Ellar, D. J. 1996. Cell targeting of a pore-forming toxin, CytA  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*, by conjugating CytA with anti-Thy 1 monoclonal antibodies and insulin. *Bioconjug. Chem.* 7: 451-460.
- Andow, D. A. y Alstad, D. N. 1998. F<sub>2</sub> screening for rare resistant alleles. *J. Econ. Entomol.* 91: 572-578.
- Andow, D. A., Alstad, D. N., Pang, Y. H., Bolin, P. C. y Hutchison, W. D. 1998. Using an F<sub>2</sub> screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxins in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 579-584.
- Andow, D. A., Olson, D. M., Hellmich, R. L., Alstad, D. N. y Hutchison, W. D. 2000. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in an Iowa population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 26-30.
- Ankersmit, G. W. 1953. DTT resistance in *Plutella maculipennis* (Lepidoptera) in Java. *Bull. Entomol. Res.* 44: 421-425.
- Arencibia, A., Vázquez, R., Prieto, D., Téllez, P., Carmona, E., Coego, A., Hernández, L., de la Riva, G. A. y Selman-Housein, G. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Mol. Breeding.* 3: 247-255.
- Aronson, A. I., Han, E. S., McGaughey, W. y Johnson, D. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 981-986.
- Aronson, A. I., Wu, D. y Zhang, C. 1995. Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. *J. Bacteriol.* 177: 4059-4065.
- Ballester, V. 1997. Resistencia a  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en poblaciones naturales de *Plutella xylostella*. **Tesis doctoral.** Universidad de Valencia.

## Bibliografía

- Ballester, V., Escriche, B., Ménsua, J. L., Riethmacher, G. M. y Ferré, J. 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to Cry1Ab. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 437-43.
- Ballester, V., Granero, F., de Maagd, R. A., Bosch, D., Ménsua, J. L. y Ferré, J. 1999a. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1900-1903.
- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B. E., Malvar, T. y Ferré, J. 1999b. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1413-1419.
- Banks, D. J., Hua, G. y Adang, M. J. 2003. Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 499-508.
- Banks, D. J., Jurat-Fuentes, J. L., Dean, D. H. y Adang, M. J. 2001. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa  $\delta$ -endotoxin binding to a novel 110 kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 909-918.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R. y Yang, N.-S. 1987. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85: 1103-1109.
- Berliner, E. 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. *Z. Gesamte Getreidewe.* (Berlin). 3: 63-70.
- Berliner, E. 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.). *Z. Angew. Entomol.* 2: 29-56.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Seguin, M., Buisson, C., Hinton, J. L., Stodola, T. J., Porter, P., Cronholm, G., Buschman, L. L. y Andow, D. A. 2003. Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1225-1233.
- Bourguet, D., Genissel, A. y Raymond, M. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93: 1588-1595.
- Bradley, D., Harkey, M. A., Kim, M. K., Biever, K. D. y Bauer, L. S. 1995. The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 162-173.
- Bravo, A. 2001. Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*, pp. 71-86. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), **Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones**

## Bibliografía

de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Phytoma-España.

Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. y Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 237-246.

Bravo, A., Sanchez, J., Kouskoura, T. y Crickmore, N. 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *B. thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* 277: 23985-23987.

Bulla, L. A., Jr., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I. y Fitz-James, P. C. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* 8: 147-204.

Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. y Derbyshire, D. J. 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* 287: 1011-1022.

Cao, J., Tang, J. D., Strizhov, N., Shelton, A. M. y Earle, E. D. 1999. Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C. *Molecular Breeding*. 5: 131-141.

Carlberg, G. 1986. *Bacillus thuringiensis* and microbial control of flies. *MIRCEN journal*. 2: 267-274.

Carlberg, G., Kihamia, C. M. y Minjas, J. 1985. Microbial control of flies in latrines in Dar es Salaam with a *Bacillus thuringiensis* (serotype 1) preparation, Muscabac. *MIRCEN journal of Applied Microbiological Biotechnology*. 1: 33-44.

Carlberg, G., Tikkanen, L. y Abdel-Hameed, A. H. 1995. Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparations, including thuringiensin, using the *Salmonella* assay. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 68-71.

Carozzi, N. B., Warren, G. W., Desai, N., Jayne, S. M., Lotstein, R., Rice, D. A., Evola, S. y Koziel, M. G. 1992. Expression of a chimeric CaMV 35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 20: 539-548.

Carroll, J., Wolfersberger, M. G. y Ellar, D. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* midgut brush border membrane vesicles proceeds by more than one mechanism. *J. Cell Sci.* 110: 3099-3104.

Chen, X. J., Curtiss, A., Alcantara, E. y Dean, D. H. 1995. Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible

## Bibliografía

binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. **J. Biol. Chem.** 270: 6412-6419.

Chen, X. J., Lee, M. K. y Dean, D. H. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 9041-9045.

Cheng, J., Bolyard, M. G., Saxena, R. C. y Sticklen, M. B. 1992. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Plant Science.** 81: 83-91.

Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M. y Kaplan, H. 1990a. Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. **J. Protein Chem.** 9: 87-94.

Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M., Raynor, T. y Kaplan, H. 1990b. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*. Structural implications. **Eur. J. Biochem.** 189: 523-527.

Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A. y Ellar, D. J. 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** 131: 249-286.

Crickmore, N. y Ellar, D. J. 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.** 6: 1533-1537.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 807-813.

Cummings, C. E., Armstrong, G., Hodgman, T. C. y Ellar, D. J. 1994. Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **Mol. Membr. Biol.** 11: 87-92.

Curtis, C. F., Cook, L. M. y Wood, R. J. 1978. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. **Ecol. Entomol.** 3: 273-287.

Dandekar, A. M., McGranahan, G. H., Vail, P. V., Uratsu, S. L., Leslie, C. A. y Tebbets, J. S. 1998. High levels of expression of full-length *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. **Plant Sci.** 131: 181-193.

Daniel, A., Sangadala, S., Dean, D. H. y Adang, M. J. 2002. Denaturation of either *Manduca sexta* aminopeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A

## Bibliografía

toxins exposes binding epitopes hidden under non-denaturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2106-2112.

de Maagd, R. A., Kwa, M. S., van der, K. H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J. y Bosch, D. 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1537-1543.

de Maagd, R. A., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W. y Bosch, D. 2000. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1559-1563.

De Rocher, E. J., Vargo-Gogola, T. C., Diehn, S. H. y Green, P. J. 1998. Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol.* 117: 1445-1461.

Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S. J., Chen, X. J., Alcántara, E. y Hussain, S. R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview. *Gene.* 179: 111-117.

Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. y Van Rie, J. 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248: 748-761.

Denolf, P., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. y Van Rie, J. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1828-1837.

Diehn, S. H., Chiu, W. L., De Rocher, E. J. y Green, P. J. 1998. Premature polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region. *Plant Physiol.* 117: 1433-1443.

Diehn, S. H., De Rocher, E. J. y Green, P. J. 1996. Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to be learned from B.t. toxin genes. *Genet. Eng. (N. Y. )*. 18: 83-99.

Escrache, B. y Ferré, J. 2001. Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*, pp. 87-108. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control de plagas*. Phytoma-España.

Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. y Koziel, M. G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5389-5394.



## Bibliografía

- Federici, B. A. y Bauer, L. S. 1998. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4368-4371.
- Ferré, J., Granero, F., González-Cabrera, J. y Ballester, V. 2001. Bases de la resistencia a *Bacillus thuringiensis* y estrategias de control en el uso de plantas transgénicas, pp. 271-296. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), **Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas.** Phytoma-España.
- Ferré, J., Real, M. D., Van Rie, J., Jansens, S. y Peferoen, M. 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.
- Ferré, J. y Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Firoz Alam, M., Datta, K., Abrigo, E., Vasquez, A., Senadhira, D. y Datta, S. K. 1998. Production of transgenic deepwater Indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Sci.* 135: 25-30.
- Fischhoff, D. A., Bowdish, K. S., Perlak, F. J., Marrone, P. G., McCormick, S. M., Niedermeyer, J. G., Dean, D. A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E. J., Rochester, D. E., Rogers, S. G. y Fraley, R. T. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology.* 5: 807-813.
- Forcada, C., Alcácer, E., Garcerá, M. D., Tato, A. y Martínez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42: 51-63.
- Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. y Shimamoto, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology (N. Y.)* 11: 1151-1155.
- Gahan, L. J., Gould, F. y Heckel, D. G. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science.* 293: 857-860.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W. y English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57: 1101-1109.
- García Marí, F., Costa Comelles, J. y Ferragut Pérez, F. 1994. *Plagas Agrícolas.* 2 ed. Phytoma-España.
- Garczynski, S. F., Crim, J. W. y Adang, M. J. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to

### Bibliografía

*Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 2816-2820.

Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. y Shai, Y. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 12289-12294.

Gazit, E. y Shai, Y. 1993. Structural and functional characterization of the  $\alpha$ -5 segment of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. **Biochemistry.** 32: 3429-3436.

Georghiou, G. P. 1994. Principles of insect resistance management. **Phytoprotection.** 75: 51-59.

Georghiou, G. P. y Lagunes-Tejeda, A. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. **Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy**

Gerber, D. y Shai, Y. 2000. Insertion and organization within membranes of the  $\delta$ -endotoxin pore-forming domain, helix 4-loop-helix 5, and inhibition of its activity by a mutant helix 4 peptide. **J. Biol. Chem.** 275: 23602-23607.

Gill, M. y Ellar, D. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. **Insect Mol. Biol.** 11: 619-625.

Gill, S. S., Cowles, E. A. y Francis, V. 1995. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAC toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **J. Biol. Chem.** 270: 27277-27282.

Gilroy, T. E. y Wilcox, E. R. 1992. Hybrid *Bacillus thuringiensis* gene, plasmid and transformed *Pseudomonas fluorescens*. Pat. N<sup>o</sup>. 5,128,130. Mycogen Corporation (San Diego, C).

Glare, T. R. y O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. 1 ed. John Wiley & Sons, Ltd.

Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. y Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Lett.** 513: 242-246.

González-Cabrera, J. 2001. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*, pp. 169-187. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), **Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas.** Phytoma-España.

## Bibliografía

- Gould, F., Anderson, A., Reynolds, A., Bumgarner, L. y Moar, W. 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high level of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88: 1545-1559.
- Griffitts, J. S., Whitacre, J. L., Stevens, D. E. y Aroian, R. V. 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science.* 293: 860-864.
- Griffitts, J. S., Huffman, D. L., Whitacre, J. L., Barrows, B. D., Marroquin, L. D., Muller, R., Brown, J. R., Hennet, T., Esko, J. D. y Aroian, R. V. 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J. Biol. Chem.:* M308142200
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R. y Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- Haider, M. Z., Knowles, B. H. y Ellar, D. J. 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal  $\delta$ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* 156: 531-540.
- Heimpel, A. M. y Angus, T. A. 1958. The taxonomy of insects pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland & Frankland. *Can. J. Microbiol.* 4: 531-540.
- Hernández, C. S., Martínez, C., Porcar, M., Caballero, P. y Ferré, J. 2003. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I  $\beta$ -exotoxin production. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 57-62.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B. E. y Ferré, J. 2001a. Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5729-5734.
- Herrero, S., Oppert, B. y Ferré, J. 2001b. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1085-1089.
- Hodgman, T. C. y Ellar, D. J. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* 1: 97-106.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7844-7848.

## Bibliografía

- Höfte, H. y Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Horák, P., Weiser, J., Mikes, L. y Kolárová, L. 1996. The effect of *Bacillus thuringiensis*  $\beta$ -exotoxin on *Trematode cercariae*. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 41-49.
- Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J. L., Schwab, G. y Adang, M. J. 2001. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 872-879.
- Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A. y McGaughey, W. H. 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the european corn borer. *Science.* 284: 965-967.
- Huang, F., Higgins, R. A. y Buschman, L. L. 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1137-1143.
- Ignoffo, C. M., Garcia, C., Kroha, M. J., Fukuda, T. y Couch, T. L. 1981. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosq. News.* 41: 85-93.
- Ingle, S. S., Trivedi, N., Prasad, R., Kuruvilla, J., Rao, K. K. y Chhatpar, H. S. 2001. Aminopeptidase-N from the *Helicoverpa armigera* (Hübner) brush border membrane vesicles as a receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin. *Curr. Microbiol.* 43: 255-259.
- Ingram, W. R. 1994. *Pectinophora* (Lepidoptera: Gelechiidae), pp. 107-148. En Mathews, A. y Tunstall, J. P. (eds.), *Insect pest of cotton*. CAB, Wallingford, UK.
- Iriarte, J. y Caballero, P. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, pp. 16-44. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*. PHYTOMA-España.
- Ishiwata, S. 1901. On a severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho.* 114: 1-5.
- James, C. 2002. Global review of commercialized transgenic crops: 2001. *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA Briefs No. 24*. Ithaca, N. Y.
- Jansens, S., Van Vliet, A., Dickburt, C., Buysse, L., Piens, C., Saey, B., De Wulf, A., Gosselé, V., Páez, A., Göbel, E. y Peferoen, M. 1997. Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Sci.* 37: 1616-1624.

## Bibliografía

- Jenkins, J. L. y Dean, D. H. 2001. Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. **BMC. Biochem.** 2: 12
- Jenkins, J. L., Lee, M. K., Sangadala, S., Adang, M. J. y Dean, D. H. 1999. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to *Manduca sexta* aminopeptidase-N receptor is not directly related to toxicity. **FEBS Lett.** 462: 373-376.
- Johnson, D. E. y McGaughey, W. H. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.** 33: 54-59.
- Jurat-Fuentes, J. L. y Adang, M. J. 2001. Importance of Cry1  $\delta$ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 323-329.
- Karim, S., Riazuddin, S., Gould, F. y Dean, D. H. 2000. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pest. Biochem. Physiol.** 67: 198-216.
- Keeton, T. P. y Bulla, L. A., Jr. 1997. Ligand specificity and affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3419-3425.
- Keeton, T. P., Francis, B. R., Maaty, W. S. y Bulla, L. A., Jr. 1998. Effects of midgut-protein-preparative and ligand binding procedures on the toxin binding characteristics of BT-R1, a common high-affinity receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 2158-2165.
- Knight, P. J., Crickmore, N. y Ellar, D. J. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c)  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol.** 11: 429-436.
- Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.** 24: 275-308.
- Knowles, B. H. y Ellar, D. J. 1986. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific  $\delta$ -endotoxin. **J. Cell Sci.** 83: 89-101.
- Knowles, B. H., Knight, P. J. y Ellar, D. J. 1991. N-acetyl galactosamine is part of the receptor in insect gut epithelia that recognizes an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.** 245: 31-35.

### Bibliografía

- Koller, C. N., Bauer, L. S. y Hollingworth, R. M. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native  $\delta$ -endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 692-699.
- Koni, P. A. y Ellar, D. J. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic  $\delta$ -endotoxins. *Microbiology.* 140: 1869-1880.
- Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S. F., Gould, F. y Moar, W. J. 1999. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1840-1845.
- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M. y Evola, S. 1993. Field performance of elite maize plants expressing an insecticidal protein gene derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology.* 11: 194-200.
- Lambert, B. y Peferoen, M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience.* 42: 112-122.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. y Thiery, I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 660-672.
- Lee, M. K. y Dean, D. H. 1996. Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 575-580.
- Lee, M. K., Rajamohan, F., Gould, F. y Dean, D. H. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3836-3842.
- Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N. y Chen, J. S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4648-4657.
- Lee, M. K., You, T. H., Gould, F. L. y Dean, D. H. 1999. Identification of residues in domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4513-4520.
- Levinson, B. L., Kasyan, K. J., Chiu, S. S., Currier, T. C. y Gonzalez, J. M., Jr. 1990. Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* 172: 3172-3179.

### Bibliografía

- Li, J., Koni, P. A. y Ellar, D. J. 1996. Structure of the mosquitocidal  $\delta$ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257: 129-152.
- Li, J. D., Carroll, J. y Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353: 815-821.
- Liang, Y., Patel, S. S. y Dean, D. H. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270: 24719-24724.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E. y Johnson, M. W. 1995. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 788-792.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Masson, L., Escriche, B. y Ferré, J. 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 1-6.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Meyer, S. K. y Crickmore, N. 2001. Cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3216-3219.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar, W. J. y Smith, R. A. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1385-1389.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E. y Pusztai-Carey, M. 1996. Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 798-804.
- Lorence, A., Darszon, A. y Bravo, A. 1997. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.* 414: 303-307.
- Lu, Y. J. y Adang, M. J. 1996. Conversion of *Bacillus thuringiensis* CryIAC-binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 33-40.
- Luo, K., Banks, D. y Adang, M. J. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 457-464.
- Luo, K., Sangadala, S., Masson, L., Mazza, A., Brousseau, R. y Adang, M. J. 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as

### Bibliografía

"receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 735-743.

Luttrell, R. G., Wan, L. y Knighten, K. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.

Martínez-Ramírez, A. C., González-Nebauer, S., Escriche, B. y Real, M. D. 1994. Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 782-787.

Martínez-Ramírez, A. C., Gould, F. y Ferré, J. 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a 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.

Masson, L., Lu, Y. J., Mazza, A., Brousseau, R. y Adang, M. J. 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. *J. Biol. Chem.* 270: 20309-20315.

Masson, L., Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Brousseau, R. y Schwartz, J. L. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 274: 31996-32000.

McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M. y Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N. Y.)*. 13: 362-365.

McClintock, J. T., Schaffer, C. R. y Sjoblad, R. D. 1995. A comparative review of the mammalian effect of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pest. Sci.* 45: 95-105.

McGaughey, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*. 229: 193-195.

McGaughey, W. H. y Beeman, R. W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 28-33.

McPherson, S. A., Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Marrone, P. G., Lavrik, P. B. y Fischhoff, D. A. 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biotechnology*. 6: 61-66.

Mellon, M. y Rissler, J. 1998. Now or never: serious new plans to save a natural pest control. Union of Concerned Scientists.



## Bibliografía

Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R. y Hayashi, Y. 1994. Enhancement of  $\delta$ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 111-112.

Moar, W. J., Puzstai-Carey, M., van Faassen, H., Bosch, D., Frutos, R., Rang, C., Luo, K. y Adang, M. J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2086-2092.

Monnerat, R., Masson, L., Brousseau, R., Puzstai-Carey, M., Bordat, D. y Frutos, R. 1999. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Curr. Microbiol.* 39: 159-162.

Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K. y Tabashnik, B. E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 5004-5009.

Morse, R. J., Yamamoto, T. y Stroud, R. M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure. (Camb. )*. 9: 409-417.

Nagamatsu, Y., Koike, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. y Furukawa, Y. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett.* 460: 385-390.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S. y Kogure, M. 1998a. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 727-734.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., Shibata, Y. y Katsumoto, T. 1998b. Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 718-726.

Nakamura, L. K. y Dulmage, H. T. 1988. *Bacillus thuringiensis* cultures available from the US Department of Agriculture. *Tech. Bull. USDA.* 1738: 38

Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D. y McGaughey, W. H. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.

Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D., Upton, S. J. y McGaughey, W. H. 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of

### Bibliografía

*Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 26: 571-583.

Oppert, B., Kramer, K. J., Johnson, D. E., MacIntosh, S. C. y McGaughey, W. H. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 198: 940-947.

Parker, M. W. y Pattus, F. 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. **Trends Biochem. Sci.** 18: 391-395.

Parrott, W. A., All, J. N., Adang, M. J., Bailey, A. M., Boerma, H. R. y Stewart, C. N., Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. **In Vitro Cell Dev. Biol.** 30: 144-149.

Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. y Fischhoff, D. A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88: 3324-3328.

Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., Wyman, J., Love, S., Reed, G. y Biever, D. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Mol. Biol.** 22: 313-321.

Powell, K. A. y Jutsum, A. R. 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. **Pest. Sci.** 37: 315-321.

Rausell, C., Martínez-Ramírez, A. C., García-Robles, I. y Real, M. D. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 1553-1558.

Salama, H. S. y el Sharaby, A. 1985. Histopathological changes in *Heliothis armigera* infected with *Bacillus thuringiensis* as detected by electron microscopy. **Insect Sci. Applic.** 6: 503-511.

Sampson, M. N. y Gooday, G. W. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology.** 144: 2189-2194.

Sangadala, S., Walters, F. S., English, L. H. y Adang, M. J. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)- K<sup>+</sup> efflux in vitro. **J. Biol. Chem.** 269: 10088-10092.

Sayed, A. H., Gatsi, R., Kouskoura, T., Wright, D. J. y Crickmore, N. 2001. Susceptibility of a field-derived, *Bacillus thuringiensis*-resistant strain of diamondback moth to in vitro-activated Cry1Ac toxin. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 4372-4373.



## Bibliografía

- Sayyed, A. H., Haward, R., Herrero, S., Ferré, J. y Wright, D. J. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509-1516.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. y Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Sebesta, K., Farkas, J., Horská, K. y Vanková, J. 1981. Thuringiensin, the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, pp. 249-282. En Burges, H. D. (eds.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press.
- Sebesta, K. y Horská, K. 1970. Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 209: 357-376.
- Simpson, R. M. y Newcomb, R. D. 2000. Binding of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins Cry1Ac and Cry1Ba to a 120-kDa aminopeptidase-N of *Epiphyas postvittana* purified from both brush border membrane vesicles and baculovirus-infected Sf9 cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1069-1078.
- Smith, G. P. y Ellar, D. J. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* 302 ( Pt 2): 611-616.
- Sneath, P. H. A. 1986. Sporeforming gram-positive rods and cocci, pp. 1104-1207. En Butler, J. P. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins.
- Stewart, G. S. A. B., Johnstone, K., Hagelberg, E. y Ellar, D. J. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem. J.* 198: 101-106.
- Stone, B. F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. World Health Organ.* 38: 325-328.
- Swadener, C. 1994. *Bacillus thuringiensis* (B.t.). *J. Pestic. Reform.* 14: 13-20.
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. I., Finson, N. y Johnson, M. W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Sims, M. A., Larkin, K., Head, G. P., Moar, W. J. y Carrière, Y. 2002a. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3790-3794.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Chilcutt, C. F., Cushing, N. L. y Johnson, M. W. 1993a. Increasing efficacy of bioassays: evaluating resistance to *Bacillus*

### Bibliografía

*thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 635-644.

Tabashnik, B. E., Finson, N. y Johnson, M. W. 1995. Prolonged selection affects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 219-224.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson, M. W. y Heckel, D. G. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4627-4629.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson, M. W. y Moar, W. J. 1993b. Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* causes minimal cross-resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1332-1335.

Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., de Maagd, R. A. y Dennehy, T. J. 2000a. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4582-4584.

Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Dennehy, T. J., Sims, M. A., Sisterson, M. S., Biggs, R. W. y Carriere, Y. 2002b. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.* 95: 1018-1026.

Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Finson, N., Masson, L. y Heckel, D. G. 1997a. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1640-1644.

Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Ménsua, J. L. y Ferré, J. 1997b. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 12780-12785.

Tabashnik, B. E., Liu, Y. B., Malvar, T., Heckel, D. G., Masson, L. y Ferré, J. 1998. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1751-1756.

Tabashnik, B. E., Malvar, T., Liu, Y. B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B. S., Park, S. H., Masson, L., de Maagd, R. A. y Bosch, D. 1996. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.

Tabashnik, B. E., Patin, A. L., Dennehy, T. J., Liu, Y. B., Carrière, Y., Sims, M. A. y Antilla, L. 2000b. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 12980-12984.

## Bibliografía

Talekar, N. S. y Shelton, A. M. 1993. Biology, ecology and management of diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.

Tanada, Y. y Kaya, H. K. 1993. Insect pathology. Academic Press.

Tang, J. D., Gilboa, S., Roush, R. T. y Shelton, A. M. 1997. Inheritance, stability and lack-of-fitness cost of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. *J. Econ. Entomol.* 90: 732-741.

Tang, J. D., Shelton, A. M., Van Rie, J., De Roeck, S., Moar, W. J., Roush, R. T. y Peferoen, M. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 564-569.

Thomas, W. E. y Ellar, D. J. 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin. *FEBS Lett.* 154: 362-368.

Vadlamudi, R. K., Ji, T. H. y Bulla, L. A., Jr. 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* 268: 12334-12340.

Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beukeleer, C., Dean, C., Zabeau, M., van Montagu, M. y Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature.* 328: 33-37.

Valaitis, A. P., Lee, M. K., Rajamohan, F. y Dean, D. H. 1995. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 1143-1151.

van der Salm, T., Bosch, D., Honee, G., Feng, L., Munsterman, E., Bakker, P., Stiekema, W. J. y Visser, B. 1994. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. *Plant Mol. Biol.* 26: 51-59.

van Frankenhuyzen, K., Nystrom, C. W. y Tabashnik, B. E. 1995. Variation in tolerance to *Bacillus thuringiensis* among and within populations of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in Ontario. *J. Econ. Entomol.* 88: 97-105.

van Hoof, A. y Green, P. J. 1997. Rare codons are not sufficient to destabilize a reporter gene transcript in tobacco. *Plant Mol. Biol.* 35: 383-387.

Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D. y Van Mellaert, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.* 247: 72-74.

Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martínez-Gil, A. F., de la Riva, G. A. y López-Revilla, R. 2000. Characterization of the

### Bibliografía

- mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33: 147-155.
- Wirth, M. C., Georghiou, G. P. y Federici, B. A. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94: 10536-10540.
- Wolfersberger, M. G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**. 46: 475-477.
- Wright, D. J., Iqbal, M., Granero, F. y Ferré, J. 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 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1814-1819.
- Wu, D. y Aronson, A. I. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. **J. Biol. Chem.** 267: 2311-2317.
- Wu, S. J. y Dean, D. H. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIII A  $\delta$ -endotoxin. **J. Mol. Biol.** 255: 628-640.
- Wünn, J., Klöti, A., Burkhardt, P. K., Biswas, G. C. G., Launis, K. e Iglesias, V. A. 1996. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. **Biotechnology**. 14: 171-176.
- Yu, C. G., Mullins, M. A., Warren, G. W., Koziel, M. G. y Estruch, J. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 532-536.
- Zhao, J. Z., Collins, H. L., Tang, J. D., Cao, J., Earle, E. D., Roush, R. T., Herrero, S., Escriche, B., Ferré, J. y Shelton, A. M. 2000. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3784-3789.



*PUBLICACIONES*





## Variation in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Toxins among Unselected Strains of *Plutella xylostella*

J. GONZÁLEZ-CABRERA,<sup>1</sup> S. HERRERO,<sup>1</sup> A. H. SAYYED,<sup>2</sup> B. ESCRICHE,<sup>1</sup> Y. B. LIU,<sup>3</sup>  
S. K. MEYER,<sup>4</sup> D. J. WRIGHT,<sup>2</sup> B. E. TABASHNIK,<sup>4</sup> AND J. FERRÉ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de CC Biològiques, Universitat de València, 46100 Burjassot, Valencia, Spain;  
<sup>2</sup>Department of Biology, Imperial College of Science, Silwood Park, Ascot, Berkshire SL5 7PY, United Kingdom;  
<sup>3</sup>U.S. Agricultural Research Station, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Salinas,  
California 93905; and <sup>4</sup>Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721

Received 20 April 2001/Accepted 23 July 2001

So far, the only insect that has evolved resistance in the field to *Bacillus thuringiensis* toxins is the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Documentation and analysis of resistant strains rely on comparisons with laboratory strains that have not been exposed to *B. thuringiensis* toxins. Previously published reports show considerable variation among laboratories in responses of unselected laboratory strains to *B. thuringiensis* toxins. Because different laboratories have used different unselected strains, such variation could be caused by differences in bioassay methods among laboratories, genetic differences among unselected strains, or both. Here we tested three unselected strains against five *B. thuringiensis* toxins (CryIAa, CryIAb, CryIAc, CryICa, and CryIDa) using two bioassay methods. Tests of the LAB-V strain from The Netherlands in different laboratories using different bioassay methods yielded only minor differences in results. In contrast, side-by-side comparisons revealed major genetic differences in susceptibility between strains. Compared with the LAB-V strain, the ROTH strain from England was 17- to 170-fold more susceptible to CryIAa and CryIAc, respectively, whereas the LAB-PS strain from Hawaii was 8-fold more susceptible to CryIAb and 13-fold more susceptible to CryIDa and did not differ significantly from the LAB-V strain in response to CryIAa, CryIAc, or CryICa. The relative potencies of toxins were similar among LAB-V, ROTH, and LAB-PS, with CryIAb and CryIAc being most toxic and CryIDa being least toxic. Therefore, before choosing a standard reference strain upon which to base comparisons, it is highly advisable to perform an analysis of variation in susceptibility among field and laboratory populations.

Insecticidal crystal (Cry) proteins of *Bacillus thuringiensis* are contained in the crystalline bodies produced during the sporulation phase. They are produced as full-length proteins (protoxins) that, upon solubilization in the insect midgut, are processed by midgut proteases to render a protease-resistant fragment that constitutes the active toxin. The active toxin binds to specific target sites in the insect midgut, creating pores in the midgut membranes that eventually kill the insect (19). Cry proteins are extremely useful because, compared with conventional insecticides, they are more specific and thus environmentally safer (2, 3). Transgenic crop plants that produce Cry proteins are being used widely (10). In addition, some insect populations resistant to chemical insecticides have been controlled with *B. thuringiensis* products (2).

So far, the only insect that has evolved resistance in the field to *B. thuringiensis* toxins is the diamondback moth (*Plutella xylostella*) (23). Documentation and analysis of resistant strains rely on comparisons with laboratory strains that have not been exposed to *B. thuringiensis* toxins. Previously published reports show considerable variation among laboratories in responses of unselected laboratory strains to *B. thuringiensis* toxins (Table 1). Such variation could affect not only the absolute assessment of toxicity but also the relative resistance levels detected for

other strains. Because different laboratories have used different unselected strains, such variation could be caused by differences in bioassay methods among laboratories, genetic differences among unselected strains, or both.

Each of our three laboratories has been using a different unselected *P. xylostella* strain as a reference strain to determine the toxicity of *B. thuringiensis* products and individual toxins (1, 12, 25). Here we used side-by-side comparisons to test the hypothesis that differences in susceptibility to Cry proteins between strains are genetically based. We also evaluated the effects of differences in bioassay protocols, including differences in the duration of exposure to toxins and in the source and preparation of toxins used in bioassays. Finally, we examined variations in the relative potencies of Cry proteins caused by differences in strains and bioassay procedures.

### MATERIALS AND METHODS

**Insects.** Each of the three susceptible strains had been reared for at least 10 years without exposure to Cry proteins. The LAB-V strain was collected in The Netherlands (5) and maintained in Spain; the ROTH strain was collected and maintained in the United Kingdom (18); and the LAB-PS strain was derived from the LAB-P strain, which was collected in Hawaii (13) and maintained in the United States. Larvae were reared on cabbage leaves.

**Cry proteins.** CryIAa, CryIAb, CryIAc, CryICa, and CryIDa were obtained from recombinant *B. thuringiensis* strains EG1273, EG7077, EG11070, EG1081, and EG7300, respectively (Ecogen Inc.). Protoxin purification, trypsin activation, and protein quantification were performed as described by Sayyed et al. (18) at the University of Valencia, Valencia, Spain. Activated toxins were sent frozen to the Imperial College of Science, Ascot, Berkshire, United Kingdom. The same batch of toxins was shared and used by the above two laboratories.

\* Corresponding author. Mailing address: Departament de Genètica, Facultat de CC Biològiques, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Phone: (34) 96 386 4506. Fax: (34) 96 398 3029. E-mail: Juan.Ferre@uv.es.

TABLE 1. Reported LC<sub>50</sub> and FL<sub>95</sub> values of different toxins for four unselected laboratory strains of *P. xylostella*

Protein	Result for the following strain:							
	LAB-V <sub>91</sub> <sup>a</sup>		Geneva <sup>b</sup>		LAB-PS <sup>c</sup>		Remion Island <sup>d</sup>	
	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>
Cry1Aa	239	127-1,045	0.3	0.2-0.3	2.80	1.94-4.26	22.10	16.20-30.16
Cry1Ab	15	5-30	0.6	0.4-1.2	1.60	1.35-1.90	0.57	0.47-0.69
Cry1Ac	44	29-99	1.1	0.5-2.5	0.74	0.50-1.16	20.09	14.67-27.52
Cry1Ca	117	68-210	4.3	3.3-5.7	10.55	8.08-14.20	7.58	5.65-10.18
Cry1Da	>1,350	NA	0.2	0.1-0.2	19.10 <sup>e</sup>	13.20-25.00	18.82	14.47-24.48

<sup>a</sup> Bioassays were performed with the diet overlay method. The larvae were intoxicated for 5 days, and mortality was scored at 5 days. Cry proteins were used in their activated form. Values are given in nanograms per square centimeter and are from references 1 (for Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac), 5 (for Cry1Da), and 7 (for Cry1Ca), which contain the most recent data published for this strain. NA, not available.

<sup>b</sup> Bioassays were performed with the leaf dip method (22). The larvae were intoxicated for 3 days, and mortality was scored at 3 days. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ca were used as solubilized protoxins, and Cry1Da was used as an activated toxin. Values are given in milligrams per liter.

<sup>c</sup> Bioassays were performed with the leaf dip method (16). The larvae were intoxicated for 2 days, and mortality was scored at 5 days. Cry proteins were used as a mixture of spores and crystals. Values are given in milligrams per liter.

<sup>d</sup> Bioassays were performed with the leaf dip method (17). The larvae were intoxicated for 2 days, and mortality was scored at 2 days. Cry proteins were used in their activated form. Values are given in milligrams per liter.

<sup>e</sup> Bioassay data are from this study (slope of the regression line obtained by probit analysis, and standard error, 2.10 ± 0.37).

**Bioassays.** Susceptibility to each Cry protein was tested with third-instar larvae by use of a leaf dip bioassay (21). At least five concentrations of each Cry protein were included. The replicates were performed on different days with larvae from different parents. We used three types of bioassays, each performed at a different laboratory: B1 (University of Valencia), B2 (Imperial College of Science), and B3 (University of Arizona, Tucson). The B1 bioassay used activated Cry proteins from Ecogen strains. Mortality was scored after larvae (10 per concentration) were exposed to Cry proteins for 2 days at 25°C. This bioassay was performed twice. The B2 bioassay also used activated Cry proteins from Ecogen strains, but mortality was scored after larvae (5 per concentration) were exposed to toxins for 5 days at 20°C. This bioassay was repeated eight times. The B3 bioassay used lyophilized powder containing spores and crystals from the strain that expresses Cry1Da (Ecogen strain EG7300). Two days after larvae (10 per concentration) were placed on treated leaf disks, fresh untreated leaf disks were added. Mortality was scored 5 days after the start of the bioassay. Rearing and tests for B3 were done at 28°C with 14 h of light and 10 h of dark. Four replicates of this bioassay were performed.

Before the side-by-side tests, strains were reared for at least two generations in the laboratory where the bioassays were performed at 25°C (B1, LAB-V versus LAB-PS) or 20°C (B2, LAB-V versus ROTH), at 70% relative humidity, and with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark.

Mortality data were evaluated by probit analysis (6) using the POLO-PC program (LeOra Software, Berkeley, Calif.) to estimate the concentrations killing 50% of the larvae tested (LC<sub>50</sub>s) and their 95% fiducial limits (FL<sub>95</sub>). LC<sub>50</sub>s were considered significantly different if their FL<sub>95</sub>s did not overlap.

## RESULTS

**Differences between strains.** Side-by-side comparisons revealed genetic differences in susceptibility to Cry proteins between unselected strains of the diamondback moth. Comparisons using the B1 bioassay showed that relative to LAB-V,

LAB-PS was 8-fold more susceptible to Cry1Ab and 13-fold more susceptible to Cry1Da (Table 2). Significant differences in LC<sub>50</sub> between LAB-V and LAB-PS were not observed for Cry1Aa, Cry1Ac, or Cry1Ca (Table 2). Comparisons using the B2 bioassay showed that relative to LAB-V, ROTH was significantly more susceptible to each of the five toxins tested (Table 3). The differences in LC<sub>50</sub> ranged from 17-fold for Cry1Aa to 170-fold for Cry1Ac.

**Differences between bioassays.** The LC<sub>50</sub> of Cry1Ab was significantly higher for the LAB-V strain in the B1 bioassay (exposure for and scoring at 2 days) than in the B2 bioassay (exposure for and scoring at 5 days) (Tables 2 and 3). Significant differences in LC<sub>50</sub> did not occur for the other four toxins considered individually. However, for all five toxins, the LC<sub>50</sub> was higher for the B1 bioassay than for the B2 bioassay (one-tailed sign test;  $P = 0.03$ ). The differences in LC<sub>50</sub> between bioassays ranged from 1.3-fold for Cry1Ac to 4.3-fold for Cry1Ab.

**Relative potencies of Cry proteins.** The analysis of bioassay data from this work showed that the relative potencies of Cry1 proteins for the LAB-V strain followed a regular pattern. With either the B1 bioassay or the B2 bioassay, Cry1Ab and Cry1Ac were the most potent, followed in order by Cry1Ca, Cry1Aa, and Cry1Da (Table 4). In addition, data reported for the same strain in 1991 (5), 1994 (1), and 1996 (7) but with a diet overlay bioassay and toxins from a different source showed the same pattern. Cry1Ab and Cry1Ac were also the most toxic for LAB-PS and ROTH. However, Cry1Ab and Cry1Ac showed

TABLE 2. Susceptibility of LAB-V and LAB-PS strains of *P. xylostella* to several Cry1 proteins in the B1 bioassay

Protein	Result <sup>a</sup> for the following strain:						Toxicity ratio (LC <sub>50</sub> of LAB-V/LC <sub>50</sub> of LAB-PS) <sup>b</sup>
	LAB-V			LAB-PS			
	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	Slope ± SE <sup>c</sup>	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	Slope ± SE	
Cry1Aa	3.82	1.53-6.98	1.75 ± 0.35	1.61	0.89-2.70	1.19 ± 0.20	NS
Cry1Ab	0.60	0.40-0.86	1.46 ± 0.26	0.079	0.031-0.38	1.90 ± 0.30	8
Cry1Ac	0.22	0.14-0.31	2.17 ± 0.37	0.23	0.16-0.32	3.34 ± 0.53	NS
Cry1Ca	1.50	0.52-3.83	1.37 ± 0.22	0.74	0.29-1.17	1.62 ± 0.39	NS
Cry1Da	45.31	14.30-95.50	0.64 ± 0.17	3.38	1.55-6.24	2.47 ± 0.38	13

<sup>a</sup> Values are given in milligrams per liter.

<sup>b</sup> NS, LC<sub>50</sub>s were not significantly different.

<sup>c</sup> Slope of the regression line obtained by probit analysis, and standard error.

TABLE 3. Susceptibility of LAB-V and ROTH strains of *P. xylostella* to several Cry1 proteins in the B2 bioassay

Protein	Result <sup>a</sup> for the following strain:						Toxicity ratio (LC <sub>50</sub> for LAB-V/LC <sub>50</sub> for ROTH)
	LAB-V			ROTH			
	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	Slope ± SE <sup>b</sup>	LC <sub>50</sub>	FL <sub>95</sub>	Slope ± SE	
Cry1Aa	2.72	1.97-4.62	1.21 ± 0.15	0.160	0.100-0.290	0.95 ± 0.12	17
Cry1Ab	0.14	0.08-0.24	0.95 ± 0.12	0.002	0.000-0.005	0.74 ± 0.23	70
Cry1Ac	0.17	0.09-0.47	1.06 ± 0.21	0.001	0.001-0.002	1.61 ± 0.30	170
Cry1Ca	1.00	0.74-1.49	1.11 ± 0.14	0.030	0.006-0.059	1.79 ± 0.60	33
Cry1Da	15.21	12.15-19.19	1.05 ± 0.35	0.270	0.180-0.290	1.01 ± 0.19	56

<sup>a</sup> Values are given in milligrams per liter.

<sup>b</sup> Slope of the regression line obtained by probit analysis, and standard error.

an inverse pattern of potencies for these two strains compared with the LAB-V strain in the same type of bioassay (Table 4). Relative potencies for the Geneva (22) and Reunion Island strains (17) differed greatly from those for the three strains that we tested. For the Geneva strain, Cry1Da had the highest potency of the five toxins tested. For the Reunion Island strain, Cry1Ab was much more potent than the other four toxins.

#### DISCUSSION

The results presented here show major genetic differences in susceptibility to Cry toxins between unselected laboratory strains of *P. xylostella* from The Netherlands (LAB-V), England (ROTH), and Hawaii (LAB-PS). In this study, genetic differences between strains in side-by-side comparisons were much larger than effects caused by differences in bioassays between laboratories.

The B1 and B2 bioassays compared here used activated toxins from the same source but differed in that the B1 bioassay was done at 25°C for 2 days whereas the B2 bioassay was done at 20°C for 5 days. As expected and in confirmation of previous results obtained with the diamondback moth (14, 20), LC<sub>50</sub>s were generally higher in shorter tests. Relative to previous studies, in the present study the extent of the difference between two time intervals might have been reduced somewhat because the temperature was higher for the shorter bioassay (B1) than for the longer bioassay (B2).

Despite differences in source of toxin and bioassay procedure and genetic differences in absolute susceptibility between strains, the patterns of relative potencies among the five toxins

tested were similar for the three unselected strains tested here. For example, the pattern of relative potency for LAB-V remained similar for at least 10 years and was not affected much by the type of bioassay (leaf dip or diet overlay) or the source of toxin. Also, for LAB-PS, relative potencies were similar in bioassays with activated toxin and bioassays with crystals and spores. The use of protoxin involves additional steps over the use of activated toxins, and these have an influence on the final toxicity (8, 15). The presence of spores may also enhance the effects of toxins (12, 22). In contrast to the similar patterns seen for the three unselected strains tested here, the Geneva and Reunion Island strains showed unique relative potencies. However, in these instances, we cannot make strong inferences about the differences among strains because toxin sources and bioassay procedures varied. Side-by-side tests would be needed to determine if the differences in relative potencies were genetically based.

Side-by-side experiments performed with LAB-V and LAB-PS and with LAB-V and ROTH in different bioassay protocols revealed important variations due to genetic differences among strains. The greatest differences were obtained between LAB-V and ROTH. LAB-V and LAB-PS were rather similar with respect to their spectrum of susceptibility and also in terms of absolute LC<sub>50</sub>s.

Significant differences among conspecific populations have also been reported for other insect species. An analysis of Cry1Aa toxicity against two unselected strains of *Heliothis virescens*, carried out in different laboratories following similar protocols, showed about a 30-fold variation in absolute LC<sub>50</sub>s, while the toxicities of Cry1Ab and Cry1Ac showed just minor

TABLE 4. Relative potencies of several Cry1 proteins against unselected strains of *P. xylostella*<sup>a</sup>

Protein	Result in the indicated test for the following strain:							
	LAB-V			LAB-PS		ROTH (bioassay B2)	Geneva (leaf dip) <sup>d</sup>	Reunion Island (leaf dip) <sup>e</sup>
	Bioassay B1	Bioassay B2	Diet overlay <sup>b</sup>	Bioassay B1	Bioassay B2 <sup>c</sup>			
Cry1Aa	6	5	6	5	26	0.6	67	3
Cry1Ab	37	100	100	100	46	50	33	100
Cry1Ac	100	82	34	34	100	100	18	3
Cry1Ca	15	14	13	11	7	3	5	8
Cry1Da	0.5	0.9	<1	2	4	0.4	100	3

<sup>a</sup> Relative potencies were estimated by assigning a value of 100 to the most potent Cry protein (the one that showed the lowest LC<sub>50</sub>). The potency of all others was calculated by dividing the lowest LC<sub>50</sub> by their LC<sub>50</sub> and multiplying the result by 100.

<sup>b</sup> Data are from Ballester et al. (1), Ferré et al. (5), and Granero et al. (7). See also Table 1.

<sup>c</sup> Data are from Liu et al. (16). See also Table 1.

<sup>d</sup> Data are from Tang et al. (22). See also Table 1.

<sup>e</sup> Data are from Monnerat et al. (17). See also Table 1.

differences. These were not side-by-side studies, but they used similar protocols to test toxicity (11, 24). Moreover, two studies performed with two unselected strains of *Trichoplusia ni* showed about 100-fold differences in absolute LC<sub>50</sub>s for activated Cry1Ab and Cry1Ac. Although these were not side-by-side studies, they were performed in the same laboratory following essentially the same protocol and using Cry proteins from the same source (4, 9).

In conclusion, susceptibility to Cry proteins may vary among unselected populations of a given insect species. This variation affects the criteria for resistance, because a treated field population might be considered resistant or not resistant depending on the unselected reference strain used. Further, such variation could affect the standardization of potency for products based on *B. thuringiensis*. We strongly recommend an analysis of variation in susceptibility among unselected field and laboratory populations before a standard reference strain upon which to base comparisons is chosen.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. Calzada Grau for technical assistance and Ecogen Inc. for providing the recombinant strains used to prepare the toxins.

This work was supported by grants from the Spanish Agency for International Cooperation (AECI project AECI99-02-1) and the U.S.-Spain Joint Commission of Scientific and Technological Cooperation (project MAE99-0239). A.H.S. was supported by the Hundred Scholarship Scheme of the Government of Pakistan. J.G.-C. was supported by an AECI fellowship. Work in the United Kingdom was conducted under MAFF license PHL 17A/2689 (6/1998).

#### REFERENCES

- Ballester, V., B. Escriche, J. L. Ménsua, G. W. Riethmacher, and J. Ferré. 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to Cry1A(b). *Biocontrol Sci. Technol.* 4:437-443.
- Charles, J. F., A. Delécluse, and C. Nielsen-LeRoux. 2000. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Entwistle, P. F., J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs. 1993. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Estada, U., and J. Ferré. 1994. Binding of insecticidal crystal protein 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.
- Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Janssens, and 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.
- Finney, D. J. 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University, Cambridge, United Kingdom.
- Granero, F., V. Ballester, and J. Ferré. 1996. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:779-783.
- Herrero, S., B. Oppert, and J. Ferré. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1085-1089.
- Iracheta, M. M., B. Pereyra-Alferez, L. Galán-Wong, and J. Ferré. 2000. Screening for *Bacillus thuringiensis* crystal proteins active against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 76:70-75.
- James, C. 2000. Global status of commercialized transgenic crops: 2000. ISAAA brief no. 21. Preview. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, N.Y.
- Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang. 2001. Importance of Cry1  $\delta$ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 67:323-329.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, W. J. Moar, and R. A. Smith. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1385-1389.
- Liu, Y. B., and B. E. Tabashnik. 1998. Elimination of a recessive allele conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* from a heterogeneous strain of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 91:1032-1037.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, and M. W. Johnson. 1995. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88:788-792.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, L. Masson, B. Escriche, and J. Ferré. 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein Cry1C to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 93:1-6.
- Liu, Y. B., B. E. Tabashnik, S. K. Meyer, and N. Crickmore. 2001. Cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3216-3219.
- Monnerat, R., L. Masson, R. Brousseau, M. Pusztai-Carey, D. Borda, and R. Frutos. 1999. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Curr. Microbiol.* 39:159-162.
- Sayed, A. H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferré, and D. J. Wright. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1509-1516.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Tabashnik, B. E., N. Finson, C. F. Chilcutt, N. L. Cushing, and M. W. Johnson. 1993. Increasing efficacy of bioassays: evaluating resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 86:635-644.
- Tabashnik, B. E., N. L. Cushing, N. Finson, and M. W. Johnson. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83:1671-1676.
- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. Van Rie, S. de Roock, W. J. Moar, R. T. Roush, and M. Peferoen. 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62:564-569.
- Van Rie, J., and J. Ferré. 2000. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, p. 219-237. In J. F. Charles, A. Delécluse, and C. Nielsen-LeRoux (ed.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Van Rie, J., S. Janssens, H. Höfte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
- Wright, D. J., M. Iqbal, F. Granero, and J. Ferré. 1997. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for the field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *azawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1814-1819.

## High Genetic Variability for Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in a Single Population of Diamondback Moth

JOEL GONZÁLEZ-CABRERA, SALVADOR HERRERO, AND JUAN FERRÉ\*

Department of Genetics, Universitat de València, 46100-Burjassot (Valencia), Spain

Received 14 May 2001/Accepted 11 August 2001

The long-term benefit of insecticidal products based on Cry toxins, either in sprays or as transgenic crops, is threatened by the development of resistance by target pests. The models used to predict evolution of resistance to Cry toxins most often are monogenic models in which two alleles are used. Moreover, the high-dose/refuge strategy recommended for implementation with transgenic crops relies on the assumption that the resistance allele is recessive. Using selection experiments, we demonstrated the occurrence in a laboratory colony of diamondback moth of two different genes (either allelic or nonallelic) that confer resistance to Cry1Ab. At the concentration tested, resistance was dominant in one selection line and partially recessive in the other. Resistant insects from the two selection lines also differed in their cross-resistance patterns. The diamondback moth colony was derived from a field population from the Philippines, which originally showed a different resistance phenotype. This is the first time that an insect population has been directly shown to carry more than one gene conferring resistance to the same Cry toxin.

Resistance to insecticides is a key issue in agriculture and in public health (with respect to control of insect-transmitted diseases) because of the capacity of insects to develop resistance to any pesticide to which they are exposed. More than 500 species of insects and mites have been reported to have developed resistance to one or more pesticides (12), and cases of resistance to pesticides, including biological insecticides such as those based on the bacterium *Bacillus thuringiensis*, continue to appear (11, 29).

At the onset of the sporulation phase, *B. thuringiensis* produces proteinaceous crystalline parasporal bodies (1). Some proteins in the crystals are active against insects, and for this reason they are generically called insecticidal crystal proteins,  $\delta$ -endotoxins, Cry proteins, or Cry toxins. There are many formulations based on a mixture of spores and crystals from different *B. thuringiensis* strains. These formulations have been used for many years as alternatives to chemical insecticides when resistance to other insecticides is severe, when natural enemies need to be preserved, when application just before harvest is necessary, or when organic farming methods are used. Since 1987 some *B. thuringiensis* genes coding for Cry proteins have been transferred to the genomes of plants, which have become resistant to insects (for reviews see references 16 and 19). Despite the high number of plant species transformed to date with *B. thuringiensis* genes, only two transformed crops (corn and cotton) are planted widely in the United States and, on a smaller scale, in other parts of the world. In 2000, a total of 11.5 million hectares was dedicated to these crops (including plants with both *B. thuringiensis* and herbicide tolerance); this represents 26% of total transgenic area (15).

Sooner or later, extensive use of *B. thuringiensis*-based insecticide sprays and particularly the high selection pressure

exerted by *B. thuringiensis* cultivars will lead to insect populations that develop resistance to Cry toxins. In fact, there are a number of insect species that have already developed resistance to single Cry toxins or mixtures of toxins in laboratory selection experiments (11, 29). So far, the diamondback moth, *Plutella xylostella*, is the only pest that has developed resistance to *B. thuringiensis* in the field. Genetic and biochemical studies with resistant insects belonging to different species have allowed workers to draw the following general conclusions concerning *B. thuringiensis* resistance: (i) in all cases this resistance is autosomally inherited; (ii) in most cases resistance is due to a recessive allele; and (iii) high levels of resistance and cross-resistance are generally related to a lack of toxin binding to midgut receptors. Resistance due to dominant (14, 22, 28) alleles and high levels of resistance not explained by receptor binding alteration (31) have been reported in a few cases.

A strategy that has been widely recommended to delay resistance to *B. thuringiensis* in insect populations in the field is to combine the high-dose strategy (expression by plants of a level of toxin sufficient to kill all heterozygous insects) with the use of refuges (plots containing non-*B. thuringiensis*-treated plants) (21; <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>). However, for this strategy to be effective, resistance has to be recessive, random mating must occur between susceptible and resistant individuals, and the frequency of resistance alleles must be low (23). Models used to predict evolution of resistance to a given Cry toxin most often assume that resistance is due to one gene with two alleles, one susceptible allele and one resistant allele. A few studies have suggested that more than one gene conferring resistance to a given Cry toxin is present in the same population (13, 24, 27, 28), but direct evidence of this is not yet available.

In this study we used the PHI colony, which was derived from insects that were collected in the Philippines from *B. thuringiensis*-treated fields and originally showed high levels of resistance to Cry1Ab (3, 4). After selection in the laboratory, this colony was shown to have independent genetic control of

\* Corresponding author. Mailing address: Departament de Genètica, Facultat de CC. Biològiques, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot (Valencia), Spain. Phone: (34) 96 386 4506. Fax: (34) 96 398 3029. E-mail: Juan.Ferre@uv.es.

Cry1Aa and Cry1Ab resistance (28). By selecting two sample lines of the PHI colony with different selective agents and with different larval instars, we obtained evidence that there are two different genes (either allelic or nonallelic) that confer resistance to Cry1Ab (we use the term gene in this paper to indicate genetic variants, regardless of whether they occur at the same locus or at different loci). Resistant insects obtained from the two selection lines differed in their patterns of cross-resistance and in their inheritance of resistance. Along with the findings of previous studies showing that the PHI colony contains other genes for resistance to Cry1A toxins, our findings indicate the high degree of variability in *B. thuringiensis* resistance genes that can be present in field populations.

#### MATERIALS AND METHODS

**Insects.** The PHI colony was derived from 130 pupae collected in the Philippines in 1993 (4). During the 7 years that this colony has been maintained in the laboratory, insects were subjected to selection with Cry1Ab and then with MYX 03604, a product containing chimeric Cry1Ab-Cry1Ac protoxin (domain I and almost all domain II from Cry1Ac plus a small part of domain II, domain III, and the C-terminal half of the protein from Cry1Ab) expressed in recombinant *Pseudomonas fluorescens* (Mycogen Corporation, San Diego, Calif.) (3). After selection was discontinued, the resistance values reverted to values close to those of the control strain. The LAB-V strain, which originated from The Netherlands, was used as the susceptible control and had never been exposed to *B. thuringiensis* (10). All insects were reared on fresh cabbage leaves at 25°C with 50% relative humidity and a photoperiod consisting of 16 h of light and 8 h of darkness.

**Cry toxins.** Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, and Cry1J were obtained from recombinant *B. thuringiensis* strains EG1273, EG7077, EG11070, EG11069, and EG7279, respectively (Ecogen Inc.). Bacteria were grown for 48 h in CCY medium (25) supplemented with the appropriate antibiotic. Spores and crystals were collected by centrifugation at  $9,700 \times g$  for 10 min at 4°C. Each pellet was washed four times with a 1 M NaCl-10 mM EDTA solution, and then it was thoroughly suspended in 10 mM KCl. Purification and activation of toxins were carried out by alkaline solubilization and trypsin activation as previously described (24).

Toxins used for labeling and binding experiments were chromatographically purified by using a MonoQ HR 5/5 anion-exchange column (fast protein liquid chromatography system; Pharmacia, Uppsala, Sweden) (24).

Protein concentrations in solutions of activated toxins were determined by the method of Bradford (8). The concentrations of spore-crystal suspensions were expressed in units of optical density at 600 nm ( $OD_{600}$  units).

**Bioassays.** Mortality was scored after 48 h. Groups of 10 third-instar larvae were placed on cabbage leaf discs that previously had been dipped in a test solution containing the surfactant 0.2% Triton AG-98. Dilutions of toxins were prepared with 50 mM carbonate buffer (pH 10.5). Dilutions of spore-crystal mixtures were prepared with distilled water. Control leaves were dipped in distilled water containing 0.2% Triton AG-98. Five dilutions of toxins were used to estimate the concentrations that killed 50% of the larvae tested ( $LC_{50}$ ) with the Polo-PC program (17). The  $LC_{50}$ s reported below are means based on two independent experiments. Single-point mortality tests with Cry1F and Cry1J were performed with 50 larvae for each concentration of toxin. These tests were performed twice.

**Selection.** Selection experiments were performed with two samples of the PHI colony. For the first sample, approximately 1,000 eggs were transferred to cabbage leaves that previously had been dipped in a mixture of spores and crystals of Cry1Aa (0.074  $OD_{600}$  unit). Two days after hatching, additional treated leaves were added, and larvae were allowed to feed for two more days. Then, fresh untreated leaves were added until pupation. The emerged adults were pooled to produce progeny for the next generation. The selection process was continued until generation 13, although selective pressure was applied only in 10 generations (selective pressure was not applied in generations 8, 9, and 12). The resulting selection line was called Sel-A.

The other sample was selected with activated Cry1Ab. Close to 300 third-instar larvae were placed on leaf discs that previously had been dipped in a solution containing 50 mg of Cry1Ab per liter. After 2 days, the survivors were transferred to fresh untreated leaves until pupation. The emerged adults were pooled to

TABLE 1. Toxicities of activated Cry1A toxins and spores and crystals of Cry1Aa

Insects	Toxin	$LC_{50}$ (FL <sub>95</sub> ) <sup>a</sup>	Resistance ratio <sup>b</sup>
Sel-A	Cry1Aa (S+C)	0.23 (0.08–0.50)	6.4
	Cry1Aa	4.47 (2.66–6.18)	1.3
	Cry1Ab	36.2 (23.14–55.17)	60.3
	Cry1Ac	26.1 (14.7–43.45)	118.6
Sel-B	Cry1Aa (S+C)	0.15 (0.06–0.38)	4.2
	Cry1Aa	2.70 (1.16–4.53)	0.8
	Cry1Ab	143 (119–186)	238
	Cry1Ac	22.7 (12.0–62.1)	103.2
PHI	Cry1Aa (S+C)	0.074 (0.006–0.176)	2.1
	Cry1Aa	11.73 (5.54–24.69)	3.5
	Cry1Ab	2.08 (1.44–3.20)	3.5
	Cry1Ac	0.93 (0.56–1.40)	4.2
LAB-V	Cry1Aa (S+C)	0.036 (0.019–0.056)	
	Cry1Aa	3.32 (1.53–6.98)	
	Cry1Ab	0.60 (0.40–0.86)	
	Cry1Ac	0.22 (0.14–0.31)	

<sup>a</sup> Values for spores and crystals (S+C) of Cry1Aa are expressed in  $OD_{600}$  units. Other values are expressed in milligrams per liter.

<sup>b</sup> Resistance ratio =  $LC_{50}$  of resistant strain/ $LC_{50}$  of LAB-V.

produce progeny for the next generation. Selection was applied for three generations, and the resulting selection line was called Sel-B.

**Evaluation of dominance.** Bioassays to determine the type of inheritance were carried out with a solution containing 50 mg of Cry1Ab per liter by crossing resistant individuals (Sel-A or Sel-B) with susceptible LAB-V individuals. For single-pair crosses, one virgin male was caged together with one virgin female for mating and egg production. The sexes of the parents were selected randomly. Only single pairs that produced enough progeny were used in Cry1Ab bioassays. Before genetic analysis, Sel-A individuals went through one generation without selection, and then they were treated with a solution containing 50 mg of Cry1Ab per liter to eliminate individuals susceptible to this concentration of toxin.

Effective dominance ( $D_{ML}$ ) was calculated from mortality values at a single concentration (6), as follows:  $D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$ , where  $ML_{RR}$ ,  $ML_{RS}$ , and  $ML_{SS}$  are the mortality values at a particular toxin concentration for the resistant line, the F<sub>1</sub> progeny, and the susceptible strain, respectively. The  $D_{ML}$  values range from 0 (completely recessive resistance) to 1 (completely dominant resistance).

**Binding assays.** Binding assays were performed with brush border membrane vesicles (BBMV) prepared from whole fourth-instar Sel-A, Sel-B, and LAB-V larvae (9). Total protein concentrations of BBMV preparations were determined by the method of Bradford (8). Activated Cry1Ab and Cry1Ac toxins were labeled with <sup>125</sup>I by the chloramine-T method (30). Binding experiments were conducted as described previously (31), except that BBMV were incubated with labeled toxin for 30 min. At the highest concentration of BBMV used, the levels of total binding of <sup>125</sup>I-labeled Cry1Ab were 9.5% for LAB-V, 1.9% for Sel-A, and 1.7% for Sel-B, and the levels of total binding of <sup>125</sup>I-labeled Cry1Ac were 35% for LAB-V and 2.4% for Sel-B.

#### RESULTS

**Response to selection and cross-resistance.** Two samples of the PHI colony were selected with different *B. thuringiensis* products. Selection line Sel-A was derived from a PHI sample selected with a mixture of spores and crystals containing only Cry1Aa protoxin. Before selection, the  $LC_{50}$  for the spore-crystal mixture was 0.074  $OD_{600}$  unit (95% fiducial limits [FL<sub>95</sub>], 0.006 to 0.176  $OD_{600}$  unit) (Table 1). After 10 generations of selection, Sel-A did not show any significant response to the selective agent ( $LC_{50}$ , 0.23  $OD_{600}$  unit; FL<sub>95</sub>, 0.08 to 0.50  $OD_{600}$  unit). The other selection line, Sel-B, was derived from a second PHI sample and was selected with solubilized and trypsin-activated Cry1Ab toxin. In this case, we observed a

TABLE 2. Toxicities of activated Cry1F and Cry1J toxins

Insects	Toxin	Concn (mg/liter)	% Mortality (FL <sub>95</sub> ) <sup>a</sup>
Sel-A	Cry1F	1	46 (33–60)
		10	88 (76–95)
	Cry1J	1	73 (59–83)
		10	98 (88–100)
Sel-B	Cry1F	1	0 (0–9)
		10	0 (0–9)
	Cry1J	1	2 (0–12)
		10	38 (26–52)
LAB-V	Cry1F	1	8 (3–20)
		10	47 (34–61)
	Cry1J	1	8 (3–20)
		10	44 (31–58)

<sup>a</sup> FL<sub>95</sub> were estimated by the modified exact Wald method (2).

strong response to the selective agent. The LC<sub>50</sub> of Cry1Ab changed from 2.08 mg/liter (FL<sub>95</sub>, 1.44 to 3.20 mg/liter) to 143 mg/liter (FL<sub>95</sub>, 119 to 186 mg/liter) in just three generations of selection (Table 1).

Despite the differences in the responses to the selective agents described above, both selection lines showed very similar patterns of cross-resistance to the Cry1A toxins (Table 1). In both cases there was a significant increase in resistance to Cry1Ab and Cry1Ac and no increase in resistance to Cry1Aa in either form (solubilized activated toxin or crystallized protoxin with spores). However, it is important to note that the responses to Cry1Ab were significantly different in the two selection lines.

Bioassays performed with Cry1F and Cry1J also revealed differences between the two selection lines (Table 2). Sel-B developed cross-resistance to Cry1F, whereas Sel-A was even more susceptible than the control LAB-V strain. For Cry1J, the susceptibilities of LAB-V and Sel-B were essentially the same, but Sel-A had significantly higher mortality at the two concentrations tested.

**Inheritance of resistance to Cry1Ab.** Analysis of the F<sub>1</sub> progeny from single-pair crosses between resistant insects and susceptible strain LAB-V insects clearly showed that there were differences in the mode of inheritance of Cry1Ab resistance in the two selection lines at the test concentration used (50 mg/liter). Bioassays of the progeny from the cross between Sel-A and LAB-V suggested that resistance to Cry1Ab was due to an autosomal dominant gene (*A*) at a single locus (Fig. 1A). Cry1Ab produced around 50% mortality in six of nine F<sub>1</sub> families (families 2, 3, 4, 5, 7, and 8), around 10% mortality in two families (families 1 and 6), and 23% mortality in one family (family 9). The sex of the parental insects did not have any effect on the results. The results obtained for the six families with mortality values around 50% corresponded to the segregation expected if the Sel-A parents were heterozygous (*AS*). The results obtained for the two families with mortality values around 10% are consistent with crosses with homozygous Sel-A parents (*AA*). If this occurred, the F<sub>1</sub> progeny from these two families should have been heterozygous (*AS*) and, when crossed with LAB-V insects (*SS*), should produce 50% resistant offspring and 50% susceptible offspring. To test this hypothesis, we crossed the family 1 and 6 survivors with LAB-V insects in single-pair mating experiments. Five crosses

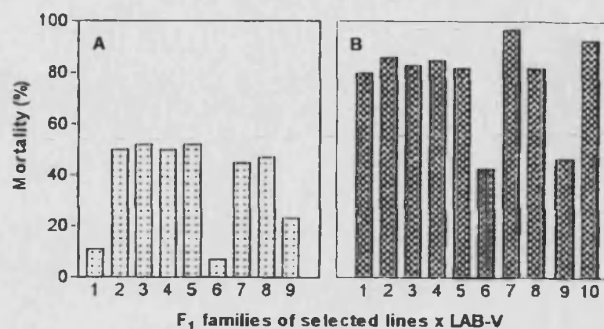


FIG. 1. Mortalities of F<sub>1</sub> progeny from single-pair crosses between insects from selected lines and LAB-V insects in the presence of 50 mg of Cry1Ab per liter. (A) Sel-A × LAB-V; (B) Sel-B × LAB-V. Assays were performed with an average of 38 larvae.

for each family produced enough offspring, and in all cases mortality was close to 60% (the expected level of mortality, since the resistant parents had 10% mortality at the test concentration) when the insects were exposed to Cry1Ab (Fig. 2). Because mortality in the presence of Cry1Ab was not determined with the Sel-A parents used in the initial crosses, we could not tell whether this was a case of partial dominance or a case of complete dominance. Finally, the 23% mortality for family 9 seemed to have been strongly affected by environmental conditions, and therefore this result is not informative.

The pattern of resistance to Cry1Ab in the Sel-B line was different. Analysis of the F<sub>1</sub> progeny from the cross between Sel-B and LAB-V insects suggested that resistance was due to an autosomal partially recessive gene (*b*) at a single locus (Fig. 1B). Cry1Ab produced mortalities ranging from 80 to 97% (mean, 86%) in 8 of the 10 families tested and of around 45% (43 and 47%) in the other two families. No effect of the sex of the parents on the progeny was detected. The results obtained for the eight families with a mean mortality value of 86% corresponded to results expected for progeny of homozygous Sel-B parents (*bb*) crossed with homozygous susceptible LAB-V insects (*ss*). Since at the test concentration the resistant parents had a mortality of 4% and the susceptible

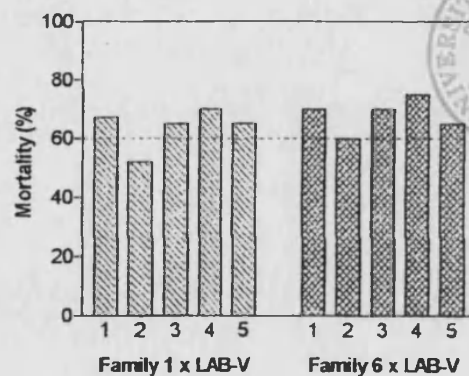


FIG. 2. Mortalities of the offspring from two test crosses of F<sub>1</sub> insects (families 1 and 6 in Fig. 1A) with LAB-V insects in the presence of 50 mg of Cry1Ab per liter.



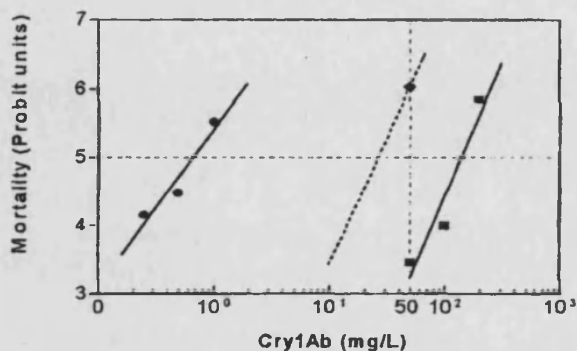


FIG. 3. Concentration-mortality responses of LAB-V (●) and Sel-B (■) insects when they were tested with activated Cry1Ab. The dashed line indicates the expected response of the  $F_1$  generation (Sel-B  $\times$  LAB-V) based on the mortality observed in the presence of 50 mg/liter ( $\blacklozenge$ ), assuming that the slope was the same as that of the regression line for Sel-B.

parents had a mortality of 100% (Fig. 3), we calculated that the effective dominance of resistance ( $D_{ML}$ ) was 0.15, which corresponded to partially recessive inheritance. The simplest explanation for the two families with mortalities around 45% is that the LAB-V insects used in these crosses were heterozygous ( $bs$ ) for the resistance gene. The progeny of a homozygous Sel-B insect with a heterozygous LAB-V insect would be 50%  $bb$  and 50%  $bs$ , which would give a global mortality of  $[(0.5 \times 0.04) + (0.5 \times 0.86)] \times 100\%$  or 45%. To test this hypothesis, survivors in these two  $F_1$  families were allowed to mate among themselves (within each family), and the  $F_2$  progeny were exposed to Cry1Ab and Cry1F. If our hypothesis was correct, the contributions to the  $F_2$  offspring of the different parental genotypes would be  $f(bb) = (0.5 \times 0.96/0.55) = 0.873$  and  $f(bs) = (0.5 \times 0.14/0.55) = 0.127$ . The allele frequencies in the parental  $F_1$  generation would then be  $f(b) = 0.873 + (0.5 \times 0.127) = 0.9365$  and  $f(s) = 0.5 \times 0.127 = 0.0635$ . Assuming that random mating occurred, Hardy-Weinberg equilibrium can be applied, and the expected frequencies of genotypes in the  $F_2$  generation would be  $f(bb) = 0.877$ ,  $f(bs) = 0.119$ , and  $f(ss) = 0.004$ . If the empirical mortality data for these three genotypes at the Cry1Ab concentration tested (4% for  $bb$ , 86% for  $bs$ , and 100% for  $ss$ ) were used, the overall expected mortality with this toxin would be 14%. The actual mortality observed in the  $F_2$  generation was 20% ( $n = 41$  or 49, depending

on the family), which is not significantly different from the calculated value ( $P < 0.05$ ). In the case of the Cry1F toxin, the mortalities for the  $bb$  and  $ss$  genotypes were 0 and 47%, respectively (Table 2). If it was assumed that the mortality for the  $bs$  genotype at the concentration tested (10 mg/liter) was 47%, the overall expected mortality would be 5.8%. Our actual results with Cry1F gave a mortality for the  $F_2$  generation of 10% ( $n = 50$  for each family), which again was close to the calculated value and consistent with the hypothesis that two individuals of the LAB-V strain were heterozygous for the resistant gene.

**Binding assays.** BBMV from LAB-V, used as a control susceptible strain, exhibited specific binding of  $^{125}I$ -labeled Cry1Ab and  $^{125}I$ -labeled Cry1Ac (Fig. 4). In contrast, BBMV from Sel-B exhibited no specific binding at all with either labeled toxin. BBMV from Sel-A were tested only with  $^{125}I$ -labeled Cry1Ab and exhibited highly reduced binding.

#### DISCUSSION

The analysis of susceptibility to Cry1Ab, Cry1F, and Cry1J and the genetic analysis showed that the types of resistance obtained in the two selection experiments were substantially different. Since at the concentration of Cry1Ab used (50 mg/liter), resistance in the Sel-A line is dominant, we could not perform complementation tests to determine whether the mutations that confer resistance are alleles of the same locus. At this concentration the two selection lines clearly differed in terms of the type of inheritance of Cry1Ab resistance, which is dominant in Sel-A and partially recessive in Sel-B.

In the selection experiments described here, similar patterns of resistance to Cry1A toxins were obtained when Cry1Aa protoxin plus spores and activated Cry1Ab were used as selective agents. It seems that the initial frequency of genes conferring resistance to Cry1Ab and Cry1Ac in the PHI colony must have been much higher than the initial frequency of genes conferring resistance to Cry1Aa, and thus the former were selected even when Cry1Aa was used as the selective agent. Previously, Tabashnik et al. (28) showed that in the PHI colony, there is evidence of independent genetic control of resistance to Cry1Aa and Cry1Ab. The fact that Cry1Ab selected for Cry1Ac resistance indicates that there are mechanisms of resistance which are shared by these toxins and can be explained by alteration of a common binding site in the midgut receptor, as shown by the binding analysis. Why selection with

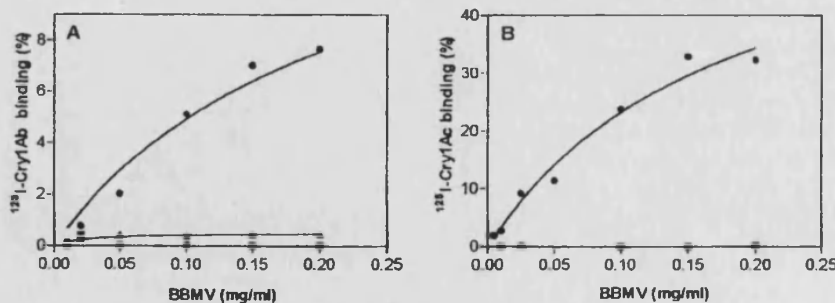


FIG. 4. Specific binding of  $^{125}I$ -labeled Cry1Ab (A) and  $^{125}I$ -labeled Cry1Ac (B) as a function of BBMV protein concentration in the resistant lines and the susceptible control strain. Symbols:  $\blacktriangle$ , Sel-A;  $\blacksquare$ , Sel-B;  $\bullet$ , LAB-V.

Cry1Aa selected for Cry1Ab and Cry1Ac resistance but not for Cry1Aa resistance is more difficult to explain. Any mechanism related to crystal solubilization or protoxin processing would be irrelevant when the insects are tested with activated Cry1A toxins. Moreover, any mechanism related to the activated toxin should have selected for Cry1Aa as well. It is possible that because the selection procedure was performed with neonate larvae and the bioassays were performed with third-instar larvae, a Cry1Aa-resistant phenotype in neonates was missed. In addition, because Sel-A went through important bottlenecks during the selection process (in generation 11 the number of parents was limited to 10 individuals), genetic drift might have influenced the final resistance phenotype of Sel-A.

The PHI colony was derived from a field population from the Philippines. The first time that bioassays were carried out, insects showed high resistance to Cry1Ab but not to Cry1Aa or Cry1Ac (4), indicating that there was a gene that conferred resistance to Cry1Ab but did not provide protection against the other Cry1A toxins. This was in agreement with the finding that BBMV from the resistant insects did not bind Cry1Ab, whereas they bound Cry1Aa and Cry1Ac (5, 28). To maintain or even increase the level of resistance, this colony was subjected to selection with pure Cry1Ab for several generations, and the resistance pattern did not change. However, resistance to Cry1Aa and Cry1Ac started to build up when the colony was exposed to MYX 03604, a product containing a chimeric Cry1Ac-Cry1Ab protoxin (3). After selection with this product, the PHI colony became resistant to Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac but not to Cry1F (28). In the present study we obtained a new phenotype (Sel-B) with resistance to Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1F, most likely caused by alteration of the common Cry1Ab/Cry1Ac/Cry1F receptor (5). Therefore, the PHI population has been shown to carry genes conferring resistance to (i) just Cry1Ab (4); (ii) Cry1Aa (28); (iii) Cry1Ab and Cry1Ac but not Cry1F, with a loss of Cry1Ab binding but not of Cry1Ac binding (28); and (iv) Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1F, with a loss of Cry1Ab and Cry1Ac binding (Sel-B in this study). We cannot completely eliminate the possibility that the resistance gene in the Sel-A line is the same gene that was previously reported for the PHI colony (28). In both cases the insects were resistant to Cry1Ab and Cry1Ac but not to Cry1F. Although PHI insects were found to be resistant to Cry1Aa as well, resistance to this toxin was shown to be independent of resistance to Cry1Ab and Cry1Ac. Finally, the finding that resistance to Cry1Ab in Sel-A is dominant whereas it was previously found to be recessive in the PHI colony might have been due to differences in the concentration or the toxin form used (7). In summary, the PHI population must have carried at least one gene for resistance to Cry1Aa, one gene for resistance to Cry1Ab, one gene for resistance to Cry1Ac (not affecting receptor binding), and one gene conferring resistance to Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1F that altered binding. In the latter case, if binding of Cry1F was not affected, at least one additional mutation would be required for resistance to Cry1F. The PHI population is not unique, because other populations have been shown to exhibit substantial genetic variation in resistance to Cry1A toxins (20, 26, 27).

The presence of heterozygous individuals in the LAB-V strain is not completely surprising, since the presence of resistance genes has been reported in other susceptible control

strains (18, 27). Furthermore, we cannot eliminate the possibility that there was contamination of the susceptible colony by resistant PHI insects. An alternative explanation for the two families with 45% mortality in the F<sub>1</sub> generation resulting from the cross between Sel-B and LAB-V is that the selection that led to the Sel-B line also selected for dominant *A* genes. These two families would be the result of the cross of two *AS* insects from the Sel-B line with susceptible homozygotes from the LAB-V line. However, in this case we would expect most members of the F<sub>2</sub> generation to be susceptible to Cry1F, which does not agree with the actual results.

Binding of Cry1Ab was strongly reduced in the two selection lines. Since the Sel-A line is not homozygous for the resistance gene, it is expected to produce susceptible homozygotes once selection is discontinued. Because this was the case when the binding analysis was performed, the residual binding observed with BBMV from Sel-A insects must have been due to the contribution of susceptible individuals. Therefore, absence of Cry1Ab binding seems to have been the cause of resistance to this toxin in both selection lines. In addition, resistance to Cry1Ac, at least in Sel-B insects, seemed to be also due to an absence of binding. Since Sel-B insects are also resistant to Cry1F, it is likely that the resistance mechanism is an alteration in the common receptor affecting binding of Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1F (5).

The two selection procedures applied to insects from the PHI colony in the present study had important differences. With regard to the selective agents used, besides the presence of spores, the differences were restricted not only to the primary structure of the toxin but also to the level of processing (protoxin versus activated toxin) and its physical state (crystal versus solubilized). Moreover, in Sel-A the selective pressure was exerted on neonate larvae, whereas in Sel-B it was exerted on third-instar larvae. It is worth bearing in mind that under field conditions insects can encounter either soluble Cry toxins in transgenic plants or *B. thuringiensis* spores and crystalline inclusions in sprayed plants or both and that different instars may be exposed to the selective agent. All these variables have an influence on the final resistance outcome.

Another result of our work is that, based on different cross-resistance patterns and types of inheritance, we found evidence of at least two distinct genes conferring resistance to the same Cry toxin (Cry1Ab) in the same insect population. Although the presence of more than one gene conferring resistance to the same Cry toxin has been suggested in other studies, the evidence reported here is more direct than the evidence provided previously (13, 24, 27, 28). Our results indicate that insect populations may carry, more frequently than has been assumed, more than one gene involved in resistance to a given Cry toxin or even to a set of toxins if cross-resistance appears. Our results have important implications for resistance management strategies, since they show the high variability of *B. thuringiensis* resistance genes present in field populations and since they stress the effect of the selective agent and/or larval instar on the final resistance outcome. Models to predict the evolution of resistance in hypothetical scenarios and especially when management strategies are designed should consider high genetic variability to be not a rare phenomenon but a very common phenomenon in field populations.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bruce E. Tabashnik for his thoughtful comments on the manuscript. We also thank Luis Calzada for his technical assistance and Ecogen for providing *B. thuringiensis* strains.

This work was supported by Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) grant AECI99-02-1°. J.G.C. was funded by an AECI fellowship.

## REFERENCES

1. Agaisse, H., and D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177:6027-6032.
2. Agresti, A., and B. A. Coull. 1998. Approximate is better than "exact" for interval estimation of binomial proportion. *Am. Stat.* 52:119-126.
3. Ballester, V. 1997. Resistencia a  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en poblaciones naturales de *Plutella xylostella*. Ph.D. thesis. University of Valencia, Valencia, Spain.
4. Ballester, V., B. Escriche, J. L. Ménsua, G. W. Riehmacher, and J. Ferré. 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to CryIA(b). *Biocontrol Sci. Technol.* 4:437-443.
5. Ballester, V., F. Granero, B. E. Tabashnik, T. Malvar, and J. Ferré. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1413-1419.
6. Bourguet, D., A. Genissel, and M. Raymond. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93:1588-1595.
7. Bourguet, D., M. Prout, and M. Raymond. 1996. Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. *Genetics* 143:407-416.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
9. Escriche, B., F. J. Silva, and J. Ferré. 1995. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal protein. *J. Invertebr. Pathol.* 65:318-320.
10. Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Janssens, and 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. Frutos, R., C. Rang, and M. Royer. 1999. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19:227-276.
12. Georgiann, G. P., and A. Lagunes-Tejeda. 1991. The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
13. Herrero, S., B. Oppert, and J. Ferré. 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1085-1089.
14. Huang, F., L. L. Buschman, R. A. Higgins, and W. H. McGaughey. 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science* 284:965-967.
15. James, C. 2000. Global status of commercialized transgenic crops: 2000. Preview. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, N.Y.
16. Jenkins, J. N. 1999. Transgenic plants expressing toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Biopesticides* 5:211-232.
17. LeOra Software. 1987. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, Calif.
18. Liu, Y.-B., and B. E. Tabashnik. 1998. Elimination of a recessive allele conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* from a heterogeneous strain of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 91:1032-1037.
19. Mazier, M., C. Pannetier, J. Tourneur, L. Jonassin, and M. Gibaud. 1997. The expression of *Bacillus thuringiensis* genes in plant cells. *Biotechnol. Annu. Rev.* 3:313-347.
20. McGaughey, W. H., and D. E. Johnson. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strains on cross-resistance in Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 87:535-540.
21. Mellan, M., and J. Rissler (ed.) 1998. Now or never: serious new plans to save a natural pest control. Union of Concerned Scientists, Cambridge, Mass.
22. Rakardja, U., and M. E. Whalon. 1995. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIIIA delta-endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 88:21-26.
23. Roush, R. T. 1994. Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic plants be better than sprays? *Biocontrol Sci. Technol.* 4:501-516.
24. Sayyed, A. H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferré, and D. J. Wright. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAC in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1509-1516.
25. Stewart, G. S. A. B., K. Johnstone, E. Hagelberg, and D. J. Ellar. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem. J.* 198:101-106.
26. Tabashnik, B. E., N. Finson, W. J. Marshall, and D. G. Heckel. 1995. Prolonged selection affects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 88:219-224.
27. Tabashnik, B. E., Y.-B. Liu, N. Finson, L. Maassen, and D. G. Heckel. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1640-1644.
28. Tabashnik, B. E., Y.-B. Liu, T. Malvar, D. G. Heckel, L. Maassen, V. Ballester, F. Granero, J. L. Ménsua, and J. Ferré. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12780-12785.
29. Van Rie, J., and J. Ferré. 2000. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, p. 219-237. In J. F. Charles, A. Delecuse, and C. Nielsen-LeRoux (ed.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
30. Van Rie, J., S. Janssens, H. Hüfte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
31. Zhao, J.-Z., H. L. Collins, J. D. Tang, J. Cao, E. D. Earle, R. T. Roush, S. Herrero, B. Escriche, J. Ferré, and A. M. Shelton. 2000. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3784-3789.



Pergamon

Insect Biochemistry and Molecular Biology 33 (2003) 929–935

Insect  
Biochemistry  
and  
Molecular  
Biology

www.elsevier.com/locate/ibmb

## Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*)

Joel González-Cabrera<sup>a</sup>, Baltasar Escriche<sup>a</sup>, Bruce E. Tabashnik<sup>b</sup>, Juan Ferré<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Facultad de CC. Biológicas, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Entomology, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA

Received 16 September 2002; received in revised form 4 June 2003; accepted 6 June 2003

### Abstract

Evolution of resistance by pests could cut short the success of transgenic plants producing toxins from *Bacillus thuringiensis*, such as Bt cotton. The most common mechanism of insect resistance to *B. thuringiensis* is reduced binding of toxins to target sites in the brush border membrane of the larval midgut. We compared toxin binding in resistant and susceptible strains of *Pectinophora gossypiella*, a major pest of cotton worldwide. Using Cry1Ab and Cry1Ac labeled with <sup>125</sup>I and brush border membrane vesicles (BBMV), competition experiments were performed with unlabeled Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ja, Cry2Aa, and Cry9Ca. In the susceptible strain, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ja bound to a common binding site that was not shared by the other toxins tested. Reciprocal competition experiments with Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ja showed that these toxins do not bind to any additional binding sites. In the resistant strain, binding of <sup>125</sup>I-Cry1Ac was not significantly affected; however, <sup>125</sup>I-Cry1Ab did not bind to the BBMV. This result, along with previous data from this strain, shows that the resistance fits the “mode 1” pattern of resistance described previously in *Plutella xylostella*, *Plodia interpunctella*, and *Heliothis virescens*.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; Cry toxins; Resistance; Binding; *Pectinophora gossypiella*; Cotton

### 1. Introduction

The widespread bacterium *Bacillus thuringiensis* makes insecticidal proteins that aggregate to form parasporal crystals (Schnepf et al., 1998). After ingestion, these “Cry” proteins dissolve and are activated in the larval midgut. A key step in their mode of action is binding to specific sites in the brush border membrane of the larval midgut, which is followed by pore formation, cell lysis, and death. Because Cry proteins kill certain pests, yet have limited effects on most non-target species, sprays of *B. thuringiensis* have been used to control pests for decades. More recently, toxin-encoding genes from *B. thuringiensis* have been expressed in transgenic crop plants, providing protection from some key pests (Schnepf et al., 1998). For example, transgenic cotton

producing the Cry1Ac toxin from *B. thuringiensis* (Bt cotton), which kills some major lepidopteran pests, grew on 4.6 million hectares in 2002 (James, 2002).

The main threat to the long-term success of this approach is evolution of resistance by pests. So far, evolution of insect resistance to Bt crops in the field has not been reported (Tabashnik et al., 2003). Nonetheless, strains of more than a dozen species of insects have evolved resistance to *B. thuringiensis* toxins in laboratory selection experiments (Ferré and Van Rie, 2002). Moreover, many cases of field-evolved resistance to *B. thuringiensis* sprays have been reported for the diamondback moth, *Plutella xylostella*, a pest of crucifer crops (Ferré and Van Rie, 2002). The most common mechanism of resistance is altered binding of *B. thuringiensis* toxins to target sites in the brush border membrane of the larval midgut (Ferré and Van Rie, 2002).

Here, we compared binding of *B. thuringiensis* toxins in susceptible (APHIS-S) and resistant (AZP-R) strains of *Pectinophora gossypiella*, from Arizona. *P. gossypiella* is a major lepidopteran pest of cotton worldwide

\* Corresponding author. Tel.: +34-96-354-4506; fax: +34-96-354-3029.

E-mail address: juan.ferre@uv.es (J. Ferré).

(Ingram, 1994). In Arizona, Bt cotton that produces Cry1Ac has been successful in controlling *P. gossypiella* (Carrière et al., 2001, 2003; Tabashnik et al., 2000b). Laboratory selection with Cry1Ac, however, has produced high levels of resistance to Cry1Ac in two strains of *P. gossypiella*, APHIS-98R (Liu et al., 1999, 2001) and AZP-R (Liu et al., 2001; Tabashnik et al., 2000a, 2002b).

Previously reported bioassays compared responses of the susceptible and resistant strains of *P. gossypiella* to 10 µg protoxin per gram of artificial diet (Tabashnik et al., 2000a). In the tests with the susceptible APHIS-S strain, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Ja, Cry2Aa, and Cry9Ca were highly toxic, Cry1Bb and Cry1Ca were somewhat less toxic, and Cry1Fa was not toxic. In the resistant AZP-R strain, cross-resistance was strong to Cry1Ab (70% survival), lower to Cry1Aa and Cry1Bb (30% and 20% survival, respectively), and not detected to Cry1Ca, Cry1Da, and Cry1Ja. Responses of another resistant strain, APHIS-98R, were similar to AZP-R, except that cross-resistance to Cry1Aa was stronger in APHIS-98R (86% survival). Also, in tests not conducted with AZP-R, APHIS-98R showed cross-resistance to Cry1Ja at 1 µg protoxin per milliliter of diet (58% survival) and no cross-resistance to Cry9Ca. With Cry2Aa, initial tests showed no cross-resistance of AZP-R or APHIS-98R (Tabashnik et al., 2000a), but subsequent tests with AZP-R revealed weak cross-resistance (5–10% survival at 1 µg/ml of artificial diet) (Tabashnik et al., 2002a). In greenhouse tests with transgenic cotton producing either Cry2Ab alone or Cry2Ab in combination with Cry1Ac, AZP-R showed little or no cross-resistance to Cry2Ab (Tabashnik et al., 2002a).

Data available so far indicate that the AZP-R and APHIS-98R strains show “mode 1” resistance, the most common pattern of resistance to *B. thuringiensis* toxins in Lepidoptera (Tabashnik et al., 1998). This pattern entails strong resistance to at least one Cry1A toxin, little or no cross-resistance to Cry1C, recessive inheritance, and reduced binding of at least one Cry1A toxin (Tabashnik et al., 1998). Previous data from the two resistant strains of *P. gossypiella* satisfy the first three criteria: strong resistance to Cry1Ac, no cross-resistance to Cry1Ca (Tabashnik et al., 2000a), and recessive inheritance of resistance to high concentrations of Cry1Ac (Liu et al., 2001; Tabashnik et al., 2000b, 2002b). Furthermore, bioassays showed cross-resistance to Cry1Aa and Cry1Ab (Tabashnik et al., 2000a) in both resistant strains, while previous binding assays with a susceptible strain of *P. gossypiella* revealed a common binding site for Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac (Karim et al., 2000). Results with other lepidopterans show that alteration of such common binding sites can confer resistance to the three Cry1A toxins (Lee et al., 1995; Ballester et al., 1999; Tabashnik et al., 1997a; Jurat-Fuentes and Adang, 2001).

Here, to check if the fourth criterion of mode 1 resistance applies to the AZP-R strain of *P. gossypiella*, we tested the hypothesis that its resistance is associated with reduced binding of Cry1Ab or Cry1Ac. To achieve this objective, we compared binding of these two toxins between a susceptible strain and the AZP-R strain. To determine if binding competition is correlated with cross-resistance to other *B. thuringiensis* toxins (Tabashnik et al., 2000a), we also evaluated Cry1Aa, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ja, Cry2Aa, and Cry9Ca in competitive binding assays with labeled Cry1Ab and Cry1Ac in susceptible and resistant *P. gossypiella*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. *B. thuringiensis* toxins

Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca, and Cry1Ja were obtained from recombinant *B. thuringiensis* strains EG1273, EG7077, EG11070, EG11916, EG1081, and EG7279, respectively (Ecogen Inc.). Cry2Aa was kindly provided by William Moar (Auburn University, Auburn, Alabama), as inclusion bodies obtained from recombinant *Escherichia coli* expressing Cry2Aa. Purified and trypsin activated Cry9Ca was obtained from Jeroen Van Rie (Aventis CropScience, Ghent, Belgium). *B. thuringiensis* strains were grown for 48 h in CCY medium (Stewart et al., 1981) supplemented with the suitable antibiotic. Spores and crystals were collected by centrifugation at  $9700 \times g$  for 10 min at 4 °C. The pellet was washed four times with 1 M NaCl/10 mM EDTA and suspended in 10 mM KCl. Toxins were trypsin activated and purified by anion-exchange chromatography (Sayyed et al., 2000). Protein concentration was measured by the method of Bradford (Bradford, 1976).

### 2.2. Insects

We used a susceptible strain (APHIS-S) and a resistant strain (AZP-R) of *P. gossypiella*. The susceptible strain had been reared in the laboratory for >20 years without exposure to toxins. The resistant strain was derived from 10 strains of *P. gossypiella*, each of which had been started from individuals collected in 1997 from a different Arizona cotton field (Tabashnik et al., 2000b), and subjected to laboratory selection with Cry1Ac (Tabashnik et al., 2000a, 2002b).

Larvae were reared on wheat germ diet at the University of Arizona, frozen, and sent to the University of Valencia for preparation of brush border membrane vesicles (BBMV) and binding tests. For the AZP-R strain, larvae used were from generations 16, 22, and 25.

### 2.3. BBMV preparation

BBMV were prepared following the differential centrifugation method (Wolfersberger et al., 1987), but using frozen whole last instar larvae (300–700 per batch) instead of dissected guts (Escriche et al., 1995). Concentration of BBMV proteins was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976).

### 2.4. Toxin labeling and binding assays

Cry1Ab and Cry1Ac were labeled with  $^{125}\text{I}$  by the method of chloramine T (Van Rie et al., 1990). The specific radioactivity obtained was 6.4 mCi/mg for Cry1Ab and 0.72 mCi/mg for Cry1Ac. Binding experiments were conducted essentially as described by Zhao et al. (2000). Incubation time was 50 min. Each reaction mixture (0.1 ml) contained 75 pM of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab or 750 pM of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, respectively. Non-specific binding, defined as the binding of labeled toxin in the presence of about 500-fold excess of unlabeled toxin, was subtracted from total binding to determine specific binding. Depending on the concentration of BBMV used, the non-specific binding for  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac was 2.5–21% for APHIS-S and 2.2–25% for AZP-R. Non-specific binding for  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab was 1.9–2.0% for APHIS-S and 1.3–1.9% for AZP-R.

To select the concentrations of BBMV for competition assays, we varied BBMV concentration and measured binding. In competition assays, the reaction mixtures contained increasing amounts of unlabeled toxin and 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of BBMV from APHIS-S or 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of BBMV from AZP-R. Binding experiments were repeated 2–3 times.

### 2.5. Data analysis

Binding data were analyzed with LIGAND software (Munson and Rodbard, 1980) to estimate dissociation constants ( $K_d$ ) and binding site concentrations ( $R_t$ ) and to fit to one- and two-site binding models. We used GraphPad Prism version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com) to perform *t*-tests and construct figures.

## 3. Results

### 3.1. Binding assays with labeled Cry1Ac

Binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ac was tested at various concentrations of BBMV from susceptible (APHIS-S) and resistant (AZP-R) *P. gossypiella* larvae (Fig. 1). Maximum specific binding was 23% for susceptible BBMV and 32% for resistant BBMV. At 0.15 mg of BBMV protein per milliliter, binding was essentially the

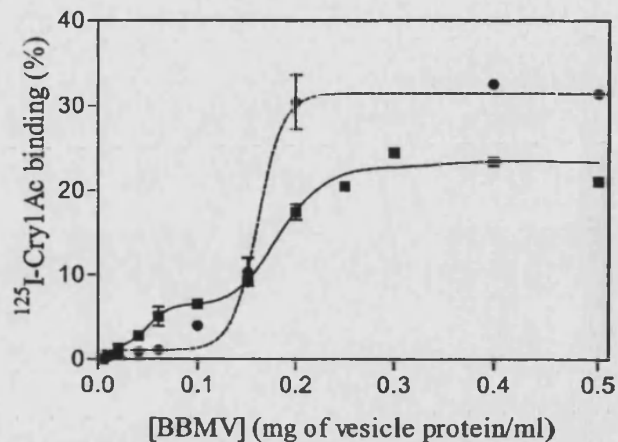


Fig. 1. Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ac at increasing concentrations of BBMV from *P. gossypiella*: APHIS-S (■), and AZP-R (●).

same for the two strains. At concentrations below this, binding was greater in the susceptible strain than in the resistant strain. At concentrations above this, the opposite occurred.

Results from homologous competition experiments (with labeled Cry1Ac and various concentrations of unlabeled Cry1Ac) confirmed that binding of Cry1Ac to BBMV from both strains was specific (Figs. 2 and 3). Binding data fit a one-site model, but not a two-site model. Based on estimated dissociation constants ( $K_d$ ), the affinity of Cry1Ac for BBMV was four times higher for susceptible BBMV than for resistant BBMV ( $P < 0.05$ , Table 1). However, the concentration of binding sites ( $R_t$ ) was 23-fold higher in resistant BBMV than in susceptible BBMV ( $P < 0.05$ , Table 1). Although the overall binding affinity, estimated from the ratio of binding site concentration to dissociation constant ( $R_t/K_d$ ), was 5.6 times higher for resistant BBMV than for susceptible BBMV, this difference between strains was not significant ( $P > 0.05$ ).

Heterologous competition assays with BBMV showed that for both strains, Cry1Ac shared its binding site with Cry1Aa and Cry1Ja (Figs. 2A and 3A), but not with Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa, and Cry9Ca (Figs. 2B and 3B). However, Cry1Ac shared its binding site with Cry1Ab in susceptible BBMV (Fig. 2A), but not in resistant BBMV (Fig. 3A). This difference between strains implies that, in the resistant strain, the common binding site lost affinity for Cry1Ab.

### 3.2. Binding assays with labeled Cry1Ab

Binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ab was tested at various concentrations of BBMV from susceptible and resistant larvae (Fig. 4). In contrast to the binding obtained using susceptible BBMV (maximum specific binding of 3%), resistant BBMV did not show any specific binding of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab. This result, along with the lack of heterol-

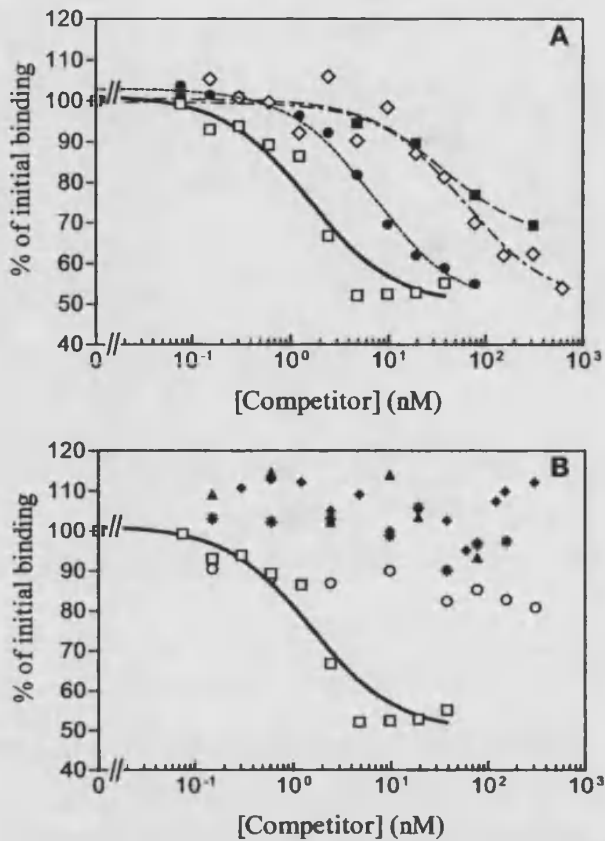


Fig. 2. Binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ac to BBMV from APHIS-S at increasing concentrations of unlabeled competitor. (A) Cry1Aa (■), Cry1Ab (●), Cry1Ac (□), and Cry1Ja (◇). (B) Cry1Ba (○), Cry1Ca (▲), Cry2Aa (◆), and Cry9Ca (\*); Cry1Ac (□) was included for comparison. Data from competition with Cry1Ja had been previously published (Herrero et al., 2001a). They have been included here for better discussion of the results.

ogous competition of Cry1Ab with  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, shows that the binding site is altered in resistant BBMV.

Homologous competition experiments with susceptible BBMV confirmed that Cry1Ab binding was specific (Fig. 5). As with  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, binding data fit a one-site model, but not a two-site model. The  $K_d$  of Cry1Ab was 0.52 nM, not significantly different than that of Cry1Ac ( $P > 0.05$ ) (Table 1). Consistent with the results with labeled Cry1Ac and susceptible BBMV, heterologous competition experiments with  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab showed that Cry1Ab shared its binding site with Cry1Aa, Cry1Ac, and Cry1Ja (Fig. 5A), but not with Cry1Ba, Cry1Ca, Cry2Aa, and Cry9Ca (Fig. 5B). Because resistant BBMV did not bind Cry1Ab, competition assays could not be done with  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab and resistant BBMV.

#### 4. Discussion

Consistent with the general finding that reduced binding of toxin is a primary mechanism of insect resistance

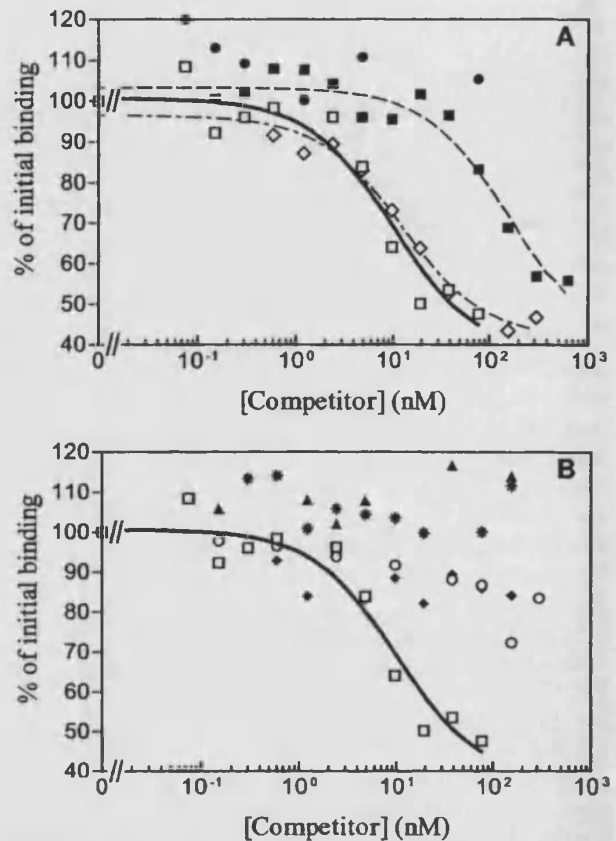


Fig. 3. Binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ac to BBMV from AZP-R at increasing concentrations of unlabeled competitor. (A) Cry1Aa (■), Cry1Ab (●), Cry1Ac (□), Cry1Ja (◇). (B) Cry1Ba (○), Cry1Ca (▲), Cry2Aa (◆), and Cry9Ca (\*); Cry1Ac (□) was included for comparison.

Table 1

Binding parameters of *B. thuringiensis* toxins with BBMV from susceptible (APHIS-S) and resistant (AZP-R) *P. gossypiella*<sup>a</sup>

Strain	Ligand	$K_d \pm \text{SEM}$ (nM)	$R_t \pm \text{SEM}$ (pmol/mg) <sup>b</sup>	$R_t/K_d^c$
APHIS-S	Cry1Ac	$1.0 \pm 0.5$	$0.18 \pm 0.09^d$	0.17
AZP-R	Cry1Ac	$4.2 \pm 1.3$	$4.1 \pm 1.0$	0.96
APHIS-S	Cry1Ab	$0.52 \pm 0.10$	$0.18 \pm 0.09^d$	0.34

<sup>a</sup> Values obtained from homologous competition. All experiments were performed per triplicate.

<sup>b</sup>  $R_t$  is expressed as pmoles of binding sites per milligram of total vesicle protein.

<sup>c</sup>  $R_t/K_d$  expresses the overall binding affinity.

<sup>d</sup> As Cry1Ab completely competes for Cry1Ac binding sites and vice versa, it was assumed that the concentration of binding sites was the same for both toxins. Thus, the  $R_t$  value was estimated from the joint analysis of binding data from homologous competition experiments of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac and  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab with BBMV from APHIS-S.

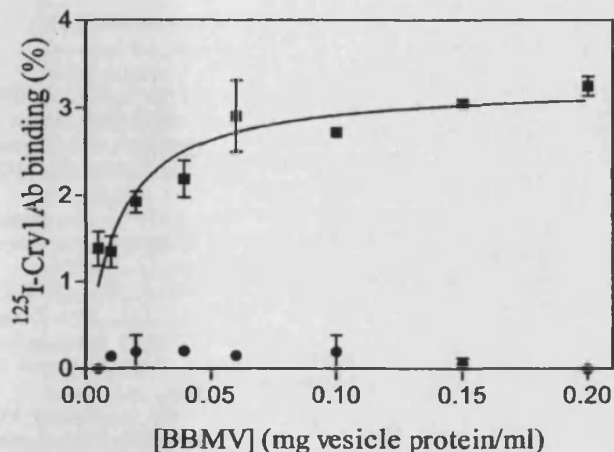


Fig. 4. Specific binding of <sup>125</sup>I-labeled Cry1Ab at increasing concentrations of BBMV from *P. gossypiella*: APHIS-S (■), and AZP-R (●).

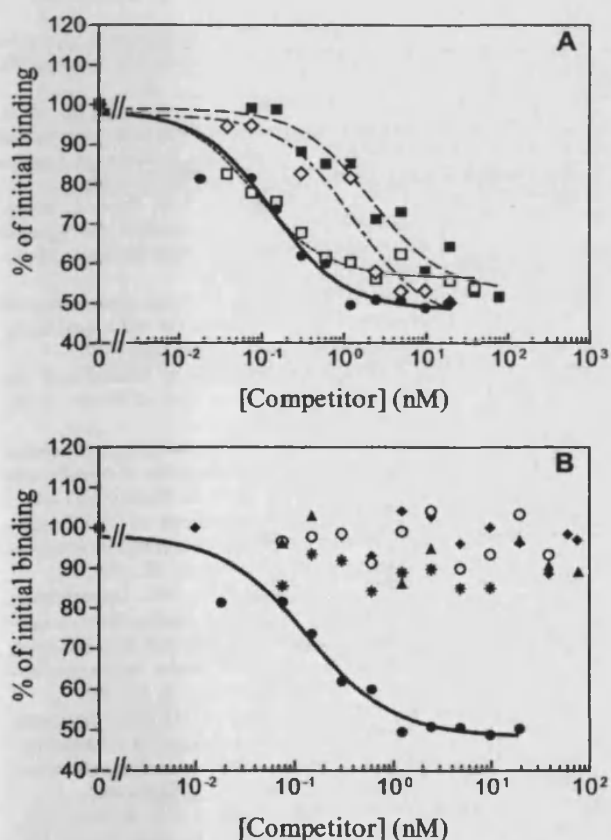


Fig. 5. Binding of <sup>125</sup>I-labeled Cry1Ab to BBMV from APHIS-S at increasing concentrations of unlabeled competitor. (A) Cry1Aa (■), Cry1Ab (●), Cry1Ac (□), and Cry1Ja (◇). (B) Cry1Ba (○), Cry1Ca (▲), Cry2Aa (◆), and Cry9Ca (\*); Cry1Ab (●) was included for comparison.

to Cry proteins, we found greatly reduced binding of Cry1Ab in the resistant AZP-R strain of *P. gossypiella*. Along with previous data showing strong resistance to Cry1Ac, strong cross-resistance to Cry1Ab but not to Cry1C, and recessive inheritance (Tabashnik et al., 2000a, b, 2002a, b), the results reported here indicate that the AZP-R strain has mode 1 resistance, the most common type of resistance to Cry1A toxins in lepidopterans. Mode 1 resistance in the YHD2 strain of *Heliothis virescens* is tightly linked to a mutation interfering with production of a cadherin protein thought to be the receptor for Cry1Ac (Gahan et al., 2001). In several resistant strains of *P. gossypiella* including AZP-R, three mutant alleles of a related cadherin-encoding gene are linked with resistance to Cry1Ac and survival on transgenic Bt cotton (Morin et al., 2003).

In conjunction with previous results (Karim et al., 2000; Herrero et al., 2001a), results of competitive binding assays reported here show that susceptible *P. gossypiella* have a common binding site for Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ja. Here, we found that in a susceptible strain, high concentrations of unlabeled Cry1Ab prevented specific binding of labeled Cry1Ac and vice versa. These results imply that Cry1Ab and Cry1Ac do not bind to other sites. A similar outcome occurred in reciprocal competition tests with Cry1Ac and Cry1Ja using the same susceptible strain (Herrero et al., 2001a). Results reported here agree with a previous study showing that in a different susceptible strain of *P. gossypiella*, the toxins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac compete for a common binding site and that Cry2Aa does not compete for this site (Karim et al., 2000).

Binding data from heterologous competition experiments with susceptible *P. gossypiella* reported here and previously (Karim et al., 2000; Herrero et al., 2001a) generally correlate well with bioassay data on cross-resistance. Results showing competition for binding among Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac fit with cross-resistance observed among these toxins in the Cry1Ac-resistant strains AZP-R and APHIS-98R (Tabashnik et al., 2000a). Evidence that Cry1Ja binds to the same site as Cry1Ac corresponds with cross-resistance to Cry1Ja in APHIS-98R (Tabashnik et al., 2000a). A concentration of 1 µg of Cry1Ja per gram of diet killed 94% of susceptible larvae, but only 42% of APHIS-98R larvae (Tabashnik et al., 2000a). No larvae from AZP-R or APHIS-98R survived at 10 µg of Cry1Ja per gram of diet (Tabashnik et al., 2000a). Because AZP-R was not tested with 1 µg of Cry1Ja per gram, we do not know if it had cross-resistance to Cry1Ja at this lower concentration. Results indicating that Cry1Ca, Cry2Aa, and Cry9Ca do not bind to the same site as Cry1Ac correlate with bioassay data showing that resistance to Cry1Ac in AZP-R and APHIS-98R does not cause cross-resistance to Cry1Ca, Cry2Aa, or Cry9Ca (Tabashnik et al., 2000a, 2002a). The correspondence in *P. gossypiella* between



binding data in susceptible strains and cross-resistance suggests that heterologous competition experiments may be useful for predicting general patterns of cross-resistance, but bioassays of resistant and susceptible strains remain essential for definitive conclusions.

It is surprising, but not unprecedented, that the AZP-R strain was resistant to Cry1Ac, but binding of Cry1Ac to BBMV was not reduced. In similar tests with strains of three other moths resistant to the three Cry1A toxins, binding of Cry1Ac was not reduced (Lee et al., 1995; Tabashnik et al., 1997b; Herrero et al., 2001b). Binding of Cry1Ab but not Cry1Ac was reduced in the PHI strain of *Plutella xylostella* (Tabashnik et al., 1997b) and the Dpl<sup>r</sup> strain of *Plodia interpunctella* (Herrero et al., 2001b), whereas binding of Cry1Aa but not Cry1Ab or Cry1Ac was reduced in the YHD2 strain of *H. virescens* (Lee et al., 1995).

Our results show that the common binding site for Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ja is altered in the AZP-R strain of *P. gossypiella*, preventing binding of Cry1Ab, but not Cry1Aa, Cry1Ac, or Cry1Ja. We hypothesize that this alteration interferes with the post-binding steps of Cry1Aa, Cry1Ac, and Cry1Ja. The steps that follow binding of *B. thuringiensis* toxins to membrane receptors are not well characterized, but are thought to involve toxin unfolding, aggregation of bound toxin molecules, insertion into the membrane, and pore formation (Schnepf et al., 1998; Gómez et al., 2002).

Each of the three mutations in the cadherin-encoding gene in AZP-R and other resistant strains of *P. gossypiella* has a deletion upstream of the putative toxin-binding region of cadherin (Morin et al., 2003). Only one of these mutations causes a frame shift with a premature stop codon expected to block production of the binding region. However, the other two mutations should allow synthesis of the protein with the putative binding region unchanged. Thus, deletion of some amino acids upstream of the putative binding region could modify post-binding events without preventing toxin binding. Functional studies of the cadherin proteins encoded by wild type and mutant alleles in conjunction with analysis of post-binding events in susceptible and resistant larvae are needed to test this hypothesis.

#### Acknowledgements

We thank Salvador Herrero for toxin preparation, and Susan Meyer and Robert Biggs for rearing and freezing *P. gossypiella*. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (Project No. AGL2000-0840-C03-01, B. Escriche was supported by the Ramón y Cajal program) and USDA-NRI grants 99-35302-8300 and 2003-01469.

#### References

- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B.E., Malvar, T., Ferré, J., 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1413–1419.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Carrière, Y., Dennehy, T.J., Pedersen, B., Haller, S., Ellers-Kirk, C., Antilla, L., Liu, Y.B., Willott, E., Tabashnik, B.E., 2001. Large-scale management of insect resistance to transgenic cotton in Arizona: can transgenic insecticidal crops be sustained? *Journal of Economic Entomology* 94, 315–325.
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Sisterson, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T.J., Tabashnik, B.E., 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 100, 1519–1523.
- Escriche, B., Silva, F.J., Ferré, J., 1995. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding studies with *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) crystal protein. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 318–320.
- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 47, 501–533.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857–860.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberón, M., 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters* 513, 242–246.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B.E., Ferré, J., 2001a. Shared binding sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5729–5734.
- Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J., 2001b. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1085–1089.
- Ingram, W.R., 1994. *Pectinophora* (Lepidoptera: Gelechiidae). In: Mathews, A., Tunstall, J.P. (Eds.), *Insect Pest of Cotton*. CAB, Wallingford, UK, pp. 107–148.
- James, C., 2002. Preview: global status of commercialized transgenic crops. In: *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, ISAAA Briefs No. 27*. ISAAA, Ithaca, New York.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M.J., 2001. Importance of Cry1  $\delta$ -endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). *Applied and Environmental Microbiology* 67, 323–329.
- Karim, S., Riazuddin, S., Gould, F., Dean, D.H., 2000. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67, 198–216.
- Lee, M.K., Rajamohan, F., Gould, F., Dean, D.H., 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3836–3842.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Patin, A.L., Bartlett, A.C., 1999. Development time and resistance to Bt crops. *Nature* 400, 519.
- Liu, Y.B., Tabashnik, B.E., Meyer, S.K., Carrière, Y., Bartlett, A.C., 2001. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Journal of Economic Entomology* 94, 248–252.
- Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C.,

- Higginson, D., Holley, D., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Carrière, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K., Tabashnik, B.E., 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 100, 5004–5009.
- Munson, P., Rodbard, D., 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Analytical Biochemistry 107, 220–239.
- Sayyed, A.H., Haward, R., Herrero, S., Ferré, J., Wright, D.J., 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Applied and Environmental Microbiology 66, 1509–1516.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 775–806.
- Stewart, G.S.A.B., Johnstone, K., Hageberg, E., Ellar, D.J., 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. Biochemical Journal 198, 101–106.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Finson, N., Masson, L., Heckel, D.G., 1997a. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94, 1640–1644.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Ménsua, J.L., Ferré, J., 1997b. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94, 12780–12785.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ferré, J., 1998. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 353, 1751–1756.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., de Maagd, R.A., Dennehy, T.J., 2000a. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. Applied and Environmental Microbiology 66, 4582–4584.
- Tabashnik, B.E., Patin, A.L., Dennehy, T.J., Liu, Y.B., Carrière, Y., Sims, M.A., Antilla, L., 2000b. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 97, 12980–12984.
- Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Sims, M.A., Larkin, K., Head, G.P., Moar, W.J., Carrière, Y., 2002a. Control of resistant pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) by transgenic cotton that produces *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. Applied and Environmental Microbiology 68, 3790–3794.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Dennehy, T.J., Sims, M.A., Sisterson, M., Biggs, R., Carrière, Y., 2002b. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Economic Entomology 95, 1018–1026.
- Tabashnik, B.E., Carrière, Y., Dennehy, T.J., Morin, S., Sisterson, M.S., Roush, R.T., Shelton, A.M., Zhao, J.-Z., 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. Journal of Economic Entomology 96 (in press).
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H., 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Applied and Environmental Microbiology 56, 1378–1385.
- Wolfersberger, M.G., Luethy, P., Maurer, P., Parenti, P., Sacchi, V.F., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Comparative Biochemistry and Physiology 86A, 301–308.
- Zhao, J.Z., Collins, H.L., Tang, J.D., Cao, J., Earle, E.D., Roush, R.T., Herrero, S., Escriche, B., Ferré, J., Shelton, A.M., 2000. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. Applied and Environmental Microbiology 66, 3784–3789.



Submitted to: Insect Biochemistry and Molecular Biology

**Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Endotoxins to  
Resistant and Susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:  
Pyralidae)**

Huarong Li<sup>1,2</sup>, Joel González-Cabrera<sup>1,3</sup>, Brenda Oppert<sup>4\*</sup>, Juan Ferré<sup>3</sup>,  
Randall A. Higgins<sup>2</sup>, Lawrent L. Buschman<sup>2</sup>, Kun Yan Zhu<sup>2</sup>, and  
Fangneng Huang<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Authors contributed equally to the publication

<sup>2</sup>Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, KS  
66506, USA

<sup>3</sup>Department of Genetics, University of Valencia, 46100-Burjassot  
(Valencia), Spain

<sup>4</sup>Grain Marketing and Production Research Center, USDA ARS, 1515  
College Avenue, Manhattan, KS 66502, USA

\*Corresponding author, FAX 785-537-5584; Email [bsop@ksu.edu](mailto:bsop@ksu.edu)

## ABSTRACT

The binding properties of *Bacillus thuringiensis* toxins to brush border membrane vesicles (BBMV) of Dipel-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* larvae were compared using ligand blot analysis, surface plasmon resonance, and radiolabeled toxin binding assays. In ligand blots, the number of Cry1Ab or Cry1Ac toxin binding proteins in BBMV from resistant and susceptible larvae as well as the relative toxin binding intensity were similar. Surface plasmon resonance with immobilized Cry1Ab activated toxin and BBMV from resistant and susceptible larvae indicated that there were no significant differences in binding. Homologous competition assays with radiolabeled Cry1Ab and Cry1Ac toxin and BBMVs from resistant and susceptible larvae resulted in similar toxin dissociation constants and binding site concentrations. Heterologous competition binding assays indicated that Cry1Ab and Cry1Ac completely competed for binding, thus there is a common binding site in the epithelium of the larval midguts of *O. nubilalis*. Overall, the binding analyses support that resistance to Cry1Ab and Cry1Ac in this Bt-resistant strain of *O. nubilalis* is not associated with differences in toxin binding.

## INTRODUCTION

The successful control of economically important crop pests with *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic technology will be compromised by the development of Bt-resistant pests. Research to understand the mechanisms of resistance to Bt in insects will provide more effective resistance management strategies for sustaining Bt-based biotechnology. Research to date has characterized two major types of Bt resistance mechanisms in insects (reviewed by Ferré and Van Rie, 2002). In most cases, high level resistance to Bt toxins has been attributed to altered toxin binding to receptors in the brush border membrane of insect midguts (Van Rie et al., 1990b; Ferré et al., 1991; Lee et al., 1995; Wright et al., 1997; Ballester et al., 1999; Sayyed et al., 2000; González-Cabrera, et al., 2003). Some resistance to Bt has been associated with decreased activation of Bt protoxin by reduced activities of midgut proteinases (Oppert et al., 1994; 1996; Forcada et al., 1996), or increased degradation of active toxin prior to or post membrane binding (Keller et al., 1996). Furthermore, resistance was also related with increased rate of cell repair or replacement in a resistant strain of *Heliothis virescens* (Martínez-Ramírez, et al., 1999). Our previous studies in *O. nubilalis* larvae demonstrated that the activity of soluble

trypsin-like proteinases was significantly reduced in resistant larvae relative to susceptible larvae and was associated with reduced protoxin activation (Li et al., unpublished data). These results were similar to those in a *Bt*-resistant strain of *Plodia interpunctella* (Oppert et al., 1994; 1996; Candas et al., 2003). In addition, a reduction of Cry1Ab binding was reported in the resistant strain of *P. interpunctella* (Herrero et al., 2001), but this reduction only partially contributed to resistance. Other factors associated with reduced oxidative metabolism also are contributing to survival of the *Bt*-resistant strain of *P. interpunctella* on *Bt*-treated diets (Candas et al., 2003).

In this study, multiple approaches were used to evaluate the binding properties of Cry proteins to resistant and susceptible strains of *O. nubilalis*. Results from ligand blot analysis, surface plasmon resonance, and radiolabeled toxin binding assays were compared in BBMV from resistant and susceptible *O. nubilalis* to further characterize *Bt* resistance mechanisms in this insect.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *2.1. Insect strains*

A susceptible strain of *O. nubilalis* was collected from egg masses in

cornfields near St. John, Kansas during 1995 and has been reared on artificial diet for over 45 generations (Reed et al., 1972; Huang et al., 1997). A Bt-resistant strain (KS-SC-R) has been selected from this susceptible strain for more than 41 generations by exposing neonates to a diet containing *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Dipel<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Chicago, IL) using doses that induced 80-95% mortality (Huang et al., 1997).

## 2.2. *Bt* toxin

For ligand blotting and surface plasmon resonance analyses, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ca protoxins were obtained from recombinant *E. coli* ECE 54, ECE53, and ECE125 strains (provided by *Bacillus* Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, Ohio State University), respectively, and partially purified as previously described (Ge et al., 1990). For radioligand binding, Cry1Ab and Cry1Ac protoxins were obtained from recombinant *B. thuringiensis* EG7077 and EG11070 strains, respectively (Ecogen Inc.). Each *B. thuringiensis* strain was grown at 29°C for 48 hours in CCY medium (Stewart et al. 1981) supplemented with 10 µg/ml of tetracycline for EG7077 strain and 3 µg/ml of chloramphenicol for EG11070 strain. Spores and crystals



were collected by centrifugation at 9700 ×g at 4°C for 10 min. Pellets were washed four times with 1 M NaCl / 10 mM EDTA and suspended in 10 mM KCl. Crystals from both strains were solubilized in 50 mM carbonate buffer, pH 10.5; 10mM dithiothreitol. Protoxins were trypsin-activated (trypsin type XI: from bovine pancreas, Sigma chemical CO. St. Louis, MO) at 37 °C, 2 hours (1mg trypsin / 10 mg of protoxin). Finally, activated toxins were purified by anion-exchange chromatography as described by Sayyed et al. (2000).

### *2.3. BBMV preparation*

Brush border membrane vesicle (BBMV) preparations were obtained from fifth instars as described by Wolfersberger et al. (1987). To prepare BBMV for radioligand binding analysis, fifth-instar larvae were collected, frozen in liquid nitrogen, preserved in dry ice, and sent to the University of Valencia, Spain. For surface plasmon resonance assays, the BBMV pellet was resuspended in HEPES-buffered saline (HBS) (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, BIAcore, Sweden), and sonicated to create uniformly sized vesicles of less than 0.5 µm. Sonication was performed on ice at 100 W and 20 kHz three times, each for 30 sec. Leucine aminopeptidase activity of crude homogenate and BBMV

preparation were determined as previously described (Li et al., unpublished data).

Protein concentration in the preparations of Bt toxins and BBMV was measured by the method of Bradford (Bradford, 1976) using the Coomassie<sup>®</sup> Plus Protein Assay (Pierce, Rockford, IL), with bovine serum albumin (BSA) as a protein standard.

#### *2.4. Ligand blotting*

Ligand blot analysis was performed with Bt toxins and BBMV from resistant and susceptible larvae of *O. nubilalis* to compare the number and size of binding proteins and relative toxin binding intensity. Briefly, 20 µg of BBMV protein from the resistant or susceptible larvae was separated in a 7% Tris-Acetate gel (Invitrogen, San Diego, CA) under denatured conditions, and transferred to a polyvinylidene difluoride Q membrane (PVDF) (Millipore, 0.45 µm, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) in Nupage transfer buffer (Invitrogen). The PVDF membrane was cut into strips and blocked with 3% (w/v) BSA in phosphate buffered saline (PBS) buffer, pH 7.4, at room temperature with agitation for 2 hr. Ligand blotting was achieved by incubating the membrane strips with 16.7 nM of trypsin-activated Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry1Ca toxins,

respectively, in PBS buffer containing 0.1% BSA (w/v) and 0.3% (v/v) Tween 20 at room temperature with agitation for 2 hr. Western blot analysis was performed using rat polyclonal antiserum against Cry1Ac (1:5,000), demonstrated to be cross reactive to Cry1Ab and Cry1Ca, and goat anti-rat IRDye 800 (LI-COR, Lincoln, NE) (1:5,000) to visualize the Cry toxins bound to the membranes. BBMV extracted from a *Bt*-susceptible strain of *P. interpunctella* larvae were also included to compare the binding specificity of Cry1Ca.

### 2.5. Toxin labeling and radioligand binding assays

Trypsin-activated Cry1Ab and Cry1Ac were labeled with  $^{125}\text{I}$  by the method of chloramine T (Van Rie et al., 1990a). The specific radioactivity of  $^{125}\text{I}$ -labeled Cry1Ab and Cry1Ac was 3.38 and 2.39 mCi/mg, respectively. To determine specific binding and specify a suitable concentration of BBMV for competition assays, a series of concentrations (0 - 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) of BBMV protein from resistant or susceptible larvae of *O. nubilalis* were incubated with either 0.56 nM of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab or 0.20 nM of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac, respectively, in 100  $\mu\text{l}$  of PBS buffer supplemented with 0.1% BSA at room temperature for 60 min. Toxin bound to BBMV was separated from free toxins in the suspension

by centrifugation at  $16100 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The pellet was washed twice with  $500 \mu\text{l}$  of ice-cold PBS buffer containing 0.1% BSA. The radioactivity remaining in the pellet was measured with a 1282 Compugamma CS universal gamma counter (LKB-Wallac Pharmacia, Turku, Finland) and considered total binding. An approximately 1000-fold excess of unlabeled toxin was used to determine non-specific binding. Specific binding was estimated by subtracting the non-specific binding from total binding.

For Cry1Ab homologous competition assays, increasing amounts of unlabeled Cry1Ab toxin were added into the binding reaction suspensions ( $100 \mu\text{l}$ ) containing the labeled Cry1Ab toxin and an appropriate concentration of BBMV from the resistant or susceptible larvae as determined in previous experiments, respectively. The reaction mixtures were incubated at room temperature for 60 min, and the proportion of bound labeled ligand was determined for each reaction. Cry1Ac homologous competition assays were also performed in the same way. For reciprocal heterologous competition assays, increasing amounts of unlabeled Cry1Ab (or Cry1Ac) toxin were added into the binding reactions containing the labeled Cry1Ac (or Cry1Ab) toxin and an appropriate concentration of BBMV from the susceptible larvae, and

the proportion of bound labeled ligand was determined for each reaction.

The concentration of BBMV protein was 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  from the resistant larvae or 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  from the susceptible larvae in the competition assays for labeled Cry1Ac, and 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  from both resistant and susceptible larvae for labeled Cry1Ab. Radioligand binding experiments were independently performed at least twice.

The estimation of dissociation constants ( $K_d$ ) and binding site concentrations ( $R_t$ ) were performed with the LIGAND software (Munson and Rodbard, 1980). Statistical tests (t-test) and charts were performed using GraphPad Prism version 3.02 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). According to the results of heterologous competition experiments, Cry1Ab and Cry1Ac have shared binding sites in the midgut of *O. nubilalis*. Thus, the  $R_t$  values were estimated for each strain using the joint analysis of the homologous competition experiments with labeled Cry1Ab and Cry1Ac.

## 2.6. Surface plasmon resonance assays

A BIAcore 3000 system and carboxymethylated dextran (CM5) sensor chips (BIAcore) were used in surface plasmon resonance assays. Based on the manufacturer's recommendation, HBS buffer (10 mM

Hepes, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05 % P20, pH 7.4) was used as running and diluting buffers for all vesicle experiments. After each injection of BBMV preparation, surface regeneration was performed by injecting two separate 1-min pulses at 5  $\mu$ l of regeneration buffer (1% Zwittergent 3-14) per minute and following one injection of 0.5% SDS solution.

According to Hua et al. (2001), > 95% pure trypsin-activated Cry1Ab, Cry1Ca, and BSA (used as a negative control) were immobilized on the different flow cell surfaces of a CM5 sensor chip, respectively, using the standard BIAcore amino coupling protocol. Carboxyl groups of the CM-dextran chains of the sensor chip surface were activated by exposure to a mixture of NHS (0.1 M *N*-hydroxysuccinimide)-EDC [0.1 M *N*-ethyl-*N*-(3-diethylaminopropyl) carbodimide] (1:1, v/v). The resulting succinimidyl ester groups easily were covalently attached to the free amine group of the N-terminal residue and the solvent-facing lysine or arginine residues of immobilized proteins. The immobilized Cry1Ab, Cry1Ca, and BSA measured approximately 3000 resonance unit (RU), equivalent to approximately 3 ng of protein.

BBMV protein was diluted to 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l with HBS buffer, and

injected over immobilized Cry protein (or BSA) surfaces at a flow rate of 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  for 120 sec. Twenty  $\mu\text{l}$  of diluted BBMV prepared from susceptible larvae of *O. nubilalis* was injected over the surfaces of Cry1Ab, Cry1Ca, and BSA to determine specific binding responses. Twenty  $\mu\text{l}$  of diluted BBMV from resistant and susceptible larvae were sequentially injected over immobilized Cry1Ab to compare binding of BBMV to the protein. The injections of BBMV from each strain were repeated at least twice over each protein surface.

The slopes of binding curves at association and disassociation phases, and binding responses of vesicle proteins to the immobilized protein surfaces, were automatically recorded in real time. These data were used to analyze the binding nature (specific or nonspecific binding) and relative binding levels of BBMV proteins to immobilized proteins.

## RESULTS

### 3.1. Ligand blotting

Both Cry1Ab and Cry1Ac demonstrated binding to BBMV proteins from *O. nubilalis* (Fig. 1 a, b). Cry1Ab and Cry1Ac interacted strongly with a BBMV protein of  $\sim 145$  kDa, and less strongly with other toxin binding proteins with molecular masses of  $\sim 126$ ,  $\sim 185$ ,  $\sim 220$  and  $>300$

kDa. Cry1Ac bound to proteins of ~126 and ~185 kDa with relatively higher intensity than Cry1Ab. There were no significant differences in the binding patterns of either Cry1Ab or Cry1Ac to BBMV from the resistant and susceptible larvae of *O. nubilalis*.

As expected, Cry1Ca did not bind to BBMV from either the resistant or susceptible strains of *O. nubilalis*, but it bound to BBMV from a susceptible strain of *P. interpunctella*, with two strong signals at ~80 and ~52 kDa (Fig. 1 c,d). This was included as a negative control, as Cry1Ca is not toxic to *O. nubilalis* (Li et al., unpublished data) but is toxic to *P. interpunctella* (McGaughey and Oppert, 1998).

### 3.2. Binding of radiolabeled toxins

BBMV from both the resistant and susceptible larvae of *O. nubilalis* demonstrated specific binding with either <sup>125</sup>I-Cry1Ab or <sup>125</sup>I-Cry1Ac toxin. Specific binding of both toxins was obtained with increasing concentrations of BBMV proteins (Fig. 2). The maximum specific binding of <sup>125</sup>I-Cry1Ab to BBMV from resistant and susceptible larvae was 16.7 and 21.4 % of the total radioactivity, respectively. Similarly, maximum specific binding of <sup>125</sup>I-Cry1Ac to BBMV from the resistant and susceptible larvae was 61.9 and 64.5 %, respectively.



Homologous competition experiments showed similar binding curves of either  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab or  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac to BBMV from the resistant and susceptible larvae (Fig.3). The estimated dissociation constants ( $K_d$ ) of Cry1Ab were  $7.9 \pm 2.9$  nM for the resistant larvae, and  $6.0 \pm 1.4$  nM for the susceptible larvae (Table 1). The  $K_d$  values of Cry1Ac were  $3.3 \pm 0.9$  and  $2.3 \pm 0.9$  nM for the resistant and susceptible strains, respectively. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the  $K_d$  values of either toxin or BBMV from resistant and susceptible larvae. The binding site concentrations ( $R_t$ ) were determined for each strain using a joint analysis of the homologous competition experiments with labeled Cry1Ab and Cry1Ac, because they shared binding sites (see the following heterologous competition data). The  $R_t$  value for the resistant strain was  $13.1 \pm 7.2$  pmol/mg of vesicle protein, and  $42.6 \pm 24.3$  pmol/mg for the susceptible strain (Table 1). There also were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the  $R_t$  values between the resistant and susceptible strains. These data suggest that the resistant and susceptible strains of *O. nubilalis* have a similar binding affinity and binding capacity for either Cry1Ab or Cry1Ac.

Reciprocal heterologous competition experiments demonstrated that Cry1Ab and Cry1Ac toxins were able to completely compete each other

for binding to BBMV from the susceptible larvae (Fig. 4). Cry1Ab and Cry1Ac share their binding sites in the epithelium of the larval midguts of *O. nubilalis*.

### 3.3. Surface plasmon resonance

The surface plasmon resonance assays demonstrated significant differences in the binding responses of immobilized Cry1Ab, Cry1Ca, and BSA to the flowing BBMV proteins from susceptible larvae of *O. nubilalis* (Fig. 5A). As expected, the non-toxic proteins, BSA and Cry1Ca, interacting with BBMV had similar slopes ( $3.5 \pm 1.6$  for BSA and  $5.5 \pm 1.7$  for Cry1Ca) for binding curves from the association phase. They were significantly lower than the slope of the binding curve for Cry1Ab ( $14.6 \pm 1.8$ ) ( $P < 0.05$ ). At the end of the injection, all binding curves rapidly decreased and stabilized at significantly different levels. BSA and Cry1Ca curves stabilized at average levels of  $44 \pm 19$  and  $52 \pm 27$  RU, respectively. These binding responses were considered non-specific binding. In contrast, Cry1Ab binding stabilized at a significantly higher level of  $256.5 \pm 26.7$  RU than those of BSA and Cry1Ca. This indicated there was significantly specific binding of Cry1Ab to the BBMV in mobile phase.

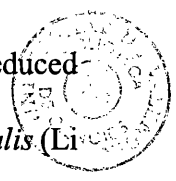
When BBMV from the resistant and susceptible larvae of *O. nubilalis* were sequentially injected over a Cry1Ab surface, the binding response patterns were similar in terms of the slope and final stabilized response level (Fig. 5B). There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the slopes at the association phase ( $15.2 \pm 3.1$  for resistant larvae, and  $13.8 \pm 2.7$  for susceptible larvae), and also in final stabilized levels ( $263.5 \pm 20.2$  RU for resistant larvae, and  $259.9 \pm 32.6$  RU for susceptible larvae).

## DISCUSSION

Using ligand blot analysis, surface plasmon resonance, and radiolabeled toxin assay, we determined that Cry1Ab or Cry1Ac toxin binding to BBMV from *O. nubilalis* larvae was similar in Bt-resistant and -susceptible strains. These data indicate that resistance to Cry1Ab and Cry1Ac in the resistant strain of *O. nubilalis* is not associated with a loss of toxin binding.

The resistant strain of *O. nubilalis* in the present study has relatively high levels of resistance to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, and Cry2Aa (all present in Dipel<sup>®</sup>, the commercial formulation used for the selection), and a moderate level of cross-resistance to Cry1B (Li et al., unpublished

data). It has been proposed that Cry2Aa has a different mode of action than the Cry1A toxins, and there are very few instances of Cry2Aa or Cry1B sharing binding sites with Cry1A toxins (English et al., 1994; Fiuza et al., 1996). Since specific binding to receptors is a determining step in the mode of action of Cry toxins, the resistance and cross-resistance pattern in our *O. nubilalis* strain also suggests a mechanism of resistance other than binding site alteration. The broad-spectrum resistance found in our strain is similar to that reported in a *Heliothis virescens* strain which, upon selection with Cry1Ac, became resistant to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry1B, and Cry1C (Gould et al., 1992). No differences in the binding of Cry1Ab or Cry1Ac toxin was found in this strain, but altered proteolytic processing (Forcada et al., 1996) and increased rate of cell repair or replacement (Martínez-Ramírez et al., 1999) were reported. The activity of soluble trypsin-like proteinases was significantly reduced and associated with reduced Cry1Ab protoxin activation in this Bt-resistant strain of *O. nubilalis* (Li et al., companion article submitted to IBMB). Further studies on other mechanisms are needed, such as increased cell repair or replacement, differences in pore formation, and multi-factorial adaptation.



It is common in lepidopteran species that Cry1A toxins share binding

sites in the larval midgut epithelium (Estada and Ferré, 1994; Escriche et al., 1997; Ballester et al., 1999; Herrero et al., 2001; Herrero et al., 2002). Our results also show that Cry1Ab and Cry1Ac compete for the same binding sites in *O. nubilalis* and are in agreement with other previously published studies with this insect (Denolf et al., 1993; Hua et al., 2001). There are examples where the alteration of a common binding site is sufficient to confer resistance (or cross-resistance) to all toxins sharing the altered binding site (Lee et al., 1995; Tabashnik et al., 1997; Sayyed et al., 2000). It is for this reason that this type of information is valuable for resistance management purposes, although mechanisms of resistance other than altered binding may present non-predictable cross-resistance patterns.

## REFERENCES

Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B.E., Malvar, T., Ferré, J., 1999.

Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1413-1419.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Candas, M., Loseva, O., Oppert, B., Kosaraju, P., Bulla Jr., L. A., 2003.

Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alterations in the Indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular and Cellular Proteomics* 2, 19-28.

Denolf, P., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J., 1993.

Two different *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1828-1837.

English, L., Robbins, H.L., Von Tersch, M.A., Kulesza, C.A., Ave, D.,

Coyle, D., Jany, C.S., Slatin, S.L., 1994. Mode of action of CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24, 1025-1035.

Escrive, B., Ferré, J., Silva F.J., 1997. Occurrence of a common

binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins CryIA from

*Bacillus thuringiensis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology  
27, 651-656.

Estada, U., Ferré, J., 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Applied and Environmental Microbiology 60, 3840-3846.

Ferré, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen, M., 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 88, 5119-5123.

Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Entomology 47, 501-33.

Fiuza, L.-M., Nielsen-LeRoux, C., Gozé, E., Frutos, R., Charles, J.F., 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:

- Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1544-1549.
- Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M.D., Martinez, R., 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31, 257-272.
- Ge, A.Z., Robert, M.P., Donald, H.D., 1990. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Escherichia coli*: Properties of the product. *Gene* 93, 49-54.
- González-Cabrera, J., Escriche, B., Tabashnik, B.E., Ferré, J., 2003. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 929-935.
- Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F.J., Moar, W.J., 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 7986-7990.



Herrero, S., Oppert, B., Ferré, J., 2001. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the Indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1085-1089.

Herrero, S., Borja, M., Ferré, J., 2002. Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae). *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4090-4094.

Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J.L., Schwab, G., Adang, M.J., 2001. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 872-879.

Huang, F., Higgins, R.A., Buschman, L.L., 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economical Entomology* 90, 1137-1143.

Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of  $\delta$ -endotoxin by gut

- proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 365-373.
- Lee, M.K., Rajamohan, F., Gould, F., Dean, D.H., 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3836-3842.
- Li, H., Oppert, B., Higgins, R.A., Huang, F., Zhu, K. Y., Buschman, L. L., 2003. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Submitted to *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (under review).
- Martínez-Ramírez, A. C., Gould, F., Ferré, J., 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology* 9, 239-246.
- McGaughey, W. H., Oppert, B., 1998. Mechanisms of insect resistance

to *Bacillus thuringiensis* toxins. Israel Journal of Entomology 32, 1-14.

Munson, P., Rodbard, D., 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. Analytical Biochemistry 107, 220-239.

Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., MacIntosh, S.C., McGaughey, W.H., 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. Biochemical and Biophysical Research Communications 198, 940-947.

Oppert, B., Kramer, K.J., Johnson, D.E., Upton, S.J., McGaughey, W.H., 1996. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin. Insect Biochemistry and Molecular Biology 26, 571-583.

Reed, G.L., Showers, W.B., Huggans, J.L., Carter, S.W., 1972. Improved procedures for mass rearing the European corn borer. Journal of Economic Entomology 65, 1472-1476.

Sayyed, A.H., Haward, R., Herrero, S., Ferré, J., Wright, D.J., 2000.

- Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1509-1516.
- Stewart, G.S.A.B., Johnstone, K., Hagelberg, E., Ellar, D.J., 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochemical Journal* 198, 101-106.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Ménsua, J.L., Ferré, J., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94, 12780-12785.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H., 1990a. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1378-1385.
- Van Rie, J., McGaughey, W. H., Johnson, D. E., Barnett, B. D., Van

Mellaert, H., 1990b. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247, 72-74.

Wolfersberger, M.G., Luethy, P., Maurer, P., Parenti, P., Sacchi, V.F., Giordana, B., Hanozet, G.M., 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 86A, 301-308.

Wright, D. J., Iqbal, M., Granero, F., Ferré, J., 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 *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1814-1819.

**Table 1.** Binding parameters of *B. thuringiensis* toxins with BBMV from susceptible and resistant larvae of *O. nubilalis*.

Insects		$K_d \pm SD$ (nM) <sup>a</sup>	$R_t \pm SD$ (pmol/mg) <sup>b</sup>
Susceptible	Cry1Ab	6.0 ± 1.4	42.6 ± 24.3
	Cry1Ac	2.3 ± 0.9	
Resistant	Cry1Ab	7.9 ± 2.9	13.1 ± 7.2
	Cry1Ac	3.3 ± 0.9	

<sup>a</sup> Values obtained from homologous competition.

<sup>b</sup>  $R_t$  is expressed as pmoles of binding sites per milligram of total vesicle protein.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Ligand blots of (a) Cry1Ab, (b) Cry1Ac, and (c) Cry1Ca to BBMV from Bt-resistant (R) and -susceptible (S) strains of *O. nubilalis*, and (d) ligand blots of Cry1Ca to BBMV from susceptible *P. interpunctella* larvae. Arrows indicate binding proteins, except for lane Cry1Ca used as a positive control. Molecular mass markers are indicated at the left in kDa.

**Fig. 2.** Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab (A) and  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (B) as a function of BBMV protein concentration in susceptible (●) and resistant larvae (■) of *O. nubilalis*.

**Fig. 3.** Binding of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab (A) and  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (B) to BBMV from susceptible (●, solid line) and resistant (■, dashed line) larvae of *O. nubilalis* at different concentrations of non-labeled homologous competitor.

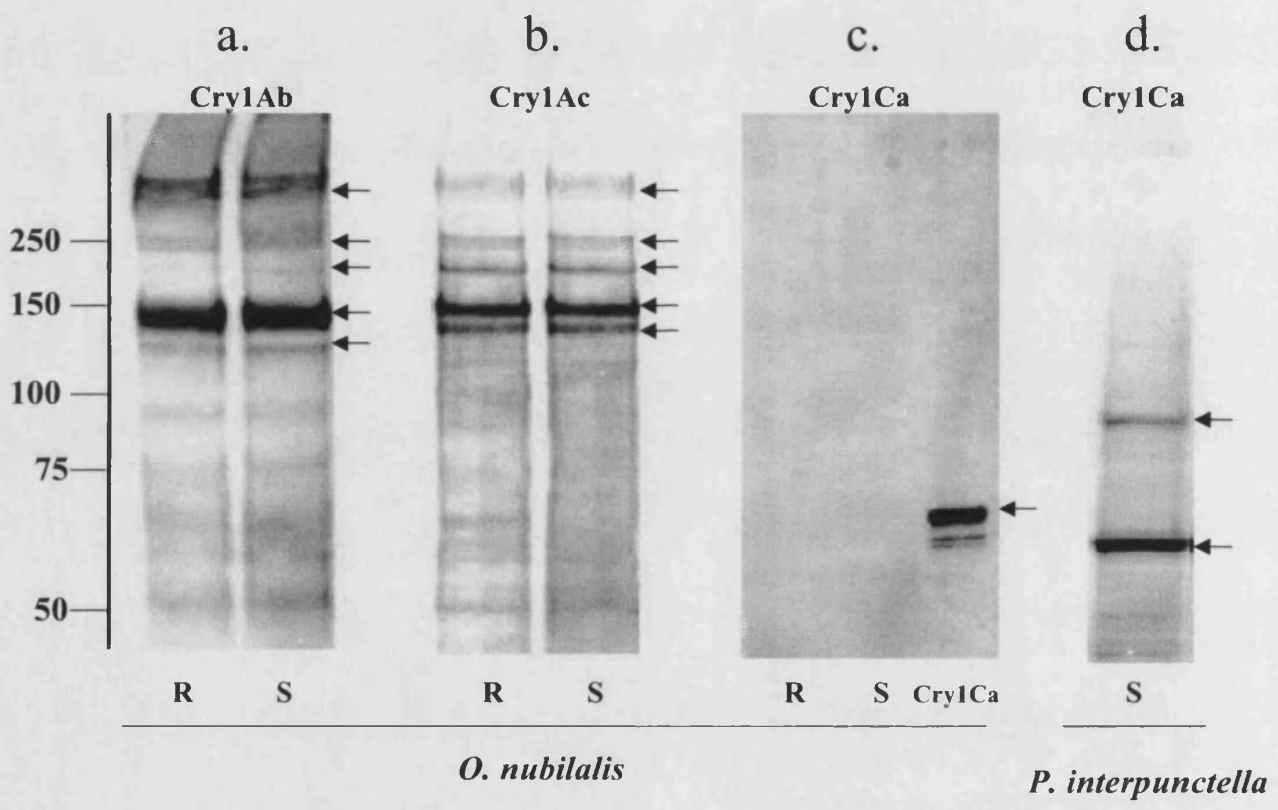
**Fig. 4.** Binding of  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ab (A) and  $^{125}\text{I}$ -Cry1Ac (B) to BBMV from susceptible larvae of *O. nubilalis* at different concentrations of non-

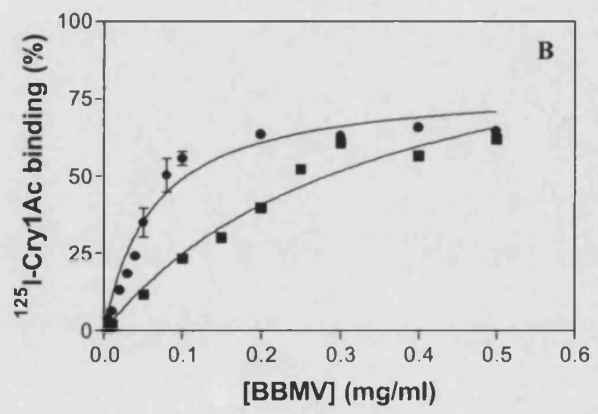
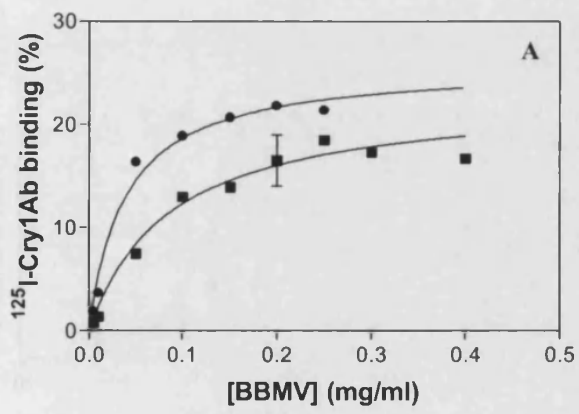
labeled competitor. Cry1Ab (●), Cry1Ac (▲). For comparison, each chart includes homologous competitor data.

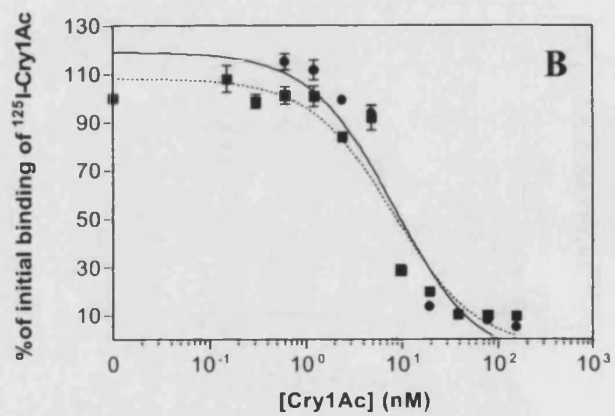
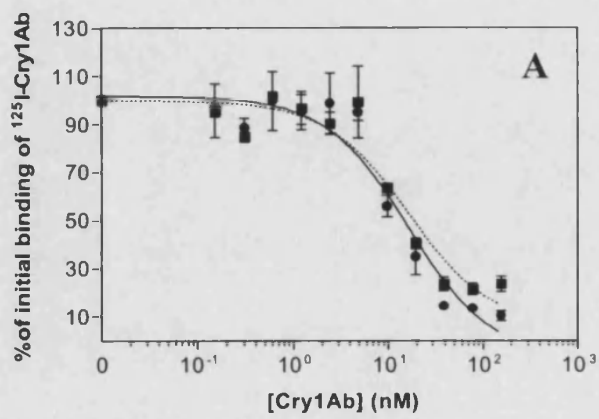
**Fig. 5.** Real-time binding responses of trypsin-activated Bt toxins to BBMV from *O. nubilalis* larvae. BBMV preparations from susceptible larvae were injected over the surfaces of chips containing Cry1Ab, Cry1Ca, and BSA (negative control) (A). BBMV preparations from resistant (R) and susceptible (S) larvae were injected over the Cry1Ab surface (B).

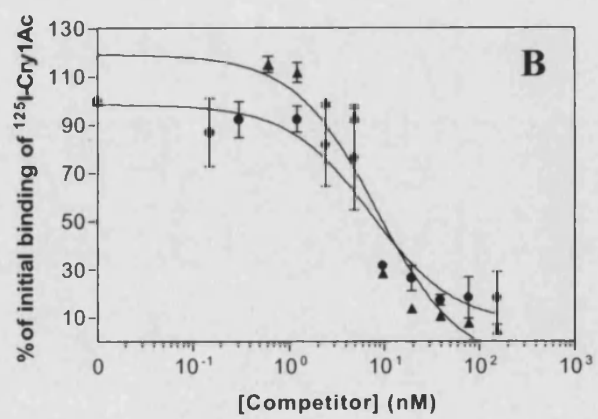
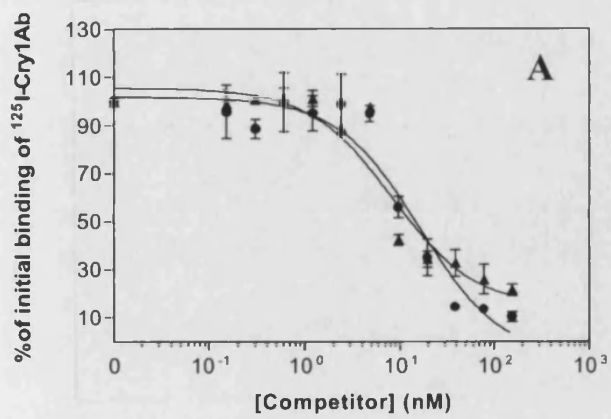


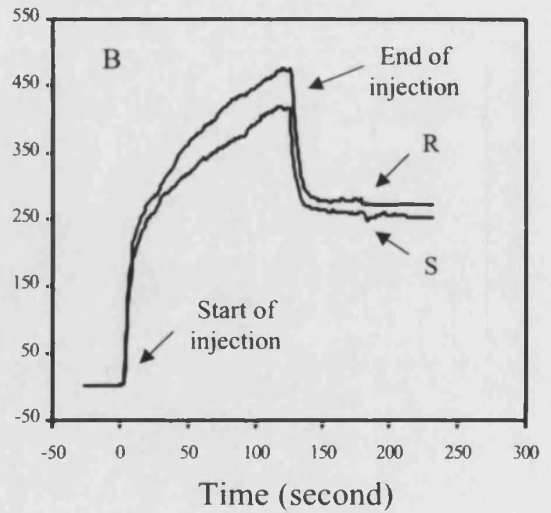
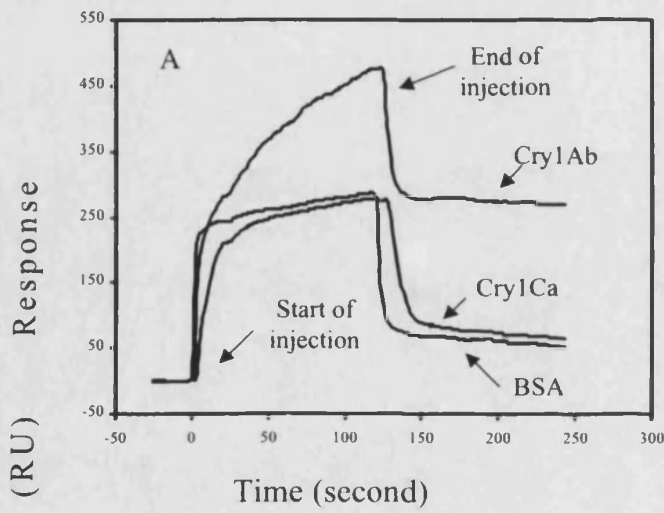














UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

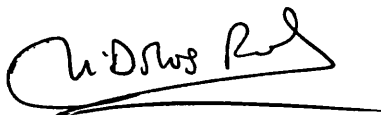
Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha  
acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

D./D<sup>a</sup>. **JOEL GONZÁLEZ CABRERA** .....

la calificación de *Sobresaliente "cum laude"* .....

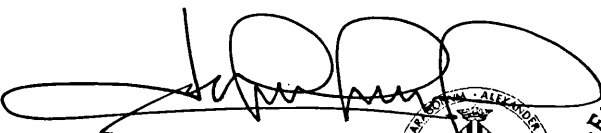
Valencia, a *30* de *enero* de *2004* .....

EL SECRETARIO,



Dr.ª. D.ª. M.ª Dolores Real García

EL PRESIDENTE



Dr. D. José Luis Ménsua Fernández

